

PA 20775

Up. 37129484
UNIVERZITET U BEOGRADU
N. Br. 10

Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Mentori:

Prof. dr Nikola Tucic

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Jelica Lazarovic

višegodišni saradnik Instituta za biološka istraživanja "Stjepan Stankovic"

mr Milena Vlahović

Član komisije:

**EFEKAT KADMIJUMA NA RAST I BIOHEMIJSKE OSOBINE LARVI GUBARA
Lymantria dispar L.**

Doktorska disertacija



Beograd, 2009.

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
"СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ"-БЕОГРАД
И. Бр. 162 037

4-708 14

Универзитет у Београду
Биолошки факултет

г-р Милана Ђоковић

ЕФЕКАТ КАДИУМА НА РАСТ И БИОХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ ЈАРНИ ГЛУБАРА
Дипломски рад

Добарка дисертација



Београд, 2009

Mentori:

Prof. dr Nikola Tucić
redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Jelica Lazarević
viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Član komisije:

dr Vesna Perić-Mataruga
naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Ova doktorska disertacija je urađena u Odeljenju za fiziologiju i biohemiju insekata Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Rad je realizovan na projektu 143033 "Fiziološki i evolucionari aspekti stresnog odgovora u prirodnim i laboratorijskim populacijama".

Prof. dr Nikoli Tuciću dugujem posebnu zahvalnost za korisne savete i sugestije u toku izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem na pomoći dr Jelici Lazarević i dr Vesni Perić-Matarugi, kao i ostalim članovima Odeljenja za fiziologiju i biohemiju insekata: dr Veri Nenadović, mr Larisi Ilijin, mr Mariji Mrdaković, mr Dajani Todorović i Dejanu Mirčiću.

Zahvaljujem se mojoj porodici na nesebičnoj podršci.

1. UVOD

1.1 POREKLO KADMIJUMA U PRIRODI I NJEGOVA PRIMENA	2
1.2 INTERAKCIJA KADMIJUMA I ESENCIJALNIH METALA	5
1.3 INTEGRISANI ĆELIJSKI ODBRAMBENI ODGOVOR NA STRES	7
1.4 TOKSIČNI EFEKTI KADMIJUMA NA INSEKTE	11
1.4.1 Adaptacije insekata na teške metale	15
1.5 DIGESTIVNI ENZIMI I ENZIMI DETOKSIFIKACIJE	17
1.5.1 Proteaze	17
1.5.2 α -Glikozidaze	19
1.5.3 β -Glikozidaze	20
1.5.4 Esteraze	21
1.5.5 Glutation S-transferaza	22
1.6 KLASIFIKACIJA DIGESTIVNIH ENZIMA I SEKRETORNA AKTIVNOST CREVA INSEKATA	25
1.6.1 Sekretija digestivnih enzima kod fitofagnih insekata	25
1.7 ADAPTACIJE NA STRES I EVOLUCIJA	27
2. CILJ RADA	30

3. MATERIJAL I METODE

3.1 USLOVI GAJENJA	31
3.2 EKSPERIMENTALNE GRUPE	31
3.3 ODREĐIVANJE KOMPONENTI ADAPTIVNE VREDNOSTI	33
3.4 BIOHEMIJSKE METODE	34
3.4.1 Određivanje aktivnosti ukupnih proteaza	35
3.4.2 Određivanje aktivnosti tripsina	35
3.4.3 Određivanje aktivnosti leucin aminopeptidaza	36
3.4.4 Određivanje aktivnosti α -glikozidaze	37
3.4.5 Određivanje aktivnosti β -glikozidaze	38
3.4.6 Određivanje aktivnosti esteraza	38
3.4.7 Određivanje aktivnosti glutation S-transferaze	39
3.4.8 Određivanje proteina	39
3.5 ELEKTROFORETSKA DETEKCIJA ENZIMA	41
3.5.1 Proteaze	41
3.5.2 Leucin aminopeptidaza	42
3.5.3 Tripsin	43

3.5.4	Glikozidaze	43
3.5.4.1	β -glikozidaza	43
3.5.4.2	α -glikozidaza	43
3.5.5	Esteraze	44
3.5.6	Alkalne fosfataze	44
3.6	PROCENAT MASE SREDNJEG CREVA	44
3.7	STATISTIČKE METODE	45
4.	REZULTATI	
4.1	KOMPONENTE ADAPTIVNE VREDNOSTI	46
4.1.1	Mortalitet	46
4.1.2	Trajanje prvog larvenog stupnja	48
4.1.3	Trajanje razvića larvi do ulaska u četvrti larveni stupanj	52
4.1.4	Masa larvi	56
4.1.5	Relativna brzina rasta	63
4.2	KORELACIJE IZMEĐU RAZLIČITIH OSOBINA ADAPTIVNE VREDNOSTI	70
4.3	POREĐENJE KORELACIJA OSOBINA ADAPTIVNE VREDNOSTI IZMEĐU RAZLIČITIH TRETMANA	77
4.4	ENZIMI UKLJUČENI U VARENJE PROTEINA	78
4.4.1	Ukupna aktivnost proteaza	78

4.4.2	<i>Tripsin</i>	84
4.4.3	<i>Leucin aminopeptidaza</i>	90
4.5	ALKALNE FOSFATAZE	96
4.6	ENZIMI UKLJUČENI U VARENJE UGLJENIH HIDRATA	97
4.6.1	α - glikozidaza	97
4.6.2	β - glikozidaza	104
4.7	ENZIMI DETOKSIFIKACIJE	110
4.7.1	<i>Esteraze</i>	110
4.7.2	<i>Glutation S-transferaza</i>	116
4.8	PROCENAT MASE SREDNJEG CREVA	122
4.9	KORELACIJE IZMEĐU ENZIMA	130
4.9.1	<i>Korelacije između procenta mase creva i enzima</i>	132
4.10	POREĐENJE KORELACIJA IZMEĐU AKTIVNOSTI ENZIMA	137
4.11	KORELACIJE IZMEĐU OSOBINA ADAPTIVNE VREDNOSTI I AKTIVNOSTI ENZIMA	140
4.12	POREĐENJE KORELACIJA IZMEĐU OSOBINA ADAPTIVNE VREDNOSTI I AKTIVNOSTI ENZIMA	146
5.	DISKUSIJA	
5.1	DEJSTVO KADMIJUMA NA ENZIME SREDNJEG CREVA	150
5.2	DEJSTVO KADMIJUMA NA OSOBINE ADAPTIVNE VREDNOSTI	158

5.3 VARIJABILNOST	164
5.4 VARIJABILNOST ENZIMSKIH IZOFORMI	167
5.5 PLASTIČNOST	171
5.6 KORELACIJE	176
5.7 BIOMARKERI I MOGUĆNOST KORIŠĆENJA ENZIMA SREDNJEG CREVA U MONITORINGU ZAGAĐENJA ŽIVOTNE SREDINE	184
6. ZAKLJUČCI	188
7. REFERENCE	192

EFEKAT KADMIJUMA NA RAST I BIOHEMIJSKE OSOBINE LARVI GUBARA *Lymantria dispar* L.

Gubar (*Lymantria dispar* L.) spada u red najinvazivnijih polifagnih vrsta insekata, koja naseljava šume, voćnjake i urbana staništa. Veoma je otporan na štetne uticaje životne sredine. U ovom radu je kod larvi gubara trećeg dana četvrtog larvenog stupnja, ispitivan akutni i hroničan uticaj dve koncentracije kadmijuma (10 i 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane), kao i oporavak od istih, na različite osobine larvi gubara IV stupnja: komponente adaptivne vrednosti (mortalitet, trajanje prvog stupnja, trajanje razvića do ulaska u četvrti larveni stupanj, masa i relativna brzina rasta larvi), aktivnosti enzima srednjeg creva (proteaza, tripsin, leucin aminopeptidaza, α i β -glikozidaza, esteraza i glutation-S-transferaza), kao i procenat mase srednjeg creva u odnosu na masu larve.

Kod svih ispitivanih enzima, osim kod GSTa, prisutan je trend pada aktivnosti na kadmijumu u odnosu na kontrolu. Hronična izloženost kadmijumu nije pokazala značajan uticaj na mortalitet prvog stupnja, kao i ukupan mortalitet, masa larvi se smanjuje pri dugotrajnim tretmanima, dok se u toku akutnog tretmana brzina rasta larvi povećava. Analize varijanse su pokazale da se kod proteolitičkih enzima aktivnost menja u zavisnosti od koncentracije metala. Na akutnim tretmanima heritabilnost mase je statistički značajna.

Između proteolitičkih enzima na svim tretmanima najverovatnije postoji neka vrsta zajedničke regulacije sinteze ili sekrecije u prisustvu kadmijuma. Regulacioni mehanizmi β -glikozidaze i GSTa se razlikuju u odnosu na ostale proučavane enzime. Zbog ograničenih energetskih resursa postoji veliki broj negativnih korelacija između mase i enzima. Znak korelacija između α i β -glikozidaza se menja na stresu u odnosu na kontrolu.

Na različitim tretmanima kadmijumom plastičnost enzima se menja.

Na istom tretmanu se izoforme jednog enzima razlikuju između full-sib familija, dok se, takođe, izoforme istog enzima jednog legla razlikuju između više različitih tretmana.

Pošto se indeks fenotipske plastičnosti ne menja u toku delovanja kadmijuma, promena osobina adaptivne vrednosti ili njihova plastičnost, se ne mogu uzeti kao dobri indikatori prisustva kadmijuma. Zbog velike osetljivosti leucin aminopeptidaze i esteraze u toku akutnog stresa, postojanja korelacija sa velikim brojem digestivnih enzima, velike plastičnosti odgovora u stresnim uslovima, ova dva enzima bi se, uz dalja istraživanja, mogla uzeti kao potencijalni biomarkeri na prisustvo kadmijuma.

Ključne reči: *Lymantria dispar* L., kadmijum, akutni, hronični stres, oporavak, osobine adaptivne vrednosti, enzimi srednjeg creva, korelacije, plastičnost, enzimske izoforme

CADMIUM EFFECT ON GROWTH AND BIOCHEMICAL TRAITS OF GYPSY MOTH LARVAE (*Lymantria dispar* L.)

The Gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) represents one of the most invasive polyphagous insect species, which inhabits forests, orchards and even urban habitats. It is very resistant to environmental stress. We investigated the acute and chronic effects of two cadmium concentrations (10 and 30 $\mu\text{gCd/g}$ dry food), as well as the recovery from chronic stress on various traits of 4th instar gypsy moth larvae: fitness components (mortality, duration of development of the first larval instar, duration of development from hatching to molting into the 4th instar, larval mass and relative growth rate), midgut enzyme activities (activity of protease, trypsin, leucine aminopeptidase, α and β -glucosidase, esterase and glutathione S-transferase), as well as the percentage of the midgut mass in relation to the larval mass.

During the cadmium treatments, all examined enzymes, with the exception of the glutathione S-transferase, showed a decrease of activity in relation to control. Chronic exposure to cadmium did not indicate significant influence on the mortality of the first instar as well as overall mortality. Larval mass decreased during the long-term treatment, while the acute treatment resulted in the growth rate increase. The analysis of variance showed that the activity of proteolytic enzymes depended on metal concentration. Significant broad-sense heritability was discovered after short-term exposure to cadmium.

Among the proteolytic enzymes, there is probably some kind of common regulation of synthesis and secretion during the cadmium treatments. Regulation mechanisms of β -glucosidase and glutathione S-transferase differ in relation to the rest of the examined enzymes. There is a large number of negative correlations between larval mass and enzymes due to the limited energy resources. The correlation sign between α and β -glucosidases changes during the stress conditions in relation to the control.

During different cadmium treatments plasticity of enzymes is changed.

During the same cadmium treatment the isozyme patterns of one enzyme vary among full-sib families, while the isoforms of the same enzyme of the same egg-hatch differ among treatments.

As the index of phenotypic plasticity does not change during the cadmium treatments, changes of life history traits or their plasticity cannot be good indicators of cadmium presence. Due to a great sensitivity of leucine aminopeptidase and esterase during the acute stress, correlated response to a large number of digestive enzymes, great plasticity in stressful conditions, these two enzymes, with further research, could be potential biomarkers for cadmium presence.

Key words: *Lymantria dispar* L., cadmium, acute, chronic stress, recovery, life history traits, midgut enzymes, correlation, plasticity, enzyme isoforms

Stani je stanje organizma koji je izazvano rednim ili većim brojem životnih izvora vršne koji dovode organizam na sam kraj (ili čak izvori) gubitak stanične mase (Korshak et al. 2004). Glavni uzroci su fizički i organski supstancijama predstavljaju hemijske stresore iz životne sredine: hemijski polutanzi, utičući na koncentraciju i opstanak vrsta, predstavljaju potencijalnu "prituču" evolucijskim procesima kao i biodiverzitetu i funkcionalizmu ekosistema i lokalni ili globalni efekti zagađenosti atmosfera, bioturbacija ili bioturbacija direktno utiču na životne sisteme, posebno kada modifikuju lokalni ekosisteme, razni reproduktivni izazvaju oštećenja i funkcionalnu integritet i produktivnost ekosistema.

1. Uvod



U ovom radu se razmatra uticaj životne sredine na organizam i njegove funkcije. Prvo se razmatra uticaj životne sredine na molekularnom nivou. Drugo se razmatra uticaj životne sredine na ćeliji, uključujući sintezu, obradu i distribuciju strukturnih proteina i lipida, kao i promene kovalentnih veza između struktura nukleotida.

2. Sekundarni efekti podrazumevaju oštećenje DNK, oštećenje membrana i iluzivno ili utiču na ćelije na ćelije procese kao što su respiracija i produkcija energije.

3. Tercijarni efekti se odnose na posledice oštećenja i njihov uticaj na procese kao što su inhibicija metaboličkih procesa, gušenje i integracija pojedinih struktura. (Korshak et al. 2004)

Zagađenje može biti jako selektivni faktor koji utiču na genetsku varijabilnost, veličinu i brzinu jedinki, funkcionalnu varijabilnost, adaptabilnost i opstanak budućih generacija. Hronična zagađenost hemijskim polutantima dovodi do kumulativnog stresa i deluje na individualne fiziološke procese i hemiju celije i celog organizma. Zbog toga predstavlja praviu diverzitetu i integritetu različitih organizama (Fox 1995).

Stres je stanje organizma koje je izazvano jednim ili većim brojem faktora životne sredine koji dovode organizam na sam kraj (ili čak izvan) granica ekološke niše (Korsloot et al. 2004). Oksidanti, teški metali i organske supstance predstavljaju hemijske stresore iz životne sredine. Hemijski polutanti, utičući na kompeticiju i opstanak vrsta, predstavljaju potencijalnu "pretnju" evolucionim procesima kao i biodiverzitetu i funkcionisanju ekosistema. Lokalni ili globalni efekti zagađenja atmosfere, hidrosfere ili biosfere direktno utiču na žive sisteme, pa usled toga modifikuju balans metala, remete reprodukciju, izazivaju oštećenja nukleinskih kiselina i proteina.

U zavisnosti od vremena izloženosti stresoru i intenziteta samog stresa, možemo razlikovati tri nivoa oštećenja u živim organizmima:

1. Primarni efekti koji se javljaju na molekularnom nivou. Ovi efekti mogu obuhvatati sintezu aberantnih polipeptida, oksidaciju i denaturaciju strukturnih proteina i lipida, kao i promene kovalentnih veza enzima i strukture nukleotida.
2. Sekundarni efekti, podrazumevaju oštećenja DNK, ćelijskih membrana i filamenata što utiče na ćelijske procese kao što su respiracija i produkcija energije.
3. Tercijarni efekti se odnose na posledice oštećenja tj. njihov uticaj na procese kao što su: inhibicija metaboličkih procesa, gubljenje integriteta pojedinih struktura, itd. (Korsloot et al. 2004).

Zagađivači mogu biti jaki selektivni faktori koji utiču na genetičku varijabilnost, veličinu i brojnost jedinki, funkcionalnu varijabilnost, adaptabilnost i opstanak budućih generacija. Hronična izloženost hemijskim polutantima dovodi do kumulativnog stresa i deluje na individue, narušava fiziološke procese i hemijski status ćelije i celog organizma. Zbog toga predstavlja pretnju diverzitetu i opstanku različitih organizama (Fox 1995).

Osnova stabilnosti bilo kog ekosistema je sposobnost populacije da se adaptira na nepredvidljive uslove životne sredine. Jedan od prvih efekata zagađenja na životinjski svet, koji je istovremeno predstavljao evolucionu promenu, zabeležen u Velikoj Britaniji, je pojava melanizna kod vrste *Biston betularia* usled povećanja čađi u vazduhu (Howlett & Majerus 1987). Istraživanja selektivne toksičnosti i otpornosti na pesticide i druge toksične materije ukazuju da su promene na nivou metabolizma najvažniji pokazatelj osetljivosti (Walker & Oesch 1983).

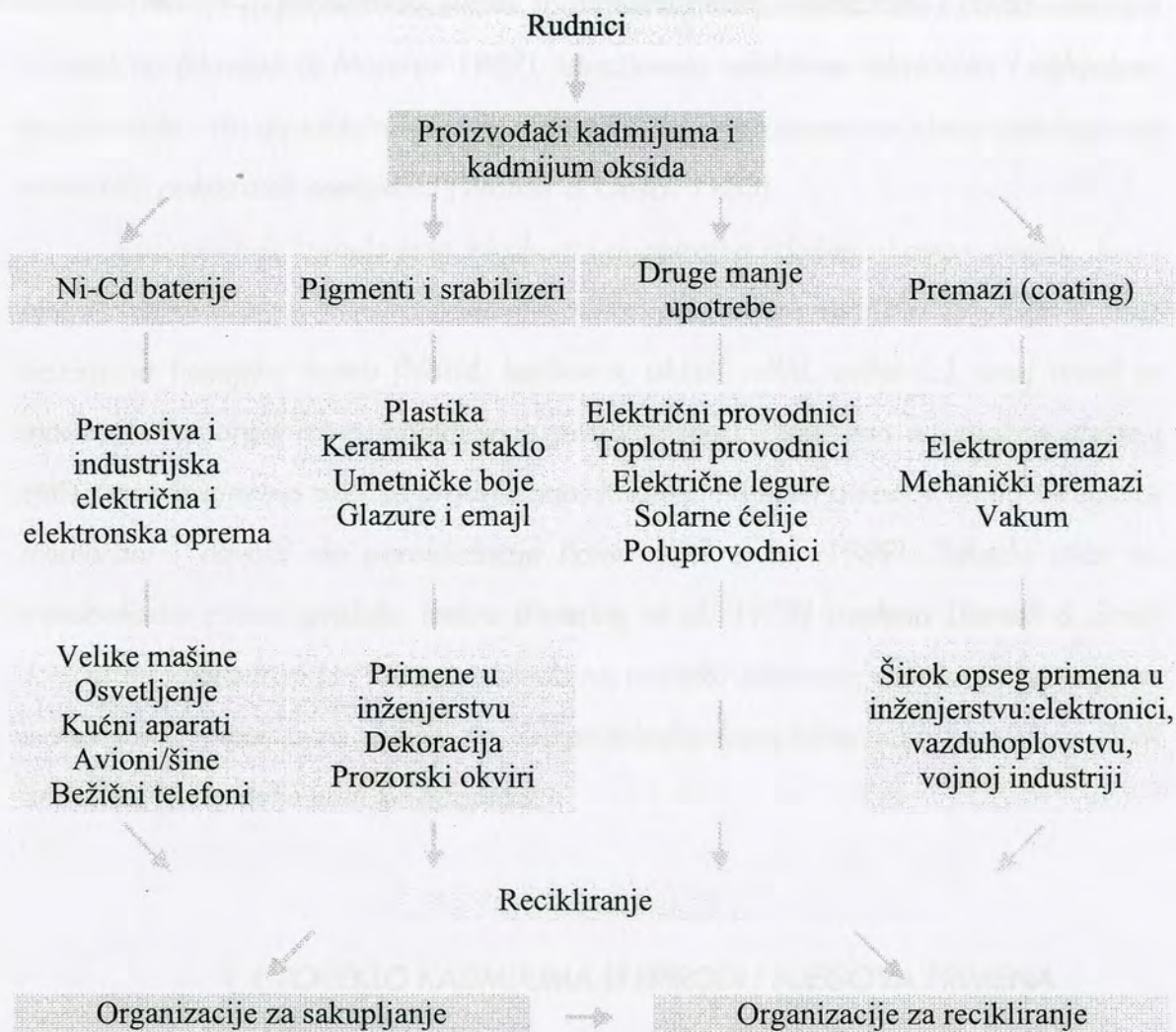
Kadmijum je kumulativan toksikant i dugotrajna izloženost ovom metalu, kao i njegovo prisustvo u hrani predstavlja veliku pretnju za različite organizme. Bez obzira na hemijsku formu (hlorid, karbonat, oksid, sulfid, sulfat ...), ovaj metal se može uneti u organizam inhalacijom, preko hrane i kože, ima teratogene efekte i utiče na embrionalno razviće organizama. Kadmijum utiče na sastav lipida u ćelijskoj membrani i dovodi do peroksidacije lipida (Gill et al. 1989). Takođe utiče na metabolizam cinka, gvožđa, bakra (Petering et al. 1979) i selena (Jamall & Smith 1985). Xu i saradnici (1995) su uočili da na početku toksičnog delovanja kadmijuma u testisima, metal prvo deluje na Zn-proteinske komplekse koji kontrološu DNK transkripciju što dalje vodi ka apoptozi.

1.1 POREKLO KADMIJUMA U PRIRODI I NJEGOVA PRIMENA

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji kadmijum spada u velike zagađivače životne sredine (WHO 1992a,b). Iako nema nikakvu fiziološku funkciju, detektovan je u više od 1000 vrsta vodene i kopnene flore i faune. Kadmijum se uglavnom koristi za proizvodnju Ni-Cd baterija (70%), za pravljenje pigmenata za boje (13%), kao antikorozivni premaz za metale (8%), stabilizator za plastiku (7%), kao dodatak legurama i za elektronske komponente (2%). U prirodi se nalazi u zemljinoj kori, zemljištu, stenama, uglju. Erozijske stene, šumski požari, vulkanske erupcije su prirodni

procesu koji emituju Cd u životnu sredinu. Njegova koncentracija u vazduhu je 0,1–5 ng/m³, zemljinoj kori 0,1–5 µg/g, morskim sedimentima oko 1 µg/g i u morskoj vodi oko 0,1 µg/L (ATSDR 1999). Interesantno je da je apsorpcija kadmijuma iz cigara veća nego iz kadmijumovih aerosola (Nordberg et al. 1985). Hemijska forma kadmijuma iz duvanskog dima je jako slična onoj koja se proizvodi u toku sagorevanja u industrijski postrojenjima, a to su prvenstveno aerosoli kadmijum oksida.

Primena kadmijuma (International Cadmium Association)



1.2 INTERAKCIJA KADMIJUMA I ESENCIJALNIH METALA

Toksičnost teških metala se zasniva i na kompeticiji esencijalnih i neesencijalnih metala. Utvrđeno je da su po veličini joni kadmijuma slični jonima kalcijuma, tako da joni kadmijuma ulaze u ćeliju putem kalcijumovih kanala (Braeckman et al. 1999). Ovaj fenomen je demonstriran kod velikog broja organizama korišćenjem agenasa koji blokiraju Ca^{2+} kanale (Borowitz & McLaughlin 1992; Roesijadi & Unger 1993; Zaroogian & Anderson 1995; Endo et al. 1996). Potpuno blokiranje ulaska kadmijuma u ćeliju može se postići unošenjem verapamila, koji je specifičan inhibitor Ca^{2+} kanala (Roesijadi & Unger 1993).

Mnogi istraživači smatraju da osnova toksičnosti kadmijuma potiče od njegovog negativnog uticaja na enzimske sisteme u ćeliji. Naime, kadmijum ima sposobnost zamene metalnih jona u metaloenzimima, uglavnom Zn^{2+} , Cu^{2+} i Ca^{2+} , kao i veliki afinitet za strukture koje sadrže $-\text{SH}$ grupe, kao što su proteini, enzimi i nukleinske kiseline (Jacobson & Turner 1980; Stohs & Bagchi 1995). Interakcija kadmijuma sa esencijalnim metalima može se odvijati u različitim fazama apsorpcije, distribucije i ekskrecije bioelementa i kadmijuma, kao i u toku biološke funkcije esencijalnih elemenata (Brzoska & Moniuszko-Jakoniuk 2001).

Metal-metal interakcije u organizmu su važan faktor akumulacije kadmijuma i njegovog toksičnog delovanja, a nagomilavanje metala u različitim orgnizmima kao i sam proces detoksifikacije i ekskrecije se razlikuju između vrsta. Cink je kofaktor u preko 300 različitih enzima. Pronađen je u gotovo svim tkivima (EPA 2005) i ima ulogu u rastu, razviću i funkcionisanju svih živih ćelija (Bray & Bettger 1990, Nishi 1996). Brojne studije su pokazale da cink može da smanji toksičnost kadmijuma (Waalkes et al. 1989; Coogan et al. 1992; Brzoska et al. 2001). Veličina jona Cd^{2+} je između jona Zn^{2+} i Hg^{2+} (Jacobson & Turner 1980). Osim toga, Cd^{2+} i Zn^{2+} imaju sličnu elektronsku konfiguraciju na njihovim spoljnim orbitalama. Za razliku od Cd, Zn je stabilan u dvovalentnom stanju i ne podleže redoks promenama. Iako oba metala imaju visok afinitet za biološke strukture koje sadrže sulfhidrilne grupe, afinitet

Uvod

kadmijuma za S–ligande , kao i za N–donore je veći nego cinka (Jacobson & Turner 1980; Jones & Cherian 1990). S obzirom da je cink često kofaktor enzima uključenih u replikaciju, transkripciju i translaciju, njegova zamena kadmijumom može značajno ugroziti preživljavanje organizama (Bray & Bettger 1990; Lohmann & Beyersmann 1993).

Toksične količine kadmijuma mogu smanjiti apsorpciju cinka (Lönnerdal 2000). Studije sprovedene na izolovanim ćelijama ili membranama proksimalnih tubula bubrega kao i tankom crevu ukazuju da cink i kadmijum mogu da imaju zajednički transport i/ili mehanizme vezivanja u transportu kroz epitel (Tacnet et al. 1990; 1991; Prasad et al. 1996). Iako se smatra se da je kod sisara crevo jedan od osnovnih organa gde se odvija interakcija između ova dva metala postoji malo podataka o njihovim direktnim efektima na srednje crevo (Andersen et al. 1994; Ohta & Cherian 1995). Smatra se da uklanjanje ili premeštanje cinka iz slabo vezanih ekstracelularnih proteina, od strane kadmijuma ili nekih drugih dvovalentnih metala, utiče na mehanizam kojim se indukuje sinteza metalotioneina (Palmiter 1994). Novija karakterizacija transportera dvovalentnih metalnih jona u epitelu, ukazuju da cink možda deli apsortivne mehanizme sa velikim brojem dvovalentnih katjona uključujući kadmijum, bakar, gvožđe i olovo (Gunshin et al. 1997; Fleming et al. 1999).

1.3 INTEGRISANI ĆELIJSKI ODBRAMBENI ODGOVOR NA STRES

Invertebrate poseduju veliki broj puteva ćelijske detoksifikacije kojim se redukuje količina štetnih metala koji cirkulišu u telesnim tečnostima (Ahearn et al. 2004). Mehanizmi eliminacije metala su sledeći:

- Fiziološki regulatorni mehanizmi usklađuju stepen ekskrecije metala sa stepenom unosa iz spoljašnje sredine. Neke vrste sa povećanim unosom metala povećavaju i stepen njegove ekskrecije.
- Mehanizmi unutarćelijske sekvestracije uključuju visoko-afinitetna mesta vezivanja metala za proteine sa malom molekulskom masom, poznate kao metalotioneini. Utvrđeno je da molekuli kadmijuma dovode do indukcije sinteze metalotioneina, glutationa i proteina toplotnog stresa. Na ovaj način vrši se detoksifikacija, i smanjenje štetnog efekta metala do određenog nivoa (Maroni 1990; Roesijadi 1992; Chin & Templeton 1993; Bauman et al. 1993). Eliminacija ovih kompleksa se obavlja preko lizozomalnog sistema.
- Intracelularni sekvestracioni procesi u kojima se formiraju specifične vakuole sa fosfornim ili sumpornim granulama za koje se vezuju metali. Postoje tri tipa granula koje služe za detoksifikaciju i ekskreciju (Hopkin 1989). Tip B je po sastavu organskog porekla i uvek sadrži sumpor za koji su vezani kadmijum, olovo, bakar, cink, gvožđe zbog velikog afiniteta ovih metala za SH grupe (Hopkin et al. 1989; Hopkin 1990). Drugi tip granula koji sadrži teške metale su tzv. A granule. S obzirom da se sastoje od kalcijum i magnezijum orto- i pirofosfata sa malim organskim komponentama, za njih se vezuju metali poput cinka, mangana, kalijuma i olova (Howard et al. 1981; Masson & Simkiss 1982; Taylor et al. 1986; Hopkin 1989). Kadmijum nije detektovan u A granulama. Još nije tačno određena funkcija C granula, ali se smatra



da imaju vezu sa metalotioneinima, a samim tim i deponovanjem kadmijuma (Hopkin 1989). Svi tipovi granula su detektovani u crevu insekata, što ukazuje na moguću ulogu ovog organa u detoksifikaciji. Ove granule se eliminišu iz ćelije egzocitozom.

Postavlja se pitanje koje su to specifičnosti kod individue koje uslovljavaju različitost odgovora svakog sistema na stres. Takođe je značajno odrediti najvažnije efekte stresora koji dovode do zajedničkih reakcija svih ili većine odbrambenih sistema. Kako i do kog nivoa ovi sistemi zajednički reaguju, tako da se mogu smatrati integrisanim sistemom? Pod integrisanim odbrambenim sistemom podrazumevaju se manje ili više nezavisni sistemi od kojih je svaki odgovoran za specifičan „zadatak“ (Korsloot et al. 2004).

Efekti stresora

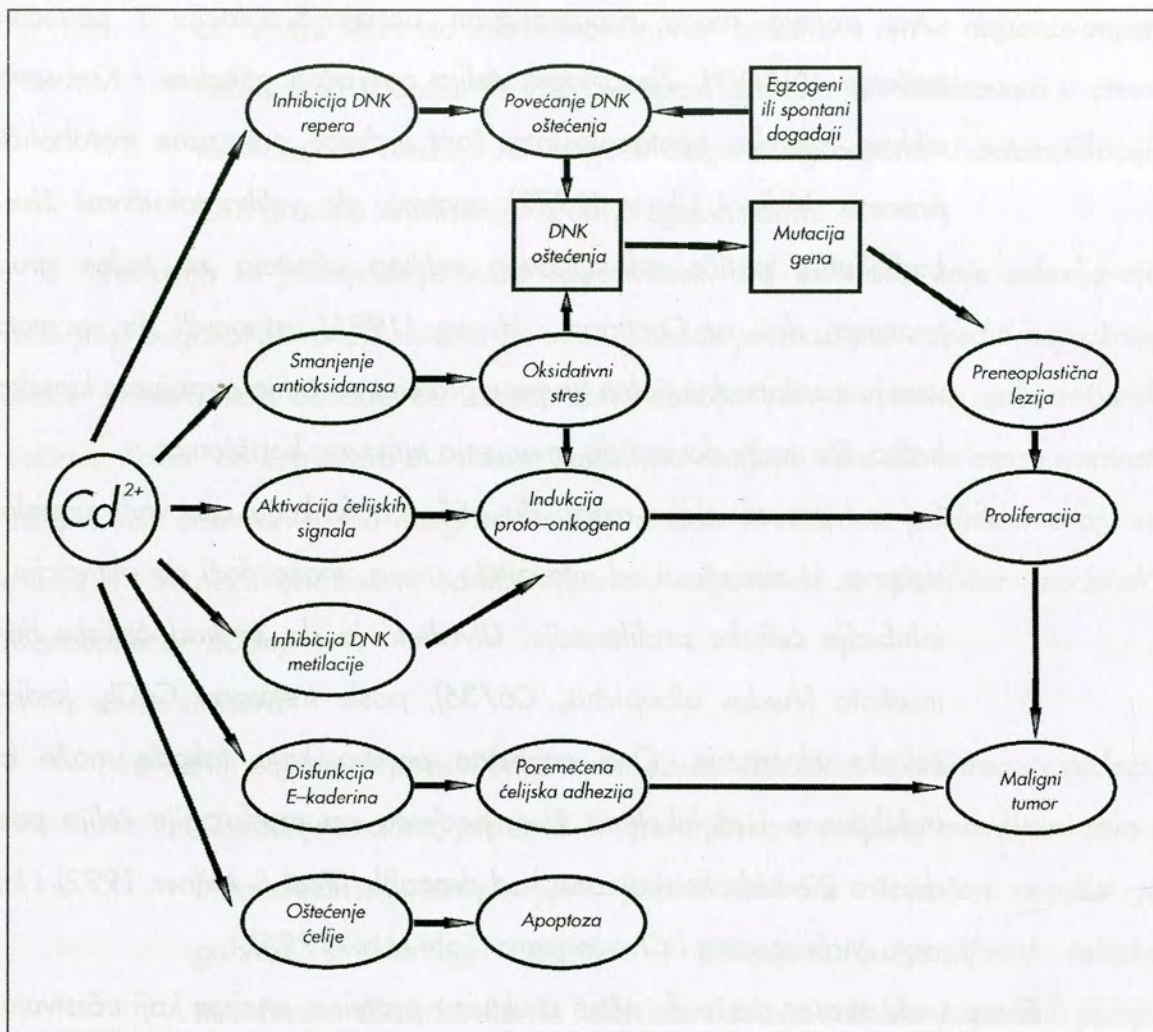
Najvažniji zajednički stresni odgovori izazvani različitim stresorima su sledeći:

1. Oštećenje enzima, proteina ili lipida (kako u ćelijskoj membrani tako i intracelularno), remećenjem njihove strukture. Konačan rezultat je gubitak strukturnog integriteta i povećana propustljivost ćelijske membrane. Ovo dovodi do smanjene funkcije i oštećenja jonskih pumpi i kanala. Na ovaj način se remeti homeostaza esencijalnih metala. Dokazano je da teški metali remete homeostazu kalcijuma (Cheung 1984; Hinkle et al. 1992).
2. Denaturacija, oksidacija, zamena metala (kofaktora) u aktivnom centru, a samim tim i inhibicija enzima. Na ovaj način dolazi do nepravilnog funkcionisanja enzimskih sistema.
3. Dva prethodno pomenuta efekta stresora uslovljavaju inhibiciju disanja i sinteze ATP-a oksidativnom fosforilacijom. Zbog toga dolazi do prelaska na anaerobni način produkcije energije, da bi se uspostavio fiziološki odnos $NAD^+/NADH$. Na ovaj način se sprečava prekidanje glikolize.



4. Oksidacija tiolnih grupa dovodi do smanjenja reduktanata kao što je glutation. Tako se ćelijsko redoks stanje pomera ka oksidujućoj sredini. Ova pojava može prouzrokovati protein-S-tiolaciju i povećano trošenje NADPH. Zbog toga, ćelija na račun glikolize i Krebsovog ciklusa, aktivira pentozofosfatni šant i druge povezane metaboličke procese. Valle i Ulmer (1972) smatraju da velika toksičnost žive i kadmijuma potiče od njihovog velikog afiniteta za tiolne grupe proteina, dok su Corrigan i Huang (1981) ustanovili da se metali vezuju za slobodne tiolne grupe u proteinima ćelija ovarijuma kineskog hrčka, što može dovesti do smanjenja njihovog korišćenja.
5. Svi ovi procesi dalje mogu da utiču na funkciju osnovnih signalnih sistema. U zavisnosti od intenziteta stresa, može doći do aktivacije ili inhibicije ćelijske proliferacije. Utvrđeno je da se kod ćelijske linije insekata (*Aedes albopictus*, C6/36), posle tretmana $CdCl_2$, javljaju ćelijske ekstenzije. Ova neobična pojava koja takođe može biti indukovana i molekulima žive, podseća na morfologiju ćelija posle dejstva 20-hidroksiekdizona kod drozofile (Peel & Milner 1992) i kod vrsta *Malacosoma* i *Christoneura* (Sohi et al. 1995).

Skoro svaki stresor može da ošteti strukturne proteine, enzime koji učestvuju u metaboličkim procesima, zatim u DNK sintezi i reparaciji, kao i enzime i proteine odbrambenog sistema uključujući antioksidativni sistem i metalotioneine. U ovim slučajevima aktiviraju se proteini stresa koji učestvuju u reparaciji oštećenih proteina ili sprečavaju dalja oštećenja. Međutim, ovakva situacija je samo privremena zato što se sintetišu novi proteini i enzimi koji ponovo uspostavljaju narušeni balans po prestanku delovanja stresora.



Molekularni i ćelijski mehanizmi kadmijuma (Waisberg et al. 2003)

1.4 TOKSIČNI EFEKTI KADMIJUMA NA INSEKTE

Mnoge studije su proučavale aktivnost enzima iz creva gubara (Valaitis 1995, Perić-Mataruga et al. 1997, Lazarević et al. 1998, Lee et al. 1998; Lazarević et al. 2004; Mrdaković et al. 2008), dok su podaci o uticaju teških metala na digestivne enzime još uvek šturi (Vlahović 2003; Vlahović et al. 2009, in press). Kadmijum utiče na metabolizam, rast i razviće kod vrste *Boettcherisca peregrina* (Wu et al. 2006). Ortel (1995a) je utvrdila da hronična izloženost kadmijumu, bakru i cinku smanjuje ukupne proteine hemolimfe, ali povećava ukupne slobodne amino kiseline kao i ukupne proteine u organizmu kod larvi gubara četvrtog stupnja. Ista naučnica je takođe otkrila (1996) da se pri koncentraciji kadmijuma od 10 i 30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane značajno smanjuje količina trehaloze, dok se koncentracija glukoze i glikogena značajno povećava na 10 $\mu\text{g Cd}$. Interesantno je da je na pomenutoj koncentraciji kadmijuma veći porast ova dva parametra nego na koncentraciji od 30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane. Obe koncentracije kadmijuma kod gubara takođe utiču na smanjenje koncentracije lipida kako u hemolimfi tako i u celom organizmu (Ortel 1995b). Nivo trehaloze u hemolimfi gubara opada u toku tretmana kadmijumom Bischof (1995). Promena biohemijskih parametara organizama je detektovana i na drugim insektima. Shin i saradnici su (2001), koristeći različite koncentracije kadmijuma (od 1.25 do 40 $\mu\text{g Cd/g}$ sveže hrane), utvrdili da kod vrste *Galleria mellonella* dolazi do pada sadržaja ukupnih lipida sa povećanjem koncentracije metala. Ova pojava je detektovana u različitim razvojnim stadijumima velikog voštanog moljca: četvrtog larvenog stupnja, poslednjeg larvenog stupnja i lutke. Nakon ubrizgavanja 5 $\mu\text{g Cd}$ u *Chrysocoris stoli* utvrđeno je da je promena nivoa lipida, proteina i ugljenih hidrata u hemolimfi, masnom telu i ovarijumima u toku pomenutog akutnog stresa tkivno specifična (Islam & Roy 1983).

Istraživanja na različitim vrstama lepidoptera su pokazala da u toku izloženosti teškim metalima dolazi do smanjenja rasta, kao i umanjena reprodukcije



(Zelenayora 1986). Ako se $2\mu\text{gCd/g}$ sveže težine ubrizga u vrstu *Locusta migratoria*, ćelije masnog tela se ne diferenciraju, a smanjuje se i produkcija jaja kod ženki (Martoja et al. 1983).

Kod larvi *Oncopeltus faciatu*s koje su bile izložene različitim koncentracijama CdCl_2 utvrđen je značajan mortalitet nimfi pri koncentraciji kadmijuma od 30mg/L (to je ujedno i LC_{50}). Takođe, sa porastom koncentracije kadmijuma produžava se i trajanje stadijuma nimfe, dok težina adulta opada. Značajno je i da je preživljavanje ženki bilo smanjeno već na koncentracijama većim od 10mgCd/L , dok je smrtnost mužjaka bila povećana na koncentracijama većim od 30mgCd/L . Već na 10mgCd/L fekunditet i fertilitet ženki su se smanjivali (Cervera et al. 2004).

Kod ćelija koje su izložene stresu dolazi uglavnom do oksidativnih ili strukturalnih oštećenja proteina. Mnogi oštećeni proteini ne mogu biti „popravljeni“ pa zato bivaju podvrgnuti proteolitičkoj degradaciji ili se regenerišu u de novo sintezi. Tri osnovna procesa su odgovorna za uklanjanje oštećenja kod proteina: a) reparacija oksidativnih oštećenja, b) ponovno uspostavljanje pravilne strukture proteina i c) proteoliza (Kültz 2005). Jedan od univerzalnih ćelijskih integrisanih odgovora na stres je inhibicija rasta i proliferacije. Braeckman i saradnici (1997) su utvrdili da čak i ekstremno male koncentracije kadmijuma dovode do ozbiljne inhibicije proliferacije kod kulture ćelija *Aedes albopictus*.

Takođe, u toku delovanja stresora dolazi do modulisanja i preusmeravanja osnovnih energetske puteva metabolizma. Migula i saradnici (1997) su utvrdili da u svim razvojnim stadijumima crvenog šumskog mrava kadmijum i živa povećavaju količinu AMP, dok se smanjuje sadržaj ATPa. Ovo je najverovatnije posledica povećane potrošnje ATPa za odbrambene procese u toku delovanja stresora. Oni su takođe utvrdili da kadmijum stimuliše esteraze. Međutim, Kramarz i Kafel (2003) su utvrdili da kod lutki vrste *Spodoptera exigua*, nakon višegeneracijskog izlaganja cinku i kadmijumu u hrani, kadmijum, za razliku od cinka, nije izazvao nikakve promene u intenzitetu respiracije. Relaxans i saradnici (1988) ističu postojanje dva moguća

načina metaboličkog odgovora na kadmijum, pri čemu jedan isključuje drugi. Prvi način, uključuje privremeno (prolazno) povećanje intenziteta metabolizma, a drugi podrazumeva kasnije smanjenje metabolizma u skladu sa mogućnošću da zadovolji potrebe za ATPom. Sibly i Calow (1989) smatraju da mehanizmi detoksifikacije mogu da koriste energiju koja se troši na procese povezane sa adaptivnom vrednošću organizma, pa zato najčešće dolazi do inhibicije rasta ili reprodukcije.

Najveći broj insekata unosi teške metale u organizam putem hrane. Drozofila, u zavisnosti od toga koji metal unese u organizam, poseduje specifična tkiva u kojima ih deponuje. Tako se bakar uglavnom apsorbuje u kuprofilnim ćelijama srednjeg creva, cink i bakar u Malpigijevim tubulama, a kadmijum u epitelijalnim ćelijama srednjeg creva (Durliat et al. 1995). Epitelne ćelije preuzimaju teške metale i sa unutrašnje strane ka lumenu creva, ali i iz hemolimfe (Dallinger 1993; Posthuma & van Straalen 1993). U početku povećana koncentracija metala dovodi do indukcije sinteze metalotioneina za koji se i vezuju. Maroni i saradnici (1987) su utvrdili da kod prirodnih populacija drozofile može doći do duplikacije gena za metalotionein, što uslovljava bržu reakciju ćelija u detoksifikaciji. Široko je prihvaćena hipoteza da je duplikacija gena prvi korak u evoluciji novih gena. Duplicirani geni mogu da izbegnu pritisak prirodne selekcije i da akumuliraju mutacije koje su neophodne da bi se stvorio gen sa novom funkcijom.

Beaty i saradnici (2002) smatraju da epitel srednjeg creva kod vodenih artropoda predstavlja toksikološki važan organ za monitoring zagađenosti životne sredine. Bakar i kadmijum remete peritrofni matriks vodenih artropoda, koji sekretuju ćelije epitela srednjeg creva. Identifikovana su i okarakterisana dva gena u srednjem crevu koje indukuju teški metali, dok drugi geni koje aktiviraju metali (MRG—metal responsive genes) još nisu okarakterisani. Jedan MRG kodira intestinalni mucin koji štiti crevo od toksina i patogena. Drugi MRG je gen za tubulin i utiče na održavanje strukture i funkcije ćelija srednjeg creva. Metalotioneini imaju osnovnu funkciju u detoksifikaciji kadmijuma. Vezivanje ovog metala za metalotionein umanjuje njegovo

vezivnje za druge ćelijske strukture. Sinteza metalotioneina se indukuje u prisutvu jona teških metala (Roesijadi 1992). Joni metala bivaju preuzeti od strane metal-regulišućeg faktora (MRF), koji se zatim vezuje za metal-regulišući element na DNK i indukuje sintezu metalotioneina (Maroni 1990; Roesijadi 1992). Kod insekatskih vrsta *Peronarcys californica* i *Locusta migratoria* detektovani su glikoproteini koji nisu metaloproteinske prirode, a poseduju sposobnost vezivanja jona metala (Maroni 1990). Kod *drözofila* dolazi do duplikacije gena za metalotionein, pri čemu su te jedinke otpornije na jone bakra i kadmijuma (Maroni et al. 1987).

Na larvama komarca, *Aedes aegypti*, je proučavana anatomska osnova toksičnosti teških metala (Rayms-Keller et al. 1998). Stepem mortaliteta larvi trećeg instara, koje su bile izložene živi, bakru i kadmijumu zavisi i od vrste metala i od doze. Gubitak peritrofne membrane u crevu je detektovan u prisustvu metala. Naime, mogu nastati greške u sintezi i/ili sekreciji jedne ili više komponenti peritrofne membrane koje sintetišu kardia ćelije kao rezultat toksičnih efekata teških metala na ćeliju ili zbog „kompromisa“ celokupne adaptivne vrednosti organizama izloženih metalima. Nepostojanje adekvatne strukture peritrofne membrane može nastati i usled greške u polimerizaciji i međusobnom povezivanju (engl. crosslinkage) proteina i hitina membrane u lumenu srednjeg creva.

S obzirom da se metali ne mogu degradovati potrebno je da dođe do njihove izolacije u određenim tkivima. Takva pojava se naziva sekvestracija (ili kompartmentalizacija) i jedan je od načina detoksifikacije. Sposobnost sekvestracije poseduju i ćelije crevnog epitela. Tu se metali deponuju u granulama (tri tipa granula), koje su inače deo lizozomalnog sistema (Hopkin 1989; Dallinger 1993; Posthuma & van Straalen 1993). Na ovaj način se skladišti značajna količina metala. Sadržaj granule se egzocitozom može izbaciti iz organizma (Dallinger 1993; Lauverjat et al. 1989). Pojedine vrste, kao *Orchesella cincta* (Collembola), eliminišu metale u toku presvlačenja, odbacujući epitel u kome su deponovani metali (Posthuma 1992). Zato se ovi insekti smatraju dekoncentratorima teških metala (Dallinger 1993).

Postoje razlike između vrsta u adaptaciji na teške metale. Tako je dokazano da je *Formica polyctena* bolje adaptirana na industrijske polutante i lakše toleriše višak jednog metala nego vrsta *Formica aquilonia* iz jako zagađenih sredina. Druga vrsta pokazuje veću korelaciju između akumulacije kadmijuma u tkivima i biohemijskih markera (enzima antioksidativnog stresa i esteraza). Ali, kod ove vrste više energije se troši na procese detoksifikacije (Migula et al. 1993). Akumulacija kadmijuma kod vrste *Proisotoma minuta* linearno raste sa povećanjem koncentracije metala u zemljištu. Međutim, koncentracija kadmijuma je neznatno smanjena kod životinja koje su nekoliko meseci bile izložene metalu, a zatim prebačene na nekoliko dana u nezagađenu sredinu. Najverovatnije da je ova vrsta zahvaljujući ekfolijaciji epitela srednjeg creva adaptirana na prisustvo metala u zemljištu (Nursita 2004).

1.4.1 Adaptacije ¹²isekata na teške metale

Obzirom da su insekti najrasprostranjenija vrsta živih organizama i naseljavaju veliki broj staništa, smatra se da imaju dobro razvijene mehanizme adaptacija na prisustvo ksenobiotika u životnoj sredini. Adaptacije su najverovatnije species specifične. Utvrđeno je da su neke vrste jedne familije odsutne na zagađenim staništima, dok druge vrste koje pripadaju istoj familiji uspešno naseljavaju isto stanište (Hågvar & Abrahamsen 1990). Populaciona poređenja kod vrste *Orchesella cincta* otkrila su da postoje razlike u efikasnosti ekskrecije kadmijuma (Posthuma et al. 1992), osobinama životne istorije (Posthuma et al. 1993), toleranciji na kadmijum (Posthuma 1990), kao i ravnoteži u organizmu između cinka i kadmijuma (Posthuma et al. 1992). Nasledna tolerancija na arsen utvrđena je kod pet od ukupno osam vrsta iz familija Ixodidae (Matthewson & Baker 1975). Analizom 22 alozima kod vrste *Orchesella cincta* utvrđena je korelacija između frekvencije alela za glutamat

oksalooacetat transaminazu i tolerancije na kadmijum (Fрати et al. 1992). Adaptacije kod drozofile uključuju duplikaciju gena za metalotionein (Maroni et al. 1987).

Pošto teški metali ne deluju na jedno ciljno mesto u organizmu, kod insekata je razvijeno više mehanizama koji utiču na otpornost jedinke. U te mehanizme se ubrajaju kako bihejvioralne promene kojima se izbegava unošenje toksikanata, tako i različiti procesi detoksifikacije: sekvestracija, kompartmentalizacija i ekskrecija. Npr. karabide su označene kao "dekoncentratori" zato što poseduju mogućnost detoksifikacije ekskrecijom vezikula ili ćelija koje sadrže metale (Janssen et al. 1991). Sekvestracija je proces akumulacije metala u organima u kojima ne dovode do štetnih efekata. Tako se kod insekata, metali mogu deponovati u egzoskeletu i glavi (Van Straalen & Donker 1994), crevu (Hopkin & Martin 1983), testisima i ovarijumima (Schmidt & Ibrahim 1994), dok su kod Lepidoptera srednje crevo i Malpigijevi sudovi mesta sa najvećom koncentracijom kadmijuma (Suzuki et al. 1984). Kompartmentalizacija je utvrđena u kutikuli skakavaca i karabida. Ova pojava je povezana sa procesom otvrdnjavanja nekih organa, npr. mandibula (Hillerton & Vincent 1982) ili detoksifikacijom u toku presvlačenja preko egzuvija (Lindqvist & Block 1994; Lindqvist et al. 1995).

Utvrđeno je da se kod populacija vrste *Chironomus riparius* (Diptera) adaptiranih i neadaptiranih na kadmijum, više od 80% kadmijuma nalaziti u crevu. Populacije larvi *C. riparius* koje su u prirodi bile naseljene u staništu sa velikom koncentracijom kadmijuma, imaju mogućnost skladištenja velike količine metala, kao i povećanu efikasnost ekskrecije tj. veći stepen eliminacije kadmijuma iz creva (Postma et al. 1996).

Vrste *Deilephila elpenor* (Nuorteva et al. 1992), *Folsomia candida* (Fountain & Hopkin 2001), *Folsomia fimatarioides*, *Isotomiella minor* (Bengtsson et al. 1994) i *Orchesella cincta* (Joosse & Verhoef 1983) izbegavaju unošenje hrane u kojoj se nalaze teški metali. Ako je koncentracija metala u životnoj sredini veća može doći do gladovanja.

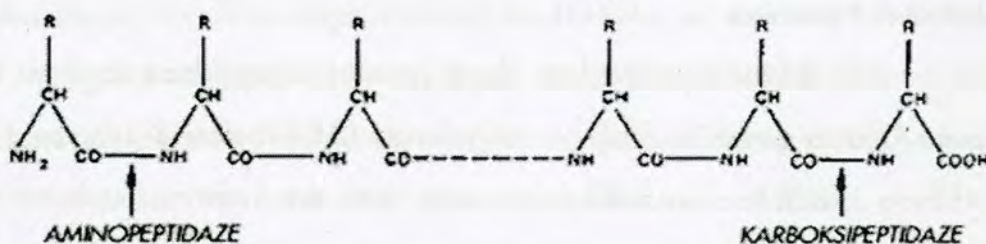
1.5 DIGESTIVNI ENZIMI I ENZIMI DETOKSIFIKACIJE

1.5.1 Proteaze

Digestivni enzimi su hidrolaze. Peptidaze (peptidne hidrolaze, EC 3.4) hidrolizuju peptidne veze. Dele se na endopeptidaze (EC 3.4.21–24) i egzopeptidaze (EC 3.2.4.11–19). U egzopeptidaze spadaju enzimi koji hidrolizuju peptidnu vezu, amino kiselinu sa N-terminalnog domena (aminopeptidaze, EC 3.4.11) ili sa C-terminalnog domena (karboksipeptidaze, EC 3.4.16–18), a takođe i oni koji su specifični za dipeptide (dipeptidne hidrolaze, EC3.4.13).

Aminopeptidaze (EC 3.4.11), hidrolizuju peptidnu vezu na N domenu peptidnog lanca. Klasifikovane su u zavisnosti od metalnih jona koji su neophodni za njihovu aktivnost. Obično se radi o jonima Zn^{2+} ili Mn^{2+} . pH optimum je bazan i kreće se najčešće od 7.2–9, dok su molekulske mase u opsegu od 90–130 kDa (Terra et al. 1996). S obzirom da je ova vrsta enzima zavisna od dvovalentnih metala, smatra se da su oni smešteni u njihovom aktivnom centru (Ferreira & Terra 1986). Aminopeptidaze mogu hidrolizovati veliki broj supstrata.

Mehanizam delovanja amino i karboksipeptidaza:



U zavisnosti katalitičkog mehanizma, specifičnih supstrata ili vrednosti pH na kojoj je aktivan, proteinaze su podeljene na potklase. Specifičnost se jedino koristi u identifikaciji individualnog enzima unutar potklase (Terra et al. 1996). Serin proteinaze imaju serin i histidin u aktivnom mestu (EC 3.4.21). U ovu grupu spada jedan od najvažnijih enzima tripsin (EC 3.4.21.4) (Terra & Ferreira 1994). On cepa

proteinske lance na mestu L-amino kiselina kao što su arginin ili lizin. Tripsin-like enzimi su pronađeni kod skoro svih insekatskih vrsta. Većina tripsina ima molekulsku masu od 20–35kDa, a pH optimum im je bazan, uglavnom između 8 i 9. Međutim, tripsini izolovani iz srednjeg creva Lepidoptera imaju veći pH optimum koji je uskladen sa većim pH creva. Za razliku od kičmenjačkih tripsina, insekatske ne aktiviraju i ne stabilizuju kalcijumovi joni (Lemos & Terra 1992). Takođe je utvrđeno da se obrada prekursora insekatskih tripsina odigrava drugačije u odnosu na vertebrate (Terra & Ferreira 1994). Cisteinske proteinaze (EC 3.4.22) poseduju cistein u aktivnom centru, a inhibiraju ih jedinjenja žive. Aktivnost cisteinskih proteinaza su prvi put demonstrirane kod hemiptera (Terra & Ferreira 1994) i koleoptera (Murdock et al. 1987; Wolfson & Murdock 1990). Interesantno je da srednje crevo larve *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae) osim serinskih proteinaza poseduje i proteinaze koje potiču iz polenovih zrna (Schumaker et al. 1993). Aspartatnim proteinazama (EC 3.4.23) je potrebna karboksilna grupa za aktivnost i imaju pH optimum ispod 5. Metaloproteinaze (2.3.24) zahtevaju jone metala za odvijanje katalitičkih procesa.

Kod drozofile je utvrđeno da tri izozima dipeptidaza kodiraju tri nezavisna gena koja su genetički udaljena od gena za LAP (Voelker & Langley 1978; Laurie-Ahlberg 1982). Kod drozofile su okarakterisane dve izoforme leucin aminopeptidaza, LAP P (pupal) i LAP G (gut), koje su vezane za ćelijsku membranu ili lokalizovane u intraćelijskim vezikulama (Hall 1988a,b). Lap izozimi su kod drozofile mapirani na poziciji 98.3 na trećem hromozomu u međusobno čvrstoj vezi (Beckman & Johnson 1964; Falke & MacIntyre 1966). Postoji mišljenje da je LAP primarna, a možda i jedina peptidaza uključena u osmoregulaciju aminokiselinskog i oligopeptidnog pula (Hiraizumi et al. 1992).

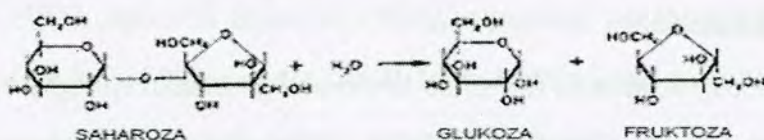
Blahovec i saradnici (2006) su utvrdili smanjenje peptidolitičke aktivnosti kod vrste *Musca domestica* pod uticajem teških metala, dok delimično prečišćene

aminopeptidaze iz vrste *Morimus funereus* imaju manju aktivnost pod uticajem dvovalentnih jona kadmijuma, cinka i kobalta (Božić et al. 2003).

1.5.2 α -Glikozidaze

α -Glikozidaze (EC 3.2.1.20) sa različitom efikasnošću hidrolizuju α -1,4 vezu kod glukoze koja ulazi u sastav aril-glikozida (u koje spada i sintetički supstrat p-nitrofenil- α -D-glukozid), disaharida ili oligosaharida (Terra et al. 1996).

