

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena P. Gavrić

**BIOMARKERI OKSIDACIONOG STRESA
I KONCENTRACIJA METALA U
ODABRANIM TKIVIMA BELOUŠKE
(*Natrix natrix*) I RIBARICE (*Natrix
tessellata*) SA PODRUČJA OBEDSKE
BARE I PANČEVAČKOG RITA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena P. Gavrić

**OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS AND
METAL CONCENTRATIONS IN
SELECTED TISSUES OF GRASS SNAKE
(*Natrix natrix*) AND DICE SNAKE (*Natrix
tessellata*) FROM OBEDSKA BARA AND
PANČEVAČKI RIT LOCALITIES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTORI:

Dr Slađan Pavlović, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša
Stanković”, Univerzitet u Beogradu

Dr Siniša Đurašević, vanredni profesor,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI

Dr Nebojša Jasnić, docent,

KOMISIJE:

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Zorica S. Saičić, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša
Stanković”, Univerzitet u Beogradu

Dr Ljiljana Tomović, vanredni profesor,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

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

Dr Slađanu Pavloviću, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, mentoru, na izboru teme, korisnim savetima i sugestijama, uloženom trudu i pomoći tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije.

Dr Siniši Đuraševiću, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentoru, na savetima i sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije, kao i na velikoj podršci tokom njene realizacije.

Dr Nebojši Jasniću, docentu Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na stručnoj pomoći, dragocenim savetima i sugestijama prilikom pregleda doktorske disertacije.

Dr Zorici S. Saičić, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, što mi je pružila šansu da zakoračim u svet nauke i ostvarim svoj san. Zahvaljujem joj se na vremenu, dugim i korisnim razgovorima i savetima koji su mi pomogli tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Podrškom i pozitivnom energijom pokazala mi je da ni jedna prepreka nije nesavladiva, a da se upornošću i voljom stiže do cilja. Čast mi je, zadovoljstvo i privilegija što sam deo njenog naučno istraživačkog tima.

Dr Branki Ognjanović, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu za ukazano poverenje i nesebičnu pomoć i korisnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Dr Ljiljani Tomović, vanrednom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na velikoj pomoći prilikom realizovanaja terenskih istraživanja i prikupljanja

materijala za eksperimentalnu obradu, kao i na korisnim sugestijama koje su doprinele uspešnoj finalizaciji ove doktorske disertacije.

Dr Mirjani Mihailović, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, na pomoći pruženoj u obradi eksperimentalnog materijala.

Dr Miroslavu Nikoliću, naučnom savetniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu na ekspeditivnosti, predusjetljivosti i na pomoći tokom eksperimentalnog rada, kao i analizi dobijenih podataka.

Kolegama iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, dr Slavici Borković-Mitić, dr Tijani Radovanović, dr Branki Gavrilović i dr Svetlani Despotović naučnim saradnicima, kao i Marku Prokiću, istraživaču saradniku zahvaljujem se na velikoj podršci i požrtvovanosti tokom izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem se kolegi Marku Anđelkoviću iz odeljenja za evolucionu biologiju na izuzetnom trudu i pomoći koji su omogućili uspešnu realizaciju terenskih istraživanja. Takođe, zahvaljujem se kolegicama iz odeljenja za ekologiju Mariji Pavlović i Dragani Pavlović na velikodušnoj pomoći i podršci tokom izrade disertacije.

Zahvaljujem se mojoj porodici na neizmernoj ljubavi, strpljenju, moralnoj podršci i pomoći koju su mi uvek pružali tokom svih ovih godina.

U Beogradu, 2015. godina

Jelena P. Gavrić

Istraživač saradnik

BIOMARKERI OKSIDACIONOG STRESA I KONCENTRACIJA METALA U ODABRANIM TKIVIMA BELOUŠKE (*Natrix natrix*) I RIBARICE (*Natrix tessellata*) SA PODRUČJA OBEDSKE BARE I PANČEVAČKOG RITA

REZIME

Ekotoksikološka istraživanja su značajna zbog činjenice da mogu imati praktičnu primenu u zaštiti životne sredine. Semiakvatične vrste zmija konstantno su izložene dejstvu kompleksa različitih ekoloških faktora kako u vodenoj tako i u terestričnoj sredini. Zmije su dugoživeći organizmi, nalaze se na vrhu lanca ishrane, imaju manji radijus kretanja u odnosu na većinu ptica i sisara i to ih čini idealnim model organizmima za praćenje efekta izloženosti različitim vrstama ksenobiotika u prirodnim uslovima.

Metali predstavljaju najrasprostranjeniju grupu zagađivača. Zbog svoje toksičnosti, biomagnifikacije duž lanca ishrane, kao i bioloških efekata koje izazivaju predstavljaju neizostavnu kariku u ekotoksikološkim istraživanjima.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita sezonska dinamika biomarkera oksidacionog stresa, uticaj metala prisutnih u životnoj sredini kao i njihova bioakumulacija u nekim tkivima *Natrix natrix* (belouška) i *Natrix tessellata* (ribarica) sa područja Specijalnog rezervata prirode Obedska bara i industrijske zone Pančevački rit, u periodu pre i posle hibernacije. U krvi, jetri, bubregu, mišiću i masnom tkivu su analizirane enzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja: aktivnost ukupne, mangan i bakar cink sadržavajuće superoksid-dismutaze (Uk SOD, Mn SOD, CuZn SOD), katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GSH-Px) i glutation-reduktaze (GR). Ispitivane su i neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja: koncentracija glutationa (GSH) i slobodnih sulfhidrilnih grupa (SH). Takođe su analizirani: biohemijski pokazatelj oksidacionih oštećenja (TBARS), enzim faze I biotransformacije: citohrom P₄₅₀1A (CYP1A), enzim faze II biotransformacije: glutation-S-transferaza (GST), biomarkeri izloženosti metalima (metalotioneini) i biomarker neurotoksičnosti (ChE). U vodi i tkivima (jetri i mišiću) analizirani su alkalni (Li, K) zemnoalkalni (Ba, Ca, Mg), prelazni (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn), slabi (Al, Pb) metali kao i metaloid As.

U jetri *N. natrix* aktivnost Uk SOD i CuZn SOD bila je značajno veća u periodu posle hibernacije, dok je kod *N. tessellata* uočen suprotan trend. Aktivnosti Uk SOD i CuZn SOD u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* nisu se značajno razlikovale između lokaliteta u oba ispitivana perioda. Aktivnost CAT u jetri, bubregu i mišiću *N. tessellata* iz Pančevačkog rita, jetri *N. natrix* sa Obedske bare kao i bubregu *N. natrix* sa oba ispitivana lokaliteta bila je veća u periodu posle hibernacije. Aktivnost GSH-Px bila je veća u periodu posle hibernacije u jetri ispitivanih vrsta sa oba lokaliteta. Smanjena aktivnost GSH-Px dobijena je u krvi obe vrste u Pančevačkom ritu, u periodu pre hibernacije, kao i u jetri i masnom tkivu *N. natrix* posle hibernacije, mišiću *N. natrix* pre hibernacije i bubregu *N. tessellata* posle hibernacije. Indukcija aktivnosti GR u jetri, bubregu i masnom tkivu *N. natrix* pre hibernacije i bubregu *N. tessellata* u oba ispitivana perioda u Pančevačkom ritu rezultat je povećane potrošnje GSH. Dobijena je značajno manja koncentracija SH grupa u jetri, bubregu, mišiću i masnom tkivu belouške iz Pančevačkog rita pre hibernacije i ribarice posle hibernacije. Povećan nivo TBARS zabeležen je u krvi *N. tessellata* iz Pančevačkog rita u periodu posle hibernacije, bubregu pre hibernacije i masnom tkivu u obe ispitivane sezone. Kod *N. natrix* iz Pančevačkog rita u krvi, jetri i masnom tkivu postoji značajno smanjenje nivoa TBARS. U periodu pre hibernacije nivo ekspresije enzima faze I biotransformacije CYP1A u jetri *N. tessellata* iz Obedske bare bio je značajno veći u poređenju sa nivoom ekspresije ovog enzima jetri *N. tessellata* iz Pančevačkog rita. U jetri i bubregu obe ispitivane vrste sa Obedske bare aktivnost GST značajno je niža u posthibernacijskom periodu u odnosu na period pre hibernacije. U krvi *N. tessellata* u obe sezone, krvi *N. natrix* u periodu pre hibernacije i jetri obe ispitivane vrste u periodu posle hibernacije aktivnost ChE bila je inhibirana kod jedinki iz Pančevačkog rita. Inhibicija ChE uočena je i kod životinja iz Obedske bare, u krvi *N. natrix* posle hibernacije, bubregu i mišiću pre hibernacije kao i u bubregu *N. tessellata* posle hibernacije. U jetri jedinki *N. natrix* iz Obedske bare u oba ispitivana perioda, kao i kod *N. tessellata* u periodu posle hibernacije zabeležen je povećan nivo ekspresije MT, što može biti direktan odgovor na intraćelijsko povećanje koncentracije metala. U periodu pre hibernacije u jetri *N. natrix* koncentracija mangana je bila značajno veća u jedinkama sa Obedske bare, dok je koncentracija aluminijuma bila veća u jetri jedinki iz Pančevačkog rita. U jetri jedinki vrste *N. tessellata* iz Obedske bare u periodu pre hibernacije, koncentracije gvožđa,

molibdena i cinka bile su takođe značajno veće u odnosu na jedinke iz Pančevačkog rita. Izmerene koncentracije bakra, mangana, molibdena i cinka u jetri *N. tessellata* posle hibernacije bile su takođe značajno veće u jedinkama sa Obedske bare.

Istraživanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji pokazala su da biomarkeri oksidacionog stresa, biotransformacije i neurotoksičnosti u ispitivanim vrstama zmija ispoljavaju varijacije u zavisnosti od ispitivane vrste, sezone, ispitivanog tkiva, lokaliteta, a samim tim i kompozicije metala u životnoj sredini. Utvrđen je različit stepen akumulacije metala u ispitivanim tkivima, koji ne korelira u potpunosti sa koncentracijom metala izmerenom u životnoj sredini što je rezultat individualne varijabilnosti i uticaja složenih ekoloških faktora.

Ključne reči: biomarkeri oksidacionog stresa, semiakvatične zmije, metali, Obedska bara, Pančevački rit

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija

UDK broj: [577.334 + 546.3 + 591.543.42]:598.115.31(497.11)(043.3)

**OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS AND METAL CONCENTRATIONS IN
SELECTED TISSUES OF GRASS SNAKE (*Natrix natrix*) AND DICE SNAKE
(*Natrix tessellata*) FROM OBEDSKA BARA AND PANČEVAČKI RIT
LOCALITIES**

ABSTRACT

Ecotoxicological studies are important due to the fact they can have a practical application in environmental protection. Semiaquatic snakes are continuously exposed to various complex environmental factors both in aquatic and terrestrial environment. They are long-living organisms, on the top of the food chain, with smaller movement radius compared to most birds and mammals, which makes them ideal model organisms for monitoring effects of exposure to different types of xenobiotics in natural conditions.

Metals are the most widespread group of pollutants. Due to their toxicity, biomagnification along the food chain, as well as biological effects they cause, they represent indispensable link in ecotoxicological research.

The aim of this doctoral thesis was to examine seasonal dynamics of oxidative stress biomarkers, the impact of metals present in the environment, as well as their bioaccumulation in some tissues of *Natrix natrix* (Grass snake) and *Natrix tessellata* (Dice snake) from Special Nature Reserve sites, Obedska bara and Pančevački rit, industrial zone, for periods before and after hibernation. In blood, liver, kidney, muscle and adipose tissue, enzyme components of system protection against oxidative damage were analyzed: activities of total, manganese and copper zinc superoxide dismutase (Tot SOD, Mn SOD, CuZn SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase (GR), non-enzymatic components of system protection against oxidative damage: concentration of glutathione (GSH) and free sulfhydryl groups (SH), biochemical indicator of oxidative damage (TBARS), phase I biotransformation enzyme: cytochrome P₄₅₀1A (CYP1A), phase II biotransformation enzyme: glutathione-S-transferase (GST), biomarkers of exposure to metals, metallothionein and activity of cholinesterase (ChE), neurotoxicity biomarker.

In water, liver and muscle tissues, alkaline (Li, K), alkaline earth metal (Ba, Ca, Mg), transient (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn), weak (Al, Pb) metals and metalloid As were analyzed.

In liver of *N. natrix* Uk SOD and CuZn SOD activities were significantly higher during the period after hibernation, while in *N. tessellata* opposite trend was obtained. Tot SOD and CuZn SOD activities in liver of *N. natrix* and *N. tessellata* did not significantly differ between locations during both studied periods. CAT activity in liver, kidney and muscle of *N. tessellata* from Pančevački rit, liver of *N. natrix* from Obedska bara, as well as kidney of *N. natrix* within both locations was higher after hibernation. GSH-Px activity was higher in the period after hibernation in liver of both studied species from both locations. Reduced GSH-Px activity in blood of both species before hibernation in Pančevački rit was obtained, as well as in liver and adipose tissue of *N. natrix* after hibernation, muscle of *N. natrix* before hibernation, and kidney of *N. tessellata* after hibernation. Induction of GR activity in liver, kidney and adipose tissue of *N. natrix* before hibernation and kidney of *N. tessellata* in both studied periods in Pančevački rit, is result of increased consumption of GSH. Significantly lower concentration of SH groups in liver, kidney, muscle and adipose tissue of *N. natrix* before hibernation and *N. tessellata* after hibernation in Pančevački rit were obtained. Increased level of TBARS was recorded in *N. tessellata* in blood after hibernation, kidney before hibernation and adipose tissue in both studied periods in Pančevački rit. In *N. natrix* in blood, liver and adipose tissue there was a significant reduction in the level of TBARS in Pančevački rit. Prior to hibernation expression level of phase I biotransformation enzymes of CYP1A in liver of *N. tessellata* was significantly higher in Obedska bara. In liver and kidney of both species in Obedska bara, GST activity was significantly lower in post hibernation period compared to period before hibernation. In blood of *N. tessellata* in both seasons, blood of *N. natrix* before hibernation and liver of both species after hibernation ChE activity was inhibited in individuals from Pančevački rit. Inhibition of ChE was obtained in Obedska bara, in blood of *N. natrix* after hibernation, kidney and muscle before hibernation, as well as in kidney of *N. tessellata* after hibernation. In liver of specimen of *N. natrix* in both studied periods, as with *N. tessellata* after hibernation, significantly higher level of MT expression in Obedska bara was recorded, which can be a direct response to an increase in intracellular concentrations of metals. Prior to hibernation in liver of *N. natrix* manganese concentration was significantly higher in individuals in Obedska bara, while the concentration of aluminum was higher in liver in individuals from Pančevački rit. In

liver samples of *N. tessellata* before hibernation concentrations of iron, molybdenum and zinc were also significantly higher in Obedska Bara in relation to Pančevački Rit. Measured concentrations of copper, manganese, molybdenum and zinc in liver of *N. tessellata* after hibernation were also significantly higher in individuals from Obedska bara.

Research carried out in this doctoral thesis showed that oxidative stress biomarkers, biotransformation and neurotoxicity in examined snakes species exhibit variations that depend on studied species, season, tested tissue, locations, and thus the composition of metals in the environment. Different degree of metal accumulation in studied tissues was determined, which does not correlate exactly with the measured metal concentration in the environment, which is result of individual variability and impact of complex environmental factors.

Key words: oxidative stress biomarkers, semiaquatic snakes, metals, Obedska bara, Pančevački rit

Scientific field: Biology

Special topic: Physiology

UDC number: [577.334 + 546.3 + 591.543.42]:598.115.31(497.11)(043.3)

SKRAĆENICE

AChE	acetilholinesteraza
AhR	aromatični ugljovodonični receptor
Al	aluminijum
APS	amonijum persulfat
ARNT	nuklearni translokator aromatičnih ugljovodoničnih receptora
As	arsen
B	bor
Ba	barijum
BChE	butirilholinesteraza
Bi	bizmut
Ca	kalcijum
CAT	katalaza
Cd	kadmijum
CDNB	1-hloro-2,4-dinitrobenzen
Co	kobalt
Cr	hrom
Cu	bakar
CuZn SOD	bakar cink sadržavajuća superoksid-dismutaza
CYP1A	citohrom P ₄₅₀ 1A
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoična kiselina)
EC SOD	ekstracelularna superoksid-dismutaza
EDTA	etilendiamintetraacetat
Fe SOD	gvožđe sadržavajuća superoksid-dismutaza
Fe	gvožđe
GR	glutation-reduktaza
GSH	redukovani glutation
GSH-Px	glutation-peroksidaza
GSSG	oksidovani glutation

GST	glutation-S-transferaza
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
HCl	hlorovodonična kiselina
Hg	živa
HNE	4-hidroksi-2-noneal
In	indijum
iRNA	informaciona ribonukleinske kiselina
K	kalijum
KCN	kalijum cijanid
Li	litijum
MDA	malondialdehid
Mg	magnezijum
Mn	mangan
Mn SOD	mangan sadržavajuća superoksid-dismutaza
Mo	molibden
MT	metalotioneini
Na	natrijum
Na ₂ CO ₃	natrijum karbonat
NADP ⁺	oksidovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaH ₂ PO ₄	natrijum dihidrogen fosfat
NaHCO ₃	natrijum bikarbonat
NaN ₃	natrijum azid
NaOH	natrijum hidroksid
Ni	nikal
Ni SOD	nikal sadržavajuća superoksid-dismutaza
O ₂	molekularni kiseonik
O ₂ ⁻	superoksid anjon radikal
-OH	hidroksilna grupa
OH [·]	hidroksil radikal
PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza

PAH	policiklični aromatični ugljovodonici
PAS	Per-Arnt-Sim superfamilija proteina
Pb	olovo
Pb	olovo
PCB	polihlorovani bifenili
PS-SG	Protein-glutation mešani disulfidi receptora
RH	supstrat
RNK	ribonukleinska kiselina
RO [·]	alkoksil radikal
RO ₂ [·]	peroksil radikal
ROH	oksisgenisani produkt reakcije
ROOH	organski peroksid
ROS	reaktivne vrste kiseonika
SDS	sodijum dodecil sulfat
Se	selen
SH	sulfhidrilna grupa
S-NO	S-nistrozilacija
SOD	superoksid-dismutaza
Sr	stroncijum
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
Tl	talijum
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UNEP	Program za životnu sredinu Ujedinjenih nacija
WHO	Svetska zdravstvena organizacija
Zn	cink

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Oksidacioni stres.....	1
1.2. Biomonitoring i biomarkeri.....	2
1.3. Biomarkeri oksidacionog stresa.....	5
1.3.1. Enzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja.....	5
1.3.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD).....	6
1.3.1.2. Katalaza (CAT).....	7
1.3.1.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px).....	8
1.3.1.4. Glutation-reduktaza (GR).....	9
1.3.2. Neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja...	9
1.3.2.1. Glutation (GSH).....	9
1.3.2.2. Sulfhidrilne (SH) grupe.....	10
1.3.3. Biohemijski pokazatelji oksidacionih oštećenja.....	11
1.3.3.1. Lipidna peroksidacija.....	11
1.4. Biotransformacioni enzimi.....	13
1.4.1. Enzimi faze I biotransformacije.....	13
1.4.1.1. Citohrom P ₄₅₀ 1A (CYP1A).....	15
1.4.2. Enzimi faze II biotransformacije.....	17
1.4.2.1. Glutation-S-transferaza (GST).....	17
1.5. Biomarkeri izloženosti metalima.....	19
1.5.1. Metalotioneini (MT).....	19
1.6. Parametri neurotoksičnosti.....	20
1.6.1. Holinesteraze.....	20
1.7. Metali kao zagađivači i mehanizmi kojima izazivaju oksidaciona oštećenja.....	21
1.8. Zmije u ekofiziološkim studijama.....	23
1.8.1. Fiziološke adaptacije zmija kao hibernatora.....	26
1.8.2. Specifičnosti antioksidacionog zaštitnog sistema kod zmija.....	27
1.8.3. Osnovne karakteristike analiziranih vrsta zmija.....	27
1.8.3.1. Belouška (<i>Natrix natrix</i>).....	29
1.8.3.2. Ribarica (<i>Natrix tessellata</i>).....	31

2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	33
3. MATERIJAL I METODE.....	35
3.1. Osnovne karakteristike ispitivanih lokaliteta i uzimanje uzoraka.....	35
3.2. Žrtvovanje životinja i priprema uzoraka za analizu.....	37
3.2.1. Priprema krvi za biohemijske analize.....	37
3.2.2. Izolovanje tkiva i određivanje kondicionog faktora (CF) i hepatosomatskog indeksa (HSI).....	37
3.2.3. Priprema tkiva za biohemijske analize.....	38
3.3. Određivanje količine hemoglobina (Hb) u krvi.....	39
3.4. Određivanje koncentracije ukupnih proteina.....	39
3.5. Natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforetska analiza proteina (SDS-PAGE).....	40
3.6. Određivanje aktivnosti enzimskih komponenti antioksidacione zaštite.....	42
3.6.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD).....	42
3.6.1.1. Lizat eritrocita i tkiva.....	42
3.6.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	43
3.6.2.1. Lizat eritrocita i tkiva.....	43
3.6.3. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px).....	43
3.6.3.1. Lizat eritrocita.....	43
3.6.3.2. Tkiva.....	44
3.6.4. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR).....	44
3.6.4.1. Lizat eritrocita i tkiva.....	44
3.6.5. Određivanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST).....	45
3.6.5.1. Plazma i tkiva.....	45
3.7. Određivanje koncentracije neenzimskih komponenti antioksidacione zaštite.....	46
3.7.1. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH).....	46
3.7.1.1. Plazma i tkiva.....	46
3.7.2. Određivanje koncentracije slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa u tkivima.....	46

3.8. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije (TBARS).....	47
3.8.1. Krv.....	47
3.8.2. Tkiva.....	47
3.9. Western blot analiza CYP1A i MT.....	48
3.10. Određivanje aktivnosti holinesteraze (ChE)	49
3.10.1. Plazma i tkiva.....	49
3.11. Određivanje koncentracije metala u vodi, jetri i mišiću <i>N. natrix</i> i <i>N. tessellata</i>	49
3.12. Statistička obrada rezultata.....	50
4. REZULTATI.....	52
4.1. Prosečne telesne mase i dužine životinja.....	52
4.2. Kondicioni faktor (CF) i hepatosomatski indeks (HIS)	53
4.3. Koncentracija hemoglobina (Hb) u krvi životinja.....	55
4.4. Koncentracija ukupnih proteina.....	56
4.5. Elektroforetski profili proteina.....	59
4.6. Aktivnost enzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja	61
4.6.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD)	61
4.6.1.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u krvi.....	61
4.6.1.2. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u tkivima.....	61
4.6.2. Aktivnost katalaze (CAT)	74
4.6.2.1. Aktivnost katalaze (CAT) u krvi.....	74
4.6.2.2. Aktivnost katalaze (CAT) u tkivima.....	74
4.6.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px)	82
4.6.3.1. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) u krvi.....	82
4.6.3.2. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) u tkivima.....	82
4.6.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR)	90
4.6.4.1. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u krvi.....	90
4.6.4.2. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u tkivima.....	90
4.7. Koncentracija neenzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja.....	97
4.7.1. Koncentracija glutationa (GSH) u krvi.....	97

4.7.2. Koncentracija glutationa (GSH) u tkivima.....	97
4.7.3. Koncentracija slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa.....	105
4.8. Nivo ekspresije enzima faze I biotransformacije citohroma P ₄₅₀ 1A (CYP1A) u jetri.....	111
4.9. Aktivnost enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST)	112
4.9.1. Aktivnost enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST) u plazmi.....	112
4.9.2. Aktivnost enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST) u tkivima.....	112
4.10. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS)	120
4.10.1. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u krvi.....	120
4.10.2. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u tkivima.....	120
4.11. Aktivnost holinesteraza (ChE)	128
4.11.1. Aktivnost holinesteraza (ChE) u plazmi.....	128
4.11.2. Aktivnost holinesteraza (ChE)	128
4.12. Nivo ekspresije metalotioneina (MT)	134
4.13. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama i lokalitetima.....	136
4.12. Koncentracije metala u vodi i tkivima ispitivanih vrsta.....	150
4.12.1. Koncentracije metala u uzorcima vode sa Pančevačkog rita i Obedske bare.....	150
4.12.2. Koncentracije metala u tkivima <i>N. natrix</i> i <i>N. tessellata</i>	152
4.12.2.1. Koncentracije metala u jetri <i>N. natrix</i> i <i>N. tessellata</i>	152
4.12.2.2. Koncentracije metala u mišiću <i>N. natrix</i> i <i>N. tessellata</i>	156
5. DISKUSIJA.....	159
6. ZAKLJUČCI.....	186
7. LITERATURA.....	190

PRILOZI

1. UVOD

1.1. Oksidacioni stres

Iako je kiseonik u molekulskom obliku relativno nereaktivan, dodavanjem elektrona ili transferom energije povećava se njegova reaktivnost i u tom procesu nastaju reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS). U ROS se ubrajaju slobodni radikali kiseonika (superoksid anjon - $O_2^{\cdot-}$, hidroksil - OH^{\cdot} , hidroperoksil - HO_2^{\cdot} , alkoksil - RO^{\cdot} , peroksil - RO_2^{\cdot} radikal) i neradikalske vrste (singlet kiseonik - 1O_2 , vodonik peroksid - H_2O_2 , hipohlorna kiselina - $HOCl$, organski peroksidi - $ROOH$, ozon - O_3) koje deluju kao oksidujuć agensi ili se lako konvertuju u slobodne radikale (Halliwell i Gutteridge, 1999). Kod aerobnih organizama tokom procesa respiracije oko 95% unetog O_2 prolazi kroz kompletnu redukciju do H_2O postepenim dodavanjem četiri elektrona. U toku ovog procesa u 1-5% slučajeva generišu se delimično redukovani intermedijeri (Scandalios, 2005; Buonocore i sar., 2010). Tako jednoelektronskom redukcijom O_2 nastaje $O_2^{\cdot-}$, dvoelektronskom H_2O_2 , a troelektronskom OH^{\cdot} .

