



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Snežana M. Orčić

**Biohemijski i fiziološki parametri stanja medonosne pčele
(*Apis mellifera* L.) tokom letnjeg i zimskog perioda na
staništima sa različitim antropogenim uticajem**

- doktorska disertacija -

Novi Sad, 2020.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Snežana M. Orčić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Danijela Kojić, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Biohemijski i fiziološki parametri stanja medonosne pčele (<i>Apis mellifera</i> L.) tokom letnjeg i zimskog perioda na staništima sa različitim antropogenim uticajem
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2020.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Prirodno-matematički fakultet, Trg Dositeja Obradovića 3

Fizički opis rada: FO	Poglavlja: 9; stranica: 246; slika: 20; grafikona: 64; tabela: 16; referenci: 415; priloga: 4.
Naučna oblast: NO	Biologija
Naučna disciplina: ND	Biohemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Medonosna pčela, oksidativni stres, imunitet insekata, metabolomika insekata.
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Medonosna pčela (<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758) je široko rasprostranjena vrsta iz grupe socijalnih insekata, glavni oprašivač mnogih divljih biljaka i poljoprivrednih kultura. Pored njene primarne uloge u oprašivanju, koristi se i za dobijanje pčelinjih proizvoda, pre svega meda, voska i propolisa, čime se dodatno naglašava njen privredni značaj. Uzimajući u obzir značaj medonosne pčele, a sa druge strane aktuelan problem pada broja kolonija, postoji potreba za razumevanje uzroka i procenu rizika koji leže u osnovi ovog kompleksnog problema. Stoga, istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji obuhvataju praćenje biohemijskih i fizioloških parametara kod medonosne pčele kao pokazatelja stanja pčelinjih zajednica tokom letnjeg i zimskog perioda na staništima sa različitim antropogenim uticajem. U prvoj fazi istraživanja su izvedeni akutni laboratorijski testovi izlaganja medonosne pčele subletalnim dozama pesticida, tiakloprida i klotianidina, a dobijeni rezultati su ukazali na narušenu neurotransmisiju, na izmene u aktivnosti antioksidativnih enzima i redoks statusa u ćeliji, kao i na imunosupresiju. U drugoj fazi istraživanja su analizirane kolonije medonosne pčele sa različitih lokaliteta na području AP Vojvodine, sa primenom stacionarnog i migratornog tipa pčelarenja, tokom letnjeg i zimskog perioda, a dobijeni rezultati su ukazali na značajne razlike u biohemijskom odgovoru medonosne pčele u zavisnosti od starosti pčela, sezone godine i tipa pčelinjaka. Na osnovu rezultata prethodne dve faze istraživanja, izvršen je odabir uzoraka, kao i izbor parametara za treću fazu istraživanja, gde je praćeno stanje medonosne pčele iz stacionarnih pčelinjih zajednica, tokom letnjeg aktivnog perioda,

	<p>kao i početkom i krajem zimskog perioda mirovanja pčela, sa tri lokaliteta u Republici Srbiji sa različitim stepenom urbanizacije i industrijalizacije: Beograd kao urbano, Susek kao ruralno i Zajača kao industrijsko područje. Dobijeni rezultati su ukazali na značajne razlike u zavisnosti od sezone godine, kao i lokaliteta sa različitim antropogenim uticajem. Zimske pčele, krajem perioda mirovanja u odnosu na početak mirovanja, karakteriše viši nivo antioksidativne zaštite, udružen sa visokim stepenom oksidativnih oštećenja, zatim bolja imunokompetencija, kao i niske energetske rezerve u masnom telu. Sezonskim povećanjem temperatura tokom godine povećava se sadržaj zasićenih, dok se smanjuje udeo nezasićenih masnih kiselina, gde se oleinska 18:1(9) kiselina izdvaja kao dominantna komponenta u ukupnom sadržaju masnih kiselina masnog tela pčela sa sve tri lokacije, tokom sva tri perioda. Niži nivo ukupnih ugljovodonika je još jedna fiziološka karakteristika zimskih pčela. Takođe, zapažene su promene i u neurotransmisiji holinergičkog tipa tokom sezone, sa višim aktivnostima acetilholinesteraze kod pčela krajem zime i tokom leta. Metabolomičkom analizom hemolimfe pčela je identifikovano 125 metabolita, uključenih u 36 metaboličkih puteva, gde se kao biomarkeri od značaja za razlikovanje letnjih i zimskih pčela izdvajaju metaboliti u metabolizmu glicerolipida i aminokiseline glicin, cistein, glutamin, fenilalanin, prolin i lizin. Poređenjem dobijenih rezultata između različitih lokaliteta, pčele iz Beograda se izdvajaju sa nižim nivoom oksidativnog stresa, nižim aktivnostima acetilholinesteraze, kao i fenol oksidaze i glukoza oksidaze, ključnih enzima u imunom odgovoru pčela. Pčele iz Suseka su se izdvojile sa najvećom masom masnog tela, što ukazuje na dobre nutritivne i energetske rezerve u pčelama tokom zime i leta, dok se Beograd izdvaja sa značajno višim udelom nezasićenih masnih kiselina u masnom telu pčela. Takođe su zabeležene razlike u relativnoj zastupljenosti <i>n</i>-alkana u pčelama sa različitih lokaliteta, te je u Beogradu najzastupljeniji nonakozan (C₂₉), dok je heptakozan (C₂₇) najzastupljeniji u uzorcima pčela iz Suseka i Zajače. Analizom sadržaja metala u pčelama, pergi i medu, zapažamo da svaku sredinu karakteriše specifičan profil zagađenja, kao i da je u medu znatno niža koncentracija svih analiziranih metala. Dobijeni rezultati pružaju dobru osnovu za dalja ispitivanja biološkog odgovora medonosne pčele, u pogledu uticaja faktora okruženja, a time i dalje definisanje</p>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	odgovarajućih mera zaštite pčelinjih zajednica.
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	31.01.2019.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: dr Jelena Purać, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>mentor: dr Danijela Kojić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Nada Plavša, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: dr Duško Blagojević, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Snežana M. Orčić, née Milovac
Mentor: MN	Dr. Danijela Kojić, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Title: TI	Biochemical and physiological parameters of honey bee (<i>Apis mellifera</i> L.) during summer and winter in habitats with different anthropogenic influence
Language of text: LT	Serbian (Latin alphabet)
Language of abstract: LA	English / Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2020
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Faculty of Sciences, Dositej Obradovic Sq 3
Physical description: PD	Chapters: 9; Pages: 246; References: 415; Tables: 16; Figures: 84; Supplements: 4.
Scientific field SF	Biology
Scientific discipline SD	Biochemistry
Subject, Key words SKW	Honey bee, oxidative stress, insect immunity, entometabolomics.

UC	
Holding data: HD	Department of Biology and Ecology (Library), Faculty of Sciences, Dositej Obradovic Sq 2, Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	<p>The honey bee (<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758) is a widespread social insect species and the main pollinator of various wild plants and agricultural crops. In addition to its primary role in pollination, the honey bee is also used for obtaining honeybee products, mostly honey, wax, and propolis, with a significant role in the economy. Number of honey bee colonies is declining, thus necessitating the assessment of underlying reasons and risks. Therefore, in this doctoral dissertation, biochemical and physiological parameters in the honey bee were monitored as indicators of the colonies' condition during the summer and winter period in habitats with different anthropogenic impacts. In the first phase of the research, acute laboratory tests of honey bee exposure to sublethal doses of pesticides (thiacloprid and clothianidin) were performed and the obtained results indicated impaired neurotransmission, changes in the activity of antioxidant enzymes, and redox status in the cell, as well as immunosuppression. In the second phase of the research, honey bee colonies from different localities in the area of AP Vojvodina were analyzed, using the stationary and migratory types of beekeeping, during the summer and winter period, and the obtained results indicated significant differences in the biochemical response of the honey bee depending on the age of the bees, the season of the year, and the type of apiary. Based on the results of the previous two phases of the research, the selection of samples was performed, as well as the selection of parameters for analysis within the third phase of the research, where the condition of honey bees from stationary bee communities was monitored during the summer active period, as well as the beginning and end of winter dormancy of bees, from three localities in the Republic of Serbia with different degrees of urbanization and industrialization: Belgrade as urban, Susek as rural and Zajaca as industrial area. The obtained results indicated significant differences depending on the season of the year, as well as the location with different anthropogenic influence. Older winter bees are characterized by a higher level of antioxidant protection, associated with a high degree of oxidative damage, better immunocompetence, as well as low</p>

	<p>energy reserves in the fat body. The seasonal increase in the temperature during the year increases the content of saturated while decreasing the ratio of unsaturated fatty acids, where oleic 18:1(9) acid stands out as the dominant component in the total fatty acid content of bee body fat from all three locations, during all three periods. The lower level of total hydrocarbons is another physiological characteristic of winter bees. Also, changes in cholinergic neurotransmission were observed during the season, with higher acetylcholinesterase activities in bees in late winter and summer. Metabolomic analysis of bee hemolymph identified 125 metabolites, included in 36 metabolic pathways, where metabolites in the metabolism of glycerolipids and amino acids glycine, cysteine, glutamine, phenylalanine, proline, and lysine stand out as biomarkers of importance for distinguishing summer and winter bees. By comparing the obtained results between different localities, honey bees from Belgrade stand out with lower levels of oxidative stress, lower activities of acetylcholinesterase as well as phenoloxidase and glucose oxidase, key enzymes in the immune response of bees. The honey bees from Susek had the largest mass of the fat body, which indicates good nutritional and energy reserves in bees during winter and summer, while the honey bees from Belgrade were shown to have a significantly higher ratio of unsaturated fatty acids in the fat body of bees during the year. There were also differences in the relative prevalence of <i>n</i>-alkanes in honey bees from different localities, nonacosane (C₂₉) being the most common in Belgrade, while heptacosane (C₂₇) is most prevalent in honey bee samples from Susek and Zajaca. By analyzing the metal content in honey bees, perga, and honey, it was noted that each environment is characterized by a specific pollution profile, as well as that the concentration of all analyzed metals in honey is significantly lower compared to samples of bees and perga. The obtained results provide a good basis for further studies of the biological response of the honey bee, in terms of the influence of the environmental factors, enabling further defining of appropriate measures for the protection of honey bee colonies.</p>
Accepted on Senate on: AS	31 January 2019.
Defended: DE	

Thesis Defend Board: DB	<p>president: Dr. Jelena Purać, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>supervisor: Dr. Danijela Kojić, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</p> <p>member: Dr. Nada Plavša, full professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad</p> <p>member: Dr. Duško Blagojević, senior scientist, Institute for Biological Research „Siniša Stanković“, University of Belgrade</p>
----------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Zahvalnica

Istraživanja prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji su izvedena u **Laboratoriji za biohemiju i molekularnu biologiju** na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu i predstavljaju deo istraživanja sprovedenih za potrebe projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom **“Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patologiji”**, br. 173014 i kratkoročnih projekata od posebnog interesa za održivi razvoj u AP Vojvodini: **„Biohemijski i ekofiziološki parametri održanja medonosnih pčela u Vojvodini“**, br. 114-451-3846/2013 i **„Molekularna osnova odgovora medonosnih pčela na prisustvo polutanata u životnoj sredini”**, br. 114-451-709/2015.

Veliku i iskrenu zahvalnost dugujem svom mentoru **prof. dr Danijeli Kojić**, kao rukovodiocu izrade ove disertacije, na ukazanom poverenju i podršci, kako u naučnom tako i u nastavnom radu, kao i na prijateljskoj pomoći i razumevanju tokom svih ovih godina. Njeno nesebično angažovanje, strpljenje i vera u pozitivni ishod su mi pomogli da savladam prepreke sa kojima sam se susretala. Hvala i za izuzetnu savesnost pri pregledu disertacije.

Zahvaljujem se **prof. dr Jeleni Purać** na uloženom trudu, korisnim sugestijama i velikoj ekspeditivnosti prilikom pregleda disertacije. Hvala **dr Dušku Blagojeviću** na angažovanju na projektu u okviru koga su proistekli rezultati ove disertacije, kao i na podršci i pomoći tokom svih ovih godina. Zahvaljujem se **prof. dr Nadi Plavši**, koja nas je pratila od samog početka našeg druženja sa pčelama, na pomoći oko sakupljanja uzoraka pčela i meda, na daljem pregledu pčela, kao i na uvek dragocenim savetima.

Prof. dr Dragani Vujanović se zahvaljujem na lepoj saradnji koja je pokrenula rad sa pčelama u našoj grupi, kao i daljoj pomoći tokom sakupljanja uzoraka. **Prof. dr Zoranu Stanimiroviću, prof. dr Jevrosimi Stevanović** i **dr Predragu Simeunoviću** sa Katedre za Biologiju Veterinarskog fakulteta u Beogradu veliko hvala što su sa nama podelili svoje dragoceno iskustvo u radu sa pčelama i obezbedili sve potrebne uzorke. **Prof. dr Ivanu Gržetiću** i **doc. dr Konstantinu Ilijeviću** se zahvaljujem na analizama metala i pomoći u daljoj interpretaciji rezultata. Zahvaljujem se **dr Branku Šikopariji** na melisopalinološkoj analizi. Velika zahvalnost ide i **pčelarima, Gavrilu iz Suseka** i **Draganu iz Zajače**, koji su uvek dobre volje izlazili u susret svim našim zahtevima. **Draganu Puškoviću** se zahvaljujem na pratnji na terenima i uvek dobroj atmosferi koja je olakšavala rad.

Zahvaljujem se **dr Miroslavu Zoriću** na prijateljskoj podršci tokom svih godina i pomoći u statističkoj obradi podataka.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorije za biohemiju i molekularnu biologiju Departmana za biologiju i ekologiju na divnoj saradnji svih ovih godina i uvek prijatnoj radnoj atmosferi. Posebna zahvalnost ide **dr Tatjani Čelić** za dugogodišnji timski rad za poželeti i drugarstvo na nezaboravnim terenima, kao i **dr Željku Popoviću** za izuzetnu kolegijalnu i prijateljsku podršku koja traje još od prvog dana u našoj grupi. Hvala **dr Sofiji Bekić** na značajnoj podršci u finalnoj fazi disertacije.

Želim da pomenem i **prof. dr Gordanu Grubor-Lajšić**, koja nas je sve okupila pod svojim „kišobranom“ i brižno podučavala svojim znanjem, stručnošću i iskustvom. Zahvalna sam joj što me je uvela u svet nauke i pružila priliku da budem deo njenog nastavno-naučnog tima.

Hvala mojoj porodici, pre svega **roditeljima**, što su bili uz mene, verovali u mene i pružali mi ogromnu podršku da istrajem u svojim ciljevima. **Bratu Draganu**, iskusnom pčelaru i velikom ljubitelju pčela, za prve korake uzorkovanja i svu dalju podršku.

Posebna zahvalnost ide **suprugu (i mom GC-MS profesoru) Dejanu i našem najdivnijem biću, dečaku Aleksandru**, koji su ušli u moj život u periodu doktorskih studija. Dejane, hvala ti na izuzetnom razumevanju, kao i na pomoći i podršci u laboratoriji i van. Hvala što ste bili uz mene i svojom neizmernom ljubavlju doprineli mom uspehu u završetku doktorske disertacije.

Snežana Orčić

Spisak skraćenica

- AChE** – acetilholinesteraza
ADS – sistem antioksidativne zaštite, engl. *antioxidative defense system*
ANOVA – statistička metoda za analizu varijanse
AP – aktivni period pčela
CAT – katalaza
CDNB – 1-hloro-2,4-dinitrobenzen
cDNK – komplementarna DNK
dNTP – dezoksinukleotid trifosfat
EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina
FAME – metil-estri masnih kiselina, engl. *Fatty acids methyl esters*
FB – masno telo insekata, engl. *Fat body*
GC-MS – gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom
GOx – glukoza oksidaza
GR – glutation reduktaza
GSH – redukovani glutation
GSSG – oksidovani glutation
GST – glutation S-transferaza
HC – ugljovodonici, engl. *Hydrocarbons*
K – klotianidin, engl. *Clothianidin*
KPM – kraj perioda mirovanja pčela
LD₅₀ – srednja letalna doza
MDA – malondialdehid
PCA – statistička metoda analize glavnih komponenti, engl. *Principal component analysis*
PCR – lančana reakcija polimeraze, engl. *Polymerase chain reaction*
PLD-DA – diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata, engl. *Partial least squares discriminant analysis*
POx – fenol oksidaza
PPM – početak perioda mirovanja pčela
proPOx – profenol oksidaza
PUFA – polinezasićene masne kiseline, engl. *Polyunsaturated fatty acids*
qPCR – kvantitativni PCR, engl. *Quantitative polymerase chain reaction*
REST – program za računanje relativne ekspresije gena, engl. *Relative Expression Software Tool*
RNS – reaktivne vrste azota, engl. *Reactive nitrogen species*
ROS – reaktivne kiseonične vrste, engl. *Reactive oxygen species*
SFA – zasićene masne kiseline, engl. *Saturated fatty acids*
SH – tiolna (sulfhidrilna) grupa proteina
SOD – superoksid dismutaza
T – tiaklopid, engl. *Thiaclopid*
TBA – tiobarbiturna kiselina, engl. *Thiobarbituric acid*
UFA – nezasićene masne kiseline, engl. *Unsaturated fatty acids*

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	OPŠTI DEO	3
2.1.	Medonosna pčela	4
2.1.1.	Taksonomija i diverzitet vrste.....	4
2.1.2.	Biologija vrste	5
2.1.2.1.	<i>Razviće medonosne pčele.....</i>	<i>5</i>
2.1.2.2.	<i>Struktura i organizacija pčelinje zajednice.....</i>	<i>7</i>
2.1.2.3.	<i>Dinamika sezonskih aktivnosti pčelinje zajednice</i>	<i>9</i>
2.1.2.4.	<i>Ishrana medonosne pčele.....</i>	<i>10</i>
2.1.3.	Uloga medonosne pčele u ekosistemu	12
2.2.	Procena stanja medonosne pčele – biohemijski i fiziološki parametri	13
2.2.1.	Oksidativni stres i antioksidativni sistem zaštite.....	13
2.2.1.1.	<i>Reaktivne vrste kiseonika i azota u biološkim sistemima.....</i>	<i>13</i>
2.2.1.2.	<i>Antioksidativni sistem zaštite</i>	<i>17</i>
2.2.1.3.	<i>Oksidativna oštećenja biomolekula.....</i>	<i>25</i>
2.2.2.	Imunitet i imunokompetencija kod insekata	26
2.2.2.1.	<i>Imuni sistem pčela.....</i>	<i>27</i>
2.2.2.2.	<i>Individualni imunitet pčela</i>	<i>28</i>
2.2.2.3.	<i>Socijalni imunitet pčela.....</i>	<i>32</i>
2.2.3.	Metabolomika.....	36
2.2.3.1.	<i>Entometabolomika.....</i>	<i>40</i>
2.3.	Značaj istraživanja medonosne pčele	41
2.3.1.	Ugroženost i zaštita vrste.....	41
2.3.2.	Medonosne pčele kao bioindikator.....	43
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	45
4.	MATERIJAL I METODE.....	47
4.1.	Postavka eksperimenta i formiranje uzoraka	48
4.1.1.	Laboratorijski akutni testovi toksičnosti pesticida	48
4.1.2.	Sakupljanje uzoraka medonosne pčele radi ispitivanja uticaja starosti pčela, sezone i tipa pčelinjaka	48

4.1.3. Sakupljanje uzoraka medonosne pčele i pčelinje hrane radi ispitivanja stanja medonosne pčele pod uticajem sezone i faktora sredine sa različitim antropogenim uticajem	50
4.2. Laboratorijske analize.....	53
4.2.1. Određivanje relativne genske ekspresije.....	53
4.2.1.1. Izolacija ukupne RNK i sinteza komplementarne DNK (cDNK).....	53
4.2.1.2. Kvantitativni PCR (qPCR).....	53
4.2.1.3. Obrada rezultata kvantitativnog PCR-a	55
4.2.2. Određivanje aktivnosti enzima acetilholinesteraze, antioksidativnih enzima, redoks statusa i enzima povezanih sa imunim odgovorom	55
4.2.2.1. Priprema uzoraka.....	55
4.2.2.2. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze	56
4.2.2.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....	57
4.2.2.4. Određivanje aktivnosti katalaze	58
4.2.2.5. Određivanje aktivnosti glutation S-transferaze	59
4.2.2.6. Određivanje sadržaja redukovanog glutationa i sulfhidrilnih grupa proteina	59
4.2.2.7. Određivanje koncentracije malondialdehida.....	60
4.2.2.8. Određivanje aktivnosti fenol oksidaze i profenol oksidaze.....	61
4.2.2.9. Određivanje aktivnosti glukoza oksidaze	62
4.2.2.10. Određivanje koncentracije proteina	62
4.2.3. Ispitivanje prisustva mikrosporidija roda <i>Nosema</i> i krpelja <i>Varroa destructor</i>	63
4.2.3.1. Ispitivanje prisustva mikrosporidija roda <i>Nosema</i>	63
4.2.3.2. Ispitivanje prisustva krpelja <i>Varroa destructor</i>	63
4.2.4. Melisopalinološka analiza	63
4.2.4.1. Priprema uzoraka meda.....	63
4.2.4.2. Kvalitativna analiza polena u medu	64
4.2.5. Određivanje koncentracije metala u pčelama i pčelinjim proizvodima.....	64
4.2.5.1. Priprema i analiza uzoraka	64
4.2.6. Analiza nepolarne frakcije lipida i ugljovodonika pčela.....	65
4.2.6.1. Ekstrakcija nepolarne frakcije lipida i ugljovodonika.....	65
4.2.6.2. Priprema uzoraka za analizu.....	65
4.2.6.3. Analiza profila masnih kiselina nepolarne frakcije lipida i ugljovodonika gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom.....	65
4.2.7. Metabolomička analiza hemolimfe pčela.....	66
4.2.7.1. Priprema uzoraka za analizu.....	66

4.2.7.2.	<i>Analiza uzoraka hemolimfe gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom</i>	66
4.2.7.3.	<i>Obrada podataka</i>	67
4.3.	Statistička obrada podataka	68
5.	REZULTATI	69
5.1.	Rezultati laboratorijskih akutnih testova toksičnosti pesticida	70
5.1.1.	Unos hrane i mortalitet	70
5.1.2.	Aktivnost enzima acetilholinesteraze	71
5.1.3.	Aktivnost antioksidativnih enzima	71
5.1.4.	Procena redoks statusa	73
5.1.5.	Aktivnost enzimâ fenol oksidaze i profenol oksidaze	75
5.2.	Rezultati analize biohemijskih i fizioloških parametara pčelinjih zajednica pod uticajem starosti pčela, sezone i tipa pčelinjaka	76
5.2.1.	Uticaj faktora: starost pčela.....	76
5.2.2.	Uticaj faktora: sezona godine.....	78
5.2.3.	Uticaj faktora: tip pčelinjaka	81
5.2.4.	Melisopalinološka analiza	84
5.3.	Rezultati analize pčelinjih zajednica i pčelinje hrane radi ispitivanja stanja medonosne pčele pod uticajem sezone i faktora sredine sa različitim antropogenim uticajem	85
5.3.1.	Ekspresija gena za antioksidativne enzime	85
5.3.2.	Aktivnost enzima acetilholinesteraze	89
5.3.3.	Aktivnost antioksidativnih enzima	90
5.3.4.	Intenzitet lipidne peroksidacije.....	99
5.3.5.	Aktivnost enzima povezanih sa imunim odgovorom	101
5.3.6.	Prisustvo mikrosporidija roda <i>Nosema</i> i krpelja <i>Varroa destructor</i>	105
5.3.6.1.	<i>Prisustvo mikrosporidija roda Nosema</i>	105
5.3.6.2.	<i>Prisustvo krpelja Varroa destructor</i>	106
5.3.7.	Koncentracija metala u pčelama i pčelinjim proizvodima.....	107
5.3.7.1.	<i>Biogeni elementi</i>	107
5.3.7.2.	<i>Neesencijalni elementi</i>	112
5.3.8.	Analiza nepolarne frakcije lipida i ugljovodonika pčela.....	117
5.3.8.1.	<i>Maseni udeo nepolarne frakcije lipida (masnog tela)</i>	117
5.3.8.2.	<i>Profil masnih kiselina nepolarne frakcije lipida (masnog tela)</i>	118
5.3.8.3.	<i>Profil ugljovodonika</i>	125
5.3.9.	Metabolomička analiza hemolimfe pčela.....	127

6.	DISKUSIJA	141
6.1.	Laboratorijski akutni testovi toksičnosti pesticida	142
6.2.	Uticaj starosti pčela, sezone i tipa pčelinjaka na biokemijske i fiziološke parametre stanja medonosne pčele	146
6.2.1.	Uticaj faktora: starost pčela.....	146
6.2.2.	Uticaj faktora: sezona godine.....	147
6.2.3.	Uticaj faktora: tip pčelinjaka	149
6.3.	Uticaj sezonskih promena i faktora sredine sa različitim antropogenim uticajem na biokemijske i fiziološke parametre stanja medonosne pčele.....	150
6.3.1.	Antioksidativni sistem i nivo oksidativnog stresa	151
6.3.2.	Aktivnost acetilholinesteraze	156
6.3.3.	Imuni status	157
6.3.4.	Masnokiselinski i ugljovodonični sastav masnog tela	159
6.3.5.	Metabolomički profil hemolimfe.....	164
6.3.6.	Sadržaj metala u pčelama i pčelinjim proizvodima.....	167
7.	ZAKLJUČCI	171
8.	LITERATURA	178
9.	PRILOZI	208

1. UVOD

Medonosna pčela (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) je široko rasprostranjena vrsta iz grupe socijalnih insekata, glavni oprašivač mnogih divljih biljaka i poljoprivrednih kultura. Pored njene primarne uloge u oprašivanju, pa samim tim i u očuvanju biodiverziteta i u održivoj poljoprivredi, medonosna pčela se koristi i za dobijanje pčelinjih proizvoda, pre svega meda, voska i propolisa, čime se dodatno naglašava njen privredni značaj.

Promene uslova životne sredine, kao posledica antropogenog uticaja, su dovele do pojave brojnih stresogenih faktora sa kojima se pčele susreću. Pretpostavlja se da je ovo i razlog pojave globalnog problema opadanja brojnosti kolonija medonosne pčele. Posebno se kao problem izdvaja preživljavanje kolonija tokom zimskog perioda, kao perioda smanjene aktivnosti i ograničene dostupnosti hrane iz prirodnih resursa.

Uzimajući u obzir značaj medonosne pčele, a sa druge strane aktuelan problem pada broja kolonija, postoji potreba za razumevanjem uzroka i procenu rizika koji leže u osnovi ovog kompleksnog problema. Stoga, procena uticaja abiotskih i biotskih faktora životnog okruženja, kroz praćenje kompleksne mreže biohemijskih i fizioloških parametara medonosne pčele, od izuzetnog je značaja. Pri tome je od velikog značaja praćenje kako ciljanih metabolita biološkog sistema, tako i analize metaboloma gde se uočavaju specifični metabolički obrasci koji se menjaju kao odgovor na promenjene uslove životne sredine. Kako je poremećaj redoks statusa pratilac mnogih stresogenih faktora, poput delovanja zagađujućih materija iz okoline, patogena i parazita, često se kao markeri u proceni efekata stresnih faktora prate nivo oksidativnog oštećenja biomolekulâ i aktivnost/ekspresija genâ enzimâ antioksidativne zaštite. Takođe, kako često u uslovima stresa dolazi i do narušavanja imunog sistema pčela, u istraživanjima koja imaju za cilj procenu rizika izloženosti pčela stresogenim faktorima, sve više se prate i parametri individualnog i socijalnog imunog odgovora medonosne pčele.

U skladu sa prethodnim, istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji obuhvataju praćenje biohemijskih i fizioloških parametara kod medonosne pčele kao pokazatelja stanja pčelinjih zajednica tokom letnjeg i zimskog perioda na staništima sa različitim antropogenim uticajem. Bolje razumevanje biološkog odgovora pčela na različite uslove životne sredine bi moglo značajno doprineti razvoju strategije za očuvanje populacija medonosne pčele.

2. OPŠTI DEO

2.1. Medonosna pčela

2.1.1. Taksonomija i diverzitet vrste

Pčele (Apiformes) obuhvataju oko 20 000 vrsta u svetu (Ascher i Pickering, 2014), naseljavajući sve kontinente (izuzev Antarktiku) i staništa paralelno sa biljkama cvetnicama. Na području Evrope je opisano ukupno 1965 vrsta pčela, što je oko 10 % od ukupnog broja opisanih vrsta pčela u svetu (Nieto i sar., 2014). Pčele se svrstavaju u superfamiliju Apoidea, koja pripada grupi Aculeata, podred Apocrita, red Hymenoptera. Podeljene su uobičajeno u dve grupe (Michener, 2007), koje ukupno obuhvataju sedam familija iz superfamilije Apoidea:

- a) dugorilične pčele: Apidae i Megachilidae;
- b) kratkorilične pčele: Andrenidae, Colletidae, Halictidae, Melittidae i Stenotritidae.

Medonosna pčela *Apis mellifera* Linnaeus (1758.) se svrstava u potfamiliju Apinae koja pripada familiji Apidae, koja obuhvata i bumbare (Bombinae), pčele bez žaoke (Meliponinae), pčele drvenarice (Xylocopinae), pčele kukavice (Nomadinae) i druge pčele (Michener, 2007).

Pored medonosne pčele *Apis mellifera* L., rod *Apis* obuhvata još tri vrste: malu medonosnu pčelu *Apis florea* Fabricius (1787.), veliku medonosnu pčelu *Apis dorsata* Fabricius (1793.) i istočnu medonosnu pčelu *Apis cerana* Fabricius (1793.).

Biološka klasifikacija evropske medonosne pčele (*Apis mellifera*, L.; engl. *Western, European, African, common, domesticated honey bee*), opisane od strane Linea, prikazana je u Tabeli 1.

Tabela 1. Biološka klasifikacija medonosne pčele *Apis mellifera* L. (Engel, 1999).

Regnum (Carstvo)	Animalia
Phylum (Tip)	Arthropoda
Subphylum (Podtip)	Mandibulata (Hexapoda)
Classis (Klasa)	Insecta
Subclassis (Potklasa)	Pterygota
Ordo (Red)	Hymenoptera
Subordo (Podred)	Apocrita
Infraordo (grupa)	Aculeata
Superfamilia (Superfamilija)	Apoidea (pčele i <i>sphecoid</i> ose)
Familia (Familija)	Apidae (bumbari i medonosne pčele)
Subfamilia (Potfamilija)	Apinae (medonosne pčele)
Tribe (Tribus)	Apini
Genus (Rod)	<i>Apis</i>
Species (Vrsta)	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus (1758.)

Apis mellifera L. je prirodno široko rasprostranjena u Evropi izuzev Islanda, Farskih ostrva, Azorskih ostrva i severne Skandinavije. Tokom evolucije izdvojilo se 28 podvrsta medonosne pčele *Apis mellifera* L., od kojih se morfološki i geografski izdvajaju četiri ekonomski značajne rase (Engel, 1999; Stanimirović i sar., 2000):

- *Apis mellifera mellifera* Linnaeus – holandska i nemačka (crna) medonosna pčela,
- *Apis mellifera carnica* Pollmann – kranjska (siva) medonosna pčela,
- *Apis mellifera caucasica* Pollmann – kavkaska (tamna i žuta) medonosna pčela,
- *Apis mellifera ligustica* Spinola – italijanska (žuta) medonosna pčela.

Apis mellifera mellifera je tamna medonosna pčela koja naseljava prostor severne i srednje Evrope. Ova rasa, koja se u literaturi često naziva nemačka crna medonosna pčela, poseduje kutikulu tamne boje i odlikuje se odličnom sposobnošću prezimljavanja u hladnim klimatskim uslovima, sporim razvojem legla u proleće, kao i velikom agresivnošću.

Apis mellifera carnica je kranjska medonosna pčela, čije stanište obuhvata područje Austrije, Mađarske, Rumunije, Bugarske i bivše Jugoslavije. Odlikuje je dobra sposobnost prezimljavanja u hladnim klimatskim uslovima, brza prolećna izgradnja legla, veliki rojidbeni nagon i dobra otpornost prema bolestima.

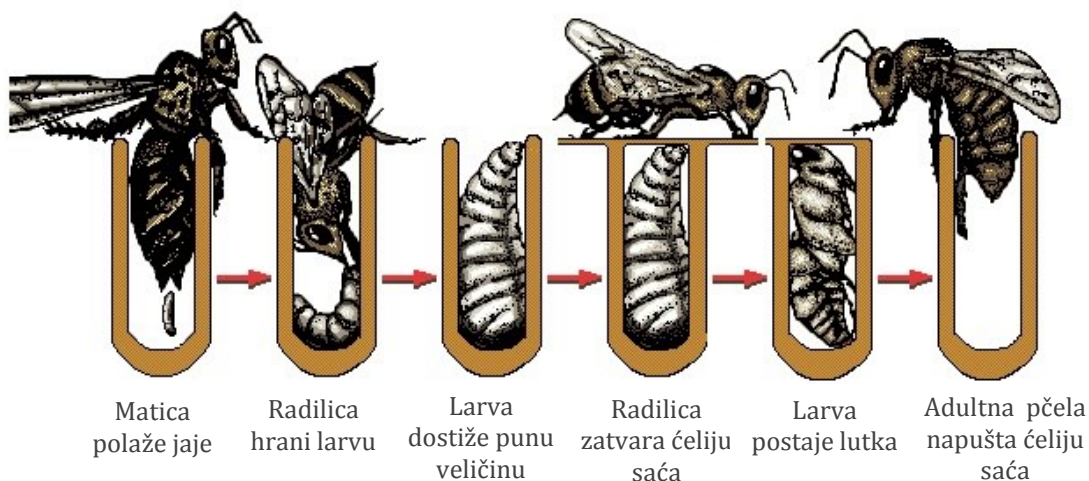
Apis mellifera caucasica je kavkaska medonosna pčela, dosta slična kranjskoj pčeli. Njen prirodni areal je ograničen na oblast Kavkaskih planina. Karakteristike ove podvrste su smirenost na saću (najmirnija podvrsta), slab rojidbeni nagon, sposobnost brzog nalaženja hrane i velika upotreba propolisa.

Apis mellifera ligustica je italijanska žuta medonosna pčela, rasprostranjena na Apeninskom poluostrvu. Odlikuje je smirenost na saću, brza prolećna izgradnja društva i relativno velika otpornost na bolesti.

2.1.2. Biologija vrste

2.1.2.1. Razviće medonosne pčele

Medonosna pčela pripada grupi holometabolnih insekata, što znači da svi članovi pčelinjeg društva tokom razvića prolaze kroz potpunu metamorfozu (Slika 1) tj. stadijume jajeta, larve, lutke i adulta (imaga).



Slika 1. Holometabolno razviće medonosne pčele (preuzeto i prerađeno prema <https://jesseproject.weebly.com/apis-mellifera.html>).

Celokupno razviće medonosne pčele obuhvata periode embrionalnog i postembrionalnog razvića (slika 2). Embrionalno razviće podrazumeva veoma dinamičan period kada se dešavaju promene unutar jajnih opni što rezultira transformacijom jedne jajne ćelije u višćelijsku larvu. Pri optimalnim uslovima, dužina embrionalnog larvenog razvića u okviru opni jajne ćelije traje tri dana.

Trut	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Radilica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Matica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	Jaje			Otvoreno leglo						Zatvoreno leglo						Izleganje - izlazak								

Slika 2. Broj dana razvojnog ciklusa izleganja truta, radilice i matice.

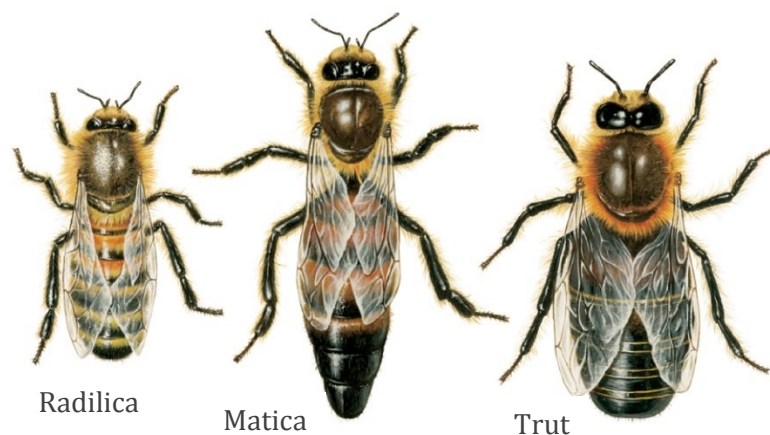
Postembrionalno razviće podrazumeva sve ostale stadijume razvoja, koji se odvijaju van jajnih opni. Na kraju trećeg dana razvića larva progriza jajne opne i izlazi iz njih u ćeliju saća kada počinje postembrionalno razviće. Tokom larvenog života obave se četiri presvlačenja, za vreme kojih larva intenzivno raste, tako da na kraju šestog dana svojim telom u potpunosti ispunjava ćeliju saća. U ovom periodu razvića, pčele radilice zatvaraju ćeliju saća voštanim poklopcem, a larvama počinju da funkcionišu paučinaste žlezde koje luče paučinastu materiju neophodnu za ulutkavanje. Larveni stadijum pčele radilice traje šest, matice pet, a truta sedam dana. Postembrionalno razviće se nastavlja stadijumom predlutke gde se jasno razlikuju sva tri telesna regiona: glava, grudi i abdomen. Tokom ovog perioda razvijaju se unutrašnji sistemi organa, čulni organi, ekstremiteti itd. te na kraju ovog stadijuma predlutka liči na imago. Stadijum predlutke kod pčele radilice traje tri, kod matice dva i kod trutova četiri dana. Pri kraju 11. dana od polaganja jajeta predlutka odbacuje svoju poslednju košuljicu i od tada počinje stadijum

lutke. Telo lutke dobija tamniji pigment i nakon još jednog presvlačenja završava se metamorfoza i počinje nov period u ontogenetskom razviću pčele radilice, tj. period imaga. Mlada pčela mandibulama progriža voštani poklopac svoje ćelije saća i samostalno izlazi napolje (Stanimirović i sar., 2000).

2.1.2.2. Struktura i organizacija pčelinje zajednice

Medonosna pčela je eusocijalni insekt tj. odlikuje je najviši nivo socijalne organizacije sa hijerarhijskom klasifikacijom. Karakteristike zajednica eusocijalnih insekata su: prisustvo specifičnih kasta, preklapanje generacija, kooperativna briga o potomstvu, podela rada i specifični oblici ponašanja i načini komunikacije među članovima društva (Wilson, 1971.)

Medonosna pčela je prilagođena životu u zajednici koju čine jedna matica, dve do tri hiljade trutova (u sezoni pčelinje paše) i više desetina hiljada radilica (slika 3). Tokom zime, kao i u slučajevima nedostatka paše u toku aktivne sezone, trutovi se uklanjaju iz košnice, te su stalni članovi pčelinjih zajednica samo matica i radilice.



Slika 3. Radilica, matica i trut (preuzeto iz Encyclopedia Britannica).

Matica je majka svih jedinki pčelinje zajednice koja je odgovorna za održavanje celovitosti pčelinje zajednice. Po izgledu, matica je znatno krupnija od radilica, duža od truta i krila su joj kraća u odnosu na dužinu tela. Matica ima višestruku ulogu u pčelinjem društvu, ali su dve najvažnije:

- a) da produkuje jajne ćelije iz kojih će se razvijati novi članovi pčelinje zajednice, doprinoseći tako razmnožavanju pčelinjeg društva u celini, jer je jedino matica reproduktivno sposobna ženka u košnici,
- b) da lučenjem specifičnih hemijskih supstanci (feromona) uslovljava razvoj i ponašanje kod pčela radilica obezbeđujući skladan razvoj pčelinjeg društva.

Takođe, utvrđeno je da, kao što matica deluje na pčelinju zajednicu, tako i pčelinje društvo kao celina i njeni pojedinačni članovi deluju na maticu, čak i kada je u pitanju razmnožavanje. Maticu odlikuje veoma brzo razviće. Od trenutka polaganja oplođene jajne ćelije u matičnjak pa do trenutka izleganja mlade matice prođe 16 dana (slika 2). Između larvi matice i ostalih pčelinjih larvi postoje znatne razlike u načinu ishrane. Larva matice tokom čitavog razvića dobija mleč i med u odnosu 1:1, dok ostale pčelinje larve dobijaju znatno manju količinu mleča a kasnije dobijaju i polen kao treću vrstu hrane. Takođe, larva matice dobija mnogo veću količinu hrane, raspoređenu u češćim obrocima, u odnosu na obroke koje dobijaju larve radilica. U normalnim okolnostima, tek izvedena matica trećeg, a najkasnije sedmog dana od izleganja, izlazi na „svadbeni let” izvan košnice kada se vrši sparivanje sa trutovima iz drugih udaljenih pčelinjaka. Pri parenju matica skladišti spermatozoide u spermateci, što je najčešće dovoljno za reprodukciju do kraja života. Nakon sparivanja, matica polaže dve vrste jaja: diploidna (oplođene jajne ćelije iz kojih se mogu razviti ženke – matica i radilice) i haploidna (neoplođene jajne ćelije iz kojih se partenogenetski mogu razviti mužjaci – trutovi). Matica ima veliki reproduktivni potencijal, izleganje jaja se odvija od sredine januara do oktobra kada dnevno može da izleže oko 2000 jaja. Životni vek matice je od pet do sedam godina, mada se u savremenom pčelarstvu matica koristi do dve godine (Stanimirović i sar., 2000).

Trutovi su haploidni mužjaci pčelinje zajednice čija je prvenstvena uloga oplođenje matice. Trutovi su krupniji od radilica, imaju velika krila, nemaju žaoku, voštane žlezde, ni korbikule za sakupljanje polena. Razvojni ciklus izleganja truta je 24 dana (slika 2). U pčelinjoj zajednici se nalaze od ranog proleća do kasne jeseni (dok traje pčelinja paša), kada počinju pripreme za prezimljavanje koje podrazumevaju i odbacivanje trutova iz zajednice koji nakon toga uginu od gladi ili hladnoće. Trutovi žive 5–6 nedelja, a za sparivanje su sposobni već posle 12 dana života, jer su im tada polni organi potpuno funkcionalni. Nakon sparivanja sa maticom trutovi uginu, jer im polni organi ostaju u matici. Pored uloge u oplođenju matice, dugo se nije znalo da trutovi imaju i niz drugih uloga u pčelinjoj zajednici. Uočeno je da prisustvo trutova stimuliše aktivnost radilica i proizvodnju veće količine meda. Takođe, imaju ulogu u zagrevanju košnice a trutovska legla predstavljaju i efikasnu rezervu vode i proteina (u sušnim periodima i nedostatku hrane radilice koriste trutovska legla da prehrane radiličko leglo).

Radilice su stalni i najmnogobrojniji članovi društva koji obavljaju sve funkcije u pčelinjoj zajednici izuzev reproduktivne. Tokom razvojnog ciklusa od 21 dana razvijaju se iz oplođenih jaja kao i matica, sa tom razlikom da njihove larve dobijaju mleč samo prva tri dana, a kasnije med i polen. Reproductivno su nesposobne jer se razvoj njihovih ovarijuma sprečava delovanjem inhibicionog feromona koji luče mandibularne žlezde matice. Radilice se mogu svrstati u dve velike grupe: grupu kućnih i grupu pčela letačica (izletnica). Grupa kućnih pčela uključuje mlade pčele i pčele radilice srednje starosti, do tri nedelje, koje su zadužene za sve poslove u košnici i čine oko 2/3 od ukupnog broja pčela radilica (pčele higijeničarke, hraniteljice, graditeljice saća, skladišterke nektara i polena i pčele stražarice). Drugu grupu pčela radilica čine starije pčele zadužene za

obavljanje svih poslova van košnice (pčele sakupljačice nektara, polena, vode, biljne smole, kao i pčele izvidnice koje izviđaju okolinu i nalaze pašu a zatim o tome obaveste pčele sakupljačice). Podela rada je ostvarena zahvaljujući temporalnom polietizmu, pojavi da tip posla zavisi od uzrasta, tako da svaka radilica sukcesivno obavlja čitavu seriju različitih poslova (Johnson, 2010). Život pčele radilice je kratak i zavisi od intenziteta njihovog rada te traje u proseku od 30 do 45 dana. Izuzetak su zimske pčele radilice, izvedene u drugoj polovini leta ili u jesen, koje žive i do šest meseci, a njihova uloga je da održe pčelinje društvo preko zime (Free i Spencer-Booth, 1959).

2.1.2.3. Dinamika sezonskih aktivnosti pčelinje zajednice

Pčelinja zajednica u umereno kontinentalnim regionima, u zavisnosti od sezone godine, prolazi kroz nekoliko različitih perioda aktivnosti. Krajem zime (februar, početak marta) dolazi do smene zimskih ili dugoživećih pčela mladim, letnjim ili kratkoživećim pčelama, pri čemu spoljašnja temperatura predstavlja ključni faktor. Tada matica počinje da polaže jaja a dugoživeće, zimske radilice neguju mlade larve. To je period intenzivnog opadanja brojnosti pčela te je i najkritičniji period za biološki opstanak pčelinje zajednice. U zavisnosti od snage pčelinjeg društva, raspoloživih rezervi pčelinje hrane, ali i od vremenskih uslova, ovaj period traje oko 30 dana.

Zatim sledi period koji karakteriše intenzivna aktivnost pčela radilica i razvoj pčelinjeg društva kada se postiže maksimalna brojnost pčela (do 60 000 pčela po društvu). Povećava se broj trutova i po ivici saća ramova sa leglom se pripremaju osnove matičnjaka u koje matica polaže jaja, što rezultuje rojenjem koje se dešava od marta do juna. Rojenje pčela predstavlja proces razmnožavanja pčelinjih zajednica podelom jedne dobro razvijene pčelinje zajednice na dve, pri čemu jedan deo pčela sa starom maticom odlazi u novi „dom“, dok ostatak pčela sa novom maticom ostaje na starom mestu. Nakon rojenja, kolonije provode leto i ranu jesen u sakupljanju polena, koji se koristi kao izvor proteina za ishranu legla, i nektara, koji se prerađuje u med i koristi kao izvor energije naročito tokom zimskih meseci (Nicolson, 2011).

Tokom avgusta, septembra i oktobra sledi period pripreme pčelinjih zajednica za zimu. Matica polaže manji broj krupnijih jaja iz kojih se legu krupnije pčele radilice koje imaju veće enegetske rezerve (Fluri i Bogdanov, 1987; Kunc i sar., 2019) i žive nekoliko puta duže u poređenju sa letnjim pčelama. One predstavljaju poslednju generaciju pčela u tekućoj godini, sa dobrim fiziološkim karakteristikama koje bi trebalo da omoguće preživljavanje nepovoljnih zimskih uslova. Sa nastupanjem jesenjih hladnoća (krajem septembra, tokom oktobra ili kasnije) radilice zatvaraju pukotine na košnici lepljivim propolisom napravljenim od biljne smole i odbacuju trutove iz zajednice. Nastupa period biološkog mirovanja pčela koji predstavlja završni period u godišnjem ciklusu aktivnosti pčelinjeg društva. U ovom periodu, pri temperaturama ispod 10 °C, pčele formiraju termoregulacioni klaster tj. zimsko klube kao uspešan način odbrane od niskih zimskih temperatura. Zimsko klube formiraju sve pčele radilice i matica, koja se nalazi u samom centru klubeta. Zagrevanje, koje se postiže pokretima mišića za letenje, postaje primarni

zadatak svih pčela tokom zimskog perioda. U centru klubeta se održava temperatura u rasponu od 15 °C do 25 °C (kada je prisutno leglo temperatura se može povećati i do 35 °C), idući prema spoljašnjem delu temperatura opada, tako da na površini klubeta, u zavisnosti od spoljašnje temperature vazduha, može biti 10 °C. Pčele sa površine klubeta se naizmenično povlače u unutrašnjost klubeta a pčele iz centralnog dela ih zamenjuju. Pčelinja kolonija započinje prezimljavanje sa 30000–40000 jedinki, a završava sa oko 10000–15000 usled prirodnog uginuća i nedostatka novih mladih pčela. Uobičajena podela rada unutar pčelinje zajednice se uspostavlja tek krajem zimskog perioda, sa pojavom prvog legla, čime se pokreće novi godišnji ciklus aktivnosti pčelinjih zajednica (Stanimirović i sar., 2000; Döke i sar., 2015).

2.1.2.4. Ishrana medonosne pčele

U pogledu ishrane, pčele se tokom celog životnog ciklusa skoro u potpunosti oslanjaju samo na cvetove biljaka tj. cvetni nektar i polen, kao izvor ugljenih hidrata, proteina, lipida i mikronutrijenata (Michener, 2007; Wright i sar., 2017).

Kod medonosne pčele, sakupljanje nektara, medne rose, polena i vode obavljaju isključivo starije pčele radilice. Unutar košnice, mlađe pčele radilice preuzimaju sakupljenu hranu, prerađuju je tako da od nektara naprave med a od polena pergu i skladište u voštanim ćelijama saća. Pored nektara, pčele mogu sakupiti i mednu rosu, slatku i lepljivu supstancu koju luče biljne vaši, od koje takođe naprave med, tzv. medljikovac. Voda se takođe sakuplja i donosi u košnicu gde služi za hidrataciju pčela i hlađenje košnice evaporacijom (Ostwald i sar., 2016).

Nektar je po sastavu smeša šećera – saharoze, glukoze, fruktoze i minornih šećera. Odnos komponenti se razlikuje između biljnih vrsta a ukupan maseni udeo šećera varira od 10 % do 70 % (Nicolson i Thornburg, 2007). Nektar sadrži i aminokiseline u niskim koncentracijama ($\mu\text{mol/L}$ do mmol/L) koje daju specifičan ukus. Fenilalanin je fagostimulativna aminokiselina za medonosne pčele te se nalazi u nektaru biljaka koje posećuju (Petanidou i sar., 2006; Hendriksma i sar., 2014). Nakon što se pčela izletnica vrati u košnicu sa nektarom u voljci tj. mednom želucu, trofalaksijom predaje nektar drugoj pčeli koja držeći nektar među mandibulama smanjuje sadržaj vode i obogaćuje nektar enzimima (invertazom, α -amilazom i glukoza oksidazom). Invertaza hidrolizuje saharozu te su dominantni šećeri u medu glukoza i fruktoza. Med koji nastaje se dalje skladišti u ćelijama saća, gde se vrši zrenje meda i dalja evaporacija vode, a zatim se zreo med (sadržaj vode ispod 20 %) zatvara voštanim poklopcem i tako služi kao glavna hrana pčelama tokom zime (Park, 1925; Plavša i Nedić, 2015). Mogućnost skladištenja meda na duži period, bez bakterijske kontaminacije, objašnjava se visokom koncentracijom šećera, kao i prisustvom enzima glukoza oksidaze koja oksiduje deo glukoze u prisustvu O_2 do glukonske kiseline i vodonik-peroksida (Kwakman i sar., 2010).

Polen je za pčele glavni izvor proteina, masti i mikronutrijenata. Sadržaj ukupnih proteina varira od 10 % do 60 % (Roulston i sar., 2000). Sastav aminokiselina ukazuje da je visok udeo neesencijalnih aminokiselina, naročito prolina, u odnosu na esencijalne aminokiseline (Somerville i Nicol, 2006). Od ugljenih hidrata, u najvećoj količini pronađeni su skrob i šećeri koji potiču iz nektara, s obzirom da se analize sastava vrše u polenu kojem su pčele delom dodale nektar (Roulston i Buchmann, 2000). Sadržaj lipida u polenu je u opsegu 2–20 % (Roulston i Cane, 2000). Sastav masnih kiselina varira u zavisnosti od vrste biljke ali se kao najzastupljenije izdvajaju palmitinska, linolna i α -linolenska kiselina. Linolna i α -linolenska kiselina, kao i dekanska, laurinska i miristinska kiselina, ispoljavaju antimikrobno dejstvo, stoga polen bogat ovim masnim kiselinama, pored nutritivne vrednosti, doprinosi održavanju higijenskih uslova u košnici (Manning, 2001). Od mikronutrijenata u polenu, pored raznih minerala i vitamina, izdvaja se prisustvo B vitaminâ (Roulston i Cane, 2000). Prikupljen polen mlade pčele radilice skladište u ćelije saća i zalivaju medom. Polen obrađen na ovaj način, tj. pomešan sa medom, sekretom pljuvačnih žlezda i enzimima fermentiše i tako nastaje perga ili pčelinji hleb (Stanimirović i sar., 2000). Nutritivni sastav perge se razlikuje u odnosu na polen: sadržaj proteina u pergi je manji (10–30 %), sadržaj lipida je takođe manji (3–8 %), sadržaj šećera je veći i potiče iz dodatog meda (25–50 %). Bakterije iz digestivnog trakta pčela takođe doprinose sastavu perge, obogaćuju pergu vitaminima B kompleksa i razgrađuju kompleksne polisaharide egzine tj. spoljašnjeg omotača polena (Lee i sar., 2014).

Pored navedenog, karakteristika medonosne pčele je i ishrana matičnom mleči. Medonosna pčela je jedinstvena među pčelama po tome što može da konvertuje hranu koju konzumira u matičnu mleč kojom hrani larve i po potrebi adultne pčele. Matična mleč je sekret subfaringealnih žlezda mladih pčela radilica, starosti između 6. i 12. dana, koji služi za ishranu matičnih larvi tokom celog perioda razvoja kao i larvi radilica i trutova u prva tri dana života (Plavša i Nedić, 2015). Nutritivni sastav matične mleči čini 14–20 % proteina, 3–10 % lipida i 11–30 % ugljenih hidrata. Proteini u matičnoj mleči imaju optimalni sastav aminokiselina za razvoj pčela, uzimajući u obzir da su jedini izvor esencijalnih aminokiselina u tom periodu. Lipide matične mleči karakteriše prisustvo retkih masnih kiselina (hidroksidikarboksilne masne kiseline) u većim količinama (Ferioli i sar., 2014), dok je sastav ugljenih hidrata sličan kao u medu, uglavnom glukoza i fruktoza u jednakom odnosu i saharoza u tragovima (Wang i sar., 2016).

Adekvatna ishrana pčela tokom celog aktivnog perioda (mart–oktobar) je od izuzetnog značaja za razvoj pčelinje zajednice. Da bi pčelinje društvo imalo dovoljnu količinu cvetova sa kojih može da sakuplja nektar i polen, primenjuje se selidba pčela na medonosne paše (bagremova, suncokretova, lipova i dr.), tzv. migratorni tip pčelarenja. Prednost selidbe pčela na medonosne paše je i veći prinos meda, kao i drugih pčelinjih proizvoda, te se pčelari često odlučuju za ovaj tip pčelinjaka. Ukoliko se primenjuje stacionarni tip pčelarenja bez seljenja košnica, izvor hrane za pčele bi trebalo obezbediti sađenjem medonosnih biljaka u blizini pčelinjaka (Plavša i Pavlović, 2017).

2.1.3. Uloga medonosne pčele u ekosistemu

Oprašivanje ili polinacija je prenošenje polena sa prašnika jednog cveta na žig tučka drugog ili istog cveta da bi došlo do spajanja muške i ženske polne ćelije odnosno oplodjenja. Stoga se može reći da je oprašivanje esencijalni proces u svakom ekosistemu koji omogućava polno razmnožavanje biljaka u prirodnim i agroekosistemima.

Oprašivači ili polinatori su odgovorni za opstanak većine biljaka cvetnica i time doprinose očuvanju biodiverziteta divljih (negajenih) cvetnica, dok oprašivanjem gajenih cvetnica dobijaju i ekonomski značaj. Utvrđeno je da prenošenje polena oprašivačima povećava genetičku raznovrsnost biljaka čime se povećava njihov adaptivni potencijal (Jabis i sar., 2011).

Biljke cvetnice (čak 80% divljih cvetnica) direktno zavise od insekata oprašivača koji su stoga veoma važni za očuvanje svih uloga koje biljke kao primarni producenti imaju u ekosistemima. Sa druge strane, biljke pružaju oprašivačima hranu (nektar i polen) te predstavljaju primer simbiotskih odnosa u prirodnim ekosistemima. Stoga je raznovrsnost oprašivača u ekosistemima u direktnoj zavisnosti od raznovrsnosti biljaka u njima i obrnuto (Biesmeijer i sar., 2006). Činjenica da je oprašivanje insektima, uglavnom pčelama, neophodno za 75 % svih useva koji se direktno upotrebljavaju u ljudskoj ishrani, naglašava i ekonomski značaj insekata oprašivača (Klein i sar., 2007).

Medonosna pčela se izdvaja kao jedan od najznačajnijih oprašivača, ne samo gajenih biljaka već i velikog broja divljih biljnih vrsta, te sa ekološkog aspekta predstavlja nezaobilaznog činioca u oprašivanju entomofilnih biljaka (vanEngelsdorp i Meixner, 2010). Sa ekonomske tačke gledišta, medonosna pčela je značajna za oprašivanje gajenih biljaka, sa jedne strane, odnosno kao proizvođač meda i drugih pčelinjih proizvoda, sa druge strane. Čak 90 % komercijalnog oprašivanja gajenih biljnih kultura vrše medonosne pčele, čime se ističe značaj pčela u proizvodnji hrane. Prinosi pojedinih useva i nekih vrsta voćaka bi se smanjili za više od 90 % bez prisustva medonosnih pčela (Klein i sar., 2007). Medonosne pčele su generalisti, tj. uspešno oprašuju cvetove nekoliko hiljada biljnih vrsta, pri oprašivanju posećuju širok areal od prosečno 4,5 km udaljenosti od košnice, a zahvaljujući dobro razvijenoj komunikaciji brzo prenose informaciju unutar brojne pčelinje zajednice o lokaciji cvetnih polja (Seeley, 1985). Stoga, medonosna pčela se izdvaja kao izuzetno efikasan oprašivač doprinoseći očuvanju biodiverziteta i održivosti poljoprivrede.

2.2. Procena stanja medonosne pčele – biohemijski i fiziološki parametri

2.2.1. Oksidativni stres i antioksidativni sistem zaštite

Molekulski kiseonik (O_2) je esencijalan za aerobni način života, međutim tokom aerobnog metabolizma, nekompletna redukcija ili aktivacija molekuskog kiseonika generiše reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) koji dalje mogu uzrokovati oštećenje ćelijskih struktura, uključujući proteine, lipide i nukleinske kiseline. Stoga su aerobni organizmi razvili kompleksan antioksidativni sistem zaštite, koji uključuje antioksidativne enzime kao i neenzimske komponente, sa ciljem održavanja reaktivnih čestica kiseonika u fiziološkim granicama. Neuravnoteženost između produkcije reaktivnih čestica kiseonika i funkcije antioksidativnog sistema je stanje oksidativnog stresa koje vodi dalje ka oksidativnom oštećenju biomolekula te je povezano sa velikim brojem oboljenja aerobnih organizama kao i procesom starenja.

2.2.1.1. Reaktivne vrste kiseonika i azota u biološkim sistemima

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) obuhvataju slobodnoradikalske oblike kiseonika i neradikalske oblike kiseonika (Tabela 2). Slobodnoradikalske hemijske vrste tj. slobodni radikali predstavljaju slobodne atome, molekule, molekulske fragmente ili jone koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjem elektronskom omotaču. Upravo nespareni elektroni, koje obeležavamo tačkom u superskriptu, daju radikalima hemijsku reaktivnost jer teže da ih spare oduzimajući elektron od nekog drugog molekula.

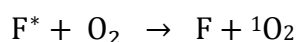
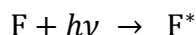
Tabela 2. Primeri reaktivnih vrsta kiseonika i azota.

Slobodnoradikalski oblici		Neradikalski oblici	
Reaktivne vrste kiseonika (ROS)			
Superoksid-anjon-radikal	O_2^-	Vodonik-peroksid	H_2O_2
Hidroksil-radikal	OH^\cdot	Singlet kiseonik	1O_2
Hidroperoksil-radikal	HOO^\cdot	Peroksinitrit	$ONOO^-$
Peroksil-radikal	ROO^\cdot	Hipohloritna kiselina	$HOCl$
Alkoksil-radikal	RO^\cdot	Ozon	O_3
Reaktivne vrste azota (RNS)			
Azot-monoksid	NO^\cdot	Azotasta kiselina	HNO_2
Azot-dioksid	NOO^\cdot	Nitroksidni anjon	NO^-
Nitratni radikal	NO_3^\cdot	Peroksinitrit	$ONOO^-$

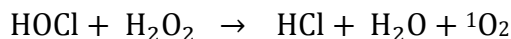
Pored najviše zastupljenih reaktivnih kiseoničnih vrsta, u biološkim sistemima se takođe generišu i reaktivne vrste azota (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) kao što su azot-monoksid (NO), peroksinitrit-anjon ($ONOO^-$, koji se podjednako klasifikuje i kao ROS) i drugi (Tabela 2).

Od reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) najznačajniji su aktivirani (singletni) i redukovani oblici molekulskog kiseonika: superoksid-anjon-radikal, vodonik-peroksid i hidroksil-radikal (Halliwell, 2001).

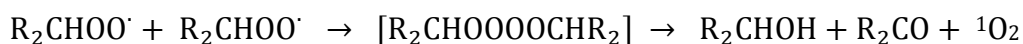
Singletni kiseonik (1O_2) predstavlja neradikalni oblik ROS-a i nastaje najčešće fotohemijским reakcijama aktivacije molekula kiseonika. Kada se fotosenzibilno jedinjenje (F) osvetli i aktivira (F*), ta energija se može preneti na molekul kiseonika konvertujući ga u singletni kiseonik, dok se fotosenzibilno jedinjenje vraća u svoje prvobitno, neekscitirano stanje:



Singletni kiseonik može nastati i tokom inflamacije, usled aktivacije fagocitnih ćelija koja dovodi do nastanka hipohloritne kiseline (HOCl) koja dalje reaguje sa vodonik-peroksidom i formira 1O_2 , što je prikazano u sledećoj reakciji:

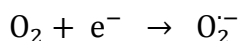


Takođe, singletni kiseonik može nastati i tokom lipidne peroksidacije u reakciji dva peroksil-radikala (R_2CHOO^\cdot) kada nastaju alkohol (R_2CHOH), keton (R_2CO) i 1O_2 , što je prikazano u sledećoj reakciji:

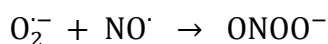


Singletni kiseonik je jak oksidant koji može reagovati sa mnogim biomolekulima, uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline (Davies, 2003; Li, 2011).

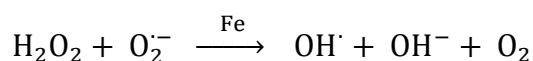
Superoksid-anjon-radikal ($O_2^{\cdot-}$) nastaje jednoelektronskom redukcijom molekula kiseonika, sa najvećim intenzitetom unutar mitohondrija pri transportu elektrona duž respiratornog lanca:



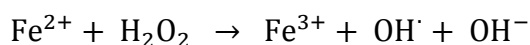
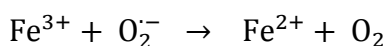
U poređenju sa drugim radikalima kiseonika, $O_2^{\cdot-}$ je manje reaktivan a zbog naelektrisanja tj. anjonskog oblika ne može direktno da reaguje sa membranskim lipidima (za razliku od njegovog protonovanog oblika HOO^\cdot). Superoksid-anjon-radikal može reagovati sa azot(II)-oksidom (NO^\cdot) pri čemu nastaje veoma reaktivan peroksinitrit ($ONOO^-$):



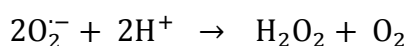
U prisustvu redoks-aktivnih metala (npr. gvožđe) superoksid-anjon-radikal reaguje sa vodonik-peroksidom (H_2O_2), pri čemu nastaje hidroksil-radikal (OH^\cdot) kao veoma reaktivna kiseonična vrsta, a reakcija je poznata kao gvoždem katalizovana Haber-Weiss-ova reakcija:



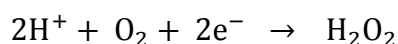
Navedena reakcija se odigrava i spontano, samo znatno sporije. Postupno prikazana gvoždem katalizovana Haber-Weiss-ova reakcija obuhvata dve odvojene reakcije:



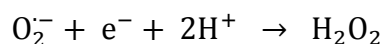
U biološkim sistemima veći deo $\text{O}_2^{\cdot-}$ podleže reakciji dismutacije, koja je katalizovana superoksid dismutazom (SOD), pri čemu nastaje vodonik-peroksid:



Vodonik-peroksid (H_2O_2) predstavlja neradikalni oblik koji, sem navedenom reakcijom dismutacije superoksid-anjon-radikala, može nastati i dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika:

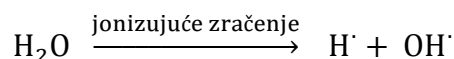


Zatim, H_2O_2 može nastati i jednoelektronskom redukcijom superoksid-anjon-radikala:

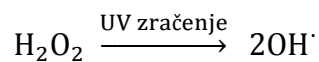


Lako difunduje kroz ćelijske membrane i može da reaguje sa jonima gvožđa i drugim jonima prelaznih metala (Fenton-ova reakcija), kada nastaje hidroksil-radikal.

Hidroksil radikal (OH^{\cdot}) predstavlja najreaktivniji redukovani oblik kiseonika. Nastaje jednoelektronskom redukcijom vodonik-peroksida, najčešće Haber-Weiss reakcijom. Takođe može nastati kao posledica jonizujućeg zračenja koje izaziva homolizu molekula vode:



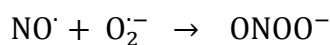
Ultraljubičasto (UV) zračenje takođe generiše OH^{\cdot} kroz proces homolize vodonik-peroksida:



Ovaj radikal već na mestu nastanka nespecifično reaguje sa biomolekulima izazivajući velika oštećenja ćelija (Halliwell, 2001).

Od reaktivnih vrsta azota (RNS) u biološkim sistemima, najznačajniji je *azot-monoksid ili azot(II)-oksid* (NO^{\cdot}) radikal. To je mali, kratkoživeći (nekoliko sekundi) molekul koji sadrži jedan nespareni elektron. NO^{\cdot} je prva gasovita supstanca identifikovana kao endogeno generisani signalni molekul. Ima ulogu signalnog molekula u raznim fiziološkim procesima, uključujući neurotransmisiju, regulaciju krvnog

pritiska, relaksaciju glatke muskulature, regulaciju odbrambenih mehanizama (Murad, 2006). Međutim, u reakciji sa ROS, najčešće superoksid-anjon-radikalom, formira mnogo reaktivniju česticu – peroksinitrit-anjon:



Takođe, azot(II)-oksid radikalom posredovane redoks reakcije mogu dovesti do formiranja sekundarnih azot-oksida, kao što je azot-dioksid radikal ($\cdot\text{NO}_2$). Azot-dioksid je slobodni radikal visoke reaktivnosti a često je prisutan u vazduhu kao aerozagađujuća materija (Li, 2011).

Izvori nastanka reaktivnih vrsta kiseonika i azota (ROS/RNS) mogu biti endogenog i egzogenog porekla (Tabela 3). Korišćenje molekulskog kiseonika od strane aerobnih organizama, koje je neminovno praćeno nastankom ROS/RNS-a, uglavnom od strane nikotinamid-adenin-dinuklotid-fosfat (NAD(P)H) oksidaza, kao i unutar mitohondrija duž elektron transportnog lanca, predstavlja endogeni izvor. Dugi niz godina se smatralo da se enzim NAD(P)H oksidaza nalazi samo u fagocitnim ćelijama gde proizvodi značajne količine superoksid-anjona te ispoljava antimikrobno dejstvo. Novije otkriće multiplih izoformi enzima, koje čine familiju NAD(P)H oksidaza (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 i NOX5; NOX je skraćena od NAD(P)H oksidaza), ukazuje da se ekspresija gena navedenih izoenzima odigrava u raznim ćelijama i da oni predstavljaju važan izvor reaktivnih čestica kiseonika pri raznovrsnim fiziološkim i patofiziološkim uslovima (Lambeth, 2004). Sinteza ROS-a u mitohondrijama se odigrava preko kompleksa I i III elektron-transportnog lanca, kao i dejstvom oksidaza (NOX4 i monoamin oksidaza) prisutnih u ovim organelama (Li i sar., 1999; Block i sar., 2009).

Drugi endogeni izvori ROS-a uključuju ksantin oksidoreduktaze (koje pokazuju ksantin dehidrogenaznu i ksantin oksidaznu aktivnost), citohrom P450 enzime, azot-oksid sintaze i peroksizome. Pored osnovne funkcije ksantin oksidoreduktaza u prevođenju hipoksantina u ksantin i dalje u mokraćnu kiselinu, sposobne su i za jedno- i dvoelektronsku redukciju O_2 u superoksid-anjon i vodonik-peroksid. Zatim, utvrđeno je da citohrom P450 enzimi u prisustvu ksenobiotika generišu značajne količine ROS-a (Lu i Cederbaum, 2008). Azot-oksid sintaze, koje pri normalnim fiziološkim uslovima katalizuju nastajanje azot(II)-oksida, pri određenim uslovima katalizuju jednoelektronsku redukciju O_2 u superoksid-anjon. Organele peroksizomi sadrže enzime kao što su flavoprotein dehidrogenaze koje proizvode značajne količine vodonik-peroksida. Peroksizomi takođe sadrže katalazu, koja dalje razlaže vodonik-peroksid.

Tabela 3. Izvori reaktivnih vrsta kiseonika i azota u biološkim sistemima (prerađeno prema Li, 2011).

Izvor	Opis
Endogeni izvori	NAD(P)H oksidaze Mitohondrije (elektron transportni lanac i oksidaze) Ksantin oksidoreduktaze Citohrom P450 enzimi Azot-oksidi sintaze Peroksizomi
Egzogeni izvori	Fizička sredstva (jonizujuće zračenje, UV zračenje) i čestice (azbestna vlakna, silikogena prašina) Ksenobiotici Biološki agensi (bakterije i virusi)

ROS/RNS mogu nastati i kao rezultat dejstva brojnih egzogenih faktora, tj. fizičkih i hemijskih agenasa u životnoj sredini, ksenobiotika i dr. (Tabela 3). Utvrđeno je da jonizujuće zračenje homolizom molekula vode generiše hidroksil-radikal (OH^\cdot) koji dodatno oštećuje tkivo nakon radijacije. Ultraljubičasto zračenje takođe generiše OH^\cdot kroz proces homolize vodonik-peroksida (H_2O_2). Čestice azbestnih vlakana i silikogena prašina takođe uzrokuju stvaranje ROS/RNS u biološkim sistemima.

Značajan izvor reaktivnih vrsta kiseonika i azota su ksenobiotici, tj. njihova mikrozomalna degradacija. Mikrozomalni enzimi citohrom P450 (CYP) sistema katalizuju oksidaciju ksenobiotika uz simultanu produkciju $\text{O}_2^{\cdot-}$ i drugih ROS/RNS. Mikrozomalne glutation S-transferaze su povezane sa enzimima CYP familije što doprinosi brzom inaktivaciji aktivnih metabolita koji se proizvode tokom biodegradacije ksenobiotika. Kao veoma zastupljeni polutanti životne sredine, joni teških metala kao što su gvožđe, bakar, kadmijum, živa, nikl, olovo i arsen, značajno doprinose produkciji reaktivnih čestica kiseonika, najčešće preko Fentonove reakcije (Stojs i Bagchi, 1995). Međutim joni metala mogu i direktno reagovati sa ćelijskim komponentama, inhibirati antioksidativne enzime vezujući se za njihove sulfhidrilne grupe (-SH), zameniti esencijalni metal u strukturi enzima itd. (Birben i sar., 2012). Agrohemijske, kao što su pesticidi, takođe značajno doprinose produkciji ROS-a u živim sistemima, indukujući oksidativni stres i narušavajući redoks homeostazu (Gauthier i sar., 2018; Abdelkader i sar., 2019).

2.2.1.2. Antioksidativni sistem zaštite

Antioksidant je svaka supstanca koja sprečava, značajno usporava ili reparira oksidativna/nitrozativna oštećenja biomolekula (Halliwell, 2007). Takođe, termin antioksidant se definiše kao svaki mehanizam, struktura i/ili supstanca koja sprečava, odlaže, uklanja ili štiti od oksidativne neenzimske hemijske modifikacije tj. oštećenja ciljnog molekula (Pamplona i Costantini, 2011). Opisana su tri načina delovanja antioksidanata u zaštiti biomolekula:

- Sakupljanje tj. „uklanjanje“ (engl. *scavenging*) ROS/RNS: Mnogi antioksidanti mogu uklanjati već prisutne ROS/RNS, npr. enzim superoksid dismutaza katalizuje dismutaciju superoksid-anjon radikala pri čemu nastaje vodonik-peroksid i molekularni kiseonik.
- Inhibicija nastanka ROS/RNS: Antioksidanti mogu delovati na izvor nastanka ROS/RNS, npr. mono-*O*-metilovani flavanoli inhibišu NAD(P)H oksidaze i time smanjuju brzinu formiranja superoksid-anjon-radikala (Steffen i sar., 2008).
- Uklanjanje ili regeneracija oštećenih biomolekula kao posledica dejstva ROS/RNS: Antioksidanti mogu izvršiti reparaciju modifikovanih biomolekula. Na primer, oksidacijom metioninskih ostataka od strane ROS/RNS nastaje metionin-sulfoksid koji se dejstvom metionin-sulfoksid reduktaze može vratiti u prvobitnu formu (Kim i Gladyshev, 2007).

Prema poreklu, antioksidanti se dele na dve velike grupe: endogene i egzogene (Tabela 4). Endogeni antioksidanti nastaju u ćelijama i dalje se klasifikuju na grupu proteinskih i grupu neproteinskih antioksidanata. Endogeni proteinski antioksidanti obuhvataju enzime (npr. superoksid dismutaza i katalaza i drugi enzimi uključeni u enzimске mehanizme antioksidativne zaštite) i neenzimske proteinske antioksidante (npr. feritin i metalotionein). Endogeni neproteinski antioksidanti uključuju redukovanu formu glutaciona, bilirubin i dr. Egzogeni antioksidanti mogu biti prirodne ili sintetičke supstance koje se unose u organizam hranom ili u vidu suplemenata, a najčešće podrazumevaju vitamin C, vitamin E i polifenole (Li, 2011).

Tabela 4. Klasifikacija antioksidanata u biologiji i medicini (prerađeno prema Li, 2011).

	Naziv antioksidanta
Endogeni proteinski antioksidanti (enzimi i neenzimski antioksidanti)	Superoksid dismutaza
	Katalaza
	Glutation peroksidaza
	Glutation reduktaza
	Glutation <i>S</i> -transferaza
	Glutaredoksin
	Tioredoksin
	Peroksiredoksin
	Tioredoksin reduktaza
	Sulfiredoksin
	Metionin-sulfoksid reduktaza
	Hem oksigenaza
	NAD(P)H: hinon oksidoreduktaza
	Paraoksonaza
	Feritin
Metalotioneini	

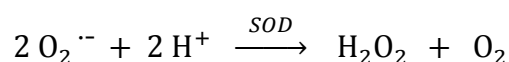
Endogeni neproteinski antioksidanti	Glutation Bilirubin Koenzim Q α -Lipoinna kiselina Melatonin Piruvat Mokraćna kiselina
Egzogeni antioksidanti	Vitamin C Vitamin E Karotenoidi Biljni fenoli

Navedeni antioksidanti, iako veoma raznovrsni, deluju jedinstveno i sinhronizovano čineći sistem antioksidativne zaštite (engl. *antioxidative defense system*, ADS). Ovaj sistem obuhvata enzimске i neenzimske mehanizme koji su funkcionalno povezani u jednu celinu.

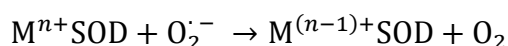
Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite obuhvataju enzime koji uklanjaju reaktivne oblike kiseonika i azota nastale tokom ćelijskog metabolizma ili kao posledica prisustva egzogenih stresogenih faktora.

Superoksid dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1) katalizuju reakciju dismutacije superoksid-anjon-radikala ($O_2^{\cdot-}$) do vodonik-peroksida (H_2O_2) i molekuskog kiseonika (O_2), obezbeđujući prvu liniju odbrane od ROS nastalih u mitohondrijama. Termin dismutacije se odnosi na hemijsku reakciju u kojoj se isti reaktant oksiduje i redukuje, te se u primeru reakcije dismutacije superoksid-anjona, jedan superoksid-anjon redukuje do vodonik-peroksida a drugi oksiduje do kiseonika, što je prikazano u sledećoj reakciji:



Postoje četiri izoforme ovog enzima i sve sadrže redoks-aktivni metal u svom aktivnom centru: Cu^{+2} u bakar,cink-zavisnoj SOD (Cu,ZnSOD), $Mn^{2+/3+}$ u mangan-zavisnoj SOD (MnSOD), $Fe^{2+/3+}$ u gvožđe-zavisnoj SOD (FeSOD) i $Ni^{2+/3+}$ u nikal-zavisnoj SOD (NiSOD). Mehanizam reakcije je sličan kod svih SOD i može se predstaviti sledećim jednačinama, gde M predstavlja pripadajući redoks metal:

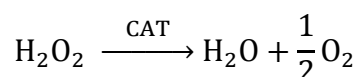


Enzimska aktivnost Cu,ZnSOD je otkrivena od strane McCord i Fridovich (1969), iako je sam protein izolovan 30 godina ranije od strane Mann i Keilin i tada nazvan bakar vezujući protein ili eritrokuprein (Li, 2011). Dalje su Fridovich i saradnici 1970. godine

otkrili MnSOD a zatim 1973. godine FeSOD (Yost i Fridovich, 1973) koja je prisutna kod prokariota i u hloroplastima biljaka, dok je najnovije otkrivena NiSOD (Kim i sar., 1996).

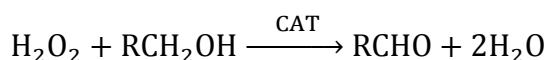
Cu,ZnSOD je homodimer, ukupne molekulske mase oko 32 kDa. Nalazi se u citosolu, nukleusu i u intermembranoznom prostoru mitohondrija. U aktivnom centru je jon bakra koji direktno učestvuje u reakciji dismutacije, dok cink doprinosi stabilnosti strukture proteina. MnSOD je homotetramer, molekulske mase 86-88 kDa. Sintetiše se u citosolu a svoju aktivnost ispoljava u matriksu mitohondrija. Opisana je i ekstracelularna izoforma SOD (ECSOD), molekulske mase 135 kDa, koja je tetramer i takođe sadrži bakar i cink (Marklund i sar., 1982). Kod insekata su takođe opisane Cu,ZnSOD u citoplazmi, MnSOD u mitohondrijama i ekstracelularna izoforma SOD (Corona i Robinson, 2006).

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je homotetramerni enzim, ukupne molekulske mase oko 240 kDa. Svaki monomer sadrži hem tj. gvožđe-protoporfirin IX u aktivnom centru enzima, te katalaza zajedno sa citohromima, globinima i peroksidazama pripada porodici hemoproteina. Katalizuje reakciju razgradnje vodonik-peroksida do vode i molekuskog kiseonika:

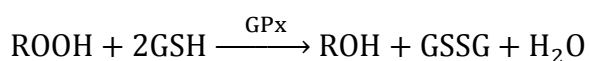
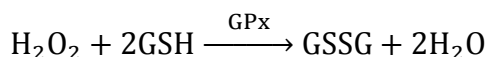


Ima značajnu ulogu u regulaciji nivoa vodonik-peroksida zajedno sa glutation peroksidazom i tioredoksin peroksidazom. Katalaza je u ćelijama primarno lokalizovana u peroksizomima gde ima najveću aktivnost, mada je aktivnost uočena i u mitohondrijama, nukleusu i endoplazmatičnom retikulumu.

Pri malim koncentracijama vodonik-peroksida, katalaza ispoljava peroksidaznu aktivnost pri čemu se oksiduju molekuli malih molekulskih masa kao što su metanol, etanol, mravlja kiselina, fenoli, indoli i dr. Sledeća jednačina ilustruje peroksidaznu aktivnost katalaze gde se alkohol (RCH₂OH) konvertuje do aldehida (RCHO) u prisustvu niske koncentracije vodonik-peroksida:



Glutation peroksidaze (GSH-Px ili GPx, EC 1.11.1.19) katalizuju reakcije redukcije vodonik-peroksida (H₂O₂) ili organskih hidroperoksida (ROOH) u prisustvu redukovanog glutationa (GSH) koji je elektron donor, pri čemu nastaju oksidovani glutation (GSSG), voda (H₂O) i odgovarajući alkohol (ROH):

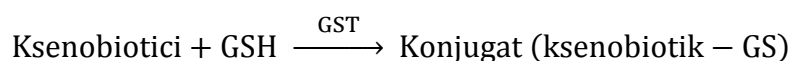


Glutation peroksidazna aktivnost je prvi put uočena u eritrocitima u ulozi zaštite hemoglobina od oksidativnog oštećenja (Mills, 1957). Enzim je kasnije nazvan GPx1 i predstavlja najbolje istraženu GPx izoformu. Dalje su, uzimajući u obzir aminokiselinsku

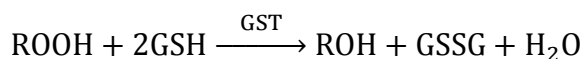
sekvencu, specifičnost ka supstratu i subćelijsku lokalizaciju enzima, opisane nove izoforme enzima, kod sisara čak šest izoenzima (GPx1–GPx6). Takođe, u zavisnosti od prisustva selenocisteinskog ostatka u enzimskoj strukturi, opisana su dva tipa glutation peroksidaza: selen-zavisne GPx i selen-nezavisne GPx. Izoforme GPx1, GPx2, GPx3 i GPx6 su homotetramerni proteini molekulske mase oko 20–25 kDa, GPx4 je monomerni enzim molekulske mase 20–22 kDa, dok je GPx5 homodimerni enzim molekulske mase 24 kDa i predstavlja selen-nezavisnu GPx. GPx1 izoforma se još naziva klasična ili citosolna (cGPx) i nalazi se u citosolu, mitohondrijama i nukleusu. GPx2 izoforma je poznata kao gastrointestinalna izoforma (GI-GPx), redukuje perokside poreklom iz hrane i nalazi se u citosolu i nukleusu (Chu i sar., 1993). GPx3 izoforma je poznata kao plazma-GPx (pGPx) a bubrezi su glavni izvor ove izoforme u plazmi. Poznata je kao jedina ekstracelularna GPx izoforma, ubraja se među najznačajnije ekstracelularne enzime kod sisara i veoma je zastupljena u plućima (Comhair i sar., 2001). Zbog niske ekstracelularne koncentracije GSH, GPx3 može da koristi ekstracelularni tioredoksin i glutaredoksin kao elektron-donore. GPx4 izoforma je poznata kao fosfolipid-hidroperoksid GPx (PHGPx). Vezana za membranu deluje direktno na fosfolipidne hidroperokside, hidroperokside masnih kiselina i holesterola. Pored membrana, subcelularno je lokalizovana i u citosolu, nukleusu i mitohondrijama. GPx5 predstavlja selen-nezavisnu izoformu koja se nalazi u ćelijama epididimalnog kanala testisa. GPx6 izoforma je značajna tokom embrionalnog razvoja sisara, kao i za olfaktorno čulo u adultnom dobu (Li, 2011).

Selen-nezavisna glutation peroksidazna aktivnost detektovana je i kod mnogih insekata, koji nemaju Se-zavisnu GSH-Px (Ahmad, 1992; Felton i Summers, 1995; Grubor-Lajšić i sar., 1996). Selen-nezavisna GSH-Px pokazuje peroksidaznu aktivnost samo prema lipidnim hidroperoksidima (LOOH), a ne i prema H₂O₂, te je mnogi smatraju izoformom glutation S-transferaza (GST) i označavaju kao GST Px (Kojić, 2009).

Glutation S-transferaze (GST, EC 2.5.1.18) predstavljaju superfamiliju antioksidativnih enzima koji na ćelijskom nivou predstavljaju glavnu liniju odbrane od oksidativnog i elektrofilnog stresa. Imaju značajnu ulogu u ćelijskoj signalnoj transdukciji i redoks-regulaciji. Katalizuju reakcije konjugacije redukovanog glutationa (GSH) sa elektrofilnim ksenobioticima kada nastaju konjugati koji su manje reaktivni i u vodi rastvorni:



Takođe je značajno delovanje GST na organske hidroperokside (ROOH), gde njihovom redukcijom u prisustvu GSH nastaju odgovarajući alkoholi (ROH), oksidovani glutation (GSSG) i voda:



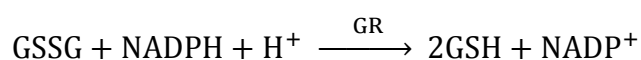
Opisane su tri glavne familije glutation *S*-transferaza:

- Citosolne GST,
- Mitohondrijalne GST,
- Mikrozomalne GST.

Citosolne GST predstavljaju najviše istraženu familiju enzima uključenih u detoksikaciju elektrofilnih ksenobiotika i reaktivnih kiseoničnih vrsta (Dourado i sar., 2008). Sisarske citosolne GST su dimerni proteini molekulske mase oko 50 kDa, svrstani u 7 klasa: Alfa (α), Mu (μ), Pi (π), Sigma (σ), Teta (θ), Omega (ω) i Zeta (ζ). Mitohondrijalne GST (karakteristične samo za sisare) su takođe dimerni proteini, svrstani u Kapa (κ)-klasu, dok su mikrozomalne GST (engl. MAPEG, *membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*) trimerni membranski proteini uključeni u metabolizam ikozanoida i glutationa (Jakobsson i sar., 1999).

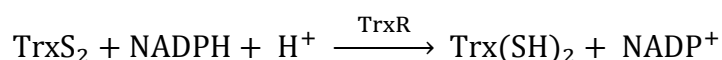
Za insekte je karakteristično da nemaju GST enzime α , μ i π -klase, dok su Delta (δ) i Epsilon (ϵ)-klase identifikovane samo kod insekata (Enayati i sar., 2005). Uporedo sa razlikama u ekologiji i drugim specifičnostima vezanim za različite insekatske vrste, zapažene su i razlike u enzimima GST superfamilije. Uočeno je da medonosne pčele imaju znatno manje članova GST superfamilije (ukupno 10) u poređenju sa vinskom mušicom (*Drosophila melanogaster*) sa ukupno 38 i malaričnim komarcem (*Anopheles gambiae*) sa ukupno 28 članova zastupljenih unutar različitih klasa GST superfamilije (Claudianos i sar., 2006). Takođe, GST enzimi δ i ϵ -klasa, koji su povezani sa otpornošću na insekticide i koji su generalno uključeni u metabolizam ksenobiotika, kod vinske mušice i malaričnog komarca imaju 20 i više članova dok medonosna pčela ima samo jedan član δ -klase i potpuno odsustvo ϵ -klase. Međutim, enzimi σ -klase, za koje se smatra da su veoma značajni u zaštiti biomolekula od oksidativnih oštećenja, su kod medonosne pčele zastupljeni sa četiri člana u poređenju sa jednim članom prisutnim kod vrsta reda Diptera (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006).

Glutation reduktaza (GSH-R ili GR, EC 1.6.4.2) je flavoprotein (sadrži FAD kao prostetičnu grupu) koji katalizuje redukciju disulfidne veze oksidovanog glutationa (GSSG) do GSH uz utrošak NADPH:



Kao deo glutation redoks ciklusa, GR ima značajnu ulogu u uklanjanju ROS, RNS i drugih reaktivnih intermedijera jer regeneriše utrošeni GSH omogućavajući normalno funkcionisanje glutation peroksidaze i glutation *S*-transferaze. Održavanjem visoke koncentracije GSH tj. visokih vrednosti odnosa GSH/GSSH (u sisarskim ćelijama oko 100:1 do 1000:1), enzim GR doprinosi održanju intracelularne redoks homeostaze (Meister, 1988). Enzim je aktivan u raznim tkivima, subćelijski lociran u citosolu i mitohondrijama. U sisarskim ćelijama enzim GR je homodimerni flavoprotein molekulske mase 104 kDa.

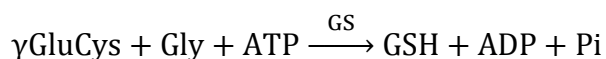
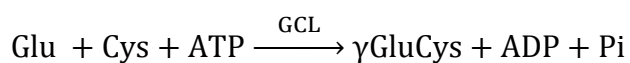
Kod insekata koji nemaju GR, redukcija GSSG se oslanja na tioredoksin redoks sistem koji uključuje tioredoksin, tioredoksin reduktazu i tioredoksin peroksidazu (Kanzok i sar., 2001; Nappi i Christensen, 2005). *Tioredoksin* (Trx(SH)₂/TrxS₂) predstavljaju familiju redoks proteina malih molekulskih masa (~12 kDa), neophodnih za održanje intracelularne redoks homeostaze (Corona i Robinson, 2006). Učestvuju u brojnim ćelijskim procesima, kao što su uklanjanje ROS/RNS, anti-inflamatorni procesi, regulacija ćelijskog signalinga i dr. Kod *Drosophila sp.* i sličnih insekata koji nemaju GR, GSSG se u enzimski nekatalizovanoj reakciji redukuje do GSH, pri čemu je redukujući evivalent Trx(SH)₂ koji se oksiduje do TrxS₂ (Kanzok i sar., 2001). *Tioredoksin reduktaza* (TrxR, EC 1.8.1.9), kao flavoprotein koji katalizuje redukciju tioredoksina (TrxS₂) uz utrošak NADPH, dalje regeneriše redukujuće forme tioredoksina (Trx(SH)₂):



Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite obuhvataju molekule malih molekulskih masa – antioksidante koji uklanjaju ROS/RNS, zaustavljaju lančane reakcije slobodnih radikala i štite makromolekule od oksidativnog oštećenja. Uobičajena je njihova podela prema rastvorljivosti na hidrosolubilne antioksidante (npr. glutation, askorbinska kiselina, mokračna kiselina) i liposolubilne antioksidante (npr. tokoferoli, tokotrienoli, karotenoidi).

Glutation (γ-L-glutamil-L-cisteinilglicin, GSH) je po strukturi tripeptid, molekulske mase 307 Da. Predstavlja glavni hidrosolubilni antioksidant, u visokim koncentracijama prisutan u citosolu, mitohondrijama i ćelijskom jedru. Njegova biosinteza se odvija u citosolu kroz dve uzastopne ATP-zavisne reakcije katalizovane enzimima γ-glutamilcistein ligaza (GCL, poznata i kao γ-glutamilcistein sintetaza) i glutation sintetaza (GS):



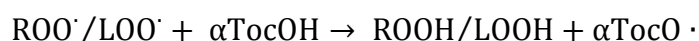
U ćelijama glutation postoji u dva oblika, kao redukovani glutation (GSH) i oksidovani glutation tj. glutation disulfid (GSSG). GSH/GSSG predstavlja glavni redoks par u animalnim ćelijama a njihov odnos je važan parametar redoks statusa organizma.

U svom redukovanom obliku predstavlja glavnu odbranu od ROS/RNS, delujući kao jak redukujući agens, tj. donor H⁺ i e⁻. Međutim, predajući e⁻ postaje veoma reaktivan i brzo reaguje sa drugim molekulom glutationa formirajući glutation-disulfid. Indirektno, GSH se kao kofaktor enzima glutation peroksidaze koristi u uklanjanju vodonik-peroksida i drugih peroksida. Takođe, GSH je kao supstrat značajan i za

aktivnost enzima glutation *S*-transferaze, glavnog detoksikacionog enzima koji katalizuje reakciju konjugacije GSH sa raznovrsnim elektrofilnim jedinjenjima, formirajući manje reaktivne, hidrofilne konjugate i na taj način omogućavajući njihovu ekskreciju. Zatim, GSH je značajan i za regeneraciju drugih antioksidanata – vitamina C i E (Meister, 1994; Li, 2011).

Askorbinska kiselina (askorbat, vitamin C) je hidrosolubilni molekul koji insekti uglavnom mogu sintetisati kao i mnoge animalne vrste izuzev primata, morskog praseta i nekoliko drugih vrsta (Bruno i sar., 2006). Vitamin C ispoljava brojne biološke funkcije u svojstvu antioksidanta, kofaktora enzima, u regulaciji rasta ćelije, signalingu itd. Kao antioksidant, askorbinska kiselina direktno uklanja mnoge reaktivne vrste, kao što su superoksid anjon-radikal, vodonik-peroksid, lipidni, hidroperoksid, hidroksil-radikal, singlet kiseonik (Felton, 1995) i štiti ćelije od oksidativnog oštećenja. Takođe, učestvuje i u reakciji regeneracije vitamina E (α -tokoferola) iz α -tokoferol radikala, pri čemu, kao donor e^- , prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu. Regeneracija askorbinske kiseline se vrši redukcijom dehidroaskorbinske kiseline uz dejstvo glutation-zavisne dehidroaskorbat reduktaze, pri čemu se dva molekula GSH oksiduju do GSSG. Regeneracija antioksidanata je od izuzetnog značaja jer se na taj način malom količinom antioksidantnih jedinjenja mogu ukloniti velike količine reaktivnih vrsta.

Vitamin E čini grupa od osam različitih oblika: α , β , γ i δ -tokoferoli i α , β , γ i δ -tokotrienoli. α -Tokoferol je dominantna forma u humanim tkivima zahvaljujući efikasnoj retenciji od strane jetre i distribuciji do perifernih tkiva, te je stoga ovo najviše izučavana forma ovog vitamina. Kao najznačajnije, izdvajaju se antioksidativna i anti-inflamatorna uloga vitamina E (Glauert, 2007). Smatra se da su α -tokoferol i drugi oblici vitamina E, zbog svoje lipofilne prirode, glavni antioksidanti u zaštiti od lipidne peroksidacije (Traber i Atkinson, 2007). Direktno reaguje sa peroksil-radikalima prekidajući lančanu reakciju lipidne peroksidacije:



Nastaje manje reaktivan α -tokoferol-radikal ($\alpha\text{TocO}\cdot$) koji se uklanja tj. redukuje do α -tokoferola u reakciji sa askorbinskom kiselinom.

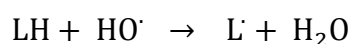
Karotenoidi predstavljaju grupu od oko 600 do sada izolovanih, lipofilnih pigmentnih jedinjenja. Sintetišu se od strane biljaka, a uključeni su u procese fotosinteze i fotoprotekcije tkiva biljaka. Glavni predstavnici karotenoida i najviše zastupljeni u ishrani su β -karoten, α -karoten, likopen, lutein, zeaksantin, β -kriptoksantin i astaksantin. Izdvajaju se po njihovoj antioksidantnoj ulozi, kao prekursori vitamina A (β -karoten, α -karoten i β -kriptoksantin) i anti-inflamatornoj ulozi (Stahl i Sies, 2005). Kao antioksidanti, uklanjaju reaktivne čestice kao što je singlet kiseonik, peroksil-radikal, hidroksil-radikal, superoksid-anjon-radikal i peroksinitrit (El-Agamey i sar., 2004; Stahl i Sies, 2005).

2.2.1.3. Oksidativna oštećenja biomolekula

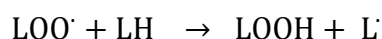
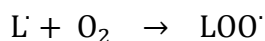
Neuravnoteženost između produkcije ROS/RNS i funkcije antioksidativnog sistema je stanje oksidativnog stresa koji dalje može uzrokovati oštećenja ćelijskih struktura. Oksidativni stres se takođe definiše i kao neuravnoteženost između oksidanata i antioksidanata u korist oksidanata, koja dovodi do poremećaja u redoks-signalingu i molekulskih oštećenja (Sies i Jones, 2007). Pored biohemijskih definicija oksidativnog stresa, uvedena je i biološki orijentisana definicija koja oksidativni stres opisuje kao bilo koju promenu molekulskih komponenata redoks sistema koja ima efekat na Darvinovu fitnes vrednost kao meru uspeha u preživljavanju i ostavljanju potomstva (Costantini, 2019). Oksidativna oštećenja biomolekula, koja nastaju kao posledica oksidativnog stresa, opisuju se kao neenzimske hemijske modifikacije biomolekula (npr. lipida, proteina, nukleinskih kiselina) pod dejstvom reaktivnih čestica kiseonika (Costantini, 2019).

Lipidna peroksidacija predstavlja lančanu radikalsku reakciju koja izaziva oksidativna oštećenja ćelijskih membrana, lipoproteina i drugih molekula i supramolekulskih struktura koje sadrže lipide. Nezasićene masne kiseline fosfolipidâ ćelijskih membrana su zbog svojih dvostrukih veza naročito podložne napadu od strane reaktivnih čestica kiseonika, iako su glikolipidi i holesterol takođe dobro poznate mete za oksidativna oštećenja. Kao rezultat procesa lipidne peroksidacije nastaju oštećenja membrane praćena gubitkom njene selektivne propustljivosti (Halliwell i Gutteridge, 2007; Ayala i sar., 2014).

Proces lipidne peroksidacije se sastoji iz tri faze: inicijacije, propagacije i terminacije. Inicijatori lipidne peroksidacije su najčešće hidroksil-radikal (HO^\cdot) i hidroperoksil-radikal (HOO^\cdot). Inicijacija predstavlja napad reaktivnih čestica kiseonika na atom vodonika i njegovo uklanjanje iz metilen-grupe ($-\text{CH}_2-$) lipida (LH) pri čemu nastaje lipidni radikal (L^\cdot):



Tokom faze propagacije, L^\cdot reaguje sa molekulom kiseonika kada nastaje lipidni peroksil-radikal (LOO^\cdot) koji dalje oduzima vodonik iz drugog lipidnog molekula (npr. nezasićene masne kiseline, LH), stvarajući novi L^\cdot (koji nastavlja lančanu reakciju) i lipidni hidroperoksid (LOOH):



Faza terminacije predstavlja reakciju lipidnog peroksil-radikala (LOO^\cdot) sa antioksidantom, koji predaje atom vodonika, što rezultuje formiranjem neradikalskog produkta. Glavni produkt lipidne peroksidacije je lipidni hidroperoksid, dok su među različitim aldehidima, kao sekundarnim produktima lipidne peroksidacije, najznačajniji malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE). MDA može da reaguje sa DNK i

proteinima te je najznačajniji mutageni produkt, dok je 4-HNE najtoksičniji produkt procesa lipidne peroksidacije (Esterbauer i sar., 1990). MDA, kao jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije, predstavlja značajan biomarker stepena oksidativnog oštećenja u biološkim sistemima (Esterbauer i Cheeseman, 1990).

Proteini su takođe meta napada reaktivnih čestica kiseonika koji uzrokuju fragmentaciju peptidnih lanaca, promene u naelektrisanju proteina, njihovo unakrsno povezivanje, oksidaciju specifičnih aminokiselina, što sve vodi do gubitka funkcije proteina (Kelly i Mudway, 2003). Bočni ostaci aminokiselina proteina, naročito cisteina i metionina, su podložni oksidaciji od strane ROS/RNS (Dean i sar., 1985). Oksidacija sulfhidrilnih grupa ili rezidua metionina unutar proteina izaziva promene u konformaciji proteina i njihovu degradaciju (Dean i sar., 1985; Keck, 1996). Enzimi koji imaju metale u aktivnom centru su naročito osetljivi na metalom katalizovane oksidacije koje izazivaju oksidativne modifikacije enzima i na taj način inhibiraju njihovu aktivnost (Stadtman, 1990). Kao biomarker oksidativnog oštećenja proteina najčešće se prati količina karbonilnih grupa ($-C(=O)-$) koje nastaju na bočnim lancima proteina pri njihovoj oksidaciji (Dalle-Donne i sar., 2003).

Reaktivne čestice kiseonika takođe izazivaju i promene na nivou nukleinskih kiselina na nekoliko različitih načina, najčešće uključujući modifikacije azotnih baza i deoksiriboze, mutacije, jednolančane i dvolančane prekide DNK lanaca i unakrsno povezivanje DNK-DNK ili DNK sa proteinima. Sve to vodi ka disfunkciji ćelije, malignim transformacijama ili ćelijskoj smrti. Kako je navedeno ranije, veoma reaktivni hidroksil-radikal ($OH\cdot$) može izazvati direktna oštećenja DNK molekula, kada u reakciji sa guaninom nastaje 8-hidroksideoksiguanozin (8-OH-G) koji predstavlja glavni biomarker oksidativnog oštećenja DNK (Birben i sar., 2012).

2.2.2. Imunitet i imunokompetencija kod insekata

Tokom evolucije, insekti su razvili kompleksne mehanizme odbrane od parazita i patogena. Fizička barijera je prva linija odbrane kod insekata koja sprečava infekciju unutar tela. Ona uključuje kutikulu egzoskeleta i peritrofnu membranu, izgrađenu od hitina i proteina, koja oblaže deo digestivnog trakta i predstavlja fizičku barijeru između crevnog sadržaja (unete hrane) i epitela srednjeg creva (Lehane, 1997). Druga linija odbrane se odnosi na imunitet insekata, koji je u osnovi veoma sličan urođenom imunitetu kičmenjaka (Hoffmann i sar., 1996), što ukazuje na zajedničko poreklo i konzervaciju komponenti imunog odgovora stotinama miliona godina (Evans i sar., 2006).

U zavisnosti od tipa odbrambenog odgovora organizma, imuni odgovor insekata se može podeliti u dve kategorije: ćelijski i humoralni imunitet (Gillespie i sar., 1997; Lavine i Strand, 2002; Boman, 2003). Karakteriše ih brz odgovor koji traje najduže nekoliko dana bez postojanja specifičnog odgovora tj. mogućnosti „pamćenja“ reakcije

na dati patogen (Hoffmann i sar., 1996). Takođe, česte interakcije ćelijskog i humoralnog imunog odgovora insekata ukazuju na kompleksnost mehanizama odbrane.

Kod socijalnih insekata, kao što je medonosna pčela, dodatno su opisani specifični mehanizmi odbrane koji čine socijalni imunitet, dok se ćelijski i humoralni imunitet grupišu u zajedničku kategoriju koja predstavlja individualni imunitet.

2.2.2.1. Imuni sistem pčela

Imuni sistem medonosne pčele je, kao i kod ostalih insekata, mezodermalnog porekla i čine ga ćelije masnog tela, limfnih žlezda i cirkulišući hemociti. Sposobnost ispoljavanja imunog odgovora, kao reakcije organizma na prisustvo patogena i parazita, naziva se imunokompetencija i može se empirijski kvantifikovati (Wilson-Rich i sar., 2008). Parametri imunokompetencije koji se najčešće koriste u proceni imunog odgovora medonosne pčele su: ukupan broj hemocita, masa masnog tela, sposobnost enkapsulacije stranog tela i aktivnost enzima fenol oksidaze i glukoza oksidaze.

Masno telo je glavni biosintetski organ insekata, funkcionalni analog jetre kičmenjaka, koji se nalazi sa unutrašnje strane kutikule i prostire duž telesnih segmenata. Ćelije masnog tela – adipociti – odgovorne su za sintezu većine hemolimfnih proteina i cirkulišućih metabolita. Takođe sintetišu i antimikrobne peptide uključene u humoralni imuni odgovor insekata, te je kvantifikacija masnog tela indirektni pokazatelj humoralnog imuniteta. Pored biosintetske uloge, masno telo služi kao rezerva glikogena i triglicerida neophodnih za razvoj i reprodukciju (Arrese i Soulages, 2010). Zapaženo je da se masno telo smanjuje sa povećanjem starosti pčela ukazujući na veći potencijal mladih pčela za sintezu antimikrobnih peptida (Brown i sar., 2003; Wilson-Rich i sar., 2008).

Limfne žlezde su parni hemocitopoetski organi insekata smešteni duž prednjeg dela dorzalnog vaskularnog suda, odgovorni za stvaranje hemocita tokom larvenog i adultnog perioda (Jung i sar., 2005).

Hemociti su ćelije telesne tečnosti insekata tj. hemolimfe. To su uglavnom loptasta bezbojna telašca, dimenzija od 2 μm do 30 μm , sa centralno postavljenim jedrom. Lagano se ameboidno kreću i najčešće se nalaze u grupacijama. Opisane su tri grupe po funkciji sličnih hemocita koje zajedno obuhvataju sedam tipova hemocita:

- a) Osnovna ćelija (pre-prohemocit, prohemocit) je prva ćelija u hemocitopoezi, koja je pluripotentna i od koje rastom, diferencijacijom, sazrevanjem i deobom nastaju ostali tipovi hemocita.
- b) Fagocitne ćelije kao što su plazmatociti i granulociti koje vrše fagocitozu raznih stranih tela i time ispoljavaju zaštitnu ulogu. Poseduju heterogene granule i vakuole što ukazuje na njihovu aktivnost tj. sposobnost da vrše inaktivaciju i digestiju stranih agenasa, često patogenih, koji ulaze u organizam preko

digestivnog trakta, disajnim putevima (kroz traheje) ili preko integumenta (Andrić i sar., 2005).

- c) Nefagocitne ćelije kao što su sferulociti, adipociti, enocitoidi i koagulociti, čije uloge su takođe povezane sa odbrambenim mehanizmima insekata. Za adipocite je karakteristično prisustvo većeg broja lipidnih kapljica u citoplazmi, međutim, izdvajanje adipocita kao posebnog tipa hemocita je još uvek diskutabilno. Smatra se da su adipociti samo funkcionalni stadijum granulocita u kojima dolazi do nakupljanja lipidnih kapljica ili je njihova pojava samo posledica prisustva ćelija masnog tela koje su dospеле u hemolimfu (Hillyer i Christensen, 2002). Za enocitoide je karakteristično prisustvo aminokiseline tirozin i komponenti kaskadne reakcije fenoloksidaze što ukazuje na njihovu ulogu u procesu melanizacije (Jiang i sar., 1997).

Ukupan broj hemocita je parametar kojim se procenjuje celularni imunitet pčela. Uočena je pozitivna korelacija između brojnosti hemocita i sposobnosti enkapsulacije, dok je faktor starenja u negativnoj korelaciji sa brojem hemocita (Schmid i sar., 2008; Wilson-Rich i sar., 2008). Generalno, veća brojnost hemocita se povezuje sa kvalitetnijom ishranom pčela i ukazuje na veću otpornost organizma na bolesti. Smatra se takođe da je procena imunokompetencije na osnovu ukupnog broja hemocita veoma varijabilna i da bi za preciznu procenu trebalo odrediti brojnost zasebno za prohemocite, kao imunoneaktivne hemocite, a zasebno za imunoaktivne hemocite kao što su granulociti i plazmatociti (Wilson-Rich i sar., 2008).

2.2.2.2. Individualni imunitet pčela

Individualni imuni odgovor medonosne pčele obuhvata ćelijski i humoralni imunitet gde ključnu ulogu imaju hemolimfne ćelije (hemociti) i masno telo.

Ćelijski odbrambeni mehanizmi obuhvataju procese kao što su fagocitoza, enkapsulacija, nodulacija i hemolimfna koagulacija, gde ključnu ulogu imaju hemociti.

Fagocitoza, kao vrsta endocitoze, je fundamentalni ćelijski mehanizam odbrane kod svih eukariotskih organizama, gde pojedinačne ćelije u svoju unutrašnjost unose čvrsta, potencijalno štetna tela koja nakon toga razlažu. Fagocitoza počinje prepoznavanjem i vezivanjem stranog tela za odgovarajući receptor fagocitne ćelije što je praćeno formiranjem fagozoma tj. obuhvatanjem stranog tela, zatim spajanjem fagozoma sa primarnim lizozomom i nastankom fagolizozoma (Stuart i Ezekowitz, 2005). Fagocitni hemociti insekata mogu vršiti fagocitozu stranih tela manjih razmera kao što su virusi, riketije, bakterije, spore gljiva i protozoe, dok se za veća tela primenjuje enkapsulacija. Pored uklanjanja patogena, fagocitoza je takođe značajna i u uklanjanju apoptotičnih ćelija tokom razvića insekata.

Enkapsulacija se odnosi na obuhvatanje većih stranih tela, kao što su paraziti i nematode gde je neophodno učešće većeg broja hemocita. Proces enkapsulacije počinje

tako što nekoliko granulocita prepoznaje strano telo i veže se za njega formirajući jedan spoljašnji sloj. Tako formirani sloj granulocita dalje aktivira plazmatocite otpuštanjem peptida PSP (engl. *plasmacyte-spreading peptide*) i drugih citokina (Clark i sar., 1998). Zatim, preko sloja granulocita, jedan sloj sačinjen od plazmatocita u potpunosti obavija strano telo. Formiranje kapsule je potpuno kada se formira još jedan sloj granulocita koji je nalik membrani koja osigurava da plazmatociti dalje neće prijanjati (Lavine i Strand, 2001). Pored učesća u formiranju kapsula, aktivirani hemociti učestvuju i u stvaranju melanina, koji se može naći unutar i okolo kapsule, kao i u stvaranju reaktivnih čestica kiseonika kojima se uništava parazit unutar kapsule (Nappi i sar., 1995). Mera enkapsulacije stranog tela ukazuje na sposobnost insekta da neutrališe tj. obuhvati veće strano telo koje ne može razložiti fagocitozom i u pozitivnoj je korelaciji sa otpornošću organizma na patogene i parazite (Doums i Schmid-Hempel, 2000). Utvrđeno je da se sposobnost enkapsulacije medonosne pčele ne menja tokom ontogenije (Wilson-Rich i sar., 2008).

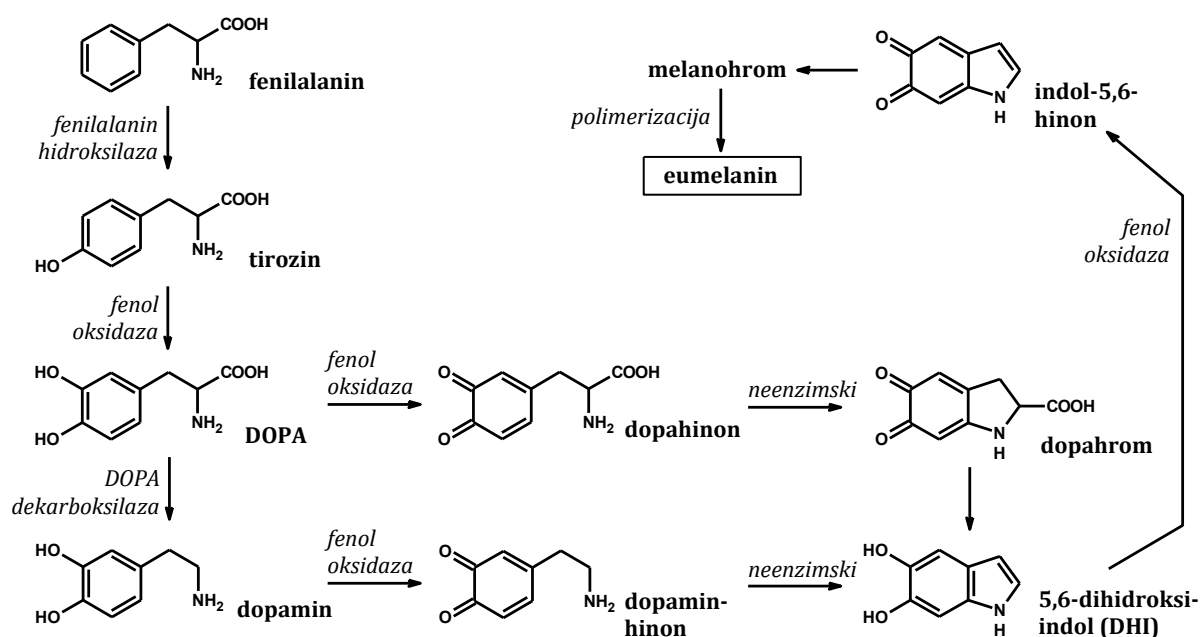
Nodulacija je ćelijski odbrambeni mehanizam sličan enkapsulaciji koji podrazumeva obuhvatanje agregata bakterijskih ćelija od strane većeg broja hemocita. Proces formiranja nodula nije u potpunosti rasvetljen, mada je utvrđeno da su u regulaciji nodulacije uključeni lecitin, eikozanoidi, profenol oksidaza i DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) dekarboksilaza (Sideri i sar., 2008).

Hemolimfna koagulacija je vid odbrambenog mehanizma u slučajevima spoljašnjih povreda i oštećenja gde se na mestu povrede formira koagulum ili ugrušak koji zatvara ranu i sprečava ulazak patogena u telesnu duplju. Hemolimfna koagulacija, zajedno sa enkapsulacijom i nodulacijom, je primer imunog odgovora gde se preklapaju odgovori celularnog i humoralnog imuniteta. Formiranje ugruška se može opisati kroz četiri faze: 1) dezintegracija hemocita (prvenstveno plazmatocita i granulocita) na mestu povrede, koja dovodi do formiranja ekstracelularnog matriksa koji predstavlja primarni, mekani ugrušak koji zatvara ranu, 2) aktivacija kaskadne reakcije enzima fenoloksidaze, zajedno sa dejstvom transglutaminaza, što rezultuje očvršćivanjem ugruška kao posledica melanizacije i umrežavanja proteina, 3) aktivacija plazmatocita pomoću peptida PSP, koji zatim čvrsto prekrivaju ugrušak, i 4) regeneracija epidermisa koji prekriva ranu i konačno zamenjuje očvršli ugrušak (Theopold i sar., 2004).

