



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU
I ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



Tatjana Nikolić

**Molekularne osnove odgovora medonosne pčele
(*Apis mellifera*, L.) na stres izazvan jonima
teških metala**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2017.

Predgovor

Ova disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja br. 173014 „Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patologiji“ i kratkoročnog projekta od posebnog interesa za održivi razvoj u AP Vojvodini „Molekularna osnova odgovora medonosnih pčela na prisustvo polutanata u životnoj sredini”.

*Najveću zahvalnost dugujem **prof. dr Jeleni Purać**, mom mentoru, bez koje bi sve bilo teže. Naučila me je kritičkom razmišljanju i da svaki korak u istraživanju treba dobro promisliti. Hvala na trudu, posvećenosti i razumevanju tokom svih ovih godina.*

*Zahvaljujem se **prof. dr Danijeli Kojić** na vremenu uloženom u laboratoriji, podršci i korisnim sugestijama.*

*Hvala **prof. dr Nedi Mimici-Dukić** na svesrdnoj pomoći i sugestijama.*

***Doc. dr Anđelki Čelić** i **doc. dr Edwardu Petriju** hvala što su svoje ogromno znanje i iskustvo nesebično podelili sa mnom i uveli me u svet tehnologije rekombinantne DNK.*

***Dr Dušku Blagojeviću** hvala na podršci i pomoći tokom godina saradnje, kao i uvek korisnim sugestijama pri tumačenju rezultata i pisanju disertacije.*

***Doc. dr Željku Popoviću** dugujem veliku zahvalnost zato što mi je pružio priliku da prvi put samostalno radim u laboratoriji i shvatim da želim da nauka bude moj životni poziv. Hvala mu što je uvek tu za prijateljski savet i podršku.*

***Prof. dr Dragani Vujanović** dugujem zahvalnost na svojoj pomoći tokom skupljanja uzoraka, analiziranja i tumačenja rezultata. **Prof. dr Ivanu Gržetiću** i **dr Konstantinu Ilijeviću** se zahvaljujem na analizama metala, kao i korisnim sugestijama u vezi sa dobijenim rezultatima. **Prof. dr Zoranu Stanimiroviću**, **prof. dr Jevrosimi Stevanović** i ostalim članovima Katedre za biologiju Veterinarskog fakulteta u Beogradu hvala što su nam pomogli na samom početku našeg rada sa pčelama, kao i na obezbeđenom biološkom materijalu.*

Veliku zahvalnost dugujem i pčelarima iz Zajače i sa Golije na dobroj volji i obezbeđenom biološkom materijalu.

***Snežani Orčić**, sa kojom sam delila „muke” na terenima i u laboratoriji, hvala na vedrom duhu i optimizmu koji uvek širi u našoj grupi. Hvala **Jovani** i **Sofiji** na pomoći u laboratoriji, kao i na predivnom vremenu provedenom na konferencijama. **Elviri**, **Ivi** i **Ani** hvala što su uvek bile prave prijateljice spremne da ohrabre i pomognu. **Milošu** i **Maji** hvala na lepoj atmosferi i druženju.*

Hvala svim studentima koji su tokom ovih godina prošli kroz našu laboratoriju. Podučavajući njih i sama sam napredovala i usavršavala svoje znanje.

*Želim da pomenem i **prof. dr Gordanu Grubor-Lajšić**, koja nažalost više nije sa nama, ali bez nje ne bih bila tu gde jesam i uvek ću joj biti zahvalna što mi je ukazala poverenje i primila me u svoju grupu.*

Hvala mojoj porodici, pre svega roditeljima, koji su me uvek podržavali i verovali da mogu da postignem sve što sam želela.

Hvala Miljanu na ljubavi i razumevanju.

Novi Sad, 2. mart 2017.

Tatjana Nikolić

Spisak skraćenica

AmMT - metalotionein medonosne pčele	MDA - malondialdehid
ANOVA - analiza varijanse	MRE - metal responsivni element (<i>engl.</i> Metal-responsive element)
APS - amonijum persulfat	MT - metalotionein
ATP - adenozin trifosfat	MTF - metal-responsivni element vezujući transkripcioni faktor (<i>engl.</i> Metal responsive element binding transcription factor)
CAT - katalaza	OD - optička gustina
CDNB - 1-hloro-2,4-dinitrobenzen	PAGE - poliakril amid gel elektroforeza
cDNK - komplementarna DNK	PCR - lančana reakcija polimeraze (<i>engl.</i> Polymerase chain reaction)
dNTP - dezoksinukleotid trifosfat	PDB - banka podataka o proteinima (<i>engl.</i> Protein Data Bank)
DTNB -5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoična kiselina	qPCR - kvantitativni PCR (<i>engl.</i> Quantitative polymerase chain reaction)
DTT - ditioneitol	REST - program za računanje relativne ekspresije gena (<i>engl.</i> Relative Expression Software Tool)
EDTA - etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina	RNS - reaktivne vrste azota (<i>engl.</i> Reactive nitrogen species)
EtOH - etanol	ROS - reaktivne kiseonične vrste (<i>engl.</i> Reactive oxygen species)
GO - genska ontologija (<i>engl.</i> Gene ontology)	SDS - natrijum dodecil sulfat
GR - glutation reduktaza	SH - tiolna (sulfhidrilna) grupa proteina
GSH - redukovani glutation	SOD - superoksid dismutaza
GSH-Px - glutation peroksidaza	TBA - tiobarbiturna kiselina
GSSG - oksidovani glutation	TEMED -tetrametil-etilen-diamin
GST - glutation S-transferaza	Tris - Tris(hidroksimetil)aminometan
Gu-HCl - guanidin-hidrohlorid	
ICP-OES - optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (<i>engl.</i> Inductively coupled plasma optical emission spectrometry)	
IPTG - izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid	
LB - Luria-Bertani	

Spisak ilustracija

Slika 1. Uticaj životne sredine na pčelinju zajednicu	18
Slika 2. Reaktivne kiseonične vrste i antioksidativni sistem zaštite	23
Slika 3. Oksidativna oštećenja biomolekula	28
Slika 4. Nastajanje malondialdehida u procesu lipidne peroksidacije	29
Slika 5. Model indukcije metalotioneina kod sisara	34
Slika 6. Uloge metalotioneina.....	36
Slika 7. Redoks ciklus cink-metalotioneina.....	37
Slika 8. Mapa lokaliteta sa prikazanim položajem košnica, izgledom terena i površinom koju pčele prelete u toku sakupljanja polena i nektara (poluprečnik 6 km)	47
Slika 9. Koncentracija metala (Ca, Cu, K, Fe, Mg, Mn, Na i Zn) u pčelama i pergi uzorkovanim u avgustu 2013. godine na tri lokacije sa različitim antropološkim uticajem	67
Slika 10. Koncentracija metala (Al, Ba, Cd, Cr, Co, Ni, Pb i Sr) u pčelama i pergi uzorkovanim u avgustu 2013. godine na tri lokacije sa različitim antropološkim uticajem	68
Slika 11. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) izražena u jedinicama enzima po miligramu ukupnih proteina i predstavljena kao srednja vrednost (\bar{A}) \pm standardna greška(SE) u pčelama iz ruralne (Golija), urbane (Beograd) i industrijske (Zajača) oblasti.....	71
Slika 12. Specifična aktivnost katalaze (CAT) izražena u jedinicama enzima po miligramu ukupnih proteina i predstavljena kao srednja vrednost (\bar{A}) \pm standardna greška (SE) u pčelama iz ruralne (Golija), urbane (Beograd) i industrijske (Zajača) oblasti	72
Slika 13. Specifična aktivnost glutacion S-transferaze (GST) izražena u jedinicama enzima po miligramu ukupnih proteina i predstavljena kao srednja vrednost (\bar{A}) \pm standardna greška (SE) u pčelama iz ruralne (Golija), urbane (Beograd) i industrijske (Zajača) oblasti.....	73
Slika 14. Relativna ekspresija gena za katalazu (<i>Cat</i>) i dva gena za superoksid dismutazu (<i>Sod1</i> i <i>Sod2</i>) u pčelama iz Beograda (urbana oblast) i Zajače (industrijska oblast) u poređenju sa ruralnom oblasti (Golija) (relativna ekspresija=1)	74
Slika 15. Relativna ekspresija tri gena za glutacion S-transferaze (<i>Gstd1</i> , <i>Gsts1</i> i <i>Gstmic1</i>) u pčelama iz Beograda (urbana oblast) i Zajače (industrijska oblast) u poređenju sa ruralnom oblasti (Golija) (relativna ekspresija=1).....	75
Slika 16. Relativna genska ekspresija <i>Sod1</i> kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze	80
Slika 17. Relativna genska ekspresija <i>Sod2</i> kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze	81

Slika 18. Relativna genska ekspresija <i>Cat</i> kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze	82
Slika 19. Relativna genska ekspresija <i>Gstd1</i> kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze	83
Slika 20. Relativna genska ekspresija <i>Gsts1</i> kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze	84
Slika 21. Relativna genska ekspresija <i>Gstmic1</i> kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze	85
Slika 22. Genska, cDNK i proteinska sekvenca potencijalnog metalotioneina medonosne pčele.....	86
Slika 23. Region 1500 bp uzvodno od otvorenog okvira čitanja.	87
Slika 24. Predviđene proteinske sekvence metalotioneina (sa RefSeq pristupnim brojevima za NCBI anotaciju 100) kod tri vrste iz reda Hymenoptera: <i>Apis florae</i> , <i>Bombus impatiens</i> i <i>Bombus terrestris</i> i poravnanje sa identifikovanim metalotioneinom kod vrste <i>Apis mellifera</i>	89
Slika 25. Filogenetsko stablo šest novih potencijalnih metalotioneina iz vrsta reda Hymenoptera i 28 proteina (sa UniProtKB pristupnim brojevima) koji su izabrani da predstavljaju šest familija životinjskih metalotioneina	92
Slika 26. Poravnanje sekvence AmMT sa strukturnim šablonima korišćenim u programu za molekularno modelovanje I-TASSER kako bi se predvidele strukturne karakteristike AmMT ...	94
Slika 27. Molekularni model i način vezivanja prelaznih metala za AmMT napravljen korišćenjem programa I-TASSER.....	95
Slika 28. Aminokiselinske sekvence rekombinantnog i divljeg tipa AmMT.	96
Slika 29. Analiza uspešnosti prečišćavanja AmMT pomoću HisTrap HF kolone na 15% SDS-PAGE.....	96
Slika 30. Povećana tolerancija <i>E. coli</i> BL21 ćelija koje ekspresuju rekombinantni AmMT (pET28+AmMT) na prisustvo Cd, Cu i Pb u poređenju sa bakterijama koje su transformisane sa praznim pET28 vektorom	97
Slika 31. Relativna genska ekspresija <i>AmMT</i> kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze	98

Spisak tabela

Tabela 1. Biološka klasifikacija medonosne pčele	4
Tabela 2. Radikalne i neradikalne kiseonične vrste	22
Tabela 3. Broj i distribucija različitih klasa enzima glutacion <i>S</i> -transferaze (GST), citohrom P450 i karboksil/holinesteraze (CCE) u genomima <i>D. melanogaster</i> , <i>A. gambiae</i> i <i>A. mellifera</i> ...	39
Tabela 4. Geni za superoksid dismutazu, katalazu i glutacion <i>S</i> -transferaze medonosne pčele i njihova subćelijska lokalizacija	41
Tabela 5. Prajmeri korišćeni u praćenju relativne ekspresije gena qPCR metodom	51
Tabela 6. Sadržaj metala u medu uzorkovanom u avgustu 2013. godine na tri lokacije sa različitim antropološkim uticajem	69
Tabela 7. Količina konzumiranog metala (u μg) po pčeli i procenat mortaliteta nakon tretmana sa bakrom, olovom ili kadmijumom u trajanju od 48 h.....	76
Tabela 8. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutacion <i>S</i> -transferaze (GST) u homogenatu celih pčela tretiranih sa bakrom, olovom i kadmijumom u trajanju od 48 h.....	77
Tabela 9. Koncentracija glutaciona (GSH), sulfhidrilnih grupa proteina (SH) i malondialdehida (MDA) u nmol/mg proteina u homogenatu celih pčela tretiranih sa bakrom, olovom i kadmijumom u trajanju od 48 h.	78
Tabela 10. Pregled mogućih transkripcionih faktora i responsivnih elemenata na DNK i njihova funkcija	88
Tabela 11. Proteinske sekvence 34 metalotioneina korišćena za filogenetsku analizu i njihovi pristupni brojevi u UniprotKB bazi	90

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo	3
2.1. Medonosna pčela	4
2.1.1. Taksonomija i biologija vrste	4
2.1.1.1. Ciklus sezonskih aktivnosti	6
2.1.1.2. Ishrana pčela	7
2.1.2. Značaj istraživanja medonosne pčele	8
2.2. Teški metali	10
2.2.1. Mehanizmi toksičnosti metala	11
2.2.1.1. Toksičnost kadmijuma	13
2.2.1.2. Toksičnost olova	14
2.2.1.3. Toksičnost nikla	15
2.2.1.4. Toksičnost gvožđa	15
2.2.1.5. Toksičnost bakra	16
2.2.1.6. Toksičnost hroma	17
2.2.1.7. Toksičnost kobalta	17
2.2.2. Izloženost pčela teškim metalima	18
2.3. Ćelijski odgovor na stres	19
2.3.1. Osnovni principi ćelijskog odgovora na stres	19
2.3.1.1. Bazalni sistem za prenos signala	20
2.3.1.2. Proteini stresa	20
2.3.1.3. Monooksigenaze	21
2.3.1.4. Odgovor na oksidativni stres	21
2.3.1.4.1. Mehanizmi antioksidativne zaštite	23
2.3.1.4.2. Oksidativna oštećenja biomolekula	27
2.3.1.5. Metalotionein	30
2.3.1.5.1. Regulacija ekspresije metalotioneina	33
2.3.1.5.2. Funkcija metalotioneina	35
2.3.2. Ćelijski mehanizmi odgovora medonosne pčele na hemijski stres	37
3. Cilj	43
4. Materijal i metode	45
4.1. Terenski testovi: opis lokaliteta i formiranje uzoraka	46
4.2. Laboratorijski testovi: postavka eksperimenta i formiranje uzoraka	48

4.3. Određivanje koncentracije metala u pčelama i pčelinjim proizvodima	49
4.3.1. Statistička obrada	49
4.4. Merenje relativne genske ekspresije	50
4.4.1. Izolacija ukupne RNK i sinteza komplementarne DNK (cDNK).....	50
4.4.2. Kvantitativni PCR (qPCR).....	50
4.4.3. Statistička obrada	52
4.5. Merenje specifične aktivnosti antioksidativnih enzima i određivanje redoks statusa.....	53
4.5.1. Merenje aktivnosti superoksid dismutaze	53
4.5.2. Merenje aktivnosti katalaze	53
4.5.3. Merenje aktivnosti glutation <i>S</i> -transferaze	53
4.5.4. Merenje sadržaja glutationa i sulfhidrilnih grupa proteina	54
4.5.5. Merenje koncentracije malondialdehida	54
4.5.6. Merenje koncentracije proteina.....	54
4.5.7. Statistička obrada	54
4.6. Identifikacija i bioinformatička analiza gena za metalotionein kod medonosne pčele.....	56
4.6.1. Pretraživanje baza podataka radi identifikacije metalotioneina.....	56
4.6.2. Analiza promotorskog regiona gena	56
4.6.3. Komparativna filogenetska analiza.....	56
4.6.4. Molekularno modelovanje	57
4.7. Kloniranje gena za metalotionein, ekspresija rekombinantnog proteina i analiza njegove funkcije	58
4.7.1. Priprema kodirajuće sekvence metalotioneina za kloniranje.....	58
4.7.2. Digestija vektora pET28 i inserta restrikcionim enzimima	59
4.7.3. Ligacija	59
4.7.4. Pravljenje kompetentnih ćelija.....	59
4.7.5. Transformacija DH5 α ćelija i izolacija pET28 vektora sa insertom.....	60
4.7.6. Transformacija BL21 ćelija i dobijanje rekombinantnog proteina	61
4.7.7. Analiza tolerancije transformisanih bakterija BL21 na metale.....	63
5. Rezultati.....	64
5.1. Rezultati terenskih testova	65
5.1.1. Određivanje koncentracije metala.....	65
5.1.1.1. Sadržaj metala u pčelama i pergi	65
5.1.1.2. Sadržaj metala u medu	69
5.1.2. Aktivnost antioksidativnih enzima	71

5.1.2.1. Aktivnost superoksid dismutaze	71
5.1.2.2. Aktivnost katalaze.....	72
5.1.2.3. Aktivnost glutation <i>S</i> -transferaze.....	73
5.1.3. Ekspresija gena za antioksidativne enzime.....	74
5.2. Rezultati laboratorijskih testova	76
5.2.1. Mortalitet i unos hrane	76
5.2.2. Aktivnost antioksidativnih enzima i redoks status.....	77
5.2.2.1. Aktivnost antioksidativnih enzima	77
5.2.2.2. Koncentracija malondialdehida, sulfhidrilnih grupa i glutationa	78
5.2.3. Ekspresija gena za antioksidativne enzime.....	79
5.2.3.1. Ekspresija gena za superoksid dismutazu	80
5.2.3.2. Ekspresija gena za katalazu	82
5.2.3.3. Ekspresija gena za glutation <i>S</i> -transferazu	83
5.3. Analiza metalotioneina	86
5.3.1. Bioinformatička analiza	86
5.3.1.1. Identifikacija gena i proteina za metalotionein u bazama podataka	86
5.3.1.2. Predviđena mesta za vezivanje transkripcionih faktora u promotorskom regionu <i>AmMT</i> gena.....	87
5.3.1.3. Komparativna filogenetska analiza.....	89
5.3.1.4. Molekularno modelovanje	93
5.3.2. Ekspresija rekombinantnog proteina i analiza njegove funkcije	96
5.3.2.1. Prečišćavanje rekombinantnog <i>AmMT</i> proteina	96
5.3.2.2. Tolerancija transformisane <i>Escherichia coli</i> na prisustvo metala.....	97
5.3.2.3. Ekspresioni profil gena za metalotionein.....	98
6. Diskusija	99
6.1. Terenski testovi	101
6.2. Laboratorijski testovi	105
6.3. Analiza metalotioneina	110
7. Zaključak	115
8. Literatura.....	118
9. Prilozi.....	136
Biografija	140

1. Uvod

Teški metali zbog sve većeg antropogenog uticaja predstavljaju jednu od glavnih zagađujućih materija u životnoj sredini. Iako su neki metali prisutni kao esencijalni bioelementi u tragovima, većina njih je u visokim koncentracijama toksična za sve životne forme. Za razliku od organskih polutanata teški metali ne podležu degradaciji i akumuliraju se u okolini, ali i u živim sistemima.

Medonosne pčele (*Apis mellifera*, L.) su kosmopolitski rasprostranjeni organizmi koji imaju ključnu ulogu u oprašivanju velikog broja biljnih vrsta. U poslednjih nekoliko decenija pčele su izložene povećanom nivou zagađenja, koji zajedno sa lošom ishranom i patogenima doprinosi slabljenju pčelinjih populacija u Evropi i svetu. Među ksenobioticima kojima je pčela izložena posebno se ističu pesticidi i teški metali. Istraživanja na ovoj vrsti su uglavnom bila fokusirana na uticaj pesticida na imuni sistem i preživljavanje. Sa druge strane, mali broj studija se bavio biohemijskom osnovom adaptivnog odgovora na zagađenje teškim metalima.

Kako bi se bolje razumeo toksični efekat ksenobiotika na organizam neophodno je identifikovati odnos između stresa koji on indukuje i biološkog odgovora. Adaptivni odgovor organizma na stres izazvan jonima teških metala zahteva koordinaciju složenih fizioloških i biohemijskih procesa. Na molekularnom nivou, odgovor podrazumeva sintezu stresom aktiviranih proteina, raznih signalnih molekula i na kraju transkripcionu aktivaciju specifičnih gena koji se aktiviraju jonima metala da bi se suprotstavili stresu. Metalotionein sistem je jedan od najviše proučavanih sistema u kontekstu teških metala. Pored toga, posebno treba istaći aktivaciju sistema antioksidativne odbrane, enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaza, glutation S-transferaza i drugih, kao i neenzimskih biomolekula, koji uklanjaju reaktivne kiseonične vrste ili neutrališu njihove štetne posledice.

Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su bila usmerena ka razumevanju molekularnih mehanizama koji se aktiviraju kod pčela kao odgovor na stres izazvan jonima teških metala, što ima poseban ekofiziološki i ekotoksikološki značaj i doprineće očuvanju prirodnih populacija medonosne pčele.

2. Opšti deo

2.1. Medonosna pčela

2.1.1. Taksonomija i biologija vrste

Postoji oko 25.000 poznatih vrsta pčela i one su podeljene u 11 familija, brojne potfamilije i rodove, a većinom ih čine solitarni organizmi. Medonosna pčela se svrstava u potfamiliju Apinae familije Apidae, koja obuhvata i druge socijalne pčele kao što su bumbari (Bombinae) i pčele bez žaoke (Meliponinae) (Devillers, 2002). Rod *Apis* obuhvata četiri vrste: *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata* i *A. florea* (Ruttner, 1988). *Apis florea* (mala medonosna pčela) i *Apis dorsata* (velika medonosna pčela) su tropske vrste koje grade gnezda u grmlju i drveću. *Apis cerana* (istočna medonosna pčela) i *Apis mellifera* (zapadna medonosna pčela) su veoma slične po načinu života, ali su kolonije *A. cerana* često slabije i prinos meda je manji (Devillers, 2002).

Evropska medonosna pčela (*Apis mellifera*, L.; *engl.* Western, European, African, common, domesticated honey bee), opisana je od strane Linea i biološka klasifikacija ove vrste je prikazana u Tabeli 1.

Tabela 1. Biološka klasifikacija medonosne pčele.

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Classis	Insecta
Subclassis	Pterygota
Ordo	Hymenoptera
Familia	Apidae
Genus	Apis
Species	<i>Apis mellifera</i>, Linnaeus (1758)

Tokom evolucije pojavile su se različite rase, pa i sojevi evropske medonosne pčele, od kojih su četiri ekonomski značajne: *Apis mellifera mellifera*, L. (tamna holandska i nemačka pčela), *Apis mellifera carnica*, Polm. (kranjska siva medonosna pčela), *Apis mellifera caucasica*, Gorb. (kavkaska (tamna i žuta) medonosna pčela) i *Apis mellifera ligustica*, Spin. (italijanska (žuta) medonosna pčela) (Stanimirović i sar., 2000).

Pčele su socijalni insekti prilagođeni životu u zajednici koju čine matica, radilice i trutovi. Svaki član zajednice ima tačno određene uloge i među njima vladaju vrlo složeni odnosi. U najpovoljnijem delu godine, u košnici se može nalaziti čak 60 000-

80 000 pčela, od čega najveći deo čine radilice, nekoliko stotina trutova i jedna matica.

Pčele u toku svog razvoja prolaze potpuni preobražaj, odnosno prolaze kroz četiri stupnja razvoja: jaje, larva, lutka i adult. Tri dana nakon polaganja, iz jaja se razvija larva koja raste i presvlači se oko 4. dana. Nakon toga prelazi u stadijum mirovanja-lutku i u tom stadijumu ostaje nekoliko dana u zatvorenoj ćeliji saća dok se ne razvije adultni oblik-imago. Ovaj proces traje 16-24 dana u zavisnosti od godišnjeg doba i kaste pčele. Dužina stadijuma jajeta je ista za sve tri kaste, ali se larvalni i stadijum lutke razlikuju i najkraći su kod razvoja matice, a najduži kod trutova.

Matica se razlikuje od radilica po veličini, naročito po izduženom abdomenu u kome se nalaze ovarijumi i seminalna vezikula tj. spermateka. Pri parenju matica skladišti spermatozoide u spermateci, što je najčešće dovoljno za reprodukciju do kraja života. Nakon toga, ona kontroliše pol svakog jajeta tako što oslobađa ili ne oslobađa spermatozoide iz spermateke pri prolasku jajne ćelije kroz jajovod. Kao i kod većine Hymenoptera, iz jaja koja su oplodena se razvijaju ženke, a iz neoplođenih mužjaci (Michener, 2000). Životni vek matice je i po nekoliko godina, što je značajno duže od života radilica i trutova (Amdam i Omholt, 2002).

Trutovi su najkrupnija kasta u koloniji i ne poseduju žaoku, korbikule i voštane žlezde s obzirom da je njihova glavna uloga oplodnja matice. Trutovi najčešće oplode maticu koja potiče iz druge košnice i ako dođe do oplodnje, ubrzo umiru jer im se kopulatorni organi zajedno sa drugim unutrašnjim organima odvoje od tela. Pored uloge u oplodnji, trutovi mogu da održavaju temperaturu u košnici zajedno sa pčelama radilicama. Na jesen, radilice ih izbacuju iz košnice i kolonija prezimljava bez trutova do formiranja novog legla.

Radilice predstavljaju najmanje i najbrojnije članove pčelinjeg društva. Život pčele radilice je kratak i traje oko 35-40 dana tokom leta, dok je zimska generacija pčela dugoživeća, i one mogu preživeti od jeseni pa sve do proleća (Matilla i sar., 2001). Pčele radilice u pčelinjem društvu obavljaju sve funkcije osim reproduktivne i mogu se podeliti na kućne pčele, koje obavljaju različite uloge unutar košnice i pčele izletnice, koje sakupljaju nektar, polen, vodu i druge materije i donose ih u košnicu.

2.1.1.1. Ciklus sezonskih aktivnosti

Rase medonosne pčele koje žive u umerenim regionima (pre svega *A. mellifera mellifera* i *A. mellifera carnica*) su razvile osobine koje im omogućavaju bezbedno preživljavanje tokom dugih i hladnih zima. Neke od osobina koje su preduslov za preživljavanje niskih temperatura su veličina (adaptirane pčele su veće), dobra termoregulacija, izmenjena fiziologija (akumulirani proteini i lipidi, zadržavanje fecesa), dug period bez legla tokom zime, povećana otpornost na infekciju nozomom (Ruttner, 1988).

Aktivnosti u koloniji počinju krajem februara i početkom marta, a temperatura je faktor koji je presudan u tome. Kada otopli, matica počinje da leže sve više jaja, a radilice počinju da izleću iz košnice radi sakupljanja meda, polena i biljne smole. Krajem proleća se povećava broj trutova i priprema nekoliko ćelija saća sa maticama, što rezultuje rojenjem, koje se dešava od marta do juna. Do rojenja dolazi kada se nova oplođena matica sa delom radilica odvoji i osniva novu koloniju, što predstavlja osnovni vid prirodnog povećanja broja kolonija.

Nakon rojenja, kolonije provode leto i ranu jesen u sakupljanju nektara, koji se prerađuje u med i koristi kao izvor energije, naročito u toku zimskih meseci i polena, koji se koristi kao izvor proteina za ishranu legla (Döke i sar., 2015). Kada postane previše toplo, prestaje polaganje jaja i sakupljanje hrane, radilice u koloniju donose vodu, skupljaju se sa spoljne strane košnice i rashlađuju je mahanjem krila, s obzirom da se temperatura iznad 37°C za pčele smatra stresnim faktorom.

Kad pčelinja zajednica polovinom godine završi svoj razvojni ciklus i postigne biološki maksimum, sledi pad u njenom razvoju. Matica postepeno smanjuje leglo, a radilice smeštaju viškove meda sa bočnih strana i iznad legla, što se smatra pripremom za prezimljavanje (Stanimirović i sar., 2000). Počinje oskudica u hrani, tako da se razvoj mladih smanjuje sve do potpunog obustavljanja polaganja jaja od strane matice tokom oktobra i novembra. Radilice sve otvore i pukotine zatvaraju lepljivim propolisom napravljenim od biljne smole i izbacuju trutove iz košnice.

Kada temperatura padne ispod 10°C pčele formiraju termoregulacioni klaster- klube i zagrevaju se pokretima krila kako bi se sačuvala dovoljno visoka temperatura (Döke i

sar., 2015). Kolonija prezimljavanje započinje sa 30 000-40 000 jedinki, a završava sa oko 10 000-15 000 usled prirodne smrti i nedostatka novih mladih pčela i legla.

Zimovanje pčela obuhvata dva perioda: period zimovanja u klubetu bez legla, kad pčele održavaju prosečnu temperaturu oko 21°C, i period zimovanja pčela u klubetu sa gajenim leglom, kada temperatura treba da bude oko 34-35°C. Period sa leglom počinje kad dani postanu duži (već u januaru) i najkritičniji je u razvoju pčelinje zajednice. Koliko će pčelinja zajednica biti u stanju da održi konstantnu temperaturu za razvoj prvog januarskog legla, zavisi pre svega od snage pčelinje zajednice i rezerve hrane, i u ovom periodu do posebnog izražaja dolaze značaj i kvalitet prirodnog meda i polena za prezimljavanje i razvoj zimskog legla u odnosu na druge vrste hrane (Stanimirović i sar., 2000).

2.1.1.2. Ishrana pčela

Adekvatna ishrana je osnova za rast i razvoj pčelinje zajednice. Nedostatak nutrijenata može da dovede do slabljenja kolonije koja zbog toga postaje podložnija uticaju stresora i patogena. Pčele za svoju ishranu sakupljaju i obrađuju nektar i polen biljaka, a zbog svojih lekovitih svojstava pčelinji proizvodi se upotrebljavaju i u ishrani ljudi.

Med se dobija iz nektara koji pčele sakupljaju iz cvetova. Nektar je po sastavu 5-80% šećer i predstavlja glavni izvor ugljenih hidrata za košnicu. Nektar koji pčele unesu u košnicu se skladišti unutar saća gde se smanjuje procenat vode do 16-18% i dodaju se enzimi (invertaza, diastaza i glukozo oksidaza) koji razlažu saharozu i odgovorni su za sastav šećera u medu (Brodschneider i Crailsheim, 2010). Skladišteni med predstavlja glavnu hranu pčelama tokom zime, a nedostatak ugljenih hidrata ograničava broj larvi koje se razvijaju u proleće, kad još uvek nema izvora nektara.

Pored nektara, pčele sakupljaju i medljiku i sokove od raznog voća. *Medljika* je slatka i gusta lepljiva supstanca koju luče biljne i štitaste vaši koje se sakupljaju na lišću. Med medljikovac kao zimska hrana je veoma štetan za pčele, jer nije lako svarljiv i može da izazove zapaljenje creva i uginuće pčela tokom zime (Stanimirović i sar., 2000).

Polen je jedini prirodni izvor proteina za pčele i najčešće sadrži više od 20% proteina i 10 amino-kiselina esencijalnih za njihov razvoj. Pored toga, pčelama je polen jedini

izvor lipida, koji čine između 0,8 i 18,9% sadržaja polena, u zavisnosti od biljne vrste, a sadrži i minerale i vitamine, naročito B grupe (Stanimirović i sar., 2000; Brodschneider i Crailsheim, 2010). Medonosna pčela (*A. mellifera*) sakuplja polen raznovrsnih vrsta biljaka, te se naziva polilektnom, dok su vrste koje sakupljaju polen samo određenog biljnog taksona oligolektnične (Michener, 2000). Prikupljen polen mlade pčele radilice skladište u ćelije saća i zalivaju medom. Polen obrađen na ovaj način, tj. pomešan sa pljuvačkom, enzimima i medom fermentiše i tako nastaje *perga* ili *pčelinji hleb* (Stanimirović i sar., 2000). Pčelinji hleb predstavlja glavnu hranu za većinu larvi i odraslih pčela. Sastav perge se malo razlikuje od polena, kiselija je zbog prisustva mlečne kiseline i veće količine vitamina K, zbog čega je sprečen rast buđi i mikroorganizama (Nagai i sar., 2004).

Matični mleč je sličan pčelinjem hlebu, ali sadrži veći procenat meda, sekreta mlečnih žlezda i feromona, a služi za ishranu ženki koje treba da se razviju u matice. Mleč je produkt aktivnosti mlečne žrelne žlezde mladih pčela, starosti od 6 do 10 dana i bogat je različitim vrstama proteina i šećera, vitaminima B grupe, i u tragovima sadrži vitamin C i ostale vitamine, osim vitamina A (Stanimirović i sar., 2000).

Pored hrane, pčele u košnicu donose još i smolu biljaka od koje prave *propolis* koji koriste za izgradnju i održavanje košnice i zatvaranje otvora kada dođe zima. Propolis sadrži 50-55% smole, 30% voska, 8-10% eteričnih materija, dok ostatak čine cvetni prah i otpaci iz košnice. Upotrebljava se u humanoj i veterinarskoj medicini zbog svojih antibakterijskih svojstava (Stanimirović i sar., 2000).

Pčelinja zajednica ima velike potrebe za vodom koju pčele iz prirode donose u mednom želucu. Voda koju radilice donose u košnicu služi za hlađenje evaporacijom i za hidrataciju jedinki unutar košnice, a za te svrhe pčele sakupe oko 25 litara vode godišnje (Nicolson, 2009).

2.1.2. Značaj istraživanja medonosne pčele

Medonosna pčela (*Apis mellifera* L.) je kosmopolitski rasprostranjen organizam i predstavlja jednog od glavnih polinatora divljih i kultivisanih biljnih vrsta (vanEngelsdorp i Meixner, 2010). Prinosi pojedinih useva i nekih vrsta voćaka bi se smanjili više od 90% bez ovih oprašivača (Klein i sar., 2007).

Broj kolonija medonosne pčele je u značajnom opadanju od vremena posle Drugog svetskog rata, a u poslednjih nekoliko godina došlo je do masovnog odumiranja pčela u pojedinim delovima sveta, pre svega Evropi i Severnoj Americi, što je doprinelo tome da njihovo zdravlje postane veoma važna tema. Deo ovih gubitaka pripisuje se kolapsu kolonija (*engl.* colony collapse disorder) koji je u naglom porastu od 2006. godine. Kolaps kolonija pčela predstavlja naglo nestajanje čitavih pčelinjih kolonija, pri čemu nema mrtvih pčela u koloniji ili košnici i nema kleptoparazita u izumrlim košnicama, bez obzira na višak skladištene hrane u njima (vanEngelsdorp i sar., 2009). Tačan razlog za ovaj fenomen još nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da nekoliko stresogenih faktora, delujući pojedinačno i/ili sinergički, doprinose slabljenju zdravstvenog stanja pčela, čineći ih podložnim bolestima. Najviše rasprostranjeni paraziti medonosne pčele su krpelj *Varroa*, koja se hrani hemolimfom 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). Pored parazita, do danas su opisana i 23 virusa medonosne pčele i smatra se da oni imaju veliku ulogu u kolapsu kolonija (Gisder i Genersch, 2015).

Očuvanje medonosne pčele je ključno, kako zbog njene uloge u ekosistemima, naročito u oprašivanju cvetova mnogih biljnih vrsta, tako i zbog brojnih produkata, pre svega meda, voska i propolisa, koji se od davnina koriste za ishranu i poboljšanje zdravlja ljudi (Simoons, 1990; Winston, 1991).

Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA, 2014) ističe značaj procene uticaja zagađenja životne sredine na zdravlje pčela na individualnom i nivou kolonije, što uključuje monitoring kolonija, laboratorijske i terenske testove. S obzirom da ne postoji procena uticaja većeg broja stresogenih faktora na pčele, naročito na molekularnom nivou, preporučuje se rad na identifikaciji ovih faktora i njihovoj interakciji, kao i procena letalnih/subletalnih efekata različitih zagađujućih materija na pčele (EFSA, 2015).

2.2. Teški metali

Kontaminacija životne sredine metalima predstavlja rastući ekološki problem i globalnu pretnju za žive organizme. Iako su metali prirodno prisutni u zemljinoj kori, najveći deo kontaminacije životne sredine potiče od antropogenih aktivnosti kao što su rudarsko-topioničarska industrija, industrijska proizvodnja, kao i upotreba metala i njihovih jedinjenja u domaćinstvu i poljoprivredi. Pored toga, i prirodni fenomeni kao što su vulkanske erupcije mogu da doprinesu zagađenju metalima. Veliki broj metala su bioelementi koji učestvuju u biohemijskim procesima i ulaze u sastav prirodnih jedinjenja kao što su metaloenzimi, neenzimski metaloproteini, koenzimi, vitamini, hormoni, antibiotici, biominerali i sl. Različiti fiziološki poremećaji se mogu javiti kao posledica promena u sadržaju esencijalnih metala, bilo da se radi o nedostatku ili višku. Drugi metali, kao što su kadmijum, olovo i živa, nemaju fiziološku funkciju i mogu da ometaju biološke procese interagujući sa makromolekulima, zamenjujući ili na drugi način utičući na esencijalne metale (Buchwalter, 2008).

Termin „teški metali” se najčešće odnosi na grupu metala i metaloida gustine veće od 5 g/cm^3 . Međutim, ovaj termin se smatra nedovoljno preciznim s obzirom da naučnici ne mogu da se usaglase i nije definisano od strane IUPAC-a koje su osobine koje treba da ima element kako bi se svrstao u teške metale, te se u literaturi često sreću različiti podaci. Ističe se potreba za novom klasifikacijom metala prema hemijskoj osnovi toksičnosti koja bi omogućila predviđanje njihovih štetnih efekata (Duffus, 2002). Izraz „teški metali” se i dalje upotrebljava u ekotoksikologiji za elemente koji izazivaju štetne biološke efekte (Banfalvi, 2011).

U najvažnije teške metale se ubrajaju: antimon (Sb), arsen (As), barijum (Ba), bizmut (Bi), kadmijum (Cd), hrom (Cr), kobalt (Co), bakar (Cu), zlato (Au), gvožđe (Fe), olovo (Pb), mangan (Mn), živa (Hg), nikl (Ni), platina (Pt), srebro (Ag), stroncijum (Sr), kalaj (Sn), vanadijum (V), cink (Zn). Veliki broj teških metala nema ekološki značaj, jer su veoma retki ili nedostupni, dok su neki bioelementi i neophodni su za normalno funkcionisanje živih sistema. Zbog visokog stepena toksičnosti na žive organizme, kao i široke rasprostranjenosti, ističu se kadmijum (Cd), olovo (Pb), živa (Hg), arsen (As), hrom (Cr), nikl (Ni), kao i bioelementi kao što su bakar (Cu), gvožđe (Fe), cink (Zn), mangan (Mn), kobalt (Co) i selen (Se), koji su u maloj

koncentraciji neopodni za razne biohemijske i fiziološke procese, ali u većoj koncentraciji postaju štetni.

Organizmi su razvili različite, najčešće energetske zahtevne detoksikacione strategije kako bi uklonili neželjene neorganske supstance. Jedan od načina za smanjenje toksičnosti metala je enzimski posredovana ćelijska neutralizacija (oksidacija, redukcija, metilacija ili demetilacija) i konjugacija sa drugim molekulima u manje toksičan oblik (na primer, $\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$; $\text{As}(\text{OH})_3 \rightarrow \text{HAsO}_4^{2-}$) ili u isparljiva jedinjenja koja se oslobađaju u okolinu ($\text{SeO}_3^{2-} \rightarrow \text{Me}_2\text{Se}$). Pored toga, specijalne membrane sprečavaju prolazak jona u naročito osetljive regione kao što su mozak, fetus ili ćelijsko jedro, a jonske pumpe mogu da uklone neželjena jedinjenja iz osetljivih delova ćelije. Adaptacije organizma uključuju i sintezu molekula kao što je metalotionein koji mogu vezati toksične jone i na taj način ih ukloniti iz cirkulacije (Silver i Phung, 2005; Kaim i sar., 2013). U slučaju da je prisutna količina koju nije moguće ukloniti na navedene načine ili je organizam hronično izložen toksičnim metalima, oni mogu da se akumuliraju i direktno ili indirektno utiču na integritet biomolekula i posledično naruše homeostazu u organizmu. Metali se akumuliraju u svim delovima ćelije, ali najviše u citosolu i lizozomima gde su vezani za proteine bogate tiolnim grupama (Olsson i sar., 1998).

2.2.1. Mehanizmi toksičnosti metala

Metali se u biološkim sistemima veoma kratko mogu naći u jonskoj formi, jer su veoma reaktivni i stupaju u interakciju sa brojnim makromolekulima. Najčešće se vezuju za sulfhidrilne, karboksilne i fosfatne grupe proteina, ali i za amine i različite anjone, kao što je hloridni anjon, što može da utiče na brojne biohemijske puteve (Buchwalter, 2008). Teški metali utiču na ćelijske komponente kao što su ćelijske membrane, mitohondrije, lizozomi, endoplazmatski retikulum, jedro i na enzime uključene u metabolizam, detoksikaciju i reparaciju (Wang i Shi, 2001). Za neke elemente, kao što su olovo, živa, arsen i hrom, vrsta jedinjenja, odnosno ligaciono i oksidaciono stanje imaju ključnu ulogu u toksičnosti (Kaim i sar., 2013).

Toksičnost teških metala se ispoljava interakcijom sa biomolekulima na više načina.

1. *Promene u konformaciji biomolekula.* Neki metali mogu da promene sternu konformaciju proteina putem interakcije sa atomima sumpora, naročito u disulfidnim mostovima. Na primer, umetanje žive između dva sumpora u disulfidnoj vezi ribonukleaze može da izmeni oblik proteina i smanji ili blokira njegovu aktivnost (Buchwalter, 2008). Kadmijum, živa i olovo inhibiraju pravilno savijanje proteina, dok hrom i nikl interaguju sa molekulom DNK (Sharma i sar., 2008).

2. *Blokiranje esencijalnih funkcionalnih grupa biomolekula.* Neki metali formiraju jake veze sa sumporom koji se nalazi u biomolekulima, najčešće u ostacima cisteina. Sulfhidrilne grupe ulaze u sastav aktivnog centra brojnih enzima, te vezivanje metala uzrokuje promenu konformacije i posledično njihovu inaktivaciju. Živa na ovaj način deaktivira alkalnu fosfatazu, laktat dehidrogenazu i glukozo-6-fosfatazu (Buchwalter, 2008).

3. *Zamena esencijalnih metalnih jona u biomolekulima.* Približno trećina svih enzima zahteva metal kao kofaktor, gde on može imati ulogu u katalitičkoj aktivnosti, redoks potencijalu, ili sternim konformacijama koje su neophodne za normalno funkcionisanje proteina. Teški metali mogu da ispolje svoj toksičan efekat tako što će zameniti metal u enzimu, nakon čega enzim može da ostane aktivan, ali najčešće je njegova aktivnost smanjena ili se u potpunosti gubi. Metalni centri u enzimima mogu biti zamenjeni metalom sa sličnim hemijskim osobinama: $Zn \leftrightarrow Cd$, $Ca \leftrightarrow Pb$, $Ca \leftrightarrow Cd$, $Mg \leftrightarrow Be$, $Mg \leftrightarrow Al$ (Kaim i sar., 2013). Npr. kadmijum i olovo mogu da zamene cink u aktivnom centru enzima.

4. *Oksidativna oštećenja biomolekula.* Mnogobrojne studije ukazuju da teški metali mogu da povećaju proizvodnju veoma reaktivnih čestica, kao što su hidroksil radikal, superoksid anjon radikal i vodonik-peroksid, što posledično dovodi do oksidativnog stresa (Ercal i sar., 2001; Stone i sar., 2002; Kim i sar., 2011b). Redoks-aktivni metali, kao što su Fe, Cu i Cr, ovaj vid toksičnosti uzrokuju kroz Fentonovoj-slične reakcije, dok se smatra da je trošenje sulfhidrilnih rezervi organizma glavni način na koji redoks neaktivni metali, kao što su Pb, Cd, Hg i As, postižu toksične oksidativne efekte. Pored toga, redoks-neaktivni metali se vezuju za tiole koji predstavljaju glavne rezerve sumpora u organizmu, a pri tome su često značajni elementi neenzimskog antioksidativnog sistema. Nastanak oksidativnog stresa dalje dovodi do lipidne

peroksidacije, oštećenja DNK, smanjenja broja slobodnih sulfhidrilnih (tiolnih) grupa i drugih promena (Stohs i Bagchi, 1995).

