

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Anja Z. Grčić

**BIOINDIKATORSKI POTENCIJAL
FIZIOLOŠKIH ODGOVORA GUBARA
Lymantria dispar L. (Lepidoptera) NA
DELOVANJE BENZO[*a*]PIRENA**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Anja Z. Grčić

**BIOINDICATION POTENTIAL OF
PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF GYPSY
MOTH *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera) ON
THE BENZO[*a*]PYREN EFFECTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

MENTORI

dr Larisa Ilijin, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Siniša Đurašević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA

dr Larisa Ilijin, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Siniša Đurašević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Vesna Perić Mataruga, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Odeljenju za fiziologiju i biohemiju insekata Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Uticaj magnetnih polja i drugih sredinskih faktora na fiziološke odgovore i ponašanje različitih vrsta” i potprojekta “Odgovori fitofagnih štetnih insekata na sredinske stresore” (broj 173027), finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvalnica

Ovom prilikom želim da izrazim zahvalnost:

Mojoj mentorki, dr Larisi Ilijin, za ukazano poverenje prilikom prijema u odeljenje i laboratoriju, za veliku posvećenost, vreme i trud koje je uložila u osmišljavanje i planiranje svih etapa ove disertacije, kao i za sve korisne savete i pomoć koju mi je pružila od prvog dana naše saradnje. Posebno sam zahvalna na izuzetnom optimizmu kojim me je bodrila, beskrajnom strpljenju i razumevanju za sve moje nedoumice, nepresušnoj kreativnosti i istrajnosti u prevazilaženju problema, svemu što me je sa radošću naučila, i za apsolutnu podršku koju mi je pružila.

Dr Siniši Đuraševiću, mentoru, za prijatnu saradnju i nesebičnu pomoć i podršku tokom doktorskih studija, kao i za sve korisne savete i sugestije koje su značajno doprinele kvalitetu i finalnoj formi disertacije.

Dr Vesni Perić Mataruga, rukovodiocu Odeljenja za fiziologiju i biohemiju insekata, za srdačnu saradnju i ljubaznost, dragocene savete i potpunu predanost u bezrezervnom prenošenju znanja i veština o problematici istraživanja, kao i velikodušnoj pomoći tokom doktorskih studija. Narочito sam zahvalna za sve inspirativne i konstruktivne razgovore, iskrenu brižnost i nepokolebljivu veru u kvalitet mog naučnog rada.

Dr Mileni Vlahović, za podršku i produktivne naučne razgovore, spremnost i dobru volju za rešavanje problema, često davanje bitnih smernica tokom istraživanja, pozitivnu atmosferu i nesebičnu pomoć u realizaciji eksperimenata.

Dr Mariji Mrdaković, za inspirativne i kritičke diskusije, konstantnu motivaciju i ohrabrenje, bezrezervnu praktičnu i intelektualnu pomoć, prijatnu i produktivnu saradnju, kao i za tople prijateljske razgovore i savete.

Dr Branki Petković, rukovodiocu odeljenja za Neurofiziologiju, za velikodušno angažovanje i izuzetnu pomoć tokom doktorskih studija, profesionalnost, predanost i taktičnost tokom divne i uspešne saradnje.

Dr Dajani Todorović, za izuzetno vredne savete i konstruktivne sugestije, posvećeno vreme i pažnju, pomoć i predano zalaganje tokom svih koraka ove disertacije, bezgranično strpljenje i ljubaznost, a posebno za vedrinu, entuzijazam i druženje.

Dr Dragani Matić i Aleksandri Filipović, za svu radost, kafe i ručkove, provedeno vreme i predivne trenutke, za beskrajnu podršku i dragocenu, nezamenjivu pomoć od prvog dana našeg poznanstva, za sve naučne i van-naučne savete i razgovore, spremnost, brzinu i efikasnost u rešavanju profesionalnih i privatnih problema, utehu i ohrabrenje, a posebno za sav smeh i prijateljstvo.

Dr Jelici Lazarević, dr Zlatku Proliču, dr Dejanu Mirčiću, dr Mileni Janković Tomanić i preminuloj dr Veri Nenadović za prijatne i zanimljive razgovore, prijateljsku atmosferu i podršku, dobru saradnju, korisne savete i praktičnu pomoć u istraživačkom radu.

Mojim prijateljima, Jelici, Neveni Z., Đorđu, Mariji, Neveni T.V. i Marini što su me uvek podržavali i bodrili, pažljivo slušali i razumeli, motivisali, tešili i od srca veselili.

Mojim kolegama sa instituta za spremnost da pomognu kao i da se druže.

Mojim roditeljima i sestri Ivi za beskrajno strpljenje, sigurnost, snagu, svaki vid podrške i svu ljubav.

Posebno mojoj porodici, Živku i Marti za ljubav, za sve.

Bioindikatorski potencijal fizioloških odgovora gubara *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera) na delovanje benzo[a]pirena

Rezime

Intenzivan antropogeni uticaj u poslednjih nekoliko decenija doveo je do značajnog porasta stepena zagađenja biosfere, kojem u velikoj meri doprinosi toksični i kancerogeni organski polutant - policiklični aromatični ugljovodonik, benzo[a]piren. Cilj ove doktorske disertacije bio je procena odgovora fizioloških i molekularnih parametara larvi *Lymantria dispar* kao potencijalnih biomarkera sredinskog zagađenja benzo[a]pirenom. Ispitan je hronični uticaj dve koncentracije ovog ksenobiotika (5 i 50 ng/g suve mase hrane) na larve *L. dispar* iz legala sakupljenih u nezagađenoj šumi (planina Majdanpek) i sakupljenih u zagađenoj šumi (okolina rudnika Bor D.O.O), sa svrhom procene efekta porekla populacije. Larve iz nezagađene šume pokazuju pad specifične aktivnosti katalaze u srednjem crevu, ali i značajan porast aktivnosti antioksidativnih enzima - superoksid dismutaze i katalaze, na nivou hemolimfe, dok je u populaciji iz zagađene šume zabeleženo povećanje aktivnosti ova dva enzima samo u okviru srednjeg creva. Detoksifikacioni enzimi, karboksilesteraze, pokazuju osetljivost i povećanje aktivnosti u prisustvu benzo[a]pirena, u srednjem crevu larvi iz nezagađene šume, kao i u mozgu larvi iz zagađene šume, koje pored toga, na nivou srednjeg creva odlikuje značajna indukcija aktivnosti glutation S-transferaza. Acetilholinesteraze nisu osetljive na primenjene koncentracije ovog ksenobiotika. Povećanje ekspresije proteina Hsp70 u okviru srednjeg creva uočeno je kod obe populacije larvi, a na nivou mozga jedino u populaciji iz zagađene šume i to pri dejstvu niže koncentracije benzo[a]pirena. Većina digestivnih enzima nije osetljiva na prisustvo benzo[a]pirena sa izuzetkom tripsina, alkalnih fosfataza i lipaza, koje odlikuje povećanje aktivnosti kod larvi iz nezagađene šume, a larve iz zagađene šume karakteriše jedino indukcija lipazne aktivnosti. Za populaciju larvi iz nezagađene šume svojstven je pad koncentracije ukupnih lipida u hemolimfi i nepromenjen sadržaj trehaloze, dok ovi parametri ne pokazuju promene u populaciji iz zagađene šume. Hronično prisustvo benzo[a]pirena i produženo angažovanje energetski zahtevnih, odbrambenih mehanizama, odrazilo se na komponente fitnesa larvi *L. dispar* pri čemu se populacija iz nezagađene šume pokazala manje podložnom energetskom deficitu, ispoljavajući smanjenje mase i relativne brzine rasta larvi petog larvenog stupnja, dok larve iz zagađene šume, pored iste promene prethodna dva parametra fitnesa, odlikuje i produženo razviće. Uočeno je da su odgovori antioksidativnih enzima - superoksid dismutaze i katalaze, u hemolimfi, kao i karboksilesteraza i digestivnih enzima - tripsina i alkalnih fosfataza, u srednjem crevu larvi, specifični i potencijalno primenjivi biomarkeri zagađenosti životne sredine sa benzo[a]pirenom za populaciju larvi poreklom iz nezagađene šume. Sličnu primenu, kada je u pitanju populacija larvi iz zagađene šume, mogu naći specifične aktivnosti superoksid dismutaze, katalaza i glutation S-transferaza u srednjem crevu larvi, aktivnost karboksilesteraza i ekspresija Hsp70 u mozgu larvi *L. dispar*.

Ključne reči: *Lymantria dispar* L.; benzo[a]piren; antioksidativni enzimi; detoksifikacioni enzimi; Hsp70; digestivni enzimi; osobine fitnesa; biomarkeri

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Ekofiziologija

Bioindication potential of physiological responses of gypsy moth *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera) on the benzo[a]pyren effects

Abstract

Over the last few decades intense anthropogenic influence has led to a significant increase of the pollution levels in the biosphere, which can greatly be attributed to the toxic and carcinogenic organic pollutants - polycyclic aromatic hydrocarbons, and especially to the benzo[a]pyrene. The aim of this dissertation was to evaluate responses of the physiological and molecular parameters of the *Lymantria dispar* larvae as a potential biomarkers of environmental pollution by benzo[a]pyrene. For the purpose of assessing the effects of population origin, *L. dispar* egg-masses were collected from unpolluted forest (Majdanpek mountain) and polluted forest (vicinity of Bor D.O.O mine). The chronic effects of the two benzo[a]pyrene concentrations in the diet (5 and 50 ng/g dry food weight) on these two population of larvae were investigated. Larvae from unpolluted forest showed a decrease of the catalase specific activity in the midgut, and a significant increase in the activity of antioxidative enzymes - superoxide dismutase and catalase, in the hemolymph, while the population from the polluted forest expressed an increase in the activity of these two enzymes only within the midgut. Detoxification enzymes - carboxylesterases, showed sensitivity and increase in activity in the presence of benzo[a]pyrene in the midgut of larvae from unpolluted forest, as well as in the brain of larvae from polluted forest, which in addition, are characterized by significant induction of glutathione S-transferase activity at the midgut level. Acetylcholinesterases are non inducible to the applied concentrations of this xenobiotic. An increase in expression of Hsp70 protein at midgut level was observed in both larval populations, while only the population from contaminated forest showed rise in brain Hsp70 concentration, after treatment with lower dose of benzo[a]pyrene. Most digestive enzymes are insensitive to the presence of benzo[a]pyrene with the exception of trypsin, alkaline phosphatases, and lipases which demonstrated increased activity in larvae from unpolluted forest. Larvae from polluted forest exhibited only induction of lipase activity. The population of non-polluted larvae is characterized by a decrease in the concentration of total lipids in the hemolymph and an unchanged trehalose content, while these parameters do not show changes in the population from the contaminated forest. The chronic presence of benzo[a]pyrene and prolonged engagement of energy-demanding defense mechanisms have reflected on the fitness components of *L. dispar* larvae, with population from unpolluted forest showing less susceptibility to energy deficiency and exhibiting reduced mass and relative growth rates of the fifth instar larvae, while the larvae from the polluted forest, in addition to the same changes in previous two fitness parameters, have also showed prolonged development. It has been noticed that responses of the antioxidative enzymes - superoxide dismutase and catalase in hemolymph, as well as carboxylesterases and digestive enzymes - trypsin and alkaline phosphatases, from the larvae midgut, are specific and potentially applicable biomarkers of environmental contamination with benzo[a]pyrene for larval populations originally from unpolluted forest systems. Similarly, when it comes to larval populations from contaminated forests, specific activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferases in the larvae midgut, as well as carboxylesterase activity and expression of Hsp70 in the brain of *L. dispar* larvae, could be potentially used in biomonitoring.

Key words: *Lymantria dispar* L.; benzo[a]pyrene; antioxidative enzymes; detoxification enzymes; Hsp70; digestive enzymes; fitness traits; biomarkers

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Ecophysiology

LISTA SKRAĆENICA

4-MU- <i>a</i> -Glc	4-metilumbeliferil- <i>a</i> -D-glukopiranozid
4-MU-Bu	4-metilumbeliferil butirat
AA	akril amid
AhR	receptor za aromatične ugljovodonike (engl. aryl hydrocarbon receptor)
ANOVA	jednofaktorska analiza varijanse
APS	amonijum persulfat
ATP	adenozin trifosfat
ATSDR	<i>The Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
B[<i>a</i>]P	benzo[<i>a</i>]piren
BSA	albumin iz goveđeg seruma (engl. bovine serum albumin)
CaCl ₂	kalcijum hlorid
CAT	katalaza
CDNB	1-hloro-2,4-dinitrobenzen
CuZn SOD	bakar-cink superoksid dismutaza
CYP	superfamilija enzima citohrom P450 (engl. cytochrom P450)
DL-BAPNA	<i>N</i> _α -benzoil-DL-arginin 4-nitroanilid hidrohlorid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB	5'-ditio-bis-(2-nitro benzoeva kiselina)
DTT	ditiotreitol
ECL	pojačana hemiluminiscencija (engl. enhanced chemiluminescence)
EC SOD	ekstracelularna izoforma superoksid dismutaze
EDTA	etilen diamin tetra sirćetna kiselina (engl. ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	engl. enzyme linked immuno sorbent assay
FAD	flavin adenin dinukleotid
FeCl ₃	gvožđe (III) hlorid
Gly	glicin
GR	glutation reduktaza
GST	glutation S-transferaza
GSSG	oksidovana forma glutationa
GSH	glutation
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
HCl	hlorovodonična kiselina
HNO ₃	azotna kiselina
HRP	peroksidaza iz rena (engl. horseradish peroxidase)
Hsp	protein toplotnog šoka (engl. heat shock protein)
Hsp70	protein toplotnog šoka 70 (engl. heat shock protein 70)
IARC	<i>International Agency for Research Cancer</i>
IBR	Integrirani odgovor biomarkera (engl. integrated biomarker response)
K	kalijum
K ₂ HPO ₄	kalijum hidrogen fosfat
K ₃ Fe(CN) ₆	kalijum heksacijanoferat (III)
KCl	kalijum hlorid
LSD	engl. Fisher's least significant difference test
Mg	magnezijum
MgCl ₂	magnezijum hlorid
Mn SOD	mangan superoksid dismutaza
Mn	mangan
Na	natrijum
Na ₂ CO ₃	natrijum karbonat

NaCl	natrijum hlorid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaF	natrijum fluorid
NaHCO ₃	natrijum bikarbonat
NaNO ₂	natrijum nitrit
NaOH	natrijum hidroksid
NP	populacija iz nezagađene šume
PAH	policiklični aromatični ugljovodonici (engl. polycyclic aromatic hydrocarbons)
PBS	fosfatom puferisani fiziološki rastvor (engl. phosphate-buffered saline)
PBST	fosfatom puferisani fiziološki rastvor sa Tween 20 (engl. phosphate-buffered saline with Tween 20)
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluorid (engl. phenylmethylsulfonyl fluoride)
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenil fosfat
<i>p</i> NP- <i>a</i> -D-Glc	<i>p</i> -nitrofenil- <i>a</i> -D-glukopiranozida
<i>p</i> NPC	<i>p</i> -nitrofenil kaprilat
PUZ	pufer za obradu uzorka
RGR	relativna brzina rasta (engl. relative growth rate)
ROS	reaktivne vrste kiseonika (engl. reactive oxygen species)
SDS PAGE	natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SDS	natrijum dodecil sulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SH	sulfhidrilna (tiolna) grupa
SOD	superoksid dismutaza
TBS	Tris pufer (engl. tris buffered saline)
TBST	Tris pufer sa dodatkom Tween 20 (engl. Tris bufferd saline with Tween 20)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
W _t	masa larvi na kraju posmatranog perioda odnosno u trećem danu petog stupnja
W ₀	masa larvi na početku posmatranog perioda odnosno prvog dana trećeg stupnja
ZnS	cink sulfid
ZP	populacija iz zagađene šume

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Benzo[<i>a</i>]piren	1
1.2. Mehanizmi toksičnosti benzo[<i>a</i>]pirena	2
1.3. Odgovori odbrambenih sistema insekata na intoksikaciju benzo[<i>a</i>]pirenom	4
1.3.1. Antioksidativni enzimi – superoksid dismutaza, katalaza i glutation reduktaza	4
1.3.2. Enzimi koji učestvuju u procesima detoksifikacije	5
1.3.3. Proteini toplotnog šoka (Hsp70)	7
1.4. Digestivni enzimi i energetske molekule u hemolimfi	8
1.5. Benzo[<i>a</i>]piren i osobine fitnesa insekata	10
1.6. Biomarkeri zagađenja životne sredine	11
2. CILJEVI	13
3. MATERIJAL I METODE	14
3.1. <i>Lymantria dispar</i> (Lepidoptera: <i>Lymantriidae</i>) (gubar)	14
3.2. Uslovi gajenja	14
3.3. Eksperimentalne grupe	14
3.4. Analiza osobina fitnesa	15
3.5. Određivanje aktivnosti antioksidativnih i detoksifikacionih enzima	15
3.5.1. Priprema homogenata	15
3.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidativnih i detoksifikacionih enzima	16
3.5.2.1. Superoksid dismutaza (SOD)	16
3.5.2.2. Katalaza	16
3.5.2.3. Glutation reduktaza (GR)	17
3.5.2.4. Glutation S-transferaza (GST)	17
3.5.2.5. Karboksilesteraze	17
3.5.2.6. Acetilholinesteraze	17
3.5.3. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), katalaze, karboksilesteraza i acetilholinesteraza nativnom elektroforezom	18
3.5.3.1. Nativna poliakrilamidna elektroforeza (PAGE)	18
3.5.3.1.1. Superoksid dismutaza (SOD)	19
3.5.3.1.2. Katalaza	19
3.5.3.1.3. Karboksilesteraze	19
3.5.3.1.4. Acetilholinesteraze	20
3.6. Detekcija aktivnosti digestivnih enzima	20
3.6.1. Priprema homogenata srednjeg creva	20
3.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje specifične aktivnosti digestivnih enzima	20
3.6.2.1. Tripsin	20
3.6.2.2. Leucin aminopeptidaza	20
3.6.2.3. Alkalne fosfataze	21

3.6.2.4. Ukupne kisele fosfataze	21
3.6.2.5. Lizozomske i nelizozomske kisele fosfataze	21
3.6.2.6. α -glukozidaza	21
3.6.2.7. Lipaze	21
3.6.3. Detekcija aktivnosti tripsina, leucin aminopeptidaze, alkalnih fosfataza, ukupnih kiselih fosfataza, α -glukozidaze i lipaza nativnom elektroforezom	22
3.6.3.1. Tripsin	22
3.6.3.2. Leucin aminopeptidaza	22
3.6.3.3. Alkalne fosfataze	22
3.6.3.4. Ukupne kisele fosfataze	22
3.6.3.5. α -glukozidaza	23
3.6.3.6. Lipaze	23
3.7. Određivanje koncentracije trehaloze i lipida u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i>	23
3.7.1. Trehaloza	23
3.7.2. Lipidi	23
3.8. Detekcija Hsp70	24
3.8.1. Određivanje nivoa ekspresije Hsp70 u mozgu larvi <i>L. dispar</i>	24
3.8.1.1. Priprema homogenata mozga	24
3.8.1.2. Western blot	24
3.8.1.3. Indirektni ELISA test	24
3.8.2. Detekcija Hsp70 Western blotom u srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i>	25
3.8.2.1. Priprema homogenata srednjeg creva	25
3.8.2.2. Western blot	25
3.9. Integrisani odgovor biomarkera	25
3.10. Statistička obrada rezultata	25

4. REZULTATI **27**

4.1. Efekti benzo[a]pirena na antioksidativne enzime srednjeg creva i hemolimfe larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume	27
4.1.1. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u srednjem crevu larvi	27
4.1.2. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u srednjem crevu larvi	29
4.1.3. Specifična enzimaska aktivnost glutation reduktaze u srednjem crevu larvi	31
4.1.4. Enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u hemolimfi larvi	32
4.1.5. Enzimaska aktivnost katalaze u hemolimfi larvi	34
4.2. Efekti benzo[a]pirena na enzime koji učestvuju u detoksifikaciji u srednjem crevu i mozgu larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume	35
4.2.1. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u srednjem crevu larvi	35
4.2.2. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u mozgu larvi	38

4.2.3. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija acetilholinesteraza u mozgu larvi	40
4.2.4. Specifična enzimaska aktivnost glutation S-transferaze u srednjem crevu larvi	42
4.3. Uticaj benzo[a]pirena na ekspresiju Hsp70 u srednjem crevu i mozgu larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume	43
4.3.1. Ekspresija Hsp70 u srednjem crevu larvi	43
4.3.2. Ekspresija Hsp70 u mozgu larvi	45
4.4. Efekti različitih koncentracija benzo[a]pirena na digestivne enzime u srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume	47
4.4.1. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija tripsina u srednjem crevu larvi	47
4.4.2. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija leucin aminopeptidaze u srednjem crevu larvi	49
4.4.3. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija alkalnih fosfataza u srednjem crevu larvi	51
4.4.4. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija ukupnih kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi	53
4.4.5. Specifična enzimaska aktivnost lizozomskih i nelizozomskih kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi	55
4.4.6. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija lipaza u srednjem crevu larvi	57
4.4.7. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija α -glukozidaze u srednjem crevu larvi	59
4.5. Efekti različitih koncentracija benzo[a]pirena na sadržaj trehaloze i lipida u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume	61
4.5.1. Uticaj benzo[a]pirena na koncentraciju trehaloze u hemolimfi larvi	61
4.5.2. Uticaj benzo[a]pirena na koncentraciju lipida u hemolimfi larvi	62
4.6. Komponente fitnesa nakon hronične izloženosti larvi <i>L. dispar</i> (poreklom iz nezagađene i zagađene šume) benzo[a]pirenu	63
4.6.1. Efekat benzo[a]pirena na preživljavanje larvi	63
4.6.2. Trajanje larvenog razvića nakon tretmana benzo[a]pirenom	64
4.6.3. Uticaj benzo[a]pirena na masu i relativnu brzinu rasta larvi	65
4.7. Integrisani odgovor biomarkera (IBR) nakon hronične izloženosti larvi <i>L. dispar</i> (poreklom iz nezagađene i zagađene šume) benzo[a]pirenu	66
4.7.1. Integrisani odgovor biomarkera za antioksidativne enzime	66
4.7.2. Integrisani odgovor biomarkera za enzime uključene u detoksifikaciju	68
4.7.3. Integrisani odgovor biomarkera za digestivne enzime	70
4.7.4. Integrisani odgovor biomarkera za osobine fitnesa	72

5. DISKUSIJA **75**

5.1. Efekti benzo[a]pirena na antioksidativne enzime larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume	75
--	----

5.1.1. Specifične aktivnosti antioksidativnih enzima u srednjem crevu i hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	75
5.2. Efekti benzo[<i>a</i>]pirena na enzime koji učestvuju u detoksifikacionim procesima larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	77
5.2.1. Specifična aktivnost i izoforme karboksilesteraza u srednjem crevu i mozgu larvi poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	77
5.2.2. Specifična aktivnost i izoforme acetilholinesteraza u mozgu larvi poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	79
5.2.3. Specifična aktivnost glutation S-transferaza u srednjem crevu larvi poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	80
5.3. Uticaj benzo[<i>a</i>]pirena na ekspresiju Hsp70 u srednjem crevu i mozgu larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	81
5.4. Efekti benzo[<i>a</i>]pirena na digestivne enzime srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	82
5.4.1. Specifična aktivnost i izoforme tripsina i leucin aminopeptidaze u srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	82
5.4.2. Uticaj benzo[<i>a</i>]pirena na alkalne i kisele fosfataze srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	83
5.4.3. Specifična aktivnost i izoforme lipaza i α -glukozidaza srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	85
5.5. Efekti benzo[<i>a</i>]pirena na koncentraciju trehaloze i lipida u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	86
5.6. Efekti benzo[<i>a</i>]pirena na osobine fitnesa larvi <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene i zagađene šume.....	87
6. ZAKLJUČCI	90
7. LITERATURA	92

1. UVOD

1.1. Benzo[a]piren

Benzo[a]piren (B[a]P) je pentaciklično, aromatično jedinjenje koje pripada policikličnim aromatičnim ugljovodonicima (PAH). Smatra se prototipskim predstavnikom ove klase organskih jedinjenja i važi za najviše proučavani PAH, primarno zbog širokog spektra njegovih toksičnih efekata zabeleženih kod laboratorijskih životinja i u ljudskoj populaciji (Miler i Ramos, 2001). Ovo jedinjenje je čvrstog agregatnog stanja, žućkaste boje i molekulske mase od 252,31 g/mol. Benzo[a]piren je izrazito nepolarno jedinjenje, praktično nerastvorno u vodi (rastvorljivost je 0,00162 mg/L na 25°C). Ukupni PAH i B[a]P predstavljaju značajne i sveprisutne organske zagađivače životne sredine u koju dospevaju procesom nepotpunog sagorevanja organske materije. Šumski požari, vulkanska aktivnost i biosinteza od strane bakterija i biljaka čine prirodne izvore PAH, koji daju gotovo zanemarljiv doprinos njihovom ukupnom sadržaju u biosferi (Prabhukumar i Pagilla, 2010). Dominantni izvori PAH su mnogobrojne antropogene aktivnosti, pre svega industrijska delatnost koja uključuje proizvodnju koksa i naftnih preradevina, kao i procese proizvodnje aluminijuma, gvožđa i čelika, zatim, sistemsko i samostalno zagrevanje domaćinstava sagorevanjem različitih goriva, emisija izduvnih gasova iz motornih vozila, spaljivanje komunalnog i industrijskog otpada, izlivanje i odlaganje nafte, ali i duvanski dim i termička obrada hrane (Shen i sar., 2011; Bari i sar., 2010; Liu i sar., 2008; Ravindra i sar., 2008; Mastral i Callen, 2000). Prema podacima IARC (International Agency for Research Cancer) (2012) prosečne koncentracije pojedinačnih PAH u vazduhu bile su između 1-30 ng/m³ u urbanim zonama, pri čemu se ističe da u okolini saobraćajnih tunela i velikih metropola za vreme grejne sezone, ove vrednosti rastu i za nekoliko desetina nanograma po kubnom metru vazduha. U studiji o zastupljenosti B[a]P u atmosferi iznad Evrope zabeleženo je da prosečna koncentracija ovog polutanta iznosi 0,5 ng/m³ u ruralnim i 2,7 ng/m³ u urbanim područjima na godišnjem nivou, kao i da prosečan nivo opterećenosti evropske populacije B[a]P iznosi 0,9 ng/m³ što je blizu gornje granice zagađenja (1 ng/m³) za 2012. godinu (Guerreiro i sar., 2016). Autori nisu uzimali u obzir koncentracije B[a]P izmerene u posebno zagađenim lokalitetima kao industrijskim, i zonama sa velikim saobraćajnim prometom. Atmosfersko opterećenje PAH u okolini aluminijumskih proizvodnih pogona raste i do 100 µg/m³, dok se pri postupku asfaltiranja, beleže koncentracije od 10-20 µg/m³ (IARC, 2012). Dimljena hrana prosečno sadrži 100 µg/kg B[a]P, a voda za piće i do 5,5 ng/L (Berglund, 1982).

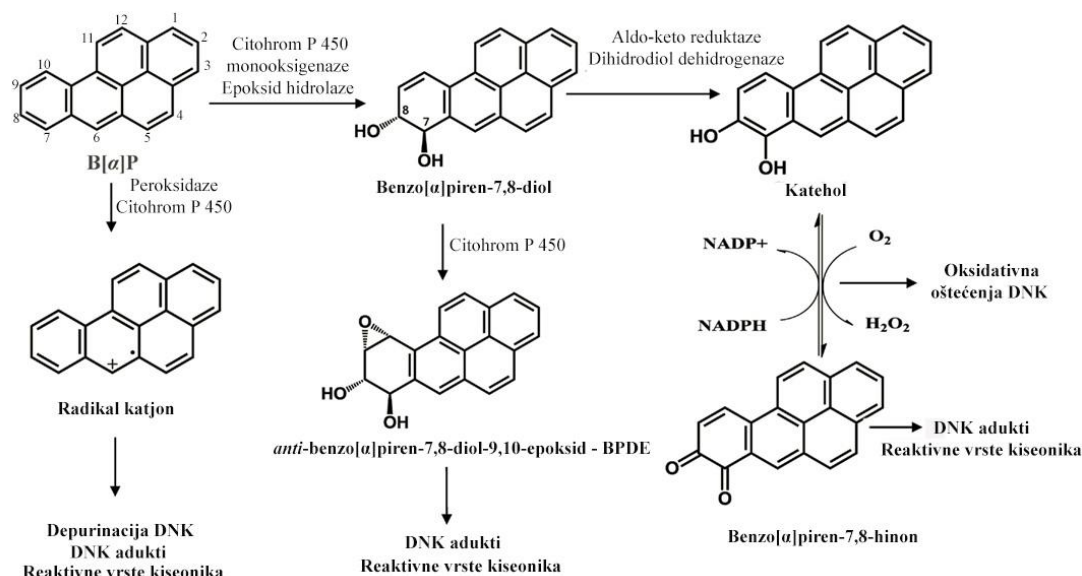
U atmosferi, preko 90% B[a]P adsorbovano je na aerosol, odnosno čestične materije vazduha i to uglavnom na čestice čiji je prečnik manji od 2,5 µm tako da je njegova particija u gasnoj fazi veoma mala (Gao i sar., 2015; Venkataraman i Friedlander, 1994). Mokrom i suvom atmosferskom depozicijom benzo[a]piren dolazi u kontakt sa površinom zemlje, i pri tome je zabeleženo da se veliki deo deponuje na vegetaciji (okvirno 40% svih PAH iz atmosfere) zahvaljujući njegovoj lipofilnoj prirodi odnosno afinitetu prema lipidima i voskovima u okviru strukture zelenih delova biljki (Wang i sar., 2008; Alfani i sar., 2001; Howsam i sar., 2001; Howsam i sar., 2000). Vegetacija predstavlja važan prirodni slivnik za B[a]P i krucijalnu kariku za njegovu bioakumulaciju u herbivornim i karnivornim životinjskim vrstama, preko kojih postaje i sastavni deo ljudske ishrane.

Benzo[a]piren zauzima osmo mesto na listi najvažnijih otrova prema ATSDR (The Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2017) i pripada grupi 1 – dokazanih kancerogena za ljude (IARC, 2012). Najviše B[a]P akumulira se u jetri, bubrezima i gastrointestinalnom traktu kod sisara, a kako veoma lako prolazi kroz ćelijske membrane zahvaljujući svojoj lipofilnoj prirodi, u okviru ćelija se koncentriše u mitohondrijama i nukleusu, gde direktno utiče na energetske metabolizam i narušava strukturu DNK molekula (videti u Miller i Ramos, 2001). Benzo[a]piren je kancerogen i u mnogobrojnim studijama je dokazano da indukuje tumore u različitim životinjskim vrstama, bez obzira na način njegove aplikacije (detaljno u IARC, 2012). Ovaj predstavnik PAH ispoljava i modulatorska svojstva u domenu endokrinih funkcija kod kičmenjaka, ostvarujući estrogene i antiestrogene efekte, kao i ekdosteroidne modifikacije kod beskičmenjaka, bilo u

nativnoj formi ili preko svojih metaboličkih intermedijera, na osnovu čega je svrstan u endokrine disruptore (Lintelmann i sar., 2003; Oberdörster i sar., 1999). Sveprisutnost B[a]P u životnoj sredini, visoka perzistentnost i višestruki aspekti ispoljavanja toksičnosti predstavljaju veliku opasnost i značajno opterećuju živi svet, zbog čega je uspostavljanje efikasnih i jednostavnih načina biomonitoringa od izuzetne važnosti, a posebno identifikacija osetljivih biohemijskih i fizioloških parametara izloženosti ovom polutantu.

1.2. Mehanizmi toksičnosti benzo[a]pirena

Benzo[a]piren predstavlja prokancerogeno jedinjenje i njegovom metaboličkom aktivacijom nastaju reaktivni intermedijeri preko kojih on ispoljava svoje toksične efekte (**Slika 1**). Metabolički, biotransformacioni procesi ovog jedinjenja izuzetno su složeni i podrazumevaju učešće velikog broja enzimskih sistema i formiranje mnogih intermedijera, sa većom ili manjom reaktivnošću, i imaju za krajnji cilj njegovu eliminaciju. Međutim, proizvode nastale oksidativnim metabolizmom B[a]P uglavnom odlikuje visoka reaktivnost, koja na mnogo načina dovodi do citotoksičnosti, oštećenja bioloških makromolekula i narušavanja integriteta i funkcija ćelija (Miller i Ramos, 2001; Gelboin, 1980). Benzo[a]piren ulazi u proces detoksifikacije koji podrazumeva dejstvo različitih enzimskih sistema u okviru faze I i faze II gde se najpre formira niz elektrofilnih metabolita B[a]P – arena, oksida, diola, fenola, epoksida i hinona, a zatim i njihovi polarni konjugati, najčešće sa glutationom, sulfatom i glukuronidom (videti u Miller i Ramos, 2001). Najvažniji enzimi faze I detoksifikacije jesu citohrom P 450 monooksigenaze, a od kojih se ističu CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1, zatim peroksidaze, reduktaze i različite hidrolaze, dok su glavni akteri u fazi II glutacion S-transferaze, sulfotransferaze, glukozil transferaze i uridin 5'-difosfat glukuronosulfotransferaze (Shimada, 2006; Eling i sar., 1986). Dokazano je nekoliko mehanizama toksičnosti benzo[a]pirena koji podrazumevaju njegove komplementarne metaboličke puteve.



Slika 1. Najvažniji putevi metaboličke transformacije B[a]P tokom faze I. detoksifikacije (prilagođeno iz Zhang i sar., 2012a)

Diol epoksidni mehanizam toksičnosti započinje oksidacijom B[a]P enzimima citohroma P 450 i dobijanjem jedinjenja benzo[a]piren-7,8-oksida što se dalje, dejstvom epoksid hidrolaze prevodi u benzo[a]piren-7,8-diol, na koji ponovo deluje monooksigenaze citohrom P 450 i oksiduje ga u benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksid. Dioli, a posebno diol epoksidi B[a]P ispoljavaju kancerogena i genotoksična svojstva (Osborne i Crosby, 1987) kroz interakciju sa molekulima DNK, uglavnom preko purinskih baza, gde formiraju raznovrsne DNK adukte. Najreaktivniji diol

epoksid, i generalno najtoksičniji intermedijer metabolizma B[a]P, jeste *anti*-benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksid (BPDE) i najzaslužniji je za formiranje DNK adukta, indukciju mutacija u genima kao i različitih tumora kod eksperimentalnih životinja (videti u IARC, 2010; Chakravarti i sar., 2008). Tung i sar. (2014) pokazali su da BPDE uzrokuje dvolančane prekide DNK molekula, *in vitro* i *in vivo*, kao i da menja ekspresiju gena uključenih u procese popravke ovih prekida, što ukazuje na povećanu frekvencu mutacija.

Oksidacijom benzo[a]pirena, transferom jednog elektrona kiseonika, dejstvom peroksidaze ili citohrom P 450 monoooksigenaze nastaje radikal katjon, koji lako formira kovalentne adukte sa guaninom i adeninom, i u značajnoj meri izaziva depurinaciju DNK (Banasiewicz i sar., 2004; Melendez-Colon i sar., 1999; Wei i sar., 1999).

Enzimi aldo-keto reduktaze i dihidrodiol dehidrogenaze oksiduju benzo[a]piren-7,8-diol do benzo[a]piren-7,8-katehola, a zatim do benzo[a]piren-7,8-hinona koji osim što formira stabilne adukte sa DNK, izaziva njegovu depurinaciju i uzrokuje jednolančane prekide dvostruke zavojnice, ali i kroz ponavljajuće redoks cikluse dovodi do značajnog porasta reaktivnih vrsta kiseonika (superoksid anjona, hidroksil radikala i vodonik peroksida) koje takođe oštećuju DNK i druge makromolekule (Mangal i sar., 2009; Balu i sar., 2006; Penning i sar., 1999). Većina epoksida B[a]P može se prevesti do fenolnih intermedijera, koji se takođe oksiduju do hinona, što dodatno povećava pul reaktivnih metabolita i kiseoničnih radikala (Pelkonen i Nebert, 1982; Gelboin, 1980). Osim hinona, i drugi reaktivni metaboliti benzo[a]pirena (oksid, diol epoksidi i katjon radikali) generišu velike količine reaktivnih vrsta kiseonika i narušavaju redoks ravnotežu ćelija dovodeći do oksidativnog stresa, zbog čega se smatra da je povećanje sadržaja prooksidanasa jedan od važnijih mehanizama toksičnosti B[a]P (Zhang i sar., 2004; Kim i Lee, 1997). Istraživanja su pokazala da su kod insekata najzastupljeniji intermedijeri metabolizma B[a]P dioli, fenoli, i posebno hinoni, što sugeriše visok stepen produkcije kiseoničnih radikala (He i sar., 1998; Hallstrom i Grafstrom, 1981).

Benzo[a]piren direktno utiče na regulaciju transkripcije gena, što postiže vezivanjem za receptor za aromatične ugljovodonike (AhR). Ovaj receptor reguliše transkripciju gena koji kodiraju mnoge enzime uključene u fazu I i II detoksifikacije ksenobiotika, uključujući monoooksigenaze citohrom P 450, aldehid dehidrogenaze i glutation S-transferaze. Postoje indikacije da AhR ima važnu ulogu u odgovoru na oksidativni stres, pri čemu je pokazano da metabolizam ksenobiotika posredovan citohrom P 450 monoooksigenazama, generiše reaktivne vrste kiseonika, kao i da vezivanje liganda za AhR (npr. B[a]P) indukuje produkciju vodonik peroksida u mitohondrijama (Senft i sar., 2002; Nebert i sar., 2000). Nađeno je da kod miševa deficitarnih u genima za AhR, intravenozna i topikalna administracija B[a]P ne izaziva tumore, što direktno pokazuje važnost ovog receptora u ostvarivanju njegovih toksičnih efekata (Shimizu i sar., 2000).

Zabeleženo je da benzo[a]piren utiče na puteve signalne transdukcije u ćeliji remećenjem homeostaze jona Ca^{2+} i utiče na ćelijsku diferencijaciju i inhibira aktiviranje B i T limfocita kod ljudi i glodara, što sugeriše i supresiju imunog odgovora (Romero i sar., 1997). Sa druge strane, nađeno je da B[a]P ispoljava i imuno stimulativna svojstva kod insekata i zglavkara, aktiviranjem fagocitoze, inkapsulacije i produkcije superoksid anjon radikala od strane hemocita, u hemolimfi (Guo i sar., 2011; Hannam i sar., 2010; Pan i sar., 2006). Benzo[a]piren-7,8-hinon inhibira aktivnost protein kinaze C, čime se onemogućava njena funkcija fosforilacije tokom prenosa signala od koje direktno zavisi transkripcija određenih gena (Yu i sar., 2002).

Između ostalih aspekata, pokazano je i da benzo[a]piren menja ekspresiju gena vezanih za proliferaciju i diferenciranje ćelija (Jiao i sar., 2008; Oguri i sar., 2003; Zhao i Ramos, 1998), kao i da, zajedno sa svojim reaktivnim metabolitima, deluje induktivno na proces apoptoze (Xiao i sar., 2007; Chen i sar., 2005).

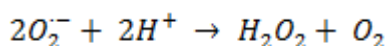
1.3. Odgovori odbrambenih sistema insekata na intoksikaciju benzo[*a*]pirenom

Intoksikaciju benzo[*a*]pirenom karakteriše aktivacija ekspresije više gena uključenih u odgovore organizma na stres, što za posledicu ima povećanje aktivnosti i sinteze: enzima uključenih u proces detoksifikacije B[*a*]P, što podrazumeva enzime iz faze I – citohrom P 450 monooksigenaze, reduktaze i hidrolaze (esteraze), kao i enzime iz faze II i to uglavnom glutathion S-transferaze, zatim antioksidativne enzime (superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaze) i proteine toplotnog šoka, hsp (od engl. heat shock protein). Benzo[*a*]piren značajno indukuje i ekspresiju mnogih gena koji kontrolišu ćelijski ciklus i apoptozu (Zhang i sar., 2017; Riaz i sar., 2009; Akerman i sar., 2004).

1.3.1. Antioksidativni enzimi – superoksid dismutaza, katalaza i glutathion reduktaza

Aerobni organizmi obezbeđuju energiju korišćenjem molekuskog kiseonika kroz procese oksidativnog metabolizma (oksidativna fosforilacija) koji su praćeni produkcijom slobodnih radikala odnosno reaktivnih vrsta kiseonika (od engl. reactive oxygen species, ROS). Ove vrste su izuzetno nestabilne zbog prisustva nesparenih elektrona i mogu naneti ozbiljnu štetu biološkim makromolekulima (lipidi, ugljenihidrati, proteini i nukleinske kiseline) ukoliko se ne uklone blagovremenim delovanjem enzimskih i ne-enzimskih komponenti antioksidativnog sistema (Ahmad, 1995). Stanja u kojima proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika prevazilazi kapacitet antioksidativne odbrane dovode do narušavanja redoks ravnoteže u ćelijama i opisuju se kao oksidativni stres (Sies, 1991). Metaboličke transformacije benzo[*a*]pirena i aktiviranje signalnih puteva, praćenih transkripcijom različitih gena vezivanjem ovog PAH za Ah receptor, dovode do stvaranja velike količine reaktivnih vrsta kiseonika u ćelijama (Mangal i sar., 2009; Senft i sar., 2002; Kim i Lee, 1997). Insekti su razvili niz mehanizama koji ih štite od delovanja prooksidanasa i sprečavaju oksidativni stres, kao što su između ostalih enzimi antioksidativne odbrane superoksid dismutaza (SOD), katalaze i glutathion reduktaze (GR) (Pardini, 1995; Ahmad i Pardini, 1990b). Aktivnosti ovih enzima antioksidativne odbrane pokazale su značajan bioindikatorski potencijal u praćenju kopnenog i vodenog zagađenja benzo[*a*]pirenom kod različitih vrsta organizama.

Superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1.) se često opisuje kao prva linija odbrane od reaktivnih vrsta kiseonika, što ostvaruje katalizom dismutacije superoksid anjon radikala do vodonik peroksida i molekuskog kiseonika (McCord i Fridovich, 1988), na sledeći način:

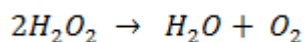


Postoji više izoformi ovog metaloenzima zavisno od metala koji je prisutan u njegovom aktivnom centru - Fe SOD, Ni SOD, Mn SOD, Cu/Zn SOD, kao i ekstracelularna EC SOD. Njegova ćelijska aktivnost je zastupljena u mitohondrijama kao Mn SOD i citoplazmi u obliku Cu/Zn SOD. Opisana je i vanćelijska aktivnost ovog enzima kod insekata (Yu, 1994).

Studije dostupne u literaturi opisuju različite efekte benzo[*a*]pirena na SOD, što je verovatno uslovljeno razlikama između različitih vrsta kičmenjaka i beskičmenjaka, kao i eksperimentalnim uslovima tretmana. Vodeni beskičmenjaci, *Mytilus galloprovincialis* (Mytilida) i *Saccostrea cucullata* (Ostreida) odgovaraju indukcijom SOD aktivnosti na produženo izlaganje B[*a*]P (Niygoi i sar., 2001; Porte i sar., 1991). Akutni tretman benzo[*a*]pirenom, uticao je na povećanje aktivnosti SOD kod larvi *Chironomus sancticaroli* (Diptera) (Vicentini i sar., 2017). Park i sar. (2012) detektovali su razlike u ekspresiji gena za Mn SOD i Cu/Zn SOD kod *Chironomus riparius* (Diptera) tokom kratkotrajnog prisustva B[*a*]P, pri čemu je uglavnom zapažena njihova supresija. Ilijin i sar. (2015) zabeležili su da dugotrajno izlaganje larvi gubara (*Lymantria dispar*) benzo[*a*]pirenu dovodi do indukcije aktivnosti SOD u srednjem crevu.

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6.) je enzim čijim dejstvom se vodonik peroksid razlaže do vode i molekuskog kiseonika (jednačina ispod). Ovaj antioksidativni enzim odlikuje visoka efikasnost

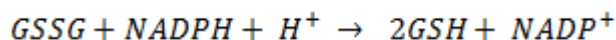
uklanjanja vodonik peroksida, a brzina katalize je zavisna od koncentracije supstrata odnosno od donora vodonika (Diplock, 1994; Sichak i Dounce, 1986).



U aktivnom centru katalaza sadrži Fe^{3+} i dominantno je zastupljena u peroksimima ali i u citoplazmi i mitohondrijama insekata (Mockett i sar., 2003; Ahmad i sar., 1988).

Zabeleženi su različiti efekti benzo[a]pirena na katalaznu aktivnost. Dugotrajno prisustvo B[a]P u medijumu vodenih beskičmenjaka *Perna viridis* i *M. galloprovincialis* (Mytilida) dovelo je do značajnog povećanja specifične aktivnosti katalaze (Richardson i sar., 2008; Orbea i sar., 2002). Suprotno ovim nalazima, pokazano je da dvonedeljno izlaganje ovom PAH ne ostvaruje nikakav uticaj na katalaznu aktivnost zemljišnog crva *Eisenia fetida andrei* (Haplotaaxida) (Saint-Denis i sar., 1999). Kod insekatske vrste *C. sancticaroli* (Diptera) akutni tretman B[a]P značajno je redukovao aktivnost katalaze (Vicentini i sar., 2017).

Glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2.) je homodimerni enzim koji u svakoj subjedinici sadrži prostetičku grupu flavin adenin dinukleotid (FAD). Katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) do redukovane forme (GSH), uz učešće nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) kao redukujućeg kofaktora. Reakcija podrazumeva prvo redukciju FAD pomoću NADPH i transfer redukujućeg ekvivalenta na redoks aktivan disulfid u aktivnom centru enzima, u kome zatim dolazi do redukcije GSSG (Tandoğan i Ulusu, 2006; Ahmad i sar., 1988).



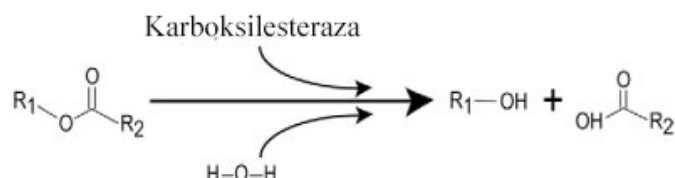
Slično primerima koji su dati za SOD i katalazu, rezultati istraživanja o uticaju benzo[a]pirena na aktivnost GR su veoma retki i nekonzistentni, što je verovatno u vezi sa model sistemima i uslovima izloženosti toksikantu. Pokazano je da kratkotrajno izlaganje benzo[a]pirenu značajno indukuje aktivnost GR kod *Pomatoschistus microps* (Gobiiformes), ali i da četvoronedeljni tretman ovim polutantom ostvaruje isti efekat na GR kod *P. viridis* (Mytilida) (Vieira i sar., 2008; Richardson i sar., 2008). Suprotno ovim rezultatima, Gravato i Guilhermino (2009) našli su da dugotrajno prisustvo B[a]P u bazenima sa vodom, nije imalo efekta na aktivnost GR kod *Dicentrarchus labrax* (Perciformes). Filipović i sar. (2019) detektovali su smanjenje aktivnosti glutacione reduktaze kod larvi *Euproctis chrysorrhoea* (Lepidoptera) posle hronične ishrane fluorantonom. Podaci o uticaju benzo[a]pirena na aktivnost GR kod insekatskih vrsta ne postoje u dostupnoj literaturi.

1.3.2. Enzimi koji učestvuju u procesima detoksifikacije

Detoksifikacija ksenobiotika podrazumeva niz složenih procesa biotransformacije, tokom kojih se odvija aktivacija i deaktivacija intermedijernih jedinjenja u cilju njihove ekskrecije. Biotransformacija se odigrava u dve faze. U fazi I hidrofobnim ksenobiotičima se povećava rastvorljivost u vodi kroz reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize, aktivnim učešćem mnogih citohrom P 450 monooksigenaza, reduktaza i karboksilesteraza. Tokom faze II metabolički intermedijeri faze I postaju značajno hidrofilniji zahvaljujući reakcijama konjugacije sa sulfatima, glukuronidima i glutationom, pomoću različitih transferaza (glutacion S-transferaza, uridin 5'-difosfat glukuronosulfotransferaza) (Yu, 2004; Timbrell, 1991). Insekti su u svom prirodnom okruženju suočeni sa mnogim toksičnim supstancama, prirodnog (sekundarni metaboliti biljaka – alelohemikalije) ili veštačkog porekla (insekticidi, PAH i drugi organski zagađivači) zbog čega poseduju različite detoksifikacione mehanizme, u okviru kojih karboksilesteraze, acetilholinesteraze i glutacion S-transferaza (GST) ostvaruju važne uloge. Ovi detoksifikacioni enzimi poseduju visok

potencijal za upotrebu u biomonitoringu zagađenja različitim organskim polutantima (videti u Hyne i Maher, 2003).

Karboksilesteraze (EC 3.1.1.1.) su klasa α/β hidrolaza koje katalizuju hidrolizu karboksilnih estara do sadržavajućih alkohola i kiselina. Hidroliza supstrata odvija se u dva koraka, i prvo dolazi do nukleofilnog napada kiseonikom aminokiselinskog ostatka serina iz aktivnog mesta, na karbonilni ugljenik supstrata, uz istovremeno izdvajanje alkoholnog proizvoda i formiranje acil forme enzima. U drugom koraku ponovo dolazi do nukleofilnog napada molekula vode radi izmeštavanja serina i oslobađanja kiseline, što je praćeno regeneracijom slobodnog enzima (Yan i sar., 2009).



Slika 2. Pojednostavljen mehanizam hidrolize karboksilestara dejstvom karboksilesteraza (prilagođeno iz Montella i sar., 2012).

Karboksilesteraze su najzastupljenija klasa esteraza u svim tkivima larvi *L. dispar*, osim u mozgu gde su dominantnije jedino acetilholinesteraze (Kapin i Ahmad, 1980). Kod insekata karboksilesteraze učestvuju u mnogim fiziološkim funkcijama – digestiji hrane, modulaciji metabolizma, rasta i reprodukcije (Montella i sar., 2012; Jones i Bancroft, 1986).

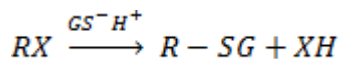
Karboksilesteraze čine važnu komponentu faze I detoksifikacionog sistema i ostvaruju važnu ulogu u razvoju otpornosti na više vrsta insekticida (Dubovskiy i sar., 2012; Dubovskiy i sar., 2011; Hemingway i sar., 2004), tako da je najviše studija urađeno upravo sa ciljem primene karboksilesteraza kao indikatora zagađenja životne sredine insekticidima (Yan i sar., 2009; Wheelock i sar., 2008; Gunning i sar., 1996). Farcy i sar. (2013) su uočili da prisustvo benzo[*a*]pirena povećava aktivnost karboksilesteraza u školjkama *Mytilus edulis* (Mytilida). Autori su zaključili da u metabolizmu B[*a*]P verovatno učestvuju karboksilesteraze zbog čega bi trebalo dodatno ispitati potencijal ovog enzima za primenu u ekotoksikološkim studijama. Takođe, Vicentini i sar. (2017) su pokazali značajnu osetljivost karboksilesteraza na prisustvo benzo[*a*]pirena i detektovali indukciju aktivnosti ovog enzima kod *C. sancticaroli* (Diptera).

