

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Branka R. Perendija

**PARAMETRI ANTIOKSIDACIONE  
ZAŠTITE U TKIVIMA NEKIH VRSTA  
SLATKOVODNIH RIBA  
IZ JEZERA GRUŽA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Branka R. Perendija

**ANTIOXIDANT DEFENCE PARAMETERS  
IN TISSUES OF SOME SPECIES  
OF FRESHWATER FISH  
FROM THE GRUŽA RESERVOIR**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

**MENTORI:**

Naučni savetnik dr Zorica S. Saičić,  
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka  
istraživanja „Siniša Stanković“

Redovni profesor dr Gordana Cvijić,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**ČLANOVI**

**KOMISIJE:**

Naučni savetnik i vanredni profesor  
dr Snežana B. Pajović, Univerzitet u  
Beogradu, Institut za nuklearne nauke  
„Vinča“ i Univerzitet u Nišu, Medicinski  
fakultet

Vanredni profesor dr Branka I. Ognjanović,  
Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-  
matematički fakultet

**Datum Odbrane:**

---

## ZAHVALNICA

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

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

Dr Gordani Cvijić, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentoru, na korisnim savetima i sugestijama, konstruktivnim komentarima i pomoći prilikom konačne izrade ove doktorske disertacije.

Dr Snežani B. Pajović, naučnom savetniku Instituta za nuklearna istraživanja „Vinča“ Univerziteta u Beogradu i vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, na značajnim komentarima, sugestijama i dragocenim savetima tokom finalne izrade ove doktorske disertacije.

Dr Branki I. Ognjanović, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, na pomoći prilikom organizovanja terenskih istraživanja, obrade materijala i na stvaranju uslova za eksperimentalni rad. Takođe joj se zahvaljujem na dragocenim savetima i komentarima koji su omogućili da ova doktorska disertacija bude uspešno finalizovana.

---

---

Dr Batu M. Koraću, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu i vanrednom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na znanju i iskustvu koje mi je strpljivo na jednostavan i originalan način prenosio tokom mog naučnog usavršavanja. Takođe mu se zahvaljujem na korisnim savetima i dragocenim komentarima tokom celokupne izrade ove doktorske disertacije.

Dr Aleksandri Korać, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na dragocenim savetima tokom izrade doktorske disertacije, a posebno na realizaciji i analizi rezultata svetlosne i elektronske mikroskopije eksperimentalnih uzoraka.

Dr Snežani Simić, docentu i dr Vladici Simić, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, na svesrdnoj pomoći prilikom terenskih istraživanja, dostupnoj naučnoj literaturi, kao i na korisnim sugestijama tokom finalne izrade ove doktorske disertacije.

Pokojnom dr Radoslavu Žikiću, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, na pomoći prilikom organizovanja početnih istraživanja ove doktorske disertacije i za veliko razumevanje i veru u mlade ljude.

Kolegama sa Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, dr Nataši Đorđević, asistentu, Bojanu, Marku i gospodinu Milosavcu, za uspešnu realizaciju terenskih istraživanja i pomoći tokom obrade eksperimentalnog materijala.

Mojim najdražim kolegama iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, dr Slađanu Pavloviću, višem naučnom saradniku, dr Slavici Borković-Mitić i dr Tijani Radovanović, naučnim saradnicima, kao i Svetlani Despotović i Jeleni Gavrić, istraživačima saradnicima, na velikoj pomoći tokom terenskog i eksperimentalnog rada i na prijateljstvu i uvek pozitivnoj atmosferi koja vlada na poslu.

Zahvaljujem se svojoj porodici, roditeljima Miljki i Radu, bratu Vladimiru i snajki Ivani, na moralnoj podršci koju su mi pružali tokom svih ovih godina.

Posebno se zahvaljujem mom dragom Bojanu na velikoj ljubavi, neizmernoj podršci i bezgraničnom strpljenju.

***Branka R. Perendija***, istraživač saradnik

---

# PARAMETRI ANTIOKSIDACIONE ZAŠTITE U TKIVIMA NEKIH VRSTA SLATKOVODNIH RIBA IZ JEZERA GRUŽA

## REZIME

Ribe mogu direktno da budu izložene toksinima cijanobakterija i zato su veoma dobri modeli za proučavanje uticaja cijanotoksina na ćelijski antioksidacioni sistem zaštite. Postoji mnogo informacija o biohemijskim i ultrastrukturnim promenama u različitim tkivima riba nakon izlaganja cijanotoksinima u laboratorijskim uslovima, ali su podaci o dejstvu cvetanja cijanobakterija u prirodnim uslovima veoma retki.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se istraži uticaj cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža na parametre antioksidacione zaštite u jetri, škragama i mišiću kod slatkovodnih vrsta riba *Rutilus rutilus* (bodorka), *Blicca bjoerkna* (blika), *Carassius gibelio* (babuška) i *Perca fluviatilis* (grgeč). Određivani su aktivnost enzima antioksidacione zaštite: ukupne, mangan i bakar cink sadržavajuće superoksid-dismutaze (Uk SOD, Mn SOD, CuZn SOD, EC 1.15.1.1), katalaze (CAT, EC 1.11.1.6), glutation-peroksidaze (GSH-Px, EC 1.11.1.9), glutation-reduktaze (GR, EC 1.6.4.2) i enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST, EC 2.5.1.18), kao i koncentracija ukupnog glutationa (GSH) i sulfhidrilnih (SH) grupa. Histopatološka analiza jetre riba proučavana je na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije. Svi ispitivani parametri mereni su pre i tokom cvetanja cijanobakterija.

Aktivnost Uk SOD i CuZn SOD u jetri *B. bjoerkna*, kao i aktivnost Mn SOD u jetri kod svih ispitivanih vrsta riba bila je povećana tokom cvetanja cijanobakterija. Elektroforetskom analizom enzima SOD konstatovane su inducibilne izoforme SOD u jetri *B. bjoerkna* tokom perioda cvetanja. Aktivnost Uk SOD, Mn SOD i CuZn SOD u škragama i mišiću ispitivanih vrsta imala je različit stepen smanjenja tokom cvetanja cijanobakterija. Izmerena aktivnost CAT u jetri svih ispitivanih vrsta riba bila je značajno manja tokom cvetanja u odnosu na period pre cvetanja. Suprotan trend detektovan je u škragama *R. rutilus* i *P. fluviatilis*, kao i u mišiću sve četiri vrste riba. Smanjenje enzimske aktivnosti GSH-Px u jetri i mišiću svih ispitivanih vrsta i u škragama *B. bjoerkna* i *C. gibelio* tokom cvetanja cijanobakterija, ukazalo je da cijanotoksini narušavaju integritet ćelijskih membrana u svim ispitivanim tkivima.

Aktivnost GR bila je značajno smanjena u jetri *C. gibelio*, škrigama sve četiri vrste riba i u mišiću *R. rutilus* i *C. gibelio*. Povećanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije GST u jetri *B. bjoerkna* tokom perioda cvetanja ukazuje na moguću aktivaciju procesa detoksifikacije toksina cijanobakterija. Smanjenje aktivnosti GST u škrigama i mišiću svih ispitivanih vrsta ukazuje na narušenu efikasnost ovih tkiva da konjuguju cijanotoksine i to može da dovede do njihove izražene unutarćelijske akumulacije tokom cvetanja cijanobakterija. Promena koncentracije ukupnog GSH i SH grupa pokazala je različit odgovor u zavisnosti od ispitivanog tkiva i vrste. Ultrastrukturalna istraživanja su ukazala da su hepatociti ispitivanih vrsta riba imali izražene promene gotovo svih organela tokom cvetanja cijanobakterija. Neki hepatociti su imali znakove nekroze, dok je bojenje propidijum-jodidom ukazalo da period cvetanja dovodi i do apoptotskih promena u jetri svih ispitivanih vrsta riba.

Dobijeni rezultati su pokazali da cvetanje cijanobakterija indukuje odgovor na oksidacioni stres u ispitivanim tkivima riba i dovodi do ultrastrukturnih promena u jetri. Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju prvi izveštaj o uticaju cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža na parametre antioksidacione zaštite (aktivnost SOD, CAT, GSH-Px, GR i enzima faze II biotransformacije GST, kao i koncentraciju GSH i SH grupa) u jetri, škrigama i mišiću slatkovodnih riba *Rutilus rutilus*, *Blicca bjoerkna*, *Carassius gibelio* i *Perca fluviatilis*. Biomonitoring antioksidacionih biomarkera u tkivima riba može da posluži kao rani upozoravajući signal koji ukazuje na oštećenja ćelija usled izloženosti cijanotoksinima u slatkovodnim ekosistemima. Ova disertacija pruža veliki doprinos na polju ekofiziologije akvatičnih organizama.

**Ključne reči:** parametri antioksidacione zaštite, slatkovodne ribe, jetra, škrge, mišić, cvetanje cijanobakterija, jezero Gruža

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija

**UDK broj:** 577.152.1:597]:556.551](043.3)

## ANTIOXIDANT DEFENCE PARAMETERS IN TISSUES OF SOME SPECIES OF FRESHWATER FISH FROM THE GRUŽA RESERVOIR

### ABSTRACT

Since fish can be directly exposed to cyanobacterial toxins, they are very good models to study the influence of cyanotoxins on the cellular antioxidant defence system. There is much information on biochemical and ultrastructural alterations in different fish tissues after exposure to cyanotoxins under laboratory conditions, however, data on the effects of cyanobacterial blooms in natural conditions are very scarce.

The aim of this doctoral dissertation was to investigate the influence of the cyanobacterial bloom in the Gruža Reservoir on the antioxidant defence parameters in the liver, gills and muscle of freshwater fish *Rutilus rutilus* (roach), *Blicca bjoerkna* (white bream), *Carassius gibelio* (prussian carp) and *Perca fluviatilis* (European perch). The activity of antioxidant defence enzymes: total, manganese and copper zinc containing superoxide dismutases (Tot SOD, Mn SOD, CuZn SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) and the biotransformation phase II enzyme glutathione-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18), as well as the concentrations of total glutathione (GSH) and sulphhydryl (SH) groups were determined. Histopathological examination of fish liver was performed by light and electron microscopy. All investigated parameters were measured before and during cyanobacterial bloom.

The activities of Tot SOD and CuZn SOD in the liver of *B. bjoerkna*, as well as Mn SOD activity in the liver of all investigated fish species increased during the cyanobacterial bloom. Electrophoretic analysis of SOD revealed the presence of inducible SOD isoforms in the liver of *B. bjoerkna* during the bloom period. The activities of Tot SOD, CuZn SOD and Mn SOD in the gills and muscle of the investigated species exhibited different degrees of reduction during the cyanobacterial bloom. The activity of CAT in the liver of all investigated fish species was significantly lower during the bloom period than in the pre-bloom period. The opposite trend was detected in the gills of *R. rutilus* and *P. fluviatilis*, as well as in the muscle of all four fish species. Reduction in the enzymatic activity of GSH-Px in the liver and muscle of



all investigated species and in the gills of *B. bjoerkna* and *C. gibelio* during the cyanobacterial bloom indicates that cyanotoxins impair the integrity of the cell membranes in all examined tissues. The activity of GR diminished significantly in the liver of *C. gibelio*, the gills of all four fish species, and in the muscle of *R. rutilus* and *C. gibelio*. The increase in the activity of the biotransformation phase II enzyme GST in the liver of *B. bjoerkna* during the bloom period points to a potential activation of the detoxification process of cyanobacterial toxins. The decrease in GST activity in the gills and muscle of all tested species indicates a perturbed efficiency of these tissues to conjugate cyanotoxins, which could lead to their intracellular accumulation during the cyanobacterial bloom. The concentrations of total GSH and SH groups exhibited a tissue- and species-dependent response. Ultrastructural examinations showed that hepatocytes displayed profound changes in almost all organelles during the cyanobacterial bloom. Some hepatocytes showed signs of necrosis, while propidium-iodide staining revealed that the bloom period also induced apoptotic changes in the liver of all investigated fish species.

The presented results show that the cyanobacterial bloom-induced response to oxidative stress caused ultrastructural alterations in the liver. The results of this doctoral dissertation are a first report on the influence of the cyanobacterial bloom in the Gruža Reservoir on antioxidant defence parameters (SOD, CAT, GSH-Px, GR and biotransformation phase II enzyme GST activities, as well as concentrations of GSH and SH groups) in the liver, gills and muscle of freshwater fish *Rutilus rutilus*, *Blicca bjoerkna*, *Carassius gibelio* and *Perca fluviatilis*. Biomonitoring of antioxidant biomarkers in fish tissue could serve as an early warning signal of cellular damage resulting from exposure to cyanotoxins in freshwater ecosystems. This dissertation is an important contribution in the field of ecophysiology of aquatic organisms.

**Key words:** antioxidant defence parameters, freshwater fish, liver, gills, muscle, cyanobacterial bloom, Gruža Reservoir

**Scientific field:** Biology

**Special topic:** Physiology

**UDC number:** 577.152.1:597]:556.551](043.3)

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Reaktivne vrste kiseonika .....	1
1.1.1. Oksidaciona oštećenja biomolekula .....	5
1.1.2. Pozitivni efekti ROS u ćeliji .....	8
1.2. Sistem zaštite od oksidacionih oštećenja .....	9
1.2.1. Enzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja .....	9
1.2.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD) .....	10
1.2.1.2. Katalaza (CAT) .....	13
1.2.1.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px) .....	14
1.2.1.4. Glutation-reduktaza (GR) .....	16
1.2.1.5. Enzim faze II biotransformacije glutation-S-transferaza (GST) .....	18
1.2.2. Neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja .....	20
1.2.2.1. Glutation (GSH) .....	21
1.2.2.2. Sulfhidrilne (SH) grupe .....	25
1.3. Biomonitoring i biomarkeri .....	28
1.3.1. Biomarkeri kod riba .....	33
1.3.1.1. Biotransformacioni enzimi .....	34
1.3.1.2. Parametri oksidacionog stresa .....	35
1.3.1.3. Fiziološki i morfološki parametri .....	36
1.4. Osnovne karakteristike cijanobakterija .....	37
1.4.1. Klasifikacija cijanotoksina .....	39
1.4.2. Osnovne karakteristike <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> .....	42
1.5. Osnovne karakteristike ispitivanih vrsta riba .....	43
1.5.1. <i>Rutilus rutilus</i> (bodorka) .....	43
1.5.2. <i>Blicca bjoerkna</i> (blika) .....	45
1.5.3. <i>Carassius gibelio</i> (babuška) .....	47
1.5.4. <i>Perca fluviatilis</i> (grgeč) .....	49

<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	51
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	53
3.1. Karakteristike lokaliteta i uzimanje uzoraka .....	53
3.2. Priprema tkiva za biohemijske analize .....	54
3.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina.....	56
3.3.1. Elektroforetska analiza proteina .....	57
3.4. Određivanje aktivnosti enzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja .....	60
3.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) .....	60
3.4.1.1. SOD nedenaturišuća elektroforetska analiza .....	61
3.4.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT) .....	63
3.4.3. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px).....	64
3.4.4. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR) .....	65
3.4.5. Određivanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST) .....	66
3.5. Određivanje koncentracije neenzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja .....	67
3.5.1. Određivanje koncentracije glutationa (GSH) .....	67
3.5.2. Određivanje koncentracije slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa ....	68
3.6. Mikroskopska analiza hepatocita .....	69
3.6.1. Svetlosna mikroskopija .....	69
3.6.2. Elektronska mikroskopija .....	70
3.7. Statistička obrada rezultata .....	71
<b>4. REZULTATI</b> .....	72
4.1. Fizičko-hemijski parametri vode i analiza cijanobakterija.....	72
4.2. Kondicioni faktor (CF) ispitivanih vrsta riba .....	73
4.3. Koncentracija ukupnih proteina .....	74
4.3.1. Elektroforetski profil proteina .....	76

4.4. Aktivnost enzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja.....	77
4.4.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD).....	77
4.4.1.1. Elektroforetski profil SOD .....	88
4.4.2. Aktivnost katalaze (CAT).....	90
4.4.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) .....	94
4.4.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) .....	98
4.4.5. Aktivnost enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST) .....	102
4.5. Koncentracija neenzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja.....	106
4.5.1. Koncentracija glutationa (GSH) .....	106
4.5.2. Koncentracija slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa .....	110
4.6. Kanonijska diskriminaciona analiza.....	114
4.6.1. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama .....	115
4.6.2. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po tkivima.....	126
4.7. Klaster analiza .....	133
4.8. Svetlosna i elektronska mikroskopija.....	137
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>142</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>182</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>187</b>

## SKRAĆENICE

$^1\text{O}_2$	singlet kiseonik
6-PG	6-fosfoglukonat
8-OH-G	8-hidroksiguanozin
ADP	adenozin difosfat
AOS	antioksidacioni zaštitni sistem
AP-1	aktivator protein 1
APS	amonijum persulfat
ATP	adenozin trifosfat
Ca	kalcijum
CAT	katalaza
CDNB	1-hloro-2,4-dinitrobenzen
-COOH	karboksilna grupa
Cu	bakar
$\text{CuSO}_4$	bakar sulfat
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	bakar sulfat pentahidrat
CuZn SOD	bakar cink sadržavajuća superoksid-dismutaza
CYP1A	citohrom P450 1A
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoična kiselina)
EC SOD	ekstracelularna superoksid-dismutaza
EDTA	etilendiamintetraacetat
FAD	flavin adenin dinukleotid
Fe SOD	gvožđe sadržavajuća superoksid-dismutaza
Fe	gvožđe
G-6-P	glukoza-6-fosfat
G6PDH	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza
GR	glutation-reduktaza
GS	glutation-sintetaza
GSH	redukovani glutation

GSH-Px	glutation-peroksidaza
G-SR	konjugat elektrofilnog supstrata i glutaciona
GSSG	oksidovani glutation
GST	glutation-S-transferaza
H <sub>2</sub> O	voda
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodonik peroksid
HCl	hlorovodonična kiselina
HNE	4-hidroksi-2-noneal
HO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	hidroperoksil radikal
HOCl	hipohlorna kiselina
K	kalijum
KCN	kalijum cijanid
L <sup>·</sup>	lipidni radikal
LH	lipid
LO <sup>·</sup>	lipidni alkoksil radikal
LOH	lipidni aldehid
LOO <sup>·</sup>	lipidni peroksil radikal
LOOH	lipidni hidroperoksid
MDA	malondialdehid
Mg	magnezijum
Mn	mangan
Mn SOD	mangan sadržavajuća superoksid-dismutaza
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
Na	natrijum
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	natrijum karbonat
NADH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	oksidovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	natrijum dihidrogen fosfat
NaHCO <sub>3</sub>	natrijum bikarbonat
NaN <sub>3</sub>	natrijum azid
NaOH	natrijum hidroksid

Native PAGE	nedenaturišuća poliakrilamidna gel elektroforeza
NBT	nitroblue-tetrazolium
NF-κB	nuklearni faktor kappa B
-NH <sub>2</sub>	amino grupa
Ni	nikal
Ni SOD	nikal sadržavajuća superoksid-dismutaza
NO <sup>•</sup>	azot oksid
non-Se GSH-Px	selen nezavisna glutathion-peroksidaza
O <sub>2</sub>	molekularni kiseonik
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	superoksid anjon radikal
O <sub>3</sub>	ozon
-OH	hidroksilna grupa
OH <sup>-</sup>	hidroksilni jon
OH <sup>•</sup>	hidroksil radikal
ONOO <sup>-</sup>	peroksinitrit
PAH	policiklični aromatični ugljovodonici
PCB	polihlorovani bifenili
PCDD	dibenzo- <i>p</i> -dioksini
PCDF	polihlorovani dibenzofurani
PH GSH-Px	fosfolipid hidroperoksid glutathion-peroksidaza
R <sup>•</sup>	organski radikal
RNK	ribonukleinska kiselina
RO <sup>•</sup>	alkoksil radikal
RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	peroksil radikal
ROH	alkohol
ROOH	organski peroksid
ROS	reaktivne vrste kiseonika
R-SSG	protein-glutathion mešani disulfid
R-X	elektrofilni supstrat
SDS	sodijum dodecil sulfat
SDS-PAGE	sodijum dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza

Se	selen
Se GSH-Px	selen zavisna glutation-peroksidaza
SH	sulfhidrilna grupa
SOD	superoksid-dismutaza
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TNB	2-nitro-5-tiobenzoična kiselina
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UDPGA	5'-difosfoglukuronska kiselina
UDPGT	UDP-glukuronil-transferaza
Uk SOD	ukupna superoksid-dismutaza
UNEP	Program za životnu sredinu Ujedinjenih nacija
WHO	Svetska zdravstvena organizacija
Zn	cink
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -glutamilcistein-sintetaza



## 1. UVOD

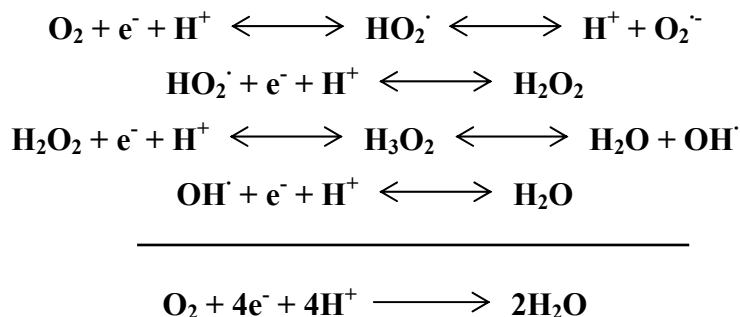
### 1.1. Reaktivne vrste kiseonika

Prisustvo molekularnog kiseonika ( $O_2$ ) u atmosferi naše planete omogućilo je razvoj aerobnog života. Kada je Zemlja nastala pre oko 4.5 milijardi godina, atmosfera je bila izrazito redukujuća i gotovo bez kiseonika. Prvobitni živi organizmi bili su anaerobni heterotrofi koji su živeli u okeanima i na taj način bili su zaštićeni od štetnih efekata jonizujućeg zračenja Sunca. Prvobitan nizak nivo kiseonika bio je rezultat fotolitičke disocijacije vode pod dejstvom jonizujućeg zračenja. Koncentracija kiseonika koja je danas prisutna u atmosferi iznosi 21% i nastala je dejstvom fotosintetičke aktivnosti cijanobakterija i biljaka. Akumulacija kiseonika u Zemljinoj atmosferi omogućila je evoluciju velikog broja različitih aerobnih organizama koji koriste  $O_2$  kao akceptor elektrona i tako dobijaju znatno više energije u poređenju sa fermentacijom i anaerobnom respiracijom. Aerobni život na našoj planeti odgovoran je za glavni deo kruženja kiseonika u prirodi, jer se kiseonik oslobađa fotosintezom, a koristi tokom procesa disanja (Scandalios, 2005).

U molekularnom obliku  $O_2$  je relativno nereaktivan. Ono što ograničava oksidacionu moć  $O_2$  je postojanje dva nesparena elektrona sa paralelnim spinom i mogućnost vezivanja samo za strukture koje imaju elektrone sa antiparalelnim spinom. Ipak, dodavanjem elektrona ili transferom energije na  $O_2$ , moguće je otkloniti ovu spinsku restrikciju i povećati reaktivnost kiseonika. Tom prilikom nastaju **reaktivne vrste kiseonika** (eng. *reactive oxygen species*, ROS) u koje se ubrajaju slobodni radikali kiseonika i neradikalske vrste koje funkcionišu kao oksidujućci agensi i/ili se lako konvertuju u slobodne radikale (Shema 1). Nespareni elektroni u spoljašnjoj orbitali odgovorni su za reaktivnost svih radikalskih vrsta kiseonika (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Fotosenzitivna jedinjenja kao što su hlorofil i strukture koje sadrže flavin mogu da predaju energiju molekulu  $O_2$  i on tada prelazi na više energetske stanje, odnosno u neradikalnu formu singlet kiseonik ( $^1O_2$ ). Ova forma može direktno da prenese energiju na ciljne molekule, kao što su DNK, proteini i lipidi i da ih oksiduje (Scandalios, 2005).

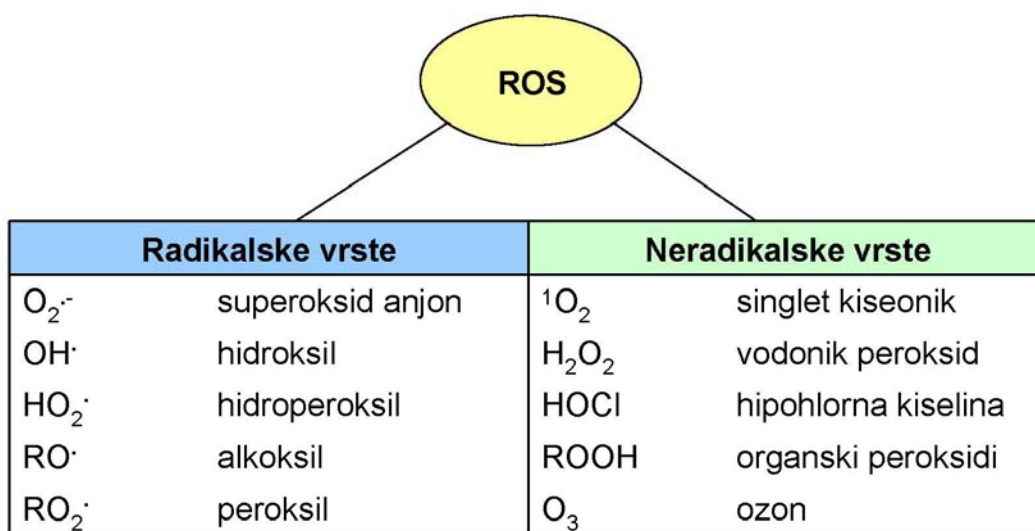
Svi aerobni organizmi koriste  $O_2$  kao krajni akceptor elektrona tokom procesa koji se odvijaju u respiratornom lancu mitohondrija, pri čemu nastaje osnovni energetski molekul adenzin trifosfat (ATP) u kom je vezana hemijska energija neophodna za odvijanje svih životnih funkcija (Buonocore i sar., 2010). Tokom procesa respiracije,  $O_2$  se kompletno redukuje do vode dodavanjem četiri elektrona, što se odigrava postupno uz formiranje delimično redukovanih intermedijera. Više od 95%  $O_2$  unetog u ćeliju prolazi kroz kompletnu redukciju do  $H_2O$ , dok se usled parcijalne redukcije oko 1-5%  $O_2$  transformiše u ROS (Scandalios, 2005). Jednoelektronskom redukcijom  $O_2$  nastaje superoksid anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), dvoelektronskom vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), a troelektronskom hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ). Postupna redukcija  $O_2$  do  $H_2O$  prikazana je u sledećim reakcijama:



Glavno mesto produkcije  $O_2^{\cdot-}$  u ćeliji su kompleks I (NADH dehidrogenaza) i kompleks III (citohrom *c* reduktaza) respiratornog lanca mitohondrija. Kompleks I je integralni multiproteinski kompleks unutrašnje membrane mitohondrija koji oksiduje NADH koristeći koenzim Q kao akceptor elektrona, dok kompleks III oksiduje koenzim Q, a kao akceptor elektrona koristi citohrom *c*. Obe navedene reakcije dovode do translokacije protona i formiranja transmembranskog potencijala neophodnog za sintezu ATP-a, ali tokom ovih reakcija dolazi i do nastanka  $O_2^{\cdot-}$ . Dejstvom kompleksa I produkovani  $O_2^{\cdot-}$  dospeva isključivo u mitohondrijalni matriks, dok  $O_2^{\cdot-}$  koji produkuje kompleks III dospeva i u matriks i u citosol (Andreyev i sar., 2005). Znatne količine  $O_2^{\cdot-}$  mogu da nastanu i pod dejstvom različitih enzimskih sistema kao što su peroksizomalna ksantin-oksidaza i membranski vezana NADPH-oksidaza (Buonocore i sar., 2010).

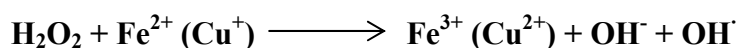
Pošto je  $O_2^{\cdot-}$  konjugovana baza slabe kiseline veoma reaktivnog hidroperoksil radikala ( $HO_2^{\cdot}$ ), jednoelektronska redukcija  $O_2$  u alkalnim uslovima dovodi do nastanka

prvenstveno  $\text{HO}_2^\cdot$ , dok je  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dominantan pri višim pH vrednostima (Scandalios, 2005). Uprkos velikom potencijalu produkcije,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  kao primarni ROS je umereno reaktivan, ali može da reaguje sa drugim molekulima i generiše sekundarne reaktivne vrste koje su reaktivnije. Tako na primer u reakciji između  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i azot oksida ( $\text{NO}^\cdot$ ) nastaje izrazito reaktivni peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), (Kruidenier i Verspaget, 2002).



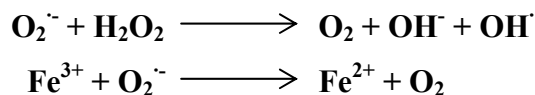
Shema 1. Primeri ROS  
(modifikovano, Halliwell i Gutteridge, 1999).

Spontanom ili katalizovanom dismutacijom  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dolazi do nastanka  $\text{H}_2\text{O}_2$ , slabo reaktivnog neradikalnog molekula koji lako difunduje kroz membrane. Produkcija  $\text{H}_2\text{O}_2$  u ćeliji omogućena je i dvovalentnom redukcijom  $\text{O}_2$  koju katalizuju pojedini enzimi. Umesto neutralizacije do vode,  $\text{H}_2\text{O}_2$  može biti metabolizovan enzimom mijeloperoksidaza do hipohlorne kiseline ( $\text{HOCl}$ ), koja je 100-1000 puta toksičnija od  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kruidenier i Verspaget, 2002). Pored toga,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ima sposobnost da reaguje sa delimično redukovanim jonima metala ( $\text{Fe}^{2+}$  ili  $\text{Cu}^+$ ) u Fentonovoj reakciji (Valko i sar., 2007):

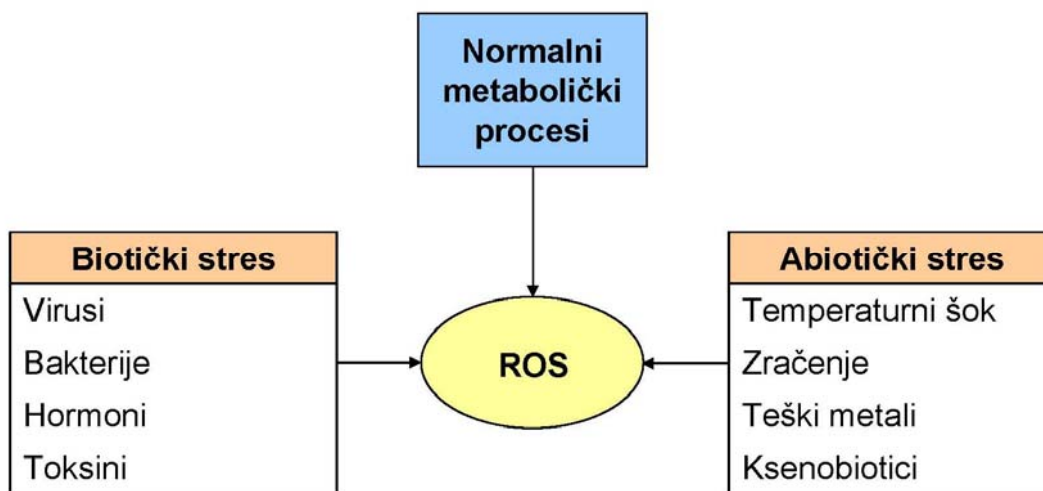


Na taj način formira se izuzetno reaktivan  $\text{OH}^\cdot$  koji ima veoma kratak polужivot ( $10^{-9}$  s), tako da reaguje blizu mesta formiranja sa praktično svim molekulima dovodeći

do izrazitih ćelijskih oštećenja. Ovaj najreaktivniji radikal kiseonika može nastati i tokom interakcije  $O_2^{\cdot -}$  i HOCl,  $Fe^{2+}$  i HOCl, kao i reakcije između  $H_2O_2$  i  $NO^{\cdot}$  (Kruidenier i Verspaget, 2002).  $OH^{\cdot}$  se formira i kad postoji povećana produkcija  $O_2^{\cdot -}$  i  $H_2O_2$  u Haber-Weiss-ovoj reakciji uz prisustvo prelaznog metala (Valko i sar., 2007):



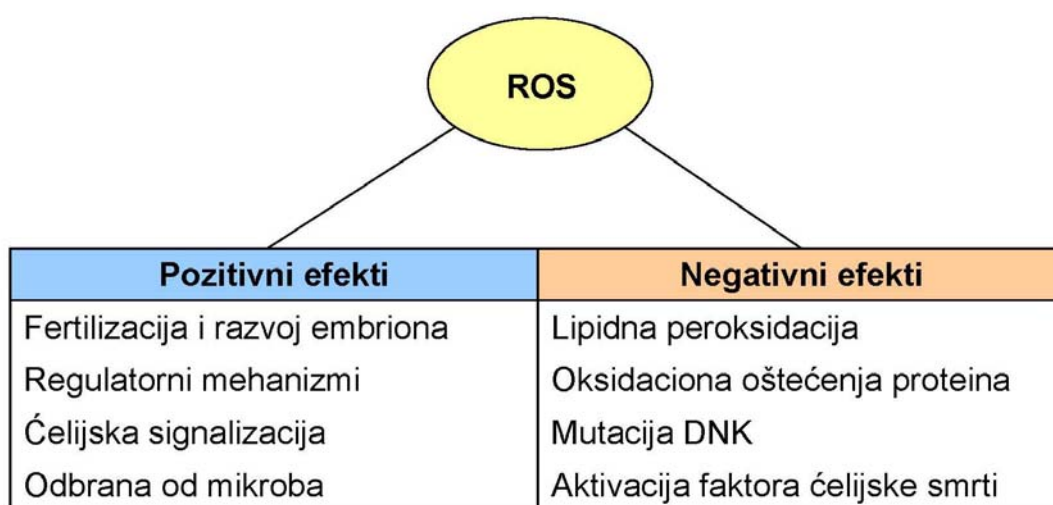
ROS se konstantno proizvode tokom aerobnog metabolizma ćelije kao deo normalnih metaboličkih procesa. Endogeni izvori ROS su mnogobrojne membranske i citosolne oksidoreduktaze, a najveća produkcija ROS u ćeliji vezana je za mitohondrije (respiratorni lanac), peroksisome i mikrozome (Buonocore i sar., 2010). ROS mogu da nastanu i pod dejstvom različitih egzogenih uticaja, kao što su razni biotički i abiotički faktori (Shema 2).



Shema 2. Faktori koji utiču na formiranje ROS.

ROS su prisutne u gotovo svim ćelijskim organelama i kompartmentima kao posledica normalne metaboličke aktivnosti i pri niskim koncentracijama imaju bitnu ulogu u ćeliji. Međutim, povećana produkcija ROS uz smanjenu antioksidacionu zaštitu ćelije, može da dovede do oksidacionih oštećenja ćelijskih konstituenata i tako izazove stanje poznato pod nazivom **oksidacioni stres**. Pozitivni i negativni efekti ROS prikazani su na Shemi 3.

Oksidacioni stres je rezultat metaboličkih procesa u kojima se koristi kiseonik i predstavlja narušenu ravnotežu između prooksidacionih i antioksidacionih reakcija. ROS mogu da interaguju sa proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama i tako dovedu do oštećenja ovih molekula i inhibicije njihove funkcije. Okidači oksidacionog stresa mogu biti nasledni ili indukovani genetički defekti, faktori životne sredine, kao i metaboličke fluktuacije (Andreyev i sar., 2005). Iako je kiseonik esencijalan za aerobni život, njegova redukcija čini ga najtoksičnijom supstancom za živi svet na Zemlji (Scandalios, 2005).



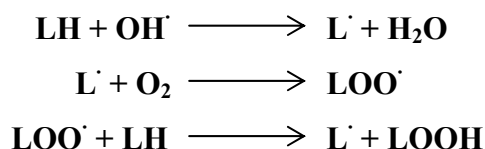
Shema 3. Pozitivni i negativni efekti ROS  
(modifikovano, Buonocore i sar., 2010).

### 1.1.1. Oksidaciona oštećenja biomolekula

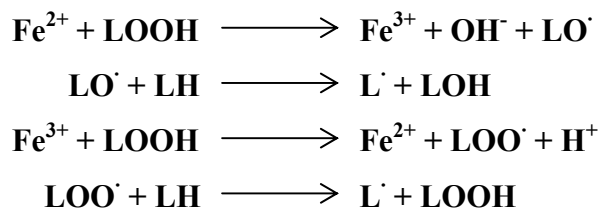
Polinezasićene masne kiseline fosfolipidnog dvosloja ćelijskih membrana predstavljaju glavne ciljne molekule za ROS. Najreaktivniji slobodni radikal kiseonika  $\text{OH}^\cdot$  započinje proces lipidne peroksidacije koji se zatim nastavlja nizom lančanih reakcija do formiranja lipidnih hidroperoksida i aldehida. Akumulacija hidroperoksida u plazma membrani i membranama organela dovodi do promene fluidnosti membrane i tako utiče na aktivnost transmembranskih enzima, transportera, receptora i drugih membranskih proteina. Krajnji rezultat lipidne peroksidacije je promena propustljivosti

membrane, što dovodi do narušavanja ćelijskog metabolizma i homeostaze, kao i ćelijske smrti (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Lipidna peroksidacija započinje preuzimanjem vodonikovog atoma nezasićene masne kiseline lipida (LH) od strane inicijatornog radikala (OH<sup>•</sup>), što dovodi do nastanka lipidnog radikala (L<sup>•</sup>). On u reakciji sa O<sub>2</sub> prelazi u izrazito reaktivan lipidni peroksil radikal (LOO<sup>•</sup>), koji zatim preuzima vodonikov atom sa susednog lipida i formira lipidni hidroperoksid (LOOH). Novonastali L<sup>•</sup> radikal interaguje sa drugim susednim lipidom u lančanoj reakciji koja dovodi do akumulacije oštećenih lipida (Catalá, 2006):



Produkt lipidne peroksidacije LOOH u reakciji sa redukovanim metalima (Fe<sup>2+</sup>) dovodi do nastanka lipidnog alkoksil radikala (LO<sup>•</sup>). On može da interaguje sa drugim lipidom, pri čemu se formiraju L<sup>•</sup> i lipidni aldehid (LOH). Takođe, LOOH može da interaguje sa oksidovanim metalima (Fe<sup>3+</sup>) formirajući LOO<sup>•</sup>. Novonastali lipidni radikali iniciraju dodatne lančane reakcije (Fagali i Catalá, 2009):



LOOH su nestabilni, razlažu se i formiraju veoma reaktivna aldehidna jedinjenja, koja su znatno stabilnija od ROS i lako difunduju u ćelijski medijum. Najpoznatiji toksični aldehidni produkti lipidne peroksidacije su 4-hidroksi-2-noneal (HNE) i malondialdehid (MDA). HNE je slabo mutagen, ali predstavlja glavni toksični produkt lipidne peroksidacije, dok MDA ima karcinogeno i mutageno dejstvo i koristi se kao biomarker lipidne peroksidacije (Valko i sar., 2007; Buonocore i sar., 2010).

Proteini su važni ćelijski konstituenti i značajni ciljni molekuli ROS. Relativno male strukturne modifikacije proteina mogu da dovedu do značajnih promena u njihovoj ćelijskoj aktivnosti. Aminokiselinske rezidue proteina razlikuju se po stepenu osetljivosti na ROS, a aminokiseline koje su najosetljivije na oksidaciju su cistein i metionin (Buonocore i sar., 2010). Slično lipidnoj peroksidaciji, OH<sup>•</sup> predstavlja najreaktivniji ROS koji uzrokuje oksidaciona oštećenja proteina. Proces oksidacije proteina najčešće dovodi do nastanka novih funkcionalnih grupa, kao što su hidroksilne i karbonilne grupe (Kruidenier i Verspaget, 2002). Karbonilacija proteina je ireverzibilan proces i koristi se kao biomarker oksidacionog stresa (Valko i sar., 2007; Almroth, 2008). Sekundarni efekti oksidacije proteina uključuju nastanak alkil, alkoksil i alkil-peroksil radikala, zatim fragmentaciju polipeptidnog lanca, promenu naelektrisanja proteina, povećanu osetljivost na proteolizu, protein-protein interakcije i agregaciju nastalih produkata (Scandalios, 2005). Narušavanje tercijarne strukture i funkcije različitih proteina (promene u aktivnosti enzima, receptornih i transportnih proteina) može da dovede do smrti ćelije (Almroth, 2008).

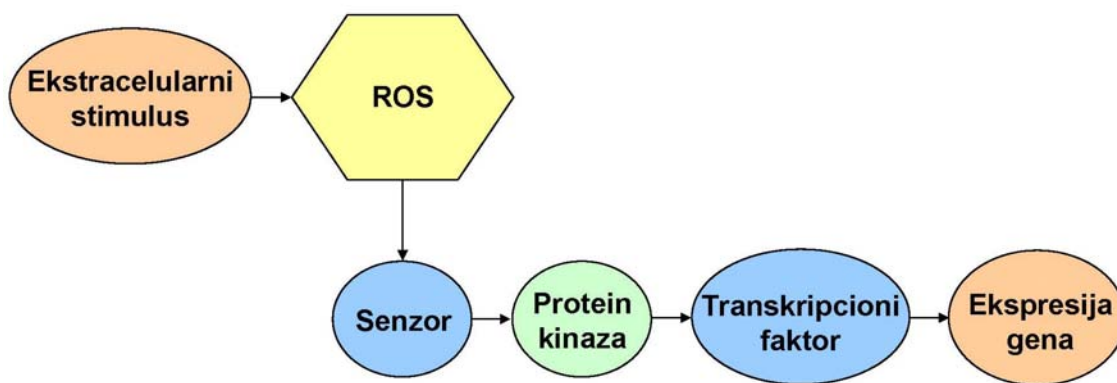
ROS mogu da reaguju sa svim komponentama DNK molekula (purinske i pirimidinske baze, dezoksiribozna osnova) i dovedu do različitih oštećenja DNK kao što su jednolančani i dvolančani prekidi molekula DNK, modifikacije purinskih i pirimidinskih baza i dezoksiriboze, delecije, mutacije i translokacije DNK, unakrsna povezivanja u okviru jednog ili oba lanca DNK, kao i unakrsna povezivanja DNK i proteina. Najviše proučavana lezija DNK je modifikacija purinske baze guanozina i formiranje 8-hidroksiguanozina (8-OH-G), koji je dobar biomarker oksidacionog stresa. Rezultat ovog procesa je zamena guanozin-citozin (GC) baznog para u timin-adenin (TA) bazni par nakon dva replikaciona ciklusa. Oštećenja DNK pod dejstvom različitih ROS dovode do sprečavanja indukcije transkripcije, greški u replikaciji i genomske nestabilnosti, što predstavlja prvi korak uključen u mutagenezu, karcinogenezu i starenje (Halliwell i Gutteridge, 1999; Buonocore i sar., 2010).

### 1.1.2. Pozitivni efekti ROS u ćeliji

Pri niskim i umerenim koncentracijama, ROS imaju mnogobrojne uloge u ćeliji, kao što su odbrana od infektivnih agenasa i uloga u funkcionisanju regulatornih mehanizama i intraćelijskih signalnih puteva (Shema 3).

ROS imaju bitnu ulogu u sazrevanju spermatozoida, aktivaciji njihove pokretljivosti i akrozomalnoj reakciji. Tokom fertilizacije, ROS utiču na interakciju spermatozoida i jajne ćelije, što omogućava fuziju gameta. Tokom razvoja embriona i fetusa ROS utiču na ključne transkripcione faktore koji menjaju gensku ekspresiju tokom razvića (Buonocore i sar., 2010).

Formiranje ROS u inflamatornim procesima dovodi do uništavanja invazivnih patogena. Povećana produkcija ROS u fagocitima predstavlja odbranu od mikroorganizama. U interakciji sa inflamatornim agensima (citokini, bakterijski produkti) dolazi do aktivacije NAD(P)H oksidaza u plazma membrani neutrofila i makrofaga, što dovodi do oslobađanja velike količine ROS. Formiranje  $O_2^-$  u fagocitima (manje u eozinofilima i limfocitima) esencijalna je za zaštitu organizma od bakterijskih infekcija. Međutim, prekomerna produkcija ROS tokom zapaljenskih procesa može da izazove destrukciju tkiva (Valko i sar., 2007; Buonocore i sar., 2010).



Shema 4. Uloga ROS u ćelijskoj signalizaciji.

ROS imaju važnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji. Signalna transdukcija je proces koji omogućava prenos informacije iz ćelijskog okruženja do različitih funkcionalnih elemenata u ćeliji. Okidači signalne transdukcije su ekstracelularni signali (hormoni,



faktor rasta, citokini i neurotransmiteri), koji dovode do aktivacije različitih protein kinaza i odgovarajućih transkripcionih faktora (NF- $\kappa$ B, AP-1) čija regulacija je redoks zavisna. Transkripcioni faktori indukuju ekspresiju određenih gena, koji imaju ulogu u aktivaciji imunog sistema, ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji, reparaciji, apoptozi, kao i u antioksidacionoj zaštiti (Valko i sar., 2007). Signalni put u ćeliji često uključuje ROS kao signalne molekule intraćelijske transdukcijske kaskade, tako da oni imaju važnu fiziološku ulogu kao sekundarni glasnici u ćeliji (Shema 4). Poznato je da pojedini ROS kontrolišu nivo respiratorne ventilacije, relaksaciju muskulature, imunološku funkciju i odgovor na oksidacioni stres (Dröge, 2002).

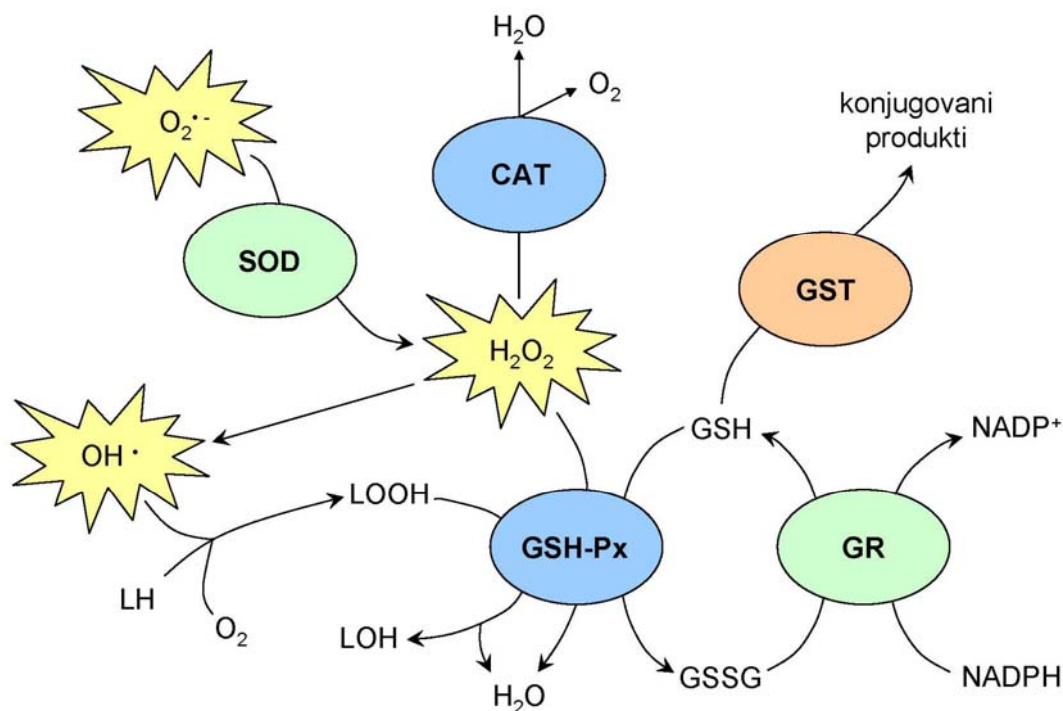
## **1.2. Sistem zaštite od oksidacionih oštećenja**

ROS su prisutni u svim kompartmentima ćelije kao rezultat normalne metaboličke aktivnosti. Međutim, pod uticajem različitih faktora, kao što su ekstremne temperature, radijacija, pesticidi, biotoksini, teški metali i drugi tipovi biotičkog i abiotičkog stresa, povećava se njihovo nastajanje. Sve ćelijske strukture su potencijalna meta za oksidaciona oštećenja i zato su se u ćeliji razvili različiti mehanizmi zaštite od povećane akumulacije ROS: preventivni mehanizmi, reparativni mehanizmi, mehanizmi fizičke odbrane i mehanizmi antioksidacione zaštite (Buonocore i sar., 2010). **Sistem zaštite od oksidacionih oštećenja** (eng. *antioxidant defence system*, AOS) sastoji se iz primarne i sekundarne antioksidacione zaštite. Primarna antioksidaciona zaštita uključuje enzimske i neenzimske komponente koje su aktivne u uslovima normalne i povećane produkcije ROS. Sekundarna antioksidaciona zaštita uključuje protein specifične oksidoreduktaze (tiol-transferaza, protein-ADP-ribozil-transferaza, ATP i  $\text{Ca}^{2+}$  nezavisna proteaza) koje učestvuju u popravci oksidacionih oštećenja biomolekula (Cadenas, 1989; Žikić i sar., 2000; Štajn i sar., 2007).

### **1.2.1. Enzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja**

Prema najnovijoj klasifikaciji sistema zaštite od oksidacionih oštećenja, u enzimskom sistemu primarne antioksidacione zaštite (Shema 5) ubrajaju se enzimi superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px) i

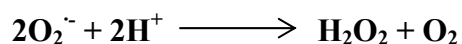
glutation-reduktaza (GR), dok se enzim glutation-S-transferaza (GST) koji je prema ranijim klasifikacijama pripadao ovoj grupi, svrstava u enzime faze II biotransformacije (Van der Oost i sar., 2003).



Shema 5. Enzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja (modifikovano, Matović i sar., 2004).

### 1.2.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD)

Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) predstavlja prvu liniju odbrane od ROS i ima ključnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidacionih oštećenja. To je metaloprotein (sa redoks aktivnim metalom) koji prevodi visoko reaktivni radikal  $O_2^{\cdot-}$  u manje reaktivnu vrstu kiseonika  $H_2O_2$  i molekularni  $O_2$  prema sledećoj jednačini:



Tokom evolucije nastalo je više klasa enzima SOD, što je povezano sa dostupnošću odgovarajućih metala u biosferi u različitim geološkim erama (Alscher i sar., 2002). Na osnovu metala koji je prisutan u aktivnom centru enzima, kao i lokacije u ćeliji, opisano je pet izoenzimskih formi SOD u živom svetu:

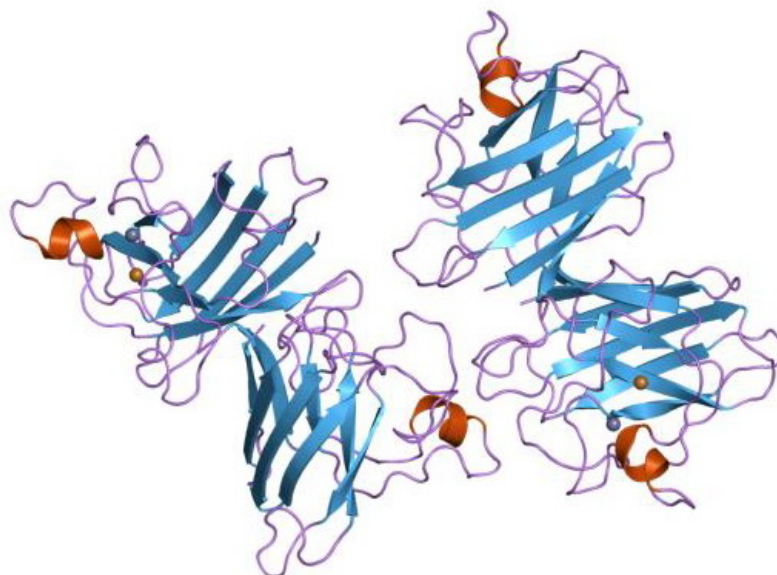
- gvožđe sadržavajuća superoksid-dismutaza (Fe SOD),
- nikal sadržavajuća superoksid-dismutaza (Ni SOD),
- mangan sadržavajuća superoksid-dismutaza (Mn SOD),
- bakar cink sadržavajuća superoksid-dismutaza (CuZn SOD) i
- ekstracelularna superoksid-dismutaza (EC SOD).

Fe SOD je evolutivno najstarija klasa SOD (Bafana i sar., 2011). U aktivnom centru ima gvožđe ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ), a prisutna je kod prokariota (fotosintetskih anaerobnih bakterija, bakterija koje redukuju sumpor i fermentativnih bakterija) i nekih eukariota (protozoa, u hloroplastima i peroksizomima kod mnogih familija viših biljaka). Karakterizacija izoenzima Fe SOD pokazala je da se i kod prokariota i kod eukariota javlja u dve forme: kao homodimer (40-50 kDa) ili homotetramer (80-90 kDa), (Alscher i sar., 2002).

Ni SOD je prvi put izolovana iz citosolne frakcije bakterije *Streptomyces seoulensis*, a kasnije je pronađena i kod drugih vrsta iz ovog roda. Strukturno je različita od ostalih izoenzimskih formi SOD. Sastoji se iz 4 identične subjedinice molekulske mase od 13.4 kDa, a vezujuće mesto za nikal ( $\text{Ni}^{3+}/\text{Ni}^{2+}$ ) nalazi se na N-terminusu proteina. Smatra se da je izoenzim Ni SOD nastao kao evolucionarna adaptacija na manju dostupnost redukovanog gvožđa u biosferi (Dupont i sar., 2008).

Mn SOD izoforma ima veliku sličnost u primarnoj, sekundarnoj i tercijarnoj strukturi sa Fe SOD izoformom. Smatra se da ove dve klase vode poreklo od istog enzima koji je u aktivnom centru imao Fe. Zbog porasta kiseonika u atmosferi i oksidacije minerala u tom periodu, odnosno zbog manje dostupnosti redukovanog Fe, došlo je do prelaza na dostupniji Mn za aktivni centar enzima. Neke bakterijske vrste i danas mogu da koriste oba metala u aktivnom centru istog enzima (Bafana i sar., 2011). Mn SOD je prisutna kod prokariota i u mitohondrijama i peroksizomima eukariota kao homodimerna ili homotetramerna izoforma, sa jednim atomom  $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$  po

subjedinici (Alscher i sar., 2002). Kod sisara Mn SOD je homotetramerni mitohondrijalni protein, a molekulska masa svake subjedinice iznosi 23 kDa. Ova izoforma obezbeđuje vitalnu zaštitu protiv ROS nastalih hiperoksijom i ima glavnu ulogu u ćelijskoj diferencijaciji i genezi tumora. Gen za Mn SOD nalazi se na hromozomu 6 kod čoveka, a na hromozomu 17 kod miša (Zelko i sar., 2002).



Slika 1. Struktura CuZn SOD  
(en.wikipedia.org).

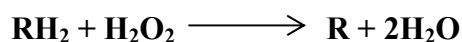
CuZn SOD (Slika 1) razvila se nezavisno kod eukariota i ima različitu sekvencu u odnosu na strukturno slične Fe SOD i Mn SOD. Nalazi se u citosolu eukariotskih ćelija kao homodimer i u hloroplastima biljaka kao homotetramer, dok se prisustvo kod nekih gram negativnih bakterija objašnjava transferom eukariotskih gena (Alscher i sar., 2002). Svaka subjedinica sadrži po jedan atom redoks aktivnog metala  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$  i jedan atom  $\text{Zn}^{2+}$  koji ima strukturnu ulogu. Aktivno mesto svake subjedinice funkcioniše nezavisno. To je prva identifikovana forma SOD, poznata pod nazivima hemokuprein, hepatokuprein, cerebrokuprein i eritrokuprein. CuZn SOD je kod sisara pronađena u citoplazmi, jedru, endoplazmatičnom retikulumu, mitohondrijama i lizozomima, homodimer je i ima molekulsku masu od 32 kDa. Lokalizovana je na hromozomu 21 kod čoveka, hromozomu 1 kod govečeta, hromozomu 9 kod majmuna i hromozomu 16 kod miša (Zelko i sar., 2002).

EC SOD je ekstracelularni homotetramer molekulske mase od 135 kDa. Pronađena je isključivo kod sisara i ima jedinstvenu strukturu. To je glikoprotein koji se prvenstveno nalazi u intersticijalnom matriksu tkiva i glikokaliksi ćelijske površine, gde je vezan za heparan sulfat proteoglikane. U manjoj količini pronadena je i u ekstracelularnim tečnostima, kao što su plazma, limfa, sinovijalna i cerebrospinalna tečnost (Alscher i sar., 2002). EC SOD je poslednja otkrivena i najmanje proučena forma enzima SOD. Iako u katalitičkom centru ima Cu i Zn, smatra se da je divergirala od CuZn SOD u ranim fazama evolucije (Bafana i sar., 2011). Lokalizovana je na hromozomu 4 kod čoveka, hromozomu 15 kod govečeta, dok se kod miša nalazi na hromozomu 5 (Zelko i sar., 2002).

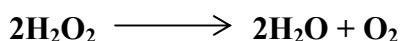
### 1.2.1.2. Katalaza (CAT)

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je jedan od najefikasnijih enzima u živom svetu. Osnovna uloga ovog antioksidacionog enzima je razlaganje neradikalnog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do H<sub>2</sub>O, čime se sprečava njegova difuzija u druge delove ćelije. Zbog svoje široke distribucije, evolutivne očuvanosti i brze aktivnosti, CAT ima važnu ulogu u sistemima koji su se razvili u aerobnoj sredini. CAT je homotetramer (Slika 2) molekulske mase od 240 kDa, koji u aktivnom centru ima gvožđe Fe<sup>3+</sup> vezano za porfirin hem grupu enzima (Scandalios, 2005).

Pri niskim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (<1 μM) CAT pokazuje peroksidaznu reakciju i redukuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koristeći različite donore vodonika (alkoholi, askorbinska kiselina):

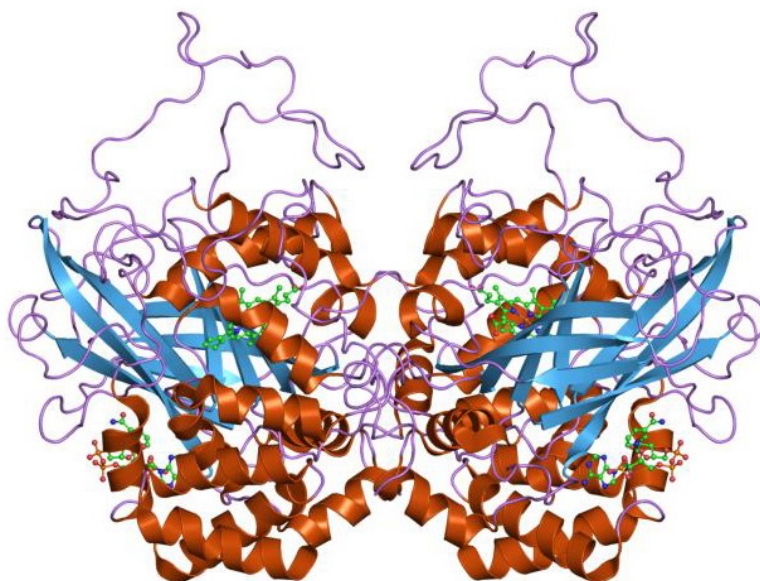


Pri visokim koncentracijama supstrata (>1 μM), CAT brzo uklanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kroz katalaznu reakciju, gde je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i donor i akceptor vodonika:



U katalaznoj reakciji ne koriste se redukujući ekvivalenti, pa je ovaj proces energetski veoma efikasan. To je značajno kada je povećana energetska potreba ćelije,

odnosno kada je povećan intenzitet kataboličkih procesa i respiracije. Na taj način formira se veća količina  $H_2O_2$ , ali on se uspešno uklanja enzimom CAT na energetski povoljan način (Scandalios, 2005). CAT ne može da bude saturisana svojim supstratom  $H_2O_2$  bez obzira na njegovu koncentraciju, tako da enzimska aktivnost raste linearno sa porastom koncentracije  $H_2O_2$  (Kruidenier i Verspaget, 2002).



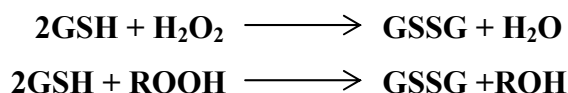
Slika 2. Struktura CAT  
(en.wikipedia.org).

U eukariotskim ćelijama CAT se predominantno nalazi u peroksizomima, a prisutan je i u citosolu i mitohondrijama (Scandalios, 2005). Mnogi peroksizomalni enzimi, kao što je enzimski sistem za  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, dovode do produkcije velike količine  $H_2O_2$ . Zbog toga je uloga CAT u ovim organelama od presudnog značaja za zaštitu ćelije od oksidacionih oštećenja (Fidaleo, 2010). Humani gen za CAT nalazi se na hromozomu 11, a najveći nivo katalazne aktivnosti kod sisara prisutan je u jetri (Ilyukha, 2001).

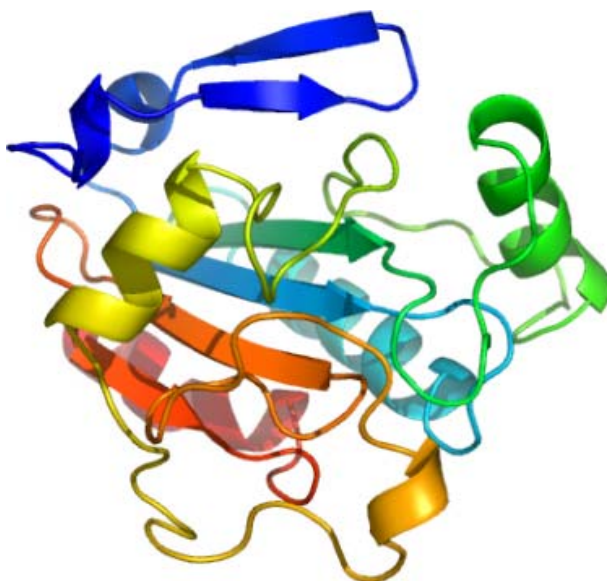
### 1.2.1.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px)

Glutation-peroksidaza (GSH-Px, EC 1.11.1.9) predstavlja bitan enzim sistema zaštite od oksidacionih oštećenja. Ima široku distribuciju u biljnom i životinjskom

svetu, dok je prisustvo ovog enzima u prokariotskim ćelijama detektovano samo kod nekoliko vrsta (Halušková i sar., 2009; Arenas i sar., 2010). Kod eukariotskih organizama nalazi se u različitim ćelijskim kompartmentima, kao što su citosol, mitohondrije, peroksizomi i intermembranski prostor i prisutna je u gotovo svim ćelijama. GSH-Px katalizuje redukciju  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i organskih hidroperoksida (ROOH) u alkohole (ROH), pri čemu kao kofaktor koristi glutation (GSH):



GSH-Px ima veći afinitet za  $H_2O_2$  u odnosu na CAT, tako da ima važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama  $H_2O_2$ , dok je CAT značajniji enzim u uslovima izrazitog oksidacionog stresa (Kruidenier i Verspaget, 2002).



Slika 3. Struktura Se GSH-Px  
([www.thesgc.org](http://www.thesgc.org)).

Opisane su tri forme ovog enzima: selen-zavisna glutation-peroksidaza (Se GSH-Px), selen-nezavisna glutation-peroksidaza (non-Se GSH-Px) i fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza (PH GSH-Px). Se GSH-Px (Slika 3) je homotetramer i sadrži Se u formi selenocisteina u svakoj subjedinici. Non-Se GSH-Px je monomer koji ima manji afinitet za  $H_2O_2$ , a efikasno redukuje organske peroksidi i

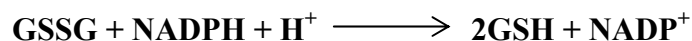
zahteva visoku koncentraciju GSH. PH GSH-Px je monomerni selenoenzim koji redukuje  $H_2O_2$ , fosfolipidne hidroperokside i perokside holesterola. To je jedini enzim koji redukuje membranske fosfolipidne hidroperokside, prekida proces lipidne peroksidacije i tako ima ključnu ulogu u ćelijskom sistemu zaštite od ROS (Andreyev i sar., 2005). Molekulska masa jednog monomera GSH-Px iznosi oko 20 kDa (Maiorino i sar., 1998; Arenas i sar., 2010).

Kod sisara je detektovano pet izoformi GSH-Px koje imaju različitu tkivnu distribuciju. Klasična GSH-Px (cGSH-Px, GSH-Px 1) je prvi identifikovani selenoprotein i nalazi se na hromozomu 3 kod čoveka. Ova izoforma je homotetramer i prisutna je u citosolu svih ćelija. Redukuje  $H_2O_2$  i lipidne hidroperokside, a ima ulogu i u skladištenju i transportu Se. Gastrointestinalna GSH-Px (GSH-Px 2) obezbeđuje zaštitu od toksičnosti lipidnih hidroperoksida koji su uneti hranom. Ova izoforma je najvažniji selenoproteinski antioksidant u debelom crevu i omogućava rani odbrambeni odgovor u borbi protiv kancera debelog creva. Ekstracelularna GSH-Px (GSH-Px 3) je selenoprotein detektovan u plazmi i bubrezima i ima ulogu u antioksidacionoj zaštiti ekstracelularnog kompartmenta (Brown i Arthur, 2001). Fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza (PH GSH-Px, GSH-Px 4) je monomer koji ima bitnu funkciju u reduktivnoj destrukciji lipidnih hidroperoksida, malih rastvorljivih hidroperoksida, hidroperoksida holesterola i holesterolskih estara. Nivo enzima GSH-Px 4 nizak je u jetri, plućima i bubrezima, a visok u testisima gde učestvuje u sazrevanju spermatozoida. Za razliku od ostalih formi GSH-Px, ova izoforma pokazuje nizak nivo reakcije sa GSH (Maiorino i sar., 1998). GSH-Px 5 je selen nezavisna GSH-Px i detektovana je u epididimisu kod velikog broja sisara (Chabory i sar., 2009).

#### **1.2.1.4. Glutation-reduktaza (GR)**

Glutation-reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) je detektovana u svim grupama živog sveta. Prisutna je u prokariotskim ćelijama i u citosolu i mitohondrijama eukariotskih ćelija. Ovaj antioksidacioni enzim katalizuje reakciju koja je esencijalna za stabilnost i integritet ćelije, jer konvertuje oksidovani glutation (GSSG) u redukovani glutation (GSH), pri čemu kao redukujući ekvivalent koristi NADPH:





Enzim GR je homodimerni flavoprotein (Slika 4) koji u aktivnom centru ima redoks aktivan disulfid. Svaka subjedinica ima molekulsku masu od oko 55 kDa i sadrži prostetičku grupu flavin adenin dinukleotid (FAD). Dimerna priroda enzima neophodna je za njegovu funkciju, jer obe subjedinice učestvuju u formiranju aktivnog centra enzima. Kod nekih organizama pronađeni su i tetrameri, pa i veće forme enzima. Katalitički ciklus GR ima dve faze, prvo NADPH redukuje FAD, pri čemu se redukujući ekvivalent prenosi na redoks aktivan disulfid, a zatim dolazi do redukcije GSSG u aktivnom centru enzima (Tandoğan i Ulusu, 2006).

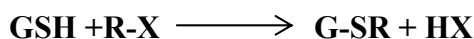


Slika 4. Struktura GR  
(annierob.hubpages.com).

Redukovani GSH učestvuje u velikom broju enzimskih i neenzimskih reakcija koje su od presudnog značaja za funkcionisanje ćelije, pri čemu prelazi u svoju oksidovanu GSSG formu. Enzim GR je zaslužan za održavanje pula GSH uglavnom u redukovanom stanju, tako da ima značajnu ulogu u regulaciji redoks homeostaze u ćeliji (Dickinson i Forman, 2002).