2.2.1.1. Toksičnost kadmijuma

Kadmijum se prirodno pojavljuje u rudama zajedno sa cinkom, olovom i bakrom. Jedinjenja kadmijuma se koriste u plastičnim proizvodima, bojama, nekim legurama i najviše u nikel-kadmijum baterijama. Metalni kadmijum se najviše koristi kao anti-korodivno sredstvo. Takođe je prisutan u fosfatnim đubrivima. Proizvodi koji sadrže kadmijum se retko recikliraju i nepropisnim odlaganjem otpada, naročito njegovim spaljivanjem, sa kadmijumom se zagađuje okolina. Prirodni kao i antropogeni izvori kadmijuma dovode do zagađenja zemljišta i povećanog usvajanja kadmijuma od strane biljaka, te kadmijum na ovaj način ulazi u lanac ishrane (Järup, 2003).

U jonskom obliku, Cd^{2+} , kadmijum ispoljava veliku sličnost sa dva biološki veoma važna jona, Zn^{2+} i Ca^{2+} i stoga može da zameni cink u enzimima ili smanji koncentraciju kalcijuma u ćeliji, što utiče na razne signalne puteve u koje je kalcijum uključen (Crichton, 2012). Smatra se da je kadmijum mnogo toksičniji od olova (Kaim i sar., 2013).

Kadmijum je veoma toksičan teški metal sa mutagenim i kancerogenom uticajem (Kakkar i Jaffery, 2005). Na ćelijskom nivou, kadmijum utiče na proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu, menjanjem ekspresije gena i signalne transdukcije (Crichton, 2012). S obzirom da nije redoks aktivan, indirektno uzrokuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i oštećenja na DNK. Kadmijum indukuje oksidativni stres kao rezultat interakcije sa tiolima i enzimima koji u normalnim uslovima štite organizam od reaktivnih kiseoničnih vrsta (Kakkar i Jaffery, 2005). Niske mikromolarne koncentracije (1 do 5 μM) stimulišu sintezu metalotioneina i glutaciona, dok relativno visoke doze, blizu citotoksičnih (10 do 50 μM) inhibiraju antioksidativne enzime superoksid dismutazu i katalazu tako što zamenjuju kofaktore koji su neophodni za njihovu aktivnost ili vezivanjem za njihove tiolne grupe. Ovo može dovesti do povećane koncentracije $O_2^{\cdot-}$ i nastanka OH^{\cdot} i posledično do lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa (Korsloot i sar., 2004).

2.2.1.2. Toksičnost olova

Olovo je neesencijalni, veoma toksični metal čiji efekti na biološke sisteme su uvek štetni. Male količine olova u životnoj sredini potiču iz prirodnih izvora, ali su antropogene aktivnosti dovele do značajnog povećanja koncentracije olova u vodi i zemljištu (Pattee i Pain, 2003). Najveći udeo zagađenja vazduha olovom je poticao od izduvnih gasova automobila, ali je u razvijenim zemljama emisija olova smanjena uvođenjem bezolovnog goriva. Do izlaganja neorganskom olovu dolazi u topionicama i rudnicima, fabrikama za proizvodnju baterija, dok je umereno izlaganje moguće u industriji stakla. Velika emisija u vazduh može dovesti do zagađenja oblasti u okolini rudnika i topionica olova, pa čak i ruralnih područja, a olovo iz vazduha dospeva u vodu i zemljište, i na taj način ulazi u žive sisteme (Järup, 2003).

Olovo je nespecifičan toksikant koji inhibira mnoge enzime neophodne za normalno funkcionisanje organizma. Kod ljudi su najviše proučeni efekti olova na hematološki sistem, mozak i nervni sistem, učenje i ponašanje, kao i reprodukciju i preživljavanje. Iako laboratorijski eksperimenti predstavljaju neophodan deo razumevanja toksičnosti metala, ne mogu se direktno ekstrapolirati na predviđanje efekata u prirodi jer veliki broj faktora životne sredine utiče na apsorpciju i distribuciju, a samim tim i na toksične efekte olova. Takođe, veći broj zagađujućih materija prisutnih u prirodnim staništima može da deluje antagonistički ili sinergistički sa olovom (Pattee i Pain, 2003).

Olovo dovodi do oksidativnog stresa menjajući aktivnost antioksidativnih enzima i antioksidanata zamenom cinka u aktivnom centru ili vezivanjem za sulfhidrilne grupe koje su važne za njihovu aktivnost. Selen ulazi u sastav glutathion peroksidaze, a olovo formira kompleks sa selenom i inhibira aktivnost ovog enzima. Olovo inhibira sintezu hema, i na taj način utiče i na aktivnost katalaze koja sadrži hem. Takođe, olovo inhibira glukozo-6-fosfat dehidrogenazu (G6PD), enzim koji oksiduje glukozo-6-fosfat do 6-fosfoglukonata. U ovoj enzimskoj reakciji nastaje redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) koji je neophodan za redukciju glutathiona (GSSG do GSH) pomoću enzima glutathion reduktaze. Inhibicijom pentozofosfatnog puta, u kojem je G6PD prvi enzim, na ovaj način dolazi do smanjenja antioksidativnog kapaciteta ćelije zbog povećanja GSSG/GSH odnosa (Flora i sar., 2008).

2.2.1.3. Toksičnost nikla

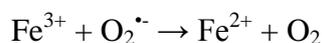
Nikl je esencijalan element biljaka i ulazi u sastav nekoliko enzima mikroorganizama, ali nije esencijalan za životinje i čoveka. Povećane koncentracije nikla su toksične, a efekti zavise od vrste jedinjenja, oblika, koncentracije i načina izlaganja (Schaumlöffel, 2012). Nikl blokira kanale za kalcijum i na taj način, menjanjem unutarćelijske koncentracije kalcijuma menja ekspresiju gena povezanih sa ćelijskim rastom, diferencijacijom i apoptozom. Ovaj metal izaziva oštećenja DNK na dva načina: putem inflamacije i formiranjem vodonik peroksida. Dalje, nikl je slabo redoks-aktivan i dovodi do male produkcije slobodnih radikala u ćeliji, ali je u brojnim studijama pokazano da se u prisustvu veće koncentracije ovog metala smanjuje količina redukovano glutationa i povećava koncentracija proizvoda lipidne peroksidacije, koji su takođe markeri oksidativnog stresa (Valko i sar., 2005).

2.2.1.4. Toksičnost gvožđa

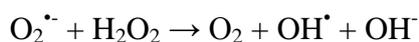
Gvožđe je esencijalni element uključen u veliki broj procesa u ćeliji koji su neophodni za život, kao što su transport kiseonika, generisanje energije i sinteza DNK, zahvaljujući njegovoj sposobnosti da prelazi iz feri (Fe^{3+}) u fero (Fe^{2+}) stanje. Međutim, ista ova aktivnost može da izazove i oštećenje ćelijskih komponenti. Gvožđe učestvuje u Fentonovoj reakciji u kojoj u prisustvu vodonik peroksida nastaje hidroksil radikal (OH^{\bullet}):



Dalje, Fe^{3+} može da se redukuje u prisustvu superoksida do molekuskog kiseonika i Fe^{2+}



Zbirno ove dve reakcije čine Haber-Weiss-ovu reakciju:



U slučaju da je prisutno previše slobodnog gvožđa, ono učestvuje u Haber-Weiss-ovoj reakciji i generiše veoma reaktivan hidroksil radikal koji može da inicira

oksidaciju gotovo svih molekula u biološkim sistemima (Valko i sar., 2005). Zbog toga je neophodna dobra regulacija transporta i skladištenja ovog metala u organizmu, u koju je uključen veliki broj regulatornih proteina, kao što su hemoglobin, transferin i feritin (Kalinowski i Richardson, 2010). U uslovima stresa, ukoliko je prisutna veća količina superoksida, dolazi do oslobađanja gvožđa iz molekula za koje je vezano. Oslobođeno Fe^{2+} dalje ulazi u Fentonovu reakciju i generiše hidroksil radikal. Oksidativni stres izazvan povećanom koncentracijom slobodnog gvožđa ima za posledicu poremećaj redoks regulacije što dovodi do oštećenja DNK, lipidne peroksidacije, oksidativnih oštećenja proteina i aktivacije signalnih puteva koji se indukuju slobodnim radikalima (Valko i sar., 2005).

2.2.1.5. Toksičnost bakra

Bakar je esencijalni kofaktor nekoliko važnih enzima: katalaze, superoksid dismutaze, peroksidaze, citohrom *c* oksidaze, ferooksidaze, monoaminoksidaze i dopamin β -monooksigenaze. Sposobnost bakra da menja oksidaciono stanje iz oksidovanog Cu^{2+} u redukovan Cu^+ je od posebne važnosti za enzime uključene u redoks reakcije. Međutim, ova osobina čini bakar potencijalno toksičnim metalom jer prelasci između Cu^{2+} i Cu^+ mogu dovesti do nastanka superoksid anjon radikala ili hidroksil radikala (Tchounwou i sar., 2012).

U povećanim koncentracijama koje prevazilaze potrebe ćelije, bakar posreduje u nastanku slobodnih radikala što dovodi do oksidacije lipida, proteina i DNK. Cu^{2+} u prisustvu reduktanata (npr. askorbinska kiselina, GSH) može biti redukovan do Cu^+ koji dalje katalizuje nastanak reaktivnog hidroksil radikala u Fentonovoj reakciji (Valko i sar., 2005):



Hidroksil radikal je veoma reaktivan i reaguje sa praktično bilo kojim molekulom koji se nalazi u njegovoj blizini, pri čemu dovodi do oštećenja ćelijskih komponenata. Za bakar i hrom, opseg između korisnih i štetnih koncentracija je veoma mali (Tchounwou i sar., 2012).

2.2.1.6. Toksičnost hroma

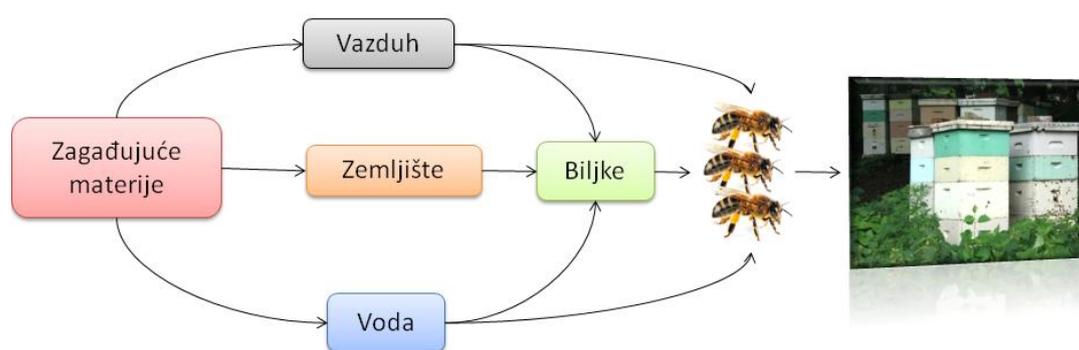
Hrom se u prirodi nalazi u valentnim stanjima od Cr^{2+} do Cr^{6+} . Toksičnost hroma zavisi od njegovog oksidacionog stanja, pri čemu je u formi metala slabo toksičan, dok je kao heksavalentni jon Cr^{6+} veoma toksičan i smatra se kancerogenom. Hrom u životnu sredinu dospeva oslobađanjem u metalurškoj i hemijskoj industriji, najčešće u obliku heksavalentnog jona Cr^{6+} . Hrom u ovom obliku lako ulazi u ćelije gde može da se redukuje do reaktivnih intermedijera Cr^{5+} , Cr^{4+} i Cr^{3+} koji dalje reaguju sa DNK, proteinima i membranskim lipidima i narušavaju integritet i funkciju ćelije (Tchounwou i sar., 2012). Redukcija Cr^{6+} može direktno da oksiduje ćelijske komponente, da sa vodonikom peroksidom reaguje u reakciji sličnoj Fentonovoj i pri tome nastane hidroksil radikal. Pojedini enzimi simultano redukuju Cr^{6+} i Cr^{5+} pri čemu nastaje superoksid anjon radikal. Cr^{6+} takođe inhibira aktivnost mitohondrijalnih proteina i narušava funkciju elektron transportnog lanca i na taj način dovodi do nepotpune redukcije kiseonika, što dovodi do nastajanja reaktivnih vrsta (Ghasemi i sar., 2013).

2.2.1.7. Toksičnost kobalta

Kobalt se u prirodi pojavljuje u obliku neorganskih i organskih soli. Ovaj metal se smatra esencijalnim za čoveka i životinje jer ulazi u sastav vitamina B12. Pri većim koncentracijama, kobalt postaje toksičan i kancerogen. Jedan od vidova toksičnosti je indukcija oštećenja molekula DNK i onemogućavanje njegove popravke. S obzirom da je ovo redoks aktivan metal, proizvodnja slobodno radikalnih vrsta doprinosi njegovoj toksičnosti (Valko i sar., 2005). Pored toga, kobalt može da se veže za sulfhidrilne grupe proteina ili da zameni metal u aktivnom centru enzima, što dovodi do njegove inaktivacije. Novija saznanja govore o mogućem učešću kobalta u poremećaju homeostaze kalcijuma i kompeticiji za Ca^{2+} -vezujuće proteine. Takođe, kobalt stabilizuje transkripcioni aktivator HIFF (*engl.* hypoxia-inducible factor) koji reguliše ekspresiju gena u stanju hipoksije, što može biti korisno, ali može imati ulogu u kancerogenezi (Simonsen i sar., 2012).

2.2.2. Izloženost pčela teškim metalima

Zagađenost životne sredine je globalan problem koji dovodi do pojave brojnih oboljenja kod organizama, kao i do opadanja brojnosti velikog broja vrsta (Ahmad, 1995). Teški metali se svrstavaju među najznačajnije potencijalno štetne polutante i njihovo prisustvo može da utiče na razne fiziološke i metaboličke procese. S obzirom da se ne razlažu, teški metali su stalno prisutni u životnoj sredini i ulaze u biološke cikluse. Pčele su izložene toksičnim metalima kroz različite izvore: kontaminiran vazduh, vodu, zemljište i hranu (Slika 1).



Slika 1. Uticaj životne sredine na pčelinju zajednicu. Pčele izletnice su u direktnom kontaktu sa zagađujućim materijama iz vode i vazduha, a indirektno preko biljaka i zagađujućim materijama iz zemljišta. Zagađujuće materije se donose u košnicu gde u kontakt sa njima mogu da dođu ostale kaste i leglo.

Pčele izletnice su u najvećoj meri izložene nepovoljnim uticajima životne sredine, jer u potrazi za hranom mogu da prelete udaljenost preko 6 km u poluprečniku (Beekman i Ratnieks, 2000) i na taj način dolaze u kontakt sa zagađujućim materijama iz okoline. Svaka pčela izletnica napravi oko 12-15 izleta u toku dana (Perugini i sar., 2011). U toku potrage za hranom, na telu pčele se zadržavaju kontaminanti iz atmosfere, a sa polenom i nektarom se donose u košnicu gde putem ishrane dolaze i do drugih kasti u koloniji, ali i do legla. Zbog toga se pčele radilice, med i perga često koriste kao bioindikator zagađenja životne sredine različitim organskim i neorganskim jedinjenjima (Conti i Botrè, 2001; Celli i Maccagnani, 2003; Lambert i sar., 2012).

2.3. Ćelijski odgovor na stres

2.3.1. Osnovni principi ćelijskog odgovora na stres

Postoje različite definicije pojma stresa, a prema jednoj od njih on predstavlja uticaj okoline koji narušava ili slabi strukturu i funkcionisanje organizma i na taj način ugrožava njegovo preživljavanje. Kada se govori o stresu, neophodno je napraviti razliku između stresora tj. stresogenih faktora (spoljašnji faktori), stresa (unutrašnje stanje organizma izazvano spoljašnjim faktorom- stresorom) i odgovora na stres (kaskada unutrašnjih promena u organizmu koje su uzrokovane stresom) (van Straalen, 2003). Prema trajanju i intezitetu dejstva stresora, postoji podela na akutni-kratkotrajni i hronični-dugotrajni stres.

Odgovor na stres se može proučavati na različitim nivoima organizacije: molekularnom, ćelijskom, histološkom, fiziološkom, ekološkom ili socijalnom. Izučavanje mehanizama adaptacije na stresne i ekstremne uslove životne sredine pruža osnovu za rešavanje zdravstvenih problema, omogućava toksikološku procenu rizika i korišćenje bioindikacije za praćenje globalnih promena u životnoj sredini (Kultz, 2005).

Odgovor na stres u zavisnosti od vremenskog intervala u kom se ispoljava može biti proksimalni, koji uključuje fiziološke, biohemijske i genomske mehanizme (fiziološka adaptacija) i ultimativni pri kom preživljavaju jedinke sa genotipom koji može da se odupre datom stresu (genetička adaptacija) (Calow, 1989).

Imajući u vidu univerzalan ćelijski odgovor organizama na stres, Kultz (2005) je definisao 44 proteina koji čine minimalni proteom stresa i mogu se podeliti u šest funkcionalnih grupa: redoks regulacija (18 gena), detekcija i popravka oštećenja DNK (4 gena), molekularni šaperoni (5 gena), degradacija proteina (6 gena), metabolizam masnih kiselina i lipida (3 gena), energetski metabolizam (5 gena), druge funkcije (3 gena). Naravno, mnogo veći broj proteina učestvuje u ćelijskom odgovoru na stres, ali nisu konzervirani kod svih organizama.

Prema Korsloot i sar. (2004), u odgovoru na stres učestvuje pet ćelijskih sistema: (1) bazalni sistem za prenos signala, (2) stres proteini, (3) monooksigenaze, (4) odgovor na oksidativni stres- antioksidativni sistem, (5) metalotionein i sa njima povezani

drugi ćelijski procesi. Ovi sistemi su u odgovoru na stres međusobno povezani i njihovo zajedničko delovanje omogućava očuvanje homeostaze i integriteta ćelija i organizma.

2.3.1.1. Bazalni sistem za prenos signala

Bazalni sistem za prenos signala je uključen u prevođenje vanćelijskih signala u unutarćelijsko okruženje i prenos do mesta na kom se signal prevodi u odgovor. U slučaju signala koji su u vezi sa ćelijskim rastom, diferencijacijom i proliferacijom ovo najčešće dovodi do aktivacije transkripcije gena povezanih sa ovim procesima. Sistem za prenošenje signala se sastoji od receptora na plazma membrani, sekundarnih glasnika, kao što su ciklični adenzin monofosfat (cAMP) i Ca^{2+} joni i sistema protein kinaza (protein kinaza C (PKC) i mitogenom aktivirana protein kinaza (MAPK)). Poslednji korak u signalnom putu je najčešće fosforilacija transkripcionog faktora (Korsloot i sar., 2004). MAPK može biti aktivirana i stresom kada se naziva signalni put stresom aktivirane protein kinaze (*engl.* stress-activated protein kinase signalling pathway, SAPK). Događaji u ovom putu su manje poznati nego u slučaju klasičnog puta aktiviranog mitogenima. SAPK/JNK signalni put može biti aktiviran različitim tipovima stresa: UV i γ -zračenjem, hiperosmolarnošću, toksinima, toplotnim stresom. Ovaj put učestvuje u različitim signalnim kaskadama koje kontrolišu ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, transformaciju, apoptozu, migraciju i integritet citoskeleta (Nishina i sar., 2004).

2.3.1.2. Proteini stresa

Indukcija proteina toplotnog stresa (*engl.* heat shock proteins, Hsp) nakon izlaganja stresorima iz životne sredine predstavlja ubikvitaran i evolutivno najočuvaniji odgovor na stres u živim sistemima (Martindale i Holbrook, 2002). Otkriveni su kao proteini koji se indukuju pri povišenim temperaturama, pa su po tome dobili naziv, ali je kasnije pokazano da mogu biti indukovani i mnogim drugim tipovima stresa kao što je hladnoća, gladovanje, osmotski stres i toksini, te je naziv „proteini stresa” prikladniji za ovu grupu molekula (van Straalen i Roelofs, 2012). Hsp obuhvata grupu proteina koji su klasifikovani u pet glavnih familija prema molekulskoj masi (Hsp 100, 90, 70, 60 i mali Hsp) (Gupta i sar., 2010). Drugi način klasifikacije je podela na konstitutivne proteine, koji su uvek prisutni u ćeliji i ne indukuju se stresogenim

faktorima, i inducibilne, čija se ekspresija veoma snažno indukuje u prisustvu stresora. Ovi proteini funkcionišu kao molekularni šaperoni koji pomažu sastavljanje, savijanje i translokaciju raznih drugih proteina u ćeliji i njihova indukcija tokom izlaganja stresu je važna jer sprečavaju pogrešno savijanje i agregaciju proteina. Povećanje ekspresije Hsp, naročito Hsp70 i malih Hsp olakšava preživljavanje ćelija i sprečava apoptozu tokom različitih stresnih uslova (Feder i Hoffman, 1999). Uloga u savijanju proteina uključuje četiri aspekta: stabilizaciju esencijalnih strukturnih proteina, olakšavanje transporta proteina kroz membrane, ponovno savijanje proteina denaturisanih zbog stresa i olakšavanje degradacije neispravnih proteina (van Straalen i Roelofs, 2012).

2.3.1.3. Monooksigenaze

Biotransformacija obuhvata sve transformacije molekula i biomolekula dejstvom enzima u biološkim sistemima. Na ovaj način se metabolišu aromatične endogene supstance (steroidni hormoni, signalni molekuli, vitamini), ali i jedinjenja koja potiču iz životne sredine (biljni toksini, zagađujuće materije, lekovi). Proces biotransformacije je katalizovan citohrom P450 enzimima koji pripadaju sistemu monooksigenaza (*engl.* mixed function oxygenase, MFO). Citohrom P450 su membranski enzimi, najviše prisutni u mikrozomalnoj frakciji endoplazmatskog retikuluma, ali se mogu nalaziti i u mitohondrijama (Korsloot i sar., 2004). Geni koji kodiraju ove enzime, označeni prefiksom *Cyp* su prisutni u svim genomima, uključujući i prokariote. Opisano je oko 200 različitih familija ovih enzima, što ih svrstava u najraznovrsniju enzimsku superfamiliju (van Straalen i Roelofs, 2012). U insekatskom genomu postoji oko sto P450 gena koji kodiraju različite enzime, što im pomaže da se odbrane od polutanata, naročito specifičnih insekticida (Feyereisen, 1999).

2.3.1.4. Odgovor na oksidativni stres

Pojava cijanobakterija, prvih fotoautotrofnih organizama, dovela je do akumulacije slobodnog kiseonika u atmosferi. Akumulacija kiseonika u molekulskom obliku (O₂) omogućila je razvoj raznovrsnih aerobnih metaboličkih puteva u kojima je O₂ akceptor elektrona, pri čemu se stvara više energije u poređenju sa anaerobnim metabolizmom. Međutim, paradoksalno je da kiseonik, koji je neophodan za aerobni

život, istovremeno predstavlja i jednu od najtoksičnijih supstanci za živi svet (Davies, 2000). Molekularni kiseonik je slabo reaktivan, ali njegovom nepotpunom redukcijom nastaju veoma reaktivne kiseonične vrste (ROS, *engl.* reactive oxygen species): slobodni radikali i neradikalske reaktivne vrste kiseonika (Tabela 2).

Tabela 2. Radikalske i neradikalske kiseonične vrste.

Radikalske vrste kiseonika		Neradikalski derivati kiseonika	
Naziv	Simbol	Naziv	Simbol
Kiseonični biradikal	$O_2^{\bullet\bullet}$	Vodonik peroksid	H_2O_2
Superoksid anjon radikal	$O_2^{\bullet-}$	Organski peroksid	ROOH
Hidroksil radikal	OH^{\bullet}	Hipohlorna kiselina	HOCl
Peroksil radikal	ROO^{\bullet}	Ozon	O_3
Alkoksil radikal	RO^{\bullet}	Aldehidi	HCOR
Azot oksid radikal	NO^{\bullet}	Singletni kiseonik	1O_2
		Peroksinitrit	ONOOH

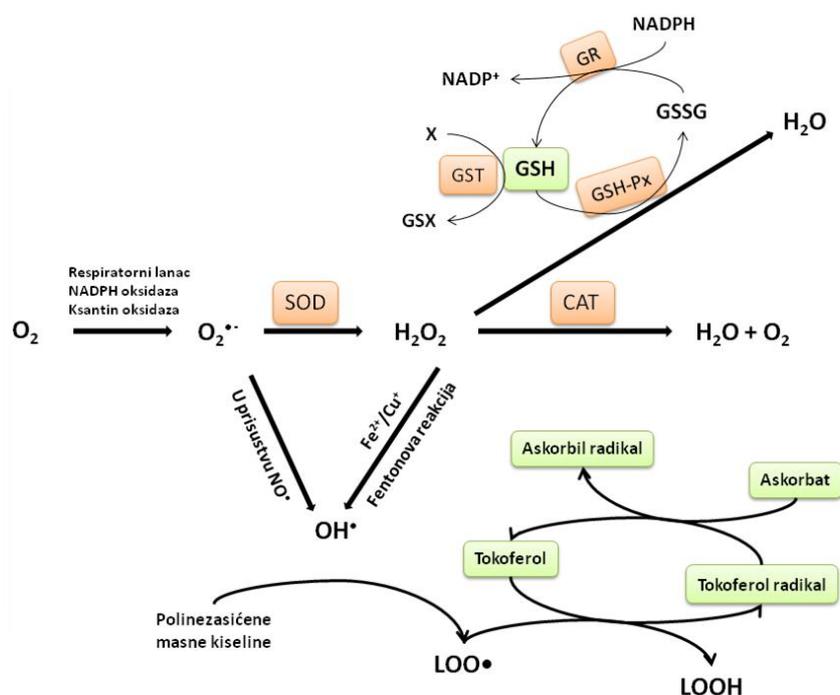
Preuzeto iz Kohen i Nyska, 2002.

Najviše zastupljene reaktivne vrste koje nastaju na ovaj način su superoksid radikal ($O_2^{\bullet-}$), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksil radikal (OH^{\bullet}). Hidroksil radikal može nastati i interakcijom $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 u prisustvu metalnih jona, posebno gvožđa i bakra (Scandalios, 2005). Slobodni joni, čak i slabo helirani, gvožđa i bakra učestvuju u Fentonovoj reakciji, stvarajući hidroksi radikal. Nastali hidroksi radikal je izuzetno reaktivan i reaguje odmah po nastanku sa makromolekulima u okruženju izazivajući oksidativna oštećenja. Pored reaktivnih kiseoničnih vrsta, postoje i reaktivne vrste azota (RNS) koje nastaju od azot(II)oksida (NO). NO je reaktivna vrsta i signalni molekul uključen u razne signalne puteve u organizmu u normalnim fiziološkim uslovima, ali i u patološkim procesima. Međutim, NO u interakciji sa ROS, najčešće superoksid radikalom, formira peroksinitritni anjon ($ONOO^-$) koji dalje može da reaguje sa biomolekulima i izazove oštećenja (Patel, 1999).

Oksidativni stres je neizbežna posledica života u atmosferi koja je bogata kiseonikom (Davies, 2000). Prema klasičnoj definiciji, oksidativni stres predstavlja poremećaje u ravnoteži između prooksidanata i antioksidanata i nastanak ćelijskih oksidativnih oštećenja (Sies i Cadenas, 1985). U svetlu kasnijih saznanja o signalnim putevima uključenim u regulaciju ovih procesa, oksidativni stres bi se preciznije mogao definisati kao poremećaj u redoks signalingu i kontroli koji dovodi do narušavanja homeostaze (Jones, 2006).

2.3.1.4.1. Mehanizmi antioksidativne zaštite

Kako bi se smanjili ili izbegli štetni efekti reaktivnih vrsta, organizmi su razvili mehanizme za njihovo uklanjanje koji predstavljaju antioksidativni sistem zaštite. Ovaj sistem se sastoji od enzimskih i neenzimskih komponenti koje su funkcionalno povezane u jednu celinu (Slika 2).



Slika 2. Reaktivne kiseonične vrste i antioksidativni sistem zaštite. Prerađeno prema Atukeren i Yigitoglu (2013). Objašnjenje u tekstu.

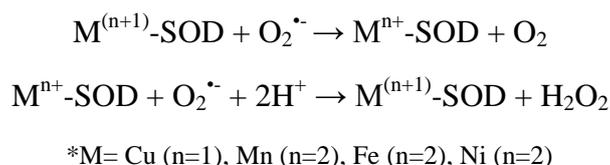
Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite insekata

Sistem antioksidativne zaštite obuhvata enzime koji uklanjaju reaktivne vrste kiseonika i azota nastale tokom ćelijskog metabolizma ili kao posledica prisustva stresogenih faktora. Najznačajniji enzimi koji imaju ovu funkciju su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation-S-transferaza (GST) i glutation reduktaza (GR).

Superoksid dismutaze (EC 1.15.1.1) su enzimi koji imaju centralnu ulogu u uklanjanju superoksid anjon radikala i sprečavanju lančanih reakcija oksidacije koje mogu dovesti do oštećenja biomolekula i nastajanja kaskade reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao što su vodonik peroksid, hipolorit, peroksinitrit i hidroksil radikal.

SOD katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) u vodonik peroksid (H_2O_2) i molekularni kiseonik (O_2). Postoje četiri tipa ovog enzima i svi sadrže redoks aktivni metal u svom aktivnom centru: $Ni^{2+/3+}$ u NiSOD, $Fe^{2+/3+}$ u FeSOD, $Mn^{2+/3+}$ u MnSOD i $Cu^{1+/2+}$ u CuZnSOD (Sheng i sar., 2014). Dismutacija $O_2^{\bullet-}$ se odvija redukcijom i reoksidacijom metalnog jona u aktivnom centru enzima.

Mehanizam reakcije:



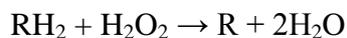
CuZnSOD je homodimer veličine oko 32 kDa, prisutan u citosolu velikog broja različitih tipova ćelija. Cink stabilizuje prostornu konformaciju proteina, dok se bakar nalazi u aktivnom centru enzima i prolazi kroz ciklus redukcije i reoksidacije pri čemu dolazi do dismutacije superoksid anjon radikala. Postoji i vanćelijska SOD koji sadrži Zn i Cu kao kofaktore, a po strukturi je homotetramer sastavljen od dva homodimera povezana disulfidnim vezama.

MnSOD je homotetramer veličine 96 kDa i nalazi se u matriksu mitohondrija. Mangan u aktivnom centru učestvuje u uklanjanju $O_2^{\bullet-}$ koji nastaje na respiratornom lancu. Aktivno mesto MnSOD se razlikuje od CuZnSOD, ali je slično kao kod FeSOD, koji se retko javlja kod eukariota.

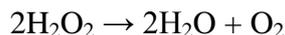
U reakciji dismutacije superoksid anjon radikala nastaje vodonik peroksid koji je takođe oksidativno aktivan i potrebno ga je brzo ukloniti. Dva enzima imaju ovu funkciju: katalaza i glutation peroksidaza.

Katalaza (EC 1.11.1.6) je homotetramerni enzim molekulske mase oko 240 kDa koji se najvećim delom nalazi u peroksizomima gde učestvuje u uklanjanju H_2O_2 koji nastaje pri β -oksidaciji masnih kiselina. Za svaki polipeptidni lanac je vezan hem koji ulazi u aktivni centar enzima. Katalaza je jedan od najefikasnijih katalizatora u prirodi, jer razlaže H_2O_2 velikom brzinom. U zavisnosti od koncentracije vodonik peroksida, ovaj enzim može imati dvojnu funkciju (Aebi, 1984): pri niskim

koncentracijama vodonik peroksida ($<1 \mu\text{M}$) ima peroksidaznu aktivnost, pri čemu se oksiduju različita organska ili neorganska jedinjenja koja mogu biti donori vodonika (etanol, askorbinska kiselina, formaldehid, nitrit i dr.):



dok pri visokim koncentracijama vodonik peroksida poseduje katalaznu aktivnost pri čemu je H_2O_2 i donor i akceptor vodonika:



Glutation peroksidaza (EC 1.11.1.9) koristi redukujući potencijal glutationa (GSH) za detoksikaciju hidroperoksida, pri čemu se dva molekula GSH oksiduju do GSSG. Glutation peroksidaze se dele na dva tipa: selen-zavisne i selen-nezavisne GSH-Px. Selen-zavisne GSH-Px mogu da redukuju vodonik-peroksid i organske hidroperokside, dok selen-nezavisne GSH-Px katalizuju samo redukciju organskih peroksida. Insekti ne poseduju selen-zavisne glutacion peroksidaze, već su glutacion-peroksidaze deo velike familije glutacion *S*-transferaza (Felton i Summers, 1995).

Glutation S-transferaze (EC 2.5.1.18) čine multigensku familiju enzima koji su uključeni u detoksikaciju, i u nekim slučajevima, aktivaciju velikog broja hemijskih jedinjenja. Ovi proteini su prisutni kod biljaka, životinja i bakterija. Smatra se da ovi enzimi imaju ključnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidativnog stresa i toksičnih supstanci. Dve genske superfamilije kodiraju GST proteine: superfamilija solubilnih enzima koja se sastoji od najmanje 16 gena i superfamilija mikrozomalnih enzima koju čini bar 6 gena (Hayes i Strange, 2000). Postoji osam genskih familija koje kodiraju solubilne GST: Alfa, Beta, Delta, Epsilon, Mu, Nu, Pi, Sigma, Teta, Tau, Zeta i Omega. Insekti nemaju gene za Alfa, Mu i Pi klase (Zimniak i Singh, 2006), dok su Delta i Epsilon identifikovane samo kod insekata (Enayati i sar., 2005). Mitohondrijalne GST pripadaju Kapa klasi (Oakley, 2011). Solubilne forme su dimerni proteini, čije subjedinice imaju masu oko 25 kDa i svaka od njih poseduje katalitičko mesto koje se sastoji od hidrofилnog dela (za koji se vezuje glutacion) i hidrofobnog regiona (za vezivanje različitih elektrofilnih supstrata) (Eaton i Bammler, 1999). Mikrozomalne GST su trimeri i prvenstveno su uključeni u metabolizam arahidonske kiseline (Hayes i Strange, 2000). Ovo su integralni membranski proteini,

koji se po novijoj nomenklaturi nazivaju membranski proteini uključeni u metabolizam eikosanoida i glutationa (MAPEG, *engl.* membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) (Oakley, 2011).

GST enzimi pokazuju nisku selektivnost prema supstancama sa reaktivnim elektrofilnim grupama, a visoku selektivnost prema GSH kao nukleofilu, što im omogućava esencijalnu biološku ulogu detoksikacije raznovrsnih toksičnih supstanci. Pored uloge u detoksikaciji ksenobiotika i endogenih elektrofila, GST imaju ulogu u transportu steroida, metabolita i lekova, i učestvuju u sintezi leukotrijena i prostaglandina (Đorđević i sar., 2000).

Glutation reduktaza (EC 1.6.4.2) katalizuje redukciju disulfidne veze oksidovanog glutationa (GSSG), i na taj način održava visoku koncentraciju GSH, što je značajno za zaštitu organizma od oksidativnih oštećenja. Glutation reduktaza koristi svoju prostetičnu grupu FAD i koenzim NADPH kako bi se redukovao jedan molarni ekvivalent GSSG do dva molarna ekvivalenta GSH (Birben i sar., 2012):



Održavanjem koncentracije redukovanog glutationa GR pomaže u normalnom funkcionisanju glutation *S*-transferaze i glutation peroksidaze.

Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

Neenzimski sistem antioksidativne zaštite obuhvata molekule malih molekulskih masa- antioksidante, koji zauzimaju važnu ulogu u zaštiti makromolekula od oštećenja koja mogu nastati tokom oksidativnog stresa, zaustavljanju propagacije lančanih slobodnoradikalskih reakcija, kao i u direktnom uklanjanju slobodnih radikala.

Prema svojoj rastvorljivosti antioksidanti se dele na:

- liposolubilne (npr. tokoferoli, karotenoidi) koji deluju u lipidnom dvosloju ćelijske membrane i membrana organela,
- hidrosolubilne (npr. glutation, mokraćna kiselina, askorbinska kiselina) koji deluju u vodenoj fazi, ostvarujući interakciju sa liposolubilnim antioksidantima na graničnoj površini membrana.

Neenzimski antioksidanti obuhvataju veliki broj strukturno različitih molekula, a prema poreklu mogu biti endogeni produkti ćelije, nutritivne egzogene materije i sintetski produkti.

Glutation (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicin, GSH) je tiolno jedinjenje koje je po strukturi tripeptid. Prisutan je u citosolu, mitohondrijama i ćelijskom jedru u velikim koncentracijama, i predstavlja glavni solubilni antioksidant u ovim ćelijskim odeljcima. GSH se sintetise u citosolu uzastopnom aktivnošću dva enzima, glutamat-cistein ligaze i glutacione sintetaze (Valko i sar., 2007).

U ćeliji glutacione postoji u dve forme- redukovanoj sa slobodnom slufhidrilnom grupom (GSH) i oksidovanoj, kao glutacione disulfid (GSSG). U redukovanoj formi deluje kao jak redukujući agens i lako predaje H^+ i e^- slobodnoradikalnim vrstama, pri čemu postaje veoma reaktivan i u reakciji sa drugim molekulom glutacione formira glutacione disulfid. Redukovani glutacione se regenerise aktivnošću glutacione reduktaze uz utrošak NADPH. Odnos GSSG/GSH je važan parametar koji govori o redoks statusu organizma.

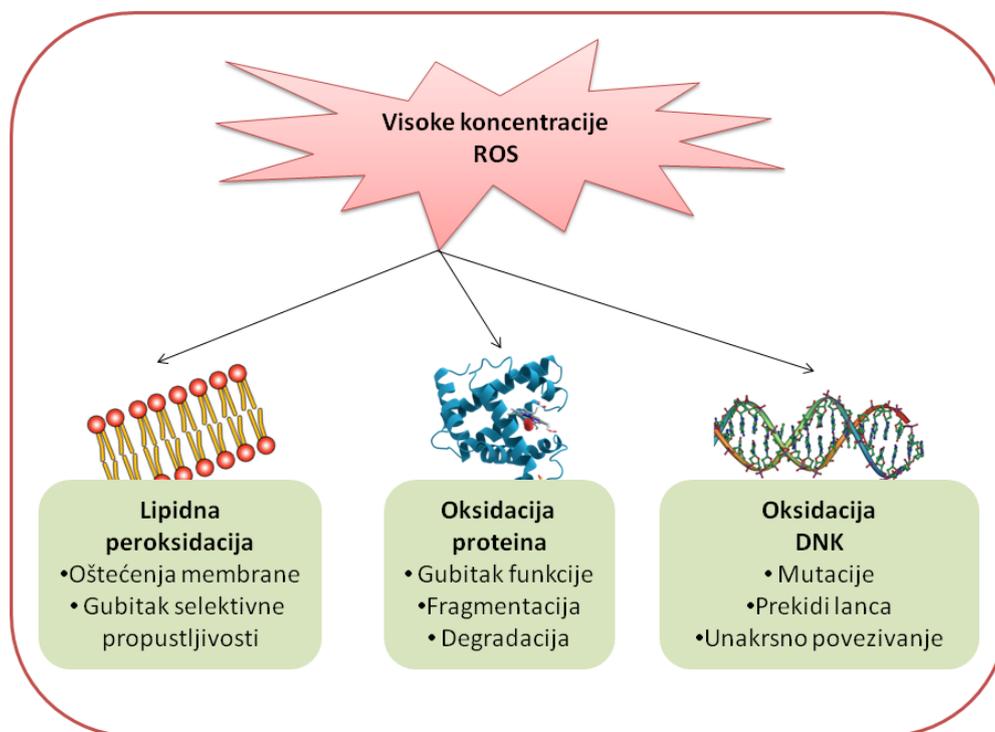
Takođe, glutacione je kofaktor nekoliko enzima uključenih u zaštitu od oksidativnog stresa. Redukcija peroksida je katalizovana glutacione peroksidazom, pri čemu se glutacione oksiduje do GSSG. Pored toga, prisustvo glutacione i aktivnost GST obezbeđuju konjugaciju različitih egzogenih i endogenih elektrofilnih jedinjenja u netoksične hidrofilne derivate (Slika 2).

GSH učestvuje u regulaciji aktivnosti nekih proteina redukcijom disulfidnih veza što može da uzrokuje aktivaciju proteina ili njihovu inaktivaciju i degradaciju. Značajan je i za regeneraciju drugih antioksidanata, vitamina C i E (Masella i sar., 2005).

2.3.1.4.2. Oksidativna oštećenja biomolekula

Nastajanje reaktivnih kiseoničnih vrsta je neizbežno u aerobnom metabolizmu, pa su zbog toga organizmi razvili efikasan sistem antioksidativne zaštite. U slučaju da produkcija reaktivnih vrsta prevazilazi kapacitete za njihovo uklanjanje, ili da je antioksidativni sistem zaštite kompromitovan, može doći do pojave oksidativnog stresa. Smanjen kapacitet za uklanjanje ili povećana sinteza reaktivnih vrsta dovodi do

njihovog nakupljanja. S obzirom na visoku reaktivnost, ROS će reagovati sa biomolekulima u svojoj okolini i dovešće do oštećenja ćelijskih struktura (Slika 3).

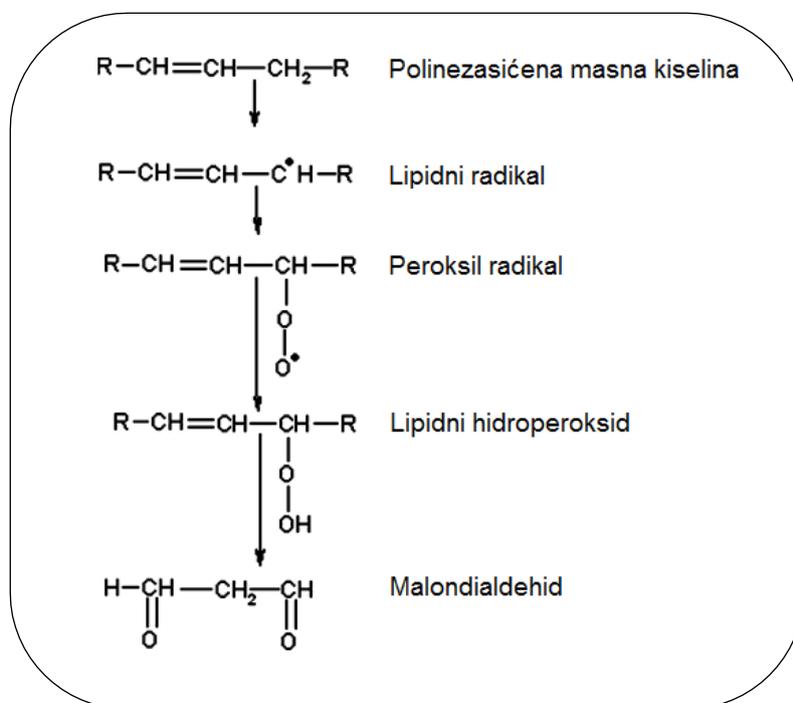


Slika 3. Oksidativna oštećenja biomolekula.

Ćelijske membrane su osetljive na oksidaciju zbog prisustva velikog broja nezasićenih masnih kiselina. Oštećenje lipida reaktivnim vrstama se naziva lipidna peroksidacija i odvija se u tri koraka: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijacija podrazumeva napad ROS na atom vodonika u metilen grupi lipida, pri čemu se vodonik uklanja i nastaje lipidni radikal (L^{\bullet}) sa jednim nesparenim elektronom. U slučaju da u okruženju postoji dovoljna količina kiseonika, radikal masne kiseline će u reakciji sa njim formirati peroksil radikal (LOO^{\bullet}). LOO^{\bullet} reaguje sa drugim molekulom lipida pri čemu nastaje lipidni hidroperoksid $LOOH$ i novi lipidni radikal, čime dolazi do lančane reakcije i propagacije nastanka peroksil radikala. Lipidni hidroperoksid dalje može da se razgradi do aldehida ili da formira ciklične hidroperokside, izoprotane i ugljovodonike.

