

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra Z. Filipović

**FIZIOLOŠKO PRILAGOĐAVANJE LARVI
GUBARA, *Lymantria dispar* L., I ŽUTOTRBE,
Euproctis chrysorrhoea L., (Lepidoptera) NA
DELOVANJE FLUORANTENA**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandra Z. Filipović

**PHYSIOLOGICAL ADJUSTMENT OF LARVAE
OF GYPSY MOTH, *Lymantria dispar* L., AND
BROWN-TAIL MOTH, *Euproctis chrysorrhoea*
L., (Lepidoptera) TO THE EFFECTS OF
FLUORANTHENE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

MENTORI

dr Marija Mrdaković, naučni savetnik

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

dr Siniša Đurašević, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

KOMISIJA

dr Marija Mrdaković, naučni savetnik

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

dr Siniša Đurašević, redovni 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 stresora 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 Mariji Mrdaković, zato što je imala beskonačno mnogo strpljenja i razumevanja za mene, za svo vreme koje je utrošila za osmišljavanje disertacije i planiranje eksperimenata, što je uvek umela da me ohrabri i motiviše. Zahvalna sam što je imala poverenja u mene, što smo zajedno rešavale sve poteškoće na koje smo nailazile, kao i za sve prijateljske razgovore koje smo vodile.

Dr Siniši Đuraševiću, mentoru, za prijatnu saradnju i podršku tokom doktorskih studija, kao i za sve korisne savete i primedbe koje su doprinele kvalitetu disertacije.

Dr Vesni Perić Mataruga, rukovodiocu Odeljenja za fiziologiju i biohemiju insekata, za poverenje koje mi je pružila od samog početka, za preneseno znanje i brojne ideje tokom svih ovih godina rada u njenoj istraživačkoj grupi. Zahvalna sam što se uvek trudila da mi omogući najbolje uslove za izradu eksperimenata i što sam znala da svaki problem na koji naiđem, ona će umeti da reši.

Dr Larisi Ilijin, za neverovatan optimizam koji je prenosila i na mene. Hvala na posvećenom vremenu, korisnim savetima i dragocenoj pomoći pri svakom koraku prilikom izrade ove disertacije.

Dr Mileni Vlahović, na podsticaju i stručnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada, uloženom vremenu i korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove disertacije.

Dr Dajani Todorović, za bezrezervnu podršku i pomoć i pre nego je zatražim, što je uvek umela da me sasluša i ohrabri, nasmeje i oraspoloži. Hvala za ljubav, pažnju i bržnost.

Dr Dragani Matić i Dr Anji Grčić, za ogromnu pomoć pri svakom koraku u izradi ove disertacije, što su mi nesebično prenele svoje znanje i uvek bile spremne da reše svaki problem sa kojim se susretnem. Hvala što ste sa mnom delile trenutke sreće zbog dobrih rezultata, ali i trenutke neuspeha koje smo zajedno uz smeh i podršku prevazilazile. Ali pre svega, hvala za ljubav i prijateljstvo.

Dr Jelici Lazarević, dr Zlatku Proliću, dr Dejanu Mirčiću, dr Mileni Janković Tomanić, dr Branki Petković i preminuloj dr Veri Nenadović za dobru atmosferu i saradnju, prijateljske razgovore i podršku.

Mojim roditeljima i braći, za svu ljubav i безусловnu podršku tokom svih ovih godina.

Posebno mom suprugu Vuku, za tehničku pomoć pri izradi disertacije, za svo vreme, savete i konstantnu podršku koja mi je bila oslonac. Hvala njemu i našem sinu Aleksi za ljubav, motivaciju i vetar u leđa.

Fiziološko prilagođavanje larvi gubara, *Lymantria dispar* L., i žutotrbe, *Euproctis chrysorrhoea* L., (Lepidoptera) na delovanje fluorantena

Rezime

Fluoranten je jedan od najrasprostranjenijih policikličnih aromatičnih ugljovodonika, prisutan u lišću različitih biljaka kojima se hrane larve polifagnih vrsta insekata *Lymantria dispar* i *Euproctis chrysorrhoea*. Cilj ove doktorske disertacije je sticanje uvida u obrasce fizioloških odgovora larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* (Lepidoptera: Erebidae) na prisustvo sredinski relevantnih koncentracija fluorantena u hrani i rasvetljavanje mehanizama odbrane od njegovog štetnog delovanja, što doprinosi sagledavanju načina njihovog prilagođavanja stresnim uslovima u okruženju. Ispitivan je hronični uticaj dve koncentracije fluorantena (6,7 i 67 ng/g suve mase hrane) na larve *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*, poreklom iz prirodnih populacija. Antioksidativni i detoksifikacioni enzimi srednjeg creva larvi su pokazali promene aktivnosti pod uticajem fluorantena, sa izraženijim odgovorima u tkivu srednjeg creva, kao i razlike u obrascima odgovora između vrsta. Uočeno je smanjenje ekspresije Hsp70 u celom srednjem crevu, a različiti odgovori Hsp70 u mozgu larvi. Kod obe vrste je došlo i do značajnih promena aktivnosti digestivnih enzima i njihovih izoformi u srednjem crevu larvi izlaganih fluorantenu. Detektovana je inhibicija aktivnosti određenih digestivnih enzima i njihovih izoformi kod larvi *L. dispar*, dok je kod larvi *E. chrysorrhoea* zabeleženo povećanje aktivnosti većeg broja enzima ove grupe, kao i ekspresija izoformi pojedinih enzima kod larvi izlaganih fluorantenu. Kanonijskom diskriminacionom analizom su potvrđene razlike između vrsta kada su u pitanju odgovori antioksidativnih i digestivnih enzima na prisustvo fluorantena u ishrani. Alokacija energetskih resursa ka mehanizmima odbrane, u prisustvu fluorantena, odrazila se na osobine životne istorije larvi obe vrste.

Ključne reči: *Lymantria dispar* L.; *Euproctis chrysorrhoea* L.; fluoranten; antioksidativni enzimi; detoksifikacioni enzimi; Hsp70; digestivni enzimi; osobine životne istorije;

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Ekofiziologija

Physiological adjustment of larvae of gypsy moth, *Lymantria dispar* L., and brown-tail moth, *Euproctis chrysorrhoea* L., (Lepidoptera) to the effects of fluoranthene

Abstract

Fluoranthene is one of the most abundant polycyclic aromatic hydrocarbons, present in the leaves of various plants used for food by larvae of polyphagous insect species *Lymantria dispar* and *Euproctis chrysorrhoea*. The aim of dissertation was to gain insight into the patterns of physiological responses of *L. dispar* and *E. chrysorrhoea* larvae (Lepidoptera: Erebidae) to the presence of environmentally relevant concentrations of fluoranthene in food and to elucidate the mechanisms of defense against its harmful effects, which contributes to perceive the way they adjust to stressful environmental conditions. Chronic effects of fluoranthene (6.7 and 67 ng/g dry food weight) on *L. dispar* and *E. chrysorrhoea* larvae, originating from natural populations, were examined. Antioxidative and detoxification enzymes of midgut showed changes of activity under the influence of fluoranthene, with more pronounced responses in midgut tissue, and between-species differences in patterns of responses. Decreased expression of Hsp70 in the midgut, and different responses of Hsp70 in the brain of larvae were noticed. Significant changes of the activity of digestive enzymes and their isoforms in the midgut of larvae of both species exposed to fluoranthene were noticed. Exposure to fluoranthene inhibited the activity of certain digestive enzymes and their isoforms of *L. dispar* larvae, and increased the activity of a number of enzymes and expression of isoforms of certain enzymes of *E. chrysorrhoea* larvae. Canonical discriminant analysis confirmed between-species differences in responses of antioxidative and digestive enzymes to the presence of fluoranthene in the diet. The allocation of energy resources to defense mechanisms affected the life history traits of treated larvae of both species.

Key words: *Lymantria dispar* L.; *Euproctis chrysorrhoea* L.; fluoranthene; antioxidative enzymes; detoxification enzymes; Hsp70; digestive enzymes; life history traits;

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Ecophysiology

LISTA SKRAĆENICA

¹O₂ – singletni kiseonik

4-MU-Bu – 4-metilumbeliferil butirat

AA – akril amid

ACP – kisele fosfataze

AChE – acetilholinesteraze

AhR – receptor za aromatične ugljovodonike (engl. aryl hydrocarbon receptor)

ALP – alkalne fosfataze

ANOVA – analiza varijanse

APS – amonijum persulfat

ATP – adenzin trifosfat

B[a]P – benzo[*a*]piren

BSA – albumin iz goveđeg seruma (engl. bovine serum albumin)

CAT – katalaza

CDA – kanonijska diskriminaciona analiza (engl. canonical discriminant analysis)

CDNB – 1-hloro-2,4-dinitrobenzen

Cu/Zn SOD – bakar-cink superoksid dismutaza

CYP – superfamilija enzima citohrom P450 (engl. cytochrom P450)

DL-BAPNA – *N*α-benzoil-DL-arginin 4-nitroanilid hidrohlorid

DMF – dimetilformamid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DTNB – 5'-ditio-bis-(2-nitro benzoeva kiselina)

DTT – ditiotreitrol

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

FAs – masne kiseline (engl. fatty acids)

FAD – flavin adenin dinukleotid

FeCl₃ – gvožđe (III) hlorid

Fe SOD – gvožđe superoksid dismutaza

FFAs – slobodne masne kiseline (engl. free fatty acids)

Fh – veća koncentracija fluorantena (engl. fluoranthen high)
Fl – manja koncentracija fluorantena (engl. fluoranthen low)
GR – glutation reduktaza
GST – glutation S-transferaza
GSSG – oksidovana forma glutationa
GSH – glutation
H₂O₂ – vodonik peroksid
HO· – hidroksilni radikal
HCl – hlorovodonična kiselina
HRP – peroksidaza iz rena (engl. horseradish peroxidase)
Hsp – protein toplotnog stresa (engl. heat shock protein)
Hsp70 – protein toplotnog stresa 70 (engl. heat shock protein 70)
K₂HPO₄ – kalijum hidrogen fosfat
K₃Fe(CN)₆ – kalijum heksacijanoferat (III)
KCl – kalijum hlorid
LACP – lizozomske kisele fosfataze
LAP – leucin aminopeptidaza
LD – trajanje razvića larvi (eng. larval development)
LSD – engl. Fisher's least significant difference test
LW – masa larvi (engl. larval weight)
MgCl₂ – magnezijum hlorid
Mn SOD – mangan superoksid dismutaza
Na₂CO₃ – natrijum karbonat
NaCl – natrijum hlorid
NADPH – redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaF – natrijum fluorid
NaNO₂ – natrijum nitrit
NaOH – natrijum hidroksid
NLACP – nelizozomske kisele fosfataze
Ni SOD – nikl superoksid dismutaza
O₂ – kiseonik
O₂^{·-} – superoksid

PAHs – 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)

PIs – Proteinazni inhibitori (engl. protease inhibitors)

PMSF – fenil-metil-sulfonil-fluorid (engl. phenylmethylsulfonyl fluoride)

PUFAs – polinezasićene masne kiseline (engl. polyunsaturated fatty acids)

pNPP – *p*-nitrofenil fosfat

pNPC – *p*-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 (tioina) grupa

SOD – superoksid dismutaza

TBS – Tris pufer (engl. tris buffered saline)

TBST – Tris pufer sa dodatkom Tween 20 (engl. Tris buffered saline with Tween 20)

TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamin

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

Tris – tris(hidroksimetil)aminometan

TRY– tripsin

W_t – masa larvi na kraju posmatranog perioda, odnosno trećeg dana po presvlačenju u peti stupanj

W₀ – masa larvi na početku posmatranog perioda, odnosno po presvlačenju u treći stupanj, kao i po presvlačenju u peti stupanj

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1.UVOD..... | 1 |
| 1.1. Policiklični aromatični ugljovodonici | 1 |
| 1.2. Fluoranten | 1 |
| 1.3. Oksidativni stres | 2 |
| 1.3.1. Oksidativna oštećenja | 3 |
| 1.3.2. Sistem antioksidativne zaštite..... | 4 |
| 1.3.3. Enzimi koji učestvuju u procesima detoksifikacije | 5 |
| 1.3.4. Proteini toplotnog stresa Hsp70..... | 7 |
| 1.4. Digestivni enzimi srednjeg creva i energetski molekuli hemolimfe | 7 |
| 1.5. Osobine životne istorije | 10 |
| 2. CILJ | 11 |
| 3. MATERIJAL I METODE..... | 11 |
| 3.1. Biologija vrsta | 12 |
| 3.2. Uslovi gajenja i eksperimentalne grupe..... | 13 |
| 3.3. Ispitivanje osobina životne istorije larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 14 |
| 3.4. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i detoksifikacije..... | 14 |
| 3.4.1. Priprema homogenata | 14 |
| 3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i detoksifikacije | 15 |
| 3.4.2.1. Superoksid dismutaza | 15 |
| 3.4.2.2. Katalaza | 15 |
| 3.4.2.3. Glutation reduktaza (GR) | 16 |
| 3.4.2.4. Ukupni glutacion (GSH) | 16 |
| 3.4.2.5. Karboksilesteraza..... | 16 |
| 3.4.2.6. Glutation S-transferaza | 16 |
| 3.4.2.7. Acetilholinesteraza | 17 |
| 3.4.3. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaze, katalaze i karboksilesteraza nativnom elektroforezom ... | 17 |
| 3.4.3.1. Nativna poliakrilamidna elektroforeza (PAGE) | 17 |
| 3.4.3.2. Superoksid dismutaza | 18 |
| 3.4.3.3. Katalaza | 19 |
| 3.4.3.4. Karboksilesteraze..... | 19 |
| 3.5. Detekcija Hsp70 | 19 |
| 3.5.1. Detekcija Hsp70 Western blotom u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 19 |
| 3.5.1.1. Priprema homogenata srednjeg creva..... | 19 |
| 3.5.1.2. Western blot..... | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.2. Određivanje nivoa ekspresije Hsp70 u mozgu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 20 |
| 3.5.2.1. Priprema homogenata mozga | 20 |
| 3.5.2.2. Western blot..... | 20 |
| 3.5.2.3. Indirektni ELISA test..... | 20 |
| 3.6. Detekcija aktivnosti digestivnih enzima | 21 |
| 3.6.1. Priprema homogenata celog srednjeg creva | 21 |
| 3.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje specifične aktivnosti digestivnih enzima | 21 |
| 3.6.2.1. Tripsin..... | 21 |
| 3.6.2.2. Leucin aminopeptidaza..... | 21 |
| 3.6.2.3. Lipaze | 21 |
| 3.6.2.4. Alkalne fosfataze | 22 |
| 3.6.2.5. Ukupne kisele fosfataze..... | 22 |
| 3.6.2.6. Lizozomske i nelizozomske kisele fosfataze | 22 |
| 3.6.3. Detekcija aktivnosti tripsina, leucin aminopeptidaze, lipaza, alkalnih fosfataza i ukupnih kiselih fosfataza nativnom elektroforezom | 22 |
| 3.6.3.1. Tripsin..... | 22 |
| 3.6.3.2. Leucin aminopeptidaza..... | 23 |
| 3.6.3.3. Lipaze | 23 |
| 3.6.3.4. Alkalne fosfataze | 23 |
| 3.6.3.5. Ukupne kisele fosfataze..... | 23 |
| 3.7. Određivanje koncentracije trehaloze i lipida u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 24 |
| 3.7.1. Trehaloza | 24 |
| 3.7.2. Lipidi | 24 |
| 3.8. Statistička obrada rezultata..... | 24 |
| 4. REZULTATI | 25 |
| 4.1. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na parametre antioksidativne zaštite i detoksifikacije srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 25 |
| 4.1.1. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 25 |
| 4.1.2. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> .. | 26 |
| 4.1.3. Specifična aktivnost glutacione reduktaze u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 27 |
| 4.1.4. Koncentracija glutationa u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 27 |
| 4.1.5. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 27 |
| 4.1.6. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 29 |
| 4.1.7. Specifična aktivnost glutacione reduktaze u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 30 |
| 4.1.8. Koncentracija glutationa u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.9. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u tkivu srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> .. | 31 |
| 4.1.10. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u tkivu srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> ... | 32 |
| 4.1.11. Specifična aktivnost glutacion reduktaze u tkivu srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> | 33 |
| 4.1.12. Koncentracija glutaciona u tkivu srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> | 34 |
| 4.1.13. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u tkivu srednjeg creva larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 35 |
| 4.1.14. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u tkivu srednjeg creva larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 36 |
| 4.1.15. Specifična aktivnost glutacion reduktaze u tkivu srednjeg creva larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 37 |
| 4.1.16. Koncentracija glutaciona u tkivu srednjeg creva larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 37 |
| 4.1.17. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 38 |
| 4.1.18. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 39 |
| 4.1.19. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u tkivu srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> | 40 |
| 4.1.20. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u tkivu srednjeg creva larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 41 |
| 4.1.21. Specifična aktivnost glutacion S-transferaze u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 42 |
| 4.1.22. Specifična aktivnost glutacion S-transferaze u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 42 |
| 4.1.23. Specifična aktivnost glutacion S-transferaze u tkivu srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> | 43 |
| 4.1.24. Specifična aktivnost glutacion S-transferaze u tkivu srednjeg creva larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 44 |
| 4.1.25. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza za parametre antioksidativne zaštite i aktivnosti glutacion S-transferaze u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 44 |
| 4.1.26. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza za parametre antioksidativne zaštite i aktivnosti glutacion S-transferaze u tkivu srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 45 |
| 4.2. Efekti prisustva fluorantena u dijeli na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i>..... | 46 |
| 4.2.1. Aktivnost superoksid dismutaze i katalaze u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> | 46 |
| 4.2.2. Aktivnost superoksid dismutaze i katalaze u hemolimfi larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 47 |
| 4.3. Efekti prisustva fluorantena u dijeli na parametre detoksifikacionog sistema u mozgu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i>..... | 48 |
| 4.3.1. Specifična aktivnost karboksilesteraza u mozgu larvi <i>L. dispar</i> | 48 |
| 4.3.2. Specifična aktivnost karboksilesteraza u mozgu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 49 |
| 4.3.3. Specifična aktivnost acetilholinesteraza u mozgu larvi <i>L. dispar</i> | 49 |
| 4.3.4. Specifična aktivnost acetilholinesteraza u mozgu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 50 |
| 4.4. Efekti prisustva fluorantena u dijeli na ekspresiju Hsp70 u celom srednjem crevu i mozgu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i>..... | 51 |
| 4.4.1. Ekspresija Hsp70 u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 51 |
| 4.4.2. Ekspresija Hsp70 u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.3. Ekspresija Hsp70 u mozgu larvi <i>L. dispar</i> | 52 |
| 4.4.4. Ekspresija Hsp70 u mozgu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 54 |
| 4.5. Efekti prisustva fluorantena u dijete na aktivnost digestivnih enzima srednjeg creva larvi | |
| <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 55 |
| 4.5.1. Specifična aktivnost i zimografska detekcija tripsina u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> ... | 55 |
| 4.5.2. Specifična aktivnost i zimografska detekcija leucin aminopeptidaze u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 56 |
| 4.5.3. Specifična aktivnost i zimografska detekcija lipaze u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 57 |
| 4.5.4. Specifična aktivnost i zimografska detekcija tripsina u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 58 |
| 4.5.5. Specifična aktivnost i zimografska detekcija leucin aminopeptidaze u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 59 |
| 4.5.6. Specifična aktivnost i zimografska detekcija lipaze u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 60 |
| 4.5.7. Specifična aktivnost i zimografska detekcija alkalnih fosfataza u celom srednjem crevu <i>L. dispar</i> larvi..... | 61 |
| 4.5.8. Specifična aktivnost i zimografska detekcija ukupnih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 62 |
| 4.5.9. Specifična aktivnost lizozomskih i nelizozomskih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> | 63 |
| 4.5.10. Specifična aktivnost i zimografska detekcija alkalnih fosfataza u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 64 |
| 4.5.11. Specifična aktivnost i zimografska detekcija ukupnih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 65 |
| 4.5.12. Specifična aktivnost lizozomskih i nelizozomskih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 66 |
| 4.5.13. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza aktivnosti digestivnih enzima, tripsina, leucin aminopeptidaze i lipaze, u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 67 |
| 4.5.14. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza aktivnosti digestivnih enzima, fosfataza, u celom srednjem crevu <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> larvi..... | 68 |
| 4.6. Efekti prisustva fluorantena u dijete na sadržaj lipida i trehaloze u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 69 |
| 4.6.1. Koncentracija lipida i trehaloze u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> | 69 |
| 4.6.2. Koncentracija lipida i trehaloze u hemolimfi larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 70 |
| 4.7. Efekti prisustva fluorantena u dijete na osobine životne istorije larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i>..... | 71 |
| 4.7.1. Trajanje razvića i masa larvi <i>L. dispar</i> | 71 |
| 4.7.2. Trajanje razvića i masa larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 72 |
| 4.7.3. Relativna brzina rasta larvi <i>L. dispar</i> | 73 |
| 4.7.4. Relativna brzina rasta larvi <i>E. chrysorrhoea</i> | 74 |
| 5. DISKUSIJA..... | 76 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na parametre antioksidativne zaštite i detoksifikacije srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 76 |
| 5.2. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 79 |
| 5.3. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na parametre detoksifikacije u mozgu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 80 |
| 5.4. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na ekspresiju Hsp70 u celom srednjem crevu i mozgu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 82 |
| 5.5. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na aktivnost digestivnih enzima srednjeg creva larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 83 |
| 5.5.1. Specifična aktivnost i izoforme tripsina, leucin aminopeptidaze i lipaze u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 83 |
| 5.5.2. Specifična aktivnost i izoforme alkalnih i kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 85 |
| 5.6. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na koncentracije lipida i trehaloze u hemolimfi larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> | 86 |
| 5.7. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na osobine životne istorije larvi <i>L. dispar</i> i <i>E. chrysorrhoea</i> . | 87 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 90 |
| 7. LITERATURA | 93 |

1. UVOD

1.1. Policiklični aromatični ugljovodonici

Policiklični aromatični ugljovodonici (od *engl.* polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) predstavljaju grupu kompleksnih organskih jedinjenja koja se sastoje iz dva ili više spojenih aromatičnih prstenova. Široko su rasprostranjeni u životnoj sredini, i osim prirodnih izvora ovih jedinjenja, kao što su vulkanska aktivnost i šumski požari, PAHs su najčešće rezultat antropogenih aktivnosti, poput aktivnosti u industrijskim postrojenjima, nepotpunog sagorevanja fosilnih goriva, emisije izduvnih gasova automobila, grejanja stambenih objekata, kuvanja, konzumiranja duvana, itd. (Finlayson-Pitts i Pitts, 1986; Srogi, 2007). Usled njihove postojanosti, potencijala za bioakumulaciju, brojnih štetnih efekata na ljude i životnu sredinu, ovi zagađivači izazvaju brigu javnosti. Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Američkih Država (EPA, 1987) označila je šesnaest PAH jedinjenja, uključujući fluoranten, kao prioritetne zagađivače, usled njihove prepoznate toksičnosti na životinje i ljude. Biljke mogu adsorbovati PAH jedinjenja iz atmosfere depozicijom na kutikuli lista ili apsorpcijom kroz stome, kao i iz zagađenog zemljišta, preko korena. Osobine listova (površina, prisustvo dlaka, kao i komponente lista- voskovi i lipidi) imaju značajnu ulogu za apsorpciju i akumulaciju lipofilnih PAHs (Srogi, 2007; Desalme i sar., 2013). PAHs su označeni kao najzastupljenija perzistentna toksična jedinjenja u šumama (Belis i sar., 2011). Štetni efekti PAHs na fiziološke procese i razviće viših biljaka (Berteigne i sar., 1988; Kummerová i Kmentova, 2004; Kummerová i sar., 2006; Oguntimehin i sar., 2008), mogu uticati na fiziologiju biljojeda, uključujući i insekte. Na ovaj način zagađivači mogu ispoljavati i indirektno dejstvo na organizme. Pokazano je da kroz promene kvaliteta hrane ili sekundarnih biljnih metabolita, zagađivači mogu da utiču na fiziološke procese i razviće fitofagnih insekata, i njihovu populacionu dinamiku (Butler i Trumble, 2008; Holopainen, 2009).

1.2. Fluoranten

Fluoranten je postojano, bioakumulativno jedinjenje, koje se u atmosferi može javljati u gasnoj i čestičnoj fazi (ECHA, 2018). Važan je predstavnik PAHs i često se koristi kao indikator ukupne izloženosti ovim zagađivačima u životnoj sredini. Poznati je zagađivač sa toksičnim i ko-kancerogenim efektima (Palmqvist i sar., 2003; Saunders i sar., 2003; Šepi i sar., 2003; Srogi, 2007; Bauer i sar., 2018). Fluoranten se sastoji iz benzena i naftalena spojenih preko petočlanog prstena. Fluoranten je strukturni izomer pirena, međutim nije termodinamički stabilan kao piren zato što njegovi elektroni ne mogu da rezonuju kroz celu strukturu. Ime je dobio zbog osobine da fluorescira pod UV svetlošću. Foto-indukovana toksičnost se javlja kada se PAH aktivira reaktivnim vrstama (Yu i sar., 2006) koje mogu da prenesu energiju na molekularni kiseonik. Ovo rezultuje proizvodnjom singlet kiseonika, koji u interakciji sa biomakromolekulima može da izazove direktna oštećenja i oksidativni stres. Studije su pokazale da akumulacija PAHs iz sedimenata praćena UV zračenjem može izazvati fotoindukovanu toksičnost kod bentosnih organizama (Davenport i Spacie, 1991; Ankley i sar., 1994; Monson i sar., 1995; Swartz i sar. 1997; Kosian i sar., 1998). Pored fluorantena, benzo[a]piren (B[a]P), antracen i piren su se pokazali kao fototoksični PAHs (Newsted i Giesy, 1987; Mekenyan i sar., 1994; Swartz i sar. 1995).

Relativno mali broj studija opisuje biotransformacione puteve fluorantena i njegove genotoksične efekte na organizme. Većina studija ukazuje na to da fluoranten pokazuje relativno nisku kancerogenu aktivnost. Međutim, fluoranten je povezan sa imunotoksičnošću (Yamaguchi i sar., 1996), uključujući apoptozu i zaustavljanje rasta mišićnih T-ćelija, nezavisno od aril ugljovodoničnog receptora. Fluoranten takođe pojačava kancerogenost B[a]P (Rice i sar., 1984), a ispitivanje je pokazalo da se tumori pluća razvijaju kod CD-1 miševa tretiranih fluorantenom (Wang i Busby, 1993). Značajno povećanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije, glutation S-transferaze i antioksidativnog enzima glutation reduktaze, kao i povećanje sadržaja ukupnog

glutationa digestivne žlezde, a redukcija aktivnosti acetilholinesteraze mišića, detektovano je kod jedinki *Carcinus means* izlaganih različitim koncentracijama fluorantena (Rodrigues i sar., 2013). Akutno, *in vitro*, izlaganje kulture primarnih hepatocita vrste riba *Oncorhynchus mykiss* fluorantenu uzrokovalo je značajna oštećenja DNK, i značajno redukovalo sadržaj ukupnog glutaciona u ćelijama (Yazdani, 2020). Značajne promene ponašanja i lokomotorne aktivnosti, detektovane kod ženki i mužjaka F-344 pacova, akutno izlaganih fluorantenu, sugerisale su neurobihejvioralnu toksičnost ovog organskog zagađivača (Saunders i sar., 2003). Fotocitotoksičnost PAH jedinjenja, uključujući i fluoranten, detektovana je kod linije transformisanih humanih epidermalnih ćelija (HaCaT keratinocita), (Wang i sar., 2007). Za razliku od većine PAHs, fluoranten ima slab afinitet za receptor za aromatične ugljovodonike (od *engl.* Aryl hydrocarbon receptor, AhR) (Barron i sar., 2004; Pushparajah i sar., 2008) koji reguliše transkripciju gena koji kodiraju mnoge enzime uključene u detoksifikaciju ksenobiotika, uključujući citohrom P450 monooksigenaze. Fluoranten je nekompetitivni inhibitor CYP1A1 (Willett i sar., 1998). Zanimljiva činjenica je da fluoranten čak smanjuje aktivnost CYP1A koja je indukovana B[a]P-om (Willett i sar., 2001).

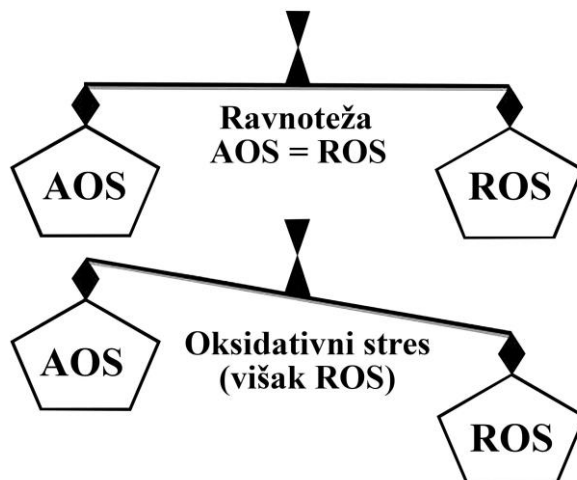
Utvrđeno je i da fluoranten može imati značajan uticaj na osobine životne istorije i dinamiku populacija. Foss i Forbes (1997) su utvrdili da je izloženost fluorantenu smanjila specifičnu brzinu rasta jedinki *Capitella* spp. Linke-Gamenick i sar. (1999) su utvrdili da je kod *Capitella* sp. izloženost fluorantenu dovela do odloženog razmnožavanja, smanjenja broja jedinki po leglu, smanjenog preživljavanja mladih, kao i do smanjenja njihove specifične brzine rasta. Izloženost fluorantenu u koncentraciji od 31 mg / g sedimenta, ili 51 mg / L vode, prouzrokovali su značajno oštećenje DNK kod *Capitella* sp., i to nakon samo jednog dana izlaganja (Palmqvist i sar., 2003). Utvrđeno je i da fluoranten redukuje broj dnevno položenih jaja, kao i broj ispiljenih jedinki kod *Acartia tonsa*, a izloženost fluorantenu (800 nM) povećava smrtnost jedinki ove vrste za 47%, nakon samo jednog dana (Bellas i Thor, 2007).

Kako je već pomenuto, PAHs su najzastupljeniji organski zagađivači šuma (Belis i sar., 2011), a studije ukazuju na veoma značajan udeo fluorantena u sumi PAHs detektovanih u lišću različitih vrsta hrasta (Howsam i sar., 2000; De Nicola i sar., 2008). Ispitivanja su pokazala da fluoranten, pored ostalih PAHs, negativno utiče na fiziološke procese i razviće kako drvenastih tako i kultivisanih biljnih vrsta (Berteigne i sar., 1989; Wittig i sar., 2003; Kummerová i sar., 2008; Tomar i Jajoo, 2014), što se može odraziti na organizme koji se njima hrane.

1.3. Oksidativni stres

Tokom evolucije, organizmi su prelaskom na aerobni način života bili izloženi potencijalno opasnim oksidacionim procesima koji ih mogu dovesti u stanje stresa (Dröge, 2002). Oksidativni stres je proces u kome se aktivirani oblici kiseonika (O₂), poznati kao reaktivne kiseonične vrste (od *engl.* reactive oxygen species, ROS), formiraju kao slobodni radikali u ćelijama (mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu, peroksizomima), u meri koja prevazilazi kapacitete odbrane sistema antioksidativne zaštite, izazivajući oštećenja ćelija i tkiva, potom uzrokujući oksidativna oštećenja (Dalton, 1995; Lesser, 2006). ROS nastaju kao nusproizvodi metaboličkih procesa i obično nisu štetni za organizam (Davies, 2000; Mittler, 2002; Gould, 2003; Møller i sar., 2007). Međutim, tokom perioda povećanog biotičkog i abiotičkog stresa, uključujući izloženost toksičnim zagađivačima poput PAHs, ROS se mogu akumulirati i izazvati oštećenja lipida, proteina i DNK, inhibirajući fiziološke procese (Mittler, 2002; Møller i sar., 2007). Postoje mnoge vrste ROS, uključujući singletni kiseonik (¹O₂), superoksid anjon radikal (O₂^{·-}), vodonik-peroksid (H₂O₂) i hidrosil radikal (HO·) (Dalton, 1995; Lesser, 2006). Pojedini ROS su slobodni radikali (O₂^{·-}, OH·), sposobni za samostalno postojanje i sadrže najmanje jedan nespareni elektron, dok su drugi neradikalske vrste (H₂O₂, ¹O₂) (Halliwell i Gutteridge, 2015). Neradikalske vrste mogu postati radikali gubljenjem ili dobijanjem jednog elektrona (Halliwell i Gutteridge, 2015). Sam O₂ je

slobodni radikal, mada se ponekad naziva dvoradikalom, jer ima dva nesparena elektrona i zato ima ograničenu sposobnost da reaguje sa organskim molekulima ukoliko nije 'aktiviran' (Lesser, 2006). Kiseonik se aktivira pomoću dva osnovna procesa, oksidacije i redukcije (Ahmad, 1992; Halliwell i Gutteridge, 2015).



Slika 1. Šematski prikaz ravnoteže između antioksidativnog sistema (AOS) i reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) (prilagođeno iz Gill i Tuteja, 2010)

1.3.1. Oksidativna oštećenja

Direktno delovanje ROS na proteine, naročito delovanje $\text{OH}\cdot$ i $^1\text{O}_2$, može prouzrokovati degradaciju ćelijskih aminokiselina i proteina (Halliwell i Gutteridge, 2015). Karbonilacija ili nastajanje karbonila, usled oksidacije aminokiselina, je ireverzibilan proces i koristi se kao biomarker oksidativnog stresa (Halliwell i Gutteridge, 2015; Møller i sar., 2007). Oksidovani proteini se proteazama mogu potpuno razgraditi na aminokiseline, a nastali proizvodi mogu se ponovo upotrebiti kao izvori ugljenika za sintezu ATP i proteina (Davies, 2000).

Još jedan vid oštećenja izazvan ROS je lipidna peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina (od *engl.* polyunsaturated fatty acids PUFAs) koja može rezultirati smanjenjem fluidnosti ćelijske membrane i oštećenjima membranskih proteina (Lesser, 2006; Møller i sar., 2007). Pored direktne štete, spektar krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije može prouzrokovati sekundarno oštećenje drugih proteina, što rezultira nepopravljivom fragmentacijom peptidnih lanaca (Davies, 1987; Lesser, 2006). Prevencija povećanog stvaranja ROS je najbolji metod za izbegavanje ovih oštećenja, ali u slučaju lipidne peroksidacije ćelije mogu održavati homeostazu popravljajući oštećene lipidne komponente (Davies, 2000).

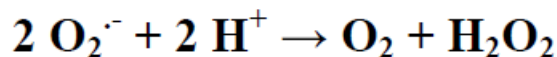
DNK se obično spontano razlaže, ali to se može pojačati u prisustvu oksidativnog stresa (Halliwell i Gutteridge, 2015). DNK može proći kroz mnoštvo modifikacija kao rezultat izloženosti $\text{OH}\cdot$, što rezultira prekidima lanaca DNK molekula, delecijama, mutacijama i translokacijama, unakrsnim povezivanjima u okviru lanaca DNK, kao i povezivanjima DNK i proteina (Lesser, 2006). Kontinuirano oksidativno oštećenje može dovesti do programirane ćelijske smrti, apoptoze i eventualne smrti organizma ako je odbrana od ROS „prebukirana“ (Halliwell i Gutteridge, 2015). Mehanizam popravljanja DNK je složen i zavisi od vrste oštećenja (Halliwell i Gutteridge, 2015), ali se veruje da enzimi GST i GPX igraju važnu ulogu u uklanjanju i izlučivanju oksidovane DNK (Davies, 2000).

1.3.2. Sistem antioksidativne zaštite

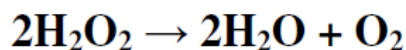
Oksidativni stres je gotovo neizbežan za većinu aerobnih organizama zbog rasprostranjenosti i hemijske prirode O₂, (Lesser, 2006). Aerobni organizmi poseduju odbrambene mehanizme protiv štetnih efekata ROS, koje čine antioksidansi koji sprečavaju, ograničavaju ili popravljaju oštećenja nastala delovanjem slobodnih radikala. Termin antioksidans odnosi se na „bilo koju supstancu koja značajno odlaže ili inhibira oksidaciju“, što uključuje enzime i druga neenzimska jedinjenja (npr. glutation, vitamine, i dr.), (Davies, 2000; Gould, 2003; Hallivell i Gutteridge, 2015).

Srednje crevo je najveći deo probavnog sistema Lepidoptera i predstavlja najvažnije mesto varenja i apsorpcije hrane, ali i veoma važnu prepreku za ksenobiotike unete hranom. Čelije epitela srednjeg creva luče peritrofnu membranu, jedinstvenu aćelijsku semi-permeabilnu barijeru koja, između ostalog, štiti epitel od oštećenja prouzrokovanih toksinima iz hrane (Barbehenn i Stannard, 2004). PAHs i njihovi reaktivni metaboliti mogu generisati ROS koji indukuju oksidativni stres i oštećuju ćelijske makromolekule (Miller i Ramos, 2001). Srednje crevo poseduje niz enzima i neenzimskih komponenata antioksidativne zaštite koji sprečavaju oksidativna oštećenja izazvana ROS. Aktivnosti antioksidativnih enzima su specifične za svako tkivo i izraženije su u metabolički aktivnim tkivima. Zavise od stepena razvoja organizma i mogu varirati između različitih vrsta.

Enzim **superoksid dismutaza** (SOD, EC 1.15.1.1) katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala do vodonik-peroksida i kiseonika (Fridovich, 1995). SOD zajedno sa katalazom predstavlja prvu liniju odbrane od ROS, štiteći ćelije od oksidativnih oštećenja nezavisno od askorbat-glutationskog ciklusa i kao takvi mogu predstavljati značajan biomarker zagađenja (Cossu i sar., 1997). U zavisnosti od vrste metalnog jona koji se nalazi u njegovom aktivnom centru, razlikujemo više vrsta ovog metaloenzima: Fe SOD, Mn SOD, Ni SOD, Cu/Zn SOD i ekstracelularna EC SOD.



Katalaza je jedan od najrasprostranjenijih i najefikasnijih enzima u prirodi i prisutna je kod skoro svih organizama. Vodonik-peroksid se pod uticajem aktivnosti katalaze (CAT, EC 1.11.1.6.) razgrađuje na vodu i kiseonik. Katalaza se sastoji od četiri identične podjedinice u čijem se središtu nalazi hematin (hem – Fe⁺³ protoporfirin) grupa koja predstavlja aktivno mesto enzima. Brzina katalizovane reakcije zavisi od koncentracije supstrata (Diplock, 1994; Halliwell i Gutteridge, 2015).



Kada je koncentracija H₂O₂ niska (<1 μM) CAT pokazuje peroksidaznu funkciju i redukuje H₂O₂ koristeći različite donore vodonika (alkoholi, askorbinska kiselina), dok pri visokim koncentracijama supstrata (>1 μM), CAT brzo uklanja H₂O₂ kroz katalaznu reakciju, gde je H₂O₂ i donor i akceptor vodonika.

Glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2.) je homodimerni flavoprotein sastavljen od dve proteinske subjedinice, od kojih svaka sadrži prostetičku grupu flavin adenin dinukleotid (FAD) u aktivnom centru (Heffner i Repine, 1989). GR ne deluje direktno na ROS, ali konverzijom oksidovanog glutationa u njegov aktivni redukovani oblik, uz učešće NADPH kao redukujućeg kofaktora, omogućava aktivnost glutacion-zavisnih enzima. Katalizovana reakcija se sastoji od dve faze, prvo dolazi do redukcije FAD pomoću NADPH i transfera redukujućeg ekvivalenta na redoks aktivan disulfid, a potom do redukcije GSSG u aktivnom centru enzima (Tandoğan i Ulusu, 2006).



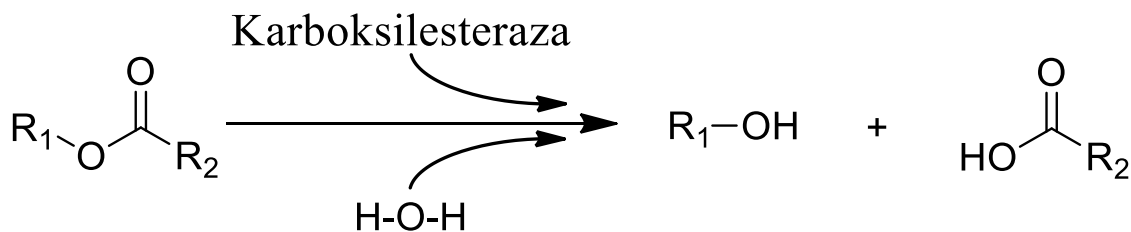
Neenzimskim komponentama sistema antioksidativne zaštite pripada **glutation** (GSH) koji pomaže u održavanju redoks homeostaze. Glutation je tripeptid koji nastaje sintezom aminokiselina (cisteina, glutamata i glicina) koja je katalizovana pomoću enzima glutamilstein-sintetaza i GSH-sintetaza (Griffith, 1999). Glutation je antioksidans koji štiti ćelije od štetnih efekata reaktivnih vrsta kiseonika i azota, poput slobodnih radikala i peroksida (Pompella i sar., 2003). Glutation se može naći u dva oblika, redukovanom (GSH) i oksidovanom (GSSG). U redukovanom, biološki aktivnom obliku, cisteinske tiolne grupe mogu donirati redukujući ekvivalent (H^+ , e^-) pojedinim nestabilnim molekulima, poput reaktivnih vrsta kiseonika ili azota, i tako preći u oksidovani glutation. Dalje, oksidovani glutation se redukuje pomoću enzima glutation reduktaze (GR), uz učešće NADPH kao redukujućeg kofaktora (Huang i Huang, 2002).

Kako bi zaštitila važne biomolekule, peritrofna membrana može biti oksidovana od strane reaktivnih vrsta, pa je stoga poznata i kao “žrtveni antioksidans” (Ahmad i Pardini, 1990; Ahmad i sar., 1991; Ahmad, 1992; Barbehenn i sar., 2001; Barbehenn i Stannard, 2004). Značajno povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima kao odgovor na oksidativni stres zabeležen je u srednjem crevu insekata (Ahmad, 1992), dok je u hemolimfi često detektovana niska aktivnost ovih enzima, iako slobodno-radikalske vrste nastaju i u hemolimfi (Tôru, 1994, 1995). Hemolimfa je, između ostalog, i medijum za transfer ksenobiotika i/ili njihovih metabolita, sadrži hemocite, ćelijske elemente koji igraju ulogu u imunskoj odbrani. Oksidativni i genotoksični efekti ksenobiotika mogu uzrokovati oštećenje hemocita. Komponente antioksidativne odbrane u ćelijama hemolimfe, kao što su enzimi SOD, CAT i GST, kao i neenzimski antioksidansi poput tiola i askorbata, imaju ključnu ulogu u eliminaciji ROS i održavanju optimalnog redoks stanja (Büyükgüzel i sar., 2010; Dubovskiy i sar., 2010).

Promene aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i ekspresija njihovih različitih izoformi ukazuju na fiziološko stanje insekata u stresnim uslovima, i mogu poslužiti kao rani znak upozorenja na izloženost zagađivačima (Stone i sar., 2002; Iljin i sar., 2015; Gavrilović i sar., 2017).

1.3.3. Enzimi koji učestvuju u procesima detoksifikacije

Karboksilesteraze (CESs, EC 3.1.1.1.) su enzimi iz porodice α/β -hidrolaza koji katalizuju hidrolizu karboksilnih estara na alkohol i kiselinu uz dodatak vode, (Junge i Krisch 1975; Myers i sar. 1988; Ollis i sar. 1992; Aldridge 1993; Cygler i sar. 1993; Heikinheimo i sar. 1999; Oakeshott i sar. 1999; Satoh i Hosokawa 2006; Hosokawa i sar. 2007), kao što je prikazano na slici:



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

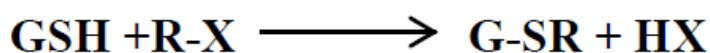
Sugerisani mehanizam ove reakcije se sastoji iz dva koraka. Prvi uključuje nukleofilni napad kiseonika sa serinskog ostatka na karbonilni ugljenik estarske veze. Ovaj korak oslobađa alkoholni metabolit usled acilovanja, karbamilovanja ili fosforilovanja enzima (u zavisnosti da li je supstrat karboksil, karbamat ili fosforni estar), stvarajući vezu između kiselinskog dela supstrata i ostatka serina. Afinitet ostatka histidina prema molekulima vode je važan deo drugog koraka i omogućava enzimu da se vrati u aktivno stanje i oslobodi molekul kiseline (Testa i Krämer 2007; Russell i sar., 2011). Ovaj korak reakcije je uobičajen proces među hidrolazama i odgovara nukleofilnom napadu

vode na acilovan enzim, što dovodi do oslobađanja kiselog dela karboksilnog estera i slobodnog aktivnog enzima (Ollis i sar. 1992; Sogorb i Vilanova 2002). Karboksilesteraze su uključene u detoksifikaciju ili metaboličku aktivaciju različitih lekova, pesticida, zagađivača životne sredine kao i nekih kancerogenih supstanci. Karboksilesteraze karakteriše više enzimskih formi, izoenzima koji se razlikuju u zavisnosti od tkiva, a i vrste organizma (Hosokawa i sar. 1995; Satoh i Hosokawa 1995; Imai, 2006).

Ova grupa enzima je opisana kod velikog broja vrsta insekata (Roslavtseva i sar., 1993; Campbell i sar., 1997; Heidari i sar., 2004, 2005; Devonshire i sar., 2007; Strode i sar., 2008). Kod insekata imaju razne fiziološke funkcije, poput razgradnje neurotransmitera i metabolizma specifičnih hormona i feromona, koje su važne za razvoj insekata i njihovo ponašanje (Taylor i Radic, 1994; Oakeshott i sar., 1999; Gilbert i sar., 2008). Karboksilesteraza, uz glutation S-transferazu i superfamiliju citohrom P450 enzima, učestvuje u razvoju rezistencije na delovanje insekticida, tzv. metaboličke rezistencije, koja se uglavnom javlja usled povećanja ekspresije ili aktivnosti ove tri porodice enzima (Mellor, 1996; Hemingway i Ranson, 2000; Hemingway i sar., 2004; Li i sar., 2007; Braga i Valle 2007; Russell i sar., 2011).

Uticaj PAHs na karboksilesteraze insekata je dokumentovan u par radova (Vicentini i sar., 2017; Grčić i sar., 2019), a takođe je opisan njihov uticaj na karboksilesteraze školjki (Farcy i sar., 2013).

Glutation S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18), enzim II faze biotransformacije katalizuje konjugaciju elektrofilnih toksičnih molekula sa GSH i na taj način smanjuje njihovu potencijalnu reaktivnost sa ćelijskim makromolekulima.



Ova kataliza je moguća zahvaljujući subjedinicama enzima koje se sastoje iz dva funkcionalna regiona u aktivnom centru, hidrofilnog G-regiona koji vezuje GSH i hidrofobnog H-regiona koji se razlikuje kod različitih izoformi u zavisnosti od supstrata koje vezuje. Nastanak GSH konjugata podrazumeva formiranje tioetarske veze između GSH i elektrofila, što supstrat čini manje reaktivnim i rastvorljivijim u vodi, omogućavajući njegovo lakše izlučivanje iz organizma. Pošto vodi eliminaciji peroksida, GST se takođe može smatrati delom antioksidativnih mehanizama insekata. GST je ključni enzim metabolizma ksenobiotika jer detoksifikuje hidrofobna jedinjenja, poput PAHs, katalizujući njihovu konjugaciju sa GSH (Marrs, 1996; Lei i sar., 2003) i tako pruža šansu biljkama i životinjama da izbegnu oksidativni stres izazvan zagađivačima (Pflugmacher i sar., 2000). GST kod insekata privlači pažnju više od 50 godina. Razlog interesa je bio taj što su hemijske reakcije katalizovane ovim enzimima uticale na otpornost insekata na insekticide. Brojne studije su pokazale da su insekticidi metabolisani GSH-zavisnim enzimima (Motoyama i Dauterman, 1975; Ahmad i Forgash, 1976; Hemingway i Ranson, 2000; Li i sar., 2007).

Acetilholinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7.) hidrolizuje acetilholin (ACh) u holinergičkim sinapsama i ima ključnu ulogu u centralnom nervnom sistemu insekata, u kojem je ACh glavni neurotransmiter (Smallman i Mansingh, 1969; Gerschenfeld, 1973; Pichon, 1974; Breer, 1981). Insekatska AChE je globularni dimer povezan disulfidnom vezom. Inhibicija aktivnosti AChE, npr. organofosforinim insekticidima, može izazvati promene u aktivnom mestu enzima, što dovodi do akumulacije acetilholina unutar sinapsi i poremećaja prenosa signala (Gunning i Moores, 2001). Promene aktivnosti AChE su korišćene kao biomarker neurotoksičnosti, najčešće pri delovanju organofosfata i karbamata, ali takođe i kao biomarkeri prisustva organskih zagađivača životne sredine, uključujući PAHs (Fu i sar., 2018). Kod nekoliko vrsta insekata opisane su posledice delovanja insekticida i biopesticida na ovaj enzim (Jensen i sar., 1997; Nathan i sar., 2008). Detekcija inhibicije AChE je pogodan biomarker kod vodenih i kopnenih beskičmenjaka (Hyne i Maher 2003), kao i kod kopnenih insekata izlaganih ksenobioticima (Jensen i sar. 1997; Badiou i sar. 2008).

Uticaj PAHs na AChE kod insekata dokumentovan je u više radova (Mrdaković i sar., 2016; Ilijin i sar., 2017; Vicentini i sar., 2017; Grčić i sar., 2019).

1.3.4. Proteini toplotnog stresa Hsp70

Insekti su, poput mnogih drugih organizama, razvili važan genetski mehanizam odgovora na toplotni stres i povećanja tolerancije na toplotu: brza indukcija ekspresije proteina toplotnog stresa (od *engl.* Heat shock protein, Hsp). Pored zaštite od toplotnog stresa, ovi proteini su uključeni u mnoge biološke procese, obezbeđuju adaptivni odgovor na širok spektar delovanja stresora u životnoj sredini, kao što su izloženost toksičnim supstancama ili zagađivačima, anoksija i isušivanje (Tammariello i sar., 1999; Mahroof i sar., 2005). Oni takođe imaju ulogu u oporavku ćelija nakon uklanjanja stresa. Ovi proteini imaju važnu ulogu u zaštiti osnovnih ćelijskih funkcija, deluju kao šaperoni koji pomažu u održavanju funkcionalne konformacije proteina i omogućavaju njihovu translokaciju kroz ćelijske membrane, minimizirajući proteinske agregate i pomažući u uklanjanju denaturisanih proteina (Mahroof i sar., 2005). Hsp su grupisani u različite porodice proteina na osnovu njihove homologne sekvence i molekulske mase, pa su tako poznati: proteini toplotnog stresa malih molekulskih masa (sHsp) i proteini većih molekulskih masa - Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp100 (Gupta i sar., 2010). Kod insekata, Hsp30, Hsp70 i Hsp90 su tri najistraženije grupe ovih proteina (Denlinger i sar., 2001). Poznato je da oni imaju važne funkcije kod insekata i razlikuju se od vrste do vrste, pa čak i kod jedinki iste vrste (King i MacRae, 2015). Proteini toplotnog stresa Hsp70 su visoko konzervirani (Gross i sar., 2003) i verovatno najbolje okarakterisani i najviše proučavani proteini kod insekata (Neven, 2000; Luo i sar., 2015). Ekspresija Hsp70 se smatra dobrim markerom za inducibilni odgovor na stres u organizmu (Bettencourt i sar., 2008; Colinet i sar., 2010). Proteini toplotnog stresa imaju ključnu ulogu u održavanju ćelijske homeostaze pod stresnim uslovima i uglavnom je proučavan njihov odgovor na ekstremne temperature, npr. kod *L. dispar* larvi u toku dijapauze (Yocum i sar., 1991), ali i kod drugih vrsta insekata (Singh i Lakhota, 2000). Doganlar i Doganlar (2015) su pokazali povećanu ekspresiju Hsp gena kod *Drosophila* sp. izloženih smeši pesticida. Braeckman i sar. (1997), kao i Kafel i sar. (2012) detektovali su povećanu ekspresiju Hsp70 kod vrsta *Aedes albopictus* i *Spodoptera exigua* koje su bile izložene kadmijumu. Međutim, neke studije sugerišu da se metalom indukovana ekspresija Hsp70 razlikuje od vrste do vrste. Indukcija Hsp kao odgovor na PAHs i druge hemijske zagađivače detektovana je kod insekata (Lee i sar., 2006), morskih sasa (Tarrant i sar., 2014) itd. Hsp70 mogu biti indukovani ksenobioticima koji nisu razgrađeni mehanizmima detoksifikacije, pa mogu uticati na pravilno savijanje nativnih proteina (Gupta i sar., 2010). Uticaj PAHs na Hsp70 kod *L. dispar* larvi je opisan u nekoliko radova (Mrdaković i sar., 2016; Ilijin i sar., 2017; Grčić i sar., 2019). Indukcija proteina toplotnog stresa je univerzalan odgovor na citotoksičnost i njihova uloga u zaštiti ćelija protiv negativnog uticaja širokog spektra hemikalija sugeriše da ovi proteini mogu biti dragocen pokazatelj ranog upozorenja na zagađenje životne sredine (Gupta i sar., 2010).

1.4. Digestivni enzimi srednjeg creva i energetske molekuli hemolimfe

Varenje i apsorpcija hrane se uglavnom odvijaju u srednjem crevu insekata, gde su epitelne ćelije zadužene za sintezu digestivnih enzima, procese transporta između lumena i hemolimfe, održavanje vrednosti pH i gradjenata jona kalijuma (Terra i Ferreira, 2012). Brojni enzimi su uključeni u procese varenja određenih hranljivih materija neophodnih za rast, razvoj i reprodukciju insekata (Terra i sar., 1996).

Proteaze su važna grupa enzima koji katalizuju hidrolizu peptidnih veza u proteinima. Zanimljivo je primetiti da se obrazac hranjenja larvi (Browne i Raubenheimer, 2003) i set crevnih proteaza menjaju tokom rasta (Patankar i sar., 2001). Neke vrste Lepidoptera pokazuju neverovatnu fleksibilnost u prilagođavanju različitim biljkama domaćinima menjajući specifičnosti crevnih proteaza kao odgovor na kvalitativne promene u sadržaju proteina u hrani i kada su postojeće proteaze neefikasne za varenje. Larve *Helicoverpa armigera* tokom razvoja pokazuju promenu preference ka ishrani određenim biljnim organima. Larve se u mlađim stupnjevima hrane lišćem,

dok se u starijim hrane semenjem biljaka domaćina, koje ima veći i kvalitativno bogatiji sadržaj proteina, neophodnih za normalno razviće. U skladu sa promenom hrane, ispitivanja su pokazala i diferencijalnu ekspresiju različitih klasa proteaza tokom larvenog razvića. Takođe, različite aktivnosti proteaza *H. armigera*, izloženih delovanju proteinaznih inhibitora (od *engl.* Protease inhibitors, PIs), omogućavaju bolju adaptaciju larvi na odbrambena jedinjenja biljaka, uključujući PIs. Regulisana ekspresija gena za proteaze u toku razvoja, i pri delovanju stresora, važna je za preživljavanje larvi (Patankar i sar., 2001). U srednjem crevu Lepidoptera aktivnost proteaza uglavnom potiče od serinskih proteaza, poput tripsina (TRY, EC 3.4.21.4), koji hidrolizuje peptidne veze u unutrašnjosti polipeptidnog lanca na karboksilnoj strani L-aminokiselina. One doprinose do 95 % potpunom varenju proteina (Terra i Ferreira, 1994; Srinivasan i sar., 2006; Tabatabaei i sar., 2011; Yao i sar., 2012). Aminopeptidaze (leucin aminopeptidaza, LAP, EC 3.4.11.1) su metaloenzimi koji uklanjaju aminokiselinske ostatke sa N-terminusa peptidnih lanaca (Valaitis, 1995). Hidrolizom delimično svarenih oligopeptida, aminopeptidaze srednjeg creva insekata igraju značajnu ulogu u intermedijernom stupnju varenja proteina (Lomate i Hivrale, 2010). Fiziološka uloga aminopeptidaza uključuje regulaciju metaboličkih puteva, kontrolu ćelijskog ciklusa i selektivnu degradaciju proteina (Taylor, 1993). Pored toga, kod nekoliko vrsta insekata, aminopeptidaze koje su vezane za membranu deo su receptorskog mehanizma koji vezuje δ -endotoksine *Bacillus thuringiensis* (Knight i sar., 1994).

Proteaze se obično mogu naći u više molekulskih oblika, poznatih kao izozimi. Karakteriše ih ista katalitička aktivnost, ali poseduju veću fleksibilnost, adaptibilnost i preciznost u obavljanju specifičnih metaboličkih funkcija (Zeidler, 2000). Poznato je da crevo *Helicoverpa armigera* sadrži oko dvadeset različitih vrsta aktivnih izoformi serinskih proteaza (Bown i sar., 1997; Gatehouse i sar., 1997; Patankar i sar., 2001), što može delovati nepotrebno, posebno kada se zna da samo nekoliko njih značajno doprinose varenju. Međutim, širi spektar proteaza može biti vrlo koristan insektima koji su tokom ishrane izloženi delovanju različitih ksenobiotika, unetih hranom.

Lipaze (Triacilglicerol lipaze, EC 3.1.1.3) su enzimi koji hidrolizuju spoljne veze triacilglicerola omogućavajući snabdevanje larvi masnim kiselinama (Terra, 2005). Široko su rasprostranjene među mikroorganizmima, biljkama i životinjama (Naumoff, 2001). Najkarakterističnija osobina lipaza je njihova aktivnost sa supstratom na spoju vodene i lipidne faze (Grillo i sar., 2007). Lipaze imaju ključnu ulogu u varenju, skladištenju i mobilizaciji lipida, a takođe su važne za mnoge fiziološke procese insekata. U srednjem crevu Lepidoptera detektovane su lipaze koje su pokazale galakto- i fosfolipaznu aktivnost (Horne i sar., 2009; Christeller i sar., 2011), kao i potencijalnu esteraznu aktivnost (Mrdaković i sar., 2008). Lipaze *Bombyx mori* su pored digestivne uloge, pokazale i antivirusnu aktivnost (Ponnuvel i sar., 2003).

Pojedini efekti alelohemikalija biljaka i zagađivača životne sredine (insekticida i teških metala) na digestivne enzime su prethodno opisani (Lazarević i Perić-Mataruga, 2003; Mrdaković i sar., 2013; Vlahović i sar., 2015; Zou i sar., 2019; Chen i sar., 2021). Međutim, podaci o delovanju PAHs na digestivne enzime su uglavnom vezani za različite vodene vrste, na čija staništa antropogene aktivnosti imaju značajan uticaj (Charron i sar., 2013; Vignet i sar., 2014; Caruso i sar., 2016). Nedavno su opisane promene aktivnosti digestivnih enzima *Eisenia fetida*, kao odgovor na izloženost PAH fenantrenu (Shi i sar., 2020). Sun i saradnici (2020) pokazali su da fluoranten, sam ili u smeši sa drugim PAH, inhibira aktivnost α -amilaze kroz dejstvo na aktivno mesto enzima. Međutim, prema dostupnim literaturnim podacima, efekti fluorantena na aktivnost digestivnih enzima kod fitofagih insekata do sada nisu bili ispitani.