Humoralni odbrambeni mehanizmi obuhvataju proces melanizacije kao i sintezu antimikrobnih peptida prisutnih u hemolimfi.

Melanizacija, kao ključni proces u imunom odgovoru, uključuje kompleksnu melanogenezu i ciljanu depoziciju melanina na mestu spoljašnje povrede ili infekcije insekta. Kao što je prethodno navedeno, proces enkapsulacije, nodulacije i hemolimfne koagulacije kod insekata često prati melanizacija. Melanini su grupa pigmenata koji su široko rasprostranjeni u prirodi. Biosinteza melanina uključuje niz sukcesivnih oksidativnih polimerizacija fenolnih i indofenolnih molekula, nastalih iz aminokiselinskog prekursora fenilalanina. Kao polazno jedinjenje, fenilalanin

hidroksilacijom uz enzim fenilalanin hidroksilazu daje tirozin. Sledeća dva koraka u melanogenezi su katalizovana fenol oksidazom koja vrši hidroksilaciju tirozina u L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) i dalju oksidaciju L-DOPA u dopahinon. Dopahinon se dalje, preko dopahroma, neenzimski konvertuje u 5,6-dihidroksiindol (DHI). DHI zatim oksidacijom u prisustvu fenol oksidaze daje indol-5,6-hinon. Krajnji korak predstavlja polimerizacija indolhinona dajući eumelanin (Nappi i Christensen, 2005; Santoyo i Córdoba-Aguilar, 2012). Dodatno, DHI može nastati alternativnim putem, dekarboksilacijom DOPA molekula uz dejstvo DOPA dekarboksilaze pri čemu nastaje dopamin koji u prisustvu fenol oksidaze daje dopamin-hinon. Dopamin-hinon dalje spontano, neenzimski daje DHI (Slika 4). Pored eumelanina, koji je najviše zastupljen i koji se još naziva crni melanin, tokom melanogeneze jednim delom nastaje i feomelanin, tzv. crveno/braon melanin. U tom slučaju dopahinon, kao intermedijer melanogeneze, reaguje sa tiolnim jedinjenjima pri čemu nastaju benzotiazini koji se dalje polimerizuju (Napolitano i sar., 2000).



Slika 4. Uloga fenol oksidaze (POx) u sintezi melanina. POx katališe reakciju nastajanja DOPA od tirozina, zatim konvertuje DOPA u dopahinon i 5,6-dihidroksiindol (DHI) u indol-5,6-hinon. Alternativni put za nastajanje DHI iz dopamina je takođe katalisan POx-om. Prerađeno prema Santoyo i Córdoba-Aguilar (2011).

Proces melanizacije se inicira prilikom povrede insekta ili detekcijom prisustva stranog tela putem lipopolisaharida, peptidoglikana, β -glukana i hemolimfnih proteina za njihovo prepoznavanje (engl. β GRP, β -1,3-glucan recognition protein) koji dalje kaskadno pokreću signalne puteve i privlače hemocite. Aktivirani hemociti dalje luče hemoatraktantne proteine kao što je PSP, što privlači plazmatocite (Lavine i Strand, 2002) koji formiraju multićelijski zid oko stranog tela (Wood i sar., 2006). Dalje, usled sinteze i depozicije melanina dolazi do uvećanja i tamnjenja unutrašnjeg sloja

multićelijskog zida od plazmatocita čime je formirana melaninska kapsula. U nekim slučajevima se može uočiti i direktno nakupljanje melanina na stranom telu. Melaninska kapsula sprečava rast i reprodukciju patogena što dovodi do njegovog uginuća (Gillespie i sar., 1997).

Ključni enzim u procesu melanizacije je fenol oksidaza (insekatska tirozinaza, EC 1.14.18.1), solubilni protein koji se kod insekata može naći u hemolimfi i različitim tipovima hemocita (Castillo i sar., 2006; Williams, 2007). Fenol oksidaza vrši oksidaciju derivata tirozina do toksičnih hinona koji dalje polimerizuju obrazujući melanin koji takođe ispoljava antimikrobno dejstvo. Enzim se sintetise u zimogenoj formi kao proenzim profenol oksidaza, koja se aktivira ograničenom proteolizom od strane serinskih proteaza. Do aktivacije proteaza dolazi tokom infekcije, povreda ili dejstva raznovrsnih hemijskih agenasa (Ashida i Brey, 1997; Cerenius i Soderhall, 2004). Karakterizacijom kaskadne reakcije fenol oksidaze, utvrđeno je da neaktivni proenzim profenol oksidaza stvara kompleks sa profenol oksidaza-aktivirajućim proteinazama (PAP), homolozima serinskih proteinaza i imunolektinima koji imaju ulogu receptora u molekulskom prepoznavanju stranog tela za enkapsulaciju (Yu i Kanost, 2004), čime se objašnjava mehanizam selektivnog nakupljanja melanina oko stranih tela tokom imunog odgovora.

Praćenje aktivnosti fenol oksidaze, ključnog enzima u imunom odgovoru beskičmenjaka, ukazuje na nivo otpornosti na viruse (Wilson i sar., 2001), bakterije (Ashida i Brey, 1997), gljive (Ochiai i Ashida, 1988) i parazite (Siva-Jothy, 2000). Takođe je utvrđeno da se tokom ontogenije pčela aktivnost fenol oksidaze povećava, tj. da pčele izletnice imaju veću aktivnost fenol oksidaze u odnosu na mlade kućne pčele (Lourenço i sar., 2005; Schmid i sar., 2008; Wilson-Rich et al., 2008). Stoga, povećani gubici pčela izletnica, koji su karakteristični za stanje kolapsa kolonija pčela, utiču na smanjenje otpornosti na bolesti na nivou celokupne kolonije pčela.

Sinteza antimikrobnih peptida (AMP) kao dela humoralnog imuniteta obuhvata sekreciju vodorastvornih peptida sa antimikrobnim delovanjem u otvoren cirkulatorni sistem insekata. Glavno mesto sinteze antimikrobnih peptida je masno telo (Søndergard, 1993; Vilmos i Kurucz, 1998), iako je utvrđeno da ih hemociti (Boman, 1991), epitel kutikule (Brey i sar., 1993), intestinum (Daffre i sar., 1994), pljuvačne žlezde (Kylsten i sar., 1992) i reproduktivni sistem (Samakovlis i sar., 1991) takođe mogu stvarati. Kao odgovor na infekciju, insekti sintetise set AMP-a koji deluju u sinergiji, vezujući se za različite komponente ćelijskog zida bakterija koje zatim uništavaju (Lemaitre i Hoffmann, 2007). Antimikrobni peptidi insekata se grupišu u nekoliko klasa po strukturnim sličnostima i načinu delovanja na patogen: atacini, lizozimi, cekropini, defenzini, antimikropni peptidi bogati prolinom i dipterici. Svoje dejstvo najčešće ispoljavaju inhibicijom sinteze membranskih proteina neophodnih u procesu ćelijske deobe bakterija, hidrolizom glikozidnih veza peptidoglikana u ćelijskom zidu bakterija, interakcijom sa lipidima membrana formirajući membranske kanale i izazivajući lizu ćelije i dr. (Carlsson i sar., 1991; Hara i Yamakawa, 1995; Rosetto i sar., 1996). AMP

opisani kod medonosnih pčela su antimikrobni peptidi bogati prolinom, kao što su apidecin (Casteels i sar., 1989), abecin (Casteels i sar., 1990), zatim himenoptecin (Casteels i sar., 1993) i defensin (Casteels-Jonsson i sar., 1994).

2.2.2.3. Socijalni imunitet pčela

Prva analiza gena uključenih u imuni odgovor medonosne pčele je omogućena sekvenciranjem genoma medonosne pčele (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). To je ujedno druga po redu (posle humanog genoma) mogućnost da se uvidom na nivou gena bolje razume otpornost na bolesti kod socijalnih bića. Poređenjem genoma medonosne pčele sa prethodno sekvenciranim genomima vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) i malaričnog komarca (*Anopheles gambiae*) uočeno je da medonosna pčela ima samo 1/3 od svih gena iz 17 genskih familija (71 gen kod medonosne pčele, 196 gena kod vinske mušice i 209 gena kod komarca) uključenih u imuni odgovor insekata (Evans i sar., 2006). „Razređeniji“ repertoar gena za imunitet se uočava na svim stupnjevima odbrambenog odgovora, od prepoznavanja patogena do ispoljavanja kranjeg imunog odgovora (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). Stoga, medonosna pčela poseduje smanjenu varijabilnost gena za enzim profenol oksidazu, tj. ima samo jedan gen za profenol oksidazu u poređenju sa *D. melanogaster* koja ima tri gena i *A. gambiae* koji ima čak devet gena koji kodiraju navedeni enzim (Evans i sar., 2006). Zatim, iako medonosna pčela u potpunosti poseduje sva četiri puta imunog odgovora (Toll, Imd, JAK/STAT i JNK), uočeno je da su ovi putevi manje fleksibilni u ispoljavanju imunog odgovora u odnosu na druge insekte. Kao primer navedenog je činjenica da medonosna pčela u poređenju sa vrstama *D. melanogaster*, *A. gambiae* i *Tribolium castaneum* (mali brašnar) ima samo polovinu od ukupnih proteina odgovornih za prepoznavanje peptidoglikana (Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). Nakon provere nekoliko hipoteza, najverovatnije objašnjenje manjeg broja gena uključenih u imuni odgovor je postojanje socijalnog imuniteta tj. antiseptičnog ponašanja kao svojevrsne barijere kojom se uspešno redukovao broj patogena i parazita koji izazivaju bolesti u pčelinjim zajednicama (Evans i sar., 2006).

Socijalni imunitet insekata se odnosi na grupni imunitet tj. odbrambene mehanizme koji su se razvili kod insekata koji žive u organizovanim zajednicama. U poređenju sa solitarnim načinom života, život u zajednici ima mnoge prednosti. Saradnja individua i sinhronizovano delovanje u zajednici olakšava naseljavanje određenog staništa, održavanje legla, potragu za hranom i odbranu od predatora. Međutim, život u zajednici ima i nedostatke kao npr. brže širenje zaraze među članovima grupe koji su gusto naseljeni i time u stalnom kontaktu (Godfrey i sar., 2005). Takođe, razlog epidemija u zajednici je i činjenica da su članovi grupe u bliskom srodstvu te i jednako osetljivi na potencijalne infekcije.

Stoga su socijalni insekti tokom evolucije uspešno razvili specifične adaptacije u borbi protiv patogena i parazita i tako stekli socijalni imunitet koji na nivou grupe povećava otpornost na bolesti (Cremer i sar., 2007). Socijalni imunitet podrazumeva

skup specifičnih oblika ponašanja kojima se održava higijena legla kao i celokupne zajednice. Antiseptično ponašanje, kao opšte prihvaćen naziv koji opisuje odbrambeno ponašanje socijalnih insekata, obuhvata higijensko ponašanje, voljno izazivanje groznice, zatim međusobno čišćenje tj. uklanjanje stranih tela i patogena sa površine tela (engl. *grooming*), uklanjanje uginulih adultnih jedinki iz zajednice (engl. *undertaking*), upotrebu biljnih smola i dr. (Wilson-Rich i sar., 2009).

Higijensko ponašanje medonosne pčele je antiseptično ponašanje koje se opisuje kao sposobnost adultnih jedinki da detektuju i uklone zaražene jedinke iz legla. Prvi put je opisano 1937. godine u nastojanju naučnika da objasne zašto su pojedine pčelinje zajednice otporne na visokozaraznu bolest pčela, američku trulež pčelinjeg legla, izazvanu bakterijom *Paenibacillus larvae* (Park, 1937; Park i sar., 1937). Park i saradnici su ustanovili da medonosna pčela uklanja i izbacuje zaražene larve ubrzo nakon njihovog uginuća. Njihova zapažanja su potvrđena od strane Woodrow i Holst (1942) koji su naveli da otpornost medonosne pčele na bolest američku trulež leži u njenoj sposobnosti da detektuje i ukloni zaražene jedinke pre nego što izazivač bolesti dostigne infektivni stadijum spore u zaraženoj pčelinjoj larvi. Stoga je rano uklanjanje zaraženih larvi ključno u sprečavanju širenja navedene bolesti.

Pored doprinosa otpornosti pčelinje zajednice na bakteriju *Paenibacillus larvae*, higijensko ponašanje medonosne pčele se takođe pokazalo kao uspešan odbrambeni mehanizam i protiv parazitskog krpelja *Varroa destructor*. Medonosna pčela *Apis cerana* (Peng i sar., 1987) i pojedine rase *Apis mellifera* su sposobne da detektuju i uklone lutke iz legla na kojima parazitira ovaj krpelj (Boecking i Spivak, 1999; Mondragon i sar., 2005). Proces uklanjanja krpelja remeti njegov reproduktivni ciklus smanjujući populaciju *Varroa destructor* unutar pčelinje zajednice (Spivak i Reuter, 1998; Spivak i Reuter, 2001).

Na osnovu dosadašnjih studija higijenskog ponašanja, može se zaključiti da su sve radilice medonosne pčele u adultnom periodu, starosti od 15 do 20 dana, sposobne da otvore zaražene ćelije saća i uklone zaraženo leglo (Arathi i sar., 2000). Razlika na nivou gena koja postoji između kolonija ukazuje samo na razliku u vremenu koje je potrebno da pčela radilica detektuje prisustvo zaraženog legla, tj. pčele radilice sa niskim pragom detekcije će brže reagovati na zaraženo leglo i ukloniti zaražene larve pre nego što postanu infektivne. Pčele radilice sa slabijom olfaktornom osetljivošću detektuju i uklanjaju zaražene larve koje su već u infektivnom stadijumu ili uginule što vodi širenju zaraze unutar zajednice. Takođe je zapaženo da pčele sa slabijom detekcijom zaraženog legla zatvaraju već otvorene ćelije zaraženog legla umesto da ih uklone. Spivak i saradnici (2003) su ispitali hipotezu da je povećana olfaktorna osetljivost pčela verovatno povezana sa različitim nivoom ekspresije određenih biogenih amina u mozgu pčela. S obzirom da je dokazano da neuromodulator oktopamin ima ključnu ulogu u odgovoru pčela izazvanom olfaktornim stimulusom (Hammer, 1993; Hammer & Menzel, 1995), ispitivanja su obuhvatila dve grupe pčela, jednu sa brzim i drugu sa kasnijom detekcijom zaraženog legla tj. grupu sa brzim i grupu sa sporim higijenskim ponašanjem,

gde se pratila razlika u intenzitetu boje oktopamin-imunoreaktivnih neurona u deutocerebralnom regionu mozga pčela. Uočeno je da pčele sa brzim higijenskim ponašanjem imaju intenzivnije obojene oktopamin-imunoreaktivne neurone, ukazujući da oktopamin ima ulogu u modulaciji ponašanja. Takođe je praćena reakcija nakon oralnog usvajanja oktopamina i njegovog antagoniste epinastina. Ustanovljeno je da oktopamin povećava olfaktornu osetljivost medonosne pčele sa sporim higijenskim ponašanjem kao i da nema efekta na pčele sa brzim higijenskim ponašanjem, dok je epinastin smanjio osetljivost pčela sa brzim higijenskim ponašanjem ali nije imao efekta na pčele sa sporim higijenskim ponašanjem. Uzimajući u obzir dobijene rezultate poređenja navedenih grupa medonosne pčele, zaključeno je da postoji razlika u distribuciji i odgovoru njihovih receptora za oktopamin, što je u saglasnosti sa njihovim prethodnim anatomskim i elektrofiziološkim istraživanjima (Spivak i sar., 2003). Dalja istraživanja razlika u higijenskom ponašanju, kao i istraživanja na polju neuromodulacije olfaktorne osetljivosti, doprineće boljem razumevanju i ciljanom uzgajanju pčelinjih kolonija sa brzim higijenskim odgovorom (Wilson-Rich i sar., 2009).

Voljno izazivanje groznice ili kontrolisano zagrevanje tela (engl. *behavioral fever*) je specifičan oblik ponašanja kojim poikilotermni organizmi povećavaju temperaturu tela kao odgovor na prisustvo patogena. Tokom ovog procesa, temperatura tela se povećava preko optimalnog temperaturnog opsega za dati patogen i time se smanjuje obim zaraze. Ovaj oblik ponašanja je uočen kako kod organizama sa solitarnim načinom života tako i kod socijalnih organizama kao što je medonosna pčela. Kod medonosne pčele, voljno izazivanje groznice je zapaženo kod adultnih jedinki koje se nalaze na leglu zaraženom gljivom *Ascosphaera apis* koja izaziva bolest krećnog legla (Starks i sar., 2000). Spore gljive *A. apis*, unete u košnicu preko pčela izletnica, svoj razvoj mogu nastaviti u crevima pčelinjih larvi kada temperatura unutar pčelinje zajednice opadne ispod 32°C na period duži od dva časa (Bailey i Ball, 1991).

Termoregulacija je široko zastupljena kod medonosne pčele budući da je leglo izrazito osetljivo na moguće temperaturne promene unutar košnice. Utvrđeno je da je optimalna temperatura legla od 32 °C do 36 °C (Heinrich, 1980; Heinrich, 1985; Seeley, 1985; Winston, 1987; Bujok i sar., 2002) i da odstupanje od optimalnog temperaturnog opsega može izazvati nepravilnosti u razvoju, bolest kao i uginuće (Fukuda i Sakagami, 1968; Winston, 1987; Bailey i Ball, 1991; Bujok i sar., 2002; Jones i sar., 2005). Održavanje optimalne temperature zahteva utrošak energije i usklađenost pokreta pčela radilica. Hlađenje pčelinjih košnica se postiže pokretima krila a ponekad je udruženo sa raspršivanjem vode koja hladi košnicu isparavanjem, dok se zagrevanje košnice postiže izometrijskim kontrakcijama grudnih mišića (Heinrich, 1980; Heinrich, 1985). Takođe je moguće i lokalno zagrevanje određene ćelije legla kada pojedinačne pčele kontrakcijama zagrevaju grudne mišiće a zatim prijanjaju uz odabranu ćeliju (Bujok i sar., 2002; Kleinhenz i sar., 2003).

Jedan od mehanizama socijalnog imuniteta medonosne pčele jeste sakupljanje i korišćenje smole, složene biljne izlučevine sa raznovrsnim antimikrobnim svojstvima.

Pčele sakupljaju smolu sa drveća različitih biljnih vrsta, dodaju joj sekrete pljuvačnih žlezda i koriste kao propolis (od latinske reči *pro* – ispred i *polis* – grad). Propolisom oblažu unutrašnjost košnice što predstavlja dodatnu zaštitu od patogena (Bankova i sar., 2000; Bastos i sar., 2008). Sakupljanje antimikrobnih sastojaka iz prirodnog okruženja i njihovo ugrađivanje u gnezdo kao propolis veoma je zanimljiv ali i relativno neistražen socijalni mehanizam odbrane pčela od patogena. Pčelinje zajednice nastanjene u divljini, u šupljini drveta, oblažu unutrašnje zidove staništa tankim slojem propolisa debljine 0,3–0,5 mm, formirajući na taj način propolisni omotač. Kako se zajednica razvija, pčele neprekidno dodaju propolis na zidove gnezda, s tim što se prvo obezbeđuju mesta na kojima će započeti izgradnja saća. Pored toga, pčele propolis koriste za zatvaranje šupljina i naprslina košnice, kao i za sužavanje ulaza u košnicu. Propolis je prva brana od štenih uticaja i naglih promena, svojim antimikrobnim svojstvima doprinosi održavanju homeostaze pčelinjeg gnezda, sprečava nekontrolisani protok vazduha i prodiranje vode i vlage u gnezdo i štiti pčelinju zajednicu od uljeza.

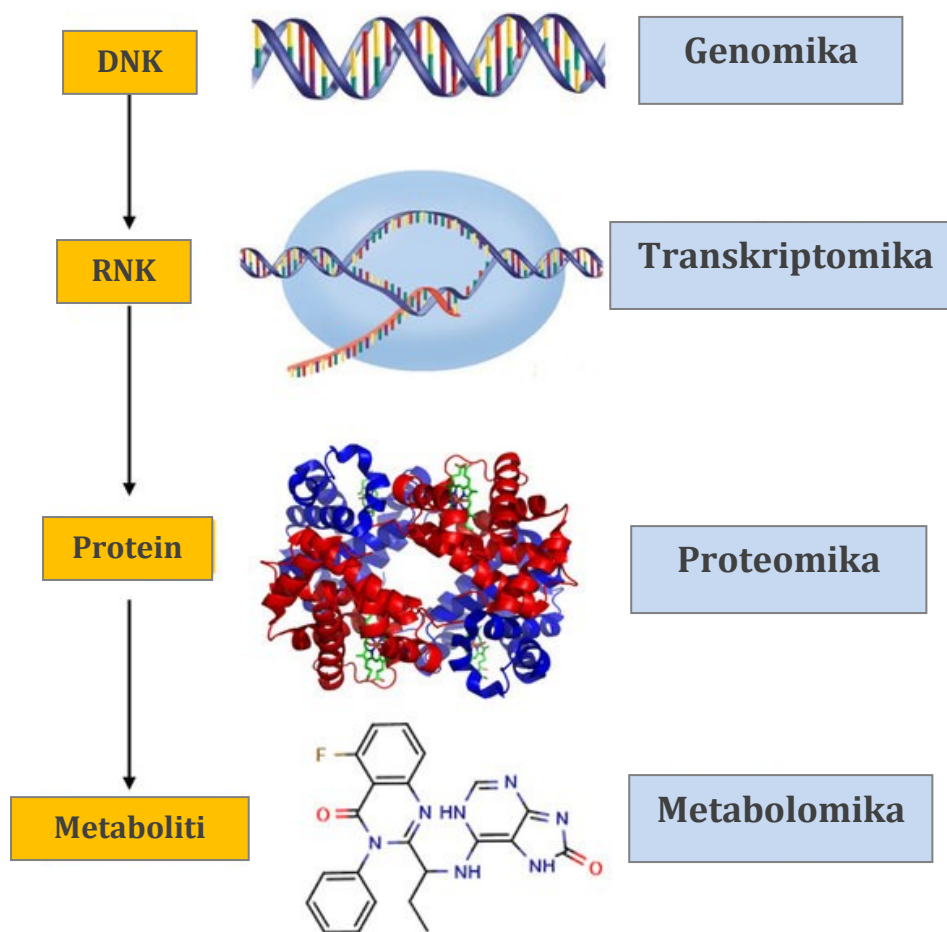
Prirodni pčelinji proizvodi kao što su med i perga se štite od bakterijske razgradnje tj. konzerviraju dejstvom enzima glukoza oksidaze kao i fizičkim karakteristikama proizvoda – niskim aktivitetom vode (Alaux i sar., 2010). Enzim glukoza oksidaza, čija se glavna ekspresija odigrava u hipofaringealnim žlezdama medonosne pčele (Ohashi i sar., 1999), prisutan je u medu (Schepartz i Subers, 1964; Ohashi i sar., 1999) i matičnoj mleči (Sano i sar., 2004; Furusawa i sar., 2008) i ispoljava antibakterijsko i antimikotično dejstvo (Wong i sar., 2008). Glukoza oksidaza katalizuje oksidaciju glukoze do glukonolaktona i vodonik-peroksida, a glukonolakton dalje u prisustvu vode spontano prelazi u glukonsku kiselinu (Takahashi i Mitsumoto, 1963). Oba produkta reakcije, glukonska kiselina i vodonik-peroksid, unutar kolonije održavaju antiseptičnu sredinu koja doprinosi prevenciji zaraze na nivou grupe (Alaux i sar., 2010). Utvrđeno je da je nivo vodonik-peroksida u medu u pozitivnoj korelaciji sa inhibicijom razvoja patogena (Taormina i sar., 2001; Brudzynski, 2006), kao i da aktivnost glukoza oksidaze veoma varira među analiziranim uzorcima meda. Ni botaničko poreklo nektara, niti geografsko poreklo meda ne utiču na nivo aktivnosti enzima u medu, ukazujući na značaj genetičkih ili epigenetičkih faktora i ishrane pčela (Bucekova i sar., 2014). Od strane Alaux i sar. (2010) je utvrđeno da kvalitetna ishrana medonosne pčele znatno utiče na aktivnost enzima, tj. da polifloralna ishrana povećava aktivnost glukoza oksidaze time obezbeđujući bolju antiseptičnu zaštitu unutar košnice tj. veću odbrambenu moć pčelinje zajednice.

Pored navedenog, adaptacije na specifične uslove života u pčelinjoj zajednici takođe obuhvataju i izgradnju saća za leglo od antimikrobnih materijala (Christe i sar., 2003), razviće mladih u zasebnim ćelijama legla, ishrana koja ima antimikrobno dejstvo kao što je matična mleč (Albert i Kludiny, 2004) i drugo.

2.2.3. Metabolomika

Metabolomika predstavlja sveobuhvatnu identifikaciju i kvantifikaciju metabolita u biološkom sistemu. Metaboliti su mali molekuli ($M_w < 1000$ Da, Villas-Bôas i sar., 2004), kao što su aminokiseline, mono- i oligosaharidi, metabolički intermedijeri, hormoni i drugi signalni molekuli, sekundarni metaboliti itd. Skup svih metabolita jednog biološkog sistema tj. uzorka ćelija, tkiva, organa ili celog organizma se naziva metabolom (Dettmer i sar., 2007).

Metabolomika može da obuhvati analizu celokupnog metaboloma ili odabranih klasa metabolita biološkog sistema u određenom vremenu. Izraz metabolomika je pandan genomici, transkriptomici i proteomici (Slika 5). Zajedno ove četiri „omike“ izgrađuju sistemsku biologiju. Metabolomika kroz analizu metabolita otkriva korelacije između metaboloma i fenotipskog stanja te sve više privlači interesovanje naučnika za primenu unutar prirodnih nauka (Snart i sar., 2015). Jedan od izazova sistemske biologije je integracija transkriptomskih, proteomskih i metabolomskih informacija živih sistema.



Slika 5. Šematski prikaz kaskade „omike“ koja čini sistemsku biologiju.

Pored izraza metabolomika, u stručnoj literaturi se koristi i izraz metabonomika. Iako postoje razlike, često se koriste kao sinonimi. Metabonomika je grana metabolomike koja proučava promene metaboloma tokom vremena, kao posledica patoloških procesa, dejstva ksenobiotika, genskih razlika i sl.

Metabolom se može proučavati u vidu analize metaboličkog profila (engl. *metabolic profiling*) ili analize metaboličkog otiska (engl. *metabolic fingerprinting*) (Dettmer i Hammock, 2004). Analiza metaboličkog profila se fokusira na određivanje grupe metabolita koji pripadaju određenoj klasi jedinjenja ili zajedničkom metaboličkom putu. Kvantitativna analiza masnih kiselina ili analiza aminokiselina su primeri analize metaboličkog profila. Još direktniji pristup je analiza ciljanih jedinjenja (engl. *target analysis*) sa ciljem kvantifikacije određenih analita, kao što su biomarkeri bolesti ili supstrati i produkti određenih enzimskih reakcija (Fiehn, 2002). Olakšavajuća okolnost u analizi metaboličkih profila, kao ciljanoj analizi, jeste upotreba standardnih rastvora u kvali- i kvantitativnoj analizi ciljanih jedinjenja, što obezbeđuje dodatnu potvrdu identiteta i omogućava egzaktnu kvantifikaciju. Takođe, brojne metode za kvantitativnu analizu metaboličkih profila su razvijene i rutinski se koriste. Međutim, delimična analiza metaboloma je upravo nedostatak analize metaboličkog profila kao metabolomičkog pristupa jer ne ispunjava suštinski zahtev omike a to je sveukupnost analize. Ipak, ukoliko se podaci dobijeni analizama metaboličkih profila dalje koriste za formiranje baza podataka, koji se mogu povezati sa mapama metaboličkih puteva ili bazama podataka drugih omika, to svakako značajno doprinosi razumevanju bioloških procesa.

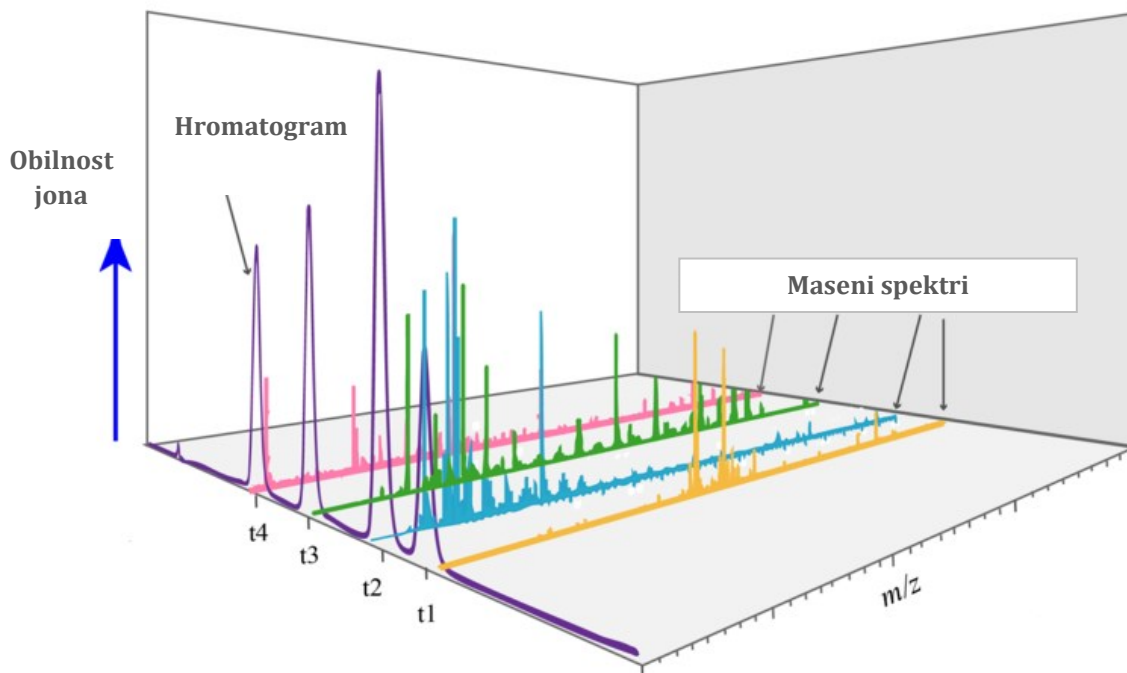
Analiza metaboličkog otiska se inicijalno ne zasniva na identifikaciji svakog detektovanog metabolita već na upoređivanju specifičnih obrazaca (engl. *patterns*) ili otisaka metabolita koji se menjaju kao odgovor na promenjene uslove životne sredine, izlaganje toksinima, na patološka stanja i sl. Stoga se analiza metaboličkog otiska koristi kao tehnika u medicinskoj dijagnostici za identifikaciju patoloških procesa kod pacijenata poređenjem različitih uzoraka tj. metaboličkih otisaka. Međutim, upotreba metabolomičke analize isključivo za dobijanje metaboličkog otiska, bez identifikacije metabolita i daljeg grupisanja eksperimentalnih grupa, ne doprinosi dubljem razumevanju biohemijskih procesa, niti otkrivanju mehanizama koji su uzroci promena. Identifikacija metabolita uz određivanje njihovih koncentracija, kao deskriptora razlika između specifičnih fenotipova, daje informacije koje se mogu interpretirati u svetlu odgovarajućih metaboličkih procesa. Stoga, metabolomička analiza u punom smislu bi obuhvatala analizu metaboličkog otiska uz dodatnu identifikaciju i kvantifikaciju detektovanih metabolita, čime se povezuju oba pristupa metabolomičke analize.

Tok metabolomičke analize obuhvata nekoliko faza, od početnog uzorkovanja do krajnje statističke obrade i vizuelizacije dobijenih rezultata. Nakon pravilnog uzorkovanja koji je u skladu sa eksperimentalnim dizajnom, sledi korak pripreme uzoraka za analizu. Priprema uzoraka zavisi od metaboličkog pristupa, tj. da li se analizira metabolički profil ili metabolički otisak. Kod analize metaboličkog profila,

priprema uzoraka obuhvata ekstrakciju i prečišćavanje prilagođeno određenoj klasi jedinjenja tj. željenoj grupi metabolita koje želimo da detektujemo. Kod analize metaboličkog otiska priprema uzoraka bi trebala biti minimalna, jer se tokom svake pripreme uzoraka deo analita izgubi, i univerzalna za različite klase jedinjenja jer je cilj da se u okviru jedne analize detektuje što veći broj raznovrsnih metabolita.

Nakon pripreme uzoraka sledi analiza koja uglavnom uključuje tehnike razdvajanja metabolita i njihovu detekciju. Kao tehnike za razdvajanje smeše metabolita najčešće se primenjuju gasna ili tečna hromatografija i kapilarna elektroforeza, koje su dalje kuplovane sa masenospektrometrijskom detekcijom. Dve osnovne metode detekcije u metabolomičkim istraživanjima su nuklearno magnetno rezonantna spektroskopija (NMR spektroskopija) i masena spektrometrija (MS) (Snart i sar., 2015). Visoka selektivnost masenog spektrometra u kombinaciji sa niskim granicama detekcije, kao i kompatibilnost sa tehnikama razdvajanja, čini masenu spektrometriju idealnom tehnikom za metabolomičke analize (Dettmer i sar., 2007). Kombinacija gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) se često koristi u metaboličkim analizama i pruža najbolju hromatografsku separaciju metabolita, jednostavnu identifikaciju specifičnih analita, kao i kvantifikaciju metabolita. Glavni preduslov za GC-MS analizu je dovoljna isparljivost i termalna stabilnost analita. Analiti sa aktivnim vodonocima u svojim funkcionalnim grupama, kao što su $-COOH$, $-OH$, $-NH-$ i $-SH$, zahtevaju hemijsku derivatizaciju (alkilovanje, acilovanje, sililovanje) kojom se smanjuje polaritet i povećava isparljivost i termalna stabilnost (Dettmer i sar., 2007). Zatim, karbonilne grupe ($C=O$) se često primenom hidrosilamina ili alkoksiamina transformišu u odgovarajuće supstituisane oksime. Korak derivatizacije, iako neophodan, dalje otežava identifikaciju jer se dobijaju izmenjeni maseni spektri detektovanih metabolita, komplikuje pripremu uzorka, zahteva izlaganje toksičnim hemikalijama, a unosi i grešku.

Sledeći korak metabolomičke analize je ekstrakcija podataka iz fajlova dobijenih sa analitičke platforme (fajlovi sirovih podataka, engl. *raw data files*). U slučaju GC-MS, nakon hromatografske separacije i MS jonizacije, fragmentacije, razdvajanja i detekcije, fajlovi sirovih podataka sadrže informacije u vidu trodimenzionalnog prikaza koji obuhvata hromatografska retencionna vremena, fizičke karakteristike molekula (maseni spektri) i obilnosti (kvantitativna karakteristika) (Slika 6). Ekstrakcija podataka podrazumeva pripremnu obradu podataka (engl. *data preprocessing*) kada se vrši otklanjanje šuma, korekcija bazne linije, poravnavanje pikova (engl. *peak alignment*), dekonvolucija signala (hromatografskih pikova i masenih spektara) i dr. uz upotrebu odgovarajućih softvera (XCMS – Smith i sar., 2006; MZmine – Katajamaa i sar., 2006; MetAlign – Lommen, 2009; AMDIS – Meyer i sar., 2010).



Slika 6. Trodimenzionalni prikaz hromatografsko-spektrometrijske analize (t_1 , t_2 , t_3 i t_4 predstavljaju retenciona vremena jedinjenja) kuplovane sa masenom spektrometrijom (m/z predstavlja odnos relativne mase i broja šarži jona).

Prilikom obrade, svakom hromatografskom piknu se dodeljuje vrednost njegovog retencionog vremena, spektar (u vidu serije m/z vrednosti i obilnosti) i naziv jedinjenja, ukoliko je izvršena identifikacija. Za identifikaciju jedinjenja se koriste dostupne biblioteke spektara (najveće su Wiley Registry of Mass Spectral Data i NIST Mass Spectral Library), uz napomenu da je za potvrdu poželjno imati odgovarajuće standarde jedinjenja, analizirane pod istim uslovima kao i uzorak. U gasnoj hromatografiji se, umesto retencionih vremena, kao normirani retencioni parametri mogu koristiti i Kovačevi ili linearni (aritmetički) retencioni indeksi, koji povezuju retenciona vremena jedinjenja sa odgovarajućim vrednostima za homologu seriju n -alkana koji se uzimaju kao standardi.

Tako dobijeni podaci prolaze još jedan korak obrade (engl. *post-processing*) koji prethodi statističkoj analizi i obuhvata filtriranje podataka (na osnovu postojanja graničnih vrednosti), popunjavanje polja nedostajućih vrednosti (engl. *“fill in” missing values*), normalizaciju (na osnovu mase uzoraka, integraljenjem i sl.), centriranje (engl. *mean centering*), skaliranje i transformaciju podataka (Spicer i sar., 2017).

Krajnji korak metabolomičke analize predstavlja statističku analizu i vizuelizaciju dobijenih podataka. Postoji više statističkih pristupa koje se primenjuju u metaboličkim istraživanjima ali najčešće korišćene metode su analiza glavnih komponenti (PCA) i diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS-DA) kada se projekcijom eksperimentalnih podataka u dve ili tri dimenzije (engl. *scores plot*) objašnjava

maksimalna varijansa (PCA) ili kovarijansa (PLS-DA) podataka. Takođe, za vizuelizaciju kompleksnih metabolomičkih podataka, često se koristi grafički prikaz u vidu korelacione toplotne mape (engl. *heat map*) gde su pojedinačne vrednosti smeštene u matricu prikazanu u vidu boja. Toplotnim mapama se istovremeno prikazuju promene u koncentracijama metabolita unutar različitih uzoraka i eksperimentalnih grupa, kao i njihovo grupisanje na osnovu sličnosti i razlika. Ukoliko je izvršena identifikacija metabolita, rezultati se mogu povezati sa odgovarajućim metaboličkim putevima, tj. metaboliti se mogu mapirati pomoću KEGG baze podataka (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, Okuda i sar., 2008) što omogućava bolju interpretaciju rezultata.

2.2.3.1. Entometabolomika

Prva metabolomička istraživanja u okviru entomologije su zabeležena 1990. godine (Thompson i sar., 1990) kroz evaluaciju efekata parazitizma na metabolizam moljca *Manduca sexta*. Pored brojnih entomoloških studija u oblasti genomike, transkriptomike i proteomike, entometabolomičke studije su i dalje oskudne. Svrha entometabolomike je bolje razumevanje ponašanja i fiziologije insekata na biohemijskom nivou a dosadašnje studije ukazuju na veliki potencijal ove grane metabolomike (Coquin i sar., 2008; Kamleh i sar., 2008; Aliferis i sar., 2012). Značajan doprinos entometabolomičkih studija se ogleda kroz napredak u razumevanju ponašanja insekata (Lenz i sar., 2001), mehanizama infekcija (Chambers i sar., 2012), odgovora na temperaturni stres (Malmendal i sar., 2006; Li i sar., 2010), mehanizama sedacije CO₂ (Colinet i Renault, 2012), simbiotskih odnosa bakterija i insekata (Wang i sar., 2010), dejstva pesticida (Derecka i sar., 2013) i dr. Iako je tokom poslednje decenije zapažen porast u broju entometabolomičkih studija, ukupan broj publikacija je i dalje relativno nizak (<50) (Snart i sar., 2015).

Pregledom metabolomičkih istraživanja medonosne pčele, u fokusu je razumevanje fizioloških procesa kroz kompleksne interakcije pčela sa dominantim patogenima i pesticidima. Metabolomičkom analizom hemolimfe medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) uočeno je da infekcija mikrosporidijom *Nosema ceranae* remeti mehanizme koji kontrolišu mobilizaciju energetske rezerve (Aliferis i sar., 2012). Kod inficiranih jedinki je zapažen pad nivoa hemolimfnih ugljenih hidrata (izuzev glukoze), šećernih alkohola i aminokiselina. Kod istočne medonosne pčele (*Apis cerana* F.) infestacija krpeljom *Varroa destructor* izaziva promene metaboličkog profila mozga pčela, sa akcentom na metabolizam linolenske kiseline, propanoata, glicina, serina i treonina, time pružajući uvid u mehanizme odbrane od široko rasprostranjenog parazita (Wu i sar., 2017). U metabolomičkoj studiji o uticaju tiakloprida na medonosnu pčelu (*Apis mellifera* L.) zapažene su značajne promene kod 115 metabolita pčela tretiranih pesticidom (Shi i sar., 2018). Upotrebom KEGG baze podataka mapirano je ukupno 48 metabolita koji su uključeni u 19 metaboličkih puteva i povezani uglavnom sa oksidativnim stresom i procesima detoksikacije, što ukazuje na aktivaciju odbrambenih sistema. Takođe, kod

pčela tretiranih pesticidom je zapažen pad u nivou serotonina, što ukazuje na ulogu tiakloprida u moždanim aktivnostima vezanim za učenje i ponašanje.

2.3. Značaj istraživanja medonosne pčele

2.3.1. Ugroženost i zaštita vrste

Promene uslova životne sredine, kao posledica antropogenog uticaja, su dovele do pojave brojnih ugrožavajućih faktora sa kojima se pčele susreću. Stresogeni faktori se uglavnom odnose na gubitak i fragmentaciju staništa (Donaldson i sar., 2001; Ricketts, 2004; Foley i sar., 2005), intenziviranje poljoprivredne proizvodnje koja uključuje povećanu upotrebu agrohemikalija, bolesti, parazite, klimatske promene i dr. (Parmesan i sar., 1999; Kremen i Ricketts, 2000; Kevan, 2001; Gonzáles-Varo i sar., 2013). To je doprinelo pojavi globalnog problema opadanja brojnosti pčela, kako divljih tako i gajenih. U periodu od 1985. do 2005. godine u Evropi je ustanovljen pad brojnosti kolonija medonosnih pčela za 16 %, sa najvećim zabeleženim gubicima u zemljama centralne Evrope, gde je u istom periodu nestalo čak 25 % kolonija medonosnih pčela (Potts i sar., 2010). Uočeno je takođe da su najveći gubici tokom zimskog perioda mirovanja medonosne pčele (Genersch i sar., 2010) kada je u košnici dugoživeća zimska generacija koja je znatno osetljivija od letnjih generacija medonosne pčele (Steinmann i sar., 2015; Kojić i sar., 2019). Deo gubitaka medonosnih pčela se pripisuje i kolapsu kolonija (engl. *colony collapse disorder*, CCD) koji je u porastu od 2006. godine najpre na američkom kontinentu (Natural Research Council, 2006; vanEngelsdorp i sar., 2008) a zatim i u Evropi (Potts i sar., 2010). Kolaps kolonija pčela predstavlja naglo nestajanje čitavih pčelinjih kolonija, pri čemu nema uginulih pčela u košnici, niti tragova parazita, dok u košnici ostaje uskladištena hrana (vanEngelsdorp i sar., 2009). I pored opsežnih studija, kolaps kolonija nije objašnjen prisustvom specifičnog patogena, niti trovanjem pčela (Cox-Foster i sar., 2007; Stokstad, 2007; Anderson i East, 2008), te tačan uzrok ovog fenomena još uvek nije poznat. Smatra se da je upravo slabljenje imunog odgovora medonosne pčele, kao posledica dejstva jednog ili više udruženih stresogenih faktora, mogući razlog gubitaka pčelinjih zajednica (Biesmeijer i sar., 2006; Pernal, 2008; vanEngelsdorp i sar., 2008). Takođe se smatra da izlaganje pesticidima iz klase neonikotinoida značajno doprinosi kolapsu kolonija smanjujući nivo imunog odgovora pčela (Johnson i sar., 2010; Di Prisco i sar., 2013; Johnson, 2015), što je dovelo do zabrane njihove upotrebe (European Commission, 2013). Veliki pritisak na preživljavanje medonosne pčele dodatno predstavlja česta zaraženost parazitima kao što su krpelj *Varroa*, koji se hrani hemolimfom i masnim telom pčela, kao i mikrosporidija *Nosema*, koja napada ćelije srednjeg creva i dovodi do poremećaja u varenju. Oba parazita dovode do slabljenja imunog sistema i skraćuju život zaražene jedinice (Le Conte i sar., 2010; Dussaubat i sar., 2012; Ramsey i sar., 2019). Pored parazitâ, do danas su opisana i 23 virusa medonosne pčele i smatra se da oni imaju veliku ulogu u kolapsu kolonija (Gisder i Genersch, 2015).

Novija studija od strane Moritz i Erler (2016) navodi da pad broja kolonija medonosne pčele ima regionalni karakter i ukazuje na značaj globalne trgovine medom kao dominantnim faktorom koji utiče na broj gajenih pčelinjih kolonija. Zaključci su izvedeni nakon analize FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) baze podataka o ukupnom broju kolonija medonosnih pčela u približno 100 država u periodu od 1961. do 2013. godine i ukupnoj količini proizvedenog meda i njegovom uvozu i izvozu. Prema podacima FAO baze, alarmantan linearni pad broja pčelinjih kolonija u proteklih 50 godina je zapažen u Sjedinjenim Američkim Državama, Nemačkoj, Austriji i Švajcarskoj (Moritz i Erler, 2016). Uzimajući u obzir i gubitak populacija divljih pčela polinatora (Fürst i sar., 2014), naglašava se potreba za rešenjem problema nedovoljnih resursa za esencijalan proces polinacije biljaka (Aizen i Harder, 2009; Breeze i sar., 2014).

Sa zajedničkim ciljem zaštite pčela, formiraju se inicijative od strane relevantnih regulatornih tela koji pozivaju na dodatna istraživanja medonosne pčele. Međunarodna unija za zaštitu prirode, preko Crvene liste ugroženih vrsta (IUCN Red List of Threatened Species™), predstavlja najrelevantiji izvor podataka u pogledu ugroženosti vrsta. Sa ciljem procene ugroženosti pčela i njihove zaštite, 2014. godine je objavila Crvenu listu za pčele Evrope (Nieto i sar., 2014, European Red List of bees), koja pored spiska vrsta sa kategorijama ugroženosti daje i informacije o ugrožavajućim faktorima sa kojima se suočavaju vrste, o njihovim ekološkim potrebama, staništima i o merama zaštite koje je potrebno preduzeti u cilju smanjenja ili sprečavanja stepena izumiranja. Ustanovljeno je da su zaštita regiona, kultivacija cvetajućih useva i agro-ekološke mere zapravo tri strategije koje imaju pozitivan efekat na održivost pčela kao oprašivača. U okviru Crvene liste za pčele Evrope, medonosna pčela je svrstana u kategoriju „DD“ (engl. *Data Deficient*) tj. bez dovoljno podataka što naglašava potrebu za dodatnim istraživanjima kolonija medonosne pčele. Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA, 2014) takođe ističe značaj procene uticaja zagađenja životne sredine na zdravlje pčela, što uključuje monitoring kolonija, laboratorijske i terenske testove. Preporučuje se rad na identifikaciji stresogenih faktora za pčele, kao i procena efekata letalnih i subletalnih dozâ različitih zagađujućih materija na pčele (EFSA, 2015). Zatim, evropska komisija (European Commission, EC) je 2017. godine pokrenula prvu EU inicijativu o polinatorima, kojom ukazuje na probleme pada broja polinatora i moguća rešenja, navodeći kao prioritetno: unapređenje dosadašnjeg saznanja o polinatorima, rešavanje uzroka pada broja polinatora i povećanje društvene svesnosti o problemu uz promovisanje saradnje (Underwood i sar., 2017).

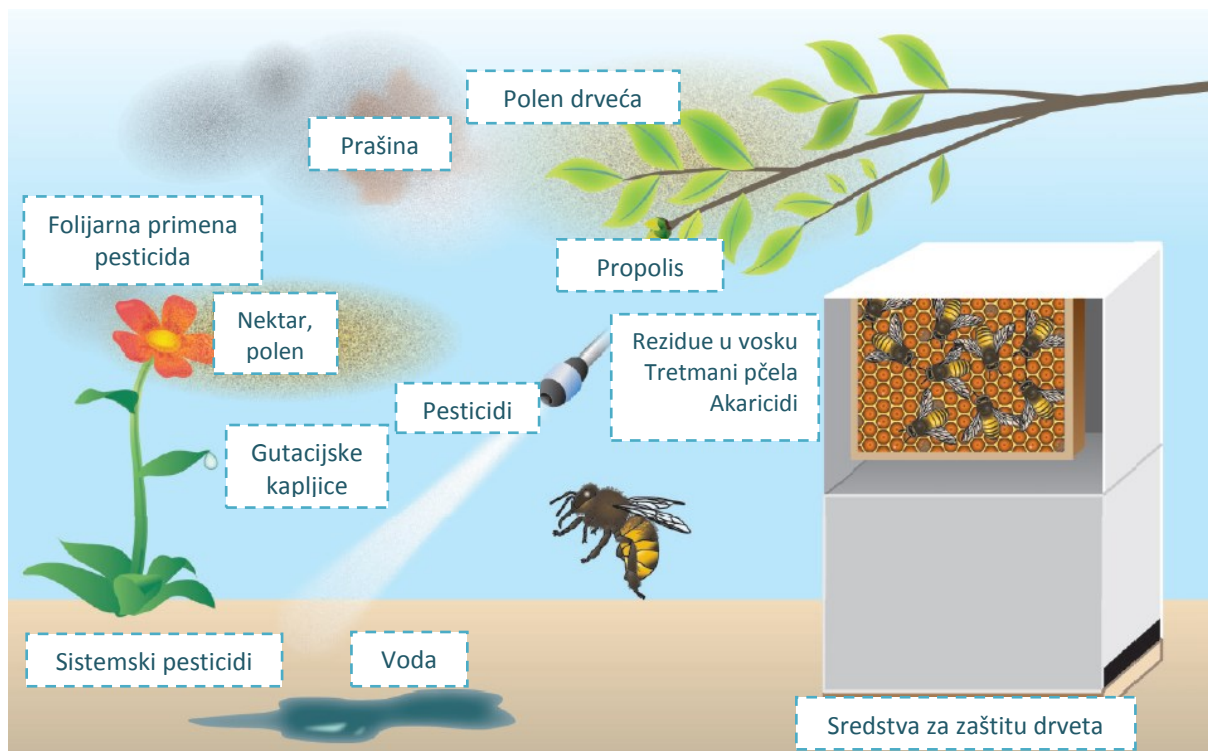
Uzimajući u obzir ulogu medonosne pčele u ekosistemima, prvenstveno u oprašivanju cvetova mnogih negajenih biljnih vrsta, a zatim i njihov privredni značaj kako u oprašivanju poljoprivrednih useva tako i zbog brojnih pčelinjih produkata, ističe se značaj očuvanja ove vrste pčela. Dobro poznavanje biologije vrste kao i mehanizama kojima se objašnjava interakcija vrste sa životnom sredinom je neophodno za uspešno praćenje stanja populacija medonosne pčele i sprovođenje adekvatnih mera zaštite. Stoga je rad u okviru ove doktorske disertacije usmeren na razumevanje mehanizama

biohemijskih i fizioloških odgovora medonosne pčele na različite antropogene uticaje u životnoj sredini.

2.3.2. Medonosne pčele kao bioindikatori

Bioindikacija je jedna od starijih i često korišćenih metoda za procenu stanja životne sredine (Liu i sar., 2009). Bioindikator predstavlja organizam, deo organizma ili zajednicu organizama koji sadrže informacije o kvalitetu životne sredine u kome se nalaze, a na osnovu čijeg prisustva ili odsustva je moguće detektovati promene i stanje kvaliteta životne sredine, kao i proceniti antropogeno dejstvo (Markert, 1994). Razlikujemo dva tipa biomonitoringa tj. dva tipa bioindikatora: pasivne i aktivne. Pasivni biomonitoring podrazumeva upotrebu pasivnih bioindikatora, odnosno organizama, njihovih delova ili zajednice organizama koji su prirodno prisutni na određenom području koje istražujemo. Oni su deo ekosistema koji nas interesuje. Aktivni biomonitoring koristi aktivne bioindikatore, odnosno organizme koji nisu deo prirodnog ekosistema, već su uneti u taj ekosistem isključivo radi njihove upotrebe kao bioindikatora (Wittig, 1993).

Insekti oprašivači se često koriste kao bioindikatori u proceni stepena zagađenosti životne sredine. Smatraju se pouzdanim bioindikatorima pošto su osetljivi na hemijsko zagađenje ali i zbog svojih morfoloških karakteristika (lako zadržavanje suspendovanih čestica iz okruženja na površini tela) kao i načina života, tj. ekologije vrsta oprašivača. Medonosna pčela je jedan od najčešće izučavanih bioindikatora iz grupe oprašivača (Ghini i sar., 2004). Prva ideja o korišćenju medonosnih pčela u biomonitoringu se javlja još 1935. godine (Crane, 1984), dok je 1962. godine predstavljena kao koristan bioindikator radionuklida u životnoj sredini (Svoboda, 1962). Od tada, medonosna pčela se sve više koristi u biomonitoringu neorganskih i organskih zagađujućih materija (Porrini i sar., 1998; Porrini i sar., 2002; Ghini i sar., 2004; Ruiz i sar., 2013; Steen i sar., 2016; Zarić i sar., 2016). Brojni su razlozi koji izdvajaju medonosnu pčelu kao izvrsnog bioindikatora. Vrsta ima širok areal rasprostranjenja pri tome pokrivajući raznovrsna staništa, zatim socijalna organizacija u pčelinjoj koloniji obezbeđuje veliku brojnost jedinki koje tokom svojih dnevnih aktivnosti prikupljanja hrane i vode pokrivaju teritoriju i do 7 km² (Crane, 1984; Perugini i sar., 2011). Tokom ishrane, medonosna pčela je potencijalno izložena brojnim zagađujućim jedinjenjima koja se nalaze u biljkama, a samim tim i u zemljištu iz kojeg se biljke hrane (Slika 7). Zatim, telo pčela je u vidu gustog pokrivača prekriveno dlakama tj. čekinjama egzokutikularnog sastava za koje se pilepljuje polen, što pčeli prvenstveno omogućava ulogu polinatora a takođe, tako se zadržavaju različite čestice nastale atmosferskom depozicijom. Na taj način, svojim uobičajenim aktivnostima pčele sporedno obavljaju i ulogu bioindikatora u biotopu koji naseljavaju, a daljom analizom pčela dobijamo informaciju o stanju kako medonosnih pčela tako i celokupnog ekosistema (Steen i sar., 2016).



Slika 7. Izloženost medonosne pčele potencijalnim toksičnim supstancama preko biljaka, vode, vazduha, zemljišta i tretmana unutar košnice. Prerađeno prema Johnson (2015).

Treba još naglasiti da se pčele mogu koristiti kao bioindikatori i kao biomonitori. U svojstvu bioindikatora njihovo prisustvo, odnosno odsustvo sa određenog područja može ukazivati na prisustvo neke vrste zagađujuće materije. Analizom pčela kao indikatora dolazimo do kvantitativnih podataka o zagađenju životne sredine i tada se pčele smatraju biomonitorima. Termini biomonitor i bioindikator se često koriste kao sinonimi, iako biomonitor je uvek i bioindikator ali bioindikator ne mora uvek biti i biomonitor (Markert i sar., 1999; Celli i Maccagnani, 2003; Parmar i sar., 2016; Zarić, 2017). Zatim, pored medonosnih pčela, u proceni stepena zagađenosti životne sredine uspešno se koriste i pčelinji proizvodi kao što su med, perga, polen, propolis i vosak, koji takođe predstavljaju reprezentativne bioindikatore okruženja (Smith i Wilcox, 1990; Conti i Botrè, 2001; Lambert i sar., 2012; Bargańska i sar., 2015; Nikolić, 2017).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su imala za cilj da se kroz praćenje niza biohemijskih i fizioloških parametara kod medonosne pčele isprati biološki odgovor pčela na različite faktore sredine i da se proceni stanje pčelinjih zajednica tokom letnjeg i zimskog perioda na više različitih lokaliteta tj. staništa sa različitim antropogenim uticajem. Cilj je bio da se kroz procenu nivoa antioksidativne zaštite, oksidativnog stresa, imunokompetencije, narušenosti neurotransmisije, izloženosti pčela pesticidima i teškim metalima, kao i analizom odabranih primarnih biomolekula, kod zimskih i letnjih generacija medonosne pčele sa različitih lokaliteta, uoče specifični odgovori koji bi se mogli povezati sa postojanjem potencijalno ugrožavajućih faktora sredine.

U skladu sa prethodnim, postavljeni su ciljevi čija je realizacija planirana u tri faze.

- U prvoj fazi istraživanja uraditi akutne laboratorijske testove izlaganja pčela subletalnim dozama pesticida da bi se ispratio biološki odgovor pčela na izolovani stres izazvan pesticidima, a sa ciljem utvrđivanja seta parametara koji bi bili adekvatni kao markeri za praćenje biohemijskog odgovora medonosne pčele na prisustvo pesticida.
- U drugoj fazi istraživanja analizirati kolonije medonosne pčele i utvrditi botaničko poreklo meda sa različitih lokaliteta, sa primenom stacionarnog i migratornog tipa pčelarenja, tokom letnjeg i zimskog perioda, a sa ciljem procene eventualnih razlika u biohemijskom odgovoru medonosne pčele u zavisnosti od starosti pčela, sezone godine i tipa pčelinjaka.
- Analiza biohemijskih i fizioloških parametara medonosne pčele kao i analiza pčelinje hrane iz stacionarnih pčelinjih zajednica, tokom letnjeg i zimskog perioda, sa tri lokaliteta u Republici Srbiji sa različitim stepenom urbanizacije i industrijalizacije, kao treća faza istraživanja. Odabir uzoraka medonosne pčele za treću fazu istraživanja, kao i izbor parametara za analizu, zasnivao se na rezultatima prethodne dve faze ispitivanja. Cilj ove faze istraživanja je uvid u biohemijski i fiziološki status pčelinjih zajednica i uočavanje eventualnih promena u vezi sa prisutnim stresom iz okruženja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Postavka eksperimenta i formiranje uzoraka

4.1.1. Laboratorijski akutni testovi toksičnosti pesticida

Za laboratorijske akutne testove korišćene su pčele radilice uzorkovane tokom letnjeg perioda iz ogledne košnice smeštene na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu (45°14'42.3"N 19°51'15.4"E). Da bi se smanjio uticaj biološkog variranja uzorka, koristile su se pčele poreklom od iste matice i približno iste starosti. Pre uzimanja uzoraka, pregledom kolonije u košnici je ustanovljeno da je pčelinja kolonija jaka, bez vidljivih znakova bolesti. Neposredno pre uzorkovanja, pčele su bile izložene dimu dva puta po 30–60 s. Zatim su starije pčele radilice sa ivičnih ramova, sakupljene u plastične tegle i prenesene u laboratoriju.

U laboratoriji su pčele anestetizirane ugljen-dioksidom (ne duže od 3 min), zatim je po 30 pčela preneseno u staklene tegle pokrivene najlonskom mrežom. Za potrebe laboratorijskih akutnih oralnih testova, postavljena su po tri biološka ponavljanja za svaku grupu (kontrolne grupe pčela i grupe koje su putem hrane izlagane subletalnim dozama pesticida).

Kontrolna grupa pčela je hranjena 1 mol/L rastvorom saharoze, dok su grupe koje su izlagane subletalnim dozama pesticida hranjene 1 mol/L rastvorom saharoze koji je sadržao određene koncentracije tiakloprida (T) i klotianidina (K). Srednja letalna doza (LD₅₀) određena oralnim testom za medonosnu pčelu za tiaklopid je 17,94 µg po pčeli a za klotianidin je 3,68 ng po pčeli (US EPA, OPP Pesticide Ecotoxicity Database). Kako bismo ispitali subletalne efekte ova dva pesticida, napravljeni su 1 mol/L rastvori saharoze, u zapremini od 4 mL po tegli, koji su sadržali pesticide u koncentracijama koje su 5, 20 i 50 puta manje od LD₅₀, tako da je svaki pesticid testiran u tri koncentracije (T5, T20, T50 i C5, C20, C50). Hrana tj. odgovarajući rastvori saharoze su dati pomoću plastičnih posudica sa malim otvorima na poklopcu koje su obrnuto okrenute i postavljene na najlonsku mrežu na tegli.

Eksperiment se odvijao 48 h u kontrolisanim uslovima (25 °C, 65 % relativna vlažnost vazduha, u mraku). Nakon 48 h je zabeleženo uginuće pčela i izmerena količina hrane koju su pčele pojele. Zatim je iz svake grupe pčela (kontrolne grupe i grupa koje su izlagane pesticidima) uzeto po deset preživelih pčela iz kojih je izolovana hemolimfa. Uzorci hemolimfe su trenutno zamrznuti pomoću suvog leda i čuvani na –70 °C do daljih analiza. Ostatak preživelih pčela je sakupljen u plastične epruvete, trenutno zamrznut pomoću suvog leda i čuvan na –20 °C do daljih analiza.

4.1.2. Sakupljanje uzoraka medonosne pčele radi ispitivanja uticaja starosti pčela, sezone i tipa pčelinjaka

Sa ciljem ispitivanja uticaja različitih faktora, kao što su starost pčela, sezona godine i tip pčelinjaka, na parametre stanja medonosne pčele, koristile su se pčele radilice

različite starosti, uzorkovane tokom letnjeg (jul/avgust) i zimskog perioda (februar/mart) 2013/14. godine, iz košnica sa tri lokaliteta u AP Vojvodini (46°05'35.0"–44°55'35.2"N, 19°10'40.7"–20°39'34.5"E): stacionarnog pčelinjaka smeštenog u Petrovaradinu (P1) i iz košnica sa migratornih pčelinjaka u Beočinu (P2) i Ravnom Selu (P3). Da bi se smanjio uticaj genetske varijabilnosti, košnice iz kojih su uzimani uzorci bile su obeležene, tako da se u svakom pčelinjaku uzorkovalo iz istih košnica, za oba perioda.

Svakom uzorkovanju je prethodio pregled pčelinje kolonije da bi se utvrdilo da je kolonija jaka i bez vidljivih simptoma bolesti. Neposredno pre uzorkovanja, pčele su bile izložene dimu dva puta po 30–60 s. Zatim su starije pčele radilice, koje aktivno učestvuju u sakupljanju nektara i polena i u kontaktu su sa sredinom van košnice, uzorkovane sa ivičnih ramova pozicioniranih dalje od pčelinjeg legla. Mlade pčele radilice (negovateljice) uzorkovane su sa ramova sa pčelinjim leglom. Tokom svakog pojedinačnog uzorkovanja je sakupljeno oko 500 pčela po lokalitetu (oko 100 pčela po košnici iz ukupno pet košnica) za svaki period. Uzorci pčela, sakupljeni u plastične tegle, trenutno su zamrznuti i transportovani na suvom ledu do laboratorije gde su dalje čuvani na –20 °C do daljih analiza. Takođe, tokom letnjeg perioda iz košnica sa sva tri lokaliteta, uzeti su uzorci pčelinje hrane tj. meda, za melisopalinološku analizu. Uzorci meda u saću su sakupljeni u plastične tegle i čuvani na sobnoj temperaturi do analize (Tabela 5).

Tabela 5. Oznake pčelinjaka i uzoraka pčela (mlade i starije pčele) i pčelinje hrane (med u saću) sa izvedenim analizama radi ispitivanja uticaja različitih faktora.

Oznaka pčelinjaka	Opis pčelinjaka	Uzorkovanje	Uzorci → Analize
P1	Petrovaradin (stacionarni pčelinjak)	Leto	Mlade pčele → SOD, CAT, GST Starije pčele → SOD, CAT, GST, MDA, AChE Med → Melisopalinološka analiza
		Zima	Starije pčele → SOD, CAT, GST, MDA, AChE
P2	Beočin (migratorni pčelinjak)	Leto	Starije pčele → SOD, CAT, GST, MDA, AChE Med → Melisopalinološka analiza
		Zima	Starije pčele → SOD, CAT, GST, MDA, AChE
P3	Ravno Selo (migratorni pčelinjak)	Leto	Mlade pčele → SOD, CAT, GST Starije pčele → SOD, CAT, GST, MDA, AChE Med → Melisopalinološka analiza
		Zima	Starije pčele → SOD, CAT, GST, MDA, AChE

4.1.3. Sakupljanje uzoraka medonosne pčele i pčelinje hrane radi ispitivanja stanja medonosne pčele pod uticajem sezone i faktora sredine sa različitim antropogenim uticajem

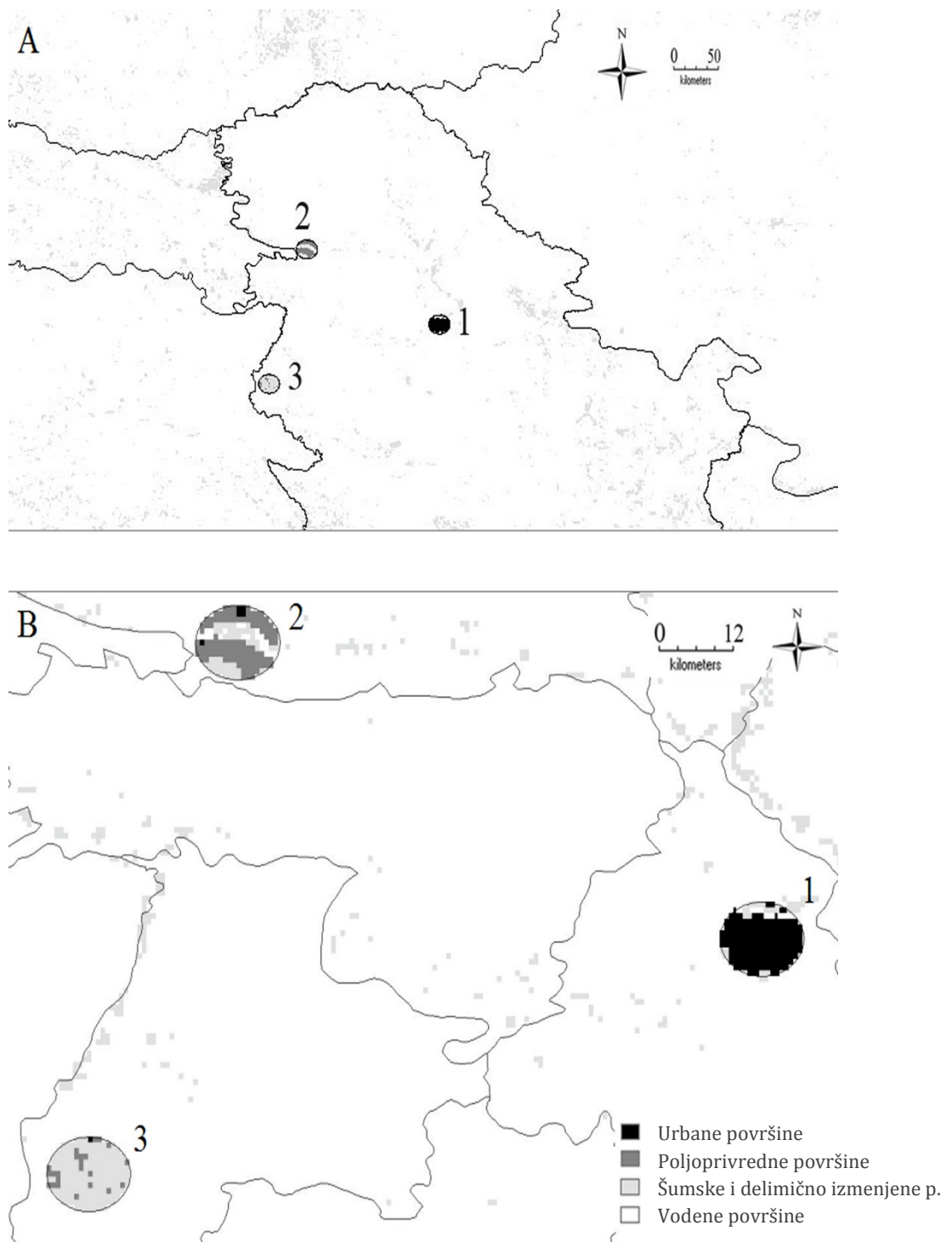
Za ispitivanja biohemijskih i fizioloških parametara stanja medonosne pčele koristile su se starije pčele radilice, uzorkovane 2013/14. godine tokom letnjeg (jul/avgust) kao i početkom (novembar/decembar) i krajem (februar/mart) zimskog perioda.

Izabrani su stacionarni pčelinjaci smešteni na tri lokaliteta u Republici Srbiji, koji obuhvataju područja sa različitim antropogenim uticajem: grad Beograd, selo Susek i industrijsko naselje Zajača (Tabela 6, Slika 8). Numerička distribucija pokrivenosti terena izračunata je pomoću ArcGIS 10.1 programa na osnovu Corine Land Cover (CLC2012) seta podataka i prikazana za površinu od 6 km u poluprečniku, jer je to prosečna udaljenost koju pčele prelete pri sakupljanju nektara i polena (Beekman i Ratnieks, 2000).

Beograd predstavlja urbanu sredinu koju karakterišu velika gustina naseljenosti i intenzivan saobraćaj. Pčelinjak iz koga su sakupljeni uzorci se nalazio na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u blizini dva velika bulevara (44°47'N 20°27'E). Prema CLC2012 setu podataka, u poluprečniku od 6 km oko pčelinjaka, 86,56 % površine je klasifikovano kao urbano područje, 8,60 % kao šumska i delimično izmenjena prirodna struktura (engl. *semi natural*) i 4,84 % su vodene površine.

Susek, selo na obroncima Fruške gore, predstavlja ruralnu sredinu koju karakterišu mala gustina naseljenosti i poljoprivreda kao glavna delatnost stanovnika. Pčelinjak iz koga su sakupljeni uzorci se nalazio na izlazu sela, okružen obradivim zemljištem (45°13'N 19°30'E). U poluprečniku od 6 km u odnosu na položaj košnica nema urbanih naselja prema CLC2012 setu podataka. 60,21 % površine oko pčelinjaka, za koju je pretpostavljeno da pčele posećuju, klasifikovano je kao poljoprivredno zemljište, zatim 25,27 % čini šumska i delimično izmenjena prirodna struktura i 11,83 % zauzimaju vodene površine.

Zajača, kao industrijsko naselje u Zapadnoj Srbiji u kome je smeštena kompanija „Rudnik i topionice Zajača“, čija je osnovna delatnost dobijanje olova iz sekundarnih sirovina, je odabrana kao industrijska sredina. Pčelinjak iz koga su sakupljeni uzorci (44°27'N 19°14'E) se nalazio na udaljenosti od 300 m od industrijskog postrojenja. Samo 0,54 % površine u poluprečniku od 6 km je klasifikovano kao urbano područje prema CLC2012 setu podataka. 87,09 % površine čini šumska i delimično izmenjena prirodna struktura i 12,37 % je klasifikovano kao poljoprivredna površina.



Slika 8. Mapa lokaliteta sa prikazanim izgledom terena na osnovu CLC2012 seta podataka i površinom koju pčele prelete tokom sakupljanja polena i nektara (poluprečnik od 6 km) A-sitna mapa, B-detajlna mapa (1 – Beograd, 2 – Susek i 3 – Zajača).

Na svakom lokalitetu tj. pčelinjaku je obeleženo pet košnica iz kojih su uzimani uzorci. Da bi se isključio uticaj bolesti pčela na merene parametre, pre svakog uzorkovanja je izvršen pregled pčelinje kolonije da bi se utvrdilo da je kolonija jaka i bez vidljivih simptoma bolesti. Neposredno pre uzorkovanja, pčele su bile izložene dimu dva puta po 30–60 s. Zatim su starije pčele radilice uzorkovane sa ivičnih ramova koji su

pozicionirani dalje od pčelinjeg legla. Tokom svakog pojedinačnog uzorkovanja po lokalitetu, za svaki period, sakupljeno je oko 1000 pčela (oko 200 pčela po košnici iz ukupno pet košnica). Radi sakupljanja uzoraka hemolimfe iz pčela, deo pčela je odmah nakon uzorkovanja izdvojen i hemolimfa je izolovana na terenu. Uzorci hemolimfe su trenutno zamrznuti pomoću suvog leda i čuvani na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljih analiza. Takođe, iz košnica su uzeti uzorci pčelinje hrane, meda i perge, za analizu sadržaja teških metala. Uzorci pčela, sakupljeni u plastične tegle, su trenutno zamrznuti i transportovani na suvom ledu do laboratorije gde su dalje čuvani na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljih analiza. Uzorci meda i perge su sakupljeni u plastične tegle i čuvani na sobnoj temperaturi do daljih analiza.

Tabela 6. Oznake uzoraka pčela i pčelinje hrane sa izvedenim analizama radi ispitivanja uticaja sezone i faktora sredine sa različitim antropogenim uticajem.

Period uzorkovanja	PPM			KPM			AP		
	Početak perioda mirovanja			Kraj perioda mirovanja			Aktivni period		
Lokalitet pčelinjaka	BG	SU	ZA	BG	SU	ZA	BG	SU	ZA
	Beograd	Susek	Zajača	Beograd	Susek	Zajača	Beograd	Susek	Zajača
Uzorci	Pčele Hemolimfa Perga			Pčele Hemolimfa			Pčele Hemolimfa Med		
Analize									
Pčele			Hemolimfa			Med i perga			
Relativna ekspresija seta gena uključenih u antioksidativnu zaštitu			Aktivnost AChE			Sadržaj metala			
Aktivnost AChE			Aktivnost SOD, CAT, GST						
Aktivnost SOD, CAT, GST			Aktivnost POx, proPOx, GOx						
Sadržaj MDA			Metabolomička analiza						
Aktivnost POx, proPOx, GOx									
Prisustvo parazita <i>Nosema</i> , <i>Varroa</i>									
Sadržaj metala									
Analiza lipida masnog tela									
Analiza ugljovodonika									

4.2. Laboratorijske analize

4.2.1. Određivanje relativne genske ekspresije

4.2.1.1. Izolacija ukupne RNK i sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Ukupna RNK je izolovana iz abdomena pčela radilica upotrebom reagensa TRIreagent (Sigma-Aldrich) prema protokolu za *Apis mellifera* (Evans i sar., 2013). Zatim je izolovana RNK rastvorena u 100 µL vode oslobođene od DNaza i RNaza (Sigma-Aldrich). Za svaku eksperimentalnu grupu formirana su po tri biološka ponavljanja, a svako biološko ponavljanje je činilo 5 abdomena pčela radilica.

Koncentracija i čistoća RNK su izmerene spektrofotometrijski pomoću uređaja BioSpec-nano (Shimadzu), merenjem apsorbance 1 µL uzorka ukupne RNK na talasnim dužinama od 260 nm, 280 nm i 230 nm.

Na osnovu dobijene apsorbance i uz korišćenje sledeće formule određena je koncentracija ukupne RNK:

$$C(\text{RNK}) = A_{260} \cdot R \cdot F$$

gde su:

$C(\text{RNK})$ – koncentracija RNK [µg/µL]

A_{260} – apsorbance uzorka na 260 nm

R – razblaženje

$F = 40$ (faktor, 1 OD (*engl.* optical density) odgovara vrednosti od 40 µg/µL RNK)

Čistoća rastvora ukupne RNK je određena poređenjem odnosa apsorbanci na 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}) i 260 nm i 230 nm (A_{260}/A_{230}). Integritet ukupne RNK je potvrđen agaroznom elektroforezom na 1 % (w/v) agaroznom gelu. Nakon određivanja koncentracije i procene čistoće ukupne RNK, koncentracija svih uzoraka je izjednačena na $C(\text{RNK})$ od 1 µg/µL dodatkom odgovarajuće količine vode oslobođene od DNaza i RNaza, nakon čega su uzorci zamrznuti na -70 °C.

Za sintezu komplementarne DNK (cDNK, *engl.* *complementary DNA*) u reakciji reverzne transkripcije (RT-PCR) korišćeno je po 1 µg ukupne RNK svakog uzorka. Za postavku reakcije korišćene su komponente komercijalnog kompleta QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) u skladu sa uputstvima proizvođača.

4.2.1.2. Kvantitativni PCR (qPCR)

Relativna kvantifikacija ekspresije odabranih gena (*engl.* qPCR, *quantitative real-time PCR*) je izmerena na uređajima ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied

Biosystems) i Eppendorf Realplex mastercycler (Eppendorf), koristeći 2X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) za praćenje umnožavanja DNK u realnom vremenu.

Za referentni gen (engl. *housekeeping gene*), koji je stabilno ekspresovan u svim eksperimentalnim grupama i na osnovu kog se normira ekspresija ciljnih gena, izabran je gen za aktin (*ActB*) čija je upotreba kao endogene kontrole kod medonosne pčele prethodno potvrđena (Lourenço i sar., 2008). Sekvence desnog F-prajmera (engl. *forward*) i levog R-prajmera (engl. *reverse*) za referentni gen i za ciljne gene, kao i reference iz kojih su preuzeti, prikazane su u Tabeli 7.

Tabela 7. Prajmeri korišćeni u praćenju relativne ekspresije gena qPCR metodom.

Ciljni gen	Sekvenca prajmera (5' → 3')	Efikasnost	Referenca
β-aktin (referentni gen)	<i>ActB.F</i> <i>ActB.R</i>	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG GACCCACCAATCCATACGGA	1,05 Antúnez i sar., 2009
Superoksid dismutaza 1 (citosolna, CuZnSOD)	<i>Sod1.F</i> <i>Sod1.R</i>	AGCAGATGCAAGTGGTGTG GAGCACCAGCATTTCCTGTAG	0,97 Collins i sar., 2004
Superoksid dismutaza 2 (mitohondrijalna, MnSOD)	<i>Sod2.F</i> <i>Sod2.R</i>	GTCGCCAAAGGTGATGTCAATAC CGTCTGGTTTACCGCCATTTG	1,05 Li i sar., 2014
Katalaza	<i>Cat.F</i> <i>Cat.R</i>	GGCGGCTGAATTAAGTGCTA TTGCGTTGTGTTGGAGTCAT	0,96 Collins i sar., 2004
Glutation S-transferaza, δ-klasa	<i>GstD1.F</i> <i>GstD1.R</i>	GGCTGCCGCTCTCGACATCG TGCCGTATTGGTCCGCCAAGT	0,9 Morimoto i sar., 2011
Glutation S-transferaza, σ-klasa	<i>GstS1.F</i> <i>GstS1.R</i>	TGGTGGTGCTCTTTCTTGGGCT TGTGGACGCTTATCAAGCCAGCT	9,9 Morimoto i sar., 2011
Glutation S-transferaza, mikrozomalna	<i>Gstmic1.F</i> <i>Gstmic1.R</i>	AATTGCAATGGTTCATTAAGTGA ATGTGCTCTGCGTACACGTT	1,03 Morimoto i sar., 2011

Svaki uzorak je urađen u tehničkom duplikatu. Ukupna zapremina reakcione smeše je bila 14 µL i sadržala je 7 µL 2X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nmol/L svakog prajmera i 50 ng uzorka (cDNA). Nakon mešanja svih komponenti, termalni program amplifikacije se sastojao od koraka početne denaturacije na 95 °C (10 min) i 40 ciklusa koji su se sastojali od dva koraka: 15 s na 95 °C i 1 min na 60 °C.

Radi provere specifičnosti qPCR reakcija, kriva topljenja svake reakcije je snimana u opsegu temperatura od 65 °C do 95 °C pri brzini zagrevanja od 0,5 °C po 5 s. Specifičnost i efikasnost korišćenih prajmera je testirana qPCR metodom pod istim uslovima koji su korišćeni za kvantifikaciju relativne ekspresije odabranih gena. Svaki par prajmera je

testiran pomoću serije od 4 razblaženja cDNK u duplikatu (tehnički replikat): 1×, 10×, 100× i 1000× razblažena cDNK.

4.2.1.3. Obrada rezultata kvantitativnog PCR-a

Kvantitativnom PCR analizom su dobijene Ct (engl. *cycle threshold*) vrednosti za sve analizirane gene, koje su potom korišćene u računanju relativne ekspresije gena pomoću programa REST 2009 (Relative Expression Software Tool, Qiagen).

Za računanje relativne ekspresije gena u REST program se unose Ct vrednosti i efikasnost prajmera referentnog i ciljnog gena u različitim eksperimentalnim grupama. Genska ekspresija praćena je u uzorcima pčela izloženih različitim antropogenim uticajima tokom zimske sezone, početkom i krajem perioda mirovanja (Tabela 6). Početak perioda mirovanja pčela, kao eksperimentalna grupa, izabrana je za kontrolnu grupu, a njena ekspresija je normirana na vrednost 1 (100%), te je u odnosu na nju računata relativna ekspresija gena druge eksperimentalne grupe.

4.2.2. Određivanje aktivnosti enzima acetilholinesteraze, antioksidativnih enzima, redoks statusa i enzima povezanih sa imunim odgovorom

4.2.2.1. Priprema uzoraka

Za određivanje aktivnosti enzima acetilholinesteraze, antioksidativnih enzima, redoks statusa i koncentracije proteina napravljeni su 10% (w/v) homogenati celih pčela (1 g uzorka pčela u 9 mL pufera za homogenizaciju). Uzorci su navedeni u Tabelama 5 i 6.

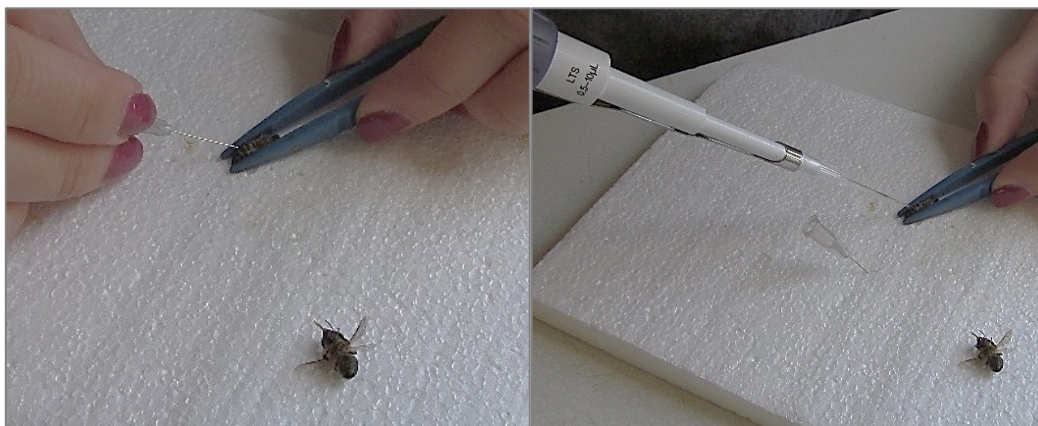
Priprema homogenata celih pčela

Pčelama je najpre izmerena masa a zatim su homogenizovane u avanu sa tučkom uz upotrebu tečnog azota i 50 mmol/L Tris-HCl pufera pH 7,4. Pufer za homogenizaciju uzoraka pčela korišćenih za dalje analize je sadržao 0,05 % (w/v) rastvor feniltiouree (osim za određivanje aktivnosti AChE i količine GSH i -SH grupa kada nije dodavana feniltiourea). Grubi homogenati su centrifugirani 10 min na 10 000 × g (4 °C) a supernatanti su dalje podeljeni na alikvotne i zamrznuti na -20 °C do daljih analiza. Za svaku eksperimentalnu grupu je formirano po pet bioloških ponavljanja od po osam pčela radilica i analize su rađene u tehničkim duplikatima ili triplikatima.

Aktivnost antioksidativnih enzima, enzima povezanih sa imunim odgovorom i koncentracija proteina je određena i u hemolimfi pčela. Uzorci su navedeni u Tabelama 5 i 6.

Izolovanje hemolimfe pčela

Uzorci hemolimfe su sakupljeni iz živih pčela radilica, neposredno nakon uzorkovanja iz košnica sa odgovarajućeg pčelinjaka (Tabela 6). Pčele su najpre kratko ohlađene na ledu (do 5 minuta) tako da su nakon uzimanja sa leda počele da pumpaju hemolimfu u sinuse. Pčela je zatim uhvaćena pincetom tako da su joj krila fiksirana (Slika 9), a zatim je sa dorzalne strane, između abdominalnih tergita (2 i 3, 4 i 5) iglom probijena intersegmentalna membrana (vodeći računa da se ne probije crevni trakt) i odmah na mesto uboda je uvučena automatska mikropipeta (ili staklena Drummond mikrokapilara) i sakupljena hemolimfa (1–5 μ L). Hemolimfa je bistra i bledo žuta tečnost, te ukoliko se uočavao mutan žuti ili braon intestinalni sadržaj, uzorci su se odbacivali. Sadržaj hemolimfe se sakupljao u polietilenske ependorf tubice zapremine 1,5 mL koje su postavljene na ledu i prethodno ispunjene gasovitim azotom (inertna atmosfera). Ependorf tubice namenjene sakupljanju uzoraka hemolimfe za dalje analize antioksidativnih enzima su prethodno tretirane 0,05 % (w/v) rastvorom feniltiouree. Hemolimfa izolovana iz 10 pčela radilica je predstavljala jedan uzorak, a za svaku eksperimentalnu grupu su formirana po tri biološka ponavljanja. Dalje je određivanje aktivnosti enzima vršeno u tehničkim duplikatima.



Slika 9. Izolovanje hemolimfe pčela.

4.2.2.2. Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze

Princip metode: Metoda po kojoj je određena aktivnost acetilholinesteraze (EC 3.1.1.7, AChE) je modifikovana Elmanova metoda (Ellman i sar., 1961), optimizovana za očitavanja na mikrotitar ploči sa 96 otvora. Zasniva se na hidrolizi acetiltioholina od strane enzima acetilholinesteraze, pri čemu nastaju tioholin i acetat. Tioholin dalje reaguje sa DTNB (5,5-ditiobis(2-nitrobenzoeva kiselina)) dajući žuto obojeni proizvod TNB (5-tio-2-nitrobenzoeva kiselina). Brzina promene intenziteta boje produkta reakcije, koju merimo na spektrofotometru na 412 nm, je proporcionalna aktivnosti enzima u uzorku.

Postupak: Na 50 μL uzorka 10% homogenata pčela je dodato 250 μL rastvora koji je dobijen mešanjem rastvora 100 mmol/L fosfatnog pufera pH 8, 10 mmol/L DTNB i 75 mmol/L acetiltioholin-jodida u zapreminskom odnosu 150 : 5 : 2. Zatim je praćena promena apsorbanca na 412 nm u toku 10 min na temperaturi od 25 °C.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifična aktivnost AChE} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \cdot V_{\text{rs}} \cdot 1000}{9,52 \cdot V_{\text{uz}} \cdot C_{\text{pr}}}$$

gde su:

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbanca uzorka u minuti

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbanca slepe probe u minuti

V_{rs} – zapremina reakcione smeše [mL]

9,52 – molarni apsorpcioni koeficijent za TNB na 412 nm [$\text{mmol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$] korigovan na dužinu puta svetlosti u mikrotitar ploči (0,7 cm)

V_{uz} – zapremina uzorka [mL]

C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]

Specifična aktivnost AChE je izražena u milijedinicama aktivnosti enzima po mg proteina u uzorku [mU/mg proteina].

4.2.2.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Princip metode: Aktivnost superoksid dismutaze (EC 1.15.1.1, SOD) je određena po metodi McCord i Fridovich (1969) u sistemu citohrom c (Fe^{3+}) / ksantin / ksantin oksidaza. U reakciji ksantina sa ksantin oksidazom stvara se superoksid-anjon-radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), koji redukuje citohrom c (Fe^{3+} u Fe^{2+}). Brzina redukcije se prati spektrofotometrijski kao porast apsorbanca na 550 nm. SOD katalizuje reakciju dismutacije superoksid-anjon-radikala i tako smanjuje brzinu redukcije citohroma c. Ovo smanjenje je proporcionalno aktivnosti SOD koja je prisutna u uzorku. Aktivnost SOD potrebna za smanjenje brzine redukcije citohroma c za 50%, pri promeni apsorbanca od $0,025 \text{ min}^{-1}$, definisana je kao jedinica aktivnosti ovog enzima.

Postupak: Za izvođenje analize pripremljeni su rastvor A i rastvor B. Rastvor A (0,57 mL 0,5 mol/L KH_2PO_4 ; 3,14 mL 0,5 mol/L Na_2HPO_4 ; 0,1 mL 100 mmol/L EDTA; 1 mL 100 mmol/L NaN_3 ; 1 mL 50 $\mu\text{mol/L}$ ksantina; 0,4 mL 20 $\mu\text{mol/L}$ citohroma c; dopunjeno do 100 ml dH_2O ; pH 7,8) je stabilan 3 dana na +4 °C a tokom rada se drži na sobnoj temperaturi. Rastvor B (XOD 0,2 U/mL u 0,1 mmol/L EDTA) se pravi svež pre analize a tokom rada se drži na ledu. Reakciona smeša sadrži 1,3 mL rastvora A, 100 μL rastvora B, 25–100 μL uzorka i dH_2O ukoliko je bilo potrebno dopuniti zapreminu reakcione smeše finalno do 1,5 mL. Dodatkom rastvora B je započinjana reakcija, a

apsorbanca je praćena tokom 3 minuta na talasnoj dužini od 550 nm. Slepa proba je sadržala 1,3 mL rastvora A, 100 µL rastvora B i 100 µL dH₂O. Promena apsorbance slepe probe treba da iznosi 0,025 min⁻¹. Reakcija se odigrava na sobnoj temperaturi.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifićna aktivnost SOD} = \frac{(\Delta A_{\text{sp}} - \Delta A_{\text{uz}}) \cdot 100}{50 \cdot \Delta A_{\text{sp}} \cdot C_{\text{pr}} \cdot V_{\text{uz}}}$$

gde su:

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti

C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]

V_{uz} – zapremina uzorka [mL]

Specifićna aktivnost SOD je izražena u jedinicama aktivnosti enzima po mg proteina u uzorku [U/mg proteina].

4.2.2.4. Određivanje aktivnosti katalaze

Princip metode: Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje vodonik-peroksida (H₂O₂) u prisustvu katalaze (EC 1.11.1.6, CAT) na 240 nm, jer na toj talasnoj dužini vodonik-peroksid pokazuje maksimum apsorpcije svetlosti. Pad apsorbance tokom vremena na datoj talasnoj dužini je proporcionalan aktivnosti katalaze u uzorku (Aebi, 1974).

Postupak: U 0,05 mol/L fosfatni pufer pH 7 je odmeren 30% H₂O₂ u kolićini da apsorbanca rastvora na 240 nm bude u opsegu 0,520–0,550. Dodavanjem 5–10 µL uzorka u ovaj rastvor (finalna zapremina od 3 mL) zapoćinje reakcija. Pad apsorbance na 240 nm je praćen tokom 3 minuta na (sobnoj) temperaturi od 25 °C.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifićna aktivnost CAT} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \cdot V_{\text{rs}} \cdot 1000}{43,6 \cdot V_{\text{uz}} \cdot C_{\text{pr}}}$$

gde su:

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti

V_{rs} – zapremina reakcione smeše [ml]

43,6 – molarni apsorpcioni koeficijent za vodonik peroksid na 240 nm [mol⁻¹ L cm⁻¹]

V_{uz} – zapremina uzorka [ml]

C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku [mg/ml]

Specifična aktivnost CAT je izražena u jedinicama aktivnosti enzima po mg proteina u uzorku [U/mg proteina].

4.2.2.5. **Određivanje aktivnosti glutation S-transferaze**

Princip metode: Glutation S-transferaza (EC 2.5.1.18., GST) katalizuje reakciju konjugacije 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) sa tiolnom grupom redukovano glutationa (GSH). Nastali CDNB-glutation konjugat ima maksimum apsorpcije na 340 nm. Aktivnost enzima se određuje merenjem brzine formiranja konjugata kroz promenu apsorpcije na 340 nm (Hagib i sar., 1974).

Postupak: Reakciona smeša finalne zapremine 0,7 mL je dobijena mešanjem 0,55 mL 0,1 mol/L fosfatnog pufera pH 6,5, 25 μ L rastvora CDNB (30,4 mg CDNB u 5 mL 96 % etanola), 75 μ L 10 mmol/L GSH i do 50 μ L uzorka. Reakcija je započeta dodatkom uzorka (5–10 μ L uzorka i dH₂O do 50 μ L). Slepa proba sadrži sve komponente sem uzorka (dH₂O umesto uzorka). Promena apsorbanca na 340 nm je praćena tokom 3 min na sobnoj temperaturi (25 °C).

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifična aktivnost GST} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \cdot V_{rs} \cdot 1000}{9,6 \cdot V_{uz} \cdot C_{pr}}$$

gde su:

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbanca uzorka u minuti

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbanca slepe probe u minuti

V_{rs} – zapremina reakcione smeše [mL]

V_{uz} – zapremina uzorka [mL]

C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]

9,6 – molarni apsorpcioni koeficijent za konjugat CDNB-glutation [$\text{mmol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$]

Specifična aktivnost GST je izražena u milijedinicama aktivnosti enzima po mg proteina u uzorku [mU/mg proteina].

4.2.2.6. **Određivanje sadržaja redukovano glutationa i sulfhidrilnih grupa proteina**

Princip metode: Sadržaj redukovano glutationa (GSH) i slobodnih sulfhidrilnih grupa (–SH) proteina je određivan metodom po Elmanu (1959) koja je optimizovana za očitavanja na mikrotitar-ploči sa 96 otvora. Metoda se zasniva na reakciji redukovano

glutationa i redukovanih -SH grupa proteina sa 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoevom kiselinom) (DTNB) pri čemu nastaje žuto obojeni proizvod, 2-nitro-5-tiobenzoeva kiselina (TNB). Nastala TNB se spektrofotometrijski određuje merenjem apsorbance na 412 nm.

Postupak: Iz 100 μL 10 % homogenata pčela su istaloženi proteini dodatkom 100 μL 4 % sulfosalicilne kiseline (SSA). Nakon centrifugiranja (5 min, 10 000 \times g), supernatant je korišćen za merenje sadržaja GSH, dok je talog, nakon što je dva puta ispran sa 100 μL 2% SSA, a zatim resuspendovan u 100 μL 6 mol/L guanidin-hidrohlorida pH 6,0 dalje korišćen za određivanje koncentracije -SH grupa.

Nakon pripreme Elmanovog reagensa (0.2 mmol/L DTNB u 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH 8,0) i standardnih rastvora glutaciona (u opsegu 0,125–2 mmol/L), na 20 μL uzorka ili standarda je dodato po 200 μL Elmanovog reagensa pri čemu se uočilo razvijanje žute boje kao posledica nastanka TNB. Formiranje proizvoda reakcije je nakon 5 min mereno spektrofotometrijski na 412 nm.

Izračunavanje rezultata: Koncentracije GSH i -SH u uzorcima su izračunate pomoću standardne krive dobijene određivanjem apsorbance za poznate koncentracije GSH i izražene kao nmol po mg proteina.

4.2.2.7. Određivanje koncentracije malondialdehida

Princip metode: Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA) je izvedeno po metodi Satoha (1978) u kojoj su zapremine reakcionih smeša optimizovane za analizu u ependorf tubama zapremine 2 mL. Metoda se zasniva na reakciji tiobarbiturine kiseline (TBA) sa malondialdehidom, koji nastaje tokom peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u sastavu bioloških membrana pod dejstvom reaktivnih čestica kiseonika. Kao proizvod reakcije nastaje obojeni kompleks koji ima maksimum apsorpcije na 530 nm.

Postupak: Na 100 μL uzorka 10 % homogenata pčela je dodato 500 μL 20 % trihlorsirćetne kiseline (TCA) i ostavljeno 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja na 3500 rpm u toku 10 min, izdvojen je supernatant i dalje korišćen u reakciji sa 500 μL 0,05 mol/L H_2SO_4 i 600 μL 0,07 % TBA u 1 mol/L Na_2SO_4 koja se odvijala u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 30 min. Nakon hlađenja na ledu, obojeni proizvod reakcije je ekstrahovan dodatkom 0,8 mL *n*-butil-alkohola uz energično mešanje. Razdvajanje faza je ubrzano centrifugiranjem na 3000 rpm u toku 10 min nakon čega je merena apsorbanca rastvora spektrofotometrijski na 530 nm.

Izračunavanje rezultata: Koncentracije MDA u uzorcima su izračunate pomoću standardne krive dobijene određivanjem apsorbanca za poznate koncentracije MDA (u opsegu 1,25–50 $\mu\text{mol/L}$) i izražene kao nmol po mg proteina.

4.2.2.8. *Određivanje aktivnosti fenol oksidaze i profenol oksidaze*

Princip metode: Aktivnost fenol oksidaze (insekatska tirozinaza, EC 1.14.18.1) u njenoj aktivnoj (POx) i zimogenoj formi (proPOx) je određena po delimično modifikovanom protokolu objavljenom od strane Laughton i Siva-Jothy (2011). Metoda se zasniva na konverziji 3,4-dihidroksi-L-fenilalanina (L-DOPA), kao supstrata, od strane fenol oksidaze, pri čemu nastaje dopahrom (dopahinon), crveno-braon obojeni produkt čiju apsorpciju pratimo na 492 nm.

Postupak: Na 5 µL hemolimfe je dodato 195 µL 10 mmol/L fosfatnog pufera pH 6,5 i tako razblaženi uzorci su odmah zamrznuti a zatim odmrznuti na ledu i izmešani uz pomoć vortex mešalice da bi se oslobodio sadržaj iz hemocita. Reakciona smeša za određivanje aktivnosti POx u ukupnoj zapremini od 200 µL je sadržala 40 µL uzorka (za slepu probu 40 µL 10 mmol/L fosfatnog pufera pH 6,5), 50 µL dH₂O i 110 µL 16 mmol/L L-DOPA. Za određivanje aktivnosti proPOx, potrebno je uvesti dodatni korak aktivacije zimogene forme enzima himotripsinom, te je reakciona smeša za proPOx umesto 50 µL dH₂O sadržala 50 µL himotripsina u koncentraciji od 0,5 mg/ml. Nakon odmeravanja 40 µL uzorka i 50 µL himotripsina i inkubacije u trajanju od 5 min, dodaje se 110 µL L-DOPA. Dalje je, kao i za POx, praćena promena apsorbanca na 492 nm na svaki minut u toku 30 min na temperaturi od 25 °C.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifična aktivnost POx (proPOx)} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \cdot V_{rs} \cdot 40 \cdot 1000}{2,59 \cdot V_{uz} \cdot C_{pr}}$$

gde su:

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbanca uzorka u minuti

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbanca slepe probe u minuti

V_{rs} – zapremina reakcione smeše [mL]

2,59– molarni apsorpcioni koeficijent za dopahrom na 490 nm [$\text{mmol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$], korigovan na dužinu puta svetlosti u mikrotitar ploči (0,7 cm)

V_{uz} – zapremina uzorka [mL]

C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]

40 – faktor razblaženja uzorka

Specifična aktivnost POx i proPOx je izražena u milijedinicama aktivnosti enzima po mg proteina u uzorku [mU po mg proteina].

4.2.2.9. **Određivanje aktivnosti glukoza oksidaze**

Princip metode: Aktivnost glukoza oksidaze (EC 1.1.3.4, GOx) je određena po protokolu Sigma-Aldrich (2015) koji je modifikovan za rad sa manjom zapreminom reakcione smeše na mikrotitar-ploči sa 96 otvora. Aktivnost glukoza oksidaze je određena kuplovanim enzimskim esejom u kome glukoza oksidaza oksiduje D-glukozu, pri čemu nastaje vodonik-peroksid koji u narednoj reakciji oksiduje redukovani o-dianizidin pod dejstvom enzima peroksidaze. Brzina reakcije se prati spektrofotometrijski na 500 nm.

Postupak: Reakciona smeša u ukupnoj zapremini od 210 µL je sadržala 128 µL 0,26 mmol/L o-dianizidina, 20 µL uzorka (za slepu probu 20 µL 50 mmol/L Na-acetatnog pufera pH 5,1), 32 µL 10,6 % (w/v) D-glukoze i 30 µL 14 U/mL enzima peroksidaze. Pripremljena je i slepa proba kod koje je umesto D-glukoze u istoj zapremini dodata dH₂O. Zatim je praćena promena apsorbance na 500 nm na svaki minut u toku 40 min na temperaturi od 25 °C.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifična aktivnost GOx} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \cdot V_{rs} \cdot 1000}{5,25 \cdot V_{uz} \cdot C_{pr}}$$

gde su:

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti

V_{rs} – zapremina reakcione smeše [mL]

5,25 – molarni apsorpcioni koeficijent za oksidovani o-dianizidin na 500 nm [mmol⁻¹ L cm⁻¹] korigovan na dužinu puta svetlosti u mikrotitar ploči (0,7 cm)

V_{uz} – zapremina uzorka [mL]

C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]

Specifična aktivnost GOx je izražena u milijedinicama aktivnosti enzima po mg proteina u uzorku [mU po mg proteina].

4.2.2.10. **Određivanje koncentracije proteina**

Princip metode: Koncentracija ukupnih proteina je određena metodom po Bradfordu (1976) koja je prilagođena za rad u mikrotitar ploči sa 96 otvora. Metoda za određivanje ukupnih proteina po Bradfordu se zasniva na formiranju kompleksa između boje Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) i proteina. Kada se veže za protein, boja prelazi u stabilnu neprotonovanu formu, sa maksimumom apsorpcije na 595 nm, zbog čega

rastvor dobija plavu boju čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku.

Postupak: Esej je izveden u mikrotitar-ploči dodavanjem 250 μ L Bradfordovog reagensa na 5 μ L standardnog rastvora proteina ili uzorka (za slepu probu: radnog pufera). Bradfordov reagens sadrži 10 mg CBB, 5 mL 96% etanola, 10 mL 85% fosforne kiseline i destilovanu vodu do 100 mL. Za pripremu standardnih rastvora proteina (u opsegu 0,125–2 mg/mL) je korišćen goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od najmanje 5 min (najduže 60 min) meri se apsorbanca na 595 nm. Mereni intenzitet plave boje je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku koja je određivana na osnovu standardne krive.

Izračunavanje rezultata: Koncentracija proteina u uzorcima je izračunata pomoću standardne krive i izražena je kao mg/mL. Ukoliko je uzorak bio razblažen, očitana koncentracija sa standardne krive je pomnožena faktorom razblaženja.

4.2.3. Ispitivanje prisustva mikrosporidija roda *Nosema* i krpelja *Varroa destructor*

4.2.3.1. Ispitivanje prisustva mikrosporidija roda *Nosema*

Ispitivanje inficiranosti pčela radilica mikrosporidijom roda *Nosema* je utvrđeno brojanjem spora po metodi po Cantwell-u (1970). Abdomeni 60 pčela radilica iz svake eksperimentalne grupe su macerirani u avanu sa tučkom uz dodatak 1 mL dH₂O po pčeli. Zapremina od 1 ml tako pripremljenog macerata je upotrebljena za određivanje prosečnog broja spora po pčeli pomoću hemocitometra i svetlosnog mikroskopa uz uvećanje od 400 \times .

4.2.3.2. Ispitivanje prisustva krpelja *Varroa destructor*

Ispitivanje prisustva parazitskog krpelja *Varroa destructor* je izvršeno brojanjem krpelja na adultnim pčelama radilicama. Da bi izrazili procenat zaraženosti pčela, broj pronađenih krpelja je podeljen sa brojem pregledanih pčela i pomnožen sa 100 (Plavša i Nedić, 2015).

4.2.4. Melisopalinološka analiza

Sa ciljem utvrđivanja botaničkog (flornog) porekla meda, kao pčelinje hrane, izvršena je identifikacija polena suspendovanog u medu kroz melisopalinološku analizu.

4.2.4.1. Priprema uzoraka meda

Priprema uzoraka meda za analizu polena je izvršena u skladu sa harmonizovanom melisopalinološkom metodologijom (von der Ohe i sar., 2004). Pre uzimanja uzorka med je dobro izmešan kako bi se suspendovan polen ravnomerno rasporedio. Zatim je u

kivetama za centrifugiranje rastvoreno 10 g meda u 20 mL destilovane vode. Rastvor je centrifugiran 10 min na 3000 rpm. Nakon odlivanja supernatanta, sediment je suspendovan u 100 μ l destilovane vode i prenet na zagrejanu predmetnu pločicu. Nakon isparavanja vode, sediment je fiksiran pokrovnom ljusticom premazanom medijumom koji sadrži želatin, glicerin, fenol i alkoholni rastvor fuksina.

4.2.4.2. Kvalitativna analiza polena u medu

Kvalitativna analiza polena u pripremljenim uzorcima je podrazumevala utvrđivanje spektra prisutnog polena iz biljaka nektarica, kao i elemenata koji ukazuju na sakupljanje medne rose (engl. *HDE – honey dew elements*) npr. alge, spore i hife gljiva, anemofilni polen (Ricciardelli, 1998). Uzorak je najpre pregledan svetlosnim mikroskopom uz uvećanje od 200 \times kako bi se procenila gustina i potvrdio homogen raspored polenovih zrna. Nakon toga, uz uvećanje od 400 \times , vršena je identifikacija i brojanje polena. Za svaki identifikovani tip polena je izračunata njegova relativna frekvencija tj. procenat. Florno poreklo meda je određeno u skladu sa zakonskom regulativom Republike Srbije (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, Sl. glasnik RS, 101/2015), gde označavanje monoflornog meda prema određenoj biljnoj vrsti zahteva prisustvo najmanje 45 % polena date vrste. Zastupljenost medne rose je određena na osnovu odnosa elemenata koji ukazuju na mednu rosu i količine polena biljaka nektarica.

4.2.5. Određivanje koncentracije metala u pčelama i pčelinjim proizvodima

4.2.5.1. Priprema i analiza uzoraka

Koncentracija metala (aluminijuma, barijuma, kalcijuma, kadmijuma, kobalta, hroma, bakra, gvožđa, kalijuma, magnezijuma, mangana, natrijuma, nikla, olova, stroncijuma i zinka) u pčelama i pčelinjim proizvodima je određena metodom optičke emisije spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES, engl. *inductively coupled plasma – optical emission spectrometry*).

Za svaku eksperimentalnu grupu su formirana po tri biološka ponavljanja za analizu pčela (10 pčela po ponavljanju) i perge, a merenja su urađena u tehničkim triplikatima. Za med su urađena tri tehnička ponavljanja za jedan uzorak sa svake lokacije. Uzorci pčela i perge su prvo osušeni na 55 \pm 5 $^{\circ}$ C do konstantne mase, nakon čega su razoreni mikrotalasnom digestijom u uređaju Ethos1 (Milestone) pri visokom pritisku u zatvorenim teflonskim sudovima, prema standardnom protokolu US EPA SW-846 Method 3052. Uzorci meda su odmah podvrgnuti mikrotalasnoj digestiji. Za digestiju uzoraka (0,5 g) je korišćena smeša 7 mL 65 % HNO₃ i 1 mL 30 % H₂O₂. Temperaturni program se sastojao od 15 min zagrevanja od 20 $^{\circ}$ C do 200 $^{\circ}$ C i 15 min digestije uzoraka na 200 $^{\circ}$ C. Dalje su uzorci razblaženi destilovanom vodom do zapremine od 25 mL.

Sadržaj metala je meren pomoću optičko emisionog spektrometra sa induktivno spregnutom plazmom (iCAP 6500Duo, Thermo Scientific), uz korišćenje standardâ Multi-Element Plasma Standard Solution4 Specpure (Alfa Aesar).

4.2.6. Analiza nepolarne frakcije lipida i ugljovodonika pčela

4.2.6.1. Ekstrakcija nepolarne frakcije lipida i ugljovodonika

Ekstrakt nepolarne frakcije lipida i ugljovodonika je dobijen postupkom tečno-čvrste ekstrakcije. Za svaku eksperimentalnu grupu (Tabela 6) su formirana po tri biološka ponavljanja od po 10 pčela radilica po jednom uzorku. Nakon merenja tačne mase uzorka, pčele su homogenizovane u avanu sa tučkom uz dodatak bezvodnog natrijum-sulfata (Na_2SO_4) u količini 1:1 u odnosu na masu uzorka. Osušeni homogenat je kvantitativno prenet u staklenu epruvetu uz ispiranje sa 2×2 mL heksana (C_6H_{14}) i ekstrahovan na ultrazvuku tokom 2 min. Ekstrakt je zatim centrifugiran i supernatant je sačuvan. Ekstrakcija taloga je ponovljena još dva puta a gornji sloj heksana je čuvan i spojen sa prethodnim. Ekstrakt je u prethodno izmerenom vialu uparen u inertnoj atmosferi (struji N_2) i suvi ostatak, koga čine nepolarni lipidi i ugljovodonici, je izmeren na analitičkoj vagi.

4.2.6.2. Priprema uzoraka za analizu

Upareni ostatak rastvoren je u 1 mL metil-*terc*-butil-etra ($\text{CH}_3\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, MTBE). Alikvot od 20 μL prenet je u insert smešten u 2 mL autosemplerski vial i razblažen sa 50 μL MTBE, nakon čega je dodato 100 μL komercijalnog TMSH reagensa (metanolni rastvor trimetilsulfonijum-hidroksida, $(\text{CH}_3)_3\text{S}^+\text{OH}^-$, oko 0,25 mol/L).

4.2.6.3. Analiza profila masnih kiselina nepolarne frakcije lipida i ugljovodonika gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom

Kvalitativna i semikvantitativna analiza izvršena je metodom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS), koristeći Agilent Technologies series 6890N gasni hromatograf (GC) kuplovan sa Agilent Technologies series 5975B kvadrupolnim masenim spektrometrom sa elektronskom jonizacijom (EI-MS). Injektovan je 1 μL rastvora uzorka u *split* modu (*split* odnos 50:1), uz temperaturu inleta od 250 °C. Pri ovim uslovima, dolazi do potpune *in situ* konverzije derivata masnih kiselina u odgovarajuće metil-estre (engl. *fatty acids methyl esters*, FAME). FAME i druge komponente razdvojene su na HP-5ms koloni (Agilent Technologies) dimenzija 30 m \times 0,25 mm, debljine sloja 0,25 μm , sa nepolarnom stacionarnom fazom na bazi *poli*(tetrametil-1,4-silfenilensiloksana). Kao gas nosač korišćen je helijum čistoće 5.0 (99,999 %), uz konstantan protok od 0,8 mL/min. Eluiranje je vršeno u temperaturno-programiranom režimu, uz početnu temperaturu od 50 °C, porast

30 °C/min do 130 °C, porast 10 °C/min do 280 °C i zadržavanje na 280 °C od 5,33 min (tako da je ukupno vreme analize 23 min). Efluens je preko transfer-linije (280 °C) prosleđen u EI-MS, uz sledeće uslove: energija elektrona 70 eV, temperatura jonskog izvora 230 °C, temperatura kvadrupola 150 °C, *solvent delay* 6,0 min, Standard Spectra Tune. U cilju detekcije svih eluiranih komponenti, akvizicija je vršena u *scan* modu, u *m/z* opsegu 45-500.

Za obradu podataka korišćen je Agilent Technologies MSD ChemStation – Enhanced Data Analysis softver (revizija E01.01.335) u kombinaciji sa AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, ver. 2.64) i NIST MS Search softverom ver. 2.0d (NIST Mass Spectrometry Data Center, NIST, Gaithersburg, USA). Za identifikaciju jedinjenja korišćena je biblioteka masenih spektara Wiley Registry of Mass Spectral Data (7th Edition). Identitet jedinjenja sa nedovoljno specifičnim ili nedovoljno kvalitetnim spektrima (neki od FAME, *n*-alkani) utvrđen je ili potvrđen na osnovu korelacije retencionih vremena sa dužinom lanca, u odnosu na pozitivno identifikovane homologe.

4.2.7. Metabolomička analiza hemolimfe pčela

4.2.7.1. Priprema uzoraka za analizu

Odmereno je 3 µL tek odmrznute hemolimfe (tačna masa izmerena je na analitičkoj vagi) i u svaki uzorak odmah dodato 100 µL izopropanola ((CH₃)₂CHOH) da bi se izvršila inaktivacija enzimâ (uključujući fenol oksidazu). Zatim je uzorak uparen do suva u struji N₂, dodato je 50 µL metilen-hlorida i nakon soniciranja ponovljeno je uparavanje radi potpunog uklanjanja rastvarača i vlage. U cilju derivatizacije aldehidâ i ketonâ (uključujući redukujuće šećere) do oksima, dodato je 60 µL rastvora MOX (metoksiamin-hidrohlorid, CH₃ONH₃⁺Cl⁻) u bezvodnom piridinu, koncentracije 35,5 mg/mL, i smeša je inkubirana na 37 °C tokom 80 min. U cilju derivatizacije svih aktivnih vodonika, dodato je 100 µL BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid, CF₃C[=NSi(CH₃)₃]OSi(CH₃)₃) sa dodatkom 1 % TMCS (trimetilhlorsilan, (CH₃)₃SiCl) i smeša je inkubirana na 37 °C tokom 30 min. Nakon centrifugiranja na 10 000 rpm tokom 8 min, supernatant je prenet u 2 mL autosemplerski vial sa insertom.