Terminacija lančane reakcije može da se dogodi ako LOO^{\bullet} reaguje sa drugim radikalom ili antioksidantom. Na ovaj način dolazi do narušavanja strukture ćelijske membrane, menjanja njene fluidnosti i gubitka selektivne propustljivosti. Jedan od

glavnih produkata lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina je malondialdehid (MDA) (Slika 4) koji se često koristi kao biomarker oksidativnog stresa (Del Rio i sar., 2005). Malondialdehid je toksičan i može da reaguje sa DNK i proteinima, pa se smatra da ima mutageni i kancerogeni potencijal (Marnett, 1999).



Slika 4. Nastajanje malondialdehida u procesu lipidne peroksidacije. Prerađeno prema Grotto i sar. (2009).

Proteini mogu pretrpeti direktna i indirektna oštećenja nakon interakcije sa ROS, kao što su peroksidacija, oštećenje pojedinih aminokiselinskih ostataka, promene u terciarnoj strukturi, degradacija, fragmentacija, što dovodi do gubitka funkcionalnosti proteina. Proizvodi oksidacije proteina su aldehidi, ketoni i druga karbonilna jedinjenja (Kohen i Nyska, 2002). Karbonilne grupe (CO) nastaju na bočnim lancima proteina (najčešće na ostacima prolina, arginina, lizina i treonina) pri njihovoj oksidaciji. Formiranje karbonilnih grupa u proteinima može biti indukovano gotovo svim tipovima ROS, a one predstavljaju dobar marker oksidativnog stresa i disfunkcije proteina (Dalle-Donne i sar., 2003). Oštećenja mogu biti uzrokovana i indirektno, vezivanjem malondialdehida i drugih produkata lipidne peroksidacije za proteine i formiranjem aldehydnih jedinjenja (Traverso i sar., 2004). Većina

oksidativno oštećenih proteina se uklanja proteaznim sistemom, a amino-kiseline koje su očuvane se koriste za sintezu novih proteina (Davies, 2000).

Reaktivne vrste mogu reagovati sa DNK molekulom i uzrokovati različita oštećenja: modifikaciju azotnih baza, jednolančane i dvolančane prekide lanaca, gubitak purinskih baza (pojava apurinskih mesta), oštećenja dezoksiriboze, unakrsno povezivanje DNK i proteina i poremećaje u sistemu za popravku DNK. Superoksid anjon radikal i vodonik peroksid ne oštećuju DNK direktno, ali od njih može nastati veoma reaktivni hidroksil radikal koji izaziva oštećenja DNK molekula. Hidroksil radikal reaguje sa guaninom i nastaje 8-hidroksi dezoksiguanozin i adeninom kada nastaje 8-hidroksi dezoksiadenozin (Kohen i Nyska, 2002). U stanju oksidativnog stresa, malondialdehid može da reaguje sa DNK pri čemu vezuje sa dezoksiguanozinom i dezoksiadenozinom i ovakve modifikacije imaju mutageni i kancerogeni potencijal (Marnett, 1999).

2.3.1.5. Metalotionein

Metalotioneini (MT) čine veoma heterogenu familiju hidrofilnih proteina male molekulske mase koji su prisutni kod životinja i nekih vrsta gljiva, biljaka i cijanobakterija (Coyle i sar., 2002; Carpeni i sar., 2007). Prvi metalotionein je opisan 1957. godine kao protein koji vezuje kadmijum u tkivu konja (Margoshes i Vallee, 1957) i naziv je dobio zbog velikog sadržaja sumpora, odnosno sulfhidrilnih grupa i metala, kadmijuma i cinka.

Prisustvo metalotioneina kod velikog broja vrsta, ali i njihova raznolikost uzrok su što još uvek nije ustanovljen dovoljno dobar princip klasifikacije ovih proteina. Prvi pokušaj da se podele u klase je bio prema sličnosti sa prvim otkrivenim metalotioneiniom iz kore bubrega konja. U klasu I su svrstani proteini čija je sekvenca veoma slična sekvenci ovog metalotioneina, i obuhvatala je metalotioneine kičmenjaka, mekušaca, i ljuskara, dok su klasi II pripadali svi ostali metalotioneini. Klasu III su činili fitohelatini, biljni polipeptidi koji nastaju polimerizacijom glutaciona. Druga podela se zasnivala na sličnosti u aminokiselinskoj sekvenci dobijenoj iz filogenetskih odnosa, pri čemu je praktično predložena posebna familija za svaku taksonomsku grupu organizama. Mana ove podele je što ne ukazuje na moguću povezanost evolucije i funkcije ovih proteina (Capdevila i Atrian, 2011).

Palacios i sar. (2011) su predložili klasifikaciju na osnovu preferencije tioneina za vezivanje dvovalentnih Zn^{2+} i Cd^{2+} ili jednovalentnih Cu^+ metalnih jona, pri čemu bi se ovi proteini delili na cink tioneine i bakar tioneine.

Bez obzira na brojne razlike, svi proteini koji pripadaju ovoj porodici su male molekulske mase (2-16 kDa), sadrže veliki procenat cisteina (oko 30% ukupnog aminokiselinskog sadržaja) i ne sadrže aromatične amino-kiseline. Sadržaj metala (najčešće Zn, Cu, Cd i Hg) varira i može da iznosi i do 11% mase, a metalni joni su za protein vezani preko nekoliko tiolnih grupa (Nordberg i Nordberg, 2009).

Kod metalotioneina različitih vrsta je očuvan visok stepen sličnosti na nivou proteina što ukazuje na njegovu važnu biološku funkciju. Apoprotein (naziva se još i tionein) nema terciarnu strukturu, a vezivanjem metala formiraju se dva klastera, C-terminalni α -domen i N-terminalni β -domen, koji vezuju tri (β -domen), odnosno četiri (α -domen) dvovalentna jona i koji su povezani kratkom sekvencom (Carpene i sar., 2007).

Velik broj cisteinskih ostataka (kod sisara se nalazi 11 cisteina u α -domenu i 9 u β -domenu) je odgovoran za kapacitet MT za koordinativno kovalentno vezivanje dvovalentnih metalnih katjona u metal tiolatne klastera. Metalotioneini mogu da vežu različite metale, ali u normalnim uslovima i u odsustvu visokih koncentracija drugih metalnih jona primarno vezuju cink i bakar (Koropatnick, 2010). Ovi metalni joni su kofaktori mnogih enzima i transkripcionih faktora, ali u povećanim koncentracijama mogu imati toksične efekte na ćeliju. Apo-MT je akceptor cinka zbog prisustva velike količine slobodnih tiolnih grupa i njihovog visokog afiniteta za cink. Međutim, tiolne grupe su veoma reaktivne i cink, iako vezan velikim afinitetom, može biti zamenjen i prebačen na drugi protein. Ovo ukazuje na moguću regulatornu ulogu MT u aktivaciji ili inaktivaciji različitih molekularnih efektor tokom razvoja organizma ili sinteze proteina (Klaasen i sar., 1999).

Do danas su opisani metalotioneini kod pojedinih vrsta prokariota, jednoćelijskih eukariota, biljaka, i raznih razreda životinja od plakozoa do kičmenjaka.

Kod sisara je opisano četiri izoforme MT (MT-1 do MT-4). MT-1 i MT-2 su prisutni u svim ćelijama i organima sisara, a najviše su ekspresovani u jetri. MT-3 se primarno ekspresuje u mozgu i glutaminergičkim neuronima, a MT-4 gotovo isključivo u

skvamoznim ćelijama epitela i jezika. MT-3 i MT-4 su konstitutivno ekspresovani u ovim tkivima i nisu inducibilni u prisustvu egzogenih agenasa, dok je ekspresija MT-1 i MT-2 veoma inducibilna (Koropatnick, 2010). Broj i pozicija cisteina u sisarskim MT je veoma očuvana i prisutni su Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys i Cys-Cys motivi, pri čemu X i Y predstavljaju amino-kiseline koje nisu cistein (Coyle i sar., 2002).

Metalotioneini su dobro proučeni kod mekušaca. Kod školjki su prisutne dve izoforme: MT10 i MT20. MT10 je polipeptid dug 73 amino-kiseline sa 21 cisteinom i sintetiše se kao odgovor na prisustvo cinka i niskih koncentracija kadmijuma, a MT20 se sastoji od 72 amino-kiseline i 23 cisteina i indukovana je visokim koncentracijama kadmijuma (Vergani, 2009). Metalotioneini puževa su specifični zbog svoje velike sličnosti u sekvenci, a u isto vreme visokoj specijalizaciji za vezivanje različitih metala. Puževi potklase Pulmonata sintetišu dve izoforme MT koje su uključene u različite procese: CuMT učestvuje u homeostazi bakra, a CdMT u detoksikaciji kadmijuma (Palacios i sar., 2011). Genomske analize su otkrile i treću izoformu koja vezuje istovremeno Cd(II) i Cu(I) (Hispard i sar., 2008).

Metalotioneini Nematoda su proučeni na model organizmu *Caenorhabditis elegans* kod kog su prisutne dve izoforme CeMT1 i CeMT2, duge 75 i 63 amino-kiseline, sa konzervisanim rasporedom cisteina (19 u CeMT1 i 18 u CeMT2). Obe izoforme preferencijalno vezuju dvovalentne metalne jone, s tim što CeMT2 ima veći afinitet prema kadmijumu, a CuMT1 prema cinku (Sturzenbaum, 2009).

Kod vinske mušice *Drosophila melanogaster* su pronađene četiri izoforme metalotioneina (MtnA do MtnD) koje su veoma dobro okarakterisane, kao i jedna novije otkrivena izoforma, MtnE (Atanesyan i sar., 2011). Sve izoforme su optimizovane za vezivanje i metabolizam bakra i sličnije su metalotioneinima kvasca nego sisara. Glavne izoforme, MtnA i MtnB su polipeptidi od 40 i 43 amino-kiseline koji sadrže 10 i 12 cisteina i najviše se sintetišu u crevima, ali i u pljuvačnim žlezdama, Malpgijevim tubulama i hemocitima. Sinteza MT kod *D. melanogaster* je indukovana metalima, pre svega bakrom i kadmijumom, a veoma slabo cinkom (Atrian, 2009).

Osim kod vinske mušice, metalotionein je opisan i kod drugih vrsta insekata: *Orchesella cincta* (Collembola), *Musca domestica* (Diptera), *Oxya chinensis* (Orthoptera).

Kod vrste *O. cincta* su izolovana dva peptida, veličine 2989 Da i 4139 Da, koji su indukovani izlaganjem insekata kadmijumu. Međutim, izolovana je samo jedna cDNK, koja kodira protein dug 77 amino-kiselina, pri čemu je manji MT identičan C-terminusu ovog proteina, a veći je isti kao N-terminus, što ukazuje na post-translaciono nastajanje ove dve izoforme metalotioneina (Hensbergen i sar., 1999, 2001).

Kod muve (*Musca domestica*) su identifikovana dva gena za metalotionein, *MdMT1* i *MdMT2*, koji kodiraju proteine dužine 40 i 42 amino-kiseline. Ekspresija ovih proteina je izmerena u različitim tkivima i povećava se pri izlaganju visokim temperaturama i u prisustvu kadmijuma (Tang i sar., 2011).

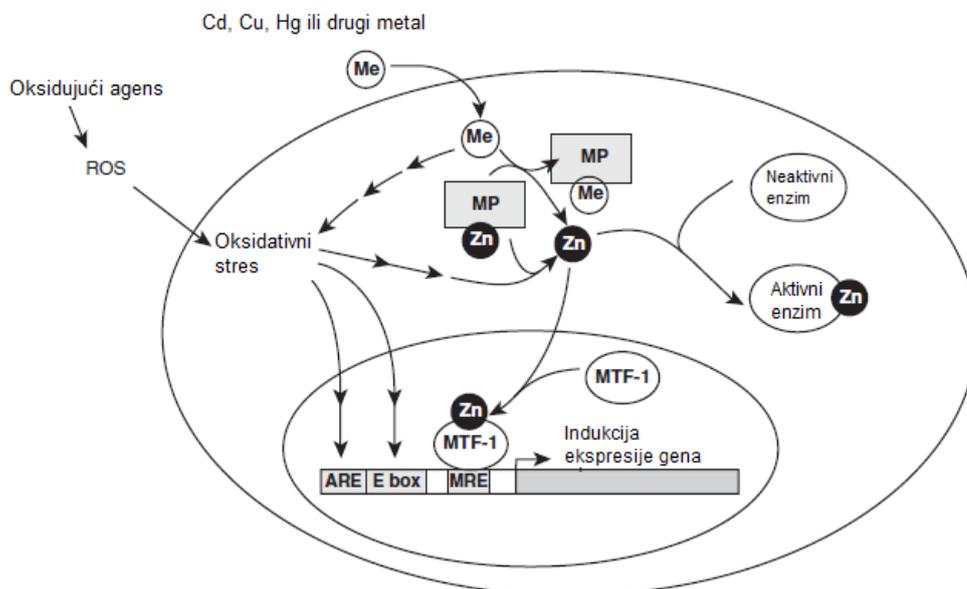
Kod vrste skakavca *Oxya chinensis* pronađena su dva gena za metalotionein koji kodiraju proteine od 40 i 64 amino-kiseline, i sadrže Cys-Cys, Cys-X-Cys i Cys-X-Y-Z-Cys motive. Ovi proteini se primarno ekspimiraju u mozgu i optičkom lobusu i u razvojnom stadijumu jajeta (Liu i sar., 2014). Oba gena su inducibilna u prisustvu cinka, bakra i kadmijuma (Liu i sar., 2015).

2.3.1.5.1. Regulacija ekspresije metalotioneina

Biosinteza MT je regulisana na nivou transkripcije vezivanjem transkripcionih faktora za regulatorne DNK elemente u promotorskom regionu gena za MT. Veći broj signala reguliše kako bazalnu, tako i indukovanu ekspresiju MT. Fiziološki i stresogeni faktori koji direktno ili indirektno indukuju ekspresiju MT pružaju uvid u moguće fiziološke uloge metalotioneina. Geni za MT su indukovani egzogenim neorganskim agensima, kao što su joni prelaznih metala i druge redoks aktivne vrste, kao i različitim signalnim molekulima (steroidni hormoni, bakterijski lipopolisaharidi i sl.). Mnogi teški metali (npr. cink, kadmijum, živa, bakar) indukuju ekspresiju MT u sisarskim ćelijama, pri čemu su cink i kadmijum najpotentniji (Koropatnick, 2010).

Geni za metalotionein sadrže TATA box i inicijatorski region (InR) koji regrutuje transkripcioni faktor IID (TFIID) kao inicijalni korak u transkripciji. Promotori

metalotioneina sadrže i GC blok (konsenzus sekvenca GGGGCGGGG) za koje se vezuje familija transkripcionih faktora Sp/XKLF sa domenom cinkanih prstiju (*engl.* zinc-finger), uključujući Sp1, koji doprinose bazalnoj transkripciji (Haq i sar., 2003).



Slika 5. Model indukcije metalotioneina kod sisara. Teški metali kao što su kadmijum, bakar i živa mogu da zamene cink u metaloproteinima (MP) što uzrokuje povećanje koncentracije slobodnog cinka (Zn) u ćeliji. Slobodan cink dalje aktivira transkripcioni faktor MTF-1, koji se vezuje za metal-responsivni element (MRE) u promotoru gena za metalotionein. Dodatna aktivacija potiče od signala za oksidativni stres. Prerađeno prema Haq i sar. (2003).

Prisustvo metal responsivnih elemenata (MRE, *engl.* metal response element), sa konsenzus sekvencom CTNTGC(G/A)CNCGGCCC je neophodno za bazalnu ekspresiju MT i u odusustvu metalnih jona. MRE su esencijalni za inducibilnost MT gena, kao i za njegovu bazalnu transkripciju i prisutni su u promotorskom regionu svih gena za MT kod sisara bez obzira na njihovu inducibilnost metalima (Koropatnick, 2010). Ekspresija gena za metalotionein u prisustvu metala se indukuje preko transkripcionog faktora MTF (*engl.* metal-responsive element-binding transcription factor) koji se vezuje za MRE. MTF se u citoplazmi aktivira u prisustvu metala i zatim transportuje u nukleus (van Straalen i Roelofs, 2012) (Slika 5). Pored toga, MTF interaguje sa drugim transkripcionim faktorima i uključen je u regulaciju ekspresije raznih gena (Koropatnick, 2010).

Glukokortikoidni hormoni indukuju ekspresiju metalotioneina preko glukokortikoid responsivnih elemenata (GRE, *engl.* glucocorticoid response element).

Glukokortikoidni receptori se nalaze u citoplazmi vezani za proteine toplotnog stresa (Hsp) koji ih drže u neaktivnoj konformaciji. Glukokortikoidni hormoni koji ulaze u ćeliju indukuju disocijaciju glutationskog receptora od Hsp, koji zatim formiraju homodimere i prelaze u jedro gde se vezuju za GRE u regulatornom regionu gena za MT. Kod insekata, uticaj hormona na ekspresiju metalotioneina nije poznat. MT geni sadrže i ARE responsivne elemente (*engl.* antioxidative response element) koji se nalaze u regulatornim sekvencama gena koji se indukuju u prisustvu ROS, interakcijom ARE sa Nrf2 (*engl.* NF-E2-related factor 2) (Haq i sar., 2003).

Inflamacija i bakterijska infekcija mogu da povećaju ekspresiju gena za MT preko JAK/STAT signalne kaskade. Interleukini (IL) i faktor tumorske nekroze (TNF α) aktiviraju JAK kinazu, koja potom fosforiliše STAT kinaze (*engl.* signal transducer and activator of transcription) koje formiraju homodimere, transportuju se u jedro i indukuju transkripciju vezivanjem za STAT responsivne elemente u promotoru gena (Haq i sar., 2003; Koropatnick, 2010).

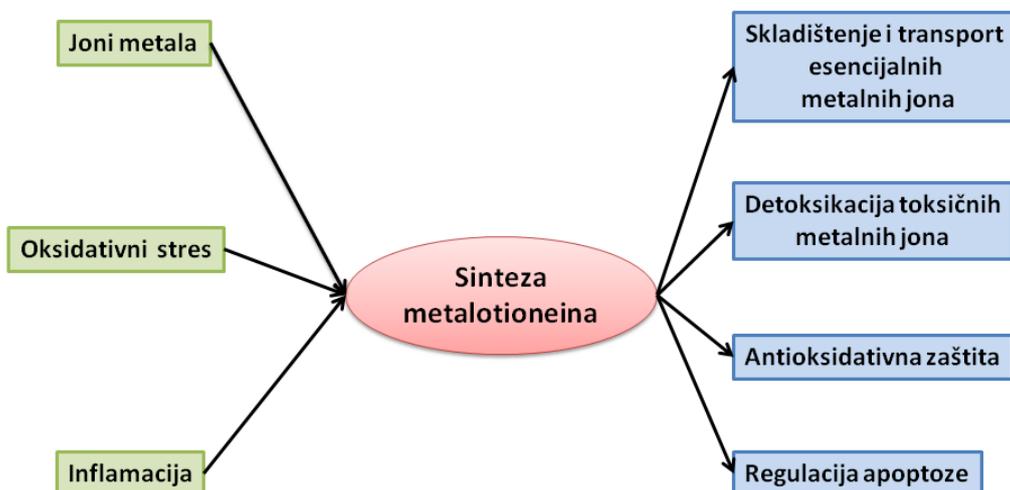
Promene u organizaciji hromatina takođe menjaju transkripciju MT, što je naročito važno za ekspresiju MT u toku razvoja (Haq i sar., 2003; Koropatnick, 2010).

2.3.1.5.2. Funkcija metalotioneina

Metalotioneini su multifunkcionalni proteini koji učestvuju u odgovoru na ćelijski i tkivni stres, u detoksikaciji teških metala, zaštiti od oksidativnog oštećenja tkiva, regulaciji homeostaze esencijalnih metalnih jona, kao i u rastu, diferencijaciji i funkciji raznih specijalizovanih ćelija i organa (Koropatnick, 2010) (Slika 6). Jedinstven raspored sulfhidrilnih grupa u kratkom peptidnom skeletu omogućava veoma efikasno vezivanje metala i nukleofilne i redoks reakcije sa toksičnim agensima koje nisu moguće sa monotiolnim jedinjenjima kao što je glutation. Sinteza metalotioneina se povećava nakon izlaganja visokim i niskim temperaturama, bakterijskim infekcijama i drugim stresogenim faktorima, kao što su manjak kiseonika i izlaganje različitim hemikalijama, što govori o njegovoj ulozi u odgovoru organizma na različite stresne uslove sredine (Petering i sar., 2009).

MT predstavlja rezervu cinka koji je neophodan za regulaciju genske ekspresije i aktivnost proteina u kojim ima ulogu kofaktora. Vezivanje cinka za MT je termodinamički stabilno, što ga čini idealnim rezervoarom ovog metala u ćeliji. Uloga

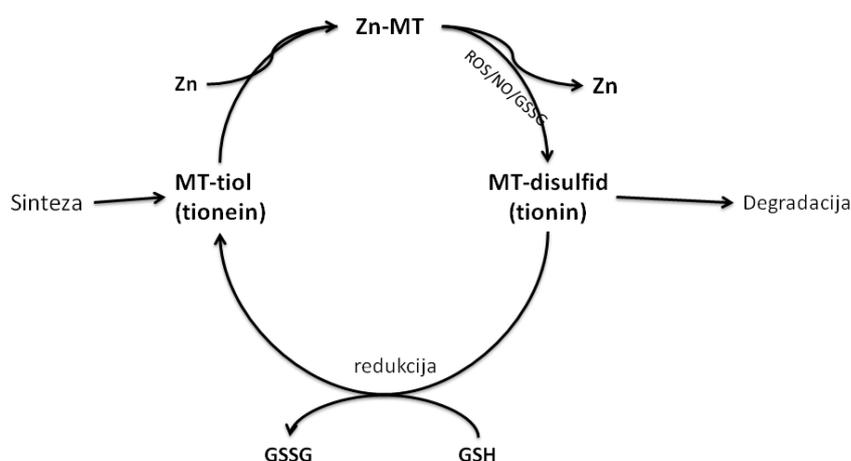
MT u regulaciji metabolizma i transporta cinka je višestruka. Prvo, MT olakšava kretanje cinka u ćeliji i doprema ga do ciljnih molekula kojima je neophodan. Drugo, MT transportuje cink u mitohondrije i jedro, gde učestvuje u respiraciji, regulaciji gena i kontroli ćelijske proliferacije i diferencijacije. Takođe, MT učestvuje u regulaciji homeostaze bakra, ali i u njegovoj detoksikaciji. Veći afinitet MT za bakar i kadmijum nego za cink čini vezivanje ovih metala termodinamički povoljnijim, pa ukoliko su prisutni u većim koncentracijama mogu da se vežu za metalotionein umesto cinka (Kang, 2006). Brojne studije ukazuju da MT ima važnu ulogu u raspoređivanju i detoksikaciji kadmijuma i žive. MT vezuje ove toksične metale u citosolu i na taj način štiti organele od oštećenja (Klaasen i sar., 1999).



Slika 6. Uloge metalotioneina.

Metalotionein, zbog visokog sadržaja tiolnih grupa, može da štiti ćeliju od reaktivnih kiseoničnih vrsta na sličan način kao glutation. Metalotionein koji sadrži cink i/ili kadmijum može da ukloni hidroksil i superoksid radikale koji su nastali u ksantin/ksantin oksidaza sistemu (Thornalley i Vasak, 1985). Dalja istraživanja su pokazala da je u *in vitro* testovima MT efikasniji od GSH u sprečavanju degradacije DNK u prisustvu hidroksil radikala (Abel i de Rooter, 1989). MT učestvuje u antioksidativnoj odbrani i kao donor cinka koji je neophodan za neke komponente antioksidativnog sistema i na taj način štiti membranu od lipidne peroksidacije.

Slobodne tiolne grupe MT su uključene u uklanjanje ROS u MT redoks ciklusu (Slika 7): u fiziološkim uslovima, u slučaju da okruženje postane oksidujuće, cink koji je vezan za MT se oslobađa oksidacijom tiolnih klastera, pri čemu dolazi do predaje elektrona nekoj ROS. Ukoliko dođe do formiranja MT-disulfida oni podležu degradaciji, ali ako atmosfera postane redukujuća, na primer, povećanjem GSH/GSSG odnosa, MT-disulfid se redukuje do apo-MT sa slobodnim tiolnim grupama. U prisustvu cinka, Zn-MT se brzo regeneriše (Gonzales-Iglesias i sar., 2014).



Slika 7. Redoks ciklus cink-metalotioneina. Prerađeno prema Gonzales-Iglesias i sar. (2014).

MT učestvuje u regulaciji apoptoze na dva načina: kontrolisanjem koncentracije cinka i interakcijom sa proteinima uključenim u apoptozu. Cink sprečava fragmentaciju DNK i inhibira mnoge proteine povezane sa procesom apoptoze, kao što su kaspaze i kalcijum-magnezijum zavisne proteaze. Takođe, metalotionein može da ima antiapoptotsko dejstvo putem transaktivacije transkripcionog faktora NF- κ B (Ruttkay-Nedecky i sar., 2014).

2.3.2. Čelijski mehanizmi odgovora medonosne pčele na hemijski stres

Sekvenca genoma medonosne pčele je objavljena 2006. godine (The Honeybee Genome Sequencing Consortium), i uočene su značajne razlike u poređenju sa prethodno sekvenciranim genomima vinske mušice, *Drosophila melanogaster* i malaričnog komarca, *Anopheles gambiae*.

Jedna od uočenih razlika je i manji broj gena za stečeni imunitet i enzime uključene u detoksikaciju, dok postoji veći broj gena za receptore za miris, kao i za sakupljanje i preradu polena i nektara, što je u skladu sa njihovom ekologijom i socijalnom organizacijom. Manji broj gena za imunitet i detoksikaciju za posledicu može da ima veću osetljivost pčela na bolesti i ksenobiotike. Ova činjenica dobija na značaju time što su pčele u velikoj meri izložene zagađujućim materijama u životnoj sredini, pre svega pesticidima, s obzirom na njihov direktan kontakt sa biljkama pri sakupljanju polena i nektara.

U poređenju sa rodovima *Anopheles* i *Drosophila*, medonosne pčele imaju 30-50% manje gena za karboksilesteraze, citohrom P450 i GST enzime koji su odgovorni za metabolizam pesticida (Tabela 3). Najveća razlika je u GST genima, familiji proteina koji su najbliže povezani sa detoksikacijom. Dve klase GST (Delta i Epsilon) koje se sastoje od enzima koji su povezani sa otpornošću na insekticide i koje broje preko 20 članova kod *D. melanogaster* i *A. gambiae*, kod medonosne pčele su prisutne samo u jednoj izoformi iz Delta klase (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006).

U genomu *A. mellifera* je identifikovano samo 10 funkcionalnih gena za GST i zastupljenost klasa je razlikuje u poređenju sa drugim vrstama insekata (Tabela 3). Klasa Delta je manje razvijene, a Epsilon nije prisutna kod medonosne pčele, dok je Sigma klasa veća kod medonosne pčele nego kod drugih insekata. Delta i Epsilon klase su prisutne samo kod insekata i veliki broj gena koji su nastali duplikacijom govori o značaju ove dve klase za adaptaciju na pritiske životne sredine. Stoga, potpuno odsustvo Epsilon klase i prisustvo samo jednog gena Delta klase mogu biti jedan od razloga za veliku osetljivost medonosne pčele na pojedine insekticide (Claudianos i sar., 2006). *GstD1* je jedini prisutan predstavnik Delta klase GST kod medonosne pčele i detektovan je u mozgu, reproduktivnom tkivu, toraksu i abdomenu (Collins i sar., 2004; Corona i sar., 2005). Kod azijske medonosne pčele, *Apis cerana cerana*, visoke temperature indukuju ekspresiju *GstD* i utvrđeno je da ovaj enzim štiti DNK od oksidativnih oštećenja. Ekspresija ovog gena je bila najveća u mozgu adulta (Yan i sar., 2013a).

Za razliku od Epsilon i Delta klase, medonosna pčela poseduje veći broj gena za GST enzime Sigma klase (4 u poređenju sa 1 kod Diptera). Pripadnici ove klase imaju veliki afinitet za produkte lipidne peroksidacije i na taj način štite ćeliju od posledica oksidativnog stresa. EST (*engl.* expressed sequence tag) sekvence gena iz ove klase su detektovane u mozgu medonosne pčele, što govori o njihovoj važnoj ulozi u ovom organu (Claudianos i sar., 2006). Do indukcije gena *AccGSTS1* kod *Apis cerana* dolazi pri tretmanima visokom i niskom temperaturom, vodonik peroksidom, živa hloridom i pesticidima, što ukazuje na širok spektar dejstva ove klase enzima protiv oksidativnog stresa (Yan i sar., 2013b).

Tabela 3. Broj i distribucija različitih klasa enzima glutation *S*-transferaze (GST), citohrom P450 i karboksil/holinesteraze (CCE) u genomima *D. melanogaster*, *A. gambiae* i *A. mellifera*. Priređeno prema Claudianos i sar. (2006).

Enzim	Klasa	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>A. mellifera</i>
GST	Delta	11	12	1
	Epsilon	14	8	0
	Omega	5	1	1
	Sigma	1	1	4
	Teta	4	2	1
	Zeta	2	1	1
	Mikrozomalna	1	3	2
Zbirno		38	28	10
P450	CYP4	32	45	4
	CYP3	36	42	28
	CYP2	6	10	8
	Mitohondrijalni CYP	11	9	6
Zbirno		85	106	46
CCE	Metabolizam ksenobiotika	13	16	8
	Obrada feromona/hormona	8	12	5
	Neuro/razvoj	14	21	11
Zbirno		35	49	24
Ukupno		157	188	80

Ostale klase, Omega, Teta i Zeta, su prisutne svuda što ukazuje da imaju ključnu ulogu u metaboličkim procesima, za razliku od detoksikacione uloge ostalih klasa i u genomu medonosne pčele prisutne su sa po jednim genom. Pored opisanih klasa, u genomu medonosne pčele su pronađena i dva gena za mikrozomalnu GST koji imaju sličnu ulogu u detoksikaciji i antioksidativnoj zaštiti kao citosolni enzimi, ali se strukturno razlikuju i predstavljaju membranski vezane proteine (Claudianos i sar., 2006).

Takođe, u genomu medonosne pčele se nalazi duplo manje gena za P450 enzime i manje od 20% gena iz grupe CYP4, koji su povezani sa otpornošću na pesticide iz grupe piretroida (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Pretragom genoma identifikovano je 46 pretpostavljenih gena za P450 enzime, što je znatno manje nego kod *Drosophila* (85 gena) i *A. gambiae* (106 gena) i pojedine klase su različito zastupljene (Tabela 3). Razlikuju se četiri klase ovih enzima: CYP2, CYP3, CYP4 i mitohondrijalni CYP. Klasa CYP3 kod insekata obuhvata dve velike familije, CYP6 i CYP9, koje su manje brojne kod medonosne pčele u odnosu na Diptere, dok je veliko smanjenje u broju gena prisutno u klasi CYP4 (32 kod vinske mušice, 45 kod komarca i 4 kod medonosne pčele). CYP2 klasa ima sličan broj gena kod sve tri vrste. Mitohondrijalni P450 enzimi su značajno redukovani u genomu medonosne pčele i ne postoje članovi CYP12 familije enzima. Članovi CYP4, -6, -9 i -12 su uključeni u detoksikaciju, pri čemu su CYP4 i CYP6 najčešće uključeni u metabolizam i otpornost na insekticide (Feyereisen, 2005), dok su CYP2 i mitohondrijalni CYP enzimi uključeni u biosintezu hormona. Stoga se čini da odsustvo većeg broja CYP4 i svih CYP12 kod pčele ukazuje na gubitak odgovora na pritiske iz životne sredine i smanjen kapacitet za detoksikaciju, a zadržavanje CYP2 klase i mitohondrijalnih enzima je u skladu sa njihovom ulogom u metabolizmu hormona (Claudianos i sar., 2006).

Enzimi iz klase karboksil/holinesteraza koje su uključene u metabolizam ksenobiotika su takođe manje zastupljeni u genomu medonosne pčele (Tabela 3): 8 gena u poređenju sa 13 kod *D. melanogaster* i 16 kod *A. gambiae* (Claudianos i sar., 2006).

Antioksidativni enzimi čine deo molekularnih mehanizama koji regulišu oksidativni stres i homeostazu ROS u ćeliji. Kod pčela su ovi enzimi posebno značajni kod zimske generacije pčela koja se odlikuje dužim životom (Korayem i sar., 2012), održavaju vijabilnost spermatozoida u spermateci matice i trutova (Weirich i sar., 2002; Collins i sar., 2004) i štite organizam od stresa izazvanog visokom stopom metabolizma (Corona i sar., 2005). Takođe, s obzirom na nedostatak gena za enzime povezane sa metabolizmom ksenobiotika medonosne pčele su naročito podložne oksidativnom stresu izazvanom nepotpunom mikrozomalnom oksidacijom ksenobiotika kao što su insekticidi (Badiou-Beneteau i sar., 2012), pa sistem

antioksidativne zaštite može imati ključnu odbrambenu ulogu u prisustvu stresora iz životne sredine.

U genomu medonosne pčele je identifikovano 38 gena za sve glavne komponente enzimskog antioksidativnog sistema: superoksid dismutazu, katalazu, homologe glutation-peroksidaze, tioredoksin-peroksidazu, glutation *S*-transferazu, tioredoksin reduktazu, glutaredoksin i metionin-R-sulfoksid reduktazu (Corona i Robinson, 2006).

Tabela 4. Geni za superoksid dismutazu, katalazu i glutation *S*-transferaze medonosne pčele i njihova subćelijska lokalizacija. Priređeno prema Corona i Robinson (2006).

Enzim	Gen	Lokalizacija
Superoksid dismutaza (SOD)	<i>Sod1</i>	Citosol
	<i>Sod2</i>	Mitohondrije
	<i>Sod3</i>	Vanćelijski
Katalaza (CAT)	<i>Cat</i>	Citosol
Glutacion <i>S</i>-transferaza (GST)	<i>GstT1</i>	Citosol
	<i>GstD1</i>	Citosol
	<i>GstS1, GstS2, GstS3, GstS4</i>	Citosol
	<i>GstZ1</i>	Citosol
	<i>GstO1</i>	Mitohondrije
	<i>Gstmic1, Gstmic2</i>	Mikrozomi

Postoji jedan gen za katalazu (*Cat*), koji kodira citosolni protein od 513 amino-kiselina i geni za citosolnu Cu, Zn-SOD (*Sod1*), mitohondrijalnu Mn-SOD (*Sod2*) i vanćelijsku SOD (*Sod3*) (Corona i Robinson, 2006) (Tabela 4). Jia i sar. (2014) su okarakterisali gen za mitohondrijalnu SOD (*AccSOD2*) kod *Apis cerana cerana* i uočili da se njegova ekspresija menja u prisustvu stresora i da ovaj enzim ima važnu ulogu u zaštiti ćelija. *Sod1* gen se indukuje pri izlaganju pčela niskim i visokim temperaturama i pri indukciji oksidativnog stresa pomoću parakvata (Koo i sar., 2016). Medonosna pčela poseduje 10 gena za GST enzime koji imaju različite uloge i subćelijsku lokalizaciju (Tabela 4).

Iako je koncentracija metalotioneina kod medonosne pčele merena kao biomarker stresa izazvanog teškim metalima (Badiou-Beneteau i sar., 2013; Gauthier i sar., 2016), gen za ovaj protein do sada nije opisan, kao ni njegova proteinska sekvenca, struktura i inducibilnost različitim jonima metala. S obzirom na veliki broj uloga koje ovaj protein ima u očuvanju homeostaze, njegovo izučavanje kod medonosne pčele je

od velikog ekofiziološkog i ekotoksikološkog značaja, posebno kada se u obzir uzme smanjen kapacitet za uklanjanje ksenobiotika kod ove vrste.

3. Cilj

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su bila usmerena ka boljem razumevanju molekularnih mehanizama adaptivnog odgovora medonosne pčele (*Apis mellifera*, L.) na stres izazvan jonima teških metala. U skladu sa postavljenim ciljem, istraživanja su bila podeljena u tri celine.

- ❖ U prvoj fazi analizirane su pčele, med i perga iz stacionarnih pčelinjih zajednica sa tri lokaliteta u Republici Srbiji sa različitim stepenom urbanizacije i industrijalizacije. Cilj ove faze istraživanja je bio da se proceni izloženost pčela toksičnim metalima iz životne sredine, merenjem njihove koncentracije u pčelama, pergi i medu, kao i da se odrede razlike u genskoj ekspresiji i aktivnosti antioksidativnih enzima između pčela sa izabranih lokaliteta.
- ❖ S obzirom na veliki broj stresogenih faktora iz životne sredine koji mogu uticati na merene parametre, u drugoj fazi rađeni su laboratorijski testovi kako bi se izolovao uticaj pojedinih komponenti zagađenja životne sredine na održanje pčelinjih zajednica. Cilj ove faze je bio da se u kontrolisanim uslovima analizira akutni uticaj prisustva jona teških metala (bakra, olova i kadmijuma) u ishrani pčela na gensku ekspresiju i aktivnost antioksidativnih enzima.
- ❖ U trećoj fazi cilj je bio da se korišćenjem bioinformatičkih alata identifikuje protein koji bi po svojim osobinama mogao da se svrsta u grupu metalotioneina medonosne pčele, koji do sada nije opisan, opiše struktura proteina i gena koji ga kodira i ispita njegova funkcija u zaštiti od toksičnosti teških metala.

4. Materijal i metode

4.1. Terenski testovi: opis lokaliteta i formiranje uzoraka

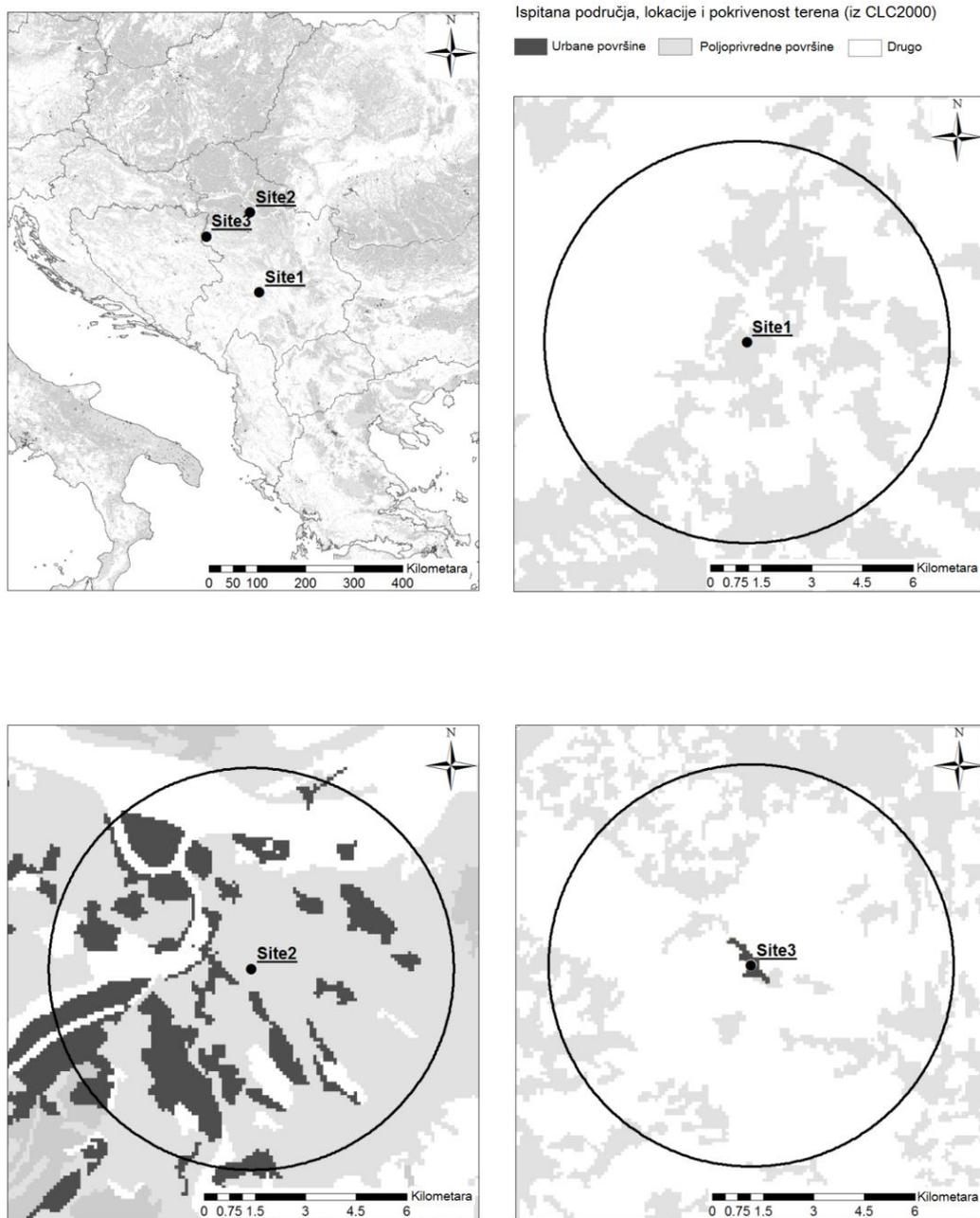
Uzorci su skupljeni u avgustu 2013. godine sa tri lokaliteta u Republici Srbiji. Lokaliteti sa kojih su sakupljeni uzorci su odabrani tako da su obuhvaćena područja sa različitim antropogenim uticajima (Slika 8). Numerička distribucija pokrivenosti terena izračunata je pomoću ArcGIS 10.1 programa, prema proceduri O'Connor i sar. (2014) na osnovu CLC2000 seta podataka (European Commission, 2005) i prikazana je na površini od 6 km u poluprečniku, jer je to prosečna udaljenost koju pčele prelete pri sakupljanju nektara i polena (Beekman i Ratnieks, 2000).

Izabrane su sledeće lokacije: selo Tunovo na Goliji, grad Beograd i industrijsko naselje Zajača.

1. Golija, selo Tunovo (43°17'09.7"N 20°25'44.0"E), predstavlja ruralno područje sa malim brojem potencijalnih zagađivača. U poluprečniku od 6 km u odnosu na položaj košnica nema urbanih naselja prema CLC2000 setu podataka (European Commission, 2005).
2. Beograd je izabran kao urbana sredina sa velikim brojem stanovnika (oko 1,5 milion) i gustim saobraćajem. Košnice iz kojih su sakupljeni uzorci su se nalazile na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u blizini dva bulevara sa gustim saobraćajem (44°47'37.5"N 20°27'51.3"E). Više od 79% površine oko pčelinjaka za koju je pretpostavljeno da pčele posećuju, klasifikovano je kao urbano područje prema CLC2000 setu podataka (European Commission, 2005).
3. Zajača (44°27'07.2"N 19°14'43.9"E) je industrijsko naselje u Zapadnoj Srbiji u kom je smeštena kompanija čija je osnovna delatnost dobijanje olova iz sekundarnih sirovina. Samo 0,6% površine u poluprečniku od 6 km je klasifikovano kao urbano područje prema CLC2000 setu podataka (European Commission, 2005).

Na svakom lokalitetu odabrano je pet košnica iz kojih je sakupljeno oko 1000 pčela radilica. Pri sakupljanju pčela vodilo se računa da to budu starije pčele sa ivičnih ramova, koje aktivno učestvuju u sakupljanju nektara i polena i koje su bile u kontaktu sa sredinom van košnice (Medryzicki i sar., 2013). U isto vreme, iz košnica su uzeti uzorci pčelinjih proizvoda- meda i perge, za analizu sadržaja jona metala. Sakupljeni uzorci pčela radilica su trenutno zamrznuti, transportovani na suvom ledu i

čuvani na -20°C , a uzorci meda i perge su čuvani na sobnoj temperaturi do daljih analiza.



Slika 8. Mapa lokaliteta sa prikazanim položajem košnica, izgledom terena i površinom koju pčele prelete u toku sakupljanja polena i nektara (poluprečnik 6 km). (Site 1- ruralno područje, Golija; Site 2- urbano područje, Beograd; Site 3- industrijsko područje, Zajača).

