

Edited by:

**Predrag Simonović, Vladica Simić,  
Snežana Simić and Momir Paunović**

---

Уредници:

**Предраг Симоновић, Владица Симић,  
Снежана Симић, Момир Пауновић**

---

# **The Danube in Serbia**

**THE RESULTS OF NATIONAL PROGRAM OF  
THE SECOND JOINT DANUBE SURVEY 2007**

# **Дунав кроз Србију**

**РЕЗУЛТАТИ НАЦИОНАЛНОГ ПРОГРАМА  
ДРУГОГ ЗАЈЕДНИЧКОГ ИСТРАЖИВАЊА  
РЕКЕ ДУНАВ 2007.**

---

**Belgrade/Београд, 2010.**

---

## Chapter 13    Поглавље 13

**SUPEROXIDE  
DISMUTASE AS RELEVANT  
OXIDATIVE STRESS  
BIOMARKER  
OF THE FRESHWATER  
BIVALVE  
*Unio tumidus*  
AT DIFFERENT LOCALITIES  
– THE SAVA RIVER  
CASE STUDY**

**СУПЕРОКСИД - ДИСМУТАЗА  
КАО РЕЛЕВАНТАН  
БИОМАРКЕР  
ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА  
КОД СЛАТКОВОДНЕ  
ШКОЉКЕ  
*Unio tumidus*  
НА РАЗЛИЧИТИМ  
ЛОКАЛИТЕТИМА  
– ПРИМЕР ИСТРАЖИВАЊА  
РЕКЕ САВЕ**

Slavica BORKOVIĆ MITIĆ, Tijana RADOVANOVIĆ, Branka PERENDIJA, Svetlana DESPOTOVIĆ, Slađan PAVLOVIĆ, Zorica SAIČIĆ

Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, 142 Despota Stefana Blvd, 11000 Belgrade, Serbia

Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, Булевар деспота Стефана 142, 11000 Београд, Србија

*Abstract* – The activity of superoxide dismutase (SOD), total protein as well as protein and SOD electrophoretic profiles in the digestive gland and the gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* at four localities of the River Sava (Jamena, Sremska Mitrovica, Šabac and Ostružnica) was examined. The specific SOD activity in the digestive gland of the *U. tumidus* was significantly higher in Jamena in respect to Šabac and Ostružnica. The different trend was obtained for the total SOD activity in the digestive gland, which was significantly increased in Sremska Mitrovica compared to investigated localities Šabac and Ostružnica. The total SOD activity in the digestive gland was also significantly higher in Jamena compared to Šabac, as well as in Šabac in respect to Ostružnica. The activity of

*Сажетак* – У нашој студији истраживали смо активност супероксид-дисмутазе (SOD), укупне протеине као и електрофоретски профил протеина и SOD у дигестивној жлезди и шкргама слатководне шкољке *Unio tumidus* на четири локалитета на реци Сави (Јамена, Сремска Митровица, Шабац и Остружница). Специфична активност SOD у дигестивној жлезди шкољке *Unio tumidus* је била значајно већа у Јамени у поређењу са Шапцем и Остружницом. Различит тренд укупне активности SOD је добијен у дигестивној жлезди, где је значајно повећање у Сремској Митровици у поређењу са истраживаним локалитетима Шабац и Остружница. Укупна активност SOD у дигестивној жлезди је такође, значајно већа у Јамени у поређењу са Шапцем, као и у Шапцу у поређењу са Остружницом. Укупна активност



total SOD in the gills of *U. tumidus* was significantly higher in Sremska Mitrovica in respect to Jamena and Šabac. The results obtained in our study show strong tissue and locality specificities, indicating different metabolic activities and various environmental influences. Our work also suggests, that the variations of SOD expression pattern in *Unio tumidus* could be used as a tool for the environment monitoring. Our study represents the first comprehensive report on SOD as a relevant oxidative stress biomarker in the freshwater bivalve *Unio tumidus* at different localities from the Sava River and provide the basis for future studies that will consider our reported parameters as potential biomarkers for biomonitoring of basal environmental conditions and some anthropogenic impacts.

## INTRODUCTION

Antioxidant enzymes play a crucial role in maintaining cell homeostasis. Antioxidant defence system (ADS) may be induced after exposure to pollutants and this response reflects the adaptation of species to their environment. ADS may also be inhibited, which may lead to antioxidant-mediated toxicities (Winston and Di Giulio, 1991; Doyotte et al., 1997).

ADS protect cells against the deleterious effects of oxyradical generation by maintaining endogenous reactive oxygen species (ROS) at relatively low levels and attenuating the damages related to their high reactivity. A range of antioxidant defence mechanisms are present in bivalve molluscs, including low molecular weight compounds (Vitamin E, ascorbic acid, reduced glutathione, etc.) and specially adapted enzymes (Winston and Di Giulio, 1991). Among these enzymes, the superoxide dismutases (SOD; EC 1.15.1.1) are oxido-reductases, which catalyze the dismutation of the superoxide anion radicals into molecular oxygen and hydrogen peroxide (Fridovich, 1989).

SOD у шкргама код *U. tumidus* је значајно већа у Сремској Митровици у поређењу са Јаменом и Шапцем. Добијени резултати у нашој студији показују велику специфичност у односу на ткиво и локалитет, указујући на различите метаболичке активности и разноврстан утицај средине. Наш рад такође, указује да варијације експресије SOD узорка код *U. tumidus* могу бити коришћене за биомониторинг средине. Наша студија представља први обиман извештај о активности супероксид-дисмутазе као релевантном биомаркеру оксидационог стреса код слатководне шкољке *Unio tumidus* на различитим локалитетима на реци Сави и обезбеђује основу за будућа проучавања која ће узети у обзир наше параметре као потенцијалне биомаркере за биомониторинг основних срединских услова и неких антропогених утицаја.

## УВОД

Антиоксидациони ензими имају важну улогу у одржавању ћелијске хомеостазе. Антиоксидациони заштитни систем (ADS) може бити индукван после излагања загађивачима и овај одговор огледа се у адаптацији јединки на различите услове средине. Овај систем може бити инхибиран, што доводи до антиоксидационо-узроковане токсичности (Winston и Di Giulio, 1991; Doyotte и сар., 1997).