Mehanizam delovanja glikozidaza:



Kod vrste *Apis mellifera* α -glukozidaza ima molekulsku masu od 82kDa i poseduje i transglukozidaznu aktivnost, tj. mogućnost formiranja oligosaharida transferom molekula glukoze ili maltoze. Inhibira je Tris, a ova forma se najverovatnije sintetiše u hipofaringealnoj žlezdi (Huber & Mathison 1976). Kod iste vrste u abdomenu je pronađena druga izoforma od 100kDa, pa se smatra da bi njena uloga bila razlaganje α -glukozida u srednjem crevu (Huber 1975). Forma ovog enzima vezana za perimikrovilarnu membranu u srednjem crevu vrste *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) ima molekulsku masu 138kDa, katalizuje hidrolizu različitih α -glukozida samo jednim aktivnim centrom i poseduje pet manjih centara potrebnih za pravilnu aktivnost enzima (Silva & Terra 1995). Kod *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) detektovano je više izoformi α -glukozidaza (Ferreira et al. 1999). Osnovna forma od 112kDa je aktivna sa melobiozom i rafinozom, dok je manja forma od 70 kDa aktivna sa digalaktozil digliceridima. Hidrolizu maltoze i finalnu digestiju skroba vrše izoforme od 74 i 94kDa. Još nije poznato koji je prirodni supstrat za α -glukozidazu od 93 kDa.

α -Glikozidaze srednjeg creva insekata imaju veliki broj zajedničkih osobina, od kojih je i već pomenuta inhibicija Tris-om. Molekulske mase su najčešće u opsegu od 60–80kDa, što ukazuje na postojanje oligomernih enzima. Subjedinice su pronađene kod drozofile, gde je detektovana forma enzima od 200kDa (Tanimura et al. 1979). Interesantno je da je pH optimum za α -glikozidaze srednjeg creva insekata između 5 i 6.5, bez obzira na pH creva (Terra et al. 1996).

1.5.3 β -Glikozidaze

β -Glikozidaze katalizuju hidrolizu terminalnog neredukujućeg β -1,4-vezanog monosaharida iz odgovarajućeg glikozida. U zavisnosti od vrste monosaharida koji je pomeren β -glikozidaze mogu biti β -glukozidaze (odvajaju molekul glukoze), β -galaktozidaze (odvajaju molekul galaktoze), β -ksilozidaze (ksilozu), itd. pH optimum ovih enzima je od 6.2–6.5, ali nezavisno od pH creva, pH optimum može biti i veći. Npr. kod Lepidoptera može ići do 7 (Terra et al. 1996).

Insekatske β -glikozidaze mogu biti podeljene u tri grupe u zavisnosti od njihove specifičnosti za supstrat (Terra & Ferreira 1994). Klasa 1 uključuje enzime koji imaju glikozil β -glikozidaznu i aril β -glikozidaznu aktivnost. To su enzimi aktivni sa p-nitrofenil- β -D-glukozidima (NP β Glu), p-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidom (NP β Gal), p-nitrofenil- β -D-fukozidom (NP β Fuc), laktozom itd. U klasu 2 se ubrajaju samo oni enzimi koji sa velikom efikasnošću hidrolizuju celobiozu i laktozu. Enzimi koji poseduju aril (ili alkil) β -glikozidaznu aktivnost spadaju u treću klasu. Oni imaju značajnu aktivnost sa NP β Glu i sličnim supstratima. Iako klase 1 i 2 imaju različitu specifičnost za supstrate ubrajaju se u tipične β -glukozidaze (EC 3.2.1.21, Terra et al. 1996). β -glukozidaza digestivnog trakta ima važnu ulogu u interakciji između insekta i biljke (Mattiacci et al. 1995; Marana et al. 2000). Do sada je Spodoptera frugiperda jedina vrsta Lepidoptera kod koje je kloniran ovaj enzim (Marana et al. 2001). Ekspresija β -glukozidaze kod svilene bube na transkripcionom

nivou pokazala je da je ekspresija gena za ovaj enzim isključivo u srednjem crevu. Znači da je srednje crevo specifično mesto za sintezu β -glukozidaze (Byeon et al. 2005).

1.5.4 Esteraze

Esteraze su grupa multifunkcionalnih i visoko polimorfnih hidrolitičkih enzima. Do sada su detektovane četiri osnovne klase esteraza: arilesteraze, acetilesteraze, karboksilesteraze, i holinesteraze. Svaka klasa je definisana specifičnošću za određeni supstrat, osetljivošću na određene inhibitore i amino kiselinama u aktivnim centrima (Tavares et al. 1998). Kod insekata je utvrđeno da esteraze utiču na regulaciju juvenilnog hormona (Kort & Granger 1981), na digestivne procese (Kapin & Ahmad 1980; Jones & Brancoft 1986), otpornost na insekticide (Fournier et al. 1993) i reprodukciju (Mane et al. 1983). Interesantno je da su supstrati na koje deluju ovi enzimi rastvorljivi u vodi. Uloga esteraza u digestiji još nije sasvim jasna, ali se smatra da bi jedna od funkcija mogla biti hidroliza holesterola i vitaminskih estara (Terra et al. 1996). U zavisnosti od lokalizacije razlikuju se i izoforme esteraza. Ipak, prava funkcija ovih enzima još nije razjašnjena.

Tavares i sradnici (1998) su detektovali šest izoformi esteraza kod *Triatoma infestans*, iz hemolimfe i Malpigijevih sudova. Između različitih polova nije bilo razlike u izoformama enzima. Takođe je ispitivano i dejstvo inhibitora. Najjače izražena elektroforetska traka je inhibirana od strane PMSF i malationa, dok sulfhidrilna jedinjenja i eserin sulfat nisu uticali na aktivnost. Zbog toga je zaključeno da je ova forma esteraza možda karboksilesteraza, koja sadrži u aktivnom mestu serin. Za razliku od ovog tipa esteraza, acetiltransferaze su u manjoj meri osetljive na PMSF, dok su holinesteraze inhibirane od strane organofosfatnih jedinjenja i eserin sulfata.

Karboksilesteraze imaju ulogu u detoksifikaciji supstanci iz životne sredine kao što su npr. insekticidi (Zhu & Brindley 1990; Prabhakaran & Kamble 1995). Ovaj tip esteraza ima nisku specifičnost za supstrat te stoga može hidrolizovati i estarske i

amidne veze u ksenobioticima (Jokanović et al. 2001). Holinesteraza je target za organofosfatna i karbamatna jedinjenja, pa je ona često inhibiraju (Xu & Bull 1994).

Chattopadhyay i saradnici (2001) su kod svilene bube u sadržaju creva, elektroforetski detektovali ukupno 5 izoformi nespecifičnih esteraza (α i β) u zavisnosti od supstrata (α ili β naftilacetata). Utvrđeno je da u srednjem crevu svilene bube postoje termostabilne esteraze (Liu et al. 1984). Wu & Hou (1993) su došli do zaključka da soj svilene bube koji ima veću aktivnost određene izoforme α -esteraze u srednjem crevu, poseduje veću tolerantnost na visoke temperature.

Kapin & Ahmad (1980) su na larvama gubara utvrdili da su karboksilesteraze predominantni enzimi u svim tkivima osim u mozgu i nervnom stablu. U srednjem crevu je u najvećoj meri prisutna karboksilesteraza, zatim aril i u najmanjoj meri holinesteraza. Mnogi istraživači smatraju da su esteraze uključene u procese apsorpcije i/ili digestije lipida (Eguchi & Iwamoto 1975; Turunen & Chippendale 1977). Kod Lepidoptera koje su polifagni insekti visoka aktivnost esteraza je u korelaciji sa širokim opsegom domaćina (Turunen & Chippendale 1977). Za razliku od drugih insekata, kod Lepidoptera celo crevo može biti uključeno u apsorpciju i digestiju (Berridge 1970). Osim toga, prednje i zadnje crevo su znatno manji od srednjeg creva, tako da je osnovna pretpostavka da se u srednjem crevu odigrava i digestija i apsorpcija u kojima učestvuju esteraze (Kapin & Ahmad 1980).

1.5.5 Glutation S-transferaza

Glutation S-transferaze predstavljaju familiju multifunkcionalnih enzima koji su uključeni u detoksifikaciju velikog broja ksenobiotika uključujući insekticide (Salinas & Wong 1999). Ona katalizuje reakciju konjugacije elektrofilnih molekula sa redukovanim glutationom (GSH) stvarajući produkt koji je rastvoran u vodi i može se lako ekskretovati (Habig et al. 1974). Konjugacijom se neutrališu elektrofilna mesta

lipofilnih supstrata i na taj način od elektrofilnog napada štite ćelijske komponente, nukleofilni kiseonik i azot u DNK (Enayati et al. 2005).

U zavisnosti od lokalizacije enzima u ćeliji, dele se na mikrozomalne i citosolne. Kod drozofile postoji jedan mikrozomalni GST gen u genomu, dok komarac *Anopheles gambiae* ima tri GST gena (Toba & Aigaki 2000; Ranson et al. 2002). Mikrozomalne forme GSTa su trimerni, membranski vezani proteini.

Dve udaljene klase citosolnih GSTa, kod kućne muve, su označene kao klasa I i II (Fournier et al. 1992). Razlika između ove dve klase je u sledećem: klasa II je kodirana jednim genom (Reiss & James 1993; Snyder et al. 1995), dok klasu I, kod vrsta *Anopheles mosquitoes*, *Drosophila melanogaster* i *Musca domestica*, kodira multigenaska familija (Toung et al. 1993; Zhou & Syvanen 1997; Ranson et al. 2002). Insekatska klasa II i tzv. sigma klasa GSTa različitih organizama, od nematoda do sisara, imaju zajedničko poreklo (Agianian et al. 2003). Klasa I je jedinstvena kod insekata i dobila je naziv Delta GST. Druga velika klasa GSTa, specifična za insekte, je Epsilon klasa (Ranson et al. 2001). Ova klasa se nezavisno širila kod drozofile i komarca, pa se smatra da ovi enzimi imaju važnu ulogu u adaptaciji ovih vrsti na uslove životne sredine (Ranson et al. 2002). Veći deo ostatka citosolnih insekatskih GSTa pripadaju Zeta, Teta i Omega klasi (Board et al. 2000; Ranson et al. 2002). Molekulske mase beskičmenjačkih glutation S-transferaza se kreću u opsegu od 36–50 kDa. Najčešće se sastoje iz dve subjedinice (koje mogu biti identične) i koje imaju molekulske mase između 20 i 27 kDa (Clark 1989b).

Najviše podataka za aktivnost antioksidativnih enzima postoji za holometabolne insekte. Važno je istaći da kod ove vrste enzima postoji velika varijabilnost u aktivnosti u zavisnosti od vrste, stupnja razvića kao i starosti insekata u svakom stupnju razvića (Ahmad & Pardini 1990; Ahmad et al. 1995). Tako je kod vrste *Delia floralis* nivo GSTa najveći u toku stadijuma larve i lutke, dok kod imaga aktivnost ovog enzima opada za polovinu (Stenersen et al. 1987). Nasuprot tome, kod *Triatoma infestans*, aktivnost sa CDNBom progresivno se povećava od jajeta,

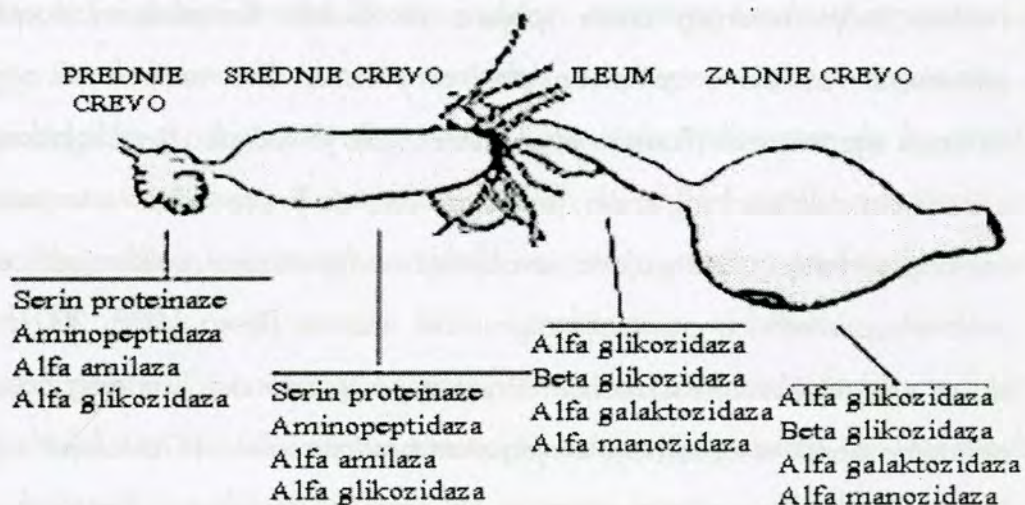
preko nimfe, a maksimalnu aktivnost GST postiže kod adulta. Kod ove vrste mužjaci imaju do 70% veću aktivnost GST nego ženke (Wood et al. 1986). Za razliku od pomenutih insekata, vrsta *Hylobius abietis* pokazuje veoma malo variranja u aktivnosti ovog enzima u toku njenog životnog ciklusa (Stenersen et al. 1987). Utvrđeno je da aktivnost GST zavisi i od vrste tkiva ili organa. Tako je visoka aktivnost detektovana u organima koji imaju funkciju u detoksifikaciji kao što su crevo (Kotze & Rose 1987; Stenersen et al. 1987), kutikula (Kotze & Rose 1987), Malpigijevi sudovi (Wood et al. 1986), masno telo (Kotze & Rose 1987).

Kod vrste *Musca domestica*, *Trichoplusia ni* i *Spodoptera eridania* koje su bile izložene različitim pro-oksidantnim alelohemikalijama aktivnost antioksidativnih enzima, uključujući i GST, raste (Zaman et al. 1995; Ahmad et al. 1995; Migula & Glowacka 1996). Međutim, u nekim drugim slučajevima tretmani nisu uticali na ove aktivnosti (Zaman et al. 1995). Kadmijum je pro-oksidant koji može da produkuje ROS (reaktivne kiseonične vrste) kao i da dovede do oštećenja ćelijskih lipida. U eksperimentima sa vrstom *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae), koncentracija kadmijuma od 200 mgCd/l ne utiče na aktivnosti katalaze i GSTa (Cervera et al. 2003). Po mišljenju Cervere i saradnika ne sme se isključiti mogućnost direktne inhibicije enzima (katalaze i GST). Naime, u eksperimentima in vitro utvrđeno je da su glutation reduktaza i GST inhibirani od strane kadmijuma koji se vezuje za cisteinske ostatke (Dieter et al. 1982; Chrestensen et al. 2000). Koncentracija kadmijuma od 20 mgCd/l ne utiče ni na lipidnu peroksidaciju ni na nivo antioksidativnih enzima (Cervera et al. 2003). Moguće je da je bazalni nivo antioksidativnih enzima u stanju da održi ROS homeostazu, ili da dolazi do nekih drugih vidova detoksifikacije, npr. metalotioneinima, lizozomima, sekvencijom koji značajno umanjuju koncentraciju teških metala u organizmu.

1.6 KLASIFIKACIJA DIGESTIVNIH ENZIMA I SEKRETORNA AKTIVNOST CREVA INSEKATA

1.6.1 Sekrecija digestivnih enzima kod fitofagnih insekata

Marana i saradnici (1996) su proučili ultrastrukturu i sekretornu aktivnost creva ortoptera. Saznanja o kompartmentalizaciji (podeli creva na delove), podržavaju hipotezu da se digestivni enzimi sintetišu i ekskretuju u svim ćelijama srednjeg creva (Ferreira et al. 1990). Takođe, ugljeni hidrati i proteini se razgrađuju u srednjem crevu kao i na prelazu srednjeg i zadnjeg creva. Jedan manji deo intermedijarne i finalne digestije se vrši na površini ceke i ventrikularnih ćelija. Najdominantniji enzimi u ćelijama i sadržaju srednjeg creva čine aminopeptidaze (solubilne i membranski vezane) i tripsin (Anstee & Charnley 1977, Ferreira et al. 1990). Kod vrste *Tenebrio molitor* digestivni enzimi, osim β -glukozidaze, se sintetišu i ekskretuju egzocitozom, kao odgovor na prisustvo hrane.



Shemtski prikaz građe creva i mesta sinteze enzima kod *Acromyrmex subterraneus* (Milton et al. 2004)

Na osnovu tehnika ćelijskog frakcionisanja i transmisione elektronske mikroskopije, utvrđeno je da kod se gusenica *Erinnyis ello* (Santos et al. 1986), karabida i larvi *tenebria* (Ferreira & Terra 1989; Ferreira et al. 1990), sekrecija β -glukozidaze obavlja egzocitozom. Sekretorni mehanizam zavisi uglavnom od regiona srednjeg creva. Tako se kod adulta komarca tripsin sekretuje egzocitozom u posteriornom regionu srednjeg creva (Graf et al. 1986). Kod muve u larvenom stadijumu (Lemos & Terra 1992, Jordao et al. 1996) i kod gusenica *Erinnyis ello* (Santos et al. 1986) tripsin se sintetiše u ćelijama srednjeg creva u aktivnoj formi, ali je spojen sa membranskim vezikulama. Ove vezikule migriraju do vrha ćelije i prekursori tripsina se pre sekrecije prevode u solubilnu formu. Anteriorne ćelije srednjeg creva sekretuju amilazu apokrinim mehanizmom, dok se tripsin nalazi u sekretornom vezikulama i sekretuje se u zadnji deo srednjeg creva (Cristofolleti et al. 2001). Kod larvi *Tenebrio molitor* najveća količina β -glikozidaze je primećena u središtu ćelija srednjeg creva spojena sa Goldži kompleksom i unutar malih sekretornih vezikula u apikalnom delu citoplazme. Ove vezikule se najverovatnije izbacuju egzocitozom (Ferreira et al. 2002). Iako je veći deo β -glikozidaze sintetisan u srednjem delu srednjeg creva, jedan deo enzima je pronađen i u anteriornom delu crevnog sadržaja. Ova pojava se objašnjava hipotezom reciklirajućih enzima (ili endo-ektoperitrofična cirkulacija digestivnih enzima) (Terra 1990, 2001). Smatra se da se enzimi izbacuju sekrecijom fluida u posteriorni deo srednjeg creva, a zatim dolazi do ponovne apsorpcije u njegovom prednjem delu. (Crostofolleti et al. 2001). Kao posledica toga primećeno je smanjenje gradijenta digestivnih enzima u luminalnom sadržaju.

1.7 ADAPTACIJE NA STRES I EVOLUCIJA

Populacije mogu različito reagovati na dejstvo toksikanata. Toksikanti mogu imati subletalne efekte kao što su redukovan rast i razviće organizma. Osetljivost individua u okviru jedne populacije može varirati zbog različitih bioloških uticaja (Forbes et al. 1995; Calow et al. 1997) kao što su stupnjevi razvića (Grime 1989) ili veličina jedinke (Kiffney & Clements 1996). Subletalni toksični efekti mogu biti izmereni energetske promene. Tako se npr. posmatra redukcija energije raspoložive za rast (engl. *scope for growth*), tj. energije koja se može koristiti za rast i reprodukciju nakon procesa detoksifikacije. Moguće je da u okviru jedne populacije različiti stupnjevi razvića imaju različitu osetljivost na teške metale. Utvrđeno je da populacije koje imaju nižu stopu rasta imaju i smanjeno preživljavanje i fekunditet (Lingjærde et al. 2001). Postavlja se pitanje da li je adaptivna vrednost kod adulta uslovljena toksikantima unetim od strane adulta ili je posledica unošenja toksikanata u toku larvenog razvića (Moe et al. 2001).

Nepovoljni faktori životne sredine redukuju adaptivnu vrednost organizma ili populacije. Da bi prevazišli ovakvo smanjenje adaptivne vrednosti organizmi ili populacije odgovaraju fenotipski ili genetički i razvijaju mehanizme da bi smanjili štetan uticaj stresa (Bijlsma & Loeschcke 2005). U opštem smislu adaptacije su promene u organizmu koje nastaju u skladu sa novim uslovima sredine pri kojima organizmi (ili grupa organizama) stiču karakteristike uključujući promene u morfologiji, fiziologiji ili ponašanju. Ovakve promene se mogu desiti fenotipski unutar jednog genotipa. U tom slučaju su fenotipske adaptacije rezultat tzv. fenotipske plastičnosti. To je sposobnost genotipa da promeni fenotip u skladu sa uslovima spoljašnje sredine (Bijlsma & Loeschcke 2005). Fenotipske adaptacije mogu biti morfološke promene (Gabriel 2005; Relyea 2005), ili npr. uticaj maternalnih efekata (Andersen et al. 2005). Kadmijum dovodi do smanjenog fekunditeta i preživljavanja kod vrste *Lucilia sericata*, dok larve iste vrste, koje su izložene kadmijumu, imaju

smanjenu stopu rasta (Simkiss et al. 1993). Adaptacije mogu obuhvatati promene u okviru frekvencije alela, koje su rezultat selekcionog pritiska (Lindgren & Laurila 2005; David et al. 2005; Sørensen et al. 2005). Ovakav tip promena je poznat kao genetička adaptacija ili evoluciona adaptacija (Bijlsma & Loeschcke 2005).

Adaptivna svojstva mogu takođe biti rezultat kontrolisanih odgovora u kojima selekcija ne deluje direktno na posmatrano svojstvo (Hoffmann et al. 2005; Malherbe et al. 2005). Važno je istaći da su neki, ako ne i većina korelisanih odgovora i/ili uzajamnih ograničenja (engl. trade-off) genotipski (populaciono) i/ili sredinski specifični (Bijlsma & Loeschcke 2005).

Iako se malo zna o dinamici adaptivnih procesa utvrđeno je da se mnogi organizmi brzo prilagođavaju na promene u životnoj sredini koje je izazvao čovek: pesticide, zagađenje, termalni stres, itd. (Woods 1981; Macnair 1997; Hoffmann et al. 2003). Prema Ronaldu Fišeru evolucija na genetičkom nivou teče zahvaljujući velikom broju nezavisnih alelskih zamena na lokusima, pri čemu svaka zamena ima malo uticaja na adaptivnu vrednost (Fisher 1930). Sa druge strane Wright (1931) je smatrao da su populacije okarakterisane koadaptiranim kombinacijama alela na interagujućim lokusima. Wrightova teorija može objasniti (negativne) epistatičke interakcije, cenu otpornosti na neki stresor i kompenzatornu evoluciju. Po Fišeru prirodna selekcija će u osnovi uvek biti u mogućnosti da poboljša adaptabilnost populacije ukoliko postoji dovoljan broj genetičkih varijacija. Ipak, po Fišeru, kada su populacije male i evolutivni potencijal za adaptivnu evoluciju postaje ograničen, verovatnoća će igrati osnovnu ulogu za dalji opstanak populacije, bez obzira da li će ona ići u smeru evolutivnih promena ili će izumreti.

Inicijalni odgovor na promenu uslova sredine prvenstveno zavisi od nivoa genetičke varijabilnosti populacije. Još nije jasno koliko je ograničen broj adaptivnih varijacija u prirodnoj populaciji. Kvantitativni modeli nastali u eksperimentima sa prirodnom selekcijom (Kristensen et al. 2005), kao i brzi odgovor mnogih organizama na pesticide, sugerišu da postoji više nego dovoljan broj genetičkih

varijacija koje su u mogućnosti da kod mnogih populacija dovedu do evolutivnog odgovora. Međutim, postoji malo podataka o tome da li je ovaj nivo varijacija dovoljan da unapredi dugotrajne adaptivne procese ili dugotrajna evolucija i adaptacija većinom zavise od fiksacija korisnih mutacija (Bijlsma & Loeschcke 2005). Npr. evolucija otpornosti na pesticide sugerise da je uključeno nekoliko gena sa jakim (velikim) uticajem, dok kvantitativno genetički eksperimenti ukazuju da više gena, sa manjim efektom, upravlja većim brojem osobina.

Pretpostavka da početni kratkotrajni odgovor organizama zavisi uglavnom od genetičke varijabilnosti unutar populacija je od velikog značaja za poremećeni ekosistem gde je priroda visoko fragmentisana. Tu su populacije obično male i izolovane, te podležu genetičkom driftu (i inbridingu). Usled toga dolazi do smanjivanja genetičke varijabilnost, te populacije su osetljivije na sredinski stres (Bijlsma & Loeschcke 2005) i dolazi do smanjenog evolutivnog potencijala (Kristensen et al. 2005).

Cilj rada je ispitivanje genetičke i plastične fenotipske komponente, kao i delatovanja izoliranih digestivnih i detoksifikacionih enzima u toku akutnog, hroničnog stresa i oporavka. Analizirane su osobine adaptivne vrednosti (morfološke, trajanje pruge stupnja, trajanje razvoda do ulaska u četvrti larvni stupanj, masa larvi i relativna brzina rasta), aktivnost enzima srednjeg creva larvi gubara (α-amilaza, tripsina, leucin aminopeptidaza, α- i β-glikozidaza, esteraza i glution S-transferaze), defekcija izobeni oksalnih kiselakza, kao i određivanje procenta mase srednjeg creva u odnosu na masu celih larvi pri različitim tretmanima kadmijskim

2. Cilj rada



ovim stresor različitim koncentracijama kadmijsuma na osobine adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima u srednjem crevu larvi gubara, kao i varijabilnost ovih osobina individualne performanse.

2. Analizirati korelacije između različitih osobina u okviru jedne sredine i utvrditi da li dolazi do promene korelacione strukture između kontrole i tretmana na kadmijsuma.
3. Proceniti plastičnost i varijabilnost plastičnosti individualne performanse larvi u odgovoru na pravstvo kadmijsuma u hrani.
4. Odrediti enzimske izolirane i utvrditi da li dolazi do promene u broju i nivou ekspresije izoliranih enzima u toku delovanja različitih tretmana kadmijsumom (akutnog, hroničnog i oporavka).
5. U toku delovanja različitih efekata kadmijsuma utvrditi osećivost proučavanih parametara, kako osobina povezanih sa adaptivnom vrednošću organizma (osobine adaptivne vrednosti), tako i aktivnosti enzima i ispitati mogućnost njihovog korišćenja kao markera izloženosti stresu (eng. exposure biomarkers).

Cilj rada je ispitivanje genetičke i plastične fenotipske komponente, kao i detektovanje izoformi digestivnih i detoksifikacionih enzima u toku akutnog, hroničnog stresa i oporavka. Analizirane su osobine adaptivne vrednosti (mortalitet, trajanje prvog stupnja, trajanje razvića do ulaska u četvrti larveni stupanj, masa larvi i relativna brzina rasta), aktivnost enzima srednjeg creva larvi gubara (aktivnosti proteaza, tripsina, leucin aminopeptidaza, α i β -glikozidaza, esteraza i glutation S-transferaze), detekcija izoformi alkalnih fosfataza, kao i određivanje procenta mase srednjeg creva u odnosu na masu cele larve pri različitim tretmanima kadmijumom.

Ciljevi ove teze su sledeći:

1. Utvrditi efekat različitih koncentracija kadmijuma na osobine adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima u srednjem crevu larvi gubara, kao i varijabilnost ovih osobina individualne performanse.
2. Analizirati korelacije između različitih osobina u okviru jedne sredine i utvrditi da li dolazi do promene korelacione strukture između kontrole i tretmana na kadmijumu.
3. Proceniti plastičnost i varijabilnost plastičnosti individualne performanse larvi u odgovoru na prisustvo kadmijuma u hrani.
4. Odrediti enzimske izoforme i utvrditi da li dolazi do promene u broju i nivou ekspresije izoformi enzima u toku delovanja različitih tretmana kadmijumom (akutnog, hroničnog i oporavka).
5. U toku delovanja različitih efekata kadmijuma utvrditi osetljivost proučavanih parametara, kako osobina povezanih sa adaptivnom vrednošću organizma (osobine adaptivne vrednosti), tako i aktivnosti enzima i ispitati mogućnost njihovog korišćenja kao markera izloženosti stresu (engl. exposure biomarkers).

3.1 USLOVI GALPIJA

Uzgoj povrća analizirano u eksperimentu odliču iz lokalne škole. Dva deset letnja je uključena u školstvu, na lokalitetu Opovo. Za zaključivanje kojim se povrćem u hladnji na 4 °C, a u do postavljanja na plivanje u moru morski.

Uzgoj povrća u školama zapremine 300 ml sa gustini 15 letni po školama. Uzgoj u školama zapremine 300 ml sa gustini 15 letni po školama. Uzgoj u školama zapremine 300 ml sa gustini 15 letni po školama.

3. Materijal i metode



Uzgoj povrća u školama zapremine 300 ml sa gustini 15 letni po školama. Uzgoj u školama zapremine 300 ml sa gustini 15 letni po školama. Uzgoj u školama zapremine 300 ml sa gustini 15 letni po školama.

3.1 USLOVI GAJENJA

Legla gubara analizirana u eksperimentu potiču iz topolove šume. Dvadeset legala je sakupljeno u oktobru, na lokalitetu Opovo. Po sakupljanju legla su stavljena u frižider na 4 °C, sve do postavljanja na piljenje u martu mesecu.

Larve su gajene u čašama zapremine 300 ml na gustini 15 larvi po čaši sve do ulaska u treći larveni stupanj, kada je gustina smanjena na pet larvi po čaši. Ulaskom u četvrti larveni stupanj larve su pojedinačno raspoređene po čašama. Temperatura gajenja je iznosila 23 °C, a fotoperiod 12^h mrak : 12^h svetlost.

3.2 EKSPERIMENTALNE GRUPE

Larve su gajene na veštačkoj dijeti (high wheat germ diet-HWG) u kojoj je kazein zamenjen hidrolizatom kvasca (Bell et al. 1981; O'dell et al. 1984). Korišćene su dve koncentracije kadmijuma 10 µg Cd/g suve hrane (u daljem tekstu označena kao C1) i 30 µg Cd/g suve hrane (označena kao C2). Kadmijum je dodavan u obliku nitratne soli: Cd(NO₃)₂·4H₂O.

Materijal i metode

U eksperimentu je formirano sedam eksperimentalnih grupa:

EKSPERIMENTALNE GRUPE	TRETMAN KADMIJUMOM	
K	kontrolna grupa bez kadmijuma	
C1	Larve gajene na manjoj koncentraciji kadmijuma ($10\mu\text{gCd/g}$ suve hrane) od izleganja do trećeg dana četvtrog larvenog stupnja	HRONIČNI EFEKAT
C2	Larve gajene na većoj koncentraciji kadmijuma ($30\mu\text{gCd/g}$ suve hrane) od izleganja do trećeg dana četvtrog larvenog stupnja	
KC1	Larve gajene na kontroli do ulaska u četvrti larveni stupanj, a zatim prenete tri dana na C1	AKUTNI EFEKAT
KC2	Larve gajene na kontroli do ulaska u četvrti larveni stupanj, a zatim prenete tri dana na C2	
C1K	Larve gajene na C1 do ulaska u četvrti larveni stupanj, a zatim prenete tri dana na K	OPORAVAK
C2K	Larve gajene na C2 do ulaska u četvrti larveni stupanj, a zatim prenete tri dana na K	

Analiza je obuhvatala 20 legala, i to 5 larvi po leglu, ukupno 100 jedinki, u okviru svake eksperimentalne grupe.

3.3 ODREĐIVANJE KOMPONENTI ADAPTIVNE VREDNOSTI

Od komponenata adaptivne vrednosti određivani su sledeći parametri:

1. ukupni mortalitet (procenat uginulih larvi od piljenja do žrtvovanja trećeg dana četvtrog larvenog stupnja) i mortalitet larvi prvog stupnja (procenat uginulih larvi prvog stupnja);
2. trajanje prvog stupnja, kao i trajanje razvića larvi od izleganja do ulaska u četvrti larveni stupanj (izraženi u danima);
3. masa larvi trećeg dana četvtrog larvenog stupnja;
4. relativna brzina rasta (RGR) koja je izračunata formulom:

$$RGR = (masa_3 - masa_2) \times 100 / masa_2$$

$masa_2$, $masa_3$ – predstavljaju masu larvi drugog i trećeg dana četvtrog larvenog stupnja

3.4 BIOHEMIJSKE METODE

Ispitivane su aktivnosti sledećih enzima:

- ukupnih proteaza;
- tripsina;
- leucin aminopeptidaze;
- α -glikozidaze;
- β -glikozidaze;
- esteraze;
- glutation S-transferaze.

Žrtvovanje larvi je obavljano na ledu, na filter papiru, trećeg dana četvrtog larvenog stupnja. Larve su presecane iza zadnjeg para nožica, uzdužno im je rasecan abdomen i izolovano celo crevo. Srednje crevo je odvojeno, očišćeno od masnog tela, isprano od hemolimfe i stavljeno u zamrzivač na -20°C do pravljenja homogenata.

Pulovani homogenati su pravljani u okviru svake eksperimentalne grupe. Za svako leglo pravljen je jedan homogenat creva uzetih od 5 larvi. Creva su homogenizovana na ledu, u 0.15 M NaCl (100mg creva/ml fiziološkog rastvora). Homogenizacija je obavljena 15 sekundi pri brzini od 20000 obrtaja u minuti. Homogenati su zatim centrifugirani u Eppendorf centrifugi 10 minuta na 10000g. Supernatant je prenet u eppendorfice i zamrznut na -20°C do određivanja aktivnosti enzima.

3.4.1 Određivanje aktivnosti ukupnih proteaza

Radena je metoda po Kunitzu (1947). Kao supstrat korišćen je 1% kazein koji je prethodno rastvoren u puferu (Gly/NaOH pH=10), zagrevanjem, bez ključanja. Uzima se po 250 μ l supstrata i isto toliko homogenata. Posle inkubacije od 1h na 40°C reakcija je prekinuta sa 500 μ l 10% TCA. Taloženje se odvija u frižideru 30 minuta na 4°C. Zatim se centrifugira 10 minuta na 10000g. Apsorpcija supernatanta se meri na 280nm. Specifična aktivnost po miligramu proteina uzorka se izračunava na sledeći način:

$$SPA(U/mg) = \frac{(A_{uz} - A_{buz} - A_{bs}) \times \frac{10}{3} \left(\frac{U}{ml}\right)}{Pr\ oteini\left(\frac{mg}{ml}\right)}$$

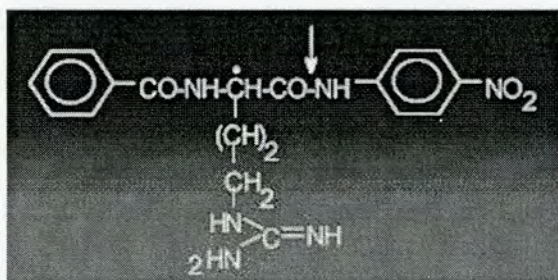
A_{uz} – apsorpcija uzorka (enzima)

A_{buz} – apsorpcija blank enzima (uzorka)

A_{bs} – apsorpcija blank supstrata

3.4.2 Određivanje aktivnosti tripsina

Metod za detekciju tripsina je po tipu sličan reakciji za detekciju leucin aminopeptidaze: sastoji se u oslobađanju p-nitroanilida iz N α -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilid hidrohlorida (BAPNA) (Erlanger et al. 1961; Valaitis 1995).



U reakcionu smešu se dodaje 50mM Gly/NaOH pH=10, 20 mM supstrat finalne koncentracije 2mM i homogenat. Preinkubacija je trajala 5 minuta, a vreme reakcije 15 minuta na 30°C. Reakcija je prekinuta 6% sirćetnom kiselinom, a apsorpcija merena na 405nm.

Specifična aktivnost (SAT), koja je izražena u odnosu na količinu proteina, je izračunata na sledeći način:

$$(U/ml) = \frac{A_{405} \times 0.0012L \times 10^6 \mu\text{mol/mol}}{1.05 \times 10^4 L/mol \times 15 \text{ min} \times 0.01\text{ml}} = A_{405} \times 0.7619048$$

$$SAT(U/mg) = \frac{\text{Aktivnost} \left(\frac{U}{ml} \right)}{\text{Proteini} \left(\frac{mg}{ml} \right)}$$

3.4.3 Određivanje aktivnosti leucin aminopeptidaza

Princip reakcije za detekciju LAP je oslobađanje p-nitroanilida iz supstrata leucin-para-nitroanilida (Erlanger et al. 1961). Korišćen je 40mM veronal/HCl pufer pH= 7.9. U puferu je inkubiran homogenat sa 20mM supstratom (njegova konačna koncentracija u inkubacionoj smeši je 2mM) na 30°C. Posle 5 minuta preinkubacije i 10 minuta inkubacije reakcija je prekinuta 6% sirćetnom kiselinom. Apsorpcija je merena na talasnoj dužini 405nm.

Aktivnost leucin aminopeptidaza je određena sledećom formulom:

$$U / ml = \frac{A_{405} \times 0.0012L \times 10^6 \mu\text{mol} / \text{mol}}{1.05 \times 10^4 L / \text{mol} \times 10 \text{ min} \times 0.01 \text{ ml}} = A_{405} \times 1.1428571$$

$$SALAP(U / \text{mg}) = \frac{\text{Aktivnost} \left(\frac{U}{\text{ml}} \right)}{\text{Pr oteini} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

Specifična aktivnost (SALAP) je izračunata kao aktivnost enzima po mg proteina.

3.4.4 Određivanje aktivnosti α -glikozidaze

Princip reakcije je oslobađanje p-nitrofenola iz 4-nitrofenil- α -D-glikopiranozida, specifičnog supstrata za detekciju α -glikozidaze (Baker, 1991). Napravljen je 20mM rastvor supstrata u vodi. U 0.2M Na-fosfatani pufer dodat je supstrat finalne koncentracije 2mM i 5 μ l homogenata. Vreme inkubacije je 10 minuta na 30°C. Reakcija se prekida sa 1ml sledeće smeše: 0.25M Na₂CO₃; 0.25M NaHCO₃ i 1% SDS. Apsorpcija je merena na 405nm.

$$U / ml = \frac{A_{405} \times 0.0012L \times 10^6 \mu\text{mol} / \text{mol}}{1.86 \times 10^4 L / \text{mol} \times 10 \text{ min} \times 0.005 \text{ ml}} = A_{405} \times 1.29032258$$

Specifična aktivnost α -glikozidaze (SA _{α} G) izračunata je na sledeći način:

$$SA_{\alpha}G(U / \text{mg}) = \frac{\text{Aktivnost} \left(\frac{U}{\text{ml}} \right)}{\text{Pr oteini} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

3.4.5 Određivanje aktivnosti β-glikozidaze

4-nitrofenil-β-D-glikopiranozid je supstrat korišćen za biohemijsku detekciju β-glikozidaze. Princip detektovanja je isti kao kod α-glikozidaze, osim što je vreme inkubacije iznosilo 60 minuta. Specifična aktivnost ($SA_{\beta}G$) je izračunata na sledeći način:

$$U / ml = \frac{A_{405} \times 0.0012 L \times 10^6 \mu mol / mol}{1.86 \times 10^4 L / mol \times 60 \text{ min} \times 0.05 ml} = A_{405} \times 0.021505376$$

$$SA_{\beta}G(U / mg) = \frac{\text{Aktivnost} \left(\frac{U}{ml} \right)}{\text{Pr oteini} \left(\frac{mg}{ml} \right)}$$

3.4.6 Određivanje aktivnosti esteraza

Za određivanje aktivnosti esteraza rađena je metoda po Lockridge & Du (1978). Supstrat (o-nitro fenil butirat) je rastvoren u metanolu neposredno pre reakcije i držan na ledu. Njegova finalna koncentracija u reakcionoj smeši je 10 mM. Korišćen je 0.02M Na-fosfatni pufer pH= 7.2. Vreme inkubacije je iznosilo 150 sec na 30°C. Apsorpcija je merena na 414 nm. Formulama:

$$U / ml = \frac{A_{414} \times 0.001 L \times 10^6 \mu mol / mol}{3.19 \times 10^4 L / mol \times 2.5 \text{ min} \times 0.01 ml} = A_{414} \times 1.2539185$$

$$SAEST(U / mg) = \frac{\text{Aktivnost} \left(\frac{U}{ml} \right)}{\text{Pr oteini} \left(\frac{mg}{ml} \right)} \text{ dolazimo do specifične aktivnosti esteraza.}$$

3.4.7 Određivanje aktivnosti glutation S-transferaze

Aktivnost glutation S-transferaze je određivana po metodi Habiga i saradnika (1974). Supstrat, 25mM 1-hloro-2,4-dinitro benzen (CDNB) je rastvoren u 95% etanolu, dok se reakcija odvijala u 0.5M kalijum-fosfatnom puferu pH=6.5. Glutation je neposredno pre reakcije rastvoren u vodi (20mM rastvor). Finalne koncentracije u reakcionoj smeši su 2.35 mM glutation, 0.98mM CDNB, uzorak (50 μ l) i 0.12M pufer. U reakcionu smešu se dodaje i 1.5 ml dejonizovane vode. Reakcija je kontinualna i očitavanja se vrše svakih 30 sekundi u toku 3 minuta, na 340nm i temperaturi 25°C. Voda je korišćena kao blank.

Aktivnost glutation S-transferaze se izračunava sledećom formulom:

$$GST(U / ml) = \frac{(A_{uz} - A_{bl})}{V} \times 312.5$$

V predstavlja zapreminu uzorka.

Specifična aktivnost po mg proteina je izračunata kao:

$$SAGST(U / mg) = \frac{\text{Aktivnost}\left(\frac{U}{ml}\right)}{\text{Pr oteini}\left(\frac{mg}{ml}\right)}$$

3.4.8 Određivanje proteina

Proteini su određivani metodom Bradforda (1976). U kiseloj sredini boja Coomassie Brilliant Blue G-250 je najstabilnija i crvene je boje. Nakon vezivanja za proteine najstabilnija je u obliku neprotonizovane forme i ima plavu boju. Boja Coomassie Brilliant Blue G-250 se vezuje za bočne lance aminokiselina, naročito lizina. Pre dodavanja u reakcionu smešu Coomassie je rastvoren u etanolu i 85% fosfornoj kiselini. Reakcija je tekla na sledeći način: 10 μ l homogenata srednjeg creva je dodato u 790 μ l dejonizovane vode, a zatim je dodato i 200 μ l koncentrovanog Bradfordovog reagensa. Vremenski interval za razvijanje boje iznosi

Materijal i metode

od 5 do 30 minuta na sobnoj temperaturi. Goveđi serum albumin (BSA) je korišćen kao proteinski standard. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 595nm, na spektrofotometru Shimadzu UV-160. Standardna prava je dobijena na osnovu apsorbance standarda i sa nje su očitavane koncentracije proteina uzoraka.

3.5 ELEKTROFORETSKA DETEKCIJA ENZIMA

Za elektroforetska ispitivanja enzimskih izoformi korišćeni su homogenati tri ista legla na svakom tretmanu (kontroli, akutnim, hroničnim i oporavcima). SeeBlue Pre-Stained standard (Invitrogen, Cat. No. LC5625) je korišćen za vizuelizaciju opsega molekulskih masa proteina u toku elektroforeze. Molekulski markeri su sledeći: miozin (250 kDa), BSA (98kDa), glutaminska dehidrogenaza (64 kDa), alkoholna dehidrogenaza (50 kDa), karbo-anhidraza (36 kDa), mioglobin (30 kDa), lizozim (16 kDa), aprotinin (6 kDa), insulin, B lanac (4 kDa). Za detekciju enzima (osim za proteaze gde je SDS prisutan u puferu za uzorke) rađena je nedenaturišuća ili „nativna“ elektroforeza u kojoj su izostavljeni denaturišući agensi kao što su deterdženti i urea. Na ovaj način možemo dobiti optimalno razdvajanje proteina u zavisnost od naelektrisanja proteina i hidrodinamičke veličine. Naelektrisanje zavisi od aminokiselinskog sastava i od post-translacionih modifikacija. Hidrodinamička veličina i pokretljivost nativnog proteina na gelu zavise od prirode konformacije. Nativnom elektroforezom se zadržava prirodna struktura i konformacija proteina, pa su zato ovakve detekcije važne u istraživanjima gde je potrebno zadržati enzimsku aktivnost. Gelovi su fotografisani na sistemu Gel-explorer ultra lum i na skeneru hp scanjet 4570c.

Elektroforeza je izvođena prema Lemliju (1970). Za detekciju svih enzima su korišćeni gelovi koncentracije 4% – stacking, 12% – running, osim za esteraze gde je gel bio 7.5%. Jačina struje je 25 mA i voltaža 125V.

3.5.1 Proteaze

PAGE elektroforeza je korišćena za detekciju ukupnih proteaza. Pufer za uzorke je sadržao SDS, ali ne i β -merkaptetanol. U svakom bunaru je bilo oko 7 μ g proteina. Modifikovana procedura (Muhlia-Almazan & Garcia-Carreno 2002) sastoji se iz sledećih koraka:

Materijal i metode

–gel se potapa u 3% kazein koji je prethodno rastvoren u 50 mM glicinskom puferu pH=10. Inkubacija traje 30 minuta na 4 °C.

–inkubacija na 40 °C/60 minuta u istom rastvoru,

–ispiranje dejonizovanom vodom,

–bojenje:inkubacija 5 minuta u 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 (40% metanol, 10% sirćetna kiselina i 0.1% Coomassie brilliant blue R-250),

–odbojavanje u 40% metanolu i 10% sirćetnoj kiselini preko noći. Odbojivač se povremeno menja i filtrira preko aktivnog uglja.

3.5.2 Leucin aminopeptidaza

Količina uzorka po bunaru je bila 9–10 µg proteina. U ovom slučaju izoforme su detektovane nativnom PAGE elektroforezom na 12% gelu. Supstrat za leucin-aminopeptidazu je L-leucin p-nitroanilid (LpNA). Procedura po Beynonu i Bondu (1994) je modifikovana i sastoji se iz sledećih faza:

– ispiranje gela u dejonizovanoj vodi 2x5 minuta na sobnoj temperaturi;

– ispiranje gela u 40mM veronal/HCl puferu pH=7.8–8 na sobnoj temperaturi;

– inkubacija (30 minuta/30 °C) u supstratu, 1mM LpNA. Pre rastvaranja u puferu (30ml), LpNA je potrebno prethodno rastvoriti u 1ml N,N-dimetil formamida (DMF).

– diazotovanje na sobnoj temperaturi u 0.1% azotastoj kiselini. NaNO₂ se rastvori u 1M HCl. Ova faza ne sme trajati više od 5 minuta.

– prekidanje reakcije 1% ureom. Inkubacija u urei traje samo 30 sekundi.

– inkubacija gela do pojave crvenkasto rozikastih traka u smeši:

N-1-naftil-etilendiamid (NEDD) 12.67mg

Etanol (47.5%) 6.6ml

Dejonizovana voda do 30 ml

Umesto NEDDa može se koristiti 1-naftil.

Obavezno je ispirati gel između svake faze dejonizovanom vodom

3.5.3 Tripsin

Ovaj enzim je detektovan takođe nativnom poliakrilamidnom elektroforezom na 12% gelu, pri istim uslovima kao i prethodni enzimi. Specifičan supstrat je 4mM N_{α} -benzoil-DL-arginin 4-nitroanilid hidrohlorid, prethodno rastvoren u DMF. Procedura je ista kao za detekciju leucin aminopeptidaze, osim što se za inkubaciju koristi glicinski pufer pH = 10. Vreme inkubacije u supstratu je 45 minuta na 30°C, a u svaki bunar je stavljano oko 9 µg proteina.

3.5.4 Glikozidaze

3.5.4.1 β-glikozidaza

Specifičan supstrat korišćen za vizuelizaciju β-glukozidaza je 4-metil umbeliferil-β-D-glukopiranozid. Približno 11µg proteina uzorka je stavljano u bunar, a rađena je nativna poliakrilamidna elektroforeza (4% i 12%). Po završenoj elektroforezi gel se drži u puferu (0.2M natrijum fosfatni pufer pH=7.2) pola sata na 4°C. Zatim se potapa u rastvor 0.74mM supstrata u puferu (Mainguet et al. 2000). Inkubacija traje sat vremena na 30°C. Fluorescencija je detektovana pomoću Ultra lum gel explorera UVA svetlom na 365nm.

3.5.4.2 α-glukozidaza

Procedura za detekciju α-glukozidaze je ista kao i za β. Razlika je jedino u fluorescentnom supstratu: koristi se 4-metil umbeliferil-α-D-glukopiranozid, vidljiv pod UVA svetlošću.

3.5.5 Esteraze

Za elektroforetsku detekciju izoformi esteraza rađena je poliakrilamidna nativna elektroforeza na 7.5% gelu. Za vizuelizaciju esteraza korišćen je rastvor 20mM natrijum fosfatnog pufera (pH=7.2), 1.07mM α -naftili fosfata (prethodno rastvorenog u acetonu) i 1.2mM Fast Blue B, rastvorenog u vodi (Wright et al. 2000; Valles & Strong 2001; Pruet et al. 2002). U bunar je stavljano oko 10 μ g proteina. Gel se inkubira na sobnoj temperaturi 40 minuta.

3.5.6 Alkalne fosfataze

Alkalne fosfataze su detektovane poliakrilamidnom nativnom elektroforezom na 12% gelu. Za vizuelizaciju fosfataza gel je potopljen u 0.13% α -naftil fosfat i 0.1% boju, Fast Blue B, koji su prethodno rastvoreni u 0.1M Tris-HCl puferu pH=8.6 (modifikovana metoda, Loxdale 1983).

3.6 PROCENAT MASE SREDNJEG CREVA

Procenat mase srednjeg creva u odnosu na masu larve trećeg dana četvtrog larvenog stupnja izračunat je formulom:

$$\% \text{mase srednjeg creva} = (M_{\text{creva}} / M_{\text{larvi}}) \times 100$$

Ovaj parametar nam daje uvid u stepen konzumacije hrane u različitim sredinama (Jindra & Sehnal 1989).

3.7 STATISTIČKE METODE

Statistička obrada rezultata urađena je kompjuterskim programom STATISTICA verzija 4.5 i SAS (izdanje 9.1.3., Service Pack 4, SAS Institute Inc, Covy, NC, USA, 2002–2003).

Za ispitivanje značajnosti efekata tretmana kadmijumom primenjena je analiza varijanse.

Dvofaktorska ANOVA je korišćena za određivanje značajnosti genetičkih i sredinskih efekata na osobine fitnesa. Određivanjem komponenata fenotipske varijanse u dvofaktorskoj analizi varijanse vrši se procena fenotipske plastičnosti (δ_{pl}^2), heritabilnosti svojstva (h_s^2) i heritabilnosti plastičnosti (h_{pl}^2) (Scheiner & Lyman, 1989).

Analiza varijanse je rađena na log-transformisanim vrednostima ispitivanih osobina.

Heritabilnost u širem smislu je izračunata za nebalansirani full-sib dizajn (Becker 1984).

Koeficijent fenotipske plastičnosti izračunat je prema Chepliku (1995). Za poređenje indeksa fenotipske plastičnosti različitih osobina između različitih tretmana koristi se Viloksonov test. Značajnost razlika u variranju indeksa utvrđeno je F-testom.

Za procenu značajnosti heritabilnosti rađen je t-test ($t=h^2/SE$), dok se za procenu značajnosti koeficijenta korelacije t-test radi na z-transformisanim vrednostima (Sokal & Rohlf 1981).

z-test se koristi i za poređenje heritabilnosti kao i koeficijenata korelacije između različitih sredina i/ili različitih polova.

Za poređenje korelacionih struktura korišćen je Spirmanov test. Značajnost Spirmanovog koeficijenta korelacije testirana je t-testom (Sokal & Rolf 1981).

4.1. KOMPONENTE ADAPTIVNE VREDNOSTI

4.1.1. MORTALITET

Na slici 1 je WU testom pokazano da je mortalitet larvi do ulaska u četvrti larvni stupanj (označen kao ukupni mortalitet), statistički značajno povećan u odnosu na kontrolu i to na oba koncentracije kadmijeva. Mortalitet larvi u prvom stupnju je sličan za ukupni mortalitet, ali ne postoje statistički značajne razlike u mortalitetu prvog stupnja između grupa izloženi različitim koncentracijama kadmijeva.

4. Rezultati



Analiza ANOVA pokazala da koncentracije kadmijeva ne utiču značajno na mortalitet larvi prvog stupnja ($F_{1,24} = 0,09$; $P > 0,05$). Statistički značajne razlike u mortalitetu između grupa izloženi različitim koncentracijama kadmijeva nisu postojale ($F_{1,24} = 0,19$; $P > 0,05$ za ukupni mortalitet i $F_{1,24} = 0,02$; $P > 0,05$ za mortalitet prvog stupnja).

Linija sone reakcije na kadmijem izloženima dva koncentracije kadmijeva pokazala je veliku varijabilnost po legima tako za ukupni mortalitet, tako i za mortalitet larvi prvog stupnja (slika 2).



Slika 1. Mortalitet larvi gubaru u prvom stupnju - (■) i ukupni mortalitet larvi do ulaska u četvrti larvni stupanj - (□)

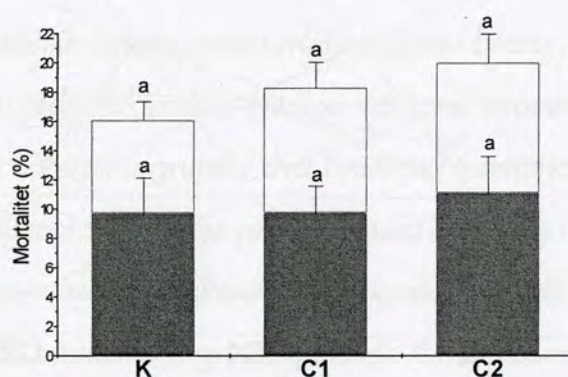
4.1 KOMPONENTE ADAPTIVNE VREDNOSTI

4.1.1 MORTALITET

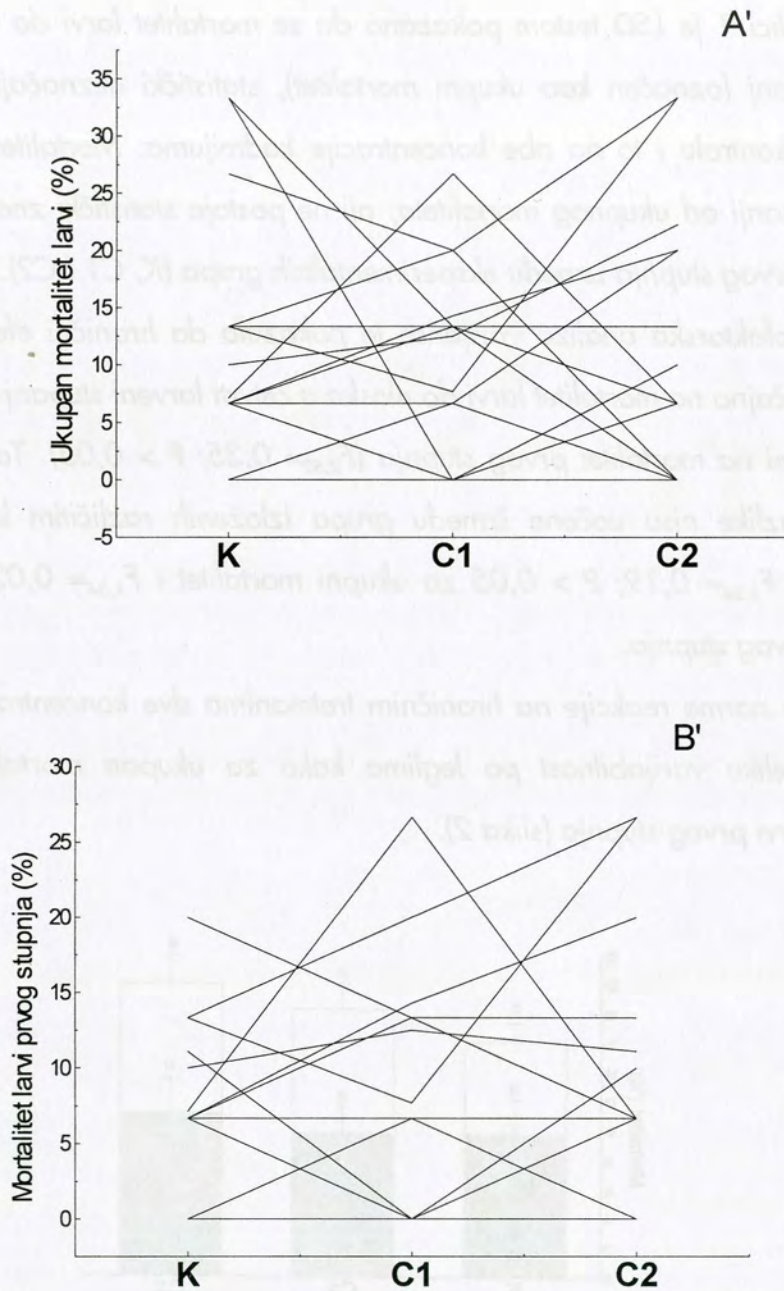
Na slici 1 je LSD testom pokazano da se mortalitet larvi do ulaska u četvrti larveni stupanj (označen kao ukupni mortalitet), statistički neznajno povećava u odnosu na kontrolu i to na obe koncentracije kadmijuma. Mortalitet larvi u prvom stupnju je manji od ukupnog mortaliteta, ali ne postoje statistički značajne razlike u mortalitetu prvog stupnja između eksperimentalnih grupa (K, C1 i C2).

Jednofaktorska analiza varijanse je pokazala da hronični efekat kadmijuma ne utiče značajno na mortalitet larvi do ulaska u četvrti larveni stupanj ($F_{2,52}=0,08$; $P > 0,05$), kao ni na mortalitet prvog stupnja ($F_{2,52}= 0,35$; $P > 0,05$). Takođe, statistički značajne razlike nisu uočene između grupa izloženih različitim koncentracijama kadmijuma; $F_{1,34}= 0,19$; $P > 0,05$ za ukupni mortalitet i $F_{1,34}= 0,02$; $P > 0,05$ za mortalitet prvog stupnja.

Linije norme reakcije na hroničnim tretmanima dve koncentracije kadmijuma pokazuju veliku varijabilnost po leglima kako za ukupan mortalitet, tako i za mortalitet larvi prvog stupnja (slika 2).