4.2. Laboratorijski testovi: postavka eksperimenta i formiranje uzoraka

Laboratorijski testovi su urađeni u julu 2015. godine. Za laboratorijske akutne testove korišćene su pčele radilice iz ogledne košnice smeštene na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu (45°14'42.3"N 19°51'15.4"E), pri čemu je posvećena pažnja da sakupljene pčele budu približno iste starosti. Pre uzimanja uzoraka izvršen je pregled kolonije, i zaključeno je da je kolonija jaka, bez vidljivih znakova bolesti. Pčele su pre uzorkovanja izložene dimu dva puta po 30-60 s. Pčele radilice su uzorkovane sa ivičnih ramova, sakupljene u teglu i odmah transportovane u laboratoriju.

U laboratoriji, pčele su anestetizirane ugljen dioksidom (ne duže od 3 min), nakon čega su prebačene u staklene tegle pokrivene najlonskom mrežom. Pčele su hranjene 1 M rastvorom saharoze koji je sadržao određene koncentracije metala: bakar(II) hlorida (CuCl_2), kadmijum(II) hlorida (CdCl_2) ili olovo(II) hlorida (PbCl_2). Kontrolne pčele su hranjene samo 1 M saharozom. Hrana je data pomoću plastičnih posudica sa malim rupama na poklopcu koje su postavljene na najlonsku mrežu. Svaki metal je testiran u 5 koncentracija:

CuCl_2 : 1000 mg/L, 100 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L, 0,1 mg/L,

PbCl_2 : 1000 mg/L, 100 mg/L, 10 mg/L, 1 mg/L, 0,1 mg/L i

CdCl_2 : 10 mg/L, 1 mg/L, 0,1 mg/L, 0,01 mg/L, 0,001 mg/L.

Ukupna zapremina saharoze je bila 5 mL po tegli. Za svaki tretman metalom, kao i za kontrolu, formirana su po tri biološka ponavljanja. Eksperiment se odvijao 48 h u kontrolisanim uslovima (25°C, 65% relativna vlažnost vazduha, u mraku). Nakon 48 h zabeležena je smrtnost i količina hrane koju su pčele pojele, a preživjele pčele su sakupljene, trenutno zamrznute pomoću suvog leda i čuvane na -20°C do daljih analiza.

4.3. Određivanje koncentracije metala u pčelama i pčelinjim proizvodima

Sadržaj metala u pčelama i pčelinjim proizvodima uzorkovanim na Goliji, u Beogradu i Zajači tokom avgusta 2013. godine je izmeren metodom optičke emisije spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES, *engl.* inductively coupled plasma - optical emission spectrometry). Uzorci pčela i perge su prvo podvrgnuti procesu liofilizacije na 60°C do postizanja konstantne mase, nakon čega su razoreni mikrotalasnom digestijom u uređaju Ethos1 (Milestone) prema standardnom protokolu US EPA SW-846 Method 3052 pri visokom pritisku u zatvorenim teflonskim sudovima. Uzorci meda su odmah podvrgnuti mikrotalasnoj digestiji. Za digestiju uzoraka je korišćena smeša 7 mL HNO₃ i 1 mL H₂O₂. Temperaturni program se sastojao iz zagrevanja od 20°C do 190°C (15 min) i 15 min na 190°C. Nakon digestije, uzorci su razređeni destilovanom vodom do zapremine od 25 mL. Detekcija metala je urađena pomoću optičko emisijnog spektrometra sa induktivno spregnutom plazmom (iCAP 6500Duo, Thermo Scientific) i dobijeni rezultati su poređeni sa standardima Multi-Element Plasma Standard Solution⁴ Specpure (Alfa Aesar).

4.3.1. Statistička obrada

Za svaku eksperimentalnu grupu formirana su tri biološka ponavljanja 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. Statistička obrada podataka o koncentraciji metala u pčelama i pergi je urađena u programu Statistica v13. Statistički značajne razlike su određene jednodimenzionalnom analizom varijanse (ANOVA) sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

4.4. Merenje relativne genske ekspresije

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

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

Koncentracija i čistoća RNK su određene spektrofotometrijski na BioSpec-nano spektrofotometru (Shimatzu), merenjem apsorbanaci uzoraka ukupne RNK na talasnim dužinama od 260, 280 i 230 nm. Čistoća ukupne RNK je određena kao odnos apsorbanaci na 260 i 280 nm. 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 1 μ g/ μ L, nakon čega su uzorci zamrznuti na -80°C .

Za sintezu komplementarne DNK (cDNK, *engl.* complementary DNA) u reakciji reverzne transkripcije korišćeno je po 1 μ g ukupne RNK svakog uzorka. Reakcija je postavljena upotrebom kompleta QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), u skladu sa uputstvima proizvođača.

4.4.2. Kvantitativni PCR (qPCR)

Relativna kvantifikacija ekspresije 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 detekciju amplikona. Za referentni gen (*engl.* housekeeping gene), koji je konstitutivno ekspresovan u svim eksperimentalnim grupama i na osnovu kog se izračunava relativna ekspresija ciljnih gena izabran je gen za aktin (*ActB*). Podobnost upotrebe aktina kao endogene kontrole kod medonosne pčele je 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 5.

Tabela 5. Prajmeri korišćeni u praćenju relativne ekspresije gena qPCR metodom.

Ciljni gen		Sekvenca	Efikasnost	Referenca
β-aktin (referentni gen)	<i>ActB.F</i> <i>ActB.R</i>	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG GACCCACCAATCCATACGGA	105%	Antúnez i sar. (2009)
Superoksid dismutaza (citosolna, CuZn)	1 <i>Sod1.F</i> <i>Sod1.R</i>	AGCAGATGCAAGTGGTGTG GAGCACCAGCATTTCCCTGTAG	97%	Collins i sar. (2004)
Superoksid dismutaza (mitohondrijalna, Mn)	2 <i>Sod2.F</i> <i>Sod2.R</i>	GTCGCCAAAGGTGATGTCAATAC CGTCTGGTTTACCGCCATTTG	105%	Li i sar. (2014)
Katalaza	<i>Cat.F</i> <i>Cat.R</i>	GGCGGCTGAATTAAGTGCTA TTGCGTTGTGTTGGAGTCAT	96%	Collins i sar. (2004)
Glutation S-transferaza, Delta klasa	<i>GstD1.F</i> <i>GstD1.R</i>	GGCTGCCGCTCTCGACATCG TGCCGTATTGGTCCGCCAAGT	90%	Morimoto i sar. (2011)
Glutation S-transferaza, Sigma klasa	<i>GstS1.F</i> <i>GstS1.R</i>	TGGTGGTGCTCTTTCTTGGGCT TGTGGACGCTTATCAAGCCAGCT	99%	Morimoto i sar. (2011)
Glutation S-transferaza, mikrozomalna	<i>Gstmic1.F</i> <i>Gstmic1.R</i>	AATTGCAATGGTTCCATTAAGTCA ATGTGCTCTGCGTACACGTT	103%	Morimoto i sar. (2011)
Metalotionein	<i>AmMT.F</i> <i>AmMT.R</i>	GACCAGGTTGCGACAAATGT TGCAACTACACTGTCCACCA	96%	-

Sve analize su urađene u tehničkom duplikatu. Reakciona smeša ukupne zapremine 14 µl je sadržala 7 µl 2X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM svakog prajmera i 50 ng cDNA. 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. Kriva topljenja svake reakcije je snimana u temperaturnom opsegu od 65°C do 95°C, sa promenom temperature od 0,5°C/5 s radi provere specifičnosti PCR reakcije. Specifičnost i efikasnost prajmera je testirana u istim uslovima koji su korišćeni za kvantifikaciju relativne ekspresije gena na qPCR-u. Svaki par prajmera je testiran u 4 serije razblaženja u duplikatu (tehnički replikat): 1X, 10X, 100X i 1000X razblažena cDNK.

4.4.3. Statistička obrada

Relativna kvantifikacija ekspresije gena izračunata je pomoću programa REST 2009 (*engl.* Relative Expression Software Tool) (Qiagen) u kome se koriste Ct vrednosti i efikasnost prajmera referentnog i ciljnog gena u različitim eksperimentalnim grupama. Relativno povećanje/smanjenje ekspresije gena u ciljnim grupama u odnosu na kontrolu je izračunato integrisanim Bootstrap randomization testom (2000 iteracija) za nivo značajnosti $p < 0,05$.

4.5. Merenje specifične aktivnosti antioksidativnih enzima i određivanje redoks statusa

Za merenje aktivnosti enzima, sadržaja glutaciona, sulfhidrilnih grupa i malondialdehida, napravljeni su 10% (w/v) homogenati celih pčela. Cele pčele su homogenizovane u Tris-HCl puferu pH 7,4 u tečnom azotu sa avanom i tučkom. Grubi homogenati su centrifugirani 10 min na 10 000 g (4°C) i supernatanti su zamrznuti na -20°C do određivanja enzimske aktivnosti. Za svaku eksperimentalnu grupu formirano je 5 bioloških ponavljanja od 8 pčela radilica i analize su rađene u tehničkim duplikatima ili triplikatima. Specifična aktivnost enzima izražena je u jedinicama aktivnosti po miligramu proteina (U/mg proteina), a koncentracija GSH, SH i MDA u nmol/mg proteina.

4.5.1. Merenje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) određena je po metodi McCord i Fridovich (1968) u sistemu citohrom *c* (Fe^{3+})/ksantin/ksantin oksidaza. Princip ove metode jeste da superoksid radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), koji se generiše u reakciji sa ksantin oksidazom, redukuje citohrom *c* (Fe^{3+} u Fe^{2+}), što je praćeno promenom apsorbance na 550 nm. Ukoliko je prisutna u uzorku, superoksid dismutaza će ukloniti superoksid radikal, tako da će se smanjiti brzina redukcije citohroma *c*. Ovo smanjenje je obrnuto proporcionalno aktivnosti SOD. Kao jedinica aktivnosti superoksid dismutaze definisana je ona aktivnost SOD potrebna za smanjenje brzine redukcije za 50% (pri promeni apsorbance od 0,025/min).

4.5.2. Merenje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) određena je metodom po Aebi-u (1984). Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju razgradnje H_2O_2 na 240 nm. Aktivnost CAT se prati kao pad apsorbance na datoj talasnoj dužini.

4.5.3. Merenje aktivnosti glutacion S-transferaze

Aktivnost glutacion S-transferaze (GST) je određena sa 1-hloro-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) kao supstratom (Hagib i sar., 1974). Metoda se zasniva na formiranju kompleksa CDNB sa glutationom, a reakciju katališe glutacion S-transferaza. Brzina formiranja kompleksa se prati spektrofotometrijski na 340 nm. Aktivnost GST se

izračunava pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDNB i izražava se po mg proteina. Specifična jedinica aktivnosti je definisana kao broj nM glutaciona oksidovanih u minuti.

4.5.4. Merenje sadržaja glutaciona i sulfhidrilnih grupa proteina

Za merenje sadržaja glutaciona (GSH) i sulfhidrilnih grupa proteina (SH), proteini u 10% (w/v) homogenatu su potaloženi pomoću 4% sulfosalicilne kiseline. Nakon centrifugiranja (5 min/10 000 g), supernatant je korišćen za merenje sadržaja GSH, dok je talog dva puta ispran sa 2% sulfosalicilnom kiselinom, resuspendovan u 6 M guanidin-HCl pH 6,0 i korišćen za određivanje koncentracije SH grupa. Sadržaj GSH i SH je izmeren metodom po Ellman-u (1959) pomoću 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB) kao supstrata. Formiranje proizvoda reakcije je praćeno na 412 nm, a koncentracije u uzorku su izračunate pomoću standardne krive uz korišćenje GSH kao standarda.

4.5.5. Merenje koncentracije malondialdehida

Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatu (10% w/v) je izmerena metodom po Slater-u (1984) koja je zasnovana na principu da malondialdehid, specifičan proizvod lipidne peroksidacije reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i obrazuje obojen kompleks sa maksimumom apsorpcije na 532 nm. Koncentracija je izračunata pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijenta.

4.5.6. Merenje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina je određena metodom po Bradford-u (1976). Metoda za određivanje ukupnih proteina po Bradford-u se zasniva na formiranju kompleksa između boje Coomassie Brilliant Blue G-250 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. Intenzitet boje se meri i na osnovu standardne krive se određuje koncentracija proteina u uzorku.

4.5.7. Statistička obrada

Statistička obrada podataka o aktivnosti enzima, koncentraciji glutaciona, sulfhidrilnih grupa i malondialdehida je urađena u programu Statistica v13. Statistički značajne

razlike su određene jednodimenzionalnom analizom varijanse (ANOVA) sa post-hoc Tukey testom za nivo značajnosti $p < 0,05$.

4.6. Identifikacija i bioinformatička analiza gena za metalotionein kod medonosne pčele

4.6.1. Pretraživanje baza podataka radi identifikacije metalotioneina

Proteinske sekvence za komparativnu analizu su preuzete iz baze GenBank (Benson i sar., 2013). Za identifikaciju metalotioneina kod pčele korišćena su četiri proteina *D. melanogaster*: MtnA (NP_524299.1), MtnB (NP_524413.1), MtnC (NP_650882.1) i MtnD (NP_788695.2) za BLAST (Altschul i sar., 1990) pretragu u UniProtKB (The UniProt Consortium) i NCBI bazama podataka.

4.6.2. Analiza promotorskog regiona gena

Moguća mesta za vezivanje transkripcionih faktora na promotorskom regionu DNK, responsivni elementi (*engl.* response elements) su pronađeni pomoću programa PROMO (Farre i sar., 2003), TFBIND (Tsunoda i Takagi, 1999), TFSEARCH (Heinemeyer i sar., 1999) i GENOMATIX (Cartharius i sar., 2005). Pretraga je bila ograničena na 1500 bp uzvodno od početka otvorenog okvira čitanja.

4.6.3. Komparativna filogenetska analiza

Sekvence metalotioneina koje su korišćene za komparativnu analizu su pronađene pomoću BLAST pretrage u NCBI i UniProtKB bazama podataka za proteine uz korišćenje prethodno identifikovanog metalotioneina kod mednosne pčele (AmMT) i metalotioneina *D. melanogaster*. U okviru InterPro baze podataka (Mitchell i sar., 2015) definisano je 6 animalnih familija metalotioneina i njihove proteinske sekvence za reprezentativne vrste su preuzete, a korišćeni su samo recenzirani proteini iz Swiss-Prot baze. Ukupno 34 sekvence su poravnate korišćenjem Clustal Omega (McWilliam i sar., 2013), obrađene pomoću Jalview (Waterhouse i sar., 2009) nakon čega je pristupljeno filogenetskoj analizi. Filogenetska stabla su napravljena Neighbour joining metodom sa bootstrapping-om (Saitou i Nei, 1987) i prikazana su pomoću programa Mega 6 (Tamura i sar., 2013).

4.6.4. Molekularno modelovanje

Strukturni i funkcionalni modeli AmMT proteina su napravljeni pomoću programa I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Yang i sar., 2015), internet platforme za predviđanje trodimenzionalne strukture i biološke funkcije proteina na osnovu predviđene aminokiselinske sekvence. I-TASSER prvo identifikuje strukturne šablone pomoću programa LOMETS iz PDB (*engl.* Protein Data Bank) biblioteke. LOMETS je meta-server koji kombinuje različite programe (*engl.* threading programs) od kojih svaki generiše desetine hiljada modela. Za svaki zadatak, I-TASSER generiše desetine hiljada konformacionih modela koje grupiše u klasterne na osnovu strukturne sličnosti i prikazuje pet najvećih klastera. Mesta za vezivanje liganda u molekularnom modelu AmMT su predviđena pomoću COACH meta-servera (Yang i sar., 2013).

4.7. Kloniranje gena za metalotionein, ekspresija rekombinantnog proteina i analiza njegove funkcije

4.7.1. Priprema kodirajuće sekvence metalotioneina za kloniranje

Komplementarna DNK je dobijena na prethodno opisan način (Poglavlje 4.4.1.). Prajmeri za umnožavanje kodirajuće sekvence za metalotionein su dizajnirani tako da sadrže mesta sečenja za restrikcione enzime. Levi prajmer je sadržao mesto prepoznavanja i sečenja enzima BamHI neposredno ispred start kodona (podvučeno) (5'-CGGGATCCATGCCGGGACCAGGTTG-3'), a desni prajmer je sadržao mesto prepoznavanja za enzim EcoRI (podvučeno) i dve dodatne baze (podebljano) umesto stop kodona (UAA) (5'-CCGGAATTCGCGCACTTGCAAGTCTTGC-3').

Kodirajuća sekvenca gena za metalotionein je umnožena lančanom reakcijom polimeraze (PCR) prema sledećem programu: početna denaturacija 5 min na 95°C, 35 ciklusa koji su se sastojali od 3 koraka: 30 s na 95°C, 30 s na 55°C i 1 min na 72°C i finalne ekstenzije 5 min na 72°C. Reakciona smeša za PCR je sadržala 1X NH₄ reakcioni pufer (Bioline), 1,5 mM MgCl₂ (Bioline), 200 nM dNTP (Kapa Biosystems), 1,25 U BioTaq DNA polimeraze (Bioline), 1 μM svakog prajmera i 100 ng cDNK u ukupnoj zapremini od 50 μL. Dobijeni PCR produkt je prečišćen pomoću ExoSap (Fermentas) i sekvenciran pomoću ABI3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Na ovaj način potvrđeno je da je umnožen kodirajući region gena za metalotionein.

Pre sečenja restrikcionim enzimima, PCR produkt je prečišćen QIAquick spin kolonom (Qiagen). Na kolonu je naneto 50 μL PCR reakcije i 250 μL PB pufera (5 M Gu-HCl, 30% izopropanol) i centrifugirano 45 s na maksimalnoj brzini (13 100 g), zatim je na kolonu dodato 750 μL PE pufera (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 80% etanol) i ponovo centrifugirano na maksimalnoj brzini 45 s. Kolona je dodatno centrifugirana 1 min kako bi se uklonili ostaci pufera i zatim je prebačena u čistu tubicu, dodato je 50 μL EB pufera (10 mM Tris-HCl, pH 8,5), inkubirano 1 min i centrifugirano 1 min. Dobijeni eluat je sadržao prečišćen PCR produkt.

4.7.2. Digestija vektora pET28 i inserta restrikcionim enzimima

Kao vektor za kloniranje korišćen je pET28 plazmid koji sadrži gen za rezistenciju na kanamicin i histidinski rep (*engl.* histidine tag). Vektor je isečen pomoću BamHI i EcoRI u dva koraka. Reakciona smeša je sadržala 3 µL pET28 vektora, 2 µL 10X SB pufera (Sigma-Aldrich), 1 µL (10 U) BamHI i 14 µL H₂O. Reakcija se odvijala 1 h na 37°C nakon čega je enzim inaktiviran zagrevanjem 15 min na 65°C. Zatim je dodato 1 µL (40 U) enzima EcoRI, reakcija se ponovo odvijala 1 h na 37°C nakon čega je enzim inaktiviran zagrevanjem 15 min na 65°C. Na taj način dobijeni su „lepljivi krajevi“. Istovremeno su rađene i kontrolne digestije u kojima je plazmid sečen samo jednim restrikcionim enzimom kako bi se potvrdila aktivnost svakog enzima ponaosob. Produkti digestije su zatim razdvojeni pomoću agarozne elektroforeze (0,9% agarozni gel, 75 V). Nakon razdvajanja, vektor je isečen sa gela i prečišćen pomoću kompleta GenElute Gel extraction Kit (Sigma-Aldrich). Koncentracija vektora nakon prečišćavanja je bila 6 ng/µL.

Na isti način je urađena i digestija inserta, tj. umnoženog kodirajućeg regiona gena za metalotionein. Nakon digestije insert je prečišćen na isti način kao i PCR produkt, pomoću QIAquick spin kolone (poglavlje 4.7.1.). Koncentracija inserta nakon prečišćavanja je bila 11,52 ng/µL.

4.7.3. Ligacija

Reakciona smeša je sadržala 30 ng vektora i 3,5 ng inserta (molarni odnos 1:3), pufer za ligaciju (25 mM TrisHCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT), 1,6 mM ATP i 4 U T4 DNK ligaze (Sigma-Aldrich) u ukupnoj zapremini od 10 µL. Kontrola je sadržala iste komponente, osim što je insert zamenjen sa sterilnom vodom. Reakcije su se odvijale na 16°C preko noći, nakon čega je ligaza inaktivirana zagrevanjem 15 min na 65°C.

4.7.4. Pravljenje kompetentnih ćelija

E. coli bakterije su gajene na 37°C na tečnom Luria-Bertani (LB) medijumu (1% tripton, 0,5% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na LB agar čvrstoj podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca, 1,5% agar). Svi medijumi za gajenje bakterija su sterilisani autoklaviranjem.

Za kloniranje metalotioneina korišćeni su sojevi bakterije *E. coli* DH5 α i BL21. Za pripremu kompetentnih ćelija bakterije su zasejane u 5 mL LB medijuma (jedna kolonija sa sveže zasejane LB agar podloge) i ostavljene na 37°C preko noći u inkubatoru sa tresilicom. Sledećeg jutra je 500 μ L ove kulture prebačeno u 50 mL svežeg LB medijuma i bakterije su gajene na 37°C u inkubatoru sa tresilicom do postizanja optičke gustine OD₆₀₀ od 0,25-0,3. Posle dostizanja odgovarajuće optičke gustine, bakterije su istaložene centrifugiranjem (5 min na 13 400 g). Nakon odlivanja supernatanta, bakterijski pelet je ostavljen na ledu 15 min, zatim je rastvoren u 1,5 mL 0,1 M CaCl₂ i ostavljen na ledu 30 min. Bakterije su potaložene centrifugiranjem 5 min na 6 000 g i rastvorene u 300 μ L pufera (0,1 M CaCl₂, 15% glicerol). Ovako pripremljene bakterije su čuvane na -80°C.

4.7.5. Transformacija DH5 α ćelija i izolacija pET28 vektora sa insertom

Vektor pET28 koji je sadržao insert sa kodirajućim regionom gena za metalotionein je transformisan u kompetentne ćelije *E. coli* DH5 α . U 100 μ L kompetentnih ćelija je dodato 10 μ L plazmida sa insertom (nakon ligacije) i pažljivo izmešano okretanjem tubice nekoliko puta. Bakterije su stajale na ledu 40 min, nakon čega su inkubirane 45 s u vodenom kupatilu na 42°C i 2 min na ledu. Transformisanim bakterijama je dodato 900 μ L LB bez antibiotika i kultivacija je nastavljena na 37°C 60 min. Nakon toga, tečna kultura je centrifugirana, 800 μ L medijuma je odbačeno, a talog je resuspendovan u preostalih 200 μ L i zasejan na selektivni LB agar u koji je dodato 50 μ g/mL kanamicina, s obzirom da vektor pET28 odezbeđuje rezistenciju na ovaj antibiotik. Bakterije su kultivisane preko noći na 37°C.

Kako bi se utvrdilo da li bakterijske kolonije koje su izrasle na selektivnoj podlozi sadrže vektor sa insertom izabrano je 5 kolonija i urađen je PCR. Deo kolonije je prebačen u 25 μ L dH₂O i inkubiran 2 min na 100°C, centrifugiran 1,5 minut na 13 000 g i 5 μ L supernatanta je uzeto za PCR reakciju koja je sadržala 1X NH₄ reakcioni pufer (Bioline), 1,5 mM MgCl₂ (Bioline), 200 nM dNTP (Kapa Biosystems), 1,25 U BioTaq DNA polimeraze (Bioline) i 1 μ M svakog prajmera u zapremini od 20 μ L. Temperaturni režim je bio identičan kao kod umnožavanja cDNK za metalotionein (Poglavlje 4.7.1.). Analizom PCR produkata na agaroznom gelu je potvrđeno prisustvo inserta u plazmidu i transformacija se smatrala uspešnom.

Za umnožavanje pET28 vektora, deo bakterijske kolonije za koju je dobijena pozitivna PCR reakcija je prenet sa čvrste podloge u 10 mL tečnog LB medijuma sa kanamicinom i kultura je inkubirana preko noći na 37°C u inkubatoru sa tresilicom. Prekonoćna kultura je istaložena centrifugiranjem 5 min/9 300 g. Bakterijski talog je resuspendovan u 250 µL pufera P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8,0), dodato je 250 µL pufera P2 za liziranje ćelija (200 mM NaOH, 1% SDS) i ćelije su promešane invertovanjem tubice nekoliko puta. Zatim je dodato 350 µL pufera N3 (4,2 M Gu-HCl, 0,9 K-acetat pH 4,8), sadržaj je promešan invertovanjem i uzorci su centrifugirani 10 min/9 300 g. Supernatant je prebačen u novu tubicu, dodato je 40 µl silika gela (koncentracija 100 mg/mL) i sadržaj je mešan invertovanjem 5 min. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 1 min/9 300 g (plazmidna DNK ostaje u talogu vezana za silika gel). Talog je ispiran sa 500 µL PE pufera (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 80% EtOH) i centrifugiran 1 min/9 300 g, što je ponovljeno dva puta. Nakon odlivanja supernatanta u talog je dodato 50 µL EB pufera za eluiranje (10 mM Tris-HCl pH 7,5), uzorci su inkubirani 5 min na 65°C i centrifugirani 1 min/9 300 g kako bi se uklonio silika gel. Supernatant u kojem se nalazila plazmidna DNK je prebačen u čistu tubicu i ostavljen na -20°C. Kako bi se potvrdilo prisustvo inserta, izolovani plazmid je sekvenciran pomoću ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) korišćenjem T7 promotor prajmera (Sigma-Aldrich).

4.7.6. Transformacija BL21 ćelija i dobijanje rekombinantnog proteina

U cilju izolacije rekombinantnog metalotioneina, pET28 plazmid sa insertom je transformisan u BL21 soj *E. coli*, na isti način kao u slučaju DH5α (Poglavlje 4.7.5.). U 100 µL kompetentnih ćelija je dodato 3 µL plazmida sa insertom. Nakon transformacije, bakterije su zasejane na selektivni LB agar i kultivisane preko noći na 37°C.

Jedna bakterijska kolonija je prenet sa čvrste podloge u 5 mL tečnog LB medijuma sa antibiotikom i inkubirana preko noći na 37°C u inkubatoru sa tresilicom. Nakon 18 h, 500 µL prekonoćne kulture je prebačeno u 100 mL svežeg LB medijuma sa kanamicinom, bakterije su gajene na 37°C u inkubatoru sa tresilicom i praćena je optička gustina kulture na 600 nm. Kad je optička gustina dostigla 0,4-0,6 u kulturu je dodat IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid) u finalnoj koncentraciji od 1 mM

koji je indukovao ekspresiju proteina. Nakon 6 h od indukcije bakterije su istaložene centrifugiranjem 10 min na 3 000 g, supernatant je odbačen, a talog resuspendovan u 10 mL pufera za ekvibraciju (500 mM NaCl, 50 mM PO_4^{2-} , pH 8,0), dodato je 10 mg lizozima (Sigma-Aldrich) (finalna koncentracija 1 mg/mL), izmešano invertovanjem i zamrznuto na -20°C .

Nakon otapanja, bakterijske ćelije su dodatno lizirane pomoću 3 ciklusa zamrzavanja/otapanja i 3 ciklusa sonikacije (30 s sonikacija/ 30 s na ledu), nakon čega je lizat centrifugiran 30 min/12 000 g i supernatant je prečišćen pomoću HisTrap kolone zapremine 1 mL (GE healthcare) za prečišćavanje rekombinantnih proteina sa histidinskim repom. Pre nanošenja ćelijskog ekstrakta, kroz kolonu je propušteno 10 mL pufera za ekvibraciju. Nakon propuštanja ćelijskog ekstrakta, proteini koji su se vezali za kolonu su isprani pomoću 10 mL imidazola (500 mM) rastvorenog u puferu za ekvibraciju.

Kako bi se proverila uspešnost prečišćavanje metalotioneina, uzorci iz svakog koraka ovog procesa su provereni elektroforezom na 15% poliakrilamidnom gelu sa SDS-om.

Elektroforeza je rađena u Bio-Rad sistemu (Mini-Protean II), u puferu pH 8,3 koji je sadržao 25 mM Tris, 192 mM glicin i 0,1% SDS. Za elektroforetsko razdvajanje korišćen je gel koji je sadržao 15% akrilamid/bisakrilamid, 0,375 M Tris HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS i 0,05% TEMED. Za nanošenje uzoraka korišćen je gel za koncentrovanje (*engl.* stacking gel) koji je sadržao 4% akrilamid/bisakrilamid, 0,125 M Tris HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS i 0,1% TEMED. Uzorci rekombinantnog proteina iz prethodnih koraka su pomešani sa puferom za uzorke (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM 2-merkaptetanol i 0,1% bromfenol plavo) u odnosu 4:1, kuvani 3 min na 95°C i nakon toga centrifugirani 10 min na 10 000 g. Elektroforeza je tekla oko sat vremena na 200 V, nakon čega je gel obojen rastvorom za bojenje (1% Comassie Blue R-250, 45% metanol, 10% sirćetna kiselina) u trajanju od 2-3 h i zatim obezbojen rastvorom za obezbojavanje (10% metanol, 10% sirćetna kiselina) preko noći kako bi se uklonila boja koja se nije vezala za proteine.

4.7.7. Analiza tolerancije transformisanih bakterija BL21 na metale

Analiza je urađena metodom opisanom u Huang i Wang (2010). Prekonoćne kulture BL21 ćelija koje su transformisane praznim (kontrola) ili rekombinantnim pET28 vektorom su razblažene 100 puta u svežem LB medijumu sa 50 µg/mL kanamicina i uzgajane na 37°C dok nije postignuta optička gustina oko 0,6 na 600 nm. Ekspresija rekombinantnog metalotioneina je indukovana dodavanjem 0,5 mM IPTG i istovremeno dodavanjem 400 µM CdCl₂, CuCl₂ ili PbCl₂ u finalnoj koncentraciji, nakon čega je rast bakterija praćen merenjem optičke gustine na 600 nm na svakih sat vremena u toku osam sati. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu.

5. Rezultati

5.1. Rezultati terenskih testova

5.1.1. Određivanje koncentracije metala

Sadržaj metala je izmeren u pčelama radilicama, pergi i medu pomoću ICP-OES metode. Uzorci su poticali sa lokaliteta sa različitim okruženjem i stepenom zagađenja: ruralno područje (Golija), urbano područje (Beograd) i industrijsko područje (Zajača).

5.1.1.1. Sadržaj metala u pčelama i pergi

Koncentracija kalijuma u pčelama iz ruralnog i urbanog područja je bila izvan radnog opsega te nije mogla biti izmerena, dok je u pčelama i pergi iz industrijske oblasti zabeleženo samo po jedno merenje (Slika 9). Koncentracija kalijuma je bila veća u pergi sa Golije nego iz Beograda, a koncentracija u Zajači se nije značajno razlikovala u odnosu na druga dva lokaliteta.

Koncentracija bakra i gvožđa je bila veća u pčelama iz urbanog područja u poređenju sa pčelama iz industrijske i ruralne oblasti, što nije praćeno istim odnosima koncentracija u pergi (Slika 9). U pergi iz Zajače je značajno smanjen sadržaj bakra u odnosu na druga dva lokaliteta, a sadržaj gvožđa je bio veći u pergi iz Zajače nego iz Beograda.

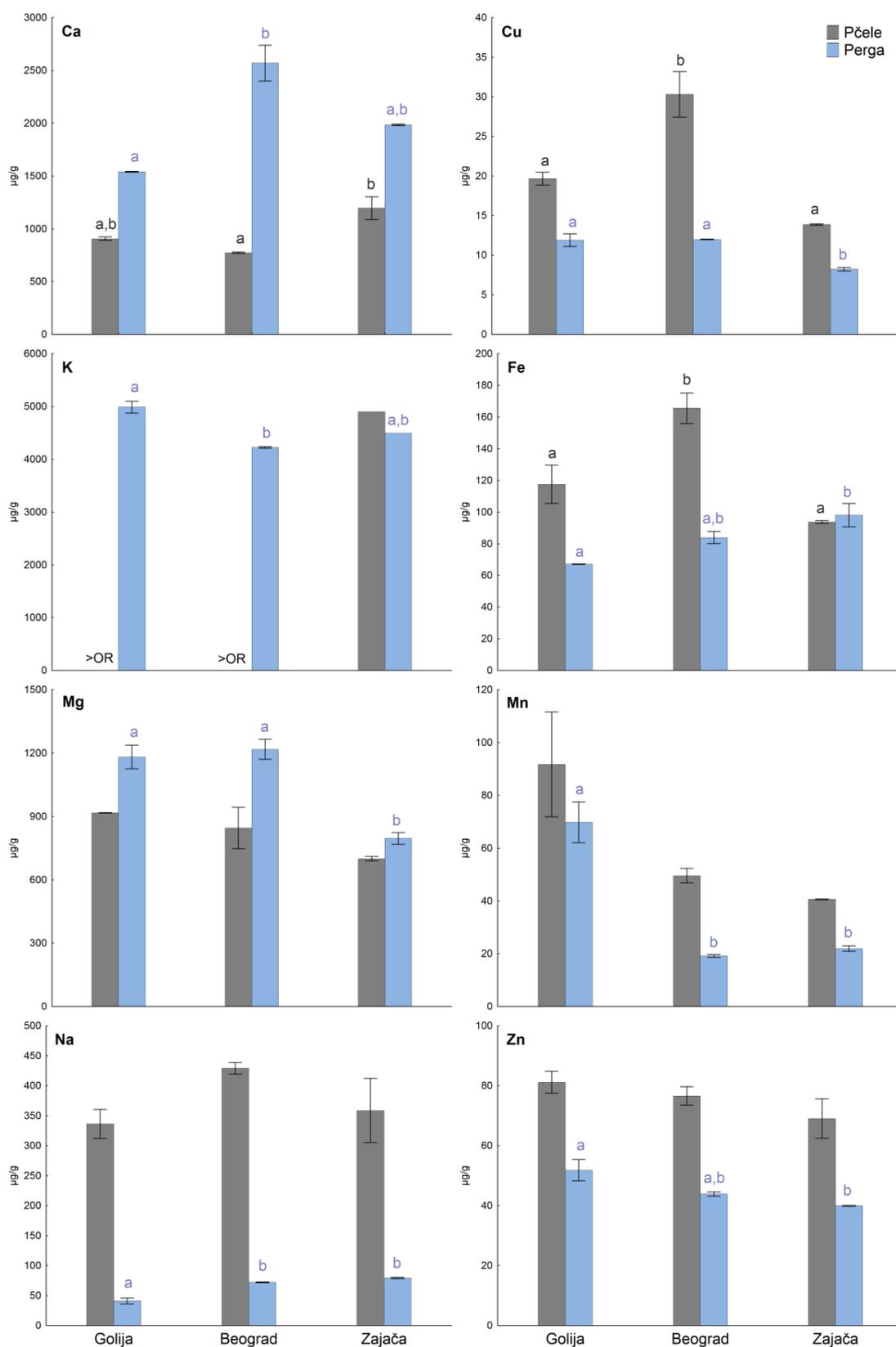
U uzorcima perge iz ruralnog područja značajno je povećana količina mangana, a smanjen sadržaj natrijuma u odnosu na urbano i industrijsko područje, dok u pčelama nije bilo razlike u koncentracijama ova dva metala. Koncentracija magnezijuma je bila manja u pergi iz Zajače u odnosu na uzorke sa druga dva lokaliteta, dok u pčelama nije bilo razlike.

Sadržaj kalcijuma se razlikovao u pčelama iz urbane i industrijske oblasti, kao i u pergi iz ruralne i urbane oblasti. Koncentracija cinka se nije razlikovala u pčelama sa različitim lokaliteta, a sadržaj ovog metala je bio značajno manji u pergi iz industrijske oblasti u poređenju sa ruralnom (Slika 9).

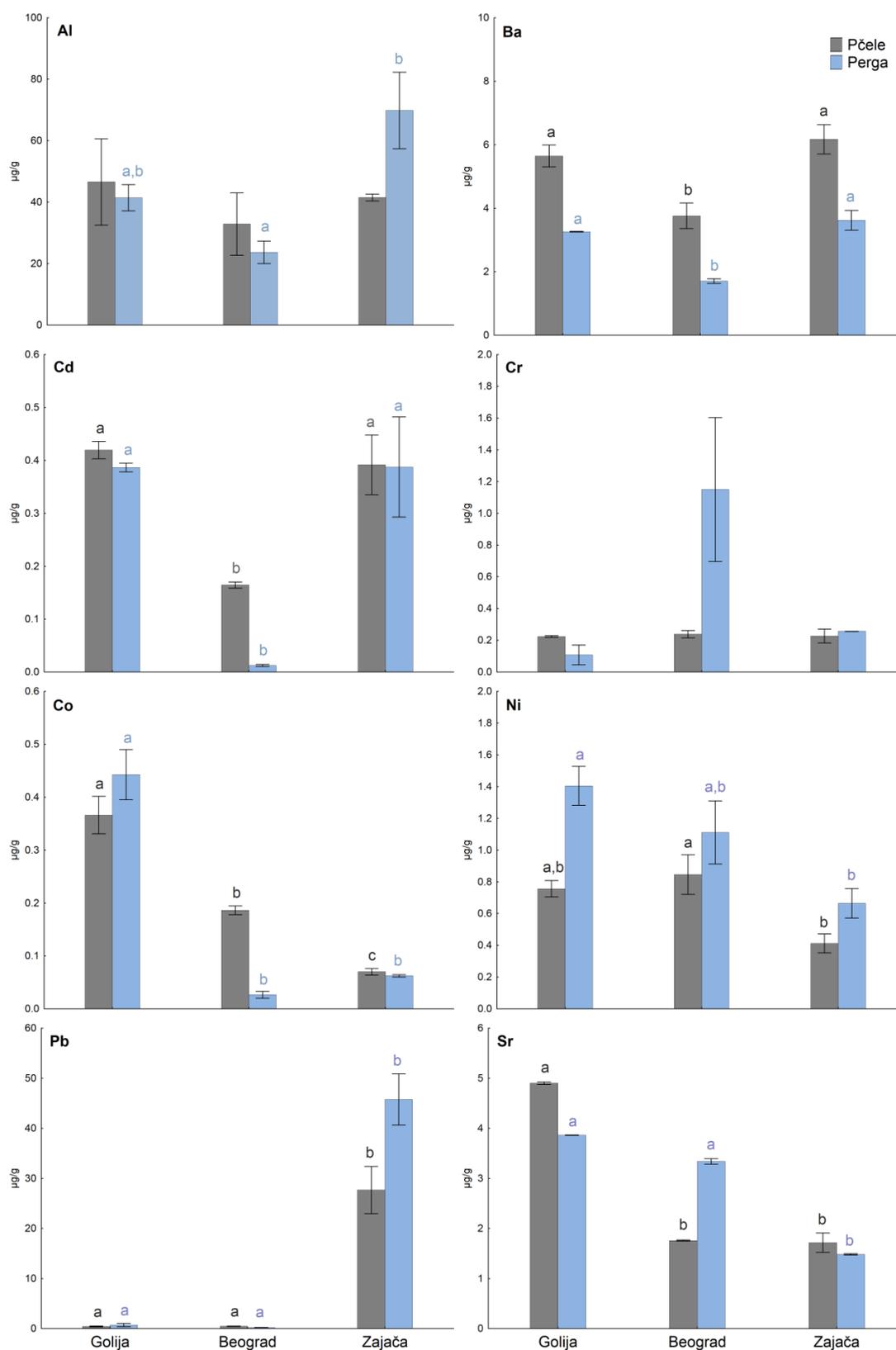
Koncentracija aluminijuma se nije razlikovala u pčelama iz različitih oblasti, ali su postojale razlike u pergi iz urbane i industrijske oblasti (Slika 10).

Koncentracija hroma se nije statistički razlikovala između uzoraka sa različitih lokacija (Slika 10). Sadržaj kadmijuma i barijuma u uzorcima perge iz ruralne i industrijske oblasti je bio sličan, dok je najmanja količina ova dva metala izmerena u pčelama i pergi iz Beograda. Količina olova u pčelama i pergi iz industrijskog područja je bila značajno povećana, i to nekoliko desetina puta u odnosu na druga dva lokaliteta.

Koncentracija nikla je bila veća u pergi iz ruralne oblasti u odnosu na industrijsku, dok u pčelama nije bilo razlike između ove dve oblasti. U uzorcima pčela je izmerena veća koncentracija nikla u urbanom nego u industrijskom području. U uzorcima pčela i perge iz ruralne oblasti, izmerena je i najveća koncentracija kobalta i stroncijuma, što je ukazalo da su na ovom području ipak prisutni izvori toksičnih metala (Slika 10).



Slika 9. Koncentracija metala (Ca, Cu, K, Fe, Mg, Mn, Na i Zn) u pčelama i pergi uzorkovanim u avgustu 2013. godine na tri lokacije sa različitim antropološkim uticajem. Koncentracija metala je izražena u µg/g i predstavljena kao srednja vrednost (\bar{A}) ± standardna greška (SE). Razlike između grupa su izračunate pomoću jednodimenzionalne ANOVA i post-hoc Tukey testa. Različito slovo predstavlja statistički značajne razlike između grupa za nivo značajnosti $p < 0,05$. OR- radni opseg.



Slika 10. Koncentracija metala (Al, Ba, Cd, Cr, Co, Ni, Pb i Sr) u pčelama i pergi uzorkovanim u avgustu 2013. godine na tri lokacije sa različitim antropološkim uticajem. Koncentracija metala je izražena u $\mu\text{g/g}$ i predstavljena kao srednja vrednost (Ar) \pm standardna greška (SE). Razlike između grupa su izračunate pomoću jednodimenzionalne ANOVA i post-hoc Tukey testa. Različito slovo predstavlja statistički značajne razlike između grupa za nivo značajnosti $p < 0,05$.

5.1.1.2. Sadržaj metala u medu

Koncentracija metala je bila mnogo niža u medu u odnosu na pčele i pergu.

Najveće koncentracije bakra (0,98 µg/g), gvožđa (2,75 µg/g), kalijuma (1755,00 µg/g), magnezijuma (101,50 µg/g), mangana (7,61 µg/g) i cinka (3,14 µg/g) su izmerene u medu poreklom iz ruralne oblasti. U medu iz urbane oblasti je bila najveća količina kalcijuma (76,98 µg/g) i natrijuma (15,47 µg/g) (Tabela 6).

Koncentracija hroma je u svim uzorcima bila ispod limita detekcije, a sadržaj kadmijuma (0,03 µg/g) i kobalta (0,04 µg/g) je bio iznad limita jedino u uzorku iz ruralne oblasti. U medu iz ruralne oblasti je takođe izmerena najveća koncentracija aluminijuma (7,26 µg/g) barijuma (0,21 µg/g), nikla (0,60 µg/g) i stroncijuma (0,19 µg/g). Sadržaj olova je bio iznad limita detekcije samo u medu iz industrijske oblasti, ali njegova koncentracija bila (0,29 µg/g) daleko niža nego u pčelama i pergi (Tabela 6).

Tabela 6. Sadržaj metala u medu uzorkovanom u avgustu 2013. godine na tri lokacije sa različitim antropološkim uticajem.

	Golija (ruralno područje)	Beograd (urbano područje)	Zajača (industrijsko područje)
Al	7,26	0,61	0,16
Ba	0,21	0,06	0,12
Cd	0,03	<DL	<DL
Ca	39,33	76,98	53,01
Co	0,04	<DL	<DL
Cr	<DL	<DL	<DL
Cu	0,98	0,37	0,19
Fe	2,75	1,83	0,60
K	1755,00	1263,00	712,20
Mg	101,50	34,40	28,83
Mn	7,61	0,38	2,54
Na	7,78	15,47	11,73
Zn	3,14	0,57	1,17
Ni	0,60	0,07	0,06
Pb	<DL	<DL	0,29
Sr	0,19	0,16	0,09

Koncentracije metala su izražene u µg/g.

DL- limit detekcije.