Slobodni radikali predstavljaju atome, jone ili molekule koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Ovakva struktura čini ih nestabilnim hemijskim česticama koje mogu reagovati međusobno ili sa drugim molekulima i tako dovesti do lančanih reakcija što za posledicu ima oštećenje biomolekula i narušavanje normalne funkcije ćelije. Slobodni radikali nastaju ne samo u procesu ćelijskog disanja u mitohondrijama već i pod uticajem UV, X- i γ -zračenja, u toku reakcija koje su katalizovane metalima, u prisustvu toksina, pesticida, a proizvode se u neutrofilima i makrofagama tokom inflamacije. Poznata je njihova dvostruka uloga u biološkim sistemima (Valko i sar., 2004). Slobodni radikali imaju važnu ulogu u imunom odgovoru na infekcije a takođe su i intermedijeri mnogih ćelijskih signalnih puteva. Nasuprot tome, u visokim koncentracijama oni mogu biti medijatori oštećenja ćelijskih struktura, uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline.

$O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 su manje reaktivne vrste ali u biološkim sistemima od njih lako nastaje OH^{\cdot} , koji je visoko reaktivan i odgovoran za oštećenja makromolekula. Međutim dok je OH^{\cdot} kratkoživeći, $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 su dugoživeće vrste ROS. OH^{\cdot} je hemijski

najreaktivnija vrsta kiseonika, veoma je mobilan i rastvorljiv u vodi. Čelija proizvodi oko 50 OH[•] svake sekunde, što znači da u toku jednog dana svaka čelija generiše oko 4 miliona OH[•] koji mogu biti neutralizovani. OH[•] nespecifično napada biomolekule i izaziva oksidaciona oštećenja na svega nekoliko nanometara od mesta produkcije. Uključen je u nastanak neurodegenerativnih poremećaja, kardiovaskularnih bolesti i kancera. U biološkim sistemima OH[•] nastaje u redoks ciklusu tokom Fenton-ove i Haber-Weiss-ove reakcije (Ayala i sar., 2014).

Iako je H₂O₂ slab oksidans, može direktno oksidovati tiol (-SH) grupe u aktivnim mestima nekih enzima, kao što je gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza. H₂O₂ takođe lako reaguje i sa nekim hem proteinima kao što su mioglobin i citohrom *c*. Neradikalske vrste poput HOCl, prvenstveno reaguju sa proteinima a najčešće mete napada su ostaci cisteina i metionina, zatim tirozina, triptofana i fenilalanina (Stocker i Keaney 2004).

Oksidacioni stres predstavlja stanje ozbiljno narušene ravnoteže između produkcije reaktivnih vrsta sa jedne strane i aktivnosti antioksidacione zaštite sa druge (Sies, 1991). U stanjima poremećene prooksidaciono/antioksidacione ravnoteže aktiviraju se odbrambeni mehanizmi čelije. Ako je stres prekomeran ili ako su odbrambeni i reparativni odgovori neadekvatni dolazi do oštećenja čelija.

1.2. Biomonitoring i biomarkeri

Svi živi sistemi nalaze se u kontinuiranoj interakciji sa stresorima koji su prisutni u životnoj sredini. Ekonomski, privredni i tehnološki napredak čovečanstva imaju za posledicu povećanje potreba za iskorišćavanjem prirodnih resursa, što dovodi do povećanja količine poljoprivrednih, industrijskih i drugih zagađujućih materija, koje se unose u životnu sredinu i deluju na organizme. Monitoring predstavlja svako ponovljeno merenje sa definisanom svrhom, jednog ili više hemijskih ili bioloških parametara prema unapred određenom rasporedu u prostoru i vremenu a korišćenjem metoda koje su uporedive i standardizovane (United Nations Environmental Program – UNEP). U okviru ekotoksikoloških studija posebnu pažnju zauzima ekološka procena rizika koja ima za cilj davanje odgovora na različita pitanja u oblasti toksikologije. Biomarkeri se široko koriste kako bi se utvrdio rizik koji zagađivači mogu izazvati u

različitim ekosistemima. Oni se definišu kao promene u biološkom odgovoru, od molekularnog preko ćelijskog i fiziološkog, pa sve do promena u ponašanju koje nastaju kao posledica izlaganja zagađivačima u životnoj sredini, dok je bioindikator organizam koji daje informaciju o stanju sredine u kojoj živi (Štajn i sar., 2007). Biomarkeri se prema WHO (1993) dele u tri kategorije: biomarkere izlaganja, efekta i osetljivosti. Biomarkeri izlaganja uključuju merenje egzogenih jedinjenja, njihovih metabolita ili produkata koji su nastali u interakciji sa ciljnim molekulom u ćelijama, i odražavaju dozu izlaganja. Biomarkeri efekta su merljive biohemijske, fiziološke, bihevioralne i druge promene koje se mogu povezati sa poremećajima funkcija i štetnim efektima po zdravstveno stanje organizma. Biomarkeri osetljivosti ukazuju na prirodnu ili stečenu sposobnost organizma da odgovori na izloženost specifičnom ksenobiotiku.

Kako bi se dobio uvid u integritet ekosistema u celini potrebno je odabrati pogodne bioindikatorske vrste, koje se nalaze na kritičnim pozicijama u trofičkom lancu. Stoga se sve veće interesovanje posvećuje pronalaženju osetljivih biomarkera koji se mogu koristiti u proceni i prognozi kvaliteta životne sredine.

Sa povećanjem broja i količine hemikalija u životnoj sredini, katalitička biotransformacija ksenobiotika razvila se kao važan mehanizam biohemijske zaštite od toksičnih hemijskih jedinjenja i predstavlja biološku adaptaciju neophodnu za opstanak. Među različitim biomarkerima posebnu pažnju u ekotoksikološkim istraživanjima imaju: sinteza metalotioneina u jetri (kao odgovor na prisustvo metala), citohromi P₄₅₀ (ukazuju na izloženost organskim zagađivačima, polihlorovanim bifenilima (PCB), policikličnim aromatičnim ugljovodonicima (PAH)), inhibicija acetilholinesteraze (AChE) (organofosfatima, karbamatima, ali i metalima), aktivnost antioksidacionih enzima, lipidna peroksidacija, zatim praćenje oštećenja molekula DNK, indukcija vitelogenina itd.

Prema Zhou i sar., (2008) idealan bioindikator ima sledeće karakteristike: 1) može da akumulira visoke nivoe zagađivača bez letalnog ishoda, 2) ima sesilni način života čime daje odgovor na lokalno zagađenje, 3) ima široku distribuciju kako bi bilo moguće ponavljanje uzorkovanja i upoređivanje, 4) ima dovoljno dug životni vek kako bi se poredio odgovor različitih starosnih grupa, 5) poseduje odgovarajuća ciljna tkiva ili ćelije, 6) lako se uzorkuje i gaji u laboratorijskim uslovima, 7) zauzima važno mesto u lancu ishrane, 8) dozni efekat nekog zagađivača može se posmatrati na njemu.

Ukoliko je ovaj skup kriterijuma suviše rigorozan može se odabrati nekoliko karakteristika organizma kao bioindikatora koji ga čine pogodnim za praćenje ciljnog efekta nekog zagađenja.

U mnogim terenskim studijama koje su dizajnirane tako da prate molekularno fiziološki odgovor prirodnih populacija zabeležene su značajne razlike u odgovoru kako enzimskih tako i neenzimskih komponenti antioksidacione zaštite na zagađivače koji su prisutni u životnoj sredini. Rezultati pokazuju velika variranja (više, jednake ili niže) aktivnosti antioksidacionih enzima, kao i izražene tkivne specifičnosti prilikom poređenja jedinki uzorkovanih sa nezagađenih (kontrolnih) i visoko zagađenih lokaliteta (Stoliar i Lushchak, 2012). Ipak, postoje značajne praznine u našem znanju o odgovoru na oksidacioni stres, naročito kod divljih životinja (Stoliar i Lushchak, 2012). Zbog toga treba koristiti što više različitih model organizama pre donošenja zaključaka, a komparativne studije bazirane na praćenu prooksidaciono/antioksidacionog odgovora u biološkim sistemima treba da budu kontrolna tačka za procenu toksičnih efekata u prirodnoj sredini (Lushchak, 2011).

Brzina pojave promena koje nastaju dejstvom zagađivača opada sa porastom nivoa biološke organizacije. To znači da su promene koje se uočavaju na nivou populacije nastale kasnije nego promene na nivou jedinke ili još nižim nivoima biološke organizacije: organima, tkivima, ćelijama, molekulima. Zbog toga molekularni biomarkeri zapravo predstavljaju najraniji odgovor na prisustvo zagađivača. Promene na nivou populacije, u smislu smanjenja brojnosti, stope preživljavanja, odnosu polova, nataliteta i mortaliteta, pojava bolesti nastaju nakon dužeg vremena izloženosti stresoru pa je potrebno duže vreme za oporavak u ovakvim ekosistemima.

Hemijskim monitoringom (merjenjem koncentracije zagađivača u vodi, sedimentu, vazduhu, zemljištu) detektuju se samo trenutne promene, a ovakva merenja ne daju podatke o mogućem štetnom uticaju stresora na organizme. Hemijski monitoring je posebno neefikasan kod diskontinuirane emisije štetnih materija u životnu sredinu. Stoga biomonitoring ima izuzetnu prednost, a u ovim studijama organizmi se koriste kako bi se procenilo stanje životne sredine. Biološki monitoring obuhvata četiri podtipa: 1) Bioakumulacioni monitoring koristi organizme kako bi se u njima merili nivoi kontaminanata, i tako se vrši procena izloženosti ksenobiotičima; 2) Monitoring biološkog efekta određuje rane promene u organizmima koje su potpuno ili delimično

ireverzibilne; 3) Monitoring zdravstvenog stanja prati nastanak bolesti ili oštećenja koje su uzrokovane dejstvom ksenobiotika a koja su ireverzibilna; 4) Monitoring ekosistema putem merenja ekoloških parametara kao što su prisustvo i sastav vrsta, gustina populacija itd. prati integritet ekosistema (Štajn i sar., 2007). Ipak, prema Van der Oost i sar. (2003) najkompletnije informacije pružaju studije koje uključuju i hemijski i biološki monitoring i kao takve čine integrativni monitoring program.

1.3. Biomarkeri oksidacionog stresa

Aerobni organizmi su izloženi neprekidnom uticaju kiseonika i tokom evolucije su razvili mehanizme zaštite od povećane produkcije ROS. Sistem zaštite od oksidacionih oštećenja sastoji se iz primarne i sekundarne antioksidacione zaštite (Cadenas, 1989). Primarna zaštita obuhvata enzimske i neenzimske komponente koje su aktivne u uslovima normalne i povećane produkcije ROS, dok sekundarna antioksidaciona zaštita obuhvata protein specifične oksidoreduktaze (tiol-transferaza, protein-ADP-ribozil-transferaza, ATP i Ca^{2+} nezavisna proteaza) koje učestvuju u popravci oksidacionih oštećenja biomolekula (Štajn i sar., 2007).

Prvu liniju antioksidacione zaštite predstavljaju enzimi koji katalizuju reakcije detoksikacije superoksid anjon radikala i vodonik peroksida i tako sprečavaju oštećenja ćelijskih biomolekula.

U biomarkere oksidacionog stresa ubrajaju se: enzimske i neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja i biohemijski pokazatelji oksidacionih oštećenja.

1.3.1. Enzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja

U enzimske komponente primarne antioksidacione zaštite ubrajaju se: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px) i glutation-reduktaza (GR) (Van der Oost i sar., 2003).

1.3.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD)

Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) (Slika 1) je metaloprotein koji katalizuje dismutaciju visoko reaktivnog $O_2^{\cdot-}$ do manje reaktivne vrste kiseonika H_2O_2 i molekularnog kiseonika. Tokom evolucije nastalo je više klasa ovog enzima koji se razlikuju prema metalu koji sadrže u aktivnom centru: gvožđe sadržavajuća superoksid-dismutaza (Fe SOD), nikal sadržavajuća superoksid-dismutaza (Ni SOD), mangan sadržavajuća superoksid-dismutaza (Mn SOD), bakar cink sadržavajuća superoksid-dismutaza (CuZn SOD) i ekstracelularna superoksid-dismutaza (EC SOD) (Alscher i sar., 2002). Neutralizaciju nastalog H_2O_2 vrše katalaza ili glutation-peroksidaza.



Slika 1. Trodimenzionalna struktura CuZn SOD (en.wikipedia.org).

Fe SOD je prisutna kod prokariota i u plastidima biljnih ćelija. Ni SOD je prisutna kod prokariota. Mn SOD je homotetramer koji se nalazi u mitohondrijama i peroksisomima eukariotskih ćelija i ćelijama prokariota. Koncentracija Mn SOD je visoka u organima sa intenzivnom respiracijom. Fe SOD i Mn SOD imaju visok stepen homologije i sličnu trodimenzionalnu strukturu, dok se ostale izoforme razlikuju (Matés, 2000). CuZn SOD je homodimer prisutan u citoplazmi eukariotskih ćelija. EC SOD je tetramerni glikoprotein koji sadrži Cu i Zn. Nalazi se u intersticijalnim prostorima tkiva, ekstracelularnim tečnostima (plazmi, limfi i sinovijalnoj tečnosti) (Matés, 2000). Ima primarnu kontrolu nad inaktivacijom NO i ulogu u neurobihevioralnim funkcijama (Levin i sar., 1998). Prema Buschfort i sar. (1997) aktivnost EC SOD kod sisara je koordinisana citokinima a manje kao odgovor ćelije na prisustvo oksidanata.

Spontana dismutacija $O_2^{\cdot-}$ je pH zavisna i maksimalni nivo ima na pH=4.8. Pri pH=7.4 nivo spontane dismutacije iznosi oko $2 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$. Nekatalizovana dismutacija zahteva direktnu reakciju dva $O_2^{\cdot-}$ što je otežano usled elektrostatičkog odbijanja dva anjona. Nivo dismutacije *in vivo* bez katalitičkog delovanja enzima ograničen je i

činjenicom da je u normalnim fiziološkim uslovima koncentracija $O_2^{\cdot-}$ niska i iznosi oko $10^{-10}M$. SOD omogućava uklanjanje $O_2^{\cdot-}$ tako što naizmeničnom redukcijom i oksidacijom katalizuje transfer elektrona između dva $O_2^{\cdot-}$ bez potrebe njihove direktne interakcije. CuZn SOD omogućava 10 000 puta bržu dismutaciju ovog radikala u poređenju sa brzinom spontane reakcije dismutacije (Madsen, 1991).

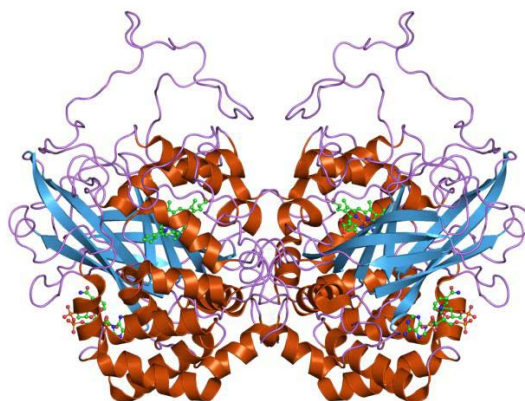
Brzina reakcije SOD i $O_2^{\cdot-}$ je duplo manja od reakcije NO sa $O_2^{\cdot-}$ i zbog toga je neophodno prisustvo dovoljne koncentracije SOD kako bi se sprečila reakcija $O_2^{\cdot-}$ sa NO. Dismutacijom $O_2^{\cdot-}$ sprečava se reakcija sa NO pri čemu nastaje veoma toksični peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) a time se omogućava i neometano obavljanje funkcije NO u signalnim putevima (Thomas i sr., 2010).

1.3.1.2. Katalaza (CAT)

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) (Slika 2) je jedan od najefikasnijih enzima u živom svetu a po strukturi je homotetramer koji u aktivnom centru sadrži gvožđe Fe^{3+} (Halliwell i Gutteridge, 2007). Katalizuje dva tipa reakcija:

- katalazna reakcija se odvija pri visokim koncentracijama supstrata ($>1 \mu M$), a tokom ove reakcije H_2O_2 se direktno prevodi u vodu i molekularni kiseonik.
- peroksidazna reakcija se odvija pri niskim koncentracijama H_2O_2 ($<1 \mu M$), a tokom ove reakcije dolazi do redukcije H_2O_2 uz pomoć različitih donora vodonika (alkoholi, askorbinska kiselina).

CAT je prisutna u aerobnim eukariotskim ćelijama, lokalizovana pretežno u peroksizomima gde ima ulogu uklanjanja H_2O_2 koji se stvara u toku β -oksidacije masnih kiselina. Takođe je prisutna i u citosolu i mitohondrijama (El-Beltagi i Mohamed, 2013).



Slika 2. Trodimenzionalna struktura CAT
(en.wikipedia.org).

1.3.1.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px)

Glutation-peroksidaza (GSH-Px, EC 1.11.1.9) katalizuje glutacionu zavisnu redukciju H_2O_2 do H_2O i organskih hidroperoksida do odgovarajućih alkohola. Široko je prisutna kod eukariotskih organizama dok je kod prokariota registrovana u malom broju vrsta (Halušková i sar., 2009; Arenas i sar., 2010). Iako GSH-Px i CAT imaju isti supstrat H_2O_2 , GSH-Px veoma efikasno reaguje sa lipidnim i drugim organskim hidroperoksidima. U odnosu na CAT ovaj enzim ima veći afinitet prema H_2O_2 i tako ima veoma važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama ove reaktivne vrste (Kruidenier i Verspaget, 2002). Glutation redoks ciklus je glavni mehanizam zaštite od niskog nivoa oksidacionog stresa (Matés, 2000).

Kod sisara je registrovano pet izoformi ovog enzima (Matés, 2000). U citosolu i mitohondrijama prisutan je selenoprotein GSH-Px 1 ili c GSH-Px, koji redukuje hidroperoksidge masnih kiselina i H_2O_2 na račun glutaciona. GSH-Px 1 izoforma najviše je prisutna u eritrocitima, bubrezima i jetri. Citosolna GSH-Px 2 i vanćelijska GSH-Px 3 su takođe selenoproteini, slabo prisutni u većini tkiva osim u gastrointestinalnom traktu

i bubrezima. Fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza ili GSH-Px 4 je zajedno sa GSH-Px 1 prisutna u većini tkiva. GSH-Px 4 je takođe selenoenzim koji je visoko eksprimiran u bubrežnim epitelnim ćelijama i testisima. Ovo je monomerni unutarćelijski antioksidacioni enzim, koji redukuje perokside holesterola i membranske fosfolipidne hidroperokside. Osim što na ovaj način čuva ćeliju, prekidajući proces lipidne peroksidacije, ovaj enzim učestvuje u sazrevanju spermatozoida i reguliše embriogenezu (Borchert i sar., 2006). GSH-Px 5 je prisutna u epididimusu velikog broja vrsta sisara i predstavlja selen nezavisnu izoformu ovog enzima.

1.3.1.4. Glutation-reduktaza (GR)

Glutation-reduktaza (GR), (GR, EC 1.6.4.2) katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani (GSH) pri čemu kao redukujući ekvivalent koristi nikotin amid adenin dinukleotid fosfat (NADPH). Osnovna uloga GR je održavanje redoks homeostaze u ćeliji. Glutation-reduktaza je dimer sastavljen od dve subjedinice od kojih svaka sadrži po jedan molekul flavin adenin dinukleotida u aktivnom centru i ima molekulsku masu od 120K Da (Štajn i sar., 2007)

1.3.2. Neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja

U neenzimske komponente sistema zaštite od oksidacionih oštećenja ubrajaju se različita jedinjenja koja se prema afinitetu i rastvorljivosti u lipidima mogu podeliti na liposolubilne i hidrosolubilne, od čega zavisi i mesto njihovog delovanja.

1.3.2.1. Glutation (GSH)

Glutation (GSH) (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicin) je tripeptid i najzastupljeniji niskomolekulski tiol u ćelijama. U ćeliji se nalazi u citosolu, jedru i mitohondrijama i to u milimolarnim koncentracijama, dok su van ćelije koncentracije GSH nekoliko mikromola (Valko i sar., 2004). Visok redoks potencijal čini GSH snažanim antioksidansom i kofaktorom za enzimske reakcije u kojima je potreban redukujući

ekvivalent (Pastore i sar., 2003). U toku oksidacionog stresa, GSH stvara disulfidne veze sa proteinima koji takođe sadrže sulfhidrilne grupe (S-tiolacija) i tako sprečava oksidaciju SH grupa i njihovo unakrsno povezivanje pomoću S-S mostova (Pompella i sar., 2003).

1.3.2.2. Sulfhidrilne (SH) grupe

Promena u sadržaju slobodnih SH grupa nastaje kao odgovor ćelije na stres. Ovaj parametar određuje nivo oksidacije proteina i drugih tiola u ćelijama i predstavlja dobar biomarker oksidacionog stresa (Kovačević i sar., 2006).

Aminokiselina cistein sadrži funkcionalnu SH grupu, koja je najreaktivnija funkcionalna grupa proteina pa stoga može doći do njenih hemijskih modifikacija (Iciek i Wlodek, 2001).