Acetilholinesteraze (EC 3.1.1.7.) pripadaju porodici holinesteraza koje su specijalizovane za hidrolizu neurotransmitera acetilholina na acetat i holin, u sinaptičkom prostoru, čime se blokira nervni impuls (Fournier i sar., 1995). Smatraju se markerom neurotoksičnosti kod insekata i izuzetno su osetljive na dejstvo organofosfatnih i karbamatnih pesticida koji inhibiraju njihovu aktivnost, zbog čega se koriste kao biomarker prisustva ovih polutanata u okruženju (Lionetto i sar., 2011; Badiou i Belzunces, 2008). Značajno je poraslo interesovanje za acetilholinesteraze i njihovu širu primenu u biomonitoringu sredinskog zagađenja, zbog njihove osetljivosti na prisustvo PAH i drugih organskih polutanata (Richardi i sar., 2018; Mrdaković i sar., 2016; Rodrigues i sar., 2013; Vieira i sar., 2008).

In vitro eksperimenti na acetilholinesterazama izolovanim iz jegulje *Electrophorus electricus* (Gymnotiformes) pokazali su da benzo[*a*]piren ostvaruje inhibitorski efekat na aktivnost ovog enzima (Jett i sar., 1999; Kang i Fang, 1997). Drugačije rezultate dobili su Jifa i sar. (2006) koji su posle 18 dana boravka *Lateolabrax japonicus* (Perciformes) u bazenima sa dodatkom B[*a*]P detektovali značajno povećanje aktivnosti acetilholinesteraza. Indukcija aktivnosti ove holinesteraze nađena je i u eksperimentima Vicentini i sar. (2017) nakon kratkotrajnog izlaganja larvi *C. sancticaroli* (Diptera) benzo[*a*]pirenu. Ilijin i sar. (2017) detektovali su inhibiciju acetilholinesterazne aktivnosti posle hroničnog tretmana larvi *L. dispar* sa benzo[*a*]pirenom.

Glutation S-transferaze (GST, EC 2.5.1.18.) predstavljaju grupu multifunkcionalnih enzima koji imaju centralnu ulogu u fazi II detoksifikacije ksenobiotika. Postoji više izoformi

enzima koje su detektovane u citoplazmi i mitohondrijama eukariotskih ćelija gde se uglavnom nalaze u solubilnom obliku, sa manjom frakcijom asociranom za membrane ćelijskih struktura (Hayes i sar., 2005; Yu, 1996). Funkcija GST jeste konjugacija redukovanog glutationa (GSH) sa reaktivnim metabolitima ksenobiotika u cilju njihove lakše ekskrecije. Mehanizam reakcije nije potpuno razjašnjen, ali je poznato da se ostvaruje nukleofilnim napadom aktivirane sulfhidrilne grupe GSH (GS^-H^+) na elektrofilni supstrat (RX) i formiranjem tioetarske veze, pri čemu se ističe važnost generisanja aktivirane sulfhidrilne grupe GSH (Angelucci i sar., 2005).



Kod insekata GST ima važnu ulogu i u antioksidativnoj odbrani koju ispoljava uklanjanjem štetnih produkata lipidne peroksidacije, ali i redukcijom organskih peroksida do alkohola, zahvaljujući peroksidaznoj katalitičkoj aktivnosti nekih izoformi (Blagojević i Grubor-Lajšić, 2000).

Postoji dosta podataka o uticaju PAH i benzo[*a*]pirena na GST različitih vrsta kopnenih i vodenih insekata i zglavkara. Hronično izlaganje vodenih beskičmenjaka *Litopenaeus vannamei* (Decapoda) i *P. viridis* (Mytilida) benzo[*a*]pirenu rezultovalo je značajnim povećanjem aktivnosti GST (Ren i sar., 2014; Richardson i sar., 2008). Slične rezultate dobili su i Riaz i sar. (2009) koji su pronašli da trodnevni tretman larvi *Aedes aegypti* (Diptera) sa B[*a*]P deluje inducibilno na aktivnost GST kao i na ekspresiju više gena koji kodiraju izoforme ovog enzima. Sa druge strane, inhibicija aktivnosti GST nađena je posle kratkotrajnog kontakta larvi *C. sancticaroli* (Diptera) sa benzo[*a*]pirenom (Vicentini i sar., 2017).

1.3.3. Proteini toplotnog šoka (Hsp70)

Proteini toplotnog šoka (od engl. heat shock protein, Hsp) predstavljaju grupu veoma zastupljenih proteina u prokariotskim i eukariotskim ćelijama, koji se na osnovu svojih primarnih funkcija nazivaju proteini stresa i molekularni šaperoni. Esencijalni su za procese uvijanja proteina u native konformacije, pozicioniranja proteina u ćeliji, degradacije oštećenih proteina, ali i sprečavanja njihove denaturacije (Morimoto i sar., 1994). Na osnovu molekularnih masa, aminokiselinske sekvence i užih specijalnosti, Hsp su podeljeni na sledeće klase: proteini toplotnog šoka malih molekularnih masa (sHsp) i one većih molekularnih masa - Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp100 (Gupta i sar., 2010). Proteini Hsp70 usko su vezani za stresna stanja u ćeliji gde se njihova ekspresija i funkcija ispoljava kao odgovor na proteotoksičnost indukovanu dejstvom različitih stresora (Lewis i sar., 1999). Proteotoksičnost dovodi do aktivnog angažovanja više izoformi Hsp70 koje deluju u pravcu sprečavanja dalje denaturacije i uklanjanja abnormalnih proteina (Mayer i Bukau, 2005).

Istraživanja su pokazala da su proteini Hsp70 osetljivi na prisustvo hemijskih zagađivača životne sredine, zbog čega su opsežno korišćeni u mnogim ekotoksikološkim studijama kao markeri proteotoksičnosti u različitim model sistemima (Gupta i sar., 2010; Bierkens, 2000; Sanders i Martin, 1993; Sanders, 1993). Benzo[*a*]piren, uzrokuje oksidativni stres povećavanjem sadržaja reaktivnih vrsta kiseonika koje oštećuju proteine oksidacijom tiolnih grupa i dovode do njihove destabilizacije (Freeman i sar., 1999). Reaktivni intermedijeri metabolizma B[*a*]P mogu formirati kovalentne i nekovalentne veze za strukturnim proteinima i enzimima, što narušava njihove strukture i funkcije i dovodi do denaturacije (Ait-Aïssa i sar., 2000; Voellmy, 1996). Takođe, veoma lipofilna jedinjenja kao benzo[*a*]piren, odlikuje sposobnost interakcije sa hidrofobnim aminokiselinskim ostacima proteina, lociranim unutar native konformacije, zbog čega dolazi do poremećaja u njihovoj strukturi (Neuhaus-Steinmetz i Rensing, 1997). Nađeno je da PAH i B[*a*]P snažno indukuju ekspresiju gena za Hsp70 kod *Eisenia fetida* (Haplotaxida) (Zhang i sar., 2017), *Tigriopus japonicas* (Haracticoida) (Rhee i sar., 2009), *Oniscus asellus* (Isopoda) (Köhler i sar., 1999) i *C. tentans* (Diptera) (Lee i sar., 2006).

1.4. Digestivni enzimi i energetske molekuli u hemolimfi

Digestivni trakt je mesto direktnog kontakta insekatskog organizma sa elementima životne sredine, akumulacije nutrijenata, ali i antinutrijenata. Glavni procesi digestije i apsorpcije hrane odigravaju se u srednjem crevu čije su epitelijalne ćelije odgovorne za sintezu mnogobrojnih digestivnih enzima, procese transporta između lumena i hemolimfe i održavanje gradijenta pH i jona kalijuma (Terra i Ferreira, 2012). Između lumena i epitela srednjeg creva nalazi se peritrofna membrana hitinsko-proteinske strukture, koja sprečava fizička oštećenja epitela i prodiranje mikroorganizma u hemolimfu, ali i povećava digestivnu efikasnost (Terra, 2001). Osim glavne uloge u digestiji i apsorpciji, srednje crevo predstavlja i centralno metaboličko mesto, zbog dominantne zastupljenosti komponenata antioksidativnog sistema kao i značajnog sadržaja detoksifikacionih enzima (Smagghe i Tirry, 2001; Blagojević i Grubor-Lajšić, 2000). Ovakva fiziološka organizacija i koncentrisanje odbrambenih mehanizama na nivou srednjeg creva ukazuje na njegovu vitalnu ulogu u sprečavanju i kontroli toksičnih efekata ksenobiotika unetih ishranom, zbog čega je ovaj deo alimentarnog trakta insekata fizička barijera i prva linija odbrane (Dow, 1986; Dauterman i Hodgson, 1978). Pokazano je da se proces biotransformacije benzo[*a*]pirena dominantno odigrava u srednjem crevu i Malpigijevim cevčicama insekata, pri čemu se veći deo ovog PAH i akumulira u crevu (He i sar., 1998; Van Brummelen i Van Straalen, 1996; Kumi i sar., 1991). Ovi nalazi sugerisu da najveći teret toksičnosti benzo[*a*]pirena u srednjem crevu nose prisutni enzimi i drugi biološki makromolekuli, uključujući i različite membranske strukture. Narušavanje aktivnosti digestivnih enzima i oštećenje ćelijskih membrana epitela srednjeg creva ozbiljno ugrožava digestiju nutrijenata kao i njihovu apsorpciju, što direktno redukuje energetske izvore dostupne za metaboličke procese i/ili deponovanje, i negativno utiče na osobine fitnesa insekata.

Podaci u literaturi opisuju efekte različitih ksenobiotika na digestivne enzime insekata sa fokusom na uticaj alelohemikalija, zatim insekticida i u manjoj meri, uticaj teških metala kao važnih polutanata životne sredine (Badiou-Bénéteau i sar., 2012; Charron i sar., 2013; Mrdaković i sar., 2014; Vlahović i sar., 2015a). Međutim, dejstvo PAH odnosno B[*a*]P na digestivne enzime insekata, i to konkretno na proteaze, fosfataze, lipaze i *α*-glukozidaze, nije ispitano ni u jednoj studiji dostupnoj u literaturi do sada, koliko je nama poznato. Sveprisutnost i visoka toksičnost ovog polutanta nameću važnost utvrđivanja njegovih efekata na aktivnost digestivnih enzima, pogotovu što je glavni put intoksikacije benzo[*a*]pirenom kroz hranu.

Proteaze su grupa hidrolitičkih enzima koji razlažu proteine do aminokiselina. Egzoproteaze (egzopeptidaze) katalizuju hidrolizu peptidne veze od N- ili C- terminalnog kraja polipeptidnog lanca, sukcesivno uklanjajući aminokiselinske ostatke (karboksipeptidaze i aminopeptidaze), dok endoproteaze (endopeptidaze) deluju na peptidne veze unutar polipeptidnog lanca. Digestivne egzoproteaze insekata dele se na serin, cistein i aspartat proteaze, na osnovu razlika u katalitičkom mehanizmu, a proizvod njihove aktivnosti su oligopeptidi koje dalje razlažu amino- i karboksipeptidaze (Terra i Ferreira, 2012). Većina proteazne aktivnosti u srednjem crevu Lepidoptera potiče od serin proteaza čiji su glavni predstavnici tripsin, himotripsin i elastaze (Srinivasan i sar., 2006) pri čemu postoje indicije da tripsin i tripsinu-slične proteaze najviše doprinose degradaciji proteina (Chougule i sar., 2008; Valaitis, 1995). Tripsin Lepidoptera hidrolizuje unutrašnje peptidne veze, bliže C-terminalnom kraju polipeptidnog lanca i odlikuje se molekulskom masom od 20-35 kDa, sa optimalnom pH vrednošću iznad 9 (Terra i Ferreira, 1994). Aminopeptidaze insekata su metaloenzimi koji uklanjaju aminokiselinske ostatke sa N-terminalnog kraja oligopeptida i kod Lepidoptera su vezane za citoplazmatičnu membranu ćelija crevnog epitela odnosno za mikrosesice epitela (Valaitis, 1995). Karakteristične molekulske mase su od 90-130 kDa, a vrednosti pH optimalne za aktivnost enzima su između 7 i 9 (Terra i Ferreira, 2012).

Uočeno je da kod Lepidoptera postoji više grupa aminopeptidaza sa velikim brojem izoformi, čija se ekspresija menja u zavisnosti od sastava supstrata radi efikasnije digestije, kao i u slučajevima prisustva inhibitora proteazne aktivnosti, gde se favorizuju rezistentnije izoforme

(Crava i sar., 2010; Wang i sar., 2005a; Rajagopal i sar., 2003). Značajne promene proteazne aktivnosti zabeležene su pri delovanju hemijskih kontaminanata životne sredine na zglavkare i insekte (Charron i sar., 2013; Vlahović i sar., 2015a).

Alkalne i kisele fosfataze katalizuju hidrolizu raznovrsnih fosfomonoestara, obezbeđuju pul fosfata u neorganskom obliku, učestvuju u reakcijama transfosforilacije i aktivno učestvuju u završnim fazama varenja hrane (Terra i sar., 1996; Cheung i Low, 1975). Alkalna fosfataza se smatra markerom mikroresica epitela srednjeg creva gde je, u okviru kolumnarnih ćelija, locirana glavna, membranska frakcija ovog enzima, uključena u procese digestije i apsorpcije nutrijenata. Solubilna forma alkalne fosfataze prisutna je na apikalnoj površini peharastih ćelija i odlikuje se ATP-aznom aktivnošću preko koje učestvuje u regulaciji jonske i osmotske ravnoteže između lumena creva i hemocela (Terra i Ferreira, 2012; Eguchi, 1995; Azuma i Eguchi, 1989). Tkivno su najzastupljenije u srednjem crevu i Malpigijevim sudovima (Ferreira i Terra, 1980). Promene u aktivnosti alkalnih fosfataza vezane su za presvlačenje i dijapauzu insekata, odgovor na stres, a doprinose i razvoju otpornosti na infekcije i insekticide (Wang i sar., 2011; Rauschenbach i sar., 2007; Miao, 2002; Yi i Adams, 2001; Sukhanova i sar., 1996).

Kisele fosfataze, pored važne uloge u digestiji nutrijenata, odlikuje učešće u mnogim metaboličkim procesima, uključujući transport jona, resorpciju vode, ekskreciju, rast i metarmofozu insekata, ali i funkcije u nadomešćivanju ćelija tokom apoptoze (Terra i Ferreira, 2012; Yi i Adams, 2001; Cheung i Low, 1975; Sridhara i Bhat, 1963). Postoji više izoformi ovih enzima različitih fizičkih svojstava i supstratnog afiniteta, od kojih je u crevu insekata odnosno citoplazmi ćelija epitela dominantna solubilna forma, dok su u manjoj meri, izoforme vezane za membranu. Aktivnost solubilnih kiselih fosfataza inhibira se dejstvom fluorida, tartarata i molibdata, dok membranske izoforme pokazuju rezistenciju prema ovim hemikalijama (Terra i Ferreira, 1994; Terra i sar., 1988). Međutim, postoje i dokazi da inhibiciji ne podležu sve kisele fosfataze u citoplazmi, već samo one uključene u procese degradacije makromolekula u okviru lizozoma, koje se smatraju markerom ovih organela (Nemec i Ženka, 1996; Aidells i sar., 1971).

Fosfataze insekata pokazuju osetljivost prema teškim metalima (Badiou-Bénéteau i sar., 2013; Vlahović i sar., 2013; Vlahović i sar., 2009). Mnoge studije pokazuju značajan, uglavnom negativan uticaj sekundarnih metabolita biljaka na aktivnost alkalnih i kiselih fosfataza Lepidoptera, što za posledicu ima smanjenu efikasnost digestije nutrijenata i nepovoljan uticaj na osobine fitnesa insekata (Senthil-Nathan, 2013; Basiouny i sar., 2010; Senthil-Nathan i sar., 2009; Senthil-Nathan i sar., 2007; Senthil-Nathan, 2006). Veliki broj sekundarnih metabolita biljnog porekla ima složene, policiklične i steroidne hemijske strukture, nalik benzo[*a*]pirenu (Senthil-Nathan, 2013; Senthil-Nathan i sar., 2005), tako da se može pretpostaviti i da ovaj PAH interaguje sa fosfatazama u srednjem crevu. Istraživanja na vodenim beskičmenjacima pokazala su da PAH i B[*a*]P ozbiljno oštećuju integritet i funkcionisanje ćelija crevnog epitela, dovodeći do uvećanja broja i dimenzija glatkog endoplazmatičnog retikuluma i lizozoma (Lowe i sar., 2006; Lowe i sar., 1981) ukazujući na potencijalnu upotrebu alkalnih i posebno kiselih fosfataza kao enzimskih indikatora toksičnosti benzo[*a*]pirena.

Lipaze su velika grupa enzima koja katalizuje hidrolitičko isecanje karboksil estarske veze primarno triacilglicerola i diacilglicerola, i u manjoj meri galaktolipida i fosfolipida, pri čemu se oslobađaju masne kiseline. Digestivne lipaze insekata ili triacilglicerol lipaze ostvaruju svoju funkciju u digestiji lipidnih komponenti hrane, pomoću različitih surfaktanata koji obezbeđuju efikasnu emulgaciju masti i formiranje velike dodirne površine između vodenih i lipidnih molekula, koje su neophodne za dejstvo ovih enzima (Terra i sar., 1996; De Veau i Schultz, 1992). U srednjem crevu Lepidoptera nalaze se i lipaze koje funkcionišu kao galaktolipaze i fosfolipaze (Christeller i sar., 2011; Horne i sar., 2009), a postoje dokazi da neke od digestivnih lipaza *L. dispar* pokazuju i potencijalnu esteraznu aktivnost (Mrdaković i sar., 2008). Digestivne lipaze insekata učestvuju i u procesima metarmofoze i apoptoze (Nishiura i sar., 2007). Zabeležena je antivirusna aktivnost digestivnih lipaza larvi *Bombyx mori* (Lepidoptera) kroz degradaciju omotača virusnog

kapsida, kao i njihov važan doprinos u razvijanju otpornosti na insekticide (Araújo i sar., 2008; Ponnuel i sar., 2003).

α -glukozidaze katalizuju hidrolizu terminalnog, neredukujućeg molekula α -1,4-glukoze sa aril ili alkil glikozida, disaharida, oligosaharida, maltoze i maltodekstrina. Većina insekatskih α -glukozidaza locirana je u srednjem crevu, uglavnom u solubilnoj formi ili zarobljena u okviru glikokaliksa koji naleže na membrane epitelnih ćelija, dok je manji deo ovih enzima vezan za membranu mikrosesica epitelnih ćelija (Silva i Terra, 1995; Terra i Ferreira, 1994). Ovi enzimi imaju ključnu ulogu u finalnim procesima digestije ugljenih hidrata. Zabeležena je značajna modulacija aktivnosti α -glukozidaza od strane biljnih alelohemikalija kao i pri izlaganju teškim metalima (Senthil-Nathan, 2013; Vlahović i sar., 2015b).

Lipaze i α -glukozidaze predstavljaju veoma važne digestivne enzime jer omogućavaju metaboličko korišćenje molekula sa najvećim energetske sadržajem, odnosno ugljenih hidrata i lipida. Dostupnost energetske depoa je od vitalnog značaja za rast, razvoj i reprodukciju insekata kako u normalnim uslovima tako i pri dejstvu stresa, kada se potrebe za energijom značajno povećavaju usled angažovanja različitih odbrambenih mehanizama. Određivanje aktivnosti ovih enzima kao i sadržaja lipida i glavnog ugljenohidratnog molekula u hemolimfi insekata - trehaloze, može biti od velikog značaja u proceni efekata toksičnih supstanci i poslužiti kao biohemijski pokazatelj prisustva i dejstva polutanata prisutnih u životnoj sredini. Masno telo insekata kombinuje svojstva i funkcije jetre i adipoznog tkiva kičmenjaka, ostvarujući fundamentalnu ulogu u deponovanju i metabolizmu lipida i ugljenih hidrata, kao i sintezi proteina hemolimfe. Tokom dugotrajnih potreba insekata za energijom, dolazi do mobilizacije lipida sa najvećim sadržajem metaboličke energije - triacilglicerola, iz masnog tela u hemolimfu, gde se slobodne masne kiseline u formi lipoforina, transportuju do targetnih tkiva (Van der Horst, 2003). Trehaloza je neredukujući disaharid glukoze koji predstavlja dominantni šećer u hemolimfi insekata, u koju dospeva razlaganjem glikogena u masnom telu. Koncentracija ovog energetske bogatog molekula je pod endokrinom kontrolom i direktno je zavisna od uslova životne sredine, fiziološkog stanja insekata i njihove ishrane (Thompson, 2003).

Pokazani su negativni efekti različitih hemijskih zagađivača na mnoge komponente energetske metabolizma zglavkara i insekata (Vlahović i sar., 2015b; Avigliano i sar., 2014; Oliveira i sar., 2013; Lavarias i sar., 2006; Choi i sar., 2001).

1.5. Benzo[a]piren i osobine fitnesa insekata

Prisustvo hemijskih toksikanata poput PAH i benzo[a]pirena predstavlja svojevrsan izazov za organizme, uključujući insekte, u smislu optimalne preraspodele energetske resursa između održavanja fizioloških i biohemijskih funkcija na optimalnom nivou, i aktiviranja različitih, energetske zahtevnih, odbrambenih sistema (Calow, 1989). Kako bi obezbedili preživljavanje, insekti troše najviše metaboličke energije na odvijanje detoksifikacionih procesa vezanih za metaboličku transformaciju i ekskreciju benzo[a]pirena, kao i na zaštitne sisteme, neophodne u prevenciji i sanaciji njegovih toksičnih efekata (antioksidativni sistem i Hsp70), zbog čega dolazi do redukcije razvića, rasta i reproduktivnih karakteristika jedinki (Van Straalen i Hoffmann, 2000; Forbes i Calow, 1996). Ovakve odbrambene strategije po principu uskraćivanja i ukidanja energetske budžeta za metaboličke procese koji direktno definišu osobine fitnesa, imaju značajan uticaj na populacionu dinamiku insekata (Sibly i Calow, 1989). Parametri fitnesa mogu pružiti važne informacije o efektima zagađivača na nivou populacije.

Dokumentovano je više podataka o uticaju PAH i benzo[a]pirena na osobine životne istorije zglavkara. Bang i sar. (2009) su pokazali da B[a]P uzrokuje telesne deformacije kod *Tigriopus japonicus* (Harpacticoida) i da značajno usporava njihovo razviće. Dugotrajna ishrana benzo[a]pirenom dovela je do značajne redukcije mase kod *Oniscus asellus* i *Porcellio scaber* (Isopoda) (Van Brummelen i Stuijzand, 1993), a kod *Daphnia magna* (Cladocera) uočeno je i smanjenje reproduktivne sposobnosti adulta (Ha i Choi, 2009). Kod insekatske vrste *C. dilutus*

(Diptera) hronično izlaganje benzo[*a*]pirenu imalo je negativan efekat na razvoj larvi i reprodukciju adulta (Du i sar., 2014). Prud'homme i sar. (2017) zapazili su da B[*a*]P značajno ubrzava razviće larvi *A. aegypti* (Diptera), ali i povećava stopu mortaliteta. Sa druge strane, Ilijin i sar. (2015) našli su da dugotrajna dijeta larvi *L. dispar* sa benzo[*a*]pirenom dovodi do značajne redukcije njihovih masa i produžava vreme razvića. Sličan rezultat dobili su Mrdaković i sar. (2015) pri ispitivanju uticaja PAH, fluorantena na osobine fitnesa larvi *L. dispar*.

1.6. Biomarkeri zagađenja životne sredine

Izuzetan značaj u praćenju vrste i količine zagađenja, tj. kontroli kvaliteta životne sredine, pridaje se biološkom monitoringu ili biomonitoringu, koji podrazumeva praćenje specifičnih bioloških odgovora organizama na promene u kvalitetu životne sredine, kao i akumulacije ksenobiotika u njihovim tkivima (Peakall i Walker, 1994).

Za razliku od hemijskog monitoringa kojim se određuje koncentracija zagađivača u životnoj sredini, biomonitoring daje prednost određivanju bioloških efekata zagađivača, na različitim nivoima biološke organizacije. Prisustvo zagađivača, čak i u niskim koncentracijama, deluje stresno na organizme i indukuje niz kaskadnih odgovora u cilju odbrane i zaštite od toksičnih efekata, pri čemu su ovi biološki događaji izuzetno brzi, a mnogi i specifično povezani sa određenim tipom zagađivača. Biomarker se definiše kao bilo koja promena u biološkom odgovoru (promene na nivou gena i molekula, na nivou ćelija i tkiva, fiziološke, kao i promene ponašanja) koja može biti povezana sa prisustvom ksenobiotika u životnoj sredini, ili njihovim toksičnim efektima (Kaviraj i sar., 2014; Peakall, 1994). Izuzetno je važno da biomarkeri ukazuju na rano prisustvo stresa u organizmima, odnosno da se njihovi odgovori mogu detektovati pre izazivanja ozbiljnih posledica na jedinke i njihove populacije. Kao posebno osetljiva grupa ističu se molekularni biomarkeri – geni, proteini i metaboliti, čiji su odgovori brzi i lako merljivi, što im daje prednost u odnosu na biomarkere vezane za više nivoe biološke organizacije (Paniagua-Michel i Olmos-Soto, 2016). Zahvaljujući tome što ističu vezu između kontaminanata i bioloških promena u organizmima, biomarkeri nalaze opsežnu primenu u ekotoksikološkim studijama, koje podrazumevaju proučavanje toksičnih efekata polutanata u laboratorijskim i terenskim uslovima, sa svrhom procene zagađenja i monitoringa (Forbes i sar., 2006).

Biomarkeri se mogu podeliti u tri grupe, na: biomarkere izloženosti, biomarkere efekta i biomarkere osetljivosti (Shugart i sar., 1992). Biomarkeri izloženosti obuhvataju kvalitativno i kvantitativno određivanje egzogenih supstanci, njihovih metabolita ili proizvoda interakcije ksenobiotika i ciljnih molekula ili ćelija, u okviru organizma. U ovaj tip spada praćenje akumulacije kontaminanata u tkivima organizama. Biomarkeri efekta podrazumevaju merljive biohemijske, fiziološke ili druge promene u tkivima i telesnim tečnostima organizma, koje se mogu povezati sa utvrđenim ili izvesnim pogoršanjem zdravlja ili bolešću. Biomarkeri osetljivosti ističu nasledenu ili stečenu sposobnost organizma da odgovori na izloženost specifičnim ksenobioticima. Ova grupa biomarkera ima poseban značaj u rasvetljavanju variranja nivoa odgovora na izloženost polutantima kod različitih jedinki. Takođe je uspostavljeno više kriterijuma koje bi biomarkeri trebalo da ispune radi pravilne i efikasne primene u biomonitoringu odnosno njihove validacije. Van der Oost i sar. (2003) ističu kao neophodne uslove za uspešnu primenu biomarkera, pre svega jednostavnost, pouzdanost i nisku cenu analize, zatim osetljivost i definisanost bazičnog odgovora kao i varijacija u prirodi, i u prisustvu ksenobiotika. Takođe ukazuju na važnost identifikacije prirode odgovora na delovanje biotičkih i abiotičkih faktora koji mogu uticati na biomarkere, kao i na poznavanje mehanizma toksičnosti i veza sa efektima ksenobiotika na višim biološkim nivoima. Uočeno je da na odgovore biomarkera mogu značajno uticati različiti fiziološki i sredinski faktori, kao što su genetičko nasleđe, starost, reproduktivni status i pol jedinki, temperatura, geografske odlike terena i dostupnost hrane. Različite populacije jedinki iste vrste, u zavisnosti od istorije kontakta sa polutantima u životnoj sredini, mogu ispoljiti drugačije biomarkerske odgovore, usled mogućeg razvoja genetičkih i fenotipskih adaptacija, karakterističnih kod produženog dejstva stresora.

Poseban problem predstavljaju staništa koja su opterećena kombinacijom više različitih polutanata, gde se indukovani biološki odgovori mogu međusobno poništiti ili intenzivirati (Forbes i sar., 2006; Brammell i sar., 2004; Shugart i sar., 1992). Više studija pokazalo je da populacija riba *Fundulus heteroclitus* (Cyprinodontiformes) iz reke Elizabet sa visokim stepenom zagađenja PAH i polihlorovanim bifenilima, ne ispoljava toksične efekte karakteristične za mehanizam dejstva benzo[a]pirena i sličnih PAH. Razlog je bila desenzitizacija glavnog receptora za ova jedinjenja, AhR, odgovornog za pokretanje bioloških odgovora, uključujući monooksigenaze citohrom P 450, čije aktiviranje izostaje (Wills i sar., 2010; Meyer i sar., 2003; Meyer i Di Giulio, 2002; Ownby i sar., 2002). Zahvaljujući ovim genetičkim adaptacijama, populacija preživljava i uspeva u prisustvu polutanata, ali kod ovih jedinki, monooksigenaze citohrom P 450 koje su prihvaćeni biomarker izloženosti za B[a]P, nemaju relevantan biološki odgovor. Zbog toga se sve više ističe važnost i prednost upotrebe kombinacije nekoliko komplementarnih biomarkera (Badiou-Bénéteau i sar., 2013). Primenom metode integrisanog odgovora biomarkera (od engl. integrated biomarker response, IBR) omogućava se jednostavna interpretacija bioloških odgovora nekoliko biomarkera, grafičkim prikazivanjem poligonalnih površina i izražavanjem IBR indeksa (Devin i sar., 2014; Beliaeff i Burgeot, 2002). Metoda se često primenjuje u proceni kvaliteta životne sredine primenom kombinacije više biomarkera, čime se omogućava simultano tumačenje njihove osetljivosti (Hou i sar., 2016; Kim i sar., 2010).

2. CILJEVI

Ciljevi ove disertacije su sledeći:

1. Odrediti specifičnu aktivnost antioksidativnih enzima - superoksid dismutaze, katalaze i glutation reduktaze u srednjem crevu larvi, kao i aktivnost superoksid dismutaze i katalaze u hemolimfi larvi *L. dispar* V stupnja, detektovati i kvalitativno analizirati izoforme.
2. Odrediti specifičnu aktivnost detoksifikacionih enzima - karboksilesteraza i glutation S-transferaza u srednjem crevu larvi, kao i karboksilesteraza i acetilholinesteraza u mozgu larvi *L. dispar* V stupnja, detektovati i kvalitativno analizirati izoforme.
3. Ispitati promene u koncentraciji proteina toplotnog šoka Hsp70 u srednjem crevu i mozgu larvi *L. dispar* V stupnja, nakon intoksikacije benzo[a]pirenom.
4. Odrediti specifičnu aktivnost digestivnih enzima u srednjem crevu larvi *L. dispar* V stupnja - tripsina, leucin aminopeptidaze, alkalnih fosfataza, kiselih fosfataza (ukupnih, lizozomskih i nelizozomskih), lipaza i α -glukozidaza, uz kvalitativnu analizu njihovih izoformi.
5. Utvrditi koncentraciju lipida i trehaloze u hemolimfi larvi *L. dispar* V stupnja.
6. Utvrditi uticaj benzo[a]pirena na osobine fitnesa - preživljavanje larvi *L. dispar*, trajanje razvića larvi, masu larvi i relativnu brzinu rasta na V stupnju.
7. Proceniti sve ispitane parametre kao potencijalne biomarkere kontaminacije benzo[a]pirenom u odnosu na osetljivost prema primenjenim koncentracijama benzo[a]pirena, kao i u zavisnosti od obrazaca odgovora kod populacija *L. dispar* različitog porekla.
8. Proceniti da li je vrsta *L. dispar* pogodna kao bioindikator zagađenja benzo[a]pirenom.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. *Lymantria dispar* (Lepidoptera: *Lymantriidae*) (gubar)

Lymantria dispar je fitofagna polifagna insekatska vrsta koja nastanjuje šumska prostranstva Evrope, Azije, Severne Afrike, Severne i Južne Amerike. Procenjeno je da u svojoj ishrani koristi više od 500 različitih biljnih vrsta (Lance, 1983). Ženke polažu jaja u leglima jednom godišnje pri čemu sve larve iz istog legla predstavljaju potomstvo jednog mužijaka i jedne ženke (full-sib familija). Da bi se jaja sačuvala od predatora, isušivanja, niskih temperatura i drugih nepovoljnih spoljašnjih uslova, ženka *L. dispar* oblaže legla dlačicama sa svog abomena. Jaja se polažu leti i nakon mesec dana neophodnih za potpuno formiranje larvi, embrioni ulaze u period mirovanja, dijapauze, sve do proleća kada dolazi do piljenja larvi. *L. dispar* odlikuje holometabolno razviće sa većim brojem larvenih stupnjeva, i to pet kod mužjaka i šest kod ženki. Adulti izlaze iz lutki tokom leta. Mužjaci su letači smeđe boje dok su ženke bele, znatno krupnije i bez sposobnosti letenja. *L. dispar* je pogodan model sistem sa dobro opisanom i definisanom fiziologijom, koju karakteriše široka rasprostranjenost, kratak životni ciklus kao i mogućnost jednostavnog gajenja i manipulisanja u laboratorijskim uslovima.

3.2. Uslovi gajenja

Legla *L. dispar* sakupljena su u jesen, tokom novembra 2013. godine, na dva lokaliteta u Srbiji. Prvi lokalitet je mešovita hrastova šuma u Majdanpeku (nezagađena lokacija, 44°25'17" N, 21°56'06" E), koja pripada Nacionalnom parku Đerdap i kao zaštićeno područje Republike Srbije nije izložena direktnom uticaju značajnih izvora zagađenja. Druga lokacija sa koje potiču legla takođe je mešovita hrastova šuma, i to iz okoline Bora (zagađena lokacija, 44°04'29.57" N, 22°05'45.28" E). U Boru se nalazi rudarsko topioničarski basen Bor D.O.O, jedan od najvećih rudnika bakra u ovom delu Evrope, i kao takav predstavlja značajan izvor zagađenja vazduha, vode i zemlje. Monitoringom kvaliteta vazduha u Boru detektovana je povišena koncentracija policikličnih aromatičnih ugljovodonika (od engl. polycyclic aromatic hydrocarbones, PAH) većih molekulskih masa na suspendovanim česticama gasne faze (Živković i sar., 2015). Takođe, pronađene su veće koncentracije različitih PAH u biljkama gajenim u blizini ovog rudarskog postrojenja (Alagić i sar., 2016).

Odabrana legla čuvana su na 4°C do aprila 2014., kada su očišćena od dlačica i površinski sterilisana potapanjem u 5% varikinu (natrijum hipohlorit), nakon čega su isprana u destilovanoj vodi i ostavljena da se osuše na vazduhu. Pripremljena jaja su držana na 23°C i fotoperiodu od 12 h svetla i 12 h mraka do piljenja, nakon čega su larve hranjene veštačkom dijetom za laboratorijsko gajenje *L. dispar* (O'Dell i sar., 1984; Bell i sar., 1981), na istoj temperaturi i fotoperiodu. Gajeno je po deset larvi u jednoj Petrijevoj posudi ($V = 200$ mL) sve do ulaska u treći larveni stupanj posle čega je gajeno po pet larvi u jednoj Petrijevoj posudi, da bi po prelasku u četvrti larveni stupanj, svaka jedinka gajena pojedinačno u Petrijevoj posudi do žrtvovanja. Hrana je menjana na 48 h.

3.3. Eksperimentalne grupe

Ispitivan je hroničani uticaj policikličnog aromatičnog ugljovodonika (PAH), benzo[*a*]pirena (B[*a*]P) na populacije larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene (Majdanpek, nezagađena šuma - NP) i zagađene (Bor, zagađena šuma - ZP) šume. Benzo[*a*]piren je dodavan u veštačku dijetu larvi. Benzo[*a*]piren (Benzo[*a*]pyrene, $\geq 96\%$ (HPLC), Sigma - Aldrich, Cat. No. B1760) najpre je rastvaran u minimalnoj zapremini acetona, a zatim je taj rastvor mešan sa ostalim sastojcima veštačke dijetete, osim agara i vode. Agar, prokuvan u destilovanoj vodi i prohladen, dodavan je na kraju pripreme veštačke dijetete. Homogeno izmešana masa dijetete ravnomerno je sipana u plitke i široke plastične posude u kojima je ostavljena 4 h radi isparavanja zaostalog acetona. Korišćene su dve koncentracije B[*a*]P u hrani: 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane i 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane. Ove dve koncentracije benzo[*a*]pirena, odabrane su za eksperiment na

osnovu rezultata merenja sadržaja B[a]P na lišću nekoliko vrsta hrasta (*Quercus* sp.), koji je biljka izbora u ishrani larvi *L. dispar* (Howsam i sar., 2000). Larve su bile hronično izložene B[a]P, od izleganja do trećeg dana petog stupnja, kada su žrtvovane. Formirano je šest eksperimentalnih grupa, pri čemu je svaka grupa sadržala po 65 jedinki:

- NP 0 ng - kontrolna grupa larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene populacije gajena na veštačkoj dijeti bez dodatka B[a]P.
- NP 5 ng - larve *L. dispar* poreklom iz nezagađene populacije gajene na veštačkoj dijeti sa dodatkom 5 ng B[a]P/g suve mase hrane.
- NP 50 ng - larve *L. dispar* poreklom iz nezagađene populacije gajene na veštačkoj dijeti sa dodatkom 50 ng B[a]P/g suve mase hrane.
- ZP 0 ng - kontrolna grupa larvi *L. dispar* poreklom iz zagađene populacije gajena na veštačkoj dijeti bez dodatka B[a]P.
- ZP 5 ng - larve *L. dispar* poreklom iz zagađene populacije gajene na veštačkoj dijeti sa dodatkom 5 ng B[a]P/g suve mase hrane.
- ZP 50 ng - larve *L. dispar* poreklom iz zagađene populacije gajene na veštačkoj dijeti sa dodatkom 50 ng B[a]P/g suve mase hrane.

U eksperimentu su za svaku populaciju bile uključene i dve kontrolne grupe koje su kao dodatak veštačkoj dijeti imale samo rastvarač odnosno aceton u koncentraciji od 3%, koliko je svaka veštačka dijeta sa dodatkom B[a]P sadržala, kako bi se utvrdilo da li aceton interferira sa efektima B[a]P. Kako nisu nađene statistički značajne razlike između kontrolnih grupa larvi *L. dispar* bez acetona u dijeti, i onih larvi koje su gajene na dijeti sa acetonom, u rezultatima su prikazane samo vrednosti dobijene za kontrolne grupe larvi *L. dispar* gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom acetona (NP 0 ng i ZP 0 ng).

3.4. Analiza osobina fitnesa

Tokom eksperimenta, u svim eksperimentalnim grupama larvi *L. dispar* praćene su sledeće karakteristike:

1. Preživljavanje larvi, koje je prikazano kao procent preživelih larvi tokom perioda od izleganja do žrtvovanja u trećem danu petog larvenog stupnja;
2. Ukupno trajanje razvića od izleganja do žrtvovanja larvi trećeg dana petog stupnja;
3. Masa larvi trećeg dana petog larvenog stupnja;
4. Određena je relativna brzina rasta (od engl. relative growth rate, RGR), za period od ulaska larvi u treći stupanj, pa sve do trećeg dana petog larvenog stupnja. RGR je izračunat po sledećoj formuli (Farrar i sar., 1989; Mrdaković i sar., 2015):

$$RGR = (\ln W_t - \ln W_0) / t,$$

W_t - masa larve na kraju posmatranog perioda odnosno u trećem danu petog stupnja

W_0 - masa larve na početku posmatranog perioda odnosno prvog dana trećeg stupnja

t - trajanje posmatranog perioda u danima

3.5. Određivanje aktivnosti antioksidativnih i detoksifikacionih

3.5.1. Priprema homogenata

L. dispar larve svih eksperimentalnih grupa žrtvovane su trećeg dana petog larvenog stupnja dekapitacijom na ledu i sakupljena je hemolimfa u mini tube koje su sadržale 1-2 kristalna zrnca feniltiouree, inhibitora fenoloksidaza. Iz glavene kapsule larve disekovan je mozak. Integument je uzdužno isečen i izolovano je celo crevo. Nakon odstranjivanja prednjeg i zadnjeg creva, uzimano je srednje crevo. Hemolimfa, mozak i srednje crevo larvi čuvani su na temperaturi od -20°C do homogenizacije.

Uzorci hemolimfe razblaženi su u odnosu 1:4 (V/V) sa ledeno hladnim puferom pH 7, koji sadrži 1,15% KCl, 25 mM K_2HPO_4 , 5 mM PMSF and 2 mM DTT, i sonifikovani u intervalu od 3 puta po 10 sekundi, sa pauzama od 10 sekundi, na frekvenciji od 20 kHz (Bandelin HD 2070 sonifikatorom). Homogenati hemolimfe centrifugirani su na 10000 g tokom 15 minuta, na temperaturi od 4°C (Eppendorf 5417R centrifugom). Odvojeni supernatanti su zamrznuti na -20°C.

U svakoj eksperimentalnoj grupi pulovano je po 30 mozgova, razblaženo ledeno hladnom destilovanom vodom, u odnosu 1:9 (w/V) i homogenizovano na ledu (MHX/E Xenox Germany homogenizatorom) tokom 3 intervala od 10 sekundi, i pauzama od 15 sekundi, na 5000 obrtaja/min. Dobijeni homogenati centrifugirani su 10 minuta na 4°C, na 10000 g (Eppendorf 5417R Germany centrifugom). Supernatanti su alikvotirani i zamrznuti na -20°C.

Srednja creva su homogenizovana pojedinačno, na ledu, u saharoznom puferu pH 7,4 (0,25 M saharoza, 0,05 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA) upotrebom Ultra Turrax (IKA-Werke) homogenizatora. Tkivo je razblaženo saharoznim puferom do koncentracije od 200 mg/mL. Uzorci su homogenizovani u tri ciklusa od po 10 sekundi, sa pauzama od 15 sekundi, pri brzini od 20000 obrtaja/min, nakon čega su podvrgnuti sonifikaciji na frekvenciji od 20 kHz, 3 puta po 10 sekundi, sa pauzama od 15 sekundi (Bandelin HD 2070 sonifikatorom). Dobijeni homogenati srednjih creva centrifugirani su na 100000 g u trajanju od 90 minuta na 4°C (ultracentrifugom Beckman L7-55). Izdvojeni su supernatanti i zamrznuti na -20°C.

Sačuvani supernatanti hemolimfe, mozga i srednjeg creva korišćeni su za detekciju enzimske aktivnosti. Koncentracija ukupnih proteina u supernatantima ovih tkiva larvi *L. dispar* određivana je metodom po Bradfordu (1976), u odnosu na proteinske standarde goveđeg albumina iz seruma (BSA, od eng. bovine serum albumin). Kvantifikacija proteinskih traka nakon zimografske detekcije enzimske aktivnosti na nativnim poliakrilamidnim gelovima izvođena je denzitometrijskom analizom primenom ImageJ programa (National Institutes of Health, USA).

3.5.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidativnih i detoksifikacionih enzima

3.5.2.1. Superoksid dismutaza (SOD)

Aktivnost SOD u srednjem crevu i hemolimfi larvi *L. dispar* određena je metodom po Misra i Fridovich (1972), koja se zasniva na enzimskoj inhibiciji autooksidacije adrenalina u baznoj sredini. Prevođenje adrenalina u adrenohrom generiše superoksid anjon radikal koji povratno ubrzava reakciju autooksidacije. SOD uklanja superoksid anjon radikal, smanjujući brzinu nastajanja adrenohroma. Aktivnost SOD određivana je preko brzine autooksidacije adrenalina odnosno kao promena apsorbancije u vremenu na talasnoj dužini od 480 nm na 25°C. Reakciona smeša je sadržala uzorak, adrenalin i karbonatni pufer pH 10,2 (50 mM Na_2CO_3 i 0,1 mM EDTA). Jedinica aktivnosti SOD definisana je kao količina enzima koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbancije u minuti.

3.5.2.2. Katalaza

Metoda po Claiborne (1985) primenjena je za određivanje katalazne aktivnosti, u srednjem crevu i hemolimfi larvi *L. dispar*. Zasniva se na merenju brzine kojom enzim prevodi vodonik peroksid do kiseonika i vode. Praćeno je smanjenje apsorbancije na talasnoj dužini od 240 nm, na 25°C. Reakciona smeša sadržala je 50 mM fosfatni pufer pH 7, vodonik peroksid i uzorak. Koncentracija vodonik peroksida za reakciju podešena je tako da apsorbancija slepe probe bude između 0,525 i 0,550, a da količina uzorka dovodi do promene srednje vrednosti apsorbancije u opsegu od 0,03 do 0,06. Tokom tri minute, na svakih 30 sekundi, očitavana je apsorbancija, od momenta dodavanja uzorka. Jedinica aktivnosti katalaze definisana je kao broj mikromolova vodonik peroksida redukovanih u minuti.

3.5.2.3. Glutation reduktaza (GR)

Glutation reduktazna aktivnost srednjeg creva larvi *L. dispar* utvrđena je po metodi Glatzle i sar. (1974), i to po principu praćenja smanjenja apsorbanije na talasnoj dužini od 340 nm, na 25°C, usled potrošnje NADPH u procesu redukcije standardne količine oksidovanog glutaciona (GSSG). Reakciona smeša je sadržala uzorak, 0,5 M fosfatni pufer pH 7,4, 2 mM GSSG, 0,5 mM EDTA i 0,1 mM NADPH. Količina uzorka u reakciji određena je tako da promena srednje vrednosti apsorbanije bude u opsegu 0,003 do 0,006. Nakon završetka lag faze od 30 sekundi, apsorbanija je očitavana tokom 3 minuta na svakih 30 sekundi. Aktivnost GR izražena je kao broj nanomolova NADPH oksidovanih u minuti.

3.5.2.4. Glutation S-transferaza (GST)

Aktivost GST u srednjem crevu larvi *L. dispar* određena je prema metodi Habig i sar. (1974). Enzim katalizuje konjugaciju supstrata 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) sa SH grupama redukovanog glutaciona (GSH). Metoda se zasniva na praćenju povećanja apsorbanije na talasnoj dužini od 340 nm, na 25°C, što je rezultat povećanja količine CDBN-glutation konjugata. Reakciona smeša sadržala je uzorak, 0,5 M fosfatni pufer pH 6,5, 25 mM CDBN i 20 mM GSH. Apsorbancija je beležena u periodu od 3 minuta na svakih 30 sekundi. Aktivnost GST definisana je kao broj nanomolova GSH utrošenih u procesu konjugacije u minuti.

3.5.2.5. Karboksilesteraze

Aktivnost karboksilestaraza u mozgu i srednjem crevu larvi *L. dispar* određena je primenom kontinualnog spektrofotometrijskog esaja koji se zasniva na hidrolitičkom oslobađanju *o*-nitrofenola iz supstrata *o*-nitrofenil butirata (Main i sar., 1961). Reakcija se odvijala na 30°C u 50 mM natrijum fosfatnom puferu pH 7,5 u prisustvu 15 mM supstrata. Apsorbancija je praćena tokom 4 minute na 414 nm. Aktivnost karboksilestaraza definisana je kao broj mikromolova *o*-nitrofenil butirata hidrolizovanih u minuti.

3.5.2.6. Acetilholinesteraze

Metod po Ellman i sar. (1961) primenjen je za utvrđivanje aktivnosti acetilholinesteraza u mozgu larvi *L. dispar*. Enzim hidrolizuje supstrat acetiltioholin jodid pri čemu se oslobađa tiholin koji u prisustvu 5, 5'-ditio-bis-(2-nitro benzoeve kiseline) (DTNB) generiše žuti 5-tio-2-nitro benzoat anjon koji se može kvantifikovati praćenjem apsorbanije na talasnoj dužini od 406 nm. Reakcija se odvija tokom 3,5 minuta (lag faza traje 1 minut) na 25°C, pri čemu se apsorbanija snima na 15 sekundi. Reakciona smeša sadrži uzorak, 0,40 mM DTNB i 0,25 M acetiltioholin jodid. Aktivnost acetilholinesteraza izražena je kao broj mikromolova acetiltioholin jodida hidrolizovanih u minuti.

3.5.3. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), katalaze, karboksilesteraza i acetilholinesteraza nativnom elektroforezom

3.5.3.1. Nativna poliakrilamidna elektroforeza (PAGE)

Rastvori, njihova priprema, priprema uzoraka i opis rada:

1. Monomerni rastvor (30% T, 2,7% C), (AA).

akrilamid	58,4 g
bisakrilamid	1,6 g
dejonizovana voda do	200 mL

2. 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, pufer za razdvajajući gel (Tris pH 8,8).

Tris	36,3 g
dejonizovana voda do	200 mL
4 M HCl do	pH 8,8

3. 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, pufer za koncentrujući gel (Tris pH 6,8).

Tris	6 g
dejonizovana voda do	100 mL
4 M HCl do	pH 6,8

4. 10% (m/V) amonijum persulfat, inicijator (APS).

APS	0,2 g
destilovana voda do	2 mL

5. Rastvor za nadslojavanje (2-butanol ili n-butanol zasićen vodom).

2-butanol ili n-butanol	100 mL
destilovana voda do	nastanka donjeg sloja vode

6. Pufer za obradu uzoraka, za 25 mL, 3X (PUZ)

0,5 M Tris-HCl pH 6, 8	9,38 mL
85% glicerol	9 mL
0,1% bromfenol-plavo	1,5 mL
destilovana voda do	25 mL

7. Pufer za elektroforezu (radno razblaženje): 0,025 M Tris, 0,192 M glicin, pH 8,3.

Tris	3 g
glicin	14,4 g
destilovana voda do	1 L

Za detekciju enzimske aktivnosti na gelu, prisutne u homogenatima mozga, srednjeg creva i hemolimfe larvi *L. dispar*, korišćena je tehnika jednodimenzionalne elektroforeze na nativnom poliakrilamidnom gelu, bez prisustva sodijum dodecil sulfata (SDS) i redukujućih hemikalija. Ovu metodu je uspostavio Laemmli (1970).

Nativni poliakrilamidni gelovi za analizu uzoraka napravljeni su po recepturi datoj u tabeli ispod. Za različite enzime korišćene su različite koncentracije gela za razdvajanje dok je gel za koncentrovanje uzoraka uvek bio 4%.

Rastvori	Gel za razdvajanje (mL)				Gel za koncentrovanje (mL)
	7,5%	8%	10%	12%	4%
AA	2,5	2,66	3,33	4	0,66
Tris pH 8,8	2,5	2,5	2,5	2,5	-
Tris pH 6,8	-	-	-	-	1,25
Destilovana voda do	4,83	4,67	4	3,33	3
Dezaeracija 5-10 minuta					
TEMED	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005
APS	0,05	0,05	0,05	0,05	0,025
Finalna zapremina	9,88	9,88	9,88	9,88	4,95

Između ploča sipan je dezaerisani rastvor gela za razdvajanje i nadslojen rastvorom za nadslojavanje. Nakon završene polimerizacije donjeg gela, sipan je dezaerisani rastvor gela za koncentrovanje. U ovaj rastvor postavljan je "češalj", za formiranje bunarčića u koje su nanošeni uzorci. Uzorci su mešani sa puferom za uzorke u odnosu 2:1. Pripremljeni uzorci ostavljeni su na sobnoj temperaturi 5 minuta, pre nanošenja na gel. Po završenoj polimerizaciji gela i odstranjivanju "češlja", bunarčići su isprani destilovanom vodom i u njih su naneti uzorci. Podešena je konstantna voltaža (80 V) tokom ulaska uzoraka u gel za razdvajanje, nakon čega je povišena na 100 V do kraja rada.

