



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



mr Danijela Kojić

**OTPORNOST NA NISKE TEMPERATURE I DEHIDRATACIJU
KUKURUZNOG PLAMENCA (*Ostrinia nubilalis* Hb)- ĆELIJSKI I
MOLEKULARNI ODGOVORI**

-Doktorska disertacija-

Novi Sad, 2009.

Veliku zahvalnost dugujem pre svega svome mentoru prof. dr Gordani Grubor-Lajšić, koja je rukovodila izradom ove teze. Zahvalnost joj dugujem i kao mentoru i kao prijatelju na pruženoj podršci i poverenju tokom svih ovih godina.

Takođe se zahvaljujem i dr Dušku Blagojeviću na pomoći oko obrade rezultata i korisnim sugestijama, kao i na bezrezervnoj podršci. Zahvaljujem se prof. dr Dušanu Stevanoviću na korisnim sugestijama tokom pisanja teze.

Kolegama iz laboratorije dr Jeleni Purać, Ani Blanuši, Elviri Pamer i Željku Popoviću dugujem posebnu zahvalnost. Jeleni se zahvaljujem na pomoći oko samih eksperimenata i beskonačnim konsultacijama, Ani na pomoći oko prikupljanja materijala na nezaboravnim terenima i laboratorijskog rada, Elviri na pomoći u laboratoriji i sugestijama tokom pisanja kao i Željku, na pomoći u laboratoriji, tehničkoj podršci i korisnim savetima.

Zahvalnost dugujem i : Dejanu Orčiću na pomoći oko gasno- hromatografske analize, Dragani Zec i dr Vesni Rajković na pomoći oko histološke obrade materijala, dr Franji Bača i njegovim saradnicima iz Instituta za kukuruz »Zemun Polje« kao i dr Vladi Beliću iz novosadskog Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo za obezbeđen biološki materijal.

Zahvaljujem se i prof. dr Radmili Kovačević na omogućenoj saradnji naše laboratorije sa NMR centrom u Birmingemu, Velika Britanija, gde je urađen metabolomički deo ovog doktorata pod vođstvom dr Ulrich Günther i dr Stefano Tiziani.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici – roditeljima i sestri na bezrezervnoj veri i podršci, suprugu i deci na podršci, strpljenju i beskrajnoj ljubavi bez koje bi sve bilo teže...

SADRŽAJ

I Uvod	1
II Opšti deo	4
1. Otpornost insekata na niske temperature	5
1.1. Insekti otporni na zamrzavanje	6
1.2. Insekti neotporni na zamrzavanje	7
1.3. Klasifikacija insekata prema otpornosti na hladnoću po Bale-u	10
1.4. Otpornost na hladnoću i dijapauza	11
2. Oksidativni stres i antioksidanti	15
2.1. Reaktivne vrste kiseonika u biološkim sistemima	17
2.2. Oksidativna oštećenja biomolekula	22
2.3. Antioksidativni sistem i antioksidanti	24
2.3.1. Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite	24
2.3.2. Neenzimski mehanizmi antioksidativne zaštite- antioksidanti malih molekulskih masa	28
2.3.2.1. Melanin- antioksidant ili prooksidant?	32
2.3.3. Regulacija ćelijske redoks homeostaze i redoks signaling	36
2.3.3.1. Vodonik peroksid kao sekundarni glasnik	39
3. Metabolomika	42
III Cilj istraživanja	49
IV Materijal i metode	51
1. Eksperimentalne životinje	52
2. Plan eksperimenta	55

3. Priprema uzorka	57
4. Određivanje ukupnih proteina	58
5. Određivanje slobodne i vezane vode diferencijalnim skenirajućim kalorimetrom	59
6. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	60
7. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	61
7.1. Određivanje aktivnosti Mn zavisne superoksid dismutaze (MnSOD)	63
8. Određivanje aktivnosti tirozinaze (TYR)	64
9. Određivanje koncentracije H ₂ O ₂	65
10. Citohemijska-Lili metoda za bojenje melanina	66
11. EPR spektroskopija	68
12. NMR analiza	69
13. Gasno-hromatografska analiza	70
14. Statistička obrada rezultata	72
V Rezultati	73
1. Kriobiološki parametri, sadržaj glicerola i trehaloze u hemolimfi i masnom telu gusenica kukuruznog plamenca, <i>Ostrinia nubilalis</i>	74
a) Sadržaj ukupne vode	75
b) Sadržaj slobodne vode	76
c) Sadržaj vezane vode	77
d) Tačka mržnjenja (SCP)	78
e) Tačka topljenja (MP)	79
f) Sadržaj glicerola	80
g) Sadržaj trehaloze	81

2. Sadržaj poliola i šećera u nedijapauzirajućim i dijavauzirajućim gusenicama kukuruznog plamenca, <i>Ostrinia nubilalis</i> , tokom dijavauze i izlaganja niskim temperaturama	85
A. Sadržaj poliola i šećera nedijapauzirajućih i dijavauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> tokom dijavauze	86
B. Sadržaj poliola i šećera dijavauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> tokom dijavauze pri izlaganju niskim temperaturama	87
a) Sadržaj glicerola	87
b) Sadržaj sorbitola	88
c) Sadržaj mio-inozitola	89
d) Sadržaj glukoze	90
e) Sadržaj fruktoze	91
f) Sadržaj trehaloze	92
3. Metabolomički (NMR) profil nedijapauzirajućih i dijavauzirajućih gusenica kukuruznog plamenca, <i>Ostrinia nubilalis</i> , pri izlaganju niskim temperaturama	95
4. Antioksidativni sistem zaštite nedijapauzirajućih i dijavauzirajućih gusenica kukuruznog plamenca, <i>Ostrinia nubilalis</i> , pri izlaganju niskim temperaturama	98
A. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite nedijapauzirajućih i dijavauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> tokom dijavauze	99
B. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite dijavauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> tokom dijavauze i izlaganja niskim temperaturama	100
a) Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD)	100
b) Aktivnost Cu,Zn zavisne superoksid dismutaze (CuZnSOD).....	102
c) Aktivnost Mn zavisne superoksid dismutaze (MnSOD).....	104
d) Sadržaj vodonik peroksida (H ₂ O ₂)	106
e) Aktivnost katalaze (CAT)	108
f) Aktivnost tirozinaze (TYR)	110

C. EPR spektroskopija dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilais</i> tokom dijapauze i izlaganja niskim temperaturama	113
D. Citohemijsko bojenje melanina dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izlaganih niskim temperaturama	116
VI Diskusija	117
1. Režim telesne vode, koncentracija glicerola i trehaloze	119
2. Sadržaj poliola i šećera	123
3. Metabolomički profil	128
4. Antioksidativni sistem zaštite	133
5. EPR spektri	137
VII Zaključci	139
VIII Literatura	144

LISTA ŠEMA

Šema 1. Osnovne karakteristike adaptacije dve glavne grupe insekata otpornih na hladnoću	9
Šema 2. Vremenska skala pojave i razvoja živog sveta na Zemlji.....	15
Šema 3. Produkcija reaktivnih čestica kiseonika i azota tokom ćelijskog metabolizma i antioksidativni sistem zaštite	32
Šema 4. Osnovni principi melanogeneze	35
Šema 5. Tiorredoksin i glutaredoksin ciklusi	38
Šema 6. Precepcija spin aktivnog jezgra u spoljašnjem magnetnom polju	45
Šema 7. Krive raspada slobodne indukcije, $s(t)$ NMR spektri i $s(v)$ NMR spektri koji se dobijaju Fourier-ovom transformacijom	46
Šema 8. Glavni putevi sinteze poliola	126

Šema 9.	Dominantni metabolički putevi kod nedijapuzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i>	129
Šema 10.	Dominantni metabolički putevi kod dijapuzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i>	131

LISTA SLIKA

Slika1	Stadijumi u razviću kukuruznog plamenca, <i>Ostrinia nubilalis</i>	53
Slika 2.	Preparati dijapuzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih različitim temperaturama bojeni na melanin	116

LISTA GRAFIKA

Grafik 1.	Sadržaj ukupne vode (g po g tkiva) u hemolimfi i masnom telu nedijapuzirajućih gusenica (ND) i dijapuzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> , izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE)	75
Grafik 2.	Sadržaj slobodne vode (g po g tkiva) u hemolimfi i masnom telu nedijapuzirajućih gusenica (ND) i dijapuzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> , izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE)	76
Grafik 3.	Sadržaj vezane vode (g po g tkiva) u hemolimfi i masnom telu nedijapuzirajućih gusenica (ND) i dijapuzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> , izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE)	77
Grafik 4	Tačka mržnjenja (SCP) hemolimfe i masnog tela nedijapuzirajućih gusenica (ND) i dijapuzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> , izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE)	78
Grafik 5.	Tačka topljenja (MP) hemolimfe i masnog tela nedijapuzirajućih gusenica (ND) i dijapuzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> , izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE)	79

Grafik 6.	Sadržaj glicerola u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> , izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE)	80
Grafik 7.	Sadržaj trehaloze u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> , izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE)	81
Grafik 8.	Sadržaj glicerola (mg po g telesne mase) dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD)	87
Grafik 9,	Sadržaj sorbitola (µg po g telesne mase) dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD)	88
Grafik 10	Sadržaj mio-inozitola (µg po g telesne mase) dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD)	89
Grafik 11.	Sadržaj glukoze (µg po g telesne mase) dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD).....	90
Grafik 12.	Sadržaj fruktoze (µg po g telesne mase) dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD)	91
Grafik 13.	Sadržaj trehaloze (mg po g telesne mase) dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD)	92
Grafik 14.	A. PCA skor i B. analiza po prvoj principalnoj komponenti (PC1) 1D HNMR spektra hidrofilnog ekstrakta hemolimfe nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih (D) gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C	96
Grafik 15.	A. PCA skor i B. analiza po prvoj principalnoj komponenti (PC1) 1D HNMR spektra hidrofilnog ekstrakta hemolimfe dijabauzirajućih (D) gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C	97
Grafik 16.	Aktivnost ukupne SOD u homogenatu celih dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijabauze.....	100

Grafik 17.	Aktivnost ukupne SOD u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze	101
Grafik 18.	Aktivnost CuZnSOD u homogenatu celih dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze	102
Grafik 19.	Aktivnost CuZnSOD u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze	103
Grafik 20.	Aktivnost MnSOD u homogenatu celih dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze	104
Grafik 21.	Aktivnost MnSOD u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze	105
Grafik 22.	Koncentracija H ₂ O ₂ u homogenatu celih dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze	106
Grafik 23.	Koncentracija H ₂ O ₂ u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze	107
Grafik 24.	Aktivnost katalaze u homogenatu celih dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze	108
Grafik 25.	Aktivnost katalaze u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze	109
Grafik 26.	Aktivnost tirozinaze u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze.....	110
Grafik 27.	EPR spektar dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> u periodu sredine dijapauze pri različitim temperaturnim tretmanima	113
Grafik 28.	EPR spektar dijapauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> u periodu kraja dijapauze pri različitim temperaturnim tretmanima	114

LISTA TABELA

Tabela 1.	Radikalni i neradikalni oblici reaktivnih vrsta kiseonika	17
Tabela 2.	Lista standarda korišćenih u gasno-hromatografskoj analizi – vreme eluiranja i specifični jonski fragmetni	71
Tabela 3.	Kriobiloški parametri dobijeni diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom, sadržaj glicerola i trehaloze nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih spoljašnjim (DS) i temperaturama ispod nule, -8°C (DE), u uzorcima hemolimfe (H) i masnog tela (MT)	82
Tabela 4.	Dvofaktorska analiza varijanse ispitivanih parametara u masnom telu i hemolimfi nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi od -8°C (DE)	83
Tabela 5.	Sadržaj poliola i šećera u nedijapauzirajućim gusenicama (ND) i dijabauzirajućim gusenicama na 5°C sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD) ..	86
Tabela 6.	Sadržaj poliola i šećera kod dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od -3 °C i -16 °C, sredinom dijabauze (SD) i krajem (KD)	93
Tabela 7.	Dvofaktorska analiza varijanse za sadržaj poliola i šećera u dijabauzirajućim gusenicama <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5, -3 i -16°C, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD).....	94
Tabela 8.	Aktivnost enzima antioksidativne zaštite enzima u homogenatu nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijabauzirajućih gusenica na temperaturi od 5°C, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD)	99
Tabela 9.	Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatu gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD)	111
Tabela 10.	Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti antioksidativnih enzima u masnom telu gusenica <i>O.nubilalis</i> izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C, sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD)	112
Tabela 11.	Parametri antioksidativnog sistema zaštite dijabauzirajućih gusenica <i>O.nubilalis</i> sredinom i krajem dijabauze, pri različitim temperaturnim tretmanima	115

I Uvod

Održanje homeostaze, kao usklađenost velikog broja biohemijskih reakcija i fizičko-hemijskih procesa u živim sistemima, pri uslovima fluktuirajuće spoljašnje sredine, osnovni je preduslov života. U takvim uslovima opstanak je zagarantovan samo pravilnim i pravovremenim odgovorom na trenutne zahteve sredine. U vezi sa tim živa bića su razvila veliki broj regulatornih mehanizama koji im omogućavaju normalno funkcionisanje u širokom opsegu uslova okruženja. U osnovi ovih mehanizama leži stalna komunikacija sa sredinom, međucelijska komunikacija signalnim molekulima i na kraju adekvatan odgovor, kako na nivou celog organizma, tako i na nivou pojedinačnih ćelija.

Međutim, kao veliki izazov, ipak se smatra život u ekstremnim uslovima sredine, poput niske i visoke temperature, visokog pritiska, anoksije, ograničene dostupnosti hrane, visoke koncentracije soli. Različiti organizmi imaju i različita rešenja. Svakako invertrebrati poseduju najširi spektar različitih adaptacija. Neki od njih uđu u stanje hipobioze, stanje smanjene metaboličke aktivnosti, dok se drugi jednostavno odsele na prihvatljivija staništa.

Iako postoji veliki broj studija o mehanizmima adaptacije, još uvek je nejasno koji momenat je okidač za čitav sled adaptivnih procesa. Jedan, do sada uočenih zajedničkih momenata kod svih tipova adaptacija je oksidativni stres i procesi u vezi sa homeostazom vode.

Iz tog razloga, danas je veliki broj istraživanja usmeren na moguću ulogu reaktivnih kiseoničnih vrsta kao primarnih signalnih molekula u adaptivnim procesima, posebno jer je reč o malim i lako difuzibilnim molekulima, kao H_2O_2 .

Upravljanje telesnom vodom je još jedan zajednički momenat ovih homeostatskih održavanja. Voda je osnovna komponenta svih živih sistema. Ona predstavlja sredinu u kojoj se odigravaju svi metabolički procesi, ali je neophodna i za održavanje strukture makromolekula i makromolekulskih struktura. Većina organizama može da preživi samo usko kolebanje ukupnog sadržaja vode. Posebno su izraženi ovi problemi u uslovima niskih temperatura, gde kao stalna pretnja postoji moguće formiranje leda, i kao posledica dehidracija.

U razumevanju svih ovih procesa sve je značajnije mesto jedne nove discipline-metabolomike. Razvoj metabolomike, kao katalogizacije i kvantifikacije mnoštva malih molekula u biološkim

sistemima izloženim različitim uticajima je omogućen postojanjem moćnih analitičkih metoda, pre svega nuklearne magnetne rezonance (NMR) i gasno-tečne hromatografije. Proučavanje razlika u metaboličkim profilima vrsta otpornih na hladnoću u zavisnosti od temperature spoljašnje sredine pruža mogućnost uvida koji su to metaboliti bitni za samu adaptaciju i indirektno ukazuje i na same metaboličke procese bilo na njihovu aktivaciju ili depresiju.

U svetlu ovih najnovijih trendova u nauci pokušali smo da sagledamo i temu ove doktorske disertacije otpornost na niske temperature i dehidrataciju kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis*. Kao insekt umerenog klimatskog područja, *Ostrinia nubilalis* suočena je sa niskim temperaturama tokom zime. Niske temperature preživljava kao dijapauzirajuća gusenica otporna na zamrzavanje telesnih tečnosti. Dijapauza ove gusenice, kao jedno opšte stanje hipometabolizma, je zapravo vrlo dinamičan proces koji uključuje veliki broj adaptivnih mehanizama vezanih za otpornost na hladnoću. Letnja generacija ovih gusenica nije otporna na niske temperature. Od ranije uočene promene u antioksidativnom sistemu dijapauzirajućih gusenica izloženih niskim temperaturama, a sa druge strane brojne činjenice o regulatornoj ulozi reaktivnih vrsta kiseonika u mnogim procesima, dale su smernicu ovom radu. Uporednim praćenjem aktivnosti antioksidativnog sistema, nivoa H_2O_2 i melanin radikala (dijapauzirajućih jedinki izloženih niskim temperaturama), kao potencijalnih aktera u redoks signalingu, otvorena je nova dimenzija ove adaptacije. Rezultati ove teze su još jedna potvrda uloge ovih molekula u procesima adaptacije na niske temperature. Poređenjem metaboličkih profila nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih insekata izloženih niskim temperaturama istaknut je značaj pojedinih metabolita i metaboličkih procesa u ovoj adaptaciji.

II Opšti deo

1. Otpornost insekata na niske temperature

Insekti kao rasprostranjena grupa organizama, prisutna u svim klimatskim područjima, od tropskih do polarnih delova, razvila je veliki broj adaptivnih mehanizama na uslove spoljašnje sredine. Otpornost na niske temperature (cold hardiness, eng.) je karakteristika svih vrsta koje mogu da prežive temperature ispod nule u određenom periodu godine ili životnog ciklusa. Problem sa kojim se organizmi sreću pri niskim temperaturama je drastično smanjenje brzine hemijskih reakcija, a ispod određene temperature javlja se i problem zamrzavanja telesne vode. I pored postojanja širokog spektara adaptacija na niske temperature, insekti se tradicionalno svrstavaju u dve glavne grupe (Cannon and Blok, 1988; Duman et 1991b, Lee, 1991):

- *otporni na zamrzavanje telesnih tečnosti*- insekti koji tolerišu ekstracelularno zamrzavanje telesnih tečnosti i
- *neotporni na zamrzavanje telesnih tečnosti*- insekti koji pothlađivanjem telesnih tečnosti održavaju tečno stanje i pri temperaturama daleko ispod nule

U osnovi ove podele je način na koji organizmi upravljaju telesnom vodom. Voda je osnovna komponenta živih organizama. Kod invertrebrata u proseku čini 70% telesne mase (normalan sadržaj telesne vode invertrebrata je od 40-90%), tako da 95-99% od ukupnog broja molekula u organizmu čine zapravo molekuli vode (Watanabe, 2006). Organizmi tolerišu samo ograničena variranja u sadržaju telesne vode. Zato nije iznenađujuće da je u otpornosti na hladnoću ključna regulacija statusa telesne vode. Redukcija ukupne telesne vode, kao jedan od aspekata adaptacije na niske temperature, često se odnosi samo na smanjenje osmotski aktivne, »slobodne« vode, a istovremeno očuvanje osmotski neaktivne, »vezane«, vode. Zapravo, slobodna voda čini onaj deo telesne vode koji se može zamrznuti i time ugroziti organizam, dok osmotski neaktivna voda, vezana za makromolekule i druge ćelijske strukture, doprinosi očuvanju bazalnog nivoa vode potrebnog u održavanju ćelijskih struktura.

U tom smislu prisutne su brojne fiziološke i biohemijske adaptacije kod obe grupe organizama koje uključuju sintezu velikog broja malih molekula, poliola i šećera, kao i specifičnih proteina.

1.1 Insekti otporni na zamrzavanje telesnih tečnosti

Smatra se da se ova adaptacija evolutivno kasnije razvila kod insekata (Vernon i Vannier, 2002). Opisano je više od 60 vrsta insekata sa ovom strategijom preživljavanja, pri tome najveći broj je prisutan u redovima Hymenoptera, Diptera, Coleoptera i Lepidoptera (Block, 1995; Zachariassen, 1985; Duman i sar, 1991a).

Osnovna strategija ove grupe organizama je u podsticanju zamrzavanja hemolimfe na umereno niskim temperaturama, iznad -10°C , pri čemu ne dolazi do intracelularnog zamrzavanja (do sada je samo kod larve vrste *Eurosta solidaginis* opisano intracelularno zamrzavanje ćelija masnog tela, Salt 1962; Lee i sar., 1993). Zamrzavanje hemolimfe je postepeno i kontrolisano prisustvom specifičnih proteina inicijatora kristalizacije, INA (ice-nucleating agents). Ovi proteini olakšavaju organizovanje molekula vode u kristal leda, delujući poput pelcera kristalizacije u pothlađenim tečnostima. Na taj način oni povećavaju tačku mržnjenja na umereno niske temperature tipično za ove organizme. Opisani proteini sa ovom funkcijom su lipoproteini sa velikim sadržajem fosfatidil inozitola, komponente neophodne za inicijaciju kristalizacije (Duman i sar., 1991b; Neven i sar., 1989).

Formiranje leda u ekstracelularnoj tečnosti praćeno je i njenim koncentrovanjem (povećanjem osmolarnosti), s obzirom na to da u rastući kristal leda mogu da se uključe samo molekuli vode, a ne i molekuli rastvoreni u njoj. Ova razlika u osmolarnosti dovodi do izlaska vode iz ćelija. Neki autori (Mazu, 1984; Karow, 1991) stoga i smatraju da je primarni stres kod zamrzavanja, zapravo ćelijska dehidracija. (Bale, 2002) objašnjava značaj ovakvog smanjenja sadržaja slobodne vode u ćelijama pored ostalog i u sprečavanju potencijalno letalnog zamrzavanje intracelularne vode. Svakako da, kako autor ističe, ovo nije jedini mehanizam i da je stanje mnogo kompleksnije.

Kod velikog broja insekata otpornih na zamrzavanje je opisano intracelularno akumuliranje poliola tokom zimskih meseci, pri čemu najčešće glicerola, ali i sorbitola, treitola i eritrola, kao i šećera fruktoze i trehaloze (Worland i sar., 2000; Zeng i sar., 2008). Smatra se da je kod ovog tipa adaptacije primarna uloga ovih molekula u smanjenju dehidracije ćelija usled formiranja kristala leda (Karow, 1991). Ovi molekuli, zato i nazvani krioprotektori, svojim koligativnim efektom povećavaju osmolarnost intracelularne tečnosti i sprečavaju njeno dalje oticanje u ekstracelularni

prostor. Sa druge strane krioprotektori koji penetriju ćelijsku membranu, pre svega trehaloza i prolin (Denlinger i Lee, 1998) značajno redukuju osmotski gradijent stvoren zbog ekstracelularno formiranog leda stabilizujući i sprečavajući mehanička oštećenja membrane. Na ovaj način dodatno doprinose zadržavanju citoplazmatske vode, smanjujući celularnu dehidraciju i održavajući kritičnu zapreminu ćelije (Baust 1973, 1982). Značaj ovih krioprotektora je i u stabilizaciji ćelijskih proteina. I pored značajnog doprinosa akumulacije poliola i šećera ukupnom održanju ćelijskih elemenata i osnovnih funkcija pri niskim temperaturama, ipak, kompletna slika, kao i mogući mehanizmi i uloga ovih molekula nisu u potpunosti proučeni.

Pored već spomenutih proteina INA, kod ovih vrsta kao odgovor na niske temperature primećena je pojava i druge grupe specifičnih proteina, tzv. antifriz proteina, AFP (antifreez protein, eng.). Ovi proteini su poznati još po nazivu proteini termalnog histerezisa, THP (Thermal Hysteresis Proteins, eng.), pošto su zaslužni za razliku u tački mržnjenja i tački topljenja telesne tečnosti (termalni histerezis, Duman, 2001). Međutim, značaj THP kod ovih vrsta je u regulaciji rasta kristala leda, pri čemu ne dolazi do formiranja većih kristala, oštrih ivica koje bi oštetile ćelije tkiva, kao i sprečavanju oštećenja tkiva kod sekundarne rekristalizacije koja je moguća u toku toplijih perioda krajem zime. Takođe, špekuliše se sa njihovom ulogom u zaštiti insekata otpornih na zamrzavanje u toku jesenjeg pada temperature ispod nule, kada još nije sintetizovano dovoljno INA i koncentracija krioprotektora još uvek je niska (Duman, 1982; Duman i sar, 1982)

1.2 Insekti neotporni na zamrzavanje telesnih tečnosti

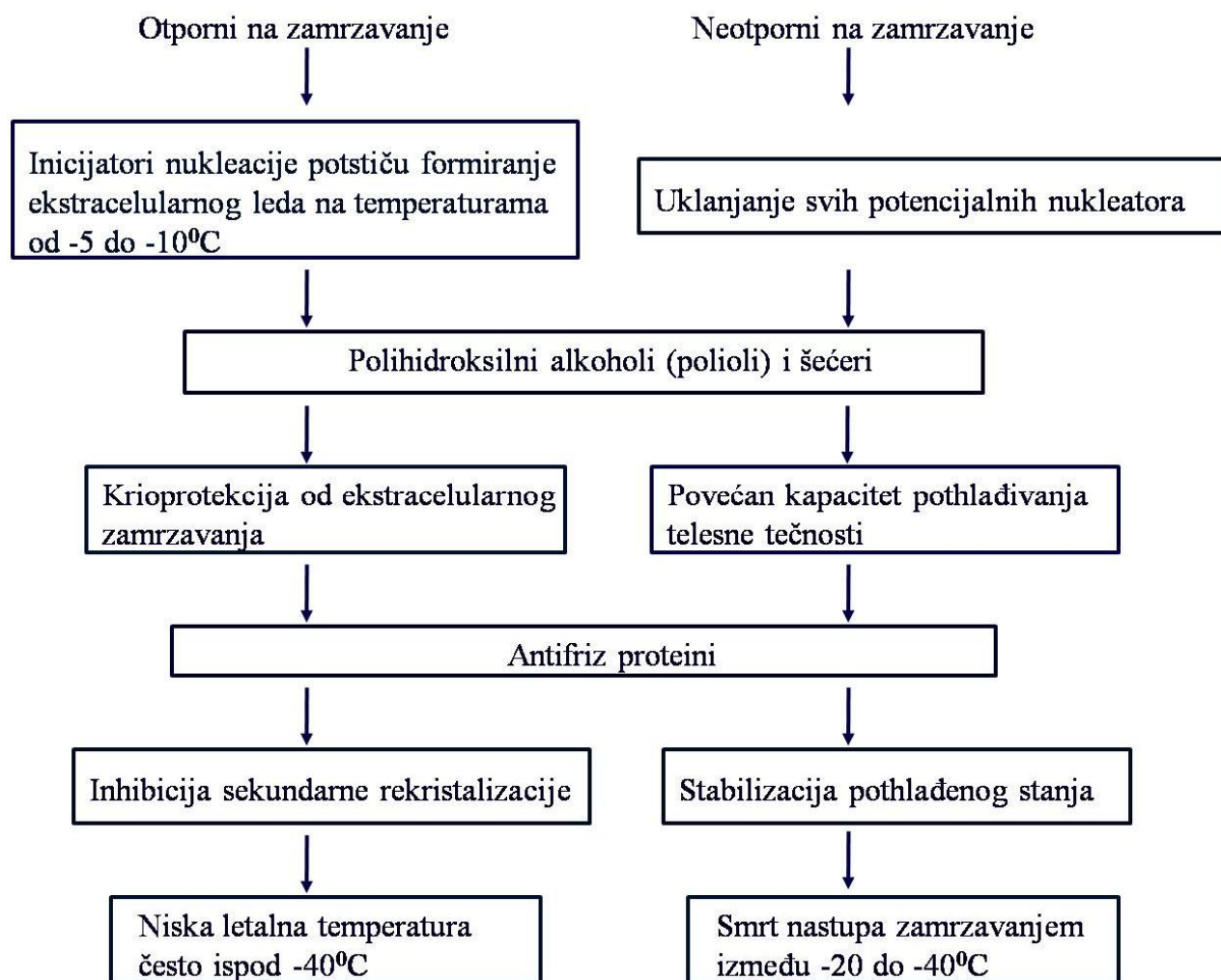
Ova strategija preživljavanja niskih temperatura je česta kod insekata, ali i kod drugih grupa zglavkara (npr. pauci, krpelji). U osnovi ovog tipa adaptacije je sniženje tačke mržnjenja telesnih tečnosti daleko ispod tačke mržnjenja čiste vode, tj. pothlađivanjem (supercooling, eng.) telesnih tečnosti. Tačka mržnjenja ove tečnosti se naziva kritična tačka mržnjenja, SCP (supercooling point, eng.).

Sama adaptacija ovih insekata na niske temperature može se grubo podeliti u dve faze. Prva faza podrazumeva veliki broj promena kako onih u ponašanju, tako i fizioloških, te uključuje pronalaženje povoljnih mesta za prezimljavanje, redukovanje sadržaja telesne vode, povećanje sadržaja masti, i možda najvažnije, prestanak ishrane i pražnjenje digestivnog sistema, da bi se uklonili ostaci hrane koji bi mogli delovati kao centri nukleacije leda. Kod mnogih insekata ove

grupe normalna crevna flora sadrži i bakterije koje deluju kao centri nukleacije (Lee i sar., 1993), pa ih je neophodno ukloniti pre zime ili redukovati njihov kapacitet nukleacije. U isto vreme uklanjaju se i mogući nukleatori iz hemolimfe (Neven i sar., 1986). Kod nekih vrsta ove promene dovode do depresije SCP i do -20°C .

Druga faza podrazumeva sintezu poliola i AFP koji dodatno snižavaju SCP. Od poliola najčešće su prisutni glicerol, manitol, sorbitol, ribitol, eritrol, etilen glikol, inozitol zatim šećeri trehaloza, glukoza, fruktoza (Somme, 1982; Lee, 1991). Oni svojim koligativnim efektom utiču na sniženje tačke mržnjenja telesnih tečnosti. Mnogi insekti ove grupe imaju multikomponentni sistem krioprotektora, koji zajedničim koligativnim efektom povećavaju kapacitet pothlađivanja tečnosti. Tako na primer kod *Cryptopygus antarcticus* su prisutni glicerol, manitol i trehaloza (Sømme i Block, 1982). Značaj multifunkcionalnog sistema krioprotektora je i u tome što bi visok nivo jednog krioprotektora imao potencijalno toksičan efekt (Bale, 2002). Osim već pomenutih moguće su i druge uloge pojedinačnih krioprotektora, jednih u regulaciji enzimskih aktivnosti, drugih u depresiji SCP i sl. (Zachariassen, 1985). Visok sadržaj krioprotektora u hemolimfi smanjuje napon vodene pare hemolimfe, ujedno smanjujući gradijent pritiska pare sa spoljašnjim ledom, čime se sprečava isparavanje vode. Sintaza krioprotektora je sezonska i pojačana je tokom jeseni, uslovljavajući sniženje SCP, što je u skladu sa sve nižim temperaturama spoljašnje sredine.

Antifriz proteini, ili proteini termalnog histerezisa, daju značajan doprinos u ukupnoj otpornosti na hladnoću ove grupe insekata. AFP smanjuju tačku mržnjenja na ne-koligativni način, ne utičući na tačku topljenja, pri tom ova razlika može biti i $5-6^{\circ}\text{C}$ (Duman i sar., 1993). Na ovaj način značajno doprinose ukupnom kapacitetu pothlađivanja telesnih tečnosti. Do sada je izolovano i okarakterisano AFP za preko 40 vrsta, uglavnom tvrdokrilaca (Coleoptera), i samo po jedan kod leptira i moljaca (Lepidoptera) i muve (Diptera) (Bale, 2002). Opšte je prihvaćeno da se ovi proteini apsorbuju specifično na površini potencijalnog kristala leda, menjajući njegovu strukturu i sprečavajući dalji rast kristala, što zahteva niže temperature za nastavak rasta kristala (Duman, 2001).



Šema 1. Osnovne karakteristike adaptacije dve glavne grupe insekata otpornih na hladnoću

Kao treći tip strategije preživljavanja niskih temperatura kod insekata, u novijoj literaturi se navodi **krioprotektivna dehidratacija**, opisana kod arktičke kolebole *Onychiurus arcticus* (Worland i sar., 1998). Ovaj način preživljavanja poznat je od ranije kod drugih grupa organizama, kao što su nematode, tartigrade i morski račići, a podrazumeva preživljavanje niskih temperatura u dehidriranom stanju. Ova adaptacija se zasniva na tome da organizam gubi vodu kroz permeabilnu kutikulu zbog postojanja razlike napona pare okolnog leda i pothlađene telesne tečnosti organizma.

1.3 Klasifikacija insekata prema otpornosti na hladnoću po Bale-u

Predhodno opisana podela insekata na dve grupe, otporne i neotporne na zamrzavanje, razmatra način na koji insekti rešavaju problem zamrzavanja telesnih tečnosti. Međutim, mnogi insekti žive u zonama gde su temperature ispod nule zimi retke ili ih uopšte nema, tako da je glavna pretnja za opstanak ovih insekata zapravo hladnoća (češće nego zamrzavanje telesnih tečnosti), koja može da bude različitog stepena, zavisno od temperature i trajanja (Bale, 1991). Naravno da postoje insekti koji mogu da prežive zamrzavanje, kao i oni koji umiru samo kada dođe do zamrzavanja telesne tečnosti, odnosno na temperaturama ispod SCP. Međutim, za većinu vrsta SCP je samo teoretska, a ne i realna donja letalna temperatura. Ovi insekti umiru, bez zamrzavanja, od kumulativnih štetnih efekata izloženosti hladnoći, poput onih nastalih zbog smanjenja enzimske aktivnosti, oštećenja na nivou plazma membrane, oksidativnog stresa itd.

Kombinujući efekte hladnoće i zamrzavanja na preživljavanje insekata pri niskim temperaturama, kao i želeći da obuhvati vrste svih klimatskih zona počev od tropa do polarnih delova, (Bale, 1996) je predložio podelu insekata u pet grupa počev od najotpornijih do onih najmanje otpornih na hladnoću. Prve dve grupe su kao i kod originalne podele:

- a) **Vrste otporne na zamrzavanje telesnih tečnosti**- one koje tolerišu zamrzavanje jednog dela svojih telesnih tečnosti. Među insektima ove grupe varira odnos između temperature zamrzavanja i letalne temperature. Tako se vrste *Hydromedion sparsutum* sa Antarktika (Bale i sar., 2000), *Syrphus ribesii* iz UK (Hart i Bale, 1997) i *Eurosta solidaginis* iz Severne Amerika (Bale i sar., 1989) zamrzavaju na -10°C , ali letalne temperature za ove tri vrste su oko -16 , -30 i -50°C .
- b) **Vrste koje izbegavaju zamrzavanje telesnih tečnosti** pothlađivanjem- pri čemu u ovu grupu spadaju samo vrste bez ili sa niskim mortalitetom u odsustvu zamrzavanja, tj. umiru samo kad se zamrznu. U ovoj grupi je na primer moljac *Epirrita autumnata* koji prezimljava u stadijumu jaja na brezama u severnoj Skandinaviji (Tenow i Nilssen, 1990)

Insekti svrstani u nove tri grupe takođe ne tolerišu zamrzavanje, ali su različito osetljivi na hladnoću:

- c) **Vrste otporne na hladnoću**- ove vrste imaju niske SCP (oko -20°C do -30°C) i visok nivo tolerancije na hladnoću. Za razliku od prehodne grupe imaju veći mortalitet nešto iznad SCP, što je naročito izraženo pri dužem izlaganju ovim temperaturama. Ova velika grupa uključuje mnoge polarne insekte, kao što je *Alaskozetes antarcticus*, sa zimskom SCP od -

30°C, a 73% preživljava izlaganje temperaturi od -20 °C u toku 100 dana (Cannon i Block, 1988)

- d) **Vrste osetljive na hladnoću**- ove vrste pothlađuju telesne tečnosti do veoma niske temperature, ali umiru posle kratkog izlaganja (oko nekoliko minuta ili sati) temperaturama značajno iznad SCP. Tako za prezimljujuće jedinke vrste *Myzus persicae* letalna temperatura je 15-18 stepeni iznad SCP (-25 °C) pri izlaganju od 1 minuta (Howling i sar., 1994)
- e) **Vrste koje oportunistički preživljavaju**- u ovu grupu spadaju vrste koje ne mogu da prežive temperature ispod granične temperature neophodne za razvoj, pa su prinuđene da za prezimljavanje potraže skloništa. Larve kućne muve *Musca domestica* zamrzavaju na -15 °C, ali pokazuju 100% mortalite posle 5 dana na 0 °C. Toplo sklonište ove larve nalaze na kućnim ljubimcima (Coulson i Bale, 1991).

Osnovni argument za ovu podelu je da za većinu insekata klimatskih područja sa zimskom sezonom, veća pretnja po opstanak su hladnoća i oštećenja vezana za nju, nego rizik od zamrzavanja. Ova nova podela je sve češća u novijoj literaturi i postiže dalju diskusiju na temu otpornosti insekata na niske temperature.

1.4 Otpornost na hladnoću i dijapauza

Dijapauza je specifično stanje mirovanja kojom insekti usklađuju svoj životni ciklus sa uslovima sredine. U dijapauzu insekti ulaze u različitim stadijumima razvića, zavisno od vrste. Smatra se da otpočinje kao odgovor na uslove sredine, kao što su sniženje temperature, odnos dana i noći, raspoloživosti i prirode hrane i sl. Dijapauza je dinamično stanje koje je dobro regulisano. Ulazak organizma u dijapauzu, kao stanje hipometabolizma, praćeno je smanjenjem metaboličke aktivnosti, ali i pripremom organizma za preživljavanje u nepovoljnim uslovima sredine. Kao takva, dijapauza je karakteristična i za insekte umerenog klimatskog područja, koji u nju ulaze tokom hladnih zimskih meseci, kao i za insekte tropa, koji dijapauziraju takom sušnih i vrelih letnjih meseci (Denlinger, 1986).

Dijapauza insekata umerenog klimatskog područja povezana je i sa njihovom otpornošću na niske temperature. Ova očigledna povezanost postoji u dve forme: kao koincidentalna i ona koja je uključena u program dijapauze (Denlinger i Lee, 1998). Za insekte sa više generacija tokom godine,

koji imaju fakultativnu dijapauzu, ova povezanost je dosta često koincidentalna. To ukazuje na mogućnost da odvojeni signali (uslovi) iz okoline kontrolišu ova dva procesa. Na primer, kod fakultativno dijapauzirajućih gusenica *Ostrinia nubilalis*, dijapauza nastupa kao odgovor na skraćenje obdanice, dok otpornost na hladnoću se razvija kao odgovor na izloženost niskim temperaturama (Hanec i Beck, 1960). Za larve kukuruznog plamenca u polju ova dva uslova su blisko povezana- koincidentalna, zapravo sve kraći dani tokom jeseni praćeni su i nižim spoljnim temperaturama.

S druge strane, dijapauzirajuće lutke muva *S.bullata* i *S.crassipalpis* (Adedokun i Denlinger, 1984; Lee i Denlinger, 1985) su otporne na hladnoću bez prethodog izlaganja niskim temperaturama, za razliku od nedijapauzirajućih lutaka koje su mnogo osetljivije na hladnoću. To znači da dijapauzu i otpornost na hladnoću ne kontrolišu odvojeni signali iz okoline, već je otpornost na hladnoću u sastavu samog programa dijapauze.

Iako je za dijapauzu karakterističan pad metaboličke aktivnosti i do 70-98% (Storey i Storey, 2001), ona je i dalje dobro regulisana i usmerena na sintezu specifičnih jedinjenja koji doprinose opstanku insekta pri niskim temperaturama. Tako su mnogi anabolički putevi, značajni za ćelijski rast i diferencijaciju supresovani, a pojačani oni uključeni u sintezu krioprotektora i proteina toplotnog stresa, Hsp (Heat shock protein, eng.). Sama dijapauza podrazumeva nekoliko odvojenih fiziološki različitih faza koje uključuju indukciju, pripremu, inicijaciju, održanje i terminaciju dijapauze. Tako se neposredno pre dijapauze insekti intenzivno hrane, da bi po ulasku u dijapauzu prestala ishrana i kretanje, a zaustavlja se i dalji rast i morfogeneza. U proseku dijapauza u umerenom klimatskom području traje od 7-10 meseci, pa su insekti tokom dijapauze energetske zavisni od rezervi stvorenih pre dijapauze. Neki autori smatraju stoga, da je dijapauza energetske skupa životna strategija, a da se cena obično ogleda u stepenu preživljavanja i padu plodnosti (Matsuo 2005, 2006).

Tokom dijapauze tri glavne nutritivne rezerve su: lipidi, ugljenihidrati i aminokiseline. Rezervni lipidi su svakako najznačajniji izvor energije tokom dijapauze. Triacilgliceride insekti mogu dobiti direktno iz hrane, ali i sintetisati od ugljenih hidrata i aminokiselinskih prekursora. Masno telo je primarno mesto sinteze i deponovanja masti (Canavoso i sar., 2001).

Glavni rezervni polisaharid je glikogen (Steele, 1985; Danks, 1987). Mnoge vrste konvertuju glikogen u krioprotektore kao direktan odgovor na niske temperature. Dijapauzirajuće gusenice

kukuruznog plamenca, *O.nubilalis*, u početku dijapauze akumuliraju veliku količinu glikogena, koja sa sve nižim temperaturama opada, dok u isto vreme raste nivo glicerola. Na kraju hladne sezone, kada opada nivo glicerola, kao krioprotektora, nivo glikogena ponovo raste (Grubor-Lajšić, 1983). Ova korelacija ukazuje na reciklažu ugljenohidratnih krioprotektora u rezervne šećere, koji se mogu iskoristiti i u zadovoljavanje trenutnih energetskih potreba organizma. Proces je veoma dinamičan, a regulisan je temperaturno zavisnom fosforilacijom glikogen fosforilaze (Churchill i Storey, 1989). Trehaloza je primarni šećer hemolimfe. Povećanje koncentracije trehaloze kod nekih vrsta u toku dijapauze je, pre svega, u vezi uloge trehaloze kao krioprotektora i u dehidrataciji (koligativni doprinos sniženju SCP i stabilizacija proteina i ćelijskih membrana), a ne kao rezervnog saharida (Hahn i Denlinger, 2007).

Takođe, uočeno je i povećanje nivoa nekih aminokiselina tokom dijapauze, što je opet primarno u vezi sa otpornošću na hladnoću i dehidratacijom (Lefevre i sar., 1989; Hahn i Danlinger, 2007). Mnogi insekti aminokiseline deponuju kao rezervne proteine, tzv. heksamerine, koje akumuliraju u velikim količinama pre ulaska u dijapauzu (Denlinger i sar, 2005). Aminokiseline ovih proteina snabdevaju kako intermedijarni, tako i respiratorni metabolizam tokom dijapauze, a takođe su značajne za pokretanje post-dijapauznih razvojnih funkcija.

Denlinger i sar. (1991) su utvrdili da niske temperature stimulišu i sintezu proteina termalnog stresa, Hsp (heat shock protein). Iako je sinteza ovih proteina prvobitno dokumentovana u termalnom stresu kod *Drosophila*, po čemu su i dobili naziv, vrlo brzo su uočeni i u drugim stresnim stanjima. Sada se ekspresija ovih proteina opisuje kao opšti odgovor na stres okruženja. Hsp između ostalog funkcionišu kao molekulski čaperoni (chaperon, eng.) koji vezujući se za proteine smanjuju štetne efekte pogrešnog uvijanja pri sintezi proteina i olakšavaju formiranje i održavanje native konformacije.

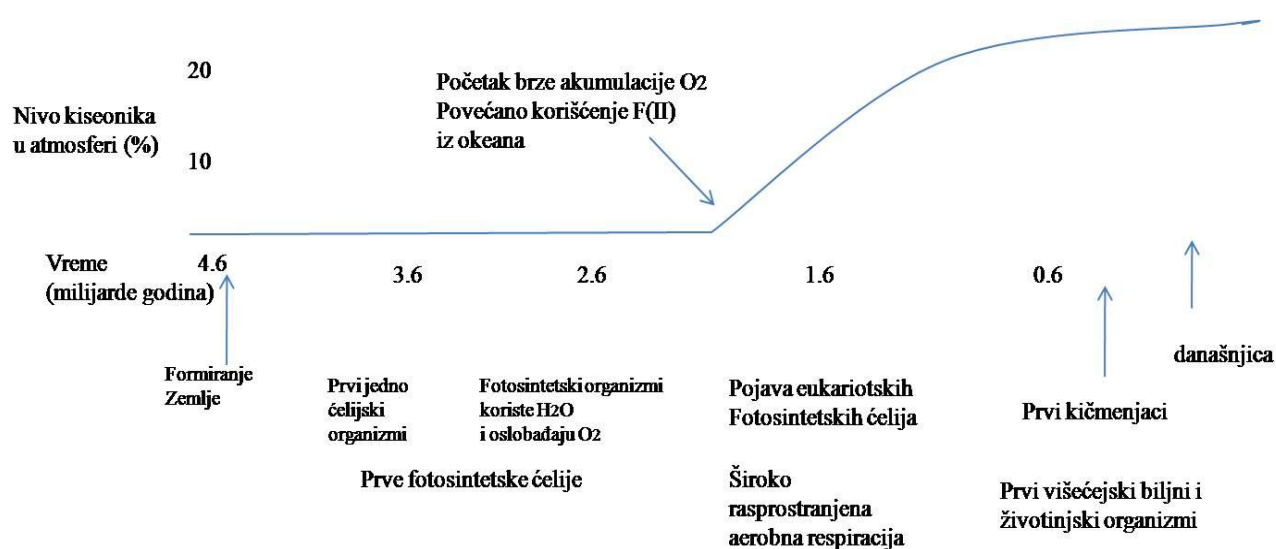
Kao odgovor na stres izazvan niskim temperaturama uglavnom se sintetišu Hsp proteini familije od 70 kDa. (Joplin i sar, 1990; Craig i sar., 1993; Morimoto i sar., 1994), mada je opisana i pojava Hsp drugih familija, Hsp90 i malih, kao Hsp23 (Joplin i sar., 1990). Kako su mnogi bitni enzimi podložni denaturaciji na niskim temperaturama, ovi stres proteini bi mogli biti uključeni u eliminaciju ovih denaturisanih proteina ili u njihovoj renaturaciju, ili očuvanje nativnosti.

Najnovija istraživanja povezuju ekspresiju Hsp kao deo strategije opšte otpornosti insekata na niske temperature (Rinehart i sar, 2007), a ne samo kao trenutni odgovor na stres izazvan hladnoćom.

Tako je dobro poznata ekspresija Hsp23 i Hsp70 kod vrste *Sarcophaga crassipalpis* pri ulasku u dijapauzu (Rinehart i sar, 2000). Ekspresija ovih proteina u dijapauzi ove vrste se donekle razlikuje u odnosu na druge tipove stresa, tj. više je deo razvojnog puta, a ne trenutni odgovor na uslove sredine. U vezi sa ekspresijom Hsp familije nije sinhronizovana, povećana je ekspresija samo Hsp70 i Hsp60, dok je Hsp90 smanjena (Rinehart i sar, 2007).

2. Oksidativni stres i antioksidativni sistem

Pojavom prvih anaerobnih organizama na planeti, pre oko 3 milijarde godina odpočeo je život na Zemlji (šema 2). Osnova energetskeg metabolizma su bile fotohemijske reakcije u kojima je korišćena sunčeva energija za produkovanje molekula kao što je NADH. U ovoj ranoj fazi ćelijske evolucije, svetlosna energija korišćena je za prenos elektrona preko hidridnog jona (jedan elektronski par i proton) sa H_2S na $NADP^+$, stvarajući na taj način jak redukcionni potencijal za fiksiranje ugljenika.



Šema 2. Vremenska skala pojave i razvoja živog sveta na Zemlji (Albert i sar., 2003)

Sledeći korak je bio pojava cijanobakterija koje koriste vodu kao izvor elektrona za fotosintezu. Ovaj proces je zahtevao dodatni fotosistem, koji u tandemu sa prvim prevazilazi veliku razliku u redoks potencijalu između H_2O i NADPH. Intenzivna fermentacija dovela je do akumulacije velike količine organske materije, ali i po prvi put do pojave O_2 u atmosferi. Akumulacija kiseonika omogućila je evoluciju aerobnih fotosintetskih organizama, koji su dobijali veliku količinu energije razgradnjom organske materije do CO_2 i H_2O . Takođe, pojavljuju se i organizmi koji više ne mogu da koriste sunčevu energiju, i koji su potpuno oslonjeni na respiraciju. Pojavom prvih eukariotskih ćelija, u simbiozi sa bakterijama zavisnim od respiracije, evolucija je krenula u pravcu razvoja višćelijskih organizama.

Iako je pojava kiseonika i aerobnog metabolizma izuzetno ubrzala točak evolucije živog sveta na Zemlji, ona je postavila i nove izazove. Naime, metaboličkom redukcijom kiseonika oko 97-99% kiseonika se redukuje do vode, pri čemu 1 do 3% podleže nepotpunoj redukciji, kada nastaju različite reaktivne vrste kiseonika. Reaktivne vrste kiseonika su slobodni radikali i druge vrste aktiviranog kiseonika koje imaju veću oksidacionu sposobnost od samog molekula kiseonika, i sastavni su deo aerobnog metabolizma ćelije. Velika reaktivnost i neselektivnost ovih čestica čini ih potencijalno štetnim za makromolekulske ćelijske elemente.

Zapravo čitav razvoj naučnih saznanja o slobodnim radikalima u biološkim sistemima možemo podeliti u tri ere. Prva započinje Gerschman-ovom slobodnoradikalskom teorijom, kojom su objašnjeni molekularni mehanizmi štetnosti parcijalno redukovanih formi kiseonika, koje se odlikuju velikom reaktivnošću (Gerschman i sar, 1954). Iste godine je grupa naučnika primetila slab elektron paramagnetno rezonantni (EPR) signal, koji je pripisan slobodnim radikalima, u različitim tipovima liofiliziranih bioloških materijala (Commoner i sar, 1954). Konačno, postavljanjem koncepta o ulozi slobodnih radikala u procesima starenja (Harman, 1956) otpočela su intenzivna proučavanja slobodnih radikala u biološkim sistemima. Druga era je otpočela 1969. kada su McCord i Fridovich otkrili enzim superoksid dismutazu (SOD) i time utvrdili kompleksnost i značaj slobodnih radikala u biološkim sistemima (McCord i Fridovich, 1969). Sa otkrićem uloge hidroksil radikala (OH^{\bullet}) u stimulaciji aktivnosti enzima guanilatciklaze i formiranju sekundarnog glasnika, cikličnog guanozin monofosfata (cGMP), otpočela je nova era, koju karakteriše konstantan priliv činjenica o ulozi slobodnih radikala u signalnoj transdukciji (Mittal i Murad, 1977).

Sve ovo ukazuje da se adaptacija živih sistema ne ogleda samo u koegzistenciji sa slobodnim radikalima, već i u razvoju različitih mehanizama u kojima učestvuju reaktivne vrste kiseonika u regulaciji brojnih fizioloških funkcija.

2.1. Reaktivne vrste kiseonika i azota u biološkim sistemima

Reaktivne vrste kiseonika-ROS (reactive oxygen species), koje se u literaturi nazivaju još i reaktivni metaboliti kiseonika-ROM (reactive oxygen metabolites), dele se u dve grupe (tabela 1.)

1. Slobodno radikalski oblici
2. Neradikalski oblici

Tabela 1. Radikalski i neradikalski oblici reaktivnih vrsta kiseonika (Pardini, 1995)

Slobodnoradikalski oblici kiseonika		Neradikalski oblici kiseonika	
<i>oznaka</i>	<i>naziv</i>	<i>oznaka</i>	<i>naziv</i>
$O_2^{\cdot-}$	Superoksid anjon radikal	H_2O_2	Vodonik peroksid
OH^{\cdot}	Hidroksil radikal	$HOCl$	Hipohlorna kiselina
HO_2^{\cdot}	Hidroperoksil radikal	O_3	Ozon
RO^{\cdot}	Alkosil radikal	1O_2	Singlet kiseonika
RO_2^{\cdot}	Peroksil radikal	$ROOH$	Organski peroksid
NO^{\cdot}	Azot oksid radikal	$ONOO^-$	Peroksinitrit

Slobodni radikali se definišu kao molekuli koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj atomskoj ili molekulskoj orbiti (Halliwell i Gutteridge, 1999). Zbog nesporenog elektrona i težnje da ga spare oduzimajući elektron od nekog drugog molekula, slobodni radikali imaju visok stepen reaktivnosti. Najznačajnija klasa slobodnih radikala u biološkim sistemima su svakako radikalski derivati kiseonika.