Koncentracija tiolnih grupa u ćelijama veća je od koncentracije GSH. Dve SH grupe mogu se oksidovati i formirati disulfidnu vezu. Ove veze u ćelijama mogu se formirati između proteina (PS-SP), glutationa (glutation disulfid, GSSG) ili mogu nastati mešani disulfidi između proteina i glutationa (PS-SG) (Hansen i sar., 2009). S-glutationilacija je jedna od postranslacionih modifikacija koja je važna u metabolizmu, signalnim putevima, za održavanje homeostaze Ca^{2+} , aktivnost antioksidacionih enzima (Townsend, 2008). Pri fiziološkim koncentracijama GSSG u ćelijama, S-tiolacija je reverzibilan proces i predstavlja jedan od postranslacionih modifikacija proteina, a verovatno ima i regulatornu ulogu u zaštiti od ireverzibilne oksidacije SH grupa (Iciek i Wlodek, 2001). Iako je GSH dominantan ligand, pri nastanku mešanih disulfida može se vezati i γ -glutamil-cistein i cistein (Seres i sar., 1996). Formiranje disulfidnih veza važno je za strukturu proteina, a osim toga glutacionilacija je i mehanizam zaštite od ireverzibilne proteinske oksidacije tokom oksidacionog stresa (Gallogly i Mieyal, 2007). Srebro, živa, bakar i olovo imaju visok afinitet vezivanja za SH grupe i tako mogu uticati na ćelijsku funkciju (Shukla i Chandra, 1997).

Oksidacija proteinskih sulfhidrila do mešanih disulfida predstavlja rani odgovor na oksidacioni stres (Margaritis i sar., 2011). Kovalentno vezivanje NO sa tiolatnim anjonom naziva se S-nitrozilacija (S-NO). U nekim patološkim stanjima povezana je sa disfunkcijom mitohondrija, sinaptičkom degeneracijom i smrti ćelije. S-NO grupa može

biti uklonjena i to primarno aktivnošću glutation reduktaze konjugacijom sa GSH i NADPH kao donorom elektrona. (Halloran i sar., 2013).

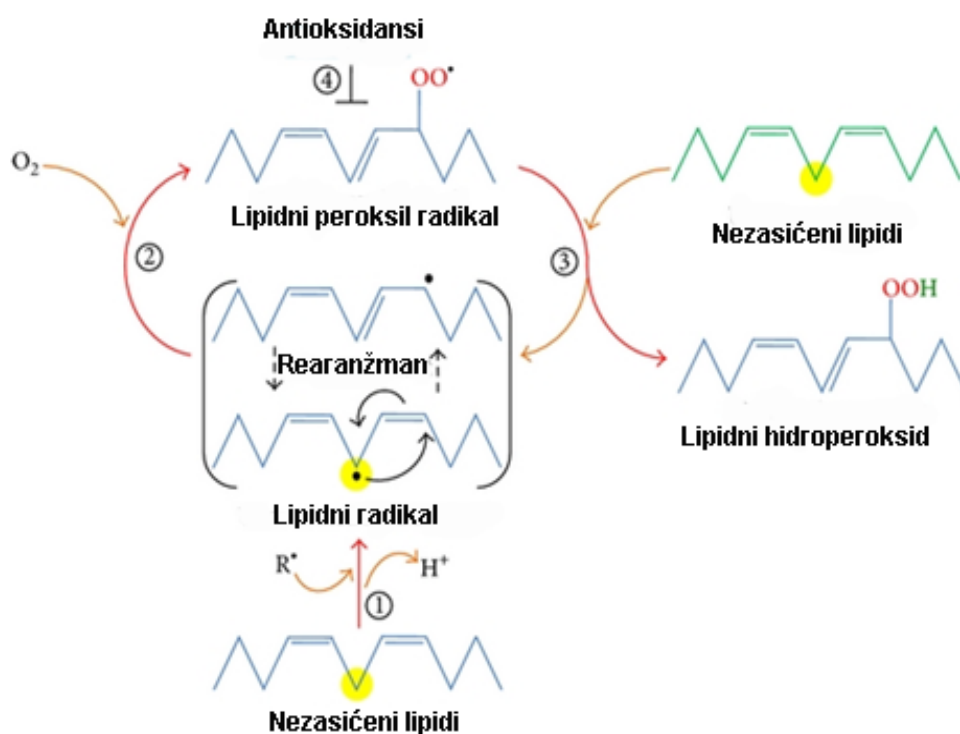
1.3.3. Biohemijski pokazatelji oksidacionih oštećenja

1.3.3.1. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je lančana reakcija koja nastaje delovanjem slobodnih radikala na nezasićene masne kiseline (Shema 1). Predstavlja jednu od najbolje proučenih manifestacija oksidacionih oštećenja (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Usled visoke zastupljenosti lipida, membrane ćelija i organela predstavljaju mesto gde može otpočeti proces oksidacionog oštećenja lipida, odnosno lipidna peroksidacija. Ovakva oštećenja dovode do promene biofizičkih svojstava membrane. Posledica toga jeste promena u permeabilnosti membrana, inaktivacija ćelijskih enzima, gubitak integriteta membrane a na kraju i smrt ćelije. U ovakvim uslovima poremećena je transportna funkcija membrane, ćelijska signalizacija kao i sveukupna funkcija ćelije. Oštećenje lizozomskih membrana dovodi do oslobađanja hidrolitičkih enzima u ćeliju. Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu znatno su manje osetljive na delovanje ROS. Prisustvo dvostrukih veza u masnim kiselinama slabi C-H veze na atomu ugljenika u blizini dvostruke veze i tako čine proces odvajanja vodonika lakšim, dok tokoferol i manitol zaustavljaju peroksidacijski proces (Štefan i sar, 2007).

Proces lipidne peroksidacije odvija se kroz tri stupnja: inicijaciju, propagaciju i terminaciju, a slobodni radikali su inicijatori i terminatori procesa lipidne peroksidacije (Schneider, 2009).



Shema 1. Proces lipidne peroksidacije
(Ayala i sar., 2014, modifikovano).

Lipidna peroksidacija počinje „napadom“ najčešće hidroksilnog radikala (Štefan i sar, 2007) koji izdvaja atom vodonika iz metilenske grupe i formira lipidni radikal. U težnji da se ovaj molekul stabilizuje dolazi do njegovog rearanžiranja i formiranja konjugovanog diena. U fazi propagacije, lipidni radikal brzo reaguje sa kiseonikom i formira lipidni peroksil radikal. Ovaj visokoreaktivni molekul napada drugi molekul masne kiseline i formira se novi lipidni radikal i lipidni hidroperoksid. U terminacionoj fazi antioksidans, kao što je vitamin E, donira proton lipidnom peroksil radikal pri čemu se formira neradikalni produkt (Ayala, 2014). U reakciji vitamina E i peroksil radikala nastaje α -tokoferoksil radikal koji je stabilan a može se redukovati askorbinskom kiselinom i redukovanom formom CoQ. Na taj način vitamin E se smatra stabilizatorom ćelijskih membrana jer štiti ćeliju od procesa lipidne peroksidacije (Žikić i sar., 2000). Takođe, reakcijom između dva lipidna radikala može nastati neradikalni

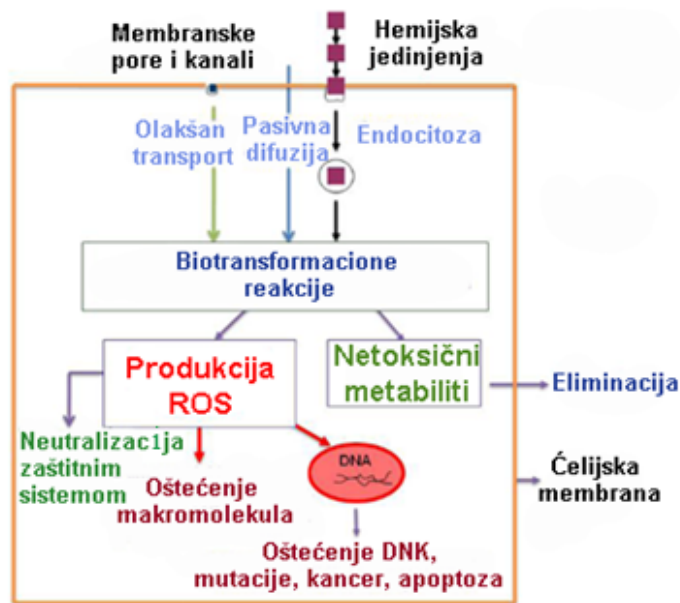
produkt. Lipidni hidroperoksidi mogu biti konvertovani u reaktivne intermedijere kiseonika kao što su lipid peroksil i/ili alkoksil radikal u redoks ciklusu prelaznih metala (Valko i sar., 2005).

Iako su glavni proizvodi lipidne peroksidacije lipidni hidroperoksidi (LOOH) kao sekundarni proizvodi tokom ovog procesa nastaju različiti aldehidi među kojima se posebno izdvajaju malondialdehid (MDA), propanal, heksanal i 4-hidroksi-2nonenal (HNE) (Esterbauer i Zolliner, 1989). Prema Esterbauer i sar. (1990) MDA ima veoma izražena mutagena svojstva dok je HNE najtoksičniji sekundarni produkt lipidne peroksidacije.

1.4. Biotransformacioni enzimi

1.4.1. Enzimi faze I biotransformacije

Većina ksenobiotika podleže procesu biotransformacije koji ima za cilj stvaranje manje toksičnih ili netoksičnih produkata (Shema 2). Ksenobiotici indukuju enzimske sisteme neophodne za njihovu detoksifikaciju. Nepolarne liposolubilne materije prevode se u polarne hidrosolubilne metabolite koje se manje distribuiraju u tkiva i lakše eliminišu. Proces biotransformacije genski je regulisan i odvija se kroz dve faze. Kod većine organizama indukcija ekspresije gena koji su odgovorni za metabolizam ksenobiotika nastaje kao adaptivni odgovor na prisustvo hemikalija. Kod kičmenjaka aromatični ugljovodonični receptor (eng. Aril hydrocarbon receptor, AhR) je jedan od hemijskih ligand zavisnih unutarćelijskih receptora koji mogu indukovati transkripciju gena kao odgovor na prisustvo ksenobiotika. AhR se može aktivirati nizom strukturno divergentnih hemikalija (Denison i Nagy, 2003). Pored uloge u metabolizmu ksenobiotika, AhR ima ulogu i u normalnom vaskularnom razvoju, imunotoksičnosti i involuciji timusa (Stevens i sar., 2009).



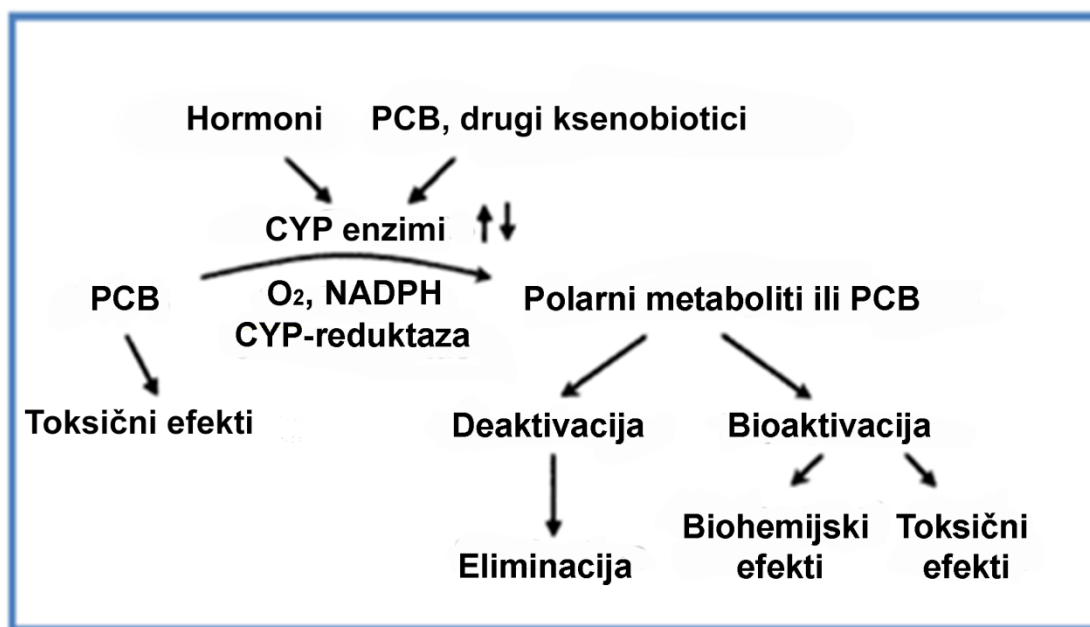
Shema 2. Unošenje ksenobiotika i hemijske reakcije u ćeliji
(Jebali i sar., 2013; modifikovano).

AhR je ligand aktivirajući transkripcioni faktor i pripada Per-Arnt-Sim (PAS) superfamiliji proteina. U odsustvu vezujućih agonista AhR se nalazi u citoplazmi u kompleksu sa šaperonima: heat-shock 90 proteinima, P23 i ARA9 (eng. Aryl hydrocarbon receptor associated 9). Hsp 90 ima ulogu da u odsustvu liganda spreči degradaciju AhR u citoplazmi (Monostory i Pascussi, 2008). P23 stabilizuje AhR-Hsp 90 interakciju dok ARA9 protein omogućava pravilno savijanje AhR polipeptidnog lanca. Nakon ulaska ksenobiotika u ćeliju on se, ukoliko po građi odgovara, vezuje za AhR i formira se kompleks ligand-AhR nakon čega dolazi do translokacije ovog kompleksa u nukleus. Nakon vezivanja agonista AhR-šaperon kompleks premešta se u jedro i vezuje se za ARNT protein (eng. AhR nuclear translocator). ARNT je strukturno veoma sličan AhR (Stevens i sar., 2009). Kompleks ligand-AhR-ARNT ima visok afinitet vezivanja za specifična mesta na DNK označena kao DRE (eng. dioxin-responsive element) sekvence. Rezultat toga je transkripciona aktivacija DER zavisnih gena među kojima je i CYP1A1 (CYP1A1, EC 1.14.14.1) enzim. Na ovaj način AhR receptor omogućava indukciju CYP enzima i učestvuje u detoksikaciji ksenobiotika (Denison i sar., 2002).

1.4.1.1. Citohrom P₄₅₀1A (CYP1A)

Prva faza metabolizma ksenobiotika uključuje reakcije oksidacije, redukcije ili hidrolize (Goeptar i sar., 1995, Štajn i sar., 2007). Ove reakcije su katalizovane mikrozomalnim monooksigenazama u koje spadaju citohrom P₄₅₀(CYP), citohrom b5 i NADPH citohrom P₄₅₀-reduktaza.

CYP enzimi su terminalne oksidaze u elektron transportnom lancu i prema Bandiera (2001) predstavljaju grupu najraznovrsnijih katalizatora u biološkim sistemima. Ovaj enzimski sistem u mogućnosti je da katalizuje oksidativnu biotransformaciju velikog broja ksenobiotika (Shema 3).



Shema 3. CYP-zavisna biotransformacija PCB-ova i modulacija toksičnosti (Bandiera, 2001; modifikovano).

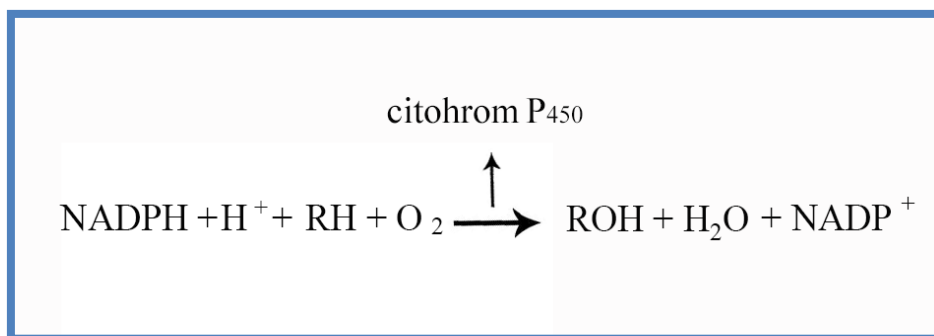
Citohromi P₄₅₀ katalizuju prvi korak u metabolizmu ksenobiotika kao što su policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) i aromatični amini (Lee i Yang, 2008). Ekspresija različitih CYP se široko koristi kao biomarker zagađenja životne sredine. Lee i Yang (2008) ističu da se sve više povećava broj naučnih publikacija koje se bave njihovom primenom u biomonitoringu. Tako je činjenica da je od 1997. do 2006.

godine broj naučnih studija o primeni CYP porastao sa 73 na 191 (Lee i Yang, 2008) pokazatelj povećanog interesovanja za ovu super-gensku familiju proteina.

Citohromi su prisutni u jetri, gde čine oko 1-2% mase hepatocita ali su detektovani i u intestinumu, bubrezima, plućima, mozgu, koži, placenti (Široká i Drastichova, 2004). Citohromi P₄₅₀ čine „superfamiliju“ koja broji više od 50 enzima (Rusić i sar., 2014). Oni predstavljaju hemoproteine povezane sa membranama endoplazmatičnog retikuluma. U eukariotskim ćelijama vezani su i za mitohondrijalne membrane, a u bakterijama prisutni su u citosolu u rastvorenom obliku (Široká i Drastichova, 2004). Naziv su dobili na osnovu toga što u kompleksu sa CO apsorbuju svetlost talasne dužine 450 nm, dok neaktivne forme citohroma P₄₅₀ imaju apsorpcioni maksimum na 420 nm, slično drugim hemoproteinima. Podela u familije i subfamilije izvršena je na osnovu homologije između aminokiselinskih sekvenci. Enzimi koji imaju sličan raspored do 40% aminokiselina pripadaju istoj porodici, do 50% istoj subfamiliji, dok oni sa sličnošću većom od 98% predstavljaju pojedinačne enzime. Naziv enzima se označava arapskim brojevima i slovom, tako prvi broj označava familiju (npr. CYP1) slovo podfamiliju (npr. CYP1A), a drugi broj označava pojedinačni enzim (npr. CYP1A2) (Rusić i sar., 2014).

Citohromi P₄₅₀ katalizuju veliki broj monooksigenaznih reakcija preko aktivacije molekuskog kiseonika. Kod čoveka od 75 izoformi najzastupljenija i najvažnija je CYP3A4 jer učestvuje u metabolizmu većine lekova (Sevrioukova i Poulos, 2013, Dürr i sar., 2007).

Pri interakciji enzima sa supstratom ferri jon (Fe^{3+}) se redukuje primajući elektron od NADP-₄₅₀ reduktaze. U pojednostavljenom obliku funkcija citohroma P₄₅₀ prikazana je na Shemi 4.



Shema 4. Opšta reakcija kojom se opisuje CYP-posredovana biotransformacija supstrata (RH - supstrat, ROH - oksigenisani produkt reakcije).

Ovo je složena monoooksigenazna reakcija u kojoj jedan molekul postaje polaran umetanjem atoma kiseonika. Na ovaj način nepolarni, liposolubilni supstrati prevode se u polarne, hidrosolubilne metabolite, što olakšava njihovu ekskreciju iz organizma ili dalju biotransformaciju. Citohromi mogu da koriste ne samo molekularni kiseonik već i kiseonik iz peroksida dok NADPH služi kao donor elektona. Citohrom b₅ može takođe biti donor elektona. Za reakciju je neophodno prisustvo NADPH reduktaze i membranskih fosfolipida.

1.4.2. Enzimi faze II biotransformacije

Enzimi faze II biotransformacije imaju ulogu u održavanju homeostaze i procesima detoksikacije ksenobiotika. Neki ksenobiotici poseduju funkcionalne grupe neophodne za direktan metabolizam pomoću enzima faze II, dok se neki metabolišu prethodno uključujući enzime faze I (George, 1994). Faza II metabolizma ksenobiotika uključuje reakcije konjugacije ksenobiotika sa endogenim ligandima.

1.4.2.1. Glutation-S-transferaza (GST)

Glutation-S-transferaza (GST) (GST, EC 2.5.1.18) predstavlja jedan od enzima faze II biotransformacije i obuhvata multigenisku familiju proteina čija je osnovna uloga

detoksikacija velikog broja jedinjenja (Eaton i Bammler, 1999). Osnovna reakcija koju GST katalizuje je konjugacija GSH sa elektrofilnim supstratima. Osim detoksikacije, GST ima još i transportnu i sintetičku funkciju. GST je dugo vremena ubrajan u parametre oksidacionog stresa, međutim, prema podeli Van der Oost i sar. (2003) svrstava se u enzime faze II biotransformacije. Širok spektar funkcija ovog enzima uključuje uklanjanje ROS, regeneraciju proteina nakon S-tiolacije, katalizuje reakcije konjugacije sa endogenim ligandima a katalizator je i u metaboličkim putevima koji nisu povezani sa detoksikacijom (Sheehan i sar., 2001). Enzimi GST familije su dimeri, prisutni uglavnom u citolazmi.

GST ima i peroksidaznu funkciju koja nije selen zavisna, odvija se u dva stupnja i zahteva prisustvo GSH (Sherratt i Hayes, 2001). U prvoj fazi dolazi do enzimske redukcije peroksida do alkohola a kao prateći produkt nastaje hidroksilovani GSH (GSOH). U drugom koraku dešava se spontana redukcija GSOH sa GSH pri čemu nastaje voda i oksidovani GSH (GSSG).

Jedna od veoma važnih uloga GST je detoksikacija endogenih produkata lipidne peroksidacije kao što je 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) (Eaton i Bammler 1999).

GST takođe može katalizovati reakcije *cis-trans* izomerizacije ili premeštanja dvostruke veze unutar policikličnih molekula. Jedan od primera ove reakcije je pretvaranje 13-*cis*-retinoinske kiseline u *trans* izomerni oblik što rezultira većim afinitetom vezivanja za receptor retinoinske kiseline (Chen i Juchau, 1997).

Inhibitori GST su uglavnom netoksični i izoenzimski specifični. U *in vitro* studijama utvrđeno je inhibitorno dejstvo različitih jedinjenja na aktivnost ovog enzima, međutim *in vivo* je pokazano inhibitorno dejstvo manjeg broja jedinjenja (derivati GSH, etakrinska kiselina ili edekrin) koji se koristi u terapiji visokog krvnog pritiska. U novijim studijama ističe se terapijski značaj GST inhibitora u poboljšavanju efikasnosti hemoterapije (Chen i sar., 2013).

Na osnovu tercijarne i kvaternarne strukture, supstratne specifičnosti i kinetičkih osobina do sada je identifikovano 15 klasa GST izoformi: alfa, beta, delta, epsilon, kapa, lambda, mu, omega, fi, pi, sigma, tau, teta, zeta i ro (Park i sar., 2009).