3.5.3.1.1. Superoksid dismutaza (SOD)

Aktivnost SOD u hemolimfi i srednjem crevu larvi, nakon native poliakrilamidne elektroforeze detektovana je na gelu je po metodi koju su opisali Azevedo i sar. (1998). Na 12% poliakrilamidni gel naneto je 10 µg proteina po bunariću. Nakon završetka elektroforeze gel je ispiran dejonizovanom vodom 2 puta po 1 minut, a zatim inkubiran u mraku na sobnoj temperaturi u 50 mM karbonatno bikarbonatnom puferu pH 10,2 koji je sadržao: 1mM EDTA, 0,05 mM riboflavin, 0,1 mM nitro plavo tetrazolijum i 0,3% TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin). Po završetku inkubacije, gel je ispran destilovanom vodom i ostavljen u vodi na dnevnom ili veštačkom svetlu do pojave prosvetljenja naspram tamno-ljubičastog gela, koja odgovaraju SOD aktivnosti u ispitanim uzorcima.

3.5.3.1.2. Katalaza

Aktivnost katalaze u srednjem crevu larvi na nativnom gelu određena je prema metodi Aebi i sar. (1983). Na 8% poliakrilamidni gel naneta je količina od 10 µg proteina po uzorku. Po završenoj elektroforezi gel je ispran 2 puta po 1 minut u destilovanoj vodi, čemu je usledila inkubacija gela u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,8 koji je sadržao 10 mM H₂O₂ (35 µl 30% H₂O₂ na 50 ml pufera), tokom 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Posle inkubacije gel je kratko ispran u destilovanoj vodi, a zatim je uronjen u rastvor koji se dobija mešanjem vodenih rastvora 2% FeCl₃ i 2% K₃Fe(CN)₆. Rastvori su držani na ledu i pomešani u razmeri 1:1 neposredno pre dodavanja gelu. Gel je inkubiran u ovoj smeši na svetlu do pojave žutih traka koje odgovaraju katalaznoj aktivnosti, naspram zelene površine gela.

3.5.3.1.3. Karboksilesteraze

Izoforme karboksilesteraza u mozgu i srednjem crevu larvi detektovane su nativnom PAGE po modifikovanoj metodi koju je opisao Loxdale (1983). U bunarčiću 7,5% poliakrilamidnog gela naneto je po 10 µg proteina. Elektroforetsko razdvajanje odvijalo se pri konstantnom naponu od 100

V na 4°C, nakon čega je gel potopljen u rastvor 20 mM natrijum fosfata (pH 7,2), 1,1 mM *a*-naftil acetata (prethodno rastvorenog u acetonu) i 1,2 mM Fast Blue B (rastvorenog u destilovanoj vodi). Inkubacija se odvijala 40 minuta na sobnoj temperaturi i rezultovala je pojavom ljubičastih traka koje odgovaraju karboksilesteraznoj aktivnosti.

3.5.3.1.4. Acetilholinesteraze

Modifikacija originalne metode po Karnovsky i Roots (1964) primenjena je u detekciji aktivnosti acetilholinesteraza na gelu nakon native PAGE, u uzorcima mozga larvi *L. dispar*. Na 10% gel je naneto po 35 µg proteina iz svake eksperimentalne grupe i elektroforetsko razdvajanje je sprovedeno na konstantnom naponu od 20 mA, na 4°C. Po završetku elektroforeze, gel je nekoliko puta, kratko ispran u destilovanoj vodi nakon čega je potopljen u rastvor koji je sadržao 0,1 M fosfatni pufer pH 6, 0,1 M acetiltioholin jodid, 0,1 M natrijum citrat, 30 mM CuSO₄ i 5 mM K₃Fe(CN)₆. Gel je inkubiran u ovom rastvoru preko noći na 25°C posle čega je dugo ispiran destilovanim vodom, do pojavljivanja prosvetljenja naspram braon gela, koja odgovaraju acetilholinesteraznoj aktivnosti.

3.6. Detekcija aktivnosti digestivnih enzima

3.6.1. Priprema homogenata srednjeg creva

Larve *L. dispar* žrtvovane su dekapitacijom trećeg dana petog larvenog stupnja, nakon čega je uzdužno isečen integument i izolovano celo crevo. Posle uklanjanja prednjeg i zadnjeg creva, srednje crevo je očišćeno od masnog tela i čuvano na -20°C. Ceo postupak izolovanja srednjeg creva larvi obavljen je na ledu. Pojedinačna srednja creva homogenizovana su na ledu u 0,15 M NaCl tako da finalna koncentracija tkiva bude 100 mg/ml. Homogenizacija je izvedena u 3 ciklusa u trajanju od 10 sekundi, i pauzama od 15 sekundi, na 20000 obrtaja/min. Homogenati su centrifugirani 10 minuta na 10000 g, nakon čega su alikvotirani supernatanti odmah zamrznuti na -20°C. Koncentracija proteina u odvojenim supernatantima određivana je metodom po Bradfordu (1976) u odnosu na BSA standard (albumin iz goveđeg seruma). Kvantifikacija elektroforetskih traka nakon zimografske detekcije enzimske aktivnosti na nativnim poliakrilamidnim gelovima izvođena je denzitometrijskom analizom primenom ImageJ programa (National Institutes of Health, USA).

3.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje specifične aktivnosti digestivnih enzima

3.6.2.1. Tripsin

Enzimska aktivnost tripsina određena je po metodi Erlangera i sar. (1961) i Valaitisa (1995). Metoda se zasniva na određivanju *p*-nitroanilina, koji se oslobađa iz supstrata *N*_α-benzoil-DL-arginin 4-nitroanilid hidrohlorida (DL-B[A]PNA), gde je aktivnost tripsina srazmerna koncentraciji *p*-nitroanilina. Inkubacija uzorka sa 20 mM supstratom odvijala se tokom 15 minuta, u 50 mM Gly/NaOH puferu (pH 10) na 30°C. Reakcija je prekinuta 6% sirćetnom kiselinom nakon čega je izmerena apsorbancija na 405 nm.

3.6.2.2. Leucin aminopeptidaza

Metoda Erlangera i sar. (1961) primenjena je u proceni aktivnosti leucin aminopeptidaze. Reakcija je izvedena na 30°C tokom 10 minuta, u 40 mM veronal/HCl puferu (pH 7,8-8) u prisustvu 20 mM supstrata, L-leucin *p*-nitroanilida. Po isteku vremena reakcija je zaustavljena 6%

sirćetnom kiselinom. U uzorcima je očitana apsorbancija na 405 nm. Aktivnost leucin aminopeptidaze proporcionalna je količini oslobođenog *p*-nitroanilina.

3.6.2.3. Alkalne fosfataze

Aktivnost alkalnih fosfataza određivana je po metodi Nemeč i Soča (1988). Zasniva se na hidrolitičkom oslobađanju *p*-nitrofenola iz *p*-nitrofenil fosfata (*p*NPP) u alkalnim uslovima. Reakciona smeša je sadržala 100 mM Tris/HCl pufer pH 8,6, 5 mM MgCl₂, 5 mM *p*NPP i uzorak. Reakcija je trajala 30 minuta, na temperaturi od 30°C, posle čega je prekinuta dodavanjem 500 mM NaOH. Apsorbancija je očitavana na 405 nm.

3.6.2.4. Ukupne kisele fosfataze

Metoda Nemeč i Soča (1988) upotrebljena je u određivanju aktivnosti ukupnih kiselih fosfataza. Princip metode je oslobađanje *p*-nitrofenola iz *p*-nitrofenil fosfata (*p*NPP) u kiselim uslovima. Reakcija je trajala 60 minuta, na 30°C, a reakciona smeša je sadržala 100 mM citratni pufer pH 5,6, 5 mM MgCl₂, 5 mM *p*NPP i uzorak. Reakcija je prekinuta dodavanjem 500 mM NaOH. Merenjem apsorbancije na 405 nm utvrđena je količina hidrolizovanog *p*-nitrofenola.

3.6.2.5. Lizozomske i nelizozomske kisele fosfataze

Enzimsku aktivnost lizozomskih fosfataza utvrđena je indirektno, kao deo ukupne aktivnosti kiselih fosfataza nakon primene specifičnog inhibitora lizozomskih fosfataza, natrijum fluorida (Amlabu i sar., 2009; Holtzman, 1989). U reakcionu smešu za određivanje ukupne aktivnosti kiselih fosfataza, i pri istim reakcionim uslovima, dodat je NaF finalne koncentracije 50 mM. Izmerena apsorbancija predstavlja aktivnost neinhibiranih nelizozomskih kiselih fosfataza, na osnovu koje je izračunata aktivnost lizozomske frakcije.

3.6.2.6. α -glukozidaza

Aktivnost α -glukozidaza određena je metodom Baker (1991), koja se zasniva na hidrolitičkom oslobađanju *p*-nitrofenola iz supstrata *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranozida (*p*NP- α -D-Glc), koje je direktno proporcionalno količini enzima. Reakciona smeša je sadržala 200 mM fosfatni pufer pH 6, 20 mM *p*NP- α -D-Glc i uzorak. Reakcija je izvedena na temperaturi od 30°C u trajanju od 15 minuta, posle čega je prekinuta dodavanjem baznog reagensa koji je sadržao 250 mM Na₂CO₃, 250 mM NaHCO₃ i 1% natrijum dodecil sulfat (SDS). Određivanjem apsorbancije na 405 nm izračunata je količina hidrolizovanog *p*-nitrofenola.

3.6.2.7. Lipaze

Za određivanje aktivnosti lipaza primenjena je modifikovana metoda Arreguin-Espinoza i sar. (2000), prilagođena za lipazu gubara (Mrdaković i sar., 2008). Metoda podrazumeva kontinuirano spektrofotometrijsko praćenje hidrolize supstrata, *p*-nitrofenil kaprilata (*p*NPC) odnosno oslobađanja proizvoda reakcije *p*-nitrofenola, na talasnoj dužini od 410 nm. Aktivnost enzima je merena tokom 4 minuta na temperaturi od 37°C, u reakcionoj smeši koja je sadržala 50 mM Tris/HCl pufer pH 8,2, 2,5 mM *p*NPC i uzorak. Jedinica enzimske aktivnosti definisana je kao količina enzima koja oslobađa 1 μ mol *p*-nitrofenola u minuti.

3.6.3. Detekcija aktivnosti tripsina, leucin aminopeptidaze, alkalnih fosfataza, ukupnih kiselih fosfataza, α -glukozidaze i lipaza nativnom elektroforezom

3.6.3.1. Tripsin

Enzimski aktivnost tripsina na nativnom poliakrilamidnom gelu određivana je prema modifikovanoj metodi Erlangera i sar. (1961). Uzorci su pomešani sa puferom za pripremu uzorka (PUZ) koji nije sadržao SDS niti redukujuća sredstva, i analizirani na 10% nativnom poliakrilamidnom gelu pri konstantnom naponu od 100 V na 4°C. Nanošeno je 5 μ g proteina po bunarčiću. Paralelno sa elektroforezom inkubirana je nitrocelulozna membrana u 2 mM supstratu, Na-benzoil-DL-arginin 4-nitroanilida hidrohloridu (DL-B[A]PNA), tokom 50 minuta na sobnoj temperaturi. DL-B[A]PNA je prvo rastvoren u dimetilformamidu (DMF) a zatim je razblažen u glicinskom puferu pH 10 do finalne koncentracije od 2 mM. Po završetku elektroforetskog razdvajanja gel je ispiran u destilovanoj vodi tokom 10 minuta i ekvilibrisan 20 minuta u 50 mM glicinskom puferu pH 10. Prethodno pripremljena nitrocelulozna membrana položena je na gel i tako ostavljena u uslovima vlažne komore na 37°C u trajanju od 1 h. Membrana je naknadno potopljena na 2,5 minuta u 0,1% NaNO₂ rastvoren u 1 M HCl, a zatim isprana 1% ureom potapanjem na 30 sekundi. Potom, membrana je inkubirana u 0,05% 1-naftilaminu rastvorenom u 47,5% etanolu sve do pojave roze obojenih traka. Reakcija je prekinuta ispiranjem u destilovanoj vodi.

3.6.3.2. Leucin aminopeptidaza

Izoenzimska aktivnost leucin aminopeptidaze detektovana je na nativnom poliakrilamidnom gelu po istoj modifikovanoj metodi kao i tripsinske izoforme (Erlanger i sar., 1961). Supstrat za leucin aminopeptidazu bio je L-leucin *p*-nitroanilid prvo je rastvoren je u minimalnoj zapremini dimetilformamida (DMF), a zatim razblažen do 2 mM u veronal/HCl puferu pH 7,8-8. U istom puferu inkubiran je i gel u trajanju od 20 minuta. Protokol je isti kao kod detekcije aktivnosti tripsina na gelu odnosno na membrani.

3.6.3.3. Alkalne fosfataze

U detekciji alkalnih fosfataza nativnom elektroforezom primenjena je modifikovana metoda Allena i sar. (1963). Nanošeno je 10 μ g proteina po bunarčiću i razvijeno na 12% gelu pri konstantnom naponu od 100 V na temperaturi od 4°C. Posle kratkog ispiranja gela destilovanom vodom, aktivnost alkalnih fosfataza vizuelizovana je uranjanjem gela u pripremljen rastvor koji je sadržao 100 mM Tris-HCl pufer (pH 8,6), 0,13% *a*-naftil fosfat i 0,1% Fast Blue B. Gel je inkubiran na sobnoj temperaturi do pojave obojenih traka.

3.6.3.4. Ukupne kisele fosfataze

Aktivnost kiselih fosfataza na nativnom određena je prema modifikovanoj metodi Allena i sar. (1963). Na 12% poliakrilamidni gel analizirano je 10 μ g proteina po bunarčiću, pri konstantnom naponu od 100 V na temperaturi od 4 °C. Nakon kratkog ispiranja u destilovanoj vodi gel je 10 minuta inkubiran u 50 mM acetatnom puferu pH 5,2 na temperaturi od 30°C. Nitrocelulozna membrana inkubirana je na sobnoj temperaturi u 0,13% *a*-naftil fosfatu rastvorenom u istom puferu. Membrana je postavljena na gel i ostavljena u uslovima vlažne komore na 30°C u mraku, tokom 1 h. Posle inkubacije, membrana je uronjena u 0,3% boju Fast Blue B rastvorenu u acetatnom puferu.

3.6.3.5. α -glukozidaza

Modifikacija metode po Badhan i sar. (2007) primenjena je u detekciji izoformi α -glukozidaze na nativnom 12% poliakrilamidnom gelu. Elektroforeza je izvedena pri konstantnom naponu od 100 V, na 4°C. Analizirano je 10 μ g proteina po bunarčiću gela. Gel je ispran destilovanom vodom, a zatim inkubiran u 50 mM citratno-fosfatnom puferu pH 4,6 tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi, posle čega je u rastvor dodat supstrat 4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozid (4-MU- α -Glc) rastvoren u minimalnoj zapremini dimetilformamida (DMF), tako da mu je finalna koncentracija, u ukupnoj inkubacionoj smeši bila 1,5 mM. Posle 2 minuta inkubacije u supstratu, gel je izložen ultraljubičastoj (UV) svetlosti pri čemu su mesta sa α -glukozidaznom aktivnošću fluorescirala.

3.6.3.6. Lipaze

Lipazna aktivnost na nativnom poliakrilamidnom gelu određena je po metodi Diaz i sar. (1999). Elektroforetski je analizirano 5 μ g proteina po bunarčiću, na konstantnom naponu od 100 V i temperaturi od 4°C. Usledilo je kratko ispiranje gela destilovanom vodom i inkubacija gela u 100 mM fosfatnom puferu pH 7 tokom 10 minuta na temperaturi od 30°C. U inkubacionu smešu dodat je 0,4 mM 4-metilumbeliferil butirat (4-MU-Bu), i posle 2 minuta blagog mućkanja, gel je izložen UV svetlu gde su se ukazale fluorescentne trake koje odgovaraju lipaznoj aktivnosti.

3.7. Određivanje koncentracije trehaloze i lipida u hemolimfi larvi *L. dispar*

3.7.1. Trehaloza

Koncentracija trehaloze određena je po metodi Wyatt i Kalf (1957). U uzorke hemolife larvi najpre je dodavana 10% trihlorsirćetna kiselina (TCA) posle čega su centrifugirani 5 minuta na 5500 obrtaja/minuti. U dobijene supernatante sipan je antronov reagens (0,15% rastvor antrona u 72% sumpornoj kiselini) i smeša je kuvana 15 minuta u ključalom vodenom kupatilu. Posle hlađenja u ledenom kupatilu tokom 10 minuta i intenzivnog vorteksovanja, u uzorcima je očitana apsorbancija na talasnoj dužini od 630 nm. Na osnovu standardne prave za trehalozni standard izračunata je koncentracija trehaloze.

3.7.2. Lipidi

Ukupni sadržaj lipida u hemolifi larvi *L. dispar* utvrđen je na osnovu metode po Zöllner i Kirsch (1962). Uzorci hemolimfe su pomešani sa koncentrovanom sumpornom kiselinom i kuvani 10 minuta u ključalom vodenom kupatilu. Uzorci ohlađeni na sobnoj temperaturi i dodat im je vanilinski reagens (0,19% rastvor vanilina u 85% fosfornoj kiselini), nakon čega su intenzivno vorteksovani i ostavljeni tokom 30 minuta, do potpunog razvijanja boje. Apsorbancija u uzorcima je izmerena na talasnoj dužini od 546 nm, a koncentracija lipida je izračunata na osnovu standardne prave za standard mešavine triacilglicerola.

3.8. Detekcija Hsp70

3.8.1. Određivanje nivoa ekspresije Hsp70 u mozgu larvi *L. dispar*

3.8.1.1. Priprema homogenata mozga

Trećeg dana petog larvenog stupnja, larve *L. dispar* su žrtvovane na ledu i izolovani su mozgovima iz glavenih kapsula. Pulovano je 25-30 mozgova po eksperimentalnoj grupi i razblaženo sa 0,9% NaCl u odnosu 1:9 (w/V). Pulovi su homogenizovani na ledu, 3 puta u trajanju od 10 sekundi, na 5000 obrtaja/min, sa pauzama od po 15 sekundi. Nakon centrifugiranja u trajanju od 10 minuta na 10000 g, supernatanti su izdvojeni i zamrznuti na -20°C.

3.8.1.2. Western blot

Uzorci su pripremljeni za SDS poliakrilamidnu elektroforezu, na 12% denaturišućem gelu, mešanjem sa Lemlijevim puferom koji je sadržao SDS i 2-merkaptoetanol, a zatim kuvanjem 2 minuta u ključalom vodenom kupatilu. Analizirano je 20 µg proteina od svake eksperimentalne grupe. Elektroforeza je izvedena na konstantnom naponu od 100 V na sobnoj temperaturi. Po završenoj elektroforezi urađen je transfer razdvojenih proteina sa gela na nitroceluloznu membranu, tokom noći na 40 V i temperaturi od 4°C. Membrana je blokirana 4% obranim mlekom u TBST puferu (0,1% Tween 20 u TBS puferu (od engl. Tris buffered saline) u trajanju od 30 minuta, a zatim je inkubirana preko noći na 4°C sa primarnim anti-Hsp70 mišijim IgG1 antitelom (monoklonsko, klon BRM-22, Sigma Aldrich), razblaženim 1:5000 u 4% mleku u TBST puferu. Dalje, membrana je isprana u TBST šest puta po 5 minuta i inkubirana 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim anti-mišijim antitelom, HRP-konjugovanim (Sigma Aldrich) i razblaženim 1:10000 u 4% mleku u TBST. Posle ispiranja u TBST u šest ponavljanja u trajanju od 5 minuta, proteini Hsp70 su vizualizovani na autoradiografskom filmu primenom ECL (od engl. enhanced chemiluminescence) reagensa (Amersham).

3.8.1.3. Indirektni ELISA test

Pulovani uzorci mozga razblaženi su u karbonatno-bikarbonatnom puferu pH 9,6, sipani u mikrotitar pločicu (10 µg proteina po bunaru) i ostavljeni tokom noći na 4°C. Pločica je tri puta isprana PBST puferom (0,05% Tween 20 u fosfatom puferisanom fiziološkom rastvoru (od engl. phosphate-buffered saline, PBS) pH 7,4), a zatim je inkubirana 2 h sa 5% obranim mlekom u PBST. Posle blokiranja reaktivnih površina u mikrotitar pločici sa obranim mlekom, bunarčići su isprani PBST, a zatim je usledila inkubacija tokom noći na 4°C sa primarnim anti-Hsp70 mišijim IgG1 antitelom (monoklonsko, klon BRM-22, Sigma Aldrich) razblaženim 1:5000 u 5% mleku u PBST. Posle ponovnog ispiranja, uzorci su inkubirani sa sekundarnim anti-mišijim antitelom, HRP-konjugovanim (Sigma Aldrich) razblaženim 1:10000 u 5% mleku u TBST, tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Boja je razvijena primenom supstrata za peroksidazu rena - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), a reakcija je zaustavljena odgovarajućim stop reagensom (Sigma Aldrich). Apsorbanca je izmerena na 450 nm u ELISA čitaču (LKB 5060-006). Uzorci su analizirani u triplikatu. Koncentracije Hsp70 u uzorcima očitavane su sa standardne prave koja je konstruisana na osnovu serije razblaženja rekombinantnog Hsp70.

3.8.2. Detekcija Hsp70 Western blotom u srednjem crevu larvi *L. dispar*

3.8.2.1. Priprema homogenata srednjeg creva

Srednja creva larvi *L. dispar* homogenizovana su pojedinačno, na ledu, u 0,9% NaCl u koji su dodati inhibitori proteaza finalne koncentracije 2 mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF) i 20 μ M E64. Tkivo je razblaženo u odnosu 1:4 (w/V). Homogenizacija je izvedena u tri ponavljanja od 10 sekundi, pri brzini od 20000 obrtaja/min, i pauzama od 15 sekundi. Homogenati su centrifugirani 10 minuta na 10000 g. Supernatanti su izdvojeni i zamrznuti na -20°C . Koncentracija proteina je određivana prema Bradfordu (1976).

3.8.2.2. Western blot

Pojedinačni uzorci srednjih creva pomešani su sa Lemlijevim puferom koji je sadržao SDS i 2-merkaptotanol, i kuvani tokom 2 minuta u ključalom vodenom kupatilu. SDS elektroforezom analizirana su po dva pojedinačna uzorka srednjeg creva za populaciju larvi poreklom iz nezagađene šume, i po tri pojedinačna creva za populaciju larvi poreklom iz zagađene šume. Nalivano je 70 μ g proteina po bunarčiću 12% poliakrilamidnog gela. Dalja procedura detaljno je opisana u odeljku o detekciji Hsp70 u mozgu (8.1.3).

3.9. Integrirani odgovor biomarkera

Integrirani odgovor biomarkera (od engl. integrated biomarker response, IBR) određen je metodom koju su opisali Beliaeff i Burgeot (2002). Vrednost svakog biomarkera u okviru pojedinačne eksperimentalne grupe (X_i) standardizovana je po formuli: $Y_i = \frac{(X_i - X_{sr})}{SD}$, gde je Y_i standardizovani odgovor biomarkera, a srednja vrednost (X_{sr}) i standardna devijacija (SD) parametra izračunati su uzimajući u obzir sve grupe. Dalje je određena vrednost $Z_i = Y_i$ ili $Z_i = -Y_i$ u zavisnosti od toga da li je tretman doveo do aktivacije ili inhibicije biomarkera. Za svaku standardizovanu vrednost biomarkera identifikovana je minimalna vrednost Z_i , i označena je kao *min*, da bi se izračunala vrednost S_i : $S_i = Z_i + |min|$, gde je $|min|$ apsolutna vrednost. Vrednosti odabranih biomarkera S_i za određenu eksperimentalnu grupu definišu radijalne koordinate na grafiku (od engl. star plot) i odgovaraju veličini efekta datog tretmana na te biomarkere. Pojedinačne površine grafika A_i , u slučaju kombinovanja tri biomarkera (kao kod parametara osobina fitnesa i enzima faze II. detoksifikacije) računane su po formuli: $A_i = \frac{S_i}{2} \sin \beta (S_i \cos \beta + S_{i+1} \sin \beta)$, gde je $\beta = \text{Arctan} \left(\frac{S_{i+1} \sin \alpha}{S_i - S_{i+1} \cos \alpha} \right)$, pri čemu je $\alpha = \frac{2\pi}{n}$ radijana. Za kombinaciju četiri biomarkera (enzimi antioksidativne zaštite i digestivni enzimi), primenjena je sledeća formula za pojedinačne površine: $A_i = (S_i \cdot S_{i+1})/2$. S_i i S_{i+1} predstavljaju rezultate pojedinačnih biomarkera odnosno njihove uzastopne koordinate na grafiku. IBR indeks predstavlja sumu svih pojedinačnih vrednosti A_i , gde je A_i površina koju definišu dva uzastopna biomarkera na grafiku.

3.10. Statistička obrada rezultata

U svim eksperimentima rezultati su izraženi kao srednja vrednost i standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Za proveru normalnosti raspodele podataka primenjivani su D'Agostino-Pearson ili Kolmogorov-Smirnov test, u zavisnosti od broja uzoraka. Ekstremne odnosno spoljne vrednosti utvrđene su pomoću Grubb's testa (G-test). Na parametre kod kojih je ustanovljena normalna raspodela (specifične aktivnosti antioksidativnih enzima, detoksifikacionih enzima i digestivnih

Materijal i metode

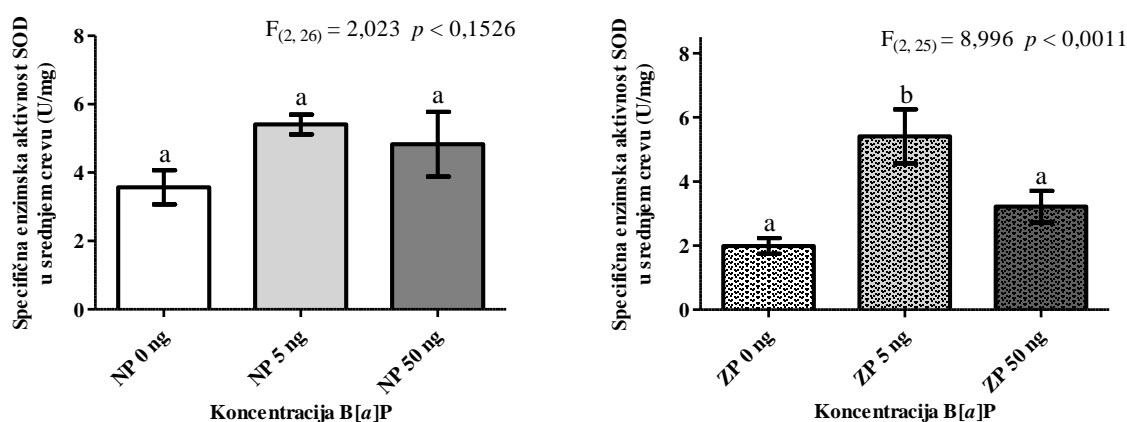
enzima, koncentracija Hsp70 u mozgu, koncentracija trehaloze i lipida, masa larvi i relativna brzina rasta na petom larvenom stupnju) primenjena je parametarska statistika - jednofaktorska ANOVA i Tukey's post hoc test. Sa druge strane, neparametarskim testovima Kruskal-Wallis ANOVA i Dunn's post hoc test analizirani su rezultati za trajanje razvića. Nivo statističke značajnosti bio je $p < 0,05$. Za sve analize korišćen je softver GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

4. REZULTATI

4.1. Efekti benzo[*a*]pirena na antioksidativne enzime srednjeg creva i hemolimfe larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

4.1.1. Specifična enzimska aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u srednjem crevu larvi

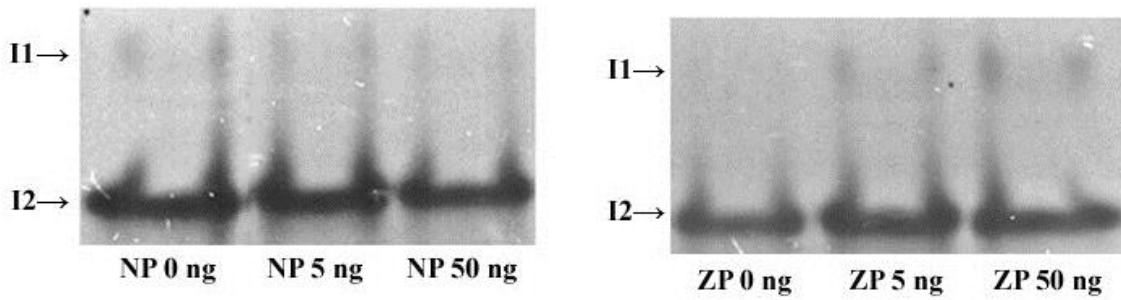
Hronični tretman benzo[*a*]pirenom nije doveo do statistički značajne razlike u specifičnoj aktivnosti SOD kod larvi poreklom iz nezagađene šume. Značajan porast aktivnosti SOD, u odnosu na kontrolnu grupu, jedino je zabeležen kod larvi poreklom iz zagađene šume, i to kod tretmana nižom koncentracijom B[*a*]P, od 5 ng/g suve mase hrane (**Slika 3**).



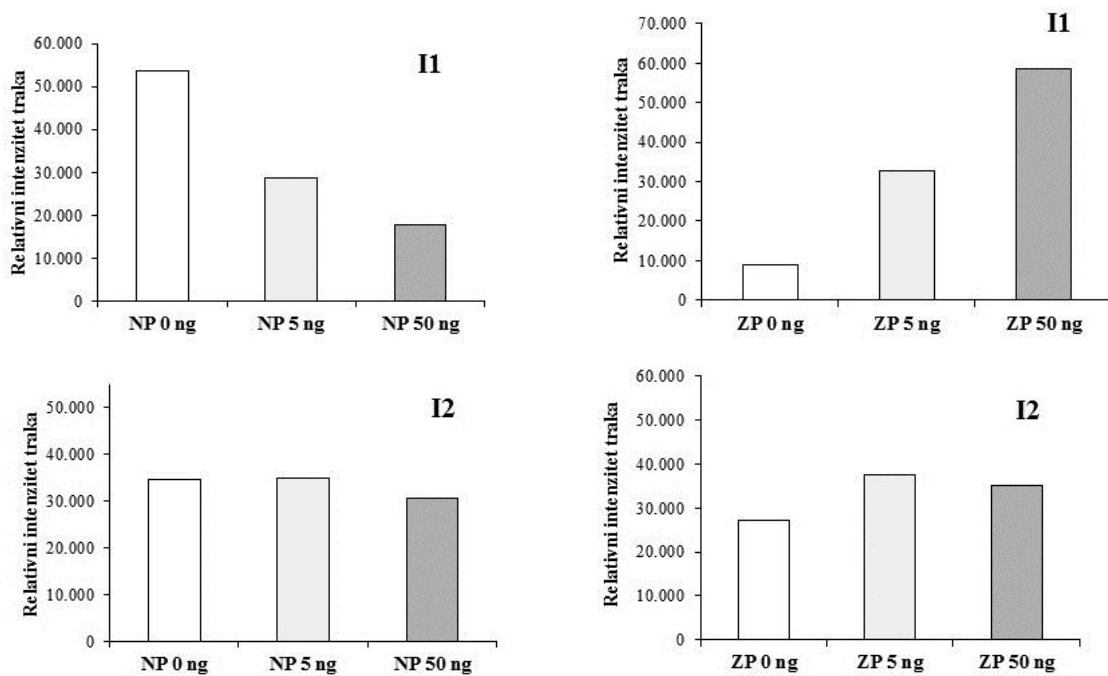
Slika 3. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost superoksid dismutaze u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Detekcija SOD aktivnosti na gelu nakon native poliakrilamidne elektroforeze (PAGE) ukazala je na prisustvo dve izoforme ovog enzima u srednjem crevu obe populacije larvi (**Slika 4A**). Densitometrijska analiza enzimskih traka pokazala je pad aktivnosti izoforme 1 (I1) u grupama tretiranim benzo[*a*]pirenom u slučaju larvi poreklom iz nezagađene šume, nasuprot larvama poreklom iz zagađene šume, gde je zabeležen porast u aktivnosti iste izoforme. Pad odnosno porast aktivnosti I1 izoforme najizraženiji je kod grupa hranjenih sa 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane. Izoforma I2 je dominantna u svim analiziranim uzorcima i pokazuje male varijacije u aktivnosti po tretmanima, kako kod larvi iz nezagađene tako i kod larvi iz zagađene šume (**Slika 4B**).

A.



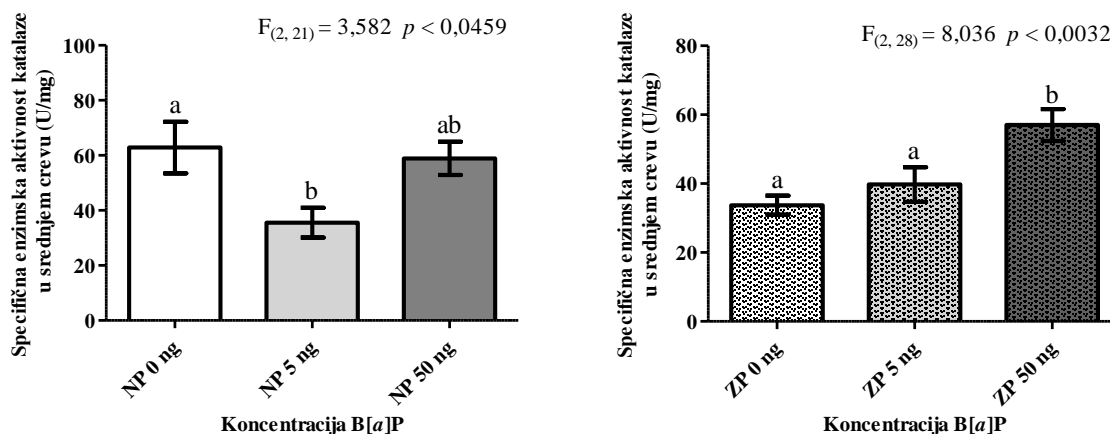
B.



Slika 4. **A.** Zimogramski prikaz superoksid dismutaze nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **B.** Denzitometrijska analiza traka relativne enzimске aktivnosti detektovanih SOD izoformi. I1 i I2 označavaju enzimске izoforme.

4.1.2. Specifična enzimska aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u srednjem crevu larvi

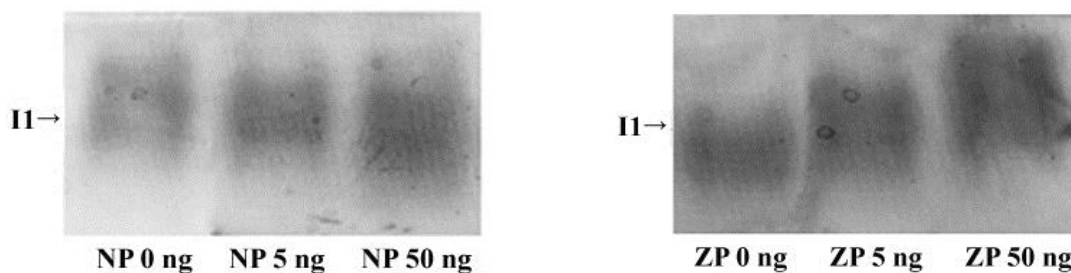
U srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume zabeleženo je značajno smanjenje specifične aktivnosti katalaze nakon tretmana nižom koncentracijom benzo[*a*]pirena (5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane). Tretman većom koncentracijom B[*a*]P (50 ng/g suve mase hrane) nije uticao na promenu enzimске aktivnosti. Kod grupe larvi poreklom iz zagađene šume hronično prisustvo B[*a*]P dovodi do dozno-zavisnog rasta specifične aktivnosti katalaze, pri čemu je statistički značajna razlika nađena pri tretmanu koncentracijom od 50 ng B[*a*]P/g suve mase (**Slika 5**).



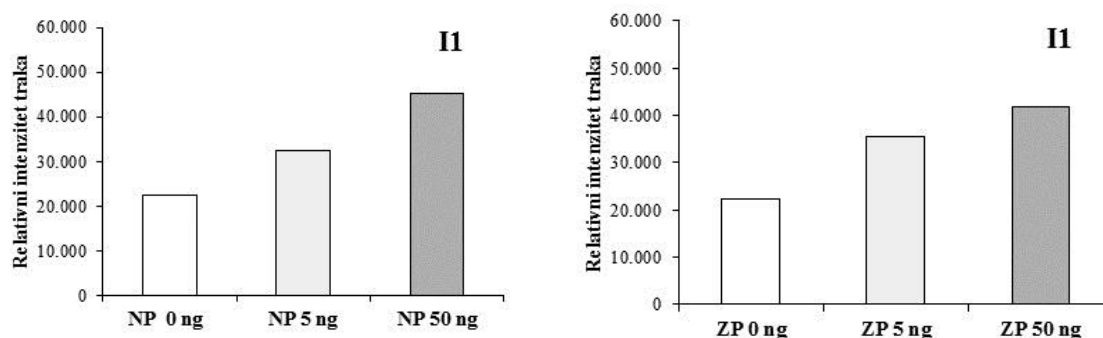
Slika 5. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost katalaze u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

U svim eksperimentalnim grupama obe populacije, zimogramska detekcija je pokazala samo jednu izoformu (I1) katalaze (**Slika 6A**). Takođe, zabeleženo je dozno-zavisno povećanje intenziteta enzimskih traka kod larvi sa obe šumske lokacije, hranjenih dijetom sa dodatkom B[a]P, u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe (**Slika 6B**).

A.



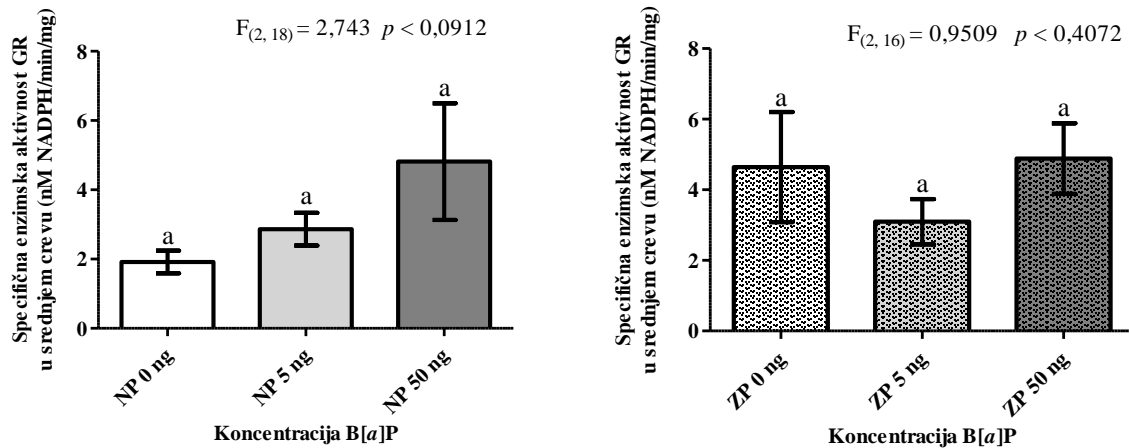
B.



Slika 6. A. Zimogramski prikaz katalaze nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **B.** Denzitometrijska analiza traka relativne enzimske aktivnosti detektovanih izoformi katalaze. I1 označava enzimsku izoformu.

4.1.3. Specifična enzimaska aktivnost glutation reduktaze u srednjem crevu larvi

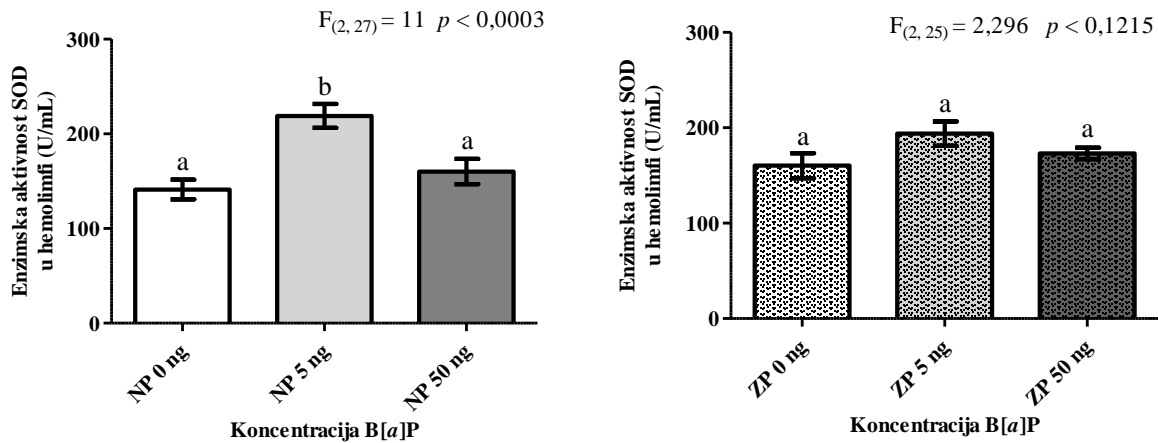
Hronični tretman benzo[*a*]pirenom nije imao statistički značajan uticaj na specifičnu aktivnost glutation reduktaze u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz obe populacije korišćene u eksperimentu. U populaciji larvi poreklom iz nezagađene šume uočen je trend rasta enzimske aktivnosti sa povećanjem koncentracije B[*a*]P u veštačkoj dijeti (Slika 7).



Slika 7. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost glutation reduktaze u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.1.4. Enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u hemolimfi larvi

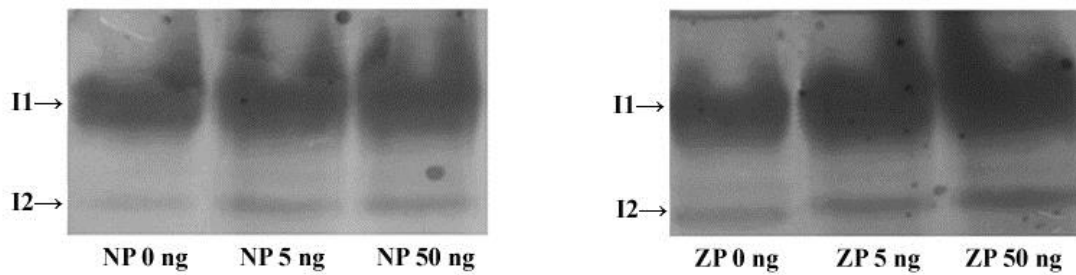
Statistički značajno povećanje enzimske aktivnosti SOD zabeleženo je jedino kod larvi poreklom iz nezagađene šume, i to kod grupe izložene koncentraciji od 5 ng B[a]P/g suve mase hrane. U hemolimfi larvi poreklom iz zagađene šume nije nađena razlika u enzimskoj aktivnosti SOD, između tretmana i kontrolne grupe (**Slika 8**).



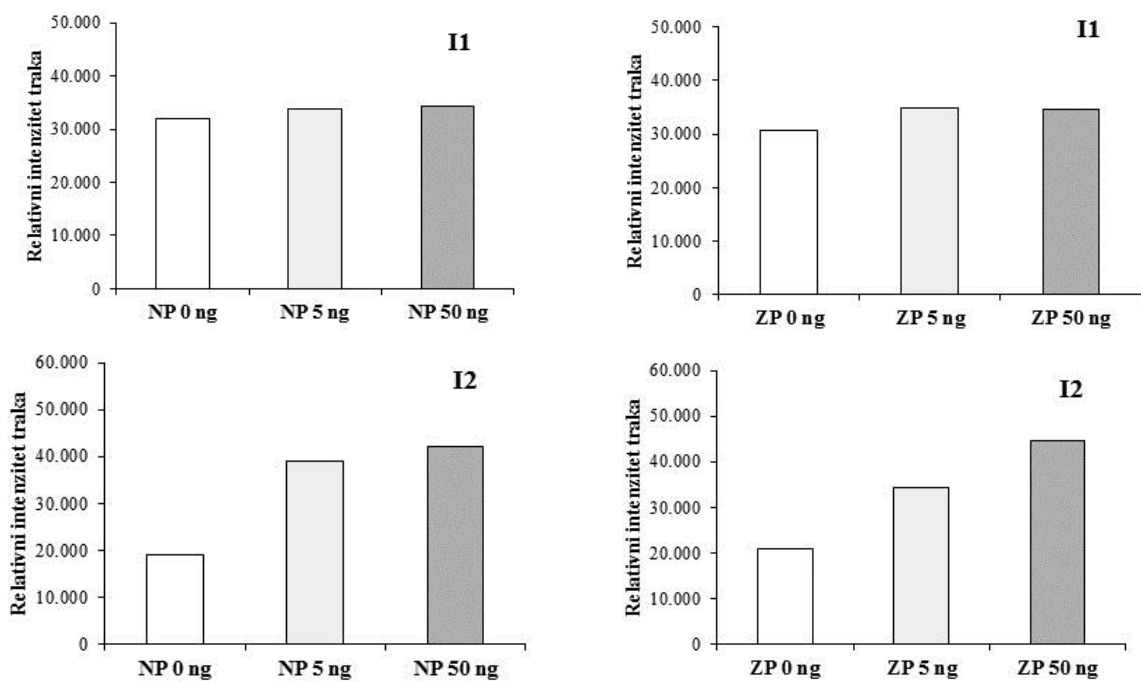
Slika 8. Uticaj benzo[a]pirena na enzimsku aktivnost superoksid dismutaze u hemolimfi larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[a]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Na zimogramu su detektovane dve izoforme SOD u hemolimfi larvi *L. dispar*, od kojih izoformu I1 odlikuje najintenzivnija aktivnost u svim analiziranim grupama (**Slika 9A**). Tretman dijetom sa dodatkom B[a]P dovodi do neznatnih razlika u aktivnosti izoforme I1 kod larvi poreklom iz nezagađene i zagađene šume, u odnosu na kontrolne grupe. Koncentracije B[a]P od 5 ng, a posebno od 50 ng/g suve mase hrane, stimulišu povećanje aktivnosti SOD izoforme I2 u hemolimfi larvi poreklom iz obe populacije *L. dispar* (**Slika 9B**).

A.



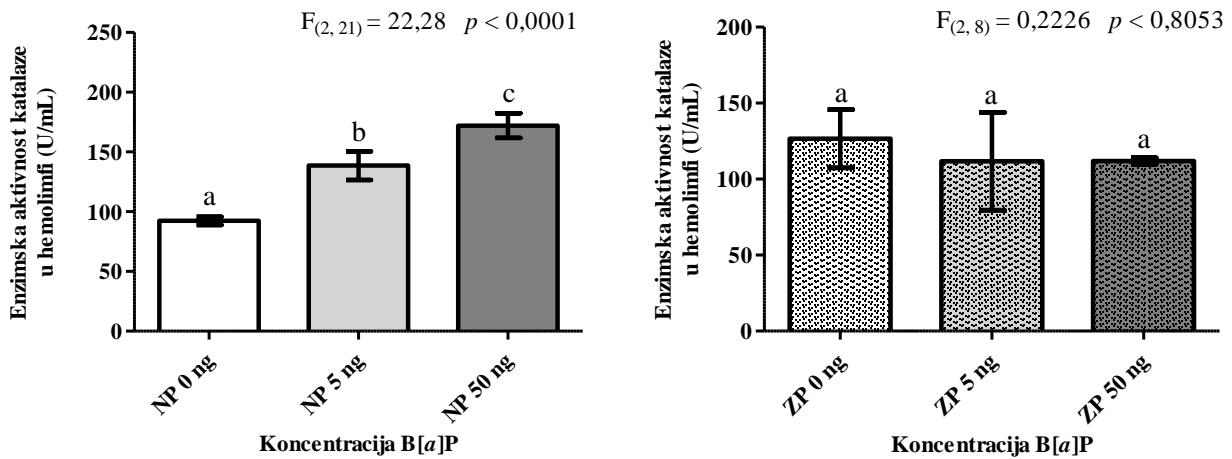
B.



Slika 9. A. Zimogramski prikaz superoksid dismutaze nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. B. Denzitometrijska analiza relativne enzimske aktivnosti detektovanih SOD izoformi. I1 i I2 označavaju enzimske izoforme.

4.1.5. Enzimska aktivnost katalaze u hemolimfi larvi

Analiza enzimske aktivnosti katalaze u hemolimfi larvi poreklom iz nezagađene šume, pokazala je statistički značajno povećanje nakon primene obe koncentracije benzo[*a*]pirena u hrani. Razlika aktivnosti enzima u hemolimfi tretiranih larvi u odnosu na kontrolnu grupu, bila je veća posle delovanja koncentracije od 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane. Kod larvi poreklom iz zagađene šume hronično prisustvo B[*a*]P u hrani ne dovodi do značajne promene u enzimskoj aktivnosti katalaze (Slika 10).

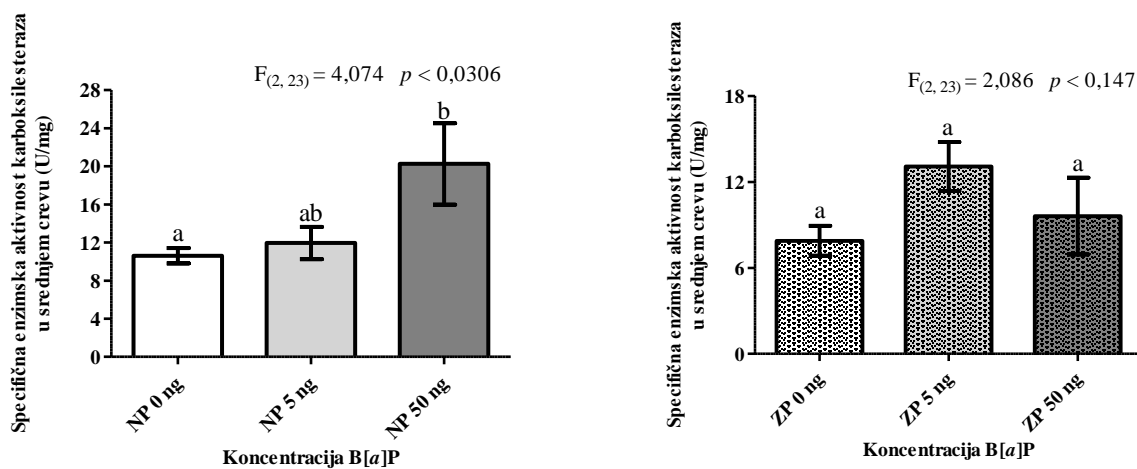


Slika 10. Uticaj benzo[*a*]pirena na enzimsku aktivnost katalaze u hemolimfi larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.2. Efekti benzo[*a*]pirena na enzime koji učestvuju u detoksifikaciji u srednjem crevu i mozgu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

4.2.1. Specifična enzimska aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u srednjem crevu larvi

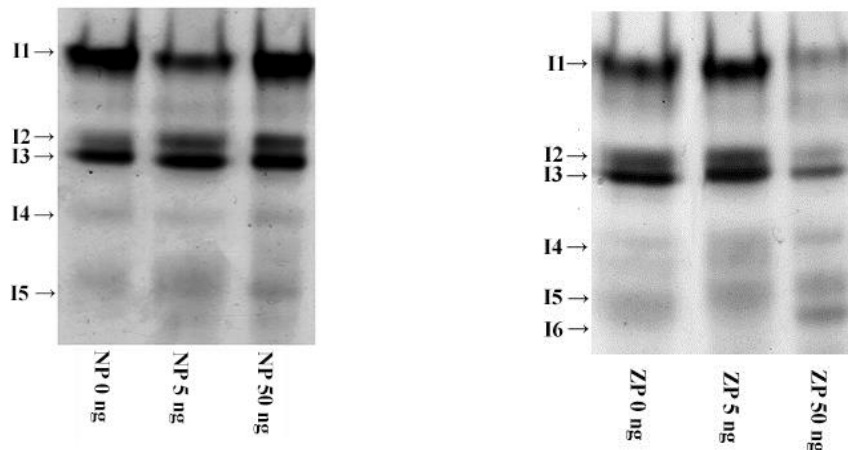
Utvrđeno je povećanje specifične aktivnosti karboksilesteraza u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume nakon hronične ishrane hranom koja sadrži 50 ng B[*a*]P/g u suvoj masi hrane. Nije pronađena statistički značajna promena aktivnosti ovih enzima u populaciji larvi poreklom iz zagađene šume (**Slika 11**).



