

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Svetlana G. Despotović

**PARAMETRI ANTIOKSIDACIONOG
ZAŠTITNOG SISTEMA I KONCENTRACIJA
TEŠKIH METALA U VISCERALNOJ MASI
ODABRANIH VRSTA PUŽEVA I ŠKOLJKI
DUNAVA, TISE I VELIKE MORAVE**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Svetlana G. Despotović

**PARAMETERS OF THE ANTIOXIDANT
DEFENCE SYSTEM AND HEAVY METAL
CONCENTRATIONS IN THE VISCERAL
MASS OF SELECTED SNAIL AND MUSSEL
SPECIES FROM THE DANUBE, TISA
AND VELIKA MORAVA RIVERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI:

Dr Slađan Pavlović, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka
istraživanja „Siniša Stanković”

Dr Siniša Đurašević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

ČLANOVI**KOMISIJE:**

Dr Zorica S. Saičić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka
istraživanja „Siniša Stanković”

Dr Momir Paunović, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka
istraživanja „Siniša Stanković”

Dr Zoran Gačić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za
multidisciplinarna istraživanja

Datum Odbrane:

ZAHVALNICA

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu na projektu 173041 pod nazivom: "Molekularno fiziološki biomonitoring aerobnih organizama zasnovan na određivanju biohemijskih biomarkera oksidacionog stresa" finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Ovom prilikom želim da se zahvalim:

Dr Slađanu Pavloviću, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, mentoru, na pomoći pri izboru teme, realizaciji i interpretaciji rezultata. Zahvaljujem mu se na korisnim savetima i sugestijama, a posebno na pomoći pri obradi podataka, objašnjavanju dobijenih rezultata uz pomoć dostupne naučne literature, koji su omogućili da ova doktorska disertacija bude uspešno finalizovana.

Dr Siniši Đuraševiću, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentoru, na savetima i sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije, kao i na velikoj podršci tokom njene realizacije.

Dr Zorici S. Saičić, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu na pozitivnoj i izuzetnoj energiji, iskustvu i znanju koje mi je prenosila tokom celokupnog naučnog rada, kao i na vremenu posvećenom mom naučnom usavršavanju. Posebno joj se zahvaljujem na dragocenoj pomoći pri realizaciji i interpretaciji dobijenih rezultata, korisnim primedbama i savetima, kao i na moralnoj podršci i neprestanom podsticanju da finalizujem izradu ove doktorske disertacije. Njena podrška, upornost i strpljenje pomogli su mi da savladam sve prepreke koje su se pojavljivale na ovom putu. Čast mi je, zadovoljstvo i privilegija što sam deo njenog naučno istraživačkog tima.

Dr Momiru Paunoviću, višem naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, na velikoj pomoći prilikom realizovanaja terenskih istraživanja i prikupljanja materijala za eksperimentalnu obradu, kao i na sugestijama i komentarima za uspešnu finalizaciju doktorske disertacije.

Dr Zoranu Gačiću, višem naučnom saradniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, na pomoći pri statističkoj obradi podataka kao i analizi dobijenih rezultata u doktorskoj disertaciji.

Dr Mirjani Mihailović, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, na pomoći pruženoj u obradi eksperimentalnog materijala.

Dr Miroslavu Nikoliću, naučnom savetniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu na ekspeditivnosti, predusjetljivosti i na pomoći tokom eksperimentalnog rada, kao i analizi dobijenih podataka.

Mojim najdražim kolegama iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, dr Slavici Borković-Mitić, dr Tijani Radovanović i dr Branki Gavrilović, naučnim saradnicima, kao i Jeleni Gavrić, istraživaču saradniku i Marku Prokiću, istraživaču pripravniku na velikoj pomoći tokom rada na terenu i u laboratoriji, konstruktivnim razgovorima pri objašnjavanju naučnih problema, a posebno na prijateljstvu i neizmernoj podršci. Takođe, posebno se zahvaljujem kolegama iz odeljenja za hidroekologiju i zaštitu voda Božici Vasiljević, Jeleni Tomović, Katarini Zorić i Vanji Marković na pruženoj pomoći tokom terenskog rada.

Zahvaljujem se mojim bliskim i dragim osobama na podršci koju su mi pružali da ostvarim svoj cilj.

Posebno se zahvaljujem mojim roditeljima Gavrilu i Kaći i sestri Dragani na moralnoj podršci, ljubavi i strpljenju koje su mi pružali tokom svih ovih godina.

U Beogradu, 2013. godine

Svetlana G. Despotović

Istraživač saradnik

PARAMETRI ANTIOKSIDACIONOG ZAŠTITNOG SISTEMA I KONCENTRACIJA TEŠKIH METALA U VISCERALNOJ MASI ODABRANIH VRSTA PUŽEVA I ŠKOLJKI DUNAVA, TISE I VELIKE MORAVE

REZIME

Slatkovodni mekušci su dobri model organizmi za proučavanje uticaja faktora sredine u biomonitoring studijama zbog svojih karakteristika: slabe pokretljivosti, načina ishrane, brojnosti, veličine tela i dr. Oni imaju sposobnost da u svom telu akumuliraju znatne količine zagađujućih materija. Na osnovu analize sadržaja ovih materija u mekušcima moguće je zaključivati o kvalitetu sredine.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj različitih lokaliteta: reka Dunav, Tisa i Velika Morava na promene u parametrima antioksidacionog zaštitnog sistema: superoksid-dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1), katalaze (CAT, EC 1.11.1.6), glutation-peroksidaze (GSH-Px, EC 1.11.1.9), glutation-reduktaze (GR, EC 1.6.4.2), enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST, EC 2.5.1.18), kao i koncentraciju glutationa (GSH). Parametri su ispitivani u visceralnoj masi puža *Viviparus acerosus* i školjke *Corbicula fluminea*. Interspecijske razlike su praćene analizom parametara antioksidacionog zaštitnog sistema u visceralnoj masi puževa *V. acerosus*, *Amphimelania holandrii* i školjki *C. fluminea* i *Sinanodonta woodiana* iz Velike Morave. Uticaj sezonskih faktora određivan je tokom aprila i septembra u visceralnoj masi vrste *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave. Analizirane su koncentracije 15 metala u visceralnoj masi sve četiri vrste slatkovodnih mekušaca u aprilu.

Značajne razlike aktivnosti SOD u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz različitih reka čine ovaj enzim pogodnim biomarkerom u ekofiziološkim studijama. Varijacije aktivnosti GST u visceralnoj masi školjke *C. fluminea* iz različitih reka, ukazuju na to da se i ovaj enzim može koristiti kao biomarker. Uporedni pregled parametara antioksidacionog zaštitnog sistema četiri vrste slatkovodnih mekušaca izdvajaju *A. holandrii* kao potencijalno bioindikatorsku vrstu. Odsustvo jasnog sezonskog uticaja na GST u visceralnoj masi *V. acerosus* izdvaja ovaj enzim kao potencijalno dobar biomarker.

Sposobnost bioakumulacije metala slatkovodnih mekušaca nije dovoljno istražena. Prema podacima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji *V. acerosus* predstavlja potencijalno dobrog indikatora zagađenosti rečnih sistema metalima.

Biomarkeri imaju važno mesto u programima monitoringa i proceni biološkog efekta različitih ksenobiotika. Biomarkeri otkrivaju stres prouzrokovan dejstvom zagađivača kao i drugim promenama u životnoj sredini. Integracija biomarkera i hemijske analize neophodna je kako bi se uspostavila veza između stresa i zagađenja. Dosadašnji literaturni podaci koji se odnose na odgovor enzimskih i neenzimskih komponenti antioksidacionog zaštitnog sistema kod slatkovodnih vrsta puževa su ograničeni što ukazuje na značaj podataka dobijenih u ovoj studiji.

Ključne reči: parametri antioksidacionog zaštitnog sistema, slatkovodni mekušci, visceralna masa, metali, Dunav, Tisa, Velika Morava

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija

UDK broj: 557.152.1: 594.1/.3]: 556.53] (043.3)

PARAMETERS OF THE ANTIOXIDANT DEFENCE SYSTEM AND HEAVY METAL CONCENTRATIONS IN THE VISCERAL MASS OF SELECTED SNAIL AND MUSSEL SPECIES FROM THE DANUBE, TISA AND VELIKA MORAVA RIVERS

ABSTRACT

Freshwater molluscs are a good model organism for studying the effects of environmental factors in biomonitoring studies due to their following characteristics: poor mobility, diet, numbers, size. They have the ability to accumulate in their body significant amounts of pollutants. By analysing the contents of these substances in molluscs we can draw conclusions about the quality of the environment.

The aim of this PhD thesis was to investigate the effects of different localities, the Danube, Tisa and Velika Morava Rivers, on changes in the parameters of the antioxidative defence system: the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), glutathione-peroxidase (GSH-Px; EC 1.11.1.9), glutathione-reductase (GR; EC 1.6.4.2), and phase II biotransformation enzyme glutathione-S-transferase (GST; EC 2.5.1.18), and glutathione (GSH) concentration. The parameters were investigated in the visceral mass of the snail *Viviparus acerosus* and mussel *Corbicula fluminea*. Interspecies differences were followed by analysing the parameters of the antioxidative defense system in the visceral mass of snails, *V. acerosus*, *Amphimelania holandrii*, and mussels, *C. fluminea* and *Sinanodonta woodiana*, from the Velika Morava River. Seasonal changes were determined during April and September in the visceral mass of species, *V. acerosus* from the Danube, Tisa and Velika Morava. We analyzed the concentrations of 15 metals in the visceral mass of all four species of freshwater molluscs in April.

Significant differences in SOD activities in the visceral mass of the snail *V. acerosus* from different rivers render this enzyme a suitable biomarker for ecophysiological studies. Variations in GST activities in the visceral mass of the mussel *C. fluminea* from different rivers can also be considered as a good biomarker. A comparative review of the parameters of the antioxidative defence system in four species of freshwater molluscs distinguish *A. holandrii* as a potential bioindicator species. The absence of a clear seasonal impact on GST in the visceral mass of *V. acerosus* makes this enzyme a good biomarker.

The potential of freshwater molluscs to bioaccumulate metals studied in this dissertation showed that *V. acerosus* is a good indicator of metal pollution in river systems.

Biomarkers have an important role in monitoring programs and assessments of the biological effects of various xenobiotics. Biomarkers reveal the influence of stress caused by pollution and other changes in the environment. The integration of biomarkers and chemical analyses is necessary to establish a connection between stress and pollution. Previous literature data related to the responses of enzymatic and nonenzymatic components of the antioxidant defence system in freshwater snail species have been limited. This points to the importance of the data obtained in this dissertation.

Key words: antioxidant defence system parameters, freshwater molluscs, visceral mass, metals, Dunav, Tisa, Velika Morava

Scientific field: Biology

Special topic: Physiology

UDC number: 557.152.1: 594.1/.3]: 556.53] (043.3)

SKRAĆENICE

Al	aluminijum
As	arsen
AOS	antioksidacioni zaštitni sistem
APS	amonijum persulfat
B	bor
Ca	kalcijum
CAT	katalaza
CDNB	1-hloro-2,4-dinitrobenzen
-COOH	karboksilna grupa
Ca	kalcijum
Cd	kadmijum
Cu	bakar
CuZn SOD	bakar cink sadržavajuća superoksid-dismutaza
CYP1A	citohrom P450 1A
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoična kiselina)
EC SOD	ekstracelularna superoksid-dismutaza
EDTA	etilendiamintetraacetat
ERA	ekološka procena rizika
FAD	flavin adenin dinukleotid
Fe SOD	gvožđe sadržavajuća superoksid-dismutaza
Fe	gvožđe
GR	glutation-reduktaza
GS	glutation-sintetaza
GSH	redukovani glutacion
GSH-Px	glutation-peroksidaza
G-SR	konjugat elektrofilnog supstrata i glutaciona
GSSG	oksidovani glutacion
GST	glutation-S-transferaza
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	vodonik peroksid

HCl	hlorovodonična kiselina
HNE	4-hidroksi-2-noneal
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
KCN	kalijum cijanid
MDA	malondialdehid
Mg	magnezijum
Mn	mangan
Mo	molibden
Mn SOD	mangan sadržavajuća superoksid-dismutaza
Na ₂ CO ₃	natrijum karbonat
NADH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid
NADP ⁺	oksidovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaH ₂ PO ₄	natrijum dihidrogen fosfat
NaHCO ₃	natrijum bikarbonat
NaN ₃	natrijum azid
NaOH	natrijum hidroksid
-NH ₂	amino grupa
Ni	nikal
Ni SOD	nikal sadržavajuća superoksid-dismutaza
non-Se GSH-Px	selen nezavisna glutation-peroksidaza
O ₂	molekularni kiseonik
O ₂ ⁻	superoksid anjon radikal
-OH	hidroksilna grupa
OH ⁻	hidroksilni jon
OH [·]	hidroksil radikal
PAH	policiklični aromatični ugljovodonici
Pb	olovo
PCB	polihlorovani bifenili
PH GSH-Px	fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza
R [·]	organski radikal
RNK	ribonukleinska kiselina
RO [·]	alkoksil radikal
RO ₂ [·]	peroksil radikal

ROH	alkohol
ROOH	organski peroksid
ROS	reaktivne vrste kiseonika
R-SSG	protein-glutation mešani disulfid
R-X	elektrofilni supstrat
SDS	sodijum dodecil sulfat
SDBS	sodijum dodecilbenzen sulfonat
Se	selen
Sr	stroncijum
Se GSH-Px	selen zavisna glutacion-peroksidaza
SH	sulfhidrilna grupa
SOD	superoksid-dismutaza
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UDPGT	UDP-glukuronil-transferaza
WHO	Svetska zdravstvena organizacija
Zn	cink

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Osnovni pojmovi o biomonitoringu.....	1
1.2. Biomarkeri	2
1.3. Metabolizam kiseonika i produkcija slobodnih radikala kiseonika	5
1.4. Parametri antioksidacionog zaštitnog sistema	8
1.4.1. Superoksid-dismutaza (SOD).....	9
1.4.2. Katalaza (CAT)	10
1.4.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px)	11
1.4.4. Glutation-reduktaza (GR).....	13
1.4.5. Glutation-S-transferaza (GST)	13
1.4.6. Glutation (GSH)	14
1.5. Specifičnosti antioksidacionog zaštitnog sistema kod mekušaca	15
1.6. Korišćenje mekušaca u biomonitoringu	16
1.6.1. Osnovne karakteristike ispitivanih vrsta slatkovodnih puževa	17
1.6.2. Osnovne karakteristike ispitivanih vrsta slatkovodnih školjki.....	19
1.7. Osnovne karakteristike ispitivanih rečnih ekosistema.....	21
1.8. Biološki efekti metala	25
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	28
3. MATERIJAL I METODE.....	30
3.1 Metodologija uzorkovanja	30
3.2 Priprema tkiva za biohemijske analize	32
3.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina	33
3.4. Određivanje aktivnosti enzima antioksidacionog zaštitnog sistema.....	34
3.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD).....	34
3.4.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	35
3.4.3. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze (GSH-Px)	37
3.4.4. Određivanje aktivnosti glutacion-reduktaze (GR).....	38
3.4.5. Određivanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije glutacion-S-transferaze (GST).....	39

3.5	Određivanje koncentracije glutaciona (GSH).....	40
3.6	Određivanje koncentracije metala.....	42
4.	REZULTATI	45
4.1	Fizičko-hemijski parametri vode	45
4.2.	Koncentracija ukupnih proteina.....	49
4.3.	Aktivnost enzima antioksidacionog zaštitnog sistema puža <i>Viviparus acerosus</i> i školjke <i>Corbicula fluminea</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru.....	50
4.3.1.	Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) puža <i>V. acerosus</i> i školjke <i>C. fluminea</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru.....	50
4.3.2.	Aktivnost katalaze (CAT) puža <i>V. acerosus</i> i školjke <i>C. fluminea</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru	52
4.3.3.	Aktivnost glutacion-peroksidaze (GSH-Px) puža <i>V. acerosus</i> i školjke <i>C. fluminea</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru.....	54
4.3.4.	Aktivnost glutacion-reduktaze (GR) puža <i>V. acerosus</i> i školjke <i>C. fluminea</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru.....	54
4.3.5.	Aktivnost glutacion-S-transferaze (GST) puža <i>V. acerosus</i> i školjke <i>C. fluminea</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru.....	57
4.4.	Koncentracija glutaciona (GSH) puža <i>Viviparus acerosus</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru	57
4.5.	Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po rekama	60
4.6.	Aktivnost enzima antioksidacionog zaštitnog sistema puževa <i>Viviparus acerosus</i> i <i>Amphimelania holandrii</i> i školjki <i>Corbicula fluminea</i> i <i>Sinanodonta woodiana</i> iz Velike Morave u septembru	63
4.6.1.	Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) puževa <i>Viviparus acerosus</i> i <i>Amphimelania holandrii</i> i školjki <i>Corbicula fluminea</i> i <i>Sinanodonta woodiana</i> iz Velike Morave u septembru	63
4.6.2.	Aktivnost katalaze (CAT) puževa <i>Viviparus acerosus</i> i <i>Amphimelania holandrii</i> i školjki <i>Corbicula fluminea</i> i <i>Sinanodonta woodiana</i> iz Velike Morave u septembru	65
4.6.3.	Aktivnost glutacion-peroksidaze (GSH-Px) puževa <i>Viviparus acerosus</i> i <i>Amphimelania holandrii</i> i školjki <i>Corbicula fluminea</i> i <i>Sinanodonta woodiana</i> iz Velike Morave u septembru	65
4.6.4.	Aktivnost glutacion-reduktaze (GR) puževa <i>Viviparus acerosus</i> i <i>Amphimelania holandrii</i> i školjki <i>Corbicula fluminea</i> i <i>Sinanodonta woodiana</i> iz Velike Morave u septembru	68

4.6.5. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) puževa <i>Viviparus acerosus</i> i <i>Amphimelania holandrii</i> i školjki <i>Corbicula fluminea</i> i <i>Sinanodonta woodiana</i> iz Velike Morave u septembru	68
4.7. Koncentracija glutationa (GSH) puževa <i>Viviparus acerosus</i> i <i>Amphimelania holandrii</i> iz Velike Morave u septembru	72
4.8. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama	72
4.9. Aktivnost enzima antioksidacionog zaštitnog sistema puža <i>Viviparus acerosus</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.....	75
4.9.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) puža <i>Viviparus acerosus</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave.....	75
4.9.2. Aktivnost katalaze (CAT) puža <i>Viviparus acerosus</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave	75
4.9.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) puža <i>Viviparus acerosus</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave	78
4.9.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) puža <i>Viviparus acerosus</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave.....	78
4.9.5. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) puža <i>Viviparus acerosus</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave.....	81
4.10. Koncentracija glutationa (GSH) puža <i>Viviparus acerosus</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru	81
4.11. Spearman-ov test korelacije između parametara antioksidacionog zaštitnog sistema i perioda, kao i parametara i lokaliteta puža <i>Viviparus acerosus</i> iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru	84
4.12. Koncentracije metala u ispitivanim uzorcima.....	85
4.12.1 Spearman-ovi koeficijenti korelacije teških metala i mikroelemenata u visceralnoj masi vrsta <i>V. acerosus</i> , <i>A. holandrii</i> , <i>C. fluminea</i> i <i>S. woodiana</i>	91
5. DISKUSIJA	94
6. ZAKLJUČCI	113
7. LITERATURA	117
PRILOZI	

1. UVOD

1.1. Osnovni pojmovi o biomonitoringu

Praćenje stanja životne sredine u cilju njenog očuvanja i sprečavanja štetnih efekata ksenobiotika na celokupan živi svet podrazumeva skup metoda koje se mogu objediniti terminom monitoring. Prema definiciji Programa za životnu sredinu Ujedinjenih nacija (eng. United Nations Environmental Program – UNEP) **monitoring** predstavlja svako ponovljeno merenje, sa definisanom svrhom, jednog ili više hemijskih ili bioloških parametara prema unapred određenom rasporedu u prostoru i vremenu, koristeći metode koje su uporedive i standardizovane. Monitoring omogućava kontrolu i prepoznavanje da je u spoljašnjoj sredini došlo do promena. Dva osnovna tipa monitoringa koji omogućavaju procenu rizika dejstva na organizme kao i procenu kvaliteta životne sredine su hemijski i biološki monitoring (De Zwart, 1995).

Hemijskim monitoringom meri se nivo određene grupe zagađivača u životnoj sredini i na taj način dobijaju podaci o izloženosti organizama ksenobioticima.

U **biološkom monitoringu** (biomonitoringu) koriste se živi organizmi da bi se procenilo stanje životne sredine. Biomonitoring obuhvata četiri podtipa:

1. Bioakumulacioni monitoring - nivo kontaminanata meri se u živim organizmima i tako vrši procena izloženosti organizama ksenobioticima.
2. Monitoring biološkog efekta - određuju se rane promene u organizmima koje su delimično ili potpuno reverzibilne (biomarkeri).
3. Monitoring zdravstvenog stanja - prati se nastanak bolesti ili oštećenje tkiva u organizmima, uzrokovanih dejstvom ksenobiotika, koji su ireverzibilni.
4. Monitoring ekosistema - prati se integritet ekosistema putem merenja ekoloških parametara kao što su prisustvo i sastav vrsta, gustina, itd.

Hemijski monitoring pruža informacije o prisustvu i nivoima kontaminanata i to omogućava procenu izloženosti organizama, ali ne govori ništa o efektima koje kontaminanti imaju na biološke sisteme (Lam, 2009). Metode biološkog monitoringa u

tom pogledu imaju niz prednosti jer mere efekte u kojima biodostupnost ispitivanih jedinjenja povezuju sa njihovom koncentracijom u organizmu i toksičnošću i omogućavaju integrisanje efekata na velikom broju jedinki. Nedostatak metoda biološkog monitoringa je teško povezivanje uočenih efekata sa specifičnim aspektima zagađenja (De Zwart, 1995). Najkompletnije informacije pružaju studije koje obuhvataju koordinisani monitoring sačinjen od hemijskih i bioloških merenja u različitim delovima životne sredine i takve studije čine integrativni monitoring program (Van der Oost i sar., 2003).

Prema hijerarhijskoj organizaciji živog sveta metodološki pristup biomonitoringa obuhvata različite nivoe, od utvrđivanja prisustva ostataka ksenobiotika u tkivima organizama do analize specifičnih bioloških krajnjih tačaka. Van Gestel i Van Brummelen (1996) predložili su četiri različita nivoa biomonitoringa:

- ✓ Suborganizmalni nivo - na nivou biohemijskih i fizioloških procesa moguće je utvrditi odstupanje od normalnog (zdravog) stanja korišćenjem biohemijskih tehnika. Uključuje korišćenje **biomarkera**.
- ✓ Organizmalni nivo - korišćenjem bioanaliza prate se preživljavanje, rast i reprodukcija jedinki kao krajnje tačke klasičnih laboratorijskih testova ekotoksičnosti.
- ✓ Populacioni nivo - prate se efekti koji se manifestuju kao promene u genetičkoj strukturi, starosnoj strukturi ili gustini populacije korišćenjem **bioindikatora**.
- ✓ Ekosistemski nivo - promene u sastavu, gustini i diverzitetu vrsta mogu ukazati na efekte zagađenja na biocenoze.

Akvatični organizmi mogu poslužiti kao dobri model sistemi za proučavanje bazičnih procesa ćelijskih i tkivnih oštećenja, praćenih fiziološkim posledicama kao što su bolesti i starenje, kao i zaštite od slobodnoradikalnih vrsta.

1.2. Biomarkeri

Biomarker u najširem smislu predstavlja svako merenje koje reflektuje interakciju između biološkog sistema i potencijalne opasnosti, koja može biti

hemijskog, fizičkog ili biološkog tipa (World Health Organization, WHO, 1993). Prema definiciji Peakall-a (1994) biomarker je svaka promena u biološkom odgovoru (od molekularnog, preko ćelijskog i fiziološkog, do promena u ponašanju), koja može biti povezana sa izloženošću hemikalijama prisutnim u sredini ili njihovim toksičnim efektom. Biomarkeri se mogu podeliti u tri grupe (WHO, 1993):

1. **Biomarkeri izlaganja** obuhvataju detektovanje egzogene supstance ili njenih metabolita ili produkata nastalih u interakciji ksenobiotika sa ciljnim molekulom i ćelijom unutar organizma.
2. **Biomarkeri efekta** uključuju merenje biohemijskih, fizioloških ili drugih promena unutar tkiva ili telesnih tečnosti koje se mogu povezati sa mogućim ili postojećim bolestima ili narušenjem zdravlja.
3. **Biomarkeri osetljivosti** ukazuju na urođene ili stečene sposobnosti organizma da odgovori na izloženost specifičnom ksenobiotiku, a uključuju genetičke faktore i promene u receptorima.

Ključna funkcija biomarkera je da obezbede rani upozoravajući signal značajnih bioloških efekata u vidu odgovora, koji se prvo dešava na suborganizmičnom nivou (molekularnom, biohemijskom i fiziološkom), za kojim slede promene na višim nivoima biološke organizacije (Lam, 2009).

Bioindikator je organizam koji svojim prisustvom, odsustvom ili ponašanjem daje informacije o uslovima u sredini u kojoj živi. Definisane kvaliteta sredine ili procena ugroženosti korišćenjem bioindikatora podrazumeva analizu informacione strukture živih sistema polazeći od pojedinačnih organizama, pa sve do kompleksnih bioloških struktura, kao što su ekosistemi. Karakteristike koje biološki sistemi poseduju, a indikativne su u biomonitoringu su ekofiziološka svojstva i odgovori na stres u odnosu na fizičke i hemijske promene u uslovima sredine. Pošto su reakcije organizma na stres uglavnom nespecifične glavna uloga bioindikatora je opšte utvrđivanje fizioloških efekata nego samo neposredno merenje sredinskih koncentracija stresora (Lam, 2009).

U biomonitoring studijama u kojima se kao model organizmi koriste ribe, predloženi su biomarkeri koji imaju najveći značaj za dobijanje podataka o kvalitetu životne sredine (Van der Oost i sar., 2003). Tu spadaju: biotransformacioni enzimi,

parametri oksidacionog stresa, biotransformacioni produkti, proteini stresa (metalotioneini i proteini multiksenobiotske rezistencije), hematološki parametri, imunološki parametri, reproduktivni i endokrinološki parametri, neuromuskulatorni parametri, genotoksikološki i fiziološki i morfološki parametri. Većina ovih parametara može se analizirati i u tkivima mekušaca što je pokazano u brojnim studijama.

Biotransformacioni enzimi ili enzimi sistema za metabolizam ksenobiotika predstavljaju pouzdane biomarkere jer su sposobni da odgovore na specifične stimulse. Njihova osnovna uloga je da kroz reakcije faze I i II povećaju rastvorljivost metabolita i olakšaju njegovu ekskreciju iz organizma (Lech i Vodcnik, 1985). Najznačajniji enzimi koji katališu reakcije faze I su citohrom P450 zavisne monooksigenaze, prostaglandin sintetaze i druge peroksidaze, monoamino oksidaze i brojne dehidrogenaze. Ovi enzimi su testirani u većoj meri kod morskih mekušaca, naročito školjki, u odnosu na slatkovodne (Wilbrink i sar., 1991; Dauberschmidt i sar., 1997). Faza II procesa biotransformacije obuhvata reakcije konjugacije ksenobiotika sa endogenim ligandom, polisaharidom ili aminokiselinom (Lech i Vodcnik, 1985). Elektrofилne supstance se konjuguju sa redukovanim glutationom (GSH), a nukleofilne sa glukuronskom kiselinom. Reakcije konjugacije katalizuju enzimi glutation-S-transferaza (GST), UDP-glukuronil transferaza (UDPGT) i drugi. Promene u aktivnosti i indukciji transkripcije gena koji kodiraju ekspresiju GST kao odgovor na izloženost polihlorovanim bifenilima (PCB) istraživani su u različitim mekušcima (Goldberg i Bertine, 2000; Hoarau i sar., 2006; Park i sar., 2009).

Parametri oksidacionog stresa obuhvataju enzime sistema zaštite od oksidacionih oštećenja, neenzimske komponente sa antioksidacionim svojstvima kao i biohemijske indikatore oksidacionih oštećenja (Van der Oost i sar., 2003). Glavna uloga antioksidanata je zaštita organizma od negativnih efekata oksidacionog stresa koji se javlja usled prekomerne produkcije reaktivnih vrsta ili oslabljene funkcije antioksidacionih komponentata (Halliwell i Gutteridge, 2007; Sies, 1993). Takođe metalotioneini koji specifično vezuju metale, mogu se smatrati biomarkerima izloženosti kod akvatičnih organizama (High i sar., 1997; Viarengo i sar., 1997).

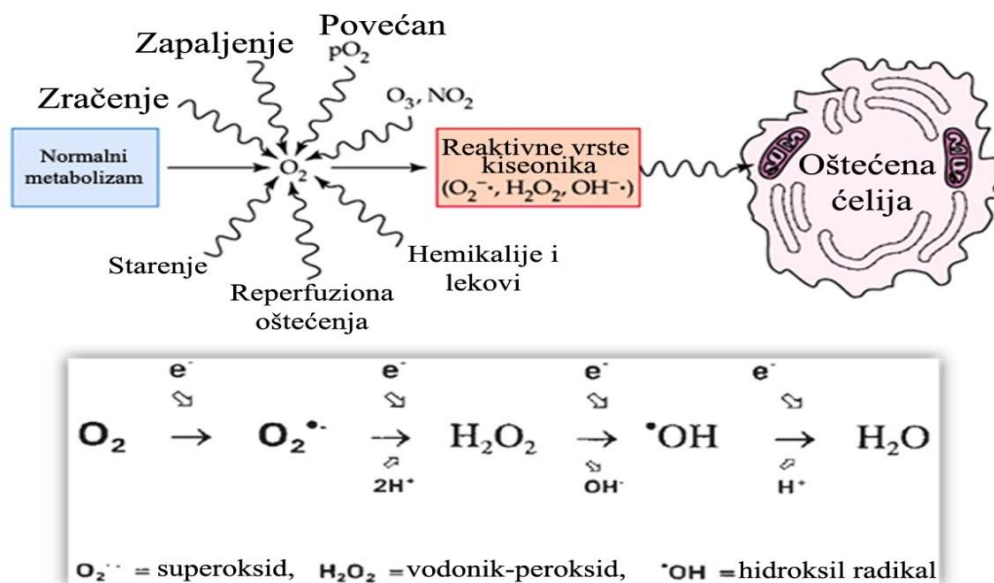
Biomarkerima se mogu smatrati i hemociti mekušaca, koji čine osnovu imunog sistema, koji su sposobni da migriraju u tkiva i štite organizam od patogena. Hemociti

školjaka iz zagađenih područja mogu proizvoditi reaktivne vrste kiseonika (ROS) u većoj meri u odnosu na kontrolne jedinice (Dyrynda i sar., 1998) i tako mogu biti pokazatelji promena u spoljašnjoj sredini.

Zbog kontradiktornih rezultata dobijenih u različitim studijama, za pojedine biomarkere, u poslednje vreme pažnja se sve više usmerava na rasvetljavanje regulatornih mehanizama koji predstavljaju osnovu odgovora organizma na stres. Lushchak (2011) je posebnu pažnju obratio na ulogu transkripcionih faktora Keap1-Nrf2 i HIF-1 α u koordinaciji odgovora organizma na prisustvo elektrofilnih ksenobiotika i oksidanata (Osburn i Kensler, 2008).

1.3. Metabolizam kiseonika i produkcija slobodnih radikala kiseonika

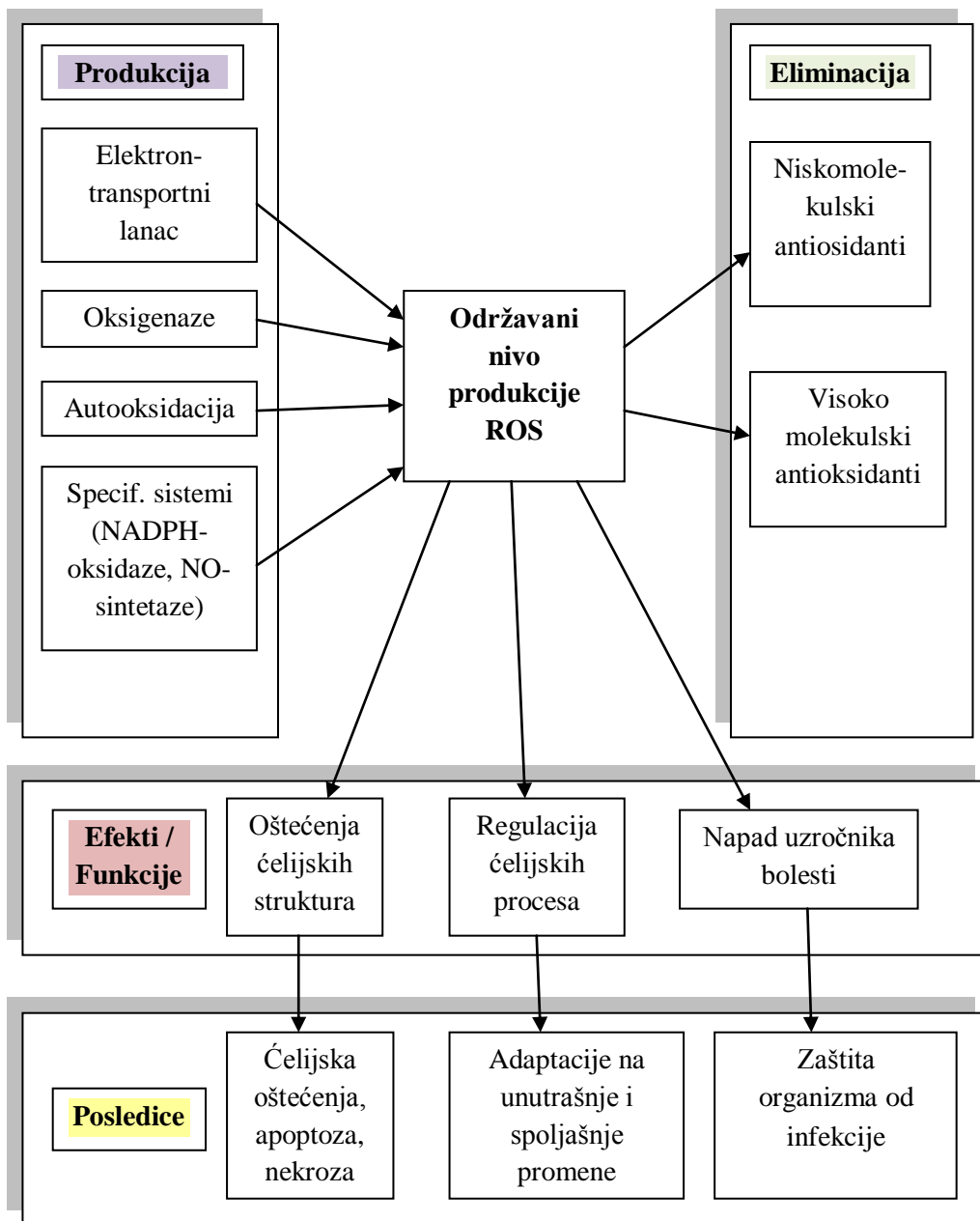
U procesima metabolizma svih ćelija aerobnih organizama neprekidno se proizvode reaktivne vrste kiseonika (ROS). Zbog njihove sposobnosti da oštete biomolekule kao i njihove biološke uloge produkcija ROS je pod stalnom ćelijskom kontrolom i njihova koncentracija obično nije veća od 10^{-8} M (Halliwell i Gutteridge, 2007). Koncentracija ROS je dinamički parametar i normalno ravnotežno stanje u ćeliji podrazumeva da je količina proizvedenih ROS praktično jednaka količini eliminisanih (Lushchak, 2011). Na Shemi 1. predstavljene su ROS i neki od procesa koji dovode do prekomerene produkcije ovih vrsta.



Shema 1. Reaktivne vrste kiseonika.