4.2.7.2. Analiza uzoraka hemolimfe gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom

Uzorci su analizirani metodom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS), koristeći Agilent Technologies series 6890N gasni hromatograf (GC) kuplovan sa Agilent Technologies series 5975B kvadrupolnim masenim spektrometrom sa elektronskom jonizacijom (EI-MS). Injektovano je 0,2 µL rastvora uzorka u splitless modu, uz temperaturu inleta od 220 °C. Komponente su razdvojene na HP-5ms koloni (Agilent Technologies) dimenzija 30 m × 0,25 mm, debljine sloja 0,25 µm, sa nepolarnom stacionarnom fazom na bazi poli(tetrametil-1,4-silfenilensiloksana). Kao gas nosač

korišćen je helijum čistoće 5.0 (99,999 %), uz konstantan protok od 0,9 mL/min. Eluiranje je vršeno u temperaturno-programiranom režimu, uz početnu temperaturu od 60 °C, porast 3 °C/min do 180 °C, porast 10 °C/min do 280 °C i zadržavanje na 280 °C od 6 min, i porast 10 °C/min do 300 °C i zadržavanje na 300 °C od 5 min (tako da je ukupno vreme analize 63 min). Efluens je preko transfer-linije (280 °C) prosleđen u EI-MS, uz sledeće uslove: energija elektrona 70 eV, temperatura jonskog izvora 230 °C, temperatura kvadrupola 150 °C, solvent delay 6,5 min, Standard Spectra Tune. U cilju detekcije svih eluiranih komponenti, akvizicija je vršena u scan modu, u m/z opsegu 35-500.

4.2.7.3. Obrada podataka

Za obradu podataka korišćen je Agilent Technologies MSD ChemStation – Enhanced Data Analysis softver (revizija E01.01.335). Dodatno, za bibliotečku pretragu korišćen je i NIST MS Search ver. 2.0d (NIST Mass Spectrometry Data Center, NIST, Gaithersburg, USA).

Detektovana jedinjenja identifikovana su poređenjem masenih spektara sa spektralnim bibliotekama:

- Wiley Registry of Mass Spectral Data, 7. izdanje (John Wiley & Sons, Inc.)
- NIST Mass Spectral Library ver. 05 (NIST Mass Spectrometry Data Center, NIST, Gaithersburg, USA)
- BinBase, ver. 2018-11-30 (Fiehn Laboratory, University of California, Davis, USA)
- GMD = Golm Metabolome Database (Max Planck), ver. 2011-11-21 (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Germany), (Hummel i sar., 2010)
- MoNA = MassBank of North America, preuzeta 2019-03-07 (Fiehn Laboratory, University of California, Davis, USA)

Za pretrage spektralnih biblioteka korišćeni su paralelno PBM (*Probability-based matching*) algoritam ChemStation softvera i kompozitni algoritam MIST MS Search softvera. Ukoliko identifikacija nije bila moguća, dodatno je korišćena *online* pretraga Human Metabolome Database ver. 4.0 (The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), Canada), (Wishart i sar., 2007; Wishart i sar., 2009, Wishart i sar., 2013; Wishart i sar., 2018). Kada je to bilo moguće, identitet je potvrđen poređenjem retencionih vremena i masenih spektara sa TMS/MOX derivatima standardnih supstanci, pripremljenih po istoj proceduri.

Statističkoj obradi podataka je prethodio još jedan korak pripreme hromatografsko-spektrometrijskih podataka (engl. *post-processing*) sa ciljem eliminacije varijacija i uticaja koji nastaju tokom analize uzoraka i ne mogu se pripisati stvarnim razlikama između uzoraka. U okviru svakog uzorka površine hromatografskih pikova su normalizovane na masu uzorka, zatim na površinu pika trehaloze, a potom centrirane na

srednju vrednost i *Pareto* skalirane. Trehaloza, kao glavni ugljeni hidrat u hemolimfi insekata, korišćena je umesto internog standarda da bi se korigovale razlike u prinosu derivatizacije i eventualna koncentrovanja ili razblaživanja.

4.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada dobijenih rezultata je urađena u programu R (verzija 3.5.1., The R Project for Statistical Computing) i programu Microsoft Excel (verzija 2013). Statistički značajne razlike između dobijenih vrednosti ispitivanih parametara eksperimentalnih grupa su određene jednofaktorskom ili dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti od $p < 0,05$. Značajnost relativnog povećanja/smanjenja ekspresije gena u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu je izračunato integrisanim *Bootstrap randomization* testom (2000 iteracija) za nivo značajnosti $p < 0,05$. Podaci dobijeni metabolomičkom analizom su statistički obrađeni multivarijacionim metodama u programu MetaboAnalyst 4.0 (Chong i sar., 2019).

5. REZULTATI

5.1. Rezultati laboratorijskih akutnih testova toksičnosti pesticida

Laboratorijski akutni testovi toksičnosti predstavljaju metodu za testiranje i procenu efekata hemijskih jedinjenja na žive sisteme i izvode se u kontrolisanim uslovima. Laboratorijski akutni testovi toksičnosti se izvode u okviru postupka procene rizika sa ciljem definisanja letalne doze primenjene test supstance – LD₅₀ (predstavlja dozu test supstance, aplicirane kontaktnim ili oralnim putem, koja izaziva uginuće kod 50% test životinja), kao i u naučno-istraživačke svrhe da bi se opisali efekti target supstanci na žive sisteme (Medrzycki i sar., 2013).

5.1.1. Unos hrane i mortalitet

Pčele radilice su u laboratorijskim uslovima u trajanju od 48 h hranjene 1 mol/L rastvorom saharoze koji je sadržao tiakloprid ili klotianidin u koncentracijama koje su 5, 20 i 50 puta niže od LD₅₀. Procenjena količina pesticida koju je svaka pčela unela je izračunata na osnovu zapremine konzumirane hrane tj. rastvora saharoze sa odgovarajućom koncentracijom tiakloprida ili klotianidina (Tabela 8). Mortalitet je zabeležen nakon 48 h i predstavljen u Tabeli 8. Značajno veći mortalitet u odnosu na kontrolnu grupu je zabeležen u eksperimentalnim grupama koje su hranjene sa najvećom koncentracijom klotianidina (K5) i srednjom koncentracijom tiakloprida (T20).

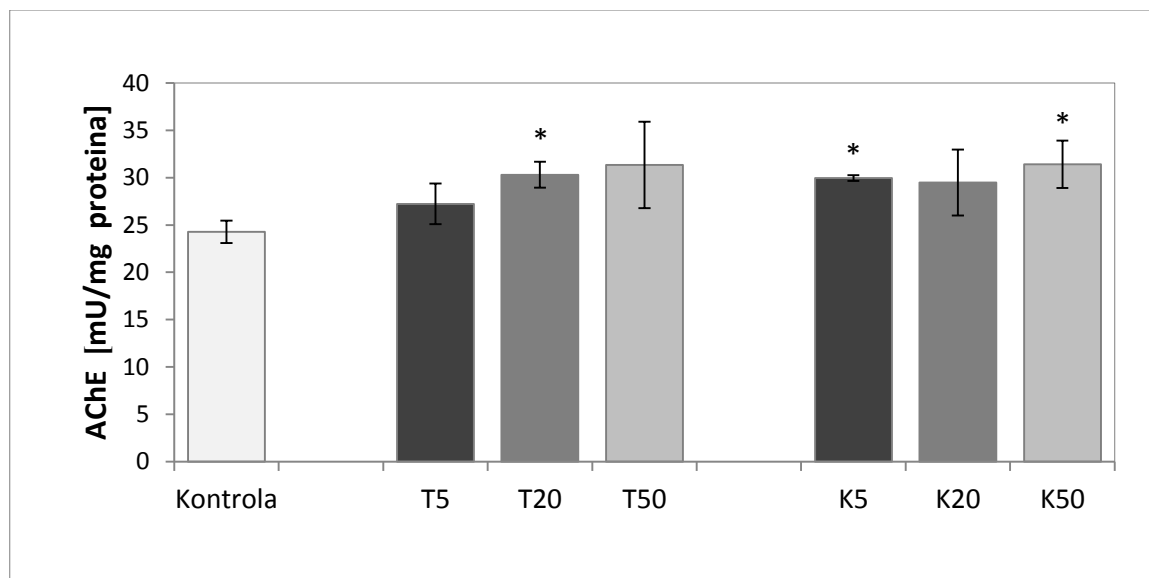
Tabela 8. Količina konzumiranog pesticida (µg po pčeli) i procenat mortaliteta nakon tretmana sa tiaklopridom i klotianidinom u trajanju od 48h.

Grupa	Koncentracija pesticida u rastvoru za hranjenje (µg/mL)	Doza pesticida (µg po pčeli)	Mortalitet (%)
Kontrola	0	0	4,4
T5	26,91	1,956	12,2
T20	6,72	0,674	13,3*
T50	2,69	0,295	10,0
K5	$5,52 \cdot 10^{-3}$	$0,664 \cdot 10^{-3}$	12,2*
K20	$1,38 \cdot 10^{-3}$	$0,191 \cdot 10^{-3}$	8,9
K50	$0,55 \cdot 10^{-3}$	$0,072 \cdot 10^{-3}$	5,6

Eksperimentalne grupe su nazvane po pesticidu (T = tiakloprid, K = klotianidin) i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze (5, 20 ili 50 puta niže u odnosu na LD₅₀). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu za nivo značajnosti $p < 0,05$ je dobijena jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom i označena je zvezdicom ().*

5.1.2. Aktivnost enzima acetilholinesteraze

Specifična aktivnost acetilholinesteraze, enzima uključenog u neurotransmisiju u sinapsama holinergičkog tipa, izmerena je u homogenatima celih pčela koje su tretirane različitim koncentracijama tiakloprida i klotianidina (Prilog 1) i prikazana na Grafiku 1.

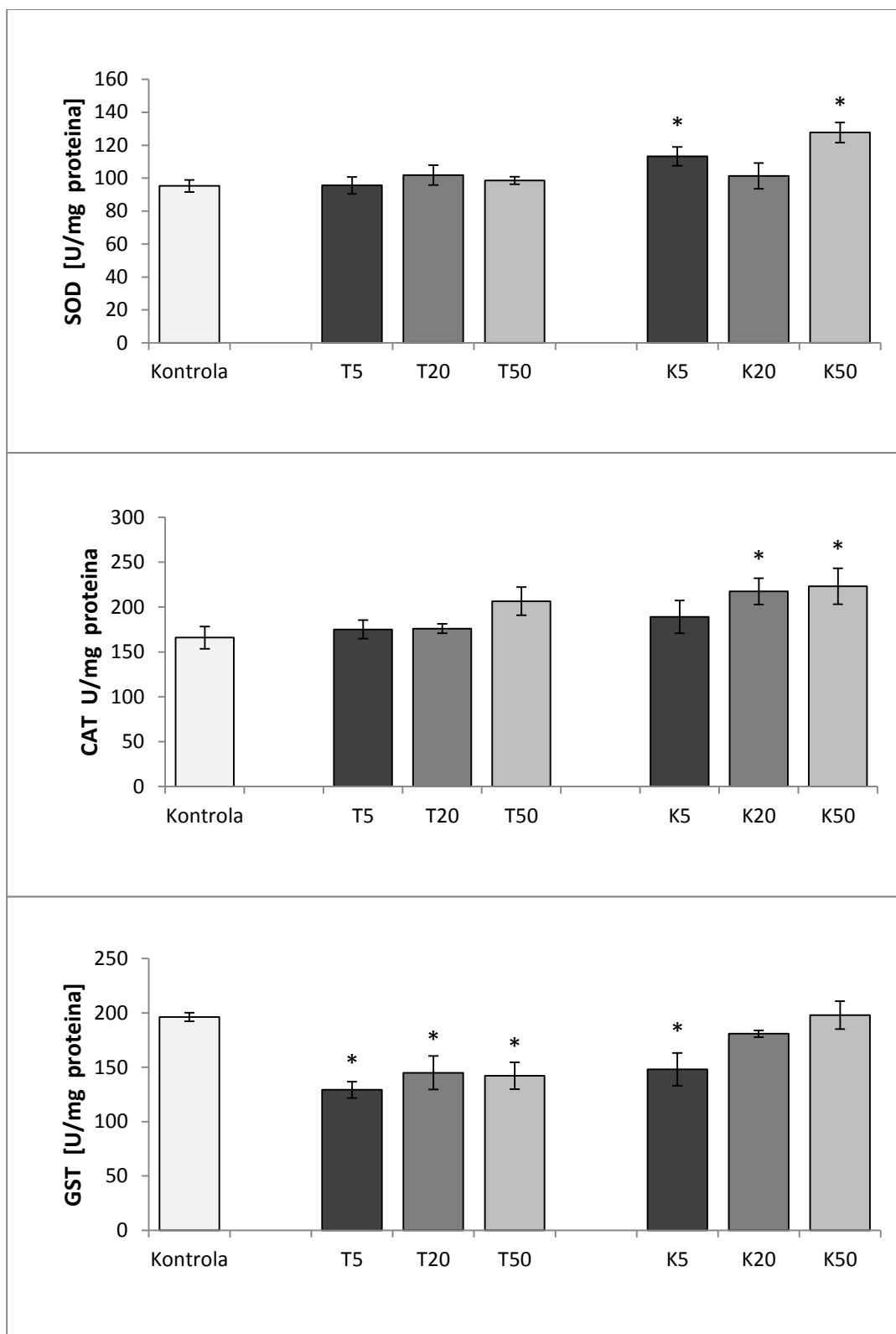


Grafik 1. Specifična aktivnost acetilholinesteraze (AChE) u homogenatu celih pčela tretiranih tiaklopridom (T) i klotianidinom (K) u trajanju od 48 h. Eksperimentalne grupe su nazvane po pesticidu (T = tiakloprid, K = klotianidin) i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze (5, 20 ili 50 puta niže u odnosu na LD_{50}). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu za nivo značajnosti $p < 0,05$ je dobijena jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom i označena je zvezdicom (*).

Povećana aktivnost enzima u odnosu na kontrolnu grupu je zapažena nakon tretmana tiaklopridom u eksperimentalnoj grupi T20 i klotianidinom u eksperimentalnim grupama K5 i K50.

5.1.3. Aktivnost antioksidativnih enzima

Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation S-transferaze (GST), glavnih enzima antioksidativne zaštite, izmerena je u homogenatima celih pčela koje su tretirane različitim koncentracijama tiakloprida i klotianidina (Prilog 1) i prikazana na Grafiku 2.



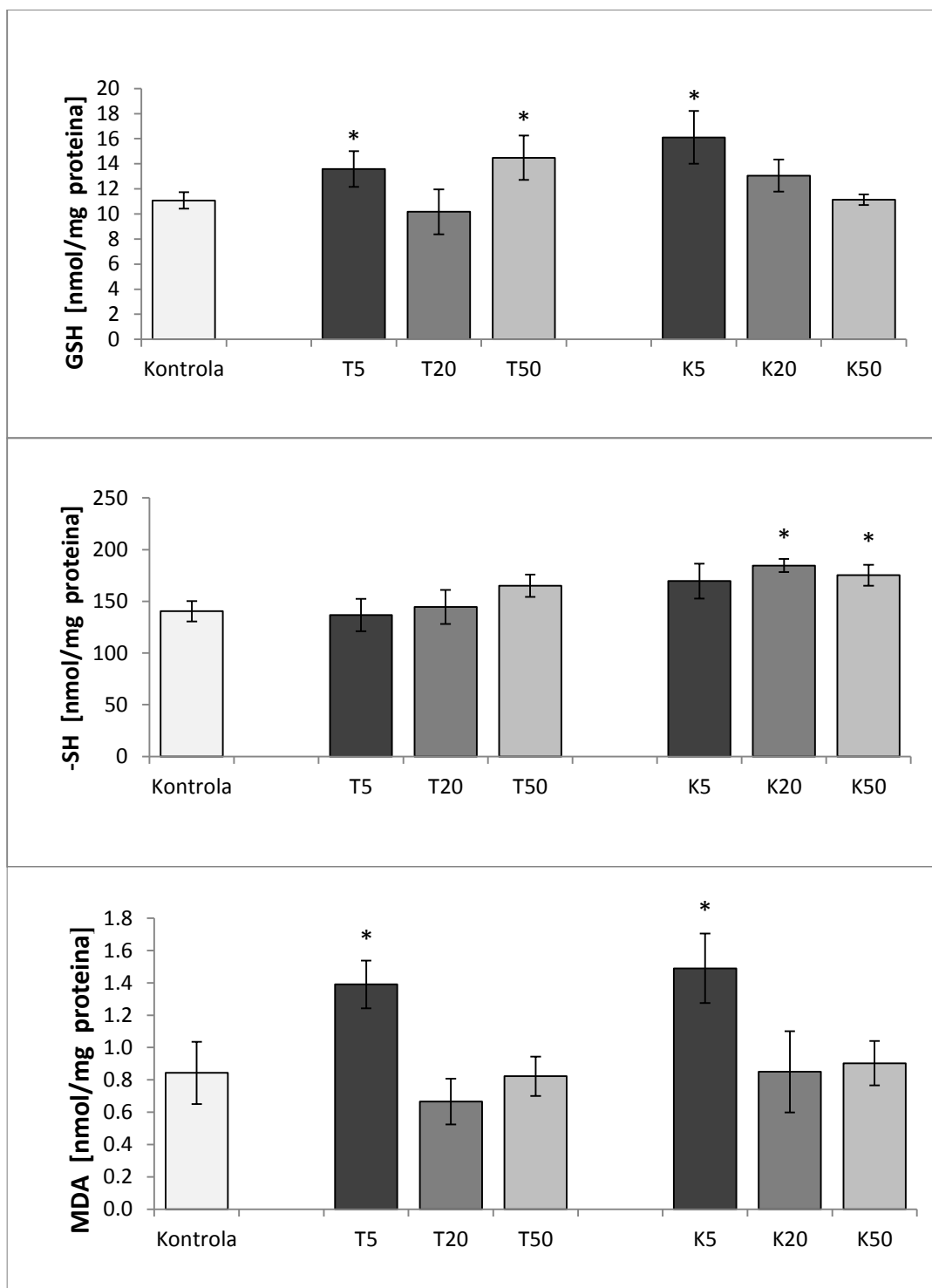
Grafik 2. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation S-transferaze (GST) u homogenatu celih pčela tretiranih tiaklopridom (T) i klotianidinom (K) u trajanju od 48 h. Eksperimentalne grupe su nazvane po pesticidu (T = tiakloprid, K = klotianidin) i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze (5, 20 ili 50 puta niže u odnosu na LD_{50}). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu za nivo značajnosti $p < 0,05$ je dobijena jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom i označena je zvezdicom (*).

Specifične aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze nisu bile promjenjene nakon tretmana tiaklopridom, dok je tretman klotianidinom izazvao povećanje aktivnosti enzima u eksperimentalnim grupama K5 i K50 za SOD, odnosno K20 i K50 za CAT.

Specifična aktivnost glutation *S*-transferaze je, nakon tretmana tiaklopridom, snižena u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu, dok je kod tretmana klotianidinom samo najveća koncentracija (K5) izazvala značajno smanjenje aktivnosti GST u odnosu na kontrolu.

5.1.4. Procena redoks statusa

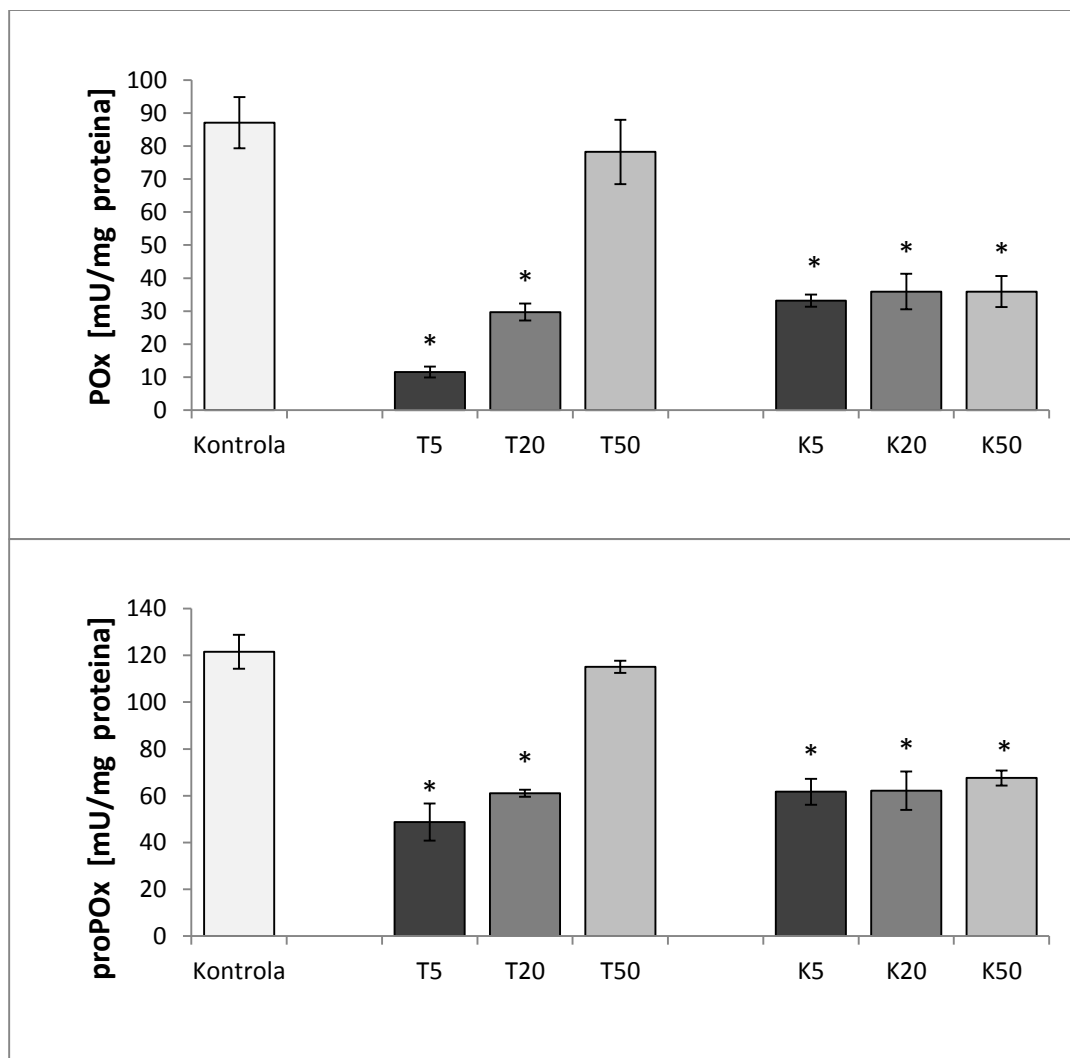
Redoks status pčela je procenjen određivanjem koncentracije redukovanog glutationa (GSH), sulfhidrilnih grupa proteina (-SH) i malondialdehida (MDA). Navedeni parametri su određivani u homogenatu celih pčela koje su tretirane različitim koncentracijama tiakloprida i klotianidina (Prilog 1), a rezultati su prikazani na Grafiku 3. Tretman pesticidima je izazvao povećanje koncentracije GSH u T5, T50 i K5 eksperimentalnim grupama, kao i povećanje sadržaja -SH grupa u K20 i K50 eksperimentalnim grupama. Koncentracija malondialdehida, markera lipidne peroksidacije, je takođe bila povećana u eksperimentalnim grupama sa najvećom primenjenom dozom tiakloprida i klotianidina (T5 i K5).



Grafik 3. Koncentracija redukovanog glutationa (GSH), sulfhidrilnih grupa proteina (-SH) i malondialdehida (MDA) u homogenatu celih pčela tretiranih tiaklopridom (T) i klotianidinom (K) u trajanju od 48 h. Eksperimentalne grupe su nazvane po pesticidu (T = tiakloprid, K = klotianidin) i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze (5, 20 ili 50 puta niže u odnosu na LD_{50}). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu za nivo značajnosti $p < 0,05$ je dobijena jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom i označena je zvezdicom (*).

5.1.5. Aktivnost enzimâ fenol oksidaze i profenol oksidaze

Specifična aktivnost fenol oksidaze i profenol oksidaze (POx i proPOx), određena u hemolimfi pčela koje su tretirane različitim koncentracijama tiakloprida i klotianidina (Prilog 1), prikazana je na Grafiku 4.



Grafik 4. Specifična aktivnost fenol oksidaze (POx) i profenol oksidaze (proPOx) u hemolimfi pčela tretiranih tiaklopridom (T) i klotianidinom (K) u trajanju od 48 h. Eksperimentalne grupe su nazvane po pesticidu (T = tiakloprid, K = klotianidin) i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze (5, 20 ili 50 puta niže u odnosu na LD_{50}). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu za nivo značajnosti $p < 0,05$ je dobijena jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom i označena je zvezdicom (*).

U poređenju sa kontrolnom grupom, tretman pesticidima je izazvao smanjenje aktivnosti fenol oksidaze i profenol oksidaze u svim eksperimentalnim grupama izuzev T50 gde je aplicirana najmanja doza pesticida.

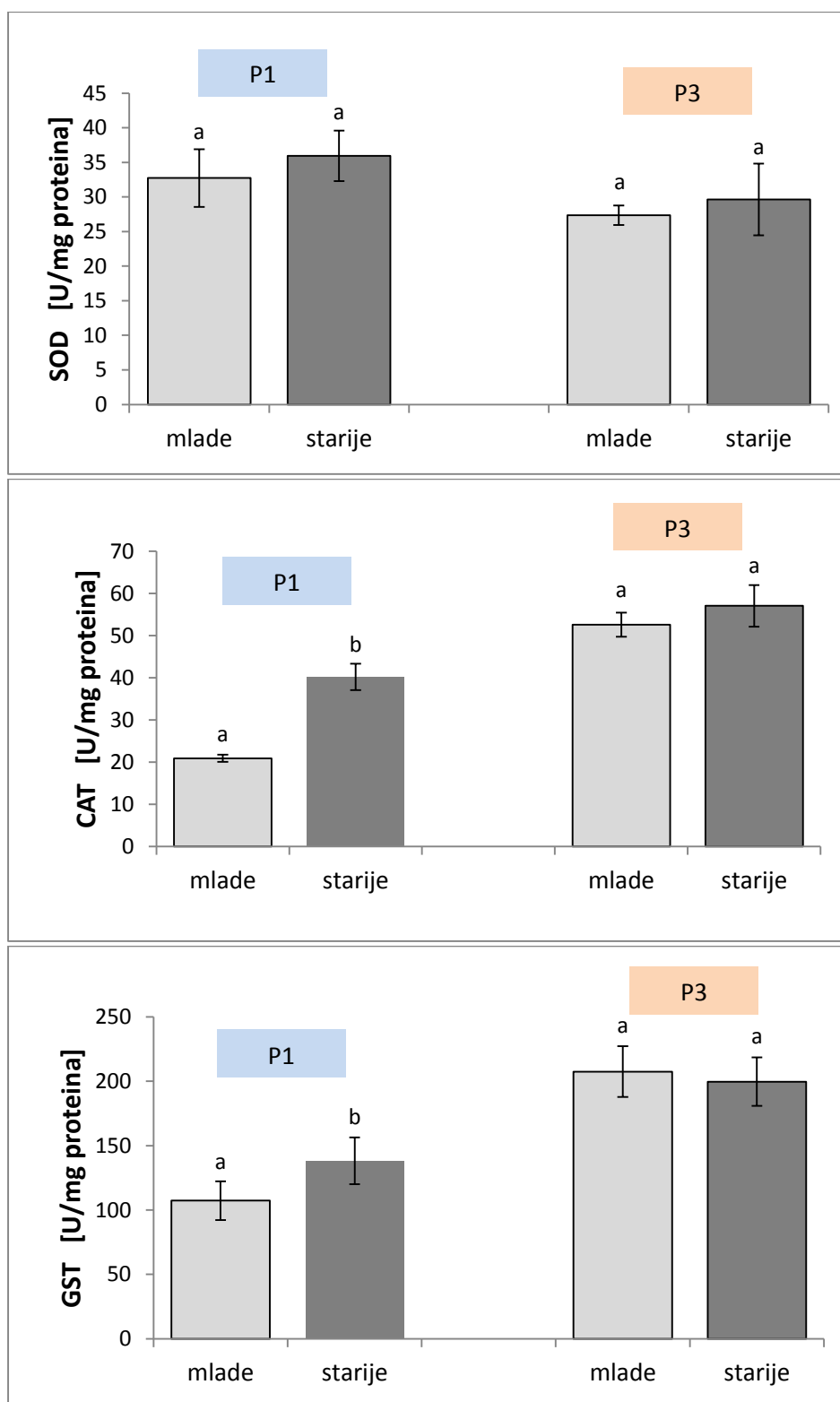
5.2. Rezultati analize biokemijskih i fizioloških parametara pčelinjih zajednica pod uticajem starosti pčela, sezone i tipa pčelinjaka

U okviru ove faze doktorske disertacije, ispitan je uticaj starosti pčela, sezone godine i tipa pčelinjaka, na biokemijsko-fiziološke parametre kojima opisujemo stanje medonosne pčele (Prilog 2).

5.2.1. Uticaj faktora: starost pčela

Sa ciljem ispitivanja uticaja starosti pčela na parametre stanja medonosne pčele, u homogenatima mladih i starijih pčela uzorkovanih tokom leta (Tabela 5), iz košnica sa stacionarnog (P1 – Petrovaradin) i migratornog pčelinjaka (P3 – Ravno Selo), analizirana je aktivnost antioksidativnih enzima. Rezultati su prikazani na Grafiku 5.

Rezultati analize antioksidativnog statusa pčela iz pčelinjaka P1 ukazuju na statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze i glutation *S*-transferaze kod starijih pčela u odnosu na mlade pčele, dok se aktivnost superoksid dismutaze nije značajno menjala. Aktivnost antioksidativnih enzima u homogenatima pčela iz pčelinjaka P3 se nije značajno menjala kod starijih pčela.

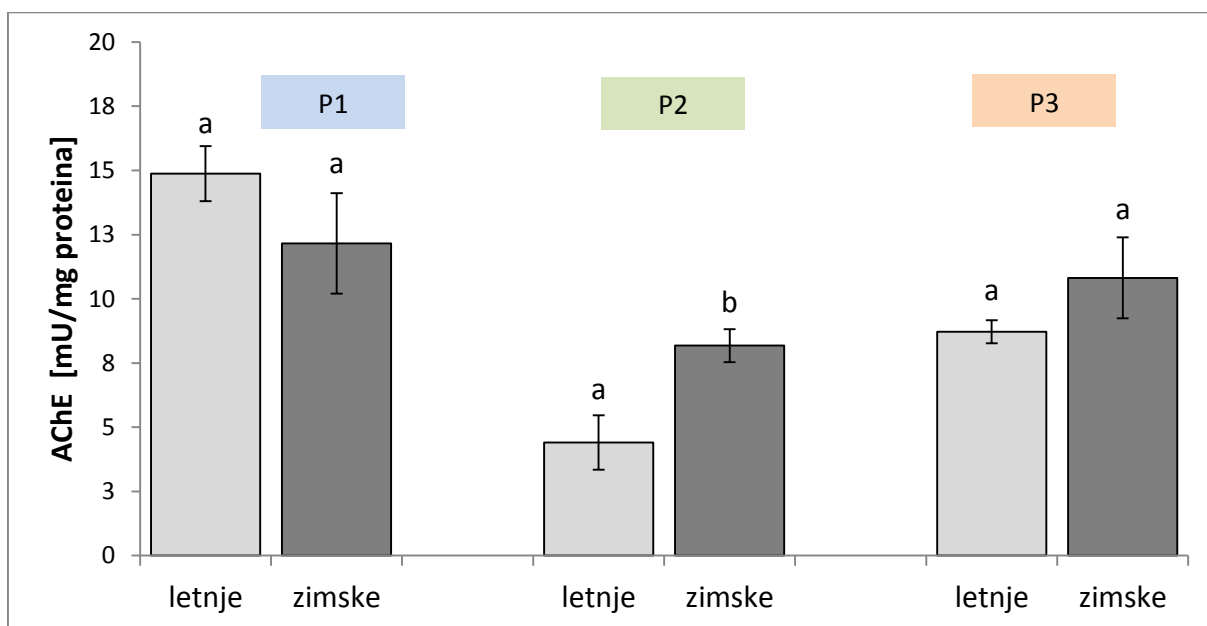


Grafik 5. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation S-transferaze (GST) u homogenatima mladih i starijih pčela iz košnica sa stacionarnog (P1-Petrovaradin) i migratornog (P3-Ravno Selo) pčelinjaka. Različita slova između grupa u okviru jednog pčelinjaka ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (t-test za nivo značajnosti $p < 0,05$).

5.2.2. Uticaj faktora: sezona godine

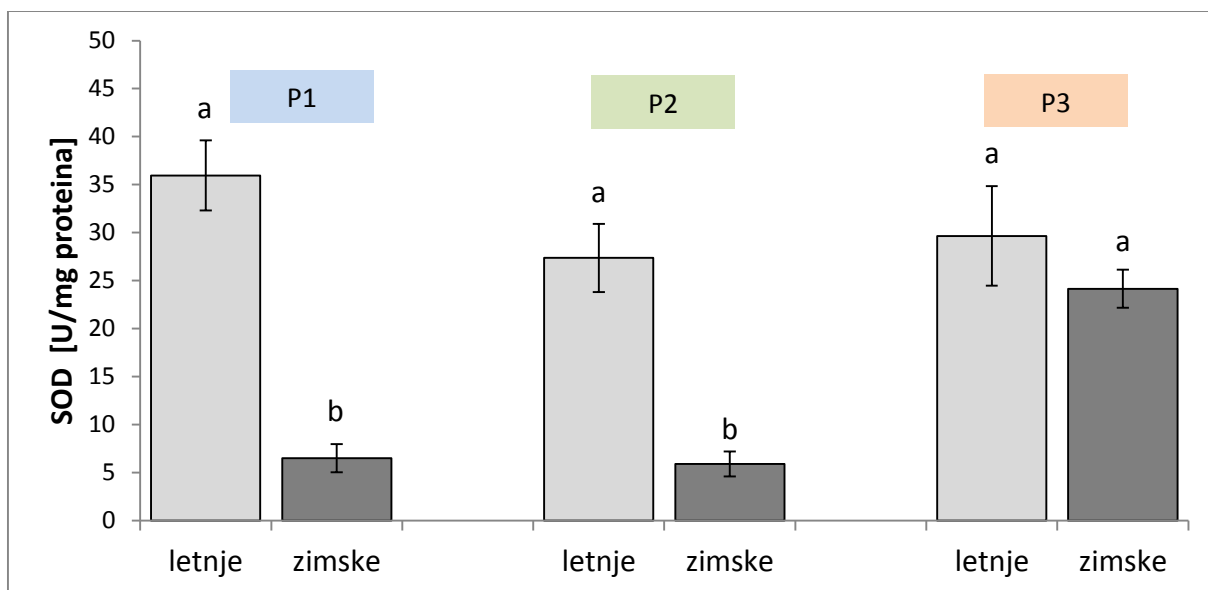
Da bi ispitali uticaj sezone, analize parametara stanja medonosne pčele su vršene u homogenatima starijih pčela koje su uzorkovane tokom letnjeg aktivnog perioda (letnje) i tokom zimskog perioda mirovanja pčela (zimске) iz košnica sa jednog stacionarnog pčelinjaka (P1 – Petrovaradin) i dva migratorna pčelinjaka (P2 – Beočin i P3 – Ravno Selo).

Aktivnost acetilholinesteraze (AChE) je bila povećana kod zimskih pčela u odnosu na letnje samo u uzorcima sa migratornog pčelinjaka P2, dok se u drugom migratornom (P3) i stacionarnom (P1) pčelinjaku nije značajno menjala (Grafik 6).

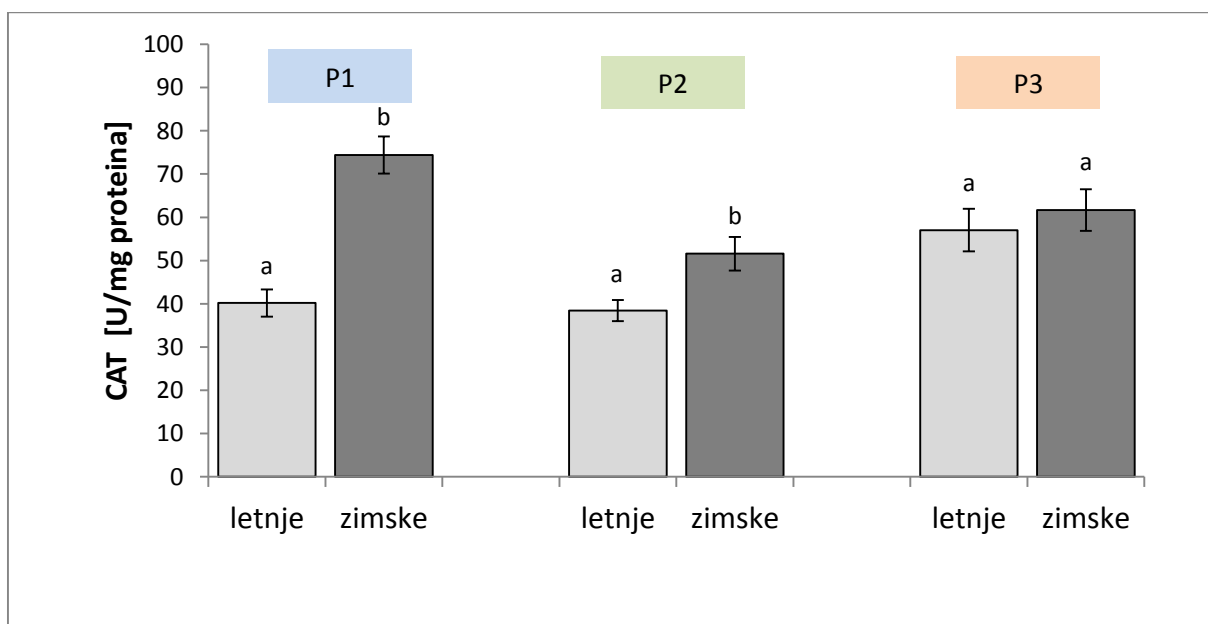


Grafik 6. Specifična aktivnost acetilholinesteraze (AChE) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa tri pčelinjaka (P1-Petrovaradin, P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru jednog pčelinjaka ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (t-test za nivo značajnosti $p < 0,05$).

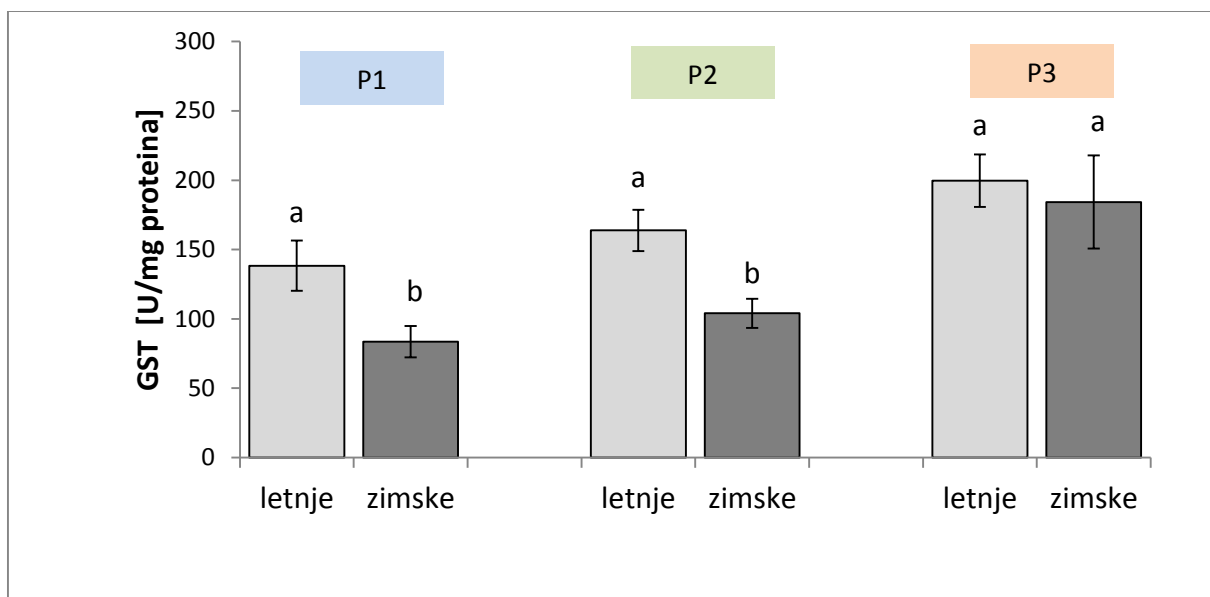
Aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD) i glutation S-transferaze (GST) su pokazale statistički značajno niže aktivnosti kod zimskih pčela u odnosu na letnje za uzorke sa pčelinjaka P1 i P2, dok se u uzorcima pčela sa pčelinjaka P3 zapaža samo trend smanjenja aktivnosti navedenih enzima, bez statističke značajnosti (Grafici 7 i 9). Aktivnost katalaze (CAT) u pčelinjacima P1 i P2 je pokazala obrnut obrazac u odnosu na aktivnost SOD i GST, tj. uočeno je statistički značajno povećanje aktivnosti CAT kod zimskih pčela u poređenju sa letnjim (Grafik 8).



Grafik 7. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa tri pčelinjaka (P1-Petrovaradin, P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru jednog pčelinjaka ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (t-test za nivo značajnosti $p < 0,05$).

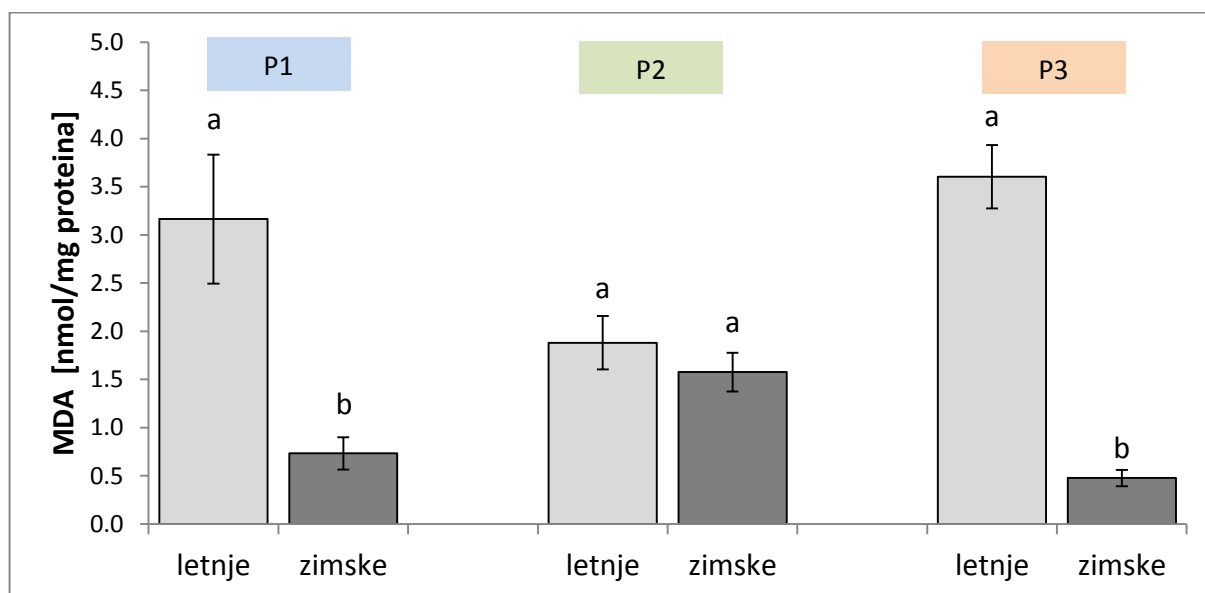


Grafik 8. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa tri pčelinjaka (P1-Petrovaradin, P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru jednog pčelinjaka ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (t-test za nivo značajnosti $p < 0,05$).



Grafik 9. Specifična aktivnost glutation S-transferaze (GST) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa tri pčelinjaka (P1-Petrovaradin, P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru jednog pčelinjaka ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (t-test za nivo značajnosti $p < 0,05$).

Rezultati merenja koncentracije malondialdehida (MDA) u homogenatima letnjih i zimskih pčela su prikazani na Grafiku 10. Zapaženo je smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije kod zimskih pčela u odnosu na letnje za uzorke sa pčelinjaka P1 i P3, dok je smanjenje koncentracije MDA u pčelinjaku P2 bez statističke značajnosti.

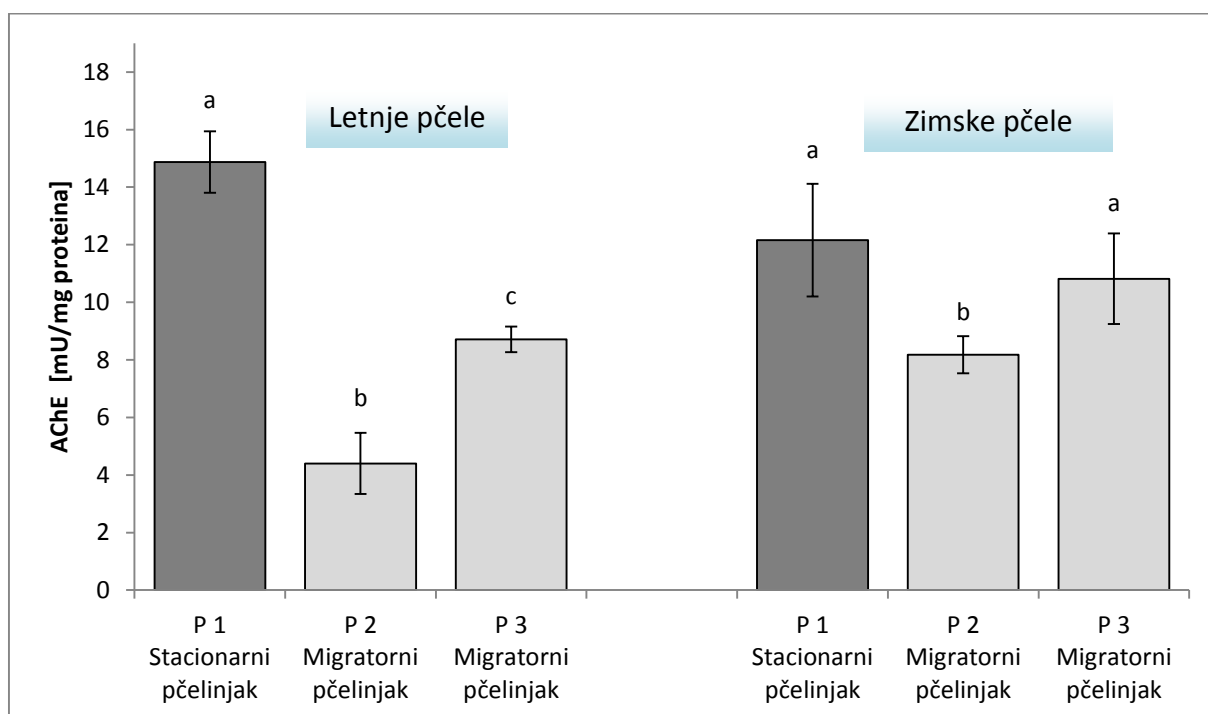


Grafik 10. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa tri pčelinjaka (P1-Petrovaradin, P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru jednog pčelinjaka ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (t-test za nivo značajnosti $p < 0,05$).

5.2.3. Uticaj faktora: tip pčelinjaka

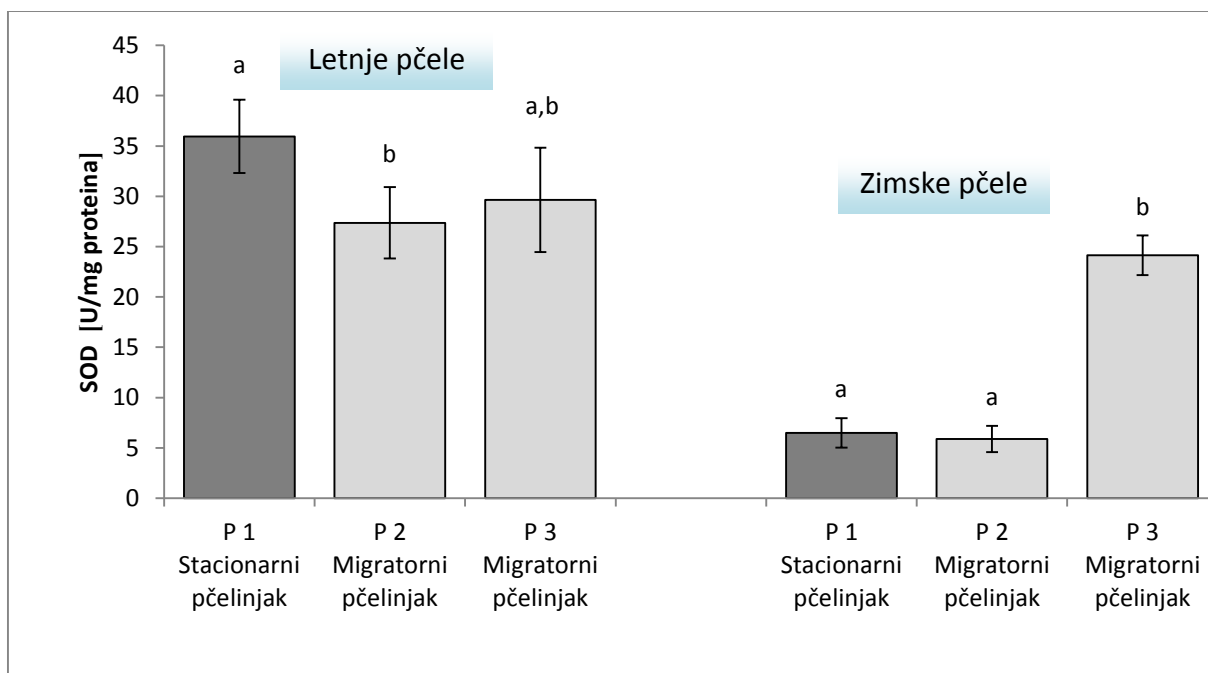
Sa ciljem boljeg uvida u bihemijske i fiziološke parametre stanja pčelinjih kolonija u zavisnosti od tipa pčelinjaka, rezultati analiza vršenih u homogenatima starijih pčela iz košnica sa jednog stacionarnog pčelinjaka (P1 – Petrovaradin) i dva migratorna pčelinjaka (P2 – Beočin i P3 – Ravno Selo) su preuređeni radi boljeg prikaza promena između sva tri analizirana pčelinjaka tokom letnjeg (letnje pčele) i zimskog perioda (zimске pčele).

Dobijene vrednosti za aktivnost acetilholinesteraze (AChE) ukazuju na smanjenu aktivnost enzima kod letnjih i zimskih pčela iz migratornih pčelinjaka P2 i P3 u poređenju sa stacionarnim pčelinjakom P1 (Grafik 11).

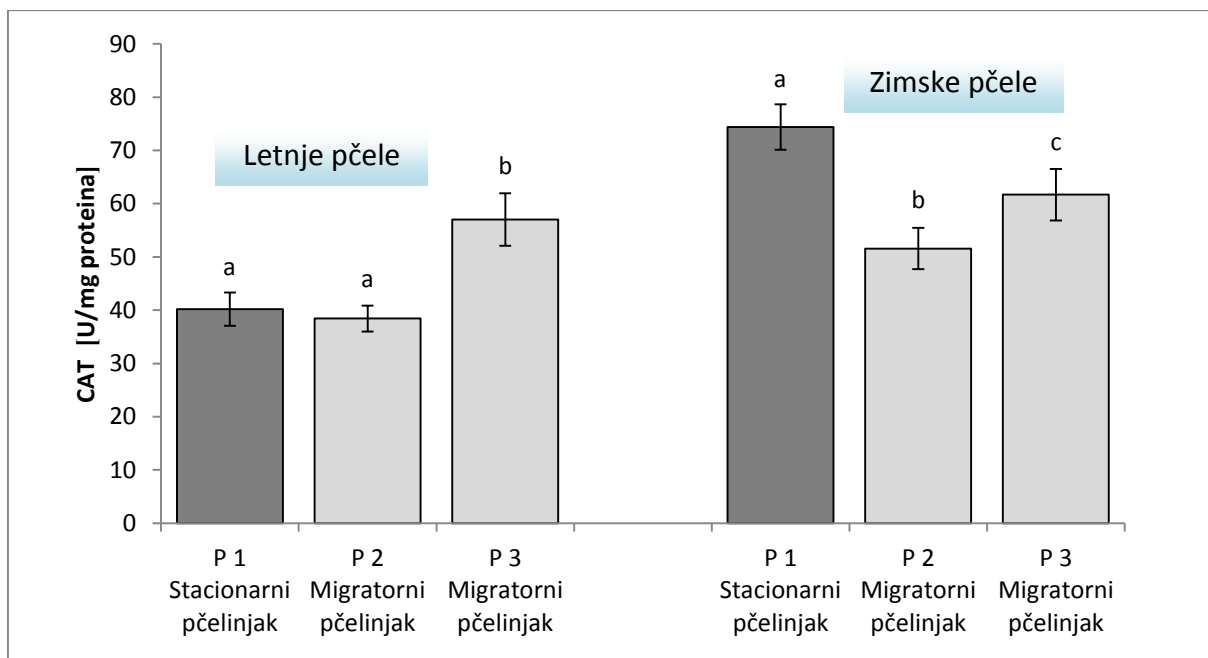


Grafik 11. Specifična aktivnost acetilholinesteraze (AChE) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa stacionarnog (P1-Petrovaradin) i dva migratorna pčelinjaka (P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru kategorije letnjih ili zimskih pčela ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (*t*-test za nivo značajnosti $p < 0,05$).

Dobijene vrednosti za aktivnost antioksidativnih enzima takođe ukazuju na postojanje statistički značajnih razlika između stacionarnog P1 i migratornih P2 i P3 pčelinjaka. U uzorcima letnjih pčela zapažen je pad aktivnosti SOD u migratornom pčelinjaku P2 u poređenju sa stacionarnim P1, dok je aktivnost CAT povećana u migratornom pčelinjaku P3 u odnosu na stacionarni pčelinjak P1. U uzorcima zimskih pčela je dobijen obrnut obrazac, aktivnost SOD je povećana u migratornom pčelinjaku P3 u odnosu na ostale, dok je aktivnost CAT u migratornim pčelinjacima P2 i P3 u padu u odnosu na stacionarni pčelinjak P1 (Grafici 12 i 13).

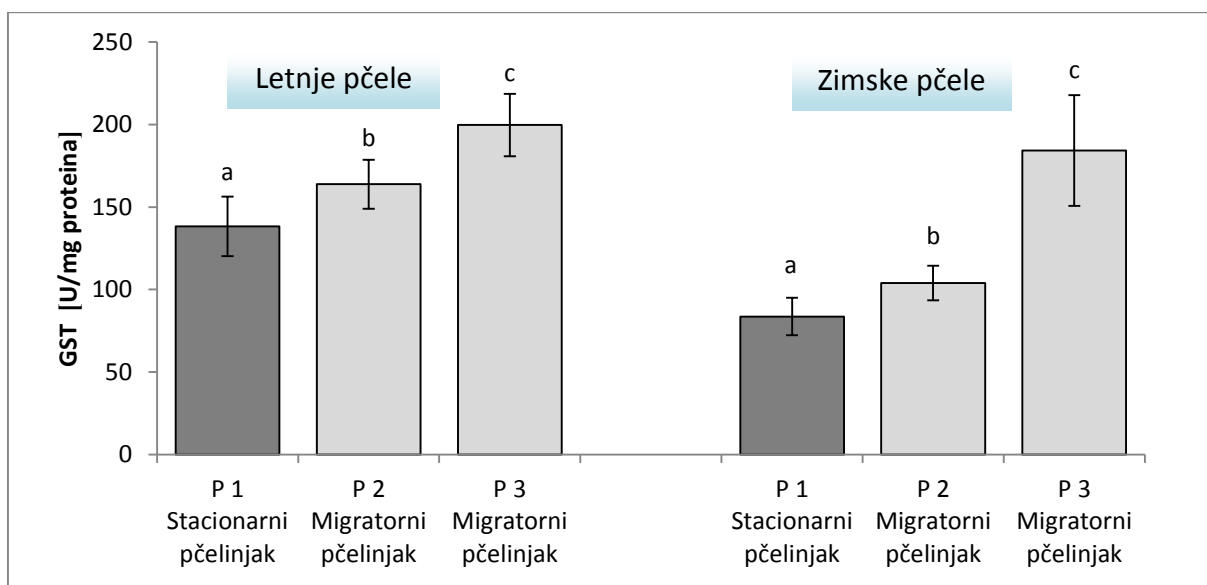


Grafik 12. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa stacionarnog (P1-Petrovaradin) i dva migratorna pčelinjaka (P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru kategorije letnjih ili zimskih pčela ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (t -test za nivo značajnosti $p < 0,05$).



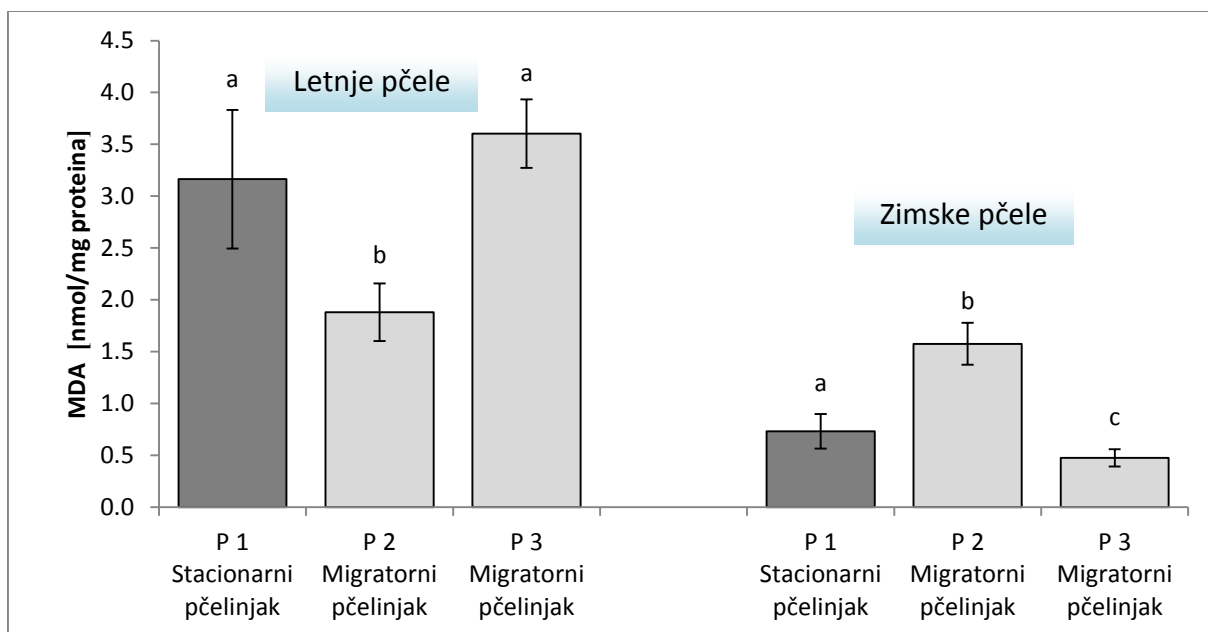
Grafik 13. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa stacionarnog (P1-Petrovaradin) i dva migratorna pčelinjaka (P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru kategorije letnjih ili zimskih pčela ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (t -test za nivo značajnosti $p < 0,05$).

Rezultati aktivnosti glutation *S*-transferaze ukazuju na povećanje aktivnosti enzima u uzorcima letnjih i zimskih pčela kod oba migratorna pčelinjaka (P2 i P3) u poređenju sa stacionarnim pčelinjakom P1 (Grafik 14).



Grafik 14. Specifična aktivnost glutation *S*-transferaze (GST) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa stacionarnog (P1-Petrovaradin) i dva migratorna pčelinjaka (P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru kategorije letnjih ili zimskih pčela ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (*t*-test za nivo značajnosti $p < 0,05$).

Rezultati određivanja koncentracije MDA pokazuju niži intenzitet lipidne peroksidacije u uzorcima letnjih pčela sa migratornog pčelinjaka P2 u poređenju sa stacionarnim P1 i drugim migratornim pčelinjakom P3. U uzorcima zimskih pčela, imamo obrnut prikaz tj. migratorni pčelinjak P2 se izdvaja sa značajno povećanim intenzitetom lipidne peroksidacije u odnosu na pčelinjake P1 i P3 (Grafik 15).



Grafik 15. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima letnjih i zimskih pčela iz košnica sa stacionarnog (P1-Petrovaradin) i dva migratorna pčelinjaka (P2-Beočin i P3-Ravno Selo). Različita slova između grupa u okviru kategorije letnjih ili zimskih pčela ukazuju na postojanje statistički značajne razlike (t-test za nivo značajnosti $p < 0,05$).

5.2.4. Melisopalinološka analiza

Da bi ispitali botaničko poreklo meda tj. zastupljenost polena biljnih vrsta sa kojih su pčele sakupljale nektar, izvedena je melisopalinološka analiza. Uzorkovanje meda je vršeno tokom letnjeg perioda i odgovara medu na kome su zazimele pčele (Tabela 5). Rezultati analize polena u medu iz košnica sa stacionarnog pčelinjaka u Petrovaradinu (P1) i migratornih pčelinjaka u Beočinu (P2) i Ravnom Selu (P3) su prikazani u Tabeli 9. Sadržaj medljike u analiziranim uzorcima meda je bio zanemarljiv ($< 0,5$).

Tabela 9. Rezultati zastupljenosti polena (%) u uzorcima meda iz košnica sa stacionarnog (P1 - Petrovaradin) i dva migratorna pčelinjaka (P2 - Beočin i P3 - Ravno Selo).

Pčelinjak	Dominatno	Značajno	Minorno
P1	<i>Robinia pseudoacacia</i> (85,3 %)	<i>Brassica napus</i>	<i>Apiaceae, Aster, Cornus, Filipendula, Helianthus, Pinus, Poaceae, Prunus, Sambucus, Tilia, Vitis, Xanthium</i>
P2	<i>Tilia</i> (71,2 %)	<i>Amorpha, Lotus, Brassica napus</i>	<i>Ailanthus, Apiaceae, Erigeron, Betula, Carduus, Clematis, Taraxacum, Filipendula, Helianthus, Ligustrum, Plantago, Prunus, Sambucus, Scabiosa, Zea mays</i>
P3	<i>Brassica napus</i> (67,5 %)	<i>Vitis, Rumex</i>	<i>Achilea, Ambrosia, Apiaceae, Artemisia, Betula, Carduus, Cariophyllaceae, Taraxacum, Filipendula, Frangula, Helianthus, Morus, Pinus, Plantago, Poaceae, Prunus, Robinia, Sambucus, Parthenocissus, Zea mays</i>

Dobijeni rezultati ukazuju na diverzitet polena koji je ključan za balansiranu ishranu pčela proteinima, masnim kiselinama i mineralima (Frias i sar., 2016). U uzorcima meda iz stacionarnog pčelinjaka P1 preovlađuje polen bagrema (85 %) te se ovaj med može svrstati u bagremov med visokog stepena monofloralnosti. Uzimajući u obzor zakonsku regulativu (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, Sl. glasnik RS, 101/2015), ovaj uzorak se može deklarirati kao monoflorni med od bagrema. U uzorcima meda iz migratornog pčelinjaka P2 preovlađuje polen lipe (71 %) te se ovaj med može svrstati u lipov med visokog stepena monofloralnosti. Odsustvo polena bagrema, veoma mali udeo polena uljane repice (3 %), kao i činjenica da identifikovani polen pripada biljkama koje cvetaju u vreme cvetanja lipe, ukazuje da se med sa ovog lokaliteta može deklarirati kao monoflorni lipov med. U uzorcima meda iz migratornog pčelinjaka P3 preovlađuje polen krstašica (67 %) uz prisustvo polena bagrema (3 %) i jabučastog i koštunjavog voća (3 %). Melisopalinološki rezultati ukazuju da u ovom medu dominira nektar biljaka koje cvetaju u prolećnom periodu. Imajući u vidu zakonsku regulativu i karakteristike tipičnog monoflornog meda u Evropi, ovaj uzorak se može deklarirati kao monoflorni med od uljane repice.

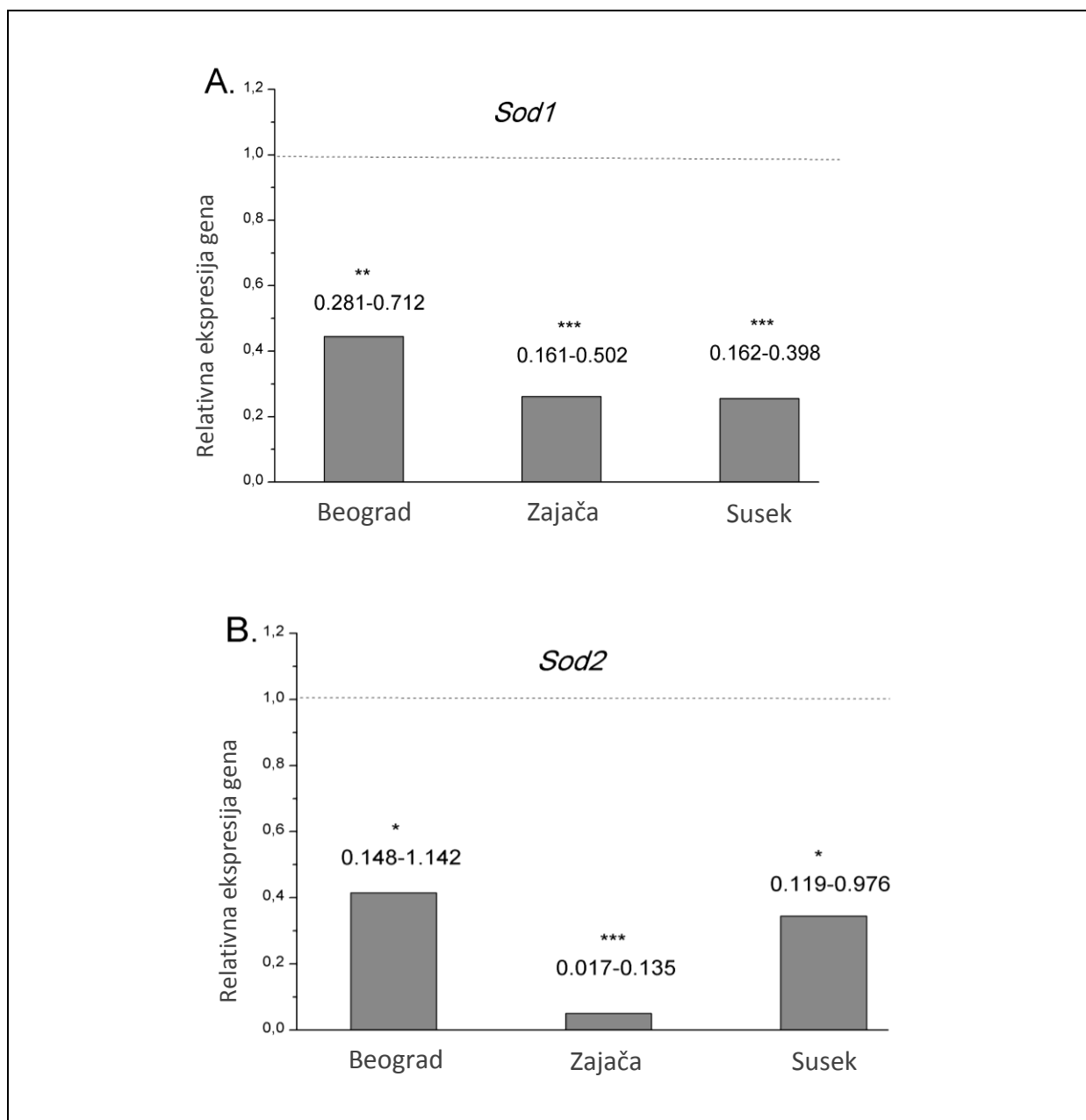
5.3. Rezultati analize pčelinjih zajednica i pčelinje hrane radi ispitivanja stanja medonosne pčele pod uticajem sezone i faktora sredine sa različitim antropogenim uticajem

U trećoj fazi istraživanja, odabir uzoraka medonosne pčele, kao i izbor biohemijskih i fizioloških parametara za analizu se zasnivao na rezultatima prve i druge faze ispitivanja. Koristile su se starije pčele radilice, uzorkovane tokom letnjeg kao i početkom i krajem zimskog perioda. Izabrani su stacionarni pčelinjaci sa tri lokaliteta u Republici Srbiji, koji obuhvataju područja sa različitim antropogenim uticajem (Beograd – urbano, Susek – ruralno i Zajača – industrijsko područje).

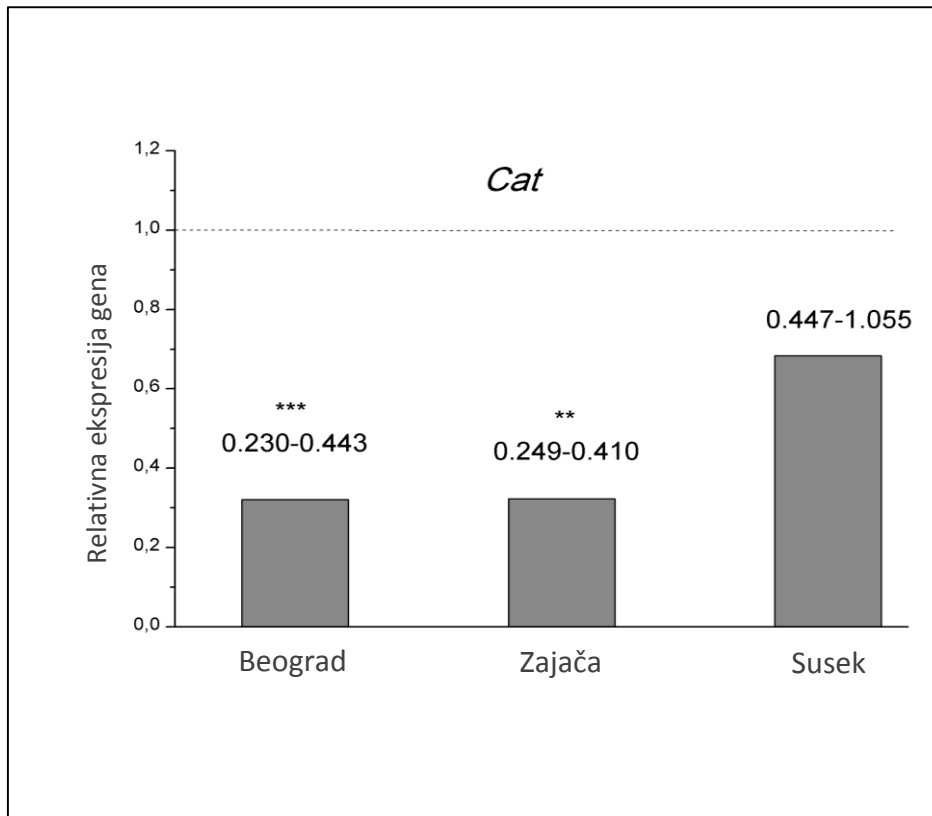
5.3.1. Ekspresija gena za antioksidativne enzime

Ekspresija gena za superoksid dismutazu, katalazu i glutation *S*-transferazu u uzorcima pčela iz Beograda, Zajače i Suseka je praćena samo tokom zime, tj. počekom i krajem perioda mirovanja, a rezultati su prikazani na Graficima 16-18. Početak perioda mirovanja pčela je kao eksperimentalna grupa izabran za kontrolnu grupu, te je u odnosu na nju računata relativna ekspresija gena krajem perioda mirovanja.

Rezultati ekspresije *Sod1* gena za citosolnu Cu,ZnSOD i *Sod2* gena za mitohondrijalnu MnSOD (Grafik 16) ukazuju na smanjenu ekspresiju u pčelama iz Beograda, Zajače i Suseka krajem perioda mirovanja u poređenju sa dobijenom ekspresijom gena početkom perioda mirovanja pčela. Takođe, u poređenju sa kontrolom, ekspresija *Cat* gena za katalazu je bila smanjena kod pčela sa sve tri lokacije (Grafik 17).

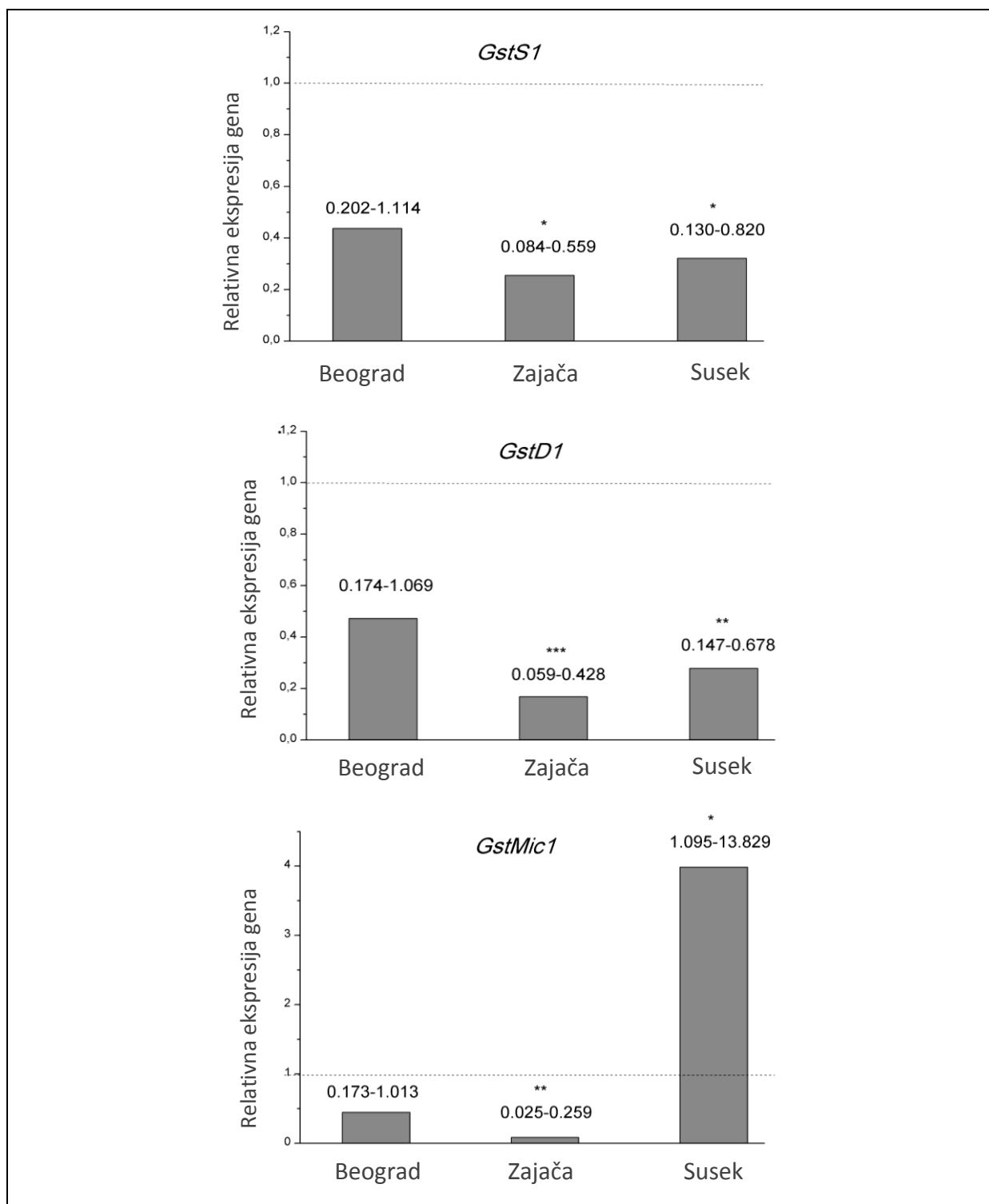


Grafik 16. Relativna ekspresija za dva gena za superoksid dismutazu: Sod1 (A) i Sod2 (B) u pčelama iz Beograda (urbano područje), Zajače (industrijsko područje) i Suseka (ruralno područje) krajem perioda mirovanja pčela (KPM) u poređenju sa početkom perioda mirovanja pčela (PPM, relativna ekspresija=1). Relativna genska ekspresija je izračunata pomoću programa REST2009 i testirana za statistički značajne razlike između kontrolnih i ciljnih grupa integrisanim „Bootstrap randomization” testom. Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića. Statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom su označene zvezdicama (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Grafik 17. Relativna ekspresija za dva gena za katalazu (*Cat*) u pčelama iz Beograda (urbano područje), Zajače (industrijsko područje) i Suseka (ruralno područje) krajem perioda mirovanja pčela (KPM) u poređenju sa početkom perioda mirovanja pčela (PPM, relativna ekspresija=1). Relativna genska ekspresija je izračunata pomoću programa REST2009 i testirana za statistički značajne razlike između kontrolnih i ciljnih grupa integrisanim „Bootstrap randomization” testom. Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića. Statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom su označene zvezdicama (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Relativne ekspresije gena *GstS1*, *GstD1* i *GstMic1* koji kodiraju tri klase GST, kod pčela u Beogradu, su pokazale tendenciju smanjenja ali ove varijacije nisu bile statistički značajne (Grafik 18). Kod pčela u Zajači, zapaža se smanjenje ekspresije svih analiziranih gena za GST za KPM period u poređenju sa kontrolnim PPM periodom. Ukoliko posmatramo pčele iz Suseka, možemo zapaziti da su geni *GstS1* i *GstD1* pokazali smanjenu ekspresiju, dok je jedino gen *GstMic1* imao povećanu ekspresiju u poređenju sa kontrolom (Grafik 18).

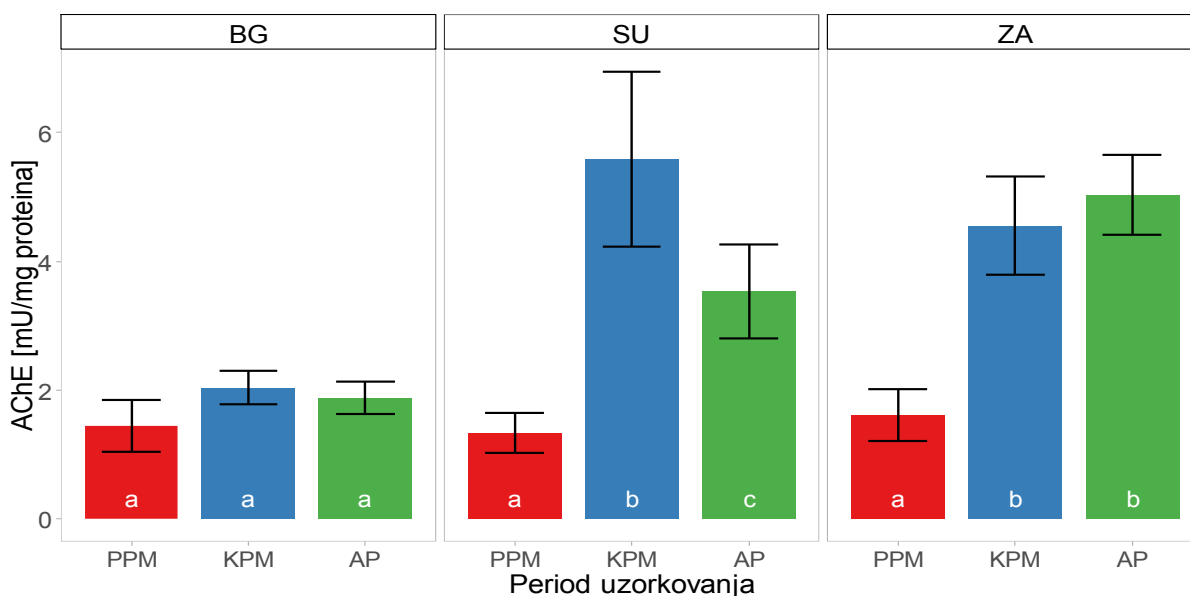


Grafik 18. Relativna ekspresija za tri gena za glutation S-transferazu (*GstS1*, *GstD1* i *GstMic1*) u pčelama iz Beograda (urbano područje), Zajače (industrijsko područje) i Suseka (ruralno područje) krajem perioda mirovanja pčela (KPM) u poređenju sa početkom perioda mirovanja pčela (PPM, relativna ekspresija=1). Relativna genska ekspresija je izračunata pomoću programa REST2009 i testirana za statistički značajne razlike između kontrolnih i ciljnih grupa integrisanim „Bootstrap randomization” testom. Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića. Statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom su označene zvezdicama (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3.2. Aktivnost enzima acetilholinesteraze

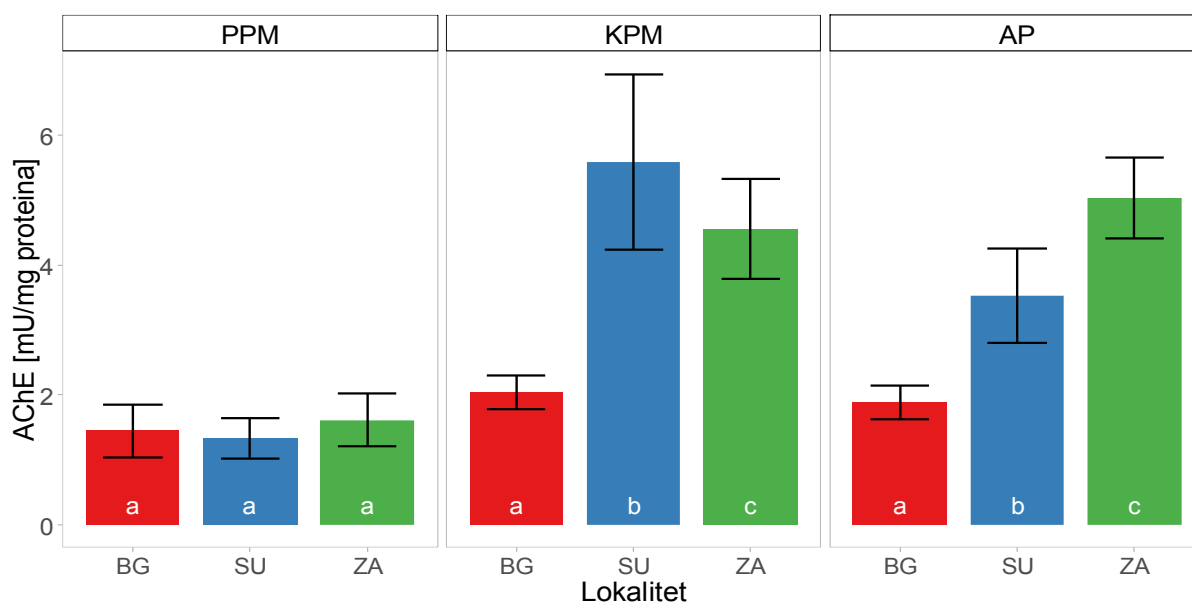
Specifična aktivnost acetilholinesteraze (AChE), izmerena u homogenatima celih pčela sa tri lokaliteta, početkom i krajem perioda mirovanja, kao i tokom aktivnog perioda (Prilog 3), prikazana je na Grafcima 19 i 20. Dobijeni rezultati su na Grafiku 19 poređeni u okviru istog lokaliteta u različitim periodima životnog ciklusa pčela, dok su na Grafiku 20 rezultati aktivnosti enzima prikazani poređenjem različitih lokaliteta tokom svakog perioda.

Posmatrajući promene u aktivnosti enzima tokom vremena za svaki lokalitet, zapažamo da u homogenatima pčela iz Beograda nije došlo do značajnih promena u aktivnosti AChE, dok je u homogenatima pčela iz Suseka i Zajače aktivnost enzima značajno viša krajem perioda mirovanja i tokom aktivnog perioda u odnosu na početak perioda mirovanja (Grafik 19).



Grafik 19. Specifična aktivnost acetilholinesteraze (AChE) u homogenatima pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Posmatrajući promene u aktivnosti enzima između različitih lokaliteta tokom svakog perioda, zapaženo je da početkom perioda mirovanja nije bilo značajnih razlika između lokaliteta, dok krajem perioda mirovanja i u aktivnom periodu imamo povećanje aktivnosti AChE u homogenatima pčela u Suseku i Zajači u odnosu na Beograd (Grafik 20).

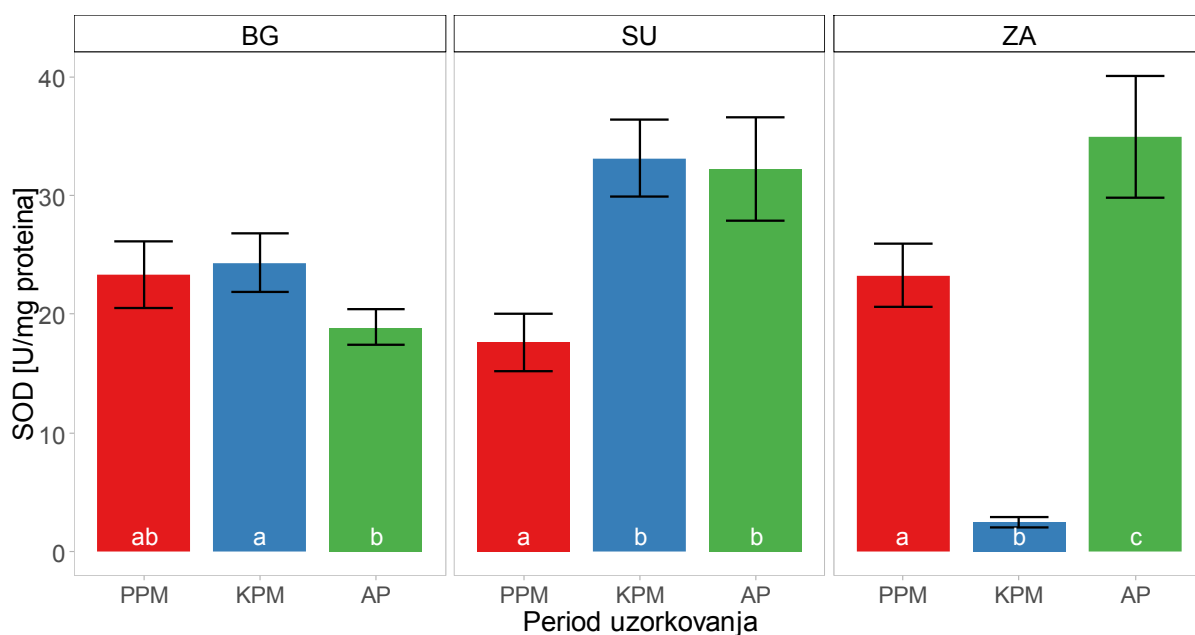


Grafik 20. Specifična aktivnost acetilholinesteraze (AChE) u homogenatima pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

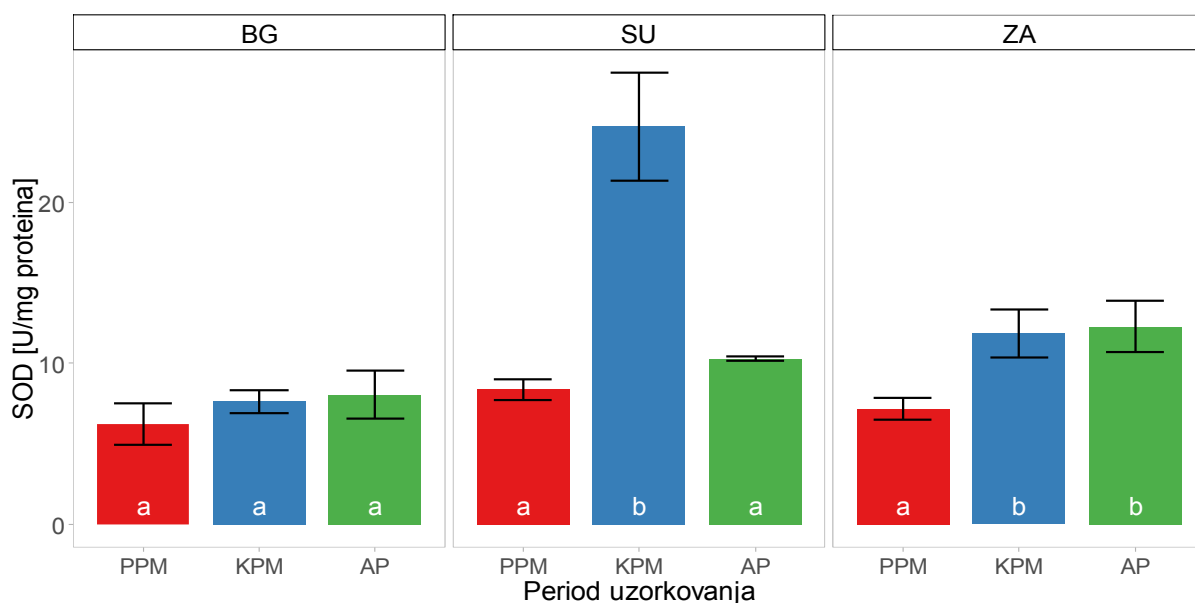
5.3.3. Aktivnost antioksidativnih enzima

Aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation S-transferaze (GST) izmerene u homogenatima celih pčela i hemolimfi pčela sa tri lokaliteta, početkom i krajem perioda mirovanja, kao i tokom aktivnog perioda (Prilog 3), prikazane su na Grafcima 21-32. Dobijeni rezultati aktivnosti enzima su poređeni na dva načina, u okviru svakog lokaliteta u različitim periodima životnog ciklusa pčela, kao i između različitih lokaliteta tokom svakog perioda. Merjenja aktivnosti antioksidativnih enzima u uzorcima pčela su pokazala da se aktivnost enzima menja tokom različitih perioda na svim analiziranim lokalitetima.

Aktivnost SOD – Posmatrajući promene u aktivnosti SOD u homogenatima pčela u okviru svakog lokaliteta, možemo zapaziti da u odnosu na KPM u urbanom području dolazi do pada aktivnosti SOD tokom aktivnog perioda, u ruralnom području imamo povećanje aktivnosti enzima krajem perioda mirovanja i u aktivnom periodu, dok u industrijskom području imamo nagli pad aktivnosti SOD krajem perioda mirovanja i najveće vrednosti zabeležene u aktivnom periodu (Grafik 21). U uzorcima hemolimfe pčela, u ruralnom području je zabeležena najviša aktivnost enzima krajem perioda mirovanja, a u industrijskom području imamo povećanje aktivnosti SOD krajem perioda mirovanja koje se nastavlja i tokom aktivnog perioda, dok u urbanom regionu nije zabeležena promena aktivnosti SOD tokom ispitivanih sezona (Grafik 22).

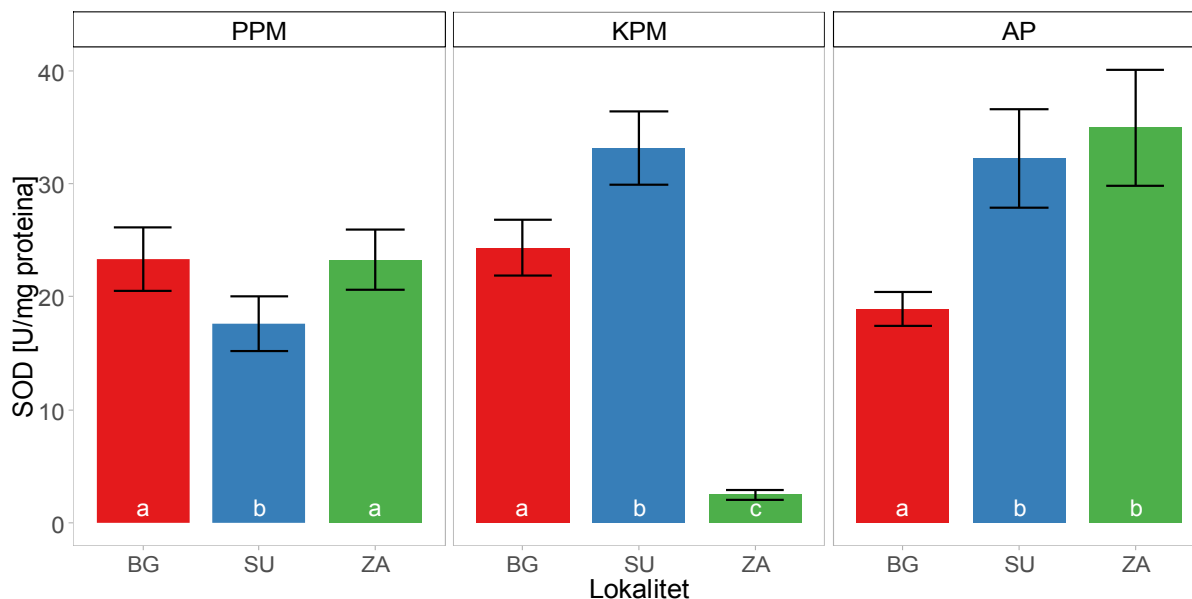


Grafik 21. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

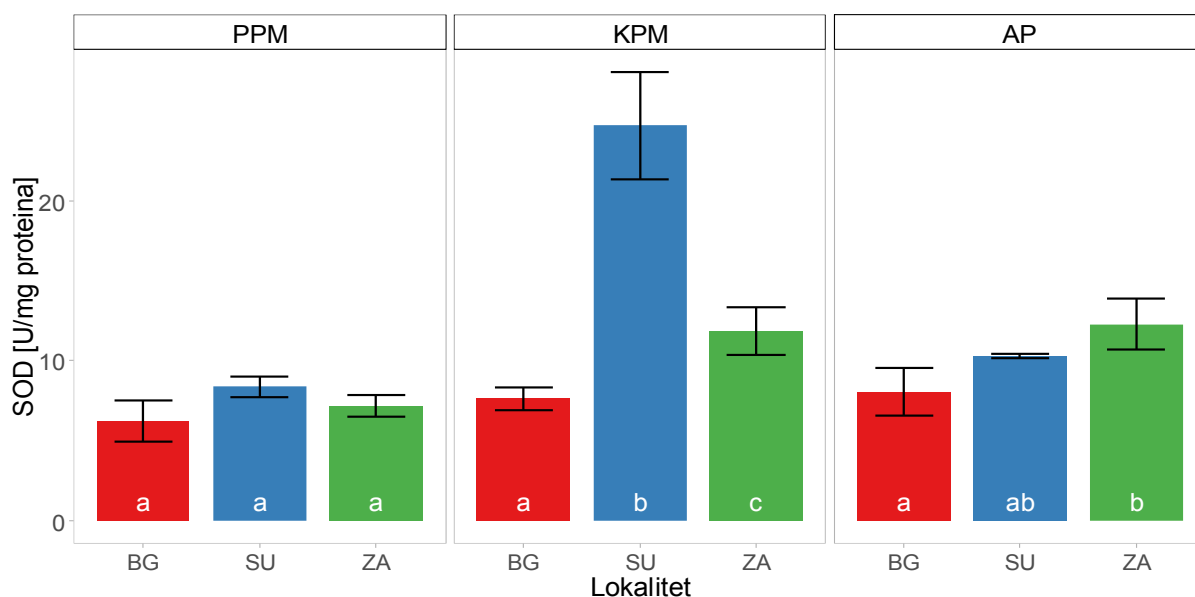


Grafik 22. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u hemolimfi pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Praćenjem promena u aktivnosti enzima tokom svakog perioda, zapaženo je značajno povećanje aktivnosti SOD u Suseku u odnosu na Beograd krajem perioda mirovanja u homogenatima i hemolimfi pčela, kao i tokom aktivnog perioda u homogenatima pčela. Međutim, početkom perioda mirovanja je u homogenatima pčela zabeležena niža aktivnost SOD u Suseku u odnosu na druga dva lokaliteta. Aktivnost SOD je bila značajno viša u Zajači u odnosu na Beograd tokom aktivnog perioda u homogenatima i hemolimfi pčela, kao i krajem perioda mirovanja samo u hemolimfi, dok je u homogenatima krajem perioda mirovanja zabeležena izuzetno niska aktivnost SOD kod pčela iz Zajače (Grafici 23 i 24).

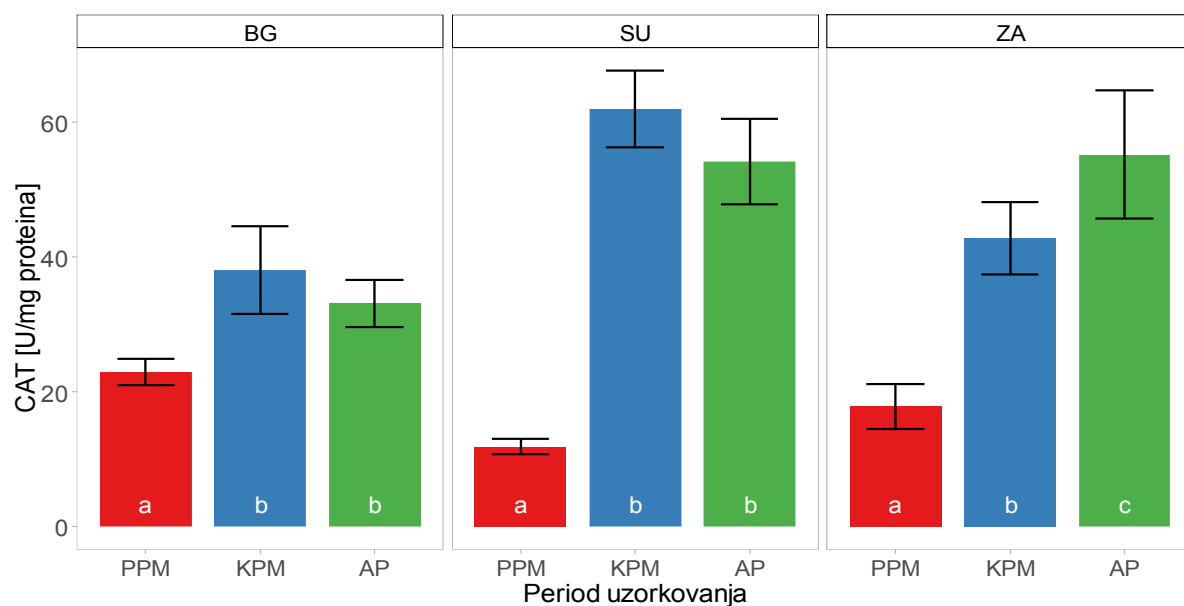


Grafik 23. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

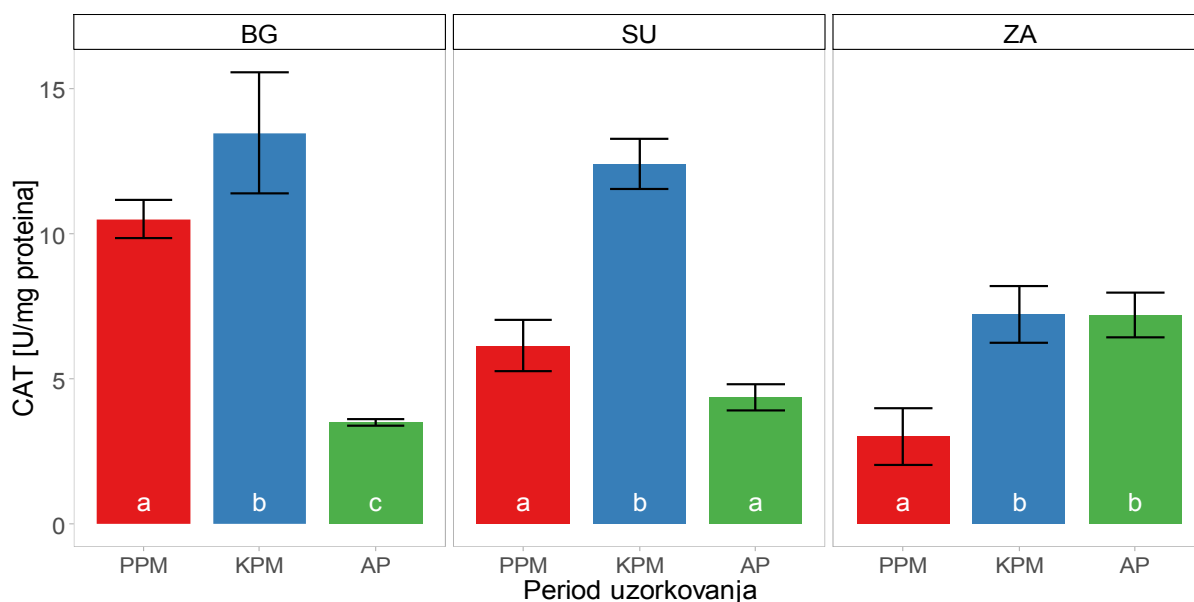


Grafik 24. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u hemolimfi pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Aktivnost CAT – Promene aktivnosti enzima katalaze u homogenatima i hemolimfi pčela u okviru svakog lokaliteta su prikazane na Graficima 25 i 26. Kod svih lokaliteta zapaža se povećanje aktivnosti CAT u homogenatima pčela krajem perioda mirovanja i tokom aktivnog perioda u odnosu na početak perioda mirovanja. Isti obrazac aktivnosti CAT u hemolimfi pčela zapažamo samo u Zajači, dok u Beogradu i Suseku imamo povećanje aktivnosti CAT početkom i krajem perioda mirovanja a zatim pad aktivnosti enzima u aktivnom periodu (Grafik 26).

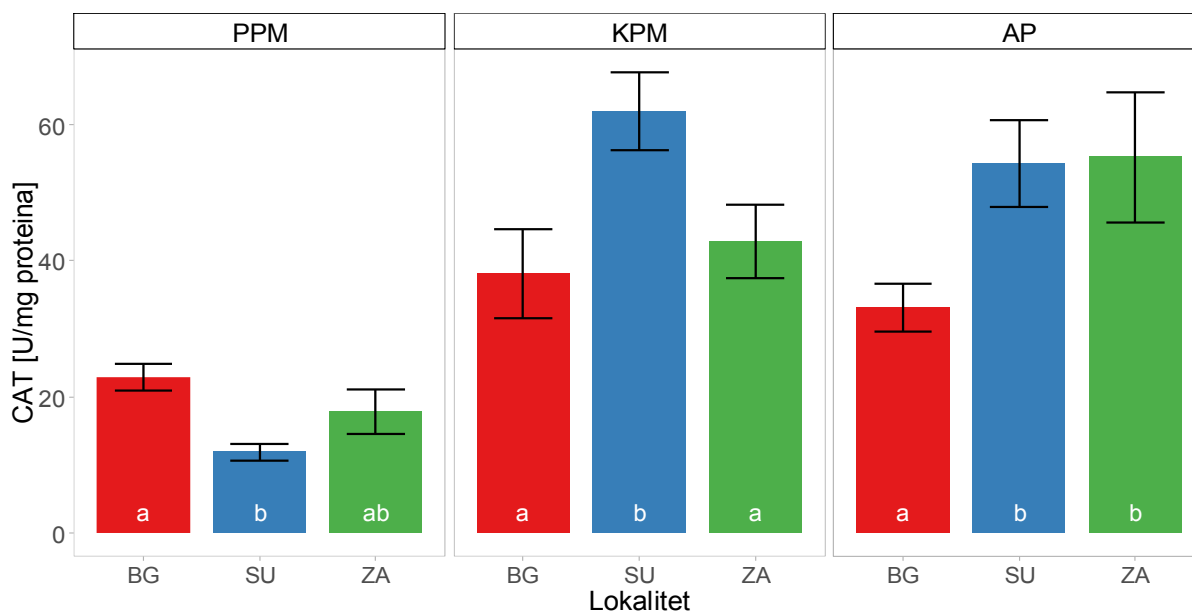


Grafik 25. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

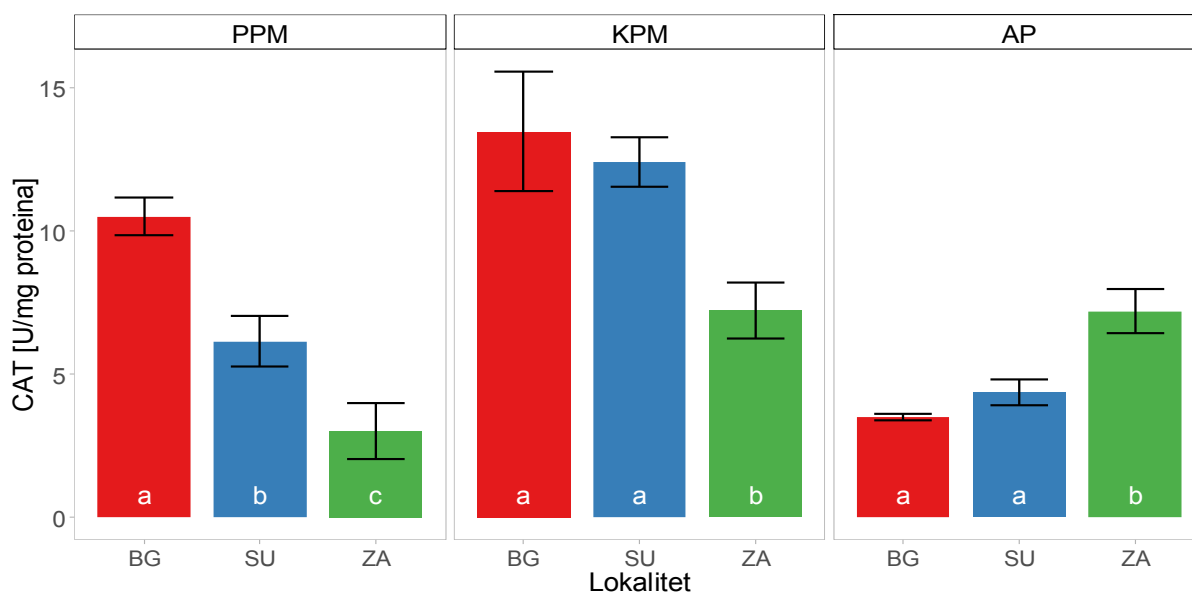


Grafik 26. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u hemolimfi pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati aktivnosti CAT u homogenatima i hemolimfi pčela su prikazani i na drugi način, tj. poređenjem aktivnosti enzima između različitih lokaliteta tokom svakog perioda (Grafici 27 i 28). Najviša aktivnost CAT početkom perioda mirovanja je izmerena u urbanom području, krajem perioda mirovanja najviše vrednosti su zabeležene u urbanom (samo u hemolimfi) i ruralnom području dok su u aktivnom periodu najviše aktivnosti enzima bile u ruralnom (samo u homogenatima) i industrijskom području (Grafici 27 i 28).

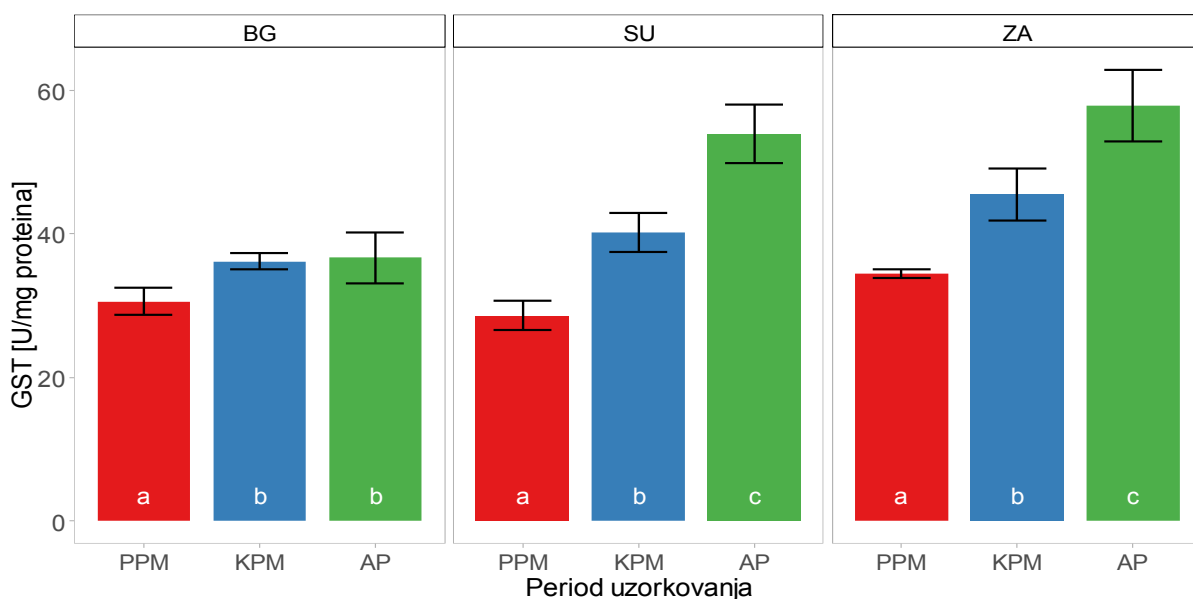


Grafik 27. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

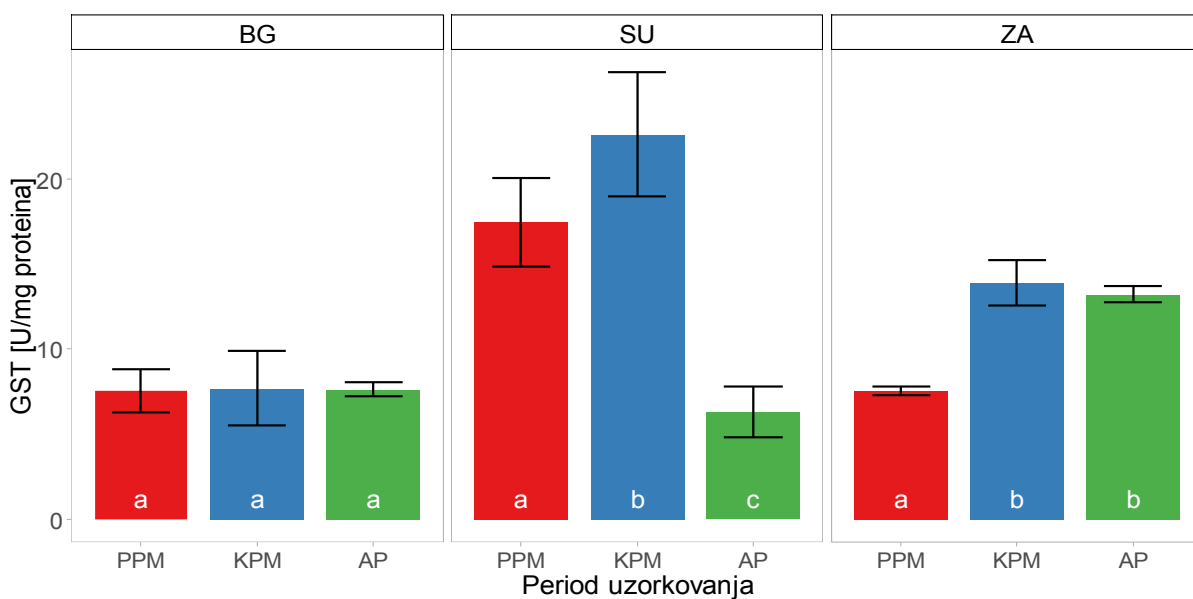


Grafik 28. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u hemolimfi pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Aktivnost GST – Promene aktivnosti enzima GST u homogenatima i hemolimfi pčela tokom godine, u okviru svakog lokaliteta, prikazane su na Graficima 29 i 30. Kod svih lokaliteta zapaža se povećanje aktivnosti GST u homogenatima pčela krajem perioda mirovanja i tokom aktivnog perioda u odnosu na početak perioda mirovanja. Za razliku od homogenata, u hemolimfi pčela u urbanom području nije bilo promena aktivnosti enzima a u ruralnom području je zapažen pad aktivnosti enzima u aktivnom periodu (Grafik 30).