### 1.2.1.5. Enzim faze II biotransformacije glutation-S-transferaza (GST)

Glutation-S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18) je važan deo detoksifikacionog sistema ćelije i pripada enzimima faze II biotransformacije. GST predstavlja multigensku familiju proteina koji su uključeni u procese detoksifikacije velikog broja različitih jedinjenja i učestvuje u zaštiti ćelije od oksidacionih oštećenja. Ovaj enzim je prisutan u gotovo svim živim sistemima. Detektovan je u prokariotskim ćelijama i u citoplazmi, mitohondrijama i mikrozmomima eukariotskih ćelija. Većina GST izoenzima su solubilni proteini, dok su u manjoj meri zastupljene forme koje su vezane za različite membrane u ćeliji (Hayes i Pulford, 1995; Hayes i sar., 2005). Najznačajnija reakcija enzima GST je konjugacija GSH sa različitim elektrofilnim supstratima (R-X), pri čemu se smanjuje njihova potencijalna reaktivnost sa ćelijskim makromolekulima:



Enzimi GST familije su homodimeri ili heterodimeri, a molekulska masa svake subjedinice iznosi oko 23-28 kDa (Slika 5). Međutim, u mikrozmomima glodara i nekih drugih vrsta sisara pronađene su i trimerne forme enzima, molekulske mase od oko 17 kDa po subjedinici (Konishi i sar., 2005; Hayes i sar., 2005).

Svaka subjedinica enzima GST poseduje dva funkcionalna regiona u aktivnom centru, hidrofilni G-region koji vezuje GSH i hidrofobni H-region koji vezuje strukturno različite elektrofilne supstrate. G-region enzima ima visoku evolutivnu očuvanost, dok se H-region razlikuje kod različitih izoformi u zavisnosti od supstrata koje vezuje. Nakon vezivanja GSH i elektrofilnog supstrata u aktivnom centru proteina, aktivira se sulfhidrilna grupa GSH, što omogućava nukleofilni "napad" na atom ugljenika, azota ili sumpora elektrofilnog jedinjenja. Formacija tioetarske veze između GSH i elektrofila, odnosno nastanak GSH konjugata rezultuje u manjoj reaktivnosti i većoj rastvorljivosti supstrata u vodi, tako da je ova reakcija uglavnom detoksifikacione prirode. Međutim, kod jedinjenja kao što su halogeni alkeni i alkani, GSH konjugati su najčešće nestabilni i mogu da formiraju različite izrazito reaktivne intermedijarne strukture (Eaton i Bammler, 1999).

Osim detoksifikacije različitih egzogenih jedinjenja, konjugacione reakcije sa GSH su ključne i za metabolizam endogenih reaktivnih međuprodukata. Svojom aktivnošću GST može da detoksifikuje štetne produkte lipidne peroksidacije kao što je HNE, tako da ovaj enzim ima važnu fiziološku ulogu u zaštiti ćelije od oksidacionog stresa koji je indukovano endogenim lipidnim peroksidima. GST takođe uklanja i jedinjenja koja nastaju oksidacionom degradacijom DNK. Nakon formiranja, GSH konjugati se acetiluju do odgovarajuće merkapturane kiseline, koja se zatim oslobađa u cirkulaciju, žuč ili urin ili podleže daljem metabolizmu (Wang i Ballatori, 1998).



Slika 5. Struktura GST

([www.jcsg.org](http://www.jcsg.org)).

Konjugacione reakcije koje se odvijaju pod katalitičkim dejstvom GST nisu karakteristične samo za procese detoksifikacije, već imaju važnu ulogu i u anaboličkim procesima. Ovaj enzim ima značajnu ulogu u sintezi specifičnih medijatora, kao što su prostaglandini i leukotrieni (Hayes i sar., 2005).

Osim sposobnosti da katalizuje formaciju tioetarske veze između GSH i elektrofilnog jedinjenja, detektovane su i druge katalitičke aktivnosti enzima GST. Pojedine izoforme enzima pokazuju GSH-Px aktivnost i katalizuju redukciju organskih hidroperoksida do odgovarajućih alkohola. Takođe, poznata je i izomerazna aktivnost, npr. tokom degradacije tirozina u jetri sisara. Pored katalitičkih aktivnosti, GST može

da nekatalitički kovalentno i nekovalentno vezuje širok spektar jedinjenja. Kovalentno vezivanje sa karcinogenim metabolitima deaktivira enzim, ali onemogućava reakciju genotoksičnog elektrofila sa molekulom DNK. Biološki značaj nekovalentnog vezivanja neutralnih i anjonskih lipofilnih jedinjenja (steroidi, hormoni, masne kiseline, žučne kiseline, hem) uključuje izolaciju, transport i olakšanu eliminaciju ovih struktura iz ćelije i organizma (Hayes i Pulford, 1995).

Do sada je identifikovano 15 klasa GST izoenzima: alfa, kapa, mu, pi, omega, sigma, teta i zeta koje su pronađene kod sisara, dok su beta, delta, epsilon, lambda, fi, tau i ro detektovane kod različitih nesisarskih vrsta (bakterije, gljive, biljke, mekušci, zglavkari, ribe, vodozemci, ptice). Klasifikacija je izvršena u zavisnosti od supstratne specifičnosti, hemijskog afiniteta, strukture, aminokiselinske sekvence i kinetičkih osobina enzima (Hayes i Pulford, 1995; Konishi i sar., 2005).

Regulacija GST zavisi od složenog kompleksa endogenih i egzogenih parametara, kao što su starost, pol, tip tkiva, uticaj različitih ksenobiotika, kao i oksidacioni stres. Regulacija ekspresije GST razlikuje se među tkivima, pri čemu se ne ekprimiraju sve izoforme u svakom tkivu. Kod sisara, alfa GST ima visok nivo ekspresije u jetri, bubrezima i testisima, ali ne i u plućima, dok je za pi GST karakterističan visok nivo u mozgu i plućima, ali ne i u jetri (Eaton i Bammler, 1999). Svaka GST klasa kod sisara kodirana je sa tri do osam gena. Humani geni za klasu alfa lokalizovani su na hromozomu 6, za klasu mu na hromozomu 1, za klasu pi na hromozomu 11, a za klasu teta na hromozomu 22. Izuzetak je mikrozomalna GST koja je kodirana jednim genom koji se nalazi na hromozomu 12 (Hayes i Pulford, 1995).

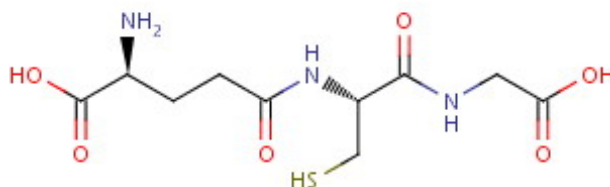
### **1.2.2. Neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja**

U neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja ubrajaju se različita hidrosolubilna i liposolubilna jedinjenja. Najviše proučavane hidrosolubilne neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja su glutation (GSH), L-askorbinska kiselina (vitamin C), mokraćna kiselina, albumin, transferin, bilirubin, poliamini, a liposolubilne retinol (vitamin A),  $\beta$ -karoten (provitamin A),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) i ubihinon (koenzim Q).

### 1.2.2.1. Glutation (GSH)

Glutation (GSH) predstavlja najzastupljeniji neproteinski, odnosno niskomolekulski tiol u ćelijama. Široko je rasprostranjen u životinjama, biljkama i mikroorganizmima i kao hidrofilno jedinjenje nalazi se u ćelijskom citosolu i drugim vodenim fazama živih sistema (Parris i Kidd, 1997). GSH ima nekoliko značajnih uloga u ćeliji: učestvuje u antioksidacionoj odbrani i detoksifikaciji različitih ksenobiotika, ima ulogu u održavanju proteinske strukture i funkcije, regulaciji sinteze i degradacije proteina, metabolizmu leukotriena i prostaglandina, redukciji ribonukleotida do dezoksiribonukleotida, regulaciji ćelijskog ciklusa i genskoj ekspresiji (Dickinson i Forman, 2002).

U većini ćelija GSH se nalazi u milimolarnoj koncentraciji, u citosolu je prisutan u koncentraciji od 1-11 mM, u jedru 3-15 mM, a u mitohondrijama od oko 5-11 mM (Valko i sar., 2007). Ekstracelularni nivo GSH je nizak i njegova koncentracija iznosi nekoliko mikromola (Schafer i Buettner, 2001).

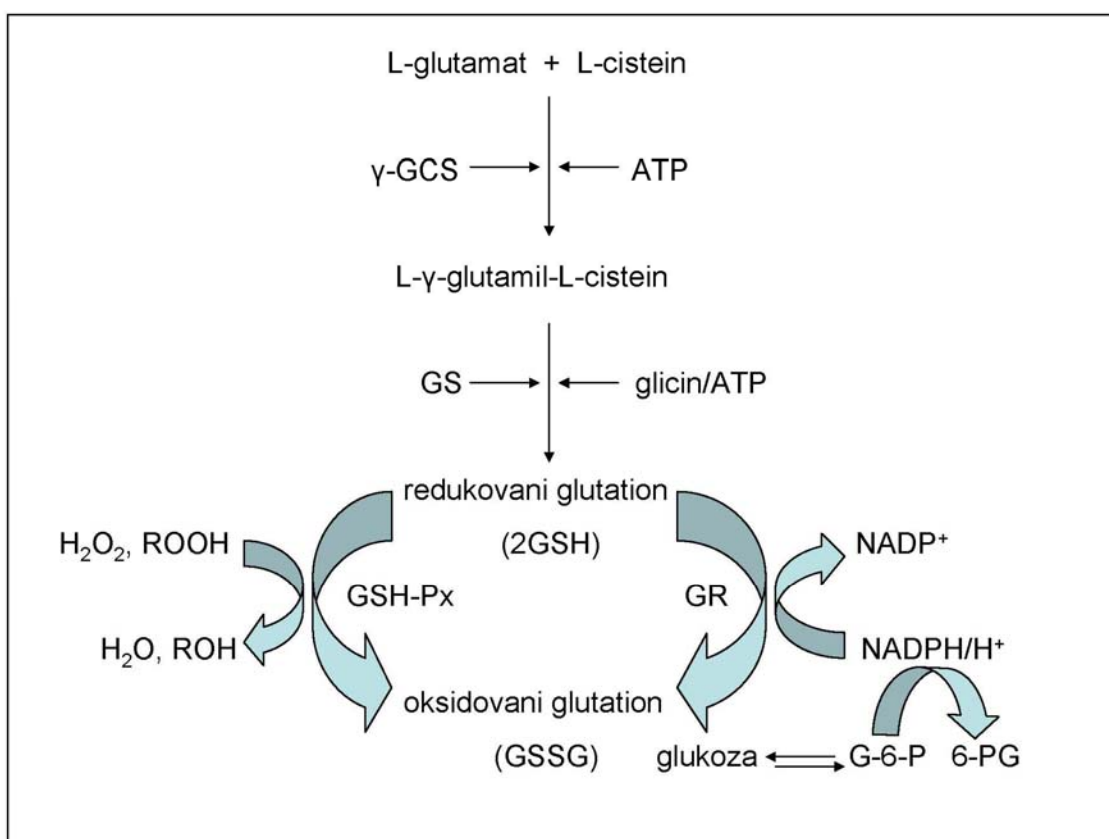


Slika 6. Struktura GSH

([www.bmrb.wisc.edu](http://www.bmrb.wisc.edu)).

Glutation (Slika 6) je tripeptid (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicin) i postoji u dve forme, redukovanoj tiolnoj GSH formi i oksidovanoj disulfidnoj GSSG formi (Parris i Kidd, 1997). Ključni funkcionalni element molekula GSH je aminokiselina cistein, koja poseduje reaktivnu sulfhidrilnu (SH) grupu i odgovorna je za mnoge funkcije GSH. Pri normalnim fiziološkim uslovima, više od 98% intracelularnog GSH je u redukovanom stanju, dok je ostatak prisutan u ćeliji u vidu disulfidne forme GSSG, mešanih disulfida (uglavnom GSS-protein) i tioestara (Wang i Ballatori, 1998). GSSG u normalnim

okolnostima čini manje od 1% ukupnog GSH i u zdravim ćelijama retko dostiže više od 10%. Do povećanja koncentracije GSSG dolazi u stanju oksidacionog stresa (Brigelius-Flohe, 1999). Odnos GSH i GSSG odražava redoks status ćelije od kojeg zavisi smer mnogih ćelijskih reakcija (Buonocore i sar., 2010). Ravnoteža GSH i GSSG u ćeliji reguliše određene metaboličke puteve preko aktivacije ili inaktivacije važnih enzima koji poseduju funkcionalne SH grupe. Tako GSH koji je prisutan u jedru održava redoks status SH grupa proteina koji su neophodni za DNK reparaciju i ekspresiju (Valko i sar., 2007).



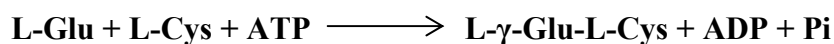
Shema 6. GSH redoks ciklus  
(modifikovano, respiratory-research.com).

Unutarćelijski sadržaj GSH zavisi od balansa između njegovog korišćenja i sinteze. GSH je redukujući ekvivalent u redukciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i lipidnih hidroperoksida pod dejstvom antioksidacionog enzima GSH-Px i konjugujući je molekul u reakciji sa enzimom faze II biotransformacije GST koja olakšava ekskreciju ksenobiotika. Obe ove

reakcije dovode do produkcije oksidovane forme glutationa GSSG. Enzim GR konvertuje GSSG u GSH uz prisustvo redukovanog NADPH koji se obezbeđuje iz glukozomonofosfatnog ciklusa. Glukozo-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH) proizvodi NADPH, molekul koji je esencijalan za funkcionisanje mnogih antioksidacionih enzima (Halliwell i Gutteridge, 1999; Almroth, 2008). Na Shemi 6 prikazane su reakcije glutation redoks ciklusa.

Pored aktivnosti enzima GR, koncentracija GSH u ćeliji regulisana je i *de novo* sintezom, koja se odigrava u citosolu svih ćelija, dok je jetra glavno mesto biosinteze ovog jedinjenja (Wang i Ballatori, 1998). GSH se sintetise iz aminokiselina koje ga čine (L-glutamat, L-cistein i glicin) i to aktivnošću dva ATP zavisna enzima:  $\gamma$ -glutamilcistein-sintetaze ( $\gamma$ -GCS) i glutation sintetaze (GS), (Griffith, 1999).

Enzim  $\gamma$ -GCS je heterodimer sastavljen iz katalitički aktivne teške subjedinice, koja sadrži sva vezujuća mesta za supstrate i lake subjedinice, koja modulira afinitet teške subjedinice za supstrate i inhibitore. Hemijski mehanizam ovog enzima uključuje dva koraka: prvo reaguju L-glutamat i ATP do intermedijarne forme  $\gamma$ -glutamilfosfata, koji zatim reaguje sa L-cisteinom do finalnog produkta L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteina:



Enzim GS je homodimer, a hemijski mehanizam takođe uključuje dva koraka, prvo reaguju L- $\gamma$ -glutamil-L-cistein i ATP do intermedijarne forme L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilfosfata, koji zatim reaguje sa glicinom do forme GSH:



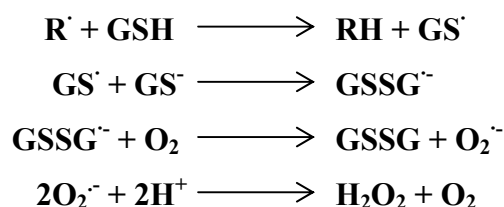
*De novo* sinteza GSH regulisana je nivoom  $\gamma$ -GCS koja je prisutna u ćeliji, dostupnošću supstrata i povratnom spregom GSH na  $\gamma$ -GCS. Intracelularni nivoi aminokiselina variraju s obzirom na vrstu organizma i tkivo, ali nivo L-cisteina je konstantno niži u odnosu na nivoe L-glutamata i glicina, tako da je dostupnost L-cisteina osnovni limitirajući faktor za GSH sintezu (Griffith, 1999). Sinteza GSH zahteva ATP, tako da i ovaj supstrat može da bude limitirajući faktor. Nedostatak

glukoze povezan je sa niskim nivoom GSH, jer ATP može ograničiti sintezu GSH kada je narušen energetska metabolizam ćelije (Papadopoulos i sar., 1997).

Iako se GSH sintetise u ćeliji, njegova biodegradacija se odigrava van ćelije. GSH poseduje specifičnu  $\gamma$ -karboksilnu peptidnu vezu između glutamata i cisteina (uobičajena je  $\alpha$ -karboksilna veza), koju može da raskine samo  $\gamma$ -glutamyltranspeptidaza, koja se nalazi na spoljašnjoj površini membrane određenih ćelijskih tipova i to uglavnom na apikalnoj površini epitelijalnih tkiva. Vezu između cisteina i glicina raskidaju dipeptidaze, koje se takođe nalaze na spoljašnjoj površini ćelijskih membrana. Produkti razgradnje, aminokiseline glutamat, glicin i cistein, mogu da se reapsorbuju u ćeliju za ponovnu sintezu glutathiona. GSH konjugate metabolizuju isti degradativni enzimi koji metabolizuju GSH. Glutamat i glicin se reapsorbuju u ćeliju, a cistein S-konjugati se intracelularno acetiluju do odgovarajuće merkapturane kiseline, a zatim se ekskretuju iz organizma ili podležu daljem metabolizmu (Wang i Ballatori, 1998).

GSH u antioksidacionoj zaštiti funkcioniše na više nivoa. Pored toga što je kofaktor pojedinih antioksidacionih enzima, GSH direktno uklanja slobodne radikalske vrste  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  i  $ONOO^-$ , kao i lipidne radikale i hidroperokside, regeneriše važne neenzimske antioksidante (askorbinska kiselina,  $\alpha$ -tokoferol) do njihovih aktivnih formi, uključen je u direktnu popravku oksidacionih oštećenja molekula DNK i sprečava apoptozu izazvanu ROS i citokinima (Kruidenier i Verspaget, 2002).

GSH može da učestvuje u antioksidacionoj zaštiti u neenzimskim reakcijama, zahvaljujući sposobnosti da reaguje sa organskim radikalima ( $R^{\cdot}$ ) i tako zajedno sa enzimom SOD funkcioniše u prevenciji oksidacionih oštećenja:



GSH takođe može neenzimski da formira metalne komplekse. GSH je jedan od značajnih liganada koji vezuju metale, tako da ima važnu ulogu u transportu, deponovanju i metabolizmu metala. GSH funkcioniše u mobilizaciji i transportu metala



između liganada, kao i kroz ćelijske membrane, izvor je cisteina za vezivanje metala i služi kao reduktant ili kofaktor u redoks reakcijama koje uključuju metale. Sulfhidrilna grupa cisteina u molekulu GSH ima visok afinitet za metale i formira merkaptide sa nekoliko endogenih metala, kao što su živa, kadmijum, bakar, selen, hrom, olovo i cink.

Jedna od važnih uloga GSH je skladištenje i transport cisteina. Aminokiselina cistein brzo autooksiduje u cistin i tako dolazi do proizvodnje toksičnih radikala kiseonika. Da bi se sprečila toksičnost ove autooksidacione reakcije, većina neproteinskog cisteina se nalazi u formi GSH (Wang i Ballatori, 1998).

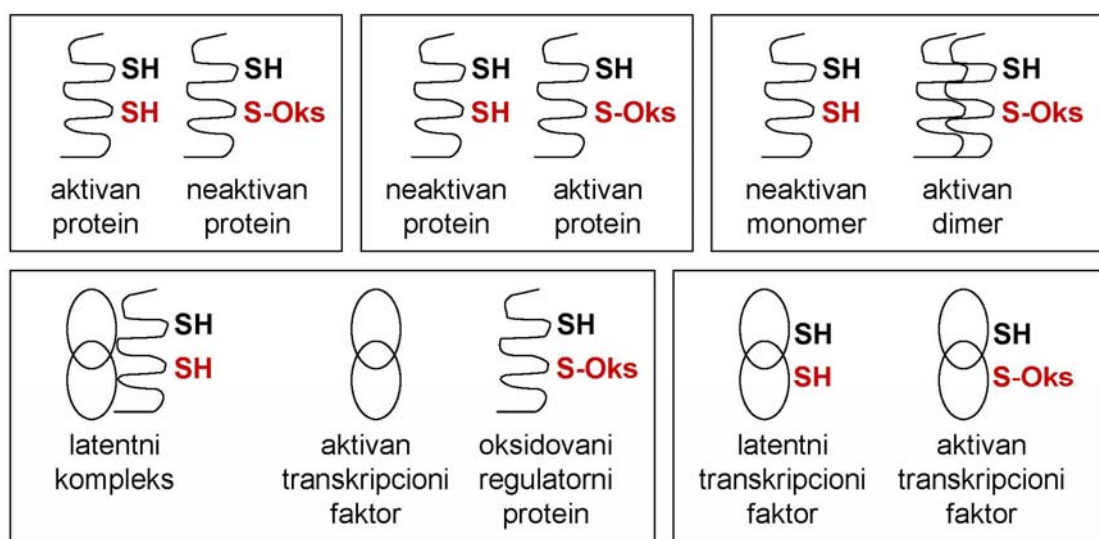
### **1.2.2.2. Sulfhidrilne (SH) grupe**

Svako organsko jedinjenje koje sadrži sulfhidrilnu (SH) grupu vezanu za ugljenik naziva se tiol (R-SH). Funkcionalna SH grupa aminokiseline cistein ima najvažniju ulogu u živim sistemima. Osim najzastupljenijeg niskomolekulskog tiola u ćeliji GSH, veliki broj proteina sadrži aminokiselinu cistein koja zbog postojanja funkcionalne SH grupe može da bude modifikovana kroz različite redoks reakcije. Određena reverzibilna modifikacija cisteina pod biološkim uslovima dovodi do jedinstvenog funkcionalnog odgovora proteina (Shema 7). Promena konformacije proteina može da dovede do promene enzimske aktivnosti i aktivnosti transportera, da utiče na vezivanje liganada za receptore, a može da izazove i protein-protein interakcije, protein-DNA interakcije i dovede do degradacije proteina. Kako većina proteina sadrži najmanje jednu ovakvu aminokiselinu podložnu reverzibilnoj oksidaciji, možemo reći da svi aspekti života zavise od redoks reakcija. SH grupe proteina su molekularni okidači sposobni da obrade redoks signal u jedinstven funkcionalni odgovor (Kemp i sar., 2008).

Redoks modifikacija SH grupa proteina obuhvata različite reakcije, kao što su nitrozilacija (S-NO), hidroksilacija (S-OH), glutationilacija (S-SG) i formiranje proteinskih disulfida (S-S). Nitrozilacija SH grupa igra važnu ulogu u procesu prenosa signala sa površine ćelije u intracelularne kompartmente, kao što su jedro i mitohondrije. Hidroksilacija proteina može da dovede do dalje oksidacije u štetne sulfinske (SO<sub>2</sub>H) i sulfonske (SO<sub>3</sub>H) kiseline. Glutathionilacija predstavlja zaštitni mehanizam koji učestvuje u prevenciji formiranja ovih kiselina, ali ima i regulatornu

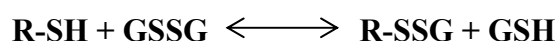
funkciju u aktivnosti proteina. Intraproteinski disulfidni mostovi imaju važnu ulogu u određivanju tercijarne strukture proteina, a samim tim i njegove funkcije (Janssen-Heininger i sar., 2008).

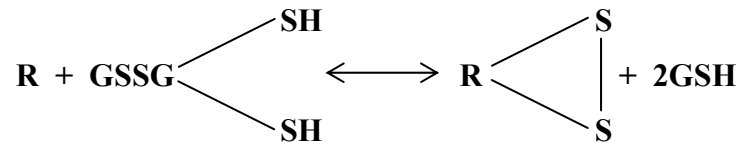
Mnogi proteini su aktivni kada su SH grupe koje su ključne za njihovo funkcionisanje u redukovanoj, tiolnoj formi, dok je za druge potrebno da budu u oksidovanoj, disulfidnoj formi. Tiol-disulfidne promene su bidirekcione, tako da je njihova ravnoteža određena ćelijskim redoks statusom (Schafer i Buettner, 2001).



Shema 7. Primeri mehanizama redoks regulacije preko oksidacije SH grupa (modifikovano, Janssen-Heininger i sar., 2008).

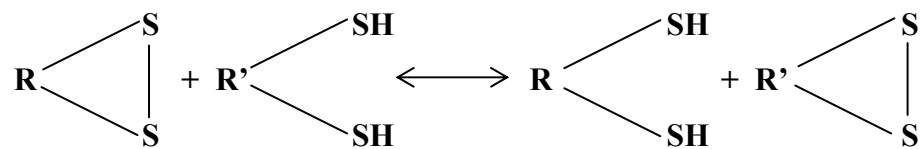
GSH/GSSG redoks par čini veliki pul redukujućih ekvivalenata u ćeliji, pa se redoks stanje ovog para koristi kao indikator redoks okruženja ćelije. GSSG reaguje sa proteinima (R-SH) pri čemu nastaju protein-glutation mešani disulfidi (glutationilovani proteini, R-SSG), a u slučaju reakcije sa dve SH grupe proteina nastaju disulfidni mostovi. Obe reakcije su reverzibilne (Dickinson i Forman, 2002):





Nivo protein-glutation mešanih disulfida u ćeliji iznosi oko 1%, ali u slučaju oksidacionog stresa, taj nivo se povećava. Smisao glutathionilacije je zaštita cisteinskih rezidua od dalje oksidacije proteina. Proteinska glutathionilacija može da utiče i na enzimsku aktivnost, što ukazuje na dodatnu regulatornu ulogu ovog procesa (Netto i sar., 2007).

Pored GSH, u regulaciju metabolizma SH grupa u ćeliji uključeni su i tiolni proteini koji funkcionišu kao ditiol/disulfid oksido-reduktaze. Regulatorni enzimi koji imaju važnu ulogu u redoks kontroli i funkcionisanju bitnih SH grupa su tioredoksin, glutaredoksin i protein disulfid izomeraza. Tioredoksin i glutaredoksin imaju ditiol/disulfid grupu u aktivnom centru, funkcionišu kao disulfid reduktaze i katalizuju redukciju disulfidnih mostova ciljnih proteina kroz reakciju ditiol/disulfid razmene:



Tioredoksin i glutaredoksin redukuju niz različitih proteina u ćeliji, pri čemu glutaredoksin može da katalizuje i redukciju protein-glutation mešanih disulfida (deglutathionilacija proteina). Disulfidni tioredoksin se vraća u aktivnu formu preko NADPH zavisnog enzima tioredoksin reduktaze, a glutaredoksin se redukuje drugim molekulom GSH (Janssen-Heininger i sar., 2008). Dok tioredoksin i glutaredoksin redukuju SH grupe, protein disulfid izomeraza uglavnom generiše disulfidne mostove u proteinu, takođe kroz proces ditiol/disulfid razmene (Netto i sar., 2007).

Kako odgovor ćelije na stres podrazumeva promenu u koncentraciji slobodnih SH grupa, ovaj parametar određuje nivo oksidacije proteina i drugih tiola u ćeliji i predstavlja dobar biomarker oksidacionog stresa (Kovačević i sar., 2006).

### 1.3. Biomonitoring i biomarkeri

Ksenobiotik je svako jedinjenje detektovano u organizmu koje se ne produkuje tokom fizioloških procesa i za koje se ne očekuje da će da bude prisutno u tom organizmu. Jedinjenja nastala tokom metabolizma kod nekih vrsta takođe mogu da postanu ksenobiotici za druge vrste koje ih unesu u svoj organizam. Tako u slučaju prevelike brojnosti cijanobakterija u slatkovodnim ekosistemima dolazi do prekomerne produkcije i oslobađanja sekundarnih metabolita cijanotoksina koji mogu da budu veoma štetni za živi svet u vodi. Međutim, termin ksenobiotik se često koristi u užem smislu i podrazumeva supstance koje su strane za ceo živi svet, odnosno supstance koje nisu postojale u prirodi pre nego što ih je čovek sintetisao. Tu se pre svega ubrajaju jedinjenja kao što su polihlorovani bifenili (PCB), policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), polihlorovani dibenzofurani (PCDF) i dibenzo-*p*-dioksini (PCDD), kao i mnoge druge organske zagađujuće materije (Van der Oost i sar., 2003).

U cilju očuvanja životne sredine i prevencije štetnih efekata ksenobiotika na živi svet, neophodan je redovan monitoring životne sredine, koji može precizno da opiše stanje ispitivanih ekosistema u prirodi. Prema definiciji Programa za životnu sredinu Ujedinjenih nacija (United Nations Environmental Program, UNEP) **monitoring** predstavlja svako ponovljeno merenje jednog ili više hemijskih ili bioloških parametara tokom dužeg ili kraćeg vremenskog perioda u određenom prostoru, korišćenjem uporedivih i standardizovanih metoda. Hemijski i biološki monitoring predstavljaju dva glavna tipa monitoringa koji imaju za cilj procenu rizika dejstva ksenobiotika na organizme i kvalitet životne sredine u ekosistemu (De Zwart, 1995).

**Hemijski monitoring** omogućava procenu izloženosti organizama ksenobioticima merenjem nivoa određenog seta kontaminanata u životnoj sredini.

**Biološki monitoring** ili biomonitoring predstavlja sistematsko korišćenje živih organizama u cilju procene stanja životne sredine i obuhvata četiri tipa monitoringa:

- Bioakumulacioni monitoring - omogućava procenu izloženosti organizama ksenobioticima merenjem nivoa kontaminanta u živim sistemima ili određivanjem kritične doze na ciljnom mestu (bioakumulacija).

- Monitoring biološkog efekta - omogućava procenu izloženosti ili efekta ksenobiotika određivanjem ranih negativnih promena u organizmu koje su delimično ili u potpunosti reverzibilne (biomarkeri).
- Zdravstveni monitoring - omogućava procenu efekta ksenobiotika ispitivanjem nastanka ireverzibilnih bolesti ili oštećenja tkiva.
- Ekosistemski monitoring - omogućava procenu integriteta ekosistema putem različitih popisa (sastav vrsta, gustina, diverzitet).

Hemijski monitoring pruža informacije koje pomažu u karakterizaciji izloženosti, dok se biološki monitoring koristi u predviđanju ekoloških uticaja ksenobiotika. Upotreba metoda biološkog monitoringa u strategijama kontrole hemijskog zagađenja ima nekoliko prednosti u odnosu na hemijski monitoring i omogućava dobijanje informacija koje se ne mogu dobiti merenjem nivoa hemijskih struktura u životnoj sredini (De Zwart, 1995). Prvo, metode biomonitoringa mere efekte u kojima je biodostupnost ispitivanih jedinjenja povezana sa njihovom koncentracijom u organizmu i toksičnošću. Drugo, većina bioloških merenja formiraju jedini način integrisanja efekata na velikom broju jedinki. Ipak, mana biološkog monitoringa je teško povezivanje zapaženih efekata sa specifičnim aspektima zagađenja. Zbog toga, najpouzdanije informacije pruža **integrativni monitoring**, odnosno studija koja se sastoji od koordinisanog monitoringa koji obuhvata i hemijska i biološka merenja u različitim delovima životne sredine (Van der Oost i sar., 2003).

S obzirom na hijerarhiju u organizaciji živog sveta, postoji više nivoa u metodologiji koja se primenjuje u biološkom monitoringu. Van Gestel i Van Brummelen (1996) definisali su četiri različita nivoa biomonitoringa:

- Suborganizmalni nivo - podrazumeva proučavanje biohemijskih i fizioloških procesa uz korišćenje biomarkera. Zasniva se na principu da odstupanja od zdravog, normalnog, stanja mogu biti merena korišćenjem biohemijskih tehnika.
- Organizmalni nivo - podrazumeva korišćenje bioanaliza. Preživljavanje, rast i reprodukcija jedinki izabrani su kao krajnja tačka klasičnih laboratorijskih ekotoksikoloških testova.

- Populacioni nivo - uključuje korišćenje bioindikatora. Na ovom nivou efekti se manifestuju kao promene u genetičkoj strukturi, starosnoj strukturi ili gustini populacije.
- Ekosistemski nivo - prati ekološke indikatore i zasniva se na principu da promene u sastavu, gustini i diverzitetu vrsta mogu da ukažu na efekte zagađenja u biocenozi.

**Bioindikator** se definiše kao organizam koji svojim prisustvom ili odsustvom ili ponašanjem pruža informacije o uslovima u životnoj sredini koju nastanjuje, a **ekološki indikator** je ekosistemski parametar koji opisuje strukturu i funkcionisanje ekosistema. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (World Health Organization, WHO, 1993) **biomarker** podrazumeva svako merenje koje oslikava interakciju između biološkog sistema i potencijalne hemijske, fizičke ili biološke opasnosti. Prema Peakall-u (1994) biomarker se definiše kao promena u biološkom odgovoru (od molekularnog, preko ćelijskog i fiziološkog odgovora, pa do promena u ponašanju), koja može biti povezana sa izloženošću kontaminantima u životnoj sredini ili nastalim toksičnim efektima usled prisustva tih kontaminanata. Van Gestel i Van Brummelen (1996) redefinisali su termine biomarker, bioindikator i ekološki indikator, povezujući ih sa različitim nivoima biološke organizacije. Prema njima, pod pojmom biomarker podrazumeva se svaki biološki odgovor na jedinjenja iz životne sredine na subindividualnom nivou, meren unutar organizma ili u njegovim produktima metabolizma (urin, feces, krzno), koji ukazuje na odstupanje od normalnog stanja i koji se ne može detektovati u intaktnom organizmu. Biomarkeri se mogu podeliti u tri grupe (WHO, 1993):

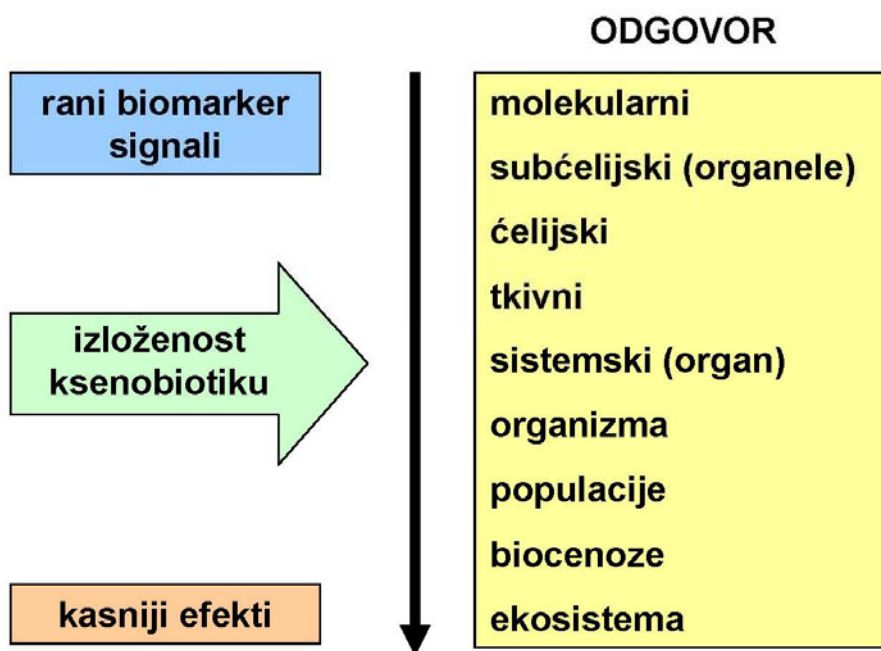
- **Biomarkeri izloženosti** podrazumevaju detektovanje i merenje egzogenih supstanci ili njihovih metabolita ili produkata interakcije između ksenobiotika i ciljnog molekula ili ćelije, koji se mere unutar organizma. Biomarkeri izloženosti mogu da se koriste za potvrdu ili procenu izloženosti jedinke ili populacije određenoj supstanci, obezbeđujući vezu između spoljašnje izloženosti i unutrašnjeg merenja. Bioakumulacija određenih kontaminanata u životinjskim tkivima spada u biomarkere izloženosti.

- **Bimarkeri efekta** uključuju merljive biohemijske, fiziološke ili druge promene u tkivima ili telesnim tečnostima organizma, koje mogu biti povezane sa utvrđenim ili mogućim pogoršanjem zdravlja ili bolešću. Biomarkeri efekta imaju upotrebu u potvrđivanju prekliničkih promena ili različitih efekta na zdravlje na osnovu izloženosti i apsorpcije hemikalija.
- **Biomarkeri osetljivosti** ukazuju na nasleđenu ili stečenu sposobnost organizma da odgovori na izloženost specifičnim ksenobioticima, uključujući genetičke faktore i promene u receptorima, koji menjaju osetljivost organizma na tu izloženost. Biomarkeri osetljivosti pomažu u rasvetljavanju variranja stepena odgovora na izloženost toksikantu kod različitih jedinki.

Za razliku od hemijskog monitoringa koji kvantifikuje nivo toksikanata u životnoj sredini, biomarkeri daju informacije o biološkom efektu tih toksikanata. Stres u organizmu koji nastaje usled prisustva ksenobiotika je okidač za kaskadu bioloških odgovora, od kojih svaki teorijski može da bude bioindikator (McCarthy i sar., 1991). Promene u biomarkerima pružaju rani upozoravajući signal i mogu se manifestovati na svim nivoima biološke organizacije. Za uspešno korišćenje nekog biomarkera, neophodno je utvrditi izvesne informacije, odnosno ispuniti sledeće kriterijume (Stegeman i sar., 1992):

- Kvantifikacija biomarkera mora biti pouzdana, relativno jeftina i laka za izvođenje.
- Odgovor biomarkera na prisustvo toksikanta mora biti osetljiv, sa ciljem da služi kao rani upozoravajući signal.
- Osnovni podaci o biomarkeru moraju da budu dobro definisani sa ciljem da se razdvoje prirodna varijabilnost (šum) i stres indukovano kontaminantom (signal).
- Uticaj različitih faktora spoljašnje sredine koji mogu dodatno da utiču na odgovor biomarkera mora da bude utvrđen.
- Mehanizam koji objašnjava vezu između odgovora biomarkera i izloženosti organizma toksikantu mora da bude utvrđen.
- Toksikološki značaj biomarkera, odnosno veza između odgovora biomarkera i dugotrajne izloženosti organizma takođe mora biti utvrđena.

Negativne efekte na nivou populacije često je teško detektovati kod organizama iz prirode, jer mnogi od ovih efekata imaju tendenciju da se manifestuju tek nakon dužeg vremenskog perioda. Kada efekti postanu uočljivi, destruktivni procesi mogu da pređu tačku reverzibilnosti. Međutim, promene u biomarkerima predstavljaju rane upozoravajuće signale, koji oslikavaju različite biološke odgovore na toksikante iz životne sredine. Prema tome, efekti na višim nivoima organizacije živih sistema mogu da se predvide ranim promenama u biološkim procesima, odnosno promenama u biomarkerima (Shema 8), (Bayne i sar., 1985). U kontekstu životne sredine, biomarkeri su osetljivi indikatori koji ukazuju na to da su toksikanti ušli u organizam, distribuirali se u tkivima i da pokazuju toksične efekte na kritičnim ciljnim strukturama (McCarthy i sar., 1991).



Shema 8. Redosled odgovora na izloženost ksenobiotiku u biološkim sistemima (modifikovano, Bayne i sar., 1985).

Prilikom korišćenja biomarkera bitno je uzeti u obzir vezu između odgovora biomarkera i karakteristika životnog ciklusa (starost, pol, zdravlje, nutritivni status organizma), zatim podatke o dozi, trajanju i načinu izloženosti organizma kontaminantu, kao i moguće prisustvo drugih štetnih jedinjenja (Stegeman i sar., 1992).



Takođe, odgovor koji je utvrđen za jednu vrstu ne mora biti istovetan i za druge vrste. Dalje, treba naglasiti da se ekotoksikološki podaci dobijeni u laboratorijskim studijama ne mogu uvek upotrebiti u predviđanju efekta toksikanata na organizme u prirodi. Studije na biomarkerima u laboratoriji uvek moraju da budu praćene terenskim istraživanjima. Za razliku od laboratorijskih ispitivanja, biomarkeri u uzorcima iz prirode pružaju podatke o zbirnom uticaju svih faktora koji egzistiraju u životnoj sredini (Van der Oost i sar., 2003).

### **1.3.1. Biomarkeri kod riba**

U studijama procene biološkog i biohemijskog odgovora na kontaminante prisutne u vodenoj životnoj sredini, ribe imaju poseban značaj. Korišćenje riba u biomonitoring studijama ima niz prednosti u odnosu na korišćenje drugih organizama. Pre svega, ova grupa organizama prisutna je u gotovo svim vodenim životnim sredinama i ima ključnu ekološku ulogu u lancima ishrane zbog svog položaja između nižih i viših trofičkih nivoa. Ribe je lako sakupiti i identifikovati, a informacije o životnom ciklusu i distribuciji poznate su za većinu vrsta. U pozitivne biološke karakteristike ubrajaju se i veličina tela, dug životni ciklus i lako odgajanje. Uprkos ograničenjima, kao što su visok nivo mobilnosti, ribe su najpogodniji organizmi za procenu zagađenja u vodenim sredinama. Najveći značaj u biomonitoringu vodenih ekosistema imaju sledeći biomarkeri kod riba:

- Biotransformacioni enzimi
- Parametri oksidacionog stresa
- Biotransformacioni produkti
- Proteini stresa, metalotioneini i proteini multiksenobiotske rezistencije
- Hematološki parametri
- Imunološki parametri
- Reproductivni i endokrinološki parametri
- Neuromuskulturni parametri
- Genotoksikološki parametri
- Fiziološki i morfološki parametri

Biomarkeri kod riba koji su najviše istraživani su enzimi uključeni u detoksifikaciju ksenobiotika i njihovih metabolita (biotransformacioni enzimi) i parametri oksidacionog stresa (antioksidacioni enzimi). Osim biohemijskih parametara poseban značaj imaju i fiziološki i morfološki parametri (Van der Oost i sar., 2003).

### 1.3.1.1. Biotransformacioni enzimi

Postoje dva načina eliminisanja različitih egzogenih i endogenih supstanci iz organizma, a to su ekskrecija jedinjenja u obliku u kom su uneti u organizam ili biotransformacija tih jedinjenja u organizmu. **Biotransformacija** je enzimski katalizovana konverzija ksenobiotskih jedinjenja u rastvorljiviju formu, koja može lakše da se ekskretuje iz organizma u odnosu na izvorni oblik ksenobiotika (Lech i Vodcink, 1985). Biotransformacija može promeniti toksičnost jedinjenja u pozitivnom ili negativnom smeru. U slučaju detoksifikacionih reakcija, toksičnost jedinjenja se smanjuje, dok se ekskrecija povećava, a u slučaju bioaktivacije, jedinjenje se transformiše u reaktivni metabolit koji je toksičniji od izvornog jedinjenja. Toksični efekti ksenobiotika mogu da se manifestuju kada se određeno strano jedinjenje ili njegov metabolit vežu za ćelijske makromolekule, što može da dovede do oštećenja membrana i genotoksičnih efekata (Van der Oost i sar., 2003).

Promene u nivou i aktivnosti biotransformacionih enzima predstavljaju najosetljivije biomarkere efekta. Kod riba, aktivnost ovih enzima može da bude indukovana ili inhibirana tokom izloženosti različitim ksenobioticima (Bucheli i Fent, 1995). Proces biotransformacije različitih jedinjenja odvija se u tri faze: faza I biotransformacije podrazumeva nesintetičke promene jedinjenja, koja se zatim mogu konjugovati u fazi II i katabolizovati u fazi III biotransformacije. Biotransformacioni enzimi imaju važnu ulogu u detoksifikaciji i uklanjanju velikog broja ksenobiotika, a samim tim i u održavanju homeostaze ćelije i organizma (Commandeur i sar., 1995).

**Faza I biotransformacije** uključuje reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize velikog broja ksenobiotika, koje su katalizovane mikrozomalnim monooksigenazama (citohrom P450, citohrom *b5* i NADPH citohrom P450 reduktaza). Citohrom P450 predstavlja veliku familiju membranski vezanih hem proteina koji su uglavnom lokalizovani u endoplazmatičnom retikulumu jetre, a u manjoj meri su detektovani u

različitim drugim organelama i tkivima riba. Najpoznatiji izoenzim iz ove grupe je citohrom P450 1A (CYP1A). Reakcije citohroma P450 mogu biti grupisane prema tipu supstrata i podeljene su u reakcije sinteze i degradacije endogenih supstrata i reakcije metabolizma ksenobiotika (Stegeman i sar., 1992). Reakcioni ciklus uključuje nekoliko koraka. U prvom koraku, supstrat se vezuje za prostetičku hem grupu enzima, zatim se gvožđe hema redukuje elektronskim transferom sa NADPH citohrom P450 reduktaze. Na ovoj tački reakcija može da se nastavi ili prekine rezultujući u oslobađanju  $O_2^-$ . Sledeći korak uključuje dodavanje drugog elektrona, najčešće preko citohroma *b5* i formiranje peroksida. Zatim dolazi do raskidanje O-O veze, formiranja radikala supstrata, hidroksilacije radikala i oslobađanja produkta (Bucheli i Fent, 1995).

**Faza II biotransformacije** uključuje konjugaciju ksenobiotika ili njegovog metabolita sa endogenim ligandom. Konjugacije su adicione reakcije u kojima se velike polarne grupe ili jedinjenja (šećeri i aminokiseline) adiraju na ksenobiotik i tako olakšavaju njegovu ekskreciju. Neka ksenobiotička jedinjenja poseduju neophodne funkcionalne grupe, kao što su -COOH, -OH ili -NH<sub>2</sub> koje omogućavaju direktan metabolizam enzimima faze II biotransformacije, dok se druga jedinjenja prvo metabolizuju dejstvom enzima faze I. Najbolje proučeni enzimi faze II biotransformacije kod riba su glutation-S-transferaza (GST) i UDP-glukuronil transferaza (UDPGT). GST je multigenska familija enzima koja katalizuje reakciju konjugacije tripeptida GSH i različitih elektrofilnih supstrata. Mikrozomalna UDPGT predstavlja multigensku familiju enzima koja katalizuje transfer 5'-difosfoglukuronske kiseline (UDPGA) na širok spektar nukleofilnih supstrata, pri čemu se formiraju O-, N-, S- i C-glukuronidi (Lech i Vodnick, 1985).

**Faza III biotransformacije** uključuje različite enzime (peptidaze, hidrolaze i  $\beta$ -liaze), koje katalizuju katabolizam konjugovanih metabolita do produkata koji mogu biti lakše ekskretovani iz organizma.

### 1.3.1.2. Parametri oksidacionog stresa

Za veliki broj kontaminanata iz životne sredine pokazano je da ispoljavaju toksične efekte koji su u vezi sa oksidacionim stresom. Tokom faze I biotransformacije, dejstvom enzima NADPH citohrom P450 reduktaze, dolazi do nastanka ksenobiotičkog

radikala, koji može da preda elektron kiseoniku i tako formira  $O_2^{\cdot-}$ . Toksični efekti kiseonika podrazumevaju oštećenja nastala usled citotoksičnog dejstva ROS koji mogu da reaguju sa važnim ćelijskim makromolekulima, dovodeći do enzimske inaktivacije, lipidne peroksidacije, oštećenja DNK i na kraju ćelijske smrti. Antioksidacioni enzimi (SOD, CAT, GSH-Px, GR) koji pripadaju sistemu zaštite od oksidacionih oštećenja imaju ključnu ulogu u odbrani ćelije od ovih reaktivnih struktura (Winston i Di Giulio, 1991).

### **1.3.1.3. Fiziološki i morfološki parametri**

U odnosu na biohemijske indikatore, fiziološki i morfološki parametri predstavljaju odgovor na višem nivou organizacije, koji prati hemijske i ćelijske interakcije koje ukazuju na ireverzibilna oštećenja. U morfološke parametre ubrajaju se histopatološki biomarkeri koji su korisni indikatori zdravlja riba i oslikavaju efekte izloženosti ovih vrsta različitim ksenobiotocima. Histopatološke studije omogućavaju istraživanje lezija i različitih promena u tkivima riba koje su posledica uticaja ksenobiotoka na organizam. Akutne promene histoloških parametara detektuju se kada je nivo kontaminanta dovoljno visok, dok je dugotrajna izloženost neophodna za određivanje subletalnih promena. Dobijeni podaci o histopatološkim i ćelijskim biomarkerima imaju veliku primenu u integrisanim terenskim studijama (Hinton, 1994; Bernet i sar., 1999). Proučavanje ultrastrukturnih promena u jetri riba pomoću elektronske mikroskopije pruža dodatni doprinos u biomonitoring studijama. Pokazano je da su odgovori biomarkera koji se koriste u ovim istraživanjima korelisani sa rezultatima ispitivanja ponašanja riba i analitičkim i limnološkim studijama i da mogu da reflektuju nivo zagađenja na ispitivanoj lokaciji (Schramm i sar., 1998).

Prvi nivo otkrivanja izloženosti i efekata potencijalnog toksikanta može da se izvrši na osnovu jednostavnog merenja kondicionog stanja organizma. Takva merenja mogu da identifikuju najosetljivije članove u populaciji riba i mogu da pruže informacije o energetske rezervama i sposobnosti životinja da tolerišu prisustvo toksikanata ili drugih faktora stresa u životnoj sredini. Morfološki parametri koji se često određuju u terenskim studijama su hepatosomatski indeks (HI) i kondicioni faktor (CF) koji omogućavaju procenu opšteg stanja riba. Ovi parametri nisu mnogo osetljivi

na toksikante i zavise od uticaja drugih faktora (sezona, bolest, dostupnost hrane), ali mogu da posluže kao početni biomarkeri koji ukazuju na izloženost ili efekat (Mayer i sar., 1992). Faktori kondicionog stanja uopšteni su i nisu specifični, ali njihova jednostavnost i brzina izvođenja čine ih važnim biomarkerima. Bagenal i Tesch (1978) su predložili formulu za izračunavanje CF kod riba, koja se bazira na odnosu između težine i dužine tela: težina (g) x 100 / dužina (cm)<sup>3</sup>. Veličina ovog parametra menja se kada je dostupnost hrane ograničena ili kada je ishrana ribe narušena dejstvom različitih faktora stresa.

#### **1.4. Osnovne karakteristike cijanobakterija**

Filum Cyanobacteria obuhvata oko 150 rodova sa oko 2000 vrsta i predstavlja jednu od najproučavanijih grupa organizama. To su fotosintetički gram negativni prokarioti koji pored eukariotskih algi i biljaka imaju sposobnost da koriste svetlosnu energiju za sintezu organskih jedinjenja iz mineralnih materija i CO<sub>2</sub>, pri čemu proizvode kiseonik. Najstariji fosilni ostaci cijanobakterija datiraju iz perioda od pre 3.5 milijardi godina, što ukazuje da su ovi autotrofni organizmi imali važnu ulogu u ranoj istoriji planete postepeno oksidujući izrazito redukovanu atmosferu. Duga evolucionarna istorija ove grupe organizama razlog je njihovog naseljavanja najrazličitijih terestričnih, slatkovodnih i morskih ekosistema na planeti (Briand i sar., 2003).

U akvatičnim ekosistemima cijanobakterije imaju važnu ulogu, jer učestvuju u primarnoj produkciji. Njihova morfologija je raznolika i uključuje sferične, ovoidne i cilindrične jednoćelijske organizme, kao i višćelijske kolonijalne i filamentozne forme. Ovi prokariotski organizmi poseduju niz specifičnih ekofizioloških adaptacija koje im pružaju kompetitivnu prednost nad drugim vrstama. Zahvaljujući formiranju gasnih vakuola mogu da naseljavaju različite dubine u vodi i to u zavisnosti od lokalizacije nutrijenata i intenziteta svetlosti. Osim hlorofila a, imaju sposobnost sinteze dodatnih fotosintetičkih pigmenata (fikocijanin, fikoeritrin), što im omogućava efikasniju apsorpciju svetlosti. Neke vrste mogu da formiraju specijalizovane ćelije heterociste uz pomoć kojih mogu da vrše fiksaciju azota (dejstvom enzima nitrogenaze), kao i mirujuće ćelije - akinete koje im omogućavaju da prežive u nepovoljnim uslovima. Takođe, proizvode širok spektar sekundarnih metabolita (nisu esencijalni za

metabolizam i rast organizma) od kojih svaki ima specifičnu funkciju i doprinosi boljem opstanku ove grupe organizama (Briand i sar., 2003; Osswald i sar., 2007; Rastogi i Sinha, 2009).

Kada se jave odgovarajući uslovi za rast i proliferaciju cijanobakterija, postoji mogućnost njihovog prenamnožavanja. U takvim slučajevima, u zajednici fotosintetskih mikroorganizama najčešće dominiraju jedna ili dve vrste cijanobakterija i njihova biomasa raste velikom brzinom. Tada dolazi do izražene migracije ovih organizama ka površini vode i pojave koja se naziva cvetanje (Briand i sar., 2003). Cvetanje cijanobakterija karakteristično je za eutrofne i hipertrofne slatkovodne ekosisteme i posledica je interakcije više faktora: povećane koncentracije nutrijenata u vodi (nitrati i fosfati), intenziteta svetlosti, temperature, pH, elektroprovodljivosti, saliniteta, kao i slabe protočnosti i turbulencije vode (WHO, 2011). Povećana koncentracija nitrata i fosfata u vodi najčešće je posledica različitih antropogenih uticaja, kao što su izlivanje kanalizacije, industrijsko zagađenje i spiranje đubriva sa obradivog zemljišta (De Figueiredo i sar., 2004; Paerl i Paul, 2012). Cvetanje cijanobakterija je pojava koja se u umerenim regionima javlja tokom toplijeg perioda godine (leto i početak jeseni), dok se u tropskim krajevima može formirati u bilo koje doba godine (Van Apeldoorn i sar., 2007).

Izražena proliferacija cijanobakterija negativno utiče na funkcionisanje akvatičnih ekosistema, jer narušava biodiverzitet i veze između organizama, a takođe smanjuje i koncentraciju kiseonika u vodi. Negativan uticaj cvetanja na različite organizme posledica je sposobnosti cijanobakterija da proizvode širok spektar bioaktivnih sekundarnih metabolita, koji su poznati pod nazivom cijanotoksini. Većina ovih sekundarnih metabolita sintetiše se aktivnošću velikih multienzimskih kompleksa koji su opisani kod raznih vrsta cijanobakterija i imaju ključnu ulogu u nastanku niza različitih jedinjenja. Smatra se da geni za ove enzime vode poreklo od zajedničkog predačkog gena ili da su posledica genskog transfera između različitih vrsta (Preußel i sar., 2006). Kod oko 40 vrsta cijanobakterija detektovana je produkcija cijanotoksina, a naročito je izražena kod rodova *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc* i *Oscillatoria* (Briand i sar., 2003; Paerl i Paul, 2012).

Cijanobakterije ekstracelularno proizvode malu koncentraciju cijanotoksina. Međutim, tokom ćelijske smrti i lize dolazi do oslobađanja cijanotoksina iz ćelije, tako da se najveća koncentracija rastvorenih toksina u vodi detektuje tokom terminalne faze cvetanja. Lizu ćelija pospešuju i hemijski tretmani koje čovek koristi u borbi protiv cijanobakterija, kao što je upotreba različitih algicida. Korišćenje bakar sulfata ( $\text{CuSO}_4$ ) može u roku od tri dana da dovede do kompletne lize cijanobakterijske populacije i oslobađanja svih toksina u vodu (Van Apeldoorn i sar., 2007).

Poslednje dve decenije urađene su brojne studije o uticaju cijanotoksina na životinje, a naročito na različite akvatične organizme koji su direktno izloženi cijanobakterijama (Briand i sar., 2003). Pojedine fitoplanktivorne vrste (zooplankton, mekušci, neke ribe) koriste cijanobakterije u ishrani, dok ih ostale vrste mogu slučajno uneti digestijom, naročito tokom izraženog cvetanja. Cijanotoksini rastvoreni u vodi mogu direktnim putem da se apsorbuju kroz škrge i površinu tela vodenih organizama. Ipak, kako je priroda većine toksina hidrofilna, ovaj način unošenja zastupljen je u manjoj meri u odnosu na ingestiju. Poznato je da se cijanotoksini akumuliraju u tkivima različitih organizama, čime je omogućeno njihovo dalje prenošenje kroz lance ishrane (Smith i sar., 2008; Amado i Monserrat, 2010).

Cvetanje cijanobakterija predstavlja veliki rizik i za čoveka kada koristi eutrofne vodene ekosisteme u svrhu rekreacionih aktivnosti, zatim ukoliko pije vodu koja nije dovoljno hemijski tretirana ili ako u ishrani upotrebljava organizme u čijim tkivima su akumulirani cijanotoksini (WHO, 2003; De Figueiredo i sar., 2004; Kinnear i sar., 2009; WHO, 2011).

#### **1.4.1. Klasifikacija cijanotoksina**

Prema hemijskoj strukturi cijanotoksini se dele na ciklične peptide, alkaloidne i lipopolisaharide (Van Apeldoorn i sar., 2007), dok se prema toksikološkim osobinama klasifikuju u pet funkcionalnih grupa: hepatotoksine (mikrocistin, nodularin), neurotoksine (anatoksin-a, anatoksin-a(S), saksitoksin), citotoksine (cilindrospermopsin), dermatotoksine (lingbiatoksin) i iritante (lipopolisaharidi), (Wiegand i Pflugmacher, 2005). Intaktne ćelije cijanobakterija, kao i cijanotoksini

oslobođeni u vodu odgovorni su za različite toksične efekte kod mnogih organizama (Amado i Monserrat, 2010).

Mikrocistini su najčešće zastupljeni cijanotoksini tokom pojave cvetanja vode. Reč je o monocikličnim heptapeptidima koji su prvi put izolovani kod vrste *Microcystis aeruginosa*, a pored roda *Microcystis* detektovani su i kod vrsta rodova *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nostoc* i *Oscillatoria*. Mikrocistini su pretežno hidrofilna jedinjenja i u ćelije dospevaju preko membranski vezanog ATP zavisnog transportera. Kada se oralno unesu, većina mikrocistina se iz digestivnog trakta prenosi u krvotok, a zatim aktivnim transportom koncentriše uglavnom u jetri, a manje u drugim tkivima. Mikrocistini koji su hidrofobniji prolaze kroz ćelijske membrane drugim mehanizmima, uključujući i difuziju (Van Apeldoorn i sar., 2007; Smith i sar., 2008). Mikrocistini deluju kao inhibitori serin/treonin protein fosfataza 1 i 2A, a inhibicija ovih enzima dovodi do hiperfosforilacije citoskeletnih proteina i deformacije ćelije. Povećana fosforilacija tumor supresor proteina može da rezultuje ćelijskom proliferacijom, transformacijom i nastankom tumora (Van Apeldoorn i sar., 2007). Mikrocistini imaju sposobnost da se vežu za ATP sintazu ( $\beta$  subjedinicu), naruše mitohondrijalni elektron transportni lanac, dovedu do depolarizacije i promene propustljivosti membrane mitohondrija, povećaju produkciju ROS i smanje antioksidacionu sposobnost ćelije preko posttranslacione modifikacije antioksidacionih enzima. Oksidacioni stres kao rezultat ovih procesa dovodi do lipidne peroksidacije, degradacije DNK, apoptoze i nekroze ćelija (Wiegand i Pflugmacher, 2005; Amado i Monserrat, 2010). Jetra je glavno mesto transformacije mikrocistina, a glavni put njihove ekskrecije je konjugaciona reakcija sa GSH koju katalizuje enzim faze II biotransformacije GST (Pflugmacher i sar., 1998).

Nodularin je monociklični pentapeptid koji ima isti način delovanja kao i heptapeptid mikrocistin. Ovaj hepatotoksin detektovan je kod vrste *Nodularia spumigena* (Van Apeldoorn i sar., 2007). Biotransformacija nodularina takođe započinje konjugacionom reakcijom sa GSH koju katalizuje enzim faze II biotransformacije GST (Beattie i sar., 2003).

Anatoksin-a je niskomolekulski alkaloid, koji ima strukturu bicikličnog sekundarnog amina. Produkuju ga vrste rodova *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Oscillatoria* i dr. Anatoksin-a je strukturni analog neurotransmitera acetilholina i funkcioniše kao postsinaptički depolarišući



neuromuskulatorni blokator. Ireverzibilno se vezuje za nikotinske acetilholin receptore nervnih ćelija, pri čemu ima veći afinitet za receptore od acetilholina. Kako acetilholinesteraza ne može da ga degraduje, dolazi do dugotrajne stimulacije mišića, a zatim i do blokiranja dalje električne transmisije koja je neophodna za aktivnost skeletnih mišića. Pri visokim dozama anatoksin-a dolazi do mišićne paralize, naročito respiratornih mišića. Kod ćelija koje nisu nervne, anatoksin-a može da dovede do povećane produkcije ROS, fragmentacije DNK, aktivacije kaspaza i apoptoze (Osswald i sar., 2007; Van Apeldoorn i sar., 2007).

Anatoksin-a(S) je guanidinski metil fosfatni ester koji je detektovan kod roda *Anabaena*. Ima sličan mehanizam dejstva kao organofosfatni insekticidi i funkcioniše kao inhibitor acetilholinesteraze i blokira degradaciju acetilholina. Ipak, ovaj toksin deluje isključivo periferno, tako da aktivnost holinesteraze mozga i retine ostaje na normalnom nivou (Van Apeldoorn i sar., 2007).

Saksitoksin je triciklični karbamatski alkaloid koji sadrži tetrahidropurinsku grupu i dve guanidinske subjedinice. Detektovan je kod rodova *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* i *Lyngbya*. Ovaj toksin se vezuje za Na<sup>+</sup> kanale membrana aksona i blokirajući njihovo otvaranje zaustavlja ulazak Na<sup>+</sup>. Blokiranje nervne transmisije dovodi do disfunkcije nerava i indukuje paralizu mišića i prestanak disanja (Van Apeldoorn i sar., 2007; Rastogi i Sinha, 2009). Saksitoksin takođe može da se veže za Ca<sup>2+</sup> i K<sup>+</sup> kanale i da utiče na brzinu njihovog otvaranja i zatvaranja, što može da promeni selektivnu propustljivost membrane i dovede do disfunkcije ćelija (Da Silva i sar., 2011a). Glavnu ulogu u metabolizmu saksitoksina imaju enzimi CYP1A i GST (Gubbins i sar., 2000).

Cilindrospermopsin je triciklični guanidinski alkaloid sa uracilskim jezgrom koji je prvi put detektovan kod vrste *Cylindrospermopsis raciborskii*, a proizvode ga i *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon issatschenkoi*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Anabaena bergeii*, kao i neke druge vrste cijanobakterija (Smith i sar., 2008; Gutiérrez-Praena i sar., 2011a). Zbog izraženog uticaja na jetru, kao i najveće akumulacije u ovom tkivu, cilindrospermopsin je ranije bio ubrajan u hepatotoksine. Međutim, kako su efekti ovog toksina jasno izraženi i u drugim tkivima, grupisan je u citotoksine, odnosno supstance toksične za ćelije. Ovaj toksin ireverzibilno blokira sintezu proteina i dovodi do fragmentacije DNK, mutageneze i ćelijske smrti (Wiegand

i Pflugmacher, 2005). Osim toga, inhibira sintezu GSH i utiče na gensku ekspresiju i aktivnost antioksidacionih enzima (Gutiérrez-Praena i sar., 2011b; Puerto i sar., 2011c). U metabolizmu cilindrospermopsina učestvuje citohrom P450 koji indukuje njegovu genotoksičnu aktivnost (Norris i sar., 2002; Žegura i sar., 2011b).

Lingbiatoksin je dermatotoksin koji funkcioniše kao inflamatorni agens i tumor promotor. Detektovan je kod marinske cijanobakterije *Lyngbya majuscula* (Smith i sar., 2008).

Lipopolisaharidi su endotoksini koji su sastavni deo spoljašnje ovojnice gram negativnih bakterija u koje spadaju i cijanobakterije. Poznato je da utiču na aktivnost biotransformacionih enzima (Wiegand i Pflugmacher, 2005; Rastogi i Sinha, 2009).

#### 1.4.2. Osnovne karakteristike *Aphanizomenon flos-aquae*

Cijanobakterija *Aphanizomenon flos-aquae* (Linnaeus) Ralfs ex Bornet & Flahault, 1886 (Slika 7) pripada redu Nostocales i familiji Nostocaceae. Prisutna je uglavnom u vodenim ekosistemima severne hemisfere i ima veliki potencijal da dovede do sezonski zavisnog cvetanja slatkovodnih i morskih ekosistema (Preußel i sar., 2006). Iako u umerenim regionima cvetanje vode najčešće izazivaju vrste cijanobakterija koje pripadaju rodovima *Microcystis* i *Anabaena*, sve više je zabeleženih slučajeva cvetanja usled prenamnožavanja vrsta iz roda *Aphanizomenon* (Yamamoto i Nakahara, 2009).



Slika 7. Cijanobakterija *Aphanizomenon flos-aquae*  
([www.itameriportaali.fi](http://www.itameriportaali.fi)).

*A. flos-aquae* je filamentozna cijanobakterija, a prosečna dužina trihoma iznosi od nekoliko desetina do nekoliko hiljada mikrometara. Trihom se sastoji uglavnom od vegetativnih ćelija i nekoliko heterocisti, dok se akineti produkuju kao odgovor na pad temperature, pH i intenziteta svetlosti (Suikkanen i sar., 2010). U periodu od zime do proleća gustina trihoma u vodi je ispod nivoa detekcije, tako da se pretpostavlja da ova vrsta prezimljava u sedimentu u formi akineta. Sa povećanjem temperature u kasno proleće počinje germinacija akineta i formiranje trihoma. U početku se većina trihoma nalazi blizu dna, a sa poboljšanjem uslova u letnjem periodu povećava se njihova brojnost u površinskim slojevima vode, dok u izrazito povoljnim uslovima može da dođe do prenamnožavanja i pojave cvetanja. Nakon cvetanja trihomi podležu defragmentaciji, a zatim dolazi do njihove degradacije dejstvom različitih mikroorganizama ili ih u ishrani koristi zooplankton (Yamamoto i Nakahara, 2009).

Mnoge studije pokazuju da su optimalne temperature za prenamnožavanje cijanobakterije *A. flos-aquae* iznad 23 °C, a najčešće u opsegu od 26 do 28 °C (Ranković i Simić, 2005). Poznato je da ova vrsta može da produkuje različite grupe cijanotoksina, uključujući neurotoksine anatoksin-a i saksitoksin, kao i citotoksin cilindrospermopsin (Pereira i sar., 2000; Ferreira i sar., 2001; Preußel i sar., 2006; Preußel i sar., 2009).

## **1.5. Osnovne karakteristike ispitivanih vrsta riba**

### **1.5.1. *Rutilus rutilus* (bodorka)**

*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) - bodorka, pripada klasi Actinopterygii, redu Cypriniformes i familiji Cyprinidae, a naseljava slatkovodne i brakične ekosisteme Evrope i Azije. Ova vrsta je potamodromna, dok su populacije koje nastanjuju brakične vode Baltičkog i Crnog mora anadromne. Prisutna je u različitim vodenim staništima, uglavnom u sporotekućim vodama nizijskih predela. Česta je u rekama, prirodnim i veštačkim jezerima koja su bogata nutrijentima, kao i u kanalima. Može da opstane u vodama lošeg kvaliteta, pa čak i u zagađenim vodama. Bodorka je bentopelagijska vrsta i živi u jatima.