ADS штити ћелије од штетних ефеката приликом стварања радикала кисеоника одржавајући ендogene реактивне врсте кисеоника (ROS) на релативно ниском нивоу и смањујући оштећења узрокована њиховом високом реактивношћу. Различити механизми антиоксидационе одбране су присутни код шкољки, укључујући и ниско молекулске компоненте (витамин Е, аскорбинска киселина, редуковани глутатион итд.) и специјално адаптиране ензиме (Winston и Di Giulio, 1991). Међу овим ензимима су супероксид-дисмутазе (SOD; EC 1.15.1.1), које су у основи оксидо-редуктазе и катализују дисмутацију супероксид анјон радикала

The antioxidative defence enzymes and non enzymatic components of ADS have been proposed as biomarkers of contaminant mediated oxidative stress in a variety of marine and freshwater organisms (Saičić et al., 1993; Žikić et al., 1996; Žikić et al., 1997; Žikić et al., 2001; Borković et al., 2005; Kovačević et al., 2006; Šaponjić et al., 2006; Žikić et al., 2006; Despotović et al., 2007; Borković et al., 2008; Kovačević et al., 2008). Our previous reports have also considered antioxidant enzymes as biomarkers for oxidative stress in marine fish (Pavlović et al., 2004; Ognjanović et al., 2008; Pavlović et al., 2008) and freshwater mussels (Perendija et al., 2007 a,b).

SOD is very important enzyme of ADS in the freshwater organisms. Many studies have shown positive correlations between levels of ADS and the influence of environmental conditions (Orbea et al., 2002).

Freshwater mussels are an ecologically important fauna because they are used as sensitive biomarkers of aquatic ecosystems pollution. Bivalves, such as *Unio tumidus* (Cossu et al., 1997) are stationary, filter-feeding organisms able to bioaccumulate and concentrate most pollutants even if they are present in fairly low concentrations (Niyogi et al., 2001). Mussels have a number of characteristics, which make them useful bioindicators of pollution: they have a wide geographical distribution, are easy to collect and are abundant in bank regions of the large "potamon type" rivers which are submitted to high contamination levels.

Mussels are also capable to bioconcentrate xenobiotics to many thousand times the biotope background. They are sessile species, which is particularly desirable with bioindicators since they are likely to reflect changes in pollution status of the environment from which they have been sampled (Phillips and Rainbow, 1989; Manduzio et al., 2004).

The aim of our study was to determine and compare the physiological

у молекуларни кисеоник и водоник-пероксид (Fridovich, 1989).

Антиоксидациони заштитни ензими и неензимске компоненте ADS су предложене за биомаркере оксидационог стреса узрокованог загађењем и испитивани су код различитих морских и слатководних организама (Saičić и сар., 1993; Žikić и сар., 1996; Žikić и сар., 1997; Žikić и сар., 2001; Borković и сар., 2005; Kovačević и сар., 2006; Šaponjić и сар., 2006; Žikić и сар., 2006; Despotović и сар., 2007; Borković и сар., 2008; Kovačević и сар., 2008). Наши предходни радови су такође, разматрали антиоксидационе ензиме као биомаркере оксидационог стреса код морских риба (Pavlović et al., 2004; Ognjanović et al., 2008; Pavlović et al., 2008) и слатководних шкољки (Perendija et al., 2007 a, b).

SOD је веома важан ензим ADS код слатководних организама. Многе студије показују позитивну корелацију између нивоа антиоксидационе одбране и утицаја срединских услова (Orbea и сар., 2002).

Слатководне шкољке су еколошки важна фауна, зато што се користе као осетљиви биомаркери загађења водених екосистема. Шкољке, као што је *Unio tumidus* (Cossu и сар., 1997) су стационарне, хране се филтрирањем и способне су да акумулирају и коцентришу већину загађивача чак и ако су присутни у прилично ниским концентрацијама (Niyogi и сар., 2001). Шкољке имају бројне карактеристике које их чине корисним биоиндикаторима загађења: имају широку географску дистрибуцију, лако се сакупљају и веома су заступљене у обалским регионима великих река „потамон типа“ које су изложене високом нивоима загађења.

Шкољке су такође у стању да коцентришу ксенобиотике до више хиљада пута већој концентрацији у односу на биотоп који насељавају. Сесилне су врсте што је нарочито пожељно за биоиндикаторе и тим пре, су погодне да одражавају промене у статусу загађења средине из које су сакупљене (Phillips и Rainbow, 1989; Manduzio и сар., 2004).

Циљ наше студије је одређивање и поређење физиолошког одговора супе-



responses of superoxide dismutase (activity, total protein concentration, as well as protein and SOD electrophoretic profiles) in freshwater bivalve *Unio tumidus* in the digestive gland and gills from the River Sava, at four localities that are characterized by different environmental conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Locality description and sample collection

The study is based on the material collected in August of 2006 and 2007. The research was carried out at four sampling localities along the banks of the main channel, covering 188 rkm of Serbian stretch of the Sava River (Figure 13.1).

In the case of molluscs collected by diving, their abundance was evaluated by collecting and counting individuals within randomly selected square areas of 0.5 m<sup>2</sup>. The

роксид-дисмутазе (активност, концентрација укупних протеина као и протеински и SOD електрофоретски профили) код слатководне шкољке *Unio tumidus* у дигестивној жлезди и шкргама из реке Саве, са четири локалитета које карактеришу различити средински услови.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### Опис локалитета и сакупљање узорака

Студија је заснована на материјалу сакупљеном у августу 2006. и 2007. године. Истраживање је спроведено на четири локалитета дуж обале главног канала, обухватајући 188 гкм српског дела реке Саве (слика 13.1).

У случају прикупљања шкољки роњењем, њихова заступљеност је процењена прикупљањем и бројањем индивидуа унутар случајно одабране површине од 0.5 m<sup>2</sup>. Ронилац је сакупио све узорке из изабраног квадранта и пренео их на



Figure 13.1. Sampling localities: (1) Jamena, (2) Sremska Mitrovica, (3) Šabac and (4) Ostružnica.

Слика 13.1. Локалитети узорковања: (1) Јамена, (2) Сремска Митровица, (3) Шабац и Остружница.

diver sampled all specimens from a chosen quadrant and removed them to the shore for identification (Paunović et al., 2008).

The coordinates of sampling localities were measured by GPS (“Garmin Etrex”) and charted using ArcView software (map 1:300,000, system WGS\_1984).

Specimens of freshwater mussels *Unio tumidus*, (n=40, 10 from each locality) were collected at four localities of the River Sava: Jamena (44°52'41.6" N and 19°05'21.0" E), Sremska Mitrovica (44°57'55.4" N and 19°36'01.4" E), Šabac (44°46'17.2" N and 19°42'16.1" E) and Ostružnica (44°43'19.5" N and 20°18'15.5" E). All specimens were sexually mature with the average shell length about 6.87 cm (Figure 13.2). After collection, the tissue samples (digestive gland and gills) were immediately dissected on ice and then frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C.