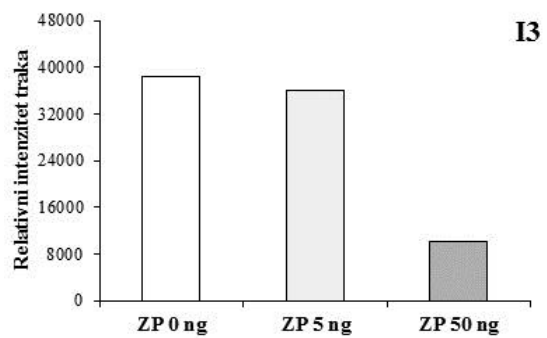
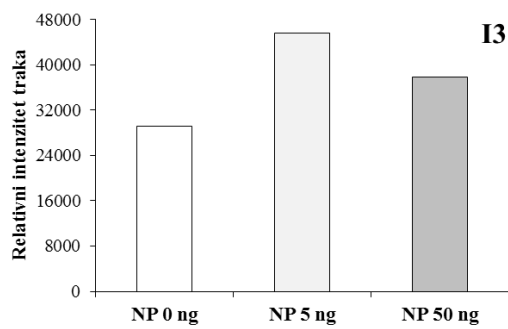
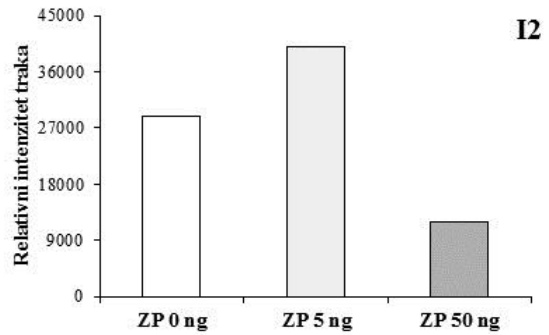
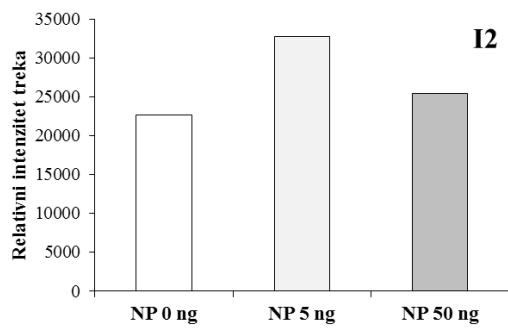
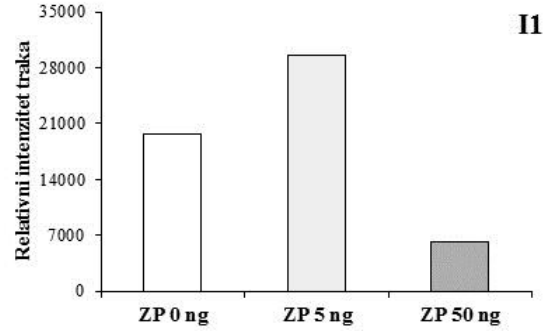
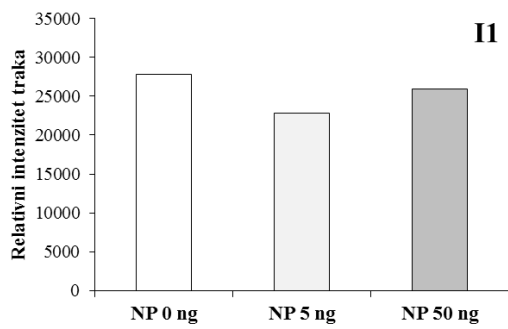
Slika 11. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost karboksilesteraza u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Detekcija aktivnosti karboksilesteraza na nativnom gelu, otkrila je postojanje većeg broja izoformi (I1 – I6) (**Slika 12A**). Izražena je redukcija intenziteta svih izoformi pri tretmanu koncentracijom od 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane, u obe populacije larvi *L. dispar*, pri čemu izoforme I2 i I5 nisu detektovane u populaciji larvi poreklom iz nezagađene šume. Izuzetak je izoforma I6 koja je prisutna jedino u populaciji larvi iz zagađene šume i to u grupi izloženoj većoj koncentraciji B[*a*]P. Zabeleženo je da koncentracija od 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane, kod jedinki iz obe populacije, slabo ili uopšte ne indukuje promene intenziteta izoformi I1 – I5 (**Slika 12B**).

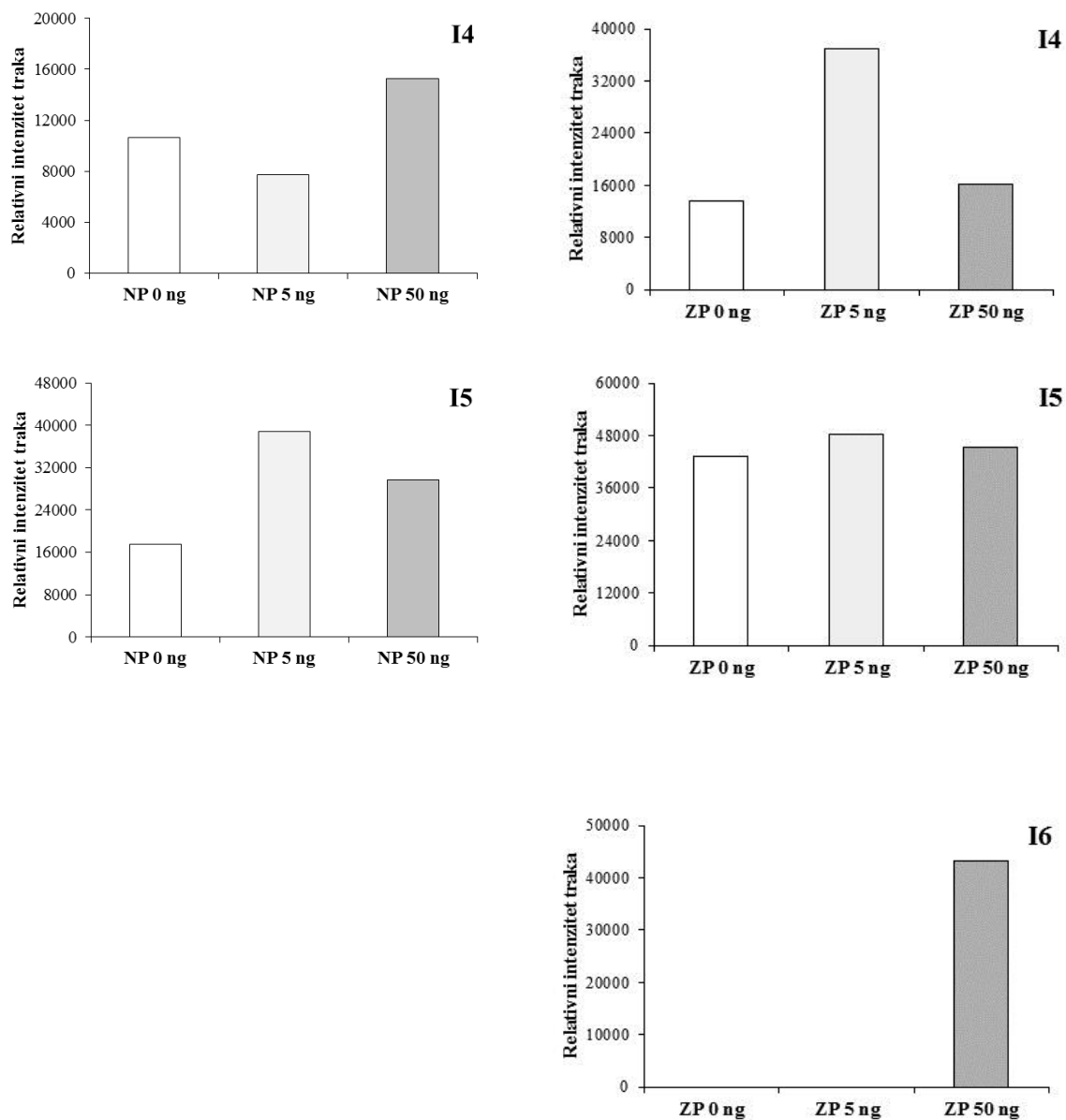
A.



B.



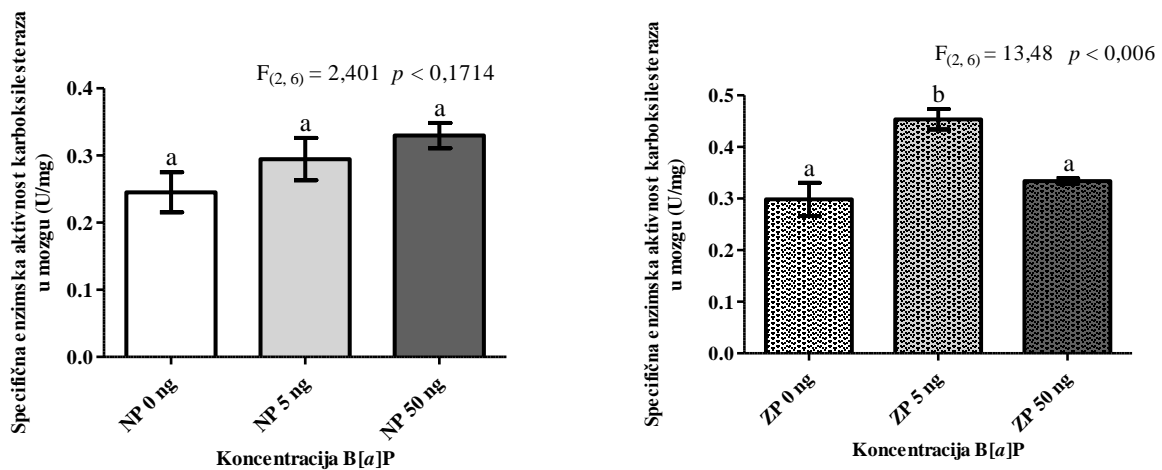
Rezultati



Slika 12. A. Zimogramski prikaz karboksilesteraza nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **B.** Densitometrijska analiza relativne enzimске aktivnosti detektovanih izoformi karboksilesteraza. I1, I2, I3, I4, I5 i I6 označavaju enzimске izoforme.

4.2.2. Specifična enzimska aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u mozgu larvi

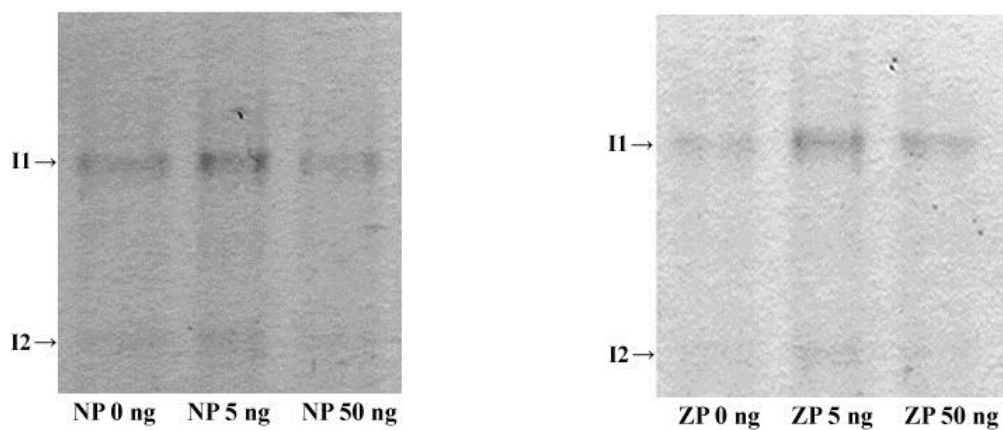
Populacija larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume ne pokazuje promene u specifičnoj aktivnosti karboksilesteraza u mozgu larvi nakon hronične izloženosti benzo[*a*]pirenu, dodatog u hranu. Rezultati su drugačiji kod larvi poreklom iz zagađene šume, gde koncentracija od 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane uzrokuje značajno povećanje specifične aktivnosti karboksilesteraze, u odnosu na kontrolu. Veća koncentracija benzo[*a*]pirena nije imala efekta na enzimsku aktivnost (Slika 13).



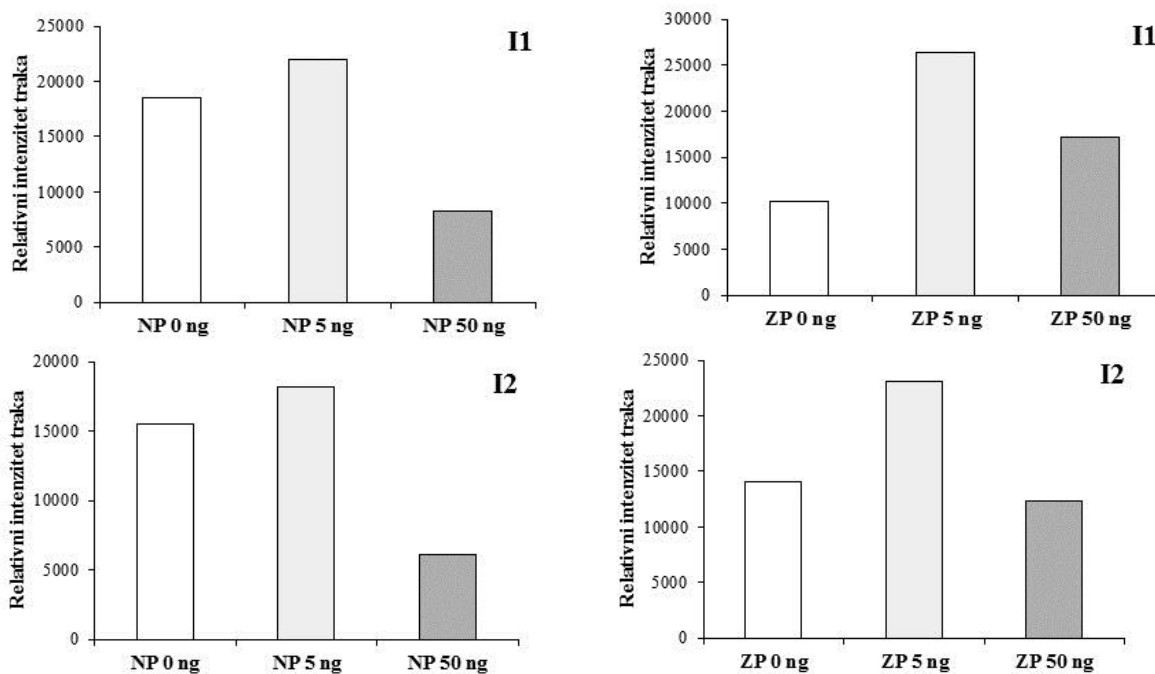
Slika 13. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost karboksilesteraza u mozgu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

U obe populacije larvi *L. dispar* uočene su dve moždane izoforme karboksilesteraza (I1 i I2) pri čemu je izoforma I1 dominantna (Slika 14A). Takođe je karakteristično za obe populacije da tretman benzo[*a*]pirenom u koncentraciji od 5 ng/g suve mase hrane dovodi po povećanja enzimске aktivnosti obe izoforme, a da hronični uticaj 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane rezultuje u smanjenju intenziteta izoformi, u odnosu na kontrolne grupe (Slika 14B).

A.



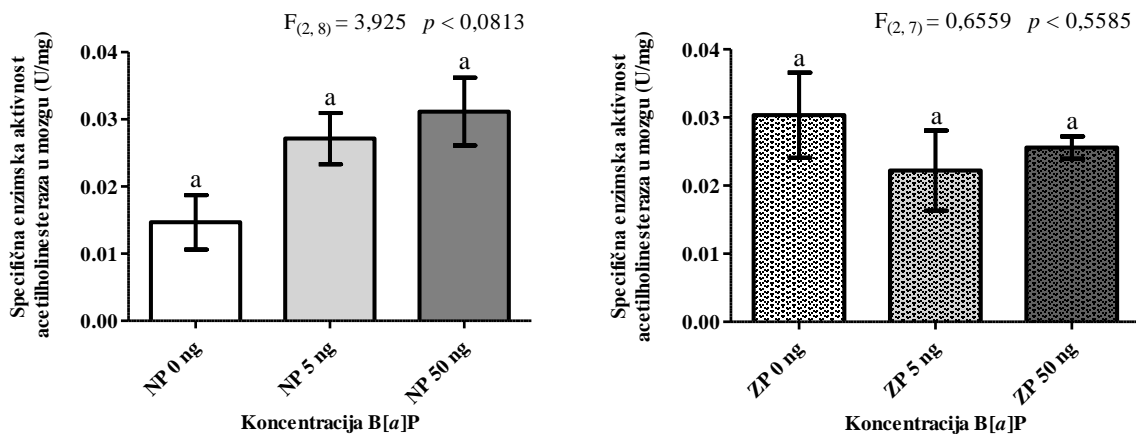
B.



Slika 14. A. Zimogramski prikaz karboksilesteraza nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. B. Densitometrijska analiza relativne enzimske aktivnosti detektovanih izoformi karboksilesteraza. I1 i I2 označavaju enzimske izoforme.

4.2.3. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija acetilholinesteraza u mozgu larvi

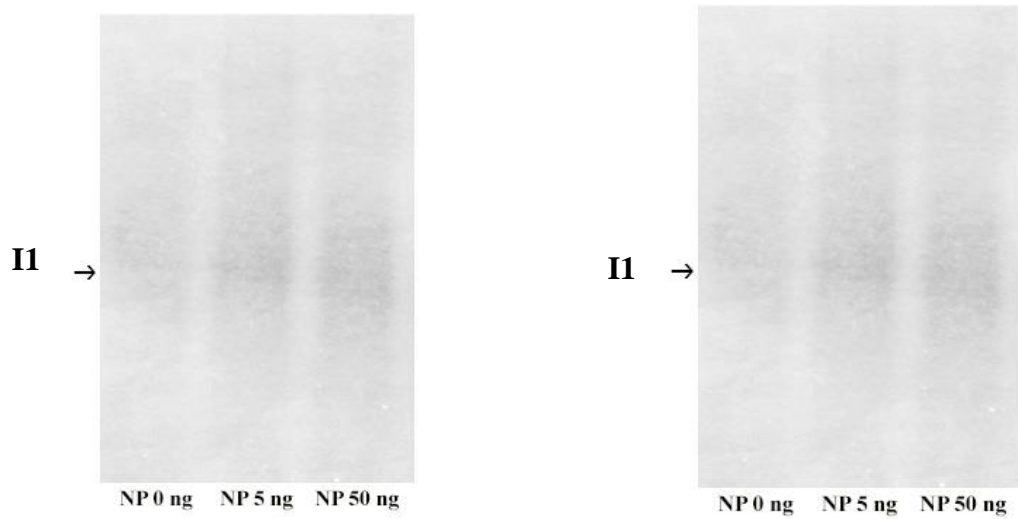
Specifična aktivnost acetilholinesteraza u mozgu larvi *L. dispar* ne pokazuje statistički značajne promene nakon hroničnog dejstva benzo[*a*]pirena. Larve poreklom iz nezagađene šume ispoljavaju trend rasta enzimске aktivnosti sa povećanjem koncentracije polutanta, suprotno larvama poreklom iz zagađene šume (**Slika 15**).



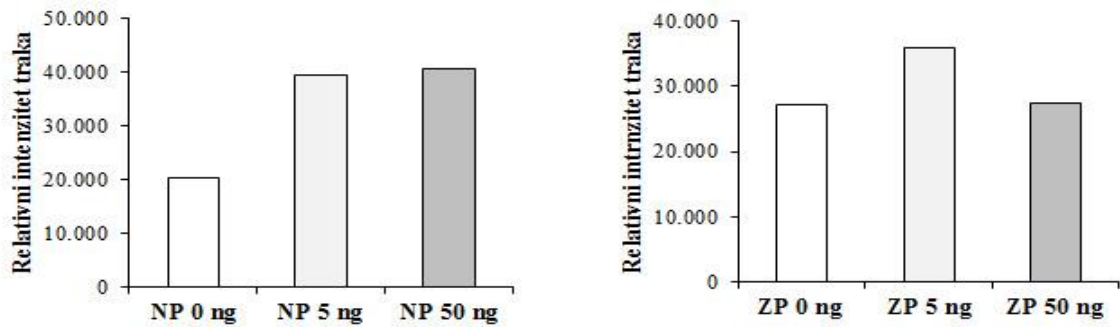
Slika 15. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost acetilholinesteraza u mozgu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Detekcijom aktivnosti acetilholinesteraza na nativnom poliakrilamidnom gelu uočena je samo jedna, slabo eksprimirana izoforma, u svim eksperimentalnim grupama. Primećene su razlike u intenzitetu ove izofome u grupama larvi tretiranih benzo[*a*]pirenom u odnosu na kontrolne grupe, obe populacije *L. dispar*. Njena aktivnost raste proporcionalno sa povećanjem koncentracije benzo[*a*]pirena, kod larvi poreklom iz nezagađene šume, dok kod populacije iz zagađene šume nije prisutna takva podudarnost (**Slika 16**).

A.



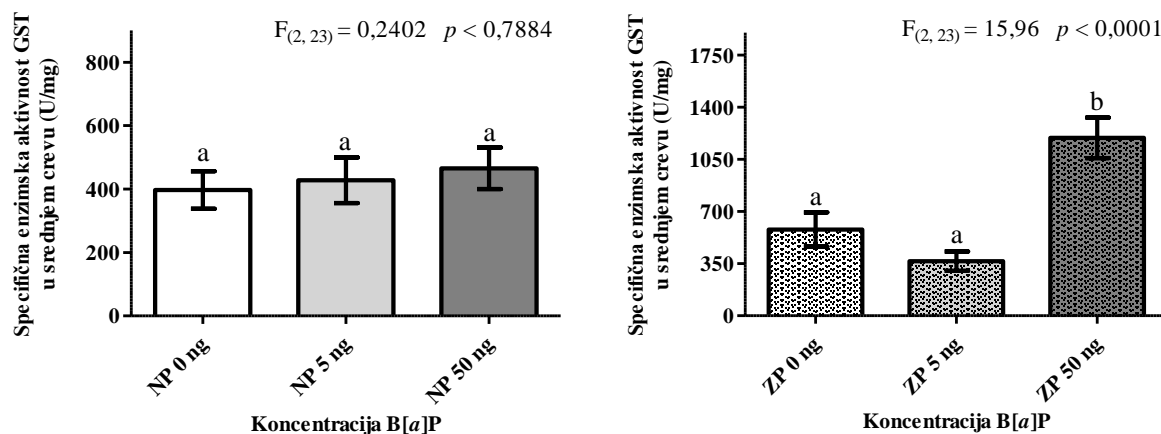
B.



Slika 16. A. Zimogramski prikaz acetilholinesteraza nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. B. Densitometrijska analiza relativne enzimске aktivnosti detektovane AChE izoforme. II označava enzimsku izoformu.

4.2.4. Specifična enzimska aktivnost glutation S-transferaze u srednjem crevu larvi

Analizom specifične aktivnosti GST u srednjem crevu larvi *L. dispar* iz nezagađene populacije, otkriveno je da nijedna koncentracija benzo[*a*]pirena u hrani ne dovodi do njene promene u odnosu na kontrolnu grupu. Kod larvi poreklom iz zagađene populacije evidentno je značajno povećanje specifične aktivnosti GST pri ishrani veštačkom dijetom sa 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane, u odnosu na kontrolne grupe (Slika 17).



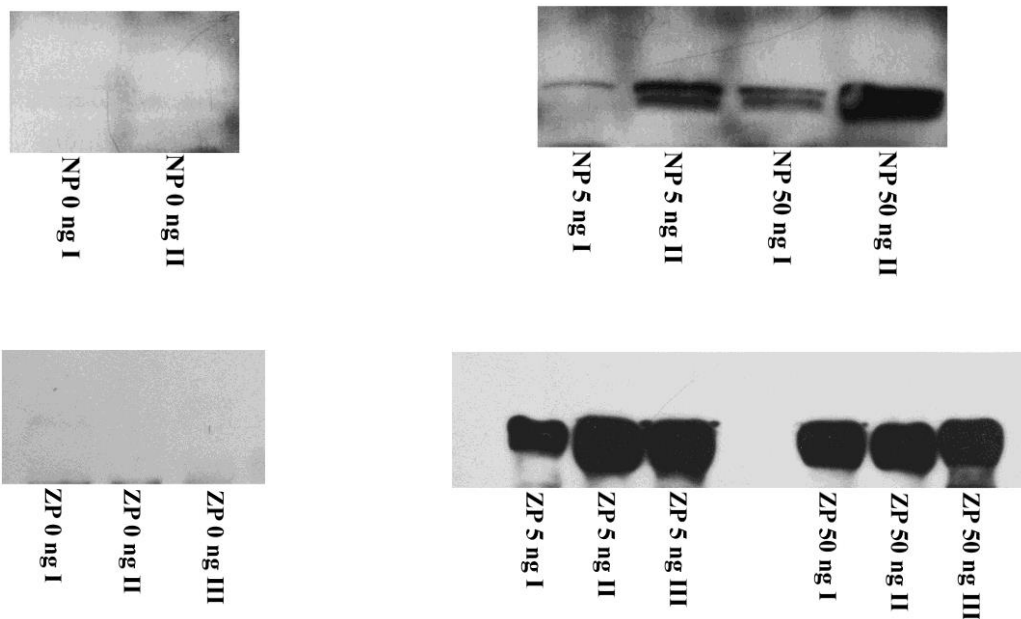
Slika 17. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost glutation S-transferaze u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.3. Uticaj benzo[a]pirena na ekspresiju Hsp70 u srednjem crevu i mozgu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

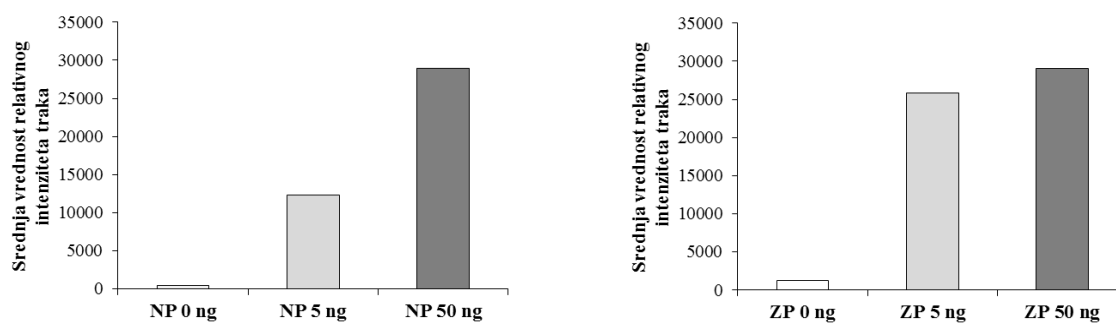
4.3.1. Ekspresija Hsp70 u srednjem crevu larvi

Ekspresija Hsp70 proteina u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume evidentno je povećana nakon hroničnog tretmana nižom koncentracijom benzo[a]pirena u hrani, a posebno posle tretmana sa višom koncentracijom B[a]P. Larve *L. dispar* poreklom iz zagađene šume posle tretmana obema koncentracijama benzo[a]pirena, imale su slično, uočljivo povećanje koncentracije Hsp70 u odnosu na kontrolu. Takođe denzitometrijskom analizom konstitutivne ekspresije ovog proteina zabeležena je veća ekspresija u populaciji larvi poreklom iz zagađene šume u odnosu na larve poreklom iz nezagađene šume (**Slika 18**).

A.



B.

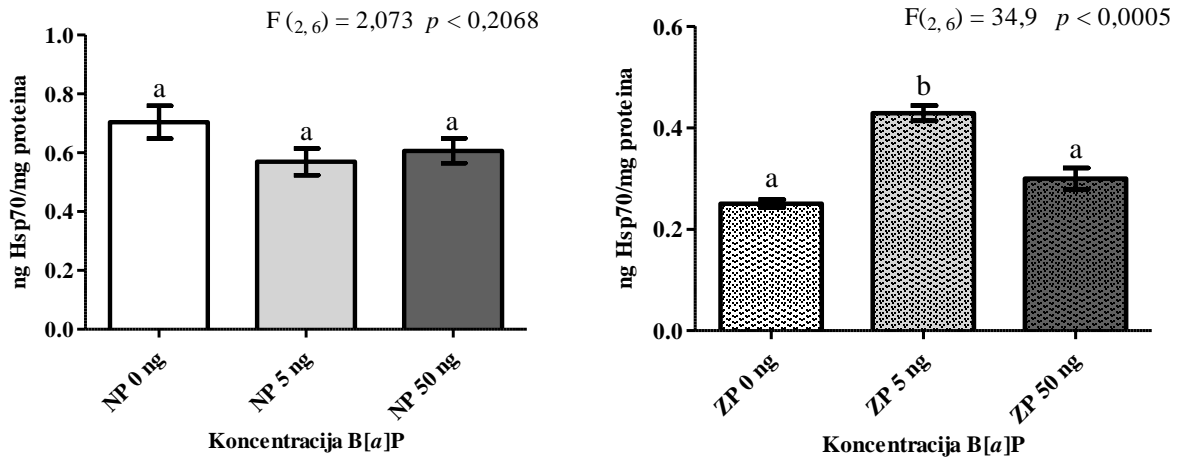


Slika 18. Uticaj benzo[*a*]pirena na koncentraciju Hsp70 u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. **A.** Western blot. **B.** Rezultati denzitometrijske analize prikazuju srednju vrednost relativne ekspresije Hsp70.

4.3.2. Ekspresija Hsp70 u mozgu larvi

ELISA test je utvrdio veću koncentraciju Hsp70 proteina u populaciji *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume u odnosu na larve poreklom iz populacije zagađene šume. Konstitutivna ekspresija ovog proteina veća je više od dva puta kod larvi poreklom iz nezagađene šume u odnosu na one poreklom iz zagađene šume. U populaciji larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume nisu uočene značajne razlike u koncentraciji Hsp70 između grupa izloženih benzo[*a*]pirenu i kontrolne grupe. Kod larvi poreklom iz zagađene šume zabeleženo je značajno povećanje koncentracije Hsp70 nakon tretmana od 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane, u odnosu na kontrolu (**Slika 19**).

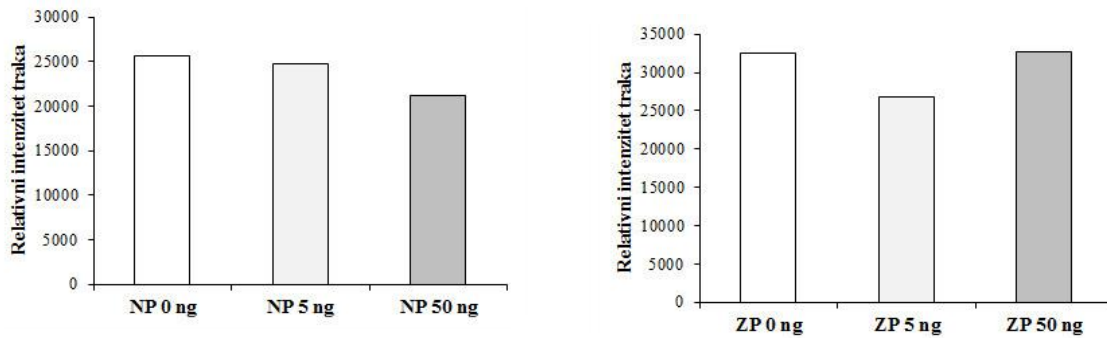
A.



B.



C.

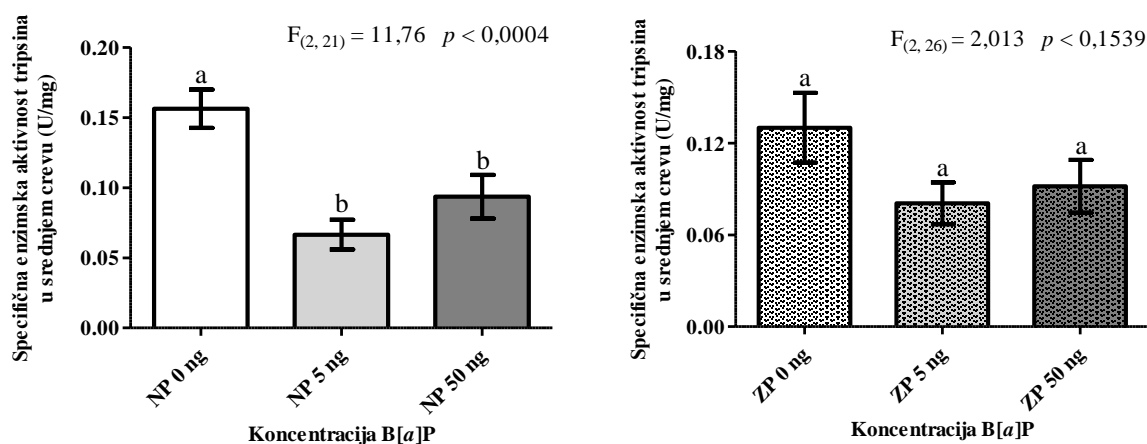


Slika 19. Uticaj benzo[*a*]pirena na koncentraciju Hsp70 u mozgu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. **A.** Koncentracije Hsp70 određene ELISA testom. **B.** Western blot. **C.** Rezultati denzitometrijske analize prikazuju relativni nivo ekspresije Hsp70. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.4. Efekti različitih koncentracija benzo[*a*]pirena na digestivne enzime u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

4.4.1. Specifična enzimska aktivnost i zimogramska detekcija tripsina u srednjem crevu larvi

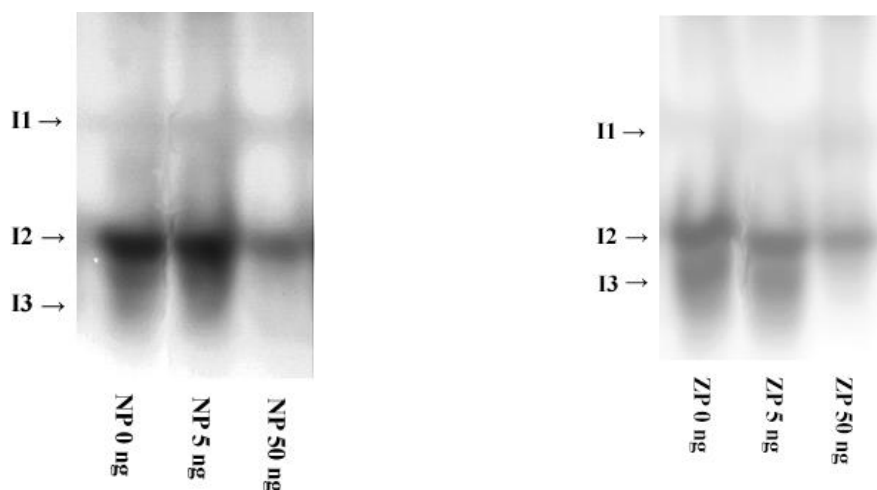
Utvrđeno je da hronična izloženost benzo[*a*]pirenu dovodi do smanjenja specifične aktivnosti tripsina u srednjem crevu larvi *L. dispar* iz obe populacije, pri čemu je taj pad, statistički značajan jedino kod populacije larvi poreklom iz nezagađene šume. U ovoj populaciji koncentracija od 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane u najvećoj meri je negativno uticala na specifičnu enzimsku aktivnost tripsina, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 20**).



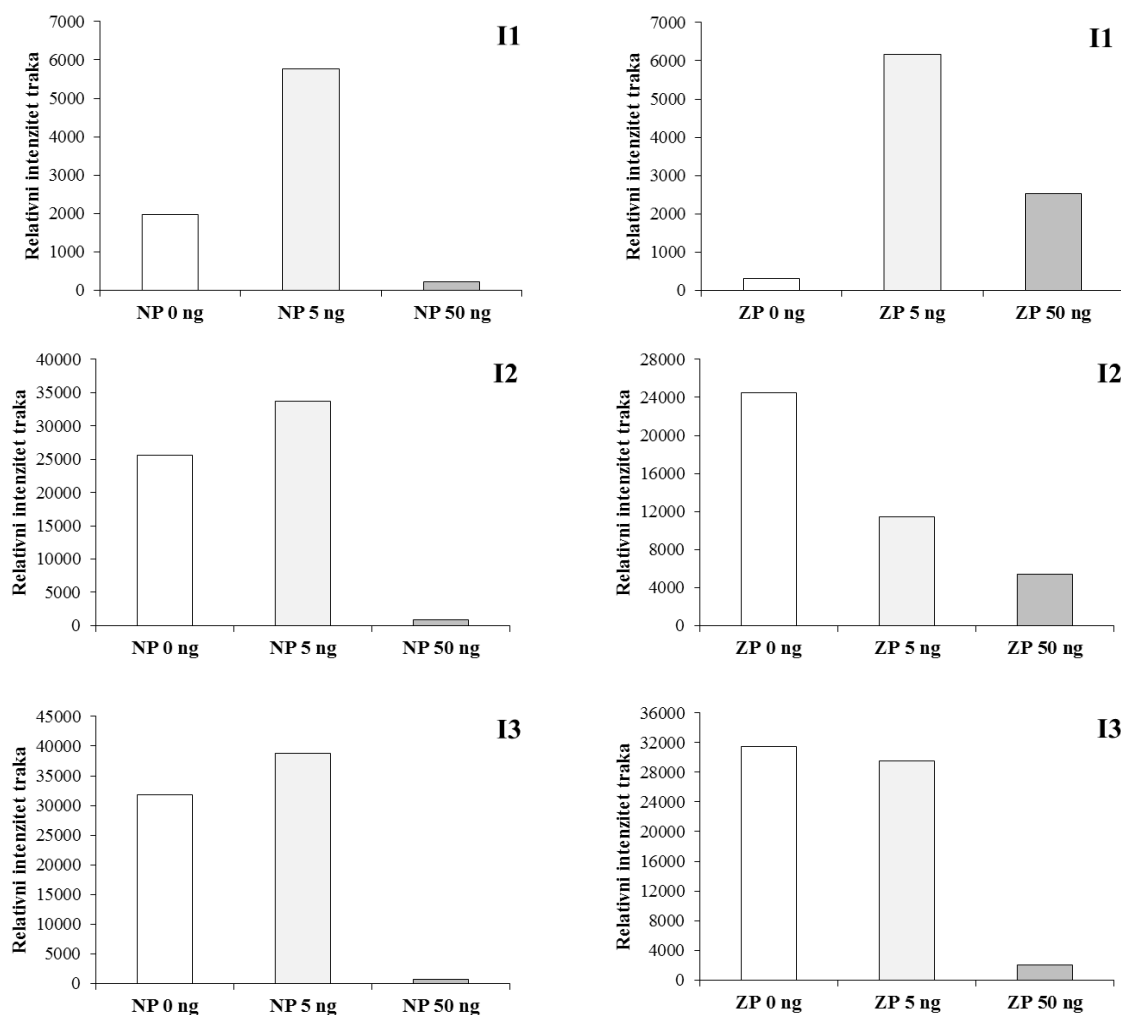
Slika 20. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost tripsina u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Zimogram je otkrio tri izoforme tripsina (I1-I3) u srednjem crevu larvi *L. dispar*. Sve izoforme prisutne su u svim eksperimentalnim grupama, a izoforma I1 pokazuje generalno veću aktivnost kod populacije larvi poreklom iz nezagađene šume (**Slika 21A**). U odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe, koncentracija od 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane indukuje povećanje aktivnosti svih izoformi kod larvi poreklom iz nezagađene šume, nasuprot larvama poreklom iz zagađene šume, gde je uočeno smanjenje njihovog intenziteta. Najveći uticaj na aktivnost izoformi tripsina imalo je hronično prisustvo benzo[*a*]pirena u koncentraciji od 50 ng/g suve mase hrane, koje je rezultovalo značajnim smanjenjem njihovih aktivnosti i gotovo izostankom izoforme 3 u obe populacije larvi *L. dispar* (**Slika 21B**).

A.



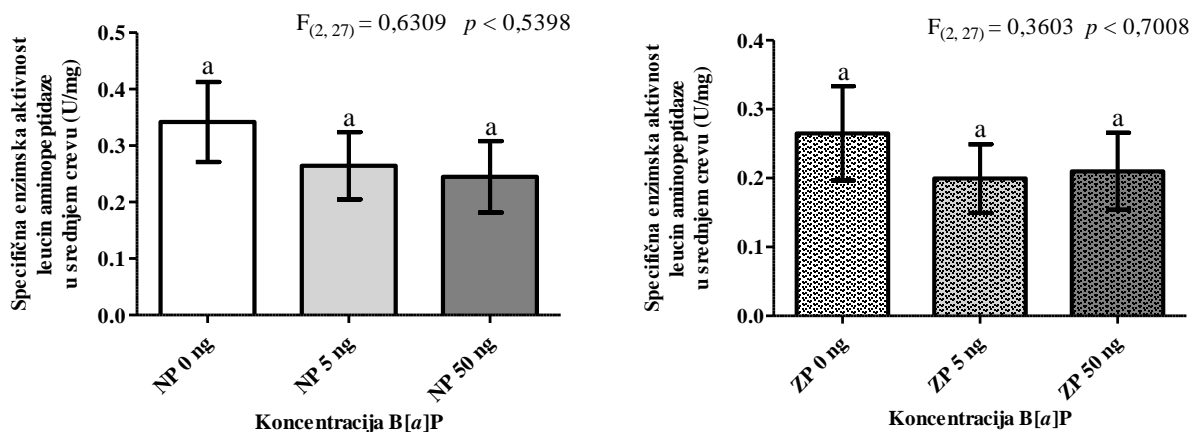
B.



Slika 21. A. Zimogramski prikaz tripsina nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. B. Denzitometrijska analiza relativne enzimske aktivnosti detektovanih izoformi tripsina. I1, I2 i I3 označavaju enzimske izoforme

4.4.2. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija leucin aminopeptidaze u srednjem crevu larvi

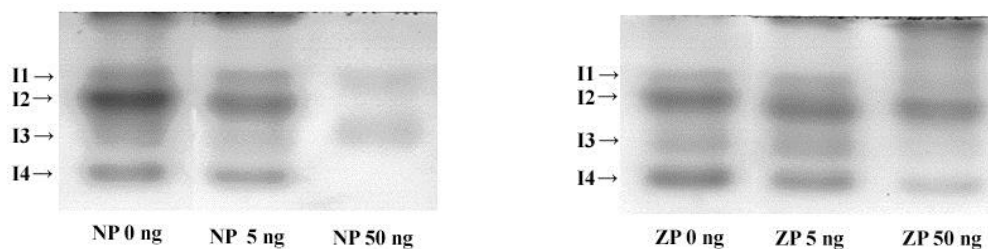
Ishrana larvi *L. dispar* sa dijetom sa dodatkom benzo[*a*]pirena (koncentracije 5 i 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane) nije imala značajnog efekta na aktivnost leucin aminopeptidaze, kod larvi obe populacije (**Slika 22**).



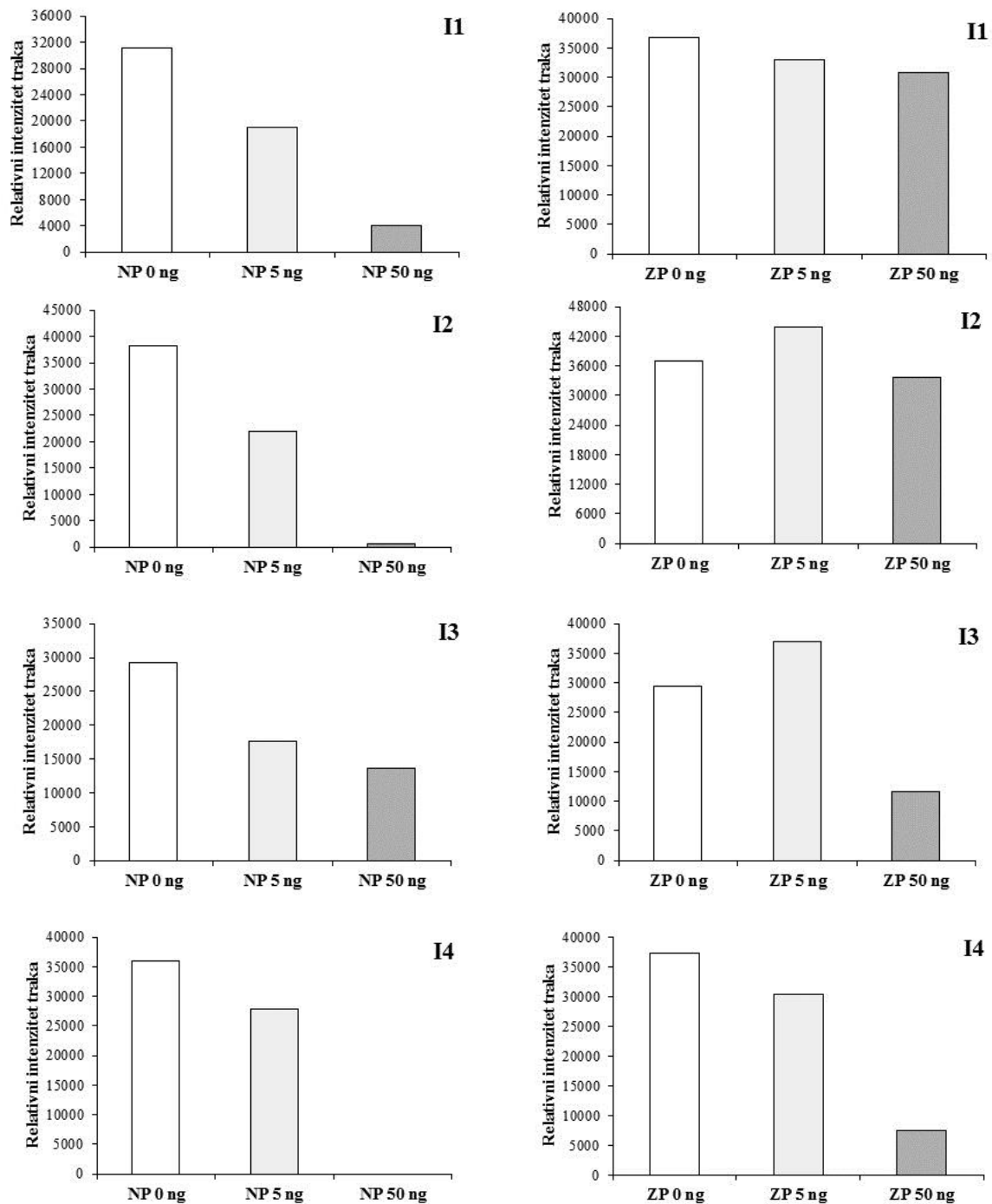
Slika 22. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost leucin aminopeptidaze u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

U srednjem crevu larvi *L. dispar* obe populacije, detektovane su četiri izoforme leucin aminopeptidaze (**Slika 23A**). Kod svih analiziranih grupa prisutne su izoforma I1 i izoforma I3 čiji su intenziteti upadljivo slabiji u odnosu na izoformu I2 i izoformu I4. Larve poreklom iz nezagađene šume pokazuju dozno-zavisno smanjenje aktivnosti svih izoformi pri čemu koncentracija od 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane dovodi do izostanka aktivnosti izoforme I4, u odnosu na kontrolu. Populaciju larvi *L. dispar* poreklom iz zagađene šume odlikuje dozno zavisian pad aktivnosti jedino kod izoformi I1 i I4 u odnosu na kontrolnu grupu. Izoforme I2 i I3 karakteriše povećanje aktivnosti u grupi izloženoj koncentraciji od 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane, nasuprot grupi hranjenoj većom koncentracijom benzo[*a*]pirena gde je zabeležena njihova inhibicija, u poređenju sa kontrolom (**Slika 23B**).

A.



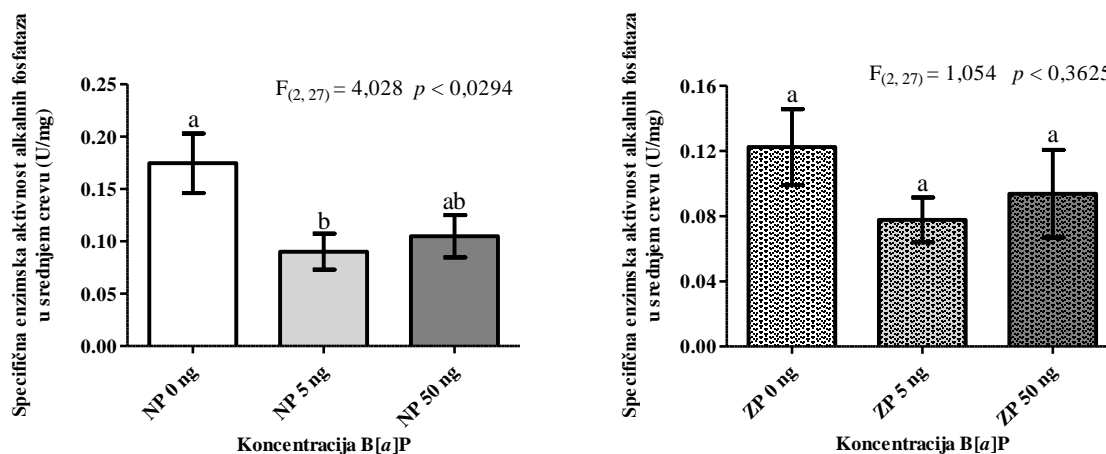
B.



Slika 23. A. Zimogramski prikaz leucin aminopeptidaze nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. B. Denzitometrijska analiza relativne enzimске aktivnosti detektovanih izoformi. I1, I2, I3 i I4 označavaju enzimске izoforme.

4.4.3. Specifična enzimska aktivnost i zimogramska detekcija alkalnih fosfataza u srednjem crevu larvi

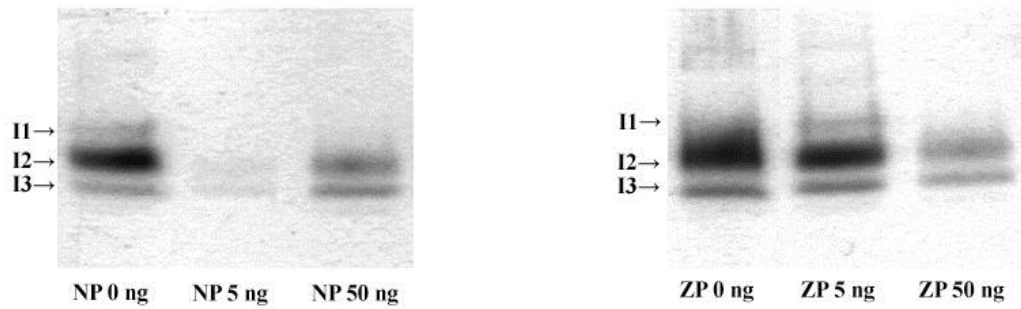
Statistički značajno smanjenje aktivnosti alkalnih fosfataza nađeno je jedino u populaciji larvi poreklom iz nezagađene šume i to kao posledica dugotrajne dijeta sa dodatkom benzo[*a*]pirena u koncentraciji od 5 ng/g suve mase hrane, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 24**).