Maksimalna zabeležena dužina *R. rutilus* iznosi 50 cm, prosečna dužina 25 cm, maksimalna zabeležena težina 1.84 kg, a maksimalna dužina života 14 godina. Bodorka ima visoko, bočno spljošteno telo sa relativno malom glavom i visokim leđnim perajem (Slika 8). U vodama sa malo hrane i mnogo riba jedinke su izduženije, dok u vodama koje su bogate hranom imaju kraće i više telo. Usta su terminalna, a boja dužice varira od žute kod juvenilnih jedinki do crvene kod adultnih. Krljušt je krupna i upadljiva, a tokom sezone parenja mužjaci imaju beličaste tuberkule na glavi i telu. Ženke imaju manje tuberkula. Leđni region je plavo-siv, tamno maslinast ili maslinasto-smeđ. Bokovi su srebrnkasti sa svetlo bakarnom nijansom kod većih jedinki, a trbuh je srebrnkasto-beo. Leđno i repno peraje su sivo-smeđe ili crvenkasto-smeđe boje, dok su grudna, trbušna i analno narandžasti do crveni.



Slika 8. *Rutilus rutilus* (bodorka)  
([www.biolib.cz](http://www.biolib.cz)).

Period mresta bodorke je od aprila do juna u plićacima bogato obraslim vegetacijom kada temperatura vode dostigne najmanje 10 °C. Tokom posebno toplih godina, mresti se 2-3 puta godišnje. Migratorna kretanja zbog parenja su kratka. Populacije koje se hrane u brakičnim vodama migriraju uzvodno i mreste se u slatkoj vodi. U toku parenja ukrštaju se sa vrstama *Abramis brama* (deverika), *Scardinius erythrophthalmus* (crvenperka) i *Alburnus alburnus* (beovica) stvarajući neplodne hibride. Polnu zrelost stiču sa 2-3 godine starosti, a ženke godinu dana kasnije. Mužjaci stižu pre ženki na mesto parenja. Jaja su 1-1.5 mm u prečniku, lepljiva su, žute do krem boje i u grupama pričvršćena za podvodnu vegetaciju ili kamenje. Manje ženke

produkuju do 10 000 jaja, a veće više od 200 000. U zavisnosti od temperature, posle 4 do 12 dana dolazi do izleganja. Larve imaju oko 5-6 mm i ostaju pričvršćene za vegetaciju dok ne istroše rezerve žumančane kesice.

*R. rutilus* je omnivorna vrsta. Larve i juvenilne jedinke se hrane uglavnom bentosnim beskičmenjacima i zooplanktonom, dok je osnova ishrane starijih jedinki biljni materijal i detritus, kao i insekti, rakovi i mali mekušci. U zavisnosti od dostupnosti određene hrane ili zbog izbegavanja predatora ili kompeticije, mogu da se premeštaju iz litoralnih u pelagijska staništa, hraneći se bentosnim organizmima i zooplanktonom. Najveću aktivnost ispoljavaju od juna do oktobra, uglavnom tokom zore i sumraka. Za vreme letnjih vrućina traže dublja mesta ili se zavlače u podlokane obale i korenje drveća. Prezimljavaju u rukavcima reka ili u dubljim delovima jezera. Bodorka je cenjena vrsta u sportskom ribolovu, dok je komercijalni značaj ove vrste mali. Samo u nekim regionima ima ekonomski značaj (Simonović, 2001; Kottelat i Freyhof, 2007).

### **1.5.2. *Blicca bjoerkna* (blika)**

*Blicca bjoerkna* (Linnaeus, 1758) - blika, pripada klasi Actinopterygii, redu Cypriniformes i familiji Cyprinidae. Ova potamodromna vrsta naseljava slatke i brakične vode Evrope i Azije. Pojavljuje se u velikom broju u plitkim, toplim nizijskim prirodnim i veštačkim jezerima i sporotekućim nižim tokovima velikih reka i kanala. Vrsta je demerzalna i živi u jatima nad muljevitim i peskovitim dnom.

Maksimalna zabeležena dužina za ovu vrstu je 36 cm, prosečna dužina 20 cm, a maksimalna zabeležena težina 1 kg, dok je maksimalni životni vek oko 10 godina. Telo blike je visoko sa blago grbavim leđima i izraženo bočno spljoštenim stranama (Slika 9). Ima malu glavu i velike oči, a usta su postavljena subinferiorno. Krljušti su relativno krupne, dobro pričvršćene za telo. Leđni region je svetlo maslinasto-smeđ ili sivo-smeđ, dok u veoma čistoj vodi može da bude siv. Bokovi su srebrnkaste do srebrnkasto-bele boje, a trbuh je beo. Neparna peraja su tamno siva sa svetlim zracima, dok su parna grudna i trbušna crvenkasta u osnovi sa sivim vrhom. Mužjaci imaju tuberkule na glavi tokom sezone parenja.

Mužjaci polno sazrevaju sa 2, a ženke sa 3 godine. Većina jedinki se mresti 2-3 puta tokom jedne sezone, u intervalima od oko 10 dana (u sumrak i zoru). Period mresta je od maja do juna, a u severnim regionima i u julu, kada temperatura dostigne 14-15 °C. U toku parenja mogu da se ukrštaju i sa deverikom, bodorkom i crvenperkom, pri čemu nastaju neplodni hibridi. Mužjaci stižu pre ženki na mesto parenja, koja su u plićacima duž obale sa gustom submerznom vegetacijom ili na plitkom šljunkovitom dnu. U tom periodu postaju izuzetno teritorijalni i agresivni prema drugim mužjacima. Tokom parenja izraženo je kompleksno ponašanje. Dolazi do grupisanja oko petnaestak jedinki, a u retkim slučajevima i do trideset. Kod mužjaka je razvijena taktika udvaranja sa izraženim pokretima praćakanja. Pokazuju poliandriju, odnosno jaja jedne ženke oplođuje više od jednog mužjaka. Jaja su lepljiva, dijametra 1.7 mm, žute su boje i u grupama su pričvršćena za vegetaciju, panjeve i krupno kamenje u periodu od nekoliko dana. Poliandrija omogućava visok nivo fertilizacije, tako da iznenadno isušivanje plićaka retko dovodi do potpunog uništavanja potomstva. Većina ženki produkuje u proseku 40 000-50 000 jaja. Posle izleganja, larve dužine 5 mm ostaju pričvršćene za vegetaciju narednih par dana dok ne krenu u potragu za hranom.



Slika 9. *Blicca bjoerkna* (blika)  
(sh.wikipedia.org).

*B. bjoerkna* je omnivorna vrsta koja se hrani u plitkim delovima vode. Ishrana larvi sastoji se od mikroskopskih algi, zooplanktona i raznih beskičmenjaka, ali kasnije prelaze na sitnije primerke onih vrsta kojima se hrane adulti. Odrasle jedinke u ishrani koriste alge, lišće vodene vegetacije, larve insekata i razne bentosne beskičmenjake, kao što su crvi, slatkovodni račići i sitni mekušci. U toplijem periodu zadržavaju se blizu

obale, a zimi se povlače u dubinu. Blika nema veliki značaj kao komercijalna vrsta, pre svega zbog male veličine i kompeticije sa drugim poželjnijim vrstama. Samo u nekim regionima ima privredno-ribolovni i sportsko-ribolovni značaj (Simonović, 2001; Kottelat i Freyhof, 2007).

### **1.5.3. *Carassius gibelio* (babuška)**

*Carassius gibelio* (Bloch, 1782) - babuška, pripada klasi Actinopterygii, redu Cypriniformes i familiji Cyprinidae. Ova vrsta je potamodromna i naseljava slatkovodne i brakične ekosisteme Evrope i Azije. Introdukovana je u evropske vode iz istočne Azije, a tačni podaci o poreklu distribucije nisu dostupni upravo zbog introdukovanja, mešanja sa vrstom *Carassius auratus* i kompleksnog načina reprodukcije. Naseljava bentopelagijal različitih mirnih voda i nizijskih reka u delovima sa izraženom submerznom vegetacijom ili redovnim plavljenjem. Dobro podnosi zagađenje i nisku koncentraciju kiseonika u vodi.

Maksimalna dužina ove vrste je 35 cm, prosečna dužina 20 cm, maksimalna težina 3 kg, a maksimalna zabeležena starost 10 godina. Od evropskih srodnika razlikuje se po telu srebrnkasto-smeđe boje, karakteristikama peraja i crnim peritoneumom. *C. gibelio* ima kratko, visoko telo sa grbavim leđima (Slika 10). Glava je mala, bez brkova, a oči su prilično velike. Leđno peraje ima veoma dugu osnovu, dok je slobodna ivica prava ili konveksna. Prva žbica leđnog peraja je nazubljena sa zadnje strane. Analno peraje ima umereno dugu osnovu i karakterističnu oštru i nazubljenu bodlju. Telo je prekriveno velikim i upadljivim krljuštima. Leđa su zeleno-smeđa, a bokovi srebrnkasti i često sa primesama žute, dok je stomak bele ili krem boje. Leđno i repno peraje su sivo-smeđi, dok su grudna, trbušna i analno svetlo sivi.

Za uspešno parenje ove vrste, neophodna je temperatura od 16-21 °C, tako da se mresti od maja do jula, ali ponegde i do kraja leta. Polnu zrelost stiže sa 2-4 godine. U azijskim populacijama postoji jednaka zastupljenost mužjaka i ženki i dolazi do oplođenja, dok je za evropske populacije karakteristična ginogeneza, odnosno sposobnost reprodukcije iz neoplođenih jaja. Ženke se mreste sa drugim ciprinidnim vrstama, kao što su *Cyprinus carpio* (šaran), *Carassius carassius* (karaš), *Rutilus rutilus* (bodorka) i *Abramis brama* (deverika), ali jaja se razvijaju bez oplođenja, što dovodi do



formiranja populacija isključivo sa ženskim jedinkama. Iako ne dolazi do fertilizacije, sperma drugih vrsta neophodna je za razviće jajeta.

Smatra se da su u Evropi prisutne triploidne populacije samo sa ženjkama. Međutim, moguće je da se u nekim populacijama, naročito starijim može naći i do 25% mužjaka koji su diploidni. U nekim populacijama egzistiraju diploidne i tetraploidne jedinke oba pola, često zajedno sa triploidnim ženjkama. Postoji mogućnost ukrštanja sa karašem i nastanka hibridnog potomstva koje može da bude fertilno. Starije individue se pare ranije u sezoni u odnosu na mlade. U populacijama sa oba pola, mužjaci pre ženki stižu do mesta mresta. Ženku prati jedan ili više mužjaka, često sa dosta praćakanja. Dok se kreću, ženke polažu ikru, na koju mužjaci zatim izbacuju spermu. Bez obzira na tip reprodukcije, mreste se u plitkim i toplim obalskim delovima na submerznoj vegetaciji i to do tri puta u sezoni. Manje ženke izbacuju do 10 000 jaja, dok kod većih taj broj dostiže i četvrt miliona. Dijametar jaja je 1.5 mm, a ikra je lepljiva i pričvršćena za vodene biljke i submerzne objekte. Posle šest do deset dana izležu se larve dužine 4-5 mm, koje posle dva do četiri dana počinju da se hrane.



Slika 10. *Carassius gibelio* (babuška)  
([www.biolib.cz](http://www.biolib.cz)).

*C. gibelio* je omnivorna vrsta. Mlađ se hrani uglavnom sitnijim organizmima, uključujući zooplankton, alge i biljni materijal. Starije i krupnije ribe u ishrani koriste i veću hranu, kao što su larve i lutke insekata, sitniji mekušci i drugi bentosni beskičmenjaci. Povremeno mogu da uzimaju i sitnije insekte sa površine vode. Zimi miruju i ne hrane se. U toku sušnih meseci, u stanju su da se ukopaju u zemlju i tako



prežive potpuno isušivanje bare ili jezera. Babuška ima sportsko-ribolovni značaj, ali malu komercijalnu vrednost. Kultivisani varijetet babuške, zlatna ribica, poznata je kao najčešća akvarijumska vrsta (Simonović, 2001; Kottelat i Freyhof, 2007).

#### 1.5.4. *Perca fluviatilis* (grgeč)

*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758 - grgeč, pripada klasi Actinopterygii, redu Perciformes i familiji Percidae. Naseljava slatke vode širom Evrope i Sibira, a primerci ove vrste pronađeni su i u brakičnim vodama Baltičkog mora. S obzirom na to da je ovo često introdukovana vrsta, u nekim zemljama ima izražen ekološki uticaj na autohtone vrste riba. Naseljava širok spektar staništa od estuarskih laguna i svih tipova jezera do tokova srednje veličine. Česta je u sporotekućim rekama i dubokim jezerima i barama, a izbegava hladne i brzotekuće vode. Vrsta je demerzalna i najčešće se nalazi među preprekama u vodi, tako da obično naseljava vode sa gustom vegetacijom.



Slika 11. *Perca fluviatilis* (grgeč)  
(eol.org).

Maksimalna zabeležena dužina *P. fluviatilis* iznosi 60 cm, a prosečna dužina 25 cm. Maksimalna zabeležena težina je 4.75 kg, maksimalna starost 22 godine, a prosečan životni vek je oko 6 godina. Kod mlađih primeraka telo je izduženo, a kod starijih visoko, robusno i blago bočno spljošteno (Slika 11). Imaju malu trougaonu glavu i velika usta. Zadnja strana škržnog poklopca završava se pljosnatom oštrom bodljom. Krljušti su sitne, ktenoidnog tipa i imaju sitne zubiće. Leđa su maslinasto-smeđa, strane

svetlo maslinaste, a stomak beo ili krem. Starije jedinke imaju tamniju obojenost od mladih. Boja ove vrste varira u zavisnosti od sredine u kojoj se nalazi, tako da u dubljim vodama imaju tamniju boju. Sa obe strane tela imaju 5-9 karakterističnih transverzalnih tamnih traka. Za *P. fluviatilis* karakteristična su dva leđna peraja koja su blisko postavljena ili se dodiruju. Prvo leđno peraje je sivo sa crnom mrljom u osnovi zadnjeg dela i znatno je više nego drugo koje je zeleno-žuto. Grudna peraja su žuta, a trbušna, analno i repno su narandžasti do jarko crveni.

Mušjaci polno sazrevaju sa 1-2 godine, a ženke sa 2-4 godine starosti. Grgeč se pari jednom godišnje od marta do juna, uglavnom u aprilu i maju kada temperatura pređe 6 °C. Mušjaci dolaze pre ženki na mesta parenja koja su u plićim delovima vode sa gustom vegetacijom. Pokazuju poliidriju i obično dva do tri muškaka oploduju jaja jedne ženke. Jaja dijametra 2-3 mm grupisana su u duge bele trake dužine 1-2 m i širine oko 1-2 cm, koje su pričvršćene za submerzne objekte (biljke i stene). Ikra je neukusna za druge ribe, pa ostaje zaštićena. Ako dođe do isušivanja pre izleganja, može da se izgubi veliki deo mladi. Ovo je naročito izraženo u rekama ako je vreme parenja u periodu visokog vodostaja. Ženke produkuju 30 000-40 000 jaja po kilogramu težine. Posle 1-3 nedelje dolazi do izleganja, što zavisi od temperature vode. Larve dužine 6-8 mm ostaju pričvršćene za submerzne objekte do tri nedelje dok ne istroše rezerve žumančane kesice.

Mlađ ove vrste živi i hrani se u otvorenoj vodi planktonskim organizmima, a sa sazrevanjem približava se obali i prelazi na sitne beskičmenjake dna. Odrasle jedinke nastavljaju da se hrane sitnijim beskičmenjacima kao što su larve i lutke insekata i račići, a zatim prelaze na krupnije beskičmenjake, mlađ i sitnije primerke drugih vrsta riba. Krupni primerci ove predatorske vrste love plen koji je i do 40-50% njihove dužine tela, a takođe proždiru i sitnije vodozemce i punoglavce. U kasno leto kada ima dosta riblje mladi u plićim delovima vode, skrivaju se u gustom vodenoj vegetaciji i love plen iz zasede. Mlade jedinke love u plitkoj vodi i žive u jatima, dok su starije jedinke solitarne i preferiraju dublju vodu. Love isključivo danju, a najviše u zoru i sumrak, dok su noću potpuno neaktivne. Sa padom temperature odlaze u dublju vodu gde prezimljavaju. Meso *P. fluviatilis* je odličnog kvaliteta, visoke nutritivne vrednosti i sa malo kostiju, tako da ova vrsta ima veliku komercijalnu vrednost (Simonović, 2001; Kottelat i Freyhof, 2007).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Tokom poslednjih decenija čovekov uticaj na životnu sredinu doveo je do eutrofikacije velikog broja vodenih ekosistema. Jedna od posledica izražene eutrofikacije prirodnih i veštačkih jezera je povećana brojnost cijanobakterija, koja u ovim ekosistemima može da dovede do pojave koja je poznata pod nazivom cvetanje vode. Pojedine vrste cijanobakterija imaju sposobnost da produkuju različite sekundarne metabolite - cijanotoksine, koji ispoljavaju niz negativnih uticaja na funkcionisanje živih sistema. Ribe su kao akvatični organizmi direktno izložene cijanotoksinima i zato predstavljaju dobre modele za istraživanje uticaja cvetanja cijanobakterija.

Poslednjih godina urađen je veliki broj eksperimenata koji se tiču dejstva različitih grupa cijanotoksina na aktivnost enzimskih i koncentraciju neenzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja u tkivima riba. Većina ovih studija ograničena je uglavnom na laboratorijska ispitivanja, dok su terenske studije malobrojne i nepotpune. Prema dostupnim literaturnim podacima, najviše rezultata na ovom polju istraživanja postoji za jetru riba, nešto manje za škrge, dok uticaj cvetanja na antioksidacione parametre u mišiću riba još nije proučavan. Osim toga, treba naglasiti da su literaturni podaci o uticaju cvetanja vrsta cijanobakterija iz roda *Aphanizomenon* veoma oskudni.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje uticaja cvetanja cijanobakterije *Aphanizomenon flos-aquae* u akumulacionom jezeru Gruža na parametre antioksidacione zaštite kod riba. Praćena je aktivnost superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GSH-Px), glutation-reduktaze (GR) i enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST), kao i koncentracija ukupnog glutationa (GSH) i slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa u jetri, škragama i abdominalnom mišiću kod sledećih vrsta riba: *Rutilus rutilus* (bodorka), *Blicca bjoerkna* (blika), *Carassius gibelio* (babuška) i *Perca fluviatilis* (grgeč). Radi utvrđivanja korelacije između promena strukture jetre i dobijenih vrednosti antioksidacionih parametara, urađena je histopatološka analiza metabolički najaktivnijeg tkiva jetre kod sve četiri vrste ispitivanih riba.

Planiranim istraživanjima u ovoj doktorskoj disertaciji treba:

- da se utvrdi da li postoji razlika u vrednostima parametara antioksidacione zaštite u jetri, škragama i mišiću kod ispitivanih vrsta riba između istraživanih perioda, odnosno pre i tokom cvetanja cijanobakterija;
- da se utvrde interspecijske razlike u vrednostima navedenih parametara antioksidacione zaštite za svako ispitivano tkivo pre i tokom perioda cvetanja, odnosno da se ispita priroda dobijenih razlika putem detektovanja parametara antioksidacione zaštite koji imaju najznačajniji uticaj u objašnjavanju varijabilnosti između ispitivanih vrsta riba;
- da se utvrdi postojanje tkivne specifičnosti u vrednostima parametara antioksidacione zaštite kod svih ispitivanih vrsta riba, odnosno da se istraže razlike u njihovoj organizaciji i distribuciji u različitim tkivima;
- da se na nivou svetlosne mikroskopije ispita nivo apoptoze hepatocita tokom perioda cvetanja, kao i da se na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije utvrdi da li postoje razlike u ultrastrukturi hepatocita kod svake ispitivane vrste riba pre i tokom perioda cvetanja.

Cilj ove doktorske disertacije je da se proceni da li navedeni antioksidacioni biomarkeri mogu da se koriste kao rani upozoravajući signali promena i oštećenja u tkivima riba koji nastaju usled pojave cvetanja i tako pruži doprinos budućim biomonitoring studijama eutrofnih vodenih ekosistema.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Karakteristike lokaliteta i uzimanje uzoraka

Akumulaciono jezero Gruža (N 43° 53.490' i E 20° 42.522') formirano je pregrađivanjem srednjeg toka reke Gruže koja pripada crnomorskom slivu (Slika 12). Ova višenamenska akumulacija oformljena je prvenstveno zbog snabdevanja stanovništva i industrije vodom, zadržavanja nanosa i zaštite od poplava. Gružansko jezero se nalazi na nadmorskoj visini od 273 m, dužine je oko 10 km, širine od 0.2 km do 1.5 km, dok je obalska linija akumulacije dugačka 42 km. Dve trećine zapremine jezera predstavlja plići region okružen obradivim zemljištem, dok jednu trećinu zapremine čini dublji deo okružen šumama i pašnjacima. Maksimalna dubina jezera je 31 m i to neposredno ispred brane, dok prosečna dubina jezera iznosi 6.3 m. Velika površina akumulacije u odnosu na njenu malu dubinu, kao i minimalno kretanje vode u jezeru značajan su preduslov za eutrofikaciju (Čomić i Ostojić, 2005).



Slika 12. Akumulaciono jezero Gruža  
(foto Z.S. Saičić).

Gružansko jezero ima visoku primarnu produkciju tokom cele godine, sa maksimumom u letnjem periodu kada povremeno dolazi do prenamnožavanja cijanobakterija i mestimične pojave vodenog cveta. Iako se za kontrolu povećanog rasta cijanobakterija u jezeru koristi algicid bakar sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ), u plićem delu akumulacije i

dalje se povremeno javlja cvetanje, pri čemu je konstatovano da vrsta *Aphanizomenon flos-aquae* dominira u zajednici cijanobakterija (Ranković i Simić, 2005).

Četiri vrste slatkovodnih riba koje su korišćene kao objekti istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su izlovljavane tokom dva perioda godine, u junu pre cvetanja i u avgustu za vreme cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža. Izlovljavanje riba obavili su lokalni ribari u plićem delu jezera. Pre cvetanja ulovljeno je 9 primeraka *Rutilus rutilus* (prosečne dužine  $15.56 \pm 1.34$  cm i mase  $57.46 \pm 15.88$  g), 26 primeraka *Blicca bjoerkna* (prosečne dužine  $18.54 \pm 0.26$  cm i mase  $58.09 \pm 2.53$  g), 6 primeraka *Carassius gibelio* (prosečne dužine  $24.50 \pm 0.74$  cm i mase  $228.98 \pm 13.01$  g) i 28 primeraka *Perca fluviatilis* (prosečne dužine  $10.27 \pm 0.27$  cm i mase  $14.13 \pm 1.15$  g). Tokom perioda cvetanja cijanobakterija broj izlovljenih riba bio je 17 jedinki *R. rutilus* (prosečne dužine  $15.85 \pm 0.62$  cm i mase  $75.88 \pm 10.29$  g), 27 jedinki *B. bjoerkna* (prosečne dužine  $17.69 \pm 0.37$  cm i mase  $77.78 \pm 4.15$  g), 12 jedinki *C. gibelio* (prosečne dužine  $23.62 \pm 0.54$  cm i mase  $255.00 \pm 18.77$  g) i 14 jedinki *P. fluviatilis* (prosečne dužine  $15.32 \pm 0.35$  cm i mase  $63.57 \pm 3.57$  g). Sve ulovljene jedinke vrsta *R. rutilus*, *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis* su bili mužjaci, dok su svi ulovljeni primerci *C. gibelio* bile ženke. Kondicioni faktor (CF) ispitivanih vrsta riba izračunat je prema formuli  $CF = \text{masa (g)} \times 100 / \text{dužina (cm)}^3$  koju su dali Bagenal i Tesch (1978).

U oba ispitivana perioda određeni su sledeći fizičko-hemijski parametri vode: temperatura, pH, koncentracija kiseonika, zasićenost kiseonikom, nitrati, fosfati, amonijak, ukupna tvrdoća i elektroprovodljivost. Uzorci vode za kvalitativnu analizu cijanobakterija uzeti su vertikalnim povlačenjem planktonske mrežice, a za kvantitativnu Rutnerovom bocom. Uzorci su zatim fiksirani u 4% formaldehidu. Kvantitativna obrada materijala urađena je po metodi koju je opisao Utermöhl (1958).

### **3.2. Priprema tkiva za biohemijske analize**

Nakon izlovljavanja, ribe su žive dopremljene u laboratoriju i odmah žrtvovane direktnim udarcem u glavu. Zatim su na ledu izolovana sledeća tkiva: jetra, škrge i abdominalni mišić (Slika 13). Odmerena i izmacerirana tkiva homogenizovana su u saharoznom puferu u odnosu 1:5 (Lionetto i sar., 2003). Homogenizovanje je obavljeno na ledu na 20000 rpm, 3 puta po 15 sekundi, sa pauzama od po 15 sekundi (Rossi i sar.,

1983; De Waziers i Albrecht, 1987). Dobijeni homogenati sonifikovani su na ledu 3 puta po 10 sekundi, sa pauzama od po 10 sekundi na frekvenciji od 20 KHz (Takada i sar., 1982). Deo dobijenih sonifikata odvajan je u epruvete za mikrocentrifugiranje i korišćen za određivanje koncentracije ukupnog GSH. Ostatak sonifikata centrifugiran je 90 minuta na 37000 rpm na 4 °C u vakuumu (Okado-Matsumoto i Fridovich, 2001).



Slika 13. Izolovanje tkiva za analizu  
(foto B.R. Perendija).

Dobijeni supernatanti su prebačeni u epruvete za mikrocentrifugiranje i zamrznuti na -80 °C, gde su čuvani do narednih biohemijskih analiza: određivanja koncentracije ukupnih proteina, aktivnosti enzima zaštite od oksidacionih oštećenja SOD, CAT, GSH-Px, GR i enzima faze II biotransformacije GST, kao i određivanja koncentracije slobodnih SH grupa.

*Rastvori:*

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

*Aparati:*

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

- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka),
- Homogenizer (Ultra-Turrax, IKA-Werk, Janke & Kunkel, Staufen, Nemačka),
- Sonifikator (Vibra Cell, Sonics and Materials Inc., SAD) i
- Ultracentrifuga (L7-55, Beckman, SAD).

### 3.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina određivana je metodom koja se zasniva na biuretskoj reakciji kupri jona ( $\text{Cu}^{2+}$ ) sa peptidnim vezama proteina u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframovskog reagensa (Folin-Ciocalteu reagens) sa aromatičnim aminokiselinama tirozinom i triptofanom prisutnim u ispitivanim proteinima (Lowry i sar., 1951). Joni  $\text{Cu}^{2+}$  vežu se za peptidne veze ispitivanih proteina i redukuju u kupro jone ( $\text{Cu}^+$ ), pri čemu nastaje kompleks  $\text{Cu}^+$ -protein. Ovaj kompleks zatim reaguje sa dodatim Folin-Ciocalteu reagensom. Kao rezultat navedenih reakcija nastaje plavo obojen kompleks sa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini od 500 nm, a dobijena apsorbanca direktno je proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku.

#### *Rastvori:*

- 0.2 N NaOH,
- Reagens I (2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0.2 N NaOH),
- 0.13 M  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ,
- 0.13 M K-Na-tartarat,
- Reagens II (1 mL 0.13 M  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  + 1 mL 0.13 M K-Na-tartarat, dopuni se do 100 mL Reagensom I) i
- Folin-Ciocalteu reagens razblažen u odnosu 1:2 sa destilovanom vodom.

#### *Aparati:*

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



#### *Eksperimentalni postupak:*

U epruvetu se sipa 3 mL Reagens II i 0.1 mL 0.2 N NaOH, a zatim se doda 0.1 mL razblaženog uzorka (R=11). Nakon vorteksovanja i inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, dodaje se 0.6 mL Folin-Ciocalteu reagensa, a zatim se smeša vorteksuje i inkubira još 30 minuta na sobnoj temperaturi. Kao blank koristi se ista kombinacija reagenasa, ali umesto uzorka dodaje se 0.1 mL destilovane vode. Apsorbanca se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 500 nm i proporcionalna je koncentraciji proteina u rastvoru. Vrednost koncentracije proteina u ispitivanim uzorcima izračunata je pomoću kalibracione krive (konstruiše se na osnovu standardnih rastvora poznatih koncentracija proteina) i izražena je kao mg proteina/mL homogenata tkiva (mg/mL).

#### **3.3.1. Elektroforetska analiza proteina**

Za poredenje proteinskih profila korišćena je sodijum dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) koja se zasniva na razdvajanju denaturisanih proteina na osnovu razlika u njihovoj relativnoj molekularnoj masi (Laemmly, 1970). Kako bi se proteini razdvojili zavisno od molekulske mase, a ne od naelektrisanja, neophodno je narušavanje njihove tercijarne strukture. U tu svrhu upotrebljava se anjonski deterdžent sodijum dodecil sulfat (SDS), koji se vezuje za polipeptide i maskira naelektrisanje koje potiče od aminokiselinskih ostataka. SDS denaturiše proteine, ali omogućava im da ostanu stabilni u rastvoru u rastegnutoj konformaciji. Dužina SDS-proteinskog kompleksa direktno je proporcionalna molekularnoj masi proteina. Kao separacioni matiks za razdvajanje biomolekula elektroforezom koristi se poliakrilamidni gel, koji se dobija mešanjem akrilamida i bis-akrilamida uz korišćenje adekvatnih katalizatora. Tokom razdvajanja proteini veće molekulske mase se kreću sporije kroz pore poliakrilamidnog gela, dok se proteini manje molekulske mase kreću brže i na osnovu toga se vrši njihovo razdvajanje.

#### *Rastvori:*

- 1.5 M Tris-HCl pufer (pH 8.8),
- 0.5 M Tris-HCl pufer (pH 6.8),

- 10% SDS,
- 30% akrilamid/N'N'-bis-metilen-akrilamid,
- 10% amonijum persulfat (APS) i
- Pufer za elektroforezu (0.25 M Tris + 1.92 M glicin + 1% SDS, pH 8.3 sa HCl).

*Poliakrilamidni gel za razdvajanje (12%):*

- |   |         |
|---|---------|
| • Destilovana voda                                | 3.35 mL |
| • 5 mL 1.5 M Tris (pH 8.8) + 6.2 H <sub>2</sub> O | 2.5 mL  |
| • 10% SDS   | 100 µL  |
| • 30% akrilamid/ N'N'-bis-metilen-akrilamid       | 4 mL    |
| • 10% APS   | 50 µL   |
| • TEMED   | 5 µL    |

*Poliakrilamidni gel za sabijanje (4%):*

- |  |         |
|--|---------|
| • Destilovana voda                                 | 3.05 mL |
| • 4 mL 0.5 M Tris (pH 6.8) + 6 mL H <sub>2</sub> O | 1.25 mL |
| • 10% SDS  | 50 µL   |
| • 30% akrilamid/ N'N'-bis-metilen-akrilamid        | 665 µL  |
| • 10% APS  | 25 µL   |
| • TEMED  | 5 µL    |

*Pufer za uzorke:*

- |                       |        |
|-----------------------|--------|
| • Destilovana voda    | 3.8 mL |
| • 0.5 M Tris (pH 6.8) | 1.0 mL |
| • Glicerol            | 0.8 mL |
| • 10% SDS             | 1.6 mL |
| • β-merkaptoetanol    | 0.4 mL |
| • 10% bromfenol plavo | 0.4 mL |

*Rastvor za bojenje proteina:*

- |                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| • Coomassie brilliant blue R-250 | 0.6 g  |
| • Metanol                        | 250 mL |
| • Sirćetna kiselina              | 100 mL |
| • Destilovana voda               | 250 mL |

*Rastvor I za odbojavanje:*

- |                     |        |
|---------------------|--------|
| • Metanol           | 500 mL |
| • Sirćetna kiselina | 100 mL |
| • Destilovana voda  | 500 mL |

*Rastvor II za odbojavanje:*

- |                     |        |
|---------------------|--------|
| • Metanol           | 50 mL  |
| • Sirćetna kiselina | 70 mL  |
| • Destilovana voda  | 880 mL |

*Aparati:*

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),
- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka),
- Sistem za elektroforezu (EC 120 Mini-Vertical Gel System, Thermo, SAD) i
- Ispravljač (Power-Pac HC Power Supply, Bio-Rad, SAD).

*Eksperimentalni postupak:*

Uzorak se meša sa puferom za uzorke u odnosu 1:1. Od toga se uzima ona zapremina koja sadrži 20 µg proteina i nanosi na ploče sa polimerizovanim gelom. Nakon montiranja sistema za elektroforezu, naliva se pufer za elektroforezu i sistem se priključuje na ispravljač na sobnoj temperaturi. Za dve gel ploče u sistemu koristi se jačina struje od 40 mA i napon od 110 V. Posle završenog razdvajanja proteina, gelovi se boje u rastvoru za bojenje proteina i odbojavaju u odgovarajućim odbojivačima, a zatim skeniraju.

### 3.4. Određivanje aktivnosti enzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja

#### 3.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)

Za određivanje aktivnosti SOD u ispitivanim uzorcima korišćena je adrenalinska metoda (Misra i Fridovich, 1972), koja se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u adrenohrom u alkalnoj sredini. Autooksidacija adrenalina zavisna je od prisustva  $O_2^{\cdot-}$ , a SOD prisutna u uzorku uklanja  $O_2^{\cdot-}$  i tako inhibira reakciju autooksidacije. Smanjenje brzine autooksidacije adrenalina meri se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 480 nm, a rast apsorbance potiče od akumulacije roze obojenog adrenohroma.

##### *Rastvori:*

- $3 \times 10^{-4}$  M adrenalin u 0.1 M HCl,
- Karbonatni pufer (0.05 M  $Na_2CO_3$  +  $10^{-4}$  M EDTA, pH 10.2 sa HCl) i
- 8 mM KCN.

##### *Aparati:*

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

##### *Eksperimentalni postupak:*

U staklenu kivetu sipa se 3 mL karbonatnog pufera, odgovarajuća zapremina prethodno podešenog adrenalina i ona količina uzorka koja izaziva inhibiciju autooksidacije adrenalina u opsegu od 16.66% do 66.66%. Promena apsorbance prati se spektrofotometrijski na 480 nm na temperaturi od 25 °C. Za izračunavanje aktivnosti SOD koristi se vrednost promene apsorbance uzorka prema slepoj probi (pufer i podešen adrenalin).

Za određivanje aktivnosti Mn SOD u uzorak se dodaje 8 mM KCN u odnosu 1:1, koji inhibira CuZn SOD. Posle inkubiranja od 15 minuta na sobnoj temperaturi, Mn SOD se određuje na isti način kao što je opisano za Uk SOD. Vrednost za aktivnost CuZn SOD dobija se kao razlika između aktivnosti Uk SOD i aktivnosti Mn SOD.

Jedinica aktivnosti SOD definiše se kao količina enzima koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance u minuti. Aktivnost Uk SOD, CuZn SOD i Mn SOD u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

#### **3.4.1.1. SOD nedenaturišuća elektroforetska analiza**

Nedenaturišuća ili nativna poliakrilamid gel elektroforeza (Native PAGE) je tehnika za razdvajanje proteina prema njihovom naelektrisanju, obliku i veličini. Za razliku od denaturišuće elektroforeze, ne koristi se anjonski deterdžent SDS i ne dolazi do denaturacije proteina. Za elektroforetski profil enzima SOD u ispitivanim uzorcima korišćena je nitroblue-tetrazolium (NBT) metoda (Mavelli i sar., 1984). Princip metode zasniva se na redukciji tetrazolijumovih soli u prisustvu  $O_2^{\cdot -}$  do formazana, koji ostaje nerastvorljiv u gelu i boji ga u plavo. Kao izvor  $O_2^{\cdot -}$  koristi se riboflavin, koji se fotohemijski redukuje u prisustvu lako oksidujuće supstance N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), a tokom reoksidacije na vazduhu generiše  $O_2^{\cdot -}$ . Enzim SOD prisutan u uzorku uklanja  $O_2^{\cdot -}$  i sprečava formiranje boje, pa mesta ovog enzima na gelu ostaju transparentna.

*Rastvori:*

- 1.5 M Tris-HCl pufer (pH 8.8),
- 30% akrilamid/N'N'-bis-metilen-akrilamid,
- 10% amonijum persulfat (APS),
- Pufer za elektroforezu (0.25 M Tris + 1.92 M glicin, pH 8.3 sa HCl),
- 0.1 M fosfatni pufer (pH 7.8),
- 0.5 mM NBT u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.8),
- 0.16 mM riboflavin u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.8) i
- 0.5 M EDTA (pH 8.0 sa NaOH).

*Poliakrilamidni gel za razdvajanje (12%):*

- Destilovana voda 3.35 mL
- 5 mL 1.5 M Tris (pH 8.8) + 6.2 H<sub>2</sub>O 2.5 mL
- 30% akrilamid/bis-akrilamid 4 mL
- 10% APS 50 µL
- TEMED 5 µL

*Supstrat za SOD:*

- 0.5 mM NBT u fosfatnom puferu (pH 7.8) 20 mL
- 0.16 mM riboflavin u fosfatnom puferu (pH 7.8) 20 mL
- TEMED 4 µL
- 0.5 M EDTA (pH 8.0) 80 µL

*Aparati:*

- Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- pH-metar (WTW, Nemačka),
- Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka),
- Sistem za elektroforezu (EC 120 Mini-Vertical Gel System, Thermo, SAD) i
- Ispravljač (Power-Pac HC Power Supply, Bio-Rad, SAD).

*Eksperimentalni postupak:*

Uzorak se razblažuje u odnosu 1:1 sa 50% glicerolom (glicerol se razblaži u odnosu 1:1 sa vodom). Od toga se uzima ona zapremina koja sadrži 20 µg proteina i nanosi na ploče sa polimerizovanim gelom. Nakon montiranja sistema za elektroforezu, naliva se pufer za elektroforezu i sistem se priključuje na ispravljač na 4 °C. Za dve gel ploče u sistemu koristi se jačina struje od 40 mA i napon od 110 V. Posle završenog razdvajanja proteina, gelovi se ispiraju destilovanom vodom i stavljaju u supstrat za SOD. Posle inkubacije od 30 minuta u mraku, supstrat se izlije, a gelovi izlože svetlosti neonske lampe do pojave tamno plave boje. Na mestima na gelu gde se nalazi SOD, ostaju ahromatske trake. Gelovi se zatim skeniraju.

### 3.4.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost CAT u ispitivanim uzorcima određivana je metodom koju je opisao Claiborne (1984). Princip metode zasniva se na praćenju brzine razgradnje  $\text{H}_2\text{O}_2$  do  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$  pod dejstvom enzima CAT. Pad apsorbance usled potrošnje  $\text{H}_2\text{O}_2$  detektuje se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 240 nm.

#### *Rastvori:*

- 0.05 M fosfatni pufer (pH 7.0) i
- 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### *Aparati:*

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

#### *Eksperimentalni postupak:*

Rastvor  $\text{H}_2\text{O}_2$  u fosfatnom puferu podešava se tako da apsorbance slepe probe na talasnoj dužini od 240 nm bude između 0.525 i 0.550. U kvarcnu kivetu sipa se 1.5 mL podešenog rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$  u fosfatnom puferu, a zatim dodaje ona količina uzorka koja dovodi do srednje vrednosti promene apsorbance u opsegu od 0.03 do 0.06. Dodavanjem uzorka započinje reakcija razgradnje  $\text{H}_2\text{O}_2$  usled prisustva CAT u uzorku, a pad apsorbance prati se spektrofotometrijski na 240 nm svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Za izračunavanje aktivnosti CAT koristi se molarni ekstinkcioni koeficijent za  $\text{H}_2\text{O}_2$  na talasnoj dužini od 240 nm koji iznosi  $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

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

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

Aktivnost antioksidacionog enzima GSH-Px određivana je metodom Tamura i sar. (1982). Princip metode zasniva se na spregnutoj aktivnosti GSH-Px (katalizuje oksidaciju GSH u GSSG uz redukciju organskih hidroperoksida) i GR (katalizuje redukciju GSSG u GSH uz oksidaciju NADPH kao koenzima). U reakcionu smešu dodaju se organski peroksid terc-butil hidroperoksid, NADPH i GR, a aktivnost enzima GSH-Px detektuje se spektrofotometrijski praćenjem oksidacije NADPH u NADP<sup>+</sup> na 340 nm.

#### *Rastvori:*

- 1mM GSH,
- 0.2 mM NADPH u 1% NaHCO<sub>3</sub>,
- 1 mM NaN<sub>3</sub>,
- 1 mM EDTA,
- 0.03 M terc-butil hidroperoksid,
- 0.5 M fosfatni pufer (pH 7.0) i
- GR.

#### *Aparati:*

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

#### *Eksperimentalni postupak:*

U kvarenu kivetu sipa se 1.6 mL H<sub>2</sub>O (ili manja zapremina u zavisnosti od količine dodatog uzorka), 0.3 mL 1mM GSH, 0.6 mL 0.2 mM NADPH, 0.1 mL 1mM NaN<sub>3</sub> (inaktivira CAT), 0.1 mL 1 mM EDTA, 0.3 mL 0.5M fosfatnog pufera (pH 7.0), 0.1 mL 0.03 M terc-butil hidroperoksida, odgovarajuća količina uzorka i 5μL GR. Pad apsorbance prati se spektrofotometrijski na 340 nm svakih 30 sekundi u toku 3 minute



na temperaturi od 25°C. Aktivnost GSH-Px određuje se prema slepoj probi (svi rastvori osim uzorka), uz korišćenje molarnog ekstinkcionog koeficijenta za NADPH na 340 nm od  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Jedinica enzimske aktivnosti GSH-Px definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH/min), a aktivnost GSH-Px u ispitivanim tkivima riba izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

#### **3.4.4. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)**

Za određivanje aktivnosti GR u ispitivanim uzorcima koristili smo metodu koju su opisali Glatzle i sar. (1974), koja se zasniva na sposobnosti GR da katalizuje reakciju redukcije GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH do  $\text{NADP}^+$ . U reakcionu smešu dodaju se GSSG i NADPH, a aktivnost GR se meri spektrofotometrijski preko smanjenja koncentracije NADPH, odnosno opadanja apsorbanca na talasnoj dužini od 340 nm.

##### *Rastvori:*

- 0.5 M fosfatni pufer (pH 7.4),
- 2 mM GSSG,
- 0.5 mM EDTA i
- 0.1 mM NADPH u 1%  $\text{NaHCO}_3$ .

##### *Aparati:*

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

##### *Eksperimentalni postupak:*

U kvarcnu kivetu dodaje se 0.6 mL 0.5 M fosfatnog pufera (pH 7.4), 0.1 mL 2mM GSSG, 0.1 mL 0.5 mM EDTA i 2 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (ili manja zapremina u zavisnosti od

zapremine uzorka koji se dodaje) i 0.1 mL 0.1mM NADPH, a zatim se sipa odgovarajuća količina uzorka. Za slepu probu koriste se isti rastvori samo bez uzorka. Apsorbanca se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm na svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Za izračunavanje aktivnosti GR koristi se molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH na 340 nm od  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

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

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

Aktivnost enzima faze II biotransformacije GST određivana je metodom koju su opisali Habig i sar. (1974). Princip metode zasniva se na sposobnosti enzima GST da katalizuje reakciju vezivanja 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) za sulfhidrilnu grupu cisteina koji ulazi u sastav tripeptida GSH, pri čemu se formira CDNB-GSH konjugat. Stopa porasta apsorbance usled nastalog CDNB-GSH konjugata direktno je proporcionalna aktivnosti biotransformacionog enzima GST u uzorku i detektuje se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm.

#### *Rastvori:*

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

#### *Aparati:*

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

#### *Eksperimentalni postupak:*

U kvarcnu kivetu za analizu sipa se 2 mL H<sub>2</sub>O (ili manja zapremina u zavisnosti od količine uzorka koji se dodaje), 0.1 mL 25 mM CDNB u 95% etanolu, 0.6 mL 0.5 M fosfatnog pufera (pH 6.5), 0.3 mL 20 mM GSH i određena količina uzorka. Povećanje apsorbance prati se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm na svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Aktivnost GST određuje se prema slepoj probi (isti rastvori samo bez uzorka), uz korišćenje molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDNB-GSH konjugat na 340 nm od  $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

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

### **3.5. Određivanje koncentracije neenzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja**

#### **3.5.1. Određivanje koncentracije glutationa (GSH)**

Za određivanje koncentracije ukupnog GSH u ispitivanim uzorcima korišćena je metoda koju je opisao Griffith (1980). Princip ove metode zasniva se na cikličnom enzimskom procesu: 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoična kiselina) (DTNB) oksiduje GSH, pri čemu nastaju GSSG i 2-nitro-5-tiobenzoična kiselina (TNB), a zatim enzim GR redukuje GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH. Stopa formiranja žuto obojenog jedinjenja TNB prati se spektrofotometrijski na 412 nm i proporcionalna je koncentraciji ukupnog GSH u uzorku.

#### *Rastvori:*

- Standard GSH,
- 10% sulfosalicilna kiselina,
- 0.3 mM NADPH,
- 6 mM DTNB,
- GR i
- Pufer (125 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 6mM EDTA, pH 7.5 sa NaOH).

*Aparati:*

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

*Eksperimentalni postupak:*

U epruvete za mikrocentrifugiranje sipa se 0.5 mL sonifikata tkiva i 0.25 mL 10% sulfosalicilne kiseline koja taloži proteine u uzorku. Posle centrifugiranja od 10 minuta na 5000 rpm, dobijeni supernatant se koristi za određivanje koncentracije GSH.

U kvarcnu kivetu dodaje se 0.7 mL 0.3 mM NADPH, 0.1 mL 6 mM DTNB, uzorak, H<sub>2</sub>O do 1 mL reakcione smeše i 5 $\mu$ L GR. Za slepu probu koriste se isti rastvori samo bez uzorka, a za standarde umesto uzorka se sipaju odgovarajuće zapremine standardnih rastvora sa poznatom koncentracijom GSH. Povećanje apsorbance prati se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 412 nm na svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C.

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

### **3.5.2. Određivanje koncentracije slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa**

Koncentracija slobodnih SH grupa u ispitivanim uzorcima određivana je metodom koju je opisao Ellman (1959). DTNB oksiduje slobodne SH grupe prisutne u uzorku, pri čemu nastaju mešani disulfidi i žuto obojeni TNB, čija se apsorbance meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 412 nm.

*Rastvori:*

- 0.1 M fosfatni pufer (pH 7.3) i
- 3 mM DTNB u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.3).

#### *Aparati:*

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

#### *Eksperimentalni postupak:*

U epruvetu se dodaje 0.5 mL uzorka, 0.5 mL 0.1 M fosfatnog pufera (pH 7.3) i 0.2 mL DTNB. Posle inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi očitava se apsorbancu na talasnoj dužini od 412 nm. Za izračunavanje koncentracije slobodnih SH grupa koristi se molarni ekstinkcioni koeficijent od  $14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Koncentracija slobodnih SH grupa u uzorku određuje se prema slepoj probi i proporcionalna je koncentraciji nastalog TNB.

Koncentracija slobodnih SH grupa u uzorku izražena je u mikromolima SH grupa po gramu tkiva ( $\mu\text{mol SH/g tkiva}$ ).

### **3.6. Mikroskopska analiza hepatocita**

Svetlosna i elektronska mikroskopija urađena je u Centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Nakon izolovanja, jetra ispitivanih vrsta riba stavljena je u neutralno puferisani 10% formalin, a zatim je podvrgnuta različitim procedurama preparacije za studiranje na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije.

#### **3.6.1. Svetlosna mikroskopija**

Tkivo jetre je posle fiksacije isprano u tekućoj vodi, a zatim po standardnim procedurama dehidratirano kroz seriju rastućih koncentracija alkohola, prosvetljeno u ksilolu i ukalupljeno u parafin. Parafinski kalupi sečeni su na preseke debljine  $5 \mu\text{m}$  na rotacionom mikrotomu (Spencer, SAD). Dobijeni parafinski preseki lepljeni su na želatinizirane pločice, a zatim podvrgnuti rutinskom procesu deparafinizacije i

rehidracije. Preseci jetre bojeni su propidijum-jodidom da bi se utvrdio nivo apoptoze hepatocita.

### **3.6.2. Elektronska mikroskopija**

Za ultrastrukturno ispitivanje uzorci tkiva jetre podvrgnuti su standardnoj proceduri pripremanja tkiva za elektronsku mikroskopiju. Tkivni isečci jetre od 1 mm<sup>3</sup> fiksirani su 2.5% glutaraldehydom u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.2) 4 sata, dok je postfiksacija izvršena 2% osmijum-tetraoksidom u istom puferu 4 sata na sobnoj temperaturi. Isečci su dehidratirani serijom alkohola rastuće koncentracije i prosvetljeni propilen-oksikom, a zatim je izvršeno kalupljenje u smoli Araldit 72 sata na temperaturi od 50 °C.

#### **Polutanki preseci**

Kalupi su sečeni ultramikrotomom (Leica UC6, Leica Microsystem, Austrija), a dobijeni preseci debljine 1 µm stavljeni su na staklene pločice i bojeni metilenskim plavim u 1% natrijum tetraborat puferu i 1% baznim fuksinom u istom puferu. Bojenje je izvršeno u jednakim količinama rastvora boje i pufera na grejnoj ploči na 50 °C. Nakon toga, pločice sa presecima ispirane su u česmenskoj, pa u destilovanoj vodi, a zatim su osušene i montirane. Dobijeni preparati tkiva jetre posmatrani su i slikani na svetlosnom mikroskopu (Leica DMBL, Leica Microsystem, Austrija).

#### **Ultratanki preseci**

Kalupi su sečeni ultramikrotomom (Leica UC6, Leica Microsystem, Austrija), a dobijeni tanki preseci od 50 nm stavljeni su na bakarne mrežice i kontrastirani, standardnom procedurom, uranil acetatom i olovo citratom. Snimci preseka dobijeni su na elektronskom mikroskopu (Philips CM12, Philips, Holandija) posredstvom digitalnog sistema (Megaview III, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Nemačka).

### 3.7. Statistička obrada rezultata

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljeni su tabelarno i grafički kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $X_{sr} \pm SG$ ) uz prikaz standardne devijacije (SD) u tabelama. Za statističku analizu postojanja značajnih razlika između ispitivanih parametara u dva perioda (pre i tokom cvetanja) korišćen je neparametrijski Mann-Whitney U-test. Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost  $p < 0.05$ . Kanonijskom diskriminacionom analizom utvrđene su razlike između vrsta u oba ispitivana perioda, kao i razlike između tkiva kod svake vrste, pri čemu su detektovane one varijable koje značajno doprinose razlikama između ispitivanih vrsta riba, kao i ispitivanih tkiva svake vrste. Rezultati ove analize predstavljeni su grafički i tabelarno. Korišćenjem klaster analize svi ispitivani parametri grupisani su u homogene grupe, a rezultati su prikazani grafički u vidu dendrograma. Za statističku obradu rezultata korišćeni su analitički protokoli koje su opisali Darlington i sar. (1973) i Dinneen i Blakesley (1973).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Fizičko-hemijski parametri vode i analiza cijanobakterija

Fizičko-hemijski parametri vode i rezultati kvantifikacije cijanobakterija pre i tokom cvetanja u akumulacionom jezeru Gruža prikazani su u Tabeli 1. U oba ispitivana perioda određivani su sledeći fizičko-hemijski parametri: temperatura, pH, koncentracija kiseonika, zasićenost kiseonikom, koncentracija nitrata, fosfata i amonijaka, kao i ukupna tvrdoća i elektroprovodljivost. Uzorkovanje vode izvršeno je u periodu izlovljavanja riba.

Tabela 1. Fizičko-hemijski parametri vode i brojnost cijanobakterija pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<b>Temperatura (°C)</b>	24.8	27.0
<b>pH</b>	8.86	8.76
<b>O<sub>2</sub> (mg/L)</b>	8.96	6.70
<b>O<sub>2</sub> (%)</b>	117.2	91.2
<b>Nitrati (mg/L)</b>	16.8	1.5
<b>Fosfati (mg/L)</b>	4.90	0.13
<b>Amonijak (mg/L)</b>	0.08	0.00
<b>Ukupna tvrdoća</b>	144	138
<b>Elektroprovodljivost (μS/cm)</b>	288	278
<b>Cijanobakterije (individua/L)</b>	-	420 000



Pre cvjetanja cijanobakterija temperatura vode bila je niža (24.8 °C) u odnosu na temperaturu vode za vreme cvjetanja (27.0°C). Vrednosti koncentracije kiseonika i zasićenosti kiseonikom bile su veće pre cvjetanja (8.96 mg/L i 117.2%) u odnosu na period tokom cvjetanja (6.70 mg/L i 91.2%). Koncentracije nitrata i fosfata takođe su pokazale veće vrednosti pre cvjetanja, dok su vrednosti pH, koncentracije amonijaka, ukupne tvrdoće i elektroprovodljivosti bile na približno istom nivou u oba ispitivana perioda.

U uzorku vode iz Gružanskog jezera pre cvjetanja nisu detektovane cijanobakterijske vrste, dok je tokom cvjetanja uočena povećana brojnost cijanobakterija (420 000 ind/L). Kvalitativna analiza uzorka vode pokazala je prisutnost sledećih vrsta cijanobakterija: *Aphanizomenon flos-aquae* (Linnaeus) Ralfs ex Bornet & Flahault, 1886, koja je bila dominantno zastupljena u uzorku, zatim *Aphanizomenon issatschenkoi* (Usacev) Proshkina-Lavrenko, 1968, *Aphanizomenon aphanizomenoides* (Forti) Horecká & Komárek, 1979 i *Lyngbya limnetica* Lemmermann, 1988.

#### 4.2. Kondicioni faktor (CF) ispitivanih vrsta riba

Vrednosti kondicionog faktora (CF) ispitivanih vrsta riba koje su izlovljene pre i tokom cvjetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža prikazane su u Tabeli 2.

Tabela 2. Kondicioni faktor (CF) ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvjetanja u jezeru Gruža.

<b>Kondicioni faktor (CF)</b>		
<b>Vrsta</b>	<b>Pre cvjetanja</b>	<b>Tokom cvjetanja</b>
<i>Rutilus rutilus</i>	1.23 ± 0.05 (0.15)	1.77 ± 0.07 * (0.29)
<i>Blicca bjoerkna</i>	0.90 ± 0.01 (0.05)	1.39 ± 0.05 * (0.26)
<i>Carassius gibelio</i>	1.56 ± 0.07 (0.17)	1.91 ± 0.07 * (0.25)
<i>Perca fluviatilis</i>	1.24 ± 0.02 (0.09)	1.80 ± 0.09 * (0.35)

Dobijeni rezultati pokazuju da su sve ispitivane vrste imale statistički značajno veći CF za vreme cvetanja u odnosu na period pre cvetanja. Dobijene vrednosti pre cvetanja cijanobakterija iznosile su  $1.23 \pm 0.05$  za vrstu *R. rutilus*,  $0.90 \pm 0.01$  za vrstu *B. bjoerkna*,  $1.56 \pm 0.07$  za vrstu *C. gibelio* i  $1.24 \pm 0.02$  za vrstu *P. fluviatilis*, dok je tokom cvetanja cijanobakterija vrsta *R. rutilus* imala CF od  $1.77 \pm 0.07$ , *B. bjoerkna*  $1.39 \pm 0.05$ , *C. gibelio*  $1.91 \pm 0.07$ , a *P. fluviatilis*  $1.80 \pm 0.09$ .

### 4.3. Koncentracija ukupnih proteina

Rezultati koncentracije ukupnih proteina u jetri (Tabela 3), škragama (Tabela 4) i mišiću (Tabela 5) ispitivanih vrsta riba ukazuju na postojanje trenda porasta koncentracije proteina za vreme cvetanja u odnosu na period pre cvetanja.

Statistički značajna razlika zabeležena je u jetri vrsta *B. bjoerkna* i *C. gibelio* gde je koncentracija proteina iznosila  $10.25 \pm 0.24$  mg/mL i  $10.83 \pm 0.22$  mg/mL pre cvetanja, a  $11.87 \pm 0.37$  mg/mL i  $11.49 \pm 0.23$  mg/mL tokom cvetanja.

Tabela 3. Koncentracija ukupnih proteina (mg/mL) u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Koncentracija proteina – Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	$12.34 \pm 0.50$ (1.42)	$13.51 \pm 0.52$ (1.63)
<i>Blicca bjoerkna</i>	$10.25 \pm 0.24$ (0.88)	$11.87 \pm 0.37$ * (1.29)
<i>Carassius gibelio</i>	$10.83 \pm 0.22$ (0.53)	$11.49 \pm 0.23$ * (0.79)
<i>Perca fluviatilis</i>	$12.38 \pm 0.47$ (1.33)	$11.88 \pm 0.43$ (1.20)

Pre cvetanja koncentracija proteina u škragama vrsta *R. rutilus* ( $8.02 \pm 0.21$  mg/mL), *B. bjoerkna* ( $8.88 \pm 0.30$  mg/mL) i *C. gibelio* ( $10.77 \pm 0.50$  mg/mL) bila je statistički značajno smanjena u odnosu na vrednosti tokom cvetanja koje su iznosile

13.20 ± 0.43 mg/mL kod vrste *R. rutilus*, 12.08 ± 0.30 mg/mL kod vrste *B. bjoerkna* i 12.17 ± 0.36 mg/mL kod vrste *C. gibelio*. Isti trend zabeležen je i u mišiću vrsta *R. rutilus*, *C. gibelio* i *P. fluviatilis* gde je koncentracija proteina pre cvetanja iznosila redom 6.98 ± 0.21 mg/mL, 6.61 ± 0.20 mg/mL i 7.63 ± 0.19 mg/mL, a za vreme cvetanja 8.88 ± 0.41 mg/mL, 8.95 ± 0.38 mg/mL i 9.39 ± 0.16 mg/mL. U jetri *R. rutilus* i *P. fluviatilis*, škragama *P. fluviatilis* i mišiću *B. bjoerkna* nije konstatovana statistički značajna razlika u vrednostima koncentracije proteina između dva ispitivana perioda.

Tabela 4. Koncentracija ukupnih proteina (mg/mL) u škragama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

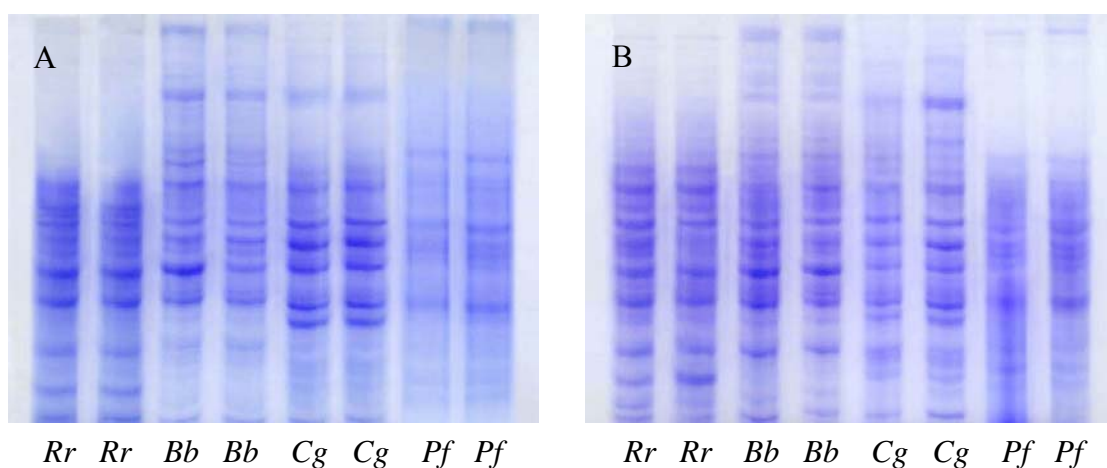
Koncentracija proteina - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	8.02 ± 0.21 (0.59)	13.20 ± 0.43 * (1.36)
<i>Blicca bjoerkna</i>	8.88 ± 0.30 (1.04)	12.08 ± 0.30 * (1.05)
<i>Carassius gibelio</i>	10.77 ± 0.50 (1.23)	12.17 ± 0.36 * (1.25)
<i>Perca fluviatilis</i>	9.47 ± 0.57 (1.61)	10.83 ± 0.14 (0.40)

Tabela 5. Koncentracija ukupnih proteina (mg/mL) u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

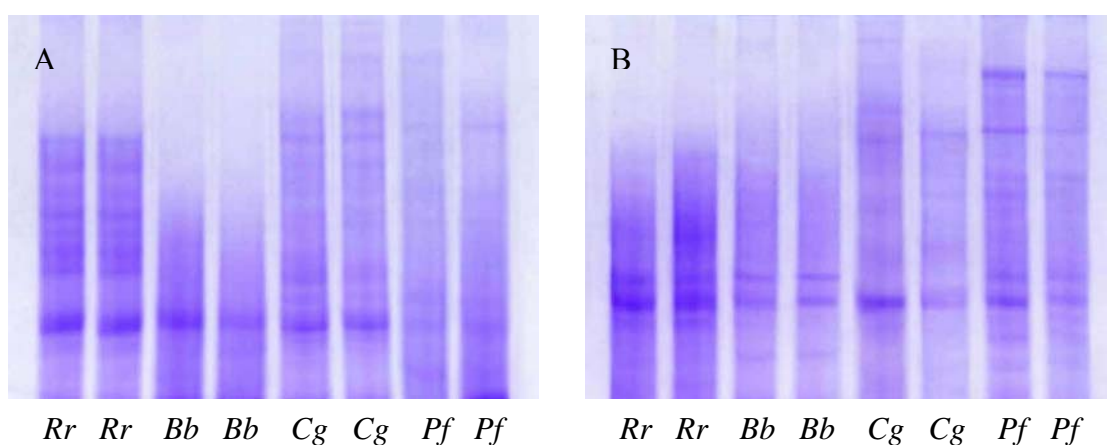
Koncentracija proteina - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	6.98 ± 0.21 (0.58)	8.88 ± 0.41 * (1.30)
<i>Blicca bjoerkna</i>	6.52 ± 0.14 (0.52)	7.66 ± 0.40 (1.38)
<i>Carassius gibelio</i>	6.61 ± 0.20 (0.48)	8.95 ± 0.38 * (1.31)
<i>Perca fluviatilis</i>	7.63 ± 0.19 (0.59)	9.39 ± 0.16 * (0.51)

### 4.3.1. Elektroforetski profil proteina

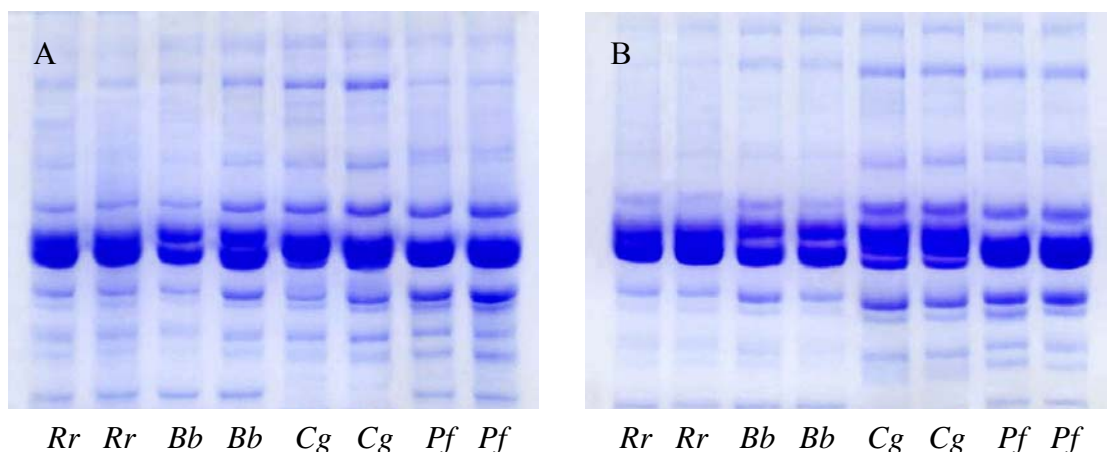
Dobijeni elektroforegrami proteina u tkivu jetre (Slika 14), škrge (Slika 15) i mišića (Slika 16) ispitivanih vrsta riba *R. rutilus*, *B. bjoerkna*, *C. gibelio* i *P. fluviatilis* ukazuju da postoje razlike u proteinskim profilima pre i tokom cvjetanja cijanobakterija u Gružanskom jezeru.



Slika 14. Elektroforetski profil proteina u jetri vrsta *R. rutilus* (*Rr*), *B. bjoerkna* (*Bb*), *C. gibelio* (*Cg*) i *P. fluviatilis* (*Pf*) pre (A) i tokom (B) cvjetanja u jezeru Gruža.



Slika 15. Elektroforetski profil proteina u škragama vrsta *R. rutilus* (*Rr*), *B. Bjoerkna* (*Bb*), *C. gibelio* (*Cg*) i *P. fluviatilis* (*Pf*) pre (A) i tokom (B) cvjetanja u jezeru Gruža.



Slika 16. Elektroforetski profil proteina u mišiću vrsta *R. rutilus* (*Rr*), *B. bjoerkna* (*Bb*), *C. gibelio* (*Cg*) i *P. fluviatilis* (*Pf*) pre (A) i tokom (B) cvetanja u jezeru Gruža.

Elektroforetska analiza proteina predstavlja kvalitativan nalaz koji naglašava razlike u profilu proteina u svim tkivima ispitivanih vrsta riba između dva istraživana perioda i koji ukazuje na razlike koje postoje između ispitivanih vrsta, kao i između tkiva svake vrste.

#### 4.4. Aktivnost enzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja

##### 4.4.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD)

Rezultati dobijeni u istraživanjima ove doktorske disertacije pokazuju da je aktivnost Uk SOD u jetri ispitivanih vrsta riba (Tabela 6, Grafik 1) bila statistički značajno povećana tokom cvetanja cijanobakterija u jezeru Gruža ( $23.62 \pm 0.74$  Jed/mg proteina) u odnosu na period pre cvetanja ( $20.25 \pm 0.55$  Jed/mg proteina) jedino kod vrste *B. bjoerkna*. U škragama (Tabela 7, Grafik 2) je zapažen trend smanjenja aktivnosti Uk SOD tokom cvetanja, tako da je aktivnost ispitivanog enzima pre cvetanja iznosila  $2.74 \pm 0.12$  Jed/mg proteina kod *R. rutilus*,  $1.29 \pm 0.03$  Jed/mg proteina kod *B. bjoerkna* i  $2.12 \pm 0.19$  Jed/mg proteina kod *P. fluviatilis*, a tokom cvetanja  $1.53 \pm 0.06$  Jed/mg proteina kod *R. rutilus*,  $0.83 \pm 0.06$  Jed/mg proteina kod *B. bjoerkna* i  $0.69 \pm 0.03$  Jed/mg proteina kod vrste *P. fluviatilis*. Statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima

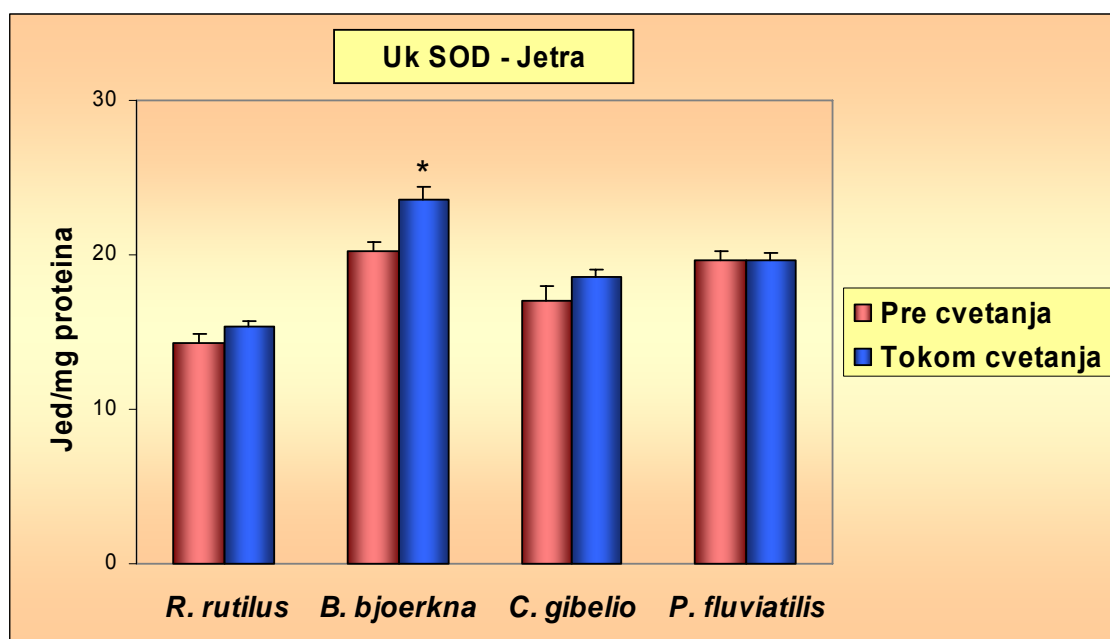
Uk SOD izmereno je i u tkivu mišića (Tabela 8 i Grafik 3) kod vrsta *C. gibelio* i *P. fluviatilis*, gde su dobijene vrednosti pre cvetanja iznosile  $4.60 \pm 0.18$  Jed/mg proteina i  $4.07 \pm 0.13$  Jed/mg proteina, a tokom cvetanja  $3.97 \pm 0.21$  Jed/mg proteina i  $3.39 \pm 0.07$  Jed/mg proteina.