Slika 1. Mortalitet larvi gubara u prvom stupnju – (■) i ukupan mortalitet larvi do ulaska u četvrti larveni stupanj – (□)



Slika 2. Linije norme reakcije za ukupan mortalitet larvi (A') i za mortalitet prvog stupnja (B') pri hroničnom efektu kadmijuma. K- kontrola, C1- 10µgCd/g i C2-30µgCd/g

4.1.2 TRAJANJE PRVOG LARVENOG STUPNJA

Na slici 3 prikazani su efekti dugotrajnog (hroničnog) izlaganja larvi prvog stupnja na dve koncentracije kadmijuma – C1 (10 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane) i C2 (30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane). Poređenje srednjih vrednosti pomoću LSD testa pokazala su da samo izlaganje višoj koncentraciji kadmijuma statistički značajno skraćuje trajanje prvog larvenog stupnja gubara u odnosu na kontrolnu grupu (K). Odsustvo razlika između K i C1 i prisustvo značajnih razlika između C1 i C2, ukazuje da samo povećana koncentracija kadmijuma značajno skraćuje trajanje prvog larvenog stupnja. Na slici A' se uočava da smanjenje dužine trajanja prvog larvenog stupnja pokazuje najveći broj legala (genotipova), 16 legala na C2 od ukupno 19 analiziranih legala na kontroli.

Dvofaktorska ANOVA (tabela 1) urađena na grupama sa dve koncentracije kadmijuma (C1 i C2), pokazala je da trajanje prvog larvenog stupnja zavisi od genotipa (efekat legla $P < 0,01$). Ova analiza je takođe ukazala i na postojanje različite osetljivosti genotipova na izlaganje kadmijumu, to je interakcija leglo \times kadmijum i ima statistički značajnu vrednost ($P < 0,05$), kao i na uticaj samog hroničnog tretmana kadmijuma na trajanje prvog stupnja ($P < 0,001$).

Pošto larve različitih legala predstavljaju rođenu braću i sestre (engl. full-sibs), moguće je na osnovu jednofaktorskih analiza varijansi proceniti ukupnu genetičku i sredinsku vrijansu za kontrolnu grupu i dva hronična tretmana. Rezultati tih analiza, kao i procene heritabilnost za trajanje prvog stupnja larvenog razvića date su u tabeli 2..Statistički značajno visoke vrednosti koeficijenta heritabilnosti u širem smislu ukazuju da su u sve tri analizirane grupe genetički činioci osnovni razlog variranja u trajanju prvog larvenog stupnja gubara. Međutim, F vrednosti dobijene poređenjem genetičkih i sredinskih varijansi u trajanju prvog stupnja larvi između analiziranih grupa (K, C1, C2) nisu pokazivale statistički značajne vrednosti. Znači, da genetički i sredinski (slučajni) činioci nisu različiti između kontrole i oba hronična tretmana. Do

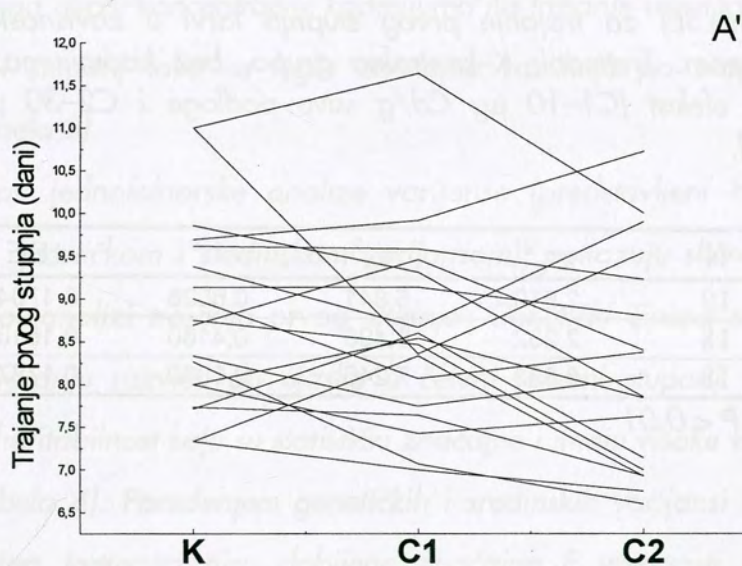
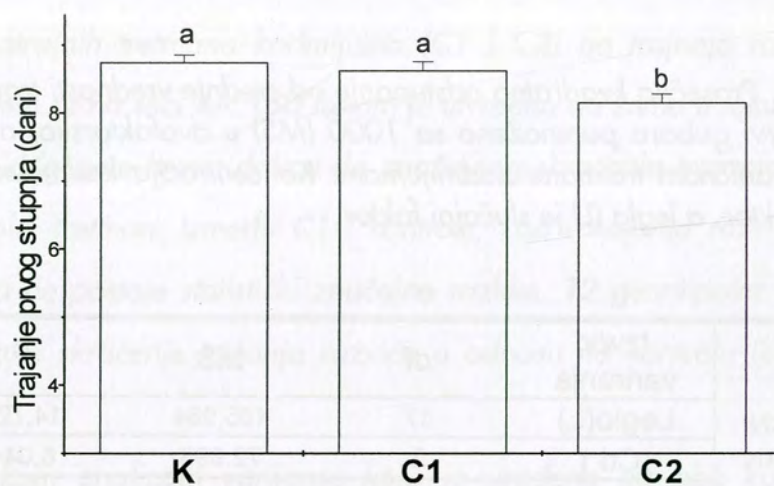
Rezultati

istog rezultata dolazi i analiza razlika između koeficijenata heritabilnosti. Međusobna poređenja heritabilnosti nisu ni u jednom slučaju pokazala statistički značajne razlike.

Dvofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da je heritabilnost plastičnosti manja od heritabilnosti svojstva ($h_{pl}^2=0,2158 < h_s^2=1,1721$).

Srednje vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti za trajanje prvog stupnja imaju pozitivne vrednosti na oba hronična tretmana ($\bar{X}_{C1}=2,0325$; $\bar{X}_{C2}=6,9685$). Poređenjem srednjih vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti (Vilkoksonov test), utvrđeno je da je na granici značajnosti povećanje vrednosti indeksa plastičnosti na C2 u odnosu na hronični tretman manje koncentracije kadmijuma ($Z=1,9380$; $P < 0,1$).

A



Slika 3. Trajanje prvog stupnja larvi gubara ($\bar{x} \pm SE$) (A) i linije norme reakcije (A') pri hroničnom efektu različitih koncentracija kadmijuma. K-kontrola, C1-10 µgCd/g i C2- 30 µgCd/g suve hrane. a, b- stubići označeni različitim slovima su značajno različiti ($P < 0,05$).

Tabela 1. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti trajanja prvog stupnja larvi gubara pomnoženo sa 1000 (MS) u dvofaktorskoj analizi varijanse pri hroničnom tretmanu kadmijumom. Koncentracija kadmijuma (Cd) je fiksirani faktor, a leglo (L) je slučajni faktor.

	Izvor variranja	df	MS	F	P
HRONIČNI TRETMAN	Leglo(L)	17	105,984	14,725	0,0057
	[Cd]	2	72,998	6,044	0,0000
	Lx[Cd]	34	12,077	1,678	0,0101
	Greška	666	7,198		

Tabela 2. Genetička varijansa (σ_g^2), sredinska varijansa (σ_w^2) i heritabilnost u širem smislu ($h^2 \pm SE$) za trajanje prvog stupnja larvi u zavisnosti od tretmana kadmijumom. Tretmani: K-kontrolna grupa, bez kadmijuma; akutni efekat hronični efekat (C1-10 $\mu\text{g Cd/g}$ suve podloge i C2-30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve podloge).

tretman	N	σ_g^2	σ_w^2	h^2	$\pm SE$	t
K	19	2,519	5,841	0,6026	0,1704	3,536**
C1	18	2,232	8,498	0,4160	0,1518	2,741*
C2	18	3,333	7,246	0,6300	0,1787	3,526**

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

4.1.3 TRAJANJE RAZVIĆA LARVI DO ULASKA U ČETVRTI LARVENI STUPANJ

Efekti dugotrajnih tretmana kadmijuma (C1 i C2) na trajanje razvića larvi gubara predstavljeni su na slici 4A. LSD testom je utvrđeno da samo u toku hroničnog efekta na 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane dolazi do značajnog skraćenja trajanja razvića u odnosu na kontrolni tretman. Između C1 i kontrole, kao i trajanja razvića na oba hronična tretmana ne postoje statistički značajne razlike. 12 genotipova od ukupno 20 legala, pokazuje skraćenje trajanja razvića u odnosu na kontrolu (linije norme reakcije, slika 4A').

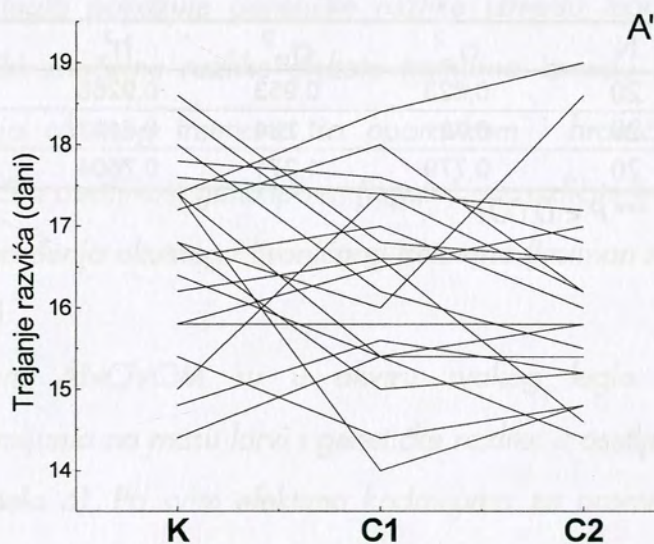
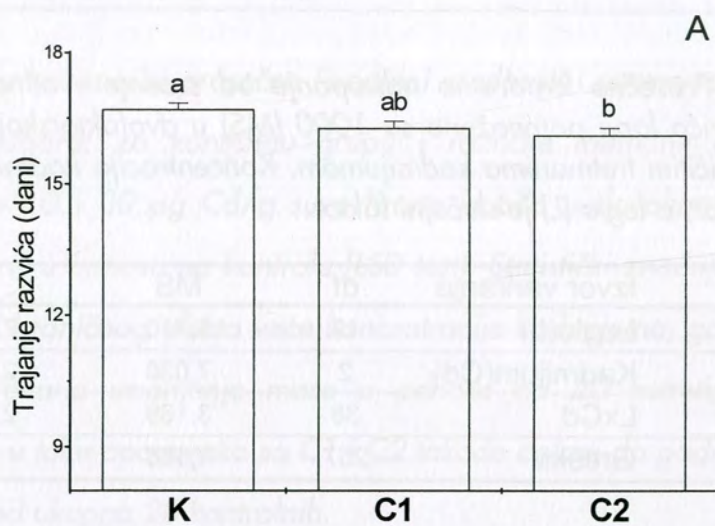
Dvofaktorskom analizom varijanse koja je urađena na obe koncentracije kadmijuma u toku dugotrajnog, hroničnog tretmana utvrđeno je da trajanje razvića do ulaska u četvrti stupanj zavisi od genotipova (legla, $P < 0,001$), ali i da je sama interakcija legla i kadmijuma statistički značajna ($P < 0,001$). Interesantno je da ne postoji značajan uticaj koncentracije kadmijuma na trajanje razvića larvi do ulaska u četvrti larveni stupanj iako se legla značajno razlikuju po svojoj osetljivosti na kadmijum (tabela 3).

Rezultati jednofaktorske analize varijanse (predstavljeni heritabilnostima u širem smislu, genetičkom i sredinskom varijansom), pokazuju slične rezultate kao u jednofaktorskoj analizi trajanja prvog stupnja. Genetički činioci su osnovni razlog promene u trajanju razvića do ulaska u četvrti larveni stupanj. Na ovo ukazuju vrednosti za heritabilnost koje su statistički značajne i imaju visoke vrednosti, naročito u kontroli (tabela 4). Poređenjem genetičkih i sredinskih varijansi kontrolne grupe i oba dugotrajna tretmana nisu dobijene značajne F vrednosti što pokazuje da genetički i sredinski činioci nisu različiti između proučavanih efekata. Na ovo ukazuje i nepostojanje statistički značajnih t vrednosti dobijenih poređenjem koeficijenata heritabilnosti u širem smislu.

Rezultati

Kao i za trajanje prvog stupnja, vrednost za heritabilnost svojstva je veća od heritabilnosti plastičnosti za trajanje razvića do ulaska u četvrti larveni stupanj ($h_{pl}^2=0,4776 < h_s^2=0,6016$).

Srednje vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti imaju pozitivne vrednosti na oba hronična tretmana ($\bar{X}_{C1}=2,138$; $\bar{X}_{C2}=3,223$). Ne postoji značajna promena plastičnosti trajanja razvića ili njene varijabilnosti između dva hronična tretmana (C1 i C2).



Slika 4. Trajanje razvića larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A) i linije norme reakcije (A') pri hroničnom efektu različitih koncentracija kadmijuma. K-kontrola, C1- 10 µgCd/g i C2- 30 µgCd/g suve hrane. a, b- stubići označeni različitim slovima su značajno različiti ($P < 0,05$).

Rezultati

Tabela 3. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti vremena trajanja razvića larvi pomnoženo sa 1000 (MS) u dvofaktorskoj analizi varijanse pri različitim tretmanima kadmijumom. Koncentracija kadmijuma (Cd) je fiksirani faktor, a leglo (L) je slučajni faktor.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
hronični	Leglo(L)	19	8,710	7,457	0,0000
	Kadmijum(Cd)	2	7,030	2,219	0,1226
	LxCd	38	3,169	2,713	0,0000
	Greška	237	1,168		

Tabela 4. Genetička varijansa (σ_g^2), sredinska varijansa (σ_ω^2) i heritabilnost u širem smislu ($h^2 \pm SE$) za trajanje razvića larvi u zavisnosti od tretmana kadmijumom. Tretmani: K-kontrolna grupa, bez kadmijuma; hronični efekat (C1-10 μg Cd/g suve podloge i C2-30 μg Cd/g suve podloge).

tretman	N	σ_g^2	σ_ω^2	h^2	$\pm SE$	t
K	20	0,823	0,953	0,9268	0,2211	4,193***
C1	20	0,721	1,284	0,7193	0,2272	3,166**
C2	20	0,779	1,271	0,7604	0,2264	3,359**

** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

4.1.4 MASA LARVI

Na slici 5 prikazane su prosečne (srednje) vrednosti i norme reakcije legala za masu larvi gubara: za kontrolnu grupu i različite tretmane kadmijumom. Trodnevno dejstvo 10 i 30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane je bilo nedovoljno da dođe do promene mase larvi u odnosu na kontrolu (LSD test). Statistički značajan pad mase je detektovan kod hroničnog efekta veće koncentracije kadmijuma, gde je kod čak 17 legala registrovano smanjenje mase u odnosu na 20 netretiranih legala. Interesantno je da u toku oporavaka sa C1 i C2 takođe dolazi do pada mase larvi i to kod 14 legala od ukupno 20 kontrolnih.

Na tabeli 5 su prikazani rezultati međusobnih poređenja različitih tretmana na masu larvi gubara (trofatorska ANOVA). Ni u jednom slučaju ne postoji statistički značajna razlika za masu larvi između različitih tretmana, što ukazuje da se masa larvi ne može koristiti prilikom utvrđivanja efekta kadmijuma na gubara. Značajan efekat legla pokazuje genetičke razlike između legala nezavisno od tretmana. Statistički značajne razlike efekata tretmana između legla utvrđene su prilikom poređenja akutnog tretmana sa oporavkom i hroničnog tretmana sa oporavkom. Različita osetljivost genotipova (legala) na različite tretmane uočena je samo u slučaju poređenja akutnog i hroničnog tretmana (tretman x leglo interakcija; $P < 0,01$, tabela).

Dvofaktorskom ANOVOM su u okviru svakog legla utvrđivani efekti koncentracije kadmijuma na masu larvi i genetičke razlike u osetljivosti larvi gubara na kadmijum (tabela 6). Pri svim efektima kadmijuma za promenu mase gubara odgovoran je genetički faktor (leglo), $P < 0,001$. U toku hroničnog efekta i oporavka od veće koncentracije metala na promenu mase utiče koncentracija kadmijuma ($P < 0,05$), dok u akutnom stresu interakcija „genotip x kadmijum“ značajno utiče na variranje mase ($P < 0,05$).

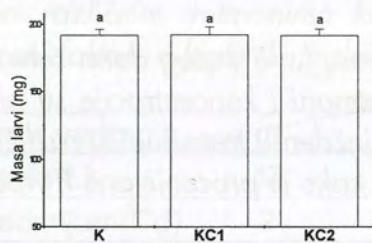
Poređenjem genetičkih varijansi za masu larve utvrđeno je da postoje značajne razlike genetičkih varijansi između hroničnog i akutnog efekta i to na obe koncentracije kadmijuma (tabela 8). I na C1 i na C2 varijansa je veća pri akutnom tretmanu.

Statistički značajne vrednosti heritabilnosti u širem smislu za masu larvi utvrđene su kod oba akutna tretmana (tabela 7). Znači, da u toku kratkotrajnog stresa kadmijumom genetički činioci predstavljaju osnovni uzrok variranja mase. Poređenjem heritabilnosti nije utvrđena ni jedna značajna t vrednost, što ukazuje da genetički i sredinski činioci nisu različiti između kontrole i tretmana.

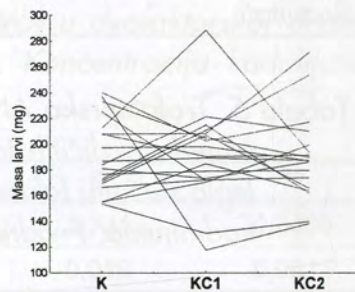
Kao i kod prethodnih osobina adaptivne vrednosti, dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da je pri svim tretmanima (akutni, hronični i oba oporavka), heritabilnost plastičnosti manja od heritabilnosti svojstva (tabela 9).

Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti mase larvi trećeg dana četvrtog larvenog stupnja prikazani su u tabeli 10. Samo kod akutnih efekata na C1 i C2 vidimo negativne vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti (tabela). To znači da određeni broj legala pokazuje veću masu nakon trodnevnog delovanja kadmijuma nego na podlozi bez kadmijuma. Poređenjem srednjih vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti utvrđeno je da se plastičnost značajno povećava na hroničnom tretmanu na C2 u odnosu na isti tretman na manjoj koncentraciji kadmijuma ($P < 0,05$; tabela 11).

Akutni
tretman

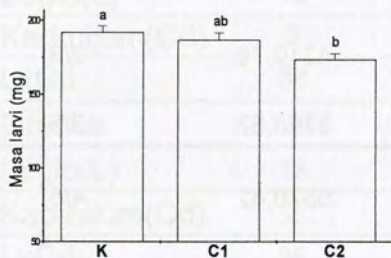


A

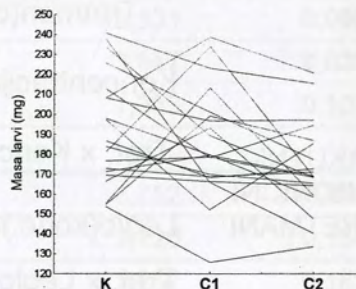


A'

Hronični
tretman

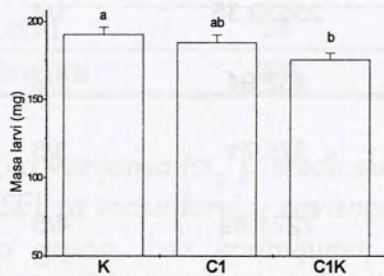


B

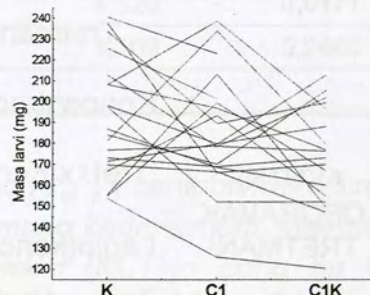


B'

Oporavak
od
10µgCd/g

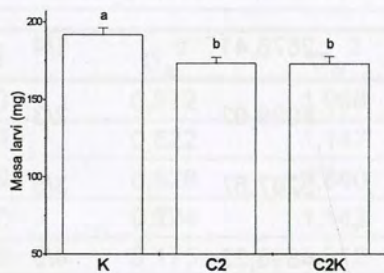


C

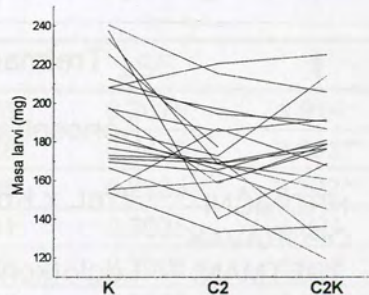


C'

Oporavak
od
30µgCd/g



D



D'

Slika 5. Masa larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C, D')

Rezultati

Tabela 5. Trofaktorska ANOVA za masu larvi trećeg dana četvrtog larvenog stupnja između različitih tretmana. Tretmani i koncentracije su bili fiksirani faktori, a leglo slučajni faktor koji je ugnježđen u tretmane sa različitim koncentracijama kadmijuma. F–odnos pokazuje kako je procenjavana F vrednost.

Poređenje	Izvor variranja	MSIII	F odnos	F vrednost
AKUTNI– HRONIČNI TRETMANI	Tretman(df=1)	16148,05	1/4	2,89
	Koncentracija(df=1)	4310,78	2/3	1,14
	Tret. x Konc (df=1)	3790,57	3/5	1,23
	Leglo(konc.)(df=38)	5570,42	4/5	1,81
	Tret. x Leglo (konc) (df=36)	3075,81	5/6	1,89**
	Greška (df=290)	1628,12		
AKUTNI– OPORAVAK TRETMANI	Tretman(df=1)	25639,35	1/4	3,53
	Koncentracija(df=1)	432,94	2/3	1,19
	Tret. x Konc (df=1)	375,71	3/5	0,21
	Leglo(konc.)(df=37)	7271,89	4/5	3,99***
	Tret. x Leglo (konc) (df=34)	1820,29	5/6	1,15
	Greška (df=284)	1581,45		
HRONIČNI– OPORAVAK TRETMANI	Tretman(df=1)	2678,41	1/4	0,55
	Koncentracija(df=1)	5039,02	2/3	1,53
	Tret. x Konc (df=1)	3287,87	3/5	2,27
	Leglo(konc.)(df=38)	4895,23	4/5	3,38***
	Tret. x Leglo (konc) (df=35)	1448,62	5/6	0,91
	Greška (df=300)	1587,17		

P < 0,01 *P < 0,001

Tabela 6. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti mase larvi trećeg dana četirtog larvenog stupnja pomnoženo sa 1000 (MS) u dvofaktorskoj analizi varijanse pri različitim tretmanima kadmijumom. Koncentracija kadmijuma (Cd) je fiksirani faktor, a leglo (L) je slučajni faktor.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	Leglo(L)	17	5,508	5,221	0,0000
	Kadmijum(Cd)	2	0,041	0,019	0,9813
	LxCd	34	2,174	2,061	0,0011
	Greška	205	1,055		
hronični	Leglo(L)	19	3,709	3,531	0,0000
	Kadmijum(Cd)	2	4,968	3,547	0,0387
	LxCd	38	1,401	1,333	0,1035
	Greška	237	1,050		
oporavak C1	Leglo(L)	18	4,141	3,752	0,0000
	Kadmijum(Cd)	2	2,942	2,120	0,1347
	LxCd	36	1,387	1,257	0,1622
	Greška	226	1,104		
oporavak C2	Leglo(L)	18	4,749	4,258	0,0000
	Kadmijum(Cd)	2	5,892	4,520	0,0177
	LxCd	36	1,304	1,169	0,2463
	Greška	226	1,115		

Tabela 7. Genetička varijansa (σ_g^2), sredinska varijansa (σ_ω^2) i heritabilnost u širem smislu ($h^2 \pm SE$) za masu larvi u zavisnosti od tretmana kadmijumom. Tretmani: K-kontrolna grupa, bez kadmijuma; akutni efekat (KC1-tri dana na C1 podlozi i KC2-tri dana na C2 podlozi); hronični efekat (C1-10 μg Cd/g suve podloge i C2-30 μg Cd/g suve podloge); efekat oporavka (C1K-tri dana oporavka od C1 podloge i C2K- tri dana oporavka od C2 podloge).

tretman	N	σ_g^2	σ_ω^2	h^2	$\pm SE$	t
K	20	0,272	1,098	0,3975	0,2076	1,914
KC1	19	0,622	1,147	0,7028	0,2423	2,901**
KC2	19	0,529	0,840	0,7725	0,2325	3,322**
C1	20	0,224	1,142	0,3281	0,2025	1,621
C2	20	0,175	0,912	0,3223	0,2005	1,608
C1K	19	0,246	0,984	0,3995	0,2135	1,871
C2K	19	0,373	1,265	0,4551	0,2200	2,068

** $P < 0,01$

Rezultati

Tabela 8. F vrednosti dobijene poređenjem genetičkih varijansi σ_g^2 za masu larvi (iznad dijagonale) i sredinskih varijansi σ_w^2 (ispod dijagonale) između različitih tretmana

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		1,215	1,553	2,283	1,941	1,108	1,369
C1	1,040		1,278	2,775*	2,360	1,097	1,669
C2	1,203	1,251		3,546**	3,105*	1,402	2,127
KC1	1,045	1,005	1,258		1,176	2,530	1,667
KC2	1,307	1,359	1,086	1,366		2,151	1,418
C1K	1,115	1,599	1,079	1,166	1,172		1,517
C2K	1,153	1,108	1,387	1,103	1,506	1,285	

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

Tabela 9. Plastičnost (δ_{pl}^2), heritabilnost plastičnosti (h_{pl}^2) i heritabilnost svojstva (h_s^2) za masu larvi dobijeni iz dvofaktorske analize varijanse kod gubara gajenih u različitim sredinama, pri akutnom, hroničnom stresu i oporavku.

efekat	δ_{pl}^2	h_{pl}^2	h_s^2
akutni	0,9490	0,4893	0,5543
hronični	0,8020	0,3730	0,4829
oporavak C1	0,7375	0,3563	0,5618
oporavak C2	0,6695	0,3011	0,6408

Tabela 10. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti mase larve trećeg dana četvrtog larvenog stupnja

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	19	-1,717	20,526	19	-2,749	20,126
hronični	20	1,484	18,254	20	8,500	12,821
oporavak	19	6,784	12,652	19	8,146	14,369

Tabela 11. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti mase larvi trećeg dana četvrtog larvenog stupnja

Poređenje		Z	P	F	P
akutni C1	–akutni C2	0,0218	0,9826	1,0402	0,9343
hronični C1	–hronični C2	2,3520	0,0187	2,0270	0,1324
oporavak C1	–oporavak C2	0,6036	0,5461	1,2898	0,5949
hronični C1	–akutni C1	0,3622	0,7172	1,2645	0,6157
	–oporavak C1	1,5025	0,1330	2,0816	0,1262
hronični C2	–akutni C2	2,6157	0,0089	2,4641	0,0583
	–oporavak C2	0,0805	0,9359	1,2560	0,6258

4.1.5 RELATIVNA BRZINA RASTA

Promene srednje vrednosti relativne brzine rasta u toku akutnog, hroničnog stresa i oporavaka date su na slici 6. LSD poređenjem je utvrđeno da do značajnog povećanja relativne brzine rasta dolazi samo pri kratkotrajnom trodnevnom tretmanu (i to na obe koncentracije kadmijuma), kao i u toku oporavka od 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane (slike 6A, D). Znači, da je u toku akutnog tretmana masa larvi trećeg dana statistički značajno veća nego masa drugog larvenog dana. Relativna brzina rasta je veća kod larvi izloženih kadmijumu u odnosu na kontrolu. Linije norme reakcije pokazuju da u odnosu na larve koje su konzumirale hranu bez kadmijuma, na akutnom stresu na C1, relativna brzina rasta raste kod 14, dok na KC2 vidimo povećanje RGR na čak 17 od ukupno 20 analiziranih legala.

Trofaktorska ANOVA (tabela 12) pokazuje da ni u jednom slučaju ne postoji značajna promena u relativnoj brzini rasta pod uticajem različitih tretmana. Možemo da zaključimo da relativna brzina rasta nije povoljan parametar u ispitivanju dejstva kadmijuma na larve gubara (bar ne na proučavanim koncentracijama). Poređenjem hroničnog tretmana i oporavka detektovana je samo značajna promena osetljivosti genotipova na različite tretmane (tretman \times leglo; $P < 0,05$).

Dvofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da pri akutnom tretmanu i oporavku od C2 koncentracija kadmijuma utiče na promenu relativne brzine rasta (i za akutni i za oporavak $P < 0,05$, tabela 13).

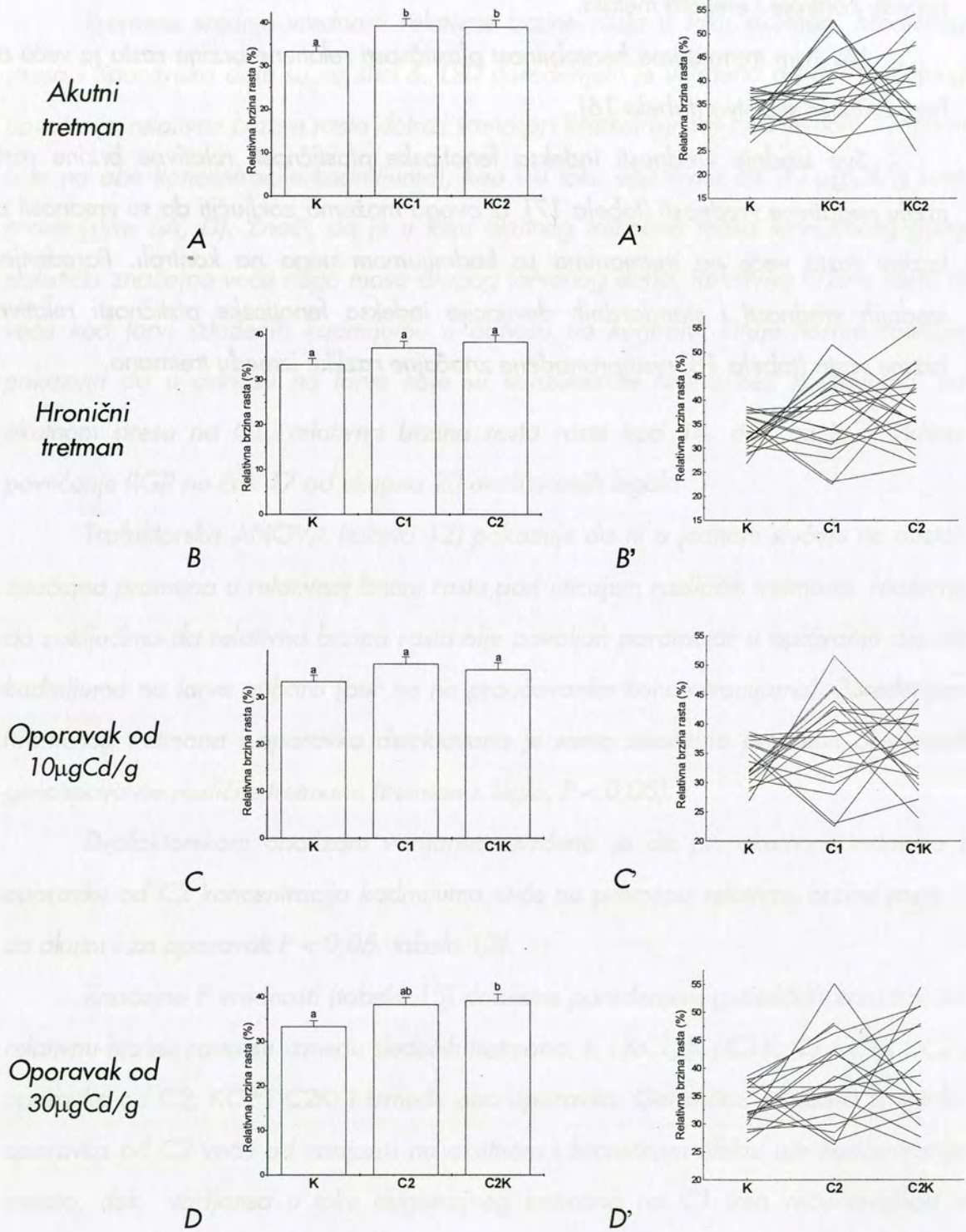
Značajne F vrednosti (tabela 15) dobijene poređenjem genetičkih varijansi za relativnu brzinu rasta su između sledećih tretmana: K i KC1, K i C1K; C1 i C1K; C2 i oporavka od C2; KC2 i C2K; i između oba oporavka. Genetička varijansa je u toku oporavka od C2 veća od varijansi na akutnom i hroničnom efektu iste koncentracije metala, dok varijansa u toku dugotrajnog tretmana na C1 ima veću vrednost u odnosu na oba kratkotrajna efekta na istoj koncentraciji (tabela 14).

Ne postoji značajna vrednost heritabilnosti ni na jednom tretmanu (tabela 14). Njihovim poređenjem, takođe nije dobijena ni jedna značajna *t* vrednost što ukazuje na nepostojanje statistički značajnih razlika između sredinskih i genetičkih činilaca između kontrole i efekata metala.

Na svim tretmanima heritabilnost plastičnosti relativne brzine rasta je veća od heritabilnosti svojstva (tabela 16).

Sve srednje vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti relativne brzine rasta imaju negativne vrednosti (tabela 17). Iz ovoga možemo zaključiti da su vrednosti za brzinu rasta veće na tretmanima sa kadmijumom nego na kontroli. Poređenjem srednjih vrednosti i standardnih devijacija indeksa fenotipske plastičnosti relativne brzine rasta (tabela 18) nisu pronađene značajne razlike između tretmana.

Rezultati



Slika 6. Relativna brzina rasta larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C', D')

Tabela 12. Trofaktorska ANOVA za relativnu brzinu rasta larvi trećeg dana četvrtog larvenog stupnja između različitih tretmana. Tretmani i koncentracije su bili fiksirani faktori, a leglo slučajni faktor koji je ugnježen u tretmane sa različitim koncentracijama kadmijuma. F-odnos pokazuje kako je procenijavana F vrednost.

Poređenje	Izvor variranja	MSIII	F odnos	F vrednost
AKUTNI- HRONIČNI TRETMANI	Tretman(df=1)	325,49	1/4	1,03
	Koncentracija(df=1)	9,58	2/3	0,14
	Tret. x Konc (df=1)	68,23	3/5	0,25
	Leglo(konc.)(df=38)	315,99	4/5	1,00
	Tret. x Leglo (konc) (df=36)	262,64	5/6	1,18
	Greška (df=290)	221,88		
AKUTNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman(df=1)	360,70	1/4	1,20
	Koncentracija(df=1)	265,14	2/3	0,59
	Tret. x Konc (df=1)	451,12	3/5	1,67
	Leglo(konc.)(df=37)	300,13	4/5	1,11
	Tret. x Leglo (konc) (df=34)	269,44	5/6	1,29
	Greška (df=284)	209,16		
HRONIČNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman(df=1)	26,51	1/4	0,09
	Koncentracija(df=1)	740,37	2/3	2,44
	Tret. x Konc (df=1)	303,25	3/5	1,00
	Leglo(konc.)(df=38)	266,27	4/5	0,88
	Tret. x Leglo (konc) (df=35)	302,99	5/6	1,52*
	Greška (df=300)	198,75		

**P < 0,05

Tabela 13. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti relativne brzine rasta (RGR) pomnoženo sa 1000 (MS) u dvofaktorskoj analizi varijanse pri različitim tretmanima kadmijumom. Koncentracija kadmijuma (Cd) je fiksirani faktor, a leglo (L) je slučajni faktor.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	Leglo(L)	17	20,660	0,868	0,6124
	Kadmijum(Cd)	2	134,956	4,780	0,0148
	LxCd	34	28,235	1,186	0,2341
	Greška	202	23,800		
hronični	Leglo(L)	19	22,423	0,877	0,6116
	Kadmijum(Cd)	2	70,745	2,442	0,1005
	LxCd	38	28,967	1,133	0,2836
	Greška	235	25,558		
oporavak C1	Leglo(L)	18	13,381	0,622	0,8807
	Kadmijum(Cd)	2	56,650	2,238	0,1213
	LxCd	36	25,310	1,176	0,2385
	Greška	222	21,515		
oporavak C2	Leglo(L)	18	33,960	1,539	0,0783
	Kadmijum(Cd)	2	103,447	4,195	0,0230
	LxCd	36	24,657	1,117	0,3073
	Greška	224	22,065		

Tabela 14. Genetička varijansa (σ_g^2), sredinska varijansa (σ_ω^2) i heritabilnost u širem smislu ($h^2 \pm SE$) za relativnu brzinu rasta u zavisnosti od tretmana kadmijumom. Tretmani: K-kontrolna grupa, bez kadmijuma; akutni efekat (KC1-tri dana na C1 podlozi i KC2-tri dana na C2 podlozi); hronični efekat (C1-10 $\mu\text{g Cd/g}$ suve podloge i C2-30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve podloge); efekat oporavka (C1K-tri dana oporavka od C1 podloge i C2K- tri dana oporavka od C2 podloge).

tretman	N	σ_g^2	σ_ω^2	h^2	$\pm SE$	t
K	20	-3,772	26,033	0,0000	0,0586	0,000
KC1	19	1,242	24,532	0,0964	0,1871	0,515
KC2	19	1,754	28,531	0,1158	0,1737	0,667
C1	20	2,954	23,360	0,2245	0,1885	1,191
C2	20	1,752	27,261	0,1208	0,1699	0,711
C1K	19	-0,688	22,285	0,0000	0,1335	0,000
C2K	19	4,582	18,704	0,3935	0,2142	1,838

Tabela 15. F vrednosti dobijene poređenjem genetičkih varijansi σ_g^2 za relativnu brzinu rasta (iznad dijagonale) i sredinskih varijansi σ_w^2 (ispod dijagonale) između različitih tretmana

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		1,277	2,153	3,037*	2,151	5,483***	1,215
C1	1,114		1,687	2,379	1,684	4,294**	1,551
C2	1,047	1,167		1,410	1,001	2,546*	2,616*
KC1	1,061	1,050	1,111		1,412	1,805	3,689**
KC2	1,096	1,221	1,046	1,163		2,549	2,612*
C1K	1,168	1,048	1,223	1,101	1,280		6,660***
C2K	1,392	1,249	1,457	1,311	1,525	1,191	

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Tabela 16. Plastičnost (δ_{pl}^2), heritabilnost plastičnosti (h_{pl}^2) i heritabilnost svojstva (h_s^2) za relativnu brzinu rasta larvi gubara dobijeni iz dvofaktorske analize varijanse kod gubara gajenih u različitim sredinama, pri akutnom, hroničnom stresu i oporavku.

efekat	δ_{pl}^2	h_{pl}^2	h_s^2
akutni	1,0364	0,4593	0,0000
hronični	1,0076	0,4826	0,0000
oporavak C1	1,0846	0,5217	0,0000
oporavak C2	0,8990	0,4076	0,1253

Tabela 17. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti relativne brzine rasta

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	19	-20,520	30,895	19	-18,000	25,161
hronični	20	-14,046	33,030	20	-16,325	25,253
oporavak	19	-9,552	22,635	19	-18,002	20,884

Rezultati

Tabela 18. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti relativne brzine rasta

Poređenje		Z	P	F	P
akutni C1	-akutni C2	0,1089	0,9133	1,5077	0,3920
hronični C1	-hronični C2	0,1493	0,8813	1,7108	0,2509
oporavak C1	-oporavak C2	0,6841	0,4939	1,1747	0,7364
hronični C1	-akutni C1	0,6841	0,4939	1,1430	0,7803
	-oporavak C1	0,6036	0,5461	2,1293	0,1152
hronični C2	-akutni C2	0,0402	0,9679	1,0073	0,9911
	-oporavak C2	0,3622	0,7172	1,4621	0,4250

4.2 KORELACIJE IZMEĐU RAZLIČITIH OSOBINA ADAPTIVNE VREDNOSTI

Na kontroli postoji samo jedna značajna korelacija (genetička) i to između ukupnog mortaliteta i mortaliteta prvog stupnja (tabela 19). Na granici značivosti je korelacija između ukupnog mortaliteta i trajanja prvog stupnja. Postoji ukupno četiri negativne korelacije po dve genetičke i fenotipske.

Postoji samo jedna statistički značajna fenotipska korelacija na akutnom tretmanu manje koncentracije kadmijuma i to između mase larvi i trajanja razvića (tabela 20). Interesantno je da su sve korelacije (i fenotipske i genetičke) negativne.

I u toku akutnog tretmana C2 značajna je ista fenotipska korelacija, između mase larvi i trajanja razvića, kao i na KC1 (tabela 21). Sve korelacije su negativne osim genetičke korelacije između trajanja razvića i relativne brzine rasta, koja je bila pozitivna na akutnom efektu C1.

U toku oba hronična tretmana značajna je genetička korelacija između ukupnog mortaliteta i smrtnosti prvog stupnja (tabele 22). Na C1 (10 µg/g) suve hrane je značajna i negativna fenotipska korelacija između mase larve i trajanja razvića. Sve fenotipske korelacije su negativne, dok postoji šest negativnih genetičkih korelacija (tri su između mase i drugih osobina fitnessa), tabela .

Na hroničnom stresu na većoj koncentraciji kadmijuma osim napred pomenute korelacije značajne su još dve genetičke: između trajanja razvića i trajanja prvog stupnja i trajanja razvića i relativne brzine rasta (tabela 23). U odnosu na C1 postoji manji broj negativnih korelacija: po dve fenotipske i genetičke.

U toku oporavka od C1 postoje dve fenotipske, statistički značajne korelacije između mase larve i trajanja razvića (negativna) i relativne brzine rasta i mase larvi (pozitivna), tabela 24. Na granici značivosti je genetička korelacija između trajanja razvića i mase (negativna). Dve fenotipske i jedna genetička korelacija su negativne.

Rezultati

Tabela 25 predstavlja korelacije između različitih osobina adaptivne vrednosti pri oporavku od 30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane. Ista fenotipska korelacija je značajna na oba oporavka i to: između mase larvi i trajanja razvića (negativna vrednost). Na granici značajnosti je pozitivna genetička korelacija između mase i relativne brzine rasta. Po jedna fenotipska i genetička korelacija su pozitivne.

Tabela 19. Genetičke korelacije između različitih osobina (iznad dijagonale) i fenotipske korelacije (ispod dijagonale) na kontroli

K	Trajanje razvića	Masa 3. dana 4. larvenog stupnja	Ukupan mortalitet	Mortalitet prvog stupnja	Trajanje prvog stupnja	RGR
Trajanje razvića		-0,2597	0,1757	0,1387	0,3467	-0,0151
Masa 3. dana 4. larvenog stupnja	-0,1171		0,0741	-0,0340	0,2558	0,0340
Ukupan mortalitet				0,7947***	0,4403 ⁺	-0,0427
Mortalitet prvog stupnja					0,3481	0,1040
Trajanje prvog stupnja						0,1173
RGR	-0,0388	0,1044				

* $P < 0,1$ *** $P < 0,001$

Rezultati

Tabela 20. Genetičke korelacije između različitih osobina (iznad dijagonale) i fenotipske korelacije (ispod dijagonale) pri akutnom efektu kadmijuma od 10 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane

KC1	Trajanje razvića	Masa 3. dana 4. stupnja	RGR
Trajanje razvića		-0,3275	-0,1532
Masa 3. dana 4. stupnja	-0,3622**		-0,1900
RGR	-0,0466	-0,0285	

** $P < 0,01$

Tabela 21. Genetičke korelacije između različitih osobina (iznad dijagonale) i fenotipske korelacije (ispod dijagonale) pri akutnom efektu kadmijuma od 30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane

KC2	Trajanje razvića	Masa 3. dana 4. stupnja	RGR
Trajanje razvića		-0,2657	0,0483
Masa 3. dana 4. stupnja	-0,2278*		-0,2447
RGR	-0,0746	-0,0782	

* $P < 0,05$

Tabela 22. Genetičke korelacije između različitih osobina (iznad dijagonale) i fenotipske korelacije (ispod dijagonale) pri hroničnom efektu kadmijuma od 10 µg Cd/g suve hrane

C1	Trajanje razvića	Masa 3. dana 4. larvenog stupnja	Ukupan mortalitet	Mortalitet prvog stupnja	Trajanje prvog stupnja	RGR
Trajanje razvića		-0,2757	0,1537	0,0192	0,3895	-0,1190
Masa 3. dana 4. larvenog stupnja	-0,2091*		0,1388	-0,0248	-0,1728	-0,3026
Ukupan mortalitet				0,9038***	-0,0508	0,0490
Mortalitet prvog stupnja					0,0400	0,0521
Trajanje prvog stupnja						0,1751
RGR	-0,1651	-0,1209				

* $P < 0,05$ *** $P < 0,001$

Rezultati

Tabela 23. Genetičke korelacije između različitih osobina (iznad dijagonale) i fenotipske korelacije (ispod dijagonale) pri hroničnom efektu kadmijuma od 30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane

C2	Trajanje razvića	Masa 3. dana 4. larvenog stupnja	Ukupan mortalitet	Mortalitet prvog stupnja	Trajanje prvog stupnja	RGR
Trajanje razvića		0,0479	0,3538	0,4185	0,6413**	0,5184*
Masa 3. dana 4. larvenog stupnja	-0,1125		-0,0705	-0,0071	0,0619	0,0004
Ukupan mortalitet				0,9305***	0,3251	0,1920
Mortalitet prvog stupnja					0,4525	0,2025
Trajanje prvog stupnja						0,3126
RGR	0,1119	-0,1109				

+ $P < 0,1$ * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Tabela 24. Genetičke korelacije između različitih osobina (iznad dijagonale) i fenotipske korelacije (ispod dijagonale) pri oporavku od efekta manje koncentracije kadmijuma

C1K	Trajanje razvića	Masa 3. dana 4. stupnja	RGR
Trajanje razvića		-0,3936 ⁺	0,1649
Masa 3. dana 4. stupnja	-0,2251*		0,1602
RGR	-0,0376	0,2225*	

⁺P < 0,1 *P < 0,05

Tabela 25. Genetičke korelacije između različitih osobina (iznad dijagonale) i fenotipske korelacije (ispod dijagonale) pri oporavku od efekta veće koncentracije kadmijuma

C2K	Trajanje razvića	Masa 3. dana 4. stupnja	RGR
Trajanje razvića		-0,3016	-0,1209
Masa 3. dana 4. stupnja	-0,2215*		0,4289 ⁺
RGR	-0,0861	0,0825	

⁺P < 0,1 *P < 0,05

4.3 POREĐENJE KORELACIJA OSOBINA ADAPTIVNE VREDNOSTI IZMEĐU RAZLIČITIH TRETMANA

Tabela 26 ne pokazuje ni jednu značajnu razliku između korelacija. Spirmanov koeficijent je statistički značajan između kontrole i hroničnog efekta na C2, što govori o sličnosti korelacionih struktura.

Tabela 26. *t* vrednosti dobijene poređenjem korelacija između osobina fitnesa na različitim tretmanima kadmijumom. (Traj. razv–trajanje razvića; masa – masa larvi četvrtog stupnja; uk. mort– ukupan mortalitet; mortal 1.– mortalitet prvog stupnja; trajanje 1.– trajanje prvog stupnja; RGR– relativna brzina rasta)

		K-C1	K-C2	K-KC1	K-KC2	K-C1K	K-C2K
Traj.razv.–	masa	0,0503	0,9147	0,2131	0,0185	0,4314	0,1306
	uk. mort.	0,0629	0,5349				
	mortal. 1.	0,3350	0,8522				
	trajanje1.	0,1378	1,1093				
	RGR	0,3046	1,7179	0,4000	0,1821	0,5211	0,3055
Masa –	uk. mort.	0,1822	0,4030				
	mortal. 1.	0,0256	0,0749				
	trajanje1.	1,2136	0,5555				
	RGR	1,0099	0,0980	0,6498	0,8147	0,3663	1,2188
Uk. mort–	mortal. 1.	1,1367	1,6084				
	trajanje1.	1,4565	0,3764				
	RGR	0,2553	0,6598				
Mortal.1.–	trajanje1.	0,8994	0,3466				
	RGR	0,1453	0,2809				
Trajanje 1.–	RGR	0,1644	0,5720				
SPIRMANOV KOEFICIJENT		0,436	0,632*	-----	-----	-----	-----

* $P < 0,05$, Spirmanov koeficijent nije izračunat tamo gde je broj korelacija koje se porede manji od 5

4.4 ENZIMI UKLJUČENI U VARENJE PROTEINA

4.4.1 UKUPNA AKTIVNOST PROTEAZA

Na slici 7 koja predstavlja srednje vrednosti specifične aktivnosti proteaza kao i linije norme reakcije, vidimo da se i na akutnom i hroničnom tretmanu aktivnost menja na isti način (slike 7A, B). LSD testom je utvrđeno da se samo na većoj koncentraciji kadmijuma (KC2 i C2) aktivnost značajno smanjuje u odnosu na kontrolu. U toku oporavka od C1 ne postoje značajne razlike u odnosu na kontrolu i hronični efekat, dok je aktivnost posle oporavka na C2 značajno manja od aktivnosti na kontroli (slike 7C, D). Linije norme reakcije su predstavljene slikama 7A'–D'. U toku akutnog efekta se smanjuje aktivnost proteaza kod 15 legala, a na hroničnom stresu i oporavku od C2 kod 17, od ukupno 20 legala na kontroli.

Dvofaktorska analiza varijanse (tabela 27) pokazuje da poređenjem akutnog i hroničnog tretmana, akutnog i oporavka, kao i hroničnog i oporavka, koncentracija kadmijuma utiče na promenu specifične aktivnosti proteaze ($P < 0,5$; $P < 0,001$). Iz ove analize možemo zaključiti da aktivnost proteaza može biti osetljiv parametar na prisustvo kadmijuma u hrani. Do sličnih zključaka smo došli i u jednofaktorskoj analizi varijanse (tabela 28). Kadmijum utiče na aktivnost proteaze na akutnom, hroničnom tretmanu i oporavku od C2 (tamo gde postoji značajno smanjenje srednje vrednosti aktivnosti proteaza, slike 7B, D).

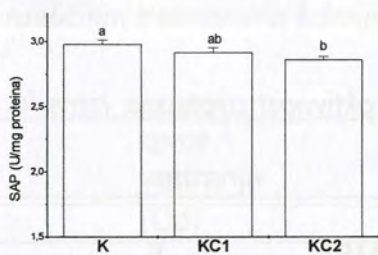
Pad varijansi specifične aktivnosti proteaza između različitih eksperimentalnih grupa je značajan između sledećih tretmana: K i C1, C2, dok je varijansa u toku oporavka sa C2 značajno manja od varijansi na kontroli, zatim C1, C2, KC1 i oporavka sa C1. Na granici značajnosti su F vrednosti između: C1 i KC1, C2 i KC1, KC1 i KC2, KC2 i C1K, KC2 i C2K (tabela 29).

Srednje vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti aktivnosti proteaza pri svim tretmanima imaju pozitivne vrednosti (tabela 30).

Utvrđeno je da je plastičnost manja, a varijabilnost plastičnosti veća, pri hroničnom tretmanu manje koncentracije kadmijuma i oporavku od C1, nego na istim tretmanima na većoj koncentraciji kadmijuma. Pri hroničnom efektu kadmijuma na C2, plastičnost je manja nego na oporavku od iste koncentracije metala, dok je varijabilnost plastičnosti veća u toku dugotrajnog efekta C2 nego na kratkotrajnom tretmanu iste koncentracije kadmijuma (tabela 31). Zaključak je da su na manjoj koncentraciji kadmijuma (C1) vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti manje nego na C2, dok je na C1 veća standardna devijacija indeksa plastičnosti u odnosu na C2.

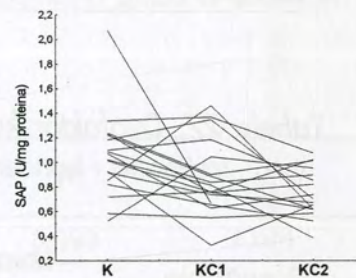
Između 30 i 64 kDa elektroforetski je detektovan veliki broj izoformi proteaza. Broj i prosvetljenost elektroforetskih traka se menja u zavisnosti od vrste tretmana (slika 8). Značajno je da se u prva dva legla na kontroli veoma slabo vide trake ispod 36 kDa, dok kod svih drugih tretmana one postaju vidljivije (od 30 – 36 kDa). Osim toga, postoji razlika u prosvetljenosti istih izoformi kod istih legala na različitim tretmanima (C1, C2, KC1 i KC2). Interesantno je da najvidljivija traka kod svih legala, na svim tretmanima ima molekulsku masu od približno 50 kDa i da se njena prosvetljenost razlikuje između različitih legala u okviru jednog tretmana, kao i u okviru jednog legla pri različitim efektima kadmijuma.

Akutni tretman



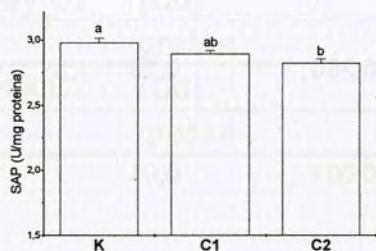
A

$F= 3,39$
 $P= 0,04$



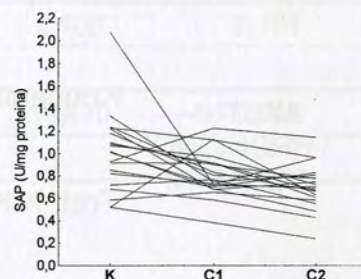
A'

Hronični tretman



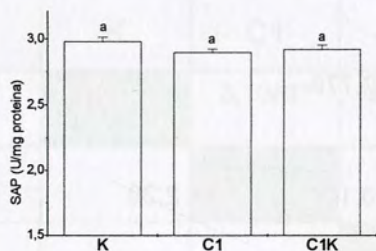
B

$F= 6,42$
 $P= 0,00$



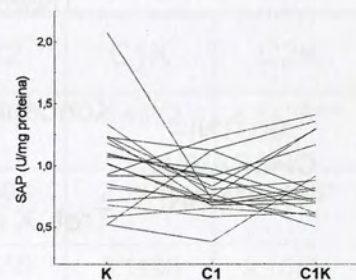
B'

Oporavak od 10 μ gCd/g



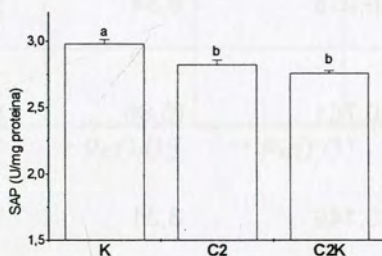
C

$F= 2,11$
 $P= 0,13$



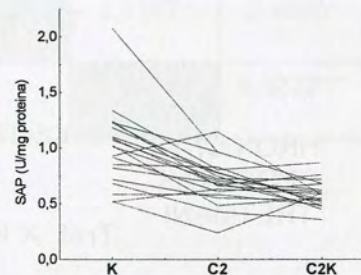
C'

Oporavak od 30 μ gCd/g



D

$F= 14,67$
 $P= 0,00$



D'

Slika 7. Specifična aktivnost proteaza larvi gubara ($\bar{x} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C', D')

Rezultati

Tabela 27. Dvofaktorska ANOVA za specifičnu aktivnost proteaza između različitih tretmana i koncentracija kadmijuma

Poređenje	Izvor variranja	df	MSIII	F	P
AKUTNI-HRONIČNI TRETMANI	Tretman	1	0,062	1,21	0,289
	Koncentracija	1	0,260	5,10	0,027
	Tret. X Konc.	1	0,001	0,01	0,906
	Greška	73	0,051		
AKUTNI-OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	0,134	2,38	0,127
	Koncentracija	1	0,778	13,85	0,000
	Tret. X Konc.	1	0,124	2,20	0,142
	Greška	71	0,056		
HRONIČNI-OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	0,015	0,34	0,562
	Koncentracija	1	0,761	16,96	0,000
	Tret. X Konc.	1	0,149	3,31	0,073
	Greška	71	0,045		

Tabela 28. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti specifične aktivnosti proteaza (MS) u jednofaktorskoj analizi varijanse kod larvi gubara izloženih različitim tretmanima kadmijumom.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	[Cd]	2	0,068	3,393	0,041
	greška	54	0,020		
hronični	[Cd]	2	0,120	6,422	0,003
	greška	57	0,019		
oporavak C1	[Cd]	2	0,038	2,106	0,131
	greška	56	0,018		
oporavak C2	[Cd]	2	0,253	14,670	0,000
	greška	56	0,017		

Tabela 29. F vrednosti dobijene poređenjem varijansi specifične aktivnosti proteaza između različitih eksperimentalnih grupa

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		3,1081*	3,0968*	1,3564	3,5457**	1,4672	8,5435***
C1			1,0037	2,2915+	1,1408	2,1185	2,7488*
C2				2,2832+	1,1450	2,1108	2,7588*
KC1					2,6141+	1,0817	6,2988***
KC2						2,4167+	2,4095+
C1K							5,8232***

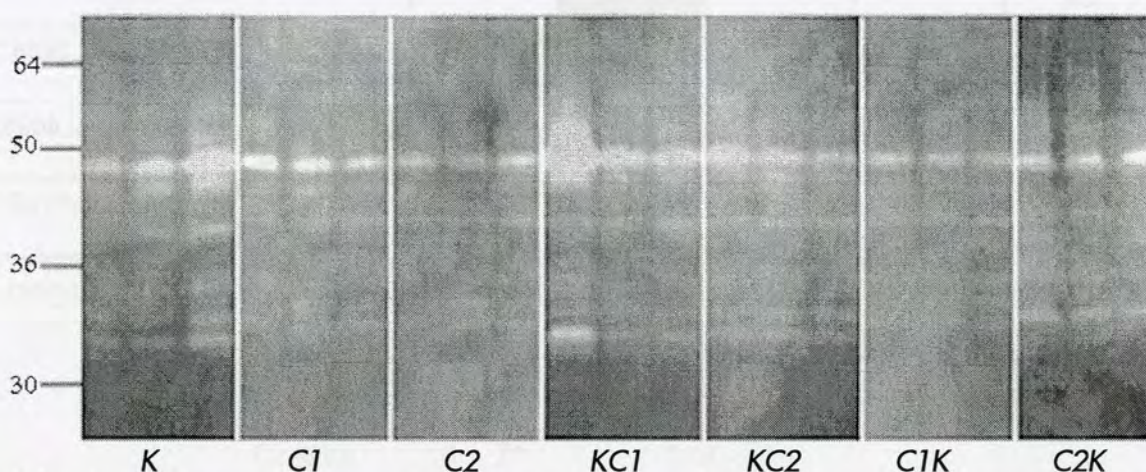
* $P < 0,1$ * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Tabela 30. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti proteaza.