Alkalne (ALP, EC 3.1.3.1) i **kisele fosfataze** (ACP, EC 3.1.3.2) su enzimi koji hidrolizuju fosfomonoestre, u alkalnim ili kiselim uslovima (Janda i Benešova, 1991). Aktivnost alkalnih i kiselih fosfataza je najveća u srednjem crevu insekata. Primarnu ulogu alkalnih fosfataza karakteriše obezbeđivanje fosfatnog jona iz mononukleotida i ribonukleoproteina za razne metaboličke procese, takođe one učestvuju i u reakcijama transfosforilacije (Sakharov i sar., 1989). Alkalne fosfataze mogu reagovati sa velikim brojem fosfatnih estara u baznim uslovima. Kod

Bombyx mori, ovi enzimi učestvuju u transportu glukoze i masnih kiselina kroz membrane epitela srednjeg creva (Sridhara i Bhat, 1963). Takođe, kod larvi ove vrste pokazana je niska aktivnost enzima u toku presvlačenja larvi, nakon čega se ona postepeno povećava, dostižući najveću vrednost u periodu pre faze maksimalne konzumacije hrane, a najmanju kada larve dostignu potpunu zrelost, (Miao, 1988).

Uloga kiselih fosfataza se ogleda u uklanjanju fosfatnih grupa iz širokog spektra fosfomonoestara u biljnim i životinjskim tkivima. Kisele fosfataze karakterišu brojne uloge, uključene su u procese varenja (Cheung i Lov, 1975), metabolizam ugljenih hidrata (Tsvetkov i sar. 2003), transport jona (Yi i Adams, 2001), zamenu ćelija tokom apoptoze (Srivastava i Saxena, 1967), i druge. Kod insekata, kisele fosfataze su lokalizovane u citosolu ćelija, a u manjoj meri i vezane za membrane epitelnih ćelija srednjeg creva (Terra i Ferreira, 1994). U ćelijama je detektovano prisustvo više izoformi enzima, različite molekulske težine, pH, temperaturnog opsega i afiniteta za različite supstrate (Sridhara i Bhat, 1963; Naqvi i sar., 1968). Aktivnost ukupnih kiselih fosfataza se često izjednačava sa aktivnošću lizozomskih formi, međutim, pojedini autori ukazuju da odgovori nelizozomskih fosfataza bivaju zanemareni (Holtzman, 1989).

Prema dostupnim literaturnim podacima, uticaj PAHs na fosfataze insekata je ispitan kod *L. dispar* larvi izlaganih delovanju benzo[a]pirena (Grčić, 2020). Međutim, studije su pokazale delovanje kadmijuma na aktivnosti fosfataza *L. dispar* larvi (Vlahović i sar., 2009, 2013a i 2013b), različitih biljaka domaćina na aktivnost alkalnih fosfataza *Bemisia tabaci* i *Trialeurodes vaporariorum* (Yan i sar., 2011), kao i uticaj insekticida na alkalne fosfataze pčele *Apis mellifera* (Carvalho i sar., 2013).

Hemolimfa je tečnost analogna krvi kičmenjaka, koja cirkuliše u unutrašnjosti tela insekata ostajući u direktnom kontaktu s tkivima. Čine je tečna faza - plazma u kojoj se nalaze suspendovane hemolimfne ćelije hemociti. Hemolimfa insekata je kompleksan i dinamičan fluid čiji sastav, tj. koncentracija supstanci, zavisi od sastava hrane i dinamke ishrane, razvića i dugih faktora (Mullins, 1985). Ona je centralni izvor informacija o mehanizmima kontrole unosa hranljivih sastojaka. Hemolimfa je ključna za transport kako hranljivih sastojaka, tako i ksenobiotika i njihovih metabolita do okolnih tkiva (Lee i sar., 1996).

Lipidi su grupa jedinjenja širokog spektra prirodnih molekula uključujući masti, voskove, sterole, vitamine rastvorljive u mastima, monogliceride, digliceride, triacilglicerol (TAG) i fosfolipide (Nelson i Cox 2004). Postoji nekoliko podgrupa lipida, uključujući masne kiseline (od *engl.* fatty acids FAs), glicerolipide, glicerofosfolipide, sfingolipide, sterolne lipide, preolne lipide, saharolipide i poliketide (Nelson i Cox 2004; Subramaniam i sar. 2009). Lipidi su ključne komponente membranskih sistema i onih za skladištenje energije kod insekata, kao i početni molekuli za sintezu mnogih sekundarnih metabolita (Horne i sar. 2009). Lipidi su veoma važni za mnoge biološke procese kod insekata kao što su metamorfoza, dijapauza, a mogu učestvovati u sintezi feromona (Hahn i Denlinger 2007; Horne i sar. 2009). Fitofagni insekti lipide dobijaju iz biljaka, uključujući glikolipide, glicerofosfolipide, vosak, sterol i vitamine rastvorljive u mastima (de Carvalho, 2018). Srednje crevo je glavno mesto za varenje i apsorpciju lipida kod insekata, kao i aktivnost enzima, kao što su TAG lipaze, fosfolipaze, holesterol esterase (Tierno de Figueroa i sar., 2011; Christeller i sar., 2011, López-Rodríguez i sar., 2012). Glavni proizvodi varenja, kao što su slobodne masne kiseline (od *engl.* free fatty acids FFAs), neesterifikovani holesterol i drugi, apsorbuju se epitelnim ćelijama creva (Guo i sar., 2008; Canavoso i sar., 2004; Jouni i sar., 2002). Nakon apsorpcije, oni se koriste kao prekursori sinteze složenijih struktura koje će se transportovati u druga tkiva insekata. FFAs se koriste za sintezu diacilglicerola (DAG), fosfolipida i TAG. Lipoforin (Lp), glavni lipoprotein prisutan u hemolimfi, prenosi lipide do određenih organa i može se reciklirati i vratiti u hemolimfu da bi opet bio dostupan kao prenosioč lipida organima kojima je to u datom momentu neophodno (Van Hoof i sar., 2005; Arrese i sar., 2010). Kada insekt ima potrebe za energijom, mobilise zalihe TAG, na primer tokom leta ili tokom razvoja jajašaca kod

ženki (Auerswald i sar., 2005, Gäde i sar, 2004). Kod ženki, proces oogeneze zahteva veliku količinu lipida koji se čuvaju kao žumance i koriste kao izvor energije tokom razvića embriona.

Trehaloza predstavlja neredukujući disaharid, koji se sastoji iz dve glukozne jedinice povezane α , α -1,1-glikozidnom vezom. Ovaj šećer je prisutan kod bakterija, gljiva, nižih i viših biljaka, insekata i drugih beskičmenjaka, gde može služiti kao izvor energije i ugljenika. U životinjskom svetu, trehaloza prisutna u hemolimfi je prvi put opisana kod insekata (Wyatt i Kalf, 1957), u fazi larve i lutke (Fairbairn, 1958). Kod adultnih insekata nivo trehaloze brzo opada tokom određenih aktivnosti koje zahtevaju energiju, kao što je letenje (Evans i Dethier, 1957), ukazujući na ulogu ovog disaharida kao izvora energetski neophodne glukoze. Zbog svojih inertnih hemijskih svojstava, trehaloza igra veliku ulogu u zaštiti organizama od stresnih uslova životne sredine, poput suše i gladovanja (Cornette i Kikawada, 2011; Tapia i Koshland, 2014). Hidroliza trehaloze je pod enzimatskom kontrolom trehalaze.

U literaturi nema podataka o uticaju fluorantena na sastav hemolimfe kod insekata. Pokazano je da uglavnom dolazi do smanjenja nivoa proteina, glikogena i lipida usled uticaja različitih hemijskih zagađivača kod mnogih zglavkara, uključujući insekte (Ortel, 1991; Bischof, 1995; Biung-Sik i sar., 2001; Lavariás i sar., 2006). Do iscrpljenja sadržaja komponenti energetskog metabolizma može doći usled korišćenja ovih rezervi za proizvodnju energije potrebne za prevazilaženje stresa izazvanog zagađivačima (Rambabu i Rao, 1994; Sancho i sar., 1998).

1.5. Osobine životne istorije

Prisustvo bijlnih odbrambenih jedinjenja kao i neorganskih i organskih zagađivača u hrani, može značajno uticati na preživljavanje, razviće i reprodukciju fitofaga. Piskorski i sar. (2011) su dokumentovali da juglon izolovan iz oraha značajno smanjuje stopu preživljavanja i produžava larveno razviće kod larvi Lepidoptera *Grapholita molesta*. Silva i sar. (2016) su ispitali uticaj 4 koncentracije rutina, citrusnog flavonoid glikozida, na larve *Spodoptera frugiperda* i pokazali linerano zavisno produženo larveno razviće i smanjenje masa kod ove vrste Lepidoptera. Matić i sar. (2016) su zabeležili dozno zavisno smanjenje mase petog stupnja *L. dispar* larvi koje su bile izložene dvema koncentracijama kadmijuma, kao i produženo trajanje četvrtog stupnja i ukupno trajanje razvića. Sličan uticaj na osobine životne istorije *L. dispar* larvi imala je i taninska kiselina koja je dovela do smanjenja mase i relativne brzine rasta (Mrdaković i sar., 2013). Nekoliko studija je dokumentovalo delovanje PAHs na osobine životne istorije fitofagih insekata (Mrdaković i sar., 2015; Ilijin i sar., 2015; Grčić i sar., 2019). Da bi prevazišli štetne efekte ksenobiotika, insekti preusmeravaju značajan deo resursa ka indukciji odbrambenih mehanizama što za rezultat ima smanjeni rast i reprodukciju (Van Straalen i Hoffman, 2000). Promene osobina životne istorije povezane su sa efektima na biohemijskom nivou jedinke, i ukazuju na potencijalne promene na nivou čitave populacije (Hyne i Maher, 2003). Ispitivanje fizioloških promena, nakon izlaganja jedinki odabranih model sistema insekata sredinski relevantnim koncentracijama zagađivača, povezuje se sa promenama osobina životne istorije što omogućava sagledavanje njihovih adaptivnih mehanizama i daje doprinos predviđanju efekata zagađivača na insekatske populacije.

2. CILJ

Cilj

Cilj istraživanja je sticanje uvida u obrasce fizioloških odgovora larvi *Lymantria dispar* i *Euproctis chrysorrhoea* (Lepidoptera: Erebidae) na prisustvo sredinski relevantnih koncentracija policikličnog aromatičnog ugljovodonika fluorantena dodatog hrani, i rasvetljavanje mehanizama odbrane od njegovog štetnog delovanja. Ispitivanja aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i aktivnosti detoksifikacionih enzima u različitim tkivima i organima, aktivnosti digestivnih enzima srednjeg creva, promena koncentracija lipida i trehaloze u hemolimfi, kao i promena osobina životne istorije larvi, pružaju mogućnost sagledavanja fizioloških odgovora koji omogućavaju prilagođavanje larvi navedenih vrsta stresnim uslovima u okruženju.

Cilj istraživanja je ostvaren:

- ❖ određivanjem specifičnih aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dismutaza, katalaza, glutation reduktaza) i koncentracija neenzimske komponente antioksidativnog sistema (glutation) u srednjem crevu, kao i aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dismutaza, katalaza) u hemolimfi larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*; detektovanjem i analizom ekspresije enzimskih izoformi;
- ❖ određivanjem specifičnih aktivnosti detoksifikacionih enzima (karboksilestaraza, glutation S-transferaza) u srednjem crevu, kao i specifičnih aktivnosti enzima (karboksilesteraza, acetilholinesteraza) u mozgu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*; detektovanjem i analizom ekspresije enzimskih izoformi;
- ❖ ispitivanjem obrazaca ekspresije proteina toplotnog stresa (Hsp70) u srednjem crevu i mozgu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*;
- ❖ određivanjem specifičnih aktivnosti digestivnih enzima (tripsin, leucin aminopeptidaza, lipaza, alkalne fosfataze, kisele fosfataze -ukupne, lizozomske i nelizozomske) srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*; detektovanjem i analizom ekspresije enzimskih izoformi;
- ❖ određivanjem koncentracija lipida i trehaloze u hemolimfi larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*;
- ❖ utvrđivanjem efekata fluorantena na osobine životne istorije (trajanje razvića, mase i relativne brzine rasta) larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*;
- ❖ utvrđivanjem razlika i sličnosti u odgovoru određenih parametara između ispitivanih vrsta, na prisustvo različitih koncentracija zagađivača u hrani, pomoću kanonijske diskriminacione i klaster analize.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Biologija vrsta

Gubar (*Lymantria dispar* L.) (Slika 3a) i žutotrba (*Euproctis chrysorrhoea* L.) (Slika 3b) su fitofagne, polifagne vrste porodice Erebiidae (Lepidoptera). Gubar je široko rasprostranjena vrsta u šumama severne Zemljine hemisfere, a opseg njegovih biljaka domaćina procenjen je na više od 500 vrsta iz 73 porodice (Lance, 1983; Liebhold i sar., 1995). Ima jednu generaciju godišnje, karakteriše ga holometabolno razviće i izraženi polni dimorfizam mužjaka i ženki, otuda i naziv *dispar* (lat.) u imenu vrste. Ženka polaže jaja u leglima koje pokriva dlačicama sa abdomena štiteći ih tako od štetnih efekata spoljne sredine i predatora. Nakon embrionalnog razvića u jajetu, nastupa faza dijapauze, a potom nastavak razvića, tako da gubar prezimljava u tzv. „pharate“ prvom larvenom stupnju (Leonard, 1968). Larve se pile u proleće, u vreme pojave mladog lišća biljaka domaćina, karakteriše ih pet (mužjaci), odnosno šest (ženke) larvenih stupnjeva. Gubar se u stadijumu adulta ne hrani, od ishrane larvi zavisi kako njihovo razviće, tako i obezbeđivanje resursa za razviće u stadijumu lutke i aktivnosti adulta. Larve gubara, posebno u starijim stupnjevima, hrane se velikim količinama lišća biljaka domaćina, a u periodima prenamnoženja izazivaju golobrst nanoseći velike štete šumama i voćnjacima.

Žutotrba (*Euproctis chrysorrhoea* L.) je takodje široko rasprostranjena vrsta, prisutna u šumama Evrope, Azije i severne Afrike. Krajem 19. veka vrsta je uneta u Severnu Ameriku gde je nakon inicijalno velike brojnosti i širokog rasprostranjenja na istoku, prisutnost svedena na populacije sa ograničenim arealom rasprostranjenja (Elkinton i sar., 2006; Frago i sar., 2009). Opseg biljaka domaćina žutotrbe je procenjen na oko 26 rodova iz 13 porodica (Forestry Compendium, 2005). Pored toga što nanosi velike štete šumama, takodje značajano oštećuje i voćnjake, ukrasno drveće i žbunje. Ima jednu generaciju godišnje i holometabolno razviće, a adulti se ne hrane i kratko žive. Ime vrste žutotrba je nastalo usled činjenice da ženke na abdomenu imaju izražene dlačice zlatnožute boje. Ženke polažu jaja u najnim leglima pokrivajući ih dlačicama sa abdomena. Larve se pile krajem leta a tokom jeseni, obmotavanjem skeletiranih listova paučinastim nitima, grade zajednička zimska gnezda unutar kojih prezimljavaju i u kojima provode i period dijapauze, karakterističan za drugi ili treći stupanj (Elkinton i sar., 2006), a prema podacima Kereši i sar. (2019) u zimskim gnezdima prezimljavaju larve prvog stupnja. Larve se pre ulaska u dijapauzu malo hrane i veoma sporo razvijaju, obzirom na ishranu starim lišćem siromašnog nutritivnog kvaliteta. Stoga je postdijapauzni period najvažniji u njihovom razviću, kada se u proleće larve pojavljuju iz zimskih gnezda i počinju ishranu na tek formiranim listovima i pupoljcima biljaka domaćina (Kelly i sar., 1989). Broj larvenih stupnjeva prosečno je 6 u optimalnim laboratorijskim uslovima (Frago i sar., 2009). Kao i kod gubara, i kod žutotrbe se javljaju periodi prenamnoženja, kada ishrana larvi može izazvati velika oštećenja u šumskim sastojinama. U pojedinim periodima se istovremeno mogu javiti prenamnoženja gubara i žutotrbe, što pojačava njihovo veoma štetno delovanje.

a.



b.



Slika 3. a. *Lymantria dispar* i b. *Euproctis chryorrhoea* larve

3.2. Uslovi gajenja i eksperimentalne grupe

Legla gubara sakupljena su novembra meseca, iz mešovite hrastove šume u okolini Majdanpeka (Nacionalni park „Đerdap“), dok su zimska gnezda žutotrbe sakupljena u februaru, iz mešovite hrastove šume u okolini Prijepolja, regiona zaštićenih područja, bez značajnih izvora zagađenja. Legla gubara su držana na temperaturi od 4°C do aprila kada su prebačena na temperaturu od 23±0.5°C i fotoperiod 12 sati svetlosti i 12 sati mraka, radi piljenja i daljeg razvića. Zimska gnezda žutotrbe su takodje čuvana na temperaturi od 4°C, a krajem marta prebačena su na sobnu temperaturu, posle čega su larve počele da izlaze iz gnezda. Po izlasku iz gnezda, larve su dalje gajene na temperaturi od 26±0.5°C i pri fotoperiodu od 16 sati svetlosti i 8 sati mraka, u laboratorijskim uslovima optimalnim za početak hranjenja, dalje razviće i presvlačenje u naredne larvene stupnjeve (Kelly i sar., 1989; Frago i sar., 2009). Larve su gajene u Petri posudama (V=200mL), deset larvi po posudi, do presvlačenja u treći stupanj kada je gajeno po 5 larvi u jednoj posudi. Nakon presvlačenja u četvrti stupanj larve su gajene pojedinačno u Petri posudama, do žrtvovanja, trećeg dana po presvlačenju u peti stupanj. Larve su hranjene veštačkom hranljivom dijetom pogodnom za obe vrste (O'Dell i sar., 1985; Kelly i sar., 1989), a njihov razvoj je praćen svakodnevno radi kontrole presvlačenja.

Eksperimentalne grupe su formirane tako što su od piljenja, odnosno izlaska iz gnezda, larve obe vrste svrstavane u jednu od tri eksperimentalne grupe: kontrolne grupe-C (*engl.* control) koje su gajene na veštačkoj dijeti bez dodataka, kao i grupe kojima je u dijetu dodavano 6,7 ng –Fl grupa (*engl.* Fluoranthene low), odnosno 67 ng –Fh grupa (*engl.* Fluoranthene high) fluorantena, po g suve mase hrane. Fluoranten (Sigma-Aldrich) je najpre rastvaran u minimalnoj zapremini acetona do odgovarajućih koncentracija, a zatim mešan sa čvrstim sastojcima veštačke dijete kojoj je potom dodat agar prokuvan u destilovanoj vodi. Homogeno izmešana dijeta je ravnomerno izlivana u plastične posude i ostavljena 4^h radi potpunog isparenja zaostalog acetona. Veštačka dijeta kontrolnih grupa sadržala je samo rastvarač (aceton) u istoj zapremini (van der Hoeven, 2010; OECD, 2013). Manja koncentracija fluorantena je odabrana na osnovu rezultata merenja sadržaja ovog zagađivača na lišću različitih biljaka, između ostalih i hrasta (Howsam i sar., 2000), biljke čijim lišćem se rado hrane kako larve gubara, tako i larve žutotrbe. Veća koncentracija fluorantena odgovara koncentracijama PAHs zabeleženim u lišću različitih biljnih vrsta (Alfani i sar., 2001;

Tian i sar., 2008, i dr.). Larve su hranjene odgovarajućim količinama hrane koja je menjana svakog drugog dana. Larve su žrtvovane trećeg dana po presvlačenju u peti stupanj.

3.3. Ispitivanje osobina životne istorije larvi *L. dispar* i *E. chrysoorrhoea*

Procena uticaja prisustva različitih koncentracija fluorantena u veštačkoj hranljivoj dijeti na osobine životne istorije larvi *L. dispar* i *E. chrysoorrhoea* vršena je analizom:

1. Trajanja razvića larvi *L. dispar* od piljenja do trećeg dana po presvlačenju u peti stupanj, kao i od presvlačenja u treći stupanj do žrtvovanja, trećeg dana po presvlačenju u peti stupanj.
2. Trajanja razvića larvi *E. chrysoorrhoea* od presvlačenja u treći stupanj do žrtvovanja, trećeg dana po presvlačenju u peti stupanj.
3. Masa *L. dispar* i *E. chrysoorrhoea* larvi trećeg dana po presvlačenju u peti stupanj.
4. Relativne brzine rasta (od *engl.* relative growth rate, RGR) larvi u periodu od ulaska u treći stupanj, do žrtvovanja. Formula korišćena za izračunavanje RGRt je:

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

gde W_t predstavlja masu larve trećeg dana po presvlačenju u peti stupanj, W_0 masu larve po presvlačenju u treći stupanj, dok je t dužina ispitivanog vremenskog intervala u danima, (Farrar i sar., 1989; Mrdaković i sar., 2015).

5. Relativne brzine rasta larvi $RGR_{5/3}$ od ulaska u peti stupanj do trećeg dana po ulasku u peti stupanj, po istoj, gore navedenoj formuli.

3.4. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i detoksifikacije

3.4.1. Priprema homogenata

Larve *L. dispar* i *E. chrysoorrhoea* iz svake ispitivane grupe su žrtvovane dekapitacijom na ledu, trećeg dana od ulaska u peti larveni stupanj, a hemolimfa je prikupljena u mini-tube u koje je dodat kristal feniltiouree, koja inhibira aktivnost fenoloksidaze. Iz glavene kapsule larve ekstrahovan je mozak. Disekvano je srednje crevo (koje je najduži deo creva ispitivanih vrsta), uzdužnim rezom integumenta. Iz dela uzorkovanih srednjih creva je izolovana peritrofna membrana da bi se dobilo tkivo srednjeg creva. Mozak, celo srednje crevo, tkivo srednjeg creva, kao i hemolimfa su do homogenizovanja skladišteni na temperaturi od -20°C .

Za razblaživanje uzoraka hemolimfe korišćen je pufer pH 7 (1,15% KCl, 25 mM K_2HPO_4 , 5 mM PMSF i 2 mM DTT), ohlađen na 0°C . Uzorci su sonifikovani na frekvenciji od 20 kHz, tri puta u intervalima od po deset sekundi, sa pauzom između intervala od deset sekundi (sonifikatorom Bandelin HD 2070). Dobijeni uzorci homogenizovane hemolimfe su centrifugirani petnaest minuta na 10000 g, na temperaturi od 4°C (centrifugom Eppendorf 5417R). Izolovani supernatanti su skladišteni na temperaturi od -20°C .

U okviru svake ispitivane grupe pulovano je po 25-30 mozgova, koji su razblaženi ledeno hladnom dejonizovanom vodom u odnosu 1/9 (w/V) i homogenizovani na ledu, na 5000 obrtaja/minuti (homogenizatorom MHX/E Xenox Germany) tri puta u intervalima od po deset sekundi, sa pauzom između intervala od petnaest sekundi. Dobijeni uzorci homogenizovanih mozgova su centrifugirani deset minuta na 10000 g, na temperaturi od 4°C (centrifugom Eppendorf 5417R). Od izolovanih supernatanta su izdvojeni alikvoti, koji su skladišteni na -20°C .

Svako celo srednje crevo kao i tkivo srednjeg creva je homogenizovano pojedinačno na ledu, u saharoznom puferu pH vrednosti 7,4 (0,25 M saharoza, 0,05 M Tris-HCl i 0,001 M EDTA) za šta je korišćen homogenizator Ultra Turrax (IKA-Werke). Finalna koncentracija rastvora tkiva

Materijal i metode

od 200 mg/mL postignuta je dodavanjem saharoznog pufera. Homogenizacija uzoraka odvijala se na 20000 obrtaja/minuti, u 3 ciklusa od po deset sekundi, sa pauzama između intervala od petnaest sekundi. Potom su uzorci sonifikovani na frekvenciji od 20 kHz, tri puta u intervalima od po deset sekundi, sa pauzom između intervala od deset sekundi (sonifikatorom Bandelin HD 2070). Supernatanti izolovanih homogenata dobijeni su centrifugiranjem na 105000 g tokom 100 minuta na temperaturi od 4°C (ultracentrifugom Beckman L7-55), a potom skladišteni na temperaturi od -20°C.

Od sonifikovanih homogenata su odvojeni alikvoti za određivanje koncentracije ukupnog GSH. Alikvoti su pomešani sa 10% sulfosalicilnom kiselinom (da bi se proteini istaložili) i centrifugirani na 10,000 g 20 min na 4°C (5417R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Dobijeni supernatanti su korišćeni za dalju analizu određivanja koncentracije GSH.

Izolovani supernatanti mozga, celog srednjeg creva i tkiva srednjeg creva, kao i hemolimfe upotrebljeni su za određivanje aktivnosti enzima. Za određivanje koncentracije ukupnih proteina u supernatantima navedenih tkiva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* korišćena je Bradfordova metoda (1976), dok je kao standard proteina korišćen goveđi albumin iz seruma (BSA, od eng. Bovine serum albumin). Za kvantifikaciju proteinskih traka nakon zimogramskog određivanja aktivnosti enzima, na nativnim gelovima od poliakrilamida, korišćena je denzitometrijska analiza pomoću programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

3.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite i detoksifikacije

3.4.2.1. Superoksid dismutaza

Određivanje aktivnosti SOD u celom srednjem crevu i tkivu srednjeg creva, kao i hemolimfi larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* rađeno je po metodi koju su opsali Misra i Fridovich (1972). Metoda se temelji na inhibiciji autooksidacije adrenalina pomoću enzima, na alkalnim pH vrednostima. Prilikom transformacije adrenalina u adenohrom nastaje superoksid anjon radikal koji reverzibilno povećava brzinu autooksidacije. SOD eliminiše nastali superoksid anjon radikal, i na taj način smanjuje brzinu kojom se stvara adenohrom. Za merenje aktivnosti SOD upotrebljena je brzina autooksidacije adrenalina, i to kao promena apsorbancije u zavisnosti od vremena, izmerena na talasnoj dužini od 480 nm, na temperaturi od 25°C. U reakcionoj smeši, pored uzorka i adrenalina, bio je i karbonatni pufer pH vrednosti 10,2 (50 mM Na₂CO₃ i 0,1 mM EDTA). Aktivnosti SOD izražena je kao količina enzima koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbancije tokom jednog minuta.

3.4.2.2. Katalaza

Aktivnost katalaze u celom srednjem crevu, tkivu srednjeg creva i hemolimfi larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* određivana je pomoću metode po Claiborne (1985), koja se temelji na merenju brzine enzimski katalizovane razgradnje vodonik peroksida na kiseonik i vodu. Smanjenje apsorbancije mereno je na talasnoj dužini od 240 nm, na temperaturi od 25°C. U reakcionoj smeši, pored uzorka i vodonik peroksida, bio je i 50 mM fosfatni pufer pH vrednosti 7. Količina vodonik peroksida je određena tako da vrednost apsorbancije slepe probe bude u opsegu između 0,525 i 0,550, dok je koncentracija uzorka određena da se srednja vrednost apsorbancije menja u opsegu između 0,03 i 0,06. Nakon dodavanja uzorka u reakcionu smešu apsorbancija je merena

na svakih trideset sekundi, u periodu od 3 minuta. Jedinica za aktivnost katalaze formulisana je kao broj mikromolova vodonik peroksida redukovanih tokom jednog minuta.

3.4.2.3. Glutation reduktaza (GR)

Metoda koju su opisali Glatzle i saradnici (1974) je korišćena za određivanje aktivnosti GR celog srednjeg creva i tkiva srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*. Princip metode zasniva se na potrošnji NADPH prilikom redukcije oksidovanog glutaciona (GSSG) standardne koncentracije, prilikom čega dolazi do snižavanja apsorbcije merene na talasnoj dužini od 340 nm, na temperaturi od 25°C. U reakcionoj smeši, pored uzorka nalazili su se i 0,50 M fosfatni pufer pH vrednosti 7,4, 2 mM GSSG, 0,5 mM EDTA i 0,1 mM NADPH. Koncentracija uzorka u reakcionoj smeši je podešena da se srednja vrednost apsorbcije menja u opsegu između 0,003 i 0,006. Posle lag faze, koja je trajala trideset sekundi, apsorbcija je merena na svakih trideset sekundi, u periodu od 3 minuta. Jedinica za aktivnost GR definisana je kao broj nanomolova NADPH oksidovanih u toku 1 minuta.

3.4.2.4. Ukupni glutacion (GSH)

Metoda koju je opisao Griffith (1980) je korišćena za detekciju ukupnog glutaciona (redukovani oblik GSH i oksidovani oblik GSSG) u homogenatima celog srednjeg creva i tkiva srednjeg creva, u kojima je za taloženje proteina upotrebljena sulfo-salicilna kiselina. Princip metode je reciklirajući proces u kom se naizmenično odvija oksidacija GSH pomoću DTNB (5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoične kiseline) i redukcija NADPH pomoću enzima GR, prilikom čega dolazi do povećavanja apsorbcije merene na talasnoj dužini od 412 nm, na temperaturi od 30°C. Apsorbcija je merena na svakih trideset sekundi, u periodu od tri minuta. Koncentracija ukupnog glutaciona izražena je kao broj nanomolova po gramu vlažnog tkiva.

3.4.2.5. Karboksilesteraza

Metoda koju su opisali Main i saradnici (1961) upotrebljena je za određivanje aktivnosti karboksilesteraza u mozgu, celom srednjem crevu i tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*. Metoda se zasniva na korišćenju kontinualnog spektrofotometrijskog eseja u kojem se vrši detekcija supstrata *o*-nitrofenol butirata, koji nakon hidrolize oslobađa *o*-nitrofenil, dodatkom 15 mM supstrata u 50 mM natrijum fosfatni pufer pH vrednosti 7,5 na temperaturi od 30°C. Apsorbcija je merena na svakih trideset sekundi, u periodu od 4 minuta, na talasnoj dužini od 414 nm. Jedinica za aktivnost karboksilesteraza određena je kao broj mikromolova *o*-nitrofenil butirata koji se hidrolizuje u minuti.

3.4.2.6. Glutation S-transferaza

Određivanje aktivnosti GST u celom srednjem crevu i tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* izvršeno je metodom koju su opisali Habig i saradnici (1974). GST katalizuje konjugaciju supstrata 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) sa -SH funkcionalnim grupama redukovanih glutaciona (GSH). Tom prilikom dolazi do povećanja količine konjugata u reakcionoj smeši, što rezultuje povećanjem apsorbcije merene na talasnoj dužini od 340 nm, na temperaturi od 25°C. U reakcionoj smeši, pored uzorka nalazili su se i 0,5 M fosfatni pufer pH 6,5, 25 mM CDBN i 20 mM GSH. Apsorbcija je merena na svakih trideset sekundi, u periodu

od tri minuta. Jedinica za aktivnost GST određena je kao broj nanomolova GSH koji se potroši u procesu konjugacije u minuti.

3.4.2.7. Acetilholinesteraza

Određivanje aktivnosti acetilholinesteraza u mozgu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* izvršeno je prema metodi Ellman i saradnika (1961). Metoda se zasniva na hidrolizi supstrata acetiltioholin jodida, prilikom čega dolazi do oslobađanja tiholina koji u reakciji sa 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoevom kiselinom) (DTNB) formira anjon 5-tio-2-nitrobenzoata žute boje, čija se koncentracija može pratiti merenjem apsorbancije na 406 nm, na temperaturi od 25°C. U reakcionoj smeši su se, osim uzorka, nalazili i 0,40 mM DTNB i 0,25 M acetiltioholin, a apsorbancija je, nakon lag faze od jednog minuta, merena na svakih 15 sekundi tokom tri i po minuta. Aktivnost acetilholinesteraza definisana je kao broj mikromolova acetiltioholin jodida hidrolizovanih u minuti.

3.4.3. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaze, katalaze i karboksilesteraza nativnom elektroforezom

3.4.3.1. Nativna poliakrilamidna elektroforeza (PAGE)

Priprema rastvora, uzoraka i opis rada:

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

| | |
|----------------------|--------|
| Akrlamid | 58,4 g |
| Bisakrlamid | 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 |

Materijal i metode

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 |

Enzimaska aktivnost, zastupljena u homogenatima celog srednjeg creva i tkiva srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*, detektovana je upotrebom metode jednodimenzionalne elektroforeze na nativnom poliakrilamidnom gelu, koju je opisao Laemmli (1970), bez dodatka natrijum dodecil sulfata (SDS) i redukujućih agenasa.

Receptura za dobijanje nativnih poliakrilamidnih gelova, koji su korišćeni za analizu uzoraka, data je u Tabeli 1. Masena koncentracija gela za koncentrovanje bila je konstantna (4%), dok su za specifične enzime upotrebljene različite koncentracije gela za razdvajanje.

Tabela 1. Recepture za dobijanje gelova za koncentrovanje i razdvajanje uzoraka.

| 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 |

Rastvor gela za razdvajanje, prethodno dezaerisan, nasut je između ploča, i preko njega je dodat rastvor za nadslojavanje. Pošto je polimerizacija gela za razdvajanje završena, nasut je dezaerisani rastvor gela za koncentrovanje, gde je postavljen i “češalj” koji služi za stvaranje bunarčića gde su nanoseni uzorci. Uzorcima je dodat pufer za uzorke, u odnosu 2:1, i držani su na sobnoj temperaturi pet minuta, pre nanošenja na gel. Nakon polimerizacije gela i uklanjanja “češlja”, a pre dodavanja uzoraka, bunarčići su isprani destilovanom vodom. Prilikom ulaska uzoraka unutar gela za razdvajanje korišćen je konstantan napon od 80 V, nakon čega je napon povišen na 100 V do kraja razdvajanja.

3.4.3.2. Superoksid dismutaza

Metoda koju su definisali Azevedo i saradnici (1998) korišćena je za određivanje aktivnosti SOD u celom srednjem crevu i tkivu srednjeg creva larvi, u gelu posle poliakrilamidne elektroforeze. U svaki bunarčić na poliakrilamidnom gelu (koncentracije 12%) dodato je po 10 µg proteina. Posle elektroforeze gel je dva puta ispran destilovanom vodom (po jedan minut), a potom inkubiran u 50 mM karbonatno bikarbonatnom puferu pH vrednosti 10,2 (pufer je sadržao 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitro plavo tetrazolijuma i 0,3% TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin)), u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, gel je potopljen u destilovanu vodu i izložen svetlu (dnevnom ili veštačkom) do nastajanja svetlih traka, nasuprot tamno-ljubičaste boje gela, koje označavaju aktivnost SOD u analiziranim uzorcima.

3.4.3.3. Katalaza

Primenom metode koju su opisali Aebi i saradnici (1983) određena je aktivnost katalaze u celom srednjem crevu i tkivu srednjeg creva larvi. U svaki bunarčić na poliakrilamidnom gelu (koncentracije 8%) stavljeno je po 10 µg proteina. Nakon završene elektroforeze, gel je dva puta ispran destilovanom vodom (po jedan minut), a zatim inkubiran dvadeset minuta u 50 mM fosfatnom puferu (pH vrednosti 7,8) kome je dodat 10 mM H₂O₂ (70 µl 30% H₂O₂ na 100 ml puferskog rastvora), u mraku na sobnoj temperaturi. Po okončanju inkubacije, gel je ispran destilovanom vodom, a potom potopljen u smešu vodenih rastvora 2% FeCl₃ i 2% K₃Fe(CN)₆, koji su prethodno ohlađeni u ledenom kupatilu i pomešani u odnosu 1:1 neposredno pre uranjanja gela. Gel je ostavljen u navedenom rastvoru sve do nastajanja traka žute boje, koje su indikator aktivnosti katalaze, nasuprot zelene boje gela.

3.4.3.4. Karboksilesteraze

Metoda koju je formulisao Loxdale (1983) upotrebljena je za određivanje izoformi karboksilesteraza u celom srednjem crevu i tkivu srednjeg creva larvi, pomoću nativne PAGE. Po 10 µg proteina dodato je u bunarčiće poliakrilamidnog gela (koncentracije 7,5%). Konstantan napon od 100 V korišćen je prilikom elektroforeze, gde se razdvajanje vršilo na temperaturi od 4°C. Posle razdvajanja, gel je uronjen u 20 mM rastvor natrijum fosfata (pH vrednosti 7,2), 1,1 mM rastvora α-naftil acetata u acetonu i 1,2 mM rastvora Fast Blue B u destilovanoj vodi. Inkubacija je trajala 40 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je došlo do pojave traka ljubičaste boje koje su pokazatelj aktivnosti karboksilesteraze.

3.5. Detekcija Hsp70

3.5.1. Detekcija Hsp70 Western blotom u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

3.5.1.1. Priprema homogenata srednjeg creva

Cela srednja creva larvi obe vrste homogenizovana su pojedinačno, na ledu, u 0,9% NaCl uz dodatak proteaznih inhibitora finalne koncentracije 2 mM fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF) i 20 µM E64. Tkiva su razblažena u odnosu 1:4 (w/V). Homogenizacija je ponovljena tri puta po 10 sekundi, pri brzini od 20000 obrtaja/min, i pauzama između ponavljanja od 15 sekundi. Homogenati su potom centrifugirani 10 minuta na 10000 g. Izdvojeni supernatanti su zamrznuti na -20°C. Koncentracija proteina je određivana prema Bradfordu (1976).

3.5.1.2. Western blot

U pojedinačne uzorke celih srednjih creva dodat je Lemlijevim pufer koji je sadržao SDS i 2-merkaptetanol, smeša je kuvana 2 minuta u ključalom vodenom kupatilu. SDS elektroforezom analizirana su po dva pojedinačna uzorka celog srednjeg creva larvi obe vrste. Stavljeno je 70 µg proteina po bunarčiću na 12% poliakrilamidnom gelu. Dalji koraci su opisani u odeljku detekcije Hsp70 u mozgu.

3.5.2. Određivanje nivoa ekspresije Hsp70 u mozgu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

3.5.2.1. Priprema homogenata mozga

Žrtvovanje larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* na ledu odvijalo se trećeg dana po presvlačenju u peti stupanj, kada su iz glavenih kapsula izolovani mozgovi. Pulovani mozgovi (25-30 po eksperimentalnoj grupi) su razblaženi pomoću 0,9% rastvora NaCl, u razmeri 1:9 (w/V). Homogenizacija pulova vršena je na ledu, na 5000 obrtaja/minuti, tri puta po 10 sekundi, sa pauzama od po 15 sekundi. Posle deset minuta centrifugiranja na 10000 g, izolovani su supernatanti i skladišteni na temperaturi od -20°C.

3.5.2.2. Western blot

Uzorci za SDS poliakrilamidnu elektroforezu na denaturišućem gelu (koncentracije 12%) su pripremani dodavanjem Lemlijevog pufera sa SDS i 2-merkaptetanolom, i zagrevanjem na ključalom vodenom kupatilu tokom dva minuta. Po svakoj eksperimentalnoj grupi ispitano je 20 µg proteina. Elektroforetsko razdvajanje odvijalo se na sobnoj temperaturi, primenom konstantnog napona (100 V). Posle elektroforeze, razdvojeni proteini su preko noći prebačeni sa gela na nitroceluloznu membranu, na naponu od 40 V na 4°C. Za blokiranje membrane korišćeno je 4% obrano mleko u TBST puferu (od *engl.* Tris buffered saline, 0,1% Tween 20 u TBS puferu) tokom 30 minuta, praćeno inkubacijom 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 preko noći. Ispiranje membrane je vršeno u TBST, 6 puta po pet minuta, a potom je inkubirana jedan sat sa sekundarnim anti-mišijim antitelom, HRP-konjugovanim (Sigma Aldrich) razblaženim 1:10000 u 4% mleku u TBST. Nakon ispiranja u TBST (6 puta po pet minuta), proteini Hsp70 su vizualizovani na autoradiografskom filmu primenom ECL (od *engl.* enhanced chemiluminescence) reagensa (Amersham).

3.5.2.3. Indirektni ELISA test

Pulovani uzorci mozgova, razblaženi pomoću karbonatno-bikarbonatnog pufera (pH vrednosti 9,6), dodati su u bunarčice mikrotitar pločice (10 µg proteina po bunarčiću) gde su ostavljeni preko noći na temperaturi od 4°C. Ispiranje mikrotitar pločice vršeno je 3 puta u PBST puferu (0,05% Tween 20 u fiziološkom rastvoru sa fosfatnim puferom PBS (od *engl.* phosphate-buffered saline)), posle čega je dva sata inkubirana u PBST sa 5% mlekom. Blokiranje reaktivnih površina mikrotitar pločice obavljeno je pomoću obranog mleka, nakon čega je pločica isprana sa PBST, i inkubirana sa primarnim anti-Hsp70 mišijim IgG1 antitelom (monoklonsko, klon BRM-22, Sigma Aldrich) razblaženim 1:5000 u 5% mleku u PBST, preko noći na temperaturi od 4°C. Nakon ispiranja pločica je inkubirana dva sata na sobnoj temperaturi sa sekundarnim anti-mišijim antitelom, HRP-konjugovanim (Sigma Aldrich) razblaženim 1:10000 u 5% mleku u TBST. Razvijanje boje postignuto je pomoću supstrata za peroksidazu rena - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), dok je adekvatan stop reagens (Sigma Aldrich) korišćen za zaustavljanje reakcije. Uzorci su ispitivani u triplikatu, očitavanjem vrednosti apsorbance na 450 nm, pomoću ELISA čitača (LKB 5060-006). Serija razblaženih rastvora rekombinantnog Hsp70 korišćena je za dobijanje standardne prave, na osnovu koje su određivane koncentracije Hsp70 u uzorcima.

3.6. Detekcija aktivnosti digestivnih enzima

3.6.1. Priprema homogenata celog srednjeg creva

Žrtvovanje larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* izvedeno je dekapitacijom, trećeg dana po ulasku u peti stupanj, posle čega su na ledu disekovana cela srednja creva i smeštena su na -20°C . Homogenizacija individualnih celih srednjih creva se odvijala na ledu u 0,15 M rastvoru NaCl, optimizovano da konačna koncentracija tkiva bude 100 mg/mL. Proces homogenizacije realizovan je u tri ciklusa od deset sekundi, na 20000 obrtaja/minuti, sa pauzama od 15 sekundi između svakog ciklusa. Dobijeni homogenati su centrifugirani deset minuta na 10000 g na temperaturi 4°C , posle čega su izolovani alikvoti supernatanata skladišteni na temperaturi od -20°C . Bradfordova metoda (1976) je korišćena za merenje koncentracije proteina u svakom od izolovanih supernatanata, poređenjem sa standardom BSA (albumin iz goveđeg seruma). Posle zimografske detekcije aktivnosti enzima na nativnim poliakrilamidnim gelovima, izvršena je kvantifikacija elektroforetskih traka denzitometrijskom analizom upotrebom programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

3.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje specifične aktivnosti digestivnih enzima

3.6.2.1. Tripsin

Metoda koju su formulisali Erlanger i saradnici (1961) i Valaitis (1995) korišćena je za određivanje enzimske aktivnosti tripsina, koja je proporcionalna količini *p*-nitroanilina, oslobođenog iz supstrata *N*_α-benzoi-DL-arginin 4-nitroanilid hidrohlorida (DL-B[A]PNA). Uzorci su inkubirani 15 minuta sa 20 mM rastvorom supstrata u 50 mM glicin/NaOH puferu (pH vrednosti 10), na temperaturi od 30°C . Nakon prekidanja reakcije pomoću 6% rastvora sirćetne kiseline, apsorbancija je merena na 405 nm.

3.6.2.2. Leucin aminopeptidaza

Aktivnost leucin aminopeptidaze određena je primenom metode koju su opisali Erlanger i saradnici (1961), dodavanjem uzoraka u 40 mM pufer veronal/HCl (pH vrednosti 7,8 do 8,0) u kojem se nalazilo 20 mM supstrata, L-leucin *p*-nitroanilida. Nakon isteka vremena od deset minuta, reakcija je prekinuta dodatkom 6% rastvora sirćetne kiseline, pa je merena apsorbancija u uzorcima na 405 nm. Količina oslobođenog *p*-nitroanilina je direktno proporcionalna aktivnosti leucin aminopeptidaze.

3.6.2.3. Lipaze

Aktivnosti lipaza su ispitane korišćenjem modifikovane metode koje su opisali Arreguin-Espinoza i saradnici (2000), a koju su za lipazu gubara prilagodili Mrdaković i saradnici (2008). Metoda se zasniva na kontinuiranoj spektrofotometrijskoj detekciji hidrolize *p*-nitrofenil kaprilata (pNPC), gde se oslobađa *p*-nitrofenol, na 410 nm. Uzorak je dodat u reakcionu smešu sa 50 mM rastvorom Tris/HCl pufera (pH vrednosti 8,2) sa 2,5 mM pNPC, i praćena je aktivnost enzima u vremenskom opsegu od četiri minuta na 37°C . Aktivnost enzima određena je kao količina enzima koja se troši na oslobađanje 1 μmol *p*-nitrofenola po minuti.

3.6.2.4. Alkalne fosfataze

Metoda Nemeč i Soča (1998) je upotrebljena za ispitivanje aktivnosti alkalnih fosfataza. Metoda se bazira na hidrolizi *p*-nitrofenil fosfata (*p*NPP) u baznim uslovima, pri čemu nastaje *p*-nitrofenol. Uzorak je dodat u reakcionu smešu sa 100 mM rastvorom Tris/HCl pufera (pH vrednosti 8,6), 5 mM MgCl₂ i 5 mM *p*NPP i nakon 30 minuta na 30°C, reakcija je zaustavljena dodatkom 500 mM NaOH. Apsorbancija je merena na talasnoj dužini od 405 nm.

3.6.2.5. Ukupne kisele fosfataze

Za ispitivanje aktivnosti ukupnih kiselih fosfataza korišćena je metoda Nemeč i Soča (1998). Metoda se zasniva na hidrolizi *p*NPP u kiselim uslovima, gde nastaje *p*-nitrofenol. Uzorak je dodat u reakcionu smešu sa 100 mM rastvorom citratnog pufera (pH vrednosti 5,6), 5 mM MgCl₂ i 5 mM *p*NPP i nakon 60 minuta na 30°C, reakcija je zaustavljena dodatkom 500 mM NaOH. Količina *p*-nitrofenola određena je merenjem apsorbancije na talasnoj dužini od 405 nm.

3.6.2.6. Lizozomske i nelizozomske kisele fosfataze

Prilikom određivanja ukupne aktivnosti kiselih fosfataza, upotrebom specifičnog inhibitora lizozomskih fosfataza NaF, indirektno je određena njihova enzimska aktivnost metodom koju su opisali Amlabu i saradnici (2009), i Holtzman (1989). Prilikom određivanja ukupne enzimске aktivnosti kiselih fosfataza, u reakcionu smešu je dodat 50 mM rastvor natrijum fluorida. Zatim je na 405 nm merena apsorbancija koja je proporcionalna aktivnosti neinhibiranih nelizozomskih kiselih fosfataza, preko čega je izračunata aktivnost lizozomske frakcije.

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

3.6.3.1. Tripsin

Modifikovana procedura koju su opisali Erlanger i saradnici (1961) korišćena je za određivanje enzimске aktivnosti tripsina na nativnom poliakrilamidnom gelu (koncentracije 10%). Nakon mešanja sa puferom za pripremu uzoraka (PUZ), bez SDS i redukujućih sredstava, uzorci proteina (5 µg po bunarčiću) su elektroforetski ispitivani primenom konstantnog napona (100 V) na temperaturi od 4°C. Uporedo je u 2 mM rastvoru supstrata (*N*_α-benzoil-DL-arginin 4-nitroanilid hidrohlorida (DL-B[*A*]PNA)) inkubirana nitrocelulozna membrana, 50 minuta na sobnoj temperaturi. Supstrat je najpre rastvoren u dimetilformamidu (DMF) a potom je rastvoru dodat glicinski pufer (pH vrednosti 10) dok nije postignuta konačna koncentracija od 2 mM. Gel je nakon elektroforeze potopljen u destilovanu vodu na deset minuta, a potom ekvilibrisan u 50 mM rastvoru glicinskog pufera (pH vrednosti 10) dvadeset minuta. Ranije pripremljena nitrocelulozna membrana postavljena je na površinu gela i ostavljena tokom jednog časa u uslovima vlažne komore na temperaturi od 37°C. Nakon toga, membrana je uronjena na dva i po minuta u 0,1% rastvor NaNO₂ u 1 M HCl, a potom potopljena u 1% rastvor uree tokom 30 sekundi. Reakcija je zaustavljena ispiranjem membrane destilovanom vodom.

3.6.3.2. Leucin aminopeptidaza

Modifikovana metoda (Erlangera i saradnika, 1961) koja je korišćena za tripsinske izoforme, upotrebljena je za analizu izoenzimske aktivnosti leucin aminopeptidaze na nativnom poliakrilamidnom gelu. Supstrat (L-leucin *p*-nitroanilid) je najpre rastvoren u najmanjoj mogućoj zapremini DMF, a potom je koncentracija podešena dodatkom 2 mM pufera veronal/HCl (opsega pH vrednosti 7,8-8). Isti pufer je korišćen i za inkubiranje gela tokom 20 minuta. Procedura je identična kao prilikom određivanja enzimske aktivnosti tripsina na gelu i membrani.

3.6.3.3. Lipaze

Metoda Diaza i saradnika (1999) upotrebljena je za određivanje aktivnosti lipaza na nativnom poliakrilamidnom gelu. Uzorci proteina (5 µg po bunarčiću) ispitivani su elektroforetski, korišćenjem konstantnog napona (100 V) na 4°C. Nakon ispiranja gela destilovanom vodom, on je inkubiran deset minuta u 100 mM fosfatnom puferu pH vrednosti 7, na 30°C. Posle dodatka 0,4 mM rastvora 4-metilumbeliferil butirata (4-MU-Bu) u smešu za inkubiranje, i dva minuta laganog mućkanja, gel je ozračen UV svetlom, što je omogućilo pojavu fluorescentnih traka koje su indikator aktivnosti lipaza.

3.6.3.4. Alkalne fosfataze

Modifikovana procedura koju su opisali Allen i saradnici (1963) upotrebljena je za određivanje alkalnih fosfataza metodom nativne elektroforeze na gelu koncentracije 12%. Uzorci od 10 µg proteina dodati su u bunarčiće i analizirani korišćenjem konstantnog napona (100 V) na 4°C. Nakon ispiranja destilovanom vodom gel je inkubiran u rastvoru pufera Tris-HCl (100 mM, pH vrednosti 8,6), 0,13% α -naftil fosfata i 0,1% Fast Blue B. Posle stajanja rastvora na sobnoj temperaturi, došlo je do nastanka obojenih traka na gelu, koje su pokazatelj aktivnosti alkalnih fosfataza.

3.6.3.5. Ukupne kisele fosfataze

Detekcija aktivnosti kiselih fosfataza na nativnom gelu urađena je korišćenjem modifikovane metode Allen i saradnika (1963). Na poliakrilamidni gel (koncentracije 12%) nanoseno je 10 µg uzorka proteina po bunarčiću, i analizirano na konstantnom naponu (100 V) na 4°C. Posle ispiranja destilovanom vodom, gel je inkubiran deset minuta u 50 mM rastvoru acetatnog pufera (pH vrednosti 5,2) na 30°C. Inkubacija nitrocelulozne membrane sprovedena je u 0,13% rastvoru α -naftil fosfata u acetatnom puferu na sobnoj temperaturi. Nitrocelulozna membrana postavljena je na površinu gela i ostavljena tokom jednog časa u uslovima vlažne komore u mraku na temperaturi od 30°C. Nakon inkubacije, membrana je potopljena u 0,3% rastvor boje Fast Blue B u acetatnom puferu.

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

3.7.1. Trehaloza

Koncentracija trehaloze određena je metodom koju su ustanovili Wyatt i Kale (1957). U uzorke hemolife larvi obe vrste dodata je 10% trihlorsirćetna kiselina (TCA) nakon čega su centrifugirani 5 minuta na 5500 obrtaja/minuti. U supernatante dodat je antronov reagens (0,15% rastvor antrona u 72% sumpornoj kiselini) i dobijena smeša je kuvana 15 minuta u ključalom vodenom kupatilu. Uzorci su potom hlađeni u ledenom kupatilu 10 minuta i intenzivno vorteksovani, nakon čega je očitana apsorbancija na talasnoj dužini od 630 nm. Koncentracija trehaloze je izračunata na osnovu standardne prave za trehalozni standard.

3.7.2. Lipidi

Ukupni sadržaj lipida u hemolifi larvi obe vrste je određen metodom Zöllner i Kirsch (1962). U uzorke hemolimfe je dodata koncentrovana sumporna kiselina i potom su kuvani 10 minuta u ključalom vodenom kupatilu. Uzorci su ohlađeni na sobnoj temperaturi nakon čega im je dodat vanilinski reagens (0,19% rastvor vanilina u 85% fosornoj kiselini). Uzorci su potom intenzivno vorteksovani i ostavljeni 30 minuta, do potpunog razvijanja boje. Apsorbancija u uzorcima je izmerena na talasnoj dužini od 546 nm, a koncentracija lipida je određena na osnovu standardne prave za standard mešavine triacilglicerola.

3.8. Statistička obrada rezultata

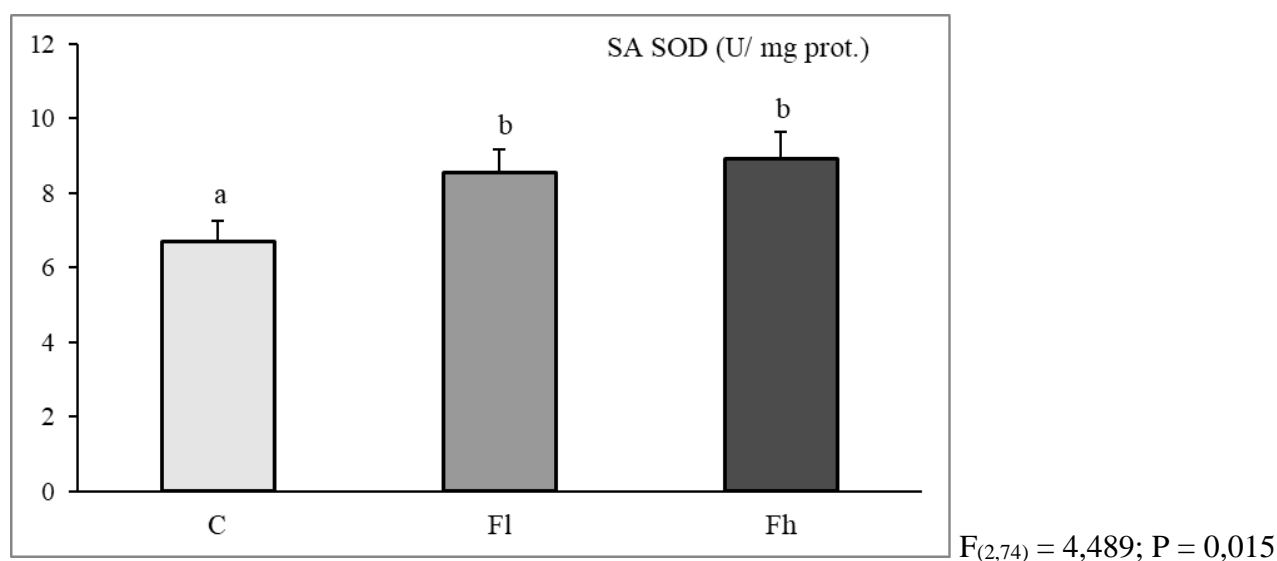
Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti sa standardnom greškom ($\bar{X} \pm SG$). Radi provere normalnosti raspodele i homogenosti varijansi, rezultati su najpre analizirani Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testovima, kao i Levene testom. Prisustvo ekstremnih vrednosti je provereno uz pomoć Grubb's testa. Značajnost razlika prosečnih vrednosti ispitivanih parametara (specifične aktivnosti antioksidativnih, detoksifikacionih, digestivnih enzima, koncentracija lipida i trehaloze, kao i koncentracija Hsp70) između eksperimentalnih grupa procenjivana je jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i post hoc Tukey's testom. Preduslov analize varijanse je normalnost raspodele unutar grupa, što je postignuto logaritamskim transformacijama vrednosti specifičnih aktivnosti antioksidativnih enzima srednjeg creva i hemolimfe, detoksifikacionih kao i digestivnih enzima srednjeg creva larvi obe vrste (Sokal i Rohlf, 1981). Neparametarskim testovima, Kruskal-Wallis ANOVA i post hoc multipnim poređenjem prosečnih rangova eksperimentalnih grupa (Siegel i Castellan, 1988), analizirane su osobine životne istorije larvi obe vrste. Nivo statističke značajnosti je bio $p < 0.05$. Za procenu razlika između ispitivanih vrsta primenjena je kanonijska diskriminaciona analiza, a korišćenjem klaster analize (Unweighted pair-group average; City-block Manhattan distances) svi ispitivani parametri su grupisani u homogene grupe. Analize su urađene uz pomoć programa Statistica 10.0 (StatSoft, Inc).

4. REZULTATI

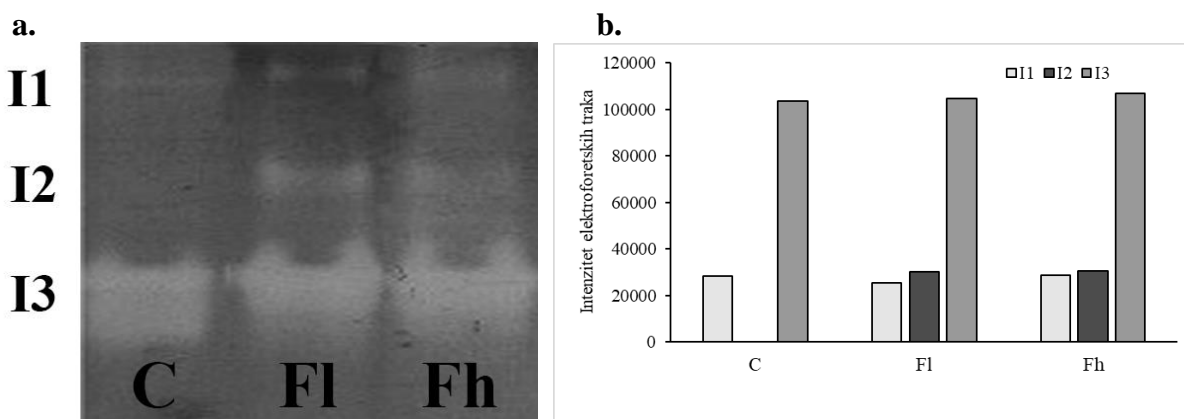
4.1. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na parametre antioksidativne zaštite i detoksifikacije srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

4.1.1. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Ispitivanjem specifične aktivnosti superoksid dismutaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* utvrđeno je statistički značajano povećanje aktivnosti enzima kod larvi gajenih na dijeti sa fluorantenom (Slika 4). Tri izoforme enzima su detektovane na nativnom poliakrilamidnom gelu, pri čemu su izoforme I1 i I3 prisutne u svim grupama, dok je izoforma I2 prisutna samo kod larvi koje su bile izložene fluorantenu. Nisu uočene promene u intenzitetu elektroforetskih traka nakon tretmana fluorantenom u odnosu na kontrolu (Slika 5a i 5b).



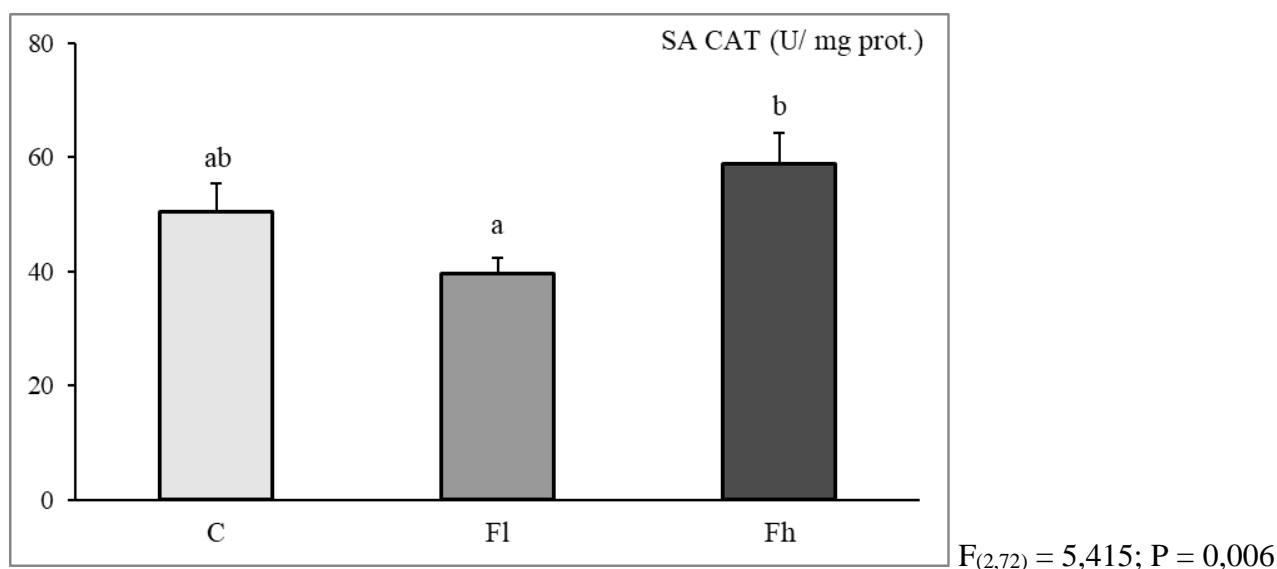
Slika 4. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SA SOD) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška ($\bar{X} \pm SG$).