обалу због идентификације (Paunović и сар., 2008).

Координате локалитета су одређене уз помоћ GPS (“Garmin Etrex”) и нацртане ArcView софтвером (мапа 1:300,000, систем WGS\_1984).

Узорци слатководних шкољки *Unio tumidus*, (n=40, 10 са сваког локалитета) су сакупљени на четири локалитета на реци Сави: Јамена (44°52'41.6" N и 19°05'21.0" E), Сремска Митровица (44°57'55.4" N и 19°36'01.4" E), Шабац (44°46'17.2" N и 19°42'16.1" E) и Остружница (44°43'19.5" N и 20°18'15.5" E). Сви узорци су били полно зрели и просечна дужина љуштуре им је била око 6.87 cm (слика 13.2). Након сакупљања узорци ткива (дигестивна жлезда и шкрге) су одмах дисековани на леду и затим залеђени у течном азоту пре смештања на -80°C.



Figure 13.2. Freshwater bivalve *Unio tumidus*.

Слика 13.2. Слатководна шкољка *Unio tumidus*.

### Tissue processing

The tissues were minced and homogenized in 5 volumes (Lionetto et al., 2003) of 25 mmol/L sucrose containing 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5 at 4°C using an IKA-Werk Ultra-Turrax homogenizer (Janke and Kunkel, Staufen, Germany) (Rossi et al., 1983). The homogenates were sonicated for 30 s at 10 kHz on ice to release enzymes (Takada et al., 1982) and then were centrifuged

### Обрада ткива

Ткиво је уситњено и хомогенизовано у односу 1:5 (Lionetto и сар., 2003) у 25 mmol/L сахарози са 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5 на 4°C коришћењем IKA-Werk Ultra-Turrax хомогенизера (Janke and Kunkel, Staufen, Germany), (Rossi и сар., 1983). Хомогенати су сонификовани 30 секунди на 10 kHz на леду да би се ослободили ензими (Takada и сар., 1982) и затим центрифугирани у Beckman ултра-



in a Beckman ultracentrifuge (90 min, 85000 x g, 4°C). The resulting supernatants were used for further biochemical analyses.

### Biochemical analyses

The activity of superoxide dismutase (SOD) was measured in triplicate for each mussel using a Shimadzu UV-160 spectrophotometer and a temperature controlled cuvette holder.

SOD activity was assayed by the epinephrine method (Misra and Fridovich, 1972). One unit of SOD activity was defined as the amount of protein causing 50% inhibition of the autoxidation of adrenaline at 26°C (Petrović et al., 1982).

The activity of SOD was expressed as specific (U/mg of protein) and as total (U/g wet mass) as described previously by De Quiroga et al. (1988).

Total protein concentration was determined according to the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as a reference and expressed in mg/g wet mass.

Protein electrophoretic profiles were examined by the standard method of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). SOD electrophoretic profiles were examined using NBT by the method of Mavelli et al., (1984).

All chemicals were products of Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

### Statistical analyses

All presented data (total protein concentration and both specific and total SOD activity) are expressed as mean  $\pm$  Standard Error (S.E.). The non-parametric Mann-Whitney U-test was used to seek significant differences in the digestive gland and gills between specimens of *Unio tumidus* from the different localities of the Sava river. A minimum significance level of  $p < 0.05$  was

центрифуги (90 мин, 85000 x g, 4°C). Добијени супернатанти су коришћени за даље биохемијске анализе.

### Биохемијске анализе

Активност супероксид-дисмутаза (SOD) је мерена у трипликату за сваку шкољку на спектрофотометру Shimadzu UV-160 у кивети са контролисаном температуром.

SOD активност је анализирана епинефринском методом (Misra and Fridovich, 1972). Јединица активности SOD се дефинише као количина протеина који изазивају 50% инхибиције аутооксидације адреналина на 26°C (Petrović и сар., 1982).

Активност SOD је изражена као специфична активност (јединица/mg протеина) и као укупна (јединица /g влажне масе), (De Quiroga и сар., 1988).

Концентрација укупних протеина је одређивана према методи Lowry и сар., (1951) коришћењем говеђег серум албумина као референтне вредности.

Електрофоретски профили протеина су испитивани стандардном методом коришћењем натријум додецил сулфата полиакриламидном гел електрофорезом (SDS-PAGE), (Laemmli, 1970). Електрофоретски профил SOD активности је испитиван коришћењем NBT методе (Mavelli и сар., 1984).

Све коришћене хемикалије су произведене у компанији Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

### Статистичке анализе

Сви добијени подаци (концентрација укупних протеина, као и специфична и укупна активност SOD) су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. Не параметарски Mann-Whitney U-test је коришћен за одређивање значајних разлика између средњих вредности података у дигестивној жлезди и шкргама шкољки са различитих локалитета реке Саве. Минимални прихватљиви ниво зна-

accepted. Analytical protocols described by Darlington et al., (1973) and Dinneen and Blakesley (1973) were followed.

чајности је  $p < 0.05$ . Коришћен је аналитички протокол Darlington и сар., (1973) и Dinneen и Blakesley (1973).

## RESULTS

The results of measured physico-chemical parameters at four localities are presented in Table 13.1.

## РЕЗУЛТАТИ

Резултати мерених физичко-хемијских параметара са четири локалитета су приказани у табели 13.1.

Table 13.1. Sampling localities: (1) Jamena, (2) Sremska Mitrovica, (3) Šabac and (4) Ostružnica.

Табела 13.1. Локалитети узорковања: (1) Јамена, (2) Сремска Митровица, (3) Шабац и (4) Остружница.

Site/Локалитет	Jamena	Sremska Mitrovica	Šabac	Ostružnica
Temperature (°C)	22.21	22.78	22.76	24.30
pH	8.1	8.5	8.5	8.3
Dissolved O <sub>2</sub> (mg/L)	5.98	7.46	7.13	6.56
Saturation (%)	66.0	82.5	75.9	73.9

Total protein concentration in the digestive gland and gills of the freshwater mussel *Unio tumidus* is shown in Table 13.2. The obtained results in the digestive gland demonstrate significantly higher total protein concentration in Jamena compared to Sremska Mitrovica ( $p < 0.05$ ) and Ostružnica ( $p < 0.05$ ), as well as in Sremska Mitrovica in respect to Šabac ( $p < 0.05$ ) and Ostružnica ( $p < 0.05$ ) and also in Šabac compared to Ostružnica ( $p < 0.05$ ). When total protein concentration in the digestive gland and gills was compared, we obtained significant differences at three localities: Jamena, Sremska Mitrovica and Šabac ( $p < 0.05$ ).