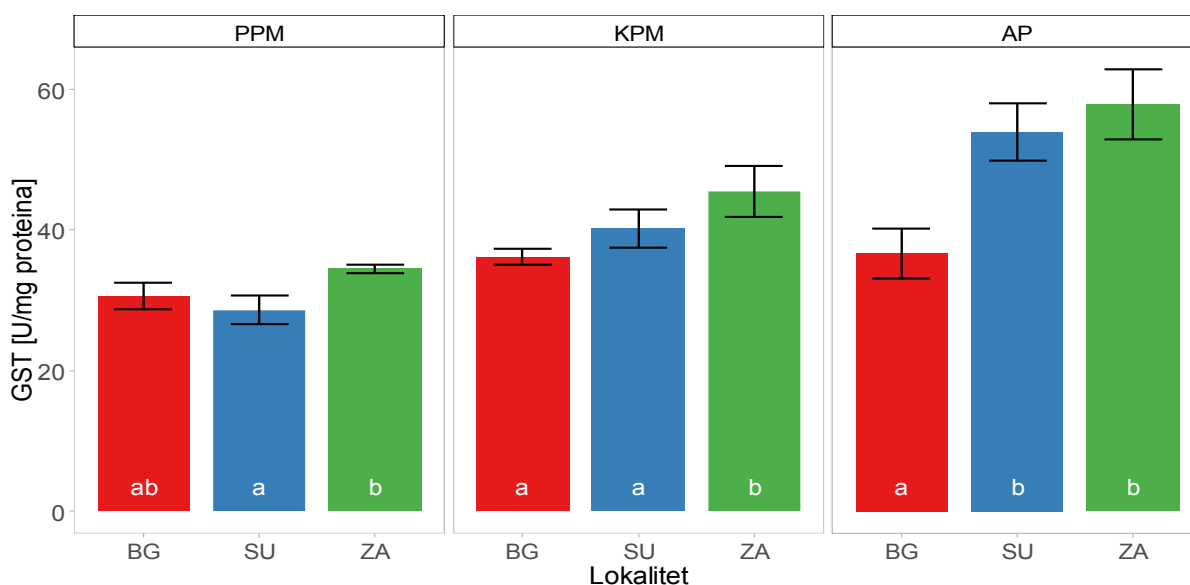


Grafik 29. Specifična aktivnost glutacion S-transferaze (GST) u homogenatima pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

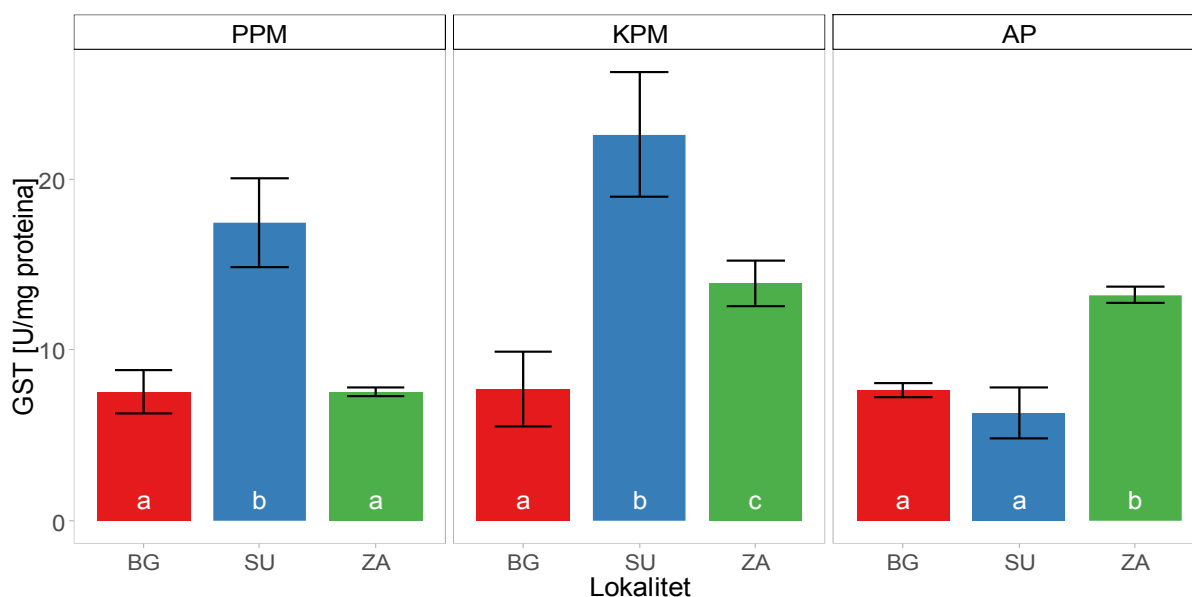


Grafik 30. Specifična aktivnost glutacion S-transferaze (GST) u hemolimfi pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati aktivnosti GST u homogenatima i hemolimfi pčela su takođe prikazani i na drugi način, tj. poređenjem aktivnosti enzima između različitih lokaliteta tokom svakog perioda (Grafici 31 i 32). Najviša aktivnost GST u homogenatima pčela, u okviru svakog perioda, zabeležena je u industrijskom području (Grafik 31). U hemolimfi pčela, aktivnost GST u Zajači je viša krajem perioda mirovanja i u aktivnom periodu u odnosu na urbani region, dok je početkom i krajem perioda mirovanja, tj. tokom zimskog perioda, najviša aktivnost enzima zabeležena u Suseku (Grafik 32).



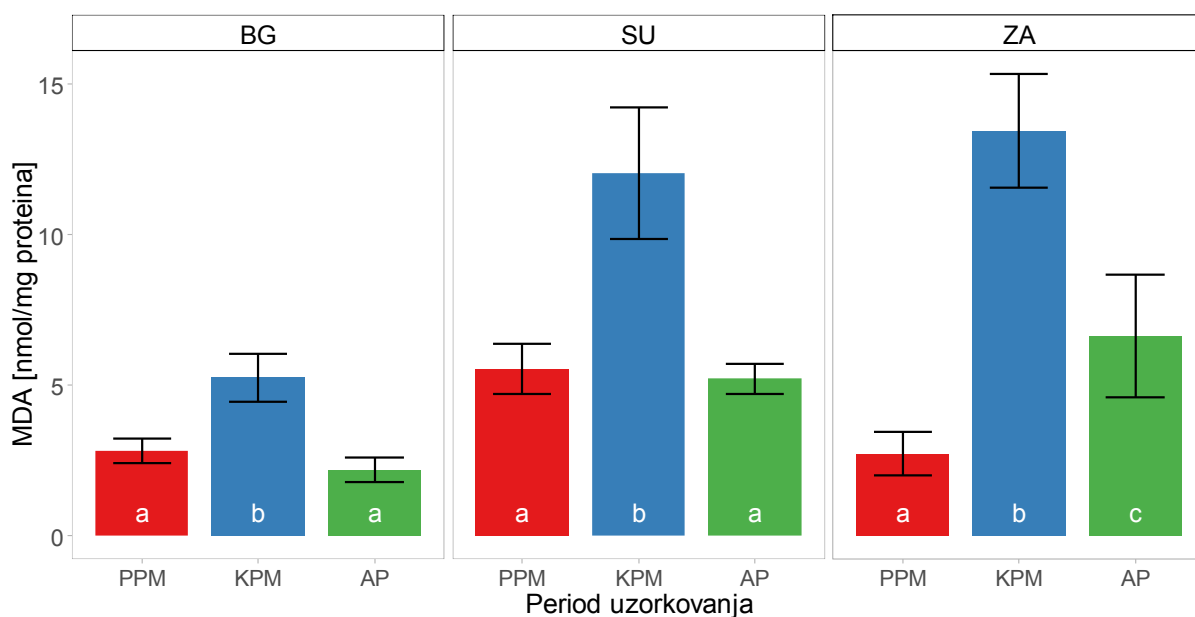
Grafik 31. Specifična aktivnost glutathion S-transferaze (GST) u homogenatima pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.



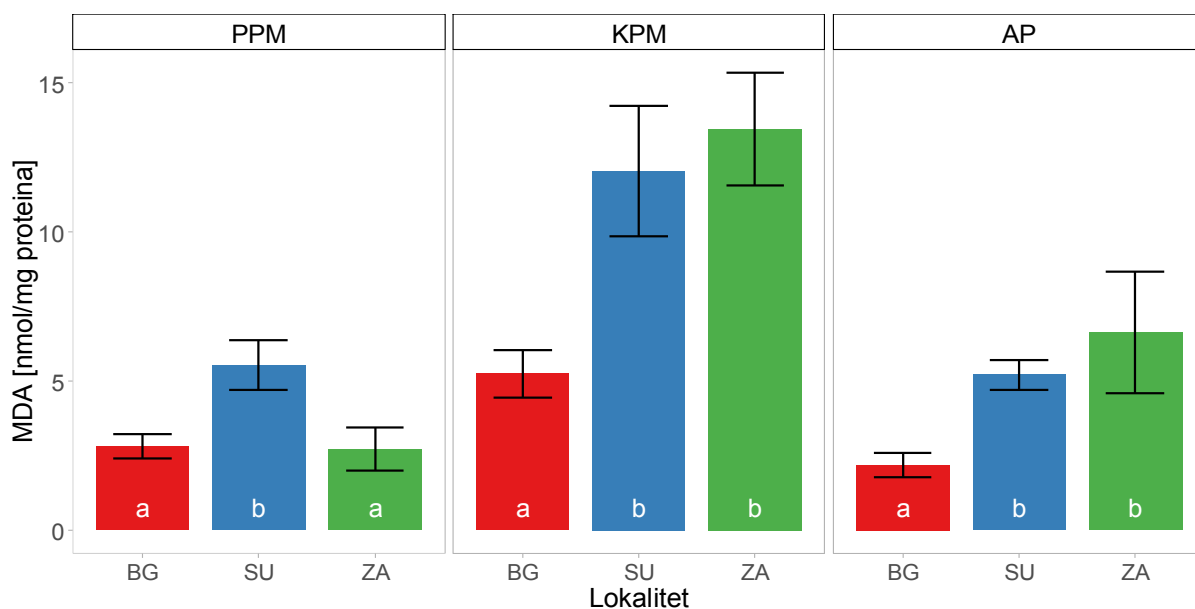
Grafik 32. Specifična aktivnost glutation S-transferaze (GST) u hemolimfi pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

5.3.4. Intenzitet lipidne peroksidacije

Promene u koncentraciji malondialdehida (MDA), tj. intenzitetu lipidne peroksidacije, u homogenatima pčela sa tri lokaliteta tokom tri perioda (Prilog 3), prikazane su na Grafcima 33 i 34. Dobijeni rezultati su poređeni na dva načina, u okviru svakog lokaliteta u različitim periodima životnog ciklusa pčela, kao i između različitih lokaliteta tokom svakog perioda. Ukoliko poredimo promene koncentracija MDA tokom godine u okviru svakog lokaliteta, značajno viši intenzitet lipidne peroksidacije je zabeležen krajem perioda mirovanja (Grafik 33). Ako poredimo promene koncentracija MDA u okviru iste sezone po lokalitetima, početkom perioda mirovanja je zabeleženo značajno povećanje koncentracije MDA u Suseku kao ruralnom području. Krajem perioda mirovanja i tokom aktivnog perioda značajno više koncentracije MDA su zabeležene u Suseku i Zajači u poređenju sa Beogradom (Grafik 34).



Grafik 33. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

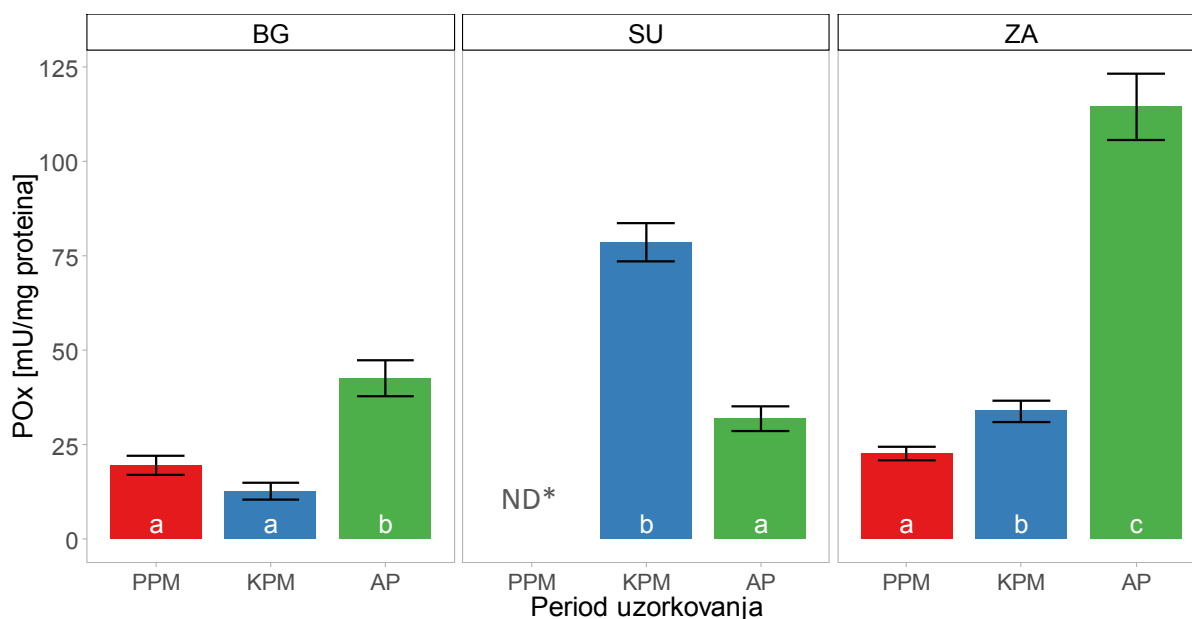


Grafik 34. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

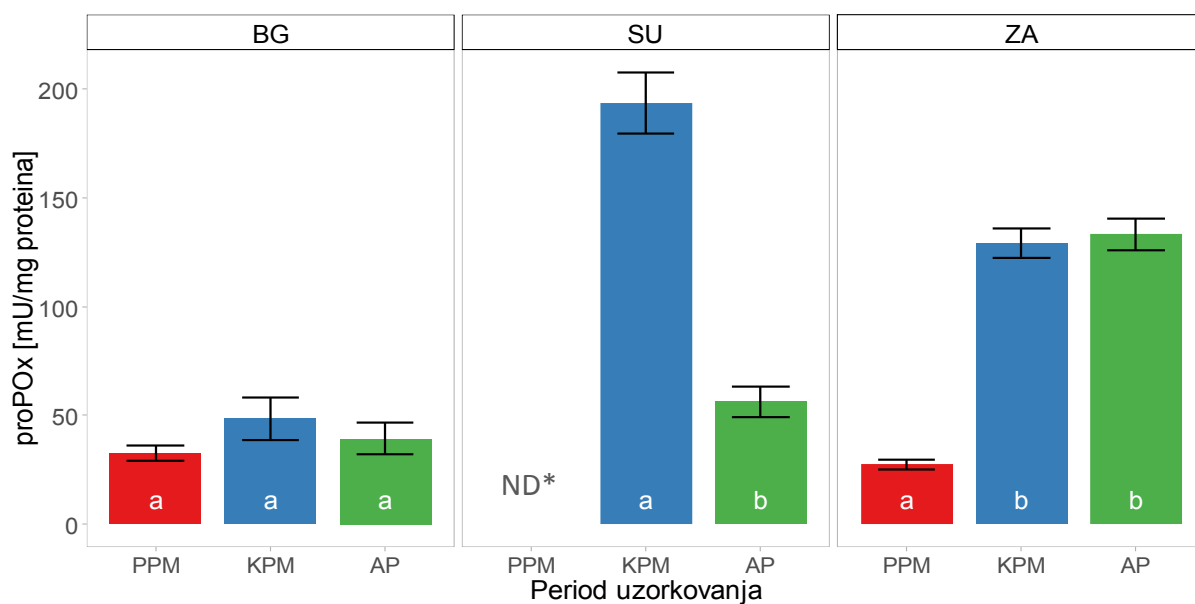
5.3.5. Aktivnost enzima povezanih sa imunim odgovorom

Specifične aktivnosti enzima fenol oksidaze (POx), profenol oksidaze (proPOx) i glukoza oksidaze (GOx), izmerene u hemolimfi pčela sa tri lokaliteta, početkom i krajem perioda mirovanja, kao i tokom aktivnog perioda (Prilog 3), prikazane su na Graficima 35-40.

Aktivnost POx i proPOx – Ukoliko pratimo promene aktivnosti POx i proPOx tokom godine, zasebno za svaki lokalitet, uočavaju se značajne razlike. U hemolimfi pčela iz Beograda značajno viša aktivnost POx je zabeležena u aktivnom periodu, dok je aktivnost proPOx ostala nepromenjena tokom sva tri perioda. Određivanje aktivnosti enzima u hemolimfi pčela iz Suseka je vršeno samo tokom dva perioda kada je zapaženo značajno smanjenje aktivnosti oba enzima u aktivnom periodu u odnosu na kraj perioda mirovanja. U hemolimfi pčela industrijskog područja zabeleženo je značajno povećanje aktivnosti POx i proPOx krajem perioda mirovanja u odnosu na početak perioda mirovanja a zatim je trend rasta aktivnosti POx nastavljen i tokom aktivnog perioda kada se dostižu najviše vrednosti (Grafici 35, 36).

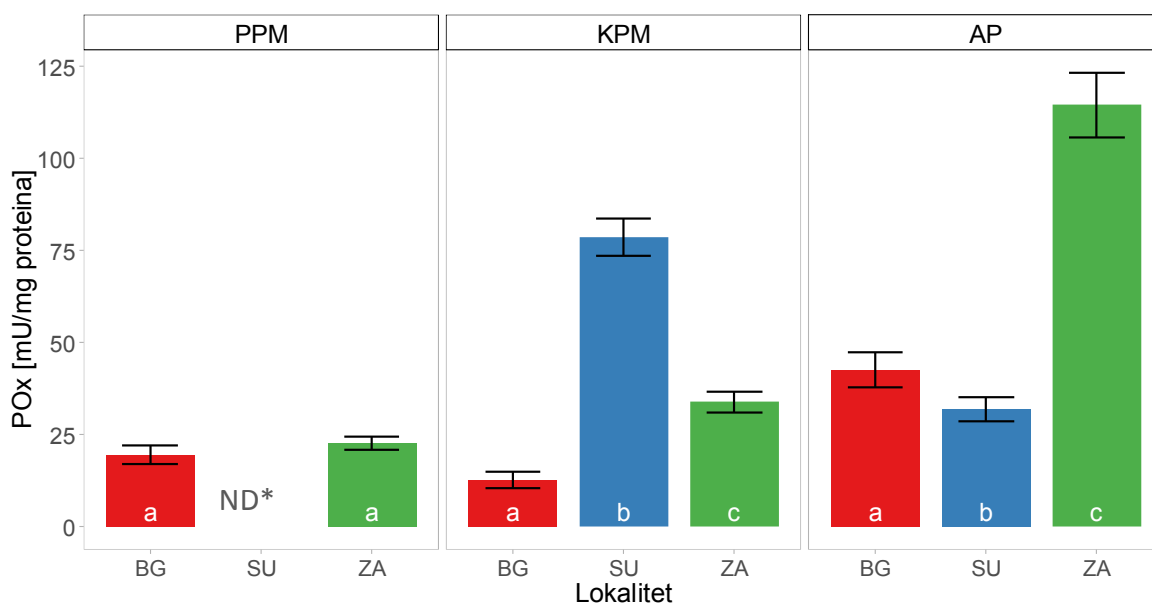


Grafik 35. Specifična aktivnost fenol oksidaze (POx) u hemolimfi pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$. *ND-nije određivano.

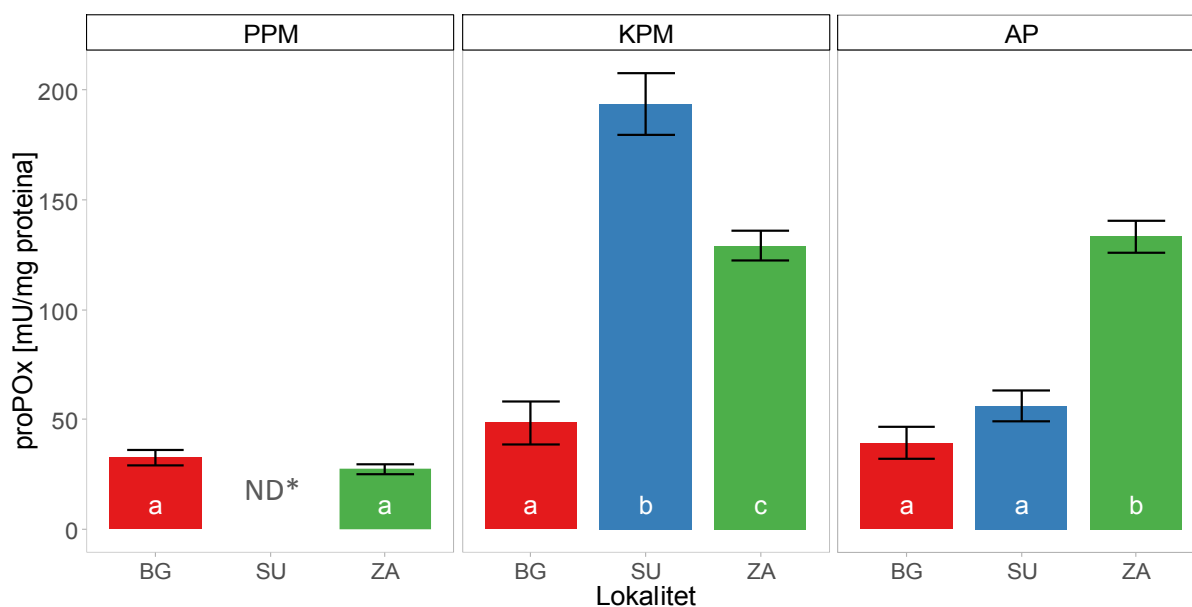


Grafik 36. Specifična aktivnost profenol oksidaze (proPOx) u hemolimfi pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$. *ND-nije određivano.

Rezultati aktivnosti POx i proPOx su takođe poređeni i između različitih lokaliteta tokom svakog perioda, kada se zapaža sličan obrazac aktivnosti. Krajem perioda mirovanja je zapaženo značajno povećanje aktivnosti enzima u Suseku i Zajači u odnosu na Beograd, dok su tokom aktivnog perioda značajno više aktivnosti enzima zabeležene u Zajači (Grafici 37 i 38).

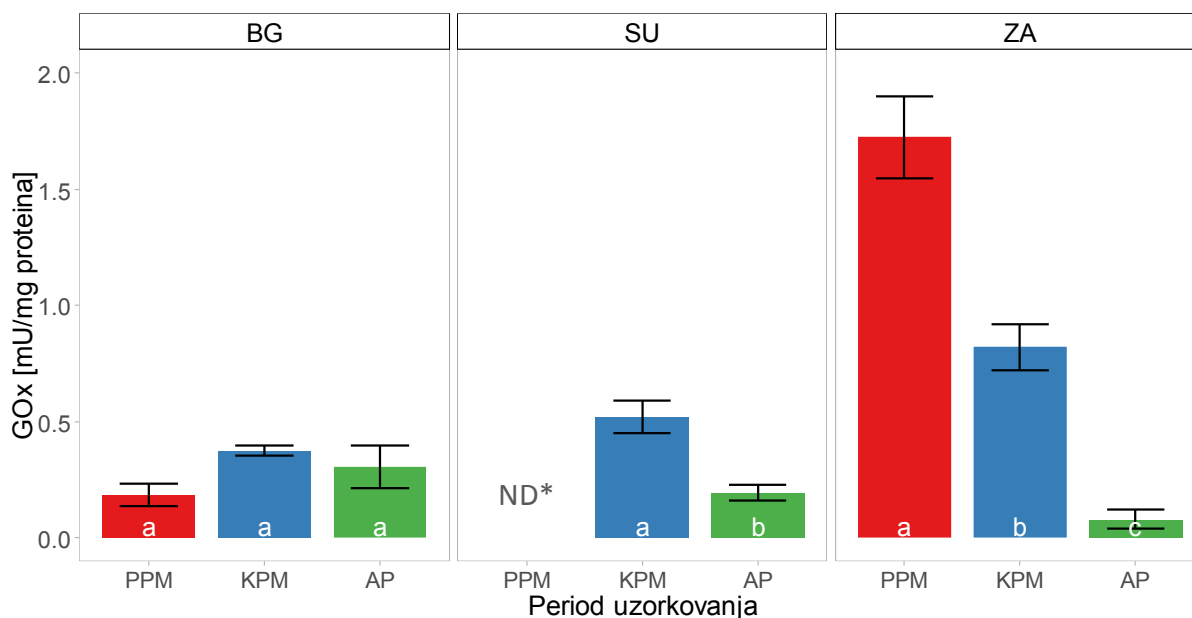


Grafik 37. Specifična aktivnost fenol oksidaze (POx) u hemolimfi pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$. *ND-nije određivano.



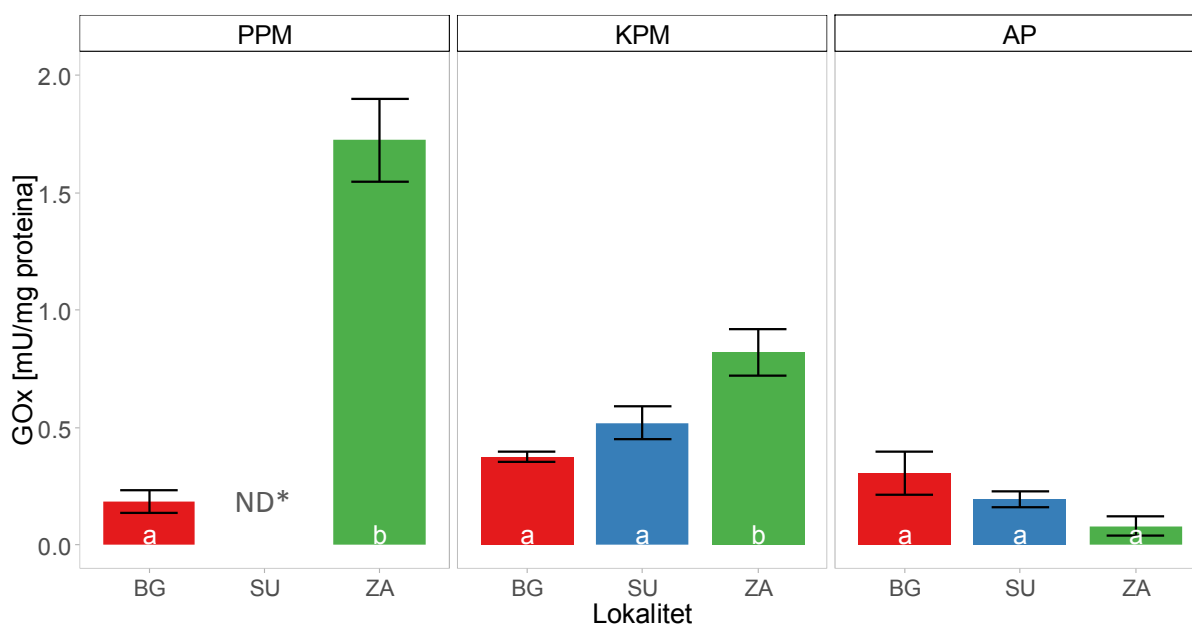
Grafik 38. Specifična aktivnost profenol oksidaze (proPOx) u hemolimfi pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$. *ND-nije određivano.

Aktivnost GOx – Posmatrajući promene aktivnosti GOx tokom godine, u okviru svakog lokaliteta, možemo zapaziti da je u hemolimfi pčela iz Beograda konstantno niska aktivnost enzima, dok u Suseku i Zajači uočavamo značajno smanjenje aktivnosti GOx u aktivnom periodu u odnosu na zimski period mirovanja (Grafik 39).



*Grafik 39. Specifična aktivnost glukoza oksidaze (GOx) u hemolimfi pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$. *ND-nije određivano.*

Promene aktivnosti enzima GOx su poređene i između različitih lokaliteta, u okviru svakog perioda (Grafik 40). Početkom i krajem perioda mirovanja, najviša aktivnost enzima je zabeležena u Zajači, značajno viša u poređenju sa Beogradom i Susekom. Tokom aktivnog perioda nije bilo statistički značajnih promena u aktivnosti enzima između različitih lokaliteta.



Grafik 40. Specifična aktivnost glukoza oksidaze (GOx) u hemolimfi pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$. *ND-nije određivano.

5.3.6. Prisustvo mikrosporidija roda *Nosema* i krpelja *Varroa destructor*

5.3.6.1. Prisustvo mikrosporidija roda *Nosema*

Prisustvo mikrosporidija roda *Nosema* u uzorcima medonosne pčele, ispitano mikroskopskim pregledom macerata abdomena pčela, prikazano je u Tabeli 10. Prisustvo spora roda *Nosema* je zabeleženo u svim uzorcima, dok je najveći stepen infekcije pčela u Beogradu i Suseku zabeležen u aktivnom periodu, a u Zajači krajem perioda mirovanja. Na osnovu broja spora po pčeli, nivo infekcije je klasifikovan kao nizak (< 5 miliona spora po pčeli), srednji (5–10 miliona spora po pčeli) i visok (≥ 10 miliona spora po pčeli), (Yücel i Goğaroğlu, 2005). Simptomi nozemoze, bolesti pčela izazvane mikrosporidijama roda *Nosema*, se uglavnom ispoljavaju kod pčela koje imaju preko 1 milion spora (Williams, 2013). Rezultati ukazuju na nizak nivo infekcije kod analiziranih pčela, dok se uzorci pčela iz Suseka, za sva tri perioda uzorkovanja, izdvajaju sa najmanjim brojem detektovanih spora roda *Nosema*.

Tabela 10. Prosečan broj spora mikrosporidija roda *Nosema* u uzorcima pčela iz Beograda (urbano područje), Suseka (ruralno područje) i Zajače (industrijsko područje) tokom različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP).

Period uzorkovanja pčela	Lokacija	Broj spora mikrosporidija roda <i>Nosema</i> *
Početak perioda mirovanja (PPM)	Beograd	2 975 000
	Susek	1 125 000
	Zajača	3 375 000
Kraj perioda mirovanja (KPM)	Beograd	1 525 000
	Susek	75 000
	Zajača	3 900 000
Aktivni period (AP)	Beograd	3 775 000
	Susek	1 775 000
	Zajača	1 900 000

* stepen infekcije: $< 5 \cdot 10^6$ (nizak), $5 \cdot 10^6 - 10 \cdot 10^6$ (srednji), $\geq 10 \cdot 10^6$ (visok)

5.3.6.2. Prisustvo krpelja *Varroa destructor*

Prisustvo parazitskog krpelja *Varroa destructor*, izvršeno brojanjem krpelja na adultnim pčelama radilicama, prikazano je u Tabeli 11. Prisustvo krpelja *Varroa destructor* je zabeleženo u svim uzorcima dok je najveća infestacija za sve tri lokacije zabeležena u pčelinjim društvima tokom aktivnog perioda. Zbog velike rasprostranjenosti krpelja *Varroa destructor* na našem području, sva pčelinja društva iz kojih su uzimani uzorci pčela za analizu su uobičajeno tretirana akaricidima tokom proleća i pred zimu te je u svim analiziranim uzorcima zabeležen nizak nivo infestacije (do 3 krpelja na 100 pčela, 3%), (Honey Bee Health Coalition, 2015). Tretman akaricidima je vršen najmanje mesec dana pre uzorkovanja.

Tabela 11. Prisustvo krpelja *Varroa destructor* u uzorcima pčela iz Beograda (urbano područje), Suseka (ruralno područje) i Zajače (industrijsko područje) tokom različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP).

Period uzorkovanja pčela	Lokacija	Prisustvo krpelja <i>Varroa destructor</i> [%]
Početak perioda mirovanja (PPM)	Beograd	0
	Susek	0
	Zajača	1
Kraj perioda mirovanja (KPM)	Beograd	2
	Susek	1
	Zajača	3
Aktivni period (AP)	Beograd	2
	Susek	3
	Zajača	3

5.3.7. Koncentracija metala u pčelama i pčelinjim proizvodima

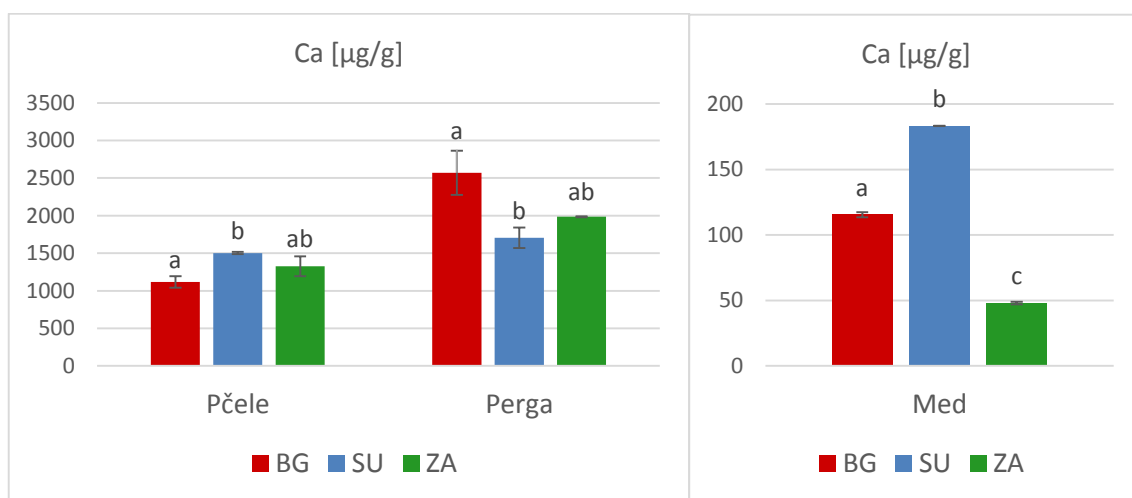
Koncentracija metala je određena u pčelama radilicama, pergi i medu pomoću ICP-OES metode. Uzorci su uzeti sa tri različite lokacije, iz Beograda (urbano područje), Suseka (ruralno područje) i Zajače (industrijsko područje) tokom zimskog perioda, kada su iz košnica uzeti uzorci perge, i tokom letnjeg perioda, kada su sakupljene pčele i med.

U uzorcima pčela i perge je zapažen približno jednak opseg koncentracijâ metala, dok je u uzorcima meda zapažena znatno niža koncentracija (10–100 puta) svih analiziranih metala u odnosu na uzorke pčela i perge.

Od ukupno šesnaest analiziranih metala, osam metala predstavlja biogene ili esencijalne elemente (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na i Zn), dok se preostalih osam metala svrstava u neesencijalne elemente (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Ni, Pb, Sr).

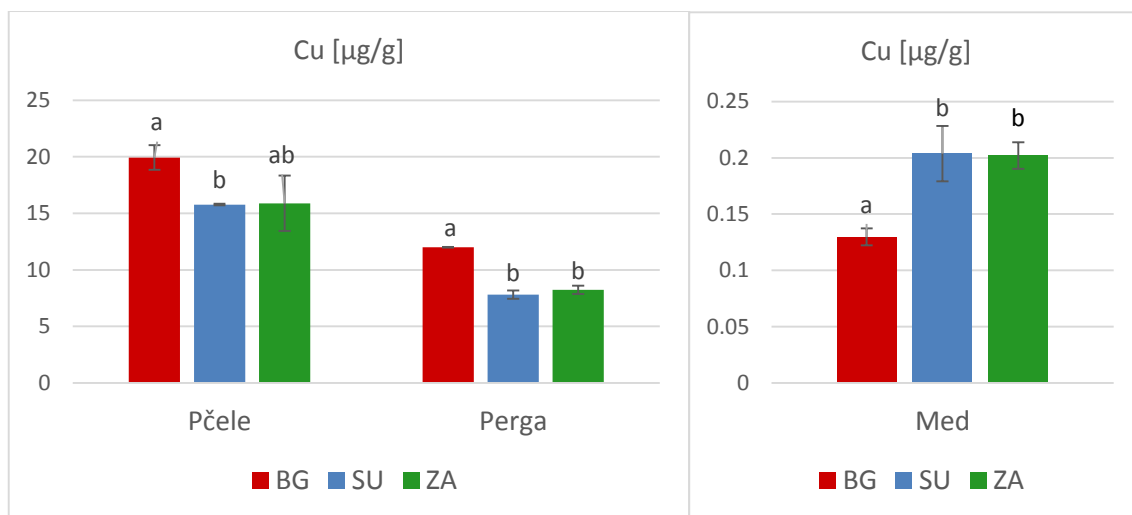
5.3.7.1. Biogeni elementi

Koncentracija kalcijuma (Ca) u uzorcima pčela i meda je bila značajno povećana u Suseku, dok je koncentracija kalcijuma u uzorcima perge bila značajno viša u Beogradu u odnosu na uzorke iz Suseka (Grafik 41).



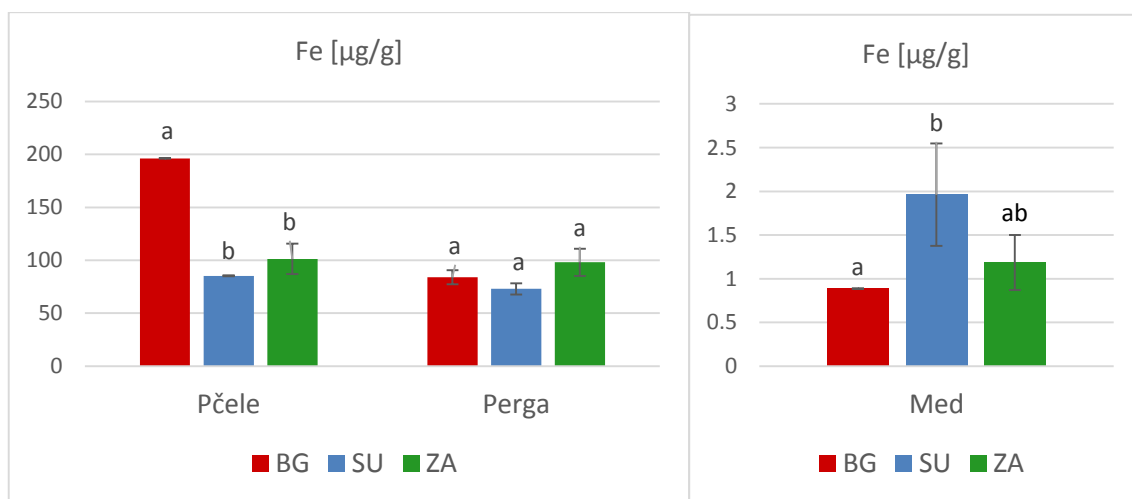
Grafik 41. Koncentracija kalcijuma (Ca) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija bakra (Cu) u uzorcima pčela je bila značajno povećana u urbanom području u odnosu na ruralno. U uzorcima perge, koncentracija bakra je takođe značajno povećana u urbanom području u odnosu na ruralno i industrijsko područje. U uzorcima meda je obrnuta situacija u odnosu na uzorke pčela i perge – u urbanom području je značajno niža koncentracija bakra u odnosu na uzorke meda iz Suseka i Zajače (Grafik 42).



Grafik 42. Koncentracija bakra (Cu) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

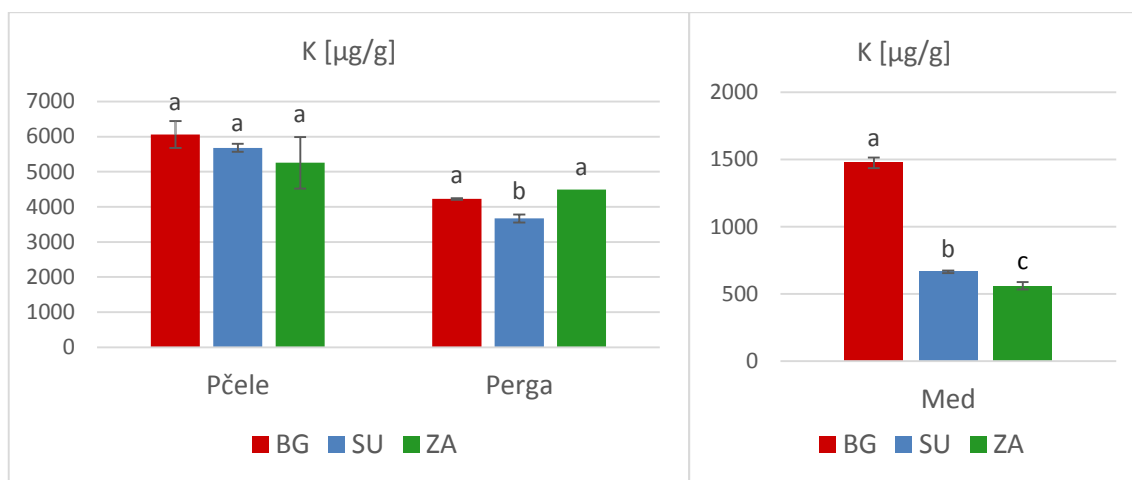
Koncentracija gvožđa (Fe) je bila značajno veća u uzorcima pčela iz urbanog područja u odnosu na uzorke pčela iz ruralnog i industrijskog područja. U uzorcima perge iz različitih oblasti nije bilo značajne razlike u sadržaju gvožđa. U uzorcima meda najviše vrednosti su zabeležene u medu iz Suseka, koje su statistički značajno više u odnosu na vrednosti sadržaja gvožđa u medu iz Beograda (Grafik 43).



Grafik 43. Koncentracija gvožđa (Fe) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorija pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

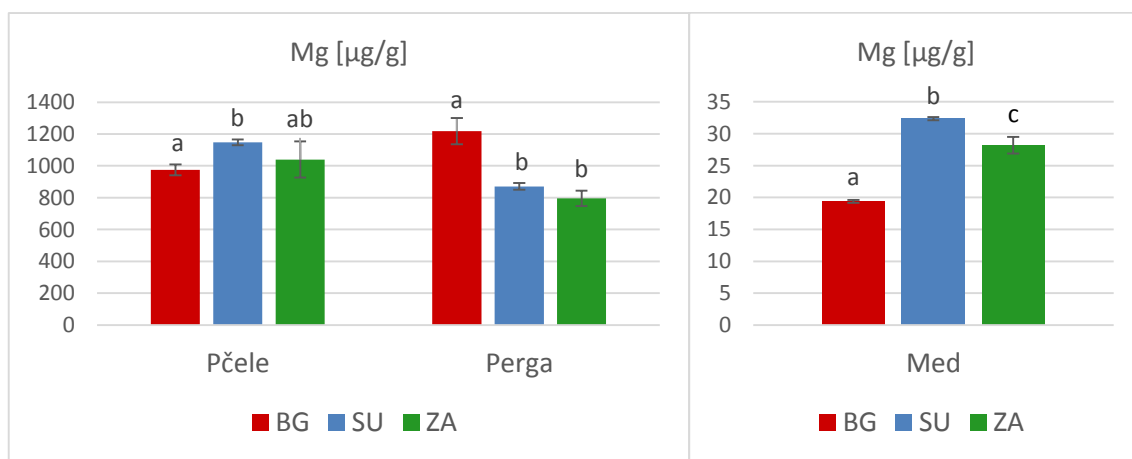
Koncentracija kalijuma (K) se nije razlikovala između uzoraka pčela iz različitih oblasti. U uzorcima perge iz Suseka je značajno smanjen sadržaj kalijuma u odnosu na

druga dva lokaliteta. Koncentracija kalijuma u uzorcima meda iz Suseka je takođe značajno snižena u odnosu na med iz Beograda, a taj trend prati sadržaj kalijuma u medu iz Zajače koji je značajno niži u odnosu na med iz Beograda i Suseka (Grafik 44).



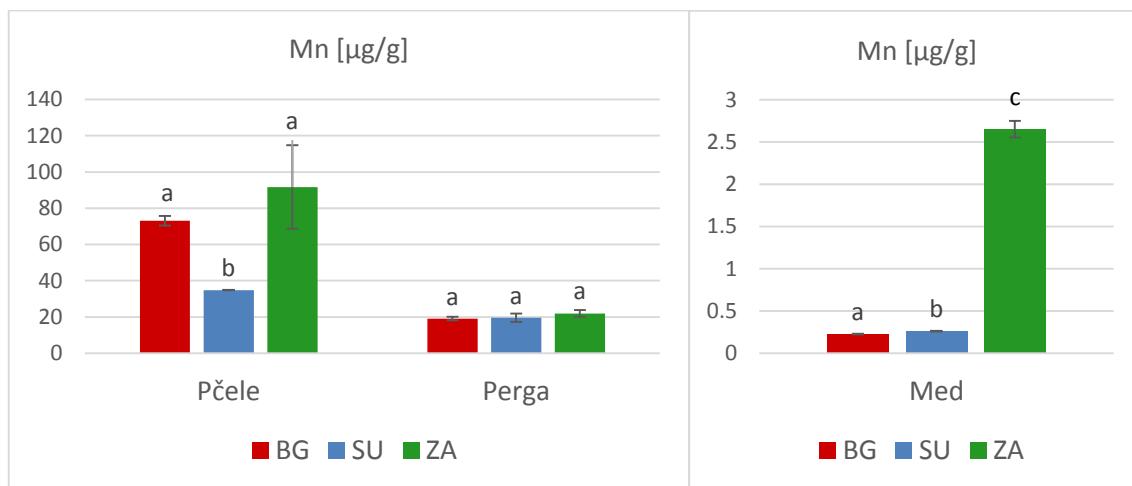
Grafik 44. Koncentracija kalijuma (K) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija magnezijuma (Mg) u uzorcima pčela je značajno viša u Suseku u odnosu na Beograd. U uzorcima meda je takođe značajno viši sadržaj Mg u ruralnom u odnosu na urbano ali i industrijsko područje. Za razliku od uzoraka pčela i meda, u uzorcima perge je najviši sadržaj Mg zabeležen u urbanom području (Grafik 45).



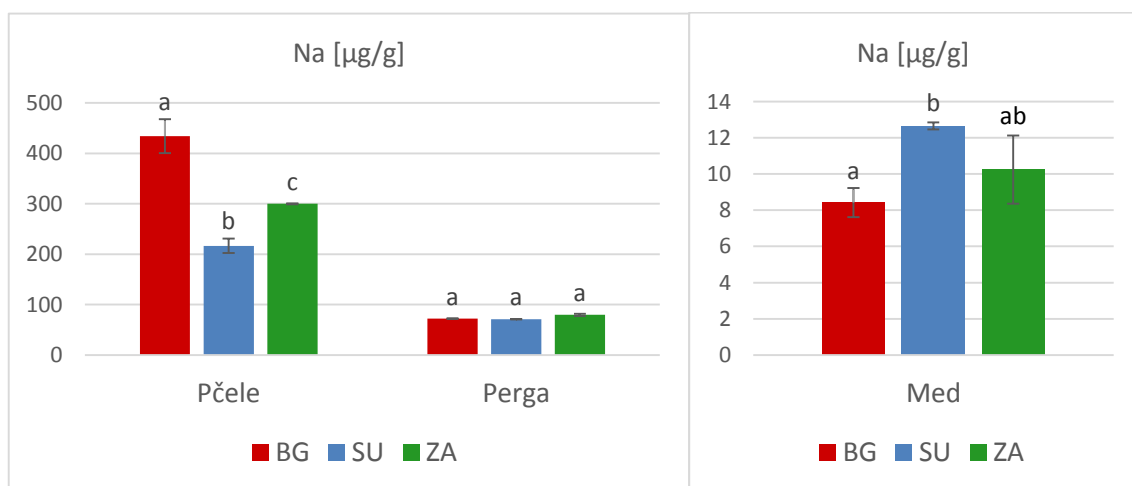
Grafik 45. Koncentracija magnezijuma (Mg) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija mangana (Mn) u uzorcima pčela je značajno niža u ruralnom u odnosu na urbano i industrijsko područje. U uzorcima perge iz različitih oblasti nije bilo značajne razlike u sadržaju mangana. U uzorcima meda, najviša koncentracija mangana je u Zajači, značajno viša u odnosu na Susek i Beograd (Grafik 46).



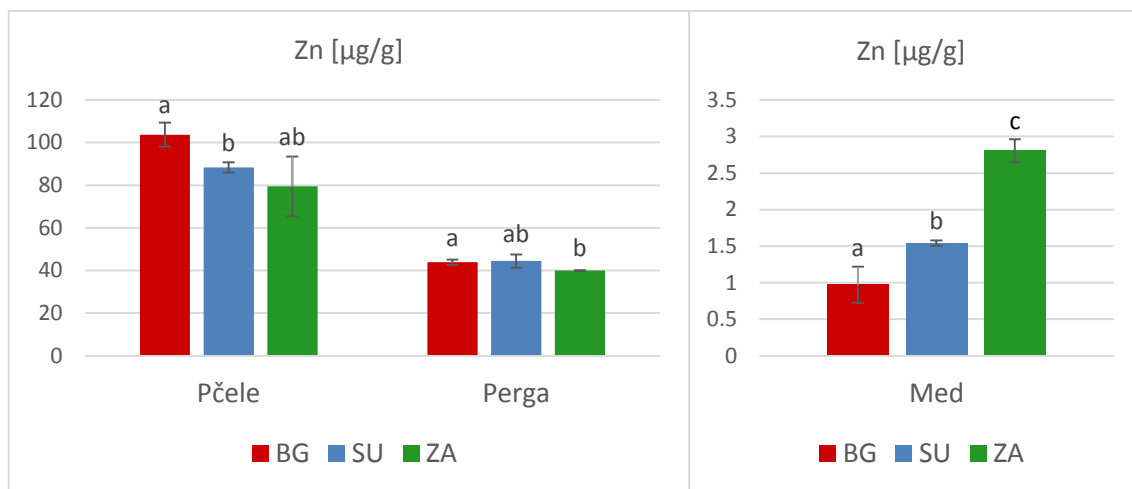
Grafik 46. Koncentracija mangana (Mn) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija natrijuma (Na) u uzorcima pčela je značajno viša u urbanom u odnosu na ruralno i industrijsko područje. U uzorcima perge iz različitih područja nije bilo značajne razlike u sadržaju natrijuma. U uzorcima meda, najviši sadržaj natrijuma je zabeležen u medu iz Suseka, značajno viši u odnosu na med iz Beograda (Grafik 47).



Grafik 47. Koncentracija natrijuma (Na) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

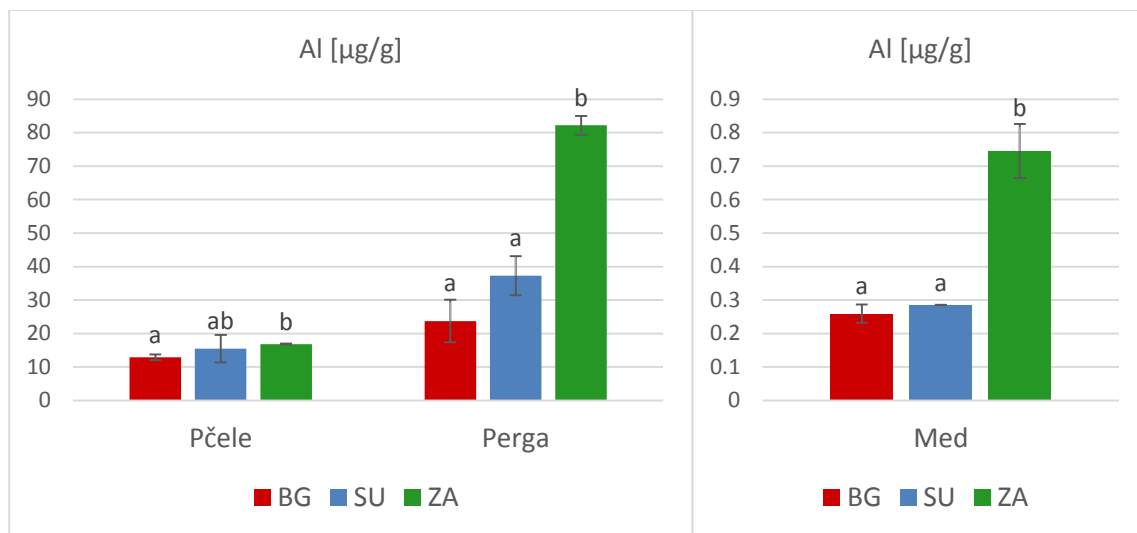
Koncentracija cinka (Zn) u uzorcima pčela je značajno viša u urbanom u odnosu na ruralno područje, a u uzorcima perge u urbanom u odnosu na industrijsko područje. Nasuprot uzorcima pčela i perge, u uzorcima meda je značajno povećanje zapaženo u industrijskom i ruralnom u odnosu na urbano područje. Značajno povećanje je zabeleženo i u medu iz ruralnog područja u odnosu na urbano (Grafik 48).



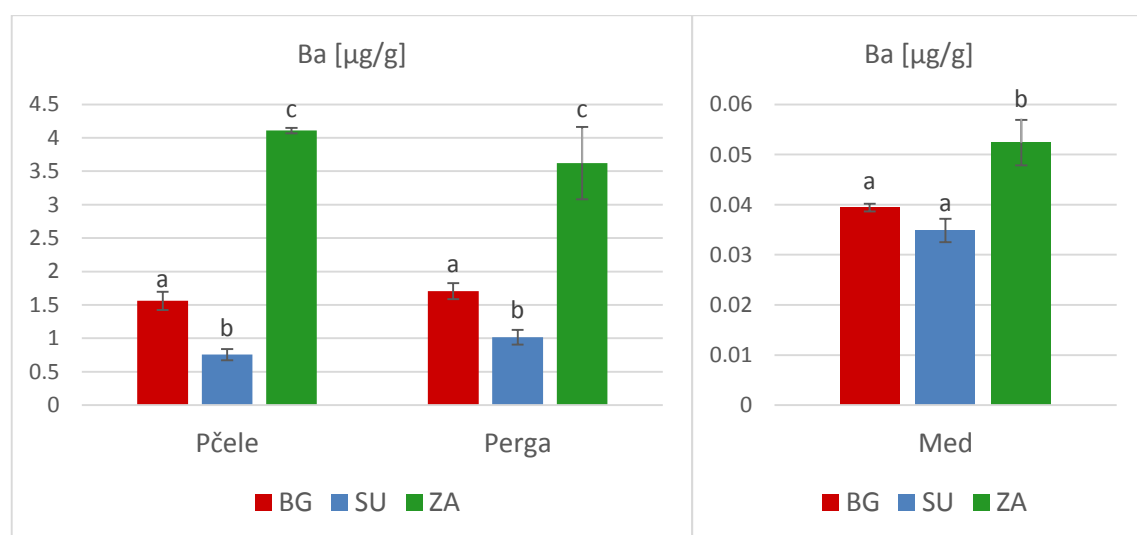
Grafik 48. Koncentracija zinka (Zn) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

5.3.7.2. Neesencijalni elementi

Koncentracije aluminijuma (Al) i barijuma (Ba) u uzorcima pčela, perge i meda su bile statistički značajno povećane u industrijskom području u poređenju sa urbanim i ruralnim područjem, sa izuzetkom Al u pčelama iz Suseka (Grafik 49 i 50).

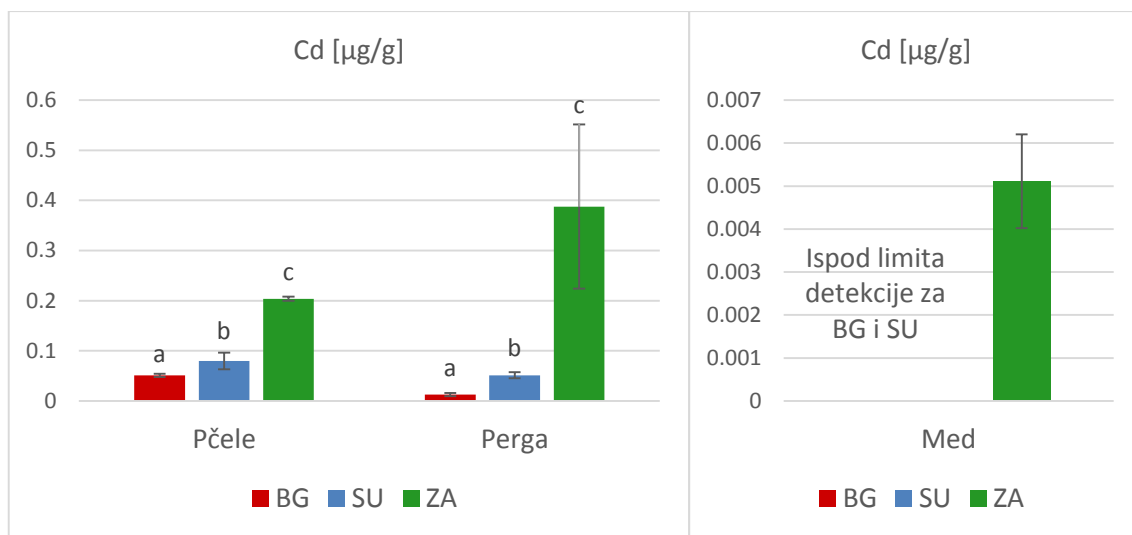


Grafik 49. Koncentracija aluminijuma (Al) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.



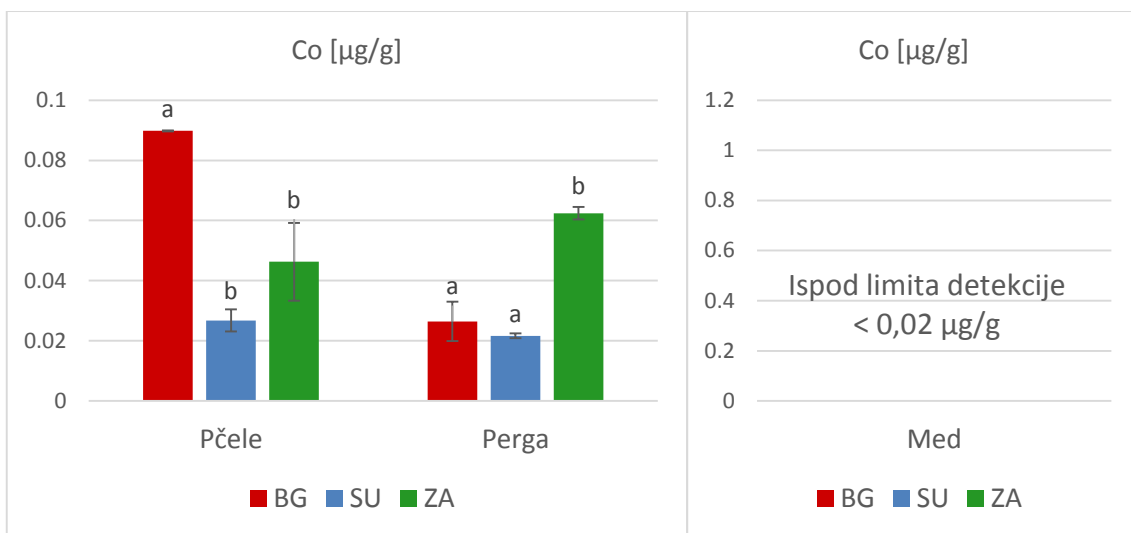
Grafik 50. Koncentracija barijuma (Ba) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija kadmijuma (Cd) u uzorcima pčela i perge je bila statistički značajno povećana u Zajači u poređenju sa urbanim i ruralnim područjem. Takođe, koncentracija kadmijuma u pčelama i pergi u Suseku je značajno viša u odnosu na Beograd (Grafik 51). Kadmijum u medu je detektovan samo u uzorcima iz Zajače, dok je u uzorcima meda iz Beograda i Suseka sadržaj bio ispod limita detekcije ($<0,004 \mu\text{g/g}$ i $<0,003 \mu\text{g/g}$, respektivno).



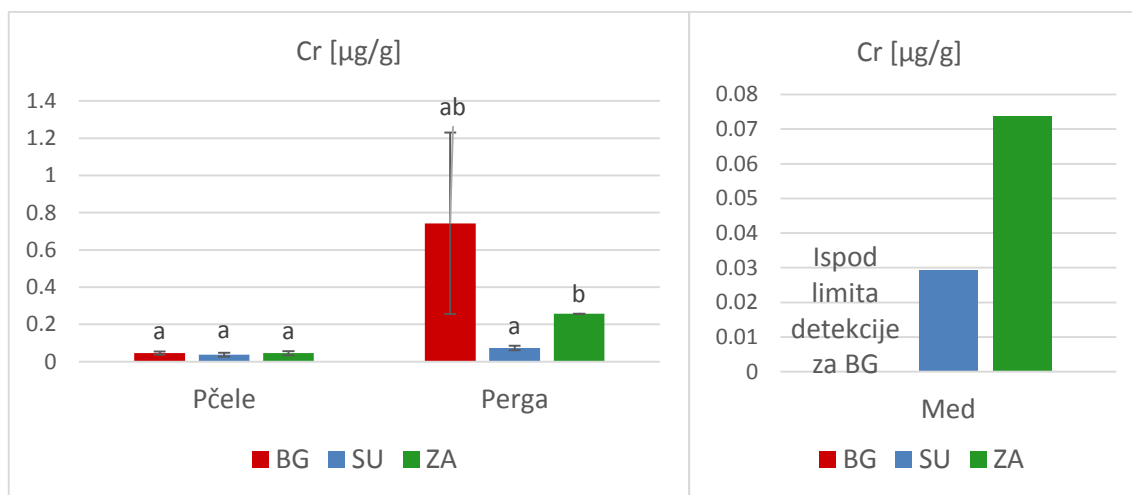
Grafik 51. Koncentracija kadmijuma (Cd) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija kobalta (Co) u uzorcima pčela je bila značajno povećana u Beogradu u odnosu na ruralno i industrijsko područje, dok je u uzorcima perge statistički značajno povećanje zabeleženo u uzorcima iz industrijskog područja (Grafik 52). Sadržaj kobalta u uzorcima meda je u svim uzorcima bio ispod limita detekcije ($0,02 \mu\text{g/g}$).



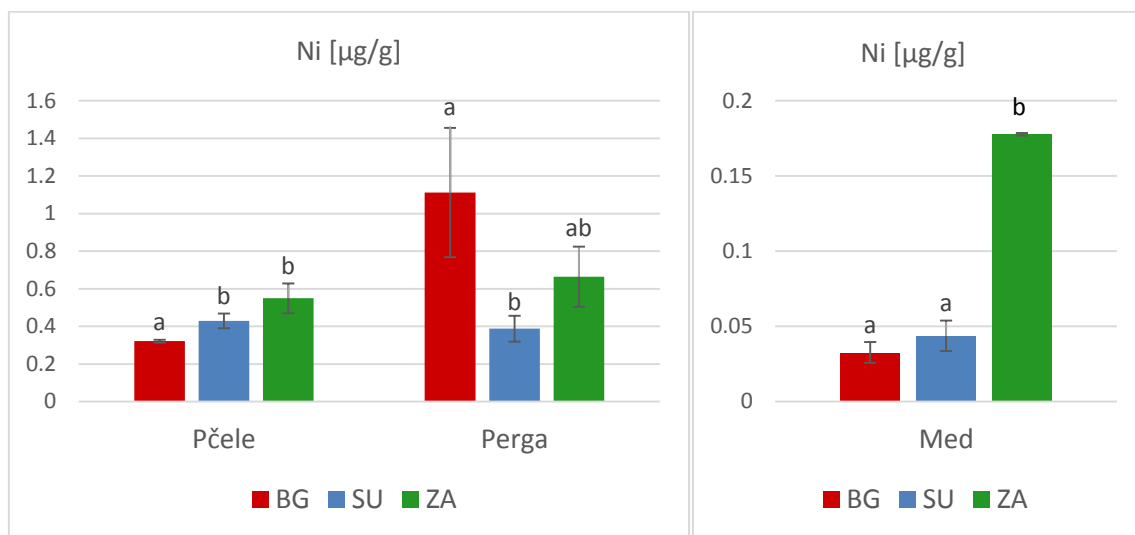
Grafik 52. Koncentracija kobalta (Co) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija hroma (Cr) se nije značajno razlikovala između uzoraka pčela iz različitih oblasti. U uzorcima perge najviše vrednosti su zabeležene u uzorcima iz Beograda, međutim statistički značajna razlika je uočena između uzoraka perge iz Suseka i Zajače, sa višim vrednostima zabeleženim u Zajači. Sadržaj hroma u uzorcima meda iz Beograda je bio ispod limita detekcije, dok je u uzorcima meda iz Suseka i Zajače zabeleženo samo po jedno merenje (koje je bilo iznad limita detekcije), gde je dvostruko veća vrednost zabeležena u medu iz Zajače u odnosu na med iz Suseka (Grafik 53).



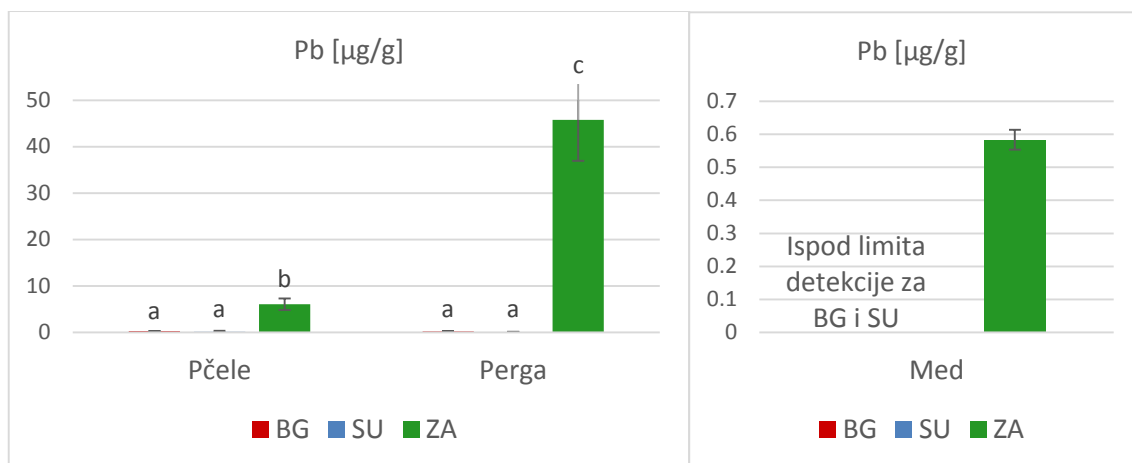
Grafik 53. Koncentracija hroma (Cr) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija nikla (Ni) u uzorcima pčela je značajno niža u urbanom u odnosu na ruralno i industrijsko područje. U uzorcima perge se izdvaja urbano područje sa značajno višim sadržajima nikla, dok se u uzorcima meda izdvaja industrijsko područje sa značajno višim sadržajem nikla u odnosu na druga dva područja (Grafik 54).



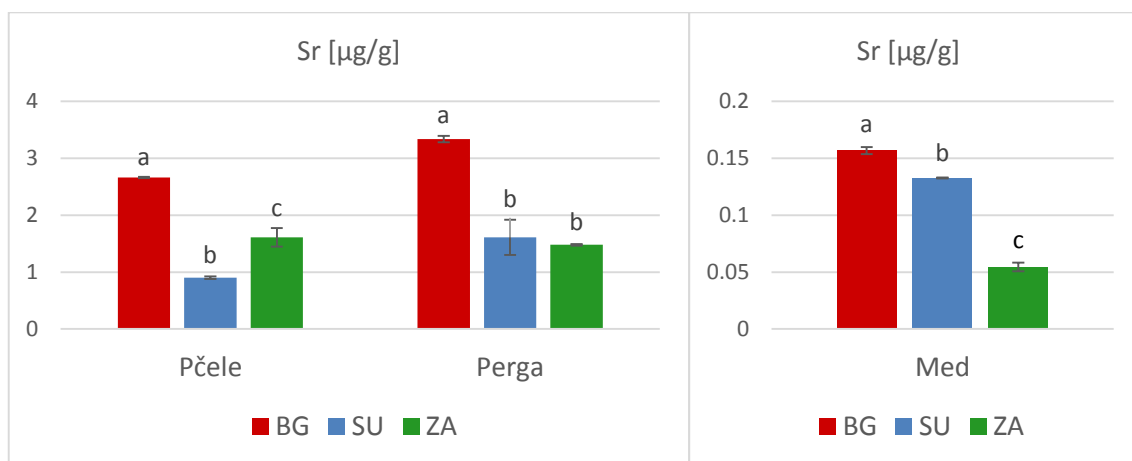
Grafik 54. Koncentracija nikla (Ni) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija olova (Pb) u uzorcima pčela i perge iz industrijskog područja je bila značajno povećana, čak nekoliko desetina puta viša u odnosu na druga dva lokaliteta (Grafik 55). Koncentracija olova u uzorcima meda je izmerena samo u medu iz Zajače, dok je sadržaj u medu iz Beograda i Suseka bio ispod limita detekcije ($< 0,07 \mu\text{g/g}$ i $< 0,06 \mu\text{g/g}$, respektivno).



Grafik 55. Koncentracija olova (Pb) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Koncentracija stroncijuma (Sr) u uzorcima pčela, perge i meda je bila statistički značajno povećana u Beogradu u poređenju sa Susekom i Zajačom (Grafik 56).



Grafik 56. Koncentracija stroncijuma (Sr) u pčelama, pergi i medu uzorkovanim sa tri različite lokacije: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorijâ pčele, perga ili med ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene jednofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

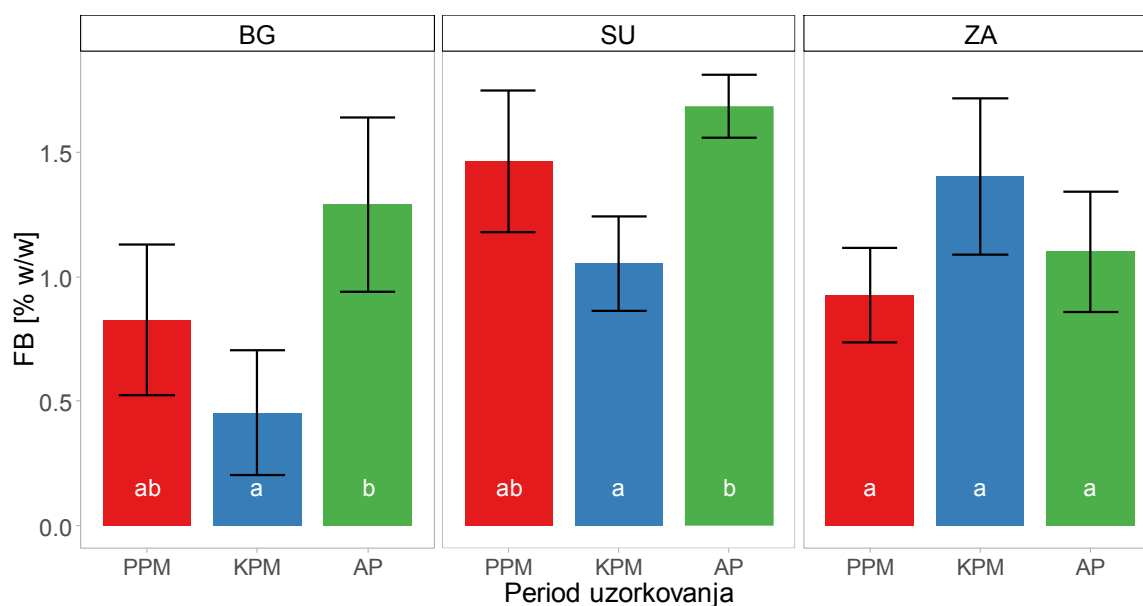
Na osnovu dobijenih podataka o koncentracijama metala u analiziranim uzorcima, može se uočiti da Zajaču, kao industrijsko područje, karakteriše značajno viši sadržaj Ba, Cd i Pb u pčelama, pergi i medu u odnosu na druga dva područja. Beograd, kao urbano područje, karakteriše značajno viši sadržaj Sr u pčelama, pergi i medu, kao i Cu u pčelama i pergi. U poređenju sa industrijskim i urbanim područjem, Susek, kao ruralno područje, karakteriše značajno viši sadržaj Ca i Mg u pčelama i medu.

5.3.8. Analiza nepolarne frakcije lipida i ugljovodonika pčela

5.3.8.1. Maseni udeo nepolarne frakcije lipida (masnog tela)

Nepolarna frakcija lipida, ekstrahovana iz homogenata celih pčela, predstavlja rezervne ili metaboličke lipide koji su po sastavu najvećim delom triacilgliceroli. S obzirom da je masno telo insekata (engl. *fat body*, FB) glavno mesto sinteze i akumulacije lipida u formi triacilglicerola, dobijena nepolarna frakcija lipida pčela prvenstveno predstavlja lipide masnog tela (Arrese i Soulages, 2010; Cerkowniak i sar., 2015). Grafici 57 i 58 prikazuju promene u količini masnog tela, izraženoj kao maseni procenat (masa izolovanog masnog tela u ukupnoj masi uzorka pčela, pomnoženo sa 100), za tri lokaliteta u okviru različitih perioda.

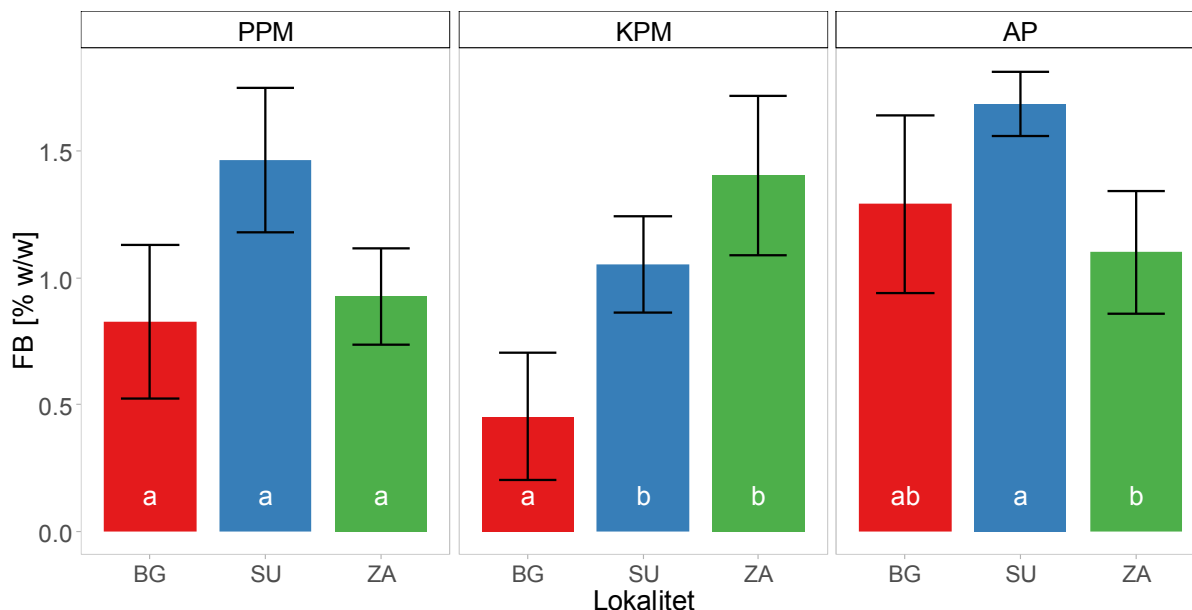
Ukoliko pratimo promene tokom godine, zasebno za svaki lokalitet, zapaženo je da se količina masnog tela menja u zavisnosti od sezone godine (Grafik 57). U uzorcima pčela iz Beograda i Suseka, količina masnog tela je značajno niža krajem zime, tj. krajem perioda mirovanja u odnosu na letnji aktivni period. U uzorcima pčela iz Zajače nije bilo statistički značajnih promena u količini masnog tela između različitih perioda.



Grafik 57. Maseni procenat masnog tela (FB) u pčelama uzorkovanim početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različita lokaliteta: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati su prikazani i u vidu promena u količini masnog tela između različitih lokaliteta, u okviru svakog perioda (Grafik 58). Početkom zime tj. perioda mirovanja najviše vrednosti su zabeležene u uzorcima pčela iz Suseka ali razlike nisu bile statistički značajne. Krajem perioda mirovanja, količina masnog tela je bila značajno veća u

uzorcima pčela iz Suseka i Zajače u odnosu na Beograd. Tokom aktivnog perioda, izdvajaju se niže vrednosti dobijene za pčele iz Zajače u odnosu na druga dva lokaliteta.



Grafik 58. Maseni procenat masnog tela (FB) u pčelama iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

5.3.8.2. Profil masnih kiselina nepolarne frakcije lipida (masnog tela)

Analiza masnih kiselina nepolarne frakcije lipida pčela sa tri lokaliteta u okviru različitih perioda, izvršena je metodom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) i predstavljena je tabelarno (Tabele 12 i 13) i grafički (Grafici 59-62).

Kvalitativno gledano, sadržaj masnih kiselina masnog tela tj. nepolarne frakcije lipida pčela čini 14 masnih kiselina sa 14 – 26 ugljenikovih atoma: miristinska 14:0, palmitinska 16:0, heksadecenska 16:1(7), palmitooleinska 16:1(9), margarinska 17:0, stearinska 18:0, oleinska 18:1(9), linolna 18:2(9,12), α -linolenska 18:3(9,12,15), 18:3(nepoznat položaj dvostrukih veza), arašidna 20:0, behenska 22:0, lignocerinska 24:0 i cerotinska 26:0 kiselina (Tabela 12).

Kvantitativna analiza je pokazala da su najzastupljenije masne kiseline masnog tela palmitinska 16:0, oleinska 18:1(9) i α -linolenska 18:3(9,12,15), čineći 79-87 %, 79-83 % i 75-85 % od ukupnog sastava masnih kiselina pčela iz Beograda, odnosno Suseka i Zajače, respektivno. Oleinska 18:1(9) kiselina predstavlja dominantnu komponentu u ukupnom sadržaju masnih kiselina nepolarne frakcije lipida pčela sa sve tri lokacije, tokom svakog perioda (Tabela 12).

Tabela 12. Procentualni udeo pojedinačnih masnih kiselina u ukupnom sadržaju masnih kiselina nepolarne frakcije lipida pčela iz Beograda (urbano područje), Suseka (ruralno područje) i Zajače (industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP).

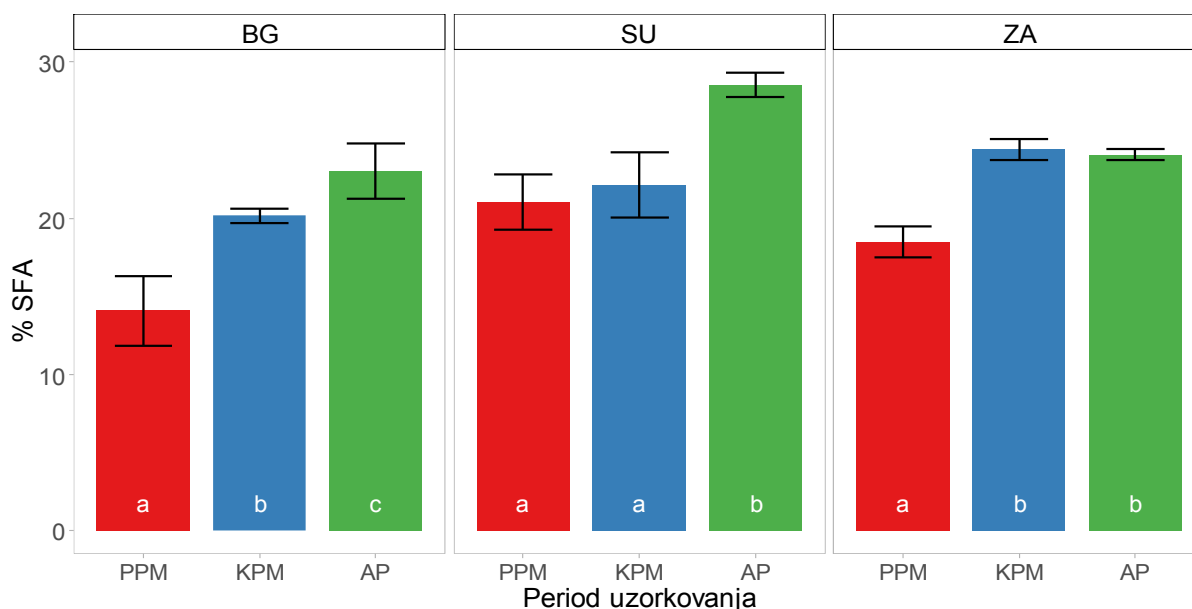
	Beograd			Susek			Zajača		
	PPM	KPM	AP	PPM	KPM	AP	PPM	KPM	AP
14:0	0	0	0	0	0	0,1	0	0,1	0
16:0	6,6	12,1	12,4	10,7	11,9	16,8	10,0	13,9	17,0
16:1(7)	0,7	0	0,5	0,4	0,2	0,1	0,7	0,2	0,1
16:1(9)	1,3	0,6	1,2	1,4	1,2	1,3	1,4	1,0	1,7
17:0	0	0	0,3	0,1	0,1	0	0	0,2	0
18:0	7,5	7,7	8,2	8,1	8,2	7,6	7,8	7,4	8,0
18:1(9)	65,1	59,4	51,2	55,4	46,2	41,3	62,3	40,4	46,0
18:2(9,12)	4,1	4,2	8,5	6,2	9,7	4,2	4,7	13,0	6,1
18:3(9,12,15)	11,0	12,1	12,1	12,4	15,8	18,1	11,9	16,2	14,8
18:3 (-)	3,7	3,6	3,4	3,1	4,7	6,4	2,6	4,7	4,3
20:0	0	0	0,3	0,2	0,4	0,6	0	0,4	0,2
22:0	0	0	0,7	0,4	0,2	0,8	0	0,8	0,5
24:0	0	0,3	1,1	1,5	1,3	1,9	0,7	1,5	1,1
26:0	0	0	0	0	0,1	0,7	0	0,2	0,2

Procentualni udeo zasićenih (SFA) i nezasićenih (UFA) masnih kiselina, gde se u nezasićene masne kiseline ubrajaju mono i polinezasićene masne kiseline (UFA = MUFA + PUFA), prikazan je u Tabeli 13. Takođe, prikazan je stepen nezasićenosti masnih kiselina kao odnos UFA/SFA. U okviru svakog lokaliteta, najveći stepen nezasićenosti se uočava početkom perioda mirovanja a zatim krajem perioda mirovanja dolazi do pada stepena nezasićenosti masnih kiselina, sa najmanjim vrednostima zabeleženim u letnjem, aktivnom periodu.

Tabela 13. Procentualni udeo masnih kiselina nepolarne frakcije lipida pčela iz Beograda (urbano područje), Suseka (ruralno područje) i Zajače (industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP), klasifikovan prema zasićenosti masnih kiselina: zasićene – SFA, nezasićene – UFA (mononezasićene – MUFA i polinezasićene – PUFA).

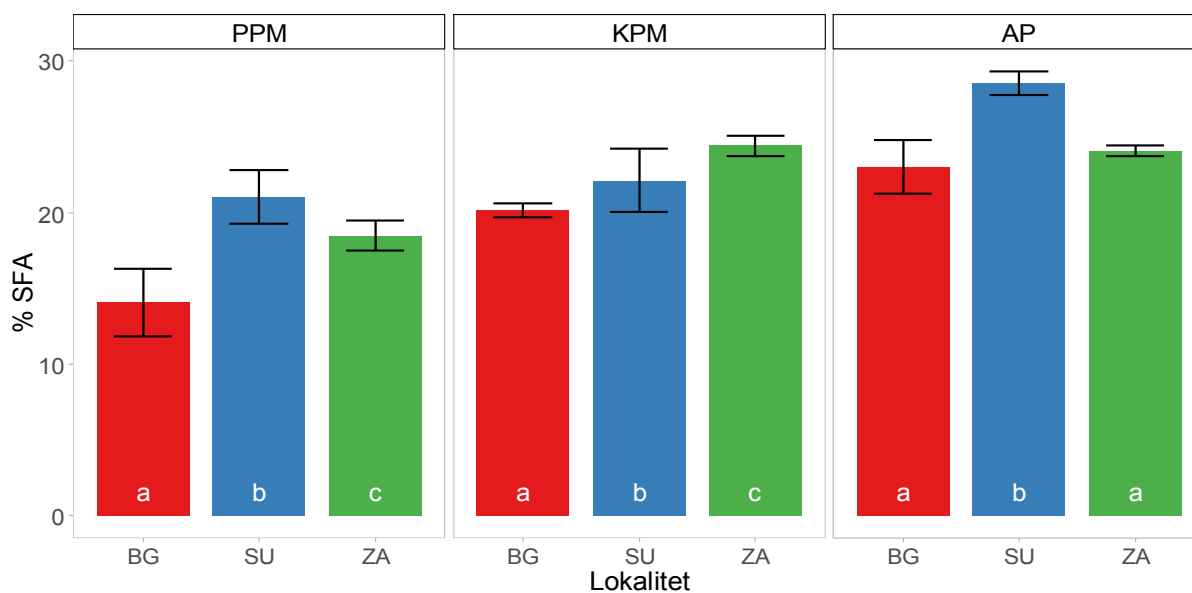
	Beograd			Susek			Zajača		
	PPM	KPM	AP	PPM	KPM	AP	PPM	KPM	AP
SFA	14,1	20,1	23,0	21,0	22,2	28,5	18,5	24,5	27,0
UFA	85,9	79,9	76,9	79,0	77,8	71,5	81,6	75,5	73,0
MUFA	67,1	60	52,9	57,2	47,6	42,7	64,4	41,6	47,8
PUFA	18,8	19,9	24,0	21,8	30,2	28,8	17,2	33,9	25,2
UFA/SFA	6,1	4,0	3,3	3,8	3,5	2,5	4,4	3,1	2,7

Promene procentualnog udela SFA u masnom telu pčela tokom godine, u okviru svakog lokaliteta, prikazane su na Grafiku 59. U masnom telu pčela sa svih lokaliteta se zapaža značajno povećanje udela SFA krajem perioda mirovanja ili tokom aktivnog perioda u odnosu na početak perioda mirovanja, tj. sa sezonski većim temperaturama tokom godine povećava se sadržaj zasićenih masnih kiselina.



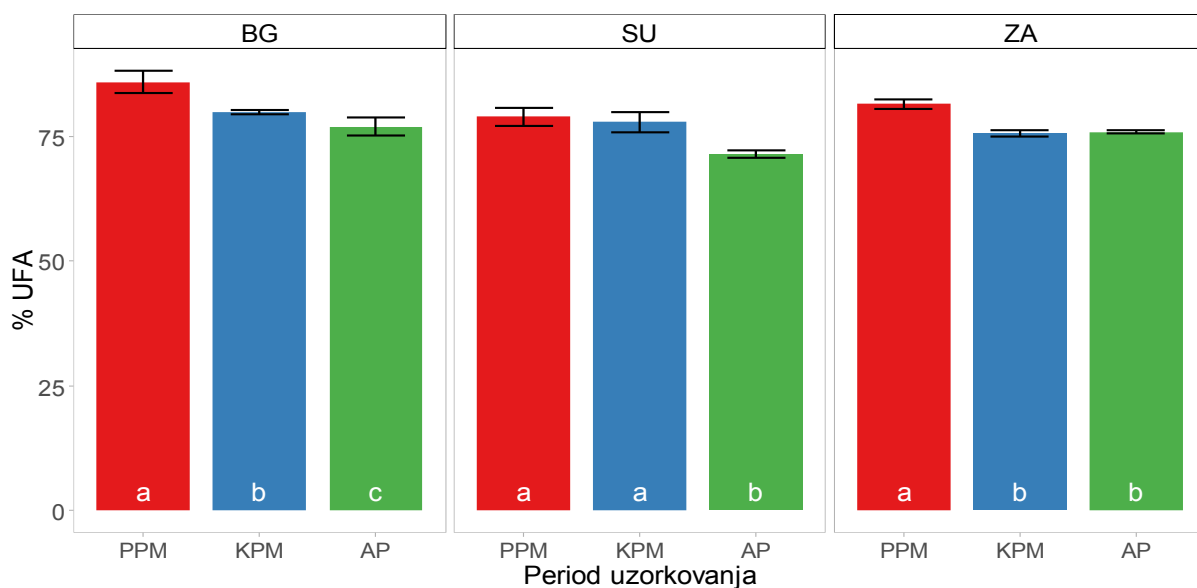
Grafik 59. Procentualni udeo zasićenih masnih kiselina (SFA) u masnom telu pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različita lokaliteta: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Pregled procentualnog udela SFA u masnom telu pčela između različitih lokaliteta u okviru svakog perioda je prikazan na Grafiku 60. Početkom perioda mirovanja, kao i tokom aktivnog perioda, značajno viši sadržaj SFA je zabeležen u masnom telu pčela iz Suseka, dok su krajem perioda mirovanja pčele iz Zajače imale značajno veći udeo SFA u masnom telu u odnosu na pčele sa druga dva lokaliteta. Najniži sadržaji SFA su zabeleženi u masnom telu pčela iz Beograda za sva tri perioda.



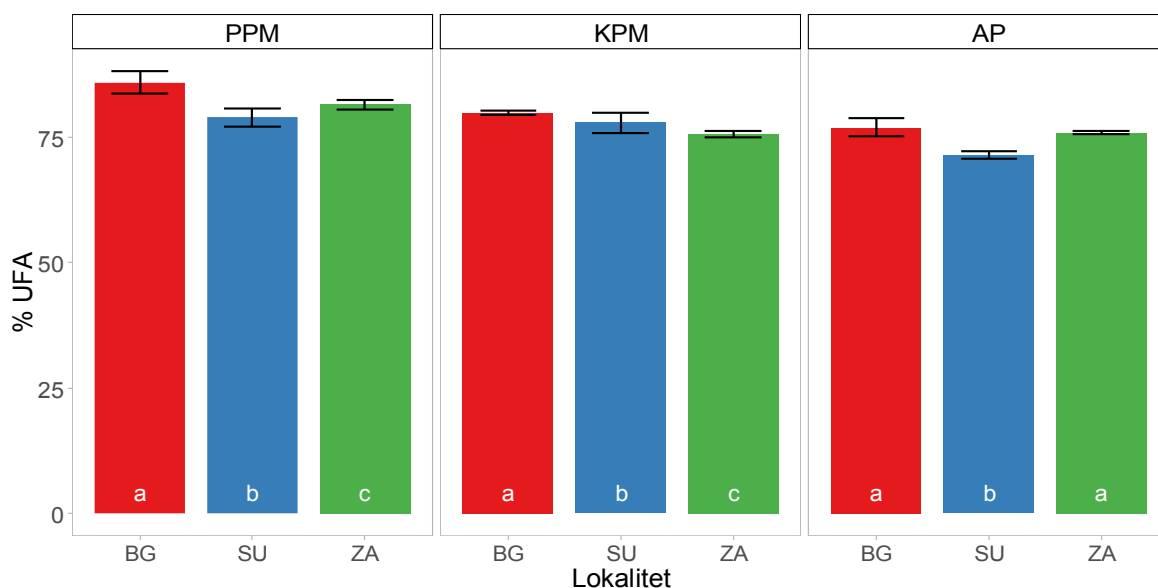
Grafik 60. Procentualni udeo zasićenih masnih kiselina (SFA) u masnom telu pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Posmatrajući promene procentualnog udela UFA u masnom telu pčela tokom godine, zasebno za svaki lokalitet, zapaža se obrnut prikaz u odnosu na udeo SFA. U masnom telu pčela sa svih lokaliteta se zapaža značajno smanjenje udela UFA krajem perioda mirovanja i/ili tokom aktivnog perioda u odnosu na početak perioda mirovanja, tj. sa sezonskim smanjenjem temperature početkom zime povećava se sadržaj nezasićenih masnih kiselina (Grafik 61).



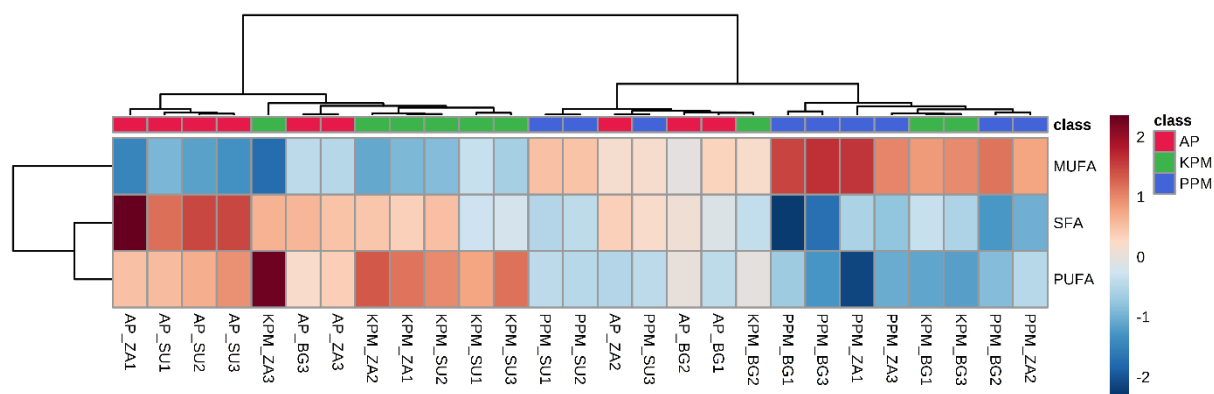
Grafik 61. Procentualni udeo nezasićenih masnih kiselina (UFA) u masnom telu pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različita lokaliteta: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom razlike za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Pregled procentualnog udela UFA u masnom telu pčela između različitih lokaliteta u okviru svakog perioda je prikazan na Grafiku 62. Za razliku od rezultata procentualnog udela SFA, značajno viši udeo UFA u masnom telu pčela je zabeležen u uzorcima iz Beograda u odnosu na pčele sa druga dva lokaliteta. Takođe, pčele iz Suseka imaju značajno niži udeo UFA početkom perioda mirovanja i u aktivnom periodu u poređenju sa pčelama sa drugih lokaliteta.



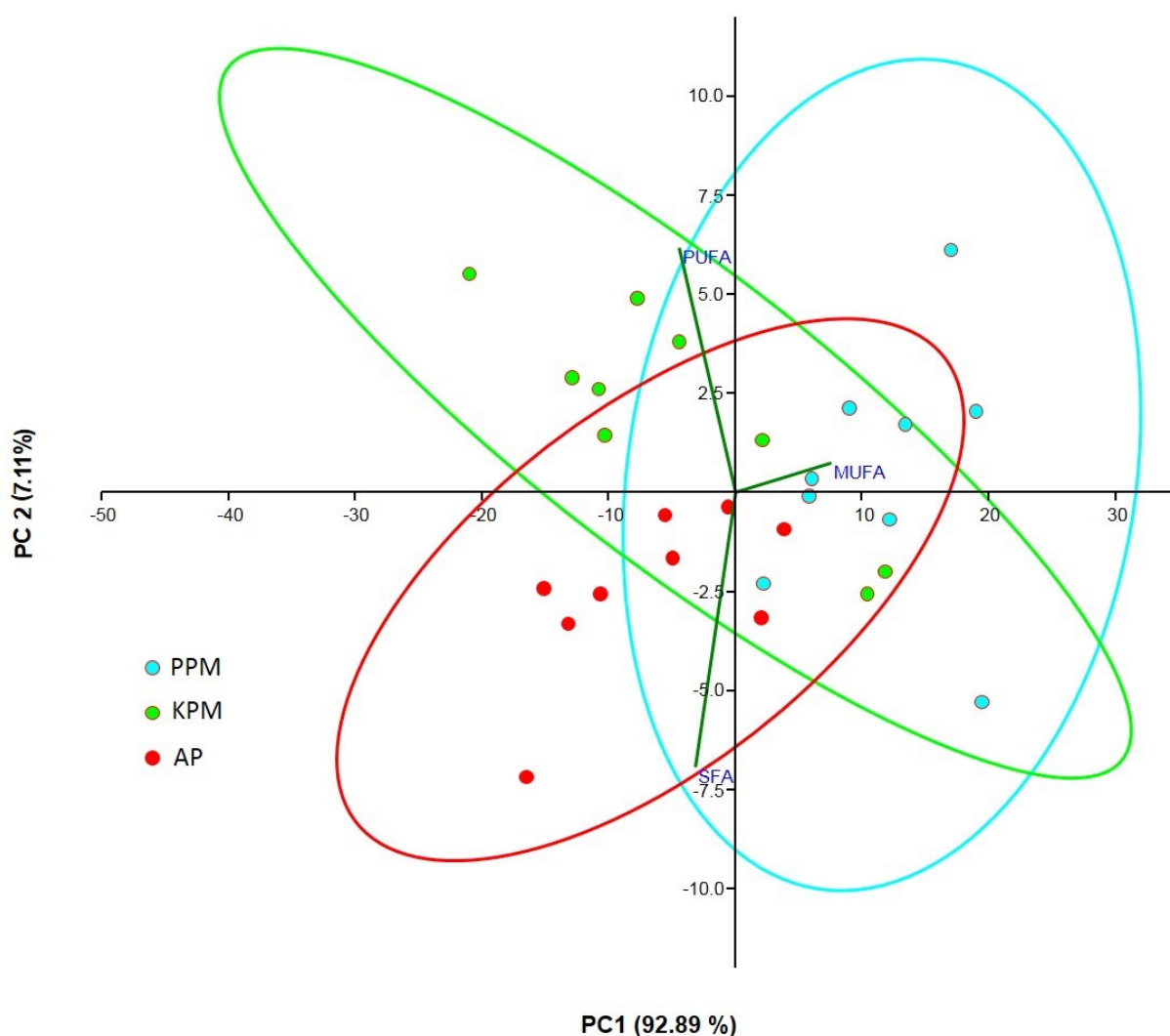
Grafik 62. Procentualni udeo nezasićenih masnih kiselina (UFA) u masnom telu pčela iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Promene u sadržaju zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih (PUFA) masnih kiselina u masnom telu pčela sa tri analiziranih lokaliteta, tokom sva tri perioda su prikazane u vidu korelacione toplotne mape tj. dvodimenzionalne mape predstavljene sa više boja koje variraju u zavisnosti od koncentracije SFA, MUFA i PUFA u različitim uzorcima (Slika 10). Na mapi se može uočiti povezanost SFA i PUFA i njihova veća zastupljenost krajem perioda mirovanja i tokom aktivnog perioda, za razliku od MUFA koje su u najvećem stepenu prisutne početkom perioda mirovanja.



Slika 10. Korelaciona toplotna mapa kao prikaz promena u sadržaju zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih (PUFA) masnih kiselina u masnom telu pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različita lokaliteta: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje).

Zastupljenost zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u masnom telu pčela, tokom različitih perioda sa tri različita lokaliteta, je analizirana i multivarijacionom statističkom metodom – PCA (engl. *Principal Component Analysis*, analiza glavnih komponenti) (Slika 11). PCA je statistički postupak koji koristi ortogonalnu transformaciju da prevede skup promenljivih, koje opisuju analizirani uzorak, u novi skup linearno nekorelisanih promenljivih koje se nazivaju glavnim komponentama. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje najveći deo varijabilnosti podataka, dok druga glavna komponenta (PC2) ima najveću preostalu varijansu pod ograničenjem da je ortogonalna na prethodnu komponentu. Prikaz u vidu biplota koji predstavlja vezu između sadržaja masnih kiselina u masnom telu pčela i perioda uzorkovanja je dat na Slici 11.



Slika 11. Analiza po glavnim komponentama (PC1 i PC2) za sadržaj zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih (PUFA) masnih kiselina u masnom telu pčela uzorkovanih početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP).

Analizom glavnih komponenti sadržaja SFA, MUFA i PUFA u masnom telu pčela tokom tri perioda (PPM, KPM i AP) dobijamo da prva glavna komponenta (PC1) opisuje 92,89 % varijabilnosti, dok druga glavna komponenta opisuje 7,11 % varijabilnosti. Uočava se grupisanje mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) sa jedne strane i zasićenih (SFA) i polinezasićenih (PUFA) masnih kiselina sa druge strane prve glavne komponente (PC1), tj. PC1 je u pozitivnoj korelaciji sa MUFA i negativnoj korelaciji sa SFA i PUFA. To je rezultovalo grupisanjem pčela po sadržaju masnih kiselina u masnom telu, tj. izdvajaju se pčele uzorkovane početkom perioda mirovanja sa jedne strane (sa visokim sadržajem MUFA) i pčele uzorkovane krajem perioda mirovanja i tokom aktivnog perioda sa druge strane. Dalje se, duž druge glavne komponente (PC2), uočava razdvajanje polinezasićenih (PUFA) i zasićenih (SFA) masnih kiselina, što rezultuje daljim grupisanjem pčela te se sa jedne strane izdvajaju pčele uzorkovane krajem perioda mirovanja (koje karakteriše visok sadržaj PUFA), a sa druge strane se izdvajaju pčele uzorkovane u letnjem, aktivnom periodu (sa visokim sadržajem SFA).

5.3.8.3. Profil ugljovodonika

Analiza ugljovodonika, ekstrahovanih iz homogenata celih pčela sa tri lokaliteta u okviru različitih perioda, izvršena je metodom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom i predstavljena tabelarno (Tabela 14) i grafički (Grafici 63 i 64). Identifikovani su dugolančani ugljovodonici tj. *n*-alkani sa neparnim brojem ugljenikovih atoma: trikozan (C₂₃), pentakozan (C₂₅), heptakozan (C₂₇) i nonakozan (C₂₉). Prisutni ugljovodonici, kao nepolarna klasa jedinjenja ekstrahovana heksanom kao nepolarnim rastvaračem, predstavljaju ukupne ugljovodonike homogenata pčela.

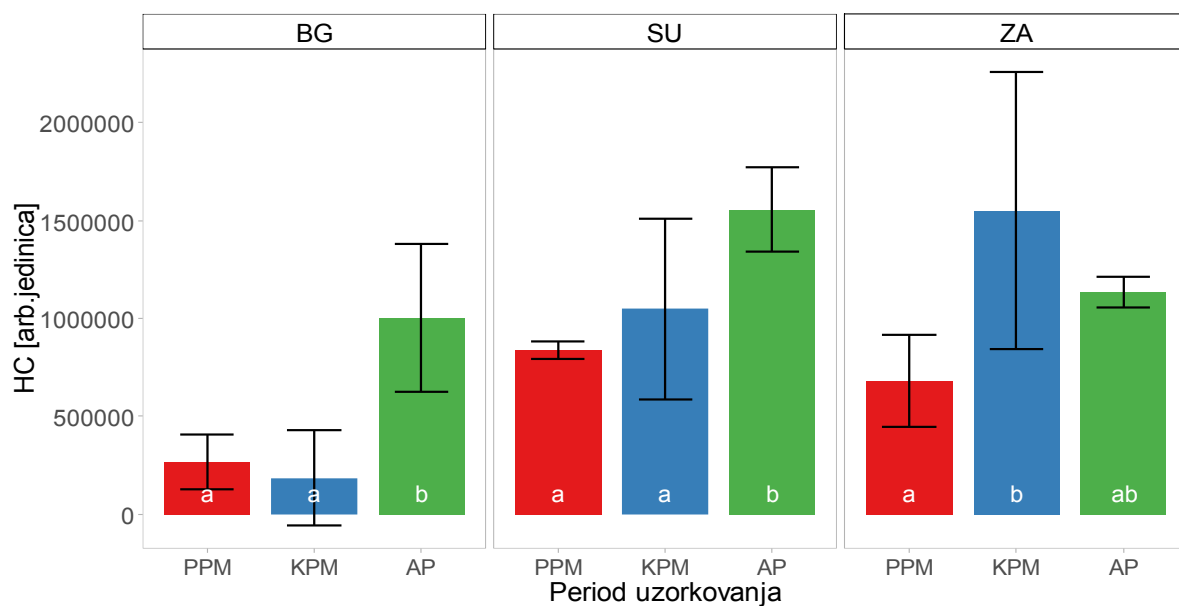
Tabela 14. Sadržaj ugljovodonika (u arbitrarnim jedinicama) u pčelama iz Beograda (urbano područje), Suseka (ruralno područje) i Zajače (industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP).

	Beograd			Susek			Zajača		
	PPM	KPM	AP	PPM	KPM	AP	PPM	KPM	AP
C ₂₃	0	0	193687	91059	587758	723792	302203	891188	740985
C ₂₅	62916	39855	177789	147282	593482	729825	461214	923426	252256
C ₂₇	86885	49304	323883	279004	1061270	1980779	662249	1812772	325054
C ₂₉	118562	293039	306400	320693	902814	1232984	620474	1023217	186445

Kvantitativna analiza je pokazala da je u uzorcima pčela iz Beograda najzastupljeniji ugljovodonik nonakozan (C₂₉), dok je heptakozan (C₂₇) najzastupljeniji u uzorcima pčela iz Suseka i Zajače. Kao najmanje zastupljeni ugljovodonici izdvajaju se trikozan (C₂₃) u pčelama iz Beograda i Suseka, kao i pentakozan (C₂₅) u pčelama iz Zajače (Tabela 14).

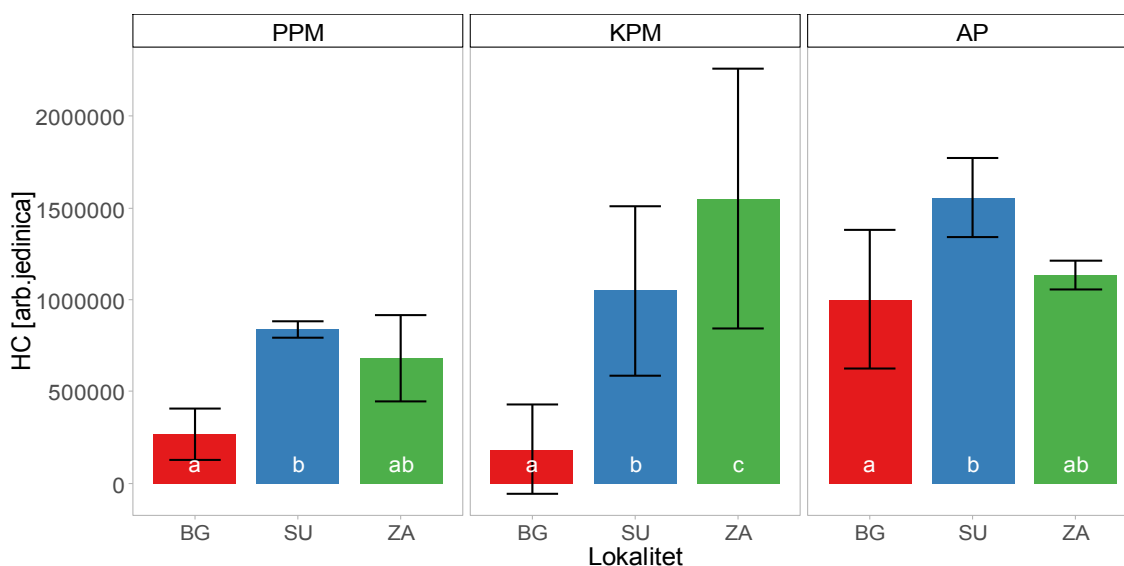
Promene u sadržaju ugljovodonika u pčelama tokom godine, zasebno za svaki lokalitet, prikazane su na Grafiku 63. U uzorcima pčela iz Beograda i Suseka se zapaža značajno povećanje sadržaja ugljovodonika tokom letnjeg aktivnog perioda u odnosu na

početak i kraj perioda mirovanja. U uzorcima pčela iz Zajače su takođe najmanje vrednosti zabeležene početkom perioda mirovanja, sa značajnim povećanjem sadržaja ugljovodonika krajem perioda mirovanja.



Grafik 63. Sadržaj ugljovodonika (HC) u pčelama uzorkovanim početkom perioda mirovanja (PPM), krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP) sa tri različita lokaliteta: Beograd (BG, urbano područje), Susek (SU, ruralno područje) i Zajača (ZA, industrijsko područje). Različita slova između grupa u okviru kategorije BG, SU ili ZA ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

Pregledom sadržaja ugljovodonika u pčelama sa različitih lokaliteta, zasebno za svaki period, zapažamo najniži sadržaj ugljovodonika u pčelama iz Beograda tokom sva tri perioda. Krajem perioda mirovanja, ističu se značajno više vrednosti sadržaja ugljovodonika u pčelama iz Zajače u poređenju sa druga dva lokaliteta (Grafik 64).



Grafik 64. Sadržaj ugljovodonika (HC) u pčelama iz Beograda (BG, urbano područje), Suseka (SU, ruralno područje) i Zajače (ZA, industrijsko područje) u okviru različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP). Različita slova između grupa u okviru kategorije PPM, KPM ili AP ukazuju na postojanje statistički značajne razlike dobijene dvofaktorskom analizom varijanse sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

5.3.9. Metabolomička analiza hemolimfe pčela

Analiza metaboličkog otiska (engl. *metabolic fingerprinting*) u hemolimfi pčela iz Beograda, Suseka i Zajače, početkom i krajem perioda mirovanja, kao i tokom aktivnog perioda, izvedena je tehnikom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom i dalje upotpunjena identifikacijom metabolita korišćenjem adekvatnih spektralnih baza i analizom standardnih rastvora jedinjenja (Tabela 15). Detektovano je 154 jedinjenja, od kojih je 125 identifikovano, sa pouzdanom identifikacijom kod 67 jedinjenja i parcijalnom ili nedovoljno pouzdanom identifikacijom kod 58 jedinjenja. Identifikovani metaboliti su razvrstani u sledeće podgrupe: Krebsov ciklus i sudbina piruvata, proteinogene aminokiseline, derivati aminokiselina i metabolizam azota, biogeni amini, osapunjivi lipidi i komponente, steroidi, monosaharidi i derivati, oligosaharidi, metabolizam nukleotida, sekundarni metaboliti biljaka, alifatični ugljovodonici i masni alkoholi, nepoznato (Tabela 15). Kao posledica procesa derivatizacije, kao sastavnog dela pripreme uzoraka, pojedina jedinjenja su gradila više derivata sa različitim brojem uvedenih trimetilsilil (TMS) i/ili metoksiimino (MOX) grupa, što je pri detekciji uzeto u obzir, te su u Tabeli 15 date sabrane površine svih hromatografskih pikova koji su poticali od istog jedinjenja (npr. glukozu čine tri pika P081+P083+P093). Najzastupljeniji metabolit u GC-MS metabolomičkoj analizi hemolimfe medonosne pčele je trehaloza, praćena fruktozom, glukozom, putrescinom i prolinom. Maseni spektri detektovanih metabolita su iskorišćeni za formiranje prve biblioteke spektara metaboloma hemolimfe medonosne pčele (Prilog 4), kao doprinos daljim entometabolomičkim istraživanjima.

Tabela 15. Relativni sadržaj (površina pikova normalizovana na masu uzorka) pojedinačnih metabolita u metabolomu hemolimfe pčela iz Beograda (BG), Suseka (SU)^a i Zajače (ZA) tokom različitih perioda: početak perioda mirovanja (PPM), kraj perioda mirovanja (KPM) i aktivni period (AP).