Slika 5. a. Zimogramska detekcija superoksid dismutaze (SOD) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi superoksid dismutaze. I1, I2 i I3 označavaju enzimске izoforme.

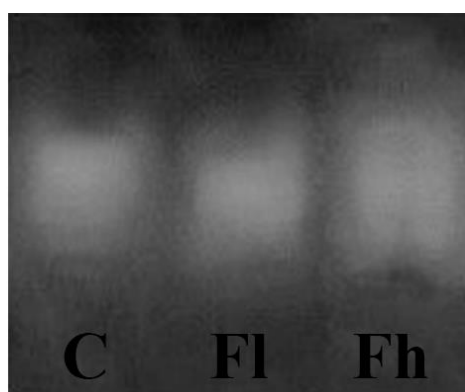
4.1.2. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Dugotrajna ishrana *L. dispar* larvi veštačkom dijetom sa dodatkom fluorantena nije dovela do statistički značajnih promena specifične aktivnosti katalaze u odnosu na larve kontrolne grupe, međutim značajno veća aktivnost enzima u celom srednjem crevu uočena je kod larvi izlaganih većoj koncentraciji, u odnosu na one izlagane manjoj koncentraciji fluorantena (**Slika 6**). Nativnom elektroforezom je utvrđeno prisustvo jedne izoforme enzima u sve tri grupe larvi, čiji intenzitet traka raste sa povećanjem koncentracije fluorantena u hrani (**Slika 7a i 7b**).

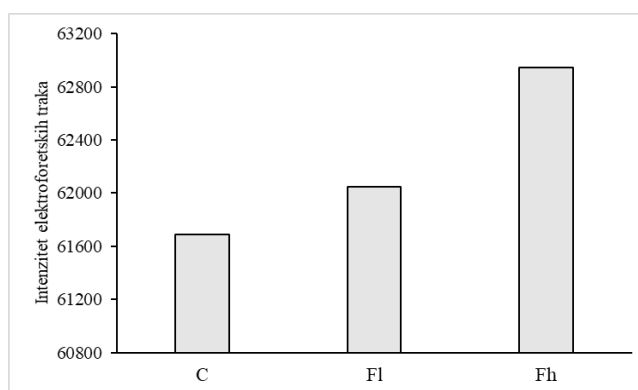


Slika 6. Specifična aktivnost katalaze (SA CAT) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (F1) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

a.



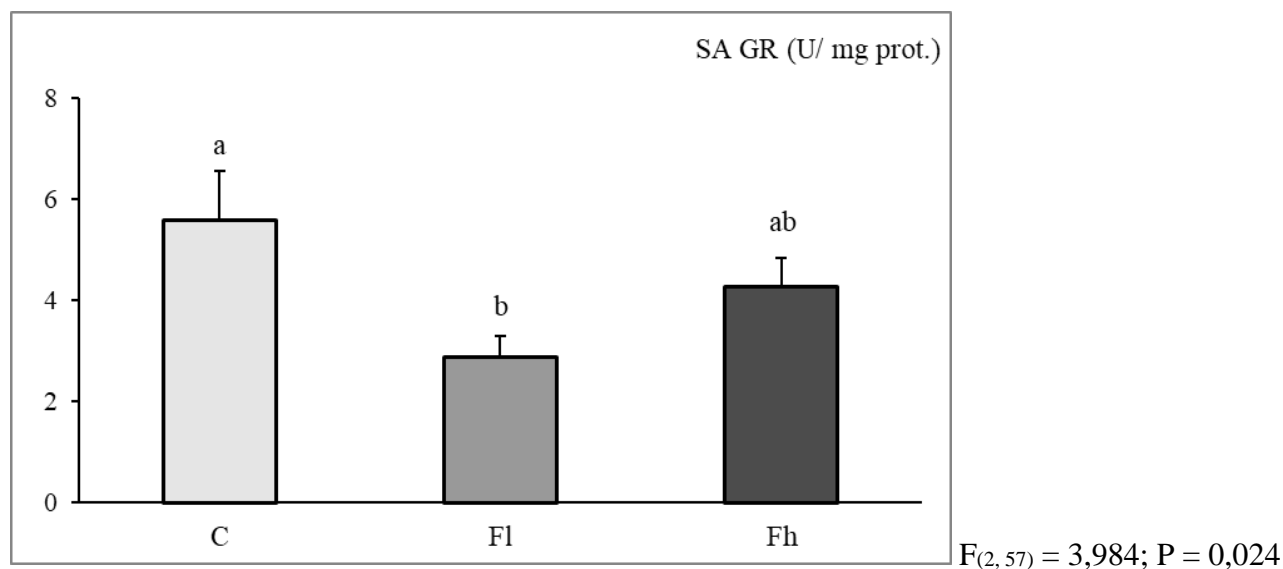
b.



Slika 7. a. Zimogramska detekcija katalaze (CAT) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovane izoforme I1 katalaze.

4.1.3. Specifična aktivnost glutacione reduktaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Statistički značajno smanjenje specifične aktivnosti glutacione reduktaze je detektovano u grupi larvi koje su izlagane fluorantenu u koncentraciji od 6,7 ng/g suve mase hrane, u odnosu na kontrolnu grupu larvi (**Slika 8**).

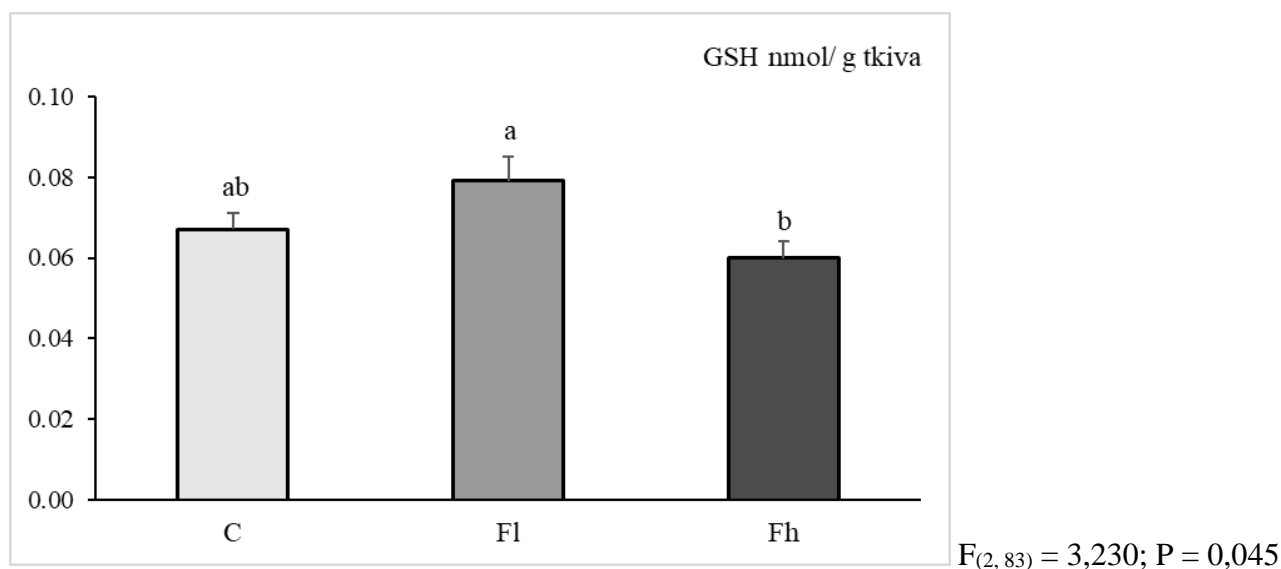


Slika 8. Specifična aktivnost glutacione reduktaze (SA GR) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.1.4. Koncentracija glutationa u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Utvrđeno je da nema statistički značajnih promena koncentracije GSH u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* nakon hroničnog tretmana fluorantenom, prisutnim u dijeti, u odnosu na kontrolu. Međutim, razlike u koncentraciji GSH detektovane su između larvi izlaganih manjoj koncentraciji i onih koje su bile izložene većoj koncentraciji fluorantena (**Slika 9**).

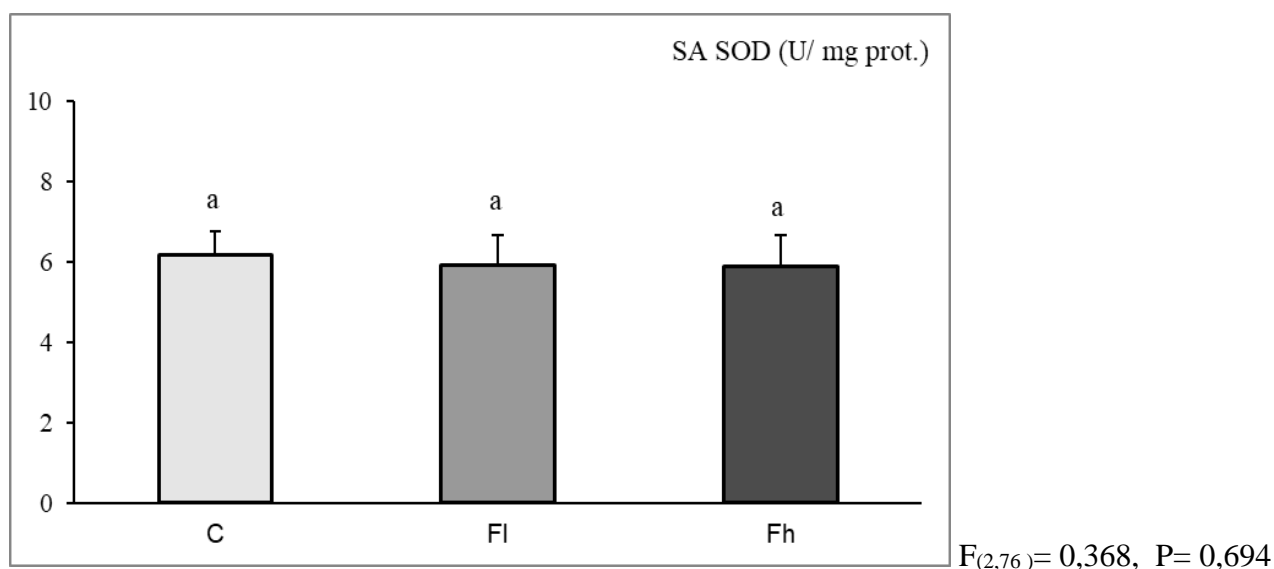
Rezultati



Slika 9. Koncentracija glutationa (GSH) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

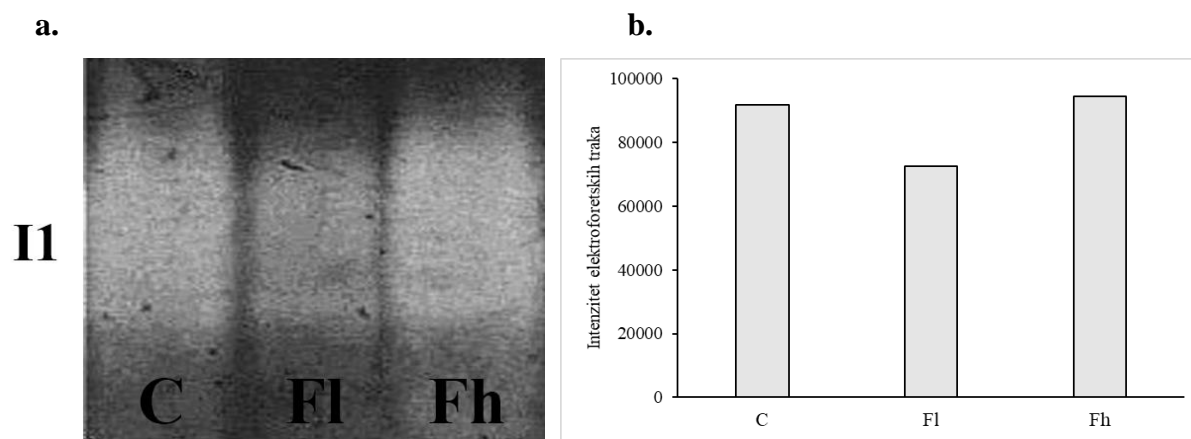
4.1.5. Specifična aktivnost i zimogramaska detekcija superoksid dismutaze u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Dugotrajna izloženost *E. chrysorrhoea* larvi fluorantenu nije imala statistički značajnog uticaja na specifičnu aktivnost superoksid dismutaze (**Slika 10**). Zimogramom je detektovana jedna izoforma sa superoksid dismutaznom aktivnošću u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi, smanjenog intenziteta u grupi larvi koje su hranjene veštačkom dijetom sa manjom koncentracijom fluorantena, u odnosu na druge dve grupe larvi (**slika 11a i 11b**).



Slika 10. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SA SOD) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

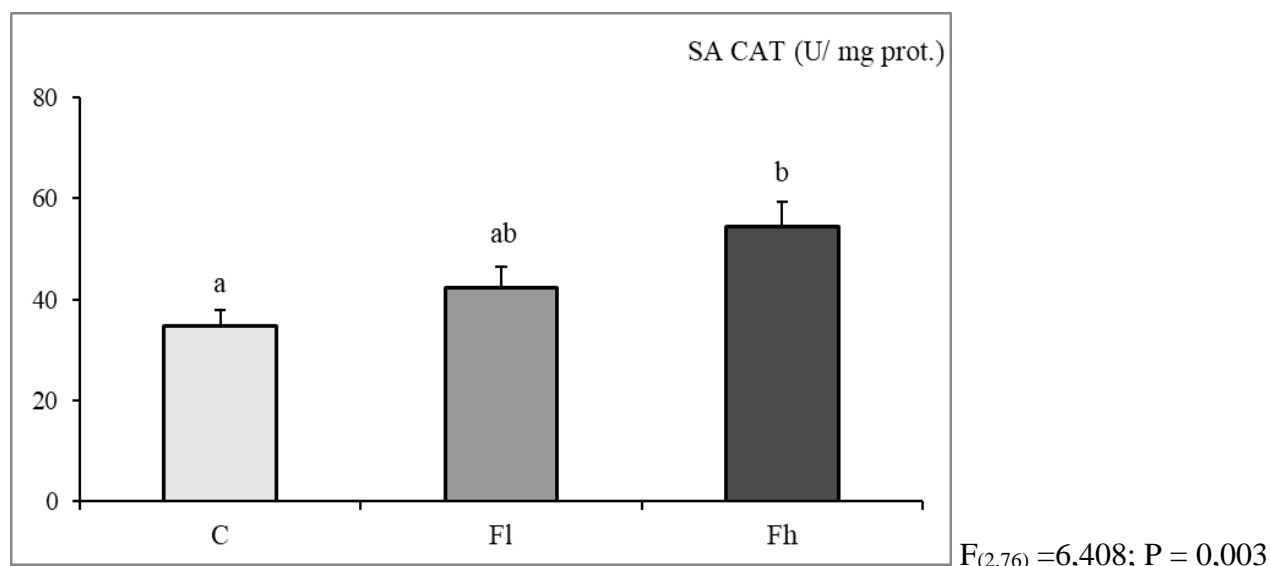
Rezultati



Slika 11. a. Zimogramska detekcija superoksid dismutaze (SOD) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovane izoforme II superoksid dismutaze.

4.1.6. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi

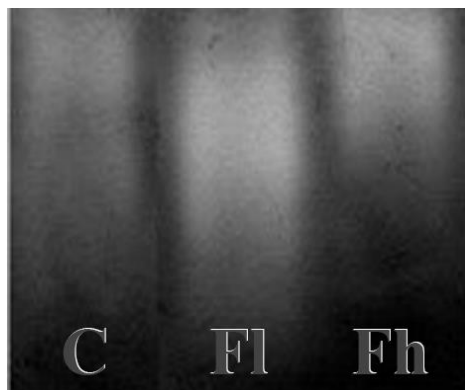
Značajno povećanje specifične aktivnosti katalaze utvrđeno je u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi nakon dugotrajne ishrane dijetom sa većom koncentracijom fluorantena (**Slika 12**). Detekcija aktivnosti katalaze na nativnom gelu otkrila je prisustvo jedne izoforme u sve tri eksperimentalne grupe, povećanog intenziteta u grupama larvi koje su bile izložene fluorantenu, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 13a i 13b**).



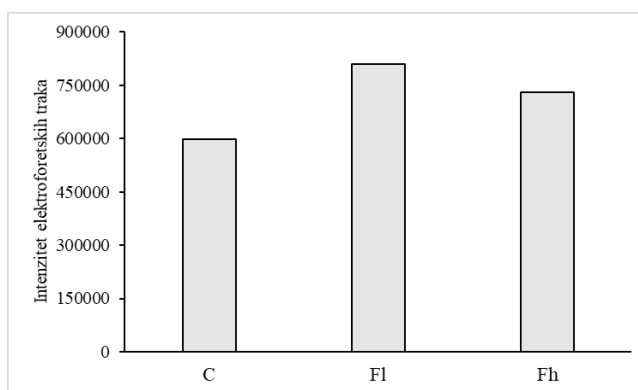
Slika 12. Specifična aktivnost katalaze (SA CAT) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

a.

II



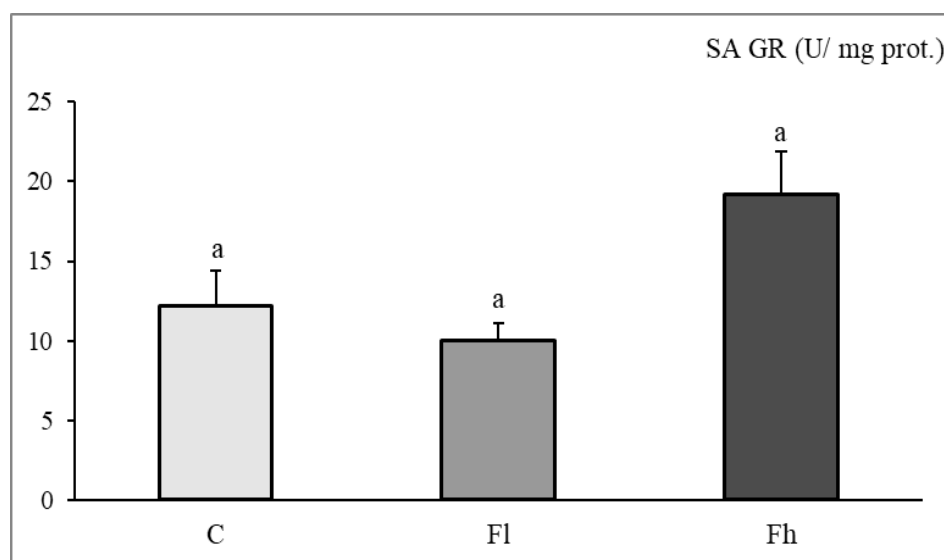
b.



Slika 13. a. Zimogramska detekcija katalaze (CAT) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Denzitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovane izoforme II katalaze.

4.1.7. Specifična aktivnost glutation reduktaze u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Hronični tretman fluorantenom nije uticao na specifičnu aktivnost glutation reduktaze celog srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatim fluorantenom, u poređenju sa kontrolnom grupom larvi. Iako je analiza varijanse pokazala značajnost razlika, naknadnim testom poređenja one nisu detektovane, ali je uočljiva tendencija porasta specifične aktivnosti enzima kod larvi koje su izlagane većoj koncentraciji fluorantena, dodatog veštačkoj dijeti (**Slika 14**).

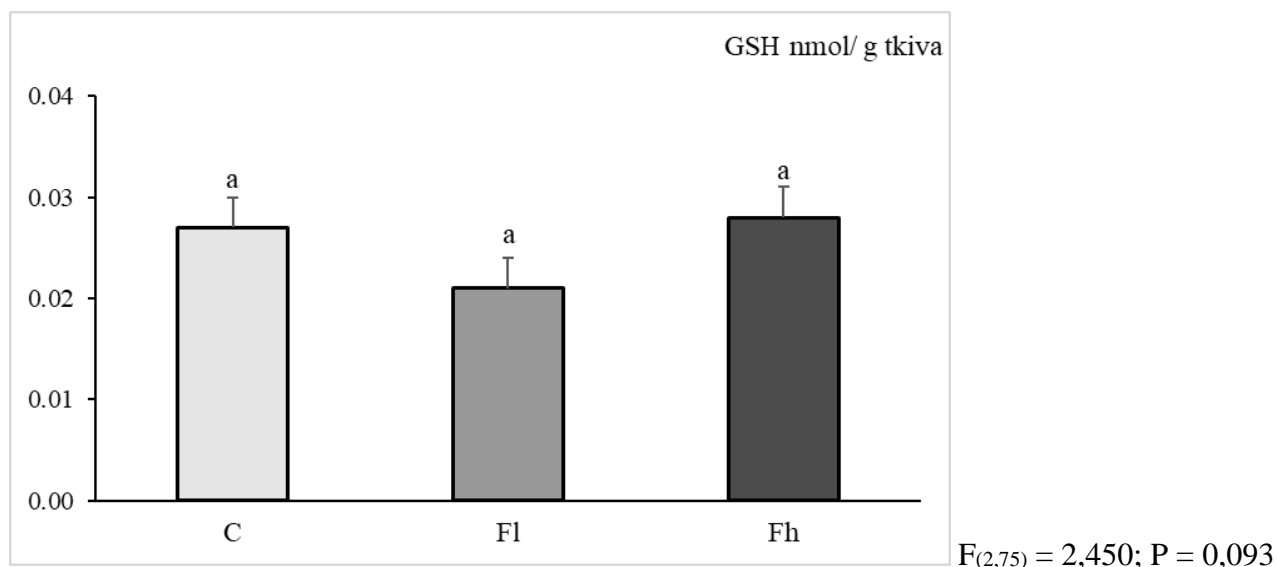


$F_{(2,55)} = 4,179; P = 0,020$

Slika 14. Specifična aktivnost glutation reduktaze (SA GR) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.1.8. Koncentracija glutationa u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Dugotrajna izloženost fluorantenu, dodatog veštačkoj dijeti, nije dovela do statistički značajnih razlika koncentracija glutationa u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*, u odnosu na kontrolu grupu (**slika 15**).

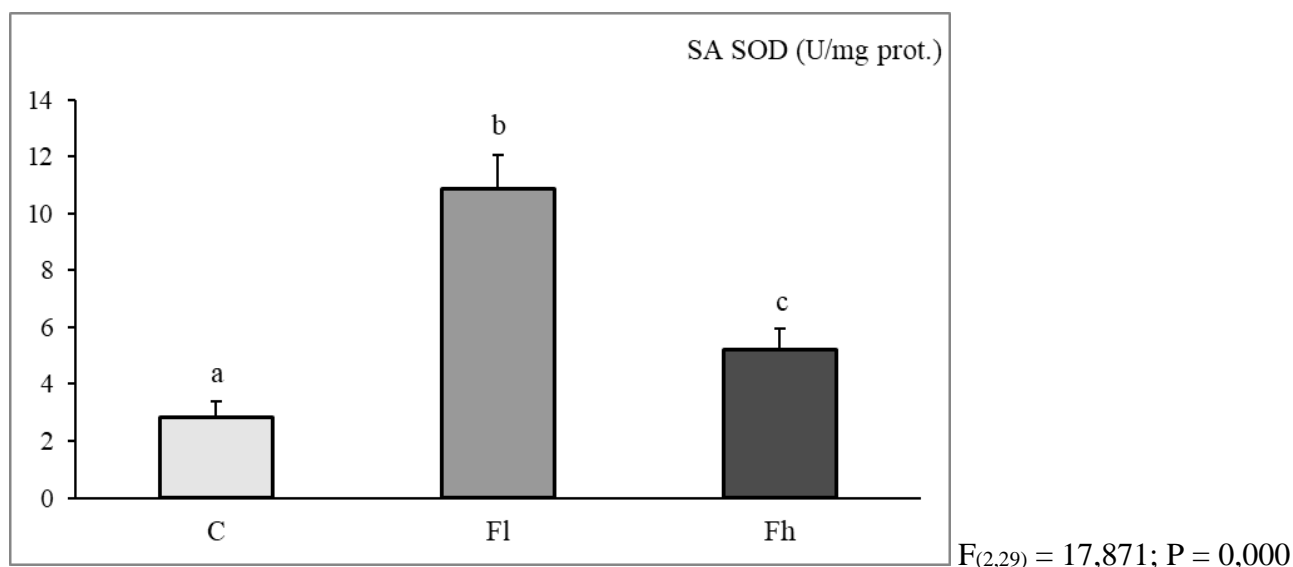


Slika 15. Koncentracija GSH u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (F1) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.1.9. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar*

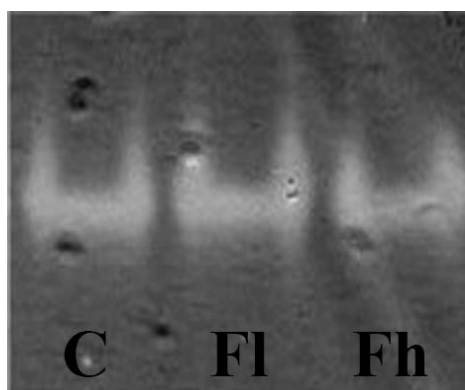
Utvrđeno je statistički značajno povećanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze u tkivu srednjeg creva *L. dispar* larvi nakon tretmana fluorantenom, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 16**). Zimogramskom detekcijom je potvrđeno prisustvo jedne izoforme, pri čemu se intenzitet enzimskih traka smanjuje sa povećanjem koncentracije fluorantena kojoj su larve bile izložene (**Slika 17a i 17b**).

Rezultati

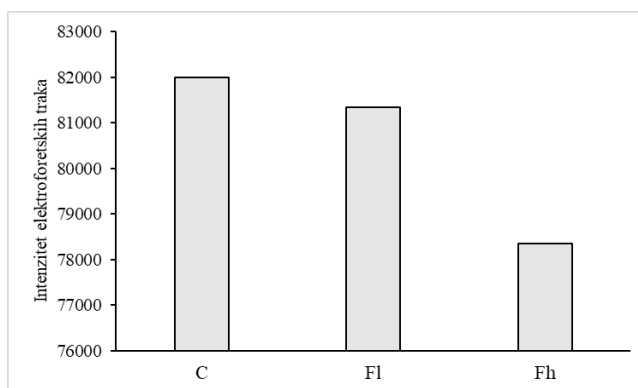


Slika 16. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SA SOD) u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

a.



b.

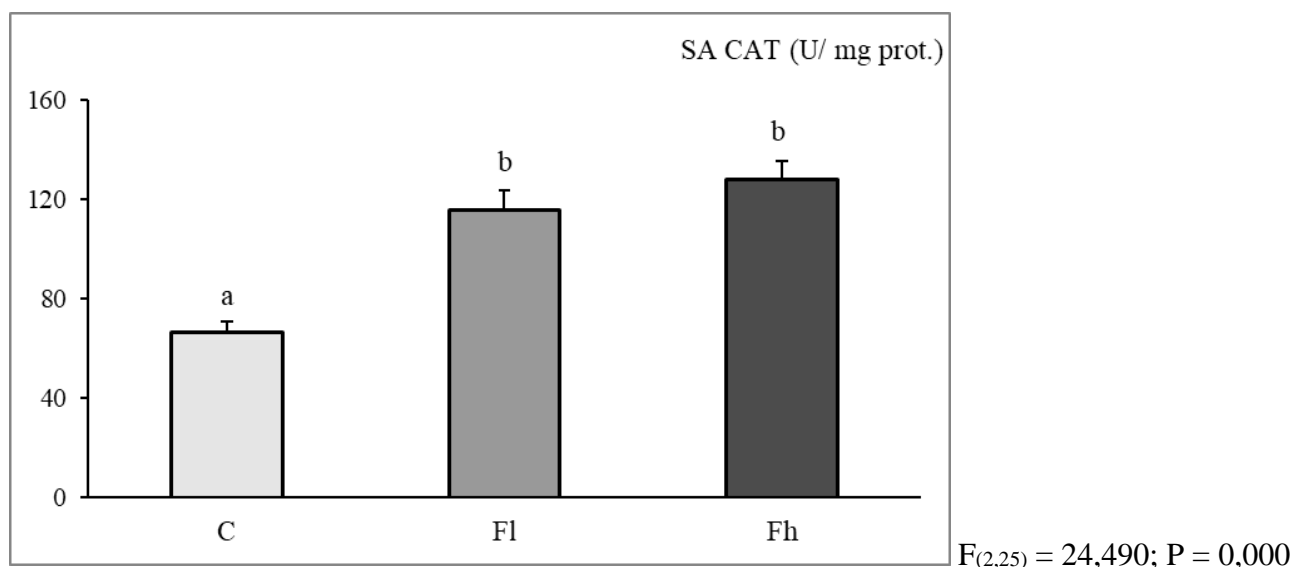


Slika 17. a. Zimogramska detekcija superoksid dismutaze (SOD) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovane izoforme I1 superoksid dismutaze.

4.1.10. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar*

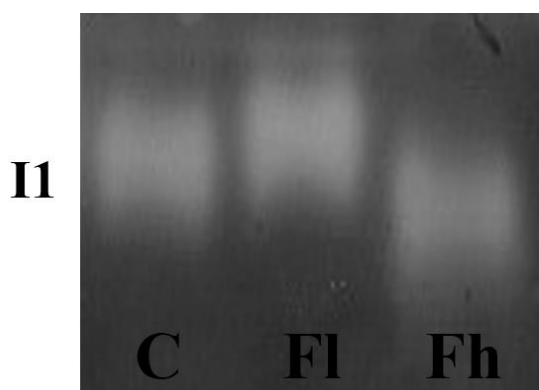
Statistički značajno povećanje specifične aktivnosti katalaze zabeleženo je u tkivu srednjeg creva *L. dispar* larvi nakon primene obe koncentracije fluorantena u hrani (**Slika 18**). Uočeno je prisustvo jedne izoforme enzima na nativnom poliakrilamidnom gelu, čiji je intenzitet povećan u tkivu srednjeg creva larvi izlaganih manjoj koncentraciji fluorantena u hrani, u poređenju sa kontrolnom grupom (**Slika 19a i 19b**).

Rezultati

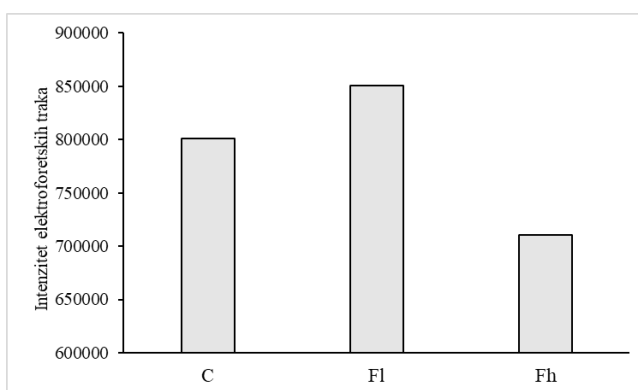


Slika 18. Specifična aktivnost katalaze (SA CAT) u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

a.



b.

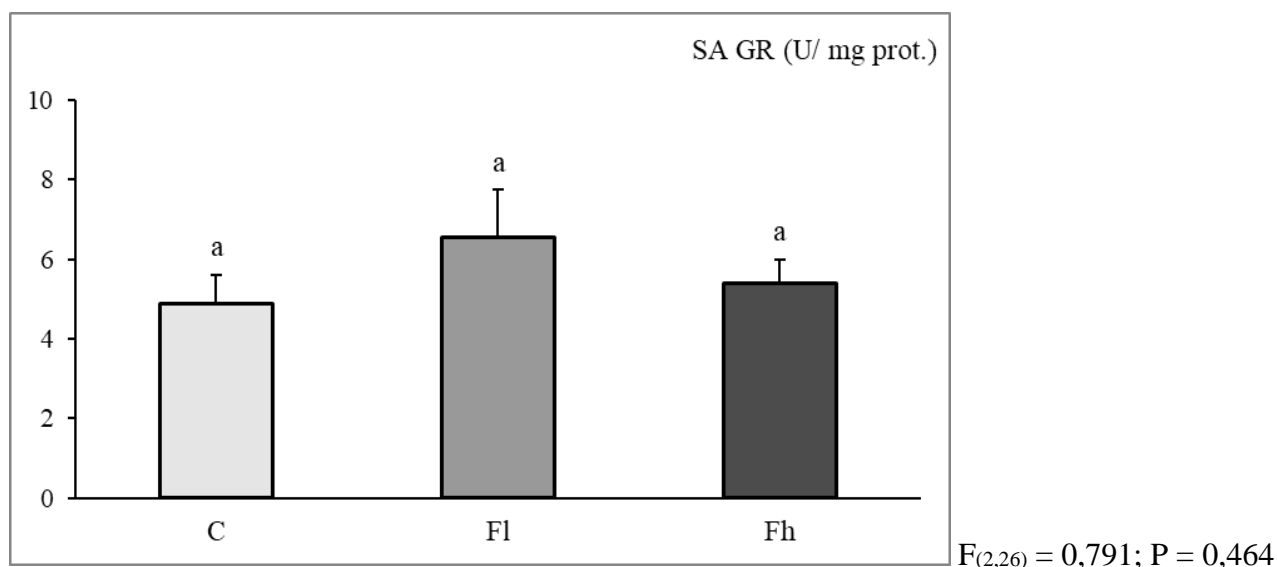


Slika 19. a. Zimogramska detekcija katalaze (CAT) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovane izoforme II katalaze.

4.1.11. Specifična aktivnost glutacion reduktaze u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar*

Nisu uočene statistički značajne razlike specifične aktivnosti enzima glutacion reduktaze u tkivu srednjeg creva *L. dispar* larvi kontrolne grupe i grupa larvi gajenih na dijeti sa dodatkom različitih koncentracija fluorantena (**Slika 20**).

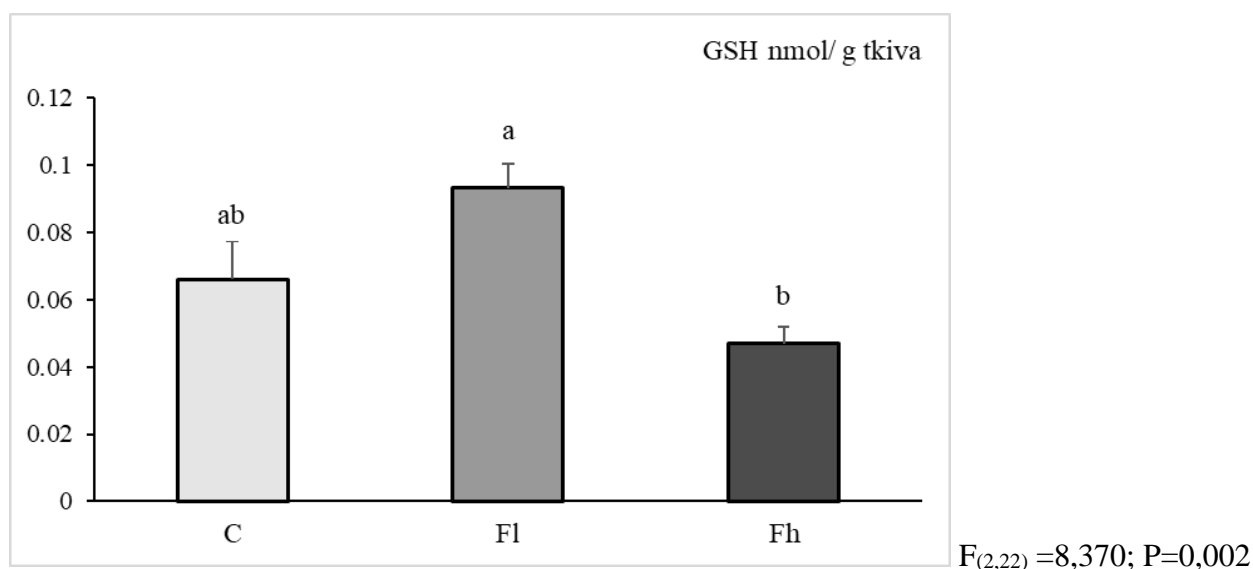
Rezultati



Slika 20. Specifična aktivnost glutation reduktaze (SA GR) u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.1.12. Koncentracija glutationa u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar*

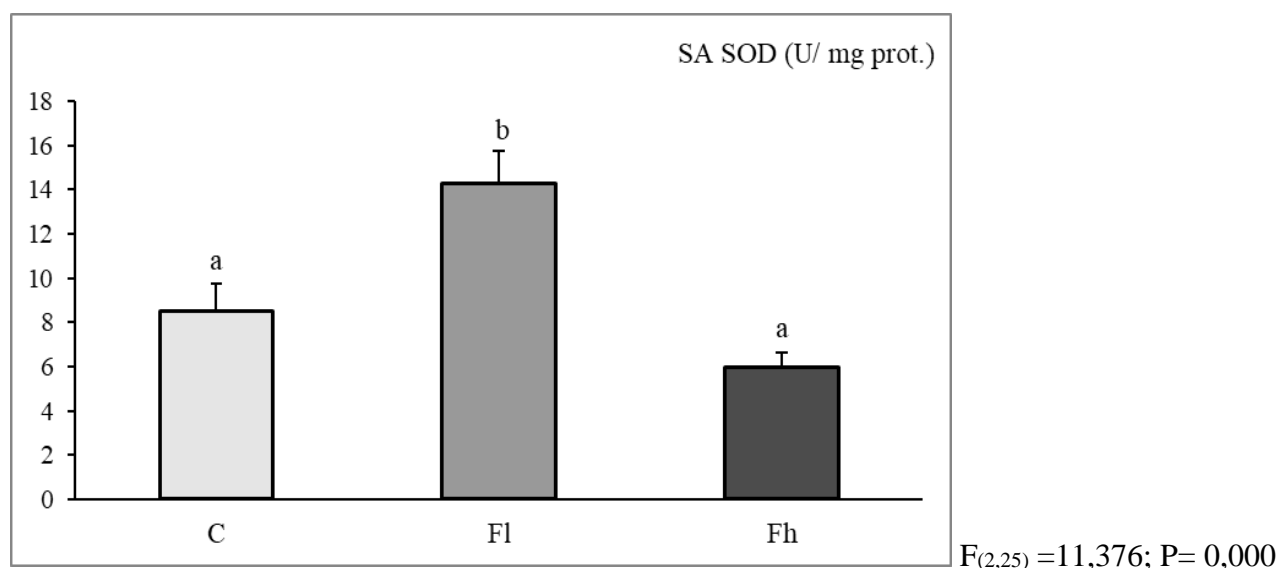
Statistička analiza pokazala je prisustvo značajnih razlika između eksperimentalnih grupa, pri čemu ishrana veštačkom dijetom koja je sadržala različite koncentracije fluorantena nije dovela do značajnih razlika u koncentraciji glutationa između tretiranih i kontrolne grupe *L. dispar* larvi. Međutim naknadnim poređenjem, detektovana je razlika koncentracija ove neenzimske komponente antioksidativne zaštite između grupa larvi izlaganih manjoj i većoj koncentraciji fluorantena, dodatog hrani (**slika 21**).



Slika 21. Koncentracija glutationa (GSH) u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

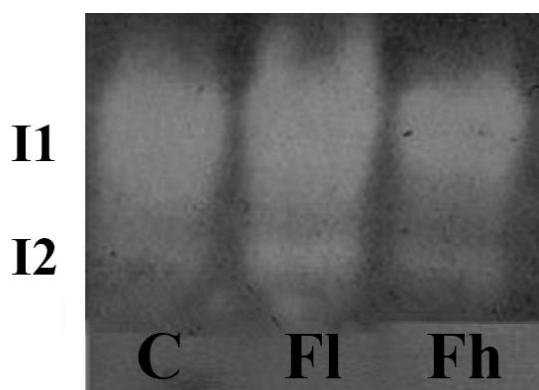
4.1.13. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija superoksid dismutaze u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea*

Statistički značajano povećanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze u tkivu srednjeg creva detektovano je kod *E. chrysorrhoea* larvi koje su izlagane manjoj koncentraciji fluorantena dodatog hrani, u odnosu na kontrolu (**Slika 22**). Zimogramskom detekcijom je uočeno prisustvo dve izoforme, koje pokazuju trend povećanja intenziteta enzimskih traka u grupi koja je bila izlagana manjoj koncentraciji fluorantena (**slika 23a i 23b**).

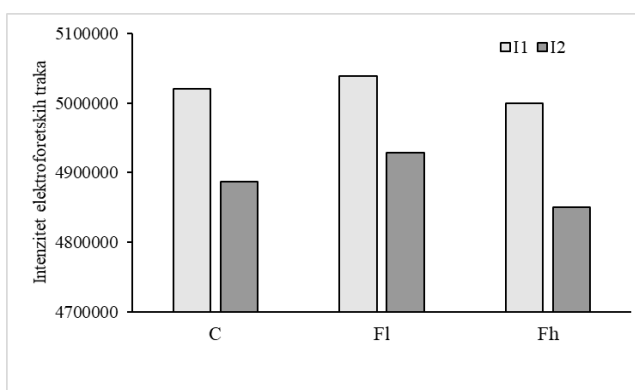


Slika 22. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SA SOD) u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

a.



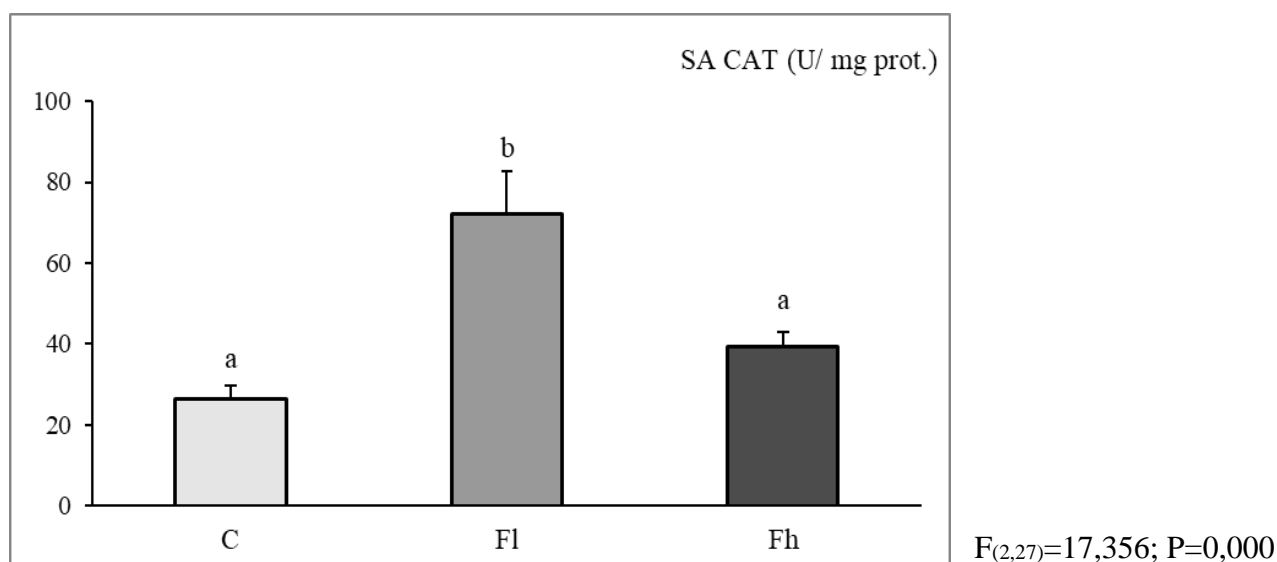
b.



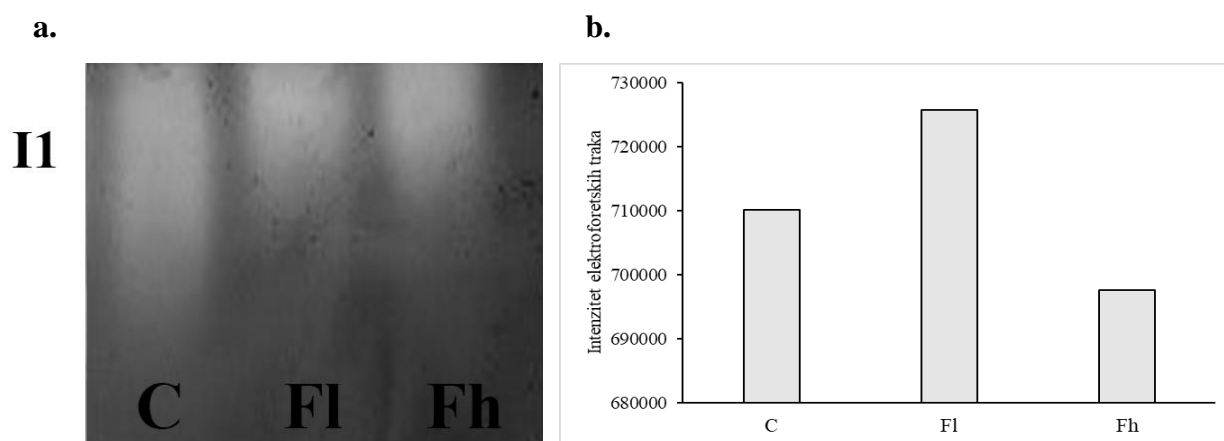
Slika 23. a. Zimogramska detekcija superoksid dismutaze (SOD) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi superoksid dismutaze. I1 i I2 označavaju enzimske izoforme.

4.1.14. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija katalaze u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea*

U tkivu srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi koje su hranjene dijetom sa dodatom manjom koncentracijom fluorantena, uočeno je statistički značajano povećanje specifične aktivnosti katalaze, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 24**). Detekcijom aktivnosti katalaze na nativnom poliakrilamidnom gelu uočena je jedna izoforma u sve tri eksperimentalne grupe, pri čemu je intenzitet ekspresije značajno veći u grupi larvi koje su bile gajene na dijeti sa manjom koncentracijom fluorantena u odnosu na druge dve grupe (**Slika 25a i 25b**).



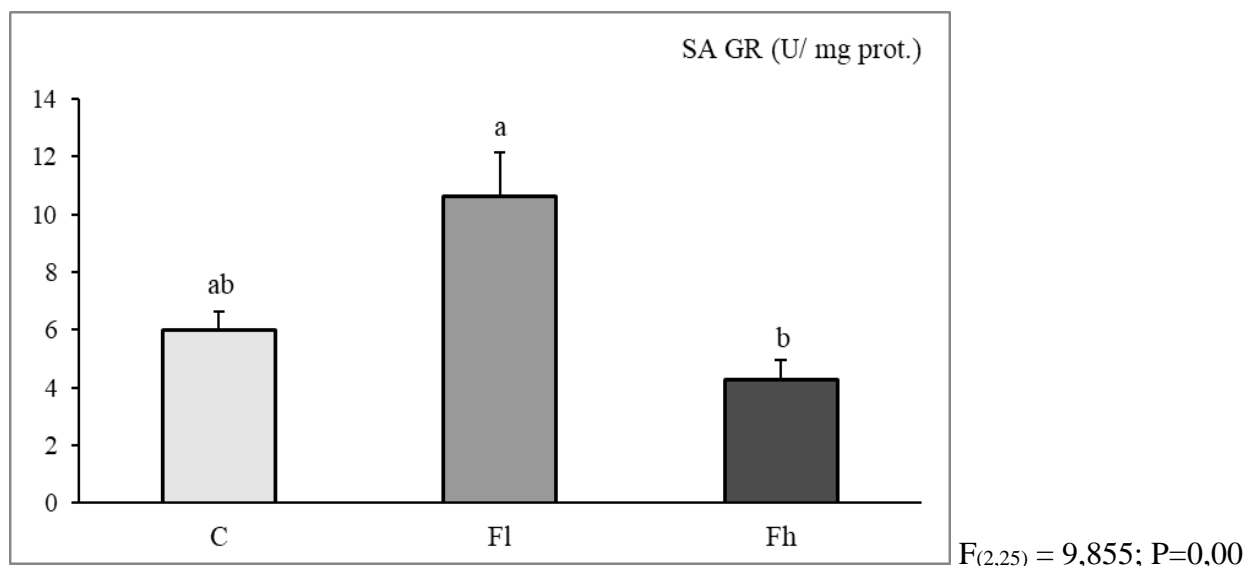
Slika 24. Specifična aktivnost katalaze (SA CAT) u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.



Slika 25. a. Zimogramska detekcija katalaze (CAT) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovane izoforme II katalaze.

4.1.15. Specifična aktivnost glutation reduktaze u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea*

Iako nisu zabeležene razlike između kontrolne i grupa larvi tretiranih fluorantenom, uočeno je statistički značajano smanjenje specifične aktivnosti glutation reduktaze u tkivu srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi koje su bile izložene većoj koncentraciji, u odnosu na grupu larvi izlaganih manjoj koncentraciji fluorantena u hrani (**Slika 26**).

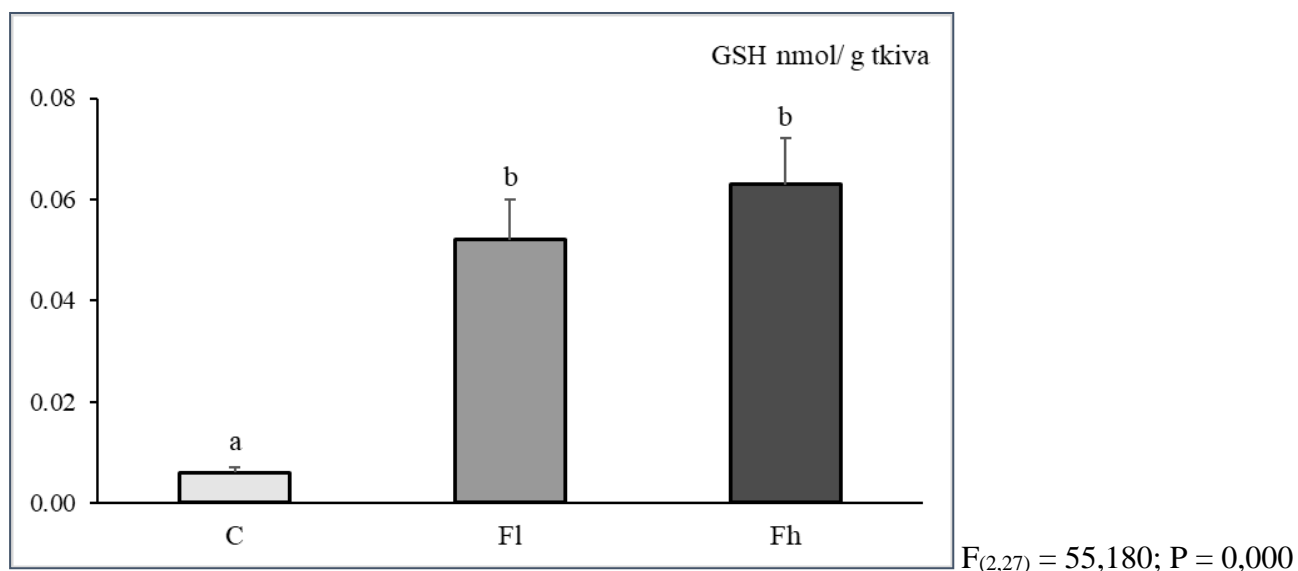


Slika 26. Specifična aktivnost glutation reduktaze (SA GR) u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.1.16. Koncentracija glutationa u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea*

Ishrana veštačkom dijetom sa dodatkom fluorantena je dovela do značajnog porasta koncentracije glutationa u tkivu srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 27**).

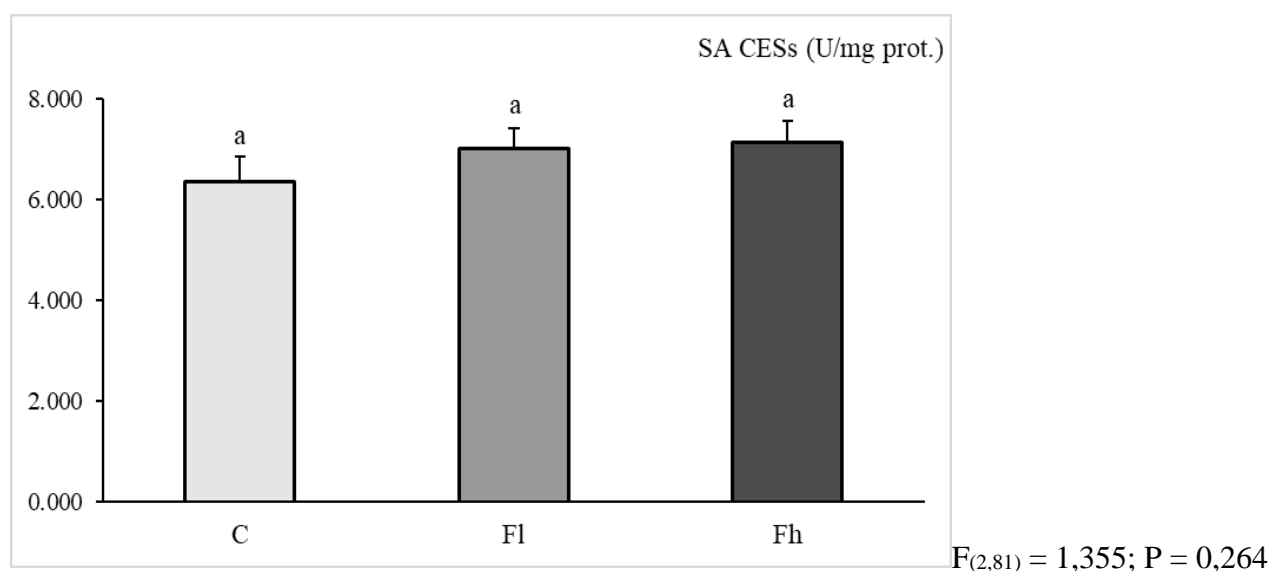
Rezultati



Slika 27. Koncentracija glutationa (GSH) u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

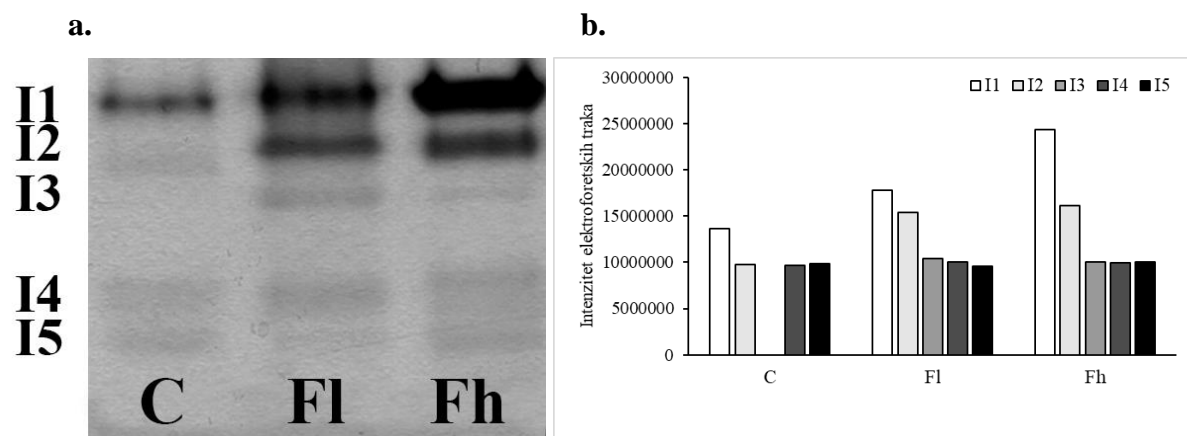
4.1.17. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Dugotrajna ishrana dijetom sa dodatim fluorantenom nije značajno uticala na aktivnost karboksilesteraza u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi (**Slika 28**). Nakon elektroforetske detekcije vidljivo je 5 izoformi enzima. Četiri izoforme su vidljive u svim grupama, dok je ekspresija izoforme I3 izostala u kontrolnoj grupi. Najdominantnija je I1 izoforma i njen intenzitet raste sa porastom koncentracije fluorantena. Sličan obrazac se može uočiti i kod izoforme I2, dok kod preostalih izoformi nema vidljivih razlika u intenzitetu između grupa (**Slika 29a i 29b**).



Slika 28. Specifična aktivnost karboksilesteraza (SA CESs) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

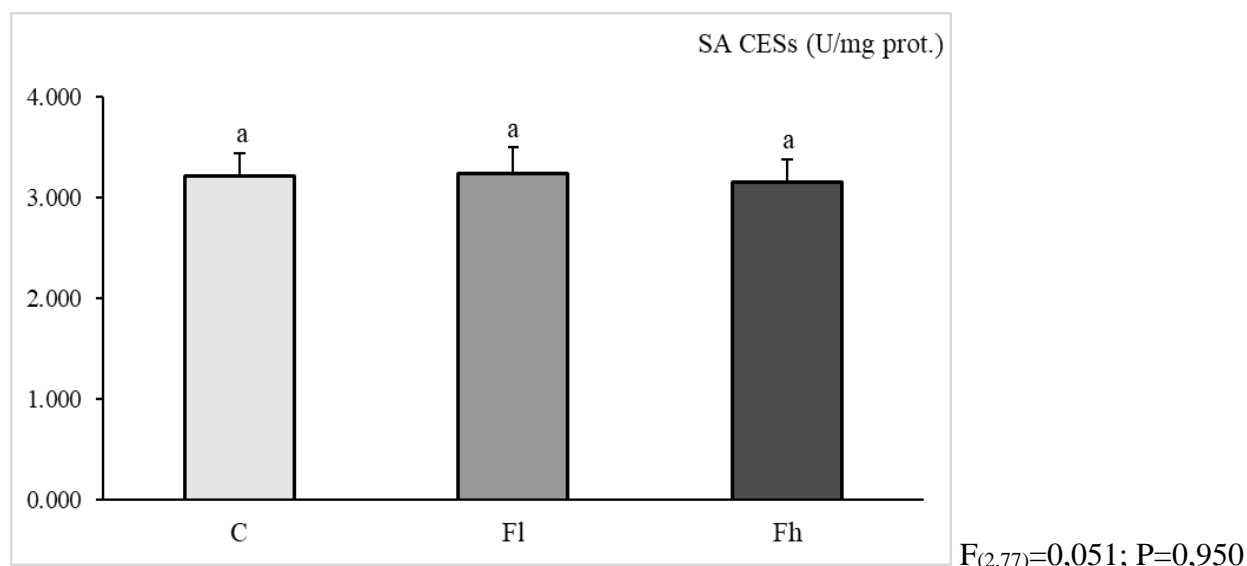
Rezultati



Slika 29. **a.** Zimogramska detekcija karboksilesteraza (CESs) nakon nativne poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi karboksilesteraza. I1, I2, I3, I4 i I5 označavaju enzimske izoforme.