U Tabeli 9 i na Grafiku 4 prikazana je aktivnost CuZn SOD u jetri ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža. Dobijeni rezultati pokazuju da je aktivnost ovog enzima u jetri *B. bjoerkna* bila povećana tokom cvetanja ( $19.30 \pm 0.62$  Jed/mg proteina) u odnosu na period pre cvetanja ( $16.78 \pm 0.52$  Jed/mg proteina). U jetri vrste *P. fluviatilis* konstatovan je suprotan trend, tako da je aktivnost Uk SOD bila statistički značajno manja tokom cvetanja ( $16.34 \pm 0.55$  Jed/mg proteina) u odnosu na period pre cvetanja ( $18.75 \pm 0.59$  Jed/mg proteina). Aktivnost CuZn SOD u škragama (Tabela 10, Grafik 5) ispitivanih vrsta riba bila je smanjena za vreme cvetanja kod sledećih vrsta: *R. rutilus*, *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis* i iznosila je redom  $1.27 \pm 0.06$  Jed/mg proteina,  $0.68 \pm 0.06$  Jed/mg proteina i  $0.47 \pm 0.02$  Jed/mg proteina. Isti trend zabeležen je i u mišiću vrste *P. fluviatilis* (Tabela 11, Grafik 6), gde je aktivnost CuZn SOD pre cvetanja ( $2.97 \pm 0.12$  Jed/mg proteina) bila statistički značajno veća u odnosu na vrednost koja je detektovana tokom cvetanja ( $2.46 \pm 0.06$  Jed/mg proteina).

Rezultati aktivnosti Mn SOD u jetri ispitivanih vrsta riba iz Gružanskog jezera prikazani su u Tabeli 12 i na Grafiku 7. Dobijeni podaci pokazuju da je aktivnost ovog enzima bila statistički značajno povećana kod svih vrsta za vreme cvetanja, kada je iznosila  $3.76 \pm 0.23$  Jed/mg proteina kod vrste *R. rutilus*,  $4.31 \pm 0.18$  Jed/mg proteina kod *B. bjoerkna*,  $2.63 \pm 0.05$  Jed/mg proteina kod *C. gibelio* i  $3.27 \pm 0.11$  Jed/mg proteina kod vrste *P. fluviatilis*. U škragama (Tabela 13, Grafik 8) i mišiću (Tabela 14, Grafik 9) ispitivanih vrsta zapažen je suprotan trend aktivnosti enzima Mn SOD. Konstatovano je statistički značajno smanjenje aktivnosti ovog enzima tokom perioda cvetanja u škragama *R. rutilus* ( $0.26 \pm 0.03$  Jed/mg proteina), *B. bjoerkna* ( $0.15 \pm 0.01$  Jed/mg proteina) i *C. gibelio* ( $0.24 \pm 0.02$  Jed/mg proteina) u odnosu na vrednosti izmerene pre cvetanja, koje su iznosile redom  $0.50 \pm 0.03$  Jed/mg proteina,  $0.31 \pm 0.01$  Jed/mg proteina i  $0.30 \pm 0.02$  Jed/mg proteina. Statistički značajno smanjenje aktivnosti Mn SOD u mišiću zabeleženo je za vreme cvetanja cijanobakterija kod vrsta *R. rutilus* ( $1.01 \pm 0.06$  Jed/mg proteina), *C. gibelio* ( $1.00 \pm 0.07$  Jed/mg proteina) i *P. fluviatilis* ( $0.93 \pm 0.02$  Jed/mg proteina).

Tabela 6. Aktivnost Uk SOD (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

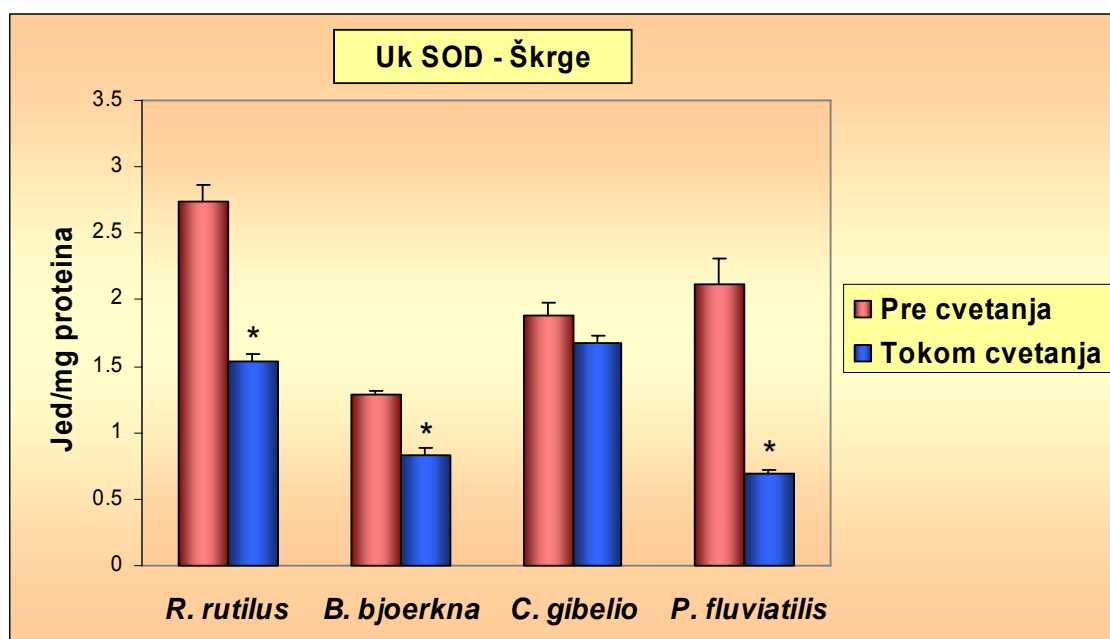
Uk SOD - Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	14.24 ± 0.63 (1.78)	15.33 ± 0.37 (1.17)
<i>Blicca bjoerkna</i>	20.25 ± 0.55 (2.00)	23.62 ± 0.74 * (2.55)
<i>Carassius gibelio</i>	17.08 ± 0.95 (2.32)	18.53 ± 0.55 (1.90)
<i>Perca fluviatilis</i>	19.67 ± 0.60 (1.70)	19.61 ± 0.49 (1.29)



Grafik 1. Aktivnost Uk SOD (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 7. Aktivnost Uk SOD (Jed/mg proteina)  
u škrigama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Uk SOD - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	2.74 ± 0.12 (0.34)	1.53 ± 0.06 * (0.18)
<i>Blicca bjoerkna</i>	1.29 ± 0.03 (0.08)	0.83 ± 0.06 * (0.19)
<i>Carassius gibelio</i>	1.88 ± 0.10 (0.25)	1.67 ± 0.06 (0.18)
<i>Perca fluviatilis</i>	2.12 ± 0.19 (0.46)	0.69 ± 0.03 * (0.06)



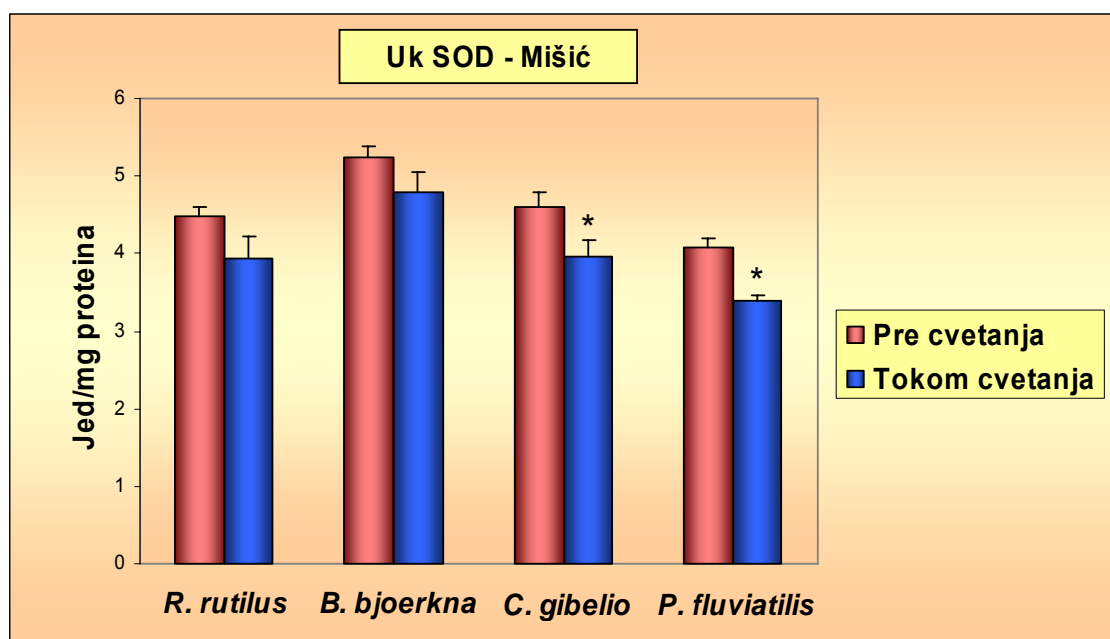
Grafik 2. Aktivnost Uk SOD (Jed/mg proteina)  
u škrigama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .



Tabela 8. Aktivnost Uk SOD (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Uk SOD - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	4.49 ± 0.11 (0.32)	3.94 ± 0.27 (0.86)
<i>Blicca bjoerkna</i>	5.23 ± 0.16 (0.60)	4.79 ± 0.26 (0.88)
<i>Carassius gibelio</i>	4.60 ± 0.18 (0.44)	3.97 ± 0.21 *
<i>Perca fluviatilis</i>	4.07 ± 0.13 (0.42)	3.39 ± 0.07 *

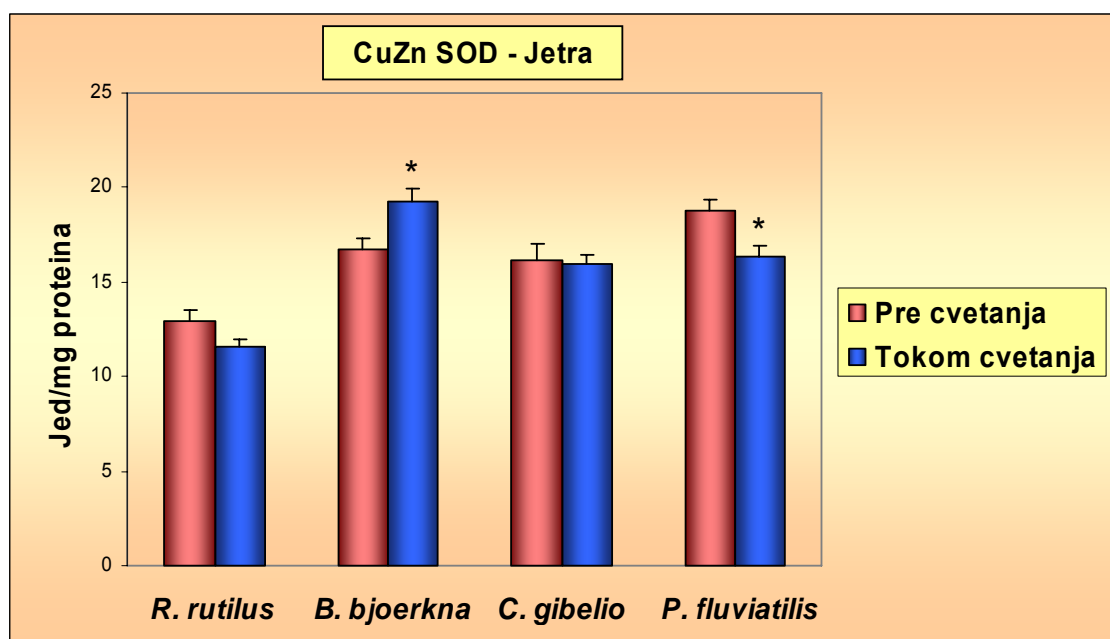


Grafik 3. Aktivnost Uk SOD (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 9. Aktivnost CuZn SOD (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

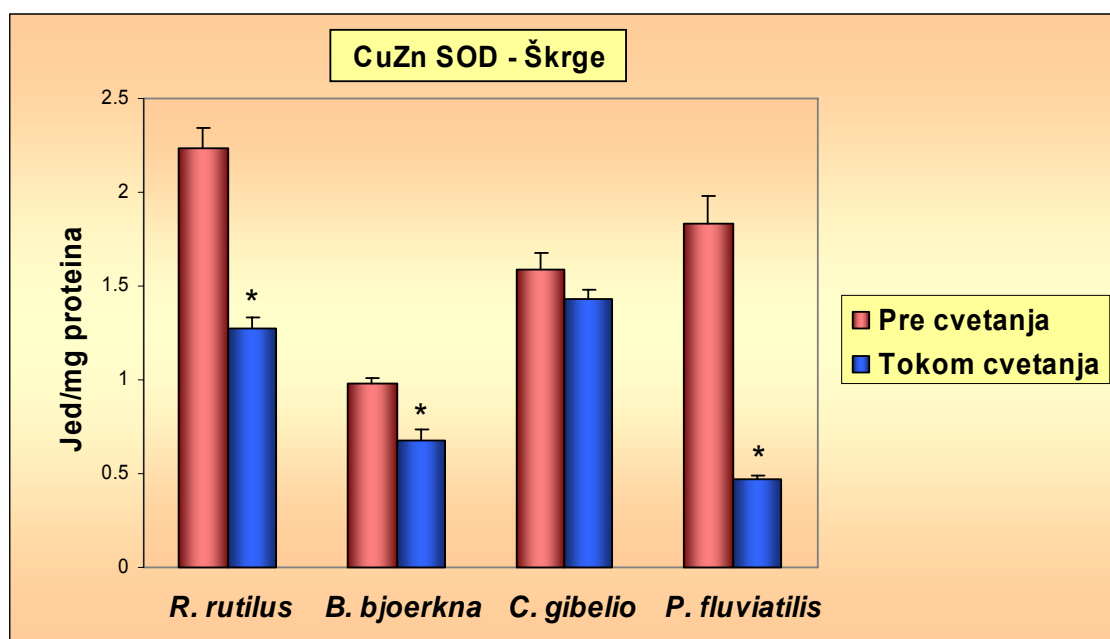
CuZn SOD - Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	12.91 ± 0.59 (1.66)	11.56 ± 0.38 (1.22)
<i>Blicca bjoerkna</i>	16.78 ± 0.52 (1.86)	19.30 ± 0.62 * (2.14)
<i>Carassius gibelio</i>	16.12 ± 0.93 (2.27)	15.91 ± 0.51 (1.77)
<i>Perca fluviatilis</i>	18.75 ± 0.59 (1.66)	16.34 ± 0.55 * (1.46)



Grafik 4. Aktivnost CuZn SOD (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 10. Aktivnost CuZn SOD (Jed/mg proteina)  
u škrgama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

CuZn SOD - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	2.24 ± 0.10 (0.29)	1.27 ± 0.06 * (0.19)
<i>Blicca bjoerkna</i>	0.98 ± 0.03 (0.09)	0.68 ± 0.06 * (0.20)
<i>Carassius gibelio</i>	1.59 ± 0.09 (0.22)	1.43 ± 0.05 (0.18)
<i>Perca fluviatilis</i>	1.83 ± 0.15 (0.38)	0.47 ± 0.02 * (0.05)

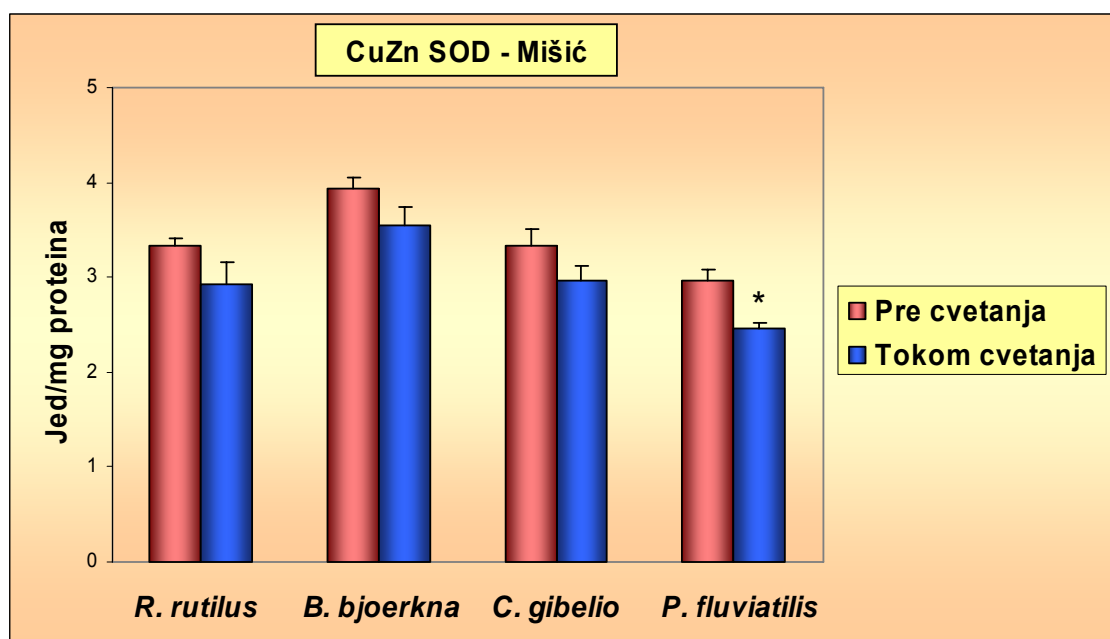


Grafik 5. Aktivnost CuZn SOD (Jed/mg proteina)  
u škrgama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 11. Aktivnost CuZn SOD (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

CuZn SOD - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	3.33 ± 0.09 (0.26)	2.93 ± 0.22 (0.69)
<i>Blicca bjoerkna</i>	3.93 ± 0.13 (0.49)	3.55 ± 0.19 (0.65)
<i>Carassius gibelio</i>	3.33 ± 0.17 (0.40)	2.97 ± 0.15 (0.51)
<i>Perca fluviatilis</i>	2.97 ± 0.12 (0.38)	2.46 ± 0.06 * (0.19)

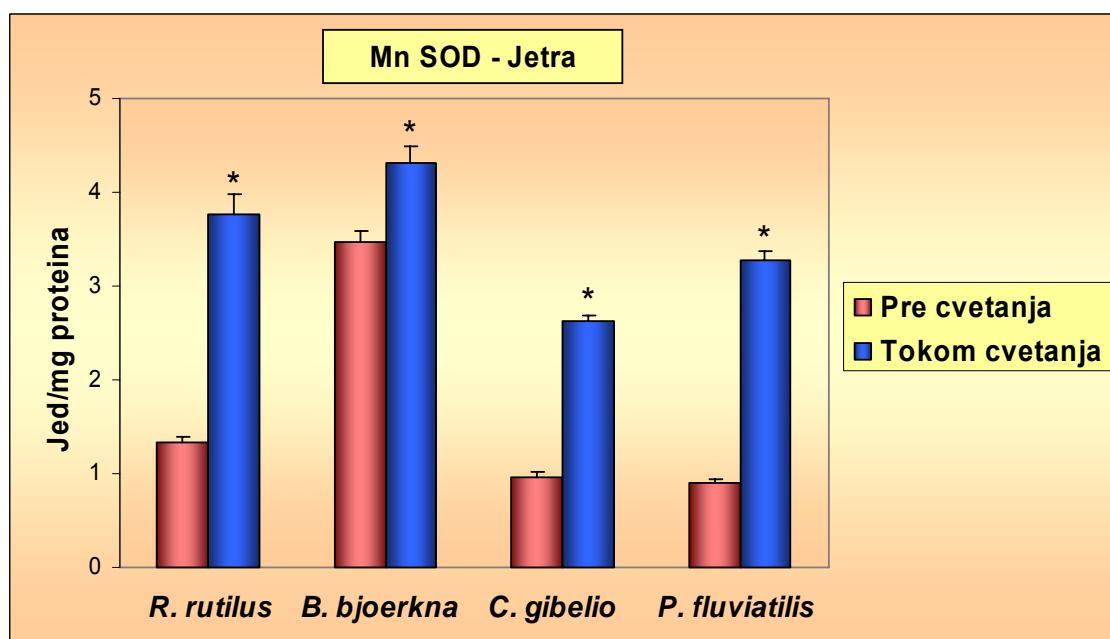


Grafik 6. Aktivnost CuZn SOD (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 12. Aktivnost Mn SOD (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

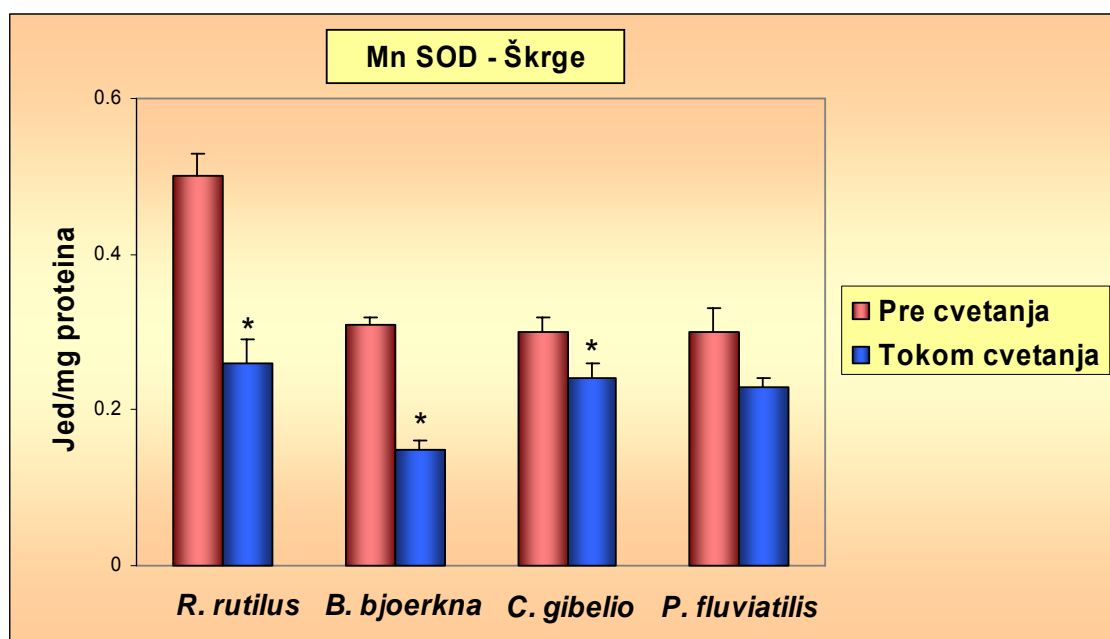
Mn SOD - Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	1.33 ± 0.06 (0.16)	3.76 ± 0.23 * (0.74)
<i>Blicca bjoerkna</i>	3.47 ± 0.12 (0.43)	4.31 ± 0.18 * (0.61)
<i>Carassius gibelio</i>	0.96 ± 0.05 (0.12)	2.63 ± 0.05 * (0.19)
<i>Perca fluviatilis</i>	0.91 ± 0.03 (0.09)	3.27 ± 0.11 * (0.29)



Grafik 7. Aktivnost Mn SOD (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 13. Aktivnost Mn SOD (Jed/mg proteina)  
u škrigama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

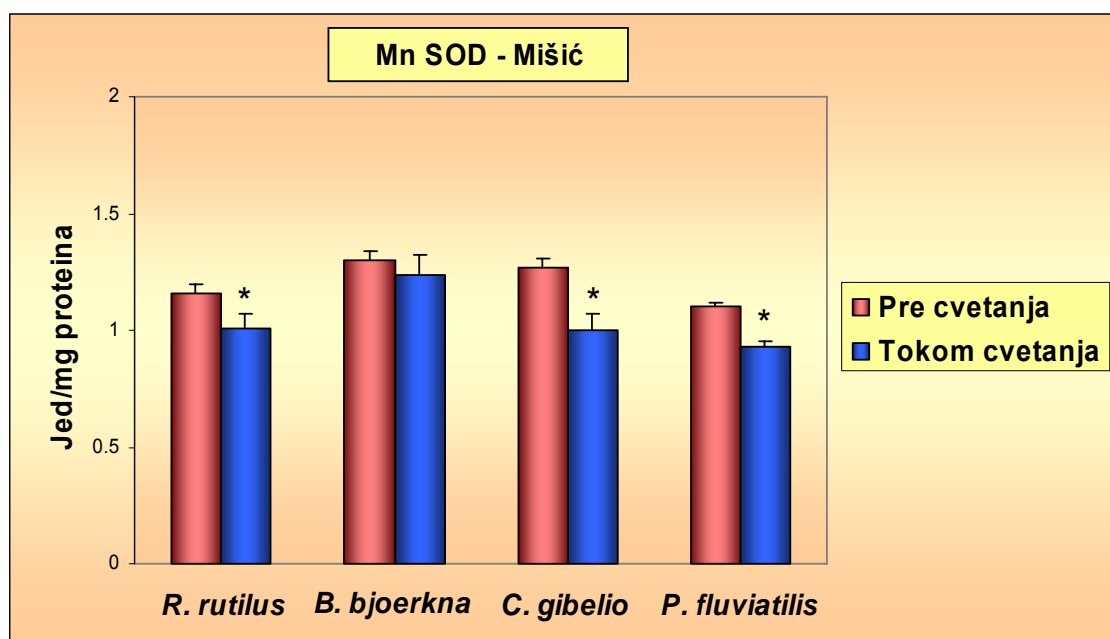
Mn SOD - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	0.50 ± 0.03 (0.08)	0.26 ± 0.03 * (0.08)
<i>Blicca bjoerkna</i>	0.31 ± 0.01 (0.03)	0.15 ± 0.01 * (0.04)
<i>Carassius gibelio</i>	0.30 ± 0.02 (0.04)	0.24 ± 0.02 * (0.05)
<i>Perca fluviatilis</i>	0.30 ± 0.03 (0.08)	0.23 ± 0.01 (0.02)



Grafik 8. Aktivnost Mn SOD (Jed/mg proteina)  
u škrigama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 14. Aktivnost Mn SOD (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Mn SOD - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	1.16 ± 0.04 (0.11)	1.01 ± 0.06 * (0.20)
<i>Blicca bjoerkna</i>	1.30 ± 0.04 (0.14)	1.24 ± 0.08 (0.27)
<i>Carassius gibelio</i>	1.27 ± 0.04 (0.11)	1.00 ± 0.07 * (0.23)
<i>Perca fluviatilis</i>	1.10 ± 0.02 (0.06)	0.93 ± 0.02 * (0.06)



Grafik 9. Aktivnost Mn SOD (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

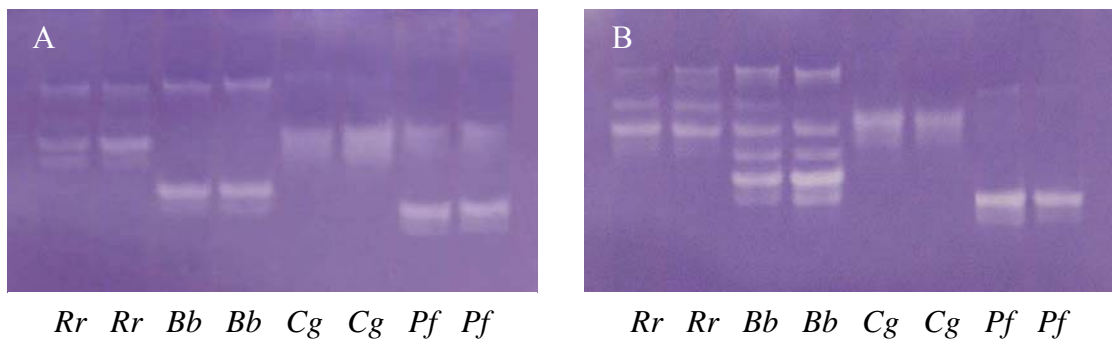
#### 4.4.1.1. Elektroforetski profil SOD

Elektroforetski profil antioksidacionog enzima SOD u jetri četiri ispitivane vrste riba *R. rutilus*, *B. bjoerkna*, *C. gibelio* i *P. fluviatilis* pre i tokom cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža prikazan je na Slici 17. Elektroforetska analiza SOD predstavlja kvalitativan nalaz koji ukazuje na postojanje razlika u profilu ovog enzima u jetri ispitivanih vrsta riba između dva istraživana perioda. Konstatovane razlike su najizraženije kod vrste *B. bjoerkna*, gde se zapaža različit broj traka pre i tokom cvetanja. Veći broj traka za vreme cvetanja u akumulacionom jezeru Gruža ukazuje na veći broj SOD izoformi u jetri vrste *B. bjoerkna* u ovom ispitivanom periodu u odnosu na period pre cvetanja.

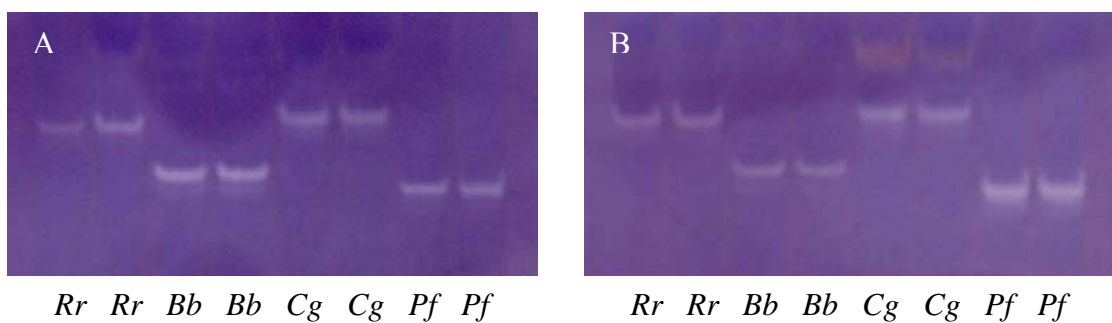
Dobijeni elektroforegrami enzima SOD u škragama (Slika 18) i mišiću (Slika 19) predstavljaju kvalitativan nalaz koji pokazuje tipičan distribicioni obrazac SOD izoformi kod svih ispitivanih vrsta riba u oba istraživana perioda. Na osnovu dobijenih elektroforetskih profila nisu konstatovane razlike u broju traka pre i tokom cvetanja cijanobakterija.

Elektroforetski nalaz enzima SOD u jetri, škragama i mišiću ispitivanih vrsta riba iz Gružanskog jezera takođe daje prikaz jasnih tkivnih i interspecijskih razlika u profilu ovog antioksidacionog enzima.

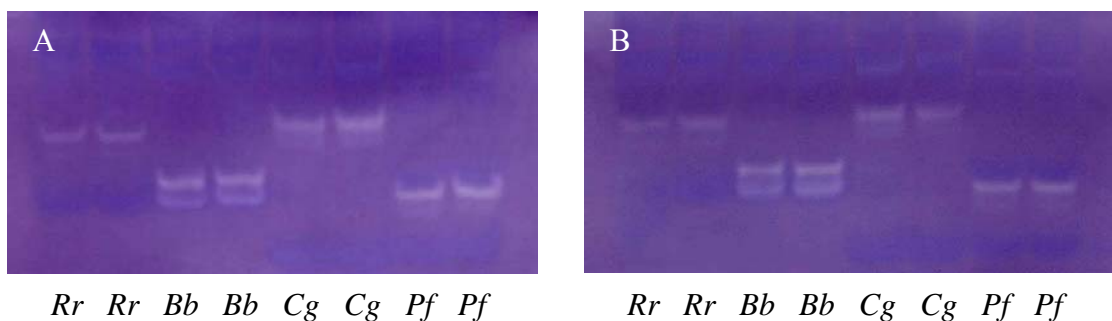




Slika 17. Elektroforetski profil SOD u jetri vrsta *R. rutilus* (*Rr*), *B. bjoerkna* (*Bb*), *C. gibelio* (*Cg*) i *P. fluviatilis* (*Pf*) pre (A) i tokom (B) cvetanja u jezeru Gruža.



Slika 18. Elektroforetski profil SOD u škrgama vrsta *R. rutilus* (*Rr*), *B. bjoerkna* (*Bb*), *C. gibelio* (*Cg*) i *P. fluviatilis* (*Pf*) pre (A) i tokom (B) cvetanja u jezeru Gruža.



Slika 19. Elektroforetski profil SOD u mišiću vrsta *R. rutilus* (*Rr*), *B. bjoerkna* (*Bb*), *C. gibelio* (*Cg*) i *P. fluviatilis* (*Pf*) pre (A) i tokom (B) cvetanja u jezeru Gruža.

#### 4.4.2. Aktivnost katalaze (CAT)

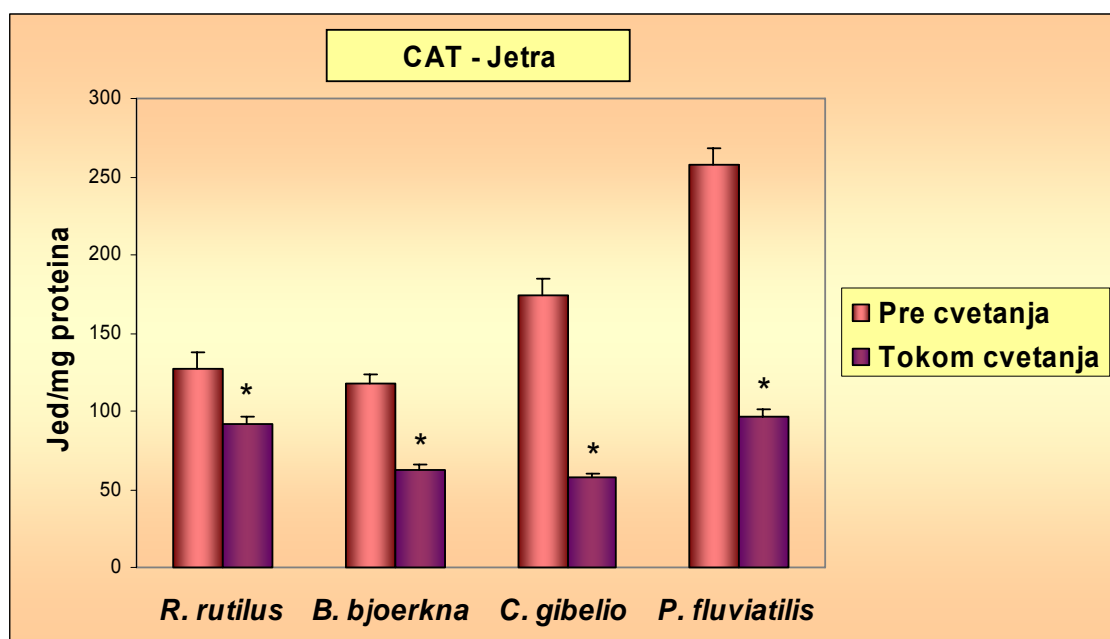
U Tabeli 15 i na Grafiku 10 prikazana je aktivnost CAT u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža. Dobijeni podaci pokazuju da je aktivnost ovog enzima bila statistički značajno smanjena kod svih vrsta za vreme cvetanja, kada je iznosila  $91.58 \pm 5.05$  Jed/mg proteina kod *R. rutilus*,  $62.05 \pm 3.30$  Jed/mg proteina kod *B. bjoerkna*,  $57.28 \pm 2.68$  Jed/mg proteina kod vrste *C. gibelio* i  $96.68 \pm 4.07$  Jed/mg proteina kod vrste *P. fluviatilis*, dok je pre cvetanja bila redom po vrstama  $127.35 \pm 10.33$  Jed/mg proteina,  $118.01 \pm 5.61$  Jed/mg proteina,  $174.34 \pm 10.77$  Jed/mg proteina i  $257.16 \pm 10.51$  Jed/mg proteina.

Aktivnost enzima CAT u škragama ispitivanih vrsta riba prikazana je u Tabeli 16 i na Grafiku 11. Tokom cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža konstatovano je statistički značajno povećanje aktivnosti ovog enzima kod vrsta *R. rutilus* i *P. fluviatilis* ( $46.90 \pm 1.95$  Jed/mg proteina i  $56.16 \pm 1.73$  Jed/mg proteina) u odnosu na vrednosti koje su izmerene u periodu pre cvetanja ( $28.04 \pm 1.62$  Jed/mg proteina i  $47.69 \pm 1.80$  Jed/mg proteina). U škragama *B. bjoerkna* i *C. gibelio* nije konstatovana statistički značajna razlika u vrednostima aktivnosti enzima CAT između dva ispitivana perioda.

Statistički podaci ukazuju da u mišiću (Tabela 17, Grafik 12) svih ispitivanih vrsta postoji značajna razlika u aktivnosti CAT između dva ispitivana perioda u vidu povećanja aktivnosti ovog enzima tokom cvetanja cijanobakterija u Gružanskom jezeru. Aktivnost ispitivanog enzima pre cvetanja iznosila je  $22.66 \pm 1.05$  Jed/mg proteina kod vrste *R. rutilus*,  $18.10 \pm 1.16$  Jed/mg proteina kod vrste *B. bjoerkna*,  $21.30 \pm 1.30$  Jed/mg proteina kod *C. gibelio* i  $15.31 \pm 1.09$  Jed/mg proteina kod *P. fluviatilis*, a za vreme cvetanja vrednosti su bile redom  $33.27 \pm 2.03$  Jed/mg proteina kod *R. rutilus*,  $41.70 \pm 3.07$  Jed/mg proteina kod *B. bjoerkna*,  $36.05 \pm 1.79$  Jed/mg proteina kod vrste *C. gibelio* i  $25.97 \pm 1.06$  Jed/mg proteina kod vrste *P. fluviatilis*.

Tabela 15. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

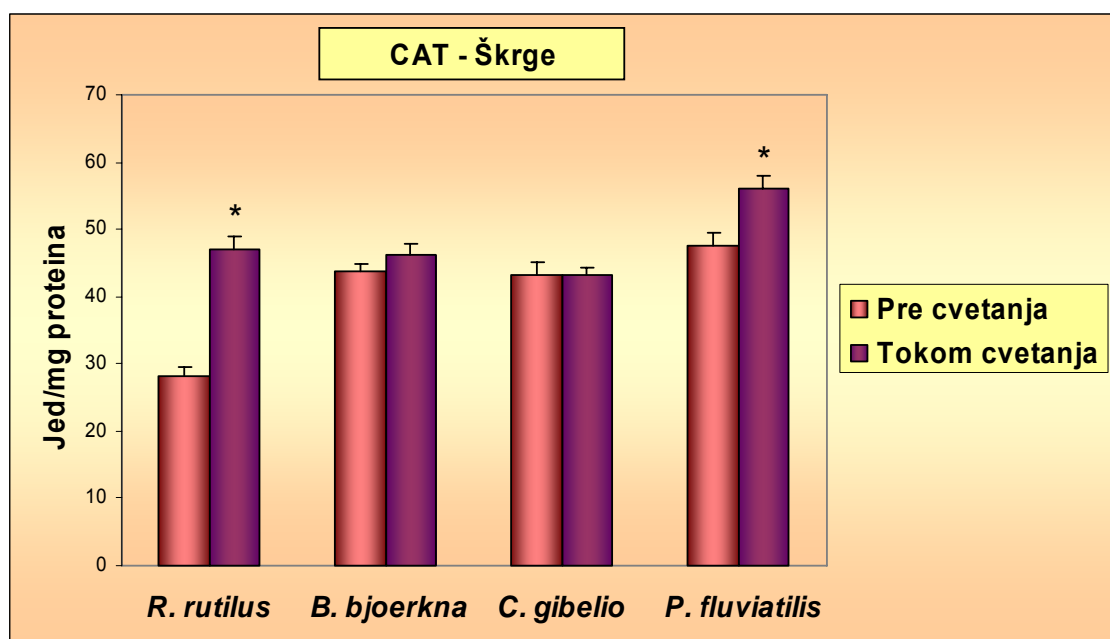
CAT - Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	127.35 ± 10.33 (27.33)	91.58 ± 5.05 * (15.14)
<i>Blicca bjoerkna</i>	118.01 ± 5.61 (20.23)	62.05 ± 3.30 * (11.42)
<i>Carassius gibelio</i>	174.34 ± 10.77 (26.38)	57.28 ± 2.68 * (9.29)
<i>Perca fluviatilis</i>	257.16 ± 10.51 (29.72)	96.68 ± 4.07 * (11.50)



Grafik 10. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 16. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina)  
u škragama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

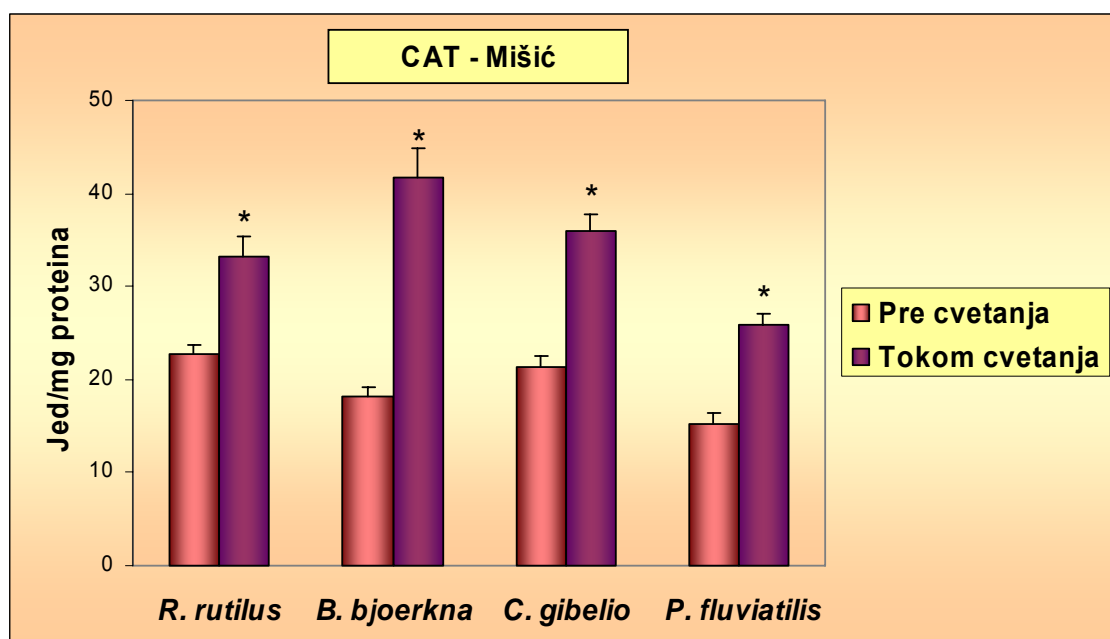
CAT - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	28.04 ± 1.62 (4.57)	46.90 ± 1.95 * (5.53)
<i>Blicca bjoerkna</i>	43.68 ± 1.10 (3.80)	46.12 ± 1.73 (6.00)
<i>Carassius gibelio</i>	43.18 ± 2.07 (5.06)	43.27 ± 0.98 (3.41)
<i>Perca fluviatilis</i>	47.69 ± 1.80 (5.09)	56.16 ± 1.73 * (4.91)



Grafik 11. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina)  
u škragama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 17. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

CAT - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	22.66 ± 1.05 (2.78)	33.27 ± 2.03 * (6.41)
<i>Blicca bjoerkna</i>	18.10 ± 1.16 (4.35)	41.70 ± 3.07 * (10.65)
<i>Carassius gibelio</i>	21.30 ± 1.30 (3.18)	36.05 ± 1.79 * (6.21)
<i>Perca fluviatilis</i>	15.31 ± 1.09 (3.25)	25.97 ± 1.06 * (3.34)



Grafik 12. Aktivnost CAT (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

#### 4.4.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px)

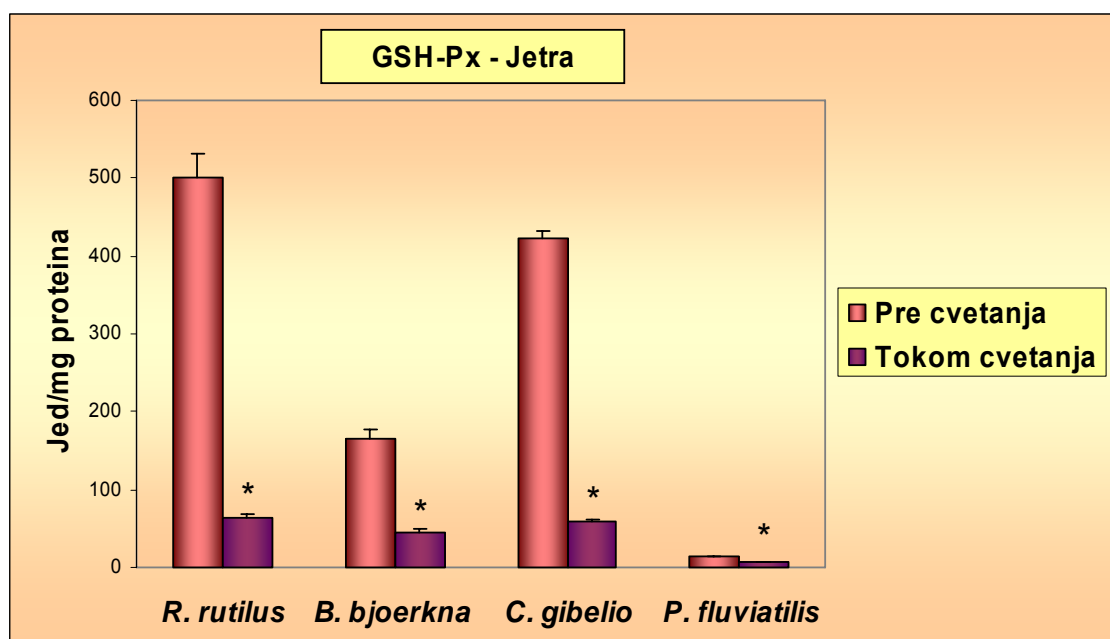
Rezultati aktivnosti enzima GSH-Px u jetri ispitivanih vrsta riba prikazani su u Tabeli 18 i na Grafiku 13. Dobijeni podaci pokazuju da je aktivnost GSH-Px bila statistički značajno smanjena u jetri svih ispitivanih vrsta za vreme cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža. Aktivnost ovog enzima u jetri *R. rutilus* iznosila je  $500.50 \pm 31.97$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $64.44 \pm 4.43$  Jed/mg proteina tokom cvetanja, kod vrste *B. bjoerkna*  $166.13 \pm 10.66$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $45.53 \pm 3.30$  Jed/mg proteina tokom cvetanja, kod vrste *C. gibelio*  $422.80 \pm 9.41$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $58.97 \pm 2.10$  Jed/mg proteina tokom cvetanja, a kod *P. fluviatilis*  $13.43 \pm 0.50$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $6.06 \pm 0.70$  Jed/mg proteina tokom cvetanja cijanobakterija.

Dobijeni statistički rezultati pokazuju da u škragama ispitivanih vrsta *B. bjoerkna*, *C. gibelio* i *P. fluviatilis* postoji značajna razlika u aktivnosti GSH-Px između dva ispitivana perioda, pri čemu je kod prve dve vrste konstatovano smanjenje, dok je kod vrste *P. fluviatilis* zabeleženo povećanje aktivnosti GSH-Px za vreme cvetanja (Tabela 19, Grafik 14). Aktivnost ovog antioksidacionog enzima u škragama vrste *B. bjoerkna* iznosila je  $22.21 \pm 0.62$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $17.10 \pm 0.56$  Jed/mg proteina tokom cvetanja, kod *C. gibelio*  $27.46 \pm 2.42$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $9.74 \pm 0.41$  Jed/mg proteina tokom cvetanja, dok je kod vrste *P. fluviatilis* aktivnost GSH-Px iznosila  $12.89 \pm 1.10$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $15.76 \pm 0.30$  Jed/mg proteina tokom cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža.

U mišiću sve četiri ispitivane vrste riba zapažen je isti trend aktivnosti GSH-Px kao i u jetri, odnosno detektovano je smanjenje aktivnosti ovog enzima tokom perioda cvetanja (Tabela 20, Grafik 15). Dobijene su sledeće vrednosti pre cvetanja:  $7.28 \pm 0.52$  Jed/mg proteina kod vrste *R. rutilus*,  $4.37 \pm 0.25$  Jed/mg proteina kod vrste *B. bjoerkna*,  $12.85 \pm 0.60$  Jed/mg proteina kod vrste *C. gibelio* i  $7.79 \pm 0.30$  Jed/mg proteina kod vrste *P. fluviatilis*, dok su izračunate vrednosti tokom cvetanja iznosile redom po vrstama  $3.20 \pm 0.37$  Jed/mg proteina,  $2.45 \pm 0.12$  Jed/mg proteina,  $3.35 \pm 0.20$  Jed/mg proteina i  $3.62 \pm 0.09$  Jed/mg proteina.

Tabela 18. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

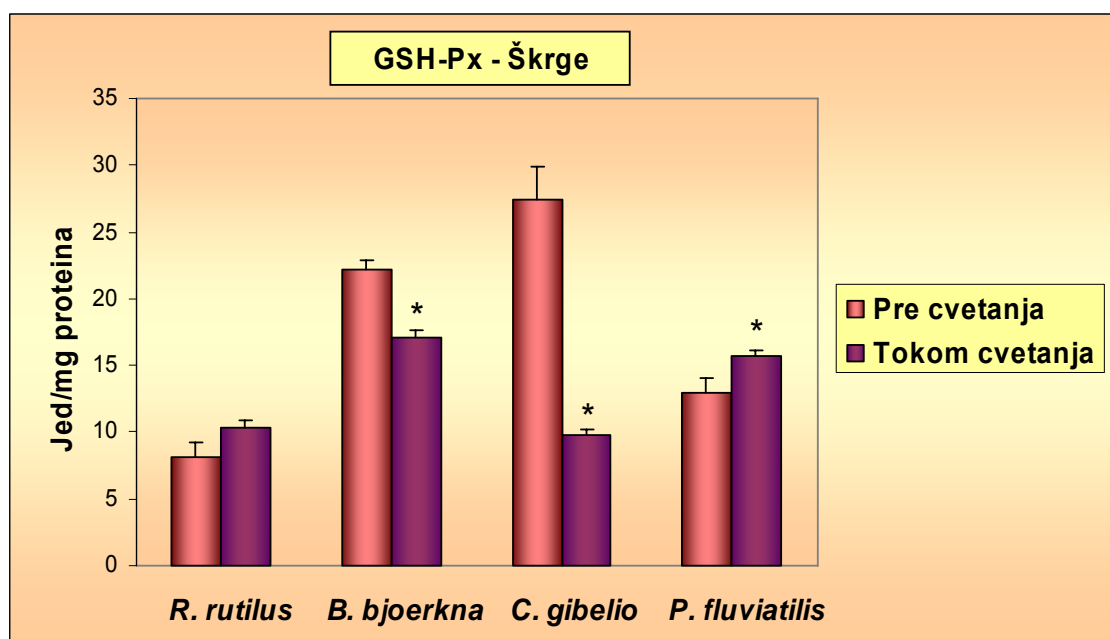
GSH-Px - Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	500.50 ± 31.97 (84.58)	64.44 ± 4.43 * (12.52)
<i>Blicca bjoerkna</i>	166.13 ± 10.66 (39.87)	45.53 ± 3.30 * (11.42)
<i>Carassius gibelio</i>	422.80 ± 9.41 (21.03)	58.97 ± 2.10 * (7.29)
<i>Perca fluviatilis</i>	13.43 ± 0.50 (1.42)	6.06 ± 0.70 * (1.72)



Grafik 13. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 19. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina)  
u škrgama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

GSH-Px - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	8.11 ± 1.13 (2.98)	10.35 ± 0.53 (1.66)
<i>Blicca bjoerkna</i>	22.21 ± 0.62 (1.87)	17.10 ± 0.56 * (1.94)
<i>Carassius gibelio</i>	27.46 ± 2.42 (5.42)	9.74 ± 0.41 * (1.28)
<i>Perca fluviatilis</i>	12.89 ± 1.10 (2.70)	15.76 ± 0.30 * (0.74)

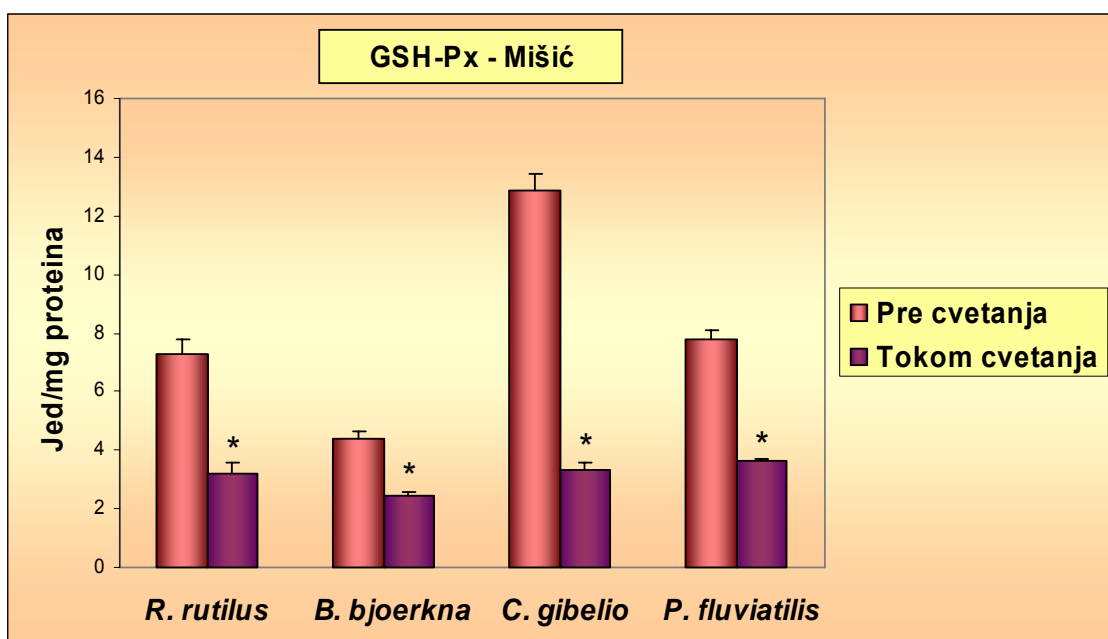


Grafik 14. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina)  
u škrgama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .



Tabela 20. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

GSH-Px - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	7.28 ± 0.52 (1.47)	3.20 ± 0.37 * (1.04)
<i>Blicca bjoerkna</i>	4.37 ± 0.25 (0.95)	2.45 ± 0.12 * (0.36)
<i>Carassius gibelio</i>	12.85 ± 0.60 (1.33)	3.35 ± 0.20 * (0.66)
<i>Perca fluviatilis</i>	7.79 ± 0.30 (0.96)	3.62 ± 0.09 * (0.30)



Grafik 15. Aktivnost GSH-Px (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

#### 4.4.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR)

Aktivnost antioksidacionog enzima GR u tkivima ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja cijanobakterija u Gružanskom jezeru prikazan je u Tabeli 21 i na Grafiku 16 za tkivo jetre, u Tabeli 22 i na Grafiku 17 za tkivo škrge i u Tabeli 23 i na Grafiku 18 za tkivo mišića. Statistički značajna razlika u aktivnosti ovog enzima između dva ispitivana perioda konstatovana je u jetri i mišiću vrsta *R. rutilus* i *C. gibelio*, kao i u škragama kod svih ispitivanih vrsta.

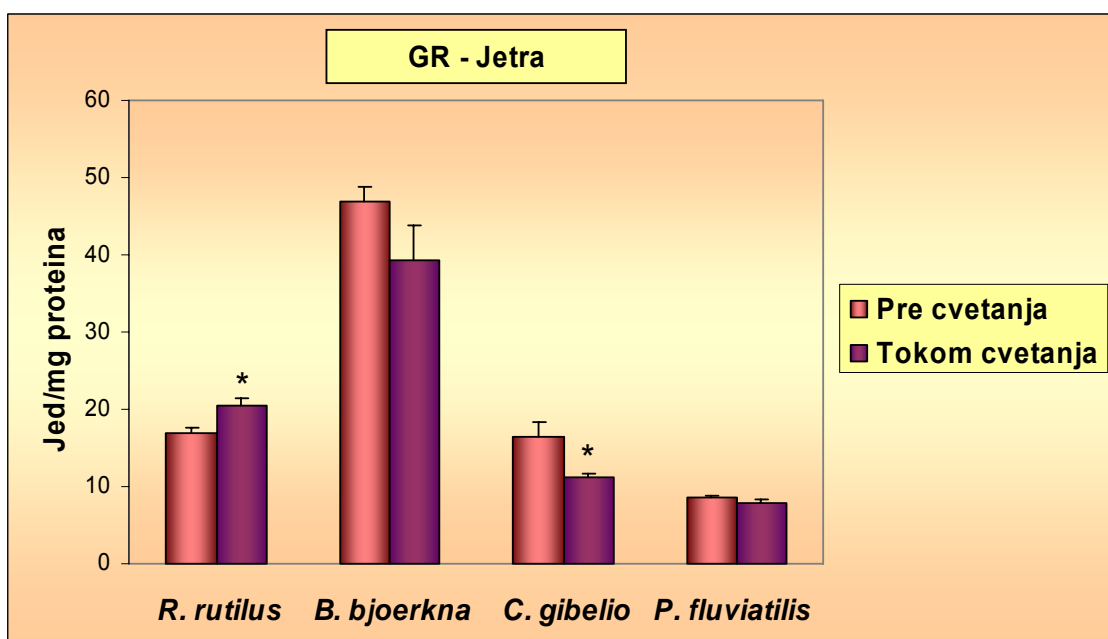
U jetri vrste *R. rutilus* izmereno je statistički značajno povećanje aktivnosti GR tokom cvetanja ( $20.45 \pm 1.09$  Jed/mg proteina) u odnosu na aktivnost pre cvetanja ( $16.90 \pm 0.78$  Jed/mg proteina). Suprotan trend zabeležen je u jetri vrste *C. gibelio*, pa je aktivnost GR pre cvetanja iznosila  $16.53 \pm 1.70$  Jed/mg proteina, a bila je smanjena tokom perioda cvetanja kada je iznosila  $11.26 \pm 0.49$  Jed/mg proteina. U jetri druge dve vrste, *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis*, nije konstatovana statistički značajna razlika u aktivnosti GR između dva ispitivana perioda.

Dobijeni podaci za aktivnost GR u škragama pokazuju da je aktivnost ovog enzima bila statistički značajno smanjena kod svih ispitivanih vrsta za vreme cvetanja, kada je iznosila  $8.98 \pm 0.67$  Jed/mg proteina kod *R. rutilus*,  $10.25 \pm 0.39$  Jed/mg proteina kod *B. bjoerkna*,  $5.78 \pm 0.33$  Jed/mg proteina kod *C. gibelio* i  $13.65 \pm 0.87$  Jed/mg proteina kod vrste *P. fluviatilis*. Pre cvetanja cijanobakterija izmerene vrednosti za aktivnost enzima GR su iznosile redom po vrstama  $12.16 \pm 0.87$  Jed/mg proteina,  $14.08 \pm 0.45$  Jed/mg proteina,  $11.43 \pm 0.84$  Jed/mg proteina i  $20.98 \pm 0.85$  Jed/mg proteina.

Potpuno isti trend zabeležen je i u mišiću vrsta *R. rutilus* i *C. gibelio*, gde je aktivnost GR bila statistički značajno manja tokom cvetanja (redom  $0.70 \pm 0.05$  Jed/mg proteina i  $6.53 \pm 0.49$  Jed/mg proteina) u odnosu na period pre cvetanja ( $0.89 \pm 0.05$  Jed/mg proteina i  $9.52 \pm 0.65$  Jed/mg proteina). S druge strane, u mišiću ispitivanih vrsta *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis* nije zapažena statistički značajna razlika u aktivnosti GR između dva istraživana perioda.

Tabela 21. Aktivnost GR (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

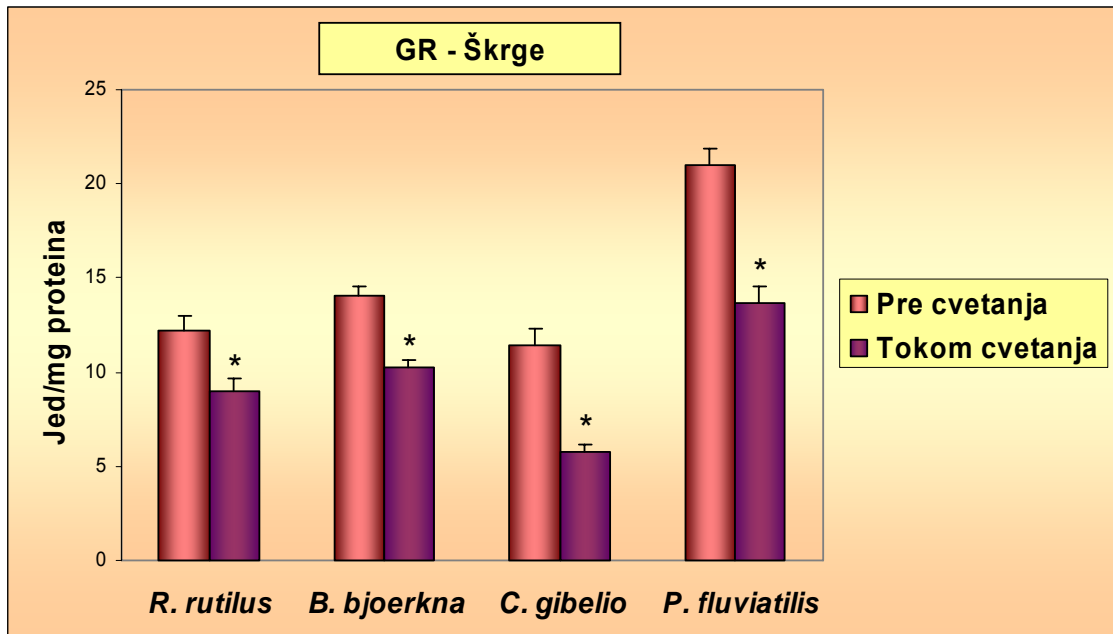
GR - Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	16.90 ± 0.78 (2.07)	20.45 ± 1.09 * (3.08)
<i>Blicca bjoerkna</i>	46.81 ± 2.11 (6.99)	39.38 ± 4.53 (14.31)
<i>Carassius gibelio</i>	16.53 ± 1.70 (4.17)	11.26 ± 0.49 * (1.38)
<i>Perca fluviatilis</i>	8.49 ± 0.33 (0.93)	7.97 ± 0.37 (1.04)



Grafik 16. Aktivnost GR (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 22. Aktivnost GR (Jed/mg proteina)  
u škrgama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

GR - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	12.16 ± 0.87 (2.45)	8.98 ± 0.67 * (2.12)
<i>Blicca bjoerkna</i>	14.08 ± 0.45 (1.56)	10.25 ± 0.39 * (1.35)
<i>Carassius gibelio</i>	11.43 ± 0.84 (1.89)	5.78 ± 0.33 * (1.10)
<i>Perca fluviatilis</i>	20.98 ± 0.85 (2.25)	13.65 ± 0.87 * (2.45)

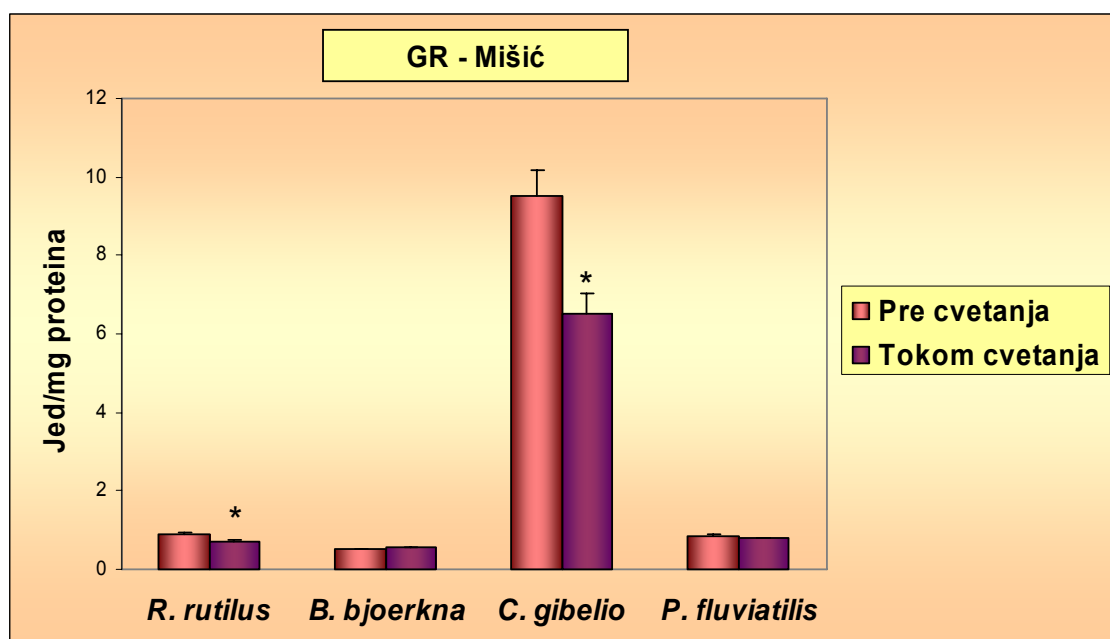


Grafik 17. Aktivnost GR (Jed/mg proteina)  
u škrgama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 23. Aktivnost GR (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

GR - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	0.89 ± 0.05 (0.14)	0.70 ± 0.05 * (0.16)
<i>Blicca bjoerkna</i>	0.50 ± 0.03 (0.11)	0.55 ± 0.03 (0.10)
<i>Carassius gibelio</i>	9.52 ± 0.65 (1.46)	6.53 ± 0.49 * (1.64)
<i>Perca fluviatilis</i>	0.83 ± 0.04 (0.11)	0.78 ± 0.03 (0.11)



Grafik 18. Aktivnost GR (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

#### 4.4.5. Aktivnost enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST)

Rezultati dobijeni u istraživanjima ove doktorske disertacije pokazuju da je aktivnost enzima faze II biotransformacije GST u jetri (Tabela 24, Grafik 19) ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža bila statistički značajno povećana tokom cvetanja cijanobakterija ( $1127.15 \pm 49.46$  Jed/mg proteina) u odnosu na period pre cvetanja ( $904.12 \pm 57.50$  Jed/mg proteina) jedino kod vrste *B. bjoerkna*. U jetri ostalih vrsta riba nisu detektovane razlike u aktivnosti GST između ispitivanih perioda.