1.5. Biomarkeri izloženosti metalima

1.5.1. Metalotioneini (MT)

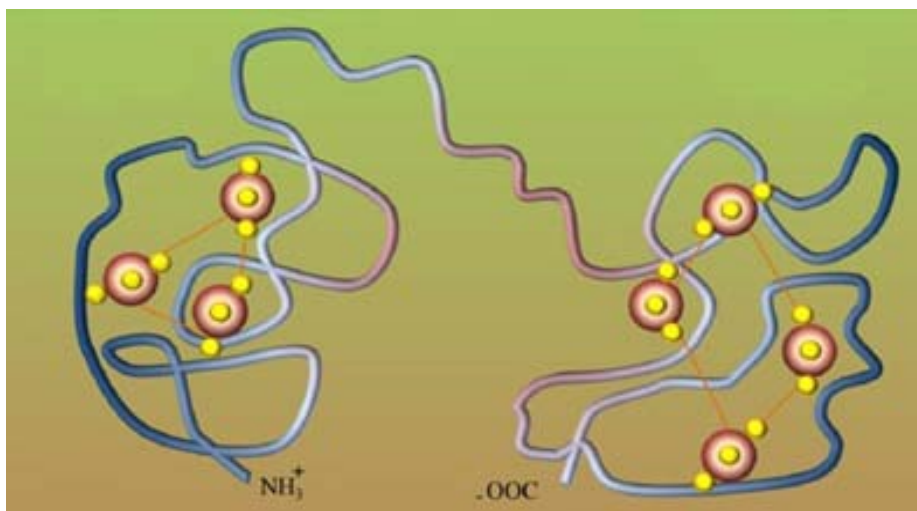
Metalotioneini su proteini male molekulske mase od 6-15 kDa (Shalini i Jeyanthi, 2014) i visokog sadržaja cisteinskih ostataka koji imaju svojstvo vezivanja za metale (Huibregtse i sar., 1989). Prvenstveno su smatrani proteinima koji imaju ulogu u detoksikaciji neesencijalnih i viška esencijalnih metala. MT mogu da vežu do 7g Zn ili drugih metala po molu tioneina. Cistein-tiolatne grupe u molekulu MT vezuju se sa jonima metala i grade metal-tiolatne grupe, koje reaguju sa $O_2^{\cdot -}$ i OH^{\cdot} . Smatra se da metalotioneini imaju sposobnost uklanjanja OH^{\cdot} radikala dok je njihova uloga u neutralisanju $O_2^{\cdot -}$ manja u poređenju sa SOD (Matović i sar., 2004).

MT su prvi put izolovani u bubregu konja (Margoshes i Vallee, 1957). Iako je prošlo više od pola veka od kako se proučavaju, i dalje se vode rasprave o tačnoj funkciji MT. MT predstavljaju klasu proteina stresa koji se indukuju u odgovoru ćelije na stres izazvan metalima. Ovaj ćelijski odbrambeni odgovor koristi se kao biomarker izlaganja i toksičnosti metala. Metali imaju različit afinitet prema tiolnim grupama prema sledećem rasporedu $Hg(II) > Cu(I) > Ag(I) > Bi(III) > Cd(II) > Pb(II) > Zn(II) > Co(II) > Fe(II)$ (Baudrimont i sar., 1997). Prema Nielson i Winge (1983) Hg i Cd imaju veći afinitet vezivanja za tiolne grupe MT od Zn. Međutim MT mogu biti indukovani i dejstvom drugih faktora kao što su hormoni i fizički stres (Kägi, 1991).

MT obuhvataju 15 familija proteina koji su izolovani kod svih životinja ali i u nekim gljivama, biljkama i cijanobakterijama. Na osnovu dosadašnjih istraživanja potvrđen je širok spektar formi MT i prihvaćena je klasifikacija na četiri grupe (MT1-MT4). Izoforme MT su klasifikovane na osnovu više različitih faktora kao što su molekulska težina, metali koje vezuju, geni koji ih kodiraju, primarna struktura itd. Prema Thirumoorthy i sar. (2011) MT1 i MT2 čine veću grupu koje su jedinstvene strukture i vezuju dvovalentne metale kao što su cink i kadmijum. MT3 i MT4 su manje brojne izoforme koje su normalno prisutne u specijalizovanim ćelijama. MT3 je prvi put izolovan u neuronima mozga kao faktor inhibicije rasta (Cherian i sar., 2003).

Na osnovu strukturnih modela, može se pretpostaviti da se MT molekul sastoji od dva vezujuća domena, α i β , koji su sastavljeni od cisteinskih klastera (Slika 3).

Kovalentnim vezama joni metala vezuju se za sulfhidrilne cisteinske ostatke. N-terminalni deo peptida je označen β domen i ima tri mesta za vezivanje dvovalentnih jona, dok C-terminalni deo (α domen) ima sposobnost da veže četiri dvovalentna metalna jona (Valko i sar., 2004).



Slika 3. Struktura MT

(Ruttkay-Nedecky i sar., 2013; modifikovano).

1.6. Parametri neurotoksičnosti

1.6.1. Holinesteraze

Holinesteraze su široko rasprostranjeni enzimi prisutni u holinergičkim i neholinergičkim tkivima kao i u plazmi i drugim telesnim tečnostima. Na osnovu specifičnosti vezivanja za supstrat podeljeni su u dve klase: acetilholinesteraze (AChE) (AChE, EC 3.1.1.7) ili prave holinesteraze i butirilholinesteraze (BChE) (BChE, EC 3.1.1.8) poznate i kao pseudoholinesteraze ili nespecifične holinesteraze (Çoğraş, 2003). AChE najbrže hidrolizuju acetilholin. Butirilholinesteraza (BChE) je slična AChE a razlikuju se na osnovu afiniteta prema estrima holina. Sa produžavanjem ugljovodoničnog lanca opada brzina kojom AChE razlaže estere holina (acetilholin,

propionilholin, butirilholin). Kod BChE brzina hidrolize opada obrnutim redom (Đorđević i sar., 2014). U mozgu, mišićima i membranama eritrocita veća je aktivnost AChE dok BChE ima veću aktivnost u jetri, crevu, srcu, bubregu i plućima (Dave i sar., 2000). AChE i BChE imaju visok stepen homologije, 65% istih aminokiselinskih sekvenci, slične su molekulske strukture i imaju slična aktivna mesta uprkos činjenici da se geni za sintezu ovih enzima nalaze na različitim hromozomima. Kod čoveka gen za AChE se nalazi na 7q22 hromozomu a za BChE na 3q26.

AChE se nalazi na postsinaptičkoj membrani i omogućava završavanje neurotransmisije razgrađujući acetilholin na holin i acetat. Oslobođeni holin ponovo preuzima presinaptički neuron i koristi za sintezu acetilholina. Inhibitori AChE dovode do akumulacije acetilholina u sinaptičkoj pukotini i otežane neurotransmisije.

Toksičnost organofosfata se ogleda u činjenici da formiraju kovalentnu vezu sa serinskim ostatkom na aktivnom mestu AChE i predstavljaju snažne ireverzibilne inhibitore ovog enzima (Dvir i sar., 2010). U prisustvu organofosfatnih jedinjenja dolazi do njihove reakcije sa AChE i na estarskom mestu stvara se kompleks enzim fosfat. Fosforilisani enzim je veoma postojan zbog atoma fosfora koji nije dovoljno elektrofilan da bi reagovao u prisustvu vode. Spontana reaktivacija se uopšte ne odvija ili je veoma spora, tj. inhibicija AChE je praktično ireverzibilna (Đorđević i sar., 2014). Posledica inhibicije je nakupljanje acetilholina u sinapsama što izaziva toksični efekat.

Organofosfati se koriste za uništavanje insekata, grinja, gljivica, nematoda. Prodiru kroz kožu i sluzokožu, mogu se uneti inhalacijom i ingestijom (Đorđević i sar., 2014). Gubitak funkcije AChE dovodi do paralize mišića a u krajnjem slučaju i do smrti kao posledice gušenja. BChE može imati ulogu u zaštiti od toksičnog dejstva inhibitora AChE jer ih može detoksikovati pre nego što stignu do AChE na fiziološki važnim ciljnim lokacijama (Çokuğraş, 2003).

1.7. Metali kao zagađivači i mehanizmi kojima izazivaju oksidaciona oštećenja

Metali privlače veliku pažnju naučne zajednice a njihova zastupljenost u životnoj sredini predstavlja ekološki problem zbog toksičnog dejstva i mogućnosti bioakumulacije. Antropogenim aktivnostima metali dospevaju do vodenih i kopnenih

ekosistema što rezultira biokumulacijom u tkivima organizama i biomagnifikacijom u lancima ishrane (Shahbaz, 2013). Razlikuju se od ostalih zagađivača po tome što ih ljudi niti proizvode niti ih mogu uništiti, a ne stvaraju se ni aktivnošću mikroorganizama. Najverovatnije da su ovo najstariji toksini poznati čovečanstvu.

Prema Duffus (2002) ne postoji nedvosmislena definicija termina „teški metali“. U većini slučajeva to se odnosi na metale i metaloide zajedno sa njihovim jedinjenjima koja su toksična ili ekotoksična i smatra se da zagađuju životnu sredinu. U teške metale se ubrajaju elementi koji pripadaju alkalnim, zemnoalkalnim, prelaznim i slabim metalima, kao i metaloidima. Termin „teški“ se ne odnose ni na jednu hemijsku karakteristiku ovih elemenata, već je usvojeno mišljenje da se to odnosi na stepen bioloških oštećenja koje izazivaju. Prema najrasprostranjenijem gledištu metali su elementi koji imaju veću gustinu od 6 g/cm^3 .

Učešće metala u procesu oksidacionih oštećenja je višestruko. Metalima indukovano formiranje slobodnih radikala dovodi do različitih modifikacija DNK, kao i indukcije lipidne peroksidacije. Mnoge studije fokusirane su na korišćenje biomarkera za procenu toksičnosti metala prisutnih u vodi i/ili sedimentu (Stohs i Bagchi 1995).

Metali proizvode slobodne radikale na više načina. Redoks aktivni metali, kao što su gvožđe (Fe), bakar (Cu), hrom (Cr), vanadijum (V) i kobalt (Co) generišu ROS u redoks ciklusu. Metali bez redoks potencijala, kao što su živa (Hg), nikl (Ni) i kadmijum (Cd) slabe antioksidacionu odbranu, vezivanjem za sulfhidrilne grupe proteina. Treći važan mehanizam proizvodnje slobodnog radikala je Fentonova reakcija, u toku koje se fero gvožđe (Fe^{2+}) oksiduje vodonik peroksidom do feri gvožđa (Fe^{3+}), hidroksil radikala i hidroksilnog anjona (Valko i sar., 2005). Bakar, hrom, vanadijum, titan, kobalt i njihovi kompleksi mogu takođe biti uključeni u Fentonovu reakciju (Lushchak, 2011). Redoks aktivni kao i redoks neaktivni metali mogu izazvati povećanje produkcije ROS, kao što su hidroksil radikal, superoksid anjon radikal i vodonik peroksid (Ercal i sar., 2001) a shodno tome metalima indukovani oksidacioni stres u ćelijama može biti delimično odgovoran za toksične efekte teških metala. Mnoge niskomolekulske komponente antioksidacione zaštite (askorbinska kiselina, alfa-tokoferol, GSH, karotenoidi, flavonoidi) sposobne su da vezuju metalne jone i na taj način smanjuju njihovu katalitičku aktivnost u formiranju ROS. Paradoksalno, neki veoma važni antioksidacioni enzimi, kao što su SOD i CAT, u svom aktivnom centru

sadrže jone metala (Jomova i Valko, 2011). Metali imaju visok afinitet vezivanja za tiol grupe enzima (Flora, 2008). Izlaganje metalima dovodi do povećanja ili do smanjenja aktivnosti enzima jetre kao i apoptoze i drugih histopatoloških promena.

Bioakumulacija metala zavisi od većeg broja faktora, biotičkih poput mase i veličine tela, starosti, pola, ishrane, metabolizma, položaja u trofičkom lancu, i abiotičkih kao što je distribucija metala u životnoj sredini, temperatura, pH vrednost vode, salinitet kod morskih vrsta, tipa staništa i interakcije sa drugim metalima. Ishrana ima najveći uticaj na akumulaciju metala u životinjskim tkivima. Bioakumulacija je složen proces koji prema Jakimska i sar. (2011) zahteva istovremeno ispitivanje nivoa metala u najmanje dva susedna trofička nivoa.

Zbog procesa biomagnifikacije, koncentracije metala u tkivima mesoždera, koji se nalaze na vrhu trofičke piramide (riba, ptica, sisara, morskih kornjača), veće su nego kod biljojeda. Međutim, dešava se da je u telu životinja sa višeg trofičkog nivoa koncentracija metala niža nego u životinjama kojima se hrane, što može biti posledica posebnog aspekta njihovog metabolizma i/ili sposobnosti da izlučuju metale (Jakimska i sar., 2011).

1.8. Zmije u ekofiziološkim studijama

Dok je veoma veliki broj biomonitoring studija baziran na praćenju efekata, izloženosti i akumulaciji ksenobiotika na mekušcima, ribama, pticama i sisarima, malo se zna o odgovoru gmizavaca, posebno zmija, na prisustvo zagađivača u životnoj sredini. Hall je 1980. godine prvi put identifikovao ekotoksikologiju gmizavaca kao nedovoljno proučenu oblast biologije. Međutim, i dalje nije ostvaren veliki napredak u znanjima o dejstvu ksenobiotika na većinu vrsta gmizavaca. Gmizavci, a posebno zmije i gušteri, malo su korišćeni kao objekti u studijama koje se odnose na probleme zagađenja životne sredine i procene rizika. Campbell i Campbell (2001) ukazuju na važnost istraživanja koje se bave izlaganjem i efektima svih vrsta organskih i neorganskih zagađivača na ovu grupu organizama.

Kako su gotovo sve vrste zmija karnivori, položaj u lancu ishrane čini ih veoma pogodnim organizmima za praćenje akumulacije i efekta zagađujućih materija. Međutim, uprkos ovoj činjenici zmije su prema Hopkins-u (2000) najmanje zastupljena

grupa kičmenjaka u ekotoksikološkim istraživanjima. Prvi naučni skup koji je bio posvećen isključivo toksikologiji gmizavaca održan je u Nešvilu (SAD) 2000 god. na zasedanju Udruženja za toksikologiju i hemiju životne sredine (Society of Environmental Toxicology and Chemistry). Pored toga, značajan doprinos bila je i publikacija Sparling i sar. (2000) koja je predstavljala sintezu ekotoksikologije vodozemaca i gmizavaca. Zmije su raznovrsna grupa gmizavaca i prema Vitt i Caldwell (2014) sadrže 39% vrsta gmizavaca sa više od 3500 opisanih vrsta.

Iako su odgovori na osnovna pitanja u oblasti toksikologije kod ostalih taksona kičmenjaka veoma dobro poznati, kod gmizavaca su ostali nedovoljno razjašnjeni. Prema Hopkins-u (2000) u buduća istraživanja potrebno je uključiti studije o model organizmima, efektima bioakumulacije, pragovima toksičnosti, endokrinim poremećajima, neinvazivnim tehnikama uzorkovanja, toksikologiji tropskih vrsta i populacionim modelima.

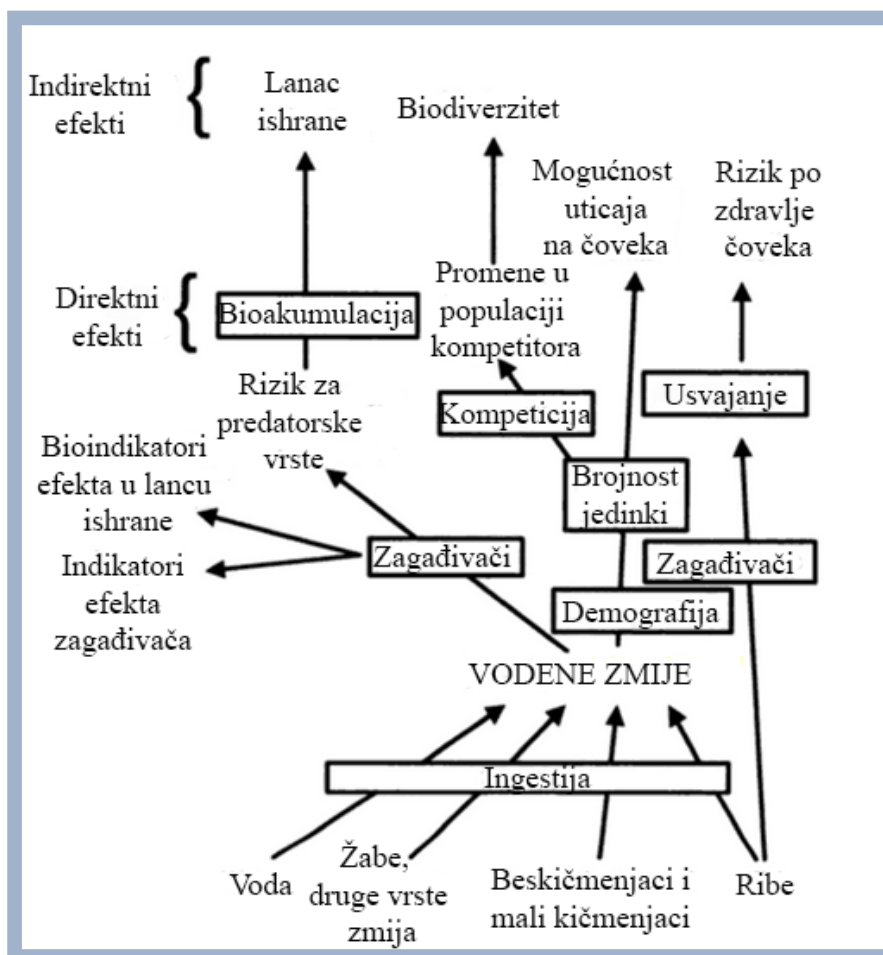
Za procenu osetljivosti gmizavaca veoma su značajne uporedne studije aktivnosti detoksikacionih enzima, vitelogenina, aktivnosti AChE, oštećenja DNK. Takođe, važno je proučavati endokrini sistem, kao i jedinjenja i mehanizme koji mogu izazvati poremećaje endokrinih funkcija kod gmizavaca. Mnogi reptili imaju složeno teritorijalno i reproduktivno ponašanje pa bi studije o efektima antropogenog uticaja na ponašanje i interakcije predator-plen bile od presudnog značaja za povezivanje biohemijских i ćelijskih promena indukovanih zagađenjem sa promenama na nivou organizma.

Prema Rezaie-Atagholipour i sar. (2012) u biomonitoring studijama zmije se mogu smatrati idealnim model organizmima za praćenje efekata izloženosti različitim vrstama ksenobiotika u prirodnim staništima (Shema 5). Vodene zmije su dugoživeći organizmi, na vrhu lanca ishrane i manjeg su radijusa kretanja u odnosu na sisare i većinu ptica. Izostavljanje gmizavaca, a posebno zmija, iz ekotoksikoloških istraživanja može se povezati sa karakteristikama životnog ciklusa, jer mnoge vrste proizvode mali broj potomaka u kratkim vremenskim intervalima, zatim sa činjenicom da se mnoge vrste ne mogu gajiti u zarobljeništvu i sa kulturološkim shvatanjima o ovoj grupi organizama (Campbell i Campbell 2001).

Prema Campbell i Campbell (2001) za šest od ukupno 15 familija podreda Serpentes ne postoje literaturni izvori o uticaju zagađivača prisutnih u životnoj sredini.

Najveći broj dostupnih podataka odnosi se na familiju Colubridae što je i razumljivo jer ova familija obihvata oko 70% ukupnog broja vrsta zmija. Prema istim autorima u toksikološkim istraživanjima najviše su proučavane vrste roda *Nerodia* koje su rasprostranjene u istočnim i centralnim delovima SAD, Meksiku i na Kubi.

Podaci o akumulaciji teških metala u tkivima zmija dosta su obimniji u odnosu na istraživanja koja se odnose na odgovor enzima antioksidacione zaštite, biomarkera neurotoksičnosti i drugih molekularno fizioloških parametara. U novije vreme dosta se pažnje posvećuje dizajniranju nedestruktivnih tehnika uzimanja uzoraka kao što je uzimanje uzoraka krvi ili odsecanje vrha repa.



Schema 5. Vodene zmije kao bioindikatori stanja životne sredine.

(Burger i Gochfeld, 2004; modifikovano).

1.8.1. Fiziološke adaptacije zmija kao hibernatora

Najznačajnije pitanje u hibernaciji je kako hibernatori bez posledica preživljavaju uslove hipotermije, smanjenog protoka krvi, afagije i izlaze iz zimskog sna bez reperfuzionih oštećenja. Ovakvi uslovi bi kod nehibernatora doveli do ugrožavanja vitalnih fizioloških funkcija. Za razliku od sisara, hibernacija kod gmizavaca je slabije izučavana. Niske ambijentalne temperature u toku zimskih meseci predstavljaju izazov za ektotermne organizme. Većina zmija umerene klimatske zone hladni period godine provodi u podzemnim skloništima (hibernakulumima) (Bauwens, 1981). Fotoperiod i temperatura su najznačajniji ekološki faktori koji preko endokrinog sistema regulišu hibernaciju. Postoje podaci da je nivo usvajanja kiseonika u ćelijama mozga direktno povezan sa inicijacijom, održavanjem i terminacijom hibernacije kod vodene zmije *Natrix piscator* (Thapliyal i Sharan 1980).

Krioprotektivne materije su slabo prisutne u telima gmizavaca i zato postoje složene metaboličke i enzimske adaptacije koje im obezbeđuju preživljavanje, a antioksidaciona odbrana je važan faktor opstanka u uslovima izrazito niskih temperatura (Hermes-Lima i Zenteno-Savín, 2002). Kod kornjače *Chrysemys picta marginata* dokazano je postojanje tri kategorije gena odgovornih za preživljavanje hladnog perioda (Storey, 1996). Ovi geni kodiraju: a) proteine koji su odgovorni za vezivanje gvožđa, b) enzime antioksidacione odbrane i c) inhibitore serin proteaza. Svi ovi mehanizmi imaju za cilj zaštitu od štetnih efekata ishemije.

Tokom veoma niskih temperatura u vanćelijskim prostorima kao i prostorima između organa može se stvarati led pa se na taj način usporava cirkulacija krvi. U ovim uslovima dolazi do smanjenja stope metabolizma kao i produkcije krioprotektivnih supstanci kod pojedinih vrsta. Kod kornjača dolazi do akumulacije većih količina glukoze i laktata što svakako daje veću otpornost na smrzavanje (Storey, 1996).

Mehanizmi adaptacija antioksidacione zaštite omogućavaju organizmima kod kojih dolazi do naglih promena u oksigenaciji tkiva da iz ovakvih stanja izađu sa malo i/ili ni malo oštećenja. Produkcija ROS javlja se tokom reperfuzije organa oksigenisanom krvlju u toku oporavka od izloženosti niskim temperaturama tokom zimskih meseci ili izloženosti anoksiji u prirodnim uslovima. U toku odmrzavanja ili povratka u normoksične uslove reperfuzijom, kiseonik se brzo dovodi do tkiva, dolazi

do ponovnog uspostavljanja aerobnog metabolizma ali se i stvaraju uslovi za potencijalni nastanak oksidacionog stresa usled reperfuzije (Hermes-Lima i Storey, 1993).