Oznaka	Jedinjenje	PPM_BG	PPM_ZA	KPM_BG	KPM_SU	KPM_ZA	AP_BG	AP_SU	AP_ZA
Krebsov ciklus i sudbina piruvata									
P001	Mlečna kiselina ^b	1220	3234	1031	1369	988	718	912	861
P017	Ćilibarna kiselina ^b	999	2777	1345	2298	1551	1198	519	1427
P027	Jabučna kiselina ^b	422	367	1755	1369	1342	422	506	574
P038	α-Hidroksiglutarina kiselina	94	722	270	127	0	39	1	0
P067	Limunska kiselina ^b	3559	2992	9333	10095	9430	9826	6212	8067
Proteinogene aminokiseline									
P002	Alanin ^b	2566	8463	4234	1465	4300	3552	2941	3311
P003+P013	Glicin	1236	2598	2056	3082	3380	2705	2767	3553
P006	Valin	1720	2163	2271	2823	4756	2185	3143	2609
P012	Leucin ^b	664	1170	1196	1208	2035	1179	1404	2559
P015+P036	Prolin	31635	39487	43757	31648	40403	44124	31329	32249
P021	Serin	386	992	1071	2680	2443	1850	1928	2573
P022	Treonin	353	858	818	1861	2531	1327	2401	1756
P032	Hidroksiprolin ^b	120	183	280	74	207	82	198	337
P034	Cistein	0	202	0	167	163	222	123	171
P042	Fenilalanin ^b	335	597	492	536	778	489	637	1871
P043	Glutaminska kiselina ^b	733	2442	2128	396	489	278	2375	344
P047	Asparagin ^b	251	478	401	708	973	617	458	715
P052+P082	Lizin	3346	2753	14380	6803	8840	5694	27447	9824
P057	Glutamin	2561	4329	4160	5826	4362	2937	2477	2344
P110	Triptofan ^b	0	47	0	436	267	118	151	526

Oznaka	Jedinjenje	PPM_BG	PPM_ZA	KPM_BG	KPM_SU	KPM_ZA	AP_BG	AP_SU	AP_ZA
Derivati aminokiselina i metabolizam azota									
P004	Sarkozin	1134	1528	1638	1565	1277	1389	661	493
P005+P023	β-Alanin ^b	2676	5723	5021	7931	7511	5910	4208	4866
P007+P033	Norvalin ^b	243	72	112	176	255	504	198	0
P008	Urea	206	115	461	478	220	293	269	410
P009	Hidroksiurea	153	76	77	187	113	223	294	207
P020+P040	Pipekolinska kiseina	149	0	112	489	460	105	0	187
P029	5-Oksoprolin (piroglutaminska kiselina)	5427	5288	3962	4830	4381	3264	3074	3099
P031+P046	γ-Aminobuterna kiselina	761	437	557	1386	1235	1056	1629	1435
P041+P063	Ornitin	132	440	786	1884	1836	782	896	815
P045	Homocistein	0	0	0	159	138	101	177	215
Biogeni amini									
P028+P053+P076	Putrescin ^b	34673	42390	47252	107310	110407	96650	71166	54384
P066	Kadaverin	335	284	481	715	394	1035	1080	293
Osapunjivi lipidi i komponente									
P010	Etanolamin	0	44	0	58	0	0	74	0
P013	H ₃ PO ₄	40988	35091	35466	35141	39700	33906	24861	21465
P014	Glicerol	6407	11491	4966	7300	4864	4933	4772	5230
P037		160	228	687	1778	2895	870	932	2005
P058	Glicerol-fosfat	9505	12881	11551	17492	16846	11066	11407	11994
P059	Fosfoetanolamin	1432	654	616	1298	1877	526	1291	1398
P069	Miristinska kiselina	2480	1453	2957	2100	1533	2178	1306	2936
P097	Palmitinska kiselina	1398	1044	657	1031	812	650	866	629
P103	Margarinska kiselina	56	17	0	0	0	0	0	14
P108	Linolna kiselina	113	179	154	1127	368	75	175	76
P109	Oleinska kiselina	1244	1803	1265	4363	1737	540	1683	759
P111	Stearinska kiselina	4755	2203	1529	1107	1345	1235	951	1420
P119	Gliceril-miristat	1132	988	1222	1046	860	1163	769	1720

Oznaka	Jedinjenje	PPM_BG	PPM_ZA	KPM_BG	KPM_SU	KPM_ZA	AP_BG	AP_SU	AP_ZA
P127+P128	Gliceril-palmitat	23941	20358	25350	24180	19504	26144	18077	32303
P129	Gliceril-margarat	627	447	583	325	539	736	301	565
P135+P138	Gliceril-stearat	39238	30230	48819	39455	31886	42530	31573	55809
P156	Gliceril-arahidat	559	527	795	480	630	562	0	726
Steroidi									
P164	Sitosterol	567	210	692	674	690	942	323	486
P165		0	0	255	364	347	561	190	0
Monosaharidi i derivati									
P030		47	287	157	279	87	60	243	69
P035	<i>C4 aldonska kiselina (eritronska/treonska)^c</i>	133	103	0	137	149	45	81	229
P048	Arabinoza ^b	0	0	184	114	109	141	482	328
P050	<i>Alditol i/ili trioza^c</i>	499	1310	474	218	268	159	387	85
P055	<i>C4/C5 alditol^c</i>	51	270	501	403	265	452	1591	657
P056	<i>C4/C5 alditol^c</i>	286	591	251	316	217	301	270	264
P060		143	118	0	59	0	369	0	72
P061		301	153	207	493	175	382	443	450
P062		183	0	436	0	0	2136	0	0
P065	<i>Heksoza^c</i>	56	137	3224	58	5	102	394	65
P068		201	456	6813	229	235	239	739	189
P070	<i>Ciklitol^c</i>	4887	1064	6533	280	3864	1643	0	382
P071	<i>Heksoza^c</i>	114	0	1816	0	0	0	938	0
P072	<i>Heksoza^c</i>	118	75	697	0	112	0	1002	181
P073		222	87	1616	756	197	90	1108	218
P075	<i>Ciklitol^c</i>	3849	157	4838	0	134	4165	0	0
P077+P079	Fruktoza ^b	250228	183340	2391208	451071	332015	173854	3255606	181466
P078	Glukonolakton	1741	13804	6788	3060	2000	1336	9169	1626
P080		405	1115	5971	280	292	305	617	4491

Oznaka	Jedinjenje	PPM_BG	PPM_ZA	KPM_BG	KPM_SU	KPM_ZA	AP_BG	AP_SU	AP_ZA
P081+P083+P093	Glukoza ^b	135577	89670	1746149	303980	204005	130876	2582795	122935
P085	<i>C6 alditol ili aldoza</i> ^c	542	2760	2670	733	985	1186	3295	997
P086	Glucitol (sorbitol) ^b	1952	19487	5921	1752	2515	2741	1795	2537
P087		179	52	0	0	0	641	0	436
P090	<i>Ciklitol</i> ^c	642	818	0	1266	2453	3740	0	3123
P091		0	159	9913	0	0	0	14040	0
P094	<i>Ciklitol</i> ^c	1098	221	764	161	576	796	529	3731
P095	Galaktonska kiselina	11	0	45	1969	866	361	126	399
P096	Glukonska kiselina	3550	50033	41950	9312	4575	2620	7120	3154
P098	Inozitol (<i>izomer</i>)	92	225	170	299	230	445	719	757
P099		193	177	2895	547	361	211	3934	185
P101	<i>Mio</i> -inozitol ^b	1731	1154	4135	1985	2505	2981	9865	5906
P104	<i>Heksoza</i> ^c	0	0	161	42	0	0	177	0
P105	<i>Heksoza / C6 alditol</i> ^c	98	84	88	207	105	151	237	324
P106	<i>Heksoza</i> ^c	54	87	54	231	66	120	94	280
P107	<i>Heksoza</i> ^c	175	108	74	46	63	148	113	212
P114	<i>Aldoheksoza-fosfat</i> ^c	384	1517	317	213	177	115	437	110
P115	<i>Aldoheksoza-fosfat</i> ^c	231	1138	302	31	0	0	37	0
P116	<i>Heksoza-fosfat</i> ^c	69	175	160	248	162	159	155	177
P117	<i>Aldoheksoza-fosfat</i> ^c	180	285	287	679	462	415	506	599
P118	<i>Heksoza-fosfat</i> ^c	13	44	47	103	107	48	51	65
P120		179	0	108	324	151	270	121	153
P121	<i>C5/C6 alditol</i> ^c	250	170	190	249	506	194	171	272
P123		0	35	108	217	573	189	178	236
P124	Inozitol-fosfat	142	100	313	1502	2091	964	1188	1223
P126		0	0	0	469	400	143	458	0

Oznaka	Jedinjenje	PPM_BG	PPM_ZA	KPM_BG	KPM_SU	KPM_ZA	AP_BG	AP_SU	AP_ZA
Oligosaharidi									
P092	<i>Disaharid</i> ^c	341	386	10483	2187	1169	741	21112	702
P113	<i>Disaharid / glikozid</i> ^c	234	355	405	260	196	100	689	0
P130	Saharoza ^b	0	0	3257	46534	0	1099	26179	5952
P131	<i>Disaharid</i> ^c	80	60	359	145	109	103	160	158
P132	<i>Disaharid</i> ^c	113	470	422	286	217	0	249	64
P133	<i>Disaharid</i> ^c	0	0	4664	0	121	133	612	0
P134	<i>Disaharid</i> ^c	213	1483	4566	1114	941	461	2985	115
P136	<i>Disaharid</i> ^c	189	1368	2703	1529	1062	459	3758	0
P137	<i>Disaharid</i> ^c	0	10	2357	0	0	0	724	0
P139	<i>Disaharid</i> ^c	0	0	14319	393	0	0	2042	0
P140	Trehaloza ^b	654352	688222	869612	1034203	651794	659110	573932	527126
P141	<i>Disaharid</i> ^c	0	0	58837	0	0	0	4887	0
P142	<i>Disaharid</i> ^c	0	0	4100	0	0	0	2828	0
P143	<i>Disaharid</i> ^c	0	0	12508	0	0	0	1434	0
P144	<i>Disaharid</i> ^c	0	0	4278	0	0	0	5432	0
P145	<i>Disaharid (sličan turanozi)</i> ^c	0	0	36274	686	191	176	8022	165
P146	<i>Disaharid</i> ^c	0	889	0	867	564	0	949	0
P147	<i>Disaharid (sličan soforozi)</i> ^c	161	0	31760	691	591	91	9746	155
P148	<i>Disaharid (sličan turanozi)</i> ^c	1006	465	20359	353	378	316	8193	186
P149	<i>Disaharid (sličan turanozi)</i> ^c	1256	554	22012	675	635	518	9256	215
P150	<i>Disaharid (sličan soforozi)</i> ^c	0	0	6143	0	0	0	1637	0
P151	<i>Disaharid (sličan genciobiozi)</i> ^c	0	0	5102	179	134	0	5462	0
P152	<i>Disaharid (sličan maltozi)</i> ^c	490	95	10930	367	424	239	9891	386
P153	<i>Disaharid (sličan genciobiozi)</i> ^c	1312	541	42739	1161	1262	841	42230	425
P154	<i>Disaharid (sličan genciobiozi)</i> ^c	295	280	1374	91	127	98	1217	70
P155	<i>Disaharid (sličan genciobiozi)</i> ^c	310	0	7536	185	200	87	7415	73
P157	<i>Disaharid (sličan laktobionskoj kiselini)</i> ^c	0	326	1421	0	0	0	670	0

Oznaka	Jedinjenje	PPM_BG	PPM_ZA	KPM_BG	KPM_SU	KPM_ZA	AP_BG	AP_SU	AP_ZA
P158	Disaharid (sličan laktobionskoj kiselini) ^c	0	0	959	0	0	0	2999	0
P163	Disaharid/trisaharid ^c	0	1482	0	501	600	0	0	726
P166	Trisaharid (sličan rafinozi) ^c	0	0	5275	222	214	136	1128	0
P167	Trisaharid (sličan melezi tozi) ^c	0	0	319	0	0	0	2892	0
P169	Trisaharid (sličan rafinozi) ^c	0	0	639	0	0	0	0	0
P170	Trisaharidi (sličan kestozi) ^c	0	0	6180	0	0	328	2150	0
P171	Trisaharidi (sličan kestozi) ^c	0	0	1653	0	0	0	2457	0
P172	Trisaharid (sličan rafinozi) ^c	0	0	4058	284	254	182	2721	0
Metabolizam nukleotida									
P102	Mokraćna kiselina	52	113	51	147	115	61	82	85
P168	Uridin	0	0	0	0	0	0	891	0
Sekundarni metaboliti biljaka									
P064	Šikimi kiselina	261	77	174	89	4	318	125	30
P074	Hinska kiselina	562	105	592	312	188	931	534	103
Alifatični ugljovodoni i masni alkoholi									
P011	Tridekan (izomer)	298	201	304	293	250	282	152	410
P018	Alkan, razgranati ^c	243	199	234	201	186	284	141	305
P026		145	93	231	177	113	167	0	193
P049		455	227	230	160	138	162	0	231
P054		120	87	42	472	450	593	131	451
P084		113	0	0	0	0	115	0	254
P112	Trikozan ^b	166	269	228	640	529	502	537	517
P125	Pentakoza n ^b	275	308	301	254	270	505	211	0
P159		935	1142	364	499	485	891	0	302
P160		506	523	240	404	414	662	252	185
P161	Dugolančani nezasićeni alkohol ^c	674	464	389	172	327	229	121	0
P162		1404	1499	2200	1544	1573	3674	2615	2114

Oznaka	Jedinjenje	PPM_BG	PPM_ZA	KPM_BG	KPM_SU	KPM_ZA	AP_BG	AP_SU	AP_ZA
Nepoznato									
P024		107	0	103	1127	293	479	182	51
P025		698	413	721	1841	2156	1830	860	1027
P044		0	0	50	117	453	32	41	26
P051		432	422	330	475	403	250	172	186
P088		0	0	308	131	0	200	10399	106
P089		0	0	415	76	35	133	7224	0
P100		231	137	106	64	138	103	180	219

^a PPM u Suseku nije određivan usled nedostatka uzorka hemolimfe

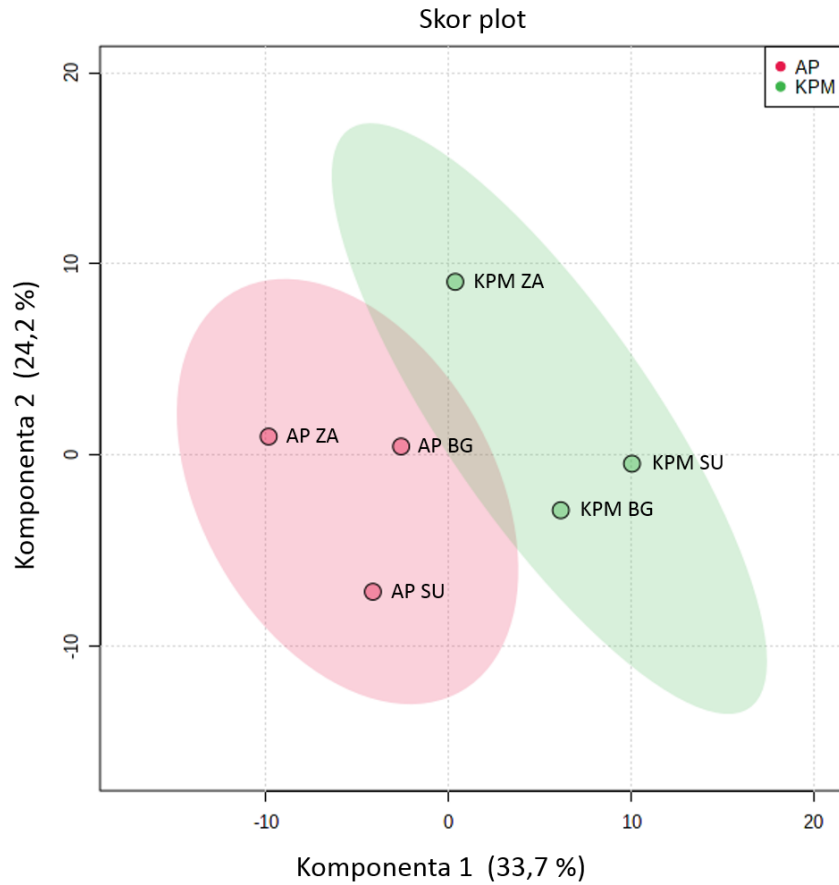
^b Identifikacija metabolita potvrđena standardima jedinjenja koji su analizirani pod istim uslovima kao i uzorci

^c Parcijalna ili nedovoljno pouzdana identifikacija metabolita

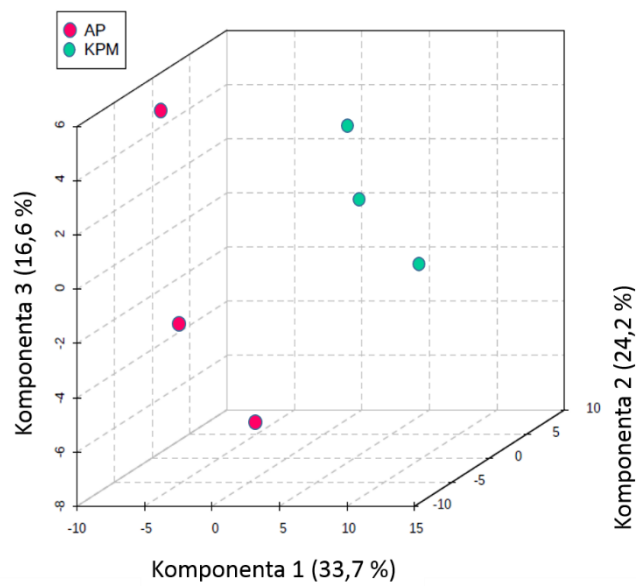
S obzirom da se analizom metaboloma generiše veliki broj podataka, uobičajeno se primenjuje multivarijaciona statistika, kao grupa metoda za smanjenje dimenzionalnosti velikih skupova podataka kako bi se lakše prikazali i interpretirali (Chong i sar., 2019). Preliminarni statistički testovi su ukazali na visoke varijacije u sadržaju glukoze i fruktoze, koje narušavaju statistički model i prikrivaju uticaje ostalih metabolita. Visoke varijacije u sadržaju glukoze i fruktoze su posledica kontaminacije pojedinih uzoraka tokom uzimanja hemolimfe, te su ugljeni hidrati izostavljeni u daljoj obradi podataka statističkim analizama. Takođe, usled nedostatka uzoraka hemolimfe pčela iz Suseka sa početka perioda mirovanja, taj period je izostavljen iz daljih statističkih analiza.

Diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS-DA) je jedna od naprednijih multivarijacionih metoda sa velikom primenom u metabolomičkim analizama. PLS-DA je nadzirana metoda, što znači da je identitet grupa definisan a fokus je na iznalaženju varijabli koje su važne za razdvajanje na grupe, te je naročito pogodna za otkrivanje biomarkera ili testiranje hipoteza. U cilju poboljšanja razdvajanja posmatranih grupa, PLS-DA metoda vrši rotiranje glavnih komponenti tako da se dobije maksimalno razdvajanje među klasama, kao i definisanje koje od promenljivih su za to najviše odgovorne.

PLS-DA analizom metabolomičkih podataka uzoraka hemolimfe pčela iz Beograda, Suseka i Zajače, prikazano je razdvajanje pčela uzorkovanih krajem perioda mirovanja i u aktivnom periodu. Prva glavna komponenta je opisala 33,7 % varijabilnosti, dok druga glavna komponenta opisala 24,2 % varijabilnosti podataka (Slike 12, 13).

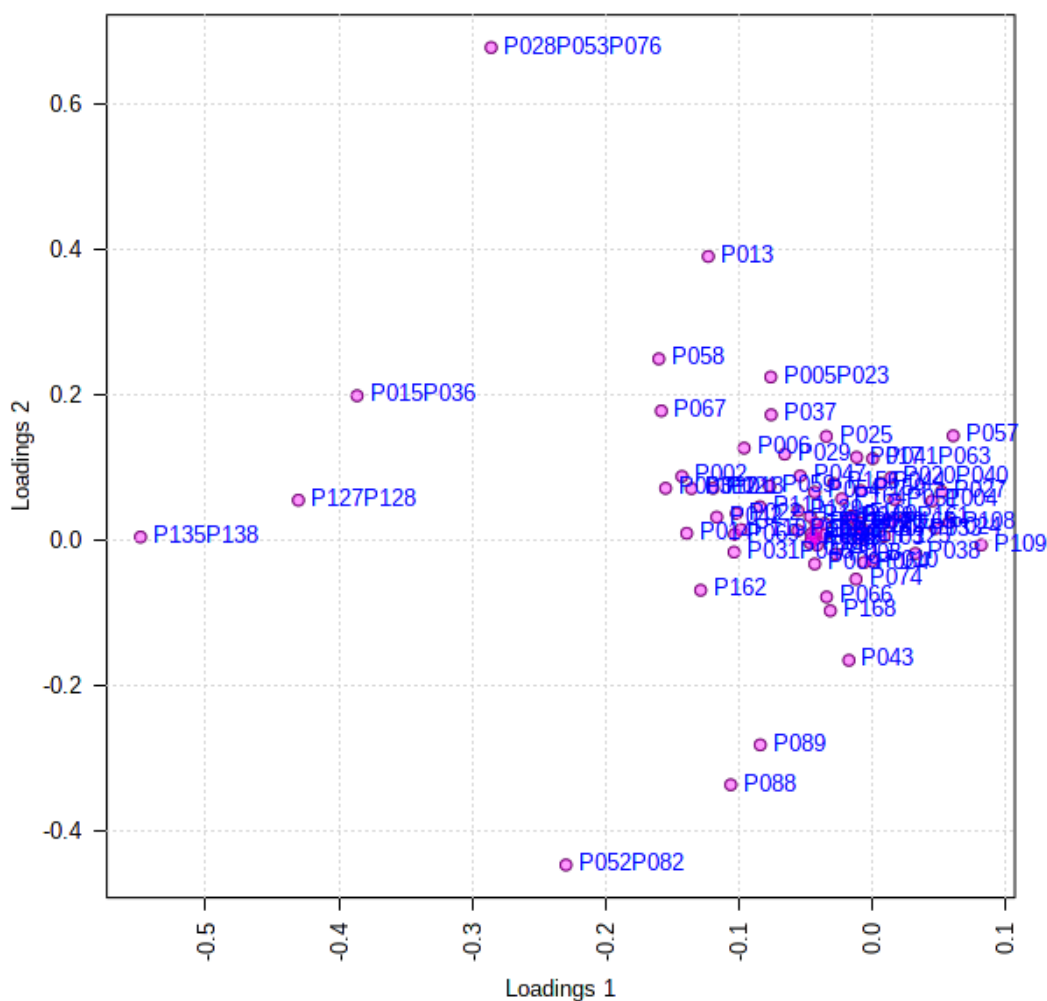


Slika 12. Grafik skorova PLS-DA analize metabolomičkih podataka hemolimfe pčela iz Beograda, Suseka i Zajače, gde je prikazano razdvajanje pčela uzorkovanih krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP).



Slika 13. 3D prikaz skorova PLS-DA analize metabolomičkih podataka hemolimfe pčela uzorkovanih krajem perioda mirovanja (KPM) i u aktivnom periodu (AP).

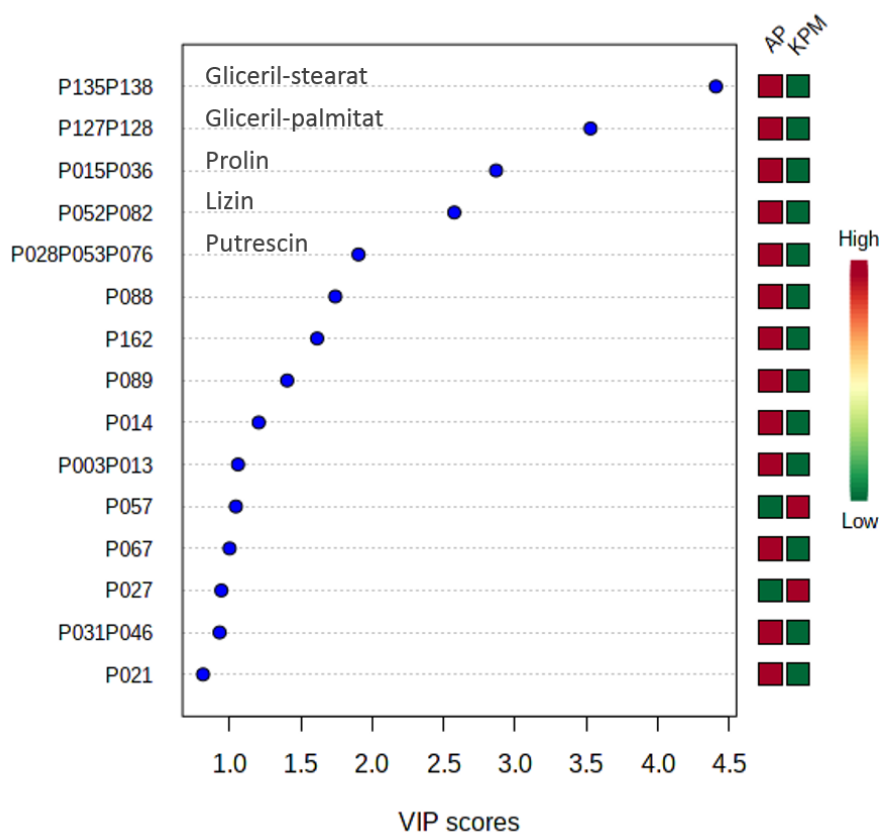
Grafik doprinosa varijabli (engl. *loadings plot*) koji pokazuje uticaj varijabli tj. metabolita koji su značajni za razdvajanje na grupe, prikazan je na Slici 14. Time su identifikovana sledeća jedinjenja kao najznačajnija za razdvajanje letnjih i zimskih pčela duž prve komponente: gliceril-stearat (P135P138), gliceril-palmitat (P127P128) i prolin (P015P036). Duž druge komponente se izdvojio putrescin (P028P053P076) koji značajno doprinosi varijacijama unutar grupâ AP i naročito KPM.



Slika 14. PLS-DA grafik doprinosa (engl. *loadings plot*) koji prikazuje uticaj varijabli tj. metabolita na razdvajanje grupa.

Izbor značajnih varijabli u klasifikaciji podataka je bitan korak u multivarijacionoj statističkoj analizi. Jedan od parametara PLS-DA modela je vrednost varijable od značaja na projekciju (engl. *Variable Importance in Projection, VIP*). VIP je parametar koji sumira važnost svake varijable u posmatranom razdvajanju grupe, zatim rangira varijable prema njihovom individualnom doprinosu. Metaboliti koji su se izdvojili kao varijable od značaja za projekciju tokom PLS-DA analize metabolomičkih podataka hemolimfe pčela, prikazani su na Slici 15. Kao varijable sa najvećim doprinosom izdvajaju se gliceril-

stearat, gliceril-palmitat, prolin, lizin, putrescin, sa višim koncentracijama u aktivnom periodu.

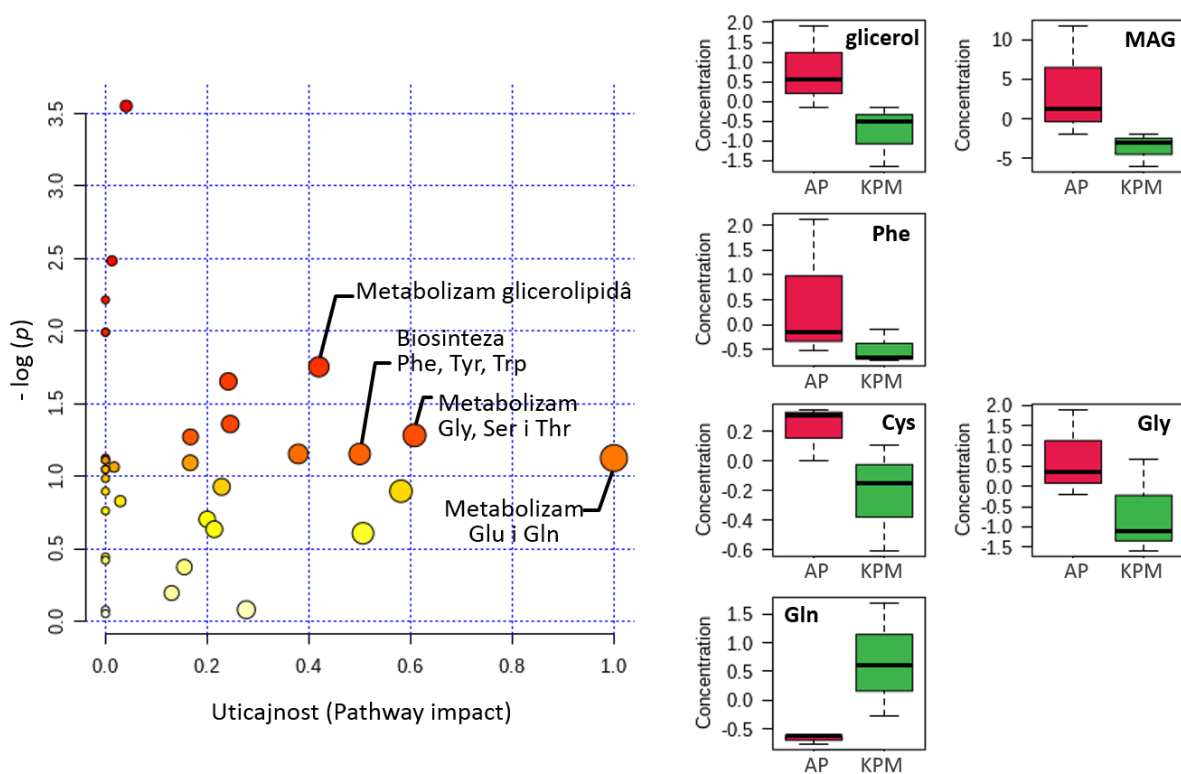


Slika 15. Prikaz varijabli od značaja u projekciji (VIP scores) PLS-DA analize. Obojeni kvadrati sa desne strane ukazuju na relativno visoke (crveni) ili relativno niske (zeleni) koncentracije metabolita koji su prikazani sa leve strane.

Rezultati analize metaboličkog otiska u hemolimfi pčela, upotpunjeni identifikacijom metabolita, su dalje iskorišćeni za mapiranje metabolita pomoću KEGG baze metaboličkih podataka (Okuda i sar., 2008) i analizu metaboličkih puteva (engl. *pathway analysis*). Identifikovani metaboliti u hemolimfi pčela su povezani sa 36 metaboličkih puteva (Tabela 16). Analizom topologije metaboličkih puteva, povezanih sa identifikovanim metabolitima u hemolimfi pčela, definiše se uticajnost metabolita na dati metabolički put (engl. *pathway impact*), dok je značajnost kvantitativnih perturbacija hemolimfnih metabolita na odgovarajući metabolički put data u vidu $-\log(p)$ vrednosti (Tabela 16, Slika 16). Da li se metabolit nalazi na značajnoj poziciji pri vrhu metaboličkog puta ili je marginalan, definiše njegovu uticajnost (engl. *pathway impact*) u okviru strukturne analize metaboličkog puta.

Tabela 16. Rezultati analize metaboličkih puteva.

Metabolički putevi	Identifikovani/ ukupni metaboliti	-log(<i>p</i>)	Uticajnost metabolita
Metabolizam piruvata	2/22	3.55	0.04
Metabolizam purina	2/63	2.49	0.01
Metabolizam galaktoze	1/27	2.22	0.00
Metabolizam taurina i hipotaurina	1/7	1.99	0.00
Metabolizam tiamina	1/7	1.99	0.00
Metabolizam glicerolipida	3/13	1.76	0.42
Metabolizam gliksilata i dikarboksilnih kiselina	6/24	1.65	0.24
Metabolizam cisteina i metionina	3/32	1.36	0.25
Metabolizam glicina, serina i treonina	5/30	1.28	0.61
Krebsov ciklus	3/20	1.27	0.17
Biosinteza fenilalanina, tirozina i triptofana	1/4	1.16	0.50
Metabolizam fenilalanina	1/7	1.16	0.38
Metabolizam D-glutamina i D-glutamata	2/5	1.13	1.00
Metabolizam azota	2/5	1.13	0.00
Elongacija masnih kiselina	1/37	1.11	0.00
Katabolizam masnih kiselina	1/38	1.11	0.00
Biosinteza aminoacil-tRNK	14/48	1.09	0.17
Biosinteza masnih kiselina	2/43	1.06	0.02
Katabolizam lizina	1/21	1.05	0.00
Metabolizam biotina	1/10	1.05	0.00
Biosinteza valina, leucina i izoleucina	3/8	0.99	0.00
Biosinteza arginina	4/12	0.93	0.23
Metabolizam alanina, aspartata i glutamata	6/23	0.90	0.58
Metabolizam pirimidinskih baza	2/40	0.90	0.00
Metabolizam sfingolipidâ	2/18	0.83	0.03
Metabolizam porfirina i hlorofila	2/24	0.76	0.00
Metabolizam butirata	4/14	0.71	0.20
Metabolizam triptofana	1/30	0.64	0.21
Metabolizam arginina i prolina	6/31	0.61	0.51
Katabolizam valina, leucina i izoleucina	2/38	0.45	0.00
Glikoliza i glukoneogeneza	1/26	0.42	0.00
Metabolizam glutationa	7/26	0.38	0.16
Metabolizam glicerofosfolipida	3/32	0.20	0.13
Metabolizam β-alanina	1/14	0.08	0.28
Metabolizam pantotenata i koenzima A	3/18	0.08	0.00
Metabolizam propanoata	2/21	0.05	0.00



Slika 16. Prikaz rezultata analize metaboličkih puteva prema parametrima uticajnosti (x-osa) i značajnosti kvantitativnih promena (y-osa) identifikovanih metabolita unutar odgovarajućeg metaboličkog puta. Veći radijus obeležja ukazuje na veću uticajnost, dok intenzivnija crvena boja obeležja ukazuje na veću značajnost promene. Metaboliti sa visokom uticajnošću u metaboličkom putu i značajnim promenama ($p < 0,05$) u koncentraciji između aktivnog perioda (AP) i kraja perioda mirovanja (KPM) su grafički prikazani sa desne strane (glicerol, MAG–monoacilgliceroli, Phe–fenilalanin, Cys–cistein, Gly–glicin i Gln–glutamin). Vrednosti koncentracija metabolita su Pareto skalirane.

Razlike u metabolomu hemolimfe letnjih i zimskih pčela praćene su promenama u metaboličkim putevima pčela, u najvećem stepenu u metabolizmu aminokiselina i glicerolipida (Tabela 16, Slika 16). Kao glavni diskriminišući metaboliti, sa značajnim promenama u sadržaju tokom godine i visokom uticajnošću u metaboličkim putevima, izdvajaju se aminokiseline glicin, cistein, glutamin, fenilalanin, kao i glicerol i monoacilgliceroli u metabolizmu glicerolipida. Koncentracije navedenih metabolita, izuzev glutamina, bile su značajno povećane tokom letnjeg aktivnog perioda u odnosu na kraj perioda mirovanja.

6. DISKUSIJA

Istraživanja u okviru ove disertacije su sprovedena na medonosnoj pčeli *Apis mellifera* L., sa ciljem da se sagleda stanje pčelinjih zajednica tokom različitih perioda u toku godine, na staništima sa različitim antropogenim uticajem. Smatra se da su upravo promene uslova životne sredine, kao posledica antropogenog uticaja, dovele do pojave brojnih stresogenih faktora i pojave globalnog problema opadanja brojnosti kolonija medonosne pčele. Mehanizmi biološkog odgovora medonosne pčele na različite uslove životne sredine se najbolje mogu sagledati kroz praćenje parametara oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite, imunokompetencije, prisustva parazita, izloženosti pčela toksičnim supstancama, kao i zastupljenosti odabranih biomolekula pri izloženosti pčela specifičnom stresu. Razumevanje ovih mehanizama bi moglo doprineti razumevanju uzroka i potencijalnom rešavanju problema pada brojnosti pčela, kao i razvoju novih i unapređenju postojećih mera zaštite pčelinjih populacija.

6.1. Laboratorijski akutni testovi toksičnosti pesticida

Laboratorijski akutni testovi izlaganja pčela subletalnim dozama pesticida predstavljaju prvu fazu istraživanja u ovoj disertaciji, sa ciljem da se isprati biološki odgovor pčela na izolovani stres izazvan pesticidima a dalje, utvrdi set parametara koji bi bili adekvatni kao markeri za praćenje biohemijskog odgovora medonosne pčele na prisustvo pesticida.

Od prve upotrebe pesticida u kontroli poljoprivrednih štetočina i korovskih biljaka, postojala je zabrinutost o njihovom uticaju na pčele, bumbare i ostale polinatore (Sánchez-Bayo i sar., 2016). Sa jedne strane, s obzirom da su pčele insekti, insekticidi mogu naškoditi njima isto kao i ciljanim vrstama tzv. štetnim vrstama insekata za rast useva. Sa druge strane, herbicidi smanjuju raznovrsnost i zastupljenost biljaka cvetnica u poljoprivrednim regionima, negativno utičući na pčele, kojima je intenziviranje poljoprivrede već osiromašilo raznovrsnost izvora hrane (Goulson i sar., 2015). Ranih 1990-ih godina je razvijena i komercijalno dostupna nova klasa insekticida, tzv. neonikotinoidi, koji su izrazito toksični za insekte (Kollmeyer i sar., 1999). Predstavljaju agoniste nikotinskih acetilholinskih receptora, čvrsto se vezujući za receptore u centralnom nervnom sistemu insekata izazivajući blokade receptora, paralizu i uginuće organizma (Tomizawa i Casida, 2005). U vodi su rastvorni i lako se usvajaju preko korena ili listova biljaka, transportujući se dalje do svih biljnih tkiva, te se nalaze i u nektaru i polenu tretiranih biljaka (Mullin i sar., 2010). Zbog svoje vodorastvornosti, lako dospevaju u vodotokove. Pored lokalne upotrebe, često se koriste kao sistemski pesticidi kojima se tretiraju semena biljaka i tada vrše profilaksu svih delova buduće biljke, čak nekoliko meseci nakon setve. Klasifikovani su u tri grupe po svojoj hemijskog strukturi: *N*-nitroguanidini (imidakloprid, tiametoksam, klotianidin i dinotefuran), nitrometileni (nitenpiram) i *N*-cijanoamidini (acetamiprid i tiakloprid). Prednosti upotrebe neonikotinoida, kao što su visoka toksičnost za insekte, niska toksičnost za kičmenjake, fleksibilna upotreba, sistemsko dejstvo i dr. ih je izdvojilo kao globalno

najčešće korišćene pesticide, čineći čak jednu četvrtinu od svih pesticida u upotrebi (Jeschke i sar., 2011).

Uticaoj pesticida na medonosnu pčelu je opisan kroz brojne studije (Laurino i sar., 2011; Sánchez-Bayo i sar., 2016; Gregorc i sar., 2018; Abdelkader i sar., 2019), s obzirom da registrovanje poljoprivrednih preparata zahteva toksikološke testove na ovoj vrsti sa ciljem procene srednje letalne doze (LD_{50}) aktivne komponente (Halm i sar., 2006; Medrzycki i sar., 2013). Uzimajući u obzir biologiju vrste, medonosna pčela je prepoznata i kao značajan model za razvoj biomarkera u proceni stanja same vrste kao i stanja životne sredine, što dalje usmerava brojne ekotoksikološke studije (Badiou i sar., 2008; Badiou-Bénéteau i sar., 2012; Carvalho i sar., 2013). Biomarkeri se definišu kao zapažajne ili merljive promene na molekularnom, biohemijskom, ćelijskom, fiziološkom nivou, kao i na nivou ponašanja, koje ukazuju na izlaganje organizma ksenobiotcima (Lagadic i sar., 1997). Kao relevantan bioindikator stanja životne sredine (Smith i Wilcox, 1990), medonosna pčela je uključena u ekotoksikološku procenu uticaja pesticida od strane internacionalnih upravnih tela (E.P.P.O. Report, 2001). Pouzdana procena uticaja pesticida i drugih stresogena zahteva kompleksnu analizu biološkog odgovora organizma, te najčešće uključuje enzimске biomarkere integriteta nervnog sistema, antioksidativne zaštite i metabolizma ksenobiotika (Badiou-Bénéteau i sar., 2012). Posebno se naglašava potreba za detaljnim studijama koje bi razjasnile uticaj insekticida, naročito njihovih subletalnih doza, na pčele i druge polinatore (Goulson, 2013; Sandrock i sar., 2014).

U okviru ove faze disertacije, kroz laboratorijske akutne oralne testove u trajanju od 48 h, pčele radilice su bile izložene subletalnim koncentracijama pesticida (5, 20 i 50 puta nižim u odnosu na LD_{50}) iz klase neonikotinoida: tiakloprid (T5, T20 i T50) i klotianidin (K5, K20 i K50), nakon čega su izmerene aktivnosti acetilholinesteraze, seta enzima antioksidativne zaštite, određen je redoks status i aktivnosti fenol oksidaze i profenol oksidaze.

Izlaganje pčela subletalnim dozama tiakloprida (u T20 grupi tj. pri koncentraciji koja je 20 puta niža u odnosu na LD_{50}) i klotianidina (u K5 i K50 grupama tj. pri koncentracijama koje su 5 i 50 puta niže u odnosu na LD_{50}) je izazvalo povećanje aktivnosti AChE u odnosu na kontrolnu grupu (Grafik 1). Generalno, snižena aktivnost AChE je uobičajeni biomarker izlaganja raznim polutantima (Frasco i sar., 2005; Tu i sar., 2009, Čolović i sar., 2013), ali takođe i povećanje aktivnosti AChE može biti znak izlaganja specifičnim agrohemikalijama, kao što su insekticidi (Badiou i sar., 2008; Boily i sar., 2013). Acetilholinesteraza je hidrolaza uključena u neurotransmisiju u sinapsama holinergičkog tipa, gde hidrolizuje neurotransmiter acetilholin (ACh) i time završava sinaptičku neurotransmisiju, tj. prenos signala iz neurona. Kada se umesto ACh za acetilholinske receptore vežu neonikotinoide, oni blokiraju vezivanje ACh kao supstrata. Kako AChE ne može da razloži neonikotinoide, neće doći ni do gašenja signala (Thany, 2009). Posledično, dolazi do nakupljanja ACh u sinapsama i stimulacije enzima AChE u tipičnom supstrat-enzim ćelijskom odgovoru (Boily i sar., 2013). Stoga, povećanje

aktivnosti AChE u eksperimentalnim grupama gde su pčele izlagane subletalnim dozama tiakloprida i klotianidina, u odnosu na kontrolnu grupu, može se objasniti kao tendencija organizma ka rešavanju problema neurotransmisije, gde bi pri normalnim okolnostima AChE oslobodila receptor.

Akutni tretman subletalnim dozama tiakloprida i klotianidina je takođe izazvao promene i u aktivnosti glavnih antioksidativnih enzima. U poređenju sa kontrolnom grupom, zapaženo je statistički značajno povećanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) nakon tretmana subletalnim dozama klotianidina u eksperimentalnim grupama K5 i K50 za SOD, odnosno K20 i K50 za CAT, dok nije bilo promena nakon tretmana tiaklopridom. Povećanje aktivnosti SOD i CAT, u odnosu na kontrolnu grupu, ukazuje na indukciju enzimske antioksidativne zaštite kod medonosne pčele, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Felton i Summers, 1995; Badiou-Bénéteau i sar., 2012; Carvalho i sar., 2013; Abdelkader i sar., 2019). Klotianidin već u malim dozama ispoljava izrazitu toksičnost za pčele, LD₅₀ se postiže sa 3,68 ng po pčeli, što je oko 5000 puta manje u odnosu na utvrđenu LD₅₀ za tiaklopid. U studiji o uticaju tiametoksama iz klase neonikotinoida na insekte i biljke, utvrđeno je da je upravo klotianidin, koji nastaje kao njegov toksični metabolički produkt, odgovoran za biološki efekat ispitivanog insekticida (Nauen i sar., 2003). Prooksidativna priroda subletalnih doza klotianidina praćena povećanim aktivnostima SOD i CAT, koje uklanjaju nastale reaktivne čestice kiseonika, izdvaja ove enzime kao senzitivne biomarkere na prisustvo klotianidina a posredno i njegovog prekursora tiametoksama.

Nasuprot aktivnostima SOD i CAT, subletalne doze tiakloprida i klotianidina su značajno snizile aktivnost glutation *S*-transferaze (GST) u odnosu na kontrolnu grupu (Grafik 2). Studije vezane za insekatsku GST su uglavnom fokusirane na ulogu enzima u procesu detoksikacije insekticida i alelohemikalija poreklom iz biljaka, gde se povećanje aktivnosti GST povezuje sa većom otpornosti na insekticide koji indukuju oksidativni stres (Vontas i sar., 2001; Badawy i sar., 2015). Pri tome, glavni mehanizam dejstva GST u odbrani insekata na prisustvo insekticida je konjugacija elektrofilnih jedinjenja sa tiol grupom redukovano glutaciona čime se supstrat neutrališe i postaje hidrofilan što olakšava njegovu dalju ekskreciju (Hagib i sar., 1974). Međutim, tretman neonikotinoidima može inhibirati GST aktivnost, što je potvrđeno i u studiji gde je akutnim laboratorijskim testovima na medonosnoj pčeli ispitan uticaj dinotefurana, neonikotinoida koji je po hemijskoj strukturi najbliži tiaklopridu i klotianidinu (Badawy i sar., 2015). Variranja aktivnosti GST se pripisuju promenama unutar specifičnih klasa GST enzimâ, koje su najverovatnije posledica promena na nivou ekspresije gena a ne kvalitativnih promena individualnih enzimâ (Ranson i sar., 2001), stoga bi dodatna istraživanja mogla bolje objasniti mehanizme specifične inhibicije GST enzimâ.

Ispitivanjem uticaja subletalnih doza tiakloprida i klotianidina na sadržaj redukovano glutaciona (GSH), sulfhidrilnih grupa proteina (-SH) i malondialdehida (MDA), procenjen je redoks status pčela u tretiranim grupama. GSH je esencijalni

endogeni tripeptid koji štiti ćeliju od oksidativnih oštećenja koja nastaju kao posledica primene neonikotinoidnih insekticida (Zhang i sar., 2011; Yan i sar., 2015). Stoga, merenje koncentracije GSH ukazuje na kapacitet organizma u odbrani od ROS/RNS i uklanjanju endogenih i egzogenih toksina elektrofilne prirode (Lushchak, 2012). Povećanje koncentracije GSH u eksperimentalnim grupama T5, T50 i K5 ukazuje na indukciju sinteze GSH nakon akutnog tretmana tiaklopridom i klotianidinom. Indukcija sinteze GSH nakon kratkoročnog izlaganja insekticidima je takođe zabeležena nakon tretmana imidaklopridom (neonikotinoidni pesticid) i dihlorvosom (organofosfatni pesticid) na zebra ribi, često korišćenom model organizmu u toksikološkim studijama (Shukla i sar., 2017). Slično rezultatima za GSH, zabeleženo je i značajno povećanje koncentracije -SH grupa ali samo kod pčela tretiranih klotianidinom (eksperimentalne grupe K20 i K50 u poređenju sa kontrolom). Možemo zaključiti da kratkoročno izlaganje klotianidinu povećava koncentraciju esencijalnih tiola u pčelama, koji podležu redoks reakcijama i tako održavaju neophodnu tiol-disulfid ravnotežu u ćelijama.

Koncentracija MDA, markera lipidne peroksidacije, statistički značajno je povećana u eksperimentalnim grupama sa najvećom primenjenom dozom tiakloprida (T5) i klotianidina (K5). Ustanovljeno je da izlaganje neonikotinoidnim pesticidima indukuje oksidativni stres, izazivajući oksidativna oštećenja kod tretiranih biljaka, riba i pacova (Ford i sar., 2011; Kapoor i sar., 2011; Shukla i sar., 2017), te je dobijeni odgovor kod medonosne pčele u ovoj disertaciji u skladu sa prethodnim istraživanjima. Novija studija o uticaju klotianidina na trutove medonosne pčele, takođe beleži povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima i nivoa MDA (Abdelkader i sar., 2019), što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Uočeno povećanje koncentracije MDA ukazuje na postojanje oksidativnih oštećenja lipidnih struktura koja dalje vode ka izmenjenoj fluidnosti i permeabilnosti ćelijskih membrana i narušavanju celokupne funkcije ćelije (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Sa ciljem procene uticaja insekticida na imuni odgovor medonosne pčele, nakon akutnog tretmana tiaklopridom i klotianidinom, izmerena je aktivnost fenol oksidaze i njenog prekursora profenol oksidaze, kao markera humoralnog imuniteta pčela. Statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima je zapaženo u svim eksperimentalnim grupama izuzev T50, gde je primenjena najmanja doza tiakloprida. Rezultati ukazuju na izrazitu supresiju imunog odgovora pod uticajem pesticida. Fenol oksidaza je ključni enzim u sintezi melanina, koji je uključen u mehanizme odbrane na nivou individualnog imuniteta pčela. Prethodne studije na medonosnoj pčeli takođe potvrđuju imunosupresiju izazvanu neonikotinoidnim pesticidima, naglašavajući da je time olakšan razvoj i širenje parazitskih i virusnih infekcija (Di Prisco i sar., 2013; Brandt i sar., 2016; Sánchez-Bayo i sar., 2016). Tako da možemo reći da rezultati imunosupresije, dobijeni u okviru ove faze disertacije, samo dodatno potvrđuju pretpostavku da upotreba pesticida iz klase neonikotinoida može biti jedan od ključnih faktora nestajanja pčelinjih kolonija.

Uočene promene ispitivanih biomarkera, uključenih u ključne fiziološke procese, opisuju biološki odgovor medonosne pčele na uticaj subletalnih koncentracija kratkoročno primenjenih neonikotinoida. Dobijeni rezultati ukazuju na narušenu neurotransmisiju, na izmene u aktivnosti antioksidativnih enzima i redoks statusa u ćeliji, kao i na imunosupresiju. Možemo reći da set ispitivanih biomarkera medonosne pčele predstavlja relevantne parametre za biomonitoring prisustva insekticida u životnoj sredini, tj. evaluaciju stanja medonosnih pčela kao i ekosistema koji naseljavaju.

6.2. Uticaj starosti pčela, sezone i tipa pčelinjaka na biohemijske i fiziološke parametre stanja medonosne pčele

6.2.1. Uticaj faktora: starost pčela

Starost pčela radilica je značajan faktor ukoliko uzmemo u obzir da je podela rada uslovljena odgovarajućim uzrastom pčela (Johnson, 2010). S obzirom da se temporalni polietizam delom bazira i na fiziološkim razlikama između radilica, svakako možemo očekivati razlike u biohemijskim i fiziološkim parametrima kojima opisujemo stanje medonosne pčele pod određenim okolnostima.

Kroz analizu mladih i starijih pčela radilica, uzorkovanih u letnjem periodu sa jednog stacionarnog (P1 – Petrovaradin) i jednog migratornog pčelinjaka (P3 – Ravno Selo), zabeležene su razlike u aktivnostima glavnih antioksidativnih enzima u pčelinjaku P1, dok se aktivnost analiziranih enzima kod pčela iz pčelinjaka P3 nije značajno menjala. Povećanje aktivnosti katalaze i glutation *S*-transferaze kod starijih u odnosu na mlade pčele iz pčelinjaka P1, ukazuje na povećan nivo enzimske antioksidativne zaštite kod starijih pčela. Za razliku od mladih pčela negovateljica čije se aktivnosti odvijaju unutar košnice, starije pčele radilice obavljaju sve poslove izvan košnice, što može objasniti razlike u nivoima antioksidativnih enzima. U potrazi za nektarom, polenom i vodom, starije pčele radilice prelete i preko 8 km dnevno, što intenzivira aktivnost grudnih mišića, te je stopa metabolizma kod starijih pčela 10-100 puta veća u odnosu na mlade pčele negovateljice (Suarez i sar., 1996). Veća stopa metabolizma uslovljava i veću produkciju ROS/RNS i aktivaciju mehanizama antioksidativne zaštite kod pčela (Williams i sar., 2008). Takođe, kroz aktivnosti van košnice, pčele su pod većim uticajem sredine koja ih okružuje, tj. veća je izloženost potencijalnim kontaminantima, što takođe može usloviti izmene u nivou antioksidativne zaštite pčela (Badiou-Bénéteau i sar., 2012; Gregorc i sar., 2018). Kako u pčelinjaku P3 nije bilo promena u aktivnosti ispitivanih enzima može se reći da pored faktora starosti pčela, na enzimski profil utiču i različiti lokalni faktori kao što su stepen zagađenja okoline, razlike u floralnom sastavu i sl.

Stoga, možemo reći da pri analizi stanja medonosne pčele treba uzeti u obzir starost pčela da bi uzorak bio reprezentativan. Takođe, ukoliko se pčele koriste kao

bioindikatori stanja životne sredine, svakako treba uzorkovati starije pčele sakupljačice (engl. *forager bee*) koje su u većem kontaktu sa sredinom koja ih okružuje.

6.2.2. Uticaj faktora: sezona godine

Faktori sredine povezani sa sezonskim promenama tokom godine, kao što su temperatura i dostupnost hrane, značajno utiču na aktivnost pčelinjih zajednica. To je naročito izraženo u umereno kontinentalnim regionima, gde pčelinja zajednica prolazi kroz nekoliko različitih perioda aktivnosti u zavisnosti od sezone godine. Dinamika sezonskih aktivnosti uslovljava i brojne promene u fiziologiji pčela, što se ogleda kroz smenu letnjih, kratkoživećih pčela sa zimskim, dugoživećim pčelama (Stanimirović i sar., 2000; Stabentheiner i sar., 2003). Ispitivanje stanja medonosne pčele tokom letnjeg aktivnog perioda i zimskog perioda mirovanja, nam daje uvid u promene biohemijskih i fizioloških parametara pčela pod uticajem sezone godine (Orčić i sar., 2017).

Analiza aktivnosti acetilholinesteraze, enzima antioksidativne zaštite i markera lipidne peroksidacije kod starijih pčela radilica, uzorkovanih iz košnica sa jednog stacionarnog (P1 – Petrovaradin) i dva migratorna pčelinjaka (P2 – Beočin i P3 – Ravno Selo), ukazala je na statistički značajne promene analiziranih parametara tokom letnjeg aktivnog perioda nasuprot zimskom periodu mirovanja pčela. U poređenju sa letnjim pčelama, kod zimskih pčela je izmerena niža aktivnosti SOD i GST u pčelinjacima P1 i P2 i niži nivo MDA u pčelinjacima P1 i P3, dok je CAT imala suprotan trend aktivnosti kod pčela iz sva tri pčelinjaka. Značajne promene u aktivnosti AChE su zabeležene jedino u pčelinjaku P2, u smislu viših vrednosti u zimskom periodu. Generalno, trend nižih vrednosti enzima kod letnjih pčela u odnosu na zimske, može se povezati sa većim prisustvom polutanata, koji uglavnom inhibiraju AChE, a sa kojima pčele tokom leta dolaze u kontakt sakupljajući nektar, polen i vodu iz okoline (Frasco i sar., 2005; Badiou i sar., 2008). Stoga možemo reći da su promene ovog parametra više u vezi sa lokacijom nego sezonskim promenama, za razliku od SOD i CAT kod kojih je jasan trend smanjenja aktivnosti SOD i povećanja aktivnosti CAT u zimskom u odnosu na letnji period, bez obzira na lokaciju.

Superoksid dismutaza ima ključnu ulogu u zaštiti pčela od oksidativnog stresa, vrši dismutaciju superoksid anjon radikala pri čemu nastaje vodonik-peroksid koji dalje predstavlja supstrat za CAT. Više aktivnosti SOD kod letnjih u odnosu na zimske pčele su zabeležene u pčelinjacima P1 i P2, dok u pčelinjaku P3 nije bilo značajnih promena (Grafik 7). Dobijeni rezultati su saglasni sa prethodnim istraživanjima (Korayem i sar., 2012) antioksidativnih enzima kod medonosne pčele, gde su pratili aktivnost SOD između juna i decembra. U navedenoj studiji je zabeleženo povećanje aktivnosti SOD od juna do septembra, a zatim je zabeležen nagli pad aktivnosti od oktobra do decembra. Visoka produkcija superoksid anjon radikala kod letnjih u odnosu na zimske pčele je posledica veće stope metabolizma usled veće aktivnosti, prvenstveno intenzivnog letenja.

Ishrana herbivornih insekata takođe ima značajnu ulogu u pogledu produkcije reaktivnih čestica kiseonika i aktivnosti antioksidativnih enzima (Aucoin i sar., 1991), što se može videti na primeru pčelinjaka P3, gde je zabeležena relativno visoka aktivnost SOD tokom godine, u odnosu na druga dva pčelinjaka. Aktivnost ovog enzima se povećava kada su u hrani prisutni potencijalni prooksidanti, koji doprinose generisanju superoksid anjon radikala u digestivnom traktu insekata (Krishnan i Kodrík, 2006). Za razliku od pčela u pčelinjacima P1 i P2, koje su prezimele na bagremovom i lipovom medu, poreklom od nektara nekultivisanih biljaka *Robinia pseudoacacia* i *Tilia sp.*, pčele u P3 pčelinjaku su prezimele na medu uljane repice (*Brassica napus*), koja je poljoprivredna kultura (Tabela 9). Uzgajanje uljane repice je veoma rasprostranjeno u analiziranom regionu i praćeno upotrebom neonikotinoidnih sistemskih pesticida kao što su klotianidin, imidakloprid ili tiametoksam (Hughes i sar., 2014). S obzirom da je upotreba neonikotinoide u tretiranju semenâ useva u Srbiji bila neregulisana do 2015. godine (Zakon o sredstvima za zaštitu bilja, Sl. glasnik RS, 41/2009 i 17/2019), nektar i polen u medu, kojim su se hranile zimske pčele, je verovatno sadržao subletalne doze pesticida (Goulson, 2013; Cutler i sar., 2014). Dobijene promene u aktivnosti SOD su u saglasnosti sa rezultatima o uticaju neonikotinoide, dobijenim tokom prve faze disertacije, čime je potvrđena indukcija aktivnosti SOD u prisustvu neonikotinoidnih pesticida. Ishrana zimskih pčela medom uljane repice je verovatno uslovlila i visoke aktivnosti enzima GST tokom zime u pčelinjaku P3 u odnosu na druga dva pčelinjaka. S obzirom da je ključna uloga enzima GST u detoksikaciji (Claudianos i sar., 2006; Badiou-Bénéteau i sar., 2012), kontinuirano visoke aktivnosti GST se mogu povezati sa aktuelnim metaboličkim procesima kod pčela koje štite ćelije od štetnog dejstva pesticida i brojnih ksenobiotika.

Uloga katalaze je razgradnja vodonik-peroksida do vode i kiseonika, čime se sprečava difuzija vodonik-peroksida kroz ćelije i tkiva. Nasuprot trendu aktivnosti SOD u pčelama, aktivnost CAT je bila niža kod letnjih u odnosu na zimske pčele, u sva tri pčelinjaka (Grafik 8). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa negativnom korelacijom između SOD i CAT, zabeleženom od strane Korayem i sar. (2012). Povećanje aktivnosti CAT kod zimskih pčela potvrđuje protektivnu ulogu ovog enzima u procesima fermentacije i truljenja u intestinumu, koje se dešava zimi, tokom dužih perioda bez letenja (Nikolenko i sar., 2012). Tada postoji povećana potreba za uklanjanjem vodonik-peroksida iz intestinuma zimskih pčela. Povećani nivoi vodonik-peroksida indukuju CAT i inhibiraju SOD (Hodgson i Fridovich, 1975), čime se mogu objasniti povećane aktivnosti CAT i snižene aktivnosti SOD, izmerene kod zimskih pčela.

Generalno niže aktivnosti antioksidativnih enzima kod zimskih pčela ukazuju na niži nivo antioksidativne zaštite, što se može povezati sa smanjenom produkcijom ROS/RNS tokom zime. To potvrđuju i niži nivoi MDA, kao markera lipidne peroksidacije, kod zimskih u odnosu na letnje pčele (Grafik 10), ukazujući na niži nivo oksidativnih oštećenja kod pčela tokom zimskog perioda (Del Rio i sar., 2005). Veća produkcija ROS/RNS usled veće aktivnosti tokom letnjeg perioda skraćuje životni vek pčela (Münch

i sar., 2008) ali ih takođe čini otpornijim s obzirom na ulogu ROS u odbrambenim mehanizmima insekata u borbi protiv patogena (Nikolenko i sar., 2012).

6.2.3. Uticaj faktora: tip pčelinjaka

Uslovi gajenja pčela se razlikuju u zavisnosti od vrste pčelinjaka, tj. da li su pčele u stacionarnom ili migratornom pčelinjaku. Stacionarni pčelinjak je svakako bliži staništu prirodnih populacija medonosne pčele, te ukoliko u okolini ima medonosnih pašnjaka i ako je ispunjen uslov minimalne udaljenosti između pčelinjakâ, svakako treba dati prednost stacionarnom tipu pčelinjaka. Relativno mali broj istraživanja je sproveden sa ciljem procene uticaja transporta na pčele u migratornim pčelinjacima (Zhu i sar., 2014). Prva obimna studija o uticaju seljenja tj. kratkotrajnog i dugotrajnog transporta pčela na životni vek i nivo oksidativnog stresa u pčelama, ukazuje na prednosti i nedostatke ovog tipa pčelinjaka (Simone-Finstrom i sar., 2016). Ustanovljeno je da pčele radilice iz migratornih pčelinjaka imaju značajno kraći životni vek u odnosu na pčele iz stacionarnih pčelinjaka. Skraćen životni vek dovodi do prevremenog sazrevanja mladih kućnih pčela radilica i njihovog izlaska iz košnice zbog potrage za hranom, što zauzvrat povećava stopu uginuća pčelinje kolonije (Perry i sar., 2015). Takođe je utvrđeno da migratorni tip pčelarenja povećava nivo oksidativnog stresa kod pčela, kao i da negativno utiče na razvoj pčelinjeg legla (Simone-Finstrom i sar., 2016).

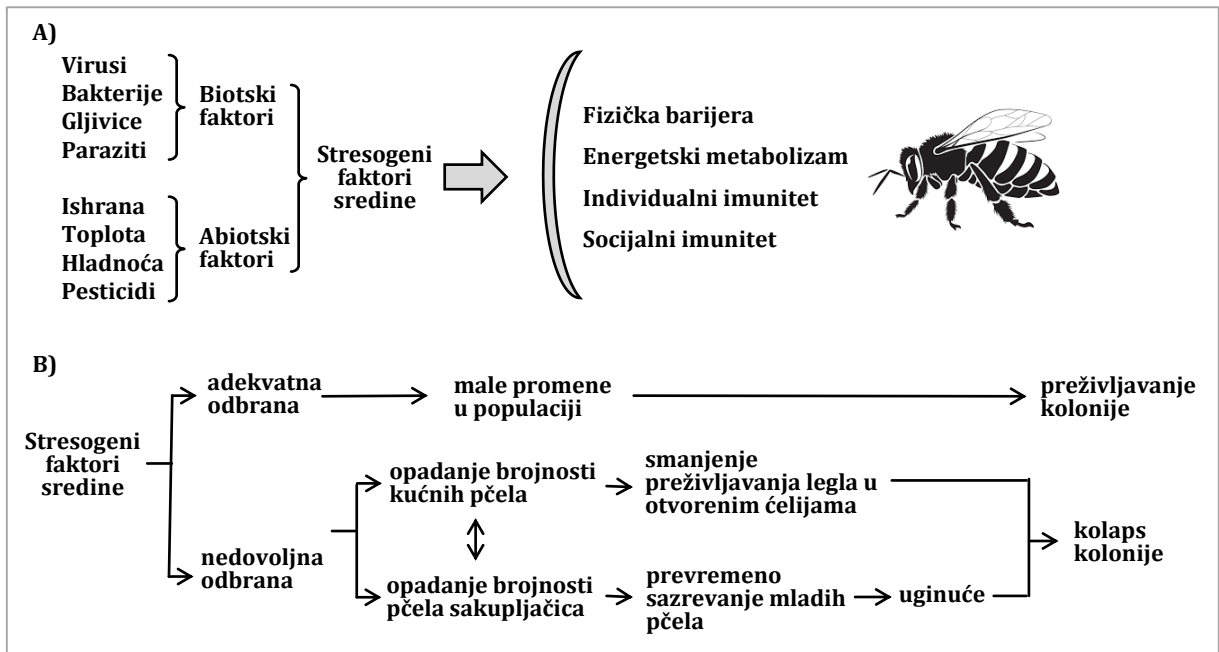
Prethodno analizirani rezultati u okviru ove faze disertacije su dalje razmatrani u smislu poređenja stacionarnih sa migratornim pčelinjacima tokom letnjeg i zimskog perioda, kada se može jasnije uočiti uticaj tipa pčelinjaka na ispitivane parametre vezane za neurotransmisiju i nivo oksidativnog stresa. Niže vrednosti aktivnosti AChE u migratornim pčelinjacima u odnosu na stacionarni pčelinjak, naročito kod letnjih pčela, ukazuju na veće prisustvo potencijalnih polutanata u okruženju, koji uglavnom inhibiraju AChE. Tu pretpostavku potvrđuje povećana aktivnost GST kod letnjih i zimskih pčela iz oba migratorna pčelinjaka u odnosu na stacionarni pčelinjak. Međutim, značajne razlike se zapažaju u vrednostima analiziranih parametara i između dva migratorna pčelinjaka. Kod pčela iz migratornog pčelinjaka P3 su zabeležene značajno više aktivnosti AChE, SOD, CAT, GST kod letnjih i zimskih pčela, kao i koncentracije MDA kod letnjih pčela, odnosu na migratorni pčelinjak P2 (Grafici 11–15). Značajne razlike između migratornih pčelinjaka ukazuju na postojanje drugih dominantnih faktora koji utiču na nivo oksidativnog stresa kod pčela. To je najčešće ishrana, koja ukoliko je u izobilju i kvalitetna, može ublažiti štetne efekte migratornog pčelarenja (Simone-Finstrom i sar., 2016).

Uzimajući u obzir dobijene rezultate, kao i literaturne podatke, koji ukazuju na postojanje značajnih razlika između pčelinjih kolonija u odnosu na tip pčelinjaka, dalje analize u okviru ove disertacije su izvedene na stacionarnim pčelinjacima. Time smo isključili faktore vezane za migraciju pčelinjih kolonija a fokus usmerili na faktore sredine, specifične za lokalitete svakog stacionarnog pčelinjaka.

6.3. Uticaj sezonskih promena i faktora sredine sa različitim antropogenim uticajem na biohemijske i fiziološke parametre stanja medonosne pčele

Efekti sezonskih promena u ovoj fazi disertacije su praćeni kroz analizu biohemijskih i fizioloških parametara u homogenatima celih pčela i hemolimfi iz stacionalnih pčelinjih zajednica, početkom i krajem zimskog perioda mirovanja, kao i tokom letnjeg aktivnog perioda. Da bi ispitali efekte faktora sredine sa različitim antropogenim uticajem na stanje medonosne pčele, odabrana su tri stacionarna pčelinjaka u Republici Srbiji, na lokalitetima sa različitim stepenom urbanizacije i industrijalizacije: Beograd – urbani region, Susek – ruralni region i Zajača – industrijski region.

Životna sredina, kao kompleks abiotskih i biotskih faktora, značajno utiče na sve segmente života medonosne pčele, kako individualno tako i na nivou kolonije. Kao ključni abiotski faktori, izdvajaju se temperatura, kvalitet ishrane i prisustvo zagađujućih materija, prvenstveno pesticida, dok se biotski faktori uglavnom odnose na prisustvo patogena i parazita (Slika 17-A). Faktori životne sredine imaju zajedničko i kompleksno delovanje i specifični su za dati lokalitet. Promene abiotskih faktora sredine retko dovode do uginuća vrste, međutim hronično i/ili intenzivno dejstvo jednog od stresogenih faktora sredine može medonosnu pčelu učiniti osetljivijom na druge faktore sredine. Kako pojedinačnim, tako i delovanjem u sinergiji, nepovoljni abiotski faktori izazivaju stres, supresujući antioksidativnu zaštitu i imuni odgovor medonosne pčele, čineći ih podložnim za patogene i parazite (Li i sar., 2018). Odgovor medonosne pčele na nepovoljne faktore sredine uglavnom uključuje fizičku barijeru, promene energetskog metabolizma, individualni i socijalni imuni odgovor (Slika 17 A). Ukoliko je odgovor, tj. odbrana medonosne pčele adekvatna, pčelinja kolonija preživljava sa malim promenama. Sa druge strane, ukoliko je odbrana medonosne pčele nedovoljna, dolazi do pada u broju pčela radilica u košnici tj. kućnih pčela, kao i radilica sakupljačica (Slika 17 B). Manje kućnih pčela ima negativan efekat na razvoj legla, naročito otvorenih ćelija legla, dok smanjenje broja pčela sakupljačica pokreće prerano sazrevanje kućnih pčela, koje stoga imaju veću stopu uginuća. Sve to negativno utiče na brojnost kolonije i dalje vodi ka kolapsu pčelinje kolonije (Goulson i sar., 2015; Perry i sar., 2015).



Slika 17. Stresogeni faktori sredine i njihov uticaj na medonosnu pčelu (prerađeno prema Li i sar., 2018).

Analiza stanja medonosne pčele na različitim lokalitetima, daje *in situ* odgovor medonosne pčele na specifične faktore sredine, karakteristične za dati lokalitet. Uvid u odgovor medonosne pčele na uslove sredinâ sa različitim antropogenim uticajem je od izuzetnog značaja s obzirom da tolerantnost medonosne pčele na stresogene faktore sredine ima svoje granice, što je potvrđeno povećanim globalnim gubicima pčelinjih kolonija (Biesmeijer i sar., 2006; Potts i sar., 2010).

6.3.1. Antioksidativni sistem i nivo oksidativnog stresa

Nivo oksidativnog stresa predstavlja značajan biološki parametar stanja organizma, s obzirom da utiče na preživljavanje i reprodukciju organizma (Beaulieu i Costantini, 2014). Iako su ROS/RNS generalno štetne za ćeliju zbog potencijalnih oksidativnih oštećenja koja mogu izazvati, imaju i korisnu ulogu u važnim fiziološkim procesima (Zuo i sar., 2015). Poznato je da varijacije u uslovima sredine, kao posledica sezonskih promena tokom godine, mogu uticati na nivo oksidativnog stresa u insektima (Lalouette i sar., 2011; Orčić i sar., 2017). Procena nivoa oksidativnog stresa u skladu sa dinamikom aktivnosti medonosne pčele, tj. kod letnjih i zimskih pčela, je značajna s obzirom da su zapaženi veći gubici pčela tokom zime (Genersch i sar., 2010). Razlozi većih gubitaka tokom zimskog perioda nisu u potpunosti razjašnjeni ali se povezuju sa narušenim imunim odgovorom i većom osetljivošću zimskih pčela na bolesti (Steinmann i sar., 2015).

Dobijeni rezultati genske ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima, kao i nivoa oksidativnog oštećenja lipida, kod pčela sa stacionarnih pčelinjaka iz Beograda, Suseka i Zajače, su ukazali na značajan uticaj sezonskih promena na vrednosti analiziranih

parametara. Relativna ekspresija gena za najznačajnije enzime antioksidativne zaštite (geni *Sod1* za Cu,ZnSOD i *Sod2* za MnSOD; gen *Cat* za CAT; geni *GstS1* za σ -klasu GST, *GstD1* za δ -klasu GST i *GstMic1* za mikrozomalnu GST) je praćena u pčelama samo tokom zimskog perioda i to na početku zimskog perioda u novembru, kao početku perioda mirovanja (PPM) i krajem zimskog perioda u martu, kao krajem perioda mirovanja pčela (KPM). Rezultati ukazuju na generalno sniženu ekspresiju navedenih gena krajem zime u odnosu na početak zimskog perioda mirovanja za sve tri lokacije (Grafici 16-18). Može se zaključiti da veliko ulaganje u ekspresiju navedenih gena, krajem životnog veka zimskih pčela, nije strategija za preživljavanje pčelinje kolonije. Izuzetak u dobijenom trendu snižene genske ekspresije je zabeležen samo u slučaju gena *GstMic1* kod pčela u Suseku, gde je krajem zime bila zabeležena njegova povećana ekspresija, za razliku od ekspresije preostale dve izoforme enzima GST (Grafik 18). U poređenju sa vinskom mušicom i malaričnim komarcem, medonosna pčela ima manji broj gena koji kodiraju enzime superfamilije GST, što za posledicu ima veću osetljivost pčela na ksenobiotike. Medonosna pčela ima potpuno odsustvo ϵ -klase enzima GST, zatim samo jednog predstavnika za δ -klasu enzima GST, koja je specifična za insekte i uključena u rezistentnost na insekticide (Claudianos i sar., 2006) i četiri predstavnika σ -klase enzima GST, koja prvenstveno ima ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa uklanjajući produkte lipidne peroksidacije (Singh i sar., 2001). Mikrozomalna klasa GST je kodirana sa dva *GstMic* gena i uključena u metabolizam ikozanoida i glutationa, takođe sa ulogom u detoksikaciji (Claudianos i sar., 2006). Stoga, povećana ekspresija *GstMic1* se može povezati sa upotrebom veštačkih đubriva i pesticida kojima se tretira poljoprivredno zemljište koje okružuje analizirani pčelinjak u Suseku (Slika 8), te su pčele na datom lokalitetu u većoj meri izložene zagađujućim materijama, pre svega pesticidima.

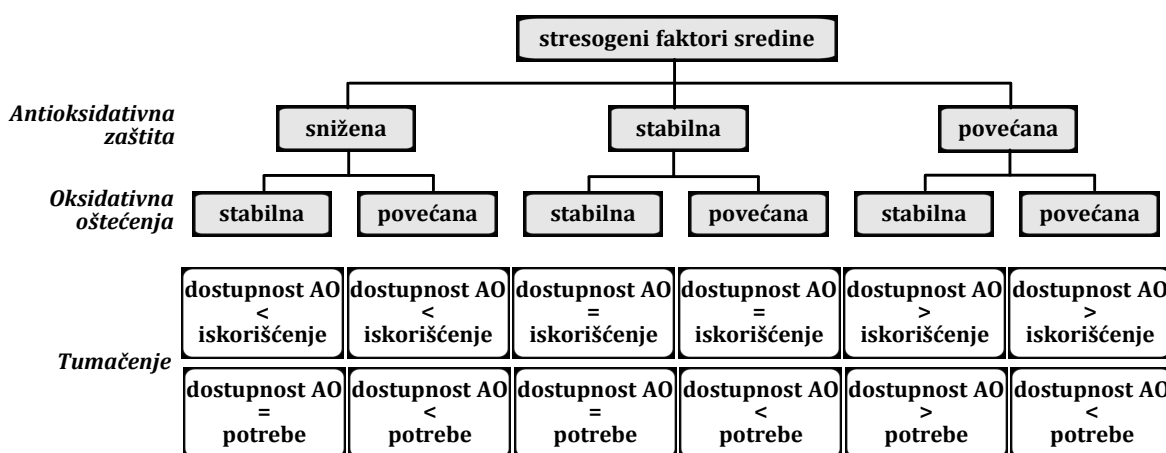
U pogledu aktivnosti antioksidativnih enzima, izmerenih u homogenatima i hemolimfi pčela tokom zimskog perioda u Beogradu, Suseku i Zajači, zapažene su više vrednosti krajem zime u odnosu na početak zimskog perioda sa jednim izuzetkom u Zajači, gde je u homogenatima pčela zabeležena niža aktivnost SOD krajem zimskog perioda. Povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima krajem zime može biti posledica povećanja ekspresije gena za antioksidativne enzime kod zimskih pčela sredinom zimskog perioda mirovanja, tokom januara zabeležene u radu Aurori i sar., 2014. Povećan nivo antioksidativne zaštite kod starijih zimskih pčela može imati ulogu u njihovoj zaštiti od povećane produkcije ROS i oksidativnih oštećenja, koji su u vezi sa starenjem. Niža aktivnost SOD krajem zimskog perioda mirovanja, koja je zabeležena samo u Zajači, može biti posledica zagađenja sredine olovom, s obzirom da je Zajača industrijsko naselje u kome je smeštena kompanija čija je delatnost proizvodnja olova iz sekundarnih sirovina. Pad aktivnosti enzima SOD, koji je u vezi sa zagađenjem olovom (Ercal i sar., 2001), do sada je zabeležen i kod drugih insekata (Migula i sar., 2004; Lomate i sar., 2015). U martu, krajem zimskog perioda mirovanja, pčele počinju sa aktivnostima van košnice te su u većem kontaktu sa sredinom koja ih okružuje, pa i prisutnim zagađujućim materijama. Brojni radovi su potvrdili povezanost zagađenja sredine sa sadržajem metala u pčelama i pčelinjim proizvodima, te i ulogu pčela kao

bioindikatora u zagađenju metalima (Bargańska i sar., 2015; Zarić i sar., 2016), čime bi se mogle objasniti dobijene promene u aktivnosti SOD kod pčela u Zajači.

Ukoliko sagledamo promene na nivou antioksidativne zaštite u homogenatima letnjih i zimskih pčela na analiziranim lokacijama, efekti sezonskih promena se takođe uočavaju. Za sve tri lokacije uočavamo više aktivnosti enzima tokom letnjeg perioda u poređenju sa vrednostima dobijenim početkom zimskog perioda mirovanja, ukazujući na viši nivo antioksidativne zaštite kod letnjih pčela. Dobijeni trend snižene aktivnosti antioksidativnih enzima kod zimskih pčela u odnosu na letnje, koji je zabeležen i tokom prethodne faze disertacije, se nastavlja i nakon poređenja aktivnosti enzima između letnjeg aktivnog perioda i kraja zimskog perioda mirovanja u homogenatima pčela u Zajači, dok su u Beogradu i Suseku dobijene približno jednake vrednosti za enzime tokom aktivnog perioda i krajem perioda mirovanja. Aktivnosti antioksidativnih enzima izmerene u hemolimfi pčela, generalno prate vrednosti dobijene u homogenatima pčela. Izuzetak imamo u hemolimfi letnjih pčela u Suseku, gde su zabeležene niže aktivnosti enzima u poređenju sa vrednostima dobijenim krajem zime (Grafici 22, 26, 30). Možemo zapaziti da se krajem perioda mirovanja Susek izdvaja od ostalih lokaliteta, kako po povećanoj ekspresiji gena za mikrozomalnu izoformu enzima GST, tako i po visokim aktivnostima antioksidativnih enzima u hemolimfi pčela. Možemo pretpostaviti da su u Suseku krajem perioda mirovanja udružena dva faktora koja doprinose dobijenim rezultatima, kao što su specifičnost lokaliteta gde je zastupljena upotreba veštačkih đubriva i pesticida, kao i starost pčela, koja krajem zime dostiže vrhunac.

Praćenjem koncentracije MDA kod pčela početkom i krajem zimskog perioda, kao i tokom leta, uočene su statistički značajne promene u nivoima oksidativnih oštećenja kod pčela u Beogradu, Suseku i Zajači koje su u skladu sa promenom sezone. Uočavaju se značajno više koncentracije MDA krajem zime u odnosu na početak zimskog perioda mirovanja za sve tri lokacije. Poređenjem nivoa MDA kod pčela tokom leta i zime, najviši nivoi oksidativnog oštećenja na sve tri lokacije su takođe uočeni krajem perioda mirovanja, sa statistički značajno višim vrednostima u odnosu na letnji aktivni period (Grafik 33). Visoke koncentracije MDA, markera lipidne peroksidacije, zabeležene kod zimskih pčela pred kraj životnog veka, mogu biti posledica akumulacije oksidativnih oštećenja kojom se objašnjava oksidativna teorija starenja (Harman, 1956; Valko i sar., 2007), udruženo sa povećanjem aktivnosti pčela koje u februaru i martu počinju sa aktivnostima van košnice. Da veća aktivnost medonosne pčele doprinosi višem nivou oksidativnog stresa, zabeleženo je u studiji Korayem i sar. (2012), gde je uočen viši nivo oksidativnog stresa u pčelama u periodu od juna do septembra, u odnosu na period od oktobra do decembra. Zatim, razvoj novog legla, koji se pokreće krajem zimskog perioda, takođe menja fiziologiju i ponašanje pčela (Pankiw, 2004). Ustanovljeno je da razvoj novog legla snižava nivo vitelogenina kod pčela radilica, koji pored uloge u sintezi matične mleči, ima ulogu u imunom odgovoru pčela (Amdam i sar., 2004), kao i ulogu antioksidanta (Seehuus i sar., 2006). Stoga, povećan nivo oksidativnog stresa zabeležen krajem zimskog perioda mirovanja može da bude i posledica sniženog nivoa vitelogenina u dugoživećim zimskim pčelama.

Utvrđeno je da prisustvo pesticida, toplota, hladnoća i drugi abiotski faktori, kao što su zagađenje teškim metalima i ultraljubičasto zračenje, indukuju nastanak reaktivnih čestica kiseonika u organizmu (Li i sar., 2018), te se dejstvo stresogenih faktora sredine može povezati sa varijacijama u oksidativnom statusu ispitivanog organizma i/ili populacije. Vrednosti oksidativnog statusa ne samo da reflektuju uslove životne sredine u kojima se organizam nalazi, već mogu i predvideti uspeh u daljem preživljavanju i reprodukciji organizma u njegovom okruženju (Beaulieu i Costantini, 2014). Dualni aspekt oksidativnog stresa (antioksidativna zaštita vs. oksidativno oštećenje) nam daje mogućnost da procenimo kapacitet odbrane organizma u borbi sa stresogenim faktorima sredine, kao i stepen oštećenja koji je nastao kao posledica delovanja nepovoljnih faktora (Slika 18). Na primer, povećanje antioksidativne odbrane koje je povezano sa stabilnim nivoima oksidativnog oštećenja, ukazuje na veću dostupnost antioksidanata (AO) u odnosu na iskorišćenje i trenutne potrebe tj. na dobru zaštitu organizma u novonastalim uslovima. Nasuprot tome, snižena antioksidativna zaštita koja je povezana sa povećanim nivoima oksidativnog oštećenja, ukazuje na iscrpljenost organizma i nedovoljnu dostupnost antioksidanata i predviđa pojavu novih oksidativnih oštećenja.



Slika 18. Promene oksidativnog balansa (antioksidativna zaštita i oksidativna oštećenja) kao posledica dejstva stresogenih faktora sredine. AO–antioksidant (prerađeno prema Beaulieu i Costantini, 2014).

Da bi razmotrili efekte faktora sredine na aktivnost antioksidativnih enzima i nivo oksidativnog oštećenja lipida kod pčela tokom zimskog i letnjeg perioda, međusobno smo poredili rezultate dobijene u Beogradu, Suseku i Zajači i uočili značajan uticaj lokalnih faktora sredine specifičnih za urbanu, ruralnu i industrijsku sredinu.

Posmatrajući aktivnost antioksidativnih enzima i stepen lipidne peroksidacije u homogenatima i hemolimfi pčela tokom zimskog perioda na sva tri lokaliteta, u Suseku i Zajači možemo zapaziti više nivoje oksidativnog stresa u odnosu na Beograd. Značajno snižene aktivnosti SOD, CAT i GST u Suseku, u homogenatima pčela sa početka zimskog

perioda mirovanja, udružene sa visokim stepenom lipidne peroksidacije ukazuju da je antioksidativna zaštita manja od trenutnih potreba. Krajem zimskog perioda mirovanja, u homogenatima i hemolimfi pčela u Suseku imamo povećanje aktivnosti SOD i CAT u odnosu na početak zime, što ukazuje na bolju dostupnost antioksidanata ali i dalje je ona manja od potreba, s obzirom da imamo i dalje visoke koncentracije MDA. Nasuprot povećanim aktivnostima SOD i CAT u pčelama u Suseku, u pčelama u Zajači su krajem zime izmerene najniže vrednosti za SOD i CAT, koje zajedno sa visokim stepenom lipidne peroksidacije ukazuju na nedovoljnu dostupnost antioksidanata, koja je manja od trenutnog iskorišćenja i potreba od strane organizma. Upravo zagađenje olovom, koje je karakteristično za Zajaču, može biti uzrok nižih aktivnosti enzima SOD i CAT, kao i povećanja stepena lipidne peroksidacije u poređenju sa drugim lokalitetima. Utvrđeno je da hronično izlaganje olovu snižava aktivnost SOD i CAT, kroz interakciju olova sa jonima bakra i cinka, kao i putem inhibicije sinteze hema, te tako smanjuje nivo antioksidativne odbrane organizma (Ercal i sar., 2001; Winiarska-Mieczan, 2018). Takođe, olovo indukuje oksidativno oštećenje ćelijskih membrana, što je praćeno povećanjem koncentracije MDA (Yiin i Lin, 1995). Možemo zaključiti da su pčele iz Zajače, tokom zimskog perioda mirovanja, izložene višem nivou oksidativnog stresa u poređenju sa drugim lokalitetima.

Ukoliko posmatramo promene u aktivnostima antioksidativnih enzima i stepenu lipidne peroksidacije u homogenatima i hemolimfi pčela tokom letnjeg perioda na sva tri lokaliteta, urbani region se izdvaja u odnosu na ruralni i industrijski region. Generalno, statistički značajno niže aktivnosti SOD, CAT i GST u homogenatima i hemolimfi pčela, kao i niže koncentracije MDA u Beogradu ukazuju na niži nivo antioksidativne zaštite, kao i oksidativnih oštećenja, u poređenju sa drugim lokalitetima. Za razliku od Beograda, u Zajači i Suseku su tokom leta zabeležene značajno više vrednosti za aktivnost antioksidativnih enzima, kao i koncentracije MDA, što ukazuje na više nivoe antioksidativne zaštite koji su ipak manji od potrebâ organizma. Povećana aktivnost antioksidativnih enzima u homogenatima i hemolimfi letnjih pčela u Zajači, može biti posledica akutnog fiziološkog stresa usled zagađenja sredine, prvenstveno prisustva olova. Odgovor organizma na uslove sredine zavisi i od vremena izloženosti datim faktorima sredine. Utvrđeno je da akutno izlaganje organizma toksičnim metalima tj. kratkoročan fiziološki stres, povećava aktivnost SOD, CAT, GPx i GR, što ukazuje na aktivaciju odbrambenih mehanizama i adaptivnog odgovora ćelije. Ako izlaganje organizma potraje, aktivnost antioksidativnih enzima uglavnom opada (Winiarska-Mieczan, 2018). Time možemo objasniti razlike u odgovoru dugoživećih zimskih i kratkoživećih letnjih pčela u Zajači u odnosu na druge lokalitete, s obzirom na razlike u vremenu izloženosti pčela faktorima industrijske sredine, a samim tim i u stepenu bioakumulacije metala. Stoga, kraći period izlaganja letnjih pčela zagađenju olovom u Zajači stimuliše mehanizme antioksidativne zaštite povećavajući aktivnost SOD, CAT i GST. Povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatima pčela u Suseku, slično kao u Zajači, takođe ukazuje na postojanje faktorâ koji indukuju enzimsku antioksidativnu zaštitu kod medonosne pčele. S obzirom da je pčelinjak u Suseku

okružen poljoprivrednim zemljištem, gde je primarna delatnost zemljoradnja, izvor polena i nektara za pčele su najvećim delom poljoprivredne monokulture koje se standardno tretiraju sistemskim i/ili lokalnim pesticidima. Poznato je da pesticidi indukuju oksidativni stres kod medonosne pčele (Badiou-Bénéteau i sar., 2012; Carvalho i sar., 2013; Abdelkader i sar., 2019), što je i potvrđeno rezultatima akutnih testova toksičnosti subletalnih doza pesticida, dobijenim u prvoj fazi disertacije. Stoga, možemo pretpostaviti da je prisustvo pesticida, poreklom sa poljoprivrednih monokultura koje okružuju pčelinjak u Suseku, doprinelo povećanju enzimske antioksidativne zaštite, kao i višim nivoima MDA u analiziranim pčelama.

6.3.2. Aktivnost acetilholinesteraze

Da bi ispitali uticaj sezonskih promena i faktora sredine na neurotransmisiju holinergičkog tipa, u homogenatima pčela iz Beograda, Suseka i Zajače je tokom godine ispitana aktivnost acetilholinesteraze, ključnog enzima u holinergičkom sistemu, koji se smatra pouzdanim biomarkerom za prisustvo neurotoksina (Key i Fulton, 2002; Badiou i sar., 2008). Acetilholin je najzastupljeniji ekscitatorni neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu insekata, te je holinergička sinaptička transmisija kod insekata intenzivno istraživana (Gerschenfeld, 1973). Većina insekatskih vrsta ima dve izoforme acetilholinesteraze, te i medonosna pčela ima membranski vezanu izoformu AChE lokalizovanu u centralnom nervnom sistemu, kao i izoformu AChE koja je lokalizovana u perifernom nervnom sistemu, u toraksu i abdomenu (Kim i sar., 2012). Kao esencijalan u nervnom sistemu insekata, holinergički sistem je meta insekticida u zaštiti bilja, više od 50 godina (Čolović i sar., 2013). Problem je što insekticidi sporedno deluju i na insekte oprašivače, menjajući holinergičku transmisiju, što se odražava na njihovu vitalnost i ponašanje. Naročitu pretnju predstavljaju subletalne doze neonikotinoidnih pesticida, koji pored negativnih efekata na ponašanje, narušavaju razvojne procese kućnih pčela, s obzirom da redukuju veličinu hipofaringealnih žlezda i sadržaj acetilholina u matičnoj mleči, što dalje remeti pravilan razvoj pčelinjeg legla (Grünwald i Siefert, 2019). Metali takođe menjaju aktivnost AChE, najčešće vezivanjem za tiolne grupe enzima (Lionetto i sar., 2012).

Kroz aktivnost acetilholinesteraze u homogenatima pčela u Beogradu, Suseku i Zajači tokom godine, dobili smo uvid u promene u neurotransmisiji holinergičkog tipa pod uticajem sezone. U Suseku i Zajači su najviše vrednosti uočene krajem zimskog perioda mirovanja i tokom leta, dok su početkom zime zabeležene najniže vrednosti. U Beogradu nije bilo statistički značajnih promena pod uticajem sezone (Grafik 19). Acetilholinesteraza, koja je uključena u terminaciju impulsa transmisije, vršeći hidrolizu neurotransmitera acetilholina, prisutna je u brojnim holinergičkim putevima u centralnom i perifernom nervnom sistemu. Acetilholin, kao ekscitatorni neurotransmiter, kod medonosne pčele je uključen u neurotransmisiju kompleksnih olfaktorno-vizuelnih procesa povezivanja mirisa sa odgovarajućim cvetovima biljkama tj. cvetnim nektarom. U skladu sa podelom posla, ta esencijalna i kognitivno zahtevna

veština je razvijena kod pčela radilica koje izlaze van košnice u potragu za nekarom i polenom (Giurfa, 2013). Stoga je kod pčela sakupljačica (engl. *forager bee*) izražen razvoj moždanih centara koji su uključeni u spoznaju i povezivanje specifičnih mirisa i slika, koji je praćen i aktivacijom holinergičkih receptora (Ismail i sar., 2006). Time delom možemo objasniti efekte sezonskih promena na aktivnost AChE, tj. veću aktivnost enzima kod pčela krajem zime i tokom leta. Takođe, uz aktivnosti pčela van košnice povećava se i njihova izloženost brojnim zagađujućim materijama prisutnim u njihovom okruženju, stoga promene u aktivnosti AChE mogu biti uslovljene i specifičnostima analiziranih lokaliteta.

Daljim poređenjem aktivnosti AChE u pčelama sa različitih lokaliteta, tokom svakog perioda, statistički značajne razlike su zabeležene krajem zime i leti, sa višim vrednostima u Suseku i Zajači u odnosu na Beograd (Grafik 20). Snižena aktivnost AChE je biomarker izlaganja raznim zagađujućim materijama, uglavnom metalima, organofosfatnim pesticidima i karbamatima (Frasco i sar., 2005; Tu i sar., 2009; Čolović i sar., 2013), dok povećanje aktivnosti AChE može biti znak izlaganja piretroidnim i neonikotinoidnim insekticidima (Badiou i sar., 2008; Boily i sar., 2013). Međutim, pojedini polutanti izazivaju bifazni odgovor organizma, kao olovo koje pri niskim koncentracijama (0,15 µg po pčeli) inhibira aktivnost AChE kod medonosne pčele, dok pri višim koncentracijama (1,4 µg po pčeli) izaziva obrnut odgovor (Nikolić i sar., 2019). Povećana aktivnost AChE koja je izmerena u Zajači, upravo može biti posledica visokog sadržaja olova u pčelama (Nikolić i sar., 2015). Dok za indukciju aktivnosti AChE u Suseku uzrok mogu biti neonikotinoide, kao pesticidi sa najvećom primenom u zaštiti useva, kojima su pčele u većoj meri izložene tokom aktivnog perioda.

6.3.3. Imuni status

Bitan parametar u proceni stanja medonosne pčele je njen imuni odgovor, koji je pod uticajem kako genetskih, tako i sredinskih faktora. Utvrđeno je da imuni odgovor medonosne pčele varira tokom godine u zavisnosti od sezone tj. postoje razlike u imunom odgovoru letnjih kratkoživećih i zimskih dugoživećih pčela (Kunc i sar., 2019). U okviru ove disertacije, sezonske promene u imunom odgovoru medonosne pčele su praćene kroz aktivnosti fenol oksidaze, ključnog enzima u procesu melanizacije tj. individualnom, humoralnom imunom odgovoru i glukoza oksidaze, koja ukazuje na stanje socijalnog imuniteta.

Povećana aktivnost POx krajem perioda mirovanja, u poređenju sa letnjim aktivnim periodom, zapažena je samo u hemolimfi pčela u Suseku, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje navode da se tokom ontogenije pčela aktivnost enzima povećava, te je viša kod starijih pčela (Lourenço i sar., 2005; Schmid i sar., 2008; Wilson-Rich et al., 2008). Kratkoživeće letnje generacije pčela kombinuju celularni i humoralni imuni odgovor, dok se dugoživeće zimske pčele uglavnom oslanjaju na humoralni imuni odgovor, koji uključuje povećanu aktivnost POx, s obzirom da je funkcija hemocita kod dugoživećih pčela limitirana jer broj hemocita opada sa starenjem pčela (Schmid i sar.,

2008; Wilson-Rich i sar., 2008; Gätschenberger i sar., 2013; Steinmann i sar., 2015). Zatim, medonosna pčela se tokom zime oslanja na zalihe meda kao osnovnog izvora hrane. Smatra se da takva ishrana, bazirana na ugljenim hidratima, utiče na strukturnu zastupljenost i funkciju hemocita kod dugoživećih zimskih pčela, uzrokujući supresiju ćelijskog imunog odgovora (Szymas i Jedruszuk, 2003; Gätschenberger i sar., 2013). Aktivnost POx u hemolimfi pčela tokom zime u Beogradu nije imala statistički značajne promene. U Zajači je viša aktivnost enzima zabeležena kod starijih pčela, krajem perioda mirovanja u odnosu na početak mirovanja. Ukoliko uzmemo u obzir letnji aktivni period u Beogradu i Zajači, zapazićemo povećanje aktivnosti POx u odnosu na zimu (Grafik 35). Međutim, ako sagledamo aktivnost profenol oksidaze, u Beogradu i Zajači zapažamo trostruko veće vrednosti za proPOx u odnosu na POx upravo krajem zimskog perioda mirovanja, koje ukazuju da su najveće „rezerve“ enzima ipak kod starijih zimskih pčela.

Aktivnost glukoza oksidaze u hemolimfi pčela tokom zime i leta, ukazala je na nivo antiseptične zaštite u košnici koja doprinosi prevenciji zaraze na nivou grupe. U Suseku i Zajači, aktivnost enzima je bila viša zimi u odnosu na letnji aktivni period, dok u Beogradu nije bilo značajnih promena tokom godine (Grafik 39). Adekvatan imuni odgovor zimskih pčela je ključan za uspešno preživljavanje pčelinje kolonije tokom zimskog, za pčele najrizičnijeg perioda (Dainat i sar., 2012). S obzirom da su pčele izložene većim ekološkim pritiscima tokom zime, povećana aktivnost enzima GOx u pčelama u Suseku i Zajači doprinosi boljem grupnom imunitetu i ukazuje na veću zaštitu pčela od potencijalnih patogena.

Kao ključni faktori sredine koji utiču na imuni odgovor organizma su dostupnost hrane, nivo zagađenja sredine, prisustvo patogena i parazita i drugi, kao i stepen opterećenja jedinke ili grupe jedinki dejstvom jednog ili više faktora istovremeno. Poređenjem aktivnosti fenol oksidaze i njenog prekursora profenol oksidaze u hemolimfi pčela iz Beograda, Suseka i Zajače, fokus je usmeren na efekte faktora sredine na imuni status pčela, kada su zapažene značajne razlike, u zavisnosti od ispitivanog lokaliteta, krajem zimskog perioda mirovanja, kao i tokom letnjeg aktivnog perioda. Najviše aktivnosti POx i proPOx, koje su zabeležene u Suseku krajem zime, kao i u Zajači tokom leta, su ukazale na dobru imunokompetenciju pčela. Aktivnost enzima glukoza oksidaze, odgovornog za antibakterijsku i antimikotičnu zaštitu meda i perge, tokom zime je bila najviša u hemolimfi pčela u Zajači, dok u letnjem aktivnom periodu nije bilo značajnih razlika između lokaliteta (Grafik 40). Pčele iz Beograda se izdvajaju sa najnižim vrednostima za oba enzima. Smatra se da je za dobar imuni odgovor, pored genetskog resursa, od najvećeg značaja kvalitetna ishrana pčela. Pčele sa polifloralnom ishranom imaju bolju sposobnost ispoljavanja imunog odgovora u poređenju sa pčelama čija je ishrana monofloralna, čak i kada monofloralna ishrana ima viši sadržaj proteina (Alaux i sar., 2010). Zapravo, ishrana pčela u kontekstu modulacije imunog odgovora, tzv. nutritivna imunologija, privlači sve veću naučnu pažnju (DeGrandi-Hoffman i Chen, 2015). Takođe, sveprisutna zaraženost pčela mikrosporidijom roda *Nosema* i krpeljom *Varroa destructor*, doprinose hroničnom stresu pčelinjeg društva što značajno narušava njihovu imunokompetenciju (Antúnez i sar., 2009; Neumann i Carreck, 2010;

Gätschenberger i sar., 2013). Naši rezultati ukazuju na nizak nivo infekcije mikrosporidijom roda *Nosema* kod analiziranih pčela na sva tri lokaliteta, sa najmanjim brojem detektovanih spora u Suseku (Tabela 10). Takođe, zabeležen je nizak nivo infestacije krpeljom *Varroa destructor* na svim lokalitetima (Tabela 11). Razlike u imunom odgovoru pčela možemo pripisati najpre genetskim faktorima tj. različitim genotipovima a zatim kvalitetu ishrane. Pčelinjak u Zajači je okružen šumskim i delimično izmenjenim prirodnim površinama (Slika 8), te možemo pretpostaviti da je kvalitetnija ishrana pčela u Zajači kompenzovala negativne uticaje prisutnog zagađenja (Naug, 2009; Brodschneider i Crailsheim, 2010; Archer i sar., 2014). Značajno niže aktivnosti POx i proPOx u hemolimfi letnjih pčela u Suseku, mogu biti posledica supresije imunog odgovora usled dejstva pesticida (Di Prisco i sar., 2013; Brandt i sar., 2016; Sánchez-Bayo i sar., 2016), s obzirom da je veći deo površine oko pčelinjaka klasifikovan kao poljoprivredno zemljište (Slika 8). Rezultati laboratorijskih testova toksičnosti pesticida, dobijeni u prvoj fazi disertacije, ukazali su na značajnu inhibiciju enzima POx i proPOx kod pčela tretiranih neonicotinoidima. Takođe, možemo pretpostaviti da je monofloralna ishrana pčela u Suseku, bazirana na poljoprivrednim monokulturama, verovatno doprinela i slabijem socijalnom imunitetu pčela, zabeleženom krajem zime.

6.3.4. Masnokiselinski i ugljovodonični sastav masnog tela

Kao ključni organ u metabolizmu nutrijenata i energije, imunom odgovoru, detoksikaciji i hormonskoj regulaciji, masno telo je esencijalno u svim životnim stadijumima insekata. Jedna od najvažnijih uloga masnog tela insekata je skladištenje i oslobađanje energetske rezerve, što zavisi od energetske potrebe insekata. Rezerve masnog tela su od izuzetnog značaja kod holometabolnih insekata koji rezerve nutrijenata stvaraju još u larvenom stupnju, ali i u adultnom stadijumu, za energetske zahtevno letenje, reprodukciju, preživljavanje nepovoljnih perioda kada je ishrana ograničena i dr. Lipidi, najvećim delom triacilgliceroli, predstavljaju glavnu komponentu masnog tela i osnovni izvor metaboličkog goriva (Arrese i Soulages, 2010).

Rezerve masnog tela kod medonosne pčele su izuzetno značajne za preživljavanje nepovoljnih zimskih uslova, kada dugoživeće zimske pčele, sa ograničenim rezervama hrane u košnici, treba da iznesu novo leglo krajem zime i time pokrenu dalji ciklus aktivnosti. Stoga, uvećanje masnog tela, koje je karakteristično za zimsku generaciju, obezbeđuje nutritivne i energetske rezerve medonosne pčele za zimsku sezonu (Shehata i sar., 1981; Fluri i Bogdanov, 1987; Kunc i sar., 2019). Određivanje masenog procenta masnog tela u pčelama početkom i krajem zime, kao i tokom leta, ukazalo je na sezonske promene u količini masnog tela. Najmanje količine masnog tela su zabeležene krajem zimskog perioda mirovanja u pčelama u Beogradu i Suseku, značajno niže u odnosu na letnji aktivni period (Grafik 57). To ukazuje na očekivano niske energetske rezerve u starijim zimskim pčelama. Za razliku od Beograda i Suseka, količina masnog tela u pčelama iz Zajače nije značajno varirala u zavisnosti od sezone.

Kao rezervni lipidi, triacilgliceroli predstavljaju dominantnu komponentu masnog tela, čineći oko 90 % lipida masnog tela, iz kojih se u zavisnosti od potreba organizma oslobađaju masne kiseline da bi se dobila neophodna energija (Arrese i Soulages, 2010). S obzirom da je prezimljavanje najkritičniji period za preživljavanje pčelinje kolonije, kada su lipidne rezerve masnog tela od fundamentalnog značaja, njihova analiza se nameće kao sledeći korak.

Karakterizacija masnih kiselina iz triacilglicerola masnog tela kod zimskih i letnjih pčela sa različitih lokaliteta, dala je uvid u sadržaj i promene masnokiselinskog sastava pod uticajem sezone. Rezultati su pokazali da sastav masnih kiselina masnog tela medonosne pčele čini 14 masnih kiselina sa 14 – 26 ugljenikovih atoma, od kojih su najzastupljenije palmitinska 16:0, oleinska 18:1(9) i α -linolenska 18:3(9,12,15), čineći oko 80 % od ukupnog sastava masnih kiselina u pčelama iz Beograda, Suseka i Zajače (Tabela 12). Oleinska 18:1(9) kiselina predstavlja dominantnu komponentu u ukupnom sadržaju masnih kiselina u masnom telu pčela sa sve tri lokacije, tokom svakog perioda. Pregledom literature je ustanovljeno da nema dostupnih podataka o profilu masnih kiselina masnog tela medonosne pčele. Međutim, dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima o kvalitativnom sastavu masnih kiselina masnog tela bumbara (Hymenoptera: Apidae) *Bombus lucorum*, *B. terrestris*, *B. lapidarius*, *B. hypnorum*, *B. hortorum* i *B. confusus* (Cvačka i sar., 2006). Insekatske vrste karakteriše visoka zastupljenost masnih kiselina sa 16 i 18 ugljenikovih atoma, te možemo reći da medonosna pčela nije izuzetak po pitanju generalnog profila masnih kiselina (Stanley-Samuels i Nelson, 1993; Kostal i Simek, 1998).

Poznato je da promene u stepenu nezasićenosti masnih kiselina utiču na biofizičke osobine lipida sa funkcijom održavanja fluidnosti lipida, kako strukturnih tako i rezervnih (Hazel, 1995). Brojne studije su ustanovile da se masnokiselinski sastav lipida menja tokom godine u zavisnosti od temperature, što predstavlja važnu kariku u mehanizmima adaptacije insekata na temperaturne promene okruženja (Kostal i Simek, 1998; Ohtsu i sar., 1998; Vukašinić i sar., 2013). Kvalitativna analiza triacilglicerola masnog tela kod zimskih pčela u Beogradu, Suseku i Zajači je ukazala na veći sadržaj nezasićenih (UFA) i niži sadržaj zasićenih masnih kiselina (SFA) u odnosu na letnje pčele, što je rezultovalo sveukupno većim stepenom nezasićenosti (UFA/SFA) lipidnog energetskeg depoa (Tabela 13). Mnogi insekti se adaptiraju na niske temperature povećavajući nezasićenost masnih kiselina strukturnih i rezervnih komponenti lipida, kao rezultat povećanja sadržaja nezasićenih masnih kiselina, uz istovremeno smanjenje sadržaja zasićenih masnih kiselina (Kostal i Simek, 1998; Michaud i Denlinger, 2006; Vukašinić i sar., 2013).

Posmatrajući promene procentualnog udela zasićenih masnih kiselina u masnom telu pčela tokom godine, na sva tri lokaliteta je zapaženo značajno povećanje udela SFA krajem zime ili tokom leta u odnosu na početak zime tj. sa sezonskim povećanjem temperatura tokom godine povećava se i sadržaj zasićenih masnih kiselina (Grafik 59). Dok je udeo nezasićenih masnih kiselina u masnom telu pčela tokom godine, na sva tri

lokaliteta, imao obrnut prikaz u odnosu na SFA (Grafik 61). Od ukupnog sadržaja UFA, možemo zapaziti da je najveći udeo mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) prisutan u pčelama početkom zimskog perioda mirovanja, dok su polinezasićene masne kiseline (PUFA), zajedno sa SFA, najvećim delom zastupljene u pčelama krajem zime i tokom letnjeg aktivnog perioda (Tabela 13, Slika 10). Analiza glavnih komponenti sadržaja SFA, MUFA i PUFA je potvrdila prethodno navedeno i dodatno, usled razdvajanja PUFA i SFA duž druge glavne komponente, sa jedne strane izdvojila pčele sa visokim sadržajem PUFA, uzorkovane krajem zime, a sa druge strane grupisala pčele sa visokim sadržajem SFA, uzorkovane u letnjem periodu (Slika 11).

Za razliku od letnjih pčela, tokom zime medonosna pčela formira termoregulacioni klaster unutar košnice, kada je glavni zadatak zimskih pčela da pokretima grudnih mišića održavaju temperaturu iznad 10 °C, na taj način obezbeđujući prezimljavanje (Stanimirović i sar., 2000; Döke i sar., 2015). Možemo zaključiti da pored promena u ponašanju zimskih u odnosu na letnje pčele, niske temperature tokom zimske sezone izazivaju i promene u fiziologiji pčela, kako povećanjem mase masnog tela, tako i promenom u stepenu nezasićenosti masnih kiselina lipida masnog tela. Veći stepen nezasićenosti masnih kiselina, koji je zabeležen kod zimskih pčela, doprinosi održanju fluidnosti lipida masnog tela i njihovom boljem iskorišćenju, odnosno funkcionalnosti organizma u celini.

Pored analize količine, kao i lipidnog sastava masnog tela u pčelama u zavisnosti od sezone godine, poređenjem dobijenih rezultata kod pčela iz Beograda, Suseka i Zajače, tj. lokaliteta sa različitim stepenom antropogenog uticaja, uočen je i značajan uticaj sredinskih faktora (Grafik 58, Tabela 12). Generalno, pčele iz Suseka su se izdvojile sa najvećom masom masnog tela, u odnosu na druga dva lokaliteta, što ukazuje na dobre nutritivne i energetske rezerve u pčelama tokom zime i leta. Pčele u Beogradu karakteriše manja količina masnog tela, koja je krajem perioda mirovanja statistički značajno niža u odnosu na masno tela u pčelama iz Suseka u Zajače. Pčele u Zajači su imale manju masu masnog tela tokom letnjeg aktivnog perioda, statistički značajno nižu u odnosu na masno telo pčela iz Suseka. Poznato je da stres kod insekata stimuliše povećanu mobilizaciju energetske rezervi iz masnog tela tako što povećava nivo oktopamina, glavnog stres hormona kod medonosne pčele (Scheiner i sar., 2006; Arrese i Soulages, 2010; Farooqui, 2012). Manje količine masnog tela, izmerene u pčelama u Beogradu i Zajači, mogu se povezati sa multiplim stresogenim faktorima karakterističnim za urbanu i industrijsku sredinu, kao što su povećano zagađenje, buka, manja raspoloživost hrane i drugo (Al-Khashman, 2013; Nieto i sar., 2014; Harrison i Winfree, 2015), koji dalje pokreću koordinisani fiziološki odgovor pčela na stres, praćen povećanim iskorišćenjem rezervi masnog tela.

Analiza zasićenosti masnih kiselina, koje ulaze u sastav lipida masnog tela, takođe je ukazala na značajne razlike između različitih lokaliteta (Grafici 60, 62). Značajno viši udeo zasićenih masnih kiselina početkom zime i tokom leta je zabeležen u masnom telu

pčela iz Suseka, a krajem zime kod pčela iz Zajače. Pčele iz Beograda karakteriše značajno viši udeo nezasićenih masnih kiselina u masnom telu tokom sva tri perioda.

Dok je sastav lipida brojnih insekatskih vrsta dobro poznat, egzaktan uticaj raznovrsnih sredinskih faktora na lipidni profil masnog tela insekata nije razjašnjen (Cerkowniak i sar., 2015). Pored sezonskih temperaturnih promena koje pokreću adaptivne mehanizme insekata, uzrokujući promene u masnokiselinskom sastavu lipida (Kostal i Simek, 1998; Ohtsu i sar., 1998; Vukašinović i sar., 2013), takođe se navodi da ishrana može biti izvor varijacija lipidnog sastava medonosne pčele (Arien i sar., 2015). Ishrana polenom medonosnoj pčeli obezbeđuje makro i mikronutrijente, uključujući proteine, lipide, vitamine i minerale (Arrese i Soulages, 2010). Polen različitih biljaka varira u sastavu masnih kiselina te je floralna raznovrsnost ključna za balansiranu ishranu medonosne pčele (Roulston i Cane, 2000). Poznato je da medonosna pčela favorizuje polen sa većim sadržajem nezasićenih masnih kiselina, koji bi ispunio nutritivne zahteve pčela za esencijalnim polinezasićenim masnim kiselinama (Serra Bonvehí i Escolà Jordà, 1997; Hendriksma i Shafir, 2016; Zarchin i sar., 2017). Stoga, zabeležene varijacije u stepenu zasićenosti masnih kiselina u masnom telu pčela možemo delom pripisati razlikama u ishrani pčela na analiziranim pčelinjacima tj. floralnoj raznovrsnosti ispitivanih lokaliteta.

Ugljovodonici, kao glavna komponenta kutikularnih lipida medonosne pčele, kao i voska koji se luči za izgradnju saća (Francis i sar., 1989), imaju značajnu protektivnu ulogu, čineći kutikulu voodootpornom i sprečavajući desikaciju. Pored toga, imaju ulogu markera tj. feromona u međusobnom prepoznavanju pčela unutar pčelinje kolonije (engl. *nestmate recognition*), što je od izuzetnog značaja u organizaciji socijalnih organizama i očuvanju integriteta unutar kolonije (van Zweden i D'Etorre, 2010). Sastav, količina i međusobni odnos ugljovodonika variraju u zavisnosti od uzrasta medonosne pčele, što doprinosi specifičnosti različitih kasta unutar kolonije, kao i celokupnoj koloniji (Francis i sar., 1989; Vernier i sar., 2019).

Analizom profila ugljovodonika u homogenatima celih pčela (Tabela 14), identifikovana su četiri dugolančana ugljovodonika tj. *n*-alkana sa neparnim brojem ugljenikovih atoma: trikozan (C₂₃), pentakoza (C₂₅), heptakoza (C₂₇) i nonakoza (C₂₉). Rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima medonosne pčele, gde se ugljovodonici koje smo identifikovali izdvajaju kao dominantni kod adultnih pčela (Blomquist i sar., 1980). Poređenjem ukupnog sadržaja ugljovodonika tokom godine, zabeležene su značajne razlike u njihovim nivoima u pčelama sa analiziranih lokaliteta (Grafik 63). Na sva tri lokaliteta, najniži sadržaj ugljovodonika je zabeležen početkom zime, dok se sa sezonski većim temperaturama, krajem perioda mirovanja i u aktivnom periodu, sadržaj ugljovodonika povećavao.

Promene u sadržaju ugljovodonika kod medonosne pčele su u skladu sa intenzitetom lučenja voska, tj. prisustvom ili odsustvom abdominalnih voštanih žlezda. Utvrđeno je da sinteza i lučenje voska zavise od uzrasta pčele, te da je najintenzivnije kod pčela starosti

oko dve nedelje i nakon toga slabi (Hepburn i sar., 1991). Nivo ugljovodonika u pčelama prati sintezu voska te je najveći sadržaj ugljovodonika detektovan kod pčela u drugoj nedelji života, nakon toga opada i zadržava se na nivou koji je zabeležen kod pčela od trećeg do šestog dana starosti (Francis i sar., 1989). Možemo zaključiti da uzrasna razlika nije uticala na nivo detektovanih ugljovodonika u Beogradu, Suseku i Zajači, s obzirom da je analiza vršena na starijim pčelama radilicama. Poznato je da se lučenje voska i izgradnja saća ne odvijaju u periodu odsustva pčelinjeg legla i pčelinje paše tj. unosa svežeg nektara i polena u košnicu, što je karakteristično za zimsku sezonu (Gallo i Chittka, 2018). To bi moglo objasniti niže nivoe ugljovodonika kvantifikovane u pčelama početkom zime. Primarni zadatak svih zimskih pčela je zagrevanje tj. termoregulacija unutar pčelinje kolonije, a uobičajena podela rada se uspostavlja tek krajem zimskog perioda (Stanimirović i sar., 2000; Döke i sar., 2015), te možemo pretpostaviti da je niži nivo ugljovodonika još jedna fiziološka karakteristika zimskih pčela, vezana za njihovo ponašanje koje je znatno drugačije u odnosu na letnje pčele.

Ako se osvrnemo na ulogu ugljovodonika kao feromona, još nije poznato da li su celokupan profil ugljovodonika ili samo prisustvo pojedinačne komponente, odgovorni za specifično prepoznavanje jedinki unutar kolonije. Prethodne studije ukazuju da su najverovatnije samo varijacije u relativnoj zastupljenosti pojedinačnih komponenti ugljovodoničnog profila dovoljne u hemijskom prepoznavanju članova kolonije (van Zweden i D'Ettorre, 2010). Naši rezultati su ukazali na razlike u relativnoj zastupljenosti četiri *n*-alkana (Tabela 14), identifikovana u homogenatima pčela iz Beograda ($C_{29}>C_{27}>C_{25}>C_{23}$), Suseka ($C_{27}>C_{29}>C_{25}>C_{23}$) i Zajače ($C_{27}>C_{23}>C_{29}>C_{25}$). Možemo videti da je u Beogradu najzastupljeniji nonakozan (C_{29}), dok je heptakozan (C_{27}) najzastupljeniji u uzorcima pčela iz Suseka i Zajače.