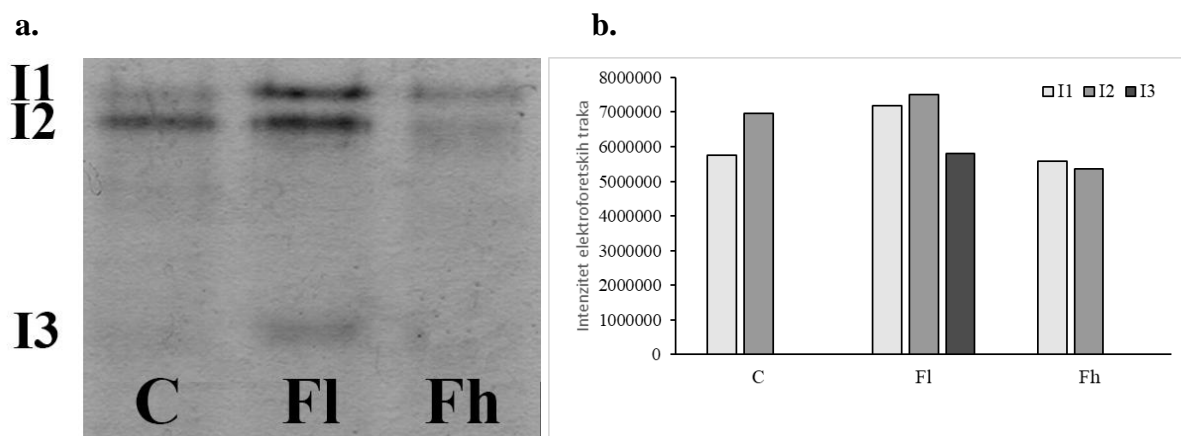
4.1.18. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Hronična izloženost fluorantenu u hrani nije dovela do promena aktivnosti karboksilesteraza u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi (**Slika 30**). Nakon nativne elektroforeze detektovano je prisustvo 3 izoforme. Izoforme I1 i I2 se mogu uočiti kod sve tri grupe, njihov intenzitet je najjači u grupi larvi koje su bile pod uticajem manje koncentracije fluorantena, kod kojih je detektovana i I3 izoforma (**Slika 31a i 31b**).



Slika 30. Specifična aktivnost karboksilesteraza (SA CESs) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

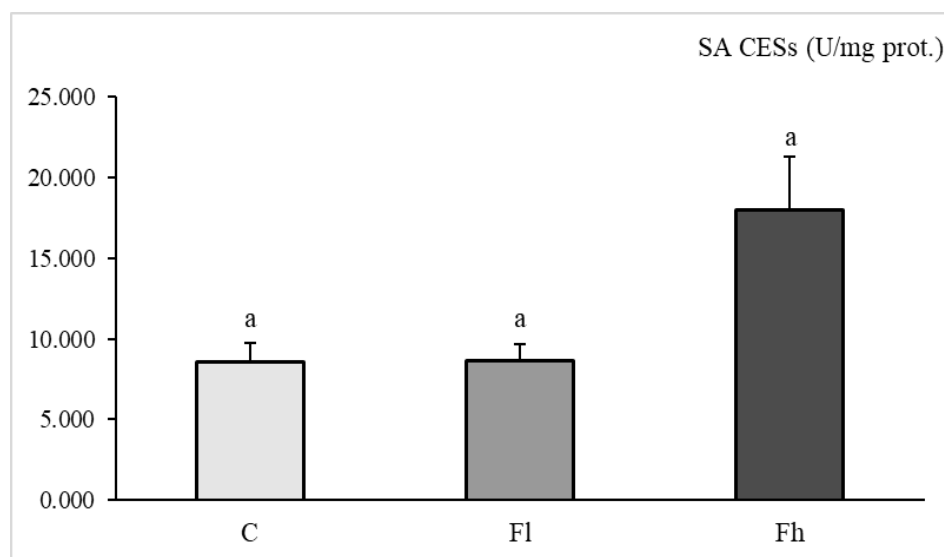
Rezultati



Slika 31. a. Zimogramska detekcija karboksilesteraza (CESs) nakon nativne poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi karboksilesteraza. I1, I2 i I3 označavaju enzimске izoforme.

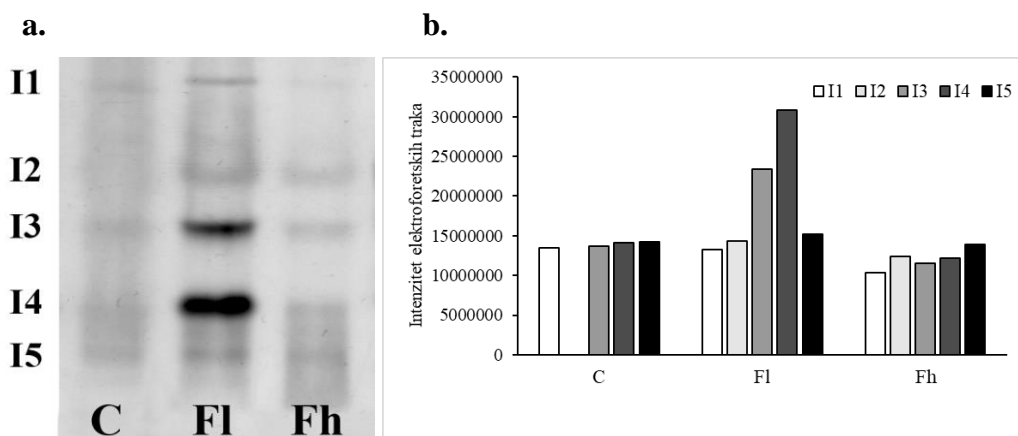
4.1.19. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar*

Specifična aktivnost karboksilesteraza u tkivu srednjeg creva *L. dispar* se nije promenila nakon dugotrajne ishrane larvi dijetom sa različitim koncentracijama fluorantena, u odnosu na kontrolu (**Slika 32**). Detektovano je prisustvo pet izoformi karboksilesteraza. Izoforme I3 i I4 imaju značajno povećan intenzitet u grupi koja je bila pod hroničnim uticajem manje koncentracije fluorantena u odnosu na druge dve grupe, dok se izoforma I2 ne uočava u kontrolnoj grupi (**Slika 33a i 33b**).



$F_{(2,27)} = 3,210$; $P = 0,056$

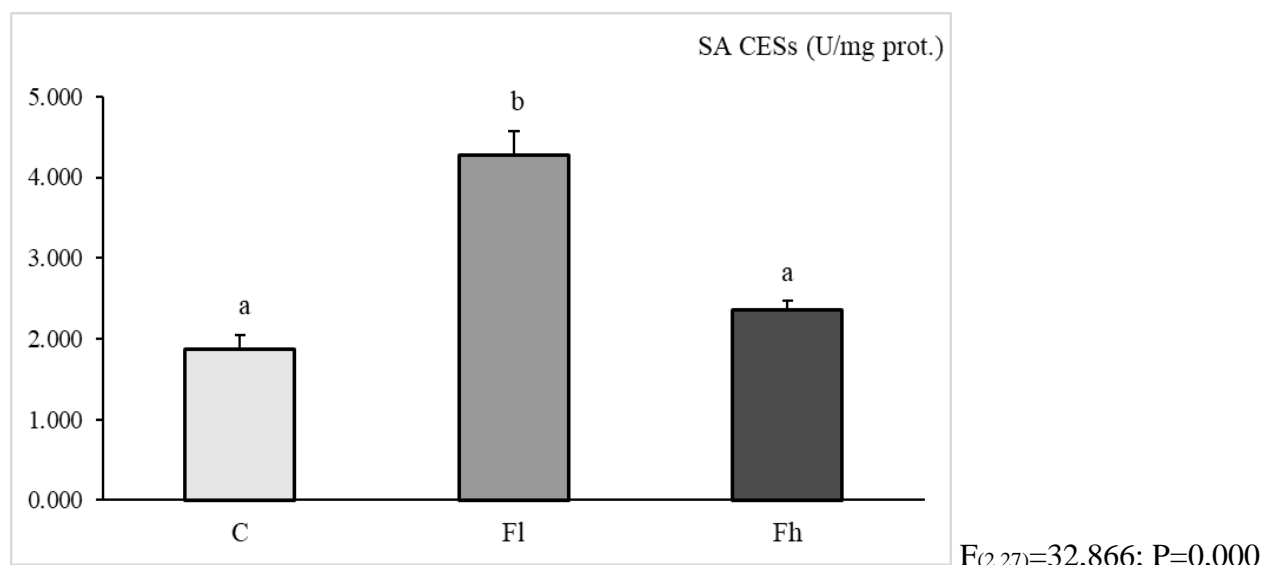
Slika 32. Specifična aktivnost karboksilesteraza (SA CESs) u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.



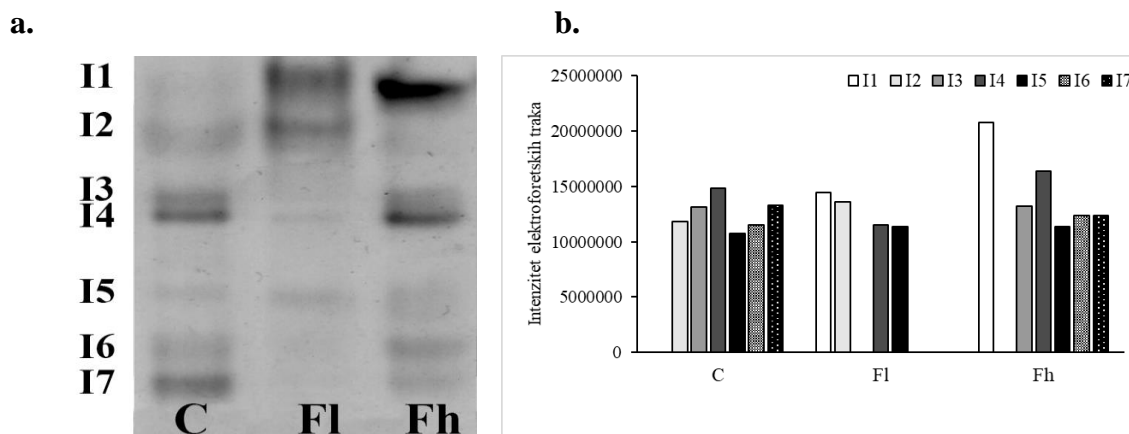
Slika 33. a. Zimogramska detekcija karboksilesteraza (CESs) nakon nativne poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi karboksilesteraza. I1, I2, I3, I4 i I5 označavaju enzimске izoforme.

4.1.20. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija karboksilesteraza u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea*

U tkivu srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi koje su bile pod uticajem manje koncentracije fluorantena u hrani došlo je do značajnog povećanja specifične aktivnosti karboksilesteraze (**Slika 34**). Detekcijom aktivnosti enzima iz tkiva creva *E. chrysorrhoea* larvi na nativnom gelu, uočeno je čak 7 izoformi. Najmanji broj izoformi se može uočiti u grupi koja je bila pod uticajem manje koncentracije fluorantena, gde je prisustvo izoformi I3, I6 i I7 inhibirano. U kontrolnoj grupi se primećuje odustvo I1, a u grupi tretiranoj većom koncentracijom fluorantena odsustvo I2 izoforme (**Slika 35a i 35b**).



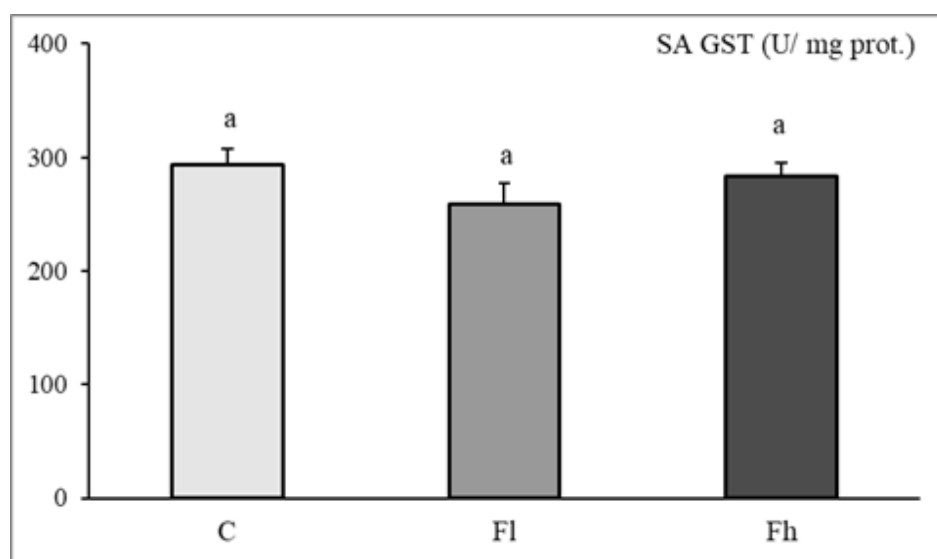
Slika 34. Specifična aktivnost karboksilesteraza (SA CESs) u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.



Slika 35. a. Zimogramska detekcija karboksilesteraza (CESs) nakon nativne poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi karboksilesteraza. I1, I2, I3, I4, I5, I6 i I7 označavaju enzimске izoforme.

4.1.21. Specifična aktivnost glutation S-transferaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Ishrana *L. dispar* veštačkom dijetom sa dodatim fluorantenom nije značajno uticala na specifičnu aktivnost glutation S-transferaze u celom srednjem crevu larvi (**Slika 36**).



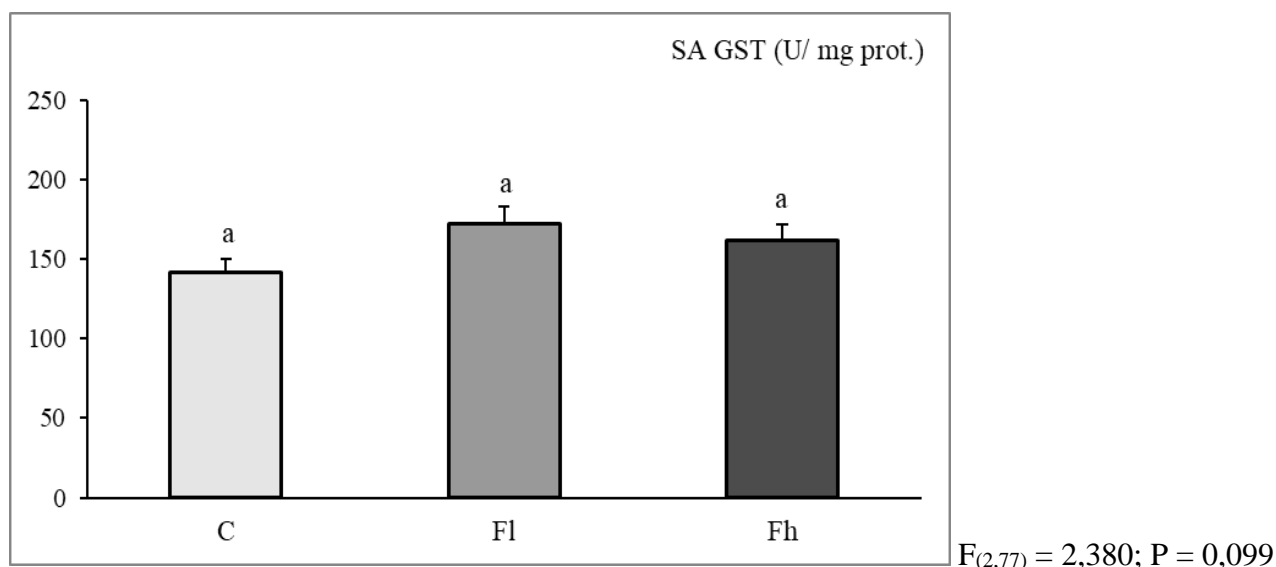
$F_{(2, 82)} = 0,037$; $P = 0,089$

Slika 36. Specifična aktivnost glutation S-transferaze (SA GST) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.1.22. Specifična aktivnost glutation S-transferaze u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Dugotrajna ishrana veštačkom dijetom sa dodatkom različitih koncentracija fluorantena nije značajno uticala na specifičnu aktivnost glutation S-transferaze u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi (**Slika 37**).

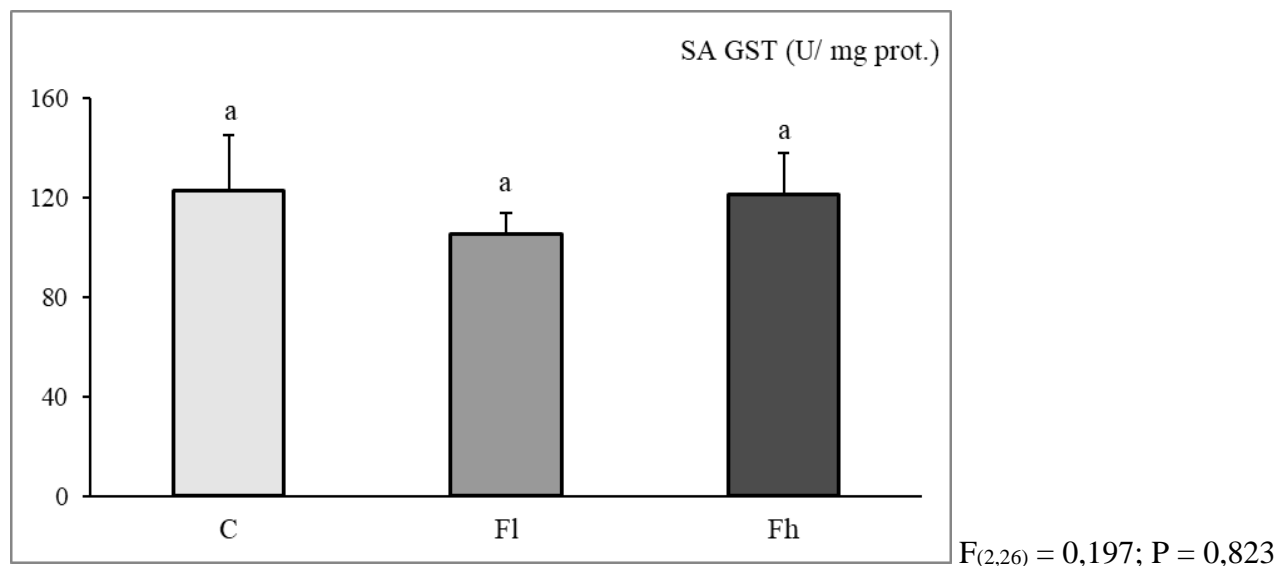
Rezultati



Slika 37. Specifična aktivnost glutation S-transferaze (SA GST) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.1.23. Specifična aktivnost glutation S-transferaze u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar*

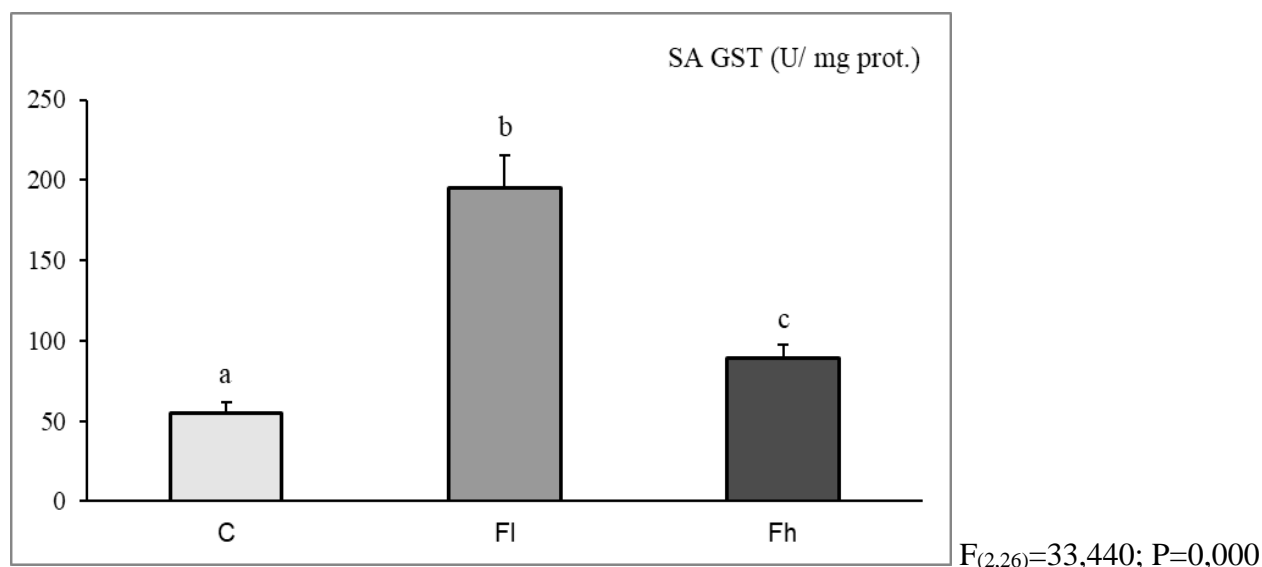
Specifična aktivnost glutation S-transferaze u tkivu creva *L. dispar* larvi izlaganih delovanju različitim koncentracija fluorantena u hrani nije se značajno promenila u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 38**).



Slika 38. Specifična aktivnost glutation S-transferaze (SA GST) u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.1.24. Specifična aktivnost glutation S-transferaze u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea*

Značajno povećanje specifične aktivnosti glutation S-transferaze uočeno je u tkivu srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi nakon tretmana obema koncentracijama fluorantena (**Slika 39**).



Slika 39. Specifična aktivnost glutation-S-transferaze (SA GST) u tkivu srednjeg creva larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (FI) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

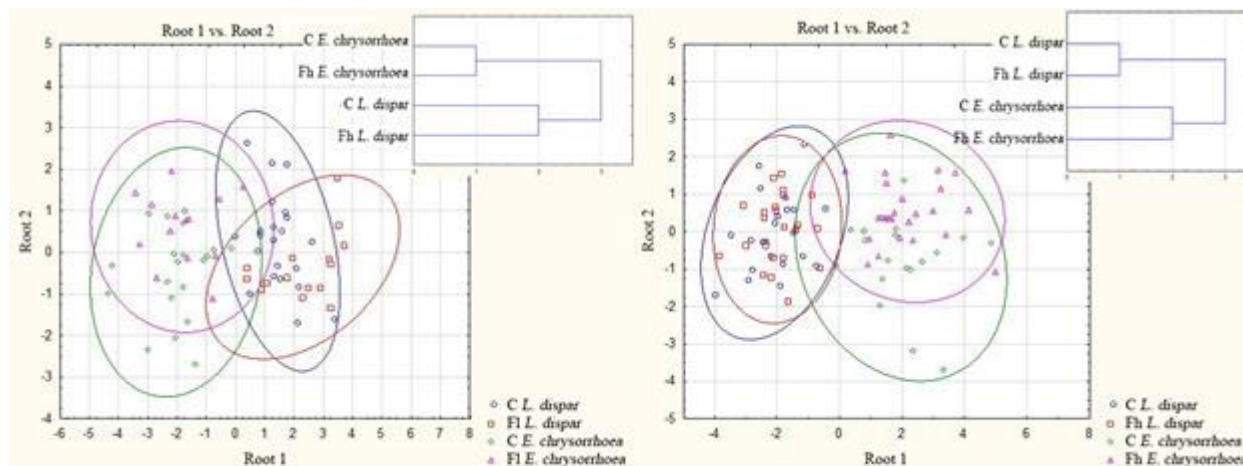
4.1.25. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza za parametre antioksidativne zaštite i aktivnosti glutation S-transferaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza primenjena na rezultate parametara antioksidativne zaštite i aktivnosti glutation S-transferaze celog srednjeg creva larvi obe vrste, izlaganih manjoj koncentraciji fluorantena prisutnog u hrani, za prvu funkciju pokazala je 93% od ukupne heterogenosti dok je na drugoj funkciji heterogenost iznosila 4,9%. Parametri koji su najviše doprineli razdvajanju vrsta su specifične aktivnosti enzima GST i GR, kao i koncentracija GSH (**Slika 40a**).

Što se tiče analize za veću koncentraciju fluorantena, rezultati su dosta slični. Na prvoj funkciji se može uočiti veliko razdvajanje gde heterogenost iznosi 94,5%, dok je na drugoj 4,1%. Parametri koji su najviše doprineli razdvajanju su isti kao i za manju koncentraciju fluorantena, specifične aktivnosti enzima GST i GR, kao i koncentracija GSH (**Slika 40b**).

a.

b.



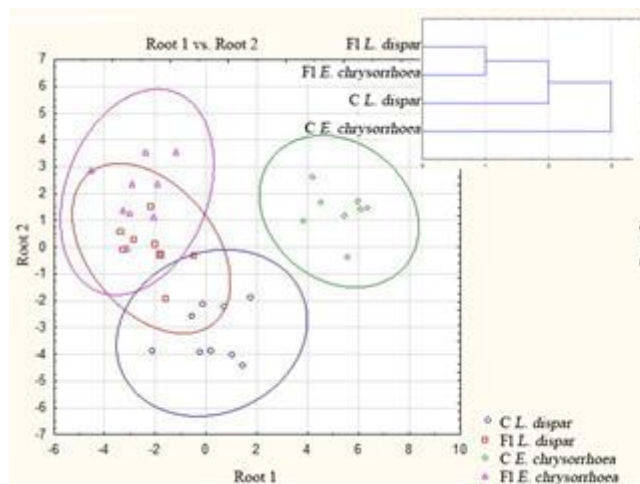
Slika 40. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza za parametre antioksidativne zaštite i aktivnosti glutation S-transferaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* za **a.** manju (6,7 ng / g suve mase hrane) i **b.** veću (67 ng / g suve mase hrane) koncentraciju fluorantena.

4.1.26. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza za parametre antioksidativne zaštite i aktivnosti glutation S-transferaze u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

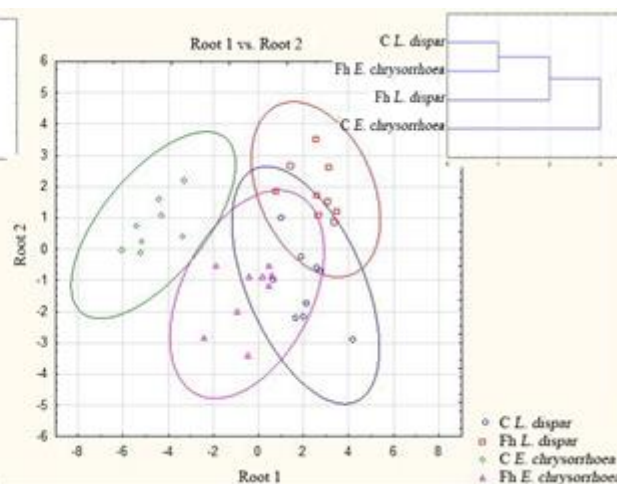
Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza za ispitivane parametre u tkivu srednjeg creva je takođe pokazala razdvajanje između vrsta, ali nešto manje u odnosu na rezultate ispitivanih parametara celog srednjeg creva. Prva kanonijska funkcija za manju koncentraciju fluorantena pokazala je 66,9 % od ukupne heterogenosti, dok je za drugu funkciju uočeno 29,4 %. Parametri koji su najviše doprineli razdvajanju su specifična aktivnost enzima GST i koncentracija GSH (**Slika 41a**).

Razdvajanje po prvoj fukciji za veću koncentraciju fluorantena je iznosilo 78,3 % od ukupne heterogenosti, dok je za drugu funkciju heterogenost bila 19,5 %. Parametri koji su najviše doprineli razdvajanju su specifične aktivnosti enzima SOD i CAT kao i koncentracija GSH (**Slika 41b**).

a.



b.

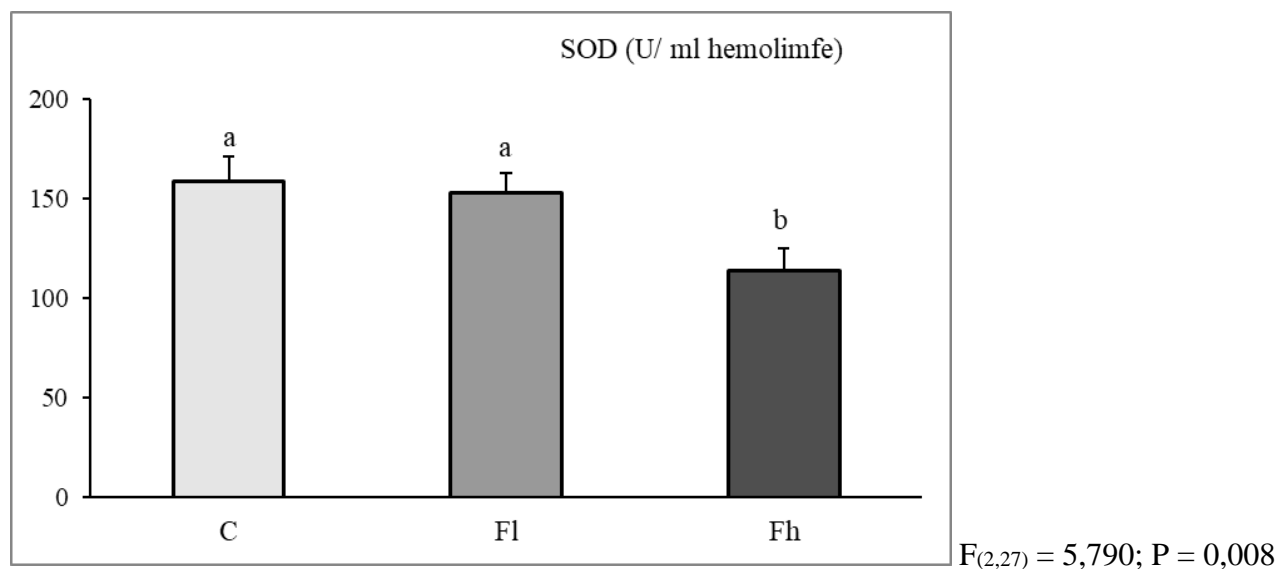


Slika 41. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza za parametre antioksidativne zaštite i aktivnosti glutacion S-transferaze u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* za **a.** manju (6,7 ng / g suve mase hrane) i **b.** veću (67 ng / g suve mase hrane) koncentraciju fluorantena.

4.2. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u hemolimfi larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

4.2.1. Aktivnost superoksid dismutaze i katalaze u hemolimfi larvi *L. dispar*

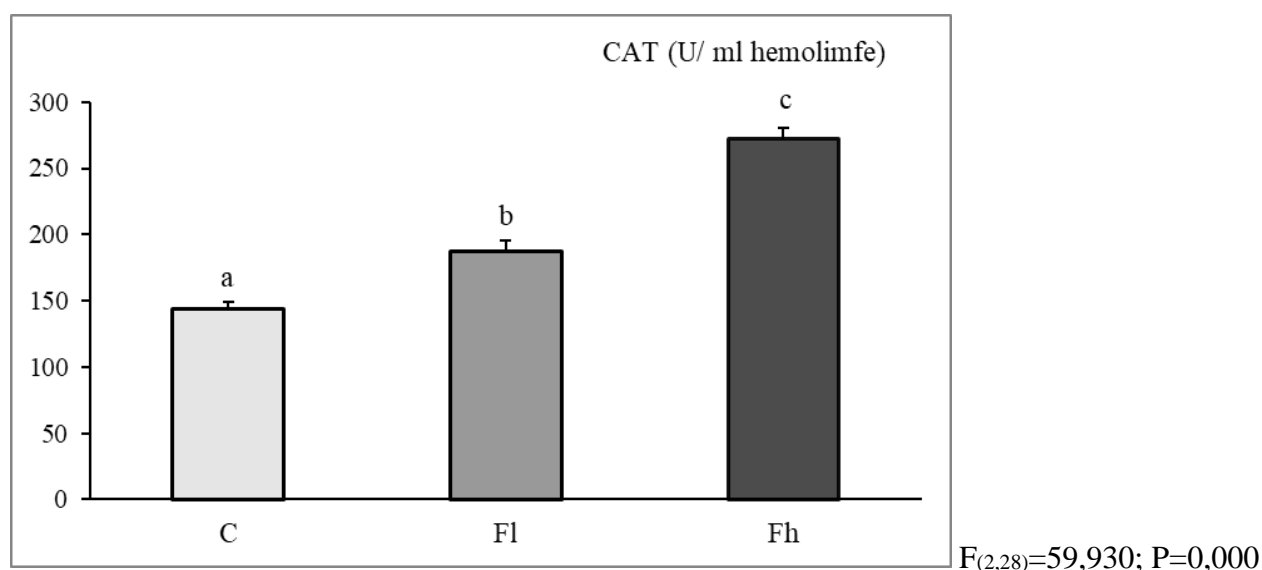
Značajno smanjenje aktivnosti superoksid dismutaze detektovano je u hemolimfi larvi *L. dispar* izlaganih većoj koncentraciji fluorantena, dodatog veštačkoj dijeti, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 42**).



Slika 42. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u hemolimfi larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (F1) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

Rezultati

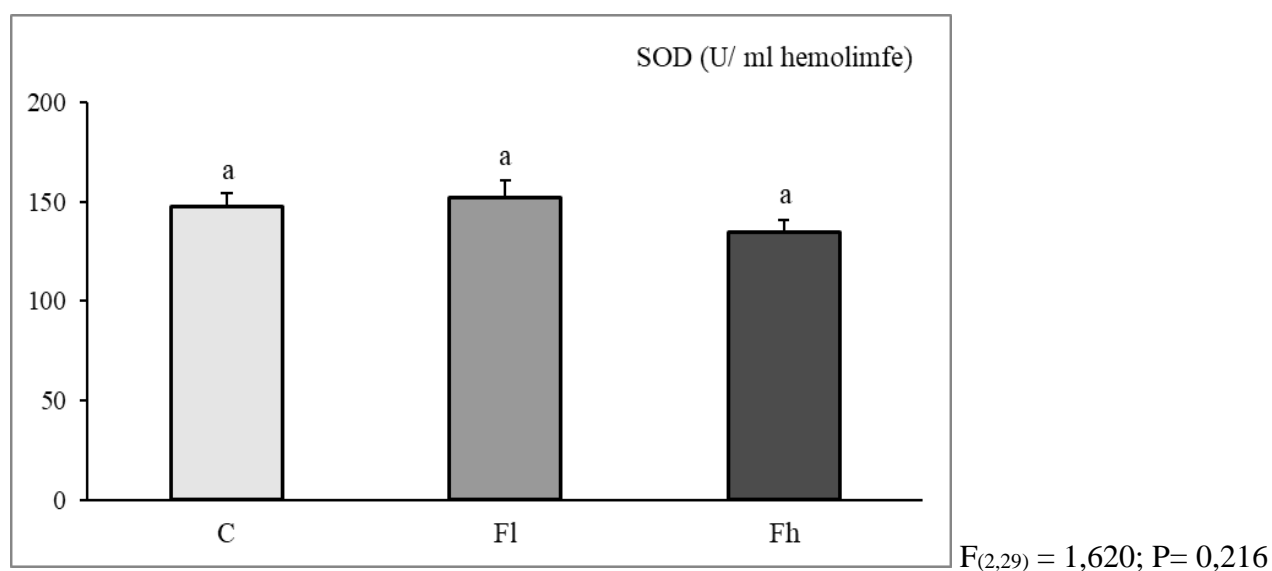
Značajno, dozno-zavisno povećanje pokazano je za aktivnost katalaze u hemolimfi *L. dispar* larvi gajenih na veštačkoj dijeti sa dodatim fluorantenom, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 43**).



Slika 43. Aktivnost katalaze (CAT) u hemolimfi larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (F1) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.2.2. Aktivnost superoksid dismutaze i katalaze u hemolimfi larvi *E. chrysorrhoea*

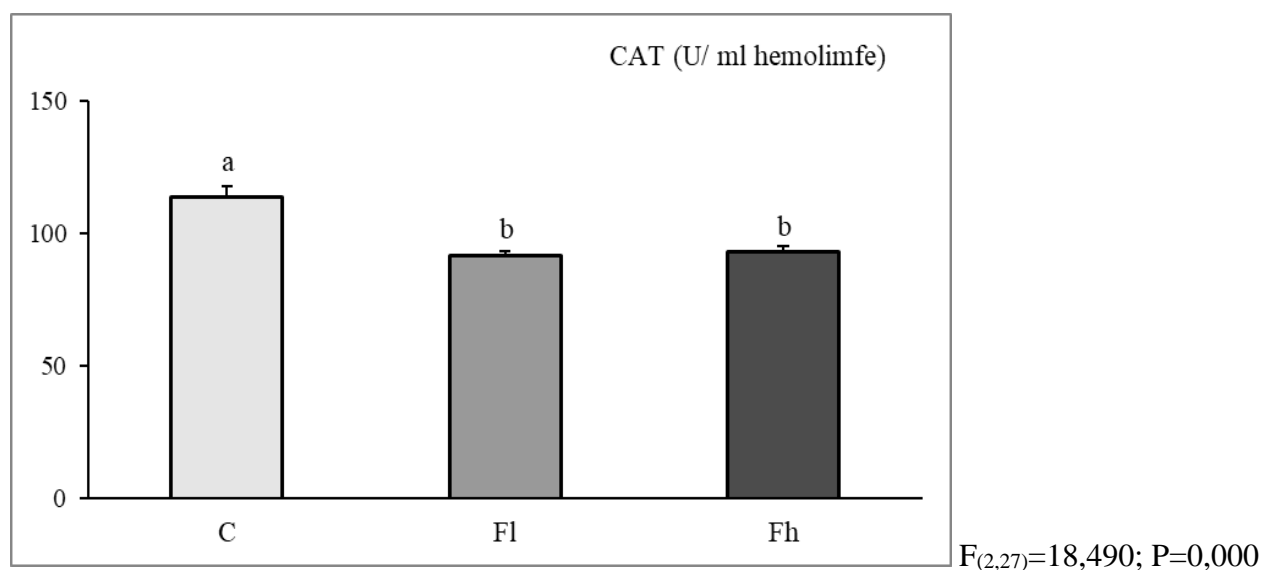
U hemolimfi *E. chrysorrhoea* larvi nisu uočene promene aktivnosti superoksid dismutaze nakon dugotrajne izloženosti fluorantenu, konzumiranom kroz dijetu (**Slika 44**).



Slika 44. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u hemolimfi larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (F1) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

Rezultati

Za razliku od aktivnosti superoksid dismutaze, aktivnost katalaze je značajno smanjena u hemolimfi *E. chrysorrhoea* larvi gajenih na dijeti sa različitim koncentracijama fluorantena (**Slika 45**).



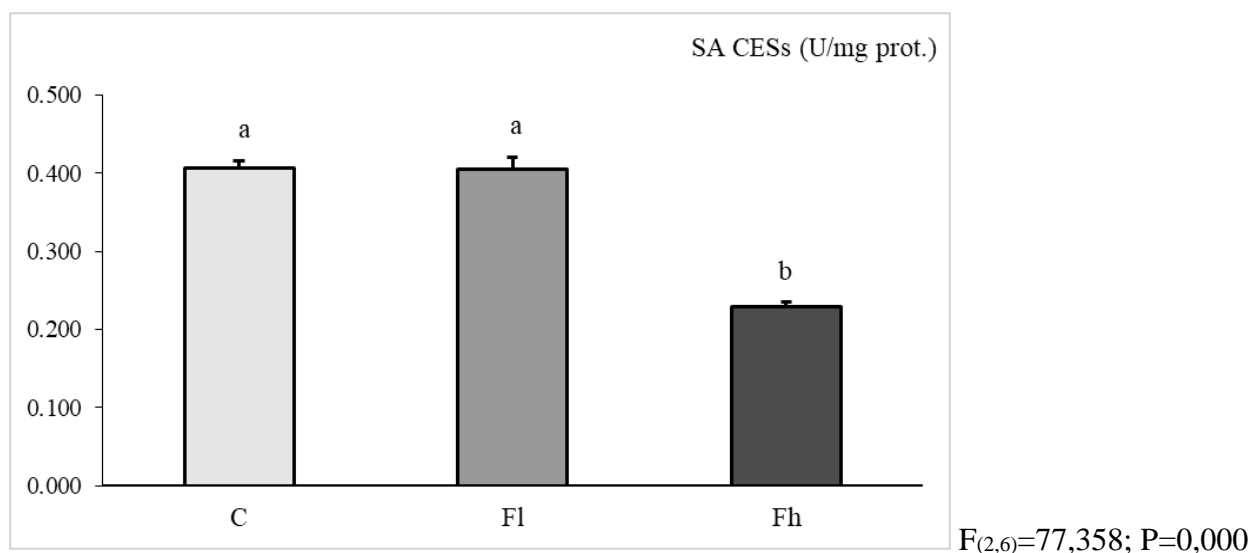
Slika 45. Aktivnost katalaze (CAT) u hemolimfi larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.3. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na parametre detoksifikacionog sistema u mozgu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

4.3.1. Specifična aktivnost karboksilesteraza u mozgu larvi *L. dispar*

Dugotrajna ishrana veštačkom dijetom sa dodatom većom koncentracijom fluorantena dovela je do redukcije specifične aktivnosti karboksilesteraze u mozgu *L. dispar* larvi (**Slika 46**).

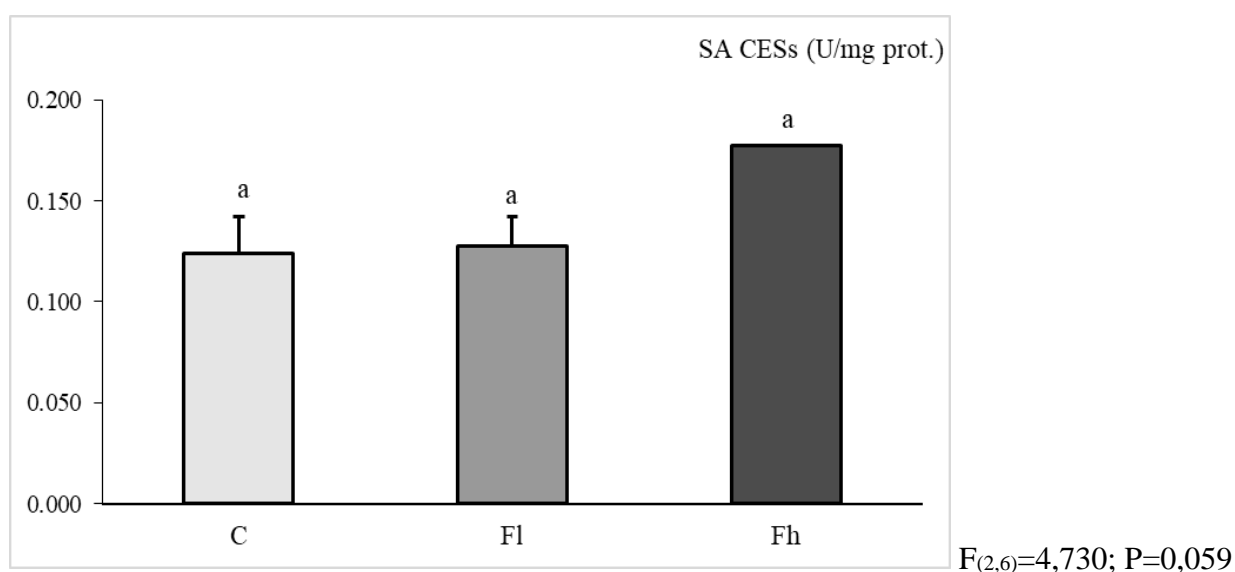
Rezultati



Slika 46. Specifična aktivnost karboksilesteraza (SA CESs) u mozgu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.3.2. Specifična aktivnost karboksilesteraza u mozgu larvi *E. chrysorrhoea*

Specifična aktivnost karboksilesteraze u mozgu *E. chrysorrhoea* larvi ne pokazuje statistički značajne promene nakon hroničnog dejstva fluorantena, dodatog hrani (**Slika 47**).



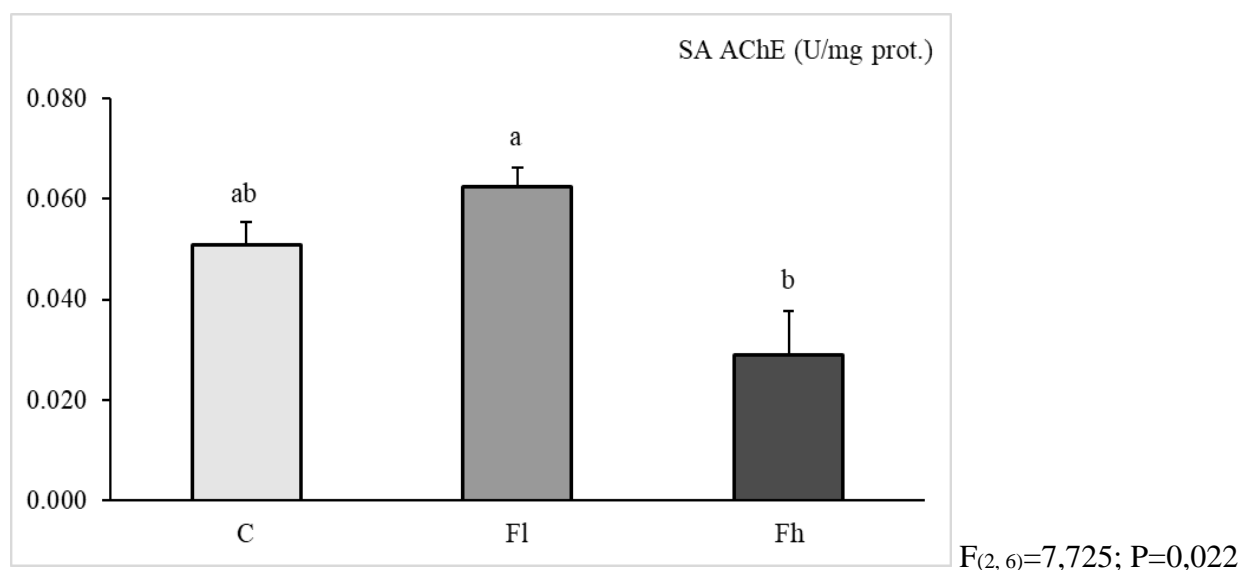
Slika 47. Specifična aktivnost karboksilesteraza (SA CESs) u mozgu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.3.3. Specifična aktivnost acetilholinesteraza u mozgu larvi *L. dispar*

Dugotrajna ishrana veštačkom dijetom sa dodatim fluorantenom nije dovela do značajnih razlika aktivnosti acetilholinesteraza u mozgu *L. dispar* larvi, u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim,

Rezultati

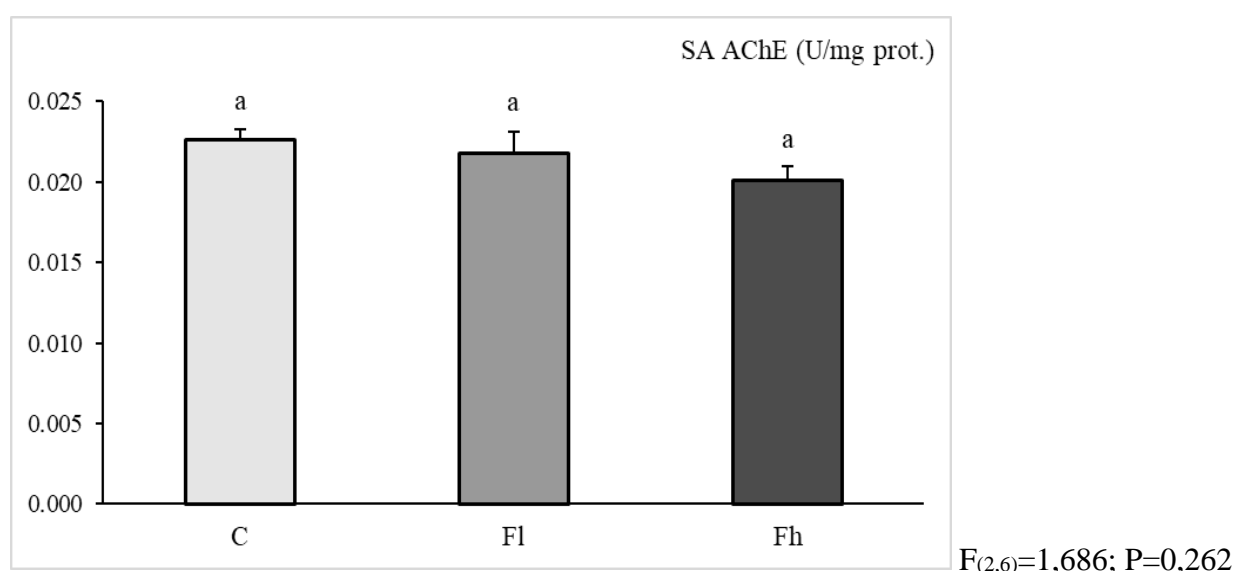
aktivnost enzima inhibirana je u grupi larvi koje su bile izlagane većoj koncentraciji fluorantena u hrani, u odnosu na grupu koja je bila pod uticajem manje koncentracije ovog zagađivača (**Slika 48**).



Slika 48. Specifična aktivnost acetilholinesteraza (SA AChE) u mozgu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.3.4. Specifična aktivnost acetilholinesteraza u mozgu larvi *E. chrysorrhoea*

Hronična izloženost različitim koncentracijama fluorantena, dodatim hrani, nije imala značajnog uticaja na specifičnu aktivnost acetilholinesteraza u mozgu *E. chrysorrhoea* larvi (**Slika 49**).



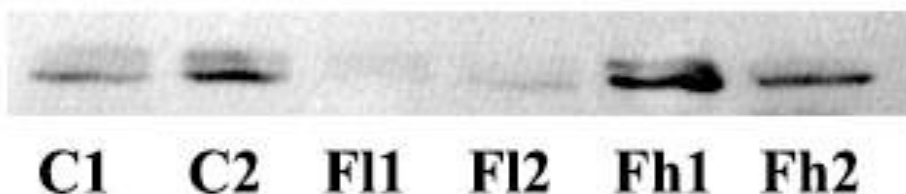
Slika 49. Specifična aktivnost acetilholinesteraza (SA AChE) u mozgu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.4. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na ekspresiju Hsp70 u celom srednjem crevu i mozgu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

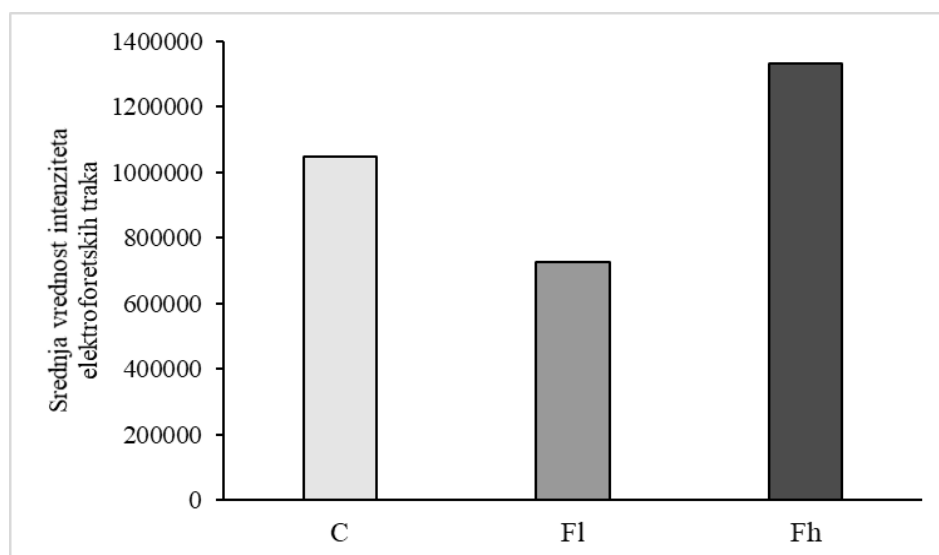
4.4.1. Ekspresija Hsp70 u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Dugotrajno izlaganje larvi *L. dispar* manjoj koncentraciji fluorantena dodatnoj hrani, dovelo je do smanjenja ekspresije Hsp70 proteina u celom srednjem crevu, dok je izlaganje većoj koncentraciji ovog zagađivača imalo suprotan efekat (Slika 50a i 50b).

a.



b.

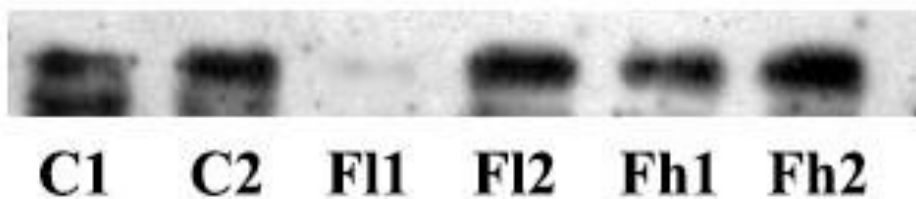


Slika 50. Efekat fluorantena na ekspresiju Hsp70 u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (F1) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. **a.** Western blot. **b.** Denzitometrijska analiza intenziteta ekspresije elektroforetskih traka Hsp70.

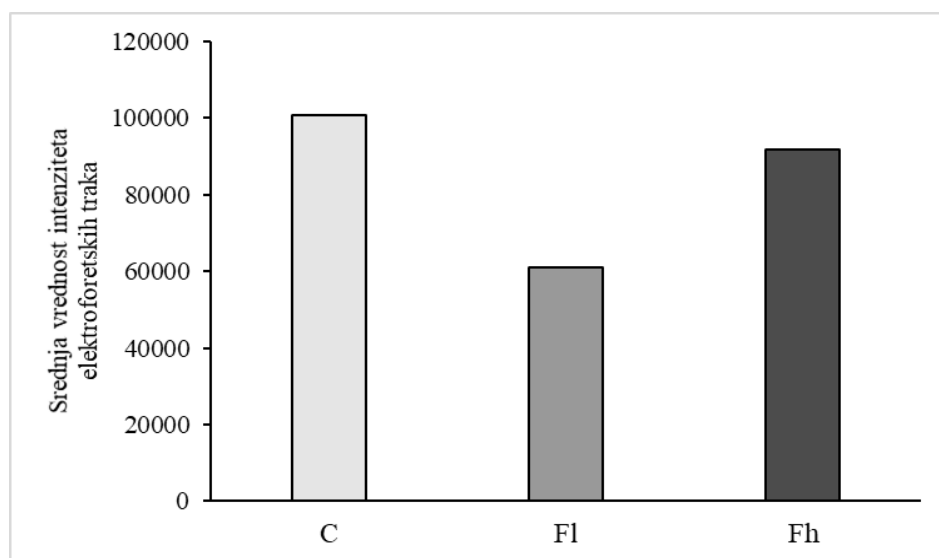
4.4.2. Ekspresija Hsp70 u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Utvrđeno je smanjenje ekspresije Hsp70 proteina u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* nakon tretmana manjom koncentracijom fluorantena, u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 51a i 51b).

a.



b.

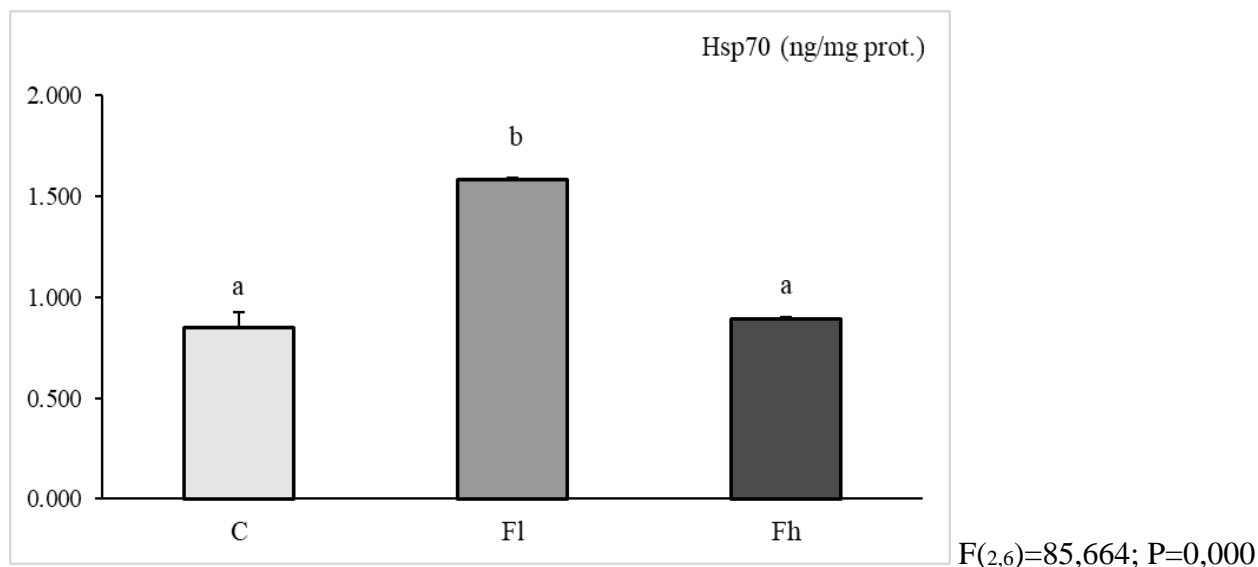


Slika 51. Efekat fluorantena na ekspresiju Hsp70 u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (F1) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. **a.** Western blot. **b.** Denzitometrijska analiza intenziteta ekspresije elektroforetskih traka Hsp70.

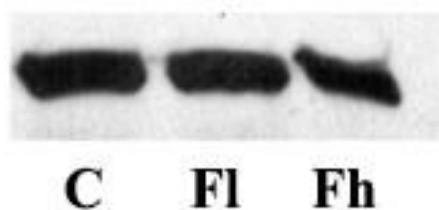
4.4.3. Ekspresija Hsp70 u mozgu larvi *L. dispar*

Značajno povećanje koncentracije Hsp70 proteina detektovano je u mozgu *L. dispar* larvi koje su hranjene veštačkom dijetom sa dodatom manjom koncentracijom fluorantena (**Slika 52a**). Analizom intenziteta ekspresije elektroforetskih traka Hsp70 kod larvi hronično izlaganih fluorantenu, dodatom hrani, uočeno je smanjenje ekspresije Hsp70 proteina u mozgu, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 52b i 52c**).

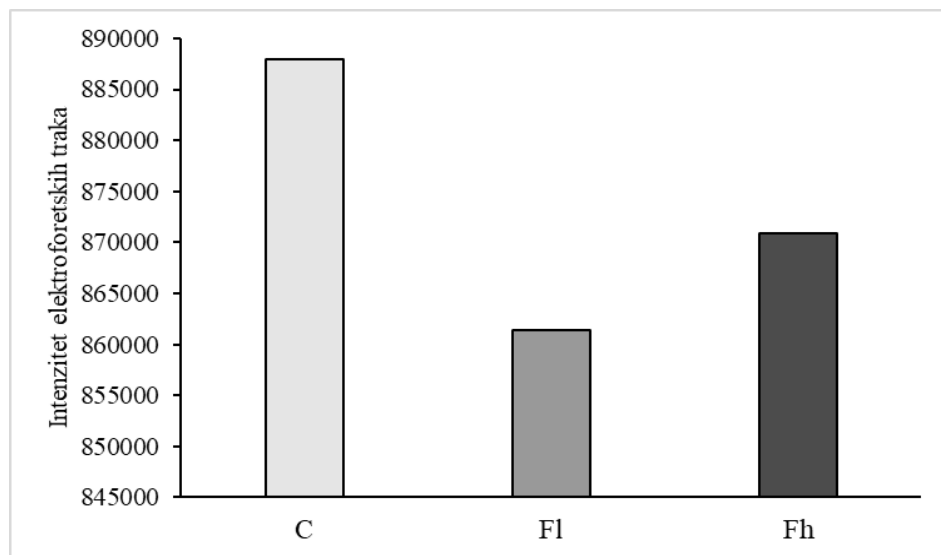
a.



b.



c.



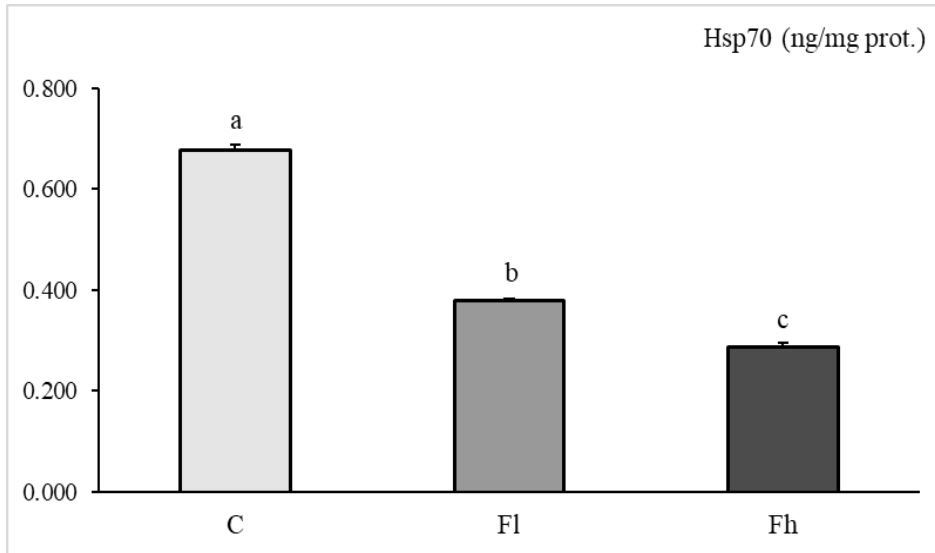
Slika 52. Efekat fluorantena na koncentraciju Hsp70 u mozgu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane; **a.** Koncentracije Hsp70 dobijene ELISA testom; **b.** Western blot. **c.** Denzitometrijska analiza intenziteta ekspresije elektroforetskih traka Hsp70.