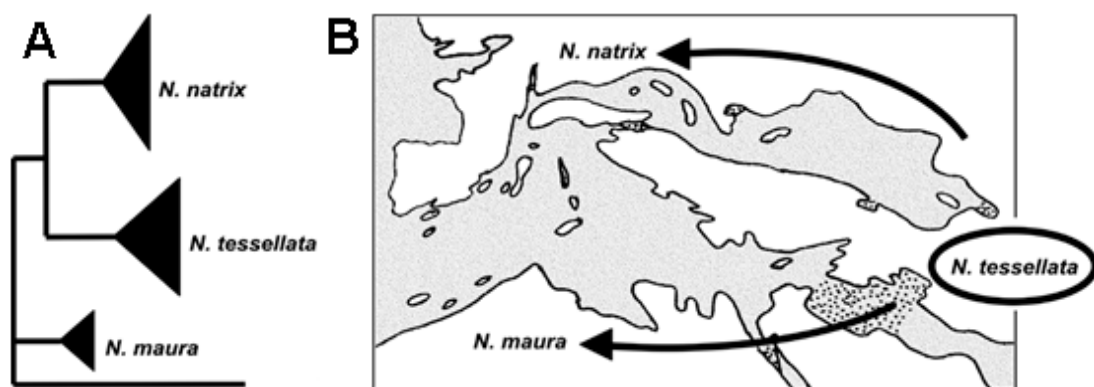
1.8.2. Specifičnosti antioksidacionog zaštitnog sistema kod zmija

Ranih 90-tih godina XX veka Hermes-Lima i Storey počeli su da proučavaju biohemijske mehanizme tolerancije na stres izazvan anoksičnim uslovima i niskim ambijentalnim temperaturama kod gmizavaca. U njihovim studijama severno američka vrsta zmije *Tamnophis sirtalis parietalis* korišćena je kao veoma pogodan model organizam zbog mogućnosti da uspešno preživi dva dana u anoksičnim uslovima na +5 °C. Nihova prva hipoteza bila je da postoji veoma moćan antioksidacioni sistem koji ih može zaštititi od post-anoksične produkcije ROS. Najpre, ovi autori su se bavili određivanjem nivoa enzima u nekim tkivima *T. sirtalis parietalis* kako bi se napravila komparacija sa drugim grupama organizama. Pokazalo se da postoji velika sličnost sa drugim nesisarskim kičmenjacima. U poređenju sa sisarima, aktivnosti enzima kod ove vrste bile su dosta niže. Tako je pokazano da je nivo SOD u jetri zmije pet puta niži u poređenju sa jetrom pacova dok je aktivnost GSH-Px niža čak 10 puta (Hermes-Lima i Storey, 1993).

1.8.3. Osnovne karakteristike analiziranih vrsta zmija

Rod *Natrix* je od 1768. godine obuhvatao veliki broj vrsta Starog i Novog sveta, međutim, Taylor i Elbel (1958) prebacili su nekoliko azijskih vrsta u rod *Rhabdophis*. Preraspodelom ostalih azijskih vrsta u tri nova roda, broj vrsta roda *Natrix* je smanjen na 21 vrstu Starog i Novog sveta. Zatim su Rossman i Eberle (1977) na osnovu morfoloških i imunoloških studija pokazali jasnu razliku između taksona Starog i Novog sveta. Afrička vrsta *N. anoscopus* je premeštena u rod *Afronatrix*, a preostale azijske vrste roda *Natrix* grupisane su u novi rod *Sinonatrix*. Natricinae Novog sveta klasifikovane su u tribus *Thamnophiini* (Guicking i sar., 2006).

Da bi se razjasnili evolucionni odnosi između vrsta roda *Natrix* izvršeno je sekvencioniranje mitohondrijalnih gena (Guicking i sar., 2006). Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je *N. maura* bazalna vrsta dok su *N. natrix* i *N. tessellata* izvedenije sestrinske vrste. Pored toga, ova filogenetska analiza identifikovala je *N. natrix* kao jedinu vrstu evropskog porekla, dok je *N. maura* poreklom iz severne Afrike, a *N. tessellata* iz jugozapadne Azije. Pretpostavlja se da se *N. maura* odvojila od zajedničkog pretka pre 18-27 miliona godina, a *N. natrix* i *N. tessellata* su se međusobno odvojile pre 13-22 miliona godina (Shema 6).



Shema 6. A) Filogenija roda *Natrix*,
 B) Hipoteza nastanka recentnih vrsta roda *Natrix* tokom miocena
 (Guicking i Joger, 2011; modifikovano).

Prema Guicking i Joger (2011) evolucija tri vrste roda *Natrix* je u korelaciji sa velikim paleogeološkim promenama. Tokom miocena dolazi do sudara arapske i turske ploče, što je omogućilo razmenu faune između Evroazije i Afrike i pretpostavlja se da su u tom trenutku preci *N. maura* izvršili invaziju na Afriku. Naknadna izolacija Afrike koja je nastala zbog otvaranja mora između Mediterana i Indopacifika tokom srednjeg miocena dovela je do nezavisne evolucije populacija u Africi i Evroaziji. Naknadno diferenciranje *N. natrix* i *N. tessellata* dešavalo se severno i južno od Paratetisa koji se prostirao kroz današnju centralnu Evropu i srednju Aziju tokom većeg dela miocena. Prema ovim autorima severna populacija proširila se u Evropi i evoluirala u *N. natrix* dok je južna ostala u južnoj Aziji i evoluirala u *N. tessellata*.

1.8.3.1. Belouška (*Natrix natrix*)

Belouška (*Natrix natrix*) je neotrovna vrsta zmiije iz porodice Colubridae (Slika 4). Potporodica Colubrinae uključuje oko 1800 vrsta svrstanih u 304 roda (Pough i sar., 2004).

Na osnovu obimnih studija morfoloških i merističkih karakteristika Thorpe (1984) je definisao četiri podvrste *N. natrix*. Dve su ostrvski endemiti: *N. n. corsi* na Korzici i *N. n. cetti* na Sardiniji. Populacije Evroazije, severne Afrike i ostrva istočnog Mediterana su takođe klasifikovane u dve podvrste: *N. n. natrix* rasprostranjenu na istočnim i *N. n. helvetica* na zapadnim delovima ovih područja. Orlow i Tunijew (1987) opisali su četvrtu vrstu *N. megalcephala*. Međutim, morfološke karakteristike ne odvajaju ovu vrstu jasno od *N. natrix scutata* pa se po Jandzík (2005) ne može priznati kao posebna vrsta.



Slika 4. Belouška (*Natrix natrix*)

(foto M. Anđelković).

N. natrix se najlakše prepoznaje po belim, žutim ili narandžastim mrljama (flekama, trakama) iza glave. Ove šare mogu biti i crne ili potpuno izostati. Boja *N. natrix* je dosta varijabilna. Može biti zelena, plavkasto zelena, maslinasto zelena ili braon, obično sa crnim tačkama ili uskim prugama sa dorzalne strane i vertikalnim prugama bočno. Gornja usna je beličasta ili žućkasta. Može dostići dužinu do 2 m, ali uglavnom dužina ne prelazi 1,20 m (Boulenger, 2000).

Rasprostranjena je od severne Afrike na jugu do Skandinavije na severu (Gregory i Isaac, 2004). *N. natrix* naseljava slična staništa kao i *N. tessellata* u evroazijskom području (Weiperth i sar., 2014). Belouška naseljava bare, jezera, potoke i reke (Beebee i Griffiths, 2000; Latifi, 2000; Szczerbak, 2003). Obično pliva po površini sa glavom iznad vode a može roniti u potrazi za plenom.

Belouška se hrani uglavnom vodozemcima, ali plen joj mogu biti i ptice, glodari, gmizavci i ribe (Madsen 1983, Hailey i Davies 1986, Luiselli i Rugiero 1991, Luiselli i sar., 1997, 2005). Veoma brzo se prilagođava promenama u dostupnosti plena, može se hraniti i alohtonim, invazivnim i potencijalno opasnim vrstama riba (Šukalo i sar., 2014).

Parenje se odvija u aprilu ili maju, zavisno od temperaturnih uslova a jaja polažu od juna do avgusta. Polažu od 6 do 24 jaja, zavisno od veličine ženke (Madsen, 1983) u šupljinama zidova, u gomilama piljevine ili opalog lišća. Jaja su veličine od 2,5 do 3,8 cm. Šest do osam nedelja nakon polaganja jaja izležu se mladi (Boulenger, 2000) dužine od 15 do 21,5 cm. Ženke belouške se ne razmnožavaju dok ne dostignu dužinu od 64 cm (Filippi, 1995), dok se mužjaci razmnožavaju pri nešto manjim telesnim dimenzijama. Mladi jedno vreme (često i do sledećeg proleća) ostaju u rupama i hrane se uglavnom crvima (Boulenger, 2000).

Belouška i ribarica nisu agresivne, ali obe vrste pokazuju antipredatorsko ponašanje, simulacija smrti (okretanje na leđa i curenje krvi iz usta), šistanje, izbacivanje sekreta neprijatnog mirisa iz kloake, retko i simulacija ujeda (Mebert, 2007).

1.8.3.2. Ribarica (*Natrix tessellata*)

Ribarica, *Natrix tessellata* ima duguljastu glavu, oči uglavnom dodiruju samo četvrtu supralabijalnu pločicu a zenice su okrugle (Slika 5). Nozdrve su usmerene na gore, a njuška je tupa i neistaknuta. Boja dorzalne strana tela *N. tessellata* kreće se od sivo zelene preko smeđe do gotovo crne sa tamnim tačkama (Mebert, 2011). Ventralna strana može biti bele, crvene, crne žuto narandžaste nijanse sa tamnim kvadratnim šarama. Maksimalna zabeležena dužina je 140 cm (Bruno i Maugeri, 1990). Polni dimorfizam manifestuje se time što su ženke veće od mužjaka (Luiselli i sar., 2007).

N. tessellata ima širok areal, naseljava prostore od severnog Egipta, Italije, Balkana, bliskog Istoka do severozapadne Kine. Najsevernije evropske populacije su na području Nemačke i Poljske (Vlček i sar., 2010). Ribarica je semiakvatična vrsta i naseljava tekuće i stajaće vode, najčešće se nalaze na rastojanju koje ne prelazi 10 m udaljenosti od obale. Međutim u vreme hibernacije mogu se locirati na većoj udaljenosti od vode, najčešće 100-500 m, a ređe te udaljenosti prelaze 1 km (Guicking i Joger, 2011). U vodi su zbog lova (ishrane), dok na kopnu provode više vremena zbog sunčanja, varenja hrane, parenja, sakrivanja, hibernacije. Neumann i Mebert (2011) su utvrdili da su jedinke *N. tessellata* najaktivnije kada je temperatura vazduha od 20 do 26 °C i pretežno oblačno vreme. Takođe, pokazali su da su dnevna kretanja jedinki u 80% slučajeva manja od 80 m.

Pretežno se hrani ribom (Filippi i sar., 1996), međutim spektar ishrane je širok, a plen ove vrste mogu biti mnogi drugi organizmi poput vodenih i kopnenih beskičmenjaka (puževa i insekata), vodozemaca i drugih gmizavaca (Gocmen i sar., 2011). Weiperth i sar. (2014) utvrdili su da različite vrste riba čine 85-100% ishrane *N. tessellata*.

Najranije parenje je zabeleženo 30 marta, a najkasnije 5 juna (Carlsson i sar., 2011). Jaja legu tokom juna ili jula meseca (Ghira i sar., 2009) i polažu od 4 do 29 jaja (Arnold i Ovenden, 2002). Veličina mladunaca (inkubiranih u terarijumu) kreće se od 20.2 do 26.4 cm (Trobisch i Gläßer-Trobisch, 2011). Hiberniraju od okrobra do aprila.



Slika 5. Ribarica (*Natrix tessellata*)
(foto M. Anđelković).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Poslednjih decenija ekofiziološka istraživanja dobijaju sve veći značaj jer pored toga što predstavljaju bazu za mnoga istraživanja mogu imati i praktičnu primenu u zaštiti životne sredine. Biomonitoring studije imaju prednost u odnosu na klasične fizičko-hemijske metode praćenja zagađenja upravo zbog činjenice da organizmi mogu da pokazuju posledice delovanja ovih materija tokom dužeg vremenskog perioda. Među mnogobrojnim štetnim materijama koje dospevaju u životnu sredinu veliki udeo imaju metali. Zbog visoke toksičnosti metala i biomagnifikacije duž lanca ishrane veoma je važno ispitivati i stepen njihove akumulacije u različitim tkivima što većeg broja organizama koji se nalaze na različitim trofičkim nivoima.

U raspoloživim literaturnim izvorima nema podataka o bazalnim nivoima i sezonskoj dinamici enzimskih i neenzimskih biomarkera oksidacionog stresa kod belouške (*Natrix natrix*) i ribarice (*Natrix tessellata*), kao ni o promenama koje izazivaju ksenobiotici prisutni u spoljašnjoj sredini.

Metali predstavljaju najrasprostranjeniju grupu zagađivača koja se u životnoj sredini može naći spiranjem podloge ili antropogenom aktivnošću. Zbog njihove toksičnosti i biomagnifikacije u lancu ishrane, kao i bioloških efekata koje izazivaju predstavljaju neizostavnu kariku u ekotoksikološkim istraživanjima.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje uticaja metala prisutnih u životnoj sredini i njihove bioakumulacije u nekim tkivima belouške i ribarice sa različitih lokaliteta na promene biomarkera oksidacionog stresa, faze I i faze II biotransformacije i biomarkera neurotoksičnosti u krvi, jetri, bubrezima, mišiću i masnom tkivu dve semiakvatične vrste zmija: belouške (*N. natrix*) i ribarice (*N. tessellata*) u periodu pre i posle hibernacije, izlovljenih u specijalnom rezervatu prirode - Obedska bara i industrijskoj zoni -Pančevački rit.

Planiranim istraživanjima u ovoj doktorskoj disertaciji utvrđene su:

- Razlike ispitivanih parametara između zmija sa dva različita lokaliteta (Obedska bara i Pančevački rit).
- Sezonske razlike između perioda pre hibernacije i posle hibernacije.

- Postojanje razlika u ispitivanim parametrima između dve vrste zmija (*N. natrix* i *N. tessellata*).
- Tkivna specifičnost ispitivanih parametara.
- Nivo bioakumulacije metala u jetri i mišiću ispitivanih vrsta zmija

U okviru istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom ispitivani su sledeći parametri:

- Parametri oksidacionog stresa:
Superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-reduktaza (GR), ukupni glutation (GSH), slobodne sulfhidrilne grupe (SH).
- Nivo ekspresije proteina faze I biotransformacije (CYP1A).
- Enzim faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST),
- Aktivnost holinesteraze (ChE) kao parametar neurotoksičnosti,
- Nivo lipidne peroksidacije,
- Nivo ekspresije metalotioneina (MT),
- U vodi i tkivima (jetri i mišiću) analiziran je veći broj metala koji su hemijski raznorodni i pripadaju sledećim grupama: alkalni (Li, K), zemnoalkalni (Ba, Ca, Mg), prelazni (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn), slabi (Al, Pb) metali, kao i metaloid As. Odabrani su lokaliteti sa različitim antropogenim uticajem, a samim tim, prema raspoloživim podacima i različitim koncentracijama metala u životnoj sredini. Takođe, praćen je i sezonski uticaj u periodu pre i posle hibernacije zmija, kao i eventualne razlike u odgovoru između ispitivanih vrsta zmija.

Cilj ove doktorske disertacije je takođe bio da se utvrdi da li vrste zmija *N. natrix* i *N. tessellata* mogu da se koriste kao bioindikator i biomonitori u proceni stanja životne sredine, zatim koji od ispitivanih parametara su najpouzdaniji biomarkeri, kao i dalje perspektive u ovoj oblasti, kao što su standardizacija referentnih vrednosti biomarkera i razvijanje neinvazivnih tehnika uzorkovanja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Osnovne karakteristike ispitivanih lokaliteta i uzimanje uzoraka

Obedska bara (44°44.8'08.37'' N; 19°59'14.38'' E) se nalazi u jugoistočnom Sremu i obuhvata ostatak napuštenog korita reke Save. Nekad je bila čuveni ornitološki rezervat, a danas je Specijalni rezervat prirode, stavljen pod zaštitu 1874. godine. Predstavlja najstarije zaštićeno područje u našoj zemlji i jedno od najstarijih zaštićenih područja u Evropi. Od 1977. godine Obedska bara zaštićena je Ramsarskom konvencijom kao močvara od međunarodnog značaja. Mrtvaje, bare, okna, močvarna vegetacija, vlažne livade i šume ovog rezervata odlikuje izuzetna biološka raznolikost i prisustvo retkih i ugroženih vrsta od nacionalnog i međunarodnog značaja. Predstavlja prirodno mrestilište za veliki broj vrsta riba reke Save, a značajno je za reprodukciju gmizavaca i vodozemaca, kao i opstanak retkih vrsta vodenih biljaka. Obedska bara povezana je sa rekam Savom samo prilikom visokog vodostaja. Zaštićena zona prostire se na površini od oko 20 000 ha.

Pančevački rit (44° 50'01.68" H; 20° 29'48.43" E) se nalazi u jugozapadnom delu Banata, u blizini Beograda, između Dunava i Tamiša. U prošlosti ovo je bilo močvarno područje, koje je često plavljeno izlivanjem ove dve reke. Danas je ovo prigradska regija pod izraženim antropogenim uticajem. Shodno tome izložena je dejstvu različitih zagađivača kako komunalnog tako i industrijskog porekla iz fabrika za proizvodnju lepka, hrane za životinje, stakla, šećera, hemijske industrije i rafinerije nafte u Pančevu. Takođe, u ovoj regiji nalaze se i značajne obradive površine kao i farme. Istraživani lokaliteti prikazani su na slici 5.

Izlaskom na teren u periodu pre hibernacije (jesen) i posle hibernacije (proleće) na opisanim lokalitetima ručno su izlovljavane ženke vrsta *N. natrix* i *N. tessellata*.



Slika 6. Geografski položaj ispitivanih lokaliteta.

3.2. Žrtvovanje životinja i priprema uzoraka za analizu

3.2.1. Priprema krvi za biokemijske analize

Izlovljene zmijske žrtvovane su dekapitacijom bez anestezije. Puna krv zmijska dobijena iskrvavljenjem sakupljana je u heparinizovane epruvete. Puna krv korišćena je za određivanje lipidnih peroksida (TBARS). Krv je centrifugirana 15 min na 5000 rpm da bi se odvojili eritrociti i plazma. U plazmi zmijska je određivana koncentracija ukupnog glutationa (GSH), kao i aktivnosti enzima glutation-S-transferaze (GST) i acetilholinesteraze (AChE). Posle odvajanja plazme, eritrociti su ispirani tri puta sa po 2 mL fiziološkog rastvora i centrifugirani tri puta po 10 min na 5000 rpm. Nakon toga odvajanje je po 1 mL ispranih eritrocita u epruvete i dodavano po 3 mL hladne destilovane vode. Uzorci su ostavljeni da liziraju na ledu (0 °C) 30 min uz povremeno mućkanje (McCord i Fridovich, 1969). U ovako pripremljenim lizatima određivana je količina hemoglobina (Hb) i aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GSH-Px) i glutation reduktaze (GR). Za određivanje aktivnosti GSH-PX lizat je razblažen do količine hemoglobina od 5 g%. Za određivanje aktivnosti CuZn SOD iz lizata je uklonjen hemoglobin metodom po Tsuchihashi (1923). Za određivanje CuZn SOD na 0.5 mL lizata uz mućkanje dodavano je 3 mL hladne destilovane vode, 1 mL etanola (-20 °C) i 0.6 mL hloroforma (-20 °C). Posle centrifugiranja 10 min na 5000 rpm odvojen je hloroformski, hemoglobinski sloj i bistri supernatant koji je korišćen za određivanje aktivnosti CuZn SOD.

3.2.2. Izolovanje tkiva i određivanje kondicionog faktora (CF) i hepatosomatskog indeksa (HSI)

Izolovani su sledeći organi: jetra, bubrezi, skeletni mišić i masno tkivo. Izmerena je masa jetre, levog i desnog bubrega i masnog tkiva. Radi određivanja kondicionog faktora (CF) i hepatosomatskog indeksa (HSI) merena je telesna masa i dužina jedinki. CF i HSI predstavljaju morfološke parametre koji se zbog jednostavnog i brzog izračunavanja često koriste u biomonitoring studijama. CF je pokazatelj opšteg stanja organizma, međutim njegova vrednost kao i vrednost HSI zavise i od uticaja drugih faktora kao što su sezona, dostupnost hrane ili bolesti. HSI je najviše korišćen u studijama na ribama kao pokazatelj izloženosti toksikantima u životnoj sredini.

Uvećanje jetre može nastati zbog hiperplazije i/ili hipertrofije. Kako je jetra glavni detoksikacioni organ, povećanje HSI može ukazivati na povećanje metabolisanja ksenobiotika (Kumari i sar., 2014). Izračunavanje CF bazira se na odnosu težine i dužine tela: $\text{težina (g)} \times 100 / (\text{dužina (cm)})^3$, a HSI na odnosu težine jetre i težine tela: $(\text{težina jetre (g)} / \text{težina tela (g)}) \times 100$ (Bagenal i Tesch, 1978; Jelodar i Fazli, 2012).

3.2.3. Priprema tkiva za biohemijske analize

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina, aktivnosti enzima zaštite od oksidacionih oštećenja SOD, CAT, GSH-Px, GR i koncentracije slobodnih SH grupa, tkiva su macerirana i homogenizovana (Ultra-Turrax, IKA-Werk, Janke & Kunkel, Staufen, Nemačka) na ledu u saharoznom puferu (0.25 M saharoza, 0.05 M Tris, 0.1 M EDTA, pH 7.4) u odnosu 1:5 (Lionetto i sar., 2003), 3 puta po 15 sekundi sa pauzama od po 15 sekundi na frekvenciji 20000 rpm (Rossi i sar., 1983; De Waziers i Albrecht, 1987). Dobijeni homogenati su zatim sonifikovani (Vibra Cell, Sonics and Materials Inc., SAD) na frekvenciji od 20 KHz, 3 puta po 10 sekundi sa pauzama od po 10 sekundi (Takada i sar., 1982). Deo sonifikata je odvojen za određivanje koncentracije ukupnog GSH a ostatak sonifikata je centrifugiran (L7-55, Beckman, SAD) 90 minuta na 37000 rpm (100000 x g) na 4 °C (Okado-Matsumoto i Fridovich, 2001). Dobijeni supernatanti prebačeni su u epruvete za mikrocentrifugiranje i do daljih analiza čuvani na temperaturi od -80 °C. Određivana je koncentracija ukupnih proteina, aktivnosti enzima zaštite od oksidacionih oštećenja Uk SOD, Mn SOD, CuZn SOD, CAT, GSH-Px, GR, enzima faze II biotransformacije GST, koncentracija slobodnih SH grupa i Western blot analiza CYP1A i MT.

Za određivanje ukupnog glutaciona u epruvetu se pipetira 250 µL sonifikata tkiva i 125 µL 10% sulfosalicilne kiseline (da bi se stabilizovali proteini) i centrifugira 10 minuta na 5000 rpm. Dobijeni supernatant se čuva na -80 °C i koristi za dalju analizu određivanja koncentracije GSH.

Za određivanje lipidnih peroksida odvojeno je 0.1 g svakog tkiva. Posle maceriranja, tkiva su homogenizovana (Ultra-Turrax, IKA-Werk, Janke & Kunkel, Staufen, Nemačka) i sonifikovana (Vibra Cell, Sonics and Materials Inc., SAD) na ledu

u 1.15 % KCl u odnosu 1:9. Neposredno nakon pripreme tkiva nastavljen je dalji eksperimentalni postupak za određivanje lipidnih peroksida.

Oko 1 g tkiva odvojen je za određivanje koncentracije metala i čuvan na -20 °C do dalje analize.

3.3. Određivanje količine hemoglobina (Hb) u krvi

Količina hemoglobina (Hb) određena je cijanmethemoglobinskom metodom (Drabkin i Austin, 1935). Metoda se zasniva na oksidovanju hemoglobina fericijanidom pri čemu nastaje methemoglobin koji reaguje sa KCN iz reagensa i nastaje stabilan obojeni kompleks cijanmethemoglobina. U 5 mL Drabkin-ovog reagensa (330 mg kalijumheksacijanoferata $[K_3Fe(CN)_6]$, 326 mg kalijum cijanida (KCN), 50 mL 0.5M fosfatnog pufera pH=7.0 dopuni se do 250 mL destilovanom vodom) dodaje se 0.02 mL krvi. Nakon inkubiranja u trajanju od 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi spektrofotometrijski (Shimadzu UV160, Japan) očitavana je apsorbancija na talasnoj dužini od 545 nm. Količina Hb izražava se u g%.