ROS nastaju nepotpunom redukcijom molekularnog kiseonika (O_2) u procesu respiracije. Potpuna redukcija O_2 do vode odvija se postepenim dodavanjem četiri elektrona, a uz ovu kompletnu redukciju u 1-5% slučajeva generišu se delimično redukovani intermedijeri (Buonocore i sar., 2010; Scandalios, 2005), (Shema 1). Jednoelektronskom redukcijom O_2 nastaje superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet -}$), dvoelektronskom vodonik peroksid (H_2O_2), a troelektronskom hidroksil radikal (OH^\bullet).

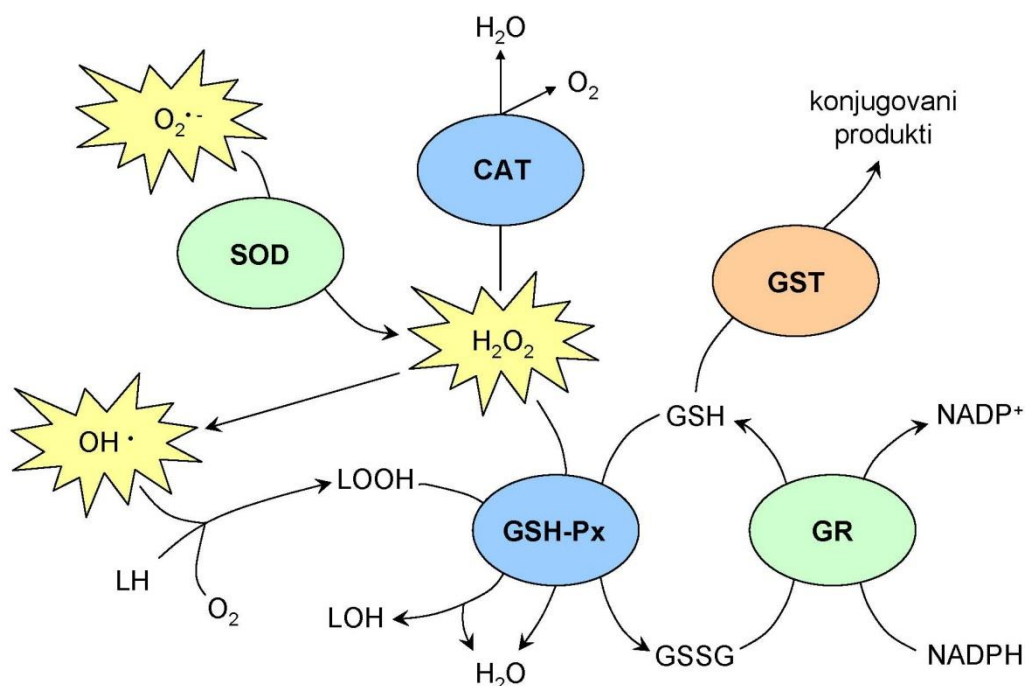
Osim što mogu dovesti do oštećenja biomolekula, ROS u fiziološkim koncentracijama imaju regulatornu ulogu različitih procesa u organizmu kao što su: ćelijska diferencijacija, prenos signala, regulacija metabolizma, odbrana od mikroorganizama, itd. (Štajn i sar., 2007), (Shema 2).



Shema 2. Procesi produkcije i eliminacija reaktivnih vrsta kiseonika i njihovi potencijalni biološki efekti.

1.4. Parametri antioksidacionog zaštitnog sistema

Tokom evolucije kod svih aerobnih organizama razvio se sistem zaštite od oksidacionih oštećenja (eng. *antioxidant defence system* - AOS), čija je osnovna uloga da spreči i ograniči nastajanje oštećenja i/ili popravi već nastala oštećenja delovanjem ROS. AOS obuhvata **primarnu** i **sekundarnu** antioksidacionu zaštitu (Cadenas, 1989). **Primarna** antioksidaciona zaštita obuhvata **enzimske** i **neenzimske** komponente dok **sekundarnu** antioksidacionu zaštitu čine protein specifične oksidoreduktaze: tiol-transferaza, protein-ADP-ribozil-transferaza, ATP i Ca^{2+} nezavisna proteaza, i svi oni učestvuju u „popravci” oksidacionih oštećenja biomolekula.



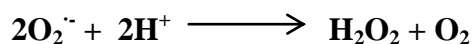
Shema 3. Enzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja (modifikovano, Matović i sar., 2004).

U enzimske komponente primarne antioksidacione zaštite, prema klasičnom konceptu, spadaju: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza

(GSH-Px), glutation-reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST), (Shema 3). Posljednjih godina je glutation-S-transferaza izdvojena iz ove grupe i uvrštena u enzime faze II biotransformacije prema konceptu kompleksne zaštite od oksidacionih oštećenja (Niki, 2000; Van der Oost i sar., 2003). Neenzimske komponente klasifikuju se prema rastvorljivosti na liposolubilne (rastvorljive u mastima) i hidrosolubilne (rastvorljive u vodi). U liposolubilne spadaju: vitamin E (α -tokoferol), vitamin A (retinol), provitamin A (β -karoten) i koenzim Q (ubihinon). Glutation (GSH), vitamin C (L-askorbinska kiselina), mokraćna kiselina, bilirubin, albumin, transferin i poliamini su najviše proučavana hidrosolubilna jedinjenja (Halliwell i Gutteridge, 2007).

1.4.1. Superoksid-dismutaza (SOD)

Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je metaloprotein koji katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) do vodonik peroksida (H_2O_2) i molekularnog kiseonika (O_2). Reakciju dismutacije opisuje jednačina:



U procesu evolucije nastalo je više klasa enzima SOD (Alscher i sar., 2002) koje se razlikuju prema metalu koji sadrže u aktivnom centru:

1. gvožđe sadržavajuća superoksid-dismutaza (Fe SOD),
2. nikal sadržavajuća superoksid-dismutaza (Ni SOD),
3. mangan sadržavajuća supeoksid-dismutaza (Mn SOD),
4. bakar cink sdražavajuća superoksid-dismutaza (CuZn SOD),
5. ekstracelularna superoksid-dismutaza (EC SOD).

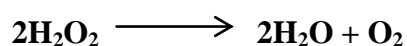
Fe SOD i Ni SOD prisutne su pretežno kod prokariota (Bafana i sar., 2011; Dupont i sar., 2008). Mn SOD je enzim koji se nalazi kod prokariota, ali i u mitohondrijama i peroksizomima eukariota u formi homodimera ili homotetramera sa

po jednim atomom Mn^{3+}/Mn^{2+} po subjedinici. EC SOD poslednja je otkrivena forma ovog enzima i nalazi se samo kod sisara u intersticijalnom matriksu tkiva i u manjim količinama u ekstracelularnim tečnostima (Alscher i sar., 2002). U katalitičkom centru sadrži Cu i Zn.

CuZn SOD prva je otkrivena forma enzima SOD, koja je poznata pod različitim imenima u zavisnosti od toga odakle je izolovana kao hemokuprein, hepatokuprein, cerebrokuprin i prisutna je kod eukariota. Homodimer je molekulske mase od 32 kDa i svaka subjedinica u aktivnom centru sadrži jedan atom redoks aktivnog Cu^{2+}/Cu^{+} i jedan atom Zn^{2+} koji ne učestvuje u katalitičkom ciklusu, već mu je uloga da stabilizuje enzim. U eukariotskoj ćeliji enzim se nalazi u citosolu, lizozomima, nukleusu, prostoru između mitohondrijalnih membrana i peroksizomoma (Halliwell i Gutteridge, 2007). Osim reakcije dismutacije superoksid anjon radikala CuZn SOD ima ulogu u nekoliko drugih reakcija kao što su: konverzija nitroksil anjona ($NO^{\cdot-}$) do azotoksida (NO^{\cdot}), nitrozilacija Tyr ostataka peroksinitritom ($ONOO^{\cdot-}$), oksidacija jonizovane forme vodonik sulfida ($HS^{\cdot-}$) do hidrosulfid radikala (HS^{\cdot}), oksidacija Cys i cistamina (ali ne i GSH) pri čemu se formiraju vodonik peroksid i disulfid (S-S). CuZn SOD izuzetno je stabilan enzim koji je otporan na toplotu, delovanje proteinaza i denaturaciju različitim agensima (Halliwell i Gutteridge, 2007). Inhibitori CuZn SOD su cijanid i dietilditiokarbamat (DDTC).

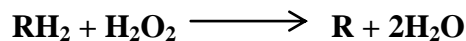
1.4.2. Katalaza (CAT)

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je enzim koji direktno prevodi vodonik peroksid u molekularni kiseonik i vodu prema reakciji:



Ovaj tip reakcije označava se kao „katalazna reakcija” i odvija se pri visokim koncentracijama supstrata ($>1 \mu M$).

Drugi tip reakcije koji katalizuje CAT i odvija se pri niskim koncentracijama H_2O_2 ($<1 \mu\text{M}$) označava se kao „peroksidazna reakcija”. U ovoj reakciji dolazi do redukcije H_2O_2 uz pomoć različitih donora vodonika (alkoholi, askorbinska kiselina). Reakcija se može predstaviti sledećom jednačinom:



CAT je homotetramer i svaka subjedinica sadrži hem grupu u aktivnom centru (Fe^{3+} vezano za porfirin) enzima. Takođe, svaka subjedinica ima za sebe vezan jedan molekul NADPH (Halliwell i Gutteridge, 2007). Molekulska masa enzima je 240 kDa (Scandalios, 2005).

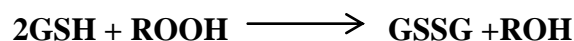
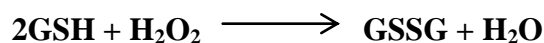
„Katalazna” aktivnost CAT se gubi disocijacijom subjedinica, dok je „peroksidazna” očuvana. Azot monoksid se reverzibilno veže za hem CAT i tako prouzrokuje umereni pad aktivnosti. Pod dejstvom UV zračenja CAT mnogih vrsta mogu proizvoditi ROS (Heck i sar., 2003).

Zasićenje CAT supstratom je praktično nemoguće zbog velike brzine reakcije i enzimaska aktivnost raste linearno sa porastom koncentracije H_2O_2 (Kruidenier i Verspaget, 2002).

U eukariotskim ćelijama CAT se predominantno nalazi u peroksizomima u kojima su smešteni i enzimi koji produkuju H_2O_2 (Fidaleo, 2010). Neki od inhibitora CAT su azid, cijanid, peroksinitrit i aminotriazol (Halliwell i Gutteridge, 2007).

1.4.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px)

Glutation-peroksidaza (GSH-Px, EC 1.11.1.9) katalizuje redukciju H_2O_2 do H_2O i organskih hidroperoksida (ROOH) do odgovarajućih alkohola (ROH) kuplovanjem ovih reakcija sa oksidacijom glutationa (GSH) prema sledećim jednačinama:



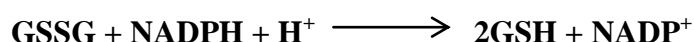
GSH-Px je pretežno prisutan u eukariotskim organizmima, dok se kod prokariota sreće kod manjeg broja vrsta (Halušková i sar., 2009; Arenas i sar., 2010). U ćelijama i tkivima može se naći u citosolu, mitohondrijama, peroksizomima i intermembranskim prostorima.

Opšta podela enzima GSH-Px obuhvata tri forme: selen-zavisna glutation-peroksidaza (Se GSH-Px), selen-nezavisna glutation-peroksidaza (non-Se GSH-Px) i fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza (PH GSH-Px). Se GSH-Px je homotetramer sa četiri atoma Se u aktivnom centru svake subjedinice. Non-Se GSH-Px je monomerni protein koji efikasno redukuje organske perokside, a ima manji afinitet za H_2O_2 (Almar i sar., 1998; Ren i sar., 2009). PH GSH-Px je monomerni selenoprotein i sposobna je da redukuje hidroperokside masnih kiselina i holesterola koji su esterifikovani i nalaze se u okviru membrana i lipoproteina (Andreyev i sar., 2005).

Identifikovano je pet izoformi GSH-Px kod sisara: klasična citosolna GSH-Px (cGSH-Px ili GSH-Px 1), gastrointestinalna GSH-Px (GSH-Px 2), ekstracelularna GSH-Px (GSH-Px 3), fosfolipid hidroperoksid GSH-Px (PH GSH-Px ili GSH-Px 4) i epididimis specifična GSH-Px (GSH-PX 5), (Ursini i sar., 1995). GSH-Px 1, 2 i 3 sastoje se iz četiri proteinske subjedinice od kojih svaka u svom aktivnom centru sadrži Se u obliku seleno-cisteina (Se-Cys; u aminokiselini Cys atom S je zamenjen Se). GSH-Px 4 je monomer sa jednim atomom Se i ova GSH-Px ima manji specifični afinitet prema GSH. Epididimis specifična GSH-Px je selen nezavisna.

1.4.4. Glutation-reduktaza (GR)

Glutation-reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani (GSH) pri čemu je donor protona nikotin adenin dinukleotid fosfat (NADPH) poreklom iz pentozofosfatnog ciklusa. Reakciju katalize GR opisuje sledeća jednačina:

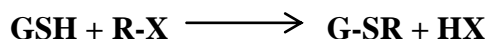


GR se sastoji iz dve subjedinice od kojih svaka sadrži po jednu prostetičku grupu flavin adenin dinukleotid (FAD). NADPH redukuje FAD, koji dalje prenosi elektrone na disulfidne mostove u aktivnom centru i nastaju SH grupe. One interaguju sa GSSG redukujući ga do GSH dok se unutar enzima obnavljaju disulfidi (Tandoğan i Ulusu, 2006).

Enzim GR prisutan je kod većine organizama u obliku dimera, ali opisani su i tetramerni oblici kod nekih vrsta. Nalazi se u citosolu i u mitohondrijama eukariotskih ćelija. Osnovna uloga GR predstavlja održavanje redoks homeostaze u ćeliji.

1.4.5. Glutation-S-transferaza (GST)

Glutation-S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18) predstavlja multigensku familiju proteina čija je osnovna uloga detoksifikacija velikog broja jedinjenja: ksenobiotika, toksina, kancerogena i dr. GST su prisutne u svim živim organizmima. Eukarioti imaju veći broj citosolnih i membranski vezanih (mitohondrije i endoplazmatični retikulum) GST izoenzima sa različitim specifičnostima za supstrat (Hayes i Pulford, 1995; Hayes i sar., 2005). Osnovna reakcija koju GST katalizuje je konjugacija GSH sa elektrofilnim supstratima:



Citosolne GST su dimeri čije subjedinice kodiraju članovi neke od genskih familija. Subjedinice mogu biti iste (homodimeri) ili različite (heterodimeri) pri čemu su uvek kodirane genima iz iste genske familije. Identifikovano je 14 klasa izoenzima GST: alfa, kapa, mu, pi, omega, sigma, teta i zeta, koje su pronađene kod sisara i beta, delta, epsilon, lambda, fi, tau, koje su pronađene kod biljaka, bakterija, invertebrata, riba, vodozemaca, ptica (Hayes i Pulford, 1995; Konishi i sar., 2005).

Mehanizam detoksifikacije uključuje reakciju konjugacije GSH sa hidrofobnim elektrofilnim ksenobioticima, ali i endogenim elektrofilima (produkti nastali dejstvom ROS na biomolekule u uslovima oksidacionog stresa) koju katalizuje GST. Konjugati GSH acetiluju se do odgovarajuće merkapturne kiseline, koja se ekskretuje ili podleže daljem metabolizmu (Wang i Ballatori, 1998). Osim detoksifikacije, GST ima još i transportnu i sintetičku funkciju. Nekovalentnim vezivanjem jedinjenja kao što su steroidi, hormoni, lekovi i dr. omogućen je transport i olakšana eliminacija ovih supstanci iz organizma (Hayes i Pulford, 1995). GST učestvuje i u sintezi leukotriena, prostaglandina (Hayes i sar., 2005). Pojedine forme GST pokazuju peroksidaznu aktivnost jer katališu redukciju organskih hidroperoksida do odgovarajućih alkohola, a poznata je i izomerazna aktivnost (Hayes i Pulford, 1995).

1.4.6. Glutation (GSH)

Glutation (GSH) je tripeptid (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicin) i predstavlja najzastupljeniji niskomolekulski tiol u ćeliji. Nalazi se u životinjama, biljkama, mikroorganizmima (Kidd, 1997). Javlja se u dve forme: redukovanoj tiolnoj GSH, koja u normalnim fiziološkim uslovima čini više od 95% ukupnog glutaciona i oksidovanoj disulfidnoj GSSG, koja u zdravim ćelijama retko dostiže 10%. U ćeliji se nalazi u citosolu, jedru i mitohondrijama i to u milimolarnim koncentracijama, dok su van ćelije koncentracije GSH nekoliko mikromola (Valko i sar., 2007).

GSH u ćeliji ima višestruke funkcije: učestvuje u antioksidacionoj odbrani, detoksifikaciji ksenobiotika, održavanju proteinske strukture i funkcije, regulaciji sinteze i degradacije proteina, metabolizmu leukotriena i prostaglandina, redukciji ribonukleotida do dezoksiribonukleotida, regulaciji ćelijskog ciklusa i genskoj ekspresiji (Dickinson i Forman, 2002).

Sulfhidrilna (SH) grupa cisteina osnovni je funkcionalni element GSH. Sadržaj GSH u ćeliji zavisen je od njegovog trošenja i sinteze. Enzimi koji koriste GSH kao kofaktor ili kosupstrat (GSH-Px i GST) dovode do trošenja GSH prevodeći ga u GSSG. Redukciju GSSG u GSH katališe GR, a kao donor redukcionog potencijala služi NADPH poreklom iz pentozomonofosfatnog ciklusa (Halliwell i Gutteridge, 1999). *De novo* sintezu GSH katalizuju ATP zavisni enzimi γ -glutamilsteinsintetaza (γ -GCS) i glutation sintetaza (GS), (Griffith, 1999) iz aminokiselina glutamata, cisteina i glicina.

U antioksidacionoj zaštiti GSH, osim kao kofaktor, učestvuje i tako što direktno uklanja slobodne radikalske vrste, lipidne radikale i hidroperokside, omogućava regeneraciju neenzimskih antioksidanata do aktivnih formi, učestvuje u popravci oksidacionih oštećenja molekula DNK i sprečava apoptozu izazvanu ROS i citokinima (Kruidenier i Verspaget, 2002).

GSH može da gradi neenzimske komplekse sa metalima i na taj način učestvuje u njihovom transportu, deponovanju i metabolizmu (Valko i sar., 2005).

1.5. Specifičnosti antioksidacionog zaštitnog sistema kod mekušaca

Akvatični mekušci konstantno su izloženi delovanju različitih tipova sredinskog stresa koji uključuju varijacije temperature vode (dnevne i sezonske), fluktuacije u koncentraciji rastvorenog kiseonika, promene u dostupnosti hrane i prisustvo zagađivača (De Almeida i sar., 2007). Da bi preživeli u ovako promenljivim uslovima sredine mekušci su razvili niz adaptivnih mehanizama.

Kao i druge grupe aerobnih životinja mekušci poseduju sve komponente antioksidacionog zaštitnog sistema. U odnosu na sisarske, generalno su aktivnosti

antioksidanata niže kod akvatičnih mekušaca. Međutim, aktivnosti enzima u digestivnoj žlezdi su istog reda veličine kao one izmerene u jetri riba (Manduzio i sar., 2005). Kod školjke *Mytilus edulis* Cu Zn SOD glavna je forma ovog enzima, dok je Mn SOD slabo ekspimirana u tkivima ove školjke (Manduzio i sar., 2003; Livingstone i sar., 1992).

Različite vrste slatkovodnih puževa i školjki mogu se razlikovati u pogledu akumulacije istog metala. Pokazano je da iako *Viviparus ater* i *Unio pictorum* imaju za nekoliko redova veličine različite koncentracije mangana u svom telu, njihov relativni antioksidacioni kapaciteti sličnih su redova veličine (Campanella i sar., 2005).

1.6. Korišćenje mekušaca u biomonitoringu

Mekušci predstavljaju jedan od najraznovrsnijih filuma životinjskog carstva i važna su komponenta akvatičnih zajednica (Tomović i sar., 2010). Najveći broj vrsta svrstava se u klase Gastropoda i Bivalvia. Zbog svoje brojnosti i prisutnosti u različitim tipovima ekosistema (vodeni i terestrični) mekušci imaju značajnu ekološku ulogu (Oehlmann i Schulte-Oehlmann, 2003).

U biomonitoring studijama mekušci se uspešno koriste u cilju prikupljanja informacija o kvalitetu ekosistema i kvantifikovanja izloženosti i efekata koji nastaju delovanjem kontaminanata u sredini koju naseljavaju (Oehlmann i Schulte-Oehlmann, 2003; Foeckler i sar., 2006).

Veći broj karakteristika čine mekušce pogodnim bioindikatorima:

- ✓ Brojni su i široko rasprostranjeni; naseljavaju sve tipove ekosistema i zbog svoje distribucije omogućavaju istraživanje većih geografskih područija.
- ✓ Ključna su karika u funkcionisanju ekosistema i zbog toga će se negativan efekat zagađivača na populaciju mekušaca prisutnu u ekosistemu najverovatnije odraziti i na ceo ekosistem.

- ✓ Većina vrsta Gastropoda i Bivalvia su izrazito slabo pokretni ili sesilni organizmi i koncentracije polutanata utvrđene u njihovim telima mogu verno predstavljati stepen zagađenja sredine.
- ✓ Odlikuju ih raznovrsni načini reprodukcije kao i strategije životnog ciklusa.
- ✓ To su relativno krupne životinje i samim tim lake za manipulaciju i gajenje u akvarijumima.
- ✓ Kontaminante iz spoljašnje sredine mogu usvajati osim putem gastrointestinalnog trakta i preko integumentuma i respiratornih organa.
- ✓ U odnosu na druge invertebrate, a naročito kičmenjake imaju nižu sposobnost ekskrecije i metabolisanja polutanata.
- ✓ Vrste koje odlikuje visoka osetljivost na zagađivače uvrštene su u ugrožene vrste.

Prema literaturnim podacima školjke imaju niži nivo aktivnosti enzimskih sistema sposobnih da metabolišu perzistentne zagađivače u odnosu na ribe ili rakove, pa prema tome koncentracije kontaminanata u tkivima školjki preciznije reflektuju stepen zagađenja sredine (Phillips, 1990).

1.6.1. Osnovne karakteristike ispitivanih vrsta slatkovodnih puževa

Prema ranijim klasifikacijama slatkovodni puževi svrstani su u dve potklase: Prosobranchia i Pulmonata. Vrste *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* pripadaju potklasi Prosobranchia čije su osnovne odlike disanje pomoću škrga, po pravilu odvojeni polovi i postojanje larvalnih stupnjeva trohofora i veliger tokom razvića. Digestivni sistem Gastropoda počinje usnim otvorom sa hitinoznom vilicom, radulom, na kojoj se nalaze poprečni nizovi zubića. Ovim je omogućen herbivoran, karnivoran, parazitski način ishrane (Krunić, 1994).

Viviparus acerosus (Bourguignat, 1862) - rečni puž, (Slika 1) pripada klasi Gastropoda, potklasi Orthogastropoda, redu Architaenioglossa, familiji Viviparidae

(Jakubik, 2006) i stanovnik je dunavskog sliva. Telo ovih puževa je kratko i robusno, tentakule imaju oblik šila i kod mužijaka desna tentakula je nešto izmenjena da bi služila kao kopulatorni organ. Poseduju operkulum, kojim se mogu zatvoriti unutar ljuštura i preživeti određeno vreme na suvom. Ljuštura je debela i oblik i veličina joj zavise od pola. Sivkaste žuto-zelene je boje sa braon linijama i visina joj može dostizati 30 - 35 mm, a širina 23 - 38 mm. Ova vrsta naseljava stajaće vode ili sporotekuće delove reka, bliže obali. Hrani se algama, organskim ostacima ili planktonom, koji filtrira iz vode tokom respiracije.



Slika 1. *Viviparus acerosus*-rečni puž

([www. biolib. cz](http://www.biolib.cz)).

Amphimelania holandrii (C. Pfeiffer, 1828) - savski puž, (Slika 2) pripada klasi Gastropoda, potklasi Orthogastropoda, redu Neotaenioglossa, familiji Melanopsidae i prisutna je u slatkim vodama istočno - evropskog rasprostranjenja. Veličina debele ljuštura može dostizati visinu 16 - 22 mm i širinu 10 - 12 mm. Naseljava potopljeno kamenje u rekama i potocima na mestima sa bržim tokom vode.



Slika 2. *Amphimelania holandrii*-savski puž
(www.naturefg.com).

1.6.2. Osnovne karakteristike ispitivanih vrsta slatkovodnih školjki

Sve slatkovodne školjke pripadaju potklasi Eulamellibranchia. Telo školjki je bočno spljošteno i nalazi se unutar dvokapke ljuštore. Glava je redukovna, a bočno spljošteno stopalo se nalazi bliže prednjem kraju tela i služi za zarivanje i kretanje kroz mulj. Plašt formira ulazni i izlazni otvor za vodu koji se nalaze na zadnjem delu tela. Tok vode kroz plaštanu duplju ima oblik slova U. Par škrge smeštene su u zadnjem delu plaštane duplje i sastoje se od po dva niza odvojenih filamenata. Osim respiratorne škrge imaju ulogu i u sakupljanju hrane - cilijarni tip ishrane. Najveći broj školjaka je odvojenih polova, ali ima i hermafrodita. Razviće se odvija preko trohofor i veliger stupnja (Krunić, 1994).

Corbicula fluminea (O. F. Muller, 1774) - azijska školjka, (Slika 3) pripada klasi Bivalvia, potklasi Eulamellibranchia, redu Veneroidea, porodici Corbiculidae i poreklom je iz Azije. Introdokovana je u Evropu (Vidal i sar., 2002). Hermafroditna je vrsta i veličina adultne jedinke može dostići 5 cm. Ljuštura je žuto zelene boje. Hrani se pretežno fitoplanktonom (algama) i naseljava peskovito ili šljunkovito dno reka, jezera ili kanala.



Slika 3. *Corbicula fluminea*-azijska školjka

(en. wikipedia. org).

Sinanodonta woodiana (Lea, 1834) - kineska carica, (Slika 4) pripada klasi Bivalvia, potklasi Eulamellibranchia, redu Unionoida, porodici Unionidae. Istočno-azijskog je porekla, ali je rasprostranjena širom sveta zahvaljujući svom larvalnom stupnju, glohidiji, koja je obligatni parazit šarana (Paunović i sar., 2006). Izgled i veličina ljuštore ove školjke zavisi od staništa, i razlikuju se jedinke koje nastanjuju šljunkovito peskovitu podlogu brzih voda u odnosu na sporotekuće. Dužina ljuštore može biti od 95 - 200 mm, a širina od 60 - 120 mm.



Slika 4. *Sinanodonta woodiana*-kineska carica

([www. biolib. cz](http://www.biolib.cz)).

1.7. Osnovne karakteristike ispitivanih rečnih ekosistema

Slatkovodni ekosistemi, a pre svega reke, predstavljaju najveće i najvažnije rezervoare slatke vode za čovečanstvo. Osim u vodosnabdevanju veliki je značaj reka u proizvodnji energije, kao izvora hrane, kao transportnih koridora itd. Struktura i funkcija rečnih ekosistema izmenjena je i menja se, neprekidno, čovekovim direktnim ili indirektnim uticajima. Izlivanjem industrijskih i komunalnih otpadnih voda i spiranjem sa poljoprivrednih površina u rekama se nakupljaju supstance, koje dovode do pogoršanja kvaliteta vodene sredine i ugrožavaju opstanak akvatičnih organizama (Lazarević i sar., 2010; Vasiljević, 2010). Poslednjih godina izražena je potreba za donošenjem konvencija i zakonskih propisa, kao i primeni već postojećih propisa u cilju zaštite i boljeg upravljanja vodama.



Slika 5. Dunav kod Vinče

(foto S. G. Despotović).

Malmqvist i Rundle (2002) su dali detaljan pregled negativnih posledica delovanja čoveka koji preko uticaja na prirodne faktore dovode do konačnih promena u vodenim ekosistemima. Antropogeno delovanje se ogleda kroz urbanizaciju, industriju, poljoprivredu i menjanje tokova reka, a konačni faktori promene su destrukcija ekosistema, fizička promena staništa, promene u hemiji vode i promene u sastavu vrsta (Li i sar., 2010).

Devedesetih godina XX veka obavljeno je istraživanje kvaliteta tada jugoslovenskih voda (Dunav, Tisa, Velika Morava) u periodu od 1991 - 1995. godine. Autori Krizan i Vojinović-Miloradov (1997) su zaključili da je u ispitivanom periodu kvalitet voda generalno poboljšan zbog smanjenja ekonomski značajne produkcije na skoro svim poljima jer su Jugoslaviji uvedene sankcije. Smanjeno je oslobađanje zagađivača u vodenu sredinu zbog manjeg obima saobraćaja i poljoprivredne i industrijske proizvodnje.

Novijeg je datuma obimnije istraživanje Dunava i njegovih pritoka (Tisa, Sava i Velika Morava) u okviru „Drugog zajedničkog istraživanja Dunava” (eng. Joint Danube Survey 2 - JDS 2) izvedenog 2007 godine, sa učešćem svih podunavskih zemalja u cilju

prikupljanja uporedivih informacija o kvalitetu vode za ceo tok Dunava („Dunav kroz Srbiju”).

Dunav (Slika 5) je druga reka po dužini u Evropi, ali sa svojih 2857 km predstavlja najznačajniji plovni put. Nastaje od Berge i Brigaha u Švarcvaidu u Nemačkoj, a uliva se u Crno more. Dunav povezuje 17 država, protiče kroz brojne industrijske i urbane centre i prima značajnu količinu zagađenja (Lazarević i sar., 2010).

Dužina toka Dunava kroz Srbiju iznosi 588 km, a taj deo predstavlja deo srednjeg toka reke. U ovom delu se po geomorfološkim karakteristikama izdvajaju tri sektora Dunava. Panonski sektor Dunava ima karakteristike aluvijalnog vodotoka, sa malim padovima i peščanim dnom, Đerdapski sektor čini uzana i duboka Đerdapska klisura, a nizvodno od Kladova Dunav ima osobine tipične nizijske reke sa višim rečnim terasama (Babić Mladenović i sar., 2010). Prema dosadašnjim podacima kvalitet vode Dunava, duž većeg dela ili čak celog toka, ispitivan je u okviru tri međunarodne ekspedicije „Prvo zajedničko istraživanje Dunava” (eng. Joint Danube Survey 1 - JDS 1) 2001, „Aqua Terra” 2004 i „Drugo zajedničko istraživanje Dunava” (eng. Joint Danube Survey 2 - JDS 2) 2007. godine. U okviru JDS 2 prepoznati su specifični problemi, pogoršanje kvaliteta sredine nizvodno od velikih gradova, kao i lošiji kvalitet vode u pritokama u poređenju sa glavnim tokom Dunava (Lazarević i sar., 2010).

Tisa (Slika 6) je najveća leva pritoka Dunava i ujedno reka sa najvećim podslivom u slivu Dunava. Dužina joj je 966 km, a kroz Srbiju protiče u dužini od 164 km. Izvire u oblasti Bukovina u Ukrajini, a kod Starog Slankamena uliva se u Dunav. Tok reke Tise kroz Srbiju ima karakteristike tipične ravničarske reke. Rečna dolina je široka, sa blagim nagibom kosina. Izražena je bočna erozija i formiranje meandri, a na dnu je sitan peščani nanos.



Slika 6. Tisa kod Ade

(foto S. G. Despotović).

Velika Morava (Slika 7) nastaje spajanjem Južne i Zapadne Morave kod mesta Stalać. Reka je duga 185 km i jedna je od desnih pritoka Dunava. Uliva se u Dunav na prostoru između Smedereva i Kostolca. Pošto ova reka celom svojom dužinom protiče kroz Srbiju razlikuju se gornji, srednji i donji tok. Gornji tok odlikuje se velikim padom nagiba korita i velika je energija toka, rečni nanos je krupan i reka slabo krivuda. U svom srednjem toku reka ima veću tendenciju krivudanja i rečni nanos je sitniji. Konačno, donji tok reke je tipičan ravničarski.

Prema rezultatima ispitivanja fizičkih i hemijskih karakteristika vode i sedimenta Dunava i pritoka (JDS 2) najveći broj parametara kvaliteta vode Dunava i pritoka prema propisima Republike Srbije odgovarao je I i II klasi vodotokova. Što se tiče sedimenta, ispitivanja su pokazala povećano zagađenje teškim metalima i organskim zagađivačima (Vasiljević, 2010).



Slika 7. Velika Morava kod Bagrdana
(foto S. G. Despotović).

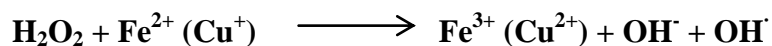
1.8. Biološki efekti metala

Metali predstavljaju poseban tip polutanata koji se u rekama mogu naći ili spiranjem podloge rečnog korita ili aktivnostima čoveka (Waykar i Deshmukh, 2012; Sakan i sar., 2011). Poljoprivreda, industrija i rudarstvo su glavni izvori zagađenja metalima (Kumar Singh i sar., 2007). Značaj metala kao zagađivača akvatičnih sistema ogleda se u njihovoj sposobnosti da prodru i akumuliraju se duž lanaca ishrane. Najznačajniji metali u smislu zagađenja vode su: Zn, Cu, Pb, Cd, Hg, Ni i Cr. Neki metali, kao na primer Cu, Zn, Cr neophodni su za funkcionisanje organizama jer predstavljaju kofaktore enzima ili ulaze u sastav respiratornih pigmenata (hemocijanin) i smatraju se esencijalnim. Međutim, pri većim koncentracijama oni ispoljavaju toksične efekte slično metalima kao što su As, Hg, Cd itd. koji se ne razgrađuju i čiji joni i pri niskim koncentracijama mogu imati ozbiljne efekte na zdravlje.

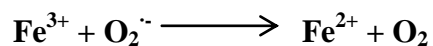
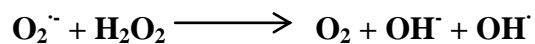
Distribucija metala u telu organizma zavisi od vrste kojoj organizam pripada, kao i od samog metala. Takođe, fiziološki procesi u organizmima, ali i abiotički faktori kao što su fizičke i hemijske karakteristike staništa utiču na akumulaciju metala (Shulkin i sar., 2003). Smatra se da bentosne vrste više akumuliraju metale i da su izloženije njihovom delovanju od vrsta koje naseljavaju više slojeve vode (Jarić i sar., 2011). Ove vrste su pogodne kao bioindikator jer omogućavaju prevazilaženje neadekvatne procene kvaliteta vodene sredine korišćenjem konvencionalnih metoda. Bioindikatorske vrste odslikavaju nivo zagađenja u ekosistemu, kao i dugoročni uticaj zagađenja (Wayker i Deshmukh, 2012). Školjke mogu da koncentrišu polutante u ljušturi, vežu ih za tioneine ili ih skladište u tkivima u vidu kalcifikovanih granula (Borković-Mitić i sar., 2013).

Teški metali u obliku finih čestica prašine dospevaju u atmosferu, odakle se talože u vodama i tlu. U vodama se brzo razređuju i talože kao teško rastvorljivi karbonati, sulfati ili sulfidi na dnu vodenih sistema. Kada se adsorpcijski kapacitet sedimenata iscrpi, raste koncentracija metalnih jona u vodi. Kruženje teških metala u prirodi zavisi od promena kojima metali podležu. Zbog toga što mogu da prodru u telo i proizvedu negativne efekte, značajno je proučiti mehanizme toksičnosti ovih elemenata i bolje razumeti načine delovanja na organizme.