Ako posmatramo varijacije u nivou ugljovodonika koje smo zabeležili između različitih lokaliteta, zapazićemo značajne razlike u ukupnom sadržaju ugljovodonika između Beograda, Suseka i Zajače (Grafik 64). Pčele iz Beograda imaju značajno niži sadržaj ukupnih ugljovodonika u odnosu na pčele iz Suseka, tokom sva tri perioda, dok su se pčele iz Zajače krajem zime izdvojile sa najvišim vrednostima. S obzirom na ulogu ugljovodonika u međusobnom prepoznavanju pčela, kako unutar kolonije tako i „uljeza“ tj. članova iz drugih kolonija, očekivane su razlike u sadržaju ugljovodonika između košnica. Specifičan profil ugljovodonika medonosne pčele je u osnovi rezultat urođenog razvojnog procesa koji je genetski određen i dalje modifikovan od strane sredinskih faktora (Vernier i sar., 2019). Raznovrsni su faktori sredine koji doprinose specifičnom ugljovodoničnom profilu, koji je više dinamičan nego statičan. Tako, materijal za gradnju košnica, zatim voštane satne osnove, kao i komponente meda i perge, zajedno utiču na specifičan miris pčela unutar košnice. Sakupljanjem nektara i polena, pčele su pod najvećim uticajem sredinskih faktora, koji dodatno modifikuju njihov ugljovodonični profil (Schmitt i sar., 2007). Vernier i sar. (2019) su formiranje profila ugljovodonika kod medonosne pčele opisali kroz dve faze. U prvoj fazi, koja se odvija kod pčela unutar košnice, sintetiše se ukupni sadržaj ugljovodonika, koji prvenstveno služe kao hidrofobna barijera u sastavu kutikule. U drugoj fazi, ukupni sadržaj ugljovodonika

ostaje nepromenjen ali se relativna zastupljenost pojedinačnih komponenti menja u skladu sa uzrasnom podelom posla i sazrevanjem pčela, koje u ovoj fazi obavljaju poslove van košnice. Stoga, zabeležene razlike u ukupnom sadržaju ugljovodonika u pčelama sa različitih lokaliteta, možemo pripisati genetski uslovljenom razvoju, dok su razlike u zastupljenosti pojedinačnih *n*-alkana verovatno rezultat uticaja sredinskih faktora, specifičnih za Beograd, Susek i Zajaču.

6.3.5. Metabolomički profil hemolimfe

Sa ciljem sveobuhvatnije procene stanja pčelinjih zajednica tokom letnjeg i zimskog perioda, rezultati prethodnih ciljanih analiza su upotpunjeni metabolomičkom analizom hemolimfe pčela. Za razliku od ciljanih analiza, metabolomičke studije naglašavaju značajnost relativnih promena zastupljenosti detektovanih metabolita u komparativnim eksperimentima, izbegavajući pristrasnost prema određenim klasama jedinjenja. Složene interakcije genoma i životnog okruženja rezultuju promenama u metabolizmu biomolekula, što se odražava na profil metabolita hemolimfe pčela, te analizom celokupnog hemolimfnog metaboloma dobijamo opsežan uvid u trenutno stanje organizma.

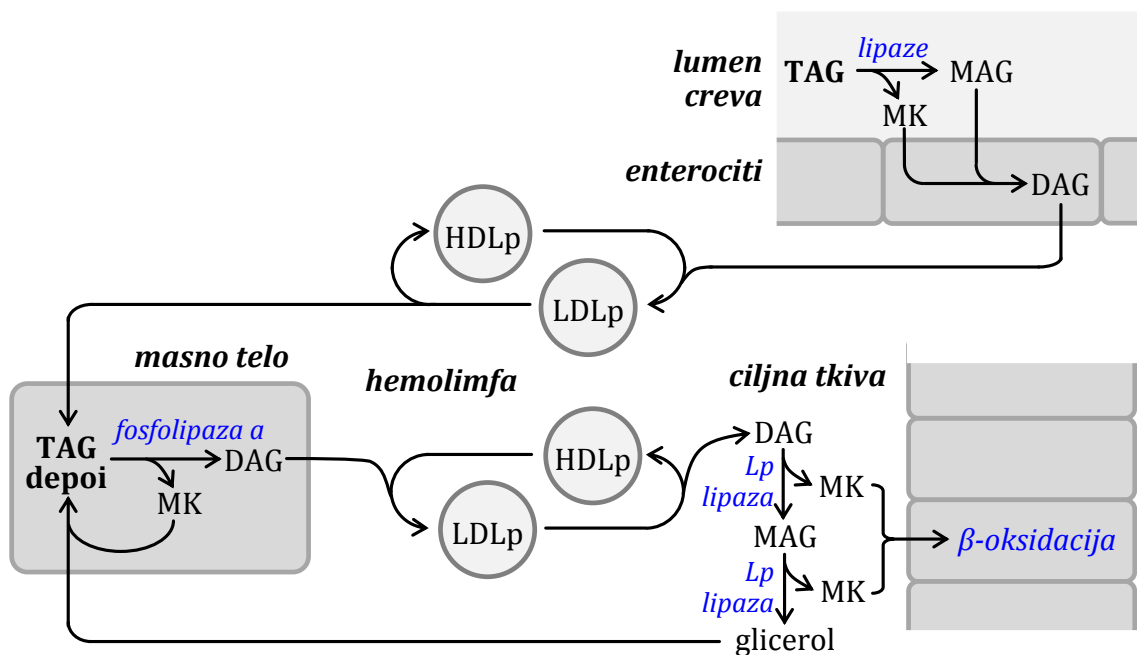
Od ukupno 154 detektovana jedinjenja u hemolimfi pčela, identifikovano je 125 metabolita, koji su uključeni u razne metaboličke puteve: glikolizu, glukoneogenezu, Krebsov ciklus, pentozo-fosfatni put, metabolizam lipida i aminokiselina (Tabela 15). Kao najzastupljeniji metabolit u hemolimfi medonosne pčele izdvojila se trehaloza, praćena fruktozom i glukozom. Hemolimfa insekata je bogata ugljenim hidratima koji su osnovni izvor energije. Trehaloza je jedna od glavnih skladišnih disaharida kod insekata, predstavlja brz izvor glukoze, što je naročito od značaja za pčele koje tokom letenja skoro isključivo koriste ugljene hidrate kao izvor energije (Becker i sar., 1996; Blatt i Roces, 2001). Utvrđeno je da je nivo trehaloze u hemolimfi pčela veoma stabilan, čak i pri eksperimentalnim uslovima gladovanja tj. male dostupnosti ugljenohidratnog izvora hrane (Wang i sar, 2019).

Analiza metaboličkog otiska u hemolimfi pčela, upotpunjena identifikacijom metabolita i daljom multivarijacionom statističkom obradom, identifikovala je jedinjenja koja su od značaja za razlikovanje letnjih i zimskih pčela (Slike 12-15). Monoacilgliceroli, kao što su gliceril-stearat i gliceril-palmitat, kao i aminokiseline prolin i lizin, izdvojile su se kao varijable sa najvećim doprinosom u razdvajanju uzoraka. Značajno viši nivoi navedenih metabolita u letnjem aktivnom periodu, u odnosu na kraj perioda mirovanja, ukazuju na razlike u metabolizmu letnjih i zimskih pčela. Dalje mapiranje metabolita pomoću KEGG baze metaboličkih podataka i analiza metaboličkih puteva su potvrdili značaj monoacilglicerola i aminokiselina kao glavnih diskriminišućih metabolita, izdvajajući aminokiseline glicin, cistein, glutamin, fenilalanin, kao i glicerol i monoacilglicerole u metabolizmu glicerolipida (Tabela 16, Slika 16). Koncentracije navedenih metabolita, izuzev glutamina, bile su značajno povećane tokom letnjeg aktivnog perioda u odnosu na kraj perioda mirovanja.

Letnji period karakteriše dobra dostupnost cvetnog nektara i polena kao izvora hrane, te i intenzivna aktivnost pčela koja je organizovana u skladu sa njihovim uzrastom. Cvetni nektar predstavlja izvor ugljenih hidrata, dok polen obezbeđuje neophodne proteine, lipide i mikronutrijente (Michener, 2007; Wright i sar., 2017). Proteini i lipidi uneti hranom razgrađuju se i apsorbuju u lumenu srednjeg creva, koje predstavlja glavno mesto lučenja digestivnih enzima, digestije hrane i apsorpcije nutrijenata (Nation, 2016). Slobodne aminokiseline nastale hidrolizom proteina, kao i monoacilgliceroli i masne kiseline nastali hidrolizom triacilglicerola, usvajaju se od strane enterocita, te se dalje u vidu slobodnih aminokiselina i diacilglicerola transportuju hemolimfom do masnog tela ili ciljnih tkiva za njihovo iskorišćenje. Stoga, dobra dostupnost hrane tokom letnjeg aktivnog perioda uslovljava i više nivoe biomolekula u hemolimfi pčela.

Insekti generalno imaju više nivoe slobodnih aminokiselina u hemolimfi, koje predstavljaju brzo dostupan supstrat za Krebsov ciklus, s obzirom da se mnoge aminokiseline mogu brzo prevesti u acetyl-CoA, piruvat ili intermedijere ciklusa (Candy i Kilby, 1975). Prolin je veoma zastupljena aminokiselina koja kod nekih insekata, uključujući i insekte iz reda opnokrilaca, služi kao značajan izvor energije za let (Bursell, 1981; Skandalis i sar., 2011). Medonosna pčela isključivo koristi ugljene hidrate kao izvor energije za let, što se objašnjava veoma intenzivnim energetskeg metabolizmom tokom lebdećeg leta, kao i specijalizovanom ishranom baziranom na ugljenim hidratima (Suarez i sar., 2005; Teulier i sar., 2016).

Monoacilgliceroli, gliceril-stearat i gliceril-palmitat, koji su se takođe izdvojili sa višim koncentracijama u hemolimfi pčela tokom letnjeg aktivnog perioda, predstavljaju intermedijere u metabolizmu lipida (Slika 19). Lipidi, koje insekti unose hranom, najvećim delom predstavljaju triacilglicerole (Nation, 2016). Nakon hidrolize triacilglicerola lipazama u lumenu srednjeg creva, monoacilgliceroli i masne kiseline, ili samo masne kiseline nakon potpune hidrolize, se usvajaju od strane ćelija creva tj. enterocita gde nastaju diacilgliceroli. U hemolimfnoj cirkulaciji, diacilgliceroli se u vidu lipoproteinskih kompleksa – lipoforina transportuju do masnog tela gde nastaju triacilgliceroli, kao glavna forma lipidnih rezervi. Po potrebi i pod kontrolom adipokinetičkog hormona, triacilgliceroli se uklanjanjem jedne masne kiseline u masnom telu prevode u diacilglicerola. Oni se dalje transportuju hemolimfom do ciljnih organa gde se dve preostale masne kiseline oslobađaju i koriste od strane ciljnog tkiva za dobijanje energije oksidacijom. Preostali glicerol se reciklira tj. vraća u masno telo gde se koristi u sintezi triacilglicerola (Arrese i Soulages, 2010; Nation, 2016).

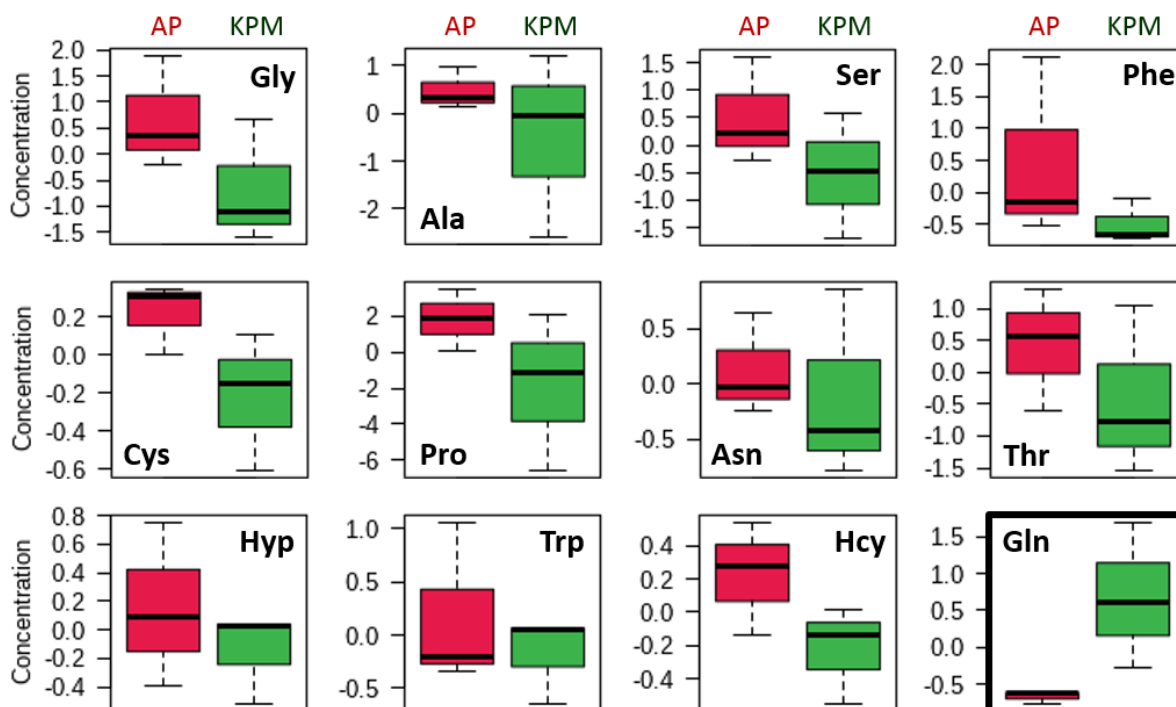


Slika 19. Metabolizam i transport acilglicerola kod insekata. TAG–triacilgliceroli, DAG–diacilgliceroli, MAG–monoacilgliceroli, MK–masna kiselina, HDLp–lipoforini visoke gustine, LDLp–lipoforini niske gustine, Lp lipaza–lipoforin lipaza.

Unos cvetnog polena kao izvora lipida u ishrani pčela tokom letnjeg perioda, intenzivira metabolizam triacilglicerola, što je praćeno povećanim nivoima glicerola, monoacilglicerola i diacilglicerola u hemolimfnoj cirkulaciji, kao intermedijera u metabolizmu triacilglicerola. Za razliku od monoacilglicerola, u okviru sprovedenog metabolomičkog istraživanja, diacilgliceroli nisu identifikovani usled njihove nedovoljne isparljivosti neophodne za detekciju košišćenim GC-MS analitičkim sistemom.

Za razliku od letnjeg aktivnog perioda, tokom zime nema priliva nektara i polena te se pčele isključivo oslanjaju na ograničene rezerve hrane skladištene u košnici. Stoga, možemo reći da su pčele tokom zime izložene jednoj vrsti nutritivnog stresa ili gladovanja koje stimuliše proces lipolize u masnom telu medonosne pčele, čime se troše energetske rezerve neophodne za prezimljavanje (Corby-Harris i sar., 2019). Pored iskorišćenja lipidnih rezervi, pčele mogu intenzivirati katabolizam proteina i kroz proces glukoneogeneze koristiti aminokiseline kao dodatni izvor energije (Wang i sar., 2019). Smatra se da su upravo aminokiseline iz telesnih proteina supstrat za glukoneogenezu, dok se aminokiseline unete polenom koriste za sintezu proteina (Wang i sar., 2019). Pri tome, u prvom koraku razgradnje aminokiselina, transaminacijom se amino grupa sa α -aminokiseline prenosi na α -ketoglutarat pri čemu nastaje glutamat. Nastali glutamat se dalje prevodi u glutamin, kao transportnu tj. cirkulatornu formu amonijaka nastalog u katabolizmu aminokiselina. Ovo je neophodno jer glutamat kod insekata ima i ulogu neurotransmitera u neuromišićnim sinapsama (Candy i Kilby, 1975). Stoga, povećanim korišćenjem aminokiselina kao izvora energije tokom zime (Slika 20) možemo objasniti

povećan nivo glutamina kod pčela krajem perioda mirovanja. Takođe, na intenzivnijem metabolizmu aminokiselina ukazuju i povećane količine mokraćne kiseline, glavne ekskretorne forme azota kod insekata, kao i uree, zabeležene kod pčela krajem perioda mirovanja (Tabela 15; Nation, 2016).



Slika 20. Poređenje nivoa pojedinačnih aminokiselina u hemolimfi pčela krajem perioda mirovanja (KPM) i tokom aktivnog perioda (AP). Vrednosti koncentracija su Pareto skalirane.

Dobijanje energije iz neugljenohidratnih izvora je od velikog značaja kod pčela krajem perioda mirovanja (Teulier i sar., 2016), kada stare dugoživeće zimske pčele treba da formiraju novo leglo i podignu prvu generaciju mladih letnjih pčela koje bi ih zamenile. To je kritičan korak u preživljavanju pčelinje kolonije i energetski je zahtevan. Za razliku od drugih insekata letača, pčele ne koriste masne kiseline i prolin kao izvor energije za letenje (Nation, 2016; Teulier i sar., 2016), što je dodatni razlog za usmeravanje metabolizma ka procesu glukoneogeneze.

6.3.6. Sadržaj metala u pčelama i pčelinjim proizvodima

Teški metali su široko rasprostranjeni u životnoj sredini a njihova zastupljenost u lokalnom ekosistemu zavisi od prirodnih i antropogenih izvora. Prirodni izvor teških metala je matični supstrat, na kome je zemljište formirano, dok su najčešći antropogeni izvori metala industrija, saobraćaj, agrohemijske, deponije komunalnog i industrijskog otpada i dr. Kao bioelementi ili esencijalni metali, koji imaju važne uloge u biološkim sistemima, izdvajaju se kalcijum (Ca), bakar (Cu), gvožđe (Fe), kalijum (K), magnezijum (Mg), mangan (Mn), natrijum (Na) i cink (Zn), dok su kadmijum (Cd), kobalt (Co), hrom (Cr), nikl (Ni) i olovo (Pb) neesencijalni metali koji su toksični čak i u tragovima

(Schroeder, 1973; Markert i sar., 2015). Međutim, čak i bioelementi, ukoliko su prisutni u višku ili nedostatku, izazivaju različite fiziološke poremećaje. Pčele su izložene toksičnim metalima kroz kontaminiran vazduh, vodu, zemljište i hranu. Izlaganje toksičnim metalima je u najvećoj meri izraženo kod pčela izletnica dok su u potrazi za hranom, kada im se na telu zadržavaju kontaminanti iz atmosfere, a putem nekatara i polena, kontaminanti dalje dospevaju i do kućnih pčela i legla. Stoga se pčele radilice, med i perga često koriste kao bioindikatori zagađenja životne sredine različitim organskim i neorganskim jedinjenjima (Conti i Botrè, 2001; Celli i Maccagnani, 2003; Lambert i sar., 2012; Bargańska i sar., 2015; Nikolić, 2017). Sa ciljem procene izloženosti pčela toksičnim metalima u Beogradu, Suseku i Zajači, izmerena je koncentracija 16 metala u homogenatima letnjih pčela i njihovoj hrani, pergi i medu.

U uzorcima pčela i perge je zabeležen približno jednak opseg koncentracija metala, sa izraženim razlikama u njihovoj zastupljenosti u zavisnosti od lokaliteta pčelinaka (Grafici 41–56). U uzorcima meda je zapažena znatno niža koncentracija (10–100 puta) svih analiziranih metala u odnosu na uzorke pčela i perge, što potvrđuje pretpostavku da pčele filtriraju tj. uklanjaju metale iz nektara, te se zbog toga u medu nalaze niske koncentracije teških metala (Ruschioni i sar., 2013). Možemo reći da svaka sredina nameće specifičan profil zagađenja, koji se odražava na sadržaj metala u pčelama i njihovoj hrani.

U Beogradu su značajno više koncentracije Co, Cu, Fe i Na u pčelama, Ca, Cu, Mg i Ni u pergi, kao i Sr u svim uzorcima u odnosu na druga dva lokaliteta. Kobalt se prirodno nalazi u zemljinoj kori, a samim tim i u zemljištu i usvaja se od strane biljaka. Međutim, translokacija kobalta iz korena ka nadzemnim delovima biljke je niska na većini zemljišta, te je atmosferska depozicija kobalta, prvenstveno kao posledica sagorevanja fosilnih goriva, otpada, iz izduvnih gasova vozila, najverovatnije glavni izvor kobalta za pčele. Višim koncentracijama bakra i gvožđa u Beogradu je najverovatnije doprineo intenzivan saobraćaj, s obzirom da se ovi metali oslobađaju trošenjem automobilskih guma i kočnica, kao i sagorevanjem fosilnih goriva (Duong i Lee, 2011; Al-Khashman, 2013). Stroncijum se prirodno nalazi u zemljinoj kori i otpušta u atmosferu kao rezultat prirodnih procesa kroz čestice prašine ili u morskim priobalnim područjima u vidu aerosola. Antropogeni izvori stroncijuma su uglavnom sagorevanje fosilnih goriva, prvenstveno uglja, kao i upotreba fosfatnih đubriva. Nije neophodan za rast biljaka ali ga biljke usvajaju da bi upotpunile potrebu za kalcijumom i dalje transportuju u nadzemne delove, te tako ulazi u lance ishrane (ATSDR, 2004).

Pčelinjak u Zajači se izdvaja po značajno višim koncentracijama Ba, Cd i Pb u svim uzorcima u odnosu na druga dva lokaliteta, dok su u medu zabeležene najviše koncentracije Al, Ba, Cd, Cr, Mn, Ni, Pb i Zn u odnosu na med iz Beograda i Suseka. Barijum je relativno zastupljen element u zemljinoj kori, te se prirodno nalazi u zemljištu i hrani. Razvoj rudarske industrije, široka upotreba barijuma u industrijskim postrojenjima za preradu, kao i deponije opasnog otpada, značajno doprinose njegovoj zastupljenosti u životnoj sredini. Poznato je da se barijum koristi u rudarskoj industriji u

sklopu maziva, u automobilskoj industriji kao komponenta svećica i drugo (ATSDR, 2007). U periodu uzorkovanja pčela i pčelinje hrane u Zajači, u okviru postrojenja „Rudnik i topionice Zajača“ se intenzivno vršila prerada sekundarnih sirovina sa ciljem dobijanja olova, što je verovatno doprinelo i povećanom prisustvu barijuma u analiziranim uzorcima. Kadmijum je takođe prisutan u zemljištu, prirodno se pojavljuje u rudama zajedno sa cinkom, olovom i bakrom, međutim antropogeni izvori kadmijuma najvećim delom doprinose njegovoj zastupljenosti u okruženju. Sastavni je deo akumulatora, nikl-kadmijum baterija, motora sa unutrašnjim sagorevanjem i drugo. Stoga, industrijsko postrojenje u Zajači takođe možemo povezati sa povećanim koncentracijama ovog toksičnog metala u pčelama, pergi i medu. Do pčela, perge i meda, kadmijum najvećim delom dospeva preko biljaka, odnosno polena i nektara. Utvrđeno je da samo mala količina kadmijuma dospeva u med iz vazduha, i to ukoliko se nalazi u neposrednoj blizini izvora zagađenja (Bogdanov, 2006). Najizraženija razlika u sadržaju metala između analiziranih lokaliteta je svakako u koncentraciji olova, koja je nekoliko desetina puta viša u pčelama i pergi u Zajači, u odnosu na Beograd i Susek. Biljke ne transportuju olovo, pa se smatra da pčele sa ovim metalom dolaze u kontakt preko vazduha (Bogdanov, 2006), što je u saglasnosti sa rezultatima merenja Agencije za zaštitu životne sredine Republike Srbije (Popović i sar., 2014), koja je pratila koncentraciju olova u vazduhu u Zajači, zbog topionice olova koja se tamo nalazi. Koncentracija olova u medu iz Zajače je takođe bila visoka (0,58 µg/g), što je prema važećem pravilniku u Republici Srbiji, gde su propisane koncentracije olova, kadmijuma, cinka, arsena, bakra i olova u medu, bilo iznad dozvoljene koncentracije od 0,5 µg/g (Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama, 2011). Olovo je nespecifičan toksikant koji inhibira mnoge enzime neophodne za normalno funkcionisanje organizma, najčešće kroz zamenu esencijalnih metalnih jona, kao što su kofaktori u enzimima. Olovo i kadmijum najčešće menjaju cink u aktivnom centru enzima, nakon čega je aktivnost enzima smanjena ili se potpuno gubi (Kaim i sar., 2013). Inhibicija enzima superoksid dismutaze, koja je u vezi sa povećanim sadržajem olova u okruženju, zabeležena je i u okviru ove disertacije (pogledati više u delu 6.3.1). Takođe, kao redoks neaktivni metali koji se vezuju za sulfhidrilne grupe, olovo i kadmijum troše sulfhidrilne rezerve organizma što dalje uzrokuje oksidativni stres (Ercal i sar., 2001).

Poređenjem sadržaja metala u pčelama, pergi i medu na sva tri lokaliteta, pčelinjak u Suseku se izdvaja sa značajno višim koncentracijama Ca i Mg u medu. Pored neophodnih makronutrijenata, kao što su proteini, lipidi i ugljeni hidrati, kompletna ishrane pčela zahteva i mikronutrijente tj. vitamine i minerale. Polen biljaka je glavni izvor minerala u ishrani pčela, gde su kalcijum, magnezijum i kalijum najzastupljeniji. Ukoliko su ti minerali deficitarni, pčele sakupljačice ih nadoknađuju preko vode koju donose u košnicu. Pri tome biraju vodu koja nije čista, već slana i „zaprljana“ tj. sadrži više mineralnih materija. Utvrđeno je da su kalcijum i magnezijum esencijalni za razvoj larvi pčela (Herbert i sar., 1978), zatim kalcijum utiče na regulaciju mišićnih pokreta i ukupni

antioksidativni kapacitet (Zhang i Xu, 2015). Međutim, ukoliko su prisutni u višku mogu imati štetne efekte, tako povećane koncentracije kalcijuma izazivaju paralizu medonosne pčele (Somerville, 2005). Kalcijum i magnezijum su prirodno veoma zastupljeni u zemljinoj kori i zemljištu, vodorastvorni su, te su i najčešći mineralni elementi u vodi. Antropogeni izvori, kao što su kalcifikacija poljoprivrednog zemljišta, cementare i primena veštačkih đubriva, mogu povećati dostupnost ovih elemenata u prirodi (Reimann i de Caritat, 1998). Ako uzmemo u obzir da je pčelinjak u Suseku okružen poljoprivrednim zemljištem i da se na udaljenosti od 15 km nalazi fabrika cementa u Beočinu, više koncentracije kalcijuma i magnezijuma u medu u Suseku mogu biti posledica veće izloženosti pčela jedinjenjima Ca i Mg, kao posledica tretmana poljoprivrednog zemljišta i mogućeg prisustva čestica cementnog klinkera i gipsa u okruženju.

7. ZAKLJUČCI

Cilj ove disertacije je bio da se analizom niza biohemijskih i fizioloških parametara kod medonosne pčele *Apis mellifera* L. isprati biološki odgovor pčela na različite faktore sredine i da se proceni stanje pčelinjih zajednica tokom letnjeg i zimskog perioda na više različitih lokaliteta tj. staništa sa različitim antropogenim uticajem.

Rezultati laboratorijskih akutnih testova toksičnosti subletalnih koncentracija pesticida su pokazali da:

- Izlaganje pčela subletalnim dozama tiakloprida i klotianidina izaziva povećanje aktivnosti acetilholinesteraze u odnosu na kontrolnu grupu. Kao posledica vezivanja neonicotinoidnih pesticida za acetilholinske receptore dolazi do njihove ireverzibilne blokade. Posledično, dolazi do nakupljanja acetilholina u holinergičkim sinapsama i stimulacije enzima acetilholinesteraze u tipičnom supstrat-enzim ćelijskom odgovoru.
- Akutni tretman subletalnim dozama tiakloprida i klotianidina izaziva promene u aktivnosti glavnih antioksidativnih enzima. Zapaženo je statistički značajno povećanje aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze nakon tretmana subletalnim dozama klotianidina što ukazuje na indukciju enzimske antioksidativne zaštite kod medonosne pčele. Dok su subletalne doze neonicotinoida značajno snizile aktivnost glutation *S*-transferaze u odnosu na kontrolnu grupu.
- Kratkoročno izlaganje subletalnim dozama tiakloprida i klotianidina indukuje sintezu redukovanog glutationa i značajno povećava koncentraciju –SH grupa (samo kod pčela tretiranih klotianidinom) što povećava koncentraciju esencijalnih tiola u pčelama, koji podležu redoks reakcijama i tako održavaju neophodnu tiol-disulfid ravnotežu u ćelijama. Koncentracija malondialdehida je takođe bila povećana kod tretiranih pčela, što ukazuje na oksidativna oštećenja lipidnih struktura, te zaključujemo da izlaganje neonicotinoidnim pesticidima indukuje oksidativni stres.
- Akutni tretman tiaklopridom i klotianidinom statistički značajno snižava aktivnost fenol oksidaze i njenog prekursora profenol oksidaze, što ukazuje na supresiju humoralnog imunog odgovora medonosne pčele.
- Dobijeni rezultati ukazuju na narušenu neurotransmisiju, na izmene u aktivnosti antioksidativnih enzima i redoks statusa u ćeliji, kao i na imunosupresiju. Možemo reći da set ispitivanih biomarkera medonosne pčele predstavlja relevantne parametre za biomonitoring prisustva insekticida u životnoj sredini, tj. procenu stanja medonosnih pčela.

Na osnovu analize stanja pčelinjih zajednica pod uticajem različitih faktora, sa ciljem procene eventualnih razlika u biohemijskom odgovoru medonosne pčele u zavisnosti od starosti pčela, sezone godine i tipa pčelinjaka, možemo zaključiti:

- Starost pčela može uticati na promene u aktivnostima antioksidativnih enzima, uzimajući u obzir povećanje aktivnosti katalaze i glutation *S*-transferaze kod starijih u odnosu na mlade pčele iz stacionarnog pčelinjaka u Petrovaradinu. S obzirom da se temporalni polietizam delom bazira na fiziološkim razlikama između pčela radilica, očekivane su razlike u biohemijskim i fiziološkim parametrima kojima opisujemo stanje medonosne pčele. Stoga, pri analizi stanja medonosne pčele, treba uzeti u obzir starost pčela da bi uzorak bio reprezentativan.
- Sezonske promene tokom godine, koje uslovljavaju smenu letnjih kratkoživećih pčela sa zimskim dugoživećim pčelama, praćene su razlikama u aktivnosti acetilholinesteraze, enzima antioksidativne zaštite i markera lipidne peroksidacije kod pčela radilica. Generalno niže aktivnosti antioksidativnih enzima kod zimskih pčela ukazuju na niži nivo antioksidativne zaštite, što se može povezati sa smanjenom produkcijom ROS/RNS tokom zime, tj. nižim nivoom oksidativnog stresa. To potvrđuju i niži nivoi malondialdehida kod zimskih pčela, ukazujući na niži nivo oksidativnih oštećenja kod pčela tokom zime.
- Razlike u gajenju pčela u zavisnosti od vrste pčelinjaka, tj. da li su pčele u stacionarnom ili migratornom pčelinjaku, praćene su promenama u biohemijskim i fiziološkim parametrima tj. zabeležene su niže aktivnosti acetilholinesteraze i povećana aktivnost glutation *S*-transferaze u migratornim pčelinjacima kod letnjih i zimskih pčela. Međutim, značajne razlike se zapažaju u vrednostima analiziranih parametara i između dva migratorna pčelinjaka, što ukazuje na postojanje drugih dominantnih faktora, najčešće ishrane, koja može uticati na nivo oksidativnog stresa kod pčela.
- Uzimajući u obzir dobijene rezultate, koji ukazuju na postojanje značajnih razlika između pčelinjih kolonija u zavisnosti od starosti pčela, sezone godine i tipa pčelinjaka, dalje analize su izvedene na starijim pčelama radilicama, uzorkovanim sa stacionarnih pčelinjaka tokom zimskog i letnjeg perioda.

Rezultati analize uticaja sezonskih promena na stanje pčelinjih zajednica u Beogradu, Suseku i Zajači, doveli su do sledećih saznanja:

- Relativna ekspresija gena za najznačajnije enzime antioksidativne zaštite (geni *Sod1* za Cu,ZnSOD i *Sod2* za MnSOD; gen *Cat* za CAT; geni *GstS1* za σ -klasu GST, *GstD1* za δ -klasu GST i *GstMic1* za mikrozomalnu GST), praćena u pčelama tokom zimskog perioda, ukazuje na sniženu ekspresiju navedenih gena krajem zime u odnosu na početak zimskog perioda mirovanja za sve tri lokacije. Može se zaključiti da veliko ulaganje u ekspresiju navedenih gena, krajem životnog veka zimskih pčela, nije strategija za preživljavanje pčelinje kolonije.

- Aktivnosti antioksidativnih enzima su više krajem zime, u odnosu na početak perioda mirovanja, što može biti posledica povećanja ekspresije gena za antioksidativne enzime kod pčela sa početka zimskog perioda. Izuzetak je niža aktivnost superoksid dismutaze krajem zime u homogenatima pčela u Zajači, verovatno kao posledica zagađenja sredine olovom. Povećan nivo antioksidativne zaštite kod starijih zimskih pčela ima ulogu u njihovoj zaštiti od povećane produkcije ROS i oksidativnih oštećenja, koji su u vezi sa starenjem. Poređenjem letnjeg i zimskog perioda, aktivnosti enzima su više tokom leta, ukazujući na viši nivo antioksidativne zaštite kod letnjih pčela. Izuzetak imamo u Beogradu i Suseku samo krajem zime, kada imamo porast aktivnosti enzima, te su zabeležene vrednosti slične onima kod letnjih pčela.
- Koncentracija malondialdehida u homogenatima pčela je ukazala na najviše nivoe oksidativnog oštećenja krajem zimskog perioda mirovanja, što može biti posledica akumulacije oksidativnih oštećenja kojom se objašnjava oksidativna teorija starenja, kao i povećane aktivnosti pčela koje u februaru i martu počinju sa aktivnostima van košnice.
- Zapažene su promene u neurotransmisiji holinergičkog tipa tokom sezone, sa višim aktivnostima acetilholinesteraze kod pčela krajem zime i tokom leta, što možemo povezati sa aktivnostima pčela van košnice. Razvoj moždanih centara koji su uključeni u spoznaju i povezivanje specifičnih mirisa i slika, izražen je kod pčela sakupljačica i praćen aktivacijom holinergičkih receptora. Takođe, tada se povećava se i izloženost pčela brojnim zagađujućim materijama u okruženju, te promene u aktivnosti enzima mogu biti uslovljene i specifičnostima analiziranih lokaliteta.
- Imuni odgovor medonosne pčele, koji je praćen tokom godine, ukazuje da se tokom ontogenije pčela povećava aktivnost fenol oksidaze, ključnog enzima u individualnom imunom odgovoru, te je aktivnost enzima i/ili proenzima viša kod starijih zimskih pčela. Aktivnost glukoza oksidaze u hemolimfi pčela, koja je bila viša tokom zime u odnosu na leto, u Suseku i Zajači je ukazala je na viši nivo antiseptične zaštite kod zimskih pčela, koja doprinosi prevenciji zaraze na nivou grupe, dok u Beogradu nije bilo promena u aktivnosti enzima tokom godine.
- Uočene su sezonske promene u količini masnog tela, kao ključnog organa u metabolizmu nutrijenata i energije. Najmanje količine masnog tela su zabeležene krajem zime u pčelama u Beogradu i Suseku, značajno niže u odnosu na letnji aktivni period, ukazujući na očekivano niske energetske rezerve u starijim zimskim pčelama, dok količina masnog tela u pčelama iz Zajače nije značajno varirala u zavisnosti od sezone.
- Sastav masnih kiselina iz triacilglicerola masnog tela medonosne pčele čini 14 masnih kiselina sa 14 – 26 ugljenikovih atoma, od kojih su najzastupljenije palmitinska 16:0, oleinska 18:1(9) i α -linolenska 18:3(9,12,15), čineći oko 80 %

od ukupnog sastava masnih kiselina u pčelama iz Beograda, Suseka i Zajače. Oleinska 18:1(9) kiselina predstavlja dominantnu komponentu u ukupnom sadržaju masnih kiselina u masnom telu pčela sa sve tri lokacije, tokom svakog perioda.

- Zapaženo je značajno povećanje procentualnog udela zasićenih masnih kiselina u masnom telu pčela krajem zime ili tokom leta u odnosu na početak zime tj. sa sezonski većim temperaturama tokom godine povećava se i sadržaj zasićenih masnih kiselina. Udeo nezasićenih masnih kiselina u masnom telu pčela tokom godine je imao obrnut prikaz u odnosu na zasićene, tj. sa sezonskim smanjenjem temperature početkom zime, značajno se povećava sadržaj nezasićenih masnih kiselina. Od ukupnog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, najveći udeo mononezasićenih masnih kiselina prisutan je u pčelama početkom zime, dok su polinezasićene masne kiseline, zajedno sa zasićenim, najvećim delom zastupljene u pčelama krajem zime i tokom leta.
- Analizom profila ugljovodonika u homogenatima celih pčela, identifikovana su četiri dugolančana ugljovodonika tj. *n*-alkana sa neparnim brojem ugljenikovih atoma: trikozan (C₂₃), pentakozan (C₂₅), heptakozan (C₂₇) i nonakozan (C₂₉). Najniži sadržaj ukupnih ugljovodonika je zabeležen početkom zime, dok se sa sezonski većim temperaturama, krajem zime i u aktivnom periodu, sadržaj ugljovodonika povećavao. Možemo pretpostaviti da je niži nivo ugljovodonika još jedna fiziološka karakteristika zimskih pčela, vezana za njihovo ponašanje koje je znatno drugačije u odnosu na letnje pčele.
- Metabolomičkom analizom hemolimfe pčela detektovano je ukupno 154 jedinjenja, od kojih je identifikovano 125 metabolita, uključenih u 36 metaboličkih puteva. Kao najzastupljeniji metabolit u hemolimfi medonosne pčele izdvojila se trehaloza, praćena fruktozom i glukozom.
- Kao biomarkeri tj. metaboliti od značaja za razlikovanje letnjih i zimskih pčela izdvojili su se glicerol i monoacilgliceroli, gliceril-stearat i gliceril-palmitat, u metabolizmu glicerolipida, zatim aminokiseline glicin, cistein, glutamin, fenilalanin, prolin i lizin. Svi navedeni metaboliti, izuzev glutamina, su zastupljeni sa značajno višim koncentracijama tokom leta u odnosu na kraj zime, što možemo povezati sa razlikama u dostupnosti hrane tokom godine, koja dalje utiče na metabolizam triacilglicerola tokom leta, kao i katabolizam proteina krajem zime, kada se aminokiseline koriste kao dodatni izvor energije.

Na osnovu rezultata analize stanja pčelinjih zajednica pod uticajem faktora sredine sa različitim antropogenim uticajem, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Aktivnost antioksidativnih enzima i stepen lipidne peroksidacije, izmerena u homogenatima i hemolimfi pčela, ukazala je na više nivoe oksidativnog stresa u Suseku i Zajači u odnosu na Beograd. Zagađenje olovom, koje je karakteristično

za Zajaču, može biti uzrok nižih aktivnosti antioksidativnih enzima, kao i povećanog stepena lipidne peroksidacije u pčelama u Zajači, dok je prisustvo pesticida, poreklom sa poljoprivrednih monokultura koje okružuju pčelinjak u Suseku, verovatno doprinelo višem nivou oksidativnog stresa u analiziranim pčelama.

- Značajno viša aktivnost acetilholinesteraze, zabeležena je u pčelama u Suseku i Zajači u odnosu na Beograd. Povećana aktivnost enzima izmerena u Zajači, može biti posledica visokog sadržaja olova u pčelama, dok za indukciju aktivnosti enzima u Suseku uzrok mogu biti neonikotinoide, kao pesticidi sa najvećom primenom u zaštiti useva.
- Sadržaj metala u pčelama i pergi ima približno jednak opseg koncentracija, sa izraženim razlikama u njihovoj zastupljenosti u zavisnosti od lokaliteta pčelinaka. U medu je zapažena znatno niža koncentracija (10–100 puta) svih analiziranih metala u odnosu na pčele i pergu.
- Možemo reći da svaka sredina nameće specifičan profil zagađenja, koji se odražava na sadržaj metala u pčelama i njihovoj hrani. U Beogradu su značajno više koncentracije Co, Cu, Fe i Na u pčelama, Ca, Cu, Mn i Ni u pergi, kao i Sr u svim uzorcima u odnosu na druga dva lokaliteta. Pčelinjak u Zajači se izdvaja po značajno višim koncentracijama Ba, Cd i Pb u svim uzorcima u odnosu na druga dva lokaliteta. U medu iz Zajače su zabeležene najviše koncentracije Al, Ba, Cd, Cr, Mn, Ni, Pb i Zn u odnosu na med iz Beograda i Suseka. Pčelinjak u Suseku se izdvaja sa značajno višim koncentracijama Ca i Mg u medu.
- Najviše aktivnosti fenol oksidaze i profenol oksidaze, koje su zabeležene u Suseku krajem zime, kao i u Zajači tokom leta, ukazale su na dobru imunokompetenciju analiziranih pčela. Aktivnost enzima glukoza oksidaze, odgovornog za antibakterijsku i antimikotičnu zaštitu meda i perge, tokom zime je bila najviša u hemolimfi pčela u Zajači, dok u letnjem aktivnom periodu nije bilo značajnih razlika između lokaliteta. Pčele iz Beograda se izdvajaju sa najnižim vrednostima za oba enzima.
- Analiza količine i lipidnog sastava masnog tela u pčelama sa različitih lokaliteta je ukazala je na značajne efekte sredinskih faktora. Generalno, pčele iz Suseka su se izdvojile sa najvećom masom masnog tela, u odnosu na druga dva lokaliteta, što ukazuje na dobre nutritivne i energetske rezerve u pčelama tokom zime i leta. Manje količine masnog tela, izmerene u pčelama u Beogradu i Zajači, mogu se povezati sa multiplim stresogenim faktorima karakterističnim za urbanu i industrijsku sredinu koji dalje pokreću koordinisani fiziološki odgovor pčela na stres, praćen povećanim iskorišćenjem rezervi masnog tela.
- Značajno viši udeo zasićenih masnih kiselina početkom zime i tokom leta je zabeležen u masnom telu pčela iz Suseka, a krajem zime kod pčela iz Zajače u

odnosu na druge lokalitete. Pčele iz Beograda karakteriše značajno viši udeo nezasićenih masnih kiselina u masnom telu tokom sva tri perioda. Zabeležene varijacije u stepenu zasićenosti masnih kiselina u masnom telu pčela možemo delom pripisati razlikama u ishrani pčela na analiziranim pčelinjacima tj. floralnoj raznovrsnosti ispitivanih lokaliteta.

- Zabeležene su razlike u relativnoj zastupljenosti četiri *n*-alkana, identifikovana u homogenatima pčela iz Beograda ($C_{29}>C_{27}>C_{25}>C_{23}$), Suseka ($C_{27}>C_{29}>C_{25}>C_{23}$) i Zajače ($C_{27}>C_{23}>C_{29}>C_{25}$). U Beogradu je najzastupljeniji nonakozan (C_{29}), dok je heptakozan (C_{27}) najzastupljeniji u uzorcima pčela iz Suseka i Zajače.
- Pčele iz Beograda imaju značajno niži sadržaj ukupnih ugljovodonika u odnosu na pčele iz Suseka, dok su se pčele iz Zajače izdvojile krajem zime sa najvišim vrednostima. Zabeležene razlike u ukupnom sadržaju ugljovodonika u pčelama sa različitih lokaliteta, možemo pripisati genetski uslovljenom razvoju, dok su razlike u zastupljenosti pojedinačnih *n*-alkana verovatno rezultat uticaja sredinskih faktora, specifičnih za Beograd, Susek i Zajaču.

Opstanak populacije u ekosistemu zavisi od odgovora jedinki unutar populacije na raznovrsne uslove sredine, te upravo detekcija mehanizama i promena u biohemijskom i fiziološkom odgovoru jedinki unutar populacije može obezbediti rani nagoveštaj prisustva stresogenih faktora sredine. Definisane uzročno–posledične veze između kvaliteta životnog okruženja i odgovora populacije doprinosi njenoj zaštiti i pre nego što nastupi kolaps u veličini populacije. Rezultati naše studije pružaju dobru osnovu za dalja ispitivanja biološkog odgovora medonosne pčele, u pogledu uticaja faktora okruženja, a time i dalje definisanje odgovarajućih mera zaštite pčelinjih zajednica.

8. LITERATURA

Abdelkader, F.B., Kairo G., Bonnet M., Barbouche N., Belzunces L.P., Brunet J.L. (2019) Effects of clothianidin on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in honey bee drone semen, *Journal of Apicultural Research* 58(5): 740-745. DOI: 10.1080/00218839.2019.1655182

Aebi H. (1974) Catalase. In: Bergmayer H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, USA.

Ahmad S. (1992) Biochemical defense of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemical Systematics and Ecology* 20: 269-296.

Aizen M.A., Harder L.D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology* 19: 915–918.

Alaux C., Ducloz F., Crauser D., Le Conte Y. (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biological Letters* 6: 562–565.

Albert S., Kludiny J. (2004) The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. *Journal of Insect Physiology* 50: 51–59.

Aliferis K.A., Copley T., Jabaji S. (2012) Gas chromatographymass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Insect Physiology* 58: 1349–1359.

Al-Khashman O.A. (2013) Assessment of heavy metals contamination in deposited street dusts in different urbanized areas in the city of Ma'an, Jordan. *Environmental Earth Sciences* 70: 2603-2612.

Amdam G.V., Simões Z.L.P., Hagen A., Norberg K., Schrøder K., Mikkelsen Ø., Kirkwood T.B., Omholt, S. W. (2004) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology* 39: 767–773.

Anderson D., East I.J. (2008) The latest buzz about colony collapse disorder. *Science* 319: 724–725.

Andrić S., Kostić T., Andrić N., Zorić S. (2005) *Uporedna fiziologija životinja*. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, R. Srbija.

Antúnez K., Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P., Higes M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* 11: 2284–2290.

Arathi H.S., Burns I., Spivak M. (2000) Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): behavioral repertoire of hygienic bees. *Ethology* 106: 365–379.

Archer C.R., Pirk C.W.W., Wright G.A., Nicolson S.W. (2014) Nutrition affects survival in African honeybees exposed to interacting stressors. *Functional Ecology* 28: 913–923.

Arien Y., Dag A., Zarchin S., Masci T., Shafir S. (2015) Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 15761-15766.

Arrese E.L., Soulages J.L. (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* 55: 207–225.

Ascher J.S., Pickering J. (2014) Discover Life – bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea). http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species

Ashida M., Brey P.T. (1997) Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: Brey P.T., Hultmark D. (Eds.), *Molecular mechanisms of immune responses in insects*. Chapman & Hall, London, pp. 135-172.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2004) Toxicological profile for Strontium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2007) Toxicological profile for Barium. Atlanta, GA, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Aucoin R.R., Philogène B.J.R., Arnason J.T. (1991) Antioxidant enzymes as biochemical defenses against phototoxin-induced oxidative stress in three species of herbivorous Lepidoptera. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 16: 139–152.

Aurori C.M., Buttstedt A., Dezmirean D.S., Mărghițaș L.A., Moritz R.F., Erler S. (2014) What is the main driver of ageing in long-lived winter honeybees: Antioxidant enzymes, innate immunity, or vitellogenin? *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 69: 633–639.

Ayala A., Munoz M.F., Arüelles S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 360438.

Badawy M.E.I., Nasr H.M., Rabea E.I. (2015) Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. *Apidologie* 46: 177-193.

Badiou A., Meled M., Belzunces L.P. (2008) Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase – a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 246-253.

Badiou-Bénéteau, A., Carvalho S.M., Brunet J-L., Carvalho G.A., Buleté A., Giroud B., Belzunces L.P. (2012) Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 82, 22-31.

Bailey L., Ball B.V. (1991) *Honey Bee Pathology*. 2nd ed. London: Academic, London, United Kingdom, pp. 208.

Bankova V., de Castro S., Marcucci M. (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31: 3–15.

Bargańska Ž., Ślebioda M., Namieśnik J. (2015) Honey bees and their products - bioindicators of environmental contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 46: 235-248.

Bastos E., Simone M., Jorge D., Soares A., Spivak M. (2008) In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 273–81.

Beaulieu M., Costantini D (2014) Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conservation Physiology* 2: 2014, cou014.

Becker A., Schloder P., Steele J.E., Wegener G. (1996) The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 52: 433–439.

Beekman M., Ratnieks F.L.W. (2000) Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology* 14: 490-496.

Biesmeijer J.C., Roberts S.P.M., Reemer M., Ohlemüller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A.P., Potts S.G., Kleukers R., Thomas C.D., Settele J., Kunin W.E. (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313: 351-354.

Birben E., Sahiner, U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* 5: 9-19.

Blatt J., Roces F. (2001) Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and *in vivo* measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *Journal of Experimental Biology* 204: 2709–2716.

Block K., Gorin Y., Abboud H.E. (2009) Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 14385-14390.

Blomquist G.J., Chu A.J., Remaley S. (1980) Biosynthesis of wax in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Insect Biochemistry* 10: 313-321.

Boecking O., Spivak M. (1999) Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30: 141–58.

Bogdanov S. (2006) Contaminants of bee products. *Apidologie* 37: 1-18.

Boily M., Sarrasin B., DeBlois C., Aras P., Chagnon M. (2013) Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 5603–5614.

Boman H.G. (1991) Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 65: 205-207.

Boman H.G. (2003) Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine* 254: 1014–1018.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–54.

Brandt A., Gorenflo A., Siede R., Meixner M., Büchler R. (2016) The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 86: 40–47.

Breeze T.D., Vaissière B.E., Bommarco R., Petanidou T., Seraphides N., Kozák L., Scheper J., Biesmeijer J.C., Kleijn D., Gyldenkerne S., Moretti M., Holzschuh A., Steffan-Dewenter I., Stout J.C., Pärtel M., Zobel M., Potts S.G. (2014) Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS ONE* 9: e82996.

Brey P.T., Lee W.J., Yamakawa M., Koizumi Y., Perrot S., Francois M., Ashida M. (1993) Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 6275-6279.

Brodtschneider R., Crailsheim K. (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278-294.

Brown M.J.F., Moret Y., Schmid-Hempel P. (2003) Activation on host constitutive immune defence by an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. *Parasitology* 126: 253-260.

Brudzynski K. (2006) Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 1228–1237.

Bruno E.J.Jr., Ziegenfuss T.N., Landis J. (2006) Vitamin C: research update. *Current Sports Medicine Reports* 5: 177-181.

Bucekova M., Valachova I., Kohutova L., Prochazka E., Klaudivy J., Majtan J. (2014) *Naturwissenschaften* 101: 661-670.

Bujok B., Kleinhenz M., Fuchs S., Tautz J. (2002) Hot spots in the bee hive. *Naturwissenschaften* 8: 229–301.

Bursell E. (1981) The role of proline in energy metabolism. In: Downer R. (Ed.), *Energy Metabolism in Insects*. New York: Plenum, pp. 135-154.

Candy D.J., Kilby B.A. (1975) *Insect biochemistry and function*. Springer: Dordrecht, Netherlands.

Cantwell G.E. (1970) Standard Methods for Counting Nosema Spores. *American Bee Journal*, 110: 222-223.

Carlsson A., Engstrom P., Palva E.T., Bennich H. (1991) Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription. *Infection and Immunity* 59: 3040.

Carvalho, S.M., Belzunces L.P., Carvalho G.A., Brunet J-L., Badiou-Bénéteau (2013) Enzymatic biomarkers as tool to assess environmental quality: A case study of exposure of the honey bee *Apis mellifera* to insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 2117-2124.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. (1993) Functional and chemical of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry* 268: 7044-7054.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaek M., Tempst P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO Journal* 8: 2387-2391.

Casteels P., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. (1990) Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* 187: 381-386.

Casteels-Jonsson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P. (1994) Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire posttranslational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry* 269: 28569-28575.

Castillo J.C., Robertson A.E., Strand M.R. (2006) Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 891-903.

Celli G., Maccagnani B. (2003) Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* 56: 137-139.

Cerenius L., Soderhall K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198: 116-126.

Cerkowniak M., Ostachowska A., Słocińska M., Rosiński G., Stepnowski P., Gołębiowski M. (2015) The influence of hormones on the lipid profile in the fat body of insects. *Invertebrate Survival Journal* 12: 225-232.

Chambers M.C., Song K.H., Schneider D.S. (2012) *Listeria monocytogenes* infection causes metabolic shifts in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 7: e50679.

Chong J., Wishart D.S., Xia J. (2019) Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics* 68: e86.

Christe P., Oppliger A., Bancalà F., Castella G., Chapuisat M. (2003) Evidence for collective medication in ants. *Ecology Letters* 6: 19-22.

Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. (1993) Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *Journal of Biological Chemistry* 268: 2571-2576.

Clark K.D., Witherell A., Strand M.R. (1998) Plasmatocyte spreading peptide is encoded by an mRNA differentially expressed in tissues of the moth *Pseudoplusia includens*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 250: 479-485.

Claudianos C., Ranson H., Johnson R.M., Biswas S., Schuler M.A., Berenbaum M.R., Feyereisen R., Oakeshott J.G. (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology* 15: 615-636.

Colinet H., Renault D. (2012) Metabolic effects of CO₂ anaesthesia in *Drosophila melanogaster*. *Biology Letters* 8: 1050–1054.

Collins A.M., Williams V., Evans J.D. (2004) Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 13: 141-146.

Comhair S.A., Bhatena P.R., Farver C., Thunnissen F.B., Erzurum S.C. (2001) Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *FASEB Journal* 15: 70–78.

Conti M.E., Botrè F. (2001) Honeybees and their products as potential bioindicators of heavymetals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment* 69: 267–282.

Coquin L., Feala J.D., McCulloch A.D., Paternostro G. (2008) Metabolomic and flux-balance analysis of age-related decline of hypoxia tolerance in *Drosophila* muscle tissue. *Molecular Systems Biology* 4: 233.

Corby-Harris V., Snyder L., Meador C. (2019) Fat body lipolysis connects poor nutrition to hypopharyngeal gland degradation in *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 116: 1–9.

Corona M., Robinson G.E. (2006) Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology* 15: 687-701.

Costantini D. (2019) Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead. *Journal of Experimental Biology* 222: jeb194688.

Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan F-L., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., vanEngelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S., Lipkin W.I. (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283-287.

Crane E. (1984) Bees, honey and pollen as indicators of metals in the environment. *Bee World* 55: 47-49.

Cremer S., Armitage S., Schmid-Hempel P. (2007) Social immunity. *Current Biology* 17: R693-R702.

Cutler C.G., Scott-Dupree C.D., Sultan M., McFarlane A.D., Brewer L. (2014) A large-scale field study examining effects of exposure to clothianidin seed-treated canola on honey bee colony health, development, and overwintering success. *Peer J* 2: e652.

Čolović M.B., Krstić D.Z., Lazarević-Pašti T.D., Bondžić A.M., Vasić V.M. (2013) Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* 11: 315-335.

Cvačka J., Hovorka O., Jiroš P., Kindl J., Stránský K., Valterová I. (2006) Analysis of triacylglycerols in fat body of bumblebees by chromatographic methods. *Journal of Chromatography A* 1101: 226-237.

Daffre S., Kylsten P., Samakovlis C., Hultmark D. (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract *Molecular Genetics and Genomics* 242: 152.

Dainat B., Evans J.D., Chen Y.P., Gauthier L., Neumann P. (2012) Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS ONE* 7: e32151.

Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329: 23-38.

Davies M.J. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 305: 761-770.

Dean R.T., Roberts C.R., Jessup W. (1985) Fragmentation of extracellular and intracellular polypeptides by free radicals. *Progress in Clinical and Biological Research* 180: 341–350.

DeGrandi-Hoffman G., Chen Y. (2015) Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 10: 170–176.

Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15: 316–328.

Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. (2007) Mass-spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Review* 26: 51-78.

Dettmer K., Hammock B.D. (2004) Metabolomics—A new exciting field within the “omics” sciences. *Environmental Health Perspectives* 112: A396–397.

Derecka K., Blythe M.J., Malla S., Genereux D.P., Guffanti A., Pavan P., Moles A., Snart C., Ryder T., Ortori C.A., Barrett D.A., Schuster E., Stöger R. (2013) Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *PLoS ONE* 8: e68191.

Di Prisco G., Cavaliere V., Annoscia D., Varricchio P., Caprio E., Nazzi F., Gargiulo G., Pennacchio F. (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 18466–18471.

Donaldson J., Nänni I., Zachariades C., Kemper J. (2001) Effects of habitat fragmentation on pollinator diversity and plant reproductive success in Renosterveld scrublands of South Africa. *Conservation Biology* 16: 1267–1276.

Doums C., Schmid-Hempel P. (2000) Immunocompetence in workers of a social insect, *Bombus terrestris* L., in relation to foraging activity and parasitic infection. *Canadian Journal of Zoology* 78: 1060-1066.

Dourado D.F., Fernandes P.A., Ramos M.J. (2008) Mammalian cytosolic glutathione transferases. *Current Protein and Peptide Science* 9: 325-337.

Duong T.T., Lee, B.K. (2011) Determining contamination level of heavy metals in road dust from busy traffic areas with different characteristics. *Journal of Environmental Management* 92: 554-562.

Dussaubat C., Brunet J.-L., Higes M., Coulburne J.K., Lopez J., Choi J.-H., Martín-Hernández R., Botías C., Cousin M., McDonnell C., Bonnet M., Belzunces L.P., Moritz R.F.A., Le Conte Y., Alaux C. (2012) Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7(5): e37017.

Döke M.A., Frazier M., Grozinger C.M. (2015) Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science*, 10: 185-193.

E.P.P.O. Report (2001) Test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honeybees. *EPPO Bulletin* 31: 323-330.

El-Agamey A., Lowe G.M., McGarvey D.J., Mortensen A., Phillip D.M., Truscott T.G. (2004) Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 430: 37-48.

Ellman G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr.V., Featherstone R.M. (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.

Enayati A.A., Ranson H., Hemingway J. (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14: 3-8.

Engel M.S. (1999) The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae: *Apis*). *Journal of Hymenoptera Research* 8: 165-196.

Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N. (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1: 529-539.

Esterbauer H., Cheeseman K.H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186: 407-421.

Esterbauer H., Eckl P., Ortner A. (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation Research* 238: 223-233.

European Commission (2013) Regulation (EU) No 485/2013. *Official Journal of the European Union* 139: 12-14.

European Food Safety Authority (EFSA) (2014) Towards an integrated environmental risk assessment of multiple stressors on bees: review of research projects in Europe, knowledge gaps and recommendations. *EFSA Journal* 12: 3594, 102 pp.

European Food Safety Authority (EFSA) (2015) Horizon 2020: EFSA's priority research topics. *EFSA supporting publication 2015, EN-0727*.

Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.-L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 15: 645–656.

Evans J.D., Schwartz R.S., Chen Y.P., Budge G., Cornman R.S., DeLa Rúa P., DeMiranda J.R., Foret S., Foster L., Gauthier L., Genersch E., Gisder S., Jarosch A., Kucharski R., Lopez D., Lun C.M., Moritz R.F.A., Maleszka R., Muñoz I., Pinto M.A. (2013) Standard methodologies for molecular research in *Apis mellifera*. In: Dietemann V., Ellis J.D., Neumann P. (Eds.) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research*. *Journal of Apicultural Research* 52(4): (2013).

Farooqui T. (2012) Review of octopamine in insect nervous systems. *Open Access Insect Physiology* 4: 1-17.

Felton G (1995): Antioxidant defenses of invertebrates and vertebrates. In: Ahmad S. (Ed.), *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. New York: Chapman & Hall, pp. 356-434.

Felton G.W., Summers C.B. (1995) Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 29: 187-197.

Feroli F., Armaforte E., Caboni M.F. (2014) Comparison of the lipid content, fatty acid profile and sterol composition in local Italian and commercial royal jelly samples. *Journal of the American Oil Chemists Society* 91: 875–884.

Fiehn O. (2002) Metabolomics—The link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155-171.

Fluri P., Bogdanov, S. (1987) Effects of artificial shortening of the photoperiod on honeybee (*Apis mellifera*) polyethism. *Journal of Apiculture Research* 26: 83–89.

Foley J.A., De Fries R., Asner G.P., Barford C., Bonan G., Carpenter S.R., Chapin F.S., Coe M.T., Daily G.C., Gibbs H.K., Helkowski J.H., Holloway T., Howard E.A., Kucharik C.J., Monfreda C., Patz J.A., Prentice I.C., Ramankutty N., Snyder P.K. (2005) Global consequences of land use. *Science* 309: 570–574.

Ford K.A., Gulevich A.G., Swenson T.L., Casida J.E. (2011) Neonicotinoid insecticides: Oxidative stress in planta and metallooxidase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 4860-4867.

Francis B.R., Blanton W.E., Littlefield J.L., Nunamaker R.A. (1989) Hydrocarbons of the cuticle and hemolymph of the adult honey bee (Hymenoptera, Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* 82: 486-494.

Frasco M.F., Fournier D., Carvalho F., Guilhermino L. (2005) Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* 10: 360–375.

Free J.B., Spencer-Booth Y. (1959): The longevity of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London, Series A, General Entomology* 34: 141-150.

Frias B.E.D., Barbosa C.D., Lourenço A.P. (2016) Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidologie* 47: 15–25.

Fukuda H., Sakagami S.F. (1968) Worker brood survival in honeybees. *Research on Population Ecology* 10: 31–39.

Fürst M.A., McMahon D.P., Osborne J.L., Paxton R.J., Brown M.J.F. (2014) Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* 506: 364–366.

Furusawa T., Rakwal R., Nam H.W., Shibato J., Agrawal G.K., Kim Y.S., Ogawa Y., Yoshida Y., Kouzuma Y., Masuo Y., Yonekura M. (2008) Comprehensive royal jelly (RJ) proteomics using one- and two-dimensional proteomics platforms reveals novel RJ proteins and potential phospho/glycoproteins. *Journal of Proteome Research* 7: 3194–3229.

Gallo V., Chittka L. (2018) Cognitive Aspects of Comb-Building in the Honeybee? *Frontiers in Psychology* 9: 900.

Gätschenberger H., Azzami K., Tautz J., Beier H. (2013) Antibacterial immune competence of honey bees (*Apis mellifera*) is adapted to different life stages and Environmental Risks. *PLoS ONE* 8: e66415.

Gauthier M., Aras P., Paquin J., Boily M (2018) Chronic exposure to imidacloprid or thiamethoxam neonicotinoid causes oxidative damages and alters carotenoid-retinoid levels in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Scientific Reports* 8: 16274.

Genersch E., von der One W., Kaatz H., Schroeder A., Otten C, Büchler R., Berg S., Ritter W., Mühlen W., Gisder S., Meixner M., Liebig G., Rosenkranz P. (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41: 332–352.

Gerschenfeld H.M. (1973) Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiological Reviews* 53: 1–119.

Ghini S, Fernández M, Picó Y, Marín R, Fini F, Mañes J, Girotti S (2004) Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47: 479–488.

Gillespie J.P., Kanost M.R., Trenczeck T. (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42: 611–643.

Gisder S., Genersch E. (2015) Special Issue: Honey bee viruses. *Viruses* 7: 5603–5608.

Giurfa M. (2013) Cognition with few neurons: higher-order learning in insects. *Trends in Neurosciences* 36: 285–294.

Glauert H.P. (2007) Vitamin E and NF-kappaB activation: a review. *Vitamins and Hormones* 76: 135–153.

Godfrey S.S., Bull C.M., Murray K., Gardner M.G. (2005) Transmission mode and distribution of parasites among groups of the social lizard *Egernia stokesii*. *Parasitology Research* 99: 223–230.

González-Varo J.P., Biesmeijer J.C., Bommarco R., Potts S.G., Schweiger O., Smith H.G., Steffan-Dewenter I., Szentgyörgyi H., Woyciechowski M., Vilà M. (2013) Combined effects of global change pressures on animal-mediated pollination. *Trends in Ecology & Evolution* 28: 524–530.

Goulson D (2013) An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology* 50: 977–987.

Goulson D., Nicholls E., Botías C., Rotheray E.L. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347: 1255957.

Gregorc A., Alburaki M., Rinderer N., Sampson B., Knight P.R., Karim S., Adamczyk J. (2018) Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. *Scientific Reports* 8: 15003.

Grubor-Lajšić G., Blok W., Jovanović A., Worland R. (1996) Antioxidant enzymes in the Antarctic fly, *Belgica antarctica*. *Cryo-Letters* 17: 39-42.

Grünewald B., Siefert P. (2019) Acetylcholine and its receptors in honeybees: Involvement in development and impairments by neonicotinoids. *Insects* 10: 420.

Hagib W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) Glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.

Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* 35: 1147-1150.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed., Oxford University Press, New York.

Halliwell, B. (2001) *Free Radicals and other reactive species in Disease*. Encyclopedia of life sciences, National University of Singapore, Singapore.

Halm M.P., Rortais A., Arnold G., Taséi J.N., Rault S. (2006) New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environmental Science and Technology* 40: 2448-2454.

Hammer M. (1993) An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59–63.

Hammer M., Menzel R. (1995) Learning and memory in the honeybee. *Journal of Neurobiology* 15: 1617–1630.

Hara S., Yamakawa M. (1995) A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemical Journal* 310: 651-656.

Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 11(3): 298-300.

Harrison T., Winfree R. (2015) Urban drivers of plant-pollinator interactions. *Functional Ecology* 29: 879–888.

Hazel J.R. (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Review of Physiology* 57: 19-42.

Heinrich B. (1980) Mechanisms of body-temperature regulation in honeybees, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology* 85: 61–87.

Heinrich B. (1985) The social physiology of temperature regulation in honeybees. In: Holldobler B., Lindauer M. (Eds.), *Experimental behavioral ecology and sociobiology*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp. 393–406.

Hendriksma H.P., Oxman K.L., Shafir S. (2014) Amino acid and carbohydrate tradeoffs by honey bee nectar foragers and their implications for plant-pollinator interactions. *Journal of Insect Physiology* 69: 56–64.

Hendriksma H.P., Shafir S. (2016) Honey bee foragers balance colony nutritional deficiencies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 70: 509–517.

Hepburn H.R., Bernard R.T.F., Davidson B.C., Muller W.J., Lloyd P., Kurstjens S.P., Vincent S.L. (1991) Synthesis and secretion of beeswax in honeybees. *Apidologie* 22: 21-36.

Herbert J., Elton W., Shimanuki H.S. (1978) Mineral requirements for brood-rearing by honeybees fed a synthetic diet. *Journal of Apicultural Research* 17: 118-122.

Hillyer J.F., Christensen B.M. (2002) Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Histochemistry and Cell Biology* 117: 431–440.

Hodgson E.K., Fridovich I. (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 14: 5294-5299.

Hoffmann J.A., Reichhart J-M., Hetru C. (1996) Innate immunity in higher insects. *Current Opinion in Immunology* 8: 8-13.

Honey Bee Genome Sequencing Consortium: Weinstock G., Robinson G., Gibbs R., Worley K., Evans J., Maleszka R. *et al.* (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931-49.

Honey Bee Health Coalition (2015) Tools for *Varroa* management, <https://honeybeehealthcoalition.org/>

Hughes J., Reay G., Watson J. (2014) Insecticide use on Scottish oilseed rape crops: historical use patterns and pest control options in the absence of neonicotinoid seed treatments. *Proceedings of Crop Protection in Northern Britain* 2014: 21–26.

Hummel, J., Strehmel, N., Selbig, J., Walther, D. and Kopka, J. (2010) Decision tree supported substructure prediction of metabolites from GC-MS profiles, *Metabolomics* 6: 322-333.

Ismail N., Robinson G.E., Fahrback S.E. (2006) Stimulation of muscarinic receptors mimics experience-dependent plasticity in the honey bee brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 207–211.

Jabis M.D., Ayers T.J., Allan G.J. (2011) Pollinator-mediated gene flow fosters genetic variability in a narrow alpine endemic, *Abronia alpina* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* 98: 1583–1594.

Jakobsson P-J, Morgenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A., Persson B. (1999) Common structural features of MAPEGda widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Science* 8: 689-692.

Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A. (2011) Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 2897–2908.

Jiang H., Wang Y., Ma C., Kanost M.R. (1997) Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 835–850.

Johnson B.R. (2010) Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64: 305-316

Johnson R.M. (2015) Honey bee toxicology. *Annual Review of Entomology* 60: 415–434.

Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A., Frazier M. (2010) Pesticides and honey bee toxicity-USA. *Apidologie* 41: 312–331.

Jones J.C., Hellweill P., Beekman M., Maleszka R., Oldroyd B.P. (2005) The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology* 191: 1121–1129.

Jung S.H., Evans C.J., Uemura C., Banerjee U. (2005) The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132: 2521–2533.

Kaim W., Schwederski B., Klein A. (2013) *Bioinorganic chemistry: Inorganic elements in the chemistry of life*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, United Kingdom.

Kamleh M.A., Hobani Y., Dow J.A.T., Watson D.G. (2008) Metabolomic profiling of *Drosophila* using liquid chromatography Fourier transform mass spectrometry. *FEBS Letters* 582: 2916-2922.

Kanzok S.M., Fechner A., Bauer H., Ulschmid J.K., Müller H.M., Botella-Munoz J., Schneuwly S., Schirmer R., Becker K. (2001) Substitution of the thioredoxin system for glutathione or thioredoxin reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 291: 643-646.

Kapoor U., Srivastava M.K., Srivastava L.P. (2011) Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food and Chemical Toxicology* 49: 3086-3089.

Katajamaa M., Miettinen J., Oresic M. (2006) MZmine: Toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*: btk039.10.1093/bioinformatics/btk039

Keck R.G. (1996) The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins. *Analytical Biochemistry* 236: 56–62.

Kelly F.J., Mudway I.S. (2003) Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids* 25: 375–396.

Kevan P.G. (2001) Pollination: a plinth, pedestal, and pillar for terrestrial productivity. The why, how, and where of pollination protection, conservation, and promotion. In: Stubbs C.S., Drummond F.A. (Eds.), *Bees and Crop Pollination – Crisis, Crossroads, Conservation*. Entomological Society of America – Thomas Say Publications in Entomology, Lanham, MD, pp. 7–68.

Key P.B., Fulton M.H. (2002) Characterization of cholinesterase activity in tissues of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72: 186-192.

Kim F.J., Kim H.P., Hah Y.C., Roe J.H. (1996) Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *European Journal of Biochemistry* 241: 178-185.

Kim H.Y., Gladyshev V.N. (2007) Methionine sulfoxide reductases: selenoprotein forms and roles in antioxidant protein repair in mammals. *Biochemical Journal* 407: 321-329.

Kim Y.H., Cha D.J., Jung J.W., Kwon H.W., Lee S.H. (2012) Molecular and kinetic properties of two acetylcholinesterases from the western honey bee, *Apis mellifera*. *PloS ONE* 7: e48838.

Klein A-M., Vaissière B.E, Cane J.H, Steffan-Dewenter I, Cunningham S.A, Kremen C., Tscharntke T. (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B* 274: 303–313.

Kleinhenz M., Bujok B., Fuchs S., Tautz H. (2003) Hot bees in empty broodnest cells: heating from within. *Journal of Experimental Biology* 206: 4217–4231.

Kojić D. (2009) Otpornost na niske temperature i dehidrataciju kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis* Hb) – ćelijski i molekularni odgovori. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, R. Srbija.

Kojić K.D., Purać S.J., Nikolić V.T., Orčić M.S., Vujanović D., Ilijević K., Vukašinović L.E., Blagojević P.D. (2019) Oxidative stress and the activity of antioxidative defense enzymes in overwintering honey bees. *Entomologia Generalis* 39: 33-44.

Kollmeyer W.D., Flattum R.F., Foster J.P., Powell J.E., Schroeder M.E., Soloway S.B. (1999). Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides. In: Yamamoto I., Casida J. (Eds.) *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 71-89.

Korayem A.M., Khodairy M.M., Abdel-Aal A.A., El-Sonbaty A.A.M. (2012) The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. *Journal of Biology and Earth Sciences* 2: B93–B109.

Kostal V., Simek P. (1998) Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols after cold-acclimation of an aestivating insect prepupa. *Journal of Comparative Physiology B* 168: 453-460.

Kremen C., Ricketts T. (2000) Global perspectives on pollination disruptions. *Conservation Biology* 14, 1226–1228.

Krishnan N., Kodrík D. (2006) Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *Journal of Insect Physiology* 52: 11-20.

Kunc M., Dobeš P., Hurychová J., Vojtek L., Beani Poiani S., Danihlík J., Havlík J., Titěra D., Hyršl P. (2019) The year of the honey bee (*Apis mellifera* L.) with respect to its physiology and immunity: a search for biochemical markers of longevity. *Insects* 10: 244.

Kwakman P.H.S, te Velde A.A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Zaat S.A.J. (2010) How honey kills bacteria. *FASEB Journal* 24: 2576–2582.

Kylsten P., Kimbrell D.A., Daffre S., Samakovlis C., Hulmark D. (1992) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: different genes are expressed in midgut and salivary glands. *Molecular Genetics and Genomics* 232: 335-343.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F. (1997) *Biomarqueurs en Ecotoxicologie*. Aspects Fondamentaux, Masson, Paris, p. 419.

Lalouette L., Williams C.M., Hervant F., Sinclair B.J., Renault D. (2011) Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 158: 229–234.

Lambert O., Piroux M., Puyo S., Thorin C., Larhantec M., Delbac F., Pouliquen H. (2012) Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environmental Pollution* 170: 254-259.

Lambeth J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* 4: 181-189.

Laughton A.M., Siva-Jothy M.T. (2011) A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 42: 140-149.

Laurino D., Porporato M., Patetta A., Manino A. (2011) Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bulletin of Insectology* 64: 107-113.

Lavine M.D., Strand M.R. (2001) Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology* 47: 965-974.

Lavine M.D., Strand M.R. (2002) Insect haemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295–1309.

Le Conte Y., Ellis M., Ritter W. (2010) Varroa mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? *Apidologie* 41: 353-363.

Lee F.J., Rusch D.B., Stewart F.J., Mattile H.R., Newton I.L.G. (2014) Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental Microbiology* 17: 796–815.

Lehane M.J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 42: 525–550.

Lemaitre B., Hoffmann J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25: 697-743.

Lenz E.M., Hagele B.F., Wilson I.D., Simpson S.J. (2001) High resolution ¹H NMR spectroscopic studies of the composition of the haemolymph of crowd- and solitary-reared nymphs of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 51-56.

Li C., Xu B., Wang Y., Yang Z., Yang W. (2014) Protein content in larval diet affects adult longevity and antioxidant gene expression in honey bee workers. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 151: 19-26.

Li G., Zhao H., Liu Z., Wang H., Xu B., Guo X. (2018) The wisdom of honeybee defenses against environmental stresses. *Frontiers in Microbiology* 9: 722.

Li H.M., Sun L., Mittapalli O., Muir W.M., Xie J., Wu J., Schemerhorn B.J., Jannasch A., Chen J.Y., Zhang F., Adamec J., Murdock L.L., Pittendrigh B.R. (2010) Bowman-Birk inhibitor affects pathways associated with energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology* 19: 303-313.

Li Y. (2011) *Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications*. Nova Science Publishers, Inc. New York.

Li Y., Zhu H., Trush M.A. (1999) Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenin and luminol. *Biochimica et Biophysica Acta* 1428: 1-12.

Lionetto M.G., Caricato R., Calisi A., Schettino T. (2012) Acetylcholinesterase inhibition as a relevant biomarker in environmental biomonitoring: new insights and perspectives. In: Visser J.E. (Ed.), *Ecotoxicology around the globe*. Nova Science Publishers, New York, USA, pp 87-115.

Liu J., Li Y., Zhang B., Cao J., Cao Z., Domagalski J. (2009) Ecological risk of heavy metals in sediments of the Luan River source water. *Ecotoxicology* 18: 748-758.

Lomate P.R., Sangole K.P., Sunkar R., Hivrale V.K. (2015) Superoxide dismutase activities in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae: Identification and biochemical properties of a manganese superoxide dismutase. *Insect Physiology* 5: 13-20.

Lommen A. (2009) MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Analytical Chemistry* 81: 3079-3086.

Lourenço A.P., Mackert A., Cristino A.D., Simões Z.L.P. (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39: 372-385.

Lourenço A.P., Zufelato M.S., Bitondi M.M.G., Simoes Z.L.P. (2005) Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 541-552.

Lu Y., Cederbaum A.I. (2008) CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology & Medicine* 44: 723-738.

Lushchak V.I. (2012) Glutathione homeostasis and functions: Potential targets for medical interventions. *Journal of Amino Acids* 2012: Article ID 736837.

Malmendal A., Overgaard J., Bundy J.G., Sorensen J.G., Nielsen N.C., Loeschcke V., Holmstrup M. (2006) Metabolomic profiling of heat stress: hardening and recovery of homeostasis in *Drosophila*. *American Journal of Physiology* 291: 205–212.

Manning R. (2001) Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World* 82: 60–75.

Markert B. (1994) Biomonitoring—Quo Vadis. *Environmental Sciences Europe (Umweltwissenschaften und Schadstoff Forschung)* 6: 145–149.

Markert B., Fränzle S., Wünschmann S. (2015) Chemical Evolution: The Biological System of the Elements. Springer, Cham.

Marklund S.L., Holme E., Hellner L. (1982) Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica Chimica Acta* 126: 41-51.

McCord J.M., Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049-6055.

McLafferty F.W., Stauffer D.B. (1989) Wiley / NBS Registry of Mass Spectral Data, 7 Volume Set. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA.

Medrzycki P., Giffard H., Aupinel P., Belzunces L.P., Chauzat M-P., Claßen C., Colin M.E., Dupont T., Girolami V., Johnson R., Le Conte Y., Lückmann J., Marzaro M., Pistorius J., Porrini C., Schur A, Sgolastra F., Delso N.S., van der Steen J.J.M., Wallner K., Alaux C., Biron D.G., Blot N., Bogo G., Brunet J-L., Delbac F., Diogon M., Alaoui H.E., Provost B., Tosi S., Vidau C. (2013) Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 52: (2013).

Meister A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry* 263: 17205-17208.

Meister A. (1994) Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of Biological Chemistry* 269: 9397-9400.

Meyer M.R., Peters F.T., Maurer H.H. (2010) Automated mass spectral deconvolution and identification system for GC-MS screening for drugs, poisons, and metabolites in urine. *Clinical Chemistry* 56(4): 575–584.

Michaud M.R., Denlinger D.L. (2006) Oleic acid is elevated in cell membrane during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology* 52: 1073-1082.

Michener C.D. (2007) *The Bees of the World*. Second Edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA.

Migula P., Laszczyca P., Augustyniak M., Wilczek G., Rozpedek K., Kafel A., Woloszyn M. (2004) Antioxidative defense enzymes in beetles from a metal pollution gradient. *Biologia* 59: 645-654.

Mills GC. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry* 229: 189-197.

Mondragon L., Spivak M., Vandame R. (2005) A multifactorial study of the resistance of Africanized and hybrid honey bees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. *Apidologie* 36: 345-58.

Morimoto T., Kojima Y., Toki T., Komeda Y., Yoshiyama M., Kimura K., Nirasawa K., Kadowaki T. (2011) The habitat disruption induces immune-suppression and oxidative stress in honey bees. *Ecology and Evolution* 1: 201-217.

Moritz, R.F.A., Erler, S. (2016) Lost colonies found in a data mine: Global honey trade but not pests or pesticides as a major cause of regional honeybee colony declines. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 216: 44-50.

Mullin C.A., Frazier M., Frazier J.L., Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D., Pettis J.S. (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *Plos ONE* 5: e9754.

Münch D., Amdam G.V., Wolschin F. (2008) Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Functional Ecology* 22: 407-421.

Murad F. (2006) Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *The New England Journal of Medicine* 355: 2003-2011.

Napolitano A., Di Donato P., Prota G. (2000) New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins: rearrangement vs. redox exchange reaction routes of a transient 2H-1,4-benzothiazine-o-quinonimine intermediate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1475: 47-54.

Nappi A.J., Christensen B.M. (2005) Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 443-459.

Nappi A.J., Vass E., Frey F., Carton Y. (1995) Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology* 68: 450-456.

Nation J.L. Sr. (2016) *Insect Physiology and Biochemistry. Third Edition*. CRC Press, University of Florida, Gainesville, USA.

Natural Research Council (2006) *Status of pollinators in North America*. National Academic Press, USA.

Nauen R., Ebbinghaus-Kintscher U., Salgado V.L., Kausmann M. (2003) Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pest Management Science* 76: 55-69.

Naug D. (2009) Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation* 142: 2369-2372.

Neumann P., Carreck N.L. (2010) Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research* 49: 1-6.

Nicolson S.W. (2011) Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology* 46: 197-204.

Nicolson S.W., Thornburg R.W. (2007) Nectar chemistry. In: Nicolson S.W., Nepi M., Pacini E. (Eds.), *Nectar and Nectaries*. Springer, Dordrecht, Netherlands.

Nieto A., Roberts S.P.M., Kemp J., Rasmont P., Kuhlmann M., García Criado M., Biesmeijer J.C., Bogusch P., Dathe H.H., De la Rúa P., De Meulemeester T., Dehon M., Dewulf A., Ortiz-Sánchez F.J., Lhomme P., Pauly A., Potts S.G., Praz C., Quaranta M., Radchenko V.G., Scheuchl E., Smit J., Straka J., Terzo M., Tomozii B., Window J., Michez D. (2014) *European Red List of bees*. Luxembourg: Publication Office of the European Union.

Nikolenko A.G., Saltykova E.S., Gaifullina L.R. (2012) Molecular mechanisms of antioxidant protective processes in honeybee *Apis mellifera*. In: Farooqui T., Farooqui A.A. (Eds.), *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspect of Cell Signaling*. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA, pp. 279–293.

Nikolić T.V. (2017) Molekularne osnove odgovora medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) na stres izazvan jonima teških metala. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, R. Srbija.

Nikolić T.V., Kojić D., Orčić S., Vukašinović E.L., Blagojević D.P., Purać J. (2019) Laboratory bioassays on the response of honey bee (*Apis mellifera* L.) glutathione S-transferase and acetylcholinesterase to the oral exposure to copper, cadmium, and lead. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 6890–6897.

Nikolić T.V., Purać J., Orčić S., Kojić D., Vujanović D., Stanimirović Z., Gržetić I., Ilijević K., Šikoparija B., Blagojević D. (2015) Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 90: 181–194.

NIST Standard Reference Database (2016) 1A v14. <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>.

Ochiai M., Ashida M. (1988) Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 12056–12062.

Ohashi K., Natori S., Kubo T. (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry* 265: 127–133.

Ohtsu T., Kimura M.T., Katagiri C. (1998) How *Drosophila* species acquire cold tolerance. *European Journal of Biochemistry* 252: 608-611.

Okuda S., Yamada T., Hamajima M., Itoh M., Katayama T., Bork P., Goto S., Kanehisa M. (2008) KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways. *Nucleic Acids Research* 36: W423-W426.

- Orčić S., Nikolić T., Purać J., Šikoparija B., Blagojević D.P., Vukašinović E., Plavša N., Stevanović J., Kojić D. (2017) Seasonal variation in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 165: 120-128.
- Ostwald M.M., Smith M.L., Seeley T.D. (2016) The behavioral regulation of thirst, water collection and water storage in honey bee colonies. *Journal of Experimental Biology* 219: 2156-2165.
- Pamplona R., Costantini D. (2011) Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology* 301: R843-R863.
- Pankiw T. (2004) Brood pheromone regulates foraging activity of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 97(3): 748-751.
- Park O.W. (1937) Testing for resistance to American foulbrood in honeybees. *Journal of Economic Entomology* 30: 504-12.
- Park O.W., Pellet F.C., Paddock F.B. (1937) Disease resistance and American foulbrood. *American Bee Journal* 77: 20-25.
- Park W. (1925) The storing and ripening of honey by honeybees. *Journal of Economic Entomology* 18: 405-410.
- Parmar T.K., Rawtani D., Agrawal Y. K. (2016) Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in Life Science* 9: 110-118.
- Parmesan C., Ryrholm N., Stefanescu C., Hill J.K., Thomas C.D., Descimon H., Huntley B., Kaila L., Kullberg J., Tammaru T., Tennent W.J., Thomas J.A., Warrant M. (1999) Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature* 399: 579-583.
- Peng Y.S., Fang Y., Xu S., Ge L., Nasr M.E. (1987) Response of foster Asian honey bee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honey bee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology* 49: 259-64.
- Pernal S.F. (2008) CAPA statement on honey bees losses in Canada (Spring 2008)- Final revision. <http://www.capabees.com/main/files/pdf/canwintlossnewrev.pdf> Accessed 12 Sept 2008.
- Perry C.J., Sovik E., Myerscough M.R., Barron A.B. (2015) Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 3427-3432.
- Perugini M., Manera M., Grotta L., Abete M.C., Tarasco R. (2011) Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biological Trace Elements Research* 140: 170-176.
- Petanidou T., van Laere A., Ellis W.N., Smets E. (2006) What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos* 115: 155-169.

Plavša N., Nedić N. (2015) Praktikum iz pčelarstva. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, R. Srbija.

Plavša N., Pavlović I. (2017) Bolesti pčela. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, R. Srbija.

Popović T., Jović B., Marić-Tanasković L., Knežević J., Mitrović-Josipović M., Dimić B. (2014) Report on the State of Air Quality in the Republic of Serbia for 2013. Ministry of Agriculture and Environmental Protection of the Republic of Serbia, Serbian Environmental Protection Agency.

Porrini C., Celli G., Radeghieri P. (1998) Monitoring of pesticides through the use of honeybees as bioindicators of the Emilia-Romagna coastline (1995-1996). *Annali di Chimica* 88: 243-252.

Porrini C., Ghini S., Girotti S., Sabatini A. G., Gattavecchia E., Celli G. (2002) Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In: Devillers J., Pham-Delègue M. (Eds.), *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. Taylor & Francis, London, pp. 186-247.

Potts S.G., Roberts S.P.M., Dean R., Marris G., Brown M., Jones R., Settele J. (2010) Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research* 49: 15-22.

Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama, Službeni list SRJ, br. 5/92, 11/92 - ispr. i 32/2002 i Službeni glasnik RS, br. 25/2010 - dr. pravilnik i 28/2011 - dr. pravilnik.

Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, Službeni glasnik Republike Srbije, 101/2015.

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>

Ramsey S.D., Ochoa R., Bauchan G., Gulbranson C., Mowery J.D., Cohen A., Lim D., Joklik J., Cicero J.M., Ellis J.D., Hawthorne D., vanEngelsdorp D. (2019) Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 1792-1801.

Ranson H., Rossiter L., Orтели F., Jensen B., Wang X., Roth C.W., Collins F.H., Hemingway J (2001) Identification of a novel class of insect glutathione S-transferase involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* 359: 295-304.

Reimann C., de Caritat P. (1998) *Chemical Elements in the Environment. Factsheets for the Geochemist and Environmental Scientist*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Ricciardelli d'Albore G. (1998) *Mediterranean melissopalynology*. Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi, Perugia, Italy.

Ricketts T.H. (2004) Do tropical forest fragments enhance pollinator activity in nearby coffee crops. *Conservation Biology* 18: 1-10.

Rosetto M., Manetti A.G., Giordano P.C., Marri L., Amons R., Baldari C.T., Marchini D., Dallai R. (1996) Molecular characterization of ceratotoxin C, a novel antibacterial female-specific peptide of the ceratotoxin family from the medfly *Ceratitis capitata*. *European Journal of Biochemistry* 241: 330-337.

Roulston T.H., Buchmann S.L. (2000) A phylogenetic reconsideration of the pollen starch-pollination correlation. *Evolutionary Ecology Research* 2: 627-643.

Roulston T.H., Cane J.H. (2000) Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* 222: 187-209.

Roulston T.H., Cane J.H., Buchmann S.L. (2000) What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs* 70: 617-643.

Ruiz J.A., Gutiérrez M., Porrini C. (2013) Biomonitoring of Bees as Bioindicators. *Bee World* 90: 61-63.

Ruschioni S., Riolo P., Minuz R.L., Stefano M., Cannella M., Porrini C., Isidoro N. (2013) Biomonitoring with honeybees of heavy metals and pesticides in nature reserves of the Marche Region (Italy). *Biological Trace Element Research* 154: 226-233.

Samakovlis C., Kylsten P., Kimbrell D.A., Engstrom Y., Hultmark D. (1991) The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Journal* 10: 163-169.

Sánchez-Bayo F., Goulson D., Pennacchio F., Nazzi F., Goka K., Desneux N. (2016) Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review. *Environment International* 89-90: 7-11.

Sandrock C., Tanadini M., Tanadini L.G., Fauser-Misslin A., Potts S.G., Neumann P. (2014) Impact of Chronic Neonicotinoid Exposure on Honeybee Colony Performance and Queen Supersedure. *PLoS ONE* 9: e103592.

Sano O., Kunikata T., Kohno K., Iwaki K., Ikeda M., Kurimoto M. (2004) Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by twodimensional gel electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 15-20.

Santoyo I., Córdoba-Aguilar A. (2012) Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142: 1-16.

Satoh K. (1978) Serum Lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 90: 37-43.

Scheiner R., Baumann A., Blenau W. (2006) Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. *Current Neuropharmacology* 4: 259-276.

Schepartz A.I., Subers M.H. (1964) The glucose oxidase of honey. I. Purification and some general properties of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 85: 228-237.

Schmid M.R., Brockmann A., Pirk C.W.W., Stanley D.W., Tautz J. (2008) Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology* 54: 439-444.

Schmitt T., Herzner G., Weckerle B., Schreier P., Strohm E. (2007) Volatiles of foraging honeybees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and their potential role as semiochemicals. *Apidologie* 38: 164-170.

Schroeder H.A. (1973) *The trace elements and nutrition*. Faber and Faber, London.

Seehuus S.C., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G.V. (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 962-967.

Seeley T.D. (1985) *Honeybee Ecology*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.

Serra Bonvehí J., Escolà Jordà R. (1997) Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 725-732.

Shehata S.M., Townsend G.F., Shuel R.W. (1981) Seasonal physiological changes in queen and worker honeybees. *Journal of Apicultural Research* 20: 69-78.

Shi T., Burton S., Wang Y., Xu S., Zhang W., Yu L. (2018) Metabolomic analysis of honey bee, *Apis mellifera* L. response to thiacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 152: 17-23.

Shukla S., Jhamtani R.C., Dahiya M.S., Agarwal R. (2017) Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. *Toxicology Reports* 4: 240-244.

Sideri M., Tsakas S., Markoutsia E., Lampropoulou M., Marmaras V.J. (2008) Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology* 123: 528-537.

Sies, H., Jones D. (2007) Oxidative stress. In: Fink G. (Ed.), *Encyclopedia of stress, 2nd edition*. Elsevier, Amsterdam, pp. 45-48.

Sigma-Aldrich (2015) Enzymatic assay of glucose oxidase. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-glucose-oxidase.html>

Simone-Finstrom M., Li-Byarlay H., Huang M., Strand M.K., Rueppell O., Tarpy D.R. (2016) Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. *Scientific Reports* 6: 32023.

Singh S.P., Coronella J.A., Benes H., Cochrane B.J., Zimniak P. (2001) Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *European Journal of Biochemistry* 268: 2912-2923.

Siva-Jothy M.T. (2000) A mechanistic link between parasite resistance and expression of a sexually selected trait in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 2523-2527.

Skandalis D.A., Roy C., Darveau C.A. (2011) Behavioural, morphological, and metabolic maturation of newly emerged adult workers of the bumblebee, *Bombus impatiens*. *Journal of Insect Physiology* 57: 704–711.

Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G. (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *ACS Publications* 78: 779–787.

Smith R.K., Wilcox M.M. (1990) Chemicals residues in bees, honey and beeswax. *The American Bee Journal* 130: 188-192.

Snart C.J.P., Hardy I.C.W., Barrett D.A. (2015) Entometabolomics: applications of modern analytical techniques to insect studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 155: 1-17.

Somerville D. (2005) *Fat Bees, Skinny Bees: A Manual on Honey Bee Nutrition for Beekeepers*. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton, Michigan.

Somerville D.C., Nicol H.I. (2006) Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46: 141–49.

Søndergard L. (1993) Homology between the mammalian liver and the *Drosophila* fat body. *Trends in Genetics* 9: 193.

Spicer R., Salek R.M., Moreno P., Cañueto D., Steinbeck K. (2017) Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics* 13: 106.

Spivak M., Masterman R., Ross R., Mescel K.A. (2003) Hygienic Behavior in the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) and the Modulatory Role of Octopamine. *Journal of Neurobiology* 55: 341-354.

Spivak M., Reuter G.S. (1998) Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie* 29: 291–302.

Spivak M., Reuter G.S. (2001). *Varroa jacobsoni* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology* 94: 326–331.

Stabentheiner A., Pressl H., Papst T., Hrassnigg N., Crailsheim K. (2003) Endothermic heat production in honeybee winter clusters. *Journal of Experimental Biology* 206: 353-358.

Stadtman E.R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 315–325.

Stahl W., Sies H. (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica and Biophysica Acta* 1740: 101-107.

Stanimirović Z., Soldatović B., Vučinić M. (2000) *Medonosna pčela*. Medicinska knjiga, Beograd, R. Srbija.

Stanley-Samuelson D.W., D.R. Nelson (1993) *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. University of Nebraska Press, Lincoln, NE.

Starks P.T, Blackie C.A., Thomas D., Seeley P.T. (2000) Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* 87: 229–231.

Steen J.J.M. van der, Cornelissen B., Blacquièrè T., Pijnenburg J.E.M.L., Severijnen M. (2016) Think regionally, act locally: metals in honeybee workers in the Netherlands (surveillance study 2008). *Environmental Monitoring and Assessment* 188: 463.

Steffen Y., Gruber C., Schewe T., Sies H. (2008) Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 469: 209-219.

Steinmann N., Corona M., Neumann P., Dainat B. (2015) Overwintering is associated with reduced expression of immune genes and higher susceptibility to virus infection in honey bees. *PLoS ONE* 10: e0129956.

Stohs S.J., Bagchi D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18: 321–336.

Stokstad E. (2007) The Case of the Empty Hives. *Science* 316: 970-972.

Stuart L.M., Ezekowitz R.A. (2005) Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity* 22: 539–550.

Suarez R.K., Darveau C.A., Welch K.C. Jr., O'Brien D.M., Roubik D.W., Hochachka P.W. (2005) Energy metabolism in orchid bee flight muscles: carbohydrate fuels all. *Journal of Experimental Biology* 208: 3573–3579.

Suarez R.K., Lighton J.R.B., Joos B., Roberts S.P., Harrison J.F. (1996) Energy metabolism, enzymatic flux capacities and metabolic flux rates in flying honeybees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12616–12620.

Svoboda J. (1962) Teneur en strontium 90 dans les abeilles et dans leurs produits. *Bulletin Apicole* 5: 101-103.

Szymas B., Jedruszuk A. (2003) The influence of different diets on haemocytes of adult worker honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie* 34: 97–102.

Takahashi T., Mitsumoto M. (1963) Transformation and hydrolysis of D-glucono- γ and δ -lactone. *Nature* 199: 765- 767.

Taormina P.J., Niemira B.A., Beuchat L.R. (2001) Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology* 69: 217–225.

Teulier L., Weber J-M., Crevier J., Darveau C-A. (2016) Proline as a fuel for insect flight: enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans. *Proceedings of the Royal Society B* 283: 20160333.

Thany SH (2009) Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *Neurotoxicology* 30: 1045–1052.

Theopold U., Schmidt O., Soderhall K., Dushay M.S. (2004) Coagulation in arthropods, defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology* 25: 289–294.

Thompson S.N., Lee R.W.K., Beckage N.E. (1990) Metabolism of parasitized *Manduca sexta* examined by nuclear-magnetic-resonance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 13: 127–143.

Tomizawa M., Casida J.E. (2005) Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 247-268.

Traber M.G., Atkinson J. (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine* 43: 4-15.

Tu H.T., Silvestre F., Scippo M.L., Thome J.P., Phuong N.T., Kestemont P. (2009) Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1463–1470.

Underwood E., Darwin G., Gerritsen E. (2017) *Pollinator initiatives in EU member states: success factors and gaps*. Institute for European Environmental Policy - IEEP.

US EPA - United States Environmental Protection Agency, Ecological Fate and Effects Division, Office of Pesticide Programs, OPP Pesticide Ecotoxicity Database: <https://ecotox.ipmcenters.org/Details.cfm?RecordID=16861>

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84.

van Zweden J.S., D’Ettorre P. (2010) Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. In: Blomquist G.J., Bagnères A.G. (Eds.), *Insect Hydrocarbons*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 222–243.

vanEngelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpay D.R., Pettis J.S. (2009) Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* 48: e6481.

vanEngelsdorp D., Hayes J.Jr., Underwood R.M., Pettis J. (2008) A Survey of honey bee colony losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS ONE* 3: e4071.

vanEngelsdorp D., Meixner M.D. (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of invertebrate pathology* 103: S80-S95.

Vernier C.L., Krupp J.J., Marcus K., Hefetz A., Levine J.D., Ben-Shahar Y. (2019) The cuticular hydrocarbon profiles of honey bee workers develop via a socially-modulated innate process. *eLife* 8: e41855.

Villas-Bôas S.G., Mas S., Åkesson M., Smedsgaard J., Nielsen J. (2004) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews* 24: 613– 646.

Vilmos P., Kurucz É. (1998) Insect immunity: Evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* 62: 59–66.

von der Ohe W., Oddo L., Piana M., Morlot M., Martin P. (2004) Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* 35: S18-S25.

Vontas J.G., Small G.J., Hemingway J. (2001) Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal* 357: 65–72.

Vukašinić E., Pond W.D., Worland M.R., Kojić D., Purać J., Blagojević P.D., Grubor-Lajšić G. (2013) Diapause induces changes in the composition and biophysical properties of lipids in larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 165: 219-225.

Wang L., Meeus I., Rombouts C., Van Meulebroek L., Vanhaecke L., Smagghe G. (2019) Metabolomics-based biomarker discovery for bee health monitoring: A proof of concept study concerning nutritional stress in *Bombus terrestris*. *Scientific Reports* 9: 11423.

Wang Y., Carolan J.C., Hao F., Nicholson J.K., Wilkinson T.L., Douglas A.E. (2010) Integrated metabonomic-proteomic analysis of an insect-bacterial symbiotic system. *Journal of Proteome Research* 9: 1257–1267.

Wang Y., Ma L., Zhang W., Cui X., Wang H., Xu B. (2016) Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 47: 48–56.

Williams G.R. (2013) *Nosema ceranae* in Western honey bees (*Apis mellifera*): biology and management. Doctoral thesis. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia.

Williams J.B., Roberts S.P., Elekonich M.M. (2008) Age and natural metabolically-intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms. *Experimental Gerontology* 43: 538-549.

Williams M.J. (2007) *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *Journal of Immunology* 178: 4711–4716.

Wilson E.O. (1971) *The Insect Societies*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA, USA.

Wilson K., Cotter S.C., Reeson A.F., Pell J.K. (2001) Melanism and disease resistance in insects. *Biology Letters* 4: 637–649.

Wilson-Rich N., Dres S.T., Starks P.T. (2008) The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 54: 1392-1399.

Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N.H., Starks P.T. (2009) Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual Review of Entomology* 54: 405-423.

Winiarska-Mieczan A. (2018) Protective effect of tea against lead and cadmium-induced oxidative stress—a review. *Biometals* 31: 909–926.

Winston M. (1987) *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, p. 281.

Wishart D.S., Feunang Y.D., Marcu A., Guo A.C., Liang K., Vázquez-Fresno R., Sajed T., Johnson D., Li C., Karu N., Sayeeda Z., Lo E., Assempour N., Berjanskii M., Singhal S., Arndt D., Liang Y., Badran H., Grant J., Serra-Cayuela A., Liu Y., Mandal R., Neveu V., Pon A., Knox C., Wilson M., Manach C., Scalbert A. (2018) HMDB 4.0 — The Human Metabolome Database for 2018. *Nucleic Acids Research* 46: D608-17.

Wishart D.S., Jewison T., Guo A.C., Wilson M., Knox C., Liu Y., Djoumbou Y., Mandal R., Aziat F., Dong E., Bouatra S., Sinelnikov I., Arndt D., Xia J., Liu P., Yallou F., Bjorndahl T., Perez-Pineiro R., Eisner R., Allen F., Neveu V., Greiner R., Scalbert A. (2013) HMDB 3.0 — The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research* 41: D801-7.

Wishart D.S., Knox C., Guo A.C., Eisner R., Young N., Gautam B., Hau D.D., Psychogios N., Dong E., Bouatra S., Mandal R., Sinelnikov I., Xia J., Jia L., Cruz J.A., Lim E., Sobsey C.A., Shrivastava S., Huang P., Liu P., Fang L., Peng J., Fradette R., Cheng D., Tzur D., Clements M., Lewis A., De Souza A., Zuniga A., Dawe M., Xiong Y., Clive D., Greiner R., Nazyrova A., Shaykhutdinov R., Li L., Vogel H.J., Forsythe I. (2009) HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research* 37: D603-610.

Wishart D.S., Tzur D., Knox C., Eisner R., Guo A.C., Young N., Cheng D., Jewell K., Arndt D., Sawhney S., Fung C., Nikolai L., Lewis M., Coutouly M.A., Forsythe I., Tang P., Shrivastava S., Jeroncic K., Stothard P., Amegbey G., Block D., Hau D.D., Wagner J., Miniaci J., Clements M., Gebremedhin M., Guo N., Zhang Y., Duggan G.E., Macinnis G.D., Weljie A.M., Dowlatabadi R., Bamforth F., Clive D., Greiner R., Li L., Marrie T., Sykes B.D., Vogel H.J., Querengesser L. (2007) HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research* 35: D521-6.

Wittig R. (1993) General aspects of biomonitoring heavy metals by plants. In: Markert B. (Ed.), *Plants as Biomonitors – Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*. VCH-Publisher, Weinheim, pp. 3–27.

Wong C.M., Wong K.H., Chen X.D. (2008) Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 927-938.

Wood W., Faria C., Jacinto A. (2006) Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Biology* 173: 405–416.

Woodrow A.W., Holst E.C. (1942) The mechanism of colony resistance to American foulbrood. *Journal of Economic Entomology* 35: 327–330.

Wright G.A., Nicolson S.W., Shafir S. (2017) Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Annual Review of Entomology* 63: 327-344.

Wu J-L., Zhou C-X., Wu P-J., Xu J., Guo Y-Q., Xue F., Getachew A., Xu S-F. (2017) Brain metabolomic profiling of eastern honey bee (*Apis cerana*) infested with the mite *Varroa destructor*. *PLoS ONE* 12: e0175573.

Yan S., Wang J., Zhu L., Chen A., Wang J. (2015) Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: 54-60.

Yiin S.J., Lin T.H. (1995) Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. *Biological Trace Element Research* 50: 167-172.

Yost F., Fridovich I. (1973) An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 248: 4905-4908.

Yu X.Q., Kanost M.R. (2004) Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology* 28: 891-900.

Yücel B., Goğaroğlu M. (2005) The impact of *Nosema apis* Z. infestation of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies after using different treatment methods and their effects on the population levels of workers and honey production on consecutive years. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8:1142-1145.

Zakon o sredstvima za zaštitu bilja, Službeni glasnik Republike Srbije, 41/2009 i 17/2019.

Zarchin S., Dag A., Salomon M., Hendriksma H.P., Shafir S. (2017) Honey bees dance faster for pollen that complements colony essential fatty acid deficiency. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 71: 172.

Zarić N.M. (2017) Medonosna pčela (*Apis mellifera*) kao bioindikator zagađenja toksičnim metalima na teritoriji Srbije. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, R. Srbija.

Zarić N.M., Ilijević K., Stanisavljević L., Gržetić I. (2016) Metal concentrations around thermal power plants, rural and urban areas using honeybees (*Apis mellifera* L.) as bioindicators. *International Journal of Environmental Science and Technology* 13: 413-422.

Zhang G., Xu B. (2015) Effects of dietary calcium levels on development, haemolymph and antioxidant status of honey bee (*Apis mellifera*) larva reared *in vitro*. *Journal of Apicultural Research* 54: 48-54.

Zhang J.J., Wang Y., Xiang H.Y., Li M.X., Li W.H., Ma K.G., Wang X.Z., Zhang J.H. (2011) Oxidative stress: role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural Sciences in China* 10: 786-96.

Zhu X., Zhou S., Huang Z.Y. (2014) Transportation and pollination service increase abundance and prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 53: 469-471.

Zuo L., Zhou T., Pannell B.K., Ziegler A.C., Best T.M. (2015) Biological and physiological role of reactive oxygen species – The good, the bad and the ugly. *Acta Physiologica* 214: 329-348.

9. PRILOZI

Prilog 1. Rezultati laboratorijskih akutnih testova toksičnosti pesticida na medonosnu pčelu (aktivnosti enzima acetilholinesteraze, antioksidativnih enzima, redoks statusa i enzima fenol/profenol oksidaze), prikazani u vidu srednjih vrednosti sa standardnom devijacijom.

Grupa	AChE mU/mg prot.	SOD U/mg prot.	CAT U/mg prot.	GST U/mg prot.	GSH nmol/mg prot.	SH nmol/mg prot.	MDA nmol/mg prot.	POx mU/mg prot.	proPOx mU/mg prot.
K	24,3 ± 1,18	95,3 ± 3,73	166 ± 12,4	196 ± 3,89	11,1 ± 0,66	140 ± 9,84	0,84 ± 0,19	87,1 ± 7,76	122 ± 7,25
T5	27,2 ± 2,16	95,6 ± 5,07	175 ± 10,2	129 ± 7,45	13,6 ± 1,42	137 ± 15,8	1,39 ± 0,15	11,5 ± 1,66	53,4 ± 0,44
T20	30,3 ± 1,38	102 ± 5,95	176 ± 5,21	145 ± 15,5	10,2 ± 1,80	145 ± 16,4	0,67 ± 0,14	29,7 ± 2,56	61,1 ± 1,49
T50	31,3 ± 4,57	98,6 ± 2,33	206 ± 15,7	142 ± 12,4	14,5 ± 1,77	165 ± 10,8	0,82 ± 0,12	78,2 ± 9,75	115 ± 2,62
K5	29,7 ± 0,30	113 ± 5,65	189 ± 18,3	148 ± 15,0	16,1 ± 2,10	170 ± 16,9	1,49 ± 0,22	33,1 ± 1,84	61,7 ± 5,55
K20	29,5 ± 3,48	101 ± 7,80	218 ± 14,7	181 ± 3,08	13,1 ± 1,28	185 ± 6,39	0,85 ± 0,25	35,9 ± 5,37	62,2 ± 8,25
K50	31,4 ± 2,51	128 ± 6,14	223 ± 20,0	198 ± 12,8	11,1 ± 0,42	175 ± 10,2	0,90 ± 0,14	35,9 ± 4,71	67,6 ± 3,20

K = kontrola; Eksperimentalne grupe su nazvane po pesticidu (T = tiaklopid, K = klotianidin) i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze (5, 20 ili 50 puta niže u odnosu na LD₅₀).

Prilog 2. Rezultati ispitivanja stanja medonosne pčele pod uticajem starosti pčela, sezone i tipa pčelinjaka (aktivnosti enzima acetilholinesteraze, antioksidativnih enzima i koncentracije malondialdehida), prikazani u vidu srednjih vrednosti sa standardnom devijacijom.