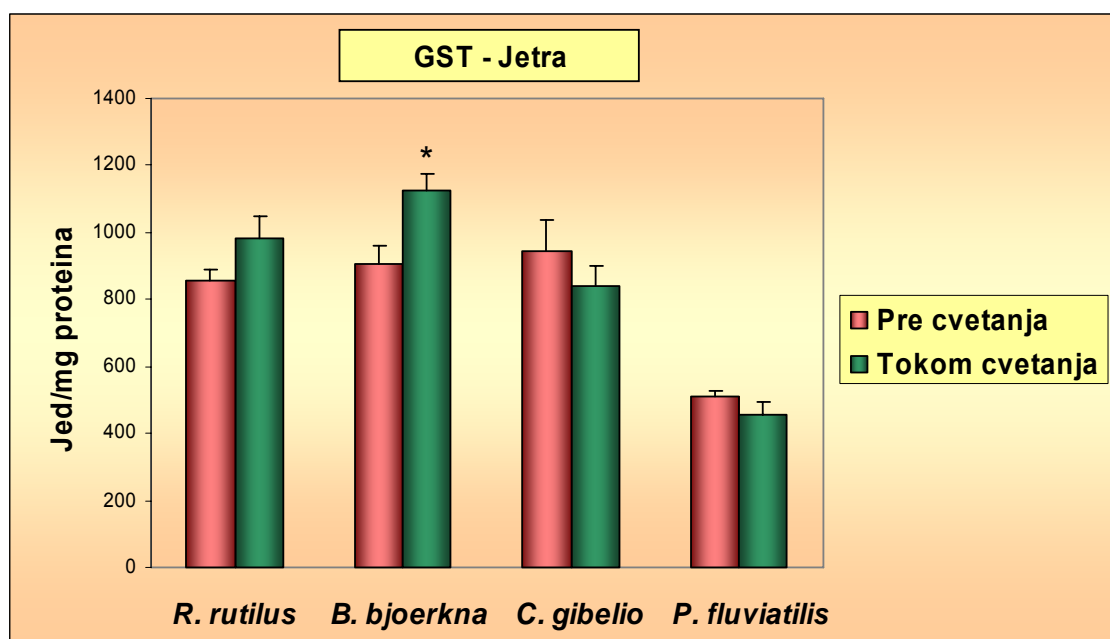
Statistički značajno smanjenje aktivnosti GST za vreme cvetanja u odnosu na period pre cvetanja zapaženo je u škragama (Tabela 25, Grafik 20) i mišiću (Tabela 26, Grafik 21) kod svih ispitivanih vrsta.

Dobijeni su sledeći podaci za aktivnost GST u škragama riba pre cvetanja cijanobakterija u jezeru Gruža:  $100.19 \pm 6.71$  Jed/mg proteina kod vrste *R. rutilus*,  $156.64 \pm 5.31$  Jed/mg proteina kod vrste *B. bjoerkna*,  $120.08 \pm 10.78$  Jed/mg proteina kod *C. gibelio* i  $78.71 \pm 4.25$  Jed/mg proteina kod *P. fluviatilis*, dok su izračunate vrednosti tokom cvetanja iznosile redom po vrstama  $77.71 \pm 4.23$  Jed/mg proteina,  $92.57 \pm 3.48$  Jed/mg proteina,  $81.34 \pm 3.75$  Jed/mg proteina i  $61.53 \pm 2.81$  Jed/mg proteina.

Aktivnost ovog biotransformacionog enzima u mišiću vrste *R. rutilus* bila je  $86.90 \pm 6.15$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $63.50 \pm 6.22$  Jed/mg proteina tokom cvetanja, kod vrste *B. bjoerkna*  $45.83 \pm 1.42$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $38.30 \pm 2.20$  Jed/mg proteina tokom cvetanja, kod *C. gibelio*  $130.94 \pm 8.24$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $74.79 \pm 4.34$  Jed/mg proteina tokom cvetanja, a kod *P. fluviatilis*  $12.88 \pm 0.41$  Jed/mg proteina pre cvetanja i  $9.08 \pm 0.49$  Jed/mg proteina tokom cvetanja cijanobakterija.

Tabela 24. Aktivnost GST (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

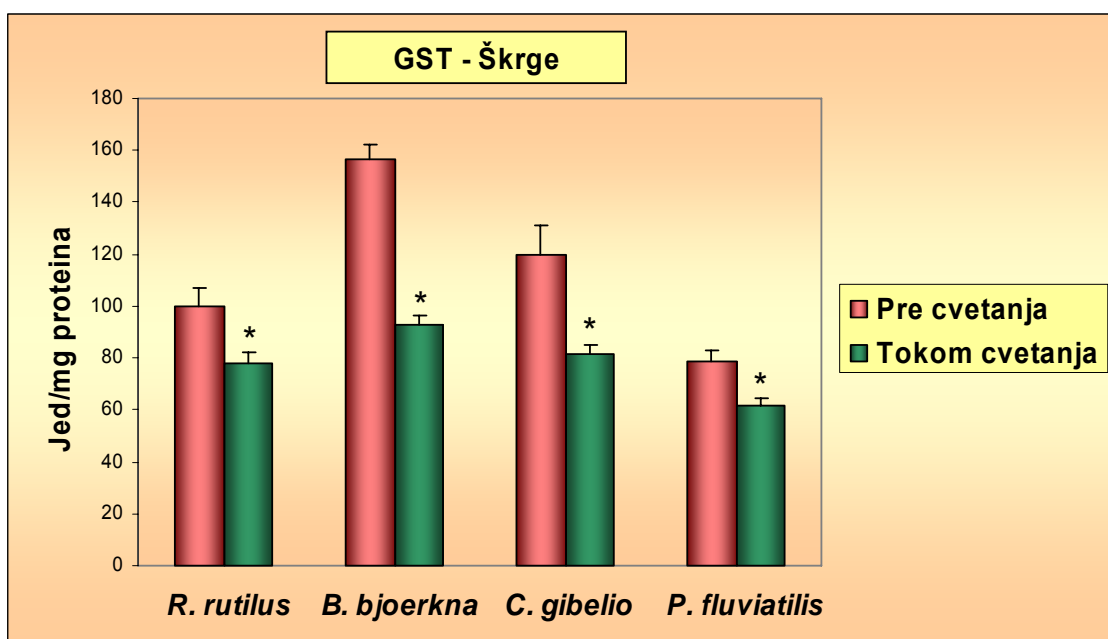
GST - Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	858.20 ± 29.95 (84.70)	982.37 ± 66.01 (198.02)
<i>Blicca bjoerkna</i>	904.12 ± 57.50 (207.31)	1127.15 ± 49.46 * (156.42)
<i>Carassius gibelio</i>	943.85 ± 92.08 (225.56)	841.65 ± 60.00 (199.01)
<i>Perca fluviatilis</i>	508.95 ± 19.24 (54.42)	456.84 ± 38.88 (109.97)



Grafik 19. Aktivnost GST u (Jed/mg proteina)  
u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 25. Aktivnost GST (Jed/mg proteina)  
u škragama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

GST - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	100.19 ± 6.71 (17.76)	77.71 ± 4.23 * (11.97)
<i>Blicca bjoerkna</i>	156.64 ± 5.31 (18.38)	92.57 ± 3.48 * (11.53)
<i>Carassius gibelio</i>	120.08 ± 10.78 (24.11)	81.34 ± 3.75 * (12.45)
<i>Perca fluviatilis</i>	78.71 ± 4.25 (12.03)	61.53 ± 2.81 * (7.94)

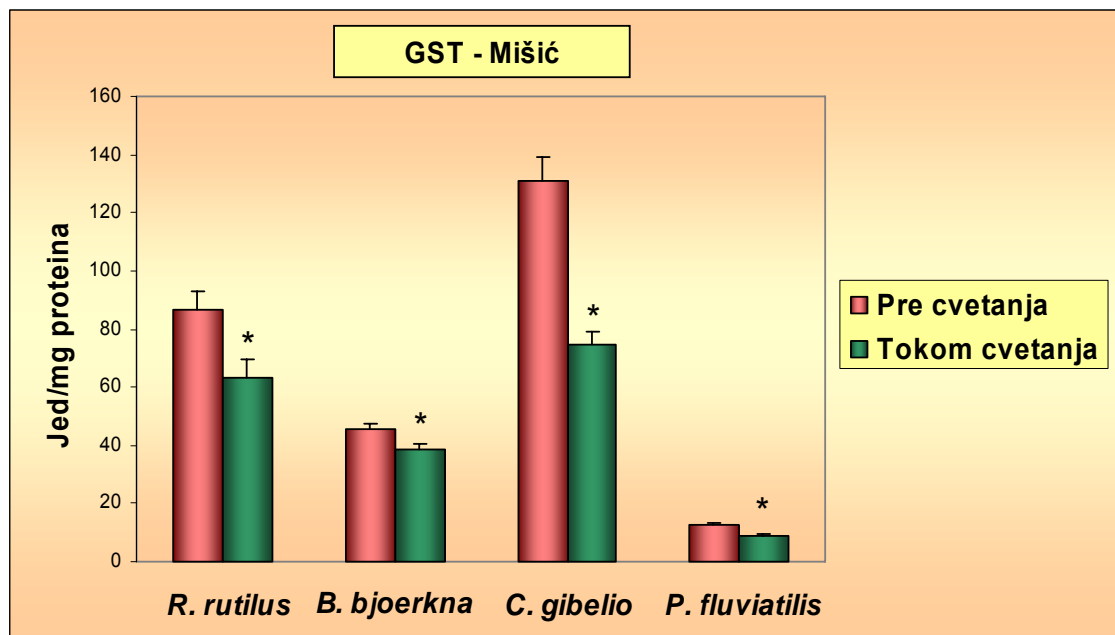


Grafik 20. Aktivnost GST (Jed/mg proteina)  
u škragama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.  
Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .



Tabela 26. Aktivnost GST (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

GST - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	86.90 ± 6.15 (16.26)	63.50 ± 6.22 * (19.66)
<i>Blicca bjoerkna</i>	45.83 ± 1.42 (5.30)	38.30 ± 2.20 * (7.62)
<i>Carassius gibelio</i>	130.94 ± 8.24 (18.42)	74.79 ± 4.34 * (13.73)
<i>Perca fluviatilis</i>	12.88 ± 0.41 (1.29)	9.08 ± 0.49 * (1.55)



Grafik 21. Aktivnost GST (Jed/mg proteina)  
u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

## 4.5. Koncentracija neenzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja

### 4.5.1. Koncentracija glutationa (GSH)

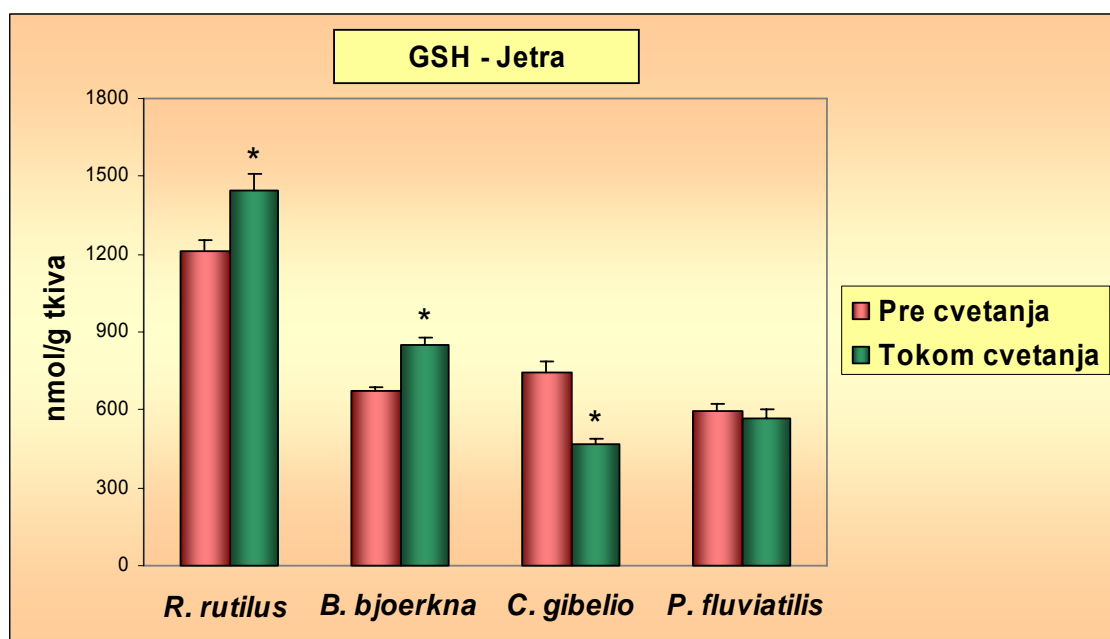
U Tabeli 27 i na Grafiku 22 prikazani su rezultati koji se odnose na izmerene vrednosti koncentracije ukupnog GSH u jetri ispitivanih vrsta riba pre i za vreme cvetanja cijanobakterija u Gružanskom jezeru. Dobijeni rezultati pokazuju da je koncentracija ove niskomolekulske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja bila povećana u jetri vrsta *R. rutilus* ( $1448.82 \pm 60.15$  nmol/g tkiva) i *B. bjoerkna* ( $852.87 \pm 24.44$  nmol/g tkiva), a smanjena kod *C. gibelio* ( $465.10 \pm 25.31$  nmol/g tkiva) tokom cvetanja u odnosu na period pre cvetanja, kada su dobijene vrednosti iznosile redom  $1210.79 \pm 42.34$  nmol/g tkiva,  $673.56 \pm 17.07$  nmol/g tkiva i  $744.72 \pm 45.39$  nmol/g tkiva. U jetri vrste *P. fluviatilis* nije konstatovana statistički značajna razlika u izmerenoj koncentraciji ukupnog GSH između ispitivanih perioda.

Dobijeni statistički podaci pokazuju da u škragama kod tri ispitivane vrste riba iz akumulacionog jezera Gruža: *R. rutilus*, *C. gibelio* i *P. fluviatilis* postoji značajna razlika u koncentraciji ukupnog GSH između dva ispitivana perioda, pri čemu je kod prve dve vrste konstatovano povećanje, dok je kod vrste *P. fluviatilis* zabeleženo smanjenje koncentracije GSH za vreme cvetanja cijanobakterija (Tabela 28, Grafik 23). Izmerena koncentracija ukupnog GSH u škragama *R. rutilus* iznosila je  $115.20 \pm 10.72$  nmol/g tkiva pre cvetanja i  $237.77 \pm 15.76$  nmol/g tkiva tokom cvetanja, kod *C. gibelio*  $45.52 \pm 5.67$  nmol/g tkiva pre cvetanja i  $73.80 \pm 5.66$  nmol/g tkiva tokom cvetanja, a kod *P. fluviatilis*  $274.53 \pm 23.51$  nmol/g tkiva pre cvetanja i  $147.15 \pm 6.09$  nmol/g tkiva tokom cvetanja.

Koncentracija ukupnog GSH u mišiću (Tabela 29, Grafik 24) bila je statistički značajno povećana za vreme cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža kod dve ispitivane vrste: *B. bjoerkna* ( $172.17 \pm 9.92$  nmol/g tkiva) i *P. fluviatilis* ( $278.62 \pm 17.60$  nmol/g tkiva) u odnosu na period pre cvetanja, kada su dobijene vrednosti iznosile redom  $118.45 \pm 5.92$  nmol/g tkiva i  $171.30 \pm 2.75$  nmol/g tkiva.

Tabela 27. Koncentracija ukupnog GSH (nmol/g tkiva) u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

GSH - Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	1210.79 ± 42.34 (112.02)	1448.82 ± 60.15 * (170.14)
<i>Blicca bjoerkna</i>	673.56 ± 17.07 (61.56)	852.87 ± 24.44 * (77.30)
<i>Carassius gibelio</i>	744.72 ± 45.39 (101.50)	465.10 ± 25.31 * (71.60)
<i>Perca fluviatilis</i>	597.33 ± 26.73 (26.73)	564.50 ± 35.35 (99.99)

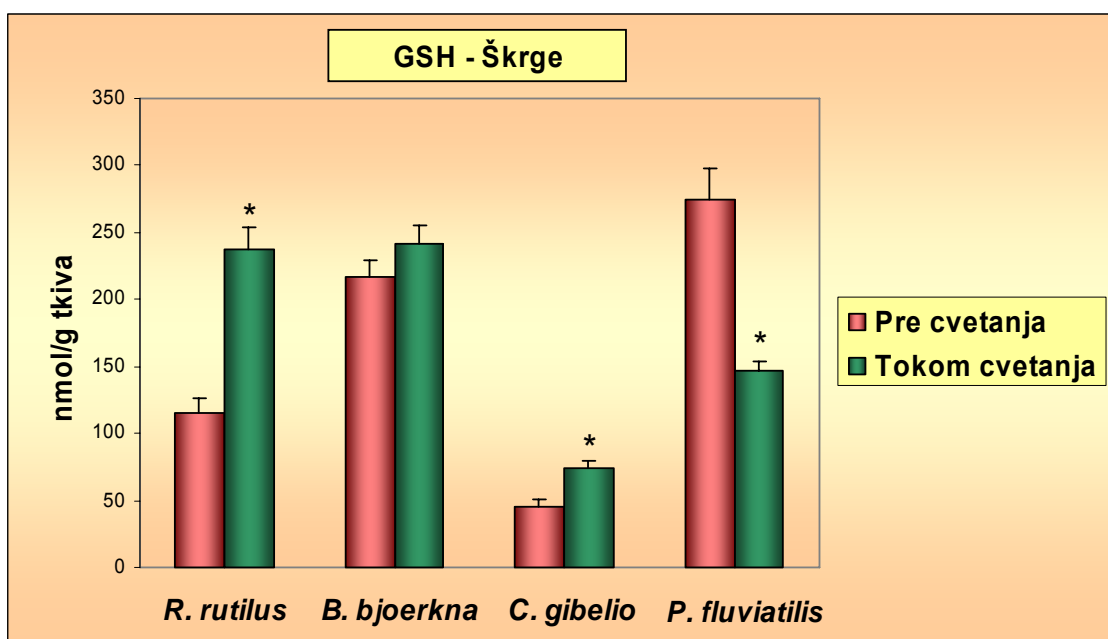


Grafik 22. Koncentracija ukupnog GSH (nmol/g tkiva) u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 28. Koncentracija ukupnog GSH (nmol/g tkiva) u škragama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

GSH - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	115.20 ± 10.72 (26.25)	237.77 ± 15.76 * (44.57)
<i>Blicca bjoerkna</i>	217.38 ± 12.24 (40.60)	242.22 ± 13.16 (41.63)
<i>Carassius gibelio</i>	45.52 ± 5.67 (12.68)	73.80 ± 5.66 * (17.89)
<i>Perca fluviatilis</i>	274.53 ± 23.51 (57.78)	147.15 ± 6.09 * (16.12)

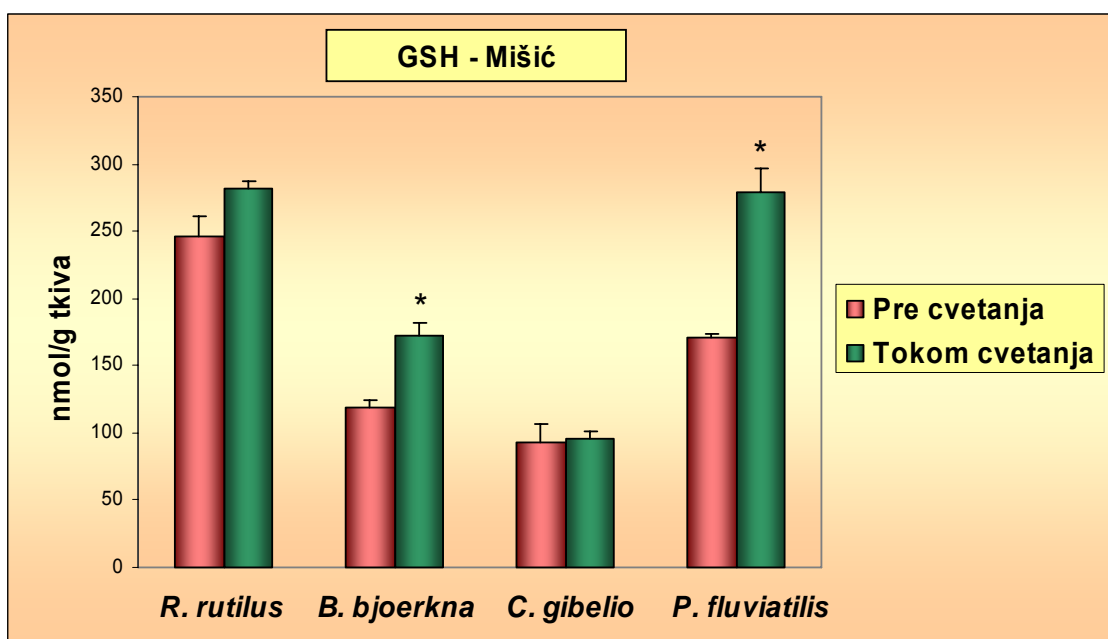


Grafik 23. Koncentracija ukupnog GSH (nmol/g tkiva) u škragama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 29. Koncentracija ukupnog GSH (nmol/g tkiva) u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

GSH - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	245.58 ± 15.82 (44.74)	281.95 ± 5.58 (17.65)
<i>Blicca bjoerkna</i>	118.45 ± 5.92 (22.13)	172.17 ± 9.92 * (32.89)
<i>Carassius gibelio</i>	92.97 ± 13.68 (30.58)	95.39 ± 6.39 (20.20)
<i>Perca fluviatilis</i>	171.30 ± 2.75 (8.69)	278.62 ± 17.60 * (55.66)



Grafik 24. Koncentracija GSH (nmol/g tkiva) u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \* p<0.05.

#### 4.5.2. Koncentracija slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa

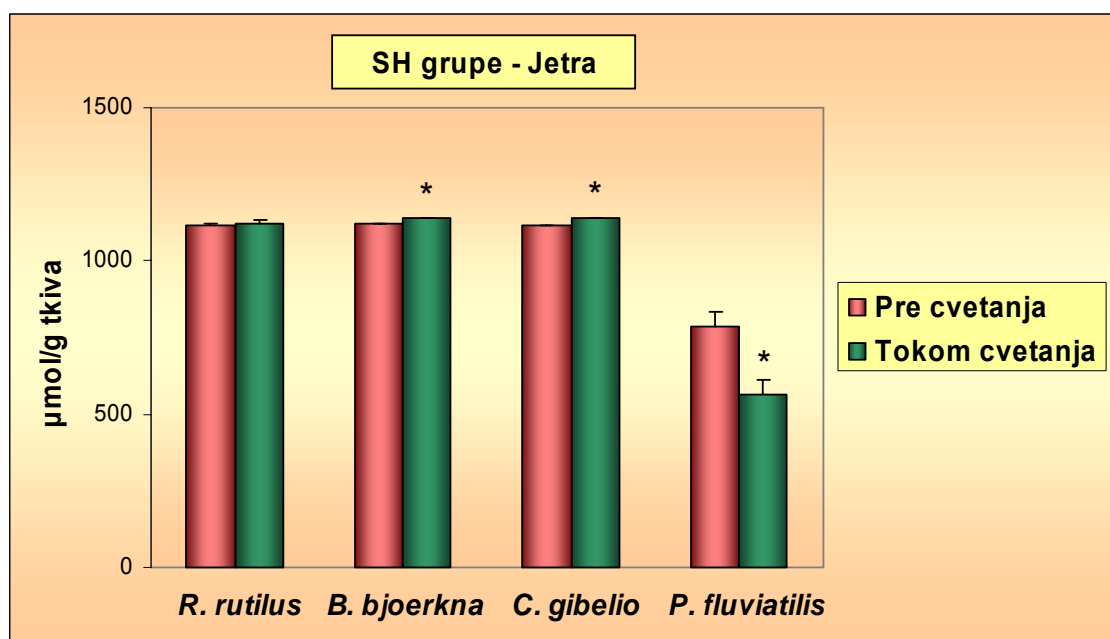
Koncentracija slobodnih SH grupa u jetri ispitivanih vrsta riba iz akumulacionog jezera Gruža prikazana je u Tabeli 30 i na Grafiku 25. Dobijeni podaci pokazuju da je koncentracija ove niskomolekulske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja bila statistički značajno povećana u jetri *B. bjoerkna* ( $1138.41 \pm 1.42 \mu\text{mol/g}$  tkiva) i *C. gibelio* ( $1137.72 \pm 0.81 \mu\text{mol/g}$  tkiva), a smanjena kod vrste *P. fluviatilis* ( $566.42 \pm 43.48 \mu\text{mol/g}$  tkiva) tokom cvetanja cijanobakterija u Gružanskom jezeru. Pre cvetanja, vrednosti koncentracije SH grupa u jetri iznosile su  $1120.00 \pm 1.12 \mu\text{mol/g}$  tkiva kod *B. bjoerkna*,  $1116.30 \pm 2.58 \mu\text{mol/g}$  tkiva kod *C. gibelio* i  $783.46 \pm 52.41 \mu\text{mol/g}$  tkiva kod *P. fluviatilis*, a tokom cvetanja  $1138.41 \pm 1.42 \mu\text{mol/g}$  tkiva kod vrste *B. bjoerkna*,  $1137.72 \pm 0.81 \mu\text{mol/g}$  tkiva kod *C. gibelio* i  $566.42 \pm 43.48 \mu\text{mol/g}$  tkiva kod *P. fluviatilis*.

Rezultati koncentracije SH grupa u škragama ispitivanih vrsta riba prikazani su u Tabeli 31 i na Grafiku 26. Tokom cvetanja konstatovano je statistički značajno povećanje koncentracije slobodnih SH grupa u škragama dve ispitivane vrste *R. rutilus* i *B. bjoerkna* ( $1115.13 \pm 1.03 \mu\text{mol/g}$  tkiva i  $1114.75 \pm 0.84 \mu\text{mol/g}$  tkiva) u odnosu na vrednosti koje su izmerene u periodu pre cvetanja ( $902.20 \pm 85.85 \mu\text{mol/g}$  tkiva i  $1098.22 \pm 8.63 \mu\text{mol/g}$  tkiva). U škragama druge dve ispitivane vrste riba iz jezera Gruža, *C. gibelio* i *P. fluviatilis*, nije bilo značajnih razlika u koncentraciji SH grupa između istraživanih perioda.

Kada je u pitanju koncentracija SH grupa u mišiću ispitivanih vrsta riba (Tabela 32 i Grafik 27) statistički značajna razlika detektovana je samo kod vrste *P. fluviatilis*, kod koje je koncentracija SH grupa bila veća pre cvetanja ( $674.04 \pm 17.94 \mu\text{mol/g}$  tkiva) u odnosu na vrednost dobijenu tokom cvetanja ( $546.85 \pm 17.18 \mu\text{mol/g}$  tkiva). S druge strane, kod ostalih ispitivanih vrsta nije bilo značajnih razlika u koncentraciji ovog parametra u mišiću između istraživanih perioda.

Tabela 30. Koncentracija slobodnih SH grupa ( $\mu\text{mol/g}$  tkiva) u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

SH grupe - Jetra		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	1118.93 $\pm$ 1.52 (4.29)	1119.33 $\pm$ 17.54 (52.62)
<i>Blicca bjoerkna</i>	1120.00 $\pm$ 1.12 (4.18)	1138.41 $\pm$ 1.42 * (4.90)
<i>Carassius gibelio</i>	1116.30 $\pm$ 2.58 (6.31)	1137.72 $\pm$ 0.81 * (2.80)
<i>Perca fluviatilis</i>	783.46 $\pm$ 52.41 (138.67)	566.42 $\pm$ 43.48 * (115.04)

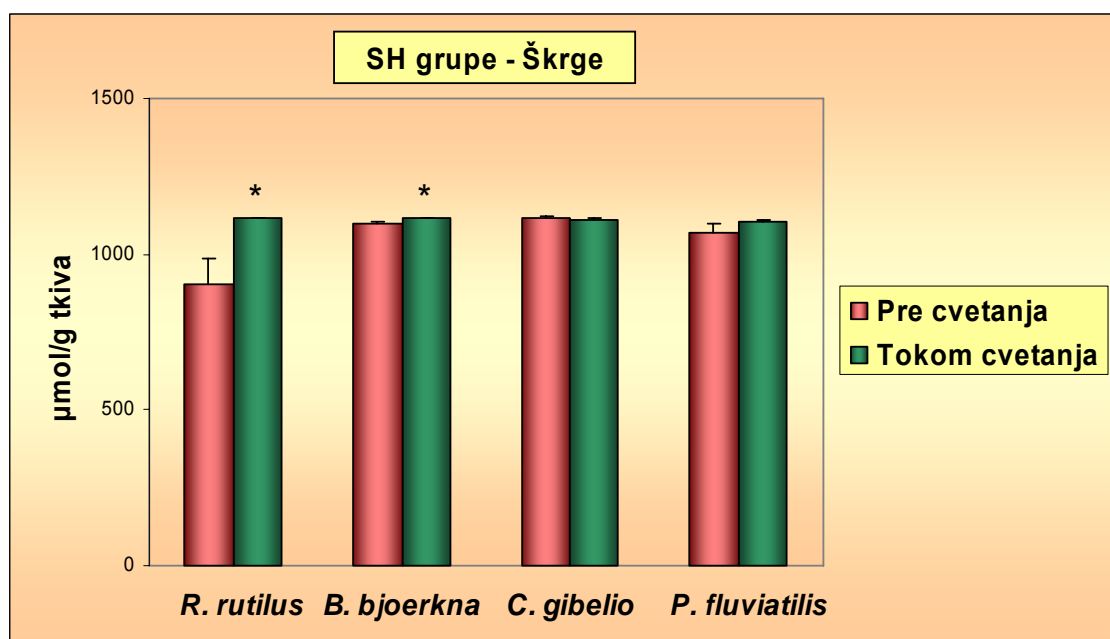


Grafik 25. Koncentracija slobodnih SH grupa ( $\mu\text{mol/g}$  tkiva) u jetri ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

Tabela 31. Koncentracija slobodnih SH grupa ( $\mu\text{mol/g}$  tkiva) u škrgama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

SH grupe - Škrge		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	902.20 $\pm$ 85.85 (227.14)	1115.13 $\pm$ 1.03 * (3.26)
<i>Blicca bjoerkna</i>	1098.22 $\pm$ 8.63 (29.90)	1114.75 $\pm$ 0.84 * (2.92)
<i>Carassius gibelio</i>	1117.61 $\pm$ 2.25 (5.51)	1112.16 $\pm$ 1.71 (5.91)
<i>Perca fluviatilis</i>	1071.72 $\pm$ 29.64 (72.60)	1105.18 $\pm$ 2.36 (6.68)



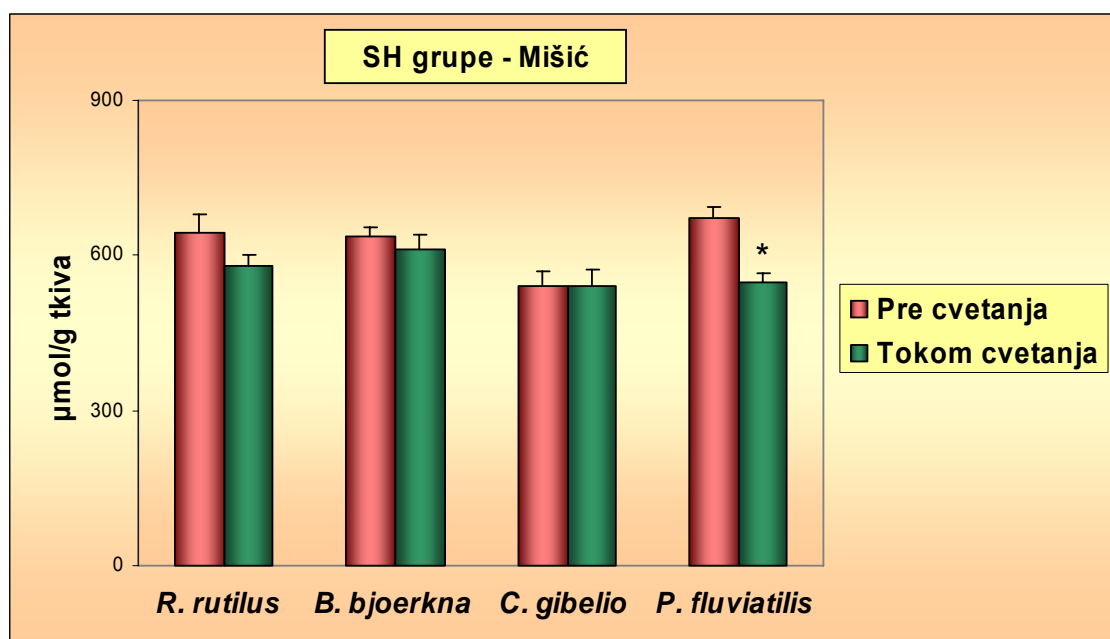
Grafik 26. Koncentracija slobodnih SH grupa ( $\mu\text{mol/g}$  tkiva) u škrgama ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .



Tabela 32. Koncentracija slobodnih SH grupa ( $\mu\text{mol/g}$  tkiva) u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

SH grupe - Mišić		
Vrsta	Pre cvetanja	Tokom cvetanja
<i>Rutilus rutilus</i>	643.54 $\pm$ 37.37 (105.70)	580.25 $\pm$ 20.93 (66.19)
<i>Blicca bjoerkna</i>	635.33 $\pm$ 19.47 (72.83)	610.51 $\pm$ 30.10 (104.25)
<i>Carassius gibelio</i>	541.43 $\pm$ 29.06 (71.18)	539.88 $\pm$ 31.82 (110.23)
<i>Perca fluviatilis</i>	674.04 $\pm$ 17.94 (53.83)	546.85 $\pm$ 17.18 * (54.32)



Grafik 27. Koncentracija slobodnih SH grupa ( $\mu\text{mol/g}$  tkiva) u mišiću ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost \*  $p < 0.05$ .

#### 4.6. Kanonijska diskriminaciona analiza

Kanonijska diskriminaciona analiza je multivarijaciona statistička analiza koja pokazuje značajnost i prirodu razlika između unapred definisanih grupa objekata, pri čemu opisuje varijabilnost definisanih grupa na osnovu ispitivanih parametara i pruža mogućnost da se odrede varijable koje imaju najznačajniji uticaj u objašnjavanju razlika između grupa. U ovoj doktorskoj disertaciji urađena je kanonijska diskriminaciona analiza enzimskih i neenzimskih antioksidacionih parametara (aktivnost Uk SOD, CAT, GSH-Px, GR i GST, koncentracija GSH i SH grupa) u jetri, škragama i mišiću kod četiri ispitivane vrste riba *R. rutilus*, *B. bjoerkna*, *C. gibelio* i *P. fluviatilis* iz akumulacionog jezera Gruža. Da bi se utvrdile interspecijske razlike za svako proučavano tkivo pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža, kao i tkivne razlike za svaku vrstu pojedinačno, grupisanje je izvršeno na dva načina - po vrstama i po tkivima. Dobijeni rezultati prikazani su grafički na osnovu prve i druge diskriminacione funkcije, a u tabelama su dati standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable, veličina eigen-vrednosti i kumulativni procenat varijanse za svaku diskriminacionu funkciju, kao i srednje vrednosti kanonijskih varijabli za svaku grupu. Standardizovanim diskriminacionim koeficijentima omogućeno je detektovanje varijabli kojima se vrši diskriminacija između definisanih grupa.

#### 4.6.1. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama

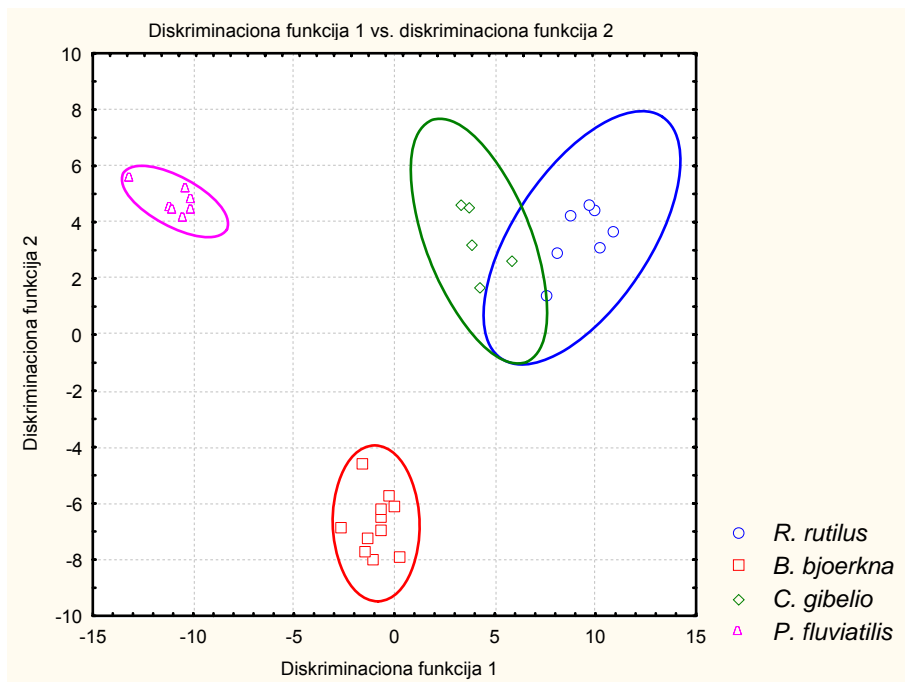
Interspecijske razlike između četiri vrste riba iz akumulacionog jezera Gruža ispitane su kanonijskom diskriminacionom analizom antioksidacionih parametara za svako tkivo pojedinačno, pri čemu je analiza izvršena za oba ispitivana perioda. Grupisanjem po vrstama dobijene su tri kanonijske diskriminacione funkcije za svaki deo analize, od kojih su prve dve funkcije koje su najbitnije za objašnjavanje varijabilnosti između grupa uzete u obzir za tumačenje dobijenih podataka.

Rezultati kanonijske diskriminacione analize parametara antioksidacione zaštite u jetri kod ispitivanih vrsta riba pre cvetanja u jezeru Gruža prikazani su na Grafiku 28 i Tabelama 33 i 34, a za period tokom cvetanja na Grafiku 29 i Tabelama 35 i 36. Pre cvetanja najizraženije je razdvajanje vrsta *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis*, dok se kod druge dve vrste, *R. rutilus* i *C. gibelio* zapaža delimično preklapanje elipsi. Prema prvoj diskriminacionoj funkciji najznačajnije je odvajanje vrste *P. fluviatilis*, dok se prema drugoj diskriminacionoj funkciji izdvaja *B. bjoerkna* u odnosu na druge vrste. U ovoj analizi prve dve kanonijske diskriminacione funkcije objašnjavaju 97.11% varijanse za ispitivane parametre. Za razdvajanje po prvoj diskriminacionoj funkciji najveći značaj ima aktivnost CAT kod vrste *P. fluviatilis* i GSH-Px kod vrsta *R. rutilus* i *C. gibelio*, dok aktivnost enzima GR najviše doprinosi izdvajanju vrste *B. bjoerkna* prema drugoj diskriminacionoj funkciji. Tokom perioda cvetanja prve dve diskriminacione funkcije objašnjavaju 85.27% od ukupne varijabilnosti ispitivanih parametara u jetri kod četiri vrste riba. Jasno se razdvajaju vrste *C. gibelio* i *P. fluviatilis*, dok kod vrsta *R. rutilus* i *B. bjoerkna* postoji delimično preklapanje elipsi. Prema prvoj kanonijskoj diskriminacionoj funkciji najznačajnije se odvajaju vrste *P. fluviatilis* u odnosu na druge ispitivane vrste, a prema drugoj *C. gibelio*. Razdvajanju po prvoj kanonijskoj funkciji najveći doprinos daje koncentracija SH grupa, a po drugoj aktivnost GSH-Px i koncentracija GSH.

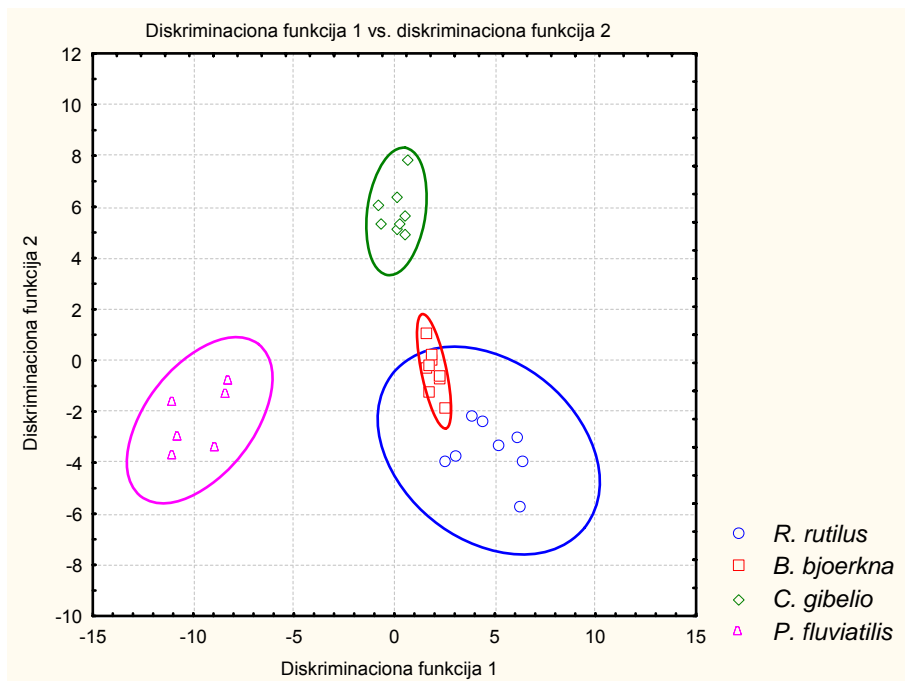
Kanonijska diskriminaciona analiza antioksidacionih parametara u škragama kod ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža pokazuje jasnu diskriminaciju između svih vrsta u oba ispitivana perioda. U periodu pre cvetanja (Grafik 30, Tabele 37 i 38) prve dve diskriminacione funkcije objašnjavaju 93.65% varijanse za ispitivane parametre. Za razdvajanje prema prvoj kanonijskoj funkciji najveći doprinos daju aktivnost GR i

koncentracija GSH, a prema drugoj aktivnost enzima Uk SOD i GSH-Px. Tokom cvetanja (Grafik 31, Tabele 39 i 40) prve dve diskriminacione funkcije pružaju objašnjenje 94.44% od ukupne varijabilnosti ispitivanih parametara u škragama. Razdvajanju po prvoj kanonijskoj diskriminacionoj funkciji koja odvaja ispitivane vrste *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis* od vrsta *R. rutilus* i *C. gibelio* najveći doprinos daje aktivnost enzima Uk SOD i GSH-Px, dok prema drugoj funkciji koja odvaja vrste *R. rutilus* i *B. bjoerkna* od vrsta *C. gibelio* i *P. fluviatilis* najviše doprinose aktivnost enzima faze II biotransformacije GST i koncentracija GSH.

Kada su u pitanju razlike između ispitivanih vrsta riba prema antioksidacionim parametrima koji su izmereni u tkivu mišića, treba istaći da postoji sličan trend diskriminacije vrsta u oba ispitivana perioda. Rezultati kanonijske diskriminacione analize pre cvetanja u jezeru Gruža prikazani su na Grafiku 32 i Tabelama 41 i 42, a tokom cvetanja na Grafiku 33 i Tabelama 43 i 44. Kumulativni procenat varijanse za prve dve kanonijske diskriminacione funkcije iznosi 93.32% pre cvetanja u jezeru Gruža, a 93.57% tokom perioda cvetanja. Pre cvetanja prva diskriminaciona funkcija kanonijske analize objašnjava 83.06% ukupne varijabilnosti, a tokom perioda cvetanja 85.92%. U oba slučaja, prema prvoj i najbitnijoj kanonijskoj funkciji jasno se zapaža izdvajanje vrste *C. gibelio* u odnosu na ostale ispitivane vrste, čemu najviše doprinosi aktivnost enzima GR i GST. Pre cvetanja uočava se delimično preklapanje elipsi vrsta *R. rutilus* i *B. bjoerkna*, dok je tokom cvetanja ovo preklapanje potpuno. Takođe, zapaža se i delimično preklapanje elipsi *R. rutilus* i *P. fluviatilis* tokom perioda cvetanja. Prema drugoj diskriminacionoj funkciji varijabla koja najviše doprinosi diskriminaciji između ispitivanih vrsta je aktivnost GSH-Px u oba ispitivana perioda.



Grafik 28. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u jetri u odnosu na ispitivane vrste riba pre cvetanja u jezeru Gruža.



Grafik 29. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u jetri u odnosu na ispitivane vrste riba tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Tabela 33. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti u jetri između ispitivanih vrsta riba pre cvetanja u jezeru Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<b>Uk SOD</b>	0.02320	-0.21718	0.004411
<b>CAT</b>	-0.91547	0.42204	-0.046397
<b>GSH-Px</b>	0.97726	0.49674	0.396619
<b>GR</b>	-0.30313	-0.96722	-0.289193
<b>GST</b>	0.34695	-0.35580	0.293605
<b>GSH</b>	0.33687	-0.03602	-0.918107
<b>SH</b>	0.56018	-0.37645	0.349662
<b>Eigen-vrednost</b>	59.24645	30.40377	2.662990
<b>Kumulativni %</b>	0.64180	0.97115	1.000000

Tabela 34. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u jetri kod ispitivanih vrsta riba pre cvetanja u jezeru Gruža.

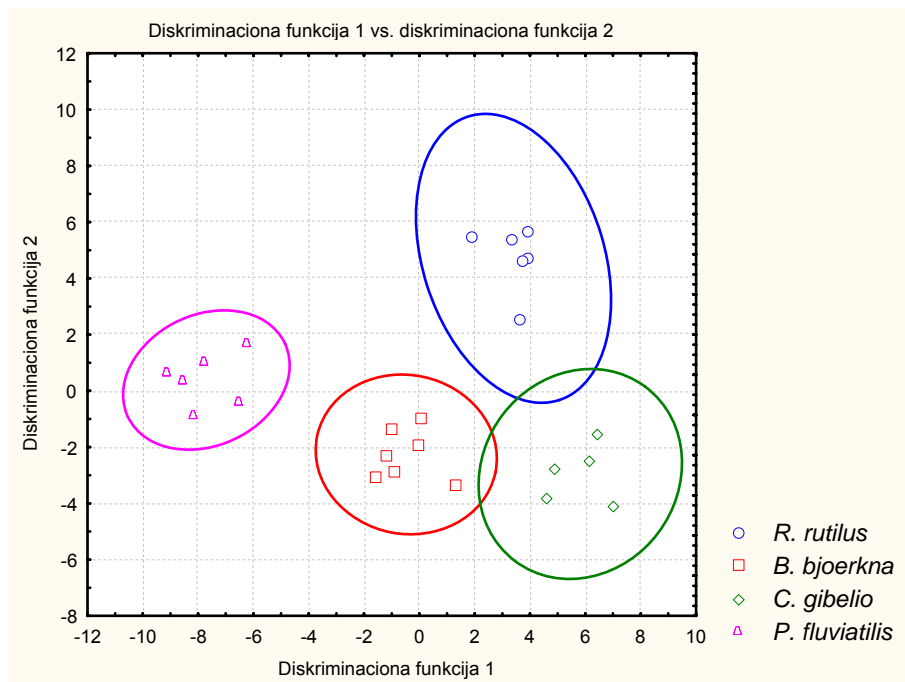
	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>R. rutilus</i>	9.3307	3.44081	-1.62264
<i>B. bjoerkna</i>	-0.9058	-6.71219	-0.05845
<i>C. gibelio</i>	4.2064	3.32352	3.12680
<i>P. fluviatilis</i>	-10.9118	4.73296	-0.51894

Tabela 35. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti u jetri između ispitivanih vrsta riba tokom cvetanja u jezeru Gruža.

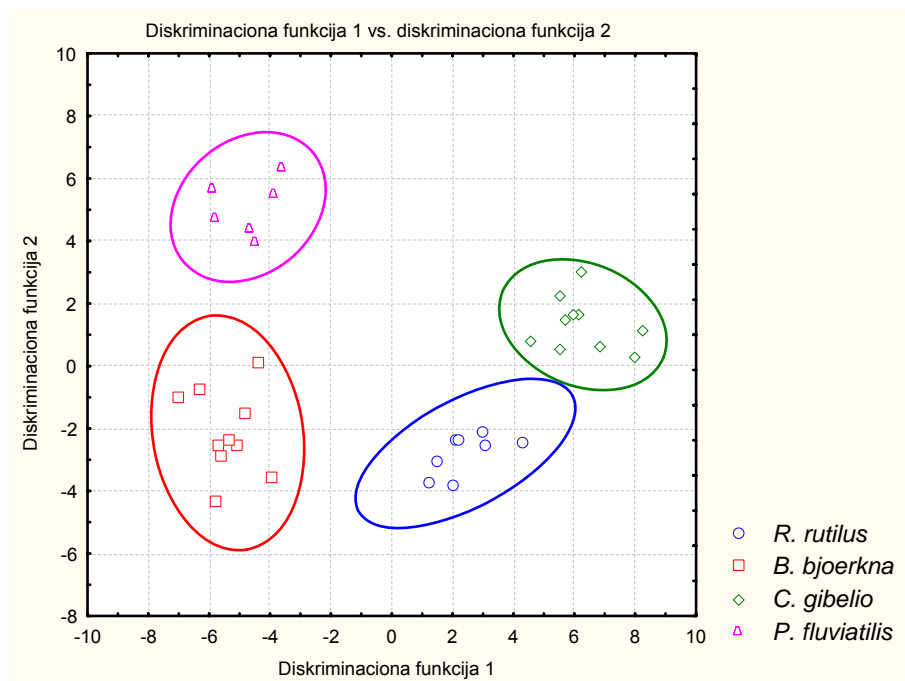
	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<b>Uk SOD</b>	-0.36638	-0.37159	0.623336
<b>CAT</b>	-0.26944	-0.18010	-0.278138
<b>GSH-Px</b>	0.18333	1.00462	-0.639097
<b>GR</b>	0.19749	-0.15197	0.650503
<b>GST</b>	0.27189	0.09012	0.452297
<b>GSH</b>	0.51164	-1.15422	0.019843
<b>SH</b>	0.78533	0.12376	0.066909
<b>Eigen-vrednost</b>	27.78286	14.48805	7.302926
<b>Kumulativni %</b>	0.56043	0.85269	1.000000

Tabela 36. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u jetri kod ispitivanih vrsta riba tokom cvetanja u jezeru Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>R. rutilus</i>	4.69309	-3.52889	-2.66525
<i>B. bjoerkna</i>	1.97306	-0.42957	3.59747
<i>C. gibelio</i>	0.10374	5.82302	-1.44073
<i>P. fluviatilis</i>	-9.68421	-2.34289	-0.52115



Grafik 30. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u škragama u odnosu na ispitivane vrste riba pre cvetanja u jezeru Gruža.



Grafik 31. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u škragama u odnosu na ispitivane vrste riba tokom cvetanja u jezeru Gruža.



Tabela 37. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti u škragama između ispitivanih vrsta riba pre cvetanja u jezeru Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<b>Uk SOD</b>	0.49183	0.57371	0.278209
<b>CAT</b>	-0.00656	-0.53051	0.152364
<b>GSH-Px</b>	0.43195	-0.59592	0.333471
<b>GR</b>	-1.25740	-0.22873	0.266845
<b>GST</b>	0.47291	-0.11397	-0.848965
<b>GSH</b>	-0.84783	0.34119	-0.439771
<b>SH</b>	-0.23904	0.02935	0.255438
<b>Eigen-vrednost</b>	29.80810	10.67441	2.742786
<b>Kumulativni %</b>	0.68960	0.93655	1.000000

Tabela 38. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u škragama kod ispitivanih vrsta riba pre cvetanja u jezeru Gruža.

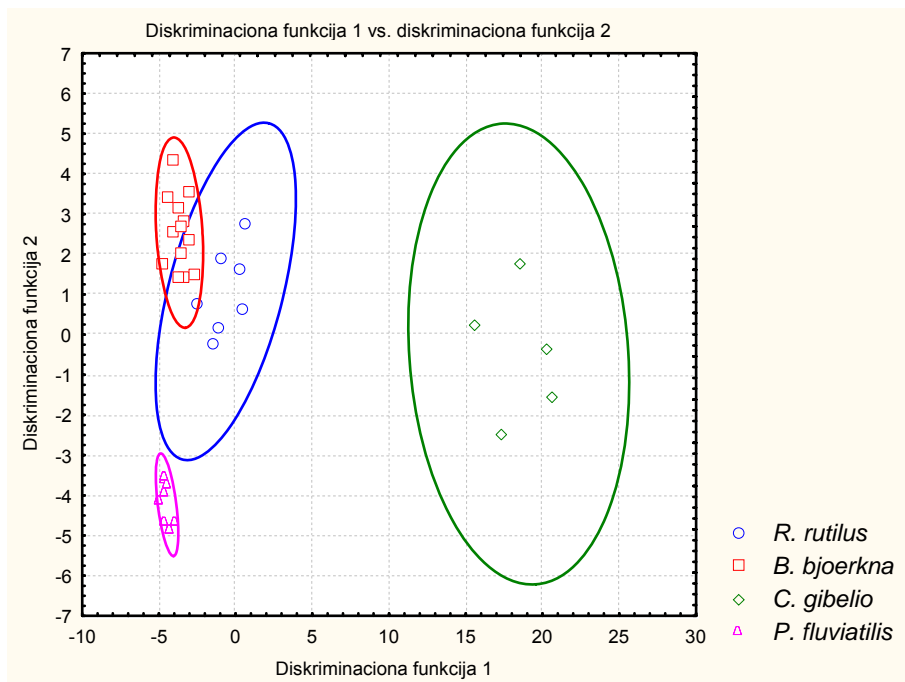
	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>R. rutilus</i>	3.40521	4.71215	-0.29086
<i>B. bjoerkna</i>	-0.47401	-2.25853	-2.05415
<i>C. gibelio</i>	5.81787	-2.95513	1.82404
<i>P. fluviatilis</i>	-7.70042	0.38540	1.16733

Tabela 39. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti u škragama između ispitivanih vrsta riba tokom cvetanja u jezeru Gruža.

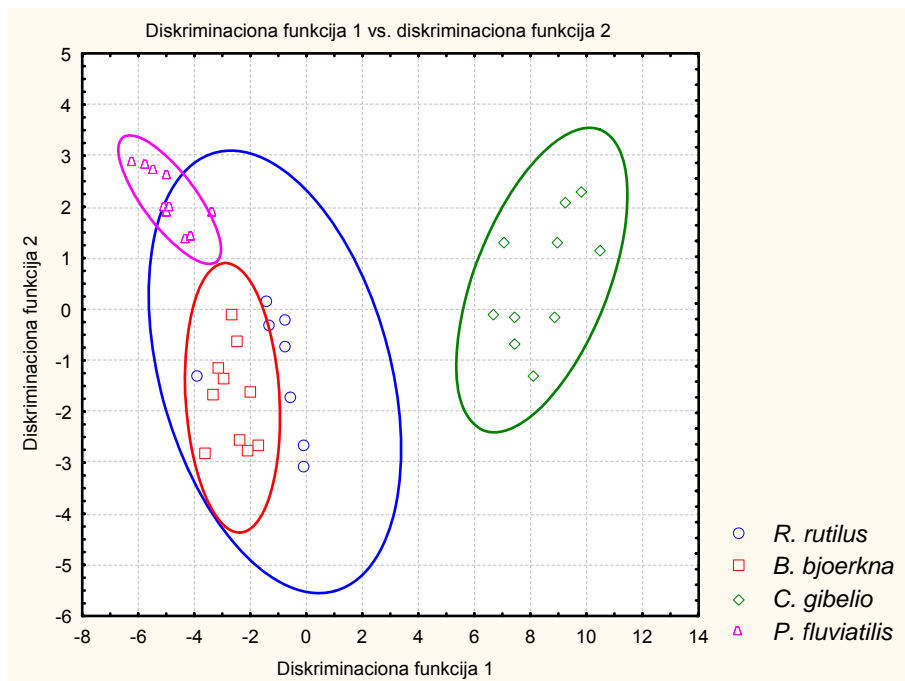
	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<b>Uk SOD</b>	0.87737	-0.436391	0.267024
<b>CAT</b>	0.14346	0.386600	0.384712
<b>GSH-Px</b>	-0.78644	0.039275	-0.363364
<b>GR</b>	-0.47591	-0.078296	0.475026
<b>GST</b>	-0.22173	-0.988608	-0.532287
<b>GSH</b>	-0.47709	-0.865233	0.459010
<b>SH</b>	0.27432	-0.617695	-0.206785
<b>Eigen-vrednost</b>	28.86066	9.368898	2.252281
<b>Kumulativni %</b>	0.71293	0.944363	1.000000

Tabela 40. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u škragama kod ispitivanih vrsta riba tokom cvetanja u jezeru Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>R. rutilus</i>	2.42186	-2.79644	2.03004
<i>B. bjoerkna</i>	-5.38941	-2.13758	-1.18506
<i>C. gibelio</i>	6.28343	1.32177	-1.12624
<i>P. fluviatilis</i>	-4.71919	5.08827	1.14544



Grafik 32. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u mišiću u odnosu na ispitivane vrste riba pre cvetanja u jezeru Gruža.



Grafik 33. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u mišiću u odnosu na ispitivane vrste riba tokom cvetanja u jezeru Gruža.

Tabela 41. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti u mišiću između ispitivanih vrsta riba pre cvetanja u jezeru Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<b>Uk SOD</b>	-0.27525	0.510399	0.364660
<b>CAT</b>	0.04990	0.292531	-0.230730
<b>GSH-Px</b>	0.19277	-0.856539	-0.159587
<b>GR</b>	0.87799	-0.102732	0.223062
<b>GST</b>	0.67107	0.658841	-0.360533
<b>GSH</b>	-0.25483	-0.254381	-0.693193
<b>SH</b>	0.04133	-0.115520	0.172332
<b>Eigen-vrednost</b>	68.63947	8.481480	5.521526
<b>Kumulativni %</b>	0.83056	0.933188	1.000000

Tabela 42. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u mišiću ispitivanih vrsta riba pre cvetanja u jezeru Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>R. rutilus</i>	-0.64159	1.07555	-4.24329
<i>B. bjoerkna</i>	-3.66080	2.53845	1.61155
<i>C. gibelio</i>	18.45346	-0.48282	0.84403
<i>P. fluviatilis</i>	-4.46509	-4.23495	0.50364

Tabela 43. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti u mišiću između ispitivanih vrsta riba tokom cvetanja u jezeru Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<b>Uk SOD</b>	-0.63536	-0.199244	0.363120
<b>CAT</b>	0.04108	-0.215514	0.064117
<b>GSH-Px</b>	-0.08841	0.567577	-0.080482
<b>GR</b>	0.88091	0.426258	0.015496
<b>GST</b>	0.91736	-0.532574	-0.664703
<b>GSH</b>	-0.43173	0.150237	-0.697646
<b>SH</b>	0.00537	0.092452	0.130199
<b>Eigen-vrednost</b>	30.10818	2.680720	2.253271
<b>Kumulativni %</b>	0.85920	0.935698	1.000000

Tabela 44. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u mišiću kod ispitivanih vrsta riba tokom cvetanja u jezeru Gruža.

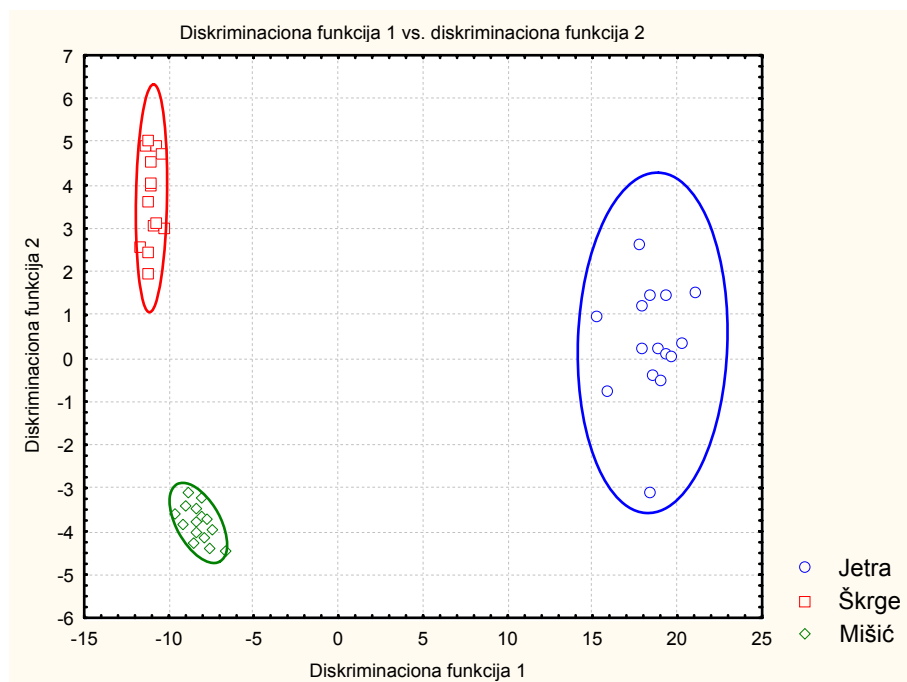
	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>R. rutilus</i>	-1.12008	-1.22546	-2.49081
<i>B. bjoerkna</i>	-2.63338	-1.73168	1.61416
<i>C. gibelio</i>	8.40554	0.56965	0.29095
<i>P. fluviatilis</i>	-4.87610	2.14239	0.08754

#### 4.6.2. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po tkivima

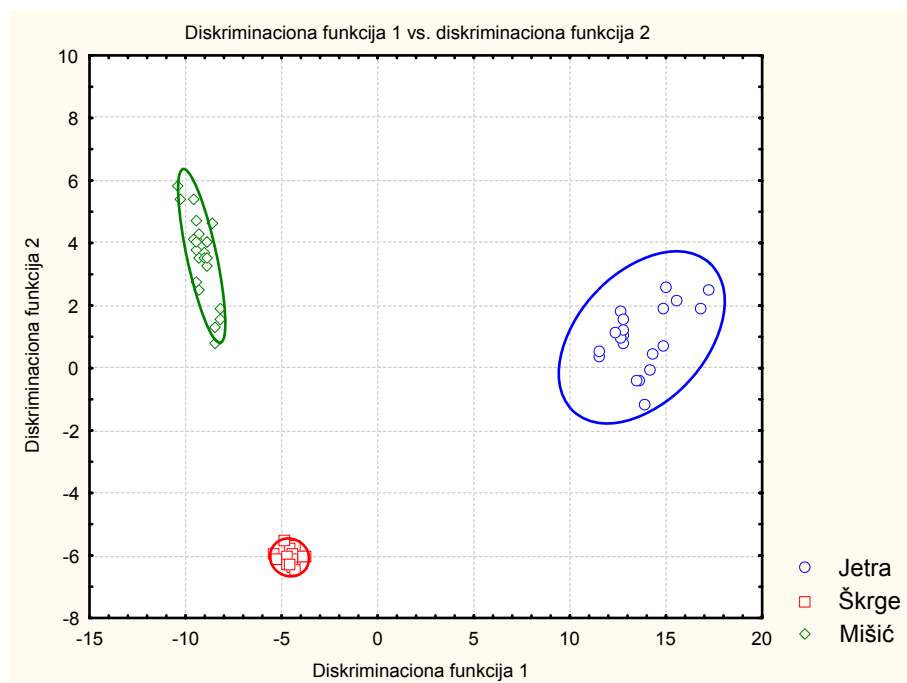
Da bi se na osnovu dobijenih vrednosti parametara antioksidacione zaštite objasnile razlike između tkiva kod svih ispitivanih vrsta riba iz Gružanskog jezera, izvršena je kanonijska diskriminaciona analiza u kojoj je grupisanje izvedeno prema ispitivanim tkivima - jetra, škrge i mišić. Za sve ispitivane vrste dobijene su dve kanonijske diskriminacione funkcije koje objašnjavaju celokupnu varijansu uzorka, pri čemu prva funkcija pruža znatno veći procenat objašnjenja ukupne varijabilnosti u odnosu na drugu diskriminacionu funkciju.

Rezultati kanonijske diskriminacione analize za vrstu *R. rutilus* prikazani su na Grafiku 34 i Tabelama 45 i 46, za vrstu *B. bjoerkna* na Grafiku 35 i Tabelama 47 i 48, za vrstu *C. gibelio* na Grafiku 36 i Tabelama 49 i 50, a za vrstu *P. fluviatilis* na Grafiku 37 i Tabelama 51 i 52. Kod svih ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža jasno se međusobno razdvajaju sva tkiva, a prema prvoj diskriminacionoj osi koja objašnjava najveći procenat varijabilnosti najizraženije je izdvajanje jetre.

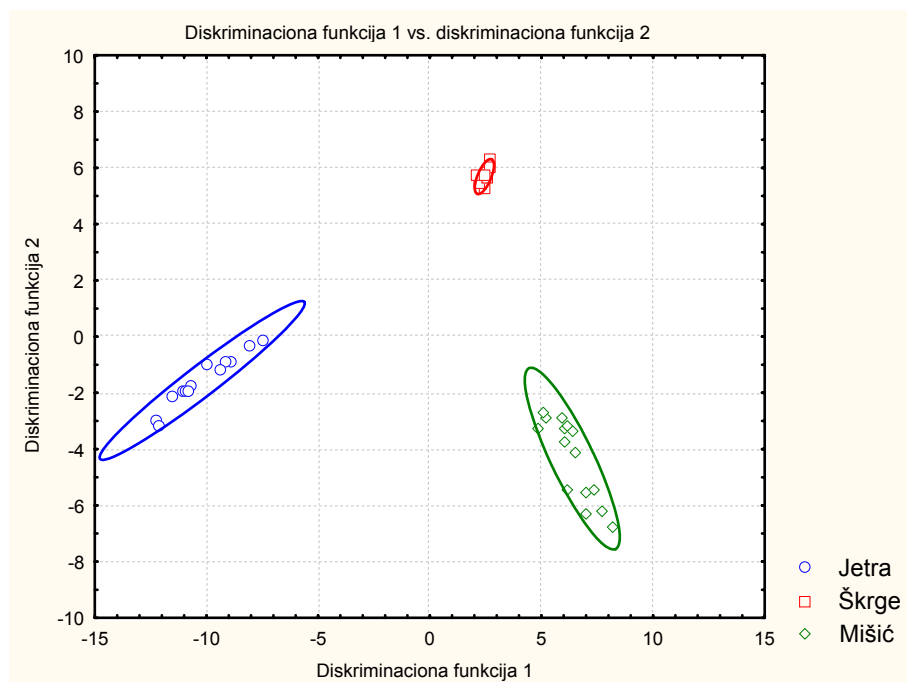
Kod ciprinidne vrste *R. rutilus*, prva kanonijska diskriminaciona funkcija objašnjava 95.05% ukupne varijanse ispitivanih parametara, a aktivnost Uk SOD i GSH-Px i koncentracija GSH u tkivu jetre najviše doprinose razlikama između tkiva. Za razdvajanje tkiva prema drugoj diskriminacionoj funkciji najznačajnija varijabla je aktivnost antioksidacionog enzima GR. Kada je u pitanju vrsta *B. bjoerkna* treba istaći da prva diskriminaciona funkcija objašnjava 86.93% ukupne varijabilnosti, a razlikama najviše doprinose aktivnost GSH-Px i koncentracija GSH u tkivu jetre. Prema drugoj diskriminacionoj funkciji najbitniji parametri za razdvajanje tkiva su aktivnost Uk SOD u mišiću i koncentracija SH grupa u škragama. Kod vrste *C. gibelio*, prva diskriminaciona funkcija objašnjava 71.95% varijanse ispitivanih parametara antioksidacione zaštite, a aktivnost Uk SOD i CAT u jetri daju najveći doprinos razlikama između tkiva. Prema drugoj diskriminacionoj funkciji zapaža se izdvajanje škrge u odnosu na jetru i mišić, čemu najznačajnije doprinosi koncentracija SH grupa. Prva diskriminaciona funkcija kod *P. fluviatilis* objašnjava 91.97% od ukupne varijabilnosti, a parametri koji su najznačajniji za tkivno specifične razlike su aktivnost Uk SOD u jetri i GR u škragama. Kada je u pitanju druga kanonijska funkcija, diskriminaciji između tkiva najviše doprinosi aktivnost enzima GR u tkivu škrge.