Iz podataka dobijenih o sadržaju bioelemenata i toksičnih metala, zaključeno je da ruralna oblast (Golija) koja je planirana da predstavlja kontrolu s obzirom da se nalazi

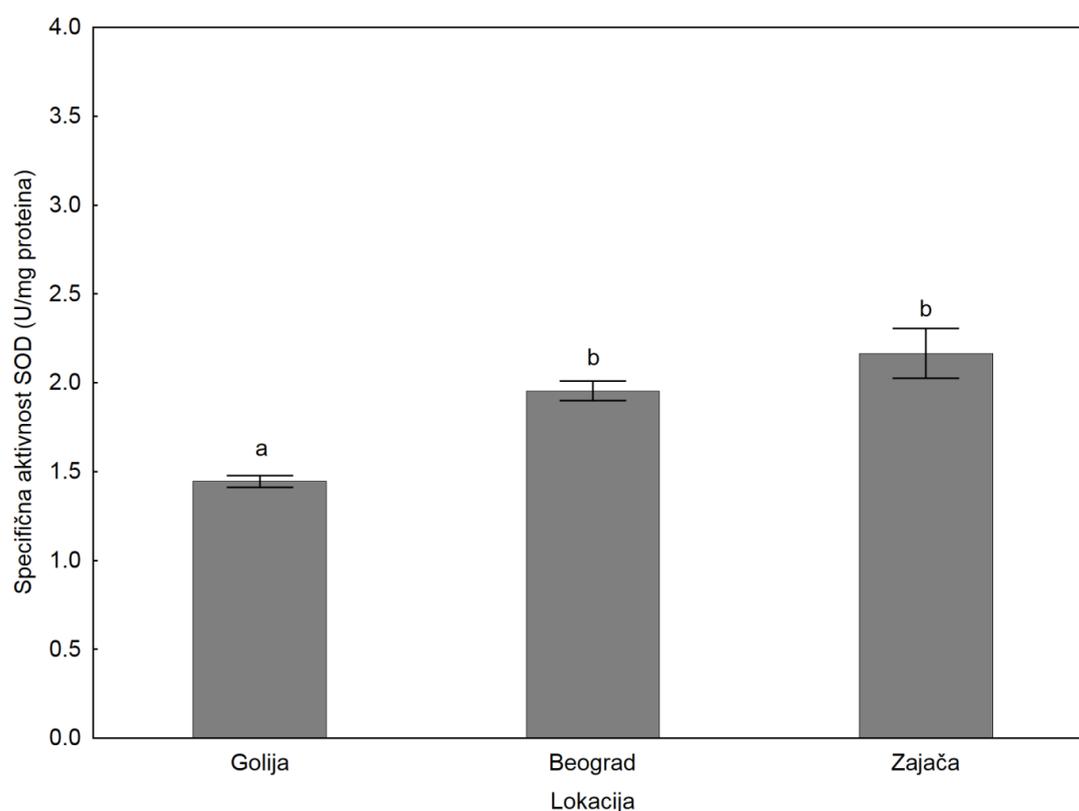
na malo naseljenoj planini, ipak nije izolovana od prisustva toksičnih metala, i da je sadržaj pojedinih elemenata veoma sličan kao u industrijskoj oblasti (Zajača). Ipak, Golija je zadržana kao kontrola za računanje relativne ekspresije gena i statističke obrade podataka o aktivnosti enzima.

5.1.2. Aktivnost antioksidativnih enzima

Rezultati merenja aktivnosti antioksidativnih enzima su pokazali da postoje značajne razlike između lokacija sa različitim antropogenim uticajem.

5.1.2.1. Aktivnost superoksid dismutaze

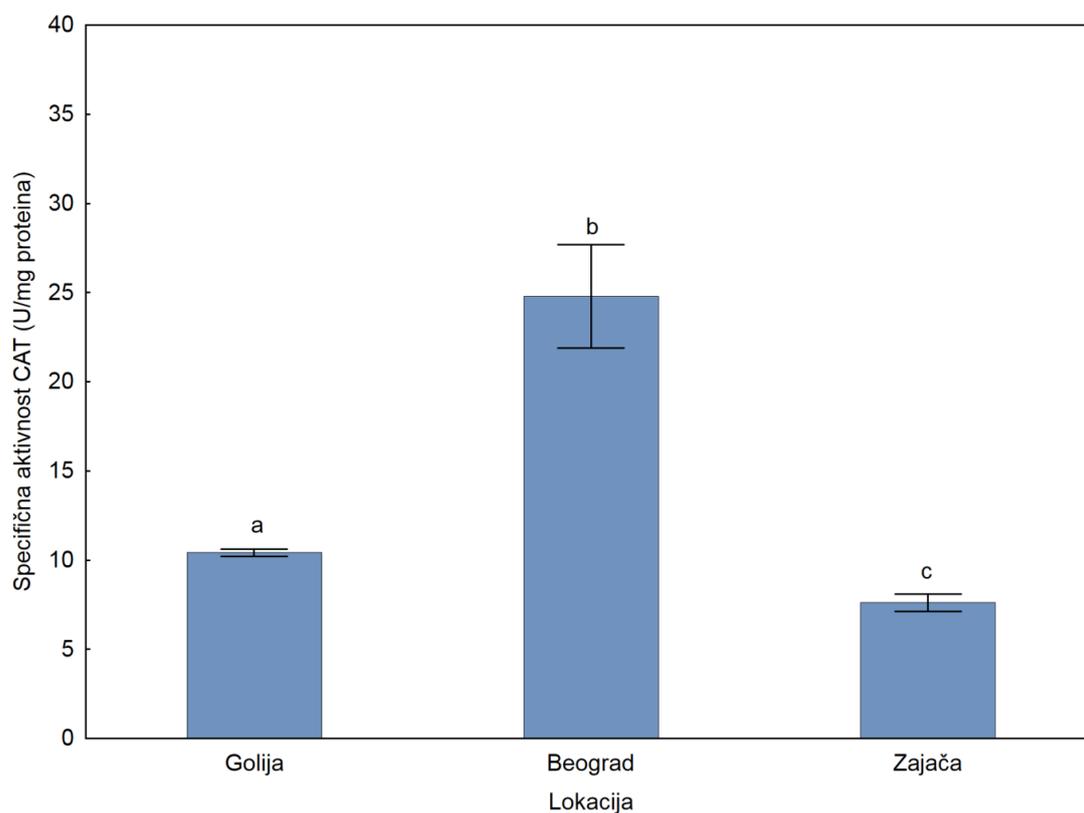
Ukupna specifična aktivnost superoksid dismutaze u homogenatima celih pčela je prikazana na Slici 11. Najveća aktivnost izmerena je u uzorcima pčela iz industrijske oblasti (Zajača). Aktivnost je takođe bila značajno povećana u urbanoj oblasti (Beograd) u odnosu na uzorke iz ruralne sredine (Golija).



Slika 11. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) izražena u jedinicama enzima po miligramu ukupnih proteina i predstavljena kao srednja vrednost (\bar{A}) \pm standardna greška (SE) u pčelama iz ruralne (Golija), urbane (Beograd) i industrijske (Zajača) oblasti. Podaci su obrađeni jednodimenzionalnom analizom varijanse (ANOVA) i post-hoc Tukey testom. Različito slovo predstavlja statistički značajne razlike između grupa za nivo značajnosti $p < 0,05$.

5.1.2.2. Aktivnost katalaze

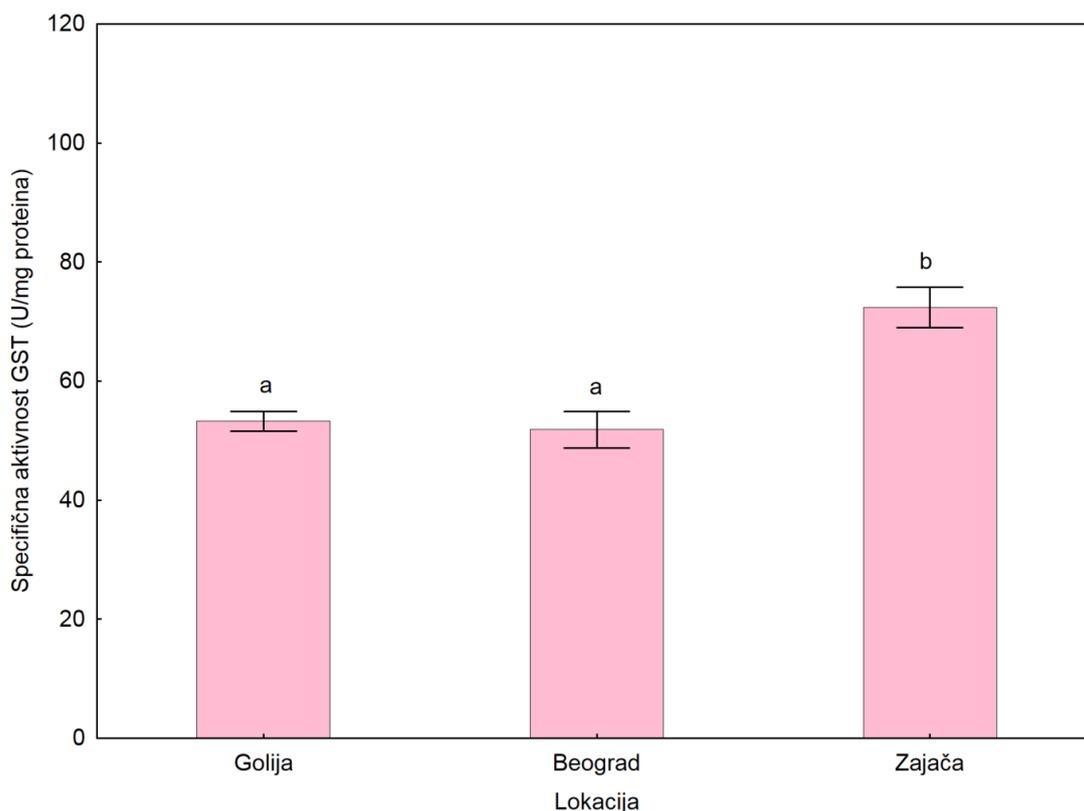
Specifična aktivnost katalaze u populacijama sa tri različite lokacije je izmerena u 10% (w/v) homogenatima celih pčela i prikazana na Slici 12. Aktivnost u pčelama iz Beograda je bila značajno veća, dok je niža aktivnost zabeležena u uzorcima iz industrijske oblasti (Zajača).



Slika 12. Specifična aktivnost katalaze (CAT) izražena u jedinicama enzima po miligramu ukupnih proteina i predstavljena kao srednja vrednost (\bar{A}) \pm standardna greška (SE) u pčelama iz ruralne (Golija), urbane (Beograd) i industrijske (Zajača) oblasti. Podaci su obrađeni jednodimenzionalnom analizom varijanse (ANOVA) i post-hoc Tukey testom. Različito slovo predstavlja statistički značajne razlike između grupa za nivo značajnosti $p < 0,05$.

5.1.2.3. Aktivnost glutation *S*-transferaze

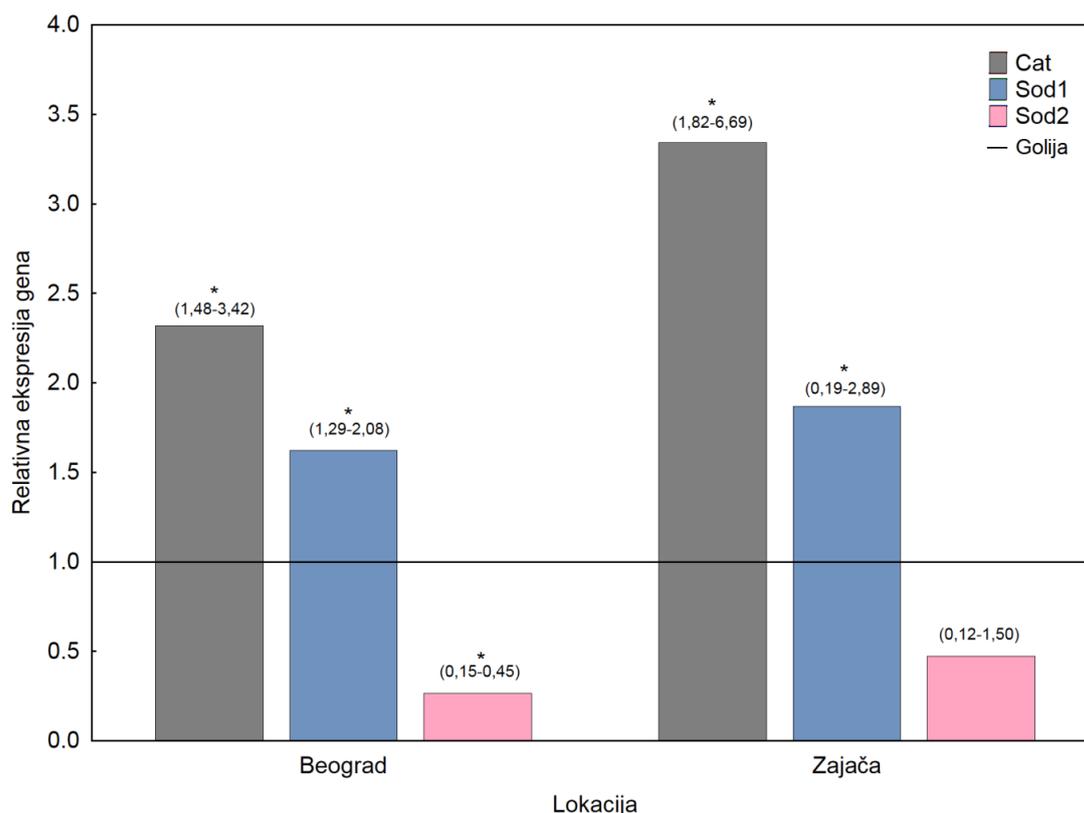
Ukupna specifična aktivnost glutation *S*-transferaze u homogenatima celih pčela je prikazana na Slici 13. Ukupna specifična aktivnost glutation *S*-transferaze bila je povišena u uzorcima pčela iz industrijske oblasti (Zajača) u poređenju sa uzorcima iz ruralne (Golija) i urbane oblasti (Beograd).



Slika 13. Specifična aktivnost glutation *S*-transferaze (GST) izražena u jedinicama enzima po miligramu ukupnih proteina i predstavljena kao srednja vrednost (\bar{A}_r) \pm standardna greška (SE) u pčelama iz ruralne (Golija), urbane (Beograd) i industrijske (Zajača) oblasti. Podaci su obrađeni jednodimenzionalnom analizom varijanse (ANOVA) i post-hoc Tukey testom. Različito slovo predstavlja statistički značajne razlike između grupa za nivo značajnosti $p < 0,05$.

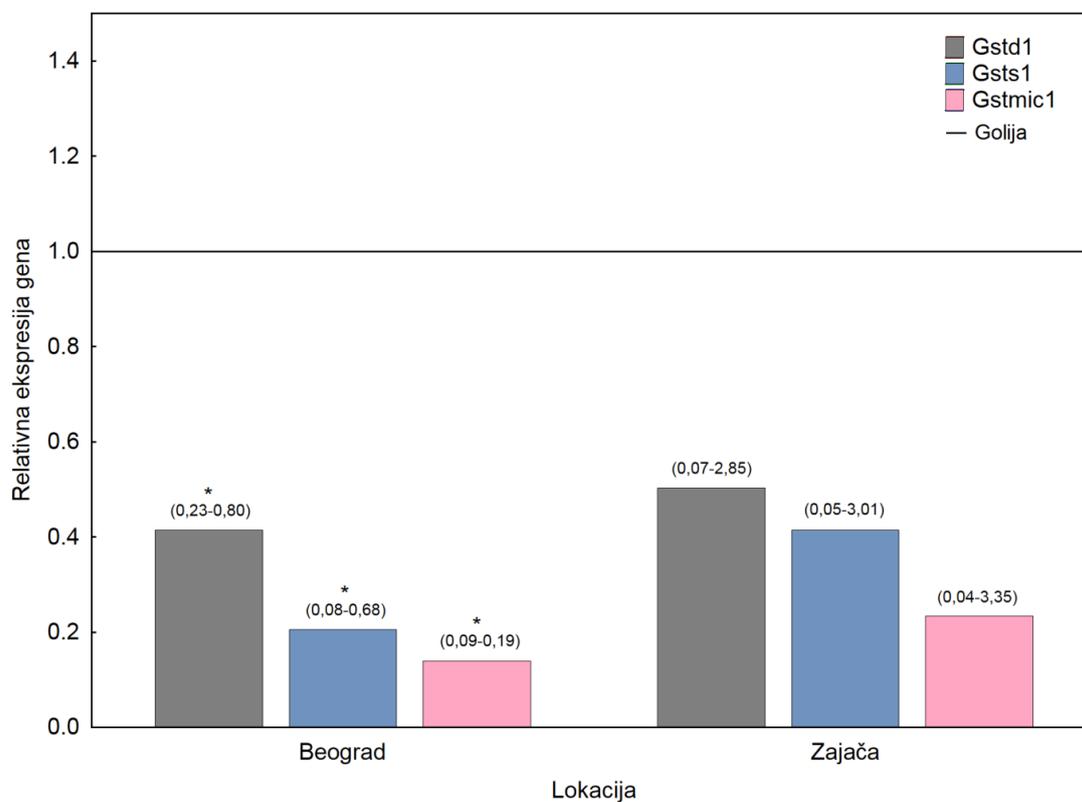
5.1.3. Ekspresija gena za antioksidativne enzime

U avgustu 2013. godine, ekspresija *Sod1* gena za citosolnu Cu,Zn-SOD (Slika 14) je bila povećana u pčelama iz urbanog i industrijskog područja u poređenju sa ruralnom oblasti koja je korišćena kao kontrolna grupa. Nasuprot tome, relativna ekspresija *Sod2* gena za mitohondrijalnu Mn-SOD je bila snižena u pčelama iz urbanog područja. Rezultati qPCR-a su takođe pokazali povećanu ekspresiju *Cat* gena kod pčela iz urbanog i industrijskog područja u poređenju sa kontrolom (Slika 14).



Slika 14. Relativna ekspresija gena za katalazu (*Cat*) i dva gena za superoksid dismutazu (*Sod1* i *Sod2*) u pčelama iz Beograda (urbana oblast) i Zajače (industrijska oblast) u poređenju sa ruralnom oblasti (Golija) (relativna ekspresija=1). Relativna genska ekspresija je izračunata pomoću programa REST2009 i testirana za statistički značajne razlike između kontrolne i ciljnih grupa integrisanim „Bootstrap randomization” testom. Statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom za nivo značajnosti $p < 0,05$ su označene zvezdicom (*). Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića.

Relativna ekspresija gena koji kodiraju tri klase GST, *Gstd1*, *Gsts1* i *Gstmic1* nije bila promenjena u pčelama iz industrijske oblasti, ali je bila smanjena u pčelama iz urbanog područja, u poređenju sa kontrolom iz ruralne oblasti (Slika 15).



Slika 15. Relativna ekspresija tri gena za glutation *S*-transferaze (*Gstd1*, *Gsts1* i *Gstmic1*) u pčelama iz Beograda (urbana oblast) i Zajače (industrijska oblast) u poređenju sa ruralnom oblasti (Golija) (relativna ekspresija=1). Relativna genska ekspresija je izračunata pomoću programa REST2009 i testirana za statistički značajne razlike između kontrolne i ciljnih grupa integrisanim „Bootstrap randomization” testom. Statistički značajne razlike u poređenju sa kontrolom za nivo značajnosti $p < 0,05$ su označene zvezdicom (*). Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića.

5.2. Rezultati laboratorijskih testova

5.2.1. Mortalitet i unos hrane

Pčele radilice su u laboratorijskim uslovima hranjene 1 M rastvorom saharoze koji je sadržao CuCl₂, PbCl₂ ili CdCl₂ u pet različitih koncentracija. Mortalitet je procenjen nakon 48 h i predstavljen u Tabeli 7. Značajno veći mortalitet je zabeležen u grupi koja je hranjena sa najvećom koncentracijom CuCl₂. Procenjena količina metala koju je svaka pčela unela je izračunata iz količine rastvora saharoze koje su pčele pojele u toku 48 h (Tabela 7).

Tabela 7. Količina konzumiranog metala (u µg) po pčeli i procenat mortaliteta nakon tretmana sa bakrom, olovom ili kadmijumom u trajanju od 48 h.

Grupa	Koncentracija metala u rastvoru za hranjenje (mg/L)	Doza metala (µg po pčeli)	Mortalitet (%)
Cu kontrola	0	0	16,67
Cu 0,1	0,1	0,0187	25,00
Cu 1	1	0,2341	38,33
Cu 10	10	2,0344	8,33
Cu 100	100	17,5813	10,00
Cu 1000	1000	69,5313	46,67*
Pb kontrola	0	0	8,33
Pb 0,1	0,1	0,0147	11,67
Pb 1	1	0,1367	8,33
Pb 10	10	1,4000	15,00
Pb 100	100	14,1667	5,00
Pb 1000	1000	84,1667	13,33
Cd kontrola	0	0	13,33
Cd 0,001	0,001	0,0002	30,00
Cd 0,01	0,01	0,0016	11,67
Cd 0,1	0,1	0,0204	20,00
Cd 1	1	0,1687	11,67
Cd 10	10	1,5130	30,00

Eksperimentalne grupe su nazvane po metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu za nivo značajnosti $p < 0,05$ je označena zvezdicom (*).

5.2.2. Aktivnost antioksidativnih enzima i redoks status

5.2.2.1. Aktivnost antioksidativnih enzima

Specifična aktivnost katalaze, superoksid dismutaze i glutation S-transferaze, glavnih enzima antioksidativne zaštite, izmerena je u homogenatu celih pčela koje su tretirane različitim koncentracijama bakra, kadmijuma i olova i prikazane su u Tabeli 8.

Tabela 8. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation S-transferaze (GST) u homogenatu celih pčela tretiranih sa bakrom, olovom i kadmijumom u trajanju od 48 h.

	SOD	CAT	GST
Cu kontrola	52,28±9,03	138,20±15,69	31,95±4,56
Cu 0,1	64,87±2,53	176,20±15,06	27,93±2,98
Cu 1	60,74±8,50	117,39±4,50	37,02±3,69
Cu 10	65,65±5,13	143,80±8,29	32,22±3,50
Cu 100	53,25±4,14	144,65±16,14	19,49±3,60
Cu 1000	54,25±2,31	122,32±9,98	16,91±2,09
	SOD	CAT	GST
Pb kontrola	77,45±8,34	167,44±17,93	34,25±3,96
Pb 0,1	100,45±7,36	223,45±17,83	39,52±5,16
Pb 1	66,43±9,05	162,22±17,60	24,91±5,68
Pb 10	92,98±9,09	172,73±42,93	38,66±8,94
Pb 100	98,79±17,92	281,54±22,52	59,62±9,02
Pb 1000	95,36±8,62	280,54±22,60*	51,17±5,04
	SOD	CAT	GST
Cd kontrola	60,98±5,56	165,46±9,68	24,17±3,01
Cd 0,001	47,03±2,38	102,01±3,64*	18,06±2,93
Cd 0,01	41,10±5,40	113,53±8,29	21,24±3,65
Cd 0,1	74,32±7,47	168,15±16,56	22,65±2,52
Cd 1	52,08±2,36	127,39±13,09	21,77±1,45
Cd 10	50,48±7,78	114,94±16,70	21,71±2,68

Eksperimentalne grupe su nazvane prema metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Rezultati su predstavljeni u jedinicama aktivnosti po miligramu proteina (U/mg proteina), kao srednja vrednost ± standardna greška i statistički obrađeni pomoću post-hoc Tukey testa. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu za nivo značajnosti $p < 0,05$ su označene zvezdicom (*).

Specifična aktivnost antioksidativnih enzima nije bila promenjena, sa izuzetkom povećane aktivnosti katalaze kod pčela tretiranih najvećom koncentracijom olova (1000 mg/L) i smanjene aktivnosti katalaze kod pčela tretiranih najmanjom koncentracijom kadmijuma (0,001 mg/L).

5.2.2.2. Koncentracija malondialdehida, sulfhidrilnih grupa i glutationa

Redoks status pčela je procenjen merenjem koncentracije malondialdehida, sulfhidrilnih grupa proteina i redukovano glutationa. Koncentracija ova tri parametra nije bila značajno promenjena nakon tretmana sa bakrom, dok je u slučaju kadmijuma smanjena količina sulfhidrilnih grupa kod pčela tretiranih sa 0,01 mg/L CdCl₂. Sadržaj glutationa je bio povećan kod pčela tretiranih sa 1 i 10 mg/L PbCl₂, a sulfhidrilne grupe proteina su povećane kod pčela tretiranih sa 0,1, 10 i 1000 mg/L PbCl₂ (Tabela 9).

Tabela 9. Koncentracija glutationa (GSH), sulfhidrilnih grupa proteina (SH) i malondialdehida (MDA) u nmol/mg proteina u homogenatu celih pčela tretiranih sa bakrom, olovom i kadmijumom u trajanju od 48 h.

	GSH	SH	MDA
Cu kontrola	0,035±0,004	0,255±0,040	1,950±0,160
Cu 0,1	0,039±0,004	0,333±0,078	1,459±0,145
Cu 1	0,045±0,006	0,378±0,093	2,728±0,056
Cu 10	0,039±0,004	0,207±0,033	1,990±0,170
Cu 100	0,025±0,002	0,213±0,059	1,890±0,100
Cu 1000	0,027±0,002	0,258±0,037	1,590±0,120
	GSH	SH	MDA
Pb kontrola	0,033±0,003	0,203±0,019	1,480±0,230
Pb 0,1	0,059±0,009	0,378±0,042*	2,980±0,590
Pb 1	0,065±0,010*	0,352±0,033	3,300±0,520
Pb 10	0,082±0,005*	0,539±0,079*	2,910±0,740
Pb 100	0,076±0,009	0,353±0,047	3,120±0,580
Pb 1000	0,063±0,005	0,453±0,057*	3,530±0,580
	GSH	SH	MDA
Cd kontrola	0,045±0,004	0,272±0,066	3,210±0,820
Cd 0,001	0,028±0,004	0,289±0,101	2,490±0,550
Cd 0,01	0,030±0,003	0,069±0,006*	1,880±0,150
Cd 0,1	0,060±0,015	0,289±0,101	2,490±0,370
Cd 1	0,035±0,005	0,175±0,049	1,300±0,220
Cd 10	0,026±0,005	0,142±0,032	1,760±0,500

Ekperimentalne grupe su nazvane prema metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Rezultati su predstavljeni u nmol po miligramu proteina, kao srednja vrednost ± standardna greška i statistički obrađeni pomoću post-hoc Tukey testa.

Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu za nivo značajnosti $p < 0,05$ su označene zvezdicom (*).

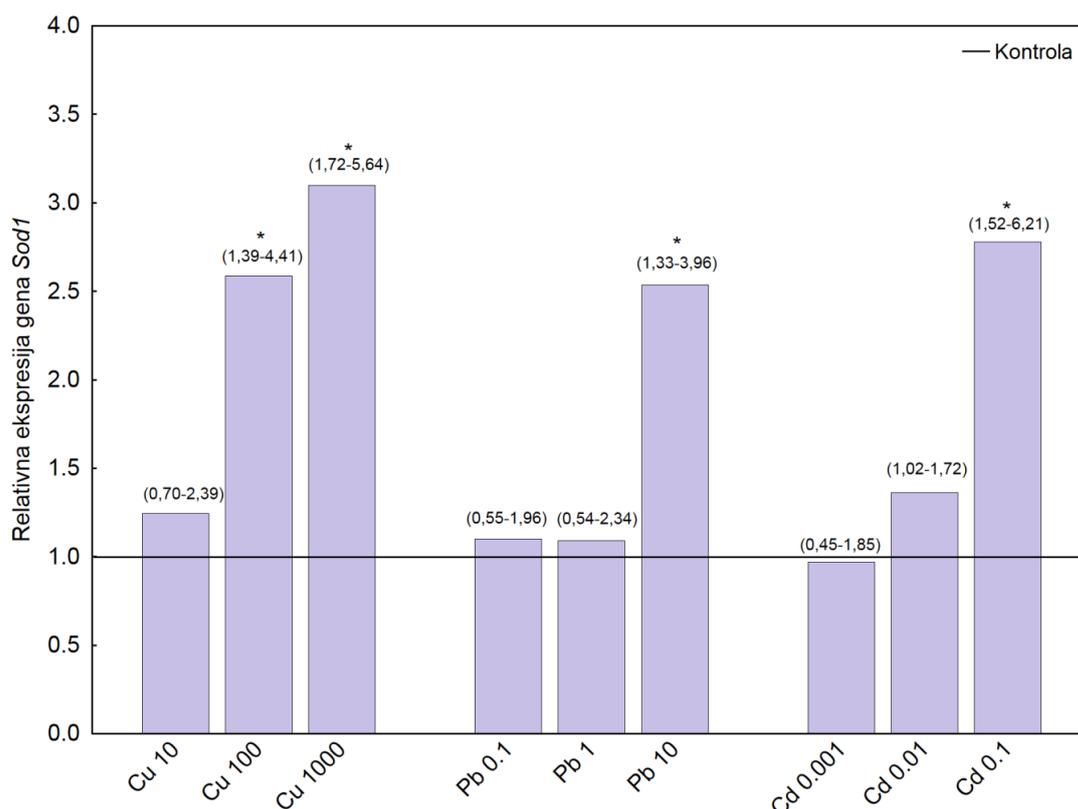
5.2.3. Ekspresija gena za antioksidativne enzime

Pčele su hranjene 1 M rastvorom saharoze sa rastućim koncentracijama CdCl_2 , CuCl_2 i PbCl_2 u toku 48 h. Analiza 6 gena za antioksidativne enzime je pokazala da postoje značajne razlike u ekspresiji kod pčela tretiranih različitim metalima u različitim koncentracijama. Tretman sa bakrom i kadmijumom je doveo do povećane ekspresije gotovo svih gena (Slike 16-21), dok je olovo izazvalo povećanu ekspresiju jedino oba gena za superoksid dismutazu, i to u koncentraciji od 10 mg/L PbCl_2 (Slike 16 i 17). U većini slučajeva ekspresija je bila dozno zavisna od koncentracije metala.

5.2.3.1. Ekspresija gena za superoksid dismutazu

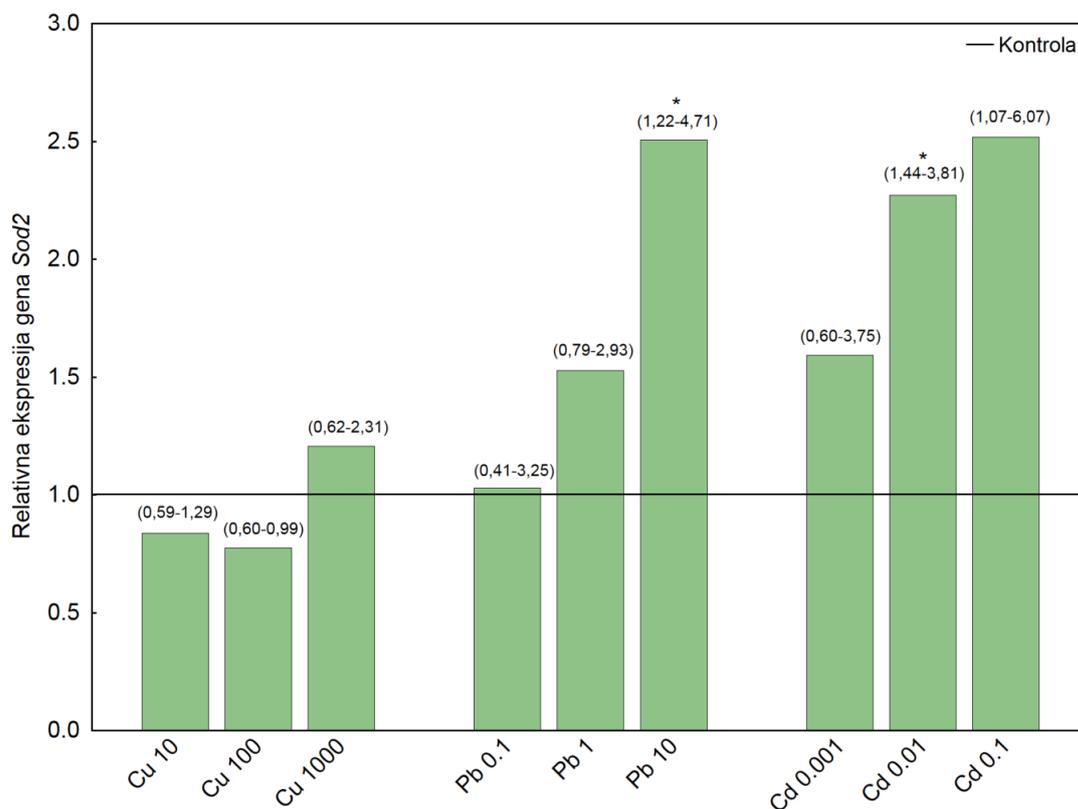
Nakon tretmana sa bakrom, olovom i kadmijumom, određena je relativna ekspresiju gena za dve izoforme superoksid dismutaze.

Ekspresija gena za citosolnu izoformu superoksid dismutaze, *Sod1*, se menjala pod uticajem sva tri metala (Slika 16). Koncentracije bakra od 100 mg/L i 1000 mg/L su indukovale povećanje ekspresije *Sod1*, kao i najveće analizirane koncentracije olova (10 mg/L) i kadmijuma (0,1 mg/L).



Slika 16. Relativna genska ekspresija *Sod1* kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze. Eksperimentalne grupe su nazvane prema metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Razlika u genskoj ekspresiji je analizirana pomoću programa REST2009. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) su označene zvezdicom (*). Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića.

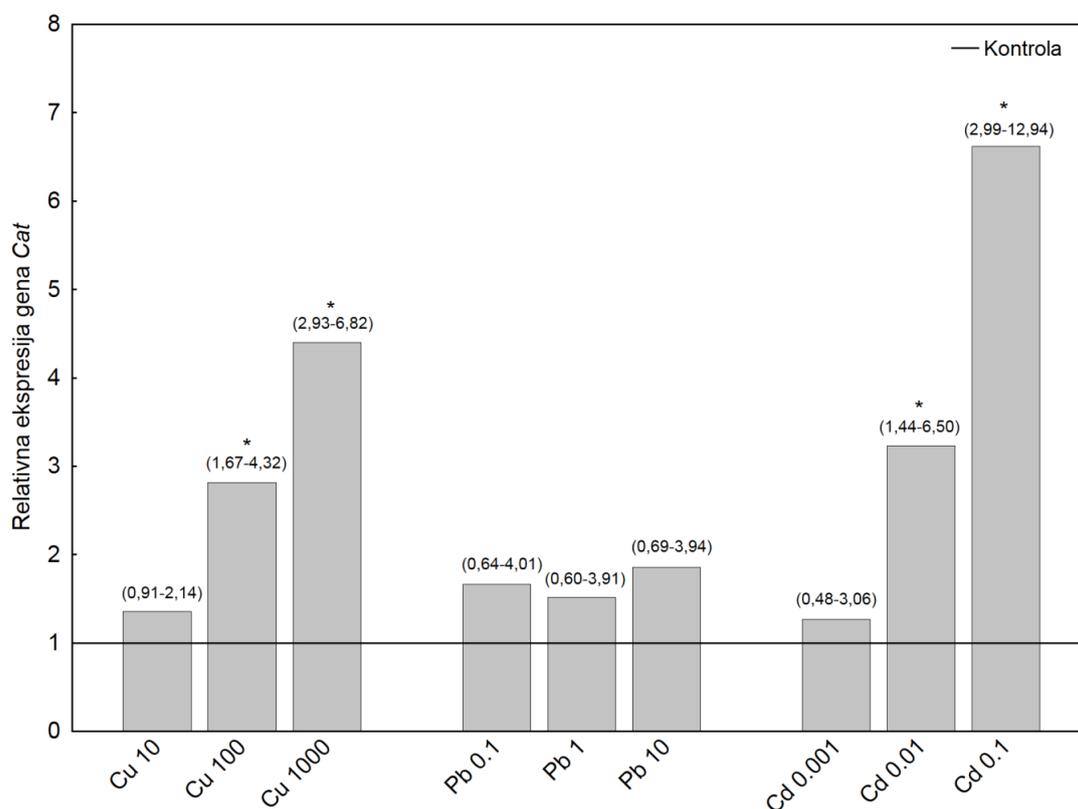
Gen za mitohondrijalnu superoksid dismutazu, *Sod2*, je pokazao manju osetljivost na date koncentracije bakra, olova i kadmijuma (Slika 17). Ekspresija ovog gena bila je povećana u grupama tretiranim sa 10 mg/L PbCl_2 i 0,01 mg/L CdCl_2 .



Slika 17. Relativna genska ekspresija *Sod2* kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze. Eksperimentalne grupe su nazvane prema metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Razlika u genskoj ekspresiji je analizirana pomoću programa REST2009. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) su označene zvezdicom (*). Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića.

5.2.3.2. Ekspresija gena za katalazu

Ekspresija gena za katalazu nije bila promenjena pod uticajem olova, ali je bila povećana nakon tretmana bakrom u koncentracijama 100 mg/L i 1000 mg/L i kadmijumom u koncentracijama 0,01 mg/L i 0,1 mg/L (Slika 18).

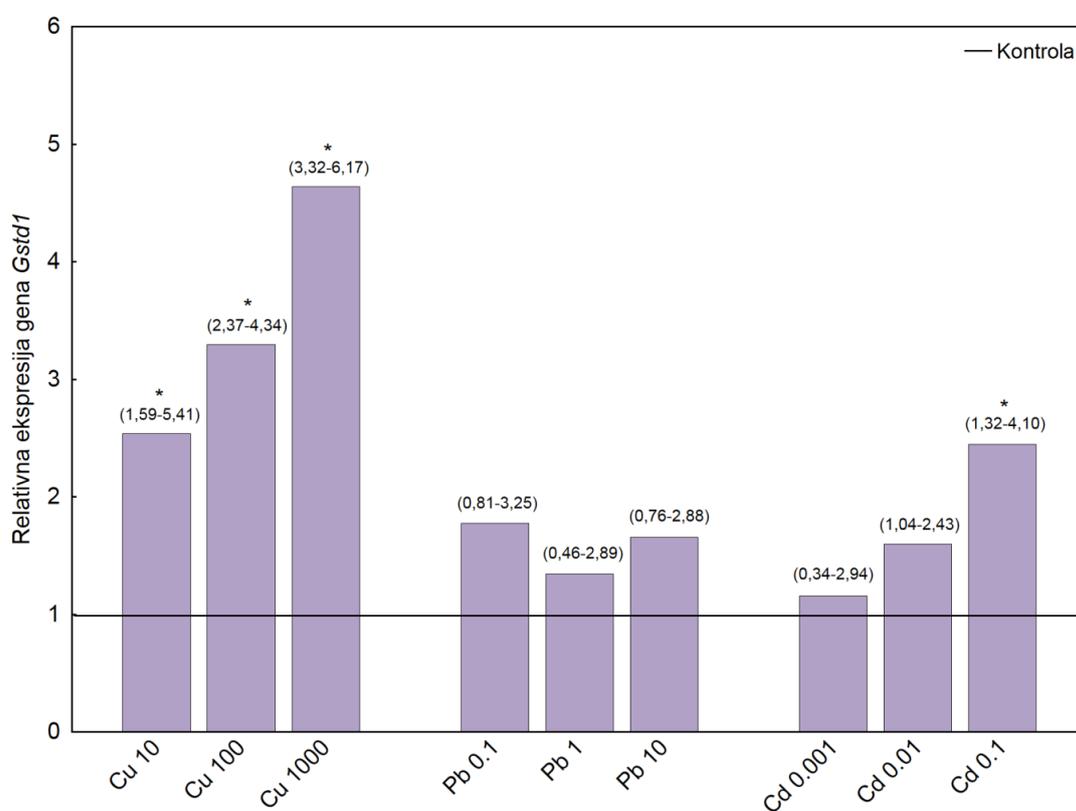


Slika 18. Relativna genska ekspresija *Cat* kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze. Eksperimentalne grupe su nazvane prema metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Razlika u genskoj ekspresiji je analizirana pomoću programa REST2009. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) su označene zvezdicom (*). Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića.

5.2.3.3. Ekspresija gena za glutacion S-transferazu

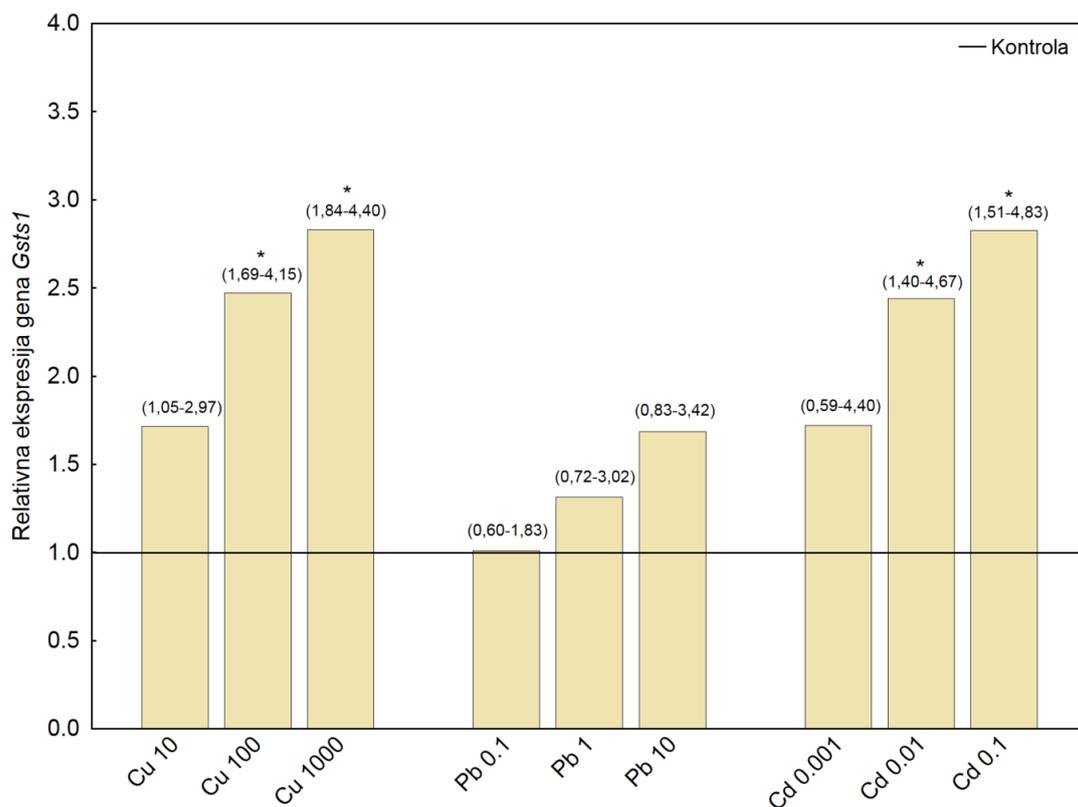
Ispitan je uticaj tretmana sa bakrom, olovom i kadmijumom na ekspresiju gena za tri izoforme glutacion S-transferaze. Olovo nije uticalo na ekspresiju ovih gena, dok je ekspresija pod uticajem bakra i kadmijuma bila promenjena u dozno zavisnom maniru.

Ekspresija gena za glutacion S-transferazu Delta klase, *Gstd1*, bila je promenjena u prisustvu bakra i kadmijuma. Sve tri date koncentracije bakra i najveća primenjena koncentracija kadmijuma (0,1 mg/L) su indukovale ekspresiju ovog gena (Slika 19).