The specific SOD activity in the digestive gland of the *U. tumidus* was significantly higher in Jamena in respect to Šabac and Ostružnica ( $p < 0.05$ ), (Figure 13.3A).

The total SOD activity in the digestive gland of *U. tumidus* was significantly higher in Jamena compared to Šabac ( $p < 0.05$ ), in Sremska Mitrovica in respect to Šabac and Ostružnica ( $p < 0.05$ )

Концентрација укупних протеина у дигестивној жлезди и шкргама слатководне шкољке *Unio tumidus* представљена је у табели 13.2. Добијени резултати у дигестивној жлезди показују значајно веће концентрације укупних протеина у Јамени у поређењу са Сремском Митровицом ( $p < 0.05$ ) и Остружницом ( $p < 0.05$ ), затим у Сремској Митровици у односу на Шабац ( $p < 0.05$ ) и Остружницу ( $p < 0.05$ ), а такође и у Шапцу у поређењу са Остружницом ( $p < 0.05$ ). Када упоредимо концентрацију укупних протеина у дигестивној жлезди и шкргама, значајне разлике добијамо на три локалитета: Јамена, Сремска Митровица и Шабац ( $p < 0.05$ ).

Специфична активност SOD у дигестивној жлезди *U. tumidus* је значајно већа у Јамени у поређењу са Шапцем и Остружницом ( $p < 0.05$ ), (слика 13.3A).

Укупна SOD активност у дигестивној жлезди *U. tumidus* је значајно већа у Јамени у поређењу са Шапцем ( $p < 0.05$ ), у Сремској Митровици у односу на Шабац и Остружницу ( $p < 0.05$ ), а такође у



Table 13.2. Total protein concentration (mg/g wet mass) in the digestive gland and gills of the freshwater mussel *Unio tumidus* at four localities.Табела 13.2. Концентрација укупних протеина (mg/g влажне масе) у дигестивној жлезди и шкргама слатководне шкољке *Unio tumidus* на четири локалитета.

Total protein concentration (mg/g wet mass)/укупна концентрација протеина				
	Jamena	Sremska Mitrovica	Šabac	Ostružnica
Digestive gland/ дигестивна жлезда	23.41 ± 0.70	29.99 ± 1.47	23.99 ± 1.06	20.74 ± 0.67
Gills/шкрге	20.29 ± 1.44	20.99 ± 1.42	18.15 ± 0.87	19.18 ± 0.79

and also in Šabac compared to Ostružnica ( $p < 0.05$ ), (Figure 13.3B).

In the gills of *U. tumidus*, the total SOD activity was significantly higher in Jamena compared to Sremska Mitrovica ( $p < 0.05$ ) and in Sremska Mitrovica in respect to Šabac ( $p < 0.05$ ), (Figure 13.4B).

Electrophoretic analysis of proteins show specificities between the freshwater mussel *U. tumidus* at four investigated localities from the River Sava (Figure 13.5 A,B).

SOD activity was analysed directly on gels after native electrophoresis, using the NBT method (Figure 13.6 A,B). We obtained two major bands for SOD isoforms (SOD-1 and SOD-2) for both tissues and all localities, and SOD-3 isoform in digestive gland in Jamena and Šabac and gills in Jamena.

## DISCUSSION

High levels of ROS induced by such environmental stressors can lead to severe cellular injury or death (Storz and Imlay, 1999). Therefore, the induction of antioxidant defence enzymes like SOD is an important protective mechanism to minimize cell oxidation in the organisms that live in polluted environments.

A difference in tissue expression was reported between the digestive glands and gills with a generally higher activity of

Шапцу када га упоредимо са Остружницом ( $p < 0.05$ ), (слика 13.3B).

У шкргама *U. tumidus* укупна активност SOD је значајно већа у Јамени у поређењу са Сремском Митровицом ( $p < 0.05$ ) и у Сремској Митровици у односу на Шабац ( $p < 0.05$ ) (слика 13.4B).

Електрофоретска анализа протеина показује специфичности поређењем слатководне шкољке *U. tumidus* на четири истраживана локалитета на реци Сави (слика 13.5 A,B).

SOD активност је анализирана директно на гелу после нативне електрофорезе коришћењем NBT методе (слика 13.6 A,B). Добијене су две главне траке SOD, назване SOD-1 и SOD-2, као и трећа трака SOD-3 и то у дигестивној жлезди јединки из Јамене и Шапца и шкргама јединки из Јамене.

## ДИСКУСИЈА

Висок ниво реактивних врста кисеоника индукованих неким срединским стресором може довести до ћелијских оштећења или до смрти (Storz и Imlay, 1999). Зато је индукција антиоксидационих заштитних ензима, као што је супероксид-дисмутаза значајан заштитни механизам који смањује ћелијску оксидацију у организмима који живе у загађеним срединама.