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	18	9,970	41,787	19	14,326	37,602
hronični	20	11,801	37,324	20	27,082	22,349
oporavak	19	1,634	49,879	19	34,783	20,556

Tabela 31. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti proteaza

Poređenje		Z	P	F	P
akutni C1	–akutni C2	1,5385	0,1239	1,2350	0,6602
hronični C1	–hronični C2	2,8746	0,0040	2,7891	0,0307
oporavak C1	–oporavak C2	3,5816	0,0003	5,8882	0,0005
hronični C1	–akutni C1	0,4573	0,6475	1,2534	0,6305
	–oporavak C1	0,7646	0,4445	1,7859	0,2191
hronični C2	–akutni C2	0,8853	0,3760	2,8307	0,0297
	–oporavak C2	2,0524	0,0401	1,1821	0,7262



Slika 8. Izoforme proteaza srednjeg creva larvi gubara četvrtog stupnja pri različitim tretmanima kadmijumom detektovane nativnom PAGE elektroforezom.

4.4.2 TRIPSIN

Slika 9 predstavlja srednje vrednosti i standardne greške aktivnosti tripsina, kao i linije norme reakcije za akutni, hronični tretman i oporavke. U toku akutnog efekta pokazan je pad srednje vrednosti specifične aktivnosti tripsina samo na koncentraciji kadmijuma od 30 $\mu\text{g/g}$ suve hrane. Za razliku od akutnog efekta, na hroničnom tretmanu dolazi do značajnog pada aktivnosti tripsina na obe koncentracije metala. Samo u toku oporavka od C1, specifična aktivnost tripsina se vraća na početnu vrednost, dok se na oporavku od C2 specifična aktivnost tripsina značajno razlikuje od kontrole (slike 9C, D). Verovatno dugotrajan stres na koncentraciji kadmijuma od 30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane dovodi do ireverzibilnih promena u sintezi i/ili sekreciji ovog enzima, a oporavak od tri dana je nedovoljan da bi se aktivnost vratila na kontrolni nivo. Linije norme reakcije pokazuju varijabilnost plastičnosti odgovora (i smanjenje aktivnosti tripsina) na KC2, zatim oba hronična tretmana i oporavku od C2.

Poređenjem akutnog i hroničnog tretmana sa oporavkom u dvofaktorskoj analizi varijanse (tabela 32), zaključeno je da na smanjenje aktivnosti tripsina značajno utiče koncentracija kadmijuma ($P < 0,05$), ali i interakcija (zajedničko delovanje) tretmana (akutni, hronični i oporavak) i koncentracije metala (10 i 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane), ($P < 0,05$ za akutni–oporavak i $P < 0,01$ za hronični–oporavak). Poređenjem aktivnosti tripsina na akutnom i hroničnom efektu kadmijuma utvrđeno je da je samo tretman kadmijumom (dugotrajan–kratkotrajan) odgovoran za razliku u aktivnosti tripsina ($P < 0,05$).

Tabela 33 predstavlja prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti specifične aktivnosti tripsina u jednofaktorskoj analizi varijanse. Kadmijum statistički značajno utiče na aktivnost posmatranog enzima u toku hroničnog tretmana i oba oporavka ($P < 0,01$). Iz analiza varijanse možemo da zaključimo da se aktivnost tripsina menja kako u prisustvu obe posmatrane koncentracije kadmijuma (10 i 30 μg

Cd/g hrane), tako i u zavisnosti od vrste tretmana (hronični ili akutni), te se može smatrati potencijalnim biomarkerom za prisustvo kadmijuma u životnoj sredini.

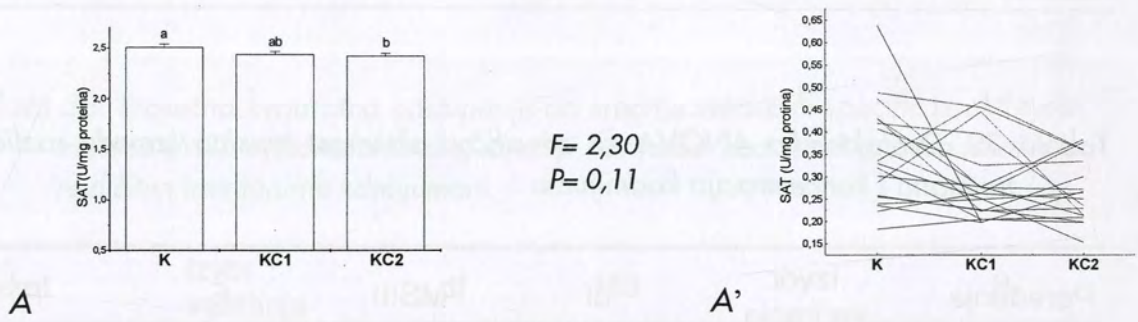
Poređenjem varijansi (tabela 34) specifične aktivnosti tripsina između različitih eksperimentalnih grupa pokazane su značajne razlike između sledećih tretmana: K i C1, K i akutnog efekta na C2, kao i kontrole i oporavka od C2 i između oba oporavka. U svim slučajevima zapažen je pad varijanse u odnosu na kontrolu. Na granici značajnosti su razlike između kontrole i C2, kao i C2 i njenog oporavka. Linije norme reakcije pokazuju smanjenu varijabilnost odgovora legala na hroničnom efektu C2 i oporavku od C2 u odnosu na kontrolu (slike 7B', D'), dok se takođe, na slici 7C jasno vidi povećanje enzimske aktivnosti u toku oporavka od C1.

Sve srednje vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti tripsina imaju pozitivne vrednosti (tabela 35), što ukazuje na veću srednju vrednost aktivnosti tripsina na kontroli u odnosu na aktivnost na tretmanima kadmijumom.

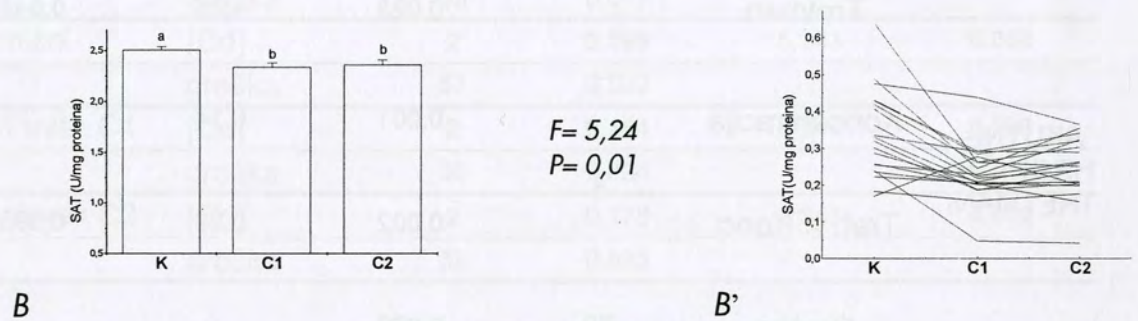
Plastičnost pri dugotrajnom tretmanu na C1 je veća od plastičnosti u toku kratkotrajnih efekata iste koncentracije kadmijuma (akutni i oporavak), dok je plastičnost u toku oporavka od C2 veća od oporavka od C1, kao i od plastičnosti na dugotrajnom tretmanu na većoj koncentraciji kadmijuma (tabela 36). Varijabilnost plastičnosti u toku oporavka od C1 je veća u odnosu na hronični tretman iste koncentracije kadmijuma, kao i od varijabilnosti u toku oporavka od C2. Pri hroničnom tretmanu na C2, varijabilnost je manja nego na akutnom efektu iste koncentracije kadmijuma.

Nativnom elektroforezom detektovane su tri izoforme tripsina (slika 10). Opseg njihovih molekulskih masa se kreće između 36 i 64 kDa. Izoforma najmanje molekulske mase, od približno 36 kDa, je najslabije vidljiva.

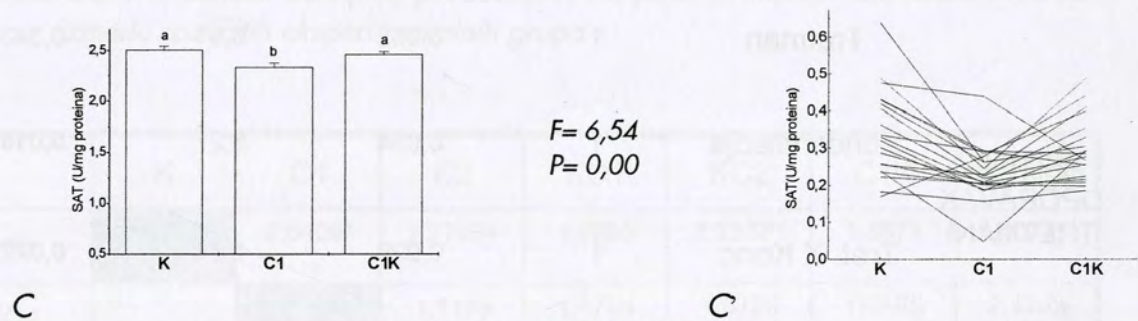
Akutni tretman



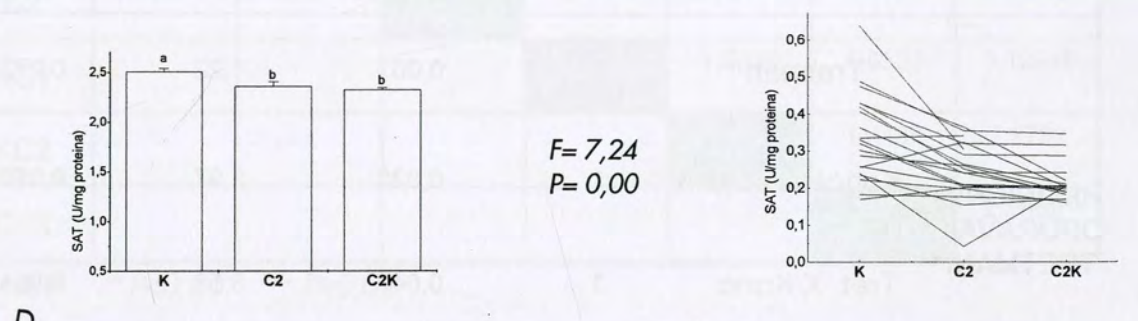
Hronični tretman



Oporavak od 10 μ gCd/g



Oporavak od 30 μ gCd/g



Slika 9. Specifična aktivnost tripsina larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C', D')

Tabela 32. Dvofaktorska ANOVA za specifičnu aktivnost tripsina između različitih tretmana i koncentracija kadmijuma

Poređenje	Izvor variranja	df	MSIII	F	P
AKUTNI- HRONIČNI TRETMANI	Tretman	1	0,023	4,05	0,048
	Koncentracija	1	0,001	0,14	0,709
	Tret. X Konc.	1	0,002	0,29	0,595
	Greška	73	0,006		
AKUTNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	0,005	0,91	0,343
	Koncentracija	1	0,034	6,27	0,015
	Tret. X Konc.	1	0,029	5,48	0,022
	Greška	70	0,005		
HRONIČNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	0,007	1,22	0,272
	Koncentracija	1	0,022	3,97	0,050
	Tret. X Konc.	1	0,047	8,58	0,004
	Greška	73	0,005		

Tabela 33. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti specifične aktivnosti tripsina (MS) u jednofaktorskoj analizi varijanse kod larvi gubara izloženih različitim tretmanima kdmijumom.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	[Cd]	2	0,040	2,299	0,110
	greška	55	0,017		
hronični	[Cd]	2	0,169	5,243	0,008
	greška	57	0,032		
oporavak C1	[Cd]	2	0,154	6,544	0,003
	greška	56	0,024		
oporavak C2	[Cd]	2	0,178	7,243	0,002
	greška	55	0,025		

Tabela 34. F vrednosti dobijene poređenjem varijansi specifične aktivnosti tripsina između različitih eksperimentalnih grupa

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		2,5409*	2,2735+	1,7280	2,7337*	1,8871	5,4077**
C1			1,1176	1,4704	1,0759	1,3465	2,1283
C2				1,3157	1,2024	1,2047	2,3786+
KC1					1,5820	1,0921	3,1294*
KC2						1,4486	1,9782
C1K							2,8656*

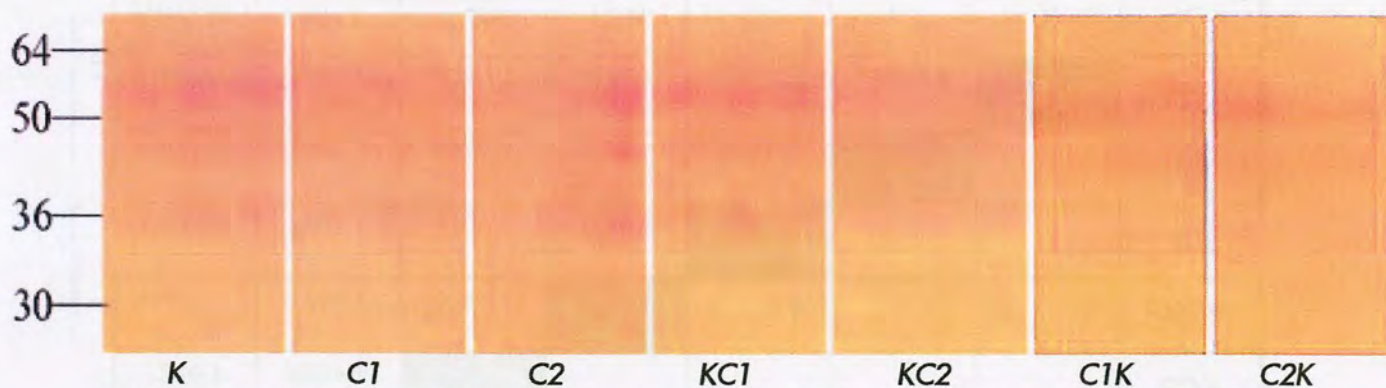
+P<0,1 *P<0,05 **P<0,01

Tabela 35. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti tripsina

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	18	15,154	27,865	19	8,090	40,897
hronični	20	27,307	28,365	20	23,866	24,175
oporavak	19	0,295	45,671	18	29,181	18,031

Tabela 36. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti tripsina.

Poređenje		Z	P	F	P
akutni C1	–akutni C2	0,4497	0,6529	2,1541	0,1204
hronični C1	–hronični C2	1,4933	0,1354	1,3767	0,4926
oporavak C1	–oporavak C2	3,5929	0,0003	6,4156	0,0004
hronični C1	–akutni C1	2,1557	0,0311	1,0362	0,9478
	–oporavak C1	2,8572	0,0043	2,5924	0,0458
hronični C2	–akutni C2	1,1670	0,2432	2,8619	0,0281
	–oporavak C2	2,1122	0,0347	1,7976	0,2296



Slika 10. Izoforme tripsina srednjeg creva larvi gubara četvrtoeg stupnja iz različitih legala izloženih različitim tretmanima kadmijumom

4.4.3 LEUCIN AMINOPEPTIDAZA

Srednja vrednost specifične aktivnosti LAP u toku oba akutna efekta značajno opada u odnosu na kontrolu, što ukazuje na veliku osetljivost ovog enzima u toku kratkotrajnog stresa na kadmijumu (slika 11B). To se jasno vidi na linijama norme reakcije, gde je smanjena varijabilnost aktivnosti LAP na tretmanima kadmijumom, tj. većina legala pokazuje pad aktivnost u odnosu na kontrolu (16 legala na KC1 i 15 legala na KC2 pokazuju manju aktivnost leucin aminopeptidaze u odnosu na 20 na kontroli). Izlaganje larvi hroničnom efektu obe koncentracije kadmijuma dovodi do pada aktivnosti LAP, pa se aktivnost na C1 i C2 značajno razlikuju kako od kontrole, tako i međusobno ($C1 < C2$) (slika 11C). Linije norme reakcije takođe prikazuju pad aktivnosti enzima kod svih legala (19 legala kod kojih je smanjena aktivnost LAP na C1 u odnosu na kontrolu). U toku oporavka od C1, aktivnost se povećava i vraća na kontrolni nivo, dok u toku oporavka od C2 aktivnost LAP nastavlja da opada i značajno se razlikuje od kontrole i C2 (ireverzibilan pad aktivnosti i manja varijabilnost je jasno vidljiv na linijama norme reakcije).

U dvofaktorskoj analizi varijanse poređena je aktivnost leucin aminopeptidaze između različitih tretmana (tabela 37). Promena aktivnosti enzima između akutnog tretmana i oporavka, kao i hroničnog tretmana i oporavka zavise od koncentracije metala i zajedničkog dejstva tretmana i koncentracije metala ($P < 0,05$ za uticaj tretmana između akutnog i oporavka; $P < 0,01$ za uticaj koncentracije između hroničnog tretmana i oporavka i $P < 0,001$ za uticaj koncentracije metala i interakcije "tretman x koncentracija" između akutnog efekta i oporavka, kao i za interakciju tretmana i koncentracije između hroničnog efekta i oporavka), dok je poređenjem akutnog i oporavka uticaj tretmana (akutni ili hronični) na aktivnost LAP na granici značajnosti ($P < 0,1$).

Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da koncentracija kadmijuma značajno utiče na specifičnu aktivnost leucin aminopeptidaze pri svim tretmanima: akutnom, hroničnom i oporavcima (za akutni $P < 0,01$, za hronični i oporavke $P < 0,001$) (tabela 38). Obzirom na sličnu promenu aktivnosti leucin aminopeptidaze, tripsina i proteaza u zavisnosti od tretmana i koncentracija kadmijuma možemo smatrati ovu grupu enzima potencijalnim indikatorima (uz dalja istraživanja) prisustva kadmijuma u životnoj sredini.

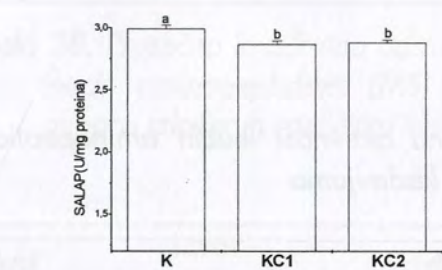
Interesantno je da se značajan pad varijanse specifične aktivnosti LAP primećuje između svih tretmana i opravka od C2 (tabela 39). Ovo potvrđuju i linije norme reakcije na slici 12B',D', gde manje variraju vrednosti specifične aktivnosti LAP za legla na C2K, nego na kontroli ili hroničnom efektu C2.

Kao kod proteaza i tripsina, sve vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti su pozitivne (tabela 40).

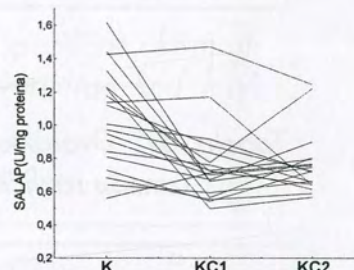
Plastičnost LAP u toku hroničnog efekta C1 je veća od plastičnost pri hroničnom tretmanu C2, i od trodnevnog kratkotrajnog efekta manje koncentracije kadmijuma, kao i od trodnevnog oporavka od C1. Plastičnost pri oporavku od C2 je veća nego plastičnost u toku hroničnog tretmana C2 i oporavka od manje koncentracije kadmijuma (tabela 41). Varijabilnost plastičnosti na oporavku od C2 je manja nego na oporavku od C1.

Detektovana je jedna izoforma leucin aminopeptidaze molekulske mase od približno 80 kDa (slika 12).

Akutni tretman



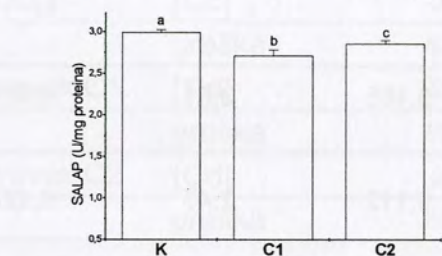
$F = 6,97$
 $P = 0,00$



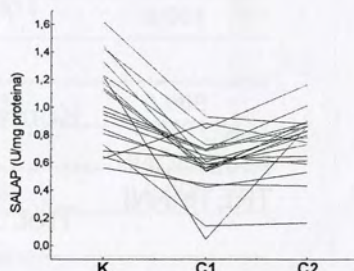
A

A'

Hronični tretman



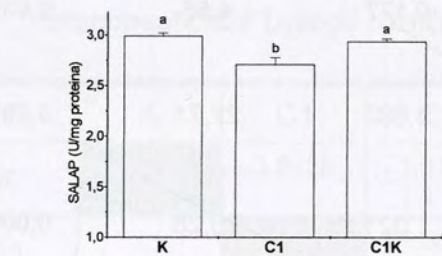
$F = 8,47$
 $P = 0,00$



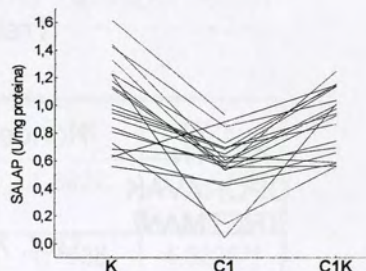
B

B'

Oporavak od 10 μ gCd/g



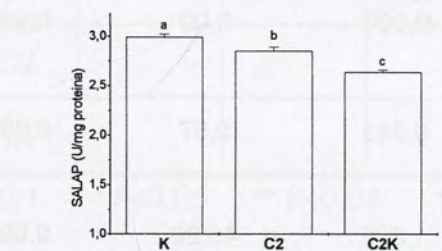
$F = 10,80$
 $P = 0,00$



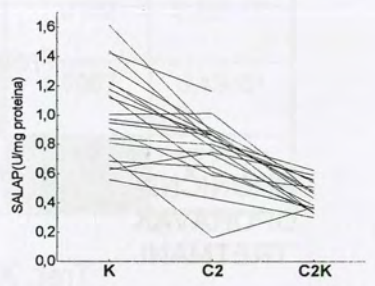
C

C'

Oporavak od 30 μ gCd/g



$F = 29,19$
 $P = 0,00$



D

D'

Slika 11. Specifična aktivnost leucin aminopeptidaze larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C', D')

Rezultati

Tabela 37. Dvofaktorska ANOVA za specifičnu aktivnost leucin aminopeptidaze između različitih tretmana i koncentracija kadmijuma

Poređenje	Izvor variranja	df	MSIII	F	P
AKUTNI- HRONIČNI TRETMANI	Tretman	1	0,177	3,86	0,053
	Koncentracija	1	0,165	3,61	0,061
	Tret. X Konc.	1	0,112	2,43	0,123
	Greška	74	0,046		
AKUTNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	0,177	4,56	0,036
	Koncentracija	1	0,882	22,71	0,000
	Tret. X Konc.	1	1,021	26,28	0,000
	Greška	71	0,039		
HRONIČNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	0,000	0,00	0,968
	Koncentracija	1	0,383	9,57	0,003
	Tret. X Konc.	1	1,836	45,89	0,000
	Greška	73	0,040		

Rezultati

Tabela 38. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti specifične aktivnosti leucin aminopeptidaze (MS) u jednofaktorskoj analizi varijanse kod larvi gubara izloženih različitim tretmanima kdmijumom.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	[Cd]	2	0,093	6,974	0,002
	greška	55	0,013		
hronični	[Cd]	2	0,395	8,471	0,001
	greška	57	0,047		
oporavak C1	[Cd]	2	0,444	10,804	0,000
	greška	56	0,041		
oporavak C2	[Cd]	2	0,595	29,193	0,000
	greška	55	0,020		

Tabela 39. F vrednosti dobijene poređenjem varijansi specifične aktivnosti leucin aminopeptidaze između različitih eksperimentalnih grupa

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		1,9758	1,9161	1,6805	2,5614 ⁺	1,6977	8,9557 ^{***}
C1			1,0312	1,1757	1,2963	1,1638	4,5326 ^{**}
C2				1,1402	1,3368	1,1286	4,6740 ^{**}
KC1					1,5241	1,0102	5,3291 ^{**}
KC2						1,5087	3,4965 [*]
C1K							5,2751 ^{**}

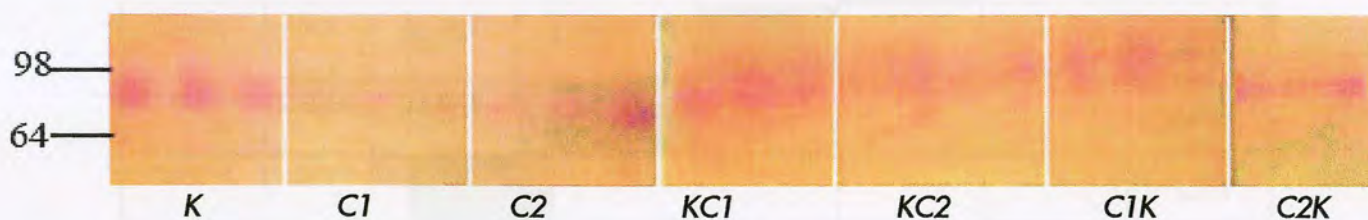
⁺P<0,1 ^{*}P<0,05 ^{**}P<0,01 ^{***}P<0,001

Tabela 40. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti leucin aminopeptidaze.

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	19	23,225	23,433	19	16,273	28,598
hronični	20	38,563	27,588	20	23,780	21,105
oporavak	19	5,843	28,563	18	51,426	15,169

Tabela 41. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti leucin aminopeptidaze.

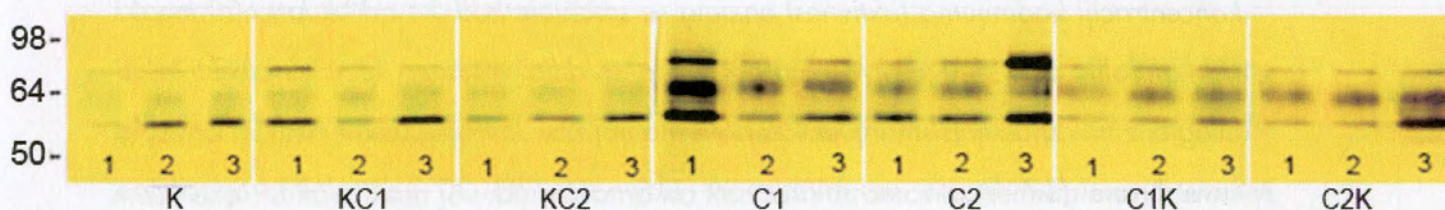
Poređenje		Z	P	F	P
akutni C1	–akutni C2	0,2831	0,7771	1,4894	0,4061
hronični C1	–hronični C2	2,9493	0,0032	1,7087	0,2519
oporavak C1	–oporavak C2	3,7236	0,0002	3,5456	0,0120
hronični C1	–akutni C1	3,1389	0,0017	1,3861	0,4929
	–oporavak C1	3,7425	0,0002	1,0719	0,8795
hronični C2	–akutni C2	0,3622	0,7172	1,8361	0,1982
	–oporavak C2	3,2881	0,0010	1,9358	0,1768



Slika 12.. Zimogramska detekcija leucin–aminopeptidaze nativnom PAGE elektroforezom

4.5 ALKALNE FOSFATAZE

Na slici 13 se vide tri osnovne izoforme alkalnih fosfataza u intervalu od 50 do 98kDa. Jasno su vidljive razlike u ekspresiji izoformi između različitih tretmana.



Slika 13. Elektroforetski profili izoformi alkalnih fosfataza larvi gubara četvrtog stupnja pri različitim efektima kadmijuma, dobijeni nativnom poliakrilamidnom elektroforezom.

4.6 ENZIMI UKLJUČENI U VARENJE UGLJENIH HIDRATA

4.6.1 ALFA GLIKOZIDAZA

Slika 14 prikazuje promenu srednje vrednosti aktivnosti α -glikozidaze, kao i varijabilnost odgovora legla na različitim tretmanima (linije norme reakcije). U toku akutnog efekta dolazi do značajnog pada aktivnosti alfa glikozidaze samo na većoj koncentraciji kadmijuma (aktivnost enzima se smanjuje kod 14 od ukupno 20 legala na kontroli), dok se u toku hroničnog stresa srednja vrednost specifičnih aktivnosti ovog enzima značajno smanjuje samo pri manjoj koncentraciji metala od 10 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane (17 legala sa smanjenom aktivnošću od 20 kontrolnih). Specifična aktivnost u toku oporavka od C1 se vraća na kontrolni nivo, dok je u toku oporavka od C2 aktivnost značajno manja od kontrole (ireverzibilno smanjenje), što se vidi na linijama norme reakcija (slika 14C, D').

α -glikozidaze pokazuju veliku osetljivost u zavisnosti od koncentracije i tipa tretmana metalom. Poređenjem akutnog efekta i oporavka (dvofaktorska analiza varijanse, tabela 42) utvrđeno je da samo koncentracija metala utiče na promenu aktivnosti α -glikozidaze ($P < 0,05$), dok je interakcija tretmana i koncentracije kadmijuma ključan faktor u promeni aktivnosti enzima između hroničnog tretmana i oporavka ($P < 0,05$).

Tabela 43 predstavlja vrednost prosečnog kvadratnog odstupanja od srednje vrednosti specifičnih aktivnosti alfa glikozidaze u jednofaktorskoj analizi varijanse. Kadmijum značajno utiče na aktivnost posmatranog enzima u toku svih tretmana (akutnog, hroničnog i oba oporavka, $P < 0,01$).

F test u poređenju varijansi specifičnih aktivnosti glikozidaza pokazuje značajne razlike između sledećih eksperimentalnih grupa: kontrole i KC2 i kontrole i C2K (tabela 44). U oba slučaja varijansa na kontroli je manja, što se može videti i na linijama norme reakcije. Na granici značajnosti je F vrednost između kontrole i C1 ($K < C1$).

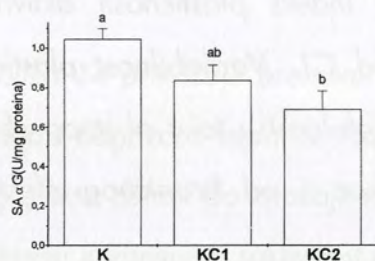
Sve srednje vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti alfa glikozidaze imaju pozitivne vrednosti (tabela 45).

Plastičnost u toku hroničnog tretmana na C1 je veća nego na C2 ili u toku oporavka od C1. U toku oporavka od C2, indeks plastičnosti aktivnosti alfa glikozidaze je veći u odnosu na oporavak od C1. Varijabilnost plastičnosti na hroničnom tretmanu na C2 je manja nego varijabilnost u toku akutnog efekta C2 i oporavka od iste koncentracije kadmijuma, kao i od hroničnog efekta manje koncentracije kadmijuma (tabela 46).

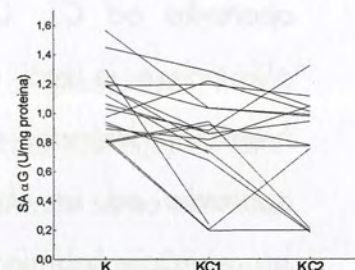
Slike 15 i 16 predstavljaju izoforme alfa glikozidaze. Na gelu su detektovane tri jasno vidljive izoforme, molekulskih masa od 50 do 64 kDa, kao i traka molekulske mase oko 98 kDa, koja je vidljiva samo na kontroli i hroničnim tretmanima. Intenziteti fluorescencije se razlikuju u zavisnosti od tretmana (na K su izoforme najjače obojene).

Rezultati

Akutni tretman



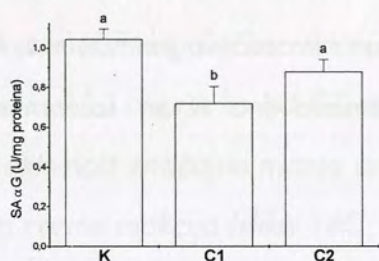
$F = 5,90$
 $P = 0,00$



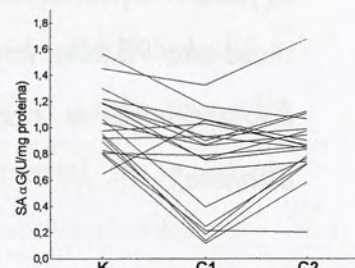
A

A'

Hronični tretman



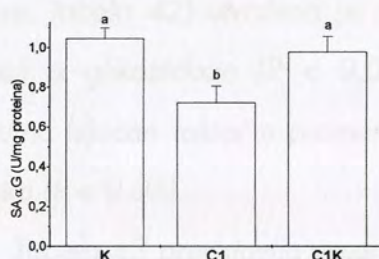
$F = 6,04$
 $P = 0,00$



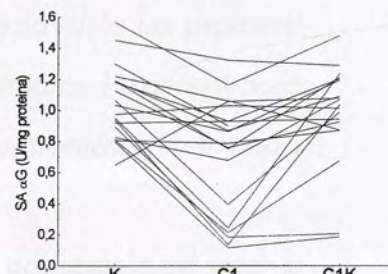
B

B'

Oporavak od 10 μ gCd/g



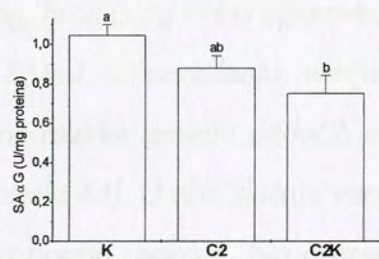
$F = 5,35$
 $P = 0,01$



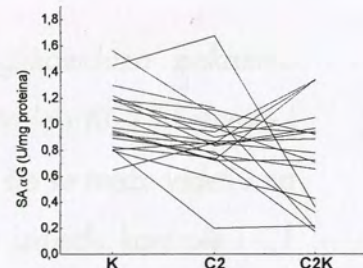
C

C'

Oporavak od 30 μ gCd/g



$F = 5,26$
 $P = 0,01$



D

D'

Slika 14. Specifična aktivnost alfa glikozidaze larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C', D')

Tabela 42. Dvofaktorska ANOVA za specifičnu aktivnost alfa glikozidaze između različitih tretmana i koncentracija kadmijuma

Poređenje	Izvor variranja	df	MSIII	F	P
AKUTNI-HRONIČNI TRETMANI	Tretman	1	0,027	0,22	0,641
	Koncentracija	1	0,001	0,00	0,945
	Tret. X Konc.	1	0,457	3,77	0,056
	Greška	74	0,121		
	Tretman	1	0,199	1,51	0,224
AKUTNI-OPORAVAK TRETMANI	Koncentracija	1	0,660	5,00	0,028
	Tret. X Konc.	1	0,028	0,22	0,644
	Greška	72	0,132		
	Tretman	1	0,083	0,71	0,402
HRONIČNI-OPORAVAK TRETMANI	Koncentracija	1	0,021	0,18	0,670
	Tret. X Konc.	1	0,717	6,10	0,016
	Greška	74	0,117		
	Tretman	1	0,083	0,71	0,402

Rezultati

Tabela 43. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti specifične aktivnosti alfa-glukozidaze (MS) u jednofaktorskoj analizi varijanse kod larvi gubara izloženih različitim tretmanima kdmijumom.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	[Cd]	2	0,371	5,905	0,005
	greška	55	0,063		
hronični	[Cd]	2	0,304	6,040	0,004
	greška	57	0,050		
oporavak C1	[Cd]	2	0,320	5,348	0,007
	greška	56	0,060		
oporavak C2	[Cd]	2	0,209	5,261	0,008
	greška	56	0,040		

Tabela 44. F vrednosti dobijene poređenjem varijansi specifične aktivnosti alfa-glukozidaze između različitih eksperimentalnih grupa

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		2,5223*	1,3856	2,0190	2,9297*	1,9601	2,7056*
C1			1,8204	1,2493	1,1615	1,2868	1,0727
C2				1,4571	2,1144	1,4146	1,9526
KC1					1,4511	1,0300	1,3401
KC2						1,4947	1,0828
C1K							1,3803

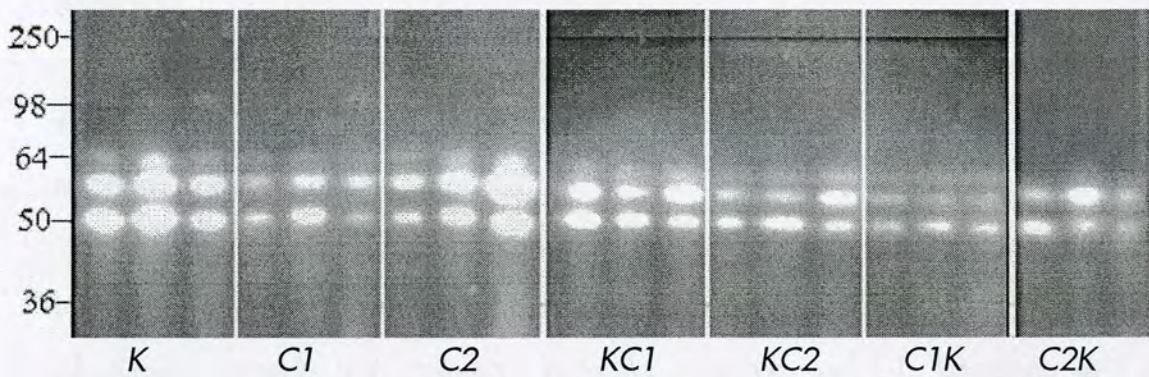
*P<0,1 *P<0,05

Tabela 45. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti alfa-glukozidaze

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	19	20,436	32,547	19	34,031	36,882
hronični	20	31,133	37,298	20	15,506	21,225
oporavak	19	4,125	33,126	19	23,560	42,820

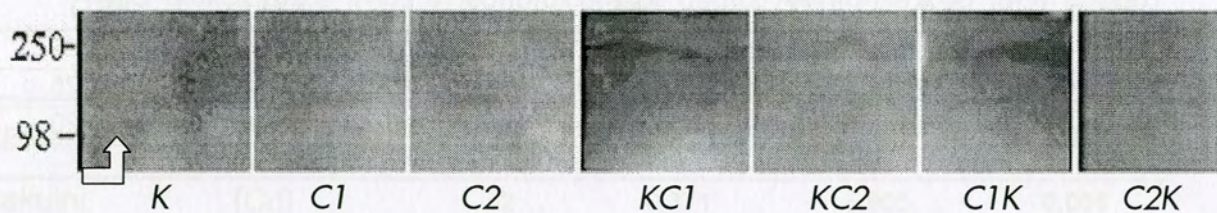
Tabela 46. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti alfa-glukozidaze

Poređenje		Z	P	F	P
akutni C1	–akutni C2	1,7202	0,0854	1,2842	0,6013
hronični C1	–hronični C2	2,2026	0,0276	3,0881	0,0180
oporavak C1	–oporavak C2	1,9719	0,0486	1,6709	0,2854
hronični C1	–akutni C1	0,8451	0,3981	1,3133	0,5672
	–oporavak C1	3,2596	0,0011	1,2678	0,6186
hronični C2	–akutni C2	1,3280	0,1842	3,0196	0,0212
	–oporavak C2	0,8853	0,3760	4,0701	0,0039

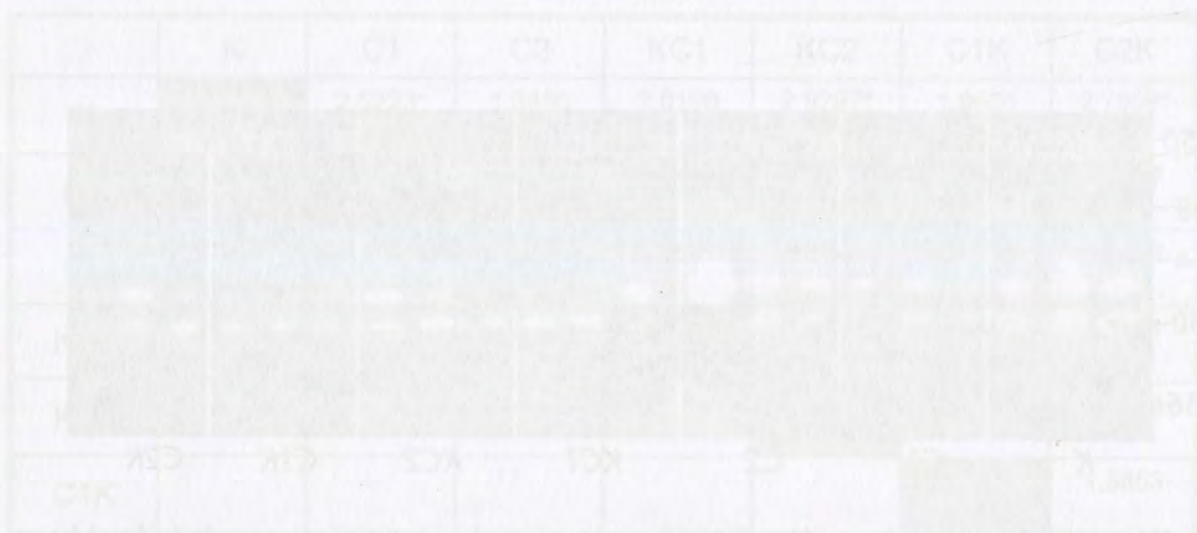


Slika 15. Zimogramski profili alfa-glukozidaze razdvojeni nativnom poliakrilamidnom elektroforezom.

Rezultati



Slika 16. Izoforme alfa glikozidaze velike molekulske mase detektovane samo na kontroli i hroničnim tretmanima.



4.6.2 BETA GLIKOZIDAZA

Srednje vrednosti specifične aktivnosti beta glikozidaze se ne razlikuju značajno od kontrolne vrednosti u toku akutnog i hroničnog stresa, kao ni u toku oporavka od C2 (slike 17B, D). Samo se aktivnost u toku oporavka od C1 značajno razlikuje od hroničnog efekta iste koncentracije kadmijuma (slika 17C). Plastičnost odgovora po leglima je predstavljena linijama norme reakcije, slike 17A'-D'.

Poređenjem akutnog i hroničnog tretmana sa oporavkom u dvofaktorskoj analizi varijanse utvrđeno je da tip tretmana metalom u oba slučaja utiče na promenu aktivnosti β -glikozidaze, $P < 0,05$, (tabela 47).

Značajan uticaj kadmijuma na aktivnost beta glikozidaze u toku oporavka od C1 je potvrđen i jednofaktorskom analizom varijanse (tabela 48). Na svim ostalim tretmanima (akutnom, hroničnom i oporavku od C2), kadmijum ne utiče značajno na promenu aktivnosti enzima.

Značajne F vrednosti su dobijene poređenjem varijansi specifične aktivnosti beta glikozidaze između sledećih eksperimentalnih grupa: K i C2, C1 i C2, C1 i C1K ($C2 > K$ i $C1K > C1$), C2 i KC2 i C2 i C2K (na C2 je veća varijansa nego na KC2 i C2K). U toku oba oporavka (C1K i C2K) povećava se varijansa u odnosu na kontrolu (slika 49).

U tabeli 50 su date srednje vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti sa standardnim devijacijama. Negativna srednja vrednost fenotipske plastičnosti je dobijena samo na oporavku od C1.

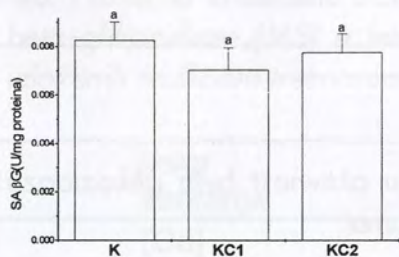
U toku dugotrajnog tretmana manje koncentracije kadmijuma plastičnost je veća nego u toku oporavka od iste koncentracije kadmijuma, dok je varijabilnost plastičnosti između istih tretmana veća na oporavku od C1. Utvrđeno je i da je varijabilnost veća u toku oporavka od C1 nego na oporavku od C2 (tabela 51).

Nativnom elektroforezom detektovana je jedna forma beta glikozidaze, molekulske mase oko 36 kDa (slika 18). Intenzitet prosvetljenosti traka se razlikuje

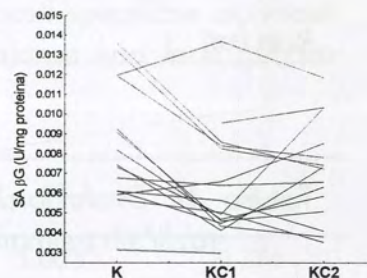
Rezultati

kod istih legala na različitim tretmanima, kao i između različitih legala u okviru istih tretmana.

Akutni tretman



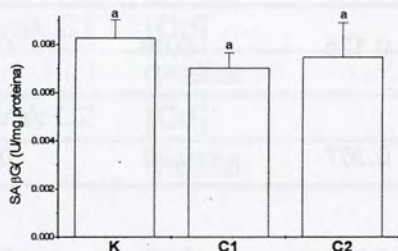
$F= 1,00$
 $P= 0,37$



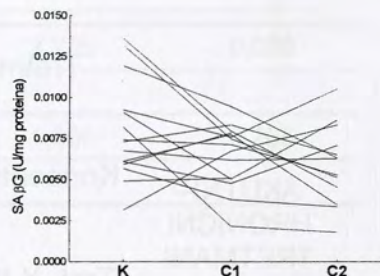
A

A'

Hronični tretman



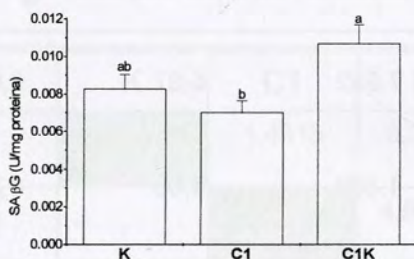
$F= 0,95$
 $P= 0,39$



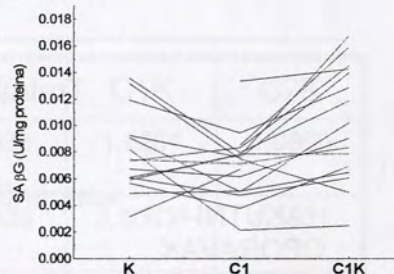
B

B'

Oporavak od 10µgCd/g



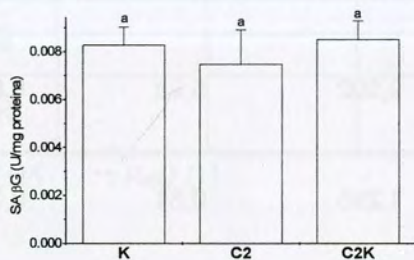
$F= 3,75$
 $P= 0,03$



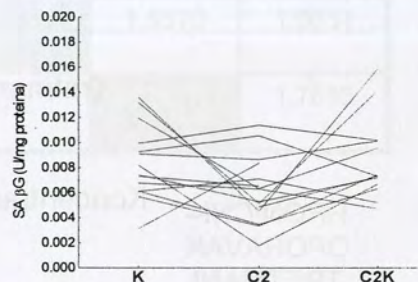
C

C'

Oporavak od 30µgCd/g



$F= 1,37$
 $P= 0,26$



D

D'

Slika 17. Specifična aktivnost beta glikozidaze larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C', D')

Rezultati

Tabela 47. Dvofaktorska ANOVA za specifičnu aktivnost beta glikozidaze između različitih tretmana i koncentracija kadmijuma

Poređenje	Izvor variranja	df	MSIIIx10 ⁻⁵	F	P
AKUTNI- HRONIČNI TRETMANI	Tretman	1	0,125	0,08	0,773
	Koncentracija	1	0,367	0,25	0,622
	Tret. X Konc.	1	0,000	0,00	0,992
	Greška	64	1,497		
AKUTNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	7,632	5,87	0,018
	Koncentracija	1	1,302	1,00	0,321
	Tret. X Konc.	1	3,141	2,41	0,125
	Greška	67	1,301		
HRONIČNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	9,502	5,93	0,018
	Koncentracija	1	1,295	0,81	0,372
	Tret. X Konc.	1	3,014	1,88	0,175
	Greška	65	1,603		

Tabela 48. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti specifične aktivnosti beta-glikozidaze (MS) u jednofaktorskoj analizi varijanse kod larvi gubara izloženih različitim tretmanima kadmijumom.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	[Cd]	2	0,033	1,003	0,374
	greška	50	0,033		
hronični	[Cd]	2	0,040	0,952	0,393
	greška	47	0,042		
oporavak C1	[Cd]	2	0,134	3,755	0,030
	greška	50	0,036		
oporavak C2	[Cd]	2	0,055	1,366	0,265
	greška	47	0,040		

Tabela 49. F vrednosti dobijene poređenjem varijansi specifične aktivnosti beta-glikozidaze između različitih eksperimentalnih grupa

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		1,4615	3,3649*	1,4975	1,1588	1,9201	1,0900
C1			4,9179**	2,1886	1,6936	2,8063*	1,5931
C2				2,2470	2,9038*	1,7525	3,0871*
KC1					1,2923	1,2822	1,3738
KC2						1,6570	1,0631
C1K							1,7615

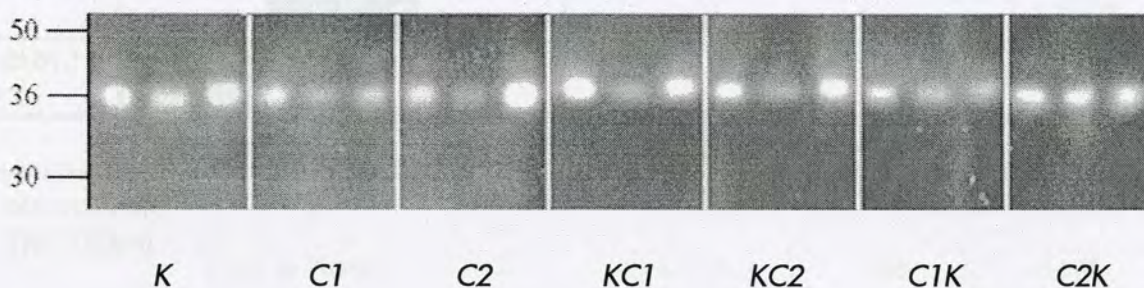
* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

Tabela 50. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti beta-glikozidaze

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	14	29,101	19,629	16	24,162	25,899
hronični	15	22,884	26,709	14	22,247	34,892
oporavak	16	-16,323	60,232	14	10,357	23,508

Tabela 51. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti beta-glikozidaze

Poređenje		Z	P	F	P
akutni C1	-akutni C2	0,4080	0,6832	1,7410	0,3218
hronični C1	-hronični C2	0,2446	0,8068	1,7067	0,3332
oporavak C1	-oporavak C2	0,9730	0,3305	6,5647	0,0015
hronični C1	-akutni C1	1,0133	0,3109	1,8515	0,2753
	-oporavak C1	2,9191	0,0035	5,0856	0,0041
hronični C2	-akutni C2	0,5241	0,6002	1,8150	0,2690
	-oporavak C2	1,4226	0,1549	2,2030	0,1677



Slika 18. Zimogramska detekcija nativnom elektroforezom beta glikozidaze srednjeg creva larvi gubara četvrto larvenog stupnja, pri različitim tretmanima kadmijom.

4.7 ENZIMI DETOKSIFIKACIJE

4.7.1 ESTERAZE

Na slikama 19A i 19B se jasno vidi da u toku akutnog i hroničnog tretmana esteraze imaju veliku osetljivost, jer na manjoj koncentraciji kadmijuma na akutnom i hroničnom tretmanu dolazi do pada srednje vrednosti specifične aktivnosti esteraza u odnosu na kontrolu. U toku akutnog tretmana linije norme reakcije pokazuju da se aktivnost esteraze na KC1 smanjuje kod 15 legala, a na C1 čak kod 17 od ukupno 20 legala na kontroli. Možda se esteraze mogu koristiti kao biomarkeri za detekciju ksenobiotika prisutnih u malim količinama u životnoj sredini. Kod oporavka od C1 aktivnost esteraza se vraća na kontrolni nivo (slika 19C), dok je u toku oporavka od C2 pad aktivnosti ireverzibilan.

Dvofaktorskom analizom varijanse je utvrđeno da poređenjem akutnog tretmana i oporavka interakcija između tretmana i koncentracije kadmijuma utiče na promenu aktivnosti esteraza, dok je poređenjem hroničnog tretmana i oporavka detektovano da sam tretman metalom utiče na promenu aktivnosti esteraze (tabela 52).

Jednofaktorska analiza varijanse pokazuje da aktivnost esteraza pri akutnom efektu i oporavcima od obe koncentracije, značajno zavisi od tretmana kadmijumom (tabela 53).

F vrednosti dobijene poređenjem varijansi specifične aktivnosti esteraza su statistički značajne između sledećih grupa: C1 i KC2, kao i C1 i C2K. U oba slučaja varijansa je veća na hroničnom tretmanu C1. Na granici značajnosti su razlike između varijansi kontrolne grupe i KC2, kao i između K i C2K (tabela 54).

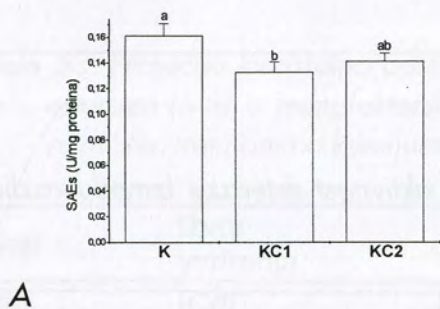
Vrednost indeksa fenotipske plastičnosti ima negativnu vrednost samo na oporavku od C1 (tabela 55). Znači, da je kao i kod β -glikozidaze, aktivnost esteraze u toku oporavka od C1 veća nego na kontroli.

Rezultati

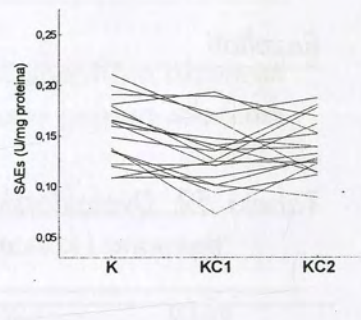
Interesantno je da su plastičnost specifične aktivnosti esteraza veće pri dugotrajnim efektima ($C1 > C1K$ i $C2 > KC2$), dok je varijabilnost plastičnosti takođe veća na $C1$ u odnosu na $KC1$ (tabela 56). Međutim, na oporavku od $C2$ plastičnost je veća nego u toku oporavka od manje koncentracije metala.

Elektroforetski je detektovano više različitih izoformi esteraza molekulskih masa od 64–250 kDa (slika 20). Izoforma veće molekulske mase (oko 250 kDa) je vidljiva samo na kontroli i pri hroničnim tretmanima. U zavisnosti od vrste tretmana dolazi do promene u nivou ekspresije i tipu esteraza.