3.4. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina određivana je metodom po Lowry-ju i sar. (1951). Kao standard za određivanje koncentracije proteina korišćen je goveđi serum albumin (Bovine Serum Albumin – BSA) od koga je pripremana serija razblaženja za standardnu krivu raspona finalnih koncentracija od 100-600 µl. Postupak se zasniva na biuretskoj reakciji kupri (Cu^{2+}) jona sa peptidnim vezama proteina u alkalnoj sredini i reakciji fosfomolibdensko-fosfovolframskog reagensa (Folin-Ciocalteu reagens) sa aromatičnim amino kiselinama tirozinom i triptofanom, koje su gradivne jedinice ispitivanih proteina. Nakon vezivanja za peptidne veze, joni Cu^{2+} redukuju se u kupro jone (Cu^+) i formira se kompleks Cu^+ -protein, koji reaguje sa dodatim Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu se stvara plavo obojeni kompleks. Intenzitet boje proporcionalan je sadržaju proteina i meri se spektrofotometrijski na 500 nm.

Pripremljeni su sledeći rastvori:

- 0.2 N NaOH,
- Reagens I (2 % Na_2CO_3 + 0.2 N NaOH),

- 0.13 M CuSO₄ x 5H₂O,
- 0.13 M K-Na-tartarat,
- Reagens II (1 mL 0.13 M CuSO₄ x 5H₂O + 1 mL 0.13 M K-Na-tartarat, dopuni se do 100 mL Reagensom I) i
- Folin-Ciocalteu reagens razblažen u odnosu 1:2 sa destilovanom vodom.

U staklenu epruvetu sipano je 3 mL Reagens II, 0.1 mL 0.2 N NaOH i 0.1 mL razblaženog uzorka (R=11) i promućkano. Za blankove, umesto uzorka pipetirano je 0.1 mL dejonizovane vode. Posle inkubacije od 15 minuta, na sobnoj temperaturi, dodano je 0.6 mL Folin-Ciocalteu reagens, promućkano i inkubirano još 30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 500 nm.

3.5. Natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforetska analiza proteina (SDS-PAGE)

Proteini jetre, mišića i bubrega *N. natrix* i *N. tessellata* razdvajani su po molekulskim masama SDS-PAGE elektroforezom (SDS polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmly, 1970) u BioRad Mini-PROTEAN III sistemu. Princip ove metode zasniva se na korišćenju anjonskog deterdženta SDS koji denaturiše proteine omotavajući se oko njihovih polipeptidnih veza. Negativno naelektrisan SDS uslovljava međusobno odbijanje, što dovodi do razdvajanja proteinskih lanaca. Proteini u električnom polju putuju prema pozitivno naelektrisanom polu brzinom koja zavisi isključivo od njihove molekulske mase. Struktura poliakrilamidnog gela pruža otpor kretanju proteina pri čemu se proteini manje molekulske mase kreću brže od proteina veće molekulske mase. Poliakrilamidni gel sastoji se od gela za razdvajanje i gela za sabijanje u kome se proteini prvo koncentrišu pre nego što pređu u gel za razdvajanje. Korišćen je 12% gel za razdvajanje (pH 8,8) i 4% gel za sabijanje (pH 6,8).

Poliakrilamidni gel za razdvajanje:

Destilovana voda	3,35 mL
5 mL 1,5 M Tris (pH 8,8) + 6,2 mL H ₂ O	2,5 mL
10% SDS	100 µL
30% akrilamid/N’N’-bis-metilen-akrilamid	4 mL
10% APS	50 µ
TEMED	5µ

Poliakrilamidni gel za sabijanje:

Destilovana voda	3,05 mL
4 mL 1,5 M Tris (pH 8,8) + 6 mL H ₂ O	1,25 mL
10% SDS	50 µL
30% akrilamid/N’N’-bis-metilen-akrilamid	665 µL
10% APS	25 µ
TEMED	5µ

Nakon polimerizacije gela za razdvajanje između staklenih ploča (oko 30 minuta) nalivan je gel za sabijanje u koji se stavljan češalj kako bi se formirali “bunarčići” u koje su kasnije nanošeni uzorci. Uzorak je u odnosu 1:1 pomešan sa puferom za uzorke (3.8 mL destilovane vode, 1 mL 0.5 M Tris-HCl pufera, pH 6,8, 0.8 mL glicerola, 1.6 mL 10% SDS-a, 0.4 mL β-merkaptioetanol i 0.4 mL 10% brom fenol plave). Zatim je ona zapremina uzorka koja sadrži 20µg proteina nanošena na gel. Elektroforeza je trajala 90 minuta pri naponu od 110 V i jačini struje od 20 mA. Posle završenog razdvajanja, gelovi su bojeni u Coomassie brilliant blue R250 i odbojavani u odgovarajućim odbojivačima. Dobijeni profili proteina predstavljaju samo kvalitativan nalaz, kako bi se naglasile razlike između ispitivanih vrsta.

Rastvor za bojenje proteina:

Coomassie brilliant blue R-250	0,6 g
Metanol	250 mL
Sirćetna kiselina	100 mL
Destilovana voda	250 mL

Rastvor I za odbojavanje:		Rastvor II za odbojavanje:	
Metanol	500 mL	Metanol	50 mL
Sirćetna kiselina	100 mL	Sirćetna kiselina	70 mL
Destilovana voda	500 mL	Destilovana voda	880 mL

3.6. Određivanje aktivnosti enzimskih komponenti antioksidacione zaštite

3.6. 1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)

3.6.1.1. Lizat eritrocita i tkiva

Aktivnost SOD merena je adrenalinskom metodom koju su opisali Misra i Fridovich (1972). Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u adrenohrom koja se odvija u prisustvu $O_2^{\cdot-}$ u alkalnoj sredini. SOD iz uzorka uklanja $O_2^{\cdot-}$ i inhibira ovu reakciju. Reakciona smeša u ukupnoj zapremini od 3 mL sadržala je karbonatni pufer (0.05 M Na_2CO_3 + 10^{-4} M EDTA, pH 10.2), 3×10^{-4} M adrenalin u 0.1 M HCl i odgovarajuću zapreminu uzorka koja izaziva inhibiciju autooksidacije adrenalina u opsegu od 16.66% do 66.66%. Aktivnost SOD predstavlja razliku vrednosti apsorbance uzorka prema slepoj probi (pufer i rastvor adrenalina čija je promena apsorbance u opsegu $\Delta A/\text{min}$ 0.020-0.022). Brzina autooksidacije adrenalina merena je spektrofotometrijski na talasnoj dužini 480 nm, a vrednost apsorbance proporcionalna je roze obojenom adrenohromu.

Mn SOD u uzorku određena je dodavanjem 8 mM KCN u odnosu 1:1, koji inhibira aktivnost CuZn SOD. Smeša uzorka i KCN inkubirana je na 15 minuta na sobnoj temperaturi, a Mn SOD određivana je na isti način kao i Uk SOD. Aktivnost CuZn SOD izračunavana je kao razlika između aktivnosti Uk SOD i aktivnosti Mn SOD.

Aktivnosti Uk SOD, CuZn SOD i Mn SOD u tkivima izražene su u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina), dok je aktivnost CuZn SOD u lizatu eritrocita izražena u jedinicama po gramu hemoglobina (Jed/g Hb). Jedinica aktivnosti SOD predstavlja onu količinu enzima koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance u minuti.

3.6.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

3.6.2.1. Lizat eritrocita i tkiva

Aktivnost CAT određena je metodom po Claiborne (1984) zasnovanoj na praćenju brzine razgradnje H_2O_2 do H_2O i O_2 katalitičkom aktivnošću CAT. U 0.05 M fosfatnom puferu (pH 7.0) rastvoreno je nekoliko kapi 30% H_2O_2 tako da apsorbancu slepe probe izmerena na 240 nm talasne dužine bude između 0.525 i 0.550. Ovako podešen rastvor (1.5 mL) sipan je u kvarcnu kivetu i zatim je dodavana odgovarajuća zapremina uzorka, koja dovodi do srednje vrednosti promene apsorbance u opsegu od 0.03 do 0.06. Molarni ekstinkcioni koeficijent za H_2O_2 na talasnoj dužini od 240 nm koji iznosi $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ korišćen je za izračunavanje aktivnosti CAT. Aktivnost enzima izražena je u jedinicama na gram hemoglobina (Jed/g Hb) za lizat eritrocita, odnosno u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina) za tkiva. Jedinica aktivnosti CAT predstavlja broj milimolova H_2O_2 redukovanih u minuti (mmol H_2O_2 /min).

3.6.3. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze (GSH-Px)

3.6.3.1. Lizat eritrocita

Aktivnost GSH-Px u lizatu eritrocita određena je metodom Maral-a i sar. (1977). Na osnovu prethodno izmerene količine hemoglobina lizat je razblažen destilovanom vodom do koncentracije od 5 g% Hb. Metoda se zasniva na sposobnosti GSH-Px da katalizuje oksidaciju redukovanog glutatona (GSH) u oksidovani oblik (GSSG) uz redukciju velikog broja hidroperoksida. Enzim glutacion reduktaza (GR) katalizuje redukciju GSSG u GSH uz oksidaciju NADPH kao koenzima. Detektovanje aktivnosti enzima omogućeno je spektrofotometrijskim praćenjem oksidacije NADPH u NADP^+ uz prisustvo GR na talasnoj dužini od 340 nm. U kvarcnu kivetu sipano je oko 0.05 mL uzorka lizata, 0.05 mL Drabkin-ovog reagensa, 1.6 mL destilovane vode, 0.6 mL 0.2 mM rastvora NADPH, 0.3 mL 0.5 M fosfatnog pufera (pH 7.0), 0.3 mL 1mM rastvora GSH, 0.1 mL 0.03M t-butil hidroperoksida i 5 μl GR (oko 3 jedinice). Drabkin-ov

reagens se dodaje u reakcionu smešu kako bi se sav hemoglobin preveo u stabilan cijanmethemoglobin i tako sprečio peroksidativni efekat hemoglobina. Apsorbanca je očitavana spektrofotometrijski na 340 nm u trajanju od 2 minuta. Jedinica aktivnosti GSH-Px definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH/min). Aktivnost enzima izražena je u jedinicama po miligramu hemoglobina (Jed/mg Hb).

3.6.3.2. Tkiva

Za određivanje aktivnost enzima GSH-Px korišćena je metoda Tamura i sar. (1982). U kvarcnu kivetu od 3 mL sipana je reakciona smeša koja je sadržala 1.6 mL H₂O, 0.3 mL 1mM GSH, 0.6 mL 0.2 mM NADPH (rastvorenog u u 1% NaHCO₃), 0.1 mL 1mM NaN₃, 0.1 mL 1 mM EDTA, 0.3 mL 0.5M fosfatnog pufera (pH 7.0), 0.1 mL 0.03 M t-butil hidroperoksida, odgovarajuća količina uzorka i 5 μ L GR. Praćen je pad apsorbance na 340 nm, spektrofotometrijski u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Aktivnost GSH-Px određivna je prema slepoj probi uz korišćenje molarnog ekstinkcionog koeficijenta za NADPH na 340 nm od 6.22 x 10³ M⁻¹cm⁻¹. Jedinica aktivnosti GSH-Px u tkivima definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH/min). Aktivnost enzima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

3.6.4. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)

3.6.4.1. Lizat eritrocita i tkiva

Za određivanje aktivnosti GR u ispitivanim uzorcima korišćena je metoda koju su opisali Glatzle i sar. (1974), a zasniva se na sposobnosti GR da katalizuje reakciju redukcije GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH do NADP⁺. Spektrofotometrijski je praćen pad apsorbance na talasnoj dužini od 340 nm koji je proporcionalan padu koncentracije NADPH u rastvoru. U kvarcnu kivetu sipano je 0.6 mL 0.5 M fosfatnog pufera (pH 7.4), 0.1 mL 2mM GSSG, 0.1 mL 0.5 mM EDTA, 2 mL destilovane vode, 0.1 mL 0.1mM NADPH i odgovarajuća zapremina uzorka. Na talasnoj dužini od 340 nm na svakih 30 sekundi u toku 3 minute i na temperaturi od 25 °C praćena je promena apsorbance. Za izračunavanje aktivnosti GR u tkivima koristi se

molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH na 340 nm od $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Aktivnost GR izražena je u nanomolovima oksidovanog NADPH u minutu na gram hemoglobina (nmol NADPH/min/g Hb) za lizat eritrocita odnosno u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina) za tkiva. Jedinica aktivnosti enzima GR definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti.

3.6.5. Određivanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST)

3.6.5.1. Plazma i tkiva

Aktivnost enzima faze II biotransformacije GST određena je metodom koju su opisali Habig i sar. (1974). Princip metode zasniva se na sposobnosti GST da katalizuje reakciju vezivanja 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) za sulfhidrilnu grupu redukovanog glutationa (GSH). Aktivnost GST određivana je spektrofotometrijski praćenjem promene apsorbanice pri nastajanju CDNB-GSH konjugata u eksperimentalnoj smeši. U kvarcnu kivetu sipano je 0.6 mL 0.5 M fosfatnog pufera (pH 6.5), 0.1 mL 25 mM CDNB u 95% etanolu, 0.3 mL 20 mM GSH, H₂O do 2 mL i određena količina uzorka plazme ili tkiva. Na talasnoj dužini od 340 nm spektrofotometrijski je praćeno povećanje apsorbanice na svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Slepu probu čine svi rastvori bez uzorka i aktivnost GST određivana je u odnosu na slepu probu korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDNB-GSH konjugat na 340 nm od $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Aktivnost GST je izražavana u jedinicama po mililitru plazme (Jed/mL plazme), odnosno u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina) za tkiva. Jedinica aktivnosti enzima faze II biotransformacije GST izražava se kao broj nanomolova CDNB-GSH konjugata nastalog u minuti (nmol CDNB-GSH/min).

3.7. Određivanje koncentracije neenzimskih komponenti antioksidacione zaštite

3.7.1. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

3.7.1.1. Plazma i tkiva

Ukupni glutation određen je metodom po Griffith-u (1980). Princip se zasniva na enzimskom cikličnom procesu u kome se GSH oksiduje DTNB i redukuje NADPH uz prisustvo GR. U kvarcnu kivetu za analizu dodavano je 0.7 mL 0.3 mmol NADPH (125 mmol NaH₂PO₄ /6 mmol EDTA, pH 7.5), 0.1 mL 6 mmol DTNB, 0.2 mL destilovane vode, uzorak i 5 µL GR (oko 3 jedinice). Za slepu probu dodavani su svi rastvori osim uzorka, a za standard 1 i standard 2 umesto uzorka sipano je 10 µL odnosno 20 µL standarda GSH. Koncentracija merena je kinetički na 412 nm, u kvarcnim kivetama tokom 30 sekundi. Koncentracija ukupnog glutationa izražavana je u nanomolovima GSH po L plazme (nmol GSH/L plazme), odnosno u nanomolovima GSH po gramu tkiva (nmol GSH/ g tkiva).

3.7.2. Određivanje koncentracije slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa u tkivima

Koncentracija slobodnih SH grupa u tkivima merena je metodom koju je opisao Ellman (1959). Metoda se zasniva na reakciji DTNB sa slobodnim SH grupama prisutnim u uzorku. DTNB oksiduje slobodne SH grupe pri čemu nastaju mešani disulfidi i žuto obojeni TNB čija se apsorbanca meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 412 nm. U epruvete je sipano 0,5 mL uzorka za analizu, 0,5 mL 0,1 M fosfatnog pufera i 0,2 mL 3 mM DTNB rastvorenog u 0,1 M fosfatnom puferu. Apsorbanca je očitavana nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Koncentracija slobodnih SH grupa izračunavana je preko molarog ekstinkcionog koeficijenta od 14150 M⁻¹cm⁻¹ i proporcionalna je koncentraciji nastalog TNB. Koncentracija slobodnih SH grupa izražavana je u mikromolovima SH grupa po gramu tkiva (µmol SH/g tkiva).

3.8. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije (TBARS)

3.8.1. Krv

Količina lipidnih peroksida (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*) određivana je u punoj heparinizovanoj krvi metodom po Ohkawa i sar. (1979). Metoda se zasniva na reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) sa produktom lipidne peroksidacije malondialdehidom (MDA). U kivetu za centrifugiranje sipan je uzorak krvi i 28% trihlorsirćetne kiseline (TCA) u odnosu 2:1 (1 mL krvi + 0.5 mL 28% TCA). Nakon centrifugiranja 5 minuta na 4000 rpm izdvojen je bistar supernatant od koga je pipetirano 0.8 mL i pomešano se sa 0.2 mL 1 % TCA. Nakon inkubiranja u vodenom kupatilu na 100 °C u trajanju od 15 minuta nastala je karakteristična svetlo-ljubičasta boja. Apsorbanca je očitavana spektrofotometrijski na 530 nm u poređenju sa slepom probom. Koncentracija je određena na osnovu molarnog ekstincionog koeficijenta za 1 μM TBARS koji iznosi 1.56×10^5 i izražava se u nmol/mL krvi.

3.8.2. Tkiva

Određivanje lipidne peroksidacije u tkivima jetre, bubrega, mišića i masnog tkiva vršeno je metodom Ohkawa i sar. (1979). Tkiva su homogenizovana i sonifikovana na ledu u 1.15% KCl u odnosu 1:9. U epruvete je pipetirano po 0.1 mL homogenata i dodavano 0.2 mL 8.1% natrijum dodecil sulfata (SDS), 1.5 mL 20 % sirćetne kiseline (pH 3.5, podešeno dodavanjem NaOH), 1.5 mL 0.8% TBA i 0.7 mL destilovane vode. Smeša je inkubirana 60 minuta na 95 °C, a zatim ostavljena da se ohladi na sobnoj temperaturi. Iz svake epruvete nakon hlađenja izdvojeno je po 2 mL smeše u čiste epruvete a zatim dodato 0.5 mL destilovane vode i 2.5 mL smeše n-butanola i piridina u međusobnom odnosu 15:1 uz mešanje. Nakon centrifugiranja 10 min na 4000 rpm odvojena su dva sloja, a zatim je koncentracija TBARS određena spektrofotometrijskim merenjem apsorbance na 532 nm. Koncentracija je izražena u nmol/mg proteina.

3.9. Western blot analiza CYP1A i MT

Nakon završene elektroforeze izvršen je transfer proteina sa gelova na PVDF (polivinilidenfluorid) membrane pomoću aparata Mini Trans-Blott Cell, BioRAD. Membrane su izrezane na nešto veće dimenzije od gela i aktivirane potapanjem u 100% metanolu u trajanju od nekoliko sekundi, a zatim isprane destilovanom vodom. Membrane i gelovi potopljeni su u transfer pufer (20% metanol, 0,192 M glicin, i 0,025 M Tris pH 8,3). Formirani su sendviči koji su se sastojali od sundera, Mini Trans-Blot filter papira (BioRad), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane, sledećeg filter papira i sundera. Ovako napravljen sendvič postavljen je u aparat za transfer. Prenos proteina sa gelova na membrane odvijao se pri konstantnom naponu od 100 V u toku 60 minuta. Bojenjem sa 5% Ponceau S bojom rastvorenoj u sirćetnoj kiselini proverena je uspešnost transfera proteina sa gela na membranu. PVDF membrane su u daljoj proceduri blokirane u nemasnom mleku u prahu rastvorenom u TBS-T puferu (0,05% Tween20 u 1,5 M NaCl, 0,2 M Tris, pH 7,4), 2h na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Blokiranje membrane omogućava da se slobodna, nespecifična mesta na membrani zaštite tako da se specifična antitela za njih ne mogu vezati. Membrane su zatim presečene na nivou određenih molekulskih težina na osnovu Page Ruler Prestained Protein Ladder markera (10-170kDa, Thermo Scientific) i inkubirane preko noći na 4°C u odgovarajućim primarnim antitelima na CYP1A (CP-226, Biosense, korišćeno razblaženje 1:500) i MT (KH-1, Biosense, korišćeno razblaženje 1:500) dobijenim iz zeca i β actin (1:10000, Sigma) dobijenim iz miša. Antitela su razblažena u 3% mleku rastvorenom u TBS-T puferu. Sledećeg dana membrane su nakon ispiranja viška primarnog antitela (5 puta po 5 minuta u TBS-T puferu) inkubirane 2h na sobnoj temperaturi u razblaženjima odgovarajućeg anti-zečjeg (korišćeno razblaženje 1:2000), odnosno anti-mišjeg (1:3000, DAKO) sekundarnog antitela konjugovanog sa peroksidazom iz rena (*engl.* horseradish peroxidase, HRP). Po inkubaciji, membrane su ispirane u TBS-T puferu, a zatim inkubirane u hemiluminiscentnom supstratu, luminolu. Nakon 2 minuta membrane su položene u kasete za razvijanje, prekrivene plastičnom folijom i preko njih je stavljen rentgen film (Kodak Medical x-ray). Nakon 2 minuta ekspozicije film je razvijan potapanjem u razvijlač a zatim u vodu i fiksir. Kvantifikacija signala rađena je pomoću softveraskog paketa TotalLab.

3.10. Određivanje aktivnosti holinesteraze (ChE)

3.10.1. Plazma i tkiva

Aktivnost holinesteraze u plazmi, jetri, mišiću i bubregu određena je metodom po Ellman i sar. 1961. Metoda se zasniva na hidrolizi acetil-tioholina pri čemu oslobođeni tiol reaguje sa DTNB i nastaje žuto obojeni 5-tio-2-nitrobenzoat TNB. Aktivnost enzima merena je spektrofotometrijski na talasnoj dužini 406 nm. U kvarcnu kivetu sipano je 3 mL 0.05 M fosfatnog pufera (pH 7,9), 0.1mL 0.156 M acetil-tioholina i određena količina uzorka plazme ili tkiva. Aktivnost je određena prema slepoj probi, i proporcionalna je koncentraciji nastalog TNB, a izražena je u $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ plazme, odnosno $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva.

3.11. Određivanje koncentracije metala u vodi, jetri i mišiću *N. natrix* i *N. tessellata*

Detekcija hemijskih elemenata u vodi i tkivu jetre i mišića vršena je metodom induktivno spregnute plazme ICP-OES (Spectro Genesis EOP II, Spectro Analytical Instruments DmbH, Kleve, Germany).

U uzorke vode sa ispitivanih lokaliteta nakon filtracije dodata je odgovarajuća količina azotne kiseline. Merenje koncentracije metala izvršeno je u 5 ponavljanja za svaki uzorak, a vrednosti su izražene u $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb). U vodi je izvršena detekcija sledećih hemijskih elemenata: Ag, Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sr, Tl i Zn. Limiti detekcije ($\mu\text{g}/\text{L}$) za određivane elemente su: Ag - 0.471, Al - 3.091, As - 6.666, B - 0.226, Ba - 0.016, Bi - 4.638, Ca - 1.721, Cd - 0.238, Co - 0.829, Cr - 0.490, Cu -10.458, Fe - 13.234, Hg - 2.211, In - 3.669, K - 6.434, Li - 2.771, Mg - 5.753, Mn - 7.305, Mo - 6.573, Na - 6.593, Ni - 11.352, Pb - 2.996 , Sr - 3.325, Tl - 1.947 i Zn - 0.362.

Ukupan uzorak za analizu metala u jetri i mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iznosio je 40 jedinki, (po pet jedinki iste vrste sa dva ispitivana lokaliteta u periodu pre i posle hibernacije).

Tokom disekcije uzeti su uzorci jetre i mišića koji su čuvani na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon izvršene liofilizacije oko 0.2 g suve mase uzorka rastvoreno je u 6 mL 65% HNO_3 i 4

mL 30% H₂O₂. Uzorci su zatim procesuirani u mikrotalasnoj peći (Speedwave™ MWS-3+, Berghof Products, Instruments GmbH, Eningem, Germany). Posle hlađenja do sobne temperature digestovani uzorci su razblaženi do ukupne zapremine od 25 mL i izvršena je detekcija sledećih hemijskih elemenata: Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn. Koncentracije metala u tkivima izražene su u µg/g suve mase.

