

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Dragana R. Matić

**POTENCIJALNA ULOGA GUBARA
(*LYMANTRIA DISPAR*, L.) KAO
BIOINDIKATORA ZAGAĐENOSTI
ŽIVOTNE SREDINE: UTICAJ
HRONIČNOG IZLAGANJA KADMIJUMU
NA RAZVIĆE, AKTIVNOSTI
DIGESTIVNIH ENZIMA SREDNJEG
CREVA, MEHANIZME
DETOKSIFIKACIJE I STEPEN
OŠTEĆENJA DNK**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Dragana R. Matic

**POTENTIAL ROLE OF GYPSY MOTH
(*LYMANTRIA DISPAR*, L.) AS A
BIOINDICATOR OF ENVIRONMENTAL
POLLUTION: THE IMPACT OF CADMIUM
CHRONIC EXPOSURE ON THE
DEVELOPMENT, MIDGUT DIGESTIVE
ENZYME ACTIVITIES, DETOXIFICATION
MECHANISMS AND DNA DAMAGE
LEVEL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTORI

dr Milena Vlahović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Siniša Đurašević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA

dr Milena Vlahović, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Siniša Đurašević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Vesna Perić Mataruga, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Larisa Ilijin, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Stoimir Kolarević, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za fiziologiju i biohemiju insekata Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta “Uticaj magnetnih polja i drugih sredinskih faktora na fiziološke odgovore i ponašanje različitih vrsta” i potprojekta “Odgovori fitofagnih štetnih insekata na sredinske stresore” (broj 173027), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Delovi eksperimenta izvedeni su na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na Katedri za mikrobiologiju u Centru za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju i na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu na Katedri za analitičku hemiju.

Zahvalnica

Ovom prilikom želim da izrazim zahvalnost:

Mojoj mentorki, dr Mileni Vlahović, za veliki entuzijazam i uloženi trud u osmišljavanju disertacije i organizaciji eksperimenata, kao i za sve što sam od nje naučila tokom različitih faza rada. Zahvalna sam što je uvek verovala u moje sposobnosti, za pohvale koje nikada nisu izostajale, ali i za neprocenjivu pomoć i usmeravanje kada sam nailazila na teškoće, za oslonac koji sam u njoj imala, kao i za odnos pun poštovanja i razumevanja.

Dr Siniši Đuraševiću, mentoru, za podršku tokom doktorskih studija i za konstruktivne primedbe i sugestije koje su doprinele kvalitetu disertacije.

Dr Vesni Perić Mataruga, rukovodiocu Odeljenja za fiziologiju i biohemiju insekata, koja mi je pružila priliku da se pridružim njenom timu, za brižnost i strpljenje, za sve dragocene savete, diskusije i bezrezervnu podršku, za atmosferu koja podrazumeva uvažavanje individualnosti i kreativnosti, za visoke radne i etičke standarde koji su me motivisali da se trudim i postizem više.

Dr Larisi Ilijin za slobodu da u bilo kom trenutku zatražim pomoć ili savet, za podsticajne razgovore, za nepresušni optimizam i dobru atmosferu, za nesebični doprinos u svim fazama realizacije doktorata.

Dr Branki Vuković Gačić za gostoprimstvo u Centru za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, za uspešnu saradnju i korisne savete.

Dr Jeleni Mutić sa Katedre za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta u Beogradu za pomoć tokom eksperimenta i za korisne sugestije tokom pisanja ove disertacije.

Dr Stoimiru Kolareviću za pomoć, objašnjenja i sve detaljne odgovore tokom eksperimenta u Centru za genotoksikologiju i ekogenotoksikologiju na Biološkom fakultetu, za prijatnu atmosferu, za vredne komentare koji su unapredili ovaj rad.

Dr Nebojši Jasniću za izuzetnu profesionalnost, za uloženi trud i veoma korisne korekcije i sugestije koje su doprinele da disertacija dobije svoju konačnu formu.

Dr Mariji Mrdaković za vredne savete i pomoć u eksperimentalnom radu, za prijateljsku podršku i brižnost, za brojne zanimljive razgovore i diskusije.

Dr Dajani Todorović, koja je od prvog dana bila tu da me sasluša i ohrabri. Hvala za veliku podršku, za pomoć tokom izvođenja eksperimenata i za pauze ispunjene smehom.

Anji Grčić i Aleksandri Filipović za divno prijateljstvo, za spremnost da podele sa mnom sve od znanja do ručka, za pomoć i pre nego što stignem da je zatražim i za sve one zabavne bezbrižne trenutke.

Dr Mileni Janković Tomanić, dr Dejanu Mirčiću, dr Zlatku Proliču i preminuloj dr Veri Nenadović za podršku, inspirativne razgovore i dobru atmosferu.

Mojim prijateljima Jeleni, Barbari, Vladi, Ivanu, Ceci, dvema Ivanama, Ani, Jovani, Marku i Zorici što su me uvek razumeli, podržavali i motivisali.

Mojoj porodici za svu ljubav, beskrajnu podršku i strpljenje.

Potencijalna uloga gubara (*Lymantria dispar*, L.) kao bioindikatora zagađenosti životne sredine: uticaj hroničnog izlaganja kadmijumu na razviće, aktivnosti digestivnih enzima srednjeg creva, mehanizme detoksifikacije i stepen oštećenja DNK

Rezime

Razvoj industrije i poljoprivrede, kao i globalna urbanizacija, doveli su do pojave velikog broja polutanata u životnoj sredini, među kojima je i izuzetno toksični teški metal kadmijum. Cilj ove disertacije bila je procena larvi gubara (*Lymantria dispar*, L.) kao potencijalnog bioindikatora zagađenosti kadmijumom. Ispitani su odgovori izabranih fizioloških parametara na različitim nivoima biološke organizacije u prisustvu dve koncentracije metala (50 i 100 µg Cd/g suve hrane). Radi ispitivanja efekta porekla populacije, legla gubara sakupljena su na dve nezagađene lokacije (Kosmaj i Homoljske planine) i dve zagađene (pored Ibarske magistrale i borskog rudnika). Larve sa Kosmaja odlikuje veća osetljivost digestivnih enzima srednjeg creva (proteaza, alkalnih i kiselih fosfataza i nespecifičnih esteraza) na tretmane, naročito na nižu koncentraciju kadmijuma, u odnosu na one uz Ibarsku magistralu. Od ispitanih detoksifikacionih mehanizama u crevu, indukcija Hsp70 značajnija je kod kosmajskih larvi, a sinteza metalotioneina kod ibarskih. Trend sniženja aktivnosti antioksidativnih enzima, superoksid dismutaze i katalaze, uočen je kod obe populacije. U svim grupama tretiranim kadmijumom najveća količina ovog metala eliminiše se putem fecesa, ali intenzivnije u ibarskoj populaciji u odnosu na kosmajsku nakon tretmana sa 50 µg Cd/g suve hrane. Kod homoljskih gusenica tretmani kadmijumom doveli su do povećanja nivoa oštećenja DNK u hemocitama i dozno-zavisnog sniženja njihove vijabilnosti, dok je u populaciji iz Bora zabeleženo samo smanjenje vijabilnosti nakon primene više koncentracije metala. Štetni efekti kadmijuma i visoka cena detoksifikacionih mehanizama odrazili su se i na osobine fitnesa u vidu promena mase larvi, relativne brzine rasta i trajanja razvića kod svih populacija u različitom stepenu. Primena većine ispitanih parametara (specifične aktivnosti tripsina, nelizozomskih kiselih fosfataza i nespecifičnih esteraza, nivoa ekspresije Hsp70, vijabilnosti hemocita i nivoa oštećenja DNK) kao biomarkera zagađenosti životne sredine kadmijumom ograničena je na osetljive populacije gubara koje prethodno nisu bile izložene polutantima, dok bi koncentracija metalotioneina mogla biti podobna kao biomarker kod populacija sa lokacija kontaminiranih tokom dužeg perioda.

Ključne reči: *Lymantria dispar*, L.; kadmijum; digestivni enzimi; antioksidativni enzimi; Hsp70; metalotionein; akumulacija kadmijuma u tkivima; genotoksičnost; osobine fitnesa; biomarkeri

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija

Potential role of gypsy moth (*Lymantria dispar*, L.) as a bioindicator of environmental pollution: the impact of cadmium chronic exposure on the development, midgut digestive enzyme activities, detoxification mechanisms and DNA damage level

Abstract

Industrial and agricultural development as well as global urbanization have caused considerable increase in the environmental pollution including extremely toxic heavy metal cadmium. The aim of this dissertation was to evaluate gypsy moth (*Lymantria dispar*, L.) larvae as bioindicators of cadmium contamination. Parameters at different levels of biological organization were assessed after chronic exposure of larvae to the metal (50 and 100 µg Cd/g dry food). To investigate the effects of population origin, gypsy moth egg-masses were collected from two unpolluted localities on Kosmaj and Homolje mountains and two polluted sites near the busy Ibar highway and Bor copper mine. Midgut digestive enzymes (proteases, alkaline and acid phosphatases and nonspecific esterases) of Kosmaj larvae were more sensitive to cadmium, especially to lower metal concentration, compared to those of Ibar larvae. Hsp70 induction was the most prominent midgut detoxification mechanism against cadmium in the population from the unpolluted forest, whereas metallothionein synthesis was the most significant in larvae from the polluted site. Activities of antioxidative enzymes, superoxide dismutase and catalase, exhibited a decreasing trend in both populations. The primary route of cadmium elimination was via feces in all metal-fed groups, but after an exposure to 50 µg Cd/g dry food metal content was significantly higher in feces of Kosmaj larvae compared to those from the highway locality. Exposure of caterpillars from the Homolje mountains to the metal led to the higher level of DNA damage in the hemocytes and a dose-dependent decrease in cell viability, whereas in Bor population only hemocyte viability was reduced after the treatment with 100 µg Cd/g dry food. Devastating cadmium effects and energetically expensive detoxification mechanisms affected the fitness traits (larval mass, relative growth rate or development parameters) in all populations. The application of selected parameters (specific activities of trypsin, nonlisosomal acid phosphatases and nonspecific esterases, Hsp70 expression, hemocyte viability and DNA damage level) as biomarkers of environmental cadmium pollution is limited mostly to sensitive populations that have not been previously exposed to pollutants. Metallothionein concentration might be suitable as a biomarker for the populations at locations that have been contaminated for a long period.

Key words: *Lymantria dispar*, L.; cadmium; digestive enzymes; antioxidative enzymes; Hsp70; metallothionein; cadmium accumulation in tissues; genotoxicity; fitness traits; biomarkers

Research area: Biology

Area of special interest: Physiology

LISTA SKRAĆENICA

ADP	adenozin difosfat
Al	aluminijum
ALP	alkalne fosfataze
ANOVA	jednofaktorska analiza varijanse
AO	akridin oranž
As	arsen
ATP	adenozin trifosfat
ATSDR	<i>The Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
BSA	albumin iz goveđeg seruma (engl. bovine serum albumin)
Ca	kalcijum
CaCl ₂	kalcijum hlorid
CbE	karboksilesteraze
CBP	engl. cathepsin B-like protease
Cd	kadmijum
CdS	kadmijum sulfid
Cu	bakar
CuZn SOD	bakar-cink superoksid dismutaza
Cys	cistein
DL-BAPNA	<i>N</i> _α -benzoil-DL-arginin 4-nitroanilid hidrohlorid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EB	etidijum bromid
ECL	pojačana hemiluminiscencija (engl. enhanced chemiluminescence)
EDTA	etilen diamin tetra sirćetna kiselina (engl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	engl. enzyme linked immuno sorbent assay
ER	endoplazmatični retikulum
ESD	test (engl. extreme studentized deviate test)
EST-C	katodna esteraza
Fe	gvožđe
FeCl ₃	gvožđe (III) hlorid
gER	granulirani endoplazmatični retikulum
Gly	glicin
GSH	glutation
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
HCl	hlorovodonična kiselina
HNO ₃	azotna kiselina
HRP	peroksidaza iz rena (engl. horseradish peroxidase)
hsc70	konstitutivni protein toplotnog šoka 70 (engl. heat shock cognate protein 70)
Hsp	protein toplotnog šoka (engl. heat shock protein)
Hsp70	protein toplotnog šoka 70 (engl. heat shock protein 70)
IARC	<i>International Agency for Research Cancer</i>
IBR	Integrisani odgovor biomarkera (engl. integrated biomarker response)
ICP-OES	optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom (engl. inductively coupled plasma optical emission spectrometry)

K	kalijum
$K_3Fe(CN)_6$	kalijum heksacijanoferat (III)
KCl	kalijum hlorid
LAP	leucin aminopeptidaza
LMP	niska tačka topljenja (engl. low melting point)
LSD	engl. Fisher's least significant difference test
M_F	finalna masa larvi na dan žrtvovanja (trećeg dana IV i V stupnja)
Mg	magnezijum
$MgCl_2$	magnezijum hlorid
Mn SOD	mangan superoksid dismutaza
Mn	mangan
M_P	početna masa larvi (prvog dana IV i V stupnja)
MRE	engl. metal response element
MTF-1	engl. metal response element-binding transcription factor-1
MtnA-E	izoforme metalotioneina A-E
Na	natrijum
Na_2CO_3	natrijum karbonat
NaCl	natrijum hlorid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaF	natrijum fluorid
$NaHCO_3$	natrijum bikarbonat
$NaNO_2$	natrijum nitrit
NaOH	natrijum hidroksid
Ni	nikl
NMP	normalna tačka topljenja (engl. normal melting point)
NP	populacija sa nezagađene lokacije
Pb	olovo
PBS	fosfatom puferisani fiziološki rastvor (engl. phosphate-buffered saline)
PBST	fosfatom puferisani fiziološki rastvor sa Tween 20 (engl. phosphate-buffered saline with Tween 20)
PCA	analiza glavnih komponenti (engl. principal component analysis)
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluorid (engl. phenylmethylsulfonyl fluoride)
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenil fosfat
PUZ	pufer za obradu uzorka
RF	radiofrekventni
RGR	relativna brzina rasta (engl. relative growth rate)
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne vrste kiseonika (engl. reactive oxygen species)
SDS PAGE	natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SDS	natrijum dodecil sulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SH	sulfhidrilna (tiolna) grupa
SOD	superoksid dismutaza
SVD	engl. singular value decomposition
TBS	Tris pufer (engl. tris buffered saline)
TBST	Tris pufer sa dodatkom Tween 20 (engl. Tris bufferd saline with Tween 20)

TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TI	intenzitet repa (engl. tail intensity)
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UPR	engl. unfolded protein response
Zn	cink
ZnS	cink sulfid
ZP	populacija sa zagađene lokacije

SADRŽAJ

<u>1. UVOD.....</u>	<u>1</u>
1.1. Kadmijum.....	1
1.2. Mehanizmi toksičnosti kadmijuma	2
1.3. Uticaj kadmijuma na digestivne enzime insekata	4
1.3.1. Proteaze.....	5
1.3.2. Fosfataze	6
1.3.2.1. Alkalne fosfataze	6
1.3.2.2. Kisele fosfataze.....	7
1.3.3. Esteraze	9
1.4. Odbrambeni odgovor na intoksikaciju kadmijumom.....	10
1.4.1. Antioksidativni enzimi – superoksid dismutaza i katalaza	10
1.4.2. Hsp70	12
1.4.3. Metalotioneini	13
1.5. Akumulacija kadmijuma u organizmu insekata i njegova eliminacija.....	15
1.6. Genotoksičnost kadmijuma i značaj u ekotoksikologiji.....	15
1.7. Efekti kadmijuma na osobine fitnesa insekata	17
1.8. Biomarkeri u ekotoksikologiji.....	18
<u>2. CILJEVI.....</u>	<u>21</u>
<u>3. MATERIJAL I METODE.....</u>	<u>22</u>
3.1. <i>Lymantria dispar</i> , L. (gubar).....	22
3.2. Eksperimentalne grupe i uslovi gajenja.....	22
3.3. Eksperiment I	24
3.3.1. Detekcija aktivnosti digestivnih enzima	24
3.3.1.1. Priprema homogenata srednjeg creva	24
3.3.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje specifične aktivnosti digestivnih enzima.....	25
<i>Tripsin</i>	25
<i>Leucin aminopeptidaza (LAP)</i>	25
<i>Ukupne proteaze</i>	25
<i>Alkalne fosfataze</i>	25

<i>Ukupne kisele fosfataze</i>	26
<i>Lizozomske i nelizozomske kisele fosfataze</i>	26
<i>Nespecifične esteraze</i>	26
3.3.1.3. Zimogramska detekcija aktivnosti digestivnih enzima	26
<i>Tripsin</i>	26
<i>Leucin aminopeptidaza (LAP)</i>	27
<i>Ukupne proteaze</i>	27
<i>Alkalne fosfataze</i>	28
<i>Ukupne kisele fosfataze</i>	28
<i>Nespecifične esteraze</i>	28
3.3.2. Detekcija aktivnosti antioksidativnih enzima u srednjem crevu	29
3.3.2.1. Priprema homogenata	29
3.3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje specifične aktivnosti antioksidativnih enzima	
.....	29
<i>Superoksid dismutaza (SOD)</i>	29
<i>Katalaza</i>	29
3.3.2.3. Detekcija aktivnosti antioksidativnih enzima nativnom elektroforezom	30
<i>Superoksid dismutaza (SOD)</i>	30
<i>Katalaza</i>	30
3.3.3. Detekcija Hsp70	30
3.3.3.1. Detekcija Hsp70 u srednjem crevu Western blotom	30
3.3.3.2. Određivanje nivoa Hsp70 u mozgu	31
<i>Priprema homogenata</i>	31
<i>Western blot</i>	31
<i>Indirektni ELISA test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)</i>	32
3.3.4. Određivanje koncentracije metalotioneina u srednjem crevu	32
3.3.5. Određivanje sadržaja kadmijuma i drugih metala u crevu, glavi, integumentu i fecesu	
.....	33
3.3.5.1. Aparatura.....	33
3.3.5.2. Reagensi	33
3.3.5.3. Priprema uzoraka	33
3.3.6. Analiza osobina fitnesa	34
3.4. Eksperiment II	34
3.4.1. Procena vijabilnosti hemocita i oštećenja DNK u njima.....	34
3.4.1.1. Priprema uzorka	34

3.4.1.2. Test ćelijske vijabilnosti	35
3.4.1.3. Komet test	35
3.4.3. Analiza osobina fitnesa	36
3.4.4. Integrisani odgovor biomarkera	36
3.5. Statistička obrada rezultata.....	37

4. REZULTATI **39**

4.1. Efekti kadmijuma na digestivne enzime u srednjem crevu	39
4.1.1. Proteaze	39
4.1.1.1. Specifična aktivnost i izoforme tripsina.....	39
4.1.1.2. Specifična aktivnost i izoforme leucin aminopeptidaze (LAP)	40
4.1.1.3. Specifična aktivnost i izoforme ukupnih proteaza	42
4.1.2. Fosfataze	45
4.1.2.1. Specifična aktivnost i izoforme alkalnih fosfataza	45
4.1.2.2. Specifična aktivnost i izoforme kiselih fosfataza.....	46
<i>Ukupne kisele fosfataze</i>	46
<i>Nelizozomske fosfataze</i>	48
<i>Lizozomske fosfataze</i>	49
4.1.3. Specifična aktivnost i izoforme nespecifičnih esteraza.....	50
4.2. Efekti kadmijuma na enzime antioksidativne zaštite	53
4.2.1. Specifična aktivnost i izoforme superoksid dismutaze (SOD).....	53
4.2.2. Specifična aktivnost i izoforme katalaze.....	54
4.3. Uticaj kadmijuma na ekspresiju Hsp70.....	57
4.3.1. Ekspresija Hsp70 u srednjem crevu	57
4.3.2. Ekspresija Hsp70 u mozgu.....	58
4.4. Efekat kadmijuma na koncentraciju metalotioneina u srednjem crevu larvi.....	60
4.5. Akumulacija kadmijuma u fecesu i tkivima larvi <i>L. dispar</i> četvrtog stupnja.....	61
4.5.1. Koncentracija kadmijuma (sa osvrtom na druge prateće metale) u fecesu, glavi i integumentu.....	61
4.5.2. Analiza glavnih komponenti	64
4.5.3. Sadržaj kadmijuma u crevu larvi <i>L. dispar</i>	66
4.6. Uticaj kadmijuma na hemocite larvi gubara.....	68
4.6.1. Vijabilnost hemocita	68
4.6.2. Nivo DNK oštećenja u hemocitama.....	68

4.7. Komponente fitnesa.....	70
4.7.1. Ukupni broj jaja i procenat neoplođenih jaja u leglima gubara	70
4.7.2. Efekat kadmijuma na preživljavanje larvi.....	70
4.7.3. Uticaj kadmijuma na masu larvi i relativnu brzinu rasta (RGR).....	71
4.7.4. Parametri trajanja razvića nakon intoksikacije kadmijumom	74
4.8. Integrisani odgovor biomarkera (IBR) nakon izloženosti kadmijumu.....	76

5. DISKUSIJA **77**

5.1. Efekti kadmijuma na digestivne enzime srednjeg creva larvi gubara	77
5.1.1. Populacija gubara sa nekontaminirane lokacije	77
5.1.1.1. Specifične aktivnosti i izoforme tripsina, leucin aminopeptidaze (LAP) i ukupnih proteaza.....	77
5.1.1.2. Specifične aktivnosti i izoforme fosfataza	80
<i>Alkalne fosfataze</i>	80
<i>Kisele fosfataze</i>	81
5.1.1.3. Specifična aktivnost i izoforme nespecifičnih esteraza	84
5.1.2. Digestivni enzimi - populacija gubara sa kontaminirane lokacije	85
5.2. Uticaj kadmijuma na antioksidativne enzime – superoksid dismutazu (SOD) i katalazu....	89
5.3. Ekspresija Hsp70 u srednjem crevu i mozgu nakon hronične izloženosti kadmijumu	91
5.4. Uticaj kadmijuma na ekspresiju metalotioneina u srednjem crevu	93
5.5. Akumulacija kadmijuma u fecesu, glavi i integumentu larvi <i>L. dispar</i>	96
5.6. Efekti kadmijuma na hemocite larvi	98
5.6.1. Vijabilnost hemocita	98
5.6.2. Nivo DNK oštećenja u hemocitama.....	99
5.7. Efekti kadmijuma na osobine povezane sa fitnessom.....	100

6. ZAKLJUČCI **105**

7. LITERATURA **109**

1. UVOD

Životna sredina, kao zbir uslova za relativno optimalan život vrsta, u značajnoj meri je narušena antropogenim uticajem, tj. uvođenjem ksenobiotika. Reakcije organizama na prisustvo ksenobiotika pružaju mogućnost njihovog korišćenja za detekciju prisustva, količine, efekata ksenobiotika na živi svet. Klasa insekata pruža brojne mogućnosti za ovo. Kao konstitutivna komponenta svih ekosistema i važna karika u lancima ishrane, insekti se mogu koristiti da ukažu na poremećaje u složenim međuodnosima vrsta u prisustvu ksenobiotika, kao i na uticaj ksenobiotika na ekosistem u celini i složenu dinamiku procesa u njemu. Insekti mogu akumulirati i tolerisati velike količine ksenobiotika, oni su jedna od najbrojnijih komponenata ekosistema, lako su dostupni za uzorkovanje, identifikaciju i eksperimentalnu manipulaciju.

1.1. Kadmijum

Kadmijum je prelazni metal srebrnasto-bele boje, pozicioniran u IIb grupi periodnog sistema elemenata. Predstavlja relativno retku komponentu Zemljine kore čija je koncentracija procenjena na 0,1 mg/kg (Heinrichs i sar., 1980; Bowen, 1979). Prisutan je i u okeanskoj vodi u koncentracijama između 5 i 110 ng/l (Morrow i sar., 2001). Najznačajniji prirodni putevi oslobađanja kadmijuma u životnu sredinu su erozija matičnih stena, vulkanske erupcije i šumski požari (Shevchenko i sar., 2003; Morrow i sar., 2001). U prirodi se veoma retko sreće kao samostalna ruda grinokit (CdS), dok je najčešće primesa u sulfidnim rudama cinka, olova i bakra, čijom se preradom komercijalno dobija. Najznačajniji njegov izvor je sfalerit (ZnS). Kadmijum u elementarnom obliku nije rastvorljiv u vodi, niti su rastvorljivi njegovi oksidi, ali neke soli poput hlorida, sulfata i nitrata jesu. Otporan je na koroziju i nezapaljiv kada je u čvrstom stanju (iako u praškastom obliku može da gori, kada oslobađa toksične gasove).

Daleko dominantniji izvor zagađenja predstavlja antropogena aktivnost koja je intenzivirana sa industrijalizacijom. Prerada obojenih metala, proizvodnja i primena fosfatnih đubriva, sagorevanje fosilnih goriva i odlaganje otpada glavni su uzroci ubrzane kontaminacije (Nair i sar., 2013; Waisberg i sar., 2003). U industriji se kadmijum koristi u proizvodnji Ni-Cd baterija, solarnih ćelija, elektronskih komponenti, akumulatora, pigmenata za boje, kao antikorozivni premaz za metale, stabilizator za

plastiku, mada je primetan trend ograničavanja njegove primene zbog visoke toksičnosti.

Prema ATSDR (The Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2017) ovaj toksikant zauzima sedmo mesto liste najvažnijih otrova, a IARC (International Agency for Research Cancer) (2012) ga je svrstao u grupu 1 dokazanih karcinogena za ljude. Najznačajniji izvor kontaminacije kod čoveka je hrana, ali i duvanski dim. Kadmijum se u ljudskom organizmu deponuje u jetri, bubrezima i kostima, sa poluvremenom života u organizmu od 20 godina (ATSDR, 2008). Toksični efekti se ogledaju u oštećenjima bubrega i jetre, bolestima kostiju, anemiji, poremećajima nervnog sistema i poremećajima u razvoju. Iako se kadmijum generalno smatra elementom koji nema biološku ulogu i čija je toksičnost po živi svet evidentna, kod nekih nižih morskih organizama, poput alge *Thalassiosira weissflogii*, registrovana je Cd-zavisna karbonska anhidraza (Alterio i sar., 2015). Zbog velike preteće opasnosti od ovog metala po živi svet i čoveka, neophodan je ozbiljan biomonitoring svih ekosistema, a potraga za pouzdanim i osetljivim molekularnim i fiziološkim markerima izloženosti ovom stresoru je imperativ.

1.2. Mehanizmi toksičnosti kadmijuma

Važan aspekt u istraživanju mehanizama toksičnosti kadmijuma je identifikacija vezujućih mesta za jon kadmijuma. *In vitro* je mnogo puta pokazano da kadmijum može da zameni jone metala u aktivnim mestima različitih metaloproteina (Moulis i Thévenod, 2010). Kako pokazuje jak afinitet prema funkcionalnim grupama koje sadrže sumpor, azot i kiseonik, može se vezati za veliki broj različitih liganda. Vezujući se za tiolne grupe proteina, formira kadmijum-tiolne komplekse (Van Straalen i Donker, 1994). Svi ovi mehanizmi rezultiraju narušavanjem strukture i gubitkom funkcije prvenstveno strukturnih proteina i enzimskih sistema u svim ćelijskim kompartmanima.

Poznato je da kadmijum indukuje oksidativni stres (Thévenod, 2009; Bertin i Averbeck, 2006). Oksidativni stres predstavlja poremećaj redoks ravnoteže u ćeliji u korist prooksidanata. Kako kadmijum ima visok afinitet prema tiolima, jedna od njegovih primarnih meta je glutation (GSH) (López i sar., 2006), a smanjenje pula redukovano GSH doprinosi poremećaju redoks ravnoteže. Iako ne može direktno da

generiše reaktivne vrste kiseonika (engl. reactive oxygen species, ROS) jer nije redoks aktivan, utvrđeno je da posredno uzrokuje produkciju ROS (Zhou i sar., 2009; Pathak i Khandelwal, 2006). Osim što u ćeliji povećava koncentraciju slobodnih redoks aktivnih metala (Dorta i sar., 2003; Casalino i sar., 1997) koji su jedan od izvora ROS, kadmijum indukuje NADPH oksidazu koja ih proizvodi. Ipak, glavno mesto nastanka ROS su mitohondrije, a Wang i sar. (2004) su na zamorcu pokazali da se produkcija ROS koju indukuje kadmijum odvija na nivou kompleksa III respiratornog lanca. ROS su glavni uzročnici oštećenja ćelijskih struktura. Dovode do oksidacije i degradacije proteina, oštećenja DNK, peroksidacije membranskih masnih kiselina, disfunkcije mitohondrija (Tang i Shaikh, 2001) i indukcije apoptoze (Takahashi i sar., 2004). Toksičnost kadmijuma ogleda se i u njegovoj interferenciji sa antioksidativnim enzimima (Saedi i sar., 2013; Valko i sar., 2006).

Pored oksidativnog stresa, kadmijum uzrokuje i stres endoplazmatičnog retikuluma (ER) *in vitro* i *in vivo*, koji ima ulogu u indukciji apoptoze (Yokouchi i sar., 2008, 2007). Stres ER karakteriše akumulacija „nesavijenih“ ili nepravilno „savijenih“ proteina, koja pokreće UPR (engl. unfolded protein response) program, koji potencijalno vodi u apoptozu.

Aspekti toksičnosti kadmijuma uključuju i njegove interakcije sa molekularnim sistemima vezanim za funkcije jona esencijalnih metala (Mg, Ca, Na, K, Fe, Cu, Zn, Mn). S obzirom na isto naelektrisanje i gotovo isti radijus jona kadmijuma i kalcijuma, kadmijum prolazi kroz ćelijsku membranu i membrane organela putem kalcijumovih kanala i transportera (Sigel i sar., 2013). Kalcijum ima brojne uloge u živim sistemima od kojih je uloga sekundarnog glasnika jedna od najvažnijih. Toksičnost kadmijuma ogleda se i u njegovoj interferenciji sa signalnim putevima kalcijuma. Naime, kadmijum se vezuje za kalcijum-detektujući receptor (receptor spregnut sa G proteinom) na površini ćelija koji reaguje na promene koncentracije vanćelijskog kalcijuma, što rezultira oslobađanjem kalcijuma iz unutarćelijskih depoa (Singh i sar., 2015; Faurskov i Bjerregaard, 2002). Takođe, kadmijum uzrokuje promene redoks stanja u ćeliji koje utiče na brojne funkcije uključujući i kalcijum-zavisne mehanizme. Održavanje redoks ravnoteže u ćeliji povezano je sa balansom jona prelaznih metala. Vezujući se za metalotioneine, kadmijum može da promeni pro- ili antioksidantni potencijal drugih

metala i metalotioneina. Verovatno ovakvi indirektni mehanizmi u većoj meri doprinose toksičnosti kadmijuma nego njegov direktan uticaj na transport drugih metala (Sigel i sar., 2013).

Jedna od posledica štetnih efekata kadmijuma je i inhibicija ćelijskog disanja i sinteze ATP oksidativnom fosforilacijom, zbog čega ćelija prelazi na anaerobni način produkcije energije (Braeckman i sar., 1999a). Kako kadmijum smanjuje pul glutationa i pomera redoks stanje ka oksidujućoj sredini, može doći do protein-S-tiolacije i povećanog trošenja NADPH, što rezultira aktivacijom pentozofosfatnog puta (Reddy i Bhagyalakshmi, 1994).

1.3. Uticaj kadmijuma na digestivne enzime insekata

Smatra se da epitel creva ima centralnu ulogu u procesima transporta između lumena creva i cirkulatornog sistema, kao i da kod lepidoptera održava gradijent pH i kalijumovih jona (Azuma i sar., 1991). Toksikanti u organizam insekata dospevaju uglavnom preko digestivnog trakta odakle se putem hemolimfe transportuju do različitih tkiva i organa. Crevo je kod insekata centralno mesto akumulacije i eliminacije kadmijuma (Kafel i sar., 2014). Tako, nakon izlaganja kadmijumu, više od 90% unete količine metala prisutno je u crevu kolembrole (Hensbergen i sar., 2000). Podaci o efektima kadmijuma i drugih teških metala na digestivne enzime kod beskičmenjaka, uključujući insekte, veoma su limitirani iako je ova problematika od velike važnosti. Kod larvi gubara poreklom iz populacije koja nema istoriju izloženosti teškim metalima evidentni su inhibitorni efekti kadmijuma na digestivne enzime (Vlahović i sar., 2015a, 2015b, 2014, 2013, 2012, 2009), kao i negativni efekti na osobine životne istorije (Mirčić i sar., 2013, 2010; Vlahović i sar., 2014, 2009). Digestivni enzimi su direktno povezani sa fitnessom jedinke budući da su uključeni u procese razlaganja i transporta nutrijenata, kao i u druge metaboličke procese od kojih zavise njeno preživljavanje i reproduktivna uspešnost. Neki od ovih enzima, poput esteraza, imaju značajnu ulogu u detoksifikacionim procesima, pa bi negativni efekti metala na njihovu aktivnost mogli da umanje kapacitet organizma za odbranu u nepovoljnim uslovima sredine (Zvereva i sar., 2003). Slabija osetljivost digestivnih enzima na teške metale mogla bi biti jedna od adaptacija koje populacijama na staništima zagađenim metalima omogućavaju opstanak.

1.3.1. Proteaze

Proteaze (peptidaze) katalizuju hidrolizu peptidne veze u proteinima. Egzopeptidaze uklanjaju terminalne aminokiseline polipeptidnog lanca, a endopeptidaze hidrolizuju peptidne veze unutar polipeptidnog lanca. Egzopeptidaze mogu biti karboksipeptidaze, koje oslobađaju aminokiseline na karboksi kraju polipeptida, ili aminopeptidaze, koje hidrolizuju peptidnu vezu na amino kraju polipeptida. Aminopeptidaze se klasifikuju prema metalnim jonima neophodnim za njihovu aktivnost. Najčešće se radi o jonima cinka ili magnezijuma za koje se smatra da su smešteni u aktivnom centru enzima (Ferreira i Terra, 1986). Optimum pH vrednosti za ove enzime se kreće od 7,2 do 9,0, dok su im molekulske mase u opsegu od 90 do 130 kDa (Terra i sar., 1996). Leucin aminopeptidaza je uključena u osmoregulaciju aminokiselinskog i oligopeptidnog pula (Hiraizumi i sar., 1993).

Na osnovu hemijske grupe u aktivnom mestu enzima koja vrši katalizu, tj. na osnovu katalitičkog mehanizma, proteaze se dele na: serinske, cisteinske, aspartatne, treoninske, glutamatne i metaloproteaze. U funkcionalnom smislu, proteaze se mogu podeliti na one koje učestvuju u digestiji hrane i na nedigestivne, koje imaju brojne regulatorne i druge uloge (Kanost i Clem, 2012). Digestija hrane se odvija aktivnošću proteinaza čije produkte dalje hidrolizuju amino- i karboksipeptidaze do dipeptida, a zatim dipeptidaze oslobađaju aminokiseline.

Familija serin proteaza obuhvata glavne digestivne enzime: tripsin, himotripsin i elastaze. U srednjem crevu larvi Lepidoptera identifikovane su sledeće proteaze: tripsin, himotripsin, elastaze, CBP (engl. cathepsin B-like protease), aminopeptidaze i karboksipeptidaze. U ukupnoj proteaznoj aktivnosti najveći udeo imaju serin proteaze – do 95% (Tabatabaei i sar., 2011; Srinivasan i sar., 2006), i to one tipa tripsina i himotripsina (Chougule i sar., 2008). Molekulska masa tripsina insekata je najčešće 20-35 kDa, a optimalni pH opseg za njihovo delovanje 8-9 (Terra i Ferreira, 1994). Tripsin Lepidoptera postiže maksimalnu aktivnost na nešto višoj pH vrednosti, u skladu sa alkalnim uslovima u njihovom srednjem crevu (Applebaum, 1985). Kalcijumovi joni ne aktiviraju i ne stabilizuju tripsin insekata za razliku od tripsina kičmenjaka (Terra i Ferreira, 1994).

Kod Lepidoptera je pokazano da su proteaze prisutne u setovima izoformi za koje je karakteristična diferencijalna genska ekspresija kojom postižu optimizaciju digestivnih procesa (Patankar i sar., 2001; Gatehouse i sar., 1997). Neke polifagne Lepidoptera mogu po potrebi, u zavisnosti od sadržaja proteina u hrani, da zamene neefikasne izoforme proteaza drugim setom izoformi (Patankar i sar., 2001). Poznato je da insekti mogu da izbegnu efekte biljnih inhibitora proteaza koje unesu kroz hranu tako što eksprimiraju izoforme proteaza otporne na inhibitore (Giri i sar., 1998).

Pokazano je da teški metali snižavaju proteolitičku aktivnost kod *Musca domestica* (Diptera) (Blahovec i sar., 2006) i *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera) (Egwim, 2011), dok su Božić i sar. (2003) utvrdili da kadmijum, cink i kobalt inhibiraju aktivnost prečišćenih aminopeptidaza kod vrste *Morimus funereus* (Coleoptera).

1.3.2. Fosfataze

Fosfataze su enzimi koji katalizuju hidrolizu različitih fosfomonoestara i učestvuju u transfosforilaciji (Calvo-Marzal i sar., 2001). Na osnovu pH opsega u kom su aktivne, razlikuju se kisele i alkalne fosfataze. Nemeč i Ženka (1996) pokazali su da se aktivnost fosfataza menja tokom razvića sa promenom koncentracije hormona.

1.3.2.1. Alkalne fosfataze

Alkalne fosfataze (ALP) su enzimi od fundamentalnog značaja za ćelijski metabolizam. Smatra se da je jedna od njihovih najvažnijih uloga preuzimanje fosfata, budući da je kod čoveka visoka aktivnost zabeležena u crevu, bubrezima, placenti i mlečnim žlezdama (Fishman, 1990). Kad je reč o insektima, ovi enzimi su najaktivniji u crevu i Malpigijevim sudovima, u tkivima za koja je karakterističan intenzivan aktivni membranski transport (Eguchi, 1995; Srivastava i Sharan, 1981). Kod većine insekata alkalne fosfataze se smatraju markerom mikrovilskih i ređe bazolateralnih membrana crevnog epitela, mada je poznata i njihova solubilna forma (Terra i Ferreira, 1994).

Najdetaljnije su ispitane alkalne fosfataze svilene bube (*Bombyx mori*, Lepidoptera). Iz srednjeg creva njenih larvi izolovana su dva izozima, od kojih je jedan vezan za membranu, a drugi je solubilna. Membranski oblik (58 kDa) prisutan je u membranama mikroresica kolumnarnih ćelija, dok je solubilna forma (61 kDa)

lokalizovana na apikalnoj površini goblet ćelija, kao i u posteriornom regionu srednjeg creva u prostoru između goblet ćelija (Azuma i Eguchi, 1989). Oba izozima pokazuju malu specifičnost za supstrat, ali se funkcionalno razlikuju po pH optimumu, kao i po osetljivosti na neke inhibitore. Dele 60% aminokiselinske sekvence i kodiraju ih dva odvojena gena koji su najverovatnije nastali genskom duplikacijom (Itoh i sar., 2003). Ekspimiraju se sinhrono, od trenutka kada se transkripti pojave neposredno pre izleganja larvi, dostižući maksimum na kraju petog stupnja, sve dok ne nestanu tokom metamorfoze (Itoh i sar., 2000).

Sugerisano je da je membranski oblik alkalnih fosfataza uključen u digestiju i apsorpciju nutrijenata, a da solubilna forma ima ATP-aznu aktivnost i da učestvuje u regulaciji jonske i osmotske ravnoteže između hemocela i lumena creva (Azuma i sar., 1991; Eguchi i sar., 1990). Alkalne fosfataze učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata, rastu i diferencijaciji, sintezi proteina, sintezi nekih enzima, kao i u sekretornim aktivnostima (Vijayavel i Balasubramanian, 2006).

Literaturni podaci o efektima kadmijuma na aktivnost ALP zglavkara nisu brojni. Najčešće je registrovana inhibicija enzima - kod insekata *Ericerus pela* (Hemiptera) (Xinping i sar., 2001) i gubara (Vlahović i sar., 2009), kao i kod rakova *Uca annulipes* (Suresh i sar., 2016) i *Scylla serrata* (Dhavale i Masurekar, 1986). Vlahović i sar. (2009) ustanovila da hronično izlaganje larvi *Lymantria dispar* kadmijumu, osim inhibicije aktivnosti alkalnih fosfataza, uzrokuje i promenu u ekspresiji izoformi. Beaumont i Toro (1996) su kod školjki takođe uočili da se ekspresija izoformi menja nakon izloženosti teškim metalima. Dosadašnje studije, iako malobrojne, sugerišu da bi alkalne fosfataze mogle biti značajne u ekotoksikologiji kao metabolički biomarkeri zagađenja metalima shodno rezultatima toksikoloških testova u laboratorijskim uslovima, kao i uočenoj osetljivosti na polutante na kontaminiranim lokacijama (Badiou-Beneteau i sar., 2013; Bounias i sar., 1996; Suresh i sar., 1993).

1.3.2.2. Kisele fosfataze

Kisele fosfataze su sveprisutni enzimi u biljnom i životinjskom svetu, ključni za brojne metaboličke procese. Najčešće se u ćelijama može detektovati više izoformi koje se razlikuju po molekularnoj masi, izoelektričnoj tački, pH optimumu i afinitetu

prema različitim supstratima (Tsvetkov i sar., 2003). Imaju ulogu u finalnim procesima digestije (Cheung i Low, 1975), u ekskreciji, resorpciji vode, zameni ćelija tokom apoptoze (Srivastava i Saxena, 1967), u rastu i metamorfozi (Janda i Benešova, 1991), kao i u jonskom transportu (Yi i Adams, 2001).

Kisele fosfataze se smatraju lizozomskim markerom u mnogim tkivima, međutim, u ćelijama creva insekata dominantno su prisutni u solubilnoj formi u citoplazmi, i u manjoj meri vezani za membranu (Terra i Ferreira, 1994). Izgleda da osetljivost solubilnih kiselih fosfataza na inhibitore varira između različitih vrsta insekata. Tako je kod nekih detektovana potpuna inhibicija solubilnih kiselih fosfataza natrijum fluoridom (Ferreira i sar., 1990; Santos i Terra, 1984), slično lizozomskim fosfatazama sisara. Ipak, drugi autori su našli i frakciju rezistentnu na NaF, te su zaključili da inhibirana frakcija odgovara lizozomskim fosfatazama (Nemec i Ženka, 1996; Aidells i sar., 1971; Chaudhary, 1964). Za razliku od lizozomskih fosfataza, čije su uloge generalno detaljnije proučene, o solubilnim formama u citoplazmi se manje zna. Tsvetkov i sar. (2003) detektovali su tri solubilne izoforme u jetri puža *Viviparus viviparus*, osetljive na kadmijum, od kojih dve najveći afinitet među prirodnim supstratima pokazuju prema fruktozi 1,6-bifosfatu, a treća hidrolizuje isključivo ADP, što jasno ukazuje na njihovu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata.

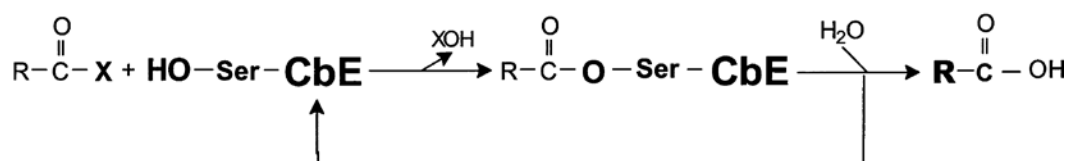
Lizozomske kisele fosfataze sa ostalim hidrolitičkim enzimima učestvuju u procesima degradacije različitih makromolekula u lizozomima, koji su ujedno i mesta akumulacije teških metala (Sterling i sar., 2007). Poznato je da kadmijum indukuje oštećenja lizozomskog sistema - povećava veličinu lizozoma, menja njihovu brojnost, narušava stabilnost membrane ili dovodi do promena u aktivnosti lizozomskih enzima (Lekube i sar., 2000). Toksikanti mogu da destabilizuju lizozomsku membranu usled čega se hidrolaze iz lizozoma oslobađaju u citoplazmu. Aktivnost lizozomskih kiselih fosfataza smatra se valjanim indikatorom stresa u biološkim sistemima. Brojni autori ustanovili su da kadmijum dovodi do povećanja aktivnosti ovih enzima kod beskičmenjaka (Mohite i sar., 2011; Olabarrieta i sar., 2001; Braeckman i sar., 1999a). Međutim, u eksperimentu koji su izveli Lacoue-Labarthe i sar. (2010) bakar je stimulisao aktivnost kiselih fosfataza, dok je kadmijum delovao inhibitorno. Slično, Vlahović je prethodno sa saradnicima (2013) pokazala da hronična intoksikacija nižim

dozama kadmijuma inhibira aktivnost ukupnih kiselih fosfataza kod larvi gubara, dok je aktivnost lizozomskih fosfataza bila redukovana nakon akutne i hronične izloženosti.