Akutni tretman



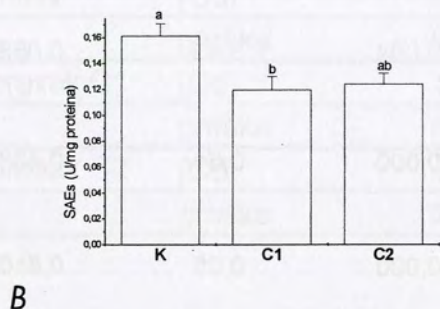
$F = 3,52$
 $P = 0,04$



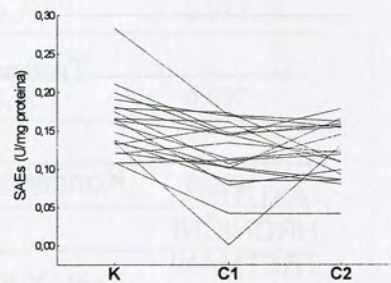
A

A'

Hronični tretman



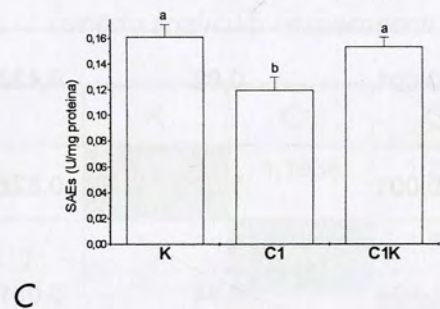
$F = 2,77$
 $P = 0,07$



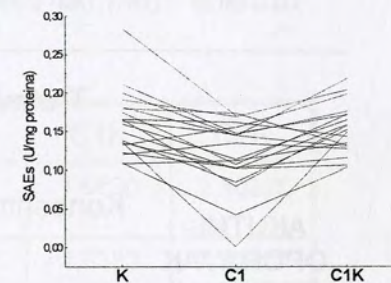
B

B'

Oporavak od 10 μ gCd/g



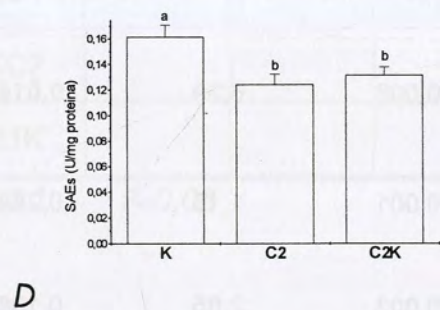
$F = 3,50$
 $P = 0,04$



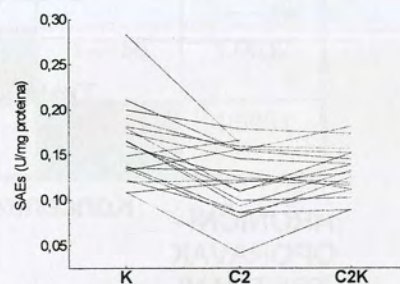
C

C'

Oporavak od 30 μ gCd/g



$F = 5,68$
 $P = 0,01$



D

D'

Slika 19. Specifična aktivnost esteraze larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C', D')

Rezultati

Tabela 52. Dvofaktorska ANOVA za specifičnu aktivnost esteraze između različitih tretmana i koncentracija kadmijuma

Poređenje	Izvor variranja	df	MSIII	F	P
AKUTNI- HRONIČNI TRETMANI	Tretman	1	0,004	3,43	0,068
	Koncentracija	1	0,000	0,61	0,438
	Tret. X Konc.	1	0,000	0,05	0,816
	Greška	73	0,001		
AKUTNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	0,001	0,62	0,432
	Koncentracija	1	0,001	1,00	0,322
	Tret. X Konc.	1	0,004	4,84	0,031
	Greška	70	0,001		
HRONIČNI- OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	0,008	6,39	0,014
	Koncentracija	1	0,001	1,16	0,284
	Tret. X Konc.	1	0,003	2,65	0,108
	Greška	73	0,001		

Tabela 53. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti specifične aktivnosti esteraza (MS) u jednofaktorskoj analizi varijanse kod larvi gubara izloženih različitim tretmanima kdmijumom.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	[Cd]	2	0,035	3,523	0,036
	greška	54	0,010		
hronični	[Cd]	2	0,238	2,768	0,071
	greška	57	0,086		
oporavak C1	[Cd]	2	0,289	3,500	0,037
	greška	56	0,083		
oporavak C2	[Cd]	2	0,079	5,683	0,006
	greška	55	0,014		

Tabela 54. F vrednosti dobijene poređenjem varijansi specifične aktivnosti esteraza između različitih eksperimentalnih grupa

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		1,1655	1,3337	1,6239	2,3542 ⁺	1,6630	2,5029 ⁺
C1			1,5545	1,8927	2,7439 [*]	1,9383	2,9173 [*]
C2				1,2176	1,7651	1,2469	1,8767
KC1					1,4497	1,0241	1,5413
KC2						1,4156	1,0632
C1K							1,5051

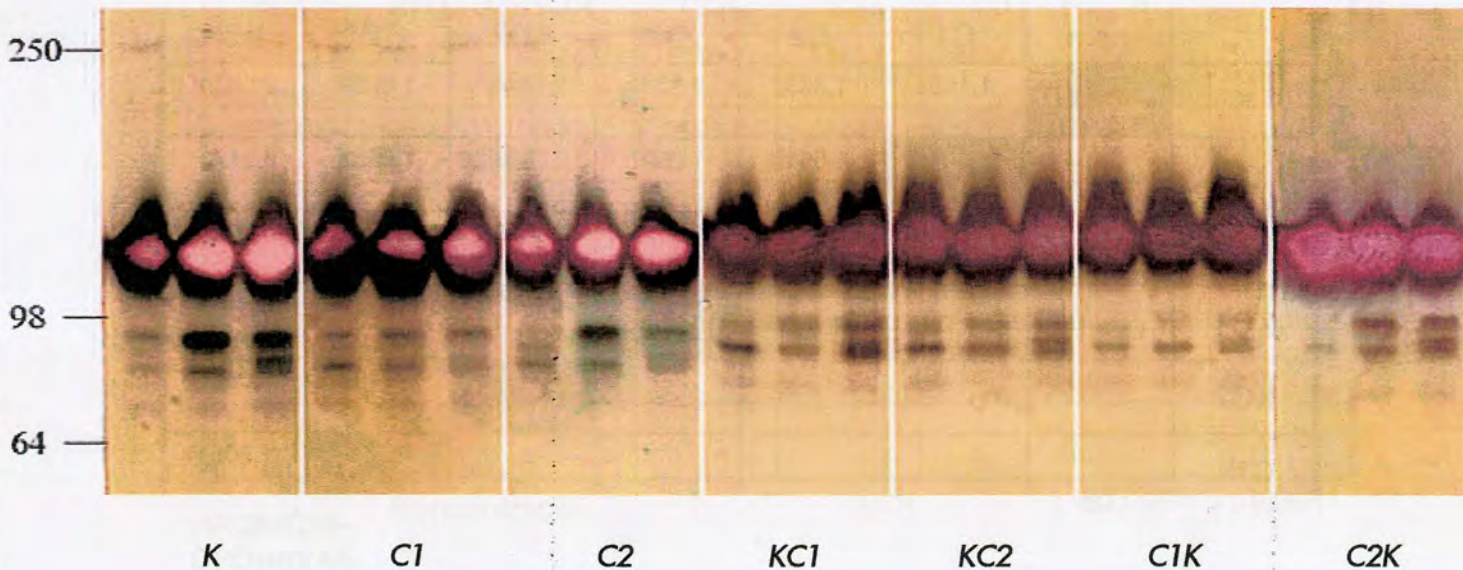
⁺P<0,1 ^{*}P<0,05

Tabela 55. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti esteraza

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	18	14,452	15,217	19	6,906	18,710
hronični	20	25,279	26,766	20	21,841	21,526
oporavak	19	-0,369	18,492	18	14,226	14,447

Tabela 56. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti esteraza

Poređenje		Z	P	F	P
akutni C1	-akutni C2	1,3283	0,1841	1,5118	0,3994
hronični C1	-hronični C2	0,2613	0,7938	1,5461	0,3505
oporavak C1	-oporavak C2	2,5912	0,0096	1,6383	0,3146
hronični C1	-akutni C1	1,7202	0,0854	3,0941	0,0232
	-oporavak C1	3,0182	0,0025	2,0950	0,1230
hronični C2	-akutni C2	2,6157	0,0089	1,3237	0,5559
	-oporavak C2	1,4589	0,1446	2,2201	0,1043



Slika 20. Elektroforetski profili izoformi esteraza larvi gubara četvrtog stupnja pri različitim efektima kadmijuma, dobijeni nativnom poliakrilamidnom elektroforezom.

4.7.2 GLUTATION S-TRANSFERAZA

Slike kojima je predstavljena srednja vrednost specifične aktivnosti glutacion S-transferaze pokazuju da se aktivnost ne menja značajno u odnosu na kontrolu u toku akutnog i hroničnog efekta ni na jednoj koncentraciji kadmijuma (slike 21A i 21B). Linije norme reakcije prikazuju heterogeno ponašanje legala pri istim efektima kadmijuma. Interesantno je da se u toku oporavka od C1, odnosno C2 primećuje povećanje specifične aktivnosti GST. Naime, u toku oporavka od C1 vidi se značajno povećanje aktivnosti kod 15 od 20 legala koja su bila na hroničnom tretmanu na C1 (slika 21C'), dok 14 od 20 legala pokazuje veću aktivnost na oporavku od C2 u odnosu hronični stres na C2 (slika 21D').

Na tabeli 57 prikazani su rezultati poređenja različitih tretmana na specifičnu aktivnost GST (dvofaktorska ANOVA). Poređenjem aktivnosti GST između akutnog i hroničnog tretmana i hroničnog i oporavka vidimo da tretman kadmijumom direktno utiče na promenu aktivnosti GST. Zajedničko delovanje (interakcija) tretmana i koncentracije utiče na promenu aktivnosti GST između akutnog i hroničnog tretmana i akutnog i oporavka. Poređenjem hroničnog tretmana i oporavka došlo se do zaključka da koncentracija metala značajno utiče na promenu aktivnosti GST.

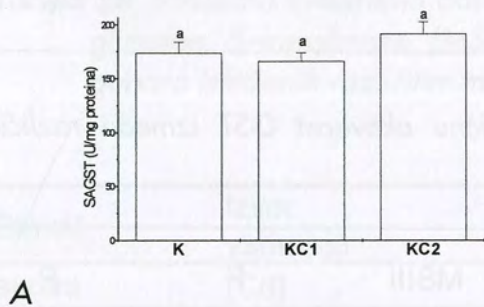
Jednofaktorskom analizom varijanse (tabela 58) utvrđeno je da kadmijum dovodi do značajne promene specifične aktivnosti GST samo u toku oporavka od manje koncentracije kadmijuma, $P < 0,05$.

Poređenjem varijansi specifične aktivnosti GST između različitih eksperimentalnih grupa detektovana je samo jedna značajna F vrednost između C1 i C2K (varijansa na C1 je manja od C2K, tabela 59). F vrednosti na granici značajnosti su između sledećih tretmana: C1 i KC2, KC1 i C2K. Linije norme reakcije, takođe, ne pokazuju vidljivu promenu varijabilnosti (značajan pad ili povećanje) aktivnosti GST po leglima pri različitim efektima kadmijuma (slike 21A'-D').

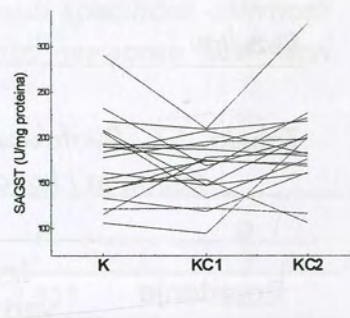
Srednje vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti na većini tretmana imaju negativnu vrednost, što ukazuje na veću vrednost aktivnosti GST na tretmanima u odnosu na kontrolu, osim pri akutnom efektu na C1 i hroničnom na C2 (tabela 60).

Interesantno je da poređenjem standardnih devijacija indeksa fenotipske plastičnosti GST nije dobijena ni jedna značajna F vrednost, dok su poređenjem indeksa plastičnosti skoro sve Z vrednosti značajne. Samo se plastičnost GST između hroničnog efekta C1 i akutnog tretmana na istoj koncentraciji kadmijuma ne razlikuje (tabela 61). Indeks fenotipske plastičnosti ima manju vrednost i na akutnom i hroničnom tretmanu na C1 u odnosu na iste tretmane na većoj koncentraciji kadmijuma. GST u toku oporavka od C1 ima veću vrednost plastičnosti nego na hroničnom tretmanu C1 i oporavku od C2, dok je indeks fenotipske plastičnosti u toku hroničnog tretmana na C2 manji od plastičnosti u toku akutnog efekta na istoj koncentraciji, a veći od oporavka od 30 µg/g suve hrane.

Akutni tretman



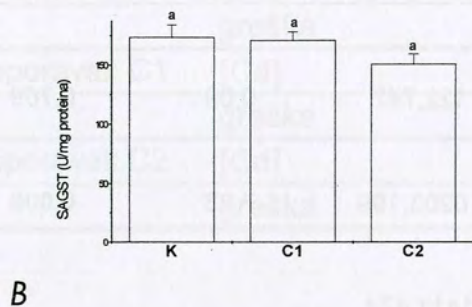
$F = 1,63$
 $P = 0,20$



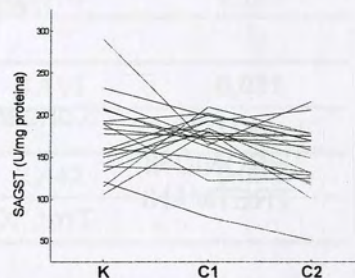
A

A'

Hronični tretman



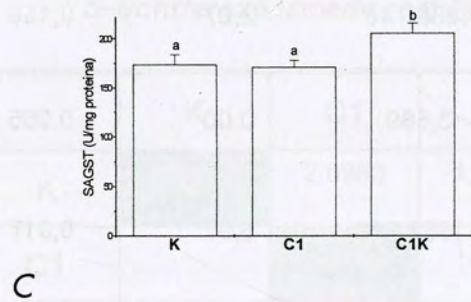
$F = 2,08$
 $P = 0,13$



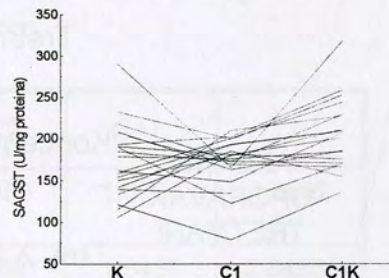
B

B'

Oporavak od 10 μ gCd/g



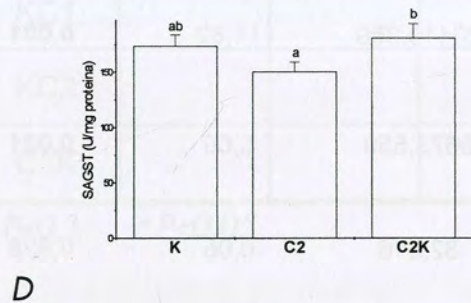
$F = 4,12$
 $P = 0,02$



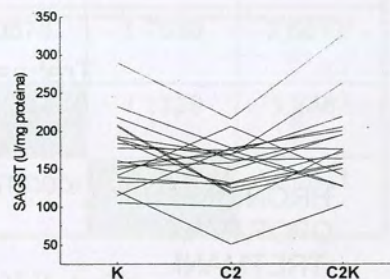
C

C'

Oporavak od 30 μ gCd/g



$F = 2,44$
 $P = 0,10$



D

D'

Slika 21. Specifična aktivnost beta GST larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C', D')

Rezultati

Tabela 57. Dvofaktorska ANOVA za specifičnu aktivnost GST između različitih tretmana i koncentracija kadmijuma

Poređenje	Izvor variranja	df	MSIII	F	P
AKUTNI-HRONIČNI TRETMANI	Tretman	1	6257,503	4,43	0,039
	Koncentracija	1	122,747	0,09	0,769
	Tret. X Konc.	1	10203,199	7,23	0,009
	Greška	64	1411,474		
AKUTNI-OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	4038,740	2,07	0,155
	Koncentracija	1	3,689	0,00	0,965
	Tret. X Konc.	1	11663,710	5,97	0,017
	Greška	67	1954,139		
HRONIČNI-OPORAVAK TRETMANI	Tretman	1	20419,350	11,82	0,001
	Koncentracija	1	9673,559	5,60	0,021
	Tret. X Konc.	1	82,016	0,05	0,828
	Greška	65	1727,076		

Tabela 58. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti specifične aktivnosti glutation S-transferaze (MS) u jednofaktorskoj analizi varijanse kod larvi gubara izloženih različitim tretmanima kdmijumom.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	[Cd]	2	0,018	1,631	0,205
	greška	55	0,011		
hronični	[Cd]	2	0,028	2,076	0,135
	greška	57	0,013		
oporavak C1	[Cd]	2	0,040	4,116	0,021
	greška	56	0,010		
oporavak C2	[Cd]	2	0,037	2,442	0,096
	greška	55	0,015		

Tabela 59. F vrednosti dobijene poređenjem varijansi specifične aktivnosti glutation S-transferaze između različitih eksperimentalnih grupa

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		2,0953	1,3866	1,9005	1,0880	1,0780	1,3582
C1			1,5111	1,1025	2,2798 ⁺	1,9437	2,8458 [*]
C2				1,3706	1,5087	1,2863	1,8833
KC1					2,0678	1,7630	2,5813 ⁺
KC2						1,1729	1,2483
C1K							1,4641

⁺P<0,1 ^{*}P<0,05

Rezultati

Tabela 60. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti glutation S-transferaze

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	19	1,546	21,542	19	-13,227	31,500
hronični	20	-4,344	33,825	20	10,123	27,578
oporavak	19	-21,757	29,838	18	-8,664	34,266

Tabela 61. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti specifične aktivnosti glutation S-transferaze

Poređenje		Z	P	F	P
akutni C1	-akutni C2	2,0251	0,0429	2,1381	0,1160
hronični C1	-hronični C2	3,0986	0,0019	1,5044	0,3813
oporavak C1	-oporavak C2	3,1139	0,0018	1,3188	0,5655
hronični C1	-akutni C1	0,4427	0,6580	2,4654	0,0612
	-oporavak C1	3,0986	0,0019	1,2851	0,5986
hronični C2	-akutni C2	3,1389	0,0017	1,3047	0,5699
	-oporavak C2	2,0686	0,0386	1,5438	0,3597

4.8 PROCENAT MASE SREDNJEG CREVA

Na slici 22 predstavljene su srednje vrednosti procenta mase srednjeg creva na različitim tretmanima, dok je značajnost promene procenjena LSD testom. Procenat mase srednjeg creva značajno se smanjuje u toku akutnog tretmana na obe koncentracije kadmijuma. Ali, u toku hroničnog efekta kadmijuma procenat mase značajno se smanjuje u odnosu na kontrolu samo na C2 (slika 22B). Za razliku od oporavka na C1 gde se procenat mase creva larve ne razlikuje značajno od kontrole i hroničnog tretmana na C1 (slika 22C), na oporavku od veće koncentracije kadmijuma vidi se značajan pad ispitivane osobine u odnosu na kontrolu—ne dolazi do oporavka (slika 22D). Smanjenje procenta mase srednjeg creva je indirektan pokazatelj smanjenog unosa kontaminirane hrane. Linije norme reakcije na slikama 22A'–D' pokazuju veliku varijabilnost legala u odgovoru na istu vrstu stresa. Kod 13 legala je na KC1 došlo do smanjenja procenta srednjeg creva u odnosu na masu larve, dok je na KC2 procenat creva u odnosu na kontrolu pao kod 15 legala. Kod čak 15 legala u toku oporavka od C2 procenat mase creva ostaje smanjen na nivou detektovanom u toku hroničnog tretmana (ireverzibilno smanjenje).

Poređenjem procenta mase creva između akutnog i hroničnog tretmana i hroničnog efekta i oporavka (tabela 62) utvrđeno je da na promenu procenta mase creva utiču isti faktori: tretman (efekat) kadmijuma, njegova koncentracija, kao i interakcija tretmana i genetičkih faktora (legla). Koncentracija metala, leglo, kao genetički faktor i interakcija tretmana i genetičkih činilaca statistički značajno utiču na promenu procenta mase creva u odnosu na masu larvi između akutnog efekta i oporavka.

Dvofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da samo pri akutnom tretmanu kadmijum značajno utiče na promenu srednje vrednosti procenta mase srednjeg creva, $P < 0,01$ (tabela 63) dok u toku oporavka od C2 leglo (genetički faktor) daje značajan doprinos u variranju ispitivanog parametra, $P < 0,001$.

Na osnovu jednofaktorske analize varijanse procenjene su genetička i sredinska varijansa za kontrolu, hronični i akutni tretman i za oporavke, kao i procene heritabilnosti u širem smislu za procenat mase larvi gubara (tabela 64). Kod svih analiziranih grupa ne postoje značajne vrednosti heritabilnosti, što ukazuje da genetički faktori ne predstavljaju osnovni faktor koji dovodi do variranja procenta mase creva.

Ne postoje statistički značajne vrednosti heritabilnosti u širem smislu za procenat creva u odnosu na masu larve (tabela 64). Poređenjem heritabilnosti dobijena je samo jedna značajna vrednost, između dva oporavka, gde je $h^2_{C2K}=0,4296 > h^2_{C1K}=0,2226$.

Različitoost između legala je veća na hroničnom tretmanu veće koncentracije kadmijuma u odnosu na dugotrajni efekat manje koncentracije kadmijuma. Interesantno je da je varijabilnost na oporavku od C2 značajno veća od varijabilnosti pri ostalim efektima kadmijumom, bez obzira da li se radi o kratkotrajnim ili dugotrajnim (tabela 65). Varijabilnost na veštačkoj dijeti bez kadmijuma je veća nego u toku trodnevnog efekta veće koncentracije kadmijuma. Genetička varijansa u toku dugotrajnog efekta kadmijuma na C2 je veća nego u toku akutnog stresa iste koncentracije metala. Nema značajnih razlika u sredinskim varijansama između eksperimentalnih grupa.

Heritabilnost plastičnosti je veća od heritabilnosti svojstva na akutnom, hroničnom efektu i oporavku od C1, dok je heritabilnost svojstva veća samo na oporavku od C2 (tabela 66).

Srednja vrednost indeksa fenotipske plastičnosti ima samo jednu negativnu vrednost i to na hroničnom tretmanu na manjoj koncentraciji kadmijuma (tabela 67).

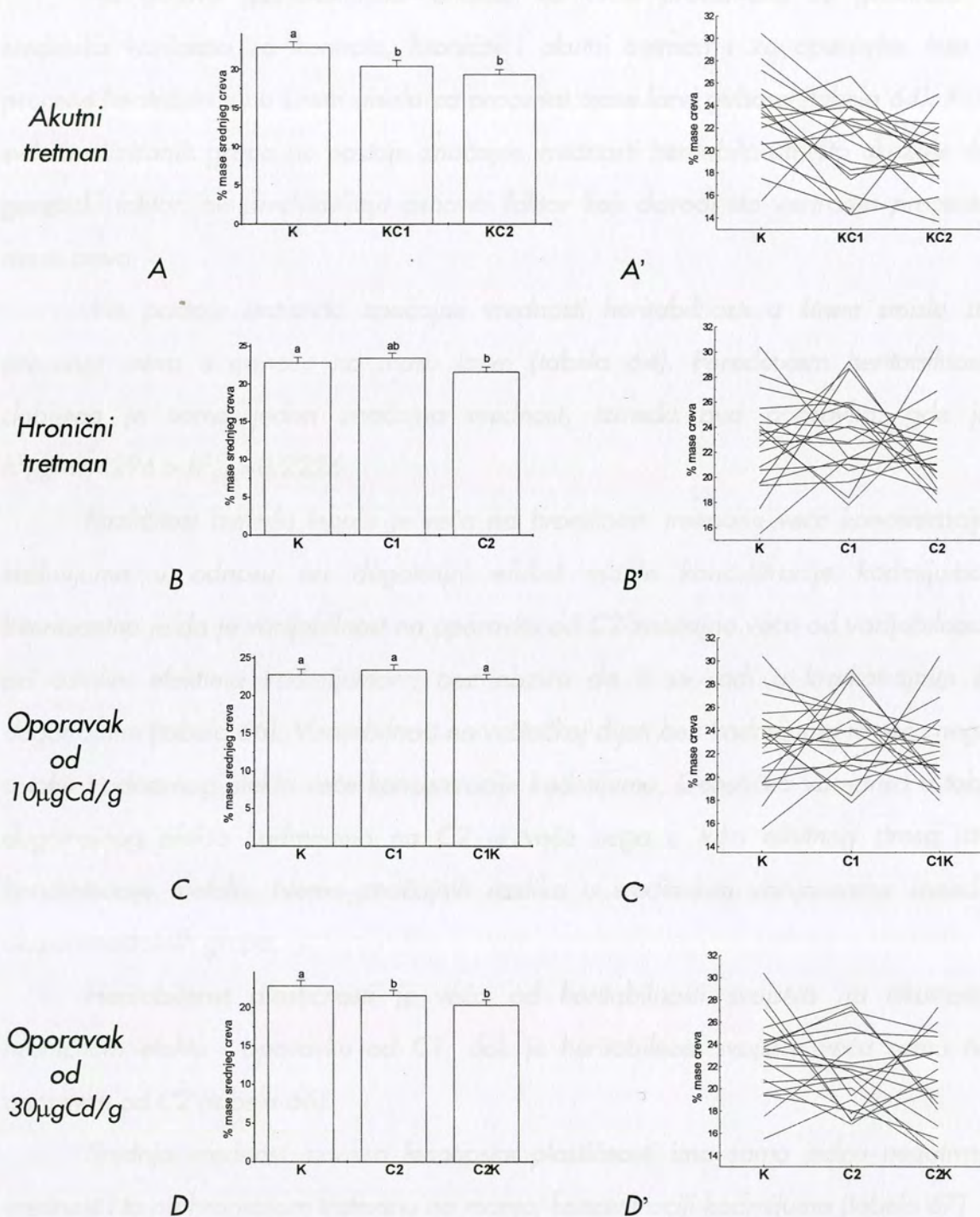
Poređenjem srednjih vrednosti indeksa fenotipske plastičnosti i standardnih devijacija procenta creva u odnosu na masu cele larve utvrđeno je da ne postoje značajne razlike između eksperimentalnih grupa, što znači da se plastičnost procenta

mase srednjeg creva i standardne devijacije njegove plastičnost ne mogu uzeti kao osetljivi parametri na prisustvo kadmijuma u hrani (tabela 68).

Parametar	Uzorkovanje	MSD	F	P
AKUTNI HRONICNI TRITMANI	Tretman (df=1)	15.55	74	0.0001
	Konzentracija (df=1)	22.49	20	0.0001
AKUTNI- OPORAVAK TRITMANI	Tret. x Konz. (df=1)	0.32	35	0.85
	Legio (konc) (df=38)	4.33	38	0.0001
	Tret. x Legio (konc) (df=36)	2.9	36	0.0001
	Gravim (df=258)	1.55	258	0.0001
AKUTNI- OPORAVAK TRITMANI	Tretman (df=1)	15.55	74	0.0001
	Konzentracija (df=1)	22.74	20	0.0001
	Tret. x Konz. (df=1)	0.03	85	0.85
	Legio (konc) (df=37)	0.3	37	0.0001
AKUTNI- OPORAVAK TRITMANI	Tret. x Legio (konc) (df=36)	0.03	36	0.85
	Gravim (df=258)	1.55	258	0.0001
	Tretman (df=1)	15.55	74	0.0001
	Konzentracija (df=1)	22.35	20	0.0001
AKUTNI- OPORAVAK TRITMANI	Tret. x Konz. (df=1)	0.35	85	0.85
	Legio (konc) (df=38)	0.3	38	0.0001
	Tret. x Legio (konc) (df=36)	0.03	36	0.85
	Gravim (df=258)	1.55	258	0.0001

Slika 22. Procenat mase srednjeg creva izvi gubara (x ± SE) (A, B, C, D) i linije norme rezidije (A, B, C, D).

Rezultati



Slika 22. Procenat mase srednjeg creva larvi gubara ($\bar{X} \pm SE$) (A, B, C, D) i linije norme reakcije (A', B', C', D')

Tabela 62. Trofaktorska ANOVA za procenat mase srednjeg creva u odnosu na masu larvi gubara između različitih tretmana. Tretmani i koncentracije su bili fiksirani faktori, a leglo slučajni faktor koji je ugnježđen u tretmane sa različitim koncentracijama kadmijuma. F-odnos pokazuje kako je procenjavana F vrednost.

Poređenje	Izvor variranja	MSIII	F odnos	F vrednost
	Tretman(df=1)	63,56	1/4	13,97***
	Koncentracija(df=1)	22,45	2/3	4,93*
AKUTNI- HRONIČNI TRETMANI	Tret. x Konc (df=1)	0,32	3/5	0,07
	Leglo(konc.)(df=38)	4,93	4/5	1,08
	Tret. x Leglo (konc) (df=36)	7,18	5/6	1,58*
	Greška (df=288)	4,55		
	Tretman(df=1)	10,61	1/4	2,58
	Koncentracija(df=1)	23,74	2/3	5,77*
AKUTNI- OPORAVAK TRETMANI	Tret. x Konc (df=1)	0,03	3/5	0,01
	Leglo(konc.)(df=37)	6,50	4/5	1,58*
	Tret. x Leglo (konc) (df=34)	6,07	5/6	1,48*
	Greška (df=283)	4,11		
	Tretman(df=1)	15,35	1/4	3,93*
	Koncentracija(df=1)	23,30	2/3	5,96*
HRONIČNI- OPORAVAK TRETMANI	Tret. x Konc (df=1)	0,06	3/5	0,02
	Leglo(konc.)(df=38)	5,52	4/5	1,41
	Tret. x Leglo (konc) (df=35)	7,84	5/6	2,01**
	Greška (df=296)	3,91		

Tabela 63. Prosečno kvadratno odstupanje od srednje vrednosti procenta mase creva u odnosu na masu larve pomnoženo sa 1000 (MS) u dvofaktorskoj analizi varijanse pri različitim tretmanima kadmijumom. Koncentracija kadmijuma (Cd) je fiksirani faktor, a leglo (L) je slučajni faktor.

Efekat	Izvor variranja	df	MS	F	P
akutni	Leglo(L)	17	8,408	1,122	0,3351
	Kadmijum(Cd)	2	53,657	6,430	0,0043
	LxCd	34	8,345	1,113	0,3172
	Greška	204	7,497		
hronični	Leglo(L)	19	7,765	1,181	0,2749
	Kadmijum(Cd)	2	13,437	1,417	0,2550
	LxCd	38	9,485	1,442	0,0545
	Greška	235	6,576		
oporavak C1	Leglo(L)	18	5,404	0,877	0,6072
	Kadmijum(Cd)	2	3,342	0,381	0,6858
	LxCd	36	8,769	1,423	0,0661
	Greška	224	6,163		
oporavak C2	Leglo(L)	18	17,217	2,706	0,0003
	Kadmijum(Cd)	2	23,321	3,158	0,0545
	LxCd	36	7,385	1,161	0,2557
	Greška	224	6,363		

Tabela 64. Genetička varijansa (σ_g^2), sredinska varijansa (σ_ω^2) i heritabilnost u širem smislu ($h^2 \pm SE$) za procenat mase srednjeg creva u odnosu na masu larvi u zavisnosti od tretmana kadmijumom. Tretmani: K–kontrolna grupa, bez kadmijuma; akutni efekat (KC1–tri dana na C1 podlozi i KC2–tri dana na C2 podlozi); hronični efekat (C1–10 μg Cd/g suve podloge i C2–30 μg Cd/g suve podloge); efekat oporavka (C1K–tri dana oporavka od C1 podloge i C2K– tri dana oporavka od C2 podloge).

tretman	N	σ_g^2	σ_ω^2	h^2	$\pm SE$	t
K	20	0,489	7,058	0,1296	0,1700	0,762
KC1	19	0,341	8,035	0,0814	0,1844	0,441
KC2	19	0,134	7,182	0,0365	0,1580	0,231
C1	20	0,256	6,602	0,0748	0,1645	0,454
C2	20	0,719	6,057	0,2123	0,1867	1,137
C1K	19	0,543	4,331	0,2226	0,1920	1,160
C2K	19	1,544	5,643	0,4296	0,2177	1,973

Tabela 65. F vrednosti dobijene poređenjem genetičkih varijansi σ_g^2 za % mase srednjeg creva u odnosu na masu larve (iznad dijagonale) i sredinskih varijansi σ_ω^2 (ispod dijagonale) između različitih tretmana

	K	C1	C2	KC1	KC2	C1K	C2K
K		1,907	1,471	1,434	3,656**	1,110	3,158*
C1	1,069		2,806*	1,330	1,917	2,117	6,023***
C2	1,653	1,090		2,111	5,380***	1,326	2,146
KC1	1,138	1,217	1,327		2,549	1,592	4,530**
KC2	1,018	1,088	1,186	1,119		4,058**	11,546***
C1K	1,630	1,524	1,398	1,855	1,658		2,845*
C2K	1,251	1,170	1,073	1,424	1,273	1,303	

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Tabela 66. Plastičnost (δ_{pl}^2), heritabilnost plastičnosti (h_{pl}^2) i heritabilnost svojstva (h_s^2) za procenat mase srednjeg creva dobijeni iz dvofaktorske analize varijanse kod gubara gajenih u različitim sredinama, pri akutnom, hroničnom stresu i oporavku.

efekat	δ_{pl}^2	h_{pl}^2	h_s^2
akutni	0,9555	0,4062	0,0025
hronični	1,1492	0,5677	0,0000
oporavak C1	1,2016	0,6124	0,0000
oporavak C2	0,7861	0,3678	0,3955

Tabela 67. Srednje vrednosti (\bar{X}) i standardne devijacije (SD) indeksa fenotipske plastičnosti procenta mase creva u odnosu na masu cele larve

efekat	C1			C2		
	N	(\bar{X})	\pm SD	N	(\bar{X})	\pm SD
akutni	19	9,600	22,381	19	14,339	20,374
hronični	20	-5,871	24,429	20	3,245	19,858
oporavak	19	1,726	19,908	19	11,666	14,617

Rezultati

Tabela 68. Rezultati poređenja srednjih vrednosti (Z, Vilkoksonov test) i standardnih devijacija (F test) indeksa fenotipske plastičnosti procenta mase creva larve u odnosu na masu larvi trećeg stupnja

Poređenje	Z	P	F	P
akutni C1 –akutni C2	1,2847	0,1989	1,2067	0,6944
hronični C1 –hronični C2	1,4933	0,1354	1,5133	0,3745
oporavak C1 –oporavak C2	1,8511	0,0642	1,8550	0,1996
hronični C1 –akutni C1	1,7707	0,0766	1,1914	0,7139
–oporavak C1	0,9256	0,3547	1,5057	0,3902
hronični C2 –akutni C2	1,8511	0,0642	1,0526	0,9101
–oporavak C2	1,2475	0,2122	1,8457	0,1997

4.9 KORELACIJE IZMEĐU ENZIMA

Na podlozi bez kadmijuma GST nije u korelaciji ni sa jednim posmatranim enzimom (tabela 69). α -glikozidaze su u značajnoj negativnoj korelaciji sa β -glikozidazom, dok je u pozitivnim korelacijama sa esterazama, leucin aminopeptidazom, tripsinom i proteazama. β -glikozidaza je u negativnoj korelaciji sa tripsinom i proteazama. Postoji značajna korelacija između esteraza i leucin aminopeptidaze, tripsina i proteaza; leucin aminopeptidaze i tripsina, kao i proteaza; i tripsina i proteaza.

U toku akutnog efekta kadmijuma na 10 $\mu\text{g/g}$ suve hrane postoji korelacija između α -glikozidaze i β -glikozidaze, esteraze, leucin aminopeptidaze i tripsina. β -glikozidaza je u korelaciji sa leucin aminopeptidazom, a esteraza sa leucin aminopeptidazom, tripsinom i proteazom (tabela 70). Leucin aminopeptidaza je u korelaciji sa tripsinom i proteazom, a tripsin sa proteazom (isto kao in a C2). Sve statistički značajne korelacije su pozitivne, dok postoji 5 negativnih korelacija i to sve između GST i digestivnih enzima. Interesantno je da između proteaza i GST postoji prva značajna negativna korelacija.

Na tabeli 71 vidimo korelacije između specifičnih aktivnosti različitih enzima pri akutnom efektu kadmijuma od 30 $\mu\text{g/g}$ suve hrane. α -glikozidaza je u korelaciji sa β -glikozidazom, esterazom i tripsinom; esteraza je u korelaciji sa leucin aminopeptidazom i tripsinom; leucin aminopeptidaza sa tripsinom, a tripsin sa proteazama. Na granici značajnosti su korelacije između α -glikozidaza i proteaza, β -glikozidaze i leucin aminopeptidaze, tripsina i GST. Sve korelacije imaju pozitivne vrednosti osim korelacija između GST i drugih posmatranih digestivnih enzima.

Na C1 postoji mali broj značajnih korelacija (tabela 72). GST nije u korelaciji ni sa jednim digestivnim enzimom (kao i na kontroli). Pozitivne korelacije su između α -glikozidaze i sledećih enzima: β -glikozidaze, esteraza, leucin aminopeptidaze i tripsina. β -glikozidaza je u pozitivnoj korelaciji samo sa leucin aminopeptidazom, a

esteraze sa leucin aminopeptidazom i tripsinom. Pozitivne korelacije su i između leucin aminopeptidaze i tripsina, kao i tripsina i proteaza. Na granici značajnosti je korelacija između β -glikozidaze i GST. Samo dve korelacije su negativne, od čega ni jedna značajna.

Na tabeli 73 su prikazane korelacije između specifičnih aktivnosti enzima pri hroničnom efektu kadmijuma od 30 $\mu\text{g/g}$ suve hrane. GST nije u korelaciji ni sa jednim enzimom, ali je korelacija sa leucin aminopeptidazom na granici značajnosti. α -glikozidaze su u korelaciji sa β -glikozidazom, esterazom, leucin aminopeptidazom i tripsinom, dok je korelacija sa proteazama na granici značajnosti. β -glikozidaza je u pozitivnoj korelaciji sa leucin aminopeptidazom, a esteraze sa leucin aminopeptidazom, tripsinom i proteazama. Leucin aminopeptidaza je u pozitivnoj korelaciji sa tripsinom i proteazama. Tripsin je takođe u pozitivnoj korelaciji sa proteazama. Na granici značajnosti je i korelacija između α -glikozidaze i proteaze. Postoji samo jedna negativna korelacija.

Korelacije između specifičnih aktivnosti enzima pri oporavku od manje koncentracije kadmijuma prikazane su u tabeli 74. α -glikozidaza je u korelaciji samo sa leucin aminopeptidazom i tripsinom, esteraza sa leucin aminopeptidazom, leucin aminopeptidaza sa tripsinom i proteazom, a tripsin sa proteazom. Kod GST samo je jedna korelacija na granici značajnosti (opet GST i proteaza). Na granici značajnosti su još korelacije između α -glikozidaza i esteraze i α -glikozidaza i proteaze, kao i β -glikozidaze i proteaze (negativna). Sve statistički značajne korelacije su pozitivne, a postoje i tri negativne korelacije.

Najmanji broj statistički značajnih korelacija između specifičnih aktivnosti enzima je prisutan pri oporavku od veće koncentracije kadmijuma (tabela 75). Postoje samo tri značajne korelacije i to leucin aminopeptidaze sa tripsinom i proteazom, kao i između tripsina i proteaza. Postoji i mali broj korelacija koje su na granici značajnosti i to između obe glikozidaze i α -glikozidaze i esteraze. U toku

oporavka od C2, GST je u negativnoj korelaciji sa tri digestivna enzima, dok je β -glikozidaza negativno korelisana sa esterazom, leucin aminopeptidazom i tripsinom.

4.9.1 Korelacije između procenta mase creva i enzima

Interesantno je da je kod tri tretmana, oba hronična i akutnog na C1, procenat mase creva u korelaciji sa aktivnošću proteaza (tabele 70, 72, 73). Na hroničnim tretmanima korelacije su pozitivne, dok je na akutnom negativna vrednost korelacije. Na hroničnom efektu veće koncentracije kadmijuma procenat mase creva je u pozitivnoj korelaciji i sa aktivnošću tripsina (tabela 73), dok je na akutnom efektu veće koncentracije u pozitivnoj korelaciji sa leucin aminopeptidazom (tabela 71). Ne postoje statistički značajne korelacije između procenta mase creva i enzima na kontroli i oporavku od C2, dok je korelacija između procenta mase i β -glikozidaze pri oporavku od C1 na granici značajnosti (tabele 69, 75, 74). Korelacija između procenta creva i esteraze na akutnom tretmanu na C1 je takođe na granici značajnosti (tabela 70).

Rezultati

Tabela 69. Korelacije između specifičnih aktivnosti enzima, kao i procenta mase i aktivnosti enzima, na veštačkoj hrani bez kadmijuma

KONTROLA	α -Glik	β -Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
% mase creva	0,0323	0,2026	-0,1769	-0,1876	-0,0334	-0,1373	-0,3718
α -Glik		-0,5735*	0,5359*	0,5638*	0,7832***	0,7009**	0,0679
β -Glik			-0,4548	-0,3825	-0,4852*	-0,4935*	-0,2319
EST				0,6511**	0,7703***	0,8366***	-0,1723
LAP					0,7945***	0,7609***	-0,0175
TRIP						0,9401***	-0,2527
Proteaze							-0,1858

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Tabela 70. Korelacije između specifičnih aktivnosti enzima, kao i procenta mase i aktivnosti enzima, pri akutnom efektu kadmijuma od 10 $\mu\text{g/g}$ suve hrane

KC1	α -Glik	β -Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
% mase creva	0,0376	0,4196	-0,5029 ⁺	-0,2698	-0,4163	-0,6288*	0,1821
α -Glik		0,5762*	0,5965*	0,6809**	0,5726*	0,4333	-0,1298
β -Glik			0,0954	0,5761*	0,3267	0,1592	-0,2742
EST				0,5286*	0,5317*	0,6294*	0,0605
LAP					0,7169**	0,5631*	-0,2444
TRIP						0,8727***	-0,4947 ⁺
Proteaze							-0,6056*

⁺ $P < 0,1$ * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

Tabela 71. Korelacije između specifičnih aktivnosti enzima, kao i procenta mase i aktivnosti enzima, pri akutnom efektu kadmijuma od 30 µg/g suve hrane

KC2	α-Glik	β-Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
% mase creva	0,0433	0,2715	0,0818	0,5430*	0,3241	0,1405	-0,1642
α-Glik		0,4971*	0,6189**	0,1516	0,5453*	0,4506 ⁺	-0,3379
β-Glik			0,3309	0,4266 ⁺	0,4412 ⁺	0,1617	-0,4352 ⁺
EST				0,5065*	0,4792*	0,2513	-0,2248
LAP					0,6278**	0,3208	-0,2193
TRIP						0,8624***	-0,2868
Proteaze							-0,307

*P < 0,1 *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001

Tabela 72. Korelacije između specifičnih aktivnosti enzima, kao i procenta mase i aktivnosti enzima, pri hroničnom efektu kadmijuma od 10 µg/g suve hrane

C1	α-GLIK	β-GLIK	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
% mase creva	0,2743	-0,2975	-0,1197	-0,0715	0,4042	0,4943*	-0,2249
α-Glik		0,4868*	0,5183*	0,6536**	0,6589**	0,2508	0,154
β-Glik			0,4180	0,5790*	0,3312	0,1207	0,4337 ⁺
EST				0,7782***	0,4914*	-0,0944	0,2262
LAP					0,4919*	-0,0984	0,3072
TRIP						0,7292**	0,1477
Proteaze							0,1617

*P < 0,1 *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001

Rezultati

Tabela 73. Korelacije između specifičnih aktivnosti enzima, kao i procenta mase i aktivnosti enzima, pri hroničnom efektu kadmijuma od 30 µg/g suve hrane

C2	α-Glik	β-Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
% mase creva	0,323	0,0311	0,1770	0,3244	0,5823*	0,5970*	0,0425
α-Glik		0,8143***	0,6207*	0,8449***	0,6890**	0,4517 ⁺	0,1798
β-Glik			0,3357	0,5873*	0,4092	0,1864	-0,0657
EST				0,6376**	0,5917*	0,5680*	0,4253
LAP					0,7593**	0,6147*	0,4620 ⁺
TRIP						0,8559***	0,2510
Proteaze							0,4198

⁺P < 0,1 *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001

Tabela 74. Korelacije između specifičnih aktivnosti enzima, kao i procenta mase i aktivnosti enzima, pri oporavku od manje koncentracije kadmijuma

C1K	α-Glik	β-Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
% mase creva	-0,0168	0,4366 ⁺	0,1126	0,1017	-0,1260	-0,0879	0,0315
α-Glik		-0,2809	0,3926 ⁺	0,5516*	0,4806*	0,4226 ⁺	0,0234
β-Glik			0,0494	0,0256	-0,3343	-0,4086 ⁺	0,0972
EST				0,6388**	0,3742	0,3132	0,2881
LAP					0,5579*	0,5600*	0,3771
TRIP						0,9245***	0,2117
Proteaze							0,4069 ⁺

⁺P < 0,1 *P < 0,05 **P < 0,01 ***P < 0,001

Tabela 75. Korelacije između specifičnih aktivnosti enzima, kao i procenta mase i aktivnosti enzima, pri oporavku od veće koncentracije kadmijuma

C2K	α -Glik	β -Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
% mase creva	-0,1609	-0,1273	0,0584	0,1118	0,2666	0,2330	-0,2034
α -Glik		0,4255 ⁺	0,4294 ⁺	0,305	0,3906	0,3914	0,0794
β -Glik			-0,0446	-0,3167	-0,1377	0,0042	0,2204
EST				0,2313	0,0592	0,0460	-0,0553
LAP					0,7111 ^{**}	0,5784 [*]	0,085
TRIP						0,8749 ^{***}	-0,1112
Proteaze							-0,0429

⁺P < 0,1 ^{*}P < 0,05 ^{**}P < 0,01 ^{***}P < 0,001

4.10 POREĐENJE KORELACIJA IZMEĐU AKTIVNOSTI ENZIMA

Poređenje korelacija između aktivnosti različitih enzima na različitim tretmanima je predstavljeno u tabeli 76. Značajne t vrednosti dobijene su poređenjem korelacija između α i β -glikozidaze na svim tretmanima kadmijumom u odnosu na kontrolu, osim na oporavku od C1. Znak korelacija između ova dva enzima u odnosu na kontrolu se menja na oba akutna, oba hronična tretmana i oporavku od C2 (na kontroli je korelacija statistički značajna i negativna, a na tretmanima i oporavku od C2 značajna i pozitivna).

Značajne t vrednosti između β -glikozidaze i esteraze su dobijene poređenjem korelacija na kontroli i oba hronična efekta, kao i akutnog tretmana na većoj koncentraciji kadmijuma. U sva tri slučaja došlo je do značajne promene znaka korelacija u odnosu na kontrolu (pozitivne su na tretmanima).

Interesantno je da su za β -glikozidazu i leucin aminopeptidazu, kao i za β -glikozidazu i tripsin dobijene značajne t vrednosti poređenjem korelacija između istih tretmana: kontrole i oba hronična i kontrole i oba akutna efekta. U svim pomenutim poređenjima došlo je do značajne promene znaka korelacija: na kontroli je vrednost korelacija negativna, a na tretmanima pozitivna.

Statistički značajno smanjenje vrednosti korelacija između esteraze i ukupnih proteaza u odnosu na kontrolu je detektovano na akutnom efektu veće koncentracije kadmijuma i oba oporavka. Isti slučaj je i sa korelacijama između tripsina i ukupnih proteaza. Međutim, značajno smanjenje vrednosti korelacija na C1 u odnosu na kontrolu je detektovano između esteraze i ukupnih proteaza i leucin aminopeptidaze i ukupnih proteaza. Korelacija između esteraze i tripsina u toku oporavka od C2 je značajno manja od korelacije između istih enzima na kontroli.

Poređenjem korelacija između procenta mase creva i specifične aktivnosti enzima registrovane su dve značajne t vrednosti i to između procenta creva i leucin aminopeptidaze između kontrole i akutnog efekta na C2 i procenta mase creva i

Tabela 76. *t* vrednosti dobijene poređenjem korelacija između aktivnosti enzima i procenta mese srednjeg creva u odnosu na masu larve na različitim tretmanima kadmijumom.

		K-KC1	K-KC2	K-C1	K-C2	K-C1K	K-C2K
α	– β	3,3286***	3,2740**	3,1341**	4,6536***	0,9948	2,9291**
	–est	0,2270	0,3411	0,0645	0,3317	0,5015	0,3684
	–lap	0,4891	1,3269	0,3788	1,5569	0,0484	0,8555
	–trip	1,0224	1,2076	0,6951	0,5388	1,4478	1,6962
	–prot	1,0298	1,0482	1,6213	0,9924	1,1428	1,2054
	–gst	0,5047	1,1469	0,2308	0,2954	0,1219	0,0306
	–%	0,0135	0,0301	0,6593	0,7858	0,1342	0,5149
β	–est	1,4907	2,2805*	2,4764*	2,1808*	1,4760	1,1803
	–lap	2,6934**	2,3465*	2,8149**	2,7950**	1,1711	0,1985
	–trip	2,2087*	2,7420**	2,3122*	2,5039*	0,4976	1,0350
	–prot	1,7825	1,9232	1,7514	1,8934	0,2917	1,4416
	–gst	0,1149	0,6287	1,8537	0,4424	0,9119	1,2178
	–%	0,6145	0,1996	1,3552	0,4526	0,7175	0,8822
Est	–lap	0,4804	0,5990	0,6974	0,0599	0,0576	1,4331
	–trip	1,0894	1,3639	1,2783	0,8848	1,7154	2,5447*
	–prot	1,1930	2,6039**	3,4512***	1,4673	2,4200*	3,0789**
	–gst	0,5964	0,1494	1,0695	1,6309	1,2857	0,3140
	–%	0,9517	0,7125	0,1548	0,9286	0,7975	0,6277
lap	–trip	0,4633	0,9447	1,4418	0,2310	1,2399	0,5136
	–prot	0,9176	1,8193	2,9026**	0,7319	0,9988	0,8950
	–gst	0,5896	0,5613	0,8862	1,3432	1,1317	0,2717
	–%	0,2206	2,1812*	0,3128	1,3667	0,7976	0,7993
Trip	–prot	1,0031	1,1921	2,1481*	1,1972	0,3273	1,0194
	–gst	0,7309	0,1005	1,0770	1,3365	1,2932	0,3880
	–%	1,0417	1,0100	1,2225	1,8157	0,2548	0,8112
prot	–gst	1,3065	0,3532	0,9290	1,6498	1,6938	0,3838
	–%	1,5284	0,7640	1,7989	2,1462*	0,1367	0,9936
Gst	–%	1,4608	0,6143	0,4278	1,1243	1,1532	0,4874
SPIRMANOV KOEFIČIJENT		0,496**	0,363 ⁺	0,250	0,501**	0,763***	0,545**

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

4.11 KORELACIJE IZMEĐU OSOBINA ADAPTIVNE VREDNOSTI I AKTIVNOSTI ENZIMA

Kod larvi koje nisu konzumirale kadmijum nije detektovan veliki broj korelacija između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima na različitim tretmanima.

Na kontroli postoji samo jedna (pozitivna) statistički značajna korelacija između mortaliteta prvog stupnja i leucin aminopeptidaze (tabela 77), što znači da je povećanje aktivnosti ovog enzima praćeno povećanom smrtnošću u ovom stupnju razvića gubara. Sa druge strane, negativne korelacije sa analiziranim komponentama adaptivne vrednosti ukazuju da povećanje aktivnosti pojedinih enzima, npr. GSTa, kao enzima detoksifikacije, praćeno padom analiziranih komponenti adaptivne vrednosti. Od četrdeset dve korelacije deset je negativno, od toga čak pet između GST i osobina fitnesa. Na granici značajnosti su korelacije između trajanja razvića i tripsina i relativne brzine rasta i GST.

Pri akutnom tretmanu na manjoj koncentraciji kadmijuma značajne korelacije su između trajanja razvića i esteraze (negativna), mase i β -glikozidaze (negativna), tripsina i proteaze (obe pozitivne) (tabela 78). Na granici značajnosti je samo korelacija između trajanja razvića i β -glikozidaze. Od dvadeset jedne korelacije devet je negativno (čak pet između trajanja razvića i enzima).

Na akutnom efektu veće koncentracije kadmijuma (tabela 79) značajne su samo dve korelacije: između trajanja razvića i leucin aminopeptidaze (pozitivna) i mase larvi i α -glikozidaze (negativna). Korelacija između α -glikozidaze i relativne brzine rasta je na granici značajnosti. Sedam korelacija je negativno, čak pet između mase larvi i enzima.

U toku trodnevnog dejstva manje koncentracije kadmijuma povećanje aktivnosti tripsina i proteaza utiče na povećanje mase, ali povećanje β -glikozidaze smanjuje masu. Međutim, na KC2 povećanje α -glikozidaze smanjuje masu, a trajanje razvića je produženo sa većom aktivnošću leucin aminopeptidaze (trade-off).

Na hroničnom tretmanu na manjoj koncentraciji kadmijuma (tabela 80) značajne su dve korelacije i to između GST i mase larve četvrtog stupnja (negativna), kao i GST i relativne brzine rasta (pozitivna). Na granici značajnosti je korelacija između mortaliteta prvog stupnja i β -glikozidaze. Postoji ukupno dvanaest negativnih korelacija (čak pet između mase i posmatranih enzima).

Na dugotrajnom efektu 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane postoji pet značajnih pozitivnih korelacija: između oba mortaliteta i α -glikozidaze i tripsina, kao i trajanja razvića i proteaza (tabela 81). Sve korelacije između osobina fitnesa (osim za RGR) i GST su negativne. Pored pomenutih pet, postoji još jedanaest negativnih korelacija. Na granici značajnosti su sledeće korelacije: između trajanja razvića i tripsina, kao i mase larve i obe glikozidaze (takođe negativna). Interesantno je da je u toku slabijeg hroničnog stresa (C1) povećanje aktivnosti GST praćeno padom mase larvi trećeg stupnja i povećanjem relativne brzine rasta (pozitivna korelacija). Takođe, u toku hroničnog tretmana na C2, možemo primetiti da je za legla koja imaju manji mortalitet (ukupan i mortalitet u prvom stupnju) u odgovoru na veću koncentraciju kadmijuma karakteristična manja aktivnost tripsina u srednjem crevu larvi, a povećanje aktivnosti GST smanjuje dužinu razvića, masu, smrtnost, dužinu trajanja prvog stupnja. Razviće je produženo sa većom aktivnošću proteaza (trade-off).

U toku oporavka od obe koncentracije kadmijuma postoji samo jedna značajna negativna korelacija između mase larvi četvrtog stupnja i β -glikozidaza (tabele 82, 83). Ovakva zakonitost je primećena i kod akutnog tretmana C1, gde takođe inhibicija β -glikozidaze značajno utiče na povećanje mase larvi. Čak jedanaest korelacija je negativno u toku oporavka od C1, a na granici značajnosti je pozitivna korelacija između β -glikozidaze i trajanja razvića. Na oporavku od C2 devet korelacija je negativno, a interesantno da su GST i β -glikozidaza u negativnoj korelaciji sa svim posmatranim osobinama fitnesa.

Tabela 77. Korelacije između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima na kontroli

KONTROLA	α -Glik	β -Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
Trajanje razvića	0,1855	0,4114	0,1996	0,0131	0,3816 ⁺	0,3384	-0,0199
Masa 3.dana 4. stupnja	-0,1184	-0,3456	0,2109	0,2330	0,0080	0,0658	0,1785
Ukupan mortalitet	0,3296	0,1209	0,2550	0,2866	0,3521	0,3680	-0,1918
Mortalitet 1. stupnja	0,2130	0,3086	0,1888	0,5548*	0,3530	0,3690	-0,2303
Trajanje 1. stupnja	0,0796	0,1365	0,1039	0,2396	0,0983	0,1950	-0,0719
RGR	-0,0519	-0,0129	-0,0908	0,1925	0,0592	0,1562	-0,4048 ⁺

⁺P<0,1 *P<0,05

Tabela 78. Korelacije između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima pri akutnom efektu kadmijuma od 10 μ g Cd/g suve hrane

KC1	α -Glik	β -Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
Trajanje razvića	0,0144	0,4269 ⁺	-0,5010*	-0,2159	-0,3126	-0,3813	-0,0201
Masa 3.dana 4. stupnja	0,1958	-0,5517*	0,2140	-0,0067	0,7316**	0,6031**	-0,3888
RGR	0,1555	0,2231	0,1750	0,1150	-0,0225	0,0640	0,1206

⁺P<0,1 *P<0,05 **P<0,01

Rezultati

Tabela 79. Korelacije između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima pri akutnom efektu kadmijuma od 30 µg Cd/g suve hrane

KC2	α-Glik	β-Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
Trajanje razvića	0,0433	0,2715	0,0818	0,5430*	0,3241	0,1405	-0,1642
Masa 3.dana 4. stupnja	-0,5331*	-0,3286	-0,0092	-0,0540	-0,0594	0,0961	0,0538
RGR	0,4408 ⁺	0,0986	0,3599	0,0294	0,2649	0,3339	-0,1834

⁺P<0,1 *P<0,05

Tabela 80. Korelacije između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima pri hroničnom efektu kadmijuma od 10 µg Cd/g suve hrane

C1	α-Glik	β-Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
Trajanje razvića	0,0189	-0,2817	0,0127	0,0426	0,1102	0,0123	0,2156
Masa 3.dana 4. stupnja	-0,0666	-0,4022	-0,1900	-0,1380	0,1097	0,1724	-0,6569**
Ukupan mortalitet	0,2377	0,3351	0,0115	0,0519	0,3025	0,3214	-0,0270
Mortalitet 1. stupnja	0,0862	0,4405 ⁺	-0,1326	-0,0807	0,0124	0,1114	0,0892
Trajanje 1. stupnja	-0,1398	0,2904	-0,1414	0,1267	-0,0592	-0,0773	0,1508
RGR	0,1641	0,2408	0,0116	0,1145	0,2292	0,3488	0,5224*

⁺P<0,1 *P<0,05 **P<0,01

Tabela 81. Korelacije između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima pri hroničnom efektu kadmijuma od 30 µg Cd/g suve hrane

C2	α-Glik	β-Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
Trajanje razvića	0,2499	0,0311	0,1320	0,2693	0,4060 ⁺	0,5206*	-0,0107
Masa 3.dana 4. stupnja	-0,3906 ⁺	-0,4817 ⁺	-0,0642	-0,2676	-0,1164	-0,0037	-0,1101
Ukupan mortalitet	0,5050*	0,4252	0,3034	0,2805	0,5567*	0,3630	-0,1786
Mortalitet 1. stupnja	0,5037*	0,4015	0,3137	0,2883	0,4996*	0,3819	-0,0851
Trajanje 1. stupnja	0,0855	0,1934	-0,2302	0,0315	0,2011	0,1297	-0,2532
RGR	-0,1731	-0,3037	-0,0641	-0,0524	0,2493	0,3707	0,2906

⁺P<0,1 *P<0,05

Tabela 82. Korelacije između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima pri oporavku od manje koncentracije kadmijuma

C1K	α-Glik	β-Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
Trajanje razvića	-0,0168	0,4366 ⁺	0,1126	0,1017	-0,1260	-0,0879	0,0315
Masa 3.dana 4. stupnja	0,0029	-0,5337*	-0,0192	-0,0137	0,2357	0,1268	-0,1750
RGR	0,3228	-0,0352	0,1911	-0,0011	0,0762	-0,1527	-0,1824

⁺P<0,1 *P<0,05

Tabela 83. Korelacije između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima pri oporavku od veće koncentracije kadmijuma

C2K	α -Glik	β -Glik	EST	LAP	TRIP	Proteaze	GST
Trajanje razvića	-0,3109	-0,1273	-0,0022	0,0448	0,1316	0,1323	-0,1422
Masa 3.dana 4. stupnja	0,1571	-0,5407*	0,2172	0,3352	0,1641	0,2524	-0,3719
RGR	0,0418	-0,2072	-0,2959	0,0547	0,1620	0,2352	-0,1176

* $P < 0,05$

4.12 POREĐENJE KORELACIJA IZMEĐU OSOBINA ADAPTIVNE VREDNOSTI I AKTIVNOSTI ENZIMA

Poređenje korelacija između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima na različitim tretmanima u odnosu na kontrolu predstavljeno je tabelom 84. Korelacija između mase i tripsina na kontroli je značajno manja od korelacije na akutnom efektu manje koncentracije kadmijuma. Ovo ukazuje na drugačiju povezanost ova dva svojstva u toku akutnog tretmana KC1, kao i na povećanje mase u toku stresa sa povećanjem aktivnosti tripsina (veće iskorištavanje hrane). Obzirom da ne postoji značajna razlika korelacije mase i aktivnosti tripsina između kontrole i KC2, kao ni između kontrole i hroničnih tretmana, verovatno da u toku jačeg i dugotrajnijeg stresa nije moguća ova adaptivna reakcija.