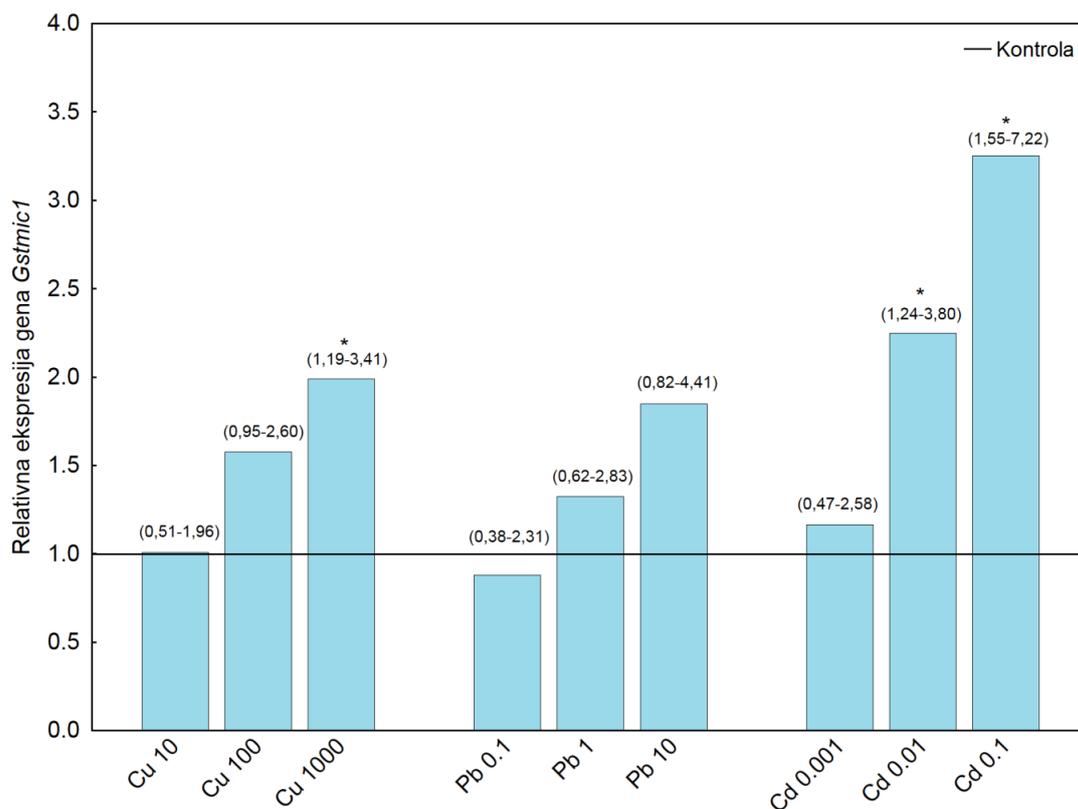
Slika 19. Relativna genska ekspresija *Gstd1* kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze. Eksperimentalne grupe su nazvane prema metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Razlika u genskoj ekspresiji je analizirana pomoću programa REST2009. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) su označene zvezdicom (*). Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića.

Gen za enzim iz Sigma klase GST, *Gsts1* je pokazao povećanu ekspresiju nakon izlaganja bakru u koncentracijama 100 mg/L i 1000 mg/L i kadmijumu u koncentracijama 0,01 mg/L i 0,1 mg/L (Slika 20).



Slika 20. Relativna genska ekspresija *Gsts1* kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze. Eksperimentalne grupe su nazvane prema metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Razlika u genskoj ekspresiji je analizirana pomoću programa REST2009. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) su označene zvezdicom (*). Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića.

Ekspresija mikrozomalne klase GST, *Gstm1c1*, je takođe bila indukovana pod uticajem bakra u najvećoj primenjenoj koncentraciji (1000 mg/L) i kadmijuma u koncentracijama 0,01 mg/L i 0,1 mg/L (Slika 21).



Slika 21. Relativna genska ekspresija *Gstm1c1* kod pčela tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze. Eksperimentalne grupe su nazvane prema metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Razlika u genskoj ekspresiji je analizirana pomoću programa REST2009. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) su označene zvezdicom (*). Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića.

AmMT gen (GB49759) se nalazi na hromozomu 2:11.186.089-11.187.768, reverzni lanac. Ovaj gen ima jedan transkript (jednu varijantu splajsinga). Transkript (GB49759-RA) dužine 684 bp ima tri kodirajuća egzona, i kodira protein dug 48 amino-kiselina (GB49759-PA). Gen *AmMT* i njegova cDNK i proteinska sekvenca su predstavljene na Slici 22. Predviđena iRNK za metalotionein je bila dostupna u NCBI bazi podataka, pod pristupnim brojem XM_001120071.1 dok nije objavljen Annotation Software Version 5.2 (07.01.2014.).

5.3.1.2. Predviđena mesta za vezivanje transkripcionih faktora u promotorskom regionu *AmMT* gena

Mesta za vezivanje transkripcionih faktora u regionu dužine 1500 bp uzvodno od mesta početka translacije su određena pomoću odgovarajućih softvera. U promotorskom regionu je identifikovan responsivni element za metale MRE (*engl.* metal-responsive element). Region od 1500 bp sa označenim MRE je prikazan na Slici 23. Predviđeni transkripcioni faktori sa svojim funkcijama i responsivnim elementima su predstavljeni u Tabeli 10. Tabela sa pozicijama reaponsivnih elemenata u promotorskom regionu je data u Prilogu 1.

```

AATTAATTTATCTCCTAAAGTAAATACAAATAAAACAAGAGGTAAATATAAATTTTGTTTAAATACATTAATCATAATTTTATTTTGT
TAATATTTTTTTTTATTTTATAAGACAACAAAACTCTAGAAAAATTCAGTACACCTAAAAATCAATTTGTACTTCTCTAGAGTTT
CATATAAACTTCCCTTACAAATTTAAAACGGTATGTTTTATTTTTTATATTTTTTCTTTATTTCTGAAAAATGTGTTCAATTCATTACA
TTTTTAGATAACGGGAAACAAATCATGTAAGCAAGGAACTCGCGTTAAGAAATTTACTGGAACTGCTCAAAGTAAAATTTGTTATCC
GACATCAAGGTACATATATATGAAAAATATATAGTTTTATAATATGTTTATTTATTTAAAAATTTTCTTACAGGTCGGATTAA
TTCCGGCACAGAAAGGAAAGAGTACAACAGATATTGGAATGTATGAAATTAATTATGAACCTGAAGATGAATCTATACATATTGAAC
AAACTGCTAATAAAAACAAATTTTATTAATAAGTGAAAAATTAATTTAAAAGAATATGAATTGCATATTTGCAATAATGTTGATAT
TTTATATTTTCATTACAATTTGAAAAAAAAGCAATAATAAAGTATATATAATTTTGTTTAATTTTAAATTTATTTTTTTCCAAAA
AAATTTGATATAAATTTTTCTTTTCAATTTATTAAGTGGTATAAAATAATATTCATGAAAAATTTTCTTAAATTTTCATTTTATA
TTCTAAAAGATTCCAAAGAAAAAATAAAATAAATAATCATTCTAATTATAAACTGACCTATTTTTCGTAATAATTTCTAG
AATGAACATAAACTTAATTCATTTGAGCGTACTGTTCTTATCTCGTAATGTTGTGTAACGTGCAACATTTCTCATGGGCTCGTGC
TGCTAAAACAGGGATGTAATTTATATATTTGTACCTTTTCATTTCTAATCTTTAGTAATAGAATTTGATAAAAAATAAAAAATGTA
TTTTATACATAGATTAATTTAAAATAATAAATTTATATAGGTTAAAATTTTCTTTTATCAATAATTTTTAAAAATTTCTATGTTT
TAGTATATATAATGCAAGATTTAATGCAGTAACCGAAATAATATTTAAAAAATAAAAAATTTTAAAAAATTTTAGATAGAAC
TTTGTATTTGGAAATATATAAAATAATTTAAACCTATAAATAATGTAATAATTGCAAAATATTAATAAAAAAATAAAAAATTTT
AATAGTAAAATTTAGTATGAAGTTTGAATTGATACGTTCTGATTTGCGCATGGCACGTTAGTTGCACACGACATTAAGATATGTT
AGTATAAGAGTGTTCATGGTAGGAGATGATCGATAAATTTGAACAGGATACGACCGAACTAAGTATGATCAGTCAAGCTTTGGAAGA
ATTTAAATCGTGATAATCATAATCATCTACAAGTAAAATG

```

Slika 23. Region 1500 bp uzvodno od otvorenog okvira čitanja. MRE i start kodon su istaknuti tamnim slovima.

Tabela 10. Pregled mogućih transkripcionih faktora i responsivnih elemenata na DNK i njihova funkcija.

Transkripcioni faktor	Mesto za vezivanje na DNK	Uloga
AP-1 Aktivatorni protein 1 (<i>engl. activator protein 1</i>)	AP-1 vezujući element (<i>engl. AP-1 binding element</i>)	Opšti odgovor na stres ¹
HSF Faktor toplotnog šoka (<i>engl. heat shock factor</i>)	Responsivni element toplotnog šoka (HSE, <i>engl. heat shock response element</i>)	Toplotni šok, opšti odgovor na stres ¹
Nrf2 Nuklearni faktor eritroid 2-povezani faktor 2 (<i>engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)	Antioksidativni responsivni element (ARE, <i>engl. antioxidant responsive element</i>), elektrofilni responsivni element (EpRE, <i>engl. electrophile responsive element</i>)	Indukcija antioksidativnih enzima i sistema za uklanjanje ROS ¹
MTF Metal-responsivni element vezujući transkripcioni faktor (<i>engl. metal responsive element binding transcription factor</i>)	Metal-responsivni element (MRE, <i>engl. metal-responsive element</i>)	Indukcija metalotioneina ¹
AhR Receptor za aromatične ugljovodonike (<i>engl. aryl hydrocarbon receptor</i>)	Responsivni element za ksenobiotike (XRE, <i>engl. xenobiotic responsive element</i>), responsivni element za dioksin (DRE, <i>engl. dioxin responsive element</i>), responsivni element za aromatične ugljovodonike (AhRE, <i>engl. aryl hydrocarbon responsive element</i>)	Indukcija enzima I i II faze biotransformacije ¹
HIF Hipoksijom indukovani faktor (<i>engl. hypoxia-inducible factor</i>)	Hipoksija responsivni element (HRE, <i>engl. hypoxia responsive element</i>)	Metabolički prelazi povezani sa hipoksijom ¹
NIT2 Familija nitrilaza, član 2 (<i>engl. nitrilase family, member 2</i>)	NIT responsivni element (<i>engl. NIT response element</i>)	Metabolički procesi jedinjenja azota ²
C/EBP-Beta CCAAT/enhenser vezujući protein Beta (C/EBP, <i>engl. CCAAT/enhancer binding protein, Beta</i>)	C/EBP-responsivni element (<i>engl. C/EBP-responsive element</i>)	Ćelijska diferencijacija, rast, preživljavanje i inflamacija ³
GR Glukokortikoidni receptor (<i>engl. glucocorticoid receptor</i>)	Glukokortikoid responsivni element (GRE, <i>engl. glucocorticoid response element</i>)	Rast, razvoj, reprodukcija, metabolizam, imuni odgovor i odgovor na stres ⁴
PPAR peroksizomalni proliferacijom aktivirani receptori (<i>engl. peroxisome proliferator activated receptor</i>)	PPAR responsivni element (PPRE, <i>engl. peroxisome proliferator hormone response element</i>)	Energetska homeostaza i metaboličke funkcije ⁵
NFAT Nuklearni faktor aktiviranih T-ćelija (<i>engl. nuclear factor of activated T-cells</i>)	NFAT vezujući element (<i>engl. NFAT binding element</i>)	Imuni odgovor ⁶
RAR-Alpha Receptor retinoične kiseline Alfa (<i>engl. retinoic acid receptor, Alpha</i>)	Responsivni element retinoične kiseline (RARE, <i>engl. retinoic acid response element</i>)	Ćelijski rast i diferencijacija ⁷

¹Van Straalen and Roelofs, 2012; ²Jaisson i sar., 2009; ³Miller i sar., 2003; ⁴Lu i sar., 2006; ⁵Tyagi i sar., 2011; ⁶Rao i sar., 1997; ⁷Lalévée i sar., 2011.

Tabela 11. Proteinske sekvence 34 metalotioneina korišćena za filogenetsku analizu i njihovi pristupni brojevi u UniprotKB bazi.

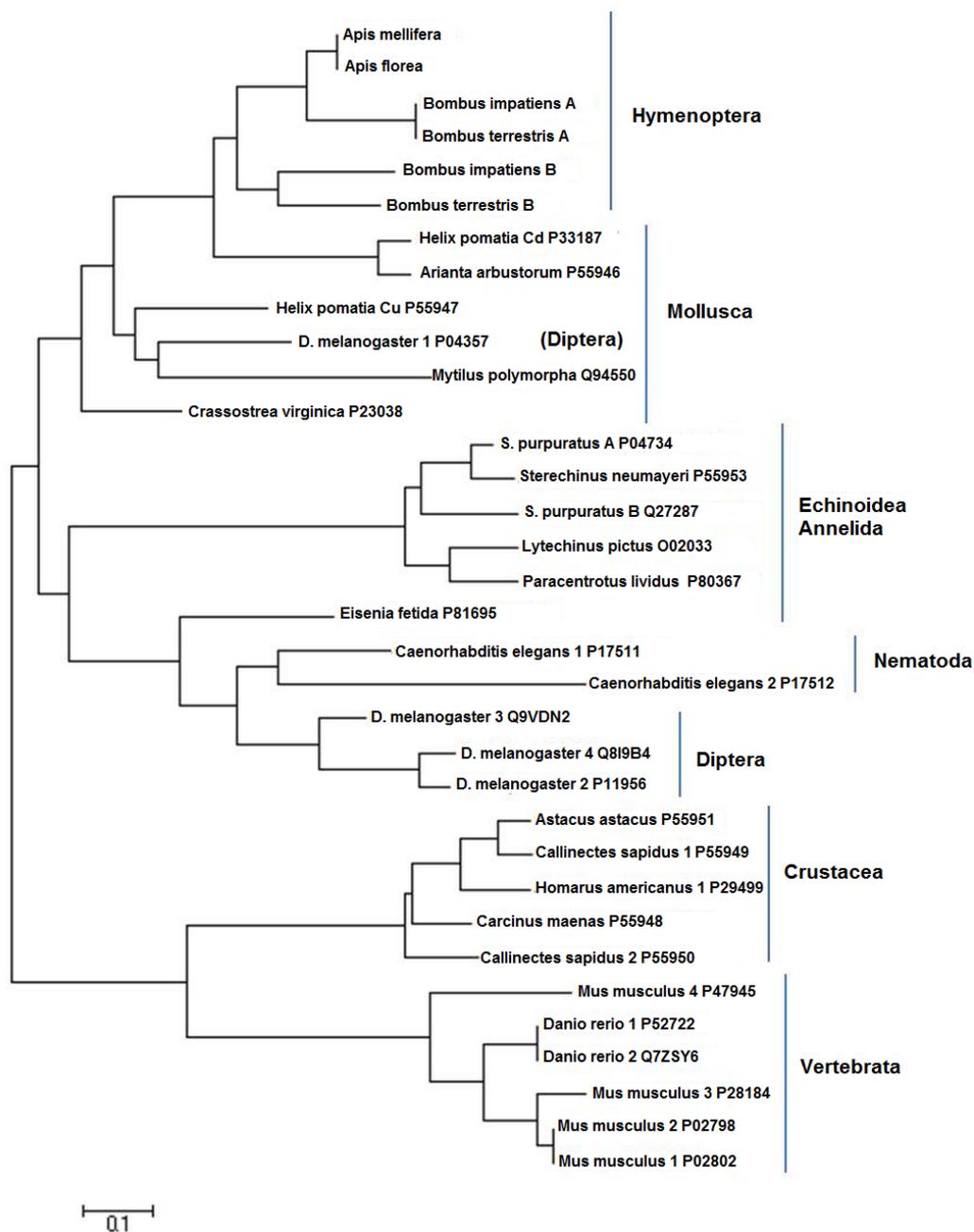
```

>D.melanogaster_1_P04357
MPCPCGSGCKCASQATKGCNCGSDCKCGGDKKSACGCSE
>D.melanogaster_2_P11956
MVCKGCGTNCQCSAQKCGDNCACNKDCQCVCKNGPKDQCCSNK
>D.melanogaster_4_Q8I9B4
MGCKACGTNCQCSATKCGDNCACSQQCQCCKNGPKDKCCSTKN
>D.melanogaster_3_Q9VDN2
MVCKGCGTNCQKQDTKCGDNCACNQDCKCVCKNGPKDQCCSKS
>Lytechinus_pictus_002033
MPGPDVKCFCCRDRGKECACGGGECCITGKCKEGRDRTCCGKCSNAACKCADGCKCEGACACTMGNCTC
>Strongylocentrotus_purpuratus_A_P04734
MPDVKCVCCKEGKECACFGQDCKTGECKDGTCCGICTNAACKCANGCKCGSGCSCTEGNCAC
>Strechinus_neumayeri_P55953
MPDVKCVCCKEGKECACGKCECTTGECKDGTCCGKCTNAACKCADGCKCGSGCSCTEGNCAC
>Paracentrotus_lividus_P80367
PDTKCVCCQDQKQPCAGQEQCCITGKCKDGDASVCCGTCNAACKCTGGCKCEGGCVCTEGNCTC
>Eisenia_fetida_P81695
DTQCCGKSTCAREGSTCCCTNCRCLKSECLPGCKKLCCADAEEKGKCGNAGCKCGAACKCSAGSCAAGCKKGCCGD
>Strongylocentrotus_purpuratus_B_Q27287
MPDVKCVCCKEGNECACTGQDCCTIGKCKDGTCCGKCSNAACKTCADGCTCGSGCSCTEGNCP
>Caenorhabditis_elegans_1_P17511
MACKCDCKNKQCKGDKCECSGDKCCEKYCCEEASEKKCCPAGCKGDCKCANCHCAEQKQCGDKTHQHGTAAAH
>Caenorhabditis_elegans_2_P17512
MVCKCDCKNQNCSCNTGTKDCDCSDAKCCEQYCCPTASEKKCKSGCAGGCKCANCECAQAAH
>Crassostrea_virginica_P23038
MSDPNCIETGTACSDSCPATGCKCGPGCKCGDDCKCAGCKVKCSCTSEGGCKCGEKCTGPATCKCGSGCSCKK
>Helix_pomatia_Cd_P33187
SGKGKGEKCTSACRSEPCQCGSKCQCGEGCTCAACKTCNCTSDGCKCGKECTGPDSCCKGSSCSCK
>Arianta_arbustorum_P55946
SGKGKGDLCCTAACKNEPCQCGSKCQCGEGCACASCKTCNCTSDGCKCGKECTGAASCKCNSSCSCK
>Helix_pomatia_Cu_P55947
SGRGKNGGACNSNPCSCGNDCKCAGAGCNDRCSCHCSNDDCKCGSQCTGSGSKCGSACGCK
>Mytilus_polymorpha_Q94550
MSDPNCVETGDCRCADGSCSDCSNCKCGDSCKSKPNCCGKNVTCKCGENCQCGVGCTGPDSCCTCDSGCSCK
>Homarus_americanus_1_P29499
PGPCCDKCEAEGGCKTGCKCTSCRCAPCEKCTSGCKCPSKDECAKTCPSKPCSCXX
>Carcinus_maenas_P55948
MPDPCCIDKCECKEGGCKAGCKCTSCRTPCEKCSSGCKCTTKEDCKTCTKPCSCCP
>Callinectes_sapidus_1_P55949
MPGPCCNDKVCQEGGCKAGCQCTSCRCSPCQKCTSGCKCATKEECSKTCTKPCSCCPK
>Callinectes_sapidus_2_P55950
MPDPCCNDKCECKEGETGTGCKCKSCRCPPCDKCSSECKCTSKEECSKTCSKPCSCCP
>Astacus_astacus_P55951
MPGPCCNDVCECAAGGCKTGCVCTSCRCSPCDKCTSGCKCPSKEECAKTCSPCECCP
>Danio_rerio_1_P52722
MDPCECAKTGACNCGATCKCTNCQCTTCKKSCCSCPPSGCSKASGCVCKGNSSCGTSCCQ
>Danio_rerio_2_Q7ZSY6
MDPCECAKTGTCNCGATCKCTNCQCTTCKKSCCSCPPSGCSKASGCVCKGNSSCGSSCCQ
>Mus_musculus_2_P02798
MDPNCSCASDGSCSACAGACKCKQCKCTSCCKKSCCSCPPVGAACKCSQGCICKEASDKCSCCA
>Mus_musculus_1_P02802
MDPNCSCSTGGSCCTTSSCACKNCKCTSCCKKSCCSCPPVGSKCAQGCVCCKGAADKCTCCA
>Mus_musculus_3_P28184
MDPETPCPTGGSCCTSDKCKCKGCKCTNCKKSCCSCPPAGCEKCAKDCVCKGEEGAKAEAEKSCCQ
>Mus_musculus_4_P47945
MDPGECTCMSGGICIGDNCCKTTCCKTCKRSCCPCPPGCAKARGCICKGSDKCSCCP

```

Nastavak Tabele 11.

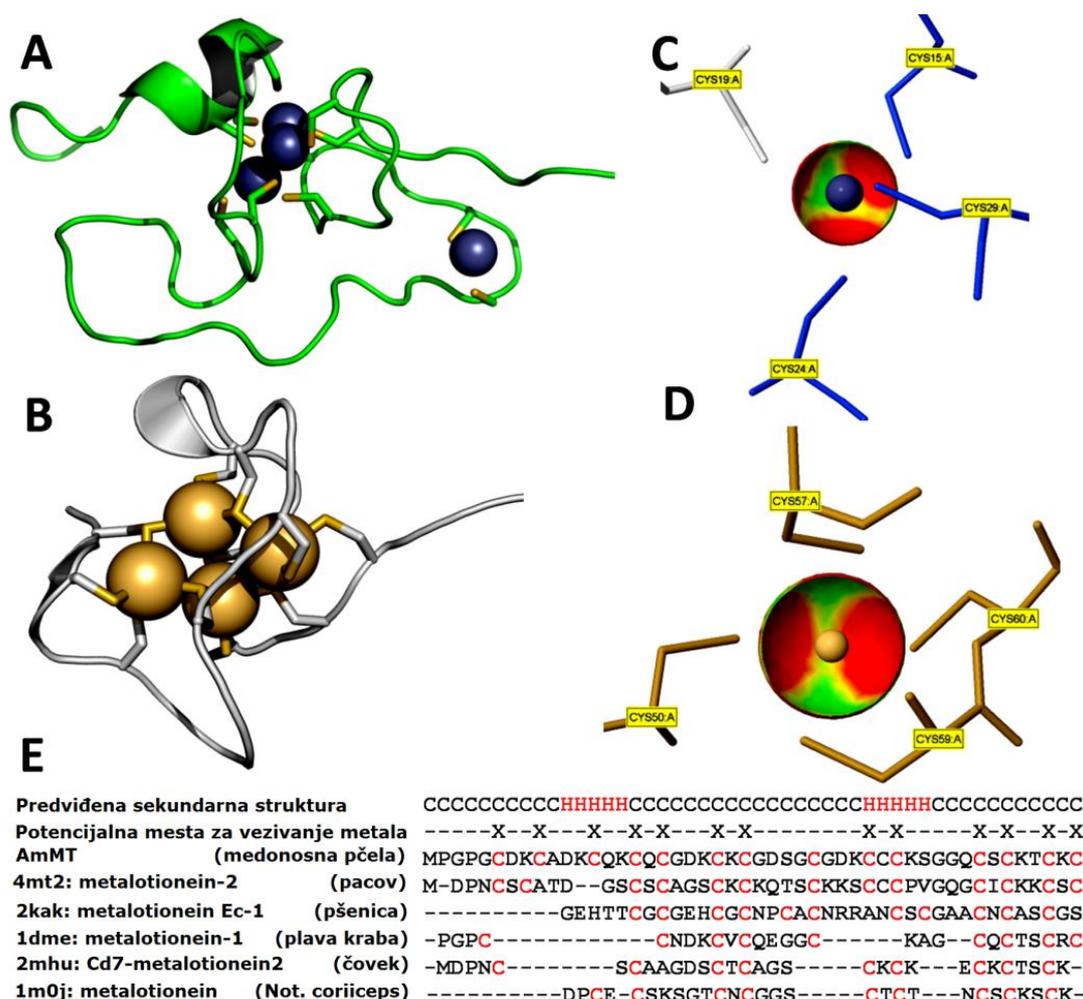
```
>Apis_mellifera
MPGPGCDKCADKQCQCGDKCKCGDSGCGDKCCCKSGGQCCKTCKC
>Bombus_impatiens_A
MPGPGCDKCSDKCQQCQCGDKCKCCVSSCGDKCACKSGEQCSCKPCKC
>Bombus_impatiens_B
MPGPACDKGSDKSQQCHCGEKCKCGDSSSADTCACKPGEQCSCNKK
>Bombus_terrestris_A
MPGPGCDKCSDKCQQCQCGDKCKCCVSSCGDKCACKSGGQCCKPCKC
>Bombus_terrestris_B
MPGPTEKESDKSQQCQCGEKCKCGDSAGADTCACKPGKECSCNKK
>Apis_florea
MPGPGCDKCADKQCQCGDKCKCGDSGCGDKCCCKSGGQCCKTCKC
```



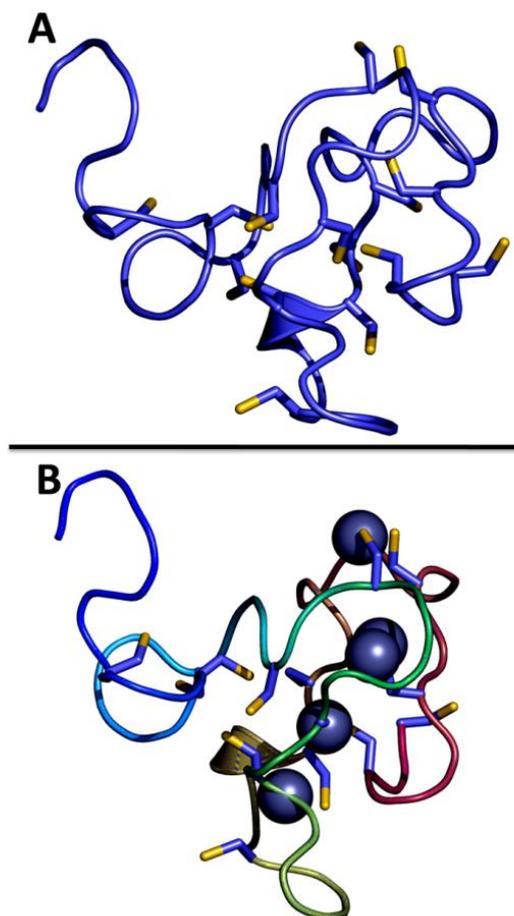
Slika 25. Filogenetsko stablo šest novih potencijalnih metalotioneina iz vrsta reda Hymenoptera i 28 proteina (sa UniProtKB pristupnim brojevima) koji su izabrani da predstavljaju šest familija životinjskih metalotioneina.

5.3.1.4. Molekularno modelovanje

Za ispitivanje osobina predviđenog metalotioneina AmMT kod medonosne pčele, urađeno je molekularno modelovanje i bioinformatička analiza strukture pomoću programa I-TASSER. Korišćenjem programa LOMETS u okviru I-TASSER-a su identifikovane matrice (predstavljene na Slici 26) koje su korišćene za predviđanje strukturnih osobina AmMT. Najbolji molekularni model i načini vezivanja prelaznih metala su prikazani na Slici 27.



Slika 26. Poravnanje sekvence AmMT sa strukturnim matricama korišćenim u programu za molekularno modelovanje I-TASSER kako bi se predvidele strukturne karakteristike AmMT. A) Struktura metalotioineina pšenice Ec-1 koji vezuje cink (PDB: 2kak). Joni cinka su predstavljeni kao plave sfere, a ostaci cisteina kao štapići. B) Mesto za vezivanje kadmijuma u metalotioneinu-2 pacova (PDB: 4mt2). Kadmijumovi joni su prikazani kao žute sfere, a ostaci cisteina koji vezuju metal su prikazani kao štapići. Detaljniji prikaz koordinativnog vezivanja cinka (C) i kadmijuma (D) za metalotionein-2 pacova (PDB: 4mt2). Četiri ostatka cisteina su uključena u koordinativno vezivanje svakog metalnog jona. E) Poravnanje sekvenci najbolje rangiranih strukturnih delova metalotioneina korišćenih u programu I-TASSER za predviđanje molekularne funkcije AmMT. Cisteinski ostaci koji vezuju metale u poravnatim fragmentima su istaknuti crvenom bojom. Cisteinski ostaci koji potencijalno mogu da učestvuju u vezivanju metala su označeni sa „X“.



Slika 27. Molekularni model i način vezivanja prelaznih metala za AmMT napravljen korišćenjem programa I-TASSER. A) Najbolje rangirani model AmMT, cisteinski ostaci koji mogu da učestvuju u koordinativnom vezivanju metala su prikazani kao štapići. B) Predviđena mesta za vezivanje metala u AmMT na osnovu rezultata sa COACH meta-servera u programu I-TASSER. Predviđeno je pet mesta za vezivanje prelaznih metala i ona su predstavljena kao plave sfere.

5.3.2. Ekspresija rekombinantnog proteina i analiza njegove funkcije

5.3.2.1. Prečišćavanje rekombinantnog AmMT proteina

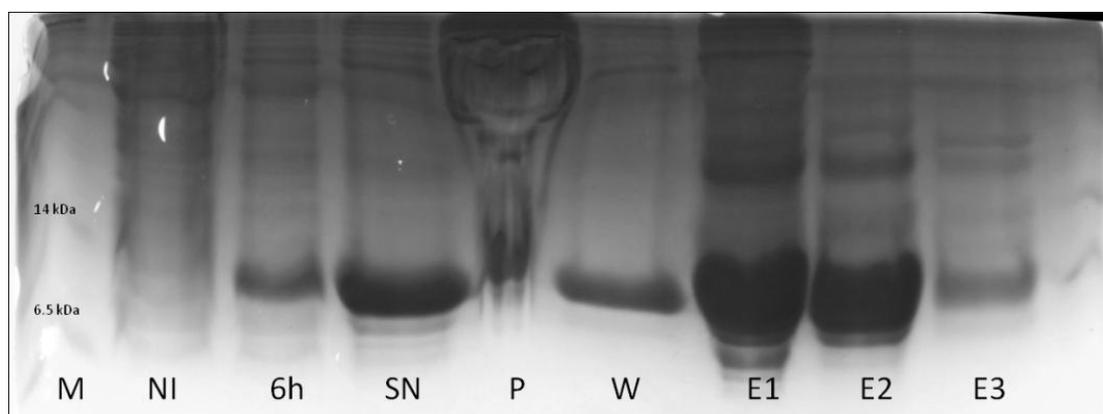
Aminokiselinska sekvenca rekombinantnog proteina je prikazana na Slici 28. Rekombinantni protein je sadržao 34 dodatne amino-kiseline na N kraju (uključujući histidinski rep) i 20 dodatnih amino-kiselina na C kraju (uključujući histidinski rep) u poređenju sa divljim tipom proteina. Molekulska težina rekombinantnog proteina (102 amino-kiseline) je 10616,9 Da, a divljeg tipa metalotioneina (48 amino-kiselina) 4893,7 Da, kako je izračunato pomoću ProtParam Tool programa.

Rekombinantni protein:

M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M A S M T G G Q Q M G R G S **M P G P**
G C D K C A D K C Q K C Q C G D K C K C G D S G C G D K C C C K S G G Q C S
C K T C K C A N S S S V D K L A A A L E H H H H H H

Slika 28. Aminokiselinske sekvence rekombinantnog i divljeg tipa AmMT. Sekvenca divljeg tipa proteina je podvučena.

Rekombinantni AmMT je prečišćen afinitetnom hromatografijom pomoću 1 mL His Trap HF kolone (GE Healthcare). U svakom koraku prečišćavanja je provereno prisustvo rekombinantnog proteina elektroforezom na 15% SDS-PAGE gelu i bojenjem sa Comassie brilliant blue bojom, što je prikazano na Slici 29.

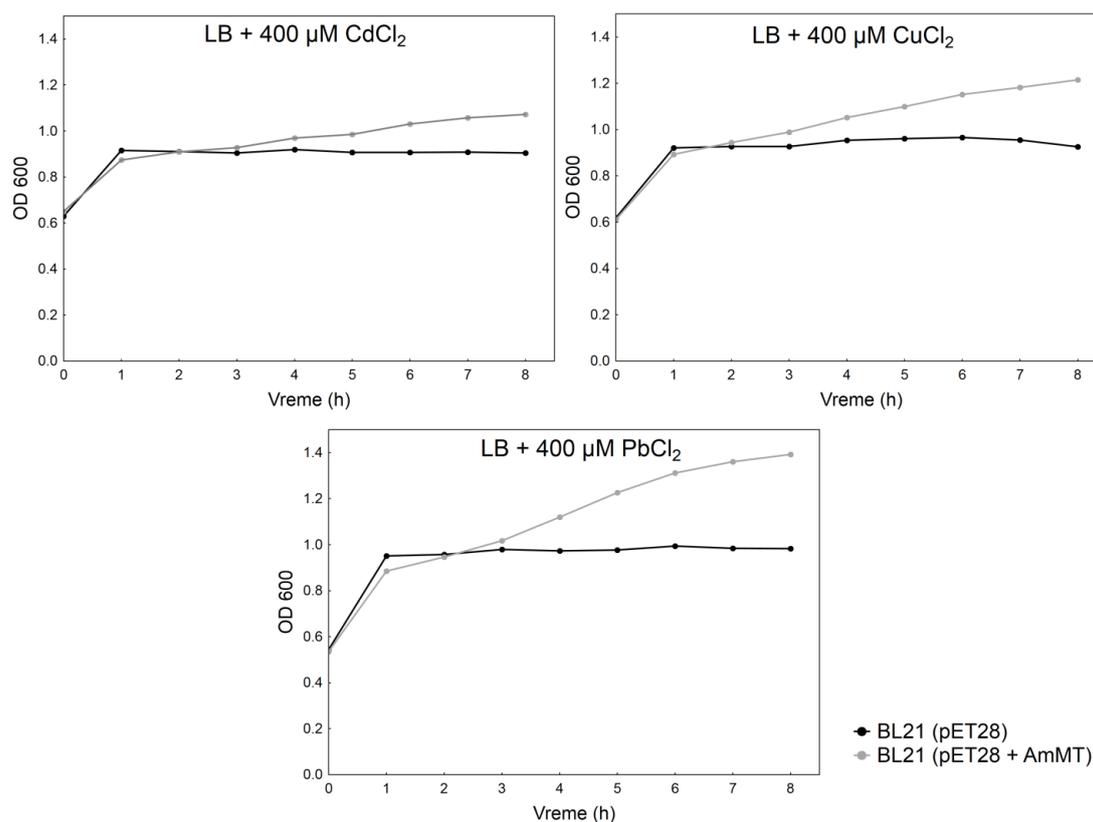


Slika 29. Analiza uspešnosti prečišćavanja AmMT pomoću HisTrap HF kolone na 15% SDS-PAGE. M-marker, NI-neindukovana ekspresija, 6h-6 sati nakon indukcije, SN-supernatant, P-talog, W-ispiranje, E-elucija

5.3.2.2. Tolerancija transformisane *Escherichia coli* na prisustvo metala

Rezultati su pokazali da ekspresija rekombinantnog AmMT u *E. coli* dovodi do povećane tolerancije na metale. Rezultati su prikazani na Slici 30.

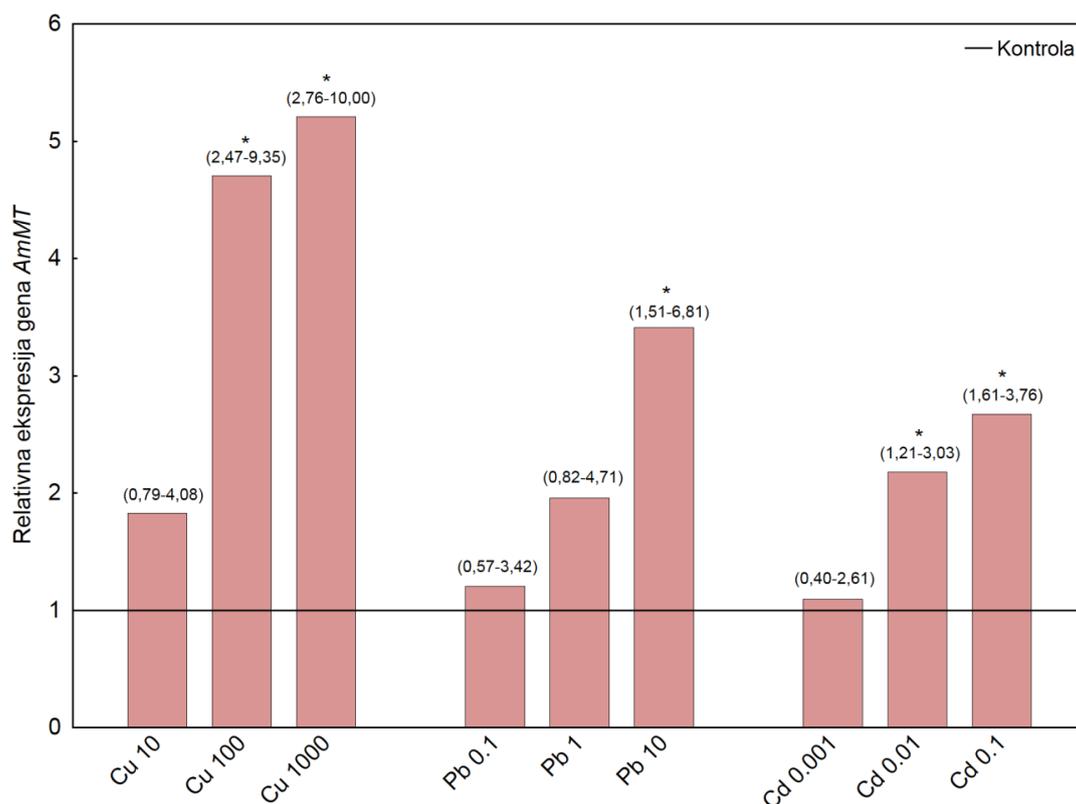
U prisustvu 400 μM CdCl_2 , 400 μM CuCl_2 i 400 μM PbCl_2 u medijumu, *E. coli* BL21 koja je imala rekombinantni plazmid je rasla brže nego isti soj koji je imao samo prazan plazmid.



Slika 30. Povećana tolerancija *E. coli* BL21 ćelija koje ekspresuju rekombinantni AmMT (pET28+AmMT) na prisustvo Cd, Cu i Pb u poređenju sa bakterijama koje su transformisane sa praznim pET28 vektorom. Ćelije su gajene na LB medijumu koji je sadržao 400 μM CdCl_2 , 400 μM CuCl_2 ili 400 μM PbCl_2 .

5.3.2.3. Ekspresioni profil gena za metalotionein

Rezultati ekspresije gena za metalotionein pokazuju doznu zavisnost između koncentracije metala i ekspresije ovog gena. Pčele hranjene 1 M rastvorom saharoze sa rastućim koncentracijama CdCl_2 , CuCl_2 i PbCl_2 u toku 48 h imale su gradualno povećanje ekspresije gena za metalotionein u poređenju sa kontrolnom grupom koja je hranjena rastvorom saharoze (Slika 31).



Slika 31. Relativna genska ekspresija *AmMT* kod pčela tretiranih sa tretiranih 48 h sa Cu, Pb i Cd u poređenju sa kontrolom koja je hranjena 1 M rastvorom saharoze. Eksperimentalne grupe su nazvane prema metalu i njegovoj koncentraciji u rastvoru saharoze u mg/L. Razlika u genskoj ekspresiji je analizirana pomoću programa REST2009. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$) su označene zvezdicom (*). Opseg vrednosti za interval poverenja 68% je predstavljen iznad stubića.

6. Diskusija

Pčele imaju veliki ekološki, ali i ekonomski značaj i zbog toga je njihova konzervacija od velike važnosti. Molekularne osnove interakcije medonosne pčele sa spoljašnjom sredinom privlače sve više pažnje u poslednjih nekoliko godina zbog toga što se smatra da bolje razumevanje mehanizama koji posreduju u interakciji medonosne pčele sa stresogenim faktorima iz životne sredine može značajno da doprinese konzervaciji ove vrste. Ćelijski odgovor na stres kod medonosne pčele nije dovoljno istražen, a razumevanje ovih mehanizama je veoma važno, jer utiče na sposobnost jedinke, ali i cele kolonije da se odbrani od uticaja različitih ksenobiotika za koje se smatra da imaju važnu ulogu u opadanju brojnosti ove vrste. Pored stresora iz životne sredine, pčele su izložene parazitima i virusima, za koje je poznato da, kada su prisutni pojedinačno ili zajedno, doprinose slabljenju kolonija (Stevanović i sar., 2011, 2013; Simeunović i sar., 2014).

Brojne studije opisuju uticaj pesticida na medonosne pčele (Johnson i sar., 2010; Goulson i sar., 2015), s obzirom da registrovanje poljoprivrednih preparata zahteva specifične toksikološke testove na ovoj vrsti (Medrzycki i sar., 2013). Međutim, mali broj istraživanja je fokusiran na odgovor medonosne pčele na zagađenje teškim metalima na biohemijskom nivou (Badiou-Beneteau i sar., 2013; Gauthier i sar., 2016).

U prva dva dela ove teze u terenskim i laboratorijskim testovima analizirana je aktivnost i genska ekspresija antioksidativnih enzima superoksid dismutaze, katalaze i glutation *S*-transferaze, kao i nivo redukovanog glutationa, sulfhidrilnih grupa proteina i malondialdehida u pčelama koje su u manjoj ili većoj meri bile izložene pojedinim teškim metalima. Analizirani parametri govore o redoks statusu i nivou oksidativnog stresa u ćeliji. Veliki deo toksičnosti teških metala proizilazi iz činjenice da oni dovode do oksidativnog stresa, tako da analiza navedenih parametara daje uvid u mehanizme odgovora medonosne pčele na povećano prisustvo teških metala u životnoj sredini.

Kako bi se dobila potpunija slika o odgovoru medonosne pčele na prisustvo teških metala, u trećem delu je analiziran metalotionein koji se smatra univerzalnim odgovorom na prisustvo ovih polutanata u živim organizmima. S obzirom da ovaj protein nije prethodno opisan kod medonosne pčele, njegova identifikacija,

bioinformatička analiza i ekspresija rekombinantnog proteina predstavljaju prvi korak u razumevanju strukture i funkcije ovog proteina.

6.1. Terenski testovi

Pčele su izložene brojnim zagađujućim materijama prisutnim u njihovom staništu, direktno iz vazduha i vode, i indirektno putem ishrane polenom i nektarom sa biljaka koje potiču sa zagađenog područja (Lambert i sar., 2012). Pčele se u mnogim istraživanjima koriste za biomonitoring zagađenja životne sredine, s obzirom da tokom prikupljanja polena i nektara obilaze velike površine oko košnice (Rashed i sar., 2009; van der Steen, 2012). Dostupni su podaci o korišćenju pčela kao bioindikatora za monitoring pesticida (Ruschioni i sar., 2013), policikličnih aromatičnih ugljovodonika (Perugini i sar., 2009) i toksičnih metala (Perugini i sar., 2011; Lambert i sar., 2012). Najčešće analizirani teški metali su olovo, kadmijum, hrom, bakar i cink, koji potiču od saobraćaja i industrijskih aktivnosti i šire se putem gasova koji nastaju sagorevanjem (van der Steen i sar., 2012).

U okviru istraživanja prikazanih u ovoj disertaciji, izabrana su tri lokaliteta za koje je smatrano da se razlikuju po stepenu urbanizacije i industrijalizacije. Vrednosti koje su dobijene su u skladu sa rezultatima brojnih analiza količine metala u pčelama čiji detaljan pregled je dat u radu van der Steen i sar. (2012).

Golija je izabrana kao kontrola jer se smatrala „čistom” lokacijom, bez izvora zagađenja na površini koju posećuju pčele oko pčelinjaka. Međutim, koncentracija toksičnih metala u pčelama radilicama i pergi je bila slična kao u industrijskoj oblasti, Zajači, a za pojedine metale i značajno veća. Tako je koncentracija kobalta, mangana, nikla i stroncijuma veća u pergi i pčelama sa Golije nego iz Zajače, dok je koncentracija kadmijuma i barijuma slična na obe lokacije u pčelama i u pergi, a veća od koncentracije u pčelama iz Beograda (Slika 10). Moguće je da su kadmijum i drugi teški metali, prirodno prisutni u zemljištu sa Golije, i da preko biljaka, odnosno polena i nektara, dospevaju do pčela, perge i meda.