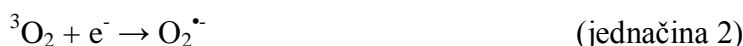
Elektronska konfiguracija **tripleta kiseonika**, (3O_2), kao osnovnog stanja kiseonika, ima dva nesparena elektrona paralelnih spinova koji zauzimaju dve degenerisane molekulske orbitale, koje ga čine paramagnetičnim. Zbog ovakve elektronske konfiguracije kiseonik ima težnju da primi elektrone i popuni orbitale, a sam da se pri tome redukuje. Ove orbitale se nazivaju razvezujuće (antivezujuće). U poređenju sa drugim diatomskim molekulima sa popunjenim antivezujućim orbitalama, npr. N_2 , dvostruka veza u diatomskom molekulu kiseonika je slabija. Međutim, da bi molekul kiseonika bio sposoban da stupi u reakciju potrebno je ukinuti postojeću spinsku restrikciju,

što se postiže bilo redukcijom sa jednim elektronom (kada nastaje $O_2^{\bullet-}$), bilo fotohemijском termalnom aktivacijom kiseonika (kada nastaje singlet 1O_2).

Pri metaboličkoj redukciji kiseonika terminalna oksidaza respiratornog lanca, citohrom c oksidaza, predaje četiri elektrona molekulu kiseonika i redukuje ga do vode :



Kada molekul kiseonika primi jedan elektron, nastaje *superoksid anjon radikal*, $O_2^{\bullet-}$ (jed.2). Njegovo formiranje je uglavnom nepoželjna posledica aerobnog metabolizma (Møller, 2001).



Produkcija superoksida je najveća unutar mitohondrija ćelija, tj. na nivou unutrašnjih membrana mitohondrija. Naime, pri transportu elektrona duž respiratornog lanca, manja količina elektrona »sklizne« sa lanca i reagujući sa kiseonikom formira kiseonični slobodni radikal-superoksid radikal (Valko i sar., 2004). Mesta formiranja superoksid radikala duž respiratornog lanca su na nivou Kompleksa I (NADH-koenzim Q reduktaza) i Kompleksa III (koenzim Q-citohrom c reduktaza) (Valko i sar., 2007). U poređenju sa drugim radikalima kiseonika, $O_2^{\bullet-}$ je manje reaktivan i sa nešto dužim poluživotom od 2-4 μ s. Takođe, ne može direktno da reaguje sa membranskim lipidima. Zbog naeletrisanja, anjonske forme, ne može da prođe kroz ćelijsku membranu (Vronova i sar, 2002). Iako najveća količina superoksida nastaje na nivou respiratornog lanca, i neki drugi enzimi, takođe, katalizuju reakciju transfera jednog elektrona sa supstrata na 3O_2 , poput nitro-propan dioksidaze, galaktozo oksidaze, ksantin oksidaze. Neki enzimi ćelijskog zida i plazma membrane (NAD[P]H oksidaza, peroksidaza, poli- i di-amino-oksidaze) mogu ekstracelularno da produkuju superoksid, koji sada igra ulogu u međućelijskom signalingu (Bolwell, 1999; Delannoy i sar., 2003). Pri autooksidaciji nekih visoko reaktivnih hemijskih jedinjenja, kao što su flavini, pteridini, difenoli i ferodoksin (jednačina 3) može doći do transfera jednog elektrona na 3O_2 (Halliwell, 1987).



U biološkim sistemima, veći deo superoksida u međusobnoj reakciji ili enzimski katalizovanoj reakciji (superoksid dismutaza, SOD) formira H_2O_2 (jednačina 4):



$\text{O}_2^{\bullet-}$ je, takođe, sposoban da oduzme elektron i nekim antioksidantima- vitamin E (α -tokoferol), vitamin C, cistein, što je u živim sistemima i iskorišćeno za zaustavljanje slobodnoradikalске propagacije (Đorđević i sar., 2000)

Vodonik peroksid, H_2O_2 je najstabilniji ROS, a nastaje nepotpunom redukcijom kiseonika sa 2 elektrona:

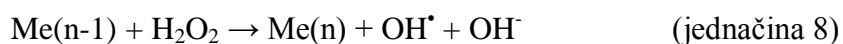


U biološkim sistemima ne nastaje samo pod dejstvom SOD (jednačina 4), već i drugih enzima: urat oksidaze, glikolat oksidaze, glukozo oksidaze, oksidaza nekih D-aminokiselina, ali i u reakcijama autooksidacije vitamina C, glutaciona, tiola i kateholamina (Halliwell i Gutteridge, 1999). Najveća produkcija H_2O_2 u ćeliji je u peroksisomima, gde se koristi za oksidaciju različitih organskih molekula. Vodonik peroksid je sposoban da oksiduje -SH grupe proteina i započne lančanu reakciju lipidne peroksidacije (Valko i sar., 2007). Lako difunduje kroz ćelijske membrane i može da reaguje sa jonima gvožđa i drugih metala, kada nastaje hidroksil radikal, OH^{\bullet} .

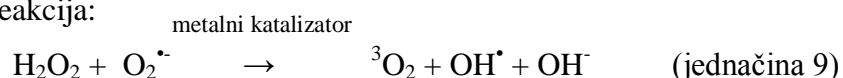
Najveća količina **hidroksil radikala**, OH^{\bullet} , jedne od najagresivnijih i najreaktivnijih čestica u hemiji, upravo i nastaje iz vodonik peroksida u Haber-Weiss-ovoj reakciji:



Pri fiziološkim uslovima ova reakcija je moguća samo uz prisustvo jona prelaznih metala kao katalizatora, u tzv. Fenton-ovoj reakciji (Liochev, 1999):



Neto reakcija:

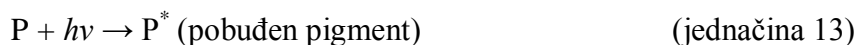


Kao metalni katalizatori *in vivo* mogu biti gvožđe, bakar ili kobalt, a ovaj mehanizam nastanka hidroksil radikala smatra se osnovnim u biološkim sistemima. Takođe, poznat je i drugi mehanizam produkcije hidroksil radikala koji uključuje $O_2^{\bullet -}$ i azot oksid radikal (NO^{\bullet}) (Radi i sar., 1991):

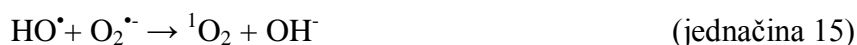


Hidroksil radikal je najopasnija radikalska vrsta, sa poluživotom oko 1 ns, praktično reaguje na mestu nastanka i može da napadne i ošteti bilo koji molekul u ćeliji (Pastor i sar., 2000).

Kratkoživeća i veoma reaktivna forma kiseonika- **singlet kiseonik**, 1O_2 , je neradikalska forma ROS-a. Nastaje promenom spina jednog od elektrona iz antivezujućih molekularskih orbitala tripleta kiseonika. U fotosenzibilnim tkivima 1O_2 se produkuje u reakciji kiseonika sa pobuđenim fotosenzibilnim jedinjenjima-fotopigmentima, kao što su hlorofil, flavonodi, porfirini i očni pigment retinol. Ovi molekuli su u stanju da prime kvant svetlosne energije i pri tome pređu u nestabilno pobuđeno stanje. Da bi se ponovo vratili u osnovno nepobuđeno stanje ovi molekuli se oslobađaju viška energije obično u vidu emisije svetlosne energije. Međutim, u prisustvu kiseonika, on prima taj kvant energije i prelazi u mnogo reaktivniju formu, singlet kiseonika (Frank i sar., 1999):



U nefotosintetskim tkivima do produkcije 1O_2 može doći u reakciji transfera elektrona sa HO^{\bullet} na $O_2^{\bullet -}$ (Halliwell, 1987):



Dalje 1O_2 može direktno da reaguje sa nezasićenim masnim kiselinama i izazove lipidnu peroksidaciju.

Od reaktivnih vrsta azota, RNS (reactive nitrogen species) u biološkim sistemima, svakako najznačajniji i najprisutniji je **azot monoksid radikal**, NO^\bullet . To je mali molekul koji sadrži nespareni elektron u antivezujućoj $2\pi_y^*$ orbitali. U biološkim sistemima nastaje pod dejstvom enzima azot-oksida sintaze (NOS), u metaboličkom putu arginina do citrulina pri čemu se formira NO^\bullet (Ghafourifar i Cadenas, 2005). Azot monoksid radikal je značajan kao signalni molekul u različitim fiziološkim procesima, poput neurotransmisije, regulacije krvnog pritiska, odbrambenim mehanizmima, regulaciji imunog odgovora (Bergendi i sar., 1999). Poluživot NO^\bullet je u vodenoj sredini nekoliko sekundi, mada pri je nižim koncentracijama kiseonika stabilniji. Rastvoran je i u vodi i u lipidima, pa lako može da difunduje kroz ćelijsku plazma membranu (Chiuen, 1999). U ekstracelularnoj sredini NO^\bullet reaguje sa vodom i kiseonikom dajući nitratne i nitritne anjone.

Azot monoksid radikal u reakciji sa superoksidnim anjon radikalom daje mnogo reaktivniju česticu – **peroksinitrit anjon, ONOO^-** :

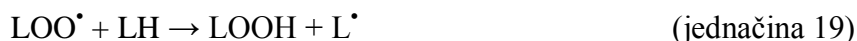


U tkivima i procesima koji dovode do produkcije obe vrste ovih radikala, kao na primer u ćelijama imunog sistema u toku inflamatornih procesa, može nastati znatna količina ONOO^- . Tako da je i toksičnost NO^\bullet povezana uglavnom sa mogućom reakcijom sa $\text{O}_2^{\bullet -}$. Peroksinitrit anjon je veoma agresivan oksidacioni agens i može da izazove fragmentaciju DNK i lipidnu peroksidaciju (Carr i sar., 2000).

2.2. Oksidativna oštećenja biomolekula

Kao što je već istaknuto produkcija reaktivnih vrsta kiseonika, ROS, i reaktivnih vrsta azota, RNS, su sastavni deo normalnog ćelijskog metabolizma. Njihova produkcija je strogo kontrolisana održavanjem ravnoteže između prooksidanata i antioksidanata. Međutim, ne tako retko dolazi do narušavanja ove ravnoteže, kada dolazi do produkcije ROS/RNS. Ovakvo stanje van fizioloških granica produkcije ROS/RNS u biološkim sistemima naziva se **oksidativni**, odnosno **nitrozativni stres** (Valko i sar., 2007). Oksidativni/nitrozativni stres je sastavni deo velikog broja biotskih i abiotskih stresova, a praćeni su narušavanjem strukture i funkcije biomolekula, poput lipida, proteina, DNK. Oksidativni stres je povezan i sa velikim brojem oboljenja biljaka i životinja, kao i sa procesom starenja.

Ćelijske komponente najpodložnije napadu ROS su svakako *nezasićene masne kiseline fosfolipida ćelijskih plazma membrana* (Siems i sar., 1995). Lipidna peroksidacija je lančana radikalska reakcija, pri čemu su kao najčešći inicijator ove reakcije hidroksil radikal i singlet kiseonika, kao reaktivne vrste kiseonika. Reakcija otpočinje oduzimanjem elektrona polinezasićenoj masnoj kiselini (LH), kada nastaje lipidni radikal (L[•]). Najčešća meta je vodonik na C atomu metinske grupe. Lipidni radikal dalje reaguje sa kiseonikom, pri čemu nastaje lipidni peroksil radikal (LOO[•]) koji sa drugim molekulom lipida formira lipidni peroksid (LOOH) i novi lipidni radikal, čime se ciklus nastavlja (jednačine 17-18):



Ukoliko se ne ukoloni LOO[•] on dalje podleže ciklizaciji, formiranju endoperoksida, kao prekursora malondialdehida (MDA) (Fedtke i sar., 1990; Fink i sar., 1997). Pored MDA, kao glavnog produkta lipidne peroksidacije, nastaje i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). Oba produkta lipidne peroksidacije se odlikuju izrazitim mutagenim i kancerogenim svojstvom. MDA unakrsno reaguje sa proteinima i bazama molekula DNK, dok HNE reaguje sa glutationom i sulfhidrilnim grupama proteina (Pardini, 1995). Svi ovi procesi vode smanjenju fluidnosti membrane i gubitka njene selektivne propustljivosti.

Pokazano je da su negativne posledice lipidne peroksidacije povezane sa velikim brojem oboljenja kao što su: ateroskleroza, hemolitička anemija, kancer, starenje (Cerutti, 1985; Halliwell i Gutteridge, 1989).

Bočni ostaci aminokiselina *proteina*, pri tome naročito cisteina i metionina, su podložni oksidaciji pod uticajem ROS/RNS (Stadtman, 2004). Oksidacija sulfhidrilnih grupa cisteina može dovesti do reverzibilnog formiranja disulfida proteina i niskomolekulskih tiola, poput glutationa (GSH), kao i intra- i inter-molekulskih povezivanja, što dovodi do promene konformacije proteinskih molekula. Oksidativnom oštećenju su takođe podložne i ϵ -amino grupe lizina, kao jedan od liganada u polipeptidnom lancu za vezivanje Fe^{2+} . Ovaj kompleks protein- Fe^{2+} reaguje sa H_2O_2 i vodi do serije reakcija, gde kao krajnji produkt nastaje protein-aldehid, Fe^{2+} i NH_3 (Stadtman, 1990). Kao mera oksidacije proteina posredovane ROS-om je upravo količina karbonilnih grupa, tako da je do danas razvijeno više veoma osetljivih metoda za određivanje proteinskih karbonilnih grupa (Dalle-Donne i sar., 2003; 2005). Povećana koncentracija RNS dovodi do nitrozilovanja proteina. Sve ove modifikacije proteinskih molekula vode promeni njihove konformacije i funkcije. Sami proteini tada postaju podložni proteolitičkim degradacijama uglavnom proteazomima (Dröge, 2002). Međutim, nekada može doći do akumulacije ovih molekula, što vodi daljim oštećenjima ćelijskih elemenata koji se mogu povezati sa starenjem, ali i nekim oboljenjima, kao što su dijabetes, ateroskleroza i dr. (Kehrer, 2000).

Kao i ostale klase biomolekula i *nukleinske kiseline* su podložne oksidativnim oštećenjima pod uticajem ROS/RNS. Ko rezultat oštećenja mogu se javiti: prekidi jednog lanca, prekid oba lanca, razmena sestrinskih hromatida, unakrsno povezivanje DNK-DNK, unakrsno povezivanje DNK-protein, modifikacija baza (hidroksilacija prstena, otvaranje, kontrakcija prstena, saturacija) kao i oštećenja na šećernoj i fosfatnoj komponenti (Simić i sar., 1989). Najviše studija o oksidativnom oštećenju DNK je u vezi sa formiranjem 8-hidroksi-deoksiguanozina, 8-OH-G (Halliwell i Gutteridge, 1999). Danas su razvijene metode za praćenje koncentracije 8-OH-G u urinu, kao merilo oksidativnog stresa *in vivo* (Maidt i Floyd, 1996). Permanentna modifikacija genetskog materijala u uslovima oksidativnog stresa je prvi korak u mutagenezi, karcinogenezi i starenju.

2.3. Antioksidativni sistem i antioksidanti

Stalno prisutna produkcija slobodnih radikala u biološkim sistemima usloвила je razvoj različitih mehanizama u odbrani organizma od ROS/RNS, bilo u smislu eliminacije ili ublažavanja njihovog negativnog dejstva. Iako različiti, mehanizmi zaštite deluju jedinstveno i sinhronizovano, pa se zajedno nazivaju sistem antioksidativne zaštite. Sistem antioksidativne zaštite obuhvata:

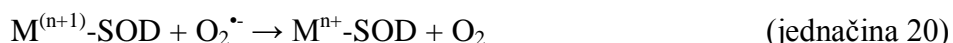
1. Enzimске mehanizme
2. Neenzimске mehanizme (zaštita malim molekulima)

2.3.1. Enzimski mehanizmi antioksidativne zaštite

Enzimski mehanizam antioksidativne zaštite obuhvata enzime koji uklanjaju slobodnoradikalske i reaktivne oblike kiseonika i azota nastale tokom uobičajnog ćelijskog metabolizma ili kao posledica nekog oblika stresa. Svakako najznačajniji su enzimi: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation-S-transferaza (GST) i glutation reduktaza (GR).

Superoksid dismutaza, SOD (EC 1.15.1.1), je metaloprotein koji katalizuje reakciju dismutacije superoksid radikala, $O_2^{\bullet-}$, do molekula kiseonika i vodonik peroksida (jednačina 4). Enzimski katalizovana reakcija je 10^4 brža od spontane (enzimski turnover veći nego kod bilo kog poznatog enzima $\sim 10^5 M^{-1}s^{-1}$ pri pH 7), što je jako bitno za održavanje konstantno niske koncentracije $O_2^{\bullet-}$ *in vivo*, oko 10^{-10} mol/L. Prvi put enzim, superoksid dismutazne aktivnosti, otkriven je kada su McCord i Fridovich uočili da metaloprotein iz goveđe krvi- eritrokuperin, do tada nepoznate funkcije, pokazuje superoksid dismutaznu aktivnost (McCord i Fridovich, 1969).

Do sada su poznata četiri oblika ovog enzima. Svi katalizuju istu reakciju sa različitom efikasnošću, ali se razlikuju po metalnom kofaktoru u aktivnom centru. To su bakar-cink zavisna SOD, Cu,Zn-SOD, mangan zavisna SOD, MnSOD, gvožđe, FeSOD i nikal zavisna SOD, NiSOD. Mehanizam reakcije je sličan kod svih SOD i može se predstaviti sledećim jednačinama:



M= Cu (n=1), Mn (n=2), Fe (n=2), Ni (n=2)

CuZnSOD je homodimer molekulske mase 32,5 kDa. U aktivnom centru je prisutan jon bakra koji učestvuje direktno u reakciji dismutacije, pri čemu menja oksidaciono stanje između +1 i +2, dok je Zn bitan za stabilizaciju strukture. Prisutan je u citosolu i nukleusu svih eukariotskih ćelija. Kod sisara okarakterisan je i ekstracelularni tip SOD (EcSOD) sa bakrom i cinkom kao metalnim kofaktorima, ali je za razliku od citosolne CuZnSOD glikozilovani homotetramer (Fridovich, 1995). **MnSOD**, prisutna u mitohondrijalnom matriksu eukariotskih ćelija je tetramerni protein od 96 kDa, dok je kod prokariota široko rasprostranjena i kao dimer i tetramer. Translacija mitohondrijalne SOD se odvija u citosolu i odatle transportuje do mitohondrija gde ispoljava svoju aktivnost. Međutim, aminokiselinska sličnost mitohondrijalne MnSOD sa prokariotskom MnSOD podržava endosimbiotsku teoriju o poreklu mitohondrija u eukariotskim ćelijama.

FeSOD je dimerni protein prisutan samo kod prokariota i u hloroplastima biljaka (Yost i Fridovich, 1973), dok je najnovije otkriven tip SOD sa niklom u aktivnom centru, **NiSOD** (Kim i sar., 1996)

Katalaza, CAT (EC 1.11.1.6), je enzim sa četiri identične tetraedarski raspoređene subjedinice, ukupne molekulske mase 240 kDa. Svaka subjedinica ima feriprotoporfirin kao prostetičku grupu u aktivom centru (Mates i sar., 1999). Katalizuje reakciju razgradnje vodonik peroksida do vode i kiseonika:



Katalaza je jedan od najefikasnijih poznatih enzima, tako da praktično ne može biti saturisan sa H_2O_2 pri bilo kojoj koncentraciji (Lledías i sar., 1998). Takođe, katalaza pokazuje i peroksidaznu aktivnost, pri čemu kao donor H koristi male molekule poput metanola, etanola, mravlje kiseline, ili fenola:



U katabolizmu vodonik peroksida pored katalaze, uključeni su i drugi tipovi peroksidaza, tako je na primer u animalnim ćelijama značajna glutation peroksidaza (GSH-Px). Osnovna uloga katalaze je u zaštiti ćelije od vodonik peroksida koji se generiše u različitim fiziološkim procesima. Najveća aktivnost katalaze je u peroksidomima, gde je i najveća produkcija H_2O_2 , mada je aktivnost uočena i u mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu i hloroplastima.

Glutation peroksidaza, GSH-Px/ GPX (EC 1.11.1.19), katalizuje redukciju hidroperoksida uz oksidaciju glutationa (GSH):



Ovaj enzim sastoji se od četiri identične subjedinice koje sadrže po jedan seleno-cisteinski ostatak (Sec). Kod sisara GSH-Px postoji u pet izoenzimskih formi. Nivo ekspresije izoformi je tkivno zavisna. Citosolna i mitohondrialna izoforma glutacione peroksidaze (cGPX ili GPX1) redukuje hidroperokside masnih kiselina (LOOH) i H_2O_2 . Međutim, da bi delovale na hidroperokside masnih kiselina nastalih u membrani, LOOH moraju predhodno biti odvojeni od membrane. Zbog toga tokom oksidativnog stresa dolazi do aktivacije i fosfolipaze C, čime se olakšava peroksidazno delovanje. Za razliku od ovih peroksidaza, fosfolipid hidroperoksid glutacione peroksidaze (PHGPX ili GPX4) deluje direktno na fosfolipidne hidroperokside, hidroperokside masnih kiselina i holesterola bez predhodnog odvajanja od membrane (De Haan i sar., 1998). Izoenzim GPX1 uglavnom je prisutan u eritrocitima, bubrezima i jetri, dok GPX4 u renalnim epitelnim ćelijama i testisima. Citosolna GPX2 ili GPX-G1, i ekstracelularna GPX3 ili GPX-P detektovane su u svim tkivima, osim u gastrointestinalnom traktu i bubrezima. Skorije je otkrivena i peta izoforma ovog enzima kod sisara, i za razliku od predhodne četiri je Se-nezavisna GSH-Px (De Haan i sar., 1998). Se-nezavisna glutacione peroksidazna aktivnost detektovana je i kod mnogih insekata, koji zapravo i nemaju Se-zavisnu GSH-Px (Grubor-Lajšić i sar., 1996, Jovanović-Galović i sar., 1997). Se-nezavisna GSH-Px pokazuje peroksidaznu aktivnost samo prema lipidnim peroksidima, a ne i prema H_2O_2 . Mnogi autori ovu GSH-Px smatraju izoformom GST, pa je i označavaju kao GST Px. Iako GSH-Px i CAT dele H_2O_2 kao supstrat, CAT ima mnogo manji afinitet za H_2O_2 nego GSH-Px (Izawa i sar., 1996). Zato se smatra da GSH-Px ima veći fiziološki značaj pri malim koncentracijama H_2O_2 , dok je CAT značajna pri oksidativnom stresu većih razmera.

Glutation-S-transferaza, GST (EC 2.5.1.18) je jedan od najvažnijih enzima detoksikacije mnogih organizama. Značajna je u odbrani ćelije pri oksidativnom stresu i od hemijskih toksina. Eukariotske ćelije sadrže multiple forme ovog enzima sa različitim katalitičkim aktivnostima, što daje široki spektar funkcija ovoj familiji enzima. Sisarske GST su klasifikovane u osam citosolnih klasa (Alfa, Mi, Pi, Teta, Sigma, Zeta, Kapa i Omega) i jednu mikrozomalnu (Ranson i sar., 2001). Kod insekata

okarakterisane su dve klase GST dugo označavane kao klasa I i II međutim, klasifikacija je usklađena i prilagođena sisarskoj, tako da je klasa I okarakterisana kao Delta i specifična je za insekte, dok su članovi klase II pridruženi Sigma klasi (Mittapalli i sar, 2007).

Reakcija koju katalizuje GST je konjugacija redukovanog glutaciona, GSH, sa elektrofilnim supstratom bilo endogene ili egzogene prirode. Ovaj konjugat, rastvoran u vodi i manje toksičan, se prvo eliminiše iz ćelije, a zatim prevodi u merkaptnu kiselinu, koja se lako ekskretuje iz organizma (Ishikawa, 1992). Glavni endogeni izvor opasnih elektrofila je oksidativni metabolizam, pa u tom smislu je značajno delovanje GST na organske hidroperokside i lipidne perokside, ali ne i na vodonik peroksid. Kao egzogeni elektrofilni od značaja su različiti tipovi ksenobiotika. Kod insekata GST je posebno povezana sa otpornošću na insekticide.

GST može da veže i razne klase steroidnih jedinjenja, prostanglandine i leukotrijene, čime olakšava njihov transport (Baars, 1984).

Glutation reduktaza, GR (EC 6.1.4.2) je flavoprotein (FAD kao prostetička grupa) koji katalizuje redukciju disulfidne veze oksidovanog glutaciona (GSSG) i »mešanih« disulfida, koji nastaju u reakciji redukovanog glutaciona i drugih molekula koji sadrže sulfhidrilne grupe, uz učešće NADPH kao redukujućeg agensa (Zeigler, 1985):



Aktivnost GR je blisko povezana sa intezitetom pentozofosfatnog puta, pošto $\text{NADPH} + \text{H}^+$ nastaje u prve dve reakcije oksidacije glukoze ovog metaboličkog puta. Doprinos GR u zaštiti organizma od oksidativnog oštećenja je u održavanju stalne koncentracije redukovanog glutaciona koji je ko-supstrat enzima značajnih u uklanjanju reaktivnih i toksičnih čestica, kao što su GSH-Px i GST. U sisarskim ćelijama dve trećine aktivnosti GR je lokalizovano u citosolu, a jedna trećina u mitohondrijama (Chance i sar, 1979). Kod nekih insekatskih vrsta distribucija aktivnosti GR u ćelijama je različita u odnosu na sisarske, veći nivo aktivnosti je registrovan u mitohondrijalnoj frakciji nego citosolnoj (Jovanović-Galović, 1998; Ahmad i sar, 1988). Kod velikog broja insekata je zabeleženo odsustvo GR aktivnosti, pri čemu je za redukciju GSSG odgovoran enzim tioredoksin reduktaza, koja kao kofaktor takođe koristi $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Kanzok i sar, 2001).

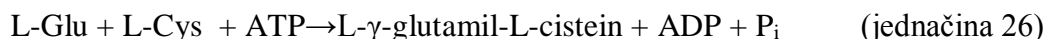
2.3.2. Neenzimatski mehanizmi antioksidativne zaštite–antioksidanti malih molekulskih masa

Neenzimatski sistem antioksidativne zaštite obuhvata određen broj molekula malih molekulskih masa-antioksidante. Oni zauzimaju značajnu ulogu u zaštiti makromolekulskih struktura koje mogu nastati tokom oksidativnog stresa, zaustavljanju propagacije lančanih slobodno radikalnih procesa, ali i u uklanjanju slobodnih radikala u direktnoj reakciji. Generalno se dele na:

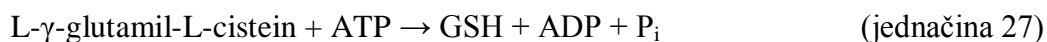
- *hidrofilne*, gde su najznačajniji redukovani glutathion, urat i askorbinska kiselina
- *hidrofobne*, kao što su tokoferoli, karotenoidi

Lista antioksidanata je mnogo šira, i stalno se objavljuju podaci o doprinosu i drugih klasa molekula ovom tipu antioksidativne zaštite. Među njima je svakako melanin, a kod insekata su poliol i ugljeni hidrati kao specifični antioksidanti.

Glutathion je tripeptid (γ -glutamylcysteinylglycine) koji postoji u dve forme- redukovanoj sa slobodnom tiol grupom, GSH, i oksidovanoj kao glutathion disulfid, GSSG. Kao glavni antioksidant prisutan je u svim organizmima (Masella i sar, 2005). Ima značajnu ulogu u održavanju redoks balansa u citosolu i ostalim ćelijskim kompartmentima, kao i antioksidativnoj zaštiti ćelije. U redukovanoj formi deluje kao jak redukujući agens, tj. donor $H^+ + e^-$. Međutim, predajući e^- postaje veoma reaktivan i brzo reaguje sa drugim molekulom glutathiona formirajući glutathion disulfid. Ova reakcija je moguća samo pri visokim koncentracijama redukovanog glutathiona u ćeliji. U citosolu je najveća koncentracija glutathiona, od 1-11 mM, gde se i odvija njegova biosinteza (Valko i sar, 2007). Sintaza se odvija u dve ATP zavisne reakcije:



reakciju katalizuje enzim γ -glutamylcystein sintaza, i druge reakcije



koju katalizuje enzim glutathion sintaza.

Ostali ćelijski kompartmenti, kao što su jedro (3-15 mM), mitohondrije (5-11 mM) i endoplazmatični retikulum, takođe održavaju relativno visoku koncentraciju glutathiona. Međutim, za razliku od citosola, jedra i mitohondrija gde preovladava redukujuća sredina sa svega 5-10%

glutaciona u oksidovanoj formi, u endoplazmatičnom retikulumu je više oksidovana sredina (odnos GSH/GSSG je 1:1 do 3:1; Hwang i sar, 1992). Oksidovana sredina u endoplazmatičnom retikulumu je neophodna zbog sinteze proteina sa disulfidnim vezama, dok je u ostalim delovima potrebno održavanje redukovane sredine upravo zbog očuvanja sulfhidrilnih grupa proteina značajnih u regulaciji mnogih metaboličkih procesa, kao i onih sa ulogom transkripcionih faktora.

GSH je značajan kao kosupstrat enzima GSH-Px pri čemu se nastali GSSG (jednačina 24) redukuje sa NADPH u reakciji katalizovanoj sa GR (jednačina 25). GSH je kao supstrat značajan i za aktivnost GST, glavnog detoksikacionog enzima koji katalizuje reakciju konjugacije redukovanog glutaciona sa hidrofobnim molekulima, poput mnogih ksenobiotika, čineći ih hidrofilnim i omogućavajući na taj način njihovu ekskreciju.

Aktivnost nekih enzima regulisana je tiol-disulfidnom razmenom glutaciona i sulfhidrilnih grupa u aktivnom centru.



Oksidovane tiol grupe enzima u reakciji sa redukovanim glutationom se vraćaju u redukovanu formu



Zbog velikog značaja GSH u uklanjanju slobodnih radikala i singlet kiseonika u ćeliji, sama ćelija na oksidativni stres odgovara brzim povećanjem njegove sinteze, što može biti kritično u toleranciji ćelije na oksidativni stres (Morales i sar., 1998; Kondo i sar, 1993). Značajan je i u regeneraciji ostalih antioksidanata, kao što su vitamin C i E (Valko i sar., 2007)

Urat, so mokraćne kiseline, je jak redukujući agens i zauzima značajno mesto u sistemu antioksidativne zaštite velikog broja organizama. Kod čoveka i primata predstavlja krajnji produkt katabolizma purinskih baza i eliminiše se urinom, pošto ovi organizmi nemaju enzim urikazu koja oksiduje urat do alantoina. Urat je dobar u uklanjanju slobodnih radikala poput peroksil radikala, singlet kiseonika, lipidnih peroksida. Helira jone gvožđa i bakra, i tako sprečava njihovo delovanje kao prooksidanta (Baskin i Salem, 1997). Urat doprinosi polovini antioksidativnog kapaciteta humane plazme, i smatra se da je tokom evolucije zamenio askorbat, kao glavnog hidrosolubilnog

antioksidanta. Značajan je i u stabilizaciji askorbinske kiseline, ali i askorbinska kiselina igra značajnu ulogu u uklanjanju uril radikala. Količina produkata oksidacije urata (oksalurat, parabanik, alantoin) može biti od značaja pri proučavanju oštećenja nastalih delovanjem ROS. Kod ptica i velikog broja insekata urat je krajnji produkt katabolima azotovih jedinjenja, tako da je svakako i značajan antioksidant kod ovih vrsta organizama.

Askorbinska kiselina, kao veoma jak antioksidant direktno reaguje sa mnogim reaktivnim vrstama kiseonika, kao što su superoksid anjon radikal, hidroperoksil radikal, vodonik peroksid, hidroksil radikal, singlet kiseonika (Baskin i Salem, 1997). Zajedno sa glutathionom značajna je u održanju redoks stanja u ćeliji (Levine i sar., 1996). Kao kosupstrat je bitna za aktivnost askorbat peroksidaze, APOx, enzima karakterističnog za više biljke i neke insekte (Mathews, 1997), koja katalizuje redukciju vodonik peroksida do vode. Askorbinska kiselina učestvuje u sintezi kolagena, a značajna je i kao koenzim dopamin- β -hidroksilaze (Ames i sar., 1981). Takođe, askorbat učestvuje i u regeneraciji α -tokoferola od α -tokoferol radikala. U ovim reakcijama askorbinska kiselina učestvuje kao elektron donor pri čemu prelazi u dehidroaskorbinsku kiselinu. Za sve antioksidante, pa i askorbat, je bitno da nakon oksidacije mogu da se regenerišu. Redukcija dehidroaskorbata do askorbata je enzimski katalizovana sa glutathion zavisnom dehidroaskorbat reduktazom, DAR (EC 1.8.5.1). Pri ovoj reakciji glutathion se oksiduje do GSSG, i ponovo redukuje delovanjem enzima GR (jednačina 25). Ukoliko se nastali dehidroaskorbat na ovaj način ne redukuje, dolazi do njegove ireverzibilne degradacije (Meister A., 1994). Veliki broj organizama može da sintetiše askorbat, ali za organizme koji su izgubili ovo svojstvo (primati, zamorče, i veliki broj insekata) neophodan je u ishrani. Za te organizme proces regeneracije askorbata je veoma značajan. Međutim, ako je askorbat u izobilju prisutan u ishrani smanjuje se i značaj ovog ciklusa.

Vitamin E postoji u osam različitih formi, četiri tokoferola i četiri tokotrienola. Ljudski organizam pretežno apsorbuje i akumulira vitamin E u obliku **α -tokoferola** (α -T-OH), koji je ujedno i fiziološki najaktivniji. Liposolubiln je i glavni je membranski antioksidant, kao i antioksidant lipoproteina plazme. Direktno reaguje sa peroksil radikalima prekidajući lančanu reakciju lipidne peroksidacije:



Nastali tokoferil radikal (α -T-O \cdot) je manje reaktivan od peroksil radikala, zbog delokalizacije elektrona u aromatičnom prstenu, i nije sposoban dalje da reaguje sa membranskim lipidima, pa se na taj način prekida lanac lipidne peroksidacije. Nastali α -T-O \cdot uklanja askorbinska kiselina sinergističkom antioksidativnom zaštitom, ali i GSH (Liebler i sar., 1986):



Nastali askorbil radikal se redukuje do askorbata enzimskim putem uz NADH ili GSH kao kofaktorima (Baskin i Salem, 1997).

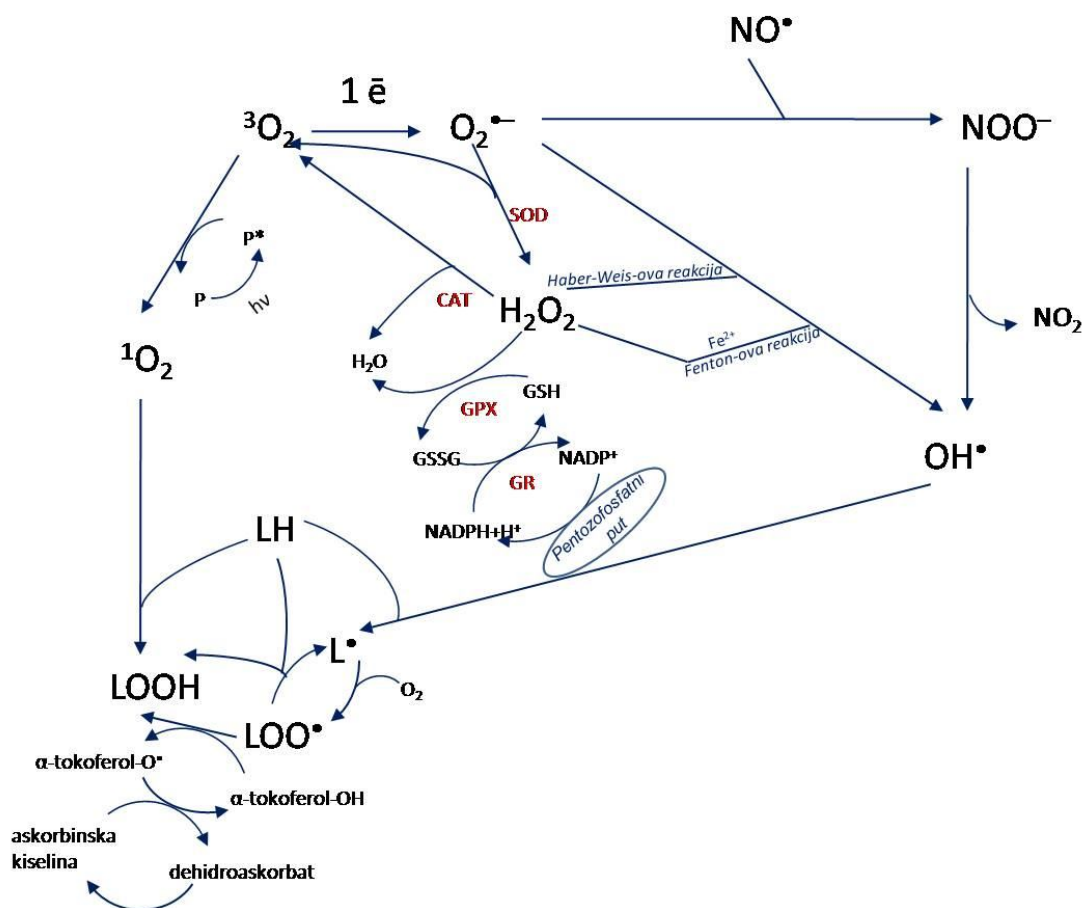
Karotenoidi (CAR) su grupa liposolubilnih jedinjenja terpenске prirode. Najznačajnija klasa karotenoida su derivati polienskog lanca sa 40 atoma ugljenika, sa cikličnom grupom (prstenom) na krajevima lanca, koja može dodatno da ima neku funkcionalnu grupu sa kiseonikom (hidroksilna, karbonilna). Dobri su u uklanjanju singlet kiseonika. Pri apsorpciji energije prelaze u energetski bogatiji nivo tripleta (^3CAR), a vraćanje u osnovno stanje (^1CAR) je praćeno emisijom toplotne energije. Likopen je izuzetno efikasan u uklanjanju $^1\text{O}_2$ sa konstantom brzine reakcije od 3.1×10^{10} ($\text{kq L}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), što je gotovo duplo više od α - i β -karoteina (1.9×10^{10} i 1.4×10^{10}), kao najzastupljenijih karotenoida (Di Mascio i sar., 1990).



Pored singlet kiseonika CAR reaguju i sa drugim reaktivnim česticama, kao što su peroksil radikali i azot dioksid radikal, bilo oduzimanjem elektrona, vodonika ili adicijom radikala (Mortensen i sar., 1997):



Na *šemi 3.* data je mreža najznačajnijih reaktivnih čestica kiseonika, ROS i azota, RNS, zajedno sa antioksidativnim sistemom zaštite, ASZ, za tipičnu eukariotsku ćeliju.



Šema 3. Produkcija reaktivnih čestica kiseonika i azota tokom ćelijskog metabolizma i antioksidativni sistem zaštite

2.3.2.1. Melanin- antioksidant ili prooksidant?

Melanin je pigment velike molekulske mase, čija biosinteza uključuje niz sukcesivnih oksidativnih polimerizacija fenolnih i indofenolnih molekula, nastalih iz aminokiselinskog prekursora L-tirozina. Zastupljen je u svim filogenetskim carstvima, sa širokim spektrom različitih uloga, uključujući termoregulaciju, hemoprotekciju, kamuflažu, deo je nespecifičanog (urođenog) imuniteta kod beskičmenjaka i dr. (Riley, 1997). Poznata su dva osnovna tipa melanina, crni eumelanin nastao polimerizacijom dihidroksifenolnih prekursora, i crveno/braon feomelanin čija je boja rezultat inkorporacije cisteina tokom polimerizacije.

Melanogeneza -Najviše saznanja o melanogenezi potiče iz istraživanja na sisarskim modelima, gde je i najbolje proučena. Međutim, kod drugih klasa organizma, posebno insekata, postoje određene

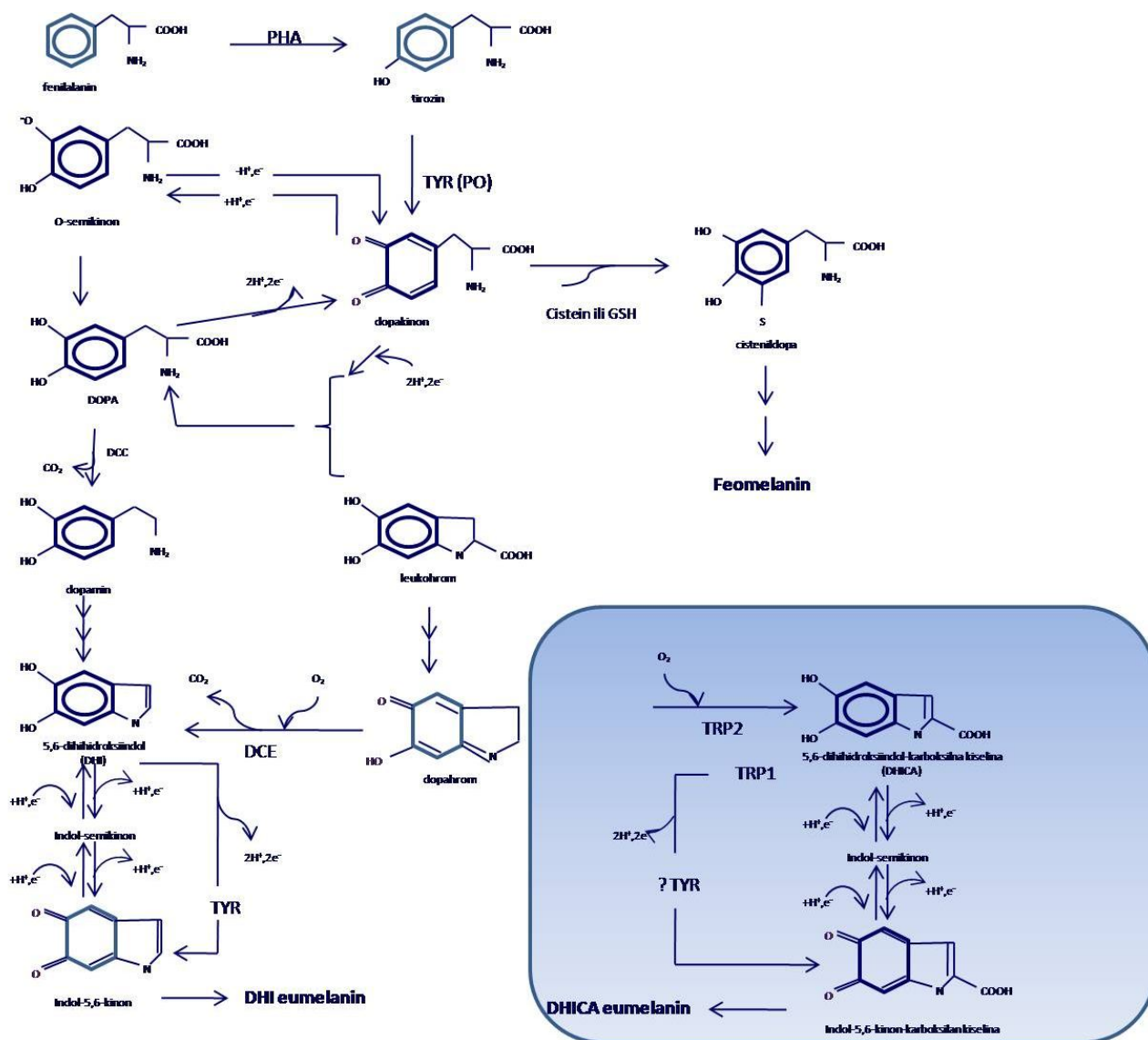
specifičnosti u melanogenezi koje su povezane i sa različitim ulogom pigmenta kod ovih organizama (Prota, 1992; Sanchez-Ferrer i sar., 1995; Napp i Christensen, 2005).

Melanogeneza kod sisara se odvija u dva razvojno različita tipa ćelija *melanocitima*, poreklom iz nervne kreste koje su lokalizovane u koži, kosi, unutrašnjem uvu, i delu mozga, i ćelija poreklom iz očne jabučice, koje formiraju deo retinalnog endotelijuma. Melanociti imaju specijalizovane organele *melanozome* u kojima se odvija sam proces melanogeneze (Prota, 1992; Riley, 1993). Melanozomi poseduju transmembranske transportere za molekule neophodne u biosintezi melanina, kao što su fenilalanin, tirozin, i tiolna jedinjenja. Ove organele nisu identifikovane kod insekata. Pigmenti, poput drosopterina i omohroma, u organelama detektovanih kod *Drosophila* nisu iste hemijske prirode kao melanin.

Melanogeneza otpočinje hidroksilacijom fenilalanina do tirozina. Reakciju katalizuje fenilalanin hidroksilaza (PAH, EC 1.14.16.1). Sledeća dva koraka u melanogenezi su katalizovana enzimom tirozinaza. **Tirozinaza** (monofenoldihidroksifenilalanin: kiseonik oksidoreduktaza, EC 1.14.18.1), katalizuje hidroksilaciju tirozina do dihidroksifenilalanina (L-DOPA), i dalje L-DOPA do dopakinona (DQ). Dopakinon je reaktivni intermedijer melanogeneze i može da reaguje sa tiolnim jedinjenjima, kao što su cistein i glutationil konjugati, i vodi do sinteze crveno/braon pigmenta feomelanina (Napolitano i sar, 2000). U odsustvu tiola DQ podleže spontanoj intramolekulskoj ciklizaciji do leukodopahroma. Iz redoks ciklusa dopakinona sa leukodopahromom nastaje dopahrom. Dopahrom ne-enzimskom dekarboksilacijom prelazi u 5,6-dihidroksiindol (DHI) koji zatim daje indol-5,6-kinon i vodi u sintezu DHI-eumelanina. Međutim, dopahrom može katalizovnom tautomerizacijom sa enzimom dopahrom tautomerazom (TRP2, tyrosinase-related protein 2, EC 5.3.3.12) da pređe u mnogo stabilniji intermedijer 5,6-dihidroksiindol-karboksilnu kiselinu (DHICA). Enzim DHICA oksidaza (TRP1, tyrosinase-related protein 1, EC 5.3.3.12) oksiduje DHICA do indol-5,6-kinin-2-karboksilne kiseline koja ne-enzimski polimerizuje do DHICA-eumelanina. Kod insekata dopahrom konvertujući enzim (DCE) favorizuje rearanžiranje dopahroma u DHI, tako da postiže sintezu DHI-eumelanina (Han i sar., 2002; Johanson i sar., 2001), a ne DHICA-eumelanina. Nema podataka da sinteza DHICA-eumelanina ide kod insekata (Nappi i Christensen, 2005), već je isključivo prisutan mnogo citotoksičniji DHI-eumelanin (Urabe i sar., 1994). Sam mehanizam koji određuje odnos eumelanin/feomelanin nije poznat, ali se predpostavlja da intamelazomalni pH igra značajnu ulogu. Ovaj odnos je bitan faktor za citoprotekciju, imajući u vidu da sisarski eumelanin ima veći stepen fotoprotekcije od feomelanina (Prota, 1992).

Pored već navedenih specifičnosti insekatske melanogeneze, ona se u još nekoliko detalja razlikuje od sisarske. Insekatska tirozinaza, ili često u literaturi nazvana polifenoloksidaza (PO), je solubilni protein, za razliku od sisarske koja je transmembranski glikoprotein. Tirozinaza insekata se nalazi u hemolimfi i *hemocitama*, koji su uključeni u veliki broj procesa sklerotizacije i melanizacije, poput formiranja kutikule, tamnjenja jaja (egg tanning, eng.), zarastanja rana, nespecifičnom imunitetu (Cerenius i Soderhall, 2004; Li i sar., 1992). Tirozinaza kod insekata se sintetiše u vidu proenzima, zimogena, koji ograničenom proteolizom serin-proteaza prelazi u aktivan enzim. Do aktivacije proteaza dolazi tokom infekcije i povreda (Ashida i Brey, 1995; Cerenius i Soderhall, 2004), što je u sklopu uloge melanina i samog procesa melanogeneze u nespecifičnom imunitetu insekata.

Melanin je **redoks-aktivan** polimer uključen u reakcije transfera elektrona sa različitim redukujućih ili oksidujućih molekula. Zavisno od redoks potencijala u ćeliji melanin može da deluje kao citoprotektor uklanjajući slobodne radikale i vezujući redoks aktivne metalne jone, ili suprotno kao generator citotoksičnih jedinjenja. Sama polimerizacija melanogenih intermedijera je slobodnoradikalska i uključuje kinonske (Q) i semikinonske ($\cdot\text{SQ}^-$) derivate indolnih i difenolnih prekursora (šema 4). Tendencija ovih intermedijera je generisanje ROS i RNS. Semikinon, $\cdot\text{SQ}^-$ koji nastaje nepotpunom redukcijom kinona sa tioredoksin reduktazom, hemijski oponaša $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Cenas i sar, 2004), i sposoban je da redukuje jone gvožđa i bakra (Fe^{3+} i Cu^{2+} do Fe^{2+} i Cu^+) koji dalje u Fentonovoj reakciji sa H_2O_2 generišu OH^\cdot . Druga bitna komponenta u melanogenezi je produkcija H_2O_2 , koji može da reaguje sa $\text{O}_2^{\cdot-}$, prelaznim metalima (jednačina 7 i 8) i kao što je već rečeno, dovede do formiranja mnogo reaktivnijeg OH^\cdot , koji uzrokuje višestruka oksidativna oštećenja ćelije.



Šema 4. Osnovni principi melanogeneze. Enzimi uključeni u melanogenezu kod kičmenjaka su: fenilalanin hidrosilaza (PHA), tirozinaza (TYR), DHICA oksidaza (tyrosinase- related protein 1-TRP1), dopahrom tautomeraza (tyrosinase- related protein- TRP2) i dopa dekarboksilaza (DCC). Kod insekata dopa dekarboksilaza (DCE) ubrzava formiranje DHI dekarboksilacijom dopahroma. Nije poznato da se DHICA put (osjenčen na šemi) odvija kod insekata. TYR kod insekata se naziva još i polifenol oksidaza (PO)(Nappi i Christensen, 2005)

Poznato je da *in vivo* melanin vezuje metalne jone, čime se dramatično menja redoks status (Sarzanini i sar., 1992). Kod insekata, prekursori melanina zajedno sa ROS i RNS predstavljaju moćan sistem odbrane od parazitskih infekcija, često citotoksičan za sam organizam. Na primer, povećan nivo DHI-melanina, kao i $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 i NO^{\bullet} su zabeleženi kod *D.malanogaster* tokom enkapsulacije parazita (Nappi i Vass, 1998, 2001). Međutim, sam melanin i melanogeneza, koje prate fagocitozu i inkapsulaciju patogena mogu imati i funkciju zaštite endogenih tkiva od sistematskih oštećenja rezultovanih uništavanjem patogena.

2.3.3. Regulacija ćelijske redoks homeostaze i redoks signaling

Stalno prisutan transfer elektrona između redoks aktivnih vrsta, tokom mnogobrojnih metaboličkih, signalnih i transkripcionih procesa, je zavistan od ćelijskog **redoks stanja** (koncentracija elektrona redoks aktivnih ćelijskih konstituenata). Redoks stanje ćelije često se opisuje kao odnos redoks parova, poput GSH/GSSG, $NAD^+/NADH$, $NADP^+/NADPH$, $Asc^{\bullet-}/Asc^-$ i drugih, unutar ćelije i ćelijskih kompartmenata, ali danas se sve češće proširuje na redoks milje ćelije. Kako su mnogi ćelijski procesi povezani sa redoks stanjem ćelije, to je neophodna i njegoa regulacija, tzv. održanje **redoks homeostaze**. Ćelija održava redoks stanje u uskim granicama pod normalnim uslovima, slično regulaciji pH vrednosti u biološkim sistemima. Međutim, pored normalnih metaboličkih procesa, dodatno na poremećaj redoks stanja utiču i različiti stresni procesi praćeni povećanom produkcijom ROS/RNS. Tiolni ostaci proteina, u formi ostataka cisteina, su kritični u redoks regulaciji. Doprinos daje ceo antioksidativni sistem zaštite, međutim centralni kontrolni sistemi su tiol-zavisni glutation i tioredoksin (Trx) redoks sistemi (Holmgren i sar., 2005). Oba sistema koriste reverzibilne ditiol-disulfid izmene pri kojima se elektroni transportuju od NADPH do mnogobrojnih supstrata (šema 5.).