Talasne dužine korišćene za detekciju elemenata su: Al - 396.152 nm, As - 197.262 nm, Ba - 230.424 nm, Ca - 370.603 nm, Cd - 226.502 nm, Co - 228.616 nm, Cr - 267.716 nm, Cu - 324.754 nm, Fe - 259.941 nm, K - 776.491 nm, Li - 460.289 nm, Mg - 285.213 nm, Mn - 257.611 nm, Mo - 202.095 nm, Ni - 231.604 nm, Pb - 220.353 nm i Zn - 213.856 nm. Limiti detekcije (mg/L) za određivane metale su: Al - 0.006, As - 0.011, Ba - 0.0001, Ca - 0.014, Cd - 0.0002, Co - 0.0007, Cr - 0.0004, Cu - 0.0016, Fe - 0.0003, K - 0.003, Li - 0.065, Mg - 0.0002, Mn - 0.00003, Mo - 0.0007, Ni - 0.0004, Pb - 0.003 i Zn - 0.0002.

Za formiranje plazme koristi se argon, koji se jonizuje pod dejstvom elektromagnetnog polja koje je formirala električna struja. Energija za ekscitaciju atoma iz uzoraka potiče od velike gustine elektrona u plazmi kao i njene temperature koja dostiže 10000 K (9726.9 °C). Uzorci u tečnom i gasovitom stanju mogu se direktno uvoditi u aparat kroz uske cevčice, dok je za uzorke u čvrstom stanju neophodna prethodna ekatrakcija ili digestija kiselinama da bi se dobio ratvor. Rastvori su prevođeni u aerosol i u takvom stanju uvođeni u kanal sa plazmom.

Kvalitet analitičkog procesa kontrolisan je analizom referentnih materija (NIST-1643, RS – za vodui GBW10015 Spinach – za tkiva).

3.12. Statistička obrada rezultata

Dobijeni rezultati predstavljeni su kao srednja vrednost ± standardna greška ($X_{sr} \pm SG$). Prvi deo istraživanja obuhvatio je ispitivanje značajnih razlika između ispitivanih biomarkera oksidacionog stresa *N. natrix* i *N. tessellata* sa područja Obedske bare i Pančevačkog rita u periodu pre i posle hibernacije. Distribucija svih varijabli analizirana je Kolmogorov-Smirnov testom normalnosti distribucije. Kako su rezultati testa potvrdili normalnu distribuciju, za analizu uticaja sezone i lokaliteta korišćena je

dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA), a za određivanje razlike između ispitivanih grupa korišćen je Fišerov post hoc test (F vrednosti prikazane su u tabelama). Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$. Kanonijskom diskriminacionom analizom za svako tkivo određivan je stepen diferenciranosti između vrsta u oba ispitivana perioda, pri čemu su detektovane varijable koje najviše doprinose razlikama.

Koncentracija metala u tkivima je takođe imala normalnu distribuciju, a razlike između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni, kao i razlike između vrsta sa istog lokaliteta analizirane su Studentovim t-testom. Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Prosečne telesne mase i dužine životinja

Pre hibernacije, u jesen (krajem oktobra) na području Obedske bare izlovljeno je 10 ženki *Natrix natrix* (belouška) čija je srednja vrednost standardne dužine tela (SVL, snout-vent length) iznosila 78.36 ± 1.95 cm, a srednja vrednost mase tela 209.26 ± 13.07 g, i 10 ženki *Natrix tessellata* (ribarica) (dužina 67.71 ± 4.26 cm, masa 131.7 ± 30.78 g) (Tabele 1 i 2). Na Pančevačkom ritu u istoj sezoni izlovljeno je takođe 10 ženki *N. natrix* (dužina 75.39 ± 0.92 cm, masa 157.33 ± 6.33 g) i 7 ženki *N. tessellata* (dužina 60.21 ± 0.90 cm, masa 77.92 ± 7.91 g).

Posle hibernacije, u proleće (početak aprila) na području Obedske bare izlovljeno je 5 ženki *N. natrix* (dužina 73.2 ± 4.35 cm, masa 149.38 ± 24.84 g) i 5 ženki *N. tessellata* (dužina 68.24 ± 2.96 cm, masa 114.37 ± 12.41 g). Na području Pančevačkog rita, posle hibernacije izlovljeno je 9 ženki *N. natrix* (dužina 73.28 ± 1.72 cm, masa 138.12 ± 10.02 g) i 6 ženki *N. tessellata* (dužina 81.52 ± 3.77 cm, masa 294.83 ± 37.13 g).

Tabela 1. Telesna masa *N. natrix* i *N. tessellata*.

Telesna masa	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	209.26 ± 13.07	149.38 ± 24.84	131.7 ± 30.78	114.37 ± 12.41
Pančevački rit	157.33 ± 6.33	138.12 ± 10.02	77.92 ± 7.91	294.83 ± 37.13

Tabela 2. Standardne dužine tela (SVL) *N. natrix* i *N. tessellata*.

Dužina SVL	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	78.36 ± 1.95	73.2 ± 4.35	67.71 ± 4.26	68.24 ± 2.96
Pančevački rit	75.39 ± 0.92	73.28 ± 1.72	60.21 ± 0.90	81.52 ± 3.77

4.2. Kondicioni faktor (CF) i hepatosomatski indeks (HSI)

U Tabelama 3 i 4 prikazane su vrednosti za CF i HSI ispitivanih vrsta, kao i rezultati dvofaktorske analize varijanse. Na promenu CF i HSI vrste *N. natrix* ispitivani faktori nisu imali značajan uticaj. Vrednost CF *N. tessellata* iz Pančevačkog rita u periodu posle hibernacije bila je značajno veća u odnosu na vrednost CF jedinki iz Obedske bare u istom periodu, kao i u odnosu na CF vrednost dobijenu u periodu pre hibernacije jedinki iz Pančevačkog rita. U periodu pre hibernacije, HSI *N. tessellata* iz Pančevačkog rita bio je veći od HSI jedinki iz Obedske bare, kao i od HSI dobijenog kod jedinki iz Pančevačkog rita u periodu posle hibernacije.

Tabela 3. Kondicioni faktor (CF) *N. natrix* i *N. tessellata*. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

KONDITIONI FAKTOR (CF)	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	0.043 ± 0.002	0.037 ± 0.002	0.037 ± 0.001	0.036 ± 0.002
Pančevački rit	0.037 ± 0.001	0.036 ± 0.003	0.035 ± 0.002	0.053 ± 0.002 ^{*b}
ANOVA efekti	S: nd	F=3.09	S: p<0.05	F=18.45
	L: nd	F=3.19	L: p<0.05	F=15.20
	SxL: nd	F=1.68	SxL: p<0.05	F=21.42

Tabela 4. Hepatosomatski indeks (HSI) *N. natrix* i *N. tessellata*. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

HEPATOSOMATSKI INDEKS (HSI)	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	3.87 ± 0.09	3.80 ± 0.38	3.06 ± 0.16	3.27 ± 0.21
Pančevački rit	3.57 ± 0.20	3.65 ± 0.57	3.80 ± 0.34*	2.86 ± 0.17 ^b
ANOVA efekti	S: nd L: nd SxL: nd	F=0.00 F=0.36 F=0.05	S: nd L: nd SxL: $p < 0.05$	F= 2.31 F=0.42 F=5.68

4.3. Koncentracija hemoglobina (Hb) u krvi životinja

Na osnovu rezultata dvofaktorske analize varijanse i Fisher-ovog post-hoc testa konstatovano je da u krvi *N. natrix* na oba ispitivana lokaliteta u periodu posle hibernacije dolazi do značajnog smanjenja koncentracije Hb. Kod *N. tessellata* nije registrovan značajan uticaj ispitivanih faktora na promenu koncentracije Hb (Tabela 5).

Tabela 5. Koncentracija hemoglobina u krvi *N. natrix* i *N. tessellata*. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki sa Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Hb	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	5.44 ± 0.41	3.65 ± 0.49 ^a	5.79 ± 0.37	5.37 ± 0.49
Pančevački rit	6.37 ± 0.43	4.72 ± 0.29 ^b	5.41 ± 0.20	5.19 ± 0.25
ANOVA efekti	S: p<0.05	F=15.19	S: nd	F= 0.76
	L: p<0.05	F=5.19	L: nd	F=0.59
	SxL: nd	F=0.03	SxL: nd	F=0.08

4.4. Koncentracija ukupnih proteina

U Tabeli 6 i 7 prikazane su koncentracije proteina u jetri i bubregu ispitivanih vrsta, kao i rezultati dvofaktorske analize varijanse uticaja sezone i lokaliteta na promenu ispitivanog parametra. Koncentracija proteina kretala se u opsegu od 13.21 ± 0.82 mg/mL do 20.33 ± 0.37 mg/mL u jetri, odnosno od 11.24 ± 0.40 do 18.55 ± 1.63 mg/mL u bubregu ispitivanih vrsta. U periodu posle hibernacije koncentracije proteina u jetri i bubregu obe ispitivane vrste bile su veće u jedinkama iz Obedske bare. U jetri vrste *N. tessellata* iz Obedske bare koncentracija proteina bila je značajno manja u periodu pre hibernacije, a isti trend dobijen je u bubregu *N. natrix*, takođe na lokalitetu Obedska bara.

Koncentracije ukupnih proteina u mišiću ispitivanih vrsta kretale su se u opsegu od 7.75 ± 0.34 do 11.84 ± 0.92 mg/mL i prikazane su u Tabeli 8. U mišiću *N. natrix* nije bilo značajne razlike u koncentraciji proteina između ispitivanih grupa. Kod vrste *N. tessellata* u periodu pre hibernacije koncentracija proteina bila je veća u jedinkama iz Pančevačkog rita, dok je posle hibernacije konstatovan suprotan trend. Kod jedinki iz Pančevačkog rita koncentracija proteina u mišiću bila je značajno manja u periodu posle hibernacije u odnosu na period pre hibernacije.

U Tabeli 9 prikazane su koncentracije ukupnih proteina u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata*. Vrednosti su se kretale u opsegu od 1.83 ± 1.19 do 8.67 ± 0.61 mg/mL. Kod vrste *N. natrix* u periodu pre hibernacije značajno veća koncentracija izmerena je kod jedinki sa Obedske bare. U masnom tkivu *N. natrix* iz Pančevačkog rita koncentracija proteina bila je značajno veća u periodu posle hibernacije. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da kod *N. tessellata* na koncentraciju proteina značajno utiče samo sezona. Tako je u jedinkama sa oba ispitivana lokaliteta koncentracija proteina značajno veća u periodu pre hibernacije.

Tabela 6. Koncentracija ukupnih proteina u jetri *N. natrix* i *N. tessellata*. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

PROTEINI JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	17.32 ± 1.21	19.80 ± 1.06	16.59 ± 0.70	20.33 ± 0.37 ^a
Pančevački rit	16.28 ± 0.54	16.82 ± 0.36*	14.68 ± 1.09	13.21 ± 0.82*
ANOVA efekti	S: nd L: $p < 0.05$ SxL: nd	F=2.83 F=4.96 F=1.16	S: nd L: $p < 0.05$ SxL: $p < 0.05$	F= 1.74 F=27.39 F=9.12

Tabela 7. Koncentracija ukupnih proteina u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata*. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

PROTEINI BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	12.69 ± 0.70	18.55 ± 1.63 ^a	13.55 ± 0.89	16.20 ± 0.75
Pančevački rit	12.44 ± 0.39	14.11 ± 0.44*	13.25 ± 1.53	11.24 ± 0.40*
ANOVA efekti	S: $p < 0.05$ L: $p < 0.05$ SxL: $p < 0.05$	F=26.73 F=10.33 F=8.27	S: nd L: $p < 0.05$ SxL: $p < 0.05$	F= 0.09 F=5.83 F=4.58

Tabela 8. Koncentracija ukupnih proteina u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata*. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

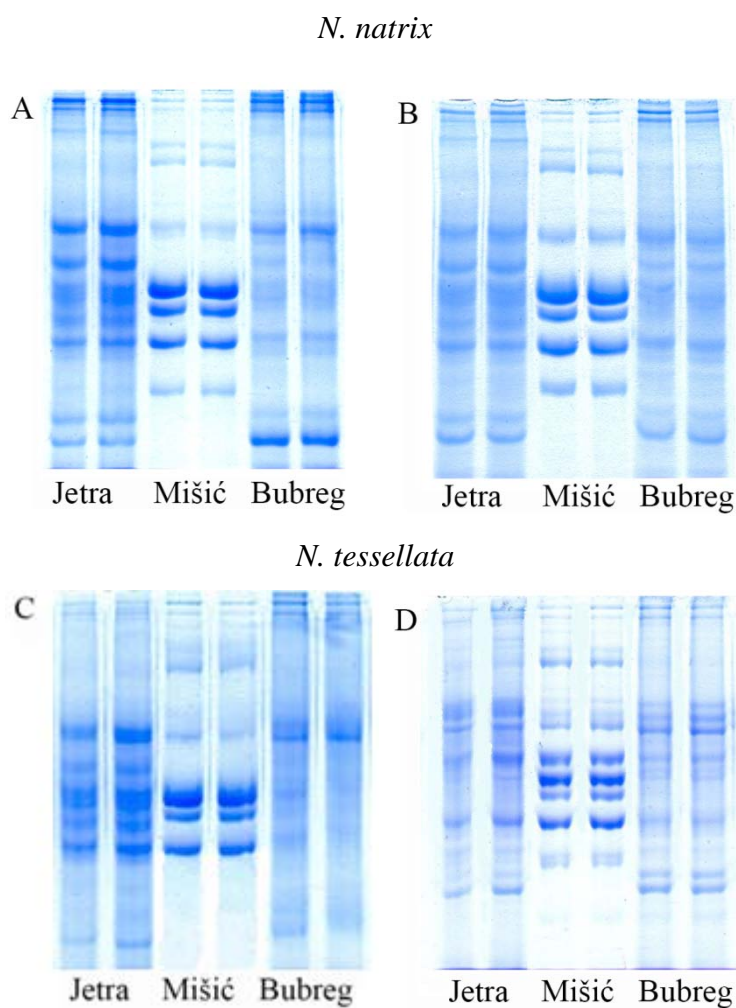
PROTEINI MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	10.12 ± 1.08	11.84 ± 0.92	9.21 ± 0.49	10.52 ± 0.41
Pančevački rit	9.37 ± 0.63	10.01 ± 0.70	11.34 ± 1.06*	7.75 ± 0.34* ^b
ANOVA efekti	S: nd L: nd SxL: nd	F=1.68 F=2.00 F=0.35	S: nd L: nd SxL: $p < 0.05$	F= 2.66 F=0.20 F=12.41

Tabela 9. Koncentracija ukupnih proteina u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata*. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

PROTEINI MASNO TKIVO	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	4.69 ± 0.42	5.35 ± 0.41	5.46 ± 0.80	4.32 ± 0.64 ^a
Pančevački rit	1.83 ± 1.19*	4.42 ± 0.41 ^b	8.67 ± 0.61	6.89 ± 0.35 ^b
ANOVA efekti	S: $p < 0.05$ L: $p < 0.05$ SxL: $p < 0.05$	F=17.80 F=24.39 F=6.30	S: $p < 0.05$ L: nd SxL: nd	F= 15.15 F=3.86 F=0.18

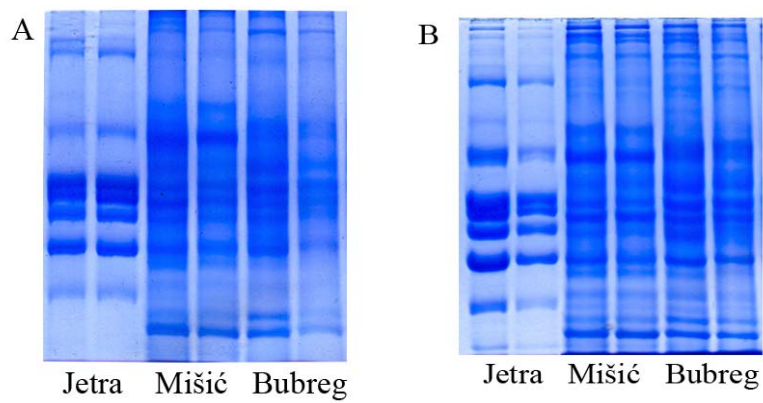
4.5. Elektroforetski profili proteina

Razlike elektroforetske analize proteina prikazane su na Slikama 7 i 8. Elektroforetska analiza proteina pokazuje razlike koje postoje između ispitivanih vrsta zmija u dva perioda istraživanja kao i razlike koje postoje između tkiva svake vrste. Na ovaj način su samo kvalitativno prikazane razlike koje postoje u kompoziciji proteina u uzorcima.

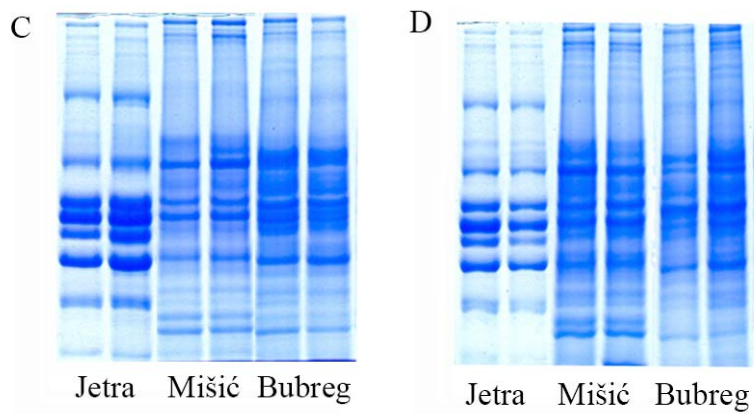


Slika 7. Elektroforetski profil proteina u jetri, mišiću i bubregu A) *N. natrix* iz Obedske bare, B) *N. natrix* iz Pančevačkog rita, C) *N. tessellata* iz Obedske bare i D) *N. tessellata* iz Pančevačkog rita u periodu pre hibernacije.

N. natrix



N. tessellata



Slika 8. Elektroforetski profil proteina u jetri, mišiću i bubregu A) *N. natrix* iz Obedske bare, B) *N. natrix* iz Pančevačkog rita, C) *N. tessellata* iz Obedske bare i D) *N. tessellata* iz Pančevačkog rita u periodu posle hibernacije.

4.6. Aktivnost enzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja

4.6.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD)

4.6.1.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u krvi

Dvofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da na aktivnost CuZn SOD u krvi obe ispitivane vrste značajno utiče samo lokalitet. Post-hoc testiranjem utvrđeno je da je kod obe vrste u periodu posle hibernacije aktivnost ovog enzima značajno manja na lokalitetu Pančevački rit u odnosu na Obedsku baru (Tabela 10; Grafik 1A i 1B).

4.6.1.2. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u tkivima

Uk SOD (Tabela 11; Grafik 2A i 2B) i CuZn SOD (Tabela 12; Grafik 3A i 3B) imale su isti trend promene aktivnosti u jetri ispitivanih vrsta. Tako je kod *N. natrix* aktivnost Uk SOD i CuZn SOD statistički značajno veća u posthibernacijskom periodu u odnosu na period pre hibernacije na oba ispitivana lokaliteta. Međuti, kod vrste *N. tessellata* aktivnosti su bile značajno manje u periodu posle hibernacije. Dvofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da na aktivnost Mn SOD u jetri *N. natrix* (Tabela 13; Grafik 4A i 4B) sezona, lokalitet kao ni njihova interakcija nemaju značajan uticaj, dok kod *N. tessellata* oba faktora kao i njihove interakcije značajno utiču na promenu aktivnosti Mn SOD. Post-hoc analizom pokazano je da je aktivnost ove izoforme SOD u periodu posle hibernacije kod zmija u Pančevačkom ritu značajno manja u odnosu na zmije uz Obedske bare u istoj sezoni, kao i da je značajno manja u odnosu na aktivnost izmerenu kod životinja iz Pančevačkog rita u periodu pre hibernacije.

Aktivnost Uk SOD (Tabela 14; Grafik 4A i 4B) i CuZn SOD (Tabela 15; Grafik 5A i 5B) u bubregu obe vrste bile su statistički značajno veće u periodu posle hibernacije u odnosu na period pre hibernacije na oba ispitivana lokaliteta. Konstatovano je da je aktivnost Uk SOD i CuZn SOD u bubregu *N. tessellata* u periodu posle hibernacije značajno manja u Pančevačkom ritu u odnosu na Obedsku baru u istoj sezoni. Kod vrste *N. natrix* iz Obedske bare aktivnost Mn SOD (Tabela 16; Grafik 7A i 7B) bila je značajno manja u periodu posle hibernacije u odnosu na period pre hibernacije, dok je u Pančevačkom ritu zabeležen suprotan trend. Takođe, kod ove vrste

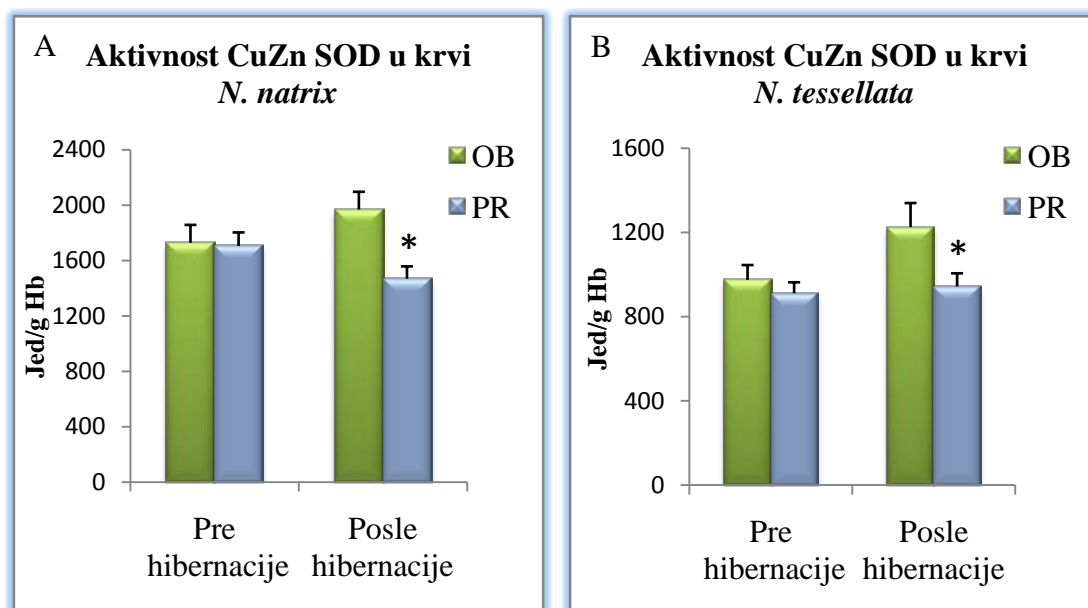
izlovljene u Pančevačkom ritu u periodu posle hibernacije aktivnost Mn SOD bila je značajno manja u odnosu na zmijske iz Obedske bare. Kod *N. tessellate*, na oba ispitivana lokaliteta aktivnost Mn SOD bila je značajno manja u posthibernacijskoj fazi. Takođe u oba ispitivana perioda aktivnost koja je izmerena u bubregu jedinki iz Pančevačkog rita bila je statistički značajno manja u odnosu na aktivnost izmerenu kod jedinki iz Obedske bare.