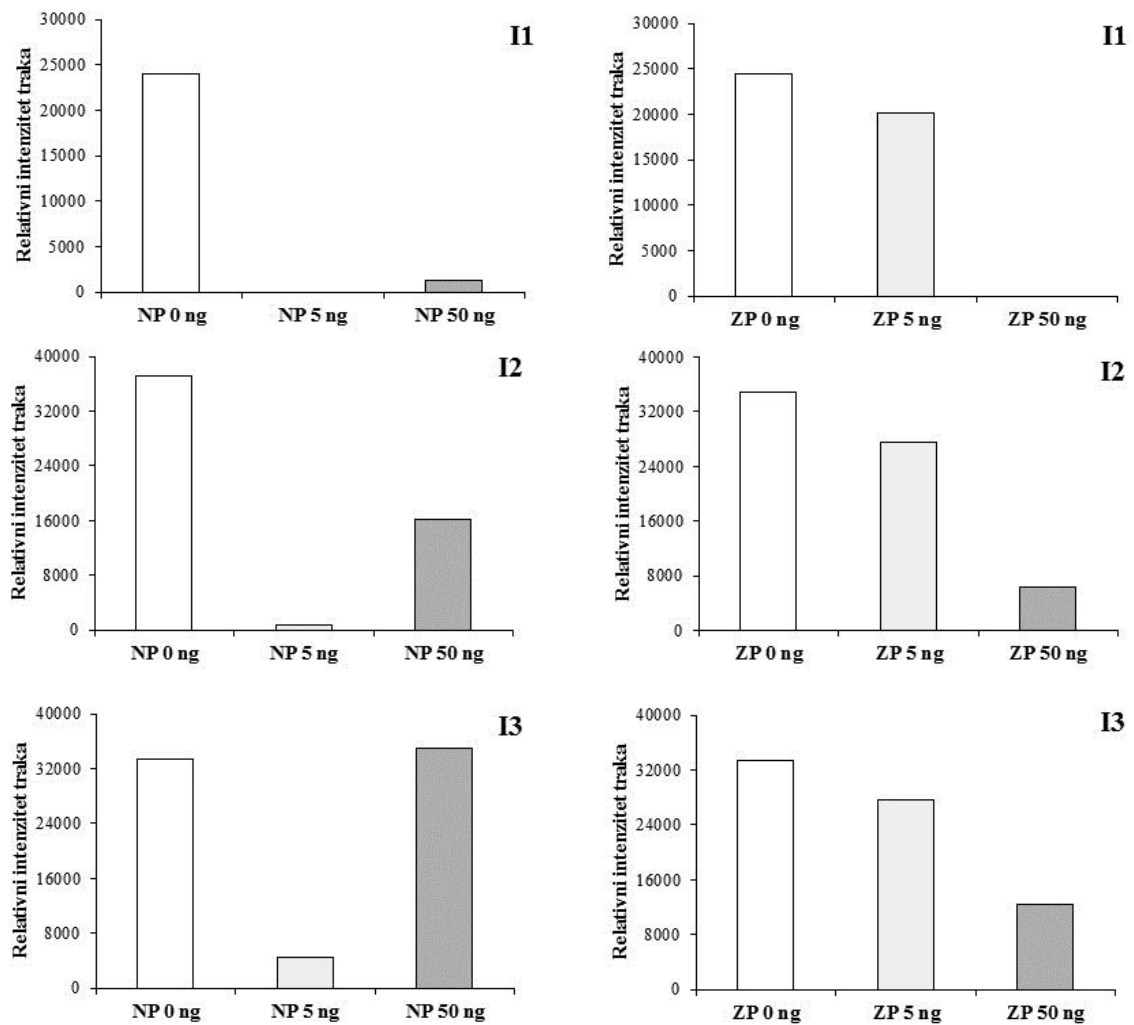
Slika 24. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost alkalnih fosfataza u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

U kontrolnim grupama obe populacije utvrđeno je postojanje tri izoforme alkalnih fosfataza na nativnom gelu (**Slika 25A**). Kod populacije larvi poreklom iz nezagađene šume manja koncentracija benzo[*a*]pirena dovela je do najveće inhibicije aktivnosti izoformi alkalnih fosfataza u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe. Grupu larvi koja je izlagana većoj koncentraciji B[*a*]P iz iste populacije, odlikuje smanjenje aktivnosti izoformi I1 i I2, kao i blago povećanje aktivnosti izoforme 3 (I3) u odnosu na kontrolnu grupu. Populacija larvi poreklom iz zagađene šume pokazuje dozno-zavisnu redukciju intenziteta svih enzimskih traka nakon hroničnog tretmana dijetom sa dodatkom benzo[*a*]pirena (**Slika 25B**).

A.



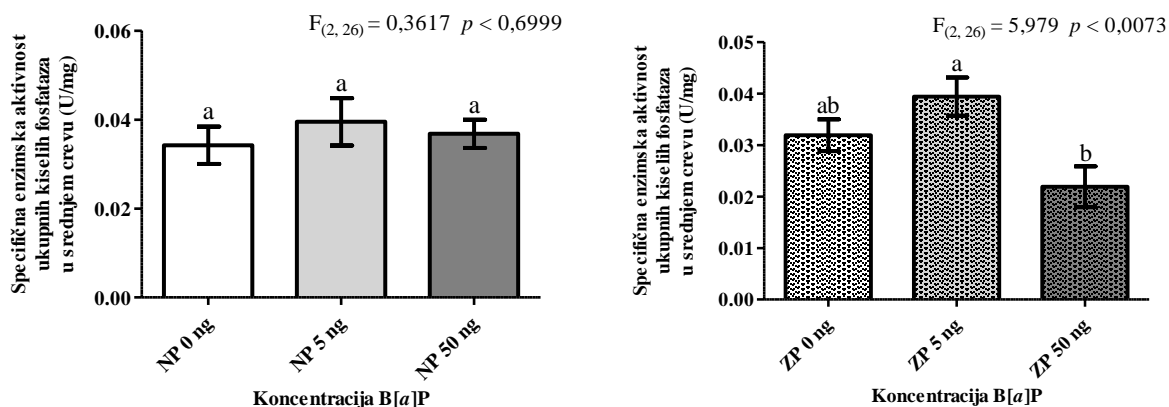
B.



Slika 25. A. Zimogramski prikaz alkalnih fosfataza nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. B. Denzitometrijska analiza relativne enzimske aktivnosti detektovanih izoformi alkalnih fosfataza. I1, I2 i I3 označavaju enzimske izoforme.

4.4.4. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramska detekcija ukupnih kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi

Ispitivanjem aktivnosti ukupnih kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi iz populacije nezagađene šume nisu nađene značajne promene usled uticaja benzo[*a*]pirena dodatog u dijetu. Aktivnost ovih enzima je izmenjena u crevima larvi poreklom iz zagađene šume koje su tretirane benzo[*a*]pirenom, pri čemu se statistički značajno razlikuju jedino srednje vrednosti dva tretmana, dok promene u odnosu na kontrolnu grupu nisu statistički značajne (**Slika 26**).

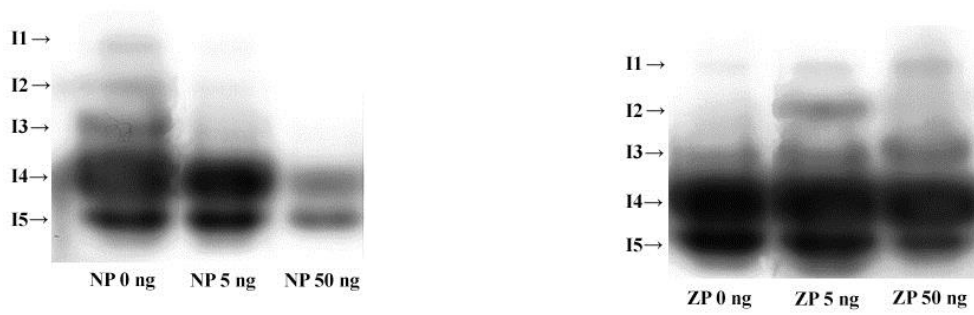


Slika 26. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost ukupnih kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

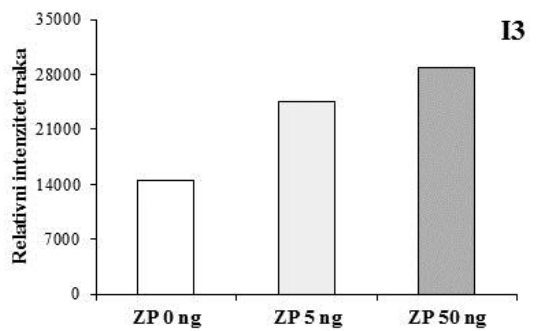
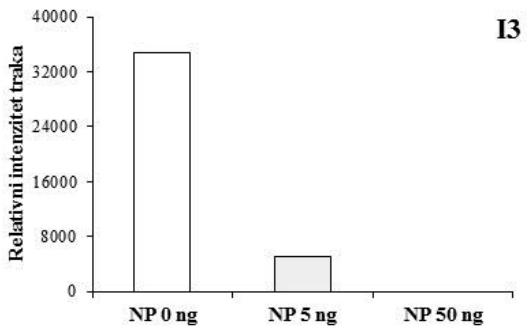
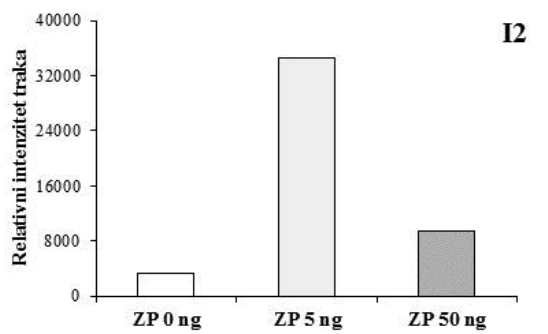
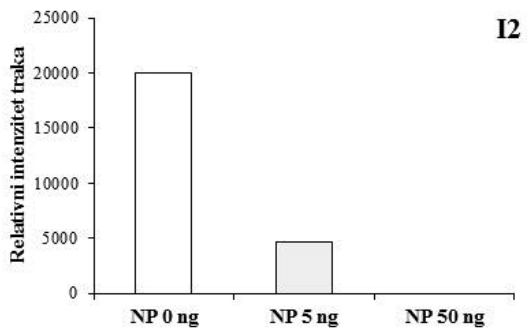
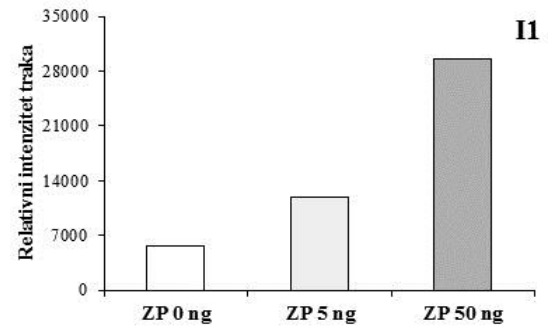
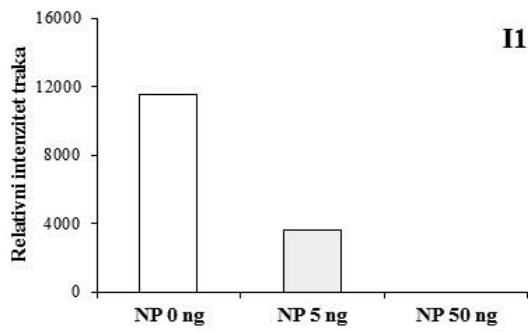
Populacija *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume odlikuje se prisustvom pet izoformi ukupnih kiselih fosfataza (I1 – I5) u kontrolnoj grupi (**Slika 27A**). Intenzitet svih pet izoformi opada sa povećanjem koncentracije B[*a*]P u hrani, tako da u grupi izloženoj većoj koncentraciji polutanta (50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane) izoforme I1, I2 i I3 uopšte nisu prisutne. Kod populacije larvi poreklom iz zagađene šume sve eksperimentalne grupe odlikuje prisutnost svih izoformi pri čemu se pod uticajem benzo[*a*]pirena aktivnosti izoformi I1 i I3 povećava na dozno zavisani način, dok intenziteti izoformi I2, I4 i I5 ne prate povećanje koncentracije polutanta (**Slika 27B**).

Rezultati

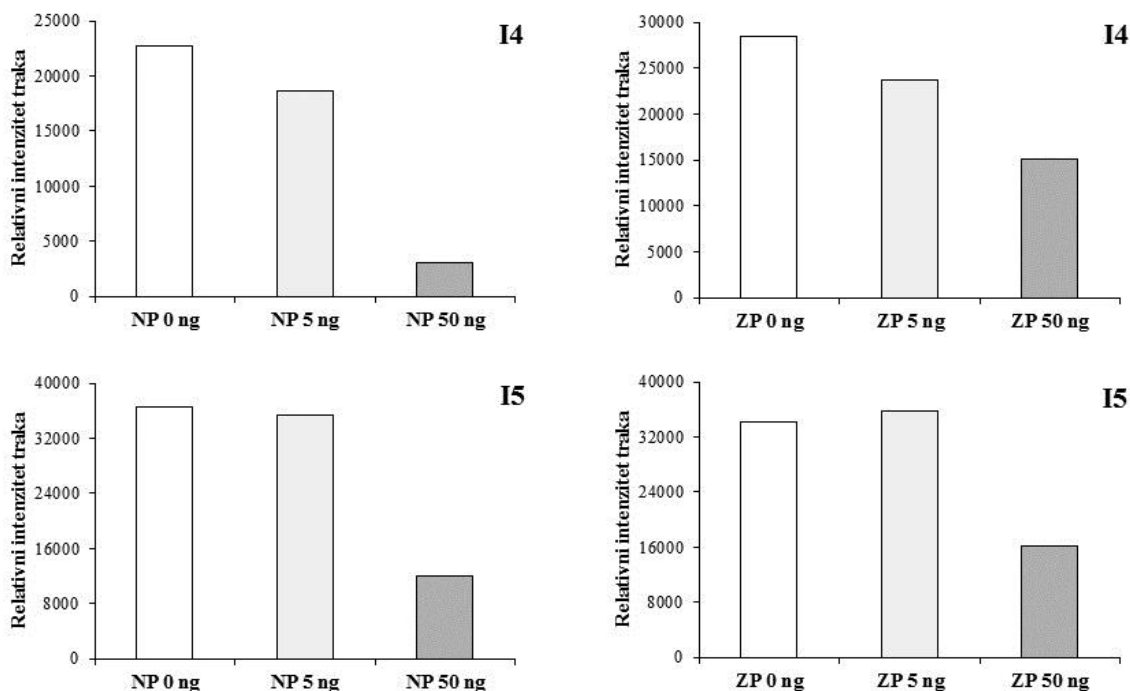
A.



B.



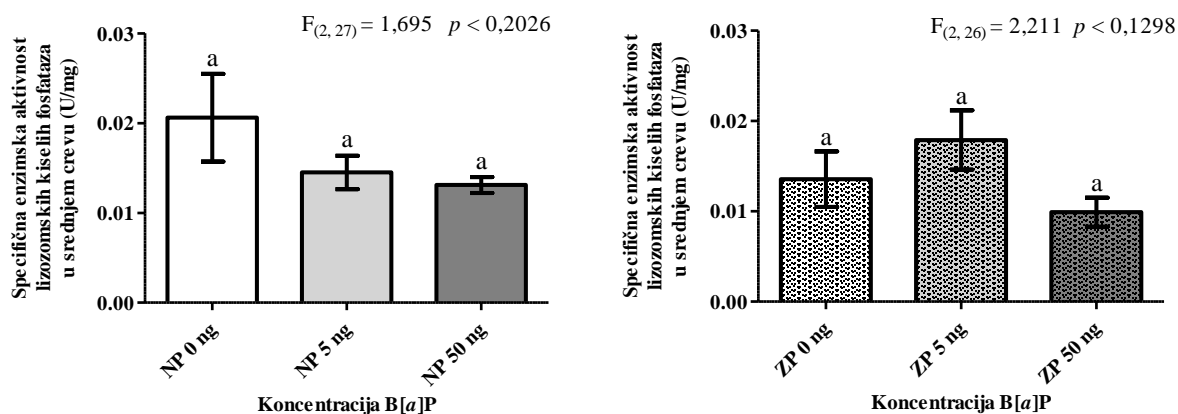
Rezultati



Slika 27. A. Zimogramski prikaz ukupnih kiselih fosfataza nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **B.** Densitometrijska analiza relativne enzimske aktivnosti izoformi ukupnih kiselih fosfataza. I1, I2, I3, I4 i I5 označavaju enzimske izoforme.

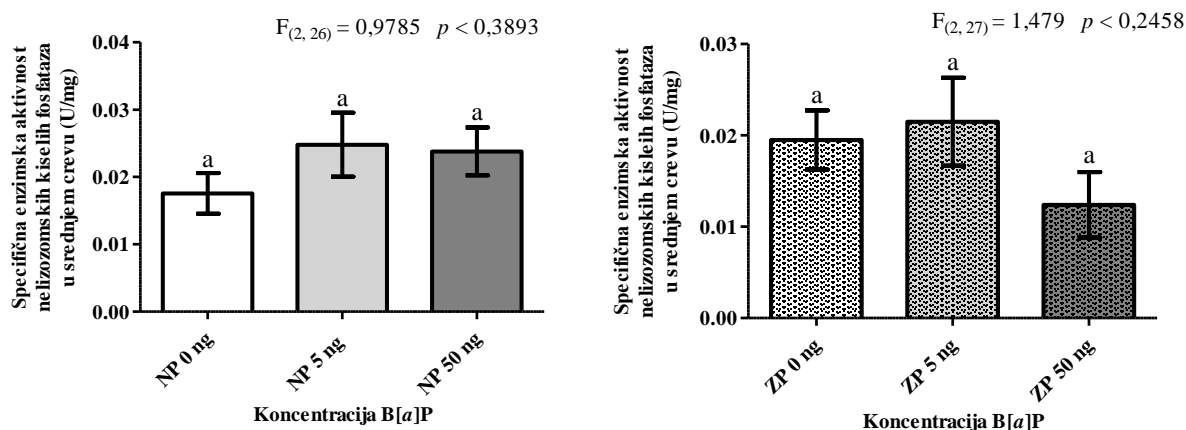
4.4.5. Specifična enzimska aktivnost lizozomskih i nelizozomskih kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi

Pokazalo se da nema statistički značajnih promena u aktivnosti lizozomske frakcije kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi *L. dispar* nakon hroničnog tretmana benzo[*a*]pirenom u dijeti, kako u populaciji iz nezagađene tako i zagađene šume. Kod populacije larvi poreklom iz nezagađene šume zapažen je trend redukcije enzimske aktivnosti pod uticajem B[*a*]P u odnosu na kontrolu, dok kod larvi poreklom iz zagađene šume, koncentracija od 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane stimuliše aktivnost lizozomskih kiselih fosfataza (**Slika 28**).



Slika 28. Uticaj benzo[a]pirena na specifičnu aktivnost lizozomskih kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[a]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

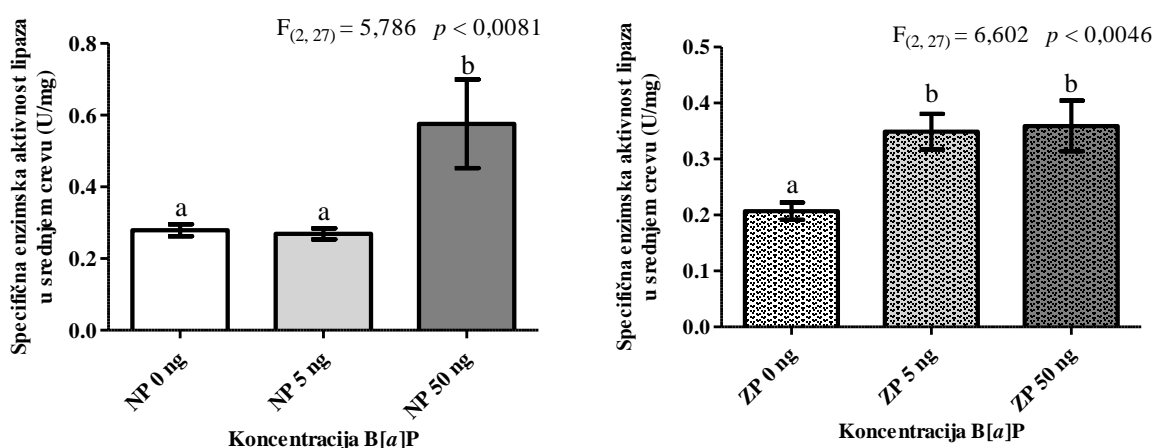
Prisustvo polutanta indukuje delimično povećanje aktivnosti nelizozomskih kiselih fosfataza u populaciji larvi poreklom iz nezagađene šume u odnosu na kontrolu, dok kod larvi poreklom iz zagađene šume, koncentracija od 50 ng B[a]P/g suve mase hrane redukuje aktivnost ovih enzima. U obe populacije larvi *L. dispar* nisu registrovane statistički značajne promene aktivnosti nelizozomskih kiselih fosfataza usled hronične izloženosti benzo[a]pirenu (**Slika 29**).



Slika 29. Uticaj benzo[a]pirena na specifičnu aktivnost nelizozomskih kiselih fosfataza u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[a]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.4.6. Specifična enzimaska aktivnost i zimogramaska detekcija lipaza u srednjem crevu larvi

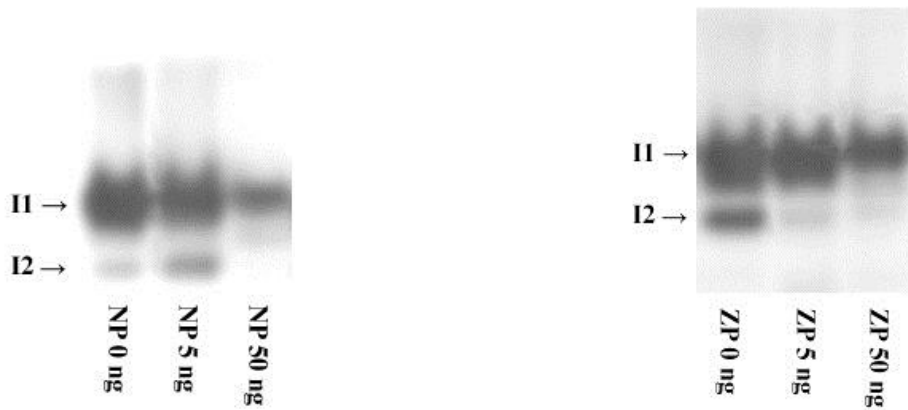
Kod larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume primećeno je stimulatívno dejstvo benzo[a]pirena u hrani na specifičnu aktivnost lipaza. Koncentracija od 50 ng B[a]P/g suve mase hrane dovela je do značajnog povećanja lipazne aktivnosti u populaciji larvi poreklom iz nezagađene šume, dok manja koncentracija ovog polutanta nije imala takav efekat, u odnosu na kontrolnu grupu. Aktivnost lipaza u crevu larvi *L. dispar* poreklom iz zagađene šume značajno je povećana nakon dejstva obe koncentracije benzo[a]pirena, u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe (Slika 30).



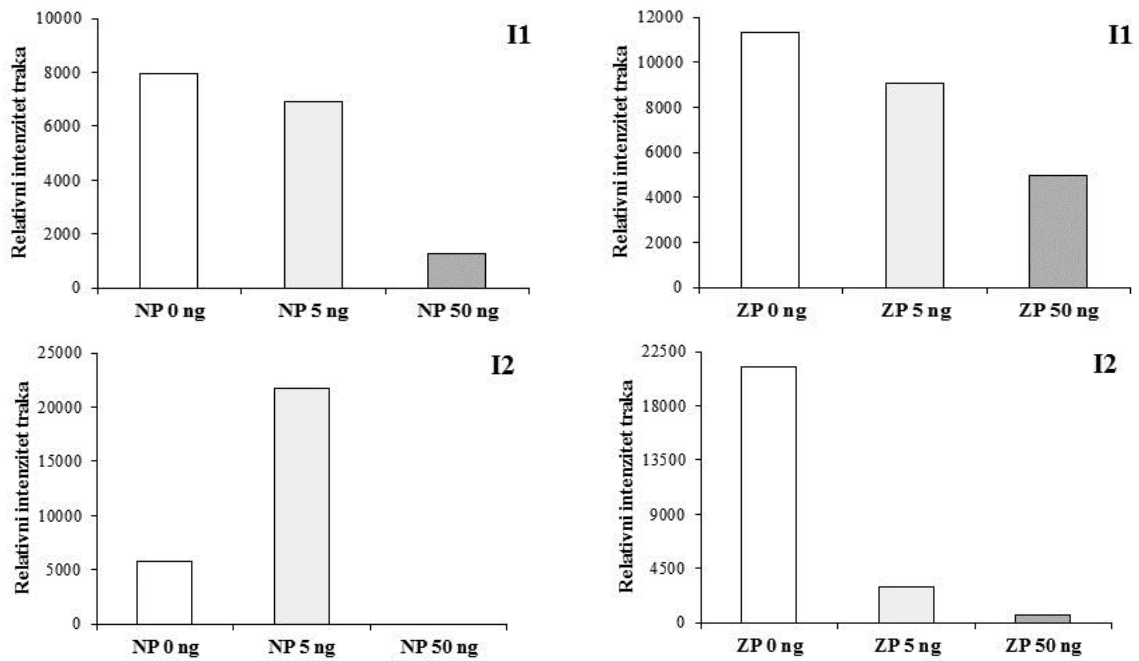
Slika 30. Uticaj benzo[a]pirena na specifičnu aktivnost lipaza u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[a]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{x} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Zimogramom su otkrivene dve izoforme (I1 i I2) sa lipaznom aktivnošću u srednjem crevu larvi *L. dispar* (Slika 31A). Kod obe populacije aktivnost izoforme I1 opada na dozno zavisian način usled dugotrajnog izlaganja beno[a]pirenu. Povećanje koncentracije polutanta značajno smanjuje aktivnost izoforme I2 u populacije larvi poreklom iz zagađene šume, dok kod larvi poreklom iz nezagađene šume, koncentracija od 5 ng B[a]P/g suve mase hrane dovodi do povećanja intenziteta izoforme I2, a veća koncentracija B[a]P potpuno inhibira ovaj izoenzim (Slika 31B).

A.



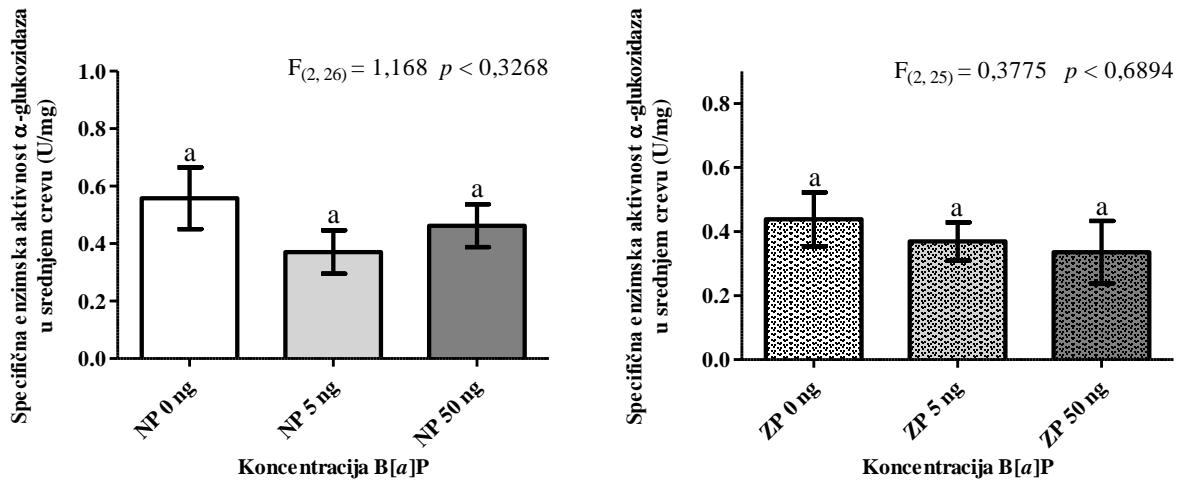
B.



Slika 31. A. Zimogramski prikaz lipaza nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. B. Denzitometrijska analiza relativne enzimske aktivnosti detektovanih izoformi lipaze. I1 i I2 označavaju enzimske izoforme.

4.4.7. Specifična enzimska aktivnost i zimogramska detekcija α -glukozidaze u srednjem crevu larvi

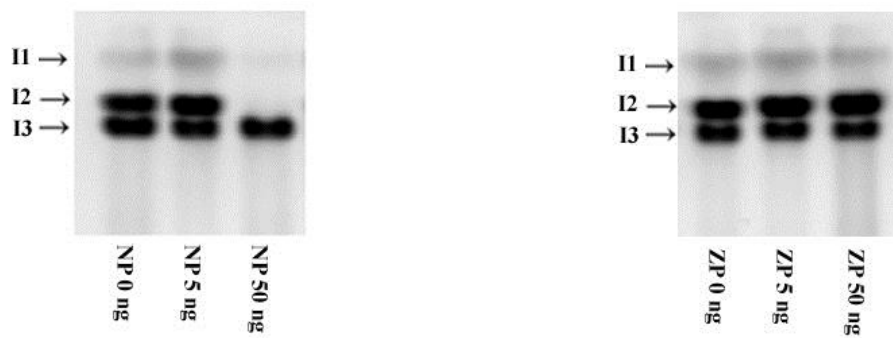
U ispitanim populacijama *L. dispar* - iz nezagađene i zagađene šume, nije pronađena statistički značajna promena specifične aktivnosti α -glukozidaze usled hronične izloženosti benzo[*a*]pirenu (Slika 32).



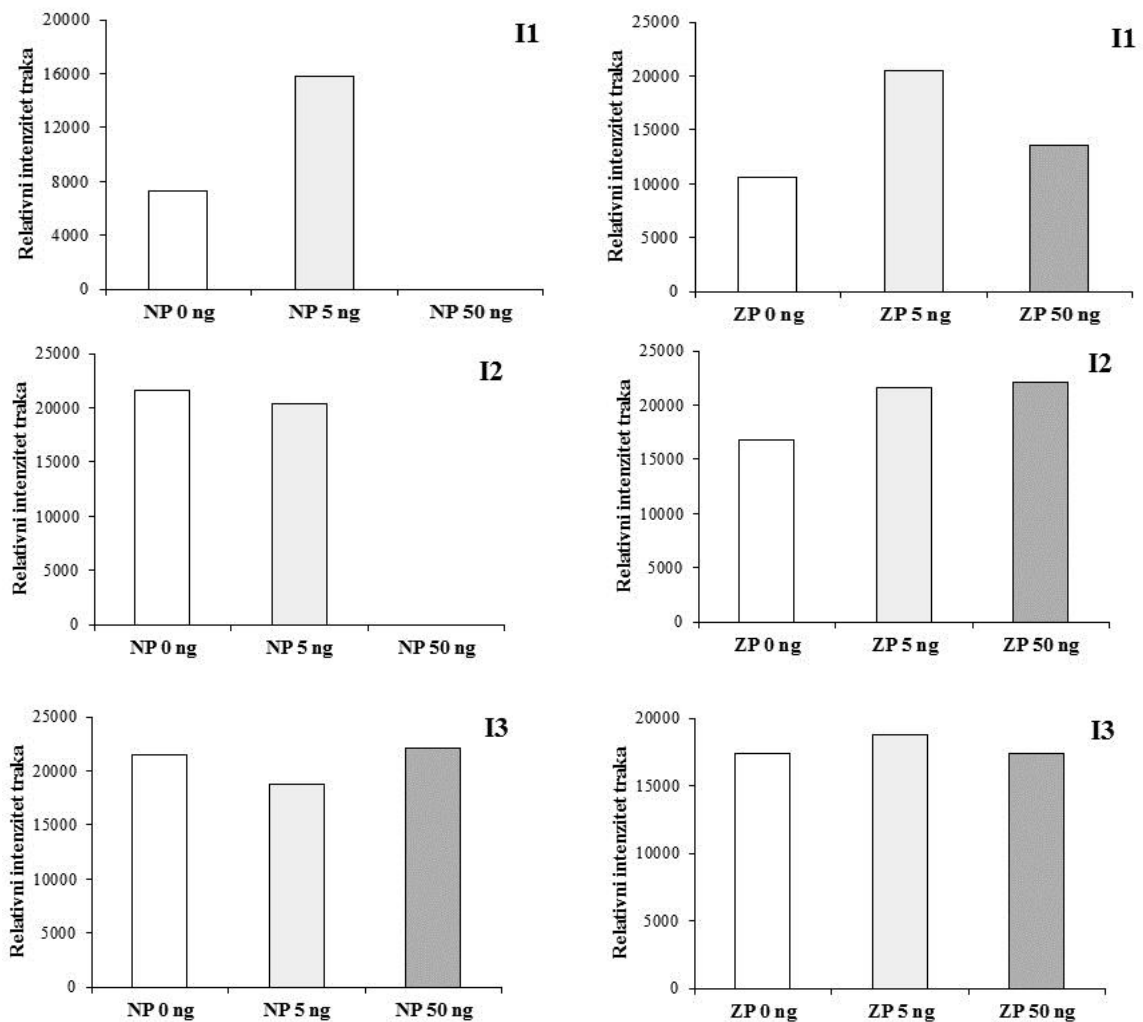
Slika 32. Uticaj benzo[*a*]pirena na specifičnu aktivnost α -glukozidaze u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Analizom srednjeg creva larvi *L. dispar* detektovane su tri izoforme α -glukozidaze (I1, I2 i I3), od kojih se po intenzitetu traka ističu izoforme I2 i I3. Izoforma I3 je prisutna u svim eksperimentalnim grupama (Slika 33A). Za larve poreklom iz obe populacije karakteristično je povećanje aktivnosti izoforme I1 kod larvi izloženih koncentraciji od 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane u odnosu na odgovarajuće kontrole. U grupi larvi poreklom iz nezagađene šume, hranjenoj sa 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane, izoforme I1 i I2 su potpuno inhibirane. Nisu zapažene veće varijacije u aktivnostima izoformi I2 i I3 kod populacije larvi poreklom iz zagađene šume (Slika 33B).

A.



B.

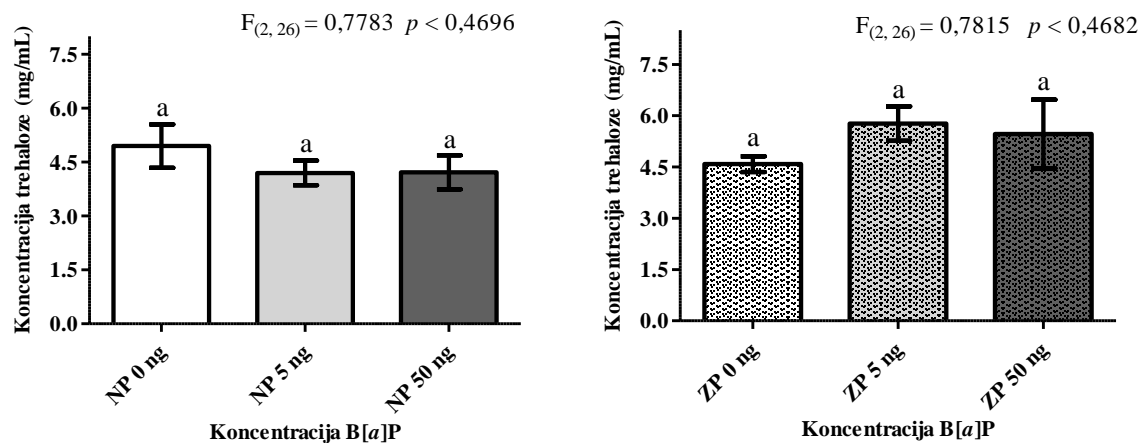


Slika 33. A. Zimogramski prikaz α -glukozidaze nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. B. Denzitometrijska analiza relativne enzimске aktivnosti izoforimi α -glukozidaze. I1, I2 i I3 označavaju enzimске izoforme.

4.5. Efekti različitih koncentracija benzo[*a*]pirena na sadržaj trehaloze i lipida u hemolimfi larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

4.5.1. Uticaj benzo[*a*]pirena na koncentraciju trehaloze u hemolimfi larvi

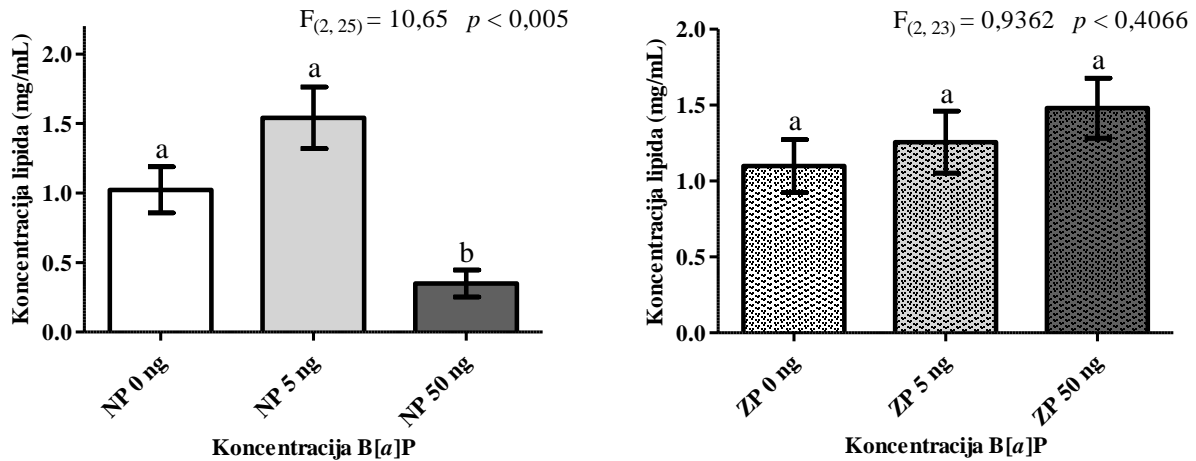
Dugotrajna izloženost larvi *L. dispar* benzo[*a*]pirenu dodatog u hranu nije imala statistički značajnog uticaja na koncentraciju trehaloze kod obe populacije larvi *L. dispar*. Primećen je različit trend u sadržaju trehaloze kod populacija larvi poreklom iz nezagađene i zagađene šume (Slika 34).



Slika 34. Efekat benzo[*a*]pirena na koncentraciju trehaloze u hemolimfi larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.5.2. Uticaj benzo[*a*]pirena na koncentraciju lipida u hemolimfi larvi

Kod larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume utvrđeno je značajno smanjenje koncentracije lipida u hemolimfi pod dejstvom benzo[*a*]pirena u koncentraciji od 50 ng/g suve mase hrane u odnosu na kontrolnu grupu. Kod larvi poreklom iz zagađene šume registrovan je trend povećanja lipidnog sadržaja sa povećanjem koncentracije polutanta u dijeti kojom su hranjene, u odnosu na kontrolu (**Slika 35**).



Slika 35. Efekat benzo[*a*]pirena na koncentraciju lipida u hemolimfi larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (nezagađena populacija - NP) i iz zagađene šume (zagađena populacija - ZP), gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.6. Komponente fitnesa nakon hronične izloženosti larvi *L. dispar* (poreklom iz nezagađene i zagađene šume) benzo[*a*]pirenu

4.6.1. Efekat benzo[*a*]pirena na preživljavanje larvi

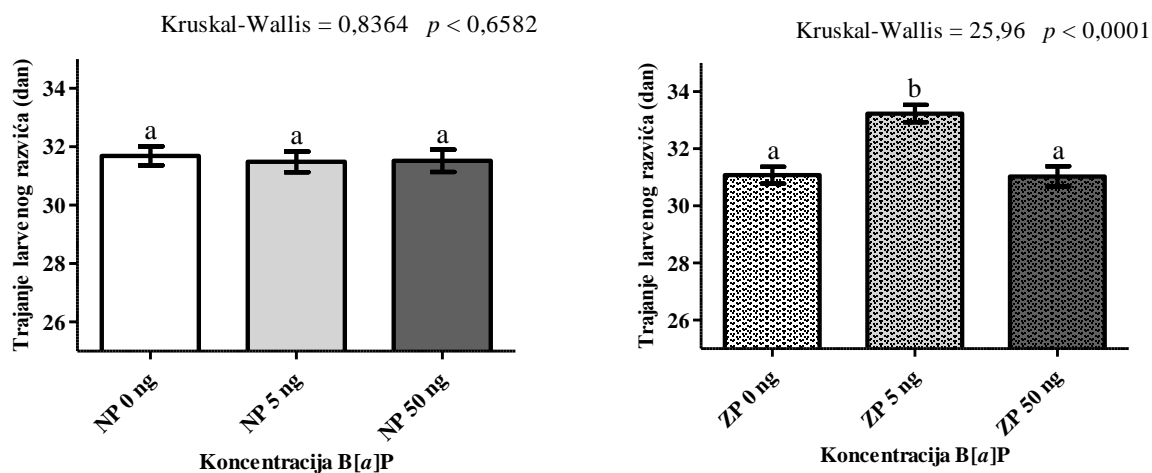
Najveći stepen preživljavanja larvi zabeležen je u kontrolnim grupama kod obe populacije. Hronični tretman nižom koncentracijom benzo[*a*]pirena (5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane) imao je veći uticaj na preživljavanje larvi poreklom iz populacije zagađene šume dok se broj preživelih larvi u populaciji poreklom iz nezagađene šume zanemarljivo promenio. Primena 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane smanjila je stopu preživljavanja larvi ispod 90% u populaciji *L. dispar* larvi poreklom iz nezagađene šume, što nije bio slučaj u zagađenoj populaciji gde je taj procenat malo iznad 90% (**Tabela 1**).

Tabela 1. Preživljavanje larvi (%) nakon hronične primene 0, 5 i 50 ng benzo[*a*]pirena po g suve mase hrane. NP – populacija *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume; ZP – populacija *L. dispar* poreklom iz zagađene šume.

Koncentracija B[<i>a</i>]P (ng)	Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene šume (NP)	Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz zagađene šume (ZP)
0 ng B[<i>a</i>]P	93,5	93,2
5 ng B[<i>a</i>]P	92,4	86,1
50 ng B[<i>a</i>]P	85,3	90,9

4.6.2. Trajanje larvenog razvića nakon tretmana benzo[*a*]pirenom

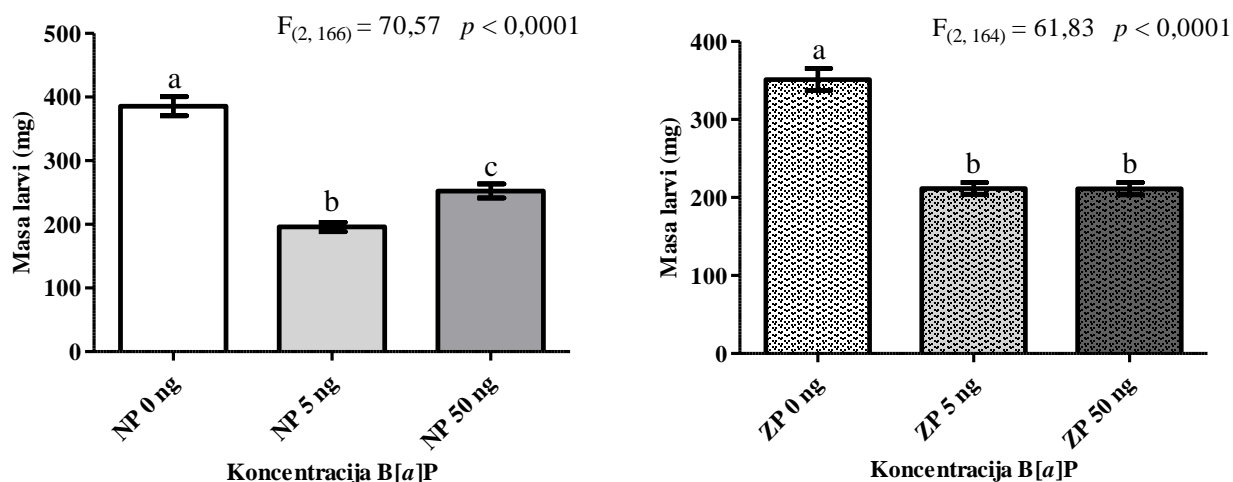
Hronično prisustvo benzo[*a*]pirena u hrani nije imalo efekta na razviće larvi poreklom iz nezagađene šume. Larve poreklom iz populacije zagađene šume posle ishrane sa 5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane značajno produžavaju ukupno razviće (Slika 36).



Slika 36. Efekti benzo[*a*]pirena na ukupno trajanje razvića larvi *L. dispar* od piljenja do žrtvovanja trećeg dana petog larvenog stupnja. Larve su gajene na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. NP – populacija *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume; ZP – populacija *L. dispar* poreklom iz zagađene šume. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

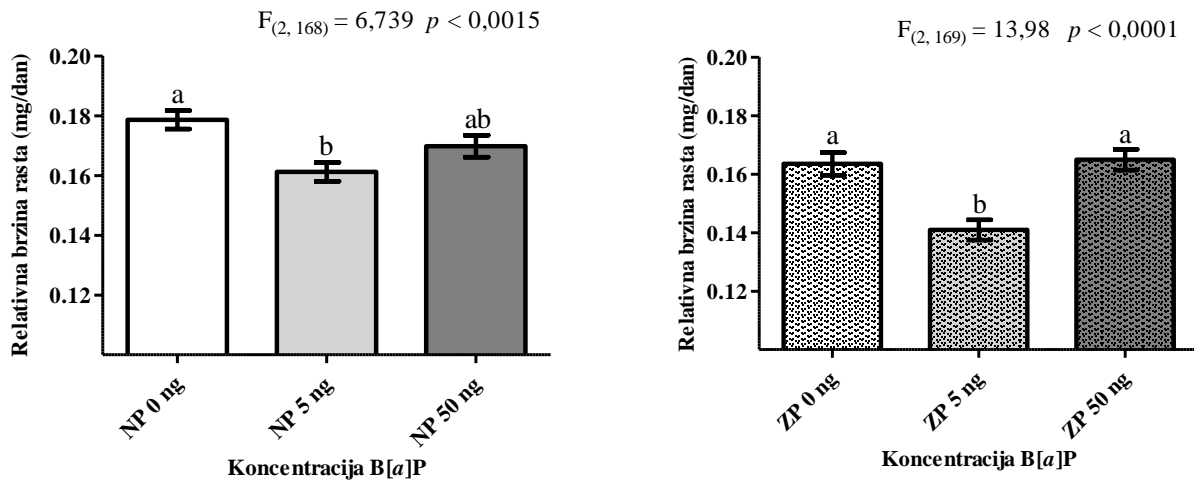
4.6.3. Uticaj benzo[*a*]pirena na masu i relativnu brzinu rasta larvi

Kod larvi poreklom iz obe populacije (nezagađene ili zagađene) imaju značajno manju masu jedinki izloženih benzo[*a*]pirenu. Hronični tretmani benzo[*a*]pirenom (obe koncentracije) uzrokovali su smanjenje mase larvi. Niža koncentracija polutanta (5 ng B[*a*]P/g suve mase hrane) imala je negativniji uticaj na mase larvi poreklom iz nezagađene šume u odnosu na tretman višom koncentracijom B[*a*]P (50 ng/g suve mase hrane). U populaciji larvi poreklom iz zagađene šume, oba tretmana ovim polutantom ostvarila su približno isti efekat. (Slika 37).



Slika 37. Mase larvi *L. dispar* trećeg dana petog larvenog stupnja nakon hroničnog tretmana benzo[*a*]pirenom. Larve su gajene na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. NP – populacija *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume; ZP – populacija *L. dispar* poreklom iz zagađene šume. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

Relativna brzina rasta značajno je smanjena u obe populacije larvi jedino pod uticajem B[a]P u koncentraciji od 5 ng/g suve mase hrane u odnosu na kontrolu (**Slika 38**).



Slika 38. Relativna brzina rasta larvi *L. dispar* nakon hroničnog tretmana benzo[a]pirenom. Larve su gajene na veštačkoj dijeti sa dodatkom 0, 5 i 50 ng B[a]P po g suve mase hrane. NP – populacija *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume; ZP – populacija *L. dispar* poreklom iz zagađene šume.

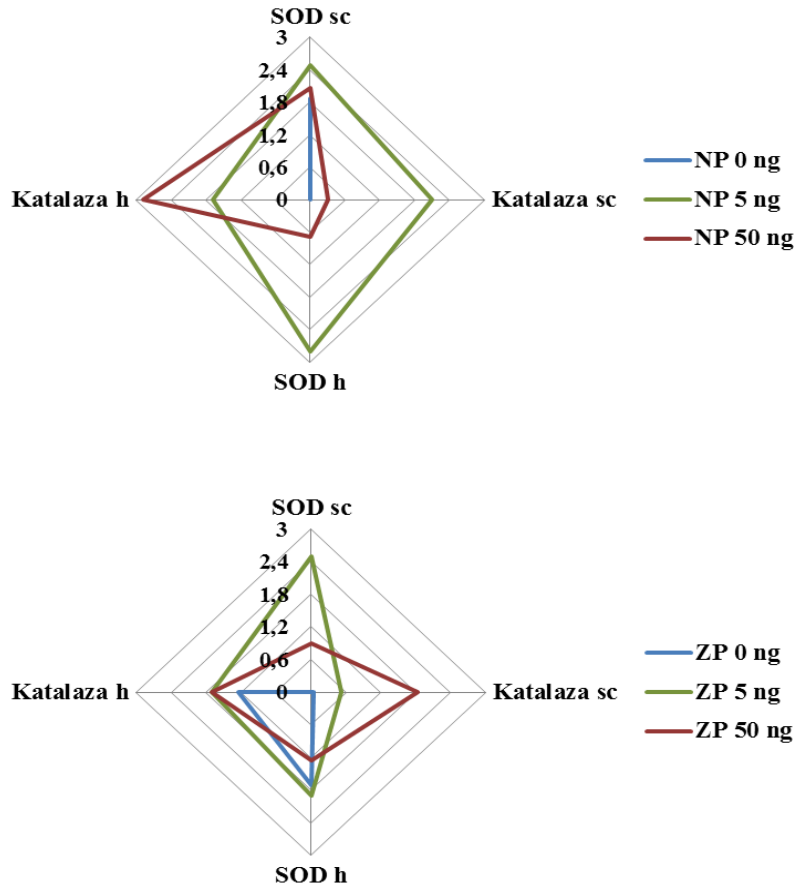
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$). Vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno ($p < 0,05$).

4.7. Integrirani odgovor biomarkera (IBR) nakon hronične izloženosti larvi *L. dispar* (poreklom iz nezagađene i zagađene šume) benzo[a]pirenu

4.7.1. Integrirani odgovor biomarkera za antioksidativne enzime

Antioksidativni enzimi ispitivanih sistema osetljivi su na manju koncentraciju benzo[a]pirena (5 ng/g suve mase hrane), u populaciji larvi *L. dispar* iz nezagađene šume, pri čemu najveće skorove na IBR grafiku pokazuju superoksid dismutaza iz hemolimfe (SOD h) i katalaza iz srednjeg creva larvi (katalaza sc) u odnosu na kontrolnu grupu. Veća koncentracija B[a]P (50 ng/g suve mase hrane) najveći efekat je imala na enzimsku aktivnost katalaze iz hemolimfe larvi *L. dispar* (katalaza h). U populaciji larvi poreklom iz zagađene šume, IBR je pokazao dozno-nezavisni efekat B[a]P na antioksidativne enzime. Najviši skorovi na radijalnom grafiku zabeleženi su za superoksid dismutazu iz srednjeg creva larvi posle dejstva niže koncentracije B[a]P (5 ng/g suve mase hrane), i za katalazu iz hemolimfe larvi pod uticajem više koncentracije B[a]P (50 ng/g suve mase hrane) (**Slika 39**). Najviši IBR indeks za antioksidativne enzime nađen je u nezagađenoj populaciji larvi nakon tretmana sa B[a]P koncentracije od 5 ng/g suve mase hrane (10,23), a najmanja vrednost IBR indeksa izračunata je za kontrolnu grupu iste populacije larvi (0) (**Tabela 2**).