Između relativne brzine rasta i GST dolazi do značajne promene znaka korelacije na oba hronična tretmana u odnosu na kontrolu (u toku dugotrajnog efekta korelacije su pozitivne, a na kontroli je korelacija negativna). Brzina rasta larvi je veća u toku hroničnog efekta ukoliko je aktivnost GSTa, a samim tim i odbrana organizma od ksenobiotika veća. Najverovatnije da u toku dugotrajnog delovanja stresora, enzimi detoksifikacije imaju ključnu ulogu u rastu larvi. Zato dolazi i do alokacije energije, koja se troši na sintezu GST, čija povećana aktivnost značajno utiče i na veću relativnu bzinu rasta larvi.

Između trajanja razvića i esteraze, tripsina i ukupne proteaze dolazi do značajne promene znaka korelacija na KC1 u odnosu na kontrolu (na akutnom tretmanu su korelacije negativne). Moguće je da u toku kratkotrajnog efekta kadmijuma, povećanjem aktivnosti digestivnih enzima larve skraćuju razviće. U toku presvlačenja larva prestaje da jede što ujedno znači da smanjuje unos kontaminirane hrane. Pored toga, samim procesom presvlačenja, putem odbacivanja košuljice, dolazi do izbacivanja metala iz organizma.

Rezultati

Ista promena znaka korelacija se vidi i na hroničnom stresu na C1 u odnosu na kontrolu između mase i GST (korelacija je veća na C1). GST je enzim detoksifikacije i povećanjem njegove aktivnosti u uslovima stresa masa larve opada zbog preusmeravanja energije na njegovu sintezu. Međutim, poređenjem korelacija između mortaliteta prvog stupnja i leucin aminopeptidaze utvrđeno je da na C1 korelacija postaje manja u odnosu na K i statistički nije značajna. Znači, da u samom početku larvenog razvića, na hroničnom stresu manjeg intenziteta, povećanje aktivnosti LAP ima važnu ulogu u smanjenju mortaliteta larvi gubara.

Spirmanov koeficijent je statistički značajan samo između kontrole i hroničnog tretmana na C2 što ukazuje na promenu korelacionih struktura između ostalih posmatranih tretmana.

Tabela 84. *t* vrednosti dobijene poređenjem korelacija između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima na različitim tretmanima kadmijumom.

	K-C1	K-C2	K-KC1	K-KC2	K-C1K	K-C2K
Uk.mortal.– α	0,2784	0,5944				
β	0,5789	0,8117				
Est	0,6935	0,1461				
Lap	0,6759	0,0185				
Trip	0,1546	0,7240				
Prot	0,1472	0,0161				
GST	0,4652	0,0380				
Mortal. 1.– α	0,3614	0,9403				
β	0,3923	0,2598				
Est	0,9028	0,3716				
Lap	1,9649*	0,9142				
Trip	0,9918	0,5006				
Prot	0,7663	0,0418				
GST	0,9014	0,4151				
Trajanje 1.– α	0,6135	0,0165				
β	0,4121	0,1428				
Est	0,6862	0,9423				
Lap	0,3254	0,5922				
Trip	0,4393	0,2929				
Prot	0,7651	0,1867				
GST	0,6232	0,5198				
Traj. razv.– α	0,4920	0,1972	0,4975	0,4144	0,5870	1,4619
β	1,9230	1,0546	0,0488	0,4340	0,0840	1,4956
Est	0,5528	0,2027	2,1255*	0,3455	0,2562	0,5773
Lap	0,0861	0,7668	0,6674	1,7091	0,2554	0,0896
Trip	0,8492	0,0842	2,0476*	0,1886	1,5176	0,7609
Prot	0,9912	0,6556	2,1281*	0,6053	1,2644	0,6293
GST	0,6966	0,0268	0,0006	0,4186	0,1476	0,3480

Rezultati

Masa-	α	0,1524	0,8558	0,9110	1,3652	0,3498	0,7963
	β	0,1742	0,4278	0,6760	0,0524	0,6418	0,6474
	Est	1,1850	0,8117	0,0092	0,6411	0,6698	0,0186
	Lap	1,0969	1,4917	0,7007	0,8366	0,7208	0,3142
	Trip	0,2978	0,3642	2,6088**	0,1937	0,6667	0,4449
	Prot	0,3156	0,2029	1,7844	0,0876	0,1768	0,5515
	GST	2,8215**	0,8483	1,6962	0,3634	1,0257	1,6120
RGR-	α	0,6342	0,3584	0,5992	1,5077	1,1102	0,2692
	β	0,6840	0,7807	0,6226	0,3056	0,0610	0,5221
	Est	0,2993	0,0783	0,7562	1,3431	0,8169	0,6040
	Lap	0,2330	0,7212	0,2280	0,4752	0,5628	0,3957
	Trip	0,5075	0,5697	0,2308	0,6089	0,0490	0,2941
	Prot	0,6023	0,6756	0,2637	0,5447	0,8940	0,2360
	GST	2,9417**	2,1242*	1,5807	0,7002	0,7031	0,8786
SPIRMANOV KOEFICIJENT		-0.041	0,635***	-0,147	0,270	0,022	0,316

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$

5.1 DEJSTVO KADMIJUMA NA ENZIME SREDNJEG CREVA

Zagađenost teškim metalima je detektovana u mnogim industrijskim regijama, ali njihov uticaj na organizme, uključujući čoveka je skoro nepoznat. Većina studija se zaniva samo na merenju metala koji je akumuliran u tkivu, dok je mehanizam toksičnosti metala na ćelijskom nivou nedovoljno razjašnjen. Promene koje nastaju pod uticajem teških metala se prvo dešavaju na molekularnom nivou. Citogenetičke analize koje su izveli Warchalowska–Silwa i saradnici (2005) pokazuju da 45,8% ženki iz populacije *Tetrix tenuicornis* koje su živele u zagađenim sredinama imaju skupove mozaičnih oogonialnih mitotičkih hromozoma kao i promenjen broj hromozoma, što može poticati od razaranja citoskeleta. Studije na fibroblastima hrčka su pokazale da olovo i živa utiču na sakupljanje tubulina i ometaju hromozomsku segregaciju kroz interakciju sa motornim proteinima citoskeleta (Their et al. 2003). Hrom, olovo i kadmijum dovode do specifičnih somatskih hromozomskih rearanžmana kod vrste *Chironomus riparius* i promene funkcionalne aktivnosti Balbanijevih prstenova (Michailova et al. 1998). U toku mejoze kod *T. tenuicornis* u prisustvu teških metala primećene su asocijacije između različitih hromozoma, aberacije hromatida (gapovi i prekidi), nedostatak fragmenata kod nekih hromozoma i stvaranje mostova (Warchalowska–Silwa & Maryanska–Nadachowska 1991). Prisustvo gapova je povezano sa tzv. "slabim mestima" na hromozomu i najverovatnije je indukovano različitim mutagenim faktorima kao što su UV zračenje i/ili prisustvo hemikalija (Kirsch–Volder 1984).

Planello i saradnici (2006) su utvrdili da kod larvi *Chironomus riparius* posle izlaganja kadmijumu dolazi do razaranja nukleolarne aktivnosti zbog velikog smanjenja transkripcije rDNK gena. Isti tim je detektovao povećanje fluorescentnih signala u oblasti centromera, koje predstavljaju regione sa visoko repetitivnim (nekodirajućim) DNK sekvencama. Redukcija prekursora rRNA i kondenzovanje hromatina predstavljaju specifične promene indukovane kadmijumom, obzirom da

ove pojave ne postoje u toku delovanja toplotnog stresa. Znači, da izloženost kadmijumu smanjuje nivo aktivnosti nukleolusa, što predstavlja dugotrajan efekat ćelijskog oštećenja. Važno je napomenuti da ostale proteinske komponente zrelih ribozoma koje nemaju veze sa nukleolusom nisu izložene pomenutom efektu kadmijuma (Govinda et al. 2000). Novija istraživanja ističu da je nukleolus organela koja detektuje, „oseća“, ćelijski stres (Olson 2004). Moguće je da i kadmijum dovodi do promena na nukleolusu, a samim tim inhibira sintezu enzima na većini tretmana (slike 7, 9, 11, 14, 19).

Toksično dejstvo kadmijuma na molekularnom nivou takođe zavisi od njegove koncentracije. Pri izlasku jona Zn iz ćelije manje koncentracije kadmijuma od 1, 5 i 10 μM zamenjuju jone cinka i uspostavljaju splajsing molekula RNK in vitro. Međutim, veće koncentracije kadmijuma pokazuju potpuno odsustvo produkata splajsinga kod larvi *Chironomus riparius* (Lee et al. 2006).

Svi napred navedeni molekularni toksični efekti teških metala mogu biti uzroci pada aktivnosti posmatranih enzima u našem eksperimentu. Interesantno je što se kod čak četiri enzima, ukupnih proteaza, tripsina, leucin aminopeptidaze i α -glikozidaze, aktivnosti značajno razlikuju od kontrole na istim tretmanima: KC2, C2 i C2K (slike 7, 9, 11, 14). Verovatno da je za inhibiciju aktivnosti različitih enzima potrebna veća količina kadmijuma bez obzira na dužinu i tip tretmana. Jedino u toku oporavaka od obe koncentracije kadmijuma, značajan porast aktivnosti postoji samo kod GSTa (slika 21), dok povećanje aktivnosti u toku akutnog i hroničnog tretmana kadmijumom nije statistički značajno. Obe koncentracije kadmijuma u toku akutnog i hroničnog tretmana primenjene u našem eksperimentu sa gubarom očigledno nisu bile dovoljne da dovedu do očekivane aktivacije GSTa. Niske koncentracije metala unete u organizam u prvim fazama detoksifikacije aktiviraju sintezu metalotioneina koji takođe ima ulogu u eliminaciji kadmijuma, pa je to možda jedan od razloga zašto u akutnim i hroničnim tretmanima ne postoji značajna promena GSTa u odnosu na kontrolu. Kod pacova je utvrđeno da pri oralnom unošenju kadmijuma prvo dolazi do

značajnog povećanja metalotioneina (metallothionein-like cadmium binding protein) u testisima, dok su aktivnost GSTa, kao i koncentracija glutaciona smanjeni intraperitonealnim unošenjem kadmijuma u životinju (Ohta et al. 1997). Znači, inhibicija samog enzima može biti pod uticajem kadmijuma (Sidhu et al. 1997; Cervera et al. 2003). Ovaj metal, takođe, redukuje GST aktivnost kod insekata (Migula & Glowacka 1996) i vodenih invertebrata (Almar et al. 1987). Aktivnost ovog enzima zavisi i od pola. Augustyniak i Migula (2000) su utvrdili da je kod mužjaka skakavca *Chorthippus brunneus* (Thunberg) aktivnost GST bila veća nego kod ženki. Kod miša kadmijum može da formira komplekse sa glutationom (Diaz-Cruz et al. 1997), koji utiču na njegovo smanjenje, a samim tim i pad aktivnost GSTa (Iscan et al. 1995). Interesantan podatak je povećanje aktivnosti glutation S-transferaze kod gusenica koje su se tri dana oporavljale od hroničnog delovanja kadmijuma (slika 21C, D). Gusenice koje su tretirane kadmijumom imaju skraćeno razviće do ulaska u četvrti larveni stupanj (Slika 4A), pa je samim tim različit hormonski status koji ga prati u odnosu na kontrolnu grupu. Brže razviće larvi tretiranih kadmijumom kod kojih je promenjen hormonski status verovatno je posledica povećane sinteze ekdisteroida i pripreme za morfogenetske promene koje prati indukcija aktivnosti glutation S-transferaze, što su naši rezultati posredno i pokazali (Nijhout 1994; Kafel et al. 2003; Enayati et al. 2005; Freitas et al. 2007).

Lee i saradnici (2006) su proučavali ekspresiju proteina u prisustvu kadmijuma kod larvi *Chironomus riparius*. Poredeći intenzitet proteinskih tačaka u dvodimenzionalnoj elektroforezi, utvrdili su da je aktivnost 21 proteina opala, a kod 18 porasla posle tretmana kadmijumom. U enzime koji imaju povećanu aktivnost spadaju i tri enzima uključena u biosintezu glutaciona i regulaciju sinteze masnih kiselina. Enzimi kojima je pod dejstvom kadmijuma smanjena aktivnost su uključeni u produkciju energije, utiču na funkcionalnost proteina, biosintezu nukleotida, ćelijsku deobu, signalnu transdukciju, metabolizam masnih kiselina i fosfolipida. Isti tim istraživača pominje da, osim ranije opisanih tipova detoksifikacije teških metala kod

insekata, postoji još jedan vid sekvenciranja koji zavisi od melanizacije. Naime, između strukturnih jedinica melanina se nalazi nekoliko negativno naelektrisanih karboksilnih grupa koji imaju funkciju katjonskih helatora (Riley 1997). Ovakva struktura omogućava pigmentu melaninu da selektivno veže pozitivno naelektrisane čestice, kao što su metali, i da ih sekvencira u ćelije koje sadrže pigmente (Blinska 2001). Nivo ovakve sekvenciranja zavisi od enzima (npr. fenol hidrolaze, Zn-metaloenzima) na koje takođe može delovati kadmijum.

Ortel (1995a) je utvrdila da hronična izloženost larvi teškim metalima (Cd, Pb, Zn, Cu) dovodi do smanjenja ukupnih proteina hemolimfe, povećava ukupne slobodne aminokiseline hemolimfe i ukupne proteine u organizmu. Tako je kod larvi koje su gajene na supstratu sa kadmijumom (10 i 30 µg/g hrane) došlo do značajnog povećanja histidina i fenilalanina. Unošenjem kadmijuma kroz hranu, kod larvi leptira kupusara, detektovano je i povećanje biogenog amina – histamina u hemolimfi (Hučkova et al. 1996). Promenjen sastav hemolimfe: aminokiselina, neurohormona i neuromodulatora, verovatno može uticati na promenu aktivnosti enzima.

Još jedan od razloga koji može dovesti do inhibicije enzima je sposobnost dvovalentnog kadmijuma da zameni katjone, cink ili kalcijum, koji u proteinima imaju ulogu kofaktora (Hainaut & Milner 1993; Chao et al. 1990, 1995). Utvrđeno je da se kod različitih organizama, u prisustvu teških metala smanjuje aktivnost nekih enzima: npr. dolazi do inhibicije ATPaza kod pacova (Carfagna et al. 1996) i račića *Penaeus indicus* (Satyavathi & Prabhakara Rao 2000), aminolevulinske kisele dehidrataze kod ribe *Hoplias malabaricus* (Costa et al. 2007), holinesteraze kod vrste *Daphnia magna* (Diamantino et al. 2003), alkalne fosfataze (Vlahović et al. 2009). Kod krabe *Carcinus maenas* je detektovano povećanje aktivnosti GST i laktat dehidrogenaze u odgovoru na prisustvo cinka i žive u vodi (Elumalai et al. 2007). Cink i živa su metali koji dovode do oksidativnog stresa, pa je povećanje aktivnosti GST odbrambeni odgovor ćelije na oksidativni stres (Elumalai et al. 2007). Međutim, najverovatnije je

da pojedini enzimi imaju veću osetljivost, pa do njihove inhibicije dolazi i na koncentraciji kadmijuma od 10 $\mu\text{g/g}$ suve hrane. Tako, u toku akutnog tretmana KC1, smanjenje aktivnosti je primećena kod leucin aminopeptidaze i esteraze (slike 11A, 19A), dok hronični efekat C1 smanjuje aktivnosti tripsina, leucin aminopeptidaze, α -glikozidaze i esteraze (slike 9B, 11B, 14B, 19B). Inhibicija enzima, ukupnih proteaza, tripsina, leucin aminopeptidaze, α -glikozidaze i esteraza primećena je posle delovanja hroničnog tretmana C2 (slike 7B, 9B, 11B, 14B, 19B). U toku oporavka od iste koncentracije ni kod jednog pomenutog enzima nema povratka aktivnosti na kontrolni nivo. Moguće objašnjenje za ovu pojavu je suviše kratko vreme od tri dana da bi došlo do oporavka i/ili gubitak funkcije DNK, ribozoma, mitohondrija i promena na nivou ćelijskog metabolizma koji dovode do ireverzibilnih promena u strukturi i/ili sintezi ovih enzima.

Dugotrajan efekat i određena koncentracija metala može lakše dovesti do kompenzatornih reakcija, povećavajući toleranciju organizma u okviru određenog genetičkog opsega (Donker & Bogert 1992; Posthuma & Van Straalen 1993). Na toleranciju prema teškim metalima i drugim polutantima nastalim antropogenim aktivnostima kod insekata, mogu uticati preadaptacije koje su nastale kao odbrana od prirodnih toksina koje proizvode biljke domaćini (Lindqvist 1992; Dallinger 1993). Aktivnost β -glikozidaze samo na oporavku od C1 zavisi od prisustva kadmijuma u hrani (jednofaktorska analiza varijanse, tabela 48). Nakon trodnevnog oporavka aktivnost beta glikozidaze je značajno veća od aktivnosti izmerene kod larvi izloženih hroničnom delovanju C1. Negativna vrednost indeksa fenotipske plastičnosti pokazuje da aktivnost ovog enzima, takođe, raste samo na C1K u odnosu na kontrolu (tabela 50). Sve ovo ukazuje na specifičnost njegove regulacije u toku delovanja različitih tretmana i koncentracija kadmijuma. Obzirom da ovaj enzim ima ulogu u detoksifikaciji toksičnih glukozića biljaka, te tako omogućava bolju toleranciju na biljke domaćine, moguće je da se tek na višim koncentracijama kadmijuma povećava njegova uloga u detoksifikaciji, ali i metabolizmu šećera. Važno je istaći da

lepidoptere nemaju β -galaktozidazu, već klasu 1 β -glukozidazu ili klasu 1 i klasu 3 β -glukozidaza (Ferreira et al. 1998). Prema istim autorima, postoji evolutivni trend po kome se veliki broj enzima sa različitom specifičnošću za supstrat stapa u jedan enzim koji može da hidrolizuje više supstrata u istom aktivnom mestu. U našem eksperimentu elektroforetska detekcija β -glukozidaze gubara četvrtog stupnja potvrđuje ovu teoriju jer je na svim tretmanima kadmijumom prisutna samo jedna forma ovog enzima (slika 18).

Esteraze su do sada uglavnom korišćene kao biomarkeri za prisustvo organofosfatnih i karbamatnih pesticida u prirodi, pa su zato i mehanizmi inhibicije najčešće proučavani kod ove vrste enzima. Međutim, o promeni aktivnosti ovih enzima, kao i samim mehanizmima interakcije sa teškim metalima malo se zna. Aktivnost karboksilesteraza skakavaca nije bila u korelaciji sa stepenom zagađenja (Augustyniak & Migula 2000). Najverovatnije je da na njihovu aktivnost, osim metala, mogu uticati i drugi faktori kao što su organska jedinjenja i sastav dijeta. Marczyk i saradnici (1993) i Wilczek i Migula (1996) su pokazali nižu karboksilesteraznu aktivnost kod paukova iz sredina koje su zagađene metalima. Međutim, Wilczek i saradnici (2003) napominju da heterogenost odgovora esteraza kod paukova u prisustvu teških metala zavisi od pola jedinke, starosti, zagađenosti sredine u kojoj su životinje živele, kompenzatornih reakcija samog organizma. Do važnih podataka o mehanizmu inhibicije holinesteraze u prisustvu žive kod drozofile su došli Frasco i saradnici (2007). Oni tvrde sledeće:

1. inhibicija je nekompetitivna;
2. živa se vezuje za površinu proteina;
3. inhibicija ne uključuje aminokiselinske ostatke u aktivnom centru;
4. živa dovodi do agregacije molekula enzima i stoga indirektno umanjuje osetljivost enzima na živu (slepljivanje sprečava vezivanje još jednog molekula metala za vezujuće mesto).

U našem eksperimentu inhibicija esteraza na manjoj koncentraciji u toku akutnog i hroničnog tretmana pokazuje veliku osetljivost ovih enzima. Aktivnost esteraza na KC2 i C2 je i dalje manja od aktivnosti na kontroli, ali je veća od aktivnosti na akutnom i hroničnom tretmanu na manjoj koncentraciji kadmijuma. Ali, povratak aktivnosti esteraza u toku oporavka od C1 na kontrolni nivo i značajno veća aktivnost na C1K u odnosu na C1 (slika 19A, B, C, D), potvrđuje prethodne zaključke da je inhibicija reverzibilna i da agregacija proteina do koje dovodi određena koncentracija teškog metala sprečava dalju intramolekularnu inaktivaciju proteina.

Kod vrste *Glossina morsitans* detektovane su dve vrste enzima koje sadrže jon cinka: tzv. cink-metaloproteaza i cink karboksipeptidaza (Yan et al. 2002). Međutim, istraživanja na aminopeptidazama iz srednjeg creva vrste *Spodoptera littoralis* pokazuju da dvovalentni joni bakra, olova i cinka inhibiraju ovu vrstu enzima (Lee & Anstee 1994).

Mehanizam inhibicije enzima od strane metala još uvek nije u potpunosti poznat. Postoji više hipoteza o načinu inhibicije. Opšte je poznato da inaktivacija enzima potiče od vezivanja metala za specifične (SH) grupe enzima (Viarengo 1989; Simkiss et al. 1993). Proteaze srednjeg creva vrste *Mamestra configurata* (Lepidoptera), sadrže cisteine koji formiraju disulfidne mostove (Hegedus et al. 2003). Razlog proteazne inhibicije u prisustvu kadmijuma može biti njegovo vezivanje za sulfhidrilne grupe, razaranje funkcionalnih S-S mostova i formiranje mostova između metala i sumpora u peptidnim lancima proteina. Leucin aminopeptidaze pokazuju najveću osetljivost i njihova aktivnost se smanjuje na akutnom efektu kadmijuma i to na obe koncentracije. Pošto su aminopeptidaze insekata metaloenzimi u čiji sastav najčešće ulaze joni cinka i mangana (Del Lama et al. 2001), mogući razlog inhibicije ovog enzima u našem eksperimentu može biti i zamena dvovalentnih metala jonima kadmijuma. Tripsin pokazuje veću osetljivost nego ukupne proteaze i njegova inhibicija se vidi i u toku hroničnog stresa na C1 (slika 9B), dok su ukupne proteaze srednjeg creva gubara inhibirane pri svim tretmanima na većoj koncentraciji metala

(slika 7A, B). Moguće je da se u prisustvu manje koncentracije kadmijuma indukuju druge proteaze, npr. elastaze, čija je osetljivost na kadmijum manja. Kod gubara su elastaze dominantne proteaze (Valaitis 1995). Koncentracija od 10 $\mu\text{g Cd/g}$ suve hrane je najverovatnije suviše mala da bi došlo do detektabilnih štetnih efekata kod proteolitičkih enzima (OSETLJIVOST: LAP>TRIP>UK.PROT). Pošto LAP ima ekstra i intraćelijsku lokalizaciju, moguće je da ovaj enzim prvi reaguje na osmotski stres (Hiraizumi et al. 1992). Obzirom da prisustvo kadmijuma dovodi do promene celokupnog energetskeg i osmotskog balansa u ćeliji, promena aktivnosti leucin aminopeptidaze može biti jedan od indikatora njegovog prisustva.

Jednofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da koncentracija kadmijuma utiče na smanjenje aktivnosti tripsina, leucin aminopeptidaze, ukupnih proteaza i α -glikozidaze (tabele 28, 33, 38, 43). Kod β -glikozidaze i GST mehanizam promene aktivnosti se najverovatnije razlikuje od prethodnih enzima. Naime, i kod β -glikozidaze i GST promena aktivnosti samo u toku oporavka od C1 zavisi od prisustva kadmijuma u hrani (tabele 48, 58). Moguće da do promene aktivnosti ovih enzima dolazi indirektno, modulacijom mnogobrojnih mehanizama sinteze i sekrecije, a ne samo direktnom inhibicijom. Ovi mehanizmi se razlikuju od mehanizama inhibicije proteolitičkih enzima, pa zato na ostalim efektima i koncentracijama kadmijuma ne možemo ni detektovati promene aktivnosti ovih enzima detoksifikacije.

Guilhermino i saradnici (1998) su izneli hipotezu da inhibicija holinesteraze potiče od vezivanja metala za anjonsko mesto enzima. Zbog vezivanja metala za anjonsko mesto, acetilholin se ne može vezati za enzim i ne može biti razložen. Različiti metali nemaju isti afinitet za vezivanje za enzim. Razlike u afinitetu potiču od različite veličine jona, kapaciteta za formiranje kompleksa, elektronegativnosti i redukcionog potencijala (Guilhermino et al 1998; Grippo & Heath 2003).

Zbog sposobnosti kadmijuma da zameni dvovalentne metale u enzimima koji imaju funkciju kofaktora, i vezivanja za transportere metala koji se nalaze u ćelijskoj

membrani (Van Straalen & Donker 1994), možemo da zaključimo da je ugrožen kako normalni metabolizam u ćeliji, tako i metabolizam metala koji imaju važnu fiziološku funkciju. Kod insekata su detektovane dve proteaze kojima je potreban jon cinka za pravilnu funkciju (Macours & Hens 2004). Metaloproteinaza označena kao ACE (angiotensin-converting enzyme) u srednjem crevu diptera ima digestivnu ulogu (Wijffels et al. 1996), a kod drozofile joj se aktivnost povećava pre i za vreme formiranja lutke (Wilson et al. 2002). Metali su sposobni da formiraju veoma jake veze sa histidinom i metioninom u bočnim lancima kod npr. metaloenzima (Frasco et al. 2007), što je najverovatnije i uzrok inhibicije nekih enzima u toku delovanja veće koncentracije kadmijuma u našem eksperimentu.

5.2 DEJSTVO KADMIJUMA NA OSOBINE ADAPTIVNE VREDNOSTI

Promene na molekularnom nivou koje su posledica delovanja kadmijuma mogu dovesti i do promena kod osobina adaptivne vrednosti. Cervera i saradnici (2004) su kod vrste *Oncopeltus fasciatus* ispitivali uticaj različitih koncentracija kadmijuma na veliki broj osobina adaptivne vrednosti. Utvrdili su da se produžava trajanje stadijuma lutke i opada težina adulta sa povećanjem koncentracije kadmijuma. Kod jedinki koje su bile izložene kadmijumu ustanovljena je i zavisnosti između smanjenja težine i vremena izleganja (smanjenje težine je proporcionalno kašnjenju u razviću). Interesantno je da u njihovom eksperimentu osetljivost na prisustvo kadmijuma zavisi od pola jedinki. Na smanjeno preživljavanje ženki uticala je manja koncentracija kadmijuma u odnosu na preživljavanje mužjaka. Međutim, stepen ovipozicije, fekunditet i fertilitet su parametri koji su najviše bili pogođeni prisustvom ovog metala.

Redukcija rasta u prisustvu teških metala je detektovana kod terestrijalnih hemimetabola (Posthuma 1990; Schmidt et al. 1992), holometabolnih insekata (Ortel

1996) vodenih holometabolnih larvi, *C. riparius*, (Sildanchandra & Crane 2000) i kolembola (Crommentuijn et al. 1993). Terestrijalne isopode u prisustvu kadmijuma smanjuju masu i pokazuju veći mortalitet (Odendaal & Reinecke 1999). U našem eksperimentu sa povećanjem koncentracije kadmijuma dolazi do statistički neznačajnog povećanja mortaliteta larvi gubara, kako ukupnog do četvrtog stupnja, tako i mortaliteta prvog stupnja. Koncentracije kadmijuma od 10 i 30 μg su verovatno niske da bi dovele do veće smrtnosti jednog određenog larvenog stupnja ili da bi zbog eventualnog kumulativnog efekta u toku razvića bile uzrok smanjenom preživljavanju. Van Ooik i saradnici (2007) su utvrdili da se brzina rasta moljca *Epirrita autumnata* značajno razlikuje između legala koja su gajena na nekontaminiranom lišću i lišću u kome je utvrđeno prisustvo teških metala, dok se težina lutke nije razlikovala u odgovoru na zagađenost sredine. Postoji mogućnost da larve manju brzinu rasta u prisustvu teških metala kompenzuju produžavanjem larvenih stupnjeva. U našem eksperimentu vidljivo je skraćenje trajanja razvića prvog stupnja i ukupnog trajanja razvića do ulaska larve u četvrti stupanj u odnosu na kontrolu i to samo u toku hroničnog tretmana na većoj koncentraciji kadmijuma. Rezultati dobijeni u našoj laboratoriji ukazuju da koncentracije kadmijuma od 10 i 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane ne utiču značajno na trajanje larvenog razvića, masu lutke i dužinu života ženki i mužjaka gubara. Jedino manja koncentracija kadmijuma kod ženki i obe koncentracije kadmijuma kod mužjaka značajno skraćuju trajanje razvića lutke (Mirčić, neobjavljeni podaci). Moguće je da su akutni tretmani na obe koncentracije kadmijuma, ali i hronični efekat na 10 $\mu\text{g Cd/g}$ hrane suviše slabi da bi doveli do statistički značajnih promena dužine razvića larvi gubara. Dugotrajni tretman niskih koncentracija teških metala može dovesti do određenog stepena tolerancije ili adaptacije na teške metale kod insekata (Posthuma & Van Straalen 1993; Godočikova et al. 1993). Osim toga, Lingjærde i saradnici (2001) su ustanovili da je razviće kod adulta, *Lucilia sericata*, u toku izloženosti kadmijumu,

osetljivije na toksikant od larvenog razvića. Znači, da se štetni efekti kadmijuma i smanjenje adaptivne vrednosti mogu uočiti i kasnije kod adulta insekata.

Gintenreiter i saradnici (1993) su kod gubara uočili snažnu korelaciju između sadržaja teških metala i težine različitih razvojnih stupnjeva gubara. Prema tome, smanjenje mase larvi četvrtog stupnja može da se objasni utroškom energije za različite tipove ekskrecije teških metala (preko fecesa, glavene kapsule i egzuvija), koje su pomenuti autori detektovali u toku izloženosti gubara teškim metalima. Osim toga, oko 35% ukupne količine kadmijuma se ekskretuje pri svakom presvlačenju (Posthuma et al. 1992). Moguće je da se održavanjem adekvatnog broja razvojnih stupnjeva izbacuje kadmijum i sprečava njegovo deponovanje.

Interesantno je da pojedine vrste mogu da osele kontaminante u hrani i izbegnu njihovo unošenje (Olla et al. 1980; Van Capelleveen et al. 1986). Tako npr. gusenice *Deilephila elpenor* koje su gajene na lišću sa kadmijumom ostavljaju nepojedene delove lišća u kojima je koncentracija metala povećana (Nuorteva et al. 1992). Izbegavanje kontaminirane hrane može dovesti do smanjenja mase larvi. Tako se u našem eksperimentu na obe koncentracije kadmijuma u toku akutnog efekta i na C2 u toku hroničnog tretmana smanjuje procenat mase srednjeg creva u odnosu na masu larve (slike 22A, B). Pošto proučavani parametar predstavlja indirektnu meru konzumacije hrane, možemo da zaključimo da kadmijum kod larvi gubara četvrtog stupnja može dovesti do smanjenog unosa hrane. Interesantno je što se % mase srednjeg creva u toku oporavka od C2 ne vraća na kontrolni nivo (slika 22D). Verovatno da za ovu osobinu koncentracija od 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane predstavlja suviše veliku koncentraciju da bi se povećala konzumacija, ili je tri dana nedovoljno za oporavak. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Fred i Brommer (2005). Oni su utvrdili da se kod larvi dve populacije vrste *Parnassius apollo* smanjuje unošenje hrane kontaminirane kadmijumom i to kod oba pola. Donker (1992) smatra da organizmi mogu da troše dodatnu energiju na izbegavanje kontaminanata. Na ovaj način se može delimično objasniti i značajan gubitak mase

kod organizama koji su izloženi kadmijumu u odnosu na netretirane životinje. Kod insekata postoji još jedan interesantan način adaptacije i izbegavanja teških metala koji se sastoji u formiranju tube oko larve kod *Chironomus luridus* (Helpern et al. 2002), inkapsulacije i modulisanja imunog odgovora promenom aktivnosti fenol oksidaze kod moljca *E. autumnata* (Van Ooik et al. 2007). Kod insekata je prisutno uzajamno ograničenje (engl. trade-off) između rasta i imunog odgovora (Rantala & Roff 2005). Alokacija energije ka imunom odgovoru i sintezi proteina koji ulaze u sastav zaštitnih struktura može dovesti do usporenog rasta, smanjenja mase larvi i inhibicije digestivnih enzima.

Pošto akutni tretman 10 i 30 $\mu\text{g Cd/g}$ suve mase hrane nije doveo do pada mase larvi četvrtog stupnja (slika 5A), možemo da zaključimo da je koncentracija metala nedovoljna i/ili tretman kadmijumom vremenski kratak da bi došlo do pada mase. Međutim, na dugotrajnom stresu na C2 i oporavcima (C1K i C2K) registrovan je pad mase gubara četvrtog stupnja (slike 5C, D). Smanjenje ove osobine adaptivne vrednosti je ireverzibilna pojava povezana sa velikim brojem regulatornih mehanizama koji ne dozvoljavaju oporavak mase, uključujući i preusmeravanje energije na procese koji omogućavaju preživljavanje. U poređenju sa masom larvi, kadmijum na relativnu brzinu rasta deluje na drugi način. U toku akutnog tretmana, obe koncentracije kadmijuma i oporavak od C2 deluju stimulatorno na brzinu rasta četvrtog stupnja (slike 6A, D). Po prestanku delovanja stresora jačeg intenziteta larva ubrzava razviće, povećavajući masu i uspostavljaajući normalne fiziološke procese. Na akutnom tretmanu se najverovatnije radi o kompenzatornim reakcijama kojima se ubrzava proces presvlačenja. Utvrđeno je da na 10 i 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane dolazi do promene u veličini nukleolusa L_2 neurona, kao i samih neurona koji su detektovani kao mesto sinteze velike forme PTTH (Ilijin, neobjavljeni podaci). Moguće je da ova promena u nivou PTTH može uticati na ubrzano presvlačenje i razviće larvi izloženih kadmijumu. Nascarella i saradnici (2003) su kod vrste *Phormia regina* Meig ustanovili da je na nižim koncentracijama kadmijuma uspešnost ulutkavanja veća

nego na većim koncentracijama. Navedene pojave se mogu objasniti pojavom koja se naziva hormezis. To je adaptivan odgovor zavisian od koncentracije polutanata, a karakteriše ga stimulacija određene osobine na maloj koncentraciji polutanta i inhibicija na većoj. Hormezis može biti ili direktno indukovan ili rezultat kompenzatornih bioloških procesa koje zatim prati poremećaj homeostaze (Calabrese & Baldwin 2002). Kadmijum indukuje hormetički odgovor kod velikog broja organizama (Calabrese & Baldwin 1999), a njegov mehanizam je još nepoznat.

Kadmijum koji je dodat u hranu dovodi do smanjenja mase i produženja larvenog razvića kod larvi *Boettcherisca peregrina* (Diptera) (Guo-Xing et al. 2006). Osim toga, kod ovih larvi je utvrđeno da prisustvo ovog metala dovodi do smanjenja sadržaja slobodnih proteina u hemolifi. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili drugi istraživači proučavajući dejstvo kadmijuma na insekte ili druge invertebrate (Rathore et al. 1979; Carr et al. 1985; Ortel 1991; Chinni & Yallapragada 2002), a u skladu je i sa inhibicijom skoro svih proučavanih digestivnih enzima u našem eksperimentu. Nasuprot smanjenju solubilnih proteina, prisustvo kadmijuma u hrani povećava sadržaj ugljenih hidrata kod *B. peregrina* i *Chrysochoris stoli* (Islam & Roy 1983; Wu et al. 2006). Interesantno je da je u našem eksperimentu u toku hroničnog tretmana na manjoj koncentraciji kadmijuma, akutnom efektu C2 i oporavku od C2 inhibirana degradacija ugljenih hidrata zbog inhibicije α -glikozidaze (slike 14A, B, D). U toku dugotrajnog tretmana na 30 μgCd aktivnost ovog enzima se značajno povećava. Rezultati naših istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima koje je na istoj vrsti dobila Ortel (1996), gde se na manjoj koncentraciji teških metala (kadmijuma, olova i bakra) povećava koncentracija složenih ugljenih hidrata (glikogena). Na većoj koncentraciji metala, ovaj odnos između složenih i prostih ugljenih hidrata se menja. Pored fizioloških aspekata jednog organizma, energetske metabolizam ima ključnu ulogu u prevazilaženju štetnih uticaja teških metala, koji utiču na preživljavanje, rast, razviće i reprodukciju organizama. Celokupni efekat izloženosti teškim metalima koji utiče na promenu u nivou

energetskih prekursora (ugljenih hidrata, proteina i lipida) može uticati na ukupnu kalorijsku vrednost. Npr. zbog smanjenja šećera, smanjuje se i kalorijska vrednost hemolimfe kod vrste *B. peregrina*. Promene kalorijske vrednosti u toku delovanja ksenobiotika mogu biti posledica modifikacije metabolizma ili smanjenja intenziteta metabolizma (Graney & Giesy 1986; Chinni et al. 2000). Utvrđeno je da kod mrava, prisustvo kadmijuma prouzrokuje pad ATPa, povećanje koncentracije AMPa dovodeći do smanjenja vrednosti AEC (engl. adenylate energy charge) (Migula 1997). Optimalno rešenje za usmeravanje energije rezultuje u postojanju najveće adaptivne vrednosti u datim uslovima. Pod uslovima se podrazumeva vrsta toksikanata i njihova koncentracija, cena detoksifikacije, ali i drugi biotički i abiotički faktori životne sredine kao što je npr. dostupnost hrane (Maryanski et al. 2002).

Po Roelofsu i saradnicima (2008) tolerantne životinje su se adaptirale preko izmenjene konstitutivne detoksifikacije kadmijuma (ili nekog drugog teškog metala). Na taj način, kod životinja koje žive u zagađenim sredinama, ćelijska homeostaza može biti održavana uprkos povećanju unutrašnje koncentracije jona metala, omogućavajući proširivanje niša koje naseljavaju ove vrste. Tako npr., insekti osim povećane sinteze metalotioneina koji učestvuje u detoksifikaciji kadmijuma, mogu vršiti detoksifikaciju metala specifičnim glikoproteinima koji nisu metaloproteinske prirode (Maroni 1990), granulama koje se nalaze u crevu (Hensbergen et al. 2000), ekfolijacijom jednoslojnog crevnog epitela (Posthuma et al. 1992), akumulacijom u egzoskeletu (Van Straalen & Donker 1994) i sekvestracijom (Lauverjat et al. 1989).

5.3 VARIJABILNOST

Evoluciono gledano, toksikološki odgovori unutar populacije su izraženi preko zbira različitosti genetičkih informacija koje su kodirane unutar genotipa individue. Genetička varijabilnost je osnova adaptivne fleksibilnosti u populaciji (Duan et al. 2001). Sposobnost populacije da odgovori na promene u životnoj sredini zavisi od genetičke varijabilnosti (Guttman 1994; Templeton 1995). Antropogeni faktori, kao što je zagađenost, može dovesti do selektivnog preživljavanja jedinki određenih genotipova.

Hoffmann i Merilä (1999) su izneli nekoliko hipoteza zašto heritabilnost svojstva može da se razlikuje između populacija koje nastanjuju povoljne i nepovoljne životne sredine. Prvo, stresni uslovi (oni koji dovode do drastičnog smanjenja adaptivne vrednosti), mogu direktno da dovedu do povećanja genetičke varijanse različitih osobina zbog povećanog stepena mutacija i rekombinacija. Ova hipoteza, ipak, ne može da objasni razlike u heritabilnosti između sredina koje se mogu uočiti između roditelja i potomaka. Povećanje genetičkih varijansi za masu gubara u odnosu na kontrolu je primećeno na obe koncentracije kadmijuma u toku akutnog tretmana. Takođe, u toku oba kratkotrajna efekta kadmijuma heritabilnost je statistički značajna (tabela 7), što ukazuje da su pri kratkotrajnom tretmanu kadmijumom genetički činioci uzrok variranju mase, dok sa povećanjem koncentracije kadmijuma variranje mase zavisi i od koncentracije metala (na C2 i C2K promena mase zavisi od kadmijuma). Važno je istaći da variranje mase na svim tretmanima zavisi od genetičkih faktora. Značajna interakcija „Leglo x Cd“ u akutnom efektu (tabela 6), ukazuje da se genotipovi razlikuju u načinu promene mase u odgovoru na kadmijum. Najverovatnije, da posle kratkotrajnog stresa, genotipovi pokazuju razlike u efikasnosti odbrambenih mehanizama i različitih kompenzatornih reakcija koje u početnim fazama stresa učestvuju u održavanju homeostaze osobina povezanih sa adaptivnom vrednošću organizma, uključujući i masu.

U nekim slučajevima kratkotrajni fiziološki odgovor na stres jasno uključuje isti mehanizam kao i selekcionirani odgovor na izloženost stresu tokom više generacija. Ovo se može naročito očekivati u slučaju prisustva retkih metabolita u hrani, dok su povećane aktivnosti enzima potrebne za procese detoksifikacije ili korišćenja hrane (Clark & Fucito 1998). Postoje dokazi da promene u hrani utiču na nivo transkripcije: npr. etanol u medijumu indukuje povećanu transkripciju *Adh* kod larvi drozofila (Geer et al. 1988).

Analize varijanse su pokazale da bi proteolitički enzimi (ukupne proteaze, tripsin i LAP) mogli da budu osetljivi parametri na prisustvo kadmijuma, jer im se aktivnost menja u zavisnosti od koncentracije metala u toku akutnog, hroničnog stresa i oba oporavka (izuzeci: kadmijum ne utiče na ukupne proteaze na C1K i na tripsin u toku akutnog tretmana C1 i oporavka od iste koncentracije, slike 7C, 9A i C).

Dvofaktorska ANOVA pokazuje da, pri poređenju akutnog i hroničnog tretmana, tretman, koncentracija metala, kao i njihova interakcija ne utiču značajno na promene aktivnosti LAP, obe glikozidaze i esteraze (tabele 37, 42, 47, 52). Poređenjem akutnog ili hroničnog tretmana sa oporavkom utvrdili smo da na ukupne proteaze, tripsin i LAP značajno utiču koncentracije metala, kao i interakcija tretmana i koncentracije, dok aktivnost β -glikozidaze zavisi i od tretmana (tabele 27, 32, 37, 47). Poređenje hroničnog efekta i oporavka je pokazalo da na aktivnost detoksifikacionih enzima (β -glikozidaze, esteraze i GST) značajno utiče tretman (tabele 47, 52, 57). Jednofaktorska analiza varijanse ukazuje da prisustvo kadmijuma u hrani značajno utiče na aktivnost LAP i α -glikozidaze na svim tretmanima (tabele 38, 43), dok u toku oporavka od C1 kadmijum značajno utiče na sve proučavane enzime, osim ukupnih proteaza (tabela 28). Pri hroničnom delovanju kadmijuma i oporavku od C2 aktivnost svih proteolitičkih enzima, kao i α -glikozidaze zavisi od prisustva metala u hrani (tabele 28, 33, 38, 43).

Iznete su i hipoteze koje objašnjavaju smanjenje genetičke varijanse u nepovoljnim uslovima. Najčešće objašnjenje smanjenju heritabilnosti u uslovima

stresa je povećanje sredinske varijanse. Ovo je česti slučaj kod artropoda koje prolaze kroz veliki broj larvenih stupnjeva. Ako nepovoljni uslovi povećaju variranje broja instara, povećanje fenotipske varijanse u veličini i seksualnom sazrevanju može da smanji heritabilnost svojstva (Ebert et al. 1993). Pad varijanse u toku oporavka od C2 za LAP i tripsin može ukazivati: 1) da se posle hroničnog efekta C2 sinteza i sekrecija ovih enzima odvijaju uniformnije, a samim tim verovatno dolazi do boljeg iskorištavanja hrane u toku stresa, oporavka larvi i preživljavanja i/ili 2) da je kod većine legala moguć ireverzibilan pad aktivnosti u toku oporavka od C2. Varijansa tripsina i ukupnih proteaza je veća na kontroli nego na tretmanima kadmijumom (tabele 29 i 34). Neki autori smatraju da se u toku stresa varijansa povećava samo kod onih enzima koji direktno utiču na detoksifikaciju posmatranog ksenobiotika (Parker & Callaghan 1997; Callaghan et al. 1998). Znači da ova vrsta proteolitičkih enzima nije uključena u detoksifikaciju kadmijuma.

Videli smo da životna sredina može uticati na ekspresiju genetičke varijanse, dovodeći do povećanja ili smanjenja heritabilnosti. Ako je srednja vrednost svojstva smanjena pod uticajem nepovoljne sredine, njena heritabilnost može da se smanji zato što geni koji u najvećoj meri kontrolišu vrednost tog svojstva nemaju uticaj na konačni fenotip (Hoffmann & Merilä 1999). U našem eksperimentu, heritabilnost ima značajnu vrednost na kontroli i na oba hronična tretmana za trajanje razvića prvog stupnja, kao i za trajanje razvića do ulaska u četvrti larveni stupanj. Ove osobine pokazuju slične rezultate u analizi varijanse. Interakcija genotip (leglo) i sredina (tretman kadmijumom) utiču na promenu ovih osobina adaptivne vrednosti. Obzirom da poređenjem genetičkih i sredinskih varijansi nisu dobijene značajne F vrednosi možemo da zaključimo da za trajanje razvića prvog stupnja i razvića do ulaska u četvrti genetički i sredinski činioci nisu različiti između kontrole i tretmana kadmijumom.

Važna činjenica je da se masa i relativna brzina rasta ne mogu koristiti kao pogodni parametri za utvrđivanje efekata kadmijuma na gubara. Naime,

poređenjem ovih parametara između različitih tretmana trofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da koncentracija kadmijuma ne dovodi do statistički značajnih promena ovih osobina (tabele 5, 12) .

Proučavanje interakcije "genotip x sredina" se obično odnosi na problem kako se evolutivno menja fenotipska plastičnost i do kog nivoa je adaptivna. Promena u poretku adaptivne vrednosti genotipa u različitim sredinama može da održi polimorfizam u klasično populaciono genetičkom smislu, pa interakcija "genotip x sredina" može slično tome biti značajna snaga koja održava varijabilnost u prisustvu drifta i drugih činilaca koji mogu smanjivati varijabilnost (Clark & Fucito 1998). Gillespie & Turelli (1989) su razmatrali značaj interakcije "genotip x sredina" kao čist aditivan model u kome genotipovi imaju varirajuću adaptivnu vrednost zbog različitih uslova sredine. Po ovom modelu genotip kojima najviše heterozigotnih lokusa je bolje prilagođen novim uslovima sredine. Međutim, nismo u mogućnosti da u laboratorijskim eksperimentima u potpunosti sagledamo puni opseg životnih sredina, jer eksperimentalno izabran skup uslova ne opisuje tačno stanje svih parametara u prirodi koji deluju na jedan genotip.

Da bismo bili u mogućnosti da odredimo da li je interakcija "genotip x sredina" važna za održavanje varijabilnosti, neophodno je odrediti veze između nivoa metabolizma i adaptivne vrednosti (fitnessa), što nije lak zadatak. Prvo, važni izvori varijabilnosti su često regulatorni faktori, koji su često plejotropni. Drugo, na promenu nekih osobina metabolizma uvek deluje istovremeno više parametara, a ne samo jedan koji može biti predmet našeg istraživanja.

5.4 VARIJABILNOST ENZIMSKIH IZOFORMI

Mnoge ekotoksikološke studije ističu značaj genetičke varijabilnosti za adekvatan odgovor populacije na akutne promene u životnoj sredini, kao i delovanja kontaminanata tokom više generacija. U prisustvu kontaminanata selekcija favorizuje individue tolerantne na stres i može da dovede do smanjenja genetičke varijabilnosti

(Guttman 1994). Analiza alozima (a takođe i izozima), može da se koristi kako bi se odgovorilo na pitanja kao što su identifikacija otpornosti/osetljivosti genotipova, veza između genetičke raznolikosti i tolerancije, kao i kako se genotip i/ili frekvencija alela menjaju u zavisnosti od izloženosti kontaminantima. Genetički faktori mogu da ispolje jači efekat na preživljavanje nego na druge osobine, kao što su npr. masa ili druge osobine organizma koje su često povezivane sa preživljavanjem (Schlueter et al. 1997). Rezultat ovakvih studija favorizuje deterministički model u populacionoj genetici. Ovaj model podržava mišljenje da je proteinski polimorfizam adaptabilan ili potencijalno adaptabilan u prirodi. Znači, da održavanje stabilne genetičke strukture, sa određenim nivoom varijabilnosti, omogućava populaciji sa genetičkom plastičnošću da adekvatno reaguje na iznenadne ili dugotrajne sredinske promene (Chagnon & Guttman 1989; Guttman 1994).

Na primer, kod medonosne pčele detektovane su četiri vrste aminopeptidaza u zavisnosti od preference za supstrat, efekata inhibitora, tkivne specifičnosti i distribucije koja zavisi od ontogenetskog razvića. Osim toga, elektroforetski je utvrđeno da samo jedna vrsta aminopeptidaze (označena kao Lap-D) ima četiri varijante sa veoma velikim nivoom intralokusne heterozigotnosti (Del Lama et al. 2001).

Izozimi predstavljaju multipne forme nekog enzima koje se mogu pojaviti kod jedne vrste ili u okviru jedne ćelije. Oni katalizuju istu reakciju i kodirani su od strane jednog gena (Hodgson 2004). Izozimi potencijalno predstavljaju brojne alozimske forme (Mukherjee et al. 2004). Za svaku populaciju i za svaki specifični polutant, aleli koji determinišu otpornost na njih će povećati učestalost ako je organizam kontinuirano izložen kontaminaciji (Yap et al. 2004). Istraživanja su pokazala da se sa većim stepenom genetičke varijabilnosti u populaciji povećava šansa da će populacija biti u mogućnosti da toleriše izloženost teškim metalima (Klerks & Weis 1987). Ako preživljavanje populacije pod uticajem sredinskog stresa zavisi od nekoliko specifičnih otpornih alozimskih genotipova, onda je promena frekvencije

alozima adaptivna. Ali, ako promene u frekvenciji alozima učestvuju u redukciji ukupne genetičke varijabilnosti (smanjuje se heterozigotnost i polimorfizam), ili povećavaju osetljivost na druge sredinske stresore, tada su promene u alozimuma maladaptivne i mogu biti povezane sa negativnim efektom sredine (Guttman 1994; Evenden & Depledge 1997).

Vidimo da se u našem eksperimentu izoforme jednog enzima na jednom tretmanu razlikuju između različitih legala (označenih sa 1, 2, 3), kao i da se izoforme enzima kod jednog legla (obeleženi istim brojevima) razlikuju između više tretmana. Različita legla predstavljaju različite genotipove, pa se može zaključiti da je genetički potencijal jedinke da adekvatno odgovori na stresore iz životne sredine, uključujući i teške metale, osnova za varijabilnost i plastičnost enzima u stresnim uslovima. Mnogi autori smatraju da velika varijabilnost alela kod populacija u zagađenoj sredini može biti izazvana adaptacijama koje omogućavaju toleranciju na teške metale (Guttman 1994). Beaumont i Toro (1996) su utvrdili da u laboratorijskim uslovima heterozigotne individue tolerantnije na stres izazvan bakrom od homozigotnih. Levins (1968) je zaključio da je genetička varijabilnost veća u stresnim sredinama. Osim toga, povećana varijabilnost enzimskih izoformi može biti posledica diferencijalne ekspresije gena u prisustvu kadmijuma. Utvrđeno je da pod uticajem kadmijuma kod vrste *Orchesella cincta* dolazi do indukovane ekspresije određenih gena (pretežno onih koji utiču na detoksifikaciju), dok životinje tolerantne na kadmijum zadržavaju isti ili čak niži stepen ekspresije gena (Roelofs et al. 2007). Moguće je da pod uticajem teških metala i kod larvi gubara dolazi do de novo sinteze izozima (kako onih koji utiču na detoksifikaciju, tako i onih koji imaju ulogu u varenju) koji utiču na održavanje homeostaze u uslovima stresa. Interesantno je da se u našem eksperimentu, kod α -glikozidaze i esteraze na kontroli i dugotrajnim tretmanima kadmijumom, pojavljuje po jedna izoforma velike molekulske mase koje nema u toku akutnih efekata i oporavaka (slike 16, 20). Takođe se primećuje da je kod istih enzimskih izoformi (npr. kod ukupnih proteaza, alkalnih fosfataza, esteraza,

α -glikozidaze, slike 8, 13, 15, 20,) između različitih tretmana povećana obojenost traka, što ukazuje najverovatnije na povećanu sintezu tih izoformi u različitim sredinama.

Promenu broja i intenziteta obojenosti elektroforetskih traka esteraza i peroksidaze pod uticajem teških metala detektovali su Sun (2005) kod crva *Pheretima guillelmi* i Sobkowiak i saradnici (2004) u ćelijskoj kulturi soje kod enzima antioksidativnog stresa. Mukherjee i saradnici (2004) su kod biljke *Lemna minor* utvrdili da promena izozima esteraza zavisi od prisustva teških metala. Znači, da se aktiviraju adaptivni mehanizmi na nivou indukcije odbrambenih proteina (Nevo et al. 1981; De Wolf et al. 2001), kako bi organizam preživeo u zagađenim životnim sredinama. Jasno je da se većina enzima koji učestvuju u metabolizmu ksenobiotika, ili na koje polutanti direktno ili indirektno deluju, pojavljuju u više izoenzimskih formi koje koegzistiraju unutar jedne individue ili čak u okviru organele. Razumevanje biohemije i molekularne biologije ovih izoenzima može objasniti razliku u osetljivosti na ksenobiotike kod različitih vrsta, organa, između polova ili stadijuma razvića.

U prirodi nisu svi genotipovi jednako osetljivi na stres (Guttman 1994). Genotipovi osetljiviji u prirodi su i u laboratorijskim uslovima podložniji negativnom uticaju kontaminanata. Guttman (1994) je kod vrste *Gambusia holbrooki*, ustanovio i vezu prisustva (i učestalosti) genotipova alozima koji uslovljavaju (ili determinišu) otpornost na kontaminante i adaptivne vrednosti kako individua, tako i populacije. Međutim, potrebno je još mnogo istraživanja koja bi objasnila biohemijske mehanizme osetljivosti koji mogu da vode razumevanju genetičke osnove otpornosti organizma na toksične uslove u životnoj sredini.

5.5 PLASTIČNOST

Fenotipska plastičnost predstavlja promenu izraženog fenotipa određenog genotipa u funkciji životne sredine. Plastičnost je određena razlikama u alelskoj ekspresiji u različitim sredinama i promenama u interakciji lokusa. Ona nije u funkciji heterozigotnosti pa podleže i prirodnoj i veštačkoj selekciji (Scheiner 1993). Životna sredina ima dve uloge u evolutivnim procesima. Prvo, sredina uspostavlja vezu između fenotipa individue i adaptivne vrednosti. Drugo, sredina interaguje sa procesima razvića i igra ključnu ulogu u određivanju fenotipa. Ova interakcija se označava kao fenotipska plastičnost (Bradshaw 1965). Fenotipska plastičnost se odnosi na opšti efekat sredine na fenotipsku ekspresiju (uključujući i izostanak odgovora), dok se norma reakcije odnosi na specifičan oblik ovog efekta (Scheiner 1993). Postoje dve "vrste" plastičnosti: prva, kontinualno varijabilna ili graduisana, kalibrisana (engl. *graded*) i druga diskontinuirano varijabilna ili diskretna (West-Eberhard 2003). Termin "norma reakcije" se češće odnosi na kalibrisanu plastičnost, mada se može odnositi i na diskretnu, gde postoji prag odgovora (engl. *threshold responses*) (Via et al 1995). Obe plastičnosti su proizvodi promena čiji je prag zavisan od genetičke varijabilnosti i adaptivnog prilagođavanja u toku prirodne selekcije (West-Eberhard 2003).

Plastičnost nije opšte svojstvo genotipa, već se odnosi na specifičnost pojedinačne osobine (Scheiner & Goodnight 1984; Scheiner et al. 1991). Data osobina može pokazivati plastičnost u odgovoru i na samo jedan sredinski faktor (Tauber & Tauber 1992). Na primer, dugovečnost se kod ženke *Drosophila melanogaster* povećava do rasta temperature od 17 °C, zadržava isti nivo do 25 °C i opada sa daljim povećanjem temperature (David et al. 1983).

Linije norme reakcije pokazuju plastičnost odgovora larvi iz različitih legala na prisustvo kadmijuma u životnoj sredini. Tako se na slikama 7, 9 i 11 vidi da aktivnost proteolitičkih enzima opada i da većina legala (familija) reaguje na sličan način kod

ukupnih proteaza, tripsina i LAP na KC2, C2 i C2K. Za razliku od proteolitičkih enzima, srednje vrednosti α -glikozidaze po leglima veoma heterogeno reaguju na kratkotrajno prisustvo kadmijuma u hrani (slika 14). Iako kod većine legala dolazi do pada aktivnosti ovog enzima na KC2, na KC1 veliki broj legala povećava aktivnost, verovatno zbog neke vrste homeotičkog odgovora na kratkotrajni stres niskog intenziteta. Velika plastičnost i heterogenost odgovora kod β -glikozidaze se vidi na svim tretmanima (slika 17). Međutim, odgovor esteraza i GST na istim tretmanima je uniformniji (slike 19, 21). Kod esteraza čak 15 legala na KC1 i 17 na C1 (od ukupno 20 legala na kontroli) smanjuje svoju aktivnost.