U Zajači je izmerena mnogostruko veća koncentracija olova u pergi i pčelama u odnosu na druge dve lokacije (Slika 10). Biljke ne transportuju olovo, pa se smatra da pčele sa ovim metalom dolaze u kontakt preko vazduha (Bogdanov, 2006), što se slaže 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. Sa druge strane, kadmijum iz zemljišta se transportuje u biljke i može da kontaminira nektar i polen, a samo mala količina ovog metala dospeva u med iz vazduha, i to ukoliko se nalazi u neposrednoj blizini izvora zagađenja (Bogdanov, 2006).

Razlike u koncentraciji pojedinih toksičnih metala (barijuma, kadmijuma, hroma i olova) u pčelama praćene su istim razlikama u pergi. Perga je fermentisani polen koji predstavlja glavni izvor proteina za pčelinju zajednicu i pored meda je osnovna hrana svih kasti pčela. S obzirom da se pergom hrani leglo, visoke koncentracije teških metala mogu uticati na razvoj larvi i lutki i dovesti do opadanja brojnosti pčela i slabljenja kolonije (Di i sar., 2016; Hladun i sar., 2016). Stoga, analiza koncentracije metala u pergi daje dobar uvid u stepen izloženosti pčelinje zajednice teškim metalima iz životne sredine.

Sadržaj svih metala u medu je bio daleko manji nego u pčelama i pergi (Tabela 6). Smatra se da su pčele u stanju da "filtriraju" teške metale iz nektara, i zbog toga se veoma male koncentracije teških metala nalaze u medu (Ruschioni i sar., 2013). Prema pravilniku koji važi u Republici Srbiji, propisane su koncentracije olova, kadmijuma, cinka, bakra i olova u medu (*Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama*, 2010). U medu sa Golije, iz Beograda i Zajače nisu izmerene koncentracije veće od dozvoljenih, izuzev koncentracije kadmijuma u medu iz Golije koja je bila na granici (0,03 µg/g).

Reaktivne kiseonične vrste nastaju u organizmu u normalnim fiziološkim uslovima, ali zagađujuće materije iz životne sredine mogu da uzrokuju njihovo prekomerno nastajanje, što dovodi do oštećenja biomolekula (Krishnan i Kodrick, 2012). Antioksidativni enzimi imaju važnu ulogu u uklanjanju ROS, zbog čega se često koriste kao biomarkeri izloženosti ksenobioticima (Valavanidis, 2006). Rezultati prikazani u okviru ove disertacije pokazuju da staništa sa različitim antropogenim uticajem i stepenom industrijalizacije utiču na aktivnost i ekspresiju analiziranih antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze, katalaze i glutation *S*-transferaze.

Superoksid dismutaza i katalaza predstavljaju osnovnu odbranu od ROS. Aktivnost ovih enzima ukazuje na nivo superoksid anjon radikala i vodonik peroksida u

organizmu tj. o potrebi za njihovim uklanjanjem (Kojić i sar., 2009; Grubor-Lajšić i sar., 2013).

Ekspresija gena za dve izoforme SOD, *Sod1* i *Sod2* i ukupna aktivnost enzima SOD je izmerena u pčelama radilicama sa tri lokaliteta. U pčelama iz industrijskog (Zajača) i urbanog (Beograd) područja je bila povećana ekspresija gena za citosolnu CuZnSOD, *Sod1*, dok je ekspresija gena za mitohondrijalnu MnSOD, *Sod2*, bila smanjena u obe grupe (Slika 14). Ovi rezultati ukazuju da životna sredina može imati različit uticaj na izoforme SOD i da odgovor ovog enzima zavisi od količine, ali i kombinacije teških metala koji su prisutni, što je pokazano i u drugim sličnim studijama (Tang i sar., 2012; Gao i sar., 2013; Won i sar., 2014). Smanjena ekspresija *Sod2* može biti posledica manje stope metabolizma u mitohondrijama. Povećana ekspresija *Sod1* koja je praćena povećanom enzimskom aktivnošću SOD na oba lokaliteta (Slika 11) ukazuje da zagađenje životne sredine može da uzrokuje nastajanje superoksid anjon radikala i utiče na oksidativni status medonosne pčele, što je u skladu sa prethodnim saznanjima o oksidativnom stresu uzrokovanom teškim metalima i posledično stimulaciji antioksidativnih mehanizama zaštite (Ercal i sar., 2001; Farmand i sar., 2005).

Aktivnost katalaze je bila povećana u pčelama iz urbane sredine (Beograd), ali je u industrijskoj sredini bila značajno smanjena u odnosu na ruralnu sredinu (Slika 12). Moguće je da povećana aktivnost u urbanoj sredini potiče od organskih zagađujućih materija, jer je pokazano da komponente izduvnih gasova, pre svega policiklični aromatični ugljovodonici i hinoni, indukuju nastajanje superoksid anjon radikala i oštećenja unutrašnje membrane mitohondrija (Xiao i sar., 2003). Ekspresija gena za katalazu je bila povećana u pčelama iz urbanog i industrijskog područja (Slika 14), što je u skladu sa rezultatima kod drugih vrsta, kao što su insekt *Chironomus riparius* (Nair i sar., 2011) i nematoda *Chaenorhabditis elegans* (Roh i sar., 2006). Sa druge strane izlaganje olovu nije dovelo do povećane ekspresije katalaza-2 gena kod *C. elegans* (Roh i sar., 2006), što govori o razlikama u regulaciji ekspresije gena u prisustvu metala. U pčelama sa industrijskog područja je izmerena smanjena enzimska aktivnost katalaze i pored povećane ekspresije gena, što ukazuje na moguću posttranskripcionu regulaciju ekspresije. Williams i sar. (2008) su uočili da katalaza medonosne pčele ima veću masu od mase izračunate na osnovu genske sekvence, što ukazuje da ovaj enzim podleže posttranslacionoj modifikaciji. Moguće je da metali

moгу da utiču na ovaj proces. Poznato je da teški metali, naročito olovo, smanjuju aktivnost katalaze (Ercal i sar., 2001). Jedan od načina inhibicije je blokada sinteze hema koji ulazi u sastav ovog enzima. Olovo ireverzibilno inhibira aminolevulinat dehidratazu, zamenjujući cink koji je neophodan za katalitičku aktivnost ovog enzima uključenog u biosintezu hema (Ajioka i sar., 2006). Stoga je moguće da velika kontaminacija metalima u industrijskom području, izmerena u pčelama, ali i u pergi kojom su se hranile, dovodi do inhibicije aktivnosti katalaze na proteinskom nivou.

Povećana aktivnost SOD i istovremeno smanjena aktivnost CAT u radilicama iz industrijskog područja govori o mogućem oksidativnom stresu izazvanim većim koncentracijama teških metala, naročito olova. Ovi enzimi su funkcionalno povezani: SOD katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala pri čemu nastaje H₂O₂ koji je supstrat za CAT. Ukoliko je CAT inhibirana, može doći do nakupljanja vodonik peroksida, koji u prisustvu slobodnih jona metala dalje dovodi do nastajanja veoma reaktivnog hidroksil radikala u Haber-Weiss-ovoj reakciji. Pored toga, nakupljanje vodonik peroksida može biti signal za povećanu potrebu za ekspresijom katalaze, što je u skladu sa izmerenim vrednostima. Moguće je da enzimi koji recikliraju askorbat, kao što je askorbat peroksidaza mogu da kompenzuju nisku aktivnost katalaze u prisustvu visokih koncentracija H₂O₂ (Mathews i sar., 1997; Jovanović-Galović i sar., 2004).

Glutation *S*-transferaze su familija multifunkcionalnih enzima koji imaju ključnu ulogu u eliminaciji ksenobiotika i antioksidativnoj zaštiti u organizmu. Indukcija glutation *S*-transferaze se smatra konzervisanim ćelijskim odgovorom na oksidativni stres (Hayes i sar., 2005). Velika aktivnost GST u masnom telu i crevu insekata govori o važnoj ulozi ovog enzima u detoksikaciji ksenobiotika i endogenih elektrofilnih supstrata (Enayati i sar., 2005). Ekspresija gena za tri ispitane klase GST (*Gstd1*, *Gsts1*, *Gstmic1*) nije bila promenjena u pčelama radilicama iz industrijske oblasti (Zajača) (Slika 15), dok je u istoj grupi izmerena značajno veća ukupna aktivnost GST u odnosu na druge dve grupe (Slika 13). Sa druge strane, ekspresija gena za tri ispitane izoforme GST u pčelama iz urbanog područja (Beograd) je bila značajno smanjena (Slika 15). Pretpostavlja se da je povećanje aktivnosti GST u radilicama iz industrijske oblasti posledica oksidativnog stresa i veće produkcije nepoželjnih produkata oksidativnog metabolizma koje ovaj enzim uklanja. Glutation *S*-transferaza je uključena u odgovor na povećano zagađenje sredine i kod

drugih vrsta insekata. Kod vrste *Pterostichus oblongopunctatus* (Coleoptera: Carabidae) je zabeležena značajno povišena aktivnost GST kod ženki u područjima sa visokim stepenom zagađenja teškim metalima u odnosu na referentnu sredinu, a u umereno zagađenim sredinama je aktivnost takođe bila viša u odnosu na referentno područje (Stone i sar., 2002). Wilczek i sar. (1997) su uočili veći nivo aktivnosti GST kod pauka sakupljenih sa različitih metalurških deponija u Češkoj Republici, u poređenju sa referentnim područjima. Badiou-Beneteau i sar. (2013) su pokazali da je GST kod medonosne pčele pod snažnim uticajem okoline, a aktivnost ovog enzima je u pozitivnoj korelaciji sa zagađenjem u životnoj sredini. Razlika u aktivnosti GST je bila više izražena u uzorcima sa terena, nego u laboratorijskim testovima sa pesticidima (Badiou-Beneteau i sar., 2012), što može da znači da u prirodi veći broj faktora deluje sinergički na aktivnost ovog enzima.

Prikazani rezultati potvrđuju hipotezu da je aktivnost antioksidativnih enzima pod primetnim uticajem životne sredine. Pčele su u prirodi izložene različitim pritiscima, pa se odgovor antioksidativnih enzima ne može sa sigurnošću povezati sa pojedinačnim polutantom. Kako bi se promene u ovim parametrima mogle pripisati uticaju određenog polutanta, potrebno je uraditi dalje analize, te su stoga rađeni laboratorijski akutni testovi.

6.2. Laboratorijski testovi

Nedavni radovi autora Hladun i sar. (2016) i Di i sar. (2016) opisuju uticaj bakra, olova i kadmijuma na razvoj i preživljavanje larvi, lutki i pčela radilica. Nakon tretmana košnice bakrom i kadmijumom u trajanju od 60 dana bilo je smanjeno preživljavanje lutki, što ukazuje da kolonije koje se duži period nalaze na zagađenim područjima mogu imati povećanu smrtnost u leglu što može da dovede do pada brojnosti pčela radilica (Hladun i sar., 2016). Laboratorijski testovi su potvrdili negativni efekat koji ovi metali imaju na larve i adultne pčele (Di i sar., 2016). Ovi eksperimenti su pokazali da rezultati dobijeni u laboratorijskim testovima mogu pomoći u razumevanju molekularnih promena koje se nalaze u osnovi efekata ispitanih metala na razvoj i preživljavanje pčela.

U drugoj fazi, u laboratorijskim testovima pčele radilice su bile izložene teškim metalima (Cu, Pb i Cd) u trajanju od 48 h, nakon čega su izmereni parametri redoks

statusa i antioksidativne zaštite. U najvećem broju slučajeva, izlaganje pčela ispitivanim metalima nije dovelo do promene u aktivnosti antioksidativnih enzima (Tabela 8). Takođe, koncentracija malondialdehida, proizvoda lipidne peroksidacije, nije bila promenjena ni u jednoj grupi (Tabela 9). Odsustvo promena u aktivnosti antioksidativnih enzima i nepromenjene koncentracije MDA su verovatno posledica kratkog perioda izlaganja uticajima pomenutih metala. Iako nije bilo razlike u aktivnosti antioksidativnih enzima, ekspresija gena koji kodiraju ove enzime je u većini slučajeva bila indukovana već nakon 48 h izlaganja metalima.

Nakon laboratorijskih testova sa tri metala, bakrom, olovom i kadmijumom, u pčelama radilicama je izmerena ukupna aktivnost SOD i ekspresija gena za dve izoforme, citosolnu (*Sod1*) i mitohondrijalnu (*Sod2*). Aktivnost SOD nije bila promenjena nakon izlaganja metalima u trajanju od 48 h (Tabela 8), ali je došlo do povećanja ekspresije oba gena, a promena je zavisila od metala i njegove koncentracije (Slike 16 i 17).

Gen *Sod1* je bio indukovano u grupama hranjenim sa 100 mg/L i 1000 mg/L CuCl_2 , a date koncentracije nisu izazvale promene u ekspresiji *Sod2*. Ekspresija gena za SOD se menja pod uticajem bakra i kod drugih vrsta. Kod morskog člankovitog crva *Neanthes succinea* ekspresija *Sod1* je bila povećana u dozno-zavisnom maniru, dok je *Sod2* indukovano samo velikim koncentracijama CuCl_2 . U terenskim testovima, bila je indukovana samo ekspresija *Sod1* (Rhee i sar., 2011). Nasuprot tome, kod kopepode *Tigriopus japonicus* oba gena su bila indukovana, ali je veća promena zabeležena kod *Sod2* (Kim i sar., 2011a). Kod zebrice *Danio rerio*, akutni tretman sa bakrom je povećao ekspresiju katalaze, ali ne i SOD (Craig i sar., 2007). Kod orijentalne voćne mušice, *Batrocera dorsalis* ekspresija sva 4 gena za SOD je bila smanjena nakon tretmana bakrom, ali povećana nakon tretmana Cd i Pb (Gao i sar., 2011).

Kod pčela tretiranih olovom bila je indukovana ekspresija gena za obe SOD izoforme, i to samo sa najvećom od tri ispitane doze olova (10 mg/L). Ekspresija gena za superoksid dismutazu kod drugih vrsta je različito osetljiva na prisustvo olova. Kod polihete *Perinereis nuntia* ekspresija *Sod1* i *Sod2* je bila veoma povećana zbog prisustva olova (Won i sar., 2014). Nasuprot tome, kod nematode *C. elegans* izlaganje olovu nije dovelo do povećanja ekspresije *Sod1* gena (Roh i sar., 2006).

Nakon 48 h, samo najveća primenjena doza CdCl_2 (0,1 mg/L) je indukovala ekspresiju *Sod1*, a niža doza (0,01 mg/L) je dovela do povećanja ekspresije gena *Sod2*. Rezultati za ekspresiju gena su u skladu sa rezultatima kod muve, *Musca domestica*, gde se ekspresija dva gena za SOD u prisustvu kadmijuma povećavala u toku vremena i dostigla najviši nivo nakon 24 h (Tang i sar., 2012). Sa druge strane, ekspresija oba SOD gena je bila povećana nakon 12 h u larvama insekta *Chironomus riparius*, ali smanjena nakon 24 h izlaganja kadmijumu (Park i sar., 2012).

Ovi rezultati ukazuju da su izoforme SOD različito osetljive na prisustvo povećane koncentracije bakra, kadmijuma i olova, ali i da je odgovor dozno zavisna i specifičan za svaki metal.

Aktivnost katalaze je bila povećana u pčelama radilicama koje su hranjene rastvorom PbCl_2 koncentracije 1000 mg/L, i smanjena kod radilica hranjenih najmanjom koncentracijom CdCl_2 (0,001 mg/L) (Tabela 8). Tretman bakrom nije doveo do promena u aktivnosti katalaze. Kadmijum i bakar su indukovali ekspresiju *Cat* gena, dok olovo nije imalo uticaja na njegovu ekspresiju (Slika 18).

Olovo u koncentracijama 0,1, 1 i 10 mg/L nije dovelo do povećanja ekspresije gena za katalazu, niti do povećanja enzimske aktivnosti. U grupi koja je hranjena sa rastvorom koncentracije 1000 mg/L došlo je do povećanja aktivnosti katalaze. Ovaj rezultat je u suprotnosti sa rezultatom dobijenim u terenskim testovima, gde je aktivnost katalaze bila inhibirana u industrijskoj oblasti, gde su pčele izložene povećanim koncentracijama olova. Objašnjenje ovakvih rezultata se može pripisati dužini izlaganja pčela teškim metalima. Kratkotrajno izlaganje olovu, kao u laboratorijskim testovima, može da dovede do povećanja aktivnosti, dok izlaganje visokim koncentracijama u dužem vremenskom periodu može da dovede do supresije katalaze (Patrick, 2006).

Doza 0,001 mg/L CdCl_2 je inhibirala aktivnost katalaze, i nije indukovala ekspresiju gena za ovaj enzim nakon 48 h. Aktivnost katalaze može biti inhibirana nakon izlaganja malim koncentracijama kadmijuma u kraćem vremenskom intervalu, dok veće doze i duže izlaganje dovode do povećanja enzimske aktivnosti (Waisberg i sar., 2003). Doze od 0,01 i 0,1 mg/L su dovele do povećanja ekspresije gena za katalazu, što ukazuje na linearno dozno-zavisnu indukciju ekspresije *Cat* gena.

U laboratorijskim testovima je praćena ukupna aktivnost GST i ekspresija tri izoforme koje pripadaju različitim klasama: *Gstd1* (Delta), *Gsts1* (Sigma) i *Gstmic1* (mikrozomalna) nakon izlaganja pčela bakru, kadmijumu i olovu. Medonosna pčela ima smanjen broj gena za ove enzime, što se smatra jednim od razloga za preosetljivost ove vrste na pesticide. Sigma klasa GST ima ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa i uklanjanju lipidnih peroksida (Sigh i sar., 2001), Delta klasa je specifična za insekte i uključena je u rezistenciju na pesticide (Udominprasert i sar., 2005), dok su mikrozomalni enzimi membranski proteini uključeni u metabolizam eikosanoida, ali imaju i detoksikacionu ulogu koja podrazumeva peroksidaznu aktivnost, pa mogu da zaštite membrane od lipidnih peroksida (Zimniak i Singh, 2006). Odgovor različitih klasa GST se nezavisno reguliše, a postoje i razlike među vrstama organizama (Yan i sar., 2013).

Rezultati su pokazali da je nivo relativne genske ekspresije tri analizirane klase GST-a u pozitivnoj korelaciji sa povećanjem koncentracije bakra i kadmijuma kojima su pčele bile izložene u laboratorijskim uslovima (Slike 19-21). Aktivnost i ekspresija GST nisu bili promenjeni u grupama tretiranim sa olovom. Povećanje ekspresije gena za GST nakon tretmana kadmijumom i bakrom može biti mehanizam za odbranu od povećanog oksidativnog stresa, a slični rezultati su dobijeni i kod drugih vrsta. Živa je indukovala ekspresiju *AccGSTS1* gena kod azijske pčele *A. cerana cerana* nakon 2 h (Yan i sar., 2013). Kod kopepode *Tigriopus japonicus* ispitano je 10 izoformi GST gena i njihov odgovor na prisustvo toksičnih metala. Nakon tretmana bakrom u trajanju od 96 h, bila je povećana ekspresija Sigma i mikrozomalne klase, dok je Delta klasa ostala nepromenjena. Za kadmijum su dobijeni slični rezultati (Lee i sar., 2008). Nair i Choi (2011) su ispitivali uticaj kadmijuma na gene Sigma i Delta klase GST kod *C. riparius*. Ekspresija svih izoformi, 3 iz klase Delta i 4 iz klase Sigma je bila povećana nakon izlaganja kadmijumu, s tim što je najveća razlika bila izmerena nakon 24 h ili 48 h, posle čega je počinjala da opada.

Malondialdehid i tiolne grupe proteina oslikavaju potencijalna oksidativna oštećenja makromolekula nakon akutne intoksikacije metalima, jer su lipidna peroksidacija (pri kojoj nastaje MDA) i oksidacija proteina važni indikatori oksidativnih oštećenja izazvanih reaktivnim vrstama (Ahmad, 1995). GSH ima važnu ulogu u homeostazi metala ali i u antoksidativnoj odbrani (Jozefczak i sar., 2012) i merenje koncentracije

redukovanog glutationa ukazuje na kapacitet organizma da veže i ukloni metale i slobodne radikale.

Koncentracija malondialdehida, markera lipidne peroksidacije, nije bila promenjena ni u jednoj grupi, što može biti posledica kratkog vremena testiranja, odnosno 48 h nije bio dovoljno dug vremenski period da bi nastala oksidativna oštećenja biomolekula.

Nakon tretmana olovom, u nekim grupama je došlo do povećanja koncentracije redukovanog glutationa i sulfhidrilnih grupa (Tabela 9). Tretmani bakrom i kadmijumom nisu doveli do promena u koncentraciji redukovanog GSH i sulfhidrilnih grupa, sa izuzetkom grupe hranjene sa 0,01 mg/L CdCl₂ kod koje je bila smanjena koncentracija sulfhidrilnih grupa (Tabela 9). Kadmijum je, kao i olovo, redoks-inaktivni metal i i trebao bi da izazove sličan odgovor organizma, ali su primenjene koncentracije CdCl₂ bile mnogo manje nego za PbCl₂, i moguće je da zbog toga nije došlo do promena u koncentraciji tiola i glutationa.

Olovo svoje toksične efekte ispoljava uticajem na brojne biohemijske procese, pre svega na kalcijum-zavisne puteve, vezuje se za sulfhidrilne i amidne grupe enzima, oštećuje ćeliju formiranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (Tchounwou i sar., 2012). Kod pčela tretiranih olovom u koncentraciji 1 i 10 mg/L bila je povećana količina redukovanog glutationa, a količina sulfhidrilnih grupa proteina u grupama tretiranim sa 0,1, 10 i 1000 mg/L PbCl₂ (Tabela 9). Prisustvo velike količine sulfhidrilnih grupa ukazuje na povećanu koncentraciju esencijalnih tiola u pčelama (Mirčić i sar., 2013), iz čega se može zaključiti da je helacija olova kod pčela prvi korak odbrane od intoksikacije olovom. S obzirom da aktivnost superoksid dismutaze i glutation *S*-transferaze nije bila promenjena, dok je samo najveća koncentracija izazvala povećanje aktivnosti katalaze, pretpostavljamo da primenjene doze olova nisu dovele do značajnog povećanja sinteze ROS. U nedavnoj studiji autora Gauthier i sar. (2016) nivo lipidne peroksidacije kod pčela se nije povećao nakon 10 dana izlaganja olovu, ali je bila povećana koncentracija α -tokoferola, što ukazuje da neenzimska antioksidativna zaštita može da ima ulogu u održavanju redoks homeostaze nakon intoksikacije ovim metalom.

Dobijeni rezultati govore o tome da teški metali mogu da naruše redoks status u ćeliji i aktiviraju ekspresiju antioksidativnih gena, ali i da kratkotrajno izlaganje nije

dovoljno da izazove promene na proteinskom nivou i oksidativna oštećenja biomolekula.

6.3. Analiza metalotioneina

Metalotioneini su proteini koji imaju važnu ulogu u homeostazi metalnih jona i detoksikaciji kod svih vrsta organizama (Perez-Rafael i sar., 2012). Međutim, postoji mali broj informacija o metalotioneinima kod insekata koji ne pripadaju redu Diptera (Atanesyan i sar., 2011; Tang i sar., 2011) i do sada ovi proteini nisu bili identifikovani kod medonosne pčele ili neke druge vrste iz reda Hymenoptera.

Gen za metalotionein i protein koji on kodira kod medonosne pčele su identifikovani pomoću bioinformatičkih alata. Gen za metalotionein je dug 1680 bp, ima tri egzona i jednu transkripcionu varijantu i kodira protein koji se sastoji od 48 amino-kiselina (Slika 22). Ovaj protein ima molekulsku masu 4893,7 Da, teoretski pI 8,37, sadrži 15 rezidua cisteina, što čini 31,2% od ukupnog broja amino-kiselina i ne sadrži aromatične amino-kiseline. Ova fizička i hemijska svojstva su u skladu sa literaturnim podacima o metalotioneinima drugih vrsta (Kägi, 1991; Ryvolova i sar., 2011). Uzvodno od start kodona je identifikovan metal responsivni element (MRE) čija sekvenca je TGCACAC (Slika 23). MRE specifično vezuje MTF-1 transkripcioni faktor koji indukuje transkripciju gena za metalotionein nakon izlaganju potencijalno toksičnim metalima kod različitih vrsta, od insekata do sisara (Zhang i sar., 2001; Lichtlen i Schaffner, 2001; Selvaraj i sar., 2005). MRE ima konsenzus sekvencu TGCRNC, gde R može biti A ili G, a N bilo koja od četiri azotne baze (Selvaraj i sar., 2005). Pored MRE elementa, u 5'-regionu 1500 bp uzvodno od start kodona identifikovano je prisustvo različitih responsivnih elemenata za vezivanje transkripcionih faktora, što dokazuje da metalotionein može biti indukovano raznim stimulusima (Zalups i Koropatnick, 2010) i ukazuje na funkcionalni fiziološki kontekst ovog proteina. U promotorskom regionu gena za metalotionein postoje responsivni elementi za transkripcione faktore koji su uključeni u opšti odgovor na stres, oksidativni stres, hipoksiju, biotransformaciju, regulaciju ćelijskog rasta i diferencijacije itd. (Tabela 10; Prilog 1).

Mnogi organizmi imaju više od jednog gena za metalotionein: kod sisara postoji 4 glavne izoforme od MT-1 do MT-4, a najkompleksniji su kod ljudi gde postoji

familija od najmanje deset različitih gena (Isani i Carpeno, 2014). Mnogi beskičmenjaci kod kojih su opisani metalotioneini imaju dva gena koji kodiraju kadmijum-vezujući i bakar-vezujući protein (Dallinger i sar., 1997; Van Straalen i Roelofs, 2012). U genomu *D. melanogaster* postoji familija od najmanje pet MT gena koji kodiraju izoforme MtnA do MntE (Atanesyan i sar., 2011). Bioinformatičkom analizom genoma medonosne pčele identifikovan je samo jedan gen za metalotionein. Poznato je da medonosna pčela ima manje gena za stečeni imunitet i enzime za detoksikaciju, verovatno na račun evolucije i povećanja broja gena povezanih sa hormonskim i hemosenzornim procesima koji su kod ove vrste veoma razvijeni zbog njene ekologije i socijalne organizacije (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), pa je moguće da je ovo slučaj i sa genom za metalotionein, a protein koji on kodira bi mogao da preuzme funkciju nekoliko različitih izoformi prisutnih kod drugih organizama.

Pretraživanjem po sličnosti identifikovano je pet mogućih proteinskih sekvenci za metalotioneine iz tri vrste reda Hymenoptera (*Apis florea*, *Bombus impatiens* i *Bombus terrestris*). Poravnanjem ovih proteina sa AmMT pokazano je da se na 25 pozicija nalaze iste amino-kiseline (od čega 9 cisteina), a na 12 pozicija amino-kiseline koje su slične po fizičkim i hemijskim osobinama (Slika 24). Tako visok stepen homologije ukazuje na veliku konzervaciju ovog proteina u redu Hymenoptera i s obzirom da nisu opisani, otvara mogućnost za njihovu dalju analizu.

Za dalje ispitivanje filogenetskih odnosa konstruisano je filogenetsko stablo sa šest novo-identifikovanih proteina kod Hymenoptera i 28 proteina predstavnika šest familija životinjskih metalotioneina (Tabela 11). Poravnanje i analiza Neighbour joining metodom su pokazali da se metalotioneini Hymenoptera grupišu bliže mekušcima nego redu Diptera (Slika 25) što je jedan od mogućih razloga zbog kojih nisu bili prethodno identifikovani. Poteškoće u definisanju evolutivnih veza se ogledaju i u nedostatku definitivne klasifikacije metalotioneina. Metalotioneini su trenutno klasifikovani ili prema taksonomskom grupisanju ili prema afinitetu za vezivanje specifičnog metala; u svakom slučaju, potrebno je razmotriti tri glavne osobine: heterogenost sekvence, trodimenzionalnu strukturu i funkciju. Najviše pažnje se trenutno posvećuje identifikaciji evolutivnih pravilnosti u smislu funkcije koja bi se mogla primeniti na različite grupe organizama (Capdevila i Atrian, 2011).

U PDB bazi su dostupne strukturne informacije za nekoliko životinjskih metalotioneina: *Oryctolagus cuniculus* (zec), *Notothenia coriiceps* (crni bakalar), *Homo sapiens*, *Mus musculus* (miš), *Rattus norvegicus* (pacov), *Homarus americanus* (američki jastog), *Callinectes sapidus* (plava kraba) i *Strongylocentrotus purpuratus* (ljubičasti morski jež). Smatra se da metalotioneini kičmenjaka, beskičmenjaka i biljaka imaju strukturu sličnu sisarskim metalotioneinima koji su najviše istraženi, sa nekim manjim razlikama (Van Straalen i Roelofs 2012). Sisarski metalotioneini se sastoje od dva klastera, α i β , koji su povezani kratkom sekvencom i koji vezuju 4 (α -domen), odnosno 3 (β -domen), dvovalentna jona metala. Kod nekih vrsta α i β domeni su zamenjeni, kod drugih (Crustacea i Nematoda) oba domena sadrže 9 cisteinskih ostataka koji vezuju po 3 dvovalentna metalna jona. Kod biljaka, dva domena su spojena veoma dugim vezujućim regionom (Cobbett i Goldsbrough 2002). Izuzetak čine metalotioneini *Drosophila* koji imaju samo jedan domen za vezivanje metala (Valls i sar., 2000; Egli i sar., 2003; Van Straalen i Roelofs 2012), slično kao kod metalotioneina gljiva i prokariota.

Kako bi se potvrdila hipoteza da *AmMT* kodira metalotionein i pružio uvid u potencijalne osobine ovog proteina, urađeno je molekularno modelovanje i bioinformatička analiza strukture pomoću I-TASSER programa (Yang i sar., 2015). Strukturne matrice identifikovane od strane I-TASSER-a u PDB bazi obuhvatale su veliki broj metalotioneina različitih organizama i drugih domena za vezivanje prelaznih metala. Kao što je prikazano na Slici 26, metalotioneini poseduju seriju petlji sa cisteinima koji su orijentisani tako da optimalno mogu da koordinativno vežu metal. Takođe, detaljnije su prikazani ostaci cisteina koji su uključeni u koordinaciju cinka (Slika 26C) i kadmijuma (Slika 26D). Kod nekih struktura, jedan cisteinski ostatak je uključen u koordinaciju dva metalna jona. Pozicije cisteina koji su uključeni u vezivanje prelaznih metala u sekvenci AmMT se poklapaju sa pozicijama kod metalotioneina drugih vrsta (Slika 25E).

Najbolji model AmMT sugerise prisustvo nekoliko džepova bogatih cisteinima koji su slični kao kod poznatih metalotioneina (Slika 27A). Predviđanjem mesta za vezivanje liganada u AmMT, korišćenjem COACH metaservera (Yang i sar., 2013), pronađeno je najmanje 5 potencijalnih mesta za vezivanje prelaznih metala, koja se sastoje isključivo od cisteinskih ostataka (Slika 27B). Cink, kadmijum i bakar su identifikovani kao mogući metalni joni za koje AmMT ima afinitet na sledećim

mestima: mesto 1 (cisteini 18, 22, 35, 43), mesto 2 (cisteini 22, 24, 29, 33), mesto 3 (cisteini 9, 17, 24), mesto 4 (cisteini 5, 6, 7, 9, 11, 14, 17), mesto 5 (cisteini 13, 16, 19, 30, 32, 33, 35, 36). Pomoću programa je sa manjim nivoom poverenja identifikovano još šest vezujućih mesta na N-kraju, za koje bi vezivanje bilo moguće uz manje konformacione korekcije. Genskom ontologijom (*engl.* gene ontology, GO) se svaki genski produkt definiše pomoću tačno definisanih termina koji opisuju njegovu molekularnu funkciju, biološki proces u kom učestvuje i ćelijski odeljak u kom deluje, a pored predviđanja strukture I-TASSER je identifikovao vezivanje jona (GO:0043167) i vezivanje prelaznih metala (GO:0046914) kao dve najbolje rangirane GO anotacije među prvih deset genskih ontologija dobijenih u PDB bazi podataka. Uzimajući sve navedeno u obzir, bioinformatička analiza strukture upućuje na zaključak da je novoidentifikovani protein AmMT metalotionein sa afinitetom za vezivanje različitih prelaznih metala, što je u skladu sa eksperimentalnim rezultatima. Pored toga, cisteinski ostaci identifikovani u AmMT kao potencijalna mesta za vezivanje jona prelaznih metala su konzervirani u predviđenim metalotioneinima drugih vrsta iz reda Hymenoptera, što može biti rezultat njihove funkcije.

Rekombinantni metalotionein je eksprimiran u *E. coli* BL21 i prečišćen je pomoću HisTrap HF kolone (Slika 29). Rekombinantni protein je imao dodatne amino-kiseline na N- i C-terminalnom kraju u odnosu na divlji tip (Slika 28), ali ova modifikacija nije uticala na kapacitet vezivanja metala. Molekularna masa rekombinantnog proteina (102 ak) je 10616,9 Da, a teoretska pI 8,52. Za proveru povećane tolerancije na prisustvo metala, rekombinantni protein je eksprimiran u *E. coli* koje su gajene u medijumu sa 400 µL CuCl₂, CdCl₂ ili PbCl₂ i pokazano je da prekomerna ekspresija povećava tolerantnost bakterija na ispitane metale (Slika 30). Ovi rezultati su u skladu sa sličnim studijama: transgene bakterije BL21 su pokazale povećanu toleranciju na izlaganje Zn, Cu, Pb i Cd kada je u njima ekspresovan metalotionein tip 2 iz mangrove *Avicennia marina* (Huang i Wang, 2010). Postoje slične studije kod drugih biljaka (Bilecen i sar., 2005; Quan i sar., 2007), ali i kod insekata, gde su bakterije sa eksprimiranim rekombinantnim proteinom MT1 pokazale povećanu toleranciju na prisustvo kadmijuma, dok sa proteinom MT2 nisu (Tang i sar., 2011). Ovi rezultati pružaju dodatnu potvrdu da AmMT vezuje metale i ima ulogu u homeostazi bioelemenata i detoksikaciji potencijalno toksičnih metala.

Gen za metalotionein do sada nije identifikovan kod medonosne pčele, pa je mehanizam njegove indukcije nakon intoksikacije teškim metalima nepoznat. Rezultati su pokazali da je nakon ishrane pčela sa rastvorom saharoze koji je sadržao rastuće koncentracije Cu, Pb i Cd nakon 48 h došlo do povećanja ekspresije gena za MT (Slika 31). Uočljiv je dozno-zavisni odgovor pri čemu je sa rastom koncentracije metala gradualno povećana i genska ekspresija, što daje dodatne informacije o ulozi *AmMT* u homeostazi i regulaciji prisustva metalnih jona. Slični rezultati su dobijeni kod muve *Musca domestica* (Tang i sar., 2011) gde je transkripciona aktivacija metalotioneina odgovala u dozno-zavisnom maniru na povećane koncentracije Cd. Ekspresija metalotioneina je takođe bila povećana pri izlaganju različitim koncentracijama kadmijuma i različitom trajanju tretmana kod kolebole *Folsomia candida* (Nakamori i sar., 2010) i pacifičke ostrige *Crassostrea gigas* (Choi i sar., 2008). Cd i Pb je povećao ekspresiju metalotioneina kod polihete *Perinereis nuntia* (Won i sar., 2012). Kod nekih organizama je primećena razlika u ekspresiji u zavisnosti od metala, kao kod školjke *Mytilus* sp., gde je MT indukovano sa vanadijumom, ali ne sa niklom (Amiard i sar., 2008) ili kod *C. elegans*, gde su MT indukovani sa kadmijumom, ali ne sa bakrom i cinkom (Swain i sar., 2004).

Rana indukcija gena za metalotionein u prisustvu toksičnih metala (pre svega Cd) kod različitih vrsta upućuje na mogućnost da se ovi geni koriste kao biomerkeri za prisustvo toksičnih metala u životnoj sredini (Carpene i sar., 2007). S obzirom da morski beskičmenjaci akumuliraju toksične metale, MT geni se koriste za indikaciju zagađenja metalima u morskim ekosistemima (Amiard i sar., 2006). Metalotionein je predložen kao prikladan biomarker za izlaganje metalima kod beskičmenjaka (npr. školjki) (Choi i sar., 2007) i za procenu količine metala u sedimentima (npr. člankoviti crvi) (Won i sar., 2008). U svakom slučaju, potrebno je obratiti pažnju pri upotrebi različitih izoformi kao biomarkera, jer su izoforme kod beskičmenjaka različito osetljive na izlaganje Cd i Cu (Won i sar., 2012; Dallinger i sar., 1997). Naši rezultati sugeriraju da je *AmMT* potencijalni bioindikator za kontaminaciju bakrom, olovom i kadmijumom.

7. Zaključak

Na osnovu terenskih istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ❖ koncentracija teških metala u pčelama i pergi se razlikuje u zavisnosti od stepena urbanizacije i industrijalizacije životne sredine, a perga može da se koristi za procenu izloženosti medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) teškim metalima;
- ❖ sadržaj metala u medu je manji u odnosu na pergu i pčele;
- ❖ aktivnost antioksidativnih enzima se menja pod uticajem životne sredine: nivo ekspresije gena i aktivnost superoksid dismutaze, katalaze i glutation *S*-transferaze su se razlikovali između pčela radilica sa različitih lokaliteta;
- ❖ povećana aktivnost superoksid dismutaze i istovremeno smanjena aktivnost katalaze govori o mogućem oksidativnom stresu u pčelama radilicama iz Zajače izazvanom velikim koncentracijama teških metala, naročito olova.

Rezultati laboratorijskih testova su pokazali da:

- ❖ izlaganje pčela bakru, olovu i kadmijumu u trajanju od 48 h nije uzrokovalo promene u aktivnosti superoksid dismutaze, katalaze i glutation *S*-transferaze u odnosu na kontrolnu grupu;
- ❖ koncentracija malondialdehida nije bila promenjena, što upućuje na zaključak da nije došlo do oksidativnih oštećenja biomolekula;
- ❖ tretman olovom je povećao koncentraciju glutaciona i sulfhidrilnih grupa proteina, što govori o tome da helacija olova može da bude prvi mehanizam odbrane od toksičnih efekata ovog metala;
- ❖ analiza gena za superoksid dismutazu (*Sod1* i *Sod2*), katalazu (*Cat*) i glutation *S*-transferazu (*Gstd1*, *Gsts1* i *Gstmic1*) je pokazala povećanje ekspresije kod pčela tretiranih bakrom i kadmijumom u različitim koncentracijama; u većini slučajeva ekspresija je bila dozno zavisna od koncentracije metala.

Identifikacija i analiza metalotioneina medonosne pčele je dovela do sledećih saznanja:

- ❖ pčele poseduju jedan gen za metalotionein, koji kodira mali protein po strukturi sličan metalotioneinima drugih vrsta i poseduje regione bogate cisteinom za koje mogu da se vežu joni metala, pre svega cink, kadmijum i bakar;
- ❖ promotorski region ovog gena, pored responsivnog elementa za metale, sadrži i veliki broj različitih responsivnih elemenata za vezivanje transkripcionih faktora koji su uključeni u opšti odgovor na stres, oksidativni stres, hipoksiju, biotransformaciju, regulaciju ćelijskog rasta i diferencijacije, što dokazuje da metalotionein medonosne pčele može biti indukovano raznim stimulusima;
- ❖ indukcija genske ekspresije gena za metalotionein (*AmMT*) kod medonosne pčele nakon izlaganja metalima i povećana tolerancija bakterija koje ekspresuju rekombinantni metalotionein na metale je potvrdila da metalotionein medonosne pčele ima ulogu u homeostazi bioelemenata i detoksikaciji potencijalno toksičnih metala.

Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za buduća istraživanja uticaja jona teških metala na medonosnu pčelu (*Apis mellifera*, L.) i predstavljaju važan korak u sveobuhvatnoj proceni uticaja stresogenih faktora iz životne sredine na pčele.

8. Literatura

- Abel J., de Ruiter N. (1989) Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicology Letters* 47: 191-196.
- Aebi H. (1984) [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 105: 121-126.
- Ahmad S. (1995) Oxidative stress from environmental pollutants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 29: 135-157.
- Ajioka R.S., Phillips J.D., Kushner J.P. (2006) Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763: 723-736.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Amdam G.V., Omholt S.W. (2002) The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology* 216: 209-228.
- Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P.S. (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76, 160–202.
- Amiard J.C., Journel R., Bacheley H. (2008) Influence of field and experimental exposure of mussels (*Mytilus sp.*) to nickel and vanadium on metallothionein concentration. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 147, 378-385.
- 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.
- Atanesyan L., Günther V., Celniker S.E., Georgiev O., Schaffner W. (2011) Characterization of MtnE, the fifth metallothionein member in *Drosophila*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16: 1047-1056.
- Atrian S. (2009) Metallothioneins in Diptera. In: Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. (Eds.) *Metal Ions in Life Sciences*, volume 5: Metallothioneins and Related Chelators. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Atukeren P., Yigitoglu M.R. (2013) The Stance of Antioxidants in Brain Tumors. In: Dr. Terry Lichtor (Ed.), *Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors*, InTech, Rijeka, Croatia.
- Badiou-Beneteau A., Carvalho S.M., Brunet J., Carvalho G.A., Bulete 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.

- Badiou-Beneteau A., Benneveau A., Geret F., Delatte H., Becker N., Brunet J.L., Reynaud B., Belzunces L.P. (2013) Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environment International* 60: 31-41.
- Banfalvi G. (2011) Heavy metals, trace elements and their cellular effects. In: Banfalvi G. (Ed.), Cellular effects of heavy metals, Springer, Netherlands.
- Beekman M., Ratnieks F.L.W. (2000) Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology* 14: 490-496.
- Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. (2013) GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41: D36-D42.
- Birben E., Sahiner U.M., Sackensen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal* 5: 9-19.
- Bogdanov S. (2006) Contaminants of bee products. *Apidologie* 37: 1-18.
- 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.
- Brodtschneider R., Crailsheim K. (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278-294.
- Buchwalter D.B. (2008) Metals. In: Smart R.C., Hodgson E. (Eds.), Molecular and Biochemical Toxicology, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Calow P. (1989) Proximate and ultimate responses to stress in biological systems. *Biological Journal of Linnean Society* 37: 173-181.
- Capdevila M., Atrian S. (2011) Metallothionein protein evolution: a miniassay. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16: 977-989.
- Carpene E., Andreani G., Isani G. (2007) Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21: 35-39.
- Cartharius K., Frech K., Grote K., Klocke B., Halmeier M., Kligenhof A., Frisch M., Bayerlein M., Werner T. (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21: 2933-2942.
- Celli G., Maccagnani B. (2003) Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* 56: 137-139.
- Choi H.J., Ji J., Chung K.H., Ahn I.Y. (2007) Cadmium bioaccumulation and detoxification in the gill and digestive gland of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 145, 227-235.

- Choi Y.K., Jo P.G., Choi C.Y. (2008) Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 147, 286-292.
- 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.
- Cobbett C., Goldsbrough P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 159–182.
- 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.
- Conti M.E., Botre F. (2001) Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment* 69: 267-282.
- Corona M., Hughes K.A., Weaver D.B., Robinson G.E. (2005) Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mechanisms of Ageing and Development* 126:1230–1238.
- Corona M., Robinson G.E. (2006) Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology* 15: 687-701.
- Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. (2002) Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 627-647.
- Craig P.M., Wood C.M., McClelland G.B. (2007) Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 293: R1882-R1892.
- Crichton R.R. (2012) Biological inorganic chemistry: A New Introduction to Molecular Structure and Function, Elsevier, Amsterdam, Netherlands
- 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.
- Dallinger R., Berger B., Hunziker P., Kägi J.H.R. (1997) Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature*, 388, 237–238.
- Davies K.J.A. (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50: 279-289.
- 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 & Cardiovascular Diseases* 15: 316-328.