Oznaka pčelinjaka	Opis pčelinjaka	Uzorci pčela	AChE mU/mg proteina	SOD U/mg proteina	CAT U/mg proteina	GST U/mg proteina	MDA nmol/mg proteina
P1	Petrovaradin (stacionarni pčelinjak)	Letnje mlade	*ND	32,7 ± 4,18	20,9 ± 0,83	107 ± 15,0	*ND
		Letnje starije	14,9 ± 1,07	36,0 ± 3,65	40,2 ± 3,14	138 ± 18,1	3,16 ± 0,67
		Zimske starije	12,2 ± 1,96	6,50 ± 1,46	74,4 ± 4,26	83,6 ± 11,3	0,73 ± 0,17
P2	Beočin (migratorni pčelinjak)	Letnje starije	4,40 ± 1,06	27,4 ± 3,55	38,4 ± 2,43	164 ± 14,9	1,88 ± 0,28
		Zimske starije	8,18 ± 0,64	5,89 ± 1,31	51,6 ± 3,90	104 ± 10,5	1,58 ± 0,20
P3	Ravno Selo (migratorni pčelinjak)	Letnje mlade	*ND	27,4 ± 1,42	52,6 ± 2,86	208 ± 19,7	*ND
		Letnje starije	8,71 ± 0,45	29,7 ± 5,18	57,0 ± 4,93	200 ± 18,9	3,60 ± 0,33
		Zimske starije	10,8 ± 1,57	24,1 ± 1,98	61,7 ± 4,82	184 ± 33,6	0,48 ± 0,08

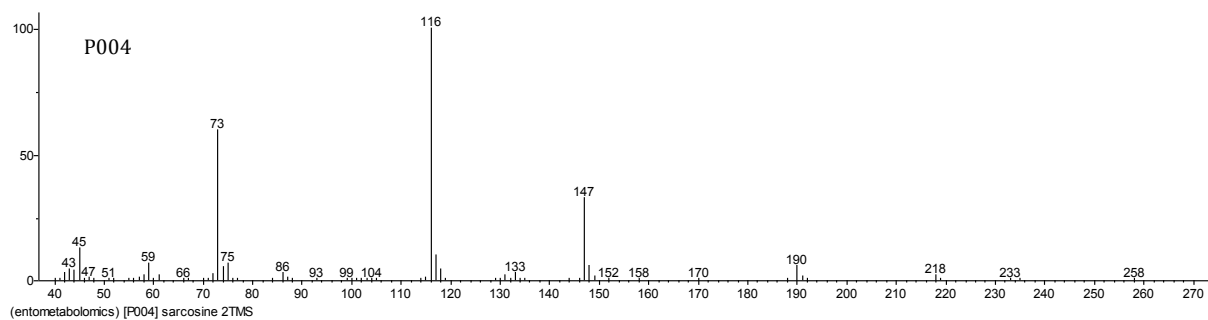
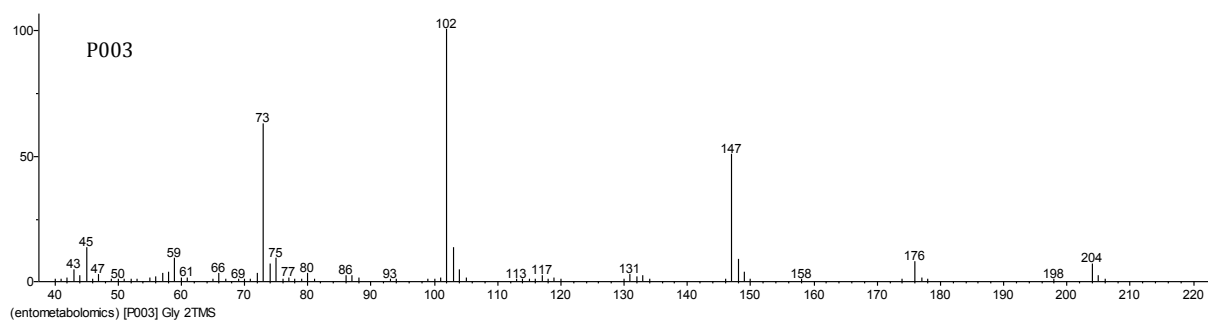
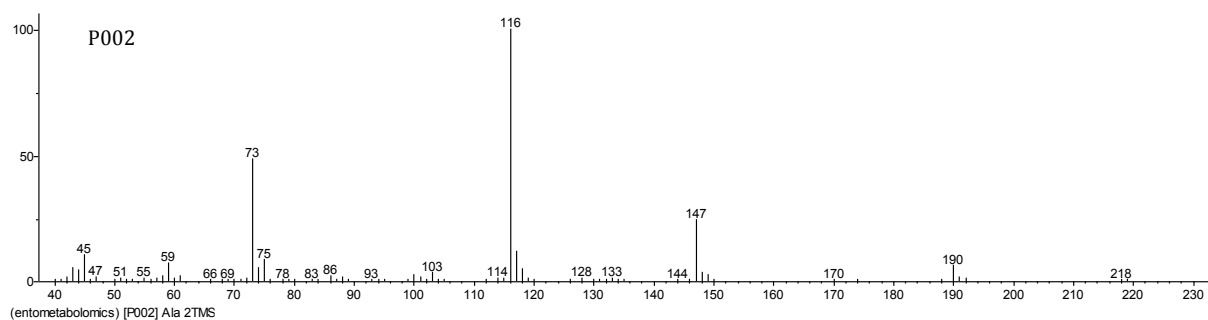
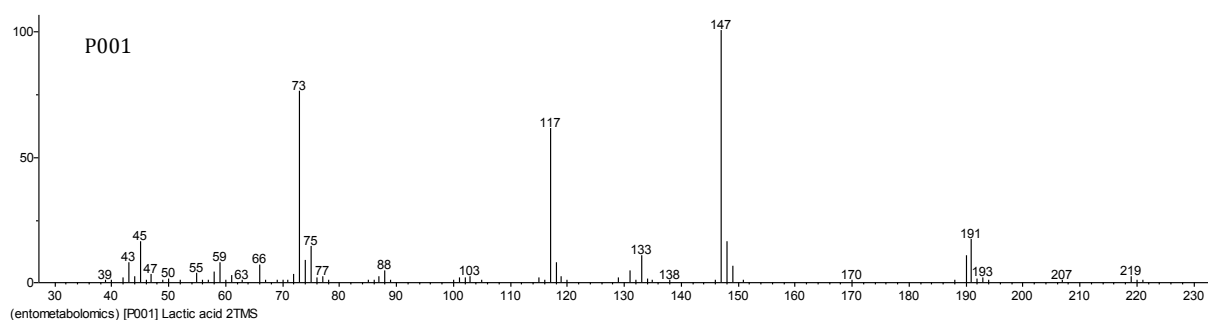
*ND – nije određivano

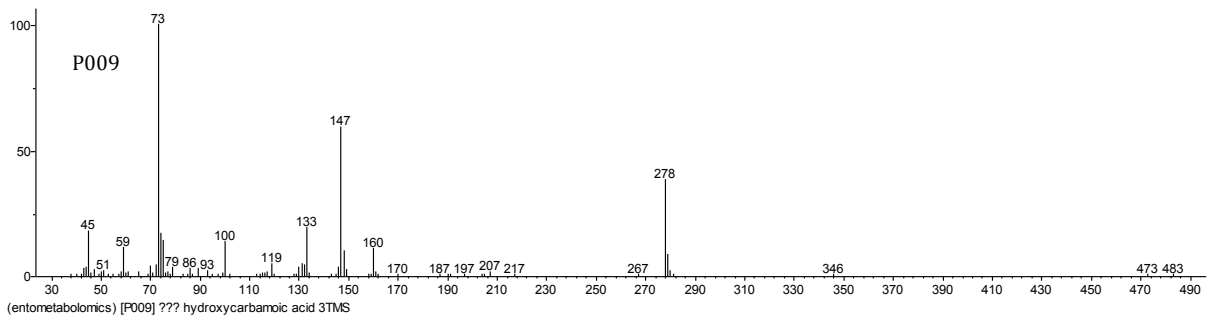
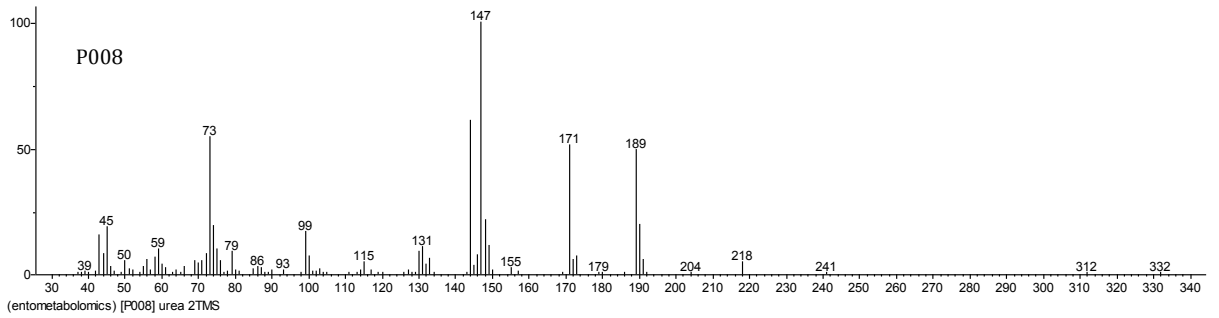
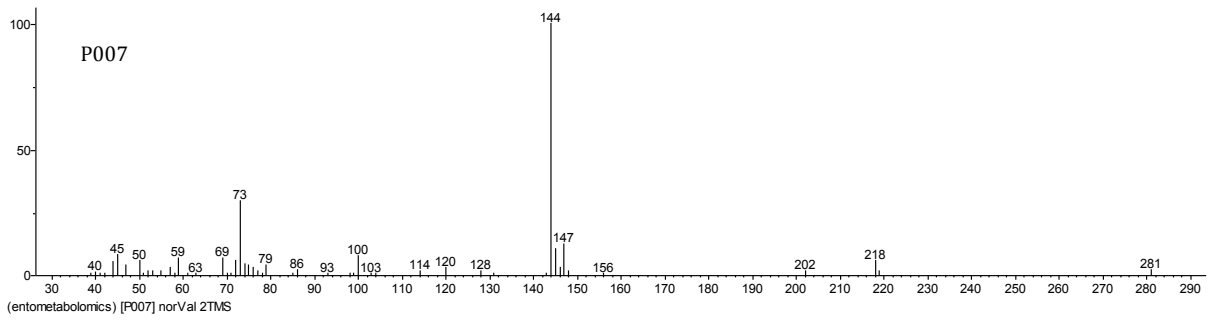
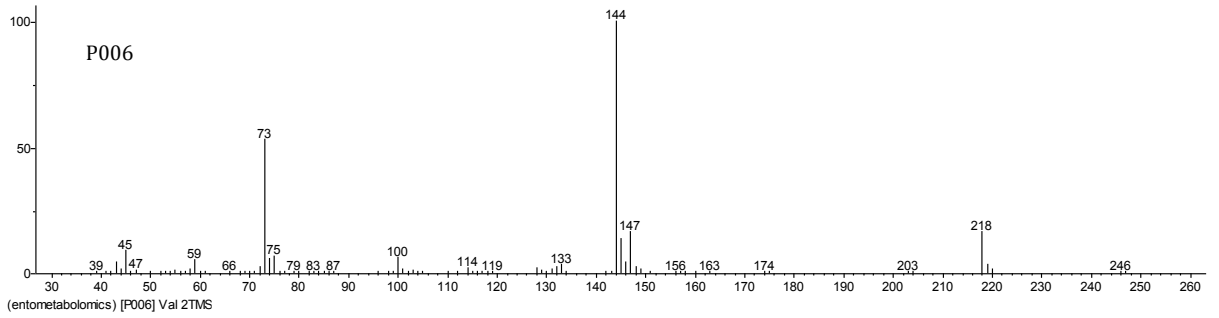
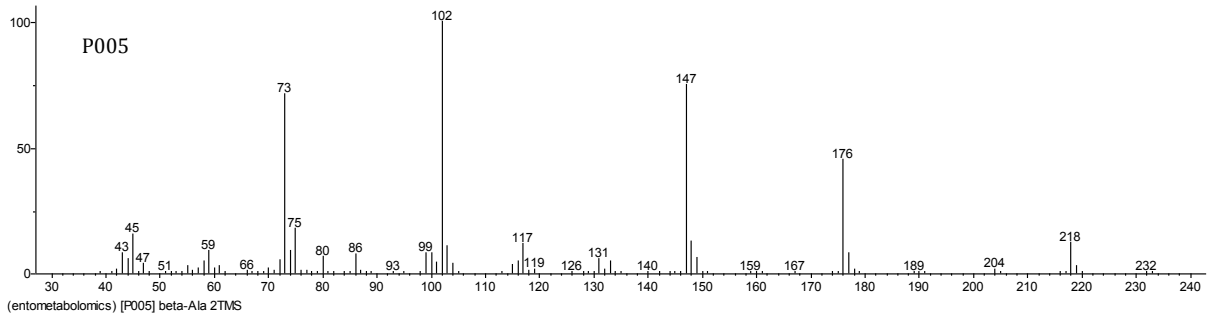
Prilog 3. Rezultati ispitivanja stanja medonosne pčele pod uticajem sezone i faktora sredine (aktivnosti enzima acetilholinesteraze, antioksidativnih enzima, koncentracije malondialdehida i aktivnosti enzima fenol/profenol oksidaze i glukoza oksidaze), prikazani u vidu srednjih vrednosti sa standardnom devijacijom.

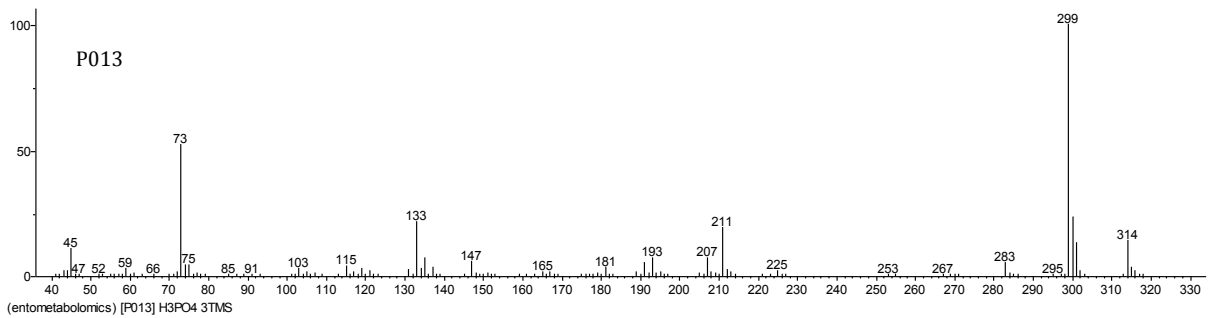
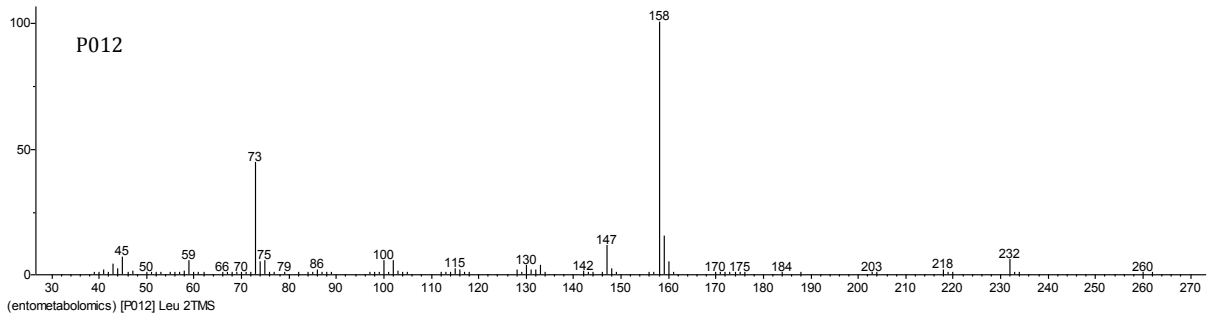
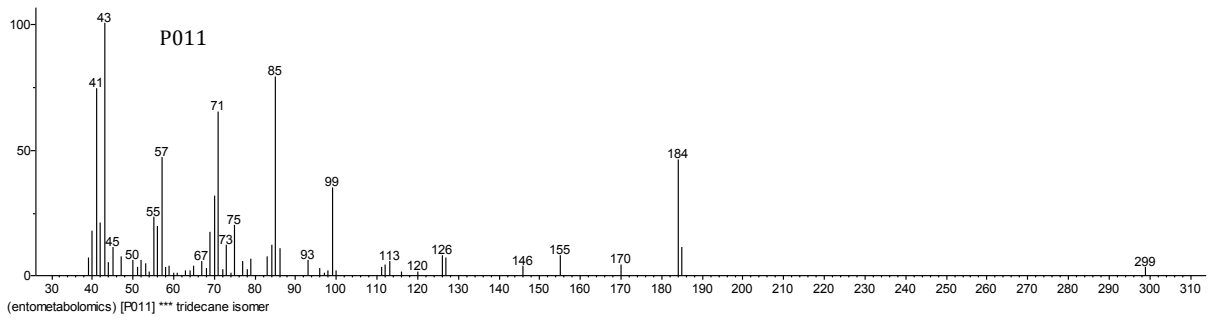
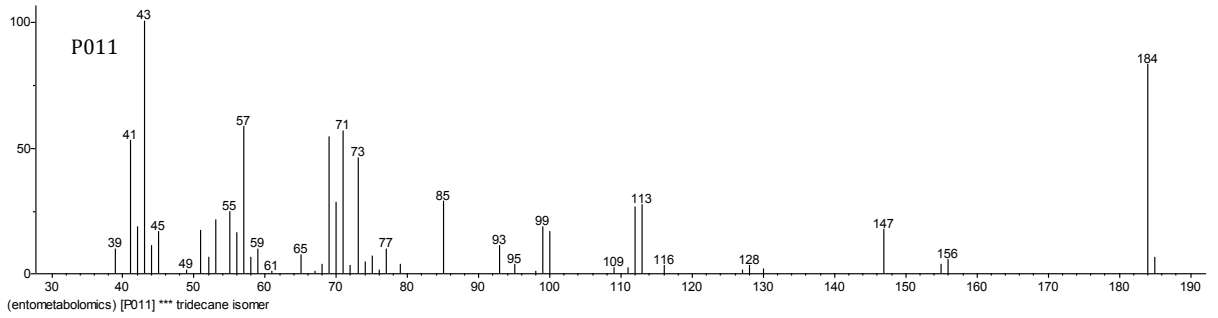
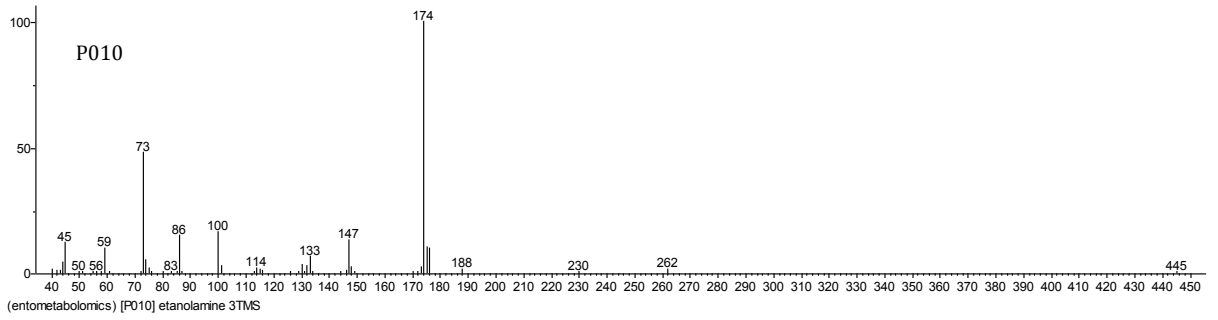
Period uzorkovanja	Lokalitet pčelinjaka	Homogenat pčelâ					Hemolimfa pčelâ					
		AChE mU/mg proteina	SOD U/mg proteina	CAT U/mg proteina	GST U/mg proteina	MDA nmol/mg proteina	SOD U/mg proteina	CAT U/mg proteina	GST U/mg proteina	POx mU/mg proteina	proPOx mU/mg proteina	GOx mU/mg proteina
PPM Početak perioda mirovanja	Beograd	1,44 ± 0,40	23,3 ± 2,81	22,9 ± 1,95	30,6 ± 1,89	2,82 ± 0,40	6,25 ± 1,27	10,5 ± 0,66	7,56 ± 1,26	19,5 ± 2,63	32,9 ± 3,51	0,18 ± 0,05
	Susek	1,33 ± 0,31	17,6 ± 2,41	11,9 ± 1,19	28,6 ± 1,99	5,54 ± 0,82	8,39 ± 0,64	6,15 ± 0,89	17,5 ± 2,60	*ND	*ND	*ND
	Zajača	1,61 ± 0,41	23,3 ± 2,69	17,8 ± 3,27	34,4 ± 0,64	2,72 ± 0,72	7,20 ± 0,69	3,02 ± 0,99	7,56 ± 0,24	22,7 ± 1,76	27,5 ± 2,23	1,73 ± 0,18
KPM Kraj perioda mirovanja	Beograd	2,04 ± 0,26	24,3 ± 2,46	38,1 ± 6,46	36,2 ± 1,08	5,25 ± 0,80	7,63 ± 0,74	13,5 ± 2,08	7,72 ± 2,17	12,7 ± 2,22	48,5 ± 9,65	0,37 ± 0,02
	Susek	5,59 ± 1,35	33,1 ± 3,24	61,9 ± 5,70	40,1 ± 2,72	12,0 ± 2,18	24,7 ± 3,33	12,4 ± 0,87	22,6 ± 3,64	78,4 ± 5,11	193 ± 14,0	0,52 ± 0,07
	Zajača	4,55 ± 0,76	2,52 ± 0,42	42,8 ± 5,35	45,5 ± 3,62	13,4 ± 1,88	11,8 ± 1,49	7,23 ± 0,98	13,9 ± 1,35	33,9 ± 2,82	129 ± 6,83	0,82 ± 0,10
AP Aktivni period	Beograd	1,88 ± 0,25	18,9 ± 1,50	33,1 ± 3,53	36,7 ± 3,53	2,20 ± 0,42	8,05 ± 1,49	3,49 ± 0,11	7,63 ± 0,41	42,5 ± 4,68	39,4 ± 7,31	0,30 ± 0,09
	Susek	3,53 ± 0,73	32,2 ± 4,32	54,2 ± 6,34	53,9 ± 4,09	5,21 ± 0,49	10,3 ± 0,16	4,37 ± 0,45	6,32 ± 1,51	31,9 ± 3,24	56,1 ± 6,90	0,20 ± 0,04
	Zajača	5,03 ± 0,62	34,9 ± 5,12	55,2 ± 9,53	57,8 ± 4,94	6,64 ± 2,04	12,3 ± 1,62	7,20 ± 0,79	13,2 ± 0,49	114 ± 8,67	133 ± 7,17	0,08 ± 0,04

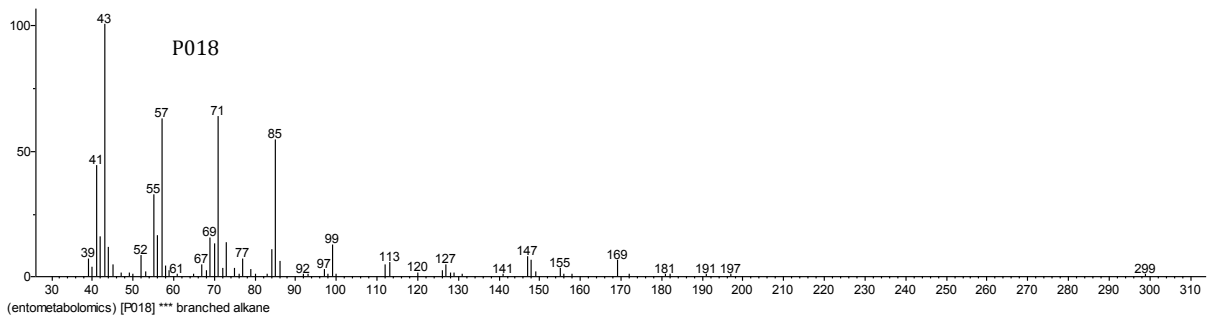
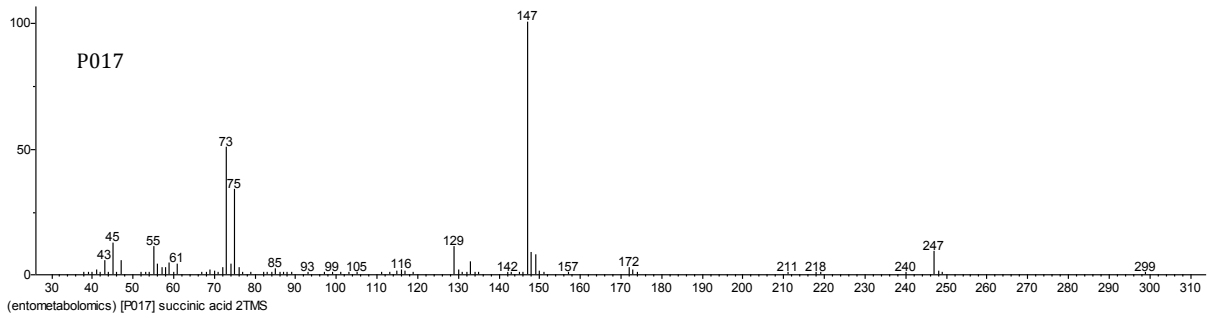
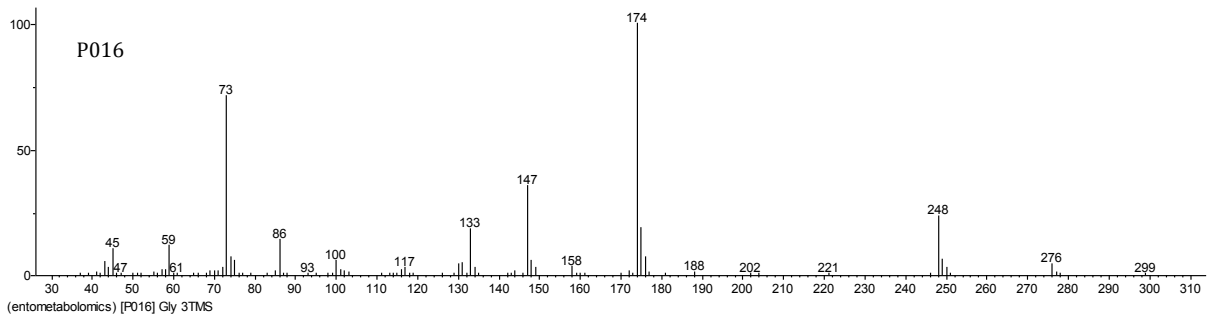
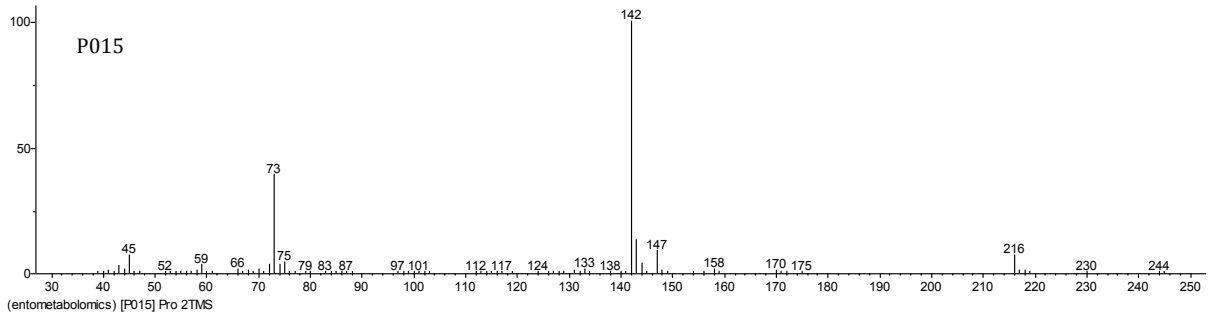
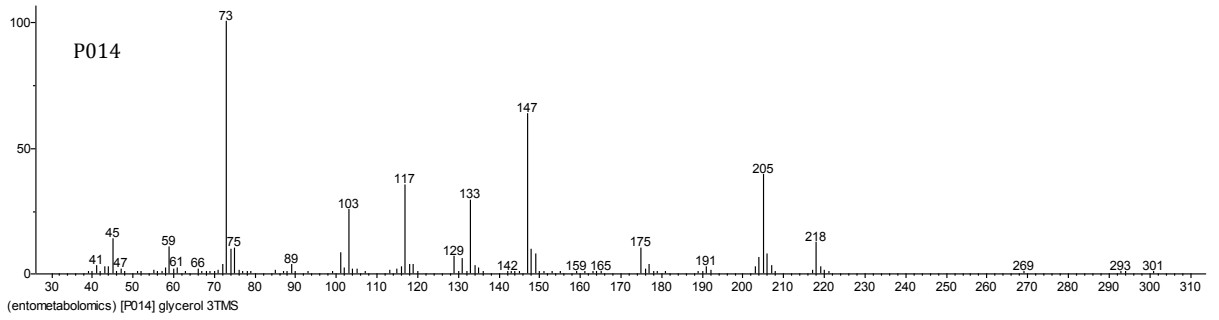
* ND – nije određivano

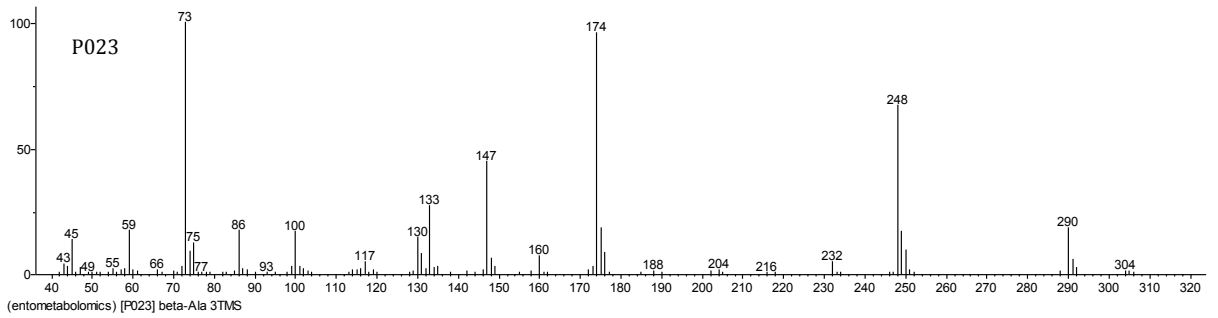
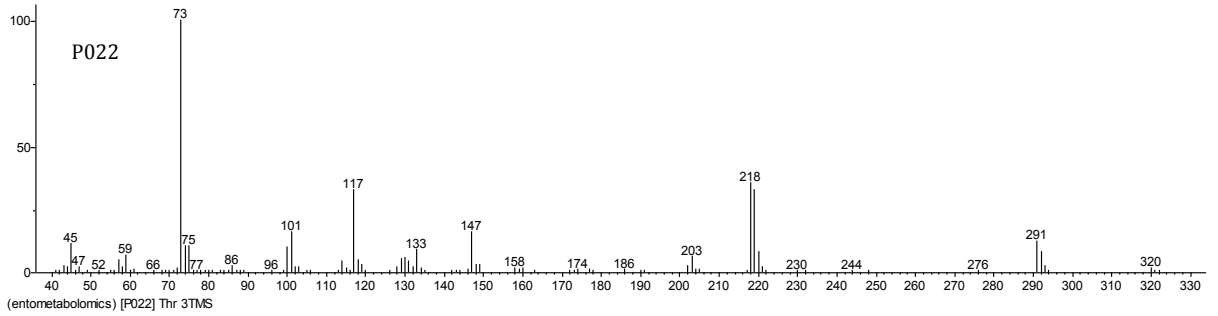
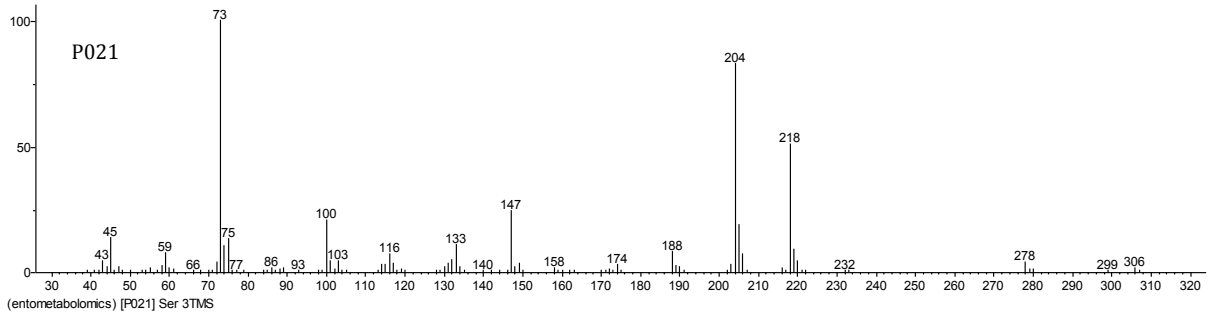
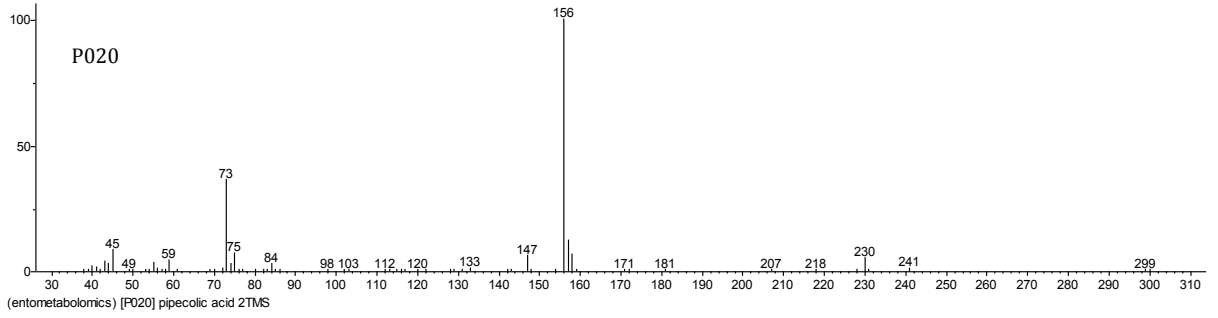
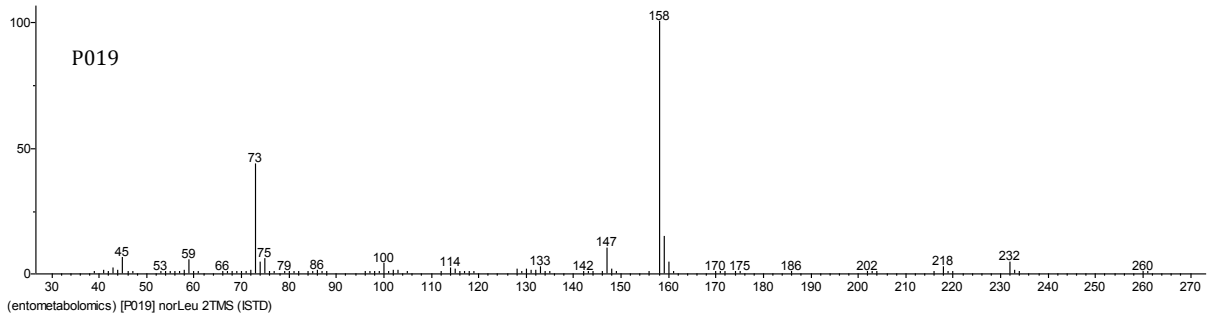
Prilog 4. Biblioteka spektara detektovanih jedinjenja u metabolomu hemolimfe medonosne pčele. Oznake (P001, P002, itd.) se odnose na detektovane pikove u hromatogramu. Identifikacije jedinjenja koje opisuju dati spektri su date u Tabeli 15.

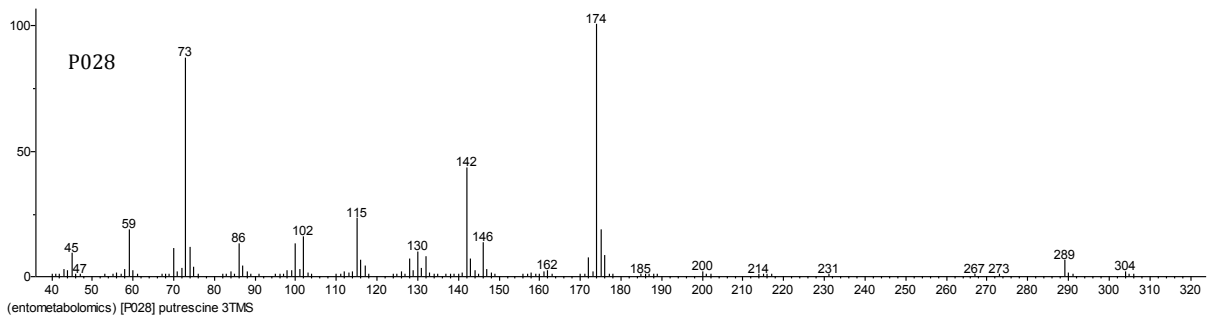
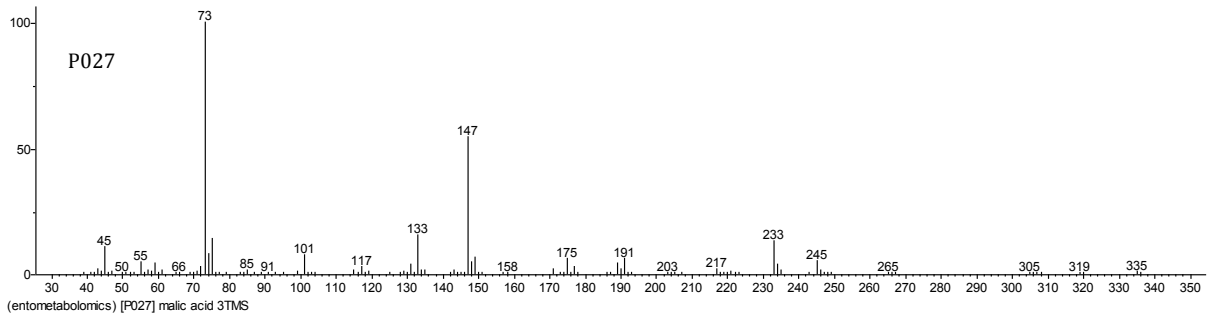
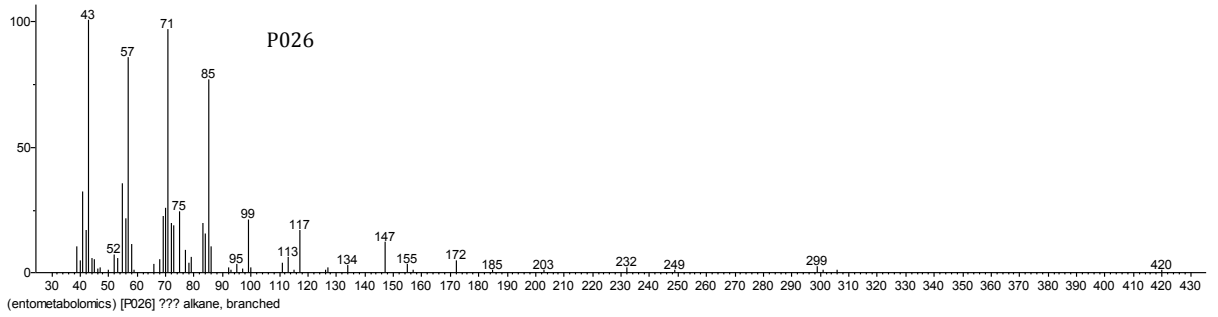
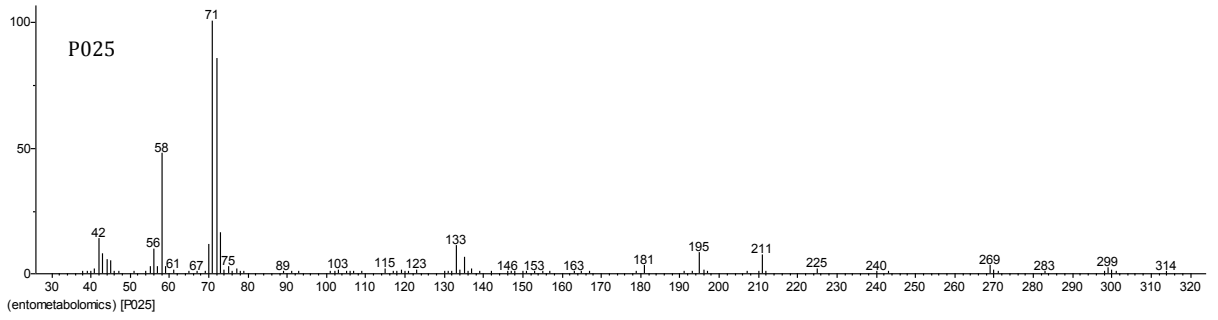
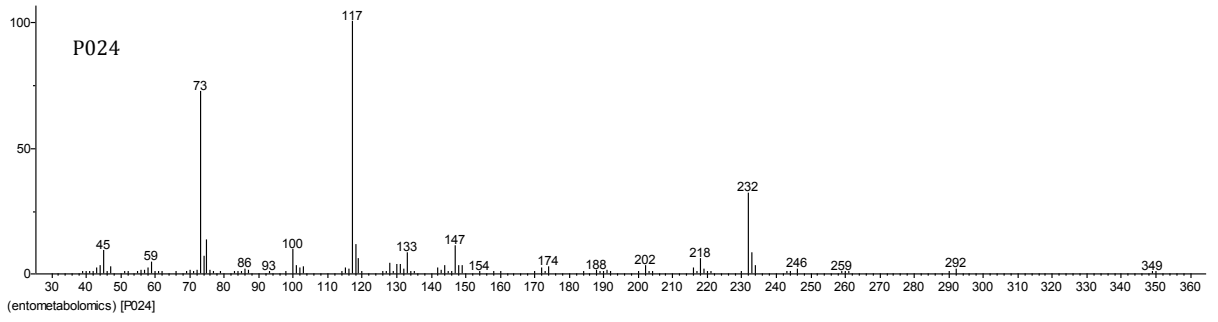


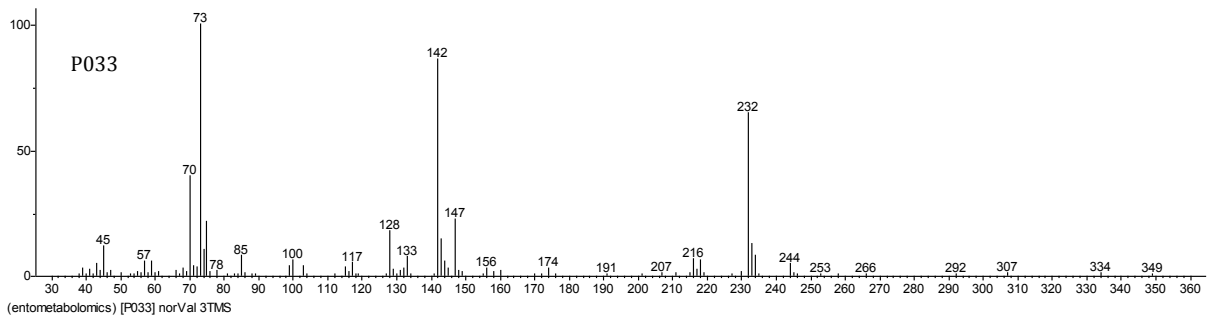
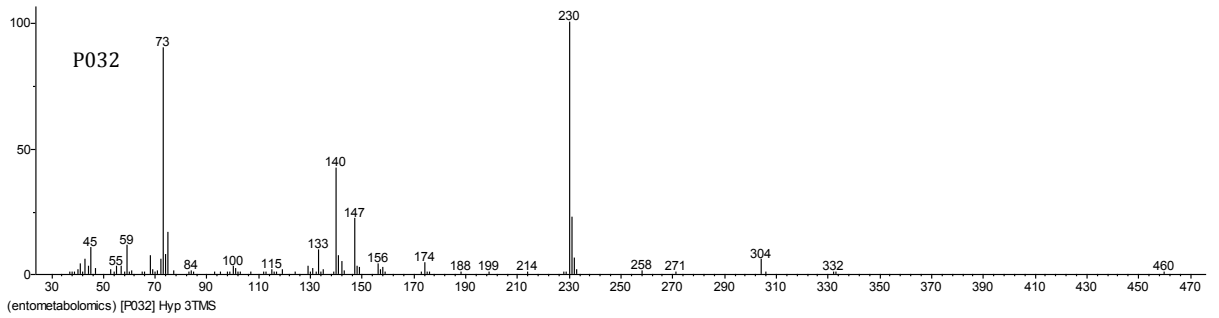
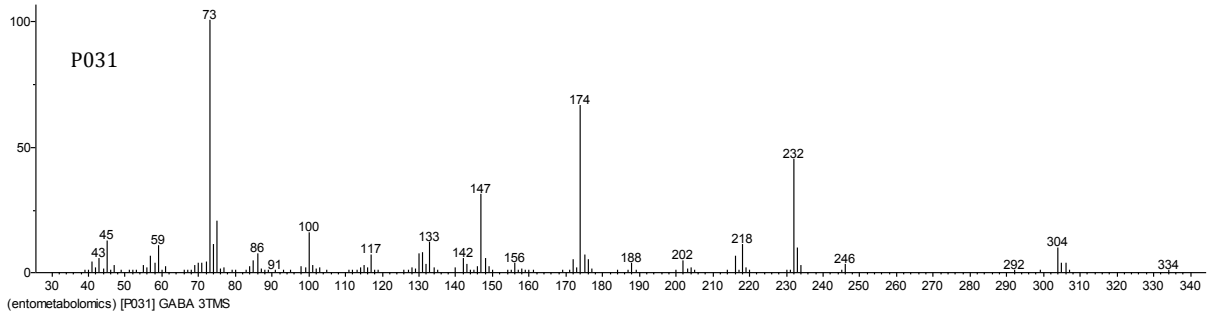
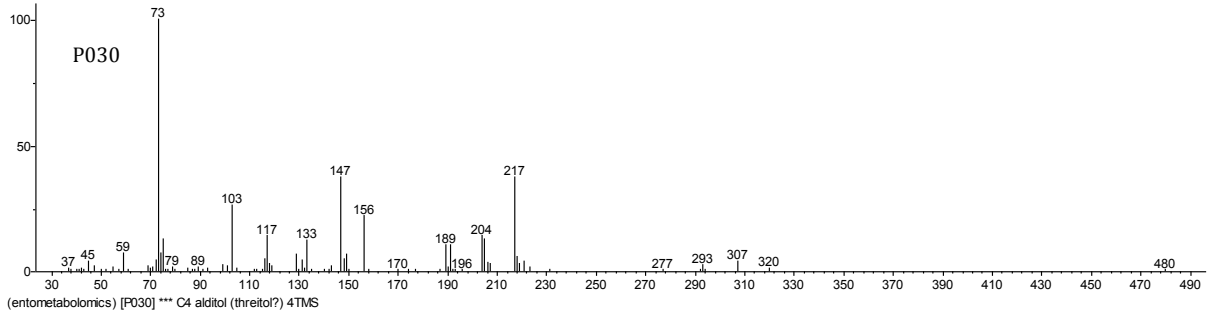
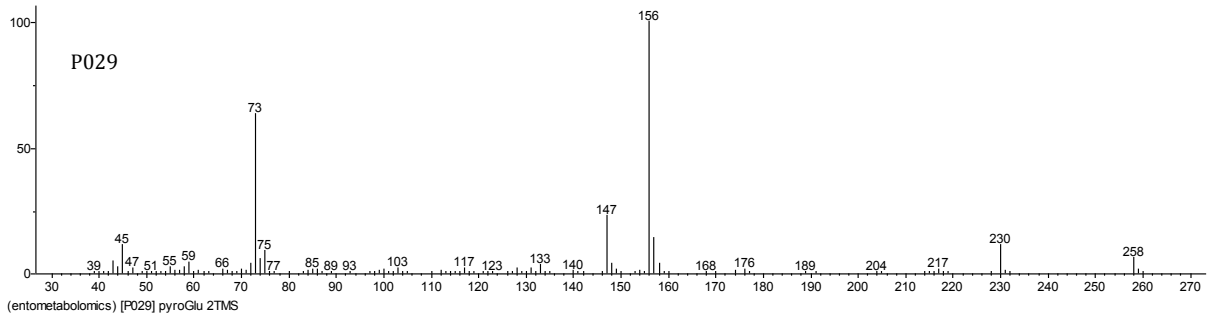


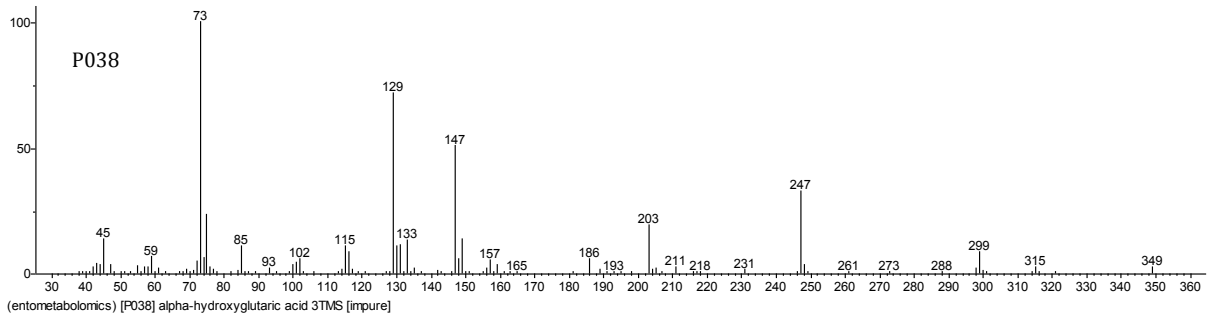
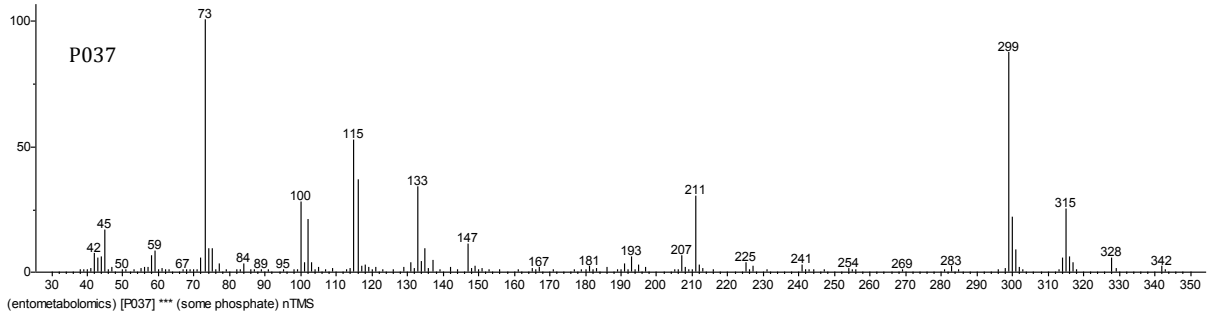
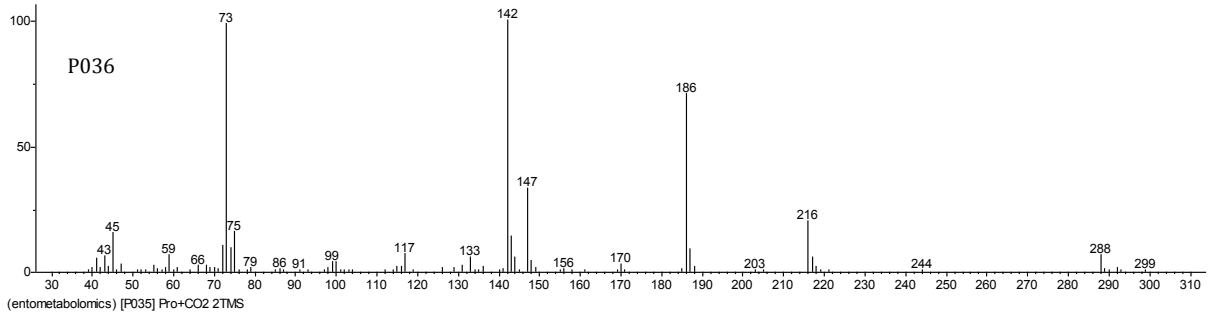
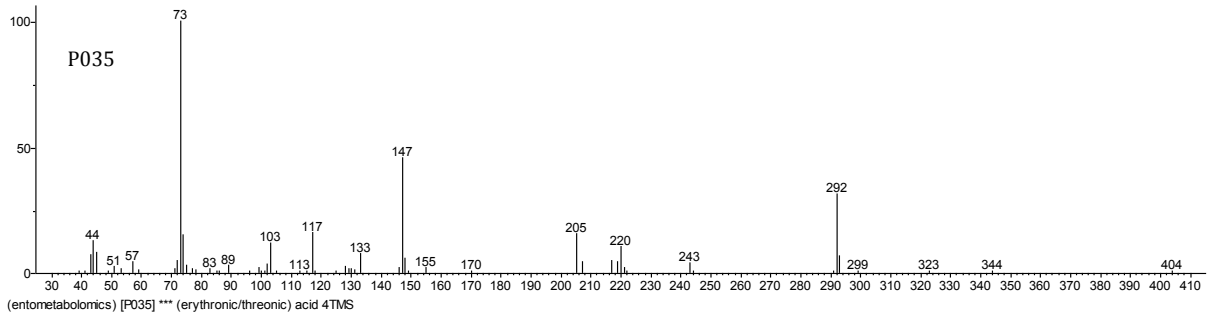
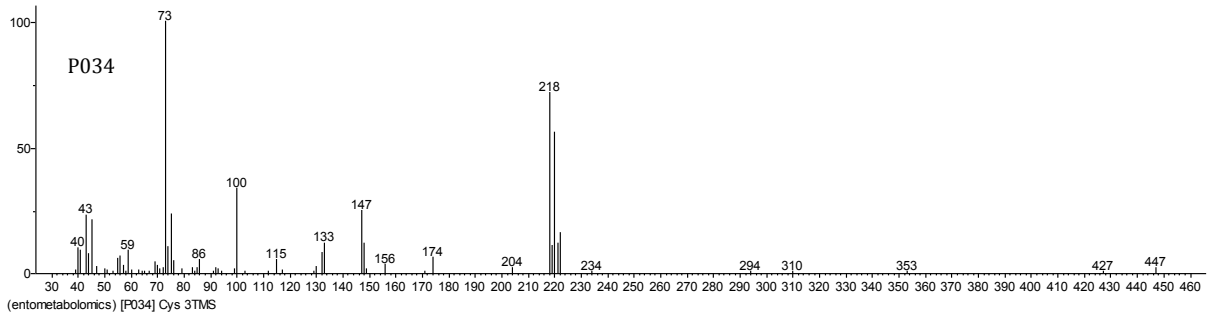


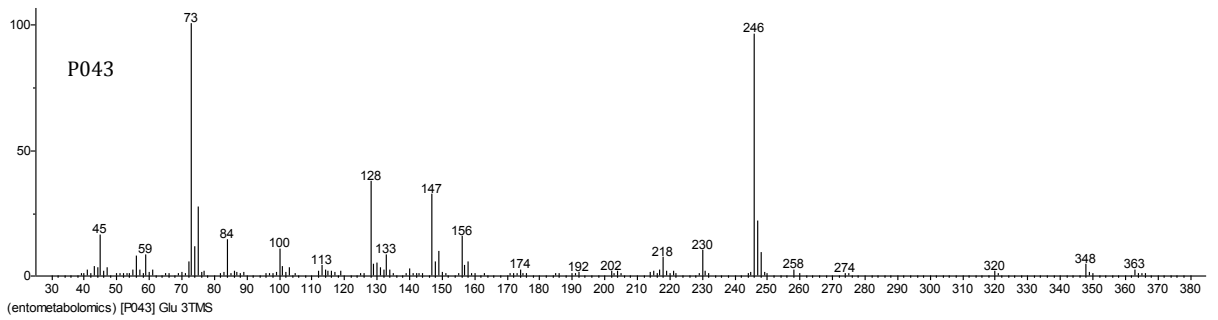
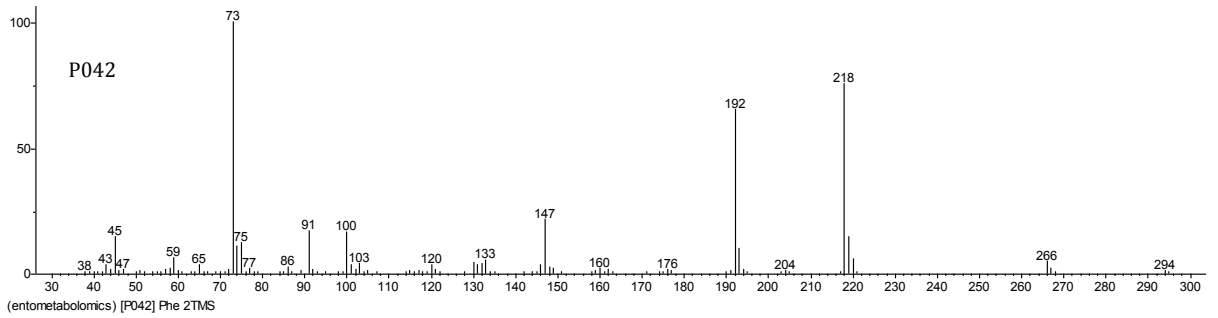
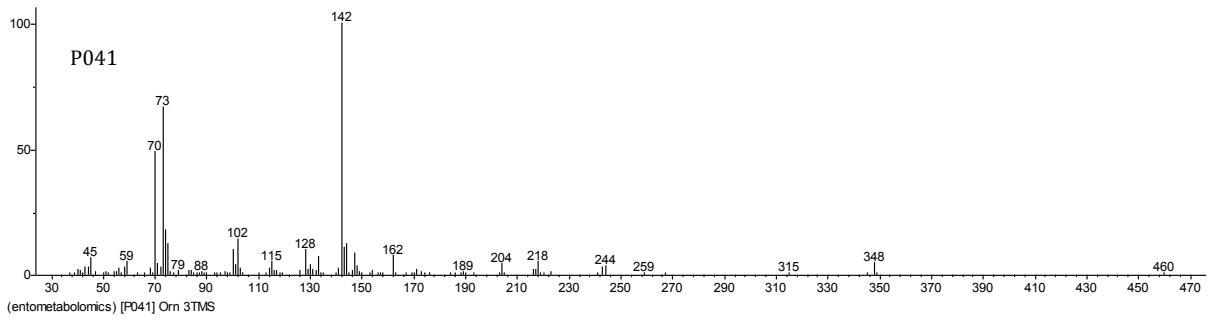
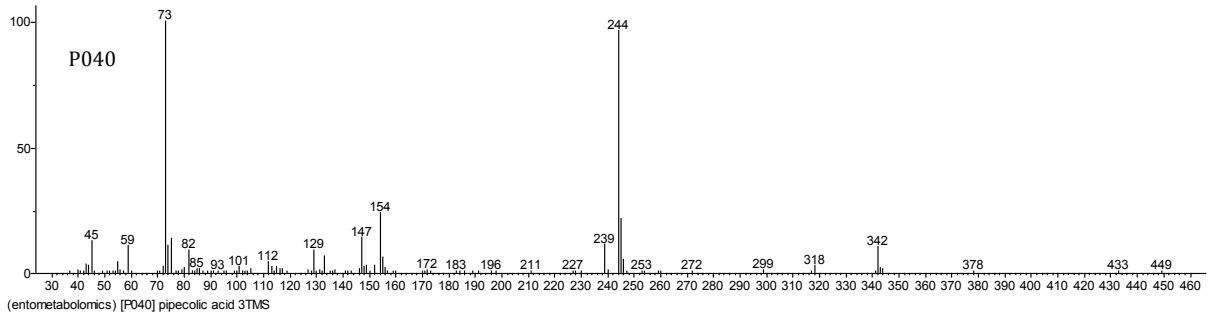
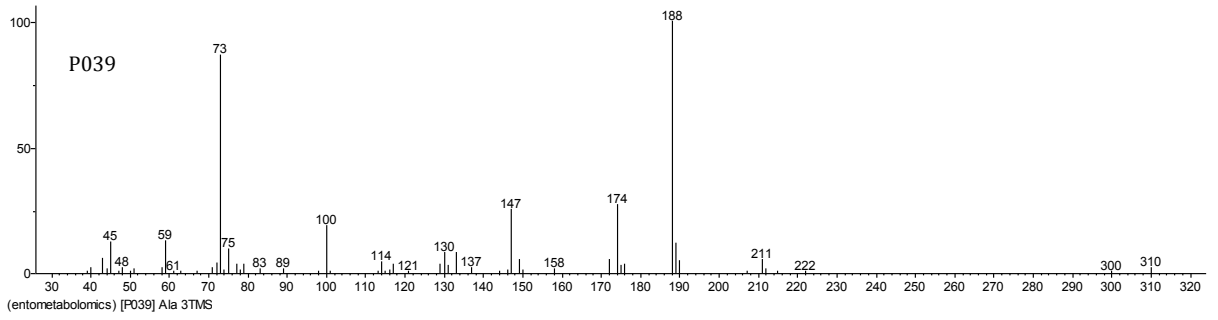


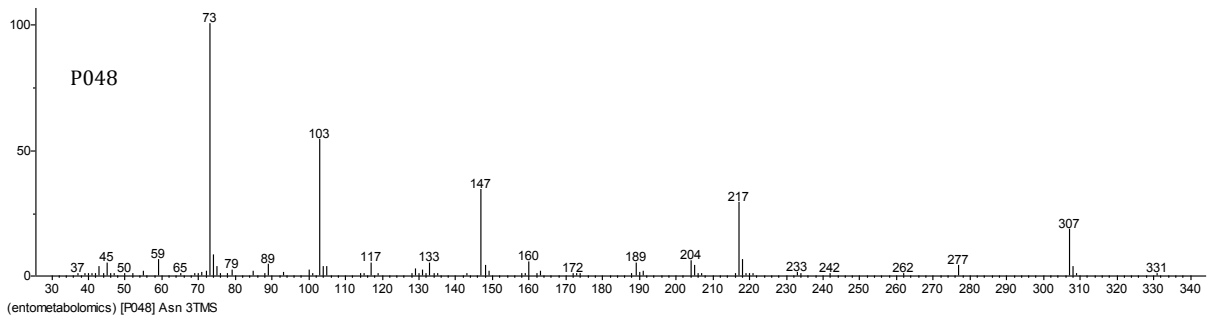
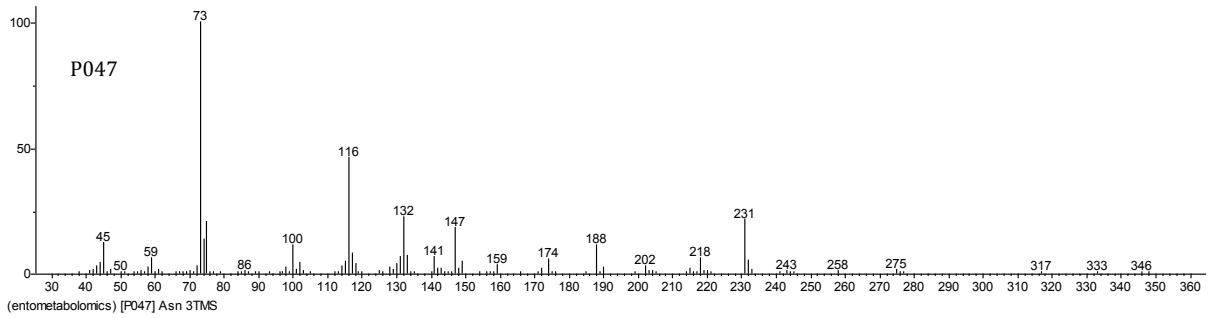
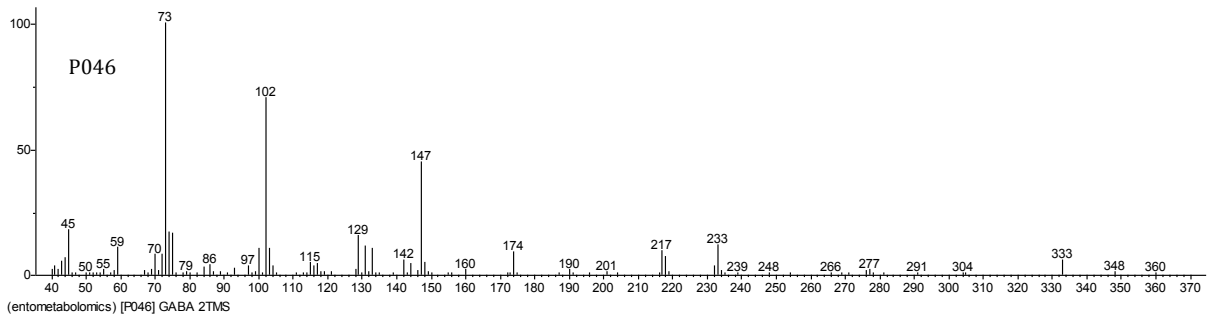
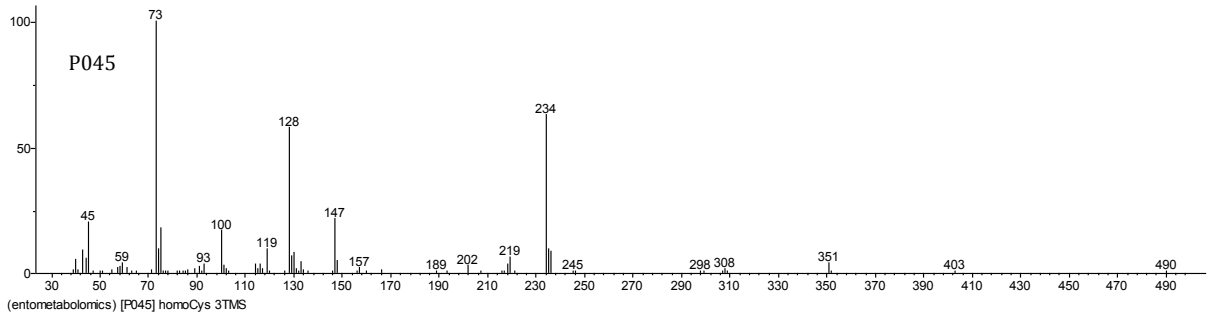
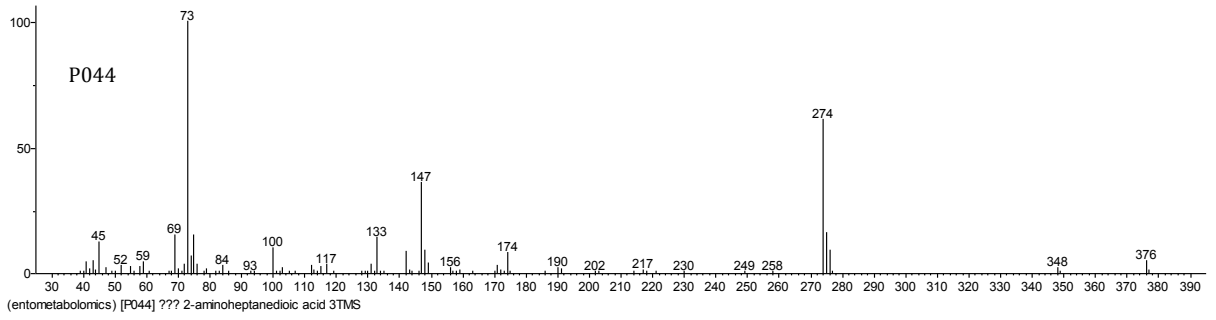


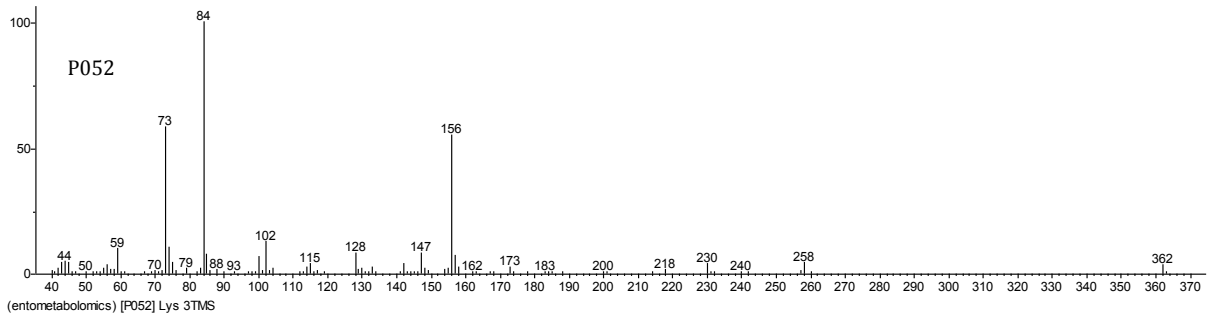
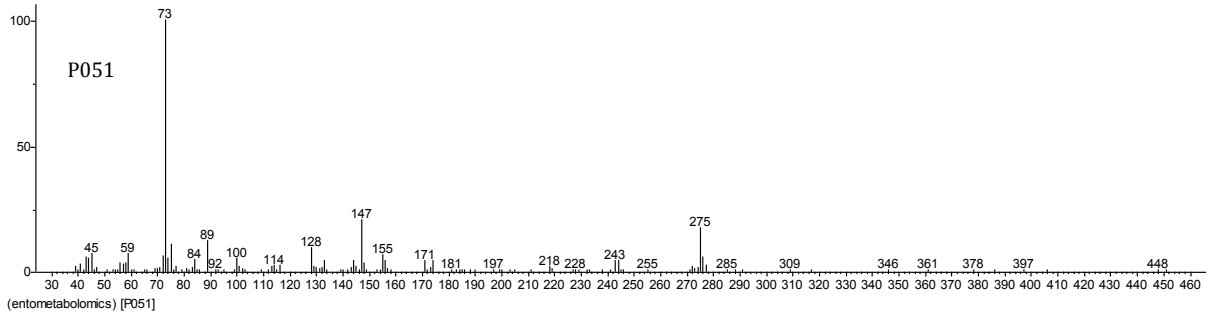
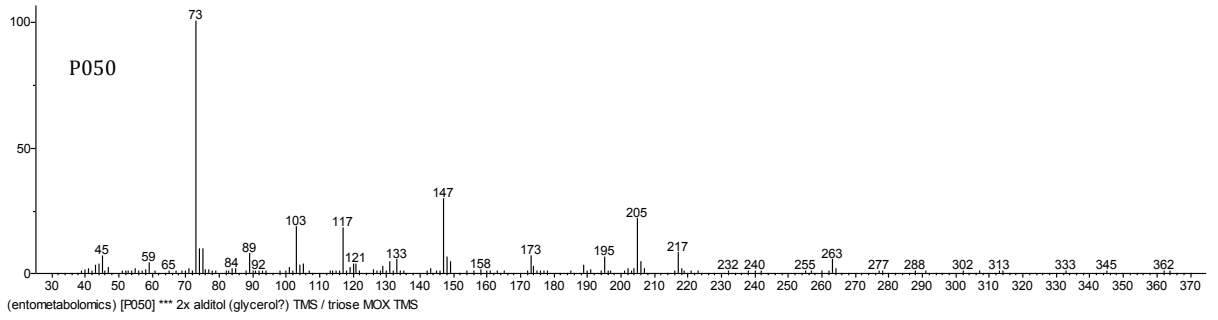
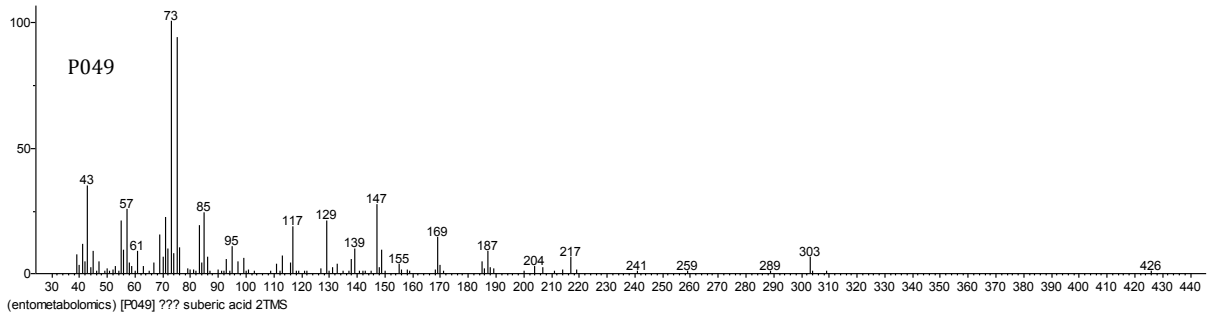


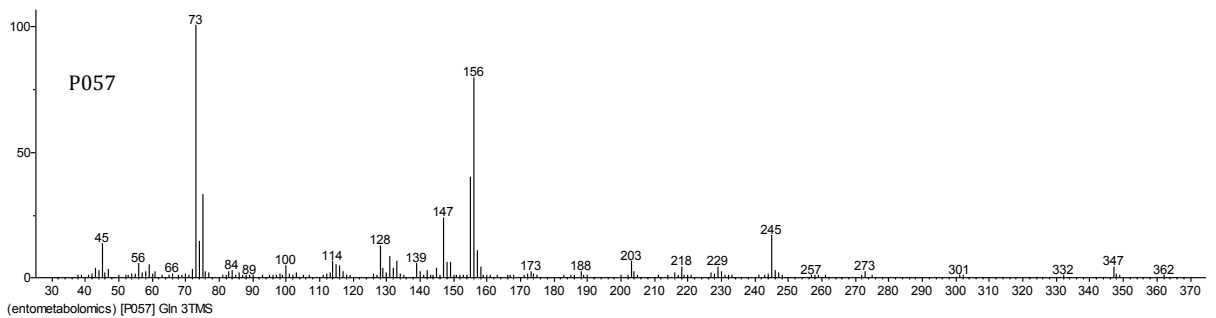
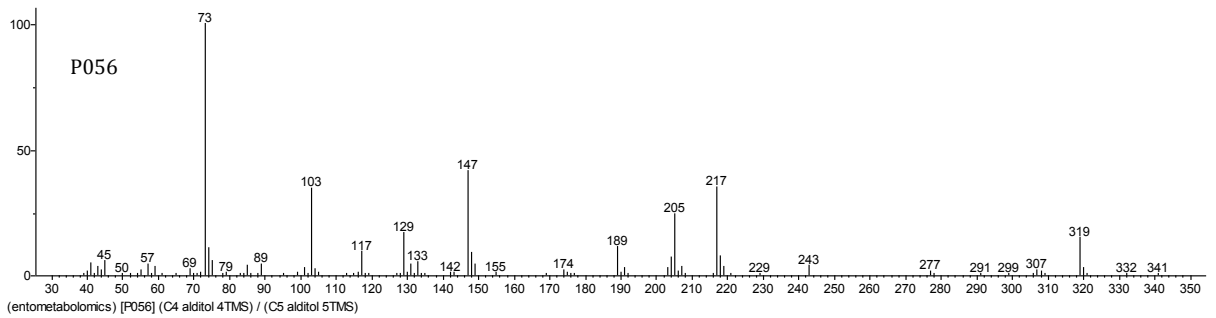
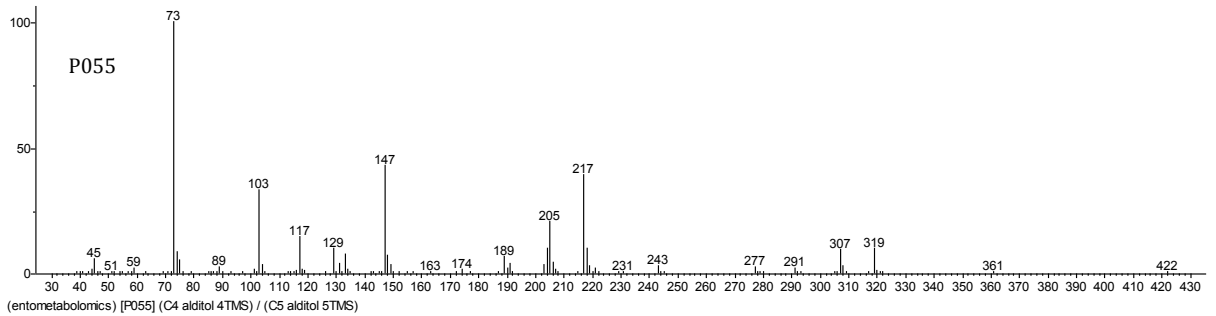
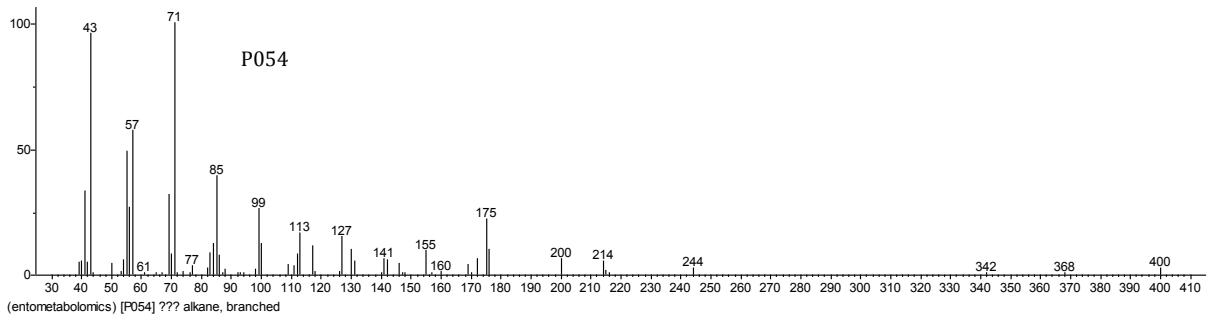
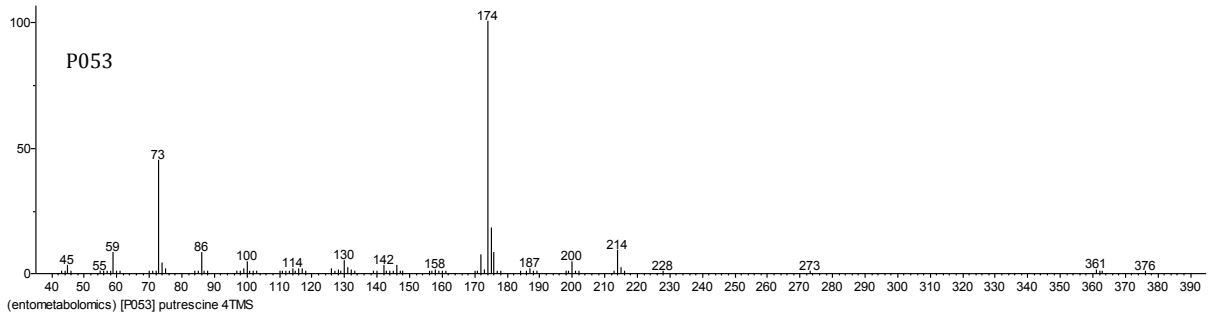


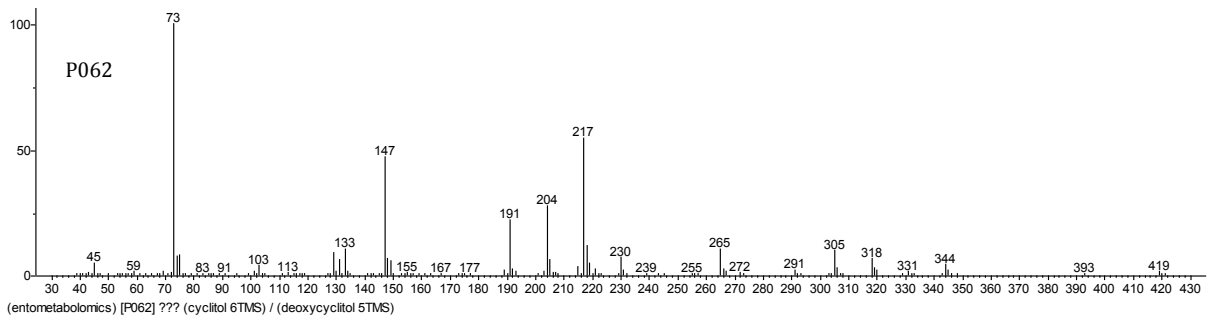
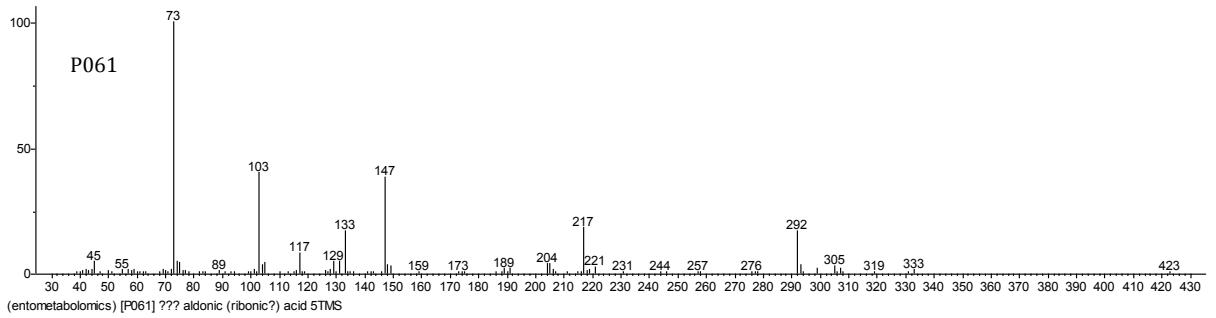
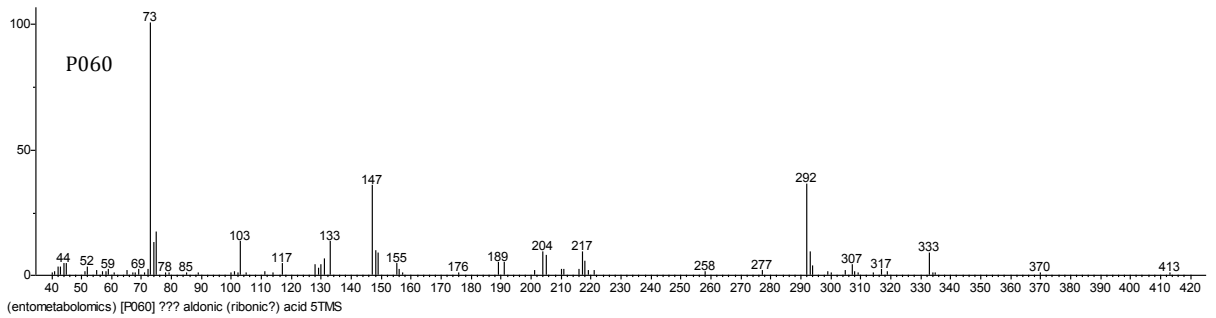
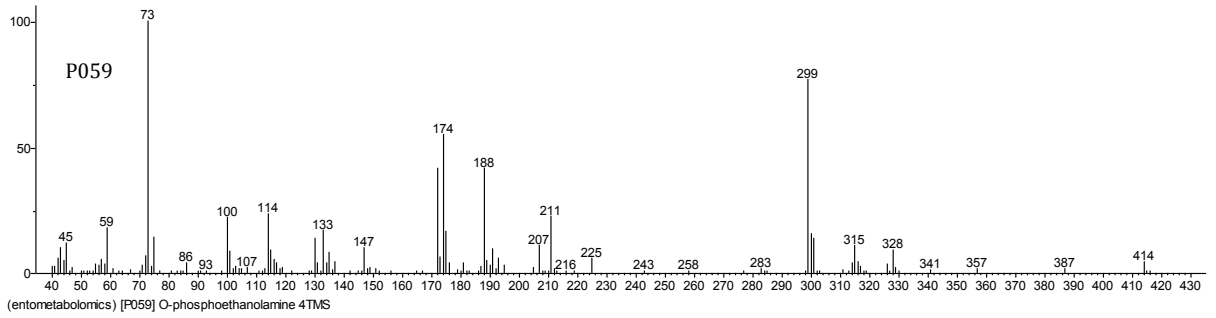
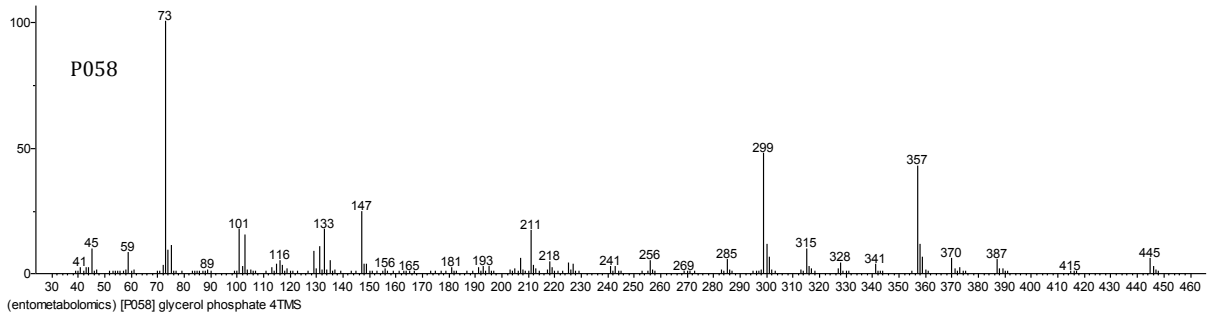


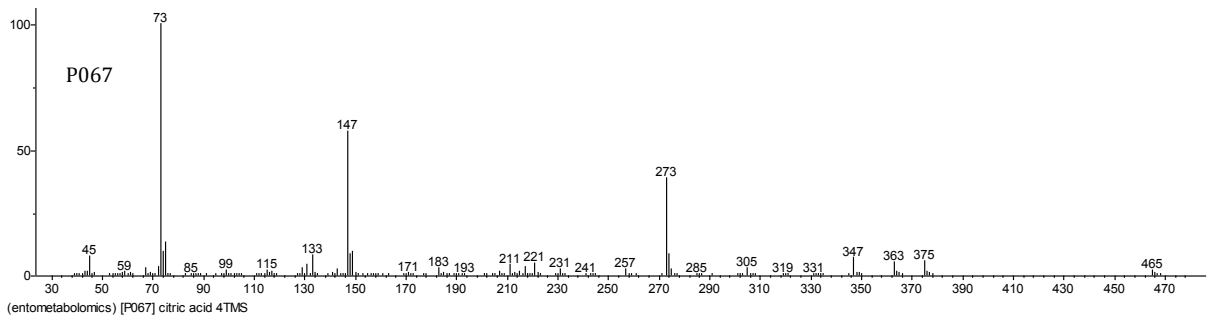
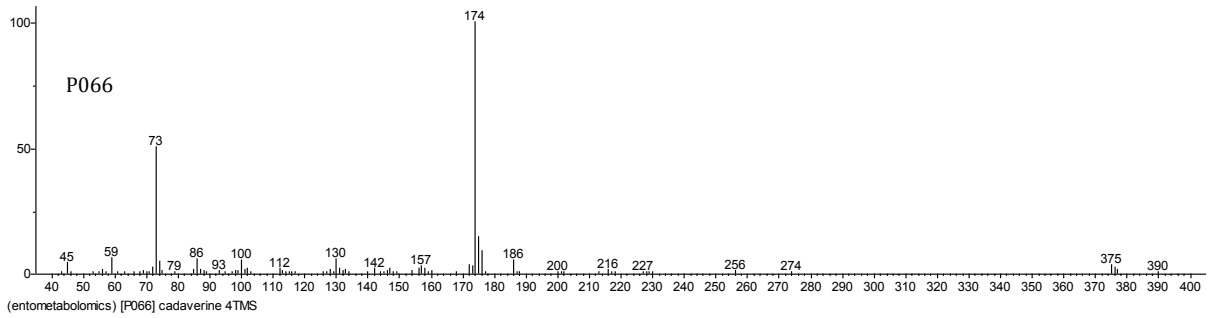
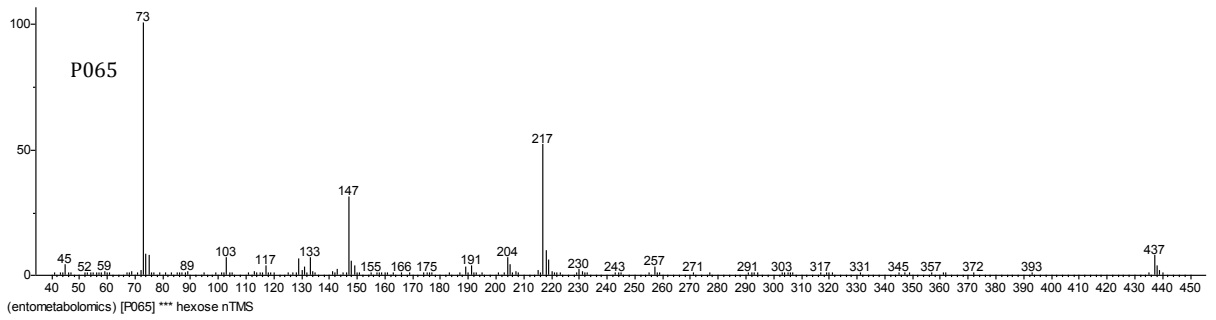
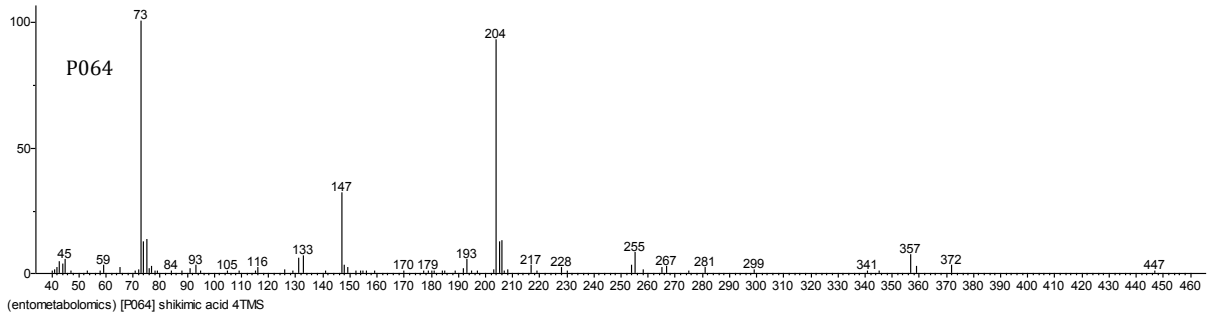
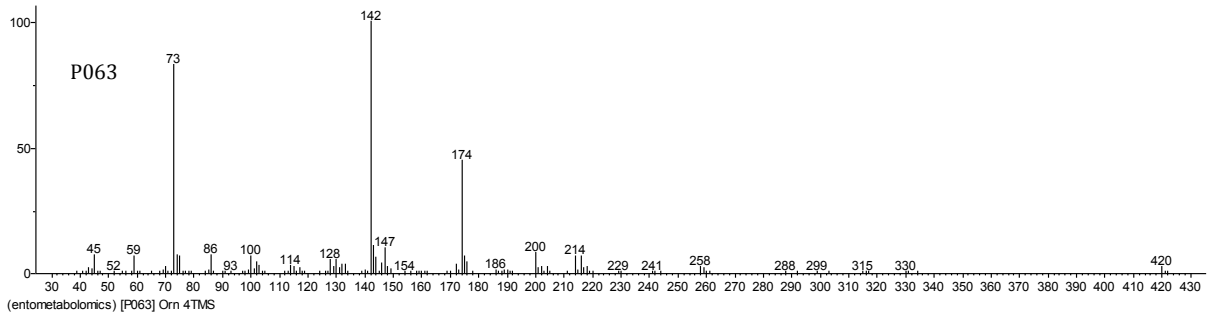


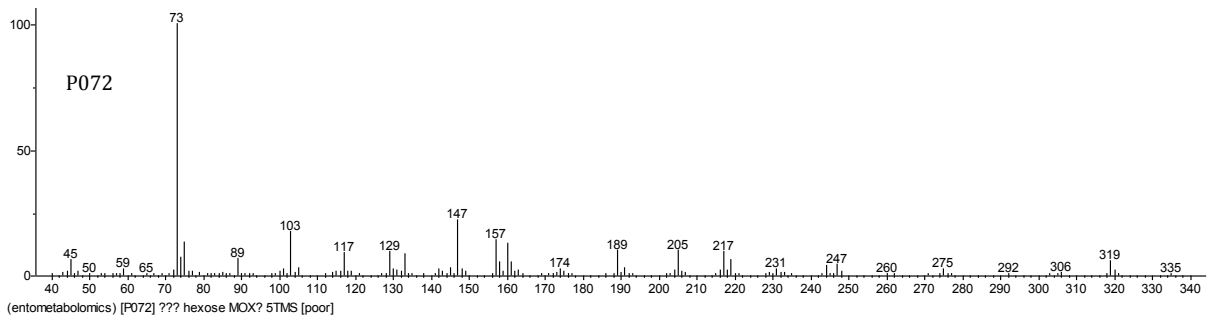
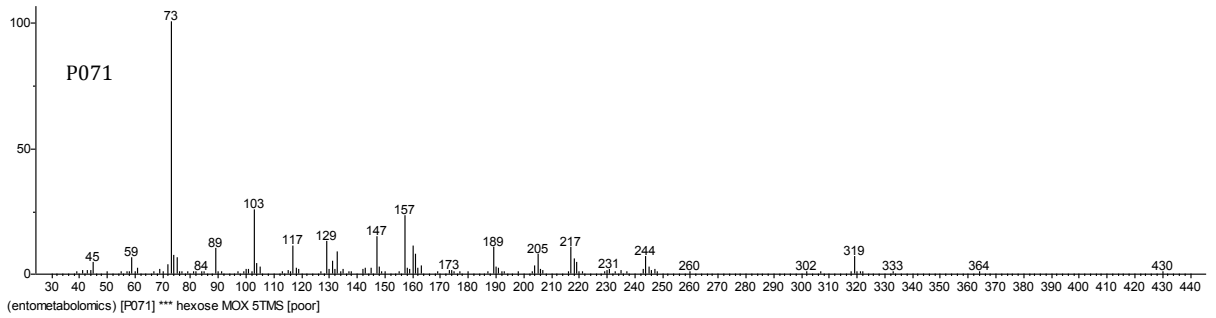
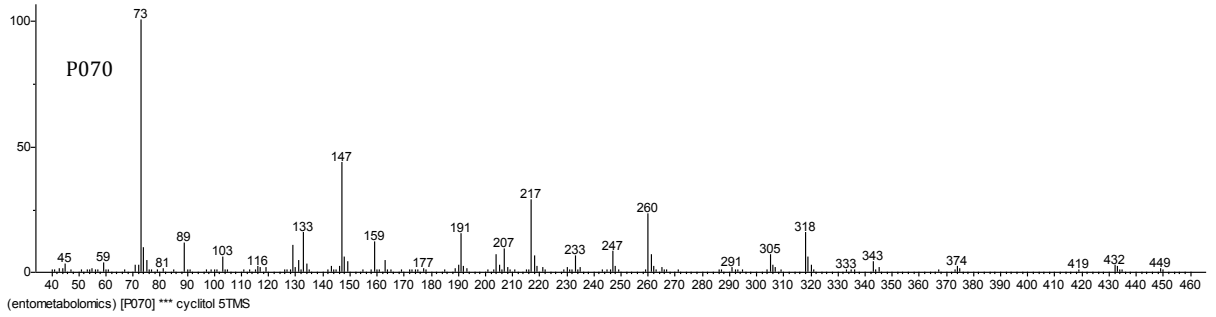
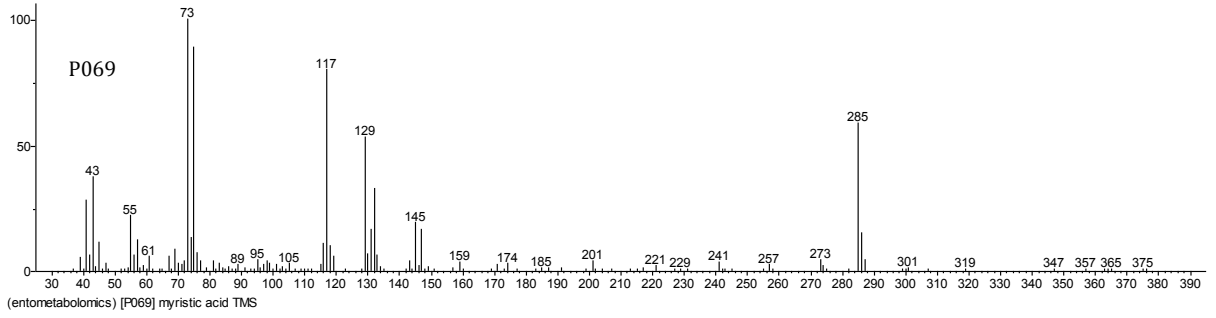
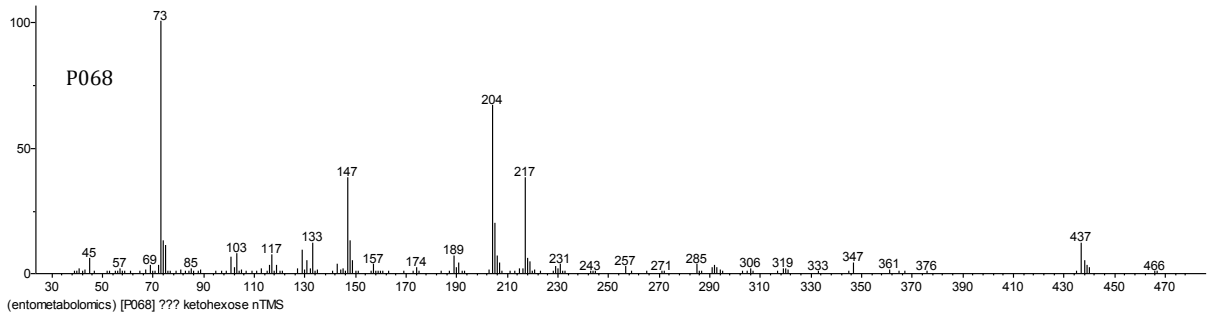


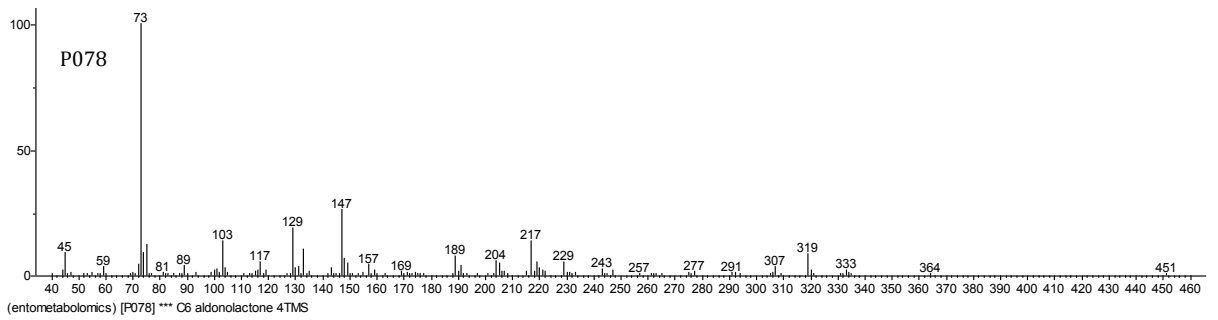
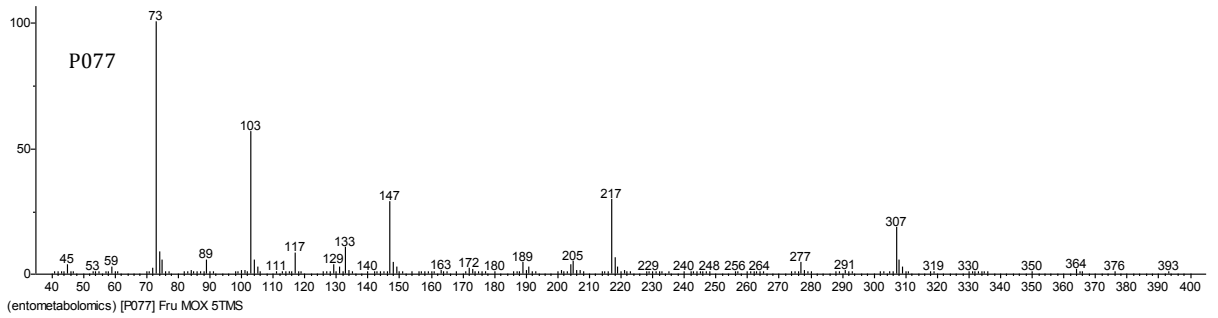
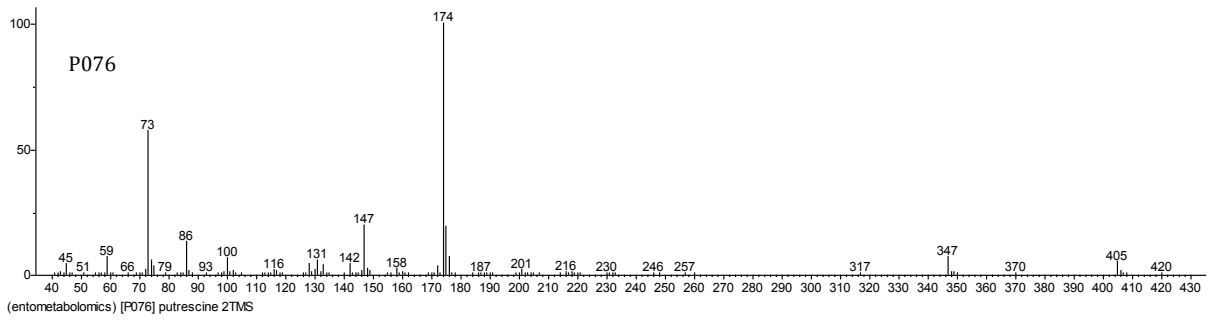
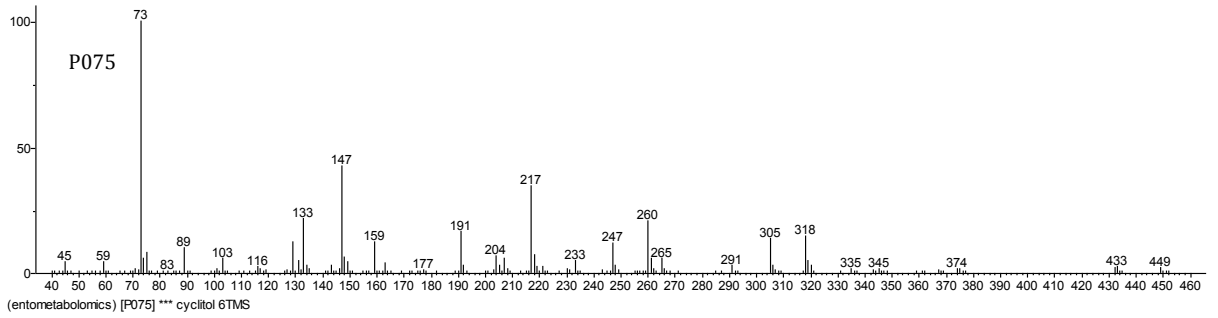
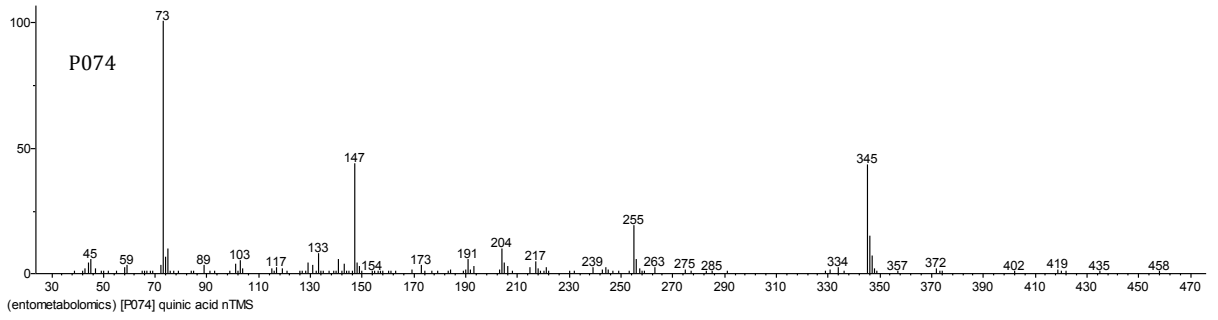


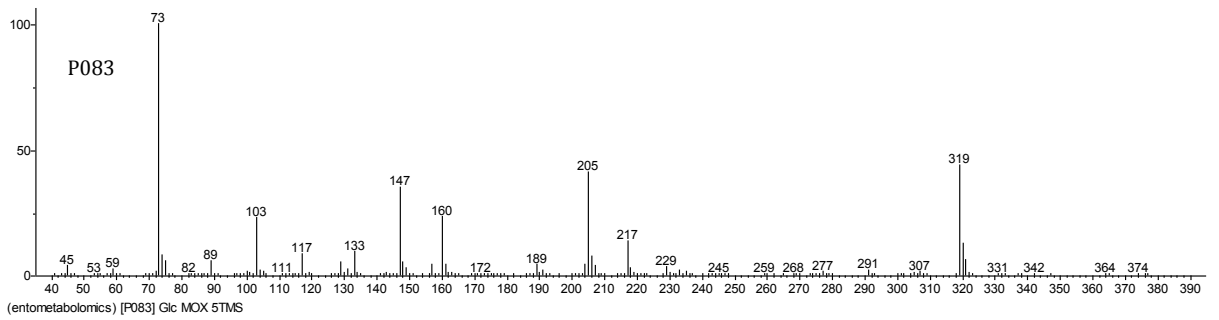
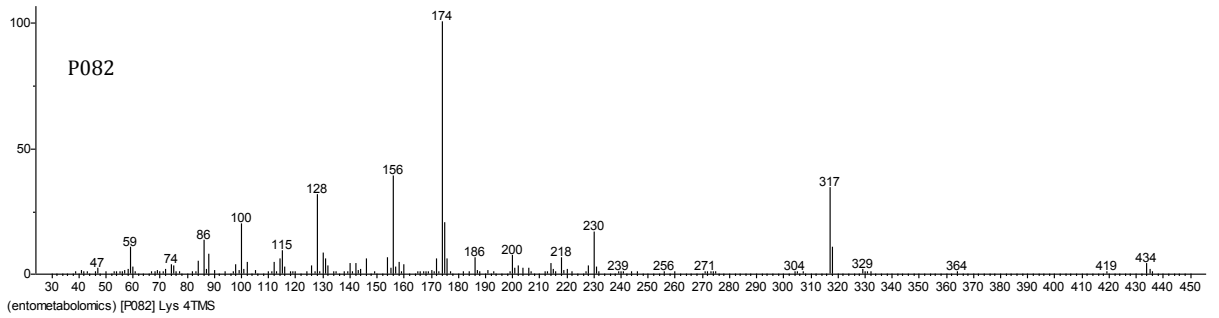
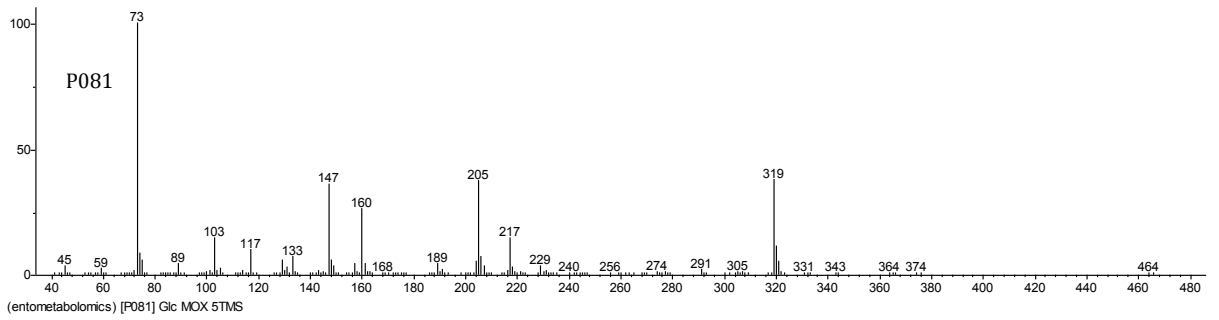
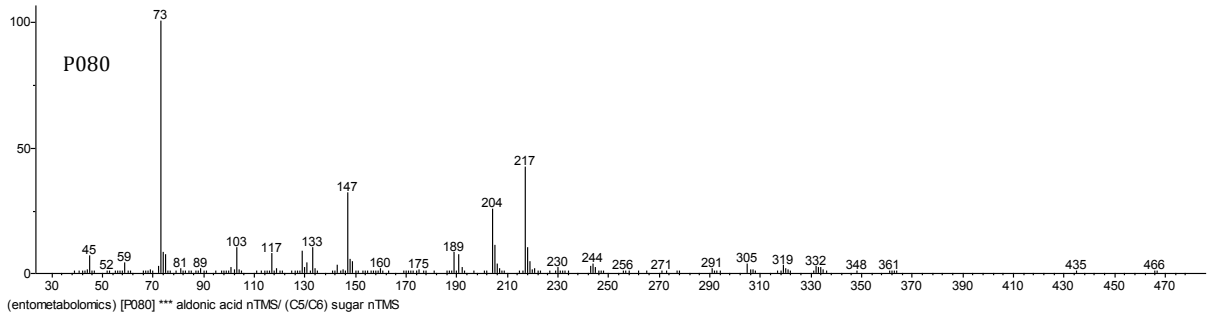
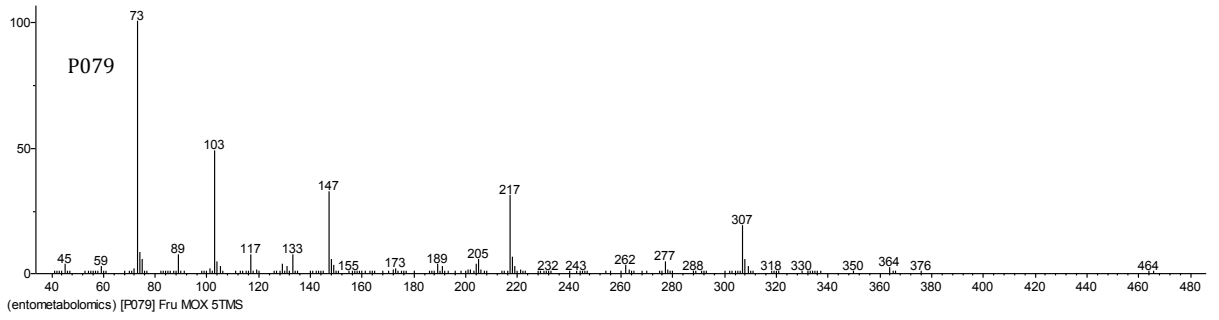


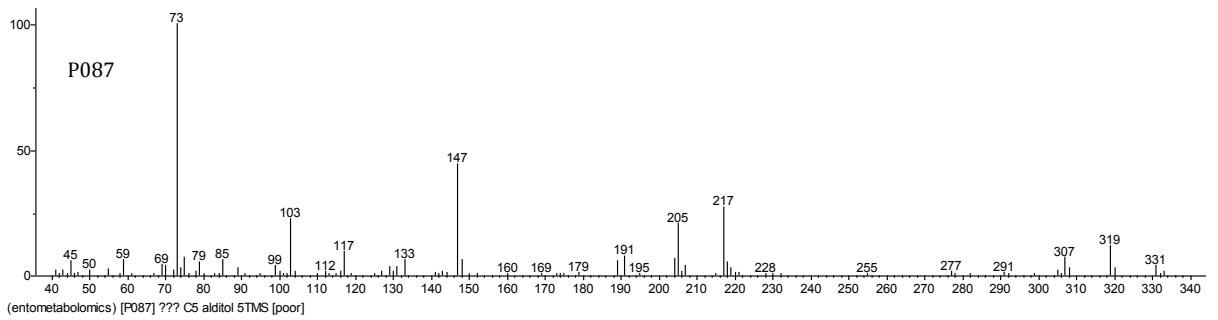
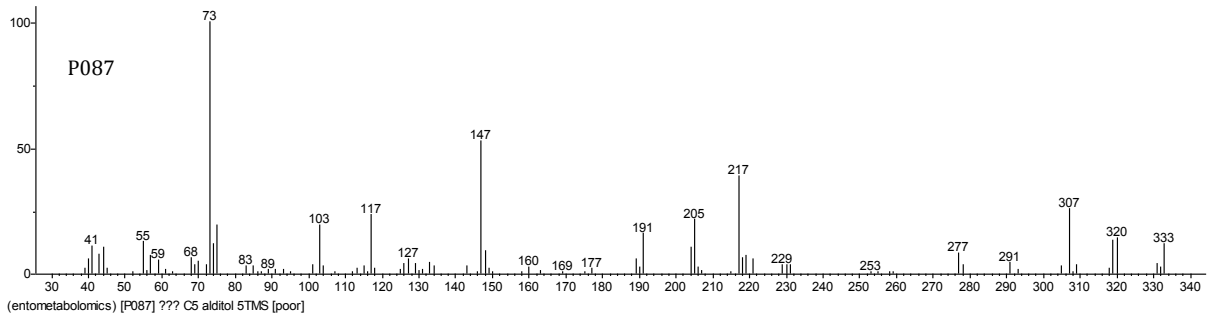
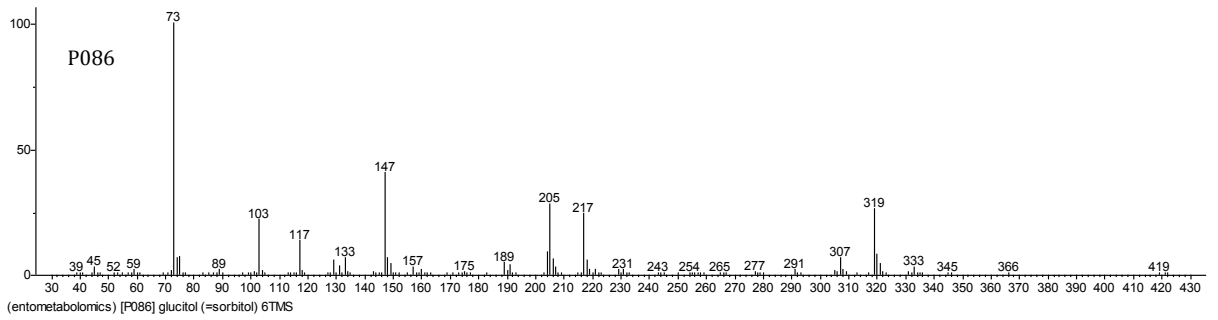
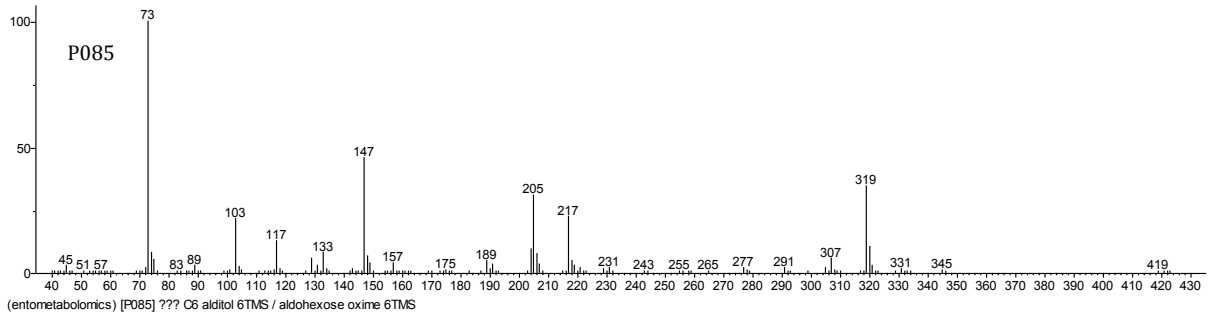
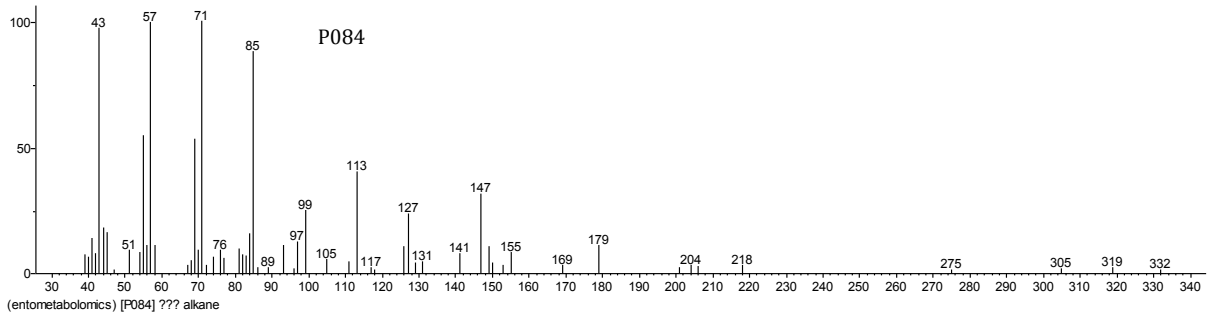