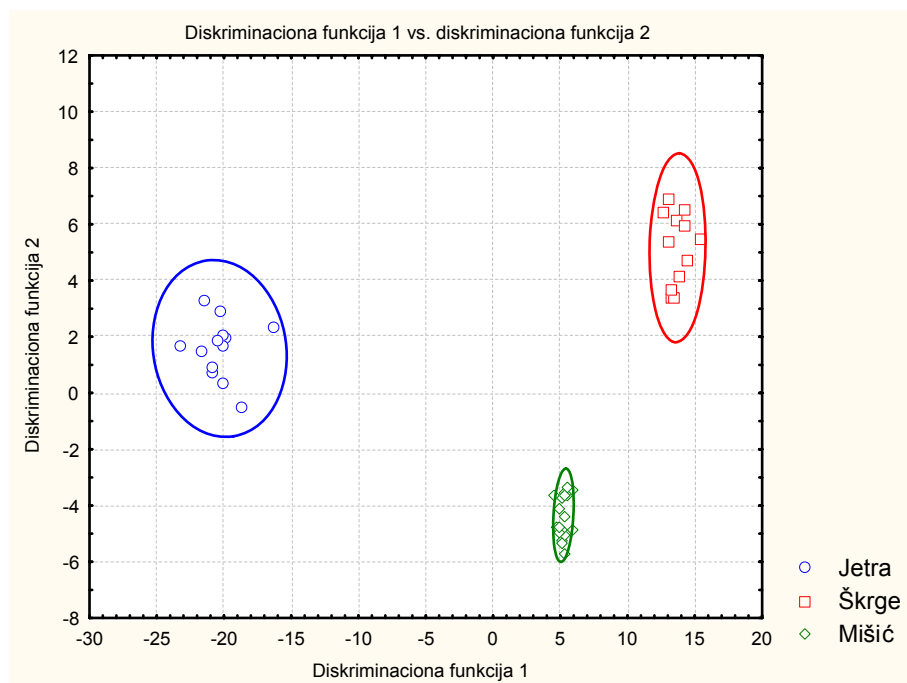
Grafik 34. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u odnosu na ispitivana tkiva kod vrste *R. rutilus* iz jezera Gruža.



Grafik 35. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u odnosu na ispitivana tkiva kod vrste *B. bjoerkna* iz jezera Gruža.



Grafik 36. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u odnosu na ispitivana tkiva kod vrste *C. gibelio* iz jezera Gruža.



Grafik 37. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje parametara antioksidacione zaštite u odnosu na ispitivana tkiva kod vrste *P. fluviatilis* iz jezera Gruža.



Tabela 45. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti između tkiva kod vrste *R. rutilus* iz jezera Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
<b>Uk SOD</b>	0.9460	-0.44029
<b>CAT</b>	0.0532	0.08832
<b>GSH-Px</b>	1.0385	0.12311
<b>GR</b>	0.0314	1.00417
<b>GST</b>	0.3507	-0.00305
<b>GSH</b>	1.2133	-0.30912
<b>SH</b>	-0.0601	0.55353
<b>Eigen-vrednost</b>	192.2731	10.00811
<b>Kumulativni %</b>	0.9505	1.00000

Tabela 46. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u ispitivanim tkivima vrste *R. rutilus* iz jezera Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
<b>Jetra</b>	18.5459	0.35587
<b>Škrge</b>	-11.0230	3.69582
<b>Mišić</b>	-8.2578	-3.80530

Tabela 47. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti između tkiva kod vrste *B. bjoerkna* iz jezera Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
<b>Uk SOD</b>	0.3772	0.73063
<b>CAT</b>	0.0283	-0.01695
<b>GSH-Px</b>	0.9583	0.17076
<b>GR</b>	0.3706	-0.16071
<b>GST</b>	0.6504	0.01623
<b>GSH</b>	0.7267	-0.23828
<b>SH</b>	0.3714	-0.84718
<b>Eigen-vrednost</b>	107.7979	16.21159
<b>Kumulativni %</b>	0.8693	1.00000

Tabela 48. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u ispitivanim tkivima vrste *B. bjoerkna* iz jezera Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
<b>Jetra</b>	13.74230	0.97957
<b>Škrge</b>	-4.58577	-6.06080
<b>Mišić</b>	-9.15783	3.58533

Tabela 49. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti između tkiva kod vrste *C. gibelio* iz jezera Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
<b>Uk SOD</b>	-0.95539	-0.58648
<b>CAT</b>	-0.81332	-0.34226
<b>GSH-Px</b>	0.11755	0.11214
<b>GR</b>	0.14592	0.16403
<b>GST</b>	-0.04365	0.00645
<b>GSH</b>	0.17669	0.01890
<b>SH</b>	-0.50034	0.86974
<b>Eigen-vrednost</b>	51.28300	19.99156
<b>Kumulativni %</b>	0.71951	1.00000

Tabela 50. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u ispitivanim tkivima vrste *C. gibelio* iz jezera Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
<b>Jetra</b>	-10.1908	-1.55917
<b>Škrge</b>	2.4479	5.69017
<b>Mišić</b>	6.3841	-4.33888

Tabela 51. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos parametara antioksidacione zaštite varijabilnosti između tkiva kod vrste *P. fluviatilis* iz jezera Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
<b>Uk SOD</b>	-1.0951	-0.03761
<b>CAT</b>	-0.1586	-0.57531
<b>GSH-Px</b>	0.5053	0.52363
<b>GR</b>	0.8261	0.76732
<b>GST</b>	-0.5874	0.38146
<b>GSH</b>	-0.3159	0.13461
<b>SH</b>	-0.1306	0.57141
<b>Eigen-vrednost</b>	198.8110	17.35498
<b>Kumulativni %</b>	0.9197	1.00000

Tabela 52. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za parametre antioksidacione zaštite u ispitivanim tkivima vrste *P. fluviatilis* iz jezera Gruža.

	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2
<b>Jetra</b>	-20.3235	1.58339
<b>Škrge</b>	13.7253	5.16524
<b>Mišić</b>	5.2369	-4.34563

#### 4.7. Klaster analiza

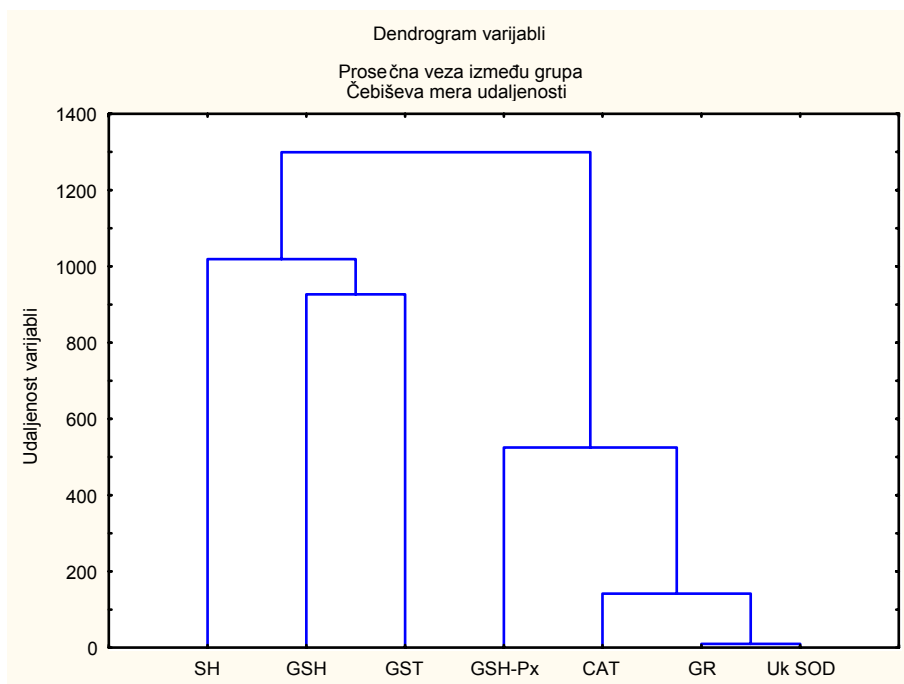
Klaster analiza (analiza grupisanja) je multivarijaciona statistička tehnika za utvrđivanje relativno homogenih grupa objekata (varijabli). Klasifikovanje objekata vrši se na osnovu karakteristika koje ti objekti poseduju prema nekom unapred određenom kriterijumu selekcije. Rezultati klaster analize parametara antioksidacione zaštite (aktivnost Uk SOD, CAT, GSH-Px, GR i GST i koncentracija GSH i SH grupa) kod četiri ispitivane vrste riba iz akumulacionog jezera Gruža prikazani su na Grafcima 38, 39, 40 i 41.

Za određivanje udaljenosti između varijabli, odnosno za procenu stepena razdvajanja klastera, korišćena je Čebiševa mera udaljenosti kod koje je distanca između dva objekta izražena kao maksimalna apsolutna razlika između dve vrednosti u bilo kojoj od varijabli. Za povezivanje objekata u klastera korišćena je metoda prosečne veze između grupa (unweighted pair-group method using arithmetic averages - UPGMA) koja definiše udaljenost između dva klastera kao prosek udaljenosti između svih parova koji se mogu definisati između dva objekta. Ova metoda uzima u obzir informacije o svim parovima objekata između dva klastera.

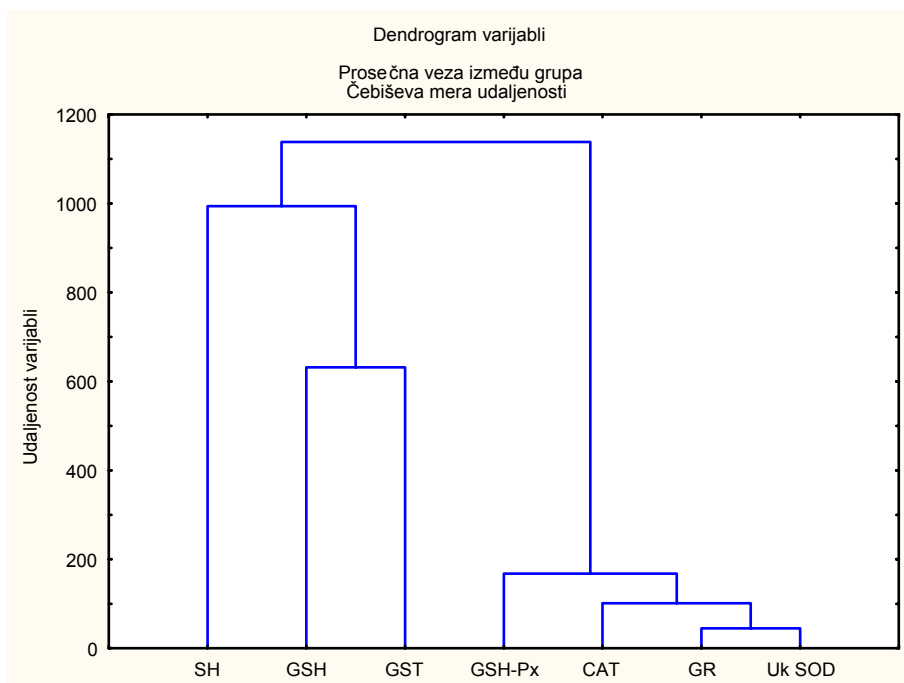
Rezultati klaster analize prikazani su grafički u vidu hijerarhijskog stabla (dendrograma), pri čemu se na horizontalnoj osi nalaze ispitivani parametri, a na vertikalnoj podaci o udaljenosti između varijabli. Linije na dendrogramu pokazuju šta se sa čim spaja, odnosno pružaju vizuelni prikaz oformljenih grupa (klastera).

Klaster analiza enzimskih i neenzimskih parametara antioksidacione zaštite kod slatkovodnih vrsta riba *R. rutilus* (Grafik 38) i *B. bjoerkna* (Grafik 39) ukazuje na isti trend grupisanja svih ispitivanih parametara. Na dendrogramu se izdvajaju dva glavna klastera, jedan kom pripadaju koncentracija SH grupa, koncentracija GSH i aktivnost enzima faze II biotransformacije GST, a drugi u kom su grupisane dobijene vrednosti za aktivnost antioksidacionih enzima GSH-Px, CAT, GR i Uk SOD. U okviru prvog klastera, koncentracija GSH i aktivnost GST izdvajaju se u posebnu podgrupu u odnosu na koncentraciju SH grupa, dok se u drugom klasteru izdvaja aktivnost GSH-Px u odnosu na izmerene aktivnosti drugih antioksidacionih enzima (aktivnost GR i Uk SOD čine jednu grupu, kojoj se pridružuje aktivnost CAT, a zatim i aktivnost GSH-Px).

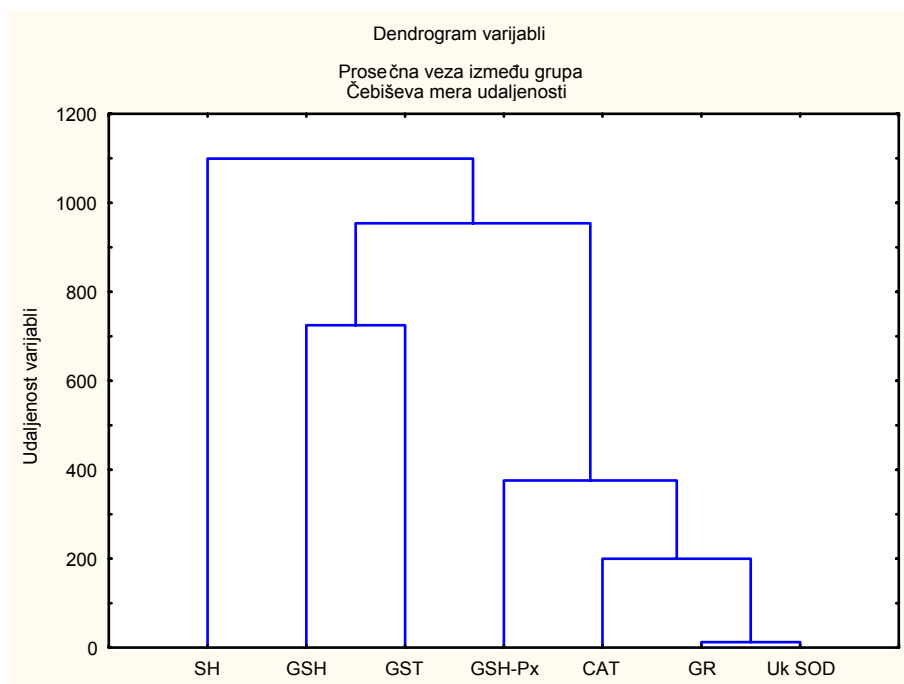
Kod vrsta *C. gibelio* (Grafik 40) i *P. fluviatilis* (Grafik 41) klaster analiza ukazuje na izdvajanje izmerenih vrednosti za koncentraciju SH grupa u potpuno nezavisan klaster u odnosu na sve ostale ispitivane parametre, koji su grupisani u dve podgrupe. Istom klasteru pripadaju vrednosti koje su dobijene za koncentraciju GSH i aktivnost enzima faze II biotransformacije GST, dok aktivnosti antioksidacionih enzima GSH-Px, CAT, GR i Uk SOD formiraju podgrupu koja kod vrste *C. gibelio* ima istu strukturu kao kod prethodne dve vrste *R. rutilus* i *B. bjoerkna*. S druge strane, kod vrste *P. fluviatilis* podgupa kojoj pripadaju izmerene vrednosti za aktivnost antioksidacionih enzima ima drugačiju strukturu u odnosu na ispitivane ciprinidne vrste. Aktivnost enzima GR, GSH-Px i Uk SOD povezani su u isti klaster dok se aktivnost enzima CAT najviše izdvaja u ovoj podgrupi.



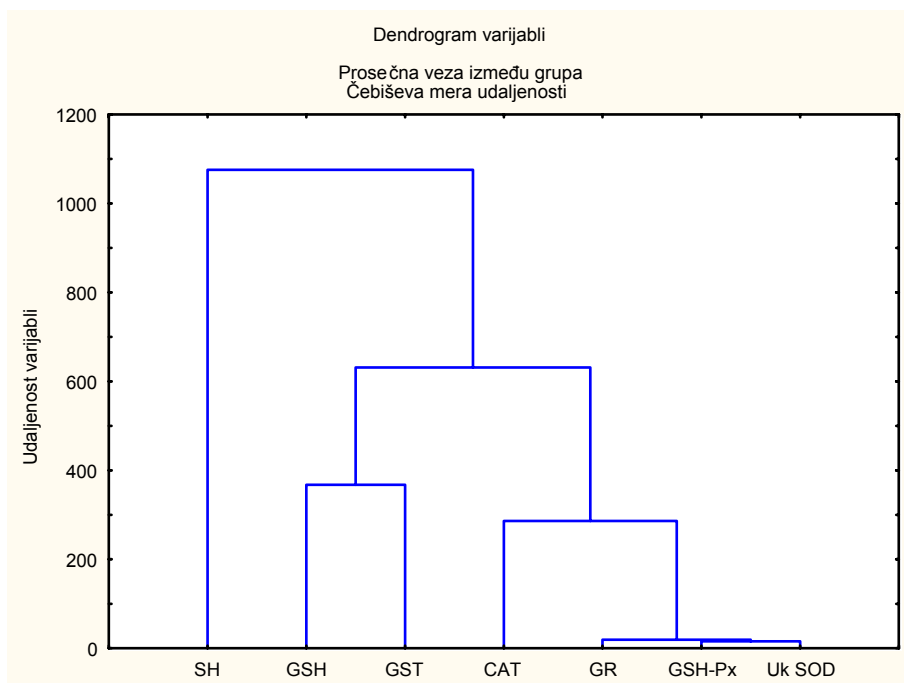
Grafik 38. Klaster analiza parametara antioksidacione zaštite kod vrste *R. rutilus* iz jezera Gruža.



Grafik 39. Klaster analiza parametara antioksidacione zaštite kod vrste *B. bjoerkna* iz jezera Gruža.



Grafik 40. Klaster analiza parametara antioksidacione zaštite kod vrste *C. gibelio* iz jezera Gruža.



Grafik 41. Klaster analiza parametara antioksidacione zaštite kod vrste *P. fluviatilis* iz jezera Gruža.



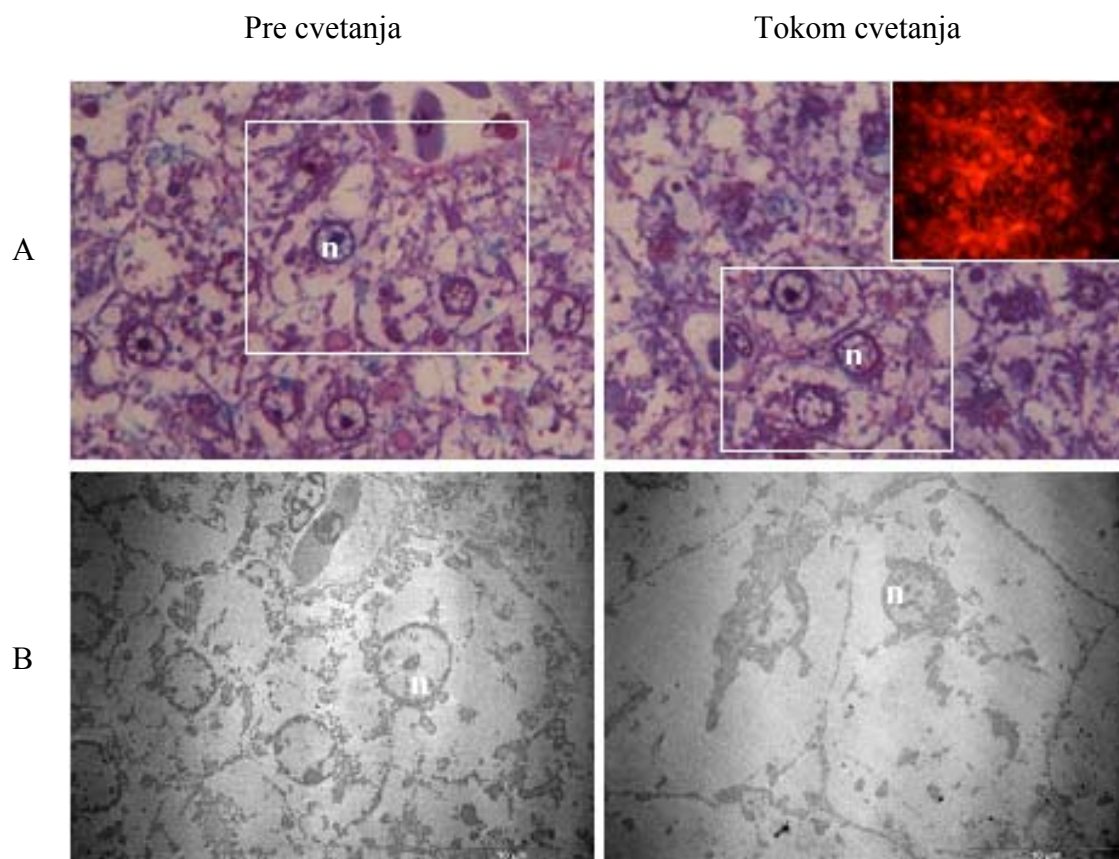
#### 4.8. Svetlosna i elektronska mikroskopija

Prikaz preseka tkiva jetre ispitivanih vrsta riba pre i tokom cvetanja u akumulacionom jezeru Gruža dat je na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije (Slika 20 za vrstu *R. rutilus*, Slika 21 za vrstu *B. bjoerkna*, Slika 22 za vrstu *C. gibelio* i Slika 23 za vrstu *P. fluviatilis*). U okviru svetlosne mikroskopije prikazan je i presek hepatocita koji je bojen propidijum-jodidom (umetak) kod svake ispitivane vrste tokom perioda cvetanja cijanobakterija.

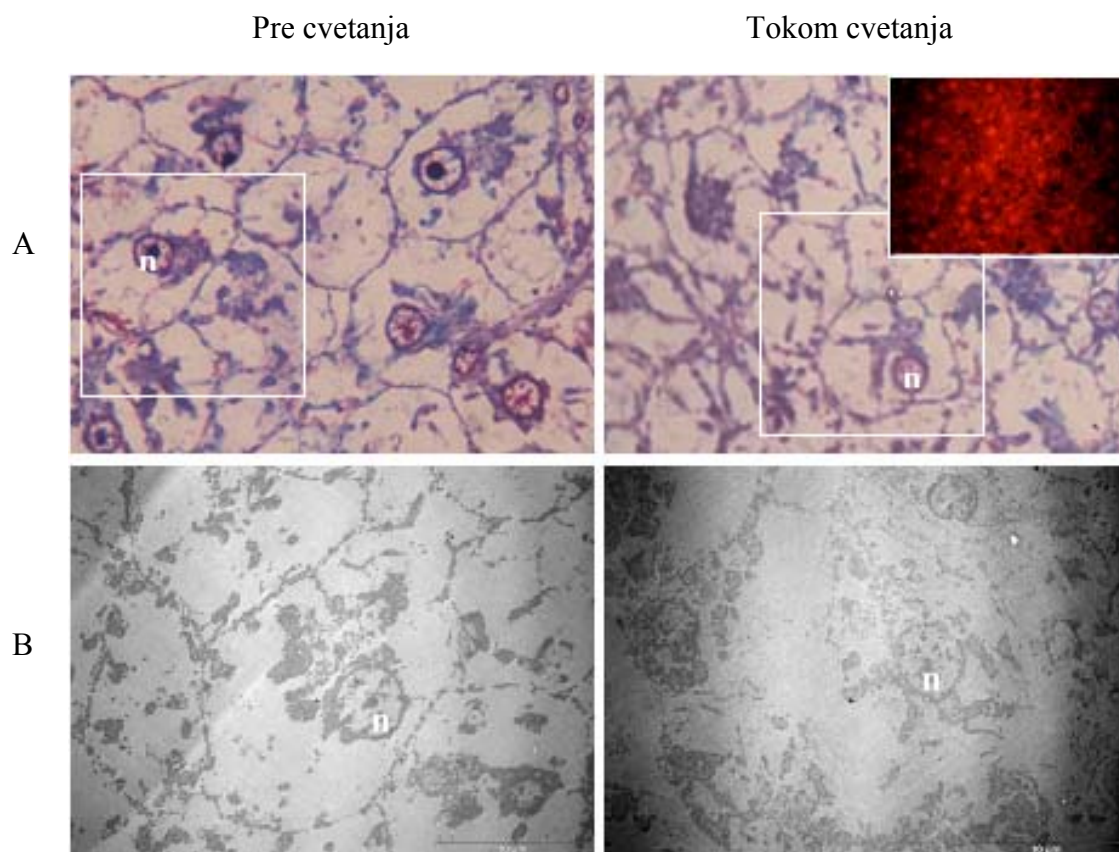
Na nivou svetlosne mikroskopije (označeno sa A na svim slikama), ni kod jedne ispitivane vrste nisu uočljive razlike u strukturi jetre između dva istraživana perioda. Na polutankim presecima tkiva jetre ispitivanih ciprinidnih vrsta riba *R. rutilus*, *B. bjoerkna* i *C. gibelio* primećuje se da je citoplazma sa organelama potisnuta i ograničena lipidnim sadržajem koji ispunjava najveći deo ćelije pre i tokom cvetanja, dok je u hepatocitima vrste *P. fluviatilis* prisutna manja količina lipidnog sadržaja u oba ispitivana perioda.

Bojenje propidijum-jodidom (umetak) ukazuje na to da je cvetanje cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža indukovalo apoptotske promene u jetri svih ispitivanih vrsta riba, što se vidi na osnovu velikog broja hepatocita koji sadrže apoptotska jedra.

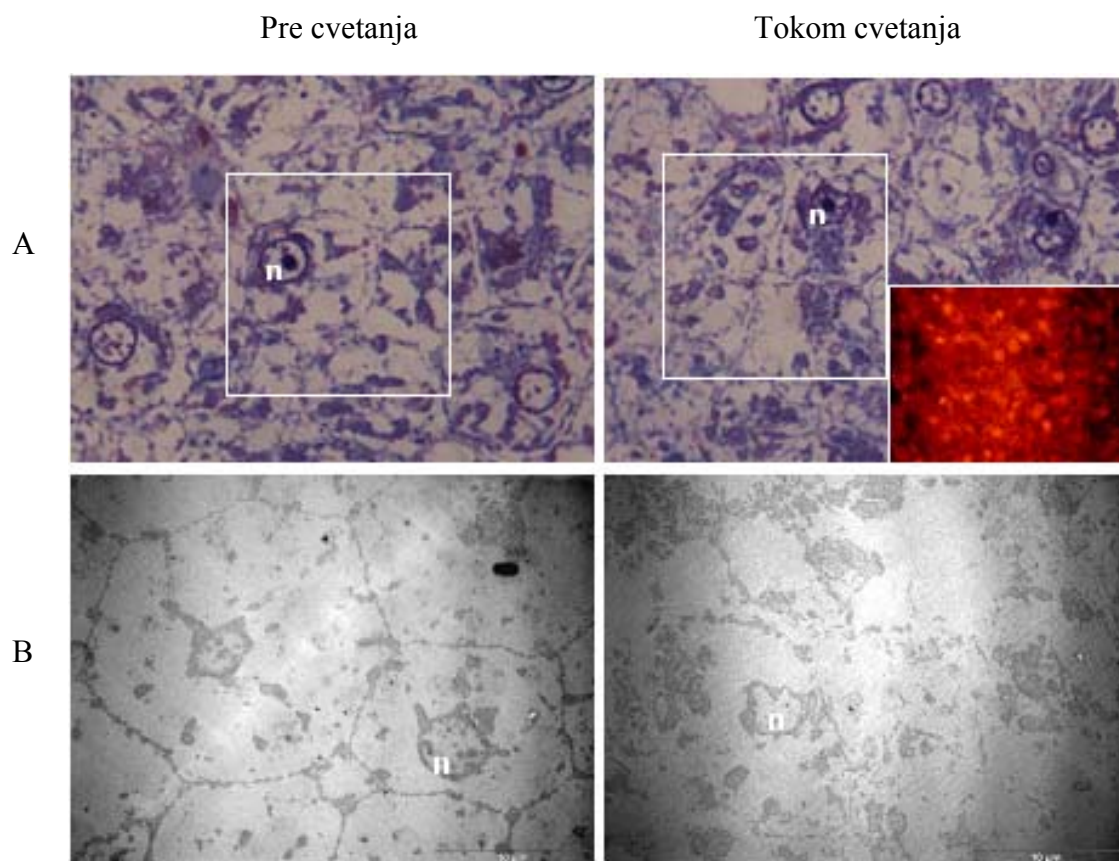
Ultratanki preseki tkiva jetre posmatrani elektronskim mikroskopom (označeno sa B na svim slikama) ukazuju na postojanje jasnih razlika u strukturi hepatocita svih ispitivanih vrsta između dva istraživana perioda. Kod ciprinidnih vrsta uočava se izražena pojava masne jetre pre cvetanja, pri čemu su ćelije ispunjene lipidnim sadržajem koji potiskuje citoplazmu sa organelama, dok vrstu *P. fluviatilis* karakteriše prisustvo lipidnih kapi u ćelijama. Međutim, tokom perioda cvetanja ispitivanje ultrastrukture hepatocita pokazalo je da pored steatoze postoje i vidljive promene gotovo svih membranski vezanih organela kod sve četiri ispitivane vrste riba. Alteracije endomembranskog sistema jasno su izražene u vidu degeneracije organela i morfoloških promena nukleusa, koje dovode do ćelijske smrti. Pojedini hepatociti kod svih ispitivanih vrsta riba iz akumulacionog jezera Gruža pokazuju jasne znake nekroze tokom perioda cvetanja cijanobakterija.



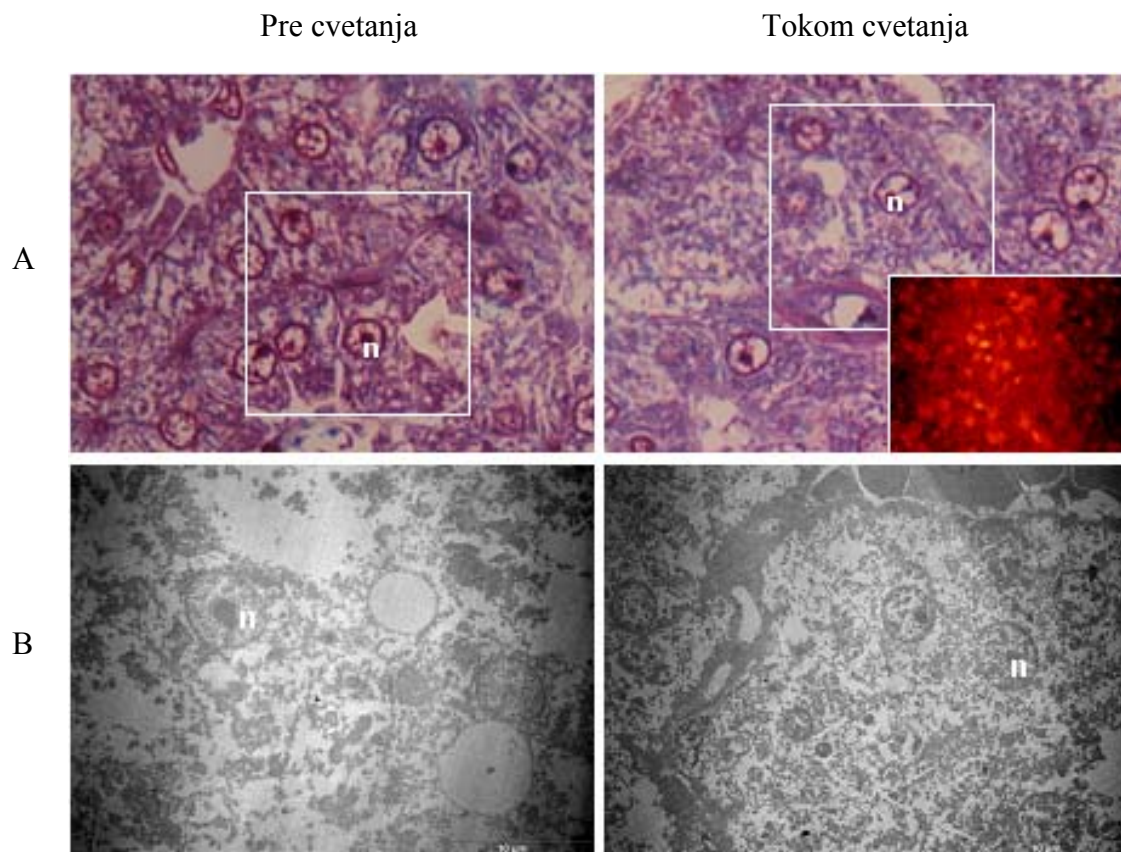
Slika 20. Svetlosna (A) i elektronska (B) mikroskopija preseka jetre *R. rutilus* pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža. Bojenje propidijum jodidom (umetak) pokazuje apoptotske promene tokom cvetanja. Uvelič. x 100, orig. n-nukleus.



Slika 21. Svetlosna (A) i elektronska (B) mikroskopija preseka jetre *B. bjoerkna* pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža. Bojenje propidijum jodidom (umetak) pokazuje apoptotske promene tokom cvetanja. Uvelič. x 100, orig. n-nukleus.



Slika 22. Svetlosna (A) i elektronska (B) mikroskopija preseka jetre *C. gibelio* pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža. Bojenje propidijum jodidom (umetak) pokazuje apoptotske promene tokom cvetanja. Uvelič. x 100, orig. n-nukleus.



Slika 23. Svetlosna (A) i elektronska (B) mikroskopija preseka jetre *P. fluviatilis* pre i tokom cvetanja u jezeru Gruža. Bojenje propidijum jodidom (umetak) pokazuje apoptotske promene tokom cvetanja. Uvelič. x 100, orig. n-nukleus.



## 5. DISKUSIJA

Vodeni ekosistemi su neprestano izloženi dejstvu različitih antropogenih uticaja koji menjaju njihovu strukturu i funkciju. Promene koje su uzrokovane ljudskom aktivnošću dovode do pogoršanja kvaliteta vodene životne sredine i ugrožavaju opstanak akvatičnih organizama. Iako vodena sredina ima veliki značaj za čoveka, izložena je uticaju različitih zagađujućih materija od kojih su mnoge toksične za živi svet (Almroth, 2008).

Vodene ekosisteme naseljava veliki broj različitih organizama od prokariota do kičmenjaka, pri čemu njihovo stanje oslikava kvalitet sredine u kojoj žive. Posebnu važnost u praćenju stanja vodenih ekosistema imaju metode u biomonitoringu koje se zasnivaju na posmatranju biohemijskih, fizioloških i histoloških indikatora izlaganja akvatičnih organizama delovanju različitih ksenobiotika. Ovi indikatori koji se jednim imenom nazivaju biomarkeri pokazuju interakciju između bioloških sistema i potencijalne opasnosti koja može biti hemijska, fizička ili biološka (WHO, 1993). Registrovanje specifičnih bioloških odgovora predstavlja pouzdan signal koji ukazuje na promene u kvalitetu vodene životne sredine. Monitoring biomarkera u vodenim organizmima, uključujući i ribe, može da ukaže na postojanje promena i oštećenja u tkivima koja nastaju usled izloženosti toksikantima.

Poznato je da veliki broj parametara životne sredine može da izazove oksidacioni stres u ćelijama organizama koji su izloženi njihovom dejstvu. Ksenobiotici su uglavnom redoks aktivna jedinjenja i imaju sposobnost da formiraju ROS preko aktivacije enzima kao što su CYP1A i NAD(P)H oksidaza, zatim oksidacionih sistema koji su katalizovani metalima ili preko redoks ciklusa. Kao rezultat oksidacionog stresa dolazi do oštećenja ključnih biomolekula (DNK, proteina, lipida), što može da dovede do ćelijske smrti (Halliwell i Gutteridge, 1999; Štajn i sar., 2007). Oksidacioni stres je patološki proces povezan sa prekomernom produkcijom ROS i predstavlja važan mehanizam toksičnosti velikog broja ksenobiotika. Proces oksidacionog stresa može da bude indukovano organskim zagađujućim materijama, teškim metalima, ali i cijanotoksinima tokom pojave cvetanja cijanobakterija (Van der Oost i sar., 2003; Bláha i sar., 2004).

Vodeni organizmi reaguju na oksidacioni stres nizom zaštitnih biohemijskih i fizioloških mehanizama čiji intenzitet zavisi od stepena narušenosti kvaliteta životne sredine. Enzimske i neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja evolutivno su se razvile kod niza različitih vodenih organizama zbog sprečavanja i repariranja oštećenja koja nastaju usled prekomerne produkcije ROS i pojave oksidacionog stresa. Parametri antioksidacione zaštite kao što su aktivnost enzima SOD, CAT, GSH-Px, GR i enzima faze II biotransformacije GST, kao i koncentracija GSH i SH grupa, često se koriste u biomonitoringu vodenih ekosistema, jer omogućavaju procenu stanja organizama koji naseljavaju ove ekosisteme i razumevanje načina na koji deluje toksikant. Aktivnost i koncentracija komponentata sistema zaštite od oksidacionih oštećenja, kao i stepen akumulacije oštećenih molekula, predstavljaju dobre biomarkere oksidacionog stresa i pružaju rani upozoravajući signal izloženosti redoks aktivnim ksenobioticima (Almroth, 2008).

Jedna od negativnih posledica antropogenog uticaja na životnu sredinu je povećana eutrofikacija vodenih ekosistema, koja podrazumeva prisustvo visokog sadržaja hranljivih biogenih materija u vodi, pre svega jedinjenja azota i fosfora (Briand i sar., 2003). Eutrofikacija je prirodan proces povećanja organske produkcije u ekosistemu, koji se znatno ubrzava usled prisustva otpadnih voda hemijske i prehrambene industrije, zatim komunalnih otpadnih voda, ali i spiranja đubriva sa obradivog zemljišta.

Eutrofikacija dovodi do masovnog razvića primarnih producenata u vodenoj životnoj sredini, a samim tim i ostalih komponenti biocenoze. Svi biološki i biohemijski procesi, uključujući i procese razlaganja, intenzivni su u eutrofnim ekosistemima, što za posledicu ima smanjivanje količine rastvorenog kiseonika u vodi. Uznapredovali procesi eutrofikacije negativno se odražavaju na kvalitet vode i stanje organizama koji naseljavaju eutrofne akvatične ekosisteme. Proces eutrofikacije je brz u stajaćim vodama, kao što su bare, prirodna jezera i veštačke akumulacije, prvenstveno zbog smanjene cirkulacije vode.

Jedna od posledica eutrofikacije vodenih ekosistema je naglo povećanje ukupne biomase cijanobakterija, što je poznato pod nazivom cvetanje vode. Podaci o cvetanju cijanobakterija poznati su u literaturi više od jednog veka, a poslednjih decenija urađen je veliki broj studija o biohemijski aktivnim sekundarnim metabolitima koje ovi

organizmi produkuju i koji su poznati pod zajedničkim nazivom cijanotoksini. Zbog sve većeg stepena eutrofikacije različitih tipova vodenih ekosistema, kao i klimatskih promena, došlo je do povećanja učestalosti, intenziteta i geografske distribucije cvetanja, tako da je ova pojava postala značajan problem širom sveta. Najpoznatiji toksogeni rodovi cijanobakterija uključuju filamentozne (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Oscillatoria*) i jednoćelijske kolonijalne oblike (*Microcystis*, *Lyngbia*), (Ferreira i sar., 2001; Žegura i sar., 2011b).

Većina cijanotoksina su jedinjenja rastvorljiva u vodi i klasifikuju se prema svojim hemijskim (ciklični peptidi, alkaloidi, lipopolisaharidi) ili toksikološkim karakteristikama (hepatotoksini, neurotoksini, citotoksini, dermatotoksini, iritanti). Ova heterogena grupa jedinjenja može da ispolji niz negativnih uticaja na funkcionisanje velikog broja različitih grupa organizama, uključujući beskičmenjake, ribe, vodozemce, ptice i sisare (Wiegand i Pflugmacher, 2005; Van Apeldoorn i sar., 2007; Chen i sar., 2009; Amado i Monserrat, 2010; Aráoz i sar., 2010; Sun i sar., 2011). Iako cijanobakterije formiraju prirodne životne zajednice u ekosistemima, istraživanja ukazuju da akvatični organizmi, uključujući i ribe reaguju na njihove metabolite kao na ksenobiotike. Mehanizmi delovanja cijanotoksina različiti su i zavise od njihove hemijske strukture. Tako su peptidi mikrocistin i nodularin specifični inhibitori serin/treonin protein fosfataza 1 i 2A, alkaloidi saksitoksin i anatoxin-a utiču na nervnu transmisiju, dok cilindrospermopsin koji je takođe alkaloid, ireverzibilno inhibira sintezu proteina preko mehanizma koji uključuje blokiranje translacije iRNK (Smith i sar., 2008).

Prisustvo visoke koncentracije cijanotoksina u vodi uglavnom je karakteristično za mikrocistin i cilindrospermopsin, a ređe za neurotoksine (WHO, 2011). U prirodnim uslovima efekti cijanotoksina na akvatične i terestrične organizme uglavnom su subletalni, a konstatovani su i slučajevi sa letalnim ishodom (Zimba i sar., 2001; Alonso-Andicoberry i sar., 2002).

S obzirom na mnogobrojne zabeležene negativne posledice intoksifikacije ljudi ovim toksinima, proučavanje načina na koji deluju cijanotoksini ima veliki značaj za čoveka. U mnogim zemljama prihvaćene su preporuke Svetske zdravstvene organizacije za kontrolu vode za piće i rekreativnih voda (WHO, 2003; Žegura i sar., 2011b).



U naučnoj literaturi sve je više podataka da različiti toksini cijanobakterija mogu da izazovu oksidacioni stres u tkivima organizama koji su izloženi njihovom dejstvu, tako da promene u vrednostima parametara antioksidacione zaštite igraju značajnu ulogu u proučavanju stepena i prirode uticaja cvetanja na žive sisteme (Pflugmacher i sar., 1998; Clemente i sar., 2010; Qiu i sar., 2012). Studije na različitim akvatičnim organizmima podržavaju činjenicu da su oksidaciona oštećenja uključena u razvoj toksičnosti cijanotoksina kako u prirodnim staništima (Qiu i sar., 2007), tako i pod laboratorijskim uslovima (Cazenave i sar., 2006; Prieto i sar., 2006).

Akumulaciono jezero Gruža ima niz karakteristika koje predstavljaju važan preduslov eutrofikacije. Površina jezera je velika u odnosu na dubinu i masu vode, dok je kretanje vode minimalno. Akumulaciju snabdevaju vodom uglavnom atmosferske padavine, a male pritoke koje se ulivaju u jezero imaju nizak stepen proticaja. Za plići region akumulacionog jezera Gruža, gde je izvršeno izlovljavanje riba za ovu studiju, karakteristično je da je okružen obradivim zemljištem, za razliku od dubljeg dela koji je okružen šumama i pašnjacima. Najznačajnija pritoka, Boračka reka, nalazi se u zoni obradivog zemljišta i naselja celom dužinom svog toka (Čović i Ostojić, 2005). Gružansko jezero karakteriše redovno mestimično cvetanje cijanobakterija u toplijem periodu godine, što ukazuje na eutrofan status ove vodne akumulacije (Ranković i Simić, 2005).

Fizičko-hemijski parametri akumulacionog jezera Gruža koji su određivani tokom istraživanja ove doktorske disertacije ukazali su na izvesne razlike između dva proučavana perioda. U junu pre cvetanja temperatura vode bila je manja, a koncentracija i zasićenost  $O_2$  veća u odnosu na avgust kada se pojavilo cvetanje. Negativna korelacija između temperature i količine rastvorenog  $O_2$  u akvatičnim ekosistemima direktna je posledica fizičkog procesa zavisnosti saturacije gasa od temperature vode, pri čemu koncentracija gasa u vodi opada sa porastom temperature.

Dodatni faktor koji doprinosi negativnoj korelaciji između temperature i količine rastvorenog  $O_2$  u vodi je uticaj živog sveta koji naseljava akvatične ekosisteme. Sa povećanjem temperature u toplijem delu godine dolazi do povećanja svih metaboličkih procesa u ekosistemu, prvenstveno primarne produkcije, a zatim i procesa razlaganja, što zahteva i povećanu potrošnju  $O_2$ .

Temperatura vode je jedan od najvažnijih faktora spoljašnje sredine koji utiče na cvetanje cijanobakterija (Liu i sar., 2006). Detektovana temperatura vode od 27 °C tokom perioda cvetanja u akumulacionom jezeru Gruža pogoduje povećanju brojnosti cijanobakterija. Literaturno je potvrđeno da je najoptimalnija temperatura za prenamnožavanje vrste *Aphanizomenon flos-aquae* u opsegu od 26 do 28 °C (Ranković i Simić, 2005).

Izmerena koncentracija nitrata i fosfata u akumulacionom jezeru Gruža bila je znatno veća pre cvetanja u odnosu na vrednosti tokom cvetanja cijanobakterija i prelazila je maksimalno dozvoljene koncentracije u vodi. Pretpostavlja se da je ovakav trend pre cvetanja posledica obilnih kiša u periodu uzorkovanja vode i povećanog spiranja mineralnih soli iz okolnog zemljišta. Treba naglasiti da je prisustvo nutrijenata u vodi, pogotovo onih koji sadrže fosfor i azot, važan faktor koji dovodi do eutrofikacije vodenih ekosistema i povećane brojnosti cijanobakterija (Briand i sar., 2003). Međutim, variranje vrednosti ovih hemijskih parametara ne mora da bude glavni ograničavajući faktor za razvoj cijanobakterija. Periodično cvetanje cijanobakterija iz roda *Microcystis*, kao i vrste *A. flos-aquae* koje je detektovano u jezeru Dianhi u Kini nije bilo povezano sa nivoom nutrijenata u vodi, jer je koncentracija ukupnog azota i fosfora bila relativno nepromenjena tokom godine (Liu i sar., 2006).

Literaturni podaci koji uključuju ispitivanje hemijskih parametara vode u periodu od formiranja akumulacionog jezera Gruža do danas, ukazuju na činjenicu da voda ove akumulacije sadrži povećanu koncentraciju Mn i organskih materija (utrošak  $\text{KMnO}_4$ ), a povremeno Fe, amonijaka, kao i soli azota i fosfora (Mihajlović i sar., 2005). Prema literaturnim podacima, u zemljištu na kojem je akumulaciono jezero Gruža izgrađeno, kao i u pritokama jezera, prisutan je Mn u većim koncentracijama. Najveće vrednosti organskih materija izmerene su u zoni gde se nalazi vegetacija, odnosno u najplićem delu akumulacije i posledica su velike primarne produkcije, ali i unosa alohtonog organskog materijala iz okolnih obradivih površina, kao i činjenice da su pritoke akumulacije često zagađene otpadnim vodama. Količine različitih pesticida koje su ispitivane u ranijim studijama uvek su pokazivale vrednosti niže od maksimalno dozvoljenih. U mulju akumulacije Gruža pored visokih koncentracija Mn, detektovana i znatna količina Cu koja je posledica upotrebe  $\text{CuSO}_4$  u cilju suzbijanja razvoja cijanobakterija (Mihajlović i sar., 2005).

U ovoj doktorskoj disertaciji kvantitativnom analizom cijanobakterija u jezeru Gruža utvrđena je brojnost od 420 000 ind/L u vodi koja je uzorkovana u avgustu tokom cvjetanja, dok u junu pre cvjetanja nisu detektovane jedinice ove grupe organizama. Razlike u brojnom stanju cijanobakterija između dva istraživana perioda mogu se objasniti njihovim specifičnim životnim ciklusom. Poznato je da cijanobakterije imaju sposobnost da prežive u nepovoljnim periodima godine kao što je zimski, tako što prezimljavaju pomoću specijalizovanih mirujućih ćelija (akineta) koje padaju na dno jezera. Nakon prezimljavanja, kada se ponovo jave povoljni uslovi, dolazi do germinacije akineta i obnavljanja populacije (Preußel i sar., 2006; Suikkanen i sar., 2010). Tokom uzorkovanja vode u junu, još uvek nije došlo do obrazovanja trihoma, tako da nije bilo moguće detektovati nijednu vrstu cijanobakterija. Ovi podaci podudaraju se sa ranijim analizama vode jezera Gruža, ali treba naglasiti da je brojnost cijanobakterija u avgustu pokazala niže vrednosti u odnosu na rezultate iz prethodnih godina. Na istom lokalitetu kvantitativnom analizom cijanobakterija u avgustu 1988. godine detektovano je 895 000 ind/L, a 1992. godine 577 000 ind/L (Ranković i Simić, 2005).

Rezultati ove doktorske disertacije koji se odnose na kvalitativnu analizu cijanobakterija za vreme cvjetanja u jezeru Gruža ukazuju na dominantno prisustvo vrsta iz roda *Aphanizomenon*, pri čemu je vrsta *A. flos-aquae* imala najveću brojnost. U uzorku vode detektovane su i vrste *A. issatschenkoi*, *A. aphanizomenoides* i *Lyngbya limnetica*, ali sa znatno manjom zastupljenošću. U avgustu prethodnih godina, Ranković i Simić (2005) su takođe detektovali mestimično cvjetanje vode izazvano povećanom brojnošću cijanobakterije *A. flos-aquae*.

U dostupnoj naučnoj literaturi poznati su brojni slučajevi cvjetanja vrsta iz roda *Aphanizomenon* (Zagajewski i sar., 2007; Voloshko i sar., 2008). Filamentozna vrsta *A. flos-aquae* je prisutna u vodenim ekosistemima severne hemisfere i ima veliki potencijal da dovede do sezonski zavisnog cvjetanja vode. Ferreira i sar. (2001) su detektovali *A. flos-aquae* kao jedinu vrstu cijanobakterija u periodu tokom jula i avgusta u portugalskom jezeru Krestuma-Lever, dok se od septembra u uzorku vode pojavljivala i vrsta *Microcystis aeruginosa*, a tokom zimskog perioda nije bilo moguće detektovati nijednu vrstu cijanobakterija.

Prema literaturnim podacima *A. flos-aquae* proizvodi različita toksična i bioaktivna jedinjenja, od kojih su najpoznatiji neurotoksični alkaloidi (anatoksin-a, saksitoksin) i citotoksini (cilindrospermopsin). Detektovani su i lipidi koji imaju negativan uticaj na razvoj embriona riba, kao i inhibitori karboksipeptidaze-A, a poznati su i podaci da ekstrakt cijanobakterije *A. flos-aquae* može da ima alergeno dejstvo (Preußel i sar., 2006). Negativan uticaj sekundarnih metabolita ove vrste na miševu u vidu izraženih lezija tkiva jetre i pluća opisali su Underdal i sar. (1999). Dok su anatoksin-a i saksitoksin okarakterisani kao intracelularni sekundarni metaboliti cijanobakterija koji se oslobađaju u vodu uglavnom tek nakon lize ćelija, cilindrospermopsin je u najvećoj meri ekstracelularan i predstavlja veću opasnost od cijanotoksina koji imaju nizak ekstracelularni sadržaj (Gutiérrez-Praena i sar., 2012b). Pojedina istraživanja pokazala su da vrste *A. issatschenkoi* i *A. aphanizomenoides* takođe imaju sposobnost da proizvode različite cijanotoksine (Van Apeldoorn i sar., 2007; Smith i sar., 2008; Ballot i sar., 2010).

Ribe se koriste u biomonitoring studijama akvatičnih ekosistema prvenstveno zbog svoje široke distribucije i naseljavanja većine ekoloških niša u vodi, ali i zbog lakog sakupljanja i identifikacije, položaja u lancu ishrane, veličine tela i dugog životnog ciklusa. Postoji više načina na koji ribe mogu da unesu cijanotoksine u svoj organizam: direktno preko ishrane fitoplanktonom ili epitelijalne apsorpcije (koža, škrge) rastvorenih toksina nakon starenja i lize ćelija cijanobakterija, kao i indirektno preko lanaca ishrane (Osswald i sar., 2007; Smith i sar., 2008; Amado i Monserrat, 2010; Kinnear i sar., 2010).

Kod omnivorne vrste *Carassius auratus* glavni put unošenja cijanotoksina koji su rastvoreni u vodi je kroz škrge tokom procesa disanja, dok ih herbivorne vrste u najvećoj meri unose preko gastrointestinalnog trakta (Zhang i sar., 2009). Za omnivornu vrstu *Rutilus rutilus* utvrđeno je da u ishrani koristi uglavnom zooplankton, dok cijanobakterije, biljni materijal i detritus predstavljaju alternativni izvor hrane (Šetlíková i Wiegand, 2009). Brojnim naučnim studijama potvrđeno je da kontakt ili unošenje čak i niskih doza cijanotoksina može da ima negativan uticaj na organizme koji žive u vodenim ekosistemima (Ferreira i sar., 2001).

Ranija ispitivanja pokazala su da ribe predstavljaju dobar model za proučavanje uticaja cijanotoksina na parametre antioksidacione zaštite (Qiu i sar., 2007; Sun i sar.,

2008). Većina istraživanja je ograničena na laboratorijske studije koje podrazumevaju izlaganje individua određenim količinama toksikanata, sa poznatim periodom izlaganja i pod kontrolisanim uslovima. Na taj način u eksperimentima je moguće kontrolisati različite parametre iz prirode, kao što su temperatura, aeracija i dostupnost hrane, čime se pojednostavljuje interpretacija rezultata. Međutim, za prikaz pravog stanja u prirodi, neophodne su terenske studije u kojima se proučavaju ribe koje su izlovljene direktno iz vodenih ekosistema u kojima su prisutni toksikanti. Terenska istraživanja uključuju kompleksnu povezanost i sinergizam velikog broja biotičkih i abiotičkih faktora koji utiču na metabolizam akvatičnih organizama i tako pružaju celokupnu sliku koja je prisutna u prirodi i koja predstavlja osnovu pristupa u biomonitoringu vodenih ekosistema. Terenske studije, čiji je predmet istraživanje odgovora sistema antioksidacione zaštite kod riba na pojavu cvetanja cijanobakterija i prisustvo cijanotoksina u prirodnim staništima, su malobrojne (Qiu i sar., 2007; Clemente i sar., 2010; Qiu i sar., 2012).

Biomarkeri antioksidacione zaštite kod riba najviše su proučavani u jetri, jer je to glavni detoksifikacioni organ i ima najvažniju ulogu u regulaciji redoks metabolizma. Jetra je takođe glavno mesto produkcije ROS i ciljni organ za većinu različitih cijanotoksina (Moreno i sar., 2005; Qiu i sar., 2007). Tkivo škrge je zbog funkcije u razmeni gasova u konstantnom direktnom kontaktu sa vodom. Usled svoje velike površine i propustljivosti, škrge riba predstavljaju primarno mesto apsorpcije ksenobiotika (Li i sar., 2010) i omogućavaju ranu procenu efekata supstanci koje su rastvorene u vodi, uključujući i cijanotoksine. Poznato je da cijanotoksini mogu pasivnim putem da prođu kroz škrge riba tokom procesa disanja (Zimba i sar., 2001; Prieto i sar., 2007). Abdominalni mišić obezbeđuje ribama energiju neophodnu za kratkotrajno intenzivno plivanje, a karakteriše ga nizak sadržaj mitohondrija i nizak nivo oksidacionog metabolizma (Li i sar., 2010). Takođe treba istaći da tkivo mišića ima konzumni značaj za čoveka.

Osetljivost riba na pojavu cvetanja zavisi od njihovog prirodnog staništa i načina ishrane. Vrste koje su native u oligotrofnim vodenim ekosistemima osetljivije su u odnosu na vrste koje su karakteristične za eutrofna staništa, gde je izloženost cijanotoksinima zastupljena u većoj meri. Fitoplanktivorne ribe koje se češće hrane cijanobakterijama, razvile su tokom evolucije posebne mehanizme (uključujući i

antioksidacione) za odbranu od cijanotoksina i otpornije su od karnivornih vrsta riba (Qiu i sar., 2007). S obzirom na činjenicu da karnivorne ribe zauzimaju više trofičke nivoe u lancima ishrane, brojne naučne studije pokazale su da se ove vrste zbog izražene akumulacije toksikanata mogu koristiti kao bioindikatori zagađenja životne sredine (Da Silva i sar., 2011a). S druge strane, postoje podaci da su ciprinidne ribe osjetljivije na pojavu cvetanja u odnosu na vrste koje pripadaju drugim redovima. Pretpostavlja se da razlog za to nisu specijski uslovljene karakteristike grupe, već omnivoran tip ishrane, odnosno pitanje količine cijanobakterija koja se unosi ingestijom (Fischer i Dietrich, 2000).

Od četiri vrste riba iz jezera Gruža koje su odabrane u ovoj doktorskoj disertaciji, *Rutilus rutilus* (bodorka), *Blicca bjoerkna* (blika) i *Carassius gibelio* (babuška) pripadaju porodici Ciprinidae i omnivorne su, dok je *Perca fluviatilis* (grgeč) kao predstavnik porodice Percidae karnivorna vrsta. Prema podacima ranijih istraživanja, vrste *R. rutilus* i *B. bjoerkna* pripadaju subdominantno zastupljenoj ihtiofauni jezera Gruža, dok je *C. gibelio* eudominantna, a *P. fluviatilis* dominantno zastupljena vrsta. Omasovljenje alohtonih riba u akumulaciji, prvenstveno vrste *C. gibelio* koja je izrazito otporna na nepovoljne uslove i lako se adaptira na različite tipove ekosistema, ugrožava autohtonu ihtiofaunu kojoj pripadaju ostale tri ispitivane vrste. Poznato je da *C. gibelio* poseduje visok nivo tolerancije na promenu mnogih faktora životne sredine, kao što su potrošnja kiseonika, pH i prisustvo ksenobiotika (Simović i Marković, 2005).

Kod svih ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža kondicioni faktor je pokazao statistički značajno povećane vrednosti tokom cvetanja u odnosu na period pre cvetanja. Na osnovu eksperimenata na slatkovodnoj ribi *Coregonus lavaretus* utvrđeno je da oralno izlaganje ćelijama cijanobakterije *Planktothrix rubescens*, kao i gajenje u vodi koja sadrži različite koncentracije ćelija ove cijanobakterijske vrste, ne dovodi do statistički značajnih promena vrednosti kondicionog faktora (Ernst i sar., 2006; Ernst i sar., 2007). Istraživanja su pokazala da ovaj parametar koji se bazira na odnosu između težine i dužine tela i koji predstavlja integrativni indikator opšteg stanja organizma, nije mnogo osjetljiv na prisustvo toksikanata. Nespecifičan je i zavisi od uticaja velikog broja drugih faktora, kao što su sezona, bolest i dostupnost hrane (Mayer i sar., 1992; Grund i sar., 2010).

Iako ne ukazuju na dejstvo cijanotoksina, dobijene vrednosti kondicionog faktora pružaju jasne podatke o opštem fiziološkom stanju riba. Sve ispitivane vrste riba iz jezera Gruža imale su kondicioni faktor veći od 1 u oba ispitivana perioda, osim vrste *B. bjoerkna* kod koje je ta vrednost bila nešto niža u periodu pre cvetanja. Poznato je da vrednosti veće od 1 ukazuju na dobar, a manje na loš opšti fiziološki status riba. U oba ispitivana perioda vrsta *C. gibelio* je imala najveći, a vrsta *B. bjoerkna* najmanji kondicioni faktor. To se može povezati sa izraženom otpornošću i adaptivnom sposobnošću alohtone vrste *C. gibelio*, koja ugrožava autohtone vrste među kojima je i *B. bjoerkna*.

Kondicioni faktor predstavlja meru energetske rezervi i menja se kada je dostupnost hrane ograničena ili kada je ishrana ribe narušena dejstvom različitih faktora stresa (Rätz i Lloret, 2003). Veće vrednosti kondicionog faktora u avgustu tokom cvetanja ukazuju na visoke energetske rezerve kod svih ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža, što je u saglasnosti sa visokim nivoom bioprodukcije u akumulaciji tokom letnjeg perioda kada je izvršeno uzorkovanje. Vrednosti kondicionog faktora znatno više zavise od dostupnosti hrane nego od prisustva toksikanata i drugih faktora stresa koji su prisutni u vodi. Na osnovu ovih istraživanja pretpostavlja se da ovaj parametar nije osetljiv na prisustvo cijanotoksina u vodi i da ne može da se koristi kao biomarker uticaja cvetanja cijanobakterija.

Izmerena koncentracija ukupnih proteina u jetri, škragama i mišiću ispitivanih vrsta riba takođe pokazuje trend rasta tokom cvetanja u odnosu na period pre cvetanja u jezeru Gruža. Ovaj parametar bio je statistički značajno povećan tokom cvetanja u škragama i mišiću kod vrste *R. rutilus*, jetri i škragama kod *B. bjoerkna*, u sva tri tkiva kod *C. gibelio* i u mišiću kod vrste *P. fluviatilis*. Gutiérrez-Praena i sar. (2011a) su pokazali da izlaganje slatkovodne ribe *Oreochromis niloticus* cijanotoksinu cilindropermopsinu ne dovodi do statistički značajnih promena koncentracije proteina u homogenatu jetre i bubrega. Međutim, smanjenje ukupnog sadržaja proteina u različitim ćelijskim linijama riba konstatovano je nakon *in vitro* primene mikrocinina (Pichardo i sar., 2005; Pichardo i sar., 2007), kao i kod polihete *Laonereis acuta* tokom perioda cvetanja u laguni Patos u Brazilu (Da Rosa i sar., 2005). Koncentracija proteina u jetri i škragama *Oreochromis* sp. koja je hranjena liofilizovanim ćelijama cijanobakterija iz roda *Microcystis* bila je manja u odnosu na kontrolne ribe (Molina i sar., 2005).

Detektovane razlike u koncentraciji proteina mogu da budu posledica velikog broja drugih spoljašnjih faktora, uključujući i dostupnost hrane. Elektroforetska analiza proteina u ovom istraživanju naglašava razlike u profilu proteina u svim tkivima ispitivanih vrsta riba između dva istraživana perioda, ali ukazuje i na razlike koje postoje između ispitivanih vrsta, kao i između tkiva svake vrste.

Korišćenje različitih biomarkera u biomonitoring studijama akvatičnih ekosistema ima veliki značaj u proceni uticaja ksenobiotika na organizme koji su izloženi njihovom dejstvu i doprinosi razumevanju odgovora na svim nivoima biološke organizacije. Uticaj sezone i lokaliteta na biomarkere antioksidacione zaštite (aktivnosti enzima SOD, CAT, GSH-Px, GR i GST i koncentraciju GSH i SH grupa) opisan je u studijama na različitim grupama morskih (Pavlović i sar., 2009) i slatkovodnih organizama (Radovanović i sar., 2010; Borković-Mitić i sar., 2011). Međutim, upotreba parametara antioksidacione zaštite u proceni ekotoksikoloških efekata cvetanja cijanobakterija proučavana je u malom broju radova (Perendija i sar., 2011; Da Silva i sar., 2011a).

Aktivnost Uk SOD u jetri bila je statistički značajno povećana tokom cvetanja u odnosu na period pre cvetanja u jezeru Gruža jedino kod vrste *B. bjoerkna*, dok kod ostalih ispitivanih vrsta nije bilo značajnih promena aktivnosti ovog enzima. Izoforma CuZn SOD u jetri pokazuje povećanje aktivnosti kod *B. bjoerkna* tokom cvetanja, ali i smanjenje kod *P. fluviatilis*. Aktivnost Mn SOD u jetri ima statistički značajan trend porasta kod sve četiri ispitivane vrste za vreme cvetanja. Iako CuZn SOD i Mn SOD katalizuju istu reakciju, reč je o strukturno različitim izoformama enzima SOD, čija se lokacija u ćeliji takođe razlikuje. CuZn SOD čini većinski deo Uk SOD i nalazi se u citosolu, dok je Mn SOD enzim mitohondrijalnog matriksa (Pérez-Jiménez i sar., 2009; Pérez-Jiménez i sar., 2012). Utvrđeno je da je ekspresija gena koji kodiraju enzime CuZn SOD i Mn SOD regulisana različitim mehanizmima (Zelko i sar., 2002). Povećana aktivnost Mn SOD u jetri kod svih ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža predstavlja rani adaptivni odgovor na oksidacioni stres. Poznato je da cijanotoksini mogu da uzrokuju pojavu oksidacionog stresa u ćeliji, a glavno mesto produkcije ROS su reakcije vezane za mitohondrijalni respiratorni lanac. Ranije studije su pokazale da oksidacione supstance mogu da izazovu povećanje aktivnosti Mn SOD što predstavlja prvu liniju odbrambenog mehanizma ćelije (Pavlović i sar., 2010).



U ovoj doktorskoj disertaciji utvrđeno je da aktivnost Uk SOD, CuZn SOD i Mn SOD u škragama i mišiću kod ispitivanih vrsta riba pokazuje trend smanjenja tokom perioda cvetanja u odnosu na period pre cvetanja. Statistički značajno smanjenje aktivnosti SOD izraženo je u različitom stepenu u zavisnosti od ispitivanog tkiva i vrste. Ranijim istraživanjima pokazano je da povećana koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izaziva inhibiciju aktivnosti SOD (Hodgson i Fridovich, 1975). S obzirom na važnost uloge koju obavlja enzim SOD, redukcija njegove aktivnosti u škragama i mišiću kod ispitivanih vrsta riba može da dovede do akumulacije reaktivnog O<sub>2</sub><sup>-</sup> u ovim tkivima i pojave oksidacionog stresa.

Poznato je da reaktivne vrste kiseonika kao što je O<sub>2</sub><sup>-</sup> nastaju tokom procesa detoksifikacije ksenobiotika, uključujući i cijanotoksine (Da Silva i sar., 2011a). U prisustvu jona Fe<sup>2+</sup> ovaj slobodni radikal reaguje sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pri čemu dolazi do formiranja izuzetno reaktivnog OH<sup>•</sup> koji može da ošteti strukturu makromolekula kao što su DNK, proteini, lipidi i ugljeni hidrati. Enzim SOD koji ima sposobnost da ukloni O<sub>2</sub><sup>-</sup> i tako doprinese održavanju balansa između oksidanata i antioksidanata, jedna je od najvažnijih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja i predstavlja pouzdan biomarker oksidacionog stresa (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Razlike u elektroforeskom profilu enzima SOD u jetri ispitivanih vrsta riba iz Gružanskog jezera najizraženije su kod ciprinidne vrste *B. bjoerkna*, gde se zapaža različit broj traka između dva ispitivana perioda. Veći broj traka koji je detektovan za vreme cvetanja, ukazuje na veći broj SOD izoformi u jetri ove vrste u odnosu na period pre cvetanja. Dobijeni podaci elektroforeske analize enzima SOD prate rezultate koji se tiču aktivnosti SOD u jetri *B. bjoerkna*, jer je jedino kod ove vrste utvrđeno povećanje aktivnosti kako Uk SOD, tako i CuZn SOD i Mn SOD za vreme cvetanja u odnosu na period pre cvetanja. Ranijim studijama na ribama utvrđeno je da pojava novih aktivnih izoformi SOD u jetri ukazuje na oksidacioni stres koji može biti izazvan dejstvom različitih faktora. Dok je u jetri kontrolnih jedinki morske ribe *Sparus aurata* detektovano više konstitutivnih izoformi Mn SOD i CuZn SOD, nakon tretiranja različitim prooksidacionim jedinjenjima (Cu, malation, dieldrin) pojavile su se i nove dodatne izoforme Mn SOD i CuZn SOD, za koje je utvrđeno da nastaju zbog modifikacija lizinskih i histidinskih rezidua enzima u reakciji sa produktima lipidne peroksidacije MDA i HNE (Pedrajas i sar., 1995; Pedrajas i sar., 1998).