Rezultati

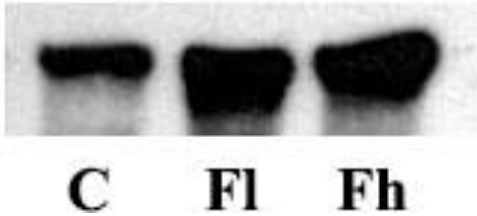
4.4.4. Ekspresija Hsp70 u mozgu larvi *E. chrysorrhoea*

Značajno smanjene koncentracije Hsp70 detektovane su u mozgu *E. chrysorrhoea* larvi izlaganih različitim koncentracijama fluorantena, dodatim hrani (**Slika 53a**). Analiza ekspresije elektroforetskih traka Hsp70 je pokazala povećanje intenziteta ekspresije Hsp70 u mozgu *E. chrysorrhoea* larvi nakon tretmana fluorantenom (**Slika 53b i 53c**).

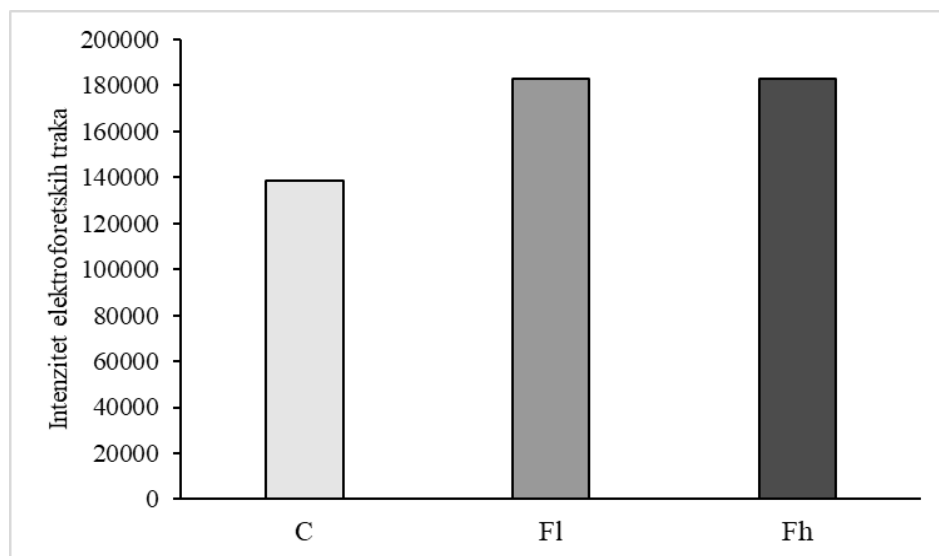
a.



b.



c.



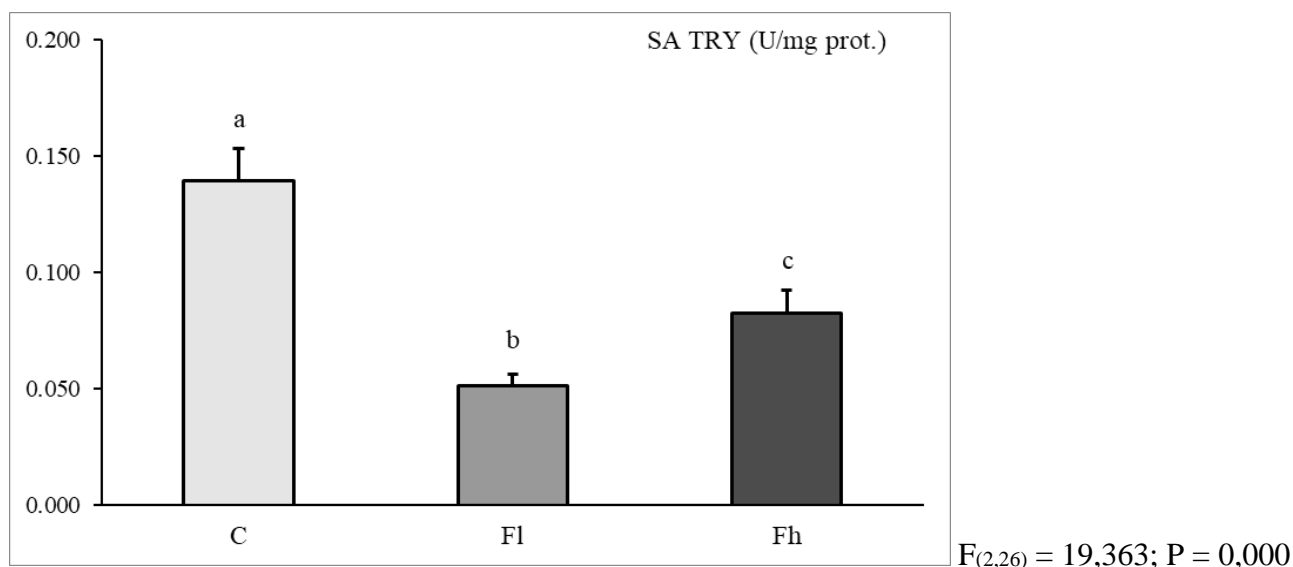
Slika 53. Efekat fluorantena na koncentraciju Hsp70 u mozgu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (F1) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane; **a.** Koncentracije Hsp70 dobijene ELISA testom **b.** Western blot. **c.** Denzitometrijska analiza intenziteta ekspresije elektroforetskih traka Hsp70.

4.5. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na aktivnost digestivnih enzima srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

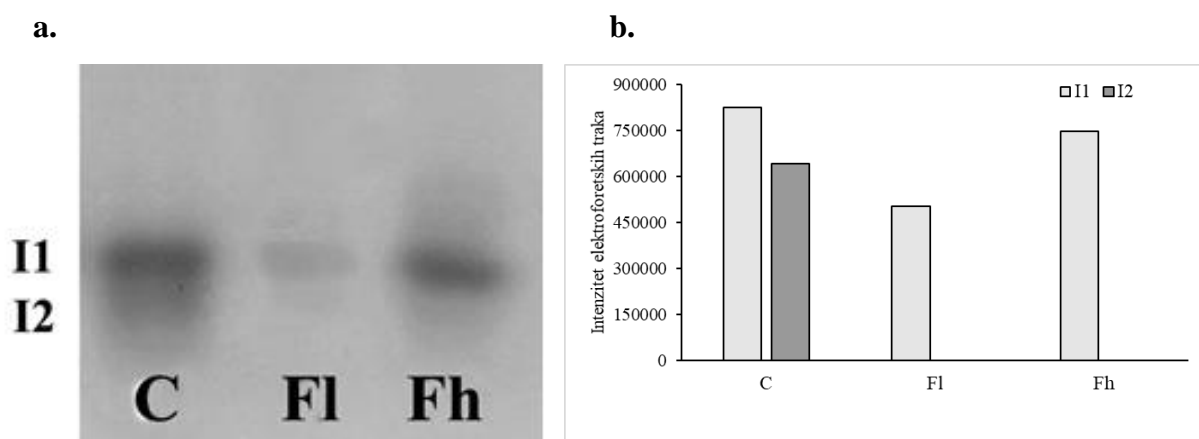
4.5.1. Specifična aktivnost i zimogramaska detekcija tripsina u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Značajno smanjenje specifične aktivnosti tripsina detektovano je u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala različite koncentracije fluorantena, pri čemu je efekat organskog zagađivača prisutnog u hrani bio veći kod larvi izlaganih manjoj koncentraciji (**Slika 54**). Zimogramskom detekcijom je utvrđeno postojanje dve izoforme. Izoforma I1 je prisutna u sve tri grupe, smanjenog intenziteta u grupama tretiranim fluorantenom u poređenju sa kontrolnom grupom. Prisustvo izoforme I2 je uočeno samo u kontrolnoj grupi (**Slika 55a i 55b**).

Rezultati



Slika 54. Specifična aktivnost tripsina (SA TRY) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

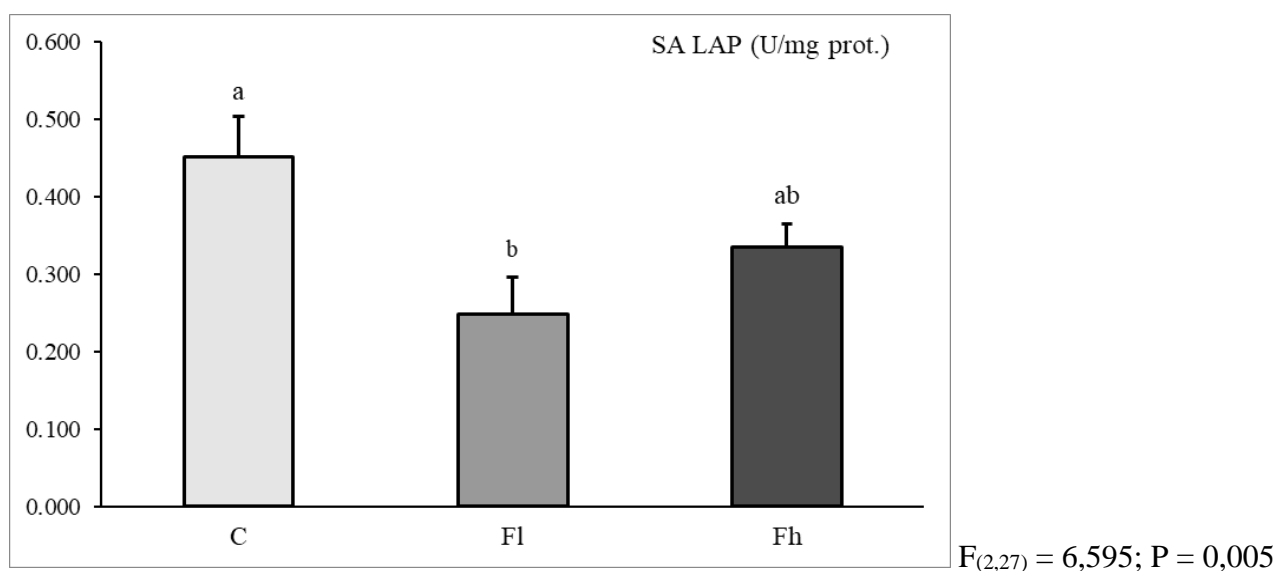


Slika 55. a. Zimogramska detekcija tripsina (TRY) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi tripsina. I1 i I2 označavaju enzimske izoforme.

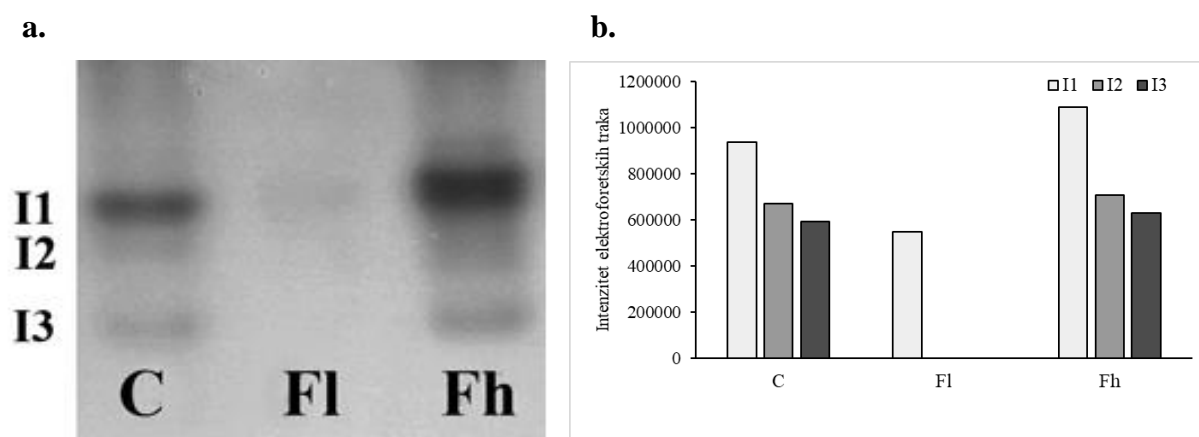
4.5.2. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija leucin aminopeptidaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Prisustvo manje koncentracije fluorantena u hrani uzrokovalo je značajno smanjenje specifične aktivnosti leucin aminopeptidaze u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi, u poređenju sa kontrolnom grupom (**Slika 56**). Detekcijom aktivnosti leucin aminopeptidaze na nativnom poliakrilamidnom gelu otkriveno je prisustvo 3 izoforme. Izoforma I1 je prisutna u sve tri grupe, dok se izoforme I2 i I3 uočavaju u kontrolnoj i grupi larvi izlaganih većoj koncentraciji fluorantena u hrani. Intenzitet I1 izoforme je najmanje izražen u gupi tretiranoj manjom koncentracijom fluorantena (**Slika 57a i 57b**).

Rezultati



Slika 56. Specifična aktivnost leucin aminopeptidaze (SA LAP) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suvemasne hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

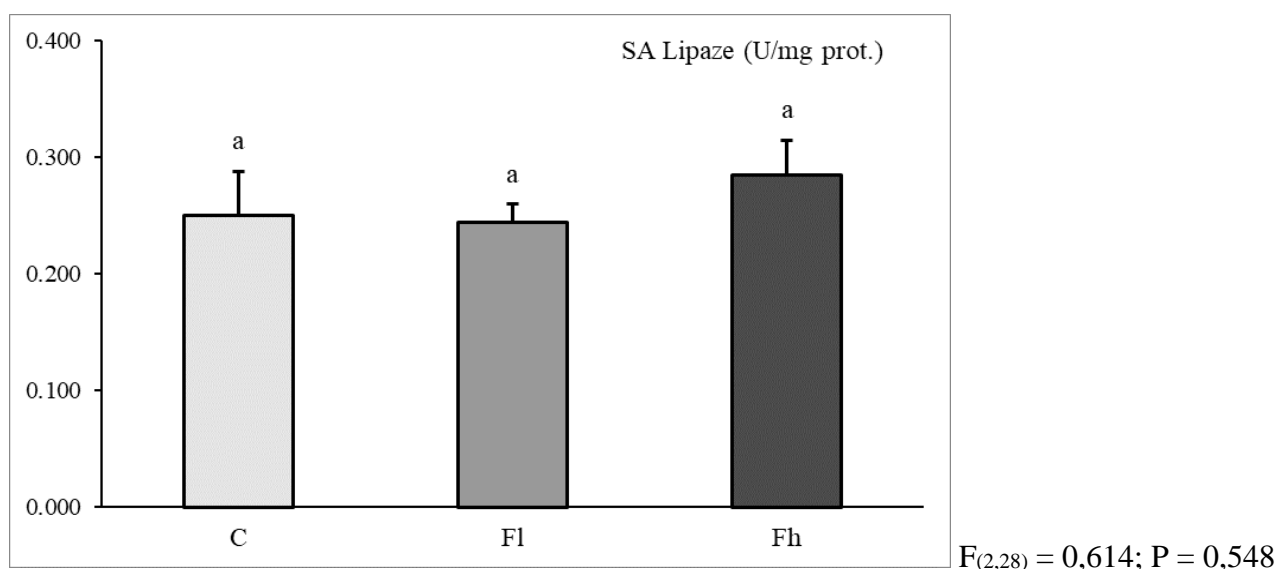


Slika 57. a. Zimogramska detekcija leucin aminopeptidaze (LAP) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi leucin aminopeptidaze. I1, I2 i I3 označavaju enzimske izoforme.

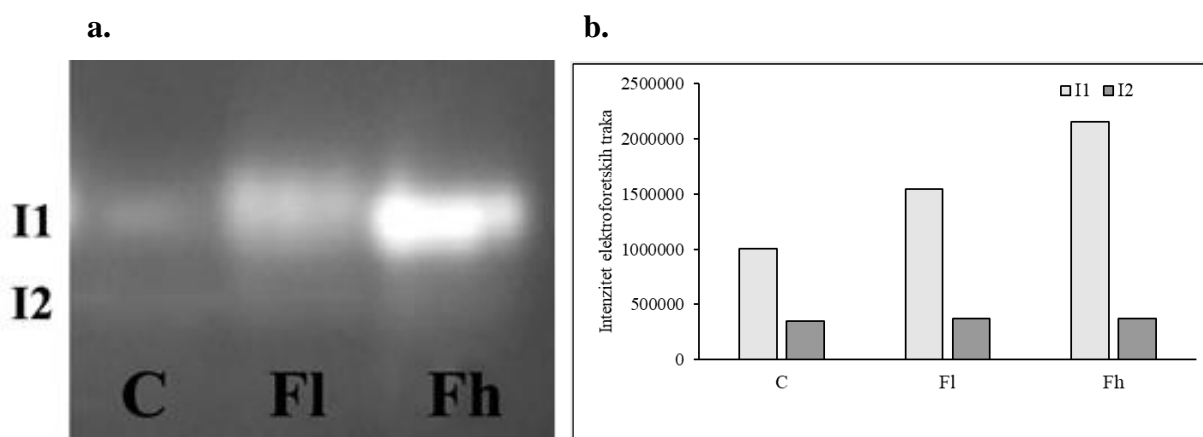
4.5.3. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija lipaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Analizom specifične aktivnosti lipaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*, uočeno je da ishrana larvi dijetom sa dodatkom fluorantena (koncentracije 6,7 i 67 ng / g suve mase hrane) nije imala statistički značajnog efekta na aktivnost enzima (**Slika 58**). Zimogramska detekcija je ukazala na prisustvo 2 izoforme u sve tri eksperimentalne grupe, pri čemu se uočava dozno-zavisno povećanje intenziteta izoforme I1, dok se intenzitet izoforme I2 nije menjao sa tretmanima (**Slika 59a i 59b**).

Rezultati



Slika 58. Specifična aktivnost lipaze (SA Lipaze) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

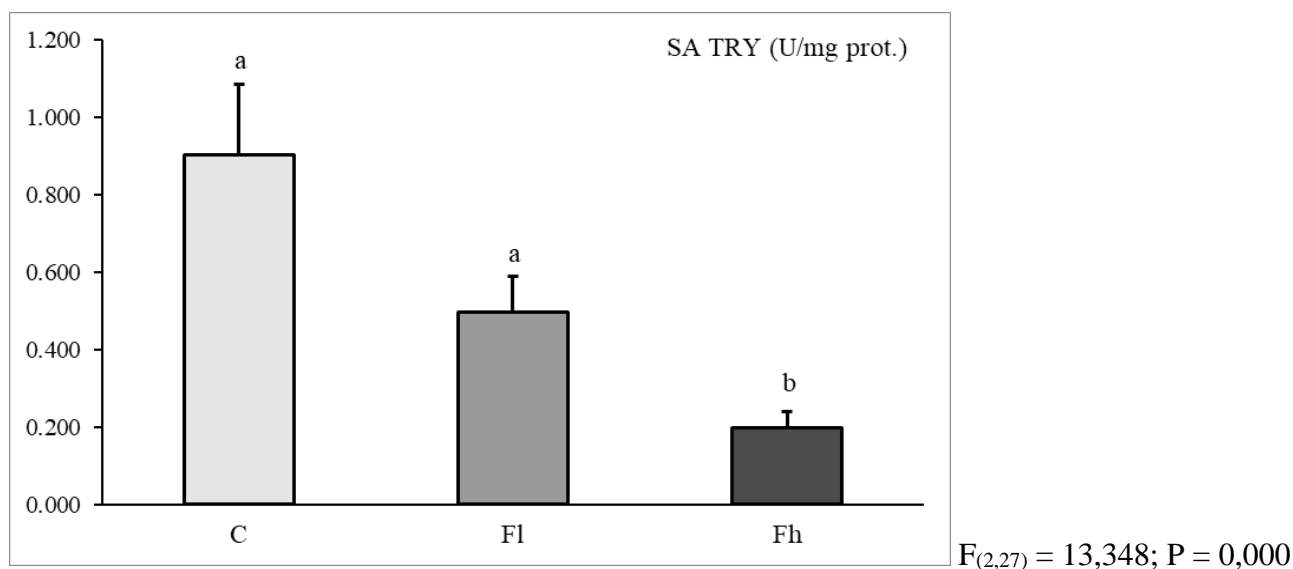


Slika 59. a. Zimogramska detekcija lipaze nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi lipaze. I1 i I2 označavaju enzimske izoforme.

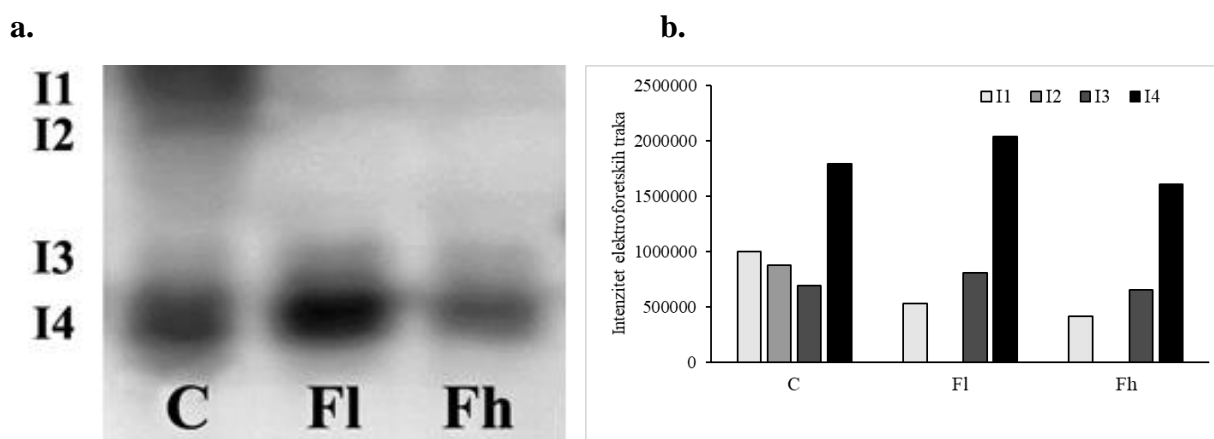
4.5.4. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija tripsina u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

U celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom sa dodatom većom koncentracijom fluorantena utvrđeno je značajno smanjenje specifične aktivnosti tripsina (**Slika 60**). Zimogramskom detekcijom je uočeno prisustvo četiri izoforme enzima. Izoforma I2 je prisutna samo u kontrolnoj grupi, dok su preostale tri prisutne u svim eksperimentalnim grupama. Izoforma I4 je najjačeg intenziteta u sve tri grupe, s tim da se njen intenzitet smanjuje u grupi tretiranoj većom koncentracijom fluorantena. Isti trend se može videti i kod preostalih izoformi (**Slika 61a i 61b**).

Rezultati



Slika 60. Specifična aktivnost tripsina (SA TRY) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

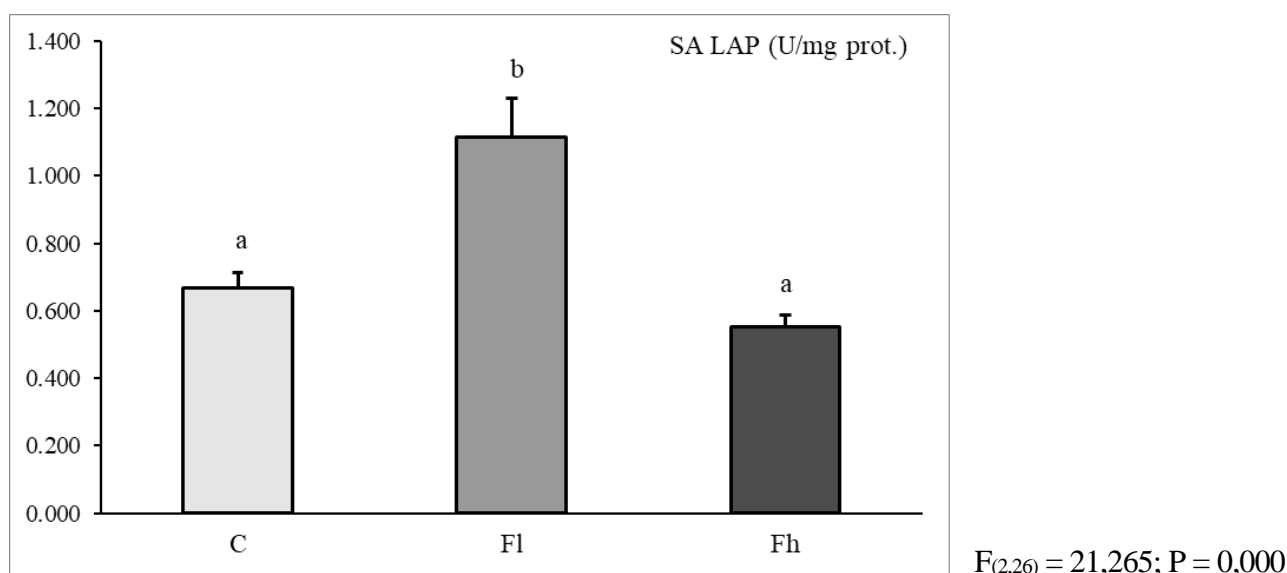


Slika 61. a. Zimogramska detekcija tripsina (TRY) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi tripsina. I1, I2, I3 i I4 označavaju enzimске izoforme.

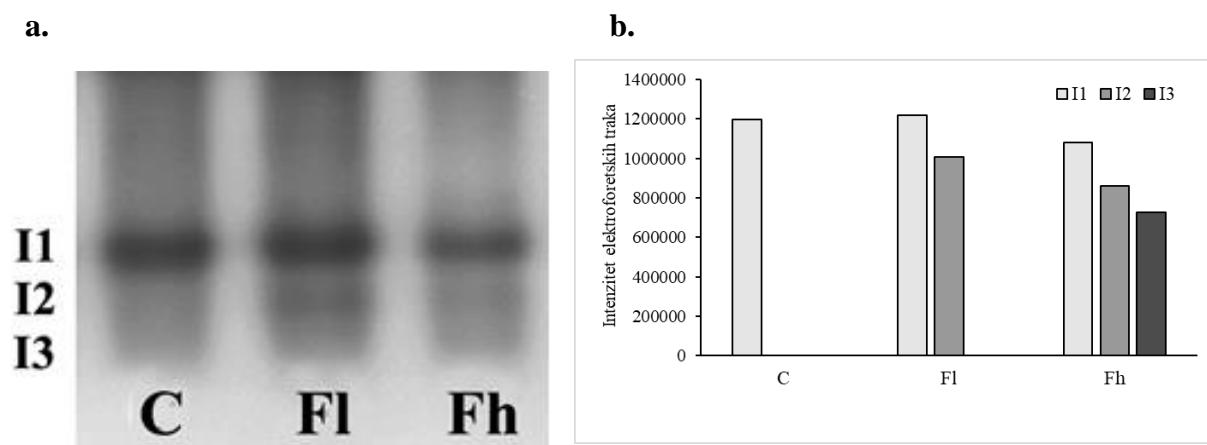
4.5.5. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija leucin aminopeptidaze u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Utvrđeno je da je dugotrajna izloženost manjoj koncentraciji fluorantena, dodatog hrani, dovela do povećanja specifične aktivnosti leucin aminopeptidaze u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* (Slika 62). Zimogramska detekcija je ukazala na prisustvo 3 izoforme. Izoforma I1 je uočena u sve tri grupe, izoforma I2 u grupama tretiranim fluorantenom, dok se izoforma I3 može uočiti samo u grupi izloženoj većoj koncentraciji organskog zagađivača. Za izoformu I1 je karakteristično smanjenje intenziteta enzimske trake u grupi tretiranoj većom koncentracijom fluorantena, u odnosu na kontrolu (Slika 63a i 63b).

Rezultati



Slika 62. Specifična aktivnost leucin aminopeptidaze (SA LAP) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

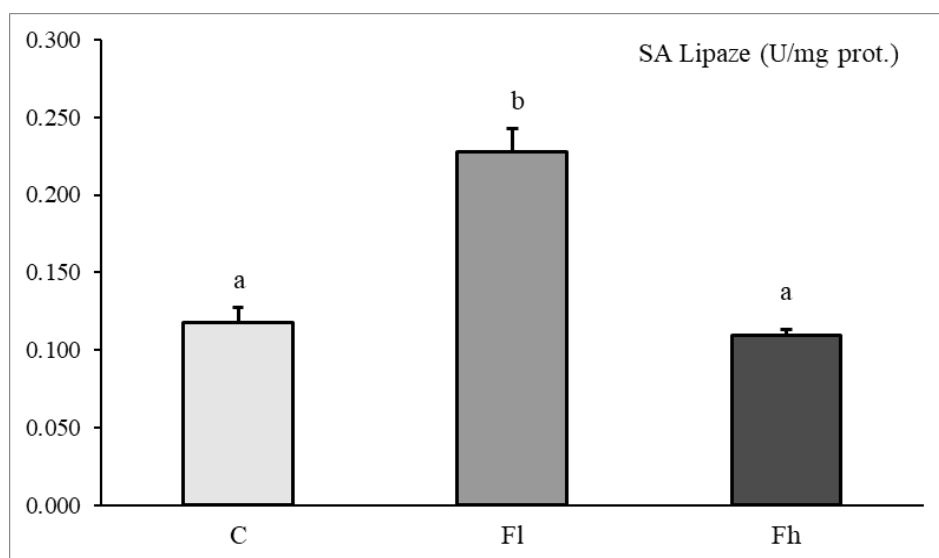


Slika 63. a. Zimogramska detekcija leucin aminopeptidaze (LAP) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi leucin aminopeptidaze. I1, I2 i I3 označavaju enzimske izoforme.

4.5.6. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija lipaze u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

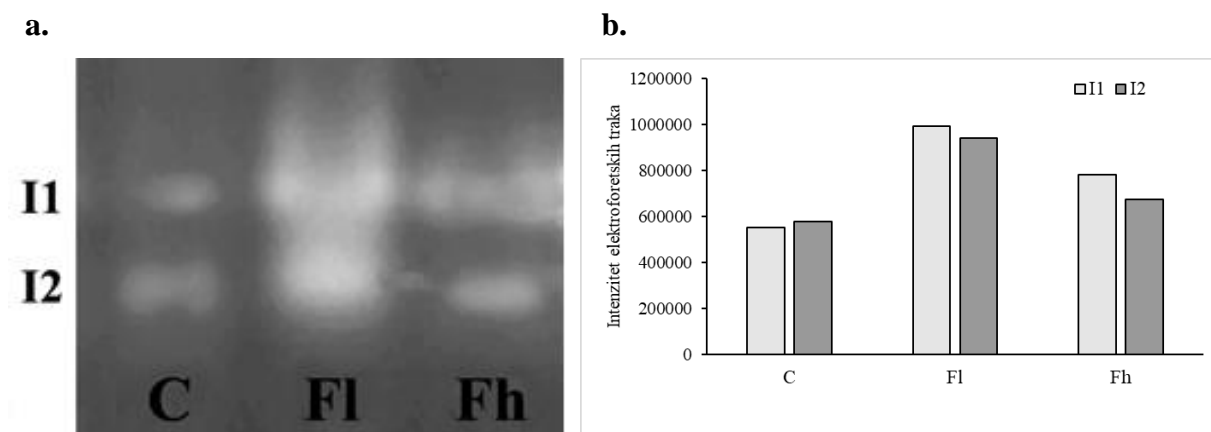
Statistički značajno povećanje specifične aktivnosti lipaze uočava se u grupi larvi izlaganih manjoj koncentraciji fluorantena, u odnosu na kontrolnu i grupu larvi dugotrajno izlaganih većoj koncentraciji fluorantena u hrani (**Slika 64**). Detekcijom aktivnosti lipaze na nativnom poliakrilamidnom gelu uočene su dve izoforme I1 i I2 u svim eksperimentalnim grupama. Densitometrijska analiza je pokazala povećanje intenziteta enzimskih traka u grupi koja je dugotrajno izlagana manjoj koncentraciji fluorantena, dodatog hrani (**Slika 65a i 65b**).

Rezultati



$F_{(2,26)} = 30,284; P = 0,000$

Slika 64. Specifična aktivnost lipaze (SA Lipaze) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

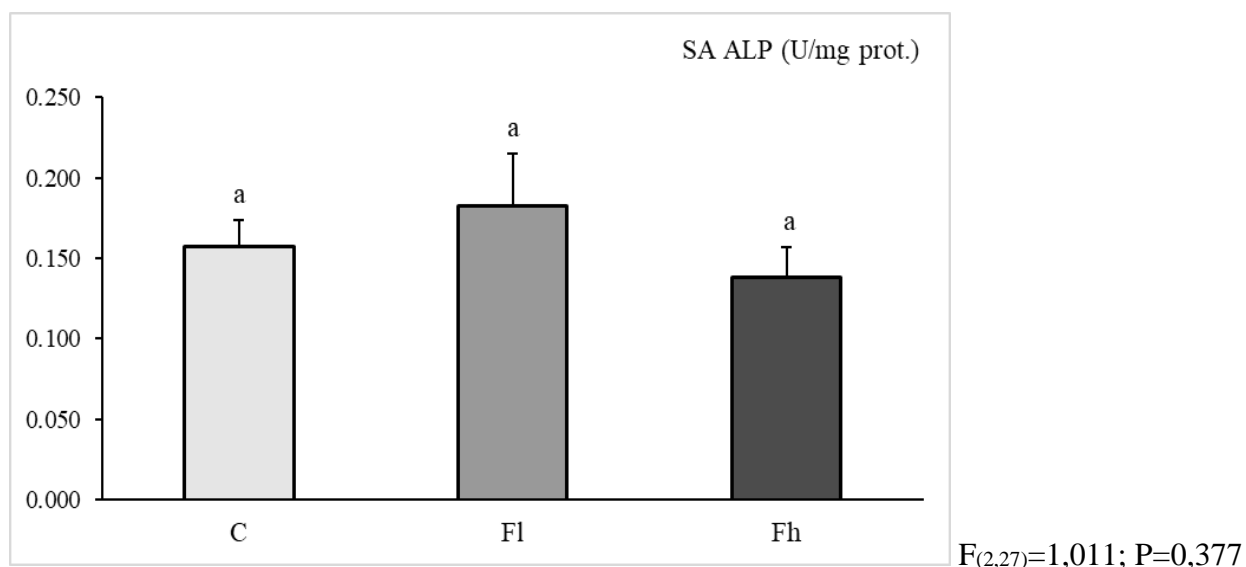


Slika 65. a. Zimogramska detekcija lipaze nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi lipaze. I1 i I2 označavaju enzimске izoforme.

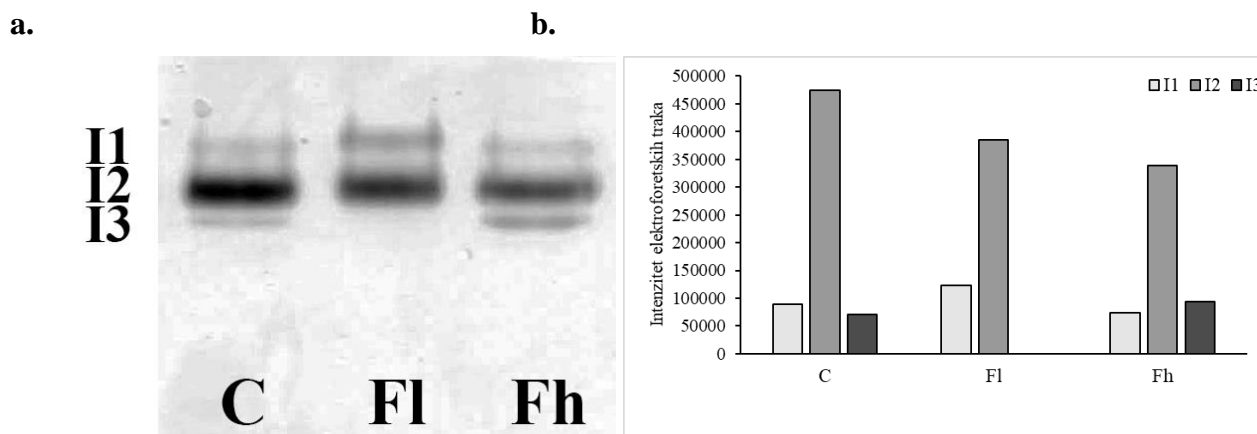
4.5.7. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija alkalnih fosfataza u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi

Specifične aktivnosti alkalnih fosfataza celog srednjeg creva *L. dispar* larvi nisu bile promenjene nakon izloženosti fluorantenu u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 66**). Zimogramskom detekcijom su zabeležene tri izoforme. Izoforme I1 i I2 su uočene u sve tri grupe, dok izoforma I3 nedostaje u grupi koja je bila izložena manjoj koncentraciji fluorantena. Najintenzivnija izoforma je I2 i njen intenzitet se smanjuje sa povećanjem koncentracije fluorantena. Takođe, može se uočiti da su izoforma I1 u grupi larvi izlaganih manjoj koncentraciji zagađivača prisutnog u hrani, kao i izoforma I3 kod larvi izlaganih većoj koncentraciji fluorantena, neznatno većeg intenziteta, u poređenju sa kontrolom (**Slika 67a i 67b**).

Rezultati



Slika 66. Specifična aktivnost alkalnih fosfataza (SA ALP) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

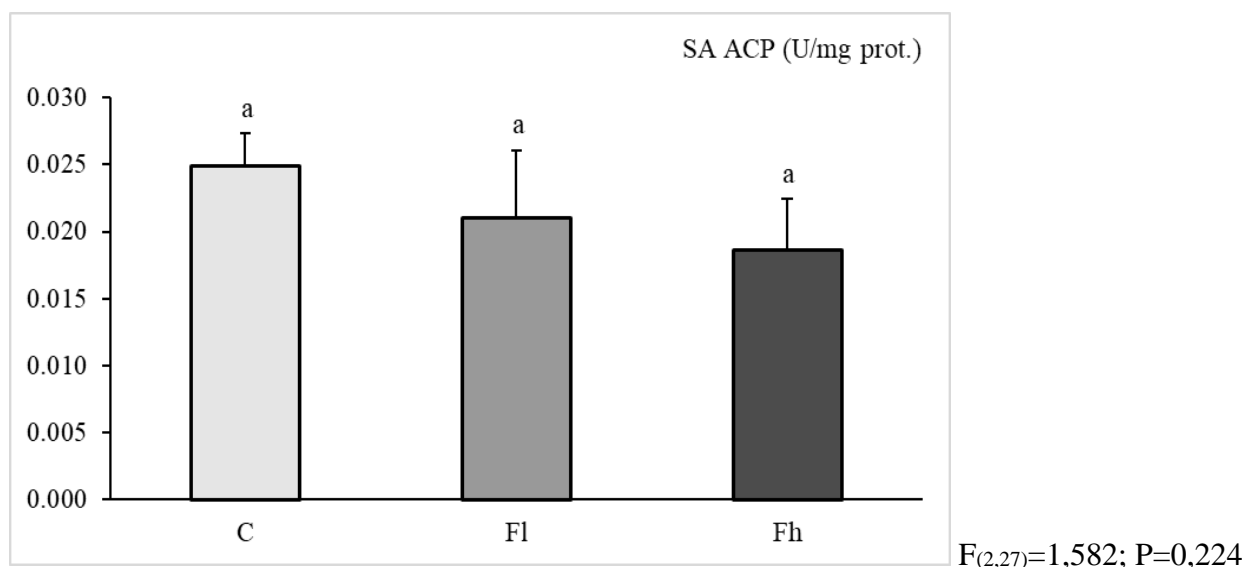


Slika 67. a. Zimogramska detekcija alkalnih fosfataza (ALP) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi alkalnih fosfataza. I1, I2 i I3 označavaju enzimске izoforme.

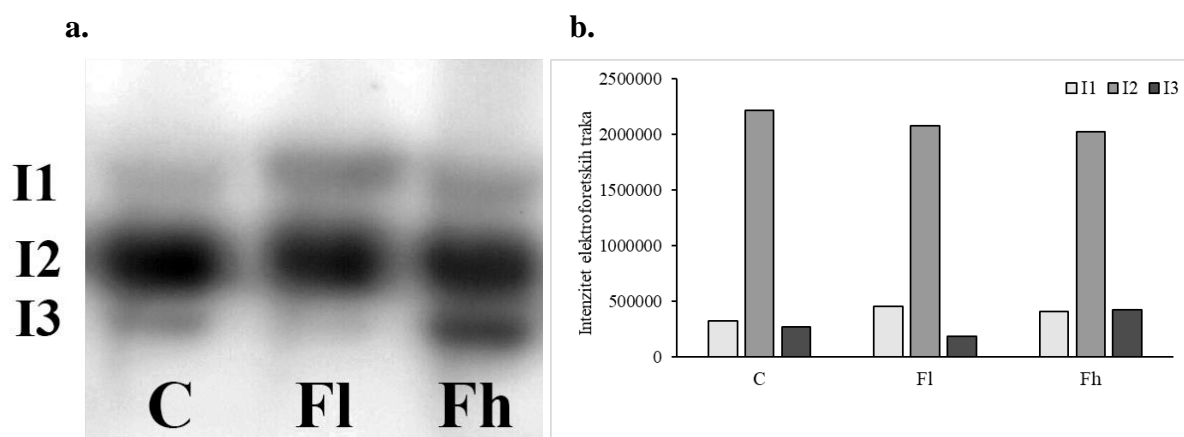
4.5.8. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija ukupnih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

U celom srednjem crevu *L. dispar* larvi nisu detektovane statistički značajne promene aktivnosti ukupnih kiselih fosfataza nakon dugotrajne izloženosti fluorantenu (**Slika 68**). Nakon zimogramske detekcije utvrđeno je da sve tri grupe odlikuje prisustvo tri izoforme. Izoforma I2 je najintenzivnija, a njen intenzitet se smanjuje sa povećanjem koncentracije fluorantena u hrani (**Slika 69a i 69b**).

Rezultati



Slika 68. Specifična aktivnost ukupnih kiselih fosfataza (SA ACP) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

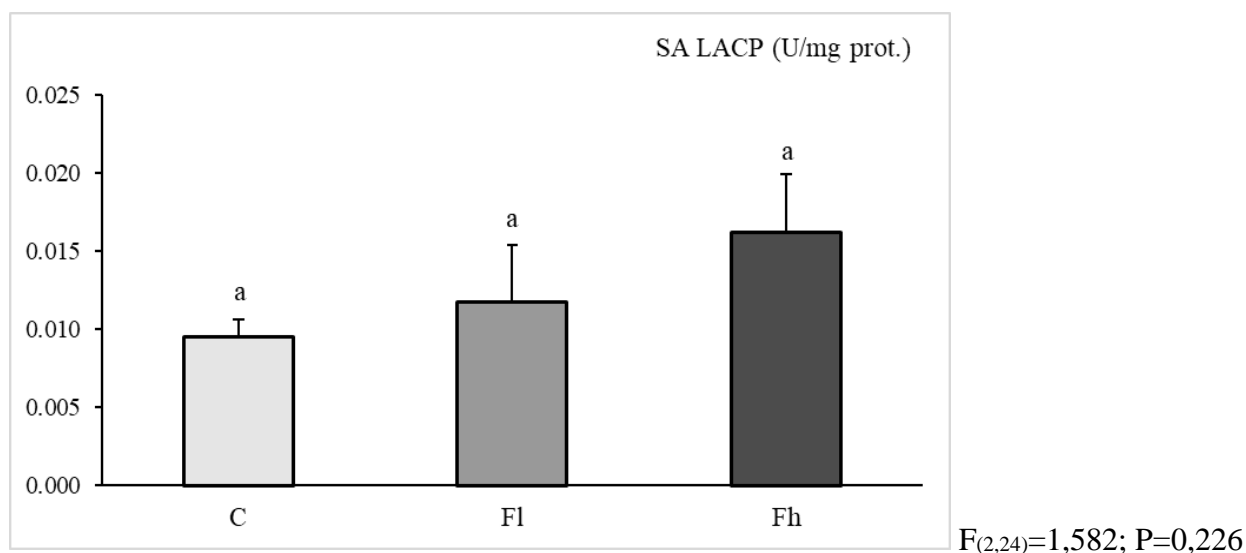


Slika 69. a. Zimogramska detekcija ukupnih kiselih fosfataza (ACP) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Denzitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi ukupnih kiselih fosfataza. I1, I2 i I3 označavaju enzimske izoforme.

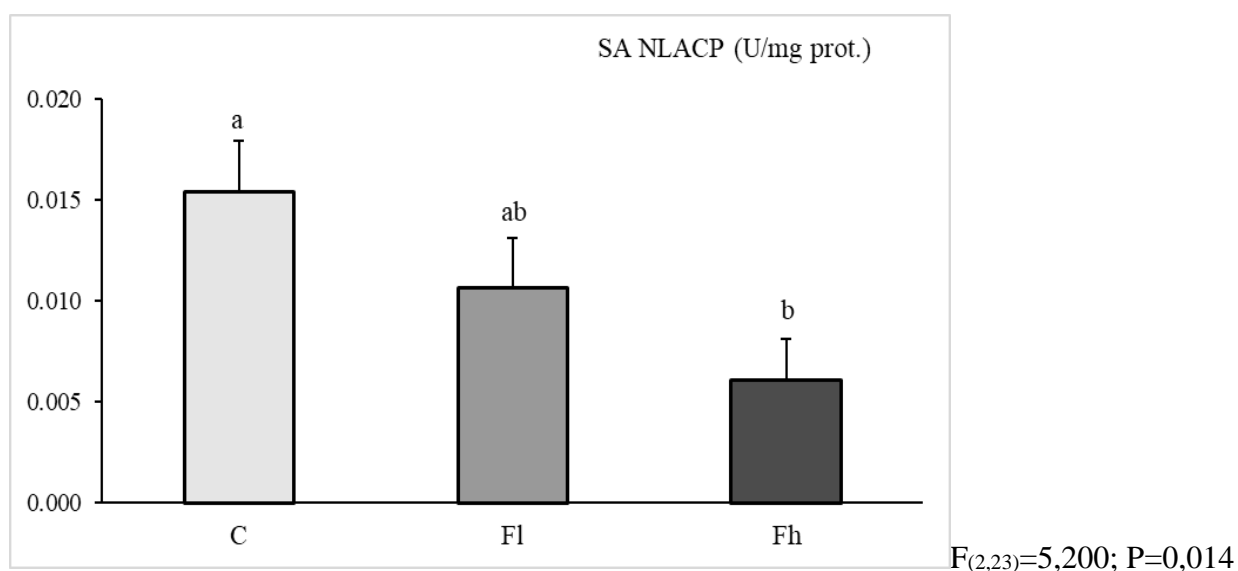
4.5.9. Specifična aktivnost lizozomskih i nelizozomskih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi *L. dispar*

Kada je u pitanju specifična aktivnost lizozomskih kiselih fosfataza, nema značajnih promena nakon tretmana fluorantenom (**Slika 70**). Značajno smanjenje aktivnosti nelizozomskih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi detektovano je nakon izloženosti fluorantenu u koncentraciji od 67 ng / g suve hrane (**Slika 71**).

Rezultati



Slika 70. Specifična aktivnost lizozomskih kiselih fosfataza (SA LACP) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

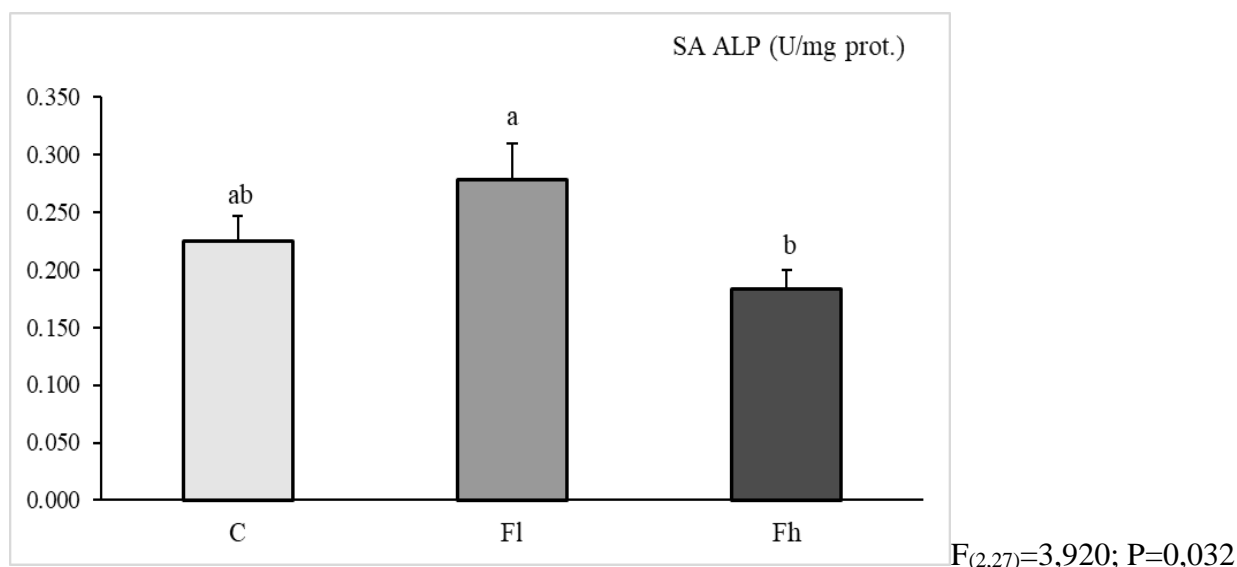


Slika 71. Specifična aktivnost nelizozomskih kiselih fosfataza (SA NLACP) u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

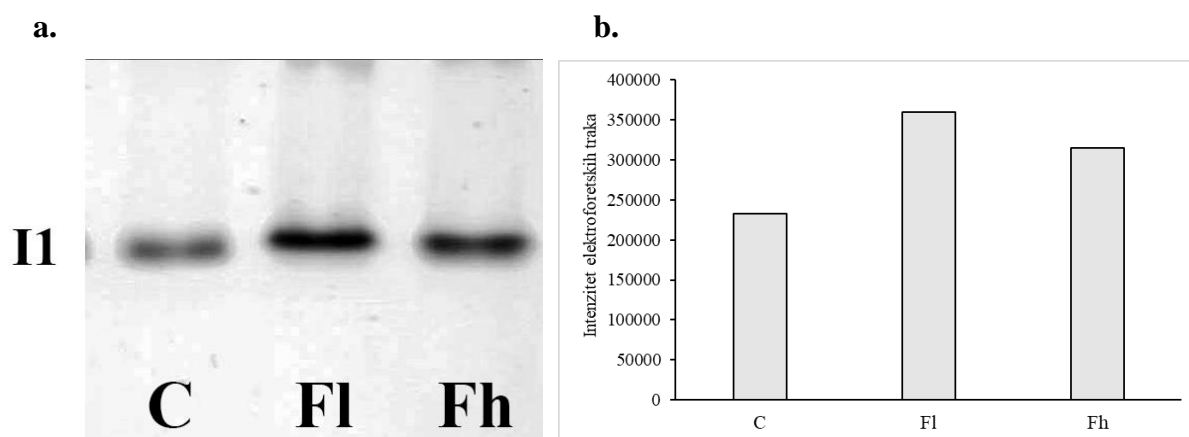
4.5.10. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija alkalnih fosfataza u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Iako nema značajnih razlika između kontrolne i tretiranih grupa, specifična aktivnost alkalnih fosfataza redukovana je značajno u grupi larvi koja je bila izložena većoj koncentraciji, u odnosu na grupu izlaganu manjoj koncentraciji fluorantena (**Slika 72**). Detekcijom aktivnosti alkalnih fosfataza na gelu, utvrđeno je postojanje samo jedne izoforme u sve tri grupe, značajno većeg intenziteta u grupama tretiranim fluorantenom u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 73a i 73b**).

Rezultati



Slika 72. Specifična aktivnost alkalnih fosfataza (SA ALP) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

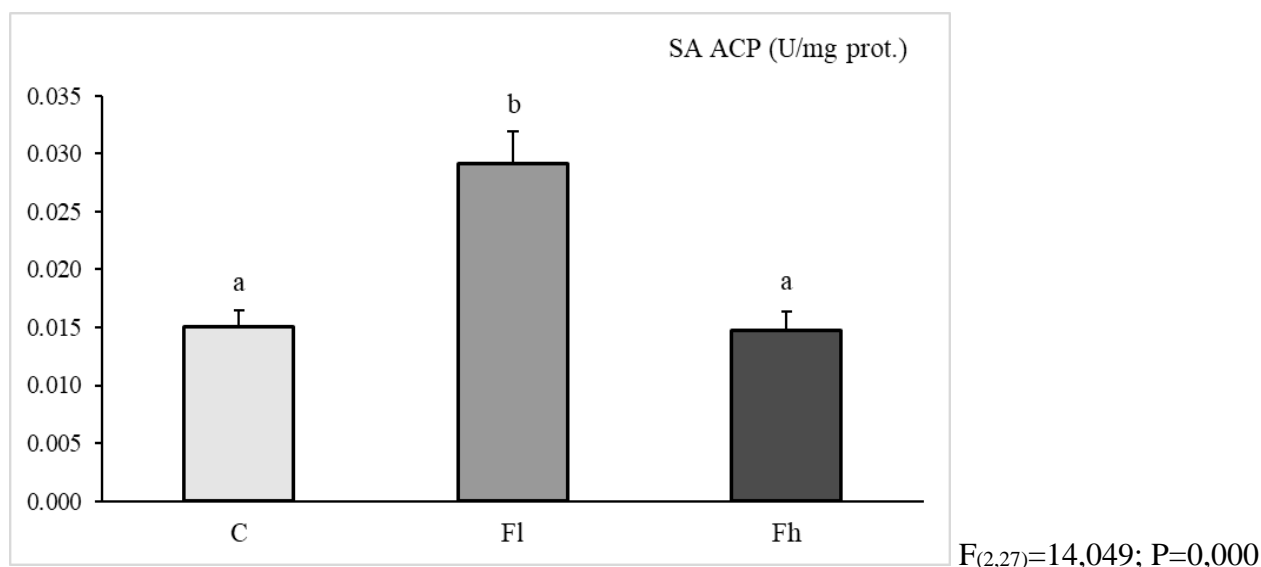


Slika 73. a. Zimogramska detekcija alkalnih fosfataza (ALP) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovane izoforme I1 alkalnih fosfataza.

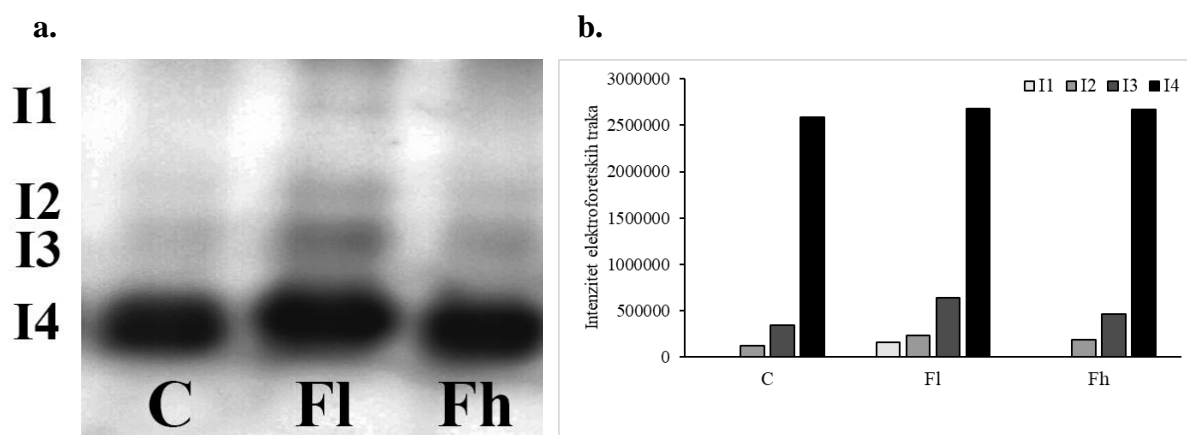
4.5.11. Specifična aktivnost i zimogramska detekcija ukupnih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Statističkom analizom specifične aktivnosti ukupnih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi detektovano je značajno povećanje aktivnosti enzima nakon tretmana fluorantenom u koncentraciji od 6,7 ng/g suve hrane (**Slika 74**). Nakon elektroforetske detekcije kiselih fosfataza kod *E. chrysorrhoea* larvi vidljive su četiri izoforme. Izoforma I1 se može uočiti samo u grupi tretiranoj manjom koncentracijom fluorantena, dok je u preostale dve grupe inhibirana. Izoforme I2 i I3 najjači intenzitet pokazuju u grupi koja je bila pod uticajem manje koncentracije fluorantena. Kod dominantne I4 izoforme nema uočljivih razlika u intenzitetu između grupa (**Slika 75a i 75b**).

Rezultati



Slika 74. Specifična aktivnost ukupnih kiselih fosfataza (SA ACP) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

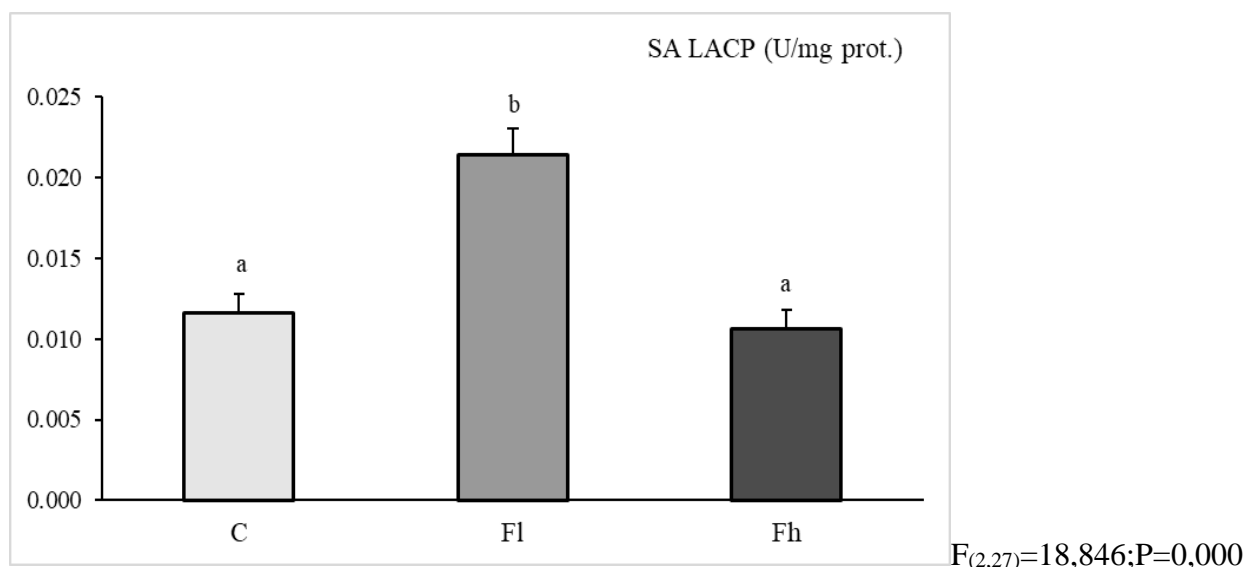


Slika 75. a. Zimogramska detekcija ukupnih kiselih fosfataza (ACP) nakon native poliakrilamid gel elektroforeze. **b.** Densitometrijska analiza intenziteta elektroforetskih traka detektovanih izoformi ukupnih kiselih fosfataza. I1, I2, I3 i I4 označavaju enzimske izoforme.