Metali svoje toksične efekte mogu ispoljavati indukcijom nastanka oksidacionog stresa. Neki metali koji imaju promenljivu valencu (Fe, Cu) učestvuju u redoks reakcijama organizma. Tako **Fentonova** reakcija opisuje nastanak OH[•] interakcijom između H₂O₂ sa jonima metala (Fe²⁺ ili Cu⁺):



OH[•] može nastati i reakcijom između O₂^{•-} i H₂O₂ u prisustvu jona metala sa promenljivom valencom u **Haber-Weiss**-ovoj reakciji (Valko i sar., 2005):



Uloga metala koji ne učestvuju u redoks reakcijama organizma u nastanku oksidacionog stresa posredna je i ostvaruje se njihovim dejstvom na antioksidacioni zaštitni sistem organizma (Matović i sar., 2004; Žikić i sar., 1997; Žikić i sar., 2000). Metali mogu da blokiraju funkcionalne grupe biomolekula (Zhang i sar., 2010), da izmeštaju esencijalne metale iz biomolekula i utiču na modifikaciju aktivnih formi biomolekula. Inaktivacija enzima dešava se vezivanjem za njihove funkcionalne grupe (Xie i sar., 2009).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U proceni stanja i kvaliteta životne sredine poslednjih decenija sve više se koriste različiti biomarkeri u koje spadaju i parametri antioksidacionog zaštitnog sistema. Zbog toga što pružaju više informacija o efektima koje zagađivači imaju na organizme, pored ukazivanja na samo prisustvo ksenobiotika u sredini, predstavljaju nezaobilaznu komponentu biomonitoring istraživanja zajedno sa hemijskim analizama. Biomarkerima se može detektovati prisustvo zagađivača čije su koncentracije toliko niske da su ispod praga osetljivosti konvencionalnih metoda, kao i utvrditi efekti svih složenih delovanja kompleksa zagađivača, koji predstavljaju realnost u prirodnim staništima.

U ovoj doktorskoj disertaciji proučavane su komponente antioksidacionog zaštitnog sistema kao celina u monitoringu slatkovodnih sistema.

Metali su posebna grupa polutanata jer se u vodenim ekosistemima mogu naći spiranjem podloge, ali i čovekovim aktivnostima. Zbog njihove toksičnosti i biomagnifikacije duž lanaca ishrane od velikog je značaja utvrditi stepen akumulacije, posebno teških metala u vodenim organizmima.

Cilj ove doktorske disertacije bio je:

1. Da se utvrdi uticaj različitih lokaliteta na parametre antioksidacionog zaštitnog sistema: superoksid-dismutaze, katalaze, glutacion-peroksidaze, glutacion-reduktaze, glutacion-S-transferaze i ukupnog glutaciona u visceralnoj masi slatkovodnog puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava,
2. Da se utvrde interspecijske razlike u vrednostima parametara antioksidacionog zaštitnog sistema u visceralnoj masi četiri vrste mekušaca: *V. acerosus*, *A. holandrii*, *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave,

3. Da se utvrdi sezonski uticaj sredinskih varijabli na parametre antioksidacionog zaštitnog sistema u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava i

4. Da se utvrde koncentracije metala u visceralnoj masi četiri vrste mekušaca: *V. acerosus*, *A. holandrii*, *C. fluminea* i *S. woodiana*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Metodologija uzorkovanja

Školjke (*Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana*) i puževi (*Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii*) sakupljani su u aprilu i septembru 2010. godine na više lokaliteta reka Dunav, Tisa i Velika Morava (Slika 8) uz pomoć ručne bentosne mreže promera okaca 500 i 250 μM .



Slika 8. Geografski položaj reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

Fizičko-hemijski parametri: temperatura vode, pH, koncentracija kiseonika u vodi, zasićenost kiseonikom, elektroprovodljivost, alkalitet i koncentracije amonijuma, nitrita, nitrata, ukupnog azota, kao i ortofosfata i ukupnog fosfora preuzete su iz hidrološkog godišnjaka Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije za 2010. godinu (RHMZ, 2010). U slučajevima gde nije bilo podataka o fizičko-hemijskim parametrima sa lokaliteta sa kojih su prikupljeni uzorci, uzeti su podaci za drugi najbliži lokalitet.

U septembru su iz Dunava, Tise i Velike Morave izlovljavane jedinke puža *Viviparus acerosus* i školjke *Corbicula fluminea*. Iz Dunava je izvađeno 12 primeraka *V. acerosus* (prosečne dužine 3.46 ± 0.07 cm i mase 9.46 ± 0.48 g) sa lokaliteta Kostolac. Na istom lokalitetu ulovljeno je 11 primeraka *C. fluminea* (prosečne dužine 3.44 ± 0.04 cm i mase 9.11 ± 0.30 g). Ukupno 22 primerka *V. acerosus* bilo je izlovljeno iz Tise: na lokalitetu Ada - 10 i na lokalitetu Novi Bečej - 12 (prosečne dužine 2.67 ± 0.07 cm i mase 4.91 ± 0.31 g) i 12 primeraka *C. fluminea* na lokalitetu Novi Bečej (prosečne dužine 2.32 ± 0.06 cm i mase 4.29 ± 0.23 g). Iz Velike Morave na lokalitetu Bagrdan izlovljeno je 12 primeraka puža *V. acerosus* (prosečne dužine 2.17 ± 0.04 cm i mase 2.69 ± 0.14 g), a 24 primerka *C. fluminea* (prosečne dužine 2.48 ± 0.08 cm i mase 5.41 ± 0.43 g) izlovljeno je na lokalitetima Markovac (12) i Varvarin (12).

U toku septembra iz Velike Morave izlovljene su i vrste *Amphimelania holandrii* i *Sinanodonta woodiana*. Zbog veličine puža *A. holandrii* (prosečne dužine 1.78 ± 0.05 cm i mase 0.96 ± 0.07 g) bilo je neophodno pulovanje tela po 2 jedinke da bi se dobila dovoljna količina uzorka za analize, pa je kompletirano 12 uzoraka (ulovljeno ukupno 24 puža). Izlovljeno je, takođe, 26 primeraka školjke *S. woodiana* (prosečne dužine 11.16 ± 0.62 cm i mase 129.42 ± 20.92 g) i to na lokalitetima Bagrdan (10), Varvarin (8) i Markovac (8).

U aprilu su jedinke *V. acerosus* izlovljavane na lokalitetima Dunava, Tise i Velike Morave. 12 primeraka (prosečne dužine 2.85 ± 0.08 cm i mase 5.42 ± 0.36 g) izlovljeno je na lokalitetu Kostolac (Dunav), 12 primeraka (prosečne dužine 2.78 ± 0.12 cm i mase 4.05 ± 0.21 g) na lokalitetu Ada (Tisa) i 11 primeraka (prosečne dužine 3.14 ± 0.08 cm i mase 4.36 ± 0.42 g) na lokalitetu Bagrdan (Velika Morava).

Jedinke sve četiri vrste ispitivanih mekušaca, u čijim su visceralnim masama određivane koncentracije metala, izlovljavane su u aprilu. Izlovljeno je 12 puževa *V. acerosus* iz Dunava (prosečne dužine 2.21 ± 0.04 cm i mase 2.91 ± 0.15 g), 12 puževa *V. acerosus* iz Tise (prosečne dužine 2.17 ± 0.04 cm i mase 2.69 ± 0.13 g) i 10 puževa *V. acerosus* iz Velike Morave (prosečne dužine 2.28 ± 0.11 cm i mase 2.91 ± 0.22 g). Vrsta *A. holandrii* izlovljena je samo na Velikoj Moravi i sakupljeno je 7 primeraka (prosečne dužine 1.75 ± 0.05 cm i mase 1.03 ± 0.11 g). Iz Dunava je izlovljeno 5 primeraka vrste *C. fluminea* (prosečne dužine 2.41 ± 0.09 cm i mase 4.62 ± 0.27 g), a iz Velike Morave 10 jedinki iste vrste (prosečne dužine 2.18 ± 0.04 cm i mase 3.56 ± 0.18 g). U Dunavu je izlovljeno 11 primeraka vrste *S. woodiana* (prosečne dužine 7.82 ± 0.40 cm i mase 44.89 ± 5.90 g), u Tisi 6 jedinki iste vrste (prosečne dužine 7.30 ± 0.35 cm i mase 38.07 ± 2.65 g) i u Velikoj Moravi 5 jedinki (prosečne dužine 8.70 ± 0.08 cm i mase 49.25 ± 2.09 g)

3.2 Priprema tkiva za biohemijske analize

Školjke i puževi su nakon izlovljavanja preneseni u laboratoriju gde je izolovano meko tkivo iz ljuštura. Određena masa tkiva je zatim homogenizovana u saharoznom puferu u odnosu 1:5 (Lionetto i sar., 2003), na 20000 rpm, 3 puta po 15 sekundi, sa pauzama od po 15 sekundi (Rossi i sar., 1983; De Waziers i Albrecht, 1987). Homogenati su dalje sonifikovani 3 puta po 10 sekundi, sa pauzama od 10 sekundi na frekvenciji od 20 KHz (Takada i sar., 1982). Sve pripreme sa tkivima obavljane su na ledu. Deo sonifikata je odvajan i korišćen za određivanje koncentracije ukupnog GSH. Ostatak sonifikata je centrifugiran 90 minuta na 37000 rpm (100000 x g) na 4 °C (Okado-Matsumoto i Fridovich, 2001) i dobijeni supernatanti su korišćeni za dalje analize.

Supernatanti su čuvani na temperaturi od -80 °C i korišćeni za dalja merenja i biohemijske analize. Određivana je koncentracija ukupnih proteina i aktivnost enzima antioksidacionog zaštitnog sistema: SOD, CAT, GSH-Px, GR, kao i enzima faze II biotransformacije GST.

Rastvori:

- Saharozni pufer (0.25 M saharoza + 0.05 M Tris + 0.1 M EDTA, pH 7.4 sa HCl).

Aparati:

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),
- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka),
- Homogenizer (Ultra-Turrax, IKA-Werk, Janke & Kunkel, Staufen, Nemačka),
- Sonifikator (Vibra Cell, Sonics and Materials Inc., SAD) i
- Ultracentrifuga (L7-55, Beckman, SAD).

3.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina određivana je metodom po Lowry-ju i sar., 1951. Metoda se zasniva na biuretskoj reakciji kupri jona (Cu^{2+}) jona sa peptidnim vezama proteina u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa (Folin-Ciocalteu reagens) sa aromatičnim amino kiselinama tirozinom i triptofanom, koje su gradivne jedinice ispitivanih proteina. Nakon vezivanja za peptidne veze joni Cu^{2+} redukuju se u kupro jone (Cu^+) i formira se kompleks Cu^+ -protein, koji reaguje sa dodatim Folin-Ciocalteu reagensom. Plava obojenost rastvora posledica je izgrađenog kompleksa čiji je maksimum apsorpcije na talasnoj dužini svetlosti od 500 nm. Vrednost apsorbanace rastvora direktno je proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku.

Rastvori:

- 0.2 N NaOH,
- Reagens I (2 % Na_2CO_3 + 0.2 N NaOH),
- 0.13 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$,

- 0.13 M K-Na-tartarat,
- Reagens II (1 mL 0.13 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ + 1 mL 0.13 M K-Na-tartarat, dopuni se do 100 mL Reagensom I) i
- Folin-Ciocalteu reagens razblažen u odnosu 1:2 sa destilovanom vodom.

Aparati:

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),
- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka) i
- Spektrofotometar (Nicolet Evolution 600 UV-VIS, Thermo, SAD).

Eksperimentalni postupak:

U staklenu epruvetu sipa se 3 mL Reagensa II, 0.1 mL 0.2 N NaOH i 0.1 mL razblaženog uzorka ($R=11$) i promućka. Za blankove umesto uzorka pipetira se 0.1 mL dejonizovane vode. Posle inkubacije od 15 minuta, na sobnoj temperaturi, dodaje se 0.6 mL Folin-Ciocalteu reagensa, promućka i inkubira još 30 minuta na sobnoj temperaturi. ApSORBANCA se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 500 nm. Vrednost koncentracije proteina izračunava se na osnovu kalibracione krive, koja se konstruiše korišćenjem standardnih rastvora poznatih koncentracija goveđeg serum albumina (Bovine Serum Albumin - BSA,). Jedinica za izražavanje vrednosti koncentracije proteina je mg proteina u mL homogenata tkiva (mg/mL).

3.4. Određivanje aktivnosti enzima antioksidacionog zaštitnog sistema

3.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD u uzorcima određivana je adrenalinskom metodom, koju su opisali Misra i Fridovich (1972). Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u adrenohrom u alkalnoj sredini. Autooksidacija

adrenalina odvija se u prisustvu O_2^- , a SOD iz uzorka uklanjajući O_2^- inhibira ovu reakciju. Spektrofotometrijski se prati smanjenje brzine autooksidacije adrenalina na talasnoj dužini od 480 nm. Vrednost apsorbance srazmerna je akumuliranom roze obojenom adrenohromu.

Rastvori:

- 3×10^{-4} M adrenalin u 0.1 M HCl,
- Karbonatni pufer (0.05 M Na_2CO_3 + 10^{-4} M EDTA, pH 10.2 sa HCl)

Aparati:

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),
- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka) i
- Spektrofotometar (Nicolet Evolution 600 UV-VIS, Thermo, SAD).

Ekperimentalni postupak:

U staklenu kivetu sipa se 3 mL karbonatnog pufera, odgovarajuća zapremina, prethodno podešenog, rastvora adrenalina i zapremina razblaženog uzorka, koja izaziva inhibiciju autooksidacije adrenalina u opsegu od 16.66% do 66.66%. Promena apsorbance očitava se spektrofotometrijski na 480 nm na temperaturi od 25 °C. Aktivnost SOD predstavlja razliku vrednosti apsorbance uzorka prema slepoj probi (pufer i rastvor adrenalina čija je promena apsorbance u opsegu 0.020- 0.022).

Jedinica aktivnosti SOD predstavlja onu količinu enzima koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance u minuti. Izražava se u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

3.4.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost CAT u ispitivanim uzorcima određivana je metodom koju je opisao Claiborne (1984). Prema osnovnom principu metode spektrofotometrijski se prati brzina

razgradnje H_2O_2 do H_2O i O_2 katalitičkom aktivnošću CAT na talasnoj dužini od 240 nm.

Rastvori:

- 0.05 M fosfatni pufer (pH 7.0) i
- 30% H_2O_2 .

Aparati:

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),
- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka) i
- Spektrofotometar (Nicolet Evolution 600 UV-VIS, Thermo, SAD).

Eksperimentalni postupak:

U fosfatnom puferu rastvori se nekoliko kapi H_2O_2 tako da apsorbance slepe probe izmerena na 240 nm talasne dužine bude između 0.525 i 0.550. Ovako podešen rastvor (1.5 mL) sipa se u kvarcnu kivetu i zatim se dodaje odgovarajuća zapremina uzorka, koja dovodi do srednje vrednosti promene apsorbance u opsegu od 0.03 do 0.06. Reakcija razgradnje H_2O_2 započinje dodavanjem uzorka, u kivetu, usled prisustva CAT i meri se pad apsorbance spektrofotometrijski na 240 nm svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Molarni ekstinkcioni koeficijent za H_2O_2 na talasnoj dužini od 240 nm koji iznosi $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ koristi se za izračunavanje aktivnosti CAT.

Jedinica aktivnosti CAT predstavlja broj milimolova H_2O_2 redukovanih u minuti (mmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$). Aktivnost enzima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

3.4.3. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px)

Aktivnost enzima GSH-Px u uzorcima određivana je metodom Tamura i sar. (1982) koja se zasniva na povezanoj aktivnosti GSH-Px (korišćenjem GSH kao kofaktora katalizuje redukciju velikog broja hidroperoksida uz istovremenu oksidaciju GSH do GSSG) i GR (katalizuje redukciju GSSG u GSH korišćenjem NADPH kao donora redukativnog potencijala, koji biva oksidovan). Detektovanje aktivnosti enzima omogućeno je spektrofotometrijskim praćenjem oksidacije NADPH u NADP⁺ na 340 nm.

Rastvori:

- 1mM GSH,
- 0.2 mM NADPH u 1% NaHCO₃,
- 1 mM NaN₃,
- 1 mM EDTA,
- 0.03 M terc-butil hidroperoksid,
- 0.5 M fosfatni pufer (pH 7.0) i
- GR.

Aparati:

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),
- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka) i
- Spektrofotometar (Nicolet Evolution 600 UV-VIS, Thermo, SAD).

Ekperimentalni postupak:

U kvarcnu kivetu sipa se 1.6 mL H₂O, 0.3 mL 1mM GSH, 0.6 mL 0.2 mM NADPH, 0.1 mL 1mM NaN₃ (inhibira aktivnost CAT), 0.1 mL 1 mM EDTA, 0.3 mL 0.5M fosfatnog pufera (pH 7.0), 0.1 mL 0.03 M terc-butil hidroperoksida, odgovarajuća

količina uzorka i 5 μ L GR. Prati se pad apsorbance na 340 nm, spektrofotometrijski u toku 3 minute na temperaturi od 25°C. Aktivnost GSH-Px utvrđuje se prema slepoj probi (sadrži sve rastvore osim uzorka) uz korišćenje molarnog ekstinkcionog koeficijenta za NADPH na 340 nm od 6.22 x 10³ M⁻¹cm⁻¹.

Jedinica enzimske aktivnosti GSH-Px definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH/min). Aktivnost enzima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

3.4.4. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)

Za određivanje aktivnosti GR u ispitivanim uzorcima korišćena je metoda koju su opisali Glatzle i sar. (1974), a zasniva se na sposobnosti GR da katalizuje reakciju redukcije GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH do NADP⁺. Spektrofotometrijski se prati pad apsorbance na talasnoj dužini od 340 nm koji je proporcionalan padu koncentracije NADPH u rastvoru.

Rastvori:

- 0.5 M fosfatni pufer (pH 7.4),
- 2 mM GSSG,
- 0.5 mM EDTA i
- 0.1 mM NADPH u 1% NaHCO₃.

Aparati:

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),
- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka) i
- Spektrofotometar (Nicolet Evolution 600 UV-VIS, Thermo, SAD).

Eksperimentalni postupak:

U kvarcnu kivetu pipetira se 0.6 mL 0.5 M fosfatnog pufera, 0.1 mL 2mM GSSG, 0.1 mL 0.5 mM EDTA, 2 mL H₂O, 0.1 mL 0.1mM NADPH i odgovarajuća zapremina uzorka. Slepa proba sadrži sve rastvore osim uzorka. Na talasnoj dužini od 340 nm na svakih 30 sekundi u toku 3 minute i na temperaturi od 25 °C prati se promena apsorbance. Za izračunavanje aktivnosti GR koristi se molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH na 340 nm od $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Jedinica aktivnosti enzima GR definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH). Aktivnost ovog enzima u ispitivanim uzorcima predstavljena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

3.4.5. Određivanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST)

Habig i sar. (1974) opisali su metodu kojom je određivana aktivnost enzima faze II biotransformacije GST. Osnovni princip metode zasniva se na reakciji vezivanja 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) za sulfhidrilnu grupu cisteina koji ulazi u sastav tripeptida GSH, pri čemu se formira CDNB-GSH konjugat, a katalizuje je GST. Nakupljanjem CDNB-GSH konjugata u eksperimentalnoj smeši dolazi do rasta apsorbance čiji je nivo direktno proporcionalan aktivnosti GST.

Rastvori:

- 0.5 M fosfatni pufer (pH 6.5),
- 25 mM CDNB u 95% etanolu i
- 20 mM GSH.

Aparati:

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),

- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka) i
- Spektrofotometar (Nicolet Evolution 600 UV-VIS, Thermo, SAD).

Eksperimentalni postupak:

U kvarcnu kivetu sipa se 0.6 mL 0.5 M fosfatnog pufera (pH 6.5), 0.1 mL 25 mM CDNB u 95% etanolu, 0.3 mL 20 mM GSH, H₂O do 2 mL i određena količina uzorka. Na talasnoj dužini od 340 nm spektrofotometrijski se prati povećanje apsorbance na svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Slepu probu čine svi rastvori bez uzorka i aktivnost GST određuje se u odnosu na slepu probu korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDNB-GSH konjugat na 340 nm od $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Jedinica aktivnosti enzima faze II biotransformacije GST izražava se kao broj nanomolova CDNB-GSH konjugata nastalog u minuti (nmol CDNB-GSH/min). Aktivnost GST predstavljena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

3.5 Određivanje koncentracije glutationa (GSH)

Koncentracija ukupnog GSH u ispitivanim uzorcima određivana je prema metodi koju je opisao Griffith (1980). Metoda je zasnovana na cikličnom enzimskom procesu gde 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoična kiselina) (DTNB) oksiduje GSH do GSSG uz nastanak 2-nitro-5-tiobenzoična kiselina (TNB). Enzim GR redukuje GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH. Prati se stopa formiranja žuto obojenog jedinjenja TNB, spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 412 nm, koja je proporcionalana koncentraciji ukupnog GSH u uzorku.

Rastvori:

- Standard GSH,
- 10% sulfosalicilna kiselina,
- 0.3 mM NADPH,
- 6 mM DTNB,

- GR i
- Pufer (125 mM NaH₂PO₄ + 6mM EDTA, pH 7.5 sa NaOH).

Aparati:

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),
- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka),
- Centrifuga (Mini Spin, Eppendorf, Nemačka) i
- Spektrofotometar (Nicolet Evolution 600 UV-VIS, Thermo, SAD).

Eksperimentalni postupak:

U epruvete za mikrocentrifugiranje sipa se 0.5 mL sonifikata tkiva i 0.25 mL 10% sulfosalicilne kiseline da bi se istaložili proteini u uzorku. Supernatanti dobijeni nakon centrifugiranja od 10 minuta na 5000 rpm, koriste se za određivanje koncentracije GSH.

U kvarcnu kivetu sipa se 0.7 mL 0.3 mM NADPH, 0.1 mL 6 mM DTNB, uzorak, H₂O do 1 mL reakcione smeše i 5μL GR. Slepa proba dobija se sipanjem svih rastvora osim uzorka, a u standarde se umesto uzorka sipaju odgovarajuće zapremine (5μL i 10 μL) standardnih rastvora sa poznatom koncentracijom GSH. Spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 412 nm prati se povećanje apsorbance na svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C.

Koncentracija ukupnog GSH u uzorku izražena je u nanomolima GSH po gramu tkiva (nmol GSH/g tkiva).

3.6 Određivanje koncentracije metala

U visceralnoj masi ispitivanih vrsta mekušaca utvrđivane su koncentracije 15 metala: aluminijum (Al), arsen (As), bor (B), kadmijum (Cd), kobalt (Co), hrom (Cr), bakar (Cu), gvožđe (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikal (Ni), olovo (Pb), selen (Se), stroncijum (Sr) i cink (Zn) metodom induktivno spregnute plazme - optičko emisije spektrometrije (eng. inductively coupled plasma - optical emission spectrometry; ICP-OES). Princip metode se zasniva na sposobnosti plazme da prenese energiju na elemente iz uzoraka unetih u aparaturu, pri čemu dolazi do ekscitacije atoma i jona iz uzorka, koji pri vraćanju na početno energetska stanje emituju fotone. Uz pomoć talasnih dužina fotona moguće je odrediti tip elementa koji ih je emitovao kao i koncentraciju elementa na osnovu intenziteta fotonskog zraka.

Za formiranje plazme koristi se argon, koji se jonizuje pod dejstvom elektromagnetnog polja koje je formirala električna struja. Energija za ekscitaciju atoma iz uzoraka potiče od velike gustine elektrona u plazmi kao i njene temperature koja dostiže 10000 K (9726.9 °C). Uzorci u tečnom i gasovitom stanju mogu se direktno uvoditi u aparat kroz uske cevčice, dok je za uzorke u čvrstom stanju neophodna prethodna ekstrakcija ili digestija kiselinama da bi se dobio rastvor. Rastvori se prevode u aerosol i u takvom stanju uvode u kanal sa plazmom.

Rastvori:

- 65 % HNO₃,
- 30 % H₂O₂.

Aparati:

- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- Liofilizator (G Freeze Dryers Rotational-Vacuum-Concentrator AMMA 1-16 LSC, Nemačka),
- Mikrotalasna peć (Speedwave™ MWS-3+; Bergof Products + Instruments GmbH, Eningem, Nemačka) i

- ICP-OES, Spectro Genesis EOP II, Spectro Analytical Instruments DmbH, Kleve, Nemačka).

Eksperimentalni postupak:

Celo telo je korišćeno kod vrsta *V. acerosus*, *A. holandrii* i *C. fluminea* da bi se dobio oko 1 g vlažne mase uzorka, a od vrste *S. woodiana* uziman je deo visceralne mase prednjeg dela tela u nivou digestivne žlezde iste mase. Kada od pojedinačnih jedinki nije bilo moguće dobiti 1 g mase, pravljene su kompozitni uzorci. Uzorci su potom liofilizovani. Nakon toga uzimano je oko 0.2 g suve težine uzorka, rastvoreno u smeši 6 mL 65% HNO₃ i 4 mL 30% H₂O₂ i digestovano u mikrotalasnoj peći po programu za digestiju uzoraka hrane (100 - 170° C). Pravljene su i slepe probe koje su sadržavale samo kiseline bez uzorka da bi se eliminisala mogućnost prisustva analiziranih elemenata u hemikalijama. Posle završetka digestije i nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, smeše sa rastvorenim uzorcima presipane su u odmerne sudove i dopunjavane destilovanom vodom do 25 ml.

U ovako pripremljenim uzorcima je metodom induktivno spregnute plazme - optičko emisije spektrometrije utvrđivana koncentracija 15 metala: Al, As, B, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr i Zn. Talasne dužine korišćene za detekciju pojedinih elemenata su: **Al** - 394.401 nm, **As** - 189.042 nm, **B** - 249.773 nm, **Cd** - 228.802 nm, **Co** - 228.616 nm, **Cr** - 205.552 nm, **Cu** - 324.754 nm, **Fe** - 259.941 nm, **Mn** - 259.373 nm, **Mo** - 202.095 nm, **Ni** - 231.604 nm, **Pb** - 220.353 nm, **Se** - 196.090 nm, **Sr** - 460.733 nm, **Zn** - 206.191 nm.

Koncentracije metala u visceralnoj masi ispitivanih mekušaca izražene su u mikrogramima po gramu tkiva (µg/g suve težine).

3.7 Statistička obrada podataka

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljeni su tabelarno i grafički kao srednja vrednost ± statistička greška ($X_{sr} \pm SG$). Za statističku analizu postojanja značajnih razlika između ispitivanih parametara po grupama korišćen je neparametrijski

Mann-Whitney *U*-test. Vrednost $p < 0.05$ uzeta je za najmanji stepen značajnosti. Kanonijskom diskriminacionom analizom utvrđene su razlike između reka u septembru, kao i razlike između ispitivanih vrsta mekušaca poreklom iz Velike Morave. Korišćenjem Spearman-ovog korelacionog testa utvrđene su korelacije između parametara antioksidacionog zaštitnog sistema i lokaliteta i istih parametara i perioda. Takođe je ovaj test korišćen za određivanje korelacija između metala u visceralnoj masi ispitivanih vrsta mekušaca. Za statističku obradu rezultata korišćeni su analitički protokoli koje su opisali Darlington i sar. (1973) i Dinneen i Blakesley (1973).

4. REZULTATI

4.1 Fizičko-hemijski parametri vode

Fizičko-hemijski parametri vode u aprilu i septembru 2010. godine za reke: Dunav, Tisa i Velika Morava predstavljeni su u Tabelama 1 i 2.

Tabela 1. Fizičko-hemijski parametri vode u aprilu 2010. godine na lokalitetima Dunav, Tisa i Velika Morava.

Parameter/lokalitet	Dunav	Tisa		Velika Morava
	Smederevo	Padej	Novi Bečej	Bagrdan
Temperatura (°C)	14.2	12.7	12.6	11.1
pH	8.1	8.0	8.0	8.0
O₂ (mg/L)	9.5	9.3	9.6	9.9
O₂ (%)	96	88	90	90
Elektroprovodljivost (μS/cm)	378	408	404	375
Alkalitet (mmol/L)	3.5	2.4	2.4	3.4
Amonijum-N (mg/L)	0.15	0.07	0.07	< 0.01
Nitriti-N (mg/L)	0.010	0.035	0.028	0.016
Nitrati-N (mg/L)	0.30	1.09	1.00	1.50
Ukupni azot (mg/L)	1.76	1.57	1.48	1.76
Ortofosfati (mg/L)	0.070	0.054	0.047	0.075
Ukupni fosfor (mg/L)	0.097	0.083	0.083	0.151

Tabela 2. Fizičko-hemijski parametri vode u septembru 2010. godine na lokalitetima Dunav, Tisa i Velika Morava.

Parameter/lokalitet	Dunav	Tisa		Velika Morava		
	Smederevo	Padej	Novi Bečej	Varvarin	Velika Plana	Bagrdan
Temperatura (°C)	21.0	18.0	20.2	18.0	19.2	20.0
pH	8.0	8.0	8.0	8.4	8.4	8.5
O₂ (mg/L)	8.0	7.9	7.9	9.9	9.1	9.7
O₂ (%)	89	84	88	104	99	107
Elektroprovodljivost (μS/cm)	397	513	579	467	577	512
Alkalitet (mmol/L)	3.4	3.0	3.3	4.4	4.6	4.5
Amonijum-N (mg/L)	0.21	0.05	0.06	0.04	0.08	0.42
Nitriti-N (mg/L)	0.016	0.021	0.026	0.080	0.088	0.310
Nitrati-N (mg/L)	1.39	1.12	0.83	0.20	0.50	0.50
Ukupni azot (mg/L)	1.67	/	1.40	2.25	2.36	2.38
Ortofosfati (mg/L)	0.065	0.064	0.033	0.144	0.170	0.161
Ukupni fosfor (mg/L)	0.108	0.129	0.152	0.175	0.238	0.228

Kada se porede fizičko-hemijski parametri vode reka Dunav, Tisa i Velika Morava u aprilu (Tabela 1) i septembru (Tabela 2) uočavaju se razlike u vrednostima većeg broja parametara. Temperatura vode je u aprilu znatno niža u odnosu na septembar. Iznosila je 14.2° C kod Smedereva (Dunav), 12.7° C kod Padeja (Tisa), 12.6° C kod Novog Bečaja (Tisa), 11.1° C kod Bagrdana (Velika Morava). Vrednosti pH su na sve tri reke u aprilu bile oko 8.0 (Tabela 1). Koncentracije rastvorenog kiseonika više su u aprilu u odnosu na septembar na svim lokalitetima: 9.5 mg/L - Smederevo, 9.3 mg/L - Padej, 9.6 mg/L - Novi Bečej, 9.9 mg/L - Bagrdan. Procenat zasićenosti vode kiseonikom u aprilu bio je najmanji kod Padeja (88%), a najviši kod Smedereva (96%).

U odnosu na septembar, zasićenost vode Dunava i Tise, kiseonikom, veća je u aprilu, dok je zasićenost vode Velike Morave manja. Elektroprovodljivost vode u aprilu (Tabela 1) je na svim rekama bila niža u odnosu na septembar (Tabela 2). Alkalitet je u aprilu imao vrednosti 2.4 mmol/L na oba lokaliteta Tise, 3.4 mmol/L kod Bagrdana (Velika Morava) i 3.5 mmol/L kod Smedereva (Dunav). Najveća razlika u koncentraciji amonijuma uočena je u vodi Velike Morave (Bagrdan) u aprilu (<0.01 mg/L) i septembru (0.42 mg/L). Na lokalitetima Tise koncentracija amonijuma u aprilu bila je ista i iznosila je 0.07 mmol/L, dok je kod Smedereva (Dunav) u istom period izmereno 0.15 mmol/L. Koncentracija nitrita imala je slične odnose u aprilu i septembru za sve reke. Kod Bagrdana (Velika Morava) detektovana je koncentracija 0.016 mg/L u aprilu, znatno manja od koncentracije izmerene u septembru (Tabela 2). U vodi Dunava (Smederevo) koncentracija nitrita u aprilu bila je 0.010 mg/L, a u istom periodu u Tisi vrednosti su bile 0.035 mg/L - Padej i 0.028 mg/L - Novi Bečej. Nitrati su u aprilu imali sledeće koncentracije: 0.30 mg/L - Smederevo, 1.09 mg/L - Padej, 1.00 - Novi Bečej, 1.50 mg/L - Bagrdan. Vrednosti koncentracije ukupnog azota iste su u aprilu u Dunavu i Velikoj Moravi 1.76 mg/L, dok su na lokalitetima Tise zabeležene nešto niže vrednosti: 1.57 mg/L - Padej i 1.48 mg/L - Novi Bečej. Ortofosfati su u aprilu imali koncentracije: 0.070 mg/L - Smederevo (Dunav), 0.054 mg/L - Padej (Tisa), 0.047 mg/L - Novi Bečej (Tisa) i 0.075 mg/L - Bagrdan (Velika Morava). Isti trend vrednosti koncentracija ukupnog fosfora kao ortofosfata u aprilu je bio na svim rekama. Najniže su vrednosti bile zabeležene u vodi Tise (0.083 mg/L - Padej i novi Bečej). Nešto viša je bila vrednost u vodi Dunava (0.097 mg/L - Smederevo), a najviša u Velikoj Moravi (0.151 mg/L - Bagrdan).

Temperatura vode u septembru kretala se od 18° C na lokalitetima Varvarin (Velika Morava) i Padej (Tisa) do 21° C, koliko je izmereno u Smederevu (Dunav). Vrednosti pH vode bila su jednake na lokalitetima Dunava i Tise i iznosile su 8.0, dok su na lokalitetima Velike Morave zabeležene nešto baznije vrednosti (Tabela 2). Koncentracija rastvorenog kiseonika, kao i zasićenost vode kiseonikom imale su najviše vrednosti u Velikoj Moravi. Na lokalitetu Varvarin izmerene su vrednosti ovih parametara u opsegu 9.9 mg/L i 104%, 9.1 mg/L i 99% na lokalitetu Velika Plana i 9.7 mg/L i 107% na lokalitetu Bagrdan. Na oba lokaliteta Tise koncentracija rastvorenog kiseonika bila je 7.9 mg/L, a zasićenost kiseonikom 84% na lokalitetu Padej i 88% na

lokalitetu Novi Bečej. U Dunavu kod Smedereva koncentracija rastvorenog kiseonika bila je 8.0 mg/L, dok je zasićenost kiseonikom bila 89%. Najniža vrednost elektroprovodljivosti zabeležena je u vodi Dunava i iznosila je 397 $\mu\text{S}/\text{cm}$, više vrednosti su zabeležene na lokalitetima Tise (Padej - 513 $\mu\text{S}/\text{cm}$ i Novi Bečej - 579 $\mu\text{S}/\text{cm}$) i Velike Morave (Varvarin - 467 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Velika Plana - 577 $\mu\text{S}/\text{cm}$ i Bagrdan - 512 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Alkalitet se kretao od 3.0 mmol/L (Padej) i 3.3 mmol/L (Novi Bečej) na Tisi, preko 3.4 mmol/L u Dunavu kod Smedereva, do 4.4 mmol/L (Varvarin), 4.5 mmol/L (Bagrdan) i 4.6 mmol/L (Velika Plana) na Velikoj Moravi. Najniže vrednosti koncentracije amonijuma zabeležene su na Tisi (Padej - 0.05 mg/L i Novi Bečej - 0.06 mg/L). Približne vrednosti su bile i kod Varvarina (0.04 mg/L) i Velike Plane (0.08 mg/L) na Velikoj Moravi, dok je najveća zabeležena vrednost kod Bagrdana (0.42 mg/L). U vodi Dunava koncentracija amonijuma bila je 0.21 mg/L. Koncentracije nitrita na istraživanim lokalitetima iznosile su: Dunav 0.016 mg/L (Smederevo), Tisa 0.021 mg/L (Padej), 0.026 mg/L (Novi Bečej) i Velika Morava 0.080 mg/L (Varvarin), 0.088 mg/L (Velika Plana) i 0.310 mg/L (Bagrdan). Koncentracije nitrata imale su suprotan trend u odnosu na koncentracije nitrita, pa su najniže vrednosti izmerene na Velikoj Moravi (0.20 mg/L - Varvarin; 0.50 mg/L - Velika Plana i Bagrdan), nešto više na Tisi (0.83 mg/L - Novi Bečej; 1.12 mg/L - Padej) i najviše na Dunavu (1.39 mg/L - Smederevo). Koncentracije ukupnog azota bile su 1.67 mg/L kod Smedereva (Dunav), 1.40 mg/L kod Novog Bečaja (Tisa), 2.25 mg/L kod Varvarina (Velika Morava), 2.36 mg/L kod Velike Plane (Velika Morava) i 2.38 mg/L kod Bagrdana (Velika Morava). U vodi Velike Morave koncentracije ortofosfata i ukupnog fosfora imale su najveće vrednosti: kod Varvarina - 0.144 mg/L i 0.175 mg/L, kod Velike Plane - 0.170 mg/L i 0.238 mg/L, kod Bagrdana - 0.161 mg/L i 0.228 mg/L. Vrednosti su se na lokalitetima Tise kretale od 0.033 mg/L (Novi Bečej) ortofosfata do 0.064 mg/L (Padej) i od 0.129 mg/L (Padej) ukupnog fosfora do 0.152 mg/L (Novi Bečej). Koncentracije ortofosfata kod Smedereva (Dunav) bila je 0.065 mg/L, a ukupnog fosfora 0.108 mg/L.