Utvrđeno je da trajanje prvog stupnja i trajanje razvića do ulaska u četvrti stupanj na hroničnom tretmanu i promena mase u toku akutnog stresa zavise od interakcije genotipa i koncentracije kadmijuma (tabele 1, 3, 6). Jedino variranje plastičnosti odgovora relativne brzine rasta ne zavisi od legla tj. interakcija „Leglo x Cd“ nije značajna (tabela 13).

Osnovna determinanta evolucije plastičnosti u odgovoru na variranje uslova životne sredine tokom vremena je relativan stepen promene sredine u odnosu na fenotip individue. Ako se fenotip individue menja brzo kao i sredina, tada je svojstvo labilno, npr. osobine ponašanja (Via & Lande 1987) kao i fiziološke osobine (Hoffmann & Parsons 1991). Postoje svojstva koja su fiksirana jednom za vreme razvića, npr. veličina holometabolnih insekata posle metamorfoze.

U našem eksperimentu, za osobine adaptivne vrednosti, detektovano je jako malo statistički značajnih promena plastičnosti i njihovih standardnih devijacija između različitih tretmana. Kod trajanja razvića prvog stupnja, trajanja razvića do četvrtog stupnja i mase larvi trećeg dana četvrtog larvenog stupnja heritabilnost plastičnosti je manja od heritabilnosti svojstva, što znači da možemo očekivati evoluciju specijalizovanih individua u heterogenoj sredini. Od svih proučavanih osobina adaptivne vrednosti, jedino kod relativne brzine rasta heritabilnost plastičnosti je veća od heritabilnosti svojstva, što ukazuje da bi očekivani evolutivni

odgovor mogao biti povećanje plastičnosti relativne brzine rasta (tabela 16). Poređenjem indeksa plastičnosti i njegove standardne devijacije nisu dobijene značajne Z i F vrednosti (osim za masu, gde je plastičnost na C2 značajno veća nego na C1). Zbog male osetljivosti, indeks plastičnosti se ne menja na različitim tretmanima, proučavane osobine adaptivne vrednosti i njihovu plastičnost ne možemo uzeti kao dobre indikatore prisustva kadmijuma u hrani.

Za razliku od ovih osobina, plastičnost enzima se menja u toku delovanja različitih tretmana kadmijumom. Interesantno je da proteolitički enzimi imaju isti način promene plastičnosti na istim tretmanima (tabele 30, 31, 35, 36, 40, 41). Na dugotrajnom i jačem stresu (C2) odgovor larvi u sintezi ovih enzima nije heterogen. Tako je plastičnost proteaza, tripsina i leucin aminopeptidaze na C2 manja od indeksa plastičnosti na oporavku od iste koncentracije metala. To ukazuje na ireverzibilne promene koje se odvijaju i po prestanku delovanja toksikanata. Pošto sva legla ne reaguju istom brzinom na promenu sredine, standardna devijacija indeksa plastičnosti za proteaze i tripsin je veća na oporavku od C2 nego u toku hroničnog stresa C2. Indeks plastičnosti tripsina, leucin aminopeptidaze i α -glikozidaze na hroničnom tretmanu na C1 je veći nego u toku akutnog tretmana i oporavka na istoj koncentraciji. Kod svih proučavanih proteolitičkih enzima na tretmanima na kojima je indeks plastičnosti statistički značajno veći, standardna devijacija je manja. Čeplikov indeks plastičnosti pokazuje pravac promene plastičnosti. Ako se familije značajno razlikuju u pravcu odgovora (smanjenje ili povećanje vrednosti neke osobine) očekuje se pad indeksa plastičnosti i velika varijabilnost. Kod leucin aminopeptidaze i α -glikozidaze plastičnost u toku hroničnog efekta na C1 je značajno veća nego na C2.

Analizom indeksa fenotipske plastičnosti utvrđeno je sledeće: vrednosti indeksa plastičnosti u toku dugotrajnog tretmana na C1 za tripsin i LAP su veće nego na akutnom efektu i oporavku od iste (C1) koncentracije (tabele 35, 41). Kod svih proteolitičkih enzima plastičnost odgovora na hroničnom tretmanu veće koncentracije

kadmijuma (smanjenje aktivnosti u odnosu na kontrolu) je manja nego na oporavku od iste koncentracije, što ukazuje na ireverzibilne efekte kadmijuma na aktivnost proteolitičkih enzima. Na većoj koncentraciji kadmijuma smanjeno je i variranje plastičnosti odgovora proteolitičkih enzima tj. uniformniji je odgovor enzima uključenih u varenje na jačem stresu. Za razliku od ovih enzima, α i β -glikozidaze, kao i enzimi detoksifikacije (GST i esteraze) imaju veći indeks plastičnosti na hroničnom tretmanu na C1 u odnosu na trodnevni oporavak od iste koncentracije (tabele 45, 46, 50, 51, 55, 56, 60, 61). Takođe, GST i esteraze imaju veću plastičnost na hroničnom efektu C2 u odnosu na akutni efekat iste koncentracije kadmijuma. Iz Čeplikove formule kojom smo izračunali fenotipsku plastičnost, možemo da zaključimo da u toku hroničnog stresa (i na C1 i na C2) enzimi detoksifikacije imaju manju aktivnost u odnosu na oporavak ili akutni efekat. Ovo je u saglasnosti sa prethodno iznetim pretpostavkama o eventualnoj inhibiciji enzima detoksifikacije od strane kadmijuma. Interesantno je i što se intenzitet aktivnosti kod proteolitičkih enzima menja u zavisnosti od toga koja je koncentracija bila primenjena. Varijabilnost indeksa plastičnosti je za α glikozidazu manja na hroničnom efektu C2 u odnosu na KC2 i oporavak C2, dok β -glikozidaza na C1 ima manju varijabilnost nego na C1K. Možda isti način promene plastičnosti, kao i njene varijabilnosti pojedinih grupa enzima ukazuju na njihovu zajedničku regulaciju i sličnu funkciju u prisustvu toksikanata. Negativne korelacije između indeksa fenotipske plastičnosti i njegove varijabilnosti ukazuju na njihovu moguću nezavisnu evoluciju (Tucić et al. 1991; Pemac & Tucić 1998).

Predložena su tri modela genetičke osnove plastičnosti koji se međusobno ne isključuju.

1. *Overdominantnost*: plastičnost zavisi od homozigotnosti (Dobzhansky 1947; Gillespie & Turelli 1989). Ovaj model pretpostavlja da je količina promene u fenotipu u različitim sredinama obrnuto proporcionalna broju heterozigotnih lokusa.

2. *Pleiotropija: plastičnost je funkcija diferencijalne ekspresije jednog gena u različitim sredinama (Via & Lande 1985, 1987). Ovaj model pretpostavlja da je ekspresija alela u jednoj sredini potencijalno nezavisna od njegove ekspresije u drugim sredinama.*
3. *Epistaza: Plastičnost nastaje zbog gena koji određuju veličinu odgovora u odnosu na efekte iz spoljašnje sredine i koji interaguju sa genima koji determinišu prosečnu ekspresiju karakteristike (Lynch et al. 1988, Scheiner & Lyman 1989). Ovaj model predviđa da su svojstvo i plastičnost nezavisne karakteristike (Gavrilets & Scheiner 1993a,b).*

U razumevanju plastičnosti se javlja novi činilac – cena plastičnosti (Moran 1992). To je cena potrebna za održavanje neophodne plastičnosti genetičke i ćelijske mašinerije. Na primer, cena koju organizam plaća je nužna za održavanje regulatornih gena i enzima. Gledajući sa genetičkog aspekta, cena plastičnosti je epistatički efekat interakcije između gena koji određuju da li će organizam da reaguje na životnu sredinu i druge strukturne gene (Scheiner 1993).

5.6 KORELACIJE

Poslednjih godina se pridaje povećan značaj uticaju sredinskih uslova na genetičku kontrolu osobina adaptivne vrednosti. Empirijski podaci nam sugerišu da su genetičke korelacije one koje nastaju zbog delovanja gena na veći broj osobina i da su sredinski zavisne (Gutteling et al. 2007). Korelacije mogu biti značajne za evoluciju ekološke specijalizacije ukoliko se smanjuje stepen do koga osobine u dve sredine mogu nezavisno da evoluiraju (Via & Lande 1985). Pokazano je da ove korelacije mogu da promene znak (pozitivan–negativan) u različitim sredinama (Sgró & Hoffmann 2004). Na primer, Czesak i Fox (2003) su utvrdili da znak genetičkih korelacija između veličine jajeta i mase ženke kod vrste *Stator limbatus* zavisi od vrste hrane koja je konzumirana. Ako korelacije između osobina adaptivne vrednosti zavise od sredinskih uslova, onda daju dublji smisao evolutivnim pravcima, posebno onda kada su genetičke korelacije negativne i reflektuju uzajamno ograničavanje između osobina. Negativne korelacije ukazuju na postojanje gena sa plejotropnim efektom ili delovanjem blisko lociranih gena (Gutteling et al. 2007). Plejotropija je pojava gde jedan gen utiče na više osobina. Genetičke korelacije između dva svojstva postaju očigledne kada na njih utiču isti geni ili skupovi gena. Pozitivne genetičke korelacije mogu da ubrzaju evoluciju specifičnih osobina. Pozitivne genetičke korelacije između svojstava koja utiču u otpornosti na stres su česte (Hoffmann & Parsons 1991). Iako nije prikazano u Rezultatima, utvrđeno je da u našem eksperimentu najveći broj statistički značajnih pozitivnih korelacija između različitih sredina detektovan za esterazu i GST, što može ukazati da ova dva enzima imaju ulogu u detoksifikaciji kadmijuma, kao i da isti geni utiču na aktivnost ovih enzima u toku različitih tretmana kadmijumom.

Korelacije između različitih osobina u istoj sredini, ili jedne osobine u različitim sredinama komplikuju određivanje smeru delovanja selekcije na neku osobinu. Genetičke korelacije između osobina zbog plejotropije mogu se održavati u

odsustvu selekcije, ali ih takođe, prirodna selekcija može oblikovati favorizujući nove mutacije koje imaju različite efekte na korelacije (Lande & Arnold 1983).

Genetičke korelacije mogu nastati zbog 1) plejotropije, 2) bliske povezanosti (asocijacije genskih lokusa zbog fizičke blizine), 3) gametske neravnoteže, neravnoteže vezanosti – (statističke asocijacije između lokusa koji nastaju zbog evolutivnih sila – engl. linkage disequilibriuma) ili 4) veze sa drugim osobinama. Održavanje genetičkih korelacija zahteva postojanje plejotropnog efekta ili veoma bliske povezanosti gena (Gutteling et al. 2007). Očigledno je da ukupan mortalitet larvi zavisi od smrtnosti larvi prvog stupnja, jer smo kod gubara četvrtog stupnja detektovali pozitivne genetičke korelacije između ukupnog mortaliteta i mortaliteta prvog stupnja i to na kontroli, i oba dugotrajna efekta kadmijumom (tabele 19, 22, 23). Osim toga, prvi stupanj je i najosetljiviji, pa se zato i veći deo ukupnog mortaliteta dešava u prvom stupnju. Statistički značajne negativne fenotipske korelacije se sreću između mase i trajanja razvića na kratkotrajnim (akutnim) tretmanima, oporavcima i hroničnom efektu 10 µgCd/g suve hrane (19, 22, 23, 24, 25). Znači da na kadmijumu sa produženjem trajanja razvića dolazi do smanjenja mase larvi. S druge strane, larve koje su otpornije na kadmijum za kraće vreme dostižu veću masu. Inače fenotipske korelacije se često koriste radi procenjivanja funkcionalne veze između biohemijskih, morfoloških ili drugih osobina čitavog organizma (Garland 1984; Steyermark et al. 2005).

Nedovoljna količina hrane ili njen nepovoljan sastav se smatraju sredinskim stresom. Smatra se da stres povezan sa graničnim uslovima životne sredine utiče na populacije mnogih vrsta (White 1993). U eksperimentima na lepidopterama i kolembolama utvrđeno je da hronična izloženost teškim metalima utiče na smanjenje konzumacije hrane, pa dolazi do pada mase larvi (Gahukar 1975; Joose & Verhoef 1983). Osim toga, neke vrste kolembola imaju sposobnost otkrivanja i izbegavanja unošenja kontaminirane hrane, zbog čega može doći do gladovanja (Joose & Verhoef 1983; Bengtsson et al. 1994; Filser & Hölscher 1997; Fountain & Hopkin

2001). Studije su pokazale da kod drozofile gladovanje utiče na aktivnost enzima (Pecsenye et al. 1996), kao i da je variranje alozima povezano sa otpornošću na gladovanje (Oudman et al. 1994).

Postoje podaci o vezi između stresa, energije i intenziteta metabolizma (Hoffmann & Parsons 1991). Otpornost na stres se može postići smanjenjem potrošnje energije koja se usmerava kompenzatornim fiziološkim odgovorima na stres ili ka ispravljanju oštećenja izazvanog stresorom, odnosno, deponovani energetske resursi se mogu koristiti da bi se prevazišao štetan uticaj stresa. Smanjeni intenzitet metabolizma bi se mogao očekivati kao posledica promenjenih enzimskih aktivnosti koje su u vezi sa jedinjenjima koja se koriste u biosintezi, pa gladovanje može imati snažan uticaj na aktivnost ovih enzima (Harshman et al. 1999). Veza između performanse organizma i enzimske aktivnosti je važna zbog dva razloga. Prvo, korelacije između enzimske aktivnosti i performanse su potrebne za određivanje mogućnosti selekcije enzimske aktivnosti. Drugo, ove korelacije mogu da obezbede dokaze za uzajamnim ograničavanjem između aktivnosti enzima i drugih vidova individualne performanse (Berrigan & Hoang 1999). Tako smo utvrdili da postoji veliki broj negativnih korelacija između mase i: β -glikozidaze na KC1 i α -glikozidaze na KC2; GSTa na C1; α i β -glikozidaze na C2 (na granici značajnosti); i β -glikozidaze na oba oporavka (tabele 78, 79, 80, 81, 82, 83). Negativna genetička korelacija može biti rezultat raspodele ograničenih resursa između različitih funkcija (Ricklefs 1991). U ovom slučaju najverovatnije dolazi do uzajamnog ograničavanja i preusmeravanja energije na procese sinteze enzima koji imaju ključnu ulogu u detoksifikaciji, između ostalih i GSTa, kao i obezbeđivanju energije za osnovne funkcije koje organizmu omogućavaju preživljavanje u uslovima stresa. Očigledno je da se energetske resursi troše i za sintezu drugih enzima detoksifikacije. Još jedno moguće objašnjenje za postojanje ovih negativnih korelacija je da se kod larvi sa većom masom energija troši za sintezu metalotioneina ili proteina toplotnog stresa koji prvi reaguju sa kadmijumom i na taj način bivaju bolje adaptirane na

njegovo prisustvo u hrani. Trajanje razvića larvi gubara se skraćuje sa povećanjem aktivnosti esteraza, koje takođe imaju važnu ulogu u procesima detoksifikacije velikog broja ksenobiotika. Međutim, neke osobine adaptivne vrednosti su u pozitivnoj korelaciji sa enzimima. Pri hroničnom, tretmanu na C1, relativna brzina rasta se povećava sa porastom aktivnosti GST (tabela 80), iako se masa larvi smanjuje, što ukazuje da se u toku stresa teškim metalima razviće može ubrzati, a da jedinke budu manje mase. Na KC2 trajanje razvića se produžava sa povećanjem aktivnosti LAP (tabela 83). Interesantno je da ukoliko se na dugotrajnom tretmanu C2 više energije troši na sintezu α -glikozidaze i tripsina, povećava se mortalitet prvog stupnja, kao i ukupan mortalitet (tabela 81). U ovom slučaju, na jačem stresu, verovatno postoji uzajamno ograničenje između sinteze, obrade i transporta enzima i preživljavanja larvi gubara. Legla sa malim mortalitetom su otpornija na kadmijum zato što se kod njih verovatno više energije troši na enzime koji direktno učestvuju u detoksifikaciji i imaju prioritet u odnosu na sintezu digestivnih enzima.

Uzrok uzajamnog ograničavanja i preraspodele energije između više osobina u nepovoljnim uslovima životne sredine može biti i smanjena potrošnja kiseonika u prisustvu teških metala. Ova pojava je registrovana kod vrsta *Leptomysis lingvura* (Gaudy et al. 1991), zatim *Uca annulipes* i *Uca triangularis* (Uma-Devi & Prabhakara-Rao 1989), kao i kod morskog račića *Palaemon serratus* (Papathanassiou 1983). Važno je napomenuti da toksični efekat kadmijuma i potrošnja kiseonika zavisi i od spoljašnjih uslova kao što su npr. pH, salinitet ili kvalitet hrane.

Chippindale i saradnici (1996) su, utvrdili uzajamna ograničenja između larvenog razvića i akumulacije energetske resursa, gde sporije razviće omogućava veću akumulaciju lipida kod adulta.

Veliki broj studija ukazuje na povezanost smanjenja intenziteta metabolizma i otpornosti na stres (Hoffmann & Parsons 1991). Ovu hipotezu su potkrepili Wang & Clark (1995) koji su kod drozofile gajene na suboptimalnom medijumu, detektovali

manju aktivnost enzima intermedijarnog metabolizma. Kod iste vrste je zamena drugog hromozoma dovela do pozitivne korelacije između količine triacilglicerola i sinteze masnih kiselina, kao i aktivnosti enzima koji utiču na sintezu NADPH potrebnog za biosintezu lipida (Clark & Keith 1988). Znači, da postoji veza između genetičke varijabilnosti enzima intermedijarnog metabolizma i deponovanja energije. Kod nas je, osim kod β -glikozidaze i GST, inhibirana aktivnost enzima, a istovremeno dolazi i do smanjenja mase larvi. Redukovan intenzitet metabolizma i manja biosinteza gradivnih komponentata negativno utiču na masu, čime su potvrđene teorije o smanjenom intenzitetu metabolizma u stresnoj sredini kod otpornih jedinki.

Snížena količina proteina u različitim tkivima može biti posledica smanjenog stepena sinteze proteina u toku stresa izazvanog metalima (Syversen 1981). Posledice osiromašjenja proteina mogu biti dalje modifikacije enzimske aktivnosti (stimulacija ili inhibicija), promene signalnog transfera u ćeliji, modifikacije amino kiselina, oksidacija sulfhidrilnih grupa koje dovode do konformacionih promena, umrežavanja proteina (engl. cross linking), cepanja peptidnih veza, kao i modifikacije ugljenohidratnog dela u glikoproteinima (Vutukuru et al. 2005).

Analizom korelacija između proučavanih enzima u okviru jednog tretmana utvrđeno je sledeće: na kontroli, zatim na oba hronična i oba akutna tretmana postoje statistički značajne korelacije između α -glikozidaze i: β -glikozidaze, esteraze i digestivnih enzima, LAP i tripsina (tabele 69, 70, 71, 72, 73). Interesantno je da su sve korelacije pozitivne, osim na kontrolnom tretmanu α i β -glikozidaze u negativnoj korelaciji (tabela 69), dok se pod dejstvom kadmijuma (kratkotrajni ili dugotrajni efekat) menja znak korelacije. Obzirom da ova tri tipa enzima deluju na različite supstrate možemo zaključiti da je u toku stresa najverovatnije njihova aktivnost usaglašena i omogućava najefektivnije iskorištavanje hranljivih materija, a samim tim i preživljavanje. Važno je istaći da postoji značajna pozitivna korelacija između β -glikozidaze i leucin aminopeptidaze na oba hronična efekta, kao i KCl i

KC2 (na granici značajnosti). Moguće je da jači stres inhibira aktivnost LAP koja utiče na proteolizu hrane i iskorištavanje ograničenih resursa u nepovoljnim uslovima i β -glikozidaze čija je ekspresija kod Lepidoptera isključivo u srednjem crevu. Na skoro svim tretmanima i kontroli detektovana je pozitivna korelacija između esteraze i: leucin aminopeptidaze i tripsina (na oporavcima postoji samo između esteraze i LAP na C1K, dok na C2K ovakve korelacije nisu detektovane). Obzirom da karboksilesteraze kod insekata hidrolizuju veliki broj supstrata, utiču na mobilizaciju masti, metabolizam i uklanjanje "nepoželjnih" estara (Ahmad, 1970; 1976), a acetilholinesteraze imaju važnu ulogu u intermedijarnom metabolizmu i digestiji estara masnih kiselina (Krishna et al. 1984), verovatno da je u toku delovanja hemijskih stresora, kao što su teški metali, uloga esteraza blisko povezana sa funkcijom proteolitičkih enzima i hidrolizom složenih jedinjenja. Najveći broj pozitivnih korelacija na svim tretmanima je utvrđen između proteolitičkih enzima, što ukazuje na zajedničku genetičku regulaciju enzima sa proteolitičkom ulogom u prisustvu kadmijuma. Hiraizumi i saradnici (1992) su kod larvi drozofile koje su gajene u uslovima osmotskog stresa, takođe utvrdili veliki broj značajnih korelacija između peptidaza. Postoji nekoliko studija koje tvrde da postoje korelacije između enzimskih aktivnosti u odgovoru na sredinski stres ili promena u hrani (Geer & Laurie-Ahlberg 1984; Geer et al. 1985; Clark 1989a), kao i da korelisane aktivnosti mogu da proisteknu iz simultane selekcije aktivnosti nekoliko enzima (Lande 1980). Može se zaključiti da aktivnosti peptidaza mogu međusobno biti korelisane, da zavise od sredinskog stresa, od genetičke osnove, a najverovatnije i od strukture samog enzima.

Osim toga, mali broj značajnih korelacija GSTa i ostalih enzima ukazuje na nezavisnu genetičku determinaciju ovog enzima detoksifikacije u okviru jedne sredine.

Na jačem i slabijem stresu fiziološki odgovor može biti drugačiji. Moguće je da su na dugotrajnom efektu kadmijuma osnovni prioriteti jedinki preživljavanje i dostizanje stupnja adulta, pa se zbog toga svi resursi usmeravaju ka pravilnom razviću digestivnog sistema, a samim tim i adekvatnoj asimilaciji hrane. Familije

(legla) sa većim procentom mase srednjeg creva imaju u uslovima hronične izloženosti kadmijumu na koncentracijama 10 i 30 $\mu\text{g/g}$ suve hrane veću aktivnost proteaze i tripsina (tabele 72, 73), dok su na kontroli, KC1 i C1K korelacije sa proteazama negativne (statistički nisu značajne) (tabele 69, 70, 71). Međutim, treba imati u vidu da je procenat mase srednjeg creva indirektan pokazatelj konzumacije hrane, jer masa creva uključuje i unetu hranu, a ne samo tkivo creva.

Određivanjem korelacija između osobina adaptivne vrednosti i aktivnosti enzima u okviru iste sredine ustanovljeno je da je masa larvi gubara u negativnoj korelaciji sa velikim brojem enzima u različitim sredinama: sa GST (na C1), sa β -glikozidazom (na KC1, C1K i C2K) (tabela 78, 80, 82, 83) i α -glikozidazom (na KC2) (tabela 79). Do negativnih genetičkih korelacija mogu da dovedu antagonistička plejotropija i cena raspodele ograničenih resursa.

Između GST i osobina adaptivne vrednosti, kao i između drugih analiziranih enzima postoji mali broj značajnih korelacija. Možemo da zaključimo da GST ima drugačiju genetičku kontrolu u odnosu na proučavane digestivne enzime, pa zato između njih nema značajnih korelacija u okviru iste sredine. U toku hroničnog stresa na 10 $\mu\text{gCd/g}$ povećana aktivnost enzima detoksifikacije povećava relativnu brzinu rasta.

Interesantno je da skoro svi stresori indukuju više od jednog stres-zavisnog odgovora (puta) (Roelofs et al. 2008). Molekularni mehanizmi koji leže u osnovi interakcije između različitih puteva zahtevaju više od jednog transkripcionog faktora za aktivaciju gena, zatim potrebu za dodatnim trans-aktivacionim DNK-vezanim transkripcionim faktorima i komplikovane interakcije između različitih kinaza signalnih transdukcionijskih puteva. Takođe, stres sam po sebi može da aktivira više od jednog odgovora, npr. kada dođe do nekoliko metaboličkih poremećaja. Moguće je da prisustvo kadmijuma dovodi do povećane sinteze Hsp proteina, metalotioneina i drugih proteina čija se aktivnost i sinteza povećavaju zbog njihove uloge u toku stresa. Zbog energije koja je utrošena na sintezu ovih proteina, smanjuje se masa

Diskusija

larve i sinteza pojedinih digestivnih enzima koji nisu esencijalni u detoksikaciji teških metala.

5.7 BIOMARKERI I MOGUĆNOST KORIŠĆENJA ENZIMA SREDNJEG CREVA U MONITORINGU ZAGAĐENJA ŽIVOTNE SREDINE

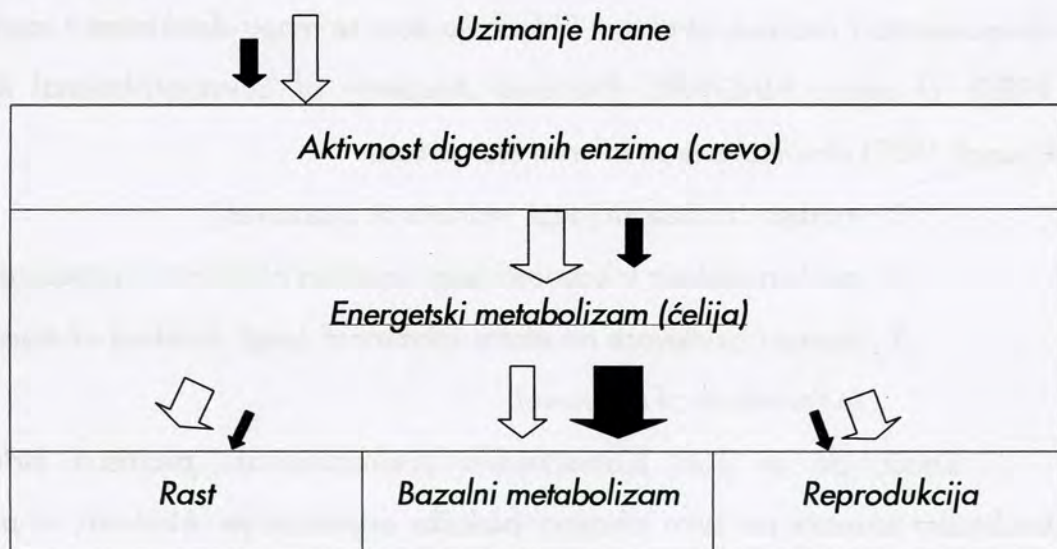
Studije o uticaju teških metala na različite organizme su brojne i raznovrsne. Neke ukazuju da kod insekata hronični uticaj teških metala dovodi do negativnih efekata na rast, razviće, reprodukciju i/ili procese presvlačenja (Van Straalen et al. 1989; Gintenreiter et al. 1993; Sildanchandra & Crane 2000; Cervera et al. 2004), dok druge studije ukazuju na promene u respiratornim (Ortel & Vogel 1989) ili metaboličkim procesima (Bischof 1995; Ortel 1995a,b, 1996; Nascarella et al. 2003). Iako se ekotoksikološko korišćenje biomarkera uglavnom razvilo kod vertebrata (McCarthy & Shugart 1990; Peakall 1992), značajan razvoj ove metodologije kod invertebrata se pojavio u zadnjih 20 godina. Korišćenje biomarkera u monitoringu zagađenja životne sredine omogućava određivanje odgovora na stres od molekuskog/biohemijskog do populacionog nivoa. Biološki markeri su po definiciji ksenobiotički indukovane promene ćelijskih ili biohemijskih komponenata i procesa, struktura ili funkcija koje se mogu detektovati i meriti (NRC 1987). U okviru NAS/NRC (National Academy of Science/National Research Council 1989) klasifikovane su tri vrste biomarkera:

1. markeri izloženosti (engl. markers of exposures)
2. markeri efekata izloženosti (engl. markers of effects of exposure) i
3. markeri osetljivosti na efekte izloženosti (engl. markers of susceptibility to the effects of exposure).

Znači, da se pod biomarkerima podrazumevaju promene indukovane sredinskim stresom na svim nivoima biološke organizacije. Međutim, u praksi se termin biomarker češće koristi u užem smislu i podrazumeva biohemijske subletalne promene koje su izazvane izloženošću jedinke ksenobioticima (Lagadic et al. 1994).

Neki od parametara koji se uzimaju kao biomarkeri kod invertebrata su sledeći: aktivnost enzima detoksifikacije, zatim enzima koji učestvuju u metabolizmu, promena količine glikogena, promena adenin nukleotidnog pula, brzina rasta,

larveno razviće, promene u ponašanju, lokomotornim funkcijama itd. Osim toga, sve češće se analiziraju promene energetskog metabolizma koje nam pružaju uvid u mehanizam toksičnosti različitih ksenobiotika, objašnjavaju efekat ksenobiotika na populaciju sa toksikološkog aspekta i na kraju dovode do razvoja alternativnih metoda u testiranju toksičnosti. Sagledavanje fizioloških (uzimanje hrane)/biohemijskih (digestija) ograničenja u toksičnim uslovima nam može pomoći da dođemo do novih činjenica o strategijama očuvanja energije u populacijama izloženih stresu i eventualnim posledicama po preživljavanje populacija koje su izložene ksenobioticima (Hasset & Landry 1983). Takođe, proučavanjem digestivnih enzima koji su odgovorni za razlaganje makromolekula hrane, možemo otkriti značaj različitih kataboličkih puteva koji zadovoljavaju metaboličke potrebe organizama u stresnim uslovima.



Šematski prikaz odgovora test organizma na toksični stres. Veličina strelica je proporcionalna veličini alokacije energije kod organizama. Bele strelice—uslovi bez stresa; crne strelice—stresni uslovi (De Coen & Janssen 1998)

Osim izbora tipa biomarkera u monitoringu zagađenosti mora se voditi računa o izboru vrste koju proučavamo, kao i o dizajnu monitoringa (Marigomez 2001). Proučavajući uticaj teških metala na određene vrste insekata Nummelin i

saradnici (2007) su došli do zaključka da su npr. mravi najnepovoljnija grupa za detekciju promena izazvanih teškim metalima (akumuliraju samo mangan), la rve vilinog konjica pogodna vrsta za detekciju gvožđa, mangana i kadmijuma, dok su *Myrmeleontidae* povoljne za akumuliranje gvožđa i mangana (Nummelin et al. 1998). Kao bioindikator kadmijuma povoljne su vrste *Halobates* spp. (Cheng et al. 1984; Schulz-Baldes 1989), dok je toksičan efekat kadmijuma proučavan i na gubaru (Gintenreiter et al. 1993; Ortel 1995a,b, 1996). Neki autori smatraju da se promene sadržaja glikogena i proteina kod riba pod uticajem metala, mogu koristiti kao biomarkeri za brzo procenjivanje toksičnosti teških metala u biomonitoringu vodenih sredina (Vutukuru et al. 2005).

De Coen i Janssen (1998) su proučavali digestivnu fiziologiju vrste *Daphnia magna* izloženu kadmijumu i 2,4-dihlorofenoksi sirćetnoj kiselini. Utvrdili su da na enzime koji razlažu polisaharide manje utiču toksikanti u poređenju sa enzimima koji vrše digestiju proteina i lipida. Kod vrste *Artemia salina*, u toku izloženosti bakru i cinku detektovana je značajna inhibicija aktivnosti amilaze i tripsina čak i pre pojave smanjenja rasta (Alayse-Danet et al. 1979). U toku delovanja stresora (subletalni efekti štetnog ulja) utvrđeno je da kod kopepoda dolazi i do smanjenog unosa hrane, pri čemu ne dolazi do značajnih promena u aktivnosti amilaze i celulaze (Samain et al. 1980).

Kod organizama postoje određena metabolička prilagođavanja na toksičan stres: energetska cena sinteze enzima može biti trivijalna u odnosu na potrebe bazalnog metabolizma, dok energetska cena samog procesa uzimanja hrane može da čini značajan deo celokupne energije jedinke (De Coen & Janssen 1998). Znači, da su za sveobuhvatne i precizne ekotoksikološke analize osim praćenja promena klasičnih biomarkera (metalotioneina, esteraza, proteina toplotnog stresa...), potrebne studije o utrošku i alokaciji energije na procese detoksifikacije i preživljavanja, stepenu konzumacije hrane, kao i o promenama aktivnosti digestivnih enzima koji

omogućavaju razlaganje makromolekula iz hrane i tako zadovoljavaju metaboličke potrebe organizama omogućavajući njihov rast i razviće u stresnim uslovima.

U našem eksperimentu je utvrđeno da je aktivnost proteolitičkih enzima inhibirana u prisustvu različitih tretmana kadmijumom, pa bi se uz dodatna istraživanja ovi enzimi mogli koristiti kao biomarkeri zagađenja životne sredine. Leucin aminopeptidaza je najosetljiviji ispitivani enzim u prisustvu ovog teškog metala, pošto je njegova aktivnost smanjena i u toku akutnih tretmana kadmijumom. Osim promene aktivnosti, varijabilnost plastičnosti enzima srednjeg creva, kao i promena njihovih izoformi u toku različitih tretmana kadmijumom se mogu koristiti kao biomarkeri izloženosti teškim metalima (Vlahović et al. 2009). Ovo istraživanje bi bilo znatno olakšano poznavanjem primarne strukture proučavanih enzima kod vrste *Lymantria dispar* i poznavanjem gena koji ih kodiraju. Osim toga, zbog eventualne upotrebe digestivnih enzima u biomonitoringu, potrebno je poznavati korelacije između aktivnosti peptidaza jer one zavise od genetičke osnove i ksenobiotika koji deluje na organizam. Neophodno je, takođe, utvrditi i tačnu lokalizaciju ovih enzima, njihovu sintezu i regulatorne mehanizme u toku delovanja teških metala.

Dva tjedna nakon što koncentracije kadmija u krvi iznad 30 µgCd/g su se pojavile, kao i za vrijeme prvog stupnja kadmioze. Sličnije prvog stupnja, kao i ulaznog razvoja do ulaska u drugi stupanj, detektovani su samo u slučaju kroničnog intenziteta na 30 µgCd/g.

6. Zaključci



Indikator je doprinosi glavnom varijabilnom mase, rila kratkotrajna kadmioza hronična / kao je stabilni znakovi.

Indikator za trajanje prvog stupnja, kao i za trajanje razvoja koji se odlikuje u četvrti i peti stupanj, kao i za trajanje razvoja do ulaska u drugi stupanj.

Trofotoksičnom analizom varijanse utvrđeno je da epizodne koncentracije kadmijuma ne utiču na masu i relativnu brzinu rasta, pa se ovaj znakovi ne mogu koristiti kao pogodni pokazatelji za utvrđivanje prisutstva kadmijuma.

Na osnovu ovih rezultata kadmioza pluća u odnosu na hroničnost postoji u slučaju decenija kadmijuma, može se zaključiti da je povećanje pluća / ili očekivani evolutivni odgovor za relativnu brzinu rasta.

Pošto se indeks kadmijuma pluća / ili očekivani odgovor na masu i relativnu brzinu rasta odnose u odnosu na masu i relativnu brzinu rasta, kadmioza pluća / ili očekivani odgovor na masu i relativnu brzinu rasta odnose u odnosu na masu i relativnu brzinu rasta.

U slučaju prvog stupnja su najosjetljiviji na kadmijum, tako da se najveći deo kadmijuma koji se akumulira u prvom stupnju.

- ✓ Dugotrajni tretmani obe koncentracije kadmijuma nemaju značajan uticaj na ukupni mortalitet, kao ni na mortalitet prvog stupnja larvi gubara.
- ✓ Skraćenje prvog stupnja, kao i ukupnog trajanja razvića do ulaska u IV larveni stupanj, detektovani su samo u toku hroničnog tretmana na 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane.
- ✓ Smanjeni unos hrane (smanjenje procenta srednjeg creva larvi) registrovan je u toku oba kratkotrajna tretmana kadmijumom, kao i na hroničnom tretmanu C2, gde je smanjenje ireverzibilno.
- ✓ Za razliku od mase koja se ne menja na kratkotrajnim tretmanima, relativna brzina rasta larvi četvrtog stupnja se povećava.
- ✓ Značajan je doprinos genotipa variranju mase. Na kratkotrajnim tretmanima heritabilnost mase je statistički značajna.
- ✓ Heritabilnost za trajanje prvog stupnja, kao i za trajanje razvića larvi do ulaska u četvrti larveni stupanj ima značajnu vrednost na kontroli i oba hronična tretmana.
- ✓ Trofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da ispitivane koncentracije kadmijuma ne utiču na masu i relativnu brzinu rasta, pa se ove osobine ne mogu koristiti kao pogodni parametri za utvrđivanje prisustva kadmijuma.
- ✓ Na osnovu većih vrednosti heritabilnosti plastičnosti u odnosu na heritabilnosti svojstva u toku delovanja kadmijuma, može se zaključiti da je povećanje plastičnosti očekivani evolutivni odgovor za relativnu brzinu rasta.
- ✓ Pošto se indeks fenotipske plastičnosti osobina adaptivne vrednosti ne menja u toku delovanja kadmijuma, promenu osobina adaptivne vrednosti, tj. njihovu plastičnost ne možemo uzeti kao dobre indikatore prisustva kadmijuma u hrani.
- ✓ Larve prvog stupnja su najosetljivije na kadmijum, tako da se najveći deo ukupnog mortaliteta dešava u prvom stupnju.

- ✓ U odnosu na hronične tretmane, aktivnost glutation S-transferaze se povećava u toku oporavaka od obe koncentracije kadmijuma, dok mali broj značajnih korelacija u okviru tretmana između GSTa i ostalih enzima ukazuju na nezavisnu regulaciju ovog enzima detoksifikacije.
- ✓ Kod svih enzima, osim GSTa, prisutan je trend opadanja aktivnosti na kadmijumu u odnosu na kontrolu.
- ✓ U toku oporavka od hroničnog stresa na 30 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane aktivnosti proteolitičkih enzima, α -glikozidaze i esteraza se ne vraćaju na kontrolni nivo.
- ✓ Najosetljiviji enzim u prisustvu kadmijuma je leucin aminopeptidaza pošto je aktivnost inhibirana na oba kratkotrajna tretmana.
- ✓ Jednofaktorska analiza varijanse i indeks fenotipske plastičnosti ukazuju na specifičnu regulaciju β -glikozidaze, jer se tokom oporavka, aktivnost ovog enzima povećava u odnosu na hronični tretman samo kod larvi koje su od piljenja do ulaska u četvrti stupanj bile izložene koncentraciji od 10 $\mu\text{gCd/g}$ suve hrane.
- ✓ Mehanizmi regulacije β -glikozidaze i GSTa se najverovatnije razlikuju od regulacionih mehanizama ostalih proučavanih enzima.
- ✓ Pošto se aktivnost proteolitičkih enzima menja u zavisnosti od koncentracije i dužine trajanja tretmana kadmijumom, ovi enzimi bi mogli da budu biomarkeri prisustva kadmijuma u hrani.
- ✓ Izoforme jednog enzima na istom tretmanu razlikuju se između različitih legala, dok se, takođe, izoforme istog enzima jednog legla razlikuju između više različitih tretmana.
- ✓ Legla (full-sib familije) se razlikuju u aktivnosti enzima, plastičnosti njihovog odgovora i ekspresiji pojedinih izoformi na različitim tretmanima kadmijumom.
- ✓ Na različitim tretmanima kadmijumom plastičnost enzima se menja.

- ✓ Plastičnost proteaza, tripsina i LAP na C2 je manja od plastičnosti na oporavku. Međutim, na hroničnom tretmanu na C1 plastičnost odgovora za tripsin, LAP i α -glikozidazu je veća nego na oporavku od iste koncentracije.
- ✓ Četiri digestivna enzima, ukupne proteaze, tripsin, leucin aminopeptidaza i α -glikozidaza pokazuju pad aktivnosti u odnosu na kontrolu i to na istim tretmanima: akutnom i hroničnom delovanju veće koncentracije kadmijuma, kao i oporavku od iste koncentracije metala.
- ✓ Ograničeni energetske resursi u toku stresa dovode do velikog broja negativnih korelacija između mase i aktivnosti enzima (α i β -glikozidaze, kao i GSTa) na različitim tretmanima. Na KC1 detektovano je skraćanje trajanja razvića larvi gubara IV stupnja sa povećanjem aktivnosti esteraza. Na C1, sa porastom aktivnosti GSTa jedinke imaju manju masu.
- ✓ Na svim tretmanima, osim u toku oporavaka, postoje statistički značajne korelacije α -glikozidaze sa aktivnostima β -glikozidaze, esteraza, LAP i tripsina.
- ✓ α i β glikozidaze su na akutnim i hroničnim tretmanima obe koncentracije kadmijuma pozitivno korelisane, dok je na kontroli znak korelacije između ova dva enzima negativan.
- ✓ Najveći broj pozitivnih korelacija registrovan je između proteolitičkih enzima na svim tretmanima, što ukazuje na njihovu zajedničku regulaciju.
- ✓ Na većini tretmana sa povećanjem aktivnosti esteraza, povećava se aktivnost LAP i tripsina. Moguća je povezanost esteraza sa funkcijom proteolitičkih enzima i hidrolizom složenih jedinjenja pod uticajem stresora.
- ✓ U eksperimentu je utvrđeno da promena proučavanih osobina adaptivne vrednosti ne može biti adekvatan pokazatelj prisustva korišćenih koncentracija kadmijuma u hrani.
- ✓ Zbog inhibicije aktivnosti LAP i esteraza u toku kratkotrajnog efekta manje koncentracije kadmijuma, postojanja korelacija sa velikim brojem digestivnih

enzima i velike plastičnosti odgovora (naročito kod LAP), ova dva enzima bi, uz dalje analize, mogla biti biomarkeri prisustva kadmijuma u hrani.

Reference

- Agarwal, B., Tucker, P.A., Schmitt, A., Leonard, K., Mulford, B., Gross, P. (2003) *Structurofolds Dictyostelia Sigmo-oxys glutathione S-transferase reveals a novel active site topography tailored for lipid peroxidation products*, *J. Mol. Biol.* 326: 131-163
- Ahearn, G. A., Mandal, P. K., Mandal, P.A. (2004), *Mechanisms of heavy-metal accumulation and detoxification in crustaceans: a review*, *J. Comp. Physiol.* 174B: 439-452
- Ahmad, J. (1970), *Localization of aspartate and oxalyl-coenzyme A synthetase in various tissues of hepatoma and organophosphorus resistant Musca domestica*, *Indian J. Comp. Physiol.* 273
- Ahmad, J. (1971) *Localization of aspartate and oxalyl-coenzyme A synthetase in various tissues of hepatoma and organophosphorus resistant Musca domestica*, *Indian J. Comp. Physiol.* 276
- Ahmed, M., Zaman, K., MarGil, R.S., Sakahe, J.P., Pariani, R. (1995), *Glutathione induced oxidative stress in a model liver species, Spodoptera eridania*, *Environ. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 442-448
- Al-Sayid, A.M., Charlou, J., Jazouli, M., Seman, J. (1979), *Modelle de detection rapide des effets sublethaux des polluants: modification des taux d'absorption et de réponse d'Anania schini contaminées par le cadmium ou le zinc*, *Ann. Biol.* 51: 41-46
- Alves, J.A., Diaz-Moyano, J., Navarro, F.J. (1987), *Glutathione content and GST S-transferase activity in midgut gland of Procerosina darkii*, *Sex differences, the effect of fasting, and their implications in cadmium toxicity*, *Comp. Biochem. Physiol.* 87C: 433-436
- Anderson, D., Niess, J.S., Sorenson, J.A., Schrambeck, L. (1994), *Experimental localization of intestinal uptake sites for metals (Cd, Hg, Zn, Se) in vivo in mice*, *Environ. Health Perspect.* 102: 199-206
- Anderson, D.H., Peralta, C., Scott, C., Tansichka, V. (2005), *Heat stress and age induced maternal effects on wing size and shape in parthenogenetic *Drosophila melanogaster**, *J. Evol. Biol.* 18: 884-892
- Anand, K.H., Chandley, A. K. (1977), *Effects of frontal ganglion removal and denervation on activity and distribution of six gut enzymes in locusts*, *J. Insect Physiol.* 23: 965-974
- ATSDR (1995) *Toxicological Profile for Cadmium*, Agency for Toxic Substances and Hazard Registry, US Department of Health and Human Services
- Aurayrac, M., Nigam, P. (2000) *Body burden with metals and detoxifying enzymes of the grasshopper—*Chorthippus brunneus* (Heuberg)* from environmentally polluted areas. In: B. Martini & K. Friess, *In: Trace Metals in the Environment*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands: 421-434

7. Reference



Reference

- Agianian, B., Tucker, P.A., Schouten, A., Leonard, K., Bullard, B., Gros, P., (2003), Structure of a *Drosophila* Sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products, *J. Mol. Biol.* 326: 151–165
- Ahearn, G. A., Mandal, P. K., Mandal P.A., (2004), Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review, *J. Comp. Physiol.* 174B: 439–452
- Ahmad, S., (1970), Localization of aliesterase and acetylcholinesterase enzymes in various tissues of susceptible and organophosphate resistant *Musca domestica* L., *Comp. Gen. Pharmacol.* 1: 273–279
- Ahmad, S., (1976), Larval and adult housefly carboxylesterase: isozymic composition and tissue pattern, *Insect Biochem.* 6: 541–547
- Ahmad, S., Pardini, R.S., (1990), Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects, *Free Radic. Biol. Med.* 8: 401–413
- Ahmad, S., Zaman, K., MacGill, R.S., Batcabe, J.P., Pardini, R., (1995), Dichloro-induced oxidative stress in a model insect species, *Spodoptera eridania*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 442–448
- Alayse-Danet, A.M., Charlou, J., Jezequel, M., Samain, J., (1979), Modele de detection rapide des effets subletaux des polluants: modification des taux d'amylase et de trypsine d'*Artemia salina* conaminees par le cuivre ou le zinc, *Mar. Biol.* 51: 41–46
- Almar, M.A., Diaz-Mayans, J., Romero, F.J., (1987), Glutathione content and GSH S-transferase activity in midgut gland of *Procambarus clarkii*. Sex differences, the effect of fasting, and their implications in cadmium toxicity, *Comp. Biochem. Physiol.* 87C: 433–435
- Andersen, O., Nielsen, J.B., Sorensen, J.A., Scherrebeck, L., (1994), Experimental localization of intestinal uptake sites for metals (Cd, Hg, Zn, Se) in vivo in mice, *Environ. Health Perspect.* 102: 199–206
- Andersen, D.H., Pertoldi, C., Scali, C., Loeschcke, V., (2005), Heat stress and age induced maternal effects on wing size and shape in parthenogenetic *Drosophila mercatorum*, *J. Evol. Biol.* 18: 884–892
- Anstee, J. H., Charnley, A. K., (1977), Effects of frontal ganglion removal and starvation on activity and distribution of six gut enzymes in *Locusta*, *J. Insect Physiol.* 23, 965–974
- ATSDR, (1999) Toxicological Profile for Cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services
- Augustyniak, M., Migula, P., (2000), Body burden with metals and detoxifying abilities of the grasshopper—*Chorthippus brunneus* (Thunberg) from industrially polluted areas Eds: B. Markert & K. Frieze, In: *Trace Metals in the Environment*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands: 423–454

Reference

- Baker, J.E., (1991), Properties of glycosidases from the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, *Insect Biochem.* 21: 615–621
- Bauman, J.W., Liu, J., Klaassen, C.D., (1993), Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals, *Fundam. Appl. Toxicol.* 21: 15–22
- Beaty, B.J., Mackie, R.S., Mattingly, K.S., Carlson, J.O., Rayms-Keller, A., (2002), The midgut epithelium of aquatic arthropods: A critical target organ in environmental toxicology, *Environ. Health Perspect.* 110: 911–914
- Beaumont, A.R., Toro, J.E., (1996), Allozyme genetics of *Mytilus edulis* subjected to copper and nutritive stress, *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 76, 1061–1071
- Becker, W.A., (1984), *Manual of Quantitative Genetics*, Academic Enterprises Pullman, Washington
- Beckman, L., Johnson, F.M., (1964), Genetic control of aminopeptidases in *Drosophila melanogaster*, *Hereditas* 51: 221–230
- Bell, R.A., Owens, C.D., Shapiro, M., Tardif, J.R., (1981), Mass rearing and virus production: Development of mass-rearing technology, Eds: Doane, C. C. & McManus, M. L., In: *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management*, 614, USDA For. Serv. Tech. Bull. 1584
- Bengtsson, G., Rundgren, S., Sjogren, M., (1994), Modelling dispersal in a soil gradient: The influence of metal resistance, competition and experience, *Oikos* 71: 13–23
- Berridge, M.J., (1970), A structural analysis of intestinal absorption, *Symp. R. Ent. SOC. London* 5: 135–151
- Berrigan, D., Hoang, A., (1999), Correlation between enzyme activities and routine metabolic rate in *Drosophila*, *J. Evol. Biol.* 12: 258–262.
- Beynon, R.J., Bond, J.S., (1994), *Proteolytic enzymes a practical approach*, IRL Press at Oxford University Press, New York
- Bijlsma, R., Loeschcke, V., (2005), Environmental stress, adaptation and evolution: an overview, *J. Evol. Biol.* 18: 744–749
- Bischof, C., (1995), Effect of heavy metal stress on carbohydrate and lipid concentration in the haemolymph and total body tissue parasitized *Lymantria dispar* L. larvae (Lepidoptera), *Comp. Biochem. Physiol.* 112C: 87–92
- Blahovec, J., Kostecka, Z., Kocisova, A., (2006), Peptidolytic enzymes in different larval stadium of housefly *Musca domestica*, *Veterinarni Medicina* 51: 139–144
- Blinska, B., (2001), On the structure of human hair melanins from an infrared spectroscopy analysis of their interaction with Cu^{2+} ions, *Spectrochim. Acta A* 2001: 2525–2533
- Božić, N., Vujčić, Z., Nenadović, V., Ivanović, J., (2003), Partial purification and characterization of midgut leucyl aminopeptidase of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae, *Comp. Biochem. Physiol.* 134B: 231–242

Reference

- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J., (2000), Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases, *J. Biol. Chem.* 275: 24798–24806
- Borowitz, J.L., McLaughlin, J.L., (1992), Evidence for calcium channels in brine shrimp: Ditiазem protects shrimp against cadmium, *Environ. Contam. Toxicol.* 48: 435–440
- Bradford, M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72: 248–254
- Bradshaw, A.D., (1965), Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants, *Adv. Genet.* 13: 115–155
- Braeckman, B., Raes, H., Van Hoyer, D., (1997), Heavy–metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells, *Cell Biol. Toxicol.* 13: 389–397
- Braeckman, B., Smagghe, G., Brutsaert, N., Cornelis, R., Raes, H., (1999), Cadmium uptake and defense mechanism in insect cells, *Environ. Res. Sect. A80*: 231–243
- Bray, T.M., Bettger, W.J., (1990), The physiological role of zinc as an antioxidant, *Free Rad. Biol. Med.* 8: 281–291
- Brzoska, M.M., Moniuszko–Jakoniuk, J., (2001), Interactions between cadmium and zinc in the organism, *Food Chem. Toxicol.* 39: 967–980
- Brzoska, M.M., Moniuszko–Jakoniuk, J., Jurczuk, M., Galazyn–Sidorczuk, M., Rogalska, J., (2001), The effect of zinc supply on cadmium–induced changes in the tibia of rats, *Food Chem. Toxicol.* 39: 729–737
- Byeon, G.M., Lee, K.S., Gui, Z.Z., Kim, I., Kang, P.D., Lee, S.M., Sohn, H.D., Jin, B.R., (2005), A digestive β –glucosidase from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization, *Comp. Biochem. Physiol.* 141B: 418–427
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., (1999), Chemical hormesis: its historical foundation as biological hypothesis, *Toxicol. Pathol.* 27: 195–216
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., (2002) Defining hormesis, *Human Exp. Toxicol.* 21: 91–98
- Callaghan, A., Parker, P.J.A.N., Holloway, G.J., (1998), The use of variance in enzyme activity as an indicator of long–term exposure test to toxicant–stressed environments in *Culex pipens* mosquitoes, *Funct. Ecol.* 12: 436–441
- Calow, P., Sibly, R.M., Forbes, V., (1997), Risk assessment on the basis of simplified life–history scenarios, *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 1983–1989

Reference

- Carfagna, M.A., Ponsler, G.D., Muhoberac, B.B., (1996), Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals, *Chem. Biol. Interact.* 100: 53–65
- Carr, R.S., Williams, J.W., Saska, F.I., Buhl, R.S., Neff, J.M., (1985), Bioenergetic alteration correlated with growth, fecundity and body burdens of cadmium in Mysids (*Mysidopsis bahia*), *Environ. Toxicol. Chem.* 4: 181–18
- Cervera, A., Maymo, A.C., Martínez-Pardo, R., Garcera, M.D., (2003), Antioxidant enzymes in *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae) exposed to cadmium, *Environ. Entomol.* 32: 705–710
- Cervera, A., Maymó, A.C., Sendra, M., Martínez-Pardo, R., Garcera, M.D., (2004), Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae), *J. Insect Physiol.* 50: 737–749
- Chagnon, N.L., Guttman, S.I., (1989), Biochemical analysis of allozyme copper and cadmium tolerance in fish using starch gel electrophoresis, *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 1141–1147
- Chao, S.H., Bu, C.H., Cheung, W.Y., (1990), Activation of troponin C by Cd^{2+} and Pb^{2+} , *Arch. Toxicol.* 64: 490–496
- Chao, S.H., Bu, C.H., Cheung, W.Y., (1995), Stimulation of myosin light-chain kinase by Cd^{2+} and Pb^{2+} , *Arch. Toxicol.* 69: 197–203
- Chattopadhyay, G.K., Sengupta, A.K., Verma, A.K., Sen, S.K., Saratchandra, B., (2001), Esterase isozyme polymorphism, specific and nonspecific esterase, syngenic lines development and natural occurrence of a thermostable esterase in the tropical silkworm *Bombyx mori* L., *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31: 1191–1199
- Cheng, L., Schulz-Baldes, M., Harrison, C.S., (1984), Cadmium in ocean-skaters, *Halobates sericeus* (Insecta), and in their seabird predators, *Mar. Biol.* 79: 321–324
- Cheplik, G.P., (1995), Genotypic variation and plasticity of clonal growth in relation to nutrient availability in *Amphibromus scabrivalvis*, *J. Ecol.* 83: 459–468
- Cheung, W.Y., (1984), Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity, *FASEB J* 43: 2995–2999
- Chin, T.A., Templeton, D.M., (1993), Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells, *Toxicology* 77: 145–156
- Chinni, S., Khan, R.N., Yallapragada, P.R., (2000), Oxygen consumption, ammonia-N excretion and metal accumulation in *Penaeus indicus* postlarvae exposed to lead, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64: 144–151
- Chinni, S., Yallapragada, P.R., (2002), Energy levels of *Penaeus indicus* postlarvae on exposure to lead, *Ecotox. Environ. Saf.* 52: 173–179

- Chippindale, A.K., Chu, T.J.F., Rose, M.R., (1996), Complex trade-offs and the evolution of starvation resistance in *Drosophila melanogaster*, *Evolution* 50: 753–766
- Chrestensen, C.A., Starke, D.W., Mieyal, J.J., (2000), Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein–glutathionyl–mixed disulfides, and initiates apoptosis, *J. Biol. Chem.* 275: 26556–26565
- Clark, A.G., (1989a), Causes and consequences of variation in energy storage in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 123: 131–144
- Clark, A.G., (1989b), The comparative enzymology of the glutathione S–transferases from non–vertebrate organisms, *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 419–446
- Clark, A.G., Keith, L.E., (1988), Variation among extracted lines of *Drosophila melanogaster* in triacylglycerol and carbohydrate storage, *Genetics* 119: 595–607
- Clark, A.G., Fucito, C.D., (1998), Stress tolerance and metabolic response in *Drosophila melanogaster*, *Heredity* 81: 514–527
- Coogan, T.P., Bare, R.M., Waalkes, M.P., (1992), Cadmium–induced DNA strand damage in cultured liver cells reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113: 227–233
- Corrigan, A.J., Huang, P.C., (1981), Cellular uptake of cadmium and zinc, *Biol. Trace Elem. Res.* 3:197–216
- Costa, J.R.M.A., Mela, M., Assis, H.C.S., Pelletier, E., Randi, M.A.F., Ribeiro, C.A.O., (2007), Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67: 82–88
- Cristofolleti, P.T., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., (2001), Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae, *J. Insect Physiol.* 47: 143–155
- Crommentuijn, T., Brils, J., Van Straalen, N.M., (1993), Influence of cadmium on life–history characteristic of *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 26: 216–227
- Czesak, M.E., Fox, C., (2003), Evolutionary ecology of egg size and number in a seed beetle: genetic trade–offs differ between environments, *Evolution* 57:1121–1132
- Dallinger, R., (1993), Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates, Eds: Dallinger, R. & Rainbow, P.S., In: *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*, Lewis Publishers, Boca Raton, 245–289
- David, J.R., Allemand, R., Van Herrewege, J., Cohet, Y., (1983), Ecophysiology: Abiotic factors, Eds: Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson, J.N., In: *The genetics and biology of Drosophila*, New York, Academic, 105–170