Rezultati



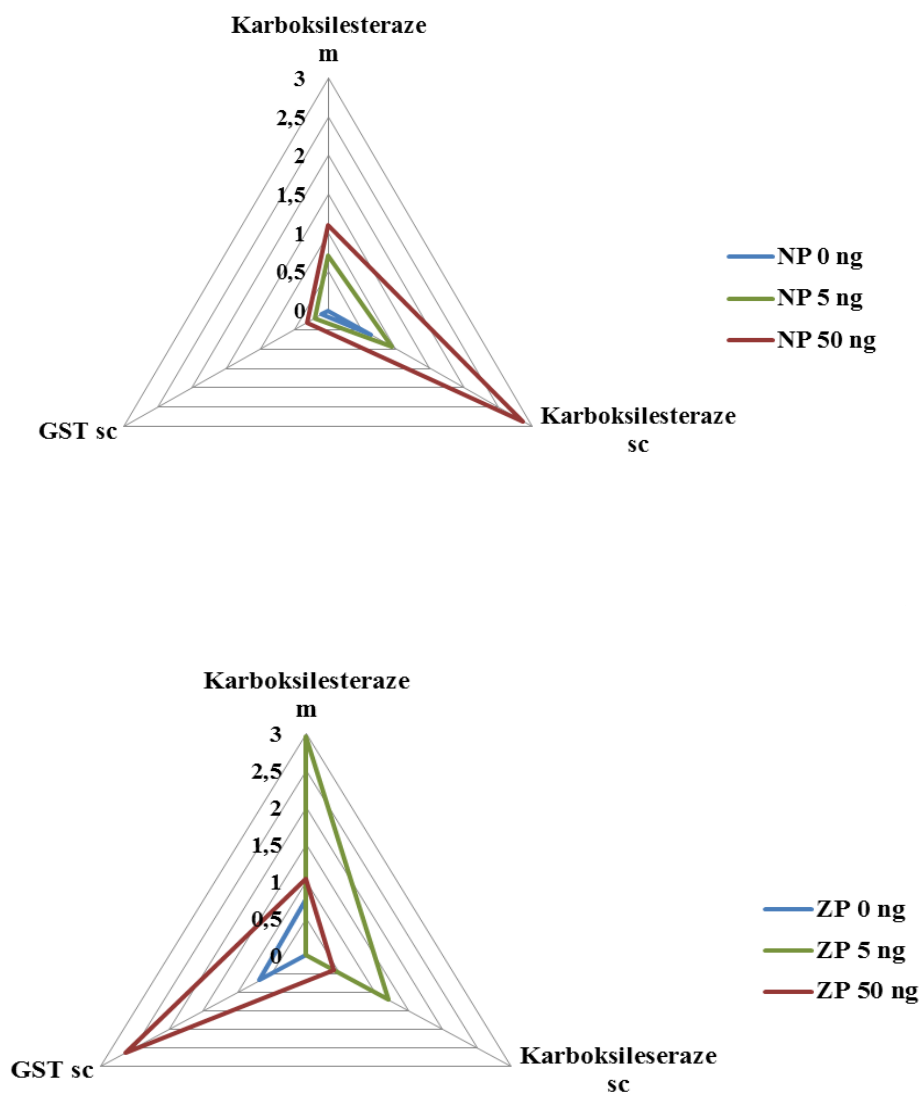
Slika 39. Integrisani odgovor biomarkera za antioksidativne enzime, nakon hronične izloženosti larvi *L. dispar* benzo[*a*]pirenu u koncentracijama od 0, 5 i 50 ng po g suve mase hrane. NP – populacija *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume; ZP – populacija *L. dispar* poreklom iz zagađene šume; SOD sc - specifična enzimaska aktivnost superoksid dismutaze u srednjem crevu larvi *L. dispar*; SOD h - enzimaska aktivnost superoksid dismutaze u hemolimfi larvi *L. dispar*; katalaza sc - specifična enzimaska aktivnost katalaze u srednjem crevu larvi *L. dispar*; katalaza h - enzimaska aktivnost u hemolimfi larvi *L. dispar*.

Tabela 2. Vrednosti IBR indeksa za antioksidativne enzime nakon hronične izloženosti larvi *L. dispar* benzo[*a*]pirenu.

	Koncentracija B[<i>a</i>]P (ng/g suve mase hrane)	IBR indeks
Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene šume (NP)	0	0
	5	9,96
	50	4,37
Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz zagađene šume (ZP)	0	1,10
	5	4,96
	50	3,79

4.7.2. Integrisani odgovor biomarkera za enzime uključene u detoksifikaciju

IBR je pokazao da hronični tretman benzo[*a*]pirenom ostvaruje dozno zavisni efekat na enzime faze I. i II. detoksifikacije larvi *L. dispar*, poreklom iz obe populacije, pri čemu je efekat naročito izražen kod larvi poreklom iz nezagađene šume. Na radijalnom grafiku najveći skor uočava se za karboksilesteraze iz srednjeg creva larvi (karboksilesteraze sc) populacije iz nezagađene šume. Kod populacije larvi iz zagađene šume najveći uticaj polutanta ostvaren je na karboksilesteraze iz mozga larvi (karboksilesteraze m) i to posle tretmana manjom koncentracijom B[*a*]P (5 ng/g suve mase hrane), kao i na glutation S-transferazu iz srednjeg creva larvi (GST sc) posle delovanja veće koncentracije B[*a*]P (50 ng/g suve mase hrane) (**Slika 40**). IBR indeks ima najvišu vrednost kod larvi poreklom iz nezagađene šume, u grupi tretiranoj sa 50 ng B[*a*]P po g suve mase hrane. Najniža vrednost IBR indeksa nađena je u istoj populaciji u kontrolnoj grupi (**Tabela 3**).



Slika 40. Integrirani odgovor biomarkera za enzime uključene u detoksifikaciju, nakon hronične izloženosti larvi *L. dispar* benzo[*a*]pirenu u koncentracijama od 0, 5 i 50 ng po g suve mase hrane. NP – populacija *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume; ZP – populacija *L. dispar* poreklom iz zagađene šume; karboksilesteraze m - specifična enzimaska aktivnost karboksilesteraza u mozgu larvi *L. dispar*; karboksilesteraze sc - specifična enzimaska aktivnost karboksilesteraza u srednjem crevu larvi *L. dispar*; GST sc - specifična enzimaska aktivnost glutation S-transferaze u srednjem crevu larvi *L. dispar*.

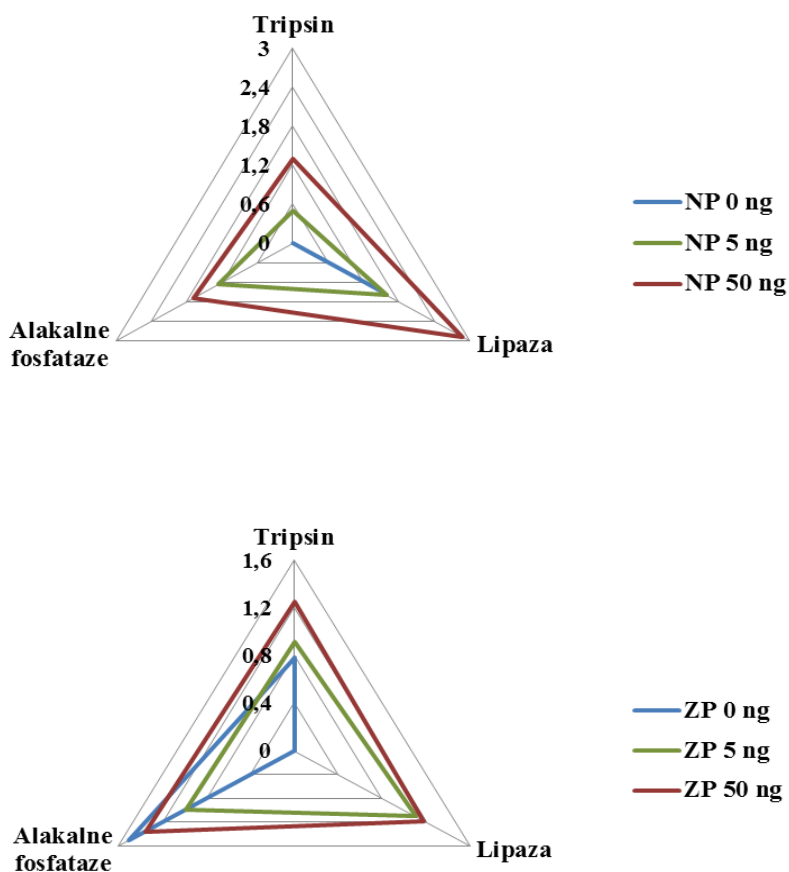
Tabela 3. Vrednosti IBR indeksa za enzime uključene u detoksifikaciju nakon hronične izloženosti larvi *L. dispar* benzo[*a*]pirenu.

	Koncentracija B[<i>a</i>]P (ng/g suve mase hrane)	IBR indeks
Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene šume (NP)	0	0,02
	5	0,34
	50	1,55
Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz zagađene šume (ZP)	0	0,17
	5	1,32
	50	1,54

4.7.3. Integrirani odgovor biomarkera za digestivne enzime

Prema IBR najveći efekat na digestivne enzime larvi *L. dispar*, poreklom iz obe populacije, imala je veća koncentracija B[*a*]P (50 ng/g suve mase hrane). Dozno-zavisni efekat benzo[*a*]pirena na ove enzime posebno je izražen kod larvi poreklom iz nezagađene šume. Tripsin, lipaza i alkalne fosfataze srednjeg creva larvi pokazuju visoke skorove na radijalnom grafiku kod populacije larvi poreklom iz nezagađene šume, nakon dejstva veće koncentracije B[*a*]P. Kod populacije *L. dispar* poreklom iz zagađene šume najveći skorovi zabeleženi su za lipazu nakon tretmana sa 50 ng B[*a*]P/g suve mase hrane (**Slika 41**). U populaciji larvi iz nezagađene šume izračunata je najveća vrednost IBR indeksa (4,98), i to u grupi izloženoj većoj koncentraciji polutanta (50 ng/g suve mase hrane). Takođe, u istoj populaciji larvi nađena je i najmanja vrednost IBR indeksa (0), u kontrolnoj grupi larvi (**Tabela 4**).

Rezultati



Slika 41. Integrisani odgovor biomarkera za digestivne enzime, nakon hronične izloženosti larvi *L. dispar* benzo[*a*]pirenu u koncentracijama od 0, 5 i 50 ng po g suve mase hrane. NP – populacija *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume; ZP – populacija *L. dispar* poreklom iz zagađene šume.

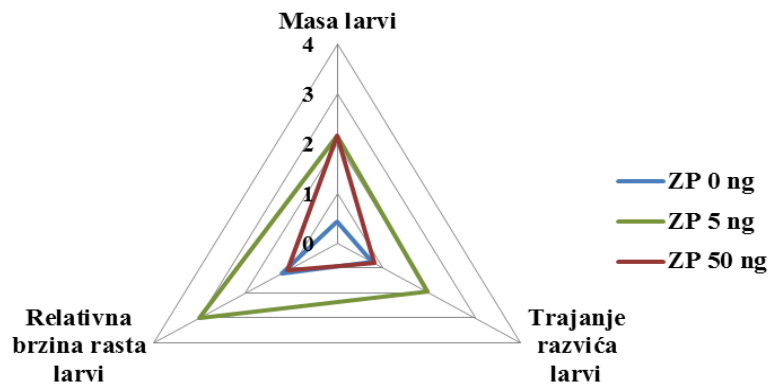
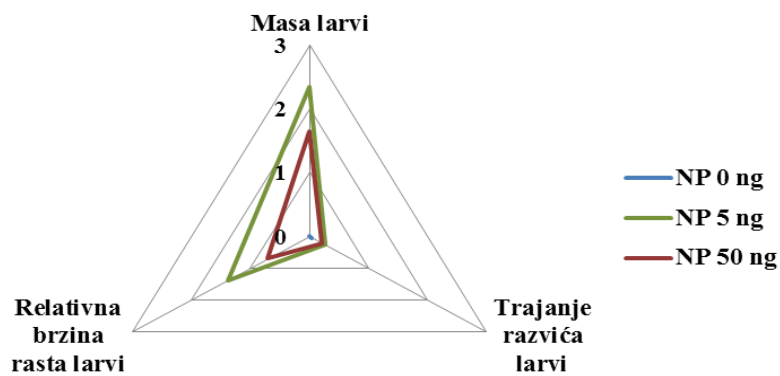
Tabela 4. Vrednosti IBR indeksa za digestivne enzime nakon hronične izloženosti larvi *L. dispar* benzo[*a*]pirenu.

	Koncentracija B[<i>a</i>]P (ng/g suve mase hrane)	IBR indeks
Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene šume (NP)	0	0
	5	1,94
	50	5,53
Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz zagađene šume (ZP)	0	0,65
	5	1,65
	50	2,81

4.7.4. Integrisani odgovor biomarkera za osobine fitnesa

Osobine fitnesa larvi *L. dispar* pokazuju dozno-nezavisan obrazac na radijalnom grafiku integrisanog odgovora biomarkera (IBR) kao i vrednostima IBR indeksa, kod obe populacije larvi (**Slika 42**). Efekat polutanta uočava se najviše na masi i relativnoj brzini razvića larvi, poreklom iz nezagađene šume. U populaciji larvi poreklom iz zagađene šume, dejstvo benzo[*a*]pirena uočava se kod svih parametara fitnesa u odnosu na kontrolnu grupu. Najviša vrednost IBR indeksa zabeležena je u populaciji larvi iz zagađene šume pri dejstvu B[*a*]P u koncentraciji 5 ng/g suve mase hrane (5,69), dok je najniža vrednost indeksa nađena u kontrolnog grupi larvi poreklom iz nezagađene šume (0) (**Tabela 5**).

Rezultati



Slika 42. Integrisani odgovor biomarkera za parametre fitnesa nakon dugotrajne izloženosti larvi *L. dispar* benzo[*a*]pirenu u koncentracijama od 0, 5 i 50 ng po g suve mase hrane. NP – populacija *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume; ZP – populacija *L. dispar* poreklom iz zagađene šume; RGR - relativna brzina rasta.

Tabela 5. Vrednosti IBR indeksa za parametre fitnesa nakon dugotrajne izloženosti larvi *L. dispar* benzo[*a*]pirenu.

	Koncentracija B[<i>a</i>]P (ng/g suve mase hrane)	IBR indeks
Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz nezagađene šume (NP)	0	0
	5	1,47
	50	0,66
Populacija <i>L. dispar</i> poreklom iz zagađene šume (ZP)	0	0,57
	5	5,69
	50	1,75

5. DISKUSIJA

5.1. Efekti benzo[a]pirena na antioksidativne enzime larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

5.1.1. Specifične aktivnosti antioksidativnih enzima u srednjem crevu i hemolimfi larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Tokom 20. i 21. veka, antropogenom aktivnošću ostvarena su izvanredna tehnološka dostignuća koja su pored brojnih benefita donela i niz nepoželjnih, pratećih elemenata, posebno u obliku toksičnih sporednih proizvoda, kao što su PAH, a posebno benzo[a]piren. Ovaj polutant opterećuje različite ekosisteme gde se u značajnom procentu deponuje na vegetaciji. *L. dispar* (Lepidoptera) je široko rasprostranjena insekatska vrsta koju odlikuje visoka adaptibilnost na različite izvore hrane i veliki apetit larvi, i tako mogu akumulirati značajne količine benzo[a]pirena (Liebhold i sar., 1995; Edwards, 1983). Benzo[a]piren na više načina ostvaruje negativne efekte na insekte i oksidativni stres predstavlja jedan od glavnih mehanizama njegove toksičnosti. Metaboličkom transformacijom odnosno aktivacijom B[a]P posredstvom sistema citrohrom P450 monooksigenaza, nastaju raznovrsni reaktivni intermedijeri kao i reaktivne vrste kiseonika, čime se remeti redoks ravnoteža i ozbiljno narušavaju ćelijske strukture i funkcije, što za posledicu ima aktiviranje antioksidativnih odbrambenih mehanizama (Miler i Ramos, 2001). Tokom akutnog i hroničnog izlaganja *Eisenia fetida andrei* (Haplotaxida) rastućim koncentracijama benzo[a]pirena, karakterističnim za ruralne, urbane i industrijske lokalitete, konstantovana je proizvodnja toksičnih metabolita B[a]P, kao i porast koncentracije lipidnih peroksida i oksidovanog oblika glutaciona, dok je aktivnost katalaze ostala nepromenjena (Saint-Denis i sar., 1999). Jedinke *Perna viridis* (Mytilida) nakon 18 dana provedenih u bazenima sa različitim koncentracijama B[a]P, nisu pokazale nikakve promene u katalaznoj aktivnosti (Cheung i sar., 2004).

Uočeno je da dugotrajna ishrana larvi *L. dispar* (Lepidoptera) sa benzo[a]pirenom kao i nimfi *Blaptica dubia* (Blattodea) sa fluorantenom, dovodi do veće aktivnosti antioksidativnih enzima odnosno do povećanja specifične aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze u srednjem crevu larvi obe vrste (Ilijin i sar., 2015; Mrdaković i sar., 2019). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je kod larvi iz nezagađene šume, od ispitivanih antioksidativnih enzima u srednjem crevu, najosetljivija katalaza (**Slike 5 i 6**), čija je aktivnost smanjena i to nakon tretmana nižom koncentracijom B[a]P (5 ng/g suve mase hrane). Superoksid dismutaza i glutation reduktaza iz srednjeg creva larvi ove populacije ne pokazuju statistički značajne promene enzimske aktivnosti, mada je uočeno diskretno povećanje aktivnosti GR sa povećanjem koncentracije benzo[a]pirena u hrani (**Slike 3, 4 i 7**). Izvesno je da se u srednjem crevu larvi, iz nezagađene šume, aktiviraju drugi činioci antioksidativnog sistema i dodatni odbrambeni mehanizmi. Visoka aktivnost SOD u kontrolnoj grupi larvi i njen trend rasta u srednjem crevu posle tretmana ukazuje na pojačano generisanje vodonik peroksida. Askorbat peroksidaza i izoforme GST sa peroksidaznom aktivnošću mogu ukloniti višak peroksida umesto katalaze (Blagojević i Grubor-Lajšić., 2000; Mathews i sar., 1997), kao i antioksidanti male molekulske mase odnosno ne-enzimski činioci zaštite – glutation, askorbinska kiselina i drugi (Barbehenn i sar., 2001). Blag porast GR pod dejstvom benzo[a]pirena ukazuje na povećanu oksidaciju glutaciona, verovatno usled povećane potrebe za regulisanjem redoks ravnoteže u ćelijama.

Rezultati Vicentini i sar. (2017) pokazuju slabu aktivaciju superoksid dismutaze i inhibiciju katalazne aktivnosti kod *Chironomus sancticaroli* (Diptera) posle akutnog tretmana različitim koncentracijama B[a]P. Inhibicija katalazne aktivnosti nađena je i nakon ishrane *Trichoplusia ni* (Lepidoptera) dijetom u koju su dodati biljni alkaloidi kvercetin i ksantotoksin (Ahmad i Pardini, 1988). Kada se ima u vidu da katalaze Lepidoptera odlikuje visoka Km vrednost (Ahmad, 1995) može se pretpostaviti i da je niska koncentracija vodonik peroksida (zbog slabe indukcije i/ili

moguće inhibicije SOD usled dugotrajnog prisustva polutanta) uzrok smanjene katalazne aktivnosti u srednjem crevu larvi iz nezagađene šume.

Treba istaći da su aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze značajno povećane u hemolimfi larvi iz nezagađene populacije (**Slike 8 i 10**). Kako je srednje crevo centralno mesto metaboličkih odnosno detoksifikacionih procesa, i prva zaštitna barijera od aktiviranih metabolita benzo[*a*]pirena i pratećih reaktivnih radikala, verovatno je da larve iz nezagađene šume ipak u izvesnoj meri angažuju odbrambeni tandem - superoksid dismutazu i katalazu u srednjem crevu.

Interesantno je da je nasuprot antioksidativnom statusu u srednjem crevu larvi iz nezagađene šume, otkrivena značajna indukcija aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze u srednjem crevu larvi poreklom iz zagađene šume (**Slike 3 i 5**). Slične razlike u superoksid dismutaznoj i katalaznoj aktivnosti, zabeležene su kod vodenih beskičmenjaka u kontaktu sa benzo[*a*]pirenom, a koji su bili poreklom sa lokaliteta različitog stepena kontaminacije (Niyogi i sar., 2001; Sole i sar., 1995a, 1995b; Porte i sar., 1991). Multigeneracijsko izlaganje *L. dispar* hemijskim stresorima antropogenog porekla verovatno je delovalo u pravcu formiranja specifičnih adaptacija koje se mahom ogledaju u aktiviranju biohemisjskih mehanizama uključenih u protektivne strategije. Kod larvi *L. dispar* iz zagađene šume, procesi biotransformacije B[*a*]P i produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta rezultiraju inducibilnošću SOD i katalaze. Karakteristično je što jedino niža doza B[*a*]P (5 ng/g suve mase hrane) provocira povećanje superoksid dismutazne aktivnosti, dok isti efekat na katalazu ostvaruje samo tretman višom dozom B[*a*]P (50 ng/g suve mase hrane). Pojava da SOD pokazuje izrazito veću aktivnost pri nižim u odnosu na više koncentracije PAH, a da posle tretmana nekim od viših vrednosti toksina aktivacija potpuno izostaje, zabeležena je u ranijim istraživanjima efekata B[*a*]P i fluorantena na larve *L. dispar* (Ilijin i sar., 2015; Mrdaković i sar., 2015). Filipović i sar. (2019) pronašli su da dugotrajna ishrana larvi *L. dispar* dijetom sa nižom koncentracijom fluorantena značajno povećava specifičnu aktivnost superoksid dismutaze, dok viša koncentracija ovog PAH snažno indukuje katalaznu aktivnost. Moguće je da u ovom eksperimentu, viša doza benzo[*a*]pirena u dijeti, tokom vremena dodatno stimuliše plastičnost odgovora, u vidu ekspresije drugih izoformi SOD (Mrdaković i sar., 2015), ali sa druge strane, moguće je i da dovodi do remećenja kompezatornih mehanizama, i inhibicije enzimske aktivnosti. Obzirom na povećanje katalazne aktivnosti tek na višoj koncentraciji B[*a*]P (50 ng/g suve mase hrane), karakteristično visoku konstitutivnu aktivnost, zajedno sa visokom K_m vrednošću katalaze kod Lepidoptera (Ahmad i Pardini, 1990a), izvesna je aktivacija alternativnih načina regulacije povećane proizvodnje peroksida. Aktivnost GR ne pokazuje osetljivost na delovanje B[*a*]P što sugerise nizak nivo potrebe za redukcijom glutationa (**Slika 7**).

Odgovor antioksidativnih enzima, superoksid dismutaze i katalaze na hronični tretman benzo[*a*]pirenom, potpuno je drugačiji u hemolimfi larvi u odnosu na srednje crevo. Populacija poreklom iz nezagađene šume pokazala je visoku osetljivost i povećanje aktivnosti ovih enzima za razliku od larvi iz zagađene šume, kod kojih su superoksid dismutaza i katalaza neinducibilni u hemolimfi (**Slike 8 i 10**). Benzo[*a*]piren prvi kontakt i efekte ostvaruje u crevu insekata dovodeći neminovno do stvaranja toksičnih radikala, oksidativnog stresa, oštećenja bioloških makromolekula i proteotoksičnosti (Miller i Ramos, 2001) što finalno može dovesti do poremećaja funkcije crevnog epitela, njegove povećane propustljivosti i "curenja", toksičnih agenasa u hemolimfu. Slaba i neadekvatna ekspresija enzima antioksidativne zaštite u srednjem crevu larvi iz nezagađene šume, verovatno nedovoljna da reguliše povećanu proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika, moguć je uzrok indukcije aktivnosti SOD i katalaze specifično u hemolimfi (Krishnan i Kodrik, 2006; Ahmad, 1992). Pored određene apsorpcije benzo[*a*]pirena iz lumena creva u hemolimfu, srednje crevo insekata predstavlja jedno od tkiva koje je najizloženije delovanju molekula B[*a*]P (Bouchard i Bouchard-Madrelle, 2000; He i sar., 1998). Bihari i sar. (1990) našli su da direktno injektovanje B[*a*]P u hemolimfu *Mytilus galloprovincialis* (Mytilida) dovodi do prekida lanaca DNK molekula u hemocitama, a za jedan od glavnih uzroka smatra se B[*a*]P-indukovani nastanak reaktivnih vrsta

kiseonika, usled njegove biotransformacije. Pokazano je i da hronična ishrana larvi *L. dispar* sa fluorantenom, dovodi do doznog zavisnog povećanja aktivnosti katalaze u hemolimfi (Filipović i sar., 2019).

Osim direktne indukcije antioksidativne odbrane u hemolimfi, iz rezultata ovog eksperimenta proističe da benzo[*a*]piren preko aktiviranja imunog sistema larvi posredno uzrokuje proizvodnju veće količine radikala i povećanje aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze. Nađeno je da benzo[*a*]piren poseduje svojstva imunotoksičnih agenasa i da hroničnim delovanjem dovodi do smanjenja broja i vijabilnosti hemocita, kao i do aktiviranja njihovog imunog odgovora, koji pored fagocitoze i inkapsulacije podrazumeva i stvaranje superoksid anjon radikala (Guo i sar., 2011; Hannam i sar., 2010; Pan i sar., 2006).

Izostanak promene aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze u hemolimfi larvi iz zagađene šume sugerise efikasnu i visoku ekspresiju činioca antioksidativne zaštite na nivou srednjeg creva, što je i detektovano. Može se zaključiti da se primarni odgovor na prisustvo benzo[*a*]pirena ogleda u indukciji enzimskog tandema superoksid dismutaze i katalaze srednjeg creva, kod populacija *L. dispar* koje su generacijama adaptirane na prisustvo stresora. Zabeleženi odgovori ispitanih enzima antioksidativne odbrane ukazuju na značaj tkivne specifičnosti i porekla populacija larvi *L. dispar*. Osim toga, IBR analiza ističe snažniji odgovor superoksid dismutaze i katalaze na nižu koncentraciju B[*a*]P kod obe populacije, u odnosu na višu koncentraciju ovog polutanta.

5.2. Efekti benzo[*a*]pirena na enzime koji učestvuju u detoksifikacionim procesima larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

5.2.1. Specifična aktivnost i izoforme karboksilesteraza u srednjem crevu i mozgu larvi poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Metabolizam benzo[*a*]pirena kod insekata direktno je povezan sa enzimima sistema za detoksifikaciju: citohrom P450 monooksigenazama, reduktazama, karboksilesterazama, acetilholinesterazama, glutation S-transferazama i drugima. Karboksilesteraze podrazumevaju veoma heterogenu grupu enzima, sposobnih za hidrolizu širokog spektra jedinjenja što uključuje i aktivnu ulogu u degradaciji i eliminaciji mnogih ksenobiotika (Panini i sar., 2016). Primena više koncentracije B[*a*]P (50 ng/g suve mase hrane) uzrokovala je povećanje aktivnosti karboksilesteraza u srednjem crevu larvi iz nezagađene šume (**Slika 11**). Hronično prisustvo benzo[*a*]pirena nije imalo efekta na isti enzim u populaciji iz zagađene šume (**Slika 11**). Literaturni podaci o efektima benzo[*a*]pirena na karboksilesteraze veoma su skromni i nedosledni. Kod larvi *C. sancticaroli* (Diptera) koje su bile bez prethodnog kontakta sa polutantima, kratko izlaganje benzo[*a*]pirenu dovelo je do porasta aktivnosti karboksilesteraza (Vicentini i sar., 2017). Sličan tretman laboratorijskog soja *Aedes aegypti* (Diptera) nije ostvario uticaj na nivou karboksilesteraza (Riaz i sar., 2009). Osim toga, nađeno je da prirodne populacije insekata i morskih beskičmenjaka, koje potiču iz okruženja opterećenog hemijskim kontaminantima, pokazuju značajno veću ekspresiju karboksilesteraza u odnosu na populacije iz nezagađenog staništa (Farcy i sar., 2013; Callaghan i sar., 1998; Ahammad-Sahib i sar., 1994). Rezultati iz ovog eksperimenta pokazuju nešto drugačiju sliku. Indukcija aktivnosti karboksilesteraza larvi iz nezagađene populacije predstavlja moguću aklimacijsku strategiju *L. dispar* na intoksikaciju B[*a*]P, što je vrlo izvesno obzirom na nizak odgovor enzima antioksidativne odbrane u crevu, kao i nepromenjenu aktivnost glutation S-transferaza (**Slika 17**), koje pored važne detoksifikacione funkcije odlikuje i peroksidazna aktivnost (Krishnan i Kodrík, 2006). Interesantno je da je upravo suprotan enzimski

profil zabeležen u srednjem crevu larvi iz zagađene šume, gde je dominantna aktivnost superoksid dismutaze, katalaze i glutation S-transferaza (**Slike 3, 5 i 17**), što ide u prilog ovom objašnjenju. Riaz i sar. (2009) pokazali su da akutno izlaganje *A. aegypti* (Diptera) subletalnim koncentracijama benzo[*a*]pirena, pored indukcije gena koji kodiraju karboksilesteraze i antioksidativne enzime, takođe snažno indukuje i ekspresiju više CYP gena koji kodiraju enzime superfamilije citohrom P450, uključene u biotransformaciju B[*a*]P. To može značiti da u srednjem crevu larvi iz zagađene šume, benzo[*a*]piren u većoj meri aktivira citohrom P450 monooksigenaze u odnosu na karboksilesteraze, obzirom da su svi enzimi uključeni u fazu I biotransformacije.

Callaghan i sar. (1998) ističu da populacije *Culex pipiens* (Diptera) koje su generacijama adaptirane na prisustvo insekticida ali i drugih organskih polutanata, odlikuje visoka aktivnost karboksilesteraza i manje eksprimiranih izoenzima, u poređenju sa populacijama poreklom sa nezagađenih staništa. Autori se pri tome ograđuju da uočeni obrazac ponajviše važi za slučaj kada populacija potiče iz sredine zagađene insekticidima. Interesantno je da elektroforetski profil karboksilesteraza srednjeg creva larvi *L. dispar* iz nezagađene šume, dobijen u ovom eksperimentu, otkriva pet izoformi u svim eksperimentalnim grupama, dok se nakon tretmana višom koncentracijom B[*a*]P kod larvi iz zagađene šume, uočava prisustvo jedne izoforme više (**Slika 12A**). Šesta izoforma karboksilesteraza (I6), karakteristična je isključivo za ovu grupu i predstavlja specifičnu fiziološku adaptaciju sa verovatnim učešćem u rezistencionim mehanizmima koji smanjuju osetljivost na ovaj ksenobiotik. Kao takva, ona može biti potencijalni pokazatelj hroničnom izlaganju benzo[*a*]pirenu, bar kada su populacije iz zagađenog staništa u pitanju.

Tkivna specifičnost se može uočiti u odgovor karboksilesteraza mozga larvi *L. dispar* na delovanje B[*a*]P u hrani, u odnosu na srednje crevo. Jedini efekat na mozak larvi iz zagađene šume je povećanje enzimske aktivnosti posle dejstva niže doze B[*a*]P u hrani (**Slika 13**). Primećuje se da hronično izlaganje benzo[*a*]pirenu formira različite obrasce ekspresije gena istih enzima, u zavisnosti od populacionog porekla *L. dispar*, što važi i za superoksid dismutazu i katalazu. Moguće je da ovi rezultati ukazuju na prisustvo različitih tipova polutanata u izvornom okruženju, koji deluju selektivno povećavajući učestalost određenih genskih alela odnosno veće produkcije karboksilesteraza u mozgu, posebno ako su među njima prisutni neurotoksini, kao što su insekticidi (Soderlund i Bloomquist, 1989). Imajući u vidu važnu ulogu karboksilesteraza u detoksifikaciji insekticida i nastanku rezistentnih sojeva (Coppin i sar, 2012; Ross i sar, 2010; Devonshire i Moores, 1982), multigeneracijska interakcija sa ovim, sve prisutnijim toksinima, verovatno bi favorizovala ekspresiju karboksilesteraza. U blizini Bora gde je zagađena šuma iz koje potiču larve *L. dispar* korišćene u ovom eksperimentu, verovatno su, osim PAH, prisutni i drugi zagađivači antropogenog porekla koji ispoljavaju neurotoksičnost i mogu specifično da indukuju izoforme karboksilesteraza u mozgu. Sa druge strane, ispitivanje tkivne distribucije karboksilesteraza u *L. dispar* pokazalo je njihovu dominantnu aktivnost u crevu larvi, dok je u mozgu zabeležen nizak stepen njihove aktivnosti, sa izuzetkom podgrupe ovih enzima, acetilholinesteraza (Kapin i Ahmad, 1980). Pored toga, kod *Acheta domesticus* (Orthoptera) utvrđeno je da su crevo i Malpijijevi sudovi centralno mesto biotransformacije B[*a*]P (He i sar, 1998) i drugih vrsta ksenobiotika, na osnovu čega se može pretpostaviti da bi genetičke adaptacije, u vidu povećanja karboksilesterazne aktivnosti, najviše bile izražene upravo u srednjem crevu. Iz ovih razloga, vrlo je verovatno da povećanje karboksilesterazne aktivnosti u mozgu larvi iz zagađene populacije, delimično može biti i posledica fenotipske aklimacije. Indikativno je da veća doza benzo[*a*]pirena prevazilazi kapacitete ovih enzima i verovatno dovodi do inhibicije. Larve iz nezagađene šume odlikuju neinducibilne moždane izoforme karboksilesteraza što je i očekivano obzirom na indukciju izoformi karboksilesteraza u srednjem crevu, ali i pre-tretmansku istoriju populacije koja isključuje postojanje selektivnih faktora.

5.2.2. Specifična aktivnost i izoforme acetilholinesteraza u mozgu larvi poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Visoka osetljivost i inhibicija acetilholinesteraza na prisustvo organofosfatnih i karbamatnih pesticida razlog je njihove široke primene kao biomarkera neurotoksičnosti kod insekata (Senthil Nathan i sar., 2008). Takođe, zabeležene su i značajne promene u aktivnosti acetilholinesteraza odnosno njihova inhibicija pri delovanju drugih ksenobiotika, kao što su PAH (Grintzalis i sar., 2012; Jett i sar., 1999), što ukazuje na njihov potencijal i kao indikatora izloženosti ovim polutantima. Ilijin i sar. (2015) zabeležili su da hronični tretman sa višim koncentracijama B[a]P (20-2000 ng/g suve mase hrane) značajno inhibira acetilholinesteraznu aktivnost kod larvi *L. dispar*. Osim toga, Mrdaković i sar. (2016) uočili su da dugotrajno dejstvo visokih koncentracija još jednog PAH, fluorantena (335 i 670 ng/g suve mase hrane) dovodi do indukcije acetilholinesterazne aktivnosti kod iste vrste. U aktuelnom eksperimentu, ni u jednoj od eksperimentalnih grupa larvi, poreklom iz ispitivanih populacija, benzo[a]piren nije značajno uticao na aktivnost acetilholinesteraza u mozgu larvi (**Slika 15**). Zapaža se veća konstitutivna ekspresija ovog enzima u kontrolnoj grupi larvi iz zagađene šume u odnosu na istu grupu iz nezagađene šume, što bi mogla biti jedna od odlika adaptivnih mehanizama na PAH. Taşkin i sar. (2007) su zabeležili povišenu aktivnost acetilholinesteraza kod prirodnih populacija *Drosophila melanogaster* (Diptera) sa lokaliteta opterećenim insekticidima, i zaključili da je visoka aktivnost ovog enzima mehanizam rezistencije na insekticide. Izvesno je da se slične razlike, koje pokazuju dobijeni rezultati, mogu objasniti populacionim poreklom larvi *L. dispar* u slučaju kontrolnih grupa analiziranih u ovoj disertaciji, ali ne objašnjavaju rezultat dobijen nakon hroničnog izlaganja benzo[a]pirenu.

U literaturi su zabeleženi različiti modulatorni efekti benzo[a]pirena na aktivnost acetilholinesteraza, ali i izostanak istih. Akutno izlaganje *M. galloprovincialis* (Mytilida) povišenoj koncentraciji B[a]P, značajno je redukovalo aktivnost ovog enzima (Banni i sar., 2010). Vicentini i sar. (2017) su zabeležili najpre indukciju acetilholinesterazne aktivnosti kod *C. sancticaroli* (Diptera) nakon 48 sati izloženosti benzo[a]pirenu, da bi posle 72 sata detektovali značajnu inhibiciju enzima u odnosu na kontrolnu grupu i na kraju eksperimenta, u 96. satu tretmana, konstatovali su da B[a]P nema uticaja na acetilholinesteraznu aktivnost. Sa druge strane, hronični tretman sa različitim dozama benzo[a]pirena nije imao uticaja na ekspresiju aktivnosti acetilholinesteraza *E. fetida andrei* (Haplotaaxida) (Saint-Denis i sar., 1999). Slično tome, Richardi i sar. (2018) nisu detektovali promene na nivou aktivnosti acetilholinesteraza kod larvi *C. sancticaroli* (Diptera), posle akutnog (96 sati) kao ni posle hroničnog tretmana (osam dana) sa još jednim PAH, fenantrenom. Interesantno je da su Ilijin i sar. (2015) zabeležili da hronični tretman nižim koncentracijama B[a]P (2 i 10 ng/g suve mase hrane) nema efekta na acetilholinesteraznu aktivnost, dok više koncentracije značajno inhibiraju ovaj enzim kod *L. dispar*. Moguće je da koncentracije ksenobiotika primenjene u ovom eksperimentu nisu bile dovoljno visoke da modifikuju aktivnost acetilholinesteraza što je verovatno posledica aktiviranja drugih detoksifikacionih instanci, bilo na nivou istog ili različitog tkiva, ali i nižeg afiniteta samog enzima prema benzo[a]pirenu kao supstratu. Ovoj pretpostavci ide u prilog povećana ekspresija karboksilesteraza u obe populacije *L. dispar*. Pored toga, u *Porcellio scaber* (Isopods) nađeno je da se od ukupne akumulirane količine B[a]P, 14% nalazi u glavenom regionu (Van Brummelen i Van Straalen. 1996), što sugerise da je i kod larvi *L. dispar* najverovatnije samo manji deo ovog polutanta dostupan kao supstrat enzimima u mozgu.

5.2.3. Specifična aktivnost glutathion S-transferaza u srednjem crevu larvi poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Višestruke insekatske izoforme GST ostvaruju centralnu funkciju u detoksifikacionim procesima ksenobiotika: primarno kroz reakcije konjugacije redukovano glutathiona sa reaktivnim metabolitima u cilju povećanja njihove hidrofiliteta i ekskrecije (Ketterer i sar., 1983); a sekundarno preko svoje peroksidazne aktivnosti, uklanjanjem lipidnih peroksida vezivanjem za glutathion (Dubovskiy i sar., 2008; Krishnan i Kodrik. 2006), čime značajno doprinose antioksidativnoj odbrani organizma (Lee i sar., 2008). Pokazano je da benzo[*a*]piren indukuje ekspresiju GST gena i da značajno povećava enzimsku aktivnost GST kod insekata i vodenih beskičmenjaka (Ren i sar., 2014; Zhang i sar., 2012b; Riaz i sar., 2009). U rezultatima ove disertacije detektovana je značajno povećana aktivnost GST kod larvi poreklom iz zagađene šume, dok populacija iz nezagađene šume ne pokazuje promene u aktivnosti ovoga enzima, nakon tretmana sa benzo[*a*]pirenom (**Slika 17**). Uočena je veza između povećane aktivnosti GST i stepena zagađenja životne sredine. Moreira i sar. (2004) su našli da blizina staništa *M. galloprovincialis* (Mytilida) izvoru organskog zagađenja, odnosno mestu izlivanja nafte u more, direktno uslovljava povećanje aktivnosti GST, tako da je i nakon godinu dana od ekološke katastrofe, aktivnost ovog enzima bila značajno povišena u jedinkama sa najzagađenijeg lokaliteta. Barata i sar. (2005) beleže da je povećanje aktivnosti GST u *Hydropsyche exocellata* (Trichoptera) u pozitivnoj korelaciji sa stepenom zagađenosti njihovog staništa različitim polutantima antropogenog porekla. Takođe, kod populacija *L. dispar* poreklom iz šume opterećene kombinacijom više polutanata, izmerena je značajno veća aktivnost GST u srednjem crevu u odnosu na populaciju larvi sa nezagađenog lokaliteta (Perić-Mataruga i sar., 2019). Rezultati aktuelnog eksperimenta ukazuju da se u srednjem crevu larvi iz zagađene šume aktivnije odigravaju procesi eliminacije toksičnih metabolita benzo[*a*]pirena u odnosu na larve iz nezagađene šume. Osim indikativnog povećanja aktivnosti GST, u ovoj populaciji zabeležen je i porast aktivnosti antioksidativnih enzima, što doprinosi pretpostavci da se ove larve odlikuju inducibilnijim i efikasnijim mehanizmima zaštite od oštećenja tkiva srednjeg creva. Nedostatak stresogenih elemenata u prirodnom okruženju verovatno je uzrok izostanka razvoja specifičnih odbrambenih strategija kod larvi iz nezagađene šume, tako da ovi enzimi nemaju potencijal za saniranje štete koje prisustvo benzo[*a*]pirena izaziva. Akutni tretman sa nekoliko koncentracija B[*a*]P kod *C. sancticaroli* (Diptera) poreklom sa nezagađene lokacije, doveo je do inhibicije GST aktivnosti posle tretmana višim dozama, dok je aktivnost posle tretmana nižim ostala nepromenjena u odnosu na kontrolnu grupu (Vicentini i sar., 2017). Osim toga, Filipović i sar. (2019) nisu detektovali promene u aktivnosti GST posle dugotrajne primene fluorantena (PAH), na larve *L. dispar* koje potiču iz šume koja je daleko od antropogenog zagađenja. Verovatno je u nekom momentu, tokom ovog eksperimenta, došlo do promena u aktivnostima GST, SOD i katalaze i kod *L. dispar* iz nezagađene šume usled neminovnog aktiviranja metaboličke degradacije benzo[*a*]pirena, samo što su dužina i intenzitet tretmana prevazišli nasleđene obrasce i kapacitete ovih enzima, rezultujući njihovom inaktivacijom i/ili izostankom merljive promene na kraju eksperimenta (Gavrilović i sar., 2017).

Izračunati IBR indeksi za bateriju detoksifikacionih enzima (karboksilesteraze iz srednjeg creva i mozga, i glutathion S-transferaze) pokazuju dozno-zavisno povećanje karakteristično za obe ispitivane populacije larvi, pri čemu je ovaj trend izraženiji kod larvi iz nezagađene šume. Dobijeni rezultat može biti veoma koristan za svrhu primene odgovora ovih enzima kao potencijalnih biomarkera prisustva benzo[*a*]pirena u životnoj sredini, posebno što je osetljivost ovih parametara nezavisna od populacionog porekla.

5.3. Uticaj benzo[a]pirena na ekspresiju Hsp70 u srednjem crevu i mozgu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Metabolizmom benzo[a]pirena, u složenim reakcijama biotransformacije, nastaje asortiman reaktivnih metabolita i reaktivnih vrsta kiseonika koji dalje, u interakcijama sa strukturnim i funkcionalnim proteinima direktno ili indirektno uzrokuju proteotoksičnost i oštećuju druge biološke makromolekule, ugrožavajući integritet ćelijskih struktura (Lowe i sar., 2006; Kelly i sar., 1998). Doganlar i Doganlar (2015) uočili su da petodnevní tretman različitim organskim pesticidima dovodi do značajnog povećanja ekspresije Hsp70 gena kod larvi *D. melanogaster* (Diptera), čak i u veoma niskim koncentracijama. Brojne studije ukazuju na povećanu sintezu proteina Hsp70 kod insekata i zglavkara tokom dejstva B[a]P, i važnu ulogu koju imaju u zaštiti i modulaciji stepena oštećenja proteina (Ilijin i sar., 2017; Rhee i sar., 2009; Lee i sar., 2006). Larve *L. dispar* iz nezagađene i zagađene populacije pokazale su izrazito, dozno-zavisno povećanje ekspresije proteina Hsp70 srednjem crevu, posle tretmana B[a]P koji je dodat u hranu (**Slika 18**). Zhang i sar. (2017) našli su da visoke koncentracije B[a]P izuzetno indukuju ekspresiju antioksidativnih enzima, prvenstveno katalaze, kao i ekspresiju proteina Hsp70, kod crva *E. fetida* (Haplotaxids). U obe kontrolne grupe analizirane u ovom eksperimentu prisustvo Hsp70 je jedva detektibilno, što kod larvi iz zagađene šume ukazuje na primarno aktiviranje i visoku efikasnost drugih zaštitnih mehanizama, odnosno na verovatni trade-off u odnosu na detoksifikacione procese. Studija o toksikokinetici B[a]P u *A. domesticus* (Orthoptera) zabeležila je da se samo 2,3% ovog ksenobiotika izlučuje u neizmenjenoj formi, a ostatak kao slobodni i konjugovani metaboliti (He i sar., 1998). Osim toga, autori su utvrdili da se u ispitanim tkivima, više od 50% B[a]P takođe nalazi u obliku intermedijera, pri čemu je istaknuto da su crevo i Malpigijevi sudovi centralno mesto njegovog metabolizma. Hronična ishrana *L. dispar* benzo[a]pirenom, najveći negativni uticaj ostvaruje u srednjem crevu, upravo zbog njegove aktivne metaboličke funkcije i prirode produkata koji nastaju u tim procesima. Konstantno opterećenje reaktivnim i toksičnim vrstama u nekom momentu prevazilazi i/ili zaobilazi detoksifikacione i antioksidativne sisteme, i uzrokuje proteotoksičnost (Sanders i Martin, 1993), što se u našem slučaju jasno vidi preko visoke ekspresije Hsp70. Monari i sar. (2011) takođe beleže u digestivnoj žlezdi morske školjke *Chamelea gallina* (Venerida) povećanu produkciju Hsp70, nakon dugoročnog kontakta sa benzo[a]pirenom. Proteini Hsp70 i Hsp90 učestvuju u stabilizaciji Ah receptora zaduženog za aktivaciju ekspresije enzima iz familije citohrom P450 monooksigenaza, sastavnog dela detoksifikacionog metabolizma benzo[a]pirena (Hahn, 2002). Iako je sinteza Hsp70 proteina energetski veoma skup proces, izvesno da je njihova funkcija u zaštiti i sprečavanju denaturacije proteina esencijalnih za vijabilnost ćelije (Hightower i sar., 1994) izuzetno dragocena u tkivu srednjeg creva, zbog čega je moguće da se vremenom, sa povećanjem izloženosti benzo[a]pirenu, dogodila alokacija energetskih resursa iz drugih adaptacionih strategija. Kod larvi iz nezagađene šume očigledan je trade-off prema antioksidativnim enzimima, dok se slična veza može uspostaviti na nivou detoksifikacionih enzima – karboksilesteraza, u populaciji larvi poreklom iz zagađene šume. Posledice ovih odbrambenih mehanizama ogledaju se i na osobinama fitnesa, preko smanjenja mase i smanjenja relativne brzine razvića larvi iz obe populacije.

Obrazac ekspresije Hsp70 proteina u mozgu larvi je u mnogome različit od obrasca u srednjem crevu, što je i očekivano obzirom na tkivnu distribuciju B[a]P i metaboličku aktivnost organa (He i sar., 1998; Van Brummelen i Van Straalen, 1996). Jedino je tretman nižom koncentracijom B[a]P indukovao povećanje ekspresije Hsp70 u mozgu, i to samo kod larvi poreklom iz zagađene šume (**Slika 19**). Dugotrajno izlaganje larvi *L. dispar* različitim koncentracijama fluorantena rezultovalo je značajnim povećanjem koncentracije Hsp70 u mozgu larvi, i to samo pod dejstvom dve najniže doze ovoga PAH, dok su veće koncentracije ostvarile drugačije efekte (Mrdaković i sar., 2016). Razlike u diferencijalnoj ekspresiji Hsp70 našli su i Monari i sar. (2011), objašnjavajući ih razlikama u biotransformacionom kapacitetu između škrga i

digestivne žlezde *C. gallina* (Venerida). Perić-Mataruga i sar. (2017) uočili su da larve *L. dispar* poreklom iz staništa opterećenog antropogenim zagađivačima, imaju povećanu ekspresiju Hsp70 u mozgu nakon tretmana kadmijumom i povišenom temperaturom, za razliku od larvi donetih sa nezagađenog staništa, u kojih je registrovan pad u ekspresiji Hsp70, posle istih tretmana. Inducibilnost Hsp70 u mozgu larvi iz zagađene šume, zabeležena u ovom radu, verovatno je jedan od faktora koji doprinosi toleranciji, odnosno deo nasleđenih adaptacija ove populacije na konstantnu izloženost polutantima. Ovome ide u prilog i povećana aktivnost karboksilesteza, što sugeriše dobru pripravnost i određeni stepen definisanosti u odabiru zaštitnih sistema, koji je karakterističan za populacije pod selektivnim pritiskom toksičnih supstrata (Ma i sar., 2000; Callaghan i sar., 1998). Zanimljivo je da su oba pomenuta parametra pokazala značajnu inducibilnost pri dejstvu niže doze B[a]P (5 ng/g suve mase hrane) dok tretman većom dozom ne daje merljive promene u njihovoj enzimskoj aktivnosti (**Slike 13 i 19**). Pored mogućnosti da dugotrajno izlaganje višoj koncentraciji ovog ksenobiotika zahteva previše energije za sintezu Hsp70 u mozgu, te da je u jednom trenutku došlo do preusmeravanja energetske resursa u pravcu drugih odbrambenih mehanizama i održavanja bazalnih metaboličkih potreba (Krebs i Holbrook, 2001), moguće je i da je nesigmoidni odgovor Hsp70 posledica hemijske prirode benzo[a]pirena (Grčić i sar., 2019). Ispoljavanjem estrogenih, ali i antiestrogenih svojstava (Lintelmann i sar., 2003), ovaj polutant spada u grupu jedinjenja - endokrini disruptori, za koju je karakteristično izazivanje dozno-nezavisnog odgovora (Lagarde i sar., 2015). Ilijin i sar. (2017) takođe su uočili da hroničan tretman nižom koncentracijom B[a]P (10 ng/g suve mase hrane) u većoj meri indukuje ekspresiju Hsp70 u mozgu larvi *L. dispar*, u odnosu na nekoliko većih doza (20, 100 i 200 ng/g suve mase hrane). Pored toga, Köhler i sar. (1999) zapazili su da visoke doze B[a]P, tokom 14 dana izlaganja *Oniscus asellus* (Isopods) dovode do kratkotrajnog povećanja ekspresije Hsp70, i da posle 24 sata nivo ovog proteina kontinuirano opada. Može se zaključiti da populacije *L. dispar* sa istorijom izlaganja različitim antropogenim polutantima, ispoljavaju određeni tkivno-zavisni obrazac ekspresije Hsp70, posebno prilikom dejstva niskih doza B[a]P, što može biti indikativno za monitoring životne sredine.