Glutation redoks sistem uključuje NADPH zavisnu glutation reduktazu (GR), glutation (GSH/GSSG) i glutation peroksidazu (GPx). Sistem predstavlja seriju reakcija koje zatvaraju ciklus oksidacije i redukcije glutationa. Organske perokside i vodonik peroksid, nastao SOD katalizovanom dismutacijom ili u toku nekih metaboličkih procesa, redukuje glutation peroksidaza uz oksidaciju GSH do GSSG. Oksidovani glutation, GSSG redukuje flavoprotein glutation reduktaza uz oksidaciju NADPH, koji nastaje u pentozofosfatnom putu, čime se zatvara ciklus.

Tioredoksin redoks sistem uključuje tioredoksin ($Trx-SH_2/Trx-aS_2$), NADPH zavisnu tioredoksin reduktazu (TrxR) i tioredoksin peroksidazu (TrxP). Slično predhodnom sistemu, ovaj sistem

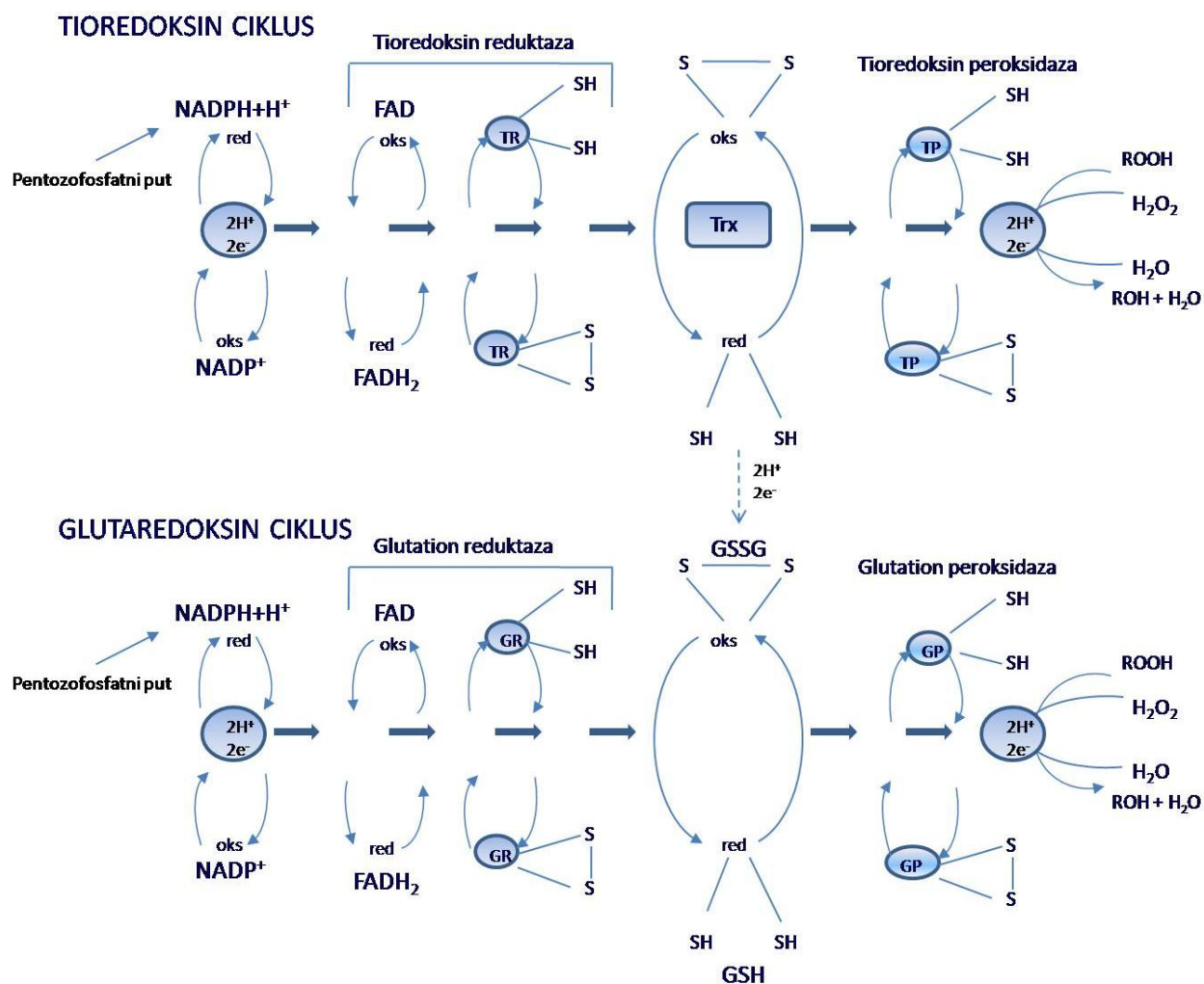
uključuje seriju reakcija koje zatvaraju ciklus oksidacije i redukcije tioredoksina. Tiorredoksin je protein male molekulske mase (12 kDa). Prisutan je u citosolu, jedru i mitohondrijama, gde ima veliki broj različitih funkcija, kao što su uloga antioksidanta, u produkciji deoksiribonukleotida, redoks kontrola, ćelijska proliferacija i diferencijacija, embriogeneza, apoptoza i dr (Arner i Holmgren, 2000; Das, 2004). U ovom sistemu tioredoksin služi kao donor elektrona tioredoksin peroksidazi, TrxP koja eliminiše organske perokside i vodonik peroksid. Ponovnu redukciju oksidovanog tioredoksina katalizuje flavoprotein, tioredoksin reduktaza, TrxR uz oksidaciju NADPH. Insekti koji nemaju GR, moraju se isključivo osloniti na Trx sistem u regulaciji nivoa redukovanog GSH (Missirlis i sar, 2002; Becker i sar., 2003). Kod ovih organizama u enzimski nekatalizovanoj reakciji GSSG se redukuje do GSH, pri čemu je redukujući evivalent Trx-SH koji se oksiduje do Trx-S₂ (Kanzok i sar., 2001).

Oksidativni stres dovodi do promene redoks stanja u ćeliji, iz redukujuće sredine u oksidujuću, pre svega povećanjem koncentracije GSSG. Porast nivoa GSSG dovodi sa druge strane do nastanka »mešovutih« disulfida proteina. Kako je za veliki broj proteina uključenih u signaling, kao što su receptori, protein kinaze i neki transkripcioni faktori, ključno prisustvo tiola, formiranje ovih disulfida može da menja njihovu funkciju. U tom smislu, GSSG može da se smatra ne-specifičnim signalnim molekulom.

Termin **redoks signaling** se koristi za opisivanje procesa regulacije prenosa signala kroz redoks reakcije (Valko i sar, 2007). Kako sistem glutation i tioredoksin održavaju redoks stanje ćelije može se smatrati da su zapravo deo redoks signalinga. Redoks signaling podrazumeva privremeno narušavanje redoks stanja, povećanjem produkcije ROS/RNS ili smanjenjem aktivnosti antioksidativnog sistema. Regulisano povećanje ROS/RNS dovodi do privremenog kontrolisanog redoks disbalansa, što pruža fiziološku osnovu za redoks regulaciju. Procesi redoks signalinga su adaptirani da indukuju protektivni odgovor na oksidativni stres i vraćanje u primarnu redoks homeostazu. Mnogi tipovi ćelija stimulisani citokinima, faktorima rasta i nekim hormonima, kao što su interleukin-1 β , interleukin-6, tumor nekroza faktor- α , angiotenzin II, faktor rasta fibroblasta i dr., generišu niske koncentracije ROS/RNS (Thannickal i Fanburg, 2000).

Ćelijski ciklus je takođe praćen promenom redoks stanja u ćeliji, regulisan promenom koncentracije GSH (Kern i Kehrer, 2005). Generalno, redukujuća sredina u ćeliji (visoke koncentracije GSH i Trx-SH) stimuliše proliferaciju, pri čemu samo mali pomak ka oksidujućoj sredini inicira diferencijaciju. Veće promene ka oksidujućoj sredini vode ćeliju ka apoptozi i nekrozi (Evens, 2004; Voehringer i sar, 2000).

Produkcija ROS/RNS dovodi do promene funkcije delova singalnih mehanizama osetljivih na promenu tio/disulfidnog redoks statusa, kao što su redoks senzitivni transkripcioni faktori (NF- κ B i AP-1), familija Src kinaza, JNK i p38 MAPK signaling putevi, insulin receptor kinaza i drugi (Dröge, 2002; Galter isar., 1994; Hehner i sar., 2000). Na ovaj način ROS/RNS igraju značajnu fiziološku ulogu kao sekundarni glasnici.



Šema 5. Tioredoksin i glutaredoksin ciklusi: redukcioni ekvivalenti sa NADPH prenose se preko flavoproteina glutation reduktaze (GR) i tioredoksin reduktaze (TR), zatim glutationa (GSSG/GSH) i tioredosina ($\text{TrxS}_2/\text{TrxSH}$) do glutationa peroksidaze (GP) i tioredoksin peroksidaze (TP) koje redukuju H_2O_2 i organske perokside. Insekti koji nemaju GR, centralni transfer elektrona sa GSSG je u neenzimatski katalizovanom transferu na Trx (Nappi i Christensen, 2005)

2.3.3.1. Vodonik peroksid kao sekundarni glasnik

Sve je veći broj podataka o ulozi vodonik peroksida, H_2O_2 kao sekundarnog glasnika u signalnoj transdukciji. Mnogi ćelijski procesi, kao što su proliferacija, diferencijacija, migracija, apoptoza su regulisani signalnim putevima aktiviranih H_2O_2 . Kao sekundarni glasnik, H_2O_2 ispunjava više kriterijuma (Bystrova i Budanova, 2007):

1. Pre svega, kao i svaki drugi sekundarni glasnik i H_2O_2 je mali, lako difuzibilni molekul koji brzo difunduje kroz ćelijski citosol noseći koncentraciono zavisani signalni talas.
2. Koncentracija sekundarnog glasnika brzo raste nakon interakcije receptor-agonist. Tako, delovanje mnogih stimulusa, poput nekih citokina i faktora rasta, praćeni su naglim povećanjem koncentracije H_2O_2 u ćeliji (H_2O_2 burst, eng.), dok sa druge strane blokiranjem produkcije H_2O_2 dolazi do supresije ovih signala.
3. Sintetiše se u specifičnoj enzimski katalizovanoj reakciji. Naime, H_2O_2 je proizvod normalnog aerobnog metabolizma i njegova koncentracija u ćelijama se održava na bazalnom nivou. Zbog lake difuzije kroz ćelijsku membranu nemoguće ga je deponovati u ćelijskim kompartmentima, kao na primer kalcijum, tako H_2O_2 signal je moguće kontrolisati samo na nivou njegove sinteze/degradacije. Postoji više dokaza da različite forme NADPH oksidaza (Nox), čija je aktivnost regulisana različitim stimulusima (različiti citokini i faktori rasta, insulin, angiotenzin II), su uključene u produkciju H_2O_2 kao sekundarnog glasnika (Lambeth, 2004). Aktivirane Nox generišu superoksid radikal, koji dalje podleže reakciji dismutacije kada nastaje H_2O_2 .
4. Nakon signalne transdukcije koncentracija sekundarnog glasnika brzo opada. Antioksidativni enzimi, poput katalaze, glutation peroksidaze, peroksiredoksina učestvuju u efikasnoj eliminaciji H_2O_2 . Regulacijom aktivnosti ovih enzima moguća je modulacija peroksidne signalne transdukcije.
5. Sekundarni glasnici imaju sposobnost reverzibilne modulacije proteina uključenih u određenim intracelularnim signalnim putevima. U tom smislu, H_2O_2 ima ulogu modulatora aktivnosti različitih signalnih molekula, kao što su fosfataze, kinaze, proteaze, jonski kanali i transporter, transkripcioni faktori. Target za H_2O_2 u signalnim putevima su sulfhidrilne (-SH) grupe bočnih lanaca cisteinskih ostataka proteina. Sulfhidrilne grupe tada podležu oksidaciji

prelazeći u sulfatidnu kiselinu (SOH) ili praveći inter-, odnosno intramolekulske disulfide, što sve dovodi do konformacionih promena proteina. Tako je, na primer, aktivacija mnogobrojnih redoks-osetljivih proteina posredovana oligomerizacijom indukovanom oksidacijom tiol grupa ili usled formiranja intramolekulskih ili intermolekulskih disulfida, kao što je aktiviranje Hsp33. Neaktivni oblik Hsp33 je monomerni protein sa četiri –SH grupe koje vezuju jon cinka. Usled oksidacije ovih cisteinskih ostataka u Hsp33 dolazi do formiranja dva intramolekulska disulfidna mosta i oslobađanja jona cinka. Daljim rearanžiranjem dva intramolekulska mosta u intermolekulska protein se aktivira (Papp i sar., 2003).

6. Specifičnost sekundarnog glasnika, kao jako bitne karakteristike neophodne za ispravan biološki odgovor, za H_2O_2 bila je dosta dugo dovođena u pitanje. Dilema se odnosila na to kako H_2O_2 selektivno prepoznaje tiolne grupe samo proteina uključenih u prenos signala, pored izobilja tiolnih grupa i u drugim proteinskim molekulima. Odgovor leži u različitoj reaktivnosti –SH grupa, odnosno sposobnosti da budu oksidativno modifikovane u prisustvu H_2O_2 , koja je uslovljena njihovom interakcijom sa susednim funkcionalnim grupama. Tako proteini uključeni u redoks signalingu imaju reaktivnije tiolne grupe.

Paradoks u ulozi H_2O_2 kao sekundarnog glasnika je njegova toksičnost, pošto je sposoban da dovede do oksidativnih oštećenja mnogih biomolekula, uključujući proteine, lipide, nukleinske kiseline. Međutim, H_2O_2 je toksičan samo u jako visokim koncentracijama koje prevazilaze antioksidativni kapacitet ćelije (okidativni stres), kad i gubi osobine signalnog molekula.

Posebna pažnja je data skorašnje otkrivenim bifunkcionalnim proteinima **proksiredoksinima (Prx)**, koji imaju ulogu intracelularnog senzora za H_2O_2 i regulišu njegovu signalnu funkciju, akumulaciju i propagaciju H_2O_2 signala. Prx je familija proteina, molekulske mase od 22-30 kDa sa tioredoksin peroksidaznom aktivnošću, prisutni u količini većoj od 1% ukupnih proteina eukariotske ćelije. Prx za razliku od katalaze i glutation peroksidaze nemaju prostetičku grupu ni metalnih jona u aktivnom centru. Peroksidaznu aktivnost omogućavaju esencijalni tiolni ostaci cisteina lokalizovani na N-terminalnom domenu proteina. U prisustvu H_2O_2 ove grupe lako podležu oksidaciji i dimerizaciji. Ovako aktivirani Prx stimulišu dalje molekule uključene u brojne ćelijske signalne puteve (MAP kinaze, NF- κ B), vršeći propagaciju H_2O_2 signala. U katalitičkom ciklusu oksidovani Prx redukuje tioredoksin reduktaza. Antioksidativne osobine Prx su funkcionalno limitirane usled visoke osetljivosti tiolnih grupa u katalitičkom centru na hiperoksidaciju, kada nastaju $-SO_2H$ i $-SO_3H$.

Bifunkcionalnost ovih molekula se ogleda u njihovom funkcionalnom preokretu peroksidazne aktivnosti u ulogu čaperona. Aktivnost Prx je regulisana promenom oligomernog stanja. Kao posledica hiperperoksidacije, Prx formiraju štapičaste oligomere mase 100-1000 kDa (Moon i sar., 2005). Ovi čaperoni imaju protektivnu ulogu u sprečavanju pogrešnog uvijanja ćelijskih proteina u uslovima oksidativnog stresa. (Rand i Grand, 2006).

3. Metabolomika

Metabolomika je nova sistemska studija, koja ima za cilj skrining jedinstvenog niskomolekulskog metaboličkog profila, tzv. hemijskog otiska (chemical fingerprint, eng.), koji za sobom ostavlja specifičan ćelijski proces. Set malih molekula-metabolita (MW < 1500Da, kao što su metabolički intermedijeri, hormoni i drugi signalni molekuli, sekundarni metaboliti) u jednom biološkom uzorku naziva se **metabolom**. Izraz je pandan genomu, transkriptomu i proteomu. Zajedno ova četiri »oma« izgrađuju **sistemsku biologiju**. Metabolom, poput transkriptoma i proteoma, je dinamičan, i menja se iz sekunde u sekundu.

U stručnoj literaturi se pored metabolomike koristi i izraz **metabonomika**. Za sada postoje neslaganja oko definicije i postavljanja jasnih razlika između metabolomike i metabonomike. Kao prvo razlika je u analitičkim tehnikama, metabolomika se oslanja na tehnike zasnovane na masenoj spektrometriji (MS), dok metabonomika na nuklearno magnetnoj rezonantnoj spektroskopiji (NMR - Nuclear Magnetic Resonance). Međutim, suštinska razlika je u činjenici da metabolomika postavlja samo metaboličke profile, dok metabonomika opisuje multiple metaboličke promene izazvane različitim metaboličkim perturbacijama. U praksi se ne pravi razlika između ova dva izraza i smatraju se sinonimima, samo što je metabolomika više prisutna u svakodnevnoj stručnoj komunikaciji.

Osnova sadašnjih istraživanja u oblasti metabolomike, leži u radu stotina naučnika iz oblasti metaboličke biohemije i kliničke hemije. Zahvaljujući ovim istraživanjima utvrđeni su i postavljeni metabolički putevi, koji su danas dostupni u vidu on-line baza podataka poput KEGG (Kanehisa i sar., 2004), BipCys (Krummenacker i sar., 2005) i Reactome (Joshi-Tope i sar., 2005). Od skora, i informacije vezane o genima i oboljenjima povezanim sa poremećajima ovih putevima su takođe dostupni on-line (Wishart i sar., 2007). Međutim, metabolomika ima mnogo šire zahteve i traži brzu identifikaciju velikog broja metabolita u isto vreme. Sveobuhvatnom analizom metabolita i/ili njihovom kombinacijom, mogu se definisati biomarkeri za razna oboljena, fiziološke adaptacije i sl. Tako da istraživanja iz oblasti metabolomike imaju veliku primenu u kliničkim istraživanjima: u postavljanju dijagnoze i prognoze toka oboljenja, praćenju terapije, metabolizama lekova, toksikologiji i sl.

Ograničavajuća činjenica u metabolomičkim istraživanjima je da ne postoji mogućnost analize čitavog niza metabolita samo jednom analitičkom tehnikom. Baze podataka se uglavnom zasnivaju na podacima dobijenim NMR analizama. Već su napravljeni prvi koraci u formiranju baze podataka

humanog metaboloma. U januaru 2007. godine, naučnici sa Univerziteta u Alberti i Univerziteta u Kalgariju (Wishart i sar., 2007) kao rezultat rada na projektu pod nazivom Human Metabolome Project dali su skicu (nacrt) humanog metaboloma u vidu odgovarajuće elektronske baze podataka-HMDB (the Human Metabolome Database, dostupna na www.hmdb.ca). HMDB sadrži okarakterisanih i katalogizovanih 2500 metabolita, 1200 komponenata lekova i 3500 komponenata hrane, koji se mogu naći u ljudskom organizmu, tkivima i tečnostima u koncentraciji većoj od 1 μM . Mnogobrojni su projekti u oblasti metabolomičkih istraživanja, koja za cilj imaju formiranje jedinstvenih metabolomičkih baza podataka i na drugim organizmima, pre svega biljnim i mikroorganizmima (na pr. MeT-RO, www.metabolomics.bbsrc.ac.uk/MeT-RO.htm), dok za druge grupe organizama, insekti i sl., za sada postoje samo mnogobrojne pojedinačne metabolomičke studije.

Bioanalitičke metode koje se koriste u metabolomici su ustvari adaptirane postojeće biohemijske tehnike. Osnovne faze svih metabolomičkih istraživanja su:

1. ekstrakcija metabolita iz biološkog materijala, odgovarajućim rastvaračem ili sistemom rastvarača
2. profilisanje velikog broja metabolita u isto vreme, umesto analize pojedinačnih
3. uspostavljanje odnosa između metabolita korišćenjem multivarijabilnih statističkih metoda

Dve osnovne metode detekcije u metabolomičkim istraživanjima su masena spektrometrija i NMR spektroskopija.

Masena spektrometrija se koristi posle separacije metabolita gasnom hromatografijom (GS), HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ili kapilarnom elektroforezom (CE-capilar electrophoresis), pri čemu najčešće korišćena i »najprirodnija« kombinacija je GS-MS. Postoje dve vrste **gasne hromatografije** gasno-čvrsta i gasno-tečna, zavisno od prirode stacionarne faze. U prvoj je kolona napunjena adsorbensom ujednačene krupnoće (silika gelom, aluminijum oksidom, aktivnim ugljem, itd.), a razdvajanje komponenti je na principu selektivne adsorpcije. Daleko univerzalnija je gasno-tečna hromatografija gde je stacionarna faza kapilarni sloj tečnosti ravnomerno raspoređen po stacionarnom nosaču ili unutrašnjem zidu kolone. Komponente se razdvajaju na osnovu različite rastvorljivosti u stacionarnoj fazi. Mobilna faza je inertni gas, najčešće argon, helijum ili azot. Da bi se komponente smeše razdvajale ovom tehnikom neophodno je da se prevedu u gasovito stanje, pa je ujedno to i ograničenje gasne hromatografije (jedinjenja

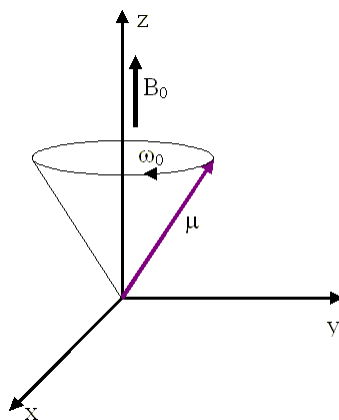
koja se razdvajaju moraju biti isparljiva i termostabilna). Često biomolekuli nisu lako isparljivi, pa se pre razdvajanja gasnom hromatografijom hemijski derivatizuju u isparljivija jedinjenja. Izbor radne temperature kolone je takođe kritičan, a zavisi od uzorka koji se analizira. Kod modernih instrumenata postoji mogućnost programiranja temperaturnog režima u koloni po ubrizgavanju uzorka, što omogućava dodatno razdvajanje komponenti prema tački ključanja. Maseni spektrometar kao detektor omogućava veoma osetljivu i specifičnu detekciju metabolita. Molekuli uzorka u ovom detektoru nakon bombardovanja elektronima visoke energije, podležu jonizaciji i dalje kaskadnoj fragmentaciji, dajući jone različite mase i naelektrisanja. Maseni analizator ovog detektora razdvaja jonske fragmente po odnosu masa/naelektrisanje (m/z) i šalje ih na detektor koji meri zastupljenost svakog fragmenta. Na ovaj način dobijaju se maseni spektri koji predstavljaju zavisnost zastupljenosti pojedinačnih fragmenata od m/z . Maseni spektar nekog jedinjenja predstavlja specifičan »fingerprint« datog molekula, pošto fragmentacija molekula zavisi od njegove strukture. Neprekidnim merenjem jonske struje dobija se gasni hromatogram, a specifična detekcija molekula je na osnovu snimljenih masenih spektara pojedinačnih komponenti. Identifikacija komponenti se vrši poređenjem masenih spektara iz postojećih baza podataka, bilo komercijalno dostupnih ili posebno formiranih u datoj laboratoriji, snimanjem odgovarajućih standarda. Kako je snimanje spektra brzo, oko 1s, moguće je praktično snimiti spektre svih eluiranih jedinjenja iz smeše. Međutim kod mnogih grupa jedinjenja gde postoji veliki broj izomera, kao kod poliola, maseni spektri nisu jedinstveni za svako jedinjenje, tako da je identifikacija najpouzdanija kombinovanjem retencionih indeksa i masenih spektara.

Detekcija metabolita ***NMR spektroskopijom*** ne zahteva prethodnu primenu tehnika separacije biomolekula, niti njihovu derivatizaciju. Sve vrste malih metabolita mogu da se mere istovremeno, pa je na neki način NMR univerzalni detektor. NMR detekcija se zasniva na osobini jezgara nekih atoma, spin aktivno jezgro, kao što su vodonik (^1H), ugljenik-13 (C^{13}), da izlaganjem dejstvu jakog i homogenog spoljašnjeg magnetnog polja počinju da se kreću konusnom putanjom oko pravca ovog magnetnog polja, odnosno vrše precesiju. Spin aktivna jezgra su ona koja imaju ugaoni moment ($I \neq 0$). Po kvantnoj teoriji broj dozvoljenih orijentacija spina ovih spin aktivnih jezgara je, takođe, različit od nule, te mogu da vrše precesiju u spoljašnjem magnetnom polju. Kao naelektrisane čestice koje se kreću, ova jezgra, imaju i magnetni moment (μ). Ugaoni moment i magnetni moment su određeni brojem protona (p) i neutrona (n) u jezgru. Postoji jednostavno pravilo, ako su p i n parni tada je $I=0$, ako je $p+n$ neparno I ima polucele vrednosti ($1/2, 3/2, \dots$), i ako su p i n

neparni I je ceo broj (1,2,3...). Precesione frekvencije spin aktivnih jezgara zavise od jačine spoljašnjeg magnetnog polja, kao i od osobina samog jezgra (I i μ), pa su zbog toga karakteristične za svako jezgro (jednačina 33), a nalaze se u oblasti radio-talasa. Kada se istovremeno ozrače elektromagnetnim talasima stupaju u *nuklearno magnetnu rezonanciju*, ako je zadovoljen uslov iz sledeće jednačina:

$$\nu = \gamma(h/2\pi)B_0 \quad (\text{jednačina 35})$$

gde su: ν -frekvencija precesije jezgra; γ - žiromagnetni odnos (predstavlja količnik magnetnog i ugaonog momenta); h - Plankova konstanta; π -3,14 ; B_0 -jačina spoljašnjeg magnetnog polja



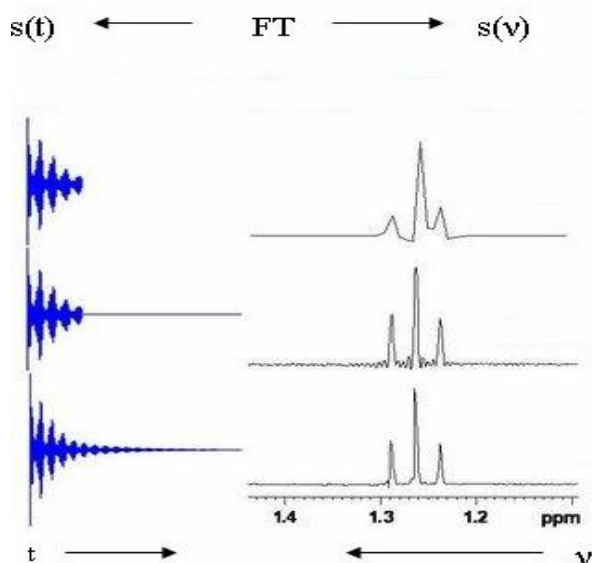
Šema 6. Precesija spin aktivnog jezgra u spoljašnjem magnetnom polju (B_0); μ -magnetni moment jezgra; ω -ugaona brzina ($\omega=2\pi\nu$)

Da bi došlo do rezonancije potrebno je da frekvencija elektromagnetnog zračenja bude ista kao precesiona frekvencija spin aktivnog jezgra. NMR predstavlja izmenu energije između jezgara i radiofrekventnog zračenja (RF-zračenje), pri čemu jedan broj jezgara apsorbuje, a drugi deo emituje zračenje iste frekvencije. Zbog preraspodele jezgara, po kvantnoj teoriji, između dozvoljenih energetskih nivoa, i veće naseljenosti najnižeg energetskog nivoa (Boltzmann-ov zakon), prevladava apsorpcija. Magnetna dejstva okoline, pre svega elektronska gustina, se superponiraju sa primenjenim spoljašnjim poljem tako da posmatrano jezgro oseća njihov kombinovan uticaj. Tako da jezga istog atoma iz različitih delova molekula imaju različite precesione frekvencije. Na ovim razlikama se i zasniva primena NMR spektroskopije za strukturalna određivanja. Spektralni opseg u kome se nalaze ove precesione frekvencije relativno je mali i ne prelazi stotinak milionitih

delova precesione frekvencije, reda veličine ppm (za protone ne prelaze 12 ppm, a za ugljenik-13 ne više od 250 ppm). Snimanje spektara zapravo predstavlja detekciju frekvencija na kojima jezgra stupaju u rezonanciju sa frekvencom rotirajućeg magnetnog polja, odnosno RF- zračenje (mnogo slabijim u odnosu na spoljašnje). On se sastoji od signala, spektralnih linija, koje se nalaze na različitim frekvencijama. Intezitet svake linije proporcionalan je veličini pobude, odnosno količini apsorbovanog radio-frekventnog zračenja. U odnosu na način pobuđivanja, postoje dve tehnike merenja NMR spektara:

- kontinuirano ozračivanje (continuous wave-CW) i
- pulsna ili FT metoda (FT-Fourier-ova transformacija).

Kod CW metode uzorak je za vreme snimanja spektra neprekidno izložen RF-zračenju. Ovom tehnikom energetski prelazi jezgara se sukcesivno pobuđuju sa promenom magnetnog polja (B_0) ili frekvencije (ν - RF-zračenja). FT-tehnikom RF-zračenje se upućuje u obliku kratkih pulseva ($< 1\text{ms}$), pri čemu se pobuđuju svi energetski prelazi u posmatranom sistemu. Zahvaljujući ovoj tehnici razvijene su moćne dvodimenzionalne NMR tehnike. Tehnika je dobila naziv po matematičkoj operaciji Fourier-ova transformacija, koja se koristi za transformaciju iz vremenskog domena krive raspada slobodne indukcije, $s(t)$ NMR spektar dobijen ovom tehnikom, u domen frekvencija, $s(\nu)$ NMR spektar koji se ne razlikuje od apsorpcionog NMR spektra snimljenog klasičnom CW tehnikom.



Šema 7. Krive raspada slobodne indukcije, $s(t)$ NMR spektri i $s(\nu)$ NMR spektri koji se dobijaju Fourier-ovom transformacijom

Uobičajan način snimanja NMR spektara je višestruko ponavljanje pulseva, jedino o čemu mora da se vodi računa je o pauzi između pulseva, neophodnoj za relaksaciju predhodno pobuđenih jezgara. Međutim, razvijene su višepulsne NMR tehnike koje koriste seriju višekratnih pulseva upravo u kratkom periodu, manjem od vremena potrebnog za relaksaciju jezgra, i na taj način dobijaju se podaci o međusobnoj spregnutosti pojedinačnih jezgara.

Danas se primenjuje veliki broj različitih NMR metoda, pored 1D tehnika (^1H NMR i ^{13}C NMR) razvijene su mnogo efikasnije 2D tehnike (2DJ NMR, COSY; HECTOR, NOESY). ^1H NMR daje dobar metabolički otisak i mogućnost simultane detekcije svih proton sadržavajućih jedinjenja u uzorku, kao što su aminokiseline, ugljeni hidrati, masne kiseline, estri, etri, lipidi. Nedostatak jednodimenzionalne NMR tehnike je preklapanje signala u kompleksnim smešama. Alternativa za analizu kompleksnih smeša su 2D NMR tehnike koje pružaju dodatne informacije o korelaciji signala šireći ga u dodatnoj dimenziji. Identifikacija se i ovde oslanja na primenu postojećih biblioteka NMR spektara.

Kako metabolomika po definciji podrazumeva određivanje velikog broja metabolita istovremeno, postavlja se problem jednostave i efektivne *vizuelizacije i analize* dobijenih podataka. Postoji više različitih pristupa analizi i vizuelizaciji ovih podataka, kao što su principalna i nezavisna analiza komponenti (Principal Component Analysis-PCA i Independent Component Analysis-ICA), multidimenzionalni skaling, različite tehnike grupisanja i funkcionalna analiza diskriminanti (Steuer, 2006). Sve ove tehnike se zasnivaju na postojanju uzajamne zavisnosti između metabolita, kao što je odnos njihovih koncentracija, izraženih kao kovarijanse ili korelacioni matriksi.

Značajna osobina metabolomičkih podataka je da nivo jednog malog broja metabolita ukoliko su *in vivo* spregnute zajedničkom funkcijom ili metaboličkim putem, ona koreliraju. Proučavanje ovih korelacija daje uvid u široku mrežu mehanizama metaboličke regulacije, gde se jedan metabolit sintetiše iz drugog metabolita u spletu biohemijskih reakcija. Razlozi variranja su u jednostavnoj činjenici da pojedninačni organizmi nikada nisu isti i pri identičnim eksperimentalnim uslovima, ali i da na ćelijski metabolizam utiče veliki broj faktora, pa pri brzim i malim promenama, naizgled konstantnog okruženja, dolazi do promene u koncentraciji metabolita, koja se dalje propagira kroz metaboličku mrežu i daje specifičan korelacioni patern (Steuer i sar., 2003; Morgentha i sar., 2006). Proučavanjem korelacija ponovljenih analiza formiraju se specifične metabolomičke korelacione mreže, gde su metaboliti predstavljeni tačkicama u dvodimenzionalnoj ravni, a oni koji koreliraju su povezani crtama- ovaj pristup je poznat i kao multidimenzionalni skaling. Udaljenost metabolita u

ovoj mreži, je mera stepena međusobne korelacije. Krična tačka u formiranju ovih mreža je utvrđivaje visine praga korelacije. Za različito postavljene pragove iste mreže mogu da idu od potpuno uvezanih metabolita, do potpunog nepostojanja korelacije među metabolitima.

Međutim, metabolomička istraživanja su češće orijentisana na sistematsko poređenje korelacija metaboličkih profila različitih grupa uzoraka (organizma, tkiva i sl.). Postoji više pristupa, pri čemu se PCA već rutinski koristi u analizi metabolomičkih podataka dobijenih NMR-om. Primenom PCA se uprošćava analiza kompleksnih metabolomičkih smeša bioloških uzoraka, koje mogu da sadrže stotine ili hiljade hemijskih komponenti. Ovom statističkom metodom se određuje pravac najvećeg broja varijacija u setu podataka, gde je metabolomički set podataka sastavljen od serije NMR spektara. Podaci se predstavljaju u dvo- ili tro-dimenzionalnom grafiku (scores plot) gde koordinate odgovaraju osnovnim (principalnim) komponentama (set metabolita koji određuje pravac dve ili tri najveće varijacije u setu podataka). Efektivno, svaki NMR spektar je redukovan na jednu tačku u PC koordinatnom sistemu, gde su slični spektri grupisani, a varijacija duž bilo koje od PC osa uzrokuje eksperimentalnu razliku između spektara (Halouska i Powers, 2006).

III Cilj istraživanja

Cilj naših istraživanja je bio da određivanjem sledećih parametara:

- kriobioloških :tačka mržnjenja, tačka topljenja, osmotski aktivna i osmotski neaktivna voda i ukupan sadržaj vode, utvrdi distribucija telesne vode (hemolimfa i masno telo) u korelaciji sa koncentracijom glicerola i trehaloze
- analizira sadržaj poliola i šećera, kao mogućih krioprotektora
- u domenu metabolike, dobiju karakteristični metabolomički profili i odredi stepen korelacije metabolita u cilju utvrđivanja metaboličke regulacije
- odredi aktivnost enzima antioksidativne zaštite (SOD, CAT, TYR), koncentracija H₂O₂ i melanina, i utvrdi moguća redoks regulacija

kod nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica *Ostrinia nubilalis*, kao i njihovim praćenjem tokom dijapauze i pri izlaganju niskim temperaturama, doprinesemo razjašnjenju mehanizama preživljavanja ove vrste u nepovoljnim uslovima, a da istovremeno dobijeni rezultati na ovom model organizmu pruže osnovu za bolje razumevanje adaptacionih procesa uopšte.

IV Materijal i metode

1. Eksperimentalne životinje

Naša istraživanja su rađena na gusenicama kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis*, Hubn. Kukuruzni plamenac pripada rodu leptira- *Lepidoptera*, familiji plamenca- *Pyralidae*, a kao vrsta prvi put je opisan 1793.godine od strane Hubnera.

Kukuruzni plamenac je poreklom iz Evrope, gde je široko rasprostranjen, ali ga takođe ima i u Severnoj Americi, Severnoj Africi, Aziji, tj. na čitavoj severnoj hemisferi.

Broj generacija je prilagođen lokalnim klimatskim uslovima i varira od jedne, u hladnijim krajevima poput Kanade, do četiri u toplijim krajevima, kao što je na primer Virdžinija, Misuri itd. U našim krajevima ova vrsta je univoltna-sa jednom generacijom, ili kao što je naročito izraženo poslednjih decenija, bivoltna -sa dve generacije (Bača, 2007).

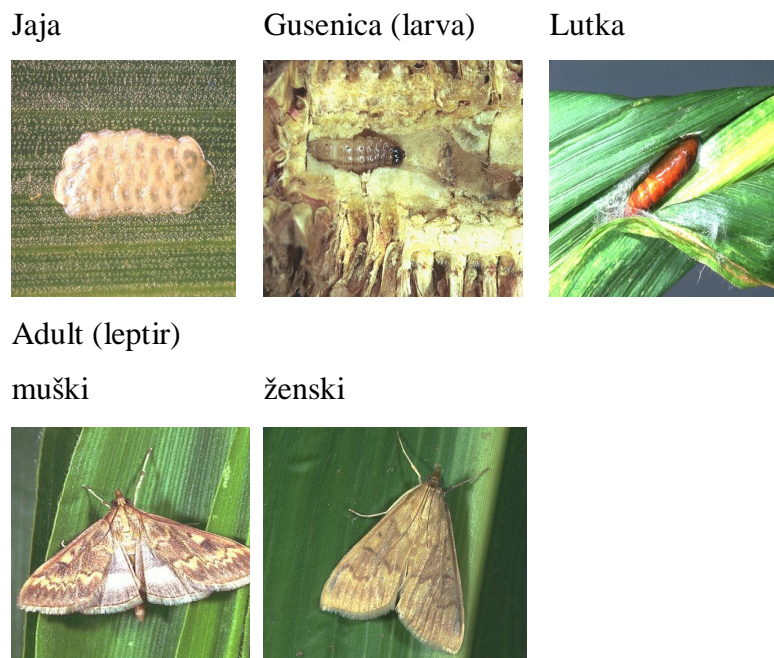
Kukuruzni plamenac je holometabolni insekt, što znači da prolazi kroz potpunu metamorfozu. Životni ciklus se karakteriše sa četiri stadijuma razvića: jaje, gusenicu, lutku i imago (adult).

U našim krajevima tokom proleća (maj-jun) ženke zimske generacije, starosti 3-4 dana, polažu 20-50 jaja dnevno. Period ovipozicije je oko 14 dana, tako da tokom života ženka položi 400-600 jaja. Polaganjem jaja se završava životni ciklus zimske generacije. Jaja, organizovana u grupe od 15-20, su blede žute boje. Starenjem postaju tamnija. Duguljastog su oblika-dužine oko 1.0 mm, i širine 0.75 mm. Razvoj u jajetu traje od 4-9 dana, pri čemu je donja temperaturna granica za razvoj 15°C.

Iz jajeta se izležu gusenice dužine 1.6 mm sa tamno smeđom hitinskom glavenom kapsulom i telom blede žute boje. Duž dorzalne strane tela proteže se tamna pruga sa čije se obe strane na svakom segmentu nalaze sitne tamne pege. Stadijum gusenice normalno prolazi kroz pet razvojnih stupnjeva (instara). Prelazak u svaki naredni instar praćen je presvlačenjem. Odrasla gusenica-V instara duga je oko 20 mm i široka oko 2 mm. Telo gusenice podeljeno je na 14 telesnih segmenata. Prva tri segmenta predstavljaju torakalni deo i nose po par člankovitih nogu. Sledećih deset segmenata predstavljaju abdominalni deo, od kojih treći, četvrti i peti nose po par lažnih abdominalnih nožica. Poslednji segment je sa dve lažne nožice. Gusenice letnje generacije se ulutkavaju u toku avgusta meseca. Donja temperaturna granica za razvoj larve je 11°C.

Lutka je žućkasto braon boje, koja brzo prelazi u tamno smeđu i mrku. Veličina lutke je zavisna od pola, pa je kod mužjaka 13-14 mm dužine i 2-2.5mm širine, dok kod ženki 16-17 mm dužine i 3,5-4 mm širine. Dužina ovog razvojnog stadijuma u poljskim uslovima je oko 12 dana, a donja temperaturna granica je 13°C. Iz lutke izlazi adult-leptir.

Adulti se odlikuju polnim dimorfizmom. Ženke su krupnije sa rasponom krila od 25 do 34 mm. Raspon krila sitnijih mužjaka iznosi od 20 do 26 mm. Ženke su svetlo žute do svetlo braon boje sa dve tamne cik-cak linije. Mužjaci su tamno braon boje, takođe sa krivudavom linijom ali blede žute boje. Leptiri su najaktivniji tokom prvih noćnih sati. Polaganjem jaja ova letnja generacija leptira završava svoj životni ciklus i otpočinje životni ciklus zimske generacije.



Slika 1. Stadijumi u razviću kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis*

Gusenice zimske generacije koje izlaze iz jaja krajem avgusta, kada dostignu peti instar ne ulutkavaju se, već ulaze u dijapauzu, i u ovom stanju mirovanja ostaju do proleća (april-maj). U toku dijapauze gusenice se ne hrane, a ukupana metabolička aktivnost je svedena na minimum. Dijapauzirajuće gusenice su otporne na niske temperature, i do -20°C , i mogu preživeti zamrzavanje ekstracelularnih tečnosti (Grubor-Lajšić i sar., 1991). Iz tog razloga *O.nubilalis* se u okviru grupe insekata otpornih na hladnoću, svrstava u insekte otporne na zamrzavanje.

O.nubilalis najčešće se razvija u kukuruzu. Mlade gusenice se u početku hrane vrhom kukuruza posebno kukuruznom metlicom, koja iz tih razloga najčešće bude polomljena. Kasnije, obično nakon trećeg presvlačenja, ulaze u stabljiku, gde hraneći se, formiraju karakteristične šupljine. Unutar stabljike oštećujući floem i ksilem biljke gusenice dolaze do samog klipa. Biljka toleriše prisustvo jedne do dve gusenice u stabljici bez vidljivih efekata. Iz ekonomskih razloga prisustvo

gusenice u klipu, posebno kod kukuruza šećerca, je neprihvatljivo. U tom smislu, gusenice letnje generacije nanose najviše štete kukuruзу. Danas je *O.nubilalis* jedan od ekonomski najznačajnijih štetočina kukuruза. Pored kukuruза *O.nubilalis* napada preko 300 raznih biljnih vrsta, uglavnom robusne biljke sa stabljikom dovoljno debelom da u nju mogu da uđu. Tako da od povrća najčešće napada boraniju, pasulj, krompir, paradajz, od žitarica heljdu, hmelj, ovas, proso, ali i neke vrste cveća i korova.

Naša istraživanja su rađena na nedijapauzirajućim gusenicama (letnja generacija gusenica) i dijapauzirajućim gusenicama (zimsko generacija gusenica). Nedijapauzirajuće gusenice su dobijene laboratorijskim uslovima iz jaja leptira uhvaćenih svetlosnom klopkom na poljima Instituta za kukuruz u Zemun Polju. Jaja su polagana na hranjivu podlogu pri uslovima konstantne temperature (25°C) i svetlosti, uz kontrolisanu vlažnost. Gusenice su gajene do V instara starosti.

Hranljiva podloga , sastav za 1L:

Destilovana voda	1000 mL
Agar	20 g
Saharoza	40 g
Pšenične klice	150 g
Lucerkino brašno	100 g
Kvasac (svež)	40 g
Askorbinska kiselina	4 g
Glacijalna sirćetna kiselina	5 ml
Metil-para-benzoat (konzervans)	4 g

Vrednost pH ovako pripremljene sveže podloge iznosi 4-4.5, i može se čuvati na hladnom (4-8°C) do četiri nedelje.

Dijapauzirajuće gusenice *O.nubilalis* su sakupljane iz kukuruznih stabala sa polja u okolini Novog Sada. Stabljike kukuruза su bile skladištene u uslovima spolašnje sredine, napolju, do početka eksperimenta.

2. Plan eksperimenta

Prvi deo eksperimenta, za utvrđivanje vodnog režima i koncentracije glicerola i trehaloze tokom hlađenja, rađen je u hemolimfi i masnom telu gusenica *O.nubilalis* sa početkom dijapauze (oktobar). Grupe su formirane na sledeći način:

- DS -gusenice u uslovima spoljašnje sredine, tj. na temperaturama iznad 0°C
- DE -eksperimentalna grupa gusenica držana na temperaturi od -8°C u toku od 10 dana

Drugi deo eksperimenta koji je podrazumevao metabolomički profilng hidrofelnog ekstrakta hemolimfe NMR spektroskopijom, je rađen takođe na oktobarskim gusenicama, sa kojima su formirane sledeće eksperimentalne grupe:

- D(5°C)- dijapauzirajuće gusenice držane na temperaturi od 5°C, 10 dana
- D(-3 °C)- dijapauzirajuće gusenice držane na temperaturi od -3°C, 10 dana
- D(-16 °C)- dijapauzirajuće gusenice držane na temperaturi od -16°C, 10dana

Deo eksperimenta koji je uključivao gasno-hromatografsku analizu šećera i poliola u homogenatu celih, i antioksidativni sistem odbrane u hemolimfi i masnom telu, rađen je na sledećim eksperimentalnim grupama:

S- Eksperiment je postavljen krajem Decembra, što predstavlja period **sredine dijapauze** gusenica *O.nubilalis*. Prikupljene gusenice su podeljene u tri eksperimentalne grupe:

- SD(5°C) - gusenice na sredini dijapauze držane na temperaturi od 5°C četiri nedelje
- SD(-3°C)- gusenice na sredini dijapauze držane na temperaturi od -3°C četiri nedelje
- SD(-16°C)- gusenice na sredini dijapauze držane na temperaturi od -16°C četiri nedelje

K- Eksperiment je postavljen početkom Aprila, što predstavlja period **kraja dijapauze** gusenica *O.nubilalis*. Prikupljene gusenice su podeljene u tri eksperimentalne grupe:

- KD(5 °C)- gusenice na kraju dijapauze držane na temperaturi od 5°C četiri nedelje
- KD(-3 °C)- gusenice na kraju dijapauze držane na temperaturi od -3°C četiri nedelje
- KD(-16 °C)- gusenice na kraju dijapauze držane na temperaturi od -16°C četiri nedelje

Izlaganje temperaturama ispod nule je bilo postepeno, temperatura je spuštana po 2°C na svakih 4 dana počevši od 5°C do odgovarajuće temperature. Nakon spuštanja temperature gusenice su ostavljane na odgovarajućoj temperaturi četiri nedelje.

Svi eksperimenti su rađeni i na grupi nedijapauzirajućih gusenica (ND) gajenih u laboratorijskim uslovima.

Gusenice korišćene u eksperimentalnim istraživanjima bile su V instaru razvoja i ujednačene veličine.

3. Priprema uzoraka

A. Priprema homogenata celih gusenica

Gusenicama je najpre izmerena masa, a zatim su homogenizovane na ledu (20% w/v, 0.05 M fosfatni pufer, pH 7.0, sa 0,05 % fenil-tioureom-FTU) u Potter-ovom staklenom homogenizeru sa 10 obrtaja. Pufer korišćen u homogenizaciji bio je predhodno ohlađen na ledu.

Homogenat je zatim centrifugiran na 15 000 g, 15 minuta na 4°C, a odvojen supernatan je podeljen na alikvote i ostavljen na -20°C do dalje analize.

B. Izolovanje hemolimfe i masnog tela gusenica

Hemolimfa gusenica je sakupljana u inertnoj atmosferi (N₂) istiskivanjem, nakon zarezivanja zadnjeg para lažnih nožica. Sakupljena hemolimfa čuvana je na -20°C do dalje analize.

Nakon istiskivanja hemolimfe izolovano je masno telo. Masno telo je najpre resuspendovano u ledenom fosfatnom puferu (0.05 M fosfatni pufer, pH 7.0), a zatim pokupljeno i homogenizovano, 20 w/v u istom puferu. Homogenat je centrifugiran na 15 000 g, 15 minuta, na 4°C, a supernatant podeljen u alikvote koji su čuvani na -20°C do dalje analize.

C. Ekstrakcija ukupnih poliola za gasno hromatografsku analizu

Prethodno izmerene gusenice su zamrznute i usitnjene u tečnom azotu u avanu sa tučkom. Ukupni polioli ekstrahovani su u 70% etanolu (0.5 mL rastvora po gusenici), nakon čega je homogenat centrifugiran 15 minuta na 15 000 g, na 4°C. Dobijeni supernatant je izdvojen i čuvan na -20°C do dalje analize. U svakoj grupi bilo je 4-5 pulovanih uzoraka, sa 4-5 gusenica.

4. Određivanje ukupnih proteina

Ukupni proteini su određivani metodom po Bradford-u (1976.).

Princip metode: Metoda za određivanje ukupnih proteina po Bradford-u se zasniva na formiranju kompleksa između boje Coomassie Brilliant Blue G-250 i proteina. Pri vezivanju za protein boja prelazi u stabilnu neprotonovanu formu, sa maksimumom apsorpcije na 595 nm.

Regensi:

- Bradford-ov reagens (10 mg CBB, 5 mL 96% etanol, 10 mL 85% fosforna kiselina, dopunjeno sa destilovanom vodom do 100 mL)
- Standardni rastvori proteina: osnovni rastvor 2 mg BSA /mL, i radni rastvori: 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 , 1.0, 1.5 mg BSA/mL

Postupak: Standardni protokol je prilagođen eseju u mikrotitar pločici, reakcione zapremine od 250 μ L:

- u bunarčić mikrotitar pločice ispipetirati 5 μ L stadardnog rastvora proteina, odnosno uzorka (za slepu probu radnog pufera)
- dodati 250 μ L reagensa
- inkubirati na sobnoj temperaturi najmanje 5 minuta, a ne duže od 1 sata
- očitati apsorbancu na 595 nm na fotometru
- na osnovu standarne krive odrediti koncentraciju proteina u uzorku.

Napomena: Ukoliko je uzorak razblažen, očitanu koncentraciju sa standardne prave pomnožiti sa faktorom razblaženja.

5. Određivanje sadržaja slobodne i vezane vode diferencijalnim skenirajućim kalorimetrom

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija je termoanalitička tehnika u kojoj se meri razlika u količinama toplote potrebne da se održe jednake temperature uzorka i referentnog uzorka podvrgnutih određenom toplotnom tretmanu (hlađenju ili grejanju). Referentni uzorak treba da ima dobro definisan toplotni kapacitet u temperaturnom rangu skeniranja, a najčešće se koriste neki metali kao npr. indijum ili cink, ili neke organske supstance kao cikloheksan ili n-dodekan. Tehnika ima široku primenu u analizi termalnih promena tokom faznih prelaza, reakcija oksidacije, kao i drugih hemijskih reakcija. Kalorimetar koji meri ove promene se naziva diferencijalni skenirajući kalorimetar (DSK).

U našim istraživanjima korišćen je DSK Mettler-Toledo, DSC820.

DSK analiza rađena je na uzorcima masnog tela i hemolimfe dijamuzirajućih gusenica, u kontrolnoj grupi, DS (iznad nule) i grupi podvrgnutoj niskim temperaturama, DE (-8°C), kao i nedijamuzirajućih gusenica, ND.

Postupak:

- pre analize na DSK u uzorcima je određena totalna količina vode. Totalna količina vode je izračunata iz razlike masa uzorka pre i posle sušenja uzoraka u struji suvog vazduha na 60°C u toku 24 sata. Uzorci su pakovani u male aluminijumske fišeke, a masa je merena na vagi Santorius M3P (tačnosti $\pm 1\mu\text{g}$).
- pre početka rada uređaj je kalibrisan radi uspostavljanja linearne temperaturne skale i kvantifikacije protoka toplote. Kao kalibraciona kontrola služila je temperatura mržnjenja vode.
- uzorci za DSK analizu su pakovani u aluminijumske fišeke zapremine 40 μl i izmereni pre analize.
- hlađenje uzoraka je bilo po sledećem programu: početna temperatura od 5°C se spuštala do -30°C, stopom od 1 °C/min, a zatim su uzorci ponovo grejani do 5 °C istom stopom.
- za analizu rezultata, odnosno termograma, dobijenog DSK analizom korišćen je program START software (verzija 6). Kao rezultat su dobijene tačka mržnjenja (SCP-super cooling point), tačka topljenja (MP-melting point), entalpija mržnjenja i topljenja. Iz dobijenih rezultata se dalje izračunava slobodna voda-osmotski aktivna (OA) deljenjem entalpije topljenja uzorka sa entalpijom topljenja vode (334.5 Jg⁻¹), a kada se od totalne vode oduzme OA dobije se vezana voda- osmotski neaktivna (OI-osmotically inactive).

6. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Katalaza (EC 1.11.1.6) katalizuje reakciju razgradnje vodonik peroksida do kiseonika i molekula vode (jednačina 22).

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

Reagensi:

- 0.05 M fosfatni pufer pH 7.0
- 30 % rastvor H_2O_2

Rastvor H_2O_2 u fosfatnom puferu se podesi tako da apsorbancia rastvora na 240 nm je između 0.520-0.550.

Postupak: Dodavanjem 5-10 μ L uzorka u podešeni rastvor H_2O_2 u fosfatnom puferu (finalna zapremina od 3 mL) odpočinje reakcija. Reakcija se prati u toku tri minuta spektrofotometrijski, kao pad apsorbance na 240 nm.

Izračunavanje:

$$\text{Specifična aktivnost (U/mg prot.)} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000}{43.6 \times C_{pr} \times V_{uz}/V_{rs}}$$

ΔA_{uz} - promena apsorbance u minuti za uzorak

ΔA_{sp} - promena apsorbance u minuti za slepu probu

C_{pr} - koncentracija proteina mg/mL

V_{uz} - zapremina uzorka

V_{rs} - zapremina reakcione smeše

43.6 - molarni ekstincioni koeficijent za vodonik peroksid na 240 nm

7. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaza (EC 1.15.1.1) katalizuje reakciju dismutacije superoksid radikal (O₂⁻, jednačina 4)

Princip metode: Aktivnost superoksid dismutaze određivana po metodi McCord i Fridovich (1968) u sistemu citohrom c (Fe³⁺)/ksantin/ksantin oksidaza.

Metoda se zasniva na tome da superoksid radikal, koji se generiše u reakciji sa ksantin oksidazom, redukuje citohrom c (Fe³⁺ u Fe²⁺) što je praćeno promenom apsorbanca na 550 nm.

Superoksid dismutaza, ako je prisutna u uzorku, dismutiraće ovaj superoksid radikal tako da će se smanjiti brzina redukcije citohroma c. Ovo smanjenje je proporcionalno aktivnosti SOD. Kao jedinica aktivnosti superoksid dismutaze definisana je ona aktivnost SOD potrebna za smanjenje brzine redukcije za 50 % (pri promeni apsorbanca od 0.025/min).

Reagensi:

- 0,5 M KH₂PO₄
- 0,5 M Na₂HPO₄
- 100 mM EDTA
- 100 mM NaN₃
- 50 μM ksantin
- Ksantin oksidaza (XOD, iz kravljeg mleka, Sigma)
- 20 μM citohrom c (Fe³⁺) (iz konjskog srca, tip III, Sigma)

Postupak:

Rastvor A- 0.57 mL KH₂PO₄, 3.14 mL Na₂HPO₄, 0.1 mL EDTA, 1.0 mL NaN₃, 1.0 mL ksantina, 0.4 mL citohroma c, dopuni se do 100 mL dH₂O, pH 7.8. Rastvor je stabilan tri dana na +4°C. Tokom rada drži se na sobnoj temperaturi.

Rastvor B- 0.2 U XOD/mL u 0.1 mM EDTA, rastvor drži se na ledu, pravi se svež svakog dana.

Reakcion smeša- 1.3 mL rastvora A, 25-100 μL uzorka, 0.1 mL rastvora B, ako je potrebno dopuniti vodom do 1,5 mL. Reakcija odpočinje dodavanjem rastvora B, a apsorbanca se prati u toku tri

minuta. Promena apsorbance slepe probe treba da iznosi 0.025/minuti. Reakcija se odigrava na sobnoj temperaturi.

Izračunavanje: Aktivnost SOD se izražava u jedinicama aktivnosti po mg proteina.

7.1. Određivanje aktivnosti Mn zavisne superoksid dismutaze (MnSOD)

Određivanje aktivnosti MnSOD zasniva se na određivanju ukupne SOD posle inhibiciji CuZnSOD sa KCN. Naime, prethodno opisanim podtupkom za određivanje SOD određuje se ukupna aktivnost SOD (MnSOD + CuZnSOD). Ukoliko uzorke pre određivanja SOD inkubiramo sa KCN, aktivnost CuZnSOD će biti inhibirana, pa će u uzorku ostati aktivna samo MnSOD. Oduzimanjem aktivnosti MnSOD od ukupne SOD dobije se aktivnost CuZnSOD.

Reagensi: Osim 4 mM KCN isti kao u postupku određivanja aktivnosti ukupne SOD

Postupak- pre određivanja aktivnosti MnSOD uzorci se inkubiraju u toku 30 minuta sa 4 mM KCN u odnosu 1:1 (finalno 2 mM KCN).

Dalji postupak i izračunavanja su isti kao kod opisane metode za određivanje ukupne SOD.

Napomena: Uzorci se duplo razblažuju sa rastvorom KCN pre određivanja, zbog čega se izračunata aktivnost množi sa dva, kao faktorom razblaženja. Takođe, treba voditi računa da i slepa proba sadrži 2 mM KCN, pošto KCN u određenom stepenu inhibira XOD.

8. Određivanje aktivnosti tirozinaze (TYR)

Tirozinaza (EC 1.14.18.1) je bifunkcionalni enzim uključen u prva dva koraka biosinteze melanina. Prva reakcija koju katalizuje je hidroksilacija tirozina do 3,4-dihidroksifenilalanina, (DOPA), a druga je reakcija oksidacije DOPA do dopahroma.

U našem radu tirozinaznu aktivnost u hemolimfi pratili smo kao DOPA oksidaznu aktivnost po metodi Chen i saradnici (2003).

Reagensi:

- 10 mM fosfatni pufer pH 6.8
- 20 mM DOPA u fosfatnom puferu

Reakciona smeša finalne zapremine od 200 μ L sadrži: 185 μ L fosfatnog pufera, 20 μ L rastvora DOPA, reakcija odpočinje dodavanjem 5 μ L uzorka. Reakcija se odigrava na sobnoj temperaturi.

Oksidacija DOPA do dopahroma je praćena kao promena apsorbance na 490 nm u toku 10 minuta.

Jedinica specifične enzimske aktivnosti definisana je kao promena apsorbance od 0.001 u minuti po mg proteina (Pang i sar., 2005).

9. Određivanje koncentracije H₂O₂

Koncentracija H₂O₂ u uzorcima određivana je Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (A22188). Detekcija H₂O₂ se zasniva na reakciji H₂O₂ sa Amplex Red reagensom (10-acetil-3,7-dihidroksifenoksazin) u prisustvu peroksidaze iz rena, kada nastaje crveni fluorescentni produkt, rezofurin.

Reagensi:

- 10 mM Amplex Red reagens u dimetilsulfoksidu (DMSO)
- reakcioni pufer, 50 mM fosfatni pufer pH 7.4
- Peroksidaza rena, 10 U/ml
- Vodonik peroksid (H₂O₂), 20 mM. Za standardnu krivu se pravi serija rastvora, koncentracije 0-10 μM, razblaživanjem 20 mM H₂O₂ sa reakcionim puferom

Neposredno pre početka eseja priprema se radni rastvor 100 μM Amplex Red reagensa i 0.2 U/ml peroksidaze rena mešanjem 50 μL 10 mM Amplex Red reagensa, 100 μL 10 U/ml peroksidaze rena i 4.85 ml reakcionog pufera. Količina dovoljna za 100 enzimskih eseja, finalne reakcione zapremine od 100 μL.

Postupak:

Reakcija odpočinje dodavanjem 50 μL radnog rastvora Amplex Red reagensa na 50 μL predhodno ispipetiranog uzorka, odnosno standarda. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi očitava se fluorescentna emisija na 590 nm, sa ekstinkcijom u rangu od 530-560 nm.

Iz standardne krive izračunava se koncentracija H₂O₂. Ukoliko je uzorak razblaživan očitana koncentracija se množi sa faktorom razblaženja.

10. Citohemijska- Lili metoda za bojenje melanina

Uzorci celih gusenica se najpre fiksiraju u 10% puferisanom formalinu, tako što se rastvor formalina ubrizgava gusenicama, a zatim preko noći ostavljene u rastvoru. Formalin je ispran 10 mM fosfatnim puferom pH 7.8, ubrizgavanjem pufera u njih i ostavljen u rastvoru pufera preko noći. Nakon ove pripreme pravljene su kriostatski poprečni preseki gusenica debljine 14 μm na silaniziranim mikroskopskim pločicama.

Na kriostatskim preparatima melanin je bojen Lili metodom, na sledeći način:

Reagensi:

1. Srebro-nitrat/Amonijak :

U 1 ml rastvora 28% rastvora amonijaka sipati 8 mL 10% rastvora AgNO_3 uz mešanje-dobija se tamni talog, koji se gubi dodavanjem preostale količine AgNO_3 , do pojave opalescencije, zatim dodati istu količinu vode.

2. 1% Rastvor joda po Vajgertu:

Jod	1 g
Kalijum-jodid	2 g
Destilovane vode	100 mL

3. 5% Natrijum-tiosulfat
4. Alkoholni eozin
5. 0.2% Zlato-hlorid

Postupak- Preparati gusenica su tretirani na sledeći način:

1. preprate isprati u tekućoj vodi
2. 1% rastvor joda 1-5 minuta
3. 5% Natrijum-tiosulfat 20-30 sekundi
4. Isprati destilovanom vodom
5. Rastvor AgNO_3 2 minuta
6. Isprati destilovanom vodom
7. Zlato-hlorid 5 minuta
8. Isprati tekućom vodom
9. Natrijum-tiosulfat 2 minuta

10. Isprati tekućom vodom

11. Alkoholni eozin 1 minut

12. Isprati, dehidrirati serijom alkohola do apsolutnog alkohola, zatim ksilol, balsam (montiranje pokrovne ljustice)

Rezultat:

Melanin-crni; pozadina-ružičasta

11. EPR spektroskopija

EPR spektri celih gusenica su snimani na Variant E104-A EPR spektrometru u mikrotalasnoj oblasti na 9.51 GHz (X-band) i na temperaturi od -150°C . Spektar je sniman pri sledećim uslovima:

- modulaciona amplituda 2 G
- modulaciona frekvencija 100 kHz
- mikrotalasna snaga 10 mW
- širina polja 200 G, sa centralnim poljem od 3310 G

Spektar je sniman EW softverom (Scientific Software Inc, Bloomington, IL, USA). Pre merenja gusenice su smeštane u kvarcnu kivetu i zamrzavane u tečnom azotu.

Svaka eksperimentalna grupa je sadržala osam gusenica. Rezultati su srednje vrednosti \pm SE odnosa inteziteta pika/masa gusenice.

12. NMR analiza

A. Priprema uzoraka za NMR analizu

Za NMR analizu pripreman je hidrofilni i hidrofobni ekstrakt hemolimfe gusenica modifikovanom metodom po Bligh-Deyar (Tiziani i sar., 2008). Nakon sakupljanja hemolimfe, odsecanjem lažnog para nožica i blagim istiskivanjem u mikrotubu obloženu fenil-tioureom, uzorci su liofilizirani preko noći. Ekstrakcija liofilizata je rađena u sistemu rastvarač metanol:hloroform:voda u odnosu 2:2:1.8 (Wu i sar, 208). Nakon centrifugiranja 10 minuta na 10 000 x g na 4°C, odvojeni su gornji hidrofilni i donji hidrofobni ekstrakt. Ekstrakti su liofilizirani i neposredno pre NMR analize polarna faza je rastvorena u 100 mM fosfatnom puferu pH 7.0 napravljen u rastvoru 90% H₂O/10% D₂O (GOSS Scientific Instruments Ltd, Essex UK), koji je sadržao 0.5 mM natrijum 3-(trimetilsilil)propionat-2,2,3,3-d₄ (TMSP, Cambridge Isotope Laboratories) kao interni standard.

B. NMR eksperiment i obrada podataka

Za NMR analize, 1D ¹H, korišćen je 500 MHz Bruker spektrometar opremljen kriogenički ohlađenom probom (Günther i sar., 2000). U oba slučaja rezonantni signal vode je potisnut ekcitacionim skulptingom. 1D spektar je sniman 90°-pulsom, spektralne širine 5kHz, relaksacionim vremenom od 3s i sa 128 transienta. Za kvantitativnu analizu, 1D spektar je sniman 30°-pulsom i relaksacionim vremenom od 15s. Bazne linije su izračunate i spektri su usklađeni. Signali koji su poticali od rezidua rastvarača i TMSP su izbačeni. Spektri su normalizovani kvocientnim normalizacionim faktorom i ograničeni na 5 ppm. Generalna log transformacija je primenjena pre obrade podataka multivarijantnom statističkom metodom.

NMR podaci su obrađeni NMRLab (Günther, 2000) u MATLAB programima (The MathWorks, Inc., Natick, MA). Multivarijantna statistička analiza (Principal component analysis-PCA) NMR metabolita je rađena sa Chenomix NMR Suite (Version 5.0; Chenomix Inc., Edmonton, Canada)

13. Gasno-hromatografska analiza

Sadržaj poliola u uzorcima *O.nubilalis* analizirani su gasno-masenom hromatografijom.

A. Prva serija eksperimenata određivanja koncentracije glicerola i trehaloze gasno-hromatografskom analizom, rađena je u etanolnim ekstraktima masnog tela i hemolimfe nedijapauzirajućih, ND, i dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih spoljašnjoj temperaturi, DS i temperaturi ispod nule (-8°C), DE grupe. Uzorci su pre nanošenja na kolonu gasnog hromatograma derivatizovani sa Sigma-Sil-A, prema metodi Sweeley i sar. (1963). Derivatizacija podrazumeva uvođenje trimetilsilil grupa, $(\text{CH}_3)_3\text{-Si-}$, umesto aktivnih vodonika hidroksilne, karbonilne i sličnih grupa. Derivati su takvom pripremom isparljiviji i termostabilniji.

Reagensi:

- Sigma-Sil-A reagens: smeša trimetilhlorosilan:heksametildisilazan:piridin u odnosu 1:3:9
- Standardni rastvori (5-25 μg / vial) glicerola i trehaloze
- Gasni hromatogram: model 5890 Hawlett Packard Co, California, USA, sa kolonom dugom 25 m, cross-vezana sa 5% PhMe silikonom, i plamenim jonizujućim detektorom.

Postupak:

- ekstakte u reakcionim vialima upariti u eksikatoru do suvog
- derivatizacija sa 50 μL Sigma-Sil-A reagensa po viali, 15 minuta na 45°C
- nanošenje 0.5 μL derivatizovanog uzorka, odnosno standarda, na kolonu gasnog-hromatograma
- gasno-hromatografska analiza na temperaturi od 250°C u struji helijuma
- integral specifičnih pikova i crtanje standardne prave, odnosno izračunavanje koncentracije glicerola i trehaloze u uzorcima

B. Druga serija eksperimenata gasno-hromatografske analize rađena je na etanolnim ekstraktima celih gusenica grupa na sredini dijapauze ($SD(5^{\circ}\text{C})$, $SD(-3^{\circ}\text{C})$ i $SD(-16^{\circ}\text{C})$), na kraju dijapauze ($KD(5^{\circ}\text{C})$, $KD(-3^{\circ}\text{C})$ i $KD(-16^{\circ}\text{C})$) i nedijapauzirajućih gusenica (ND). Derivatizacija je rađena sa reagensom Power Sil, Alltech.

Reagensi:

- Power Sil, *Alltech* reagens: smeša N,O-bis(trimetilsilil)acetamid: trimetilhlorosilan: N-trimetilsililimidazola u odnosu 3:2:3
- Standardni rastvori: trehaloza (0.1-20 µg/ vial), glicerol (1-30 µg/ vial) glukoza, manitol, manoza, fruktoza, sorbitol, mio-inozitol (0.1-2.0 µg/ vial)
- Gasno-maseni hromatogram (GS-MS): Agilent Technologies, serijski broj 6890N/5975B, na koloni HP-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm (Agilent Technologies), sa masenim spektrometrom kao detektorom

Postupak:

- po 10 µL standarda/uzorka su upareni preko noći u eksikatoru u reakcionim vialama
- derivatizacija sa 25 µL Power Sil reagensa, 30 minuta na 50°C
- na kolonu je nanošeno 1 µL uzorka, sa splinom 1:100, i temperaturom injektovanja od 250°C
- komponente su razdvajane u temperaturnom modu: startna temperatura od 50°C, 20°C/min, do 280°C, koja je držana konstantno narednih 13.5 min (ukupno vreme analize 30 min)
- eluirane komponente su analizirane na masenom spektrometru sa jonskim izvorom elektrona energije 70 eV
- identifikacija komponenti na osnovu retencionog indeksa (RI) i masenih spektara (m/z) standarda u SIM modu, tabela 2.

Tabela 2. Lista standarda korišćenih u gasno-hromatografskoj analizi – vreme eluiranja i specifični jonski fragmenti

Interval akvizicije (min)	Standardi		Specifični joni (m/z)
	Standard	Vreme eluiranja (min)	
10-14	glicerol	10.87	147, 205
14-14.5	fruktoza	14.38	141, 191, 204, 217
14.5-15.4	glukoza 1	14.74	191, 204, 205, 319
	glukoza 2	15.13	
	sorbitol	14.96	
15.4-18	mio-inozitol	15.75	147, 217, 305
18-30	trehaloza	19.5	217, 361

14. Statistička obrada podataka

Rezultati su statistički obrađeni dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i predstavljeni su kao srednje vrednosti \pm S.E. (standardna greška). Za utvrđivanje statistički značajnih razlika između pojedinačnih grupa korišćen je Tukey HSD test za nejednak broj uzoraka.

V Rezultati

1. Kriobiološki parametri, sadržaj glicerola i trehaloze u hemolimfi i masnom telu gusenica kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis*

U cilju analize ćelijskih i molekularnih mehanizama adaptacije na niske temperature gusenica kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis*, određeni su sledeći kriobiološki parametri u hemolimfi i masnom telu:

- a) ukupan saržaj vode (water content, eng., WC),
- b) sadržaj slobodne/osmotski aktivne vode (osmotically active, eng., OA)
- c) sadržaj vezane/osmotski neaktivne vode (osmotically inactive, eng., IA)
- d) tačka mržnjenja (supercooling point, eng., SCP),
- e) tačka topljenja (melting point, eng., MP)

nedijapauzirajućih (ND) i oktobarskih dijapauzirajućih gusenica, i to iz prirode izloženih spoljašnjim temperaturama (DS, temperature iznad 0°C) i eksperimentalnih, izloženih niskim temperaturama (-8 °C), u toku 10 dana (DE). Rezultati su prikazani na graficima 1-5 i tabeli 3.

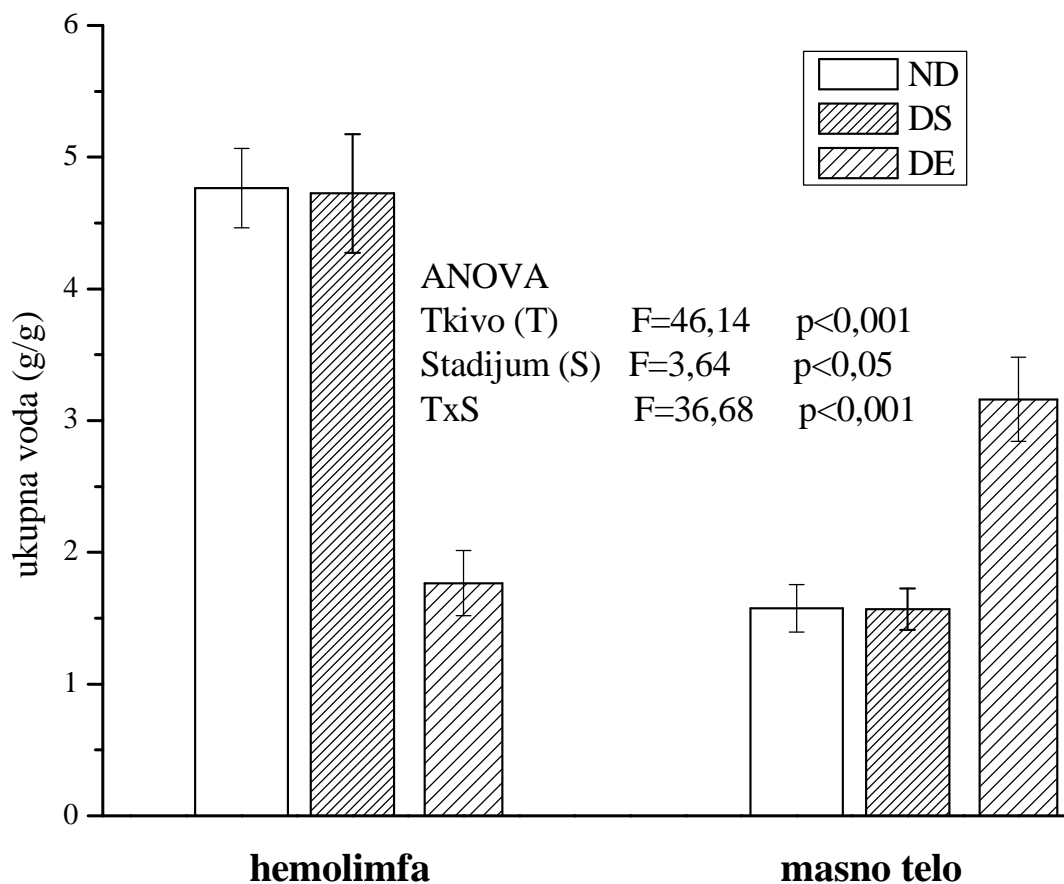
Kako ovi kriobiološki parametri u hemolimfi i masnom telu gusenica zavise u velikoj meri od koncentracije krioprotektora, određena je koncentracija

- f) glicerola i
- g) trehaloze,

kao najznačajnijih krioprotektora, u uzorcima hemolimfe i masnog tela sve tri grupe gusenica (ND, DS i DE). Rezultati gasno-hromatografske analize prikazani su na graficima 6 i 7 i tabeli 3.

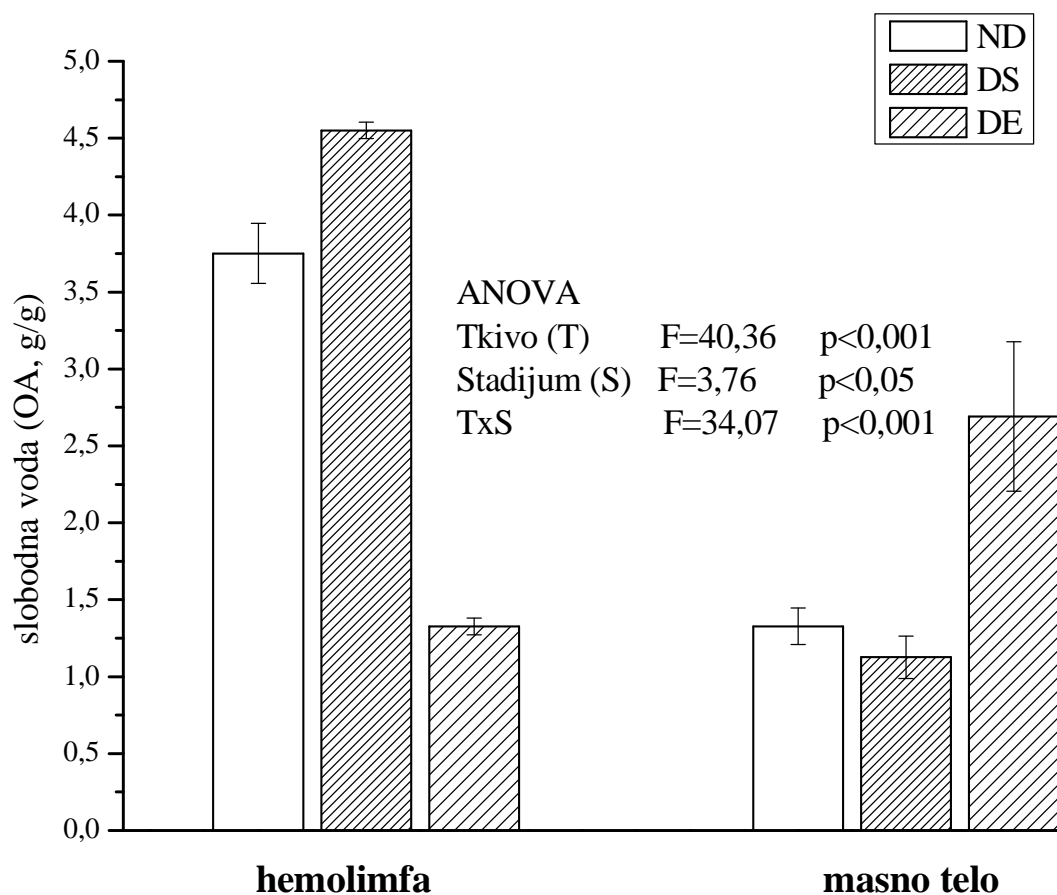
U tabeli 4. su prikazani rezultati dvofaktorske analize varijansi dobijenih kriobioloških parametara i rezultata gasno-hromatografske analize u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih gusenica i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* grupa DS i DE.

a) Sadržaj ukupne vode



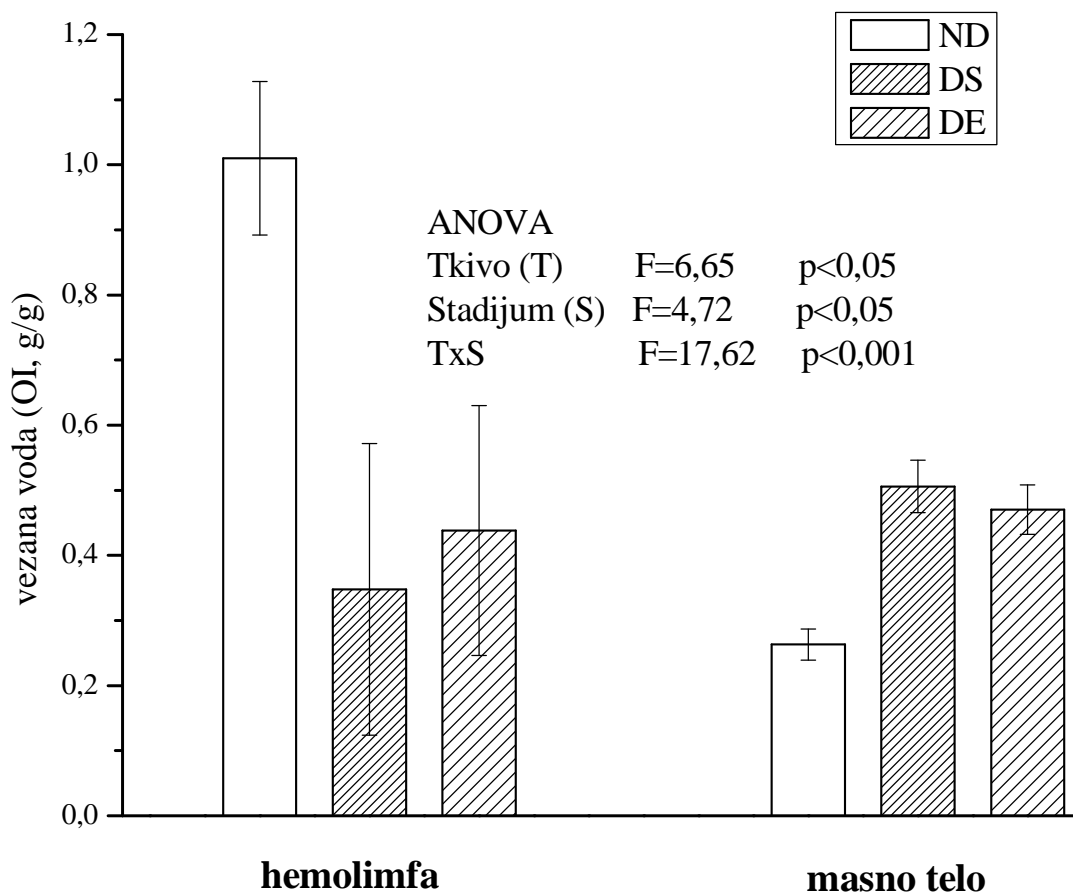
Grafik 1. Sadržaj ukupne vode (g po g tkiva) u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis*, izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat tkiva-T, efekat stadijuma- S, efekat interakcije- TxS, F-faktor

b) Sadržaj slobodne vode



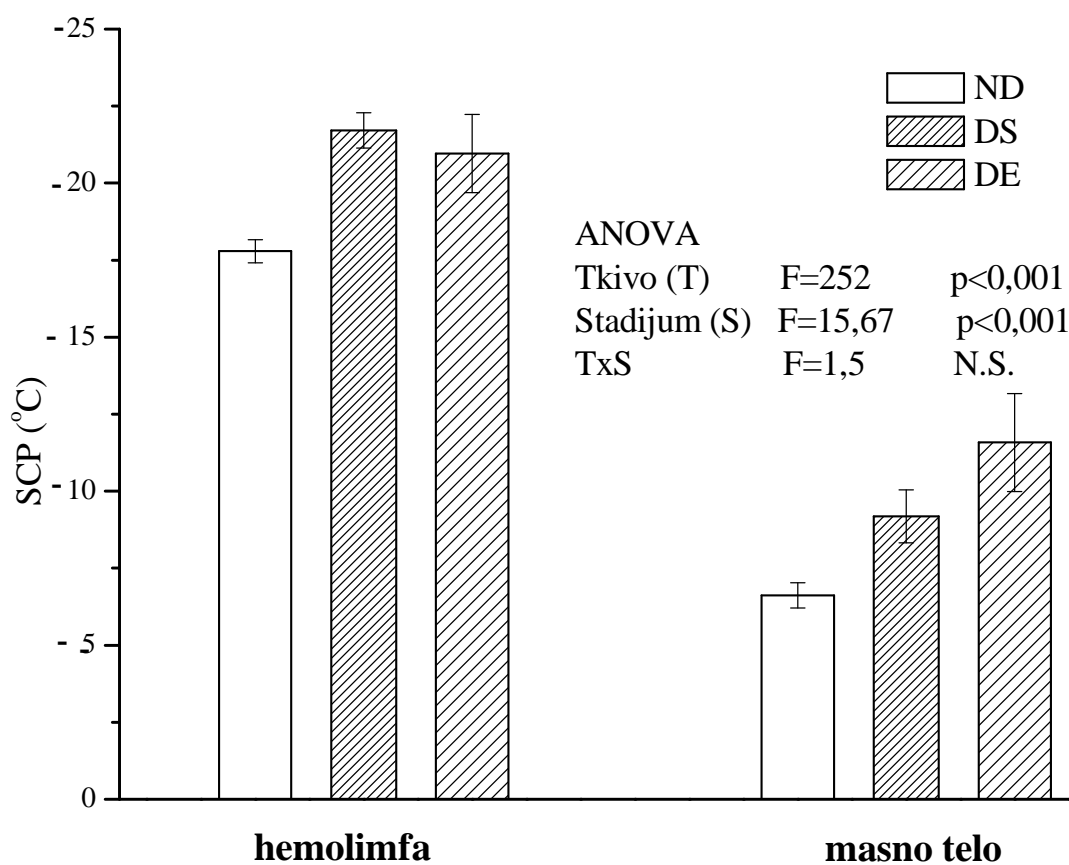
Grafik 2. Sadržaj slobodne vode (g po g tkiva) u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis*, izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat tkiva-T, efekat stadijuma- S, efekat interakcije- TxS, F-faktor

c) Sadržaj vezane vode



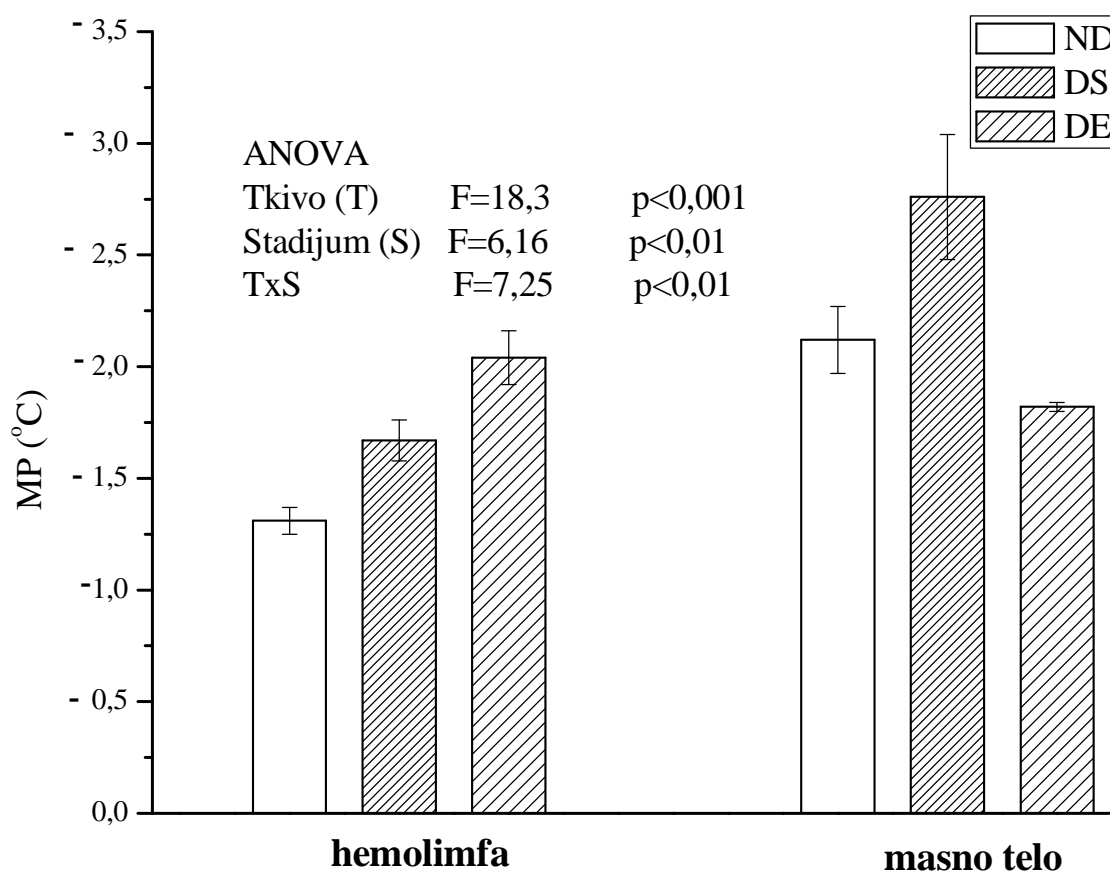
Grafik 3. Sadržaj vezane vode (g po g tkiva) u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis*, izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat tkiva-T, efekat stadijuma- S, efekat interakcije- TxS, F-faktor

d) Tačka mržnjenja, SCP



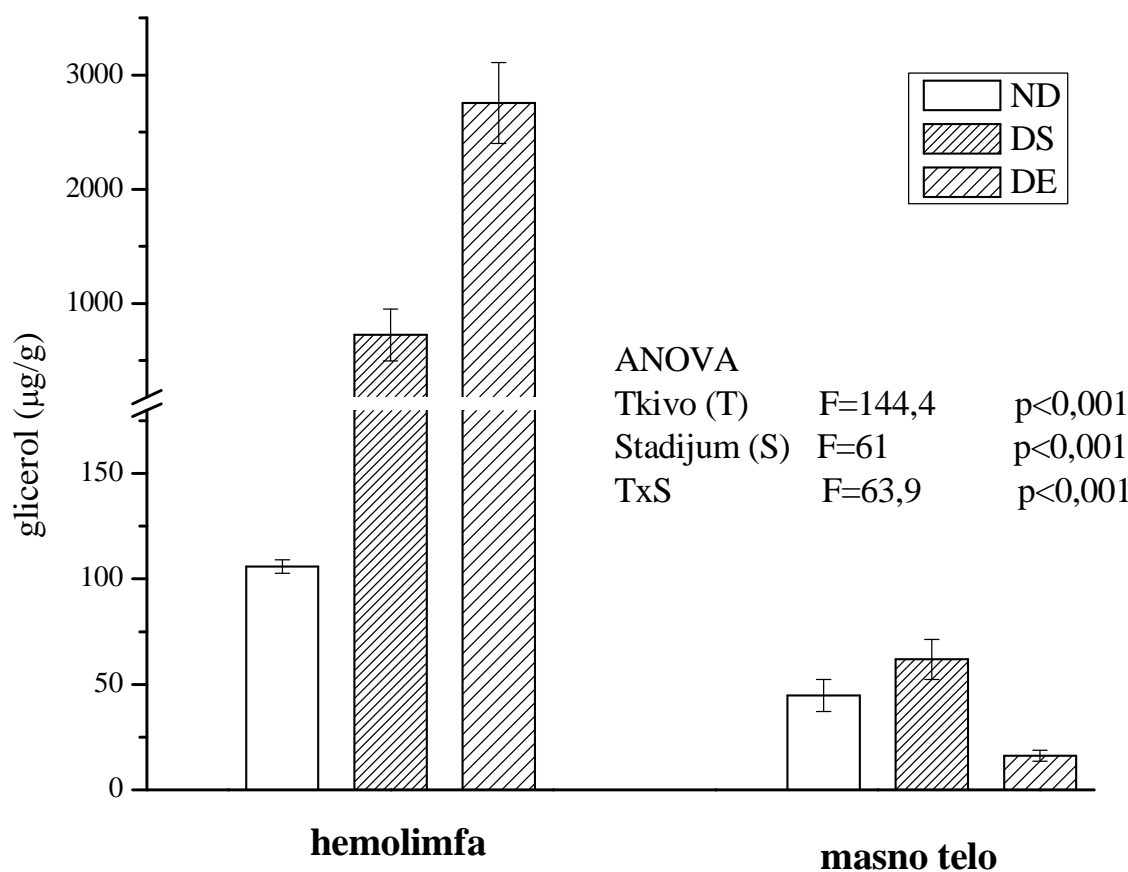
Grafik 4. Tačka mržnjenja (SCP) hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijaupauzirajućih gusenica *O.nubilalis*, izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat tkiva-T, efekat stadijuma- S, efekat interakcije- TxS, F-faktor

e) Tačka topljenja, MP



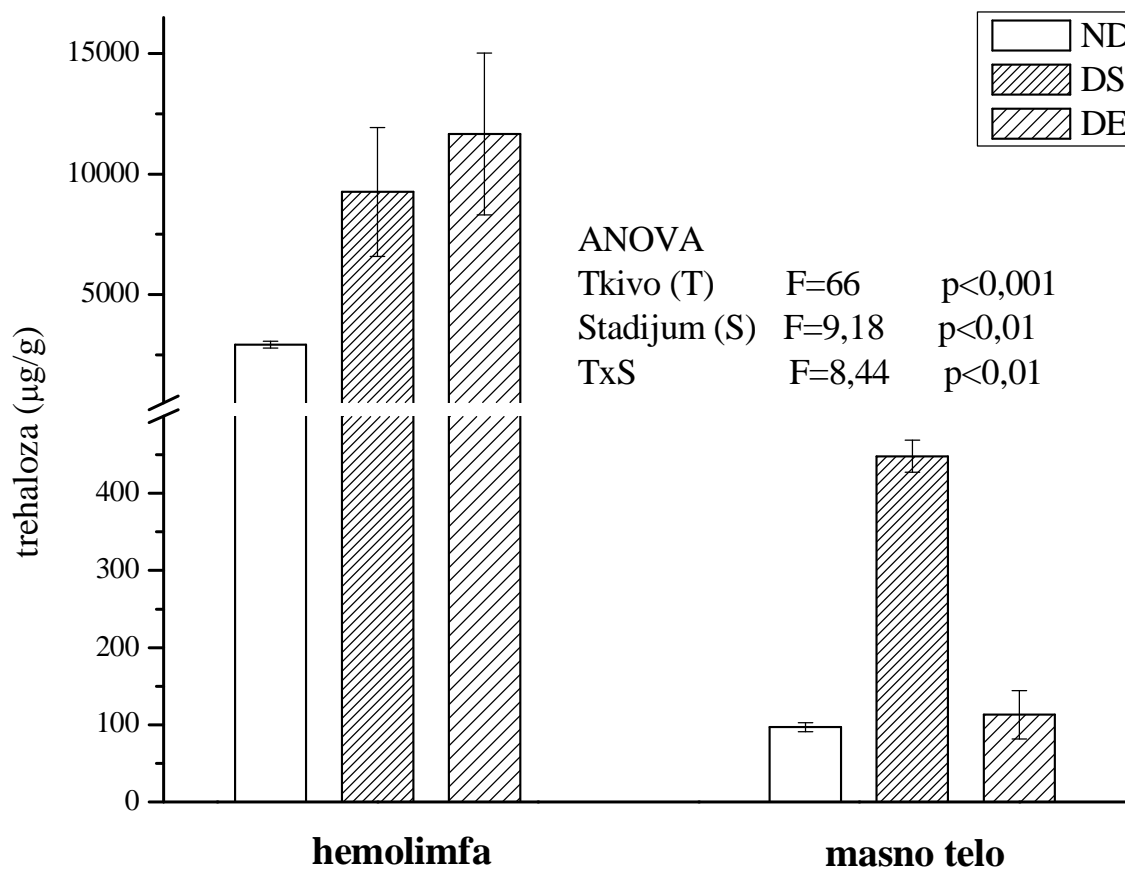
Grafik 5. Tačka topljenja (MP) hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis*, izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat tkiva-T, efekat stadijuma- S, efekat interakcije- TxS, F-faktor

f) Sadržaj glicerola



Grafik 6. Sadržaj glicerola (μg po g tkiva) u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis*, izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat tkiva-T, efekat stadijuma- S, efekat interakcije- TxS, F-faktor

g) Sadržaj trehaloze



Grafik 7. Sadržaj trehaloze (μg po g tkiva) u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis*, izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat tkiva-T, efekat stadijuma- S, efekat interakcije- TxS, F-faktor

Tabela 3. Kriobiološki parametri dobijeni diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom, sadržaj glicerola i trehaloze nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih spoljašnjim (DS) i temperaturama ispod nule, -8°C (DE), u uzorcima hemolimfe (H) i masnog tela (MT). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm S.E:

	DS (n=3)		DE (n=3)		ND (n=6)	
	MT	H	MT	H	MT	H
Ukupna voda (g/g)	1.57 \pm 0.16	4.73 \pm 0.45	3.16 \pm 0.32	1.77 \pm 0.25 ^Δ	1.58 \pm 0.15	4.76 \pm 0.30
Slobodna voda (OA) (g/g)	1.13 \pm 0.14	4.55 \pm 0.053	2.69 \pm 0.49	1.33 \pm 0.05	1.33 \pm 0.12	3.75 \pm 0.19
Vezana voda (OI) (g/g)	0.51 \pm 0.04	0.35 \pm 0.22	0.47 \pm 0.04	0.44 \pm 0.19	0.26 \pm 0.02	1.01 \pm 0.12
SCP (°C)	-9.18 \pm 0.86	-21.71 \pm 0.57	-11.58 \pm 1.59	-20.96 \pm 1.27	-6.62 \pm 0.41	-17.79 \pm 0.38
MP (°C)	-2.76 \pm 0.28	-1.67 \pm 0.09	-1.82 \pm 0.02	-2.04 \pm 0.12	-2.12 \pm 0.15	-1.31 \pm 0.06
Odnos OI: OA	1 : 2.2	1 : 13	1 : 5.2	1 : 3	1 : 5	1 : 3.7
glicerol (μg/g)	61.9 \pm 9.4	725.6 \pm 226.2	16.2 \pm 2.6	2754.8 \pm 354.0	44.8 \pm 7.6	105.8 \pm 3.2
trehaloza (μg/g)	447.9 \pm 20.8	9257.8 \pm 2673.6	113.1 \pm 31.3	11669.0 \pm 3357.0	97.0 \pm 5.9	2919.8 \pm 134.8

DS-dijapauzirajuće gusenice izložene spoljnim temperaturama; DE-dijapauzirajuće gusenice na -8°C (10 dana); ND- grupa nedijapauzirajućih gusenica; MT- masno telo; H- hemolimfa; OA- osmotski aktivna voda; OI- osmotski neaktivna voda; SCP- tačka mržnjenja (Supercooling point, eng.); MP- tačka topljenja (Melting point, eng.); n-broj uzoraka

Tabela 4. Dvofaktorska analiza varijanse ispitivanih parametara u masnom telu i hemolimfi nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica izloženih spoljašnjim temperaturama (DS) i temperaturi od -8°C (DE).

Parametri		Tkivo (T)	Stadijum (S)	T x S	Greška
<i>Ukupna voda</i>	Df	1	2	2	17
	MS	14.91	1.18	11.86	0.32
	F	46.14***	3.64*	36.68***	
<i>Slobodna voda (OA)</i>	Df	1	2	2	16
	MS	11.86	1.10	10.01	0.294
	F	40.36***	3.76*	34.07***	
<i>Vezana voda (OI)</i>	Df	1	2	2	16
	MS	0.185	0.121	0.497	0.028
	F	6.55*	4.27*	17.62***	
<i>OI/OA</i>	Df	1	2	2	16
	MS	0.016	0.002	0.125	0.0015
	F	10.13**	1.09	81.62***	
<i>Tačka mržnjenja (SCP)</i>	Df	1	2	2	16
	MS	632.6	39.3	3.757	2.507
	F	252***	15.67***	1.5	
<i>Tačka topljenja (MP)</i>	Df	1	2	2	17
	MS	1.53	0.51	0.61	0.084
	F	18.3***	6.16**	7.25**	
<i>Glicerol</i>	Df	1	2	2	14
	MS	5.76 x 10 ⁶	2.4 x 10 ⁶	2.5 x 10 ⁶	39895
	F	144.4***	61***	63.9***	
<i>Trehaloza</i>	Df	1	2	2	14
	MS	258 x 10 ⁶	36 x 10 ⁶	33 x 10 ⁶	3.9 x 10 ⁶
	F	66***	9.18**	8.44**	

Ms – srednja vrednost kvadrata (mean square, eng.), df – stepeni slobode (degree of freedom, eng.)
F – faktor. *** - p<0.001; ** - p<0.01; * - p<0.05.

Rezultati pokazuju da je količina svih ispitivanih parametara statistički značajno različita u masnom telu i hemolimfi (dvofaktorska analiza varijanse, efekat tkiva – T, tabela 4). U hemolimfi je više ukupne, slobodne i vezane vode, pri čemu je odnos između vezane i slobodne vode nešto niži (ali statistički značajan) u odnosu na masno telo (tabela 3). Hemolimfa sadrži i višestruko veće koncentracije glicerola i trehaloze nego masno telo (grafik 6 i 7). Izmerena tačka mržnjenja hemolimfe je statistički višestruko niža nego kod masnog tela (grafik 4), ali hemolimfa ima neznatno višu tačku topljenja (grafik 5).

Generalno, dvofaktorskom analizom varijanse za faktor stadijum (tabela 4, efekat stadijuma – S) pokazano je da u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice, gusenice u dijapauzi imaju višestruko više glicerola i trehaloze (one izložene temperaturi od -8°C čak imaju višestruko više glicerola i više trehaloze nego dijapauzirajuće na temperaturi spoljašnje sredine, grafici 6 i 7), nekoliko stepeni nižu SCP, nižu MP i manje vezane vode (grafici 3-5).

Međutim, masno telo i hemolimfa se razlikuju prema merenim parametrima kada se analizira tok i stepen promena kod gusenica u dijapauzi u odnosu na nedijapauzirajuće i dodatnim izlaganjem niskoj temperaturi u dijapauzi (dvofaktorska analiza varijanse, efekat interakcije T x S, tabela 4).

U hemolimfi, u dijapauzi se povećavaju količine glicerola i trehaloze, višestruko, pri čemu smanjenje spoljašnje temperature dovodi do daljeg, opet višestrukog povećanja koncentracija (grafici 6 i 7). Kod jedinki u dijapauzi se smanjuje SCP hemolimfe, pri čemu sa daljim izlaganjem hladnoći nema daljeg sniženja SCP (grafik 4). U dijapauzi se smanjuje MP hemolimfe, ali tek sa izlaganjem niskoj temperaturi promene postaju statistički značajno različite (grafik 5). Stanje dijapauze karakteriše smanjenje vezane vode (grafik 3), pri čemu izlaganje niskoj temperaturi u dijapauzi smanjuje količinu slobodne (grafik 2), a time i ukupne vode (grafik 1).

S druge strane, u masnom telu gusenica u dijapauzi nalaze se veće količine glicerola i trehaloze, ali pri snižavanju spoljašnje temperature na eksperimentalnih -8°C , dolazi do značajnog smanjenja koncentracije i glicerola i trehaloze (nivo glicerola se čak spusti ispod nivoa nedijapauzirajućih, grafik 6). Ovakav trend promena je, čini se, prema statističkoj analizi karakterističan i za MP i količinu vezane vode (grafici 3 i 5). Dodatno izlaganje niskoj temperaturi u dijapauzi na -8°C u masnom telu dovodi do povećanja ukupne i slobodne vode (grafici 1 i 2). Inače, SCP masnog tela gusenica u dijapauzi je niža u odnosu na SCP nedijapauzirajućih, ali se dodatnim izlaganjem hladnoći ne menja (kao i u slučaju hemolimfe, grafik 4).

2. Sadržaj poliola i šećera u nedijapauzirajućim i dijabauzirajućim gusenicama *O.nubilalis* tokom dijabauze i pri izlaganju niskim temperaturama

Na osnovu specifičnih masenih spektara i retencionih vremena standarda glicerola, sorbitola, mio-inozitola, glukoze, fruktoze i trehaloze, urađena je identifikacija i kvantifikacija poliola i šećera u homogenatu celih gusenica *O.nubilalis*, i to nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih sredinom (SD) i krajem dijabauze (KD) pri različitim temperaturnim tretmanima (5°C, -3°C i -16°C).

U tabeli 5. prikazani su rezultati sadržaja poliola i šećera u homogenatu nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih gusenica *O.nubilalis* tokom dijabauze na temperaturi od 5°C obrađeni ANOVA i Tukey-evim HSD testom.

Na graficima 8-13. i tabeli 6. prikazani su rezultati sadržaja poliola i šećera u homogenatu dijabauzirajućih gusenica pri izlaganju niskim temperaturama (-3°C i -16°C) tokom dijabauze.

U tabeli 7. su prikazani rezultati dvofaktorske analize varijanse za sadržaj poliola i šećera u homogenatu celih dijabauzirajućih gusenica pri izlaganju niskim temperaturama tokom dijabauze.

A. Sadržaj poliola i šećera nedijapauzirajućih i dijavauzirajućih gusenica *O.nubilalis* tokom dijavauze

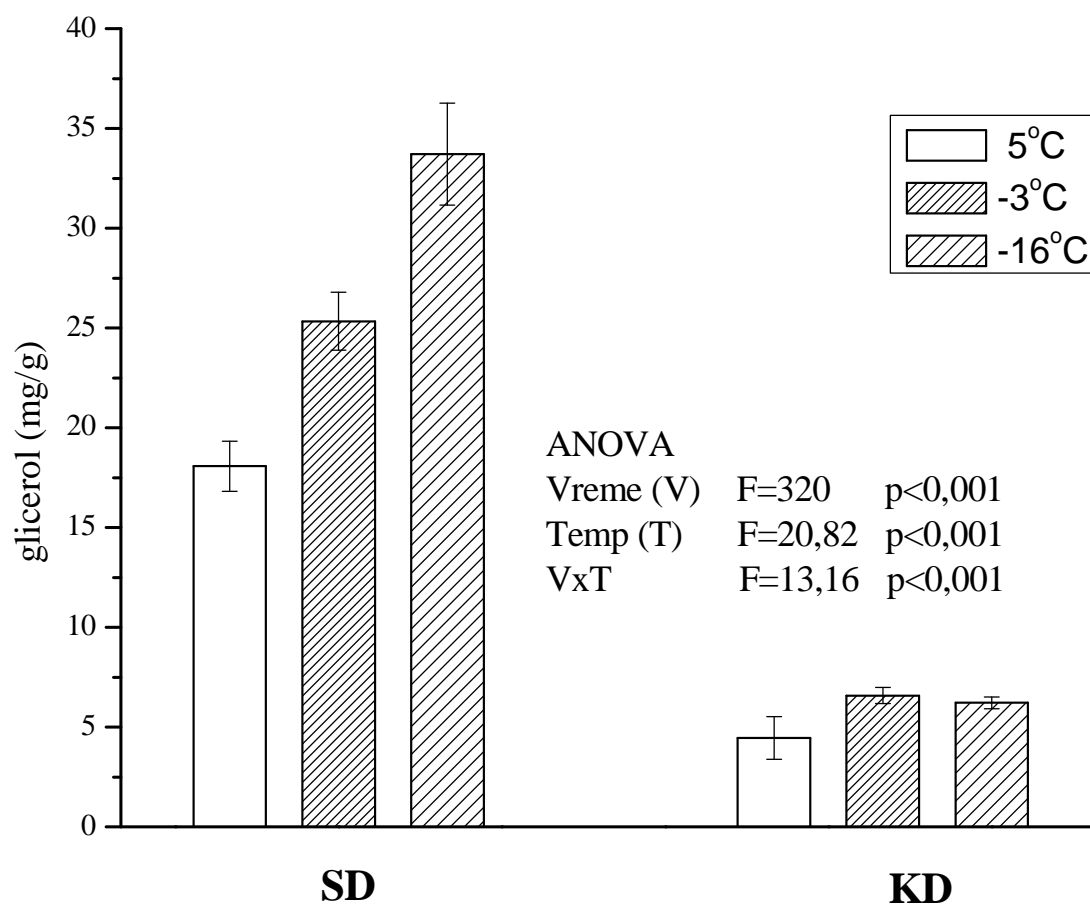
Tabela 5. Sadržaj poliola i šećera u nedijapauzirajućim gusenicama (ND) i dijavauzirajućim gusenicama na 5°C sredinom (SD) i krajem dijavauze (KD). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.E.