Reference

- David, J.R., Araripe, L.O., Chakir, M., Legout, H., Lemos, B., Petavy, G., Rohmer, C., Joly, D., Moreteau, B., (2005), Male sterility at extreme temperatures: a significant but neglected phenomenon for understanding *Drosophila* climatic adaptations, *J. Evol. Biol.* 18: 838–846
- De Coen, W.M., Janssen, C.R. (1998), The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing, *Hydrobiologia* 367: 199–209
- De Wolf, H., Jordaens, K., Reusens, E., Blust, R., Backeljau, T., (2001), Esterase variation in the periwinkle *Littorina littorea*, along the western and eastern Scheldt estuarium, *Mar. Environ. Res* 52: 373–382
- Del Lama, M.A., Bezerra, R.M., Egea Soares, A.E., Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., (2001), Genetic, ontogenetic, and tissue-specific variation of aminopeptidases of *Apis mellifera*, *Apidologie* 32: 25–35
- Diamantino, T. C., Almeida, E., Soares, A. M. V. M., Guilhermino, L., (2003), Characterization of Cholinesterases from *Daphnia magna* Straus and Their Inhibition by Zinc, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71:219–225
- Diaz-Cruz, M.S., Mendieta, J., Tauler, R., Esteban, M., (1997), Cadmium binding properties of glutathione: a chemometrical analysis of voltammetric data, *J. Inorg. Biochem.* 66: 29–36
- Dieter, H.H., Abel, J., Ohnesorge, F.K., (1982), In vitro inhibition of the soluble glutathione S-transferases from rat liver by heavy metals, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 27: 25–32
- Dobzhansky, T., (1947), Adaptive changes induced by natural selection in wild populations of *Drosophila*, *Evolution* 22: 1–16
- Donker, M.H., (1992), Energy reserves and distribution of metals in populations of the isopod *Porcellio scaber* from metal-polluted sites, *Funct. Ecol.* 6: 445–454
- Donker, M.H., Bogert, C.G., (1992), Adaptation to cadmium in three populations of the isopod *Porcellio scaber*, Ed: Donker, M.H., In: *Physiology of metal adaptation in the isopod Porcellio scaber*, Vrije Universiteit, Enschede, 75–84
- Duan, Y., Guttman, S.I., Oris, J.T., Bailer, A.J., (2001), Differential survivorship among allozyme genotypes of *Hyalella azteca* exposed to cadmium, zinc or low pH, *Aquat. Toxicol.* 54: 15–28
- Durliat, M., Bonneton, F., Boissonneau, E., Andre, M., Wegnez, M., (1995), Expression of metallothionein genes during the post-embryonic development of *Drosophila melanogaster*, *BioMetals* 8:339–351
- Ebert, D., Yampolsky, L., Stearns, S.C., (1993), Genetics of life history in *Daphnia magna*. I. Heritabilities at two food levels, *Heredity* 70: 335–343
- Eguchi, M., Iwamoto, A., (1975), Changes in protease, esterase and phosphatase in the alimentary canal of the silkworm during metamorphosis, *Insect Biochem.* 5: 495–507

- Elumalai, M., Antunes, C., Guilhermino, L., (2007), Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the Minho River estuary (NW Portugal) exposed to zinc and mercury, *Chemosphere* 66: 1249–1255
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J., (2005), Insect glutathione transferases and insecticide resistance, *Insect Mol. Biol.* 14: 3–8
- Endo, T., Kimura, O., Sakata, M., (1996), Effects of zinc and copper on uptake of cadmium by LLC-PK₁ cells, *Biol. Pharm. Bull.* 19: 944–948
- EPA, (2005), Toxicological review of zinc and compounds, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen W., (1961), The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin, *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271–278
- Evenden, A.J., Depledge, M.H., (1997), Genetic Susceptibility in Ecosystems: The Challenge for Ecotoxicology, *Environ. Health Perspect.* 105 (Suppl. 4) 105: 849–854
- Falke, E.V., MacIntyre, R.J., (1966), The genetic localization of non-specific leucine aminopeptidase in *Drosophila melanogaster*, *Drosophila Inform. Serv.* 41: 165–166
- Ferreira, C., Terra, W.R., (1986), Substrate specificity and binding loci for inhibitors in an aminopeptidase purified from the plasma membrane of midgut cells of an insect (*Rhynchosciara americana*) larva, *Arch. Biochem. Biophys.* 244: 478–485
- Ferreira, C., Terra, W.R., (1989), Spatial organization of digestion, secretory mechanism and digestive enzyme properties in *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae), *Insect Biochem.* 19: 383–391
- Ferreira, C., Oliveira, M., Terra, W.R., (1990), Compartmentalization of the digestive process in *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) adults, *Insect Biochem.* 20: 267–274
- Ferreira, C., Bellinello, G.L., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., (1990), digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae, *Insect Biochem.* 20: 839–847
- Ferreira, C., Torres, B.B., Terra, W.R., (1998), Substrate specificities of midgut β -glycosidases from insects of different orders, *Comp. Biochem. Physiol.* 119B: 219–225
- Ferreira, C., Marana, S.R., Silva, C., Terra, W.R., (1999), Properties of digestive glycosidases and peptidases and the permeability of the peritrophic membranes of *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae), *Comp. Biochem. Physiol.* 123B: 241–250

- Ferreira, A.H.P., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., Ferreira, C., (2002), Secretion of β -glucosidase by middle midgut cells and its recycling in the midgut of *Tenebrio molitor* larvae, *J. Insect Physiol.* 48: 113–118
- Filser, J., Hölscher, G., (1997), Experimental studies on the reactions of *Collembola* to copper contamination, *Pedobiologia* 41: 173–178
- Fisher, R.A., (1930), *The Genetical Theory of natural Selection*, Clarendon Press, Oxford, UK
- Fleming, R.E., Migas, M.C., Zhou, X., Jiang, J., Britton, R. S., Brunt, E. M., Tomatsu, S., Waheed, A., Bacon, B.R., Sly, W.S., (1999), Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3143–3148
- Forbes, V.E., Møller, V., Depledge, M.H., (1995), Intrapopulation variability in sublethal response to heavy-metal stress in sexual and asexual gastropod populations, *Funct. Ecol.* 9: 477–484
- Fountain, M.T., Hopkin, S.P., (2001), Continuous monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in a metal exposure test, *Ecotox. Environ. Safe.* 48: 275–286
- Fournier, D., Bride, J.M., Poire, M., Berge, J.B., Plapp, F.W., (1992), Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides, *J. Biol. Chem.* 267:1840–1845
- Fournier, D., Mutero, A., Rungger, D., (1993), *Drosophila* acetylcholinesterase: expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes, *Eur. J. Biochem.* 203: 513–519
- Fox, A.G., (1995), Tinkering with the Tinkerer: Pollution versus Evolution, *Environ. Health Persp.* 103 (Suppl 4): 00–00
- Frasco, M.F., Colletier, J.P., Weik, M., Carvalho, F., Guilhermino, L., Stojan, J., Fournier, D., (2007), Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury, *FEBS Journal* 274: 1849–1861
- Frati, F., Fanciulli, P.P., Posthuma, L., (1992), Allozyme variation in reference and metal-exposed natural populations of *Orchesella cincta* (L.) (Insecta, Collembola), *Biochem. Syst. Ecol.* 20: 297–310
- Fred, M.S., Brommer, J.E., (2005), The decline and current distribution of *Parnassius apollo* (Linnaeus) in Finland; the role of Cd, *Ann. Zool. Fennici* 42: 69–79
- Freitas, D.R.J., Rosa, R.M., Moraes, J., Campos, E., Logullo, C., Da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., (2007), Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae), *Comp. Biochem. Physiol.* 146A: 688–694

- Gabriel, W., (2005), How stress selects for reversible phenotypic plasticity, *J. Evol. Biol.* 18: 873–883
- Gahukar, R.T., (1975), Effects of dietary zinc sulphate on the growth and feeding behaviour of *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lep. Pyraustidae), *Z. Angew. Ent.* 79, 352–357
- Garland, T. Jr., (1984), Physiological correlates of locomotory performance in a lizard: an allometric approach, *Am. J. Physiol.* 247: R806–R815
- Gaudy, R., Guerin, J.P., Keranbrum, P., (1991), Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* (Crustacea: Mysidacea), *Mar. Biol.* 109, 493–501
- Gavrilets, S., Scheiner, S.M., (1993a), The genetics of phenotypic plasticity. V. Evolution of reaction norm shape, *J. Evol. Biol.* 6: 31–48
- Gavrilets, S., Scheiner, S.M., (1993b), The genetics of phenotypic plasticity. VI. Theoretical predictions for directional selection, *J. Evol. Biol.* 6: 49–68
- Geer, B.W., Laurie-Ahlberg, C.C., (1984), Genetic variation in the dietary sucrose modulation of enzyme activities in *Drosophila melanogaster*, *Genet. Res.* 43: 307–321
- Geer, B.W., Langevin, M.L., McKechnie, W.W., (1985), Dietary ethanol and lipid synthesis in *Drosophila melanogaster*, *Biochem Genet.* 23: 607–622
- Geer, B.W., McKechnie, S.W., Bentley, M.M., Oakeshott, J.G., Quinn, E.M., Langevin, M.L., (1988), Induction of alcohol dehydrogenase by ethanol in *Drosophila melanogaster*, *J. Nutr.* 118: 398–407
- Gill, K.D., Pal, R., Sandhir, R., et al. (1989), Effect of chronic cadmium exposure on lipid composition and peroxidation in liver and kidneys in rats, *Med. Sci. Res.* 17: 921–924
- Gillespie, J.H., Turelli, M., (1989), Genotype–environment interaction and the maintenance of polygenic variation, *Genetics* 121: 129–138
- Gintenreiter, S., Ortel, J., Nopp, H.J. (1993), Effects of different dietary levels of cadmium, lead, copper and zinc on vitality of the forest pest insect *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae, Lepid.), *Arch. Contam. Toxicol.* 25: 62–66
- Godočikova, J., Polek, B., Kliment, V., (1993), Influence of metal pretreatment on the acute toxicity of cadmium on the larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae), *Biologia, Bratislava* 48: 637–641
- Govinda, S., Kutlow, T., Bentivegna, C.S., (2000), Identification of a putative ribosomal protein mRNA in *Chironomus riparius* and its response to cadmium, heat shock and actinomycinD, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14: 195–203
- Graf, R., Raikhel, A.S., Brown, M.R., Lea, A.O., Briegel, H., (1986), Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.), *Cell and Tissue Res.* 245: 19–27
- Graney, R.L., Giesy, J.P.J., (1986), Effects of long-term exposure to pentachlorophenol on free amino acid pool and energy reserves of the

- freshwater amphipod *Gammarus pseudolimnaeus*, *Ecotox. Environ. Saf.* 12: 233–251
- Grime, J.P., (1989), *The stress debate: symptom of impeding synthesis?*, *Biol. J. Linn. Soc.* 37: 3–17
- Grippo, M.A., Heath, A.G., (2003), *The effect of mercury on the feeding behaviour of fished minnows (Pimephales promelas)*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55: 187–198
- Guilhermino, L., Barros, P., Silva, M.C., Soares, A.M.V.M., (1998), *Should the use of inhibition of cholinesterase as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned?*, *Biomarkers* 3/2: 157–163
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, L., Hediger, M.A., (1997), *Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter*, *Nature* 388: 482–488
- Guo-Xing, W., Gong-Yin, Y., Cui, H., Jia-An, C., (2006), *Accumulation of cadmium and its effects on growth, development and hemolymph biochemical compositions in Boettcherisca peregrina larvae (Diptera: Sarcophagidae)*, *Insect Sci.* 13: 31–39
- Gutteling, E.W., Doroszuk, A., Riksen, J.A.G., Prokop, Z., Kammenga, J.E., (2007), *Environmental influence on genetic correlations between life-history traits in Caenorhabditis elegans*, *Heredity* 98: 206–213
- Guttman, S.I., (1994), *Population genetic structure and ecotoxicology*, *Environ. Health. Perspect.* 102 (Suppl. 12): 97–100
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., (1974), *Glutathione S-transferases*, *J. Biol. Chem.* 249: 7130–7139
- Hågvar, S., Abrahamsen, G., (1990), *Microarthropoda and Enchytraeidae (Oligochaeta) in naturally lead-contaminated soils: a gradient study*, *Environ. Entomol.* 19: 1263–1277
- Hainaut, P., Milner, J., (1993), *A structural role for metal ions in the “wild type” conformation of the tumor suppressor protein p53*, *Cancer Res.* 53: 1739–1742
- Hall, N.A., (1988a), *Peptidases in Drosophila melanogaster. II. The variation of peptidase activities during development*, *Insect Biochem.* 18: 145–155
- Hall, N.A., (1988b), *Peptidases in Drosophila melanogaster. III. The regulation of leucine aminopeptidase P and leucine aminopeptidase G*, *Insect Biochem.* 18: 157–161
- Harshman, L.G., Hoffmann, A.A., Clark, A.G., (1999), *Selection for starvation resistance in Drosophila melanogaster: physiological correlates, enzyme activities and multiple stress responses*, *J. Evol. Biol.* 12: 370–379
- Hasset, R.P., Landry, M.R., (1983), *Effects of food-level acclimation on digestive enzyme activities and feeding behavior of Calanus pacificus*, *Mar. Biol.* 75: 47–55

- Hegedus, D., Baldwin, D., O'Grady, M., Braun, L., Gleddie, S., Sharpe, A., Lydiate, D., Erlandson, M., (2003), Midgut protease from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae: characterization, cDNA cloning, and expressed sequence Tag analysis, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 53: 30–47
- Helpern, M., Gasith, A., Bresler, V.M., Broza, M., (2002), The protective nature of *Chironomus luridus* larval tubes against copper sulfate, *J. Insect Sci.* 2:1–5
- Hensbergen, P.J., Van Velzen, M.J.M., Adi Nugroho, R., Donker, M.H., Van Straalen, N.M., (2000), Metallothionein-bound cadmium in the gut of the insect *Orchesella cincta* (Collembola) in relation to dietary cadmium exposure, *Comp. Biochem. Physiol.* 125C: 17–24
- Hillerton, J.E., Vincent, J.F., (1982), The specific location of zinc in insect mandibles, *J. Exp. Biol.* 101: 333–336
- Hinkle, P.M., Shanshala II, E.D., Nelson, E.J., (1992), Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake, *J. Biol. Chem.* 267: 25553–25559
- Hiraizumi, K., Tavormina, P. A., Mathes, K.D., (1992), Genetic and environmental effects on the expression of peptidases and larval viability in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 131: 625–642
- Hodgson, E., (2004), *A textbook of modern toxicology*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey
- Hoffmann, A.A., Parsons, P.A., (1991), *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*, Oxford University Press
- Hoffmann, A.A., Merilä, J., (1999), Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions, *Tree* 14: 96–101
- Hoffman, A.A., Sørensen, J.G., Loeschcke, V., (2003), Adaptation to extreme temperatures in *Drosophila* combining quantitative and molecular approaches, *J. Therm. Biol.* 28: 175–216
- Hoffmann, A.A., Hallas, R., Anderson, A.R., Telonis-Scott, M., (2005), Evidence for a robust sex-specific trade-off between cold resistance and starvation resistance in *Drosophila melanogaster*, *J. Evol. Biol.* 18: 804–810
- Hopkin, S.P., Martin, M.H., (1983), Heavy metals in the centipede *Lithobius variegatus* (Chilopoda), *Environ. Pollut.* 6B: 309–318
- Hopkin, S.P., (1989), *Ecophysiology of Metals i Terrestrial Invertebrates*, Elsevier Applied Science, Elsevier, New York
- Hopkin, S.P., Hames, C.A.C., Dray, A., (1989), X-ray microanalytical mapping of the intracellular distribution of pollutant metals, *Microsc. Anal.* 14: 23–27
- Hopkin, S.P., (1990), Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods, *Funct. Ecol.* 4: 321–327
- Howard, B. Mitchell, P.C.H., Ritchie, A., Simkiss, K., Taylor, M., (1981), The composition of intracellular granules from metal accumulating cells of the snail *Helix aspersa*, *Biochem. J.* 194: 507–511

Reference

- Howlett, R.J., Majerus M.E.N., (1987), The understanding of industrial melanism in the peppered moth (*Biston betularia*) (Lepidoptera: Geometridae), *Biol. J. Linn. Soc.* 30:31–44
- Hučkova, A., Kazimirova, M., Slovak, M., (1996), Heavy metal-affected changes in haemolymph histamine concentration in the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera, Noctuidae), *Biologia, Bratislava* 51: 571–574
- Huber, R.E., (1975), The purification and study of a honey bee abdominal sucrase exhibiting unusual solubility and kinetic properties, *Arch. Biochem. Biophys.* 168: 198–209
- Huber, R.E., Mathison, R.D., (1976), Physical, chemical and enzymetic studies on the major sucrase of honey bee (*Apis mellifera*), *Can. J. Biochem.* 54: 153–164
- Iskan, M., Coban, T., Eke, B.C., (1995), Differential response of hepatic monooxygenase and glutathione S-transferases of mice to a combination of cadmium and nickel, *Comp. Biochem. Physiol.* 111C: 61–68
- Islam, A., Roy, S., (1983), Effects of CdCl₂ on the quantitative variations of carbohydrate, protein, amino acid and cholesterol in *Chrysochoris stollii* Wolf (Insecta: Hemiptera), *Curr. Sci.* 52: 215–217
- Jacobson, K.B., Turner, J.E., (1980), The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids, *Toxicology* 16: 1–37
- Jamall, I.S., Smith, J.C., (1985), The effects of dietary selenium on cadmium binding in rat kidney and liver, *Arch. Toxicol.* 56: 252–255
- Janssen, M.P.M., Bruins, A., De Vries, T.H., Van Straalen, N.M., (1991), Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305–312
- Jindra, M., Sehnal, F., (1989), Larval growth, food consumption, and utilization of dietary protein and energy in *Galleria mellonella*, *J. Insect Physiol.* 35: 719–724
- Jokanović, M., (2001), Biotransformation of organophosphorus compounds, *Toxicology* 166: 139–160
- Jones, B.R., Brancoft, H.R., (1986), Distribution and probable physiological role of esterases in reproductive, digestive and fat-body tissue of adult cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, *Biochem. Genet.* 24: 499–508
- Jones, M.M., Cherian, M.G., (1990), The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication, *Toxicology* 62: 1–25
- Josse, E.N.G, Verhoef, S.C., (1983), Lead tolerance in *Collembola*, *Pedobiologia* 25: 11–18
- Jordao, B.P., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Lehane, M.J., Ferreira, C., (1996), Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 337–346
- Jordao, B.P., Capella, A.N., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., (1999), Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase and trypsin and

- secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells, *J. Insect Physiol.* 45: 29–37
- Kafel, A., Bednarska, K., Augustyniak, M., Witas, I., Szulinska, E., (2003), Activity of glutathione S-transferase in *Spodoptera exigua* larvae exposed to cadmium and zinc in two subsequent generation, *Environ. Int.* 28: 683–686
- Kapin, M.A., Ahmad, S., (1980), Esterases in larval tissue of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): optimum assay conditions, quantification and characterization, *Insect Biochem.* 10: 331–337
- Kiffney, P.M., Clements, W.H., (1996), Size-dependent response of macroinvertebrates to metals in experimental streams, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1352–1356
- Kirsch-Volder, M., (1984), *Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of industrial pollutants*, Plenum, New York
- Klerks, P.L., Weis, J.S., (1987), Genetics adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review, *Environ. Pollut.* 45: 173–205
- Korsloot, A., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., (2004), Introduction, Eds: Korsloot, A., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., In: *Environmental stress and cellular response in arthropods*, CRC Press, 1–10
- Kort, C.A.D., Granger, N.A., (1981), Regulation of the juvenile hormone titer, *Ann. Rev. Entomol.* 26: 1–28
- Kotze, A.C., Rose, H.A., (1987), Glutathione S-transferase in the Australian blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann), *Pestic. Biochem. Physiol.* 29: 77–86
- Kramarz, P., Kafel, A., (2003), The respiration rate of the beet armyworm pupae (*Spodoptera exigua*) after multi-generation intoxication with cadmium and zinc, *Environ. Poll.* 126: 1–3
- Krishna, G., Govardhan, L., Veerabhadrapa, P.S., (1984), Tissue esterases of *Exoristina sorbillans* (Uzi fly), *J. Biosci.* 6: 249–255
- Kristensen, T.N., Sorensen, P., Kruhoffer, M., Pedersen, K.S., Loeschcke, V. (2005). Genome-wide analysis on inbreeding effects on gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 171(1): 157–167.
- Kültz, D., (2005), Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response, *Annu. Rev. Physiol.* 67: 225–257
- Kunitz, M., (1947), Crystalline soyabean trypsin inhibitor-II. General properties, *J. Gen. Physiol.* 30: 291–310
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680–685
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., (1994), The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities, *Ecotoxicology* 3: 193–208
- Lande, R., (1980), The genetic covariance between characters maintained by pleiotropic mutations, *Genetics* 94: 203–215

Reference

- Lande, R., Arnold, S.J., (1983), The measurement of selection on correlated characters, *Evolution* 37: 1210–1226
- Laurie-Ahlberg, C.C., (1982), Genetic, ontogenetic and tissue specific variation of dipeptidases in *Drosophila melanogaster*, *Biochem. Genet.* 20: 407–424
- Lauverjat, S., Ballan-Dufrançais, C., Wegnez, M., (1989), Detoxification of cadmium. Ultrastructural study and electron-microprobe analysis of the midgut in a cadmium-resistant strain of *Drosophila melanogaster*, *Biol. Metals* 2: 97–107
- Lazarević, J., Perić-Mataruga V., Leković, S., Nenadović, V., (1998), The properties of α -amylase from the midgut of *Lymantria dispar* larvae, Eds: Adamovic, In: *Gypsy moth outbreaks in Serbia*, The entomological society of Serbia, Belgrade, 95–114
- Lazarević, J., Perić-Mataruga, V., Vlahović, M., Mrdaković, M., Cvetanović, D., (2004), Effects of rearing density on larval growth and activity of digestive enzymes in *Lymantria dispar* L., (Lepidoptera: Lymantriidae), *Folia Biol. (Krakow)* 52: 105–125
- Lee, M.J., Anstee, J.H., (1994), Characterization of midgut exopeptidase activity from larval *Spodoptera littoralis*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 63–71
- Lee, K-Y., Valaitis, P.A., Denlinger, L.D., (1998), Activity of gut alkaline phosphatase, proteases and esterase in relation to diapause of pharate first instar larvae of gypsy moth, *Lymantria dispar*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 37: 197–205
- Lee, S.E., Yoo, D.H., Son, J., Cho, K., (2006), Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae, *Proteomics* 6: 945–957
- Lemos, F.J.A., Terra, W.R., (1992), Soluble and membrane bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22: 613–619
- Levins, R., (1968), *Evolution in changing environments*, New Jersey, Princeton Univ. Press
- Lindgren, B., Laurila, A., (2005), Proximate causes of adaptive growth rates: growth efficiency variation among latitudinal populations of *Rana temporaria*, *J. Evol. Biol.* 18: 820–828
- Lindqvist, L., (1992), Accumulation of cadmium, copper and zinc in five species of phytophagous insects, *Environ. Entomol.* 21: 160–163
- Lindqvist, L., Block, M., (1994), Excretion of cadmium and zinc during moulting in the grasshopper *Omocestus viridulus* (Orthoptera), *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1669–1672
- Lindqvist, L., Block, M., Tjälve, H., (1995), Distribution and excretion of Cd, Hg, Methyl-Hg and Zn in the predatory beetle *Pterostichus niger* (Coleoptera: Carabidae), *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 1195–1201
- Lingjærde, O.C., Stenseth, N.C., Kristoffersen, A.B., Smith, R.H., Moe, S.J., Read, J.M., Daniels, S., Simkiss, K., (2001), Exploring the density-dependent

- structure of blowfly populations using non-parametric additive modelling, *Ecology* 82: 2645–2658
- Liu, Z.G., Kobayashi, M., Yoshitake, N., (1984) Genetical studies on the heat-stable esterase in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori* L., *J. Seri. Sci. Jpn.* 53: 432–439
- Lockridge, O., La Du B.N, (1978), Comparison of atypical and usual human serum cholinesterase, *J. Biol. Chem.* 253: 361–366
- Lohmann, R.D., Beyersmann, D., (1993), Cadmium and zinc mediated changes of the Ca^{2+} -dependent endonuclease in apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 190: 1097–1103
- Lönnerdal, B., (2000), Dietary factors influencing zinc absorption, *J. Nutr.* 130: 1378S–1383S
- Loxdale, H.D., (1983), Electrophoretic study of enzymes from cereal aphid populations. I. Electrophoretic techniques and staining system for characterising isozymes from six species of cereal aphids (Homoptera: Aphididae), *Bull. Entomol. Res.* 73: 645–657
- Lynch, C.B., Sulzbach, D.S., Connolly, M.S., (1988), Quantitative-genetic analysis of temperature regulation in *Mus domesticus*. IV. Pleiotropy and genotype-by-environment interactions, *Am. Nat.* 132: 521–37
- Macnair, M.R., (1997), The evolution of plants in metal-contaminated environments, Eds: Bijlsma, R. & Loeschcke, V., In: *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*, Birkhäuser Verlag, Basel, CH, 3–24
- Macours, N., Hens, K., (2004), Zinc-metalloproteases in insects: ACE and ECE, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 34: 501–510
- Mainguet, A.M., Louveaux, A., El Sayed, G., Rollin, P., (2000), Ability of a generalist insect, *Shistocerca gregaria*, to overcome thioglucoside defense in desert plants: tolerance or adaptation?, *Entomol. Exp. Appl.* 94: 309–317
- Malherbe, Y., Kamping, A., van Delden, W., de Zande, L., (2005), ADH enzyme activity and Adh gene expression in *Drosophila melanogaster* lines differentially selected for increased alcohol tolerance, *J. Evol. Biol.* 18: 811–819
- Mane, S.D., Tompkins, L., Richmond, R.C., (1983), Male esterase-6 catalyzes the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster* females, *Science* 222: 419–421
- Marana, S.R., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., Ferreira, C., (1996), Ultrastructure and secretory activity of *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) midguts, *J. Insect Physiol.* 43:465–473
- Marana, S.R., Terra, W.R., Ferreira, C., (2000), Purification and properties of a beta-glucosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1139–1146

- Marana, S.R., Jacobs-Lorena, M., Terra, W.R., Ferreira, C., (2001), Amino acid residues involved in substrate specificity of the *Spodoptera frugiperda* β -glucosidase, *Eur. J. Biochem.* 269: 3705–3714
- Marczyk, G., Migula, P., Trzcionka, E., (1993), Physiological response of spiders to environmental pollution in the Silesian region (Southern Poland), *Sci. Total Environ. (Suppl.)*: 1315–1322
- Marigomez, I., (2001), Assessment of the marine environment health based on monitoring networks: a theoretical example – the Basque Country, SETAC Europe 11th Annual Meeting, Madrid
- Maroni, G., Wise, J., Young, J. E., Otto, E., (1987), Metallothionein gene duplication and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 117: 739–744
- Maroni, G., (1990), Animal metallothioneins, Eds: Shaw, A.J., In: *Heavy-Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, CRC Press, Florida, U.S.A., 216–229
- Martoja, R., Bouquegneau, J.M., Verthe, C., (1983), Toxicological effect and storage of cadmium and mercury in an insect *Locusta migratoria*, *J. Invert. Pathol.* 42: 17–32
- Maryanski, M., Kramarz, P., Laskowski, R., Niklinska, M., (2002), Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetle (*Poecilus cupreus* L.) exposed to zinc- or cadmium-contaminated food, *Ecotoxicology* 11: 127–139
- Masson, A.Z., Simkiss, K., (1982), Sites of mineral deposition in metal accumulating cells, *Exp. Cell Res.* 139: 383–391
- Matthewson, M. D., Baker, J.A.F., (1975), Arsenic resistance in species of multi-host ticks in the Republic of South Africa and Swaziland, *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 46: 341–344
- Mattiacci, L., Dicke, M., Posthumus, M.A., (1995), β -glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 2036–2040
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R., (1990), *Biomarkers of Environmental Contamination*, Lewis Publ., Boca Raton, FL, Lewis Publishers
- Michailova, P., Petrova, N., Ramella, L., Sella, G., Bovero, S., (1998), Structural and functional alterations of chromosome G of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) from a polluted Piedmont station, *Environ. Pollut.* 103: 127–134
- Migula, P., Nuorteva, S-L., Nuorteva, P., Glowacka, E., Oja, A., (1993), Physiological disturbances in ants (*Formica aquilonia*) to excess of cadmium and mercury in a Finnish forest, *Sci. Tot. Environ. Suppl.* 2: 1305–1314

- Migula, P., Glowacka, E., (1996), Heavy metals as stressing factors in the red wood ants (*Formica polyctena*) from industrially polluted forests, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354: 653–659
- Migula P., (1997), Molecular and physiological biomarkers in insects as the tools in environmental hazard assessment, *Acta Physiol. Entomol. Hun.* 32: 231–243
- Migula, P., Glowacka, E., Nuorteva, S-L., Nuorteva, P., Tulisalo, E., (1997), Time related effects of intoxication with cadmium and mercury in red wood ant, *Ecotoxicology* 6: 307–320
- Milton, E.J., Silva, C.P., Samuels, R.I., (2004), Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): distribution in the gut of adult workers and partial characterization, *J. Insect Physiol.* 50: 881–891
- Moe, S.J., Stenseth, N.C., Smith, R.H., (2001), Effects of a toxicants on population growth rates: sublethal and delayed responses in blowfly populations, *Funct. Ecol.* 15: 712–721
- Moran, N.A., (1992), The evolutionary maintenance of alternative phenotypes, *Am. Nat.* 139: 971–989
- Mrdaković, M., Lazarević, J., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Vlahović, M., (2008), Partial characterization of a lipase from gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larval midgut, *Folia Biol. (Krakow)* 56: 103–110
- Muhlia-Almazan, A., Garcia-Carreno, F.L., (2002), Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut of the white shrimp *Penaeus vannamei*, *Comp. Biochem. Physiol.* 133B: 383–394
- Mukherjee, S., Mukherjee, S., Bhattacharyya, P., Duttagupta, A.K., (2004), Heavy metal levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed *Lemna minor*: field and laboratory studies, *Environ. Int.* 30: 811–814
- Murdock, L.L., Brookhart, G., Dunn, P.E., Foard, D.E., Kelley, S., Kitch, L., Shade, R.E., Shukle, R.H., Wolfson, J.L., (1987), Cysteine digestive proteinases in Coleoptera, *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 783–787
- NAS/NRC (National Academy of Science/ National Research Council), (1989), *Biologic Markers in Reproductive Toxicology*, National Academy Press, Washington, DC
- Nascarella, M.A., Stoffolano, J.G.Jr., Stanek III, E.J., Kosteki, P.T., Calabrese, E.J., (2003), Hormesis and stage specific toxicity induced by cadmium in an insect model, the queen blowfly, *Phormia regina* Meig., *Environ. Pollut.* 124: 257–262
- Nevo, E., Pearl, T., Beiles, A., Wool, D., (1981). Mercury selection of alozyme genotypes in shrimps, *Experientia* 37: 1152–1154
- Nijhout, H.F., (1994), *Insect hormones*, Princeton University Press, Princeton
- Nishi, Y., (1996), Zinc and growth, *J. Am. Coll. Nutr.* 15: 340–344

- Nordberg, G.F., Kjellström T., Nordberg M., (1985), *Kinetics and metabolism*. Eds: Friberg, L., Elinder, C.G., Kjellström, T., Nordberg, G.F., In: *Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal*. Vol. I. Exposure, dose, and metabolism. Boca Raton, FL: CRC Press, 103–178
- NRC (National Research Council), (1987), *Committee on Biological Markers, Environ. Health Perspect.* 74: 3–9
- Nummelin, M., Lodenius, M., Tulisalo, E., (1998), *Waterstriders (Gerridae: Heteroptera) as indicators of heavy metal pollution*, *Entomol. Fenn.* 8: 185–191
- Nummelin, M., Lodenius, M., Tulisalo, E., Hirvonen, H., Alanko, T., (2007), *Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution*, *Environ. Pollut.* 145: 339–347
- Nuorteva, P., Nuorteva, S.-L., Mathur, B., (1992), *Excretory inhibition of bioaccumulation in Lepidoptera*, Eds: Bohac, J. & Ruzicka, V., In: *Bioindicators Betriorisationis Regionis, Ceske Budejovice*, 362–367
- Nursita, A.I., (2004), *SuperSoil 2004: 3rd Australian New Zeland Soils Conference, University of Sidney, Australia*
- Odell, T.M., Bell, R.A., Mastro, V.C., Tanner, J.A., Kennedy, J.F., (1984), *Production of the gypsy moth, Lymantria dispar, for research and biological control*. Eds. King, E.G. & Leppla, N.C., In: *Advanced and Challenges in Insect Rearing, USDA-ARS, New Orleans, LA*, 156–166
- Odendaal, J.P., Reinecke, A.J., (1999), *Short-term toxicological effects of cadmium on the woodlouse, Porcellio laevis (Crustacea, Isopoda)*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43: 30–34
- Ohta, H., Cherian, M.G., (1995), *The influence of nutritional deficiencies on gastrointestinal uptake of cadmium and cadmium-metallothionein in rats*, *Toxicology* 97: 71–80
- Ohta, H., Nakakita, M., Tanaka, H., Seki, Y., Yoshikawa, H., (1997), *Induction of metallothionein-like cadmium-binding protein in the testis by oral cadmium administration in rats*, *Ind. Health* 35: 96–103
- Olla, B.L., Pearson, W.H., Studholme, A.L., (1980), *Applicability of behavioral measures in environmental assessment*, *Rapp. Reun. Cons. Int. Explor. Mer.* 179: 162–173
- Olson, M.O., (2004) *Sensing cellular stress: another new function for nucleolus?* *Sci. STKE* 224: pe10
- Ortel, J., Vogel, W.R., (1989), *Effects of lead and cadmium on oxygen consumption and life expectancy of the pupal parasitoid, Pimpla turionellae*, *Entomol. Exp. Appl.* 52: 83–88
- Ortel, J., (1991), *Effects of lead and cadmium on chemical composition and total water content of the pupal parasitoid, Pimpla turionellae*, *Entomol. Exp. Appl.* 59:93–100

- Ortel, J., (1995a), Changes in protein content and free amino acid composition in metal-contaminated gypsy moth larvae (*Lymantria dispar* L., Lymantriidae, Lepidoptera), *Comp. Biochem. Physiol.* 112C: 291–298
- Ortel, J., (1995b), Effects of metals on the total lipid content in the gypsy moth (*Lymantria dispar* L., Lymantriidae, Lepid.) and its hemolymph, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55: 216–221
- Ortel, J. (1996), Metal-supplemented diets alter carbohydrate levels in tissue and hemolymph of gypsy moth larvae (*Lymantria dispar*, Lymantriidae, Lepidoptera), *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1171–1176
- Oudman, L., Delden, W.V., Kamping, A., Biljsma, R., (1994), Starvation resistance in *Drosophila melanogaster* in relationship to the polymorphisms at the *Adh* and *alpha-Gdh* loci, *J. Insect Physiol.* 40: 709–713
- Palmiter, R.D., (1994), Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1219–1223
- Papathanassiou, E., 1983. Effects of cadmium and mercury ions on respiration and survival of the common prawn *Palaemon serratus* (Pennant). *Rev. Int. Oceanogr. Med.* 72, 21–35
- Parker, P.J.A.N., Callaghan, A., (1997), The effect of low level of organophosphate exposure on esterase activity and allele frequency in field populations of *Simulium equinum* (Diptera: Simuliidae), *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 2550–2555
- Peakall, D., (1992), *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*, Chapman&Hill, London
- Pecsenye, K., Lefkovitch, L.P., Giles, B.E., Saura, A., (1996), Differences in environmental temperature, ethanol and sucrose associated with enzyme activity and weight changes in *Drosophila melanogaster*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 135–145
- Peel, D.J., Milner, M.J., (1992), The response of *Drosophila* imaginal disc cell lines to ecdysteroids, *Roux's Arch. Dev. Biol.* 202: 23–35
- Pemac, D., Tucić, B., (1998), Reaction norms of juvenile traits to light intensity in *Iris pumila* (Iridaceae): a comparison of populations from exposed and shaded habitats, *Pl. Syst. Evol.* 209: 159–176
- Perić-Mataruga, V., Blagojević, D., Spasić, M.B., Ivanović, J., Janković-Hladni, M., (1997), Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut *Lymantria dispar* L., caterpillars of different population origins, *J. Insect Physiol.* 43: 101–106
- Petering, H.G., Choudhury, H., Stemmer, K.L., (1979), Some effects of oral ingestion of cadmium on zinc, copper and iron metabolism, *Environ. Health Perspect.* 28: 97–106

- Planello, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., (2006), Ribosomal genes as early target of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae, *Sci. Tot. Environ.* 373: 113–121
- Posthuma, L., (1990), Genetic differentiation between populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from heavy metal contaminated sites, *J. Appl. Ecol.* 27: 609–622
- Posthuma, L., (1992), Genetic ecology of metal tolerance in Collembola, Ph.D. thesis, Vrije University, Amsterdam, the Netherlands
- Posthuma, L., Hogervorst, R.F., Van Straalen, N.M., (1992), Adaptation to soil pollution by cadmium excretion in natural populations of *Orchesella cincta* (L.) (Collembola), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 146–156
- Posthuma, L., Van Straalen, N.M., (1993), Heavy metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences, *Comp. Biochem. Physiol.* 106C: 11–38
- Posthuma, L., Verweij, R.A., Widianarko, B., Zonneveld, C., (1993), Life-history patterns in metal-adapted Collembola, *Oikos* 67: 235–249
- Postma, J.F., Van Nugteren, P., Buckert-de Jong, M.B. (1996), Increased cadmium excretion in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius* (Diptera), *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 332–339
- Prabhakaran, S.K. and S.T. Kamble, (1995), Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach, *Blattella germanica* (L.), *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 519–524
- Prasad, R., Kaur, D., Kumar, V., (1996) Kinetic characterization of zinc binding to brush border membranes from rat kidney cortex: interaction with cadmium, *Biochim. Biophys. Acta* 1284: 69–78
- Pruett, J.H., Guerrero, F.D., Hernandez, R., (2002), Isolation and identification of an esterase from a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), *J. Econ. Entomol.* 95(5): 1001–1007
- Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C.W., Collins, F.H., Hemingway, J., (2001), Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*, *Biochem. J.* 359: 259–304
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Unger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R., (2002), Evolution of supergene families associated with insecticide resistance, *Science* 298: 179–181
- Rantala, M.J., Roff, D.A., (2005), An analysis of trade-off in immune function, body size and development time in Mediterranean field cricket, *Gryllus bimaculatus*, *Funct. Ecol.* 19: 323–330
- Rathore, R.S., Sanghui, P.K., Swarup, H., (1979), Toxicity of cadmium chloride and lead nitrate to *Chironomus tetans* larvae, *Environ. Pollut.* 18: 173–177

- Rayms-Keller, A., Olson, K.E., McGaw, M., Oray, C., Carlson, J.O., Beaty, B.J., (1998), Effects of heavy metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 39: 41–47
- Reiss, R.A., James, A.A., (1993), A glutathione S-transferase gene of the vector mosquito, *Anopheles gambiae*, *Insect. Mol. Biol.* 2: 25–33
- Relexans, J. C., Lerat, L., Etcheber, H. (1988). Une strategie d'étude des effets de quelques polluants (Cd, Zn, BaP) sur la respiration de communautés benthiques maintenues *in vitro*. *Oceanis, Paris* 14: 41 l–21
- Relyea, R.A., (2005), The heritability of inducible defences in tadpoles, *J. Evol. Biol.* 18: 856–866
- Ricklefs, R.E., (1991), Structures and transformations of life histories, *Funct. Ecol.* 5: 174–183
- Riley, P.A., (1997), Melanin, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29: 1235–1239
- Roelofs, D., Mariën, J., Van Straalen, N.M., (2007), Differential gene expression profiles associated with heavy metal tolerance in the soil insect *Orchesella cincta*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 287–295
- Roelofs, D., Aarts, M.G.M., Schat, H., Van Straalen, N.M., (2008), Functional ecological genomics to demonstrate general and specific responses to abiotic stress, *Funct. Ecol.* 22: 8–18
- Roesijadi, G., (1992), Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals, *Aquat. Toxicol.* 22: 81–114
- Roesijadi, G., Unger, M.E., (1993), Cadmium uptake in gills of mollusc *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channel blockers, *Aquat. Toxicol.* 24: 195–206
- Salinas, A.E., Wong, M.G., (1999), Glutathione S-transferases—A review, *Curr. Med. Chem.* 6: 279–309
- Samain, J.F., Moal, J., Coum, A., Le Coz, J.R., Daniel, J.Y., (1980), Effects of the „Amoco Cadiz“ oil spill on zooplankton: a new possibility of ecophysiological survey, *Helgoländer wiss. Meeresunters* 33: 225–235
- Santos, C.D., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., (1986), Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanism. *Can. J. Zool.* 64: 490–500
- Satyavathi, C., Prabhakara Rao, Y., (2000), Inhibition of Na⁺, K⁺ –ATPase in *Penaeus indicus* postlarvae by lead, *Comp. Biochem. Physiol.* 127 C: 11–22
- Scheiner, S.M., Goodnight, C.J., (1984), The comparison of phenotypic plasticity and genetic variation in populations of the grass *Danthonia spicata*, *Evolution* 38: 845–855
- Scheiner, S.M., Lyman, R.F., (1989), The genetics of phenotypic plasticity. I. Heritability, *J. Evol. Biol.* 2: 95–107

Reference

- Scheiner, S.M., Caplan, R.L., Lyman, R.F., (1991), The genetics of phenotypic plasticity, III. Genetics correlations and fluctuating asymmetries, *J. Evol. Biol.* 4: 51–68
- Scheiner, S.M., (1993), Genetics and evolution of phenotypic plasticity, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 35–68
- Schlueter, M.A., Guttman, S.I., Oris, J.T., Bailer, A.J., (1997), Differential survival of fished minnows, *Pimephales promelas*, as affected by copper exposure, prior population stress, and allozyme genotypes, *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 939–947
- Schmidt, G.H., Ibrahim, N.M.M., Abdallah, M.D., (1992), Long-term effects of heavy metals in food on developmental stages of *Aiolopus thalassinus* (Saltatoria: Acrididae), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 375–382
- Schmidt, G.H., Ibrahim, N.M.M., (1994), Heavy metal content (Hg^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2}) in various body parts: its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults, *Ecotox. Environ. Safe.* 29: 148–164
- Schulz-Baldes, M., (1989), The sea-skater *Halobates micans*: an open ocean bioindicator for cadmium distribution in Atlantic surface waters, *Mar. Biol.* 102: 211–215
- Schumaker, T.T.S., Cristofolletti, P.T., Terra, W.R., (1993), Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae, *Apidologie* 24: 3–17
- Sgró, C.M., Hoffmann, A.A., (2004), Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation, *Heredity* 93: 241–248
- Shin, B.-S., Choi, R.N., Lee, C.-U., (2001), Effect of cadmium on total lipid content and fatty acids of the great wax moth, *Galleria mellonella*, *Korean J. Ecol.* 24: 349–352
- Sibly, R.M., Calow, P. (1989), A life-cycle theory of responses to stress, *Biol. J. Linn. Soc.* 37: 101–116
- Sidhu, M., Prasad, R., Gill, K.D., Nath, R., (1997), Alterations in isoforms of glutathione S-transferase in liver and kidney of cadmium exposed rhesus monkeys: purification and kinetic characterization, *Mol. Cell Biochem.* 166: 55–63
- Sildanchandra, W., Crane, M., (2000), Influence of sexual dimorphism in *Chironomus riparius* Meigen on toxic effects of cadmium, *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2309–2313
- Silva, C.P., Terra, W.R., (1995), An α -glucosidase from the perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. Purifications and properties, *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 25: 487–494
- Simkiss, K., Daniels, S., Smith, R.H., (1993), effects of population density and cadmium toxicity on growth and survival of blowflies, *Environ. Pollut.* 81: 41–45

- Snyder, M.J., Walding, J.K., Feyereisen, R., (1995), Glutathione S-transferases from larval *Manduca sexta* midgut: sequence of two cDNAs and enzyme induction, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 455–465
- Sobkowiak, R., Rymer, K., Rucińska, R., Deckert, J., (2004), Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells, *Acta Biochim. Pol.* 51: 219–222
- Sohi, S.S., Palli, S.R., Cook, B.J., Retnakaran, A., (1995), Forest insect cell lines responsive to 20-hydroxyecdysone and two nonsteroidal ecdysone agonists, RH-5849 and RH-5992, *J. Insect Physiol.* 41: 457–464
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., (1981), *Biometry*, Freeman, San Francisco
- Sørensen, J.G., Norry, F.M., Scannapieco, A.C., Loeschcke, V., (2005), Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from New World, *J. Evol. Biol.* 18: 829–837
- Stenersen, J., Kobro, S., Bjerke, M., Arend, U., (1987), Glutathione S-transferase in aquatic and terrestrial animals from nine phyla, *Comp. Biochem. Physiol.* 86C: 73–82
- Steyermark, A.C., Miamen, A.G., Feghahati, H.S., Lewno, A.W., (2005), Physiological and morphological correlates of among-individual variation in standard metabolic rate in the leopard frog *Rana pipiens*, *J. Exp. Biol.* 208: 1201–1208
- Stohs, S.J., Bagchi, D., (1995), Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Rad. Biol. Med.* 18: 321–336
- Sun, Z., (2005), Enzymical and cytological response of earthworms under inducement of heavy metals, Center for sciences and technology development, Ministry for education, P.R. China
- Suzuki K.T., Aoki, Y., Nishikawa, M., Masui, H., Matsubara, F. (1984), Effect of cadmium-feeding on tissue concentrations of elements in germ-free silkworm (*Bombyx mori*) larvae and distribution of cadmium in the alimentary canal, *Comp. Biochem. Physiol.* 79C: 249–253
- Syversen, T.L.M., (1981), Effects of methylmercury on protein synthesis *in vitro*, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 49:422–426
- Tacnet, F., Watkins, D.W., Ripoche, P., (1990), Studies of zinc transport into brush-border membrane vesicles isolated from pig small intestine, *Biochim. Biophys. Acta* 1024: 323–330.
- Tacnet, F., Watkins, D.W., Ripoche, P., (1991), Zinc binding in intestinal brush-border membrane isolated from pig, *Biochim. Biophys. Acta* 1063: 51–59
- Tanimura, T., Kitamura, K., Fukuda, T., Kikuchi, T., (1979), Purification and partial characterization of three forms of α -glucosidase from the fruit fly (*Drosophila melanogaster*), *J. Biochem.* 85: 123–130

- Tauber, C.A., Tauber, M.J., (1992), Phenotypic plasticity in *Chrysoperla*: genetic variation in the sensory mechanism and correlation reproductive traits, *Evolution* 46: 1754–1773
- Tavares, M.G., Ceron, C.R., Azeredo-Oliveira, M.T.V., (1998), Tissue-specific expression of esterases in *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera), *Genet. Mol. Biol.* 21: 461–464
- Taylor, M., Simkiss, K., Greaves, G.N., (1986), Amorphous structure of intracellular mineral granules, *Biochem. Soc. Trans.* 14: 549–552
- Templeton, A.R., (1995), Biodiversity at the molecular level: experiences from disparate macroorganisms, Ed: Hawksworth, D.L., In: *Biodiversity: Measurement and Estimation*, Chapman and Hall, New York, 59–64
- Terra, W.R., (1990), Evolution of digestive systems of insects, *Ann. Rev. Entomol.* 35: 181–200
- Terra, W.R., Ferreira, C., (1994), Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function, *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 1–62
- Terra, W.R., Ferreira, C., Jordao, B.P., Dillon, R.J., (1996), Digestive enzymes, Eds: Lehane, M.J. & Billingsley, P.F., In: *Biology of insect midgut*, Chapman & Hall, 153–186,
- Terra, W.R., (2001), The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47: 47–61
- Their, R., Bonacker, D., Stoiber, T., Bohm, K.J., Wang, M., Unger, E., Bolt, H.M., Degen, G., (2003), Interactions of metal salts with cytoskeletal motor protein systems, *Toxicol. Lett.* 140–141: 75–81
- Toba, G., Aigaki, T., (2000), Disruption of the microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*, *Gene* 253: 179–187
- Toung, Y.-P.S., Hsieh, T., Tu, C.-P.D., (1993), The glutathione S-transferase D genes: a divergently organized, intronless gene family in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.* 268: 9737–9746
- Tucić, N., Milošević, M., Gliksman, I., Milanović, D., Aleksić, I., (1991), The effects of larval density on genetic variation and covariation among life-history traits in the bean-weevil (*Acanthoscelides obtectus* Say), *Funct. Ecol.* 5: 525–534
- Turunen, S., Chippendale, G.M., (1977), Ventricular esterases: comparison of their distribution within the larval midgut of four species of Lepidoptera: *Ann. Ent. Soc. Am.* 70: 146–149
- Uma-Devi, V., Prabhakara-Rao, Y., 1989. Heavy metal toxicity to fiddler crabs, *Uca annulipes* (Latreille) and *Uca triangularis* (Milne Edwards): respiration on exposure to copper, mercury, cadmium and zinc. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 165–172.
- Valaitis, A.P., (1995), Gypsy moth midgut proteinases: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and brush border membrane leucine aminopeptidase, *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25: 139–149

- Valle, B.L., Ulmer, D.D., (1972), Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead, *Annu. Rev. Biochem.* 41: 91–128
- Valles, S.M., Strong, C. A., (2001), A microsomal esterase involved in cypermethrin resistance in the german cockroach, *Blattella germanica*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 71: 56–67
- Van Capelleveen, H.E., Van Straalen, N.M., Van Der Berg, M., Van Wachem, E., (1986), Avoidance as a mechanism of tolerance for lead in terrestrial arthropods, Ed: Veldhuis, H.W.H., In: *Proceedings of the third European Congress of Entomology, Amsterdam*, 251–254
- Van Ooik, T., Rantala, M. J., Saloniemi, I., (2007), Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*, *Environ. Pollut.* 145: 348–354
- Van Straalen, N.M., Schobben, J.H.M., De Goede, R.G.M., (1989), Population consequences of cadmium toxicity in soil microarthropods, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17: 190–204
- Van Straalen, N.M., Donker, M.H., (1994), Heavy metal adaptation in terrestrial arthropods – Physiological and genetic aspects, Eds: Sommeijer, M.J. & Van der Blom, J., In: *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (N. E. V.)*, Netherlands Entomological Society, Amsterdam, 3–17
- Via, S., Lande, R., (1985), Genotype–environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity, *Evolution* 39: 505–522
- Via, S., Lande, R., (1987), Evolution of genetic variability in a spatially heterogeneous environment: effects of genotype–environment interaction, *Genet. Res.* 49: 147–156
- Via, S., Gomulkiewicz, R., de Jong, G, Scheiner, S.M., Schlichting, C.D., Van Tienderen, P.H., (1995), Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy, *Trends Ecol. Evol.* 10: 212–217
- Viarengo, A., (1989), Heavy metal in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at cellular level, *Rev. Aquat. Sci.* 1: 259–317
- Vlahović, M., (2003), Uticaj kadmijuma na aktivnost fosfataza u srednjem crevu larvi gubara *Lymantria dispar*, Magistarski rad, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu
- Vlahović, M., Lazarević, J., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., (2008), Plastic response of larval mass and alkaline phosphatase to cadmium in the gypsy moth larvae, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, doi:10.1016/j.ecoenv.2008.03.012
- Voelker, R.A., Langley, C.H., (1978), Dipeptidase A: a polymorphic locus in *Drosophila melanogaster*, *Genetica* 49: 233–236
- Vutukuru, S.S., Suma, Ch., Radha Madhavi, K., Juveria, J., Smitha Pauleena, J., Venkateswara Rao, J., Anjaneyulu, Y., (2005), *Studies on the development of*

- potential biomarkers for rapid assessment of copper toxicity to freshwater fish using *Esomus danricus* as model, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2: 63–73
- Waalkes, M.P., Rehm, S., Riggs, C.W., Bare, R.M., Devor, D.E., Poirier, L.A., Wenk, M.L., (1989), Cadmium carcinogenesis in male Wistar [CrI:(WI)BR] rats: dose–response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the testes, and at the injection site, *Cancer Res.* 49: 4282–4288
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., (2003), Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology* 192: 95–117
- Walker, C.H., Oesch F., (1983), Enzymes in selective toxicity, Eds: Jakoby, W. & Caldwell, J., In: *Biological Basis of Detoxication*, London: Academic Press, 349–386
- Wang, L., Clark, A.G., (1995), Physiological genetics of the response to a high sucrose diet by *Drosophila melanogaster*, *Biochem. Genet.* 33: 149–164
- Warchalowska–Silwa, E., Maryanska–Nadachowska, A., (1991), Chromosome aberrations in a natural population of *Tetrix tenuicornis* (Sahlb.) (Tetrigidae: Orthoptera), *Folia Biol. (Krakow)* 39: 5–15
- Warchalowska–Silwa, E., Niklinska, M., Görlich, A., Michailova, P., Pyza, E., (2005) Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas, *Environ. Pollut.* 133: 373–381
- West–Eberhard, M.J., (2003), *Developmental plasticity and evolution*, Oxford University Press, New York
- White, T.C.R., (1993), *The inadequate environment: nitrogen and the abundance of animals*, Springer–Verlag, Berlin
- WHO, (1992a), *Environmental Health Criteria 134: Cadmium*. World Health Organization, Geneva
- WHO, (1992b), *Environmental Health Criteria 135: Cadmium—Environmental Aspects*. World Health Organization, Geneva
- Wijffels, G., Fitzgerald, C., Gough, J., Riding, G., Elvin, C., Kemp, D., Willadsen, P., (1996), Cloning and characterization of angiotensin–converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system, *Europ. J. Biochem.* 237: 414–423
- Wilczek, G., Migula, P., (1996), Metal body burdens and detoxifying enzymes in spiders from industrially polluted areas, *Fresenius J., Anal. Chem.* 354: 643–67
- Wilczek, G., Babczynska, A., Migula, P., Wencelis, B., (2003), Activity of esterases as biomarkers of metal exposure in spiders from metal pollution gradient, *Pol. J. Environ. Stud.* 12: 765–771
- Wilson, C.L., Shirras, A.D., Isaac, R.E., (2002), Extracellular peptidases of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*, *Peptides* 23: 2007–2014

Reference

- Wolfson, J.L., Murdock, L.L., (1990), Diversity in digestive proteinase activity among insects, *J. Chem. Ecol.* 16: 1089–1102
- Wood, E., Casabe, N., Melgar, F., Zerba, E., (1986), Distribution and properties of glutathione S-transferase from *Triatoma infestans*, *Comp. Biochem. Physiol.* 84B: 607–618
- Woods, R.J., (1981), Insecticide resistance: genes and mechanisms, Eds: Bishop, J.A., & Cook, L.M., In: *Genetic Consequences of man made changes*, Academic Press, London, UK, 53–96
- Wright, S., (1931), Evolution in Mendelian populations, *Genetics* 16:97–159
- Wright, R.J., Scharf, M.E., Meinke, L.J., Zhou, X., Siegfried, B.D., Chandler, L.D., (2000), Larval susceptibility of an insecticide-resistant western corn rootworm (*Coleoptera: Chrysomelidae*) population to soil insecticides: laboratory bioassays, assays of detoxification enzymes, and field performance, *J. Econ. Entomol.* 93: 7–13
- Wu, D.J., Hou, R.F., (1993), Relationship between thermotolerancy and heat-stable esterase in the silkworm *Bombyx mori* L. (*Lepidoptera: Bombycidae*), *Appl. Entomol. Zool.* 28: 371–377
- Wu, G.X., Ye, G.Y., Hu, C., Cheng, J.A., (2006), Accumulation of cadmium and its effects on growth, development and hemolymph biochemical compositions in *Boettcherisca peregrina* larvae (*Diptera: Sarcophagidae*), *Insect Sci.* 13: 31–39
- Xu, C., Holscher, M.A., Jones, M.M., Singh, P.K., (1995), Effect of monoisoamyl meso-2,3-dimercaptosuccinate on the pathology of acute cadmium intoxication, *J. Toxicol. Environ. Health* 45: 261–277
- Xu, G., D.L. Bull, (1994), Acetylcholinesterase from the horn fly (*Diptera: Muscidae*) II. Biochemical and molecular properties, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 27: 109–121
- Yan, J., Cheng, Q., Li, C.-B., Aksoy, S., (2002), Molecular characterization of three gut genes from *Glossina morsitans*: cathepsin B, zinc-metalloprotease and zinc-carboxypeptidase, *Ins. Mol. Biol.* 11: 57–65
- Yap, C.K., Tan, S.G., Ismail, A., Omar, H., (2004), Allozyme polymorphisms and heavy metal levels in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) collected from contaminated and uncontaminated sites in Malaysia, *Environ. Int.* 30: 39–46
- Zaman, K., MacGill, R.S., Johnson, J.E., Ahmad, S., Pardini, R.S., (1995), An insect model for assessing oxidative stress related to arsenic toxicity, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29: 199–209
- Zaroogian, G., Anderson, S., (1995), Comparison of cadmium, nickel and benzo(a)pyrene uptake into cultured brown cells of the hard shell clam, *Mercenaria mercenaria*, *Comp. Biochem. Physiol.* 111C: 109–116

Reference

- Zelenayora, E., (1986), *Scotia segetum* (Lepidoptera, Noctuidae) oogenesis affected by copper ions added to semisynthetic diet of larvae, *Biologia (Bratislava)* 41: 563-577
- Zhou, Z.H., Syvanen, M., (1997), A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*, *Mol. Gen. Genet.* 256: 187-194
- Zhu, K.Y., W.A. Brindley, (1990), Properties of esterases from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) and the roles of the esterases in insecticide resistance, *J. Econ. Entomol.* 83: 725-732



Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

Efekat kadmijuma na rast i biohemijske osobine larvi gubara (*Lymantria dispar* L.)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 20.3.2014.

Душан Милошевић

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

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

Efekat kadmijuma na rast i biohemijske osobine larvi gubara (*Lymantria dispar* L.)

која је моје ауторско дело.

Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

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 следећој страници.)

Потпис

Милена Милошевић

У Београду, 20.3.2014