Разлике у ткивној експресији између дигестивне жлезде и шкрга су ко-

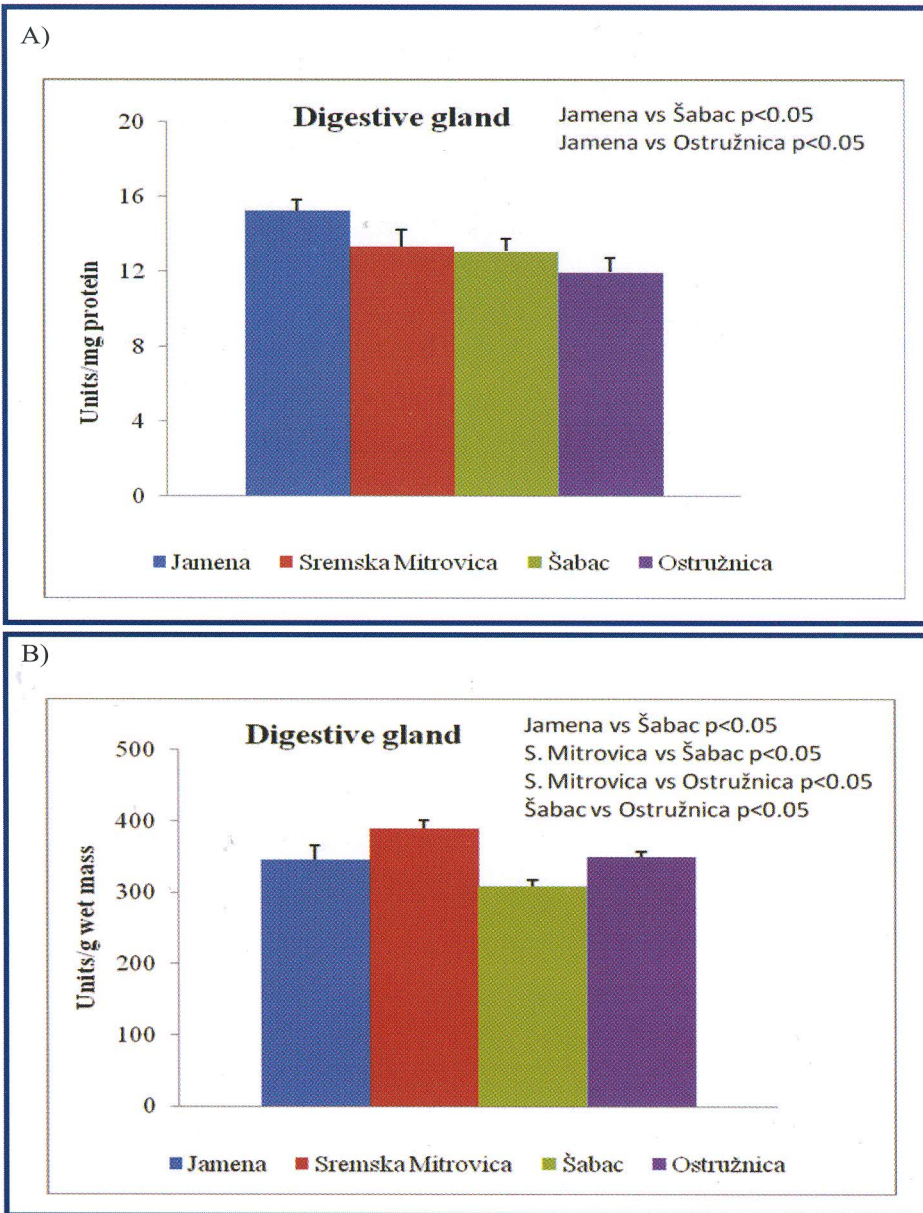


Figure 13.3 (A,B). Specific (A), (Units/mg protein) and total (B), (Units/g wet mass) activities of superoxide dismutase (SOD) in the digestive gland of freshwater bivalve *Unio tumidus* from the River Sava. The data are expressed as mean  $\pm$  S.E. The non-parametric Mann-Whitney U-test was used to seek significant differences between means. A minimum significance level of  $p < 0.05$  was accepted.

Слика 13.3 (A,B). Специфична (A), (Јединице/mg протеина) и укупна (B), (Јединице /g влажне масе) активност супероксид-дисмутазе (SOD) у дигестивној жлезди слатководне шкољке *Unio tumidus* из реке Саве. Вредности су представљене као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. Не параметарски Mann-Whitney U-test је коришћен за одређивање значајних разлика између средњих вредности.

Минимални прихватљиви ниво значајности је  $p < 0.05$ .



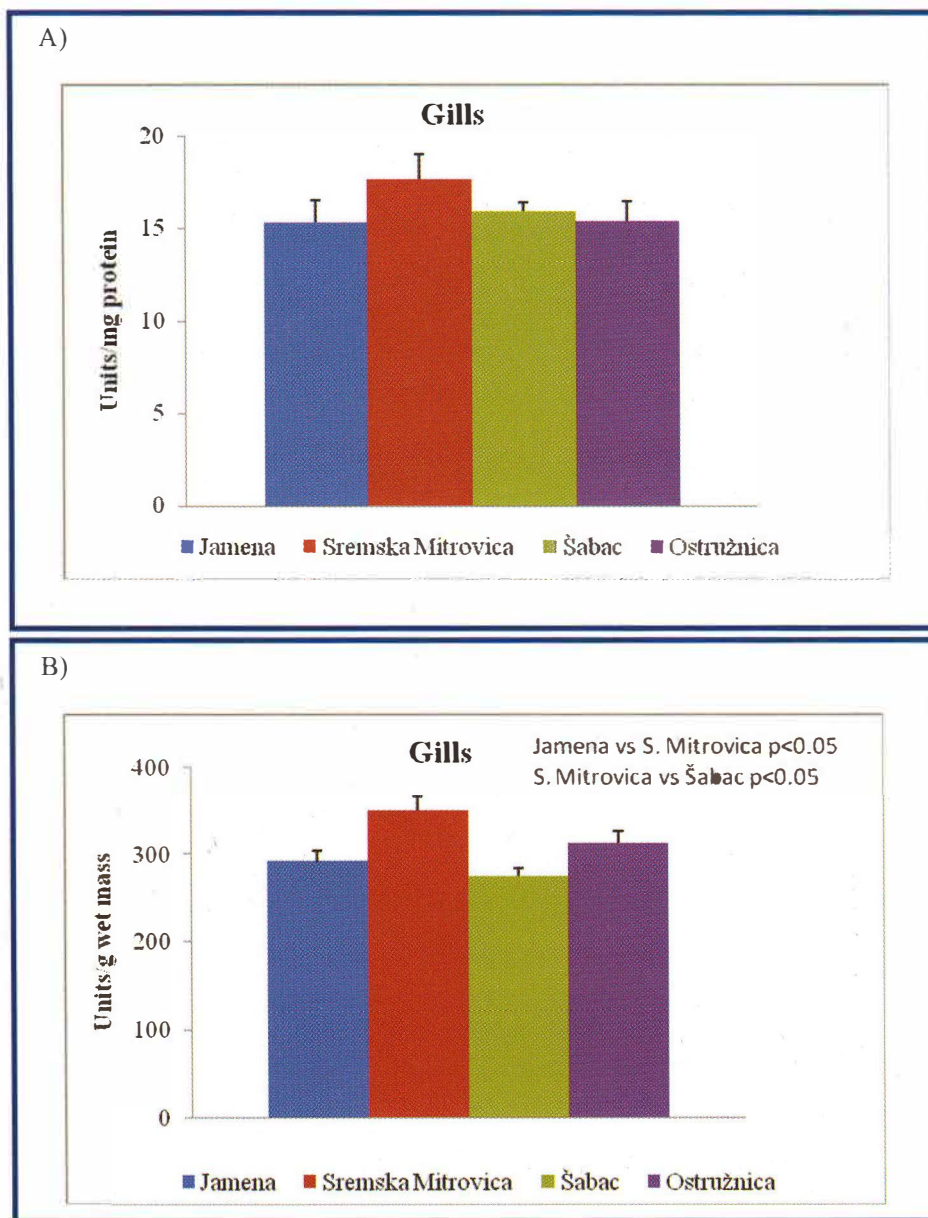


Figure 13.4. (A,B). Specific (A), (Units/mg protein) and total (B), (Units/g wet mass) activities of superoxide dismutase (SOD) in the gills of freshwater bivalve *Unio tumidus* from the River Sava. The data are expressed as mean  $\pm$  S.E. The non-parametric Mann-Whitney U-test was used to seek significant differences between means. A minimum significance level of  $p < 0.05$  was accepted.