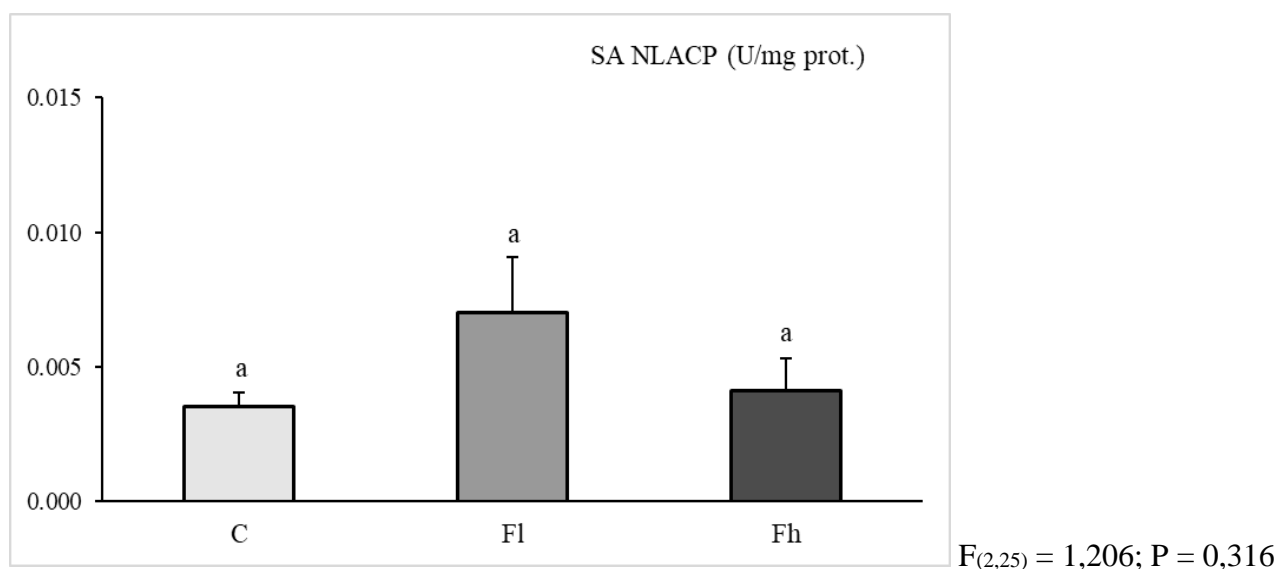
4.5.12. Specifična aktivnost lizozomskih i nelizozomskih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*

Evidentno je povećanje specifične aktivnosti lizozomskih kiselih fosfataza u grupi *E. chrysorrhoea* larvi tretiranih manjom koncentracijom fluorantena u odnosu na kontrolu (**Slika 76**), dok za specifične aktivnosti nelizozomskih fosfataza nisu detektovane statistički značajne razlike između kontrolne i grupa larvi izlaganih fluorantenu, prisutnom u hrani (**Slika 77**).

Rezultati



Slika 76. Specifična aktivnost lizozomskih kiselih fosfataza (SA LACP) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.



Slika 77. Specifična aktivnost nelizozomskih kiselih fosfataza (SA NLACP) u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

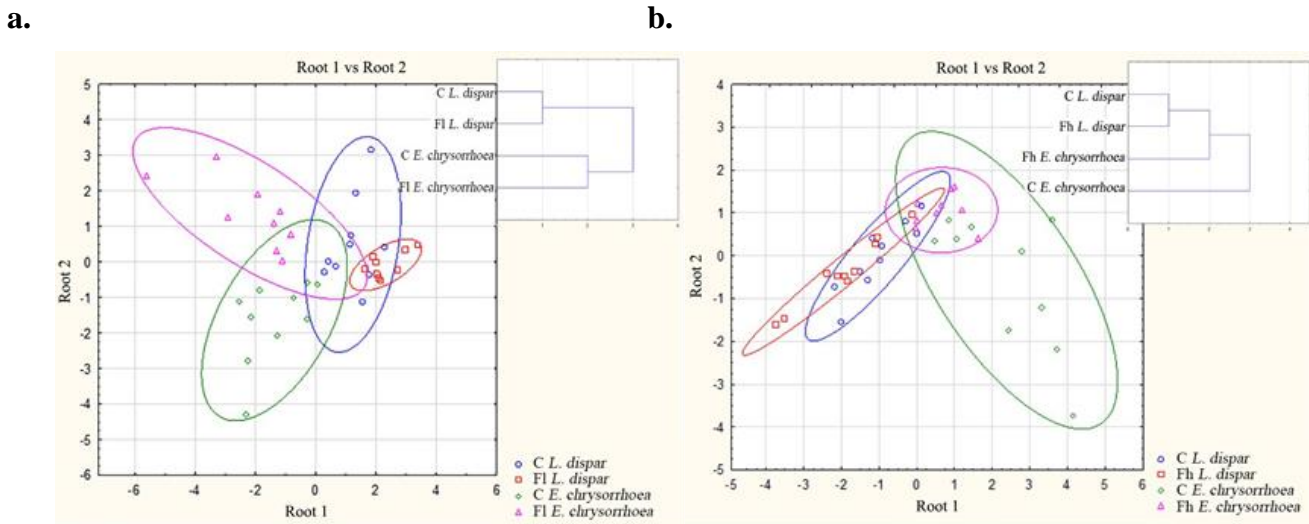
4.5.13. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza aktivnosti digestivnih enzima, tripsina, leucin aminopeptidaze i lipaze, u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza je primenjena radi utvrđivanja razlika i/ili sličnosti u promenama aktivnosti digestivnih enzima, tripsina i leucin aminopeptidaze, kao i lipaze, celog srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*, nakon hroničnog stresa izazvanog fluorantenom dodatim u hranu.

Rezultati

Kanonijska diskriminaciona analiza za manju koncentraciju fluorantena pokazala je razdvajanje po prvoj kanonijskoj funkciji koja nosi 73 % heterogenosti, čemu je najviše doprinela specifična aktivnost leucin aminopeptidaze. Larve ovih vrsta su pokazale razdvajanje po drugoj funkciji 27 %, a enzim koji je najviše doprineo razdvajanju u ovom slučaju je specifična aktivnost tripsina (**Slika 78a**).

Za ispitivanje odgovora na prisustvo veće koncentracije fluorantena u hrani, prva kanonijska funkcija pokazala je 87,1 % od ukupne heterogenosti, dok je za drugu funkciju uočeno 11,9 %. Parametri koji su najviše doprineli razdvajanju su specifična aktivnost lipaze po prvoj kanonijskoj funkciji, odnosno specifična aktivnost tripsina po drugoj kanonijskoj funkciji (**Slika 78b**).



Slika 78. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza digestivnih enzima (TRY, LAP, lipaza) *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* larvi za **a.** manju (6,7 ng / g suve mase hrane) i **b.** veću (67 ng / g suve mase hrane) koncentraciju fluorantena.

4.5.14. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza aktivnosti digestivnih enzima, fosfataza, u celom srednjem crevu *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* larvi

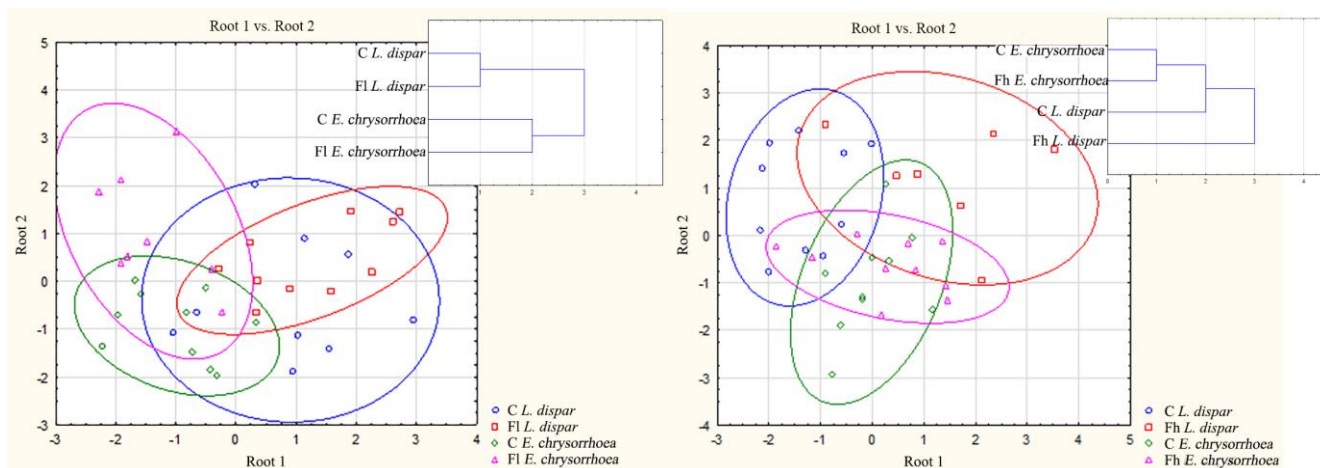
Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza je primenjena radi utvrđivanja razlika i/ili sličnosti u promenama aktivnosti digestivnih enzima, alkalnih, ukupnih kiselih, lizozomskih i nelizozomskih kiselih fosfataza celog srednjeg creva *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* larvi koje su nastale kao posledica stresa izazvanog dodatkom fluorantena u ishranu.

Kanonijska diskriminaciona analiza za manju koncentraciju fluorantena pokazala je razdvajanje po prvoj kanonijskoj funkciji koja nosi 69,8 % heterogenosti, čemu su najviše doprinele specifične aktivnosti lizozomskih i nelizozomskih kiselih fosfataza. Razdvajanje po drugoj funkciji je iznosilo 30,1 %, a enzim koji je najviše doprineo razdvajanju u ovom slučaju su bile ukupne kisele fosfataze (**Slika 79a**).

Primenom kanonijske diskriminacione analize za veću koncentraciju fluorantena može se uočiti da je razdvajanje po prvoj kanonijskoj funkciji niže nego u prethodnom slučaju i iznosilo je 50,9 % od ukupne heterogenosti, dok je za drugu funkciju uočeno 47,8 %. Parametri koji su najviše doprineli razdvajanju su alkalne, lizozomske i nelizozomske kisele fosfataze po prvoj kanonijskoj funkciji, odnosno specifična aktivnost alkalnih fosfataza po drugoj kanonijskoj funkciji (**Slika 79b**).

a.

b.

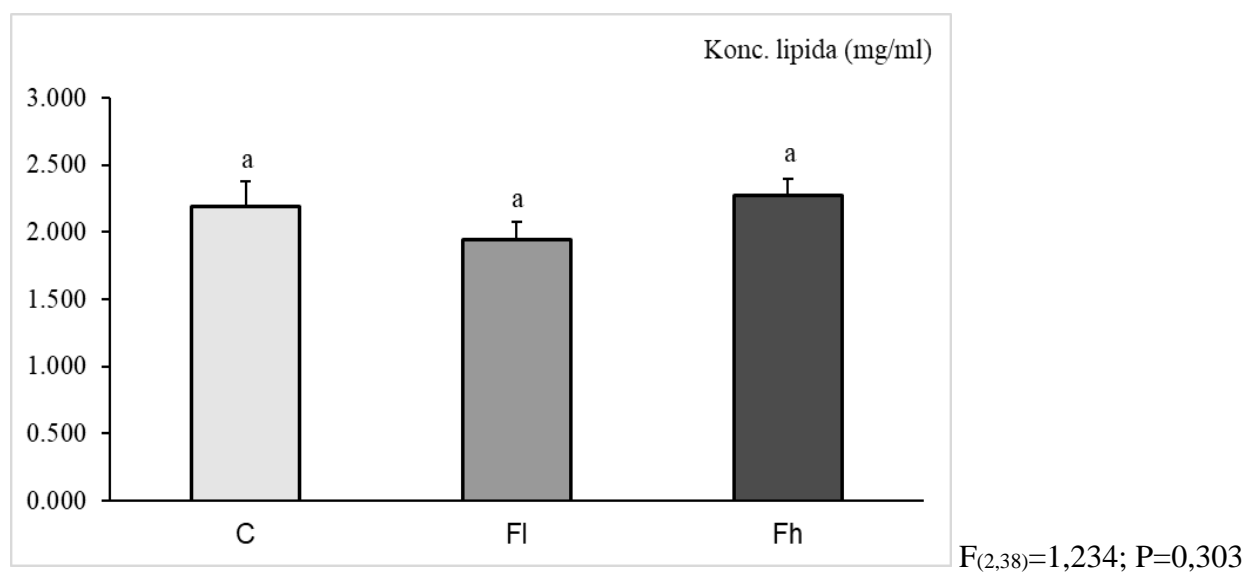


Slika 79. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza digestivnih enzima (fosfataza) *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* larvi za **a.** manju (6,7 ng / g suve mase hrane) i **b.** veću (67 ng / g suve mase hrane) koncentraciju fluorantena.

4.6. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na sadržaj lipida i trehaloze u hemolimfi larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

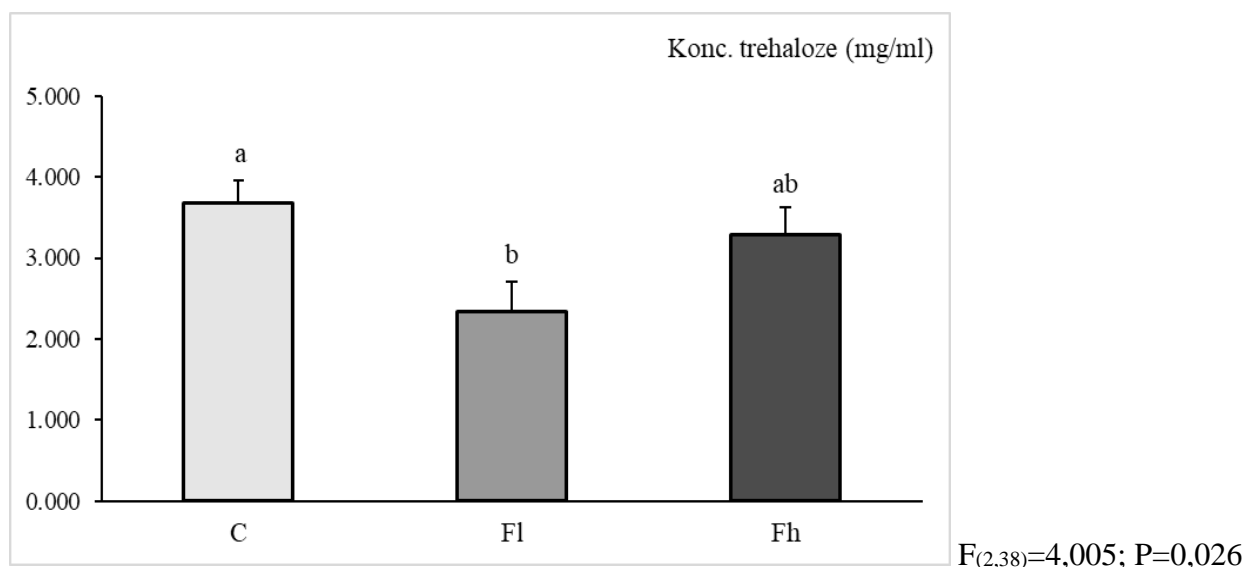
4.6.1. Koncentracija lipida i trehaloze u hemolimfi larvi *L. dispar*

Dugotrajna izloženost fluorantenu, dodatom hrani, nije značajno uticala na koncentraciju lipida u hemolimfi *L. dispar* larvi, u odnosu na kontrolu (**Slika 80**). Značajno smanjenje koncentracije trehaloze utvrđeno je u hemolimfi larvi izlaganih delovanju fluorantena u koncentraciji od 6,7 ng /g suve mase hrane, u odnosu na kontrolnu grupu (**Slika 81**).



Slika 80. Koncentracija lipida u hemolimfi larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (F1) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

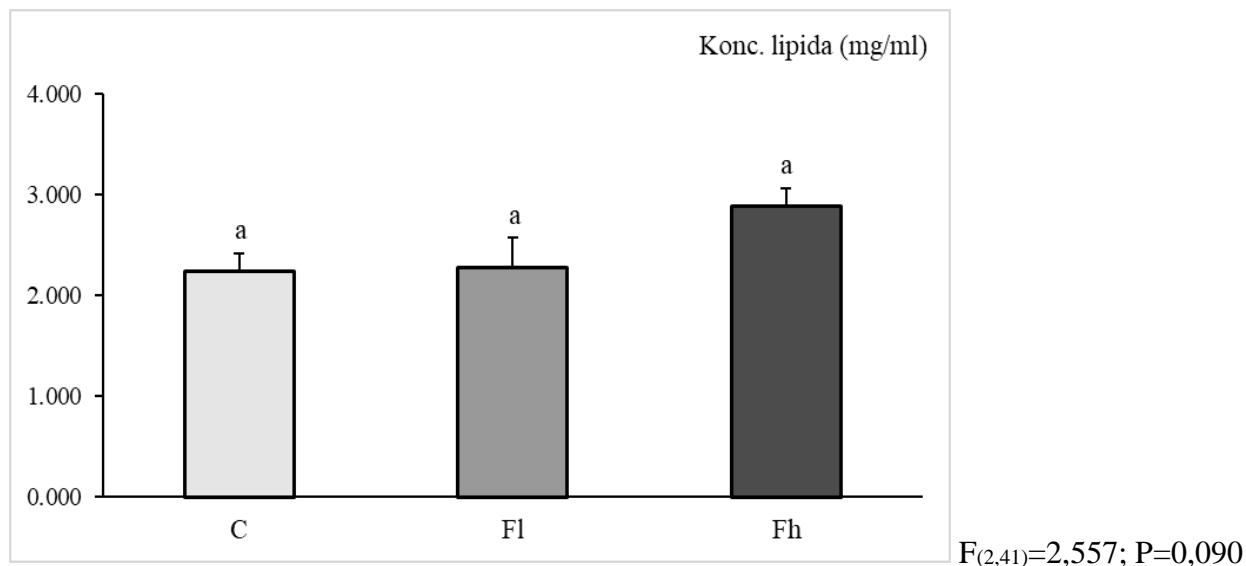
Rezultati



Slika 81. Koncentracija trehaloze u hemolimfi larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

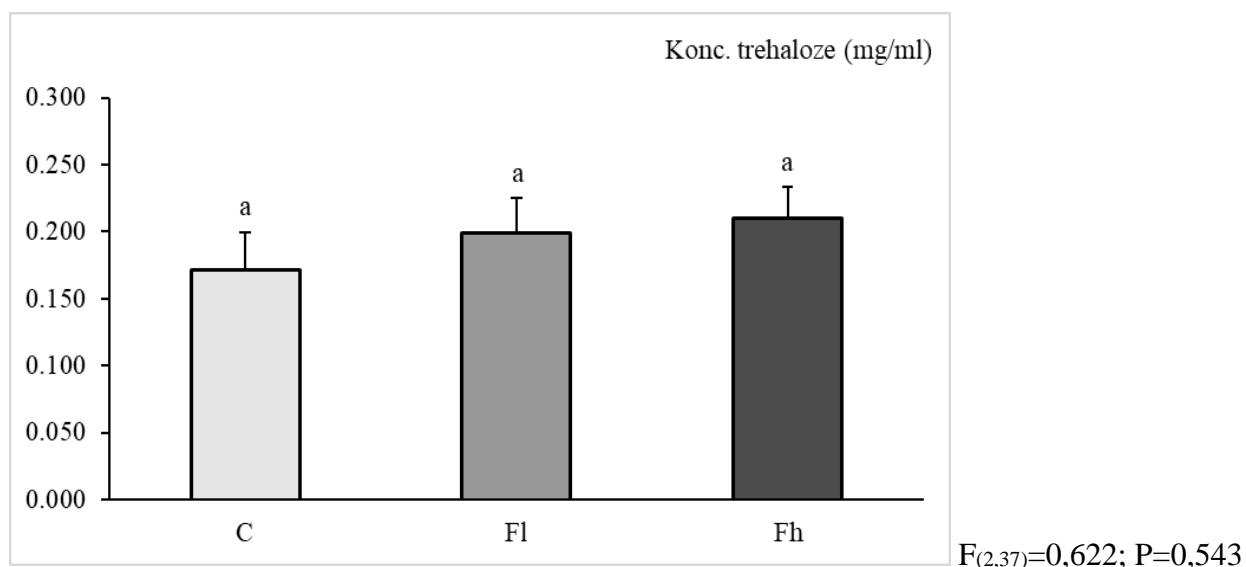
4.6.2. Koncentracija lipida i trehaloze u hemolimfi larvi *E. chrysorrhoea*

Dugotrajna izloženost *E. chrysorrhoea* fluorantenu dodatom hrani nije imala statistički značajnog uticaja na koncentracije lipida i trehaloze u hemolimfi larvi tretiranih grupa, u odnosu na kontrolnu grupu larvi (**Slike 82 i 83**).



Slika 82. Koncentracija lipida u hemolimfi larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

Rezultati



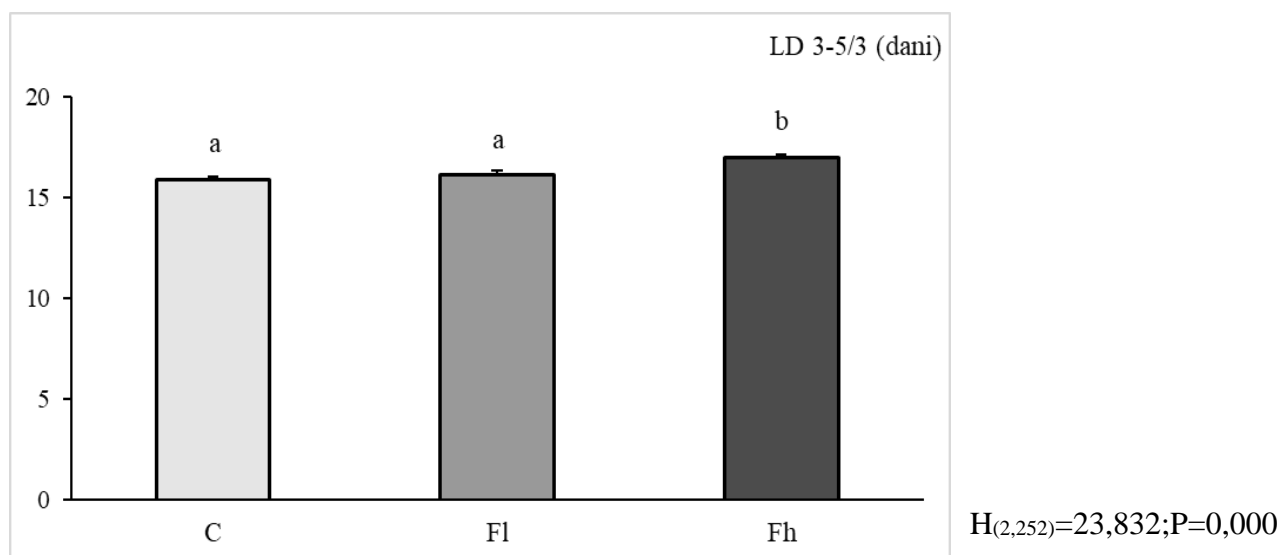
Slika 83. Koncentracija trehaloze u hemolimfi larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.7. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na osobine životne istorije larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

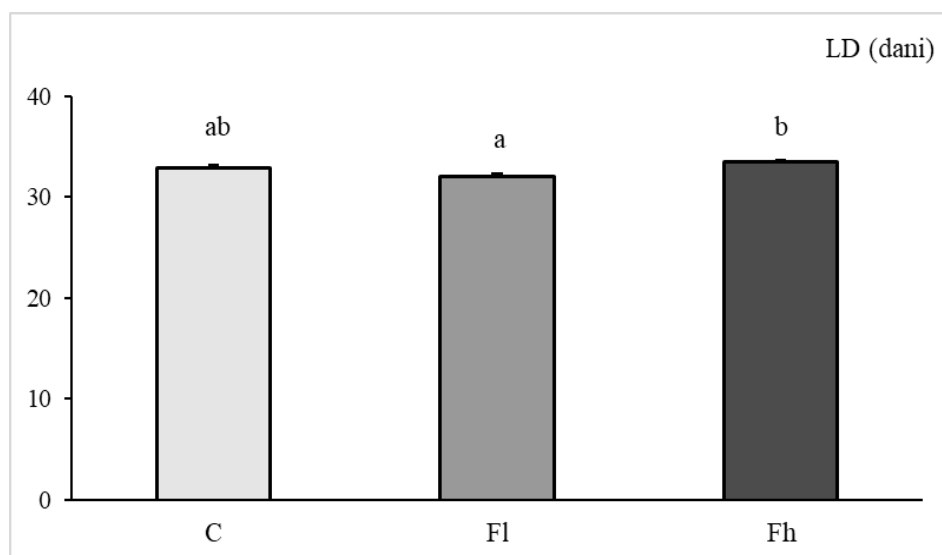
4.7.1. Trajanje razvića i masa larvi *L. dispar*

Dugotrajna ishrana *L. dispar* larvi veštačkom dijetom koja je sadržala veću koncentraciju fluorantena dovela je do značajno produženog trajanja njihovog razvića od ulaska u treći stupanj do trećeg dana petog stupnja (**Slika 84a**). Prisustvo fluorantena u hrani nije imalo uticaja na ukupno trajanje razvića (od piljenja do trećeg dana petog stupnja) larvi *L. dispar*, u poređenju sa istim u kontrolnoj grupi larvi. Međutim značajno produženo trajanje razvića uočava se kod larvi izlaganih većoj koncentraciji, u odnosu na trajanje razvića larvi izlaganih manjoj koncentraciji fluorantena u hrani (**Slika 84b**). Gajenje larvi na dijeti sa dodatkom manje koncentracije fluorantena uzrokovalo je redukciju mase *L. dispar* larvi petog stupnja (treći dan), (**Slika 84c**).

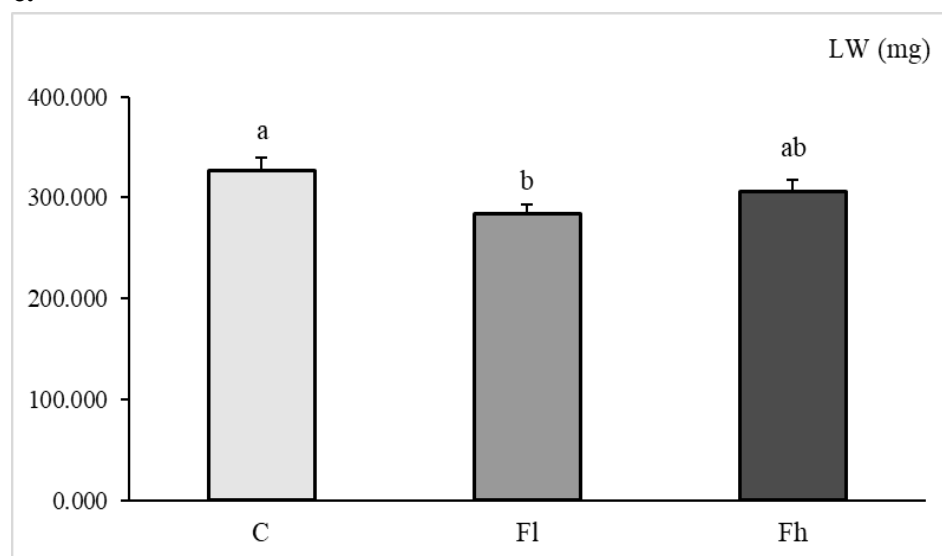
a.



b.

H_(2,252)=12,732; P= 0,002

c.

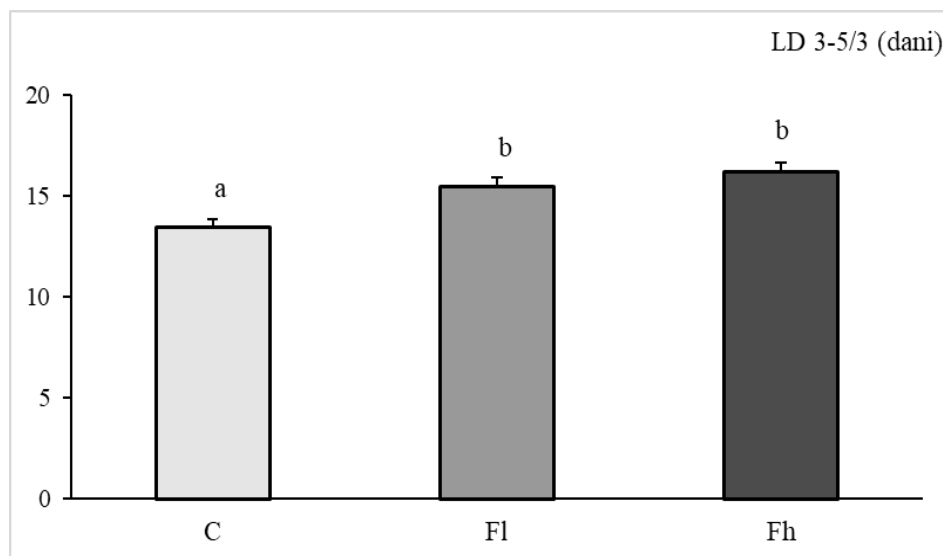
H_(2,251)=7,025; P=0,030

Slika 84. Efekat fluorantena na **a.** trajanje razvića od ulaska u treći stupanj do trećeg dana petog stupnja, **b.** trajanje razvića od piljenja do trećeg dana petog stupnja i **c.** masu petog stupnja (treći dan) larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

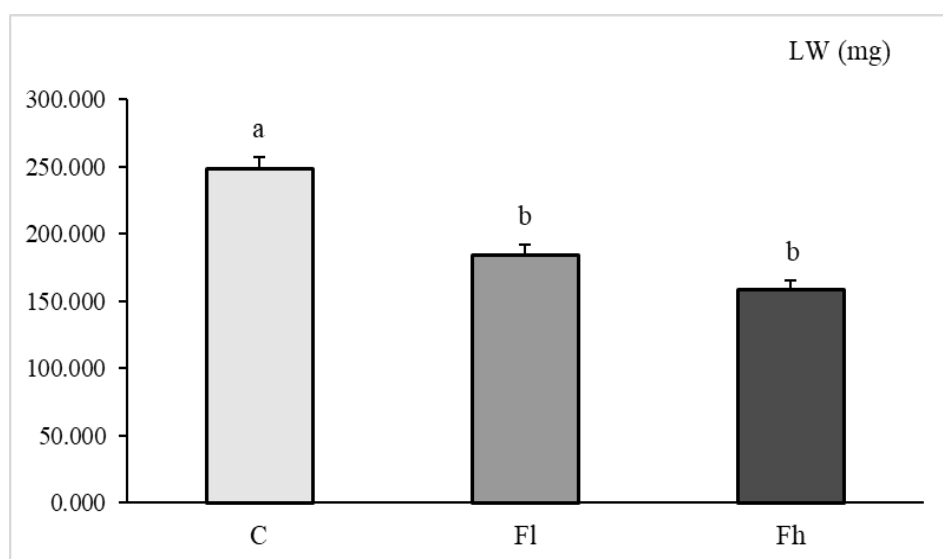
4.7.2. Trajanje razvića i masa larvi *E. chrysorrhoea*

Ishrana veštačkom dijetom sa dodatim fluorantenom dovela je do značajnog produžetka trajanja razvića od ulaska u treći stupanj do trećeg dana petog stupnja (**Slika 85a**), a smanjenja masa petog stupnja (treći dan) *E. chrysorrhoea* larvi (**Slika 85b**).

a.

 $H_{(2,220)}=25,170$; $P=0,000$

b.

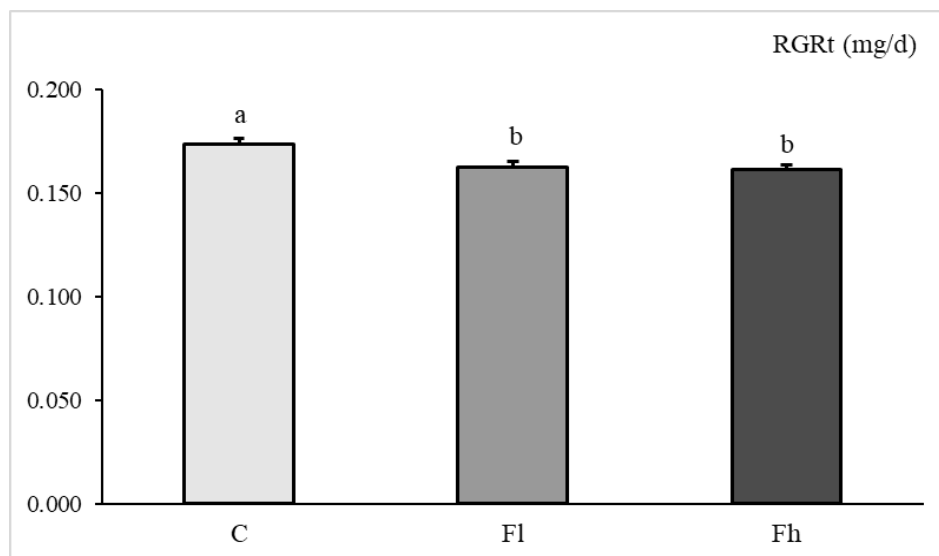
 $H_{(2,216)} = 46,665$; $P=0,000$

Slika 85. Efekat fluorantena na **a.** trajanje razvića od ulaska u treći stupanj do trećeg dana petog stupnja i **b.** masu petog stupnja (treći dan) larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

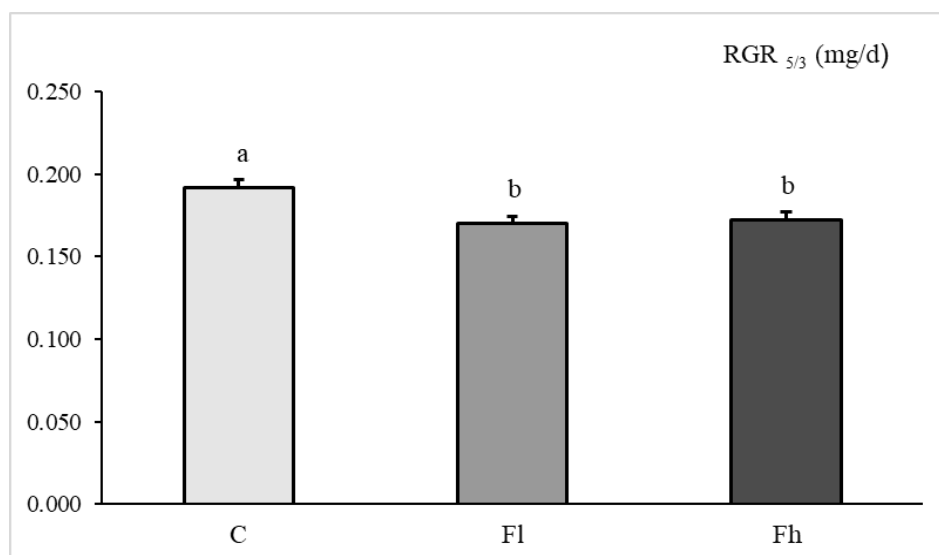
4.7.3. Relativna brzina rasta larvi *L. dispar*

Hronični tretman različitim koncentracijama fluorantena dodatim hrani imao je značajan uticaj na relativnu brzinu rasta *L. dispar* larvi. Relativne brzine rasta od ulaska u treći stupanj do trećeg dana petog stupnja (RGR_t), kao i tokom tri dana petog stupnja (RGR_{5/3}) su značajno smanjene u grupama koje su bile izlagane fluorantenu, u odnosu na kontrolne grupe larvi (**Slika 86a i 86b**).

a.

 $H_{(2, 251)} = 12,301; P = 0,002$

b.

 $H_{(2, 250)} = 16,616; P = 0,000$

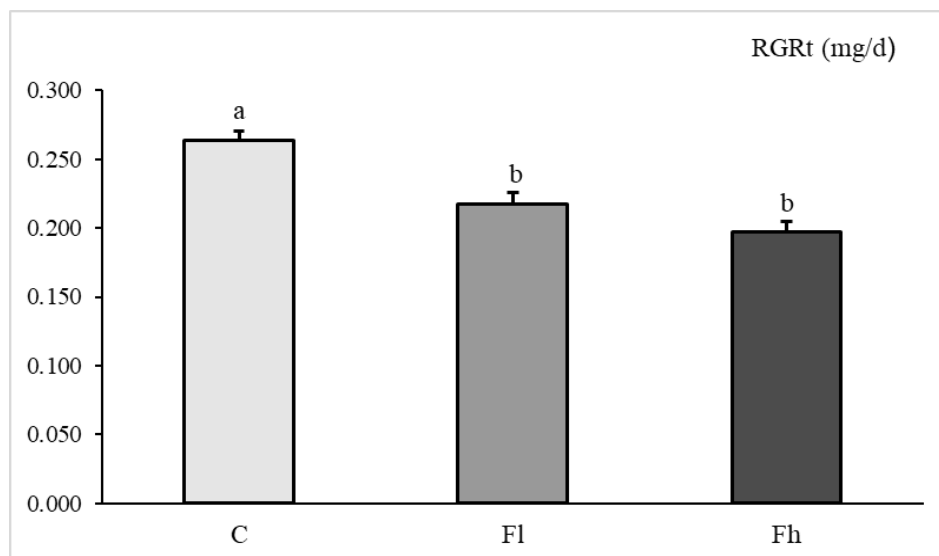
Slika 86. Efekat fluorantena na relativne brzine rasta **a.** RGRt i **b.** RGR_{5/3} larvi *L. dispar* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

4.7.4. Relativna brzina rasta larvi *E. chrysorrhoea*

Kod larvi *E. chrysorrhoea* dugotrajno izlaganih različitim koncentracijama fluorantena dodatim hrani, takođe je detektovano značajno smanjenje relativnih brzina rasta od ulaska u treći stupanj do trećeg dana petog stupnja (RGRt), kao i tokom tri dana petog stupnja (RGR_{5/3}), u poređenju sa kontrolom (**Slika 87a i 87b**).

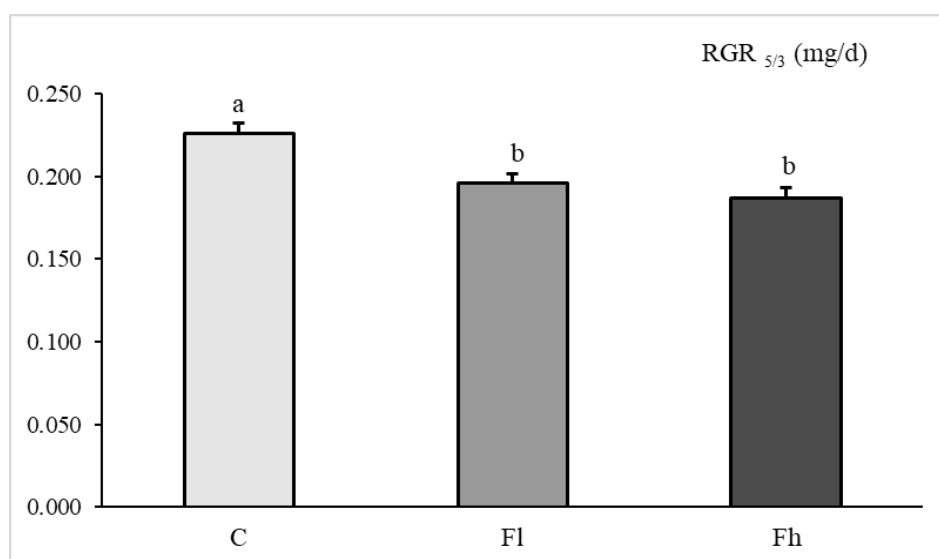
Rezultati

a.



$H_{(2, 222)} = 39,993; P = 0,000$

b.



$H_{(2, 221)} = 24.821; P = 0,000$

Slika 87. Efekat fluorantena na relativne brzine rasta **a.** RGR_t i **b.** RGR_{5/3} larvi *E. chrysorrhoea* hranjenih veštačkom dijetom koja je sadržala 6,7 ng (Fl) i 67 ng (Fh) fluorantena po g suve mase hrane. Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na značajne razlike između grupa ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao $\bar{X} \pm SG$.

5. DISKUSIJA

5.1. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na parametre antioksidativne zaštite i detoksifikacije srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

Relativno mali broj istraživanja odnosi se na efekte policikličnih aromatičnih ugljovodonika na kopnene insekte, dok je ispitivanje uticaja fluorantena na živi svet uglavnom vezano za vodene organizme (Bach i sar., 2005; Schuler i sar., 2007; Baas i sar., 2010). Wernersson i Dave (1998) su utvrdili da izlaganje UV svetlosti pojačava toksične efekte fluorantena na *Daphnia magna*, indukujući proizvodnju tzv. singlet kiseonika ili slobodnih radikala. Autori su takođe sugerisali da pojedini antioksidansi ili druge supstance koje vezuju slobodne radikale mogu smanjiti osetljivost organizma na toksičnost fluorantena. Takođe, potvrđena je i veza između akutnog delovanja subletalne doze fluorantena i indukcije detoksifikacionih enzima kod *Aedes aegypti* larvi (Poupardin i sar., 2008), kao i to da fluoranten suplementisan u veštačku dijetu za gajenje gubara uzrokuje povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima kod larvi ove vrste (Mrdaković i sar., 2015). Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju značajne promene antioksidativnih parametara u srednjem crevu *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* larvi koje su bile gajene na dijeti sa dodatkom različitih, sredinski relevantnih koncentracija fluorantena. Ovaj odgovor se i očekivao s'obzirom da je srednje crevo Lepidoptera glavno mesto odbrane od štetnih efekata ksenobiotika unetih ishranom. Pored uloga u zaštiti crevnog epitela od abrazije česticama hrane, unetih ksenobiotika i patogena, kao i procesu digestije, opisana je i uloga peritrofne membrane u antioksidativnoj odbrani (Barbehenn, 2001; Terra, 2001), a pomenute promene su uočene kako u srednjem crevu, tako i u tkivu srednjeg creva bez peritrofne membrane, larvi ovih vrsta Lepidoptera.

Enzim antioksidativne zaštite koji je pokazao najveću osetljivost na prisustvo fluorantena u hrani kod *L. dispar* larvi je superoksid dismutaza. Značajno povećanje aktivnosti ovog enzima zabeleženo je u celom srednjem crevu i u tkivu srednjeg creva *L. dispar* larvi koje su hranjene dijetom sa dodatkom fluorantena. Iako je očekivano da ROS bivaju eliminisani iz lumena creva u reakciji sa antioksidansima niske molekulske težine, ili učešćem peritrofne membrane, peroksidi mogu da difunduju u epitel srednjeg creva i izazovu ozbiljna oštećenja ćelija (Ahmad, 1992; Barbehenn i sar., 2001; Krishnan i Kodrik, 2006). Detektovana povećana aktivnost superoksid dismutaze ukazuje na povećano stvaranje superoksid anjon radikala u prisustvu organskog zagađivača u hrani, kao i na njihovu konverziju u vodonik-peroksid. Ovakav odgovor je prethodno utvrđen kod *L. dispar* larvi koje su bile izlagane trofičkom stresu i delovanju alelohemikalija, delovanju kadmijuma, kao i benzo[a]pirena (Perić-Mataruga i sar., 1997, 2015; Mirčić i sar., 2013; Ilijin i sar., 2015). S'obzirom da CAT razlaže vodonik-peroksid na kiseonik i vodu, povećana aktivnost superoksid dismutaze je praćena povećanom aktivnošću katalaze (Halliwell i Gutteridge, 2015), što je i detektovano u tkivu srednjeg creva *L. dispar* larvi. Međutim, u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi nije došlo do statistički značajnog povećanja aktivnosti katalaze u grupama koje su bile izlagane delovanju fluorantena, u poredjenju sa kontrolom. Iako se može uočiti rast aktivnosti katalaze u grupi hranjenoj hranom sa većom koncentracijom fluorantena, kao i razlika u enzimskom odgovoru između dve grupe larvi koje su bile izložene fluorantenu, u ovom slučaju katalaza verovatno nije učestvovala u uklanjanju vodonik-peroksida. Značajnu ulogu u uklanjanju vodonik-peroksida može imati askorbat-reciklirajući sistem, što je pokazano kod larvi *Orgyia leucostigma* hranjenih dijetom bogatom prooksidansima (Barbehenn i sar., 2001). Superiorna odbrana ovih larvi od oksidativnog stresa može se objasniti prisustvom većih koncentracija askorbata i glutaciona u lumenu srednjeg creva. Sledeći enzim čiju smo promenu pod uticajem fluorantena ispitivali je glutation reduktaza, enzim koji ima ključnu ulogu u održavanju normalnog funkcionisanja enzima koji zavise od GSH, jer katalizuje redukciju GSSG do GSH (Wang i sar. 2001). Značajan pad aktivnosti GR uočen je u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* koje su bile izložene manjoj koncentraciji fluorantena dodatog hrani, iako su aktivnost GST i koncentracija ukupnog glutaciona ostale nepromenjene. Smanjena aktivnost glutation reduktaze, kao posledica delovanja o-dihidroksifenola, prethodno je zabeležena kod dve vrste žitnih afida (Lukasik i Golawska, 2007).

Pritsos i sar. (1988) takođe su zabeležili smanjenu aktivnost ovog enzima kod larvi *Papilio polixenes* koje su bile izložene kvercetinu, i ukazali da aktivnost GR može zavisiti od metaboličkih procesa, kao i od neenzimske oksidacije. Nepoznato je na koji način fluoranten inhibira aktivnost GR. Elliott i sar. (1992) su sugerisali inhibiciju reaktivnim intermedijerima alelohemikalija koji blokiraju aktivno mesto vezivanja enzima i tako dovode do njegove inaktivacije. Međutim, ovaj mehanizam inhibicije je manje efikasan kada je indukovana aktivnost superoksid dismutaze. Drugi mehanizam inhibicije aktivnosti glutacion reduktaze može biti formiranje kompleksa sa alelohemikalijom putem kovalentne ili vodonične veze. Uzimajući u obzir povišenu aktivnost superoksid dismutaze, detektovanu u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi izlaganih fluorantenu u hrani, može se pretpostaviti da je smanjena aktivnost glutacion reduktaze bila posledica vezivanja za zagađivač, ili verovatnije, za neki od njegovih metabolita. Uprkos razlikama između grupa izlaganih fluorantenu, značajne promene u ukupnoj koncentraciji glutaciona nisu zabeležene ni u celom srednjem crevu ni u tkivu srednjeg creva *L. dispar* larvi nakon izlaganja fluorantenu, u poređenju sa kontrolom, što bi moglo ukazati na učešće drugih mehanizama u metabolizmu zagađivača.

Iako nisu zabeležene promene aktivnosti superoksid dismutaze u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi, aktivnost katalaze je bila značajno veća kod larvi izlaganih većoj koncentraciji fluorantena, dodatog hrani. Može se pretpostaviti da je povećan nivo peroksida bio ishod neke paralelne reakcije u organizmu, nezavisne od aktivnosti superoksid dismutaze. Prema Halliwell i Gutteridge (2015), metabolički procesi katalizovani drugim enzimima mogu dovesti do stvaranja peroksida. Slični rezultati koji ukazuju na aktivnost katalaze direktno regulisane koncentracijom peroksida zabeleženi su kod *L. dispar* larvi VI stupnja koje su bile na ishrani koja je sadržala kadmijum, kao i u srednjim crevu *L. dispar* larvi koje su ishranom unosile veće koncentracije policikličnih aromatičnih ugljovodonika (Mirčić i sar., 2013; Ilijin i sar., 2015; Mrdaković i sar., 2015). Značajno povećana aktivnost superoksid dismutaze i katalaze zabeležena je u tkivu srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi koje su bile pod uticajem manje koncentracije fluorantena u hrani. Efekat sličan hormezisu utvrđen je kod insekata i drugih organizama izlaganih niskim koncentracijama insekticida i teških metala (Velki i Hackenberger, 2012; Ku i sar. 2015; Liu i sar. 2019).

Kada su u pitanju aktivnost glutacion reduktaze i koncentracija ukupnog glutaciona kod *E. chrysorrhoea* larvi, zabeležili smo povećanje koncentracije GSH u tkivu srednjeg creva, u grupama larvi koje su bile hranjene dijetom sa dodatkom fluorantena, dok promena aktivnosti glutacion reduktaze nije bilo, u poređenju sa kontrolnom grupom. Rezultat za GSH nije bio očekivan obzirom da je u tkivu srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi detektovana i povećana aktivnost glutacion S-transferaze, što implicira povećanu konjugaciju GSH sa određenim elektrofilnim jedinjenjima i njegovo uklanjanje. Međutim koncentracija GSH može biti povećana na različite načine. Na primer, može se reciklirati u lumenu creva ili sintetisati u pljuvačnim žlezdama (Barbehenn i sar., 2001). GSH je tripeptid (Glu-Cis-Gly) koji se nalazi u većini životinjskih ćelija (Meister, 1994) i može delovati direktno ili indirektno kao antioksidans. On uklanja širok spektar slobodnih radikala, može redukovati H_2O_2 (Davies, 2000) i reagovati sa 1O_2 , $O_2^{\cdot-}$ i HO^{\cdot} (Lesser, 2006). GSH je kofaktor pojedinih antioksidativnih enzima, a može i da stopira lančane reakcije u kojima učestvuju slobodni radikali (Lesser, 2006). Povećana koncentracija GSH je nađena kod više vrsta insekata izlaganih stresnim uslovima. Allen i sar. (1984) su zabeležili povećanu koncentraciju GSH kod mušica izloženih parakvatu. Perić-Mataruga i sar. (1997, 2015) su takođe zabeležili veće koncentracije GSH u srednjem crevu larvi gubara koje su bile hranjene bagremovim lišćem ili tretirane grelinom. Pored antioksidativnih svojstava, utvrđeno je da GSH igra i značajnu ulogu u procesima razvića larvi *Ostrinia nubilalis* (Grubor-Lajišić i sar., 1997).

Uočeno je da je dugotrajno delovanje fluorantena, dodatog hrani, dovelo do promena specifičnih aktivnosti enzima i koncentracije GSH, koje su bile izraženije u tkivu srednjeg creva larvi, u odnosu

na celo srednje crevo, a najveći broj enzima promenio je svoju aktivnost u tkivu srednjeg creva tretiranih grupa larvi *E. chrysorrhoea*. Ekspresija izoformi enzima takođe se razlikovala među tkivima, kao i među vrstama. Zimogramskom detekcijom je otkriven veći broj proteinskih traka u regionu aktivnosti superoksid dismutaze u celom srednjem crevu nego u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar*, dok je kod *E. chrysorrhoea* larvi situacija bila suprotna. Ekspresija određenih izoformi može biti energetski povoljan način za eliminaciju zagađivačem indukovanih superoksid anjon radikala i vodonik-peroksida iz određenih tkiva larvi. Kanonijska diskriminaciona analiza je potvrdila razlike između vrsta, tj. razlike u odgovoru ispitivanih parametara u celom srednjem crevu i tkivu srednjeg creva *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* larvi koje su bile tretirane manjom i većom koncentracijom fluorantena, unetog ishranom.

Karboksilesteraze su klasa enzima koji katalizuju hidrolizu karboksilnih estara, njihova aktivnost i ekspresija brojnih izoformi variraju u zavisnosti od tkiva i takođe se razlikuju kod različitih organizama (Wheelock i sar., 2008). Pored uloga u fiziološkim procesima koji utiču na razvoj i ponašanje insekata, karboksilesteraze su uključene u detoksifikaciju različitih ksenobiotika (Yu i sar., 2006; Després i sar., 2007; Kontogiannatos i sar., 2011; Wei i sar., 2021). Karboksilesteraze su jedna od tri najvažnije klase enzima detoksifikacije kod insekata (Després i sar., 2007). Studija u kojoj je ispitivana aktivnost esteraza u različitim tkivima *L. dispar* larvi ukazuje na karboksilestrazu kao dominantni enzim čija je aktivnost najveća u srednjem crevu, dok nervni sistem karakteriše veća aktivnost acetilholinesteraza. U hemolimfi je ukupna aktivnost esteraza bila zanemarljiva. Takođe, pokazane su značajne promene aktivnosti karboksilesteraza srednjeg creva tokom razvoja larvi od ranog trećeg do sredine petog stupnja, što se poklapa sa periodom intenzivnijeg hranjenja (Kapin i Ahmad, 1980). Uloga karboksilesteraza kao enzima koji učestvuje u detoksifikaciji biljnih hemikalija i insekticida, kao i u razvoju rezistencije na insekticide dokumentovana je kod različitih Lepidoptera i drugih insekata (Cao i sar., 2008; Zhu i sar., 2011; Lv i sar., 2014). S'obzirom da fluoranten, za razliku od ostalih PAHs, ne indukuje enzime citohrom P450 superfamilije koji su uljučeni u fazu I biotransformacije, a neki autori čak dovode u pitanje merljivost CYP enzima kod beskičmenjaka (Hahn, 2002), uloga karboksilesteraza bi mogla biti važna u procesu metaboličke transformacije ovog organskog zagađivača. U ovoj studiji je zabeleženo značajno povećanje specifične aktivnosti karboksilesteraza u tkivu srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi izloženih manjoj koncentraciji fluorantena, dodatog hrani, dok prisustvo zagađivača nije uticalo na aktivnost enzima u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea*, niti u celom srednjem crevu ili tkivu srednjeg creva *L. dispar* larvi. Porast aktivnosti karboksilesteraza pokazan je kod larvi *Chironomus sancticaroli*, izlaganih delovanju benzo[a]pirena (Vicentini i sar., 2017), dok isti polutant nije imao uticaj na njihovu aktivnost kod larvi *Aedes aegypti* (Riaz i sar., 2009). Ispitivanje efekata PAHs na aktivnost karboksilesteraza u različitim tkivima pacova pokazalo je da neki od njih mogu umereno indukovati karboksilesteraznu aktivnost, dok drugi nisu imali nikakav uticaj na aktivnost enzima (Nousiainen i sar., 1984). Ispitujući mikrozomske karboksilesteraze jetre kod nekoliko vrsta sisara, Satoh i Hosokawa (1995) su zaključili da izozimi karboksilesteraza, različitih vrsta, pokazuju razlike u afinitetu ka supstratima zbog razlika u aminokiselinskim sekvencama aktivnog mesta.

Ova studija otkrila je različite obrasce ekspresije izoformi ovoga enzima kod larvi obe vrste. Kako fluoranten uglavnom nije uticao na specifičnu aktivnost karboksilesteraza, pretpostavka je da bi aktivna modulacija ekspresije izoformi mogla biti energetski isplativija za larve izložene ovom zagađivaču. Dakle, intenzivnije dve najdominantnije izoforme karboksilesteraze u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi, dugotrajno izloženih svakoj od koncentracija fluorantena, kao i ekspresija izoforme I3 kod larvi u tretiranom, ali ne i u kontrolnoj grupi, obezbeđuju nepromenenu aktivnost enzima u prisustvu zagađivača. Pet izoformi karboksilaze je detektovano i u tkivu srednjeg creva *L. dispar* larvi, a primećen je pojačan intenzitet dve izoforme kod larvi izloženih manjoj koncentraciji fluorantena. Takođe, ekspresija izoforme I2 je zabeležena kod larvi grupa tretiranih fluorantenom. Kao i u celom srednjem crevu, različita ekspresija izoformi u tkivu srednjeg creva omogućava efikasnu aktivnost enzima, kao odgovor na prisustvo zagađivača. Iako je specifična aktivnost

karboksilesteraze pokazala tendenciju povećanja, kod larvi izlaganih većoj koncentraciji zagađivača, resursi su verovatno usmereni ka indukciji drugih enzima koji učestvuju u procesu detoksifikacije. U celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi se uočava pojačan intenzitet dve enzimske izoforme u grupi tretiranoj manjom koncentracijom fluorantena, kao i prisustvo izoforme I3 samo u toj grupi. S' druge strane, značajno povećana specifična aktivnost karboksilesteraze u tkivu srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi koje su bile izložene manjoj koncentraciji fluorantena u hrani može da sugeriše odgovor enzima sličan hormezisu, mada inhibitorni efekat veće koncentracije zagađivača nije zabeležen.

Glutation S-transferaza predstavlja najvažniji enzim faze II detoksifikacije i igra ključnu ulogu u odbrani protiv različitih sredinskih zagađivača. GST uklanja toksična, hidrofobna jedinjenja poput PAHs, katalizujući njihovu konjugaciju sa GSH (Marrs, 1996; Lei i sar., 2003). Konjugacija PAHs sa glutathionom povećava njihovu rastvorljivost u vodi, i time omogućava organizmu da ih lakše izluči, kao što je pokazano na primeru rakova *Macrophthalmus hirtipes* (Koenig i sar., 2008). S' druge strane, GST se takođe može smatrati komponentom sistema antioksidativne zaštite, jer uklanja perokside (Singh i sar., 2001; Krishnan i Kodrik, 2006), ili elektrofilne supstrate koji su proizvod oksidativnog metabolizma (Chasseaud, 1979).

Značajne promene aktivnosti glutathion S-transferaze nisu zabeležene ni u celom srednjem crevu, ni u tkivu srednjeg creva *L. dispar* larvi nakon izlaganja sredinski relevantnim koncentracijama fluorantena, prisutnim u hrani, u poređenju sa kontrolnim grupama, što ukazuje na učešće drugih mehanizama u metabolizmu ovog organskog zagađivača. Sličan odgovor uočen je u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi, ali je aktivnost glutathion S-transferaze bila povećana u tkivu srednjeg creva larvi izlaganih obema koncentracijama fluorantena u hrani. Iako povećanje aktivnosti GST podrazumeva konjugaciju sa redukovanim glutathionom i smanjenje njegove koncentracije, ukupna koncentracija GSH u tkivima srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi je povećana, što ukazuje na značaj prethodno opisanih odbrambenih uloga ovog jedinjenja. Povećana aktivnost glutathion S-transferaze zabeležena je kod nekoliko vrsta insekata kao odgovor na zagađenje PAHs. Pokazano je da izlaganje larvi komaraca *Aedes aegypti* fluorantenu povećava aktivnost glutathion S-transferaze (Poupardin i sar., 2008). Gavrilović i sar. (2017) zabeležili su povećanje aktivnosti ovog enzima u srednjem crevu *L. dispar* larvi kao odgovor na tretman benzo[a]pirenom. Mrdaković i sar. (2019) su zabeležili značajno povećanje aktivnosti glutathion S-transferaze kod nimfi *Blaptica dubia* nakon akutnog tretmana fluorantenom.

Nekoliko studija je pokazalo da i biljni sekundarni metaboliti indukuju aktivnost GST kod insekata *in vivo*. Chrzanowski i sar. (2012) su utvrdili povećanje aktivnosti glutathion S-transferaze kod afida tretiranih fenolnom kiselinom. U srednjem crevu vrste *Popillia japonica*, koja je bila hranjena laticima cveta biljke geranium, ili veštačkom dijetom sa dodatkom kuiskualinske kiseline, takodje je došlo do povećanja aktivnosti glutathion S-transferaze (Adesanya i sar., 2017). Aktivnost glutathion S-transferaze je bila povećana i pod uticajem kvercetina kod *Bombyx mori* (Zhang i sar., 2012.), kao i taninske kiseline kod *Micromelalopha troglodyta* (Cheng i sar., 2015) i *Helicoverpa armigera* (Chen i sar., 2003). Indukcija detoksifikacionih mehanizama važna je komponenta fizioloških adaptacija organizama u stanju stresa izazvanog prisustvom ksenobiotika.

5.2. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na aktivnost enzima antioksidativne zaštite u hemolimfi larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

Detektovane su takođe i promene aktivnosti SOD i CAT u hemolimfi larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* nakon izlaganja fluorantenu, dodatog hrani. Čelije hemolimfe igraju ključnu ulogu u imunološkoj odbrani insekata. One su značajan pokazatelj stresa, sa procesima fagocitoze i enkapsulacije kao odbrambenim odgovorima (Dubovskiy i sar., 2010; Jiang i sar., 2010). PAHs

deluju kao imunotoksični agensi, a hronična izloženost ovim zagađivačima može dovesti do promena u imunskom odgovoru (Guo i sar., 2011). Promene u broju i vijabilnosti hemocita koje smanjuju sposobnosti fagocitoze, i povećavaju prisustvo superoksidnih anjona, zabeleženi su kod morskih beskičmenjaka izloženih PAHs (Gopalakrishnan i sar., 2011; Giannapas i sar., 2012). Takođe se pokazalo da PAH jedinjenja niže molekulske mase indukuju oksidativni stres, stvarajući slobodne radikale u toku biotransformacije unutar lizozoma hemocita, narušavajući tako njihov integritet i fluidnost membrane (Giannapas i sar., 2012). Hannam i saradnici (2010) su uočili da izlaganje *Pecten maximus* PAH fenantrenu dovodi do oksidativnog stresa što se ogleda u značajnom smanjenju količine ukupnog GSH i povećanom nivou lipidne peroksidacije u hemolimfi.