4.2. Koncentracija ukupnih proteina

Vrednosti koncentracije proteina u visceralnoj masi puža - *V. acerosus* i školjke - *C. fluminea* u septembru 2010. godine iz reka: Dunav, Tisa i Velika Morava predstavljene su u Tabeli 3. Kod obe vrste uočava se da su najviše vrednosti izmerene kod jedinki iz Dunava, a najniže kod onih iz Tise. Za vrstu *V. acerosus* vrednosti su bile 4.83 ± 0.10 mg/mL kod jedinki iz Dunava, 3.75 ± 0.10 mg/mL kod jedinki iz Tise i 4.39 ± 0.13 mg/mL kod jedinki iz Velike Morave. Uočene su statistički značajne razlike između Dunava i Tise (^a $p < 0.05$), Dunava i Velike Morave (^a $p < 0.05$) kao i Tise i Velike Morave (^b $p < 0.05$).

Tabela 3. Koncentracija ukupnih proteina (mg/mL) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava i puža *A. holandrii* i školjke *S. woodiana* iz Velike Morave.

Koncentracija proteina				
Vrsta		Dunav	Tisa	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	april	4.62 ± 0.18	4.52 ± 0.14	5.18 ± 0.18
	septembar	4.83 ± 0.10	$3.75 \pm 0.10^{a*}$	$4.39 \pm 0.13^{ab*}$
<i>Corbicula fluminea</i>		9.99 ± 0.30	6.35 ± 0.22^a	9.29 ± 0.25^b
<i>Amphimelania holandrii</i>				10.62 ± 0.29
<i>Sinanodonta woodiana</i>				4.61 ± 0.17

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava;
^{*} $p < 0.05$ april vs septembar.

U Tabeli 3. predstavljene su koncentracije proteina za vrstu *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave, dobijene u aprilu 2010. godine. Poređenjem vrednosti koncentracija proteina iz aprila sa onim iz septembra uočeno je da su vrednosti bile statistički značajno manje kod jedinki iz Tise u septembru (3.75 ± 0.10 mg/mL) u odnosu na april (4.52 ± 0.14 mg/mL), ($*p < 0.05$). Isti je odnos koncentracija proteina zapažen kod jedinki iz Velike Morave, a vrednosti su bile značajno veće u aprilu (5.18 ± 0.18 mg/mL) u odnosu na septembar (4.39 ± 0.13 mg/mL), ($*p < 0.05$). Kod jedinki iz Dunava nije bilo značajnih razlika između vrednosti koncentracija proteina izmerenih u aprilu i septembru (4.62 ± 0.18 mg/mL, april i 4.83 ± 0.10 mg/mL, septembar).

Vrednosti koncentracije ukupnih proteina dobijene za jedinke vrste *C. fluminea* iz Tise (6.35 ± 0.22 mg/mL) bila je statistički značajno manja u odnosu na vrednost kod onih iz Dunava (9.99 ± 0.30 mg/mL), ($^ap < 0.05$) i vrednost dobijenih iz jedinki iz Velike Morave (9.29 ± 0.25 mg/mL), ($^bp < 0.05$).

U Tabeli 3 date su i vrednosti koncentracije proteina za vrste *A. holandrii*, iz Velike Morave, dobijene u visceralnoj masi i *S. woodiana*, iz Velike Morave, dobijene u visceralnoj masi koje su iznosile 10.62 ± 0.29 mg/mL i 4.61 ± 0.17 mg/mL respektivno.

4.3. Aktivnost enzima antioksidacionog zaštitnog sistema puža *Viviparus acerosus* i školjke *Corbicula fluminea* iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru

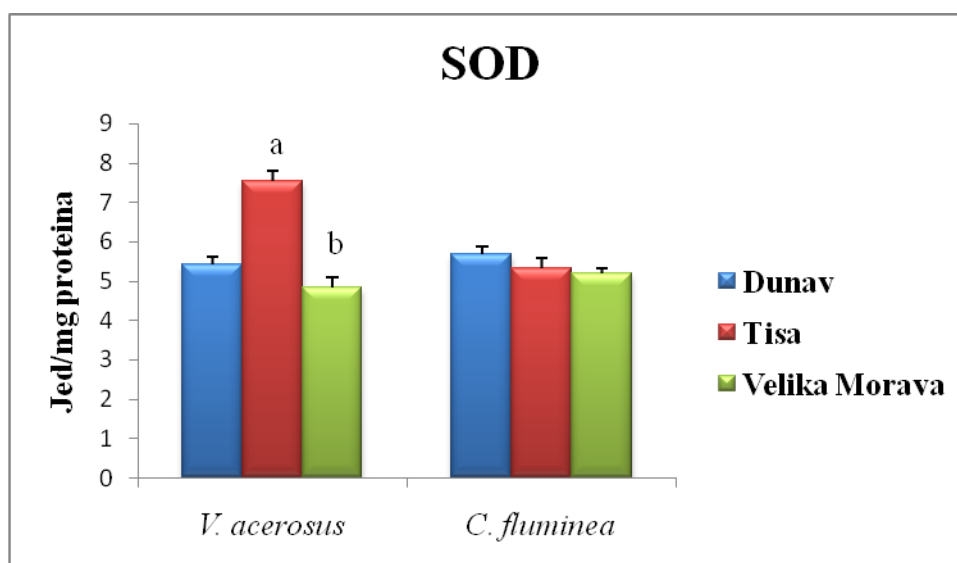
4.3.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru

Rezultati dobijeni u istraživanjima ove doktorske disertacije pokazuju da su srednje vrednosti aktivnosti superoksid-dismutaze kod vrste *V. acerosus* bile 5.41 ± 0.21 Jed/mg proteina kod jedinki iz Dunava, 7.53 ± 0.27 Jed/mg proteina iz Tise i 4.84 ± 0.26 Jed/mg protein iz Velike Morave (Tabela 5, Grafik 1). Primenom Mann-Whitney U testa utvrđene su statistički značajne razlike između aktivnosti SOD kod jedinki iz

Tabela 4. Aktivnost SOD (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

SOD			
Vrsta	Dunav	Tisa	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	5.41 ± 0.21	7.53 ± 0.27 ^a	4.84 ± 0.26 ^b
<i>Corbicula fluminea</i>	5.67 ± 0.22	5.32 ± 0.25	5.20 ± 0.13

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.



Grafik 1. Aktivnost SOD (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.

Dunava u odnosu na Tisu i kod jedinki iz Tise u odnosu na Veliku Moravu. Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost $^{a,b}p < 0.05$.

Kod vrste *C. fluminea* iz Dunava, Tise i Velike Morave (Tabela 4, Grafik 1) nije bilo statističkih značajnih razlika u aktivnosti SOD, a vrednosti su se kretale od 5.20 ± 0.13 Jed/mg proteina kod jedinki iz Velike Morave, 5.32 ± 0.25 Jed/mg proteina iz Tise i 5.67 ± 0.22 Jed/mg protein iz Dunava.

4.3.2. Aktivnost katalaze (CAT) puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru

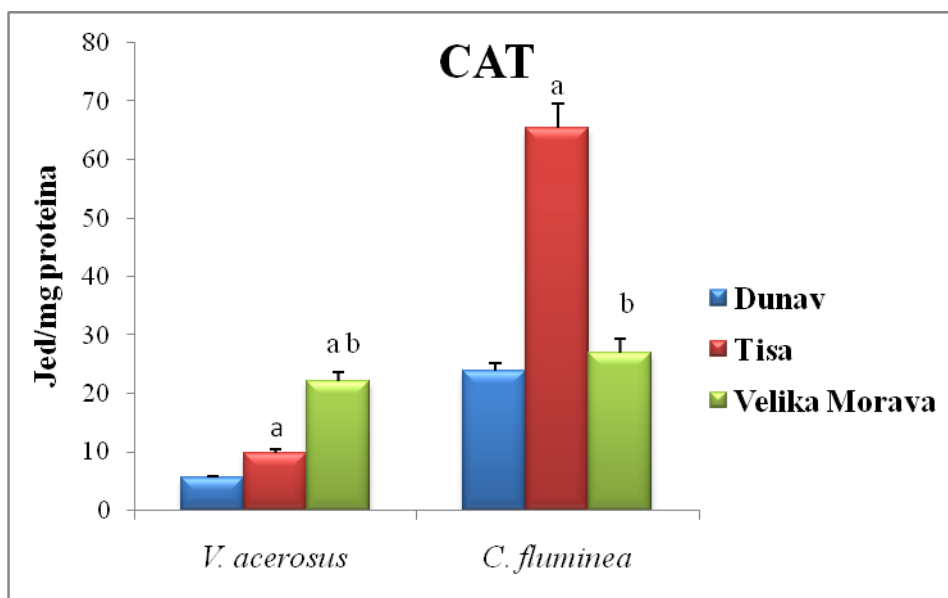
Kod vrste *V. acerosus* (Tabela 5, Grafik 2) uočene su statistički značajne razlike u aktivnosti CAT kod jedinki iz Dunava (5.58 ± 0.34 Jed/mg proteina) u odnosu na jedinke iz Tise (9.87 ± 0.56 Jed/mg protein), ($^ap < 0.05$) i Velike Morave (22.14 ± 1.60 Jed/ mg protein), ($^ap < 0.05$). Takođe je vrednost aktivnosti CAT kod jedinki iz Velike Morave bila značajno veća u odnosu na one iz Tise ($^bp < 0.05$).

Aktivnost CAT izmerena u jedinkama vrste *C. fluminea* bila je najniža u Dunavu i iznosila je 23.78 ± 1.41 Jed/mg proteina. Nešto veće vrednosti su dobijene kod jedinki iz Velike Morave (26.98 ± 2.41 Jed/mg proteina). U odnosu na ove vrednosti, značajno je veća bila aktivnost CAT kod jedinki iz Tise (65.50 ± 4.05 Jed/mg protein), ($^{a,b}p < 0.05$). Sve vrednosti su predstavljene u Tabeli 5 i na Grafiku 2.

Tabela 5. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

CAT			
Vrsta	Dunav	Tisa	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	5.58 ± 0.34	9.87 ± 0.56 ^a	22.14 ± 1.60 ^{ab}
<i>Corbicula fluminea</i>	23.78 ± 1.41	65.50 ± 4.05 ^a	26.98 ± 2.41 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.



Grafik 2. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava..

4.3.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru

Najveća vrednost aktivnosti GSH-Px za vrstu *V. acerosus* (Tabela 6, Grafik 3) izmerena je kod jedinki iz Velike Morave i iznosila je 4.70 ± 0.15 Jed/mg proteina. Vrednosti dobijene za jedinke iz Dunava bile su 3.92 ± 0.14 Jed/mg proteina, iz Tise 3.54 ± 0.20 Jed/mg proteina. Statistički značajne su bile razlike između vrednosti dobijenih za Veliku Moravu u odnosu na vrednosti dobijene za Tisu i one dobijene za Dunav (^{a,b} $p < 0.05$).

Aktivnosti GSH-Px izmerene kod vrste *C. fluminea* iz Dunava, Tise i Velike Morave (Tabela 6, Grafik 3) iznosile su 5.99 ± 0.25 Jed/mg proteina (Dunav), 6.61 ± 0.20 Jed/mg proteina (Tisa) i 6.31 ± 0.24 Jed/mg proteina (Velika Morava). Konstatovana je statistički značajna razlika između vrednosti dobijenih na Dunavu i Tisi (^a $p < 0.05$).

4.3.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru

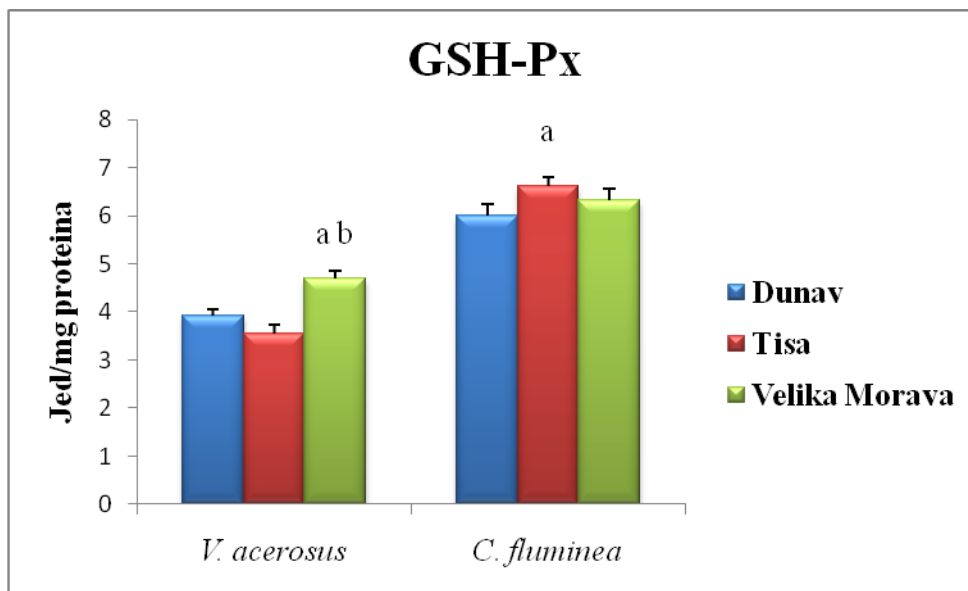
Vrednosti specifične aktivnosti GR za vrste *V. acerosus* i *C. fluminea* iz Dunava, Tise i Velike Morave date su u Tabeli 7 i na Grafiku 4. Za obe vrste uočene su statistički značajne razlike između aktivnosti enzima dobijenih na Dunavu u odnosu na Tisu i Veliku Moravu, kao i onih sa Tise u odnosu na Veliku Moravu (^{a,b} $p < 0.05$). Za vrstu *V. acerosus* najveće vrednosti dobijene su kod jedinki iz Velike Morave (5.04 ± 0.16 Jed/mg proteina), nešto niže kod jedinki iz Tise (3.82 ± 0.19 Jed/mg proteina), a najniže kod jedinki iz Dunava (3.05 ± 0.10 Jed/mg proteina).

Aktivnost GR izmerena kod *C. fluminea* (Tabela 7, Grafik 4) kretala se od najveće vrednosti kod jedinki iz Tise (7.40 ± 0.66 Jed/mg proteina), zatim kod jedinki iz Velike Morave (4.36 ± 0.24 Jed/mg proteina), do najmanje kod jedinki iz Dunava (3.30 ± 0.30 Jed/mg proteina).

Tabela 6. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

GSH-Px			
Vrsta	Dunav	Tisa	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	3.92 ± 0.14	3.54 ± 0.20	4.70 ± 0.15 ^{ab}
<i>Corbicula fluminea</i>	5.99 ± 0.25	6.61 ± 0.20 ^a	6.31 ± 0.24

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.



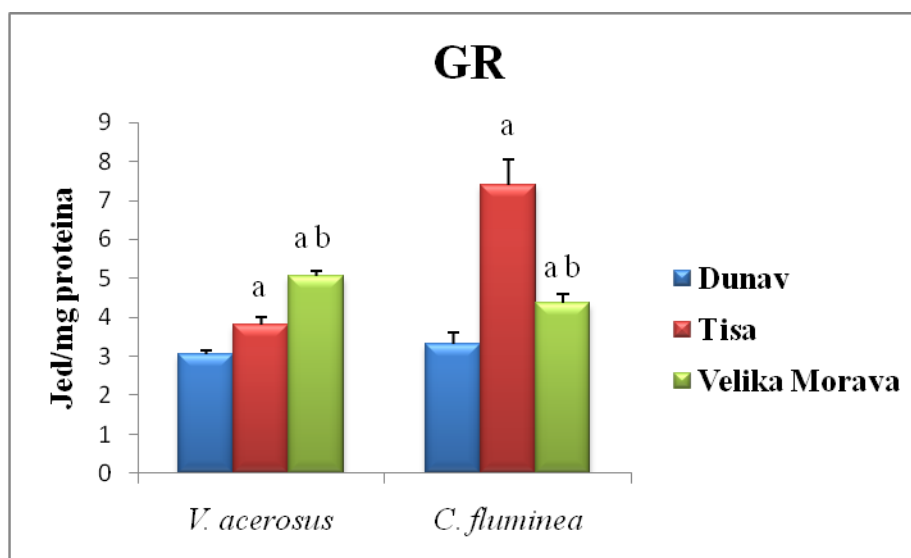
Grafik 3. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava

Tabela 7. Aktivnost GR (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

GR			
Vrsta	Dunav	Tisa	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	3.05 ± 0.10	3.82 ± 0.19 ^a	5.04 ± 0.16 ^{ab}
<i>Corbicula fluminea</i>	3.30 ± 0.30	7.40 ± 0.66 ^a	4.36 ± 0.24 ^{ab}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.



Grafik 4. Aktivnost GR (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava;
^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.

4.3.5. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru

Najveća aktivnost GST bila je u septembru kod jedinki vrste *V. acerosus* iz Velike Morave i iznosila je 1322.72 ± 60.73 Jed/mg proteina. Manje su bile vrednosti dobijene za jedinke iste vrste iz Tise (1137.14 ± 48.82 Jed/mg proteina) i iz Velike Morave (1017.48 ± 35.51 Jed/mg proteina), ali uočene razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 8, Grafik5).

Kod vrste *C. fluminea* aktivnost GST (Tabela 8, Grafik 5) bila je najveća kod jedinki iz Tise (360.47 ± 13.46 Jed/mg proteina) i statistički značajno je bila veća u odnosu na vrednosti izmerene kod jedinki iz Dunava (223.60 ± 11.84 Jed/mg proteina) kao i kod jedinki iz Velike Morave (235.29 ± 6.61 Jed/mg protein), (^{a,b} $p < 0.05$).

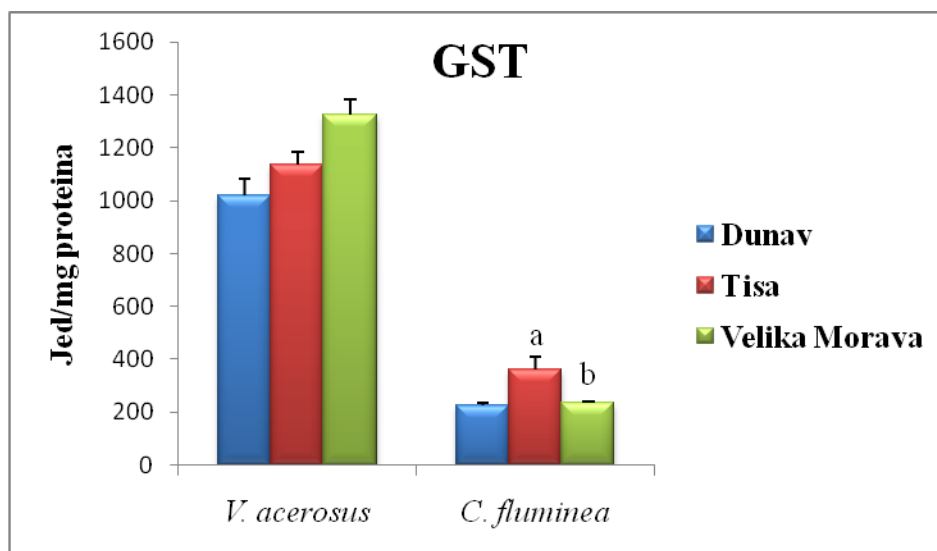
4.4. Koncentracija glutationa (GSH) puža *Viviparus acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u septembru

Koncentracija GSH izmerena u visceralnoj masi jedinki vrste *V. acerosus* (Tabela 9, Grafik 6) bila je najveća kod puževa iz Dunava i iznosila je 125.00 ± 4.63 nmol/g tkiva. Vrednosti dobijene za puževe iz Tise i Velike Morave bile su: 107.53 ± 4.10 nmol/g tkiva i 52.83 ± 2.96 nmol/g tkiva. Obe vrednosti su statistički značajno niže od vrednosti dobijene u puževima iz Dunava (^a $p < 0.05$). Uočeno je da su i vrednosti dobijene za puževe iz Tise bile značajno veće od vrednosti dobijenih za puževe iz Velike Morave (^b $p < 0.05$).

Tabela 8. Aktivnost GST (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

GST			
Vrsta	Dunav	Tisa	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	1017.48 ± 35.51	1137.14 ± 48.82	1322.72 ± 60.73
<i>Corbicula fluminea</i>	223.60 ± 11.84	360.47 ± 13.46 ^a	235.29 ± 6.61 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.



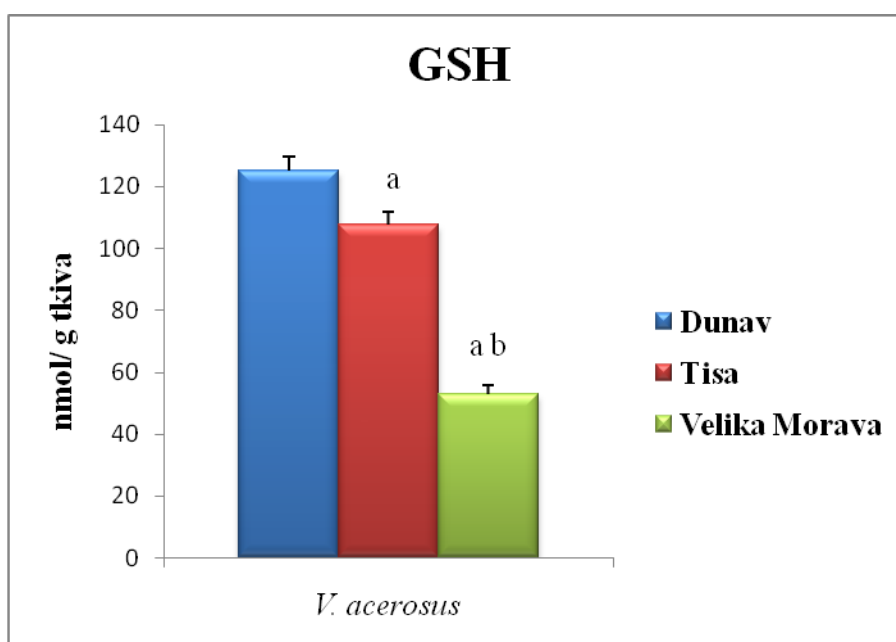
Grafik 5. Aktivnost GST (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.

Tabela 9. Koncentracija GSH (nmol/g tkiva) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

GSH			
Vrsta	Dunav	Tisa	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	125.00 ± 4.63	107.53 ± 4.10 ^a	52.83 ± 2.96 ^{ab}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava; ^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.



Grafik 6. Koncentracija GSH (nmol/g tkiva) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

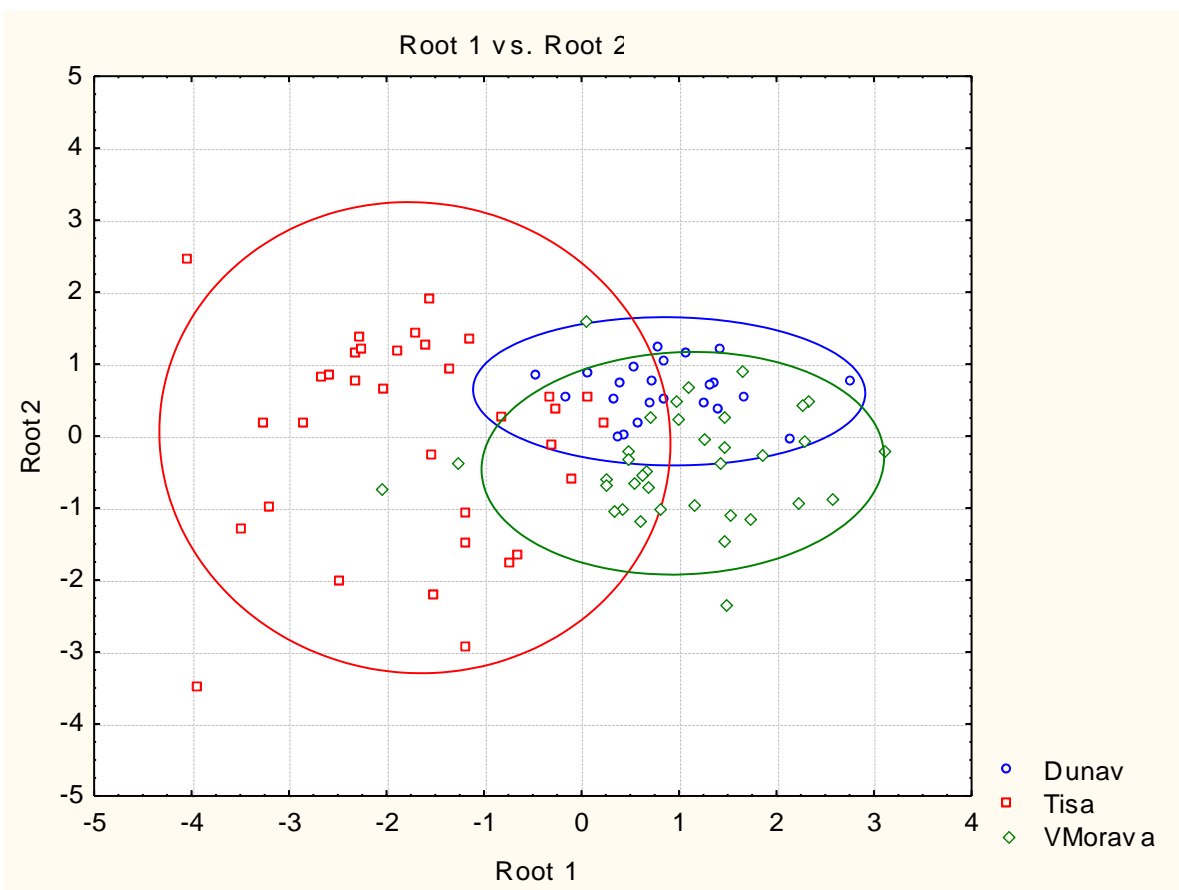
Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: Dunav vs Tisa i Dunav vs Velika Morava;
^b $p < 0.05$ Tisa vs Velika Morava.

4.5. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po rekama

Razlike između reka Dunav, Tisa i Velika Morava ispitivane su diskriminacionom analizom korišćenjem parametara antioksidacionog zaštitnog sistema određenih tokom septembra u visceralnoj masi mekušaca *V. acerosus* i *C. fluminea*. Grupisanjem po rekama dobijene su dve diskriminacione funkcije (Root 1 i Root 2) koje objašnjavaju varijabilnost između grupa.

Rezultati kanonijske diskriminacione analize parametara antioksidacionog zaštitnog sistema (aktivnost SOD, CAT, GSH-Px, GR i GST) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava prikazani su na Grafiku 7 i Tabelama 10 i 11.

Dobijeni podaci pokazuju da razdvajanje reka Dunav, Tisa i Velika Morava nije potpuno, tj. zapaža se delimično preklapanje elipsi. Prema prvoj diskriminacionoj funkciji (Root 1) najznačajnije je odvajanje Tise, dok se prema drugoj diskriminacionoj funkciji (Root 2) razdvajaju Dunav i Velika Morava. Prva kanonijska diskriminaciona funkcija, u ovoj analizi, objašnjava 91.8% varijanse za ispitivane parametre. Za razdvajanje po prvoj diskriminacionoj funkciji najveći značaj imaju SOD i CAT za reku Tisu, a GSH-Px za reku Dunav, dok aktivnost enzima GR najviše doprinosi izdvajanju reke Velike Morave prema drugoj diskriminacionoj funkciji.



Grafik 7. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u visceralnoj masi ispitivanih vrsta mekušaca iz Dunava, Tise i Velike Morave.

Tabela 10. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable. Doprinos parametara antioksidacionog zaštitnog sistema varijabilnosti u viscerlnoj masi ispitivanih vrsta mekušaca iz Dunava, Tise i Velike Morave.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
SOD	-0.970	0.261
CAT	-1.285	0.133
GSH-Px	1.152	-0.499
GR	-0.216	-0.785
GST	-0.010	-0.389
Eigen-vrednost	1.742	0.156
Kumulativni %	0.918	1.000

Tabela 11. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametare antioksidacionog zaštitnog sistema u visceralnoj masi kod ispitivanih vrsta mekušaca iz Dunava, Tise i Velike Morave.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
Dunav	0.899	0.622
Tisa	-1.709	-0.021
Velika Morava	1.039	-0.377

4.6. Aktivnost enzima antioksidacionog zaštitnog sistema puževa *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* i školjki *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana* iz Velike Morave u septembru

4.6.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) puževa *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* i školjki *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana* iz Velike Morave u septembru

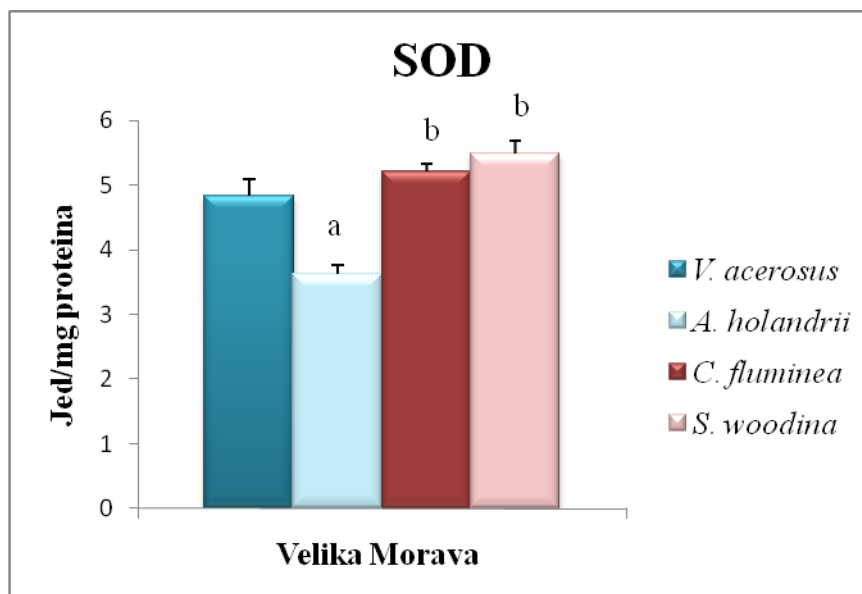
Dobijeni rezultati pokazuju da je aktivnost SOD bila najveća u visceralnoj masi *S. woodiana* i njena vrednost je iznosila 5.49 ± 0.19 Jed/mg proteina. U visceralnoj masi *C. fluminea* izmerena je aktivnost od 5.20 ± 0.13 Jed/mg proteina, dok su aktivnosti u puževima bile niže i to kod vrste *V. acerosus* 4.84 ± 0.26 Jed/mg proteina, a kod vrste *A. holandrii* 3.62 ± 0.15 Jed/mg proteina (Tabela 12).

Značajne razlike u aktivnosti SOD dobijene su između dve vrste puževa (^a $p < 0.05$), kao i između puža *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* (^b $p < 0.05$) i *S. woodiana* (^b $p < 0.05$), (Grafik 8).

Tabela 12. Aktivnost SOD (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

SOD	
Vrsta	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	4.84 ± 0.26
<i>Amphimelania holandrii</i>	3.62 ± 0.15 ^a
<i>Corbicula fluminea</i>	5.20 ± 0.13 ^b
<i>Sinanodonta woodiana</i>	5.49 ± 0.19 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.



Grafik 8. Aktivnost SOD (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.

4.6.2. Aktivnost katalaze (CAT) puževa *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* i školjki *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana* iz Velike Morave u septembru

Prema vrednostima aktivnosti CAT vrste se svrstavaju u dve grupe. Prvu grupu sa nižim aktivnostima CAT čine puž - *V. acerosus* i školjka - *C. fluminea* sa vrednostima 22.14 ± 1.60 Jed/mg proteina i 26.98 ± 2.41 Jed/mg proteina. U drugoj grupi su puž - *A. holandrii* i školjka - *S. woodiana* kod kojih su izmerene aktivnosti CAT bile 85.91 ± 4.35 Jed/mg proteina i 91.78 ± 4.78 Jed/mg proteina (Tabela 13). Između vrsta u grupama nisu uočene statistički značajne razlike (Grafik 9). Značajno su bile veće vrednosti aktivnosti CAT u vrsta *A. holandrii* i *S. woodiana* u odnosu na *V. acerosus* (^a $p < 0.05$), *A. holandrii* u odnosu na *C. fluminea* (^b $p < 0.05$), kao i *S. woodiana* u odnosu na *C. fluminea* (^c $p < 0.05$).

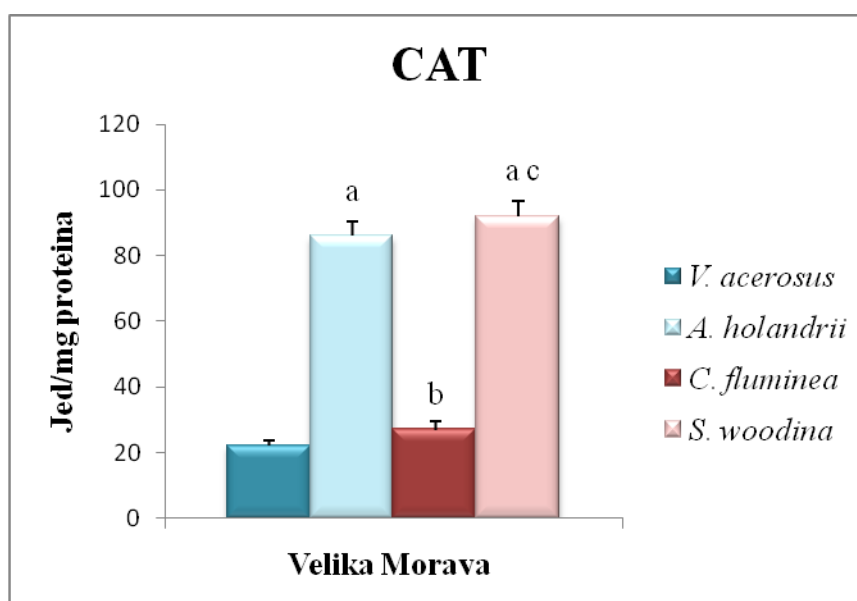
4.6.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) puževa *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* i školjki *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana* iz Velike Morave u septembru

A. holandrii je imala najveću aktivnost GSH-Px (23.20 ± 0.58 Jed/mg proteina) u septembru i aktivnosti ovog enzima kod ostale tri vrste su bile značajno manje (^{a,b} $p < 0.05$). Aktivnost GSH-Px izmerena u telu vrste *V. acerosus* iznosila je 4.70 ± 0.15 Jed/mg proteina, u telu *C. fluminea* 6.31 ± 0.24 Jed/mg proteina, a u visceralnoj masi *S. woodiana* 2.50 ± 0.15 Jed/mg proteina. Statistički značajne razlike u aktivnosti za *V. acerosus*, osim u odnosu na *A. holandrii*, dobijene su i u odnosu na obe vrste školjki (^a $p < 0.05$). Takođe, aktivnost GSH-Px bila je značajno veća kod vrste *C. fluminea* u odnosu na *S. woodiana* (^c $p < 0.05$), (Tabela 14, Grafik 10).

Tabela 13. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

CAT	
Vrsta	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	22.14 ± 1.60
<i>Amphimelania holandrii</i>	85.91 ± 4.35 ^a
<i>Corbicula fluminea</i>	26.98 ± 2.41 ^b
<i>Sinanodonta woodiana</i>	91.78 ± 4.78 ^{ac}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.