	ND (n=4)	SD (n=4)	KD (n=3)	ANOVA
<i>Glicerol</i>	0.18 \pm 0.002 ^a	18.1 \pm 1.3 ^c	4.5 \pm 1.1 ^b	P<0.001
<i>Sorbitol</i>	57 \pm 9 ^{ab}	78 \pm 12 ^a	35 \pm 3 ^b	P<0.05
<i>Mio-inozitol</i>	60 \pm 5	79 \pm 5	74 \pm 7	N.S.
<i>Glukoza</i>	81 \pm 17 ^a	92 \pm 6 ^a	199 \pm 6 ^b	P<0.001
<i>Fruktoza</i>	68 \pm 7 ^a	45 \pm 5 ^b		
<i>Trehaloza</i>	0.38 \pm 0.06	4.6 \pm 0.3	5.5 \pm 0.3	P<0.001

Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinačnih grupa (post hoc poređenje je vršeno Tukey-evim HSD testom za nejednak broj uzoraka, n)

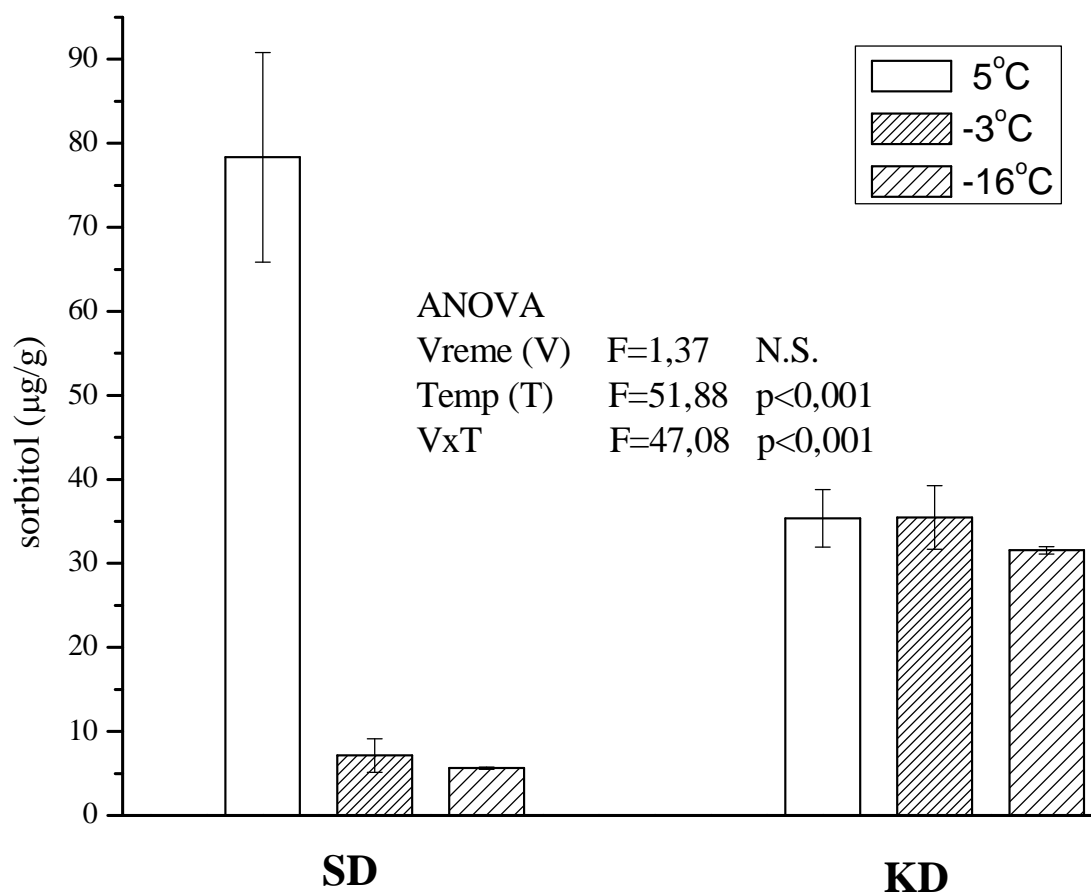
B. Sadržaj poliola i šećera dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* tokom dijapauze pri izlaganju niskim temperaturama

a) Sadržaj glicerola



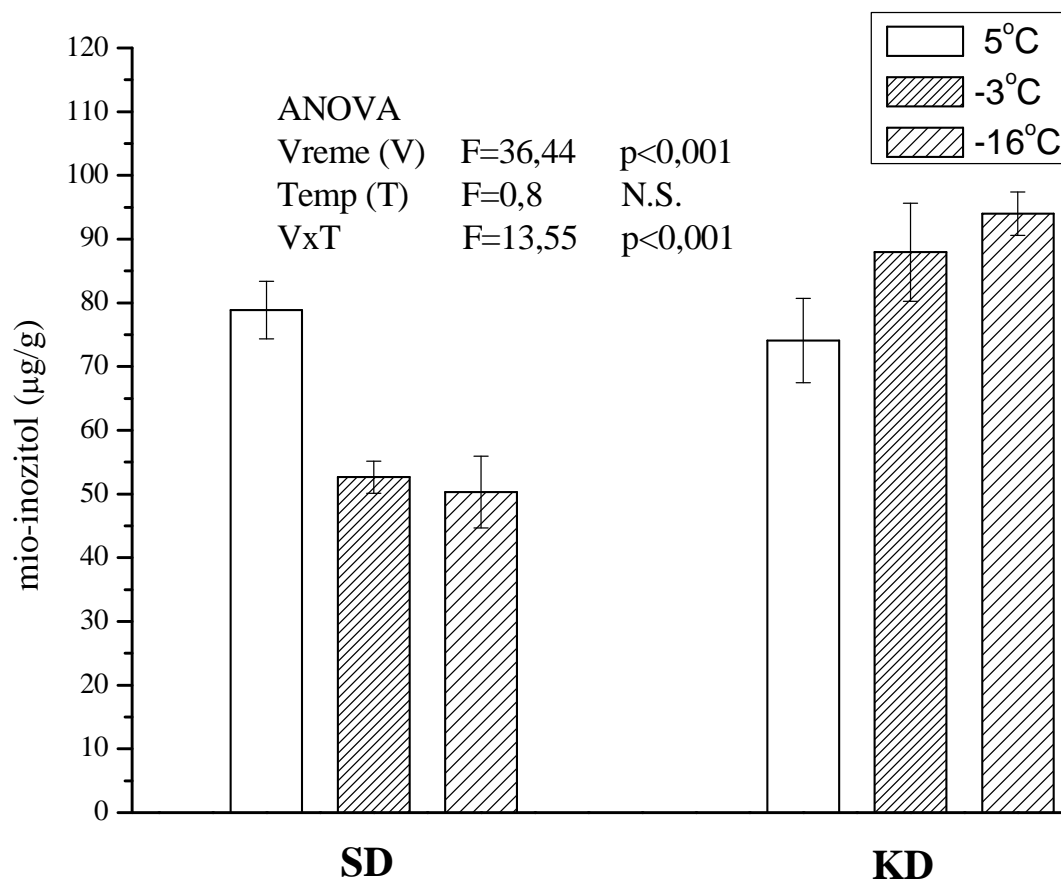
Grafik 8. Sadržaj glicerola (mg po g telesne mase) dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijapauze (KD). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

b) Sadržaj sorbitola



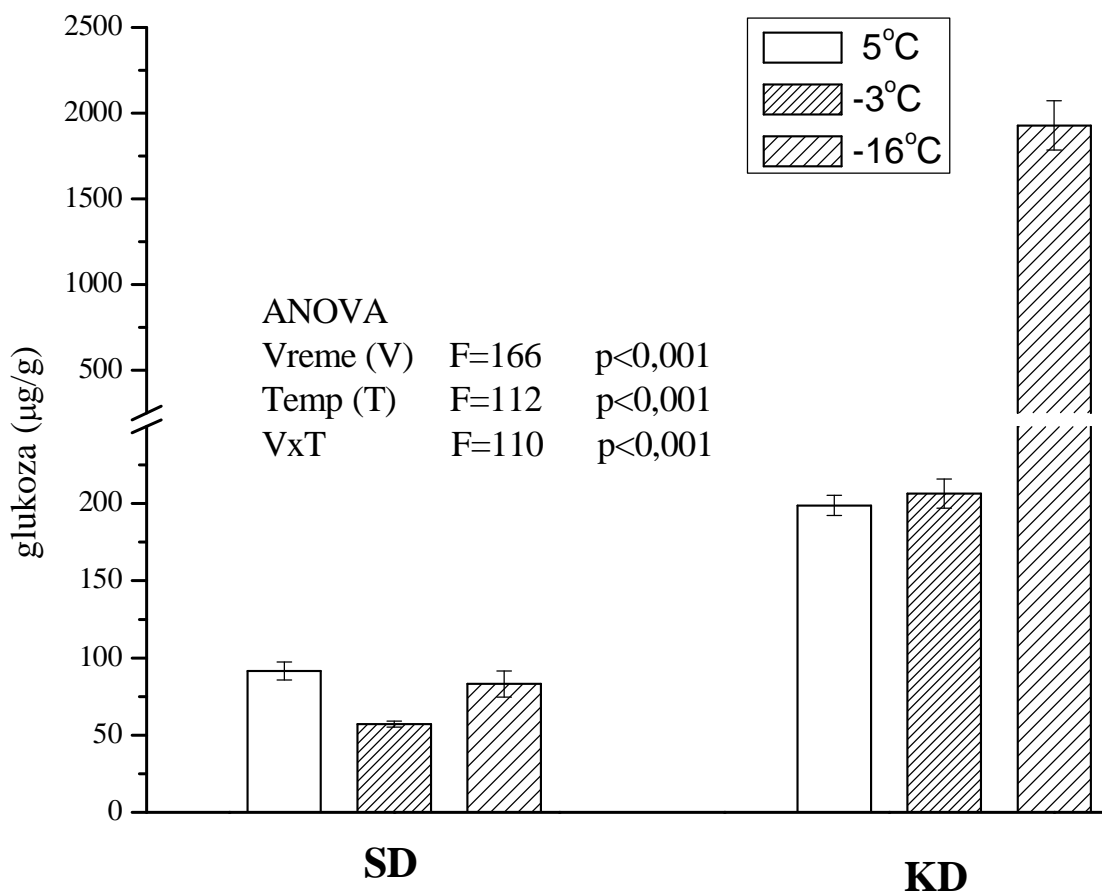
Garfik 9. Sadržaj sorbitola (μg po g telesne mase) dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C , -3°C i -16°C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijapauze (KD). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

c) Sadržaj mio-inozitola



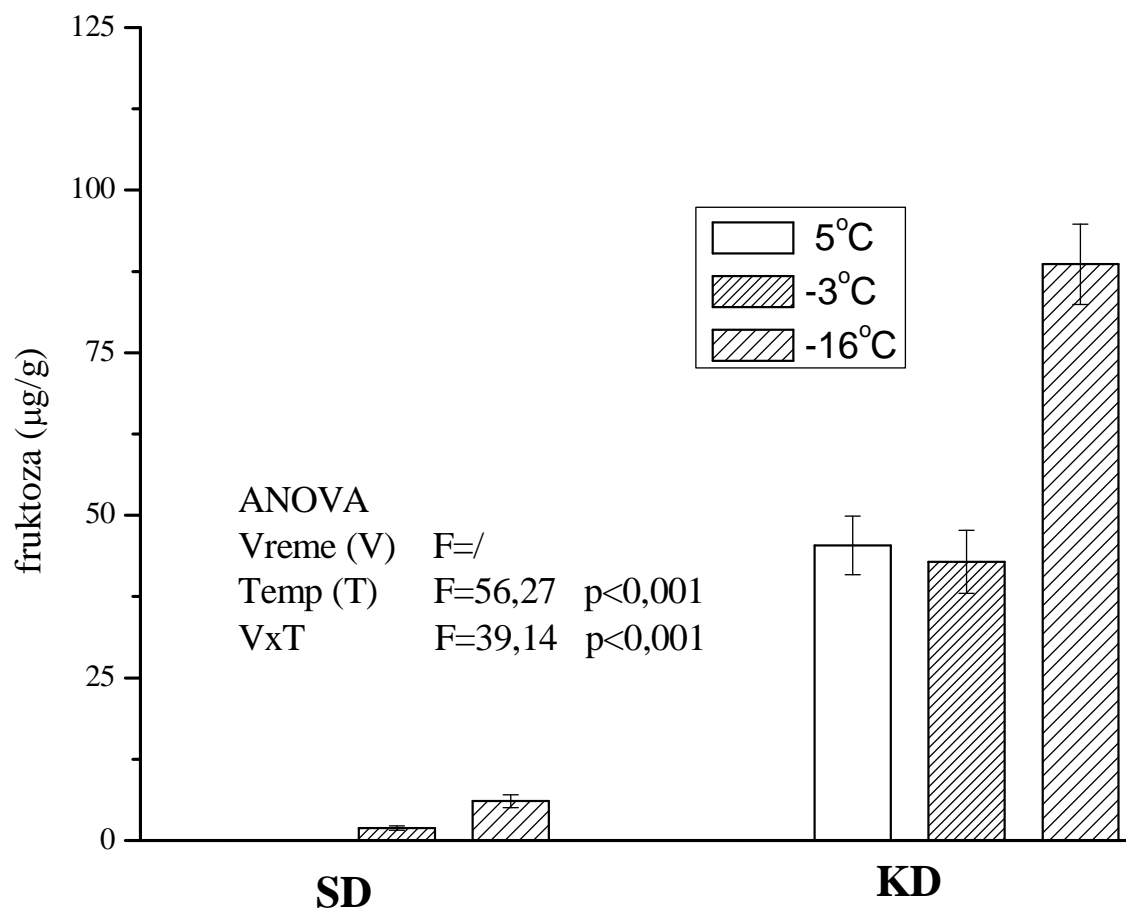
Garfik 10. Sadržaj mio-inozitola (μg po g telesne mase) dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C , -3°C i -16°C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijapauze (KD). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

d) Sadržaj glukoze



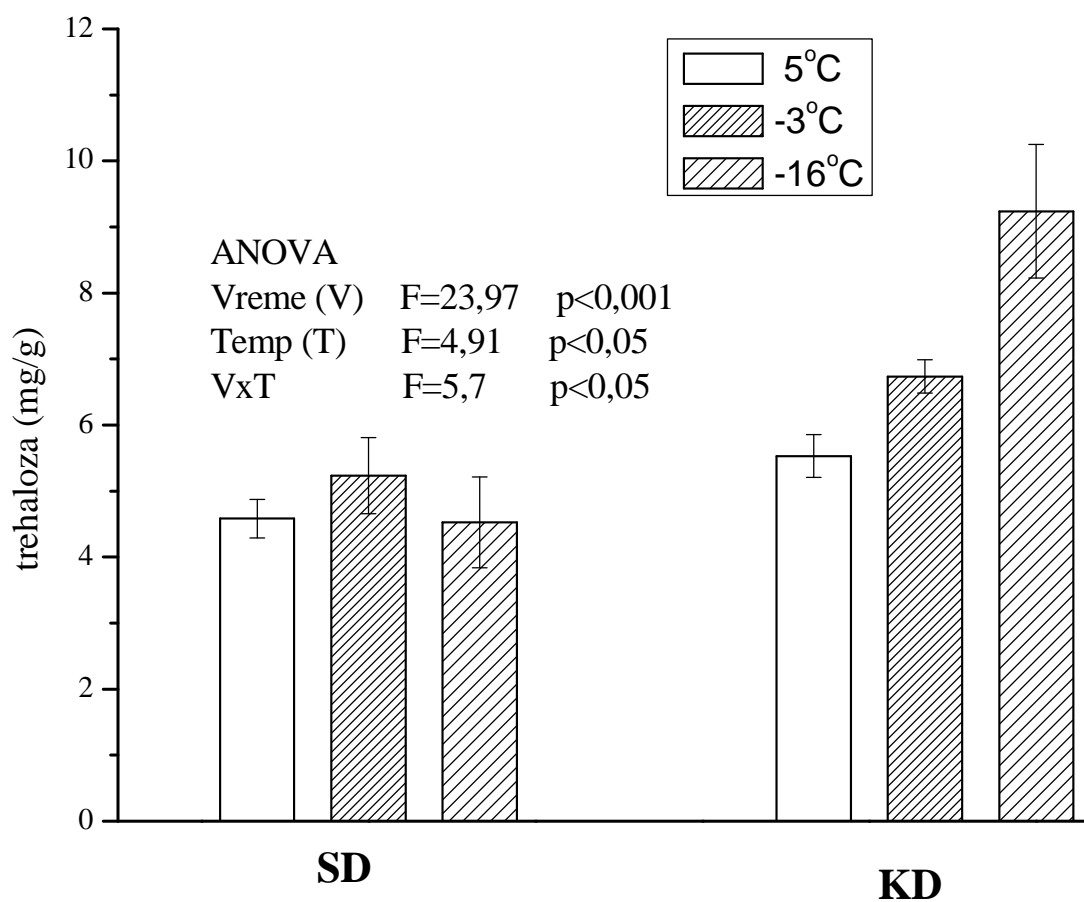
Garfik 11. Sadržaj glukoze (μg po g telesne mase) dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C , -3°C i -16°C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijapauze (KD). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

e) Sadržaj fruktoze



Garfik 12. Sadržaj fruktoze (μg po g telesne mase) dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C , -3°C i -16°C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijapauze (KD). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

f) Sadržaj trehaloze



Garfik 13. Sadržaj trehaloze (mg po g telesne mase) dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem dijapauze (KD). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

Tabela 6. Sadržaj poliola i šećera kod dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od -3 °C i -16 °C, sredinom dijapauze (SD) i krajem dijapauze (KD). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm S:E. n-broj uzoraka

	Sredina dijapauze (SD) (n=5)		Kraj dijapauze (KD) (n=4)	
	<i>SD</i>(-3°C)	<i>SD</i>(-16°C)	<i>KD</i>(-3°C)	<i>KD</i>(-16°C)
<i>Glicerol</i> (mg/g)	25.4 \pm 1.4	33.7 \pm 2.6	6.6 \pm 0.4	6.2 \pm 0.3
<i>Sorbitol</i> (μg/g)	7.2 \pm 1.9	5.6 \pm 0.1	35.5 \pm 3.8	31.6 \pm 0.4
<i>Mio-inozitol</i> (μg/g)	52.6 \pm 2.5	50.3 \pm 5.6	87.9 \pm 7.7	94.0 \pm 3.4
<i>Glukoza</i> (μg/g)	57.1 \pm 1.9	83.2 \pm 8.4	206.4 \pm 9.5	1928.1 \pm 143.7
<i>Fruktoza</i> (μg/g)	1.9 \pm 0.3	6.0 \pm 0.9	42.9 \pm 4.8	88.6 \pm 6.2
<i>Trehaloza</i> (mg/g)	5.2 \pm 0.6	4.5 \pm 0.7	6.7 \pm 0.3	9.2 \pm 1.0

Tabela 7. Dvofaktorska analiza varijanse za sadržaj poliola i šećera u dijapauzirajućim gusenicama *O.nubilalis* izlaganih temperaturi od 5, -3 i -16°C, sredinom (SD) i krajem dijapauze (KD)

		Vreme (V)	Temp (T)	V x T	Greška
<i>Glicerol</i>	df	1	2	2	18
	MS	2289	149	94	7.14
	F	320***	20.82***	13.16***	
<i>Sorbitol</i>	df	1	2	2	12
	MS	60.29	2402	2143	41.31
	F	1.37	51.88***	47.08***	
<i>Mioinozitol</i>	df	1	2	2	18
	MS	3591	78.8	1335	98.5
	F	36.44***	0.8	13.55***	
<i>Glukoza</i>	df	1	2	2	16
	MS	2.6 x 10 ⁶	1.74 x 10 ⁶	1.71 x 10 ⁶	15613
	F	166***	112***	110***	
<i>Fruktoza</i>	df		1	1	11
	MS		1991	1385	35.38
	F		56.27***	39.14***	
<i>Trehaloza</i>	df	1	2	2	17
	MS	31.82	6.52	7.56	1.33
	F	23.97***	4.91*	5.7*	

MS – srednja vrednost kvadrata (mean square, eng.), df – stepeni slobode (degree of freedom, eng.)
F – faktor. *** - p<0.001; ** - p<0.01; * - p<0.05.

Takođe, dvofaktorska analiza varijanse za sadržaj poliola i šećera u dijapauzirajućim gusenicama sredinom (SD) i krajem dijapauze (KD) izlaganih temperaturi od 5 °C, -3 °C i -16°C je potvrdila razliku u njihovoj količini sredinom i krajem dijapauze (statistički značajni efekti vremena dijapauze – V, tabela 7). Izlaganje niskoj temperaturi menja količine merenih šećera i poliola (statistički značajni efekti temperature – T, tabela 7), međutim, gusenice u dijapauzi različito reaguju na snižavanje temperature spoljašnje sredine u zavisnosti od perioda dijapauze kada su niskoj temperaturi izloženi (statistički značajne interakcije V x T, tabela 7). Sredinom dijapauze, gusenice na izlaganje niskoj temperaturi povećavaju koncentraciju glicerola (grafik 8) i fruktoze (na -16 °C je koncentracija viša u odnosu na -3 °C, grafik 12), ali se smanjuje koncentracija sorbitola (grafik 9) i mio-inozitola (koncentracije su na -3 i -16 °C slične, ali značajno niže u odnosu na 5 °C, grafik 10). Nasuprot njima, gusenice na kraju dijapauze na izlaganje niskoj temperaturi takođe povećavaju količinu glicerola (nivoi na -3 °C i -16 °C nisu značajno različiti), ali i mio-inozitola, glukoze, fruktoze i trehaloze, ali tek na temperaturi od -16 °C (grafici 8-13).

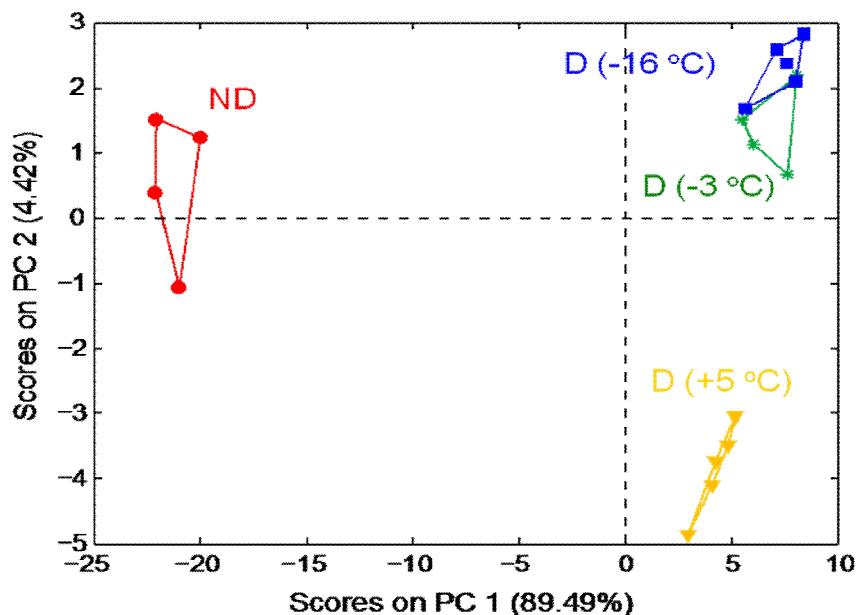
3. Metabolomički (NMR) profili nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis*, pri izlaganju niskim temperaturama

Nuklearno magnetno rezonantna (NMR) spektroskopija je korišćena za pregled metabolita u hemolimfi nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica *Ostrinia nubilalis* izloženih 10 dana na temperaturama 5°C, -3°C i -16°C.

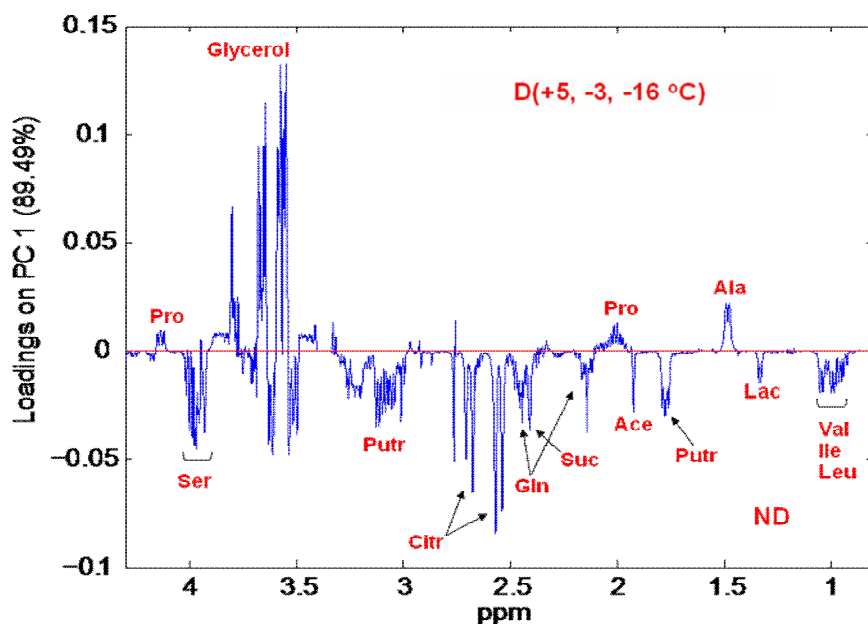
Statistička analiza po principalnim komponentama 1D H NMR spektara hidrofилnih ekstrakata hemolimfe nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih (D) gusenica *O.nubilalis* predstavljena je na grafiku 14.A. Uzorci ND i D se različito grupišu u PCA plotu, razdvajaju se po prvoj principalnoj komponenti, PC1. Signali najznačajnijih metabolita koji predstavljaju razliku u metaboličkim profilima nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih (D) gusenica *O.nubilalis*, analiziranih po prvoj principalnoj komponenti u opsegu od 0.8-4.3 ppm NMR spektra predstavljeni su na grafiku 14.B. Sa grafika se može videti da su glavne odlike metaboličkih profila dijapauzirajućih gusenica povećan sadržaj glicerola i aminokiselina prolina i alanin u hemolimfi, dok je za metabolički profil nedijapauzirajućih gusenica karakteričan povećan sadržaj aminokiselina poput Ser, Gln i aminokiselina sa alifatičnim bočnim ostacima (Val, Leu, Ile). Takođe, kod ND grupe značajno je povećan sadržaj citrata, acetata, sukcinata i putrescina.

PCA skor 1 D H NMR spektara hemolimfe dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* prikazan je na grafiku 15.A. Na grafiku izrazito grupisanje uzoraka na 5°C, a na drugoj strani uzoraka hemolimfe gusenica držanih na temperaturama ispod nule (-3°C i -16°C) po PC1. Opseg NMR spektra od 0.8-4.3 ppm, sa najznačajnijim metabolitima u hemolimfi koji predstavljaju razliku u metaboličkim profilima dijapauzirajućih (D) gusenica izloženih temperaturi od 5°C i temperaturama ispod nule (-3°C i -16°C) analiziran po PC1 komponenti predstavljen je na grafiku 15.B. Pri izlaganju niskim temperaturama u metaboličkom profilu hemolimfe najizrazitije je povećanje glicerola, acetata i alanina. Metabolički profil hemolimfe dijapauzirajućih gusenica izloženih temperaturama od 5°C u odnosu na hemolimfu gusenica izloženih temperaturama iznad nule ima sličan spektar metabolita kao profili nedijapauzirajućih u odnosu na dijapauzirajuće gusenice (grafik 14.B), ali za različiti PC skor.

A.



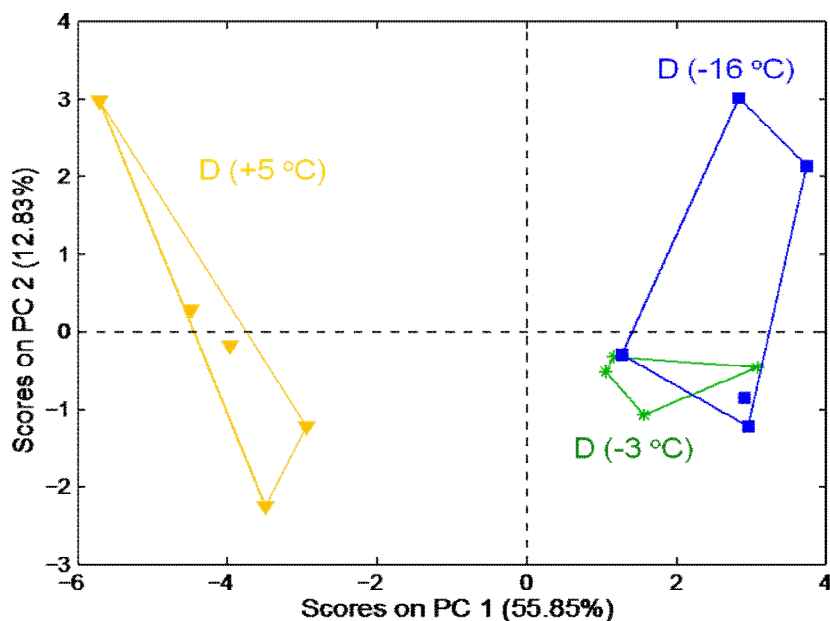
B.



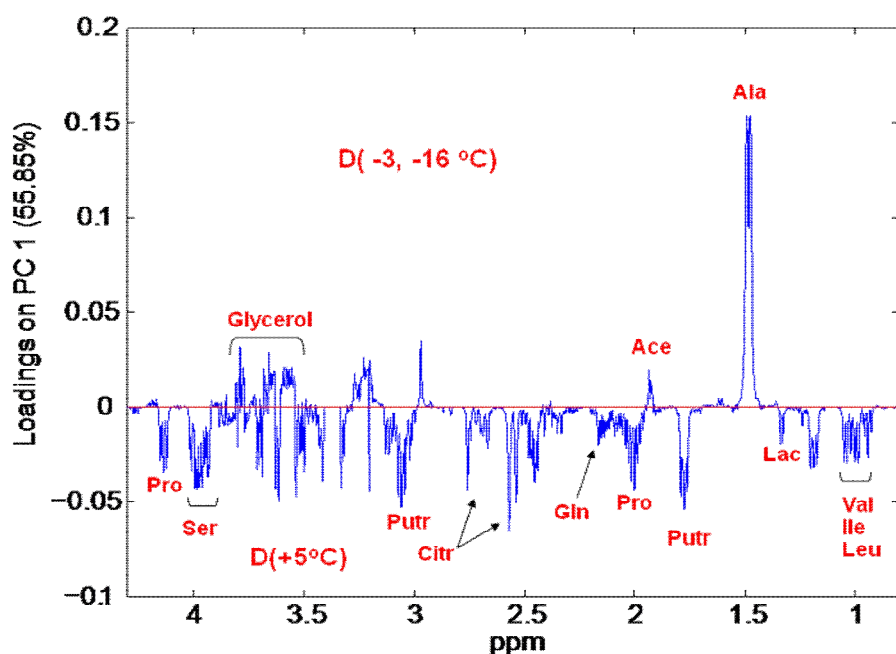
Grafik 14. A. PCA skor i B. analiza po prvoj principalnoj komponenti (PC1) 1D HNMR spektra hidrofilnog ekstrakta hemolimfe nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih (D) gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C. Signali na grafiku predstavljaju najznačajnije metabolite koji predstavljaju razliku u metaboličkim profilima nedijapauzirajućih (negativni deo grafika) i dijapauzirajućih (pozitivni deo grafika) gusenica.

Oznake metabolita: Ala- alanin; Val- valin; Ile- izoleucin; Leu- leucin; Lac- laktat; Putr- putrescin; Ace- acetat; Pro- prolin; Ser- serin; Suc- sukcinat; Gln- glutamin; Citr- citrat.

A.



B.



Grafik 15. A. PCA skor i B. analiza po prvoj principalnoj komponenti (PC1) 1D HNMR spektra hidrofilnog ekstrakta hemolimfe dijapauzirajućih (D) gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C. Signali na grafiku predstavljaju najznačajnije metabolite koji predstavljaju razliku u metaboličkim profilima na temperaturama -3 °C i -16 °C (pozitivan deo grafika) i na temperaturi 5°C (negativan deo grafika).

Oznake metabolita: Ala-alanin; Val-valin; Ile- izoleucin; Leu- leucin; Lac-laktat; Putr- putrescin; Ace- acetat; Pro- prolin; Ser-serin; Gln- glutamin; Citr- citrat.

4. Antioksidativni sistem zaštite nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis*, pri izlaganju niskim temperaturama

U okviru ispitivanja značaja antioksidativnog sistem zaštite i njegove moguće regulatorne uloge u adaptaciji metabolizma gusenica *O.nubilalis* na niske temperature određivana je aktivnost antioksidativnih enzima: superoksid dismutaze (SOD)- ukupne, CuZn- i Mn-zavisne SOD, katalaze (CAT) u homogenatu i masnom telu, i tirozinaze (TYR) u hemolimfi nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C, sredinom i krajem dijapauze. Takođe, određena je koncentracija H₂O₂ u masnom telu i hemolimfi, kao i EPR spektroskopija celih dijapauzirajućih gusenica izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C, sredinom i krajem dijapauze. Citohemijsko bojenje melanina je rađeno na preparatima dijapauzirajućih gusenica u periodu sredine dijapauze.

U tabeli 8. prikazani su rezultati aktivnosti antioksidativnih enzima obrađeni ANOVA i Tukey-evim HSD testom, u homogenatu nedijapauzirajućim i dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* na temperaturi od 5°C, tokom sredine i krajem dijapauze.

Rezultati aktivnosti antioksidativnih enzima pri izlaganju niskim temperaturama u homogenatu i masnom telu dijapauzirajućih gusenica sredinom i krajem dijapauze prikazani su na graficima 16-26 i tabeli 11.

Dvofaktorske analize varijansi (ANOVA) aktivnosti antioksidativnih enzima dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* pri izlaganju niskim temperaturama tokom dijapauze date su u tabeli 9. za homogenat i tabeli 10. za masno telo.

EPR spektri celih dijapauzirajućih gusenica izloženih niskim temperaturama, sredinom i krajem dijapauze prikazani su na graficima 27 i 28, i tabeli 11.

Citohemijski preparati kioskopskih preseka dijapauzirajućih gusenica bojeni na melanin prikazani su na slici 2.

A. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite nedijapauzirajućih i dijavauzirajućih gusenica *O.nubilalis* tokom dijavauze

Tabela 8. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u homogenatu nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijavauzirajućih gusenica na temperaturi od 5°C, sredinom (SD) i krajem dijavauze (KD). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška.

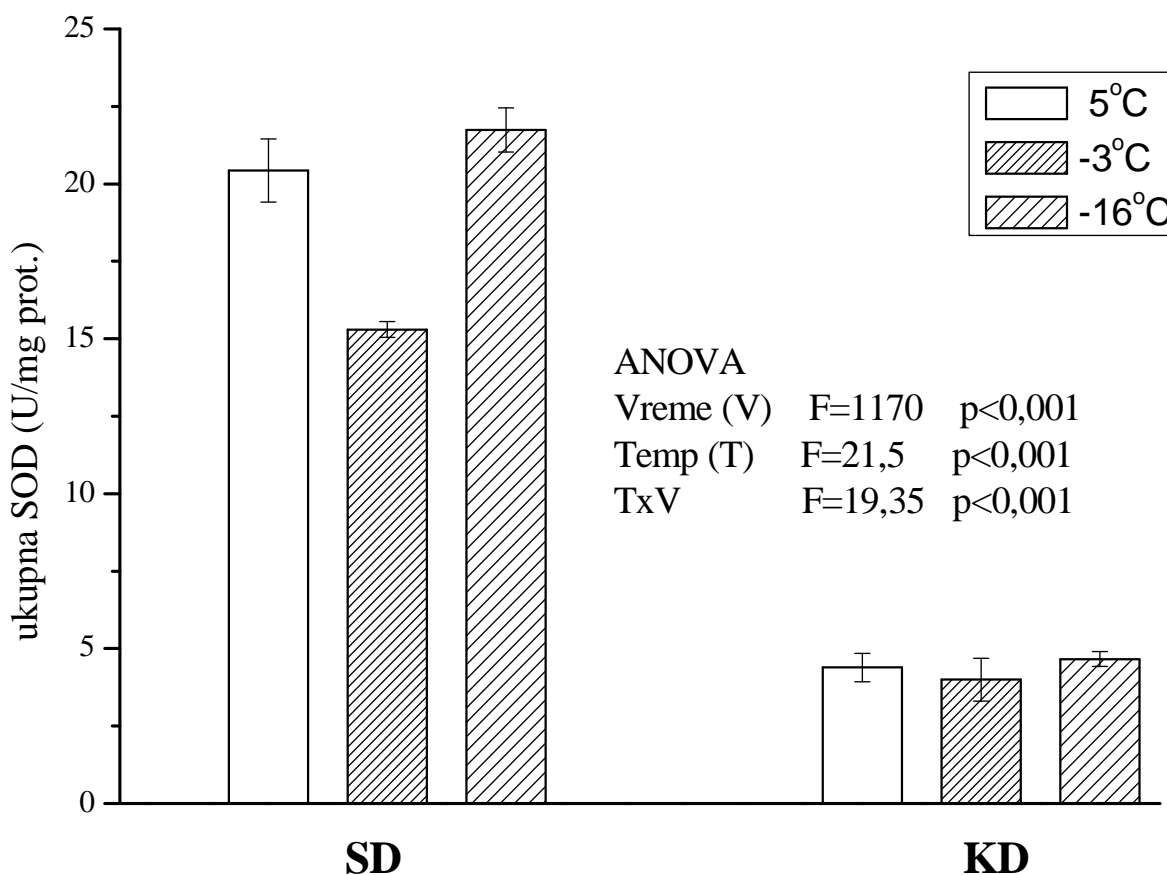
	ND (n=6)	SD (n=4)	KD (n=3)	ANOVA
<i>SOD (U/mg prot.)</i>	12 ± 1 ^b	20.4 ± 0.3 ^c	4.9 ± 0.5 ^a	P<0.001
<i>CuZnSOD(U/mg prot.)</i>	8 ± 0.5 ^b	11.7 ± 0.9 ^c	1.9 ± 0.4 ^a	P<0.001
<i>MnSOD(U/mg prot.)</i>	6.1 ± 0.2 ^b	7.1 ± 0.7 ^b	2.9 ± 0.3 ^a	P<0.001
<i>CAT(U/mg prot.)</i>	13.9 ± 0.6 ^c	11.6 ± 0.5 ^b	6.6 ± 0.6 ^a	P<0.001
<i>Tyr(U/mg prot.)</i>	57 ± 6 ^a	12 ± 1 ^b	12.3 ± 0.8 ^b	P<0.001

Različita slova u indeksu označavaju statistički značajnu razliku između pojedinih grupa (post hoc poređenje je vršeno Tukey-evim HSD testom za nejednak broj uzoraka, n)

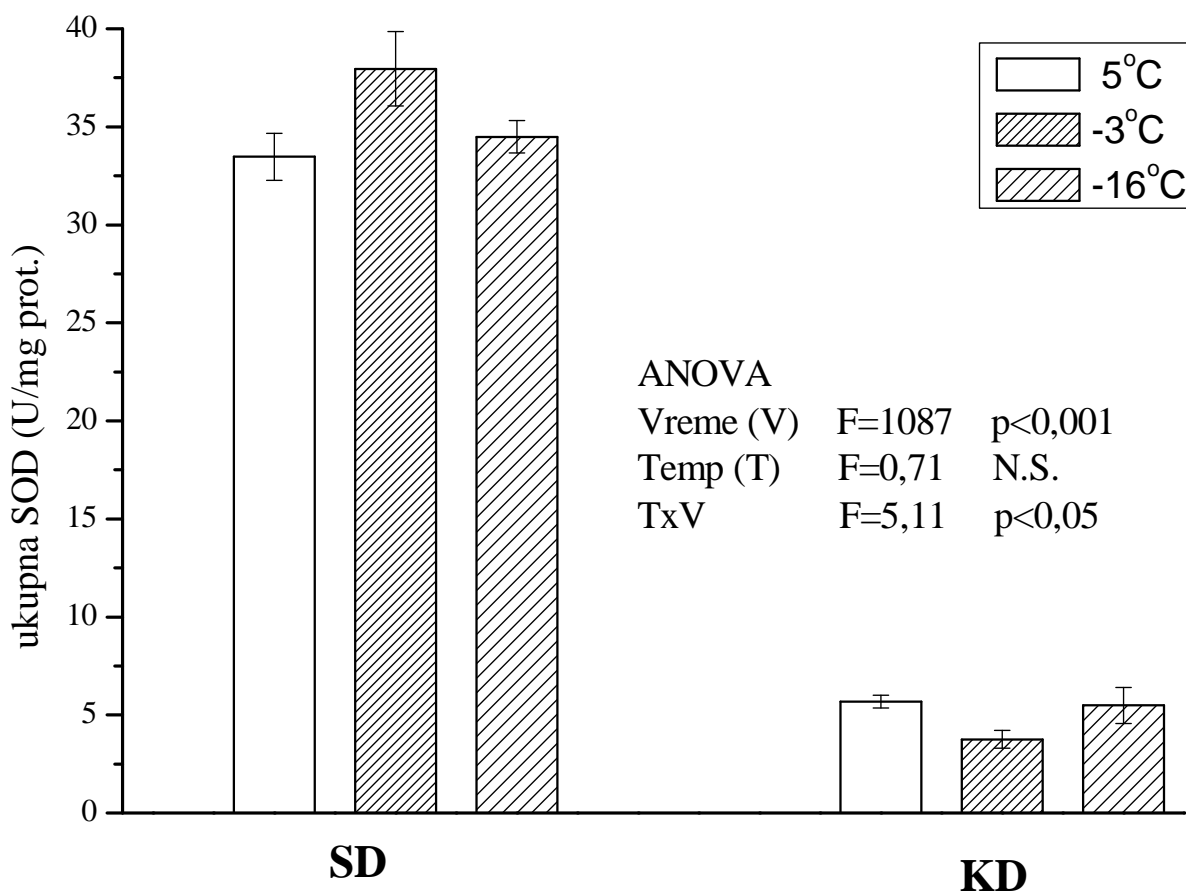
Merenja aktivnosti antioksidativnih enzima su pokazala da se njihova aktivnost menja u dijavauzi, kao i tokom trajanja dijavauze. Gusenice sredinom dijavauze u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice imaju statistički značajno višu aktivnost ukupne i CuZnSOD i nižu aktivnost CAT. Međutim, period kraja dijavauze karakteriše statistički značajno niža aktivnost CuZnSOD, MnSOD i CAT. Tokom dijavauze, izmerena je niža aktivnost Tyr u odnosu na nedijapauzirajuće stanje.

B. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* tokom dijapauze i izlaganja niskim temperaturama

a) Aktivnost ukupne superoksid dismutaze (SOD)

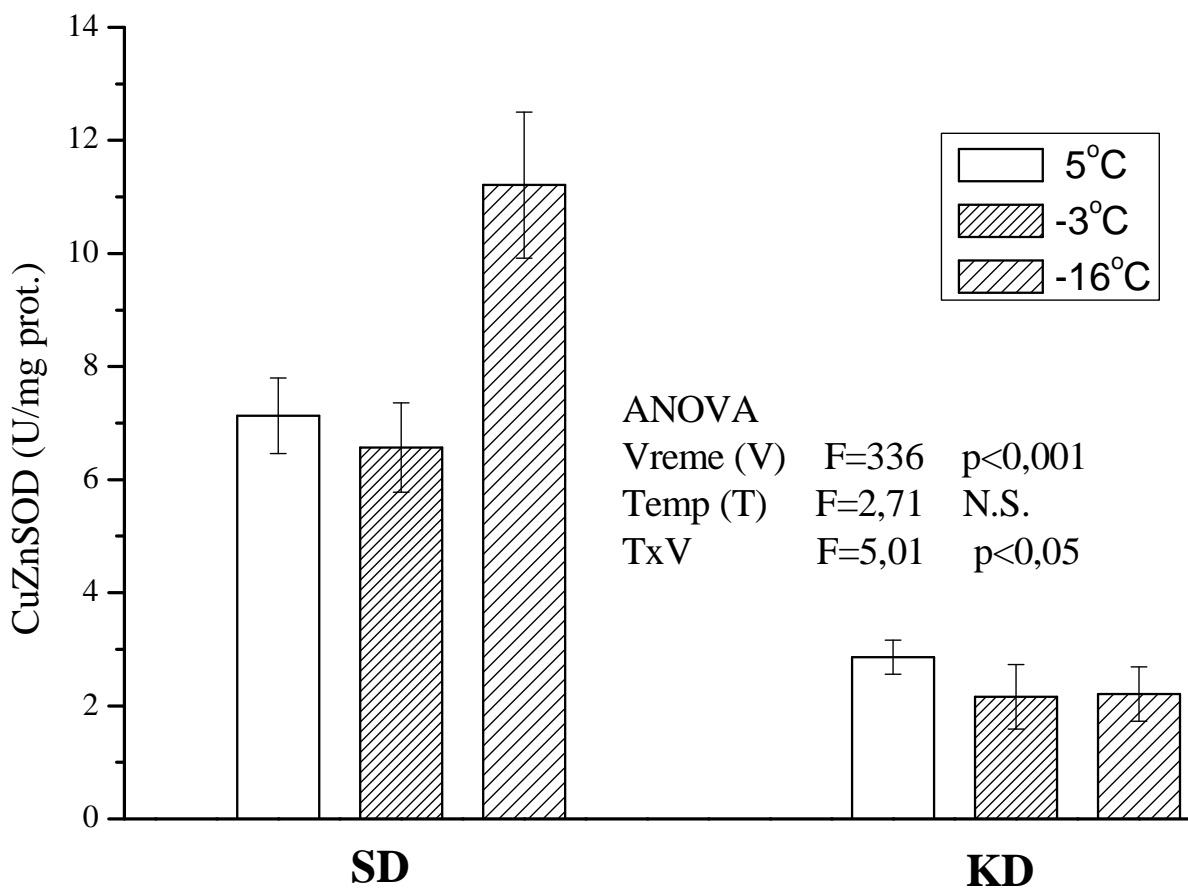


Grafik 16. Aktivnost ukupne SOD u homogenatu celih dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

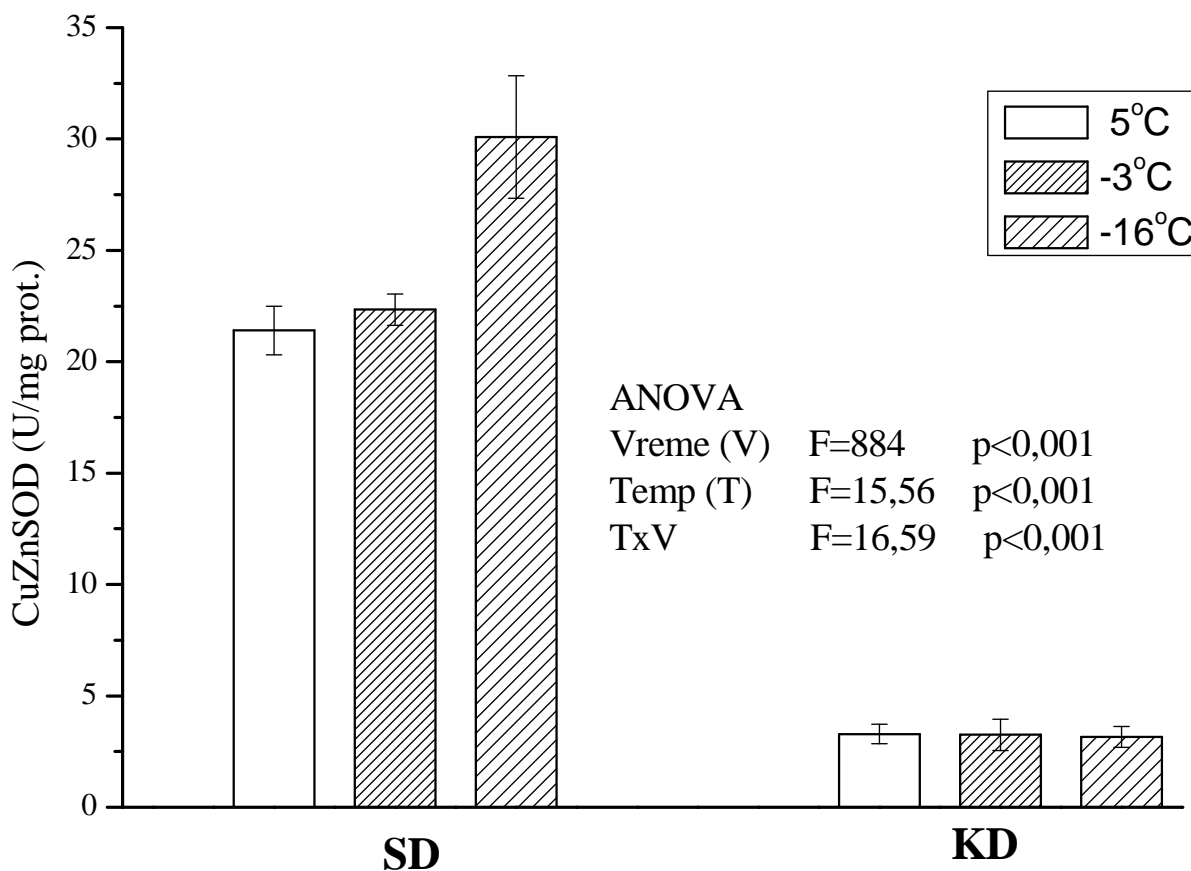


Grafik 17. Aktivnost ukupne SOD u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

b) Aktivnost Cu,Zn zavisne superoksid dismutaze (CuZnSOD)

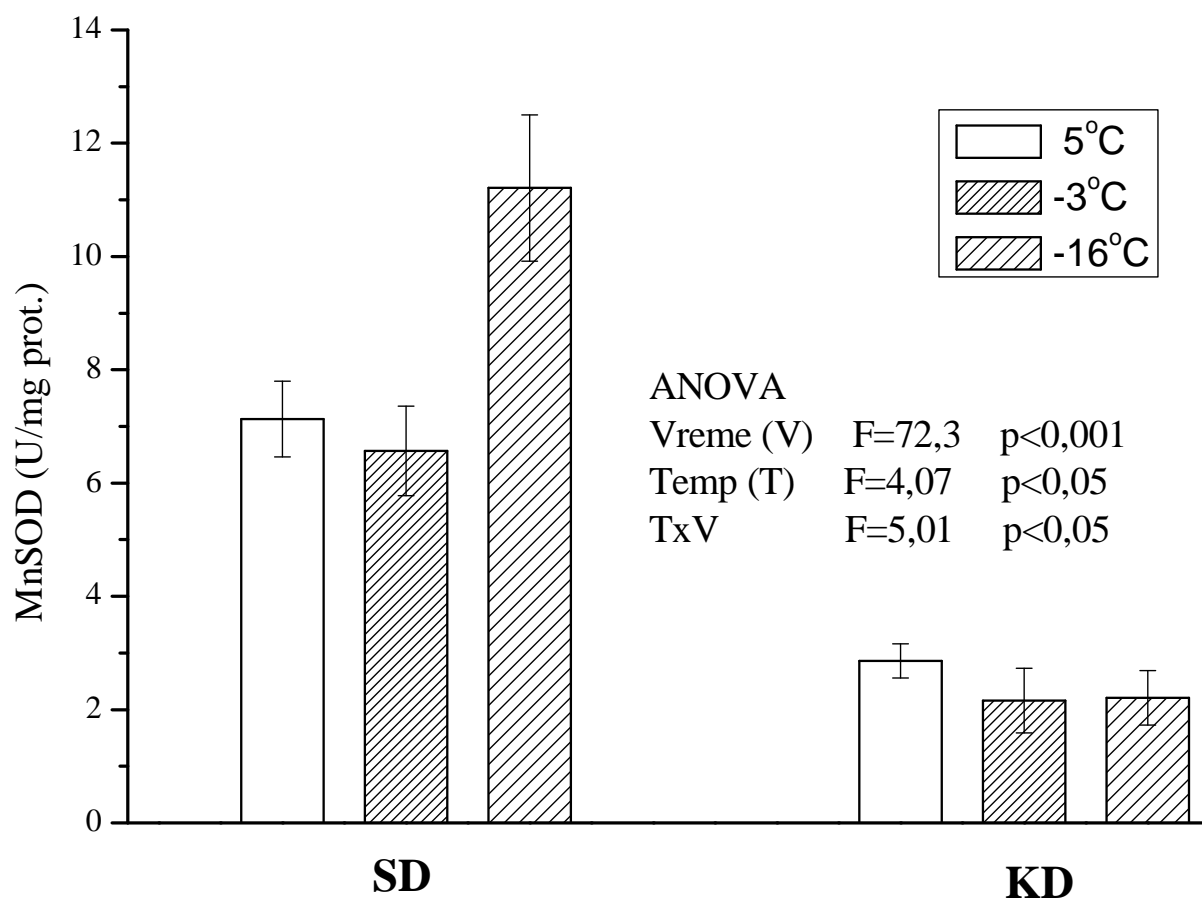


Grafik 18. Aktivnost CuZnSOD u homogenatu celih dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