1.3.3. Esteraze

Esteraze su hidrolitički enzimi koji katalizuju raskidanje ili formiranje estarskih veza. Njihova nomenklatura i klasifikacija veoma su složene s obzirom na brojnost i raznolikost karakteristične za ovu grupu enzima. Kako najčešće ne pokazuju usku specifičnost za supstrate, po jednom od sistema klasifikacije koji primenjuje osetljivost na inhibitore kao dodatni kriterijum, ovi enzimi dele se na: acetilesteraze, arilesteraze, karboksilesteraze i holinesteraze (Oakeshott, 1993). Kapin i Ahmad (1980) našli su da su karboksilesteraze najdominantnije esteraze u tkivima larvi gubara osim u mozgu i nervnom stablu. I u srednjem crevu su najzastupljenije karboksilesteraze a slede ih arilesteraze i, u najmanjoj meri prisutne, holinesteraze. Nomenklatura karboksilesteraza je kompleksna i na nivou individualnog organizma budući da je prisutno mnoštvo izoformi koje variraju između tkiva i organizama (Imai, 2006; Hosokawa i sar., 1995; Satoh i Hosokawa, 1995).

Mehanizam hidrolize karboksil estara podrazumeva reverzibilnu acilaciju hidroksilne grupe serina u aktivnom centru proteina pri čemu se oslobađa alkohol iz karboksilnog estera. Sledi nukleofilni napad vode koji oslobađa odgovarajuću karboksilnu kiselinu i obnavlja slobodni aktivni enzim (**Slika 1**).



Slika 1. Mehanizam hidrolize karboksilnih estara delovanjem karboksilesteraza (CbE)

Esteraze učestvuju u procesima digestije kod insekata (Montella i sar., 2012; Terra i sar., 1996; Kapin i Ahmad, 1980). Degradacijom juvenilnog hormona i njegovih analoga regulišu reprodukciju i dijapauzu (Vermunt i sar., 1997). Takođe, hidrolizuju i druge estre koji su povezani sa razvićem, ponašanjem i reprodukcijom, poput feromona (Montella i sar., 2012). Esteraze spadaju u najznačajnije enzime sistema za

detoksifikaciju (Dubovskiy i sar., 2011). Poznata je njihova uloga u odbrani insekata od patogenih mikroorganizama i njihovih toksina (Dubovskiy i sar., 2012; Serebrov i sar., 2006). U velikom broju radova opisano je da učestvuju u metabolizmu pesticida povećavajući toleranciju organizma prema ovim jedinjenjima (Barrios i sar., 2010; Vioque-Fernandez i sar., 2007; Bonacci i sar., 2004; Sogorb i Vilanova, 2002). U ekotoksikološkim studijama esteraze se najčešće ispituju radi primene u biomonitoringu organofosfornih i karbamatnih insekticida (Vioque-Fernández i sar., 2007; Prabhakaran i Kamble, 1995; Zhu i Brindley, 1990). Međutim, još uvek nema dovoljno literaturnih podataka da bi se izveli zaključci o eventualnoj ulozi esteraza u detoksifikaciji metala. Kod larvi gubara aktivnost esteraza smanjuje se nakon akutne i hronične izloženosti manjim dozama kadmijuma u laboratorijskim uslovima (Vlahović i sar., 2012). Uočivši promene u aktivnosti ovih enzima kod zglavkara koji naseljavaju staništa zagađena teškim metalima, nekoliko autora je ukazalo i na mogućnost njihove primene u biomonitoringu (Wilczek i sar., 2003a; Stone i sar., 2002).

1.4. Odbrambeni odgovor na intoksikaciju kadmijumom

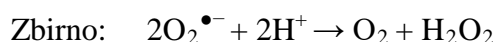
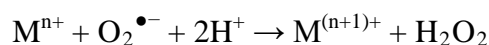
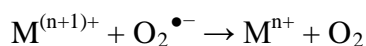
Kadmijum-indukovani profil ekspresije ćelije uključuje sledeće gene: gene vezane za promet metala (metalotionein, fitohelatin sintaza, jonske pumpe), gene koji kodiraju za komponente antioksidativne odbrane (superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaze), *hsp* (engl. heat shock proteins) i šaperone, gene vezane za „sumpornu“ odbranu („sulphate uptake“ proteini, sinteza metionina, cisteina i glutationa), gene vezane za metabolizam gvožđa (ferotransferin, transporteri gvožđa, feritin) i gene koji kodiraju za elemente prirodnog imunskog odgovora (serin proteaze i antimikrobni peptidi) (Janssens et al., 2009; Yamada et al., 2009).

1.4.1. Antioksidativni enzimi – superoksid dismutaza i katalaza

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) javljaju se kod svih aerobnih organizama kao posledica oksidativnog metabolizma (Ahmad, 1995). U cilju uklanjanja ROS, insekti imaju enzime antioksidativne zaštite slične onima opisanim kod kičmenjaka (Pardini, 1995). Međutim, u prisustvu prooksidanata dolazi do narušavanja balansa između produkcije ROS i delovanja antioksidativne zaštite, tj. nastupa stanje oksidativnog stresa

(Halliwell i Gutteridge, 2007). Kao što je već rečeno, kadmijum nije redoks aktivan metal, ali posredno dovodi do povećanja koncentracije ROS u ćeliji (Stohs i sar., 2001). U primarne komponente antioksidativne zaštite insekata spadaju enzimi superoksid dismutaza (SOD) i katalaza.

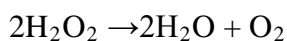
Superoksid dismutaza je metaloenzim koji katalizuje prevođenje superoksid anjon radikala u molekularni kiseonik i vodonik peroksid (Fridovich, 1978). Tzv. “ping-pong” mehanizam kojim se odvija ova reakcija uključuje uzastopnu redukciju i oksidaciju metalnog centra (M) uz istovremenu oksidaciju i redukciju superoksid anjon radikala (Abreu i Cabelli, 2010):



Na osnovu metala u aktivnom centru, kao i lokacije enzima, kod insekata se razlikuju tri forme SOD, slično kičmenjacima: Cu/Zn SOD (prisutna u citosolu), Mn SOD (locirana u mitohondrijama) i vanćelijska SOD (Datkhile i sar., 2009; Landis i Tower, 2005).

Podaci o efektima kadmijuma na SOD su brojni i naizgled oprečni, budući da variraju između vrsta, mogu biti tkivno-specifični i zavisni od uslova izloženosti metalu. Nakon hroničnog izlaganja larvi gubara kadmijumu, značajne promene aktivnosti SOD u srednjem crevu nisu uočene na trećem, četvrtom, petom ni šestom larvenom stupnju (Mirčić i sar., 2013). Wang i sar. (2011) su u tkivu testisa raka *Sinopotamon henanense* registrovali povećanje aktivnosti ovog enzima usled izlaganja nižim koncentracijama kadmijuma, dok su više doze dovele do smanjenja njegove aktivnosti. Kod *Oxya chinensis* (Orthoptera) uočen je trend povećanja aktivnosti SOD, kao i uticaj koncentracije kadmijuma i razvojnog stupnja na ovaj parametar (Zhang i sar., 2011).

Katalaza katalizuje razlaganje vodonik peroksida do vode i molekularnog kiseonika (Halliwell i Gutteridge, 2007):



Radi se o tetramernom proteinu čije subjedinice sadrže protoporfirinske grupe sa Fe^{3+} u aktivnom mestu (Bogdanović, 2007). Aktivnost katalaze je najviša u citosolu i peroksizomima, a nekoliko studija pokazuje da je kod Lepidoptera izrazita i u mitohondrijama (Suman i sar., 2009; Ahmad i sar., 1988).

Kao i u slučaju SOD, efekti kadmijuma na ovaj enzim zavise od brojnih faktora. Mirčić i sar. (2013) pokazali su da je kadmijum snizio aktivnost katalaze na trećem larvenom stupnju gubara, a povećao je na šestom stupnju. Aktivaciju katalaze kod skakavca nakon izloženosti metalu zabeležili su Zhang i sar. (2011), uz značajan uticaj razvojnog stupnja i pola na odgovor enzima. Tretmani kadmijumom nisu doveli do promena kod *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera) (Cervera i sar., 2003), a kod raka *Daphnia magna* samo je najviša primenjena koncentracija metala proizvela efekat, i to inhibiciju katalaze (Barata i sar., 2005).

Aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze pokazale su se kao podobni potencijalni indikatori zagađenja teškim metalima kod više vrsta kopnenih i vodenih vrsta zglavkara (Shonouda i sar., 2016; Emre i sar., 2013; Barata i sar., 2005; Lijun i sar., 2005).

1.4.2. Hsp70

Proteini toplotnog šoka (Hsp) predstavljaju grupu visoko konzerviranih i sveprisutnih proteina, koji imaju ulogu citosolnih molekulskih šaperona. Grupisani su prema molekulskim masama. Za proteine Hsp70 karakteristično je da imaju izrazito konzerviran N-terminalni ATP-azni domen i manje konzerviran C-terminalni domen (Bukau i Horwich, 1998). Pripadaju multigenskoj familiji od kojih se bar jedna forma (*hsc70*) konstitutivno eksprimira u odsustvu stresa, a ekspresiju jedne ili više izoformi (*hsp70*) indukuje stres (Gil i Pla, 2001).

Sintezu Hsp70 aktiviraju različiti stresori, uključujući teške metale, koji utiču na integritet unutarćelijskih proteina (Sanders, 1993). Smatraju se pogodnim biomarkerima proteotoksičnosti kod različitih organizama (Sørensen i sar., 2003; Feder i Hofmann, 1999; Triebkorn i sar., 1997; Köhler i sar., 1992). Hsp70 imaju esencijalnu ulogu u metabolizmu proteina u normalnim i stresnim uslovima (Su i sar., 2010). Održavaju

proteinsku homeostazu tako sto regulišu savijanje oštećenih proteina ili degradaciju onih koji se ne mogu popraviti (Kokolakis i sar., 2009; Mayer i Bukau, 2005; Hartl i Hayer-Hartl, 2002; Nollen i Morimoto, 2002). Smatra se da proteini toplotnog šoka imaju važnu ulogu u pojavi rezistencije i adaptacija u životnoj sredini (Sørensen i sar., 2003).

Poznato je da kadmijum može da indukuje sintezu ovih proteina kod insekata. Tako su Braeckman i sar. (1999b) registrovali indukciju sinteze proteina mase od oko 70 kDa, pretpostavljajući da se radi o familiji Hsp70, nakon što su tretirali kadmijumom ćelijsku liniju *Aedes albopictus* C6/36. Akutna izloženost larvi *Chironomus riparius* (Diptera) ovom polutantu dovela je do trostrukog povećanja nivoa transkripta gena *hsp70* (Planello i sar., 2010). Povišena ekspresija Hsp70 uočena je i kod *Musca domestica* (Diptera) nakon tretmana kadmijumom (Tang i sar., 2012).

1.4.3. Metalotioneini

Metalotioneini su metal-vezujući citosolni proteini male molekulske mase (2-11 kDa) prisutni kod svih organizama uključujući bakterije, biljke, beskičmenjake i kičmenjake. Karakteriše ih visok sadržaj cisteina (30-33% aminokiselinskog sadržaja). Zahvaljujući tiolnim (-SH) grupama cisteinskih ostataka, ovi proteini pokazuju visok afinitet ka prelaznim metalima, prvenstveno ka metalima iz 1B i 2B grupe periodnog sistema elemenata (Vallee, 1991). Cisteini su skoro po pravilu uređeni u metalo-tiolatne klastere konfiguracije Cys-X-Cys ili Cys-X-Y-Cys, gde su X i Y bilo koje aminokiseline osim cisteina. I kod kičmenjaka i kod beskičmenjaka najčešće su prisutna dva metalo-vezujuća klastera po molekulu metalotioneina.

Primarna struktura metalotioneina je izuzetno varijabilna; konzervirana je samo između veoma bliskih vrsta (Shaw i sar., 2007), što otežava klasifikaciju ovih proteina. Često je prisutna i pojava više izoformi u genomu jedne vrste (Janssens i sar., 2009). Izoforme metalotioneina mogu pokazivati značajne razlike u afinitetu prema različitim metalima. U genomu *D. melanogaster* identifikovano je pet gena za metalotioneine koji kodiraju za pet izoformi MtnA-E (Atanesyan i sar., 2011). Egli i sar. (2006) pokazali su da je MtnA specifičan za bakar, a MtnB za kadmijum. Specifičnost izoformi za određene metale primećena je i kod drugih beskičmenjaka: kod gastropoda (Palacios i

sar., 2011), *Lumbricus rubellus* (Stürzenbaum i sar., 2004), *Caenorabditis elegans* (Swain i sar., 2004) i *Daphnia magna* (Poynton i sar., 2007). Primena molekularnog sekvenciranja i nuklearno-magnetno-rezonantne spektroskopije omogućila je značajne uvide u molekularnu strukturu metalotioneina i njihove interakcije sa metalima, međutim, takva istraživanja mahom su bila usmerena na sisarske i biljne vrste. Mali broj studija odnosi se na molekularnu karakterizaciju metalotioneina zglavkara: rakova (Asselman i sar., 2012), diptera (Atanesyan i sar., 2011) i kolembola (Janssens i sar., 2007).

Metalotioneini imaju vrlo važnu ulogu u održavanju homeostaze esencijalnih metala, prvenstveno bakra i cinka, kao i u detoksifikaciji teških metala poput kadmijuma i žive. Učestvuju u zaštiti od oksidativnog stresa, neuroprotektivnim mehanizmima, proliferaciji, kao i u apoptotičkim procesima (Ruttkay-Nedecky i sar., 2013). Takođe, učestvuju u održavanju ćelijskog redoks statusa (Viarengo i sar., 2000). Sintezu metalotioneina mogu indukovati sledeći stimuli: slobodni metalni joni, oksidativni stres, izmenjeni redoks status, hormonski stimuli, kao i toplotni šok (Liu i sar., 2014; Janssens i sar., 2007).

Regulacija ekspresije gena za metalotionein uključuje transkripcijski faktor MTF-1 koji se nakon vezivanja metala vezuje za MRE (engl. metal response element), uzvodno od strukturnih gena za metalotionein (Selvaraj i sar., 2005; Andrews, 2000). Sekvenciranje homologa MTF-1 gena različitih nesisarskih i sisarskih vrsta otkrilo je visoku konzerviranost, što ukazuje na postojanje ovog mehanizma kod svih viših eukariota (Lichtlen i sar., 2001).

Rezultati nekoliko studija na insektima ukazali su na potencijalnu primenu metalotioneina u biomonitoringu metala s obzirom na to da metali mogu da indukuju sintezu metalotioneina i da je nivo metalotioneina dobro korelisan sa koncentracijom metala u tkivima (Badiou-Beneteau i sar., 2013; Mireji i sar., 2010; Croteau i sar., 2002).

1.5. Akumulacija kadmijuma u organizmu insekata i njegova eliminacija

Koliko je poznato autoru ove studije, skoro da nema literaturnih podataka o akumulaciji i ekskreciji teških metala kod gubara. Metali se najčešće akumuliraju u srednjem crevu insekata (Posthuma i sar., 1992; Hopkin, 1989; Suzuki i sar., 1984), ali postoje obimni nalazi o kompartmentalizaciji teških metala u organima u kojima ne uzrokuju oštećenja ili su oštećenja manja. Visoke koncentracije žive, kadmijuma i olova detektovane su u testisima i jajnicima *Ailopus thalassmus* (Schmidt i Ibrahim, 1994). Kompartmentalizacija teških metala u kutikuli skakavaca i karabida povezana je sa tvrdoćom nekih organa, na primer mandibula, ili sa potencijalnom detoksifikacijom preko odbačenih delova egzoskeleta u toku presvlačenja (Lindqvist i sar., 1995; Lindqvist i Block, 1995). Visoke koncentracije bakra i kadmijuma nađene su u fecesu insekata izloženih teškim metalima (Prince i sar., 2001). Povećane koncentracije metala u fecesu kolembola potiču iz unutarćelijskih mineralnih depozita epitela srednjeg creva i (ili) iz vezikula koje sadrže teške metale (Pawert i sar., 1996; Joosse i Buker, 1979). Prema Gintenreiteru (1993a), ova akumulacija je srazmerna nivou zagađenja.

Tolerancija na metale kod beskičmenjaka zasnovana je na redukovanom unosu metala, njihovoj sekvestraciji i eliminaciji (Grzeš, 2010). Kao što je navedeno ranije (Vlahović i sar., 2014, 2013, 2012), varijabilnost ovih mehanizama, koji se tiču efikasnosti digestije i preživljavanja tokom izloženosti teškim metalima između individua iz iste populacije, potiče od fenotipske plastičnosti. Mehanizmi detoksifikacije metala (tolerancije) kod insekata mogu biti čak efikasniji u poređenju sa onima kod kičmenjaka. Van Straalen i Roelofs (2005) rezimirali su nalaze o toleranciji na metale kod insekata. Glavni mehanizmi su: duplikacija metalotioneinskih gena, izmenjene osobine životne istorije, povišena ekskrecija kadmijuma putem odbacivanja epitela creva, nepromenjeni rast i sekvestracija (kompartmentalizacija).

1.6. Genotoksičnost kadmijuma i značaj u ekotoksikologiji

Kadmijum predstavlja slab mutagen koji uzrokuje prekide DNK lanaca, formiranje DNK-protein ukrštenih veza, razmene između sestara hromatida i

hromozomske aberacije (Kračun-Kolarević i sar., 2015; Filipic i sar., 2006; Mourón i sar., 2004). Kako pokazuje slab afinitet prema DNK molekulu (Janssens i sar., 2009), genotoksičnost ispoljava u najvećoj meri indirektno, i to produkujući reaktivne vrste kiseonika (ROS), interferencijom sa enzimskim i neenzimskim komponentama ćelijske antioksidativne odbrane i ometanjem DNK reparacionih mehanizama (Joseph, 2009; Liu i sar., 2009; Beyersmann i Hartwig, 2008). Neki od mehanizama reparacije DNK koje kadmijum inhibira su: isecanje baza, isecanje nukleotida, ispravka pogrešno sparenih baza i uklanjanje mutagenog DNK prekursora 8-oxo-dGTP (Hartwig i Schwerdtle, 2002). Akumulacija jednolančanih i dvolančanih prekida DNK lanaca vodi hromozomskim aberacijama koje mogu biti uzrok ćelijske smrti, i mogu negativno uticati na preživljavanje i reprodukciju ostavljajući posledice na nivou populacije.

Jedan od najčešće korišćenih testova genotoksičnosti u ekotoksikologiji je elektroforeza pojedinačnih ćelija, poznat kao komet test. U početku se test radio u neutralnim uslovima koji su omogućavali samo detekciju dvolančanih DNK prekida, ali je kasnije razvijen alkalni komet test (Singh i sar., 1988) kojim je moguće detektovati i jednolančane prekide, alkalno labilna mesta, DNK-protein i DNK-DNK unakrsne veze, kao i nekompletna mesta popravke (Valverde i Rojas, 2009). Komet test je osetljiv, pouzdan, jednostavan i brz, moguće ga je primeniti na bilo kom tipu ćelija sa jedrom (Kolarević i sar., 2016, 2013). Pokazuje dobre korelacije sa osobinama fitnesa kao što su rast, razviće i reprodukcija (Jha, 2008). Literaturni podaci ukazuju na jasnu vezu između vijabilnosti hemocita i nivoa oštećenja DNK (Rank i sar., 2007; Hagger i sar., 2005), a povezanost ovih parametara sa imunskim sistemom, odnosno fitnessom je očigledna.

Prvobitno je komet test korišćen u studijama genotoksičnosti kod sisara, ali je vremenom njegova upotreba proširena na sve taksone s obzirom na univerzalnost strukture, funkcije i reparacionih mehanizama DNK kod različitih organizama. Primena ovog testa na beskičmenjacima ima posebno mesto u ekotoksikologiji imajući u vidu njihov veliki značaj u ekosistemima, jednostavnost i nisku cenu gajenja, kao i minimalni upliv etičkih i zakonskih normativa. Prednost je i što se u svrhe monitoringa mogu koristiti i vrste koje nisu standardni model organizmi, budući da za detekciju DNK oštećenja nije potrebno poznavanje kariotipa ili genomske strukture. Nažalost, komet

test se na insektima u ekotoksikologiji relativno retko primenjuje uprkos širokim mogućnostima. Genotoksičnost kadmijuma je pokazana kod nekoliko vrsta Artropoda koristeći komet test: na ćelijama srednjeg creva drozofile (Shukla i sar., 2011), na žlezdanim ćelijama srednjeg creva i hemocitama pauka *Steatoda grossa* (Stalmach i sar., 2015), kao i na hemocitama skakavca *Schistocerca gregaria* (Yousef i sar., 2010) i raka *Peaneus monodon* (Jose i sar., 2011).

1.7. Efekti kadmijuma na osobine fitnesa insekata

Poznato je da kadmijum ispoljava toksična dejstva na svim nivoima biološke organizacije, od molekularnog nivoa do celog organizma. Smatra se da cenu adaptacija na stres jedinka plaća na nivou osobina povezanih sa fitnessom. Najveći deo energije organizam troši na preživljavanje, a preostale resurse može da iskoristi za procese rasta i reprodukcije (Bednarska i sar., 2013). Tokom izloženosti polutantima energija se preusmerava ka detoksifikacionim mehanizmima (metalotioneini, Hsp, antioksidativna odbrana, itd.) u korist preživljavanja, što rezultira redukcijom rasta i reprodukcije (van Straalen i Hoffman, 2000). Osobine fitnesa predstavljaju vezu između efekata na biohemijskom nivou individue i višeg populacionog nivoa (Hyne i Maher, 2003). Na osnovu parametara fitnesa mogu se predvideti efekti zagađenja na nivou populacije. Zato je važno ispitati njihovu doznu zavisnost od polutanta i povezati ih sa toksičnim efektima na nižim biološkim nivoima.

Brojne studije ukazale su na štetne efekte kadmijuma na nivou osobina životne istorije insekata. Cervera i sar. (2004) detektovali su značajan mortalitet nimfi *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera), smanjeno preživljavanje adulta, kao i redukovan fekunditet, fertilitet i procenat izlegnutih larvi nakon hroničnog tretmana ovim metalom. Osim toga, masa adulta bila je snižena i trajanje razvića produženo proporcionalno koncentraciji kadmijuma. Wu i sar. (2006) našli su da hronična izloženost kadmijumu prolongira ukupno trajanje razvića larvi *Boettcherisca peregrina* (Diptera) i redukuje njihovu masu. Povećan mortalitet larvi *Spodoptera exigua* (Lepidoptera) nakon hroničnog izlaganja kadmijumu, kao i produženo razviće, prijavili su Kafel i sar. (2012a). Dok je redukcija rasta *Oxya fuscovittata* (Orthoptera) zabeležena i nakon izlaganja nižim dozama kadmijuma, samo je najviša primenjena doza redukovala

procenat njihovog preživljavanja i veličinu legla (Malakar i sar., 2009). Gao i sar. (2012) uočili su negativne efekte ovog polutanta na preživljavanje i reprodukciju *Sitobion avenae* (Hemiptera). Naši prethodni eksperimenti, kao i studije drugih autora, potvrdili su da kadmijum takođe negativno utiče na rast, razviće i dužinu života gubara (Mirčić i sar., 2013; Vlahović i sar., 2009; Ortel, 1996; Gintenreiter i sar., 1993b).

1.8. Biomarkeri u ekotoksikologiji

Razvoj industrije i agrikulture, kao i globalna urbanizacija, rezultirali su pojavom velikog broja ksenobiotika u životnoj sredini i nametnuli konstatnu potrebu za unapređenjem mera kontrole njenog kvaliteta. U proceni stanja životne sredine važnu ulogu ima biološki monitoring, koji podrazumeva kako praćenje akumulacije toksikanata u tkivima organizama, tako i utvrđivanje promena na različitim nivoima biološke organizacije: nižim nivoima organizacije, na nivou celog organizma, populacionom i ekosistemskom (Van Gestel i Van Brummelen, 1996).

Biomarkeri vode poreklo iz medicine, gde su se pokazali veoma korisnim kao indikatori izloženosti specifičnim toksikantima ili kao rani pokazatelji specifičnih bolesti ili sindroma (Timbrell, 1998). Osamdesetih godina dvadesetog veka otpočela su nastojanja da se razviju biomarkeri za primenu u ekotoksikologiji. Ekotoksikološke studije obuhvataju izučavanje toksičnih efekata polutanata u kontrolisanim laboratorijskim uslovima u svrhe predviđanja, kao i eksperimente na terenu u cilju procene zagađenja i monitoringa (Jemec i sar., 2010).

Biomarker se može definisati kao bilo koji biološki odgovor na ksenobiotik koji predstavlja merilo izloženosti tom toksikantu ili merilo njegovog toksičnog efekta (Peakall, 1994). Međutim, veliki broj autora podržava definicije koje ih ograničavaju na biološke odgovore na nivoima ispod nivoa celog organizma. Tako, biomarkeri bi trebalo da budu rani indikatori stresa (biohemijski, fiziološki, histološki), čije je odgovore moguće detektovati pre nego što se efekti polutanata ispolje na performansama jedinki ili na nivou populacije (Forbes i sar., 2006). To je jedan od razloga što su molekularni i biohemijski biomarkeri danas dominantni. Takođe, njihova velika osetljivost i na male doze toksikanata, odgovori u kratkom vremenskom intervalu, jednostavnost uzorkovanja i merenja čine ih superiornim u odnosu na biomarkere na višim nivoima

organizacije. Potraga za biomarkerima uključuje i dimenziju upoznavanja mehanizama toksičnosti polutanata, što omogućava uvid u uzročno-posledične relacije između nižih i viših nivoa biološke organizacije.

Prema kriterijumima za validaciju, kako ih je rezimirao van der Oost sa saradnicima (2003), biomarkeri treba da budu: 1. pouzdani, jeftini i jednostavni, 2. osetljivi na polutant, 3. definisanog bazičnog nivoa i poznatog odgovora na varijacije u prirodi i na izloženost toksikantu, 4. ustanovljenog odgovora na različite biotičke i abiotičke faktore koji mogu uticati na biomarker, 5. poznatog mehanizma toksičnosti, 6. ustanovljenih relacija sa efektima polutanta na višim biološkim nivoima. Forbes i sar. (2006) ističu da se razlike u odgovorima na toksikant između populacija moraju posebno uzeti u obzir. Uzroci tih razlika mogu biti geografski uticaji, parametri staništa, genetička struktura populacija, ali i specifična istorija izloženosti populacije polutantima. Izloženost populacije teškim metalima tokom dužeg vremenskog perioda može da rezultira fiziološkim ili genetičkim adaptacijama koje povećavaju toleranciju te populacije na metale. Pojava povećane tolerancije registrovana je kod više vrsta insekata, u populacijama koje naseljavaju staništa kontaminirana metalima (Kafel i sar., 2014; Lagisz i Laskowski, 2008; Sterenborg i Roelofs, 2003; Postma i sar., 1996). Zato je u ekotoksikološkim studijama važno ispitati efekat porekla populacije na potencijalne biomarkere zagađenja.

Razlikuju se tri grupe biomarkera: biomarkeri izloženosti, biomarkeri efekta i biomarkeri osetljivosti (Links i Groopman, 2010; Wallace Hayes, 2007). Biomarkeri izloženosti podrazumevaju detekciju egzogene supstance ili produkata koji nastaju njenom interakcijom sa endogenim komponentama u organizmu. Biomarkeri efekta odnose se na prisustvo i veličinu biološkog odgovora (biohemijske, fiziološke i druge promene u tkivima ili telesnim tečnostima organizma) na izloženost toksikantu. Biomarkeri osetljivosti su indikatori urođene ili stečene sposobnosti organizma da odgovori na izloženost određenom ksenobiotiku.

Dok su neki biomarkeri specifični za određeni polutant ili za set polutanata, drugi mogu da reaguju i na polutante i na promene različitih prirodnih faktora u životnoj sredini (Valavanidis i Vlachogianni, 2010). Zato se u studijama biomonitoringa najčešće izučavaju setovi biomarkera (Badiou-Beneteau i sar., 2013). Kako bi stepen

specifičnosti bio veći, važno je uzeti u obzir i aspekt komplementacije različitih biomarkera (Gil i Pla, 2001). Tako, mnogi metali mogu da indukuju sintezu metalotioneina, ali ako se istovremeno u tkivu ili telesnoj tečnosti utvrdi povišena koncentracija određenog metala, tada je specifičnost značajno veća.

Metodom koju su razvili Beliaeff i Burgeot (2002) odgovori nekoliko biomarkera se kombinuju u jedinstveni indeks koji olakšava interpretaciju detektovanih promena. Tzv. "Integrirani odgovor biomarkera" (engl. integrated biomarker response, IBR), izražen IBR indeksom i grafički, poligonalnim poljima, sve češće se koristi u studijama zasnovanim na istovremenoj primeni više biomarkera radi procene ekološkog rizika (Serafim i sar., 2012; Damiens i sar., 2007).

2. CILJEVI

Ciljevi ove disertacije su sledeći:

1. Odrediti specifičnu aktivnost digestivnih enzima u srednjem crevu: tripsina, leucin aminopeptidaze, ukupnih proteaza, alkalnih fosfataza, kiselih fosfataza (ukupnih, nelizozomskih i lizozomskih) i nespecifičnih esteraza, uz kvantitativnu analizu njihovih izoformi.
2. Odrediti aktivnost antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze i katalaze) u srednjem crevu larvi IV stupnja i detektovati njihove izoforme.
3. Ispitati promene u ekspresiji Hsp70 u srednjem crevu i mozgu larvi gubara IV stupnja.
4. Detektovati metalotioneine u srednjem crevu larvi gubara IV stupnja nakon intoksikacije kadmijumom.
5. Ispitati načine akumulacije i eliminacije kadmijuma u srednjem crevu, glavi, integumentu i izmetu larvi gubara IV stupnja.
6. Utvrditi uticaj kadmijuma na nivo oštećenja DNK u hemocitama i njihovu vijabilnost kod larvi V stupnja.
7. Utvrditi efekte kadmijuma na osobine fitnesa (ukupni broj jaja u leglima i udeo neoplođenih jaja, preživljavanje larvi, masu larvi i relativnu brzinu rasta na IV i V stupnju i parametre razvića).
8. Proceniti sve ispitane parametre kao potencijalne biomarkere kontaminacije kadmijumom s obzirom na osetljivost koju pokažu na primenjene doze kadmijuma, kao i u zavisnosti od obrazaca odgovora kod različitih populacija.
9. Proceniti da li je vrsta *Lymantria dispar* pogodna kao bioindikator zagađenja kadmijumom.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. *Lymantria dispar*, L. (gubar)

Lymantria dispar prvi put je opisana 1758. od strane Linea. Radi se o polifagnoj herbivornoj vrsti, široko rasprostranjenoj u šumama severne Zemljine hemisphere. Gubar nanosi ogromnu štetu šumskim ekosistemima, a broj biljnih vrsta kojima se hrani procenjuje se na više od 500 (Lance, 1983). Ima jednu generaciju godišnje i holometabolno razviće. Jaja polaže u grupama (leglima); jedno leglo je produkt jednog oplođenja, odnosno, larve iz istog legla potiču od istih roditelja (full-sib familija). Leglo je od niskih temperatura i predatora zaštićeno dlačicama poreklom sa abdomena ženke. Mesec dana po polaganju jaja, larve su potpuno formirane, nakon čega se razviće prekida i one ulaze u dijapauzu koja traje do proleća. Tokom razvića, larva prolazi kroz periode presvlačenja, a na broj stupnjeva utiču brojni biotički i abiotički faktori. Prednosti gubara kao eksperimentalnog animalnog modela su kratak životni ciklus, mogućnost jednostavnog gajenja u laboratorijskim uslovima na veštačkoj dijeti, velika rasprostranjenost, kao i dobro definisana morfologija i fiziologija vrste.

3.2. Eksperimentalne grupe i uslovi gajenja

Legla gubara sakupljena su u kasnu jesen na četiri lokaliteta u Srbiji (**Slika 2**). Legla za **Eksperiment I** poticala su sa lokaliteta u neposrednoj blizini Ibarske magistrale gde je dnevni promet između 10000 i 20000 vozila (zagađena lokacija), i sa Kosmaja, planine u okolini Beograda (nezagađena lokacija, 44°27'56" 20°33'56"). Kosmaj je zaštićeno područje Republike Srbije (predeo izuzetnih odlika), udaljen od svih značajnijih izvora zagađenja.

Za **Eksperiment II** legla su prikupljena na Homoljskim planinama i u okolini Bora. Homoljske planine se smatraju nezagađenim regionom, shodno niskoj gustini naseljenosti i znatnoj udaljenosti od idustrijskih i urbanih izvora kontaminacije. U okolini Bora smešten je jedan od najvećih rudnika bakra u Evropi, Rudarsko topioničarski basen Bor DOO. Vazduh, zemljište i voda u Boru i okolini kontinuirano su izloženi metalima tokom više od sto godina, otkad je počela proizvodnja bakra 1903. godine. Prema nedavnim studijama zagađenosti i podacima tridesetogodišnjeg monitoringa kvaliteta vazduha u Boru, koncentracije nekoliko teških metala (Cu, As,

Cd, Pb, Mn, Ni) povišene su u zemljištu i u suspendovanim česticama u vazduhu, pri čemu kadmijum u zemljištu dostiže koncentracije od 5,85 i 6 mg/kg (Dimitrijević i sar., 2016; Nikolić i sar., 2011).



Slika 2. Legla gubara na kori drveta sa Homoljskih planina

Prikupljena legla čuvana su na 4 °C do proleća. Tada su jaja sterilisana u 0,25% natrijum hipohloritu (5% varikina), isprana u destilovanoj vodi, osušena na vazduhu i ostavljena na temperaturi od 23 °C pri fotoperiodu 12 h svetlost : 12 h mrak. Nakon izleganja, larve su gajene u istim uslovima temperature i fotoperioda, na veštačkoj dijeti (O'Dell i sar., 1984; Bell i sar., 1981). Do presvlačenja u treći stupanj bilo je po deset jedinki u jednoj Petrijevoj kutiji, zatim po pet na trećem stupnju, a na četvrtom i petom stupnju gajene su pojedinačno (**Slika 3**). Hrana je svakodnevno menjana.



Slika 3. Larva gubara u Petrijevoj kutiji tokom gajenja

Kontrolne grupe iz svih populacija dobijale su hranu bez kadmijuma, dok je hrana za eksperimentalne grupe larvi sadržala kadmijum u koncentracijama od 50 i 100 µg Cd/g suve hrane (tretmani C₁, odnosno C₂) (**Slika 4**). Metal je dodavan u formi nitratne soli Cd(NO₃)₂·4H₂O. Larve su bile hronično izložene kadmijumu, od izleganja

do trećeg dana četvrtog stupnja tokom **Eksperimenta I**, odnosno, do trećeg dana petog stupnja u **Eksperimentu II**, kada su žrtvovane. U **Eksperimentu I** gajeno je po 70 larvi u kontrolnim grupama i grupama tretiranim sa 50 µg Cd/g suve hrane, i po 80 larvi u grupama tretiranim sa 100 µg Cd/g suve hrane. U okviru **Eksperimenta II** gajeno je po 60 larvi u svim grupama.



Slika 4. Larve gubara sa nezagađene lokacije (NP - Kosmaj) na četvrtom stupnju, tretirane sa 50 i 100 µg Cd/g suve hrane (C₁ i C₂,)

3.3. Eksperiment I

3.3.1. Detekcija aktivnosti digestivnih enzima

3.3.1.1. Priprema homogenata srednjeg creva

Larve su žrtvovane na ledu trećeg dana četvrtog stupnja. Dekapitovane su i presećane iza zadnjeg para nožica, a zatim je izolovano celo crevo kroz uzdužno isećen integument. Nakon odstranjivanja prednjeg i zadnjeg creva, srednje crevo je očišćeno od masnog tela i čuvano na -20 °C. Creva su homogenizovana pojedinačno, na ledu, u 0,15 M NaCl puferu tako da finalna koncentracija tkiva bude 100 mg/ml. Homogenizacija je trajala 3 x 10 sekundi pri brzini od 20000 obrtaja/min, sa pauzama od 15 sekundi. Homogenati su centrifugirani 10 minuta na 10000 g, supernatanti su izdvojeni i odmah zamrznuti na -20 °C. Koncentracija proteina je određivana metodom po Bradfordu (1976) u odnosu na BSA standard (albumin iz goveđeg seruma).

3.3.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje specifične aktivnosti digestivnih enzima

Tripsin

Aktivnost tripsina merena je po metodi Erlangera i sar. (1961) i Valaitisa (1995). Princip metode je u oslobađanju *p*-nitroanilina iz supstrata *N*_α-benzoil-DL-arginin 4-nitroanilid hidrohlorida (DL-BAPNA), pri čemu je aktivnost tripsina srazmerna koncentraciji *p*-nitroanilina. Inkubacija homogenata sa 20 mM supstratom odvijala se u 50 mM Gly/NaOH puferu (pH 10) na 30 °C. Nakon 15 minuta reakcija je prekinuta 6% sirćetnom kiselinom i merena je apsorbancu na 405 nm.

Leucin aminopeptidaza (LAP)

Za procenu aktivnosti leucin aminopeptidaze primenjena je metoda Erlangera i sar. (1961). Reakcija se odvijala u 40 mM veronal/HCl puferu (pH 7,8-8) u prisustvu supstrata 20 mM L-leucin *p*-nitroanilida na 30 °C tokom 10 minuta, a potom je prekinuta 6% sirćetnom kiselinom. Aktivnost LAP proporcionalna je količini oslobođenog *p*-nitroanilina. Apsorbancu je očitavana na 405 nm.

Ukupne proteaze

Aktivnost ukupnih proteaza određena je proteolitičkim esejom (Kunitz, 1947) u prisustvu kazeina kao supstrata. 1% kazein u 200 mM Gly/NaOH puferu (pH 10) inkubiran je sa homogenatom u razmeri 1:1 u trajanju od 60 minuta na 40 °C. Reakcija je prekinuta 10% trihlorsirćetnom kiselinom. Precipitacija preostalog kazeina odvijala se tokom 30 minuta na 4 °C, a zatim je sadržaj centrifugiran na 10000 g 10 minuta. Apsorbancu je očitavana u supernatantima na 280 nm. Ukupna aktivnost proteaza proporcionalna je količini slobodnih aminokiselina i peptida.

Alkalne fosfataze

Aktivnost alkalnih fosfataza određivana je po metodi autora Nemeč i Socha (1988). Princip se zasniva na oslobađanju *p*-nitrofenola iz *p*-nitrofenil fosfata (*p*NPP), univerzalnog supstrata za detekciju fosfatazne aktivnosti, u alkalnim uslovima. Reakciona smeša je sadržala 100 mM Tris/HCl pufer pH 8,6, 5 mM MgCl₂, 5 mM *p*NPP i homogenat. Reakcija se odvijala na 30 °C u trajanju od 30 minuta, nakon čega je prekinuta dodavanjem 500 mM NaOH. Apsorbancu je očitavana na 405 nm.

Ukupne kisele fosfataze

Aktivnost kiselih fosfataza određena je metodom koju su razvili Nemeč i Soča (1988). Princip metode je oslobađanje *p*-nitrofenola iz *p*-nitrofenil fosfata (*p*NPP) u kiselim uslovima. Reakcija se odvijala na 30 °C u smeši koja je sadržala 100 mM citratni pufer pH 5,6, 5 mM MgCl₂, 5 mM *p*NPP i homogenat. Nakon 60 minuta prekinuta je dodavanjem 500 mM NaOH. Apsorbanca *p*-nitrofenola merena je na 405 nm.

Lizozomske i nelizozomske kisele fosfataze

Aktivnost lizozomskih fosfataza utvrđena je indirektno, kao frakcija ukupne aktivnosti kiselih fosfataza nakon primene specifičnog inhibitora natrijum fluorida (Amlabu i sar., 2009; Holtzman, 1989). U istu reakcionu smešu za određivanje ukupne aktivnosti kiselih fosfataza dodat je NaF finalne koncentracije 50 mM. Apsorbanca predstavlja aktivnost neinhibiranih nelizozomskih kiselih fosfataza, na osnovu koje je izračunata aktivnost lizozomske frakcije.

Nespecifične esteraze

Za određivanje aktivnosti esteraza poslužio je kontinualni spektrofotometrijski esej koji se zasniva na principu oslobađanja *o*-nitrofenola iz supstrata *o*-nitrofenil butirata (Lockridge i La Du, 1978). Reakcija se odvijala na 30 °C u 20 mM natrijum fosfatnom puferu pH 7,2 u prisustvu supstrata finalne koncentracije 10 mM. Apsorbanca je praćena tokom 150 sekundi na 414 nm. Aktivnost esteraza proporcionalna je promeni količine *o*-nitrofenola u jedinici vremena.

3.3.1.3. Zimogramska detekcija aktivnosti digestivnih enzima***Tripsin***

Aktivnost tripsina određivana je nativnom elektroforezom prema modifikovanoj metodi Erlangera i sar. (1961). Uzorci su pomešani sa puferom za obradu uzorka (PUZ) koji nije sadržao SDS niti redukujuća sredstva, i odmah su nalivani na 10% poliakrilamidni gel bez SDS. Nanošeno je 5 µg proteina po bunariću, nakon čega su proteini razdvajani pri konstantnom naponu od 100 V na 4 °C. Nitrocelulozna membrana je inkubirana u 2 mM supstratu *N*_α-benzoil-DL-arginin 4-nitroanilida

hidrohloridu (DL-BAPNA) u trajanju od 50 minuta na sobnoj temperaturi. DL-BAPNA je prvo rastvoren u dimetilformamidu (20 mM), a zatim je razblažen u glicinskom puferu pH 10 do 2 mM. Gel je ispiran u destilovanoj vodi 2 x10 minuta i ekvilibrisan 20 minuta u glicinskom puferu (pH 10). Membrana je položena na gel i sendvič je ostavljen u uslovima vlažne komore na 37 °C u trajanju od 1 h. Membrana je zatim potopljena na 2,5 minuta u 0,1% NaNO₂ koji je rastvoren u 1 M HCl, pa isprana 1% ureom potapanjem na 30 sekundi. Potom je inkubirana u 0,05% 1-naftilaminu rastvorenom u 47,5% etanolu do pojave roze obojenih traka. Reakcija je odmah prekinuta ispiranjem u destilovanoj vodi.

Kvantifikacija elektroforetskih traka u ovoj studiji izvođena je denzitometrijskom analizom upotrebom ImageJ programa (National Institutes of Health, USA).

Leucin aminopeptidaza (LAP)

Aktivnost leucin aminopeptidaze određivana je po istoj modifikovanoj metodi kao i aktivnost tripsina (Erlanger i sar., 1961). Supstrat za LAP bio je L-leucin *p*-nitroanilid, rastvoren u dimetilformamidu (20 mM), a zatim razblažen do 2 mM u veronal/HCl puferu pH 7,8-8. U istom puferu je ekvilibrisan gel u trajanju od 20 minuta. Detalji protokola su isti kao za detekciju aktivnosti tripsina na gelu, tj. na membrani.