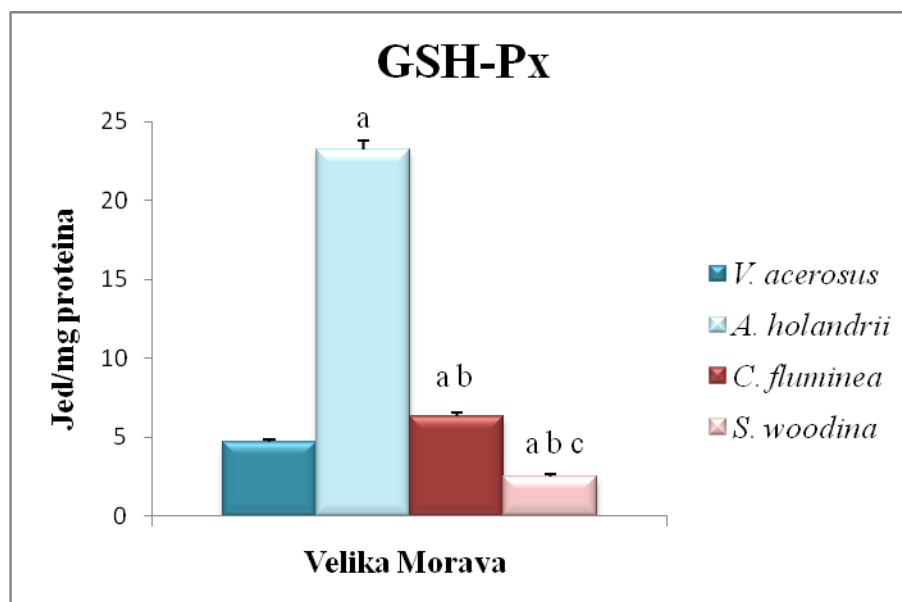
Grafik 9. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.

Tabela 14. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

GSH-Px	
Vrsta	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	4.70 ± 0.15
<i>Amphimelania holandrii</i>	23.20 ± 0.58 ^a
<i>Corbicula fluminea</i>	6.31 ± 0.24 ^{ab}
<i>Sinanodonta woodiana</i>	2.50 ± 0.15 ^{abc}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.



Grafik 10. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina) u telu puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.

4.6.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) puževa *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* i školjki *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana* iz Velike Morave u septembru

Vrednosti aktivnosti enzima GR za sve četiri vrste predstavljene su u Tabeli 15 i na Grafiku 11. Odnos je bio sličan onom uočenom za GSH-Px sa razlikom između vrsta *V. acerosus* i *C. fluminea* kod kojih je značajno veća aktivnost dobijena kod puža (5.04 ± 0.16 Jed/mg proteina) u odnosu na školjku (4.36 ± 0.24 Jed/mg proteina), (^a $p < 0.05$). *A. holandrii* imala je najveću aktivnost GR (9.47 ± 0.60 Jed/mg proteina) i statistički je bila značajno veća u odnosu na aktivnosti kod ostalih vrsta (^{a,b} $p < 0.05$).

Najmanja aktivnost GR zabeležena je u visceralnoj masi *S. woodiana*, koja je iznosila 1.09 ± 0.07 Jed/mg proteina i bila je značajno manja od aktivnosti ovog enzima u ostale tri vrste (^{a,b,c} $p < 0.05$).

4.6.5. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) puževa *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* i školjki *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana* iz Velike Morave u septembru

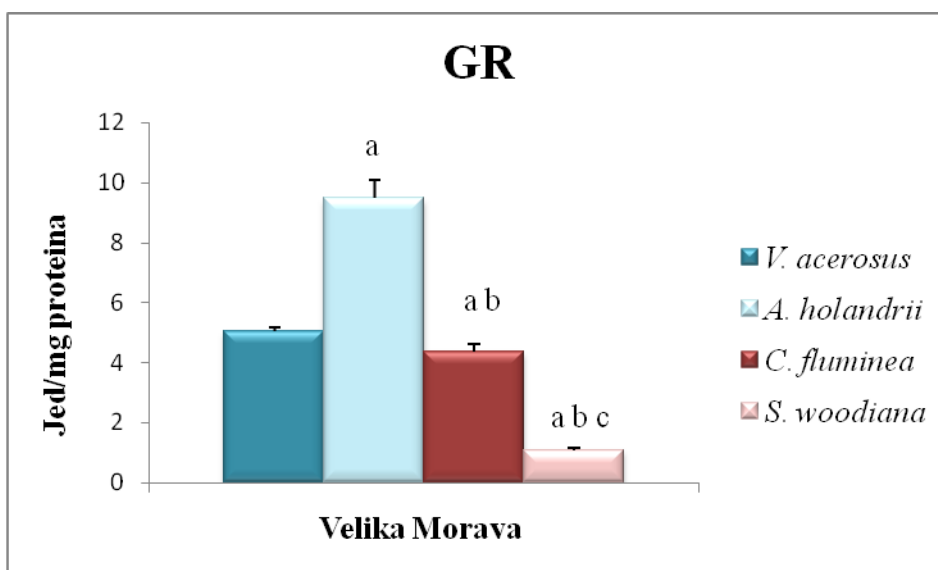
Glutation-S-transferaza (Tabela 16, Grafik 12) imala je isti trend aktivnosti između ispitivanih vrsta mekušaca kao i GR. Aktivnost izmerena u telu *V. acerosus* iznosila je 1322.72 ± 60.73 Jed/mg proteina i bila je značajno veća u odnosu na aktivnosti ovog enzima u školjkama - *C. fluminea* (235.29 ± 6.61 Jed/mg proteina) i *S. woodiana* (119.74 ± 11.24 Jed/mg proteina), (^a $p < 0.05$), a statistički značajno manja od one izmerene u telu *A. holandrii* (17013.85 ± 497.20 Jed/mg proteina), (^a $p < 0.05$).

Aktivnost GST određena u *A. holandrii* bila je značajno veća u odnosu na aktivnost ovog enzima u obe vrste školjki (^b $p < 0.05$). *C. fluminea* imala je statistički značajno veću aktivnost GST u odnosu na *S. woodiana* (^c $p < 0.05$).

Tabela 15. Aktivnost GR (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

GR	
Vrsta	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	5.04 ± 0.16
<i>Amphimelania holandrii</i>	9.47 ± 0.60 ^a
<i>Corbicula fluminea</i>	4.36 ± 0.24 ^{ab}
<i>Sinanodonta woodiana</i>	1.09 ± 0.07 ^{abc}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.



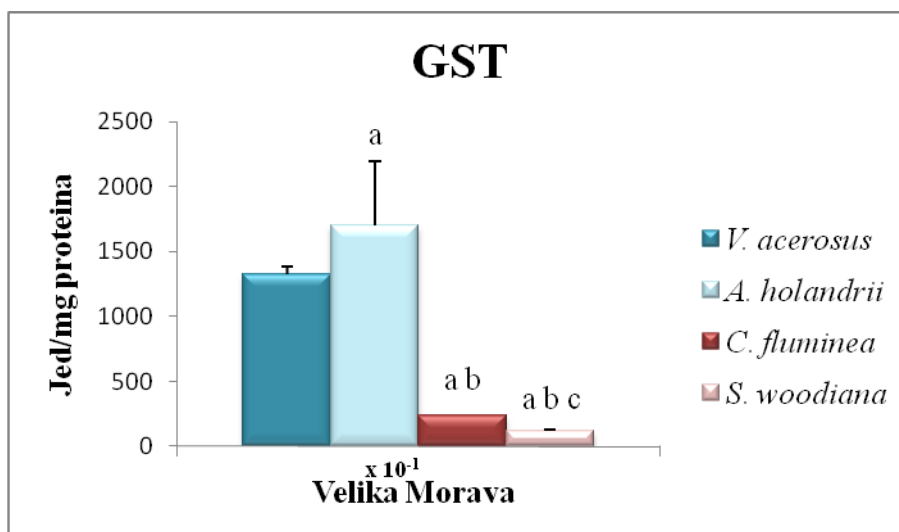
Grafik 11. Aktivnost GR (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.

Tabela 16. Aktivnost GST (Jed/mg proteina) u vsceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

GST	
Vrsta	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	1322.72 ± 60.73
<i>Amphimelania holandrii</i>	17013.85 ± 497.20 ^a
<i>Corbicula fluminea</i>	235.29 ± 6.61 ^{ab}
<i>Sinanodonta woodiana</i>	119.74 ± 11.24 ^{abc}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.



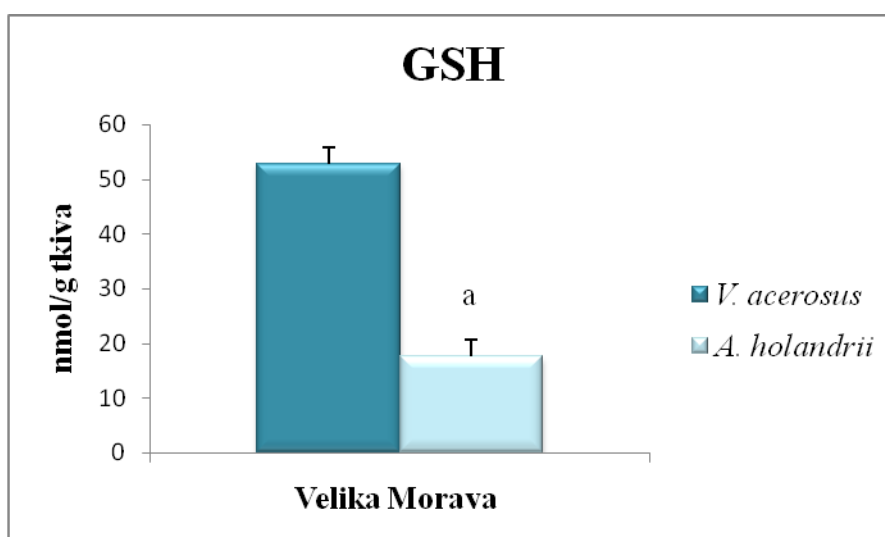
Grafik 12. Aktivnost GST (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* i školjki *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*; ^b $p < 0.05$ u odnosu na *A. holandrii*; ^c $p < 0.05$ u odnosu na *C. fluminea*.

Tabela 17. Koncentracija GSH (nmol/g tkiva) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* iz Velike Morave.

GSH	
Vrsta	Velika Morava
<i>Viviparus acerosus</i>	52.83 ± 2.96
<i>Amphimelania holandrii</i>	17.51 ± 3.06 ^a

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*.



Grafik 13. Koncentracija GSH (nmol/g tkiva) u visceralnoj masi puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* iz Velike Morave.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. ^a $p < 0.05$: u odnosu na *V. acerosus*.

4.7. Koncentracija glutationa (GSH) puževa *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* iz Velike Morave u septembru

Dobijeni rezultati pokazuju da je veća koncentracija niskomolekulske komponente GSH bila u telu *V. acerosus* (52.83 ± 2.96 nmol/g tkiva) u odnosu na *A. holandrii* (17.51 ± 3.06 nmol/g tkiva), (^a $p < 0.05$). Sve vrednosti predstavljene su u Tabeli 17 i na Grafiku 13.

4.8. Kanonijska diskriminaciona analiza – grupisanje po vrstama

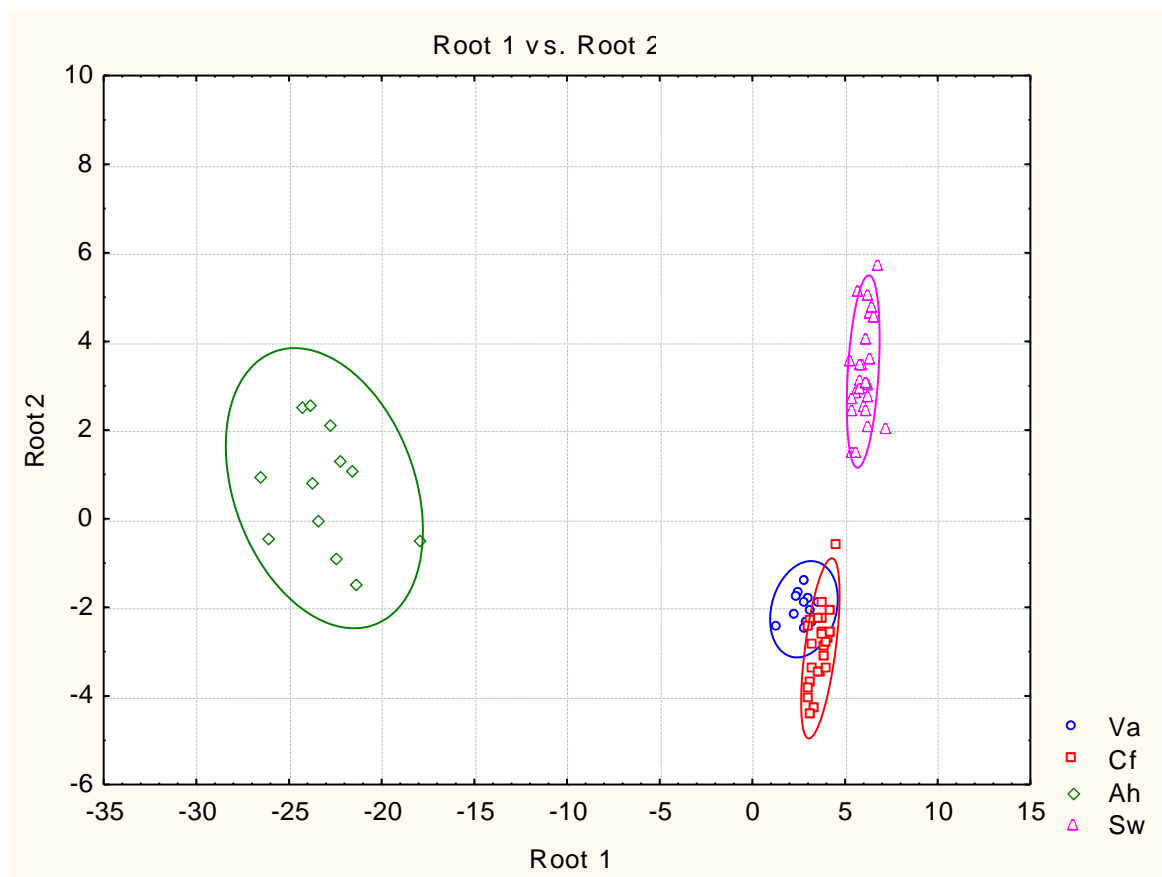
Razlike između četiri vrste mekušaca iz Velike Morave ispitane su kanonijskom diskriminacionom analizom korišćenjem parametara antioksidacionog zaštitnog sistema određenih u visceralnoj masi. Urađena je kanonijska diskriminaciona analiza enzimskih komponenti antioksidacionog zaštitnog sistema (aktivnost SOD, CAT, GSH-Px, GR i GST) u visceralnoj masi kod ispitivanih vrsta mekušaca *V. acerosus*, *C. fluminea*, *A. holandrii* i *S. woodiana* iz reke Velika Morava. Grupisanjem po vrstama dobijene su tri kanonijske diskriminacione funkcije za svaki deo analize, od kojih su prve dve funkcije koje su najbitnije za objašnjavanje varijabilnosti između grupa uzete u obzir za tumačenje dobijenih podataka.

Na Grafiku 14 i u Tabelama 18 i 19 predstavljeni su rezultati kanonijske diskriminacione analize parametara antioksidacionog zaštitnog sistema u visceralnoj masi ispitivanih vrsta mekušaca iz Velike Morave.

Uočava se dobro razdvajanje vrsta *A. holandrii* i *S. woodiana*, dok kod vrsta *V. acerosus* i *C. fluminea* dolazi do blagog preklapanja elipsi. Prema prvoj diskriminacionoj funkciji (Root 1) najznačajnije je odvajanje *A. holandrii* na jednoj strani u odnosu na ostale tri vrste. Vrsta *S. woodiana* odvaja se prema drugoj diskriminacionoj funkciji u odnosu na *V. acerosus* i *C. fluminea*.

U ovoj analizi prve dve kanonijske diskriminacione funkcije objašnjavaju 99.5% varijanse za ispitivane parametre. Za razdvajanje po prvoj diskriminacionoj funkciji najveći značaj ima GST za vrstu *A. holandrii* i SOD za vrstu *S. woodiana*. Aktivnost

CAT prema drugoj diskriminacionoj funkciji najviše doprinosi razdvajanju vrste *S. woodiana* od vrsta *V. acerosus* i *C. fluminea*. Razdvajanje između poslednje dve vrste najbolje opisuje treća diskriminaciona funkcija pri čemu najveći doprinos ima aktivnost enzima GSH-Px.



Grafik 14. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacionog zaštitnog sistema u visceralnoj masi ispitivanih vrsta mekušaca (Va – *V. acerosus*, Cf – *C. fluminea*, Ah – *A. holandrii*, Sw – *S. woodiana*).

Tabela 18. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacionog zaštitnog sistema varijabilnosti u viscerlnoj masi ispitivanih vrsta mekušaca iz Velike Morave.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
SOD	0.408	-0.026	-0.084
CAT	-0.016	0.838	-0.203
GSH-Px	-0.449	-0.523	-0.862
GR	-0.214	-0.498	0.458
GST	-0.756	0.436	0.475
Eigen-vrednost	110.639	7.832	0.622
Kumulativni %	0.929	0.995	1.000

Tabela 19. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacionog zaštitnog sistema u visceralnoj masi kod ispitivanih vrsta mekušaca iz Velike Morave.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>V. acerosus</i>	-2.786	-2.042	-1.633
<i>A. holandrii</i>	23.090	0.689	0.070
<i>C. fluminea</i>	-3.671	-2.924	0.686
<i>S. woodiana</i>	-5.982	3.324	0.088

4.9. Aktivnost enzima antioksidacionog zaštitnog sistema puža *Viviparus acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru

4.9.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) puža *Viviparus acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave

Aktivnost SOD izmerena u telu puža *V. acerosus* bila je veća u septembarskim uzorcima iz sve tri reke u odnosu na uzorke iz aprila (Tabela 20, Grafik 15). Međutim, statistički značajne razlike dobijene su samo na Tisi (* $p < 0.05$). Vrednosti u uzorcima iz Dunava iznosile su 4.89 ± 0.26 Jed/mg proteina u aprilu i 5.41 ± 0.21 Jed/mg proteina u septembru. U uzorcima iz Tise 4.78 ± 0.22 Jed/mg proteina izmereno je u aprilu, a 7.53 ± 0.27 Jed/mg proteina u septembru, dok je u uzorcima iz Velike Morave izmereno 4.17 ± 0.43 Jed/mg proteina u aprilu i 4.84 ± 0.26 Jed/mg proteina u septembru.

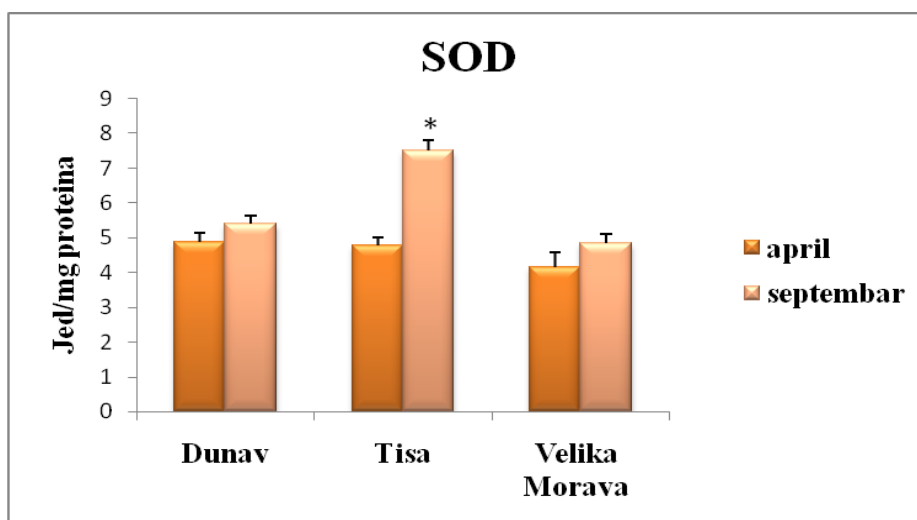
4.9.2. Aktivnost katalaze (CAT) puža *Viviparus acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave

Vrednosti aktivnosti CAT pokazuju statistički značajne razlike u uzorcima iz sve tri reke (Tabela 21, Grafik 16). Aktivnost enzima izmerena u uzorcima iz Dunava bila je značajno manja u septembru (5.58 ± 0.34 Jed/mg proteina) od aktivnosti određene u aprilu (18.75 ± 0.99 Jed/mg proteina), (* $p < 0.05$). U puževima iz Tise izmerena je, takođe, manja aktivnost CAT u septembru (9.87 ± 0.56 Jed/mg proteina) u odnosu na april (14.16 ± 0.86 Jed/mg proteina), (* $p < 0.05$). Puževi vrste *V. acerosus* iz Velike Morave, uzorkovani u septembru imali su veću aktivnost CAT (22.14 ± 1.60 Jed/mg proteina) od onih uzorkovanih u aprilu (15.28 ± 1.02 Jed/mg proteina), (* $p < 0.05$).

Tabela 20. Aktivnost SOD (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

SOD			
Period	Dunav	Tisa	Velika Morava
april	4.89 ± 0.26	4.78 ± 0.22	4.17 ± 0.43
septembar	5.41 ± 0.21	7.53 ± 0.27*	4.84 ± 0.26

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
* $p < 0.05$: april vs septembar.



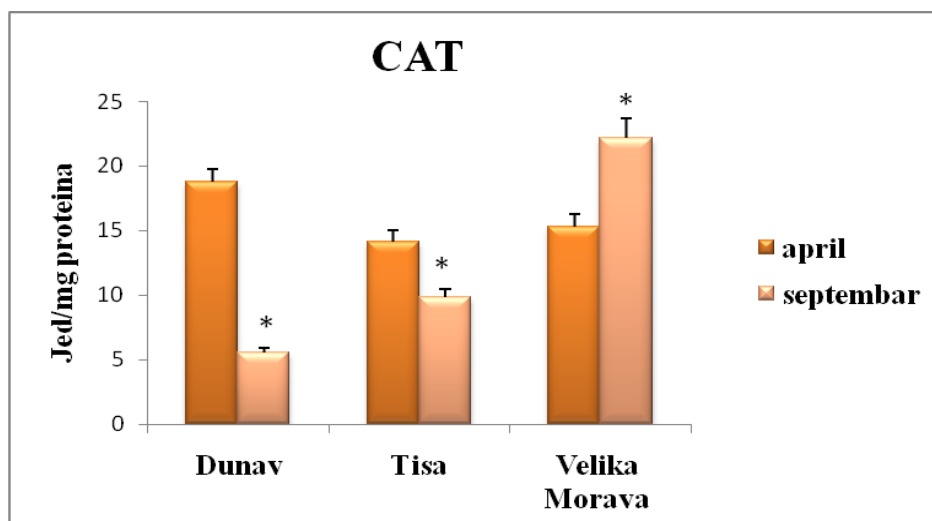
Grafik 15. Aktivnost SOD (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: april vs septembar.

Tabela 21. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

CAT			
Period	Dunav	Tisa	Velika Morava
april	18.75 ± 0.99	14.16 ± 0.86	15.28 ± 1.02
septembar	5.58 ± 0.34*	9.87 ± 0.56*	22.14 ± 1.60*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
* $p < 0.05$: april vs septembar.



Grafik 16. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: april vs septembar.

4.9.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) puža *Viviparus acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave

Doijeni trend aktivnosti GSH-Px isti je u sve tri ispitivane reke (Tabela 22, Grafik 17). Rezultati su pokazuju da je aktivnost ovog enzima značajno manja u aprilu u odnosu na septembar (* $p < 0.05$). Aktivnosti dobijene u telu puževa iz Dunava iznosile su 2.89 ± 0.13 Jed/mg proteina i 3.92 ± 0.14 Jed/mg proteina; iz Tise 1.95 ± 0.09 Jed/mg proteina i 3.54 ± 0.20 Jed/mg proteina; iz Velike Morave 2.82 ± 0.18 Jed/mg proteina i 4.70 ± 0.15 Jed/mg proteina u aprilu i septembru.

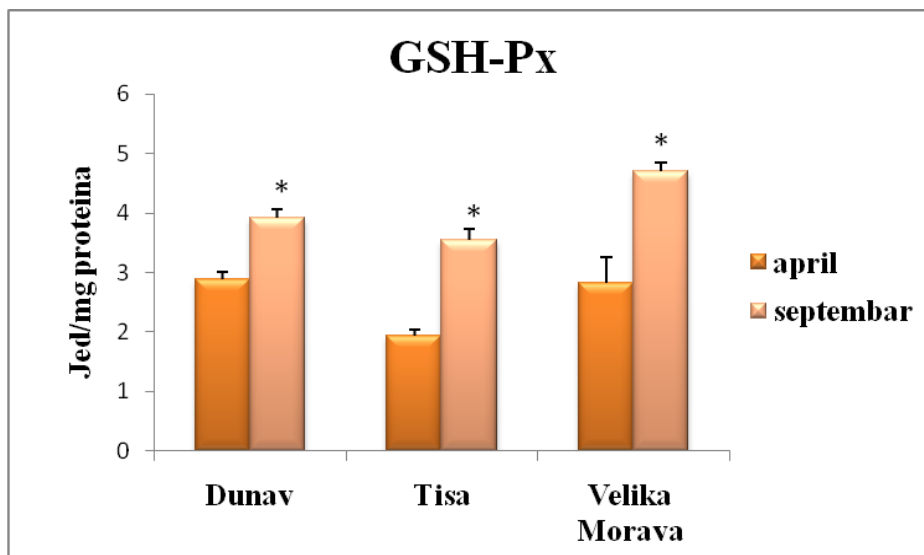
4.9.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) puža *Viviparus acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave

Aktivnost GR (Tabela 23, Grafik 18) bila je najniža u telu puževa iz Tise izlovljenih u aprilu (2.54 ± 0.11 Jed/mg proteina), a najviša u telu puževa iz Velike Morave izlovljenih u septembru (5.04 ± 0.16 Jed/mg proteina). Kod jedinki vrste *V. acerosus* iz Dunava aktivnosti izmerene u aprilu i septembru imale su slične vrednosti i nije uočena statistički značajna razlika između ispitivanih perioda. Uzorci iz septembra iz Tise i Velike Morave (3.82 ± 0.19 Jed/mg proteina i 5.04 ± 0.16 Jed/mg proteina) imali su značajno veću aktivnost GR od onih u aprilu (2.54 ± 0.11 Jed/mg proteina i 2.93 ± 0.22 Jed/mg proteina), (* $p < 0.05$).

Tabela 22. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

GSH-Px			
Period	Dunav	Tisa	Velika Morava
april	2.89 ± 0.13	1.95 ± 0.09	2.82 ± 0.18
septembar	3.92 ± 0.14*	3.54 ± 0.20*	4.70 ± 0.15*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
* $p < 0.05$: april vs septembar.



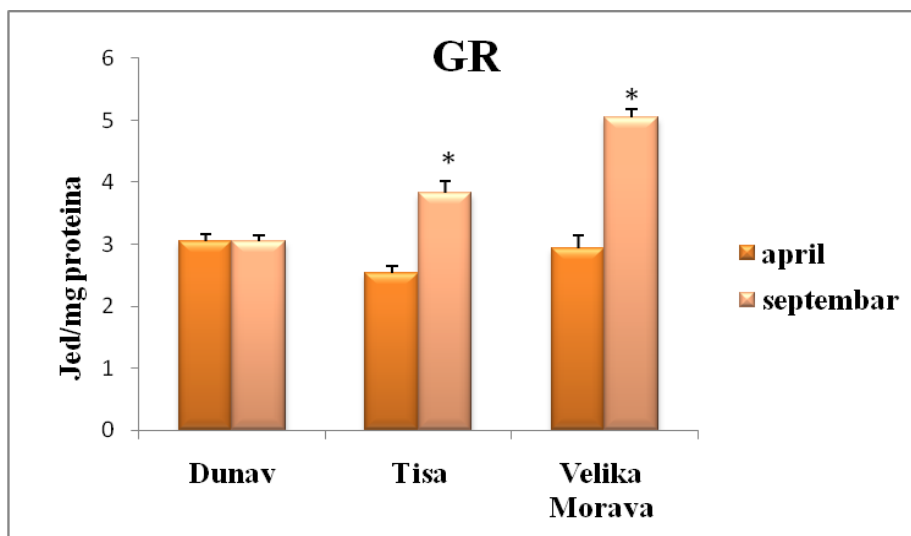
Grafik 17. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: april vs septembar.

Tabela 23. Aktivnost GR (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

GR			
Period	Dunav	Tisa	Velika Morava
april	3.04 ± 0.13	2.54 ± 0.11	2.93 ± 0.22
septembar	3.05 ± 0.10	3.82 ± 0.19*	5.04 ± 0.16*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
* $p < 0.05$: april vs septembar.



Grafik 18. Aktivnost GR (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: april vs septembar.

4.9.5. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) puža *Viviparus acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave

U Tabeli 24 i na Grafiku 19 prikazane su sve vrednosti aktivnosti GST određene u telu *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru. Aktivnost GST izmerena u aprilu u telu puževa iz Dunava iznosila je 1152.37 ± 34.89 Jed/mg proteina, a u septembru 1017.48 ± 35.51 Jed/mg proteina što je predstavljalo statistički značajno smanjenje ($*p < 0.05$). Uzorci iz Tise imali su isti trend vrednosti u dva perioda, veću aktivnost u aprilu (1157.56 ± 65.09 Jed/mg proteina) u odnosu na septembar (1137.14 ± 48.82 Jed/mg proteina), ali nije bile statistički značajne razlike između perioda. Ovakve razlike nisu uočene ni između aktivnosti GST izmerenoj u puževima iz Velike Morave kod kojih je aktivnost u aprilu (1108.56 ± 72.63 Jed/mg proteina) bila manja od one u septembru (1322.72 ± 60.73 Jed/mg proteina).

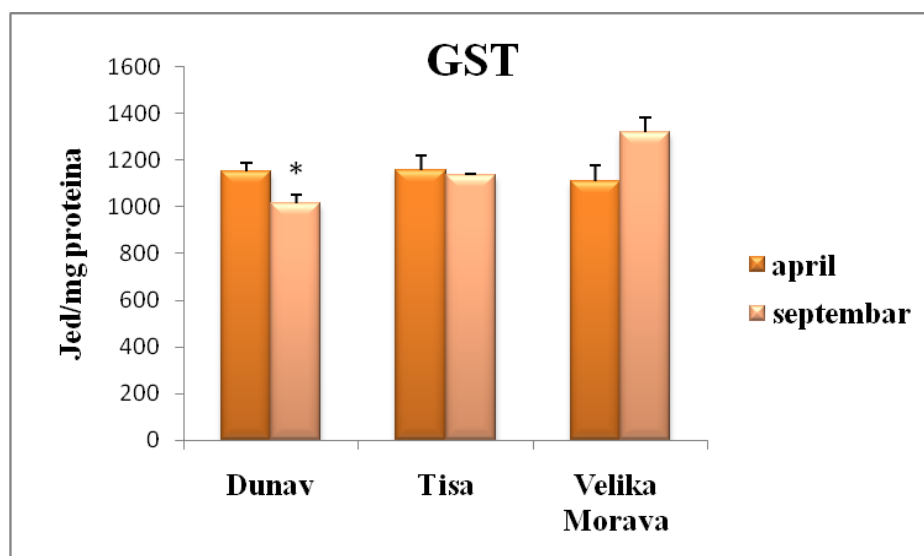
4.10. Koncentracija glutationa (GSH) puža *Viviparus acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru

Koncentracija GSH imala je jedinstven trend u periodima april i septembar za sve tri reke (Tabela 25, Grafik 20). Koncentracija je bila statistički značajno veća u septembru u odnosu na april ($*p < 0.05$). U telu puževa iz Dunava koncentracije GSH iznosile su 39.70 ± 2.84 nmol/g tkiva u aprilu i 125.00 ± 4.63 nmol/g tkiva u septembru; u puževa iz Tise 27.52 ± 1.16 nmol/g tkiva u aprilu i 107.53 ± 4.10 nmol/g tkiva u septembru; u puževa iz Velike Morave 33.13 ± 2.25 nmol/g tkiva u aprilu i 52.83 ± 2.96 nmol/g tkiva u septembru.

Tabela 24. Aktivnost GST (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

GST			
Period	Dunav	Tisa	Velika Morava
april	1152.37 ± 34.89	1157.56 ± 65.09	1108.56 ± 72.63
septembar	1017.48 ± 35.51*	1137.14 ± 48.82	1322.72 ± 60.73

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
* $p < 0.05$: april vs septembar.



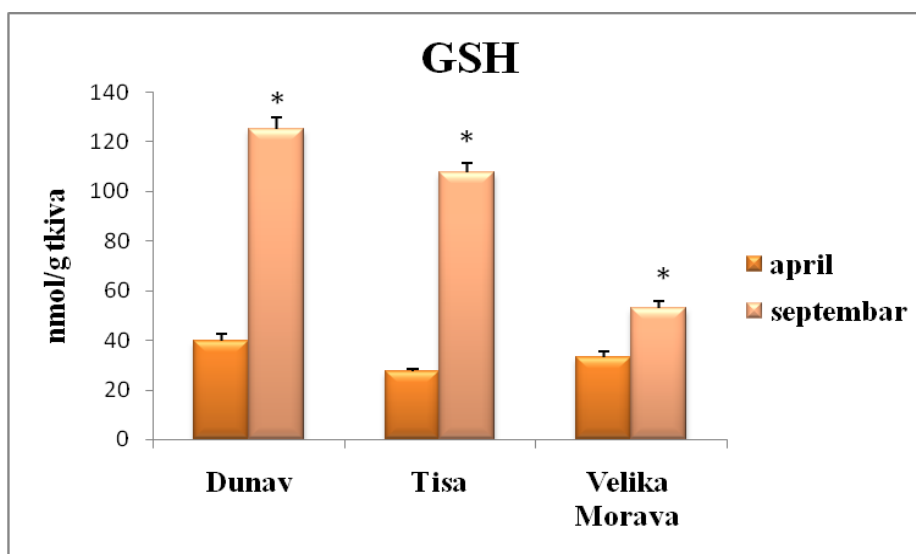
Grafik 19. Aktivnost GST (Jed/mg proteina) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: april vs septembar.

Tabela 25. Koncentracija GSH (nmol/g tkiva) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

GSH			
Period	Dunav	Tisa	Velika Morava
april	39.70 ± 2.84	27.52 ± 1.16	33.13 ± 2.25
septembar	125.00 ± 4.63*	107.53 ± 4.10*	52.83 ± 2.96*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.G. Statistički značajno kada je $p < 0.05$.
* $p < 0.05$: april vs septembar.



Grafik 20. Koncentracija GSH (nmol/g tkiva) u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru.

Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: april vs septembar.

4.11. Spearman-ov test korelacije između parametara antioksidacionog zaštitnog sistema i perioda, kao i parametara i lokaliteta puža *Viviparus acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru

Odnosi između aktivnosti enzima antioksidacionog zaštitnog sistema kao i koncentracije GSH i perioda (sezone) (april i septembar) i lokaliteta (Dunav, Tisa i Velika Morava) analizirani su Spearman-ovim testom korelacije. Uočeno je da svi parametri antioksidacionog zaštitnog sistema, osim GST imaju statistički značajne ($p < 0.05$) korelacije u odnosu na period (Tabela 26).

Tabela 26. Spearman-ovi koeficijenti korelacije za parametre AOS u visceralnoj masi puža *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave u aprilu i septembru u odnosu na period i lokalitet.

	Spearman R	P-nivo
Period i SOD	<i>0.513781</i>	0.000001
Period i CAT	<i>-0.406117</i>	0.000169
Period i GSH-Px	<i>0.689675</i>	0.000000
Period i GR	<i>0.560704</i>	0.000000
Period i GST	-0.026115	0.816986
Period i GSH	<i>0.825038</i>	0.000000
Lokalitet i SOD	-0.159054	0.156108
Lokalitet i CAT	<i>0.397480</i>	0.000238
Lokalitet i GSH-Px	0.122654	0.275338
Lokalitet i GR	<i>0.325065</i>	0.003067
Lokalitet i GST	<i>0.276851</i>	0.012348
Lokalitet i GSH	<i>-0.316235</i>	0.004027

U odnosu na lokalitet parametri koji pokazuju statistički značajne ($p < 0.05$) korelacije su CAT, GR, GST i GSH (Tabela 27).