U ovoj studiji, smanjena aktivnost superoksid dismutaze u hemolimfi larvi *L. dispar* izlaganih većoj koncentraciji fluorantena može sugerisati indukciju enzimskih izoformi koje efikasno konvertuju superoksid anjon radikale u vodonik-peroksid. Pan i sar. (2006) su takođe utvrdili smanjenu aktivnost superoksid dismutaze u hemolimfi *Chlamis ferrari*, usled izlaganja školjki višim koncentracijama benzo[a]pirena i benzo(k)fluorantena. Dalja transformacija vodonik-peroksida u kiseonik i vodu se vrši povećanom aktivnošću katalaze, u obe grupe *L. dispar* larvi koje su izlagane fluorantenu, prisutnom u hrani. Ranija istraživanja su pokazala povećane aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze u hemolimfi *L. dispar* larvi koje su bile izložene benzo[a]pirenu, pri čemu je pretpostavljeno da su povećane aktivnosti pomenutih enzima povezane sa aktivacijom imunskog sistema larvi (Gavrilović i sar., 2017), što podrazumeva stvaranje superoksidnih anjonskih radikala u ćelijama hemolimfe (Ahmad i sar., 1991). Izloženost *E. chrysorrhoea* larvi obema koncentracijama fluorantena, dodatog hrani, rezultiralo je smanjenjem aktivnosti katalaze u hemolimfi, što sugerise učešće drugih komponenti ili mehanizama odbrane od negativnih efekata zagađivača i njegovih metabolita. Učešće neenzimskih antioksidanasa, tiola i askorbata u procesima enkapsulacije uočeno je u hemolimfi larvi *Galleria mellonella* (Grizanova i sar., 2018). Pokazano je da inhibicija aktivnosti katalaze može biti posledica delovanja superoksid anjonskih radikala i konverzije enzima u neaktivne forme (Kono i Fridovich, 1982). Pan i sar. (2006) sugerisu da promene aktivnosti antioksidativnih enzima u hemolimfi ukazuju na prisustvo određenih oštećenja organizma.

Značajni efekti sredinski relevantnih koncentracija fluorantena na aktivnosti antioksidativnih enzima u različitim tkivima, detektovani su kod larvi dve vrste Lepidoptera. Odgovori analiziranih parametara antioksidativne zaštite, specifični za tkivo, kao i razlike u obrascima odgovora između vrsta, predstavljaju važan korak u razjašnjavanju načina prevazilaženja stresa izazvanog prisustvom organskog zagađivača u hrani kod larvi ovih vrsta. Pored toga, detektovane promene aktivnosti antioksidativnih enzima ukazuju na njihov biomarkerski potencijal u proceni zagađenja životne sredine.

5.3. Efekti prisustva fluorantena u dijeli na parametre detoksifikacije u mozgu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

Kod *L. dispar* larvi koje su bile pod uticajem veće koncentracije fluorantena u hrani, aktivnost karboksilesteraza u mozgu je bila inhibirana, dok kod *E. chrysorrhoea* larvi nisu detektovane značajne promene aktivnosti enzima. Već je napomenuto da karboksilesteraza detoksifikuje veliki broj pesticida hidrolizom estarske veze, a visok nivo aktivnosti enzima detektovan kod nekih organizama, mnoge pesticide može učiniti neefikasnim (Stenersen, 2004). Međutim, drugi mehanizam kojim karboksilesteraze detoksifikuju neke organofosfate jeste njihovo vezivanje za aktivno mesto (Maxwell, 1992; Chambers i sar., 1994; Wheelock i sar., 2005; Crow i sar., 2007) i formiranje stabilnog kompleksa enzim-inhibitor (Satoh i Hosokawa, 1998). Ova inhibicija se smatra mehanizmom smanjenja koncentracije pesticida dostupnog za inhibiciju aktivnosti AChE (Maxwell, 1992; Chanda i sar., 1997).

U mozgu *L. dispar* larvi tretiranih većom koncentracijom fluorantena uočeno je smanjenje aktivnosti acetilholinesteraza, te možemo pretpostaviti sličan mehanizam vezivanja fluorantena za karboksilesteraze, u cilju smanjenja koncentracije zagađivača i sprečavanja većeg inhibitorynog efekta na aktivnosti AChE. Kod jedinki *Eisenia fetida* koje su bile kratkotrajno izložene različitim PAHs, između ostalih i fluorantenu, također je zabeležena inhibicija karboksilesteraza, dok je inhibicija acetilholinesteraza zavisila od vrste i koncentracije PAHs (Nam i sar., 2015).

AChE može biti pokazatelj potencijalne neurotoksičnosti (Peakall, 1992), a inhibicija ovog enzima se koristi kao specifični biomarker za organofosfate i karbamate (Thompson, 1999). Međutim, neke studije su pokazale da i drugi zagađivači životne sredine, poput metala i nekih surfaktanata također mogu inhibirati ovaj enzim (Payne i sar., 1996; Martinez-Tabche i sar., 1997; Najimi i sar., 1997; Guilhermino i sar., 1998). Kompleksne smeše pesticida i metala su također snažni inhibitori holinesteraznih sistema (Bocquené i sar., 1995; Forget i sar., 1999). Nekoliko laboratorijskih studija je pokazalo da nafta i jedinjenja poput PAHs inhibiraju aktivnost AChE (Kang i Fang, 1997; Martinez-Tabche i sar., 1997; Akcha i sar., 2000), iako mehanizmi ove inhibicije nisu razjašnjeni. PAHs su lipofilna jedinjenja, te mogu dospeti u fosfolipidne slojeve i menjati karakteristike membrana, utičući na membranski vezane enzime poput AChE (Rodrigues i sar., 2013). Jett i sar. (1999) su testirali hipotezu da je inhibicija acetilholinesteraza insekticidom hlorspirifosom veća kada je uz insekticid prisutno i nekoliko policikličnih aromatičnih ugljovodonika koji se nalaze u kućnoj prašini (piren, benzo[a]piren, antracen i fluoranten). Svaki od navedenih PAHs je u smeši sa insekticidom pojačao njegovu inhibitorynu moć. Zabeležen je značajan inhibitoryni uticaj PAHs na aktivnost AChE mišića rakova, *Carcinus maenas* (Rodrigues i sar., 2013), ali nije uočen njihov efekat na aktivnost AChE kod jedinki *Eisenia fetida* (Nam i sar., 2015). Pojedini zagađivači životne sredine mogu i povećati aktivnost ovog enzima kod nekih organizama. Tako je npr. zabeležena povećana aktivnost AChE u digestivnim žlezdama dagnji, kao odgovor na akutno izlaganje nekim metalima (Bainy i sar., 2006), kao i kod *Helicoverpa zea* larvi koje su bile akutno izložene visokim koncentracijama insekticida (Massa i sar., 2008).

Aktivnost AChE je značajno inhibirana kod *L. dispar* larvi koje su bile izložene većoj, u odnosu na larve izložene manjoj koncentraciji fluorantena. Pokazano je da mala količina insekticida malationa nema značajan uticaj na aktivnost AChE kod larvi vrste *Galleria mellonella*. Međutim, smanjena aktivnost AChE i povećana aktivnost SOD je uočena kod larvi *G. mellonella* izloženih većim koncentracijama insekticida, sugerišući vezu između delovanja ovih enzima (Büyükgüzel, 2009). Moreira i saradnici (2005) su ispitivali promene aktivnosti AChE i GST kod školjki *Mytilus galloprovincialis* koje su bile sakupljene sa staništa zagađenih naftom. U naftnim mrljama se može naći širok spektar jedinjenja poput PAHs i metala. Školjke koje su uzete sa ovih staništa su pokazale smanjenu aktivnost AChE a povećanu aktivnost GST, u poređenju sa jedinkama prikupljenim sa referentnog staništa. Ilijin i sar. (2017) su dokumentovali da BaP u koncentraciji od 20-2000 ng / g suve hrane inhibira aktivnost AChE u mozgu larvi *L. dispar*. Međutim, Mrdaković i sar. (2016) su zabeležili suprotan rezultat, veće koncentracije fluorantena su povećavale aktivnosti AChE kod iste vrste. Grčić i sar. (2019) su ispitivali promene aktivnosti AChE u mozgu larvi *L. dispar* poreklom iz različitih populacija, koje su bile izlagane sredinski relevantnim koncentracijama BaP-a, u hrani. Međutim, rezultati su pokazali da prisustvo BaP nije uticalo na aktivnost AChE.

Iako PAHs povećavaju inhibitorynu moć organofosfata kada su u smeši, oni su ipak slabiji inhibitori aktivnosti AChE u poređenju sa ovim insekticidima (Jett i sar., 1999). Tako, izostanak inhibicije aktivnosti AChE kod larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*, kao odgovor na prisustvo fluorantena u hrani, može sugerisati indukciju parametara koji su verovatno pogodniji pokazatelji hronične izloženosti PAHs ili bar fluorantenu. Takođe, indukcija antioksidativne zaštite koja je zabeležena kod larvi obe ispitivane vrste, može uticati na očuvanje fiziološki odgovarajuće AChE aktivnosti. Pokazano je da insekte

karakterišu nekoliko nesenzitivnih formi AChE od kojih svaka ispoljava različite profile senzitivnosti i ima svoje karakteristične kinetičke parametre (Gunning i Moores, 2001).

5.4. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na ekspresiju Hsp70 u celom srednjem crevu i mozgu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

Proteini toplotnog stresa su molekularni šaperoni koji učestvuju u sprečavanju i popravljanju oštećenja ćelijskih komponenata, izazvanih delovanjem stresora. Ovi proteini su indukovani širokim spektrom stresora (Hightower, 1991; Sanders, 1993; Parsell i Lindquist, 1994) kojima je zajedničko da oštećuju proteine direktno ili da uzrokuju sintezu aberantnih proteina (Hendrick i Hartl, 1993). Literaturni podaci ukazuju na to da proteini toplotnog stresa pružaju zaštitu od ćelijskih oštećenja izazvanih stresnim uslovima u okruženju (tolerancija na stres) (Parsell i Lindquist, 1994), a akumulacija ovih proteina u organizmima povezana je sa intenzitetom stresa. Funkcije ovih proteina uključuju stabilizaciju proteinskih prekursora pre sklapanja, translokaciju proteina u organele, preuređivanje proteinskih oligomera, rastvaranje proteinskih agregata i razgradnju denaturisanih proteina (Hightower, 1991; Gething i Sambrook, 1992; Hendrick i Hartl, 1993; Parsell i Lindquist, 1994).

Već smo pominjali da ROS mogu oštetiti proteine i ostale ćelijske komponente, a obzirom da fluoranten indukuje stvaranje ROS-a, za očekivati je bilo da ekspresija proteina toplotnog stresa bude povećana u grupama larvi obe vrste koje su bile izložene fluorantenu. Međutim, kada je crevo u pitanju, ovaj rezultat smo zabeležili samo u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi koje su bile pod uticajem veće koncentracije fluorantena. Značajan porast nivoa Hsp70 zabeležen je kod ostriga izloženih smeši PAHs koja je sadržala i fluoranten (Cruz-Rodrigues i Chu, 2002). Boutet i sar. (2004) su zabeležili povećan nivo Hsp70 kod pacifičkih ostriga *Crassostrea gigas* koje su bile izložene ugljovodonicima.

U celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi koje su bile izložene fluorantenu, nivo ekspresije Hsp70 je bio značajno smanjen. Ovo bi moglo ukazati na nedostatak zaštite od stresa od strane Hsp70 u ovom slučaju, a možda i indukciju njegove uloge u neurohormonalnoj reorganizaciji (Rybczynski i Gilbert, 1995; Zhao i Jones, 2012). Sposobnost fluorantena da inhibira ekspresiju proteina stresa (Hsp60 i Hsp70) je demonstrirana kod vrste amfipoda, *Hiallela azteca* (Werner i Nagel, 1997). Smanjenje koncentracija Hsp70 su takođe opisane kod adulta *Tetrix tenuicornis*, izloženih teškim metalima (Warchałowska-Sliwa i sar., 2005). Menjajući svoj obrazac ekspresije, Hsps mogu odgovoriti na bilo koji poremećaj ćelijske homeostaze. To ih čini pogodnim bioimarkerima ranog upozorenja na prisustvo zagađivača u životnoj sredini (Feder i Hofmann, 1999; Morales i sar., 2011).

Kada je u pitanju detekcija Hsp70 proteina u mozgu larvi, može se uočiti ekspresija jedne trake Hsp70 u svim eksperimentalnim grupama, kod larvi obe vrste. Međutim, promena koncentracije Hsp70 proteina u mozgu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* uzrokovana fluorantenom je pokazala suprotan trend među vrstama. Kod *L. dispar* je došlo do povećanja koncentracije Hsp70 u grupi larvi hranjenih dijetom sa dodatkom manje koncentracije fluorantena, dok je kod larvi *E. chrysorrhoea* došlo do redukcije koncentracije Hsp70 u obe tretirane grupe. Grčić i sar. (2019) su ispitali uticaj dve koncentracije benzo[a]pirena na Hsp70 u mozgu *L. dispar* larvi i takođe uočili da hroničan tretman manjom koncentracijom zagađivača indukuje ekspresiju Hsp70. Do sličnog rezultata su došli i Ilijin i sar. (2017). Međutim, kako evolucija indukovane ekspresije Hsp70 može korelirati sa okolinom u kojoj žive različite vrste i izazovima sa kojima se suočavaju, ostaje otvoreno pitanje. Različit odgovor kod *E. chrysorrhoea* larvi u odnosu na *L. dispar* larve nije u potpunosti neočekivan. S'obzirom da je indukcija Hsp70 proteina skup energetski proces i da njihova ekspresija predstavlja balans između cene i dobiti, možemo zaključiti da su se kod *E. chrysorrhoea* larvi uključili drugi mehanizmi zaštite na uštrb ekspresije Hsp70. Sličan odgovor su

zabeležili Kafel i sar. (2014) kod vrste *Spodoptera exigua*, kod koje je nivo Hsp70 bio inhibiran, a ukupni antioksidativni kapacitet povećan u odnosu na kontrolu, nakon višegeneracijskog tretmana ove vrste kadmijumom.

5.5. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na aktivnost digestivnih enzima srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

5.5.1. Specifična aktivnost i izoforme tripsina, leucin aminopeptidaze i lipaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

Studije o uticaju policikličnih aromatični ugljovodonika na aktivnost digestivnih enzima fitofagnih insekata su retke (npr. Grčić, 2020), ali mogu se naći podaci o uticaju ovih zagađivača na aktivnosti digestivnih enzima drugih organizama. Nedavno su utvrđene promene aktivnosti digestivnih enzima kod *Eisenia fetida*, kao odgovor na delovanje fenantrena (Shi i sar., 2020). Sun i saradnici (2020) ukazali su da fenantren, sam ili u smeši sa drugim PAHs, inhibira aktivnost α -amilaze delujući na aktivno mesto enzima. Međutim, prema dostupnim literaturnim podacima, efekti fluorantena na aktivnost digestivnih enzima kod fitofagnih insekata još uvek nisu ispitani. Ova studija je pokazala značajne promene specifičnih aktivnosti digestivnim enzima celog srednjeg creva larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*, kao odgovor na tretman sredinski relevantnim koncentracijama fluorantena, dodatog hrani.

Aktivnost digestivnih enzima obezbeđuje konverziju unetih nutrijenata i snabdevanje energetskim resursima neophodnim za rast i metabolizam. Prisustvo toksina u hrani može značajno da utiče na aktivnost digestivnih enzima, na šta insekti mogu odgovoriti promenom nivoa njihove aktivnosti i/ili sintezom manje osetljivih ili neosetljivih izoformi. Efekti zagađivača na digestivne enzime mogu se ispoljiti kroz uticaj na njihovu sintezu ili lučenje (sekreciju) (Dedourge-Geffard i sar., 2013). Na potencijalni značaj ovih enzima kao biomarkera izlaganja zagađivačima ukazali su Lagadic i sar. (1994), Hyne i Maher (2003) i Lai i sar. (2011). Povrh toga, štetni efekti ksenobiotika na aktivnost digestivnih enzima mogu uticati na rast i razvoj organizama. Inhibicija/stimulacija određenih digestivnih enzima može dovesti do metaboličkog disbalansa, sporijeg rasta larvi, čak i do smrti insekata (Applebaum i sar., 1961; Bhattacharyya i sar., 2007; Babu i Subrahmanyam, 2010).

Kada su u pitanju specifične aktivnosti tripsina i leucin aminopeptidaze u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi, u ovoj studiji oba enzima pokazala su isti obrazac odgovora, odnosno smanjenje aktivnosti kao rezultat izlaganja manjoj koncentraciji fluorantena u hrani, u poređenju sa kontrolnom grupom. Međutim, tripsin je pokazao veću osetljivost, pa je njegova aktivnost takođe značajno smanjena kao odgovor na veću koncentraciju fluorantena u hrani. Lowe i sar. (1981) su ukazali da je dugotrajno izlaganje dagnji *Mitilys edulis* smešama policikličnih aromatičnih ugljovodonika dovelo do promena u strukturi epitelijskih ćelija creva, narušilo njihovu sinhronost i uticalo je na strukturu ćelijskih lizozoma. Moguće je da fluoranten ima sličan toksični uticaj na ćelije epitela srednjeg creva larvi, da remeti strukturne i funkcionalne osobine što za posledicu može imati smanjenu sintezu i/ili lučenje enzima. Druga mogućnost je da fluoranten direktno inhibira aktivnost enzima, blokiranjem katalitičkog mesta ili aminokiselinskih ostataka koji su uključeni u vezivanje i stabilizaciju substrata. Sličan mehanizam inhibicije tripsina opisali su Napoleão i sar. (2012), koji su izlagali larve *Aedes aegypti* lektinu iz lišća *Myracrodruon urundeuva*. Dodatno, inhibiciju aktivnosti tripsina i leucin aminopeptidaze srednjeg creva larvi *L. dispar* izloženih kadmijumu opisali su Vlahović i sar. (2015), a aktivnost tripsina je takođe bila smanjena u srednjem crevu larvi *Helicoverpa armigera* čija je hrana sadržala LAP iz biljaka (Lomate i sar., 2013). Fitofagni insekti mogu da prevaziđu štetne efekte biljaka domaćina zahvaljujući plastičnosti, brzom i efikasnoj modulaciji aktivnosti njihovih enzima (Broadway, 1997; Lomate i Hivrale, 2011; War i sar., 2013). Mrdaković i sar. (2014) su zabeležili pad aktivnosti tripsina kao odgovor na alelohemikalijski stres,

dok je povišena aktivnost lipaze u stanju stresa predstavljala adaptivni odgovor *L. dispar* larvi. U ovoj studiji nisu zabeležene značajne promene specifične aktivnosti lipaze, ali je pokazana tendencija blagog povećanja aktivnosti ovog enzima kod larvi *L. dispar* koje su izlagane većoj koncentraciji fluorantena, što bi moglo ukazati na sličan odbrambeni mehanizam protiv štetnih efekata fluorantena.

Kod larvi *E. chrysorrhoea* su detektovani različiti odgovori digestivnih enzima na prisustvo fluorantena u hrani. Zabeležen je pad aktivnosti tripsina kod larvi koje su bile izložene većoj koncentraciji fluorantena. S druge strane, izloženost manjoj koncentraciji fluorantena u hrani uzrokovala je značajno povećanje specifične aktivnosti leucin aminopeptidaze u homogenatima celog srednjeg creva *E. chrysorrhoea* larvi. Povećanje aktivnosti leucin aminopeptidaze usled izloženosti fluorantenu može doprineti efikasnijem varenju oligopeptida, što doprinosi boljoj iskorišćenosti hrane. Lomate i Hivrale (2011) naglašavaju adaptivni značaj indukcije aminopeptidaza u procesu varenja proteina, u stresnim uslovima sredine.

Takođe, zabeležen je značajan porast aktivnosti lipaze kod larvi *E. chrysorrhoea* koje su izlagane manjoj koncentraciji fluorantena, u poređenju sa kontrolom. Povećana aktivnost lipaze zabeležena je i kod drugih vrsta Lepidoptera izlaganih nutritivnom i temperaturnom stresu (Janković-Tomanić, 2012; Sarate i sar., 2012). Iz ovoga proizilazi da larve *E. chrysorrhoea* tretirane fluorantenom imaju veću potrebu za lipidnim nutrijentima kao važnim izvorom energije. Veća specifična aktivnost lipaze omogućava efikasno korišćenje lipida iz hrane, obezbeđujući sticanje energetskih resursa, neophodnih i za indukciju odbrambenih mehanizama u stresnim uslovima. Dodatno, povećana aktivnost lipaze može odražavati veće potrebe za lipidima iz hrane u starijim larvenim stupnjevima, kod vrsta koje se ne hrane kao odrasle jedinke (Stockhoff, 1993). Lavarías i sar. (2006) su ukazali na povišenu aktivnost lipaze u digestivnim žlezdama *Macrobrachium borellii*, koje su bile izložene rastvornim frakcijama ulja, mešavini monocikličnih aromatičnih ugljovodonika. Došli su do zaključka da prisustvo organskih zagađivača uzrokuje visoku potrošnju energije i konstantno angažovanje njenih rezervi.

Enzimi koji su prisutni u više molekulskih formi, poznati su kao izozimi. Karakteriše ih ista katalitička aktivnost, što organizmima omogućava veću fleksibilnost, mogućnost prilagođavanja i preciznost u obavljanju specifičnih metaboličkih funkcija (Zeidler, 2000). Izoforme enzima mogu se razlikovati prema osetljivosti na određeni zagađivač, jer u slučaju izloženosti mogu dati različit odgovor u vidu inhibicije ili aktivacije (Sanchez-Hernandez, 2011). Pojedini autori smatraju da bi izozimska varijabilnost mogla biti korisna u monitoringu populacija organizama osetljivih na hemijske polutante (Yap i sar., 2011; Evenden i Depledge, 1997; Guttman, 1994).

Rezultati ove studije ukazuju da, u zavisnosti od primenjene koncentracije fluorantena i tretiranih vrsta, različite izoforme enzima pokazuju razlike u aktivnosti. Iako je kod *E. chrysorrhoea* larvi uočen veći broj izoformi tripsina, inhibicija izoforme I2 u celom srednjem crevu larvi izloženih fluorantenu je uočena kako kod *L. dispar*, tako i kod *E. chrysorrhoea*. Sa druge strane, ekspresija najdominantnije izoforme tripsina I4 u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi izlaganih manjoj koncentraciji fluorantena, može ukazati na indukciju manje osetljive izoforme enzima, što omogućava efikasnije varenje proteina. Izlaganje larvi nižim koncentracijama fluorantena dovelo je do povećanja specifične aktivnosti leucin aminopeptidaze u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea*, ali i do smanjene aktivnosti ovog enzima u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi, u poređenju sa vrednostima kontrolnih grupa. To može biti posledica različitih obrazaca ekspresije izoformi leucin aminopeptidaze. Inhibicija izoformi I2 i I3 uočena je kod *L. dispar* larvi koje su bile izložene delovanju niže koncentracije fluorantena, u poređenju sa kontrolnom grupom. Sa druge strane, prisustvo I2 izoforme uočava se u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi izlaganih nižim koncentracijama fluorantena u hrani, a koja nije uočena kod larvi kontrolne grupe. To bi moglo ukazati da je ekspresija manje osetljive ili na prisustvo zagađivača neosetljive izoforme leucin aminopeptidaze larvi *E. chrysorrhoea* omogućila povećanu aktivnost enzima. Ekspresija

izoforme II lipaze u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* pokazuje zavisnost od koncentracije fluorantena, tako da njen intenzitet raste s koncentracijom zagađivača. S' druge strane, ekspresija obe izoforme lipaze u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* je najintenzivnija u grupi izlaganoj manjoj koncentraciji fluorantena u hrani, što odgovara detektovanim specifičnim aktivnostima enzima i verovatno omogućava efikasnije varenje lipida iz hrane u stresnim uslovima. Promene u ekspresiji izoformi enzima ukazuju na adaptivni odgovor larvi na prisustvo zagađivača. Kanonijska diskriminaciona analiza potvrdila je da aktivnosti, u ovom poglavlju opisanih digestivnih enzima, značajno doprinose diferencijaciji među vrstama. Odgovori digestivnih enzima, specifične aktivnosti i ekspresija izoformi, srednjeg creva larvi obe vrste na sredinski relevantne koncentracije fluorantena iz hrane, doprinose razumevanju njihovih mehanizama prilagođavanja stresnim uslovima okruženja. Osim toga, uočene promene aktivnosti tripsina i leucin aminopeptidaze i ekspresije izoformi ukazuju da se ovi enzimi mogu razmatrati i kao potencijalni biomarkeri zagađenja fluorantenom u životnoj sredini.

5.5.2. Specifična aktivnost i izoforme alkalnih i kiselih fosfataza u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

U ovoj studiji nisu zabeležene promene aktivnosti alkalnih, ukupnih kiselih i lizozomskih kiselih fosfataza u celom srednjem crevu *L. dispar* larvi. Jedino su nelizozomske kisele fosfataze pokazale osetljivost na prisustvo fluorantena u hrani, obzirom da je ishrana larvi dijetom sa dodatkom veće koncentracije ovog zagađivača inhibirala aktivnost enzima, u odnosu na kontrolnu grupu. Inhibicija kiselih fosfataza zabeležena je i kod larvi *Cnaphalocrocis medinalis* koje su bile hronično izlagane delovanju biljnih insekticida i toksina *Bacillus thuringiensis* (Nathan i sar., 2004). Autori su zaključili da smanjena aktivnost kiselih fosfataza pod uticajem biljnih insekticida i bakterijskog toksina sugerise smanjeno oslobađanje fosfora potrebnog za energetske metabolizam, smanjenu brzinu metabolizma, kao i smanjenu brzinu transporta metabolita, a može biti posledica njihovog direktnog dejstva na regulaciju aktivnosti enzima. Ista vrsta, *C. medinalis* je bila izložena i limonoidima iz biljke *Azadirachta indica* i takođe pokazala smanjenu aktivnost kiselih fosfataza (Nathan i sar., 2005). Smanjena aktivnost fosfataza je zabeležena i u hepatopankreasu i ovarijumu kraba *Scylla tranquebarica* poreklom iz staništa koje je bilo zagađeno naftalinom (Vijayavel i sar., 2006).

Aktivnost alkalnih fosfataza se nije menjala ni kod *E. chrysorrhoea* larvi koje su bile izložene fluorantenu u odnosu na kontrolnu grupu. Kada su u pitanju ukupne kisele fosfataze i lizozomske kisele fosfataze može se primetiti povećanje aktivnosti u grupi koja je bila pod uticajem manje koncentracije fluorantena. Braeckman i sar., (1999) su, ispitujući uticaj kadmijuma na kisele fosfataze ćelijske linije C6/36 insekta *Aedes albopictus*, utvrdili povećanje njihove aktivnosti što ukazuje na aktivaciju lizozomskog sistema u cilju sekvenciranja ksenobiotika. Visok nivo aktivnosti kiselih fosfataza detektovan je i u hemolimfi školjki izloženih PAH jedinjenjima male molekulske težine, kao što su fenantren i antracen (Giannapas i sar., 2012), što može ukazivati na promene u imunološkoj odbrani, usled promena integriteta lizozomskih membrana u hemocitima. Promene integriteta lizozomske membrane bi mogle rezultirati oslobađanjem kiselih fosfataza u citosol (Moore, 1976; Baccino, 1978), što dovodi do ozbiljnih ćelijskih oštećenja, na šta ukazuju povećani nivoi ćelijske smrti kod testiranih školjki. Visoka aktivnost kiselih fosfataza u hemolimfi ovih školjki može ukazivati na njenu prekomernu produkciju / hipersintezu u vijabilnim hemocitima, kako bi se poboljšala odbrana od toksičnih efekata ksenobiotika. S druge strane, visoki nivoi kiselih fosfataza mogu biti posledica oslobađanja enzima u citosol nakon destabilizacije lizozomske membrane i prateće ćelijske smrti (Sharma i Thomas, 2007; Izagirre i sar., 2009).

Različit odgovor larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* još jednom možemo potražiti u različitom obrascu ekspresije izoformi. Zimogram alkalnih fosfataza celog srednjeg creva *L. dispar* larvi otkriva 3 izoforme, a intenzitet najdominantnije izoforme opada sa koncentracijom fluorantena. Kod *E. chrysorrhoea* larvi možemo uočiti samo jednu izoformu alkalnih fosfataza povećanog intenziteta u grupama izloženim zagađivaču. Kod *L. dispar* larvi, uočavaju se tri izoforme kiselih fosfataza, dok se kod *E. chrysorrhoea* larvi mogu primetiti četiri izoforme, pri čemu je prisustvo II izoforme zabeleženo samo u grupi koja je bila izlagana manjoj koncentraciji fluorantena u hrani. Ovo može ukazivati da je upravo ova izoforma glavni nosioc specifične aktivnosti kiselih fosfataza i razlog različitog odgovora na prisustvo fluorantena između dve ispitane vrste. Kanonijska diskriminaciona analiza je potvrdila razlike između vrsta u odgovorima fosfataza na prisustvo fluorantena u dijeti.

5.6. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na koncentracije lipida i trehaloze u hemolimfi larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

Hemolimfa insekata predstavlja centralni izvor informacija o mehanizmima koji kontrolišu unos hranljivih sastojaka. U hemolimfu dospevaju hranljive materije tek apsorbirane iz hrane u crevima ili proizvedene od strane metaboličkih aktivnosti masnog tela i drugih tkiva. Iz hemolimfe se takođe crpe hranljive materije putem masnog tela i drugih tkiva koje su neophodne za somatski i reproduktivni rast, disanje ili izlučivanje. Kao rezultat toga trenutna koncentracija sastojaka u hemolimfi može ukazati na vreme, količinu i hranljivost nedavnih obroka, kao i na trenutne nutritivne potrebe insekata (Abisgold i Simpson, 1987; Simpson i Simpson, 1990; Chyb i Simpson, 1990). Hemolimfa je značajna ne samo za transport hranljivih sastojaka, već i ksenobiotika i njegovih metabolita do okolnih tkiva (Lee i sar., 1996).

Lipidi se obično smatraju glavnim izvorom energije tokom faze kada se insekti ne hrane (Beenackers i sar., 1980). Pretpostavlja se da se veliki procenat ugljenih hidrata unetih hranom tokom razvoja larvi zapravo transformišu u lipide (Candy, 1985). Lipidi uskladišteni u vitalnim organima oksiduju se lipazama da bi oslobodili neophodnu energiju, npr. tokom faze metamorfoze insekata koja je energetske vrlo zahtevna (Keeley, 1985). Takođe nizak sadržaj lipida može biti posledica mobilizovanja lipida za podmirivanje energetskih potreba u stanju stresa. Kod *Pimpla turionellae* larvi koje su bile pod uticajem cipermetrina (Sak i sar., 2006), ili kadmijuma (Ortel, 1991), zabeležen je nizak sadržaj lipida. Smanjenje koncentracije lipida detektovano je i kod *Galleria mellonella* larvi koje su takođe bile izložene stresu, izazvanom prisustvom kadmijuma (Byung-Sik i sar., 2001). Altuntaş (2015) daje dodatno objašnjenje kada su promene koncentracije lipida u pitanju. Naime, u njegovoj studiji *G. mellonella* larve su bile izložene organofosforom pesticidu etefonu, a smanjen sadržaj lipida povezuje sa korišćenjem lipida i glukoze za sintezu lipoproteina, koji se mogu koristiti za popravak oštećenja organela ćelija i tkiva nastalih usled stresa izazvanog pesticidom. Lohar i Wright (1993) takođe su ukazali na smanjenje koncentracije lipida u hemolimfi, masnom telu i oocitima kod ženki *Tenebrio molitor* izloženih malationu. Autori smatraju da je do smanjenja koncentracije lipida došlo usled dejstva insekticida na adipokinetički hormon koji kontroliše lipidni metabolizam. Kada je u pitanju uticaj PAHs na sadržaj lipida i trehaloze kod insekata, u literaturi nema dostupnih podataka, međutim utvrđeno je da je sadržaj lipida u hepatopankreasu, hemolimfi i jajnicima manji kod kraba koje su poreklom iz staništa zagađenog naftalenom u poređenju sa sadržajem iz jedinki prikupljenih sa referentnog mesta (Vijayavel i sar., 2006). U aktuelnoj studiji, *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* larve, koje su bile pod uticajem fluorantena, nisu pokazale promene u koncentraciji lipida u hemolimfi. Ni jedna od ispitanih vrsta nije aktivirala lipidni katabolizam kao glavni izvor metaboličke energije u stanju stresa, već su na stresne uslove larve odgovorile aktiviranjem drugih energetskih resursa.

Međutim zabeležen je pad koncentracije trehaloze kod *L. dispar* larvi koje su bile izložene manjoj koncentraciji fluorantena. Iako je fiziološka uloga trehaloze kao izvora energije tokom razvoja insekata uglavnom nejasna, veruje se da je njena mobilizacija presudna za održavanje metaboličke homeostaze (Matsuda i sar., 2015). Trehaloza je neredukujući disaharid glukoze koja predstavlja osnovni oblik prenosa ugljenih hidrata od glikogenskih depoa u masnom telu do tkiva kojima je potrebna energija (Thompson, 2003), u normalnim uslovima ali i u stanju stresa. Ugljeni hidrati igraju važnu ulogu u strukturi i funkciji svih tkiva tokom života insekata (Chippendale, 1978) i njihov sadržaj u hemolimfi je važan pokazatelj brzine metabolizma (Zhu i sar., 2012). Nekoliko studija je zabeležilo smanjenje sadržaja ugljenih hidrata u pojedinim tkivima različitih vrsta insekata izlaganih delovanju insekticida (Shakoori i sar., 1988; Mandal i Chaudhuri, 1992; Radwan i Shaurub, 1995; El-Bokl i sar., 1998). Rezerve ugljenih hidrata su na različitim nivoima u različitim fazama razvoja insekata. Smanjena koncentracija trehaloze je zabeležena i u hemolimfi *L. dispar* larvi koje su bile zaražene parazitima *Gliptapanteles liparidis*, ali i pod uticajem kadmijuma (Bischof, 1995).

Generalno, koncentracija trehaloze u hemolimfi insekata je uglavnom visoka, oni je koriste kao izvor energije u svojim tkivima i organima, hidrolizujući je u dva molekula glukoze (Wyatt, 1967). Interesantno je da su detektovane koncentracije trehaloze u hemolimfi *E. chrysorrhoea* larvi bile manje od koncentracija izmerenih u hemolimfi *L. dispar* larvi. Ovo može sugerisati da *E. chrysorrhoea* larve uspešno koriste trehalozu, i u manjim koncentracijama, zarad dobijanja energije kako u normalnim, tako i u stresnim uslovima.

5.7. Efekti prisustva fluorantena u dijeti na osobine životne istorije larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*

Osim različitih odgovora ispitivanih enzima u različitim tkivima larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*, na delovanje fluorantena dodatog hrani, zabeležen je i uticaj na osobine životne istorije kod obe vrste. Indukcija odbrambenih mehanizama omogućava insektima da prevaziđu delovanje brojnih ksenobiotika u okruženju (Van Straalen i Hoffman, 2000) što se, usled različite preraspodele resursa, odražava na performansu jedinki u stresnim uslovima sredine (Hoffmann i Parsons, 1991).

Količina i kvalitet ishrane su od velike važnosti za sve osobine životne istorije, hrana koju larva konzumira, kao i uskladištene hranljive materije, doprinose reprodukciji i preživljavanju na stupnju adulta (Boggs i Freeman, 2005). Utvrđeno je da nedostatak hrane tokom razvoja može uticati na produženje larvenog razvića, smanjenje relativne brzine rasta, masu i kasniji reproduktivni učinak (Briegel, 1990; Berrigan i Charnov, 1994; Blanckenhorn, 1998; Fischer i Fiedler, 2001). Mnoge studije su ukazale i na uticaj biljki hraniteljki na osobine životne istorije *L. dispar* larvi (Barbosa, 1978; Stoyenoff i sar., 1994; Lazarević i sar., 2002).

Prisustvo fluorantena u hrani nije imalo uticaja na ukupno trajanje razvića *L. dispar* larvi, u poređenju sa istim kod larvi kontrolne grupe. Međutim, uočavaju se razlike u trajanju razvića larvi gajenih na dijeti sa dodatkom manje, i veće koncentracije fluorantena u hrani koje je bilo produženo. Produženje trajanja razvića može biti način kojim se obezbeđuje vreme dovoljno za veću konzumaciju hrane larvi izlaganih suboptimalnoj dijeti (Slansky, 1993), što bi mogao biti odgovor *L. dispar* larvi na prisustvo veće koncentracije zagađivača u hrani. Pod uticajem veće koncentracije zagađivača je došlo i do produženog trajanja razvića larvi u periodu od ulaska u treći stupanj do žrtvovanja, trećeg dana petog stupnja. Ovaj rezultat je očekivan, pošto se larve u ovom periodu najviše hrane, ali tako unesu i veću količinu zagađivača koji može da ispolji negativne efekte na njihov razvoj. Pored povećane ekspresije Hsp70 proteina u celom srednjem crevu larvi, što predstavlja energetski veoma skup proces, veća koncentracija fluorantena uzrokuje i indukciju aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD u celom srednjem crevu i tkivu srednjeg creva, CAT u

tkivu srednjeg creva i hemolimfi), izazivajući tako energetski disbalans koji rezultuje produženim razvićem larvi. Produženje trajanja razvića bi trebalo da omogući veću konzumaciju i iskoristljivost unetih nutrijenata, sticanje dovoljnih količina gradivnih materija i energije, potrebnih za rast u prisustvu zagađivača, ali takođe važnih i za stupanj lutke i adulta, (faza životnog ciklusa u kojima se insekt ne hrani). Manja koncentracija fluorantena u hrani je dovela do smanjenja masa larvi u petom stupnju. I na ovoj koncentraciji zagađivača, većina resursa je bila usmerena ka antioksidativnoj odbrani, ali i povećanju koncentracije Hsp70 proteina u mozgu larvi. Takođe, manja koncentracija fluorantena je dovela do inhibicije aktivnosti tripsina i leucin aminopeptidaze što može dovesti do slabije iskoristivosti hrane i biti jedan od razloga za smanjenje masa. Hronično izlaganje kadmijumu u hrani, dovelo je do značajnog smanjenja masa larvi četvrtog stupnja i redukovalo aktivnost ukupnih proteaza srednjeg creva *L. dispar* larvi (Vlahović i sar., 2014). Produženo trajanje larvenih stupnjeva i redukcija masa larvi zabeleženi su takođe kod *L. dispar* izlaganih kadmijumu, suplementisanom dijeti (Mirčić i sar., 2013), ili hranjenih lišćem topole gajene na zemljištu kontaminiranom olovom, kadmijumom i cinkom (Jiang i Yan, 2017).

Kod *E. chrysorrhoea* larvi, obe koncentracije fluorantena su dovele do produženog trajanja razvića (period od ulaska u treći stupanj do žrtvovanja, trećeg dana petog stupnja) i smanjenja masa larvi. Indukcija aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD i CAT) u celom srednjem crevu i tkivu srednjeg creva, kao i nenzimskog antioksidativnog parametra (GSH) u tkivu srednjeg creva, i indukcija detoksifikacionih enzima u tkivu srednjeg creva (GST i CESs) tokom ishrane dijetom sa dodatim fluorantenom, dovela je do deficita resursa koji je rezultirao produžetkom trajanja razvića a smanjenjem masa larvi. Pokazano je da prisustvo piridin alkaloida nikotina u veštačkoj dijeti uzrokuje smanjenje masa i značajno redukovanje relativne brzine rasta larvi *Spodoptera eridania* (Cresswell i sar., 1992), dok je produženo trajanje razvića, kao posledica oksidativnog stresa izazvanog hroničnim delovanjem organskog herbicida parakvata, detektovano kod larvi *Helicoverpa armigera* (Apirajkamol i sar., 2020). Ispitivanjem efekata vremenskog stresa, tj. gajenjem larvi *Lestes viridis* u uslovima fotoperioda koji simulira kasniji period u sezoni njihovog razvića, pokazano je da one ubrzavaju svoj razvoj, što je međutim rezultovalo kraćim životnim vekom adulta, oštećenjem lipida, proteina i DNK usled oksidativnog stresa, kao i redukovanjem imunske funkcije i smanjenjem masa jedinki. Rezultati studije su ukazali na posredničku ulogu oksidativnog stresa u uzajamnom ograničavanju (trade-off) bržeg razvoja larvi i životnog veka adulta (Janssens i Stoks, 2018). Trajanje razvića i metamorfoza insekata su, kao i brojni drugi procesi, pod kontrolom hormona, juvenilnog, ekdisteroida i drugih, a narušavanje njihovog balansa može rezultovati abnormalnim razvićem (Dhadialla i sar., 1998). Kod *Chironomus tentans* je pokazana redukcija kumulativne pojave adulta (ukupnog broja jedinki koje dostignu stupanj adulta), uzrokovana fluorantenom i pentahlorbenzenom, pri čemu je sugerisano da to može biti posledica njihovog indirektnog delovanja na nivoe hormona, njihovog interferiranja sa biohemijskim procesima stvaranja ili metabolizma hormona (Schuler i sar., 2007). Opisane promene trajanja razvića larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* bi mogle biti delom i posledica promena na nivou hormonalne regulacije, usled prisustva zagađivača (ili nekog od njegovih metabolita).

Takođe, značajno smanjene relativne brzine rasta od ulaska u treći stupanj do trećeg dana petog stupnja, i tokom tri dana petog stupnja detektovano je kod larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* gajenih na dijeti sa dodatkom fluorantena. Ovaj period razvića larvi karakteriše povećana konzumacija hrane, a samim tim i njihov maksimalan prirast, kao i promenjen afinitet u ishrani koji se ogleda u povećanoj konzumaciji određenih nutrijenata (Kelly i sar., 1989; Stockhoff, 1993). Kao što je već pomenuto, indukcija određenih mehanizama odbrane, poput antioksidativnih, detoksifikacionih kao i promene digestivnih enzima, verovatno je dovela do veće alokacije resursa za odbranu i metabolizam kod larvi izloženih fluorantenu, što je rezultiralo smanjenjem relativne brzine njihovog rasta. Smanjene relativnih brzina rasta *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* larvi izloženih fluorantenu takođe mogu biti posledica smanjene konzumacije hrane, kao što je pokazano kod *Manduca sexta* larvi koje su bile izložene variranju komponenata dijete, a njihova potreba za

Diskusija

proteinima bila je manje izražena u četvrtom i petom larvenom stupnju, u poređenju sa trećim (Ojeda-Avila i sar., 2003). Iako su Tammaru i Esperk (2007) zabeležili značajno niži trenutni RGR poslednjih larvenih stupnjeva kod nekoliko vrsta Lepidoptera, u odnosu na prethodne, u ovoj studiji su zabeležene nešto veće vrednosti relativne brzine rasta tokom tri dana petog stupnja u odnosu na relativnu brzinu rasta od ulaska u treći stupanj do trećeg dana petog stupnja kod *L. dispar* larvi u svim eksperimentalnim grupama, dok kod *E. chrysorrhoea* larvi to nije bio slučaj. Larve najviše konzumiraju hranu u poslednjim larvenim stupnjevima (Leonard, 1974), tako da bi povećanje relativne brzine rasta larvi *L. dispar* tokom tri dana petog stupnja moglo biti posledica njihovog intenzivnijeg hranjenja u ovom periodu, što bi omogućilo da brže dostignu stadijum lutke, uprkos negativnim efektima zagađivača.

Smanjena relativna brzina rasta u grupama koje su bile izlagane fluorantenu u hrani je bila očekivana, pošto procesi održanja homeostaze u stanju stresa uključuju preusmeravanje značajnog dela energetske resurse ka metaboličkim i odbrambenim procesima, umesto ka rastu. Slični efekti PAHs, benzo[a]pirena i fluorantena, na relativnu brzinu rasta larvi *L. dispar* su već bili opisani (Ilijin i sar. 2015; Mrdaković i sar., 2015; Grčić i sar., 2019). Na rast insekata utiču različiti faktori koji mogu voditi promenama njihove fiziologije i ponašanja, a intenzivnija brzina rasta se u većini slučajeva smatra benefitnom. Međutim par studija je ukazalo na cenu veće brzine rasta insekata (Nylín i Gotthard, 1998). Tako je npr. kod larvi *Lymantria dispar* i *Pararge aegeria*, izlaganih nutritivnom stresu, zabeležen trade-off između veće brzine rasta i preživljavanja jedinki (Stockhoff, 1991; Gotthard i sar., 1994). Literaturni podaci ukazuju da larve Lepidoptera ne rastu do svog fiziološkog maksimuma, već prilagođavaju rast optimalnom (Gotthard, 2008), u zavisnosti od raznovrsnih i često stresnih uticaja okoline sa kojima se susreću. Različiti fiziološki odgovori fitofagnih insekata na delovanje ksenobiotika omogućavaju prevazilaženje njihovih štetnih efekata, prilagođavanje jedinki stresnim uslovima, kao i optimalno razviće u datim uslovima.

6. ZAKLJUČCI

Zaključci

Larve *Lymantria dispar* i *Euproctis chryorrhoea* su osjetljive na sredinski relevantne koncentracije fluorantena. Efekat je tkivno specifičan i pokazani su različiti obrasci promena aktivnosti i molekularnog diverziteta ispitivanih enzima i odgovora drugih ispitivanih parametara.

- Aktivnost SOD u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* je povećana, kao i ekspresija izoforme ovog enzima, u odnosu na kontrolu. GR aktivnost je bila smanjena u grupi larvi gajenih na dijete sa manje fluorantena, u odnosu na kontrolu.
- Aktivnost katalaze je povećana u celom srednjem crevu *E. chryorrhoea* larvi gajenih na dijete sa više fluorantena. Intenzivnija ekspresija detektovane izoforme enzima zabeležena je na obe koncentracije fluorantena, u odnosu na kontrolu.
- Povećana aktivnosti SOD i CAT u tkivu srednjeg creva larvi *L. dispar* gajenih na dijete sa dodatkom fluorantena, ukazuje na prisustvo ROS i može se smatrati fiziološkim odgovorom na stresni ambijent.
- Aktivnost SOD i CAT je bila takođe povećana u tkivu srednjeg creva larvi *E. chryorrhoea* na dijete sa manje fluorantena, dok je značajno povećanje koncentracije GSH uočeno kod larvi na dijete sa različitim koncentracijama fluorantena.
- Fluoranten u dijete koreliše sa povećanjem aktivnosti karboksilesteraza samo u tkivu srednjeg creva *E. chryorrhoea* larvi. Međutim, javljaju se tkivno specifični obrasci ekspresije izoformi ovog enzima, različiti kod larvi ispitivanih vrsta. Fluoranten u dijete uticao je na ekspresiju većeg broja izoformi enzima u tkivu srednjeg creva *E. chryorrhoea* larvi, a uočena je ekspresija izoforme enzima koja nije detektovana u kontroli.
- Kod larvi *L. dispar* je fluoranten u dijete indukovao ekspresiju izoformi karboksilesteraza kako u celom srednjem crevu tako i u tkivu srednjeg creva, koje nisu detektovane u kontroli.
- GST je pokazala osjetljivost na prisustvo fluorantena samo u tkivu srednjeg creva *E. chryorrhoea* larvi, gde je detektovano povećanje specifične aktivnosti enzima, u odnosu na kontrolu.
- Indukcija detoksifikacionih mehanizama predstavlja fiziološku adaptaciju ispitivanih vrsta Lepidoptera na stresni efekat ksenobiotika.
- Promena aktivnosti SOD i CAT detektovana je u hemolimfi larvi obe vrste. Aktivnost SOD je niža u hemolimfi larvi *L. dispar* gajenih na dijete sa više fluorantena. Katalaza je aktivnija u hemolimfi larvi gajenih na obe koncentracije fluorantena. Smanjenje aktivnosti katalaze zabeleženo je u hemolimfi *E. chryorrhoea* larvi tretiranih sa obe koncentracije fluorantena.
- Promene aktivnosti antioksidativnih enzima u hemolimfi ukazuju na fiziološku adaptaciju u smislu zaštite od oksidativnih oštećenja.
- Inhibicija specifične aktivnosti karboksilesteraza detektovana je u mozgu *L. dispar* larvi gajenih na dijete sa više fluorantena, što ukazuje na fiziološki mehanizam smanjenja koncentracije zagađivača dostupnog za inhibiciju AChE.
- Prisustvo različitih koncentracija fluorantena u dijete nije značajno uticalo na aktivnost acetilholinesteraza u mozgu larvi *L. dispar* i *E. chryorrhoea*, u odnosu na kontrolu. Fluoranten je indukovao mehanizame antioksidativne zaštite što je verovatno uticalo na očuvanje fiziološki odgovarajuće aktivnosti AChE.

Zaključci

- Hronično delovanje dve koncentracija fluorantena u dijeti, uzrokovalo je različitu ekspresiju proteina Hsp70 u celom srednjem crevu *L. dispar* i *E. chrysorrhoea* larvi. Smanjenje ekspresije Hsp70 uočeno je kod *E. chrysorrhoea* larvi gajenih na dijeti sa dodatkom različitih koncentracija fluorantena. Ovo je bilo izraženije kod larvi izlaganih manjoj koncentraciji fluorantena. Povećanje ekspresije Hsp70 detektovano je kod larvi *L. dispar* na većoj koncentraciji fluorantena. Rezultat ukazuje na različite odgovore u intenzitetu proteotoksičnosti koja je izazvana fluorantenom.
- ELISA testom je utvrđeno da je manje fluorantena u dijeti uzrokovalo povećanje koncentracije Hsp70 proteina u mozgu larvi *L. dispar*, dok je smanjenje koncentracija Hsp70 detektovano u mozgu *E. chrysorrhoea* larvi izlaganih različitim koncentracijama fluorantena. Međutim, ekspresija proteina nakon western blota je pokazala suprotan trend kod larvi obe vrste.
- Smanjena aktivnost tripsina, kao i inhibicija ekspresije jedne izoforme enzima, detektovana je u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* izlaganih različitim koncentracijama fluorantena.
- Kod *E. chrysorrhoea* larvi izlaganih većoj koncentraciji fluorantena, detektovana je smanjena specifična aktivnost tripsina i ekspresija većeg broja izoformi enzima, pri čemu je inhibicija ekspresije jedne izoforme enzima detektovana kod obe tretirane grupe, dok je intenzitet dominantne izoforme manji u grupi tretiranoj sa više fluorantena.
- Aktivnost leucin aminopeptidaze je smanjena u celom srednjem crevu larvi *L. dispar* na nižoj koncentraciji fluorantena, kod kojih je uočena inhibicija ekspresije dve izoforme i smanjen intenzitet ekspresije jedne izoforme enzima.
- Kod *E. chrysorrhoea* larvi uočava se povećana aktivnost leucin aminopeptidaze u prisustvu manje koncentracije fluorantena, kao i ekspresija izoformi enzima kod larvi na dijeti sa različitim koncentracijama fluorantena koje nisu detektovane u kontroli. Ovo ukazuje na bolju iskoristljivost hrane zahvaljujući efikasnijem varenja oligopeptida.
- Prisustvo različitih koncentracija fluorantena u dijeti nije značajno uticalo na aktivnost lipaze larvi *L. dispar*, ali je uočeno povećanje intenziteta ekspresije jedne enzimske izoforme sa povećanjem koncentracije fluorantena. Povećana aktivnost enzima, kao i intenzivnija ekspresija izoformi, zabeleženi su u celom srednjem crevu larvi *E. chrysorrhoea* na manjoj koncentraciji fluorantena, sugerišući njihovu povećanu potrebu za lipidno bogatim nutrijentima kao značajnim izvorom energije, u stresnim uslovima koji nameću mobilizaciju energetske resurse.
- Smanjenje aktivnosti nelizozomskih fosfataza detektovano je kod larvi *L. dispar* u prisustvu više fluorantena. Manje fluorantena vodilo je povećanju aktivnosti ukupnih kiselih i lizozomskih fosfataza u celom srednjem crevu *E. chrysorrhoea* larvi, u odnosu na kontrolu.
- Kod larvi *L. dispar* izloženih manjoj koncentraciji fluorantena došlo je do smanjenja koncentracije trehaloze, dok kod *E. chrysorrhoea* nema promena u ukupnom sadržaju energetske molekula u hemolimfi. Nijedna vrsta nije aktivirala lipidni katabolizam kao glavni izvor metaboličke energije larvi u stresu, što može ukazati da su koristile druge energetske resurse.
- Alokacija resursa ka indukciji mehanizama odbrane u odgovoru na prisustvo zagađivača u hrani dovela je do promena na nivou osobina životne istorije larvi *L. dispar* i *E. chrysorrhoea*. Prisustvo veće koncentracije fluorantena u hrani je dovelo do produženog trajanja razvika, dok je u prisustvu manje koncentracije uočena redukcija mase *L. dispar* larvi, u poređenju sa kontrolnom grupom. Kod *E. chrysorrhoea* detektovano je produženo razviće i smanjenje masa u prisustvu fluorantena u hrani. Smanjenje relativnih brzina rasta zabeleženo je kod larvi obe vrste na različitim koncentracijama fluorantena.

Zaključci

- Kanonijska diskriminaciona analiza je potvrdila razlike između vrsta kada su u pitanju odgovori antioksidativnih i digestivnih enzima na prisustvo fluorantena u hrani.
- Analiza izozima može poslužiti u biomonitoringu sredinskog zagađenja s obzirom da hronična izloženost fluorantenu dovodi do razlika u ekspresiji izoformi karboksilesteraza, kao i izoformi digestivnih enzima, u srednjem crevu larvi obe vrste.
- Indukcija aktivnosti antioksidativnih i detoksifikacionih enzima, promene aktivnosti digestivnih enzima, kao i različita ekspresija izoformi ovih enzima, kod larvi obe vrste, jesu deo fiziološkog prilagođavanja za prevazilaženje štetnih efekata fluorantena u hrani.
- Rezultati studije doprinose proširenju veoma oskudnih znanja u ovoj oblasti i sagledavanju fizioloških mehanizama odbrane i prilagođavanja insekata na sve veće prisustvo organskih zagađivača u okruženju.

7. LITERATURA

Literatura

- Abisgold, J.D., Simpson, S.J., 1987. The Physiology of Compensation by Locusts for Changes in Dietary Protein. *Journal of Experimental Biology* 129, 329-346.
- Adesanya, A.W., Held, D.W., Liu, N., 2017. Geranium intoxication induces detoxification enzymes in the Japanese beetle, *Popillia japonica* Newman. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 143, 1-7.
- Aebi, H.E., 1983. Catalase, in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, pp. 273- 286.
- Agency, ECHA, 2018. Support document for identification of Fluoranthene as a substance of very high concern because of its PBT¹ (Article 57D) and vPvB², (Article 57E) properties, Member State Committee.
- Agency, EPA, 1987. Emergency and Hazardous Chemical Inventory Forms and Community Right-to-Know Reporting Requirements; Final Rule. 52 FR 38344.
- Ahmad, S., 1992. Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemical Systematics and Ecology* 20, 269-296.
- Ahmad, S., Duval, D.L., Weinhold, L.C., Pardini, R.S., 1991. Cabbage looper antioxidant enzymes: Tissue specificity. *Insect Biochemistry* 21, 563-572.
- Ahmad, S., Forgash, A.J., 1976. Nonoxidative Enzymes in the Metabolism of Insecticides. *Drug Metabolism Reviews* 5, 141-164.
- Ahmad, S., Pardini, R.S., 1990. Antioxidant defense of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*: Enzymatic responses to the superoxide-generating flavonoid, quercetin, and Photodynamic furanocoumarin, Xanthotoxin. *Photochemistry and Photobiology* 51, 305-311.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 49, 269-287.
- Aldridge, W.N., 1993. The esterases: perspectives and problems. *Chemico-Biological Interactions* 87, 5-13.
- Allen, S.L., Misch, M.S., Morrison, B.M., 1963. Variations in the electrophoretically separated acid phosphatases of tetrahymena. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 11, 706-719.
- Allen, R.G., Farmer, K.J., Newton, R.K., Sohal, R.S., 1984. Effects of paraquat administration on longevity, oxygen consumption, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides and glutathione in the adult housefly. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 78, 283-288.
- Altuntaş, H., 2015. Effects of Ethephon on the Hemolymph Metabolites of the Greater Wax Moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Physica Polonica Series a* 128, B182-B183.
- Amlabu, E., Nok, A.J., Sallau, A.B., 2009. Purification and biochemical characterization of lysosomal acid phosphatases (EC 3.1.3.2) from blood stream forms, *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitology International* 58, 238-242.
- Ankley, G., Collyard, S., Monson, P., Kosian, P., 1994. Influence of ultraviolet light on the toxicity of sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1791-1796.

Literatura

- Apirajkamol, N., James, B., Gordon, K.H.J., Walsh, T.K., McGaughran, A., 2020. Oxidative stress delays development and alters gene expression in the agricultural pest moth, *Helicoverpa armigera*. *Ecology and Evolution* 10, 5680-5693.
- Applebaum, S.W., Jankovic, M., Birk, Y., 1961. Studies on the midgut amylase activity of *Tenebrio molitor* L. larvae. *Journal of Insect Physiology* 7, 100-108.
- Arreguin-Espinosa, R., Arreguin, B., González, C., 2000. Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31, 239-244.
- Arrese, E.L., Howard, A.D., Patel, R.T., Rimoldi, O.J., Soulages, J.L., 2010. Mobilization of lipid stores in *Manduca sexta*: cDNA cloning and developmental expression of fat body triglyceride lipase, TGL. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40, 91-99.
- Auerswald, L., Siegert, K.J., Gäde, G., 2005. Activation of triacylglycerol lipase in the fat body of a beetle by adipokinetic hormone. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 461-470.
- 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. *Physiologia Plantarum* 104, 280-292.
- Baas, J., Stefanowicz, A.M., Klimek, B., Laskowski, R., Kooijman, S.A.L.M., 2010. Model-based experimental design for assessing effects of mixtures of chemicals. *Environmental Pollution* 158, 115-120.
- Babu, S.R., Subrahmanyam, B., 2010. Bio-potency of serine proteinase inhibitors from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98, 349-358.
- Baccino, F.M., 1978. Selected patterns of lysosomal response in hepatocytic injury, in: F., S.T. (Ed.), *Biochemical Mechanisms of Liver Injury* Academic Press, New York-London, pp. 518-557.
- Bach, L., Palmqvist, A., Rasmussen, L.J., Forbes, V.E., 2005. Differences in PAH tolerance between *Capitella* species: Underlying biochemical mechanisms. *Aquatic Toxicology* 74, 307-319.
- Badiou, A., Meled, M., Belzunces, L.P., 2008. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase—A biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 246-253.
- Bainy, A., Medeiros, M., Di Mascio, P., Almeida, E., 2006. In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. *Biotemas* 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. *Journal of Insect Physiology* 47, 349-357.
- Barbehenn, R.V., Stannard, J., 2004. Antioxidant defense of the midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars. *Journal of Insect Physiology* 50, 783-790.
- Barbosa, P., 1978. Host plant exploitation by the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24, 228-237.
- Barron, M.G., Heintz, R., Rice, S.D., 2004. Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Marine Environmental Research* 58, 95-100.