Ukupne proteaze

Izoforme proteaza detektovane su na gelu prema modifikovanoj metodi autora Muhlia-Almazan i Garcia-Carreno (2002). Količina od 5 µg proteina nanošena je u bunariće 10% SDS poliakrilamidnog gela. Elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 100 V u neredukujućim uslovima - PUZ nije sadržao redukujuća sredstva poput β-merkaptioetanol. Uzorci nisu termički obrađeni, ali su proteini u uzorcima bili denaturisani s obzirom na prisustvo SDS u PUZ i puferu za elektroforezu. Gel je ispiran 2 x 10 minuta u destilovanoj vodi, a zatim ekvilibrisan 20 minuta u 50 mM glicinskom puferu pH 10. Potom je potopljen u 3% kazein (prethodno rastvoren u istom puferu i rashlađen na 4 °C) na 30 minuta na 4 °C kako bi supstrat difundovao u gel pri minimalnoj enzimskoj aktivnosti. Usledila je inkubacija gela sa supstratom na 40 °C tokom 60 minuta u cilju detekcije maksimalne aktivnosti proteaza. Nakon ispiranja

dejonizovanom vodom, gel je obojen u 0,1% Coomassie brilliant blue R-250 u trajanju od 5 minuta. Za obezbojavanje preko noći korišćen je rastvor koji je sadržao 40% metanola i 10% sirćetne kiseline.

Alkalne fosfataze

Za detekciju aktivnosti alkalnih fosfataza nativnom elektroforezom primenjena je modifikovana metoda Allena i sar. (1963). 10 µg proteina po bunariću 12% gela razdvojeno je pri konstantnom naponu od 100 V na 4 °C. Za vizuelizaciju je pripremljen rastvor koji je sadržao 100 mM Tris-HCl pufer (pH 8,6), 0,13% α-naftil fosfat i 0,1% Fast Blue B. Gel je inkubiran na sobnoj temperaturi do pojave obojenih traka.

Ukupne kisele fosfataze

Izoforme kiselih fosfataza su detektovane prema modifikovanoj metodi Allena i sar. (1963). Na 12% poliakrilamidni gel naneto je 10 µg proteina po bunariću. Proteini su razdvojeni pod uslovima native elektroforeze pri konstantnom naponu od 100 V na 4 °C. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi tokom 1 minuta, gel je 10 minuta ekvilibrisan u 50 mM acetatnom puferu (pH 5,2) na 30 °C. Nitrocelulozna membrana je inkubirana na sobnoj temperaturi u 0,13% α-naftil fosfatu rastvorenom u istom puferu. Membrana je položena na gel i sendvič je ostavljen u uslovima vlažne komore na 30 °C u mraku u trajanju od 1 h. Nakon inkubacije, membrana je potopljena u 0,3% boju Fast Blue B rastvorenu u acetatnom puferu.

Nespecifične esteraze

Izoforme esteraza detektovane su nativnom elektroforezom po modifikovanoj metodi koju je opisao Loxdale (1983). Po 10 µg proteina nalivano je u bunariće 7,5% poliakrilamidnog gela. Nativna elektroforeza se odvijala pri konstantnom naponu od 100 V na 4 °C. Gel je potom potopljen u rastvor 20 mM natrijum fosfata (pH 7,2), 1,1 mM α-naftil acetata (prethodno rastvorenog u acetonu) i 1,2 mM Fast Blue B (rastvorenog u destilovanoj vodi). Inkubacija se odvijala 40 minuta na sobnoj temperaturi.

3.3.2. Detekcija aktivnosti antioksidativnih enzima u srednjem crevu

3.3.2.1. Priprema homogenata

Creva su homogenizovana pojedinačno, na ledu, u saharoznom puferu pH 7,4 (0,25 M saharoza, 0,05 M TRIS, 0,10 M EDTA) tako da koncentracija tkiva bude 200 mg/ml. Homogenizacija je trajala 3 x 15 sekundi sa pauzama od 15 sekundi, pri brzini od 20000 obrtaja/min. Uzorci su zatim sonifikovani na frekvenciji od 20 kHz u intervalu 3 x 10 sekundi sa pauzama od 10 sekundi. Nakon centrifugiranja na 100000 g u trajanju od 90 minuta na 4 °C, supernatanti su izdvojeni i zamrznuti na -20 °C.

3.3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje specifične aktivnosti antioksidativnih enzima

Superoksid dismutaza (SOD)

Aktivnost je određivana adrenalinskom metodom, koja se zasniva na principu inhibicije autooksidacije adrenalina u adrenohrom od strane superoksid dismutaze u baznoj sredini (Misra i Fridovich, 1972). Prilikom konverzije adrenalina u adrenohrom oslobađa se superoksid anjon radikal koji ubrzava reakciju autooksidacije. SOD uklanja superoksid anjon radikal redukujući tako brzinu nastajanja adrenohroma. Aktivnost SOD određivana je kao promena apsorbance u vremenu na talasnoj dužini od 480 nm na 25 °C u reakcionoj smeši koja je sadržala uzorak, adrenalin i karbonatni pufer pH 10,2 (50 mM Na₂CO₃ i 0,1 mM EDTA). Jedinica aktivnosti SOD definisana je kao količina enzima koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance u minuti.

Katalaza

Aktivnost katalaze je određena po metodi koju je opisao Claiborne (1985), zasnovanoj na praćenju brzine kojom enzim razlaže vodonik peroksid na vodu i kiseonik. Opadanje apsorbance mereno je na 25 °C na talasnoj dužini od 240 nm, na kojoj vodonik peroksid ima maksimum apsorpcije. Reakciona smeša sadržala je 0,05 M fosfatni pufer, pH 7. Koncentracija vodonik peroksida podešena je tako da apsorbance slepe probe bude između 0,525 i 0,550, a da količina uzorka dovodi do promene srednje vrednosti apsorbance u opsegu od 0,03 do 0,06. Apsorbance je očitavana svakih 30

sekundi u toku tri minute nakon dodavanja uzorka. Jedinica aktivnosti katalaze definisana je kao broj mikromolova vodonik peroksida redukovanih u minuti.

3.3.2.3. Detekcija aktivnosti antioksidativnih enzima nativnom elektroforezom

Superoksid dismutaza (SOD)

Aktivnost SOD određena je po metodi koju su opisali Azevedo i sar. (1998). Na 10% poliakrilamidni gel naneto je 8 µg proteina po bunariću. Nakon završetka elektroforeze gel je ispiran dejonizovanom vodom 2 x 1 minut, a zatim je inkubiran u mraku na sobnoj temperaturi u 50 mM karbonatno bikarbonatnom puferu pH 10,2 koji je sadržao: 1mM EDTA, 0,05 mM riboflavin, 0,1 mM nitro plavo tetrazolijum i 0,3% TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin). Po završetku inkubacije, gel je ispran destilovanom vodom i ostavljen u vodi na dnevnom ili veštačkom svetlu do pojave prozirnih traka.

Katalaza

Aktivnost katalaze na gelu određena je prema metodi Aebi i sar. (1983). Količina od 9 µg proteina naneta je na 8% poliakrilamidni gel. Posle elektroforeze gel je ispran 2 x 1 minut u destilovanoj vodi. Inkubiran je tokom 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,8 koji je sadržao 10 mM H₂O₂ (35 µl 30% H₂O₂ na 50 ml pufera). Po završetku inkubacije gel je kratko (3 x 5 sekundi) ispran u destilovanoj vodi, a zatim je uronjen u rastvor koji se dobija mešanjem vodenih rastvora 2% FeCl₃ i 2% K₃Fe(CN)₆. Ova dva rastvora su držana na ledu i sjedinjena u razmeri 1:1 neposredno pre dodavanja gelu. Gel je inkubiran na svetlu do pojave žutih traka.

3.3.3. Detekcija Hsp70

3.3.3.1. Detekcija Hsp70 u srednjem crevu Western blotom

Creva su homogenizovana pojedinačno, na ledu, u 0,15 M NaCl uz dodatak inhibitora proteaza finalne koncentracije 1 mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF) i 20 µM E64, 3 x 10 sekundi pri brzini od 20000 obrtaja/min, sa pauzama od 15 sekundi. Koncentracija tkiva bila je 150 mg/ml. Homogenati su centrifugirani 10 minuta na

10000 g. Supernatanti su izdvojeni i odmah zamrznuti na -20 °C. Koncentracija proteina je određivana prema Bradfordu (1976).

Uzorci su pomešani sa Lemlijevim puferom koji je sadržao SDS i 2-merkaptetanol, i kuvani su 2 minuta na 100 °C. U bunariće 12% SDS-poliakrilamidnog gela nanošeno je 50 µg proteina. Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 100 V na sobnoj temperaturi. Transfer na nitroceluloznu membranu odvijao se tokom noći na 40 V. Membrana je blokirana 4% obranim mlekom u TBST puferu (0,1% Tween 20 u TBS puferu (engl. Tris buffered saline)) u trajanju od 30 minuta, a zatim je inkubirana preko noći na 4 °C sa primarnim anti-Hsp70 mišijim IgG1 antitelom (monoklonsko, klon BRM-22, Sigma Aldrich), razblaženim 1:5000 u 4% mleku u TBST puferu. Membrana je potom isprana u TBST 6 x 5 minuta i inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim anti-mišijim antitelom, HRP-konjugovanim (Sigma Aldrich) i razblaženim 1:10000 u 4% mleku u TBST. Nakon ispiranja u TBST 6 x 5 minuta, proteini Hsp70 su vizualizovani na autoradiografskom filmu primenom ECL (engl. enhanced chemiluminescence) reagensa (Amersham).

3.3.3.2. Određivanje nivoa Hsp70 u mozgu

Priprema homogenata

Nakon žrtvovanja larvi trećeg dana četvrtog stupnja, mozgovi su izolovani iz glavenih kapsula. Pulovalo je 18-20 mozgova po eksperimentalnoj grupi i homogenizovani su na ledu u 120 µl dejonizovane vode 3 x 10 sekundi, na 5000 obrtaja/min, sa pauzama od po 15 sekundi. Posle centrifugiranja u trajanju od 10 minuta na 10000 g, supernatanti su izdvojeni i zamrznuti na -20 °C.

Western blot

Uzorci su pomešani sa Lemlijevim puferom koji je sadržao SDS i 2-merkaptetanol, i kuvani su 2 minuta na 100 °C. Nalivano je 8 µg proteina po bunariću 12% poliakrilamidnog gela. Dalja procedura detaljno je opisana u odeljku o detekciji Hsp70 u crevu (3.3.3.1).

Indirektni ELISA test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

Uzorci mozga razblaženi su u karbonatno-bikarbonatnom puferu (pH 9,6), naliveni na mikrotitar pločicu (15 µg proteina po bunaru) i ostavljeni tokom noći na 4 °C. Pločica je tri puta isprana PBST puferom (0,05% Tween 20 u fosfatom puferisanom fiziološkom rastvoru (engl. phosphate-buffered saline, PBS) pH 7,4), a zatim je inkubirana 2 h sa 5% obranim mlekom u PBST. Usledilo je ispiranje bunara sa PBST, a zatim inkubacija tokom noći na 4 °C sa primarnim anti-Hsp70 mišijim IgG1 antitelom (monoklonsko, klon BRM-22, Sigma Aldrich) razblaženim 1:5000 u 5% mleku u PBST. Nakon ponovnog ispiranja, uzorci su inkubirani sa sekundarnim anti-mišijim antitelom, HRP-konjugovanim (Sigma Aldrich) razblaženim 1:10000 u 5% mleku u TBST, tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Boja je razvijena primenom supstrata za peroksidazu rena - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), a reakcija je zaustavljena odgovarajućim stop reagensom (Sigma Aldrich). Apsorbanca je izmerena na 450 nm u ELISA čitaču (LKB 5060-006). Uzorci su analizirani u triplikatu. Koncentracije Hsp70 u uzorcima očitavane su sa standardne prave koja je konstruisana na osnovu serije razblaženja rekombinantnog Hsp70.

3.3.4. Određivanje koncentracije metalotioneina u srednjem crevu

Koncentracija metalotioneina u srednjem crevu određivana je pomoću kita MT PAGE *Tissue* (Ikzus Environment) neposredno nakon homogenizacije tkiva. Creva su homogenizovana pojedinačno u puferu (100 mg tkiva/300 µl pufera), uz dodatak mešavine inhibitora proteaza iz kita, kao i 2 mM PMSF i 20 µM E64 (finalne koncentracije). Homogenizacija je rađena na isti način kao za detekciju Hsp70. Nakon centrifugiranja uzorka na 25000 g / 25 minuta na 4 °C, supernatanti i standard metalotioneina inkubirani su sa fluorescentnom bojom (monobromobiman) u vodenom kupatilu tokom 10 minuta na 37°C i odmah su nanošeni na 14% poliakrilamidni gel. Posle SDS elektroforeze pri konstantnom naponu od 100 V u tris/glicinskom sistemu na 4 °C, gel je ispiran dejonizovanom vodom 2 x 15 minuta. Za detekciju fluorescentnog signala upotrebljen je Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR System (Bio-Rad). Proteini u supernatantima izmereni su metodom po Bradfordu (1976). Koncentracija metalotioneina u uzorcima određena je na osnovu standardne prave.

3.3.5. Određivanje sadržaja kadmijuma i drugih metala u crevu, glavi, integumentu i fecesu

3.3.5.1. Aparatura

Koncentracije metala (Al, Cd, Cu, Fe, Ni, Mn, Pb i Zn) određene su u svim uzorcima primenom optičke emisione spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES, model 6500 Duo, Thermo Scientific, UK). Snaga RF generatora bila je 1,05 kW, brzina protoka argonskog gasa (u l/min): u plazmi 12; pomoćnog gasa 0,5; gasa za raspršivanje 0,5. Odabrane talasne dužine (nm) su iznosile: Al (308,2); Cd (214,8); Cu (324,7); Fe (238,2); Ni (231,6); Mn (220,3); Zn (213,8). Svaki uzorak je analiziran u duplikatu, a svaka analiza podrazumevala je tri replikata. Za proveru tačnosti i preciznosti uređaja korišćen je standardni referentni materijal TORT-2 (hepatopankreas jastoga; NRC Kanada). Razlike između sertifikovanih vrednosti i izmerenih koncentracija bile su manje od 10%.

3.3.5.2. Reagensi

Sve hemikalije i reagensi bili su analitičke čistoće (Merck, Darmstadt, Germany). Stakleno posuđe i plastične boce očišćeni su kiselinom (potapanjem u 10% azotnu kiselinu 12 h) i dobro isprani destilovanom vodom. Osnovni multielementni rastvor (ICP multi-element standard solution IV, Merck), koji je sadržao dvadeset dva elementa, koncentracije 1000 mg/l, upotrebljen je za pripremu standardnih rastvora za ICP-OES merenja.

3.3.5.3. Priprema uzoraka

Trećeg dana četvrtog stupnja prikupljen je feces larvi, koje su zatim žrtvovane, a glave i integumenti su izolovani za eksperiment. Uzorci su prebačeni u plastične kivete i izmerena im je masa. U svaku kivetu dodato je po 4 ml 65% HNO₃ i 1 ml 30% H₂O₂, i usledila je digestija na 80 °C tokom 4 h. Kada su ohlađeni, svi uzorci su razblaženi destilovanom vodom do finalne zapremine od 10 ml.

3.3.6. Analiza osobina fitnessa

Praćene su sledeće osobine:

1. Ukupan broj jaja i procenat neoplođenih jaja u prikupljenim leglima;
2. Preživljavanje larvi, određeno kao procenat preživelih larvi tokom perioda nakon izleganja do žrtvovanja na četvrtom larvenom stupnju;
3. Masa larvi prvog, drugog i trećeg dana četvrtog stupnja;
4. Relativna brzina rasta (engl. relative growth rate, RGR), određena prema Tammaru et al. (2004) po formuli:

$$\text{RGR} = \log (M_F/M_P)/3 \text{ dana} \times 100$$

M_F – finalna masa na dan žrtvovanja (treći dan IV stupnja)

M_P – početna masa prvog dana IV stupnja

5. Trajanje prvog, drugog i trećeg stupnja, kao i ukupno trajanje razvića od izleganja larvi do žrtvovanja trećeg dana četvrtog stupnja

3.4. Eksperiment II

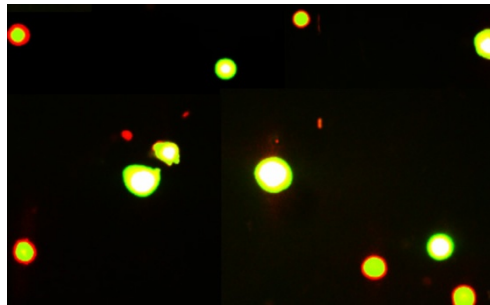
3.4.1. Procena vijabilnosti hemocita i oštećenja DNK u njima

3.4.1.1. Priprema uzorka

Hemolimfa je prikupljena odsecanjem zadnjeg para nožica kod larvi trećeg dana petog stupnja. Formirano je osam uzoraka po eksperimentalnoj grupi pulovanjem hemolimfe od po dve larve. Svaki uzorak je odmah razblažen deset puta u Ringerovom rastvoru (192 mM NaCl, 3,2 mM KCl, 2,4 mM CaCl₂, 2,4 mM NaHCO₃; pH 7,0) koji je preporučen za lepidopteru *Bombyx mori* (Mitsubishi, 2002). Rastvor je sadržao i 0,07% feniltioureu u cilju sprečavanja melanizacije i koagulacije hemolimfe (Carmona i sar., 2011). Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 500 g na 4 °C. Supernatanti su odbačeni, a talog je resuspendovan u 80 µl preostalog supernatanta. 20 µl dobijene ćelijske suspenzije upotrebljeno je za test ćelijske vijabilnosti, a 60 µl za komet test.

3.4.1.2. Test ćelijske vijabilnosti

Vijabilnost hemocita je određivana pomoću diferencijalnog akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB) eseja prema Squieru i Cohenu (2001). U 20 μl ćelijske suspenzije, dodato je 2 μl AO/EB boje (smeša 100 $\mu\text{g/ml}$ AO i 100 $\mu\text{g/ml}$ EB u odnosu 1:1). Suspenzija je nanošena na mikroskopsku pločicu i posmatrana na fluorescentnom mikroskopu pod uvećanjem 400x. Čelije su smatrane vijabilnim ukoliko su im jedra bila obojena zelenom fluorescencijom koja potiče od AO. Ukoliko je integritet membrane narušen, tada i EB difunduje u ćeliju, pa jedra emituju narandžastu ili crvenu fluorescenciju. Takve ćelije su smatrane nevijabilnim (**Slika 5**).

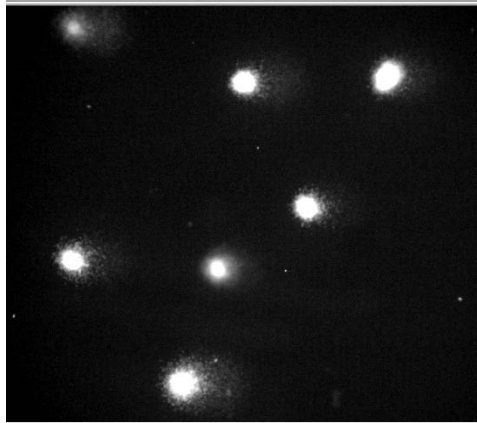


Slika 5. AO/EB diferencijalno bojenje hemocita larvi gubara

3.4.1.3. Komet test

Za procenu oštećenja DNK primenjena je alkalna verzija komet testa (Singh i sar., 1988). Mikroskopske pločice su prekrivene sa dva sloja 1% agaroze normalne tačke topljenja (Normal Melting Point – NMP). 30 μl suspenzije ćelija pomešano je sa 70 μl 1% agaroze niske tačke topljenja (Low Melting Point – LMP), a zatim je 70 μl smeše naneto na pločice. Nakon što se agarozna stegla, pločice su potopljene u hladan rastvor za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1,5% Triton X-100, pH 10) na 1 h. U narednom koraku inkubirane su 20 minuta u hladnom rastvoru (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) kako bi došlo do denaturacije, a tokom narednih 20 minuta odvijala se elektroforeza (0,5-0,75 V/cm, 300 mA) u istom rastvoru. Pločice su posle elektroforeze potopljene u hladan rastvor za neutralizaciju (0,4 M Tris, pH 7,5) na 15 minuta, a potom u hladan metanol radi fiksacije. Nakon fiksacije, sušile su se 24 h u mraku na 4 °C. Neposredno pre analize, rehidrirane su 15 minuta u hladnoj destilovanoj vodi. Za bojenje je korišćena boja AO (2 $\mu\text{g/ml}$).

Komete su posmatrane na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austria) (Slika 6) i analizirane primenom softvera Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK). Za procenu DNK oštećenja izabran je parametar intenzitet repa komete (engl. tail intensity %). Za svaku eksperimentalnu grupu pripremljeno je osam pločica, a analizirano je 50 kometa na svakoj pločici (400 kometa po grupi).



Slika 6. “Komete” hemocita larvi gubara

3.4.3. Analiza osobina fitnessa

Praćene su iste osobine fitnessa kao u **Eksperimentu I**, izuzev što u ovim leglima nije utvrđen ukupni broj jaja, kao ni procenat neoplođenih jaja. Preživljavanje larvi određeno je za period od izleganja do žrtvovanja trećeg dana petog larvenog stupnja. Mase larvi izmerene su prvog, drugog i trećeg dana petog stupnja, i upotrebljene su za računanje relativne brzine rasta (RGR). Zabeleženo je trajanje pojedinačnih larvenih stupnjeva, uključujući četvrti, kao i ukupno trajanje razvića od izleganja larvi do žrtvovanja trećeg dana petog stupnja.

3.4.4. Integrisani odgovor biomarkera

Integrisani odgovor biomarkera (engl. integrated biomarker response, IBR) određen je metodom koju su opisali Beliaeff i Burgeot (2002). Vrednost svakog biomarkera u okviru pojedinačne eksperimentalne grupe (X_i) standardizovana je po formuli: $Y_i = (X_i - X_{sr}) / SD$, gde je Y_i standardizovani odgovor biomarkera, a srednja vrednost (X_{sr}) i standardna devijacija (SD) parametra dobijeni su uzimajući u obzir sve

grupe. Zatim je određena vrednost $Z_i = Y_i$ ili $Z_i = -Y_i$ u zavisnosti od toga da li je biomarker na tretman odgovorio aktivacijom ili inhibicijom. Za svaki parametar je identifikovana minimalna vrednost Z_i , označena kao min, da bi bila izračunata vrednost $S_i = Z_i + |\min|$, gde je $|\min|$ apsolutna vrednost. Vrednosti odabranih biomarkera S_i za određenu eksperimentalnu grupu predstavljaju radijalne koordinate na grafiku (engl. star plot) i odgovaraju veličini efekta datog tretmana na te biomarkere. Pojedinačne površine grafika A_i računane su po formuli: $A_i = (S_i * S_{i+1}) / 2$, gde S_i i S_{i+1} predstavljaju rezultate pojedinačnih biomarkera, tj. njihove uzastopne koordinate na grafiku. Biomarkeri su raspoređeni u smeru kazaljke na satu: S1 – intenzitet repa komete TI (%), S2 – vijabilnost hemocita, S3 – masa larvi trećeg dana petog stupnja, i S4 – ukupno trajanje razvića larvi od izleganja do žrtvovanja trećeg dana petog stupnja. IBR indeks predstavlja sumu svih pojedinačnih vrednosti A_i , gde je A_i površina koju definišu dva uzastopna biomarkera na grafiku.

3.5. Statistička obrada rezultata

Analiza koncentracija kadmijuma u tkivima i izmetu uključivala je deskriptivnu statistiku, jednofaktorsku analizu varijanse (ANOVA), uporedni t -test i Fisher's Least Significant Difference Test (LSD). Za deskriptivnu statistiku i pomenute testove korišćena je demo verzija NCSS statističkog softvera (Hintze, 2001). Verovatnoća $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Analiza glavnih komponenti (engl. Principal Component Analysis (PCA)) izvedena je primenom statističkog paketa PLS Tool Box, v.6.2.1 za MATLAB 7.12.0 (R2011a). Pre multivarijantne analize svi podaci su autoskalirani da bi vrednosti bile izražene u kompatibilnim jedinicama. Za PCA je primenjen *Singular Value Decomposition (SVD)* algoritam i 0,95 nivo poverenja za Q i T2 vrednosti Hotellingove raspodele korišćene za otkrivanje grubih grešaka među rezultatima.

Kada je reč o ostalim eksperimentima, rezultati su izraženi kao srednja vrednost i standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Za proveru normalnosti raspodele podataka primenjen je D'Agostino-Pearson test, osim u slučaju koncentracije metalotioneina i specifične aktivnosti antioksidativnih enzima, gde je zbog manjeg broja uzoraka upotrebljen

Kolmogorov-Smirnov test. Ekstremi su utvrđeni pomoću ESD (engl. extreme studentized deviate) testa.

Na parametre kod kojih je ustanovljena normalna raspodela (specifične aktivnosti digestivnih i antioksidativnih enzima, koncentracija Hsp70 u mozgu, vijabilnost hemocita, masa larvi i relativna brzina rasta (RGR) na četvrtom i petom larvenom stupnju, ukupni broj jaja u leglu i procenat neoplođenih jaja u leglu) primenjena je parametarska statistika - jednofaktorska ANOVA i Tukey's post hoc test, odnosno *t*-test za poslednja dva parametra. Sa druge strane, neparametarskim testovima Kruskal-Wallis ANOVA i Dunn's post hoc test analizirani su koncentracija metalotioneina, količina oštećenja DNK i parametri trajanja razvicia. Nivo statističke značajnosti bio je $p < 0,05$. Za sve analize korišćen je softver GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

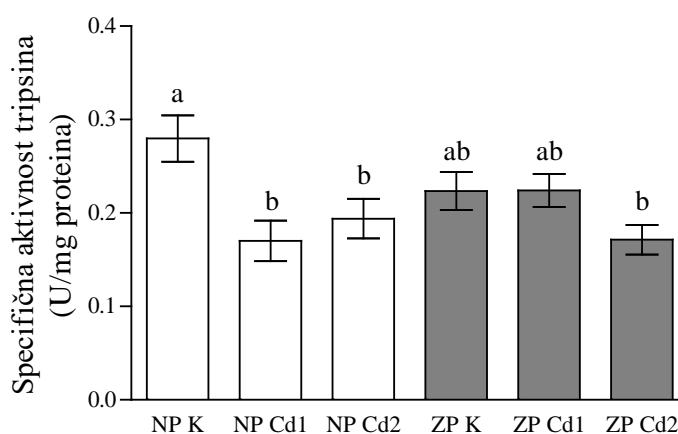
4. REZULTATI

4.1. Efekti kadmijuma na digestivne enzime u srednjem crevu

4.1.1. Proteaze

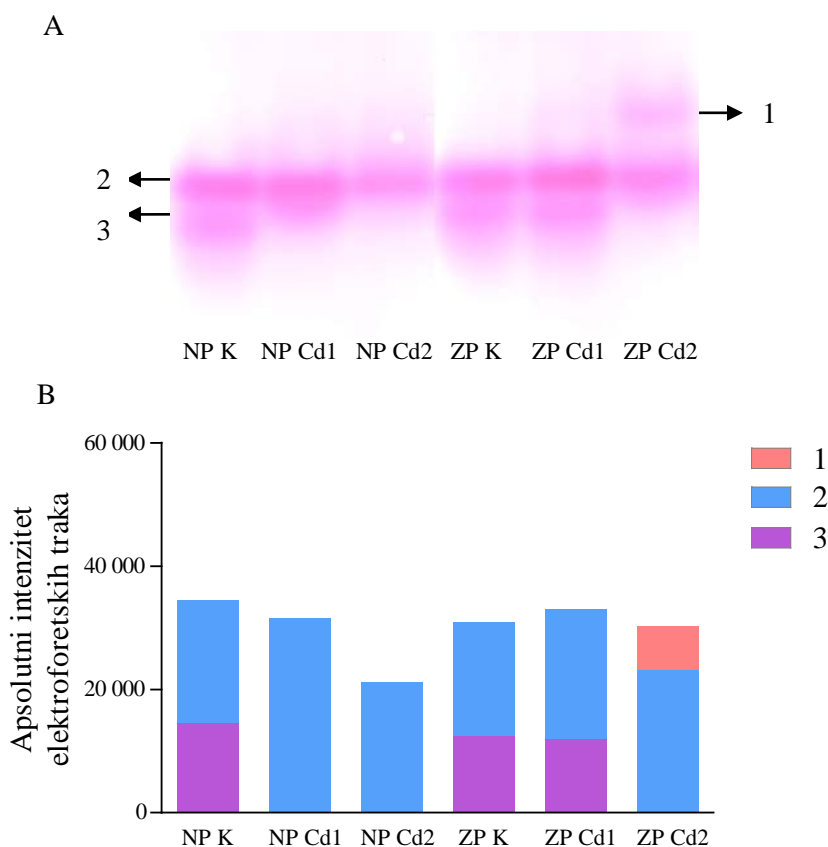
4.1.1.1. Specifična aktivnost i izoforme tripsina

U populaciji gubara sa nezagađene lokacije oba tretmana kadmijumom dovela su do značajnog smanjenja specifične aktivnosti tripsina u odnosu na kontrolu, ali bez dozne zavisnosti. Izloženost larvi sa kontaminiranog lokaliteta kadmijumu nije rezultirala statistički značajnim promenama aktivnosti enzima (**Slika 7**).



Slika 7. Efekat kadmijuma na specifičnu aktivnost tripsina u srednjem crevu larvi *Lymantria dispar* četvrtog stupnja. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

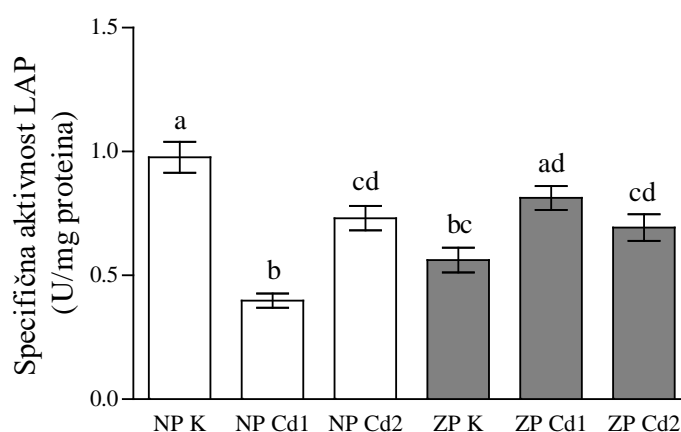
U kontrolnim grupama larvi iz obe populacije prisutne su dve izoforme tripsina, označene brojevima 2 i 3. Kod larvi sa Kosmaja nakon obe doze kadmijuma aktivnost tripsina potiče samo od izoforme 2. Nakon tretmana larvi sa kontaminirane lokacije dozom od 50 μg Cd/g suve hrane detektovane su iste trake (2 i 3) kao u kontrolnoj grupi. Pri dozi od 100 μg Cd/g suve hrane traka 3 je izostala, ali je detektovana nova izoforma 1, najmanje elektroforetske pokretljivosti (**Slika 8**).



Slika 8. A. PAGE zimogram aktivnosti tripsina. Svaka kolona predstavlja uzorak slučajno izabrane jedinke po tretmanu. **B.** Denzitometrijska analiza traka. Brojevima 1-3 označene su pojedinačne izoforme.

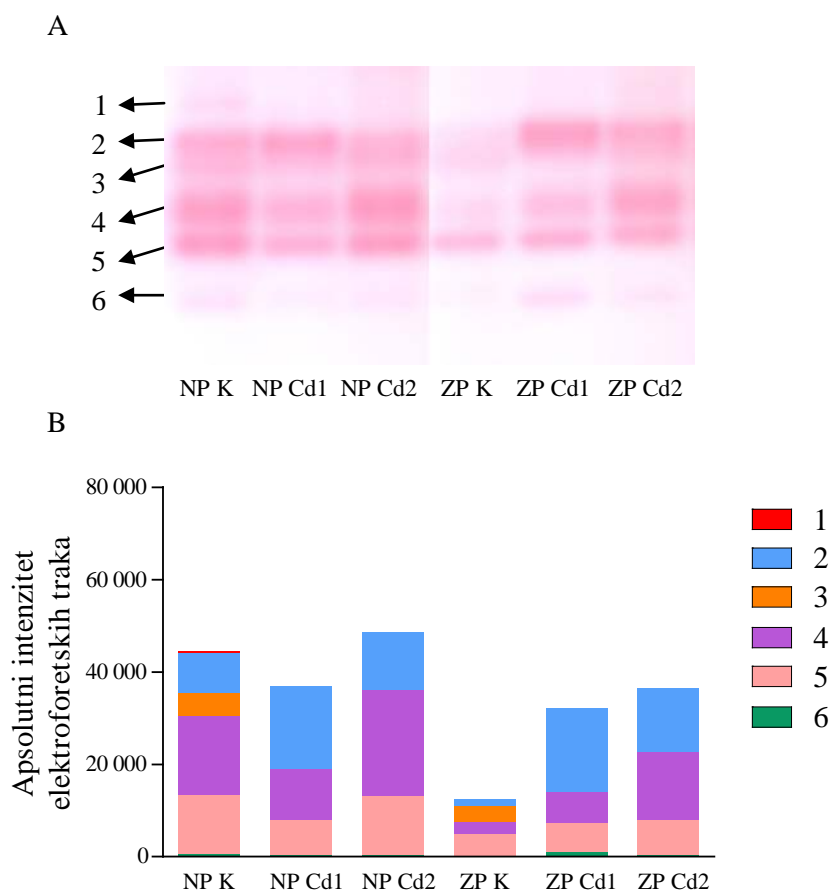
4.1.1.2. Specifična aktivnost i izoforme leucin aminopeptidaze (LAP)

Nakon intoksikacije larvi poreklom sa Kosmaja, aktivnost LAP bila je snižena nakon obe primenjene doze u poređenju sa kontrolnom grupom. Inhibicija nižom dozom kadmijuma bila je statistički značajno izraženija u odnosu na tretman višom dozom. U drugoj populaciji larvi izloženost koncentraciji od 50 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane rezultirala je povećanjem aktivnosti LAP, dok viša doza nije imala efekta u odnosu na kontrolu. Aktivnost LAP u kontrolnoj grupi iz te populacije bila je niža u odnosu na kontrolu sa nekontaminiranog lokaliteta. Međutim, nakon primene niže doze, aktivnost je bila značajno viša kod larvi sa zagađene lokacije u odnosu na ekvivalentnu grupu sa Kosmaja (**Slika 9**).



Slika 9. Specifična aktivnost leucin aminopeptidaze (LAP) u srednjem crevu larvi *Lymantria dispar* četvrtog stupnja nakon tretmana kadmijumom. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

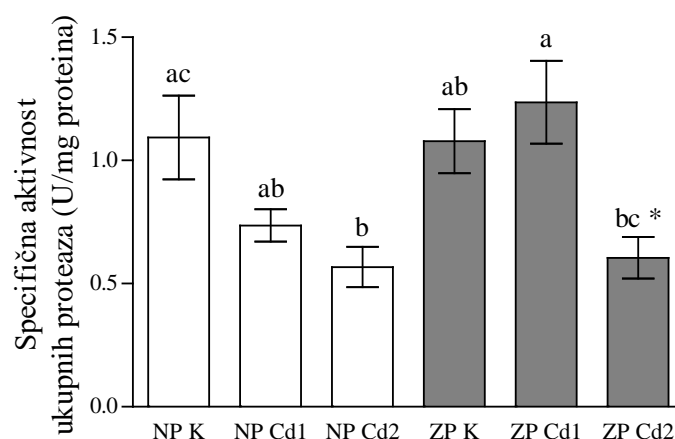
U kontrolnoj grupi larvi poreklom sa nekontaminiranog lokaliteta detektovan je najveći broj izoformi LAP – šest, od kojih je izoforma 1 prisutna samo u toj grupi. Aktivnost izoforme 2 je kod obe populacije pojačana nakon oba tretmana kadmijumom u odnosu na odgovarajuće kontrole. Traka 3 detektovana je samo kod kontrolnih grupa. Dozno zavisni rast aktivnosti izoforme 4 uočen je kod larvi sa zagađenog lokaliteta. U toj populaciji intenziteti traka 2 i 4 višestruko su uvećani nakon oba tretmana u poređenju sa kontrolom (**Slika 10**).



Slika 10. A. PAGE zimogram aktivnosti LAP. Svaka kolona predstavlja uzorak slučajno izabrane jedinice po tretmanu. **B.** Denzitometrijska analiza traka. Brojevima 1-6 označene su pojedinačne izoforme.

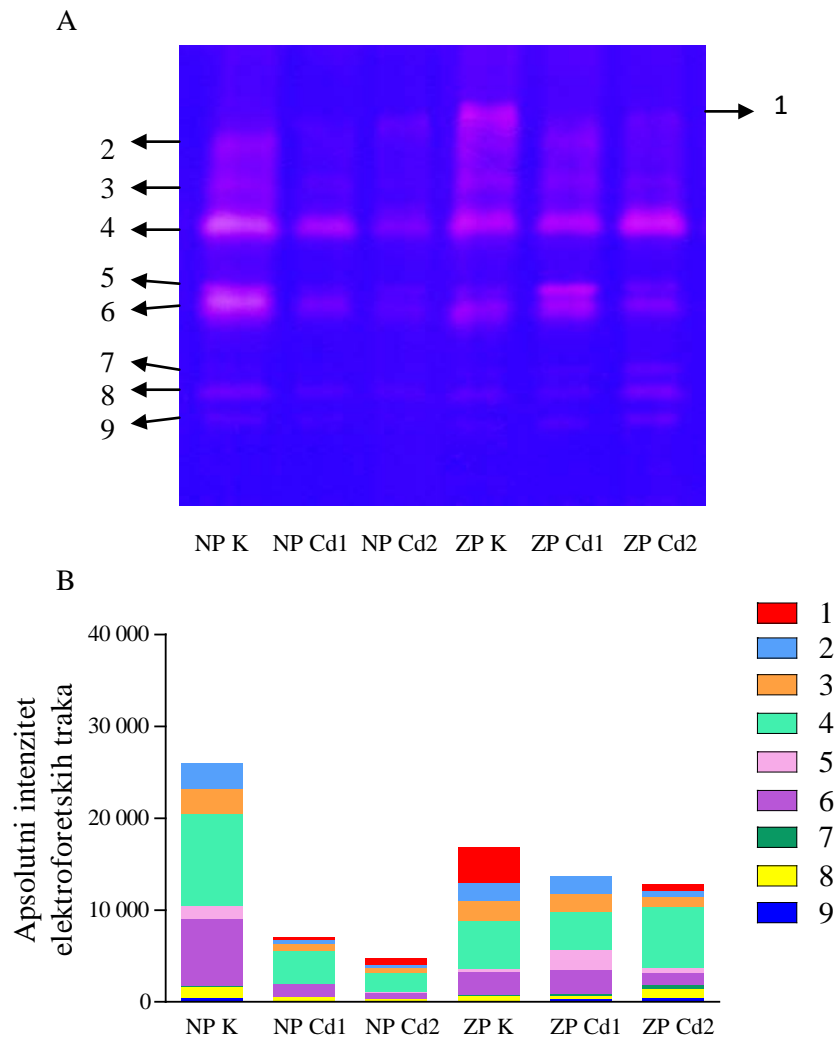
4.1.1.3. Specifična aktivnost i izoforme ukupnih proteaza

Sniženje aktivnosti ukupnih proteaza u populaciji gubara sa Kosmaja detektovano je nakon izloženosti larvi koncentraciji od 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane. Kod larvi poreklom sa staništa u blizini magistralnog puta aktivnost enzima nakon više doze kadmijuma bila je redukovana u odnosu na grupu koja je dobijala 50 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane. Statistička analiza koja je obuhvatila samo grupe iz te populacije, pokazala je značajno sniženje aktivnosti kod larvi tretiranih višom dozom metala i u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 11**).



Slika 11. Specifična aktivnost ukupnih proteaza u srednjem crevu larvi *Lymantria dispar* četvrtog stupnja nakon tretmana kadmijumom. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, * predstavlja značajnu razliku između tretmana i kontrole prema testu koji obuhvata samo populaciju sa zagađene lokacije ($p < 0,05$).

Detektovan je veliki broj izoformi (9) ukupnih proteaza u svim eksperimentalnim grupama larvi gubara. U populaciji sa nekontaminirane lokacije jasno je vidljiv trend redukcije intenziteta svih traka nakon tretmana kadmijumom dok su u populaciji sa zagađene lokacije razlike između eksperimentalnih grupa manje izražene. Izuzetak je izoforma 1 koja se u populaciji sa Kosmaja javlja samo posle izloženosti kadmijumu, a odsutna je u kontrolnoj grupi. Ista izoforma pokazuje višestruko veću aktivnost u kontrolnoj grupi larvi sa zagađene lokacije, da bi u toj populaciji bila odsutna nakon niže doze metala, odnosno inhibirana nakon više doze (**Slika 12**). U kosmajskoj populaciji izoforme manje molekulske mase se gube nakon oba tretmana.

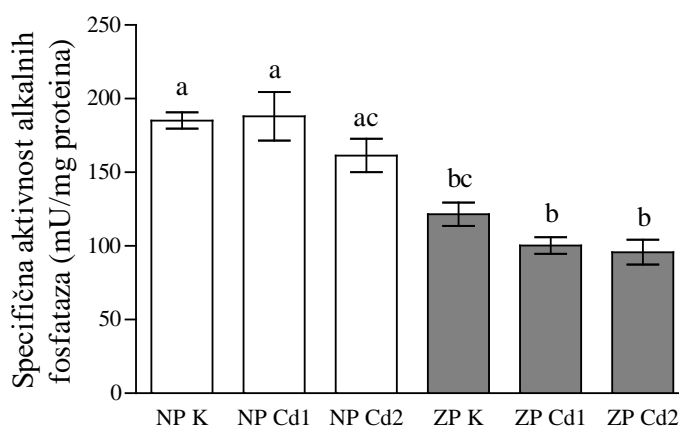


Slika 12. A. PAGE zimogram aktivnosti ukupnih proteaza. Svaka kolona predstavlja uzorak slučajno izabrane jedinice po tretmanu. **B.** Denzitometrijska analiza traka. Brojevima 1-9 označene su pojedinačne izoforme.

4.1.2. Fosfataze

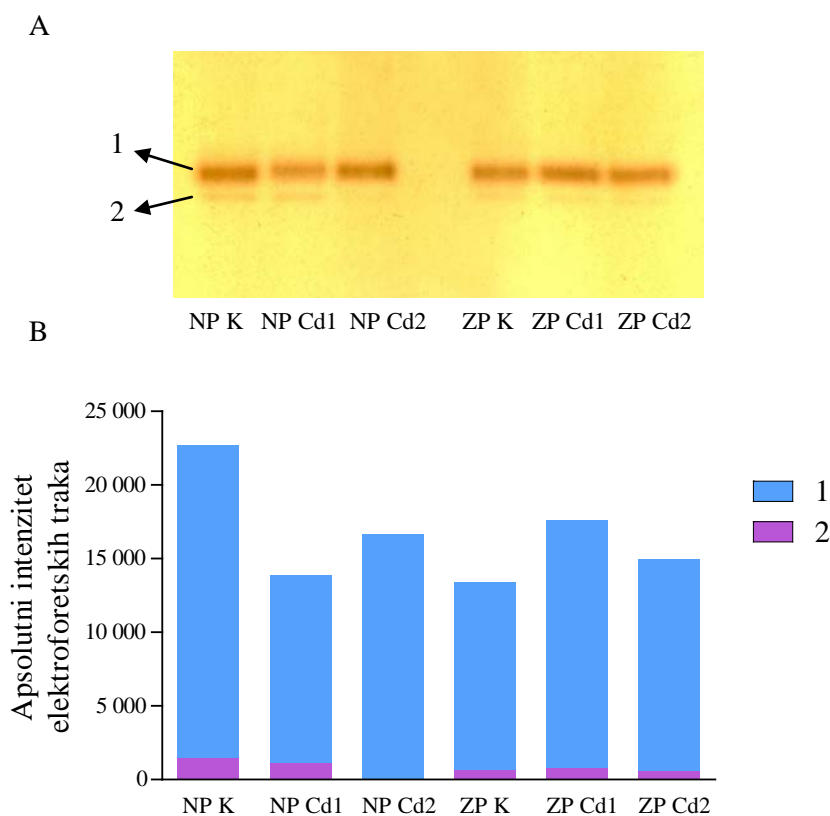
4.1.2.1. Specifična aktivnost i izoforme alkalnih fosfataza

Srednje vrednosti alkalnih fosfataza nisu bile promenjene nakon izloženosti kadmijumu ni u jednoj populaciji u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe. Evidentna je niža aktivnost enzima u svim grupama iz kontaminirane populacije u odnosu na ekvivalentne grupe iz populacije sa Kosmaja (**Slika 13**).