5.4. Efekti benzo[a]pirena na digestivne enzime srednjeg creva larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

5.4.1. Specifična aktivnost i izoforme tripsina i leucin aminopeptidaze u srednjem crevu larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Osnovni gradivni elementi bioloških makromolekula obezbeđuju se kroz efikasnu digestiju nutrijenata iz hrane, što ukazuje na veliki značaj digestivnih enzima za rast i razvoj organizma. Trofički stres tj. prisustvo toksina u hrani značajno može uticati na aktivnost digestivnih enzima, posebno proteaza, koje su odgovorne za najveći deo digestivne aktivnosti kod larvi *L. dispar* (Srinivasan i sar., 2006). Dugotrajna ishrana hranom sa dodatkom različitih koncentracija benzo[a]pirena generalno je indukovala smanjenje aktivnosti tripsina (**Slika 20**) i leucin aminopeptidaze u srednjem crevu (**Slika 22**). Inhibitorni efekat, obe doze ovog polutanta, statistički je značajan samo u slučaju tripsina i to u grupi larvi iz nezagađene šume. U dostupnoj literaturi nisu prisutne slične studije o dejstvu benzo[a]pirena na digestivne proteaze insekata ili zglavkara. Postoje podaci da hronično, oralno uzimanje B[a]P kod vodenih kičmenjaka (*Dicentrarchus labrax*, *L.* i *Epinephelus coioides*) uzrokuje ozbiljne deformacije u ultrastrukturi enterocita, ali i drugih ćelija crevnog epitela, dovodeći do njihove hiperplazije, zatim hipertrofije endoplazmatičnog retikuluma, povećanja broja lizozoma i vakuola, degeneracije mitohondrija i gubljenja međućelijskih kontakta (Yuen i sar., 2007; Lemarie i sar., 1992). Takođe, zabeleženo je i da

dugotrajno izlaganje *M. edulis* (Mytilida) smeši policikličnih aromatičnih ugljovodonika, menja strukturu digestivnih ćelija, remeti njihov sinhronitet i radikalno utiče na strukturu ćelijskih lizozoma (Lowe i sar., 1981). Izvesno je da benzo[*a*]piren ostvaruje slične toksične efekte na ćelije epitela srednjeg creva *L. dispar*, u okviru kojih se odvija sinteza i deponovanje proteaza, ali i drugih digestivnih enzima (Terra i Ferreira, 1994), i ozbiljno narušava njihove strukturne, a time i funkcionalne odlike, dovodeći do smanjene proizvodnje i/ili sekrecije enzima. Zabeleženo povećanje ekspresije Hsp70 u srednjem crevu obe populacije larvi, ukazuje na postojanje stresnih procesa koji verovatno dovode i do proteotoksičnosti. Ako se ima u vidu da su serin proteaze, a pre svega tripsin i himotripsin, zaslužne za 95% ukupne enzimske digestije kod Lepidoptera (Tabatabaei i sar., 2011; Chougule i sar., 2008), verovatno je da dobar deo oštećenih i denaturisanih proteina u srednjem crevu čine upravo ove proteaze. Zbog svoje izuzetno lipofilne prirode, molekuli benzo[*a*]pirena mahom su vezani za proteinske i lipidne molekule, najpre tokom metaboličke obrade na nivou lumena i epitela srednjeg creva, a kasnije tokom transporta do drugih tkiva (Tipping i Ketterer, 1981; Tipping i sar., 1980). Mayer i sar. (1996) su našli da digestivne tečnosti, ekstrahovane iz vodenih beskičmenjaka (*Arenicola marina* i *Parastichopus californicus*) značajno povećavaju rastvorljivost i biodostupnost, različitih PAH. Pored indirektno izazvane proteotoksičnosti, postoji mogućnost i da je B[*a*]P u direktnom kontaktu sa tripsinom izazvao inhibiciju njegove aktivnosti, blokirajući katalitičko mesto ili aminokiselinske ostatke uključene u vezivanje i stabilizaciju supstrata.

Za digestivne enzime fitofagnih insekata, uključujući *L. dispar*, karakteristična je visoka plastičnost odnosno brza i efikasna modulacija aktivnosti, u cilju prevazilaženja toksičnih izazova, koje uglavnom ostvaruju sekundarni metaboliti biljki hraniteljki (War i sar., 2013; Lomate i Hivrale, 2011; Broadway, 1997). Mrdaković i sar. (2014) su zaključili da je inhibicija aktivnosti ukupnih proteaza i tripsina, uz istovremeno povećanje aktivnosti lipaza, adaptivni odgovor dve populacije *L. dispar* na dugotrajnu ishranu taninskom kiselinom. Vrlo je verovatno da su larve iz aktuelnog eksperimenta primenile sličnu taktiku u cilju prevazilaženja toksičnog efekta benzo[*a*]pirena, posebno što je detektovano značajno povećanje aktivnosti digestivnih lipaza, kod obe populacije (**Slika 30**). U uslovima hroničnog stresa povećava se potrošnja metaboličkih resursa usled aktiviranja odbrambenih mehanizama, a kako su lipidi energetski bogatiji od proteina verovatno se radi o trade-off-u u smislu pada proteazne aktivnosti. Obrazac ekspresije izoformi tripsina veoma je sličan u obe populacije, pri dejstvu veće koncentracije B[*a*]P (**Slika 21**). U slučaju leucin aminopeptidaze nađene su zanimljive razlike u ekspresiji četiri detektovane izoforme, u zavisnosti od tretmana i populacije (**Slika 23**). Generalno, sve izoforme leucin aminopeptidaze pokazuju veću osetljivost na tretmane benzo[*a*]pirenom kod larvi iz nezagađene šume, pri čemu se uočava gotovo potpuna inhibicija izoformi I2 i I4, za razliku od larvi iz zagađene šume gde samo veća koncentracija ovog PAH negativno utiče na aktivnost svih izoformi. Mala varijabilnost enzimskih izoformi sugerise slabu adaptibilnost na nivou proteaza – tripsina i leucin aminopeptidaze, i potvrđuje njihov trade-off prema drugim procesima za obezbeđivanje metaboličke energije i efikasnu detoksifikaciju.

5.4.2. Uticaj benzo[*a*]pirena na alkalne i kisele fosfataze srednjeg creva larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Alkalne i kisele fosfataze Lepidoptera kroz svoje primarne funkcije hidrolize fosfomonoestara i transfosforilaciju (Calvo-Marzal i sar., 2001) ostvaruju važne uloge u mnogim metaboličkim procesima, od kojih su efikasan transport nutrijenata i jona kroz crevni epitel, kao i produkcija fosfatnih jona važnih za energetski metabolizam, od izuzetnog značaja tokom delovanja stresogenih faktora. Visoku osetljivost odnosno inhibiciju ovih enzima pri akutnom i hroničnom dejstvu kadmijuma kod larvi *L. dispar* (Lepidoptera) zabeležili su Vlahović i sar. (2013, 2009). U

ovom eksperimentu niža koncentracija B[a]P (5 ng/g suve mase hrane) je imala značajan uticaj na aktivnost alkalnih fosfataza (**Slika 24**), i to isključivo kod populacije *L. dispar* iz nezagađene šume, dok kisele fosfataze nisu pokazale statistički značajne promene u svojoj aktivnosti (**Slike 26, 28 i 29**). Badiou-Bénéteau i sar. (2013) našli su da populacija *Apis mellifera* (Hymenoptera) poreklom iz urbane sredine, opterećene teškim metalima, poseduje viši nivo ekspresije alkalnih fosfataza, u odnosu na populaciju iz ruralne sredine. Rezultati ovog dela istraživanja ukazuju da je moguće da je pre-tretmanska istorija kontakta sa polutantima doprinela razlikama u enzimskom odgovoru na nivou ispitivanih populacija, mada treba istaći da teški metali i PAH imaju različit modalitet delovanja i toksičnosti na insekte. Uticaj PAH na ove digestivne enzime insekata nije ispitan, odnosno podaci o sličnim studijama nisu prisutni u dostupnoj literaturi. U revijalnoj studiji Senthil-Nathan (2013) opisuje negativan uticaj alelohemikalija iz grupe triterpenoida policikličnih struktura – limonoida, na digestivne enzime Lepidoptera, a posebno njihov inhibitoryni efekat na aktivnosti alkalnih i kiselih fosfataza. Autor ističe da je pad aktivnosti ovih enzima u direktnoj vezi sa narušavanjem apsorpcije nutrijenata i zabeleženom redukcijom mase larvi. Iako mehanizam inhibicije alkalnih fosfataza limonoidima nije poznat, na osnovu relativne sličnosti u hemijskim strukturama, pretpostavljamo da i molekuli benzo[a]pirena i/ili njegovih metabolita, mogu delovati po istom principu.

Za benzo[a]piren i njegov metabolizam karakteristična je produkcija toksičnih intermedijera i povećanje koncentracije reaktivnih vrsta kiseonika (De Almeida i sar., 2007; Le Bras i sar., 2005), koje imaju veliki afinitet prema lipidnim molekulima, posebno onim u membranskim strukturama. Kroz procese peroksidacije narušava se struktura ćelijske membrane, i dolazi do inhibicije asociranih membranskih enzima, kao i do poremećaja ćelijske funkcije, što finalno vodi ćelijskoj smrti (Maria i Bebianno, 2011; Sikkim i sar., 2000; Mikhail i sar., 1996). Kako su alkalne fosfataze mahom membranski enzimi kolumnarnih ćelija epitela, orijentisani prema lumenu srednjeg creva (Eguchi, 1995), izvesno je da se peroksidacijom lipidnog dvosloja narušava celovitost i struktura ovih proteina, zbog čega one gube svoju katalitičku aktivnost. Bouchard i Bouchard-Madrell (2000) pokazali su da ingestija B[a]P uzrokuje značajne lezije alimentarnog trakta *Gomphocerus sibiricus* (Orthoptera). Pored toga, u prethodnom pasusu (5.4.1) opisana su istraživanja koja potvrđuju degenerativni efekat benzo[a]pirena na ćelije epitela creva vodenih kičmenjaka i beskičmenjaka, koji se direktno odražava na digestiju (Yuen i sar., 2007; Lemarie i sar., 1992; Lowe i sar., 1981). U populaciji larvi iz nezagađene šume, hronična ishrana sa benzo[a]pirenom indukovala je aktivnost karboksilesteraza u srednjem crevu, što ukazuje na aktivne procese metaboličke transformacije benzo[a]pirena i povećanja hidrofилnosti ovog planarnog i izuzetno lipofilnog molekula, a koji generalno za posledicu imaju povećanje sadržaja slobodnih radikala. Ujedno, na nivou ovog tkiva, nije zabeležena aktivacija antioksidativnih enzima i GST, naprotiv, došlo je do smanjenja katalazne aktivnosti. Nađeni enzimski odgovori karakteristični za *L. dispar* iz nezagađene šume, sugerišu visok potencijal za B[a]P-indukovanu toksičnost bioloških makromolekula u okviru srednjeg creva, koji se posebno ogleda u inhibiciji digestivnih enzima, tripsina i alkalnih fosfataza. Funkcija ovih enzima nije značajno promenjena kod populacije larvi iz zagađene šume, verovatno zbog generacijski formiranih adaptacija na prisustvo polutanata, i izvesnog povećanja učestalosti alela katalaze, SOD i GST, usled čega je njihov ekspresioni i katalitički kapacitet u srednjem crevu bio dovoljan da umanji toksične efekte benzo[a]pirena, uspostavi oksido-reduktivni balans i do određene mere, održi povoljne fiziološke uslove za funkcionisanje digestivnih enzima. Obe populacije odlikuje priustvo tri izoforme alkalnih fosfataza (**Slika 25**), čiji su intenziteti na nativnom gelu izraženiji kod populacije iz zagađene šume. Kod larvi iz nezagađene šume uočava se dozno-nezavisni odgovor, tako da su izoforme I1 i I2 u velikoj meri inhibirane primenom niže doze B[a]P. Ova, hormezi slična pojava, u odgovoru biohemijskih parametara na dejstvo B[a]P, ali i drugih PAH na insekte, relativno je česta i opisana u našim prethodnim eksperimentima (Filipović i sar., 2019; Grčić i sar., 2019; Ilijin i sar., 2017; Mrdaković i sar., 2016; Ilijin i sar., 2015). Iako nisu detektovane statistički značajne promene u specifičnoj aktivnosti kiselih fosfataza (**Slika 26**), kako lizozomskog (**Slika 28**) tako i nelizozomskog porekla (**Slika 29**), zimogram je pokazao inhibiciju

tri izoforme, od ukupno pet eksprimiranih, nakon tretmana većom dozom B[a]P u populaciji iz nezagađene šume (**Slika 27**). Aktivne izoforme (I4 i I5) iz ove grupe larvi, dominantne su i stabilne u intenzitetu kod svih eksperimentalnih grupa, što može značiti da su glavni nosioci specifične aktivnosti ovih enzima. Verovatno je aktivnost kiselih fosfataza manje promenjena B[a]P-indukovanom toksičnošću u odnosu na alkalne, zbog njihove lokalizacije, primarno u okviru citoplazme ćelija crevnog epitela (Terra i Ferreira, 1994), što ih u izvesnoj meri fizički izdvaja od lumena srednjeg creva, glavnog mesta generacije reaktivnih intermedijera i kiseoničnih radikala. U svakom slučaju, dobijeni rezultati ukazuju na slabo učešće ovih enzima u detoksifikacionim i odbrambenim mehanizmima, angažovanim u prisustvu benzo[a]pirena.

5.4.3. Specifična aktivnost i izoforme lipaza i α -glukozidaza srednjeg creva larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Angažovanje biohemijskih odbrambenih sistema u okviru adaptivnih modifikacija uslovljenih prisustvom antinutrijenata, zahteva dostupnost signifikantnih energetske resursa što često znači pojavu specifičnih kompenzatornih mehanizama. Populacije *L. dispar* korišćene u aktuelnom eksperimentu, pokazuju značajno povećanje specifične aktivnosti lipaza u srednjem crevu nakon dugotrajnog prisustva benzo[a]pirena u hrani (**Slika 30**), dok je istovremeno, aktivnost α -glukozidaza ostala nepromenjena (**Slika 32**). Dobijeni rezultat sugerije favorizaciju odnosno povećanu potrebu B[a]P-tretiranih larvi za lipidnim nutrijentima na uštrb razlaganja i apsorpcije ugljenohidratnih molekula. Podaci o efektima benzo[a]pirena na enzime insekata koji učestvuju u katabolizmu lipida i ugljenih hidrata nisu prisutni u literaturi. Lipidi su najvažniji izvor energije za više larvene stupnjeve *L. dispar* (Stockhoff, 1993), a kako su po prirodi bogatijeg energetskog potencijala u odnosu na proteine i ugljene hidrate (Arrese i Soulages, 2010), izvesno je primarno aktiviranje njihovog katabolizma pod dejstvom nepovoljnih agenasa. Zanimljivo je da su dve populacije, različitog porekla i drugačijih, verovatno nasleđenih ekspresionih obrazaca u domenu antioksidativnih i detoksifikacionih mehanizama, pokazale istu adaptivnu plastičnost ova dva enzima u odgovoru na benzo[a]piren. Šta više, značajna redukcija mase larvi u obe populacije, ukazuje na visoku energetske cenu odabrane strategije detoksifikacije benzo[a]pirena, i da energija dobijena primarno digestijom lipida, ipak nije bila dovoljna da se izbegne trade-off u osobinama fitnesa. Ispitivanjem uticaja u vodi rastvorne frakcije nafte, odnosno smeše monocikličnih aromatičnih ugljovodonika, na lipidni metabolizam slatkovodnog raka *Macrobrachium borellii* (Decapoda) ustanovljeno je povećanje aktivnosti lipaza u digestivnoj žlezdi, ali i drugih enzima uključenih u katabolizam lipida, na osnovu čega su autori zaključili da prisustvo organskih zagađivača uslovljava visoku energetske potrošnju i konstantnu mobilizaciju energetske zaliha (Lavarías i sar., 2006). Hronično izlaganje najjednostavnijem PAH, naftalenu, nije ostavilo posledice na ugljenohidratni metabolizam u crevu vodenih kičmenjaka, *Abramis brama* i *Oreochromis mossambicus* (Cypriniformes) odnosno nisu detektovane promene u aktivnosti amilolitičkih enzima (Golovanova i sar., 1994). Mrdaković i sar. (2014) našli su da kod dve populacije *L. dispar* naviknute na različite biljke hraniteljke, nakon ishrane taninskom kiselinom, dolazi do povećanja aktivnosti lipaza u srednjem crevu, što se posebno ističe kao važan adaptivni odgovor larvi na stresogene uslove. Za tri populacije *Sitophilus zeamais* (Coleoptera) - jedne osetljive, i dve sa različitim stepenom rezistencije na insekticide, pokazano je da tretman piretroidom indukuje aktivnost lipaza u otpornim populacijama, pri čemu je uočeno da najrezistentniju populaciju, koja nema promena u fitnes-karakteristikama tj. smanjenje mase larvi, odlikuje i specifično povećanje aktivnosti amilaza u crevu (Araújo i sar., 2008). Ovi rezultati ukazuju da različit nivo i vrsta selektivnog pritiska može proizvesti populacije insekata visoko prilagođene na dejstvo ksenobiotika i to bez "naplate", plastičnosti što nije slučaj u ovom eksperimentu. Izvesno je da su na zagađenom lokalitetu bile prisutne različite vrste polutanata i da

se nijedan od njih nije isticao po zastupljenosti, zbog čega je verovatno da ova populacija *L. dispar* nije dovoljno specijalizovala svoje odbrambene sisteme i pokazuje trade-off u masi larvi.

Upečatljivo povećanje lipazne aktivnosti delimično može biti i posledica same prirode varenja lipida i lipofilnih jedinjenja. Zapravo, digestija hidrofobnih molekula najpre podrazumeva njihovu solubilizaciju što se u alimentarnom traktu insekata odvija zahvaljujući posebnoj vrsti surfaktanata, lizolecitinu i sličnim fosfolipidima (Terra i Ferreira, 2012). Očekivano je da se njihova produkcija povećava sa povećanim sadržajem lipofilnih jedinjenja u hrani, kao što je u ovom eksperimentu verovatno slučaj, imajući u vidu izuzetnu nepolarost benzo[*a*]pirena. Tako, dodatno stimulisana emulsifikacija crevnog sadržaja povećava dodirnu površinu između lipidnih i vodenih molekula, koja predstavlja zonu delovanja digestivnih lipaza, i deluje inducibilno na njihovu aktivnost (Terra i Ferreira, 2012; De Veau i Schultz, 1992). Da antinutrijenti mogu na opisani način indirektno uticati na aktivnost lipaze, zaključili su i Mrdaković i sar. (2013), tokom ispitivanja uticaja taninske kiseline na digestivne enzime *L. dispar*. U ovom eksperimentu grupe larvi koje pokazuju povećanje aktivnosti lipaza u odnosu na kontrolu, odlikuje prisustvo samo jedne izoforme (II) dok je drugoj detektovanoj izoformi aktivnost skoro u potpunosti inhibirana (**Slika 31**). Rezultat je karakterističan za obe populacije i ukazuje na verovatnu fenotipsku akomodaciju ekspresije u smeru samo određenih alela za lipaze, kako bi se larve što efikasnije izborile sa zahtevnim okruženjem, bez nepotrebne potrošnje resursa za sintezu mnogobrojnih enzimskih varijanti.

Indekse dobijene metodom IBR za kombinaciju digestivnih enzima - tripsina, lipaza i alkalnih fosfataza odlikuje izrazito dozno-zavisno povećanje u obe populacije larvi (iz nezagađene i zagađene šume), što je karakteristično jedino još za trijadu detoksifikacionih enzima - karboksilesteraze u srednjem crevu, karboksilesteraze u mozgu i glutation S-transferaze. Takođe, digestivna baterija parametara pokazuje veću osetljivost kod larvi iz nezagađene šume. Specifična enzimska aktivnost ovih digestivnih enzima ima dobar potencijal za indikaciju i praćenje zagađenja benzo[*a*]pirenom.

5.5. Efekti benzo[*a*]pirena na koncentraciju trehaloze i lipida u hemolimfi larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Hemolimfa insekata je centralno mesto transporta nutrijenata, rastvorenih gasova, bioloških makromolekula, metabolita, jona, kao i ksenobiotika i proizvoda njihovog metabolizma. Simpson i Raubenheimer (1993) istakli su vitalni značaj ovog tečnog tkiva u proceni nutricionog i metaboličkog statusa insekata. Dugotrajna ishrana benzo[*a*]pirenom nije imala uticaja na koncentraciju trehaloze u hemolimfi larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume (**Slika 34**) ali je zabeležen značajan pad koncentracije lipida nakon tretmana većom dozom B[*a*]P koji je dodat u hranu (**Slika 35**). U populaciji larvi iz zagađene šume nema promena u ukupnom sadržaju trehaloze i lipida, u okviru hemolimfe (**Slike 34 i 35**). U literaturi nisu dostupni podaci o uticaju benzo[*a*]pirena na sastav hemolimfe kod insekata. Molekuli trehaloze su osnovni oblik u kome se ugljeni hidrati prenose od glikogenskih depoa u masnom telu, do tkiva kojima je potrebna energija (Thompson, 2003), kako u normalnim uslovima, tako i u stanju stresa. Do mobilizacije glikogena i povećanja koncentracije trehaloze posebno dolazi pri ekstremnim sredinskim okolnostima na primer pri visokim temperaturama, suši itd. (Vanin i sar., 2008; Watanabe i sar., 2002; Storey, 1997; Denlinger, 1991). Moguće je da je aktiviranje lipidnog katabolizma kao dominantnog izvora metaboličke energije, deo adaptivnog odgovora obe populacije *L. dispar* na hronični stres izazvan benzo[*a*]pirenom, na uštrb korišćenja glikogenskih rezervi. Nepromenjena aktivnost *a*-glukozidaza u srednjem crevu, uz istovremenu indukciju digestivnih lipaza, takođe ukazuje na prednost dekompozicije, apsorpcije i korišćenja lipidnih nutrijenata. Ispitivanja su pokazala da sredinski

zagađivači - teški metali i insekticidi prirodnog i veštačkog porekla, značajno modifikuju energetske metabolizam insekata, i dovode do smanjenja koncentracije lipidnog sadržaja u hemolimfi (Altuntaş, 2015; Emre i sar., 2013; Sak i sar., 2006; Shin i sar., 2001; Ortel, 1995). Takav odgovor zabeležen je i kod larvi iz nezagađene šume, i sugeriše depleciju lipidnih molekula, kako iz masnog tela tako i iz hemolimfe, da bi se potkrepili energetske zahtevi ciljnih tkiva, koja učestvuju u odbrambenim mehanizmima. Dugotrajno delovanje stresora na insekte praćeno je mobilizacijom energetskih rezervi upravo zbog povećanih metaboličkih zahteva (Even i sar., 2012; Johnson i White, 2009), i to se oslikava u promenama parametara hemolimfe, zahvaljujući njenoj transfernoj funkciji. Međutim, lipidni status hemolimfe Lepidoptera takođe je zavisna i od uslova gajenja, sastava dijeta, a naročito od razvojnog stupnja larve, pri čemu su česte značajne fluktuacije ovih molekula, kako između različitih tako i u okviru istih razvojnih stupnjeva (Ojeda-Avila i sar., 2003; Janda, 1987; Grau i Terriere, 1971). Ortel (1995) ističe da se nivo lipida u hemolimfi tokom delovanja stresora, tumači i uzima kao indikator sa velikim oprezom, zbog karakteristične fluidnosti ovog tkiva i fizioloških uticaja na njegov sastav. Tako, koncentracija lipida kod populacije iz zagađene šume, nije pokazala značajne promene i očekivani pad nakon tretmana sa benzo[*a*]pirenom, naprotiv, zabeležen je diskretan trend rasta lipidnog sadržaja sa rastom doze polutanta. Indukcija aktivnosti lipaza i značajna redukcija mase usled delovanja B[*a*]P ukazuje na aktivne kataboličke procese i potrošnju lipidnih depoa iz masnog tela, što bi dovelo i do njihove alokacije iz hemolimfe. Međutim, delovanje stresa na insekte direktno je povezano sa lučenjem insekatskih hormona stresa, oktopamina i adipokinetičkog hormona, čija je funkcija mobilizacija glikogena i lipida iz masnog tela, pri čemu direktno dovode do povećanja lipidnog pula u hemolimfi (Johnson i White, 2009; Adamo i sar., 1995; Fields i Woodring, 1991). Verovatno da je zabeležen lipidni status u larvama iz ovog eksperimenta posledica usklađivanja adaptivnih mehanizama tokom kataboličkih procesa, sa drugim, fiziološkim procesima vezanim za razvoj larvi. Osim toga, opisano je povećanje koncentracije specifičnih lipoproteina u hemolimfi – lipoforina male gustine, tokom imunog odgovora Lepidoptera u hemolimfi (Dettlof i sar., 2001). Kako benzo[*a*]piren pokazuje imunostimulativna svojstva kod insekata (Guo i sar., 2011; Hannam et sar., 2010; Pan i sar., 2006) postoji mogućnost da je u interakciji sa komponentama imune odbrane indukovao i povećanje koncentracije lipoforina male gustine, indirektno dovodeći do porasta ukupnih lipida u hemolimfi. Teško je sa sigurnošću protumačiti dobijene rezultate lipidnog statusa, jer se u hemolimfi integriše celokupna adaptivna strategija insekatskog organizma pri čemu većina bioloških makromolekula i metabolita iz ovog tkiva, ispoljava svoje finalne, efektorske funkcije u okviru drugih tkiva.

5.6. Efekti benzo[*a*]pirena na osobine fitnesa larvi *L. dispar* poreklom iz nezagađene i zagađene šume

Insektima je tokom uticaja sredinskih, stresogenih faktora od fundamentalnog značaja količina raspoložive metaboličke energije, odnosno efikasnost modulacija energetskog metabolizma u smislu optimalne preraspodele energetskih resursa između osnovnih, fizioloških funkcija neophodnih za rast i razvoj insekata, i mehanizama koji teže uspostavljanju homeostatskog stanja, što često uslovljava aktiviranje odbrambenih i detoksifikacionih sistema (Van Straalen i Hoffman, 2000; Calow, 1991). Indukcija i odvijanje ovih zaštitnih procesa zahteva značajnu potporu metaboličke energije koja se obezbeđuje alokacijom sa onih funkcija koje nisu esencijalne za preživljavanje, kao što su rast i razmnožavanje (Sokolova i sar., 2012). Dugotrajna ishrana relativno niskim koncentracijama benzo[*a*]pirena slično je uticala i na preživljavanje larvi obe ispitivane populacije u ovom eksperimentu, pri čemu je najveći mortalitet bio približno 15% (**Tabela 1**). Podaci o osetljivosti insekata i zglavkara na B[*a*]P i druge PAH prilično su retki i neusaglašeni. Indikativna je različita osetljivosti između različitih vrsta. Devetonedeljna ishrana sa benzo[*a*]pirenom, u koncentraciji od 316 µg/g suve mase hrane, smanjila je preživljavanje *Oniscus*

asellus i *P. scaber* (Isopoda) na 76%, odnosno 71%, i značajno usporila njihov rast, posebno kod *O. asellus* (Van Brummelen i Stuijzand, 1993). Araújo i sar. (2014) su konstatovali visoku smrtnost svih ispitivanih vodenih insekata iz familija– Limnephilidae, Chironomidae, Grypopterygidae i Hydrobiosidae, nakon primene različitih koncentracija smeše PAH (0,6-9,7 µg/L medijuma), i to posle samo 12 sati delovanja. Sa druge strane, akutna primena benzo[*a*]pirena u koncentraciji od 0,6 µg/L kod jedinki *A. aegypti* (Diptera) dovela je do niskog mortaliteta od 5,4% (Prud'homme i sar., 2017). Rezultati ove teze pokazuju da obe doze benzo[*a*]pirena dovode do značajnog smanjenja mase larvi petog larvenog stupnja (**Slika 37**), u obe populacije *L. dispar*, dok je produženo vreme razvića larvi zabeleženo samo kod populacije iz zagađene šume, i to pod uticajem niže doze B[*a*]P (**Slika 36**). Povećana ekspresija Hsp70 proteina u srednjem crevu i mozgu larvi, uz indukciju aktivnosti antioksidativnih (SOD i katalaza) i detoksifikacionih enzima (GST u crevu, i karboksilesteraza u mozgu) tokom ishrane sa benzo[*a*]pirenom, sigurno je negativno uticala na energetske balans larvi iz zagađene šume. Dugotrajno stanje povećanih energetske potreba, uslovljeno aktiviranjem kompenzatornih mehanizama u cilju smanjenja toksičnih efekta benzo[*a*]pirena, verovatno crpi energetske depoe larvi, u vidu lipida i glikogena, i smanjuje zapreminu masnog tela (Jeong i Cho, 2007). U uslovima kontinuiranog stresa, insekti često smanjuju unos hranljivih materija, što u aktuelnom eksperimentu može biti i aklimativna odlika kako bi se izbegla kontaminirana hrana (Toro i sar., 2003), čime se direktno ograničava i smanjuje raspoloživa količina nutrijenata, neophodnih u stanju povećane energetske potrošnje (Wang i sar., 2005b; Van Haren i sar., 1994). Osim toga, za molekule benzo[*a*]pirena karakteristično je da lako i neometano prolaze kroz ćelijske membrane, zahvaljujući svojoj nepolarnoj prirodi, pri čemu se u značajnoj meri koncentrišu u membranama ćelijskih organela, a posebno mitohondrijama, Goldžijevom aparatu i nukleusu (Miller i Ramos, 2001; Barhoumi i sar., 2000). Postoje indikacije da benzo[*a*]piren, i njegovi reaktivni metaboliti, direktno interferiraju u lanacu transporta elektrona, narušavajući energetske metabolizam i proizvodnju adenozin trifosfata (ATP) (Zhu i sar., 1995). Takođe, dugotrajno prisustvo organskog polutanta dovodi do akumulacije oštećenja membrana organela, funkcionalnih i strukturnih proteina, i generalne citotoksičnosti, pri čemu se redukuje i produkcija ATP (Sokolova i sar., 2012). Zbirno metaboličko stanje larvi u ovom eksperimentu sugeriše energetske deficit koji se ogleda u njihovoj smanjenoj masi, što je izvesno uzrok i produženog razvića larvi iz zagađene šume.

Za presvlačenje i prelazak larvi Lepidoptera u sledeći larveni stupanj, dostizanje određene mase je od kritičnog značaja jer predstavlja signal za prestanak lučenja juvenilnog hormona, i indukuje sintezu prorakotropnog hormona i ekdisteroida - hormona koji iniciraju i kontrolišu presvlačenje (Davidowitz i sar., 2003; Nijhout, 1981). Konstantan energetske disbalans i adaptivna alokacija resursa prema zahtevnim detoksifikacionim mehanizmima (Mouneyrac i sar., 2011) negativno su uticali na masu larvi iz zagađene šume čime se produžilo i vreme potrebno za dostizanje finalnog, petog larvenog stupnja. Populacija iz nezagađene šume nije trpela posledice koje se odražavaju na vreme razvića, u odnosu na kontrolnu grupu, iako pokazuje značajan pad mase larvi, nakon tretmana sa B[*a*]P. Aktiviranje odbrambenih sistema, posebno detoksifikacionih mehanizama, manje je izraženo kod ovih larvi i najveća količina energije bila je usmerena ka sintezi Hsp70 proteina u srednjem crevu. Produžena ekspresija Hsp70 povećava ionako visoku cenu produkcije proteina, koja zahteva gotovo petinu dostupnih zaliha ATP (Hand i Hardewing, 1996). Detektovani pad aktivnosti digestivnih enzima (tripsina i alkalnih fosfataza) u populaciji iz nezagađene šume, ukazuje na smanjenu efikasnost razlaganja i apsorpcije nutrijenata, a time i manju dostupnost molekula bogatih energijom kako za mobilizaciju tako i za skladištenje. Verovatno da su drugačije strategije adaptacije i/ili aklimacije ovih larvi, bez pre-tretmanskog kontakta sa polutantima, bile manje opterećenje za jedinke, tako da nema trade-off-a u pogledu dužine razvića. Treba istaći posebno svojstvo benzo[*a*]pirena da ispoljava značajan afinitet i interaguje sa ekdizonskim receptorom, indukujući nishodne procese od kojih je najvažniji presvlačenje u sledeći larveni stupanj (Oberdörster i sar., 1999). Remećenje endokrinih funkcija i presvlačenja u prisustvu B[*a*]P i drugih PAH primećeno je kod zglavkara *Callinectes sapidus*

(Decapode) (Mothershead i Hale, 1992; Weis i sar., 1992). Postoji mogućnost da je prisustvo benzo[a]pirena interferiralo sa metabolizmom i hormonskom odnosno endokrinom regulacijom presvlačenja larvi u aktuelnom eksperimentu, što se u kombinaciji sa različitim, verovatno nasleđenim mehanizmima modulacije toksičnih efekata polutanta, a zavisno od populacionog porekla, ispoljilo u različitoj meri na osobine fitnesa.

Pripadnost benzo[a]pirena grupi endokrinih disruptora u priličnoj meri uslovljava, za njih karakteristični dozno-nezavisni odgovor relativne brzine rasta (Lagarde i sar., 2015; Lintelmann i sar., 2003), kao što je bio slučaj i za više ispitanih parametara u okviru ove disertacije. Manja koncentracija B[a]P (5 ng/g suve mase hrane) značajno je smanjila brzinu rasta larvi, dok veća koncentracija (50 ng/g suve mase hrane) nije izazvala promene u ovoj osobini fitnesa. Ovo je bio slučaj kod obe ispitane populacije *L. dispar*. Ovakav obrazac, hormoni-sličnih promena u masi i brzini rasta larvi *L. dispar* zabeležili su Ilijin i sar. (2015) i Mrdaković i sar. (2015), tokom hroničnog tretmana sa B[a]P, odnosno fluorantenom, koji su dodavani u dijetu. Autori takođe ističu mogućnost da produženo dejstvo viših koncentracija PAH u nekom momentu aktivira druge, sofisticiranije i efikasnije mehanizme odbrane, koji troše manje metaboličke energije i ostvaruju manje negativnih efekata na osobine fitnesa larvi. Moguće je da molekuli benzo[a]pirena u većoj koncentraciji pokazuju sklonost ka međusobnoj interakciji i agregaciji što može indukovati mehanizme sekvestracije kod Lepidoptera, kojima se povećava efikasnost njihove ekskrecije i značajno se smanjuje toksični uticaj (Despres i sar., 2007; Nishida, 2002). Ovakva strategija bi obezbedila manja energetska ulaganja za zaštitu od benzo[a]pirena i verovatno neometanu brzinu rasta larvi. Populacija larvi *L. dispar* iz zagađene šume pokazuje veći stepen aktiviranja antioksidativnih i detoksifikacionih sistema što se ogleda u izraženijem trade-off-u ispitanih osobina fitnesa. U ovom pogledu, odgovori pojedinačnih biohemijskih parametara ostvaruju u određenoj meri odgovarajuću ekstrapolaciju ka višem nivou biološke organizacije. Uočava se da su razlike u odgovoru osobina fitnesa veoma male između dve populacije larvi obzirom na različite pre-tretmanske istorije tj. kontakte sa polutantima. Do istih zaključaka došli su i Kovatch i sar. (2000) ispitivanjem fitnesa tri populacije *Microarthridion littorale* (Harpacticoida) koje je odlikovalo različito poreklo – jedna je uzeta iz nezagađene sredine, dok su druge dve populacije prikupljene sa lokacije opterećene PAH i lokacije zagađene kombinacijom metala i PAH. Nakon četrnaest dana izlaganja *M. littorale* sedimentu sa visokom koncentracijom PAH i metala, nađeno je da nema nikakvih razlika u osobinama fitnesa između tri populacije zglavkara, iako su detektovane izuzetne genetičke diferencijacije kod populacija sa višegeneracijskim kontaktom sa polutantima u odnosu na populaciju sa nezagađenog lokaliteta. Osobine fitnesa larvi *L. dispar* iz aktuelnog eksperimenta, pokazuju prilično uniforman odgovor na dejstvo relativno niskih koncentracija benzo[a]pirena, zbog čega potencijalno mogu biti veoma korisne u studijama biomonitoringa životne sredine.

6. ZAKLJUČCI

- ❖ Populacije gubara *Lymantria dispar* koje potiču iz nezagađene šume (lokalitet koja pripada Nacionalnom parku Đerdap) i iz zagađene šume (lokalitet Bor, u blizini Rudarsko topioničarskog basena Bor D.O.O.) pokazale su različitu tkivnu specifičnost i osetljivost na hronični tretman dvema koncentracijama benzo[a]pirena (B[a]P) koje su dodate u veštačku dijetu za ovu vrstu.
- ❖ U tkivima srednjeg creva larvi iz nezagađene šume koje su tretirane benzo[a]pirenom, katalazna aktivnost je bila smanjena, dok je kod jedinki poreklom iz zagađene šume koje su generacijama bile izložene antropogenim zagađivačima, aktivnost superoksid dismutaze i katalaze značajno indukovana u srednjem crevu, posle tretmana benzo[a]pirenom.
- ❖ U hemolimfi larvi poreklom iz nezagađene šume ispitivani antioksidativni enzimi su pokazali visoku osetljivost, što je moguća posledica njihove nedovoljne ekspresije u srednjem crevu, u odnosu na proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika posle tretmana benzo[a]pirenom. Izostanak promene aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze u hemolimfi larvi iz zagađene šume može biti u vezi sa povišenom ekspresijom enzima antioksidativne zaštite u srednjem crevu.
- ❖ Hronično izlaganje benzo[a]pirenu formira različite obrasce ekspresije karboksilesteraza, u zavisnosti od tkivne specifičnosti i populacionog porekla larvi *L. dispar*. Intoksikacija benzo[a]pirenom je bila u korelaciji sa povećanom aktivnošću karboksilesteraza srednjeg creva larvi iz nezagađene populacije. Kod larvi iz zagađene šume, analizom elektroforetskog profila registrovano je prisustvo jedne izoforme karboksilesteraza u srednjem crevu koja nije prisutna u prethodno pomenutoj populaciji. Ovo može biti potencijalni pokazatelj prisustva B[a]P u šumskim ekosistemima.
- ❖ Odgovor karboksilesteraza u mozga larvi *L. dispar* detektovan je u vidu povećanja enzimske aktivnosti, samo na nižoj koncentraciji B[a]P, u populaciji iz zagađene šume.
- ❖ Ni u jednoj od ispitivanih populacija, B[a]P nije značajno uticao na aktivnost acetilholinesteraze u mozgu larvi. Moguće je da primenjene koncentracije B[a]P nisu bile dovoljno visoke da modifikuju njenu aktivnost tj. afinitet samog enzima prema B[a]P supstratu je bio niži.
- ❖ Larve iz zagađene šume odlikuje značajno povećanje specifične aktivnosti glutation S-transferaza u srednjem crevu, dok u populaciji larvi iz nezagađene šume nisu zabeležene promene u aktivnosti ovih enzima. Istaknuta primarna, detoksifikaciona funkcija GST, zajedno sa sekundarnom ulogom koju ostvaruju u regulaciji oksidativnog stresa, sugeriše veći stepen metabolizma i uklanjanja B[a]P, specifičan za populaciju *L. dispar* iz zagađene šume, što može biti dobar pokazatelj hroničnog prisustva ovog PAH u zagađenim šumama.
- ❖ Hronična ishrana *L. dispar* dijetom u koju je dodat B[a]P, najveći negativni uticaj ostvaruje u srednjem crevu, što pokazuje i izrazito dozno-zavisno povećanje ekspresije proteina Hsp70 u ovom tkivu. U obe, analizirane, kontrolne grupe u ovom eksperimentu prisustvo Hsp70 je jedva detektibilno, tako da se B[a]P uzrokovana proteotoksičnost, jasno uočava preko visoke ekspresije Hsp70.
- ❖ Različit obrazac ekspresije Hsp70 u mozgu larvi je očekivan, obzirom na tkivnu distribuciju B[a]P i metaboličku aktivnost ovog organa. Tretman nižom koncentracijom indukovao je povećanje ekspresije Hsp70, i to samo kod larvi populacije zagađene šume, što može biti posledica prirode B[a]P. Ovaj polutant spada u grupu jedinjenja endokrinih disruptora, za koju je karakteristično izazivanje dozno-nezavisnog odgovora.

Zaključci

- ❖ Dugotrajna ishrana dijetom sa dodatkom B[a]P indukovala je pad aktivnosti tripsina i leucin aminopeptidaze u srednjem crevu. Inhibitorni efekat, obe doze ovog polutanta značajan je u slučaju tripsina i to kod populacije larvi iz nezagađene šume. Inhibicija aktivnosti ovih proteaza, je adaptivni odgovor dve populacije *L. dispar* na dugotrajnu ishranu ovim ksenobiotikom.
- ❖ Niža koncentracija B[a]P u hrani je imala inhibitorni efekat na aktivnost alkalnih fosfataza kod larvi populacije *L. dispar* iz nezagađene šume. Aktivnost kiselih fosfataza je bila manje osetljiva na B[a]P-indukovanu toksičnost u odnosu na alkalne fosfataze. Funkcija ovih enzima nije značajno promenjena kod populacije larvi iz zagađene šume, verovatno zbog generacijski formiranih adaptacija na prisustvo polutanata.
- ❖ Obe ispitivane populacije *L. dispar* pokazuju povećanje specifične aktivnosti lipaza u srednjem crevu nakon tretmana B[a]P, dok je aktivnost α -glukozidaza ostala nepromenjena. Dugotrajna ishrana larvi iz nezagađene šume dijetom sa dodatkom B[a]P nije imala uticaja na koncentraciju trehaloze u hemolmfi larvi, ali je koncentracija lipida nakon tretmana većom dozom bila značajno niža. U populaciji larvi iz zagađene šume nema promena u ukupnom sadržaju energetskih molekula u hemolimfi. Dobijeni rezultat sugerise da je aktiviranje lipidnog katabolizma kao dominantnog izvora metaboličke energije, deo adaptivnog odgovora kod larvi nezagađene populacije na hronično stanje stresa izazvano B[a]P, na uštrb korišćenja glikogenskih rezervi.
- ❖ Niža koncentracija B[a]P je u većom meri uticala na preživljavanje larvi poreklom iz zagađene šume, dok se broj larvi poreklom iz nezagađene šume zanemarljivo promenio. Primena 50 ng B[a]P/g suve mase hrane smanjila je stopu preživljavanja larvi ispod 90% u populaciji *L. dispar* poreklom iz nezagađene šume, što nije bio slučaj sa zagađenom populacijom.
- ❖ Obe koncentracije B[a]P dovode do značajnog smanjenja masa larvi petog larvenog stupnja, u obe populacije *L. dispar*, dok je produženo razviće larvi zabeleženo samo kod onih poreklom iz zagađene šume, i to pod uticajem niže doze B[a]P. Relativna brzina rasta značajno je smanjena u obe populacije larvi jedino pod uticajem B[a]P u koncentraciji od 5 ng/g suve mase hrane u odnosu na kontrolu. Ukupno metaboličko stanje larvi u ovom eksperimentu sugerise energetski deficit koji se ogleda u njihovoj smanjenoj masi, što je izvesno uzrok i produženog razvića larvi iz zagađene šume.
- ❖ Analiza IBR indeksa pokazala je da set detoksifikacionih enzima i set digestivnih enzima pokazuju jasno dozno-zavisno povećanje IBR indeksa u obe populacije larvi, tako da imaju dobar potencijal za detekciju hroničnog zagađenja B[a]P, nezavisno od porekla larvi. Takođe, dve baterije biomarkera - enzimi antioksidativne odbrane i parametri fitnesa larvi, karakterise izrazit dozno-nezavisni rast IBR indeksa, kod obe populacije larvi, zbog čega nisu dobri kandidati za primenu u biomonitoringu zagađenja ovim ksenobiotikom.
- ❖ Upečatljivo je za populaciju larvi iz nezagađene šume da pokazuje veće razlike u vrednostima IBR indeksa, posle različitih tretmana sa benzo[a]pirenom i to kod svih ispitanih baterija biomarkera, što može biti značajan pokazatelj razlika u osetljivosti odgovora populacija *L. dispar* koje su različitog porekla.

7. LITERATURA

- Adamo, S.A., Linn, C.E., Hoy, R.R., 1995. The role of neurohormonal octopamine during 'fight or flight' behaviour in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.* 198, 1691–1700.
- Aebi, H.E., 1983. Catalase, in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol 3. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Florida, pp. 273–286.
- Ahmad, S., Pardini, R.S., 1990a. Antioxidant defense of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*: Enzymatic responses to the superoxide-generating flavonoid, quercetin, and photodynamic furanocoumarin, xanthotoxin. *Photochem. Photobiol.* 51, 305-311.
- Ahmad, S., Pardini, R.S., 1990b. Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 401-413.
- Ahmad, S., Pritsos, C.A., Bowen, S.M., Heisler, C.R., Blomquist, G.J., Pardini, R.S., 1988. Antioxidant enzymes of larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*: subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase. *Free Radic. Res. Commun.* 4, 403–408.
- Ahmad, S., 1995. Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins, in: Ahmad, S. (Ed.), *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Chapman and Hall, New York, pp. 238-272.
- Ahmad, S., 1992. Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 269–296.
- Ahammad-Sahib, K.I., Hollingworth, R.M., Whalon, M.E., Ioannidis, P.M., Grafius, E.J., 1994. Polysubstrate monooxygenases and other xenobiotic-metabolizing enzymes in susceptible and resistant colorado potato beetle. *Pestic. Biochem. Phys.* 49, 1-12.
- Aidells, B., Lockshin, R.A., Cullin, A.M., 1971. Breakdown of the silk glands of *Galleria mellonella* - acid phosphatase in involuting glands. *J. Insect Physiol.* 17, 857–869.
- Aït-Aïssa, S., Porcher, J.M., Arrigo, A.P., Lambré, C., 2000. Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: elationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* 145, 147–157.
- Akerman, G.S., Rosenzweig, B.A., Domon, O.E., McGarrity, L.J., Blankenship, L.R., Tsai, C.A., Culp, S.J., Mac Gregor, J.T., Sistare, F.D., Chen, J.J., Morris, S.M., 2004. Gene expression profiles and genetic damage in benzo[*a*]pyrene diol epoxide-exposed TK6 cells. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* 549, 43-64.
- Alagić, S., Stankov-Jovanović, V., Mitić, V., Cvetković, J., Petrović, G., Stojanović, G. 2016. Bioaccumulation of HMW PAHs in the roots of wild blackberry from the Bor region (Serbia): phytoremediation and biomonitoring aspects. *Sci. Total Environ.* 562, 561-570.
- Allen, S.L., Misch, M.S., Morrison, B.M., 1963. Variations in the electrophoretically separated acid phosphatases of *Tetrahymena*. *J. Histochem. Cytochem.* 11, 706–719.
- Alfani, A., Maisto, G., Prati, M.V., Baldantoni, D., 2001. Leaves of *Quercus ilex* L. as biomonitors of PAHs in the air of Naples (Italy). *Atmos. Environ.* 35, 3553–3559.
- Altuntaş, H., 2015. Effects of ethephon on the hemolymph metabolites of the greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Physica Polonica* 128, B-182-183.
- Amlabu, E., Nok, A., Sallau, A.B., 2009. Purification and biochemical characterization of lysosomal acid phosphatases (EC 3.1.3.2) from blood stream forms, *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol. Int.* 58, 238–242.

- Angelucci, F., Baiocco, P., Brunori, M., Gourlay, L., Morea, V., Bellelli, A., 2005. Insights into the catalytic mechanism of glutathione S-transferase: The lesson from *Schistosoma haematobium*. *Structure* 13, 1241–1246.
- Araújo, C.V.M., Moreira-Santos, M., Sousa, J.P., Ochoa-Herrera, V., Encalada, A.C., Ribeiro, R., 2014. Contaminants as habitat disturbers: PAH-driven drift by Andean paramo stream insects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 89–94.
- Araújo, R.A., Guedes, R.N.C., Oliveira, M.G.A., Ferreira, G.H., 2008. Enhanced activity of carbohydrate and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Bull. Entomol. Res.* 98, 417–424.
- Arreguín-Espinosa, R., Arreguín, B., González, C., 2000. Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 239–244.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L., 2010. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207–225.
- ATSDR, n.d. Agency for toxic substances and disease registry [WWW Document]. ATSDR 2017 Subst. Prior. List. URL <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>
- Avigliano, L., Fassiano, A.V., Medesani, D.A., Ríos de Molina, M.C., Rodríguez, E.M., 2014. Effects of glyphosate on growth rate, metabolic rate and energy reserves of early juvenile crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *M. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 631–635.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280–292.
- Azuma, M., Eguchi, M., 1989. Discrete localization of distinct alkaline phosphatase isozymes in the cell surface of silkworm midgut epithelium. *J. Exp. Zool.* 251, 108–112.
- Badhan, A.K., Chadha, B.S., Kaur, J., Saini, H.S., Bhat, M.K., 2007. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI387099. *Bioresour. Technol.* 98, 504–510.
- Badiou-Bénéteau, A., Benneveau, A., Géret, F., Delatte, H., Becker, N., Brunet, J.L., Reynaud, B., Belzunces, L.P., 2013. Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environ. Int.* 60, 31–41.
- Badiou-Bénéteau, A., Carvalho, S.M., Brunet, J.L., Carvalho, G.A., Buleté, A., Giroud, B., Belzunces, L.P., 2012. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 82, 22–31.
- Badiou, A., Meled, M., Belzunces, L.P., 2008. Honey bee *Apis mellifera* acetylcholinesterase—a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 69, 246–253.
- Baker, J.E., 1991. Properties of glycosidases from the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Insect Biochem.* 21, 615–621.
- Balu, N., Padgett, W.T., Nelson, G.B., Lambert, G.R., Ross, J.A., Nesnow, S., 2006. Benzo[a]pyrene-7,8-quinone-3'-mononucleotide adduct standards for 32P postlabeling analyses: detection of benzo[a]pyrene-7,8-quinone-calf thymus DNA adducts. *Anal. Biochem.* 355, 213–223.