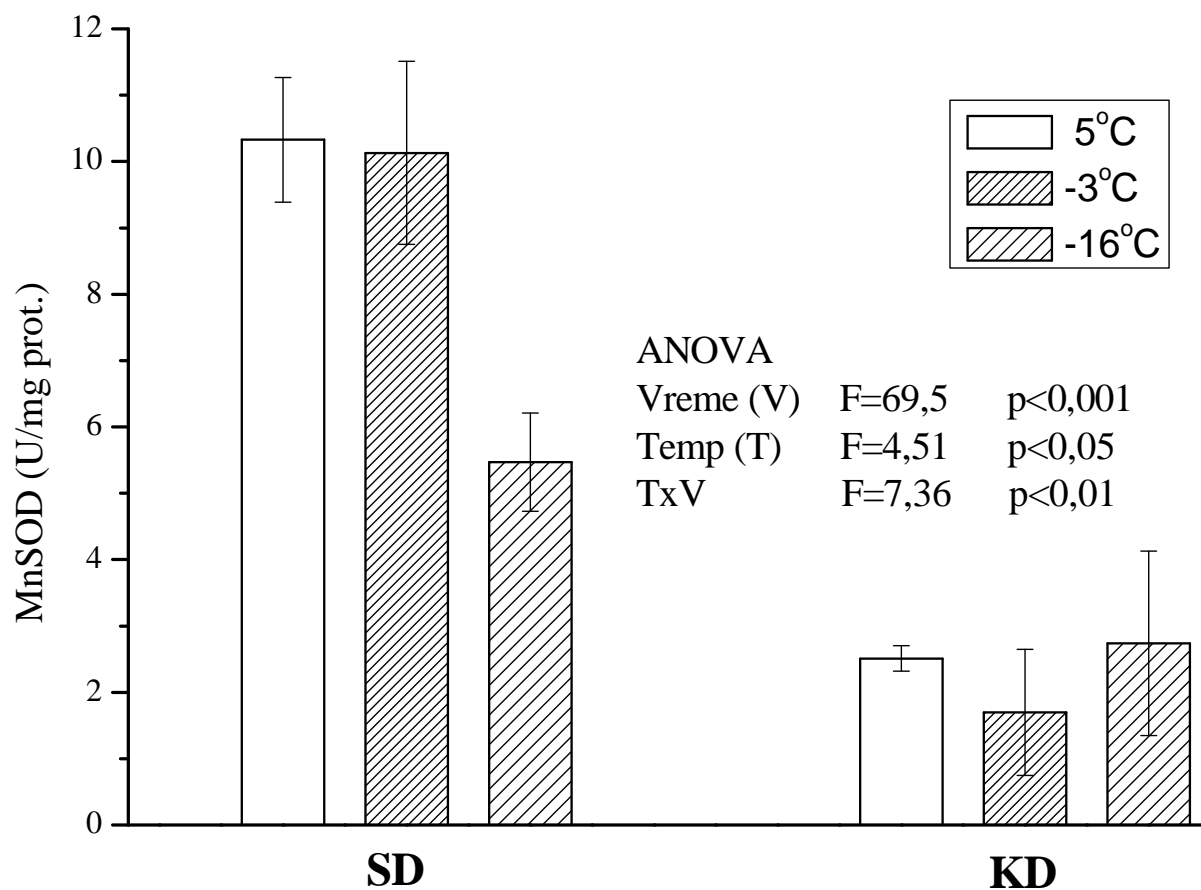


Grafik 19. Aktivnost CuZnSOD u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

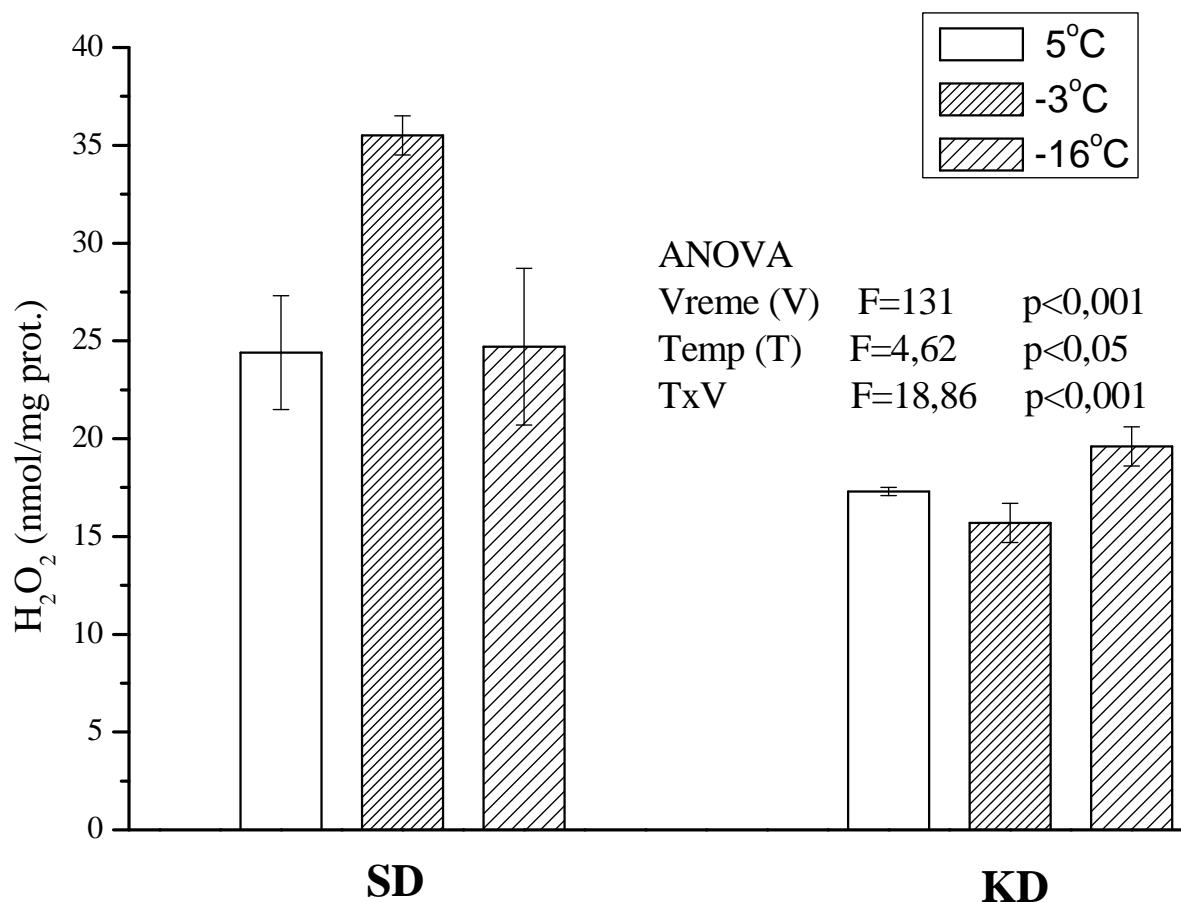
c) Aktivnost Mn zavisne superoksid dismutaze (MnSOD)



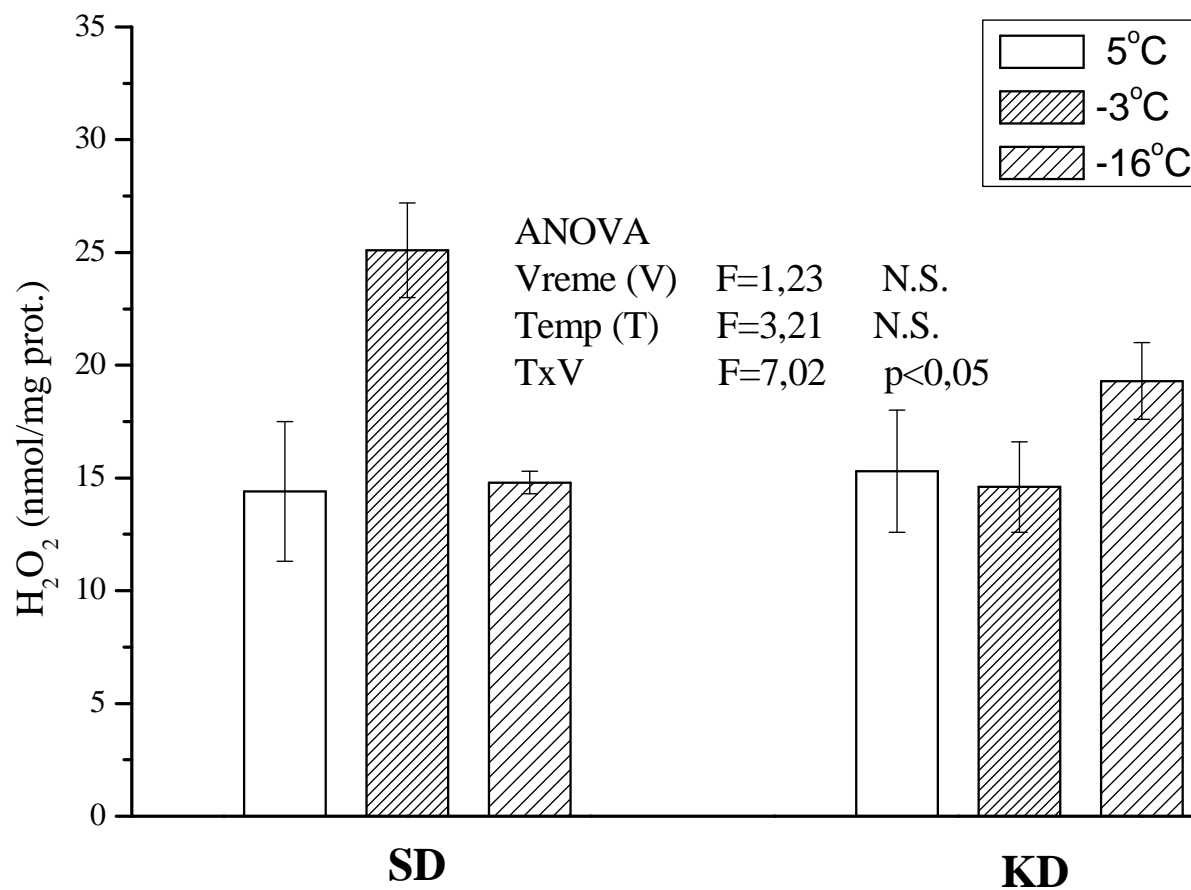
Grafik 20. Aktivnost MnSOD u homogenatu celih dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapuze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor



Grafik 21. Aktivnost MnSOD u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statisitčki značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

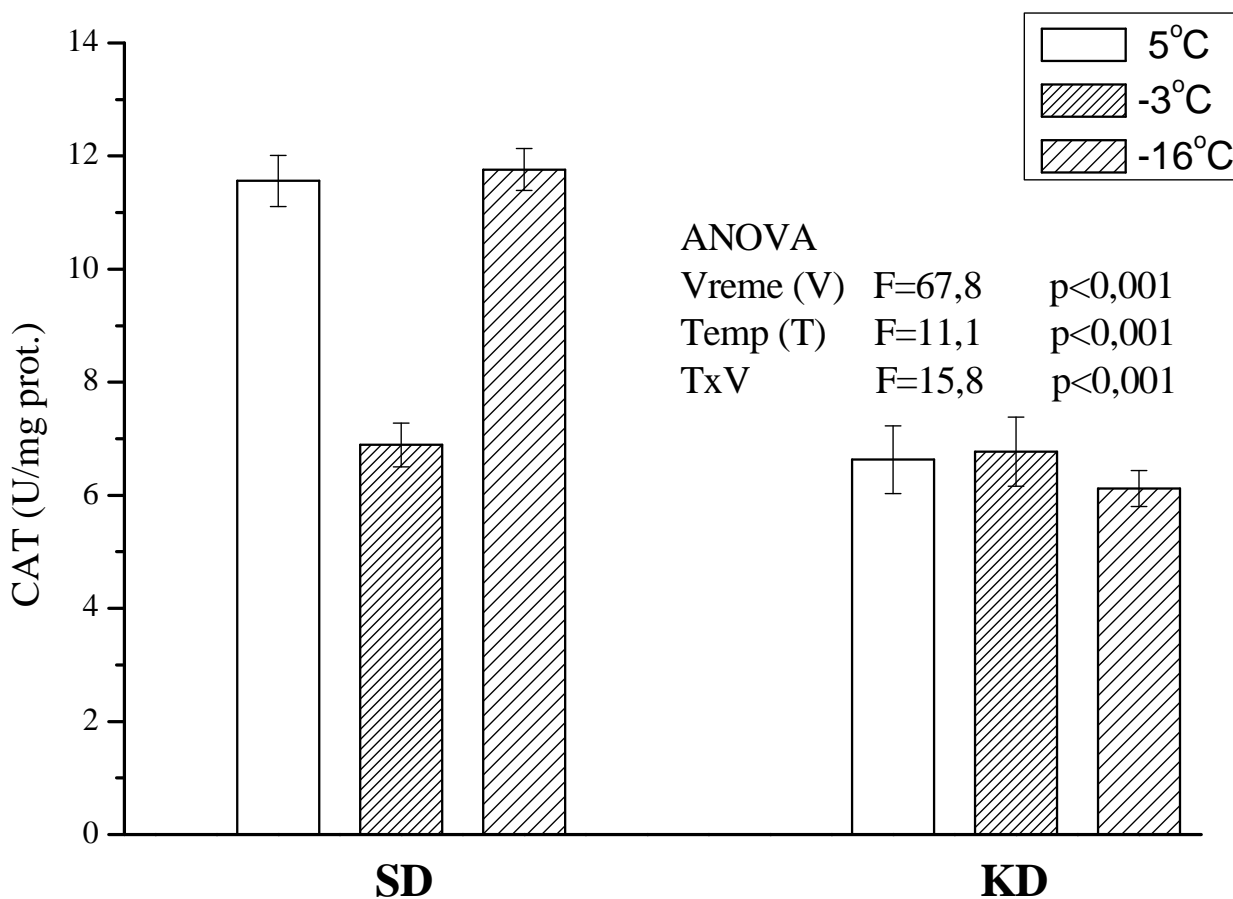
d) Sadržaj vodonik peroksid (H_2O_2)

Grafik 22. Koncentracija H_2O_2 u homogenatu celih dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

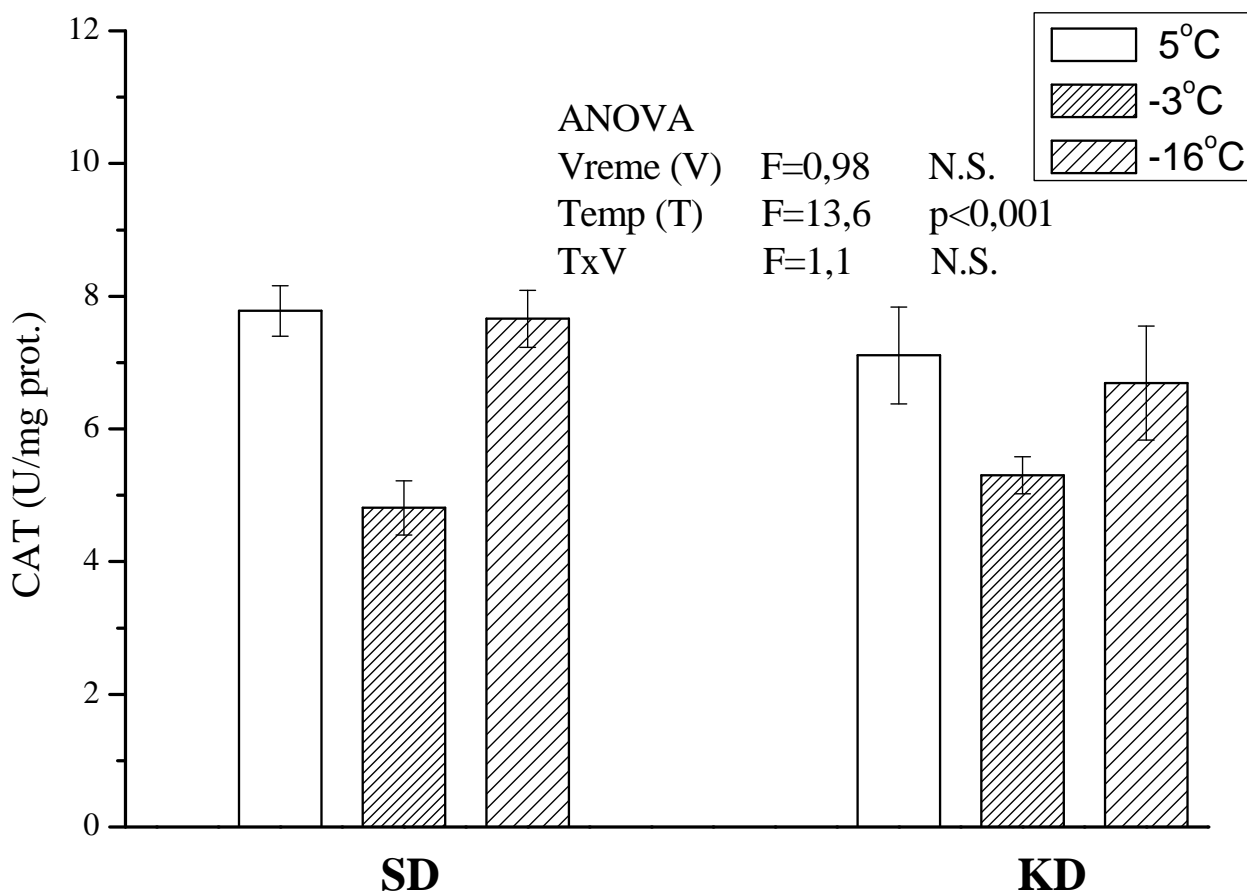


Grafik 23. Koncentracija H₂O₂ u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

e) Aktivnost katalaza (CAT)

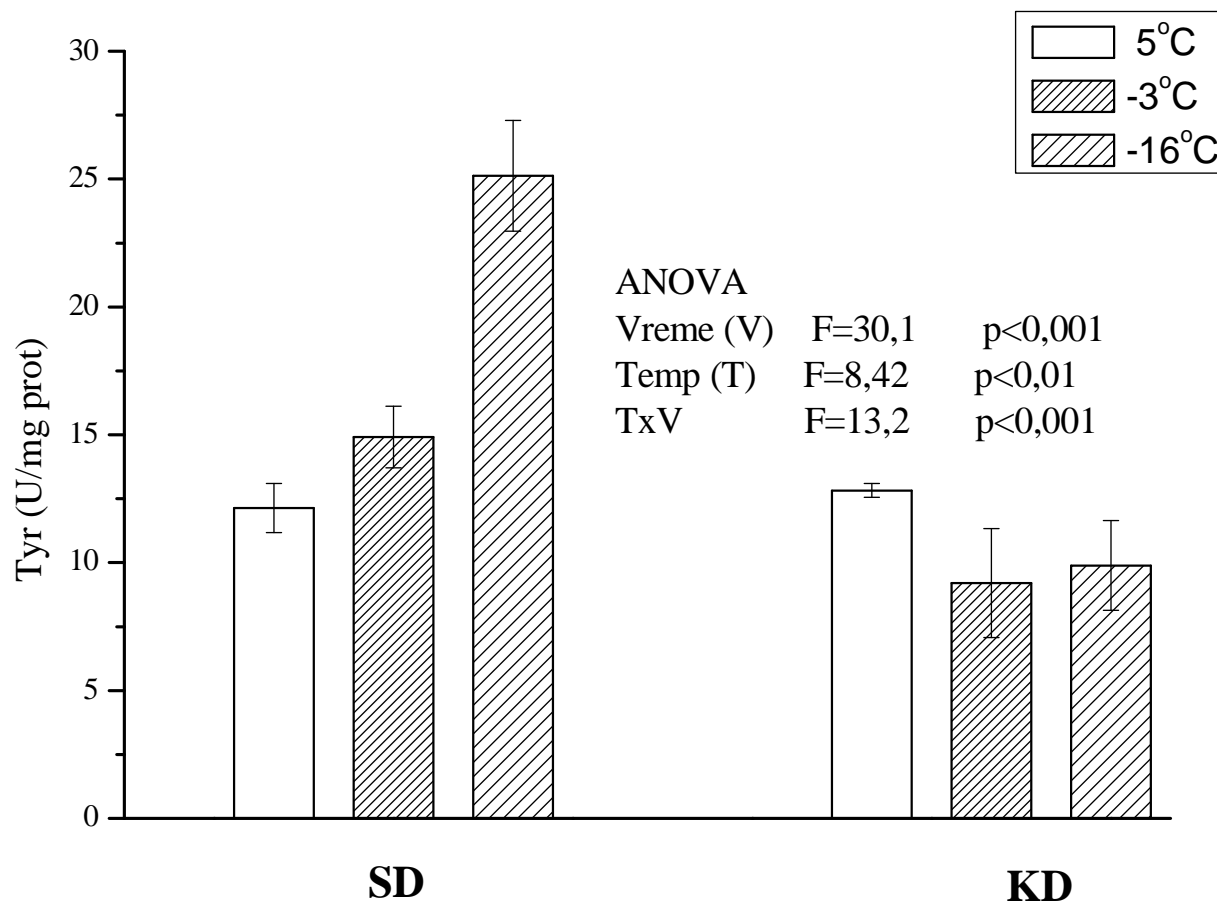


Grafik 24. Aktivnost katalaze u homogenatu celih dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor



Grafik 25. Aktivnost katalaze u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statisitčki značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

f) Aktivnost tirozinaze (Tyr)



Grafik 26. Aktivnost tirozinaze u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C tokom deset dana, sredinom (SD) i krajem (KD) dijapauze. Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (two-way ANOVA), efekat vremena dijapauze- V, efekat temperature- T, efekat interakcije- VxT, F-faktor

Tabela 9. Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatu gusenica *O.nubilalis* izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16 °C, sredinom (SD) i krajem dijavauze (KD)

		<i>Vreme (V)</i>	<i>Temp (T)</i>	<i>V x T</i>	Greška
<i>Ukupna SOD</i>	Df	1	2	2	14
	MS	1045	19.22	19.35	0.89
	F	1170***	21.5***	19.35***	
<i>CuZnSOD</i>	Df	1	2	2	15
	MS	416	3.36	7.04	1.24
	F	336***	2.71	5.68*	
<i>MnSOD</i>	Df	1	2	2	15
	MS	179	10.1	12.4	2.48
	F	72.3***	4.07*	5.01*	
<i>CAT</i>	Df	1	2	2	24
	MS	81.2	13.3	18.9	1.2
	F	67.8***	11.1***	15.8***	
<i>H₂O₂</i>	Df	1	2	2	12
	MS	623	20.19	89.4	4.74
	F	131***	4.26*	18.86***	
<i>Tyr</i>	Df	1	2	2	14
	MS	234	65.3	102	7.76
	F	30.1***	8.42**	13.2***	

MS – srednja vrednost kvadrata (mean square, eng.), df – stepeni slobode (degree of freedom, eng.)
 F – faktor. *** - p<0.001; ** - p<0.01; * - p<0.05.

Tabela 10. Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) aktivnosti antioksidativnih enzima u masnom telu gusenica *O.nubilalis* izloženih izloženih temperaturama od 5°C, -3 °C i -16°C, sredinom (SD) i krajem dijapauze (KD).

		<i>Vreme (V)</i>	<i>Temp (T)</i>	<i>V x T</i>	Greška
<i>Ukupna SOD</i>	Df	1	2	2	13
	MS	4244	2.77	20	3.9
	F	1087***	0.71	5.11*	
<i>CuZnSOD</i>	Df	1	2	2	14
	MS	2270	39.9	42.6	2.57
	F	884***	15.56***	16.59***	
<i>MnSOD</i>	Df	1	2	2	13
	MS	178	11.5	18.8	2.56
	F	69.5***	4.51*	7.36**	
<i>CAT</i>	Df	1	2	2	22
	MS	0.98	13.6	1.1	1.0
	F	0.98	13.6***	1.1	
<i>H₂O₂</i>	Df	1	2	2	11
	MS	16.18	41	92	13.1
	F	1.23	3.13	7.02*	

MS – srednja vrednost kvadrata (mean square, eng.), df – stepeni slobode (degree of freedom, eng.)
F – faktor. *** - p<0.001; ** - p<0.01; * - p<0.05

I dvofaktorskom analizom varijanse je pokazano da je nivo antioksidativnih enzima kod gusenica u sredini dijapauze statistički značajno veći nego kod gusenica na kraju dijapauze (dvofaktorska analiza varijanse ANOVA, efekat vremena dijapauze – V), kako u homogenatu celih jedinki, tako i u masnom telu (tabele 9 i 10). Izlaganje niskoj temperaturi dovodi do promena u nivou antioksidativnih enzima, ali je odgovor različit u homogenatu u odnosu na masno telo, ali i u odnosu na period dijapauze (ANOVA, efekti vremena dijapauze – V i vremena dijapauze i temperature – V x T, tabele 9 i 10).

Izlaganje niskoj temperaturi gusenica na kraju dijapauze ne dovodi do promena antioksidativnih enzima, izuzev smanjenja aktivnosti katalaze u masnom telu na temperaturi -16°C.

Za razliku od njih, izlaganje niskoj temperaturi gusenica na sredini dijapauze dovodi do promena i to:

smanjenja ukupne SOD i CAT i povećanja H₂O₂ u homogenatu na -3°C;

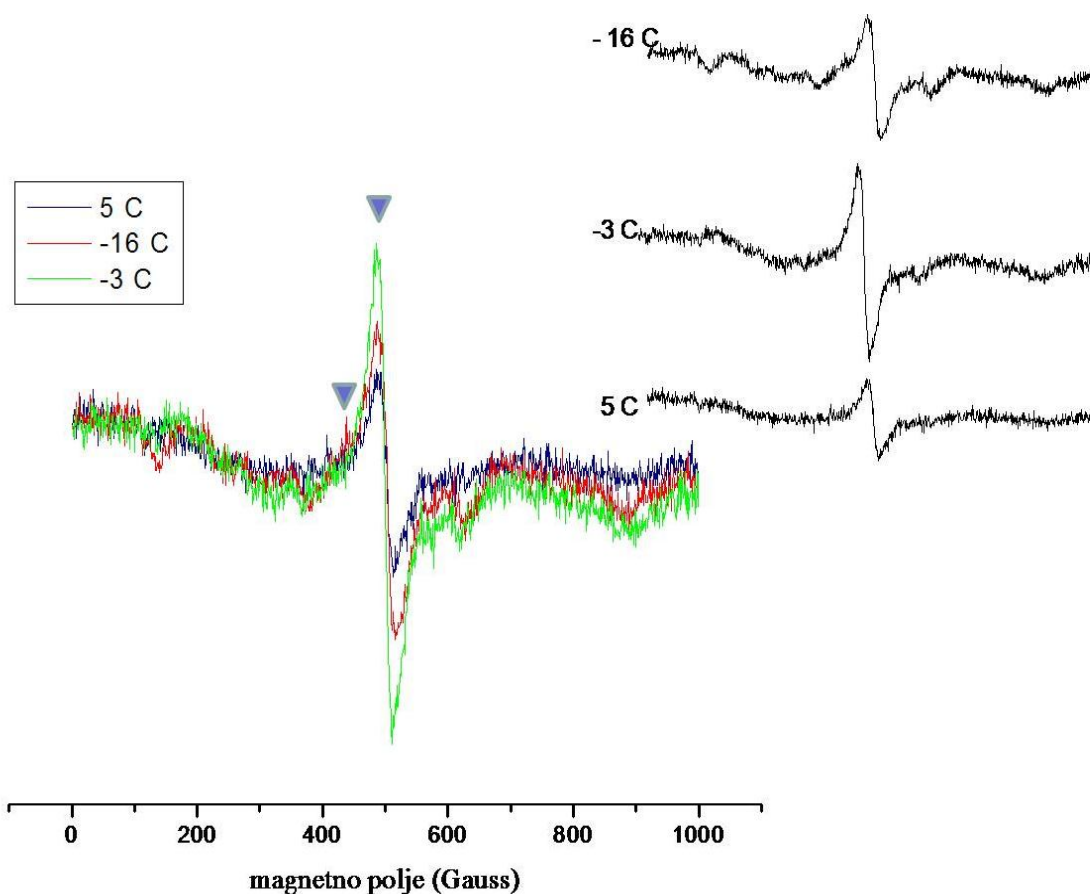
povećanja MnSOD i Tyr u homogenatu na -16°C;

smanjenja CAT i povećanja H₂O₂ u masnom telu na -3°C;

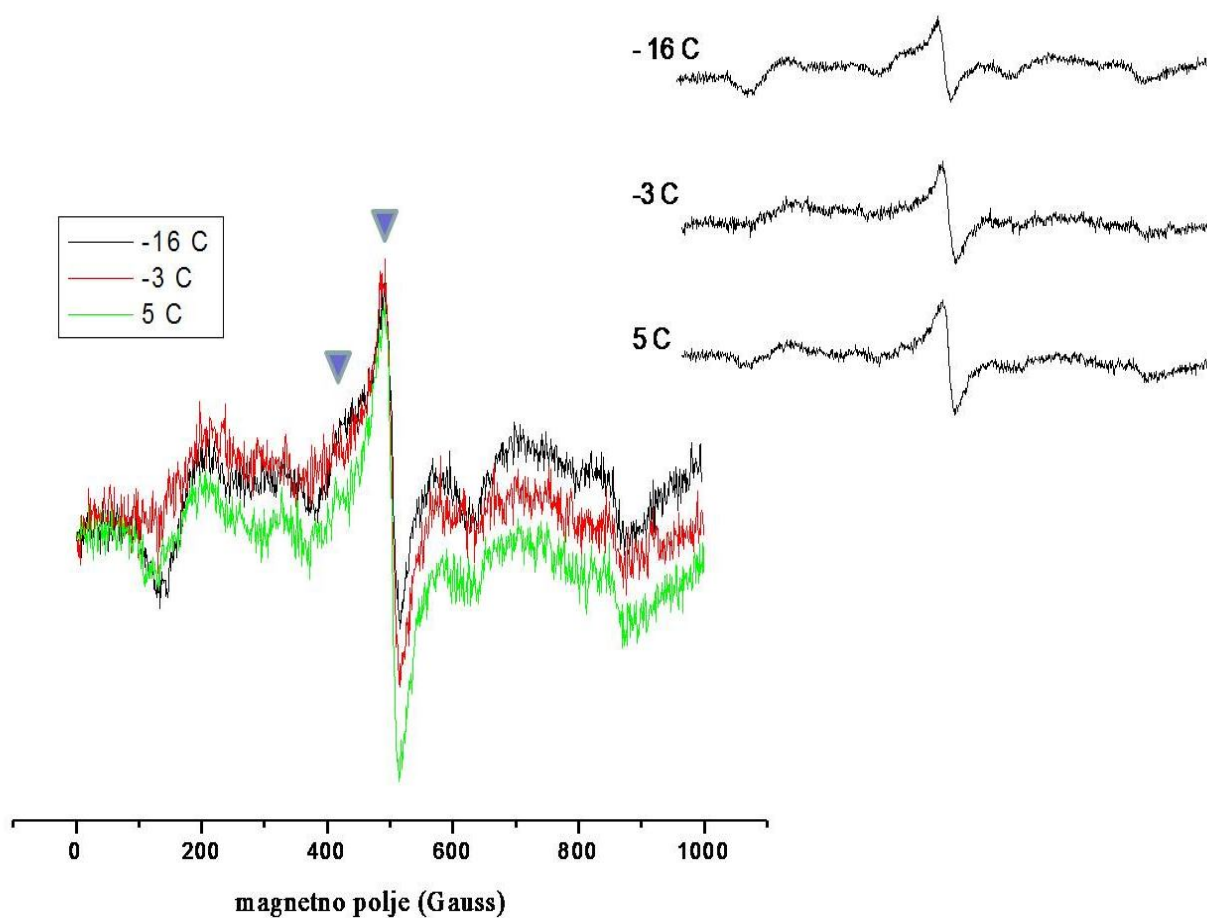
povećanja CuZnSOD i smanjenja MnSOD u masnom telu na -16°C.

C. EPR spektroskopija dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* tokom dijapauze i izlaganja niskim temperaturama

EPR spektar celih gusenica *O.nubilalis* pri različitim temperaturnim tretmanima sredinom i krajem dijapauze prikazani su na graficima 27 i 28, kao i tabeli 6.



Grafik 27. EPR spektar dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* u periodu sredine dijapauze pri različitim temperaturnim tretmanima (5°C-plava linija, -3°C-zelena linija i -16°C-crvena linija). Trouglići označavaju EPR signale karakteristične za melanin. Merenja su rađena na -150°C. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti signala iz 8 uzoraka normalizovanih na mase i sabiranih.



Grafik 28. EPR spektar dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* u periodu krajem dijapauze pri različitim temperaturnim tretmanima (5°C-zelena linija, -3°C-crvena linija i -16°C-crna linija). Troughi označavaju EPR signale karakteristične za melanin. Merenja su rađena na -150°C. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti signala iz 8 uzoraka normalizovanih na mase i sabiranih.

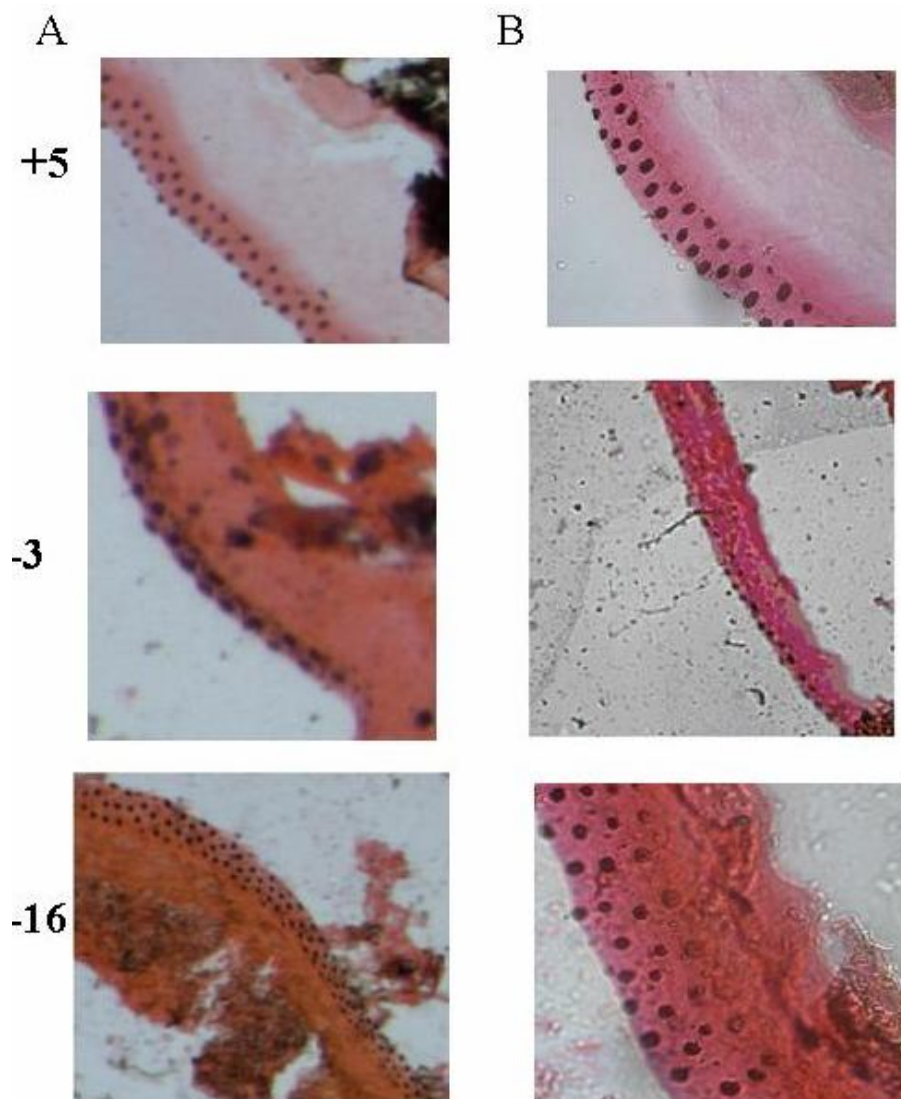
Karakterističan signal melanin radikala dobijen je u EPR spektrima gusenica i na sredini i na kraju dijapauze (grafici 27 i 28). Dva pika koja pripadaju melaninu odgovaraju stabilnom semikinonskom radikalu eumelanina (centralni pik) i feomelanina (mali pik sa leve strane centralnog pika). U grupi na sredini dijapauze signal je najjači u grupi gusenica na temperaturi od -3 °C, ali je i na -16°C je pojačan u odnosu na kontrolnu grupu gusenice na 5°C. Kod gusenica na kraju dijapauze nema razlike u intezitetu signala pri različitim temperaturnim tretmanima.

Tabela 11. Parametri antioksidativnog sistema zaštite dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* sredinom i krajem dijapauze, pri različitim temperaturnim tretmanima. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška

		Sredina dijapauze (SD) (n=4)			Kraj dijapauze (KD) (n=3)		
		<i>SD(5°C)</i>	<i>SD(-3°C)</i>	<i>SD(-16°C)</i>	<i>KD(5°C)</i>	<i>KD(-3°C)</i>	<i>KD(-16°C)</i>
ukupna SOD (U/mg prot)	<i>homogenat</i>	20.43 \pm 1.02	15.30 \pm 0.25	21.74 \pm 0.71	4.90 \pm 0.46	4.00 \pm 0.69	4.66 \pm 0.24
	<i>masno telo</i>	33.47 \pm 1.19	37.96 \pm 1.89	34.49 \pm 0.82	5.68 \pm 0.32	3.76 \pm 0.46	5.49 \pm 0.92
CuZnSOD (U/mg prot)	<i>homogenat</i>	11.67 \pm 0.86	9.15 \pm 0.58	12.42 \pm 0.78	2.04 \pm 0.26	2.45 \pm 0.24	1.89 \pm 0.10
	<i>masno telo</i>	21.41 \pm 1.09	22.34 \pm 0.7	30.10 \pm 2.75	3.29 \pm 0.43	3.25 \pm 0.71	3.15 \pm 0.47
MnSOD (U/mg prot)	<i>homogenat</i>	7.13 \pm 0.67	6.57 \pm 0.79	11.21 \pm 1.29	2.86 \pm 0.30	2.16 \pm 0.57	2.21 \pm 0.48
	<i>masno telo</i>	10.33 \pm 0.94	10.13 \pm 1.38	5.47 \pm 0.74	2.51 \pm 0.19	1.70 \pm 0.95	2.74 \pm 1.39
H₂O₂ (U/mg prot)	<i>homogenat</i>	24.4 \pm 2.9	35.5 \pm 1.0	24.7 \pm 4.0	17.3 \pm 0.2	15.7 \pm 1.0	19.6 \pm 1.0
	<i>masno telo</i>	14.4 \pm 3.1	25.1 \pm 2.1	14.8 \pm 0.5	15.3 \pm 2.7	14.6 \pm 2.0	19.3 \pm 1.7
CAT (U/mg prot)	<i>homogenat</i>	11.56 \pm 0.45	6.86 \pm 0.39	11.76 \pm 0.37	6.63 \pm 0.60	6.77 \pm 0.61	6.12 \pm 0.32
	<i>masno telo</i>	7.78 \pm 0.38	4.81 \pm 0.41	7.66 \pm 0.43	7.11 \pm 0.73	5.30 \pm 0.28	6.69 \pm 0.86
TYR (U/mg prot)	<i>hemolimfa</i>	12.14 \pm 0.96	14.91 \pm 1.21	25.13 \pm 2.17	12.82 \pm 0.27	9.20 \pm 2.13	9.98 \pm 1.76
EPR-melanin radikal signal (g ⁻¹)(n=8)	<i>cele gusenice</i>	82.0 \pm 33.2	198.1 \pm 25.9	125.1 \pm 19.9	3.52 \pm 0.55	3.45 \pm 0.33	3.01 \pm 0.47

D. Citohemijsko bojenje melanina dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* izloženih niskim temperaturama

Kriostatski presecci celih gusenica sa sredine dijapuze pri različitim temperaturnim tretmanima su citohemijski bojeni na melanin Lili metodom. Na slici 2. su date mikrografije obojenih preseka.



Slika 2. Preparati dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* pri temperaturnim tretmanima 5°C, -3°C i -16°C bojeni na melanin. Mikrografije pod A. snimane pod lupom Lieca MZ 16 sa uvećanjem x115, pod B. na sistemskom mikroskopu Olympus BX51, sa uvećanjem x400, odnosno mikrografija -3 B sa uvećanjem x200.

Crne tačke na roze pozadini predstavljaju melanin. Kao što se može videti melanin se nalazi na spoljnoj strani kutikule gusenica. Značajne razlike na preparatima nisu uočljive.

VI Diskusija

Veliki je broj studija o adaptaciji insekata na niske temperature ali još uvek je otvoreno i diskutabilno pitanje primarnog stresa pri izloženosti organizama niskim temperaturama. Pored fundamentalnog značaja razumevanja principa adaptacija, ovo polje je mnogo šire, i zalazi i u oblast krioprezervacije tkiva i organa. Insekti kao evolutivno stara grupa organizama, široko rasprostranjena, važe kao dobar model za različite tipove istraživanja i svakako su nezaobilazni u ovoj oblasti.

Istraživanja u ovoj tezi su bila fokusirana na molekularne mehanizme adaptacije na hladnoću i sa njom povezanu dehidraciju dijapauzirajućih gusenica kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis*. Dijapauza, kao stanje hipometabolizma, je u funkciji preživljavanja nepovoljnih uslova sredine. Konkretno za *O.nubilalis* to je dijapauzirajući stadijum gusenice u kome prezimljavaju i kada postaju otporne na niske temperature, a pripadaju grupi insekata otpornih na zamrzavanje telesnih tečnosti, za razliku od letnjih, nedijapauzirajućih gusenica. U sklopu odgovora na niske temperature ove vrste je sinteza velike količine glicerola i trehaloze, kao glavnih krioprotektora (Gubor-Lajšić i sar., 1991). Deo istraživanja u ovom radu je usmeren na detekciju i drugih potencijalnih krioprotektora, kao i sagledavanje celokupne usmerenosti metabolizma i njegove regulacije. U tom smislu, značajan deo rezultata se odnosi na moguću ulogu antioksidativnog sistema zaštite. Rezultati distribucije vode između tkiva i njen odnos sa biomolekulima, pružaju značajan doprinos razumevanju očuvanja ćelijskih struktura i preživljavanja.

1. Režim telesne vode, koncentracija glicerola i trehaloze

Fiziološki efekti zamrzavanja i dehidracije su međusobno povezani procesi. Niske temperature dovode do dehidracije ne samo formiranjem, za mnoge organizme, letalnih kristala leda, već i gubitka vode zbog smanjenog pritiska vodene pare u prisustvu leda. Veliki broj istraživača smatra da je primarni stres pri niskim temperaturama ustvari dehidracija (Mazur 1984, Karow 1991). Sasvim je sigurno da je ključno za opstanak pri niskim temperaturama kontrola raspodele telesne vode. Održanje bazalnog nivoa telesne vode neophodno je za očuvanje integriteta ćelijske membrane, strukture i funkcije biomolekula.

Brojna istraživanja odnosa osmotski aktivne vode (OA) i osmotski neaktivne (OI) vode kod insekata izloženih niskim temperaturama, ukazuje da ova raspodela telesne vode predstavlja ključni mehanizam adaptacija na niske temperature (Warton i Block, 1997; Worland, 1996). Osmotski aktivna voda, ili kako se još naziva slobodna voda se odnosi na deo vode koji se može zamrznuti. Njena količina je kritična pri temperaturama nižim od nule. Kako veći deo organizma čini voda, kod invetrebata i do 70%, struktura i funkcija biomolekula je određena njihovom interakcijom sa molekulima vode. Sinteza osmotski aktivnih jedinjenja (polioli i šećeri), kao odgovor insekata na niske temperature, je pre svega u funkciji očuvanja telesne vode. Akumulacijom ovih krioprotektora na koligativan način se snižava tačka mržnjenja (SCP) telesnih tečnosti, ali i mnogo značajnije, povećava se ili održava sadržaj vezane vode, odnosno menja odnos OI:OA, na račun OI, te su oni i anhidroprotektori.

U cilju proučavanja otpornosti na niske temperature *O.nubilalis*, diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) određeni su neki kriobiološki parametri hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajući gusenica izloženih spoljašnjim temperaturama iznad 0°C (DS) i temperaturi ispod nule, -8°C (DE) (tabela 3, grafici 1-5). Tačke mržnjenja, SCP, kao deo osnovnih kriobioloških parametara, se razlikuju između ova dva tkiva kod svih grupa: SCP za hemolimfu su generalno za 10°C niža u odnosu na masno telo (tabela 3, grafik 4). Vrednosti SCP za masno telo su od -6.62°C za ND gusenice, do -11.58°C za DE grupu, dok za hemolimfu od -17.79°C za ND do -20.90°C za DE grupu gusenica. Akumulacija glicerola i trehaloze pre svega u hemolimfi (tabela 3, grafici 6 i 7), verovatno doprinosi ovoj razlici. Niska SCP i u ND grupi, mada statistički značajno viša od DS i DE grupe, ukazuje da sniženje SCP nije jedini mehanizam otpornosti ovih organizama na niske temperature. To ukazuje da akumulacija krioprotektora sa dijapauzom i niskim

temperaturama pored sniženja SCP kao jedan od mehanizama otpornosti, verovatno ima i drugih funkcija.

Promena u preraspodeli osmotski aktivne i osmotski neaktivne vode u masnom telu i hemolimfi sa hlađenjem je drastična. U masnom telu ukupan sadržaj vode i sadržaj osmotski aktivne vode se duplo povećava sa hlađenjem (tabela 3, grafici 1 i 2). Praktično sav doprinos povećanju ukupne vode u masnom telu je na račun osmotski aktivne vode (grafik 2), pošto se sadržaj osmotski neaktivne vode ne menja tokom hlađenja (grafik 3). Ukupan efekat hlađenja je prema tome promena odnosa OI:OA u masnom telu pri izlaganju gusenica niskim temperaturama sa 1:2.2, na temperaturama iznad nule (grupa DS), na 1:5.2 za DE grupu gusenica (tabela 3). Režim vode u hemolimfi je potpuno drugačiji pri izlaganjima niskim temperaturama i ukupan sadržaj vode opada (grafik 1). Variranja su i ovde na nivou osmotski aktivne vode, dok OI ostaje nepromenjena (grafik 3), pa se odnos OI:OA menja sa 1:13, za temperature iznad nule, na 1:3, u uslovima izloženosti gusenica niskim temperaturama. Ova činjenica ukazuje na značaj osmotski neaktivne vode u održanju bazalnog nivoa telesne vode, s obzirom da se ona izgubi isparavanjem. Smanjenje osmotski aktivne vode, koja može da se zaledi, tokom izlaganja niskim temperaturama štiti organizam od letalne dehidracije. Gubitak ukupnog sadržaja osmotski aktivne vode kao mehanizam preživljavanja niskih temperatura opisan je kod jedne vrste arktičke kolebole, *Onychiurus arcticus*. Mehanizam je nazvan krioprotektivna dehidracija, a posebno treba istaći da i ovde nisu zapažena variranja u sadržaju osmotski neaktivne vode (Worland i sar., 1998.).

Tačka topljenja, MP, je niža od SPC, u svim grupama. Razlika između MP i SCP se kreće od oko 4-7°C za masno telo i 16-19°C za hemolimfu (tabela 3, grafik 5). Teoretski ona bi morala da bude ista, ali specifičnim sastavom tečnosti može se postići ova razlika. Pojava se naziva termalni histerezis i nastaje zbog prisustva specifičnih antifriz proteina. Naša istraživanja nisu išla u pravcu dokazivanja njihovog prisustva, pa se njihovo prisustvo samo pretpostavlja. Međutim, razlika u SCP i MP je fiziološki veoma značajna za insekte otporne na zamrzavanje telesnih tečnosti. Postojanjem ove razlike izbegava se moguća rekristalizacija telesnih tečnosti pri malim temperaturnim variranjima, koje su najčešće praćene formiranjem oštrih ivica leda (Delinger i Lee, 1998).

Rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju da je glicerol glavni krioprotektor ovih organizama, s obzirom na veliku razliku u sadržaju glicerola u hemolimfi između dijapauzirajućih i nedijapauzirajućih gusenica (tabela 3, grafik 6; dvofaktorska analiza varijanse, efekat stadijuma-S,

tabela 4). To je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u radu Grubor-Lajšić (1983), gde je praćena sezonska promena sadržaja glicerola u hemolimfi dijavauzirajućih gusenica *O.nubilalis* iz prirode. Rezultati pomenutih istraživanja jasno ukazuju na korelaciju povećanja sadržaja glicerola u hemolimfi i niskih temperatura, tokom zimskih meseci. Koncentracija glicerola raste od septembra dostiže maksimum u januaru, da bi u aprilu, sa krajem dijavauze glicerol potpuno iščezao. U istom radu je zabeleženo povećanje glicerola u hemolimfi i pri izlaganju gusenica konstantno niskim temperaturama u eksperimentalnim uslovima, što je kasnije potvrđeno i u radu Stanić (2003), ali na homogenatu celih gusenica. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima predhodnih autora, a značaj je u utvrđenoj različitoj distribuciji glicerola u hemolimfi i masnom telu (grafik 6), dvofaktorska analiza varijance, efekat tkiva- T, tabela 4). Sadržaj glicerola u hemolimfi je i do nekoliko desetina puta veći u odnosu na masno telo. To je u skladu sa činjenicom da je kod insekata mesto sinteze glicerola masno telo, a mesto akumulacije hemolimfa (Storey i Storey, 1986). U prilog ovome idu i naši rezultati da je nivo glicerola u masnom telu dijavauzirajućih oktobarskih gusenica izloženih spoljašnjim temperaturama, DS, tek neznatno veći u odnosu na nedijavauzirajuće gusenice, i drastično opada pri izlaganju dijavauzirajućih gusenica niskim temperaturama (grafik 6). U hemolimfi sadržaj glicerola kod DS, u odnosu na ND grupu, je 7 puta veći što ukazuje da je akumulacija glicerola u hemolimfi u sklopu programa dijavauze, i bez predhodnog izlaganja gusenica niskim temperaturama. Dodatno povećanje sadržaja od 3.8 puta pri izlaganju dijavauzirajućih gusenica niskim temperaturama, DE grupa, nedvosmisleno potvrđuje njegovu ulogu glavnog krioprotektora.