Slika 13. Specifična aktivnost alkalnih fosfataza u srednjem crevu larvi *Lymantria dispar* četvrtog stupnja nakon intoksikacije kadmijumom. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Detektovane su dve izoforme alkalnih fosfataza, prisutne kod obe populacije u svim grupama osim u nezagađenoj, koja je tretirana višom dozom kadmijuma. Izoforma 1, manje elektroforetske pokretljivosti, ubedljivo je dominantnija u odnosu na izoformu 2 (**Slika 14**).

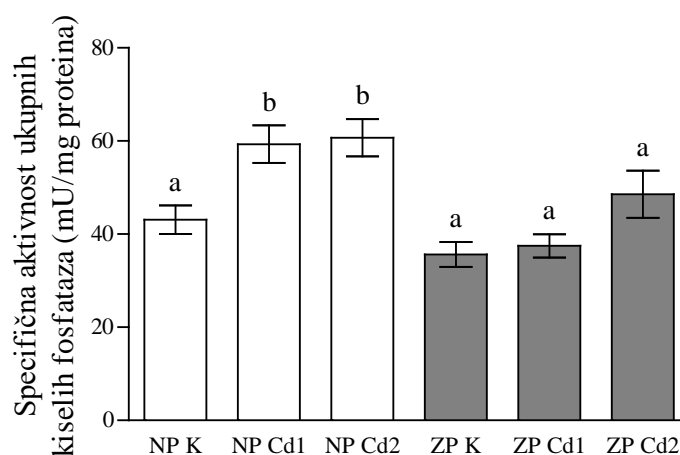


Slika 14. A. PAGE zimogram aktivnosti alkalnih fosfataza. Svaka kolona predstavlja uzorak slučajno izabrane jedinke po tretmanu. **B.** Densitometrijska analiza traka. Brojevi 1 i 2 označavaju pojedinačne izoforme.

4.1.2.2. Specifična aktivnost i izoforme kiselih fosfataza

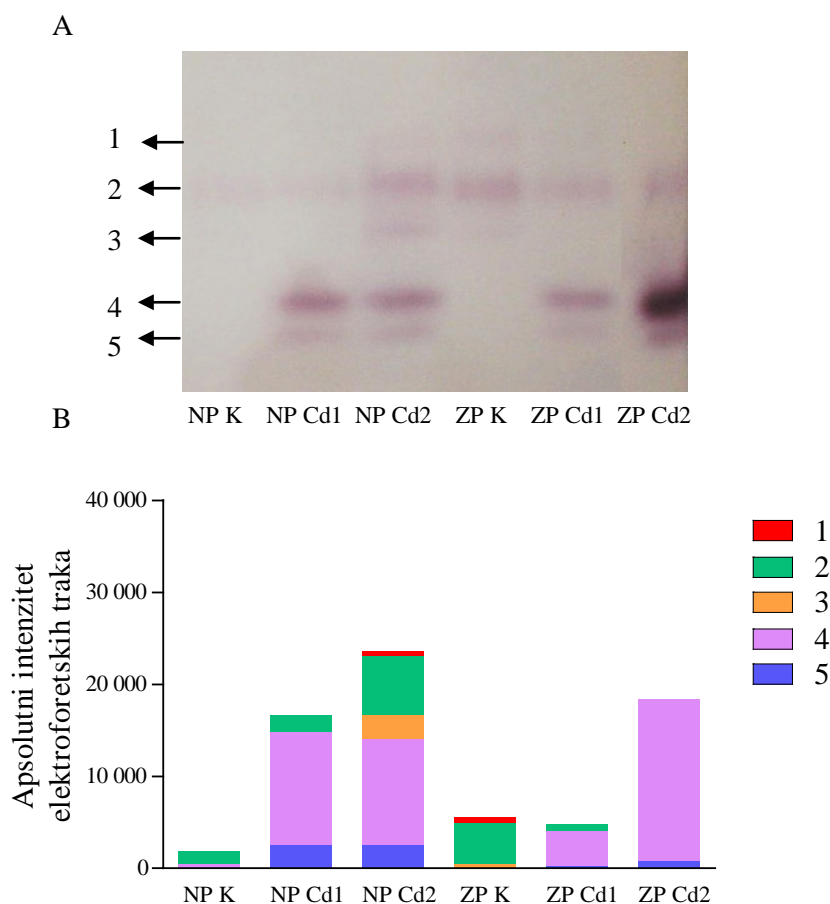
Ukupne kisele fosfataze

U populaciji larvi poreklom sa nezagađene lokacije zabeležen je rast ukupne aktivnosti kiselih fosfataza nakon izloženosti obema koncentracijama kadmijuma. U drugoj populaciji nije uočen značajan efekat metala u odnosu na kontrolu. Posle oba tretmana kadmijumom aktivnost ovih enzima bila je značajno niža kod larvi sa kontaminirane lokacije u poređenju sa ekvivalentnim grupama sa Kosmaja (**Slika 15**).



Slika 15. Uticaj kadmijuma na specifičnu aktivnost ukupnih kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi gubara četvrtog stupnja. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

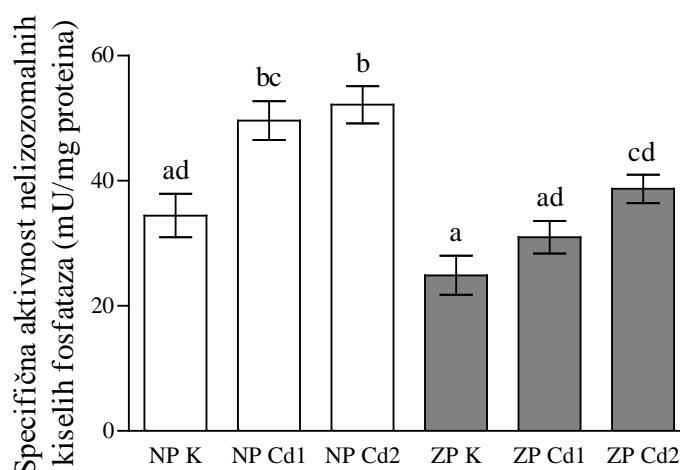
U kontrolnoj grupi iz nezagađene populacije trake 2, 3 i 4 bile su veoma slabog intenziteta. Pored izoformi 2 i 3, kod kontrolnih larvi iz druge populacije detektovana je i traka broj 1. Oba tretmana kadmijumom dovela su do višestrukog povećanja aktivnosti izoforme 4 kod obe populacije, s tim što je kod larvi sa kontaminiranog lokaliteta rast bio umeren nakon niže doze. U odgovoru na tretmane, pojavila se i nova izoforma 5, čija je aktivnost bila izraženija u populaciji sa Kosmaja (**Slika 16**).



Slika 16. A. PAGE zimogram aktivnosti ukupnih kiselih fosfataza. Svaka kolona predstavlja uzorak slučajno izabrane jedinke po tretmanu. **B.** Densitometrijska analiza traka. Brojevima 1-5 označene su pojedinačne izoforme.

Nelizozomske fosfataze

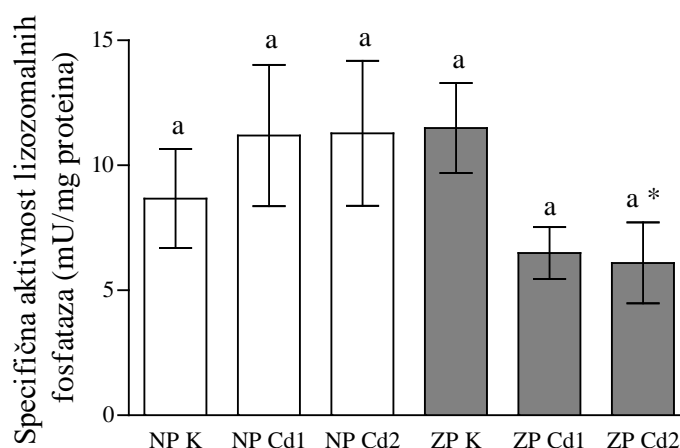
Aktivnost frakcije kiselih fosfataza rezistentnih na natrijum fluorid bila je značajno povišena nakon oba tretmana kadmijumom u odnosu na kontrolu u populaciji sa Kosmaja. Dozna zavisnost nije uočena. Statistički značajno povećanje aktivnosti ovih enzima registrovano je i kod larvi poreklom iz blizine Ibarske magistrale, ali samo nakon tretmana sa 100 µg Cd/g suve hrane. Ipak, vrednosti parametra u obe tretirane grupe iz te populacije bile su značajno niže u odnosu na ekvivalentne grupe iz populacije sa Kosmaja (**Slika 17**).



Slika 17. Efekat kadmijuma na specifičnu aktivnost nelizozomskih fosfataza u srednjem crevu larvi *Lymantria dispar* četvrtog stupnja. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Lizozomske fosfataze

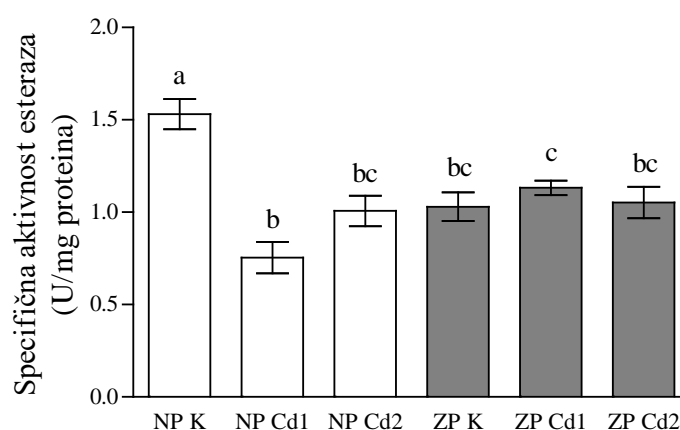
Ni u jednoj populaciji nisu registrovane statistički značajne promene aktivnosti lizozomskih fosfataza nakon dugotrajne izloženosti kadmijumu. Kod kosmajске populacije, sa povećanjem koncentracije kadmijuma, primećena je tendencija porasta enzimske aktivnosti. Treba pomenuti da je tretirane grupe iz ove populacije karakterisala veoma visoka varijansa. Aktivnost nakon tretmana većom dozom kadmijuma kod zagađene populacije bila je značajno niža u odnosu na kontrolu prema statistici koja je obuhvatala samo tu populaciju (**Slika 18**).



Slika 18. Specifična aktivnost lizozomskih fosfataza u srednjem crevu larvi *Lymantria dispar* trećeg dana četvrtoeg stupnja nakon hroničnog unosa kadmijuma kroz hranu. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, * predstavlja značajnu razliku između tretmana i kontrole prema testu koji obuhvata samo populaciju sa zagađene lokacije ($p < 0,05$).

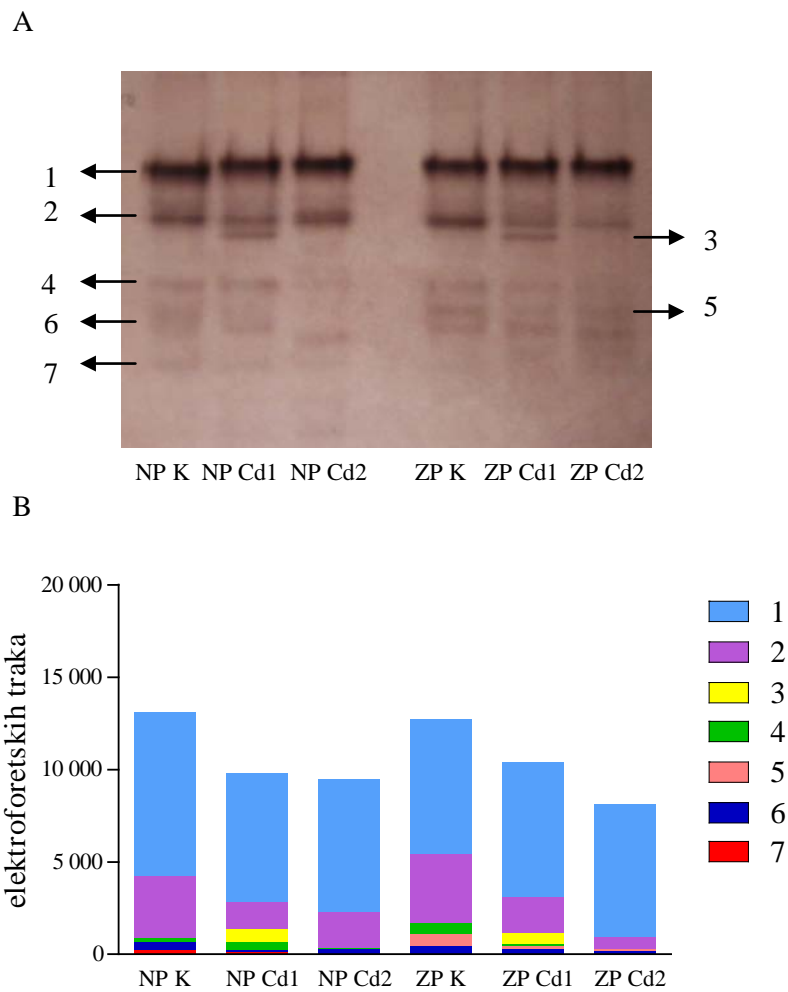
4.1.3. Specifična aktivnost i izoforme nespecifičnih esteraza

Oba tretmana kadmijumom dovela su do statistički značajnog smanjenja aktivnosti esteraza kod larvi poreklom sa nezagađene lokacije. Ipak, dozna zavisnost nije registrovana. U drugoj populaciji izloženost kadmijumu nije imala uticaja na ove enzime, ali je uočeno da je aktivnost kod kontrolnih larvi bila niža u odnosu na kontrolnu grupu sa nekontaminirane lokacije. Nakon tretmana sa 50 μg Cd/g suve hrane izmerena je značajno viša aktivnost esteraza kod larvi sa zagađene lokacije u odnosu na ekvivalentnu grupu sa Kosmaja (**Slika 19**).



Slika 19. Uticaj kadmijuma na specifičnu aktivnost esteraza u srednjem crevu larvi gubara četvrtog stupnja. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

U eksperimentu je detektovano sedam izoformi esteraza, među kojima se izoforma 1 u svim eksperimentalnim grupama ističe najvišom aktivnošću. Među izozimima manje elektroforetske pokretljivosti uočena je pojava nove trake broj 3 kod obe populacije larvi, isključivo nakon primene niže doze kadmijuma (50 μg Cd/g suve hrane). Trake koje odgovaraju izoformama veće elektroforetske pokretljivosti generalno su slabijeg intenziteta u svim grupama, a njihov obrazac sličan je u okviru svake populacije (**Slika 20**).

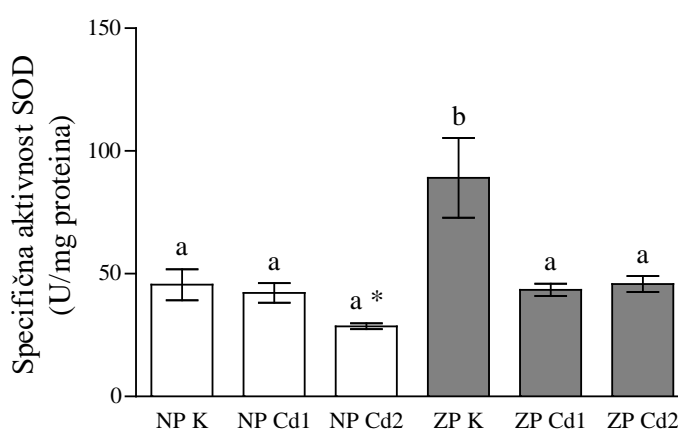


Slika 20. A. PAGE zimogram aktivnosti esteraza. Svaka kolona predstavlja uzorak slučajno izabrane jedinice po tretmanu. **B.** Denzitometrijska analiza traka. Brojevima 1-7 označene su pojedinačne izoforme.

4.2. Efekti kadmijuma na enzime antioksidativne zaštite

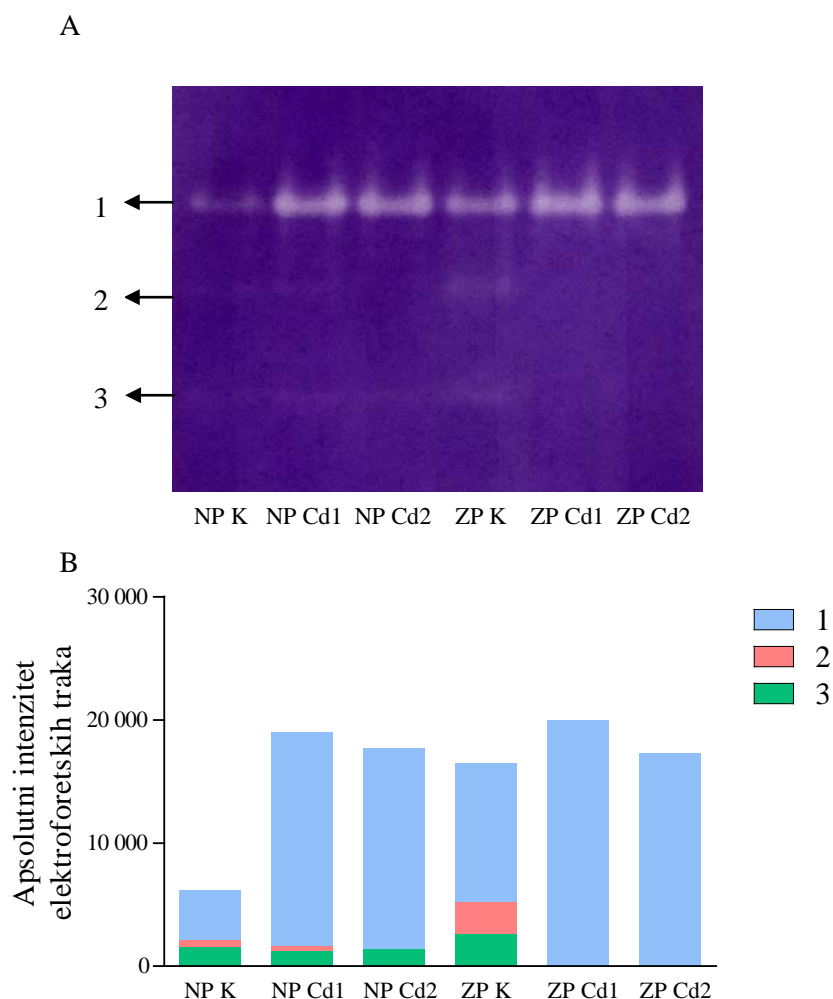
4.2.1. Specifična aktivnost i izoforme superoksid dismutaze (SOD)

Statistička analiza aktivnosti SOD u populaciji gubara sa Kosmaja otkrila je značajno smanjenje nakon tretmana kadmijumom u koncentraciji od 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane. Kod kontrolnih larvi poreklom sa kontaminiranog lokaliteta evidentna je viša aktivnost ovog enzima u odnosu na oba hronična tretmana, kao i u odnosu na kontrolnu grupu iz druge populacije (**Slika 21**).



Slika 21. Uticaj kadmijuma na specifičnu aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u srednjem crevu larvi gubara četvrtog stupnja. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, * predstavlja značajnu razliku između tretmana i kontrole prema testu koji obuhvata samo populaciju sa nezagađene lokacije ($p < 0,05$).

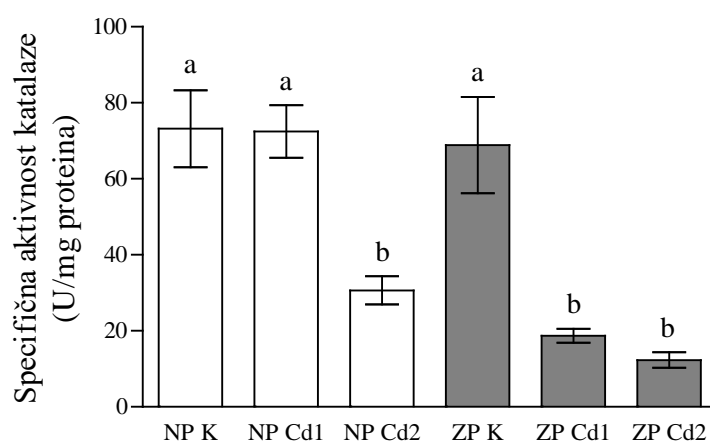
Na zimogramu su detektovane tri izoforme SOD u srednjem crevu larvi gubara, od kojih je izoforma broj 1 najdominantnija po aktivnosti u svim grupama. Sve tri izoforme su vidljive kod kontrolnih grupa u obe populacije, kao i nakon tretmana nižom dozom kadmijuma u populaciji sa nekontaminirane lokacije. Nakon doze od 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane, kod larvi sa Kosmaja uočene su trake 1 i 3. Kod larvi iz zagađene sredine posle hroničnih tretmana registrovana je samo izoforma 1 (**Slika 22**).



Slika 22. A. PAGE zimogram aktivnosti SOD. Svaka kolona predstavlja uzorak slučajno izabrane jedinke po tretmanu. **B.** Denzitometrijska analiza traka. Brojevima 1-3 označene su pojedinačne izoforme.

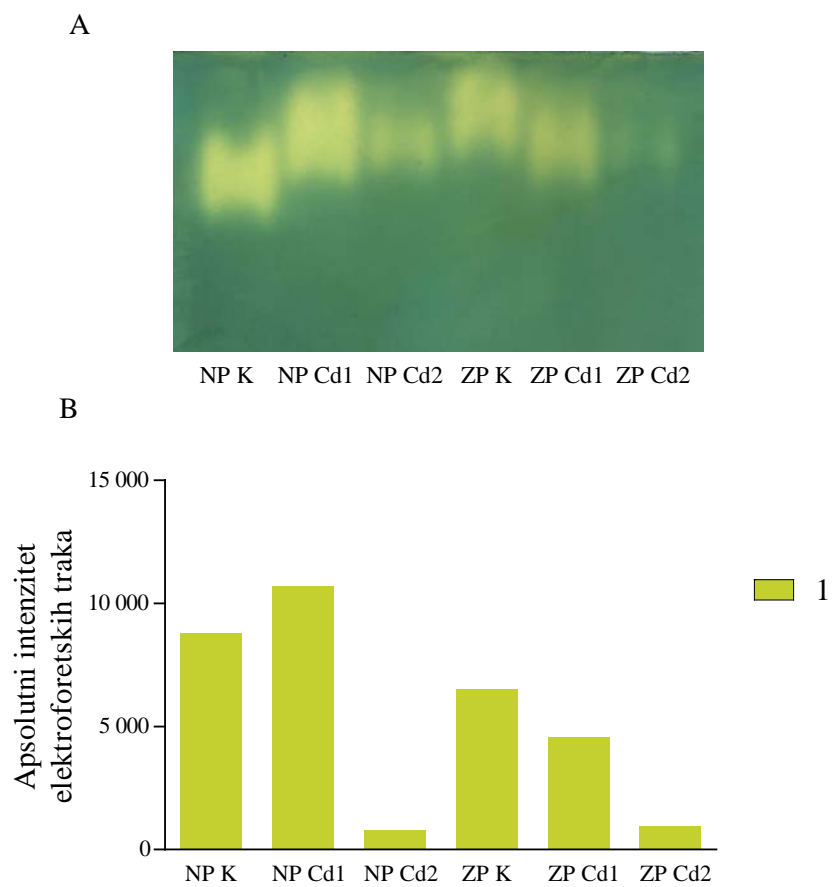
4.2.2. Specifična aktivnost i izoforme katalaze

U populaciji larvi sa nekontaminirane lokacije specifična aktivnost katalaze redukovana je značajno samo nakon hronične izloženosti kadmijumu koncentracije 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane. U drugoj populaciji su oba tretmana dovela do smanjenja aktivnosti enzima, iako ne na dozno-zavisani način. Nakon doze od 50 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane aktivnost kod larvi sa zagađene lokacije bila je značajno niža u odnosu na ekvivalentnu grupu sa Kosmaja (**Slika 23**).



Slika 23. Uticaj kadmijuma na specifičnu aktivnost katalaze u srednjem crevu larvi gubara četvrtog stupnja. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Samo jedna izoforma katalaze, koju karakteriše izrazito slaba elektroforetska pokretljivost, uočena je kod obe populacije u svim eksperimentalnim grupama. Smanjenje intenziteta traka vidljivo je nakon primene više doze kadmijuma kod populacije larvi sa Kosmaja, i nakon oba tretmana kod populacije sa zagađene lokacije u odnosu na odgovarajuće kontrole (**Slika 24**).

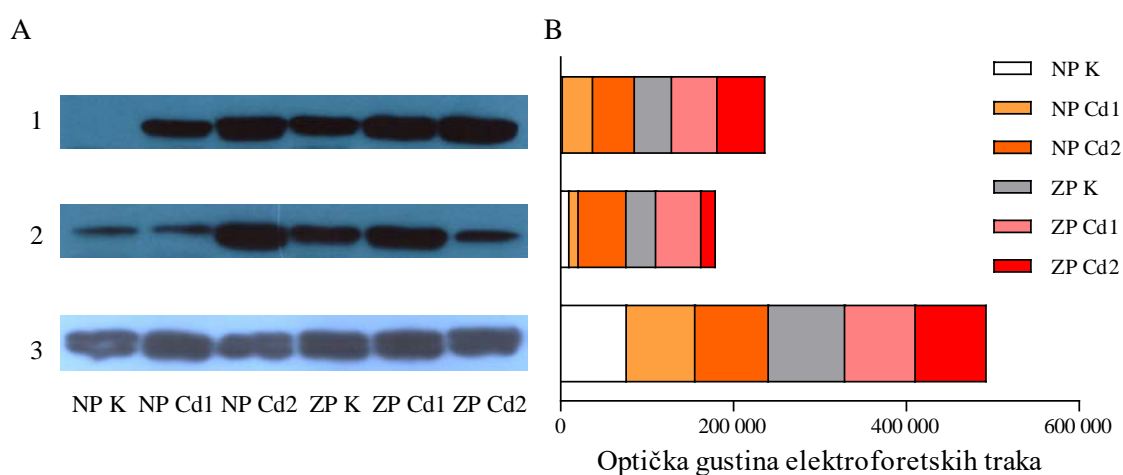


Slika 24. **A.** PAGE zimogram aktivnosti katalaze. Svaka kolona predstavlja uzorak slučajno izabrane jedinice po tretmanu. **B.** Densitometrijska analiza traka. Broj 1 označava jedinu prisutnu izoformu.

4.3. Uticaj kadmijuma na ekspresiju Hsp70

4.3.1. Ekspresija Hsp70 u srednjem crevu

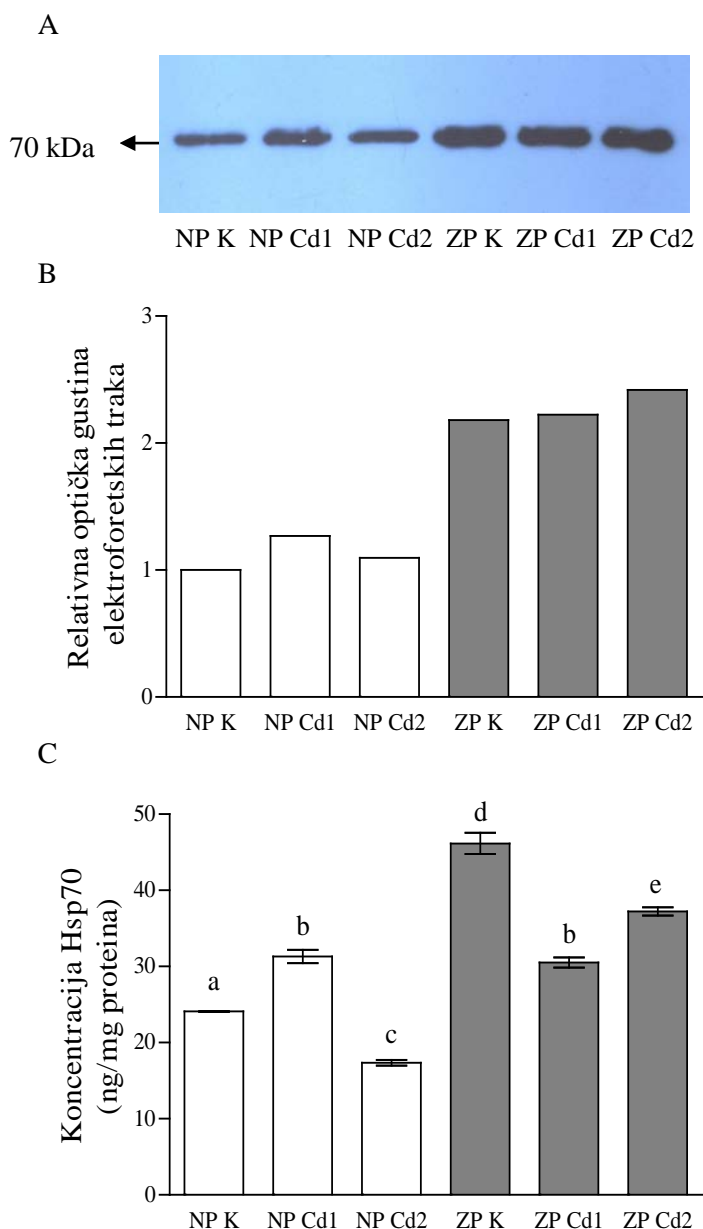
Evidentna je povišena ekspresija Hsp70 u kontrolnoj grupi larvi poreklom sa zagađene lokacije u odnosu na kontrolu iz populacije sa Kosmaja. Obe doze kadmijuma mogu da dovedu do povećanja količine Hsp70 u srednjem crevu i u jednoj i u drugoj populaciji larvi. Nakon tretmana nižom dozom kadmijuma (50 μg Cd/g suve hrane) uočljiva je viša ekspresija ovih proteina u populaciji sa zagađene lokacije u odnosu na drugu populaciju (**Slika 25**).



Slika 25. Efekat kadmijuma na ekspresiju Hsp70 u srednjem crevu larvi gubara četvrtog stupnja – Western blot (**A**) sa denzitometrijskom analizom traka (**B**). NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Brojevi 1, 2 i 3 označavaju tri blota na kojima trake predstavljaju uzorke pojedinačnih jedinki.

4.3.2. Ekspresija Hsp70 u mozgu

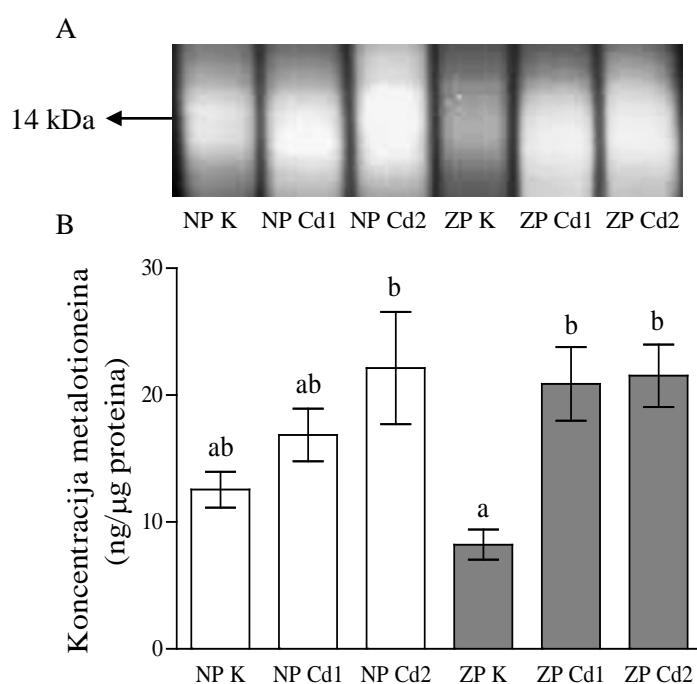
Kod larvi sa nezagađene lokacije samo je tretman sa 50 µg Cd/g suve hrane doveo do povećanja koncentracije Hsp70, i to za približno 30%. Prema ELISA testu, nakon dugotrajnog unosa 100 µg Cd/g suve hrane ekspresija Hsp70 u ovoj populaciji bila je snižena za 28% u odnosu na kontrolu. Kontrolna grupa iz populacije sa kontaminiranog lokaliteta imala je dvostruko višu ekspresiju ovih proteina u odnosu na netretiranu grupu sa Kosmaja. Međutim, hronični tretmani kadmijumom nisu indukovali ekspresiju Hsp70 u populaciji iz blizine magistralnog puta; ELISA test je pokazao da je ekspresija bila čak značajno snižena za 34% nakon manje doze kadmijuma u odnosu na kontrolu, odnosno za 20% nakon više doze. Ipak, koncentracija ovih proteina nakon tretmana višom dozom bila je približno dvostruko veća u odnosu na odgovarajuću grupu iz populacije gubara sa Kosmaja (**Slika 26**).



Slika 26. Uticaj kadmijuma na ekspresiju Hsp70 u mozgu larvi gubara četvrtog stupnja. **A.** Western blot. Trake na blotu predstavljaju pulovane uzorke mozgova. **B.** Rezultati denzitometrijske analize prikazuju relativni nivo ekspresije Hsp70 u odnosu na grupu NP K. **C.** Koncentracije Hsp70 dobijene ELISA testom. Populacije gubara potiču sa nezagađenog lokaliteta (NP, Kosmaj) i zagađenog lokaliteta (ZP, Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.4. Efekat kadmijuma na koncentraciju metalotioneina u srednjem crevu larvi

U populaciji gubara poreklom sa kontaminiranog lokaliteta, koncentracija metalotioneina u srednjem crevu larvi bila je približno 2,5 puta povišena nakon oba hronična tretmana kadmijumom u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Tendencija rasta ekspresije ovih proteina vidljiva je i u populaciji sa Kosmaja, ali statistički značajne razlike nisu registrovane. (Slika 27).



Slika 27. A. SDS-PAGE elektroforeza metalotioneina obeleženih fluorescentnim reagensom u srednjem crevu larvi gubara četvrtog stupnja nakon hronične izloženosti kadmijumu. **B.** Koncentracija metalotioneina na osnovu denzitometrijske analize gela. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Različita slova označavaju značajne razlike između eksperimentalnih grupa ($p < 0,05$). NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane.

4.5. Akumulacija kadmijuma u fecesu i tkivima larvi *L. dispar* četvrtog stupnja

4.5.1. Koncentracija kadmijuma (sa osvrtom na druge prateće metale) u fecesu, glavi i integumentu

Sedam metala Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni i Zn kvantifikovani su u fecesu, glavi i integumentu larvi. U **Tabelama 1-3** prikazana je njihova koncentracija u fecesu i tkivima za obe populacije larvi i sve tretmane (K, Cd1 i Cd2).

Najveći sadržaj kadmijuma u kontrolnim uzorcima nađen je u glavi, kako kod larvi sa nekontaminirane lokacije, tako i kod onih sa kontaminirane (**Tabele 1-3**), a zatim u fecesu i integumentu, redom. Razlike između srednjih vrednosti sadržaja kadmijuma u glavi, fecesu i integumentu bile su statistički značajne (**Tabela 4**). Fisher's LSD test pokazao je da se u kontrolnoj grupi nivo kadmijuma u glavi značajno razlikovao u odnosu na feces i integument (**Tabela 4**). Ipak, nisu utvrđene razlike u sadržaju kadmijuma u fecesu, glavi i integumentu između kontrolnih grupa larvi sa nezagađene i zagađene lokacije ($t = 2,02$, $tcr = 2,57$; $t = 0,16$, $tcr = 3,18$; $t = 0,93$, $tcr = 2,57$, redom).

Nakon hronične izloženosti obema koncentracijama kadmijuma, najviši sadržaj tog metala određen je u fecesu. Tako, količina kadmijuma bila je povećana 26 puta u grupi Cd1 i 158 puta u grupi Cd2 sa nezagađene lokacije, a 81 put i 221 put, redom, u ekvivalentnim grupama sa zagađenog lokaliteta (**Tabela 1**). Jednofaktorska ANOVA potvrdila je značajne razlike između srednjih vrednosti sadržaja kadmijuma u kontrolnim, Cd1 i Cd2 uzorcima za obe analizirane lokacije (**Tabela 4**), dok je Fisher's LSD test sugerisao da se svaka grupa razlikuje značajno od druge dve (**Tabela 4**). Osim toga, sadržaj kadmijuma u tri komponente divergirao je i kod Cd1 i kod Cd2 uzoraka, pri čemu su se vrednosti za feces razlikovale od vrednosti za glavu i integument (**Tabela 4**).

U glavama i integumentima je sadržaj kadmijuma bio blago povišen nakon tretmana (**Tabele 2 i 3**). Štaviše, zabeležene su statistički značajne razlike u sadržaju kadmijuma između glava i integumenata u grupama C, Cd1 i Cd2 sa obe lokacije

(**Tabela 4**). Što se tiče fecesa, sadržaj kadmijuma u Cd1 uzorcima sa zagađene lokacije bio je viši u odnosu na uzorke sa nekontaminirane lokacije ($t = 3,53$, $t_{cr} = 2,57$), dok su glave sa nezagađene lokacije sadržale više kadmijuma u odnosu na one sa zagađene lokacije ($t = 3,61$, $t_{cr} = 3,18$).

Osim kadmijuma, koncentracije šest drugih elemenata u tragu određene su u uzorcima fecesa, glave i integumenta u svih šest grupa (**Tabele 1-3**). U kontrolnim grupama, elementi kao što su Al, Cu, Ni i Zn akumulirani su u glavi, dok su Fe i Mn eliminisani putem fecesa (**Tabele 1-3**). Nakon izloženosti kadmijumu, glave larvi sa nezagađenog lokaliteta sadržale su više Al, Mn i Ni, dok je feces sadržao više Fe i Mn u odnosu na ekvivalentne uzorke sa zagađenog lokaliteta. Uniformna promena u sadržaju elemenata, kao reakcija organizma na višu koncentraciju kadmijuma, nije primećena kako za analizirana tkiva i feces, tako ni za dva lokaliteta.

Tabela 1. Parametri deskriptivne statistike dobijeni analizom sadržaja metala ($\mu\text{g/g}$) u fecesu insekata sa nezagađene i zagađene lokacije

Feces		Nezagađena lokacija						
		Al	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
Kontrola	Sr. vrednost	69,0	0,26	4,08	259,3	173,3	2,51	9,93
	St. dev.	28,3	0,14	2,14	80,3	60,8	1,07	10,76
Cd1	Sr. vrednost	100,4	6,68	2,66	192,9	117,5	1,81	2,64
	St. dev.	30,7	2,73	0,83	93,7	52,8	0,55	1,56
Cd2	Sr. vrednost	107,5	41,05	5,70	218,0	115,7	3,57	21,91
	St. dev.	98,8	29,88	4,17	67,5	21,9	2,67	26,28

Feces		Zagađena lokacija						
		Al	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
Kontrola	Sr. vrednost	46,0	0,18	1,85	157,3	116,6	3,83	2,50
	St. dev.	17,5	0,07	0,40	80,5	67,2	4,07	1,03
Cd1	Sr. vrednost	50,4	14,59	3,68	231,0	159,3	3,43	8,55
	St. dev.	27,7	5,83	1,30	57,4	33,2	4,05	5,09
Cd2	Sr. vrednost	60,0	39,70	5,88	330,3	159,5	3,02	16,01
	St. dev.	16,9	15,95	1,93	139,9	47,5	1,91	8,05

Tabela 2. Parametri deskriptivne statistike dobijeni analizom sadržaja metala ($\mu\text{g/g}$) u glavama insekata sa nezagađene i zagađene lokacije

Glava		Nezagađena lokacija						
		Al	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
Kontrola	Sr. vrednost	183,5	0,98	9,58	65,8	4,34	10,15	182,71
	St. dev.	130,3	0,54	10,70	53,1	2,19	10,29	112,80
Cd1	Sr. vrednost	246,0	0,88	2,25	23,8	3,97	3,11	116,88
	St. dev.	107,7	0,40	0,93	6,1	1,66	1,41	83,24
Cd2	Sr. vrednost	609,2	2,72	8,99	70,1	7,21	16,55	138,32
	St. dev.	250,6	1,34	8,52	38,4	2,85	21,62	61,92

Glava		Zagađena lokacija						
		Al	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
Kontrola	Sr. vrednost	540,0	0,93	52,5	53,8	6,83	9,35	223,9
	St. dev.	269,4	0,28	89,2	10,6	3,39	6,18	76,3
Cd1	Sr. vrednost	76,6	0,10	3,8	19,4	3,75	1,68	224,2
	St. dev.	57,9	0,06	1,6	11,7	2,06	1,23	130,8
Cd2	Sr. vrednost	162,7	1,37	7,1	71,0	4,82	7,32	107,3
	St. dev.	114,8	0,79	3,5	25,8	2,68	2,99	55,0

Tabela 3. Parametri deskriptivne statistike dobijeni analizom sadržaja metala ($\mu\text{g/g}$) u integumentu insekata sa nezagađene i zagađene lokacije

Integument		Nezagađena lokacija						
		Al	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
Kontrola	Sr. vrednost	53,7	0,080	0,93	16,4	2,10	0,44	16,3
	St. dev.	18,8	0,026	0,19	13,7	0,94	0,16	5,3
Cd1	Sr. vrednost	24,6	0,295	0,93	8,9	1,09	0,43	14,7
	St. dev.	3,8	0,144	0,16	7,3	0,22	0,08	0,7
Cd2	Sr. vrednost	24,0	0,943	1,25	8,9	1,18	0,90	15,5
	St. dev.	14,4	0,682	0,28	3,8	0,38	0,44	1,7

Integument		Zagađena lokacija						
		Al	Cd	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn
Kontrola	Sr. vrednost	15,4	0,066	1,06	4,96	0,87	0,40	14,0
	St. dev.	3,1	0,016	0,25	2,38	0,16	0,21	1,3
Cd1	Sr. vrednost	45,3	0,405	1,02	7,31	1,93	0,41	15,9
	St. dev.	15,5	0,413	0,14	5,12	1,33	0,21	1,2
Cd2	Sr. vrednost	58,5	0,469	0,97	8,80	1,17	0,47	14,7
	St. dev.	22,4	0,137	0,18	2,94	0,74	0,22	1,9

Tabela 4. Jednofaktorska ANOVA za značajne razlike između srednjih vrednosti sadržaja kadmijuma ($P = 0,05$). K – kontrola, Cd1 i Cd2 – tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane

		F^a	P	F_{cr}	Fisher's LSD test
Nezagađena lokacija	Feces	9,62	0,0021	3,68	K(Cd1,Cd2) Cd1(K,Cd2) Cd2(K,Cd1)
	Glava	5,74	0,0247	4,26	Cd2(K,Cd1)
	Integument	7,48	0,0056	3,68	Cd2(K,Cd1)
Zagađena lokacija	Feces	24,97	<0,0001	3,68	K(Cd1,Cd2) Cd1(K,Cd2) Cd2(K,Cd1)
	Glava	7,00	0,0147	4,26	Cd1(K,Cd2)
	Integument	4,46	0,0301	3,68	K(Cd1,Cd2)

		F^a	P	F_{cr}	Fisher's LSD test
Nezagađena lokacija	Kontrola	13,72	0,0006	3,81	G(I,F)
	Cd1	24,52	<0,0001	3,81	F(I,G)
	Cd2	8,47	0,0044	3,81	F(I,G)
Zagađena lokacija	Kontrola	48,89	<0,0001	3,81	G(I,F)
	Cd1	29,24	<0,0001	3,81	F(I,G)
	Cd2	28,92	<0,0001	3,81	F(I,G)

^a Razlike između tri seta podataka smatrane su značajnim kada je $F > F_{cr}$, tj. kada je $P \leq 0,05$

4.5.2. Analiza glavnih komponenti

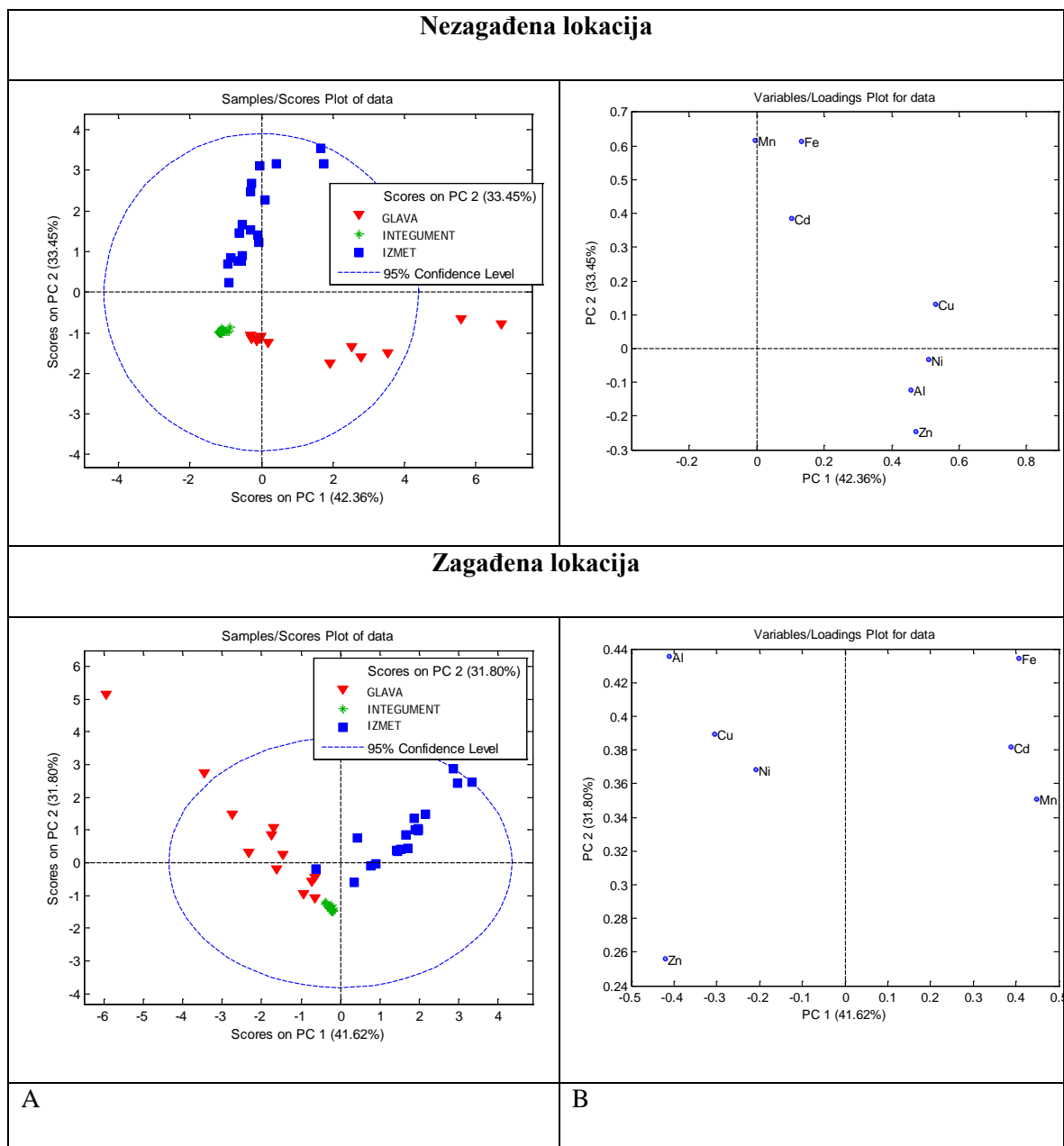
Analiza glavnih komponenti, PCA, primenjena je u cilju uspostavljanja kriterijuma za ponašanje gubara u uslovima stresa koji je rezultat povećane koncentracije kadmijuma u organizmu. Ova metoda nudi uvid u strukturu podataka uz mogućnost otkrivanja logičkog obrasca. Multivarijantna analiza urađena je zasebno na podacima dobijenim za uzorke sa nezagađene i zagađene lokacije. Matricu podataka činili su rezultati za sadržaj elemenata u fecesu, glavi i integumentu za uzorke iz svih šest grupa.