- Devillers J. (2002) The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. In: Devillers J., Pham-Delègue M. (Eds.), *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. Taylor & Francis, London, UK
- Di N., Hladun K.R., Zhang K., Liu T., Trumble J.T. (2016) Laboratory bioassays on the impact of cadmium, copper and lead on the development and survival of honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae and foragers. *Chemosphere* 152: 530-538.
- Döke M.A., Frazier M., Grozinger C.M. (2015) Overwintering honey bees: biology and management. *Current opinion in Insect Science* 10: 185-193.
- Đorđević V.B., Pavlović D.D., Kocić G.M. (2000) Biohemija slobodnih radikala. Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu.
- Duffus J.H. (2002) "Heavy metals"—A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *pure and Applied Chemistry* 74: 793-807.
- 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.
- Eaton D.L., Bammler T.K. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences* 49: 156-164.
- Egli D., Selvaraj A., Yepiskoposyan H., Zhang B., Hafen e., Georgiev O., Schaffner W. (2003) Knockout of 'metal-responsive transcription factor' MTF-1 in *Drosophila* by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. *EMBO Journal* 22: 100–108.
- Ellman G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70–77.
- Elsik C.G., Worley K.C., Bennett A.K., Beye M., Camara F., Childers C.P., de Graaf D.C., Debyser G., Deng J., Devreese B., Elhaik E. (2014) Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC genomics* 15: 86.
- Enayati A.A., Ranson H., Hemingway J. (2005) Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14: 3-8.
- 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.
- European Commission (2005) Image2000 and CLC2000 products and methods. Italy: Joint Research Centre (DG JRC), European Commission.

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 16 pp.

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: <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.11>.

Farmand F., Ehdaie A., Roberts C.K., Sindhu R.K. (2005) Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environmental Research* 98: 33–39.

Farré D., Roset R., Huerta M., Adsuara J.E., Roselló L., Mar Albà M.M., Messeguer X. (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research* 31: 3651-3653.

Feder M.E., Hoffman G.E. (1999) Heat-shock protein, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology* 61: 243-282.

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

Feyereisen R. (1999) Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology* 44: 507-533.

Flora S.J.S., Mittal M., Mehta A. (2008) Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* 128: 501-523.

Gao X., Jia F., Shen G., Jiang H., Dou W., Wang J. (2013) Involvement of superoxide dismutase in oxidative stress in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*: molecular cloning and expression profiles. *Pest Management Science* 69: 1315-1325.

Gauthier M., Aras P., Jumarie C., Boily M. (2016) Low dietary levels of Al, Pb and Cd may affect the non-enzymatic antioxidant capacity in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Chemosphere* 144: 848-854.

Ghasemi H., Rostampour F., Ranjbar A. (2013) The role of oxidative stress in metals toxicity/Mitochondrial dysfunction as a key player. *Galen Medical Journal* 3: 2-13.

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

- Gonzales-Iglesias H., Alvarez L., Garcia M., Petrash C., Sanz-Medel A., Coca-Prados M. (2014) Metallothioneins (MTs) in the human eye: a perspective article on the zinc–MT redox cycle. *Metallomics* 6: 201-208.
- 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: 1-16.
- Grotto D., Santa Maria L., Valentini J., Paniz C., Schmitt G., Garcia S.C., Pomblum V.J., Rocga J.B.T., Farina M. (2009) Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química Nova* 32: 169-174.
- Grubor-Lajšić G., Petri E.T., Kojić D., Purać J., Popović Ž.D., Worland M.R., Clark S.M., Mojović M., Blagojević D.P. (2013) Hydrogen peroxide and ecdysone in the cryoprotective dehydration strategy of *Megaphorura arctica* (Onychiuridae: Collembola). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 82: 59-70.
- Gupta S.C., Sharma A., Mishra M., Mishra R.K., Chowduri D.K. (2010) Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sciences* 86: 377-384.
- Hagib W.H, Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974) Glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry* 294: 7130-7139.
- Haq F., Mahoney M., Koropatnick J. (2003) Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* 533: 211-226.
- Hayes J.D., Strange R.C. (2000) Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *Pharmacology* 61: 154-166.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005) Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 51-88.
- Heinemeyer T., Chen X., Karas H., Kel A.E., Liebich I., Meinhardt T., Reuter I., Schacherer F., Wingender E. (1999) Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Research* 27: 318-322.
- Hensbergen P.J., Donker M.H., Hunziker P.E., van der Schors R.C., van Straalen N.M. (2001) Two metal-binding peptides from the insect *Orchesella cincta* (Collembola) as a result of metallothionein cleavage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 1105-1114.
- Hensbergen P.J., Donker M.H., van Velzen M.J.M., Roelofs D., van der Schors R.C., Hunziker P.E., van Straalen N.M. (1999) Primary structure of a cadmium-induced metallothionein from the insect *Orchesella cincta* (Collembola). *European Journal of Biochemistry* 259: 197-203.
- Hispard F., Schuler D., de Vaufléury A., Scheifler R., Badot P.M., Dallinger R. (2008) Metal distribution and metallothionein induction after cadmium exposure in the terrestrial snail *Helix aspersa* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1533-1542.

- Hladun K.R., Di N., Liu T.X., Trumble J.T. (2016) Metal contaminant accumulation in the hive: consequences for whole-colony health and brood production in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry* 35: 322-329.
- Huang G.Y., Wang Y.S. (2010) Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicennia marina*) in response to metal stress. *Aquatic Toxicology* 99: 86-92.
- Isani G., Carpenè E. (2014) Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: a long journey from nematodes to mammals. *Biomolecules*, 4: 435-457.
- Jaisson S., Veiga-da-Cunha M., Van Schaftingen E. (2009) Molecular identification of ω -amidase, the enzyme that is functionally coupled with glutamine transaminases, as the putative tumor suppressor Nit2. *Biochimie*, 91: 1066-1071.
- Järup L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68: 167-182.
- Jia H., Sun R., Shi W., Yan Y., Li H., Guo X., Xu B. (2014) Characterization of a mitochondrial manganese superoxide dismutase gene from *Apis cerana cerana* and its role in oxidative stress. *Journal of Insect Physiology* 60: 68-79.
- Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A., Frazier M. (2010) Pesticides and honey bee toxicity - USA. *Apidologie* 41: 312-331.
- Jones D.P. (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 8: 1865-1879.
- Jovanović-Galović A., Blagojević D.P., Grubor-Lajšić G., Worland R., Spasić M.B. (2004) Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): diapause and metamorphosis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 55: 79-89.
- Jozefczak M., Remans T., Vangrosveld J., Cuypers A. (2012) Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 3145-3175.
- Kägi J.H. (1991) Overview of metallothionein. *Methods in Enzymology*, 205: 613-626.
- Kaim W., Schwederski B., Klein A. (2013) Bioinorganic chemistry: Inorganic elements in the chemistry of life, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, United Kingdom.
- Kakkar P., Jaffery F.N. (2005) Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 335-349.
- Kalinowski D.S., Richardson D.R. (2010) Cellular and molecular biology of iron-binding proteins. In: Zalups R.K., Koropatnick J. (Eds.) Cellular and Molecular Biology of Metals, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA.

Kang Y.J. (2006) Metallothionein Redox Cycle and Function. *Experimental Biology and Medicine* 231: 1459.

Kersey P.J., Allen J.E., Armean I., Boddu S., Bolt B.J., Carvalho-Silva D., Christensen M., Davis P., Falin L.J., Grabmueller C., Humphrey J., Kerhornou A., Khobova J., Aranganathan N.K., Langridge N., Lowy E., McDowall M.D., Maheswari U., Nuhn M., Ong C.K., Overduin B., Paulini M., Pedro H., Perry E., Spudich G., Tapanari E., Walts B., Williams G., Tello-Ruis M., Stein J., Wei S., Ware D., Bolser D.M., Howe K.L., Kulesha E., Lawson D., Maslen G., Staines D.M. (2016) Ensembl Genomes 2016: more genomes, more complexity. *Nucleic Acids Research* 44: D574-D580.

Kim B.M., Rhee J.S., Park G.S., Lee J., Lee Y.M., Lee J.S. (2011a) Cu/Zn- and Mn superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: molecular cloning and expression in response to environmental pollutants. *Chemosphere* 84: 1467-1475.

Kim B.Y., Hui W.L., Lee K.S., Wan H., Yoon H.J., Gui Z.Z., Chen S., Jin B.R. (2011b) Molecular cloning and oxidative stress response of a sigma-class glutathione *S*-transferase of the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 158: 83-89.

Klaasen C.D., Liu J., Choudhuri S. (1999) Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 267-294.

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: Biological Sciences* 274: 303-313.

Kohen R., Nyska A. (2002) Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30: 620-650.

Kojić D., Spasojević I., Mojović M., Blagojević D., Worland R., Grubor-Lajšić G., Spasić M.B. (2009) Potential role of hydrogen peroxide and melanin in the cold hardiness of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *European Journal of Entomology* 106: 451-454.

Koo H.-N., Lee S.-G., Yun S.-H., Kim H.K., Choi Y.S., Kim G.-K. (2016) Comparative analyses of Cu-Zn superoxide dismutase (SOD1) and thioredoxin reductase (TrxR) at the mRNA level between *Apis mellifera* L. and *Apis cerana* F. (Hymenoptera: Apidae) under stress conditions. *Journal of Insect Science* 16: 1-6.

Korayem A.M., Khodairy M.M., Abdel-Aal A.-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.

Koropatnick J. (2010) Metallothionein and Metal Homeostasis. In: Zalups R.K., Koropatnick J. (Eds.) Cellular and Molecular Biology of Metals, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA.

Korsloot A., van Gestel C.A.M., van Straalen N.M. (2004) Environmental stress and cellular response in arthropods. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA.

Krishnan N., Kodrik D. (2012) Endocrine control of oxidative stress in insects. In: Farooqui T., Farooqui A.A. (Eds.) Oxidative stress in vertebrates and invertebrates: molecular aspect of cell signaling (1st ed.). New Jersey: Wiley-Blackwell. p 261–270.

Kültz D. (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology* 67: 225-257.

Lalevée S., Anno Y.N., Chatagnon A., Samarut E., Poch O., Laudet V., Benoit GG., Lecompte O., Rochette-Egly C. (2011) Genome-wide in silico identification of new conserved and functional retinoic acid receptor response elements (direct repeats separated by 5 bp). *Journal of Biological Chemistry* 286: 33322-33334.

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.

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 K.-W., Raisuddin S., Rhee J.-S., Hwang D.-S., Yu I.T., Lee Y.-M., Park H.G., Lee J.-S. (2008) Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. *Aquatic Toxicology* 89: 158-166.

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.

Lichtlen P., Schaffner W. (2001) Putting its fingers on stressful situations: the heavy metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Bioessays* 23: 1010-1017.

Liu Y., Wu H., Kou L., Liu X., Zhang J., Guo Y., Ma E. (2014) Two metallothionein genes in *Oxya chinensis*: Molecular characteristics, expression patterns and roles in heavy metal stress. *PLoS ONE* 9: e112759.

Liu Y., Wu H., Yu Z., Guo Y., Zhang J., Zhu K.Y., Ma E. (2015) Transcriptional response of two metallothionein genes (*OcMT1* and *OcMT2*) and histological changes in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea) exposed to three trace metals. *Chemosphere* 139: 310-317.

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.

Lu N.Z., Wardell S.E., Burnstein K.L., Defranco D., Fuller P.J., Giguere V., Hochberg R.B., McKay L., Renoir J.M., Weigel N.L., Wilson E.M., McDonnell D.P., Cidlowski J.A. (2006) International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacological Reviews* 58: 782-797.

Margoshes M., Vallee B.L. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of American Chemical Society* 79: 4813-4814.

Marnett L.J. (1999) Lipid peroxidation- DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* 424: 83-95.

Martindale J.L., Holbrook N.J. (2002) Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology* 192: 1-15.

Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Givannini C. (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 577-586.

Mathews M.C., Summers C.B., Felton G.W. (1997) Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 34: 57-68.

Matilla H.R., Harris J.L., Otis G.W. (2001) Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes sociaux* 48: 88-93.

McCord J.M., Fridovich I. (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 243: 5753-5760.

McWilliam H., Li W., Uludag M., Squizzato S., Park Y.M., Buso N., Cowley A.P., Lopez R. (2013) Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* 41: W597-W600.

Medrzycki P., Giffard H., Aupinel P., Belzunces L.P., Chauzat M.-P., Claßen C., Colin M.E., Dupont T., Girolami V., Johnson R., Leconte Y., Lückmann J., Marzaro M., Pistorius J., Porrini C., Schur A., Sgolastra F., Simon Delso N., van der Steen J.J.M., Wallner K., Alaux C., Biron D.G., Blot N., Bogo G., Brunet J.-L., Delbac F., Diogon M., El Alaoui H., Provost B., Tosi S., Vidau C. (2013) Standard methods for toxicology 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: <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.14>.

Michener C.D. (2000) Bees of the World. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.

Miller M., Shuman J.D., Sebastian T., Dauter Z., Johnson P.F. (2003) Structural basis for DNA recognition by the basic region leucine zipper transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein α . *Journal of Biological Chemistry* 278: 15178-15184.

Mirčić D., Blagojević D., Perić-Mataruga V., Ilijin L., Mrdaković M., Vlahović M., Lazarević J. (2013) Cadmium effects on the fitness-related traits and antioxidative defense of *Lymantria dispar* L. larvae. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 209-218.

Mitchell A., Chang H.Y., Daugherty L., Fraser M., Hunter S., Lopez R., McAnulla C., McMenamin C., Nuka G., Pesseat S., Sangrador-Vegas A., Scheremetjew M., Rato C., Yong S.Y., Bateman A., Punta M., Attwood T.K., Sigrist C.J., Redaschi N., Rivoire C., Xenarios I., Kahn D., Guyot D., Bork P., Letunic I., Gough J., Oates M., Haft D., Huang H., Natale D.A., Wu C.H., Orengo C., Sillitoe I., Mi H., Thomas P.D., Finn R.D. (2015) The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research* 43: D213-D221.

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.

Munoz-Torres M.C., Reese J.T., Childers C.P., Bennett A.K., Sundaram J.P., Childs K.L., Anzola J.M., Milshina N., Elsik C.G. (2011) Hymenoptera Genome Database: integrated community resources for insect species of the order Hymenoptera. *Nucleic Acids Research* 39: D658-D662.

Nagai T., Nagashima T., Myoda T., Inoue R. (2004) Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung/Food* 48: 226-229.

Nair P.M.G., Choi J. (2011) Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. *Aquatic Toxicology* 101: 550-560.

Nair P.M.G., Park S.Y., Choi J. (2011) Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 154: 399–408.

Nakamori T., Fujimori A., Kinoshita K., Ban-nai T., Kubota Y., Yoshida S. (2010) mRNA expression of a cadmium-responsive gene is a sensitive biomarker of cadmium exposure in the soil collembolan *Folsomia candida*. *Environmental Pollution*, 58, 1689-1695.

Nicolson S.W. (2009) Water homeostasis in bees, with the emphasis on sociality. *The Journal of Experimental Biology* 212: 429-434.

Nishina H., Wada T., Katada T. (2004) Physiological Roles of SAPK/JNK Signaling Pathway. *The Journal of Biochemistry* 136: 123-126.

Nordberg M., Nordberg G.F. (2009) Metallothioneins: Historical development and overview. In: Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. (Eds.) Metal Ions in Life Sciences, volume 5: Metallothioneins and Related Chelators. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

O'Connor D.J., Sady's M., Skjøth C.A., Healy D.A., Kennedy R., Sodeau J.R. (2014) Atmospheric concentrations of *Alternaria*, *Cladosporium*, *Ganoderma* and *Didymella*

spores monitored in Cork (Ireland) and Worcester (England) during the summer of 2010. *Aerobiologia* 30:397–411.

Oakley A.J. (2011) Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews* 43: 138-151.

Olsson P.-E., Kling P., Hogstrand C. (1998) Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In: Langston W.J., Bebianno M.J. (Eds.) *Metal metabolism in aquatic environments*. Thomson Science, London, UK.

Palacios Ò., Atrian S., Capdevila M. (2011) Zn- and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins? *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16: 991-1009.

Park S.Y., Nair P.M.G., Choi J. (2012) Characterization and expression of superoxide dismutase genes in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae as a potential biomarker of ecotoxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 156: 187-194.

Patel R.P., McAndrew J., Sellak H., Roger White C., Jo H., Freeman B.A., Darley-Usmar V.M. (1999) Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411: 385-400.

Patrick L. (2006) Lead toxicity part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review* 11: 114-127.

Pattee O.H., Pain D.J. (2003) Lead in the environment. In: Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton Jr. G.A. Jr., Cairns Jr. J. (Eds.) *Handbook of Ecotoxicology*, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA.

Pérez-Rafael S., Mezger A., Lieb B., Dallinger R., Capdevila M., Palacios O., Atrian S. (2012) The metal binding abilities of *Megathura crenulata* metallothionein (McMT) in the frame of Gastropoda MTs. *Journal of Inorganic Biochemistry* 108: 84-90.

Perugini M., Di Serafino G., Giacomelli A., Medrzycki P., Sabatini A.G., Persano Oddo L., Marinelli E., Amorena M. (2009) Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in bees (*Apis mellifera*) and honey in urban areas and wildlife reserves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7440–7444.

Perugini M., Manera M., Grotta L., Abete M.C., Tarasco R., Amorena M. (2011) Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honey bees as bioindicators. *Biological Trace Element Research* 140: 170–176.

Petering D.H., Krezoski S., Tabatabai N.M. (2009) Metallothionein toxicology: Metal ion trafficking and cellular protection. In: Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. (Eds.) *Metal Ions in Life Sciences*, volume 5: Metallothioneins and Related Chelators. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

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.

Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama ("Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 - ispr. i 32/2002 i "Sl. glasnik RS", br. 25/2010 - dr. pravilnik i 28/2011 - dr. pravilnik).

Rao A., Luo C., Hogan P.G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of Immunology* 15: 707-747.

Rashed M.N., El-Haty M.T.A., Mohamed S.M. (2009) Bee honey as environmental indicator for pollution with heavy metals. *Toxicological and Environmental Chemistry* 91: 389-403.

Rhee J.S., Won E.J., Kim R.O., Lee J., Shin K.H., Lee J.S. (2011) Expression of superoxide dismutase (SOD) genes from the copper-exposed polychaete, *Neanthes succinea*. *Marine Pollution Bulletin* 63, 277-286.

Roh J., Lee J., Choi J. (2006) Assessment of stress-related gene expression in the heavy metal-exposed Nematode *Caenorhabditis elegans*: a potential biomarker for metal-induced toxicity monitoring and environmental risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 2946-2956.

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.

Ruttkay-Nedecky B., Nejdil L., Gumulec J., Zitka O., Masarik M., Eckschlager T., Striborova M., Adam V., Kizek R. (2014) The role of metallothionein in oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 6044-6066.

Ruttner F. (1988) Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Germany.

Ryvolova M., Krizkova S., Adam V., Beklova M., Trnkova L., Hubalek J., Kizek R. (2011) Analytical methods for metallothionein detection. *Current Analytical Chemistry* 7: 243-261.

Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

Scandalios J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 995-1014.

- Schaumlöffel D. (2012) Nickel species: Analysis and toxic effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 26: 1-6.
- Selvaraj A., Balamurugan K., Yepiskoposyan H., Zhou H., Egli D., Georgiev O., Thiele D.J., Schaffner W. (2005) Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes. *Genes & Development* 19: 891-896.
- Sharma S.K., Goloubinoff P., Christen P. (2008) Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372: 341-345.
- Sheng Y., Abreu I.A., Cabelli D.E., Maroney M.J., Miller A.-F., Teixeira M., Selverstone Valentine J. (2014) Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chemical Reviews* 114: 3854-3918.
- Sies H., Cadenas E. (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 311: 617-631.
- Sigh S.P., Coronella J.A., Beneš 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.
- Silver S., Phung L.T. (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32: 587-605.
- Simeunović P., Stevanović J., Ćirković D., Radojičić S., Lakić N., Stanišić Lj., Stanimirović Z. (2014) *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *Journal of Apicultural Research* 53: 545-554.
- Simonsen L.O., Harbak H., Bennekou P. (2012) Cobalt metabolism and toxicology- A brief update. *Science of the Total Environment* 432: 210-215.
- Simoons, F.J. (1990) Spices and Flavorings; Honey, Sugar and Other Sweeteners. in: *Food in China: A Cultural and Historical Inquiry*. Telford Press, Telford, Pennsylvania.
- Slater T.F. (1984) Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 105: 283-93.
- Stanimirović Z., Soldatović B., Vučinić M. (2000) *Medonosna pčela*. Medicinska knjiga, Beograd.
- Stevanović J., Stanimirović Z., Genersch E., Kovačević S.R., Ljubenković J., Radaković M., Aleksić N. (2011) Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 42: 49-58.
- Stevanović J., Simeunović P., Gajić B., Lakić N., Radović D., Fries I., Stanimirović Z. (2013) Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie* 44: 522-536.

- Stohs S.J., Bagchi D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine* 18: 321-336.
- Stone D., Jepson P., Laskowski R. (2002) Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 132: 105–112.
- Sturzenbaum S.R. (2009) Earthworm and Nematode metallothioneins. In: Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. (Eds.) *Metal Ions in Life Sciences*, volume 5: Metallothioneins and Related Chelators. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Swain S.C., Keusekotten K., Baumeister R., Stürzenbaum S.R. (2004) *C. elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *Journal of Molecular Biology*, 341, 951-959.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tang T., Hiang D., Zhang D., Wu Y., Murphy R.W., Liu F. (2011) Identification of two metallothionein genes and their roles in stress responses of *Musca domestica* toward hyperthermy and cadmium tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 160: 81-88.-
- Tang T., Huang D.-W., Zhou C.-Q., Li X., Xie Q.-J., Liu F.-S. (2012) Molecular cloning and expression patterns of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in *Musca domestica*. *Gene* 505: 211-220.
- Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. (2012) Heavy metals and the environment. *Experientia Supplementum* 101: 133-164.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931-949.
- Thornalley P.J., Vasak M. (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation- induced oxidative stress, kinetics and mechanisms of its reaction with superoxide and hydrogen radicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 827: 36-44.
- Traverso N., Menini S., Pesce Maineri E., Patriarca S., Odetti P., Cottalasso D., Marinari U.M., Pronzato M.A. (2004) Malondialdehyde, a Lipoperoxidation-Derived Aldehyde, Can Bring About Secondary Oxidative Damage To Proteins. *Journal of Gerontology* 59: 890-895.
- Tsunoda T., Takagi T. (1999) Estimating transcription factor bind ability on DNA. *Bioinformatics* 15: 622-630.

- Tyagi S., Gupta P., Saini A.S., Kaushal C., Sharma S. (2011) The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2: 236-240.
- Udomsinprasert R., Pongjaroenkit S., Wongsantichon J., Oakley A.J., Prapanthadara L., Wilce M.C.J., Ketterman A.J. (2005) Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochemical Journal* 388: 763-771.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M. (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 178-189.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12: 1161-1208.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., 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.
- Valls M., Bofill R., Romero-Isart N., González-Duarte R., Abián J., Carrascal M., González-Duarte P., Capdevila M., Atrian S. (2000) Drosophila MTN: a metazoan copper-thionein related to fungal forms. *FEBS Letters* 467: 189-194.
- van der Steen J.J.M., de Kraker J., Grothenius T. (2012) Spatial and temporal variation of metal concentrations in adult honeybees (*Apis mellifera* L.). *Environmental Monitoring and Assessment* 184: 4119-4126.
- van Straalen N.M. (2003) Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environmental Science and Technology* 325-330.
- van Straalen N., Roelofs D. (2012) An Introduction to Ecological Genomics. Oxford University Press, Oxford, UK.
- 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., Tarpy D.R., Pettis J.S. (2009) Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* 48: e6481.
- 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.
- Vergani L. (2009) Metallothioneins in aquatic organisms: Fish, crustaceans, molluscs, and echinoderms. In: Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. (Eds.) *Metal Ions in Life Sciences*, volume 5: Metallothioneins and Related Chelators. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192: 95-117.

- Wang S., Shi X. (2001) Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 222: 3-9.
- Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M., Clamp M., Barton G.J. (2009) Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191.
- Weirich G.F., Collins A.M., Williams V.P. (2002) Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33: 3-14.
- Wilczek G., Majkus Z., Migula P., Bednarska K., Swierczek E. (1997) Heavy metals and detoxifying enzymes in spiders from coal and metallurgic dumps near Ostrava (Czech Republic). In: Zabka M. (Ed.), *Proceedings of the 16th European Colloquium of Arachnology*, Siedlce, Poland, July 1996: 317–328.
- 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.
- Winston, M. L. (1991) *The Biology of the honey bee*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Won E.J., Raisuddin S., Shin K.H. (2008) Evaluation of induction of metallothionein-like proteins (MTLPs) in the polychaetes for biomonitoring of heavy metal pollution in marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 544-551.
- Won E.J., Rhee J.S., Ra K., Kim K.T., Au D.W., Shin K.H., Lee J.S. (2012) Molecular cloning and expression of novel metallothionein (MT) gene in the polychaete *Perinereis nuntia* exposed to metals. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 2606-2618.
- Won E., Ra K., Kim K., Lee J., Lee Y. (2014) Three novel superoxide dismutase genes identified in the marine polychaete *Perinereis nuntia* and their differential responses to single and combined metal exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107: 36-45.
- Xiao G.G., Wang M., Li N., Loo J.A., Nel A.E. (2003) Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *Journal of Biological Chemistry* 278: 50781–50790.
- Yan H., Jia H., Wang Z., Gao H., Guo X., Xu B. (2013a) Identification and characterization of an *Apis cerana cerana* Delta class glutathione S-transferase gene (*AccGSTD*) in response to thermal stress. *Naturwissenschaften* 100: 153-163.
- Yan H., Jia H., Gao H., Guo X., Xu B. (2013b) Identification, genomic organization, and oxidative stress response of a sigma class glutathione S-transferase gene (*AccGSTS1*) in the honey bee, *Apis cerana cerana*. *Cell Stress and Chaperones* 18: 415-426.

Yang J., Roy A., Zhang Y. (2013) Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment, *Bioinformatics* 29: 2588-2595.

Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. (2015) The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12: 7-8.

Zalups R.K., Koropatnick D.J. (Eds.) (2010) Cellular and molecular biology of metals. Crc Press, Boca Raton, Florida.

Zhang B., Egli D., Georgiev O., Schaffner W. (2001) The Drosophila homolog of mammalian zinc finger factor MTF-1 activates transcription in response to heavy metals. *Molecular and Cellular Biology* 21: 4505-4514.

Zimniak P., Singh S.P. (2006) Families of glutathione transferases. In: Awasthi Y.C. (Ed.) Toxicology of Glutathione Transferases. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA.

9. Prilozi

Prilog 1. Moguća mesta za vezivanje transkripcionih faktora su pronađena pomoću programa PROMO, TFBIND, TFSEARCH i GENOMATIX. Pretraga je bila ograničena na 1500 bp uzvodno od početka otvorenog okvira čitanja. Pozicija je prikazana tako da se prvi bazni par u promotorskom regionu posmatra kao 1, a poslednji kao 1500.

Transkripcioni faktor	Mesto za vezivanje na DNK	Sekvenca	Lanac	Pozicija
AP-1	AP-1 binding element	TGATC	-	20
AP-1	AP-1 binding element	GGTGTA	-	33
AP-1	AP-1 binding element	AATATTCATC	-	92
AP-1	AP-1 binding element	ATTACATCACT	-	128
AP-1	AP-1 binding element	ATTAATCA	+	207
AP-1	AP-1 binding element	TTAATCA	+	208
AP-1	AP-1 binding element	AGTTTCA	+	309
AP-1	AP-1 binding element	TTTACAAAT	-	327
AP-1	AP-1 binding element	GTTTCATTCATT	-	386
AP-1	AP-1 binding element	TTCATTCAT	-	387
AP-1	AP-1 binding element	AACAAATCATG	-	416
AP-1	AP-1 binding element	CGGATTAAT	-	564
AP-1	AP-1 binding element	CCAAT	-	603
AP-1	AP-1 binding element	GATGAATCTAT	+	636
AP-1	AP-1 binding element	TTTATTAAT	-	678
AP-1	AP-1 binding element	ATTAATAAG	+	681
AP-1	AP-1 binding element	TTTATTAAG	-	857
AP-1	AP-1 binding element	ATATAATCATT	-	951
AP-1	AP-1 binding element	ACTGACCTATT	+	972
AP-1	AP-1 binding element	CTTAATTCATT	-	1013
AP-1	AP-1 binding element	TTGTGTAAC	+	1052
AP-1	AP-1 binding element	ATTTCTCAT	+	1068
AP-1	AP-1 binding element	CCAAT	-	1075
AP-1	AP-1 binding element	TTTAGTAAT	+	1138
AP-1	AP-1 binding element	TTTATACAT	-	1175
HSF	HSE	AGAAN	+	79
HSF	HSE	CTCTAGAA	+	263
HSF	HSE	TTCTAGAG	-	263
HSF	HSE	AGAAN	+	267
HSF	HSE	AGAAN	-	366
HSF	HSE	AGAAN	-	373
HSF	HSE	TGTTTCATTCA	-	385
HSF	HSE	GGAACCTCGCG	+	434
HSF	HSE	AGAAN	+	447
HSF	HSE	AGAAN	+	580
HSF	HSE	AGATGAATCT	+	635
HSF	HSE	TGAACAAACT	+	653
HSF	HSE	AGAAN	+	708
HSF	HSE	AGAAN	-	846
HSF	HSE	AAAAGATTCC	-	921
HSF	HSE	AGAAN	+	933

HSF	HSE	TTCC	+	909
HSF	HSE	AGAAN	-	959
HSF	HSE	TTCT	+	978
HSF	HSE	AGAAN	-	995
HSF	HSE	AGAAN	+	1000
HSF	HSE	AGAAN	-	1035
HSF	HSE	AGAAN	-	1069
HSF	HSE	AGAAN	+	1147
HSF	HSE	AGAAN	-	1223
HSF	HSE	AGAAN	-	1248
HSF	HSE	AGAAN	-	1256
HSF	HSE	AGAAN	+	1341
HSF	HSE	GGAA	-	1459
NRF2	ARE, EpRE	AACTTCCTTT	-	320
NRF2	ARE, EpRE	ACCTGAAGAT	+	629
MTF	MRE	CACG	+	1492
AhR	XRE, DRE, AhRE	AGGAACTCGCGTTAAG	+	433
AhR	XRE, DRE, AhRE	GAACTCGCGTTAAGAA	-	435
AhR	XRE, DRE, AhRE	CGGCACAGAAAGGAAA	-	574
AhR	XRE, DRE, AhRE	TATTATTTTCGTAAAA	+	979
AhR	XRE, DRE, AhRE	GTAATGTTGTGTAACG	+	1046
AhR	XRE, DRE, AhRE	GTTGTGTAACGTGCAA	+	1051
AhR	XRE, DRE, AhRE	CATTGGGCTCGTGCTG	+	1074
AhR	XRE, DRE, AhRE	GCAGTAACACGAAATAATA	-	1286
AhR	XRE, DRE, AhRE	TAACACGAAATAATAT	-	1290
AhR	XRE, DRE, AhRE	TGGCACGTTAGTTGCACA	-	1483
AhR	XRE, DRE, AhRE	TTGCACACGACATTAAGA	-	1494
HIF1	HRE	CGTG	+	1052
HIF1	HRE	CGTG	-	1481
NIT2	NIT RE	TATCTM	+	150
NIT2	NIT RE	TATCTM	-	404
NIT2	NIT RE	TATCTM	+	1040
NIT2	NIT RE	TATCTM	-	1336
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TTATTGCTTACACC	+	26
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AAATGTTGAAGTAT	+	49
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATATTTTCATCAAAA	-	93
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	GAATTACATCACTT	+	126
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AAATTTTCAGTACAC	-	270
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	CCTTACAAATTA	-	325
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TTTTTCTTTATTC	-	363
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TTATTCTGAAAATG	+	371
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AAATCATGTAAGCA	+	419
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	GCGTTAAGAAATTA	+	441
C/EBPbeta	C/EBP-responsive element	CTGGRAA	+	455
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATATTATGAAAAAA	+	501
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TTATGAAAAAATAT	+	504
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TAGTTTTATAATAT	+	520
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TTATTTAAAAATTT	+	540
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AGAGTACAACAGAT	+	589

C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AGATATTGGAATGT	+	599
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATATTGAACAAACT	+	649
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATAAGTGGAAAAAT	+	685
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	GAATTGCATATTTG	+	715
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	CATATTTGCAATAA	-	721
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TATTTTCATTACAA	-	748
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AAAAAAAGCAATAA	+	767
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATTTTGTTTAATTT	-	794
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TTTTTTCCAAAAAA	-	818
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATTTTTCCTTAATT	-	892
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TAATTTTCATTTTAT	-	901
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TATTTTCGTAAAAT	+	982
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATGTTGTGTAACGT	+	1049
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AACGTGCAACATTT	-	1058
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ACATTTCTCATTGG	-	1066
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ACCTTTCATTTCCCT	-	1120
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TCATTTCCCTAATCT	-	1125
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATCTTTAGTAATAG	+	1135
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AATTTTTAAAATTT	-	1237
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATATAATGCAAGAT	+	1266
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATATTTTTAAAAAAT	+	1320
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	ATTTTTAAAAAATTT	+	1322
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	GTATTTGGAAATAT	+	1349
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AAATAATGTAAATA	+	1383
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TAATTGCAAAATATT	-	1395
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	AAATTTTGAATAGT	+	1424
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TTGCGCA		1476
C/EBP BETA	C/EBP-responsive element	TTGCACA		1494
GR beta	GRE	AGATCA	+	19
GR beta	GRE	ATTACA	+	128
GR beta	GRE	ATTACA	+	394
GR beta	GRE	ATTACA	+	755
GR beta	GRE	TGTTCT	+	1034
GR beta	GRE	AGAACA	-	1034
GR beta	GRE	TGTTCT	+	1255
GR beta	GRE	AGAACA	-	1255
PPAR	PPRE	TCATTTATTGCTTACACCTG	-	22
PPAR	PPRE	GCTCAAAGTAAA		464
PPAR	PPRE	TGAACC	+	626
PPAR	PPRE	TGACCT	+	974
PPAR	PPRE	AGGTCA	-	974
PPAR	PPRE	AGTTCA	-	1004
NFAT-1	NFAT binding element	TTTTCC	+	551
NFAT-1	NFAT binding element	GGAAAA	-	551
NFAT	NFAT binding element	GGAA	+	580
NFAT-1	NFAT binding element	GGAAAA	+	691
NFAT-1	NFAT binding element	TTTTCC	-	691
NFAT-1	NFAT binding element	TTTTCC	+	820
NFAT-1	NFAT binding element	GGAAAA	-	820

NFAT-1	NFAT binding element	AGGAAAAA	-	893
NFAT-1	NFAT binding element	TTTTCC	+	894
NFAT-1	NFAT binding element	GGAAAA	-	894
NFAT	NFAT binding element	GGAA	+	1350
NFAT	NFAT binding element	GGAA	+	1352
RARalpha1	RARE	GTTCA	+	386
RARalpha1	RARE	TGAAC	-	386
RARalpha1	RARE	TGAAC	+	626
RARalpha1	RARE	GTTCA	-	626
RARalpha1	RARE	TGAAC	+	653
RARalpha1	RARE	GTTCA	-	653
RARalpha1	RARE	TGACC	+	974
RARalpha1	RARE	AGGTCA	-	974
RARalpha1	RARE	TGAAC	+	1004
RARalpha1	RARE	AGTTCA	-	1004

Biografija



Tatjana V. Nikolić rođena je 21. novembra 1987. godine u Novom Sadu. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Srbobranu, nakon čega 2006. godine upisuje studije Molekularne biologije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Diplomirala je 2010. godine i upisala master studije na istom Fakultetu. Tokom master studija provela je mesec dana u Češkoj Republici, gde je u Laboratoriji za dijapauzu insekata, Biološkog centra Češke akademije nauka u Češkim Buđevovicama uradila eksperimentalni deo svog master rada „Aktivnost kaspaza 3, 8 i 9 u dijapauzi kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis*” koji je uspešno odbranila u oktobru 2011. Iste godine upisuje doktorske studije Biohemije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Sve ispite predviđene planom i programom je položila sa prosečnom ocenom 9,67. Za istraživača-pripravnika za užu naučnu oblast Molekularna biologija je izabrana u januaru 2013. godine, a u oktobru 2015. za istraživača-saradnika u istoj naučnoj oblasti.

Od marta 2012. je učesnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patologiji” (OI 173014), najpre kao stipendista, a od februara 2014. je zaposlena kao istraživač na istom projektu. Bila je učesnik i na dva kratkoročna projekta od posebnog interesa za održivi razvoj u AP Vojvodini: „Biohemijski i ekofiziološki aspekti održanja medonosnih pčela u Vojvodini” (2013-2014) i „Molekularna osnova odgovora medonosnih pčela na prisustvo polutanata u životnoj sredini” (2015-2016).

U toku doktorskih studija bila je uključena u izvođenje nastave na predmetima „Osnove molekularne biologije” za studente biologije i biohemije i „Mehanizmi ekoloških adaptacija” za studente biologije i ekologije.

Koautor je dva rada kategorije M21 i jednog rada kategorije M22, kao i većeg broja saopštenja sa nacionalnih i međunarodnih naučnih konferencija.

Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije i Srpskog biološkog društva.

Novi Sad, 2. mart 2017.

Tatjana Nikolić

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni

broj:

IBR

Tip

Monografska dokumentacija

dokumentacije:

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada:

Doktorska disertacija

VR

Autor:

Tatjana Nikolić

AU

Mentor:

Dr Jelena Purać, vanredni profesor PMF-a u Novom Sadu

MN

Naslov rada:

Molekularne osnove odgovora medonosne pčele (*Apis mellifera*, L.) na stres izazvan jonima teških metala

NR

Jezik

Srpski (latinica)

publikacije:

JP

Jezik izvoda:

srp. / eng.

JI

Zemlja

Republika Srbija

publikovanja:

ZP

Uže geografsko

Vojvodina

područje:

UGP

Godina:

2017.

GO

Izdavač:

Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa:

Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

MA

Fizički opis
rada:

Broj poglavlja: 9; Strana: 139; Lit. citata: 221; Tabela: 11; Slika: 31;
Prilozi: 1

FO

Naučna oblast:

Hemija

NO

Naučna disciplina: ND
Ključne reči: PO
UDK
Čuva se: ČU

Biohemija

Medonosna pčela, antioksidativni enzimi, teški metali, metalotionein, odgovor na stres

Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

Važna napomena: VN

Izvod: IZ

Istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su bila usmerena ka razumevanju molekularnih mehanizama koji se aktiviraju kod medonosne pčele (*Apis mellifera*, L.) kao odgovor na stres izazvan jonima teških metala, što zbog važnosti medonosne pčele kao oprašivača ima poseban značaj i očekuje se da će doprineti očuvanju ove vrste. Istraživanja su bila podeljena u tri faze. U prvoj fazi za analize su korišćene populacije pčela sa lokaliteta sa različitim antropološkim uticajem i izmerena je koncentracija metala u pčelama, pergi i medu, kao i relativna genska ekspresija i aktivnost antioksidativnih enzima. U drugoj fazi pčele su u kontrolisanim laboratorijskim uslovima bile izložene subletalnim dozama jona teških metala (bakra, kadmijuma i olova), nakon čega su izmereni parametri koji ukazuju na redoks status i nivo oksidativnog stresa. Rezultati prve dve faze su pokazali da se ekspresija gena i aktivnost antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze, katalaze i glutation *S*-transferaze) razlikuje u zavisnosti od stepena urbanizacije i industrijalizacije, dok je izlaganje bakru i kadmijumu u kontrolisanim uslovima u trajanju od 48 h dovelo samo do promene u ekspresiji gena i u većini slučajeva ekspresija je bila dozna zavisna od koncentracije metala. Olovo je uzrokovalo promene u koncentraciji glutationa i sulfhidrilnih grupa proteina, što govori o tome da helacija olova može da bude prvi mehanizam odbrane od toksičnih efekata ovog metala. U trećoj fazi bioinformatičkom analizom je pronađen metalotionein medonosne pčele i ispitana je njegova funkcija u zaštiti od toksičnih efekata jona teških metala. Utvrđeno je da pčele poseduju jedan gen za metalotionein, koji kodira mali protein sa regionima bogatim cisteinom za koje mogu da se vežu joni metala. Indukcija genske ekspresije metalotioneina medonosne pčele nakon izlaganja metalima i povećana tolerancija bakterija koje ekspresuju rekombinantni metalotionein na metale je potvrdila da metalotionein medonosne pčele ima ulogu u homeostazi bioelemeata i detoksikaciji potencijalno toksičnih metala. Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za buduća istraživanja uticaja jona teških metala na medonosnu pčelu i predstavljaju važan korak u sveobuhvatnoj proceni uticaja stresogenih faktora iz životne sredine na pčele.

Datum 22.12.2015.

prihvatanja teme
od strane

Senata:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi

komisije:

KO

predsednik:

dr Neda Mimica-Dukić, red. prof., Prirodno-matematički fakultet,
Univerzitet u Novom Sadu

član:

dr Jelena Purać, vanr. prof., Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u
Novom Sadu, mentor

član:

dr Danijela Kojić, vanr. prof., Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet
u Novom Sadu

član:

dr Anđelka Ćelić, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u
Novom Sadu

član:

dr Duško Blagojević, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Printed text
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Tatjana Nikolić
AU

Mentor: Dr Jelena Purać, associate professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
MN

Title: Molecular basis of honey bee (*Apis mellifera*, L.) response to heavy metal stress
TI

Language of text: Serbian (Latin)
LT

Language of abstract: eng. / srp.
JI

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2017.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
PP

Physical description: Chapters: 9; Pages: 139; References: 221; Tables: 11; Figures: 31; Supplements: 1
PD

Scientific field: Chemistry
SF

Scientific discipline: Biochemistry
SD

Key words: Honey bee, antioxidative enzymes, heavy metals, metallothionein, stress response
SKW

UC

Holding data: Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection (Library), Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
HD

Note:

N

Abstract:

AB

Research in this doctoral thesis focuses on understanding the molecular mechanisms activated in the honey bee (*Apis mellifera* L.) as a response to stress caused by exposure to heavy metal ions. Because of the importance of honeybees as pollinators, this has special significance and is expected to contribute to the conservation of this species. Studies have been divided into three phases. In the first phase, bee populations from three localities under different anthropological influence were used and the concentrations of metals in the bees, honey and bee bread (perga), as well as relative gene expression and activity of antioxidant enzymes were measured. In the second phase, bees were exposed to sublethal doses of heavy metal ions (copper, cadmium and lead) under controlled laboratory conditions, after which parameters that indicate redox status and oxidative stress were determined. The results of the first two phases showed that gene expression and activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, and glutathione *S*-transferase) varies depending on the degree of urbanization and industrialization, while exposure to copper and cadmium in controlled conditions for 48 h resulted only in a change in gene expression in the majority of cases, and the expression was dose-dependent on the concentration of the metal. Lead has caused changes in the concentration of glutathione and sulfhydryl groups of proteins, which indicates that chelation may be the first defense mechanism against the toxic effects of this metal. In the third stage, honeybee metallothionein was identified by bioinformatic analysis and its function in protection against the toxic effects of heavy metal ions was examined. It has been found that honeybees have one metallothionein gene, which encodes a small protein with cysteine-rich regions that may bind metal ions. The induction of metallothionein gene expression after exposure of honeybees to metals and increased tolerance of bacteria that express recombinant metallothionein confirmed that this protein plays a role in the homeostasis of bioelements and detoxification of potentially toxic metals. These results form the basis for future research on the impact of heavy metal pollution on the honey bee and represent an important step in the comprehensive assessment of the impact of stress factors from the environment on honey bees.

Accepted on Senate on: 22.12.2015.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:
DB

president:

dr Neda Mimica-Dukić, full professor, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

member:

dr Jelena Purać, associate professor, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad, mentor

member:

dr Danijela Kojić, associate professor, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

member:

dr Anđelka Čelić, assistant professor, Faculty of Sciences,
University of Novi Sad

member:

dr Duško Blagojević, principal research fellow, Institute for
biological research „Siniša Stanković”, University of Belgrade