Literatura

- Browne, L., Raubenheimer, D., 2003. Ontogenetic changes in the rate of ingestion and estimates of food consumption in fourth and fifth instar *Helicoverpa armigera* caterpillars. *Journal of Insect Physiology* 49, 63-71.
- Bauer, A.K., Velmurugan, K., Plöttner, S., Siegrist, K.J., Romo, D., Welge, P., Brüning, T., Xiong, K.-N., Käßlerlein, H.U., 2018. Environmentally prevalent polycyclic aromatic hydrocarbons can elicit co-carcinogenic properties in an in vitro murine lung epithelial cell model. *Archives of Toxicology* 92, 1311-1322.
- Beenackers, A.M.T., Van der Horst, D.J., Marrewijk, W.J.A., 1980. Role of Lipids in Energy Metabolism, pp. 53-100.
- Belis, C.A., Offenthaler, I., Weiss, P., 2011. Semivolatiles in the Forest Environment: The Case of PAHs, in: Shröder, P., Collins, C.D. (Eds.), *Organic Xenobiotics and Plants*, pp. 47-73.
- Bellas, J., Thor, P., 2007. Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology* 16, 465-474.
- Berrigan, D., Charnov, E.L., 1994. Reaction Norms for Age and Size at Maturity in Response to Temperature: A Puzzle for Life Historians. *Oikos* 70, 474-478.
- Berteigne, M., Rose, C., C., Gerard, J., Dizengremel, P., 1988. Effects of polyaromatic hydrocarbons on the forest ecosystem and woody plants, *International Symposium Forest Tree Physiology*, Nancy, France.
- Berteigne, M., Rose, C., Gerard, J., Dizengremel, P., 1989. Effects of polyaromatic hydrocarbons on the forest ecosystem and woody plants. *Annals of Forest Science* 46.
- Bettencourt, B.R., Hogan, C.C., Nimali, M., Drohan, B.W., 2008. Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of Hsp70 copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in Hsp70 null flies. *BMC Biology* 6, 5.
- Bhattacharyya, A., Mazumdar Leighton, S., Babu, C.R., 2007. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 145, 669-677.
- Bischof, C., 1995. Effects of heavy metal stress on carbohydrate and lipid concentrations in the haemolymph and total body tissue of parasitized *Lymantria dispar* L. larvae (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 112, 87-92.
- Blanckenhorn, W.U., 1998. Adaptive Phenotypic Plasticity in Growth, Development, and Body Size in the Yellow Dung Fly. *Evolution* 52, 1394-1407.
- Bocquené, G., Bellanger, C., Cadiou, Y., Galgani, F., 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* 4, 266-279.
- Boggs, C.L., Freeman, K.D., 2005. Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia* 144, 353-361.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147-157.
- Bown, D.P., Wilkinson, H.S., Gatehouse, J.A., 1997. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 625-638.

Literatura

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Braeckman, B., Brys, K., Rzeznik, U., Raes, H., 1999. Cadmium pathology in an insect cell line: ultrastructural and biochemical effects. *Tissue Cell* 31, 45-53.
- Braeckman, B., Raes, H., Van Hoye, D., 1997. Heavy-metal toxicity in an insect cell line. Effects of cadmium chloride, mercuric chloride and methylmercuric chloride on cell viability and proliferation in *Aedes albopictus* cells. *Cell Biology and Toxicology* 13, 389-397.
- Braga, I.A., Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16, 179-293.
- Breer, H., 1981. Characterization of synaptosomes from the central nervous system of insects. *Neurochemistry International* 3, 155-163.
- Briegel, H., 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 36, 165-172.
- Broadway, R.M., 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43, 855-874.
- Butler, C.D., Trumble, J.T., 2008. Effects of pollutants on bottom-up and top-down processes in insect-plant interactions. *Environmental Pollution* 156, 1-10.
- Büyükgüzel, E., 2009. Evidence of oxidative and antioxidative responses by *Galleria mellonella* larvae to malathion. *Journal of Economic Entomology* 102, 152-159.
- Büyükgüzel, E., Hyršl, P., Büyükgüzel, K., 2010. Eicosanoids mediate hemolymph oxidative and antioxidative response in larvae of *Galleria mellonella* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156, 176-183.
- Byung-Sik, S., Ri-Na, C., Choong-Un, L., 2001. Effects of Cadmium on Total Lipid Content and Fatty Acids of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *The Korean Journal of Ecology* 24, 349-352.
- Campbell, P.M., Trott, J.F., Claudianos, C., Smyth, K.A., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 1997. Biochemistry of esterases associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with comparisons to putative orthologues in other Diptera. *Biochemical Genetics* 35, 17-40.
- Canavoso, L.E., Frede, S., Rubiolo, E.R., 2004. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 845-854.
- Candy, D.J., 1985. Intermediary metabolism, in: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Pergamon Oxford, UK, pp. 1-41.
- Cao, C.-W., Zhang, J., Gao, X.-W., Liang, P., Guo, H.-L., 2008. Overexpression of carboxylesterase gene associated with organophosphorous insecticide resistance in cotton aphids, *Aphis gossypii* (Glover). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90, 175-180.
- Caruso, G., De Pasquale, F., Mita, D.G., Micale, V., 2016. Digestive enzymatic patterns as possible biomarkers of endocrine disruption in the red mullet (*Mullus barbatus*): A preliminary investigation. *Marine Pollution Bulletin* 105, 37-42.

Literatura

- Carvalho, J.C., Cardoso, P., Borges, P.A.V., Schmera, D., Podani, J., 2013. Measuring fractions of beta diversity and their relationships to nestedness: a theoretical and empirical comparison of novel approaches. *Oikos* 122, 825-834.
- Chambers, J.E., Ma, T., Boone, J.S., Chambers, H.W., 1994. Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sciences* 54, 1357-1364.
- Chanda, S.M., Mortensen, S.R., Moser, V.C., Padilla, S., 1997. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison. *Fundamental and Applied Toxicology* 38, 148-157.
- 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*. *Environmental Science and Pollution Research International* 20, 9044-9056.
- Chasseaud, L.F., 1979. The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Advances in Cancer Research* 29, 175-274.
- Chen, F., Gao, X., Lei, M., Zheng, B., 2003. Effects of tannic acid on glutathione S-transferases in *Helicoverpa armigera* (Hubner) 46, 684-690.
- Chen, Y.-z., Zhang, B.-w., Yang, J., Zou, C.-s., Li, T., Zhang, G.-c., Chen, G.-s., 2021. Detoxification, antioxidant, and digestive enzyme activities and gene expression analysis of *Lymantria dispar* larvae under carvacrol. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 24, 208-216.
- Cheng, H., Tang, F., Li, W., Xu, M., 2015. Tannic Acid Induction of a Glutathione S-transferase in *Micromelalopha troglodyta* (Lepidoptera: Notodontidae) Larvae. *Journal of Entomological Science* 50, 350-362.
- 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). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 4, 349-361.
- 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. *Journal of Insect Physiology* 57, 1232-1239.
- Chrzanowski, G., Leszczyński, B., Czerniewicz, P., Sytykiewicz, H., Matok, H., Krzyżanowski, R., Sempruch, C., 2012. Effect of phenolic acids from black currant, sour cherry and walnut on grain aphid (*Sitobion avenae* F.) development. *Crop Protection* 35, 71-77.
- Chyb, S., Simpson, S.J., 1990. Dietary selection in adult *Locusta migratoria*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 56, 47-60.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity, in: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, pp. 283-284.
- Colinet, H., Lee, S.F., Hoffmann, A., 2010. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS Journal* 277, 174-185.
- Cornette, R., Kikawada, T., 2011. The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge. *IUBMB Life* 63, 419-429.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid Peroxidation in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, as Biomarkers of Aquatic Contamination in Field Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38, 122-131.

Literatura

- Cresswell, J.E., Merritt, S.Z., Martin, M.M., 1992. The effect of dietary nicotine on the allocation of assimilated food to energy metabolism and growth in fourth-instar larvae of the southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *Oecologia* 89, 449-453.
- Crow, J.A., Borazjani, A., Potter, P.M., Ross, M.K., 2007. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221, 1-12.
- Cruz-Rodriguez, L., Chu, F.-L., 2002. Heat-shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and to suspended field contaminated sediments. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 60, 157-168.
- Cygler, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M.K., Doctor, B.P., 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Science* 2, 366-382.
- Dalton, D., 1995. Antioxidant defenses of plants and fungi, in: Ahmad, S. (Ed.), *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*, Chapman & Hall, New York, pp. 298-355.
- Davenport, R., Spacie, A., 1991. Acute Phototoxicity of Harbor and Tributary Sediments from Lower Lake Michigan. *Journal of Great Lakes Research* 17, 51-56.
- Davies, K.J., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry* 262, 9895-9901.
- Davies, K.J., 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50, 279-289.
- de Carvalho, C.C.C.R., Caramujo, M.J., 2018. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules* 23, 2583.
- De Nicola, F., Maisto, G., Prati, M.V., Alfani, A., 2008. Leaf accumulation of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Quercus ilex* L. *Environmental Pollution* 153, 376-383.
- Dedourge-Geffard, O., Charron, L., Hofbauer, C., Gaillet, V., Palais, F., Lacaze, E., Geffard, A., Geffard, O., 2013. Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97, 139-146.
- Denlinger, D.L., Rinehart, J.P., Yocum, G.D., 2001. - Stress proteins: A role in insect diapause?, in: Denlinger, D.L., Giebultowicz, J.M., Saunders, D.S. (Eds.), *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 155-171.
- Desalme, D., Binet, P., Chiapusio, G., 2013. Challenges in Tracing the Fate and Effects of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Deposition in Vascular Plants. *Environmental Science & Technology* 47, 3967-3981.
- Després, L., David, J.-P., Gallet, C., 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 298-307.
- Devonshire, A.L., Heidari, R., Huang, H.Z., Hammock, B.D., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., 2007. Hydrolysis of individual isomers of fluorogenic pyrethroid analogs by mutant carboxylesterases from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 891-902.

Literatura

- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., Le, D.P., 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology* 43, 545-569.
- Diaz, P., Prim, N., Javier Pastor, F.I., 1999. Direct fluorescence-based lipase activity assay. *Biotechniques* 27, 696-698, 700.
- Diplock, A.T., 1994. Antioxidants and disease prevention. *Molecular Aspects of Medicine* 15, 293-376.
- Doganlar, O., Doganlar, B., 2015. Responses of antioxidant enzymes and heat shock proteins in drosophila to treatment with a pesticide mixture. *Archives of Biological Sciences* 67, 46-46.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82, 47-95.
- Dubovskiy, I., Grizanova, E., Chertkova, E., Slepneva, I., Komarov, D., Vorontsova, Y., Glupov, V., 2010. Generation of reactive oxygen species and activity of antioxidants in hemolymph of the moth larvae *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) at development of the process of encapsulation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 46, 35-43.
- El-Bokl, M.M., Hamed, M.S., Moawad, H.M., 1998. Effects of sublethal dosage of plant extracts and Cypermethrin on certain biochemical aspects of the first of filial generation of *Culex pipiens* larvae. *Journal of the Egyptian-German Society of Zoology* 26, 45-55.
- Elkinton, J.S., Parry, D., Boettner, G.H., 2006. Implicating an introduced generalist parasitoid in the invasive browntail moth's enigmatic demise. *Ecology* 87, 2664-2672.
- Elliott, A.J., Scheiber, S.A., Thomas, C., Pardini, R.S., 1992. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochemical Pharmacology* 44, 1603-1608.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271-278.
- Evans, D.R., Dethier, V.G., 1957. The regulation of taste thresholds for sugars in the blowfly. *Journal of Insect Physiology* 1, 3-17.
- Evenden, A.J., Depledge, M.H., 1997. Genetic susceptibility in ecosystems: the challenge for ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 105 Suppl 4, 849-854.
- Fairbairn, D., 1958. Glucose, trehalose and glycogen in *Porrocaecum decipiens* larvae. *Nature* 181, 1593-1594.
- Farcy, E., Burgeot, T., Haberkorn, H., Auffret, M., Lagadic, L., Allenou, J.P., Budzinski, H., Mazzella, N., Pete, R., Heydorff, 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. *Environmental Science and Pollution Research International* 20, 630-650.
- Farrar, R.R., Barbour, J.D., Kennedy, G.G., 1989. Quantifying Food Consumption and Growth in Insects. *Annals of the Entomological Society of America* 82, 593-598.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61, 243-282.

Literatura

- Finlayson-Pitts, B.J., Pitts, J., J N, 1986. Atmospheric chemistry. Fundamentals and experimental techniques. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Fischer, K., Fiedler, K., 2001. Effects of Larval Starvation on Adult Life-history Traits in the Butterfly species *Lycaena tityrus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Entomologia Generalis* 25, 249-254.
- Forestry Compendium, 2005. *Euproctis chrysorrhoea* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) Datasheet. CAB International, Wallingford, UK.
- Forget, J., Pavillon, J.-F., Beliaeff, B., Bocquené, G., 1999. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 912-918.
- Foss, H.E., Forbes, V.E., 1997. Effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene on growth rate and nucleic acid composition of *Capitella* sp. I. *Marine Biology* 129, 489-497.
- Frago, E., Selfa, J., Pujade-Villar, J., Guara, M., Bauce, E., 2009. Age and size thresholds for pupation and developmental polymorphism in the browntail moth, *Euproctis chrysorrhoea* (Lepidoptera: Lymantriidae), under conditions that either emulate diapause or prevent it. *Journal of Insect Physiology* 55, 952-958.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 64, 97-112.
- Fu, H., Xia, Y., Chen, Y., Xu, T., Xu, L., Guo, Z., Xu, H., Xie, H.Q., Zhao, B., 2018. Acetylcholinesterase Is a Potential Biomarker for a Broad Spectrum of Organic Environmental Pollutants. *Environmental Science & Technology* 52, 8065-8074.
- Chippendale, G.M., 1978. The functions of carbohydrates in insect life processes. In (ed.), Rockstein, M. *Biochemistry of Insects*, pp. 1-55. Academic Press, New York.
- Gäde, G., Auerswald, L., Predel, R., Marco, H.G., 2004. Substrate usage and its regulation during flight and swimming in the backswimmer, *Notonecta glauca*. *Physiological Entomology* 29, 84-93.
- Gatehouse, L.N., Shannon, A.L., Burgess, E.P., Christeller, J.T., 1997. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 929-944.
- 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.
- Gerschenfeld, H.M., 1973. Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiological Reviews* 53, 1-119.
- Gething, M.J., Sambrook, J., 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- Giannapas, M., Karnis, L., Dailianis, S., 2012. Generation of free radicals in haemocytes of mussels after exposure to low molecular weight PAH components: Immune activation, oxidative and genotoxic effects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 155, 182-189.
- Gilbert, E.R., Wong, E.A., Webb, K.E., Jr., 2008. Board-Invited Review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *Journal of Animal Science* 86, 2135-2155.

Literatura

- Gilbert, L.I., Granger, N.A., Roe, R.M., 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 617-644.
- Gilbert, L.I.e., 2012. *Insect molecular biology and biochemistry*. Amsterdam; Boston: Academic Press.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.
- Glatzle, D., Vuilleumier, J.P., Weber, F., Decker, K., 1974. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 30, 665-667.
- Gopalakrishnan, S., Huang, W.-B., Wang, Q.-W., Wu, M.-L., Liu, J., Wang, K.-J., 2011. Effects of tributyltin and benzo[a]pyrene on the immune-associated activities of hemocytes and recovery responses in the gastropod abalone, *Haliotis diversicolor*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 154, 120-128.
- Gotthard, K., 2008. Adaptive Growth Decisions in Butterflies. *Bioscience* 58, 222-230.
- Gotthard, K., Nylin, S., Wiklund, C., 1994. Adaptive variation in growth rate: life history costs and consequences in the speckled wood butterfly, *Pararge aegeria*. *Oecologia* 99, 281-289.
- Gould, K., 2003. Abiotic stresses | Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants, pp. 9-16.
- 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. *Archives of Biological Sciences* 71, 56-56.
- Grčić, A., 2020. Bioindication potential of physiological responses of gypsy moth *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera) on the benzo[a]pyren effects, Belgrade: University of Belgrade, Faculty of Biology, Belgrade: University of Belgrade, p. 113.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106, 207-212.
- Griffith, O.W., 1999. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 922-935.
- Grillo, L.A.M., Majerowicz, D., Gondim, K.C., 2007. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 579-588.
- Grizanova, E.V., Semenova, A.D., Komarov, D.A., Chertkova, E.A., Slepneva, I.A., Dubovskiy, I.M., 2018. Maintenance of redox balance by antioxidants in hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* larvae during encapsulation response. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 98, e21460.
- Gross, C., Schmidt-Wolf, I.G., Nagaraj, S., Gastpar, R., Ellwart, J., Kunz-Schughart, L.A., Multhoff, G., 2003. Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones* 8, 348-360.
- Grubor-Lajšić, G., Jovanović-Galović, A., Taški, K., Vujović, A., 1997. Superoxide anion generation in larvae and pupae of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hubn. *Acta Entomologica Serbica* 2, 137-140.

Literatura

- Guilhermino, L., Piedade Barros, M.C.S.A., M. V. Soares, A. M. V. M., 1998. Short Communication: Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned. *Biomarkers* 3, 157-163.
- Gunning, R.V., Moores, G.D., 2001. Insensitive Acetylcholinesterase as Sites for Resistance to Organophosphates and Carbamates in Insects: Insensitive Acetylcholinesterase Confers Resistance in Lepidoptera, in: Ishaaya, I. (Ed.), *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 221-238.
- Guo, Y., Wu, K., Huo, X., Xu, X., 2011. International Perspectives: Sources, Distribution, and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Environmental Health* 73, 22-25.
- Guo, Z., Jensen, M.D., Xu, J., Zhou, L., Persson, X.-M.T., Balagopal, P., Yarasheski, K., 2008. Oxidation of intracellular and extracellular fatty acids in skeletal muscle. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 5-15.
- Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences* 86, 377-384.
- Guttman, S.I., 1994. Population genetic structure and ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 102 Suppl 12, 97-100.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.
- Hahn, D.A., Denlinger, D.L., 2007. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *Journal of Insect Physiology* 53, 760-773.
- Hahn, M.E., 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions* 141, 131-160.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5 ed. Oxford University Press, Oxford.
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., John Moody, A., 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.
- Heffner, J.E., Repine, J.E., 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *American Review of Respiratory Disease* 140, 531-554.
- Heidari, R., Devonshire, A.L., Campbell, B.E., Dorrian, S.J., Oakeshott, J.G., Russell, R.J., 2005. Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by in vitro mutagenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 597-609.
- Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C., Ollis, D.L., 1999. Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases. *Structure* 7, R141-146.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 653-665.
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45, 371-391.
- Hendrick, J.P., Hartl, F.U., 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry* 62, 349-384.

Literatura

- Hightower, L.E., 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66, 191-197.
- Hoffmann, A.A., Parsons, P.A., 1991 *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, Oxford
- Holopainen, J., Semiz, G., Blande, J., 2009. Life-history strategies affect aphid preference for yellowing leaves. *Biology letters* 5, 603-605.
- Holtzman, E., 1989. Historical Fragments; Methods; Some Terminology, Lysosomes, pp. 1-24.
- Horne, I., Haritos, V.S., Oakeshott, J.G., 2009. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 547-567.
- Hosokawa, M., Endo, T., Fujisawa, M., Hara, S., Iwata, N., Sato, Y., Satoh, T., 1995. Interindividual variation in carboxylesterase levels in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 23, 1022-1027.
- Hosokawa, M., Furihata, T., Yaginuma, Y., Yamamoto, N., Koyano, N., Fujii, A., Nagahara, Y., Satoh, T., Chiba, K., 2007. Genomic structure and transcriptional regulation of the rat, mouse, and human carboxylesterase genes. *Drug Metabolism Reviews* 39, 1-15.
- Howsam, M., Jones, K.C., Ineson, P., 2000. PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. I — Concentrations and profiles. *Environmental Pollution* 108, 413-424.
- Huang, K.P., Huang, F.L., 2002. Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochemical Pharmacology* 64, 1049-1056.
- Hyne, R.V., Maher, W.A., 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 366-374.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry* 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, Lymantriidae) upon chronic exposure to benzo(a)pyrene. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 20818-20823.
- Imai, T., 2006. Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21, 173-185.
- Izagirre, U., Ruiz, P., Marigómez, I., 2009. Time-course study of the early lysosomal responses to pollutants in mussel digestive cells using acid phosphatase as lysosomal marker enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 587-597.
- Janković-Tomanić, M., 2012. Uticaj temperature i kvaliteta hrane na varijabilnost komponenti adaptivne vrednosti i fiziologiju varenja larvi gubara *Lymantria dispar* L., University of Belgrade, Faculty of Biology, p. 231.
- Janssens, L., Stoks, R., 2018. Rapid larval development under time stress reduces adult life span through increasing oxidative damage. *Functional Ecology* 32, 1036-1045.
- Jensen, P.S., Mrazek, D., Knapp, P.K., Steinberg, L., Pfeffer, C., Schowalter, J., Shapiro, T., 1997. Evolution and Revolution in Child Psychiatry: ADHD as a Disorder of Adaptation. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 36, 1672-1681.

Literatura

- Jett, D., Navoa, R., Lyons, M., 1999. Additive inhibitory action of chlorpyrifos and PAHs on acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicology Letters* 105, 223-229.
- Jiang, D., Yan, S., 2017. Effects of Cd, Zn or Pb stress in *Populus alba berolinensis* on the development and reproduction of *Lymantria dispar*. *Ecotoxicology* 26, 1305-1313.
- Jiang, H., Vilcinskas, A., Kanost, M.R., 2010. Immunity in lepidopteran insects. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 708, 181-204.
- Jouni, Z.E., Zamora, J., Wells, M.A., 2002. Absorption and tissue distribution of cholesterol in *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 49, 167-175.
- Junge, W., Krisch, K., 1975. The carboxylesterases/amidases of mammalian liver and their possible significance. *Critical Reviews in Toxicology* 3, 371-435.
- Lohar, M.K., Wright, D.J., 1993. Changes in the lipid content in haemolymph, fat body and oocytes of malathion treated *Tenebrio molitor* L. adult females. *Pakistan Journal of Zoology* 25, 57-60.
- Kafel, A., Nowak, A., Bembenek, J., Szczygieł, J., Nakonieczny, M., Swiergosz-Kowalewska, R., 2012. The localisation of HSP70 and oxidative stress indices in heads of *Spodoptera exigua* larvae in a cadmium-exposed population. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78, 22-27.
- Kafel, A., Rozpędek, K., Szulińska, E., Zawisza-Raszka, A., Migula, P., 2014. The effects of cadmium or zinc multigenerational exposure on metal tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Science and Pollution Research International* 21, 4705-4715.
- Kang, J.J., Fang, H.W., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 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 Biochemistry* 10, 331-337.
- Keeley, L.L., 1985. Biochemistry and physiology of the insect fat body, in: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon, New York, pp. 211-228.
- Kelly, G.M., Huebner, E., 1989. Embryonic development of the hemipteran insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Morphology* 199, 175-196.
- Kereši, T., Konjević, A., Popović, A., 2019. Posebna entomologija 2. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- King, A.M., MacRae, T.H., 2015. Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. *Annual Review of Entomology* 60, 59-75.
- Knight, P.J., Crickmore, N., Ellar, D.J., 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology* 11, 429-436.
- Koenig, S., Savage, C., Kim, J.P., 2008. Non-destructive assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure by fluorimetric analysis of crab urine. *Marine Pollution Bulletin* 56, 2003-2008.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological Chemistry* 257, 5751-5754.

Literatura

- Kontogiannatos, D., Michail, X., Kourti, A., 2011. Molecular characterization of an ecdysteroid inducible carboxylesterase with GQSCG motif in the corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Journal of Insect Physiology* 57, 1000-1009.
- Kosian, P.A., Makynen, E.A., Monson, P.D., Mount, D.R., Spacie, A., Mekenyan, O.G., Ankley, G.T., 1998. Application of toxicity-based fractionation techniques and structure-activity relationship models for the identification of phototoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment pore water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 1021-1033.
- Krebs, R.A., Feder, M.E., 1997. Natural variation in the expression of the Heat-Shock Protein HSP70 in a population of *Drosophila melanogaster* and its correlation to tolerance of ecologically relevant thermal stress. *Evolution* 51, 173-179.
- Krishnan, N., Kodr k, D., 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *Journal of Insect Physiology* 52, 11-20.
- Ku, T., Yan, W., Jia, W., Yun, Y., Zhu, N., Li, G., Sang, N., 2015. Characterization of synergistic embryotoxicity of nickel and buprofezin in zebrafish. *Environmental Science & Technology* 49, 4600-4608.
- Kummerová, M., Kmentov, E., 2004. Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere* 56, 387-393.
- Kummerová, M., Krulov, J., Zezulka,  ., Triska, J., 2006. Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. *Chemosphere* 65, 489-496.
- Kummerová, M., Vnov, L., Krulov, J., Zezulka,  ., 2008. The use of physiological characteristics for comparison of organic compounds phytotoxicity. *Chemosphere* 71, 2050-2059.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3, 193-208.
- Lai, T., He, B., Fan, H., Zhou, R., Yang, Y., 2011. Effects of cadmium stress on the activities of antioxidant enzymes, digestive enzymes and the membrane lipid peroxidation of the mangrove mud clam *Geloina coaxans* (Gmelin). *Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica* 31, 3044-3053.
- Lance, D.R., 1983. Host-seeking behavior of the gypsy moth: the influence of polyphagy and highly apparent host plants, in: S., A. (Ed.), *Herbivorous Insects: Host-seeking Behavior and Mechanisms*, Academic Press, New York, pp. 210-224.
- Lavaras, S., Pollero, R.J., Heras, H., 2006. Activation of lipid catabolism by the water-soluble fraction of petroleum in the crustacean *Macrobrachium borellii*. *Aquatic Toxicology* 77, 190-196.
- Lazarevi, J., Perc-Mataruga, V., 2003. Nutritive stress effects on growth and digestive physiology of *Lymantria dispar* larvae. *Jugoslavenska medicinska biohemija* 22, 53-59.
- Lazarevi, J., Perc-Mataruga, V., Stojkovi, B., Tuci, N., 2002. Adaptation of the gypsy moth to an unsuitable host plant. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 102, 75-86.
- Lee, C.-Y., Umphrey, H.R., Douglas Watson, R., 1996. Developmental Changes in the Level of Vitellin-immunoreactive Proteins in Hemolymph and Tissues of the Blue Crab *Callinectes sapidus*: Relation to Vitellogenesis. *Journal of Crustacean Biology* 16, 1-9.

Literatura

- 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.
- Lei, A.-p., Wong, Y.-s., Tam, N.F.-y., 2003. Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species. *Chemosphere* 50, 293-301.
- Liebhold, A.M., Gottschalk, K.W., Muzika, R.M., Montgomery, M.E., Young, R., O'Day, K., Kelly, B., 1995. Suitability of North American tree species to gypsy moth: a summary of field and laboratory tests. General Technical Report NE-211. USDA Forest Service, Randor, PA, 1-34.
- Leonard, D.E., 1968. Diapause in the Gypsy Moth. *Journal of Economic Entomology* 61, 596-598.
- Leonard, D.E., 1974. Recent Developments in Ecology and Control of the Gypsy Moth. *Annual Review of Entomology* 19, 197-229.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* 68, 253-278.
- Li, X., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology* 52, 231-253.
- Lindquist, S., 1986. The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry* 55, 1151-1191.
- Liu, F., Lu, Z., Wu, H., Ji, C., 2019. Dose-dependent effects induced by cadmium in polychaete *Perinereis aibuhitensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169, 714-721.
- Lomate, P.R., Hivrale, V.K., 2010. Partial purification and characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) active aminopeptidase secreted in midgut. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 155, 164-170.
- 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 Interactions* 5, 359-368.
- Lomate, P.R., Jadhav, B.R., Giri, A.P., Hivrale, V.K., 2013. Alterations in the *Helicoverpa armigera* Midgut Digestive Physiology after Ingestion of Pigeon Pea Inducible Leucine Aminopeptidase. *PLOS ONE* 8, e74889.
- López-Rodríguez, M.J., Trenzado, C.E., Tierno de Figueroa, J.M., Sanz, A., 2012. Digestive enzyme activity and trophic behavior in two predator aquatic insects (Plecoptera, Perlidae): a comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 162, 31-35.
- 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. *Aquatic Toxicology* 1, 213-226.
- Loxdale, H.D., Castañera, 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). *Bulletin of Entomological Research* 73, 645-657.
- Lukasik, I., Golawska, S., 2007. Activity of Se-independent glutathione peroxidase and glutathione reductase within cereal aphid tissues. *Biological Letters* 44, 31-39.

Literatura

- Luo, S., Ahola, V., Shu, C., Xu, C., Wang, R., 2015. Heat shock protein 70 gene family in the Glanville fritillary butterfly and their response to thermal stress. *Gene* 556, 132-141.
- Lv, M., Wu, W., Liu, H., 2014. Effects of Fraxinellone on the midgut enzyme activities of the 5th Instar Larvae of Oriental Armyworm, *Mythimna separata* Walker. *Toxins (Basel)* 6, 2708-2718.
- Mahroof, R., Yan Zhu, K., Neven, L., Subramanyam, B., Bai, J., 2005. Expression patterns of three heat shock protein 70 genes among developmental stages of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 141, 247-256.
- Main, A.R., Miles, K.E., Braid, P.E., 1961. The determination of human-serum-cholinesterase activity with o-nitrophenyl butyrate. *Biochemical Journal* 78, 769-776.
- Mandal, D., Chaudhuri, D.K., 1992. Studies on carbohydrate, protein and lipid levels in normal and stress conditions in fat body and integument as compared to whole body during development of rice moth, *Corcyra cephalonica* (St.). *Insect Science and Its Application* 13, 121-128.
- Marrs, K.A., 1996. The Functions and Regulations of Glutathione S-Transferases in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 127-158.
- Martinez-Tabche, L., Mora, B.R., Faz, C.G., Castelan, I.G., Ortiz, M.M., Gonzalez, V.U., Flores, M.O., 1997. Toxic effect of sodium dodecylbenzenesulfonate, lead, petroleum, and their mixtures on the activity of acetylcholinesterase of *Moina macrocopa* in vitro. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12, 211-215.
- Massa, R., Blevins, S., Chao, S.L., 2008. Role of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase following exposure to nicosulfuron and diazinon in *Helicoverpa zea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 230-235.
- Matić, D., Vlahović, M., Kolarević, S., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vuković Gačić, B., 2016. Genotoxic effects of cadmium and influence on fitness components of *Lymantria dispar* caterpillars. *Environmental Pollution* 218, 1270-1277.
- Maton, A., 1993. Human biology and health. 1st ed. Englewood Cliffs, N.J. Prentice Hall.
- Matsuda, H., Yamada, T., Yoshida, M., Nishimura, T., 2015. Flies without trehalose. *Journal of Biological Chemistry* 290, 1244-1255.
- Maxwell, D.M., 1992. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114, 306-312.
- Meister, A., 1994. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *Journal of Biological Chemistry* 269, 9397-9400.
- Mekenyan, O.G., Ankley, G.T., Veith, G.D., Call, D.J., 1994. QSARs for photoinduced toxicity: I. Acute lethality of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 28, 567-582.
- Mellor, P.S., 1997. The biology of disease vectors. Edited by Barry J. Beaty and William C. Maquardt (Colorado, University Press of Colorado, 1996). pp. 632.
- Miao, Y.-G., 2002. Studies on the activity of the alkaline phosphatase in the midgut of infected silkworm, *Bombyx mori* L. *Journal of Applied Entomology* 126, 138-142.
- Miller, K.P., Ramos, K.S., 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metabolism Reviews* 33, 1-35.

Literatura

- Mirčić, D., Blagojević, D., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Lazarević, J., 2013. Cadmium effects on the fitness-related traits and antioxidative defense of *Lymantria dispar* L. larvae. *Environmental Science and Pollution Research International* 20, 209-218.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 247, 3170-3175.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58, 459-481.
- Monson, P.D., Ankley, G.T., Kosian, P.A., 1995. Phototoxic response of *Lumbriculus variegatus* to sediments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 891-894.
- Montella, I.R., Schama, R., Valle, D., 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107, 437-449.
- Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell and Tissue Research* 175, 279-287.
- Morales, M., Planelló, R., Martínez-Paz, P., Herrero, O., Cortés, E., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2011. Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153, 150-158.
- Moreira, S.M., Guilhermino, L., 2005. The Use of *Mytilus galloprovincialis* Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferases Activities as Biomarkers of Environmental Contamination Along the Northwest Portuguese Coast. *Environmental Monitoring and Assessment* 105, 309-325.
- Motoyama, N., Dauterman, W., 1975. Interstrain comparison of glutathione-dependent reactions in susceptible and resistant houseflyTM *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5, 489-495.
- 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.
- 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). *Environmental Science and Pollution Research* 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

Literatura

- differently adapted populations to allelochemical stress: Effects of tannic acid. *European Journal of Entomology* 110, 55-63.
- Mullins, D.E., 1985. Chemistry and physiology of the hemolymph, in: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Pergamon Press, Oxford, pp. 355-400.
- Myers, M., Richmond, R.C., Oakeshott, J.G., 1988. On the origins of esterases. *Molecular Biology and Evolution* 5, 113-119.
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubèze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 901-908.
- Nam, T.H., Jeon, H.J., Mo, H.H., Cho, K., Ok, Y.S., Lee, S.E., 2015. Determination of biomarkers for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) toxicity to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Geochemistry and Health* 37, 943-951.
- Napoleão, T.H., Pontual, E.V., de Albuquerque Lima, T., de Lima Santos, N.D., Sá, R.A., Coelho, L.C., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., Paiva, P.M., 2012. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology Research* 110, 609-616.
- Naqvi, S.N., Ashrafi, S.H., Qadri, M.A., 1968. Acid phosphatase activity in the digestive system of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Australian Journal of Biological Sciences* 21, 1047-1052.
- Nathan, S.S., Chung, P.G., Murugan, K., 2004. Effect of botanical insecticides and bacterial toxins on the gut enzyme of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis*. *Phytoparasitica* 32, 433.
- Nathan, S.S., Kalaivani, K., Murugan, K., 2005. Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica* 96, 47-55.
- Naumoff, D.G., 2001. β -Fructosidase superfamily: Homology with some α -L-arabinases and β -D-xylosidases. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 42, 66-76.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th edition ed. W. H. Freeman.
- Nemec, V., Socha, R., 1988. Phosphatases and pteridines in malpighian tubules: a possible marker of mosaic mutant in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhoridae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 85, 321-326.
- Neven, L.G., 2000. Physiological responses of insects to heat. *Postharvest Biology and Technology* 21, 103-111.
- Newsted, J.L., Giesy, J.P., 1987. Predictive models for photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*, Strauss (Cladocera, Crustacea). *Environmental Toxicology and Chemistry* 6, 445-461.
- Nousiainen, U., Törrönen, R., Hänninen, O., 1984. Differential induction of various carboxylesterases by certain polycyclic aromatic hydrocarbons in the rat. *Toxicology* 32, 243-251.
- Nylin, S., Gotthard, K., 1998. Plasticity in Life-History Traits. *Annual Review of Entomology* 43, 63-83.
- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Russell, R.J., Robin, G.C., 1999. Carboxyl/cholinesterases: a case study of the evolution of a successful multigene family. *Bioessays* 21, 1031-1042.

Literatura

- OECD, Guidelines for the Testing of Chemicals. Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure. Adopted: 26 July 2013.
- Oguntimehin, I., Nakatani, N., Sakugawa, H., 2008. Phytotoxicities of fluoranthene and phenanthrene deposited on needle surfaces of the evergreen conifer, Japanese red pine (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.). *Environmental Pollution* 154, 264-271.
- Ojeda-Avila, T., Woods, H., Raguso, R., 2003. Effects of dietary variation on growth, composition, and maturation of *Manduca sexta* (Sphingidae: Lepidoptera). *Journal of Insect Physiology* 49, 293-306.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., et al., 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Engineering* 5, 197-211.
- Ortel, J., 1991. Effects of lead and cadmium on chemical composition and total water content of the pupal parasitoid, *Pimpla turionellae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 59, 93-100.
- Palmqvist, A., Selck, H., Rasmussen, L.J., Forbes, V.E., 2003. Biotransformation and genotoxicity of fluoranthene in the deposit-feeding polychaete *Capitella* sp. I. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2977-2985.
- 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*. *Environmental Pollution* 141, 443-451.
- Parsell, D.A., Lindquist, S., 1994. Heat Shock Proteins and Stress Tolerance. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones, 457-494. Morimoto, R.I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Patankar, A.G., Giri, A.P., Harsulkar, A.M., Sainani, M.N., Deshpande, V.V., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S., 2001. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 453-464.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 32, 225-231.
- Peakall, D., 1992. The role of biomarkers in environmental assessment, in: Peakall, D. (Ed.), *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 201-226.
- Perić-Mataruga, V., Vlahović, M., Mrdaković, M., Matić, D., Gavrilović, A., Mrkonja, A., Ilijin, L., 2015. Ghrelin effects on midgut tissue antioxidative defense and glutathione S-transferase activity in *Lymantria dispar* (Lepidoptera). *Turkish Journal of Biology* 39, 618-623.
- Perić-Mataruga, V., Blagojević, D., Spasić, M.B., Ivanović, J., Janković-Hladni, M., 1997. Effect of the Host Plant on the Antioxidative Defence in the Midgut of *Lymantria dispar* L. Caterpillars of Different Population Origins. *Journal of Insect Physiology* 43, 101-106.
- Pflugmacher, S., Schröder, P., Sandermann, H., 2000. Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 54, 267-273.
- Pichon, Y., 1974. Chapter 2 – The pharmacology of the insect nervous system, in: Rockstein, M. (Ed.), *The Physiology of Insecta* (Second Edition), Academic Press, pp. 101-174.
- Piskorski, R., Ineichen, S., Dorn, S., 2011. Ability of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) to detoxify juglone, the main secondary metabolite of the non-host plant walnut. *Journal of Chemical Ecology* 37, 1110-1116.

Literatura

- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F., 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* 66, 1499-1503.
- 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. *Journal of Virology* 77, 10725-10729.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P., 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 540-551.
- Pritsos, C.A., Ahmad, S., Bowen, S.M., Elliott, A.J., Blomquist, G.J., Pardini, R.S., 1988. Antioxidant enzymes of the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes*, and their response to the prooxidant allelochemical, quercetin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 8, 101-112.
- Pushparajah, D.S., Umachandran, M., Nazir, T., Plant, K.E., Plant, N., Lewis, D.F., Ioannides, C., 2008. Up-regulation of CYP1A/B in rat lung and liver, and human liver precision-cut slices by a series of polycyclic aromatic hydrocarbons; association with the Ah locus and importance of molecular size. *Toxicology In Vitro* 22, 128-145.
- Qu, Y., Xiao, D., Li, J., Chen, Z., Biondi, A., Desneux, N., Gao, X., Song, D., 2015. Sublethal and hormesis effects of imidacloprid on the soybean aphid *Aphis glycines*. *Ecotoxicology* 24, 479-487.
- Radwan, Z.A., Shaurub, E.H., 1995. Sublethal effect of Cypermethrin on certain biochemical aspects in the developmental stages of the blowfly *Chrysomia albiceps* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae). *Journal of the Egyptian-German Society of Zoology* 16, 535-553.
- Rambabu, J.P., Rao, M.B., 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Muller). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology (USA)* 53, 142-148.
- 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. *Aquatic Toxicology* 93, 61-69.
- Rice, J.E., Hosted, T.J., Lavoie, E.J., 1984. Fluoranthene and pyrene enhance benzo[a]pyrene—DNA adduct formation in vivo in mouse skin. *Cancer Letters* 24, 327-333.
- Rodrigues, A.P., Lehtonen, K.K., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2013. Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: Accumulation and multibiomarker responses. *Science of The Total Environment* 443, 454-463.
- Roff, D., 2001. Life History, Evolution of, in: Levin, S.A. (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)*, Academic Press, Waltham, pp. 631-641.
- Roslavtseva, S.A., Eremina, O., Bakanova, E.I., Poliakova Iu, B., 1993. The enzyme systems in natural populations of the housefly *Musca domestica* highly resistant to organophosphate insecticides. *Izvestiya Akademii Nauk Azerbajdzhanskoj SSR. Serija Biologiceskih Nauk*, 722-731.
- Russell, R.J., Scott, C., Jackson, C.J., Pandey, R., Pandey, G., Taylor, M.C., Coppin, C.W., Liu, J.-W., Oakeshott, J.G., 2011. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications* 4, 225-248.
- Rybczynski, R., Gilbert, L.I., 1995. Prothoracicotropic hormone elicits a rapid, developmentally specific synthesis of beta tubulin in an insect endocrine gland. *Developmental Biology* 169, 15-28.

Literatura

- 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). *Belgian Journal of Zoology* 136, 53-58.
- Sakharov, I.Y., Makarova, I.E., Ermolin, G.A., 1989. Chemical modification and composition of tetrameric isozyme K of alkaline phosphatase from harp seal intestinal mucosa. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 92, 119-122.
- Sanchez-Hernandez, J.C., 2011. Pesticide Biomarkers in Terrestrial Invertebrates in: Stoytcheva, M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, InTech, pp. 213–240.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Fernández, C., Andreu, E., 1998. Liver Energy Metabolism of *Anguilla anguilla* after Exposure to Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 168-175.
- Sanders, B.M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Critical Reviews in Toxicology* 23, 49-75.
- Sarate, P.J., Tamhane, V.A., Kotkar, H.M., Ratnakaran, N., Susan, N., Gupta, V.S., Giri, A.P., 2012. Developmental and digestive flexibilities in the midgut of a polyphagous pest, the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Science* 12.
- Satoh, T., Hosokawa, M., 1995. Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. *Toxicology Letters* 82-83, 439-445.
- Satoh, T., Hosokawa, M., 1998. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38, 257-288.
- Satoh, T., Hosokawa, M., 2006. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions* 162, 195-211.
- Saunders, C.R., Shockley, D.C., Knuckles, M.E., 2003. Fluoranthene-induced neurobehavioral toxicity in F-344 rats. *International Journal of Toxicology* 22, 263-276.
- Schuler, L.J., Landrum, P.F., Lydy, M.J., 2007. Response spectrum of pentachlorobenzene and fluoranthene for *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1248-1257.
- Nathan, S.S., Young Choi, M., Yul Seo, H., Hoon Paik, C., Kalaivani, K., Duk Kim, J., 2008. Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 244-250.
- Šepić, E., Bricelj, M., Leskovsek, H., 2003. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. *Chemosphere* 52, 1125-1133.
- Shakoori, A.R., Fayyaz, M., Saleem, M.A., 1988. Biochemical changes induced by Fenprothrin in the sixth instar larvae of *Tribolium castaneum* Herbert (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 24, 215-220.
- Sharma, S.R.K., Thomas, S., 2007. Hemolymph acid phosphatase activity in the green mussel (*Perna viridis*, Linnaeus, 1758) exposed to copper and mercury. *Journal of the Marine Biological Association of India* 49.
- Shi, Z., Wen, M., Zhang, J., Tang, Z., Wang, C., 2020. Effect of phenanthrene on the biological characteristics of earthworm casts and their relationships with digestive and anti-oxidative systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 193, 110359.

Literatura

- Siegel, S., Castellan, J.N., 1988. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. 2 ed. McGraw-Hill, New York.
- Silva, T.R.F.B., Almeida, A.C.d.S., Moura, T.d.L., Silva, A.R.d., Freitas, S.d.S., Jesus, F.G., 2016. Effect of the flavonoid rutin on the biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Acta Scientiarum. Agronomy 38.
- Simpson, S.J., Simpson, C.L., 1990. The mechanisms of compensation by phytophagous insects, in: Bernays, E.A. (Ed.), Insect-plant interactions, CRC Press, Florida, Boca Raton, pp. 111-160.
- Singh, A.K., Lakhota, S.C., 2000. Tissue-specific variations in the induction of Hsp70 and Hsp64 by heat shock in insects. Cell Stress & Chaperones 5, 90-97.
- Singh, S.P., Coronella, J.A., Benes, H., Cochrane, B.J., Zimniak, P., 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. European Journal of Biochemistry 268, 2912-2923.
- Slansky, F.J., 1993. Nutritional ecology: the fundamental quest for nutrients, in: Stamp, N.E., Casey, T.M. (Eds.), Caterpillars: ecological and evolutionary constraints on foraging, Chapman and Hall, New York.
- Smallman, B.N., Mansingh, A., 1969. The cholinergic system in insect development. Annual Review of Entomology 14, 387-408.
- Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicology Letters 128, 215-228.
- Sokal, R.S., Rohlf, F.J., 1981. Biometry. Freeman, San Francisco. pp. 937.
- Sridhara, S., Bhat, J.V., 1963. Alkaline and acid phosphatases of the silkworm, *Bombyx mori* L. Journal of Insect Physiology 9, 693-701.
- Srinivasan, A., Giri, A.P., Gupta, V.S., 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. Cellular & Molecular Biology Letters 11, 132-154.
- Srivastava, J.P., Saxena, S.C., 1967. On the Alkaline and Acid Phosphatase in the Alimentary Tract of *Periplaneta americana* L. (Blattaria : Blattidae). Applied Entomology and Zoology 2, 85-92.
- Srogi, K., 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. Environmental Chemistry Letters 5, 169-195.
- Stearns, S., 1992. The evolution of life histories. Oxford Univ. Press., Oxford.
- Stenersen, J., 2004. Chemical pesticides : mode of action and toxicology. Boca Raton : CRC Press.
- Stockhoff, B.A., 1991. Starvation resistance of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae): tradeoffs among growth, body size, and survival. Oecologia 88, 422-429.
- Stockhoff, B.A., 1993. Ontogenetic change in dietary selection for protein and lipid by gypsy moth larvae. Journal of Insect Physiology 39, 677-686.
- Stone, D., Jepson, P., Laskowski, R., 2002. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 132, 105-112.
- Stoyenoff, J.L., Witter, J.A., Montgomery, M.E., 1994. Nutritional indices in the gypsy moth (*Lymantria dispar* (L.)) under field conditions and host switching situations. Oecologia 97, 158-170.

Literatura

- Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., Hawkes, N.J., Lumjuan, N., Nelson, D.R., Drane, D.R., Karunaratne, S.H., Hemingway, J., Black, W.C.T., Ranson, H., 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 113-123.
- Subramaniam, G., Ang, K., Ng, S.B., Buss, A., Butler, M., 2009. A benzopyrroloisoquinoline alkaloid from *Ficus fistulosa*. *Phytochemistry Letters* 2, 88-90.
- Sun, K., Song, Y., Liu, Z., Jing, M., Wan, J., Tang, J., Liu, R., 2020. Toxicity assessment of Fluoranthene, Benz(a)anthracene and its mixed pollution in soil: Studies at the molecular and animal levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 202, 110864.
- Swartz, R.C., Ferraro, S.P., Lamberson, J.O., Cole, F.A., Ozretich, R.J., Boese, B.L., Schults, D.W., Behrenfeld, M., Ankley, G.T., 1997. Photoactivation and toxicity of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in marine sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2151-2157.
- Swartz, R.C., Schults, D.W., Ditsworth, G.R., Lamberson, J.O., Dewitt, T.H., 1990. Toxicity of fluoranthene in sediment to marine amphipods: A test of the equilibrium partitioning approach to sediment quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 1071-1080.
- Swartz, R.C., Schults, D.W., Ozretich, R.J., Lamberson, J.O., Cole, F.A., Ferraro, S.P., Dewitt, T.H., Redmond, M.S., 1995. ΣPAH: A Model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 1977-1987.
- 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). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14, 187-194.
- Tammariello, S., Rinehart, J., Denlinger, D., 1999. Desiccation elicits heat shock protein transcription in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but does not enhance tolerance to high or low temperatures. *Journal of Insect Physiology* 45, 933-938.
- Tamaru, T., Esperk, T., 2007. Growth allometry of immature insects: larvae do not grow exponentially. *Functional Ecology* 21, 1099-1105.
- Tandoğan, B., Ulus, N., 2006. Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences* 31, 230-236.
- Tapia, H., Koshland, D.E., 2014. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance. *Current Biology* 24, 2758-2766.
- Tarrant, A.M., Reitzel, A.M., Kwok, C.K., Jenny, M.J., 2014. Activation of the cnidarian oxidative stress response by ultraviolet radiation, polycyclic aromatic hydrocarbons and crude oil. *Journal of Experimental Biology* 217, 1444-1453.
- Taylor, A., 1993. Aminopeptidases: structure and function. *The FASEB Journal* 7, 290-298.
- Taylor, P., Radić, Z., 1994. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34, 281-320.
- Terra, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 47-61.
- Terra, W.R., 2005. Biochemistry of digestion. *Comprehensive molecular insect science*, 171-224.

Literatura

- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 109, 1-62.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 2012. 11 - Biochemistry and Molecular Biology of Digestion, in: Gilbert, L.I. (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, Academic Press, San Diego, pp. 365-418.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Baker, J.E., 1996. Compartmentalization of digestion. In: *Biology of the Insect Midgut*, pp. 206-235.
- Testa, B., Krämer, S.D., 2007. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 3. Reactions of hydrolysis and their enzymes. *Chemistry & Biodiversity* 4, 2031-2122.
- Thompson, H.M., 1999. Esterases as Markers of Exposure to Organophosphates and Carbamates. *Ecotoxicology* 8, 369-384.
- Thompson, S.N., 2003. Trehalose – The Insect ‘Blood’ Sugar. *Advances in Insect Physiology* 31, 205-285.
- Tierno de Figueroa, J.M., Trenzado, C.E., López-Rodríguez, M.J., Sanz, A., 2011. Digestive enzyme activity of two stonefly species (Insecta, Plecoptera) and their feeding habits. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 160, 426-430.
- Tomar, R.S., Jajoo, A., 2014. Fluoranthene, a polycyclic aromatic hydrocarbon, inhibits light as well as dark reactions of photosynthesis in wheat (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 109, 110-115.
- Tôru, A., 1994. Superoxide generation *in vitro* in lepidopteran larval haemolymph. *Journal of Insect Physiology* 40, 165-171.
- Tôru, A., 1995. Superoxide generative reaction in insect haemolymph and its mimic model system with surfactants *in vitro*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25, 247-253.
- Tsvetkov, I.L., Popov, A.P., Konichev, A.S., 2003. Acid phosphatase complex from the freshwater snail *Viviparus viviparus* L. under standard conditions and intoxication by cadmium ions. *Biochemistry (Mosc)* 68, 1327-1334.
- Valaitis, A.P., 1995. Gypsy moth midgut proteinases: Purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush border membrane leucine aminopeptidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25, 139-149.
- Van der Hoeven, N., 2010. Is it safe to pool the blank control data with the solvent control data? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1480-1483.
- Van Hoof, D., Rodenburg, K.W., Van der Horst, D.J., 2005. Receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking of lipoproteins and transferrin in insect cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 117-128.
- Van Straalen, N.M., Hoffmann, A.A., 2000. Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants, in: Kammenga, J.E., Laskowski, R. (Eds.), *Demography in Ecotoxicology*, John Wiley and Sons, Chichester, pp. 147-161.
- Velki, M., Hackenberger, B.K., 2012. Species-specific differences in biomarker responses in two ecologically different earthworms exposed to the insecticide dimethoate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 156, 104-112.
- 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

Literatura

- in the Midge Larvae of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). *Neotropical Entomology* 46, 658-665.
- Vignet, C., Le Menach, K., Mazurais, D., Lucas, J., Perrichon, P., Le Bihanic, F., Devier, M.H., Lyphout, L., Frère, L., Bégout, M.L., Zambonino-Infante, J.L., Budzinski, H., Cousin, X., 2014. Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish--part I: Survival and growth. *Environmental Science and Pollution Research International* 21, 13804-13817.
- Vijayavel, K., Anbuselvam, C., Balasubramanian, M.P., Samuel, V.D., Gopalakrishnan, S., 2006. Assessment of biochemical components and enzyme activities in the estuarine crab *Scylla tranquebarica* from naphthalene contaminated habitats. *Ecotoxicology* 15, 469-476.
- Vijayavel, K., Balasubramanian, M.P., 2006. Changes in oxygen consumption and respiratory enzymes as stress indicators in an estuarine edible crab *Scylla serrata* exposed to naphthalene. *Chemosphere* 63, 1523-1531.
- Viktor Janda Jr., J.B., 1991. Changes in the activity of phosphomonoesterases in relation to growth and metamorphosis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Acta entomologica Bohemoslovaca* 88, 13-24.
- Vlahović, M., Ilijin, L., Lazarević, J., Mrdaković, M., Gavrilović, A., Matić, D., Perić-Mataruga, V., 2014. Cadmium-induced changes of gypsy moth larval mass and protease activity. *Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 160, 9-14.
- Vlahović, M., Ilijin, L., Mrdaković, M., Gavrilović, A., Matić, D., Lazarević, J., Perić-Mataruga, V., 2015. Alteration of the Activities of Trypsin and Leucine Aminopeptidase in Gypsy Moth Caterpillars Exposed to Dietary Cadmium. *Water, Air, & Soil Pollution* 226, 387.
- 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1148-1155.
- Vlahović, M., Perić-Mataruga, V., Mrdaković, M., Matić, D., Lazarević, J., Nenadović, V., Ilijin, L., 2013. Enzymatic biomarkers as indicators of dietary cadmium in gypsy moth caterpillars. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 3447-3455.
- Vlahović, M.S., Perić-Mataruga, V.D., Lazarević, J.M., Mrdaković, M.M., Matić, D.R., Todorović, D.D., Ilijin, L.A., 2015. Response of α -glucosidase in gypsy moth larvae to acute and chronic dietary cadmium. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 50, 285-292.
- Wang, J.S., Busby, W.F., Jr., 1993. Induction of lung and liver tumors by fluoranthene in a preweanling CD-1 mouse bioassay. *Carcinogenesis* 14, 1871-1874.
- Wang, S., Sheng, Y., Feng, M., Leszczynski, J., Wang, L., Tachikawa, H., Yu, H., 2007. Light-induced cytotoxicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons on the US EPA priority pollutant list in human skin HaCaT keratinocytes: relationship between phototoxicity and excited state properties. *Environmental Toxicology* 22, 318-327.
- Wang, Y., Oberley, L.W., Murhammer, D.W., 2001. Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 1448-1455.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Hussain, B., Buhroo, A.A., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C., 2013. Effect of plant secondary metabolites on legume pod borer, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Pest Science* 86, 399-408.

Literatura

- Warchałowska-Sliwa, E., Niklińska, M., Görlich, A., Michailova, P., Pyza, E., 2005. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environmental Pollution* 133, 373-381.
- Wei, H., Tan, S., Li, Z., Li, J., Moural, T.W., Zhu, F., Liu, X., 2021. Odorant degrading carboxylesterases modulate foraging and mating behaviors of *Grapholita molesta*. *Chemosphere* 270, 128647.
- Werner, I., Nagel, R., 1997. Stress proteins HSP60 and HSP70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2393-2403.
- Wernersson, A.S., Dave, G., 1998. Effects of different protective agents on the phototoxicity of fluoranthene to *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 120, 373-381.
- Wheelock, C., Shan, G.M., Ottea, J., 2005. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *Journal of Pesticide Science – Journal of Pesticide Science* 30, 75-83.
- Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D., 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 195, 117-178.
- Willett, K.L., Lienesch, L.A., Di Giulio, R.T., 2001. No detectable DNA excision repair in UV-exposed hepatocytes from two catfish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 128, 349-358.
- Willett, K.L., Randerath, K., Zhou, G.-D., Safe, S.H., 1998. Inhibition of CYP1A1-Dependent Activity by the Polynuclear Aromatic Hydrocarbon (PAH) Fluoranthene. *Biochemical Pharmacology* 55, 831-839.
- Wittig, R., Ballach, H.J., Kuhn, A., 2003. Exposure of the roots of *Populus nigra* L. cv. Loenen to PAHs and its effect on growth and water balance. *Environmental Science and Pollution Research International* 10, 235-244.
- Wyatt, G.R., 1967. The Biochemistry of Sugars and Polysaccharides in Insects. *Advances in Insect Physiology* 4, 287-360.
- Wyatt, G.R., Kale, G.F., 1957. The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrates. *Journal of General Physiology* 40, 833-847.
- Yamaguchi, K., Near, R., Shneider, A., Cui, H., Ju, S.T., Sherr, D.H., 1996. Fluoranthene-induced apoptosis in murine T cell hybridomas is independent of the aromatic hydrocarbon receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* 139, 144-152.
- Yan, Y., Peng, L., Liu, W.-X., Wan, F.-H., Harris, M.K., 2011. Host plant effects on alkaline phosphatase activity in the whiteflies, *Bemisia tabaci* Biotype B and *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Insect Science* 11.
- Yao, J., Buschman, L.L., Oppert, B., Khajuria, C., Zhu, K.Y., 2012. Characterization of cDNAs Encoding Serine Proteases and Their Transcriptional Responses to Cry1Ab Protoxin in the Gut of *Ostrinia nubilalis* Larvae. *PLOS ONE* 7, e44090.
- Yap, C.K., Chong, C.M., Tan, S.G., 2011. Allozyme polymorphisms in horseshoe crabs, *Carcinoscorpius rotundicauda*, collected from polluted and unpolluted intertidal areas in Peninsular Malaysia. *Environmental Monitoring and Assessment* 174, 389-400.

Literatura

- Yazdani, M., 2020. Comparative toxicity of selected PAHs in rainbow trout hepatocytes: genotoxicity, oxidative stress and cytotoxicity. *Drug and Chemical Toxicology* 43, 71-78.
- 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). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 46, 152-163.
- Yocum, G.D., Joplin, K.H., Denlinger, D.L., 1991. Expression of heat shock proteins in response to high and low temperature extremes in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 18, 239-249.
- Yu, H., Xia, Q., Yan, J., Herreno-Saenz, D., Wu, Y.-S., Tang, I.W., Fu, P.P., 2006. Photoirradiation of polycyclic aromatic hydrocarbons with UVA light - a pathway leading to the generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and dna damage. *International Journal of Environmental Research Public Health* 3, 348-354.
- Yu, S.J., 2008. Detoxification Mechanisms in Insects, in: Capinera, J.L. (Ed.), *Encyclopedia of Entomology*, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1187-1201.
- Zeidler, M., 2000. Electrophoretic analysis of plant isozymes. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium, Biologica* 38.
- Zhang, Y.E., Ma, H.J., Feng, D.D., Lai, X.F., Chen, Z.M., Xu, M.Y., Yu, Q.Y., Zhang, Z., 2012. Induction of detoxification enzymes by quercetin in the silkworm. *Journal of Economic Entomology* 105, 1034-1042.
- Zhao, L., Jones, W., 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress response. *Invertebrate Survival Journal* 9, 93-101.
- Zhu, Q., He, Y., Yao, J., Liu, Y., Tao, L., Huang, Q., 2012. Effects of sublethal concentrations of the chitin synthesis inhibitor, hexaflumuron, on the development and hemolymph physiology of the cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Science* 12, 27-27.
- Zhu, Y.C., Guo, Z., Chen, M.S., Zhu, K.Y., Liu, X.F., Scheffler, B., 2011. Major putative pesticide receptors, detoxification enzymes, and transcriptional profile of the midgut of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 106, 296-307.
- 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). *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* 135, 545-561.
- Zou, C., Wang, Y., Zou, H., Ding, N., Geng, N., Cao, C., Zhang, G., 2019. Sanguinarine in *Chelidonium majus* induced antifeeding and larval lethality by suppressing food intake and digestive enzymes in *Lymantria dispar*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 153, 9-16.

Biografija

Aleksandra Z. Filipović (devojačko prezime Mrkonja) rođena je 27.04.1985. u Trebinju. Osnovnu školu i Gimnaziju „Jovan Dučić“ završila je u Trebinju. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Hemija, upisala je 2003. godine. Diplomski rad pod naslovom “Izolovanje i identifikacija diarilheptanoida Platifilozida i Acerozida VIII iz biljne vrste *Alnus viridis* subsp. *viridis*”, uradila je u laboratorijama Katedre za organsku hemiju, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Centra za hemiju IHTM-a. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija, upisala je 2013. 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 stekla je 2015. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je pod mentorstvom dr Marije Mrdaković, naučnog savetnika sa Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković”, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Do danas je objavila 16 naučnih radova u međunarodnim časopisima, jedno kongresno saopštenje na međunarodnim skupovima i četiri kongresna saopštenja na domaćim skupovima.