Za nezagađenu lokaciju, PCA je rezultovala trokomponentnim modelom kojim se objašnjava 86,72% ukupnog varijabiliteta među podacima. Prva glavna komponenta (PC1) obuhvata 42,36% varijabiliteta, druga (PC2) 33,45%, a treća (PC3) 10,91%.

Uzajamne projekcije skorova i odgovarajućih koeficijenata latentnih varijabli za prve dve glavne komponente predstavljene su na **Slici 28**. Grafik skorova (**Slika 28A**) ukazuje na postojanje tri klastera objekata razdvojena duž PC2 ose koji odgovaraju različitim delovima insekata (feces (F), glava (G) i integument (I)). Uzorci fecesa i glave bili su rasuti u širem opsegu, dok su se svi oni koji pripadaju integumentu preklapali. Grafik koeficijenata latentnih varijabli (**Slika 28B**) pokazao je da su varijable Cd, Fe i Mn imale najveći pozitivan uticaj duž PC2 pravca i definisale su klaster uzoraka fecesa, dok su varijable Zn i Al imale najveći negativan uticaj na PC2 i odredile su grupu glava.

Slični rezultati dobijeni su za uzorke sa zagađene lokacije. PCA je trokomponentnim modelom objasnila 85,57% ukupne varijanse (PC1 obuhvata 41,62% varijabiliteta, PC2 31,80% i PC3 12,16%). Uzajamne projekcije skorova i odgovarajućih koeficijenata latentnih varijabli za prve dve glavne komponente predstavljene su na **Slici 28**. Tri klastera uzoraka koji pripadaju fecesu, glavi i integumentu bila su razdvojena duž PC1 pravca (**Slika 28A**). Uzorci fecesa bili su određeni sadržajem Fe, Cd i Mn (koji su imali najveći pozitivan uticaj na PC1), dok su uzorci glave bili determinisani sadržajem Al, Cu i Ni (negativnog uticaja na PC1) (**Slika 28B**).

Rezultati metode prepoznavanja obrazaca pokazali su da larve gubara ne akumuliraju elemente u integumentu, ali eliminišu Cd, Fe i Mn iz organizma putem fecesa, dok su Al, Cu, Ni i Zn uskladišteni u glavi.



Slika 28. PCA, (A) grafik skorova, (B) grafik koeficijenata latentnih varijabli

4.5.3. Sadržaj kadmijuma u crevu larvi *L. dispar*

Tabela 5 prikazuje sažetu deskriptivnu statistiku koncentracije kadmijuma u crevu larvi poreklom sa zagađene i nezagađene lokacije nakon izloženosti dvema koncentracijama kadmijuma (Cd1 i Cd2). Jednofaktorska ANOVA pokazala je da tretmani kadmijumom značajno utiču na sadržaj ovog metala u crevu kod obe

populacije (**Tabela 6**), a Fisher's LSD test utvrdio je da se grupe tretirane metalom značajno razlikuju od odgovarajućih kontrola (**Tabela 6**). Nisu uočene razlike u koncentraciji metala između ekvivalentnih grupa dveju populacija (rezultati t -testa za kontrolne grupe: $t = 0,16$, $t_{cr} = 2,45$; za Cd1 grupe: $t = 0,92$, $t_{cr} = 2,23$; za Cd2 grupe: $t = 1,32$, $t_{cr} = 2,36$).

Tabela 5. Parametri deskriptivne statistike dobijeni analizom sadržaja kadmijuma ($\mu\text{g/g}$) u uzorcima creva insekata sa nezagađene i zagađene lokacije

Crevo		Cd	
		Nezagađena lokacija	Zagađena lokacija
Kontrola	Sr. vrednost	1,494	1,480
	St. dev.	0,689	1,494
Cd1	Sr. vrednost	54,000	66,453
	St. dev.	21,777	25,178
Cd2	Sr. vrednost	71,471	111,100
	St. dev.	28,071	65,851

Tabela 6. Jednofaktorska ANOVA za značajne razlike između srednjih vrednosti sadržaja kadmijuma ($P = 0,05$)

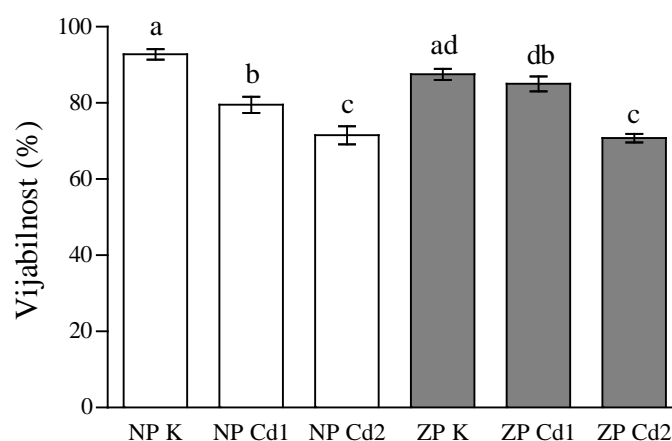
Crevo	F^a	P	F_{cr}	Fisher's LSD test
Nezagađena lokacija	15,69	0,0003	3,74	K(Cd1,Cd2)
Zagađena lokacija	6,96	0,0149	4,26	K(Cd1,Cd2)

^a Razlike između tri seta podataka smatrane su značajnim kada je $F > F_{cr}$, tj. kada je $P \leq 0,05$

4.6. Uticaj kadmijuma na hemocite larvi gubara

4.6.1. Vijabilnost hemocita

Kod larvi poreklom sa Homoljskih planina, na petom larvenom stupnju, registrovano je dozno-zavisno smanjenje vijabilnosti hemocita nakon oba tretmana kadmijumom ($79,50 \pm 2,16$ i $71,50 \pm 2,34$, redom), kao što prikazuje **Slika 29**. U populaciji sa zagađene lokacije samo je viša koncentracija kadmijuma značajno redukovala vijabilnost ($70,75 \pm 1,13$). Viša doza kadmijuma od $100 \mu\text{g Cd/g}$ suve hrane snizila je vijabilnost do približno 70% u obe populacije, ali ne ispod te vrednosti koja se smatra graničnom prihvatljivom vrednošću za komet test.

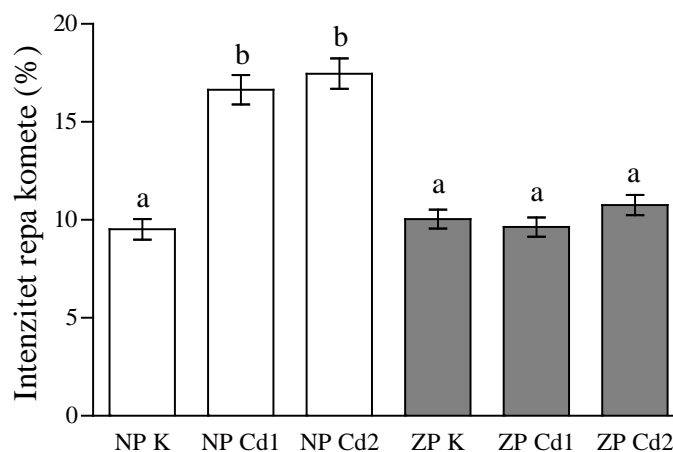


Slika 29. Efekat kadmijuma na vijabilnost hemocita larvi *Lymantria dispar* trećeg dana petog stupnja. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Homoljske planine), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Bor), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i $100 \mu\text{g Cd/g}$ suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.6.2. Nivo DNK oštećenja u hemocitama

Ustanovljeno je da su promene u nivou oštećenja DNK (izraženog kao intenzitet repa komete) u hemocitama larvi gubara populaciono-specifične. U populaciji sa nezagađenog lokaliteta količina DNK oštećenja se povećala posle izloženosti obema

koncentracijama kadmijuma (**Slika 30**). U populaciji larvi sa zagađene lokacije nije detektovan genotoksični efekat kadmijuma. Nivo DNK oštećenja bio je značajno viši nakon obe doze metala kod larvi sa Homoljskih planina u odnosu na ekvivalentne grupe iz druge populacije.

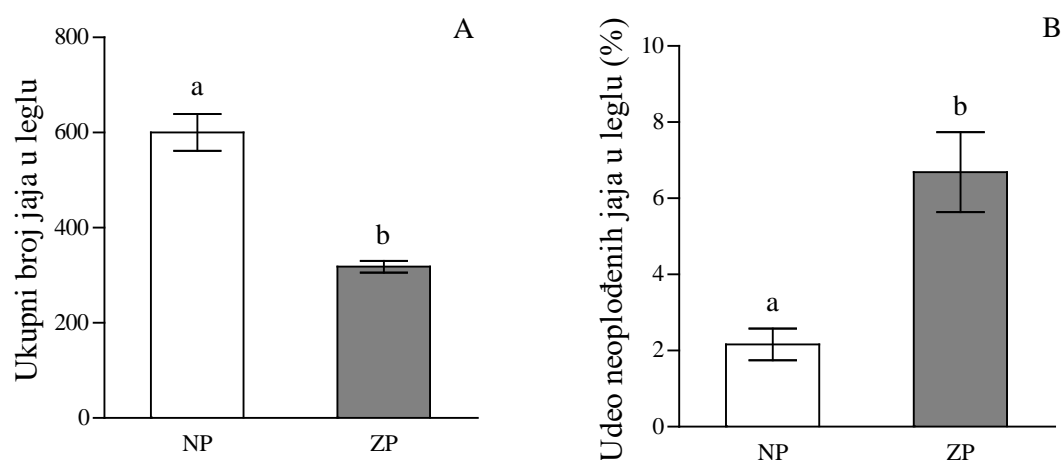


Slika 30. Nivo DNK oštećenja (intenzitet repa komete) u hemocitama larvi gubara trećeg dana petog stupnja nakon intoksikacije kadmijumom putem hrane. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Homoljske planine), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Bor), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$), (400 nukleusa). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.7. Komponente fitnesa

4.7.1. Ukupni broj jaja i procenat neoplođenih jaja u leglima gubara

Značajno manji broj jaja konstatovan je u leglima prikupljenim na zagađenoj lokaciji u blizini Ibarske magistrale u odnosu na legla sa Kosmaja (**Slika 31A**). Osim toga, udeo neoplođenih jaja u tim leglima bio je približno tri puta veći u odnosu na legla sa nekontaminirane lokacije (**Slika 31B**).



Slika 31. Ukupni broj jaja (A) i udeo neoplođenih jaja (B) u leglima gubara sa dve lokacije. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Kosmaj), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Ibarska magistrala). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.7.2. Efekat kadmijuma na preživljavanje larvi

Stope preživljavanja larvi poreklom sa dva nezagađena i dva zagađena lokaliteta nisu bile niže od 90% tokom hroničnih tretmana dvema koncentracijama kadmijuma (**Tabela 7**). Najveći procenat preživelih larvi nakon oba tretmana konstatovan je u populaciji iz Bora dok je najniži zabeležen u populaciji sa Kosmaja u svim eksperimentalnim grupama.

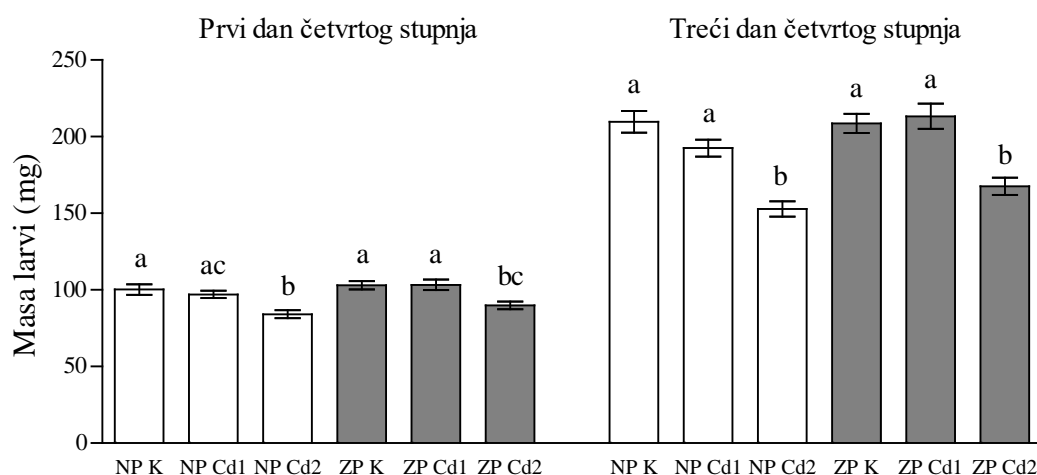
Tabela 7. Stopa preživljavanja (%) u eksperimentalnim grupama larvi sa nezagađenih lokacija (Kosmaj i Homoljske planine) i zagađenih (Ibarska magistrala i Bor) nakon hroničnih tretmana kadmijumom sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane (Cd1 i Cd2)

	Kosmaj	Ibarska magistrala	Homoljske planine	Bor
K	90,0	100,0	95,0	95,0
Cd1	90,0	92,0	93,3	98,3
Cd2	93,3	93,3	96,7	98,3

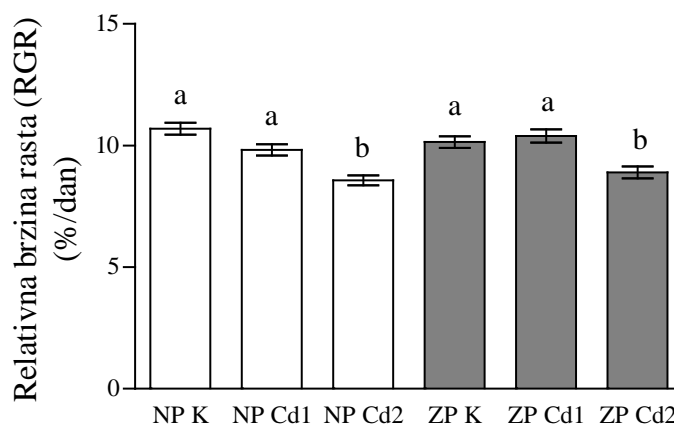
4.7.3. Uticaj kadmijuma na masu larvi i relativnu brzinu rasta (RGR)

Modalitet promena mase larvi prvog i trećeg dana četvrtog stupnja bio je veoma sličan kod obe populacije gubara (sa lokacija Kosmaj i Ibarska magistrala) izloženih obema koncentracijama kadmijuma (50 i 100 μg Cd/g suve hrane) (**Slika 32**). Larve sa oba lokaliteta koje su dobijale 100 μg Cd/g suve hrane imale su manju masu u poređenju sa kontrolnim larvama, kao i onim koje su primale 50 μg Cd/g suve hrane.

Osim toga, trend relativne brzine rasta (RGR) bio je isti kao i kod mase larvi (**Slika 33**). Nezavisno od porekla populacije, brzina rasta je bila značajno niža na 100 μg Cd/g suve hrane u odnosu na kontrolne larve i one koje su dobijale nižu dozu kadmijuma. Nije bilo značajne razlike u RGR između kontrole i grupe tretirane sa 50 μg Cd/g suve hrane ni u jednoj ni u drugoj populaciji.



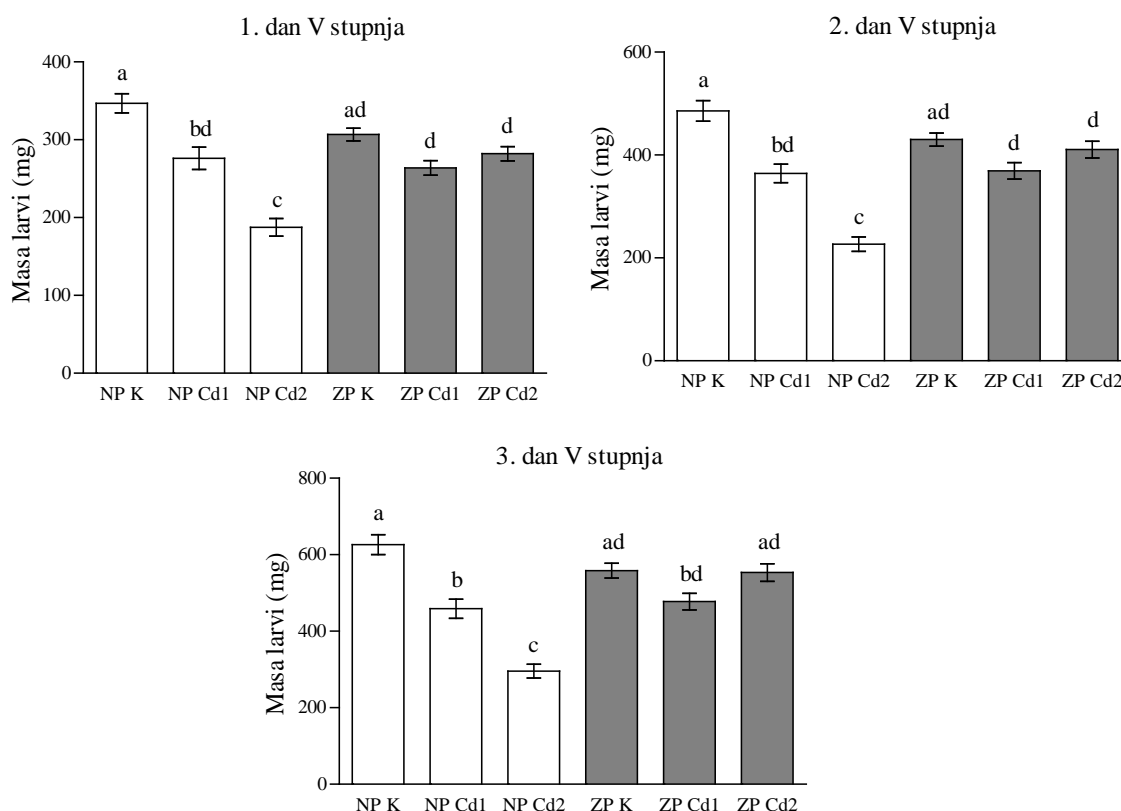
Slika 32. Poređenja mase larvi prvog i trećeg dana četvrtog stupnja poreklom iz populacija sa nezagađene (NP, Kosmaj) i zagađene lokacije (ZP, Ibarska magistrala), izloženih tretmanima sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane (Cd1 i Cd2). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).



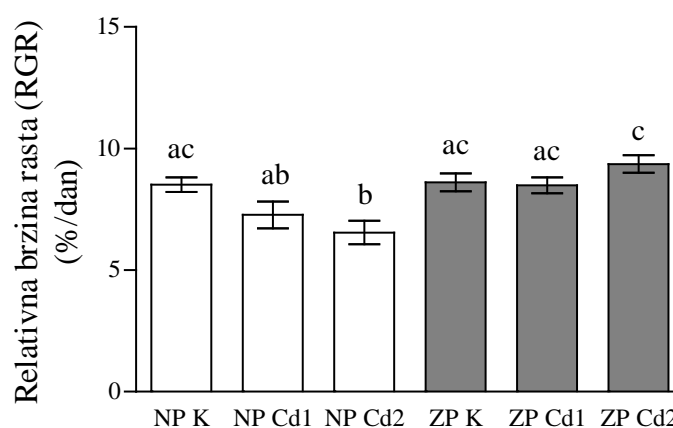
Slika 33. Poređenja relativne brzine rasta larvi (RGR) iz populacija poreklom sa nezagađene (NP, Kosmaj) i zagađene lokacije (ZP, Ibarska magistrala) nakon tretmana sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane (Cd1 i Cd2). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Prvog, drugog i trećeg dana petog stupnja detektovano je dozno-zavisno sniženje mase larvi sa nekontaminiranog lokaliteta na Homoljskim planinama, dok kod larvi poreklom sa zagađene lokacije u okolini Bora nije bilo promena mase (**Slika 34**). Nakon tretmana višom dozom kadmijuma (100 μg Cd/g suve hrane) uvek je masa larvi sa zagađene lokacije bila značajno viša u odnosu na grupu sa nezagađene.

U populaciji sa Homoljskih planina samo je tretman od 100 μg Cd/g suve hrane doveo do sniženja relativne brzine rasta. RGR larvi iz te eksperimentalne grupe takođe je značajno niži u odnosu na ekvivalentnu grupu iz populacije sa kontaminirane lokacije (**Slika 35**).



Slika 34. Promene mase larvi *Lymantria dispar* izmerenih prvog, drugog i trećeg dana petog stupnja nakon hronične izloženosti kadmijumu. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Homoljske planine), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Bor), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).



Slika 35. Efekti kadmijuma na relativnu brzinu rasta (RGR) larvi *Lymantria dispar*. NP – populacija sa nezagađenog lokaliteta (Homoljske planine), ZP – populacija sa zagađenog lokaliteta (Bor), K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani sa 50 i 100 μg Cd/g suve hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.7.4. Parametri trajanja razvića nakon intoksikacije kadmijumom

Kod gubara poreklom iz populacije sa Kosmaja drugi larveni stupanj bio je značajno produžen posle tretmana sa 50 μg Cd/g suve hrane u odnosu na kontrolnu grupu (**Tabela 8**). Treći stupanj je trajao duže kod larvi koje su primale 100 μg Cd/g suve hrane u poređenju sa kontrolom, kao i sa grupom koja je tretirana nižom dozom metala. Za razliku od populacije sa Kosmaja, kadmijum je uticao samo na treći stupanj larvi poreklom sa kontaminirane lokacije. Naime, uočeno je da je treći stupanj nakon tretmana višom dozom kadmijuma trajao značajno duže u odnosu na tretman nižom dozom ovog metala. Razlike u trajanju razvića između ekvivalentnih grupa dveju populacija nisu registrovane.

Tabela 8. Efekti kadmijuma na dužinu razvića larvi gubara sa Kosmaja i iz blizine Ibarske magistrale. Rezultati prikazuju srednju vrednost i standardnu grešku ($\bar{X} \pm SG$) trajanja pojedinačnih larvenih stupnjeva od prvog do trećeg, kao i ukupnog trajanja razvića od izleganja do žrtvovanja trećeg dana četvrtog stupnja (u danima). Različita slova označavaju značajne razlike između eksperimentalnih grupa unutar larvenih stupnjeva ($p < 0,05$).

Larveni stupanj	n	NP K	NP Cd1	NP Cd2	ZP K	ZP Cd1	ZP Cd2
I	45-57	9,82 ± 0,44 ^{ab}	10,71 ± 0,35 ^a	10,05 ± 0,41 ^{ab}	9,08 ± 0,34 ^b	9,39 ± 0,26 ^{ab}	9,30 ± 0,35 ^{ab}
II	45-57	4,07 ± 0,11 ^a	4,67 ± 0,13 ^b	4,45 ± 0,11 ^{ab}	4,58 ± 0,13 ^{ab}	4,67 ± 0,13 ^b	4,83 ± 0,10 ^b
III	45-56	5,20 ± 0,11 ^a	5,00 ± 0,11 ^a	5,93 ± 0,11 ^b	5,36 ± 0,09 ^{ac}	5,30 ± 0,09 ^a	5,82 ± 0,11 ^{bc}
Ukupno	45-56	22,09 ± 0,42 ^{ab}	23,38 ± 0,33 ^{ab}	23,43 ± 0,39 ^a	22,02 ± 0,30 ^b	22,37 ± 0,22 ^{ab}	23,02 ± 0,30 ^{ab}

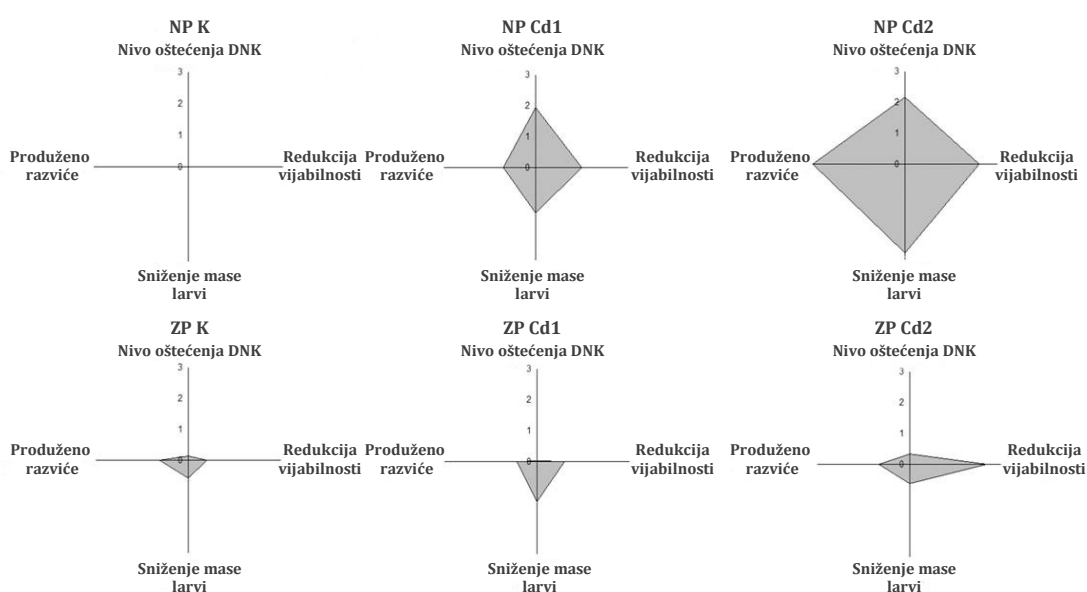
U populaciji sa Homoljskih planina nije uočen efekat kadmijuma na trajanje ranih razvojnih stupnjeva (I i II stupanj), ali je evidentan trend produženja kasnijih stupnjeva, počev od trećeg (**Tabela 9**). Četvrti stupanj i ukupno razviće bili su značajno produženi na dozno-zavisan način. Za razliku od populacije sa nezagađene lokacije, kadmijum je uticao samo na prva dva stupnja kod larvi poreklom sa kontaminiranog područja. Drugi i četvrti stupanj, kao i ukupno razviće do trećeg dana petog stupnja bili su produženi kod kontrolnih larvi iz populacije iz Bora u odnosu na kontrolne larve sa Homoljskih planina.

Tabela 9. Efekti kadmijuma na dužinu razvića larvi gubara sa Homoljskih planina i iz okoline Bora. Rezultati prikazuju srednju vrednost i standardnu grešku trajanja pojedinačnih larvenih stupnjeva od prvog do četvrtog, kao i ukupnog trajanja razvića od izleganja do žrtvovanja trećeg dana petog stupnja (u danima). Različita slova označavaju značajne razlike između eksperimentalnih grupa unutar larvenih stupnjeva ($p < 0,05$).

Larveni stupanj	n	NP K	NP Cd1	NP Cd2	ZP K	ZP Cd1	ZP Cd2
I	57-60	9,02 ± 0,18 ^{ab}	9,45 ± 0,27 ^{ab}	9,64 ± 0,22 ^a	8,65 ± 0,21 ^b	7,37 ± 0,20 ^c	7,63 ± 0,19 ^c
II	58-60	3,90 ± 0,09 ^a	4,26 ± 0,10 ^{ab}	4,17 ± 0,06 ^{ab}	4,49 ± 0,09 ^{bc}	4,63 ± 0,11 ^c	5,02 ± 0,08 ^d
III	57-60	5,43 ± 0,09 ^a	5,73 ± 0,11 ^a	6,56 ± 0,12 ^b	6,09 ± 0,09 ^{acd}	5,73 ± 0,09 ^{ac}	6,31 ± 0,12 ^{bd}
IV	23-29	5,31 ± 0,13 ^a	6,50 ± 0,21 ^b	8,22 ± 0,33 ^c	6,29 ± 0,14 ^b	6,04 ± 0,18 ^{ab}	6,30 ± 0,21 ^b
Ukupno	23-29	24,62 ± 0,35 ^a	27,46 ± 0,43 ^b	32,72 ± 0,54 ^c	27,17 ± 0,21 ^b	26,35 ± 0,23 ^{ab}	27,33 ± 0,32 ^b

4.8. Integrisani odgovor biomarkera (IBR) nakon izloženosti kadmijumu

IBR indeks je pokazao izrazit dozno-zavisni efekat kadmijuma u populaciji sa nezagađene lokacije, dok su manje promene uočene u populaciji sa zagađene lokacije (Slika 36). Najviša IBR vrednost (13,5) dobijena je za larve sa Homoljskih planina koje su dobijale 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane, dok je najniža vrednost IBR zabeležena kod kontrolnih larvi iz iste populacije (Tabela 10).



Slika 36. Integrisani odgovor biomarkera (IBR) nakon hronične izloženosti larvi gubara kadmijumu. NP i ZP – populacije sa nezagađene (Homoljske planine) i zagađene lokacije (Bor); K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani kadmijumom koncentracija 50 i 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane.

Tabela 10. Integrisani odgovor biomarkera (IBR) nakon izloženosti larvi *Lymantria dispar* kadmijumu; NP i ZP – populacije sa nezagađene i zagađene lokacije; K – kontrola, Cd1 i Cd2 – hronični tretmani kadmijumom koncentracija 50 i 100 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane.

Grupa	NP K	NP Cd1	NP Cd2	ZP K	ZP Cd1	ZP Cd2
IBR indeks	0	4,4	13,5	0,6	1,0	1,7

5. DISKUSIJA

5.1. Efekti kadmijuma na digestivne enzime srednjeg creva larvi gubara

5.1.1. Populacija gubara sa nekontaminirane lokacije

5.1.1.1. Specifične aktivnosti i izoforme tripsina, leucin aminopeptidaze (LAP) i ukupnih proteaza

Dostupnost energije iz hrane direktno zavisi od digestivne funkcije organizma čiji su nosioci digestivni enzimi. Štetni uticaji polutanata na sistem organa za varenje, i posledično na energetske metabolizam, mogu se odraziti na rast i reprodukciju organizma. Toksikanti mogu direktnom interakcijom sa digestivnim enzimima da dovedu do promena njihovih hidrolitičkih svojstava, a mogući su i efekti na nivou sinteze ili sekrecije enzima (Dedourge-Geffard i sar., 2013). Ujedno, otpornost ovih enzima na metale može da predstavlja prednost za organizam u kontaminiranoj sredini (Zvereva i sar., 2003). Zato Lai i saradnici (2011) navode da digestivni enzimi mogu biti pokazatelji metaboličkog statusa organizma, kao i stepena adaptiranosti na uslove životne sredine. Više autora je ukazalo na potencijalni značaj ovih enzima kao biomarkera izloženosti toksikantima (Lai i sar., 2011; Hyne i Maher, 2003; Lagadic i sar., 1994).

Inhibicija tripsina i LAP u srednjem crevu larvi *Lymantria dispar* sa nezagađene lokacije nakon 50 i 100 µg Cd/g suve hrane u skladu je sa rezultatima naše prethodne studije, kada je redukcija njihove specifične aktivnosti (u daljem tekstu: aktivnosti) bila uočena nakon nižih hroničnih doza metala (10 i 30 µg Cd/g suve hrane) (Vlahović i sar., 2015). Aktuelni eksperiment pokazao je da se osetljivost ukupnih proteaza ipak razlikuje u zavisnosti od porekla populacija. Aktivnost ukupnih proteaza se smanjuje na 100 µg Cd/g suve hrane, dok je u ranijim eksperimentima inhibicija bila vidljiva već na 30 µg Cd/g suve hrane kod populacije poreklom iz bagremove šume, 30 km udaljene od Beograda (Vlahović i sar., 2014).

Mehanizam inhibicije proteazne aktivnosti još uvek nije razjašnjen. Ipak, poznato je da je visoki afinitet kadmijuma prema sulfhidrilnim grupama proteina jedan od najčešćih uzroka inaktivacije enzima generalno (zbog uticaja na aktivno mesto

enzima, dovodeći do promena u konformaciji molekula enzima ili čak do formiranja proteinskih multimer/agregata) (Qin i sar., 2016; Rubino, 2015). U inhibiciji leucin aminopeptidaze gubara značajnu ulogu bi mogla imati i kompeticija između jona kadmijuma i cinka. Utvrđivanjem sekvence leucin aminopeptidaza za nemali broj insekatskih vrsta, uključujući i one iz porodice Lepidoptera, pokazalo se da sadrže karakterističan cink vezujući motiv na osnovu kog su svrstane u M₁ familiju neutralnih cink metalopeptidaza (Cristofolletti i sar., 2016; Terra i Ferreira, 2012). Veoma je čest fenomen da joni kadmijuma u proteinima zamene jone cinka koji imaju ključnu ulogu u katalizi ili u formiranju pravilne konformacije proteina (Tamas i sar., 2014; Tang i sar., 2014), što dovodi do inhibicije aktivnosti.

Naravno, brojni drugi toksični efekti kadmijuma na ćeliju mogu se indirektno odraziti i na aktivnost digestivnih enzima. Planello i sar. (2007) uočili su promene u veličini i arhitekturi nukleolusa, praćene redukcijom sinteze ribozomske RNK nakon izloženosti vodenog insekta *Chironomus riparius* (Diptera) ovom metalu, i zaključili da dugoročno takav efekat može ozbiljno da remeti sintezu proteina. Na sintezu proteina, a time i enzima, mogu da utiču i oštećenja granuliranog endoplazmatičnog retikuluma (gER) kada se sa njegove površine gube ribozomi usled delovanja kadmijuma (Yang i sar., 2015). Akumulacija nepravilno savijenih proteina u unutrašnjosti ER takođe je posledica stresa iako još uvek nije potpuno razjašnjeno kako kadmijum ometa uspostavljanje pravilne konformacije proteina (Tamas i sar., 2014; Biagioli i sar., 2008). Aktivnost digestivnih enzima u velikoj meri zavisi i od bioenergetskog statusa ćelije, koji trpi značajne promene pod uticajem kadmijuma. Izloženost toksikantu povećava potrebu ćelije za energijom zbog intenzivnog ulaganja u procese detoksifikacije. Produženi stres vodi akumulaciji različitih ćelijskih oštećenja, uključujući i oštećenja mitohondrija, što zajedno rezultira energetske deficitom koji se ogleda u sniženom nivou NADH i ATP, kao i u izmenjenom metabolizmu ugljenih hidrata, proteina i lipida (Yang i sar., 2015; Sokolova i sar., 2012; Ortel, 1996; Ortel, 1995). Treba pomenuti i da neke vrste zglavkara imaju sposobnost prepoznavanja i izbegavanja hrane kontaminirane teškim metalima (Bahadorani i Hilliker, 2009; Fountain i Hopkin, 2001), a smanjen unos hrane može da utiče na aktivnost digestivnih enzima.

Inhibiciju aktivnosti tripsina nakon izloženosti kadmijumu utvrdili su i De Coen i Janssen (1997) kod *Daphnia magna*, dok su Sahana i Joy (2016) detektovali inhibiciju ukupnih proteaza kod kolembrole *Cyphoderus javanus* Börner. Grover i sar. (2016) pokazali su *in vitro* da kadmijum inhibira aktivnost “tripsin-like” proteaza izolovanih iz creva *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera).

Enzimi su često prisutni u više molekularnih formi, izozima, koje karakteriše ista katalitička aktivnost omogućavajući organizmima veću fleksibilnost, prilagodljivost i preciznost u obavljanju metaboličkih funkcija (Zeidler, 2000). Isti autor navodi dva izvora varijabiliteta ovih formi: 1. genetički (izozimi mogu biti produkti multiplih genskih lokusa ili varijante jednog gena – aleli (alozimi), i 2. epigenetički (posttranslacione modifikacije). Izoforme enzima mogu se međusobno razlikovati po osetljivosti na toksikant, i u slučaju izloženosti mogu odgovoriti na različite načine, inhibicijom ili aktivacijom (Sanchez-Hernandez, 2011).

Populacija sa visokom varijabilnošću izozima verovatno ima veće izgleda za bolju toleranciju na metale (Klerks i Weis, 1987; Lavie i Nevo, 1987). Promene u ekspresiji izoformi enzima možda predstavljaju adaptivni odgovor jedinke na prisustvo metala iako takva veza još uvek nije jasno utvrđena. Kako Terra i Ferreira (2012) navode, insekti mogu da se adaptiraju na prisustvo biljnih inhibitora serinskih proteaza unetih kroz hranu tako što u crevu povećavaju ekspresiju proteaza ili ekspimiraju nove proteaze otporne na inhibitor. Mehanizam kojim inhibitor indukuje sintezu rezistentnog tripsina nije još uvek razjašnjen, ali se zna da je prvi korak u tom procesu ekspresija celog seta izoformi tripsina srednjeg creva (Brioschi i sar., 2007). Pojedini autori smatraju da bi izozimska varijabilnost mogla biti korisna alatka u monitoringu populacija organizama osetljivih na hemijske polutante (Yap i sar., 2011; Evenden i Depledge, 1997; Guttman, 1994).

U skladu sa literaturnim podacima, i rezultati naše studije ukazali su na razlike u aktivnosti između različitih izoformi enzima u zavisnosti od tretmana i populacije. U kosmajskoj populaciji gubara aktivnost izoforme 3 tripsina u potpunosti je izostala posle oba tretmana. Povišena aktivnost izoforme 2 nakon niže doze kadmijuma u odnosu na kontrolu mogla bi biti adaptacija koja omogućava nesmetanu digestiju proteina u prisustvu metala povećanjem ekspresije otpornijeg tripsina. Slično smo registrovali i u

slučaju leucin aminopeptidaze – dok su izoforme 1 i 3 bile u potpunosti inhibirane nakon oba tretmana, aktivnost izoforme 2 bila je povišena. Moguće je da je ekspresija drugih izoformi LAP (4 i 5), koje su bile inhibirane nakon slabijeg tretmana kadmijumom, intenzivirana nakon više doze kako bi bio kompenzovan inhibicioni efekat metala. Zato je u toj eksperimentalnoj grupi zabeležena značajno viša ukupna aktivnost LAP u poređenju sa grupom koja je primala nižu dozu metala. Pored opšte inhibicije izozima ukupnih proteaza kadmijumom, oba tretmana su uslovlila pojavu izoforme 1 koja je u kontrolnoj grupi bila potpuno odsutna. Iako su mehanizmi inhibicije i aktivacije individualnih izoformi proteaza nepoznati, ovakvi rezultati sugerišu da izozimi nisu u jednakoj meri podložni direktnoj inhibiciji kadmijumom, kao i da kadmijum posredno ili neposredno verovatno može da utiče na njihovu ekspresiju.

5.1.1.2. Specifične aktivnosti i izoforme fosfataza

Alkalne fosfataze

Ni u jednoj od ispitanih populacija kadmijum nije značajno uticao na srednju vrednost aktivnosti alkalnih fosfataza. Kod populacije sa nekontaminirane lokacije uočena je značajno veća varijabilnost ovog parametra nakon izloženosti nižoj i višoj koncentraciji kadmijuma u odnosu na kontrolu (F test, $p = 0,0034$; $p = 0,0464$, redom). Povećana varijansa oko srednje vrednosti različitih bioloških parametara i njena potencijalna primena kao indikatora izloženosti toksikantima bila je i ranije predmet ekotoksikoloških studija (Vlahović i sar., 2009; Barata i sar., 2000; Callaghan i Holloway, 1999; Forbes i Depledge, 1996). Callaghan i saradnici (1998) pokazali su da dugotrajna izloženost komarca (*Culex pipiens*) organofosfatima povećava varijansu aktivnosti esteraza i zaključili da se promene varijanse dešavaju primarno kod onih enzimskih sistema koji direktno učestvuju u detoksifikaciji ksenobiotika. Stres može da utiče na varijansu fenotipskih osobina u populaciji na nekoliko načina – uzrokujući mutacije, indukujući/menjajući ekspresiju već prisutnih gena ili povećavajući stopu rekombinacija (Forbes i Depledge, 1996). Povećan broj izoformi može biti posledica prethodno navedenih promena na nivou gena. Promena aktivnosti i zastupljenosti izoformi u zavisnosti od tretmana ukazuje na multifunkcionalnost i moguće učešće u velikom broju fizioloških procesa u uslovima stresa. U aktuelnom eksperimentu, na zimogramu nije detektovana velika varijabilnost izoformi alkalnih fosfataza. Osim toga,

kadmijum značajno inhibira samo izoformu 2, dok je izoforma 1 verovatno najodgovornija za hidrolizu fosfata u uslovima stresa kod ispitivanih populacija gubara.