4.12. Koncentracije metala u ispitivanim uzorcima

Dobijene koncentracije metala u četiri ispitivane vrste mekušaca prikazane su u Tabelama 27, 28 i 29. Cd i Mo bili su u svim ispitivanim uzorcima ispod praga detekcije (ND). Co je bio ispod praga detekcije u svim uzorcima iz Dunava, u visceralnoj masi *S. woodiana* iz Tise, a u Velikoj Moravi izmeren je samo u telu *V. acerosus*. Nikal (Ni) nije detektovan u visceralnoj masi *S. woodiana* iz Dunava, a u ovoj vrsti iz sve tri reke nije utvrđeno ni prisustvo Pb. Prisustvo ovog metal, kao ni Mn, nije utvrđeno ni u *C. fluminea* iz Velike Morave.

Poređenje bioakumulacije metala, koji su detektovani u ispitivanim vrstama pokazalo je da svaka vrsta ima svoje specifičnosti, kao i da postoje razlike u koncentracijama istog metala u visceralnoj masi jedinki iz različitih reka. Ako se posmatraju kao grupe, između puževa i školjki postoje značajne razlike u bioakumulaciji sledećih metala: Al, B, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr i Zn.

Redosled koncentracija metala od najveće do najmanje u visceralnoj masi ispitivanih vrsta je predstavljen:

V. acerosus

Dunav - Fe > Al > Zn > Cu > Cr > Sr > Mn > B > As > Se > Ni > Pb;

Tisa - Al > Fe > Cr > Mn > Zn > Cu > Sr > B > Pb > Ni > As > Se > Co;

Velika Morava - Fe > Al > Cr > Zn > Mn > Cu > B > Ni > Pb > As > Co > Se.

S. woodiana

Dunav - Mn > Fe > Zn > Al > Sr > Cr > Cu > As > B > Se;

Tisa - Fe > Mn > Al > Cr > Zn > Sr > Cu > B > As > Se > Ni;

Velika Morava - Mn > Fe > Zn > Al > Sr > Cr > Cu > B > As > Se > Ni.

C. fluminea

Dunav - Fe > Al > Cr > Zn > Mn > Cu > B > Sr > Ni > As > Pb > Se;

Velika Morava - Fe > Al > Zn > Cr > Cu > Sr > As > Ni > Se > B.

A. holandrii

Velika Morava – Fe > Al > Zn > Cr > Cu > Mn > Sr > B > As > Ni > Se > Pb.

Tabela 27. Koncentracija metala ($\mu\text{g/g}$ suve težine) u visceralnoj masi vrsta *V. acerosus*, *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Dunava.

DUNAV			
	<i>V. acerosus</i>	<i>C. fluminea</i>	<i>S. woodiana</i>
Al	1614.215 \pm 345.461	2252.090 \pm 823.464	50.482 \pm 24.427
As	4.495 \pm 0.531	7.978 \pm 0.574	4.866 \pm 0.603
B	11.625 \pm 2.910	13.634 \pm 4.494	4.478 \pm 0.614
Cd	ND	ND	ND
Co	ND	ND	ND
Cr	123.650 \pm 26.802	305.192 \pm 95.966	18.837 \pm 6.846
Cu	145.289 \pm 15.056	42.186 \pm 0.885	6.073 \pm 1.356
Fe	2272.164 \pm 596.064	2521.957 \pm 909.276	556.942 \pm 89.876
Mn	66.426 \pm 19.704	66.894 \pm 30.454	1140.738 \pm 276.598
Mo	ND	ND	ND
Ni	2.062 \pm 0.587	9.716 \pm 3.368	ND
Pb	1.412 \pm 0.536	4.018 \pm 1.800	ND
Se	2.306 \pm 0.211	3.583 \pm 0.342	2.389 \pm 0.296
Sr	89.802 \pm 10.029	9.726 \pm 2.049	48.228 \pm 11.549
Zn	256.469 \pm 71.461	167.468 \pm 29.167	107.984 \pm 18.595

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.G.

ND – označava vrednosti koje su bile ispod praga detekcije.

Tabela 28. Koncentracija metala ($\mu\text{g/g}$ suve težine) u visceralnoj masi vrsta *V. acerosus* i *S. woodiana* iz Tise.

TISA		
	<i>V. acerosus</i>	<i>S. woodiana</i>
Al	8619.717 ± 1410.203	1440.747 ± 466.299
As	8.075 ± 0.890	5.817 ± 1.445
B	48.342 ± 7.973	17.944 ± 5.747
Cd	ND	ND
Co	2.102 ± 0.697	ND
Cr	551.028 ± 91.793	245.812 ± 86.286
Cu	222.024 ± 33.768	21.684 ± 4.265
Fe	8552.848 ± 1375.986	3294.488 ± 1243.162
Mn	328.839 ± 59.189	1764.132 ± 825.673
Mo	ND	ND
Ni	9.349 ± 1.645	1.480 ± 0.666
Pb	16.903 ± 3.758	ND
Se	3.843 ± 0.332	4.081 ± 1.508
Sr	71.680 ± 2.401	77.086 ± 40.411
Zn	320.450 ± 60.005	174.035 ± 38.867

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.G.

ND – označava vrednosti koje su bile ispod praga detekcije.

Tabela 29. Koncentracija metala ($\mu\text{g/g}$ suve težine) u visceralnoj masi vrsta *V. acerosus*, *A. holandrii*, *C. fluminea* i *S. woodiana* iz Velike Morave.

VELIKA MORAVA

	<i>V. acerosus</i>	<i>A. holandrii</i>	<i>C. fluminea</i>	<i>S. woodiana</i>
Al	8477.625 \pm 1427.903	1447.025 \pm 188.521	255.846 \pm 39.574	98.428 \pm 38.100
As	13.158 \pm 1.855	4.796 \pm 0.425	8.262 \pm 0.496	3.443 \pm 0.971
B	55.278 \pm 9.621	9.730 \pm 1.229	2.170 \pm 0.233	3.897 \pm 0.305
Cd	ND	ND	ND	ND
Co	4.670 \pm 1.110	ND	ND	ND
Cr	1061.078 \pm 179.314	160.271 \pm 24.436	156.629 \pm 18.710	37.950 \pm 9.184
Cu	100.351 \pm 6.780	128.497 \pm 5.405	42.223 \pm 1.221	5.195 \pm 0.674
Fe	10427.277 \pm 1746.709	1772.207 \pm 205.438	380.595 \pm 51.122	684.810 \pm 113.470
Mn	381.059 \pm 70.237	87.735 \pm 16.801	ND	1738.192 \pm 359.386
Mo	ND	ND	ND	ND
Ni	36.162 \pm 6.095	3.754 \pm 0.884	2.962 \pm 0.540	0.806 \pm 0.402
Pb	28.790 \pm 5.844	1.490 \pm 0.702	ND	ND
Se	3.439 \pm 0.288	2.994 \pm 0.216	2.637 \pm 0.163	2.990 \pm 0.320
Sr	73.538 \pm 6.904	57.319 \pm 7.906	10.084 \pm 1.428	50.968 \pm 10.620
Zn	424.452 \pm 77.127	297.681 \pm 50.917	198.002 \pm 19.053	104.690 \pm 16.766

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.G.

ND – označava vrednosti koje su bile ispod praga detekcije.

Tabela 30. Srednje vrednosti metala u sedimentu reka Dunav, Tisa i Velika Morava (tokom 2010. godine).

A)

metal (mg/kg) reka	As	Cd	Cr	Cu	Fe
Dunav	19.38	0.70	55.25	183.38	35995.38
Tisa	16.00	1.97	74.33	188.44	51833.22
Velika Morava	16.50	1.00	119.50	125.50	47100.00

B)

metal (mg/kg) reka	Mn	Ni	Pb	Zn
Dunav	1265.50	60.25	76.25	243.38
Tisa	1683.44	52.78	78.22	370.89
Velika Morava	1212.50	143.00	106.50	217.50

4.12.1 Spearman-ovi koeficijenti korelacije teških metala i mikroelemenata u visceralnoj masi vrsta *V. acerosus*, *A. holandrii*, *C. fluminea* i *S. woodiana*

Statističkom analizom zabeležene su brojne pozitivne korelacije između različitih metala u visceralnoj masi svake pojedinačne vrste mekušca. Najveći broj korelacija detektovan je u visceralnoj masi *V. acerosus*, a najmanji u visceralnoj masi vrste *A. holandrii*.

U visceralnoj masi puža *V. acerosus* nisu utvrđene korelacije Sr sa nekim drugim metalom. Osim ovog elementa ni Se i As nisu korelirali sa nekim od metala u visceralnoj masi *A. holandrii*.

Tabela 31. Spearman-ovi koeficijenti korelacije između metala u visceralnoj masi *V. acerosus*.

	As	B	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Se	Sr	Zn
Al	0.965	0.972	0.934		0.965	0.975	0.856	0.954	0.882		0.696
As		0.892	0.935		0.912	0.920	0.908	0.911	0.822		0.817
B			0.952		0.996	0.985	0.892	0.951	0.872		0.678
Cr					0.969	0.959	0.970	0.971	0.806		0.716
Cu									0.474		0.468
Fe						0.987	0.913	0.957	0.863		0.694
Mn							0.897	0.964	0.884		0.737
Ni								0.936	0.729		0.658
Pb									0.817		0.686
Se											0.696
Sr											

Tabela 32. Spearman-ovi koeficijenti korelacije između metala u visceralnoj masi *A. holandrii*.

	As	B	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Se	Sr	Zn
Al					0.964	0.857					
As											
B							0.857				
Cr							0.928			0.786	
Cu							-0.821				
Fe						0.928					
Mn											
Ni								0.821		0.821	
Pb											
Se											
Sr											

U visceralnoj masi školjke *C. fluminea* nisu utvrđene korelacije Se sa drugim metalima, a kod *S. woodiana* As nije korelirao ni sa jednim drugim metalom.

Tabela 33. Spearman-ovi koeficijenti korelacije između metala u visceralnoj masi *C. fluminea*.

	As	B	Cr	Cu	Fe	Ni	Se	Sr	Zn
Al		0.811	0.618		0.943	0.718			
As			0.654	0.593				0.718	
B			0.574		0.783	0.624			
Cr					0.746	0.864		0.804	0.593
Cu								0.682	
Fe						0.793		0.575	
Ni								0.754	0.546
Se									
Sr									0.754

Tabela 34. Spearman-ovi koeficijenti korelacije između metala u visceralnoj masi *S. woodiana*.

	As	B	Cr	Cu	Fe	Mn	Se	Sr	Zn
Al		0.748	0.772	0.489	0.719				0.453
As									
B			0.731	0.479	0.785		0.512		0.666
Cr				0.610	0.669		0.518		0.578
Cu									
Fe									0.447
Mn							0.753	0.959	0.820
Se								0.683	0.695
Sr									0.845

5. DISKUSIJA

Osnovna svrha praćenja stanja životne sredine jeste dobijanje dovoljnog broja kvalitetnih i pouzdanih informacija na osnovu kojih se može vršiti ekološka procena rizika (eng. ecological risk assessment-ERA). Određivanje stepena rizika od zagađenja predstavlja proces praćenja intenziteta i mogućnosti uticaja čoveka na spoljašnju sredinu (Suter, 1993). Prvobitno ERA je razvijena da bi se utvrdio štetan uticaj različitih hemikalija na spoljašnju sredinu i obezbedila kvantitativna osnova za kategorizaciju i poređenje različitih oblika rizika, kao i poboljšanje razumevanja rizika.

Kontrola kvaliteta životne sredine mora biti primarni zadatak pri korišćenju prirodnih resursa kao i pri svakom drugom antropogenom dejstvu sa mogućim posledicama na stanje ekosistema. U prošlosti se praćenje stanja životne sredine zasnivalo na merenju fizičkih i hemijskih parametara sredine, međutim dobijeni podaci su govorili o stepenu zagađenja, ali ništa o efektima koje zagađivači imaju na biološke sisteme. Novijeg je datuma praćenje vremenskih i prostornih promena u odabranim biološkim sistemima ili parametrima, koje odslikavaju promene u stanju i/ili kvalitetu sredine (Lam, 2009). U organizmima promene koje se dešavaju na molekularnom i ćelijskom nivou prethode promenama na nivou populacija i kao takve predstavljaju rane upozoravajuće signale.

Idealan biomarker je onaj kod koga možemo uočiti jasnu uzročno-posledična vezu između nekog ksenobiotika i odgovora tog biomarkera (De Zwart i sar., 1999). Drastične promene pojedinačnog biomarkera ne moraju nužno dovesti do posledica na višim biološkim nivoima. Zbog toga je u ekološkoj proceni rizika dobro koristiti više biomarkera na različitim nivoima (od molekularnog do populacijskog) ali i odabrati set različitih biomarkera na istom biološkom nivou. Oehlmann i Schullte-Oehlmann (2003) predstavili su studiju o delovanju tributina na akvatične mekušce u kojoj su pokazali kako se promene nastale pod uticajem zagađivača mogu pratiti od molekularnog pa sve do nivoa populacije.

Veliki broj parametara životne sredine može da izazove oksidacioni stres u ćelijama organizama koji su izloženi njihovom dejstvu. Oksidacioni stres je deo opšteg stresa koji nastaje kada na organizam deluju spoljašnji ili unutrašnji faktori koji remete

homeostazu. U odgovoru na stres organizam aktivira zaštitne mehanizme da bi se vratio na prethodno stanje ili se prelazi na novo stabilno stanje (Lushchak, 2011). Oksidacioni stres podstiče odgovor brojnih biohemijskih i fizioloških zaštitnih mehanizama kod vodenih organizama. Tokom evolucije ovi organizmi razvili su enzimske i neenzimske komponente AOS koje sprečavaju i popravljaju oštećenja nastala pod uticajem prekomerne produkcije ROS. U proceni stanja životne sredine i razumevanju načina delovanja toksičnih materija kao biomarkeri koriste se i parametri antioksidacionog zaštitnog sistema: aktivnosti enzima SOD, CAT, GSH-Px, GR i enzima faze II biotransformacije GST, kao i koncentracije niskomolekulske komponente GSH.

Razlike u odgovoru biomarkera dobijene u laboratorijskim uslovima i studijama sa životinjama iz prirode posledica su kompleksnosti uslova u akvatičnoj sredini, gde faktori mogu delovati sinergistički na organizam ili se njihova dejstva mogu međusobno poništavati. Jedan od primera jesu polifenoli koji su poznati kao antioksidansi, a u prisustvu H_2O_2 i Cu^{2+} jona stiču prooksidantska svojstva (Labieniec i Gabryelak, 2007). Regoli i Principato (1995) su poredili laboratorijske i rezultate dobijene terenskim istraživanjima u cilju dobijanja korisnih putokaza za pravilno korišćenje biohemijskih odgovora kao biomarkera u praćenju zagađenja teškim metalima. U njihovoj studiji školjke koje su bile izložene zagađenju imale su značajno nižu koncentraciju GSH u poređenju sa kontrolama. Kod školjki iz prirode i kontrolnih nisu uočene razlike u aktivnosti GR, GSH-Px, CAT, SOD, za razliku od školjki prenetih sa nezagađenog na zagađeno mesto i jedinki izlaganih jonima Cu u laboratoriji, kod kojih su varijacije u aktivnosti enzima bile značajne. Ovo ukazuje na prisustvo adaptacionih i kompenzatornih mehanizama kod organizama hronično izloženih zagađenju. Laboratorijska istraživanja predstavljaju prvi značajan korak u testiranju efekata koje proizvodi neka hemikalija, ali se dobijeni rezultati ne mogu direktno ekstrapolirati na uslove u prirodi.

Parametri AOS deluju koordinisano da bi obezbedili optimalnu zaštitu od oksidacionog stresa (Hermes-Lima i sar., 2001). Promene u aktivnosti nekih enzima mogu biti kompenzovane promenama drugih, kao napr. deficijencija u aktivnosti CAT usled inhibicije može biti nadoknađena povećanjem aktivnosti GSH-Px i GST (Bagnyukova i sar., 2005).

U mnogim studijama do sada pokazana je pozitivna korelacija između nivoa antioksidacione odbrane i faktora sredine (Orbea i sar., 2002). Izloženost zagađenju dovodi do pojave oksidacionog stresa u mekušcima. Povećana aktivnost CAT je pokazana kao odgovor na izloženost organohlornim jedinjenjima i PCB-ovima kod *Perna viridis* i *Ruditapes philippinarum* (De Luca-Abbott i sar., 2005). Indukcija aktivnost SOD je uočena kod vrste *Mytilus galloprovincialis* u delovima vodotoka nizvodno od gradske sredine (Nasci i sar., 2000). Bigot i sar., 2010. pokazali su da se kod školjki *Unio tumidus* izloženih osmočasovnom komunalnom i poljoprivrednom zagađenju indukuje ekspresija informacione RNK (iRNK) za Se-GSH-Px. Imunotoksični efekti kao i ekspresije gena enzima CAT, SOD, GR, Se-GSH-Px ispitivani su u hemocitima puževa *Lymnaea stagnalis*. Pokazano je da u zoni vodotoka sa najvećim koncentracijama zagađivača dolazi do indukcije iRNK samo za enzime CAT i Se-GSH-Px (Gust i sar., 2013).

Kako eksploatacija vode konstantno raste neophodno je kontinuirano praćenje stanja kvaliteta vode u cilju prevencije negativnih posledica. Antropogenim dejstvom može doći do narušavanja stanja vodenih ekosistema i ugrožavanja opstanka akvatičnih organizama (Malmqvist i Rundle, 2002). U reke Dunav, Tisu i Veliku Moravu, koje predstavljaju sisteme sa specifičnim fizičko-hemijskim karakteristikama dnevno dospevaju i različite zagađujuće materije pre svega otpadnim industrijskim i komunalnim vodama i spiranjem sa poljoprivrednih površina. Metali, policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), organohlorni i organofosfatni pesticidi, polihlorovani bifenili, dioksini i drugi ksenobiotici imaju značajnu ulogu u izazivanju oksidacionih oštećenja u vodenim organizmima. Ovi zagađivači stimulišu produkciju ROS kroz različite mehanizme kao što su: redoks reakcije katalizovane flavoprotein reduktazama, redoks reakcije sa O₂, remećenje elektron transportnog lanca i povećavanje kapaciteta antioksidacione zaštite (Livingston, 2001). Vlyssides i Israilides (1997) su uočili da se organska jedinjenja teško razlažu u vodi i zbog toga se mogu smatrati visoko toksičnim zagađivačima. Mehanizam toksičnosti koji leži u osnovi oštećenja ćelija uključuje reakcije autooksidacije preko semihinonskog radikala tokom kojih se generišu ROS.

Određivanje parametara antioksidacionog zaštitnog sistema i utvrđivanje koncentracija teških metala u tkivima prirodnih populacija mekušaca važan je deo

menadžmenta slatkovodnih ekosistema. Zagađenje vodotokova Srbije potiče od tri najznačajnija antropogena izvora: komunalnih i industrijskih otpadnih voda i ocednih voda sa poljoprivrednih površina (Vasiljević, 2010). Sve razvijeniji saobraćaj dovodi do povećanja zagađenja, a velika količina olova i ulja sa ulica se kišama sliva u tokove reka. Većina rudnika u Srbiji se nalazi na tokovima reka koji su kao i termoelektrane veliki zagađivači - proizvode velike količine pepela, kao i veliku količinu sumpora i azotnih oksida. U Srbiji postoji ogroman broj divljih deponija sa kojih ocedne vode slobodno natapaju zemljište i dospevaju u vodna tela (Samardžić, 2013).

Dunav je reka koja protiče kroz 10 zemalja i veliki broja metropola. U našoj zemlji osim komunalnih voda vodotok je opterećen i industrijskim zagađenima iz rafinerije Pančevo i termoelektrane Kostolac, a izgradnjom brane na Dunavu i formiranjem hidroelektrana Đerdap I i II došlo je do promena u hidrološkom režimu (Lazarević i sar., 2010). Korišćenjem vode Dunava za hladene peći termoelektrane Kostolac i vraćanjem nedovoljno rashlađene vode u tok menja se termički bilans vode. Mađutim, na osnovu fizičko-hemijskih parametara datih u Tabelama 1 i 2 jasno se vidi da je vodotok Dunava znatno boljeg kvaliteta jer Dunav kao velika reka ima i veći kapacitet autopurifikacije.

Pored industrijskih postrojenja i gradova uz Tisu kroz Rumuniju, Ukrajinu, Slovačku i Mađarsku, gde je evidentirano više stotina potencijalnih zagađivača, značajan udeo u zagađivanju reke daju i naši gradovi i industrijska postrojenja od mađarske granice do Slankamena, gde se reka uliva u Dunav. Poslednjih godina više puta dolazilo je do akcidenata u industrijskim postrojenjima u gornjem toku reke Tise, na području Rumunije i Mađarske. Usled toga povremeno je registrovano povećanje koncentracije metala Cd, Mn, Zn, Pb i Cu. Kao i na Dunavu izgradnja brane na Tisi kod Bečeja promenila je režim života u njoj (Samardžić, 2013).

Velika Morava protiče kroz najnaseljenije delove Srbije i područja sa najintenzivnijom industrijskom i poljoprivrednom proizvodnjom. Kvalitet vode Velike Morave pod velikim je uticajem Južne i Zapadne Morave, kao i brojnih pritoka. Duž toka reke nalaze se brojne nelegalne šljunkare, kod kojih dolazi do pravljenja rupa na rečnom dnu u koje se odlaže smeće i otpad različitog sastava. Isušeni meandri Velike Morave pretvoreni su u poljoprivredno zemljište (Samardžić, 2013).

Veliki broj radova bavi se istraživanjem biomarkera kod akvatičnih vrsta koje su izlovljene na lokalitetima različitih vodenih sistema koji se razlikuju u pogledu tipa i stepena zagađenja. Razlike u aktivnostima enzima AOS zapažaju se i na različitim lokalitetima jedne reke. Borković-Mitić i sar. (2010) ispitivali su aktivnost SOD u digestivnoj žlezdi slatkovodne školjke *Unio tumidus* i ustanovili da je ona bila značajno veća na lokalitetu Jamena u odnosu na lokalitete Šabac i Ostružnica na reci Sava.

Isti biomarker kod različitih vrsta koje su izlovljene sa jednog lokaliteta ima species specifičan odgovor. Odgovori parametara AOS na neki stresor ne mogu se posmatrati odvojeno kao svaki pojedinačni biomarker već zajedno učestvuju u održavanju homeostaze (Despotović i sar., 2012). Indukovanje odgovora AOS javlja se kao posledica izloženosti ksenobioticima. Prema hemijskim karakteristikama zagađivači mogu biti dominantno rastvoreni u vodi ili vezani za partikule u sedimentu. Zbog različitog načina ishrane puževi i školjke na različit način unose ksenobiotike u organizam. Školjke sa filtracionim načinom ishrane preko škrge usvajaju hranljive čestice dok puževi pored ovakvog načina unose hranu i tako što pasu sa podloge (Krunić, 1994).

Osim polutanata prirodni faktori mogu uticati na poremećaj ravnoteže između produkcije i eliminacije ROS, čija je posledica pojava oksidacionog stresa (Halliwell i Gutteridge, 2007). Usled toga menja se i aktivnost parametara AOS, koji deluju u cilju umanjivanja ili neutralisanja efekata oksidacionog stresa. Situacija se komplikuje činjenicom da variranje sredinskih faktora utiče i na same kontaminante i zbog toga je ponekad teško interpretirati rezultate biomonitoring studija (Sheehan i Power, 1999).

Sezonske promene rečnih ekosistema se ogledaju u promenama fizičko-hemijskih parametara vode, kao što su temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, pH i naročito su izražene u vodenim sistemima umerenih klimatskih područija sa smenom četiri godišnja doba. One dovode do metaboličkih promena koje su povezane sa fiziološkim statusom životinja, koji je zavisao od dostupnosti hrane i reproduktivnog ciklusa (Livingstone, 2001). Mehanizam kojim promena pH utiče na pojavu oksidacionih oštećenja i aktivnost AOS nije jasan. Kod ektoterma kao što su puževi i školjke temperatura ima najveći uticaj na strukture i funkcije na svim nivoima biološke organizacije. Studije na akvatičnim organizmima pokazale su da razlike u

biomarkerima potiču od varijacija u sredinskim i biološkim faktorima, dok je uticaj lokaliteta manje izražen (Leiniö i Lehtonen, 2005).

U uslovima sa većim koncentracijama rastvorenog kiseonika povećane su aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px u škrgama *Mytilus galloprovincialis* (Santovito i sar., 2005). Ovo se dešava u mesecima kada je temperatura vode niža i povećana je rastvorljivost kiseonika u vodi. Smanjena aktivnost enzima AOS u zimskoj sezoni prema nekim autorima posledica je promenjenog metaboličkog statusa životinja (Viarengo i sar., 1990; Regoli, 1998). Lushchak i Bagnyukova (2006) pokazali su značajan uticaj različitih sredinskih nivoa kiseonika na slobodno-radikalske procese. Česte su promene nivoa kiseonika u akvatičnim sredinama, i zato su organizmi razvili niz adaptacija za uslove anoksije/hipoksije i hiperoksije. Kod vrsta koje su tolerantne na anoksiju ili hipoksiju dolazi do anticipativnog povećanja aktivnosti nekih AOS enzima tokom perioda niskog nivoa kiseonika, da bi pri povratku na normoksiju ovi enzimi imali sposobnost uklanjanja oštećenja u uslovima oksidacionog stresa

U uslovima hiperoksije GSH sistem ima značajnu adaptivnu ulogu. Hipoksija ne utiče na nivo koncentracije GSH, ali povratak na normoksiju dovodi do dupliranja koncentracije GSH u jetri zbog povećane potrebe za ovim molekulom (Lushchak i sar., 2005). Pokazano je da hiperoksija ima varijabilni uticaj na hepatični sadržaj GSH (Ritola i sar., 2002) Kontinuirana hiperoksija 14 dana ima manje izražen efekat na GSH od smene hiperoksije sa normoksijom u istom trajanju. Na kraju tretmana dolazilo je do povećanja koncentracije GSH (Lushchak i Bagnyukova, 2006).

Aktivnosti enzima SOD, CAT i GSH-Px školjki *Pyganodon grandis* i *Pyganodon fragilis* su u istraživanjima Doucet-Beaupré i sar. (2010) bile nezavisne od temperature za razliku od svih drugih ispitivanih enzima. Takođe, nije utvrđen jasan sezonski trend za enzime SOD, CAT i GST u studiji Lavarías i sar. (2011). Povećanje aktivnosti CAT ukazuje na prisustvo većih koncentracija H_2O_2 u vodi. U plitkim vodama pod uticajem UV zračenja dolazi do akumuliranja H_2O_2 (Buchner i sar., 1996). Na povećanu aktivnost CAT utiče povećanje fotohemijske produkcije vodonik peroksida, koja je izraženija u vodama sa većim koncentracijama rastvorenih organskih materija u odnosu na relativno čiste vode (Herut i sar., 1998; Buchner i sar., 1996).

Pozitivnu korelaciju između aktivnosti GST i temperature dobili su Ronisz i sar. (1999) u ženjkama jegulje. Veće aktivnosti GST u zimu u odnosu na proleće u jetri i mišiću ribe *Liza ramada* zapažene su u studiji Pavlović i sar., (2004) što je objašnjeno sinergističkim delovanjem između stresa uzrokovanog hladnoćom i toksičnih efekata polutanata. Prema Solé i sar. (2006) nema korelacija između aktivnosti GST i temperature. Aktivnost enzima AOS je u korelaciji sa koncentracijom rastvorenog kiseonika u vodi, naročito u škrigama (Santovito i sar., 2005).

Kao posledica povećanih koncentracija azota i fosfora, kao i njihovih jedinjenja javlja se eutrofikacija ili nakupljanje organskih jedinjenja. Eutrofikacija je prirodni proces koji se znatno ubrzava dospevanjem industrijskih i komunalnih otpadnih voda u reke i spiranjem đubriva sa obradivih površina, a njen efekat takođe je proučavan u nekim biomonitoring studijama (Briand i sar., 2003).

U vodenim sistemima najzastupljnije forme neorganskog azota su joni amonijuma, nitriti i nitrati. Prirodno oni u ekosisteme dospevaju atmosferskim padavinama, površinskim ili podzemnim oticanjem voda, razlaganjem geološke podloge, fiksiranjem od strane nekih prokariotskih vrsta i razlaganjem organskih materija. Nitrati su najzastupljenija forma jer je favorizovana dvostepena oksidacija amonijum jona, preko nitrita do nitrata. Toksičnost nitrata se ogleda u prevođenju pigmentata koji prenose kiseonik u forme koje nisu sposobne da ga vežu (Camarago i sar., 2005). U uslovima povećanih koncentracija nitrata mogu nastati hipoksični uslovi, sa štetnim dejstvom na organizme.

Postavlja se pitanje da li je pokazatelj sredinskog stresa povećanje ili smanjenje aktivnosti nekog enzima? Neki autori su pokazali da nakon kratkotrajne izloženosti školjki različitim polutantima dolazi do smanjenja aktivnosti enzima AOS (Canesi i sar., 1999; Gravato i sar., 2005), posle čega dolazi do indukcije antioksidacionog zaštitnog sistema. Ako su školjke izložene dugotrajnom i intenzivnom zagađenju, antioksidanti bivaju nadvladani i enzimi AOS progresivno smanjuju aktivnost do veoma niskih vrednosti (Regoli i Principato, 1995; Frenzilli i sar., 2004). ROS mogu prouzrokovati oštećenja parametara AOS. Vodonik peroksid može da inhibira SOD, superoksid CAT, a obe reaktivne vrste mogu inhibirati GR, a GST inaktiviraju prooksidantna jedinjenja (Bagnyukova i sar., 2006). Inaktivacija se može objasniti karbonilacijom proteina

direktnim delovanjem ROS pri čemu se gubi aktivnost enzima (Stadtman i sar., 1991). Neki produkti lipidne peroksidacije kao 4-hidroksi-2 nonenal (HN) i drugi aldehidi mogu reagovati sa aminokiselinskim ostacima i menjati funkciju proteina (Stadtman i Levine, 2000).

Povećanje aktivnosti enzima AOS u tkivima školjki pod uticajem zagađenja može predstavljati adaptaciju na hronično prisustvo zagađivača u sredini (Box i sar., 2007; Cheung i sar., 2001; Lima i sar., 2007). Izmerena aktivnost enzima predstavlja rezultat dva procesa: produkcije (sinteze) enzima i inaktivacije enzima.

Prema dobijenim rezultatima u ovoj doktorskoj disertaciji, u septembru aktivnost SOD u visceralnoj masi vrste *V. acerosus* bila je značajno veća kod jedinki iz Tise u odnosu na aktivnost ovog enzima kod jedinki iz Dunava i Velike Morave. Aktivnost SOD u visceralnoj masi vrste *C. fluminea* nije pokazala značajne razlike u zavisnosti iz koje su reke izlovljene jedinke. Poređenjem aktivnosti SOD u visceralnim masama četiri vrste iz Velike Morave u septembru ustanovljeno je da je vrsta *A. holandrii* imala najmanju aktivnost ovog enzima. Statistički značajno su bile veće aktivnosti SOD vrsta *V. acerosus*, *C. fluminea* i *S. woodina* u odnosu na *A. holandrii*. Aktivnost enzima SOD izmerena u visceralnoj masi *V. acerosus* bila je veća u septembru u odnosu na april na sve tri reke, a statistički značajno samo na Tisi.

Temperatura vode na svim lokalitetima reka Dunav, Tisa i Velika Morava bila je znatno viša u septembru u odnosu na april. Generalno, u uslovima većih temperatura povećava se ukupni metabolizam organizma, a samim tim su i aktivnosti enzima povećane. Buchner i sar. (1996) pokazali su da aktivnost enzima SOD raste u uslovima sredinskog povećanja temperature. Varijabilnost aktivnosti SOD vrste *Saccostrea cuculata* u odnosu na sezonu dobili su Niyogi i sar. (2001), a maksimalna aktivnost zabeležena je u leto.

Livingston, (1995) je pokazao slabu varijabilnost aktivnosti enzima SOD kod školjki *Mytilus galloprovincialis*, što je u saglasnosti sa rezultatima naše studije koji se odnose na vrstu *Corbicula fluminea* izlovljenu na rekama Dunav, Tisa i Velika Morava. Manduzio i sar., (2003) na osnovu elektroforetskog ispitivanja SOD kod školjke *Mytilus edulis* detektovali su pojavu nove izoforme ovog enzima kod školjki izloženih

zagađenju iako je ukupna aktivnost ostala nepromenjena. Veća aktivnost SOD zabeležena je u letnjem u odnosu na zimski period kod *Nacella concinna* (Abele i sar., 1998). Zajednički uticaj jona Fe i promene pH nastale u vodi dodavanjem krečnjaka dovode samo do blažih promena u aktivnosti SOD u bubregu *Carassius auratus* (Bagnyukova i sar., 2006).

U kontrolisanim uslovima ispitivano je dejstvo anjonskih surfaktanata Na dodecil sulfata (eng. Sodium dodecyl sulfate - SDS) i Na dodecilbenzen sulfonata (eng. Sodium dodecylbenzene sulfonate - SDBS) na aktivnost SOD, CAT, GSH-Px i GST, kao i na koncentraciju GSH u digestivnoj žlezdi i posteriornom mišiću aduktoru školjke *Mytilus galloprovincialis*. Aktivnost SOD je bila značajno smanjena nakon izlaganja školjki SDBS 72h (Liu i sar., 2010). Kada je aktivnost SOD redukovana povećanje koncentracija GSH može predstavljati kompenzatorni mehanizam (Munday i Winterbourn, 1989). Nakon izloženosti SDBS aktivnost CAT značajno je smanjena što može biti posledica dovoljno velike aktivnosti GSH-Px (Liu i sar., 2010). Vranković i sar., (2012) su ispitivanjem 3 lokaliteta na reci Bosni sa različitim tipom zagađenja izmerili najveću aktivnost SOD u jedinkama *Holandriana holandrii* izlovljenim na referentnom lokalitetu, koji nije imao uočljivih izvora zagađenja. Autori su objasnili ovakav odgovor SOD kao rezultat povećane produkcija superoksida usled intenziviranja normalnih fizioloških procesa.

CAT je imala najnižu aktivnost u visceralnoj masi *V. acerosus* iz Dunava, a najvišu u telu jedinki iste vrste iz Velike Morave. Značajno je bila veća aktivnost ovog enzima i kod jedinki iz Tise u odnosu na one iz Dunava. Kod vrste *C. fluminea* najniža izmerena aktivnost CAT bila je kod jedinki iz Dunava, a aktivnost ovog enzima kod jedinki iz Tise bila je značajno veća u odnosu na aktivnosti izmerene u visceralnoj masi jedinki iz druge dve reke. Najveća aktivnost CAT izmerena je u visceralnoj masi *S. woodina*, a nešto niža je detektovana u *A. holandrii*. Značajno niže aktivnosti CAT bile su u visceralnim masama *V. acerosus* i *C. fluminea*. CAT prema našim rezultatima nije imala jasan sezonski trend jer su aktivnosti ovog enzima izmerene u visceralnoj masi *V. acerosus* iz Dunava i Tise bile niže u septembru nego u aprilu, a kod jedinki iz Velike Morave zabeležene su suprotne tendencije. Na sve tri reke između perioda postojale su statistički značajne razlike u aktivnosti CAT.

U prisustvu ksenobiotika, kao što su teški metali, PCB, policiklični aromatični ugljovodonici (eng. polycyclic aromatic hydrocarbons - PAH) produkcija $O_2^{\cdot-}$ unutar organizma se povećava što utiče na indukciju aktivnosti SOD i CAT. Postoji jasna razlika u odgovoru ćelije na egzogene perokside i endogeno produkovane perokside i superoksid anjon radikal pod uticajem ksenobiotika. U prvom slučaju povećava se samo aktivnost CAT i GSH-Px, dok u drugom dolazi do povećanja aktivnosti SOD paralelno sa CAT (Angel i sar., 1999). Doyotte i sar. (1997) nisu dobili promene u aktivnosti SOD kod slatkovodnih školjki izloženih Cu. Aktivnost SOD i CAT u hepatopankreasu puža *Bellamyia aeruginosa* prvobitno raste sa porastom koncentracija Cu u podlozi, da bi pri koncentracijama od 570 $\mu\text{g/g}$ suve mase došlo do drastičnog sniženja aktivnosti enzima upućujući na inhibiciju (Ma i sar., 2010). Najupadljiviji rezultat je smanjenje koncentracije GSH u tkivima školjki izloženih metalima, napr. Cu kod *Mytilus galloprovincialis* (Viarengo i sar., 1990).