Слика 13.4. (A,B). Специфична (A), (Јединице/mg протеина) и укупна (B), (Јединице /g влажне масе) активност супероксид-дисмутазе (SOD) у шкргама слатководне шкољке *Unio tumidus* из реке Саве. Вредности су представљене као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка. Не параметарски Mann-Whitney U-тест је коришћен за одређивање значајних разлика између средњих вредности. Минимални прихватљиви ниво значајности је  $p < 0.05$ .

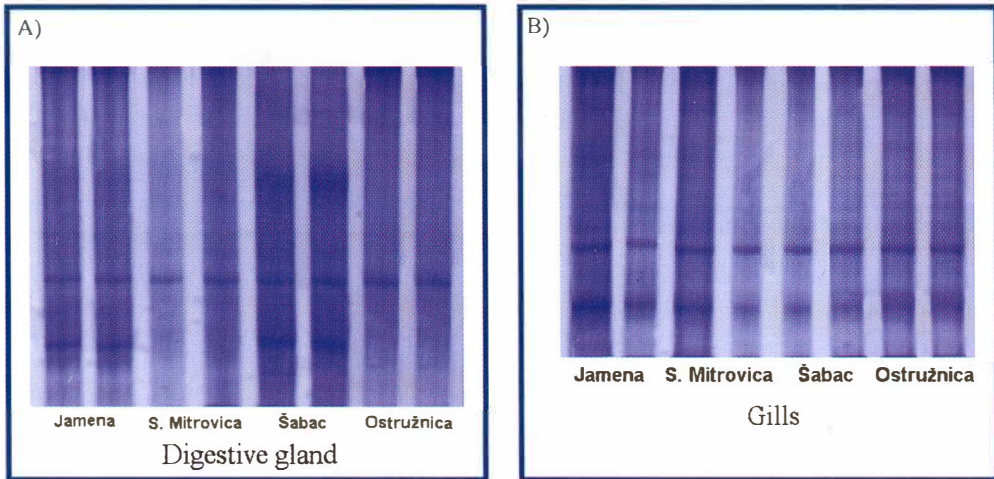


Figure 13.5 (A,B). SDS-PAGE analysis of proteins in the digestive gland (A) and gills (B) of freshwater bivalve *Unio tumidus*. Two samples at each investigated locality were analysed.

Слика 13.5 (A,B). SDS-PAGE анализа протеина у дигестивној жлезди (A) и шкргама (B) слатководне шкољке *Unio tumidus*. Анализирана су по два узорка за сваки истраживани локалитет.

SOD in digestive gland. Moreover, although the digestive gland is of special interest because this tissue is involved in most biotransformation processes and redox-cycling generation, it showed high fluctuations of activity levels between samplings, thus rendering interpretation of the results uneasy, unlike those obtained with the gills.

нстатоване, са генерално већом SOD активношћу у дигестивној жлезди. Осим тога, дигестивна жлезда је од нарочитог значаја јер ово ткиво учествује у већини биотрансформационих процеса и редокс циклус генерације, показује велико варирање нивоа активности између узорковања па чини тежом интерпретацију резултата, за разлику од резултата добијених у шкргама.

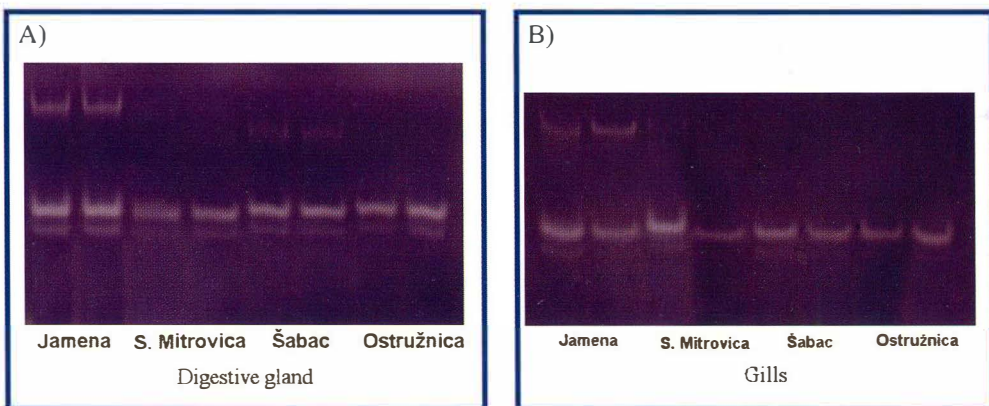


Figure 13.6 (A,B). Superoxide dismutase (SOD) electroforesis using the NBT method. Two samples at each investigated locality were analysed.

Слика 13.6 (A,B). Електрофореза супероксид-дисмутазе (SOD) добијена NBT методом. Анализирана су по два узорка за сваки истраживани локалитет.



Changes in temperature and food availability induce oxygen consumption and cellular oxyradical generation, which are compensated by increasing antioxidant defence.

The differences in the protein concentration in the investigated tissues could be a consequence of various external influences, such as different food availability or the different degree of pollution at the investigated localities. Furthermore, the differences between the total protein concentrations in the investigated tissues and the analysis of protein electrophoretic profiles show strong tissue and locality specificities. The differences between investigated localities can be the consequence of different degree of pollution.

Electrophoresis in native conditions associated with NBT photochemical revelation allowed simultaneous characterization of SOD isoforms. Using this technique, we detected three SOD isoforms in the digestive gland and in the gills of *Unio tumidus*. Manduzio et al. (2003) reported that two major bands, named SOD-1 and SOD-2, were obtained at pI 4.7 and pI 4.6, respectively. The third band at pI 4.55, named SOD-3, was not systematically visualized in tissue extracts from mussels collected at the reference site, but always with very weak intensity (<10% of the total SOD activity) compared to the two others. In contrast, SOD-3 was always present and pronouncedly expressed in the digestive gland of mussels taken at the polluted site (20-40% of the total SOD activity). We also obtained the third band of electrophoretic profiles of SOD, named SOD-3, in the digestive gland of mussels taken at localities Jamena and Šabac and the gills at Jamena. According to the results of Manduzio et al. (2003), it can be concluded that SOD-3 isoform is connected with more polluted sites of Jamena and Šabac. Our results suggest that the variations

Температура и расположивост хране индукује потрошњу кисеоника и стварање хелијских радикала кисеоника, што се надокнађује порастом антиоксидационе одбране.