Međutim, veća varijabilnost aktivnosti alkalnih fosfataza nakon tretmana kadmijumom kod nezagađene populacije ne mora biti dokaz da ovi enzimi igraju direktnu ulogu u detoksifikaciji metala. U literaturi nisu pronađene informacije o direktnom učešću ALP u detoksifikaciji teških metala. Kao što je već navedeno, u literaturi je najčešće zabeležen inhibitorski efekat kadmijuma na ALP zglavkara (Suresh i sar., 2016; Xinping i sar., 2001; Dhavale i Masurekar, 1986) mada ima i drugačijih slučajeva poput studije u kojoj je Badiou-Beneteau sa saradnicima (2013) našao povišenu aktivnost enzima kod pčela sa staništa kontaminiranog kadmijumom i drugim teškim metalima. S obzirom na višestruke uloge ALP u ćelijskom metabolizmu, o kojima je prethodno bilo reči (Poglavlje 1.3.2.1.), i brojne faktore koji utiču na njihovu aktivnost, nije lako objasniti odgovor ovih enzima u kontekstu toksičnih efekata kadmijuma (Wang i sar., 2011). Genotipska varijabilnost unutar populacije, kao i razlike u metaboličkom statusu i fiziološkom stanju između jedinki, mogu usloviti različite obrasce preraspodele energije u odgovoru na stres, i rezultirati povećanjem varijanse parametara na raznim nivoima biološke organizacije. Prethodna istraživanja na populaciji gubara sa nekontaminirane lokacije pokazala su da je hronični tretman larvi iz osetljive populacije kadmijumom od 30 µg Cd/g suve hrane doveo do povećanja varijanse fenotipske plastičnosti aktivnosti alkalnih fosfataza (Vlahović i sar., 2009).

Kisele fosfataze

Aktuelni eksperiment je pokazao da kod larvi gubara sa nekontaminirane lokacije izloženost kadmijumu povećava ukupnu aktivnost kiselih fosfataza. Primenom natrijum fluorida, specifičnog inhibitora lizozomskih fosfataza (Amlabu i sar., 2009; Holtzman, 1989), utvrđeno je da je povišena ukupna aktivnost kiselih fosfataza prvenstveno posledica rasta aktivnosti nelizozomske frakcije ovih enzima, dok lizozomske kisele fosfataze u istoj populaciji pokazuju samo tendenciju rasta, ali bez statističke značajnosti. U velikom broju studija u kojima je zabeleženo povećanje aktivnosti lizozomskih fosfataza nakon delovanja stresora, nisu primenjivani specifični inhibitori različitih frakcija fosfataza, te je ukupna aktivnost kiselih fosfataza često izjednačavana sa aktivnošću lizozomskih. Na takvo tumačenje ukazali su izvesni autori

(Holtzman, 1989) upozoravajući da odgovori nelizozomskih kiselih fosfataza bivaju zanemareni.

Smatra se da je rast aktivnosti kiselih fosfataza pokazatelj aktivacije lizozomskog sistema u pokušaju da sekvstrira ksenobiotik (Braeckman i sar., 1999a; Gill i sar., 1992). U više studija na beskičmenjacima hipersinteza lizozomskih fosfataza predstavljena je kao komponenta ćelijskog odbrambenog odgovora na intoksikaciju kadmijumom - u škrgama i hepatopankreasu školjke *Lamellidens marginalis* (Jayakumar i sar., 2007), u hepatopankreasu, ovarijumu, spermateci, mišiću, škrgama i hemolimfi krabe *Uca annulipes* (Suresh i sar., 2016), kao i kod insekatske ćelijske linije *Aedes albopictus* C6/36 (Braeckman i sar., 1999a). Smatra se da lizozomske kisele fosfataze, između ostalog, stimulišu katabolizam ugljenih hidrata kada je u stanju stresa povećana potrošnja energije (Suresh i sar., 2016; Sreenivasan i sar., 2011). Međutim, ako stres prevazilazi detoksifikacione kapacitete lizozoma, može doći do oslobađanja hidrolitičkih enzima u citoplazmu usled destabilizacije i oštećenja lizozomskih membrana (Sokolova i sar., 2005).

Kako aktivnost lizozomskih fosfataza pokazuje samo tendenciju rasta nakon tretmana kadmijumom, rezultat ove disertacije na gubaru mogao bi da sugeriše da stabilnost membrane lizozoma larvi iz populacije koja nema istoriju izloženosti toksikantima, nije značajnije narušena uprkos primenjenim visokim dozama kadmijuma. Moguće je da organizmi izloženi dugotrajnom stresu uspevaju da uspostave ravnotežu nakon prvobitnog šoka i aktivacije odbrambenih mehanizama, što može da objasni zašto se kasnije mogu "izgubiti" rani pokazatelji stresa. Proučavajući vremenski profil odgovora lizozomskih fosfataza na izloženost kadmijumu u hepatopankreasu školjke, Wang i sar. (2011) utvrdili su da aktivnost enzima prvo opada, da bi zatim usledio oporavak, što su povezali sa stimulacijom ćelijskih odbrambenih mehanizama. Imajući u vidu da je u našoj prethodnoj studiji na gubaru zabeleženo smanjenje aktivnosti lizozomskih fosfataza nakon nižih hroničnih doza kadmijuma (Vlahović i sar., 2013), moguće je da na aktivnost lizozomskih fosfataza kadmijum utiče direktno (nakon izlivanja enzima u citoplazmu), kao i indirektno utičući na sudbinu lizozoma. Prema Jayakumaru i sar. (2007), sniženje aktivnosti može se objasniti i curenjem lizozomskih hidrolaza iz oštećenih ćelija, odakle dospevaju u hemolimfu. Zato bi zavisnost

aktivnosti lizozomskih fosfataza od koncentracije kadmijuma kod gubara mogla biti suviše kompleksan indikator toksičnosti za primenu u ekotoksikologiji. Tsvetkov i sar. (2003) pokazali su da izoforme lizozomskih fosfataza karakteriše niska mobilnost na gelu (tj. velike molekulske mase), kao i da kadmijum dovodi do povećanja njihove aktivnosti. Možemo da pretpostavimo da izoforme najmanje mobilnosti na našem zimogramu predstavljaju lizozomske fosfataze, čija aktivnost pokazuje tendenciju rasta u populaciji sa nezagađene lokacije.

Budući da aktivnost nelizozomske frakcije kiselih fosfataza raste u obe populacije nakon izloženosti kadmijumu (u populaciji sa zagađene lokacije značajno je povišena samo posle tretmana višom dozom), moguće je da ovi enzimi imaju direktnu ili indirektnu ulogu u odbrambenoj reakciji na stres. Izoforme 4 i 5, koje karakteriše velika mobilnost na gelu i izrazito visok intenzitet aktivnosti nakon tretmana kadmijumom u obe populacije larvi, najverovatnije odgovaraju nelizozomskim fosfatazama. Tsvetkov i sar. (2003) ustanovili su da aktivnosti citosolnih izoformi kiselih fosfataza u jetri rastu nakon izloženosti puža *Viviparus viviparus* kadmijumu u trajanju od tri dana (akutni efekat). Dve citosolne izoforme identifikovali su kao enzime koji učestvuju u metabolizmu ugljenih hidrata, čija povećana aktivnost dovodi do inhibicije kataboličkih procesa. Treća citosolna izoforma, koja najverovatnije stimuliše glikolizu, bila je u potpunosti inhibirana nakon tretmana kadmijumom. Autori studije smatraju da je inhibicija katabolizma ugljenih hidrata nespecifična adaptacija na stres - detektovana je kod različitih taksona nakon delovanja brojnih stresora uključujući toksikante, nisku i visoku temperaturu, kao i gladovanje. Sa druge strane, Reddy i Bhagyalakshmi (1994) i Suresh i sar. (2016) sugerisali su da rast aktivnosti kiselih fosfataza kod rakova nakon tretmana kadmijumom ubrzava razlaganje fosfata kako bi se oslobodila energija, shodno lošem energetske statusu ćelije zbog oštećenja ATP-aznog sistema. Autor ove teze nije došao do drugih literaturnih podataka o nelizozomskim kiselim fosfatazama. Kiselim fosfatazama se generalno pripisuje važna uloga u metabolizmu ugljenih hidrata tokom izloženosti teškim metalima, ali, kako je već predočeno, autori uglavnom podrazumevaju da aktivnost enzima detektovana u grubom homogenatu ili citoplazmi potiče od lizozomskih fosfataza.

5.1.1.3. Specifična aktivnost i izoforme nespecifičnih esteraza

Iako nije razjašnjen potencijalni doprinos sistema esteraza procesu detoksifikacije teških metala, smatra se da je stanje ovih enzima pokazatelj odbrambenih sposobnosti insekata u nepovoljnim uslovima sredine. Tako, inhibicija esteraza metalima unetim putem hrane može da oslabi odbrambenu sposobnost organizma (Zvereva i sar., 2003).

Literaturni podaci o uticajima kadmijuma na sistem esteraza nisu jednoobrazni, što otežava interpretaciju rezultata. Wilczek i sar. (2003b) uočili su povišenu aktivnost karboksilesteraza na svim stupnjevima razvića *Poecilus cupreusa* (Coleoptera) nakon tretmana kadmijumom. Kao potencijalna objašnjenja stimulacije aktivnosti ovih enzima naveli su da metal možda indirektno utiče na njihovu gensku ekspresiju i (ili) stimuliše produkciju metabolita koji su supstrati za karboksilesteraze. Zhang i sar. (2014) utvrdili su da aktivnost esteraza kod *Oxya chinensis* (Orthoptera) može da raste ili opada nakon hroničnih tretmana kadmijumom zavisno od stupnja razvića, koncentracije metala, kao i od izabranog enzimskog supstrata. Nakon izloženosti raka *Penaeus monodon* nižoj koncentraciji kadmijuma aktivnost esteraza u hemocitama se nakon početnog rasta vratila na prvobitnu vrednost, dok je metal u visokoj koncentraciji delovao inhibitorno u svim ispitanim vremenskim tačkama (Xian i sar., 2014).

U našem eksperimentu, kod larvi gubara poreklom sa nezagađene lokacije, obe primenjene doze kadmijuma dovele su do sniženja aktivnosti esteraza. Izuzetak od opšteg trenda redukcije aktivnosti izoformi bila je pojava nove izoforme 3 isključivo nakon slabijeg tretmana kadmijumom kod obe populacije, što bi moglo da navede na pretpostavku o aktivaciji izozima otpornijeg na prisustvo teškog metala ili, pak, o njegovoj potencijalnoj ulozi u detoksifikaciji.

Mehanizam inhibicije aktivnosti esteraza teškim metalima još uvek nije sasvim rasvetljen. Frasco i sar. (2007) ustanovili su da kod vinske mušice mehanizam inhibicije acetilholinesteraze živom ne uključuje interakciju sa tiolnom grupom. Uzastopno vezivanje dva jona žive za površinu molekula (vezujuća mesta nisu u aktivnom centru enzima) rezultira njegovom nestabilnošću i dovodi postepeno do ireverzibilne denaturacije. U ovom slučaju proces inhibicije je kompleksan jer vezivanje prvog jona

žive za enzim stimuliše reverzibilnu agregaciju proteina koja ih štiti od denaturacije tako što jonima žive smanjuje dostupnost drugog vezujućeg mesta na molekulu. Ispitujući efekte bakra, gvožđa, olova i kadmijuma na aktivnost acetilholinesteraza i karboksilesteraza ribe *Danio rerio*, de Lima i sar. (2013) predložili su objašnjenje prema kom inhibicija nastupa usled jakih jonskih interakcija između metala i enzima, koje narušavaju adekvatnu konformaciju enzima. Pokazali su da u inhibiciji pomenutim metalima ne učestvuju tiolne grupe u aktivnom centru budući da jodsirćetna kiselina, blokator tiolnih grupa proteina, nije inhibirala aktivnost acetilholinesteraze i karboksilesteraze.

Sa druge strane, neki autori smatraju da kadmijum indirektno može dovesti do supresije aktivnosti esteraza. Xian i sar. (2014) pretpostavili su da bi ROS mogli da modifikuju ili oštete proteinsku strukturu enzima s obzirom na to da je snižena aktivnost esteraza rakova bila korelisana sa povećanom koncentracijom ROS nakon tretmana kadmijumom. Rezultati studije na morskom pužu *Littorina littorea* sugerisali su da su u inhibiciju enzima EST-C (katodna esteraza) ovim metalom najverovatnije uključeni transkripcioni, posttranskripcioni, translacioni i drugi indirektni procesi (Mazon i sar., 1998).

5.1.2. Digestivni enzimi - populacija gubara sa kontaminirane lokacije

Niže aktivnosti leucin aminopeptidaze, alkalnih fosfataza i esteraza u kontrolnoj grupi larvi poreklom sa zagađene lokacije u odnosu na ekvivalentnu grupu sa Kosmaja najverovatnije su posledica dugotrajne izloženosti te populacije polutantima. Moguće je da je reč o fiziološkim adaptacijama, tj. maternalnom efektu koji podrazumeva prenos obrazaca ekspresije proteina sa roditeljske generacije, izložene polutantima, na potomačku generaciju. Prisustvo polutanata može biti dovoljno jak selektivni pritisak da dovede do razlika u učestalosti alela enzima između populacija, ali je nemoguće utvrditi da li se radi o fiziološkim ili genetičkim adaptacijama na osnovu posmatranja prve generacije odgajene u laboratoriji (Van Straalen i Roelofs, 2005).

Sniženu aktivnost esteraza u populacijama zglavkara sa lokacija kontaminiranih teškim metalima detektovali su Zvereva i sar. (2003) kod adulta *Chrysomela lapponica* (Coleoptera), kao i Wilczek i sar. (1997) kod paukova. Naredna studija Wilczek i sar.

(2003a) na drugim dvema vrstama paukova duž gradijenta zagađenja metalima pokazala je, pak, rast aktivnosti ovih enzima. Sa druge strane, Callaghan i sar. (1998) nisu našli promene kod populacije *Culex pipiens* (Diptera) iz reke zagađene teškim metalima. Ovakvi različiti rezultati saglasni su sa hipotezom da esteraze najverovatnije ne učestvuju direktno u detoksifikaciji metala, već da aktivnost ovih enzima zavisi od fiziološkog stanja životinja i uslova spoljašnje sredine (Zhang i sar., 2014; Wilczek i sar., 2003b). U skladu sa ovim zaključkom su i naši rezultati - odsustvo aktivacije alkalnih fosfataza i esteraza nakon tretmana kadmijumom u populaciji gubara sa zagađene lokacije, kao i niža aktivnost u kontrolnoj grupi u poređenju sa populacijom sa Kosmaja.

Digestivni enzimi larvi koje potiču iz blizine prometne magistrale pokazali su manju osetljivost na kadmijum, naročito na njegovu nižu dozu, u odnosu na populaciju sa nekontaminirane lokacije. Za razliku od efekta na populaciju sa Kosmaja, hronični unos 50 µg Cd/g suve hrane nije rezultirao inhibicijom tripsina, LAP i esteraza niti je doveo do rasta aktivnosti ukupnih kiselih i nelizozomskih kiselih fosfataza u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. Štaviše, nakon ovog tretmana uočene su značajne razlike između larvi dveju populacija u slučaju leucin aminopeptidaze, ukupnih kiselih fosfataza, kiselih nelizozomskih fosfataza i esteraza.

Tolerancija na teške metale davno je uočena u populacijama zglavkara koje su im generacijama bile izložene, a u studijama ovog fenomena najčešće su proučavane osobine fitnesa (Donker i Bogert, 1991) i mehanizmi detoksifikacije: sinteza metalotioneina i Hsp, intenzitet ekskrecije metala i sistem antioksidativne odbrane (Kafel i sar., 2012b; Timmermans i sar., 2005; Postma i sar., 1996). Kako se na osnovu dostupne literature o digestivnim enzimima ne može direktno objasniti njihova veza sa tolerancijom na nižu dozu kadmijuma u našem eksperimentu, pretpostavljamo da superiorniji mehanizmi detoksifikacije u ovoj eksperimentalnoj grupi mogu delom da objasne otpornost enzima na polutant. Rezultati naše studije ukazali su na efikasnije mehanizme sekvestracije i eliminacije kadmijuma kod larvi tretiranih sa 50 µg Cd/g suve hrane. Ekskrecija metala putem fecesa bila je dva puta intenzivnija u toj populaciji u odnosu na populaciju sa Kosmaja. Iako se koncentracije kadmijuma u crevu između ovih grupa larvi nisu razlikovale, moguće je da je kod larvi sa zagađene lokacije metal u

većoj meri bio sekvestriran nekim mehanizmom, odnosno “inaktiviran”. Verovatno količina slobodnog kadmijuma u ćeliji nije bila dovoljna da direktno inhibira aktivnosti digestivnih enzima niti da značajnije ošteti ključne strukture za funkcionisanje ćelije, poput mitohondrija i mašinerije za sintezu proteina. O efikasnijem adaptivnom odgovoru na stres nakon primene niže doze kadmijuma svedoči i pojava hormezisa u slučaju leucin aminopeptidaze. Hormezis je fenomen kada stres nižeg intenziteta aktivira ili intenzivira ćelijske i molekularne mehanizme koji povećavaju sposobnost ćelije i organizma da se suprotstave ozbiljnijem stresu (Calabrese i sar., 2007). Naime, nakon tretmana sa 50 µg Cd/g suve hrane aktivnost LAP bila je čak značajno povišena u odnosu na odgovarajuću kontrolu, dok se grupa koja je primila veću dozu kadmijuma nije razlikovala od kontrolne. S obzirom na prethodno predočenu potencijalnu ulogu kiselih nelizozomskih fosfataza u metabolizmu tokom stresa, izostanak aktivacije ovih enzima ide u prilog zaključku da larve poreklom iz okoline magistralnog puta bolje tolerišu dozu kadmijuma od 50 µg Cd/g suve hrane.

Nakon tretmana sa 100 µg Cd/g suve hrane aktivnosti enzima u dvema populacijama uglavnom su bile ujednačene izuzev u slučaju ukupnih kiselih i nelizozomskih kiselih fosfataza čije su aktivnosti bile značajno niže kod larvi sa zagađene lokacije.

Redukcija aktivnosti ukupnih proteaza i kiselih lizozomskih fosfataza u odnosu na kontrolu, iako statistički značajna samo u okviru populacije sa kontaminirane lokacije, kao i rast aktivnosti nelizozomskih fosfataza, sugerišu da je i populacija sa zagađene lokacije osetljiva na višu dozu kadmijuma, ali u manjoj meri nego populacija sa Kosmaja. Trend redukcije aktivnosti lizozomskih fosfataza kod larvi sa zagađene lokacije nije lako objasniti. Osim direktnog negativnog efekta metala na lizosome i enzime, moguće je da se radi o preraspodeli energije između ekspresije lizozomskih fosfataza i sinteze komponenti odbrambenog sistema ćelije u uslovima izloženosti kadmijumu.

Izozim tripsina 1, koji je detektovan samo kod larvi sa zagađenog lokaliteta nakon tretmana kadmijumom u koncentraciji od 100 µg Cd/g suve hrane, i izozim LAP 1, prisutan jedino u kontrolnoj grupi sa Kosmaja, jedini su primeri izoformi digestivnih enzima čija je pojava bila specifična za neku od populacija. U ranijim studijama je

primenom elektroforetskih analiza ustanovljeno da dugotrajno prisustvo polutanata može predstavljati selektivni pritisak koji rezultira promenama u genetičkoj strukturi populacija. Studije koje su na terenu i u laboratoriji sprovedi Nevo i saradnici (Lavie i Nevo, 1987a, 1987b, 1982; Nevo i sar., 1981) na morskim mekušcima pokazale su da veća učestalost određenih izoformi pojedinih enzima (fosfoglukomutaza, fosfoglukoza izomeraza, alkalne fosfataze) doprinosi toleranciji populacija sa kontaminiranih lokaliteta na teške metale. Korelaciju između tolerancije na metale i učestalosti alela gena za glutamat oksaloacetat transaminazu uočili su Frati i sar. (1992) kod kolebole *Orchesella cincta*. Parker i Callaghan (1997) našli su povećanu učestalost određenih izoformi esteraza u populacijama *Simulium equinum* (Diptera) izloženim organofosforim jedinjenjima. Možemo pretpostaviti da u našem eksperimentu izoformu tripsina 1 odlikuje veća otpornost na metale, te je selektovana u prisustvu visoke koncentracije polutanata u blizini Ibarske magistrale.

Međutim, lako se uočava da je kod posmatranih populacija ponašanje izoformi digestivnih enzima u odgovoru na stres često bilo slično, samo što je efekat kadmijuma na larve sa zagađene lokacije bio blaži, shodno efikasnijoj eliminaciji metala i drugim odbrambenim mehanizmima, o čemu je već bilo reči. Tako je tretman od 100 µg Cd/g suve hrane kod larvi sa kontaminirane lokacije intenzivirao ekspresiju izoforme tripsina 2, za koju pretpostavljamo da je manje osetljiva na kadmijum od izoforme 3 koja je u potpunosti izostala. Ovakav obrazac zabeležen je i u populaciji sa Kosmaja već nakon primene niže doze metala. Izoforma leucin aminopeptidaze 3 bila je sasvim odsutna nakon oba tretmana kod obe populacije, dok je ekspresija izoformi 2 i 4 bila višestruko povećana, što je u populaciji sa zagađene lokacije rezultiralo značajnim rastom ukupne aktivnosti enzima nakon primene niže doze kadmijuma u odnosu na kontrolu. Izoforma esteraza 3 javila se jedino nakon primene doze od 50 µg Cd/g suve hrane, kao i kod larvi sa Kosmaja. Ovi rezultati sugerisu da manja osetljivost digestivnih enzima na kadmijum kod larvi sa zagađene lokacije generalno nije rezultat selektivnog pritiska polutanata na pojedinačne izoforme enzima (izuzimajući izoformu tripsina 1). Verovatno je da se obe populacije odlikuju sličnim fiziološkim adaptacijama koje im omogućavaju da u prisustvu teških metala optimizuju ekspresiju izoformi tako da funkcije enzima ne budu ugrožene.

5.2. Uticaj kadmijuma na antioksidativne enzime – superoksid dismutazu (SOD) i katalazu

Kod larvi koje potiču sa zagađenog lokaliteta, hranjenih hranom bez kadmijuma, rast aktivnosti SOD mogao bi biti jedan od adaptivnih mehanizama na teške metale, ali i na druge potencijalno prisutne polutante poput policikličnih aromatičnih ugljovodonika (Srogi, 2007), koji mogu da uzrokuju oksidativni stres (Gavrilović i sar., 2017). Brojne studije su pokazale da dugotrajna izloženost metalima rezultira aktivacijom SOD. Nakon prekida višegeneracijske izloženosti *Spodoptera exigua* (Lepidoptera) kadmijumu u laboratorijskim uslovima, aktivnost ovog enzima bila je povećana u odnosu na kontrolne larve koje nisu bile tretirane kadmijumom (Kafel i sar., 2014). Migula i sar. (2004) su na četiri vrste insekata prikupljenih duž gradijenta zagađenja teškim metalima detektovali pozitivnu korelaciju aktivnosti SOD sa nivoom zagađenja ili sa koncentracijama metala akumuliranim u organizmu. Takođe, Wu i sar. (2014) našli su povišenu aktivnost SOD kod laboratorijskog soja *Boettcherisca peregrine* (Diptera) rezistentnog na kadmijum u odnosu na soj osetljiv na kadmijum.

Za razliku od SOD, nije bilo indicija da katalaza doprinosi boljoj adaptiranosti populacije sa kontaminirane lokacije u odnosu na populaciju sa Kosmaja, budući da nisu ustanovljene razlike između kontrolnih grupa. Prema Ahmadu i Pardiniju (1990), za insekte je karakterističan visok konstitutivni nivo aktivnosti katalaze koji se retko menja pod uticajem spoljašnjih izvora oksidativnog stresa.

Iako kadmijum nije redoks-aktivan metal, on posredno uzrokuje produkciju ROS (Stohs i sar., 2001), pa je aktivacija antioksidativnih enzima očekivana. Ipak, u našem eksperimentu je kod obe populacije zabeležen samo pad aktivnosti SOD i katalaze nakon tretmana kadmijumom. Poznato je da odgovori antioksidativnih enzima na spoljašnje stresore mogu da variraju između vrsta i različitih tkiva (Wilczek i sar., 2004), a zavise i od pola (Zhang i sar., 2011), kao i od stupnja razvića (Mirčić i sar., 2013; Perić-Mataruga i sar., 1997).

Na aktivnost SOD i katalaze u velikoj meri utiče koncentracija kadmijuma. Utvrđeno je da izloženost pojedinih insekata niskim dozama kadmijuma rezultira aktivacijom antioksidativnih enzima, dok visoke doze uzrokuju sniženje aktivnosti

(Yuan i sar., 2014; Lijun i sar., 2005). U našem eksperimentu primenjene su visoke koncentracije kadmijuma koje su, kako izgleda, bile dovoljne da dovedu do inhibitorynog efekta. Međutim, u tom slučaju ostaje nejasno zašto je tretman od 50 µg Cd/g suve hrane inhibirao aktivnosti oba enzima kod larvi sa zagađene lokacije, ali ne i kod larvi sa Kosmaja, čiji su digestivni enzimi pokazali veću osetljivost na ovu koncentraciju. Nameće se pitanje da li je pad aktivnosti posledica direktne inhibicije enzima ili je reč o adaptivnoj strategiji, što bi se moglo pretpostaviti na osnovu razlika u odgovorima dve populacije. Nakon niže doze kadmijuma, ekskrecija metala putem fecesa bila je dva puta efikasnija kod larvi sa zagađene lokacije u odnosu na larve sa Kosmaja, što je verovatno redukovalo nivo oksidativnog stresa, a time i potrebu za delovanjem antioksidativnih enzima. Tako bi sniženje aktivnosti SOD i katalaze u toj grupi moglo biti posledica trade-offa sa intenziviranim mehanizmima sekvestracije i ekskrecije kadmijuma uključujući indukciju metalotioneina. U populaciji sa Kosmaja, sa druge strane, antioksidativni enzimi su verovatno igrali važniju ulogu u odbrani od stresa uzimajući u obzir značajno nižu efikasnost ekskrecije kadmijuma. U prilog ovom objašnjenju ide prisustvo obe izoforme, SOD 2 i SOD 3, u toj grupi sa Kosmaja nakon tretmana nižom dozom kadmijuma, dok iste izostaju u grupi iz druge populacije, što sugeriše da se pre radi o selektivnoj aktivnosti izoformi.

Redukcija aktivnosti antioksidativnih enzima u grupama larvi tretiranim sa 100 µg Cd/g može se takođe povezati sa aktivacijom alternativnih odbrambenih mehanizama – sa indukcijom sinteze Hsp70 u populaciji sa nezagađene lokacije, odnosno, sa rastom ekspresije metalotioneina u drugoj populaciji. Moguće je i da je tako visoka doza metala dovoljna da u nekoj meri direktno inhibira aktivnost SOD i katalaze kod obe populacije larvi, posebno uzimajući u obzir da se radi o metaloenzimima. Smatra se da CuZn SOD i Mn SOD mogu biti inhibirane zamenom jona cinka, odnosno mangana kadmijumom (Arroyo i sar., 2011). Negativni efekat na katalazu verovatno se dešava usled interakcije kadmijuma sa imidazolnom grupom u aktivnom centru enzima (Casalino i sar., 2002).

5.3. Ekspresija Hsp70 u srednjem crevu i mozgu nakon hronične izloženosti kadmijumu

Proteini toplotnog šoka se konstitutivno ekspimiraju i u odsustvu stresa, u malim količinama dovoljnim za održavanje ćelijske homeostaze (Sørensen i sar., 2003). Na brojnim vrstama je pokazano da povišen nivo ovih proteina ima važnu ulogu u uslovima stresa kada je ugrožen integritet proteina, uključujući stanja izloženosti teškim metalima (Köhler i sar., 1992). Ekspresija Hsp70 kod svake vrste i populacije predstavlja balans između dobrobiti i cene, s obzirom na uticaj na rast, brzinu razvića i reprodukciju (Yousef i sar., 2010). Predmet naše studije bili su, između ostalog, efekti dugoročne izloženosti populacije gubara polutantima na ekspresiju ovih proteina u srednjem crevu i mozgu larvi nakon hroničnih tretmana kadmijumom.

Viši nivo ekspresije Hsp70 uočen u crevu i mozgu kod prve generacije larvi odgajenih u kontrolnim laboratorijskim uslovima može biti posledica maternalnih efekata ili delovanja prirodne selekcije pod pritiskom dugotrajnog prisustva toksikanata na zagađenoj lokaciji sa koje larve potiču (Johnston, 2011). U blizini Ibarske magistrale verovatno su, osim teških metala, prisutni i drugi polutanti koji ispoljavaju proteotoksičnost i mogu da indukuju sintezu Hsp70, poput policikličnih aromatičnih ugljovodonika (Mrdaković i sar., 2016). S obzirom na važnu ulogu Hsp70 u reparaciji oštećenih proteina, može se očekivati njihova visoka konstitutivna ekspresija u odgovoru na višegeneracijsku izloženost ksenobioticima (Sanders i Martin, 1993). U našem eksperimentu, kod kontrolnih larvi sa zagađene lokacije povećana ekspresija Hsp70 u crevu bila je udružena sa povišenom aktivnošću SOD i niskom koncentracijom metalotioneina. Takva odbrambena strategija, sa uočljivim trade-offom između različitih detoksifikacionih mehanizama, verovatno predstavlja adaptaciju na specifičnu kombinaciju polutanata prisutnih na staništu koje ta populacija naseljava, u blizini Ibarske magistrale.

Slično, alternativna aktivacija sinteze Hsp70 i metalotioneina u crevu uočena je nakon tretmana kadmijumom kod obe populacije - kosmajska populacija odgovorila je rastom Hsp70, a larve sa zagađene lokacije povećanjem metalotioneina. Rast koncentracije Hsp70, zabeležen kod larvi sa Kosmaja, u skladu je sa podacima

dobijenim na drugim vrstama insekata koji pokazuju da u odgovoru na kadmijum učestvuje familija Hsp70 (Tang i sar., 2012; Planello i sar., 2010; Yousef i sar., 2010). Međutim, kod larvi sa kontaminirane lokacije, koje su u kontrolnim uslovima imale visok nivo ekspresije Hsp70, zabeležili smo neznatnu indukciju ekspresije nakon oba tretmana. Kad je reč o populacijama sa istorijom izloženosti teškim metalima, osim slučajeva povišene ekspresije proteina toplotnog šoka, u literaturi je zabeležen i značajan broj suprotnih, gde je nivo Hsp70 bio neočekivano redukovan u odnosu na populacije koje prethodno nisu bile u kontaktu sa toksikantima (Haap i sar., 2009; Köhler, 2000). Autori pomenutih studija objašnjavaju fenomen redukcije nivoa Hsp70 hipotezom da kod populacija dugoročno izloženih teškim metalima selekcija može da favorizuje druge adaptivne mehanizme (npr. sintezu proteina bogatih cisteinom kakvi su metalotioneini i efikasniju ekskreciju metala), s obzirom na energetski skup mehanizam sinteze proteina toplotnog stresa (mada odgovor zavisi i od tipa metala). Haap i sar. (2016) su pokazali da klon *Daphnia magna*, otporniji na kadmijum, karakteriše niži nivo Hsp70 i visoka ekspresija metalotioneina, dok je kod klona osetljivijeg na kadmijum bilo obrnuto.

Odgovori na tretmane kadmijumom razlikovali su se između creva i mozga, što je u skladu sa rezultatima drugih studija o tkivno specifičnoj ekspresiji Hsp (Benhamed i sar., 2016). U mozgu je samo tretman nižom dozom kadmijuma, i to kod populacije sa nekontaminirane lokacije, rezultirao rastom ekspresije Hsp70. Suprotni odgovori na manju i veću dozu kadmijuma u mozgu tretiranih larvi poreklom sa Kosmaja ne predstavljaju iznenađenje. Od ranije je poznato da odgovori Hsp70 na stresor mogu biti nesigmoidni. Köhler i sar. (1999) su kod dve vrste kolembola duž gradijenta metala pronašli da individue iz sredine gradijenta imaju najviši nivo Hsp70. Redukcija ekspresije koju smo uočili nakon tretmana većom dozom kadmijuma može se objasniti aktiviranjem ili intenziviranjem drugih detoksifikacionih mehanizama (npr. sinteza metalotioneina, deponovanje metala u granule, antioksidativna odbrana) nauštrb sinteze Hsp70 na visokim koncentracijama kadmijuma.

Strategija sekvenciranja i ekskrecije kadmijuma na račun mehanizma spašavanja oštećenih proteina putem Hsp70 jasno je vidljiva u populaciji sa zagađene lokacije. U toj populaciji se lako uočava relacija između koncentracije Hsp70 u mozgu i

koncentracije kadmijuma u glavi nakon tretmana. Značajno redukovana koncentracija kadmijuma u glavi u odnosu na kontrolu nakon tretmana nižom dozom ovog metala i njegova nepromenjena koncentracija nakon tretmana višom dozom pokazatelji su efikasne ekskrecije kadmijuma. Takva efikasna eliminacija metala bila je praćena smanjenom ekspresijom Hsp70 u mozgu nakon oba tretmana. Nakon primene niže doze kadmijuma kod ibarske populacije ekskrecija je bila najefikasnija, a koncentracija Hsp70 najniža. Inhibicija Hsp70 u mozgu mogla je bar delimično biti posledica i duge izloženosti kadmijumu (Luo i sar., 2014). Warchalowska-Sliwa i sar. (2005) uočili su na insektu *Tetrix tenuicornis* (Orthoptera) da je indukcija Hsp70 bila intenzivnija nakon akutnog stresa u odnosu na hronični.

Studija na insektu *Spodoptera exigua* (Lepidoptera) takođe je pokazala da indukcija sinteze Hsp70 nije relevantan mehanizam detoksifikacije u glavi larvi nakon izloženosti jedne generacije kadmijumu, kao ni nakon izloženosti 44 generacije (Kafel i sar., 2012b). Isti autori su kod prve generacije izložene kadmijumu uočili trade-off između sinteze Hsp70 i sistema antioksidativne zaštite - nivo Hsp70 bio je redukovano u odnosu na kontrolu i višegeneracijski tretman metalom, dok je istovremeno ukupni antioksidativni kapacitet bio povišen. Mozak je krucijalni organ za koji je poznato da ima posebno efikasne mehanizme odbrane protiv stresa (Badiou-Beneteau i sar., 2013). Rezultati te studije sugerisali su da kod pčela mozak, u odnosu na crevo, ima veću sposobnost indukcije metalotioneina nakon izloženosti neesencijalnim elementima.

5.4. Uticaj kadmijuma na ekspresiju metalotioneina u srednjem crevu

U ovoj studiji je demonstrirano da sve eksperimentalne grupe larvi iz obe populacije gubara, uključujući i one koje nisu bile tretirane kadmijumom, ekspimiraju metalotionein. Takvi nalazi potvrđuju konstitutivnu ekspresiju ovih proteina, uočenu ranije i kod drugih beskičmenjaka (Timmermans i sar., 2005). Ipak, evidentne su razlike u odgovorima između dve populacije gubara nakon hronične izloženosti kadmijumu.

Značajna indukcija sinteze metalotioneina u odnosu na kontrolu u crevu larvi registrovana je samo u populaciji sa kontaminirane lokacije, i to nakon oba tretmana kadmijumom. Tako je ovim eksperimentom prvi put pokazano da kadmijum kod gubara može da indukuje ekspresiju metalotioneina, koji verovatno učestvuje u njegovoj

detoksifikaciji. Poznato je da je kadmijum jedan od najjačih aktivatora sinteze metalotioneina uz živu i bakar (Van Straalen i Roelofs, 2005). Metalotioneini nesumnjivo igraju značajnu ulogu u sekvestraciji i detoksifikaciji metala kod beskičmenjaka (Rosabal i sar., 2012; Amiard i sar., 2006). Devedeset devet procenata kadmijuma u crevu vezano je za metalotioneine kod kolebole *Orchesella cincta* (Hensbergen i sar., 2000), a najveći deo kadmijuma akumuliranog u telu larvi *Chaoborus* (Diptera) pronađen je u frakciji HSP (engl. heat stable proteins) koja sadrži metalotioneine i metalotioneinima slične proteine (Rosabal i sar., 2012). Prema Roelofs i saradnicima (2007) nivo ekspresije metalotioneina u korelaciji je sa efikasnošću ekskrecije kadmijuma.

Naša studija pokazala je da je kod obe populacije nakon oba tretmana kadmijumom koncentracija metala najviša u fecesu i crevu larvi. Kako je nakon primene niže doze kadmijuma eliminacija metala putem fecesa bila dva puta intenzivnija kod larvi iz populacije sa kontaminirane lokacije u odnosu na populaciju sa Kosmaja, a razlike u koncentraciji metalotioneina u crevu između ovih grupa nije bilo, efikasnija ekskrecija kadmijuma može se objasniti alternativnim mehanizmima sekvestracije i eliminacije kadmijuma koji ne uključuju metalotioneine. Poznati su i drugi kadmijum-vezujući ligandi koji učestvuju u detoksifikaciji - glutation (Meister i Anderson, 1983) i makromolekuli poput glikoproteina koji su detektovani kod nekoliko vrsta zglavkara (Dallinger, 1993; Martoja i sar., 1983). Dallinger (1993) navodi da su među kopnenim beskičmenjacima poznate vrste kod kojih metalotionein čak uopšte nije prisutan. Osim toga, metali mogu da se akumuliraju u lizozomskim granulama, endoplazmatičnom retikulumu i mitohondrijama pre nego što budu eliminisani fecesom (Sokolova i sar., 2005; Van Straalen i Roelofs, 2005; Ahearn i sar., 2004). Primećeno je da mehanizam akumulacije metala u organelama i granulama i mehanizam sekvestracije putem metalotioneina mogu biti alternativno zastupljeni u različitim tkivima (Ortega i sar., 2017; Amiard i sar., 2006).

O potencijalnom značaju mehanizama sekvestracije i eliminacije koji ne uključuju metalotionein kod gubara svedoči i izostanak značajnog rasta koncentracije metalotioneina kod larvi sa Kosmaja nakon oba tretmana metalom (mada je tendencija rasta vidljiva) iako nije bilo razlike između ekvivalentnih grupa dveju populacija

gubara. Kontrolna grupa iz te populacije imala je za 50% višu ekspresiju metalotioneina u odnosu na kontrolne larve sa kontaminirane lokacije i varijansa je bila značajno veća nakon izlaganja larvi višoj dozi kadmijuma u poređenju sa kontrolnom grupom (F test, $p < 0,0334$). Povećanje varijabilnosti nakon izloženosti stresu može biti pokazatelj veće osetljivosti populacije sa Kosmaja na kadmijum u odnosu na populaciju sa zagađene lokacije, kao što je prethodno objašnjeno na slučaju alkalnih fosfataza (Poglavlje 5.1.1.2).

Iako je indukcija sinteze metalotioneina uočena samo kod larvi sa kontaminirane lokacije, teško je zaključiti u kojoj meri taj mehanizam doprinosi boljoj toleranciji te populacije na teške metale. Prema literaturnim podacima, u populacijama beskičmenjaka koje naseljavaju staništa zagađena metalima, najčešće je detektovana viša ekspresija metalotioneina, kako konstitutivna tako i indukovana, u odnosu na populacije sa čistih lokacija (Mustonen i sar., 2014; Timmermans i sar., 2005; Klerks i Bartholomew, 1991). Smatra se da je povišena ekspresija metalotioneina jedna od genetičkih adaptacija u populacijama sa dugom istorijom izloženosti metalima (Janssens i sar., 2009). Međutim, studija na pauku *Pardosa saltans* pokazala je da se rast metalotioneina nakon izloženosti kadmijumu u laboratorijskim uslovima ne razlikuje između populacija poreklom sa lokacija kontaminiranih tokom dugih perioda, i odgovarajućih referentnih populacija sa čistih lokaliteta (Eraly i sar., 2010). Ortega i sar. (2017) detektovali su čak višu ekspresiju metalotioneina i pre i posle aklimatizacije kod jedinki krabe *Ucides cordatus* prikupljenih sa nezagađene lokacije u poređenju sa organizmima sa zagađene lokacije. Pored detoksifikacije teških metala, metalotioneini kod različitih bioloških vrsta mogu imati dodatne funkcije, pri čemu njihova ekspresija zavisi i od fiziološkog stanja jedinke i rasta (Lukan, 2009 i reference tamo navedene), i može varirati između različitih organa (Ivanina i sar., 2008). Yang i sar. (2015) uočili su da nakon indukcije metalotioneina u početnoj fazi izloženosti kadmijumu sledi sniženje ekspresije do nivoa u kontrolnoj grupi, najverovatnije usled iscrpljivanja energetske rezervi ćelije. Uzimajući sve ove činjenice u obzir, jasno je da je koncentracija metalotioneina u tretiranim grupama larvi gubara bila uslovljena brojnim faktorima, ali da je on nesumnjivo jedan od ključnih faktora koji utiče na detoksifikaciju kadmijuma.

5.5. Akumulacija kadmijuma u fecesu, glavi i integumentu larvi *L. dispar*

Aktuelna studija je ukazala na nekoliko razlika u obrascu akumulacije kadmijuma između populacija sa različitom istorijom izloženosti metalima. Dok je ekskrecija kadmijuma putem fecesa bila visoka kod obe populacije, kod larvi sa kontaminirane lokacije koje su dobijale 50 µg Cd/g suve hrane bila je dva puta viša u poređenju sa ekvivalentnom grupom iz druge populacije. Ovaj rezultat ukazuje na viši nivo detoksifikacije. Osim toga, količina kadmijuma u fecesu je rasla proporcionalno koncentraciji u hrani. Nakon ingestije 100 µg Cd/g suve hrane verovatno je detoksifikacija putem fecesa dostigla maksimum s obzirom na to da je u obe populacije količina kadmijuma bila približno ista. Znači da kod gubara feces predstavlja glavno mesto depozicije metala nakon dugotrajnog tretmana kadmijumom.

Najveća količina unetog kadmijuma detektovana je u fecesu različitih vrsta insekata (Ding i sar., 2013; Pedersen i sar., 2008). Mrtve odbačene ćelije koje sadrže velike količine metala oslobađaju se u lumen creva odakle dospevaju u feces. Pored metalotioneina, koji je glavni činilac u detoksifikaciji kadmijuma, Hopkin (1989) je opisao guste vezikule poreklom iz lizozomskog sistema, koje sadrže veliku količinu sumpora i metala, uključujući kadmijum. Osim toga, različiti joni metala mogu da budu zarobljeni u depozitima kalcijum pirofosfata (zamenjujući jone kalcijuma) i ugrađeni u granule koje učestvuju u eliminaciji metala (Masala i sar., 2002). Ovo može biti razlog slične fekalne ekskrecije različitih metala, kao što je slučaj sa kadmijumom, gvožđem i manganom u aktuelnom eksperimentu.

Čvrsti delovi kutikule insekata (mandibule, klešta, itd.) sadrže metale u tragu. Zn, Mn i Fe prisutni su u relativno velikim količinama i čine 1% suve mase kutikule (Chapman, 1998). Ustanovljeno je da kod tzv. "leaf-cutter" mrava Zn i Mn povećavaju tvrdoću mandibula (Schofield i sar., 2002). S obzirom da je najviša akumulacija kadmijuma, kao i Al, Cu, Ni i Zn, bila u glavama larvi (u obe populacije) koje su dobijale nekontaminiranu hranu, može se zaključiti da je tkivo glave osnovno mesto za akumulaciju metala. S obzirom na to da smo analizirali cele glave, uključujući egzoskelet, mozak, itd., moguće je da su sva tkiva glave podobna za aglomeraciju teških

metala. Ovi rezultati na insektima u potpunosti podržavaju teoriju o afinitetu metala prema mozgu gde se dugoročno zadržavaju. Ipak, niža koncentracija kadmijuma u glavi larvi sa kontaminirane lokacije posle izloženosti kadmijumu u koncentraciji od 100 µg Cd/g suve hrane ukazuje na taloženje metala u drugim tkivima (npr. u fecesu), kao i na povišen nivo specifičnih detoksifikacionih mehanizama (Hsp70).