Vidal i sar. (2002) nisu zapazili da lokalitet ima uticaja na aktivnost CAT. Sličan rezultat dobili su i Angel i sar., (1999). Odgovor CAT na izloženost zagađenju zavisi od tkiva i dužine izlaganja, kao i prirode kontaminanta (Regoli i sar., 2002). Regoli i sar. (1998) su dobili pad u aktivnosti CAT *A. anguilla* i *M. balthica* nakon izlaganja benzo(a)pirenu i metalima. Povećanje aktivnosti zabeležio je Livingstone i sar., (1989) kod *M. edulis* izloženih menadionu. Aktivnost CAT je merena u jetri i bubregu jedinki vrste *Carassius auratus* izloženim različitim koncentracijama jona Fe. Uočeno je da niže koncentracije Fe dovode do smanjenja aktivnosti CAT, dok je aktivnost ovog enzima u akvarijumu sa najvećom koncentracijom Fe približna kontrolnim vrednostima (Bagnyukova i sar., 2006).

Osman i sar. (2007) poređenjem aktivnosti CAT u tkivima *Dreissena polymorpha*, pokazali su da se u visceralnoj masi aktivnost CAT smanjuje samo nakon kratkotrajnog izlaganja zagađivaču dok u škragama aktivnost drastično opada nakon dužeg izlaganja zagađenju. Takođe je pokazano da je aktivnost ovog enzima 3 puta veća u visceralnoj masi nego u škragama. Aktivnost CAT izmerena u visceralnoj masi *C. fluminea* iz reke Dronne nije pokazala sezonski značajne razlike iako je veća aktivnost ovog enzima izmerena u aprilu i oktobru u odnosu na druge periode godine (Vidal i sar., 2002). Veća aktivnost ovog enzima bila je u septembru u odnosu na april iste godine u

studiji Vidal i sar. (2002). Povećana aktivnost enzima CAT i GST u toplijim mesecima povezuje se sa povećanom metaboličkom aktivnošću (Regoli i sar., 1998). (Angel i sar., 1999) utvrdili su da aktivnost CAT slabo varira u zavisnosti od sezone. Mahmoud i sar. (2010) su dobili aktivnost CAT veća je u letnjem periodu pod uticajem temperature u odnosu na zimu prema

Rezultati dobijeni u ovoj studiji za aktivnost GSH-Px u visceralnoj masi vrste *V. acerosus* pokazali su da je ona bila značajno veća kod jedinki izlovljenih iz Velike Morave u odnosu na jedinke iz Dunava i Tise, između kojih nisu uočene značajne razlike u aktivnosti. Aktivnost GSH-Px izmerena u visceralnoj masi vrste *C. fluminea* bila je najveća u jedinkama iz Tise, ali značajno veća samo u odnosu na jedinke iz Dunava. Aktivnost GSH-Px bila je prema rezultatima oko pet puta veća kod jedinki *A. holandrii* u odnosu na *V. acerosus*, četiri puta u odnosu na *C. fluminea*, a čak deset puta u odnosu na vrstu *S. woodina*. Statistički značajne razlike postojale su u aktivnosti ovog enzima između svih vrsta međusobno. Aktivnost GSH-Px određena u jedinkama puža *V. acerosus* značajno je bila veća u septembru u odnosu na april na sve tri reke.

Indukcija aktivnosti GSH-Px školjki izloženih različitim polutantima pokazana je u brojnim studijama (Livingstone, 1990; Solé i sar., 1994). Jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na aktivnost GSH-Px je nivo koncentracije redukovanoG SH.

Indukcija aktivnosti GSH-Px zavisna od doze frakcije sirove nafte konstatovana je u visceralnoj masi puža *Austrocochlea porcata* izloženoj vodenom rastvoru frakcije u laboratoriji. Povećanje aktivnosti GSH-Px ukazuje na to da je životinja bila izložena oksidacionom stresu, koji su prouzrokovali prooksidanti iz nafte (Reid i MacFarlane, 2003). Suprotno ovome Geret i sar. (2003) zapazili su depleciju GSH-Px na zagađenim mestima u odnosu na nezagađena u škrgama *Ruditapes decussatus*. Smanjenu aktivnost GSH-Px detektovali su i drugi autori (Nasci i sar., 2000; Cossu i sar., 1997). Ovakav odgovor enzima može predstavljati samo prvi odgovor na prisustvo polutanta (Doyotte i sar., 1997). Aktivnost GSH-Px u hepatopankreasu *Macrobrachium malcolmsonii* povećava se nakon 30 dana izloženosti naftnim derivatima, kao i aktivnost GST da bi uklonila nakupljene produkte metabolizma naftnih derivata (Arun i Subramanian, 2007). Značajno niža aktivnost GSH-Px izmerena je u stopalu *S. woodina* u odnosu na *U. pictorum* i *U. tumidus* iz reke Save kod Šabca (Perendija i sar., 2007). Aktivnost

GSH-Px i GR opada kod školjki prebačenih sa kontrolnog mesta na četiri različito zagađena lokaliteta kao odgovor na prisustvo prooksidantnih hemikalija Cossu i sar., (2000). Aktivnost GSH-Px povećana je u jetri i mišiću vrsta *Blica bjoerkna*, *Carassius gibelio*, *Rutilus rutilus* i *Perca fluviatilis* jezera Gruža i u škragama *B. bjoerkna* i *C. gibelio* u periodu pre cvetanja algi (Perendija, 2012).

Aktivnost GR određena u ovoj doktorskoj disertaciji pokazala je sličan trend određen za aktivnost enzima CAT. Kod vrste *V. acerosus* aktivnost je bila najveća u visceralnoj masi jedinki iz Velike Morave, a najmanja kod jedinki iz Dunava. Kod jedinki vrste *C. fluminea* aktivnost GR od najveće ka najmanjoj ide redom po rekama: Tisa, Velika Morava i Dunav. Slično enzimu GSH-Px aktivnost GR se značajno razlikovala između vrsta. Najveća aktivnost detektovana je u visceralnoj masi *A. holandrii*, a najmanja u *S. woodina*. Aktivnost enzima GR kod *V. acerosus* i *C. fluminea* bila je oko dva puta manja od one izmerene u *A. holandrii*. Aktivnost GR u visceralnoj masi je, slično GSH-Px bila veća u septembru u odnosu na april.

U prisustvu teških metala i drugog industrijskog otpada aktivnost GR izmerena u digestivnoj žlezdi *Dreissena polymorpha* nije se promenila, dok je kod *Procambrus clarkii* došlo do povećanja aktivnosti (Faria i sar., 2010). Drugi autori dobili su rezultate prema kojima nije bilo promene aktivnosti GR i GSH-Px kod školjki i rakova izloženih teškim metalima i organohlorinim jedinjenjima (Cheung i sar., 2002; Torres i sar., 2002; Bebianno i sar., 2005).

Slatkovodne ribe *Oreochromis niloticus* i *Clarias lazera* sakupljane su sa 4 mesta na Nilu sa različitim tipovima zagađenja i merene su aktivnosti GST, GR i GSH-Px u jetri i bubregu (Hamed i sar., 2003). U oba tkiva aktivnost svih enzima povećana je kod *O. niloticus* ulovljenih na svim mestima u odnosu na kontrolu. Odgovor enzima bio je varijabilniji kod *C. lazera*. GSH-Px je imao smanjenu aktivnost u oba tkiva kod riba ulovljenih na jednom mestu, a povećana aktivnost ovog enzima i GR konstatovana je na ostala 3 lokaliteta. Smanjena je bila i aktivnost GST u različitoj meri u jetri i bubregu *C. lazera* sa tri mesta. Odnos GSH-Px i GR enzima ukazuju na mogući uticaj metabolizma peroksida na GSH homeostazu. Značajno niža aktivnost GR kod *C. lazera* ukazuje na veći gubitak GSSG preko žuči ili plazme u uslovima povećane oksidacije GSH.

Pokazano je da se aktivnost GR u jetri i bubregu vrste *Carassius auratus* smanjuje pod uticajem krečnjaka (Bagnyukova i sar., 2006). GR aktivnost bila je najveća u stopalu *U. pictorum*, a u stopalima *U. tumidus* i *S. woodina* je bila slične aktivnosti (Perendija i sar., 2007). Prema Patel i sar., (1990) aktivnost GR opada kod *Anadara granosa* nakon izloženosti Hg. Doyotte i sar., 1997 određivali su aktivnost GR u škragama i digestivnoj žlezdi nakon izloženosti Cu. Ista grupa autora ustanovila je da je GR osetljiviji parametar od Se zavisne GSH-Px.

Enzim GST, generalno je imao aktivnosti i do pet puta veće u visceralnoj masi puževa, *V. acerosus* u odnosu na školjke, *C. fluminea*. Trend ativnosti ovog enzima u telu *V. acerosus* prati trend enzima CAT i GR, ali nije bilo značajnih razlika kod jedinki iz različitih reka. Aktivnost GST izmerena u visceralnoj masi *C. fluminea* takođe je pokazala sličan odnos po rekama kao enzimi CAT i GR za ovu vrstu. Sličan trend aktivnosti enzima GSH-Px i GR uočen je i za GST, ali su razlike između vrsta bile izraženije. Oko deset puta je manja aktivnost ovog enzima kod vrste *V. acerosus*, pedeset puta kod vrste *C. fluminea*, a čak sto puta kod vrste *S. woodina* u odnosu na *A. holandrii*. Enzim GST pokazao je slično kao CAT neuniforman trend aktivnosti u odnosu na period i reku. Niža aktivnost bila je u septembru u jedinkama puževa iz Dunava i Tise, a obrnuto, u aprilu kod jedinki iz Velike Morave.

U različitim studijama proučavana je aktivnost GST nakon izloženosti različitim ksenobioticima (Sheehan i sar., 1995; Fitzpatrick i sar., 1997; Di Giulio i sar., 1993; Lenartova i sar., 1997). Niska aktivnost GST ukazuje na smanjenu sposobnost organizma u detoksifikaciji ksenobiotika. Uticaj azinfos-metila, organofosfatnog insekticida na aktivnost GST nije uočena kod jedinki *Biomphalaria glabrata* (Kristoff i sar., 2008). GST može ispoljavati peroksidaznu aktivnost i uočene su korelacije između aktivnosti ovog enzima i GSH-Px (Speers-Roesch i Ballantyne, 2005; Despotović i sar., 2012).

U telu puža *Bellamyia purificata* bisfenol A dovodi do povećanja aktivnosti GST, dok istovremeno utiče na smanjenje koncentracije GSH (Li i sar., 2008). Nije bilo varijacija u aktivnosti GST u zavisnosti od lokaliteta u studiji Vidal i sar. (2002), a nije uočena ni jasna sezonska zavisnot aktivnosti GST. Borković i sar. (2005) su ustanovili da je aktivnost GST značajnije veća u zimu u odnosu na topliji period godine. Suprotno

prethodnoj studiji Mahmoud i sar. 2010 dobili su povećanu aktivnost GST u leto ukazuje na aktivaciju detoksifikacionih procesa u digestivnoj žlezdi *Fulvia fragilis* tokom izloženosti zagađenju. Kada je nedovoljna odbrana enzimima faze I javljaju se toksični efekti i na ovom stupnju zaštita je omogućena jedino aktivnošću GST. Aktivnost GST bila je značajno veća u stopalu *U. pictorum* u odnosu na *U. tumidus* i *S. woodina* ali najniža je kod *U. tumidus* (Perendija i sar., 2007). Cilj studije Osman i sar., 2007 je bio da se na osnovu odabranih biomarkera utvrdi da li se mogu napraviti razlike između dva tipa sedimenta kojima su izlagane *D. polymorpha* poreklom iz jezera, jednog zagađenog, a drugog relativno čistog. Sediment je sadržao različite koncentracije PAH, PCB, hlorovanih bifenila (CB). Dok se aktivnost GST u škrgama smanjivala i nakon kraće i duže izloženosti zagađenom sedimentu u visceralnoj masi nije pokazala značajne razlike aktivnosti u odnosu na kontrolu. Aktivnost GST je 2 puta veća u visceralnoj masi u odnosu na škrge. Aktivnost GST je inhibirana dejstvom kontaminanata, a GSH se troši u reakcijama konjugacije. Prema Bagnyukova i sar. (2006) aktivnost GST se smanjuje usled izloženosti Fe i krečnjaku u jetri i bubregu vrste *C. auratus* i to maksimalno pri najvećoj dozi Fe (500 μ M).

Jedinke vrste *Holandriana holandrii* sakupljane su na 3 lokaliteta reke Bosne sa različitim tipom zagađenja (Visoko, Doboj i Modrica). Aktivnosti CAT, GPx i GST bile su povećane na lokalitetu Modrica, mesto sa najvećim stepenom zagađenja zbog prisustva rafinerija u njegovoj blizini. Autori su pretpostavili da su jedinke na ovom lokalitetu bile pod većim uticajem oksidacionog stresa. Veći je stres poreklom od zagađivača na lokalitetu Modrica (u blizini rafinerija i skorašnji akcidenti sa gorenjem ulja) u odnosu na druga dva, po pretpostavci autora na osnovu aktivnosti enzima GST. U telu puževa koncentracije organskih zagađivača bile su ispod praga detekcije. Nije uočena značajna razlika u aktivnosti GR u ispitivanim uzorcima (Vranković i sar., 2012).

Koncentracija GSH izmerena je samo u visceralnoj masi puževa. Odnos koncentracija u odnosu na to iz koje su reke jedinke bio je obrnuto proporcionalan aktivnosti GSH zavisnih enzima. Tako je koncentracija GSH bila najveća u telu puževa iz Dunava, zatim nešto manja kod jedinki iz Tise, dok su puževi iz Velike Morave imali najmanju koncentraciju GSH. Koncentracija GSH bila je značajno veća u visceralnoj

masi puža *V. acerosus* u odnosu na *A. holandrii*. Koncentracija GSH izmerena u visceralnoj masi *V. acerosus*, prema dobijenim rezultatima jasno je značajno veća u septembru na sve tri reke. Veća koncentracija GSH u tkivima organizma ukazuje na veću toleranciju prema faktorima koji mogu dovesti do pojave oksidacionog stresa (Lushchak i sar., 2005). Sadržaj GSH i aktivnost GST u digestivnoj žlezdi školjki izloženih SDS i SDBS bili su veći nego kod kontrolnih jedinki što je moglo da predstavlja veći antioksidacioni kapacitet (Liu i sar., 2010).

Pad koncentracije GSH sa povećanjem akumulacije Cu u telu može se objasniti reakcijom detoksifikacije u kojoj GSH veže metal poput metalotioneina (Kuroshima, 1995). Metali imaju visok afinitet prema svim reaktivnim grupama GSH –SH grupi, amino –NH₂, 2 karboksil grupe COOH, kao i prema peptidnim vezama.

Kod školjki koje su se nalazile u sedimentu sa visokim koncentracijama PAH, PCB i CB oko 2 puta je veća koncentracija GSH u visceralnoj masi nego u škragama. Koncentracija u škragama opada nakon kratkotrajnog izlaganja zagađenju, dok u visceralnoj masi nema promena koncentracije (Osman i sar., 2007). Chandran i sar. (2005) su ispitivali uticaj Cd i Zn na parametre antioksidacionog zaštitnog sistema u digestivnoj žlezdi i bubregu *Achatina fulica* i ustanovili da je aktivnost SOD, CAT, GSH-Px kao i koncentracija GSH bila smanjena su u oba tkiva. Mahmoud i sar. (2010) uočili su da je nivo GSH u digestivnoj žlezdi *Fulvia fragilis* u leto veći u odnosu na zimu, kada koncentracija značajno pada.

Kanonijskom diskriminacionom analizom ispitivana su razlike između reka Dunav, Tisa i Velika Morava, na osnovu aktivnosti enzima AOS u visceralnoj masi *V. acerosus* i *C. fluminea*. Pošto su SOD i CAT parametri koji najviše doprinose izdvajanju Tise u odnosu na druge dve reke može se pretpostaviti da su jedinke puževa i školjki izloženih na lokalitetim Tise bili izloženi povećanim koncentracijama O₂⁻ i H₂O₂. U reci Tisi su u odnosu na Dunav i Veliku Moravu moguće bile povećane koncentracije zagađivača koji doprinose povećanoj produkciji O₂⁻ i H₂O₂, ili su ove reaktivne vrste usled prirodnih procesa imale veću koncentraciju u Tisi. Kod jedinki iz Tise aktivnost SOD bila je najveća u visceralnoj masi *V. acerosus*, dok je aktivnost CAT bila najveća u visceralnoj masi *C. fluminea*.

Na reci Velika Morava poređeni su parametri AOS kod dve vrste puževa (*A. holandrii* i *V. acerosus*) i dve vrste školjki (*C. fluminea* i *S. woodiana*). Kanonijskom diskriminacionom analizom utvrđeno je jasno izdvajanje vrste *A. holandrii* prema diskriminacionoj funkciji 1. *A. holandrii* ima izrazito veće vrednosti GST, GSH-Px i GR u poređenju sa drugom ispitivanom vrstom puža i dve vrste školjki. Na osnovu ovoga može se zaključiti da *A. holandrii* ima veći detoksifikacioni kapacitet od ostalih vrsta mekušaca. Vrste *V. acerosus* i *C. fluminea* imaju određene sličnosti u odgovoru parametara AOS prema kanonijskoj analizi, ali kako razdvajanju ove dve vrste najviše doprinosi aktivnost GSH-Px može se pretpostaviti da postoje razlike u osetljivosti ovih vrsta na prisustvo organskih hidroperoksida.

Spearman-ovim korelacionim testom utvrđene su korelacije za parametre AOS u visceralnoj masi puža *V. acerosus* sa lokalitetom i periodom. Na osnovu tih rezultata može se zaključiti da su aktivnosti enzima SOD, CAT, GSH-Px i GR pod jakim sezonskim uticajem i faktori sredine koji variraju sezonski značajno moduliraju aktivnost ovih enzima. Pod velikim je uticajem sezonskih promena i koncentracija GSH. Aktivnost enzima GST jedina je za koju je uočeno da ne podleže sezonskim uticajima. Aktivnost CAT, GR, GST i koncentracija GSH pod uticajem su karakteristika lokaliteta što može navesti na zaključak da bi oni bili potencijalno dobri biomarkeri, ali za enzime CAT i GR, kao i za koncentraciju GSH pri iminterpretiranju rezultata mora se u obzir uzeti i sezonski uticaj.

Poslednjih dekada došlo je do povećanog nakupljanja metala u vodenoj sredini zbog njihovog korišćenja u poljoprivrednim, hemijskim i industrijskim procesima. Metali na više načina mogu dospeti u unutrašnjost ćelija. Generalno, u ćeliju ulaze putem interakcija sa transportnim proteinima u procesu olakšane difuzije ili kroz jonske kanale u membrani. Na primer, Cd prolazi kroz ćelijsku membranu kroz Ca^{2+} kanale (Chandran i sar., 2005). Kada dospeju u ćeliju metali se mogu vezati za biomolekule, stvoriti depoe u subćelijskim kompartmentima ili podležu metaboličkoj transformaciji i/ili eliminaciji. Visokoafinitetni ligandi za metale su metalotioneini, SH-grupama bogati proteini i GSH. Oni omogućavaju uklanjanje slobodnih jona metala u ćeliji i održavaju gradient sa spoljašnjim medijumom (Viarengo, 1989).

Porast koncentracije jona metala u ćeliji može rezultovati povećanjem sadržaja metala u pojedinim delovima ćelije, koji su često mesta toksičnog dejstva. U mitohondrijama se metali mogu vezati za ključne enzime i respiratorne proteinske komplekse, i smanjujući efikasnost konverzije energije i ometajući oksidativnu fosforilaciju izazvati oksidaciona oštećenja.

Unos metala preko hrane u poređenju sa direktnom adsorpcijom iz rastvora je od fundamentalnog značaja kod heterotrofnih vodenih organizama. Dostupni podaci su ograničeni, ali ukazuju da su hrana i čestice važniji izvori metala u odnosu na vodu za krupnije životinje kao što su ribe i rakovi (Fairbrother i sar., 2007). U zagađenoj akvatičnoj sredini, unos preko hrane je značajniji zbog bogatijeg sadržaja metala u sedimentu, česticama i detritusu (Coetzee i sar., 2002).

Mekušci kao i druge vrste invertebrata akumuliraju metale u svojim tkivima pa se mogu smatrati model organizmima za istraživanje kinetike, akumulacije metala i detoksifikacije.

Da bi procenili efikasnost bioakumulacije metala u tkivima dve vrste školjki Usero i sar. (2005) su izračunali biosedimentacioni akumulacioni faktor, koji su definisali kao odnos koncentracije metala u organizmu i sedimentu. U njihovoj studiji Zn i Cu su metali sa najvišim akumulacionim faktorom dok je Cr metal sa najnižim vrednostima ovog parametra.

Poznat je program za nadgledanje sredine sproveden u Sjedinjenim američkim državama 1976.godine u kome su korišćene četiri vrste školjki *Mytilus edulis*, *Mytilus californicus*, *Crassostrea virginica* i *Ostrea equestris* u većoj geografskoj regiji, a nazvan je „Školjka sat” (eng. Mussel watch). U visceralnoj masi merene su koncentracije teških metala, radionuklida, halogenovanih ugljovodonika i ugljovodonika iz nafte. Prema dostupnim literaturnim podacima mnogo manje studija se bavilo akumulacijom metala kod slatkovodnih mekušaca, pre svega školjki, u odnosu na marinske.

Waykar i Deshmukh, (2012) su u svojoj studiji u laboratorijskim uslovima, proučavali koja je od tri ispitivane vrste: *Lamellidens corrianus*, *Lamellidens marginalis* i *Indonaia caeruleus* pogodna da bude bioindikator na osnovu akumulacije Cu, Cd, Hg,

As, Pb i Zn. Razlike između vrsta uslovljene su veličinom tela, rastom, fitnessom, reproduktivnom sposobnošću, genotipom, razlikama u nivou metabolizma i težini. Kod bliskih vrsta školjki razlike u biokoncentraciji su većinom uzrokovane interspecijskim razlikama u biokinetici usvajanja, eliminacije i fiziološkim karakteristikama kao što su pumpanje, filtracija i respiracija. Kod različitih vrsta mekušaca koncentracije elemenata se razlikuju zbog species specifične sposobnosti/kapaciteta da regulišu akumulaciju metala (Christopher i sar., 2010). Generalno, vrsta koja je tolerantnija u odnosu na određeni metal akumulira ga više nego vrsta koja nije tolerantna i koja metal u tom slučaju akumulira u manjoj meri ili ne preživljava u prisustvu metala. Koncentracija metala u živim organizmima može premašiti za nekoliko redova veličine koncentraciju iz okruženja (Casas i sar., 2008).

Gundacker (2000) je ispitivao razlike u bioakumulaciji Cu, Cd, Pb i Zn između 2 vrste bivalvia (*Anodonta* sp. i *Unio pictorum*) i 2 vrste gastropoda (*Radix ovata* i *Viviparus* sp.). Puževi su 20 puta više akumulirali Cu u odnosu na školjke pa je pretpostavljeno da one u regulaciji bioakumulacije Cu imaju veću sposobnost eliminacije.

Puževi kao i školjke i druge vrste invertebrate sposobni su da deponuju teške metale u svojim tkivima i zato mogu poslužiti kao model organizmi u istraživanjima kinetike, akumulacije i detoksifikacije metala. Trenutno nema dovoljno literaturnih podataka o koncentracijama metala kod slatkovodnih mekušaca iz reka Srbije. Prema rezultatima dobijenim u ovoj studiji sve četiri vrste puževa i školjki razlikovali su se po stepenu akumulacije svih ispitivanih metala, a ustanovljena je i razlika u bioakumulaciji iste vrste u odnosu na to iz koje reke potiče. Ako se uporede prosečne vrednosti koncentracija metala u sedimentu reka Dunav, Tisa i Velika Morava (Tabela 30) i koncentracija metala u visceralnoj masi mekušaca (Tabele 27, 28 i 29) zapaža se da se odnosi koncentracija delimično poklapaju.

U jednoj od mnogobrojnih studija sakupljeno je devet vrsta morskih puževa i školjki duž obale kineskog Bohai mora i korišćeno da bi se utvrdio stepen bioakumulacije metala As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se i Zn (Wang i sar., 2005). Prema rezultatima ove studije mekušci mogu selektivno da akumuliraju određene elemente. Puževi *Rapana venosa* i *Neverita didyma* su akumulirale veće koncentracije

As i Se u odnosu na školjke. Korelacije između pojedinih metala ispitivane su kod slatkovodnih riba i to između tkiva, kao i unutar istog tkiva. Najviše korelacija uočeno je u jetri (Jarić, 2011). Hamed i Emara 2006. određivali su nivo teških metala Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Fe i Mn u plićaku, sedimentu i mekom tkivu puža *Patella caerulea* i školjke *Barbatus barbatus*. Najveća akumulacija u tkivima mekušaca utvrđena je za Fe, Zn i Mn, a najmanja za Cd. Bioakumulacija je izraženija kod *P. caerulea*.

Yap i sar., (2010) su pokazali da je distribucija teških metala u pojedinim delovima tela mekušaca povezana sa načinom ishrane i života. Prema literaturnim podacima faktori koji utiču na distribuciju teških metala su veličina kontaktne površine tkiva, afinitet metala za vezujuća mesta na metalotioneinima (Viarengo i sar., 1985) kao i tkivne razlike u akumulaciji i ekskreciji metala (Gundacker, 1999). Specifični načini ishrane različitih vrsta mekušaca podrazumevaju hranjenje filtracijom pomoću škrga i sposobnost da životinja pase sa površine sedimenta.

Zbog nesumnjivog značaja koji mekušci imaju u biomonitoring studijama, bilo je neophodno ispitati da li vrste *Viviparus acerosus*, *Amphimelania holandrii*, *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana* mogu da posluže kao bioindikator u praćenju stanja i kvaliteta sredine reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju polaznu osnovu za permanentno i sistematično korišćenje odabranih vrsta mekušaca u praćenju stanja vodenih ekosistema. Potrebno je detaljnije proučiti aktivnost enzima SOD i GST vrste *V. acerosus*, aktivnost GST vrste *C. fluminea*, uz praćenje odgovora celokupnog antioksidacionog zaštitnog sistema. Kao potencijalno dobar bioindikator mogla bi da posluži vrsta *A. holandrii* zbog izrazitih razlika u aktivnosti parametara AOS u odnosu na ostale ispitivane vrste. U praćenju stanja zagađenosti vodene sredine teškim metalima vrsta *V. acerosus* se pokazala kao najstabilnija i najpouzdanija, ali se ne trebaju zanemariti ni ostale ispitivane vrste, uz dalje pokušaje da se utvrdi kakva bi bila tkivna distribucija pojedinih metala i biokinetika u svakoj vrsti.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivanjem parametara antioksidacionog zaštitnog sistema i koncentracije metala u visceralnoj masi slatkovodnih mekušaca, puževa - *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* i školjki - *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana*, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Aktivnost SOD u visceralnoj masi puža *V. acerosus* u septembru značajno je veća kod jedinki iz Tise u odnosu na jedinke iz Dunava i Velike Morave, za razliku od vrste *C. fluminea* kod koje nema razlike u aktivnosti ovog enzima bez obzira na to iz koje su reke jedinke izlovljavane. Interspecijske razlike u aktivnosti SOD kod četiri vrste mekušaca iz Velike Morave pokazale su da je aktivnost ovog enzima veća kod školjki nego kod puževa, a najmanja aktivnost je izmerena u visceralnoj masi *A. holandrii*. Aktivnost SOD u visceralnoj masi *V. acerosus* veća je u svim rekama tokom septembra u odnosu na april, što ukazuje na uticaj faktora sredine, koji se menjaju sezonski.
2. Aktivnost CAT u visceralnoj masi puža *V. acerosus* značajno je veća kod jedinki iz Velike Morave u odnosu na jedinke iz Dunava i Tise, a u visceralnoj masi *C. fluminea* najveća aktivnosti CAT je dobijena kod jedinki iz Tise. Razlike u aktivnosti CAT između vrsta su takve da je aktivnost ovog enzima veća u visceralnoj masi *V. acerosus* u odnosu na *A. holandrii*, kao i u visceralnoj masi *S. woodiana* u odnosu na *C. fluminea*. U Dunavu i Tisi aktivnost CAT u visceralnoj masi puža *V. acerosus* veća je u aprilu, dok je u Velikoj Moravi aktivnost veća u septembru.
3. Aktivnost GSH-Px veća je kod školjke *C. fluminea* u odnosu na puža *V. acerosus* kod jedinki iz sve tri reke. Najveća aktivnost ovog enzima bila je kod jedinki *C. fluminea* iz Tise, dok je u visceralnoj masi *V. acerosus*

aktivnost GSH-Px bila najveća kod jedinki iz Velike Morave. Interspecijske razlike su izmerene u aktivnosti GSH-Px i najveća aktivnost ovog enzima bila je u visceralnoj masi vrste *A. holandrii*, a najmanja u visceralnoj masi *S. woodiana*. Aktivnost GSH-Px značajno je veća u septembru u poređenju sa aprilom kod jedinki *V. acerosus* iz reka Dunav, Tisa i Velika Morava.

4. Aktivnost GR kod jedinki puža *V. acerosus* i školjke *C. fluminea* pokazuje isti trend kao aktivnost CAT, ukazujući na jednak odgovor ovih enzima na uticaj svih faktora u rekama kojima su mekušci izloženi. Vrsta *A. holandrii* ima najveću aktivnost GR od sve četiri vrste mekušaca iz Velike Morave, a postoje i značajne razlike između svih vrsta međusobno. Aktivnost GR u visceralnoj masi *V. acerosus* veća je u septembru u odnosu na april, značajne razlike u aktivnosti su dobijene kod jedinki iz Tise i Velike Morave.
5. GST ima veću aktivnost kod puža *V. acerosus* u odnosu na školjku *C. fluminea*. Nema značajnih razlika u aktivnosti ovog enzima kod jedinki *V. acerosus* iz Dunava, Tise i Velike Morave. U visceralnoj masi *C. fluminea* aktivnost GST bila je najveća kod jedinki iz Tise. Aktivnost enzima GST bila je veća kod puževa *V. acerosus* i *A. holandrii* u odnosu na školjke *C. fluminea* i *S. woodiana*. Između svih ispitivanih vrsta prisutne su značajne razlike u aktivnosti ovog enzima. Sezonski uticaj na aktivnost GST nije jasan, a značajna razlika u aktivnosti ovog enzima u visceralnoj masi puža *V. acerosus* uočava se samo kod jedinki iz Dunava.
6. Koncentracija GSH u visceralnoj masi puža *V. acerosus* najveća je kod jedinki iz Dunava, a najmanja kod jedinki iz Velike Morave. Odnos koncentracije GSH i aktivnosti GSH zavisnih enzima je obrnuto proporcionalan. Koncentracija GSH je bila veća u visceralnoj masi *V. acerosus* u odnosu na *A. holandrii*. Koncentracija GSH bila je manja u aprilu u odnosu na septembar u visceralnoj masi *V. acerosus*.
7. Kanonijskom diskriminacionom analizom utvrđeno je da se reke nepotpuno razdvajaju, što ukazuje da postoje sličnosti, ali i razlike u karakteristikama

rečnih sistema. Prema prvoj diskriminacionoj funkciji najznačajnije je izdvajanje reke Tise. Parametri koji najviše doprinose razdvajanju su SOD i CAT.

8. Kanonijskom diskriminacionom analizom jasno se razdvajaju ispitivane vrste mekušaca i može se konstatovati *species*-specifična aktivnost parametara antioksidacionog zaštitnog sistema. Vrsta *A. holandrii* izrazito se odvaja od ostale tri vrste, a parametar koji najviše doprinosi tome je GST. Detektovanim razlikama najviše doprinose aktivnost SOD i CAT kod vrste *S. woodiana*, a GSH-Px kod vrsta *V. acerosus* i *C. fluminea*. Prema svemu navedenom *A. holandrii* bi se mogla smatrati za potencijalno dobar bioindikator u biomonitoring studijama.
9. Prema Spearman-ovom testu korelacije svi parametri antioksidacionog zaštitnog sistema u visceralnoj masi *V. acerosus*, osim GST, imaju jasan sezonski karakter. Po lokalitetu razlikuju se aktivnosti CAT, GR i GST, kao i koncentracija GSH. Iz svega se može zaključiti da bi aktivnost GST mogla biti pouzdan biomarker u biomonitoring studijama u kojima se kao model organizam koristi puž *V. acerosus*.
10. Metali imaju *species*-specifičan nivo akumulacije u visceralnoj masi mekušaca i ne odražavaju u potpunosti odnos koncentracija metala prisutnih u sedimentu.
11. Spearman-ovim korelacijama utvrđen je određen broj pozitivnih korelacija između metala u visceralnoj masi ispitivanih vrsta. Najveći broj korelacija zabeležen je za vrstu *V. acerosus*, a najmanji za vrstu *A. holandrii*.

OPŠTI ZAKLJUČAK

Istraživanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji pokazala su da se svi ispitivani antioksidacioni parametri: SOD, CAT, GSH-Px, GR, enzim faze II biotransformacije GST i koncentracija GSH mogu koristiti kao efektivni biomarkeri za molekularno fiziološki biomonitoring rečnih ekosistema i to pruža veliki doprinos na polju ekofiziologije akvatičnih organizama. Dobijeni rezultati predstavljaju značajan naučni doprinos, jer su to podaci o uporednom pregledu uticaja lokaliteta i sezone na parametre antioksidacionog zaštitnog sistema u visceralnoj masi puževa - *Viviparus acerosus* i *Amphimelania holandrii* i školjki - *Corbicula fluminea* i *Sinanodonta woodiana*, a takođe, analiza koncentracije metala predstavlja prve podatke dobijene na ispitivanim vrstama u rekama Dunav, Tisa i Velika Morava.

7. LITERATURA

1. ABELE, D., BURLANDO, B., VIARENGO, A. and PÖRTNER, H. (1998): Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comp. Biochem. Phys. B* 120, 425-435.
2. ALMAR, M., OTERO, L., SANTOS, C. and GONZÁLEZ GALLEGO, J. (1998): Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *J. Environ. Sci. Heal. B* 33, 769-783.
3. ALSCHER, R.G., ERTURK, N. and HEATH, L.S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331-1341.
4. ANDREYEV, A.Y., KUSHNAREVA, Y.E. and STARKOV, A.A. (2005): Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 70, 200-214.
5. ANGEL, D.L., FIEDLER, U., EDEN, N., KRESS, N., ADELUNG, D. and HERUT, B. (1999): Catalase activity in macro- and microorganisms as an indicator of biotic stress in coastal waters of the eastern Mediterranean Sea. *Helgoland Mar. Res.* 53, 209-218.
6. ARENAS, F.A., DÍAZ, W.A., LEAL, C.A., PÉREZ-DONOSO, J., IMLAY, J.A. and VÁSQUEZ, C.C. (2010): The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 690-694.
7. ARUN, S. and SUBRAMANIAN, P. (2007): Cytochrome P450-dependent monooxygenase system mediated hydrocarbon metabolism and antioxidant enzyme responses in prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. *Comp. Biochem. Phys. C* 145, 610-616.

8. BABIĆ MLADENOVIĆ, M., BARTOŠ DIVAC, V. and KOLAROV, V. (2010): Natural characteristics of the Danube River in Serbia, Chapter 4, In: The Danube in Serbia (P. Simonović, V. Simić, S. Simić, M. Paunović, editors), Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management - Republic Directorate for Water, University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, University of Kragujevac, Faculty of Science, p.p. 59-78.
9. BAFANA, A., DUTT, S., KUMAR, A., KUMAR, S. and AHUJA, P.S. (2011): The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68, 129-138.
10. BAGNYUKOVA, T.V., CHAHRAK, O.I. and LUSHCHAK, V.I. (2006): Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325-331.
11. BAGNYUKOVA, T.V., STOREY, K.B. and LUSHCHAK, V.I. (2005): Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. *Comp. Biochem. Phys. B* 142, 335-341.
12. BEBIANNO, M.J., COMPANY, R., SERAFIM, A., CAMUS, L., COSSON, R.P. and FIALA-MÉDONI, A. (2005): Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* 75, 354-373.
13. BIGOT, A., VASSEUR, P. and RODIUS, F. (2010): SOD and CAT cDNA cloning, and expression pattern of detoxification genes in the freshwater bivalve *Unio tumidus* transplanted into the Moselle river. *Ecotoxicology* 19, 369-376.
14. BORKOVIĆ-MITIĆ, S., PAVLOVIĆ, S., PERENDIJA, B., DESPOTOVIĆ, S., GAVRIĆ, J., GAČIĆ, Z. and SAIČIĆ, Z. (2013): Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidant enzymes and concentrations of vitamin E and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River. *Ecol. Indic.* 32, 212-221.