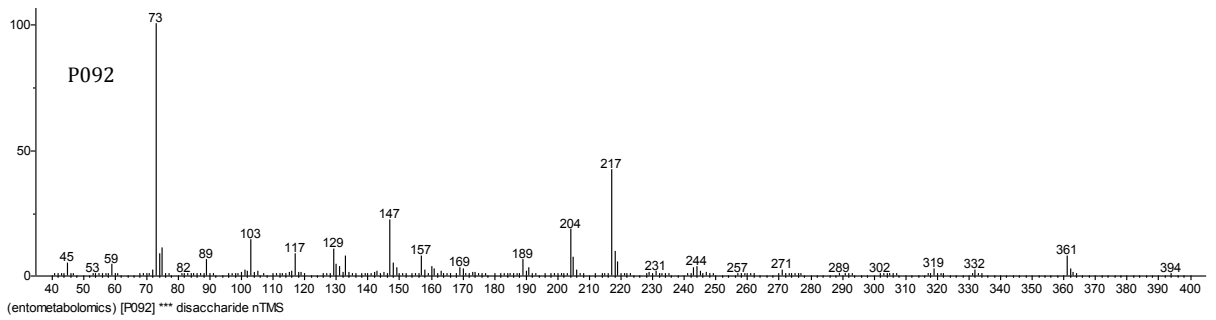
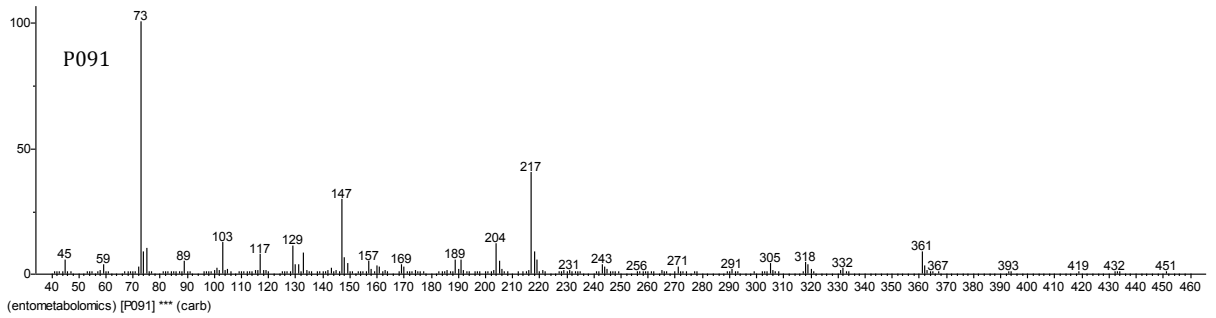
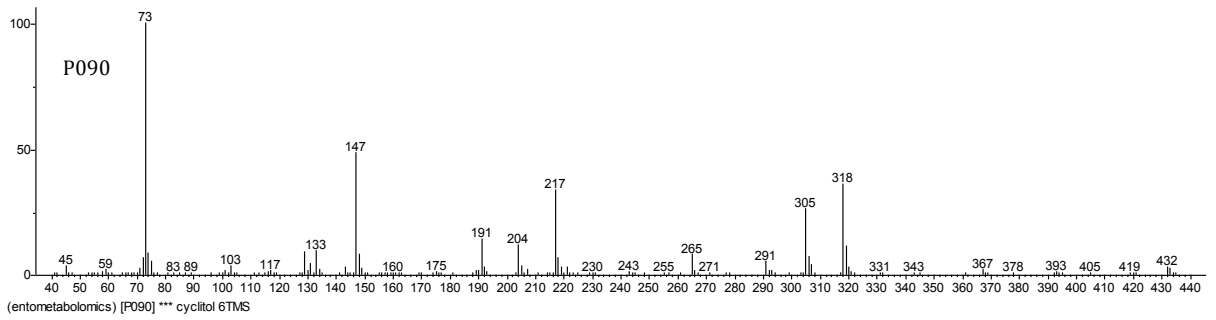
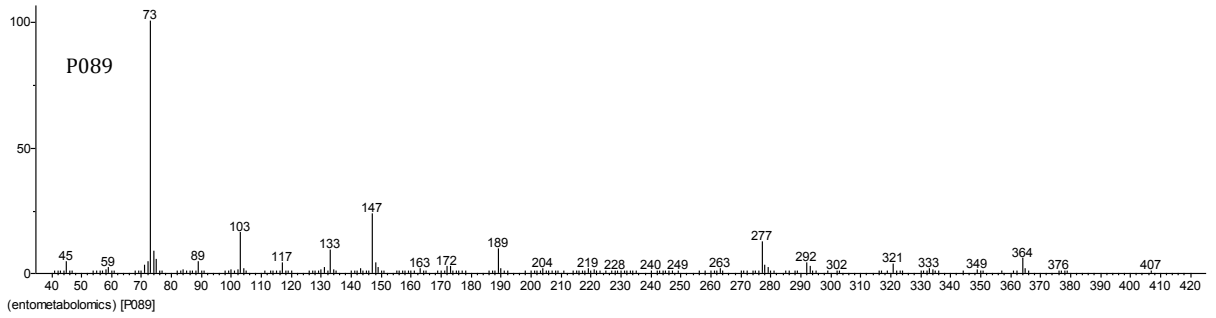
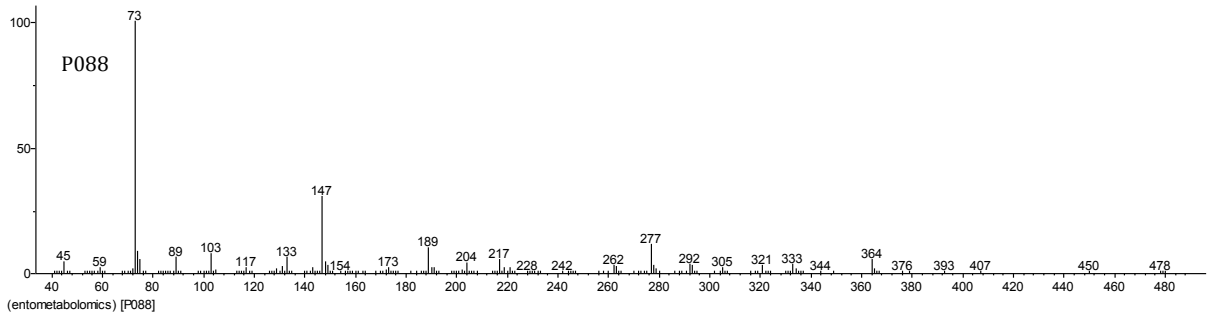


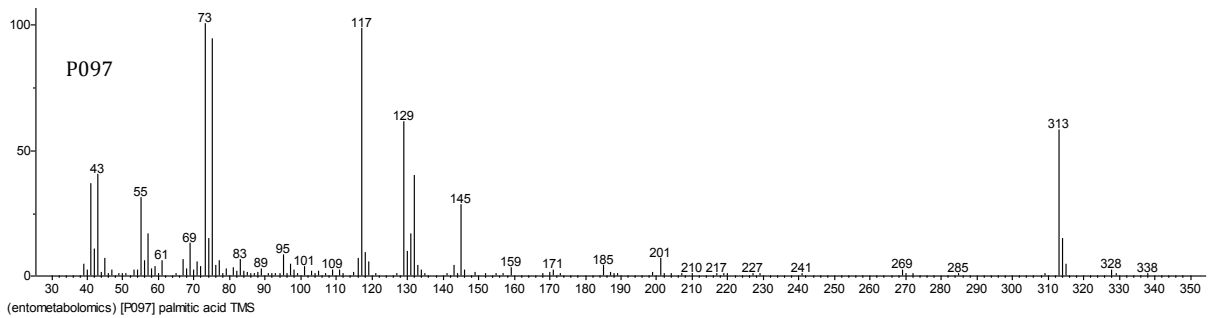
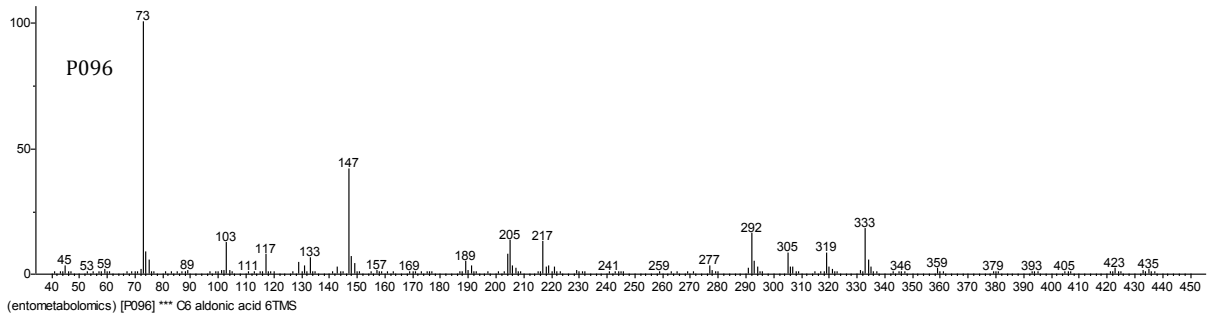
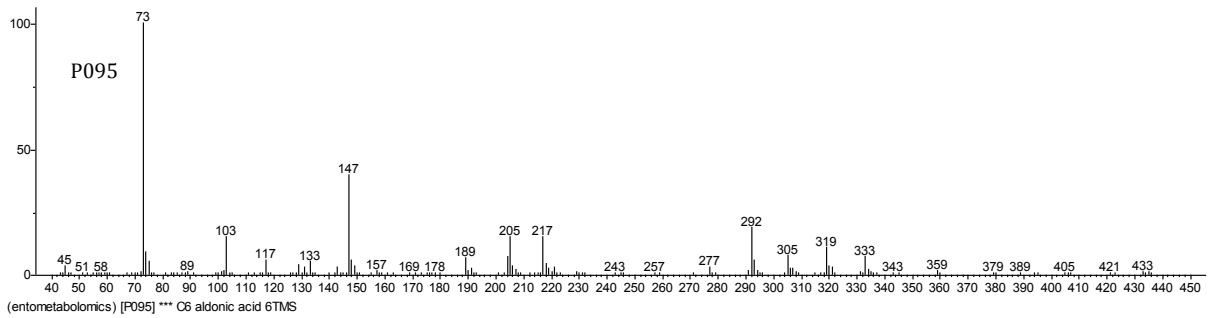
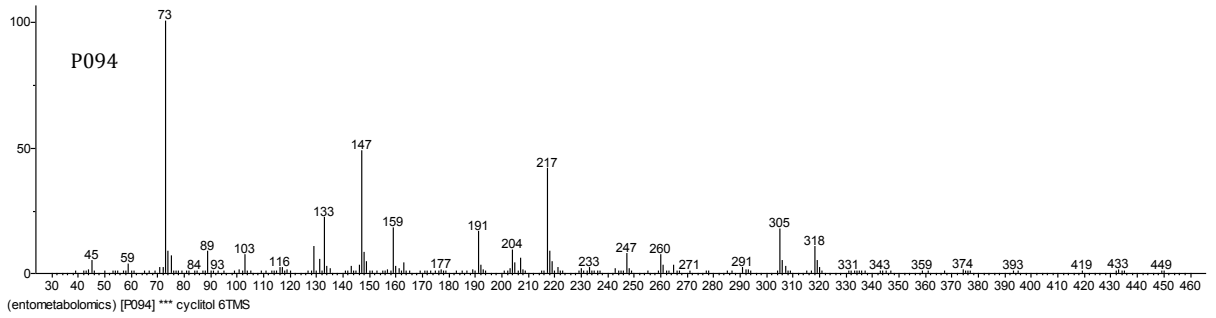
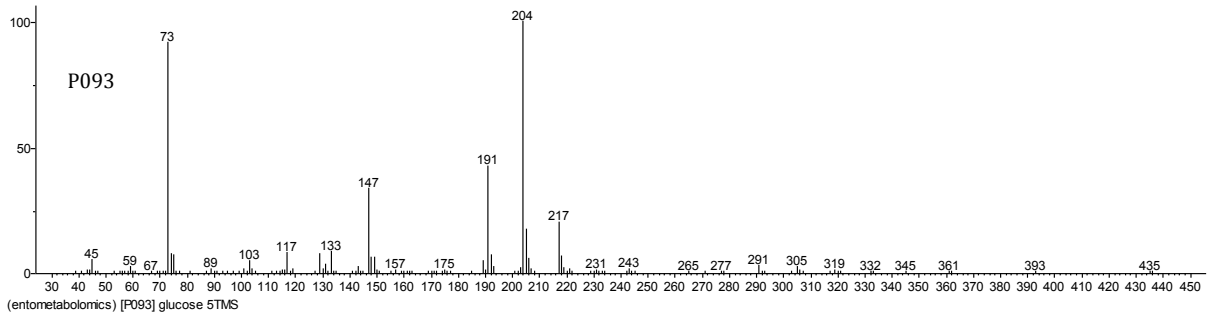


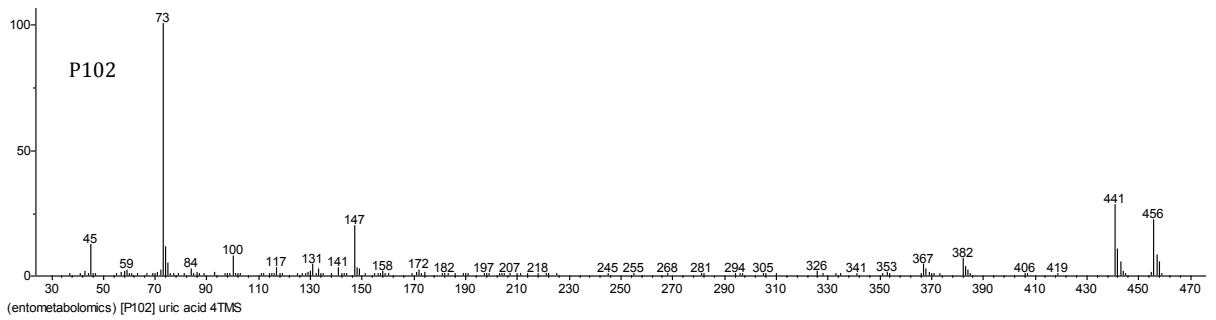
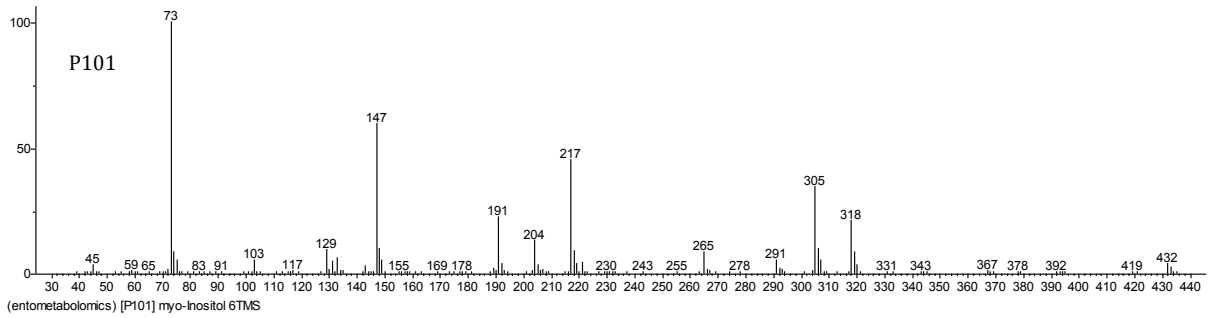
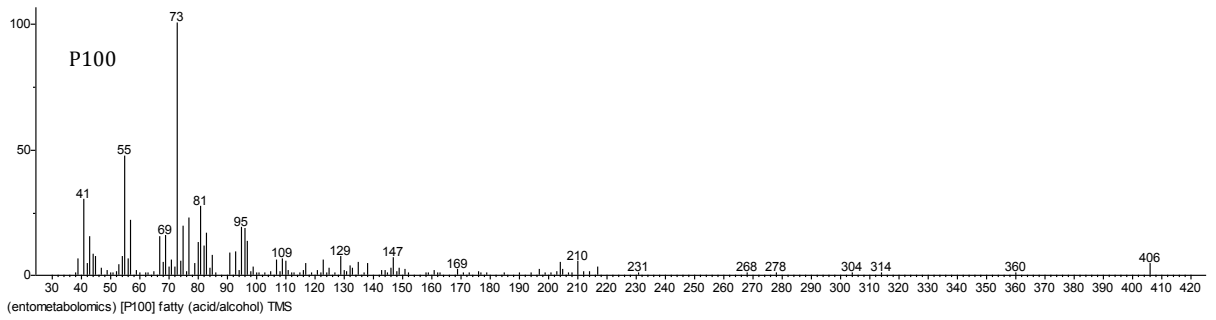
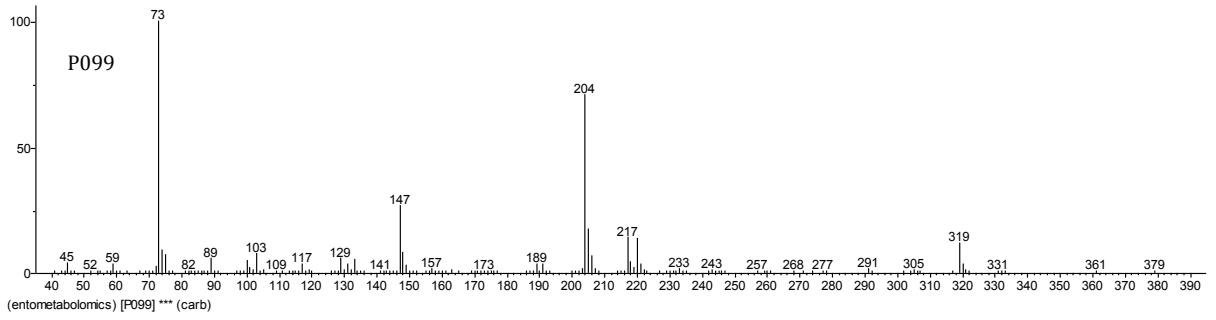
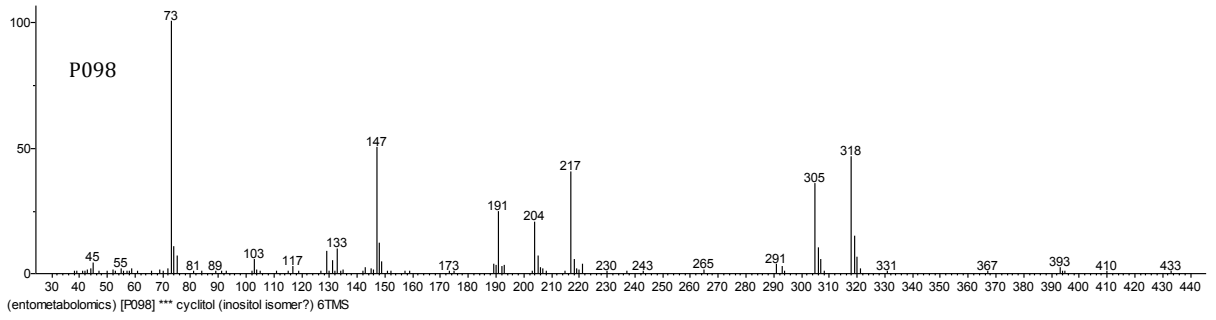


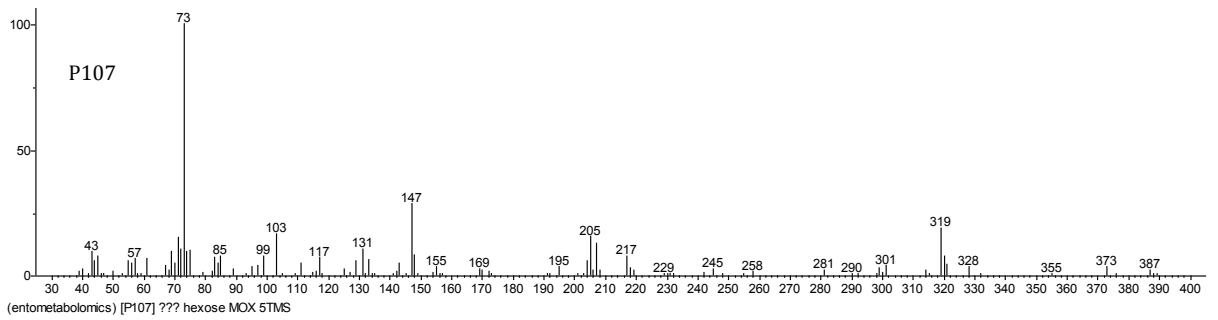
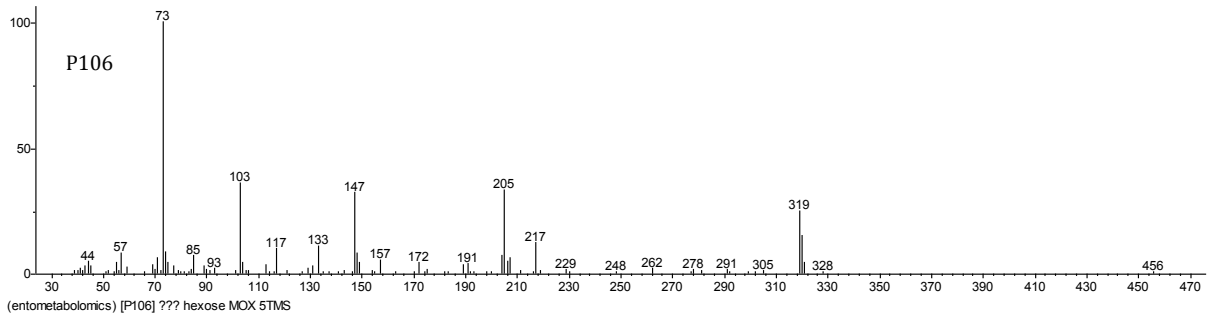
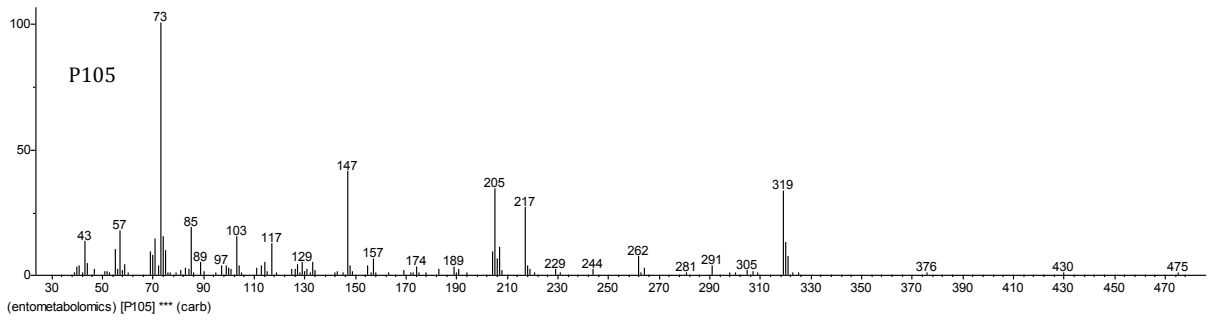
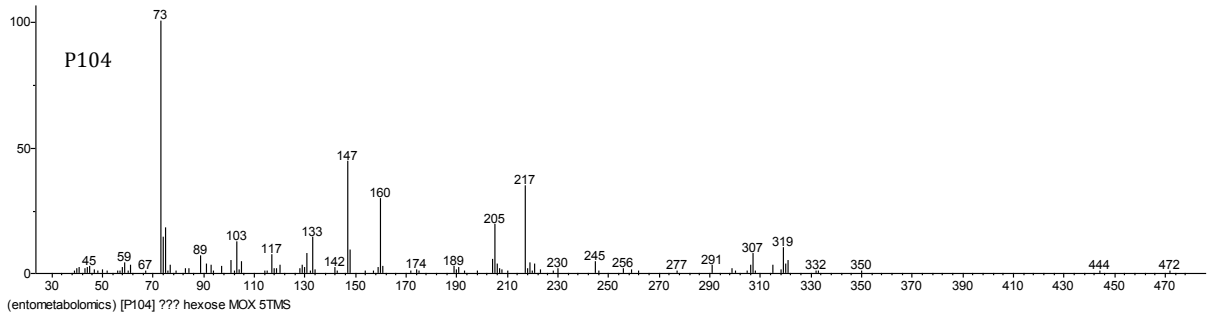
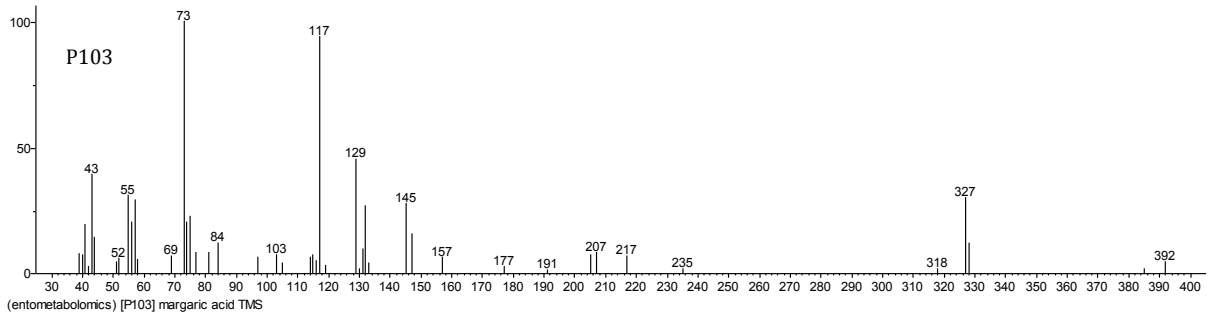


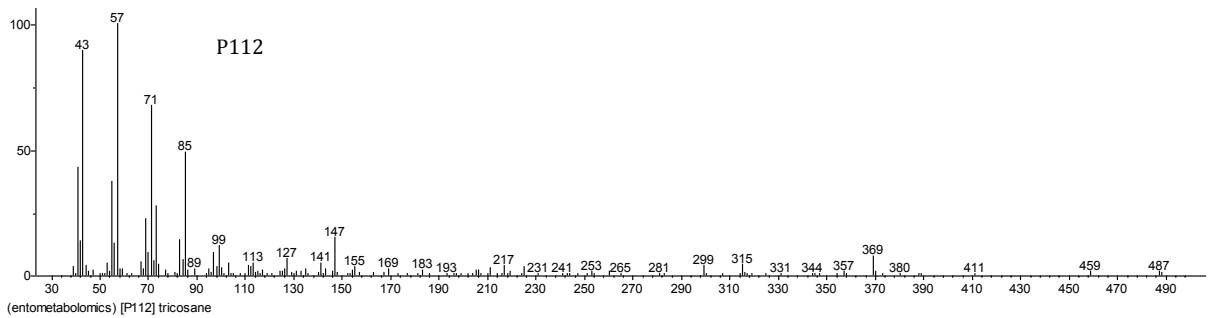
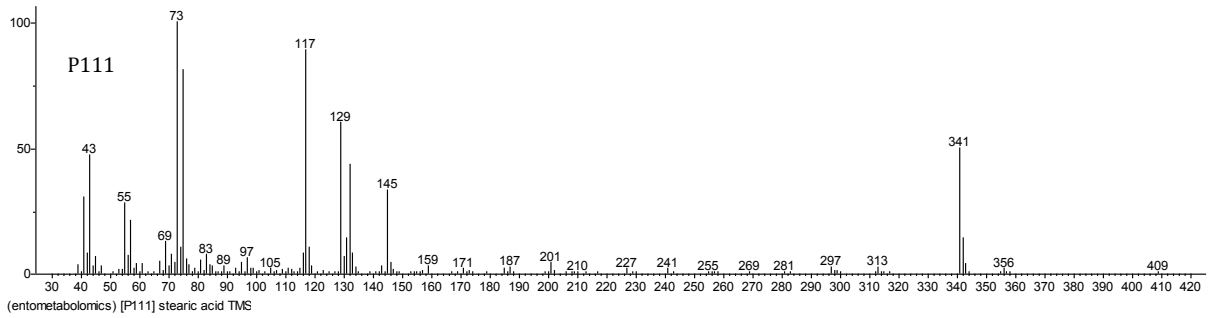
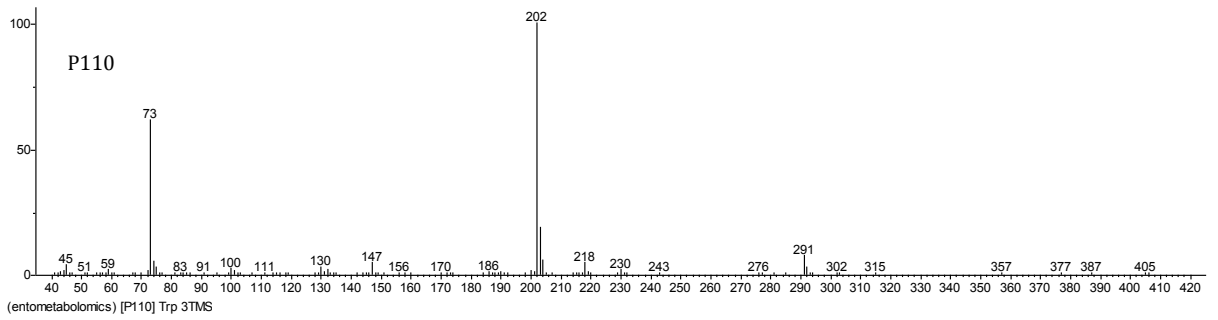
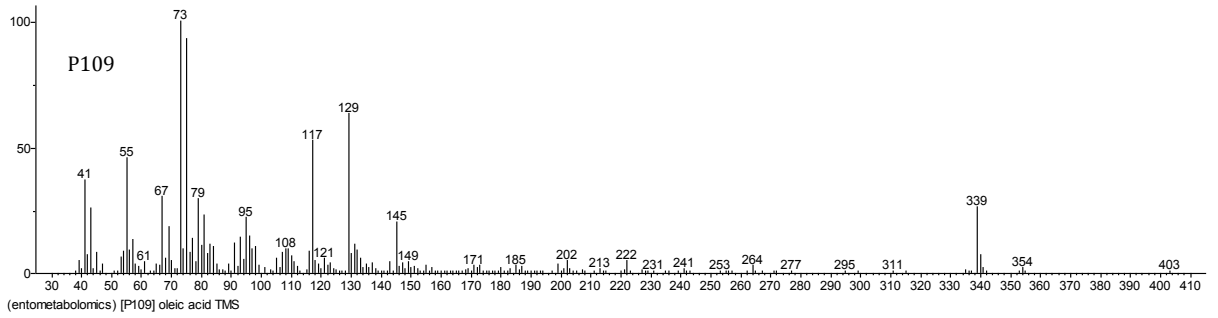
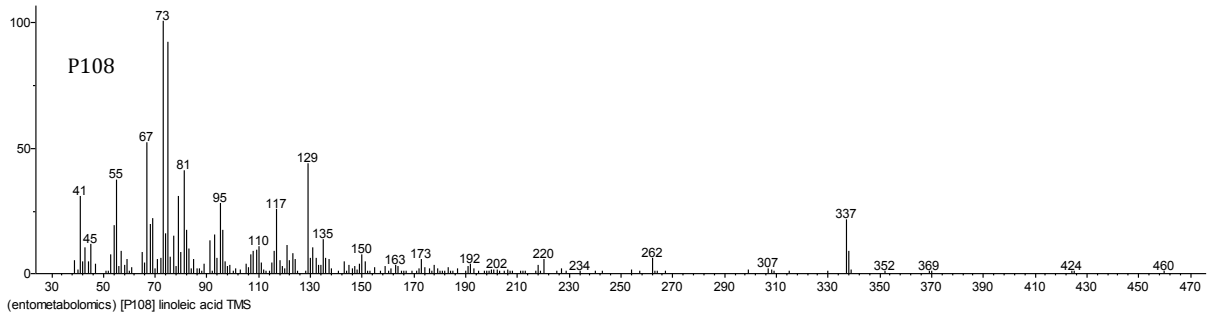


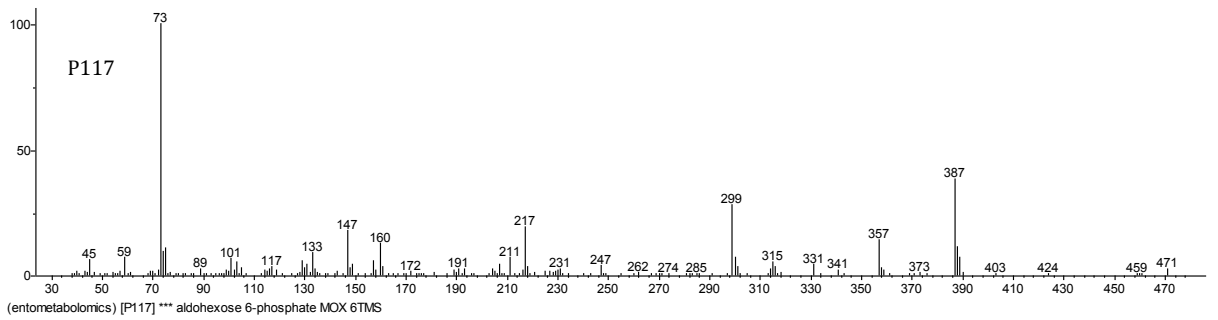
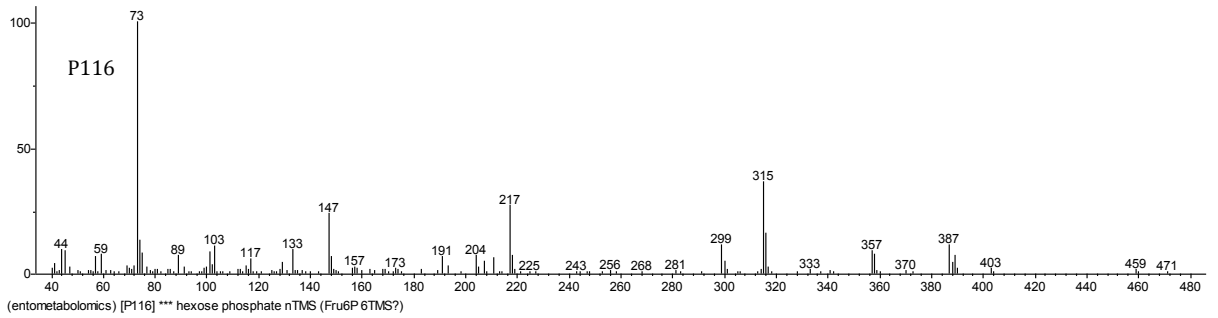
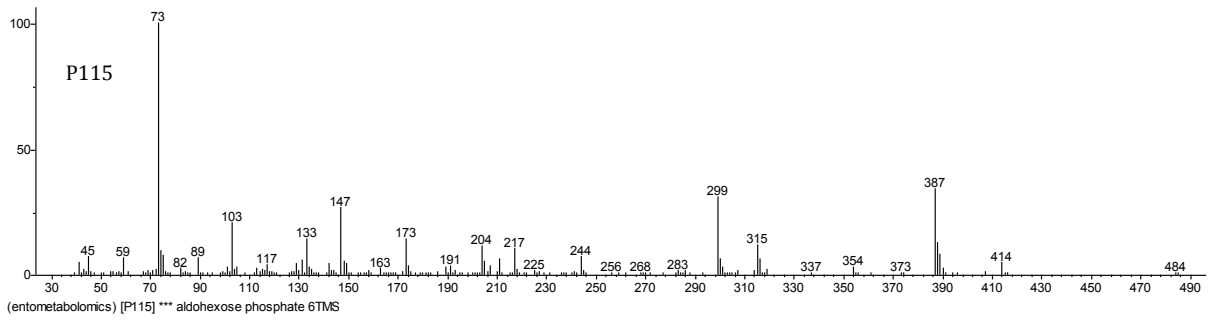
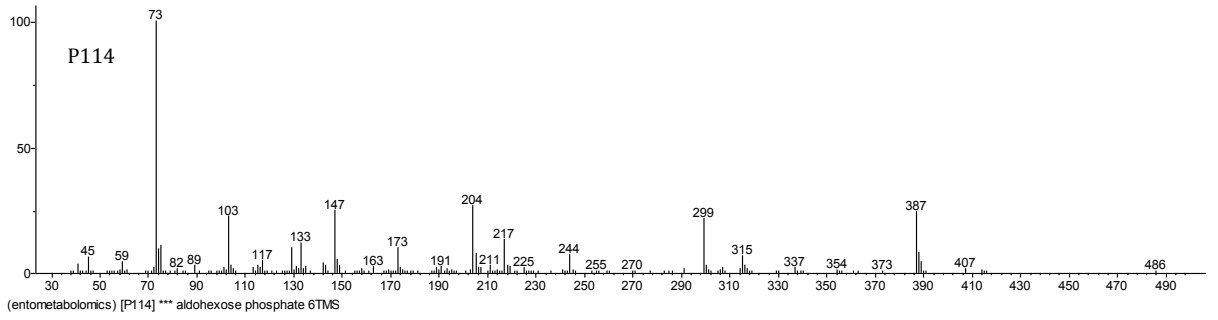
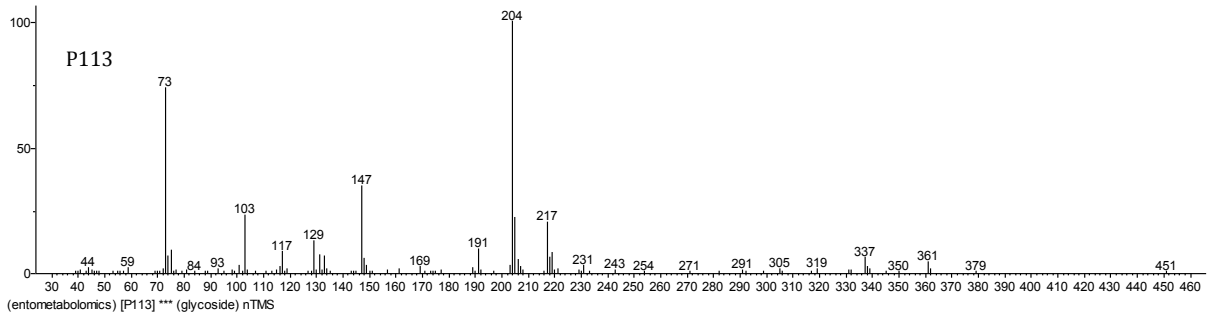


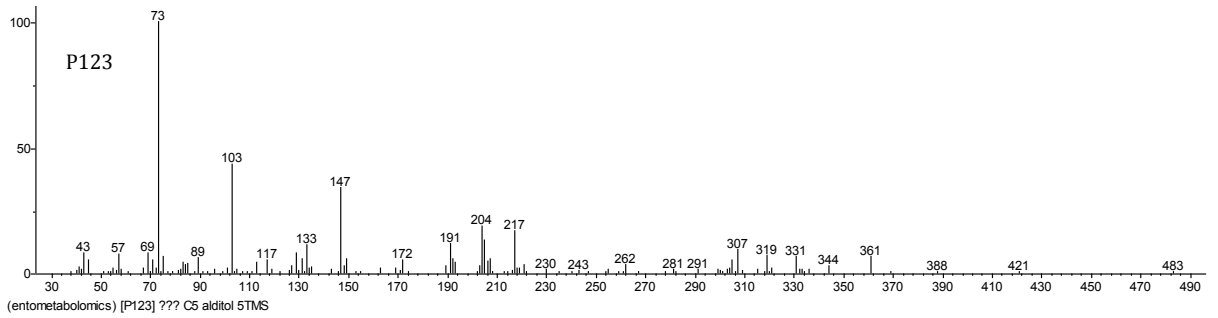
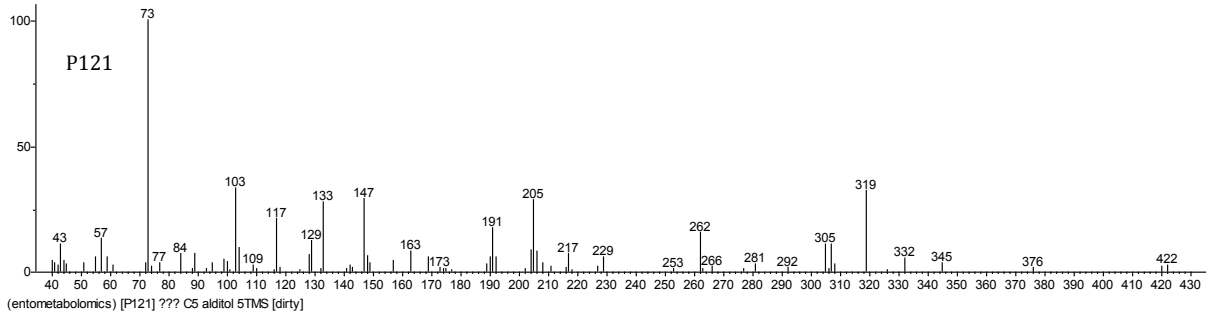
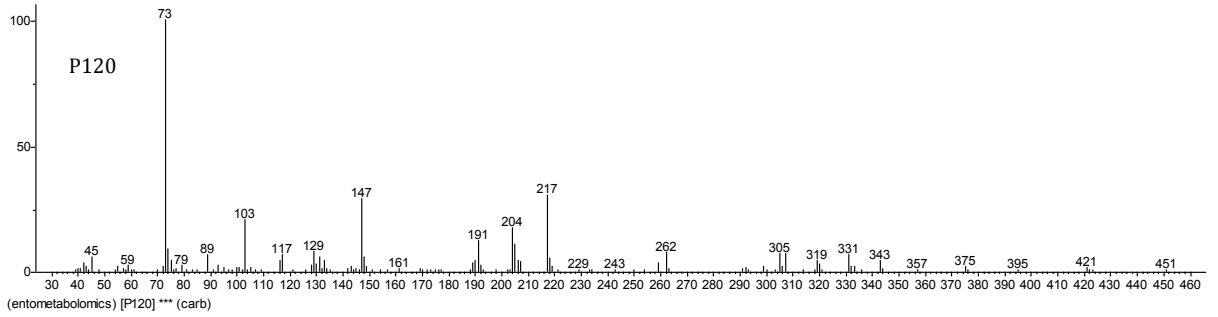
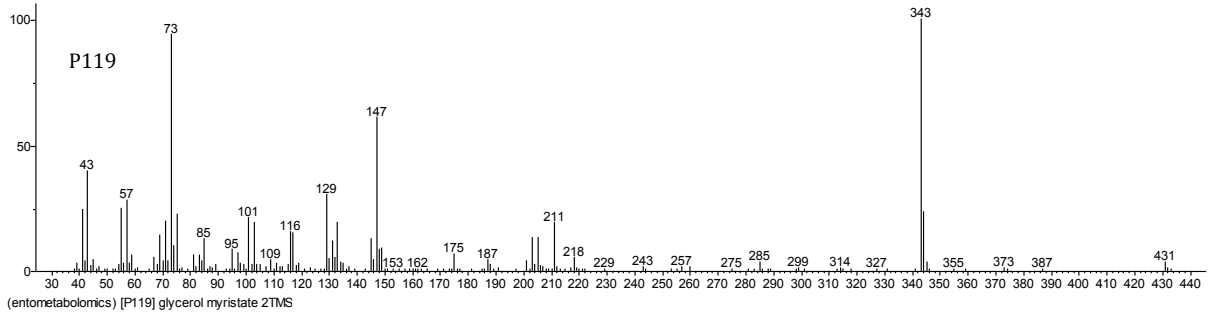
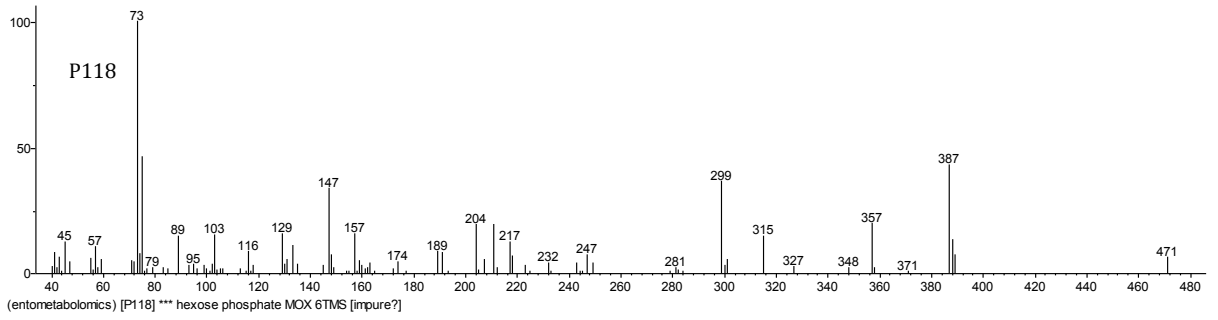


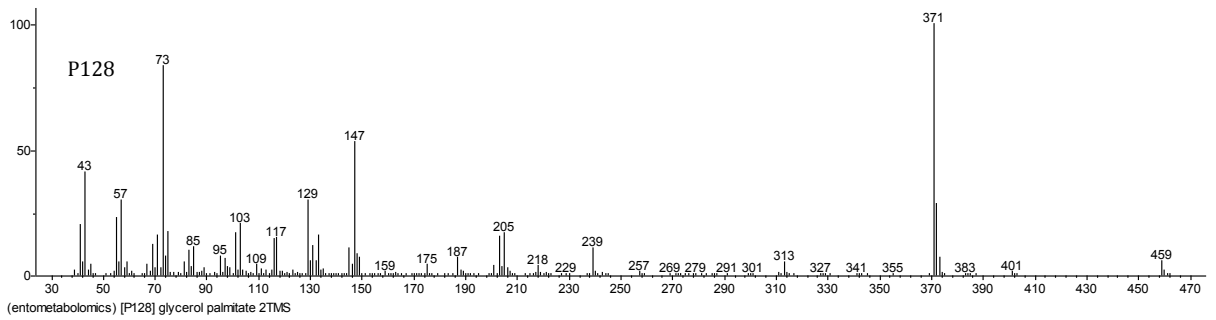
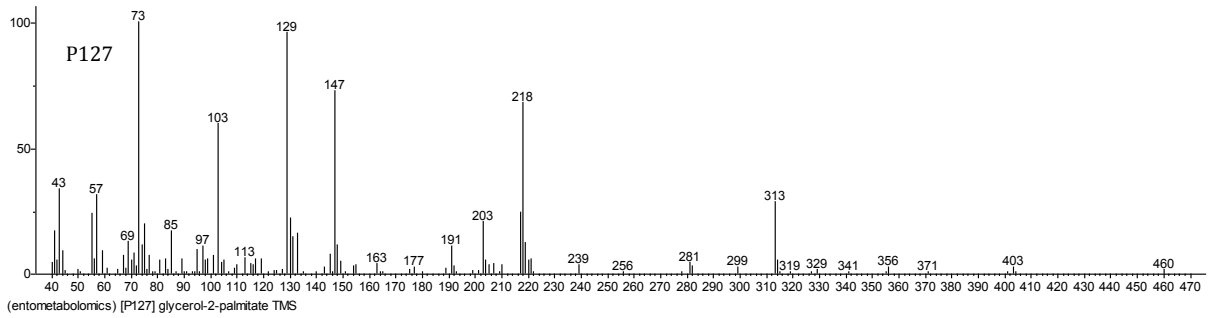
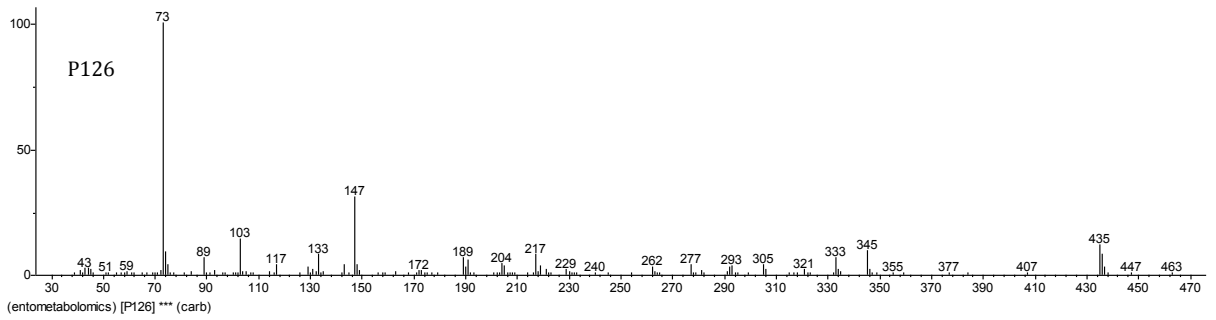
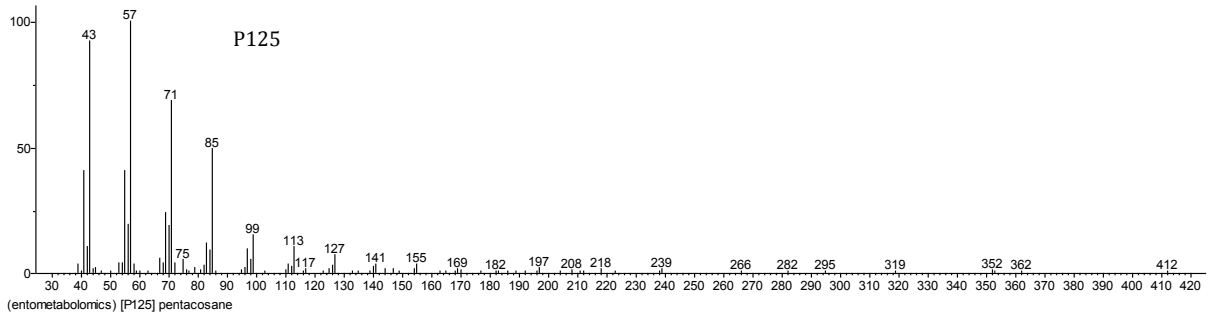
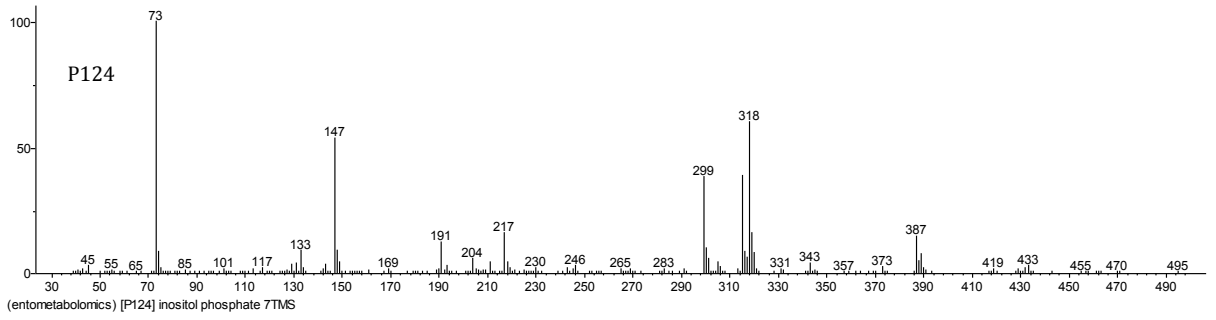


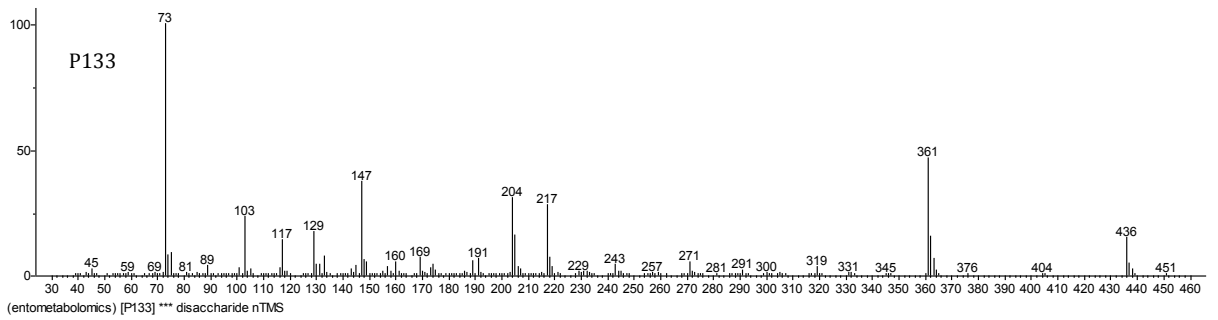
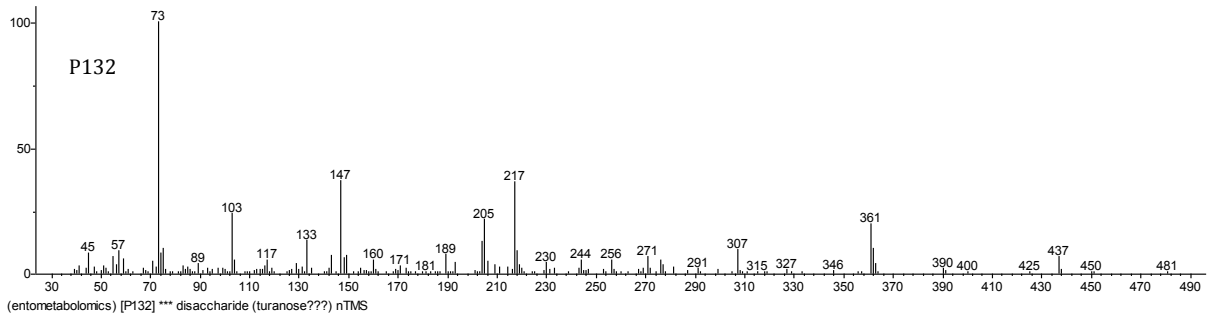
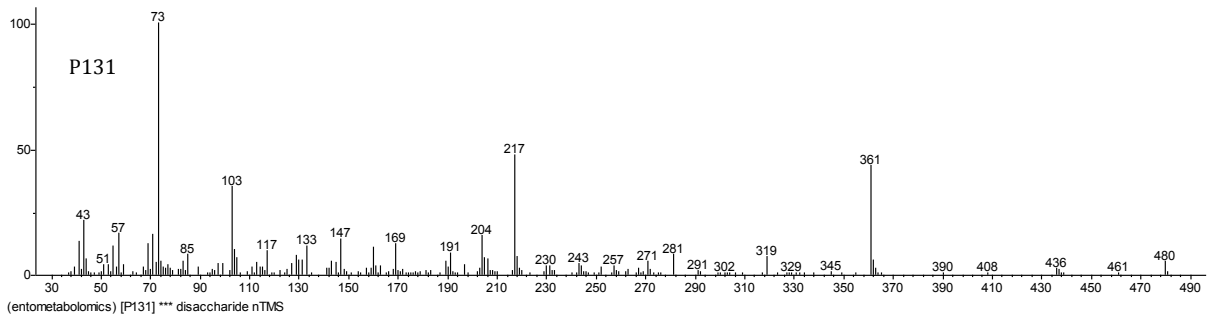
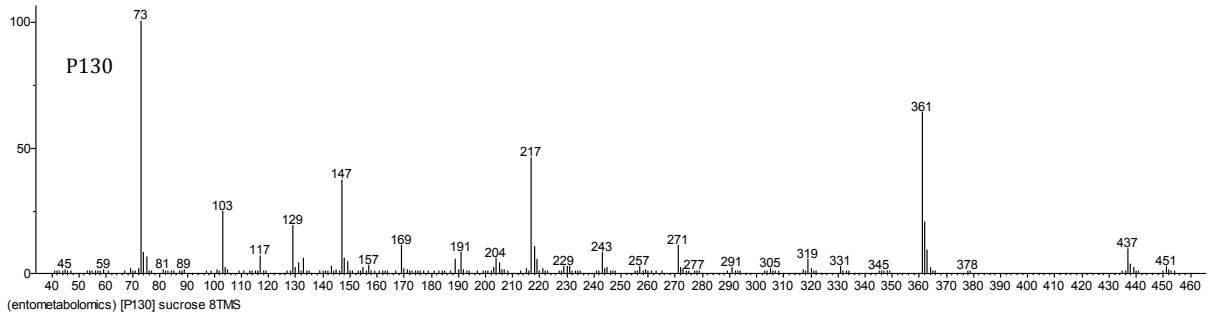
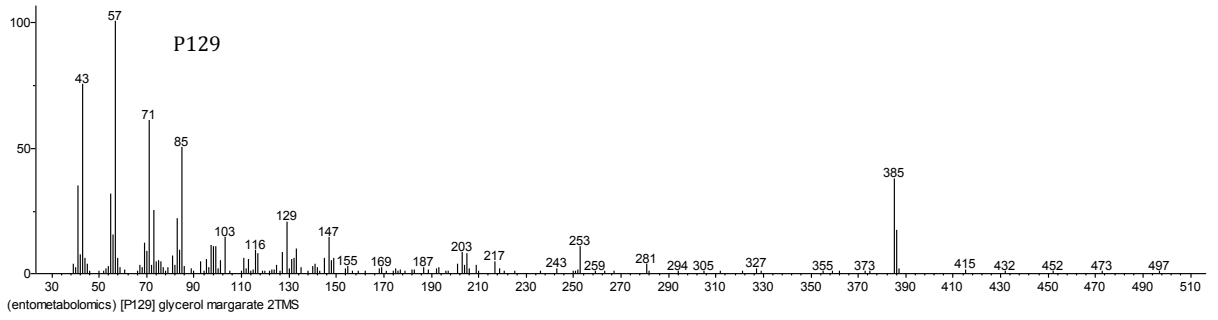


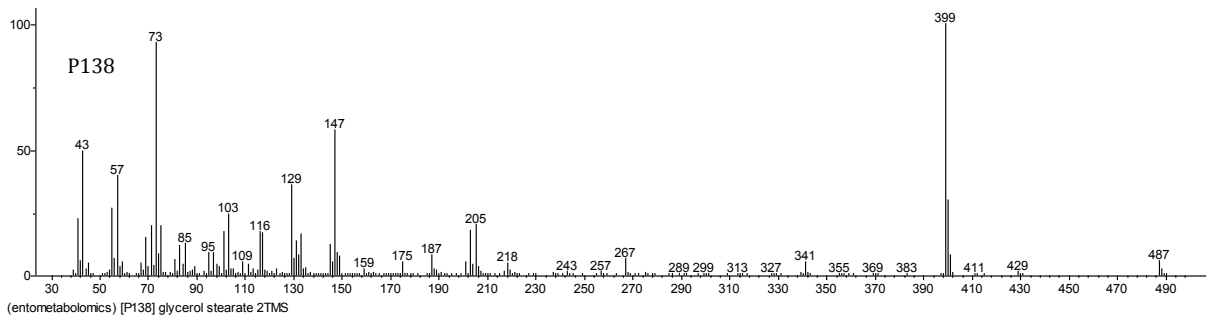
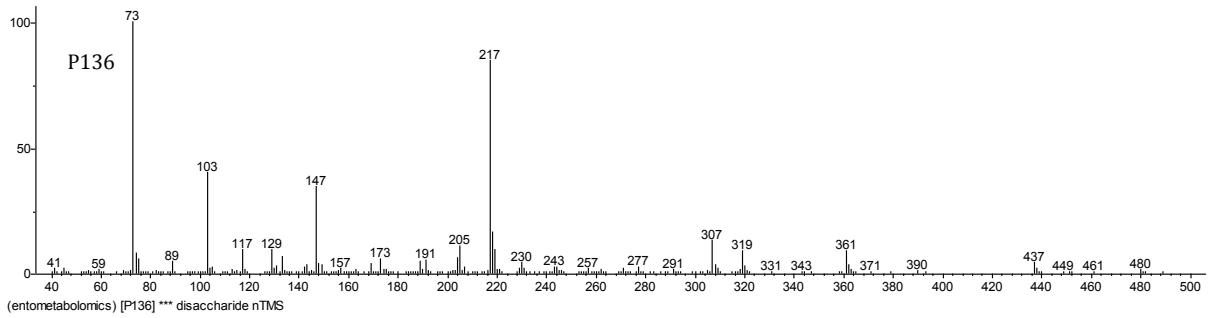
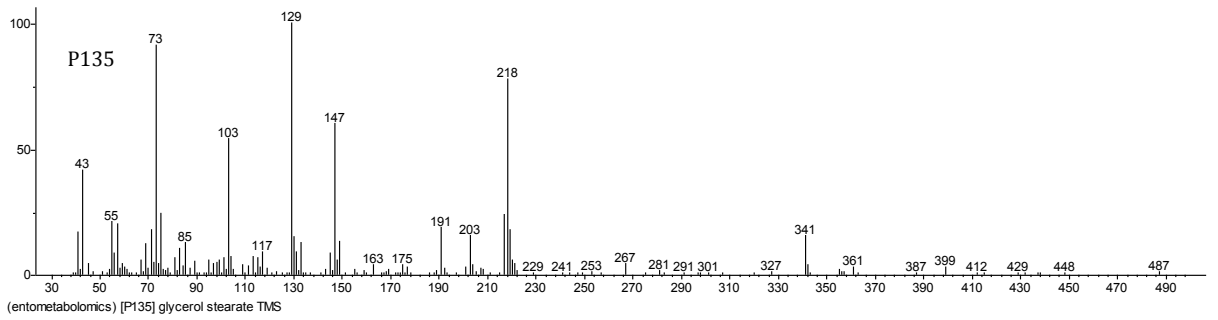
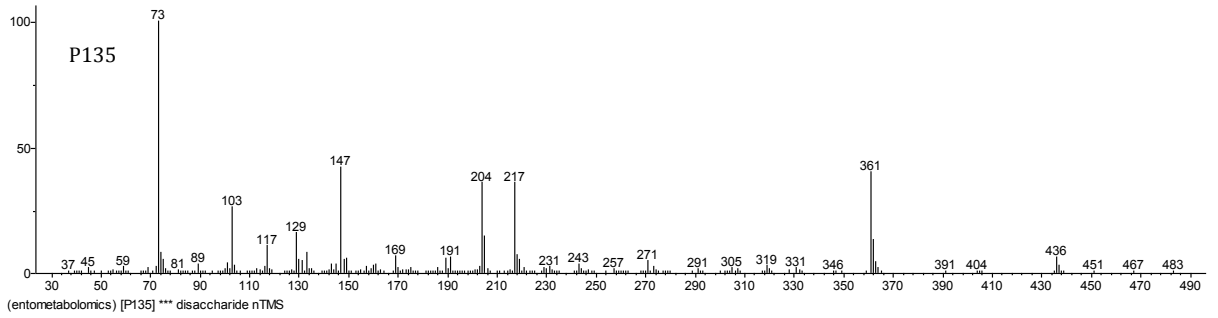
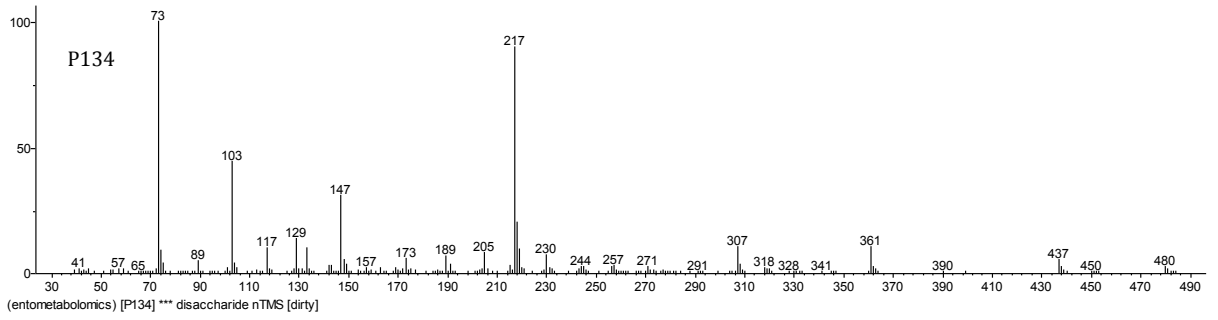


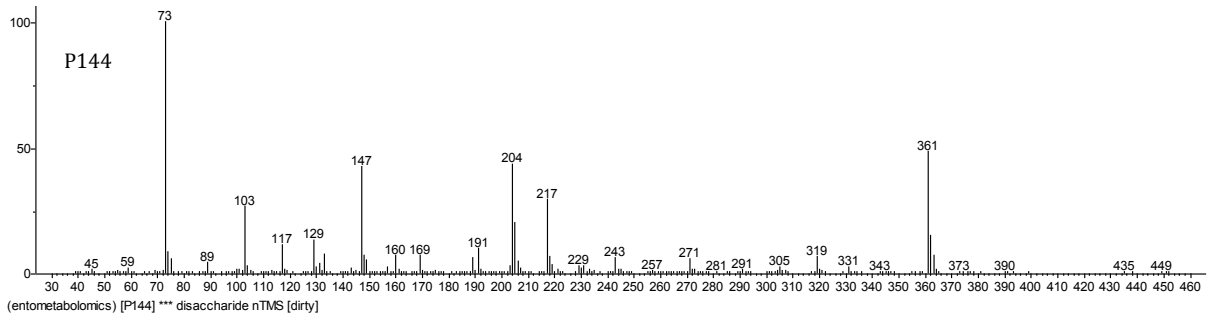
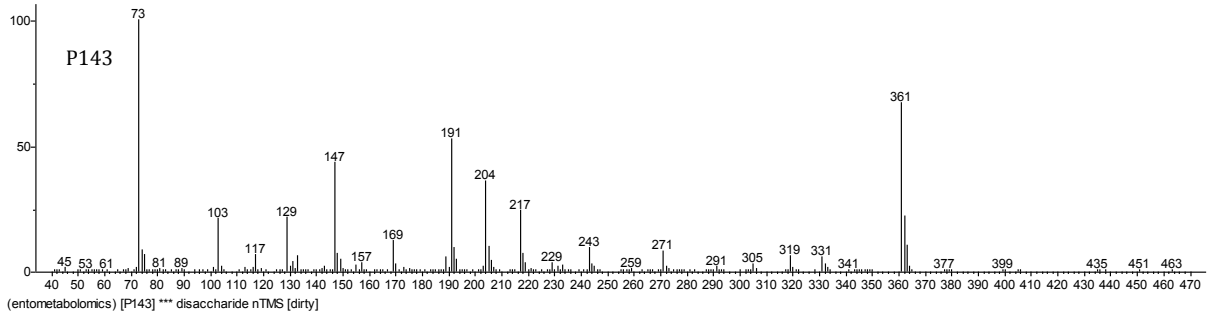
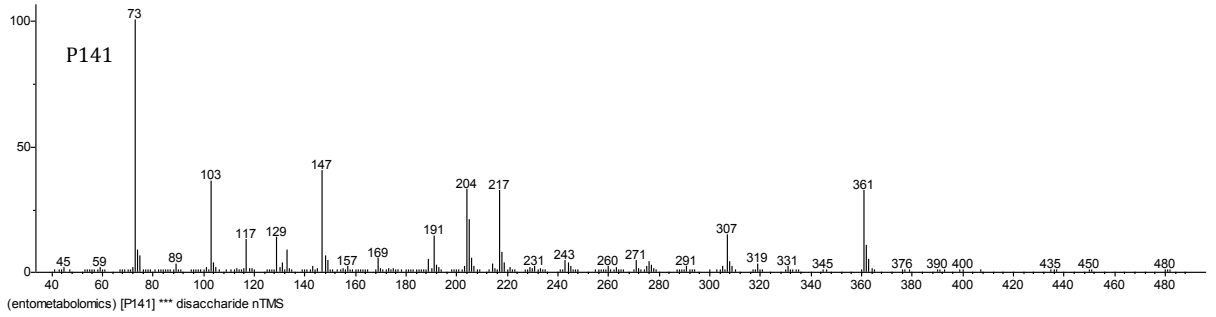
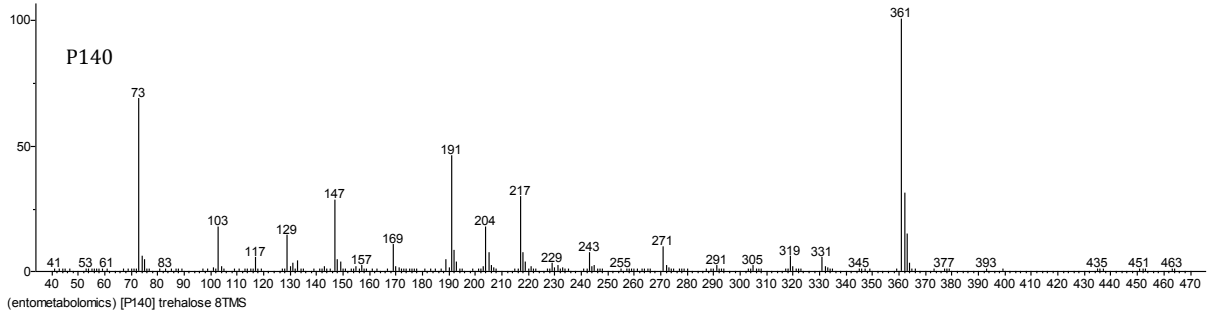
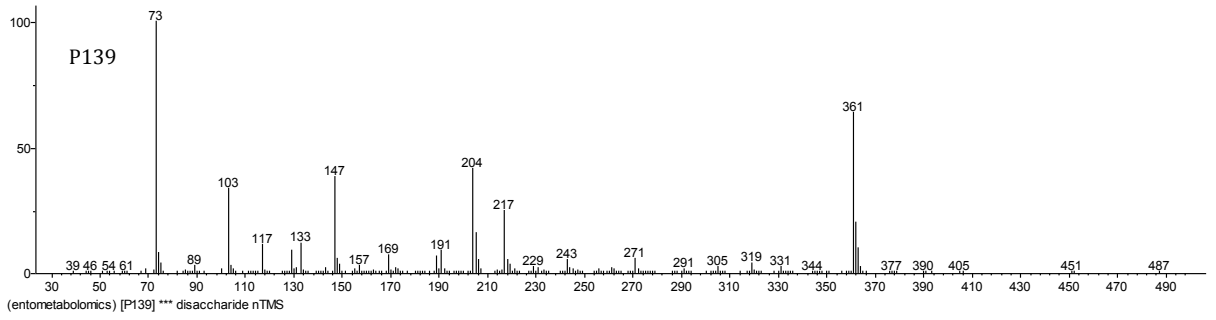


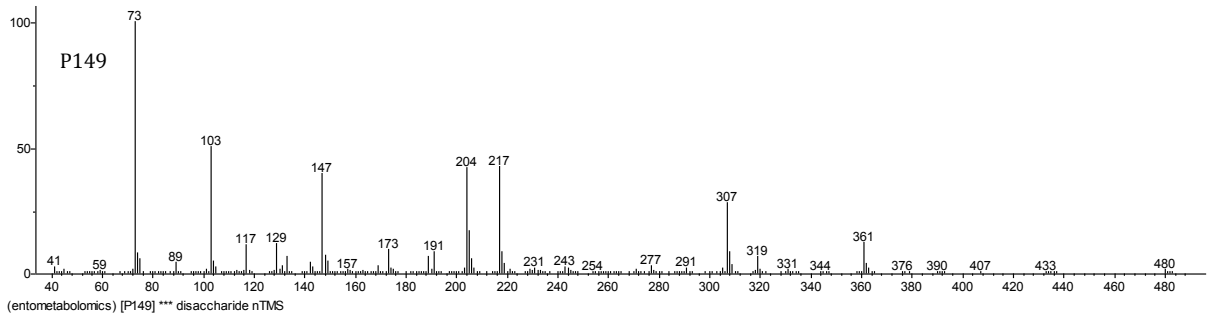
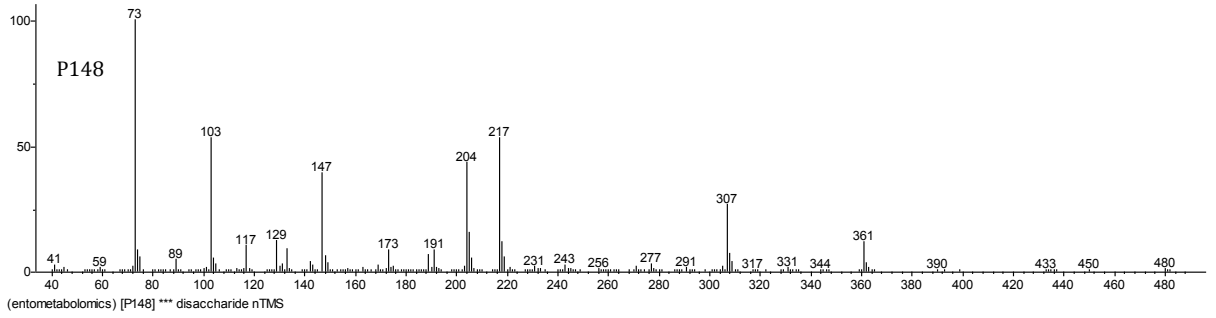
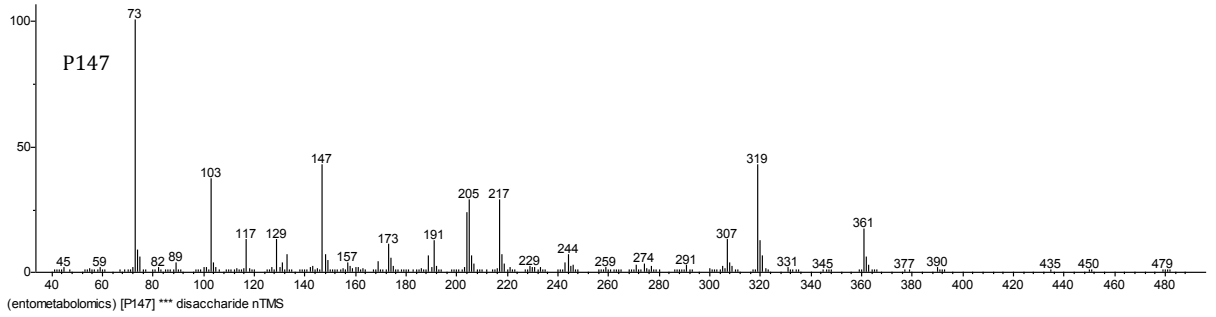
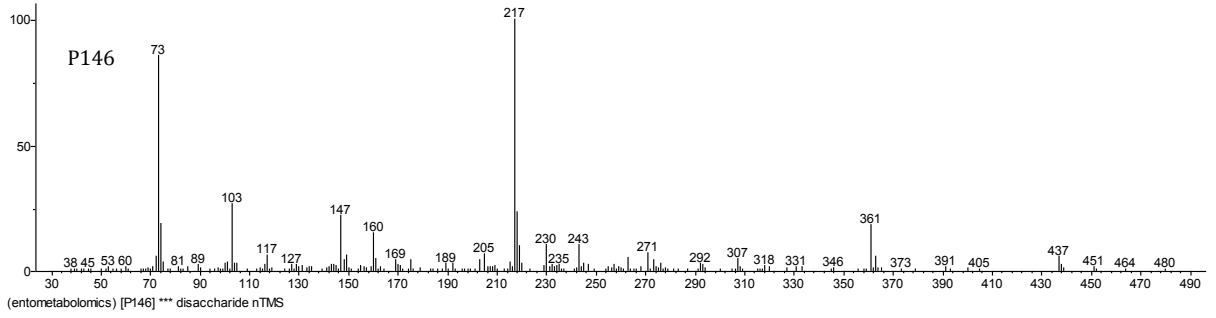
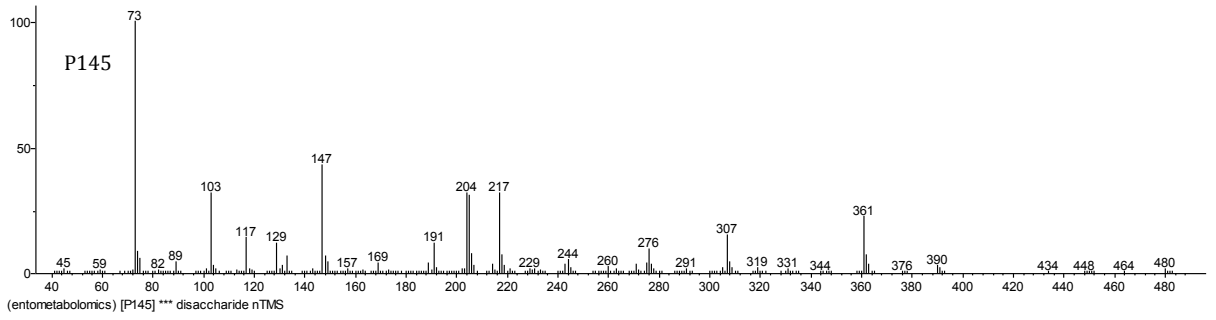


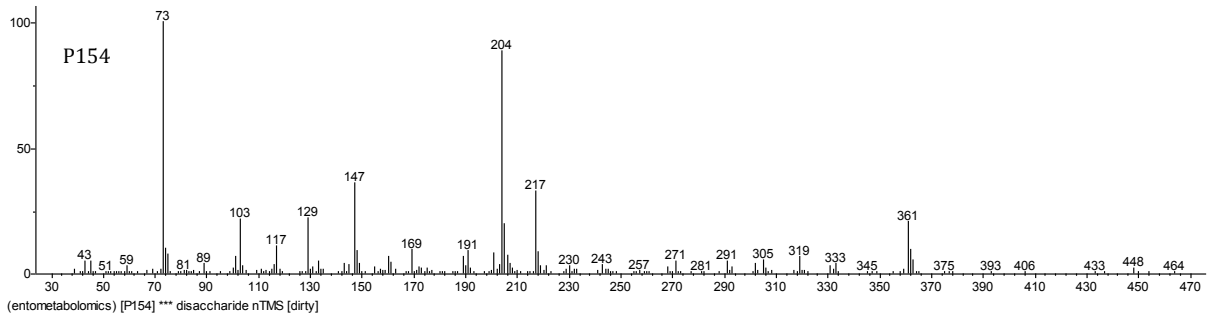
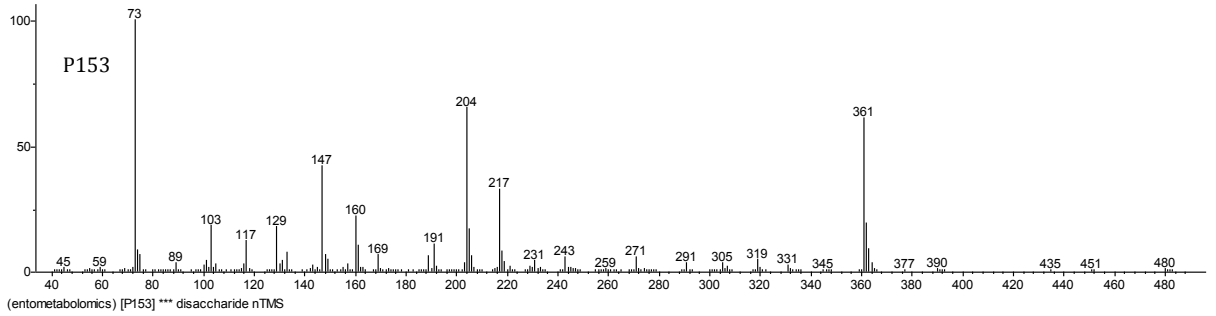
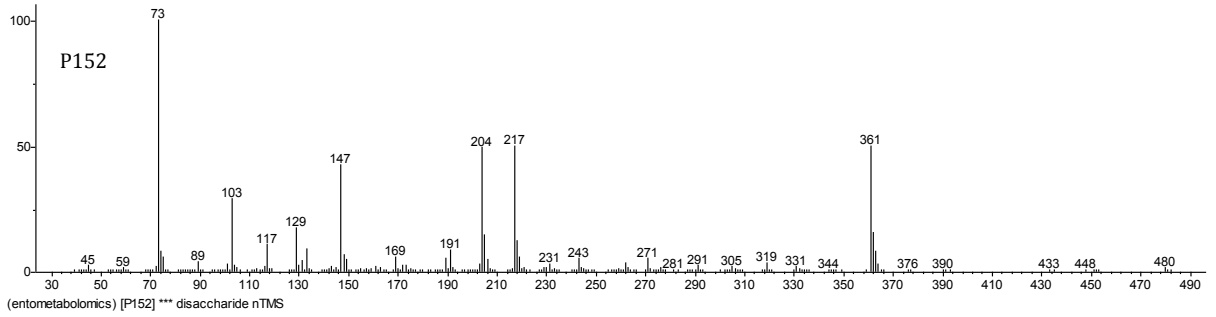
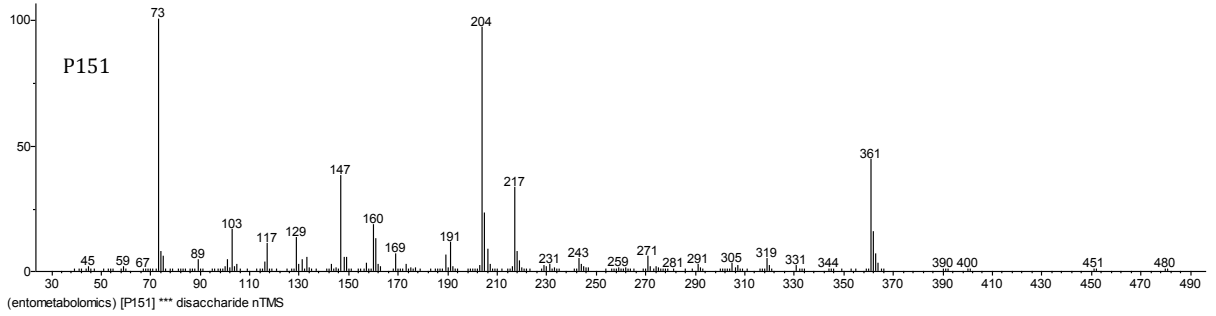
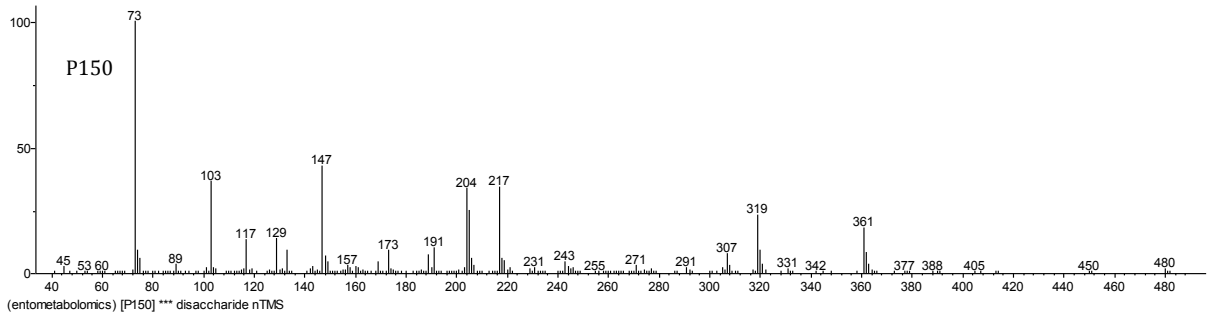


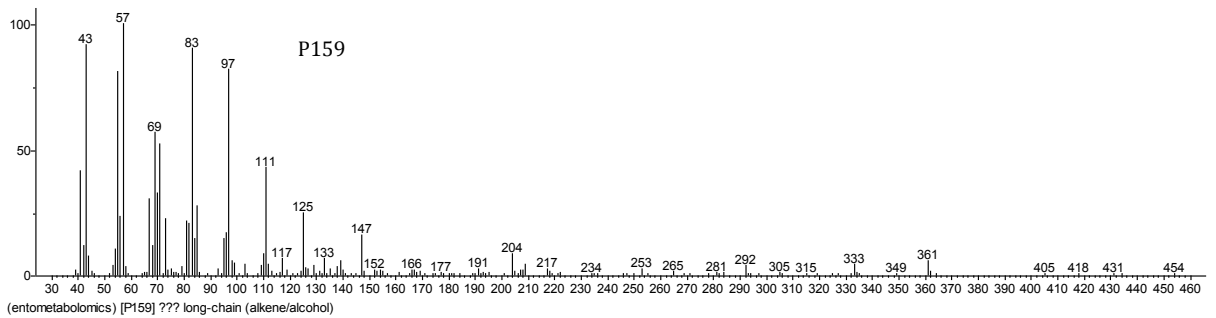
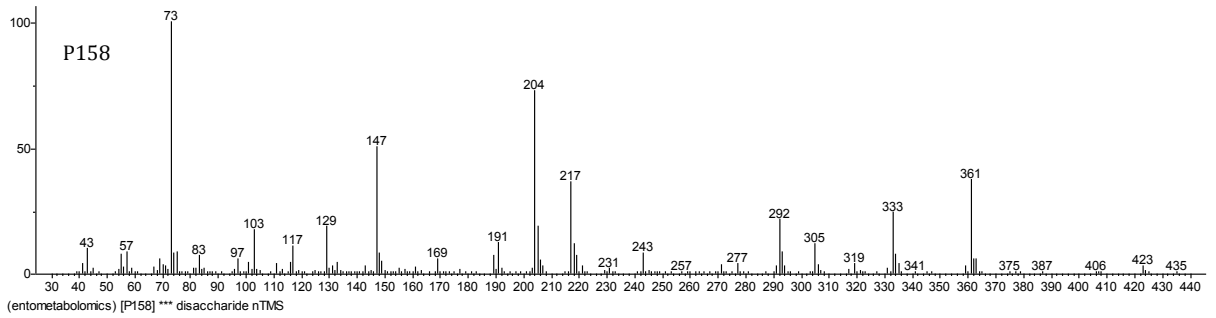
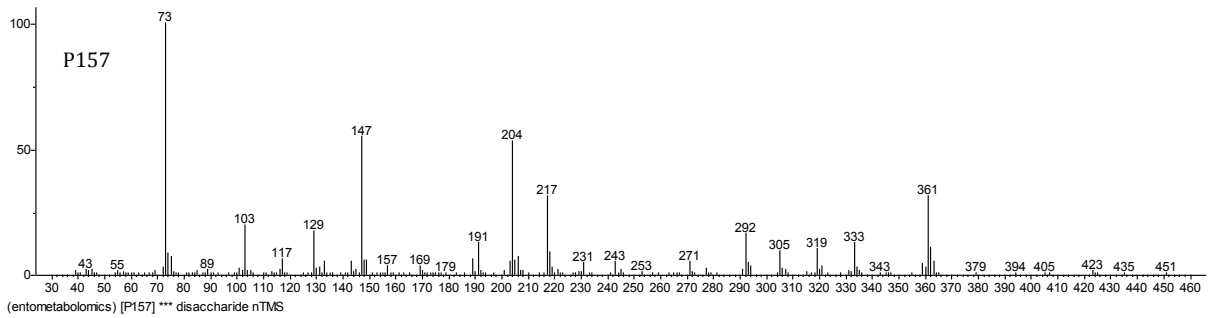
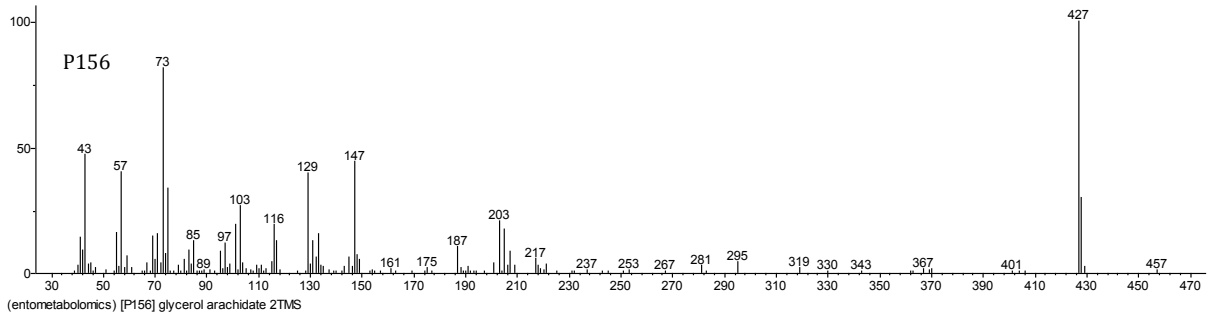
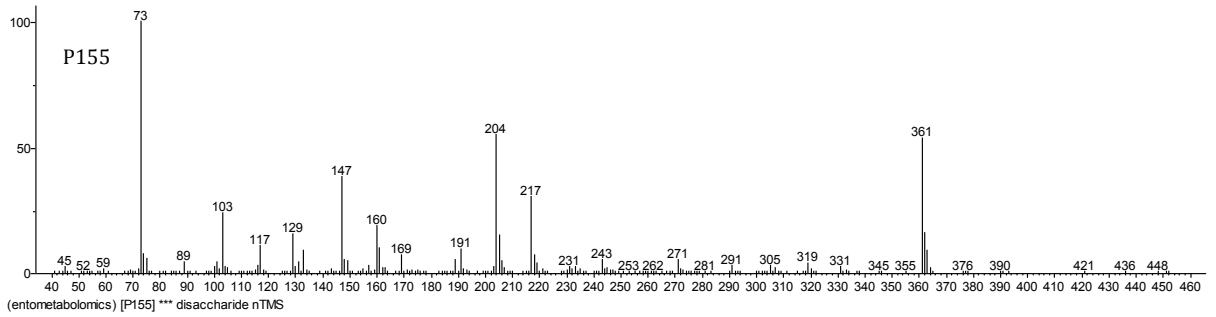


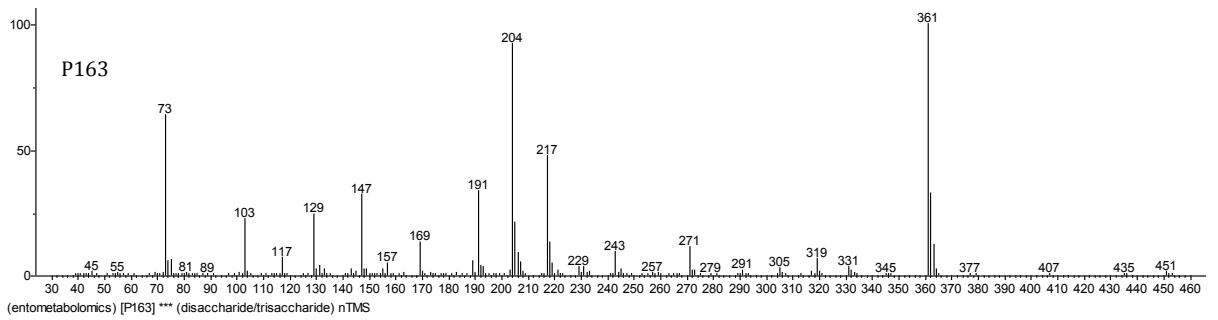
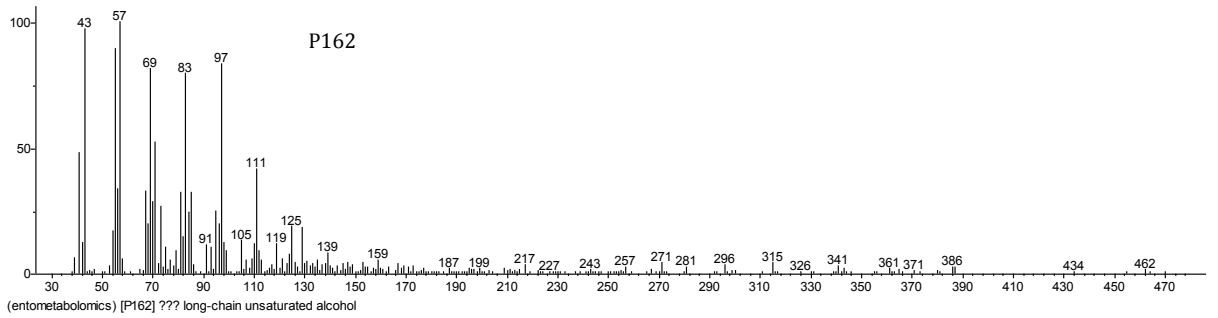
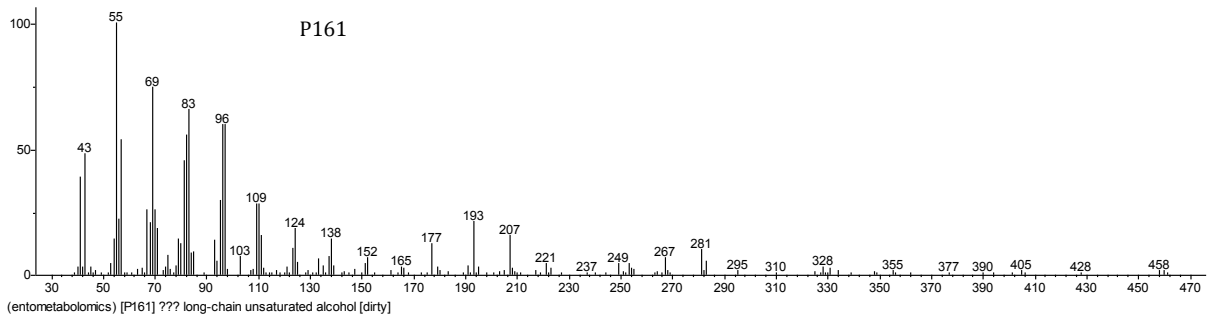
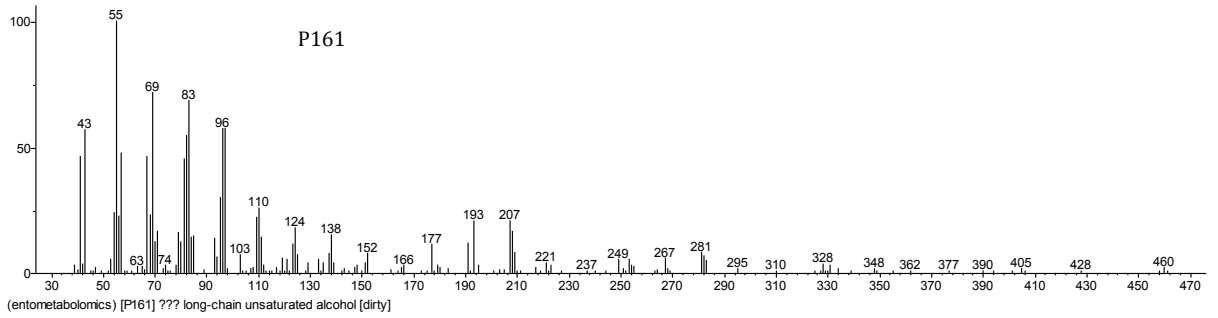
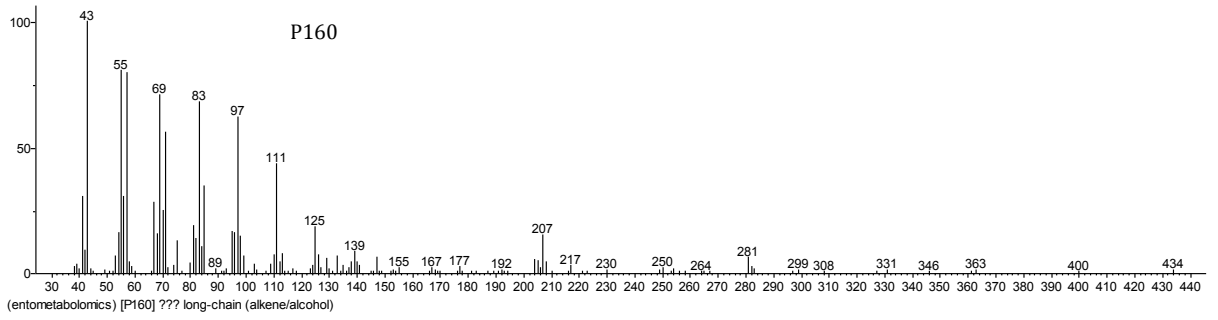


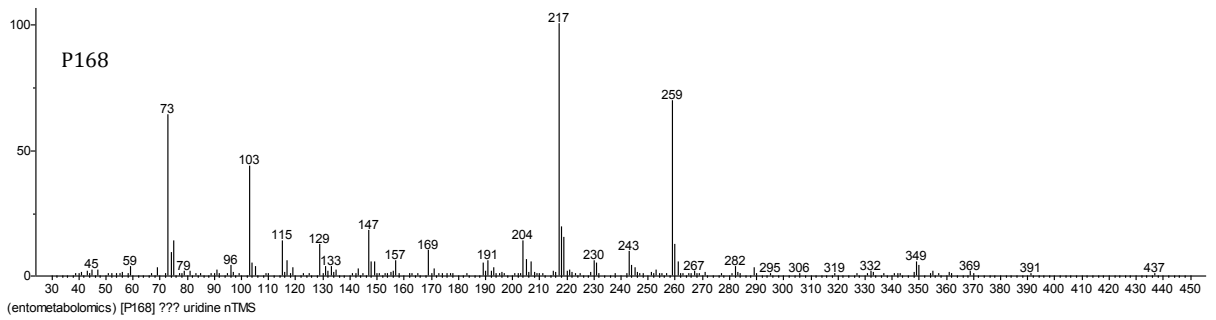
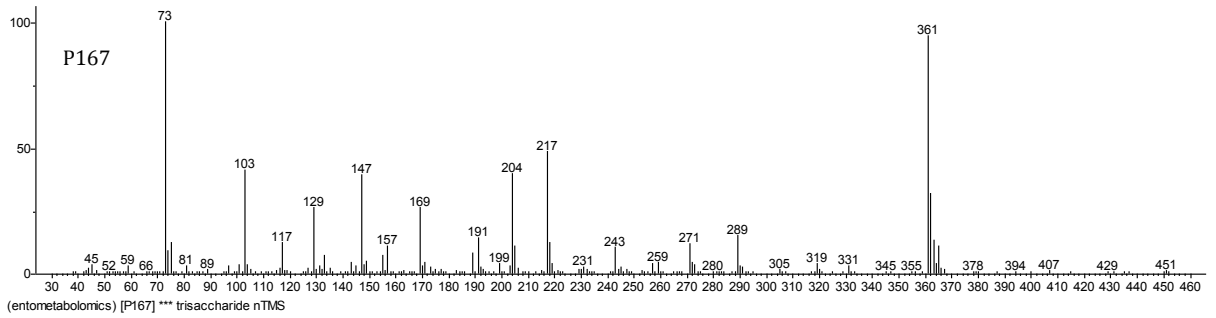
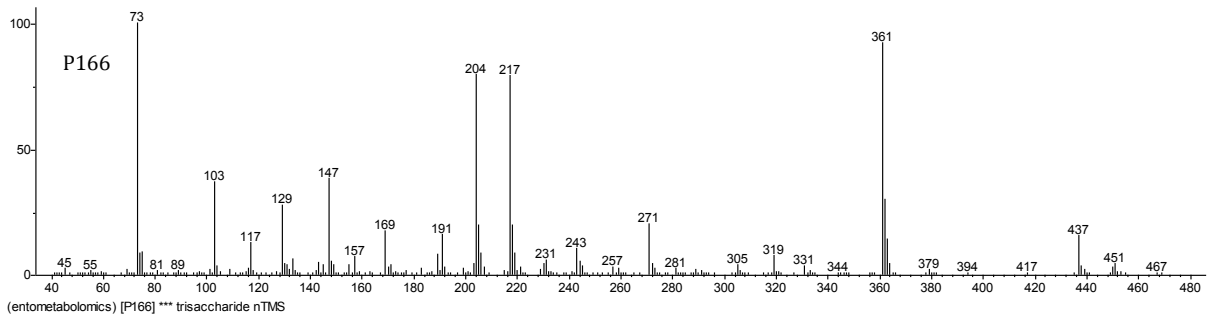
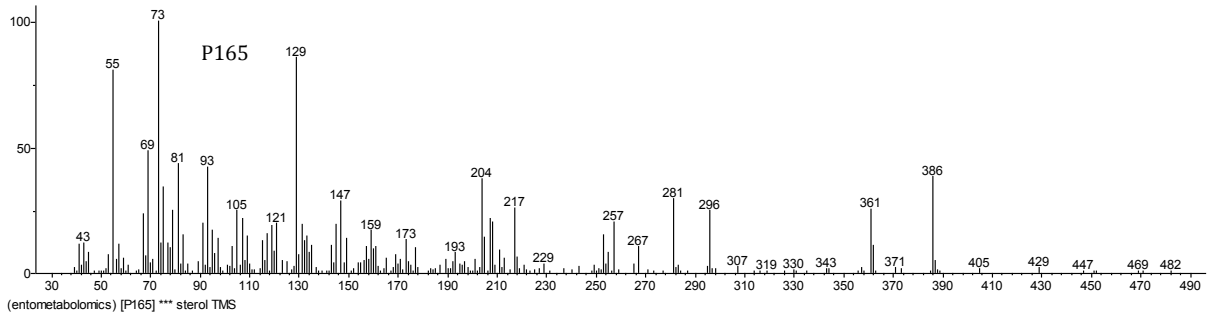
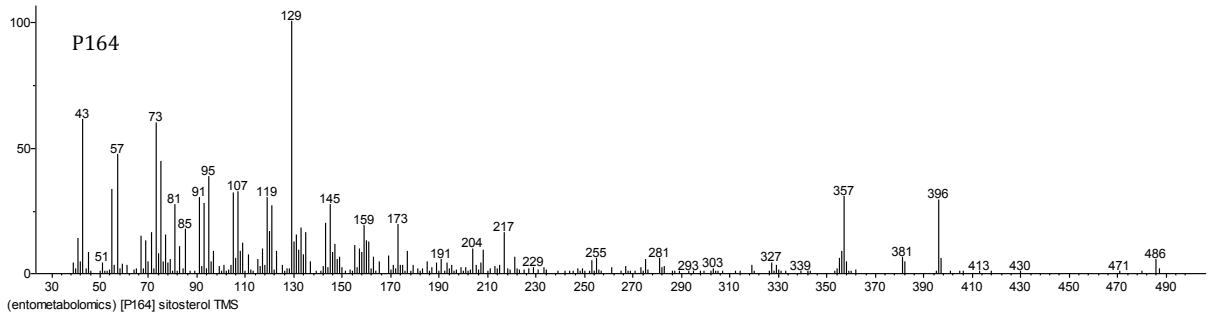


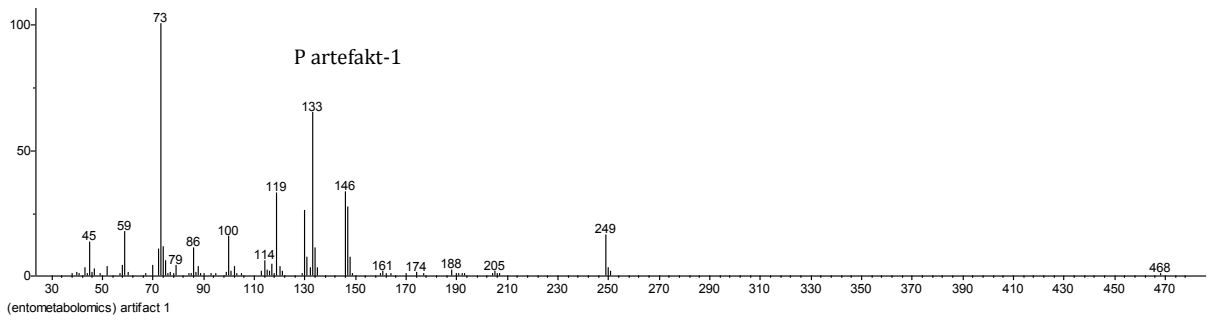
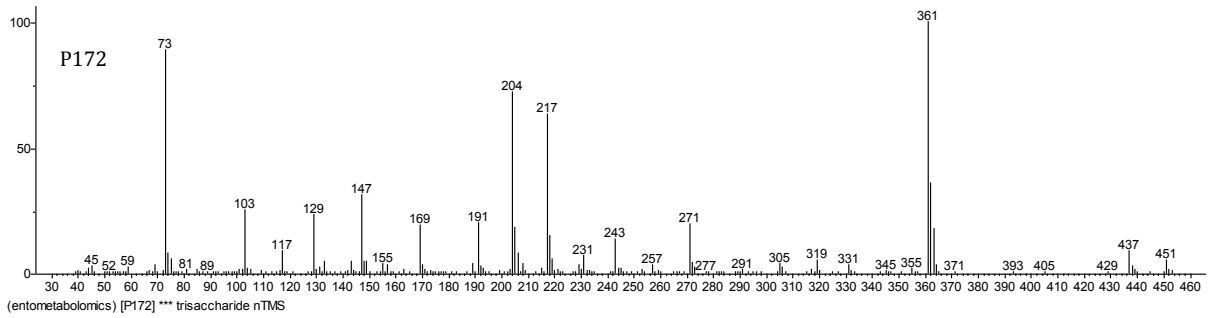
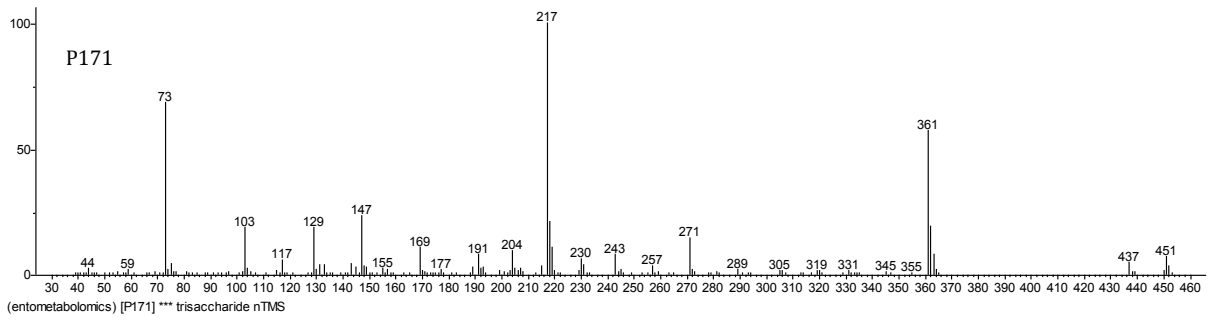
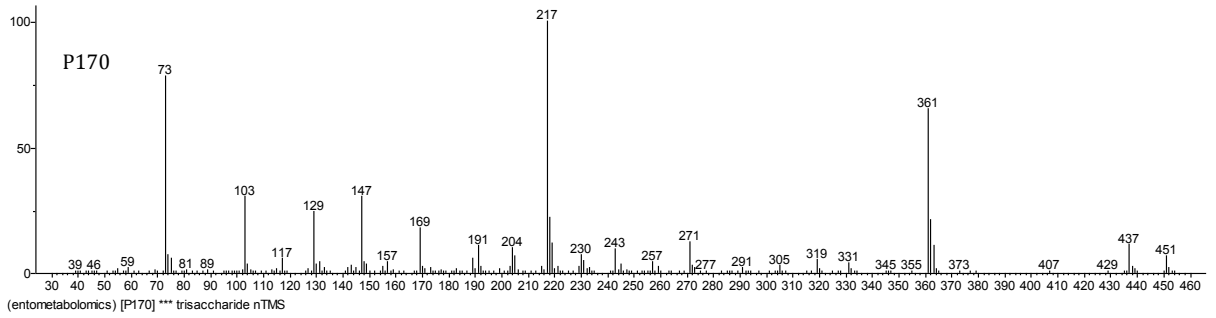
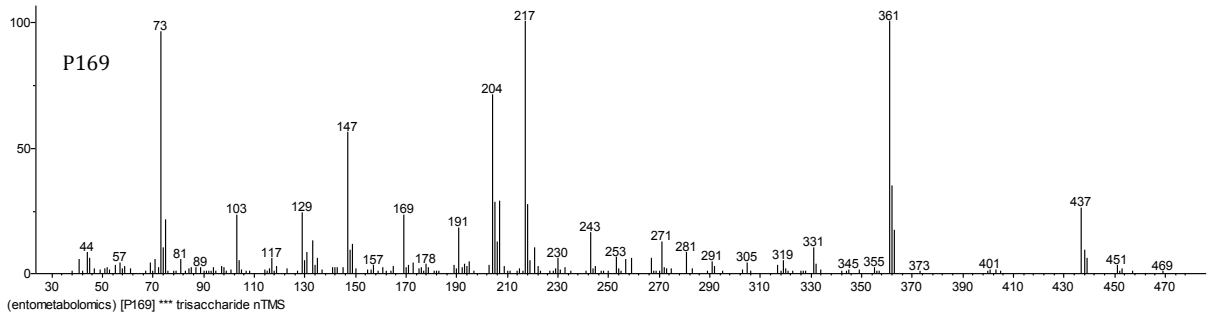


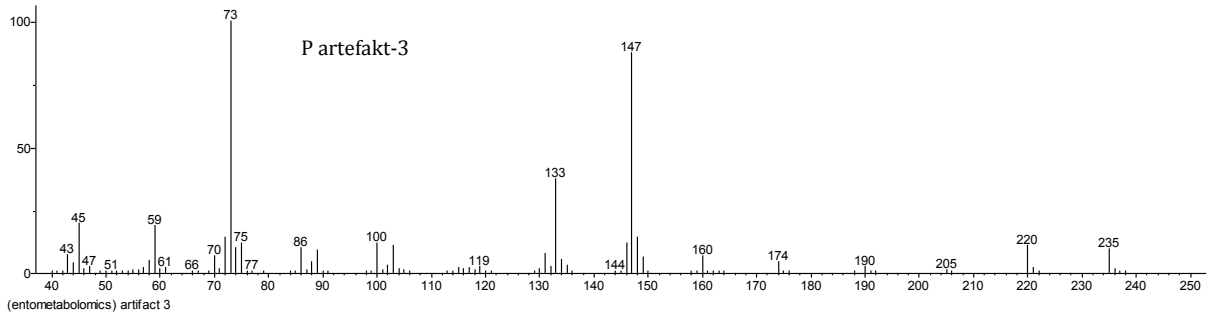
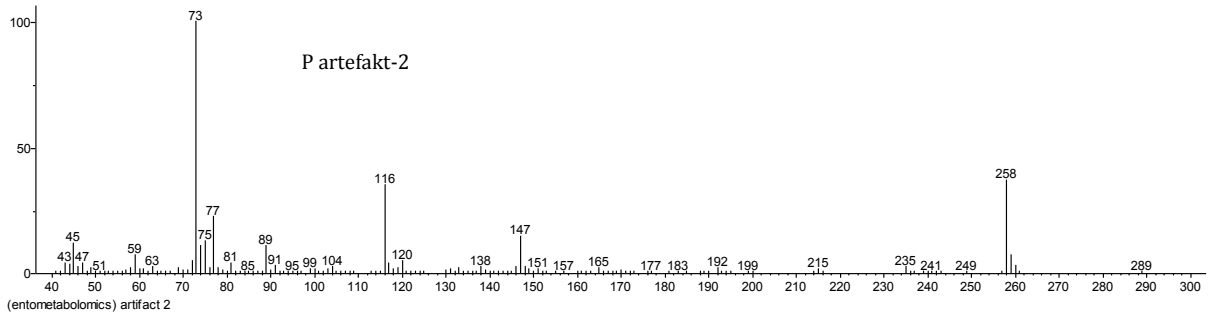












BIOGRAFIJA AUTORA



Snežana Orčić (rođ. Milovac) je rođena 3. avgusta 1982. godine u Novom Sadu. U istom gradu je završila srednju medicinsku školu 2001. godine, kada upisuje studije biologije na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Zvanje Diplomirani biolog je stekla 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,07 i ocenom 10 na diplomskom radu sa temom: „Uticaj antitoksičnog nutritiva (ATN)

na biohemijsko-fiziološke procese kukuruza (*Zea mays* L.) u uslovima suviška olova“ izvedenom u Laboratoriji za biohemiju Departmana za biologiju i ekologiju. Iste godine, na istom fakultetu, upisuje master akademske studije, modul: Funkcionalna biologija. Od 2008. godine, u zvanju istraživača pripravnika, je bila zaposlena na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, u okviru projekta osnovnih istraživanja (oblast hemija) Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj. Zvanje Diplomirani biolog – master je stekla 2010. godine sa prosečnom ocenom 10 i ocenom 10 na završnom master radu sa temom: „Raspodela teških metala u biotskom i abiotskom matriksu pored visoko frekventne saobraćajnice“ izvedenom na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu. 2012. godine, u okviru projekta osnovnih istraživanja (oblast biologija) Ministarstva prosvete i nauke „Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patološkim procesima“ zasniva radni odnos na mestu istraživača saradnika na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Iste godine upisuje doktorske akademske studije biologije, kada polaže sve planom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 9,83. Od 2007. godine, nakon završetka osnovnih diplomskih studija, uključena je u izvođenje praktičnog dela nastave, a od 2014. godine je u zvanju asistenta na Katedri za biohemiju, molekularnu biologiju i genetiku.

Učestvovala je u realizaciji šest nacionalnih i regionalnih projekata i tri međunarodna projekta. Pohađala je brojne seminare iz oblasti analitike zagađujućih materija u biotskim i abiotskim uzorcima, a od aprila do juna 2014. godine boravila je u Pekingu, na studijskom boravku u sklopu seminara o industrijskoj primeni biotehnologije, organizovanom od strane Kineskog naučnog instituta za hranu i fermentaciju. Koautor je tri rada kategorije M21a, tri rada kategorije M21, tri rada kategorije M22 i jednog rada kategorije M23, kao i preko 40 saopštenja sa nacionalnih i međunarodnih naučnih konferencija. Član je Biohemijskog društva Srbije i Srpskog biološkog društva.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Биохемијски и физиолошки параметри стања медоносне пчеле (<i>Apis mellifera</i> L.) током летњег и зимског периода на стаништима са различитим антропогеним утицајем
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије биологије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Новом Саду. Истраживања обухваћена овом докторском дисертацијом су део пројекта под називом: „Молекуларни механизми редокс сигналинга у хомеостази, адаптацији и патолошким процесима“ (ОИ173014) финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.
1. Опис података
1.1 Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> _____ Докторска дисертација _____
1.2 Врсте података а) квантитативни <input checked="" type="radio"/> б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____

г) административни подаци: навести врсту _____

д) узорци ткива: навести врсту _____

ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

е) текст, навести врсту преглед литературе

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: лабораторијски експерименти и мерења

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека .xlsx

б) SPSS фајл, датотека _____

в) PDF фајл, датотека .pdf

д) Текст фајл, датотека _____

е) JPG фајл, датотека .jpg, .tiff

ф) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли 156

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је дефинисан примењеном методом

б) варијабле које се више пута мере односе се на испитиване карактеристике анализираних система

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип анализа биохемијских и физиолошких карактеристика система

б) корелационо истраживање, навести тип мултиваријациона анализа експерименталних података

ц) анализа текста, навести тип прикупљање података из литературних извода

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

UV-Vis спектрофотометар, оптички емисиони спектрометар индуктивно спрегнуте плазме (ICP-OES), квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (QRT-PCR), гасна хроматографија са масеном спектрометријом (GC-MSD), светлосни микроскоп

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? 7

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Статистичком проценом добијених резултата и поређењем експерименталних и теоријских података

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Статистичком контролом изведеног резултата

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до 31.12.2022.

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
 - б) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

a) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Уз претходну комуникацију и писмено одобрење власника података

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима: Добијањем шифре од власника података за приступ подацима који су похрањени у Репозиторијуму Универзитета у Новом Саду

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Снежана Орчић, e-mail: snezana.orcic@dbe.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Снежана Орчић, e-mail: snezana.orcic@dbe.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Снежана Орчић, e-mail: snezana.orcic@dbe.uns.ac.rs