Prema van Straalenu i Roelofsu (2005), samo 40% unetog kadmijuma eliminiše se u jednom ciklusu presvlačenja. Preostali kadmijum je uskladišten u organima koji se ne obnavljaju (Lindqvist i Block, 1995) i koji imaju potencijal za akumulaciju metala bez letalnog ishoda. To je verovatno razlog što se eliminacija metala tokom metamorfoze odvija preko integumenta. Najvažniji rezultat aktuelnog eksperimenta bio je sličan nivo aglomeracije kadmijuma nakon tretmana sa 50 i 100 µg Cd/g suve hrane u populaciji sa kontaminirane lokacije, koja se značajno razlikovala od kontrolnog nivoa. Dvostruka količina kadmijuma kod larvi sa nezagađenog lokaliteta koje su dobijale hranu sa višom koncentracijom metala u poređenju sa populacijom sa zagađene lokacije primer je drugačijih odgovora populacija insekata poreklom iz različitih staništa, kao i različitih mehanizama akumulacije posle izloženosti ekstremno visokim količinama kadmijuma.

Koncentracija esencijalnih metala, bakra i cinka, ostala je u integumentu na približno istom nivou, nezavisno od tretmana kadmijumom i porekla populacije (Tabela 3). Bakar vezan za sumpor u metalotioneinima (Baghban i sar., 2014) i njegova ekskrecija putem granula, fecesom, verovatno može da objasni povećanje koncentracije ovog metala u fecesu larvi iz obe populacije nakon obe koncentracije kadmijuma. Bakar je esencijalni faktor u krucijalnom proteinu hemolimfe, hemocijaninu, koji je odgovoran za transport kiseonika; cink se često javlja u aktivnim centrima enzima uključujući DNK-vezujuće peptide (Van Straalen i Roelofs, 2005). Izgleda da su depoi ovih metala u integumentu neophodni s obzirom na njihove fiziološke uloge. Detoksifikacija kadmijuma putem granula manje je energetski zahtevna za razliku od aktivne regulacije internih koncentracija Ni i Al (Holmstrup i sar., 2011). Ovo može biti razlog različitih modaliteta akumulacije između kadmijuma i drugih pratećih elemenata u našem istraživanju.

Ovaj eksperiment pokazuje da se samo deo unetog kadmijuma zadržava u organizmu larvi gubara, ali dovoljno da prouzrokuje oštećenja na hemocitama (Matić i sar., 2016). Sposobnost gusenica za ekskreciju teških metala temelj je njihove otpornosti prema ozbiljnom zagađenju životne sredine, kao i pokazatelj njihove velike adaptabilnosti. Očigledno je da su larve iz našeg eksperimenta postigle visok nivo detoksifikacije u prisustvu ekstremno visokih doza kadmijuma unetog putem hrane. Neophodni su dalji eksperimenti u cilju objašnjenja potencijalnih fizioloških adaptacija, kao i trade-offa između parametara vitalnosti i procesa ključnih za preživljavanje u stresnim uslovima.

5.6. Efekti kadmijuma na hemocite larvi

5.6.1. Vijabilnost hemocita

Ovim eksperimentom su pokazane značajne razlike u osetljivosti na hroničnu izloženost kadmijumu između populacija larvi gubara sa nekontaminirane i zagađene lokacije. Dozno-zavisno sniženje vijabilnosti hemocita kod larvi sa nezagađene lokacije bilo je očekivano zbog akumulacije oštećenja indukovanih kadmijumom i lošeg adaptivnog odgovora. AO/EB test ćelijske vijabilnosti ispituje integritet ćelijske membrane. Kadmijum može da dovede do oštećenja membrane direktno – inhibicijom esencijalnih membranskih proteina ili uticajem na sastav membranskih lipida (Chen i sar., 2014). Indirektni efekti su u najvećoj meri uzrokovani reaktivnim kiseoničnim vrstama (engl. reactive oxygen species - ROS) koje dovode do peroksidacije lipida, ali i oslobađanjem hidrolaza iz oštećenih lizozoma u citosol (Matozzo i sar., 2001). Osim toga, ovaj metal direktno ograničava energetske resurse inhibirajući oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijama i redukujući nivo ATP u citosolu. I drugi autori su našli da kadmijum *in vivo* i *in vitro* smanjuje vijabilnost hemocita na dozno-zavisan način kod beskičmenjaka (Kračun-Kolarević i sar., 2015; Snyman i Odendaal, 2009; Sokolova i sar., 2004).

Tolerancija na tretman nižom koncentracijom kadmijuma (50 µg Cd/g suve hrane) uočena kod larvi sa zagađene lokacije može se objasniti adaptacijama u ovoj populaciji - intenzivnim mehanizmima detoksifikacije. Slično, Braeckman i sar. (1999b)

primetili su “hormezi sličnu” devijaciju od obrasca sigmoidnog opadanja vijabilnosti insekatskih ćelija u određenom opsegu koncentracija kadmijuma, dok je uobičajeni obrazac sniženja vijabilnosti uočen pri najvišim koncentracijama kadmijuma. U aktuelnom eksperimentu, vijabilnost je redukovana nakon tretmana sa 100 µg Cd/g suve hrane, verovatno kao rezultat energetski zahtevne ćelijske odbrane na tako visokoj koncentraciji i visokog nivoa nereparabilnih oštećenja. Iako bi se moglo očekivati da larve tolerantne na metale mogu da spreče prelazak kadmijuma u cirkulaciju preko creva, naši nalazi govore da on ipak prolazi, samo u manjoj meri u odnosu na larve sa nezagađene lokacije. Leonard i sar. (2009) takođe su pokazali da crevo nije potpuna barijera. Iznenadjujuće, Kafel i sar. (2012a) pronašli su da je nakon izloženosti kadmijumu koncentracija ovog metala povišena u hemolimfi, a snižena u celim organizmima larvi *Spodoptera exiqua* (Lepidoptera) tolerantnih na metale u poređenju sa netolerantnim larvama. Akumulacija metala u hemolimfi verovatno je posledica intenzivnog uklanjanja metala iz drugih tkiva i mogla bi da objasni opadanje vijabilnosti hemocita koje smo detektovali kod larvi gubara sa zagađene lokacije nakon tretmana višom dozom kadmijuma.

5.6.2. Nivo DNK oštećenja u hemocitama

Kao što je očekivano, genotoksični efekat kadmijuma bio je očigledan u populaciji gubara sa nezagađenog lokaliteta. Nivo oštećenja DNK bio je sličan nakon primene manje i veće doze kadmijuma. S obzirom na primenjene relativno visoke doze kadmijuma, dostizanje platoa u nivou DNK oštećenja nije iznenadjujuće. Slični rezultati primećeni su i u prethodnim studijama na slatkovodnim školjkama (Gačić i sar., 2014) i slatkovodnim oligohetama (Kračun-Kolarević i sar., 2015) izloženim kadmijumu. S obzirom na to da su štetni efekti kadmijuma vidljivi na svim nivoima biološke organizacije kod larvi gubara sa nezagađene lokacije, najverovatnije je stres prevazišao kapacitet odbrambenih mehanizama. Povišen nivo oštećenja DNK i narušena permeabilnost ćelijske membrane hemocita mogu se sagledati u svetlu izrazitog prooksidativnog delovanja kadmijuma. Prethodno smo pokazali smanjenje pula glutaciona i inhibiciju aktivnosti askorbat peroksidaze, indikatore oksidativnog stresa, u tkivu srednjeg creva petog stupnja larvi gubara nakon izloženosti kadmijumu koncentracije 50 µg Cd/g suve hrane (Mirčić i sar., 2013). Povišena ukupna količina SH

grupa ukazala je na ulogu proteinskih tiola u odbrambenom odgovoru na stres kadmijumom.

Tolerancija koju smo registrovali u populaciji iz Bora mogla bi se objasniti efikasnijom antioksidativnom odbranom, kao što je pokazano na drugoj vrsti iz reda lepidoptera, *Spodoptera exigua*, nakon višegeneracijske izloženosti kadmijumu (Kafel i sar., 2014, 2012a). Najsveobuhvatnija studija o toleranciji na metale kod insekata u svetlu genetičkih adaptacija odnosi se na populacije kolebole *Orchesella cincta* koje nastanjuju lokalitete zagađene metalima. Autori su ustanovili da je fenomen tolerancije na metale povezan sa prekomernom ekspresijom jedne kopije metalotioneinskog gena, kao i sa promenama ekspresije nekoliko drugih gena uključenih u ćelijsku signalizaciju, ćelijski transport i apoptozu, te su sugerisali da bi regulacija transkripcije ovih gena mogla biti meta prirodne selekcije (Janssens i sar., 2009; Roelofs i sar., 2007, 2006). Uočeno je i nasledno uvećanje efikasnosti ekskrecije kadmijuma kod *O. cincta* (Posthuma i Van Straalen, 1993). Kontinuirana izloženost metalnim polutantima tokom više od jednog veka mogla je da dovede do selekcije uspešnijih genotipova u populaciji gubara lociranoj u blizini rudnika. Ako dve populacije sa različitom istorijom izloženosti teškim metalima različito odgovore na hronični stres, moguće je da bi tolerancija na metale mogla biti rezultat genetičkih adaptacija. Sa druge strane, odgovori na stres legala gubara iz prirode koje smo ispitivali u laboratorijskim uslovima mogli bi biti posledica epigenetičkih efekata, poput maternalnih efekata, kao što su sugerisali pojedini autori u multigeneracijskim studijama tolerancije na metale kod insekata (Augustyniak i sar., 2014; Lagisz i Laskowski, 2008).

5.7. Efekti kadmijuma na osobine povezane sa fitnessom

Populacije koje naseljavaju kontaminirana staništa tokom razvića su pod konstantnim pritiskom koji rezultira preraspodelom energije između procesa preživljavanja, detoksifikacije i reprodukcije (Calow i Sibly, 1990). Redukcija ukupnog broja jaja, kao i veći procenat neoplođenih jaja, u leglima gubara koja smo prikupili sa lokacije kod Ibarske magistrale u odnosu na legla sa Kosmaja, pokazatelji su deficita energije uzrokovanog prisustvom polutanata. Slično, negativnu korelaciju između dugotrajne izloženosti polutantima i produkcije jaja uočili su i Lagisz i sar. (2002) kod

Pterostichus oblongopunctatus (Coleoptera) duž gradijenta zagađenja metalima. Cena tolerancije na teške metale kod *Anopheles gambiae* (Diptera) plaćena je, između ostalog, smanjenim fekunditetom i sniženim procentom izlegnutih larvi (Mireji i sar., 2010).

Kod larvi iz legala iz okoline Ibarske magistrale, odgajenih u kontrolnim laboratorijskim uslovima, ustanovili smo da je energija preusmeravana na odbrambene mehanizme poput povišene konstitutivne ekspresije Hsp70 i povišene aktivnosti SOD. Interesantno, preživljavanje larvi u toj grupi bilo je čak 100%, što bi se moglo dovesti u vezu sa delovanjem Hsp70 i SOD u odsustvu polutanata. Tretmani kadmijumom ni u jednoj od populacija nisu snizili preživljavanje ispod 90%. Iako su neki autori uočili negativan efekat kadmijuma na mortalitet kod populacija insekata koje ranije nisu bile izložene polutantima (Kafel i sar. 2014; Cervera i sar., 2004), Van Straalen i sar. (1989) zaključili su da samo veoma visoke koncentracije ovog metala mogu da utiču na preživljavanje u populacijama *Orchesella cincta*, kao i da kadmijum prvenstveno utiče na brzinu rasta jedinki i indirektno na reprodukciju.

Brojni štetni efekti kadmijuma na nižim nivoima organizacije, kao i visoka cena odbrambenog odgovora na stres, negativno se odražavaju na energetske status (Sokolova i sar., 2012; Maryanski i sar., 2002; Van Straalen i Hoffman, 2000). Iako je za akutnu izloženost kadmijumu karakteristično intenziviranje (energetskog) metabolizma, studije pokazuju da produženi stres redukuje proizvodnju ATP, prvenstveno zbog akumulacije oštećenja mitohondrija (Sokolova i sar., 2012), ali i mašinerije za sintezu proteina i drugih ćelijskih struktura, o čemu je bilo više reči u poglavlju o digestivnim enzimima (Poglavlje 5.1.1.1.).

Tako, smanjenje mase larvi koje smo registrovali kod populacija sa Kosmaja i iz okoline Ibarske magistrale nakon tretmana kadmijumom u koncentraciji od 100 µg Cd/g suve hrane, kao i kod populacije sa Homoljskih planina nakon tretmana obema dozama metala, može se, između ostalog, posmatrati kao posledica energetskog deficita. Na osobine fitnesa tokom dugotrajnih tretmana kadmijumom utiče i inhibicija digestivnih enzima u srednjem crevu larvi, koju smo uočili kako u aktuelnoj, tako i u prethodnim studijama (Vlahović i sar., 2015, 2014, 2013, 2012, 2009). Značajan nivo oštećenja DNK, koji smo registrovali u hemocitama larvi sa Homoljskih planina nakon oba

tretmana, još je jedan primer kako se brojna oštećenja u različitim organima i tkivima na najnižim nivoima organizacije akumuliraju i reflektuju na nivou celog organizma. Redukcija mase može biti i posledica gladovanja uključujući izbegavanje kontaminirane hrane, kao što je primećeno kod gusenica *Deilephila elpenor* sa zagađenih lokaliteta (Nuorteva i sar., 1992). Osim toksičnih efekata metala, cena detoksifikacije visoke doze kadmijuma od 100 µg Cd/g suve hrane verovatno je jedan od uzroka smanjenja mase larvi. U obe populacije (sa Kosmaja i iz blizine Ibarske magistrale) u kojima smo merili ekskreciju kadmijuma putem fecesa, količina eliminisanog metala bila je višestruko veća nakon tretmana većom dozom kadmijuma u odnosu na tretman manjom dozom ovog metala. Indukcija sinteze Hsp70 kod larvi sa Kosmaja i sinteze metalotioneina kod larvi sa kontaminirane lokacije (a verovatno i drugih komponenti koje učestvuju u odbrambenom odgovoru ali nisu bile predmet ovog istraživanja) morali su predstavljati značajno opterećenje za jedinke koje su trpele i velika oštećenja shodno visokoj dozi kadmijuma. Sintaza proteina je najveći potrošač ATP, naročito u uslovima stresa, kada se aktiviraju odbrambeni mehanizmi ćelije (Yang i sar., 2015). Mouneyrac i sar. (2011) takođe su zaključili da su mehanizmi detoksifikacije energetske skupi i da se mogu negativno odraziti na osobine fitnesa insekata.

Obrazac promena RGR u sve četiri populacije pratio je promene u masi larvi – registrovali smo ili sniženje oba parametra, ili izostanak promena oba parametra (kod larvi iz okoline Bora). Jedini izuzetak predstavljali su gubari sa Homoljskih planina koji se, nakon primene niže doze kadmijuma, nisu razlikovali po relativnoj brzini rasta uprkos sniženoj masi sva tri dana petog stupnja u odnosu na odgovarajuću kontrolu. To znači da je redukovana masa ovih larvi na petom stupnju posledica sporijeg rasta na ranijim stupnjevima razvića, kada su manje larve bile osetljivije na kadmijum. Takođe, i kod Gintenreitera i sar. (1993b) rani larveni stupnjevi gubara bili su podložniji toksičnom dejstvu metala u odnosu na kasnije starije stupnjeve.

Najvažniji cilj organizama tokom intenzivnog stresa je dostizanje zrelosti uprkos štetnim efektima na osobine fitnesa (masu larvi, trajanje larvenih stupnjeva) (Matić i sar., 2016; Vlahović i sar., 2014). Smanjenje mase i produženje larvenog razvića kod različitih populacija (kosmajske, ibarske i homoljske) nakon izloženosti kadmijumu podržavaju hipotezu prema kojoj larve nekih insekata moraju da dostignu određenu

masu kako bi mogle da se presvuku u naredni stupanj, kao što je predloženo za *L. dispar* (Gintenreiter i sar., 1993b) i *Oncopeltus fasciatus* (Cervera i sar., 2004). Odnosno, produženo vreme razvića može se sagledati kao kompenzacija za sporiju brzinu rasta (Gintenreiter i sar., 1993b). Usporavanje razvića takođe može biti posledica štetnih efekata kadmijuma na neuroendokrini sistem insekata koje smo uočili u našim prethodnim studijama na gubaru (Ilijin i sar., 2010).

Produženi četvrti stupanj i produženo ukupno trajanje razvića kontrolnih larvi iz Bora u odnosu na kontrolnu grupu poreklom sa Homoljskih planina verovatno predstavlja adaptaciju na polutante prisutne na lokaciji u blizini rudnika. Zanimljivo je što su borske larve na tretmane kadmijumom pokazale veću toleranciju u odnosu na homoljsku populaciju, tj. nakon više doze metala četvrti stupanj i ukupno trajanje razvića bili su značajno kraći.

I u drugim studijama na populacijama zglavkara izloženih metalima tokom dužih vremenskih perioda registrovani su slični efekti na nivou osobina fitnesa u odnosu na populacije koje nisu imale kontakt sa polutantima. Kafel i sar. (2012a) su sproveli eksperiment tokom kog su generacije *Spodoptera exigua* (Lepidoptera) odgajili u prisustvu kadmijuma, i zaključili da toleranciju na metale populacija stiče vremenom. Kod prve generacije insekata detektovali su produženo ukupno razviće, a isti efekat su našli i nakon 33 tretirane generacije. Ipak, u 61. generaciji trajanje razvića nije se više razlikovalo u odnosu na kontrolu, dok je preživljavanje bilo redukovano samo kod prve generacije. Posthuma (1990) je našao manju redukciju rasta u odgovoru *Orchesella cincta* sa kontaminiranog lokaliteta na ovaj metal. Ipak, Jones i Hopkin (1998) su na dve vrste rakova ustanovili da su jedinke sa lokacija zagađenih metalima bile manje mase u odnosu na one sa nekontaminiranih, dok štetnih efekata na reprodukciju nije bilo (Jones i Hopkin, 1996).

Rezultati ove disertacije pokazali su da je poreklo populacije bitan faktor koji utiče na odgovore osobina fitnesa i biohemijske parametre u toku hronične izloženosti kadmijumu. Ovu činjenicu moramo imati u vidu i pri izboru populacije u (eko)toksikološkim istraživanjima. Dok su kod populacije sa Kosmaja biohemijski biomarkeri, za razliku od osobina fitnesa, bili osetljivi već na nižu dozu kadmijuma, populacije iz blizine Ibarske magistrale i sa Homoljskih planina karakterisala je slična

osetljivost ove dve grupe pokazatelja. Ranije studije takođe su sugerisale da biomarkeri na nižim nivoima organizacije nisu uvek nužno osetljiviji u odnosu na osobine celog organizma (Jemec i sar., 2008; Day i Scott, 1990). Iako različiti molekularni i biohemijski biomarkeri mogu biti adekvatni pokazatelji izloženosti jedinke toksikantu, na osnovu njihovih odgovora teško se mogu predvideti posledice na nivou organizma ili populacije (Mussali-Galante i sar., 2013; Hyne i Maher, 2003; Lagadic i sar., 1994). Osobine fitnesa tako predstavljaju vezu između nižih nivoa organizacije i nivoa populacije i ekosistema. Zato im se pridaje veliki značaj u ekotoksikološkim studijama uprkos komplikovanoj evaluaciji koja podrazumeva dug period do ispoljavanja efekata polutanata na ovom nivou (Hyne i Maher, 2003).

6. ZAKLJUČCI

- Utvrđeno je da populacije gubara *Lymantria dispar* koje potiču iz šume na Kosmaju i Homoljskim planinama (nezagađene populacije), kao i onih u blizini Ibarske magistrale i borskog rudnika (zagađene populacije) karakteriše različita osetljivost na kadmijum.
- Populacija gubara sa Kosmaja (nezagađena populacija) pokazuje redukciju specifične aktivnosti digestivnih proteolitičkih enzima i esteraza nakon hroničnih tretmana kadmijumom uz rast aktivnosti ukupnih i nelizozomskih kiselih fosfataza.
- Niža doza kadmijuma od 50 µg Cd/g suve hrane uslovljava jedino rast aktivnosti leucin aminopeptidaze creva kod larvi iz blizine Ibarske magistrale, što ukazuje na povećanu osetljivost ovog enzima. Ostali digestivni enzimi srednjeg creva: ukupne proteaze, lizozomske i nelizozomske kisele fosfataze, menjaju aktivnost samo u prisustvu veće koncentracije metala (100 µg Cd/g suve hrane).
- Tripsin predstavlja potencijalno dobar biomarker zagađenja u populacijama koje prethodno nisu bile izložene teškim metalima zbog promene aktivnosti nakon hroničnog tretmana obema dozama kadmijuma.
- Možemo pretpostaviti da, za razliku od tripsina, leucin aminopeptidaza ima najverovatnije drugačije mehanizme odgovorne za regulaciju aktivnosti enzima u prisustvu obe ispitivane koncentracije kadmijuma.
- Specifična aktivnost ukupnih proteaza ne pokazuje dovoljnu osetljivost na metal, budući da kod obe populacije samo izlaganje većoj dozi kadmijuma dovodi do promene ovog parametra.
- Varijansa specifične aktivnosti alkalnih fosfataza raste nakon oba tretmana kod larvi sa Kosmaja, što ukazuje na potencijalnu primenu u biomonitoringu kadmijuma. Neophodni su dodatni eksperimenti kako bi dozna zavisnost parametra bila detaljnije ispitana.
- Specifična aktivnost nelizozomskih kiselih fosfataza mogla bi da bude podesan biomarker kontaminacije kadmijumom. Ograničavajući faktor mogla bi biti manja osetljivost populacija iz zagađenih staništa.

- Odgovor lizozomskih fosfataza zavisi od porekla populacije i ukazuje na nisku osetljivost enzima na kadmijum.
- Specifična aktivnost esteraza larvi gubara predstavlja potencijalni osetljiv biomarker zagađenja kadmijumom u populacijama koje prethodno nisu bile izložene polutantima.
- Analiza izozima mogla bi biti korisna alatka u biomonitoringu s obzirom na to da izloženost kadmijumu dovodi do razlika u ekspresiji izoformi proteaza, kiselih fosfataza, esteraza i superoksid dismutaze u crevu larvi iz obe populacije.
- Efekti polutanata prisutnih u blizini Ibarske magistrale vidljivi su kod larvi odgajenih na kontrolnoj hrani – snižena je aktivnost leucin aminopeptidaze, alkalnih fosfataza i esteraza u odnosu na populaciju sa Kosmaja, dok su aktivirani mehanizmi detoksifikacije: visoka specifična aktivnost superoksid dismutaze, kao i povećan nivo ekspresije Hsp70.
- Superoksid dismutaza i katalaza reaguju isto na identične tretmane kadmijumom - u populaciji sa Kosmaja redukcijom specifične aktivnosti nakon više doze, a u populaciji sa zagađenog lokaliteta redukcijom nakon obe doze metala.
- Nivo konstitutivne ekspresije Hsp70 u crevu larvi sa Kosmaja izrazito je nizak, a trend indukcije sinteze nakon izloženosti kadmijumu očigledan. Zbog malih promena ekspresije u odgovoru na tretmane kod larvi poreklom iz blizine Ibarske magistrale, potencijalna primena Hsp70 kao biomarkera ograničena je na populacije gubara koje nemaju istoriju izloženosti toksikantima.
- Kod obe populacije, nivo ekspresije Hsp70 u mozgu larvi se ne menja u skladu sa povećanjem koncentracije kadmijuma.
- Koncentracija metalotioneina bi mogla biti podesan parametar za praćenje nivoa zagađenja kadmijumom na prethodno kontaminiranim lokacijama s obzirom na to da indukcija sinteze ovih proteina nakon tretmana metalom predstavlja značajan odbrambeni mehanizam samo kod larvi poreklom sa lokaliteta iz blizine magistralnog puta.

- Kod obe populacije larvi koje su unosile kontrolnu hranu, najveća koncentracija kadmijuma registrovana je u glavi.
- Nakon hronične intoksikacije najviši nivo kadmijuma izmeren je u fecesu, dok je integument pokazao najmanje promene.
- Vijabilnost hemocita predstavlja potencijalno dobar biomarker jer daje najevidentniji odgovor na prisustvo kadmijuma u hrani kod obe populacije gubara, sa naglaskom na doznoj zavisnosti kod homoljske populacije (sa nezagađene lokacije).
- Izlaganje kadmijumu povećava nivo oštećenja DNK u hemocitama samo kod larvi sa Homoljskih planina.
- Štetni efekti polutanata na lokaciji kod Ibarske magistrale i visoka cena detoksifikacionih mehanizama odražavaju se i na nivou fitnesa u vidu sniženog ukupnog broja jaja i povećanog procenta neoplođenih jaja u leglima gubara sa tog lokaliteta.
- Primenjene doze metala nisu značajno uticale na preživljavanje larvi iz ispitanih populacija.
- Nakon tretmana kadmijumom utvrđene su promene mase larvi, relativne brzine rasta i (ili) parametara trajanja razvića kod svih populacija.
- Dozno-zavisne promene mase larvi petog stupnja, kao i trajanja četvrtog stupnja i ukupnog razvića larvi sa Homoljskih planina sugerišu da ovi parametri mogu da budu valjani biomarkeri zagađenja u nekim osetljivijim populacijama koje nisu prethodno bile izložene polutantima.
- IBR indeks takođe je otkrio više nego jasne razlike između populacija sa Homoljskih planina i iz Bora. U nezagađenoj populaciji uočeno je dozno-zavisno povećanje IBR indeksa. Primenjena baterija biomarkera (nivo oštećenja DNK, vijabilnost hemocita, masa larvi na petom stupnju i ukupno trajanje razvića) pokazala se kao moćna alatka za poređenje osetljivosti ovih populacija na kadmijum.

- Na osnovu ustanovljenih činjenica o osetljivosti parametara sa različitih nivoa biološke organizacije larvi *Lymantria dispar* na dve koncentracije kadmijuma, može se zaključiti da je ova vrsta potencijalni bioindikator u (eko)toksikološkim istraživanjima. Primena većine biomarkera, međutim, ograničena je na osetljive populacije koje prethodno nisu bile izložene polutantima, budući da je u populacijama sa zagađenih lokacija uočena povećana tolerancija na metale, naročito u onoj koja naseljava lokaciju u blizini rudnika. Molekularni, biohemijski i ćelijski biomarkeri pokazali su generalno veću osetljivost na nižu dozu kadmijuma u odnosu na parametre fitnesa, izuzev u slučaju homoljske populacije.

7. LITERATURA

- Abreu, I.A., Cabelli, D.E., 2010. Superoxide dismutases - a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 263–274.
- Aebi, H.E., 1983. Catalase, in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol 3. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Florida, pp. 273–286.
- Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J. Comp. Physiol. B* 174, 439–452.
- Ahmad, S., 1995. Oxidative stress from environmental pollutants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 135–157.
- Ahmad, S., Pardini, R.S., 1990. Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 401–413.
- Ahmad, S., Pritsos, C.A., Bowen, S.M., Heisler, C.R., Blomquist, G.J., Pardini, R.S., 1988. Antioxidant enzymes of larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*: subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase. *Free Radic. Res. Commun.* 4, 403–408.
- Aidells, B., Lockshin, R.A., Cullin, A.-M., 1971. Breakdown of the silk glands of *Galleria mellonella* - acid phosphatase in involuting glands. *J. Insect Physiol.* 17, 857–869.
- Allen, S.L., Misch, M.S., Morrison, B.M., 1963. Variations in the electrophoretically separated acid phosphatases of *Tetrahymena*. *J. Histochem. Cytochem.* 11, 706–719.
- Alterio, V., Langella, E., De Simone, G., Monti, S.M., 2015. Cadmium-containing carbonic anhydrase CDCA1 in marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Mar. Drugs* 13, 1688–1697.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.
- Amlabu, E., Nok, A., Sallau, A.B., 2009. Purification and biochemical characterization of lysosomal acid phosphatases (EC 3.1.3.2) from blood stream forms, *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol. Int.* 58, 238–242.
- Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem. Pharmacol.* 59, 95–104.
- Applebaum, S.W., 1985. Biochemistry of digestion, in: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Vol. 4. Pergamon Press, London, pp. 9–311.
- Arroyo, V.S., Flores, K.M., Ortiz, L.B., Gomez-Quiroz, L.E., Gutierrez-Ruiz, M.C., 2012. Liver and cadmium toxicity. *J. Drug Metab. Toxicol.* S5.

- Asselman, J., Glaholt, S.P., Smith, Z., Smagghe, G., Janssen, C.R., Colbourne, J.K., Shaw, J.R., De Schampelaere, K.A.C., 2012. Functional characterization of four metallothionein genes in *Daphnia pulex* exposed to environmental stressors. *Aquat. Toxicol.* 110–111, 54–65.
- Atanesyan, L., Günther, V., Celniker, S.E., Georgiev, O., Schaffner, W., 2011. Characterization of MtnE, the fifth metallothionein member in *Drosophila*. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 1047–1056.
- ATSDR, n.d. Agency for toxic substances and disease registry [WWW Document]. ATSDR 2017 Subst. Prior. List. URL <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>
- Augustyniak, M., Orzechowska, H., Kędziorski, A., Sawczyn, T., Doleżych, B., 2014. DNA damage in grasshoppers' larvae - comet assay in environmental approach. *Chemosphere* 96, 180–187.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280–292.
- Azuma, M., Eguchi, M., 1989. Discrete localization of distinct alkaline phosphatase isozymes in the cell surface of silkworm midgut epithelium. *J. Exp. Zool.* 251, 108–112.
- Azuma, M., Takeda, S., Yamamoto, H., Endo, Y., Eguchi, M., 1991. Goblet cell alkaline phosphatase in silkworm midgut epithelium: Its entity and role as an ATPase. *J. Exp. Zool.* 258, 294–302.
- Badiou-Bénéteau, A., Benneveau, A., Gélet, F., Delatte, H., Becker, N., Brunet, J.L., Reynaud, B., Belzunces, L.P., 2013. Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environ. Int.* 60, 31–41.
- Baghban, A., Sendi, J.J., Zibae, A., Khosravi, R., 2014. Effect of heavy metals (Cd, Cu, and Zn) on feeding indices and energy reserves of the cotton boll worm *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Plant Prot. Res.* 54, 367–373.
- Bahadorani, S., Hilliker, A.J., 2009. Biological and behavioral effects of heavy metals in *Drosophila melanogaster* adults and larvae. *J. Insect Behav.* 22, 399–411.
- Barata, C., Baird, D.J., Amat, F., Soares, A.M.V.M., 2000. Comparing population response to contaminants between laboratory and field: an approach using *Daphnia magna* ephippial egg banks. *Funct. Ecol.* 14, 513–523.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 140, 175–186.
- Barrios, S., Zerba, E., Picollo, M.I., Audino, P.G., 2010. Activity of increased specific

- and non-specific esterases and glutathione transferases associated with resistance to permethrin in *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) from Argentina. *Parasitol. Res.* 106, 415–421.
- Beaumont, A.R., Toro, J.E., 1996. Allozyme genetics of *Mytilus edulis* subjected to copper and nutritive stress. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 76, 1061–1071.
- Bednarska, A.J., Stachowicz, I., 2013. Costs of living in metal polluted areas: respiration rate of the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* from two gradients of metal pollution. *Ecotoxicology* 22, 118–124.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322.
- Bell, R.A., Owens, C.D., Shapiro, M., Tardif, J.R., 1981. Mass rearing and virus production, in: Doane, C.C., McManus, M.L. (Eds.), *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management*. USDA, Washington, pp. 599–655.
- Benhamed, S., Guardiola, F.A., Martinez, S., Martinez-Sanchez, M.J., Perez-Sirvent, C., Mars, M., Esteban, M.A., 2016. Exposure of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) to sediments contaminated with heavy metals down-regulates the gene expression of stress biomarkers. *Toxicol. Reports* 3, 364–372.
- Bertin, G., Averbeck, D., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549–1559.
- Beyersmann, D., Hartwig, A., 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch. Toxicol.* 82, 493–512.
- Biagioli, M., Pifferi, S., Raghianti, M., Bucci, S., Rizzuto, R., Pinton, P., 2008. Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. *Cell Calcium* 43, 184–195.
- Blahovec, J., Kosticka, Z., Kocisova, A., 2006. Peptidolytic enzymes in different larval stadium of housefly *Musca domestica*. *Vet. Med. (Praha)*. 51, 139–144.
- Bogdanović, V., 2007. Redoks regulacija ćelijskog ciklusa azot oksidom. Departman za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Bonacci, S., Browne, M.A., Dissanayake, A., Hagger, J.A., Corsi, I., Focardi, S., Galloway, T.S., 2004. Esterase activities in the bivalve mollusc *Adamussium colbecki* as a biomarker for pollution monitoring in the Antarctic marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 445–455.
- Bounias, M., Kruk, I., Nectoux, M., Popeskovic, D., 1996. Toxicology of cupric salts on honeybees. V. Gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatases. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 67–76.
- Bowen, H.J.M., 1979. *Environmental Chemistry of the Elements*. Academic Press, London.

- Božić, N., Vujčić, Z., Nenadović, V., Ivanović, J., 2003. Partial purification and characterization of midgut leucyl aminopeptidase of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 134, 231–241.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Braeckman, B., Brys, K., Rzeznik, U., Raes, H., 1999a. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects. *Tissue Cell* 31, 45–53.
- Braeckman, B., Smagghe, G., Brutsaert, N., Cornelis, R., Raes, H., 1999b. Cadmium uptake and defense mechanism in insect cells. *Environ. Res.* 80, 231–243.
- Brioschi, D., Nadalini, L.D., Bengtson, M.H., Sogayar, M.C., Moura, D.S., Silva-Filho, M.C., 2007. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1283–1290.
- Bukau, B., Horwich, A.L., 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351–366.
- Calabrese, E.J., Bachmann, K.A., Bailer, A.J., Bolger, P.M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M.G., Chiueh, C.C., Clarkson, T.W., Cook, R.R., Diamond, D.M., Doolittle, D.J., Dorato, M.A., Duke, S.O., Feinendegen, L., Gardner, D.E., Hart, R.W., Hastings, K.L., Hayes, A.W., Hoffmann, G.R., Ives, J.A., Jaworowski, Z., Johnson, T.E., Jonas, W.B., Kaminski, N.E., Keller, J.G., Klaunig, J.E., Knudsen, T.B., Kozumbo, W.J., Lettieri, T., Liu, S.-Z., Maisseu, A., Maynard, K.I., Masoro, E.J., McClellan, R.O., Mehendale, H.M., Mothersill, C., Newlin, D.B., Nigg, H.N., Oehme, F.W., Phalen, R.F., Philbert, M.A., Rattan, S.I.S., Riviere, J.E., Rodricks, J., Sapolsky, R.M., Scott, B.R., Seymour, C., Sinclair, D.A., Smith-Sonneborn, J., Snow, E.T., Spear, L., Stevenson, D.E., Thomas, Y., Tubiana, M., Williams, G.M., Mattson, M.P., 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 122–128.
- Callaghan, A., Holloway, G.J., 1999. The relationship between environmental stress and variance. *Ecol. Appl.* 9, 456–462.
- Callaghan, A., Parker, P.J.A.N., Holloway, G.J., 1998. The use of variance in enzyme activity as an indicator of long-term exposure to toxicant-stressed environments in *Culex pipiens* mosquitoes. *Funct. Ecol.* 12, 436–441.
- Calow, P., Sibly, R.M., 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Funct. Ecol.* 4, 283–288.
- Calvo-Marzal, P., Rosatto, S.S., Granjeiro, P.A., Aoyama, H., Kubota, L.T., 2001. Electroanalytical determination of acid phosphatase activity by monitoring p-nitrophenol. *Anal. Chim. Acta* 441, 207–214.

- Carmona, E.R., Creus, A., Marcos, R., 2011. Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 724, 35–40.
- Casalino, E., Calzaretto, G., Sblano, C., Landriscina, C., 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 179, 37–50.
- Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, C., 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 346, 171–179.
- Cervera, A., Maymó, A.C., Martínez-Pardo, R., Garcerá, M.D., 2003. Antioxidant enzymes in *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae) exposed to cadmium. *Environ. Entomol.* 32, 705–710.
- Cervera, A., Maymó, A.C., Sendra, M., Martínez-Pardo, R., Garcerá, M.D., 2004. Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae). *J. Insect Physiol.* 50, 737–749.
- Chapman, R.F., 1998. *The Insects: Structure and Function*, 4th ed. Cambridge University Press.
- Chen, Z.S., Lee, G.J., Liu, J.C., 2000. The effects of chemical remediation treatments on the extractability and speciation of cadmium and lead in contaminated soils. *Chemosphere* 41, 235–242.
- Cheung, W.W.K., Low, K.W., 1975. Ultrastructural and functional differentiation of the midgut of the sugar cane beetle, *Protaetia acuminata* (F.) (Coleoptera: Cetoniidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 4, 349–361.
- Chougule, N.P., Doyle, E., Fitches, E., Gatehouse, J.A., 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *J. Insect Physiol.* 54, 563–572.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity, in: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, pp. 283–284.
- Cristofolletti, P.T., Mendonça de Sousa, F.A., Rahbé, Y., Terra, W.R., 2006. Characterization of a membrane-bound aminopeptidase purified from *Acyrtosiphon pisum* midgut cells. *FEBS J.* 273, 5574–5588.
- Croteau, M.-N., Hare, L., Campbell, P.G.C., Couillard, Y., 2002. Metallothionein-like metal-binding protein in the biomonitor *Chaoborus*: occurrence and relationship to ambient metal concentrations in lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 737–741.
- Dallinger, R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates, in: Dallinger, R., Rainbow, P.S. (Eds.), *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 245–289.
- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M., Salbert, V., 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated

- using transplanted mussels. *Chemosphere* 66, 574–583.
- Datkhile, K.D., Mukhopadhyaya, R., Dongre, T.K., Nath, B.B., 2009. Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 500–506.
- Day, K.E., Scott, I.M., 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquat. Toxicol.* 18, 101–113.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 6, 43–55.
- De Lima, D., Roque, G.M., de Almeida, E.A., 2013. *In vitro* and *in vivo* inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Environ. Res.* 91, 45–51.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Geffard, A., Amiard-Triquet, C., 2013. Origin of energy metabolism impairments, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P. (Eds.), *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press, Boca Raton, pp. 279–306.
- Dhvale, D.M., Masurekar, V.B., 1986. Effect of cadmium exposure on the activity of phosphatases in the hepatopancreas of crab *Scylla serrata* (Forsk.). *Indian J. Mar. Sci.* 15, 193–194.
- Dimitrijević, M.D., Nujkić, M.M., Alagić, S.Č., Milić, S.M., Tošić, S.B., 2016. Heavy metal contamination of topsoil and parts of peach-tree growing at different distances from a smelting complex. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, 615–630.
- Ding, P., Zhuang, P., Li, Z., Xia, H., Lu, H., 2013. Accumulation and detoxification of cadmium by larvae of *Prodenia litura* (Lepidoptera: Noctuidae) feeding on Cd-enriched amaranth leaves. *Chemosphere* 91, 28–34.
- Donker, M.H., Bogert, C.G., 1991. Adaptation to cadmium in three populations of the isopod *Porcellio scaber*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 100, 143–146.
- Dorta, D.J., Leite, S., DeMarco, K.C., Prado, I.M.R., Rodrigues, T., Mingatto, F.E., Uyemura, S.A., Santos, A.C., Curti, C., 2003. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J. Inorg. Biochem.* 97, 251–257.
- Dubovskiy, I.M., Grizanov, E.V., Ershova, N.S., Rantala, M.J., Glupov, V.V., 2011. The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Chemosphere* 85, 92–96.
- Dubovskiy, I.M., Slyamova, N.D., Kryukov, V.Y., Yaroslavtseva, O.N., Levchenko, M.