Разлике у концентрацији протеина између испитиваних ткива могу бити последица различитих спољашњих утицаја, као што је различита расположивост хране или различит степен загађености на испитиваним локалитетима. Осим тога, разлике у концентрацији укупних протеина у испитиваним ткивима, као и електрофоретска анализа протеина показују велику специфичност у односу на ткиво и локалитет. Ове разлике између испитиваних локалитета могу бити последица различитог степена загађења на испитиваним локалитетима.

Нативна електрофореза са НБТ фотохемијском детекцијом, омогућава истовремену карактеризацију SOD изоформи. Коришћењем ове технике, открили смо три SOD изоформе у дигестивној жлезди и шкргама *Unio tumidus*. Manduzio и сар., (2003) су детектовали, две најважније траке, назване SOD-1 и SOD-2, које су добијене на pI 4.7 и pI 4.6. Трећа трака, добијена на pI 4.55, названа SOD-3, није увек видљива у екстракту ткива шкољки сакупљених на референтном месту и слабог је интензитета (мање од 10% од укупне SOD активности) у поређењу са друге две траке. Насупрот томе, SOD-3 је увек присутна и веома изражена у дигестивној жлезди шкољки узетих са загађених локалитета (20-40% од укупне SOD активности). Ми смо такође, добили трећу траку на електрофоретском профилу SOD, названу SOD-3, у дигестивној жлезди шкољки са локалитета Јамена и Шабац и шкргама са локалитета Јамена. На основу података које су добили Manduzio и сар., (2003), можемо закључити да је SOD-3 изоформа коју смо детектовали повезана са загађењем и да на локалитетима Јамена и Шабац постоји већи степен загађења у односу на друге испитиване локалитете. Наши резултати указују да се

of SOD expression pattern in *Unio tumidus* could be used as a tool for the environment monitoring.

варијације у експресионом обрасцу SOD код *Unio tumidus* могу користити за средински мониторинг.

## CONCLUSIONS

Our study represents the first comprehensive report of SOD as a relevant oxidative stress biomarker of the freshwater bivalve *Unio tumidus* at different localities from the Sava River and provides the basis for future studies that will consider our reported parameters as potential biomarkers for biomonitoring of basal environmental conditions and some anthropogenic impacts. The observed parameters are effective in routine environmental monitoring, especially SOD-3 isoform obtained in animals from Jamena and Šabac. Further investigation is needed in order to define the link between the specific pollutants/groups of pollutants and a particular biomarker. As the molluscs represents one of the principal components of the community in large lowland rivers in the region, such as the Sava, the Danube, the Velika Morava and the Tisa, the methodology presented here is especially applicable in routine monitoring of these ecosystems.

*Acknowledgments* – This study was supported by the Ministry of Science and Technological Development of Republic of Serbia, Grant No. 143035B. The authors are thankful to MSc Radmila Paunović Štajn for proofreading the manuscript.

## ЗАКЉУЧАК

Наша студија представља први обиман извештај о активности супероксид-дисмутазе као релевантног биомаркера оксидационог стреса код слатководне шкољке *Unio tumidus* на различитим локалитетима на реци Сави и обезбеђује основу за будућа проучавања која ће узети у обзир наше параметре као потенцијалне биомаркере за биомониторинг основних срединских услова и неких антропогених утицаја. Испитивани параметри су ефективни биомаркери за рутински мониторинг спољашње средине. Будућа истраживања морају да дефинишу везу између специфичних загађивача/групе загађивача и одређеног биомаркера. С обзиром да шкољке представљају једну од важних компоненти заједнице у великим равничарским рекама у региону, као што су Сава, Дунав, Велика Морава и Тиса, методологија приказана овде је нарочито примењива за рутински мониторинг ових екосистема.

*Захвалница* – Ова студију је подржало Министарство науке и технолошког развоја Републике Србије, Пројекат бр. 143035Б. Аутори захваљују Мр Радмили Пауновић Штајн за лекторисање рукописа на енглеском језику.

## REFERENCES/ЛИТЕРАТУРА

- Borković, S. S., J. S. Šaponjić, S. Z. Pavlović, D. P. Blagojević, S. M. Milošević, T. B. Kovačević, R. M. Radojičić, M. B. Spasić, R. V. Žikić, and Z. S. Saičić (2005). The activity of antioxidant defence enzymes in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Adriatic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **141**, 366-374.
- Borković, S. S., S. Z. Pavlović, T. B. Kovačević, A. Š. Štajn, V. M. Petrović, and Z. S. Saičić (2008). Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* **147**, 122-128.
- Cossu, C., A. Doyotte, M. C. Jacquin, M. Babut, A. Exinger, and P. Vasseur (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **38**, 122-131.
- Darlington, R. B., S. Weinsberg, and H. Walberg (1973). Canonical variate analysis and related techniques. *Rev. Edu. Res.* **43**, 433-454.
- De Quiroga, B. G., P. Gil., and M. Lopez-Tores (1988). Physiological significance of catalase and glutathione-peroxidases and *in vivo* peroxidation in selected tissues of the toad *Discoglossus pictus* (*Amphibia*) during acclimation to normobaric hyperoxia. *J. Comp. Physiol.* **158**, 583-590.
- Despotović, S. G., B. R. Perendija, T. B. Kovačević, S. S. Borković, S. Z. Pavlović, S. M. Milošević, V. D. Djikanović, P. D. Cakić, S. B. Pajović, and Z. S. Saičić (2007). Glutathione redox status in some tissues and the intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel (*Barbus barbus*) (pisces) from the Danube River. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* **59**, 57-58.
- Dinneen, L. C., and B. C. Blakesley (1973). A generator for the sampling distribution of the Mann Whitney U statistic. *Applied Statistics* **22**, 269-273.
- Doyotte, A., C. Cossu, M. Jacquin, M. Babut, and P. Vasseur (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* **39**, 93-110.
- Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutases. Adaptation to a-paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* **264**, 7761-7764.
- Kovačević, T. B., S. S. Borković, S. Z. Pavlović, R. M. Radojičić, and Z. S. Saičić (2006). The concentrations of antioxidant compounds in the hepatopancreas, the gills and muscle of some freshwater crayfish species. *Acta Biol. Hung.* **57**, 449-458.
- Kovačević, T. B., S. S. Borković, S. Z. Pavlović, S. G. Despotović, and Z. S. Saičić (2008). Glutathione as a suitable biomarker in hepatopancreas, gills and muscle of three freshwater crayfish species. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* **60**, 59-66.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lionetto, M. G., R. Caricato, M. E. Giordano, M. F. Pascariello, L. Marinosci, and T. Schettino (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholineesterase and antioxidant enzyme activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar. Poll. Bull.* **46**, 324-330.