- Banasiewicz, M., Nelson, G., Swank, A., Grubor, N., Ross, J., Nesnow, S., Köfeler, H., Small, G.J., Jankowiak, R., 2004. Identification and quantitation of benzo[a]pyrene derived DNA adducts formed at low adduction level in mice lung tissue. *Anal. Biochem.* 334, 390–400.
- Bang, H.W., Lee, W., Kwak, I.S., 2009. Detecting points as developmental delay based on the life-history development and urosome deformity of the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus sensu lato*, following exposure to benzo[a]pyrene. *Chemosphere* 76, 1435-1439.
- Banni, M., Negri, A., Dagnino, A., Jebali, J., Ameer, S., Bousetta, H., 2010. Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 842–848.
- Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escale, M., Prat, N., Porte, C., 2005. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricopter larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquat. Toxicol.* 74, 3–19.
- Barbehenn, R.V., Bumgarner, S.L., Roosen, E.F., Martin, M.M., 2001. Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *J. Insect Physiol.* 47, 349-357.
- Barhoumi, R., Mouneimne, Y., Ramos, K.S., Safe, S.H., Phillips, T.D., Centonze, V.E., Ainley, C., Gupta, M.S., Burghardt, R.C., 2000. Analysis of benzo[a]pyrene partitioning and cellular homeostasis in a rat liver cell line. *Toxicol. Sci.* 53, 264–270.
- Bari, M.A., Baumbach, G., Kuch, B., Scheffknecht, G., 2010. Air Pollution in Residential Areas from Wood-fired Heating. *Aerosol Air Qual. Res.* 11, 749-757.
- Basiouny, A.L., Hamadah, Kh.Sh., Tanani, M.A., 2010. Efficacy of the wild plant *Fagonia bruguieri* (Zygophyllaceae) on acid and alkaline phosphatase activities in the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.* 2, 1–10.
- Bell, R.A., Owens, C.D., Shapiro, M., Tardif, J.R., 1981. Mass rearing and virus production, in: Doane, C.C., McManus, M.L. (Eds.), *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management*. USDA, Washington, 599–655.
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322.
- Berglind, L., 1982. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial discharges and other aqueous effluents. Oslo, Central Institute for Industrial Research (Nordic PAH Project, Report No. 16), 21 pp.
- Bierkens, J.G.E.A., 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology* 153, 61–72.
- Bihari, N., Batel, R., Zahn, R.K., 1990. DNA damage determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene and 4-nitroquinoline-N-oxide. *Aquat. Toxicol.* 18, 13-22.
- Blagojević, D., Grubor-Lajšić, G., 2000. Multifunctionality of antioxidant system in insects. *Arch. Biol. Sci.* 52, 185-194.
- Bouchard, J., Bouchard-Madrell, C., 2000. Lesions provoquées chez le criquet *Gomphocerus sibiricus* par l'absorption de benzo[a]pyrene et de 3-méthylcholanthrene. *Ann. Sci. Nat.* 21, 119–136.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brammell, B.F., Price, D.J., Birge, W.L., Elskus, A.A., 2004. Apparent lack of CYP1A response to high PCB body burdens in fish from a chronically contaminated PCB site. *Mar. Environ. Res.* 58, 251–255.
- Broadway, R.M., 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 855–874.
- Callaghan, A., Parker, P.J.A.N., Holloway, G.J., 1998. The use of variance in enzyme activity as an indicator of long-term exposure to toxicant-stressed environments in *Culex pipiens* mosquitoes. *Funct. Ecol.* 12, 436–441.
- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 100, 3-6.
- Calow, P. 1989. Physiological ecotoxicology: theory, practice and application, in: Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen, F. (Eds.), *Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology*. Conference Organizing Committee, Lyngby, Denmark, pp. 23-25.
- Calvo-Marzal, P., Rosatto, S.S., Granjeiro, P.A., Aoyama, H., Kubota, L.T., 2001. Electroanalytical determination of acid phosphatase activity by monitoring *p*-nitrophenol. *Anal. Chim. Acta* 441, 207–214.
- Chakravarti, D., Venugopal, D., Mailander, P.C., Meza, J.L., Higginbotham, S., Cavalieri, E.L., Rogan, E.G., 2008. The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutat. Res.* 649, 161–178.
- Charron, L., Geffard, O., Chaumot, A., Coulaud, R., Queau, H., Geffard, A., Dedourge-Geffard, O., 2013. Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12, 9044-9056.
- Chen, J.H., Chou, F.P., Lin, H.H., Wang, C.J., 2005. Gaseous nitrogen oxide repressed benzo[*a*]pyrene-induced human lung fibroblast cell apoptosis via inhibiting JNK1 signals. *Arch. Toxicol.* 79, 694–704.
- Cheung, C.C.C., Siu, W.H.L., Richardson, B.J., De Luca-Abbott, Ska.B., Lam, P.K.S., 2004. Antioxidant responses to benzo[*a*]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environ. Pollut.* 128, 393–403.
- Cheung, W.W.K., Low, K.W., 1975. Ultrastructural and functional differentiation of the midgut of the sugar cane beetle, *Protaetia acuminata* (F.) (Coleoptera:Cetoniidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 4, 349–361.
- Choi, J., Roche, H., Caquet, T., 2001. Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 130, 11–17.
- Chougule, N.P., Doyle, E., Fitches, E., Gatehouse, J.A., 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *J. Insect Physiol.* 54, 563–572.

- Christeller, J.T., Amara S., Carrière, F., 2011. Galactolipase, phospholipase and triacylglycerol lipase activities in the midgut of six species of lepidopteran larvae feeding on different lipid diets. *J. Insect Physiol.* 57, 1232–1239.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity, in: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, 283–284.
- Coppin, C.W., Jackson, C.J., Sutherland, T., Hart, P.J., Devonshire, A.L., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 2012. Testing the evolvability of an insect carboxylesterase for the detoxification of synthetic pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 343–352.
- Crava, C.M., Bel, Y., Lee, S.F., Manachini, B., Heckel, D.G., Esviche, B., 2010. Study of the aminopeptidase N gene family in the lepidopterans *Ostrinia nubilalis* (Hubner) and *Bombyx mori* (L.): Sequence mapping and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 506–515.
- Dauterman, W.C., Hodgson, E., 1978. Detoxification mechanisms in insects, in: Rockstein, M. (Ed.), *Biochemistry of insects*. Academic Press, New York, pp. 541–577.
- Davidowitz, G., D'Amico, J.L., Nijhout, H.F., 2003. Critical weight in the development of insect body size. *Evol. Dev.* 5, 188–197.
- De Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Martinez, G.R., Miyamoto, S., Onuki, J., Barbosa, L.F., Garcia, C.C.M., Prado, F.M., Ronsein, G.E., Sigolo, C.A., Barbosa Brochini, C., Martins, A.M.G., Gennari de Medeiros, M.H., Di Mascio, P., 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 146, 588–600.
- Denlinger, D.L., 1991. Relationship between cold hardiness and diapause, in: Lee, R.E., Denlinger, D.L. (Ed.), *Insects at Low Temperature*. New York: Chapman and Hall, pp. 174–198.
- Despres, L., David, J.-P., Gallet, C., 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals - a review. *Trends Ecol. Evol.* 22, 298–307.
- Dettloff, M., Wittwer, D., Weise, C., Wiesner, A., 2001. Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell Tissue Res.* 306, 449–458.
- De Veau, E.J.I., Schultz, J.C., 1992. Reassessment of interaction between gut detergents and tannins in Lepidoptera and significance for gypsy moth larvae. *J. Chem. Ecol.* 18, 1437–1453.
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., Pain-Devin, S., 2014. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 2448–2454.
- Devonshire, A.L., Moores, G.D., 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pest. Biochem. Phys.* 18, 235–246.
- Diaz, P., Prim, N., Pastor, F.I.J., 1999. Direct Fluorescence-Based Lipase Activity Assay. *BioTechniques*, 27, 696–700.
- Diplock, A.T., 1994. Antioxidants and disease prevention. *Mol. Aspects Med.* 15, 293–376.
- Doganlar, O., Doganlar, Z.B., 2015. Responses of antioxidant enzymes and heat shock proteins in *Drosophila* to treatment with a pesticide mixture. *Arch. Biol. Sci.* 67, 869–876.

- Dow, J.A.T., 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19, 187-328.
- Dubovskiy, I.M., Grizanova, E.V., Ershova, N.S., Rantala, M.J., Glupov, V.V., 2011. The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Chemosphere* 85, 92–96.
- Dubovskiy, I.M., Slyamova, N.D., Kryukov, V.Y., Yaroslavtseva, O.N., Levchenko, M.V., Belgibaeva, A.B., Adilkhankyzy, A., Glupov, V.V., 2012. The activity of nonspecific esterases and glutathione-S-transferase in *Locusta migratoria* larvae infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales). *Entomol. Rev.* 92, 27–31.
- Dubovskiy, I.M., Martemyanov, V.V., Vorontsova, Y.L., Rantala, M.J., Gryzanova, E.V., Glupov, V.V., 2008. Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 148, 1-5.
- Du, J., Li, Y., Huang, Z.C., You, J., 2014. Chronic toxicity thresholds for sediment-associated benzo[a]pyrene in the midge (*Chironomus dilutus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 370-378.
- Edwards, N.T., 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment - a review. *J. Environ. Qual.* 12, 427-441.
- Eguchi, M., 1995. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 111, 151–162.
- Ellman, G.L., Courtney, K.O., Anders, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Eling, T., Curtis, J., Battista, J., Marnett, L.J., 1986. Oxidation of (+)-7,8-dihydroxy-7,8-dihydro benzo[a]pyrene by mouse keratinocytes: evidence for peroxy radical and monooxygenase-dependent metabolism. *Carcinogenesis* 7, 1957–1963.
- Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O., Cogun, H.Y., 2013. Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106, 371-377.
- Erlanger, B.F., Kokowski, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271–278.
- Even, N., Devaud, J.-M., Barron, A., 2012. General stress responses in the honey Bee. *Insects*, 3, 1271–1298.
- Farcy, E., Burgeot, T., Haberkorn, H., Auffret, M., Lagadic, L., Allenou, J.P., Budzinski, H., Mazzella, N., Pete, R., Heydorff, M., Menard, D., Mondeguer, M., Menard, D., Mondeguer, F., Caquet, T., 2013. An integrated environmental approach to investigate biomarker fluctuations in the blue mussel *Mytilus edulis* L. in the Vilaine estuary, France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 630–650.
- Farrar, R.R., Barbour, J.D., Kennedy, G.G., 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82, 593-598.
- Ferreira, C., Terra, W.R., 1980. Intracellular distribution of hydrolases in midgut caeca cells from an insect with emphasis on plasma membrane-bound enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 66, 467–473.

- Fields, P.E., Woodring, J.P., 1991. Octopamine mobilization of lipids and carbohydrates in the house cricket *Acheta domesticus*. *J. Insect Physiol.* 37, 193–199.
- Filipović, A., Mrdaković, M., Ilijin, L., Vlahović, M., Todorović, D., Grčić, A., Perić-Mataruga, V., 2019. Effect of fluoranthene on antioxidative defense in different tissues of *Lymantria dispar* and *Euproctis chrysorrhoea* larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 224, 108565.
- Forbes, V.E., Calow, P., 1996. Costs of living with contaminants: implications for assessing low-level exposures. *Belle Newsletter* 4, 3.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272–280.
- Fournier, D., Maturano, M., Gagnoux, L., Ziliani, P., Pertuy, C., Pralavorio, M., Bride, J.-M., Elmarbouh, L., Klæbe, A., Masson, P., 1995. Insect Acetylcholinesterase and Resistance to Insecticides, in: Quinn, D.M., Balasubramanian, A.S., Doctor, B.P., Taylor, P. (Eds.), *Enzymes of the Cholinesterase Family*. Springer, Boston, MA, pp. 149-153.
- Freeman, M.L., Borrelli, M.J., Meredith, M.J., Lepock, J.R., 1999. On the path to the heat shock response: destabilization and formation of partially folded protein intermediates, a consequence of protein thiol modification. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 737–745.
- Gao, B., Wang, X., Zhao, X., Ding, X., Fu, X., Zhang, Y., He, Q., Zhang, Z., Liu, T., Huang, Z., Chen, L., Peng, Y., Guo, H., 2015. Source apportionment of atmospheric PAHs and their toxicity using PMF: impact of gas/particle partitioning. *Atmos. Environ.* 103, 114-120.
- Gavrilović, A., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Mrkonja, A., Matić, D., Perić-Mataruga, V., 2017. Effects of benzo[a]pyrene dietary intake to antioxidative enzymes of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae from unpolluted and polluted forests. *Chemosphere* 179, 10–19.
- Gelboin, H.V., 1980. Benzo[a]pyrene Metabolism, Activation, and Carcinogenesis: Role and Regulation of Mixed-Function Oxidases and Related Enzymes. *Physiol. Rev.* 60, 1107–1166.
- Glatzle, D., Vuilleumier, J.P., Weber, F., Decker, K., 1974. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of riboflavin status in humans. *Experientia* 30, 665-667.
- Golovanova, I.L., Chuiko, G.M., Pavlov, D.F., 1994. Effects of cadmium, naphthalene and DDVP on gut carbohydrases activity in bream (*Abramis brama* L.) and Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 338-345.
- Grau, P.A., Terriere, L.C., 1971. Fatty acid profile of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the effect of diet and rearing conditions. *J. Insect Physiol.* 17, 1637-1649.
- Gravato, C., Guilhermino, L., 2009. Effects of benzo[a]pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, Growth and Behavior. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 121–137.
- Grčić, A., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Filipović, A., Đurašević, S., Perić-Mataruga, V., 2019. Benzo[a]pyrene-induced changes in carboxylesterase, acetylcholinesterase and heat shock protein 70 of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) from unpolluted and polluted forests. *Arch Biol Sci.* 71, 735-745.

- Grintzalis, K., Georgiou, C.D., Dailianis, S., 2012. Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels. *Mar. Environ. Res.* 81, 26-34.
- Guerreiro, C.B.B., Horalek, J., de Leeuw, F., Couvidat, F., 2016. Benzo[a]pyrene in Europe: Ambient air concentrations, population exposure and health effects. *Environ. Pollut.* 214, 657-667.
- Gunning, R.V., Moores, G.D., Devonshire, A.L., 1996. Esterases and esfenvalerate resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hübner) Lepidoptera: Noctuidae. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54, 12–23.
- Guo, Y., Wu, K., Huo, X., Xu, X., 2011. Sources, distribution and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Environ. Health* 73, 22–25.
- Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far: a minireview. *Life Sci.* 86, 377–384.
- Ha, M.H., Choi, J., 2009. Effects of environmental contaminants on hemoglobin gene expression in *Daphnia magna*: a potential biomarker for freshwater quality monitoring. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 330-337.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hahn, M.E., 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* 141, 131–160
- Hallstrom, I., Grafstrom, R., 1981. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fraction of *Drosophila melanogaster*. II. Enzyme induction and metabolism of benzo[a]pyrene. *Chem.-Biol. Interact.* 34, 145-159.
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., Moodya, A.J., Jones, M.B., 2010. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere* 78, 779–784.
- Hand, S.C., Hardewig, I., 1996. Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 539-563.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol.* 45, 51-88.
- Hemingway, J., Hawkes, N., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34, 653-665.
- He, S.X., Nicholson, R.A., Law, F.C.P., 1998. Benzo[a]pyrene toxicokinetics in the cricket following injection into the haemolymph. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6, 81-89.
- Hightower, L.E., Sadis, S.E., Takenaka, I.M., 1994. In teractions of vertebrate hsc70 and hsp70 with unfolded proteins and peptides, in: Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (Eds.), *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 179–207.
- Holtzman, E., 1989. Historical fragments; methods; some terminology, in: *Lysosomes*. Springer US, Boston, MA, pp. 1–24.

- Horne, I., Haritos, V.S., Oakeshott, J.G., 2009. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 547–567.
- Hou, J., You, G., Xu, Y., Wang, C., Wang, P., Miao, L., Dai, S., Lv, B., Yang, Y., 2016. Antioxidant enzyme activities as biomarkers of fluvial biofilm to ZnO NPs ecotoxicity and the Integrated Biomarker Responses (IBR) assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, 10–17.
- Howsam, M., Jones, K.C., Ineson, P., 2000. PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species, I – Concentrations and profiles. *Environ. Pollut.* 18, 413–424.
- Howsam, M., Jones, K.C., Ineson, P., 2001. PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. II : uptake during a growing season. *Chemosphere* 44, 155–164.
- Hyne, R.V., Maher, W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 366–374.
- IARC, 2012. Chemical Agents and Related Occupations, in: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 100F, pp. 111–138.
- IARC, 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, in: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 92. pp. 1–853.
- Ilijin, L., Mrdaković, M., Todorović, D., Vlahović, M., Gavrilović, A., Mrkonja, A., Perić-Mataruga, V., 2015. Life history traits and the activity of antioxidative enzymes in *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Lymantriidae) larvae exposed to benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 2618–2624.
- Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Matić, D., Gavrilović, A., Mrkonja, A., Perić-Mataruga, V., 2017. Acetylcholinesterase and heat shock protein 70 response in larval brain tissue of *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, *Limntriidae*) upon chronic exposure to benzo[a]pyrene. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 20818–20823.
- Janda, V., 1987. Beitrag zur Stoffwechsel physiologie der insekten metamorphose. Skripta Fakultatis Scientia Naturalis, University of Purkyne, Brno. 17, 515–530.
- Jeong, W.G., Cho, S.M., 2007. Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 265, 343–350.
- Jett, D.A., Navoa, R.V., Lyons, M.A. Jr., 1999. Additive inhibitory actions of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicol. Lett.* 105, 223–229.
- Jiao, S., Liu, B., Gao, A., Ye, M., Jia, X., Zhang, F., Liu, H., Shi, X., Huang, C., 2008. Benzo[a]pyrene-caused increased G1-S transition requires the activation of c-Jun through p53-dependent PI-3K/Akt/ERK pathway in human embryo lung fibroblasts. *Toxicol. Lett.* 178, 167–175.
- Jifa, W., Zhiming, Y., Xiuxiana, S., You, W., 2006. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 230–236.

- Johnson, E.C., White, M.P., 2009. Stressed-out insects: Hormonal actions and behavioral modifications and hormonal actions, in: Pfaff, D.W., Parnold, A., Metgen, A., Efahrbach, S., Trubin, R. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior* (2nd edition), Vol 2 Academic Press. pp 1069–1097.
- Jones, B.R., Bancroft, 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.
- Kang, J.J., Fang, H.W., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 367–369.
- Kapin, M.A., Ahmad, S., 1980. Esterases in larval tissues of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.): Optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem.* 10, 331-337.
- Karnovsky, M.J., Roots, L.A., 1964. Direct coloring thiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 219-21.
- Kaviraj, A., Unlu, E., Gupta, A., El Nemr, A., 2014. Biomarkers of environmental pollutants. *Biomed. Res. Int.* 806598.
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.D., Abramo, K.H., Levin, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ. Health Perspect.* 106, 375-84.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Perspect.* 49, 59-69.
- Kim, K.B., Lee, B.M., 1997. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo[a]pyrene. *Cancer Lett.* 113, 205–212.
- Kim, W.K., Lee, S.K., Jung, J., 2010. Integrated assessment of biomarker responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to perfluorinated organic compounds. *J. Hazard. Mater.* 180, 395-400.
- Köhler, H.R., Knödler, C., Zanger, M., 1999. Divergent kinetics of hsp70 induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B[a]P, PCB52, *g*-HCH, PCP): suitability and limits of a biomarker. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 179–185.
- Kovatch, C.E., Schizas, N.V., Chandler, G.T., Coull, B.C., Quattro, J.M., 2000. Tolerance and genetic relatedness of three meiobenthic copepod populations exposed to sediment-associated contaminant mixtures: Role of environmental history. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 912–919.
- Krebs, R.A., Holbrook, S.H., 2001. Reduced enzyme activity following Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 39, 73-82.
- Krishnan, N., Kodrík, D., 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *J. Insect Physiol.* 52, 11-20.
- Kumi, C.O., Nicholson, R.A., Law, F.C.P., 1991. Absorption, degradation and excretion of benzo[a]pyrene in the cricket (*Acheta domestica*). *Xenobiotica* 21, 1357.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S.M., Belzunces, L.P., Emond, C., Guerbet, M., Rousselle, C., 2015. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ. Health* 14, 13.
- Lance, D.R., 1983. Host-seeking behavior of the gypsy moth: the influence of polyphagy and highly apparent and apparent host plants, in: Ahmad, S. (Ed.), *Herbivorous Insect. Host-Seeking Behavior and Mechanisms*. Academic Press, New York, pp. 201–204.
- Lavariás, S., Pollero, R.J., Heras, H., 2006. Activation of lipid catabolism by the water-soluble fraction of petroleum in the crustacean *Macrobrachium borellii*. *Aquat. Toxicol.* 77, 190–196.
- Le Bras, M., Clement, M.V., Pervaiz, S., Brenner, C., 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol. Histopathol.* 20, 205–220.
- Lee, K.-W., Raisuddin, S., Rhee, J.-S., Hwang, D.-S., Yu, I.T., Lee, Y.-M., Park, H.G., Lee, J.-S., 2008. Expression of glutathione S-transferase (GST) genes in the marine copepod *Tigriopus japonicus* exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* 89, 158-166.
- Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H., Choi, J., 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65, 1074–1081.
- Lemaire, P., Berhaut, J., Lemaire Gony, S., LaFaurie, M., 1992. Ultrastructural changes induced by benzo[*a*]pyrene in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver and intestine: importance of the intoxication route. *Environ. Res. Environ Res.* 57, 59-72.
- Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billingham, Z., Depledge, M.H., 1999. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8, 351-369.
- Liebold, A.M., Gottschalk, K.W., Muzika, R.M., Montgomery, M.E., Young R, O'Day, K., Kelley, B., 1995. Suitability of North American tree species to the gypsy moth: A summary of field and laboratory tests. USDA For Serv. Gen. Techn. Rep. NE 211.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A., 2003. Endocrine Disruptors in the Environment (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 75, 631–681.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Calisi, A., Schettino, T., 2013. Acetylcholinesterase inhibition as a relevant biomarker in environmental biomonitoring: New insights and perspectives. *Biomed. Res. Int.* 321213.
- Liu, D., Pann, L., Zhen, P.L.Z.C.Y., Miao, J., 2014. Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[*a*]pyrene. *Ecotox. Environ. Saf.* 107, 251–259.
- Liu, G., Niu, Z., Niekerk, D., Xue, J., Zheng, L., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from coal combustion: emissions, analysis, and toxicology. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1921, 1-28.

- Lomate, P.R., Hivrale, V.K., 2011. Differential responses of midgut soluble aminopeptidases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host and non-host plant diets, *Arthropod Plant Inte.* 5, 359–368.
- Lowe, D.M., Moore, M.N., Clarke, K.R., 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat. Toxicol.* 1, 213–226.
- Lowe, D.M., Moore, M.N., Readman, J.W., 2006. Pathological reactions and recovery of hepatopancreatic digestive cells from the marine snail *Littorina littorea* following exposure to a polycyclic aromatic hydrocarbon. *Mar. Environ. Res.* 61, 457–470.
- Loxdale, H.D., Castanera, P., Brookes, C.P., 1983. Electrophoretic study of enzymes from cereal aphid populations. I. Electrophoretic techniques and staining systems for characterising isoenzymes from six species of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* 73, 645–657.
- Ma, X.L., Cowles, D.L., Carter, R.L., 2000. Effect of pollution on genetic diversity in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* and the acorn barnacle *Balanus glandula*. *Mar. Environ. Res.* 50, 559–563.
- Main, A.R., Miles, K.E., Braid, P.E., 1961. The determination of human-serum-cholinesterase activity with *o*-nitrophenyl butyrate. *Biochem. J.* 78, 769–776.
- Mangal, D., Vudathala, D., Park, J.H., Lee, S.H., Penning, T.M., Blair, I.A., 2009. Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 788–797.
- Maria, V.L., Bebianno, M.J., 2011. Antioxidant and lipid peroxidation responses in *Mytilus galloprovincialis* exposed to mixtures of benzo[*a*]pyrene and copper. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 154, 56–63.
- Mastral, A.M., Callen, M.S., 2000. A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3051–3057.
- Mathews, M.C., Summers, C.B., Felton, G.W., 1997. Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34, 57–68.
- Mayer, L.M., Chen, Z., Findlay, R.H., Fang, J., Sampson, S., Self, R.F.L., Jumars, P.A., Quet el, C., Donard, O.F.X., 1996. Bioavailability of Sedimentary Contaminants Subject to Deposit-Feeder Digestion. *Environ. Sci. Technol.* 30, 2641–2645.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1988. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radic. Biol. Med.* 5, 363–369.
- Melendez-Colon, V.J., Luch, A., Seidel, A., Baird, W.M., 1999. Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis* 20, 1885–1891.
- Meyer, J.N., Di Giulio, R.T., 2002. Patterns of heritability of decreased EROD activity and resistance to PCB 126-induced teratogenesis in laboratory-reared offspring of killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated site in the Elizabeth River, VA, USA. *Mar. Environ. Res.* 54, 621–626.

- Meyer, J.N., Wassenberg, D.M., Karchner, S.I., Hahn, M.E., Di Giulio, R.T., 2003. Expression and inducibility of aryl hydrocarbon receptor pathway genes in wild-caught killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different contaminant-exposure histories. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2337–2343.
- Miao, Y.G., 2002. Studies on the activity of the alkaline phosphatase in the midgut of infected silkworm, *Bombyx mori*. *L. J. Appl. Entomol.* 126, 138–142.
- Mikhail, F., Denissenko, K., Annie, P., Moon-shong, T., Gerd, P.P., 1996. Preferential formation of benzo[*a*]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274, 430–432.
- Miller, K.P., Ramos, K.S., 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[*a*]pyrene and related hydrocarbons. *Drug. Metab. Rev.* 33, 1-35.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.
- Mockett, R.J., Bayne, A.-C.V., Kwong, L.K., Orr, W.C., Sohal, R.S., 2003. Ectopic expression of catalase in *Drosophila* mitochondria increases stress resistance but not longevity. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 207-217.
- Monari, M., Foschi, J., Rosmini, R., Marin, M.G., Serrazanetti, G.P., 2011. Heat shock protein 70 response to physical and chemical stress in *Chamelea gallina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 397, 71-78.
- Montella, I.R., Schama, R., Valle, D., 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 107, 437-449.
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Riberio, R., Guilhermino, L., 2004. The ‘Coral Bulker’ Fuel Oil Spill on the North Coast of Portugal: Spatial and Temporal Biomarker Responses in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology*, 13, 619–630.
- Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C., 1994. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones, in: Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (Eds.), *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 1–30.
- Mothershead, R.F., Hale, R.C., 1992. Influence of ecdysis on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in field exposed blue crabs (*Callinectes sapidus*). *Mar. Environ. Res.* 33, 145–156.
- Mouneyrac, C., Leung, P.T.Y., Leung, K.M.Y., 2011. Cost of tolerance, in: Amiard Triquet, C. Rainbow, P.S., Romeo, M. (Eds.), *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 265–297.
- Mrdaković, M., Ilijin, L., Vlahović, M., Filipović, A., Grčić, A., Todorović, D., Perić-Mataruga, V., 2019. Effects of dietary fluoranthene on nymphs of *Blaptica dubia* S. (Blattodea: Blaberidae). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 26, 6216-6222.
- Mrdaković, M., Ilijin, L., Vlahović, M., Matić, D., Gavrilović, A., Mrkonja, A., Perić-Mataruga, V., 2016. Acetylcholinesterase (AChE) and heat shock proteins (Hsp70) of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larvae in response to long-term fluoranthene exposure. *Chemosphere* 159, 565-569.

- Mrdaković, M., Ilijin, L., Vlahović, M., Todorović, D., Gavrilović, A., Mrkonja, A., Perić-Mataruga, V., 2015. Effects of fluoranthene on the fitness-related traits and antioxidative defense in *Lymantria dispar* L. *Environmental Science and Pollution Research*. 22, 10367–10374.
- 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 biologica* (Krakow) 56, 103-110.
- Mrdaković, M., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Vlahović, M., Janković-Tomanić, M., Mirčić, D., Lazarević, J., 2013. Response of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae from differently adapted populations to allelochemical stress: effects of tannic acid. *Eur. J. Entomol.* 110, 55–63.
- Mrdaković, M., Stojković, B., Ilijin, L., Vlahović, M., Perić-Mataruga, V., Lazarević, J., 2014. Testing the adaptive plasticity of gypsy moth digestive enzymes in response to tannic acid using phenotypic selection analysis. *Genetika* 46, 883-894.
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., Dalton, T.P., 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 59, 65–85.
- Nemec, V., Socha, R., 1988. Phosphatases and pteridines in malpighian tubules: a possible marker of mosaic mutant in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhoridae). *Acta Entomol. Bohemoslov.* 85, 321–326.
- Nemec, V., Ženka, J., 1996. Activity of phosphatases and esterases in the aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae), and in the gut wall of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and pupae. *Eur. J. Entomol.* 93, 37–44.
- Neuhaus-Steinmetz, U., Rensing, L., 1997. Heat shock protein induction by certain chemical stressors is correlated with their cytotoxicity, lipophilicity and protein-denaturing capacity. *Toxicology* 123, 185–195.
- Nijhout, H.F., 1981. Physiological control of molting in insects. *Am. Zool.* 21, 631–640.
- Nishida, R., 2002. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 57–92.
- Nishiura, J.T., Burgos, C., Aya, S., Goryacheva, Y., Lo, W., 2007. Modulation of larval nutrition affects midgut neutral lipid storage and temporal pattern of transcription factor expression during mosquito metamorphosis. *J. Insect Physiol.* 53, 47–58.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 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.
- Oberdörster, E., Cottam, D.M., Wilmot, F.A., Milner, M.J., McLachlan, J.A., 1999. Interaction of PAHs and PCBs with ecdysone-dependent gene expression and cell proliferation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160, 101-108.
- O'Dell, T.M., Bell, R.A., Mastro, V.C., Tanner, J.S., Kennedy, J.F., 1984. Production of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, for research and biological control, in: King, E.G., Leppla, N.C. (Eds.), *Advanced and Challenges in Insect Rearing*. USDA-ARS, New Orleans, LA, pp. 156–166.

- Oguri, T., Singh, S.V., Nemoto, K., Lazo, J.S., 2003. The carcinogen (7R,8S)-dihydroxy-(9S,10R) epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene induces Cdc25B expression in human bronchial and lung cancer cells. *Cancer Res.* 63, 771–775.
- Ojeda-Avila, T., Woods, H.A., Raguso, R.A., 2003. Effects of dietary variation on growth, composition, and maturation of *Manduca sexta* (Sphingidae: Lepidoptera). *J. Insect Physiol.* 49, 293-306.
- Oliveira, C., Almeida, J.R., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., Gravato, C., 2013. Swimming velocity, avoidance behavior and biomarkers in *Palaemon serratus* exposed to fenitrothion. *Chemosphere* 90, 936–944.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2002. Interactive effects of benzo[*a*]pyrene and cadmium and effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Biomarkers* 7, 33–48.
- Ortel, J., 1995. Effects of metals on the total lipid content in the gypsy moth (*Lymantria dispar*, Lymantriidae, Lepid.) and its hemolymph. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 216-221.
- Osborne, M.R., Crosby, N.T., 1987. Benzopyrenes. Cambridge Monographs on Cancer Research. Cambridge, England: Cambridge University Press.
- Ownby, D.R., Newman, M.C., Mulvey, M., Vogelbein, W.K., Unger, M.A., Arzayus, L.F., 2002. Fish (*Fundulus heteroclitus*) populations with different exposure histories differ in tolerance of creosote contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1897–1902.
- Paniagua-Michel, J., Olmos-Soto, J., 2016. Modern Approaches into Biochemical and Molecular Biomarkers: Key Roles in Environmental Biotechnology. *J. Biotechnol. Biomater.* 6, 1000216.
- Panini, M., Manicardi, G.C., Moores, G.D., Mazzoni, E., 2016. An overview of the main pathways of metabolic resistance in insects. *Invert. Surviv. J.* 13, 326-335.
- Pan, L.Q., Ren, J., Liu, J., 2006. Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo[*a*]pyrene and benzo[*k*]fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys ferrari*. *Environ. Pollut.* 141, 443–451.
- Pardini, R.S., 1995. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active prooxidants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 101–118.
- Park, S.-Y., Nair, P.M., Choi, J., 2012. Characterization and expression of superoxide dismutase genes in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae as a potential biomarker of ecotoxicity. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 156, 187–194.
- Peakall, D.B., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3, 157-160.
- Peakall, D.B., Walker, C.H., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates. *Ecotoxicology* 3, 173–179.
- Pelkonen, O., Nebert, D.W., 1982. Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Etiologic Role in Carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34, 189–222.

- Penning, T.M., Burczynski, M.E., Hung, C.F., McCoull, K.D., Palackal, N.T., Tsuruda, L.S., 1999. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1–18.
- Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., Todorović, D., Prokić, M., Matić, D., Vlahović, M., 2019. Parameters of oxidative stress, cholinesterase activity, Cd bioaccumulation in the brain and midgut of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) caterpillars from unpolluted and polluted forests. *Chemosphere* 218, 416-424.
- Perić-Mataruga, V., Petković, B., Ilijin, L., Mrdaković, M., Dronjak Čučaković, S., Todorović, D., Vlahović, M., 2017. Cadmium and high temperature effects on brain and behaviour of *Lymantria dispar*. L. caterpillars originating from polluted and less-polluted forests. *Chemosphere* 185, 628-636.
- Ponnuvel, K.M., Nakazawa, H., Furukawa, S., Asaoka, A., Ishibashi, J., Tanaka, H., Yamakawa, M., 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.* 77, 10725–10729.
- Porte, C., Sole, M., Albaiges, J., Livingstone, D.R., 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 100, 183-186.
- Prabhukumar, G., Pagilla, K., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban runoff sources, sinks and treatment: a review. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering Illinois Institute of Technology, Chicago, IL, 1-15.
- Prud'homme, S.M., Chaumot, A., Cassar, E., David, J.-P., Reynaud, S., 2017. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. *Environ. Pollut.* 220, 242-254.
- Rajagopal, R., Agrawal, N., Selvapandiyan, A., Sivakumar, S., Ahmad, S., Bhatnagar, R.K., 2003. Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Biochem. J.* 379, 971–978.
- Rauschenbach, I.Y., Bogomolova, E.V., Gruntenko, N.E., Adonyeva, N.V., Chentsova, N.A., 2007. Effects of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone on alkaline phosphatase activity in *Drosophila* under normal and heat stress conditions. *J. Insect Physiol.* 53, 587–591.
- Ravindra, K., Sokhi, R., van Grieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.* 42, 2895–2921.
- Ren, X., Pan, L., Wang, L., 2014. Metabolic enzyme activities, metabolism-related genes expression and bioaccumulation in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 79–86.
- Rhee, J.S., Raisuddin, S., Lee, K.W., Seo, J.S., Ki, J.S., Kim, I.C., Park, H.G., Lee, J.S., 2009. Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicas* to environmental toxicants. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 149, 104–112.
- Riaz, M.A., Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., David, J.P., 2009. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquat. Toxicol.* 93, 61-69.

- Richardi, V.S, Vicentini, M., Morais, G.S., Rebecchi, D., da Silva, T.A., Favaro, L.F., Navarro-Silva, M.A., 2018. Effects of phenanthrene on different levels of biological organization in larvae of the sediment-dwelling invertebrate *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). *Environ. Pollut.* 242, 277-287.
- Richardson, B.J., Mak, E., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses?. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 503–514.
- Rodrigues, A.P., Lehtonen, K.K., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2013. Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: accumulation and multibiomarker responses. *Sci. Total Environ.* 443, 454-463.
- Romero, D.L., Mounho, B.J., Lauer, F.T., Born, J.L., Burchiel, S.W., 1997. Depletion of glutathione by benzo[a]pyrene metabolites, ionomycin, thapsigargin, and phorbol myristate in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 62–69.
- Ross, M.K., Streit, T.M., Herring, K.L., Xie, S., 2010. Carboxylesterases: dual roles in lipid and pesticide metabolism. *J. Pestic. Sci.*, 35, 257–264.
- Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Thybaud, E., Ribera, D., 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo[a]pyrene. *Soil Biol. Biochem.* 31, 1837-1846.
- Sak, O., Uçkan, F., Ergin, E., 2006. Effects of Cypermethrin on total body weight, glycogen, protein, and lipid contents of *Pimpla turionellae* (L.) (Hymenoptera : Ichneumonidae). *Belg. J. Zool.*, 136, 53-58.
- Sanders, B.M., Martin, L.S., 1993. Stress-proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *Science Total Environ.* 140, 459–470.
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 49–75.
- Senft, A.P., Dalton, T.P., Nebert, D.W., Genter, M.B., Puga, A., Hutchinson, R.J., Kerzee, J.K., Uno, S., Shertzer, H.G., 2002. Mitochondrial reactive oxygen production is dependent on the aromatic hydrocarbon receptor. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1268–1278.
- Senthil-Nathan, S., Choi, M.Y., Paik, C.H., Seo, H.Y., Kalaivani, K., 2009. Toxicity and physiological effects of neem pesticides applied to rice on the *Nilaparvata lugens* Stål, the brown planthopper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1707–1713.
- Senthil-Nathan, S., Choi, M.Y., Paik, C.H., Seo, H.Y., 2007. Food consumption, utilization, and detoxification enzyme activity of the rice leafhopper larvae after treatment with *Dysoxylum* Triterpenes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 260–267.
- Senthil-Nathan, S., Choi, M.Y., Seo, H.Y., Paik, C.H., Kalaivani, K., Kim, J.D., 2008. Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Ecotox. Environ. Safe.* 70, 244-250.
- Senthil-Nathan, S., Kalaivani, K., Murugan, K., Chung, P.G., 2005. The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leafhopper. *Pestic. Biochem. Physiol.* 81, 113–122.

- Senthil-Nathan, S., 2006. Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 84, 98–108.
- Senthil-Nathan, S., 2013. Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Front. Physiol.*, 4, 359.
- Shen, H., Tao, S., Wang, R., Wang, B., Shen, G., Li, W., Su, S., Huang, Y., Wang, X., Liu, W., Li, B., Sun, K., 2011. Global time trends in PAH emissions from motor vehicles. *Atmos. Environ.* 45, 2067-2073.
- Shimada, T., 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 257–276.
- Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., 2000. Benzo[*a*]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *PNAS* 97, 779–782.
- Shin, B.-S., Choi, R.N., Lee, C.-U., 2001. Effects of cadmium on total lipid content and fatty acids of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Korean J. Ecol.* 24, 349-352.
- Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., 1992. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview. *Risk Anal.* 12, 353-360.
- Sibly, R.M., Calow, P., 1989. A life-cycle theory of response to stress. *Biol. J. Linn. Soc.* 37, 101-116.
- Sichak, S.P., Dounce, A.L., 1986. Analysis of the peroxidatic mode of action of catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 286-295.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91, 31-38.
- Sikkim, J.H., Kwack, S., Lee, B.M., 2000. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and benzo[*a*]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[*a*]pyrene. *Chem. Biol. Interact.* 127, 139-150.
- Silva, C.P., Terra, W.R., 1995. An α -glucosidase from perimicrovillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells: Purification and properties. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 487–494.
- Simpson, S.J., Raubenheimer, D., 1993. The central role of the haemolymph in the regulation of nutrient intake in insects. *Physiol. Ent.* 18, 395-403.
- Smagghe, G., Tirry, L., 2001. Insect Midgut as a Site for Insecticide Detoxification and Resistance, in: Ishaaya. I. (Eds.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Soderlund, D.M., Bloomquist, J.R., 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 77-96.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15.
- Sole, M., Porte, C., Albaiges, J., 1995a. The use of biomarker for assessing the effects of organic pollution in mussels. *Sci. Total Environ.* 159, 147-153.

- Sole, M., Porte, C., Albaiges, J., 1995b. Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 157-164.
- Sridhara, S., Bhat, J.V., 1963. Alkaline and acid phosphatases of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect Physiol.* 9, 693–701.
- Srinivasan, A., Ashok, G.P., Gupta, V.S., 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 11, 132–154.
- Stockhoff, B.A., 1993. Ontogenetic change in dietary selection for protein and lipid by gypsy moth larvae. *J. Insect Physiol.* 39, 677–686.
- Storey, K.B., 1997. Organic solutes in freezing tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 117, 319–326.
- Sukhanova, M.Z., Grenback, L.G., Gruntenko N.E., Khlebodarova, T.M., Rauschenbach I.Y., 1996. Alkaline phosphatase in *Drosophila* under heat stress. *J. Insect Physiol.* 42, 161–165.
- Tabatabaei, P.R., Hosseinaveh, V., Goldansaz, S.H., Talebi, K., 2011. Biochemical characterization of digestive proteases and carbohydrases of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Asia. Pac. Entomol.* 14, 187–194.
- Taşkın, V., Küçükakyüz, K., Arslan, T.V., Çöl, B., Göçmen, B., 2007. The biochemical basis of insecticide resistance and determination of esterase enzyme patterns by using PAGE in field collected populations of *Drosophila melanogaster* from Muğla province of Turkey. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 31-40.
- Tandoğan, B., Ulusu, N.N., 2006. Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *FABAD J. Pharm. Sci.* 31, 230-237.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2012. 11 - Biochemistry and Molecular Biology of Digestion, in: Gilbert, L.I. (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, Elsevier, pp. 365-418.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Garcia, E.S., 1988. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.* 18, 423–434.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Jordão, B.P., Dillon, R.J., 1996 . Digestive enzymes, in: Lehane, M.J., Billingsley, P.F. (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London, UK, pp. 153–194.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function - a review. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 109, 1-62.
- Terra, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 47–61.
- Thompson, S.N., 2003. Trehalose – The insect ‘blood’ sugar. *Adv. Insect Physiol.* 31, 205–285.
- Timbrell, J.A., 1991. *Principles of Biochemical Toxicology* (2nd ed.), Taylor and Francis, London.
- Tipping, E., Ketterer, B., 1981. The influence of soluble binding proteins on lipophile transport and metabolism in hepatocytes. *Biochem. J.* 195, 441-452.
- Tipping, E., Moore, B.P., Jones, C.A., Cohen, G.M., Ketterer, B., Bridges. J.W., 1980. The non-covalent binding of benzo[*a*]pyrene and its hydroxylated metabolites to intracellular proteins and lipid bilayers. *Chem. Biol. Interact.* 32, 291-304.

- Toro, B., Navarro, J.M., Palma-Fleming, H., 2003. Relationship between bioenergetics responses and organic pollutants in the giant mussel, *Choromytilus chorus* (Molusca: Mytilidae). *Aquat. Toxicol.* 63, 257-269.
- Tung, E.W.Y., Philbrook, N.A., Belanger, C.L., Ansari, S., Winna, L.M., 2014. Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: A possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. *Mutat. Res.* 760, 64–69.
- Valaitis, A.P., 1995. Gypsy moth midgut proteinases: Purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush border membrane leucine aminopeptidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 139-149.
- Van Brummelen, T.C., Stuijzand, S.C., 1993. Effects of benzo[a]pyrene on survival, growth and energy reserves in the terrestrial isopods *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber*. *Sci. Total Environ.* 134, 921–930.
- Van Brummelen, T.C., Van Straalen, N.M., 1996. Uptake and elimination of benzo[a]pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 277-85.
- Van der Horst, D.J., 2003. Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism: a review. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 136, 217-226.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Van Haren, R.J.F., Schepers, H.E., Kooijman, S.A.L.M., 1994. Dynamic energy budgets affect kinetics of xenobiotics in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 29, 163-189.
- Van Straalen, N.M., Hoffmann, A.A., 2000. Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants, in: Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), *Demography of Ecotoxicology*. Wiley, New York, pp. 147–161.
- Vanin, S., Bubacco, L., Beltramini, M., 2008. Seasonal variation of trehalose and glycerol concentrations in winter snow-active insects. *Cryo. Lett.* 29, 485–491.
- Venkataraman, C., Friedlander, S.K., 1994. Size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons and elemental carbon: 2. Ambient measurements and effects of atmospheric processes. *Environ. Sci. Technol.* 28, 563-572.
- Vicentini, M., Morais, G.S., Rebecchi-Baggio, D., Richardi, V.S., Santos, G.S., Cestari, M.M., Navarro-Silva, M.A., 2017. Benzo[a]pyrene exposure causes genotoxic and biochemical changes in the midge larvae of *Chironomus sancticarloi* Strixino and Strixino (Diptera: Chironomidae). *Neotrop. Entomol.* 46, 658-665.
- Vieira, L.R., Sousa, A., Frasco, M.F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L., 2008. Acute effects of benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Sci. Total Environ.* 395, 87–100.
- Vlahović, M., Ilijin, L., Mrdaković, M., Gavrilović, A., Matić, D., Lazarević, J., Mataruga, V.P., 2015a. Alteration of the activities of trypsin and leucine aminopeptidase in gypsy moth caterpillars exposed to dietary cadmium. *Water. Air. Soil Pollut.* 226, 1-13.
- Vlahović, M., Lazarević, J., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., 2009. Plastic responses of larval mass and alkaline phosphatase to cadmium in the gypsy moth larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1148–1155.

- Vlahović, M., Mataruga, V.D.P., Lazarević, J.M., Mrdaković, M.M., Matić, D.R., Todorović, D.D., Ilijin, L.A., 2015b. Response of α -glucosidase in gypsy moth larvae to acute and chronic dietary cadmium. *J. Environ. Sci. Health. B.* 50, 285–292.
- Vlahović, M., Mataruga, V.P., Mrdaković, M., Matić, D., Lazarević, J., Nenadović, V., Ilijin, L., 2013. Enzymatic biomarkers as indicators of dietary cadmium in gypsy moth caterpillars. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 3447–3455.
- Voellmy, R., 1996. Sensing stress and responding to stress, in: Feige, U., Morimoto, R.I., Yahara, I., Polla, B. (Eds.), *Stress-Inducible Cellular Responses*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 121–137.
- Wang, P., Zhang, X., Zhang, J., 2005a. Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isoenzymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 611–620.
- Wang, S., Hong, H., Wang, X., 2005b. Bioenergetic responses in green lipped mussels (*Perna viridis*) as indicators of pollution stress in Xiamen coastal waters, China. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 738–743.
- Wang, Y.Q., Tao, S., Jiao, X.C., Coveney, R.M., Wu, S.P., Xing, B.S., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in leaf cuticles and inner tissues of six species of trees in urban Beijing. *Environ. Pollut.* 151, 158–164.
- Wang, Z., Liu, S., Yang, B., Liu, Z., 2011. Characterization of soluble and membrane-bound alkaline phosphatase in *Nilaparvata lugens* and their potential relation to development and insecticide resistance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 78, 30–45.
- War, A.R., Panlraj, M.G., Hussain, B., Buhroo, A.A., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C., 2013. Effect of plant secondary metabolites on legume pod borer, *Helicoverpa armigera*, *J. Pest Sci.* 86, 399–408.
- Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F., Okuda, T., 2002. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *J. Exp. Biol.* 205, 2799–2802.
- Wei, S.J., Chang, R.L., Merkle, K.A., Gwynne, M., Cui, X.X., Murthy, B., Huang, M.T., Xie, J.G., Lu, Y.P., Lou, Y.R., Jerina, D.M., Conney, A.H., 1999. Dose dependent mutation profile in the c-Ha-ras protooncogene of skin tumors in mice initiated with benzo[*a*]pyrene. *Carcinogenesis* 20, 1689–1696.
- Weis, J.S., Cristini, A., Rao, K.R., 1992. Effects of pollutants on molting and regeneration in crustacea. *Am. Zool.* 32, 495–500.
- Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D., 2008. Applications of Carboxylesterase Activity, in: Whitacre, D.M. (Eds.), *Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs)*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, 195, pp. 117–178.
- Wills, L.P., Matson, C.W., Landon, C.D., Di Giulio, R.T., 2010. Characterization of the recalcitrant CYP1 phenotype found in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a Superfund site on the Elizabeth River, VA. *Aquat. Toxicol.* 99, 33–41.
- Wyatt, G.R., Kalf, G.F., 1957. The chemistry of insect hemolymph: II. Trehalose and other carbohydrates. *J. Gen. Physiol.* 40, 833–847.

- Xiao, H., Rawal, M., Hahm, E.R., Singh, S.V., 2007. Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide causes caspase-mediated apoptosis in H460 human lung cancer cell line. *Cell Cycle*, 6, 2826–2834.
- Yan, S., Cui, F., Qiao, C., 2009. Structure, Function and Applications of Carboxylesterases from Insects for Insecticide Resistance. *Protein Pept. Lett.* 16, 1181-1188.
- Yi, S.X., Adams, T.S., 2001. Age and diapause-related acid and alkaline phosphatase activities in the Intestine and malpighian tubules of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 46, 152–163.
- Yu, D., Kazanietz, M.G., Harvey, R.G., Penning, T.M., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones inhibit the activity of the catalytic fragment of protein kinase C. *Biochemistry* 41, 11888–11894.
- Yu, S.J., 2004. Detoxification Mechanisms in Insects, in: Capinera, J.L. (Eds.), *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht.
- Yu, S.J., 1996. Insect Glutathione S-transferases: a review. *Zool. Stud.* 35, 9-19.
- Yuen, B.B., Wong, C.K., Woo, N.Y., Au, D.W., 2007. Induction and recovery of morphofunctional changes in the intestine of juvenile carnivorous fish (*Epinephelus coioides*) upon exposure to foodborne benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.*, 82, 181-94.
- Zhang, L., Duan, X., He, N., Chen, X., Shi, J., Li, W., Xu, L., Li, H., 2017. Exposure to lethal levels of benzo[a]pyrene or cadmium trigger distinct protein expression patterns in earthworms (*Eisenia fetida*). *Sci. Tot. Environ.* 595, 733–742.
- Zhang, L., Jin, Y., Huang, M., Penning, T.M., 2012a. The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons: interconversion of PAH catechols and PAH o-quinones. *Front. Pharmacol.* 3, 193.
- Zhang, L., Qiu, L., Wu, H., Liu, X., You, L., Pei, D., Chen, L., Wang, Q., Zhao, J., 2012b. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 155, 517–527.
- Zhang, X., Wu, R.S.S., Fu, W., Xu, L., Lam, P.K.S., 2004. Production of reactive oxygen species and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in KB cells co-exposed to benzo[a]pyrene and UV-A radiation. *Chemosphere* 55, 1303-1308.
- Zhao, W., Ramos, K.S., 1998. Modulation of hepatocyte gene expression by the carcinogen benzo[a]pyrene. *Toxicol. In Vitro* 12, 395–402.
- Zhu, H., Li, Y., Trush, M.A., 1995. Characterization of benzo[a]pyrene quinone-induced toxicity to primary cultured bone marrow stromal cells from DBA/2 mice: Potential role of mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130, 108–120.
- Zöllner, N., Kirsch, K., 1962. The quantitative determination of lipids (micromethod) by means of the sulfo-phospho-vanillin reaction common to many natural lipids (all plasma lipids). *Z Ges Exp Med.* 135, 545-561.
- Živković, M., Jovašević-Stojanović, M., Cvetković, A., Lazović, I., Tasić, V., Stevanović, Ž., Gržetić, I., 2015. PAHs levels in gas and particle-bound phase in schools at different locations in Serbia. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 21, 159-167.

Biografija

Anja Z. Grčić (devojačko prezime Gavrilović) rođena je 27.04.1986. u Užicu. Osnovnu školu je završila u Kosjeriću, a gimnaziju „Sveti Sava“ u Požegi. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Biohemija, upisala je 2005. godine. Završni rad pod naslovom “Optimizacija izolovanja β -glukozidaze iz slatkog badema (*Prunus dulcis* var. *amygdalus*)”, i master rad pod naslovom „Prečišćavanje i karakterizacija izoforme α -amilaze soja 12B *Bacillus* sp. efikasne u hidrolizi sirovog skroba“ uradila je u Laboratoriji za eksperimentalnu biohemiju, enzimologiju i biotehnologiju na katedri za biohemiju, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Master studije je završila 2012. godine sa prosekom 9,80. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija, upisala je 2012. godine. Iste godine je zaposlena kao istraživač pripravnik na Odeljenju za fiziologiju i biohemiju insekata, Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Od tada je bila angažovana na projektu “Uticaj magnetnih polja i drugih sredinskih stresora na fiziološke odgovore i ponašanje različitih vrsta” (173027), potprojekat “Odgovori fitofagnih štetnih insekata na sredinske stresore” kojim je rukovodila dr Vesna Perić Mataruga, a bio je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Zvanje istraživač saradnik Anja Grčić je stekla 2014. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je pod mentorstvom dr Larise Ilijin, višeg naučnog saradnika sa Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Član je Udruženja toksikologa Srbije, Evropskog udruženja toksikologa (EUROTOX), Internacionalnog udruženja toksikologa (IUTOX), Srpskog biološkog društva i Entomološkog društva Srbije.

Do danas je objavila 16 naučnih radova u međunarodnim časopisima, dva kongresna saopštenja na međunarodnim skupovima i tri kongresna saopštenja na domaćim skupovima.