- V., Belgibaeva, A.B., Adilkhankyzy, A., Glupov, V. V., 2012. The activity of nonspecific esterases and glutathione-S-transferase in *Locusta migratoria* larvae infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales). *Entomol. Rev.* 92, 27–31.
- Egli, D., Domènech, J., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Hua, H., Capdevila, M., Georgiev, O., Schaffner, W., Atrian, S., 2006. The four members of the *Drosophila* metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. *Genes to Cells* 11, 647–658.
- Eguchi, M., 1995. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 111, 151–162.
- Eguchi, M., Azuma, M., Yamamoto, H., Takeda, S., 1990. Genetically defined membrane-bound and soluble alkaline phosphatases of the silkworm: their discrete localization and properties. *Prog. Clin. Biol. Res.* 344, 267–87.
- Egwim, E., 2011. Partial characterization of protease activity from *Rhynchophorus palmarum* (palm weevil). *African J. food Sci. Technol.* 2, 140–145.
- Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O., Cogun, H.Y., 2013. Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106, 371–377.
- Eraly, D., Hendrickx, F., Bervoets, L., Lens, L., 2010. Experimental exposure to cadmium affects metallothionein-like protein levels but not survival and growth in wolf spiders from polluted and reference populations. *Environ. Pollut.* 158, 2124–2131.
- Erlanger, B.F., Kokowski, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271–278.
- Evenden, A.J., Depledge, M.H., 1997. Genetic susceptibility in ecosystems: the challenge for ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl, 849–854.
- Faurskov, B., Bjerregaard, H., 2002. Evidence for cadmium mobilization of intracellular calcium through a divalent cation receptor in renal distal epithelial A6 cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 445, 40–50.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282.
- Ferreira, C., Bellinello, G.L., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 1990. Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* 20, 839–847.
- Ferreira, C., Terra, W.R., 1986. The detergent form of the major aminopeptidase from the plasma membrane of midgut caeca cells of *Rhynchosciara americana* (Diptera)

- larva. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 84, 373–376.
- Filipic, M., Fatur, T., Vudrag, M., 2006. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 25, 67–77.
- Fishman, W.H., 1990. Alkaline phosphatase isozymes: recent progress. *Clin. Biochem.* 23, 99–104.
- Forbes, V.E., Depledge, M.H., 1996. Environmental stress and the distribution of traits within populations, in: *ECOTOXICOLOGY: Ecological Dimensions*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 71–86.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272–280.
- Fountain, M.T., Hopkin, S.P., 2001. Continuous monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in a metal exposure test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 275–286.
- Frasco, M.F., Colletier, J.-P., Weik, M., Carvalho, F., Guilhermino, L., Stojan, J., Fournier, D., 2007. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *FEBS J.* 274, 1849–1861.
- Fрати, F., Fanciulli, P.P., Posthuma, L., 1992. Allozyme variation in reference and metal-exposed natural populations of *Orchesella cincta* (insecta: Collembola). *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 297–310.
- Fridovich, I., 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875–880.
- Gačić, Z., Kolarević, S., Sunjog, K., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., 2014. The impact of in vivo and in vitro exposure to base analogue 5-FU on the level of DNA damage in haemocytes of freshwater mussels *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. *Environ. Pollut.* 191, 145–150.
- Gao, H.-H., Zhao, H.-Y., Du, C., Deng, M.-M., Du, E.-X., Hu, Z.-Q., Hu, X.-S., Ni, X., 2012. Life table evaluation of survival and reproduction of the aphid, *Sitobion avenae*, exposed to cadmium. *J. Insect Sci.* 12, 1–9.
- Gatehouse, L.N., Shannon, A.L., Burgess, E.P., Christeller, J.T., 1997. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 929–944.
- Gavrilović, A., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Mrkonja, A., Matic, D., Perić-Mataruga, V., 2017. Effects of benzo[a]pyrene dietary intake to antioxidative enzymes of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae from unpolluted and polluted forests. *Chemosphere* 179, 10–19.
- Gil, F., Pla, A., 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21, 245–255.
- Gill, T.S., Tewari, H., Pande, J., 1992. Short- and long-term effects of copper on the

- rosy barb (*Puntius conchoni* Ham.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23, 294–306.
- Gintenreiter, S., Ortel, J., Nopp, H.J., 1993a. Bioaccumulation of cadmium, lead, copper, and zinc in successive developmental stages of *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae, Lepid) - a life cycle study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 55–61.
- Gintenreiter, S., Ortel, J., Nopp, H.J., 1993b. Effects of different dietary levels of cadmium, lead, copper, and zinc on the vitality of the forest pest insect *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae, Lepid). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 62–66.
- Giri, A.P., Harsulkar, A.M., Deshpande, V. V., Sainani, M.N., Gupta, V.S., Ranjekar, P.K., 1998. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiol.* 116, 393–401.
- Grover, S., Kaur, S., Gupta, A.K., Taggar, G.K., Kaur, J., 2016. Characterization of trypsin like protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and its potential inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 1–8.
- Grześ, I.M., 2010. Ants and heavy metal pollution – a review. *Eur. J. Soil Biol.* 46, 350–355.
- Guttman, S.I., 1994. Population genetic structure and ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 12, 97–100.
- Haap, T., Schwarz, S., Köhler, H.-R., 2016. Metallothionein and Hsp70 trade-off against one another in *Daphnia magna* cross-tolerance to cadmium and heat stress. *Aquat. Toxicol.* 170, 112–119.
- Hagger, J.A., Depledge, M.H., Galloway, T.S., 2005. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 811–816.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford University Press, Oxford.
- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295 (5561), 1852–1858.
- Hartwig, A., Schwerdtle, T., 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol. Lett.* 127, 47–54.
- Heinrichs, H., Schulz-Dobrick, B., Wedepohl, K.H., 1980. Terrestrial geochemistry of Cd, Bi, Tl, Pb, Zn and Rb. *Geochim. Cosmochim. Acta* 44, 1519–1533.
- Hensbergen, P.J., van Velzen, M.J., Nugroho, R.A., Donker, M.H., van Straalen, N.M., 2000. Metallothionein-bound cadmium in the gut of the insect *Orchesella cincta* (Collembola) in relation to dietary cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 125, 17–24.
- Hintze, J., 2001. *Number Cruncher Statistical Systems*. Kaysville, Utah.
- Hiraizumi, K., Mathes, K.D., Shalish, C.I., 1993. Chromosomal effects on peptidase

- activities in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 31, 29–50.
- Holmstrup, M., Sørensen, J.G., Overgaard, J., Bayley, M., Bindesbøl, A.-M., Slotsbo, S., Fisker, K. V., Maraldo, K., Waagner, D., Labouriau, R., Asmund, G., 2011. Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octaedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil. *Environ. Pollut.* 159, 190–197.
- Holtzman, E., 1989. Historical fragments; methods; some terminology, in: *Lysosomes*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–24.
- Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*, 1st ed. New York: Elsevier Applied Science.
- Hosokawa, M., Endo, T., Fujisawa, M., Hara, S., Iwata, N., Sato, Y., Satoh, T., 1995. Interindividual variation in carboxylesterase levels in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 23, 1022–1027.
- Hyne, R. V, Maher, W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 366–74.
- IARC, 2012. Cadmium and cadmium compounds, in: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 100C. pp. 121–145.
- Ilijin, L., Mrdaković, M., Mataruga, V.P., Lazarević, J., Matić, D., Todorović, D., Vlahović, M., 2015. Adjustment of L1 neurosecretory neuron activity in response to different stressors in gypsy moth caterpillars. *Arch. Biol. Sci.* 67, 965–972.
- Ilijin, L., Perić-Mataruga, V., Radojčić, R., Lazarević, J., Nenadović, V., Vlahović, M., Mrdaković, M., 2010. Effects of cadmium on protocerebral neurosecretory neurons and fitness components in *Lymantria dispar* L. *Folia Biol. (Praha)*. 58, 91–99.
- Imai, T., 2006. Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 173–185.
- Itoh, M., Inoue, T., Kanamori, Y., Nishida, S., Yamaguchi, M., 2003. Tandem duplication of alkaline phosphatase genes and polymorphism in the intergenic sequence in *Bombyx mori*. *Mol. Genet. Genomics* 270, 114–120.
- Itoh, M., Suzuki, T., Eguchi, M., 2000. Temporally regulated transcription of alkaline phosphatase genes in the midgut of *Bombyx mori*. *J. Sericultural Sci. Japan* 69, 297–303.
- Ivanina, A. V., Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2008. Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *J. Exp. Biol.* 211, 577–586.
- Janda, V.J.R., Benesova, J., 1991. Changes in the activity of phosphomonoesterases in relation to growth and metamorphosis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Acta Entomol. Bohemoslov.* 88, 13–24.
- Janssens, T.K., Mariën, J., Cenijn, P., Legler, J., van Straalen, N.M., Roelofs, D.,

- Ingersoll, R., Sheppard, H., Ray, S., Fox, M., Smith, G., Murofushi, H., Shibata, T., Ohta, K., 2007. Recombinational micro-evolution of functionally different metallothionein promoter alleles from *Orchesella cincta*. *BMC Evol. Biol.* 7, 88.
- Janssens, T.K.S., Roelofs, D., van Straalen, N.M., 2009. Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates. *Insect Sci.* 16, 3–18.
- Jayakumar, P., Jothivel, N., Paul, V., 2007. Heavy metals induced alterations in the acid phosphatase activity in the edible freshwater mussel *Lamellidens marginalis* (Lamarck). *Internet J. Toxicol.* 5.
- Jemec, A., Drobne, D., Tisler, T., Sepčić, K., 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies--lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 17, 571–581.
- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Jamnik, P., Roš, M., 2008. Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 147, 61–68.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221.
- Jones, D.T., Hopkin, S.P., 1998. Reduced survival and body size in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* from a metal-polluted environment. *Environ. Pollut.* 99, 215–223.
- Jones, D.T., Hopkin, S.P., 1996. Reproductive allocation in the terrestrial isopods *Porcellio scaber* and *Oniscus asellus* in a metal-polluted environment. *Funct. Ecol.* 10, 741–750.
- Joose, E.N.G., Buker, J.B., 1979. Uptake and excretion of lead by liter-dwelling collembola. *Environ. Pollut.* 18, 235–240.
- Jose, S., Jayesh, P., Mohandas, A., Philip, R., Bright Singh, I.S., 2011. Application of primary haemocyte culture of *Penaeus monodon* in the assessment of cytotoxicity and genotoxicity of heavy metals and pesticides. *Mar. Environ. Res.* 71, 169–177.
- Joseph, P., 2009. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 272–279.
- Kafel, A., Nowak, A., Bembenek, J., Szczygie, J., Nakonieczny, Mirosław Świergosz-Kowalewska, R., 2012b. The localisation of HSP70 and oxidative stress indices in heads of *Spodoptera exigua* larvae in a cadmium-exposed population. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 22–27.
- Kafel, A., Rozpędek, K., Szulińska, E., Zawisza-Raszka, A., Migula, P., 2014. The effects of cadmium or zinc multigenerational exposure on metal tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 4705–4715.
- Kafel, A., Zawisza-Raszka, A., Szulińska, E., 2012a. Effects of multigenerational cadmium exposure of insects (*Spodoptera exigua* larvae) on anti-oxidant response

- in haemolymph and developmental parameters. *Environ. Pollut.* 162, 8–14.
- Kanost, M.R., Clem, R.J., 2012. Insect proteases, in: *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. pp. 346–364.
- Kapin, M.A., Ahmad, S., 1980. Esterases in larval tissues of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.): optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem.* 10, 331–337.
- Klerks, P.L., Bartholomew, P.R., 1991. Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquat. Toxicol.* 19, 97–112.
- Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Pollut.* 45, 173–205.
- Köhler, H.R., Eckwert, H., Triebkorn, R., Bengtsson, G., 1999. Interaction between tolerance and 70kDa stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Appl. Soil Ecol.* 11, 43–52.
- Köhler, H.R., Triebkorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P.M., Alberti, G., 1992. The 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 334–338.
- Kokolakis, G., Kritsidima, M., Tkachenko, T., Mintzas, A.C., 2009. Two hsp23 genes in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: structural characterization, heat shock regulation and developmental expression. *Insect Mol. Biol.* 18, 171–181.
- Kolarević, S., Knežević-Vukčević, J., Paunović, M., Kračun, M., Vasiljević, B., Tomović, J., Vuković-Gačić, B., Gačić, Z., 2013. Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Morava River in Serbia with the comet assay. *Chemosphere* 93, 243–251.
- Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Slobodnik, J., Liška, I., Gačić, Z., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B., 2016. Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. *Sci. Total Environ.* 540, 377–385.
- Kračun-Kolarević, M., Kolarević, S., Atanacković, A., Marković, V., Gačić, Z., Paunović, M., Vuković-Gačić, B., 2015. Effects of 5-fluorouracil, etoposide and CdCl₂ in aquatic oligochaeta *Limnodrilus udekemianus* Claparede (Tubificidae) measured by comet assay. *Water, Air, Soil Pollut.* 226, 1-9.
- Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30, 291–310.
- Lacoue-Labarthe, T., Le Bihan, E., Borg, D., Koueta, N., Bustamante, P., 2010. Acid phosphatase and cathepsin activity in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs: the effects of Ag, Cd, and Cu exposure. *ICES J. Mar. Sci.* 40, 659–667.
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., 1994. The role of biomarkers in environmental

- assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3, 193–208.
- Łagisz, M., Kramarz, P., Laskowski, R., Tobor, M., 2002. Population parameters of the beetle *Pterostichus oblongopunctatus* F. from metal contaminated and reference areas. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 243–249.
- Łagisz, M., Laskowski, R., 2008. Evidence for between-generation effects in carabids exposed to heavy metals pollution. *Ecotoxicology* 17, 59–66.
- Lai, T., He, B., Fan, H., Zhou, R., Yang, Y., Guangxi, M., 2011. Effects of cadmium stress on the activities of antioxidant enzymes, digestive enzymes and the membrane lipid peroxidation of the mangrove mud clam *Geloina coaxans* (Gmelin). *Acta Ecol. Sin.* 31, 3044–3053.
- Lance, D.R., 1983. Host-seeking behavior of the gypsy moth: the influence of polyphagy and highly apparent and apparent host plants, in: Ahmad, S. (Ed.), *Herbivorous Insect. Host-Seeking Behavior and Mechanisms*. Academic Press, New York, pp. 201–204.
- Landis, G.N., Tower, J., 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126, 365–379.
- Lavie, B., Nevo, E., 1987a. Differential fitness of allelic isozymes in the marine gastropods *Littorina punctata* and *Littorina neritoides*, exposed to the environmental stress of the combined effects of cadmium and mercury pollution. *Environ. Manage.* 11, 345–349.
- Lavie, B., Nevo, E., 1987b. The interactive effects of cadmium and mercury pollution on allozyme polymorphisms in the marine gastropod. *Chemosphere* 16, 543–549.
- Lavie, B., Nevo, E., 1982. Heavy metal selection of phosphoglucose isomerase allozymes in marine gastropods. *Mar. Biol.* 71, 17–22.
- Lekube, X., Cajaraville, M.P., Marigómez, I., 2000. Use of polyclonal antibodies for the detection of changes induced by cadmium in lysosomes of aquatic organisms. *Sci. Total Environ.* 247, 201–212.
- Leonard, E.M., Pierce, L.M., Gillis, P.L., Wood, C.M., O'Donnell, M.J., 2009. Cadmium transport by the gut and Malpighian tubules of *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 92, 179–186.
- Lichtlen, P., Wang, Y., Belser, T., Georgiev, O., Certa, U., Sack, R., Schaffner, W., 2001. Target gene search for the metal-responsive transcription factor MTF-1. *Nucleic Acids Res.* 29, 1514–1523.
- Lijun, L., Xuemei, L., Yaping, G., Enbo, M., 2005. Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera Acridoidae). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 412–416.
- Lindqvist, L., Block, M., 1995. Excretion of cadmium during moulting and metamorphosis in *Tenebrio molitor* (Coleoptera; Tenebrionidae). *Comp. Biochem.*

- Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 111, 325–328.
- Lindqvist, L., Block, M., Tjälve, H., 1995. Distribution and excretion of Cd, Hg, methyl-Hg and Zn in the predatory beetle *Pterostichus niger* (Coleoptera: Carabidae). Environ. Toxicol. Chem. 14, 1195–1201.
- Links, J.M., Groopman, J.D., 2010. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility, in: McQueen, C.A. (Ed.), Comprehensive Toxicology. Elsevier, UK, pp. 225–244.
- Liu, J., Qu, W., Kadiiska, M.B., 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 238, 209–214.
- Liu, Y., Wu, H., Kou, L., Liu, X., Zhang, J., Guo, Y., Ma, E., 2014. Two metallothionein genes in *Oxya chinensis*: molecular characteristics, expression patterns and roles in heavy metal stress. PLoS One 9, e112759.
- Lockridge, O., La Du, B.N., 1978. Comparison of atypical and usual human serum cholinesterase. Purification, number of active sites, substrate affinity, and turnover number. J. Biol. Chem. 253, 361–366.
- López, E., Arce, C., Oset-Gasque, M.J., Cañadas, S., González, M.P., 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. Free Radic. Biol. Med. 40, 940–951.
- Loxdale, H.D., Castanera, P., Brookes, C.P., 1983. Electrophoretic study of enzymes from cereal aphid populations. I. Electrophoretic techniques and staining systems for characterising isoenzymes from six species of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae). Bull. Entomol. Res. 73, 645–657.
- Lukan, M., 2009. Heavy metals in alpine terrestrial invertebrates. Oecologia Mont. 18, 31–38.
- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., Huang, M., 2014. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. Fish Shellfish Immunol. 38, 318–329.
- Malakar, C., Ganguly, A., Haldar, P., 2009. Influence of cadmium on growth, survival and clutch size of a common Indian short horned grasshopper, *Oxya fuscovittata*. Am. J. Toxicol. Sci. 1, 32–36.
- Martoja, R., Bouquegneau, J.M., Verthe, C., 1983. Toxicological effects and storage of cadmium and mercury in an insect *Locusta migratoria* (Orthoptera). J. Invertebr. Pathol. 42, 17–32.
- Maryński, M., Kramarz, P., Laskowski, R., Niklińska, M., 2002. Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetles (*Poecilus cupreus* L.) exposed to zinc- or cadmium-contaminated food. Ecotoxicology 11, 127–139.
- Masala, O., McInnes, E.J.L., O'Brien, P., 2002. Modelling the formation of granules: the influence of manganese ions on calcium pyrophosphate precipitates. Inorganica

Chim. Acta 339, 366–372.

- Matić, D., Vlahović, M., Kolarević, S., Perić Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vuković Gačić, B., 2016. Genotoxic effects of cadmium and influence on fitness components of *Lymantria dispar* caterpillars. *Environ. Pollut.* 218, 1270–1277.
- Matozzo, L., Ballarin, D., Pampanin, D.M., Marin, M.G., 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 163–170.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- Mazón, L.I., Gonzalez, G., Vicario, A., Estomba, A., Aguirre, A., 1998. Inhibition of esterases in the marine gastropod *Littorina littorea* exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 284–287.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711–760.
- Migula, P., Laszczyca, P., Augustyniak, M., Wilczek, G., Rozpłodek, K., Kafel, A., Woloszyn, M., 2004. Antioxidative defence enzymes in beetles from a metal pollution gradient. *Biol. Bratislava* 59, 645–654.
- Mirčić, D., Blagojević, D., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Lazarević, J., 2013. Cadmium effects on the fitness-related traits and antioxidative defense of *Lymantria dispar* L. larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 209–218.
- Mirčić, D., Janković-Tomanić, M., Nenadović, V., Franeta, F., Lazarević, J., 2010. The effects of cadmium on the life history traits of *Lymantria dispar* L. *Arch. Biol. Sci.* 62, 1013–1020.
- Mireji, P.O., Keating, J., Hassanali, A., Mbogo, C.M., Muturi, M.N., Githure, J.I., Beier, J.C., 2010. Biological cost of tolerance to heavy metals in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Med. Vet. Entomol.* 24, 101–107.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Mitsubishi, J., 2002. *Invertebrate Tissue Culture Methods*, 1st ed. Springer, Japan.
- Mohite, V.T., Lahir, Y.K., Pathare, M., Agwuocha, S., Mane, U.H., 2011. Study on the effects of exposure of sub lethal dose of cadmium and zinc on the enzymatic activity in the tissues of green mussel - *Perna viridis* (L) from Ratnagiri coast, Maharashtra. *J. Ecophysiol. Occup. Heal.* 11, 131–140.
- Montella, I.R., Schama, R., Valle, D., 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 437–449.
- Morrow, H., 2001. Cadmium and cadmium alloys, in: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New York, pp. 471-

- Moulis, J.-M., Thévenod, F., 2010. New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. *BioMetals* 23, 763–768.
- Mouneyrac, C., Leung, P.T.Y., Leung, K.M.Y., 2011. Cost of tolerance, in: Amiard-Triquet, C. Rainbow, P.S., Romeo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 265–297.
- Mourón, S.A., Grillo, C.A., Dulout, F.N., Golijow, C.D., 2004. A comparative investigation of DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and K-ras gene mutations induced by cadmium salts in cultured human cells. *Mutat. Res.* 568, 221–231.
- Muhlia-Almazán, A., García-Carreño, F.L., 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 133, 383–394.
- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Rojas Del Castillo, E., 2013. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: From molecules to ecosystems. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 29, 117–140.
- Mustonen, M., Haimi, J., Väisänen, A., Knott, K.E., 2014. Metallothionein gene expression differs in earthworm populations with different exposure history. *Ecotoxicology* 23, 1732–1743.
- Nair, A.R., Degheselle, O., Smeets, K., Van Kerkhove, E., Cuypers, A., 2013. Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6116–6143.
- Nemec, V., Socha, R., 1988. Phosphatases and pteridines in malpighian tubules: a possible marker of mosaic mutant in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhoridae). *Acta Entomol. Bohemoslov.* 85, 321–326.
- Nemec, V., Ženka, J., 1996. Activity of phosphatases and esterases in the aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae), and in the gut wall of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and pupae. *Eur. J. Entomol.* 93, 37–44.
- Nevo, E., Perl, T., Beiles, A., Wool, D., 1981. Mercury selection of allozyme genotypes in shrimps. *Experientia* 37, 1152–1154.
- Nikolić, Đ., Milošević, N., Živković, Ž., Mihajlović, I., Kovačević, R., Petrović, N., 2011. Multi-criteria analysis of soil pollution by heavy metals in the vicinity of the copper smelting plant in Bor (Serbia). *J. Serbian Chem. Soc.* 76, 625–641.
- Nollen, E.A.A., Morimoto, R.I., 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *J. Cell Sci.* 115, 2809–2816.
- Nuorteva, P., Nuorteva, S.L., Mathur, B., 1992. Excretory inhibition of bioaccumulation in Lepidoptera, in: Bohac, J., Ruzicka, V. (Eds.), *Proc. VIth Internat. Conf.*

Bioindicadores Deteriorationis Regionis in Ceske Budejovice. pp. 362–367.

- O'Dell, T.M., Bell, R.A., Mastro, V.C., Tanner, J.S., Kennedy, J.F., 1984. Production of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, for research and biological control, in: King, E.G., Leppla, N.C. (Eds.), *Advanced and Challenges in Insect Rearing*. USDA-ARS, New Orleans, LA, pp. 156–166.
- Oakeshott, J.G., van Papenrecht, E.A., Boyce, T.M., Healy, M.J., Russell, R.J., 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica* 90, 239–268.
- Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J., Cajaraville, M., 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol. Vitr.* 15, 511–517.
- Ortega, P., Vitorino, H.A., Moreira, R.G., Pinheiro, M.A.A., Almeida, A.A., Custódio, M.R., Zanotto, F.P., 2017. Physiological differences in the crab *Ucides cordatus* from two populations inhabiting mangroves with different levels of cadmium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 361–371. <https://doi.org/10.1002/etc.3537>
- Ortel, J., 1996. Metal-supplemented diets alter carbohydrate levels in tissue and hemolymph of gypsy moth larvae (*Lymantria dispar*, Lymantriidae, Lepidoptera). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1171–1176.
- Ortel, J., 1995. Changes in protein content and free amino acid composition in metal-contaminated gypsy moth larvae (*Lymantria dispar* L., Lymantriidae, Lepidoptera). *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 112, 291–298.
- Palacios, O., Pagani, A., Pérez-Rafael, S., Egg, M., Höckner, M., Brandstätter, A., Capdevila, M., Atrian, S., Dallinger, R., 2011. Shaping mechanisms of metal specificity in a family of metazoan metallothioneins: evolutionary differentiation of mollusc metallothioneins. *BMC Biol.* 9, 4-23.
- Pardini, R.S., 1995. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 101–118.
- Parker, P.J.-A.N., Callaghan, A., 1997. Esterase activity and allele frequency in field populations of *Simulium equinum* (L.) (Diptera: Simuliidae) exposed to organophosphate pollution. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2550–2555.
- Patankar, A.G., Giri, A.P., Harsulkar, A.M., Sainani, M.N., Deshpande, V. V., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S., 2001. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 453–464.
- Pathak, N., Khandelwal, S., 2006. Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium. *Toxicology* 220, 26–36.
- Pawert, M., Triebkorn, R., Gräff, S., Berkus, M., Schulz, J., Köhler, H.-R., 1996. Cellular alterations in collembolan midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. *Sci. Total Environ.*

181, 187–200.

- Peakall, D.B., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3, 157–160.
- Pedersen, S.A., Kristiansen, E., Andersen, R.A., Zachariassen, K.E., 2008. Cadmium is deposited in the gut content of larvae of the beetle *Tenebrio molitor* and involves a Cd-binding protein of the low cysteine type. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 148, 217–222.
- Perić-Mataruga, V., Blagojević, D., Spasić, M.B., Ivanović, J., Janković-Hladni, M., 1997. Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of different population origins. *J. Insect Physiol.* 43, 101–106.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2010. Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Sci. Total Environ.* 408, 1598–1603.
- Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2007. Ribosomal genes as early targets of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae. *Sci. Total Environ.* 373, 113–121.
- Postuma, L., 1990. Genetic differentiation between populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from heavy metal contaminated sites. *J. Appl. Ecol.* 27, 609–622.
- Postuma, L., Hogervorst, R.F., Van Straalen, N.M., 1992. Adaptation to soil pollution by cadmium excretion in natural populations of *Orchesella cincta* (L.) (Collembola). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 146–156.
- Postuma, L., Van Straalen, N.M., 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 106, 11–38.
- Postma, J.F., VanNugteren, P., De Jong, M.B.B.-, 1996. Increased cadmium excretion in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius* (diptera). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 332–339.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Cavigliolo, G., Chan, S., Holman, P.S., Loguinov, A. V., Bauer, D.J., Komachi, K., Theil, E.C., Perkins, E.J., Hughes, O., Vulpe, C.D., 2007. *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1044–1050.
- Prabhakaran, S.K., Kamble, S.T., 1995. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of german cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 519–524.
- Prince, S.P., Senthilkumar, P., Subburam, V., 2001. Mulberry-silkworm food chain - a templet to assess heavy metal mobility in terrestrial ecosystems. *Environ. Monit. Assess.* 69, 231–238.

- Qin, W., Bazeille, N., Henry, E., Zhang, B., Deprez, E., Xi, X.-G., 2016. Mechanistic insight into cadmium-induced inactivation of the Bloom protein. *Sci. Rep.* 6, 26225.
- Rank, J., Lehtonen, K.K., Strand, J., Laursen, M., 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquat. Toxicol.* 84, 50–61.
- Reddy, P.S., Bhagyalakshmi, A., 1994. Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29, 255–264.
- Roelofs, D., Mariën, J., van Straalen, N.M., 2007. Differential gene expression profiles associated with heavy metal tolerance in the soil insect *Orchesella cincta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 287–295.
- Roelofs, D., Overhein, L., de Boer, M.E., Janssens, T.K.S., van Straalen, N.M., 2006. Additive genetic variation of transcriptional regulation: metallothionein expression in the soil insect *Orchesella cincta*. *Heredity (Edinb.)* 96, 85–92.
- Rosabal, M., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2012. Subcellular metal partitioning in larvae of the insect *Chaoborus* collected along an environmental metal exposure gradient (Cd, Cu, Ni and Zn). *Aquat. Toxicol.* 120–121, 67–78.
- Rubino, F.M., 2015. Toxicity of glutathione-binding metals: a review of targets and mechanisms. *Toxics* 3, 20–62.
- Ruttikay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6044–6066.
- Saedi, Z., Gavanji, S., Davodi, S., 2013. A review of genetic and epigenetic mechanisms in heavy metal carcinogenesis: nickel and cadmium. *Int. J. Sci. Res. Environ. Sci.* 1, 202–216.
- Sahana, A., Joy, V.C., 2016. Short-term biochemical impacts in *Cyphoderus javanus* Börner (Collembola) as potential biomarkers of fly ash and heavy metal pollution in tropical lateritic soil. *J. Environ. Prot. (Irvine, Calif.)* 7, 1–13.
- Sanchez-Hernandez, J.C., 2011. Pesticide biomarkers in terrestrial invertebrates, in: Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. InTech, pp. 213–240.
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 49–75.
- Santos, C.D., Terra, W.R., 1984. Plasma membrane-associated amylase and trypsin. *Insect Biochem.* 14, 587–594.
- Satoh, T., Hosokawa, M., 1995. Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. *Toxicol. Lett.* 82–83, 439–445.

- Schmidt, G.H., Ibrahim, N.M., 1994. Heavy metal content (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) in various body parts: its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29, 148–164.
- Schofield, R.M.S., Nesson, M.H., Richardson, K.A., 2002. Tooth hardness increases with zinc-content in mandibles of young adult leaf-cutter ants. *Naturwissenschaften* 89, 579–583.
- Selvaraj, A., Balamurugan, K., Yepiskoposyan, H., Zhou, H., Egli, D., Georgiev, O., Thiele, D.J., Schaffner, W., 2005. Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes. *Genes Dev.* 19, 891–896.
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V.F., França, S., Vasconcelos, R.P., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2012. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecol. Indic.* 19, 215–225.
- Serebrov, V. V., Gerber, O.N., Malyarchuk, A.A., Martemyanov, V. V., Alekseev, A.A., Glupov, V. V., 2006. Effect of entomopathogenic fungi on detoxification enzyme activity in greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) and role of detoxification enzymes in development of insect resistance to entomopathogenic fungi. *Biol. Bull.* 33, 581–586.
- Shaw, J.R., Colbourne, J.K., Davey, J.C., Glaholt, S.P., Hampton, T.H., Chen, C.Y., Folt, C.L., Hamilton, J.W., 2007. Gene response profiles for *Daphnia pulex* exposed to the environmental stressor cadmium reveals novel crustacean metallothioneins. *BMC Genomics* 8, 477.
- Shevchenko, V., Lisitzin, A., Vinogradova, A., Stein, R., 2003. Heavy metals in aerosols over the seas of the Russian Arctic. *Sci. Total Environ.* 306, 11–25.
- Shonouda, M.L., El-Samad, L.M., Mokhamer, Elh., Toto, N., 2016. Use of oxidative stress and genotoxic biomarkers of aquatic beetles *Anaceana globulus* (Coleoptera: Hydrophilidae) as biomonitors of water pollution. *J. Entomol.* 13, 122–131.
- Shukla, A.K., Pragma, P., Chowdhuri, D.K., 2011. A modified alkaline Comet assay for in vivo detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 726, 222–226.
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K. (Eds.), 2013. Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Metal Ions in Life Sciences. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Singh, P., Gupta, S., Mogra, P., Sankhala, V., 2015. Molecular mechanism of cadmium toxicity through oral route. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* 5, 1538–1545.
- Snyman, R.G., Odendaal, J.P., 2009. Effect of cadmium on haemocyte viability of the

- woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda, Crustacea). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 83, 525–529.
- Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicol. Lett. 128, 215–228.
- Sokolova, I.M., Evans, S., Hughes, F.M., 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. J. Exp. Biol. 207, 3369–3380.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Mar. Environ. Res. 79, 1–15.
- Sokolova, I.M., Ringwood, A.H., Johnson, C., 2005. Tissue-specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). Aquat. Toxicol. 74, 218–228.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Ecol. Lett. 6, 1025–1037.
- Squier, M.K., Cohen, J.J., 2001. Standard quantitative assays for apoptosis. Mol. Biotechnol. 19, 305–312.
- Sreenivasan, R.S., Krishna Moorthy, P., Deecaraman, M., 2011. Cypermethrin induced toxicity to phosphatases and dehydrogenases in gills and hemolymph of fresh water crab, *Spiralothelphusa hydrodroma* (Herbst). Int. J. Biol. Med. Res. 2, 784–788.
- Srinivasan, A., Giri, A.P., Gupta, V.S., 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. Cell. Mol. Biol. Lett. 11, 132–154.
- Srivastava, J.P., Saxena, S.C., 1967. On the alkaline and acid phosphatase in the alimentary tract of *Periplaneta americana* L. (Blattaria: Blattidae). Appl. Ent Zool Tokyo 2, 85–92.
- Srivastava, S.K., Sharan, R.K., 1981. Histochemical localization of alkaline phosphatase in the alimentary canal of *Tribolium castaneum* (Herbst). J. Entomol. Res. 1983 5, 175–176.
- Srogi, K., 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. Environ. Chem. Lett. 5, 169–195.
- Stalmach, M., Wilczek, G., Wilczek, P., Skowronek, M., Mędrzak, M., 2015. DNA damage in haemocytes and midgut gland cells of *Steatoda grossa* (Theridiidae) spiders exposed to food contaminated with cadmium. Ecotoxicol. Environ. Saf. 113, 353–361.
- Sterenberg, I., Roelofs, D., 2003. Field-selected cadmium tolerance in the springtail *Orchesella cincta* is correlated with increased metallothionein mRNA expression. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 741–747.

- Sterling, K.M., Mandal, P.K., Roggenbeck, B.A., Ahearn, S.E., Gerencser, G.A., Ahearn, G.A., 2007. Heavy metal detoxification in crustacean epithelial lysosomes: role of anions in the compartmentalization process. *J. Exp. Biol.* 210, 3484–3493.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20, 77–88.
- Stone, D., Jepson, P., Laskowski, R., 2002. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 132, 105–112.
- Stürzenbaum, S.R., Georgiev, O., Morgan, A.J., Kille, P., 2004. Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6283–6289.
- Su, X., Du, L., Li, Y., Li, Y., Zhou, J., Li, T., 2010. Cloning and expression of HSP70 gene of sipuncula *Phascolosoma esculenta*. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 461–466.
- Suman, S., Seth, R.K., Chandna, S., 2009. Mitochondrial antioxidant defence in radio-resistant Lepidopteran insect cells. *Bioinformation* 4, 19–23.
- Suresh, P.G., Reju, M.K., Mohandas, A., 1993. Haemolymph phosphatase activity levels in two fresh-water gastropods exposed to copper. *Sci. Total Environ.* 134, 1265–1277.
- Suresh, V., Jaganath Bose, M., Deecaraman, M., 2016. Toxic effects of cadmium on the acid and alkaline phosphatase activity of female fiddler crab, (*Uca annulipes*). *World J. Zool.* 11, 123–130.
- Suzuki, K.T., Aoki, Y., Nishikawa, M., Masui, H., Matsubara, F., 1984. Effect of cadmium-feeding on tissue concentrations of elements in germ-free silkworm (*Bombyx mori*) larvae and distribution of cadmium in the alimentary canal. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 79, 249–253.
- Swain, S.C., Keusekotten, K., Baumeister, R., Stürzenbaum, S.R., 2004. *C. elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. *J. Mol. Biol.* 341, 951–959.
- Tabatabaei, P.R., Hosseiniaveh, V., Goldansaz, S.H., Talebi, K., 2011. Biochemical characterization of digestive proteases and carbohydrases of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Asia. Pac. Entomol.* 14, 187–194.
- Takahashi, A., Masuda, A., Sun, M., Centonze, V.E., Herman, B., 2004. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). *Brain Res. Bull.* 62, 497–504.
- Tamás, M.J., Sharma, S.K., Ibstedt, S., Jacobson, T., Christen, P., 2014. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules* 4,

252–267.

- Tang, L., Qiu, R., Tang, Y., Wang, S., 2014. Cadmium-zinc exchange and their binary relationship in the structure of Zn-related proteins: a mini review. *Metallomics* 6, 1313–1323.
- Tang, T., Wu, C., Li, J., Ren, G., Huang, D., Liu, F., 2012. Stress-induced HSP70 from *Musca domestica* plays a functionally significant role in the immune system. *J. Insect Physiol.* 58, 1226–1234.
- Tang, W., Shaikh, Z.A., 2001. Renal cortical mitochondrial dysfunction upon cadmium metallothionein administration to Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 63, 221–235.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2012. Biochemistry and molecular biology of digestion, in: Gilbert, L.I. (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 365–418.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 109, 1–62.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Baker, J.E., 1996. Compartmentalization of digestion, in: Lehane, M., Billingsley, P. (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 206–235.
- Thévenod, F., 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238, 221–239.
- Timbrell, J.A., 1998. Biomarkers in toxicology. *Toxicology* 129, 1–12.
- Timmermans, M.J.T.N., Ellers, J., Roelofs, D., van Straalen, N.M., 2005. Metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in metal-stressed and reference populations of the springtail *Orchesella cincta*. *Ecotoxicology* 14, 727–739.
- Triebkorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., Müller, E.F., 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 6, 57–73.
- Tsvetkov, I.L., Popov, A.P., Konichev, A.S., 2003. Acid phosphatase complex from the freshwater snail *Viviparus viviparus* L. under standard conditions and intoxication by cadmium ions. *Biochemistry. (Mosc.)* 68, 1327–1334.
- Valaitis, A.P., 1995. Gypsy moth midgut proteinases: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush border membrane leucine aminopeptidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 139–149.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., 2014. Integrated biomarkers in aquatic organisms as a tool for biomonitoring environmental pollution and improved ecological risk

- assessment [WWW Document]. Sci. Adv. Environ. Toxicol. Ecotoxicol. issues. URL www.chem-tox-ecotox
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.
- Vallee, B.L., 1991. Introduction to metallothionein. *Methods Enzymol.* 205, 3–7.
- Valverde, M., Rojas, E., 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat. Res.* 681, 93–109.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217–225.
- Van Straalen, N.M., Donker, M.H., 1994. Heavy metal adaptation in terrestrial arthropods - physiological and genetic aspects. *Proc. Sect. Exp. Appl. Entomol. Netherlands Entomol. Soc.* 5, 3–17.
- Van Straalen, N.M., Hoffmann, A.A., 2000. Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants, in: Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), *Demography of Ecotoxicology*. Wiley, New York, pp. 147–161.
- Van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2005. Cadmium tolerance in a soil arthropod - a model of real-time microevolution. *Entomol. Ber.* 65, 105–111.
- Van Straalen, N.M., Schobben, J.H., de Goede, R.G., 1989. Population consequences of cadmium toxicity in soil microarthropods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17, 190–204.
- Vermunt, A.M., Koopmanschap, A.B., Vlak, J.M., de Kort, C.A., 1997. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a putative juvenile hormone esterase from the Colorado potato beetle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 919–928.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46, 407–417.
- Vijayavel, K., Balasubramanian, M.P., 2006. Fluctuations of biochemical constituents and marker enzymes as a consequence of naphthalene toxicity in the edible estuarine crab *Scylla serrata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 141–147.
- Vioque-Fernández, A., Alvesde Almeida, E., López-Barea, J., 2007. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 145, 404–412.
- Vlahović, M., Ilijin, L., Lazarević, J., Mrdaković, M., Gavrilović, A., Matić, D., Mataruga, V.P., 2014. Cadmium-induced changes of gypsy moth larval mass and

- protease activity. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 160, 9–14.
- Vlahović, M., Ilijin, L., Mrdaković, M., Gavrilović, A., Matić, D., Lazarević, J., Mataruga, V.P., 2015a. Alteration of the activities of trypsin and leucine aminopeptidase in gypsy moth caterpillars exposed to dietary cadmium. *Water. Air. Soil Pollut.* 226, 1-13.
- Vlahović, M., Lazarević, J., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., 2009. Plastic responses of larval mass and alkaline phosphatase to cadmium in the gypsy moth larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1148–1155.
- Vlahović, M., Mataruga, V.D.P., Lazarević, J.M., Mrdaković, M.M., Matić, D.R., Todorović, D.D., Ilijin, L.A., 2015b. Response of α -glucosidase in gypsy moth larvae to acute and chronic dietary cadmium. *J. Environ. Sci. Health. B.* 50, 285–292.
- Vlahović, M., Mataruga, V.P., Ilijin, L., Mrdaković, M., Mirčić, D., Todorović, D., Lazarević, J., 2012. Changes in activity of non-specific esterases in cadmium treated *Lymantria dispar* larvae. *Ecotoxicology* 21, 370–378.
- Vlahović, M., Mataruga, V.P., Mrdaković, M., Matić, D., Lazarević, J., Nenadović, V., Ilijin, L., 2013. Enzymatic biomarkers as indicators of dietary cadmium in gypsy moth caterpillars. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 3447–3455.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95–117.
- Wang, X., Yang, H., Liu, G., Wang, Q., 2011. Enzyme responses and lipid peroxidation in gills and hepatopancreas of clam *Macra vereformis*, following cadmium exposure. *Chinese J. Oceanol. Limnol.* 29, 981–989.
- Wang, Y., Fang, J., Leonard, S.S., Krishna Rao, K.M., 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1434–1443.
- Warchałowska-Śliwa, E., Niklińska, M., Görlich, A., Michailova, P., Pyza, E., 2005. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environ. Pollut.* 133, 373–381.
- Wilczek, G., Babczyńska, A., Augustyniak, M., Migula, P., 2004. Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient. *Environ. Pollut.* 132, 453–461.
- Wilczek, G., Babczynska, A., Migula, P., Wencelis, B., 2003a. Activity of esterases as biomarkers of metal exposure in spiders from the metal pollution gradient. *Polish J. Environ. Stud.* 12, 765–771.
- Wilczek, G., Kramarz, P., Babczyńska, A., 2003b. Activity of carboxylesterase and glutathione S-transferase in different life-stages of carabid beetle (*Poecilus cupreus*) exposed to toxic metal concentrations. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*

Toxicol. Pharmacol. 134, 501–12.

- Wilczek, G., Majkus, Z., Migula, P., Bednarska, K., Swierczek, E., 1997. Heavy metals and detoxifying enzymes in spiders from coal and metallurgic dumps near Ostrava (Czech Republic), in: Zabka, M. (Ed.), Proceedings, 16th European Colloquium of Arachnology. Siedlce, Poland, pp. 317–328.
- Wu, G.-X., Gao, X., Tan, Q., Li, Z.-Y., Hu, C., Ye, G.-Y., 2014. Resistance selection with cadmium and changes in the activities of antioxidases in *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *J. Asia. Pac. Entomol.* 17, 123–127.
- Wu, G.-X., YE, G.-Y., HU, C., CHENG, J.-A., 2006. Accumulation of cadmium and its effects on growth, development and hemolymph biochemical compositions in *Boettcherisca peregrina* larvae (Diptera: Sarcophagidae). *Insect Sci.* 13, 31–39.
- Xian, J.-A., Li, B., Guo, H., Miao, Y.-T., Ye, J.-M., Feng, L.-N., Ye, C.-X., Pan, X.-B., Wang, A.-L., Hao, X.-M., 2014. Haemocyte apoptosis of the tiger shrimp *Penaeus monodon* exposed to cadmium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 525–528.
- Xinping, Z., Jiuyuan, Z., Shouzhong, Y., Kewu, L., Dong, Y., 2001. Functional groups of alkaline phosphatase from *Ericerus pela*. *Acta Ecol. Sin.* 44, 257–262.
- Yamada, H., Uenishi, R., Suzuki, K., Koizumi, S., 2009. Cadmium-induced alterations of gene expression in human cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28, 61–69.
- Yang, J., Liu, D., He, Y., Wang, L., Sokolova, I.M., Santi, A., Toni, C., Correia, S.C., Caperuto, E.C., 2015. Mitochondrial energy metabolism in the hepatopancreas of freshwater crabs (*Sinopotamon henanense*) after cadmium exposure. *Environ. Sci. Process. Impacts* 17, 156–165.
- Yap, C.K., Chong, C.M., Tan, S.G., 2011. Allozyme polymorphisms in horseshoe crabs, *Carcinoscorpius rotundicauda*, collected from polluted and unpolluted intertidal areas in Peninsular Malaysia. *Environ. Monit. Assess.* 174, 389–400.
- Yi, S.-X., Adams, T.S., 2001. Age- and diapause-related acid and alkaline phosphatase activities in the intestine and malpighian tubules of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 46, 152–163.
- Yokouchi, M., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Kasai, A., Takano, Y., Yao, J., Kitamura, M., 2007. Atypical, bidirectional regulation of cadmium-induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response. *Cell Death Differ.* 14, 1467–1474. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402154>
- Yokouchi, M., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Okamura, M., Du, S., Kasai, A., Takano, Y., Shitamura, A., Shimada, T., Yao, J., Kitamura, M., 2008. Involvement of selective reactive oxygen species upstream of proapoptotic branches of unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 283, 4252–4260.
- Yousef, H.A., Afify, A., Hasan, H.M., Meguid, A.A., 2010. DNA damage in hemocytes of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) exposed to contaminated food with cadmium and lead. *Nat. Sci.* 2, 292–297.

- Yuan, H., Chu, F., Qin, F., Liu, J., He, Y., Liu, H., 2014. Effects of cadmium exposure on the lipid peroxide content and the antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the fat body in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.* 57, 168–175.
- Zeidler, M., 2000. Electrophoretic analysis of plant isozymes. *Biologica* 38, 7–16.
- Zhang, Y., Sun, G., Yang, M., Wu, H., Zhang, J., Song, S., Ma, E., Guo, Y., 2011. Chronic accumulation of cadmium and its effects on antioxidant enzymes and malondialdehyde in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1355–1362.
- Zhou, Y., Zhang, S., Liu, C., Cai, Y., 2009. The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK1 cells. *Toxicol. Vitro.* 23, 288–294.
- Zhu, K.Y., Brindley, W.A., 1990. Properties of esterases from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) and the roles of the esterases in insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 83, 725–732.
- Zvereva, E., Serebrov, V., Glupov, V., Dubovskiy, I., 2003. Activity and heavy metal resistance of non-specific esterases in leaf beetle *Chrysomela lapponica* from polluted and unpolluted habitats. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 135, 383–3.

Biografija

Dragana R. Matić rođena je 10.03.1981. u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Prvu beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2000. godine. Diplomski rad pod naslovom “Neposredni i odloženi efekti perinatalne primene fenciklidina na acetilholinesterazu u mozgu pacova” uradila je u Laboratoriji za neurohemiju na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studije je završila 2008. godine sa prosekom 9,29. Od 2009. do 2011. godine bila je deo istraživačkog tima na Institutu za biosintezu neuralnih struktura u Centru za molekularnu neurobiologiju Hamburg (ZMNH). Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija, upisala je 2011. godine. Iste godine je zaposlena kao istraživač pripravnik na Odeljenju za fiziologiju i biohemiju insekata Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” (IBISS) Univerziteta u Beogradu. Od tada je angažovana na projektu “Uticaj magnetnih polja i drugih sredinskih stresora na fiziološke odgovore i ponašanje različitih vrsta” (173027), potprojekat “Odgovori fitofagnih štetnih insekata na sredinske stresore” kojim rukovodi dr Vesna Perić Mataruga, a finansiran je od strane Ministarstva i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zvanje istraživač saradnik Dragana Matić je stekla 2012. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je pod mentorstvom dr Milene Vlahović, višeg naučnog saradnika IBISS.

Član je Udruženja toksikologa Srbije, Srpskog biološkog društva i Entomološkog društva Srbije.

Do danas je objavila 24 naučna rada u međunarodnim časopisima, jedno kongresno saopštenje na međunarodnom skupu i tri kongresna saopštenja na domaćim skupovima.

Изјава о ауторству

Потписана _____ Драгана Матић _____

Број индекса _____ Б3035/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Потенцијална улога губара (*Lymantria dispar*, L.) као биоиндикатора загађености животне средине: утицај хроничног излагања кадмијуму на развиће, активности дигестивних ензима средњег црева, механизме детоксификације и степен оштећења ДНК“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Драгана Матић _____

Број индекса _____ Б3035/2011 _____

Студијски програм _____ Анимална и хумана физиологија _____

Наслов рада „Потенцијална улога губара (*Lymantria dispar*, L.) као биоиндикатора загађености животне средине: утицај хроничног излагања кадмијуму на развиће, активности дигестивних ензима средњег црева, механизме детоксификације и степен оштећења ДНК“ _____

Ментор _____ др Милена Влаховић и др Сениша Ђурашевић _____

Потписана _____ Драгана Матић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____



Изјава о коришћењу

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

**Потенцијална улога губара (*Lymantria dispar*, L.) као биоиндикатора
загађености животне средине: утицај хроничног излагања кадмијуму на
развиће, активности дигестивних ензима средњег црева, механизме
детоксификације и степен оштећења ДНК**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____



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

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

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

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

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

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