Trehaloza je osnovni šećer u hemolimfi insekata, a pri uslovima dehidratacije i niskih temperatura igra ulogu glavnog stabilizatora membranskog dvosloja (Crowe i sar, 1987; Delinger i Lee, 1998). Sezonsko variranje sadržaja trehaloze u hemolimfi dijavauzirajućih gusenica i signifikantno povećanje pri izlaganju gusenica niskim temperaturama, je opisano u radu Grubor-Lajšić (1983). Autor smatra da je pored krioprotektorne uloge trehaloza značajna u prenosu glukoznih jedinica glikogena masnog tela do ostalih delova organizma. Kako glicerol uglavnom vodi poreklo od glukoze glikogena, trehaloza bi predstavljala intermedijer u nastanku glicerola. U radu Stanić (2003) je opisano sezonsko variranje ukupnog sadržaja trehaloze kod *O.nubilalis*, ali nije uočeno povećanje pri izlaganju niskim temperaturama. Naši rezultati analize masnog tela i hemolimfe ukazuju na različitu distribuciju trehaloze između ova dva tkiva, pri čemu je sadržaj u hemolimfi u odnosu na masno telo 20 puta veći kod ND grupe, odnosno 30 puta veći kod DS grupe. Sa izlaganjem niskim

temperaturama (-8°C) ovaj odnos raste do 103. Visoka koncentracija trehaloze ukazuju na značaj trehaloze kao osnovnog šećera u hemolimfi, a višestruko povećanje sa ulaskom u dijapauzu, posebno sa hlađenjem i na ulogu u adaptaciji na niske temperature (tabela 3, grafik 7).

Kako se naši rezultati (tabela 3, grafici 6 i 7) odnose na gusenice početkom dijapauze- oktobar, kada spoljašnje temperature nisu bile ispod nule, bilo je interesantno odrediti sadržaj ovih krioprotektora, ali i drugih poliola i šećera, tokom dijapauze i u uslovima niskih temperatura.

2. Sadržaj poliola i šećera

Akumulacija niskomolekulskih jedinjenja, poliola i šećera, je karakteristika insekata umerenog klimatskog područja tokom zimske dijapauze. Uloga ovih molekula obuhvata koligativnu depresiju SCP, stabilizaciju ćelijske mebrane i biomolekula pri niskim temperaturama, kao i regulaciju zapremine ćelije tokom formiranja ekstracelularnih kristala leda.

Iako je glicerol univerzalni krioprotektor, neke vrste akumuliraju i druge polirole. Tako dijapauzirajući adulti *Pyrrhocoris apterus*, tokom prilagođavanja na niske temperature akumuliraju velike količine ribitola i sorbitola (Košťál i sar. 2004), dok je kod *Aulacophora nigripennis* mio-inozitol glavni krioprotektor (Watanabe i Tanaka, 1997). Druge vrste u okviru prilagođavanja na niske temperature akumuliraju velike količine trehaloze (Worland i sar., 1998). Takođe, neke vrste su razvile multikomponentni sistem krioprotektora koji združenim koligativnim efektom doprinose snižavanju tačke mržnjenja telesnih tečnosti. Tako na primer kod *Cryptopygus antarticus* su prisutni glicerol, manitol i trehaloza (Sømme i Block, 1982).

Za praćenje efekta niskih temperatura na *O.nubilalis* odabrali smo decembarske (sredina dijapauze) i aprilske (kraj dijapauze) gusenice izložene temperaturi od -3°C i -16°C , dok je odgovarajuća grupa na 5°C bila kontrolna grupa. Temperatura od -3°C je odabrana kao potencijalno granična temperatura u procesu prilagođavanja organizma na niske temperature. Temperatura od -16°C je odabrana kao niska temperatura, tipična za duboku zimu. Radi utvrđivanja specifičnosti metabolizma u dijapauzi određen je sadržaj poliola i kod nedijapauzirajućih gusenica.

Na osnovu rezultata (tabela 5.) možemo zaključiti da je nivo glicerola veći sredinom dijapauze u odnosu na kraj dijapauze (grafik 8). Trehaloza neznatno, mada statistički značajno, raste sa tokom dijapauze (tabela 5, grafik 13; dvofaktorska analiza varijanse, vremenski faktor dijapauze-V, tabela 7). Kako su u odnosu na ostale ispitivane polirole i šećere, glicerol (sa 2-3% ukupne telesne mase) i trehaloza (do 0.5%) najviše zastupljeni, možemo zaključiti da su oni i najznačajniji krioprotektori *O.nubilalis*. Međutim, zanimljiva su njihova variranja sa izlaganjem gusenica niskim temperaturama u raznom periodu dijapauze (tabela 6). Nivo glicerola u homogenatu dijapauzirajućih gusenica (sredina dijapauze) signifikantno raste sa hlađenjem (-3°C i -16°C u odnosu na 5°C), dok njegova količina krajem dijapauze raste tek neznatno, mada statistički značajno (grafik 8). Sa druge strane,

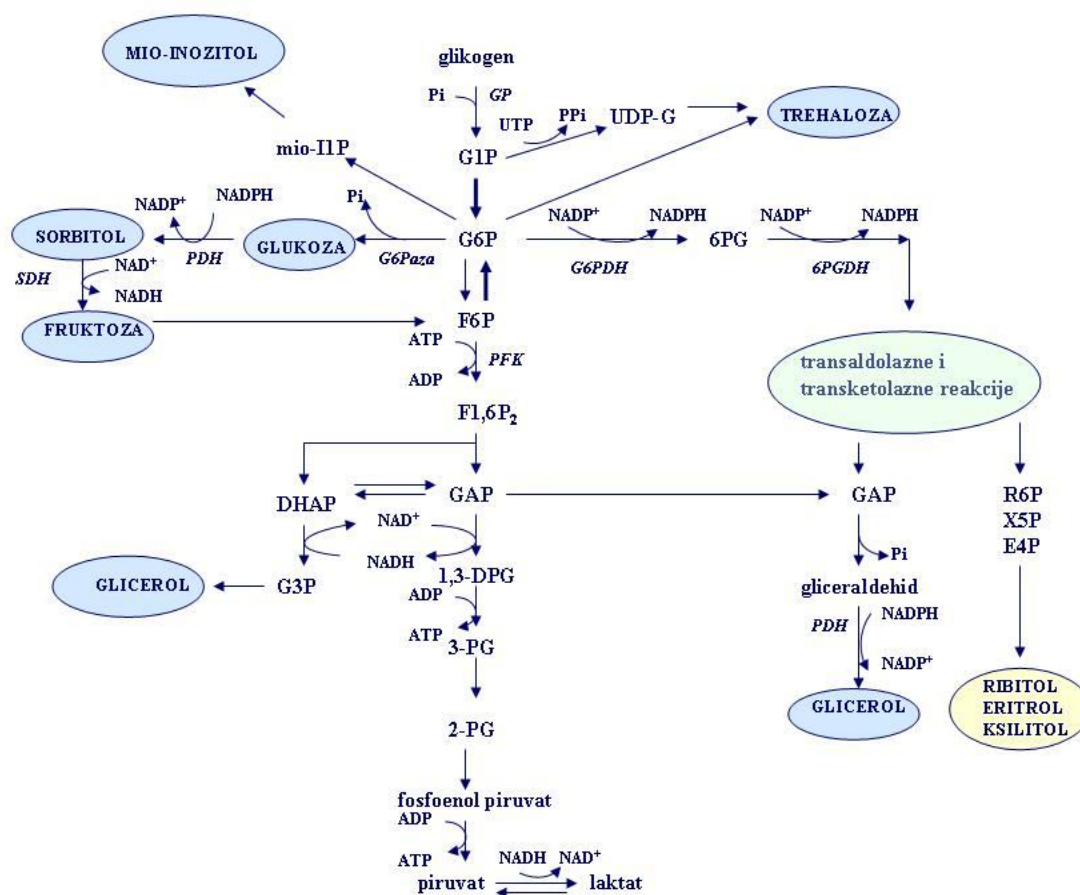
kod gusenica na kraju dijapauze sa hlađenjem raste nivo trehaloze, što nije slučaj sredinom dijapauze (grafik 13). Na osnovu ovoga može se zaključiti da je mehanizam otpornosti na hladnoću dijapauzirajućih gusenica složen i da se menja tokom dijapauze. Može se reći da je to dinamičan proces, koji mora da se prilagodi i uslovima okruženja (učestalost i verovatnoća niskih temperatura) i stadijumu razvića, odnosno raspoloživim energetske rezervama i potrebama. Kraj dijapauze pored pripreme za ulazak u novu fazu razvića, ulutkavanje, karakteriše i pad energetske rezervi organizma. Može se pretpostaviti da ovu fazu životnog razvoja karakteriše promena aktivnosti enzimske garniture, kada se smanjuje nivo aktivnosti enzima uključenih u sintezu glicerola, dok enzimi uključeni u sintezu trehaloze ostaju aktivni. Mada su mehanizmi regulacije aktivnosti ovih enzima kod insekata malo proučeni, postojeći rezultati ukazuju na promenu redoks statusa ćelije tokom dijapauze kao mogućeg regulatornog faktora. Poznato je da kraj dijapauze karakteriše povećan nivo respiracije koju prati i povećana produkcija ROS/RNS što je praćeno potrošnjom redukujućih koenzima (pre svega NADPH). Ovaj pad u potencijalu faktora redukujuće sredine, u cilju održanja redoks homeostaze, ne pogoduje sintezi glicerola za čiju sintezu su ovi koenzimi neophodni. Sintaza trehaloze, sa druge strane, ne zahteva redukovane koenzime NADPH, ali troši glukozo-6-fosfat koji bi mogao potencijalno da se uključi u pentozo fosfatni put (PPP) i doprinese sintezi NADPH, te i na taj način povećanje trehaloze utiče na smanjenje sinteze glicerola. Imajući u vidu da je trehaloza osnovni šećer hemolimfe insekata uopšte, njen značaj je mnogo širi od uloge krio/anhidro protektora. Mogući preokret može biti i sa stanovišta energetske potreba u ovoj fazi razvića, kraj dijapauze, kada je opravdanija i racionalnija sinteza trehaloze, a ne glicerola, jer je verovatnoća za pojavu niskih temperatura u ovom periodu godine veoma mala. (Šema 8.).

Sadržaj ostalih ispitivanih poliola (sorbitol i mio-inozitol) i šećera (glukoza i fruktoza) je daleko manji i reda je $\mu\text{g/g}$ telesne mase (tabele 5 i 6). Sintaza poliola podrazumeva regulaciju aktivnosti serije enzima uključenih u njihovu sintezu, kako na nivou samih enzima, tako i na nivou transdukcije signala i genske ekspresije (Košťál i sar., 2004). Kontrola uključuje specifične signale, od niske temperature, reaktivnih čestica kiseonika, do efekata samih poliola na enzimsku aktivnost. Tako određeni polioli indukuju glikogenolitičke procese koji vode u sintezu poliola. Kod vrsta *Epiblema scudderiana* i *Eurosta solidaginis* aktivnost protein kinaze A, koja reguliše aktivnost enzima uključenih u sintezu njihovih krioprotektora, je regulisana pored temperature i koncentracijom glicerola, odnosno sorbitola (Pfister i Storey, 2002).

Sinteza poliola se odvija u masnom telu, dok se akumuliraju u hemolimfi. Poreklo poliola je iz glikogena (Šema 8.). Kod insekata gotovo sav glicerol se sintetiše iz glukoze kroz pentozofosfatni put. Značaj ovakve sinteze je u produkciji redukovano koenzima NADPH, neophodan u sintezi poliola, odnosno za aktivnost poliol dehidrogenaza (PDH), kao i održanju redoks statusa ćelije u uslovima pojačanog oksidacionog stresa tokom izloženosti niskim temperaturama, koji nastaje zbog pada nivoa respiracije usled čega dolazi do akumulacije elektrona duž respiratornog laca. Zbog gubitka jednog ugljenikovog atoma kroz PPP kao CO₂, neto reakcija za 6 glukoze-6-fosfata je 10 gliceraldehid fosfata (GAP) i 12 NADPH. Nastao GAP može da vodi do sinteze glicerola, ali zavisno od potreba za ATP i do piruvata, odnosno laktata. Sinteza sorbitola iz glukoze, kao krioprotektora, zaobilazi pentozofosfatni put. U tom slučaju da bi se obezbedila dovoljna količina NADPH deo gliko-6-fosfata iz glikogena mora proći kroz PPP, a drugi deo ide u sintezu sorbitola.

Kod *O.nubilalis* nivo sorbitola opada pri izlaganju niskim temperaturama oko deset puta (grafik 9), dok nivo mio-inozitola oko 25% (grafik 10). Rezultat je neočekivan za gusenice na sredini dijapauze, ako se ima u vidu da su ovi polioli kod nekih drugih vrsta insekata dokazani krioprotektori. Kako u isto vreme raste nivo glicerola, može se pretpostaviti da dolazi do interkonverzije ovih poliola u glicerol. Na kraju dijapauze nivo sorbitola u kontrolnoj grupi opada na polovinu i ne menja se sa izlaganjem gusenica niskim temperaturama. Nivo sorbitola je statistički značajno niži od nivoa kod nedijapauzirajućih gusenica (tabela 5). Tako da možemo zaključiti da sorbitol nema ulogu krioprotektora kod ove vrste insekata. Međutim nivo mio-inozitola sa izlaganjem niskim temperaturama krajem dijapauze u manjem stepenu raste, ali kako se radi o malim količinama krioprotektora, reda 90 µg po g telesne mase, možemo zaključiti da ni on ne igra ulogu krioprotektora dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis*.

Od šećera značajna su variranja u nivou glukoze, čiji nivo na kraju dijapauze i dalje sa hlađenjem značajno raste (grafik 11). Nivo glukoze verovatno raste zbog aktivacije glikogen fosforilaze, ali nije jasna njena akumulacija. Kod nekih vrsta žaba glukoza ima ulogu krioprotektora (Storey, 2004). Dobar je stabilizator proteina, jednostavno se sintetiše iz glikogena, ali takođe, reaktivna je, pa se samim tim i povećava mogućnost sporednih, nepoželjnih reakcija glikozilacije kojoj su podložni proteini. Kao čest alosterni modulator može da utiče i na tok mnogih metaboličkih procesa. Moguće je da je pri niskim temperaturama na kraju dijapauze, kada je važno samo preživeti kratkotrajne i ne tako ekstremne padove temperature, glukoza najjeftiniji krioprotektor.



Šema 8. Glavni metabolički putevi sinteze poliola (Storey, 2004). Glikogen je osnovni izvor ugljenika za sintezu poliola i kod insekata najveća količina glicerola nastaje iz gliceraldehid fosfata (GAP) nastalog u fosfopentoznom putu (PPP). Polioli sa 4, 5 i 6 ugljenikovih atoma mogu da nastanu iz produkata PPP nakon uklanjanja fosfata i daljim prevođenjem šećera u polirole pod dejstvom polirol dehidrogenaze (PDH). Prikazani enzimi su: GP-glikogen fosforilaza; G6Paza-glukoza-6-fosfataza; G6PDH- glukoza-6-fosfat dehidrogenaza; 6PGDH- 6-fosofoglukonat dehidrogenaza; PFK- fosfofrukto kinaza; SDH- sorbitol dehidrogenaza

Fruktoza koja u kontrolnoj grupi na sredini dijapauze praktično nije registrovana, u grupi na kraju je prisutna u značajnom nivou (grafik 12). Sa hlađenjem se povećava i sredinom i krajem dijapauze, ali mnogo izrazitije krajem dijapauze, kada je njen nivo raste petanest puta (grafik 12). Korelacija u povećanju koncentracije fruktoze i glukoze sa izlaganjem gusenica niskim temperaturama možda leži u njihovoj metaboličkoj povezanosti, pošto fruktoza u dve sukcesivne reakcije nastaje iz glukoze

(šema 8). Ovakve promene u nivoima šećera sa tokom dijapauze ukazuju na opšte metaboličke promene organizma. Kako se smanjeni nivo glicerola i njegova akumulacija sa padom temperature krajem dijapauze, verovatno su pokrenuti putevi sinteze alternativnih krioprotektora. Organizam verovatno koristi funkcionalne i isplative metaboličke puteve, a združenim koligativnim i nekoligativnim efektima fruktoza, glukoza i trehaloza doprinose opstanku organizma na kraju dijapuze pri padu temperature daleko ispod nule (-16°C).

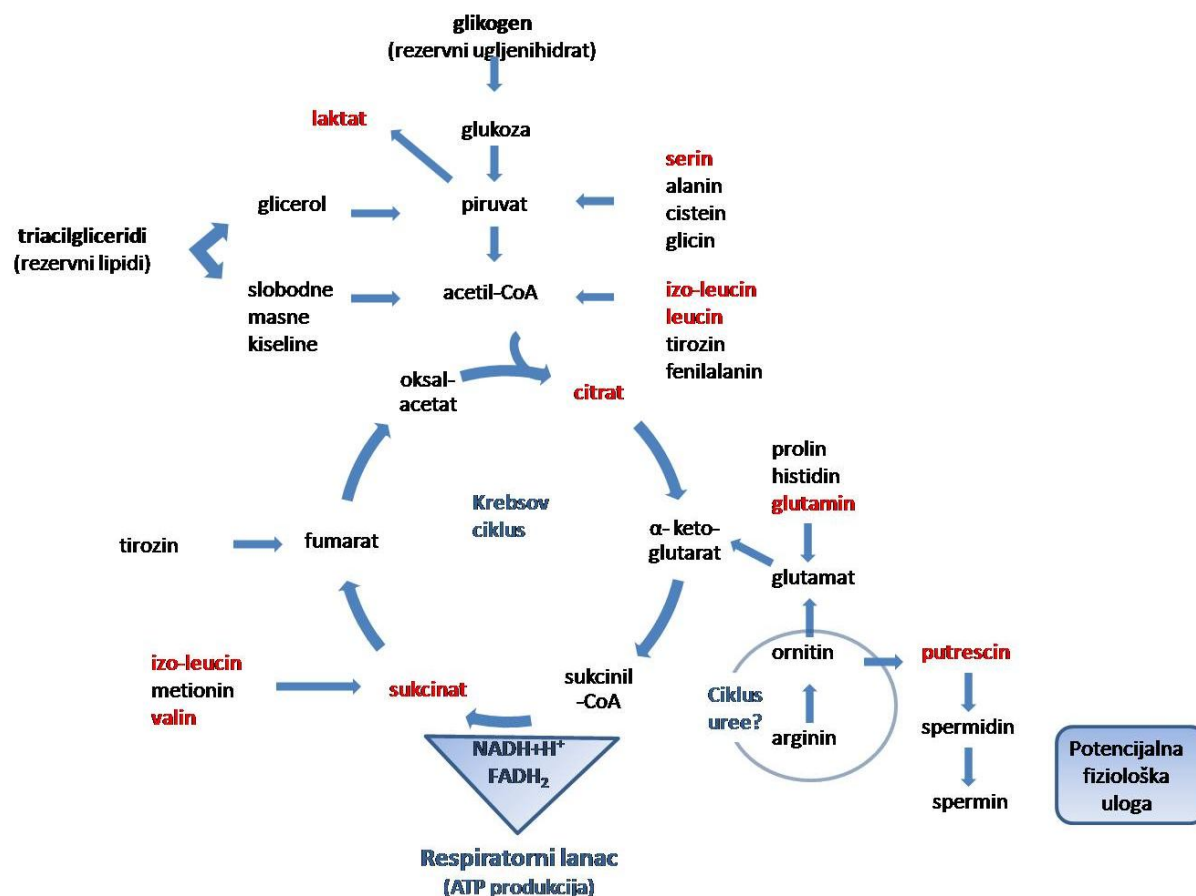
3. Metabolomički profil

Kako su predhodne analize sadržaja glicerola i trehaloze u hemolimfi i masnom telu pokazale da se akumulacija ovih krioprotektora tokom hlađenja odvija prevashodno u hemolimfi, tako smo kao uzorak za analizu metaboličkog profila NMR spektrometrijom odabrali hemolimfu gusenica *O.nubilalis*. Hemolimfa insekata je složena telesna tečnost, bogata jedinjenjima malih molekulskih masa, pre svega poliolima, kao što su glicerol i šećeri, ali i slobodnim aminokiselinama. Variranja u sastavu hemolimfe, kako sezonska, vezana za adaptaciju na spoljašnje uslove, tako i u pojedinim fazama razvića su već opisana kod mnogih vrsta insekata (Goto i sar., 2001, 1998; Storey i Storey, 1990).

Za praćenje efekta niskih temperatura odabrali smo analizu metaboličkog profila hemolimfe gusenica *O. nubilalis*, izlaganih temperaturama -3°C i -16°C , dok je grupa na temperaturi od 5°C bila kontrolna grupa. Radi utvrđivanja specifičnosti metabolizma u dijapauzi urađen je i NMR profil nedijapauzirajućih gusenica.

Rezultati NMR metaboličkih profila dijapauzirajućih i nedijapauzirajućih gusenica prikazani u PCA plotu su prostorno razdvojeni (*grafik 14A*). Jasno grupisanje spektara metabolita dijapauzirajućih gusenica, kako kontrolne tako i izlaganih temperaturama ispod nule, ukazuje na postojanje zajedničkog metaboličkog modela (paterna) karakterističnog za dijapauzu. U poređenju sa nedijapauzirajućim gusenicama varijacije duž prve komponente, PC1 (*grafik 14B*) po kojoj se ovi spektri razdvajaju ukazuju na značajan metabolizam aminokiselina kod nedijapauzirajućih gusenica u odnosu na dijapauzirajuće. Kada se razmatra metabolizam nedijapauzirajućih gusenica, treba imati u vidu da se radi o gusenicama V instara, neposredno pre ulutkavanja, što karakteriše prestanak uzimanja hrane, ali ne i pad metabolizma. Ovaj stadijum razvića praćen je gubitkom ćelija, kao deo procesa normalnog razvića-programirana smrt, ali istovremeno i selektivnom sintezom novih proteina. Izvor aminokiselinskih prekursora za nove proteine su uglavnom rezervni proteini koji se sintetišu u masnom telu, a skladište u hemolimfi. U toku metamorfoze ovi proteini se povlače u masno telo, gde se razgrađuju do aminokiselina koje se koriste za sintezu novih proteina. Tako da povećan sadržaj slobodnih aminokiselina, prekursora proteina, u hemolimfi u ovom stadijumu razvića može se povezati sa povećanom biosintezom novih proteina koji će imati ulogu u predstojećoj metamorfozi, pre nego sa pojačanim katabolizmom proteina. Veća količina laktata,

acetata, sukcinata kod nedijapauzirajućih gusenice ukazuje na pojačan katatabolizam rezervnih lipida i ugljenih hidrata, tj. na povećane energetske potrebe (šema 9.). Razlike u intermedijalnim metabolitima oksidativnog metabolizma potiču od različite metaboličke aktivnosti-nedijapauzirajuće gusenice, sa intezivnim oksidativnim metabolizmom i dijabauzirajuće sa karakterističnim padom respiracije i oksidativnog metabolizma (Slama i Denlinger, 1992).



Šema 9. Dominantini metabolički putevi kod nedijapuzirajućih gusenica *O.nubilalis*. Crveno su označeni najrelevantniji metaboliti koji predstavljaju razliku između metaboličkog NMR profila nedijapauzirajućih u odnosu na dijabauzirajuće

Aminokiseline alanin, prolin i serin su glavne slobodne aminokiseline zastupljene u visokim koncentracijama u hemolimfi insekata i njihovo povećanje je opisano kod mnogih vrsta sa dijabauzom (Goto i sar., 2001; 2001a). Povećanje nivoa aminokiselina serina, prolina i glutaminske kiseline uz relativno nisku koncentraciju alanina kod *O.nubilalis* tokom dijabauze i izlaganja niskim temperaturama opisano je i u radu Grubor-Lajšić (1983). Ovakve rezultate autor objašnjava mogućom oksidacijom alanina u prolin, pri čemu kao intermedijer nastaje glutaminska kiselina, i da

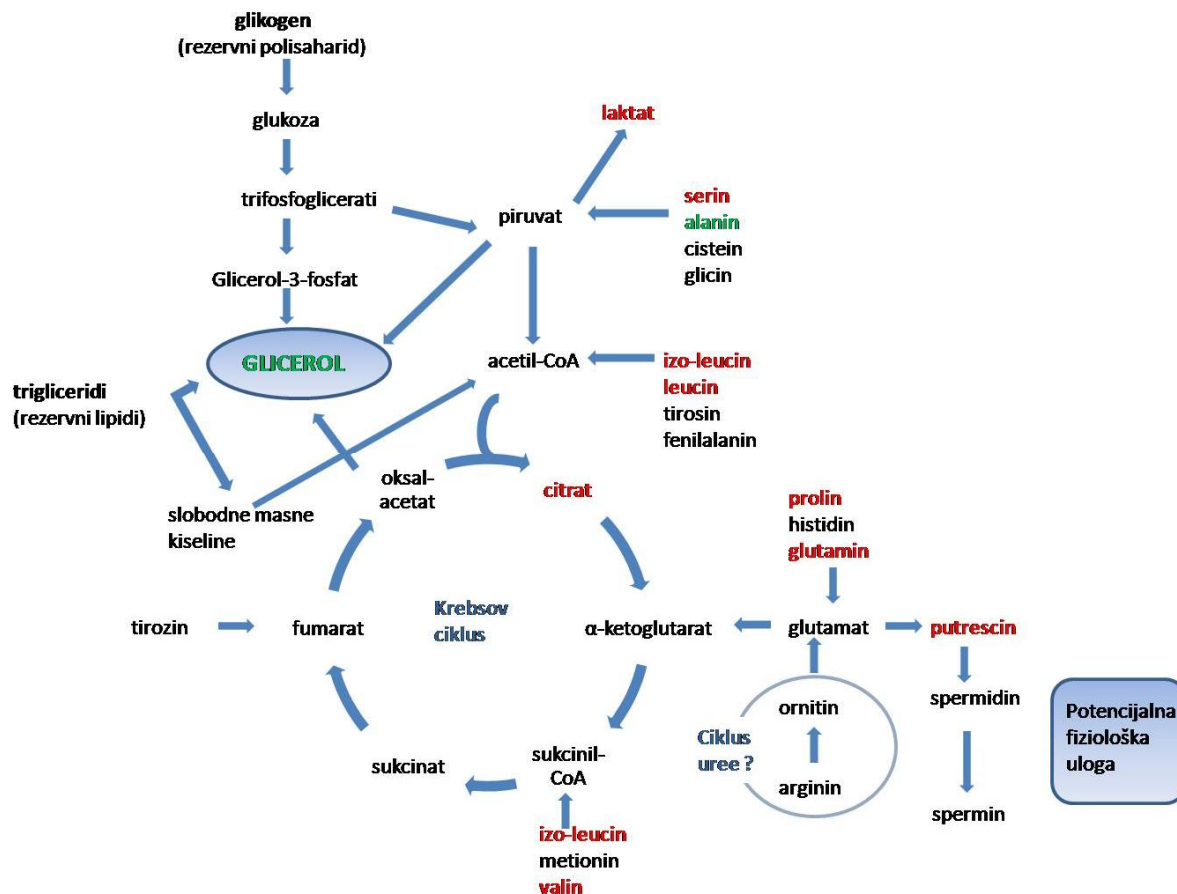
je u toku rada jednostavno »uhvaćen« trenutak bogat glutamatom. Naročito, je ovaj odnos izražen na kraju dijapauze, kada je veoma niska koncentracija i alanina i prolina, a visoka koncentracija glutamata, što implicira na moguću ulogu glutamata u procesima vezanih za završetak dijapauze. NMR spektrometrijom nismo detektovali povećanu koncentraciju glutamata kod dijapauzirajućih gusenica, već dominantno povećanje glicerola, prolina i alanina.

Prisustvo glicerola detektovanog NMR spektrometrijom kao najznačajnijeg krioprotektora dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* i njegovo povećanje izlaganjem gusenica niskim temperaturama je samo još jedna potvrda predhodnih rezultata. Korelacija između povećane koncentracije alanina i otpornosti na hladnoću je opisana kod velikog broja insekata (Rivers i sar., 2001; Goto i sar., 2001,2001a; Michaud i sar., 2008). Ova aminokiselina štiti proteine od inaktivacije hladnoćom i kao manje toksičan produkt katabolizma piruvata od laktata (u stanju kada je Krebsov ciklus inaktiviran hladnoćom, ili smanjenog inteziteta tokom dijapauze) daje doprinos perživljavanju na niskim temperaturama (Michaud i sar., 2008). Povećan nivo prolina kod dijapauzirajućih gusenica verovatno vodi poreklo od akumuliranog alanina koji se prevodi u prolin tokom dijapauze, kao što je opisano kod dijapauzirajućih jaja svilene bube, *Bombyx mori* (Osanai i Yonezawa, 1986).

Pri analizi podataka metaboličke aktivnosti organizma treba imati u vidu da predstavljaju sliku trenutnog stanja, koje se menja i pod uticajem je mnogobrojnih faktora sredine. Verovatno smo i mi u našim istraživanjima »uhvatili« samo odgovarajući momenat metaboličke aktivnosti karakteristične za prvu polovinu dijapauze (gusenice u oktobru) i priprema za nastupajuće niske temperature.

PCA analizom metaboličkih profila dijapauzirajućih gusenica izloženih različitim temperaturama, uočava se razdvajanje spektara u PCA plotu gusenica na 5°C sa jedne strane i onih izloženih temperaturama ispod nule, -3°C i -16°C (grafik 15A). Poreklo glicerola čija se koncentracija povećava sa niskim temperaturama je pre svega iz glikogena (Grubor-Lajšić, 1983) ali prisustvo aminokiselina serina, prolina, glutamina, izoleucina, leucina i valina, kao i citrata, intermedijera Krebsovog ciklusa (grafik 15B) ukazuje na moguću uključenost ovih metabolita u sintezu glicerola (šema 10). Kako je sam početak dijapauze povezan i sa sintezom specifičnih proteina (INP, AFP) detektovane aminokiseline na 5°C mogu biti i u ulozi njihovih proteinskih prekursora, s obzirom da

je u toku eksperimenta temperatura postepeno snižavana što vodi ka pokretanju adaptivnih mehanizama otpornosti na hladnoću.



Šema 10. Dominantini metabolički putevi kod dijapuzirajućih larvi *O.nubilalis*. Crveno su označeni najrelevantniji metaboliti koji predstavljaju razliku između metaboličkog NMR profila dijapuzirajućih na 5°C u odnosu na -3°C i -16°C. Zeleno su označeni najrelevantniji metaboliti za metabolički profil na temperaturama -3°C i -16°C.

Interesantno je prisustvo poliamina putrescina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$) u grupi nedijapuzirajućih i dijapuzirajućih gusenica *O.nubilalis* na 5°C (grafici 14B i 15B). Povećanje nivoa ovog metabolita u toku stresa je opisano kod biljaka (Renaut i sar., 2005), kišnih glista, nematoda, pijavice i planarija (Hamana i sar., 1995), ali i insekata pri toplotnom stresu (Michaud i sar., 2008). Kod biljaka je putrescin marker stresa koji nastaje aktiviranjem enzima arginin dekarboksilaze, koja katalizuje konverziju arginina u putrescin (Borrell i sar., 1996). Kod životinja konverzija arginina u putrescin ide preko arginaze, a nastali ornitin se dalje konvertuje preko ornitin dekarboksilaze. Potvrda ovog

metaboličkog puta bilo bi variranje arginina i ornitina, ali u našim eksperimentima to nije utvrđeno. Kako su arginin i ornitin deo ciklusa uree čije prisustvo kod insekata je pod znakom pitanja, poreklo putrescina ostaje da se istraži. Primarni ekskretorni produkt katabolizma azotovih jedinjenja, nukleinskih kiselina i proteina kod insekata je mokraćna kiselina a samo u tragovima se ekskretuje urea (Dungern i Briegel, 2001). U našem eksperimentu nije zabeležena nikakva promena u koncentraciji uree, mada je ovaj metabolit dokazan osmo- i krioprotektor kod insekata (Michaud i sar., 2008). Međutim, putrescin, kao i njegovi derivati spermin i spermidin, su regulatorni molekuli sa značajnom ulogom u osnovnim genetskim procesima, poput sinteze DNA i ekspresije gena (Jänne i sar., 2004), tako da ostaje otvoreno pitanje njihove potencijalne fiziološke uloge kod gusenica *O. nubilalis*.

4. Antioksidativni sistem zaštite

Otpornost na hladnoću i dijapauza insekata uključuju različite nivoe regulacije mnogobrojnih biohemijskih i fizioloških procesa. Niske temperature su praćene padom respiracije i metaboličke aktivnosti, koje i ako svedene na minimum su dobro kontrolisane i usmerene ka preživljavanju nepovoljnih uslova sredine.

Nekoliko fizioloških odgovora otpornosti na hladnoću su u direktnoj vezi sa oksidativnim procesima. Pre svega, to je činjenica da tokom izlaganje organizama niskim temperaturama zbog usporenih enzimskih reakcija pada potražnja za ATP, a u vezi sa tim pada nivo respiracije, što ima za posledicu akumulaciju elektrona na određenim tačkama respiratornog lanca. Ovaj proces vodi do pojačane produkcije ROS i potencijalno do oksidativnog stresa. Zato je adaptacija čitavog antioksidativnog sistema (ADS) ključna u otpornosti organizama na niske temperature. ADS insekata pri izlaganju niskim temperaturama kao deo redoks regulacije, uključen je u održanje optimalne koncentracije ROS i u smanjenju rizika od slobodno radikalskih oštećenja, povezanih sa oksidativnim stresom (Blagojević, 2007). Međutim, sve je veće i šire polje istraživanja moguće povezanosti, kao i mogućih regulatornih odnosa između mehanizama otpornosti na hladnoću i procesa vođenih slobodnim radikalima (ROS) i antioksidativnim sistemom zaštite (ADS) (Grubor-Lajšić i sar., 1997; Jovanović-Galović i sar., 2004; Jovanović-Galović i sar., 2007). Veliki broj istraživanja upravo potvrđuje ovu dualističku prirodu ROS i regulatorne uloge ADS, koja se zasniva na tome da visoke koncentracije ROS oštećuju molekule i ćelijske elemente, dok pri nižim koncentracijama učestvuju u procesima ćelijskog signalinga, genske ekspresije i regulacije fizioloških procesa uključujući i adaptaciju (Valko i sar., 2007). Sa druge strane, sinteza krioprotektora, pre svega poliola, praćena je potrošnjom redukovanih koenzima (NADPH), što je takođe značajno u regulaciji redoks stanja ćelije.

Prethodna istraživanja na *O.nubilalis* su pokazala da je sinteza glicerola kod dijapauzirajućih gusenica blisko povezana sa antioksidativnim sistemom zaštite (Stanić i sar., 2004). Ova činjenica je u saglasnosti sa visokim potrebama za redukujućim ekvivalentima NADPH sa jedne strane za sintezu glicerola, a sa druge strane za funkcionisanje antioksidativnog sistema zaštite, kao velikog potrošača NADPH. Fluks kroz heksozomonofosfatni put je kritičan u adaptaciji na niske temperature. Izlaganjem dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* niskim temperaturama Stanić i sar., 2004 su utvrdili povećanje aktivnosti enzima glukozo-6-fosfat dehidrogenaze (G-6-PDH), kao prvog

enzima oksidativne faze pentozofosfatnog puta. Ovaj rezultat je samo još jedna potvrda značaja pentozofosfatnog puta u otpornosti na hladnoću kod insekata. Naime, uočeno je da kod insekata otpornih na hladnoću, G-6-PDH ima visok afinitet prema supstratu i na niskim temperaturama, što je jako bitno za produkciju NADPH neophodnog za sintezu poliola iz šećera (Storey i sar., 2001).

Rezultati ove teze ukazuju da je efekat niskih temperatura na antioksidativni sistem zaštite dijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* (tabele 8 i 11) izražen samo na sredini dijapauze (grafici 16-25). Nivo aktivnosti ukupne SOD u homogenatu celih gusenica je u skladu sa ranije dobijenim rezultatima (Stanić, 2003) i znatno je veća od aktivnosti SOD kod drugih vrsta iz reda Lepidoptera (Lee i Berenbaum, 1990). Ova činjenica se može objasniti postojanjem proteinske frakcije u hemolimfi gusenica *O. nubilalis* koja produkuje O_2^{\bullet} (Grubor-Lajšić i sar., 1997a), pa se u reakciji ne može izbeći metabolički generisan O_2^{\bullet} . Aktivnost SOD je u proseku pet puta veća kod grupe gusenica na sredini dijapauze u odnosu na kraj dijapauze (tabela 8), što ukazuje na veću produkciju slobodnih radikala u ovom periodu. Pad aktivnosti ukupne SOD na sredini u odnosu na početak dijapauze, u homogenatu, opisan je i u radu Stanić, 2003. Možemo zaključiti da je trend smanjene aktivnosti ukupne SOD sa tokom dijapauze u korelaciji sa opštim padom metaboličke aktivnosti i respiracije.

Izlaganje niskim temperaturama gusenica na sredini dijapauze dovodi do pada ukupne aktivnosti SOD u homogenatu celih gusenica na $-3^{\circ}C$ (grafik 16), pri čemu ovom padu doprinosi pad aktivnosti CuZnSOD (grafik 18), ali ne i MnSOD čija aktivnost je neznatno manja (grafik 20). MnSOD je mitohondrijalna SOD i ključan je enzim u eliminaciji O_2^{\bullet} nastalog na respiratornom lancu, a istovremeno u produkciji H_2O_2 , što je u skladu sa našim rezultatima određivanja koncentracije H_2O_2 (grafik 22). Izdvojili bi temperaturu od $-3^{\circ}C$ kada dolazi do povećanja koncentracije H_2O_2 koje prati pad u aktivnosti CAT (grafik 24). Katalaza, suprotno od SOD koja generiše H_2O_2 , ima ulogu u njegovoj eliminaciji tako da smanjena aktivnost ovog enzima ima za posledicu održavanje visokog nivoa H_2O_2 nastalog delovanjem MnSOD u mitohondrijama. Enzimi SOD i CAT su tandemske enzimi u terminaciji slobodno radikalskih procesa, ali i u regulaciji redoks stanja sredine. Pad u aktivnosti CAT na $-3^{\circ}C$ je verovatno posledica povećane produkcije NO^{\bullet} , što je u skladu sa činjenicom da povećan nivo NO^{\bullet} dovodi do reverzibilne inhibicije CAT (Brunelli, 2001). Sa druge strane smanjena aktivnost CuZnSOD je u korelaciji sa povećanim nivoom H_2O_2 , s obzirom da je H_2O_2 poznat kao spor ireverzibilni inhibitor CuZnSOD (Salo i sar., 1990), pri čemu nema efekta na aktivnost MnSOD (Fridovich, 1986), što je potvrđeno i našim rezultatima (grafici 18, 20, 22 i 24).

Možemo da zaključimo da je H_2O_2 mogući molekul transmitter stresa i da verovatno ima regulatornu ulogu na temperaturi od $-3^{\circ}C$, kao ključnoj temperaturi u otpornosti na hladnoću, dok je uloga ADS ne samo u uklanjanu ROS/RNS već i u regulaciji koncentracija pojedinih komponenti ROS/RNS (H_2O_2 i NO^{\cdot}) koje mogu da vode fiziološkom odgovoru u skladu sa potrebama okoline.

Donekle sličan obrazac u aktivnostima enzima ADS i koncentracije H_2O_2 u homogenatu celih gusenica na sredini dijapauze i izloženih različitim temperaturama, ne pokazuje masno telo, na osnovu čega se može zaključiti da doprinos u ukupnom ADS u homogenatu potiče i iz drugih organa (digestivni, nervni sistem i sl.). Ustvari, utvrđeno je takođe povećanje koncentracija H_2O_2 (grafik 23)/ i pad aktivnost CAT (grafik 25) / ali je promena aktivnosti CuZnSOD i MnSOD različita pri različitim temperaturama (tabela 8 i 11). Dok je aktivnost CuZnSOD povećana na $-16^{\circ}C$ (grafik 19), na ovoj temperaturi aktivnost MnSOD je znatno smanjena u odnosu na druge dve grupe ($5^{\circ}C$ i $-3^{\circ}C$) (grafici 21). Povećana aktivnost CuZnSOD ove grupe može da bude iz razloga predhodnog iskustva, na nešto višim temperaturama poput $-3^{\circ}C$, kad je došlo do povećane produkcije H_2O_2 i ireverzibilne inaktivacije određene količine CuZnSOD, pa ćelija odgovara povećanom produkcijom enzima. Sa druge strane, razlog niže aktivnosti mitohondrijalne MnSOD je verovatno u smanjenoj respiraciji i manjem oksidativnom stresu, pošto su mitohondrije primaran izvor ROS pri oksidativnom stresu na niskim temperaturama. Povećana aktivnost CuZnSOD je bitna za ponovno uspostavljanje redok homeostaze i zaštite organizma od oštećenja izazvana ROS, čija produkcija prati i druge metaboličke procese, a ne samo one vezane za respiraciju.

Aktivnost, kao i koncentracija H_2O_2 u homogenatu celih gusenica i masnom telu na kraju dijapauze ne pokazuju značajne statističke razlike među grupama podvrgnutim različitim temperaturnim tretmanima (grafici 22 i 23; dvofaktorske analize varijanse, efekti vremena dijapauze-V i vremena dijapauze i temperature-TxV, tabele 9 i 10). Pri razmatranju ovih rezultata treba imati u vidu da je kraj dijapauze povezan sa rastom prosečnih dnevnih temperatura, tako da gusenice gube sposobnost regulacije odgovora na niske temperature preko jako osetljivog ADS i ROS sistema. Pored toga petostruko smanjena aktivnost ispitivanih ADS enzima i dvostruko smanjena koncentracija H_2O_2 , idu u prilog nemogućnosti ovog sistema da adekvatno odgovori promenama temperature kao kod gusenica na sredini dijapauze.

Za razliku od SOD, CAT u homogenatu i masnom telu gusenica *O.nubilalis* je u odnosu na druge vrste iz reda Lepidoptera, i do 20-30 puta niža (Ahmad i sar., 1995; Pritsos i sar., 1988) što je u saglasnosti sa prethodnim radovima Stanić i sar. (2003) i Jovanović-Galović (1997). Autori ove razlike objašnjavaju kao još jednu potvrdu velike varijabilnosti u pogledu biohemijskih parametara kod relativno srodnih vrsta, što može biti posledica različite ishrane, specifičnosti razvića i drugih faktora.

Nedijapauzirajuće gusenice sa intenzivnom ishranom i respiracijom, u odnosu na kontrolnu grupu gusenica na sredini dijaupaze, imaju znatno nižu aktivnost ukupne SOD u homogenatu celih gusenica. Tome doprinosi smanjena aktivnost CuZnSOD, s obzirom da je aktivnost MnSOD nepromenjena (tabela 8). Mitohondrijalna MnSOD je tako veća u odnosu na citosolnu CuZnSOD što je verovatno posledica pojačane produkcije O_2^{\bullet} na nivou mitohondrija (intenzivna respiracija). Sa druge strane, visoka CAT aktivnosti u ovoj grupi verovatno prati visoku koncentraciju H_2O_2 nastalog aktivnošću MnSOD. Slični rezultati za CAT u grupi nedijapauzirajućih gusenica *O.nubilalis* su dobijeni u radu Jovanović-Galović (2007) i to u mitohondrijalnoj frakciji, kao posledica visoke produkcije H_2O_2 delovanjem MnSOD. Povećanje aktivnosti CAT može da ukaže na postojanje i drugih procesa praćenih produkcijom H_2O_2 , poput melanogeneze, na šta ukazuje i višestruko veća aktivnost tirozinaze (Tyr) u ovoj grupi gusenica (tabela 8).

5. EPR spektri

Na osnovu iznetih rezultata i literaturnih podataka može se zaključiti da je redoks regulacija ključna u adaptivnim procesima koji prate dijapauzu i otpornost na niske temperature gusenica *O. nubilalis*. Za potpuniju sliku redoks stanja snimljen je EPR spektar celih gusenica, jer je poznato da pored ROS i RNS i drugi fiziološki aktivni molekuli mogu biti uključeni u propagaciju i atenuaciju slobodno radikalskih signala.

Na EPR spektru celih gusenica (grafici 27 i 28) uočava se signal semikinonskih radikala eumelanina i feomelanina, što govori o značaju ovih molekula u redoks statusu *O.nubilalis*. Značajna je činjenica da se ovi signali razlikuju pri različitim temperaturnim tretmanima samo na sredini dijapauze što je u skladu i sa svim ostalim ispitivanim parametrima ADS u našim istraživanjima. U reakciji sa ROS hidrokinoni melanina prelaze u semikinonske radikale (Meredith, 2006), tako da povećanje signala na niskim temperaturama može da ukaže na postojanje oksidativnog stresa. Povećanje je izraženo na -3°C , kada je povećana i koncentracija H_2O_2 . Odnos koncentracije H_2O_2 i signala melanina je značajan sa više aspekata, sa jedne strane sinteza melanina praćena produkcijom H_2O_2 , a sa druge strane melanin je poznat antioksidant, odnosno »hvatač« ROS (Goncalves i Pombeiro-Sponchiado, 2005). Takođe, H_2O_2 je ključan u biosintezi melanina. Pokazano je u kulturi melanocita da razgradnjom intracelularnog H_2O_2 melanociti gube sposobnost biosinteze melanina (Kasraee i sar., 2003). Ova činjenica ukazuje da je biosinteza melanina u sklopu antioksidativne zaštite organizma, i da melanin ćelija koristi kao zaštitu od oksidativnog stresa uklanjajući intracelularni H_2O_2 . Takođe, primećeno je da je povećanje signala eumelanina kod gusenica *Malacosoma disstria*, stresiranih ishranom, u korelaciji sa povećanom produkcijom melanina (Barbehenm, 2003). Prema tome, autori ističu da nije jasno da li povećan signal eumelanina potiče od oksidativnog stresa ili povećane produkcije melanina. Dalja istraživanja u ovoj tezi su bila, u tom smislu, u vezi sa metabolizmom melanina, tako da je aktivnost tirozinaze, kao drugi ključni korak u regulaciji sinteze melanina, određivana u toku dijapauze i temperaturnih tretmana. Skok aktivnosti Tyr je zapažen na temperaturi od -16°C na sredini dijapauze, kada je registrovano i povećanje aktivnosti MnSOD u homogenatu gusenica (grafik 20), mada koncentracija H_2O_2 nije povećana kao ni signal melanin radikala (grafik 26). Povećane aktivnosti enzima Tyr i MnSOD, koje ne prati povećanje koncentracije H_2O_2 i melanin radikala, može da ukaže na postojanje specifične regulacije aktivnosti ovih enzima *in vivo*, koja ne postoji u *in vitro* uslovima. Ova pojava je česta u slučajevima regulacije enzimske aktivnosti alosternim modulatorima, kojih ne bude u dovoljnoj količini u *in*

in vitro reakcionim smesama. Iz rezultata, možemo pretpostaviti da povećani signal melanin radikala na -3°C nije zbog njegove povećane sinteze već da potiče iz njegove reakcije sa H_2O_2 (grafik 22). Sa druge strane u grupi na kraju dijapauze nema statistički značajnih promena u aktivnost tirozinaze sa hlađenjem, a ne dolazi ni do povećanja melanin radikal signala ni koncentracije H_2O_2 . Rezultat je u saglasnosti sa aktivnošću ostalih ispitivanih enzima ADS, za koje takođe nisu zabeležene promene sa temperaturnim tretmanima u ovom periodu dijapauze. Verovatno, na kraju dijapauze i uloga melanina se menja tako da je on od značaja za dalju morfogenezu i nema ulogu antioksidanta. Ovi rezultati navode na zaključak da je oksidativni stres izazvan hlađenjem ove grupe gusenica svakako regulisan na drugi način.

Višestruko veća aktivnost TYR kod nedijapauzirajućih (tabela 8) verovatno je u skladu sa pojačanom produkcijom melanina, značajnog u antioksidativnoj zaštiti zbog većeg nivoa respiracije i metabolizma, kao i pojačanim nivoom UV zračenja tokom letnjih meseci.

Citohemijska istraživanja u ovoj tezi su rađena sa ciljem razumevanja uloge melanina u adaptaciji *O.nubilalis* na niske temperature. Preparati gusenica su bojeni citohemijski na melanin (slika 2) da bi se utvrdile eventualne razlike u produkciji melanina pri temperaturnom tretmanu gusenica *O.nubilalis*. Odabrana je samo grupa na sredini dijapauze, pošto je samo u ovoj grupi EPR-om uočeno variranje signala melanina pri niskim temperaturama. Jasno je uočena produkcija melanina u ekstrakutanoznim ćelijama, ali neke značajne razlike u intenzitetu nisu vidljive ovom makroskopskom metodom.

Na osnovu dobijenih rezultata jasna je značajna uloga ADS, melanina i H_2O_2 u otpornosti na hladnoću, ali samo kod dijapauzirajuće grupe na sredini dijapauze. Koji su mehanizmi otpornosti na hladnoću na kraju dijapauze nije iz ovih istraživanja sasvim jasno. Više faktora može da utiče na ovakav rezultat, kao što su dužina obdanice, priprema za predstojeću metamorfozu, više prosečne temperature itd.

VII Zaključci

Cilj ove teze je bio da se ispituju mehanizmi preživljavanja niskih zimskih temperatura, i sa njima povezane dehidracije, gusenica kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis*. Istraživanja su rađena u grupi dijapauzirajućih gusenica u toku dijapauze i izlaganja niskim temperaturama, kao i u grupi nedijapauzirajućih gusenica.

- Na osnovu kriobioloških istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:
 - režim telesne vode je od ključnog značaja za preživljavanje kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis* na temperaturama ispod nule. Preraspodela vode je između hemolimfe i masnog tela, pri čemu povećanje osmotski aktivne (OA) vode u masnom telu prati njen pad u hemolimfi. Nivo osmotski neaktivne vode (OI), kao bazalnog nivoa telesne vode, se ne menja pri izlaganju niskim temperaturama. Tako da odnos OI/OA za hemolimfu pri izlaganju niskim temperaturama menja sa 1/13 na 1/3, a za masno telo od 1/2,2 na 1/5,2.
 - tačka mržnjenja hemolimfe i masnog tela gusenica *O. nubilalis* je niža za samo 3-4°C kod dijapauzirajućih gusenica u odnosu na nedijapauzirajuće što ukazuje na postojanje genetske osnove ove vrste na preživljavanje niskih temperatura
 - utvrđena razlika u tački topljenja, koja je viša od tačke mržnjenja (termalni histerezis), 4-7°C za masno telo i 16-19 °C za hemolimfu, ukazuje na prisustvo antifriz proteina. Značaj ove pojave je u zaštiti organizma od topljenja ekstracelularnih kristala leda usled variranja spoljašnjih temperatura, čija ponovna rekristalizacija je praćena formiranjem potencijalno letalnih oštrih ivica kristala leda
 - nivo glicerola i trehaloze sa početkom dijapauze i izlaganjem niskim temperaturama se višestruko povećava, pre svega u hemolimfi, što ukazuje na značaj ovih molekula kao krioprotektora, kao i hemolimfe kao mesta njihove akumulacije

- Rezultati analize koncentracije glicerola i trehaloze u homogenatu celih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze i pri izlaganju niskim temperaturama, pokazuju da:
 - nivo glicerola u kontrolnoj grupi (5°C) sredinom dijapauze čini i do 2% telesne mase, da bi krajem dijapauze sadržaj opao na 0,5%
 - sa izlaganjem niskim temperaturama nivo glicerola raste u grupi na sredini dijapauze čineći i do 3% telesne mase, dok u grupi na kraju dijapauze nivo raste tek neznatno na 0,6%.
 - trehaloza je drugi po zastupljenosti šećer sa 0,5% od ukupne telesne mase dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (kontrolna grupa, 5°C). Nivo trehaloze kod dijapauzirajućih gusenica je oko 13 puta veći u odnosu na nedijapauzirajuće, što ukazuje na značaj trehaloze kao krioprotektora. Za razliku od glicerola, njen nivo se ne menja na kraju dijapauze u odnosu na sredinu
 - sa izlaganjem niskim temperaturama nivo trehaloze raste samo u grupi gusenica na kraju dijapauze
 - analizom ostalih poliola i šećera u homogenatu nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* je utvrđeno prisustvo sorbitola, mio-inozitola, glukoze i fruktoze, a njihov sadržaj je daleko niži u odnosu na glicerol i trehalozu i kreće se oko 0,008% telesne mase
 - nivo sorbitola na sredini dijapauze i kod nedijapauzirajućih gusenica je na istom nivou, dok krajem dijapauze značajno opada, kao i na sredini dijapauze sa izlaganjem niskim temperaturama
 - nivo mio-inozitola se ne menja tokom dijapauze i nema značajnih razlika u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice. Sa izlaganjem niskim temperaturama nivo mio-inozitola značajno opada sredinom dijapauze, već na temperaturi od -3°C, dok krajem dijapauze nivo raste na -16°C

- nivo šećera glukoze i fruktoze značajno raste krajem u odnosu na sredinu dijapauze. Sa izlaganjem niskim temperaturama, posebno izuzetno niskim (-16°C) nivo glukoze višestruko raste i dostiže 0,2% telesne mase
- na osnovu izloženih rezultata analize poliola i šećera kod gusenica *O. nubilalis* možemo zaključiti da se njihova uloga u dijapauzi i preživljavanju niskih temperatura menja tokom dijapauze. Na sredini dijapauze kao najznačajniji krioprotektor izdvaja se glicerol, da bi na kraju dijapauze značajnu ulogu imali šećeri trehaloza, glukoza i fruktoza. Rezultat je još jedna potvrda da je dijapauza dinamično stanje podeljeno u više faza
- Na osnovu analize metaboličkih profila nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izloženih niskim temperaturama, možemo zaključiti:
 - NMR metabolički profil nedijapauzirajućih gusenica u odnosu na dijapauzirajuće (kontrolna grupa, 5°C) karakteriše prisustvo slobodnih aminokiselina i intermedijera oksidativnog metabolizma, što ukazuje na intenzivan metabolizam i biosintezu proteina za nastavak životnog ciklusa
 - NMR metabolički profil dijapauzirajućih gusenica karakteriše prisustvo glicerola i aminokiselina alanina i prolina. Alanin je mogući prekursor glicerola i ima ulogu u stabilizaciji proteina od inaktivacije niskim temperaturama, a nastaje i u energetskom metabolizmu prolina, koji je takođe povećan kod dijapauzirajućih gusenica
 - u NMR metaboličkim profilima dijapauzirajućih gusenica izloženih niskim temperaturama, u odnosu na kontrolne (5°C), izdvaja se povećanje alanina, glicerola i acetata, što ukazuje na njihovu metaboličku povezanost karakterističnu za otpornost ove vrste na niske temperature
 - povećanje nivoa putrescina, poznatog markera stresa, zabeleženo je kod nedijapauzirajućih i kontrolnih dijapauzirajućih gusenica (5°C), a njegova uloga, kao i moguća uloga njegovih daljih metabolita spermina i spermidina tek treba da se ispita

- Na osnovu analize rezultata aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT i TYR), koncentracije H₂O₂ i EPR analize dijavuzirajućih gusenica tokom dijavuaze i pri izlaganju niskim temperaturama, možemo zaključiti:
 - aktivnost enzima SOD (CuZnSOD i MnSOD) i CAT u homogenatu celih gusenica i masnom telu, kao i koncentracija H₂O₂ u homogenatu je veća u grupi gusenica na sredini dijavuaze, što ukazuje na povećanu produkciju ROS u odnosu na kraj dijavuaze, pri čemu je aktivnost TYR nepromenjena
 - izlaganje niskim temperaturama ima uticaja na antioksidativni sistem zaštite samo sredinom dijavuaze. Utvrđen je pad u aktivnosti CuZnSOD i CAT, kao i porast koncentracije H₂O₂ i melanin radikala u homogenatu gusenica na -3°C u odnosu na 5°C i -16°C
 - korelacija porasta koncentracije H₂O₂ i odsustvo pada aktivnosti MnSOD (dodatno povećanje na -16°C), ukazuje na najverovatnije mitohondrijalno poreklo H₂O₂. Istovremeni pad aktivnosti CAT (uklanja H₂O₂) omogućava održavanje relativno visoke koncentracije H₂O₂ kod dijavuzirajućih gusenica. Utvrđeni porast signala melanin radikala dodatno ukazuje na neophodnost dostizanja redoks stanja neophodnog za pokretanje adaptivnih procesa otpornosti *O. nubilalis* na niske temperature
 - grupu nedijavuzirajućih gusenica karakteriše izrazita aktivnost CAT i TYR, što je u skladu sa intenzivnom respiracijom i melanogenezom i sa njima povezanom produkcijom ROS
- Kao opšti zaključak nameće se činjenica da su dijavuaza, kao i mehanizam adaptacije kukuruznog plamenca *O. nubilalis* na niske temperature, kompleksni, dobro regulisani i da je za bolje razumevanje neophodan ekofiziološki, fiziološki i biohemijski pristup. U tom smislu su i rezultati naših istraživanja otvorili mnogobrojna pitanja koja zahtevaju dalja istraživanja.