- Lowry, O. H., N. L. Rosebrough, A. L. Farr, and R. I. Randall (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Manduzio, H., T. Monsinjon, B. Rocher, F. Leboulenger, and C. Galap (2003). Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* **64**, 73-83.
- Manduzio, H., T. Monsinjon, C. Galap, F. Leboulenger, and B. Rocher (2004). Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.* **70**, 83-93.
- Mavelli, I., M.R. Ciriolo, L. Rossi, T. Meloni, G. Forteleoni, A. De-Flora, U. Benatti, A. Morelli, and G. Rotilio (1984). Favism: A hemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decrease glutathione peroxidase activities in red blood cells. *Eur. J. Biochem.* **139**, 13-18.
- Misra, H. P., and I. Fridovich (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3170-3175.
- Niyogi, S, S. Biswas, S. Sarker, and A. G. Datta (2001). Antioxidant enzymes in brackishwater oyster, *Saccostrea cucullata* as potential biomarkers of polyaromatic hydrocarbon pollution in Hooghly Estuary (India): seasonality and its consequences. *Sci. Total Environ.* **281**, 237-246.
- Ognjanović B. I., J. G. Milovanović, N. Z. Đorđević, S. D. Marković, R. V. Žikić, A. Š. Štajn and Z. S. Saičić (2008). Parameters of oxidative stress in liver and white muscle of hake (*Merluccius merluccius* L.) from the adriatic sea. *Kragujevac J. Sci.* **30**, 137-144.
- Orbea, A., M. Ortiz-Zarragoitia, M. Sole, C. Porte, and M. Cajaraville (2002). Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalvia molluscs, crabs and fish from Urdiabai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* **58**, 75-98.
- Paunović, M. M., S. S. Borković, S. Z. Pavlović, Z. S. Saičić, and P. D. Cakić (2008). Results of the 2006 Sava survey – aquatic macroinvertebrates. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* **60**, 265-271.
- Pavlović, S. Z, D. Belić, D. P. Blagojević, M. R. Radojičić, V. R. Žikić, S. Z. Saičić, G. Grubor-Lajšić, and M. B. Spasić (2004). Seasonal variations of cytosolic antioxidant enzyme activities in the liver and white muscle of thinlip gray mullet (*Liza ramada* Risso) from the Adriatic sea. *Cryo Letters* **25**, 273-285.
- Pavlović, S. Z, S. S. Borković, T. B. Kovačević, B. I. Ognjanović, R. V. Žikić, A. Š. Štajn, and Z. S. Saičić (2008). Antioxidant defense enzyme activities in the liver of red mullet (*Mullus barbatus* L) from the Adriatic Sea: the effects of locality and season. *Fresenius Environ. Bull.* **17**, 558-563.
- Perendija, B. R., S. S. Borković, T. B. Kovačević, S. Z. Pavlović, B. D. Stojanović, M. M. Paunović, P. D. Cakić, S. B. Pajović, and Z. S. Saičić (2007a). Activities of superoxide dismutase and catalase in the foot of three freshwater mussel species. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* **59**, 17-18.

- Perendija, B. R., S. S. Borković, T. B. Kovačević, S. Z. Pavlović, B. D. Stojanović, M. M. Paunović, P. D. Cakić, R. M. Radojičić, S. B. Pajović, and Z. S. Saičić (2007b). Glutathione dependent enzyme activities in the foot of three freshwater mussel species in the Sava River, Serbia. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* **59**, 169-175.
- Petrović, V. M., M. Spasić, Z. Saičić, B. Milić, and R. Radojičić (1982). Increase in superoxide dismutase activity induced by thyroid hormones in the brains of neonate and adult rats. *Experientia*. **38**, 1355-1356.
- Phillips, D. J. H., and P. S. Rainbow (1989). Strategies of metal sequestration in aquatic organisms. *Mar. Environ. Res.* **28**, 207-210.
- Rossi, M. A., G. Cecchini, and M. M. Dianzani (1983). Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase in two different hepatomas and in normal liver. *IRCS Med. Sci. Biochem.* **11**, 805.
- Saičić, Z. S., R. Radojičić, V. Janić-Šibalić, B. Buzadžić, M. Spasić and V. M. Petrović (1993). Comparative studies on superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and some tissues of different freshwater fish species. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* **45**, 23- 24.
- Storz, G., and J. A. Imlay (1999). Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 188-194.
- Šaponjić, S. J., S. S. Borković, T. B. Kovačević, S. Z. Pavlović, S. D. Labus-Blagojević, D. P. Blagojević, Z. S. Saičić, R. M. Radojičić, R. V. Žikić, and M. B. Spasić (2006). Activity of antioxidant defense enzymes in the Mediterranean Sea shrimp (*Parapenaeus longirostris*): relation to the presence of PCBs and PAHs in the south Adriatic Sea. *Period. Biolog.* **108**, 117-125.
- Takada, Y., T. Noguchit, and M. Kayaia (1982). Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. *Cancer Res.* **42**, 4233-4235.
- Winston, G. W., and R. T. Di Giulio (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* **19**, 137-161.
- Žikić, R. V., A. Štajn, Z. S. Saičić, M. B. Spasić, K. Ziernicki, and V. M. Petrović (1996). The activities of superoxide dismutase, catalase and ascorbic acid content in the liver of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch) exposed to cadmium. *Physiol. Res.* **45**, 479-481.
- Žikić, R. V., A. Štajn, B. I. Ognjanović, S. Z. Pavlović, and Z. S. Saičić (1997). Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and transaminases in the plasma of carps (*Cyprinus carpio* L.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.* **46**, 391-396.
- Žikić, R. V., A. Š. Štajn, S. Z. Pavlović, B. I. Ognjanović, and Z. S. Saičić (2001). Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.* **50**, 105-111.
- Žikić, R. V., B. I. Ognjanović, S. D. Marković, S. Z. Pavlović, R. P. Mihajlović, Z. S. Saičić, and A. Š. Štajn (2006). Lipid peroxidation and the concentration of antioxidant compounds (vitamin E and vitamin C) in the liver and white muscle of red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea. *Period. Biol.* **108**, 139-143.