Istraživanja na školjkama pokazala su da elektroforetska analiza SOD predstavlja kvalitativnu metodu koja može da ukaže na promene uslova u vodenoj životnoj sredini i tako posluži kao dobar biomarker u biomonitoringu akvatičnih ekosistema (Borković-Mitić i sar., 2010; Borković-Mitić i sar., 2011). Pored dve konstitutivne, inducibilna izoforma CuZn SOD je konstatovana u digestivnoj žlezdi jedinki *Mytilus edulis* koje su sakupljene sa zagađenih staništa, kao i kod jedinki koje su bile izložene povećanoj koncentraciji Cu (Manduzio i sar., 2003). Literaturno je potvrđeno da je u mulju akumulacije Gruža detektovana znatna količina Cu koja je posledica upotrebe CuSO<sub>4</sub> u cilju suzbijanja razvoja cijanobakterija (Mihajlović i sar., 2005) i to može da predstavlja dodatno objašnjenje SOD profila kod vrste *B. bjoerkna*. Pérez-Jiménez i sar. (2009) detektovali su tri izoforme SOD u tkivima morske ribe *Dentex dentex*, Mn SOD koja je bila konstitutivna u jetri, belom mišiću, srcu i eritrocitima, CuZn SOD I koja je bila konstitutivna u jetri, belom mišiću i srcu i CuZn SOD II koja je bila inducibilna u mišiću. Autori su zaključili da je indukcija nove SOD izoforme povezana sa ishranom organizma i prisustvom prooksidacionih molekula u ćelijskom okruženju.

Dobijeni elektroforegrami enzima SOD u škragama i mišiću kod ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža pokazuju tipičan distribicioni obrazac SOD izoformi kod svih vrsta u oba ispitivana perioda, pri čemu ni kod jedne vrste nisu konstatovane razlike u broju traka pre i tokom cvetanja. Elektroforetski nalaz enzima SOD u jetri, škragama i mišiću takođe daje prikaz jasnih tkivnih razlika, kao i razlika između vrsta.

CAT je najvažniji enzim koji katalizuje degradaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produkovanog tokom procesa dismutacije O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pod dejstvom enzima SOD, tako da inhibicija njegove aktivnosti može da dovede do izrazitih oštećenja ćelije (Halliwell i Gutteridge, 1999). Eksperimentima je utvrđeno da je po pitanju uklanjanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jetra najugroženije tkivo kod ispitivanih riba iz jezera Gruža, jer je u ovom tkivu kod svih vrsta konstatovan statistički značajan pad aktivnosti CAT tokom cvetanja cijanobakterija. Poznato je da smanjena aktivnost CAT nastaje usled povećane produkcije O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i peroksil radikala koji preko direktnih oštećenja enzima deluju kao inhibitori njegove aktivnosti (Kono i Fridovich, 1982). Redukcija aktivnosti CAT u jetri može da nastane usled promena u strukturi subjedinica ovog enzima pod dejstvom cijanotoksina kao i zbog veće osetljivosti u odnosu na SOD.

Nasuprot rezultatima koji su dobijeni za jetru, aktivnost CAT pokazuje rast za vreme cvetanja u škragama *R. rutilius* i *P. fluviatilis*, kao i u mišiću sve četiri ispitivane vrste riba. Dobijeni rezultati ukazuju na jasnu tkivnu specifičnost aktivnosti CAT, pri čemu je kao i u slučaju enzima SOD veće podudaranje u tkivu škriga i mišića, dok se jetra izdvaja. Enzimski sistem koji čine SOD i CAT predstavlja prvu liniju odbrane od slobodnih radikala. U ovim eksperimentima utvrđeno je da SOD ima veći značaj u antioksidacionoj odbrani u jetri ispitivanih riba tokom cvetanja, dok u škragama i mišiću tu ulogu preuzima CAT.

Puerto i sar. (2009) su u svojoj studiji dobili slične rezultate na ćelijskoj liniji hepatocita riba, gde su toksični efekti mikrocistina doveli do povećanja aktivnosti SOD, a smanjenja aktivnosti CAT. Isti trend zabeležili su Da Silva i sar. (2011a) u mozgu slatkovodne ribe *Hoplias malabaricus* koja je tretirana lizatom cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii*. S druge strane, Atencio i sar. (2008) utvrdili su dozno zavisno smanjenje aktivnosti kako SOD, tako i CAT u jetri slatkovodne ribe *Tinca tinca* nakon oralnog izlaganja cijanobakterijama iz roda *Micrcystis* u laboratorijskim uslovima. Prieto i sar. (2007) su na sličan način tretirali vrstu *Oreochromis niloticus* i tako konstatovali smanjenje aktivnosti SOD i CAT u jetri i bubrezima, dok u škragama nije bilo promena aktivnosti ovih enzima. Pad aktivnosti CAT zabeležen je i u jetri ribe *Platichthys flesus* nakon intraperitonealne aplikacije cijanotoksina nodularina (Persson i sar., 2009).

U naučnoj literaturi opisane su i brojne studije u kojima mikrocistini dovode do povećanja aktivnosti SOD i CAT u tkivima slatkovodnih riba tokom tretiranja u laboratorijskim uslovima. Potvrdu ovakvih rezultata pružila su proučavanja na nivou transkripcije gena za antioksidacione enzime, koja su ukazala na pozitivnu regulaciju transkripcije SOD i CAT u jetri jedinki *Carassius auratus* koje su tretirane mikrocistinima (Sun i sar., 2008). Trend rasta aktivnosti oba enzima zabeležen je u jetri, bubregu i škragama kod vrste *Oreochromis* sp. posle intraperitonealne aplikacije mikrocistina (Prieto i sar., 2006), kao i u jetri vrste *Misgurnus mizolepis* nakon oralnog izlaganja materijalu koji je sadržao cijanobakterije iz roda *Microcystis* (Li i sar., 2005). Međutim, izlaganje onoj koncentraciji mikrocistina koja odgovara koncentraciji koja je prisutna u većini eutrofnih jezera, nije dovelo do promene aktivnosti SOD i CAT u jetri vrste *Cyprinus carpio* (Jiang i sar., 2012).

Razlike između navedenih laboratorijskih istraživanja posledica su specifičnih eksperimentalnih uslova, primenjene doze i tipa cijanotoksina, dužine izlaganja, kao i tkivnih i interspecijskih razlika u osetljivosti na toksine. Cazenave i sar. (2006) su utvrdili dualni odgovor CAT aktivnosti u jetri ribe *Corydoras paleatus* nakon izlaganja rastvorenim mikrocistinima, pri čemu je pri niskim koncentracijama ovog toksina detektovano povećanje, a pri visokim smanjenje enzimske aktivnosti. Visoke doze toksina mogu da izazovu oštećenja enzima, dok niske doze nakon dužeg perioda primene indukuju odbrambeni odgovor. Kada su u pitanju terenske studije, Li i sar. (2007a) su zabeležili statistički značajno povećanje aktivnosti CAT u jetri i bubregu fitoplanktivorne ribe *Hypophthalmichthys molitrix* tokom cvetanja *Microcystis aeruginosa* u jezeru Taihu u Kini u odnosu na periode pre i posle cvetanja. Nasuprot navedenim studijama, rezultati Clemente i sar. (2010) pokazali su da je aktivnost CAT u jetri slatkovodne vrste *Geophagus brasiliensis* ostala nepromenjena bez obzira na povećanje brojnosti cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii* u jezeru Alagados u Brazilu.

Tokom eksperimenata, konstatovan je statistički značajan pad aktivnosti enzima GSH-Px u jetri i mišiću kod svih ispitivanih vrsta riba za vreme cvetanja u jezeru Gruža u odnosu na period pre cvetanja. Potpuno isti trend zabeležen je i u škragama *B. bjoerkna* i *C. gibelio*, dok je povećanje aktivnosti GSH-Px tokom cvetanja detektovano jedino u škragama vrste *P. fluviatilis*. Poznato je da GSH-Px ima veći afinitet za  $H_2O_2$  u odnosu na CAT, tako da igra važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama  $H_2O_2$ , dok je CAT značajniji enzim u uslovima izrazitog oksidacionog stresa. Unutarćelijska koncentracija  $H_2O_2$  predstavlja važan faktor koji utiče na nivo enzimske funkcionalnosti CAT i GSH-Px (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Smanjena aktivnost CAT i GSH-Px u jetri svih ispitivanih vrsta riba tokom perioda cvetanja, ukazuje na opštu opterećenost ovog tkiva neorganskim i organskim hidroperoksidima. Tkivo škriga karakterišu izrazite razlike između vrsta i specifična kombinacija odgovora ova dva enzima. Kod *R. rutilus* aktivnost CAT u škragama statistički je značajno veća tokom cvetanja u odnosu na period pre cvetanja, dok za aktivnost GSH-Px nema promena. Kod vrsta *B. bjoerkna* i *C. gibelio* CAT ostaje na istom nivou u oba perioda istraživanja, a GSH-Px pokazuje trend smanjenja tokom cvetanja. Jedino je u škragama vrste *P. fluviatilis* detektovano povećanje aktivnosti oba

enzima ukazujući na veći stepen odbrane od prekomerno produkovanih neorganskih i organskih peroksida. U mišiću svih vrsta prisutan je suprotan trend između aktivnosti ova dva enzima, pri čemu porast aktivnosti CAT predstavlja zaštitni mehanizam odbrane od povećane produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok pad aktivnosti GSH-Px ukazuje na ugroženost integriteta ćelijskih membrana.

Statistički značajan pad aktivnosti GSH-Px detektovali su Da Silva i sar. (2011a) u mozgu slatkovodne ribe *Hoplias malabaricus* nakon tretiranja lizatima cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii* koja proizvodi saksitoksin. S obzirom na glavnu detoksifikacionu ulogu enzima GSH-Px u terminaciji slobodno radikalskih lančanih reakcija u procesu lipidne peroksidacije, autori su zaključili da ovaj cijanotoksin može da naruši integritet ćelijskih membrana. Suprotan trend konstatovan je u jetri ribe *Misgurnus mizolepis* nakon ingestije materijala koji je sadržao ćelije cijanobakterija (Li i sar., 2005). Detektovano povećanje aktivnosti GSH-Px ukazalo je na njegovu ulogu u sprečavanju nastanka oksidacionog stresa, što je potvrđeno analizom nivoa lipidne peroksidacije koji je ostao stabilan. Puerto i sar. (2009) su dobili slične rezultate na ćelijskoj liniji hepatocita riba, gde su toksični efekti mikrocistina doveli do povećanja aktivnosti GSH-Px.

Subhronično oralno izlaganje ćelijama cijanobakterija koje sadrže mikrocistine dovelo je do povećane aktivnosti GSH-Px, ali i do pozitivne regulacije transkripcije gena za ovaj enzim u jetri *Oreochromis niloticus*. Dobijena korelacija između aktivnosti enzima i genske ekspresije ukazala je na činjenicu da je povećanje aktivnosti enzima GSH-Px posledica njegove *de novo* sinteze, koja je indukovana povećanim nivoom oksidacionog stresa u hepatocitima (Puerto i sar., 2011b). *In vitro* eksperimenti su potvrdili osetljivost ćelija jetre riba na indukciju oksidacionog stresa koji je izazvan metabolitima cijanobakterija. Akutno izlaganje izolovanih hepatocita šarana *Cyprinus carpio* visokim koncentracijama mikrocistina rezultovalo je prekomernom produkcijom ROS, kao i stimulacijom antioksidacionih enzima SOD, CAT i GSH-Px (Li i sar., 2003b).

Aktivnost enzima GR kod vrste *R. rutilus* bila je povećana tokom cvetanja jedino u jetri, dok je u škragama i mišiću detektovan suprotan trend. U istom periodu, kod vrsta *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis* zabeleženo je smanjenje aktivnosti GR samo u škragama, a kod *C. gibelio* u svim ispitivanim tkivima. Može se zaključiti da je *C.*

*gibelio* najosetljivija vrsta po pitanju održavanja redoks homeostaze u uslovima cvetanja u Gružanskom jezeru. Pad aktivnosti GR usled toksičnih efekata cijanotoksina zapažen je u eksperimentima na ćelijskoj liniji hepatocita riba (Puerto i sar., 2009). Nepromenjena aktivnost enzima GR konstatovana je u jetri, škragama, mišiću i mozgu vrste *Cyprinus carpio* koja je hranjena ekstraktom liofilizovanih ćelija cijanobakterije *Microcystis aeruginosa* (Amado i sar., 2011).

Uticaj mikrocistina na transkripciju gena za antioksidacione enzime u jetri *Carassius auratus* istraživali su Sun i sar. (2008). Rezultati njihove studije su pokazali da mikrocistini dovode do negativne regulacije transkripcije gena za GSH-Px i GR. Dinamika genske ekspresije antioksidacionih enzima zavisi i od mnogih biotičkih i abiotičkih faktora, kao što su starost, ishrana i faktori životne sredine, a takođe je specijes i tkivno specifična. Na osnovu proučavanja uticaja intraperitonealne aplikacije mikrocistina i ingestije cijanobakterija na aktivnost antioksidacionih enzima u tkivima slatkovodne ribe *Oreochromis* sp. zabeleženo je povećanje aktivnosti GR jedino u jetri, dok u škragama nije došlo do promena aktivnosti ovog enzima. Aktivnost GSH-Px ostala je stabilna u navedenim tkivima bez obzira na eksperimentalne uslove (Prieto i sar., 2006; Prieto i sar., 2007).

Izražena tkivna specifičnost u aktivnosti enzima GSH-Px i GR detektovana je kod vrste *Corydoras paleatus* nakon izlaganja mikrocistinima koji su bili rastvoreni u vodi akvarijuma, pri čemu je u jetri detektovano povećanje, a u škragama smanjenje aktivnosti enzima (Cazenave i sar., 2006). Inhibicija antioksidacione i detoksifikacione sposobnosti u škragama *Corydoras paleatus* ukazala je da ovaj glavni organ direktne razmene sa spoljašnjom sredinom nema adekvatan kompenzatorni mehanizam za prisustvo mikrocistina, pa su autori zaključili da se ovaj cijanotoksin ne metaboliše u škragama. Efekat blokiranja antioksidacionog sistema u škragama posledica je stalne direktne izloženosti cijanotoksinima koji su rastvoreni u vodi, za razliku od drugih organa koji su izloženi samo onoj količini toksina koja je uneta u organizam i specifično distribuirana u različitim tkivima.

Enzim faze II biotransformacije GST je konjugacioni enzim koji igra ključnu ulogu u razgradnji toksičnih ksenobiotika. Pflugmacher i sar. (1998) su u *in vitro* eksperimentima na enzimskom ekstraktu iz različitih akvatičnih organizama (biljke *Ceratophyllum demersum*, školjke *Dreissena polymorpha*, raka *Daphnia magna* i ribe

*Danio rerio*) utvrdili da metabolizam mikrocistina počinje konjugacionom reakcijom sa GSH koju katalizuje enzim GST. Formiranje mikrocistin-GSH konjugata predstavlja prvi stepen detoksifikacije ovog cijanotoksina i kod biljaka i kod životinja. Konjugacija neutralizuje elektrofilni centar mikrocistina i povećava njegovu rastvorljivost, pri čemu se smanjuje toksičnost i olakšava ekskrecija ovog toksina.

Literaturno je potvrđeno da GST učestvuje i u metabolizmu drugih cijanotoksina. Tako, povećanje specifične aktivnosti GST u jetri slatkovodne ribe *Salmo salar* ukazuje na procese konjugacije saksitoksina u ovom tkivu (Gubbins i sar., 2000), a postoje podaci i o detoksifikaciji nodularina preko konjugacije sa GSH kod rakova, mekušaca i riba (Beattie i sar., 2003; Persson i sar., 2009).

Detoksifikacija toksina uz pomoć enzima GST je mehanizam koji omogućava različitim akvatičnim organizmima da prežive u uslovima toksičnog stresa koji izazivaju cijanobakterije. Kod riba je identifikovano šest klasa enzima GST (alfa, zeta, teta, mu, pi i ro), a nivo ekspresije izoformi GST razlikuje se kako između vrsta, tako i između tkiva iste vrste (Li i sar., 2008a; Šetlíková i Wiegand, 2009). Kako prisustvo metabolita cijanobakterija dovodi do promena aktivnosti enzima faze II biotrasformacije GST, ovaj parametar može da se koristi kao pouzdan biomarker kontaminacije akvatičnih organizama cijanotoksinima (Qiu i sar., 2007).

Brojne su studije u kojima cijanotoksini dovode do povećanja aktivnosti GST u jetri riba, što predstavlja glavni detoksifikacioni put odbrane. S obzirom na činjenicu da je GST multigeneska familija enzima koja katalizuje konjugaciju elektrofilnih jedinjenja, indukcija ovih enzima neophodna je kada postoji hemijski stres. Značajan rast aktivnosti GST zabeležen je u jetri *Hypophthalmichthys molitrix* nakon intraperitonealnog injeciranja mikrocistina (Li i sar., 2007b), kao i u jetri i bubregu iste vrste za vreme cvetanja u jezeru Taihu u Kini u odnosu na periode pre i posle cvetanja (Li i sar., 2007a). Povećanje aktivnosti GST detektovano je i u jetri riba koje pripadaju različitim trofičkim nivoima, a izlovljene su tokom perioda cvetanja u istom jezeru (Qiu i sar., 2007).

Aktivnost GST u jetri slatkovodne vrste *Geophagus brasiliensis* iz jezera Alagados u Brazilu bila je značajno veća u leto kada je zabeležena najveća brojnost cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii* u odnosu na proleće i jesen kada je brojnost ove vrste u jezeru bila manja (Clemente i sar., 2010). Kako je u navedenoj

studiji istovremeno došlo i do smanjenja aktivnosti CAT, autori su zaključili da indukcija aktivnosti GST predstavlja kompenzaciju redukcije aktivnosti drugih antioksidacionih enzima (Van der Oost i sar., 2003). Povećanje aktivnosti GST detektovano je i kod vrste *Cyprinus carpio* nakon tretiranja mikrocistinima pod laboratorijskim uslovima (Jiang i sar., 2012). Subhronično oralno izlaganje ćelijama cijanobakterija koje sadrže mikrocistine dovelo je do povećane aktivnosti GST, ali i do pozitivne regulacije transkripcije gena za ovaj enzim u jetri *Oreochromis niloticus* (Puerto i sar., 2011b).

Smanjenje aktivnosti GST detektovano je u jetri mladih jedinki *Carassius auratus* koje su intraperitonealno tretirane mikrocistinom (Malbrouck i sar., 2003), kao i kod vrste *Platichthys flesus* nakon intraperitonealne aplikacije cijanotoksina nodularina (Persson i sar., 2009). Pad aktivnosti GST zapažen je u jetri, crevu, mozgu i škragama kod vrste *Corydoras paleatus* nakon izlaganja rastvoru mikrocistina (Cazenave i sar., 2006). Redukcija aktivnosti GST povećava rizik od nastanka oštećenja koja produkuju cijanotoksini, a narušen mehanizam faze II biotransformacije dovodi i do povećane osetljivost organizma na prisustvo drugih ksenobiotika u vodi. Pad aktivnosti GST može da bude posledica redukovane sinteze GST proteina na molekularnom nivou ili kovalentnih modifikacija koje dovode do ireverzibilnog gubitka enzimske aktivnosti (Cazenave i sar., 2006; Persson i sar., 2009). Literaturno je potvrđeno da cijanotoksin nodularin uzrokuje inhibiciju protein fosfataza, što dovodi do fosforilacije subjednica GST, a samim tim i narušavanja aktivnosti ovog enzima (Beattie i sar., 2003).

Aktivnost GST u jetri, škragama i mišiću ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža merena je da bi se procenile promene u procesu biotransformacije u ovim tkivima tokom pojave cvetanja vode. Za vreme cvetanja, aktivnost GST u jetri bila je povećana jedino kod *B. bjoerkna*, dok kod ostalih ispitivanih vrsta nisu zabeležene promene aktivnosti ovog enzima između dva istraživana perioda. Moguće objašnjenje ovakvog trenda je činjenica da jetra ima veoma visok bazalni nivo kako aktivnosti enzima GST, tako i koncentracije GSH, što omogućava održavanje detoksifikacionih procesa na istom (*R. rutilus*, *C. gibelio* i *P. fluviatilis*) ili većem nivou (*B. bjoerkna*). Jetra je najvažnije mesto detoksifikacije egzogenih i endogenih elektrofilnih jedinjenja i važno je da poseduje adekvatnu aktivnost enzima GST i odgovarajuću količinu njegovog supstrata GSH.



Pojedini autori nisu konstatovali promene aktivnosti GST u hepatocitima riba nakon izlaganja cijanotoksinima u laboratorijskim uslovima (Li i sar., 2003b; Gélinas i sar., 2012). Literaturno je potvrđeno da nepromenjena aktivnost GST kod akvatičnih organizama može da indukuje intraćelijsku akumulaciju cijanotoksina i dovede do oksidacionog stresa (Leão i sar., 2008).

U škragama i mišiću svih ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža detektovan je statistički značajan pad aktivnosti GST tokom cvetanja. Zabeleženi rezultati ukazuju na smanjenu efikasnost ova dva tkiva da konjuguju metabolite cijanotoksina i druge reaktivne supstance, verovatno usled već nastalih oštećenja makromolekula, ali i zbog znatno nižeg bazalnog nivoa GST u odnosu na jetru.

Stepen uticaja cijanotoksina na različite organe zavisi od načina unošenja toksina u tkiva, kao i biotransformacione i bioakumulacione sposobnosti organa (Cazenave i sar., 2006). Različit odgovor aktivnosti i ekspresije enzima GST u jetri i bubregu vrste *Oreochromis niloticus* koja je hranjena ćelijama cijanobakterija, Puerto i sar. (2011b) objasnili su postojanjem tkivno specifične distribucije različitih izoformi ovog enzima. Šetlíková i Wiegand (2009) su ispitivali detoksifikacionu sposobnost u tkivima slatkovodnih riba *R. rutilus* i *Hypophthalmichthys molitrix* i utvrdili su da GST izoenzimi u jetri imaju tri puta veću sposobnost konjugacije mikrocistina u odnosu na škrge. Konstatovano je da se efikasnost detoksifikacije mikrocistina razlikuje i između vrsta, jer je sposobnost detoksifikacije u jetri i škragama kod *R. rutilus* bila veća u odnosu na *H. molitrix*. Pojedini istraživači zaključili su da je za otpornost *H. molitrix* na visoku koncentraciju cijanotoksina u vodi odgovoran visok bazalni nivo GSH, čime je obezbeđena dovoljna količina kofaktora za detoksifikaciju pomoću enzima GST (Li i sar., 2007a; Li i sar., 2008b).

Odgovor GST u tkivima organizama koji su izloženi cijanotoksinima u prirodnim uslovima zavisi od velikog broja faktora, kao što su hemijska struktura toksina i specifične fizičke i hemijske karakteristike vodene životne sredine, ali i od moguće interakcije više različitih toksina. Best i sar. (2002) su ispitivali uticaj mešavine hepatotoksina mikrocistina i endotoksina lipopolisaharida na aktivnost GST kod embriona slatkovodne ribe *Danio rerio* i utvrdili su da lipopolisaharidi značajno redukuju aktivnost ovog enzima, pri čemu smanjuju sposobnost ispitivanog objekta da detoksifikuje mikrocistine. Ovakav efekat lipopolisaharida može da modifikuje

toksičnost mikrocistina u prirodnim uslovima kada se javi cvetanje. Treba istaći da lipopolisaharide produkuju sve gram negativne bakterije, uključujući i cijanobakterije, tako da ova jedinjenja mogu da budu prisutna u visokoj koncentraciji u vodi tokom perioda cvetanja. Pozitivna regulacija transkripcije gena za GST detektovana je u jetri *Oreochromis niloticus* bez obzira na to da li su ribe hranjene ćelijama *Microcystis aeruginosa* koje sadrže mikrocistine ili sojevima koji nemaju sposobnost produkcije ovog toksina. Dobijeni rezultat ukazao je na zaključak da ova vrsta cijanobakterije osim mikrocistina sadrži i druga bioaktivna jedinjenja koja mogu da doprinesu toksičnim efektima (Puerto i sar., 2011b). Uticaj netoksogenih sojeva cijanobakterija na aktivnost biotransformacionih enzima zabeležen je i kod drugih akvatičnih organizama (Puerto i sar., 2011a).

Rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da tokom perioda cvetanja cijanobaktirija u akumulacionom jezeru Gruža dolazi do promena ispitivanih enzimskih parametara antioksidacione zaštite u tkivima istraživanih vrsta riba u vidu povećanja ili smanjenja njihove aktivnosti. Pavagadhi i sar. (2012) su pokazali da niske koncentracije cijanotoksina dovode do povećanja, a visoke koncentracije do smanjenja aktivnosti enzima zaštite od oksidacionih oštećenja.

Povećanje enzimske aktivnosti ukazuje na indukciju molekularnih mehanizama sinteze enzima (*de novo* sinteze) ili na aktivaciju postojećih enzima. Indukcija aktivnosti antioksidacionih enzima nakon izlaganja cijanotoksinima smatra se adaptivnim odgovorom i predstavlja kompezatorni mehanizam koji omogućava ribama da prevaziđu negativne uticaje cvetanja, odnosno da spreče oštećenja koja mogu da nastanu usled dejstva cijanotoksina.

Supresija enzimske aktivnosti može da se poveže sa sekundarnim efektima putem inhibicije enzima supstratom. Blokada enzimske aktivnosti delovanjem supstrata, posledica je kovalentne modifikacije enzima koja dovodi do ireverzibilnog gubitka njegove aktivnosti. Alternativno objašnjenje smanjenja aktivnosti enzima je redukcija sinteze proteina na molekularnom nivou. Poznato je da toksini cijanobakterija mogu da inhibiraju transkripciju specifičnih gena i dovedu do pada nivoa iRNK, što se odražava na manju aktivnost određenih antioksidacionih enzima (Da Silva i sar., 2011a).

Koncentracija ukupnog GSH u jetri ispitivanih vrsta *R. rutilus* i *B. bjoerkna* bila je veća, a kod *C. gibelio* manja tokom cvetanja u odnosu na period pre cvetanja. U jetri

vrste *P. fluviatilis* nisu konstatovane statistički značajne razlike u koncentraciji GSH između ispitivanih perioda. U škragama je koncentracija ovog antioksidanta bila statistički značajno povećana kod *R. rutilus* i *C. gibelio* tokom cvetanja, dok je trend smanjenja zapažen kod *P. fluviatilis*. Koncentracija ukupnog GSH u mišiću pokazala je statistički značajne promene jedino kod *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis* i to u vidu rasta tokom cvetanja.

Promene koncentracije GSH pod dejstvom cijanotoksina mogu da se razlikuju i kod iste vrste, kao što je slučaj sa srebrnim šaranom (*Hypophthalmichthys molitrix*). *In vivo* istraživanjem biomarkera oksidacionog stresa u jetri jedinki *H. molitrix* koje su 25 dana bile izložene cvetanju cijanobakterija iz roda *Microcystis* u prirodnim uslovima, detektovano je povećanje koncentracije GSH u odnosu na kontrolne jedinke, što je ukazalo na indukciju oksidacionog stresa pod dejstvom sekundarnih metabolita cijanobakterija (Bláha i sar., 2004). Međutim, *in vivo* studijom na srebrnom šaranu nakon višemesečne izloženosti cvetanju cijanobakterija, nije zabeležena značajna promena koncentracije GSH u jetri i bubrezima između tri ispitivana perioda, odnosno pre, tokom i nakon cvetanja cijanobakterija (Li i sar., 2007a).

Drugi autori su dobili varijabilne rezultate na različitim vrstama u zavisnosti od eksperimentalnih uslova. Atencio i sar. (2008) su utvrdili da oralno izlaganje cijanobakterijama iz roda *Microcystis* ne dovodi do promena koncentracije GSH u jetri slatkovodne ribe *Tinca tinca*, što je posledica visokog bazalnog nivoa i/ili povećane sinteze GSH. Li i sar. (2003b) su u *in vitro* eksperimentu na hepatocitima *Cyprinus carpio* detektovali pad koncentracije GSH nakon izlaganja mikrocistinima. Ding i sar. (2000) su zapazili dvofaznu promenu koncentracije GSH u hepatocitima, sa značajnim povećanjem u inicijalnoj fazi, što je praćeno padom nakon dužeg tretmana ekstraktom cijanobakterija. Rezultati ovih eksperimenata ukazali su na ulogu GSH u inicijalnim procesima konjugacije uz pretpostavku da je aktivacija enzima  $\gamma$ -GCS i GS odgovorna za početni rast unutarćelijskog sadržaja GSH.

Gutiérrez-Praena i sar. (2011a) su zapazili redukciju koncentracije GSH i aktivnosti  $\gamma$ -GCS u jetri i bubregu *Oreochromis niloticus* nakon izlaganja cijanotoksinu cilindrospermopsinu. Ovi autori su pretpostavili da inhibicija sinteze GSH predstavlja glavni mehanizam redukcije njegove koncentracije, što isključuje mehanizme kao što su povećana potrošnja i formiranje GSSG, izražen efluks GSH iz ćelije, nedostatak

prekursora za sintezu i smanjen nivo ATP-a. Gutiérrez-Praena i sar. (2011b) su utvrdili da niske koncentracije cilindropermopsina dovode do povećanja koncentracije redukovanog GSH i aktivnosti  $\gamma$ -GCS u ćelijama jetre riba, dok je pad koncentracije redukovanog GSH koji je posledica smanjena aktivnosti  $\gamma$ -GCS konstatovan u eksperimentima na kulturi ćelija nakon inkubacije sa visokom dozom cilindropermopsina.

Literaturno je potvrđeno da ksenobiotici mogu da indukuju sintezu GSH u jetri riba. Međutim, različiti podaci ukazuju da koncentracija GSH u drugim organima zavisi od njegove koncentracije u plazmi, čiji je glavni izvor jetra. Ukoliko postoji pad koncentracije GSH u jetri, manja količina ovog antioksidanta se eksportuje u plazmu i u manjoj meri je dostupan ekstrahepatičnim tkivima, kao što su škrge i mišić. Obnavljanje GSH pula u ekstrahepatičnim tkivima sporije je u odnosu na jetru, tako da njegova koncentracija u mišiću i škragama može da predstavlja bolji biohemijski marker izloženosti ksenobioticima u odnosu na glavni detoksifikacioni organ (Li i sar., 2010). Tkivna specifičnost u odgovoru na oralnu aplikaciju ekstrakta cijanobakterija koje proizvode mikrocistine detektovana je i kod *Cyprinus carpio*. Međutim, u ovom slučaju zabeleženo je smanjenje aktivnosti GST i koncentracije GSH u jetri tretiranih riba, dok je vrednost ovih parametara ostala nepromenjena u škragama, mišiću i mozgu (Amado i sar., 2011).

Pored niskomolekulskog tiola GSH, veliki broj proteina sadrži funkcionalnu SH grupu, koja može da bude modifikovana kroz različite redoks reakcije, tako da njihova reverzibilna modifikacija može da dovede do promena u funkciji proteina, što uključuje i aktivnost enzima. Sve strukture u ćeliji koje sadrže SH grupe imaju važnu ulogu u antioksidacionoj zaštiti i održavanju redoks homeostaze (Janssen-Heininger i sar., 2008). Koncentracija slobodnih SH grupa u jetri *B. bjoerkna* i *C. gibelio*, kao i u škragama *R. rutilus* i *C. gibelio* bila je povećana tokom cvetanja u odnosu na period pre cvetanja, dok je suprotan trend konstatovan u jetri i mišiću *P. fluviatilis*. Rast koncentracije SH grupa predstavlja adaptivni odgovor na prisustvo cijanotoksina u vodi, dok pad koji je zabeležen kod vrste *P. fluviatilis* ukazuje na smanjenu zaštitu od ROS i narušenu regulaciju redoks zavisnih procesa.

Iako su akvatični organizmi koji nastanjuju eutrofne slatkovodne ekosisteme često izloženi cvetanju cijanobakterija, negativni uticaji ove pojave uglavnom imaju

subletalno dejstvo. Zbog toga vodeni organizmi mogu duži period da akumuliraju cijanotoksine, što omogućava njihov transfer u druge žive sisteme preko lanaca ishrane (Qiu i sar., 2007). Cijanotoksini su detektovani u jetri, crevu, škragama, bubregu, mišiću, krvi i mozgu riba (Chen i sar., 2006; Bakke i Horsberg, 2010; Clemente i sar., 2010; Da Silva i sar., 2011a; Jiang i sar., 2012). Postoji mogućnost da se cijanotoksini konstatuju u tkivima riba čak i kada nije prisutno cvetanje cijanobakterija za vreme sakupljanja uzoraka (Castonguay i sar., 1997).

Literaturno je potvrđeno da je stepen akumulacije cijanotoksina tkivno specifičan i da zavisi od karakteristika metabolizma određenog tkiva i njegove detoksifikacione sposobnosti. Chen i sar. (2006) su proučavali nivo bioakumulacije mikrocistina u tkivima fitoplanktivornog srebrnog šarana koji je bio izložen cvetanju u jezeru Taihu u Kini i utvrdili su da se tokom godine najveća koncentracija mikrocistina akumulira u crevima, a zatim u jetri. Manja količina ovog toksina detektovana je u mišiću, a najmanja u škragama. Najveći sadržaj mikrocistina u ispitivanim tkivima zabeležen je tokom perioda cvetanja, dok je pre i nakon tog perioda nivo toksina u tkivima bio značajno manji, što je ukazalo na procese biotransformacije i ekskrecije. Sličan trend na godišnjem nivou zapažen je i kod slatkovodne ribe *Aristichthys nobilis* iz jezera Taihu u Kini (Chen i sar., 2007).

Koncentracija saksitoksina u mišiću slatkovodne ribe *Geophagus brasiliensis* iz jezera Alagados u Brazilu bila je na istom nivou u sve tri ispitivane sezone tokom godine, kako u leto kada je zabeležena najveća brojnost cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii* i koncentracija cijanotoksina u vodi, tako i u proleće i jesen kada su ove vrednosti bile niže. Verovatan uzrok odsustva razlike u koncentraciji saksitoksina u mišiću između različitih perioda objašnjen je ireverzibilnim vezivanjem ovog cijanotoksina za ispitivano tkivo mišića, tako da u periodima smanjene brojnosti cijanobakterija u vodi nije došlo do redukcije njegove koncentracije u ovom tkivu (Clemente i sar., 2010). Međutim, kada su Bakke i Horsberg (2010) ispitivali proces akumulacije saksitoksina u tkivima bakalara *Gadus morhua*, otkrili su da je njegova akumulacija u mišiću na veoma niskom nivou. Najveća koncentracija saksitoksina detektovana je u glavnom ekskretornom organu - bubrezima, a zatim u jetri, krvi i na kraju škragama.

Razlike u dobijenim rezultatima navedenih studija mogu se objasniti činjenicom da se nivo akumulacije cijanotoksina takođe razlikuje između različitih vrsta, što može da zavisi i od tipa ishrane organizama. Tako su Xie i sar. (2005) u terenskoj studiji zapazili da najveću koncentraciju mikrocistina u jetri i mišiću akumuliraju karnivorne ribe, zatim omnivorne, dok je koncentracija mikrocistina u ovim tkivima bila najniža kod fitoplanktivornih vrsta. Dobijeni podaci slažu se sa istraživanjima Qiu i sar. (2007) koji su konstatovali najveća oštećenja jetre kod karnivornih vrsta, što je bila posledica visoke akumulacije cijanotoksina. Rezultati navedenih studija ukazuju na to da različiti akvatični organizmi imaju različit metabolički put razgradnje, kao i obrazac akumulacije cijanotoksina (Zhang i sar., 2009).

Kako su toksini cijanobakterija detektovani i u tkivima drugih grupa organizama koji su svojim životnim ciklusom vezani za vodenu životnu sredinu (školjke, puževi, rakovi i žabe), pored direktnog aktivnog ili pasivnog unošenja toksina, lanci ishrane predstavljaju dodatan indirektan put intoksifikacije različitih akvatičnih organizama cijanotoksinima (Chen i sar., 2005; Gkelis i sar., 2006; Dewes i sar., 2006; Kankaanpää i sar., 2007; White i sar., 2007; Berry i Lind, 2010; Sabatini i sar., 2011).

Prema istraživanjima Kinnear i sar. (2009) akvatični organizmi na nižem nivou organizacije akumuliraju veću koncentraciju cilindrospermopsina u odnosu na biološki kompleksnije životinje. Najveći kapacitet bioakumulacije detektovan je kod puževa, zatim školjki, rakova, vodozemaca i na kraju riba. Dobijeni podaci pružaju informacije o stepenu osetljivosti različitih organizama na toksičnost cijanotoksina, pri čemu je konstatovano da su ribe najugroženija grupa organizama. Ispitivanje uticaja cijanotoksina na ribe je posebno značajno, jer se ovi organizmi nalaze na vrhu akvatičnih lanaca ishrane, tako da visok stepen akumulacije cijanotoksina u njihovim tkivima može da ugrozi i čoveka koji ih koristi u ishrani (De Magalhães i sar., 2001; Mohamed i sar., 2003; Pichardo i sar., 2005; Deblois i sar., 2008; Nyakairu i sar., 2010).

Osim brojnih eksperimenata koji obuhvataju uticaj cijanotoksina na aktivnost i koncentraciju komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja u različitim tkivima riba, istraživanja su ukazala da toksini cijanobakterija mogu da povećaju intracelularnu produkciju ROS i indukuju oksidacioni stres i kod drugih kako akvatičnih, tako i terestričnih organizama.

Istraživanja na poliheti *Laonereis acuta* pokazala su da izlaganje liofilizovanim ćelijama toksogenih i netoksogenih cijanobakterija dovodi do smanjenja aktivnosti CAT, ali da nema uticaj na aktivnost GR i GST. Međutim, kod grupe koja je tretirana toksogenim cijanobakterijama konstatovan je povećan nivo lipidnih peroksida i DNK-protein interakcija, što je ukazalo na indukciju oksidacionog stresa usled negativnog dejstva cijanotoksina (Leão i sar., 2008). U prirodnim uslovima, jedinke iste vrste pokazale su povećanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije GST i nivoa lipidne peroksidacije tokom cvetanja cijanobakterija iz roda *Anabaena* u laguni Patos. Iako je u ovoj studiji konstatovana niska koncentracija cijanotoksina u vodi, pretpostavljeno je da je cvetanje cijanobakterija dovelo do ubrzanja ciklusa hiperoksigenacije i hipoksije vodenog ekosistema tokom dana i noći i na taj način prouzrokovalo prekomerno formiranje ROS, dok je indukcija aktivnosti GST posledica povećane stope konjugacionih reakcija sa produktima oksidacionih oštećenja DNK i membranskih lipida (Da Rosa i sar., 2005).

Školjke predstavljaju važne vektore u procesu transfera cijanotoksina putem lanaca ishrane i mogu da akumuliraju visoke koncentracije ovih toksina u svojim tkivima bez uočljivih štetnih efekata. Velika brzina akumulacije i spor proces detoksifikacije cijanotoksina čini ih pogodnim organizmima u biomonitoring studijama akvatičnih ekosistema. Školjke se hrane filtriranjem i tokom cvetanja mogu da koriste cijanobakterije kao glavni izvor hrane. Rezultati koji su dobijeni u laboratorijskim eksperimentima pokazali su da su školjke veoma otporne na različite cijanotoksine zbog velikog stepena aktivnosti proteina multiksenobiotske rezistencije (Contardo-Jara i sar., 2008).

Uticaj cilindrospermopsina na aktivnost GSH-Px i GST u digestivnoj žlezdi i škragama slatkovodnih i morskih školjki detektovali su Puerto i sar. (2011a), a odgovor ispitivanih parametara pokazao je tkivne i interspejske razlike. Kankaanpää i sar. (2007) su konstatovali povećanu aktivnost CAT u digestivnoj žlezdi *Mytilus edulis* nakon izlaganja ekstraktu cijanobakterija koje proizvode nodularin. Aktivnost GST je ostala nepromenjena, što je ukazalo da ovaj enzim nije značajno uključen u procese detoksifikacije nodularina kod ove vrste školjki. Izlaganje *Mytilus galloprovincialis* ekstraktu cijanobakterije *Microcystis aeruginosa*, kao i rastvoru mikrocistina, rezultovalo je odgovorom ovog detoksifikacionog puta u vidu povećanja aktivnosti GST

u crevu i škrgama (Vasconcelos i sar., 2007). Uticaj na ekspresiju gena za enzime CAT i GST konstatovan je kod vrste *Dreissena polymorpha* nakon tretiranja mikrocistinima (Contardo-Jara i sar., 2008), kao i veći stepen odgovora ovih enzima u odnosu na vrstu *Unio tumidus* (Burmester i sar., 2012). U digestivnoj žlezdi *Diplodon chilensis patagonicus* mikrocistini su izazvali značajno povećanje aktivnosti SOD, CAT i GST, kao i rast koncentracije redukovanog GSH (Sabatini i sar., 2011).

Toksični efekti cijanotoksina i posledične promene vrednosti biohemijskih i fizioloških parametara zabeleženi su i kod rakova. Povećana aktivnost CAT i GST detektovana je u hepatopankreasu *Litopenaeus vannamei* nakon intraperitonealne aplikacije ekstrakta *Microcystis aeruginosa* (Gonçalves-Soares i sar., 2012), kao i kod krabe *Chasmagnathus granulatus* koja je tretirana mikrocistinima (Pinho i sar., 2003). Indukcija aktivnosti GST konstatovana je i u različitim tkivima (hepatopankreas, škrge, mišić) raka *Penaeus monodon* nakon intramuskulatorne aplikacije mikrocistina (Pflugmacher i sar., 2005). Nasuprot rezultatima u navedenim studijama, visoka doza primenjenog cijanotoksina i dugotrajna izloženost mogu da dovedu do smanjenja aktivnosti enzima GST, kao i koncentracije GSH, što je detektovano kod vrste *Daphnia magna* (Chen i sar., 2005).

S obzirom na zabeležene slučajeve masovnog umiranja domaćih i divljih životinja zbog toksičnih efekata cijanotoksina u prirodnim uslovima (Negri i sar., 1995; Alonso-Andicoberry i sar., 2002), proučavanje sistema zaštite od oksidacionih oštećenja kod terestričnih organizama takođe zauzima poseban značaj u biomonitoring studijama koje obuhvataju uticaj cvetanja cijanobakterija. Kada je u pitanju subletalno dejstvo cijanotoksina, rezultati Paškova i sar. (2008) pokazali su da mikrocistini dovode do povećanja aktivnosti enzima GSH-Px, GR i GST, kao i koncentracije GSH u jetri, srcu i mozgu japanske prepelice *Coturnix coturnix japonica*, ukazujući na pojavu oksidacionog stresa u ispitivanim organima.

Istraživanja na sisarskim modelima koji su tretirani različitim tipovima cijanotoksina pokazala su da ovi toksini u većini slučajeva dovode do pada aktivnosti parametara antioksidacione zaštite. Uticaj intraperitonealne aplikacije mikrocistina na smanjenje aktivnosti enzima SOD, CAT, GSH-Px i GR zapažen je u jetri i bubregu pacova (Moreno i sar., 2005) i miševa (Sedan i sar., 2010). Pretpostavljeno je da je pad aktivnosti ispitivanih parametara antioksidacione zaštite posledica smanjene *de novo*



sinteze i/ili oksidacione inaktivacije proteina. Za razliku od enzima faze II biotransformacije GST, čija je promena aktivnosti zavisila od koncentracije primenjenog toksina, statistički značajan pad koncentracije GSH detektovan je u jetri miševa koji su tretirani cilindrospermopsinom (Norris i sar., 2002), mikrocistinom (Jayaraj i sar., 2006), kao i ekstraktom liofilizovanih ćelija *A. flos-aquae* iz jezera Dianhi u Kini (Liu i sar., 2006). Smanjenje aktivnosti enzima SOD, CAT i GR usled dejstva mikrocistina zapaženo je i u jetri zečeva (Zhao i sar., 2009).

Kada se navedeni rezultati istraživanja uticaja cijanotoksina na parametre antioksidacione zaštite kod sisara uporede sa podacima koji su dobijeni u eksperimentima na ribama, može se zaključiti da su sisarski organizmi znatno osetljiviji. Potvrda dobijenih rezultata nalazi se u činjenici da je vrednost poluletalne doze primenjenog cijanotoksina veća kod riba u odnosu na sisare, kao i da je proces detoksifikacije ovih toksina iz tkiva riba znatno brži u poređenju sa sisarima (Zurawell i sar., 2005; Pichardo i sar., 2007). Pošto cijanobakterije predstavljaju sastavni deo ishrane mnogih slatkovodnih riba, zbog toga su ovi organizmi bolje adaptirani na prisustvo cijanotoksina u odnosu na sisare.

Ispitivanje efekata cijanotoksina na životinjskim sistemima ima veliki značaj, jer omogućava ekstrapolaciju dobijenih rezultata na čoveka. Poznato je da cvetanje cijanobakterija u slatkovodnim ekosistemima može da ugrozi zdravlje ljudi zbog upotrebe vode za piće koja nije dovoljno hemijski tretirana ili usled korišćenja u ishrani onih organizama u čijim tkivima su akumulirani cijanotoksini (Kinneer i sar., 2010). Alergijske reakcije, gastroenteritis i bolesti jetre predstavljaju najčešće simptome povezane sa dejstvom različitih cijanotoksina, dok je potencijalno kancerogeni uticaj mikrocistina takođe ispitan u brojnim naučnim studijama (Hitzfeld i sar., 2000; Žegura i sar., 2011b). Istraživanja Gutiérrez-Praena i sar. (2012b) su pokazala da cilindrospermopsin dovodi do povećane produkcije ROS i rasta koncentracije GSH u ćelijskoj liniji humanog karcinoma debelog creva, pri čemu uzrokuje morfološka oštećenja ćelija. Žegura i sar. (2011a) utvrdili su da ovaj toksin deluje genotoksično na ljudske limfocite, jer indukuje jednolančane prekide DNK, ali takođe utiče i na ekspresiju gena za enzime SOD i GSH-Px.

Pored uticaja na životinje i ljude, cijanotoksini ispoljavaju toksikološke efekte i na biljnim organizmima. Ukoliko se navodnjavanje biljaka vrši vodom iz eutrofnih

ekosistema u kojima se javlja cvetanje, postoji mogućnost uticaja cijanotoksina na rast, morfogenezu, oksidacioni status i produkciju biljnih kultura (Prieto i sar., 2011; Chen i sar., 2012). Proces akumulacije cijanotoksina u biljkama dodatno povećava stepen transfera ovih toksina u druge organizme preko lanaca ishrane, što dodatno ugrožava i čoveka.

Proučavanje uticaja cijanotoksina na različitim živim sistemima neophodno je zbog procene osetljivosti organizama koji pripadaju različitim nivoima organizacije. Na taj način omogućava se razumevanje načina na koji se narušava ravnoteža akvatičnih ekosistema u kojima se javlja cvetanje, ali i potencijalni uticaj na terestrične organizme koji dolaze u kontakt sa ovim ekosistemima i koji su direktno ili indirektno izloženi dejstvu cijanotoksina.

Na osnovu do sada predstavljenih rezultata ove doktorske disertacije utvrđeno je da cvetanje cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža dovodi do oksidacionog stresa u jetri, škragama i mišiću *R. rutilus*, *B. bjoerkna*, *C. gibelio* i *P. fluviatilis*. Detektovane promene vrednosti parametara antioksidacione zaštite pokazuju specifičnost odgovora koji zavisi od ispitivane vrste i tkiva. Utvrđeno je da se stepen toksičnosti cijanotoksina razlikuje kod različitih vrsta riba i da različita tkiva reaguju na različite načine i različitim intenzitetom na prisustvo toksina. Na osnovu kanonijske diskriminacione analize parametara antioksidacione zaštite (aktivnosti Uk SOD, CAT, GSH-Px, GR, GST i koncentracije GSH i SH grupa) u jetri, škragama i mišiću ispitivanih vrsta riba iz akumulacionog jezera Gruža, omogućeno je detektovanje onih antioksidacionih parametara koji imaju najznačajniji uticaj u objašnjavanju varijabilnosti između vrsta, odnosno tkiva.

Rezultati kanonijske diskriminacione analize koji uključuju grupisanje parametara po vrstama, urađeni su za svako tkivo pojedinačno u oba ispitivana perioda. Kada je u pitanju jetra, pre cvetanja je najizraženije bilo izdvajanje vrsta *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis*, pri čemu je utvrđeno da detektovanoj varijabilnosti najviše doprinose aktivnosti enzima CAT, GSH-Px i GR. Konstatovano je da je aktivnost CAT u jetri vrste *P. fluviatilis* bila veća, a aktivnost GSH-Px manja u odnosu na ostale ispitivane vrste. Ovakav trend funkcionisanja enzima koji uklanjaju perokside ukazuje na stanje oksidacionog stresa u jetri *P. fluviatilis*, jer je CAT dominantniji enzim u odnosu na GSH-Px u uslovima visokih koncentracija  $H_2O_2$  (Kruidenier i Verspaget, 2002). Glavni

faktori koji doprinose razlikama između vrsta tokom cvetanja su pored aktivnosti enzima GSH-Px i koncentracija GSH i SH grupa. Zabeležen niži stepen aktivnosti enzima GSH-Px u jetri *P. fluviatilis* tokom oba ispitivana perioda ili je posledica niskog bazalnog nivoa aktivnosti ovog enzima koji je karakterističan za vrstu ili ukazuje na smanjenu efikasnost u procesu zaštite ćelijskih membrana od procesa lipidne peroksidacije. Pošto je *P. fluviatilis* karnivorna, a ostale tri ispitivane vrste riba omnivorne, dobijeni rezultati se podudaraju sa istraživanjima Radi i sar. (1987) koji su pokazali da je aktivnost CAT veća, a GSH-Px manja kod karnivornih vrsta riba u odnosu na herbivorne i omnivorne.

Distribucija parametara antioksidacione zaštite u škragama ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža pokazuje izraženu specifičnost vrsta sa jasnom diskriminacijom u oba ispitivana perioda. Detektovanim razlikama između vrsta najviše doprinose aktivnost GR i koncentracija GSH pre cvetanja, a aktivnost Uk SOD i GSH-Px tokom cvetanja. Aktivnost enzima GR i koncentracija GSH u škragama ispitivanih vrsta riba pokazuju isti trend pre cvetanja, odnosno zapaženo je da veću vrednost aktivnosti GR prati i veća koncentracija GSH kod svake ispitivane vrste, što je posledica funkcionalne korelisanosti ova dva parametra. Velike razlike između vrsta u vrednostima aktivnosti enzima Uk SOD i GSH-Px u škragama, ukazuju na različit stepen uklanjanja  $O_2^-$  i organskih peroksida u ovom tkivu tokom perioda cvetanja.

Prema vrednostima antioksidacionih parametara koji su izmereni u mišiću ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža, konstatovan je sličan trend diskriminacije vrsta u oba ispitivana perioda. Rezultati kanonijske diskriminacione analize pokazali su da se *C. gibelio* najviše izdvaja po svojoj specifičnosti u odnosu na ostale vrste. Tome u najvećoj meri doprinose aktivnosti enzima GR i GST u mišiću *C. gibelio* koje su bile veće u odnosu na vrednosti koje su zabeležene kod *R. rutilus*, *B. bjoerkna* i *P. fluviatilis*. Visok bazalni nivo aktivnosti enzima GR i GST u mišiću *C. gibelio* verovatno je posledica specifičnosti ove alohtone vrste i predstavlja adaptaciju na eutrofno stanje ispitivanog ekosistema. Aktivnost enzima GST u mišiću ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža bila najniža kod vrste *P. fluviatilis* i to u oba istraživana perioda.

Podaci dobijeni kanonijskom diskriminacionom analizom pokazuju da su komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja u svakoj vrsti drugačije organizovane, pa čak i u okviru iste familije. Slični rezultati dobijeni su i u

istraživanjima na školjkama i rakovima u kojima je ispitivan nivo interspecijskih razlika (Kovačević i sar., 2006; Perendija i sar., 2007a; Perendija i sar., 2007b; Kovačević i sar., 2008).

Rezultati kanonijske diskriminacione analize koji objašnjavaju razlike u vrednostima parametara antioksidacione zaštite između tkiva ukazuju na izrazitu tkivnu specifičnost i najizraženije izdvajanje jetre u odnosu na škrge i mišić kod svih ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža. Parametri koji najviše doprinose opisanom trendu tkivne specifičnosti su aktivnost Uk SOD, GSH-Px i koncentracija GSH kod *R. rutilus*, aktivnost GSH-Px i koncentracija GSH kod *B. bjoerkna*, zatim aktivnost Uk SOD i CAT kod *C. gibelio*, kao i aktivnost Uk SOD i GR kod *P. fluviatilis*.

Posmatrajući tkivnu distribuciju ispitivanih parametara antioksidacione zaštite, konstatuje se da su vrednosti koje su izmerene u jetri bile znatno veće u odnosu na ostala ispitivana tkiva, jer je jetra glavni centar različitih fizioloških procesa, uključujući i detoksifikaciju ksenobiotika (Moreno i sar., 2005; Qiu i sar., 2007). Škrge su primarna meta toksičnih jedinjenja koja su prisutna u životnoj sredini, a osetljivost ovog organa posledica je ne samo njegove velike površine koja olakšava interakciju toksikanata, već i slabije razvijenog antioksidacionog i detoksifikacionog sistema u odnosu na jetru. Abdominalni mišić koji je analiziran u ovoj studiji ima nizak sadržaj mitohondrija, kao i intenzitet oksidacionog metabolizma (Li i sar., 2010).

Amado i sar. (2011) su konstatovali najveću aktivnost GST, kao i koncentraciju GSH u jetri *Cyprinus carpio*, dok je vrednost ovih parametara bila znatno manja u škragama, a najmanja u mišiću. Despotović i sar. (2007) su, takođe, detektovali statistički značajno veću koncentraciju GSH u jetri u odnosu na mišić kod mrene *Barbus barbus* iz reke Dunav. Tkivna specifičnost parametara antioksidacione zaštite konstatovana je i kod drugih akvatičnih organizama, kao što su rakovi i školjke. Borković i sar. (2008) ispitivali su aktivnost antioksidacionih enzima SOD, CAT, GSH-Px, GR i enzima faze II biotransformacije GST u hepatopankreasu, škragama i mišiću američkog raka *Orconectes limosus*. Kanonijskom diskriminacionom analizom autori su utvrdili različitu tkivnu distribuciju ispitivanih enzima i zaključili su da su dobijeni rezultati posledica različitih metaboličkih aktivnosti tkiva, kao i specifičnosti odgovora na uslove životne sredine. Eksperimenti na slikarskoj školjki *Unio tumidus* pokazali su da je

aktivnost SOD i CAT statistički značajno veća u digestivnoj žlezdi u odnosu na škrge (Borković-Mitić i sar., 2011).

Određivanje razlika u antioksidacionom statusu između tkiva kod akvatičnih organizama neophodno je u biomonitoring studijama vodenih ekosistema, jer su ove razlike odgovorne za međuorgansku varijabilnost simptoma toksičnosti. Tkivna specifičnost odgovora parametara antioksidacione zaštite na prisustvo cijanotoksina direktna je posledica razlika u bazalnim vrednostima i organizaciji ovih parametara u različitim tkivima, kao i specifičnosti metaboličkih procesa ispitivanih tkiva (Amado i sar., 2011).

Iako svi istraživani parametri antioksidacione zaštite obavljaju svoju specifičnu ulogu u ćeliji, njihovo sinergističko delovanje u procesu uklanjanja ROS povezuje ih u funkcionalno jedinstvenu celinu. Da bi se utvrdila priroda povezanosti pojedinačnih komponenti ovog integrisanog sistema, urađena je klaster analiza ispitivanih parametara antioksidacione zaštite (aktivnosti Uk SOD, CAT, GSH-Px, GR, GST i koncentracije GSH i SH grupa) za svaku vrstu pojedinačno.

Kod vrsta *R. rutilus* i *B. bjoerkna* dobijena su dva glavna klastera, jedan koji čine koncentracija SH grupa, koncentracija GSH i aktivnost enzima faze II biotransformacije GST i drugi u kom su grupisane vrednosti koje su izmerene za aktivnost enzima GSH-Px, CAT, GR i Uk SOD. Međutim, kod *C. gibelio* i *P. fluviatilis* klaster analiza je ukazala na izdvajanje koncentracije SH grupa u potpuno nezavisan klaster u odnosu na sve ostale ispitivane parametre koji su grupisani u dve podgrupe, prvu kojoj pripadaju koncentracija GSH i aktivnost enzima faze II biotransformacije GST i drugu koju čine aktivnosti GSH-Px, CAT, GR i Uk SOD.

Povezanost aktivnosti antioksidacionih enzima GSH-Px, CAT, GR i Uk SOD pokazala je razlike na nivou familija. Kod ciprinidnih vrsta *R. rutilus*, *B. bjoerkna* i *C. gibelio* aktivnost enzima GR i Uk SOD čine jednu grupu, kojoj se pridružuje aktivnost CAT, a zatim i GSH-Px, dok su kod vrste *P. fluviatilis* aktivnosti enzima GR, GSH-Px i Uk SOD povezane u isti klaster, a aktivnost enzima CAT se najviše izdvaja.

Dobijeni rezultati klaster analize pružaju prikaz organizacije komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja kod svih ispitivanih vrsta riba iz jezera Gruža i doprinose razumevanju načina na koji su ove komponente povezane. Funkcionalna povezanost enzima faze II biotransformacije GST i neenzimskog antioksidanta GSH

koja je uočena kod svih ispitivanih vrsta riba predstavlja važan faktor u procesu detoksifikacije cijanotoksina.

Korelacija antioksidacionih enzima predstavlja bitan zaštitni mehanizam od oksidacionog stresa koji je uzrokovan cijanotoksinima. Qiu i sar. (2007) su zabeležili pozitivnu korelaciju aktivnosti GSH-Px i GST, SOD i GST, CAT i GST u jetri vrsta *Hypophthalmichthys molitrix* i *Aristichthys nobilis*, kao i SOD i CAT kod *Carassius auratus*, dok u jetri *Culter ilishaeformis* nije konstatovana korelacija između ispitivanih enzima. Vrste sa boljom korelacijom aktivnosti antioksidacionih enzima u jetri imale su efikasniju eliminaciju ROS i zaštitu hepatocita od lezija tokom pojave cvetanja cijanobakterija.

Istraživanja su pokazala da u tkivima različitih vodenih organizama ponovo dolazi do uspostavljanja prooksidaciono/antioksidacione ravnoteže nakon prestanka dejstva cijanotoksina. Persson i sar. (2009) su konstatovali da se aktivnost CAT i GST u jetri *Platichthys flesus* vraća na kontrolni nivo deset dana nakon intraperitonealne aplikacije cijanotoksina nodularina, dok su Prieto i sar. (2007) utvrdili da procesi oporavka od oksidacionog stresa u jetri *Oreochromis niloticus* počinju 72 h nakon akutnog izlaganja ćelijama cijanobakterija koje sadrže mikrocistine. Sličan vremenski obrazac vraćanja aktivnosti enzima antioksidacione zaštite na kontrolni nivo nakon prestanka dejstva cijanotoksina utvrđen je i kod školjki (Contardo-Jara i sar., 2008).

Proučavanjem biohemijskog odgovora u jetri riba koje nastanjuju vode koje karakteriše redovna periodična pojava cvetanja, zabeležena je kompleksna fluktuacija aktivnosti enzima antioksidacione zaštite tokom godine i to u zavisnosti od istraživanog parametra i ispitivane vrste (Qiu i sar., 2007). Brojne naučne studije su pokazale da je toksogeni potencijal ekstrakta cvetanja znatno veći od pojedinačno izolovanih toksina (Žegura i sar., 2011b), tako da ispitivanje biohemijskih i histoloških bioindikatora u tkivima vodenih organizama koji su izlovljeni iz svojih prirodnih staništa predstavlja neophodan pristup u proučavanju uticaja cvetanja cijanobakterija.

Smanjenje antioksidacione zaštite tokom cvetanja može da utiče na promenu morfologije i funkcije tkiva i tako naruši homeostazu organizma, a samim tim i da poveća osetljivost na druge stresore koji su prisutni u vodenim ekosistemima. Poznato je da promene u vrednostima ispitivanih biomarkera antioksidacione zaštite u tkivima akvatičnih organizama mogu da nastanu usled dejstva različitih faktora, kao što su

dostupnost hrane, reproduktivni ciklus, uticaj sezone ili promene u metabolizmu ćelije (Pavlović i sar., 2008; Pavlović i sar., 2010; Radovanović i sar., 2010). Bitnu ulogu igra i uticaj drugih ksenobiotika u vodi kao i sezonske razlike u njihovoj koncentraciji (Ognjanović i sar., 2008; Borković-Mitić i sar., 2010).

Pored određivanja stepena bioakumulacije i detoksifikacije cijanotoksina u tkivima različitih organizama, kao i utvrđivanja promena aktivnosti i koncentracije parametara antioksidacione zaštite, histopatološke analize pružaju direktan prikaz uticaja cijanotoksina na funkcionisanje organizama u vidu promena strukture ćelija i tkiva. Ćelijski biomarkeri koji uključuju histopatološke i ultrastrukturne promene predstavljaju odgovor na intermedijarnom nivou biološke organizacije, odnosno nalaze se između nižeg nivoa koji uključuje promene biohemijskih parametara i višeg nivoa koji se odnosi na promene na individualnom ili populacionom nivou. Ovaj tip odgovora osetljiviji je od reproduktivnih i parametara rasta i kao integrativni parametar može da omogući bolju procenu stanja organizma u odnosu na pojedinačan biohemijski odgovor (Grund i sar., 2010). Histološki parametri su osetljivi indikatori oštećenja ćelija i omogućavaju brzu procenu uticaja toksikanata na strukturu i funkciju različitih tkiva i organa (Bernet i sar., 1999). Poznato je da ultrastrukturne alteracije omogućavaju detektovanje ciljnih unutarćelijskih struktura na koje deluju cijanotoksini (Gutiérrez-Praena i sar., 2012b).

Toksični efekti cijanotoksina verifikovani su velikim brojem histopatoloških studija na ribama, u kojima je konstatovano da mogu da dovedu do niza morfoloških promena različitih tkiva kod ovih akvatičnih organizama. Iako je analizama na nivou svetlosne i elektronske mikroskopije utvrđeno da cijanotoksini mogu da indukuju oštećenja srca, bubrega, škrge, mišića, mozga i gastrointestinalnog trakta riba, najizraženije promene pod dejstvom cijanotoksina detektovane su u strukturi jetre (Fischer i Dietrich, 2000; Ernst i sar., 2007; Atencio i sar., 2008; Gutiérrez-Praena i sar., 2012a).

Rezultati analize na nivou svetlosne mikroskopije su pokazali da nema uočljivih razlika u strukturi jetre kod svih ispitivanih vrsta riba između perioda pre i tokom cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža. Međutim, bez obzira na proučavani period, konstatovano je da jetra svih vrsta pokazuje jasne znakove steatoze, koja je nešto manje izražena kod vrste *P. fluviatilis* u odnosu na *R. rutilus*, *B. bjoerkna* i

*C. gibelio*. Na nivou elektronske mikroskopije potvrđena je steatoza jetre kod svih ispitivanih vrsta riba u oba istraživana perioda. U hepatocitima ciprinidnih vrsta uočena je velika količina lipidnog sadržaja koji potiskuje citoplazmu sa organelama, dok vrstu *P. fluviatilis* karakteriše prisustvo lipidnih kapi u ćelijama jetre.

Steatoza predstavlja abnormalnu akumulaciju triglicerida u ćelijama i poznato je da može biti indukovana nizom ksenobiotika, kao i cijanotoksinima. Različiti laboratorijski eksperimenti pokazali su da mikrocistini mogu da uzrokuju steatozu hepatocita riba, ptica i sisara. Najspecifičnija promena koja je uočena tokom ispitivanja uticaja različitih tipova mikrocistina na morfologiju ćelijskih linija hepatoma riba je bila indukcija mikrovezikularne steatoze (Pichardo i sar., 2005; Pichardo i sar., 2007), dok je makrovezikularna steatoza hepatocita zapažena kod vrste *Tinca tinca* nakon ishrane ćelijama cijanobakterija iz roda *Microcystis* (Atencio i sar., 2008). Znakovi steatoze bili su uključeni i u histopatologiju jetre *Oreochromis niloticus* koja je tretirana cilindrospermopsinom (Gutiérrez-Praena i sar., 2012a). Akumulacija lipida u navedenoj studiji posledica je degenerativnih procesa u hepatocitima koji uključuju inhibiciju sinteze glikoproteina i smanjenu sposobnost uklanjanja i mobilizacije lipida iz ćelija. Steatoza jetre zabeležena je i kod japanske prepelice koja je hranjena biomasom cijanobakterija koje proizvode mikrocistine (Skocovska i sar., 2007). Tokom istraživanja hroničnog uticaja mikrocistina na strukturu jetre pacova, Guzman i Solter (1999) su detektovali vakuole u citoplazmi hepatocita koje su bile ispunjene lipidima, čime je potvrđena steatoza.

Proučavanje strukture jetre riba ukazalo je na pojavu steatoze hepatocita ispitivanih vrsta iz Gružanskog jezera ne samo tokom perioda cvetanja, već i pre tog perioda kada u uzorku vode nije bilo moguće detektovati cijanobakterije. Poznato je da abnormalnu akumulaciju lipida u ćelijama mogu da izazovu različiti ksenobiotici, uključujući i teške metale (Van Dyk i sar., 2007). Činjenica je da je u svim eutrofnim vodenim ekosistemima prisutan kompleks različitih stresora koji mogu da utiču na organizme koji naseljavaju ove ekosisteme. Znaci steatoze bili su najmanje izraženi kod *P. fluviatilis*, pa se može zaključiti da je ova vrsta znatno otpornija u odnosu na ostale ispitivane vrste riba na agense koji mogu da indukuju poremećaj metabolizma triglicerida. Kako toksična jedinjenja dovode do povećane produkcije ROS i indukcije



lipidne peroksidacije i oksidacije proteina, oksidacioni stres takođe može da bude odgovoran za pojavu steatoze (Gutiérrez-Praena i sar., 2012a).

Za razliku od svetlosne mikroskopije, na ultratankim presecima jetre riba iz akumulacionog jezera Gruža zapažene su jasne razlike u strukturi hepatocita između dva istraživana perioda. Kod svih ispitivanih vrsta vidljive su degenerativne promene gotovo svih membranski vezanih organela tokom perioda cvetanja. Konstatovane su alteracije endomembranskog sistema i morfološke promene jedra, a kod pojedinih hepatocita uočeni su i znakovi nekroze. Bojenje preseka jetre propidijum-jodidom je ukazalo da cvetanje cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža indukuje apoptotske promene koje su konstatovane na nivou jedra i mitohondrija.