VIII Literatura

- Adedokun, T.A. i Denlinger, D.L. (1984): Cold hardiness: A component of the diapause syndrome in pupae of the flesh flies, *Sarcophaga crassipalpis* and *S.bullata*, *Physiol.Entomol.*, Vol. 9, 361-364
- Aebi, H. (1984): Catalase in vitro, *In methods in Enzymology*, Vol. 105 (edite by Packer L.) 121-126, Academic Press, New York
- Ahmad, S., Pritsos, C.A., Browen, S., Heisler, C.R., Blomquist, G.J., Pardini, R.S. (1988): Subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in the southern armyworm, *Spodoptera eridania*, *Arch.Insect Biochem.Physiol.*, Vol. 7, 173-186
- Ahmad, S., Zaman, K., MacGill, R.S., Batcabe, J.P., Pardini, R.S. (1995): Dichlone-induced oxidative stress in a model insect species, *Spodoptera eridania*, *Arch.Environ.Contam.Toxicol.*, Vol. 29, 442-448
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2003): Essential cell biology, Garland Science, Taylor & Francis group, London
- Ames, B.N., Cathert, R., Schwies, E. Hochsein, P. (1981): Uric acid provides and Antiooxidant defence in humans against oxidant- and radical- causing aingin and cancer, A hypotheses, *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, Vol 78, 6858-6862
- Arner, E.S.J. i Holmgren, A. (2000): Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur.J.Biochem.*, Vol 267, 6102-6109
- Ashida, M., Brey, P.T. (1995): Rol of the integument in insect defense pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, Vol. 92, 10698-10702
- Baars, A.J. (1984): Detoxication catalyzed by glutathione S-transferases, Life Chemistry Reports, Suppl 2, *Oxidative Damage and Related Enzymes*, Michelson, A.M., Banister, J.V. (eds)
- Bača, F., Gošić-Dondo, S., Kaitović, Ž., Hadžistević, D. (2007): European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn) population fluctuation at Zemun Polje between 1986 and 2005, *MAYDICA*, Vol. 52, 325-328

- Bale, J. S. (1991): Insects at low temperature: a predictable relationship?, *Funct.Ecol.*, Vol. 5, 291–298.
- Bale, J. S. (1996): Insect cold hardiness: a matter of life and death, *Eur.J.Entomol.*, Vol. 93, 369–382.
- Bale, J. S., Block, W., Worland, M. R. (2000): Thermal tolerance and acclimation response of the sub-Antarctic beetle *Hydromedion sparsutum*, *Polar Biol.*, Vol. 23, 77–84.
- Bale, J. S., Hansen, T. N., Baust, J. G. (1989): Nucleators and sites of nucleation in the freeze tolerant larvae of the gallfly *Eurosta solidaginis* (Fitch), *J.Insect Physiol.* Vol. 35, 291–298.
- Bale, J.S. (2002): Insect and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, Vol. 357, 849-862
- Barbehenn RV, Poopat U, Spencer B (2003): Semiquinone and ascorbyl radicals in the gut fluids of caterpillars measured with EPR spectrometry, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 33, 125–130.
- Baskin, S. I., i Salem, H., (1997), *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*, Taylor & Francis, Washington, SAD
- Baust, J. G. (1973): Mechanisms of cryoprotection in freezing tolerant animal systems, *Cryobiology*, Vol. 10, 197–205.
- Baust, J. G. (1982): Environmental triggers to cold hardening, *Comp.Biochem. Physiol. A* , Vol. 73, 563–570.
- Becker, K., Kanzok, S.M., Iozef, R., Fischer, M., Schirmer, R.H., Rahlfs, S. (2003): Plasmoredoxin, a novel redox-active protein unique for malarial parasites, *Eur.J.Biochem*, Vol. 270, 1057-1064
- Bergendi, L, Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M. (1999): Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sci.*, Vol 65, 1865-1874
- Blagojević, D. (2007): Free radical-mediated stress and antioxidant defence in organisms subjected to low temperatures, *CryoLetters*, Vol. 28, 137-150
- Block, W., (1995): Insects and freezing, *Sci.Progress*, Vol 78, 349-372

- Bolwell, G.P. (1999): Role of active oxygen species and NO in plant defense responses, *Curr.Opin.Plant Biol.*, Vol. 2, 287-294
- Borrell, A., Besford, R.T., Altabella, T., Masgrau, C., Tiburcio, A.F. (1996): Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically stressed oat leaves, *Physiol.Plants*, Vol.98, 105-110
- Bradford, M., A (1976): Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, Vol. 72, 248-254
- Brunelli, V. Yermilov and J.S. Beckman (2001): Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide, *Free Radical Biol. Med.*, Vol. 30, 709–714.
- Bystrova, M.F. i Budanova, E.N. (2007): Hydrogen Peroxide and Peroxiredoxins in Redox Regulation of Intracellular Signaling, *Biochemistry(Moscow)*, Vol.1, 99-107
- Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Karnas, K.J., Pennington, J.E., Wells, M.A. (2001): Fat metabolism in insects, *Annual Review of Nutrition*, Vol. 21, 23–46
- Cannon, R. J. C. i Block, W. (1988): Cold tolerance of microarthropods, *Biol.Rev.*, Vol. 63, 23–77
- Carr, A., McCall, M.R., Frei, B. (2000): Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection, *Arterioscl.Thromb.Vasc.Biol.*, Vol 20, 1716-1723
- Cenas, N., Nivinskas, H., Anusevicius, Z., Sarlauskas, J., Lederer, F., Arner, E.S.J. (2004): Interaction of quinones with thioredoxin reductase-a challenge to the antioxidant role of the mammalian selenoprotein, *J.Biol.Chem.*, Vol. 279, 2583-2592
- Cerenius, L. i Soderhall, K. (2004): The prophenoloxidase-activating system in invertebrates, *Immunol.Rev.*, Vol. 198, 116-126
- Cerutti, P.A: (1985): Proxidant states and tumor promotion, *Science*, Vol. 227: 375-381
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalias, *Physiol.Rev.*, Vol. 59, 527-538
- Chen, Q.-X., Liu, X.-D., Huang, H. (2003): Inactivation Kinetics of Mushroom Tyrosinase in the Dimethyl Sulfoxide Solution, *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 68, 644-649

- Chiuen, C.C. (1999): Neuroprotective properties of nitric oxide, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, Vol. 890, 301-311
- Churchill, T.A. i Storey, K.B. (1989): Regulation of glycerol biosynthesis in a freeze avoiding insect, *Journal of Comparative Physiology*, Vol. 159, 461–472.
- Commoner, B., Townsend, J., Pake, G.E. (1954): Free radicals in biological materials, *Nature*, Vol.174, 689-691
- Coulson, S. J. i Bale, J. S. (1991): Anoxia induces rapid cold hardening in the housefly *Musca domestica*, *J.Insect Physiol.*, Vol. 37, 497–501.
- Craig, E.A., Gambill, B.D., Nelson, R.J. (1993): Heat shock proteins: Molecular chaperones of protein biogenesis, *Microbiol.Rev.*, Vol. 57, 402-414
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Aurell Wistrome, C. (1987): Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars, *Biochem.J.*, Vol. 242, 1-10
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A. (2003): Protein carbonylation in human diseases, *Trends Mol.Med.*, Vol. 9, 169-176
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G. (2005): Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics, *Mass Spectrom.Rev.*, Vol 24, 55-99
- Danks, H.V. (1987): Insect Dormancy: An Ecological Perspective, *Biological Survey of Canada Press, Ottawa*
- Das, K.S. (2004): Thioredoxin system in premature and newborn biology, *Antiox.Redox.Signal.*, Vol 6, 177-184
- De Haan, J.D., Bladier, C., Griffiths, P (1998): Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J.Bio. Chem.* , Vol. 273, 22528–36
- Delannoy, E., Jalloul, A., Assigbetse, K., Marmey, P., Geiger, J. P., Lherminier, J., Daniel, F., Martinez, C., Nicole, M. (2003): Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight, *Mol., Plant Microbe In.*, Vol.16, 1030-1038

- Denlinger, D. L. i Lee Jr., R. E. (1998): Physiology of cold sensitivity. In: G. J. Hallman and D. L. Denlinger, editors. *Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management*. Westview, Boulder, Colorado. Pages. 55–95
- Denlinger, D.L. (1986): Dormancy in tropical insect, *Annual ReviewnEntomol.*, Vol 31, 239-264
- Denlinger, D.L., Joplin, K.H., Chen, C.P., Lee, R.E. (1991): Cold shock and heat shock, *In Lee, R.E. i Denlinger, D.L., eds. Insects at Low Temperature*, 131-148, Chapman and Hall, New York
- Denlinger, D.L., Yocum, G.D., Rinehart, J.L. (2005): Hormonal control of diapause. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 3. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 615–650.
- Di Mascio, P., Devasagayam, T. P. A., Kaiser, S., and Sies, H. (1990): Carotenoids, tocopherols, and thiols and biological singlet molecular oxygen quenchers, *Biochem. Soc. Trans.*, Vol. 18:1054-1056
- Dr□ge, W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol.Rev.*, Vol.82, 47-95
- Duman, J. G. (1982): Insect antifreezes and ice nucleating agents, *Cryobiol*, Vol. 19, 613–627.
- Duman, J. G. (2001): Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods, *A.Rev.Physiol*, Vol. 63, 327–357.
- Duman, J. G., Horwath, K. L., Tomchaney, A. , Patterson, J. L. (1982): Antifreeze agents of terrestrial arthropods, *Comp.Biochem.Physiol. A*, Vol. 73, 545–555.
- Duman, J. G., Wu, D. W., Wolber I, P., Mueller, G. M., Neven, L. G. (1991a): Further characterization of the lipoprotein ice nucleator from the freeze tolerant larvae of the crane fly *Tipula trivittata*, *Comp.Biochem. Physiol. B*, Vol. 99, 599–607
- Duman, J.G., Wu, D.W., Olsen, T.M., Urratia, M., Tursman, D. (1993): Termal hysteresis proteins, *Advances Low Temperature Biology*, Vol.2, 131-182
- Duman, J.G., Wu, D.W., Xu, L., Tursman, D., Olsen, T.M. (1991b): Adaptations of insects to subzero temperatures, *Quart.Rev.Biol.*, Vol. 66, 387-410

- Dungern, P.von i Briegel, H. (2001): Protein catabolism in mosquitoes: Ureotely and uricotely in larval and imaginal *Aedes aegypti*, *J.Insect Physiol.*, Vol.47, 131-141
- Đorđević, V.B., Pavlović, D.D., Kocić, G.M. (2000): Karakteristike slobodnih radikala, *In: Biohemija slobodnih radikala* (Đorđević, V.B., Pavlović, D.D., Kocić, G.M, eds.), Tehnofarm d.o.o., Beograd, 7-69
- Evens, A.M. (2004): Motexafin gadolinium: A redox-active tumor selective agent for the treatment of cancer, *Curr.Opin.Oncol.*, Vol. 16, 576-580
- Fedtke, N., Boucheron, J.A., Walker, V.E., Swenberg, J.A. (1990): Vinyl chloride-induced DNA adducts. 2. Formation and persistence of 7-2'-oxoethylguanine and n2,3-ethenoguanine in rat-tissue DNA. *Carcinogenesis*, Vol.11, 1287-1292
- Fink, S.P., Reddy, G.R., Marnett, L.J. (1997): Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, Vol 94, 8652-8657
- Frank, H., Young, A., Britton G., Cogdell, R. (1999), *In The photochemistry of carotenoides* (*Advances in Photosynthesis*), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Fridovich, I. (1995): Superoxide radicals and superoxide dismutases, *Ann.Rev.Biochem.*, Vol. 64, 97-112
- Galter, D., Mihm, S., Dröge, W. (1994): Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and activator protein-1, *Eur.J.Biochem*, Vol. 221, 639-648
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn, W.O. (1954): Oxygen poisoning and x-irradiation-A mechanism in common, *Science*, Vol.119, 623-626
- Ghafourifar, P. i Cadenas, E. (2005): Mitochondrial nitric oxide synthase, *Trends Pharmacol.Sci.*, Vol 26, 190-195
- Goncalves, R.C., Pombeiro-Sponchiado, S.R. (2005): Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*, *Biol.Pharm.Bull.*, Vol. 28, 1129-1131
- Goto, M., Fujii, M., Suzuki, K., Sakai, M. (1998): Factors affecting carbohydrate and free amino acide content in overwintering larvae of *Enosima leucotaeniella*, *J.Insect Physiol*, Vol. 44, 87-94

- Goto, M., Li, Y.-P., Kayaba, S., Outani, S., Suzuki, K. (2001a): Cold hardiness in summer and winter diapause and post-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. under temperature acclimation, *J.Insect Physiol.*, Vol. 47 (2001) 709–714
- Goto, M., Sekine, Y., Outa, H., Hujikura, M., Suzuki, K. (2001): Relationships between cold hardiness and diapause, and between glycerol and free amino acid contents in overwintering larvae of the orient corn borer, *Ostrinia furnacalis*, *J.Insect Physiol.*, Vol. 47, 157-165
- Grubor-Lajšić, G. (1983): Biohemijsko proučavanje krioprotektnog sistema insekata *Ostrinia nubilalis*, Hubn, *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
- Grubor-Lajšić, G., Block, W., Palanački, V., Glumac, S. (1991): Cold hardiness parameters of overwintering diapause larvae of *Ostrinia nubilalis* in Vojvodina, Yugoslavia, *Cryo-Letters*, Vol.12, 177-182
- Grubor-Lajšić, G., Blok, W., Jovanović, A., Worland, R. (1996): Antioxidant enzymes in the Antarctic fly, *Belgica antarctica*, *Cryo-Lett.*, Vol. 17, 39-42
- Grubor-Lajšić, G., Block, W., Telesmanic, M., Jovanović, A., Stevanović, D., Bača, F., (1997): Effect of cold acclimation on the antioxidant defense system of two larval Lepidoptera (Noctuidae); *Arch.Insect Biochem.Physiol.*, Vol.36, 1-10
- Günther, U.L., Ludwig, C., Ruterjans, H. (2000): NMRLAB - Advanced NMR data processing in MATLAB, *J.Magn.Reson.*, Vol. 145, 201-208
- Hahn, D.A. i Denlinger, D.L. (2007): Meeting the energetic demands of insect diapause: Nutrient storage and utilization, *Journal of Insect Physiology*, Vol. 53, 760-773
- Halliwell, B. (1987): Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts, *Chem.Phys.Lipids.*, Vol. 44, 327-340
- Halliwell, B. i Gutteridge, J.M.C. (1989), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford
- Halliwell, B. i Gutteridge, J.M.C. (1999), *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.), Oxford University Press.

- Halouska, S. i Powers, R. (2006): Negative impact of noise on the principal component analysis of NMR data, *J.Magnet.Res.*, Vol.178, 88-95
- Hamana, K., Hamana, H., Shinozawa, T. (1995): Alterations in polyamine levels of nematode, earthworm, leech, and planarian during regeneration, temperature and osmotic stress, *Comp.Biochem.Biophys.*, Vol. 11B, 91-97
- Han, D., Fang, J.M., Ding, H.Z., Johnson, J.K., Christensen, B.M., Li, J.Y. (2002): Identification of *Drosophila melanogaster* yellow-f and yellow-f2 proteins as dopachrome-conversion enzymes. *Biochem.J.*, Vol. 368, 333-340
- Hanec, W. i Beck, S.D. (1960): Cold hardiness in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubn.), *J.Insect.Physiol.*, Vol. 5, 169-180
- Harman, D. (1956): Aging-A theory based on free-radical and radiation-chemistry, *J.Gerontol.*, Vol. 11, 298-300
- Hart, A. J. i Bale, J. S. (1997): Evidence for the first strongly freeze tolerant insect found in the UK., *Ecol.Entomol.*, Vol. 22, 242-245
- Hehner, S.P., Breitkreutz, R., Shubinsky, G., Unsoeld, H., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, M.L. (2000): Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool, *J.Immunol.*, Vol. 165, 4319-432
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M.E., Hudemann, C., Lillig, C.H. (2005): Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems, *Biochemical Society Transactions*, Vol. 33, 1375-1377
- Howling, G. G., Bale, J. S., Harrington, R. (1994): Effects of extended and repeated exposures on the low temperature mortality of the peach-potato aphid *Myzus persicae.*, *Ecol. Entomol.* Vol 19, 361-366.
- Hwang, C., Sinsky, A.J., Lodish, H.F. (1992): Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum, *Science*, Vol. 257, 1496-1502
- Ishikawa, T. (1992): The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump, *Trend.Biochem.Sci.*, Vol. 17, 463-468

- Izawa S, Y. Inoue, A. Kimura (1996): Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.J.*, Vol. 320, 61-67
- Jänne, J., Alhonen, L., Pietilä, M., Keinänen, T.A. (2004): Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals, *Eur. J. Biochem.* Vol. 271, 877-894
- Johnson JK, Li, J., Christensen, B.M.(2001): Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, *Insect Biochem.Mol. Bio.* Vol. 31,1125-1135
- Joplin, K.H., Yocum, G.D., Denlinger, D.L. (1990): Cold shock elicits expression of heat shock proteins in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, *Journal of Insect Physiology*, Vol.36, 825-834
- Joshi-Tope, G., Gillespie, M., Vastrik, I., D'Eustachio, P., Schmidt, E., de Bono, B., Jassal, B., Gopinath, G.R., Wu, G.R., Matthews, L. i ostali (2005): Reactome: a knowledgebase of biological pathways, *Nucleic Acids Res.*, 33, D428–D432
- Jovanović-Galović, A. (1998): Antioksidativni sistem kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis*, Hbg): subćelijska distribucija i uloga antioksidanta u metamorfozi, *Doktorska disertacija*, Univerzitet u Novom Sadu
- Jovanović-Galović, A., Blagojević, D., Grubor-Lajšić, G., Worland, R., Spasić, M.B. (2004): Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): diapause and metamorphosis, *Arch. Insect Biochem.Pysiol.*, Vol. 55: 79-89
- Jovanović-Galović, A., Blagojević, D., Grubor-Lajšić, G., Worland, R., Spasić, M.B. (2007): Antioxidant defense in mitochondria during diapause and postdiapause development of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.), *Arch. Insect Biochem.Pysiol.*, Vol. 64: 111-119
- Jovanović-Galović, A., Grubor-Lajšić, G., Taški, K., Vujović, G. (1997): Subcellular distribution and activities of antioxidant enzymes in the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) Hbn. 11th Balkan Biochem.Biophys.Days, Abstr. 127, 393, Tessaloniki, Greece
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y. and Hattori, M. (2004): The KEGG resource for deciphering the genome, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 32, D277–D280

- Kanzok, S.M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J.K., Muller, H.-M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R.H., Becker, K. (2001): Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*, *Science*, Vol. 291, 643-646
- Karow, A.M. (1991): Chemical cryoprotection of metazoan cells, *BioScience*, Vol. 41, 155-160
- Kasraee B, Sorg O & Saurat JH (2003): Hydrogen peroxide in the presence of cellular antioxidants mediates the first and key step of melanogenesis: a new concept introducing melanin production as a cellular defence mechanism against oxidative stress, *Pigment Cell Research*, Vol. 16, 571
- Kehrer, J.P. (2000): The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, Vol. 149, 43-50
- Kern, J.C. i Kehrer, J.P. (2005): Free radicals and apoptosis: Relationships with glutathione, thioredoxin and the Bcl family of protein, *Front.Biosci.*, Vol. 10, 1727-1738
- Kim, F.J., Kim, H.P., Hah, Y.C., Roe, J.H. (1996): Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*, *Eur.J.Biochem.*, Vol.241, 178-185
- Kondo, T., Yoshida, K., Urata, Y., Goto, S., Gasa, S., Taniguchi, N. (1993): Glutamylcysteine synthetase and active transport of glutathione S-conjugate are responsive to heat shock in K562 erythroid cells, *J.Biol.Chem.*, Vol. 268, 20366-20372
- Košťál, V., Tollarová, M., Šula, L. (2004): Adjustments of the enzymatic complement for polyol biosynthesis and accumulation in diapausing cold-acclimated adults of *Pyrrhocoris apterus*, *J.Insect Physiol.*, Vol. 2004, 303-313
- Krummenacker, M., Paley, S., Mueller, L., Yan, T. and Karp, P.D. (2005): Querying and computing with BioCyc databases, *Bioinformatics*, Vol. 21, 3454-3455
- Lambeth, J.D. (2004): NOX enzymes and the biology of reactive oxygen, *Nat.Rev.Immunol.*, Vol 4, 181-189
- Lee, K. and M. R. Berenbaum (1990): Defense of parsnip webworm against phototoxic furanocoumarins: the role of antioxidant enzymes, *J Chem.Ecol*, Vol. 16, 2451-2460

- Lee, R. E., McGrath, J. J., Morason, R. T., Taddeo, R. M. (1993): Survival of intracellular freezing, lipid coalescence and osmotic fragility in fat body cells of the freeze-tolerant gallfly *Eurosta solidaginis*. , *J.Insect Physiol.*, Vol. 39, 445–450.
- Lee, R.E. (1991): Principles of insect low temperature tolerance. In „Insect at Low Temperature“ Ed by RE Lee, DL Denlinger, Chapman & Hill, New York, 17-46
- Lee, R.E. i Denlinger, D.L. (1985): Cold tolerance in diapausing and non-diapausing stages of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, *Physiol.Entomol.*, Vol. 10, 309-315
- Lee, R.E. (1991): Principles of insect low temperature tolerance, *In R.E.Lee & D.L.Denlinger*, eds *Insect at Low Temperature*, 17-46, Chapman and Hall, New York
- Lee, R.E., Lee, M.R., Strong-Gunderson, J.M. (1993): Insect cold-hardiness and ice nucleating active microorganisms including their potential use for biological control, *J.Insect.Physiol.*, Vol. 39, 1-12
- Lefevre, K.S., Koopmanschap, A.B., DeKort, C.A.D. (1989): Changes in the concentrations of metabolites in hemolymph during and after diapause in female Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, *Journal of Insect Physiology*, Vol. 35, 121–128.
- Levine, G.N., Frei, B.; Koulouris, S. N., Gerhard, M.D., Keaney, J.F., Vita, J.A., (1996): Ascorbic Acid Reverses Endothelial Vasomotor Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease, *Circulation*, Vol. 93, 1107-1113
- Li, J., Tracy, J.W., Christensen, B.M. (1992): Phenol oxidase activity in hemolymph compartments of *Aedes aegypti* during melanotic encapsulation reactions against microfilariae, *Dev.Comp.Immunol.*, Vol. 16, 41-48
- Liebler, D.C., Kling, D.S., Reed, D.J. (1986): Antioxidant protection of phospholipide bilayers by α -tocopherol, *J.Biol.Chem.*, Vol 261, 12114-12119
- Liochev, S.I. (1999): The mechanism of „Fenton-like“ reaction and their importance for biological systems, A biologist's view, *Metal.Ions.Biol.Syst.*, Vol.36, 1-39
- Lledías F, Rangel, P., Hansberg W. (1998): Oxidation of catalase by singlet oxygen, *J Biol.Chem* , Vol. 273, 10630-10637

- Maidt, M.L. i Floyd, R.A. (1996): Measurement of products of free radical attack on nucleic acids. In Punchard, N.A. i Kelly, F.J.Y. (eds): Free Radicals: A Practical Approach. IRL Press at Oxford University Press, 201-209
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005): Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J.Nutr.Biochem.*, Vol. 16, 577-586
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., De Castro, I.N. (1999): Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin.Biochem.*, Vol.32, 595-603
- Mathews, M.C., Summers, C.B., felton, G.W. (1997): Ascorbate peroxidase- a novel antioxidant enzyme in insects, *Arch.Isect.Biochem.Physiol.*, Vol. 34, 57-68
- Matsuo, Y., 2005. Extreme eye projection in the male weevil, *Exechesops leucopis* (Coleoptera: Anthribidae): its effect on intrasexual behavioral interferences, *Journal of Insect Behavior*, Vol. 18, 465–477.
- Matsuo, Y., 2006. Cost of prolonged diapause and its relationship to body size in a seed predator, *Functional Ecology*, Vol. 20, 300–306.
- Mazur, P.(1984): Freezing of living cells: Mechanisms and implication, *American J. Physiol.*, Vol.247, 125-142
- McCord, J.M. i Fridovich, I. (1968): The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase, *J.Biol.Chem.*, Vol. 243, 5753-5760
- McCord, J.M. i Fridovich, I. (1969): Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte Hemocuprein, *J.Biol.Chem.*, Vol.244, 6049-6055
- Meister A. (1994): Glutathion-Ascorbic Acid Antioxidant System in Animal, *Journal of biological Chemistry*, Vol. 269, 9397-9400
- Meredith P, Powell BJ, Riesz J, Nighswander-Rempel SP, Pederson MR & Moore EG (2006): Towards Structure-Property-Function Relationships for Eumelanin, *Soft Matter*, Vol. 2, 37–44.

- Michaud, R.M., Benoit, J.B., Lopez-Martinez, G., Elnitsky, M., Lee, R., Denlinger, D.L. (2008): Metabolomics reveals unique and shared metabolic changes in response to heat shock, freezing and desiccation in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*, *J.Insect Physiol.*, Vol. 57, 645-655
- Missirlis, F., Ulschmid, J.K., Hirose-Takamori, M., Gronke, S., Schafer, U., Becker, K., Phillips, J.P., Jackel, H. (2002): Mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductase variants encoded by a single *Drosophila* gene are both essential for viability, *J.Biol.Chem.*, Vol. 277, 11521-11526
- Mittal, C.K. i Murad, F. (1977): Activation of guanylate cyclase by superoxide-dismutase and hydroxyl radical- Physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol.74, 4360-4364
- Mittapalli, O., Neal J.J., Shukle R.H. (2007): Tissue and life stage specificity of glutathione S-transferase expression in the Hessian fly, *Mayetiola destructor*: Implications for resistance to host allelochemicals, *Journal of Insect Science*, Vol. 7, 1-13
- Møller, I.M. (2001): Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species, *Annu.Rev.Plant Biol.*, Vol. 52, 561-591
- Moon, J.C., Hah, Y.-S., Kim, W.Y., Jung, B.G., Jang, H.H., Lee, J.R., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Jeon, M.G., Kim, C.M., Cho, M.J., Lee, S.Y. (2005): Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype 2 that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death, *J.Biol.Chem.*, Vol. 280, 28775-28784
- Morales, A., Miranda, M., Sanchez-Reyes, A., Colell, A., Biete, A., Fernandez-Checa, J.C. (1998): Transcriptional regulation of the heavy subunit chain of γ -glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation *FEBS Lett.*, Vol. 427, 15-20
- Morgenthal K, Weckwerth W, Steuer R. (2006): Metabolomic networks in plants: transitions from pattern recognition to biological interpretation, *Biosystems*, Vol. 83, 108–17
- Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. eds. (1994), *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Mortensen, A., Skibsted, L. H., Sampson, J., Rice-Evans, C., and Everett, S. A. (1997): Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants, *FEBS Letters*, Vol. 418:91-97

- Napolitano, A., Di Donato, P., Prota, G. (2000): New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins: rearrangement vs. redox exchange reaction routes of a transient 2H-1,4-benzothiazine-o-quinonimine intermediate, *Biochim.Biophys.Acta-Gen Subjects*, Vol. 1475, 47-54
- Nappi, A.J. i Christensen B.M. (2005): Melanogenesis and associated cytotoxic reaction: Application to insect innate immunity, *Insect Biochem.Mol. Biol.*, Vol. 35, 443-459
- Nappi, A.J., i Vass, E. (1998): Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*, *J.Parasitol.*, Vol. 84, 1150-1157
- Nappi, A.J., i Vass, E. (2001): Cytotoxic reactions associated with insect immunity. In Beck, G. Sugumaran, M., Cooper, E.I. (Eds.), *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 329-348
- Neven, L. G., Duman, J. G., Beals, J. M. , Castellino, F. J. (1986): Overwintering adaptations of the stag beetle, *Ceruchus piceus*: removal of ice nucleators in winter to promote supercooling, *J.Comp. Physiol*, Vol. 156, 707–716
- Neven, L. G., Duman, J. G., Low, M. G., Sehl, L. C., Castellino, F. J. (1989): Purification and characterization of an insect haemolymph lipoprotein ice nucleator: evidence for the importance of phosphatidylinositol and apolipoprotein in the ice nucleator activity, *J.Comp. Physiol. B.*, Vol. 159, 71–82
- Osanai, M. and Yonezawa, Y. (1986): Changes in amino acid pools in the silkworm, *Bombyx mori* during embryonic life: Alanine accumulation and its conversion to proline during diapause, *Insect Biochem.*, Vol. 16, 373-379
- Pang, Q., Zhang, S., Shi, X., Su, F., Wu, D. (2005): Purification and characterisation of phenoloxidase from amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*, *Fish & Shellfish Immunology*, Vol.19, 139-148
- Papp, E., Nardai, G., Soti, C., Csermely, P. (2003): Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis, *Biofactors*, Vol. 17, 249-257
- Pardini, R.S. (1995): Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants, *Arch.Insect Biochem.Physiol*, Vol 29, 101-118

- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., Brenowitz, M. (2000): A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBPDNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding, *J.Mol.Biol.*, Vol 304, 55-68
- Pfister, T.D. i Storey, K.B. (2002): Protein kinase A: purification and characterization of the enzyme from two cold-hardy goldenrod gall insects, *Insect Biochem.Mol.Biol.*, Vol. 32, 505-515
- Pristos, C.A., Ahmad, S., Bowen, S.M., Elliot, A.J., Blomquist, G.J., Pardini, R.S: (1988): Antioxidant enzymes of the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*, and their response to the prooxidant allelochemical, quercetin, *Arch.Insect Biochem.Physiol.*, Vol. 8, 101-112
- Prota, G. (1992): Melanins and melanogenesis, Academic Press, New York
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, R.A. (1991): Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *J.Biol.Chem.*, Vol 266, 295-304
- Rand, J.D. i Grand, C.M. (2006): The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation, *Mol.Biol.Cell*, Vol. 17, 387-401
- Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F.H., Hemingway, J. (2001): Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*, *Biochem.J.*, Vol. 359, 295-304
- Renaut, J., Hoffmann, L, Hausman, J.-F. (2005): Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in polar plantlets, *Physiol.Plant.*, Vol. 125, 82-94
- Riley, P.A. (1993): Mechanistic aspects of the control of tyrosinase activity, *Pigm.Cell Res.*, Vol. 6, 182-185
- Riley, P.A. (1997): Melanin, *Int.J.Biochem. Cell Biol.*, Vol. 29, 1235-1239
- Rinehart, J.P. i Denlinger, D.L (2000): Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress, *Insect Mol Biol*, Vol. 9, 641-645.

- Rinehart, J.P., Li, A., Yocum, G.D., Robich, R.M., Hayward, S.A.L., Denlinger, D.L. (2007): Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause, *PNAS*, Vol. 104, 11130-11137
- Rivers, D.B., Lee Jr, R.E., Denlinger, D.L. (2000): Cold hardiness of the fly pupal parasitoid *Nasonia vitripennis* is enhanced by its host, *Sarcophaga crassipalpis*, *J.Insect Physiol.*, Vol. 46, 99-106
- Salo, D.C., Pacifici, R.E., Lin, S.W., Giulivi, C., Davies, K.J.A. (1990): Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation, *J. Biol. Chem.*, Vol. 265, 11919–11927.
- Salt, R. W. (1962): Intracellular freezing in insects, *Nature*, Vol 193, 1207–1208.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Gracia-Canovas, F., Gracia-Carmona, F. (1995): Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, *Biochim.Biophys.Acta*, Vol. 1247, 1-11
- Sarzanini, C., Mentasti, E., Abollino, O., Fasano, M (1992): Metal ion content in sepia-officinalis melanin, *Marine Chem*, Vol. 39, 243
- Siems, W.G., Grune, T., Esterbauer, H. (1995): 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine, *Life Sci.*, Vol.57, 785-789
- Simić, M.G., Bergtold, D.S., Karam, L.R. (1989): Generation of oxy radicals in biosystems, *Mutat. Res.*, Vol. 214, 3-12
- Sláma, K, Denlinger, D.L. (1992): Infradian cycles of oxygen consumption in diapausing pupae of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, monitored by a scanning microrespirographic method, *Arch.Insect Biochem.Physiol.*, Vol. 20, 135-140
- Sømme, L. i Block, W. (1982): Cold tolerance of Collembola at Signy Island, *Maritime Antarctic. Oikos*, Vol. 38, 168–176
- Sømme, L (1982): Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods, *Comp.Biochem.,Physiol.*, Vol. 73A, 519-543
- Stadtman, E.R: (1990): Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanisms and biological consequences, *Free Radic.Biol.Med.*, Vol 9, 315-325

- Stadtman, E.R. (2004): Role of oxidant species in aging, *Curr.Med.Chem.*, Vol. 11, 1105-1112
- Stanić, B. (2003): Antioksidativni sistem insekata: uloga askorbata i pentozofosfatnog puta, na modelu *Ostrinia nubilalis*, *Magistarska teza*, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad
- Stanić, B., Jovanović-Galović, A., Blagojević, D., Grubor-Lajšić, G., Worland, R., Spasić, M.B. (2004): Cold hardiness in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae): Glycerol content, hexose monophosphate shunt activity and antioxidative defense system, *Europ.J.Entomol.*, Vol. 101, 459-466
- Steele, J.E. (1985): Control of metabolic processes. In: Kekurt, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Vol. 8. Pergamon Press, Oxford, pp. 99–146
- Steuer R, Kurths J, Fiehn O, Weckwerth W. (2003): Observing and interpreting correlations in metabolomic networks, *Bioinformatics*, Vol.19, 1019–1026
- Steuer, R. (2006): On the analysis and interpretation of correlation in metabolomic data, *Briefings in Bioinformatics*, Vol. 7, 151-158
- Storey, K.B. (2004): Biochemistry of carbohydrate protectants, in *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 479-492
- Storey, K.B, Keefe, D., Kourtz, L., Storey, J.M. (1991): Glucoso-6-phosphate dehydrogenase in cold hardy insect: kinetic properties, freezing stabilization, and control of hexose monophosphate shunt activity, *Insect.Biochem.*, Vol.21, 157-164
- Storey, K.B. i Storey, J.M. (1986): Winter survival of gall fly larvae, *Eurosta solidaginis*: profiles of fuel reserves and cryoprotectants in a natural population, *J. Insect Physiol.*, Vol. 32, 549-556
- Storey, J.M., Storey, K.B. (1990): Carbon balance and energetics of cryoprotectant synthesis in a freeze-tolerant insect: responses to perturbation by anoxia, *J.Compar.Physiol B.*, Vol. 160, 77-84
- Storey, K.B. i Storey, J.M. (2001): Hibernation: Poikilotherms. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd., Nature Publishing Group
- Sweeley, C.C., Bently, R., Makita, M., Wells, W.W. (1963): Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances, *J.Am.Chem.Soc.*, Vol. 85, 2497-2506

- Tenow, O. i Nilssen, A. (1990): Egg cold hardiness and topoclimatic limitations to the outbreaks of *Epirrita autumnata* in northern Fennoscandia, *J.Appl.Ecol.*, Vol. 27, 723–734.
- Thannickal, V.J. i Fanburg, B.L. (2000): Reactive oxygen species in cell signaling, *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.*, Vol. 279, L1005-L1028
- Tiziani, S., Lodi, A., Ludwig, C., Parsons, H.M., Viant, M.R. (2008): Effects of the application of different window functions and projection methods on processing of H-1 J-resolved nuclear magnetic resonance spectra for metabolomics, *Anal.Chim.Acta*, Vol. 610, 80-88.
- Urabe, K., Aroca, P., Tsukamoto, K., Mascagna, D., Palumbo, A., Prota G., Hearing, V.J. (1994): The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol.1221, 272–278
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol.Cell.Biochem.*, Vol. 266, 37-56
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 39, 44-84
- Vernon, P i Vannier, G. (2002): Evolution of freezing susceptibility and freezingn tolerancen in terrestrial arthropods, *R.Biologies*, Vol. 325, 1185-1190
- Voehringer, D.W., Hirschberg, D.L., Xiao, J., Lu, Q., Roederer, M., Lock, C.B. (2000): Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, Vol. 97, 2680-2685
- Vronová, E., Inzé, D., van Breusegem, F. (2002): Signal transduction during oxidative stress, *J.Exp.Bot.*, Vol. 53. 1227-1236
- Warton, D.A. i Block, W. (1997): Differential scanning calorimerty studies on an Antarctic nematode (*Panagrolaimus davidi*) wich survives intracellular freezing, *Cryobiology*, Vol.34, 114-121
- Watanabe, M. (2006): Anhydrobiosis in invertebrates, *App.Entomol.Zool.*, Vol. 41, 15-31

- Watanabe, M. i Tanaka, K. (1997) : Potoperiodic control of adult diapause, cold hardiness, and inositol accumulation in a beetle, *Aulacophora nigripennis* (Coleoptera, Chrysomelidae), *Zool.Sci.*, Vol. 14, 233-237
- Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., i ostali (2007): HMDB: the Human Metabolome Database, *Nucleic Acids Res.*, Vol 35, D521-D526
- Worland, M. R., Grubor-Lajšić, G. , Montiel, P. O. (1998) Partial desiccation induced by sub-zero temperatures as a component of the survival strategy of the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Tullberg), *J.Insect Physiol.*, Vol. 44, 211–219.
- Worland, M.R. (1996): The relationship between water content and cold tolerance an the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Collembola: *Onychiuridae*), *EUR.j.Entomol.*, Vol. 93, 341-348
- Worland, R.W., Block, W., Grubor-Lajšić, G. (2000): Survival of *Heleomyza borealis* (Diptera, Heleomyzidae) larvae down to -60°C, *Physiol.Entomol.*, Vol. 25, 1-5
- Wu, H.F., Southam, A.D., Hines, A., Viant, M.R. (2008): High-throughput tissue extraction protocol for NMR and MS-based metabolomics, *Anal Biochem*, Vol. 372, 204-212.
- Yost, F. i Fridovich, I. (1973): An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*, *J.Biol.Chem.*, Vol. 248, 4905-4908
- Zachariassen, (1985): Physiology of cold tolerance in insects, *Physiol.Rev.*, Vol. 65, 799-832
- Zeigler, D.M. (1985): Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation, *Annu.Rew.Biochem.*, Vol. 54, 305-329
- Zeng, J.-P., Ge, F., Su, J.-W., Wang, Y. (2008): The effect of temperature on diapause and cold hardiness of *Dendrolimus tabulaeformis* (Lepidoptera:Lasiocampidae), *Eur.J.Entomol.*, Vol. 105, 299-606

BIOGRAFIJA



Danijela K. Kojić rođena je 16. aprila 1973. godine u Kragujevcu. Osnovne studije upisala je školske 1992/1993. godine na Hemijskom fakultetu, smer Biohemija, Univerzitet u Beogradu. Diplomirala je 1996. godine sa prosečnom ocenom 9.76 i ocenom 10 na diplomskom radu sa temom »Karakterizacija alkalne fosfataze izolovane iz *E.coli*«. Nosilac je diplome Univerziteta u Beogradu kao najboljeg studenta generacije Hemijskog fakulteta koji je diplomirao u školskoj 1996/97. godini, kao i diploma Srpskog Hemijskog Društva i »Đorđa Stefanovića« koju dodeljuje Katedra za biohemiju i NN Hemijskog fakulteta najboljem studentu svoje generacije.

Magistarske studije upisala je 1996. godine na Hemijskom fakultetu, smer Biohemija, Univerzitet u Beogradu. Magistrirala je 30. maja 2000. godine sa prosečnom ocenom 10 i tezom »Karakterizacija Na,K-ATPaze i Mg-ATPaze plazma membrana nervnih završetaka mozga pacova adsorbovanih na polistirensku podlogu«. Eksperimentalni deo teze radila je na Institutu za nuklearne nauke »Vinča«, Laboratorija za fizičku hemiju, pod mentorstvom dr Vesne Vasić, gde je i bila zaposlena kao istraživač-pripravnik preko tržišta rada. U zvanje istraživač saradnik birana je 2002.

U periodu od 2002-2005 bila je angažovana na projektu »Fizičko hemijska ispitivanja mehanizama reakcija biološki aktivnih organskih jedinjenja« (br. 1991), a trenutno je na projektu »Uloga redoks aktivnih supstanci u procesima održavanja homeostaze živih sistema« (br. 143034), Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj.

Od 1. oktobra 2004. birana je u zvanje i zanovala je radni odnos na mesto asistenta uža naučna oblast Biohemija na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Pod mentorstvom prof.dr Gordane Grubor-Lajšić u laboratoriji za Biohemiju, Departmana za biologiju i ekologiju bavi se problematikom otpornosti insekata na niske temperature, kao i problematikom oksidativnog stresa i sistemom antioksidativne zaštite.

Do sada je objavila 6 radova u međunarodnim, od toga dva u vrhunskim međunarodnim časopisima, i 3 u nacionalnim naučnim časopisima. Autor je i ko-autor mnogobrojnih saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RDB

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska publikacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Kojić Danijela
AU

Mentor: Dr Gordana Grubor-Lajšić, redovni profesor,
MN Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Naslov rada: Otpornost na niske temperature i dehidraciju
NR kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis* Hb)- ćelijski i molekularni odgovori

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2009.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, PMF,
MA Trg Dositeja Obradovića 2

Fizički opis rada: poglavlja (8); str. (163); tabela (11); grafikona (28);
FO slika (2); šema (10) lit. navoda (213);

Naučna oblast: Biologija
NO

Naučna disciplina: Biohemija
ND

Ključne reči: insekti, kukuruzni plamenac, otpornost na hladnoću,
KR dehidratacija

Univerzalna decimalna klasifikacija:
UDK

Čuva se: Biblioteka Dept. za biologiju i ekologiju, PMF,
ČU Novi Sad

Važna napomena: nema
VN

Izvod:

Kukuruzni plamenac, *Ostrinia nubilalis* Hb, je insekt umerenog klimatskog područja koji niske zimske temperature preživljava ulaskom u dijapauzu u stadijumu gusenice. Tokom dijapauze gusenice postaju otporne na hladnoću i sposobne da prežive vanćelijsko zamrzavanje telesne tečnosti.

Cilj ove teze je bio razumevanje mehanizama otpornosti na niske temperature gusenica *O. nubilalis* na ćelijskom i molekularnom nivou.

Istraživanja su rađena na letnjim, nedijapauzirajućim gusenicama kao i zimskim gusenicama koje su bile izlagane uticaju niskih temperatura u različitim periodima dijapauze. Određivan je režim telesne vode, sadržaj poliola i šećera kao mogućih krioprotektora, kao i NMR metabolomički profili. Zbog pretpostavljene uloge antioksidativnog sistema zaštite (ADS) u procesima vezanim za otpornost na hladnoću određivane su aktivnosti određenih antioksidativnih enzima kao i produkcija H₂O₂ i melanina.

Rezultati ukazuju da je izlaganje niskim temperaturama kod dijapauzirajućih gusenica praćeno preraspodelom osmotski aktivne (OA) vode na nivou hemolimfe i masnog tela, pri čemu nivo OA opada u hemolimfi, a raste u masnom telu. Nivo osmotski neaktivne vode (OI) ostaje nepromenjen.

Nivo glicerola je značajno veći kod dijabazirajućih u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice, a njegov nivo se višestruko povećava pri izlaganju niskim temperaturama na sredini dijabauze ukazujući na njegov značaj kao glavnog krioprotektora u ovoj fazi dijabauze. Krajem dijabauze sa niskim temperaturama višestruko se povećava nivo trehaloze, glukoze i fruktoze, a tek neznatno glicerola.

NMR metabolomički profili su potvrdili značaj glicerola u otpornosti na hladnoću, ali i aminokiselina alanina i prolina. U nedijapuzirajućim i dijabauzirajućim gusenicama na 5°C registrovano je prisustvo putrescina, poznatog markera stresa, a njegova uloga, kao i moguća uloga njegovih daljih metabolita spermina i spermidina tek treba da se ispita.

Odgovor ADS-a na niske temperature takođe je zavistan od perioda dijabauze. Na sredini dijabauze, na temperaturi od -3°C, a ne i na -16°C, dolazi do povećanja koncentracije H₂O₂ i signala melanin radikala, dok aktivnost katalaze i CuZnSOD, ali ne i MnSOD, opada. Kako je glavni izvor H₂O₂ mitohondrijalna MnSOD, ovaj enzim je verovatno uključen u regulaciju unutarćelijskog nivoa H₂O₂. Produkcija melanina verovatno je u funkciji odbrane organizma od oksidativnog stresa zbog uklanjanja intracelularnog H₂O₂. Predpostavljamo da je temperatura od -3°C ključna temperatura za pokretanje adaptivnih mehanizama za otpornost na hladnoću gusenica *O.nubilalis*. Promene u ADS sa izlaganjem niskim temperaturama nisu primećene na kraju dijabauze.

Rezultati ove teze ukazuju da je dijabauza dinamično stanje podeljeno na faze, a sama otpornost na hladnoću dobro regulisana i usklađena sa ukupnim metaboličkim potrebama tokom dijabauze.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

Predsednik: dr Duško Blagojević, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd

Član: dr Gordana Grubor-Lajšić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, mentor

Član: dr Dušan Stevanović, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, mentor

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monograph type

Type of record:

TR

Printed text

Contents code:

CC

PhD Thesis

Author:

AU

Danijela Kojić

Mentor:

MN

dr Gordana Grubor-Lajšić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad

Title:

TL

Cold hardiness and dehydration of European corn Borer (*Ostrinia nubilalis*): molecular and cell mechanisme

Language of text:

LT

Serbian

Language of abstract:

LA

Serbian/English

Country of publication:

CP

Serbia

Locality of publication:

LP

Vojvodina

Publication year:

PY

2009.

Publisher:

PU

Author's reprint

Publ. Place: Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty
PP of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2

Physical description: chapters (8), pages (163), figures (2), schemes (10),
PD tables (11), graphs (28), references (213)

Scientific field: Biology
SF

Scientific discipline: Biochemistry
SD

Key words: insect, European corn, cold hardiness, dehydration
KW

Universal decimal classification:
UDC

Holding data: The Library of Dept. of Biology and Ecology, Faculty
HD of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja
Obradovića 2, 21000 Novi Sad, SCG

Note:
N

Abstract:
AB

European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hb, is insect species of the temperate zone that survives low winter temperatures as a diapausing larva. Diapausing larvae are cold hardy and tolerate the formation of extracellular ice crystals.

The aim of this thesis was to investigate the cellular and molecular basis of *O. nubilalis* cold hardiness.

Thus, our research was focused on the non-diapausing (ND) as well as the diapausing (D) larvae that were exposed to low temperatures during different diapausal phases. Body water management, content of polyols and sugars as well as metabolomic NMR profiles, were assessed. Because of the possible role of the antioxidant defence system (ADS) in insects' cold hardiness, antioxidant enzymes activity as well as the content of H₂O₂ and melanin was measured.

Results showed that the exposure of diapausing larvae to low temperatures provokes exchanges of osmotically active (OA) body water between hemolymph and fat body. With low temperatures, OA water was decreased in hemolymph, increased in fat body while the content of osmotically inactive (OI) water was constant.

The level of glycerol was higher in diapausing compared to non-diapausing larvae, and showed 2-fold increase with the exposure to low temperatures in mid-diapause. This confirmed that glycerol is

O.nubilalis major cryoprotectant in mid-diapause cold hardiness. On the other hand, at the end of the diapause, the content of trehalose, glucose and fructose, except the glycerol, was substantially increased.

NMR metabolic profiling confirmed the importance of glycerol in diapausal cold hardiness as well as implied the importance of alanine and proline. In addition to this, putrescine, a well-know stress marker, were detected in ND and D larvae at 5 °C suggesting that its metabolites, namely sperimine and spermidine, can have potential role in diapause.

The ADS response to low temperatures differs during diapause timescale. In mid- diapause, exposure of larvae to -3°C, but not -16°C, resulted in the elevation of H₂O₂ concentration and melanin radical signal. On the other hand, the activity of catalase and CuZnSOD, but not of MnSOD, was decreased. Since the mitochondrial MnSOD is the main source of H₂O₂, this enzyme probably regulates the intracellular level hydrogen peroxide. Melanin probably serves as a defence mechanism against oxidative stress while it reduces the level of intracellular H₂O₂. Temperature of -3°C is probably the ‘trigger temperature’ for mechanism in adaptation of larvae *O.nubilalis* to cold. There were no changes detected in ADS during exposure to cold in the end of diapausing period.

The results of this thesis suggested that the *O. nubilalis* diapause is rather dynamic state divided into different phases and that the cold hardiness is highly regulated and in accordance with the current metabolic demands of each diapausal phase.

Accepted by the Scientific Board on:

ASB

Defended:

DE

Thesis defends board:

DB

President: dr Duško Blagojević, Principal Research Fellow,
Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Beograd

Member: dr Gordana Grubor-Lajšić, Full Professor,
Faculty of Sciences, University of Novi Sad, mentor

Member: dr Dušan Stevanović, Full Professor,
Faculty of Sciences, University of Novi Sad