15. BORKOVIĆ MITIĆ, S., RADOVANOVIĆ, T., PERENDIJA, B., DESPOTOVIĆ, S., PAVLOVIĆ, S. and SAIČIĆ, Z. (2010): Superoxide dismutase as relevant oxidative stress biomarker of the freshwater bivalve *Unio tumidus* at different localities - the Sava River case study, Chapter 13, In: The Danube in Serbia (P. Simonović, V. Simić, S. Simić, M. Paunović, editors), Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water Managment - Republic Directorate for Water, University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, University of Kragujevac, Faculty of Science, p.p. 225-240.
16. BORKOVIĆ, S.S., ŠAPONJIĆ, J.S., PAVLOVIĆ, S.Z., BLAGOJEVIĆ, D.P., MILOŠEVIĆ, S.M., KOVAČEVIĆ, T.B., RADOJIČIĆ, R.M., SPASIĆ, M.B., ŽIKIĆ, R.V. and SAIČIĆ Z.S. (2005): The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Phys. C* 141, 366-374.
17. BOX, A., SUREDA, A., GALGANI, F., PONS, A. and DEUDERO, S. (2007): Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Phys. C* 146, 531-539.
18. BRIAND, J., JACQUET, S., BERNARD, C. and HUMBERT, J. (2003): Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34, 361-377.
19. BUCHNER, T., ABELE-OESCHGER, D. and THEEDE, H. (1996): Aspects of antioxidant status in the polychaete *Arenicola marina*: tissue and subcellular distribution, and reaction to environmental hydrogen peroxide and elevated temperatures. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 143, 141-150.
20. BUONOCORE, G., PERRONE, S. and TATARANNO, M.L. (2010): Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 15, 186-190.
21. CADENAS, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 79-110.

22. CAMARAGO, J.A., ALONSO, A. and SALAMANCA, A. (2005): Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58, 1255-1267.
23. CAMPANELLA, L., GATTA, T. and RAVERA, O. (2005): Relationship between anti-oxidant capacity and manganese accumulation in the soft tissue of two freshwater molluscs: *Unio pictorum mancus* (Lamellibranchia, Unionidae) and *Viviparus ater* (Gastropoda, Prosobranchia). *J. Limnol.* 64,153-158.
24. CANESI, L., VIARENGO, A., LEONZIO, C., FILIPPELLI, M. and GALLO, G. (1999): Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67-76.
25. CASAS, S., GONZALEZ, J.L., ANDRAL, B. and COSSA, D. (2008): Relation between concentration in water and metal content in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*): impact of physiology. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1543-1552.
26. CHANDRAN, R., SIVAKUMAR, A.A., MOHANDASS, S. and ARUCHAMI, M. (2005): Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comp. Biochem. Phys. C* 140, 422-426.
27. CHEUNG, C.C.C., ZHENG, G.J., LAM, P.K.S. and RICHARDSON, B.J. (2002): Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 181-191.
28. CHEUNG, C.C., ZHENG, G.J., LI, A.M., RICHARDSON, B.J. and LAM, P.K. (2001): Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 52, 189-203.
29. CHRISTOPHER, B., NDOME, U.B., EKALUO, F.E. and ASUQUO, A.E. (2010): Comparative bioaccumulation of heavy metals (Fe, Mn, Zn, Cu, Cd and Cr) by some edible aquatic mollusks from the Atlantic coastline of South Eastern Nigeria. *World J. Fish Mar. Sci.* 2, 317-321.
30. CLAIBORNE, A. (1984): Catalase activity. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (Ed. Greenwald, R.A.), CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 283-284.

31. COETZEE, L., DU PREEZ, H.H. and VAN VUREN, J.H.J. (2002): Metal concentrations in *Clarias gariepinus* and *Labeo umbratus* from the Olifants and Klein Olifants River, Mpumalanga, South Africa: Zinc, copper, manganese, lead, chromium, nickel, aluminium and iron. *Water SA*. 28, 433-448.
32. COSSU, C., DOYOTTE, A., BABUT, M., EXINGER, A. and VASSEUR, P. (2000): Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotox. Environ. Safe*. 45, 106-121.
33. COSSU C., DOYOTTE, A., JACQUIN, M.C., BABUT, M., EXINGER, A. and VASSEUR, P. (1997): Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotox. Environ. Safe*. 38, 122-131.
34. DARLINGTON, R.B., WEINBERG, S. and WALBERG, H. (1973): Canonical variate analysis and related techniques. *Rev. Educ. Res*. 43, 433-454.
35. DAUBERSCHMIDT, C., DIETRICH, D.R. and SCHLATTER, C. (1997): Investigations on the biotransformation capacity of organophosphates in the mollusc *Dreissena polymorpha* P. *Aquat. Toxicol*. 37, 283-294.
36. DE ALMEIDA, E.A., BAINY, A.C.D., DE MELO LOUREIRO, A.P., MARTINEZ, G.R., MIYAMOTO, S., ONUKI, J., BARBOSA, L.F., GARSIA, C.C.M., PRADO, F.M., RONSEIN, G.E., SIGOLO, C.A., BROCHINI, C.B., MARTINS, A.M.G., DE MEDEIROS, M.H.G. and DI MASCIO, P. (2007): Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Phys. A* 146, 588-600.
37. DE LUCA-ABBOTT, S.B., RICHARDSON, B.J., MCCLELLAN, K.E., ZHENG, G.J., MARTIN, M. and LAM, P.K.S. (2005): Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. *Mar. Pollut. Bull*. 51, 694-707.

38. DESPOTOVIĆ, S.G., PERENDIJA, B.R., GAVRIĆ, J.P., BORKOVIĆ-MITIĆ, S.S., PAUNOVIĆ, M.M., PAVLOVIĆ, S.Z. and SAIČIĆ, Z.S. (2012): Seasonal changes in oxidative stress biomarkers of the snail *Viviparus acerosus* from the Velika Morava River, Serbia. Arch. Biol. Sci., Belgrade 64, 953-962.
39. DE WAZIERS, I. and ALBRECHT, R. (1987): The effects of vitamine A nutritional status on glutathione, glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in rat intestine. Experientia 43, 394-395.
40. DE ZWART, D. (1995): Monitoring water quality in the future, Volume 3: Biomonitoring. National Institute for Public Health and Environmental Protection (RIVM), Bilthoven, The Netherlands, pp. 1-81.
41. DE ZWART, L.L., MEERMAN, J.H.N., COMMANDEUR, J.N.M. and VERMEULEN, N.P.E. (1999): Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans. Free Rad. Biol. Med. 26, 202-226.
42. DICKINSON, D.A. and FORMAN, H.J. (2002): Cellular glutathione and tiols metabolism. Biochem. Pharmacol. 64, 1019-1026.
43. DIGIULIO, R. T., HABIG, C. and GALLAGHER, E. P. (1993): Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. Aquat. Toxicol. 26, 1-22.
44. DINNEEN, L.C. and BLAKESLEY, B.C. (1973): A generator for the sampling distribution of the Mann Whitney U statistic. Appl. Stat. 22, 269-273.
45. DOUCET-BEAUPRÉ, H., DUBÉ, C., BRETON, S., PÖRTNER, H.O. and BLIER, P.U. (2010): Thermal sensitivity of metabolic enzymes in subarctic and temperate freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida). J. Therm. Biol. 35, 11-20.
46. DOYOTTE, A., COSSU, C., JACQUIN, M.C., BABUT, M. and VASSEUR, P. (1997): Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat. Toxicol. 39, 93-110.

47. DUPONT, C.L., NEUPANE, K., SHEARER, J. and PALENIK, B. (2008): Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. *Environ. Microbiol.* 10, 1831-1843.
48. DYRYNDA, E.A., PIPE, R.K., BURT, G.R. and RATCLIFFE, N.A. (1998): Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquat. Toxicol.* 42, 169-185.
49. FAIRBROTHER, P., WILLIAMS, G., BARTON, R., GIBELLIERI, E. and TROPEOLI, A. (2007): Unions facing the future: questions and possibilities. *Labor. Studies J.* 31, 31-53.
50. FARIA, M., HUERTAS, D., SOTO, D.X., GRIMALT, J.O., CATALAN, J. RIVA, M.C. and BARATA, C. (2010): Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* 78, 232-240.
51. FIDALEO, M. (2010): Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62, 615-625.
52. FITZPATRICK, P.J., O'HALLORAN, J., SHEEHAN, D. and WALSH, A.R. (1997): Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.), as potential organic pollution biomarkers. *Biomarkers* 2, 51-56.
53. FOECKLER, F., DEICHNER, O., SCHMIDT, H. and CASTELLA, E. (2006): Suitability of Molluscs as bioindicators for meadow- and flood-channels of the Elbe-floodplains. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 91, 314-325.
54. FRENZILLI, G., BOCCHETTI, R., PAGLIARECCI, M., NIGRO, M., ANNARUMMA, F., SCARCELLI, V., FATTORINI, D. and REGOLI, F. (2004): Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Mar. Environ. Res.* 58, 609-613.
55. GERET, F., SERAFIM, A. and BEBIANNO, M.J. (2003): Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicology* 12, 417-426.

56. GLATZLE, D., VULLIEMUIER, J.P., WEBER, F. and DECKER, K. (1974):
Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the
assesment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 30, 665-667.
57. GOLDBERG, E.D. and BERTINE, K.K. (2000): Beyond the mussel watch-new
directions for monitoring marine pollution. *Sci. Total Environ.* 247, 165-
174.
58. GRAVATO, C., OLIVEIRA, M. and SANTOS, M.A. (2005): Oxidative stress
and genotoxic responses to resin acids in Mediterranean mussels.
Ecotoxicol. Environ. Saf. 61, 221-229.
59. GRIFFITH, O.W. (1980): Determination of glutathione and glutathione disulfide
using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-
212.
60. GRIFFITH, O.W. (1999): Biologic and pharmacologic regulation of mammalian
glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 922-935.
61. GUNDACKER, C. (2000): Comparison of heavy metal bioaccumulation in
freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna. *Environ. Pollut.* 110,
61-71.
62. GUNDACKER, C. (1999): Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn)
deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena*
polymorpha Pallas. *Chemosphere* 38, 3339-3356.
63. GUST, M., FORTIER, M., GARRIC, J., FOURNIER, M. and GAGNÉ, F. (2013):
Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to
the snail *Lymnea stagnalis*. *Aquat. Toxicol.* 126, 393-403.
64. HABIG, W.H., PUBST, M.J. and JAKOBY, W.B. (1974): Glutathione S-
transferase. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
65. HALLIWELL B. and GUTTERIDGE, J. M. C. (2007): *Free Radicals in Biology
and Medicine*. 4th ed. Oxford University Press Inc., New York, USA.
66. HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. (1999): *Free Radicals in Biology
and Medicine*, Third edition, Oxford University Press Inc., New York, USA.

67. HALUŠKOVÁ, L., VALENTOVIČEVÁ, K., HUTTOVÁ, J., MISTRÍK, I. and TAMÁS, L. (2009): Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 1069-1074.
68. HAMED, M.A. and EMARA, A.M. (2006): Marine molluscs as biomonitors for heavy metal levels in the Gulf of Suez, Red Sea. *J. Mar. Syst.* 60, 220-234.
69. HAMED, R.R., FARID, N.M., ELOWA, S.H.E. and ABDALLA, A.M. (2003): Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. *Environmentalist* 23, 313-322.
70. HAYES, J.D. and PULFORD, D.J. (1995): The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600.
71. HAYES, J.D., FLANAGAN, J.U. and JOWSEY, I.R. (2005): Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
72. HECK, D.E., VETRANO, A.M., MARIANO, T.M. and LASKIN, J.D. (2003): UVB light stimulates production of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 278, 22432-22436.
73. HERMES-LIMA, M., STOREY, J.M. and STOREY, K.B. (2001): Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. *Cell Mol. Respon. Stress* 2, 263-287.
74. HERUT, B., SHOHAM-FRIDER, E., KRESS, N., FIEDLER, U. and ANGEL, D.L. (1998): Hydrogen peroxide production rates in clean and polluted coastal marine waters of the Mediterranean, Red and Baltic Seas. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 994-1003.
75. HIGH, K.A., BARTHET, V.J., MCLAREN, J.W. and BLAIS, J.S. (1997): Characterization of metallothionein-like proteins from zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1111-1118.
76. HOARAU P., DAMIENS, G., ROMÉO, M., GNASSIA-BARELLI, M. and BEBIANNO, M.J. (2006): Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comp. Biochem. Phys. C* 143, 196-203.

77. JAKUBIK, B. (2006): Reproductive pattern of *Viviparus viviparus* (Linnaeus 1758) (Gastropoda, Viviparidae) from littoral aggregations in through-flow reservoir (Central Poland). *Pol. J. Ecol.* 54, 39-55.
78. JARIĆ, I., VIŠNJIĆ-JEFTIĆ, Ž., CVIJANOVIĆ, G., GAČIĆ, Z., JOVANOVIĆ, LJ., SKORIĆ, S. and LENHARDT, M. (2011): Determination of differential metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of starlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchem. J.* 98, 77-81.
79. KIDD, P.M. (1997): Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern. Med. Rev.* 2, 155-176.
80. KONISHI, T., KATO, K., ARAKI, T., SHIRAKI, K., TAKAGI, M. and TAMARU, Y. (2005): A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochem. J.* 388, 299-307.
81. KRISTOFF, G., VERRENGIA GUERRERO, N.R. and COCHÓN, A.C. (2008): Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Chemosphere* 72, 1333-1339.
82. KRIZAN, J. and VOJINOVIC-MILORADOV, M. (1997): Water quality of Yugoslav Rivers (1991-1995). *Wat. Res.* 31, 2914-2917.
83. KRUIDENIER, L. and VERSPAGET, H.W. (2002): Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1997-2015.
84. KRUNIC, M. (1994): *Zoologija Invertebrata, I deo*. Udžbenik, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, str 1-337.
85. KUMAR SINGH, R., CHAVAN, S.L. and SAPKALE, P.H. (2007): Heavy metal concentrations in water, sediments and body tissues of red worm (*Tubifex* sp.) collected from natural habitats in Mumbai, India. *Environ. Monit. Assess.* 129, 471-481.
86. KUROSHIMA, R. (1995): Hepatic metallothionein and glutathione levels in Red Sea bream. *Comp. Biochem. Phys. C* 110, 95-100.

87. LABIENIEC, M. and GABRYELAK, T. (2007): Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H₂O₂ or Cu²⁺ ions. *Toxicol. in vitro* 21, 146-156.
88. LAM, P.K.S. (2009): Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean. Coast. Manage.* 52, 348-354.
89. LAVARÍAS, S., HERAS, H., PEDRINI, N., TOURNIER, H. and ANSALDO, M. (2011): Antioxidant response and oxidative stress levels in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to the water-soluble fraction of petroleum. *Comp. Biochem. Phys. C* 153, 415-421.
90. LAZAREVIĆ, M., MILOVANOVIĆ, D., SIMONOVIĆ, P., SIMIĆ, V., SIMIĆ, S., CAKIĆ, P. and PAUNOVIĆ, M. (2010): Introduction, Chapter 1, In: *The Danube in Serbia* (P. Simonović, V. Simić, S. Simić, M. Paunović, editors), Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management - Republic Directorate for Water, University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, University of Kragujevac, Faculty of Science, p.p. 15-30.
91. LECH, J.J. and VODICNIK, M.J. (1985): Biotransformation. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications* (Eds. Rand, G.M. and Petrocelli, S.R.), Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, p.p. 526-557.
92. LEINIÖ, S. and LEHTONEN, K.K. (2005): Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comp. Biochem. Phys. C* 140, 408-421.
93. LENARTOVA, V., HOLOVSKA, K., PEDRAJAS, J.R., MARTINEZLARA, E., PEINADO, J., LOPEZBAREA, J., ROSIVAL, I. and KOSUTH, P. (1997): Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers* 2, 247-252.
94. LI, L., ZHENG, B. and LIU, L. (2010): Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia Environ. Sci.* 2, 1510-1524.

95. LI, X., LIN, L., LUAN, T., YANG, L. and LAN, C. (2008): Effects of landfill leachate effluent and bisphenol A on glutathione and glutathione-related enzymes in the gills and digestive glands of the freshwater snail *Bellamya purificata*. *Chemosphere* 70, 1903-1909.
96. LIMA, I., MOREIRA, S.M., OSTEN, J.R., SOARES, A.M. and GUILHERMINO, L. (2007): Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. *Chemosphere* 66, 1230-1242.
97. LIONETTO, M.G., CARICATO, R., GIORDANO, M.E., PASCARIELLO, M.F., MARINOSCI, L. and SCHETTINO, T. (2003): Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mulus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar. Poll. Bull.* 46, 324-330.
98. LIU, B., YU, Z., SONG, X. and YANG, F. (2010): Effects of sodium dodecylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate on the *Mytilus galloprovincialis* biomarker system. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 835-841.
99. LIVINGSTONE, D.R. (2001): Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
100. LIVINGSTONE, D.R. (1990): Oxyradical production as pollution-mediated mechanisms of toxicity in the common mussels, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Funct. Ecol.* 4, 415-424.
101. LIVINGSTONE, D.R., LEMAIRE, P., MATTHEWS, A.A., PETERS, L., PORTE C., FITZPATRICK, P.J., FÖRLIN, L., NASCI, C., FOSSATO, V., WOOTON, N. and GOLDFARB, P. (1995): Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*Zostericessor ophiocephalus*) and mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice lagoon, Italy: biochemical studies. *Mar. Environ. Res.* 39, 235-240.
102. LIVINGSTONE, D., LIPS, F., MARTINEZ, P. and PIPE, R. (1992): Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). *Mar. Biol.* 112, 265-276.

103. LIVINGSTONE, D.R., MARTINEZ, P.G. and WINSTON, G.W. (1989): Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 15, 213-236.
104. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.L., FARR, A.L. and RANDALL, R.I. (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
105. LUSHCHAK, V.I. (2011): Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30.
106. LUSHCHAK, V.I. and BAGNYUKOVA, T.V. (2006): Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp. Biochem. Phys. B* 144, 283-289.
107. LUSHCHAK, V.I., BAGNYUKOVA, T.V., HUSAK, V.V., LUZHNA, L.I., LUSHCHAK, O.V. and STOREY, K.B. (2005): Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1670-1680.
108. MA, T., SHUANGJIAO, G., ZHOU, K., ZHU, C., DENG, K., LUO, Q. and WANG, Z. (2010): Laboratory culture of the freshwater benthic gastropod *Bellamya aeruginosa* (Reeve) and its utility as a test species for sediment toxicity. *J. Environ. Sci.* 22, 304-313.
109. MAHMOUD, N., DELLALI, M., EL BOUR, M., AISSA, P. and MAHMOUDI, E. (2010): The use of *Fulvia fragilis* (Mollusca: Cardiidae) in the biomonitoring of Bizerta lagoon: A multimarkers approach. *Ecol. Indic.* 10, 696-702.
110. MALMQVIST, B. and RUNDLE, S. (2002): Threats to the running water ecosystems of the world. *Environ. Conserv.* 29, 134-153.
111. MANDUZIO, H., ROCHER, B., DURAND, F., GALAP, C. and LEBOULENGER, F. (2005): The point about oxidative stress in molluscs. *I.S.J.* 2, 91-104.
112. MANDUZIO, H., MONSINJON, T., ROSHER, B., LEBOULENGER, F. and GALAP, C. (2003): Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 64, 73-83.

113. MATOVIĆ, V., PLAMENAC-BULAT, Z. i ĐUKIĆ, D. (2004): Uticaj povećanog unošenja kadmijuma na antioksidativni zaštitni sistem. Jugoslov. Med. Biohem. 23, 117-126.
114. MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1972): The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 247, 3170-3175.
115. MUNDAY, R. and WINTERBOURN, C.C. (1989): Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. Biochem. Pharmacol. 38, 4349-4352.
116. NASCI, C., DA ROS, L., NESTO, N., SPERNI, L., PASSARINI, F. and PAVONI, B. (2000): Biochemical and histochemical responses to environmental contaminants in clam, *Tapes philippinarum*, transplanted to different polluted areas of Venice lagoon, Italy. Mar. Environ. Res. 50, 425-430.
117. NIKI, E. (2000): Oxidative stress and ageing. Internal Med. 39, 324-326.
118. NIYOGLI, S., BISWAS, S., SARKER, S. and DATTA, A.G. (2001): Antioxidant enzymes in brackish water oyster, *Saccostrea cuculata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. Sci. Total. Environ. 281, 237-246.
119. OEHLMANN, J. and SCHULTE-OEHLMANN, U. (2003): Molluscs as bioindicators, Chapter 17, In: Bioindicators and Biomonitoring (B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors), Elsevier Science, Amsterdam, p.p. 577-635.
120. OKADO-MATSUMOTO, A. and FRIDOVICH, I. (2001): Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. J. Biol. Chem. 276, 38388-38393.
121. ORBEA, A., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., SOLE, M., PORTE, C. and CAJARAVILLE, M. (2002): Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalvia molluscs, crabs and fish from Urdiabai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). Aquat. Toxicol. 58, 75-98.

122. OSBURN, W.O. and KENSLER, T.W. (2008): Nrf2 signaling: An adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat. Res.* 659, 31-39.
123. OSMAN, A.M., VAN DEN HEUVEL, H. and VAN NOORT, P.C.M. (2007): Differential responses of biomarkers in tissues of a freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, to the exposure of sediment extracts with different levels of contamination. *J. Appl. Toxicol.* 27, 51-59.
124. PARK H., AHN, I.Y., KIM, H., LEE, J. and SHIN, S.C. (2009): Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. *Comp. Biochem. Phys. C* 150, 528-536.
125. PATEL, B., CHANDY, J.P. and PATEL, S. (1990): Effect of mercury, selenium and glutathione on sulphhydryl levels and glutathione reductase in blood clam *Anadara granosa* (L.). *Indian J. Mar. Sci.* 19, 187-190.
126. PAVLOVIĆ, S.Z., BELIĆ, D., BLAGOJEVIĆ, D.P., RADOJIČIĆ, R.M., ŽIKIĆ, R. V., SAIČIĆ, Z.S., GRUBOR-LAJŠIĆ, G. and SPASIĆ, M.B. (2004): Seasonal variations of cytosolic antioxidant enzyme activities in the liver and white muscle of thinlip gray mullet (*Liza ramada* Risso) from the Adriatic Sea. *CryoLetters* 25, 273-285.
127. PAUNOVIĆ, M., CSÁNYI, B., SIMIĆ, V., STOJANOVIĆ, B. and CAKIĆ, P. (2006): Distribution of *Anodonta* (*Sinanodonta*) *woodiana* (Rea, 1834) in inland waters of Serbia. *Aquatic Invasions* 1, 154-160.
128. PEAKALL, D.W. (1994): Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1, 55-60.
129. PERENDIJA, B.R., BORKOVIĆ, S.S., KOVAČEVIĆ, T.B., PAVLOVIĆ, S.Z., STOJANOVIĆ, B.D., PAUNOVIĆ, M.M., CAKIĆ, P.D., RADOJIČIĆ, R.M., PAJOVIĆ, S.B. and SAIČIĆ, Z.S. (2007): Glutathione dependent enzyme activities in the foot of three freshwater mussel species in the Sava River, Serbia. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 59, 169-175.
130. PERENDIJA, B.R. (2012): Parametri antioksidacione zaštite u tkivima nekih vrsta slatkovodnih riba iz jezera Gruža. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija, str. 212.

131. PHILLIPS, D.J.H. (1990): Furness RW and rainbow. In: Walsh PM (ed) Metals in the Marine Environment. CRC Press, Florida, pp. 81-99.
132. REGOLI, F. and PRINCIPATO, G. (1995): Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143-164.
133. REGOLI, F., GORBI, S., FRENZILLI, G., NIGRO, M., CORSI, I., FOCARDI, S. and WINSTON, G.W. (2002): Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 54, 419-423.
134. REGOLI, F., HUMMEL, H., AMIRAD-TRIQUET, C., LARROUX, C. and SUKHOTIN, A. (1998): Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 594-601.
135. REID, D.J. and MACFARLANE, G.R. (2003): Potential biomarkers of crude oil exposure in the gastropod mollusc, *Austrocochlea porcata*: laboratory and manipulative field studies. *Environ. Pollut.* 126, 147-155.
136. REN, Q., SUN, R.R., ZHAO, X.F. and WANG, J.X. (2009): A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S-transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Comp. Biochem. Phys. C* 149, 613-623.
137. RHMZ (2011): Hidrološki godišnjak. Izveštaj o kvalitetu voda 2010. Republički hidrometeorološki zavod, Republika Srbija.
138. RITOLA, O., TOSSAVAINEN, K., KIURU, T., LINDSTRÖM-SEPPÄ, P. and MÖLSÄ, H. (2002): Effects of continuous and episodic hyperoxia on stress and hepatic glutathione levels in one-summer-old rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichtyol.* 18, 159-164.
139. RONISZ, D., JOAKIM LARSSON, D.G. and FÖRLIN, L. (1999): Seasonal variation in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comp. Biochem. Phys. C* 124, 271-279.

140. ROSSI, M.A., CECCHINI, G. and DIANZANI, M.M. (1983): Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase in two different hepatomas and in normal liver. *IRCS Med. Sci. Biochem.* 11, 805.
141. SAKAN, S., ĐORĐEVIĆ, D., DEVIĆ, G., RELIĆ, D., ANĐELKOVIĆ, I. and ĐURIČIĆ, J. (2011): A study of trace element contamination in river sediments in Serbia using microwave-assisted *aqua regia* digestion and multivariate statistical analysis. *Microchem. J.* 99, 492-502.
142. SAMARDŽIĆ, M. (2013): Vremensko i prostorno rasprostiranje zagađivača u slivu Velike Morave. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Srbija.
143. SANTOVITO, G., PICCINI, E., CASSINI, A., IRATO, P. and ALBERGONI, V. (2005): Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Phys. C* 140, 321-329.
144. SCANDALIOS, J.G. (2005): Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.
145. SHEEHAN, D. and POWER, A. (1999): Effects of seasonality on xenobiotics and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusks. *Comp. Biochem. Phys. C* 123, 193-199.
146. SHEEHAN, D., MCINTOSH, J., POWER, A. and FITZPATRICK, P.J. (1995): Drug metabolizing enzymes of mussels as bioindicators of chemical pollution. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 419-422.
147. SHULKIN, V.M., PRESLEY, B.J. and KAVUN, V.I. (2003): Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environ. Int.* 29, 493-502.
148. SIES, H. (1993): Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219.

149. SOLÉ, M., KOPECKA, J. and GARCÍA DE LA PARRA, L.M. (2006): Seasonal variations of selected biomarkers in sand gobies *Pomatoschistus minutus* from Guadalquivir estuary, Southwest Spain. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 50, 249-255.
150. SOLÉ, M., PORTE, C. and ALBAIGÉS, J. (1994): Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. Aquat. Toxicol. 30, 271-283.
151. SPEERS-ROESH, B. and BALLANTYNE, J.S. (2005): Activities of antioxidant enzymes and cytochrom c oxidase in liver of arctic and temperate teleosts. Comp. Biochem. Phys. A 140, 487-494.
152. STADTMAN, E.R. and LEVINE, R.L. (2000): Protein oxidation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 899, 191-208.
153. STADTMAN, E.R., OLIVER, C.N. and STARKE-REED, P.E. (1991): Implication of metal-catalyzed oxidation of enzymes in aging, protein turnover, and oxygen toxicity. Korean J. Biochem. 23, 49-54.
154. SUTER, G.W. H. (1993): Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl, USA.
155. ŠTAJN, A.Š., ŽIKIĆ, R.V. i SAIČIĆ, Z.S. (2007): Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja. Udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, str. 1-449.
156. TAKADA, Y., NOGUCHI, T. and KAYIYAMA, M. (1982): Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. Cancer Res. 42, 4233-4235.
157. TAMURA, M., OSCHINO, N. and CHANCE, B. (1982): Some characteristics of hydrogen and alkyl-hydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. J. Biochem. 92, 1019-1031.
158. TANDOĞAN, B. and ULUSU, N.N. (2006): Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. FABAD J. Pharm. Sci. 31, 230-237.

159. TOMOVIĆ, J., VRANKOVIĆ, J., TUBIĆ, B., BORKOVIĆ MITIĆ, S., PAVLOVIĆ, S., SAIČIĆ, Z. and PAUNOVIĆ, M. (2010): Malakofauna of the Serbian stretch of the Danube River and studied tributaries (The Tisa, Sava and Velika Morava), Chapter 12, In: The Danube in Serbia (P. Simonović, V. Simić, S. Simić, M. Paunović, editors), Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management - Republic Directorate for Water, University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, University of Kragujevac, Faculty of Science, p.p. 207-224.
160. TORRES, M.A., TESTA, C.P., GÁSPARI, C., MASUTTI, M.B., PANTIZ, C.M., CURI-PEDROSA, R., DE ALMEIDA, E.A., DI MASCIO, P. and FILHO, D.W. (2002): Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 923-932.
161. URSINI, F., MAIORINO, M., BRIGELIUS-FLOHÉ, R., AUMANN, K.D., ROVERI, A., SCHOMBURG, D. and FLOHÉ, L. (1995): Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* 252, 38-53.
162. USERO, J., MORILLO, J. and GRACIA, I. (2005): Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere* 59, 1175-1181.
163. VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M. and TELSER, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.
164. VALKO, M., MORRIS, H. and CRONIN, M.T.D. (2005): Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.
165. VAN DER OOST, R., BEYER, J. and VERMEULEN, N. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
166. VAN GESTEL, C.A.M. and VAN BRUMMELEN, T.C. (1996): Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.

167. VASILJEVIĆ, M. (2010): Results of physical and chemical analyses of water and sediment in the Danube River and observed tributaries, Chapter 8, In: The Danube in Serbia (P. Simonović, V. Simić, S. Simić, M. Paunović, editors), Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management - Republic Directorate for Water, University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, University of Kragujevac, Faculty of Science, p.p. 111-138.
168. VIARENGO, A. (1989): Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Rev. Aquat. Sci.* 1, 295-317.
169. VIARENGO, A., PONZANO, E., DONDERO, F. and FABBRI, R. (1997): A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69-84.
170. VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M., POLI, G., MOORE, M.N. and ORUNESU, M. (1990): Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Phys. C* 97, 37-42.
171. VIARENGO, A., PALMERO, S., ZANICCHI, G., CAPELLI, R., VAISSIERE, R. and ORUNESU, M. (1985): Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *Mar. Environ. Res.* 16, 23-36.
172. VIDAL, M.L., BASSÈRES, A. and NARBONNE J.F. (2002): Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). *Comp. Biochem. Phys. C* 131, 133-151.
173. VLYSSIDES, A.G. and ISRAILIDES, C.J. (1997): Detoxification of tannery waste liquors with an electrolysis system. *Environ. Poll.* 97, 147-152.
174. VRANKOVIĆ, J., LABUS-BLAGOJEVIĆ, S., CSANYI, B., MAKOVINSKA, J., CVETKOVIĆ, O., GAČIĆ, Z., BLAGOJEVIĆ, D. and PAUNOVIĆ, M. (2012): Antioxidant enzymes and GST activity in natural populations of *Holandriana holandrii* from the Bosna River. *Turk. J. Biol.* 36, 477-485.
175. WANG, W. and BALLATORI, N. (1998): Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50, 335-355.

176. WANG, Y., LIANG, L., SHI, J. and JIANG, G. (2005): Study on the contamination of heavy metals and their correlations in mollusks collected from coastal sites along the Chinese Bohai Sea. *Environ. Int.* 31, 1103-1113.
177. WAYKAR, B. and DESHMUKH, G. (2012): Evaluation of bivalves as bioindicators of metal pollution in freshwater. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 48-53.
178. WHO INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - IPCS (1993): Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
179. WILBRINK, M., GROOT, E.J., JANSEN, R., DE VRIES, Y. and VERMEULEN, N.P.E. (1991): Occurrence of a cytochrome P-450-containing mixed-function oxidase system in the pond snail, *Lymnea stagnalis*. *Xenobiotica* 21, 223-233.
180. XIE, L., FLIPPIN, J.L., DEIGHTON, N., FUNK, D.H., DICKEY, D.A. and BUCHWALTER, D.B. (2009): Mercury(II) bioaccumulation and antioxidant physiology in four aquatic insects. *Environ. Sci. Technol.* 43, 934-940.
181. YAP, C.K., EDWARD, F.B. and TAN, S.G. (2010): Similarities and differences of metal distributions in the tissues of mollusks by using multivariate analyses. *Environ. Monit. Assess.* 165, 39-53.
182. ZHANG, Y., SONG, J., YUAN, H., XU, Y., HE, Z. and DUAN, L. (2010): Biomarker responses in the bivalve (*Chlamys farreri*) to exposure of the environmentally relevant concentrations of lead, mercury, copper. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30, 19-25.
183. ŽIKIĆ, R.V., ŠTAJN, A.Š., OGNJANOVIĆ, B.I., PAVLOVIĆ, S.Z. and SAIČIĆ, Z.S. (1997): Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and transaminases in the plasma of carps (*Cyprinus carpio* L.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.* 46, 391-396.
184. ŽIKIĆ, R.V., ŠTAJN, A.Š., SAIČIĆ, Z.S., SPASIĆ, M.B. i MILOVANOVIĆ, S.R. (2000): Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Monografija, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 1-150.

BIOGRAFIJA AUTORA



Svetlana G. Despotović, istraživač saradnik, rođena je 24.10.1978. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu. Diplomirala je 2007. godine na Biološkom fakultetu u Beogradu (studijska grupa Biologija), sa prosečnom ocenom 9.36. Diplomski rad pod nazivom „Koncentracija glutaciona u nekim tkivima mreke (*Barbus barbus*)“ uradila je u Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. Školske 2007./2008. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija, modul Fiziologija stresa i adaptacija. Od 2007. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 2008. godine, a reizabrana 2011. godine.

Od 2007. do 2010. godine bila je angažovana na projektu 143035B „Proučavanje poremećaja homeostaze i određivanje biomarkera oksidacionog stresa kod aerobnih organizama” finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U tekućem periodu od 2011. do 2014. godine angažovana je na projektu 173041 „Molekularno fiziološki biomonitoring aerobnih organizama zasnovan na određivanju biohemijskih biomarkera oksidacionog stresa“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je u Odeljenju za fiziologiju pod mentorstvom Dr Slađana Z. Pavlovića, višeg naučnog saradnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.

Do sada je objavila 26 bibliografskih jedinica: 12 naučnih radova u međunarodnim časopisima, jedno poglavlje u istaknutoj monografiji nacionalnog značaja, 4 kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 9 kongresnih saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Prema Science Citation Index-u ima 11 citata.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Светлана Г. Деспотовић

број уписа Б3001/2007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Параметри антиоксидационог заштитног система и концентрација тешких метала
у висцералној маси одабраних врста пужева и шкољки

Дунава, Тисе и Велике Мораве“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 29.05.2013.

Светлана Деспотовић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Светлана Г. Деспотовић

Број уписа Б3001/2007

Студијски програм Анимална и хумана физиологија

Наслов рада „Параметри антиоксидационог заштитног система и концентрација тешких метала у висцералној маси одабраних врста пужева и шкољки Дунава, Тисе и Велике Мораве“

Ментори Виши научни сарадник др Слађан З. Павловић, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

Ванредни професор др Синиша Ђурашевић, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Потписани Светлана Г. Деспотовић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 29.05.2013.

Светлана Деспотовић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Параметри антиоксидационог заштитног система и концентрација тешких метала у висцералној маси одабраних врста пужева и шкољки

Дунава, Тисе и Велике Мораве“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 29.05.2013.

Светлана Јесичковић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.