Apoptoza, programirana ćelijska smrt, je glavni citotoksični efekat dejstva mikrocistina u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima na ćelijskim linijama riba i sisara. To je aktivan proces koji je regulisan komplikovanim mehanizmima aktivacije i sinteze genskih produkata koji su neophodni za destrukciju ćelije. Putevi indukcije apoptoze pod uticajem mikrocistina uključuju formiranje velike količine ROS, koje je praćeno promenama membranskog potencijala mitohondrija i propustljivosti membrana, što dovodi do narušavanja procesa oksidativne fosforilacije i sinteze ATP-a i na kraju potpune disfunkcije ćelije (Zhang i sar., 2008). Indukcija apoptoze pod dejstvom mikrocistina moguća je preko aktivacije proteaze kalpaina. Amado i sar. (2011) su konstatovali značajno veću aktivnost kalpaina u jetri šarana koji je hranjen ekstraktom liofilizovanih ćelija cijanobakterije *Microcystis aeruginosa* u odnosu na kontrolne jedinke. U ovoj studiji je detektovan i pad koncentracije GSH, pa su autori zaključili da do aktivacije kalpaina dolazi zbog povećane produkcije ROS usled smanjenog nivoa antioksidacione zaštite, kao i snižene sposobnosti GSH da modulira aktivnost kalpaina preko nekompetitivne inhibicije. Fischer i Dietrich (2000) su u eksperimentima na istom modelu potvrdili da mikrocistini izazivaju apoptozu kao primarni mehanizam ćelijske smrti hepatocita.

Osim mikrocistina, utvrđeno je da i drugi cijanotoksini imaju sposobnost da indukuju apoptozu. Da Silva i sar. (2011a) su primenili kometa esej na mozgu slatkovodne ribe *Hoplias malabaricus* koja je tretirana lizatom cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii* i zaključili su da saksitoksin koji proizvodi ova cijanobakterija ima genotoksično dejstvo i da dovodi do defragmentacije DNK, što

može da izazove ćelijsku smrt putem procesa apoptoze. Autori su utvrdili da saksitoksin remeti ravnotežu jona u ćeliji i narušava unutarćelijsku homeostazu, dok povećana produkcija ROS indukuje ćelijsku smrt.

Slični rezultati su dobijeni i na sisarskim modelima. Tokom istraživanja hroničnog uticaja mikrocistina na stukturu jetre pacova, Guzman i Solter (1999) su opisali tipične apoptotske promene jedra i citoplazme. Navedeni autori su analizom na nivou svetlosne mikroskopije zabeležili apoptotska tela sa ili bez hromatina, a takođe su konstatovani i hepatociti sa kondenzovanim hromatinom koji je bio ograničen uz unutrašnju membranu jedra. U eksperimentima na ljudskim limfocitima pokazano je da cilindrospermopsin indukuje povećanu ekspresiju gena p53, što za sobom povlači pozitivnu regulaciju ekspresije gena BAX i BCL-2 koji igraju važnu ulogu u procesu apoptoze (Žegura i sar., 2011a).

Za razliku od apoptoze, nekroza predstavlja ireverzibilnu leziju koja je povezana sa hroničnim izlaganjem ksenobioticima i nastaje putem različitih mehanizama kao što su hipoksija, poremećaj sinteze proteina i metabolizma ugljenih hidrata. Tako je nekroza jetre konstatovana kod slatkovodne ribe *Geophagus brasiliensis* tokom cvetanja cijanobakterije *Cylindrospermopsis raciborskii* u jezeru Alagados u Brazilu. Ova pojava bila je vidljiva kako u leto kada je zabeležena najveća brojnost *C. raciborskii*, tako i u proleće i jesen kada je brojnost ove vrste cijanobakterije u jezeru bila manja (Clemente i sar., 2010). Znakovi nekroze hepatocita detektovani su i kod *Oreochromis* sp. koja je hranjena liofilizovanim ćelijama cijanobakterija iz roda *Microcystis* (Molina i sar., 2005). Promena oblika ćelija, povećanje broja i veličine lizosomalnih tela, kao i pojava nekroze i apoptoze bile su tipične morfološke promene ćelijskih linija hepatoma riba koje su tretirane mikrocistinima (Pichardo i sar., 2005; Pichardo i sar., 2007).

Da li će cijanotoksini da izazovu apoptozu ili nekrozu zavisi od tipa i koncentracije toksina. Da Silva i sar. (2011b) proučavali su genotoksične efekte ekstrakta cvetanja cijanobakterija iz roda *Microcystis* na vrsti *Oreochromis niloticus* i zaključili su da je pojava apoptoze izraženija od nekroze pri niskim koncentracijama cijanotoksina, dok je pri visokim koncentracijama nekroza dominantniji proces. Li i sar. (2003a) su dobili slične rezultate u eksperimentima na izolovanim hepatocitima šarana i utvrdili su da niske koncentracije mikrocistina dovode do apoptoze ćelija, dok veće

koncentracije uzrokuju nekrozu. Potpuno isti trend zapažen je i u eksperimentima na ćelijskoj kulturi hepatocita pacova (McDermott i sar., 1998).

Različitim eksperimentima u laboratorijskim uslovima potvrđeno je da stepen patoloških promena ćelija jetre usled dejstva cijanotoksina pokazuje doznu zavisnost. Oralno unošenje ćelija cijanobakterije *Microcystis* dovelo je do ultrastrukturnih alteracija hepatocita omnivorne slatkovodne ribe *Tinca tinca*. Međutim, promene tkiva detektovane su i pri niskim dozama ćelija cijanobakterija, a bile su sve izraženije sa povećanjem doze, kada je mogla da se uoči velika količina amorfnog granularnog glikogena u hepatocitima, zatim lipidni depoziti, kao i makrovezikularna steatoza (Atencio i sar., 2008).

*In vivo* eksperimentima na vrsti *Hypophthalmichthys molitrix* kojoj je intraperitonealno aplikovana doza od 1000 µg mikrocistina po kg, utvrđeno je da je nivo ultrastrukturnih promena jetre vremenski zavisna. Nakon 1h zapaženo je širenje intercelularnih prostora, kao i pojava ćelija sa dva jedra, dok je posle 3h došlo do smanjenja veličine hepatocita, kao i redukcije količine organela, naročito granulisanog endoplazmatičnog retikuluma. Progresivan gubitak kristi i matriksa mitohondrija rezultovao je kompletnom transparentnošću mitohondrija nakon 12h od primene mikrocistina. Posle 24h došlo je do fragmentacije endoplazmatičnog retikuluma, proliferacije lizozoma, dok je nakon 48h konstatovano oštećenje membrane jedra, vezikulacija endoplazmatičnog retikuluma, a uočena je i velika količina autofagnih vakuola (Li i sar., 2007b).

Izlaganje slatkovodne ribe *Coregonus lavaretus* ćelijama cijanobakterije *Planktothrix rubescens* koja produkuje mikrocistine, izazvalo je niz patoloških promena u tkivu jetre. Svetlosnom mikroskopijom detektovan je granulisan citosol, dezintegracija strukture parenhima jetre, disocijacija ćelija, apoptoza i nekroza, dok je stepen opisanih patoloških promena pokazao kako vremensku, tako i doznu zavisnost (Ernst i sar., 2006; Ernst i sar., 2007). Analizom tkiva jetre na nivou svetlosne mikroskopije takođe su konstatovane progresivne promene u vidu lezija i nekroze hepatocita kod mladih jedinki slatkovodne ribe *Carassius auratus* kojima je intraperitonealno aplikovan mikrocistin. Promene su obuhvatale dezorganizaciju ćelijske strukture, gubitak adherentnih veza između hepatocita i jasne znakove nekroze. Pojedini hepatociti su pokazali lizu membrana i apoptotske promene (Malbrouck i sar.,

2003). Tretiranje amfidromne ribe *Oryzias latipes* ekstraktom cijanobakterije *Planktothrix agardhii* koja proizvodi mikrocistin, kao i rastvorom čistog mikrocistina dovelo je do gubitka veza između ćelija jetre, kao i lize hepatocita (Djediat i sar., 2011; Trinchet i sar., 2011).

Qui i sar. (2007) pokazali su da stepen oštećenja jetre riba usled cvetanja cijanobakterija može da zavisi od trofičkog nivoa ispitivanih vrsta. Njihovom studijom utvrđeno je da fitoplanktivorne vrste pokazuju najveću otpornost na cvetanje, dok su karnivorne vrste najosetljivije na povećanu brojnost cijanobakterija. Tako su subćelijske strukture hepatocita fitoplanktivornih riba *Hypophthalmichthys molitrix* i *Aristichthys nobilis* bile gotovo u potpunosti očuvane tokom cvetanja *Microcystis aeruginosa* u jezeru Taihu u Kini. Osim nekoliko lipidnih kapi i lizozoma, ćelije su imale nepromenjenju strukturu sa okruglim jedrom, intaktnim mitohondrijama i uobičajenom strukturom endoplazmatičnog retikuluma. Autori su zaključili da zapažena proliferacija lizozoma u ovoj studiji predstavlja adaptivni mehanizam neophodan za uklanjanje ili smanjenje oštećenja ćelija u uslovima stresa koji su indukovali mikrocistini. Međutim, kod omnivorne vrste *Carassius auratus* hepatociti su pokazali patološke promene u vidu deformacije membrane jedra i velikog broja lipidnih kapi, dok su kod karnivorne vrste *Culter ilishaeformis* cijanotoksini potpuno narušili strukturu endomembranskog sistema hepatocita, uključujući membranu jedra, endoplazmatični retikulum i mitohondrije (gubitak kristi i matriksa).

U navedenoj studiji konstatovano je da histopatološke karakteristike mogu da budu znatno osetljiviji biomarkeri oštećenja jetre riba u odnosu na biohemijske parametre, jer su kod vrsta *C. auratus* i *C. ilishaeformis* detektovane znatne ultrastrukturne promene jetre tokom cvetanja, dok je većina ispitivanih enzima antioksidacione zaštite pokazala male promene aktivnosti u ovom tkivu. Međutim, nakon perioda cvetanja cijanobakterija došlo je do obnavljanja kako enzimske aktivnosti, tako i svih ćelijskih struktura, što je ukazalo na reverzibilnost toksičnih efekata cijanotoksina.

Uprkos velikom broju navedenih histopatoloških studija na ribama koje su bile izložene toksinima cijanobakterija, retki su podaci o uticaju cvetanja vrste *A. flos-aquae* na morfologiju jetre riba (Perendija i sar., 2011). Negativni efekti sekundarnih metabolita ove vrste cijanobakterija proučavani su uglavnom na sisarskim modelima.

Svetlosna mikroskopija jetre miševa koji su tretirani ekstraktom liofilizovanog materijala *A. flos-aquae* pokazala je izražene promene strukture hepatocita, kao što su razlike u veličini jedra, zatim vakuolizacija jedra i citoplazme i nejasne granice između ćelija, a takođe je zapažena i pojava nekroze. Analizom hepatocita na nivou elektronske mikroskopije utvrđeni su gubitak međućelijskih veza, oštećenje plazma membrane, degenerativne promene mitohondrija sa dezorganizacijom kristi, dilatacija i vezikulacija endoplazmatičnog retikuluma, kao i pojava membranom okruženih vakuola u citoplazmi i jedru ćelija (Underdal i sar., 1999). S druge strane, Liu i sar. (2006) su kod miševa tretiranih ekstraktom cijanobakterije *A. flos-aquae* koja je tokom perioda cvetanja izolovana iz jezera Dianhi u Kini, detektovali znatno manje promene ultrastrukture hepatocita i to samo na nivou mitohondrija.

Opisane histopatološke analize u navedenim studijama prate rezultate koji obuhvataju ispitivanje enzimskih i neenzimskih parametara antioksidacione zaštite. Promene aktivnosti antioksidacionih enzima, kao i vrednosti koncentracije neenzimskih antioksidanata koje nastaju usled dejstva cijanotoksina, direktno su povezane sa oksidacionim oštećenjima ključnih biomolekula, što može da dovede do procesa koji indukuju apoptozu i nekrozu ćelija. Narušeno funkcionisanje parametara antioksidacione zaštite može da onemogući prevenciju histoloških oštećenja koja nastaju pod uticajem cijanotoksina.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu eksperimentalnih rezultata koji su dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivanjem parametara antioksidacione zaštite u jetri, škragama i abdominalnom mišiću slatkovodnih vrsta riba *Rutilus rutilus* (bodorka), *Blicca bjoerkna* (blika), *Carassius gibelio* (babuška) i *Perca fluviatilis* (grgeč) pre i tokom cvetanja cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Aktivnost Uk SOD i CuZn SOD u jetri bila je statistički značajno veća tokom cvetanja u odnosu na period pre cvetanja jedino kod vrste *B. bjoerkna*, što se podudara sa rezultatima analize elektroforetskog profila SOD u jetri koji je ukazao da cvetanje cijanobakterija indukuje dodatne izoforme SOD jedino kod ove vrste. Mn SOD je imala povećanu aktivnost u jetri kod svih ispitivanih vrsta riba. Aktivnost Uk SOD, CuZn SOD i Mn SOD u škragama i mišiću svih ispitivanih vrsta riba imala je različit stepen smanjenja tokom perioda cvetanja cijanobakterija. Elektroforetski nalaz SOD u jetri, škragama i mišiću ispitivanih vrsta riba ukazao je na postojanje jasnih tkivnih i interspecijskih razlika u profilu ovog enzima.
2. Aktivnost CAT bila je smanjena u jetri, a povećana u mišiću svih ispitivanih vrsta riba tokom perioda cvetanja cijanobakterija. Trend povećanja aktivnosti CAT konstatovan je i u škragama *R. rutilus* i *P. fluviatilis* tokom cvetanja. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da SOD ima veći značaj u antioksidacionoj odbrani u jetri ispitivanih vrsta riba tokom cvetanja, dok u škragama i mišiću tu ulogu preuzima CAT.

3. Aktivnost GSH-Px pokazala je trend smanjenja u jetri i mišiću kod svih ispitivanih vrsta riba, kao i u škragama *B. bjoerkna* i *C. gibelio* tokom perioda cvetanja. Može se zaključiti da cvetanje cijanobakterija narušava integritet ćelijskih membrana u svim ispitivanim tkivima riba. Povećanje aktivnosti enzima GSH-Px tokom perioda cvetanja je zapaženo jedino u škragama vrste *P. fluviatilis*.
4. Aktivnost GR bila je statistički značajno smanjena u jetri *C. gibelio*, škragama kod svih ispitivanih vrsta riba, kao i u mišiću *R. rutilus* i *C. gibelio* tokom perioda cvetanja. Zaključuje se da cvetanje cijanobakterija može indirektno da naruši funkcionisanje GSH zavisnih enzima GSH-Px i GST. Aktivnost GR je bila povećana tokom perioda cvetanja jedino u jetri vrste *R. rutilus*.
5. Enzim faze II biotransformacije GST pokazao je trend povećanja aktivnosti tokom perioda cvetanja jedino u jetri vrste *B. bjoerkna*, dok je trend smanjenja detektovan u škragama i mišiću kod svih ispitivanih vrsta riba. Povećanje aktivnosti GST u jetri *B. bjoerkna* ukazuje na potencijalnu aktivaciju procesa biotransformacije cijanotoksina. Smanjena aktivnost GST u škragama i mišiću kod svih ispitivanih vrsta riba ukazuje na narušenu efikasnost ovih tkiva da konjuguju metabolite cijanotoksina, što može da dovede do njihove izražene unutarćelijske akumulacije tokom perioda cvetanja.
6. Neenzimski parametri antioksidacione zaštite, koncentracija ukupnog GSH i SH grupa, nemaju jedinstven trend promena i reaguju na pojavu cvetanja različito kod različitih ispitivanih tkiva i vrsta. Konstatovano povećanje koncentracije ukupnog GSH u jetri i škragama vrste *R. rutilus*, jetri i mišiću *B. bjoerkna*, škragama *C. gibelio* i mišiću *P. fluviatilis* je verovatno posledica njegove *de novo* sinteze.

7. Kanonijskom diskriminacionom analizom utvrđena je priroda interspecijskih razlika u distribuciji ispitivanih parametara antioksidacione zaštite. Parametri koji najviše doprinose razlikama između vrsta razlikuju se u zavisnosti od istraživanog perioda. Kada je u pitanju tkivo jetre i period pre cvetanja, za razdvajanje po prvoj diskriminacionoj funkciji najveći značaj ima aktivnost CAT kod vrste *P. fluviatilis* i GSH-Px kod vrsta *R. rutilus* i *C. gibelio*, dok aktivnost enzima GR najviše doprinosi izdvajanju vrste *B. bjoerkna* prema drugoj diskriminacionoj funkciji. Tokom cvetanja, razdvajanju po prvoj kanonijskoj funkciji najveći doprinos daje koncentracija SH grupa, a po drugoj aktivnost GSH-Px i koncentracija GSH. Distribucija parametara antioksidacione zaštite u škrgama ispitivanih vrsta riba pokazala je izraženu specifičnost vrsta sa jasnom diskriminacijom i pre i tokom cvetanja cijanobakterija. Kada je u pitanju tkivo mišića, u oba ispitivana perioda najizraženije je bilo izdvajanje vrste *C. gibelio*, kod koje su aktivnosti enzima GR i GST bile veće u odnosu na vrednosti izmerene kod ostalih vrsta riba.
8. Distribucija parametara antioksidacione zaštite kod ispitivanih vrsta riba tkivno je specifična. Na osnovu rezultata kanonijske diskriminacione analize zaključujemo da postoji jasno razdvajanje jetre, škrge i mišića kod svih ispitivanih vrsta. Po svojoj specifičnosti najviše se izdvaja jetra, u kojoj su konstatovane najveće vrednosti ispitivanih antioksidacionih parametara. Detektovanim razlikama najviše doprinose aktivnost Uk SOD i GSH-Px i koncentracija GSH kod *R. rutilus*, aktivnost GSH-Px i koncentracija GSH kod *B. bjoerkna*, aktivnost Uk SOD i CAT kod *C. gibelio* i aktivnost Uk SOD i GR kod *P. fluviatilis*.



9. Klaster analizom utvrđena je priroda povezanosti pojedinačnih komponenti funkcionalno jedinstvenog i integrisanog sistema antioksidacione zaštite. Kod svih ispitivanih vrsta izraženo je grupisanje aktivnosti GST i koncentracije GSH u jedinstven klaster, kao i aktivnosti enzima SOD, CAT, GSH-Px i GR u drugi klaster. Funkcionalna povezanost enzima faze II biotransformacije GST i neenzimskog antioksidanta GSH je važan faktor u procesu detoksifikacije cijanotoksina.
10. Na nivou svetlosne mikroskopije nisu uočene razlike u strukturi jetre ispitivanih vrsta riba između istraživanih perioda. Na osnovu bojenja propidijum-jodidom može se zaključiti da cvetanje cijanobakterija indukuje apoptozu hepatocita. Na nivou elektronske mikroskopije konstatovan je uticaj cvetanja na ćelije jetre u vidu alteracija endomembranskog sistema, morfoloških promena jedra, kao i nekroze pojedinih hepatocita. Analiza tkiva jetre svetlosnom i elektronskom mikroskopijom ukazala je na pojavu steatoze kod svih ispitivanih vrsta riba bez obzira na istraživani period, na osnovu čega se zaključuje da postoji dodatni potencijalni stresor u ispitivanoj vodenoj sredini koji negativno utiče na funkcionisanje glavnog metaboličkog i detoksifikacionog organa.
11. Zapažene promene ultrastrukture hepatocita ispitivanih vrsta riba tokom perioda cvetanja u korelaciji su sa dobijenim rezultatima koji se tiču parametara antioksidacione zaštite. Konstatovane promene aktivnosti antioksidacionih enzima SOD, CAT, GSH-Px, GR i enzima faze II biotransformacije GST, kao i koncentracije neenzimskih komponenti GSH i SH grupa, koje su posledica cvetanja, povezane su sa oksidacionim oštećenjima ključnih biomolekula i indukcijom procesa apoptoze i nekroze ćelija.

## OPŠTI ZAKLJUČAK

Istraživanja ove doktorske disertacije pokazala su da cvetanje cijanobakterija u akumulacionom jezeru Gruža indukuje odgovor svih ispitivanih parametara antioksidacione zaštite: aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px, GR i enzima faze II biotransformacije GST, kao i koncentracije ukupnog GSH i SH grupa u jetri, škrigama i abdominalnom mišiću riba *Rutilus rutilus*, *Blicca bjoerkna*, *Carassius gibelio* i *Perca fluviatilis*. Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju prvi izveštaj koji uzima u obzir četiri vrste slatkovodnih riba iz jezera Gruža za koje je karakteristično cvetanje cijanobakterija iz roda *Aphanizomenon*. Dobijeni podaci potvrđuju činjenicu da je oksidacioni stres uključen u mehanizam dejstva cijanotoksina i da narušeno funkcionisanje parametara antioksidacione zaštite dovodi do ultrastrukturnih oštećenja jetre, kao i pojave apoptoze i nekroze hepatocita. Utvrđivanje odgovora parametara antioksidacione zaštite u ispitivanim vrstama riba koje su izložene pojavi cvetanja u akumulacionom jezeru Gruža, ukazuje da se ovi parametri mogu koristiti kao pouzdani biomarkeri efekta u proceni ranog odgovora na pojavu cvetanja cijanobakterija i prisustvo cijanotoksina u vodi i to pruža veliki doprinos na polju ekofiziologije akvatičnih organizama.

## 7. LITERATURA

1. ALMROTH, B.C. (2008): Oxidative damage in fish used as biomarkers in field and laboratory studies. Doctoral Dissertation, Department of Zoology/Zoophysiology, Göteborg University, Sweden, pp. 1-74.
2. ALONSO-ANDICOBERRY, C., GARCIA-VILLADA, L., LOPEZ-RODAS, V. and COSTAS, E. (2002): Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria. *Vet. Res.* 151, 706-707.
3. ALSCHER, R.G., ERTURK, N. and HEATH, L.S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331-1341.
4. AMADO, L.L. and MONSERRAT, J.M. (2010): Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: why and how. *Environ. Inter.* 36, 226-235.
5. AMADO, L.L., GARCIA, M.L., RAMOS, P.B., YUNES, J.S. and MONSERRAT, J.M. (2011): Influence of a toxic *Microcystis aeruginosa* strain on glutathione synthesis and glutathione-S-transferase activity in common carp *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cyprinidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 319-326.
6. ANDREYEV, A.Y., KUSHNAREVA, Y.E. and STARKOV, A.A. (2005): Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 70, 200-214.
7. ARÁOZ, R., MOLGÓ, J. and DE MARSAC, N.T. (2010): Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 56, 813-828.
8. ARENAS, F.A., DÍAZ, W.A., LEAL, C.A., PÉREZ-DONOSO, J., IMLAY, J.A. and VÁSQUEZ, C.C. (2010): The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 690-694.
9. ATENCIO, L., MORENO, I., JOS, A., PICHARDO, S., MOYANO, R., BLANCO, A. and CAMEÁN, A.M. (2008): Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon* 52, 1-12.

10. BAFANA, A., DUTT, S., KUMAR, A., KUMAR, S. and AHUJA, P.S. (2011): The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68, 129-138.
11. BAGENAL, T.B. and TESCH, F.W. (1978): Methods for assessment of fish production in fresh waters. In: *Age and Growth* (Ed. Bagenal, T.B.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 101-136.
12. BAKKE, M.J. and HORSBERG, T.E. (2010): Kinetic properties of saxitoxin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 152, 444-450.
13. BALLOT, A., FASTNER, J., LENTZ, M. and WIEDNER, C. (2010): First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in northeastern Germany. *Toxicon* 56, 964-971.
14. BAYNE, B.L., BROWN, D.A., BURNS, K., DIXON, D.R., IVANOVICI, A., LIVINGSTONE, D.A., LOWE, D.M., MOORE, M.N., STEBBING, A.R.D. and WIDDINGS, J. (1985): The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger, New York, USA, pp. 1-384.
15. BEATTIE, K.A., RESSLER, J., PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., OBEREMM, A., KRAUSE, E., STEINBERG, C.E.W. and CODD, G.A. (2003): Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. *Aquat. Toxicol.* 62, 219-226.
16. BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P. and WAHLI, T. (1999): Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25-34.
17. BERRY, J.P. and LIND, O. (2010): First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegogolo” snails (*Pomacea patula catemacensis*). *Toxicon* 55, 930-938.
18. BEST, J.H., PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., EDDY, F.B., METCALF, J.S. and CODD, G.A. (2002): Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 60, 223-231.

19. BLÁHA, L., KOPP, R., ŠIMKOVÁ, K. and MAREŠ, J. (2004): Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Acta Vet. Brno* 73, 477-482.
20. BORKOVIĆ, S.S., PAVLOVIĆ, S.Z., KOVAČEVIĆ, T.B., ŠTAJN, A.Š., PETROVIĆ, V.M. and SAIČIĆ, Z.S. (2008): Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 122-128.
21. BORKOVIĆ-MITIĆ, S.S., KOVAČEVIĆ, T.B., PERENDIJA, B.R., DESPOTOVIĆ, S.G., GAVRIĆ, J.P., PAVLOVIĆ, S.Z. and SAIČIĆ, Z.S. (2011): Superoxide dismutase and catalase activities in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio pictorum* from the Sava River. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 63, 185-192.
22. BORKOVIĆ-MITIĆ, S.S., RADOVANOVIĆ, T.B., PERENDIJA, B.R., DESPOTOVIĆ, S.G., PAVLOVIĆ, S.Z. and SAIČIĆ, Z.S. (2010): Superoxide dismutase as relevant oxidative stress biomarker of the freshwater bivalve *Unio tumidus* at different localities - The Sava river case study. In: *The Danube in Serbia. The Results of National program of the Second Joint Danube Survey 2007* (Eds. Simonović, P., Simić, V., Simić, S. and Paunović, M.), Republic of Serbia, Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management-Republic Directorate for Water, University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, University of Kragujevac, Faculty of Science, Kragujevac, pp. 225-240.
23. BRIAND, J., JACQUET, S., BERNARD, C. and HUMBERT, J. (2003): Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34, 361-377.
24. BRIGELIUS-FLOHE, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 951-965.
25. BROWN, K.M. and ARTHUR, J.R. (2001): Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* 4, 593-599.

26. BUCHELI, T.D. and FENT, K. (1995): Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25, 201-268.
27. BUONOCORE, G., PERRONE, S. and TATARANNO, M.L. (2010): Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 15, 186-190.
28. BURMESTER, V., NIMPTSCH, J. and WIEGAND, C. (2012): Adaptation of freshwater mussels to cyanobacterial toxins: response of the biotransformation and antioxidant enzymes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 296-309.
29. CADENAS, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 79-110.
30. CASTONGUAY, M., LEVASSEUR, M., BEAULIEU, J.L., GREGOIRE, F., MICHAUD, S., BONNEAU, E. and BATES, S.S. (1997): Accumulation of PSP toxins in Atlantic mackerel: seasonal and ontogenic variations. *J. Fish Biol.* 50, 1203-1213.
31. CATALÁ, A. (2006): An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38, 1482-1495.
32. CAZENAVE, J., BISTONI, M.A., PESCE, S.F. and WUNDERLIN, D.A. (2006): Differential detoxification and antioxidant response in diverse organs of *Corydoras paleatus* experimentally exposed to microcystin-RR. *Aquat. Toxicol.* 76, 1-12.
33. CHABORY, E., DAMON, C., LENOIR, A., KAUSELMANN, G., KERN, H., ZEVNIK, B., GARREL, C., SAEZ, F., CADET, R., HENRY-BERGER, J., SCHOOR, M., GOTTWALD, U., HABENICHT, U., DREVET, J.R. and VERNET, P. (2009): Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 2074-2085.
34. CHEN, J., HAN, F.X., WANG, F., ZHANG, H. and SHI, Z. (2012): Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 193-199.

35. CHEN, J., XIE, P., ZHANG, D. and LEI, H. (2007): *In situ* studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a biomanipulation fish - bighead carp (*Aristichthys nobilis*). Environ. Pollut. 147, 150-157.
36. CHEN, J., XIE, P., ZHANG, D., KE, Z. and YANG, H. (2006): *In situ* studies on the bioaccumulation of microcystins in the phytoplanktivorous silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stocked in Lake Taihu with dense toxic *Microcystis* blooms. Aquaculture 261, 1026-1038.
37. CHEN, J., ZHANG, D., XIE, P., WANG, Q. and MA, Z. (2009): Simultaneous determination of microcystin contaminations in various vertebrates (fish, turtle, duck and water bird) from a large eutrophic Chinese lake, Lake Taihu, with toxic *Microcystis* blooms. Sci. Total Environ. 407, 3317-3322.
38. CHEN, W., SONG, L., DANYUN, O. and GAN, N. (2005): Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR. Environ. Toxicol. 20, 323-330.
39. CLAIBORNE, A. (1984): Catalase activity. In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Research (Ed. Greenwald, R.A.), CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 283-284.
40. CLEMENTE, Z., BUSATO, R.H., RIBEIRO, C.A.O., CESTARI, M.M., RAMSDORF, W.A., MAGALHÃES, V.F., WOSIACK, A.C. and DE ASSIS, H.C.S. (2010): Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. Toxicon 55, 396-406.
41. COMMANDEUR, J.N.M., STIJNTJES, G.J. and VERMEULEN, N.P.E. (1995): Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxification mechanisms of xenobiotics. Pharmacol. Rev. 47, 271-330.
42. CONTARDO-JARA, V., PFLUGMACHER, S. and WIEGAND, C. (2008): Multi-xenobiotic-resistance a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins. Toxicon 52, 936-943.
43. ČOMIĆ, LJ. i OSTOJIĆ, A. (2005): Reka i akumulaciono jezero Gruža. Monografija: Akumulaciono jezero Gruža (Urednici Čomić, Lj. i Ostojić, A.), Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 21-28.

44. DA ROSA, C.E., DE SOUZA, M.S., YUNES, J.S., PROENÇA, L.A.O., NERY, L.E.M. and MONSERRAT, J.M. (2005): Cyanobacterial blooms in estuarine ecosystems: characteristics and effects on *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar. Pollut. Bull.* 50, 956-964.
45. DA SILVA, C.A., OBA, E.T., RAMSDORF, W.A., MAGALHÃES, V.F., CESTARI, M.M., RIBEIRO, C.A.O. and DE ASSIS, H.C.S. (2011a): First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon* 57, 141-147.
46. DA SILVA, R.R.P., PIRES, O.R. and GRISOLIA, C.K. (2011b): Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis* spp bloom extracts containing microcystins. *Toxicon* 58, 259-264.
47. DARLINGTON, R.B., WEINBERG, S. and WALBERG, H. (1973): Canonical variate analysis and related techniques. *Rev. Educ. Res.* 43, 433-454.
48. DE FIGUEIREDO, D.R., AZEITEIRO, U.M., ESTEVES, S.M., GONÇALVES, F.J.M. and PEREIRA, M.J. (2004): Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 151-163.
49. DE MAGALHÃES, V.F., SOARES, R.M. and AZEVEDO, S.M.F.O. (2001): Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon* 39, 1077-1085.
50. DE WAZIERS, I. and ALBRECHT, R. (1987): The effects of vitamine A nutritional status on glutathione, glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in rat intestine. *Experientia* 43, 394-395.
51. DE ZWART, D. (1995): Monitoring water quality in the future, Volume 3: Biomonitoring. National Institute for Public Health and Environmental Protection (RIVM), Bilthoven, The Netherlands, pp. 1-81.
52. DEBLOIS, C.P., ARANDA-RODRIGUEZ, R., GIANI, A. and BIRD, D.F. (2008): Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon* 51, 435-448.



53. DESPOTOVIĆ, S.G., PERENDIJA, B.R., KOVAČEVIĆ, T.B., BORKOVIĆ, S.S., PAVLOVIĆ, S.Z., MILOŠEVIĆ, S.M., DJIKANOVIĆ, V.D., CAKIĆ, P.D., PAJOVIĆ, S.B. and SAIČIĆ, Z.S. (2007): Glutathione redox status in some tissues and the intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel (*Barbus barbus*) (Pisces) from the Danube River. Arch. Biol. Sci. Belgrade 59, 57-58.
54. DEWES, L.J., SANDRINI, J.Z., MONSERRAT, J.M. and YUNES, J.S. (2006): Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). Ecotoxicol. Environ. Saf. 65, 201-208.
55. DICKINSON, D.A. and FORMAN, H.J. (2002): Cellular glutathione and tiols metabolism. Biochem. Pharmacol. 64, 1019-1026.
56. DING, W.X., SHEN, H.M. and ONG, C.N. (2000): Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. Environ. Health Perspect. 108, 605-609.
57. DINNEEN, L.C. and BLAKESLEY, B.C. (1973): A generator for the sampling distribution of the Mann Whitney U statistic. Appl. Stat. 22, 269-273.
58. DJEDIAT, C., MOYENGA, D., MALÉCOT, M., COMTE, K., YÉPRÉMIAN, C., BERNARD, C., PUISEUX-DAO, S. and EDERY, M. (2011): Oral toxicity of extracts of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix agardhii* to the medaka fish (*Oryzias latipes*). Toxicon 58, 112-122.
59. DRÖGE, W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 82, 47-95.
60. DUPONT, C.L., NEUPANE, K., SHEARER, J. and PALENIK, B. (2008): Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. Environ. Microbiol. 10, 1831-1843.
61. EATON, D.L. and BAMMLER, T.K. (1999): Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. Toxicol. Sci. 49, 156-164.
62. ELLMAN, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.

63. ERNST, B., HOEGER, S.J., O'BRIEN, E. and DIETRICH, D.R. (2006): Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquat. Toxicol.* 79, 31-40.
64. ERNST, B., HOEGER, S.J., O'BRIEN, E. and DIETRICH, D.R. (2007): Physiological stress and pathology in European whitefish (*Coregonus lavaretus*) induced by subchronic exposure to environmentally relevant densities of *Planktothrix rubescens*. *Aquat. Toxicol.* 82, 15-26.
65. FAGALI, N. and CATALÁ, A. (2009): Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. *Chem. Phys. Lipids* 159, 88-94.
66. FERREIRA, F.M.B., SOLER, J.M.F., FIDALGO, M.L. and FERNÁNDEZ-VILA, P. (2001): PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon* 39, 757-761.
67. FIDALEO, M. (2010): Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62, 615-625.
68. FISCHER, W.J. and DIETRICH, D.R. (2000): Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 73-81.
69. GÉLINAS, M., JUNEAU, P. and GAGNÉ, F. (2012): Early biochemical effects of *Microcystis aeruginosa* extracts on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 161, 261-267.
70. GKELIS, S., LANARAS, T. and SIVONEN, K. (2006): The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. *Aquat. Toxicol.* 78, 32-41.
71. GLATZLE, D., VULLIEMUIER, J.P., WEBER, F. and DECKER, K. (1974): Glutathione reductase test with whole blood a convenient procedure for the assesment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 30, 665-667.

72. GONÇALVES-SOARES, D., ZANETTE, J., YUNES, J.S., YEPIZ-PLASCENCIA, G.M. and BAINY, A.C.D. (2012): Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. *Mar. Environ. Res.* 75, 54-61.
73. GRIFFITH, O.W. (1980): Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.
74. GRIFFITH, O.W. (1999): Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 922-935.
75. GRUND, S., KEITER, S., BÖTTCHER, M., SEITZ, N., WURM, K., MANZ, W., HOLLERT, H. and BRAUNBECK, T. (2010): Assessment of fish health status in the Upper Danube River by investigation of ultrastructural alterations in the liver of barbel *Barbus barbus*. *Dis. Aquat. Org.* 88, 235-248.
76. GUBBINS, M.J., EDDY, F.B., GALLACHER, S. and STAGG, R.M. (2000): Paralytic shellfish poisoning toxins induce xenobiotic metabolising enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Environ. Res.* 50, 479-483.
77. GUTIÉRREZ-PRAENA, D., JOS, A., PICHARDO, S. and CAMEÁN, A.M. (2011a): Oxidative stress responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a single dose of pure cylindrospermopsin under laboratory conditions: influence of exposure route and time of sacrifice. *Aquat. Toxicol.* 105, 100-106.
78. GUTIÉRREZ-PRAENA, D., JOS, Á., PICHARDO, S., MOYANO, R., BLANCO, A., MONTERDE, J.G. and CAMEÁN, A.M. (2012a): Time-dependent histopathological changes in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral and intraperitoneal route. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 102-113.
79. GUTIÉRREZ-PRAENA, D., PICHARDO, S., JOS, Á. and CAMEÁN, A.M. (2011b): Toxicity and glutathione implication in the effects observed by exposure of the liver fish cell line PLHC-1 to pure cylindrospermopsin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1567-1572.

80. GUTIÉRREZ-PRAENA, D., PICHARDO, S., JOS, Á., MORENO, F.J. and CAMEÁN, A.M. (2012b): Biochemical and pathological toxic effects induced by the cyanotoxin cylindrospermopsin on the human cell line Caco-2. *Water Res.* 46, 1566-1575.
81. GUZMAN R.E. and SOLTER, P.F. (1999): Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure. *Toxicol. Pathol.* 27, 582-588.
82. HABIG, W.H., PUBST, M.J. and JAKOBY, W.B. (1974): Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
83. HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. (1999): *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third edition, Oxford University Press Inc., New York, USA, pp. 1-936.
84. HALUŠKOVÁ, L., VALENTOVIČEVÁ, K., HUTTOVÁ, J., MISTRÍK, I. and TAMÁS, L. (2009): Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 1069-1074.
85. HAYES, J.D. and PULFORD, D.J. (1995): The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600.
86. HAYES, J.D., FLANAGAN, J.U. and JOWSEY, I.R. (2005): Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
87. HINTON, D.E. (1994): Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fishes. In: *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives* (Eds. Malins, D.C. and Ostrander, G.K.), Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 207-239.
88. HITZFELD, B.C., HÖGER, S.J. and DIETRICH, D.R. (2000): Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 108, 113-122.
89. HODGSON, E.K. and FRIDOVICH, I. (1975): The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 14, 5294-5299.

90. ILYUKHA, V.A. (2001): Superoxide dismutase and catalase in the organs of mammals of different ecogenesis. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 37, 241-245.
91. JANSSEN-HEININGER, Y.M.W., MOSSMAN, B.T., HEINTZ, N.H., FORMAN, H.J., KALYANARAMAN, B., FINKEL, T., STAMLER, J.S., RHEE, S. and VILET, A. (2008): Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1-17.
92. JAYARAJ, R., ANAND, T. and RAO, P.V.L. (2006): Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. *Toxicology* 220, 136-146.
93. JIANG, J., SHI, Y., SHAN, Z., YANG, L., WANG, X. and SHI, L. (2012): Bioaccumulation, oxidative stress and HSP70 expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR under laboratory conditions. *Comp. Biochem. Physiol. C* 155, 483-490.
94. KANKAANPÄÄ, H., LEINIÖ, S., OLIN, M., SJÖVALL, O., MERILUOTO, J. and LEHTONEN, K.K. (2007): Accumulation and depuration of cyanobacterial toxin nodularin and biomarker responses in the mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 68, 1210-1217.
95. KEMP, M., GO, Y. and JONES, D.P. (2008): Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 921-937.
96. KINNEAR, S. (2010): *Cylindrospermopsis*: a decade of progress on bioaccumulation research. *Mar. Drugs* 8, 542-564.
97. KINNEAR, S.H.W., DUIVENVOORDEN, L.J. and FABBRO, L.D. (2009): Ecotoxicity and bioaccumulation of toxin from *Cylindrospermopsis raciborskii*: towards the development of environmental protection guidelines for contaminated water bodies. In: *Lake Pollution Research Progress* (Eds. Miranda, F.R. and Bernards, L.M.), Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp. 81-105.

98. KONISHI, T., KATO, K., ARAKI, T., SHIRAKI, K., TAKAGI, M. and TAMARU, Y. (2005): A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream *Pagrus major*. *Biochem. J.* 388, 299-307.
99. KONO, Y. and FRIDOVICH, I. (1982): Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754.
100. KOTTELAT, M. and FREYHOF, J. (2007): Handbook of European Freshwater Fishes. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland, pp. 1-646.
101. KOVAČEVIĆ, T.B., BORKOVIĆ, S.S., PAVLOVIĆ, S.Z., DESPOTOVIĆ, S.G. and SAIČIĆ, Z.S. (2008): Glutathione as a suitable biomarker in hepatopancreas, gills and muscle of the three freshwater crayfish species. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 60, 59-66.
102. KOVAČEVIĆ, T.B., BORKOVIĆ, S.S., PAVLOVIĆ, S.Z., RADOJIČIĆ, R.M. and SAIČIĆ, Z.S. (2006): The concentrations of antioxidant compounds in the hepatopancreas, the gills and muscle of some freshwater crayfish species. *Acta Biol. Hung.* 57, 449-458.
103. KRUIDENIER, L. and VERSPAGET, H.W. (2002): Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1997-2015.
104. LAEMMLY, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
105. LEÃO, J.C., GERACITANO, L.A., MONSERRAT, J.M., AMADO, L.L. and YUNES, J.S. (2008): Microcystin-induced oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar. Environ. Res.* 66, 92-94.
106. LECH, J.J. and VODICNIK, M.J. (1985): Biotransformation. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications* (Eds. Rand, G.M. and Petrocelli, S.R.), Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, pp. 526-557.
107. LI, G., XIE, P., FU, J., HAO, L., XIONG, Q. and LI, H. (2008a): Microcystin-induced variations in transcription of GSTs in an omnivorous freshwater fish, goldfish. *Aquat. Toxicol.* 88, 75-80.

108. LI, L., XIE, P. and CHEN, J. (2007a): Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake, China. *Toxicon*, 49, 1042-1053.
109. LI, L., XIE, P., GUO, L., KE, Z., ZHOU, Q., LIU, Y. and QIU, T. (2008b): Field and laboratory studies on pathological and biochemical characterisation of microcystin-induced liver and kidney damage in the phytoplanktivorous bighead carp. *ScientificWorldJournal* 8, 121-137.
110. LI, L., XIE, P., LI, S., QIU, T. and GUO, L. (2007b): Sequential ultrastructural and biochemical changes induced *in vivo* by the hepatotoxic microcystins in liver of the phytoplanktivorous silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 357-367.
111. LI, X., LIU, Y. and SONG, L. (2003a): Cytological alteration in isolated hepatocytes from common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystin-LR. *Environ. Toxicol.* 16, 517-522.
112. LI, X., LIU, Y., SONG, L. and LIU, J. (2003b): Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicon* 42, 85-89.
113. LI, X.Y., CHUNG, I.K., KIM, J.I. and LEE, J.A. (2005): Oral exposure to *Microcystis* increases activity-augmented antioxidant enzymes in the liver of loach (*Misgurnus mizolepis*) and has no effect on lipid peroxidation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141, 292-296.
114. LI, Z.H., ZLABEK, V., GRABIC, R., LI, P. and RANDAK, T. (2010): Modulation of glutathione-related antioxidant defense system of fish chronically treated by the fungicide propiconazole. *Comp. Biochem. Physiol. C* 152, 392-398.
115. LIONETTO, M.G., CARICATO, R., GIORDANO, M.E., PASCARIELLO, M.F., MARINOSCI, L. and SCHETTINO, T. (2003): Intergrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mulus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar. Poll. Bull.* 46, 324-330.

116. LIU, Y., CHEN, W., LI, D., SHEN, Y., LI, G. and LIU, Y. (2006): First report of aphanotoxins in China-waterblooms of toxigenic *Aphanizomenon flos-aquae* in Lake Dianchi. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 84-92.
117. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.L., FARR, A.L. and RANDALL, R.I. (1951): Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
118. MAIORINO, M., WISSING, J.B., BRIGELIUS-FLOHE, R., CALABRESE, F., ROVERI, A., STEINERT, P., URSINI, F. and FLOHE, L. (1998): Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. *FASEB J.* 12, 1359-1370.
119. MALBROUCK, C., TRAUSCH, G., DEVOS, P. and KESTEMONT, P. (2003): Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol. C* 135, 39-48.
120. MANDUZIO, H., MONSINJON, T., ROCHER, B., LÉBOULENGER, F. and GALAP, C. (2003): Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 64, 73-83.
121. MATOVIĆ, V., PLAMENAC-BULAT, Z. i ĐUKIĆ, D. (2004): Uticaj povećanog unošenja kadmijuma na antioksidativni zaštitni sistem. *Jugoslov. Med. Biochem.* 23, 117-126.
122. MAVELLI, I., CIRIOLO, M.R., ROSSI, L., MELONI, T., FORTELEONI, G., DE-FLORA, A., BENATTI, U., MORELLI, A. and ROTILIO, G. (1984): Favism: a hemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decrease glutathione peroxidase activities in red blood cells. *Eur. J. Biochem.* 139, 13-18.
123. MAYER, F.L., VERSTEEG, D.J., MCKEE, M.J., FOLMAR, L.C., GRANNEY, R.L., MCCUME, D.C. and RATTNER, B.A. (1992): Metabolic products as biomarkers. In: *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress* (Eds. Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M. and Bergman, H.L.), Lewis Publishers, Chelsea, USA, pp. 5-86.



124. MCCARTHY, J.F., HALBROOK, R.S. and SHUGART, L.R. (1991): Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker-based biomonitoring capability. Publication no. 3072, ORNL/TM-11783, Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA, pp. 1-85.
125. MCDERMOTT, C.M., NHO, C.W., HOWARD, W. and HOLTON, B. (1998): The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon* 36, 1981-1996.
126. MIHAJLOVIĆ, R., ĐURAN, D., MILOVANOVIĆ, D. i GAVRILOVIĆ, G. (2005): Fizičke i hemijske karakteristike vode hidrosistema Gruža. Monografija: Akumulaciono jezero Gruža (Urednici Čomić, Lj. i Ostojić, A.), Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 31-48.
127. MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1972): The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.
128. MOHAMED, Z.A., CARMICHAEL, Z.A. and HUSSEIN, A.A. (2003): Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. *Environ. Toxicol.* 18, 137-141.
129. MOLINA, R., MORENO, I., PICHARDO, S., JOS, A., MOYANO, R., MONTERDE, J.G. and CAMEÁN, A. (2005): Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicon* 46, 725-735.
130. MORENO, I., PICHARDO, S., JOS, A., GÓMEZ-AMORES, L., MATE, A., VAZQUEZ, C.M. and CAMEÁN, A.M. (2005): Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. *Toxicon* 45, 395-402.
131. NEGRI, A.P., JONES, G.J. and HINDMARSH, M. (1995): Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisons from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Toxicon*, 33, 1321-1329.

132. NETTO, L.E.S., OLIVEIRA, M.A., MONTEIRO, G., DEMASI, A.P.D., CUSSIOL, J.R.R., DISCOLA, K.F., DEMASI, M., SILVA, G.M., ALVES, S.V., FARIA, V.G. and HORTA, B.B. (2007): Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 180-193.
133. NORRIS, R.L.G., SEAWRIGHT, A.A., SHAW, G.R., SENOGLES, P., EAGLESHAM, G.K., SMITH, M.J., CHISWELL, R.K. and MOORE, M.R. (2002): Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicol* 40, 471-476.
134. NYAKAIRU, G.W.A., NAGAWA, C.B. and MBABAZI, J. (2010): Assessment of cyanobacteria toxins in freshwater fish: a case study of Murchison bay (Lake Victoria) and Lake Mburo, Uganda. *Toxicol* 55, 939-946.
135. OGNJANOVIĆ, B.I., ĐORĐEVIĆ N.Z., PERENDIJA, B.R., DESPOTOVIĆ, S.G., ŽIKIĆ, R.V., ŠTAJN, A.Š. and SAIČIĆ, Z.S. (2008): Concentration of antioxidant compounds and lipid peroxidation in the liver and white muscle of hake (*Merluccius merluccius* L.) in the Adriatic Sea. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 60, 601-607.
136. OKADO-MATSUMOTO, A. and FRIDOVICH, I. (2001): Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. *J. Biol. Chem.* 42, 38388-38393.
137. OSSWALD, J., RELLÁN, S., GAGO, A. and VASCONCELOS, V. (2007): Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ. Int.* 33, 1070-1089.
138. PAERL, H. and PAUL, V.J. (2012): Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 46, 1349-1363.
139. PAPADOPOULOS, M.C., KOUMENIS, I.L., DUGAN, L.L. and GIFFARD, R.G. (1997): Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res.* 748, 151-156.
140. PARRIS, M. and KIDD, P.D. (1997): Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern. Med. Rev.* 2, 155-176.

141. PAŠKOVÁ, V., ADAMOVSÝ, O., PIKULA, J., SKOČOVSKÁ, B., BAND'OUCHOVÁ, H., HORÁKOVÁ, J., BABICA, P., MARŠÁLEK, B. and HILSCEROVÁ, K. (2008): Detoxification and oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Sci. Total Environ.* 398, 34-47.
142. PAVAGADHI, S., GONG, Z., HANDE, M.P., DIONYSIOS, D.D., CRUZ, A.A. and BALASUBRAMANIAN, R. (2012): Biochemical response of diverse organs in adult *Danio rerio* (zebrafish) exposed to sub-lethal concentrations of microcystin-LR and microcystin-RR: a balneation study. *Aquat. Toxicol.* 109, 1-10.
143. PAVLOVIĆ, S.Z., BORKOVIĆ, S.S., KOVAČEVIĆ, T.B., OGNJANOVIĆ, B.I., ŽIKIĆ, R.V., ŠTAJN, A.Š. and SAIČIĆ, Z.S. (2008): Antioxidant defense enzyme activities in the liver of red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea: the effects of locality and season. *Fresen. Environ. Bull.* 17, 558-563.
144. PAVLOVIĆ, S.Z., BORKOVIĆ-MITIĆ, S.S., RADOVANOVIĆ, T.B., PERENDIJA, B.R., DESPOTOVIĆ, S.G., GAVRIĆ, J.P. and SAIČIĆ, Z.S. (2009): Activity of oxidative stress biomarkers in the white muscle of red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 61, 693-701.
145. PAVLOVIĆ, S.Z., BORKOVIĆ-MITIĆ, S.S., RADOVANOVIĆ, T.B., PERENDIJA, B.R., DESPOTOVIĆ, S.G., GAVRIĆ, J.P. and SAIČIĆ, Z.S. (2010): Seasonal variations of the activity of antioxidant defense enzymes in the red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea. *Mar. Drugs* 8, 413-428.
146. PEAKALL, D.W. (1994): Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1, 55-60.
147. PEDRAJAS, J.R., GAVILANES, F., LÓPEZ-BAREA, J. and PEINADO, J. (1998): Incubation of superoxide dismutase with malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. An evaluation of xenobiotics in fish. *Chem. Biol. Interact.* 116, 1-17.

148. PEDRAJAS, J.R., PEINADO, J. and LÓPEZ-BAREA, J. (1995): Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem. Biol. Interact.* 98, 267-282.
149. PEREIRA, P., ONODERA, H., ANDRINOLO, D., FRANCA, S., ARAÚJO, F., LAGOS, N. and OSHIMA, Y. (2000): Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon* 38, 1689-1702.
150. PERENDIJA, B.R., BORKOVIĆ, S.S., KOVAČEVIĆ, T.B., PAVLOVIĆ, S.Z., STOJANOVIĆ, B.D., PAUNOVIĆ, M.M., CAKIĆ, P.D., RADOJIČIĆ, R.M., PAJOVIĆ, S.B. and SAIČIĆ, Z.S. (2007a): Glutathione dependent enzyme activities in the foot of three freshwater mussel species in the Sava River, Serbia. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 59, 169-175.
151. PERENDIJA, B.R., BORKOVIĆ, S.S., KOVAČEVIĆ, T.B., PAVLOVIĆ, S.Z., STOJANOVIĆ, B.D., PAUNOVIĆ, M.M., CAKIĆ, P.D., PAJOVIĆ, S.B. and SAIČIĆ, Z.S. (2007b): The activities of superoxide dismutase and catalase in the foot of three freshwater mussel species. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 59, 17-18.
152. PERENDIJA, B.R., DESPOTOVIĆ, S.G., RADOVANOVIĆ, T.B., GAVRIĆ, J.P., BORKOVIĆ-MITIĆ, S.S., PAVLOVIĆ, S.Z., OGNJANOVIĆ, B.I., SIMIĆ, S.B., PAJOVIĆ, S.B. and SAIČIĆ, Z.S. (2011): Biochemical and ultrastructural changes in the liver of European perch (*Perca fluviatilis* L.) in response to cyanobacterial bloom in the Gruža Reservoir. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 63, 979-989.
153. PÉREZ-JIMÉNEZ, A., HIDALGO, M.C., MORALES, A.E., ARIZCUN, M., ABELLÁN, E. and CARDENETE, G. (2009): Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in *Dentex dentex* fed on different dietary macronutrient levels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 150, 537-545.
154. PÉREZ-JIMÉNEZ, A., PERES, H., RUBIO, V.C. and OLIVA-TELES, A. (2012): The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comp. Biochem. Physiol. C* 155, 506-516.

155. PERSSON, K.J., LEGRAND, C. and OLSSON, T. (2009): Detection of nodularin in European flounder (*Platichthys flesus*) in the west coast of Sweden: evidence of nodularin mediated oxidative stress. *Harmful Algae* 8, 832-838.
156. PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., OBEREMM, A., BEATTIE, K.A., KRAUSE, E., CODD, G.A. and STEINBERG, C.E.W. (1998): Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527-533.
157. PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., WERNER, S., SCHRÖDER, H. and KANKAANPÄÄ, H. (2005): Activity and substrate specificity of cytosolic and microsomal glutathione S-transferase in Australian black tiger prawns (*Penaeus monodon*) after exposure to cyanobacterial toxins. *Environ. Toxicol.* 20, 301-307.
158. PICHARDO, S., JOS, A., ZURITA, J.L., SALGUERO, M., CAMEÁN, A.M. and REPETTO, G. (2005): The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR. *Toxicol. in Vitro* 19, 865-873.
159. PICHARDO, S., JOS, A., ZURITA, J.L., SALGUERO, M., CAMEÁN, A.M. and REPETTO, G. (2007): Acute and subacute toxic effects produced by microcystin-YR an the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1. *Toxicol. in Vitro* 21, 1460-1467.
160. PINHO, G.L.L., DA ROSA, C.M., YUNES, J.S., LUQUET, C.M., BIANCHINI, A. and MONSERRAT, J.M. (2003): Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 135, 459-468.
161. PREUßEL, K., STÜKEN, A., WIEDNER, C., CHORUS, I. and FASTNER J. (2006): First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 47, 156-162.

162. PREUßEL, K., WESSEL, G., FASTNER, J. and CHORUS, I. (2009): Response of cylindrospermopsin production and release in *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) to varying light and temperature conditions. *Harmful Algae* 8, 645-650.
163. PRIETO, A., CAMPOS, A., CAMEÁN, A. and VASCONCELOS, V. (2011): Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1973-1980.
164. PRIETO, A.I., JOS, Á., PICHARDO, S., MORENO, I. and CAMEÁN, A.M. (2006): Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquat. Toxicol.* 77, 314-321.
165. PRIETO, A.I., PICHARDO, S., JOS, Á., MORENO, I. and CAMEÁN, A.M. (2007): Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* 84, 337-345.
166. PUERTO, M., CAMPOS, A., PRIETO, A., CAMEÁN, A., DE ALMEIDA, A.M., COELHO, A.V. and VASCONCELOS, V. (2011a): Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells. *Aquat. Toxicol.* 101, 109-116.
167. PUERTO, M., GUTIÉRREZ-PRAENA, D., PRIETO, A.I., PICHARDO, S., JOS, A., MIGUEL-CARRASCO, J.L., VAZQUEZ, C.M. and CAMEÁN, A.M. (2011b): Subchronic effects of cyanobacterial cells on the transcription of antioxidant enzyme genes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicology* 20, 479-490.
168. PUERTO, M., JOS, A., PICHARDO, S., GUTIÉRREZ-PRAENA, D. and CAMEÁN, A.M. (2011c): Acute effects of pure cylindrospermopsin on the activity and transcription of antioxidant enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed by gavage. *Ecotoxicology* 20, 1852-1860.

169. PUERTO, M., PICHARDO, S., JOS, Á. and CAMEÁN, A.M. (2009): Oxidative stress induced by microcystin-LR on PLHC-1 fish cell line. *Toxicol. in Vitro* 23, 1445-1449.
170. QIU, T., XIE, P., KE, Z., LI, L. and GUO, L. (2007): In situ studies on physiological and biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake. *Toxicon* 50, 365-376.
171. QIU, T., XIE, P., LI, L., GUO, L., ZHANG, D. and ZHOU, Q. (2012): Nephrotoxic effects from chronic toxic cyanobacterial blooms fishes with different trophic levels in a large Chinese lake. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 252-261.
172. RADI, A.A.R., MATKOVICS, B. and CSENGERI, I. (1987): Comparative studies of the phospholipid fatty acids and the antioxidant enzyme activities in fish with different feeding habits. *Comp. Biochem. Physiol. B* 87, 49-54.
173. RADOVANOVIĆ, T.B., BORKOVIĆ-MITIĆ, S.S., PERENDIJA, B.R., DESPOTOVIĆ, S.G., PAVLOVIĆ, S.Z., CAKIĆ, P.D. and SAIČIĆ, Z.S. (2010): Superoxide dismutase and catalase activities in the liver and muscle of barbel (*Barbus barbus*) and its intestinal parasite (*Pomphorhynchus laevis*) from the Danube river, Serbia. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 62, 97-105.
174. RANKOVIĆ, B. i SIMIĆ, S. (2005): Fitoplankton akumulacionog jezera Gruža. Monografija: Akumulaciono jezero Gruža (Urednici Čomić, Lj. i Ostojić, A.), Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 65-78.
175. RASTOGI, R.P. and SINHA, R.P. (2009): Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 27, 521-539.
176. RÄTZ, H.J. and LLORET, J. (2003): Variation in fish condition between Atlantic cod (*Gadus morhua*) stocks, the effect on their productivity and management implications. *Fish. Res.* 60, 369-380.
177. ROSSI, M.A., CECCHINI, G. and DIANZANI, M.M. (1983): Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase in two different hepatomas and in normal liver. *IRCS Med. Sci. Biochem.* 11, 805.

178. SABATINI, S.E., BRENA, B.M., LUQUET, C.M., JULIÁN, M.S., PIREZ, M. and DE MOLINA, M.C.R. (2011): Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam *Diplodon chilensis patagonicus* upon subchronic exposure to toxic *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1188-1194.
179. SCANDALIOS, J.G. (2005): Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.
180. SCHAFER, F.Q. and BUETTNER, G.R. (2001): Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191-1212.
181. SCHRAMM, M., MÜLLER, E. and TRIEBSKORN, R. (1998): Brown trout (*Salmo trutta* f. Fario) liver ultrastructure as a biomarker for assessment of small stream pollution. *Biomarkers* 3, 93-108.
182. SEDAN, D., ANDRINOLO, D., TELESE, L., GIANNUZZI, L., DE ALANIZ, M.J.T. and MARRA, C.A. (2010): Alteration and recovery of the antioxidant system induced by sub-chronic exposure to microcystin-LR in mice: its relation to liver lipid composition. *Toxicon* 55, 333-342.
183. SIMONOVIĆ, P. (2001): Ribe Srbije. NNK International, Zavod za zaštitu prirode Srbije, Biološki fakultet, Beograd, str. 1-247.
184. SIMOVIĆ, S. i MARKOVIĆ, G. (2005): Autohtone i alohtone vrste u zajednici riba u akumulacionom jezeru Gruža. Monografija: Akumulaciono jezero Gruža (Urednici Čomić, Lj. i Ostojić, A.), Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 137-151.
185. SKOCOVSKA, B., HILSCHEROVA, K., BABICA, P., ADAMOVSKY, O., BANDOUCHOVA, H., HORAKOVA, J., KNOTKOVA, Z., MARSALEK, B., PASKOVA, V. and PIKULA, J. (2007): Effects of cyanobacterial biomass on the Japanese quail. *Toxicon* 49, 793-803.
186. SMITH, J.L., BOYER, G.L. and ZIMBA, P.V. (2008): A review of cyanobacterial odours and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture* 280, 5-20.



187. STEGEMAN, J.J., BROUWER, M., RICHARD, T.D.G., FÖRLIN, L., FOWLER, B.A., SANDERS, B.M. and VAN VELD, P.A. (1992): Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress (Eds. Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M. and Bergman H.L.), Lewis Publishers, Chelsea, USA, pp. 235-335.
188. SUIKKANEN, S., KAARTOKALLIO, H., HÄLLFORS, S., HUTTUNEN, M. and LAAMANEN M. (2010). Life cycle strategies of bloom-forming, filamentous cyanobacteria in the Baltic Sea. *Deep-Sea Res. II* 57, 199-209.
189. SUN, H., YANG, W., CHEN, Y. and YANG, Z. (2011): Effect of purified microcystin on oxidative stress of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* larvae under different ammonia concentrations. *Biochem. Systemat. Ecol.* 39, 536-543.
190. SUN, Y., TANG, R., LI, D., ZHANG, X., FU, J. and XIE, P. (2008): Acute effects of microcystins on the transcription of antioxidant enzyme genes in crucian carp *Carassius auratus*. *Environ. Toxicol.* 23, 145-152.
191. ŠETLÍKOVÁ, I. and WIEGAND, C. (2009): Hepatic and branchial glutathione S-transferases of two fish species: substrate specificity and biotransformation of microcystin-LR. *Comp. Biochem. Physiol. C* 149, 515-523.
192. ŠTAJN, A.Š., ŽIKIĆ, R.V. i SAIČIĆ, Z.S. (2007): Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja. Udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 1-449.
193. TAKADA, Y., NOGUCHI, T. and KAYIYAMA, M. (1982): Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. *Cancer Res.* 42, 4233-4235.
194. TAMURA, M., OSCHINO, N. and CHANCE, B. (1982): Some characteristics of hydrogen and alkyl-hydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *J. Biochem.* 92, 1019-1031.
195. TANDOĞAN, B. and ULUSU, N.N. (2006): Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *FABAD J. Pharm. Sci.* 31, 230-237.

196. TRINCHET, I., DJEDIAT, C., HUET, H., DAO, S.P. and EDERY, M. (2011): Pathological modifications following sub-chronic exposure of medaka fish (*Oryzias latipes*) to microcystin-LR. *Reprod. Toxicol.* 32, 329-340.
197. UNDERDAL, B., NORDSTOGA, K. and SKULBERG, O.M. (1999): Protracted toxic effects caused by saline extracts of *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanophyceae/Cyanobacteria). *Aquat. Toxicol.* 46, 269-278.
198. UTERMÖHL, H. (1958): Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitt. Int. Verein. Limnol.* 9, 1-38.
199. VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M. and TELSER, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84.
200. VAN APELDOORN, M.E., VAN EGMOND, H.P., SPEIJERS, G.J.A. and BAKKER, G.J.I. (2007): Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 7-60.
201. VAN DER OOST, R., BEYER, J. and VERMEULEN, N. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
202. VAN DYK, J.C., PIETERSE, G.M. and VAN VUREN, J.H.J. (2007): Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 432-440.
203. VAN GESTEL, C.A.M. and VAN BRUMMELEN, T.C. (1996): Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicol.* 5, 217-225.
204. VASCONCELOS, V.M., WIEGAND, C. and PFLUGMACHER, S. (2007): Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. *Toxicon* 50, 740-745.
205. VOLOSHKO, L., KOPECKY, J., SAFRONOVA, T., PLJUSCH, A., TITOVA, N., HROUZEK, P. and DRABKOVA, V. (2008): Toxins and other bioactive compounds produced by cyanobacteria in Lake Ladoga. *Estonian J. Ecol.* 57, 100-110.

206. WANG, W. and BALLATORI, N. (1998): Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50, 335-355.
207. WHITE, S.H., DUIVENVOORDEN, L.J., FABBRO, L.D. and EAGLESHAM, G.K. (2007): Mortality and toxin bioaccumulation in *Bufo marinus* following exposure to *Cylindrospermopsis raciborskii* cell extracts and live cultures. *Environ. Pollut.* 147, 158-167.
208. WHO (2003): Algae and cyanobacteria in fresh water. In: *Guidelines for Safe Recreational Water Environments. Vol. 1: Coastal and Fresh Waters.* World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 136-158.
209. WHO (2011): Toxic cyanobacteria. In: *Guidelines for Drinking-water Quality, fourth edition.* World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 293-294.
210. WHO INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY - IPCS (1993): Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
211. WIEGAND, C. and PFLUGMACHER, S. (2005): Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203, 201-218.
212. WINSTON, G.W. and DI GIULIO, R.T. (1991): Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
213. XIE, L.Q., XIE, P., GUO, L.G., LI, L., MIYAVARA, Y. and PARK, H.D. (2005): Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ. Toxicol.* 20, 293-300.
214. YAMAMOTO, Y. and NAKAHARA, H. (2009): Life cycle of cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Taiwania* 54, 113-117.
215. ZAGAJEWSKI, P., GOŁDYN, R. and FABÍŚ, M. (2007): Water blooms and their toxicity in public swimming areas of lakes in the Poznań district. *Ocean. Hydrob. Studies* 36, 181-187.

216. ZELKO, I.N., MARIANI, T.J. and FOLZ, R.J. (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 337-349.
217. ZHANG, D., XIE, P., LIU, Y. and QIU, T. (2009): Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Sci. Total Environ.* 407, 2191-2199.
218. ZHANG, H., ZHANG, J., CHEN, Y. and ZHU, Y. (2008): Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage. *Fish Physiol. Biochem.* 34, 307-312.
219. ZHAO, Y., XIE, P. and ZHANG, X. (2009): Oxidative stress response after prolonged exposure of domestic rabbit to a lower dosage of extracted microcystins. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 195-199.
220. ZIMBA, P.V., KHOO, L., GAUNT, P., CARMICHAEL, W.W. and BRITTAIN, S. (2001): Confirmation of catfish mortality from *Microcystis* toxins. *J. Fish Dis.* 24, 41-47.
221. ZURAWELL, R.W., CHEN, H., BURKE, J.M. and PREPAS, E.E. (2005): Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J. Toxicol. Environ. Health B* 8, 1-37.
222. ŽEGURA, B., GAJSKI, G., ŠTRASER, A. and GARAJ-VRHOVAC, V. (2011a): Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress. *Toxicon* 58, 471-479.
223. ŽEGURA, B., ŠTRASER, A. and FILIPIČ, M. (2011b): Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. *Mutat. Res.* 727, 16-41.
224. ŽIKIĆ, R.V., ŠTAJN, A.Š., SAIČIĆ, Z.S., SPASIĆ, M.B. i MILOVANOVIĆ, S.R. (2000): Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Monografija, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 1-150.

## BIOGRAFIJA AUTORA



Branka R. Perendija, istraživač saradnik, rođena je 03.06.1982. godine u Foči (Bosna i Hercegovina). Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Arandelovcu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Biologija), upisala je školske 2001/2002 godine. Školske 2005/2006 godine bila je stipendista Fonda za mlade talente Republike Srbije. Diplomirala je 2006. godine sa prosečnom ocenom 9.76, a diplomski rad pod nazivom „Aktivnost glutation zavisnih enzima u stopalu tri vrste slatkovodnih školjki“ uradila je u Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu. Školske 2006/2007 godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija, modul Fiziologija stresa i adaptacija. Od 2007. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, a u zvanje istraživač saradnik izabrana je iste godine.

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

Do sada je objavila 23 bibliografske jedinice: 9 naučnih radova u međunarodnim časopisima, jedno poglavlje u istaknutoj monografiji nacionalnog značaja, 4 kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 9 kongresnih saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Prema Science Citation Index-u ima 5 citata.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Бранка Р. Перендија

број уписа АС060128

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Параметри антиоксидационе заштите у ткивима неких врста

слатководних риба из језера Гружа“

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

Потпис докторанда

У Београду, 17.04.2012.

Бранка Перендија

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Бранка Р. Перендија

Број уписа АС060128

Студијски програм Анимална и хумана физиологија

Наслов рада „Параметри антиоксидационе заштите у ткивима неких врста  
слатководних риба из језера Гружа“

Ментори Научни саветник др Зорица С. Саичић, Институт за биолошка  
истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

Редовни професор др Гордана Цвијић, Биолошки факултет,  
Универзитет у Београду

Потписани Бранка Р. Перендија

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 17.04.2012.

Бранка Перендија



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

„Параметри антиоксидационе заштите у ткивима неких врста

слатководних риба из језера Гружа“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

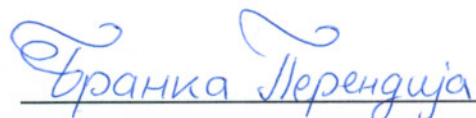
5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 17.04.2012.

  
Бранка Перендија



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

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

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

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

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

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