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da na aktivnost Uk SOD u mišiću *N. natrix* (Tabela 17; Grafik 8A) značajno utiče samo lokalitet. Post-hoc testiranjem utvrđeno je da je aktivnost izmerena u ovom tkivu u jedinkama iz Pančevačkog rita značajno veća u odnosu na Obedsku baru u periodu pre hibernacije. Na aktivnost Uk SOD u mišiću *N. tessellata* (Tabela 17; Grafik 8B) značajno su uticali sezona, lokalitet i njihova interakcija. Aktivnost koja je izmerena kod životinja iz Pančevačkog rita pesle hibernacije bila je značajno veća u odnosu na one iz Obedske bare u istoj sezoni, i u odnosu na period pre hibernacije u Pančevačkom ritu. Na aktivnost CuZn SOD u mišiću obe ispitivane vrste (Tabela 18; Grafik 9A i 9B) značajno utiče sezona, a post-hoc testiranjem pokazano je da je aktivnost značajno veća u periodu posle hibernacije na oba ispitivana lokaliteta. Kod vrste *N. natrix* dvofaktorskom analizom varijanse potvrđen je i uticaj lokaliteta. U periodu pre hibernacije aktivnost CuZn SOD bila je veća u mišiću jedinki iz Pančevačkog rita. Na aktivnost Mn SOD u mišiću (Tabela 19; Grafik 10A i 10B) značajno utiče samo sezona, što je pokazano dvofaktorskom analizom varijanse. Kod *N. natrix* aktivnost je značajno manja na oba ispitivana lokaliteta, dok je kod *N. tessellata* aktivnost značajno manja samo kod jedinki iz Obedske bare u periodu posle hibernacije u odnosu na prehibernacijski period.

U masnom tkivu izmerena je samo Uk SOD (Tabela 20; Grafik 11A i 11B). Kod vrste *N. natrix* dvofaktorska analiza varijanse pokazala je anačajan uticaj oba faktora kao i njihove interakcije. Pre hibernacije aktivnost je bila značajno veća u jedinkama iz Pančevačkog rita, dok je posle hibernacije dobijen suprotan trend. U masnom tkivu jedinki iz Obedske bare aktivnost Uk SOD bila je veća u periodu posle hibernacije, dok je kod jedinki iz Pančevačkog rita bila veća u periodu posle hibernacije u odnosu na prehibernacijski period. U masnom tkivu *N. tessellata* nisu konstatovane značajne razlike između grupa koje su poređene.

Tabela 10. Aktivnosti CuZn SOD (Jed/g Hb) u krvi *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

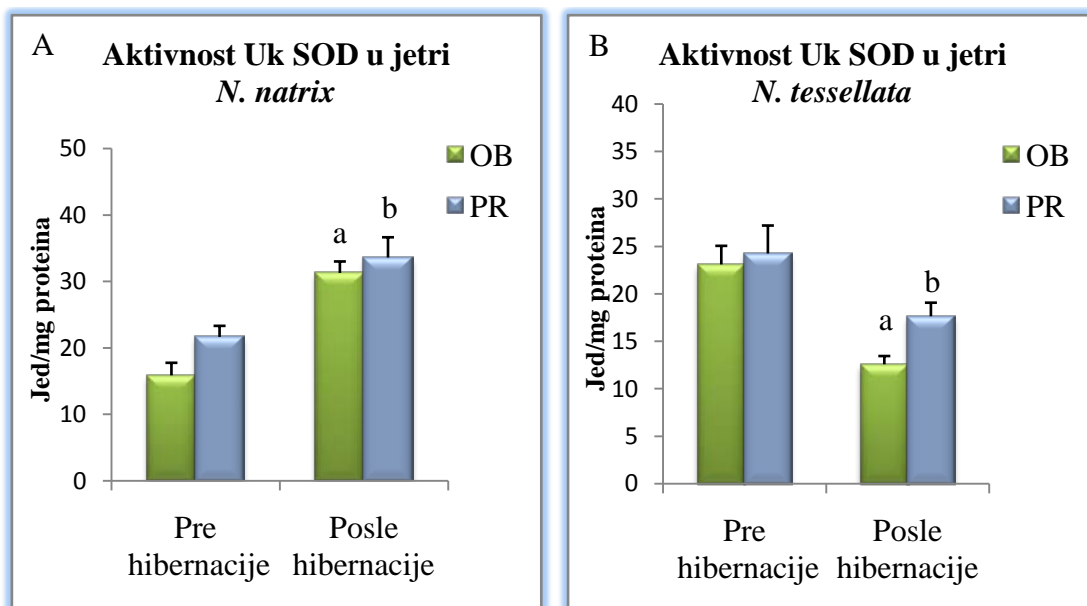
CuZn SOD KRV	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	1728.65 \pm 129.52	1968.76 \pm 128.48	975.47 \pm 70.60	1226.89 \pm 114.01
Pančevački rit	1705.91 \pm 97.91	1469.81 \pm 88.61*	912.51 \pm 51.67	944.65 \pm 62.20*
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 0.00 F= 4.94 F= 4.12	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 3.23 F= 4.79 F= 1.93



Grafik 1. Aktivnost CuZn SOD izražena u J/g Hb u krvi A) *N. natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 11. Aktivnosti Uk SOD (Jed/mg proteina) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

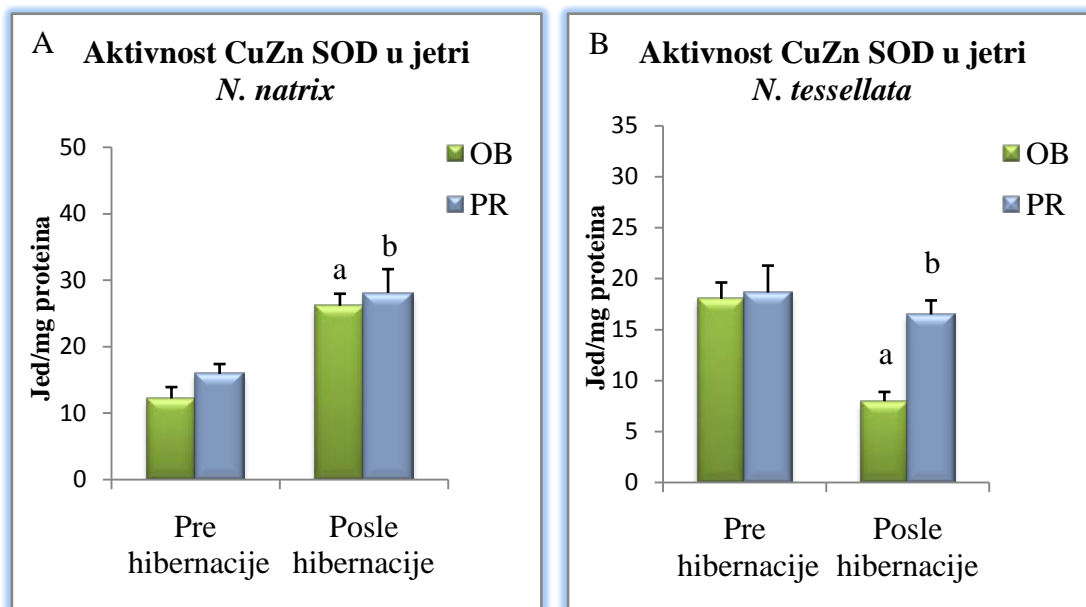
Uk SOD JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	15.90 \pm 1.89	31.31 \pm 1.73 ^a	23.12 \pm 1.96	12.60 \pm 0.87 ^a
Pančevački rit	21.68 \pm 1.67	33.63 \pm 3.05 ^b	24.27 \pm 2.95	17.66 \pm 1.43 ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05	F= 34.17	S: p<0.05	F= 14.68
	L: nd	F= 2.99	L: nd	F= 1.93
	SxL: nd	F= 0.55	SxL: nd	F= 0.77



Grafik 2. Aktivnost Uk SOD izražena u Jed/g Hb u masnom tkivu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 12. Aktivnosti CuZn SOD (Jed/mg proteina) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

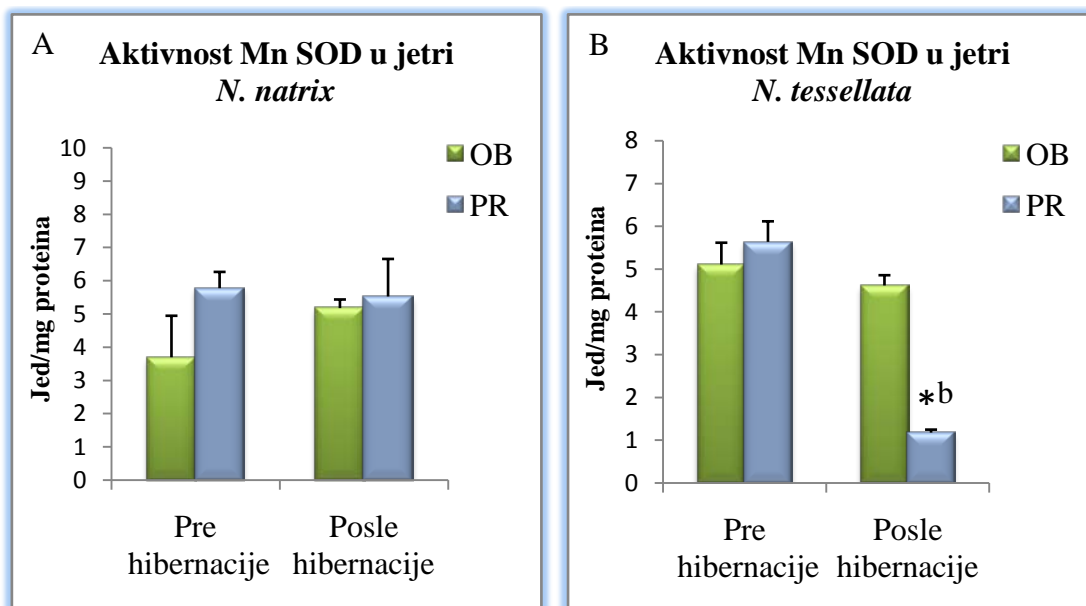
CuZn SOD JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	12.20 \pm 1.71	26.14 \pm 1.82 ^a	18.01 \pm 1.61	7.97 \pm 0.91 ^a
Pančevački rit	15.90 \pm 1.48	28.09 \pm 3.57 ^b	18.63 \pm 2.65	16.48 \pm 1.38 ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: nd SxL: nd	F= 26.92 F= 1.26 F= 0.12	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 9.71 F= 5.45 F= 4.07



Grafik 3. Aktivnost CuZn SOD izražena u Jed/mg proteina u jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 13. Aktivnosti Mn SOD (Jed/mg proteina) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

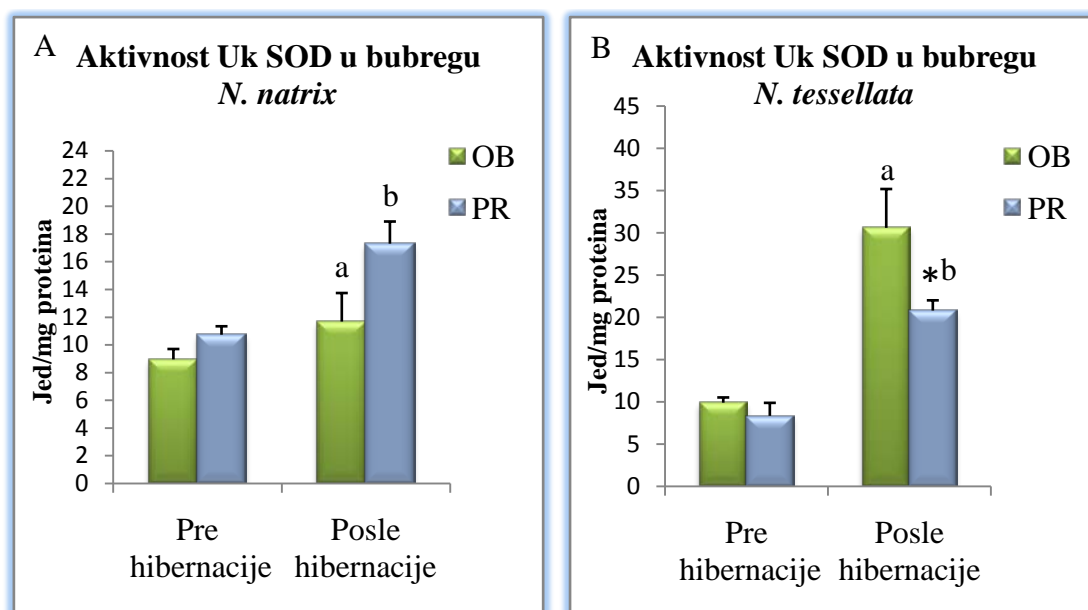
Mn SOD JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	3.70 \pm 1.25	5.18 \pm 0.26	5.11 \pm 0.51	4.62 \pm 0.24
Pančevački rit	5.78 \pm 0.49	5.53 \pm 1.13	5.64 \pm 0.48	1.18 \pm 0.07* ^b
ANOVA efekti	S: nd	F= 0.40	S: p<0.05	F= 22.46
	L: nd	F= 1.57	L: p<0.05	F= 7.75
	SxL: nd	F= 0.78	SxL: p<0.05	F= 14.51



Grafik 4. Aktivnost Mn SOD izražena u Jed/mg proteina u jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 14. Aktivnosti Uk SOD (Jed/mg proteina) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

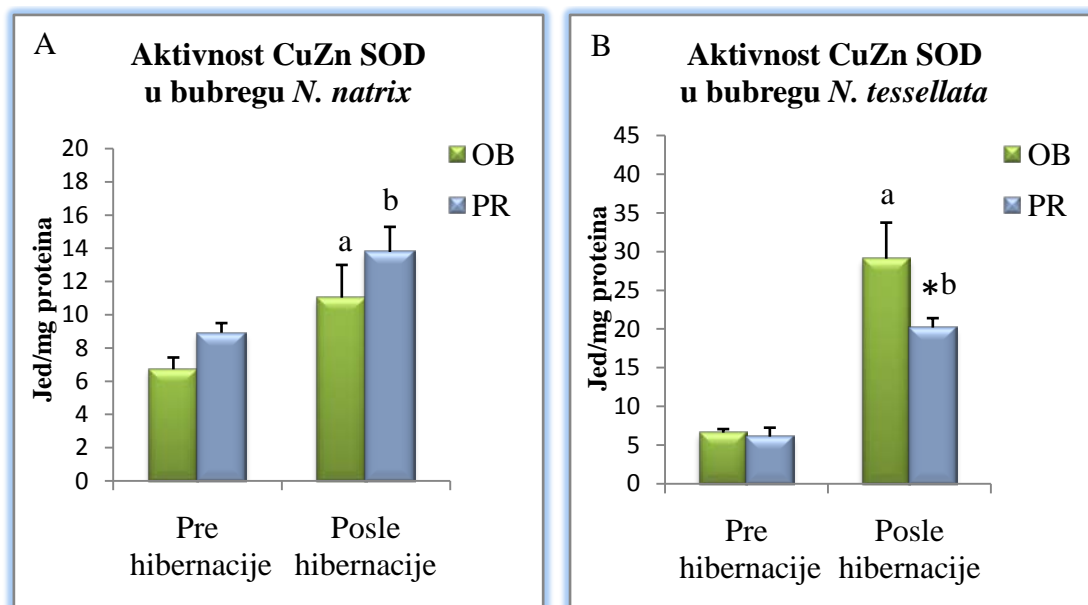
Uk SOD BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	8.95 \pm 0.75	11.68 \pm 2.06	9.90 \pm 0.62	30.60 \pm 4.60 ^a
Pančevački rit	10.73 \pm 0.61	17.30 \pm 1.60 ^{*b}	8.34 \pm 1.54	20.81 \pm 1.21 ^{*b}
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 13.84 F= 8.75 F= 2.34	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 57.80 F= 6.76 F= 3.55



Grafik 5. Aktivnost UkSOD izražena u Jed/mg proteinu u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 15. Aktivnosti CuZn SOD (J/mg proteina) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

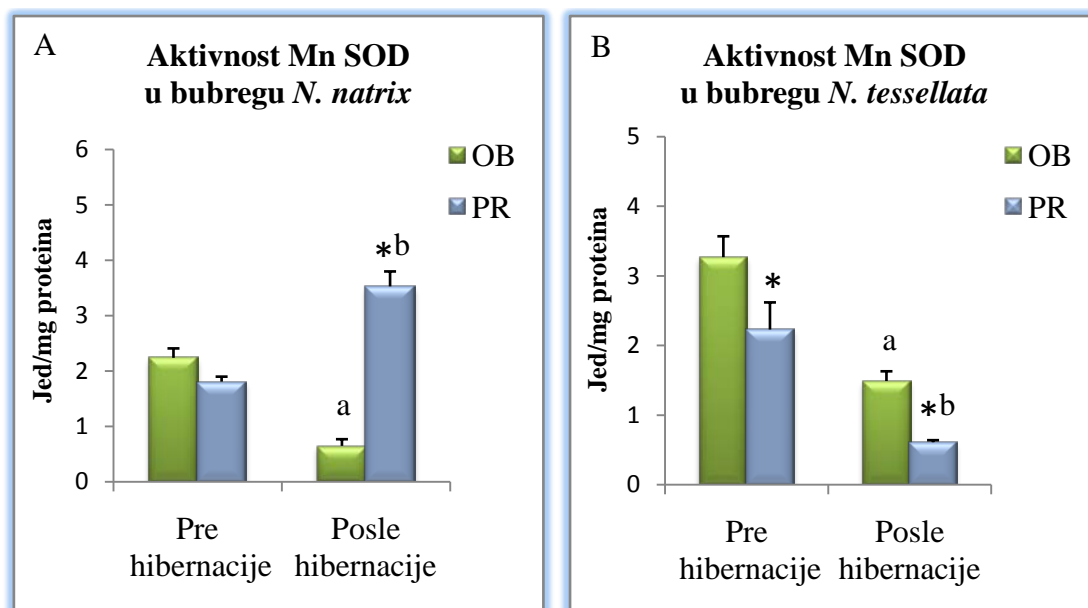
CuZn SOD BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	6.72 \pm 0.71	11.03 \pm 1.97 ^a	6.62 \pm 0.46	29.10 \pm 4.67 ^a
Pančevački rit	8.92 \pm 0.58	13.78 \pm 1.51 ^b	6.10 \pm 1.16	20.20 \pm 1.22 ^{*b}
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 14.99 F= 4.35 F= 0.05	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 71.81 F= 4.77 F= 3.77



Grafik 6. Aktivnost CuZn SOD izražena u Jed/mg proteina u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 16. Aktivnosti Mn SOD (Jed/mg proteina) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

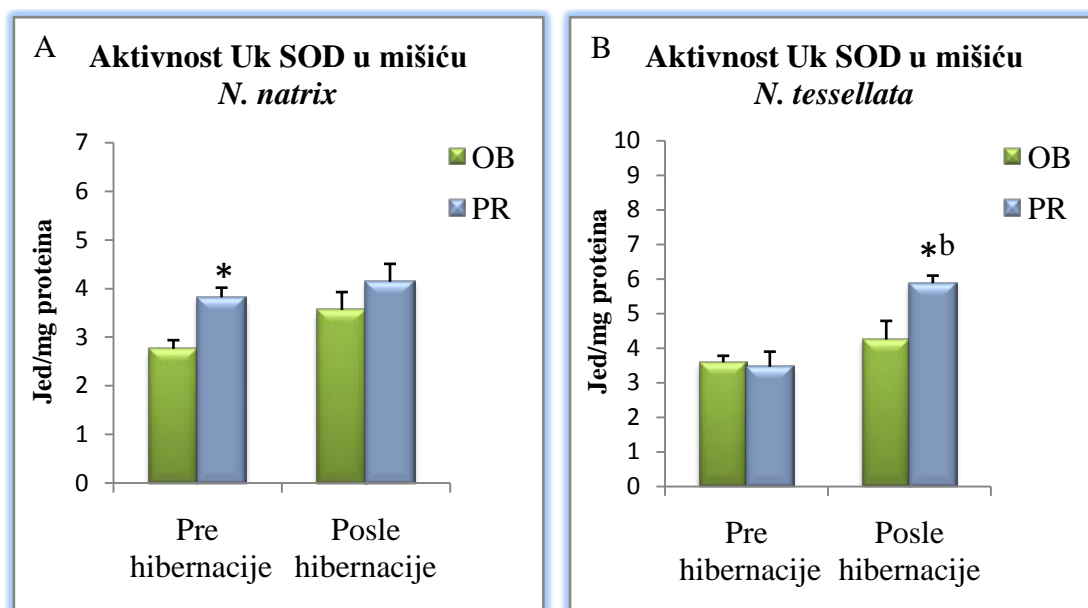
Mn SOD BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	2.24 \pm 0.17	0.65 \pm 0.12 ^a	3.27 \pm 0.30	1.49 \pm 0.14 ^a
Pančevački rit	1.81 \pm 0.09	3.53 \pm 0.27 ^{*b}	2.23 \pm 0.39 [*]	0.61 \pm 0.03 ^{*b}
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 0.11 F= 40.71 F= 73.85	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 36.10 F= 11.54 F= 0.08



Grafik 7. Aktivnost Mn SOD izražena u Jed/mg proteina u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 17. Aktivnosti UkSOD (J/mg proteina) u mišiću *N. tessellata* i *N. natrix* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

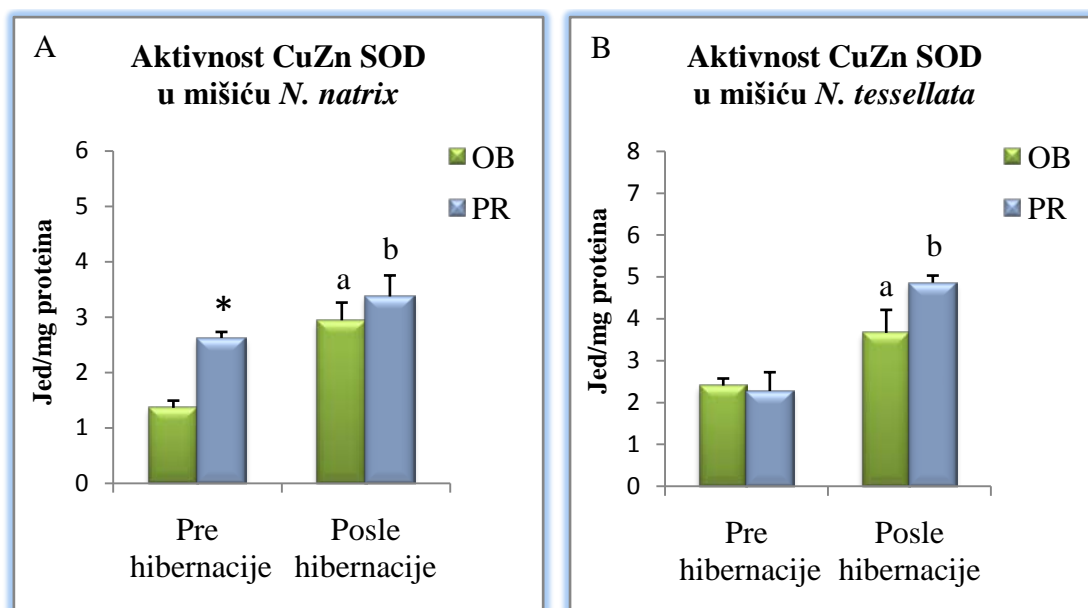
Uk SOD MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	2.76 \pm 0.18	3.56 \pm 0.37	3.59 \pm 0.19	4.25 \pm 0.54
Pančevački rit	3.82 \pm 0.20*	4.14 \pm 0.37	3.46 \pm 0.44	5.88 \pm 0.22* ^b
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 3.65 F= 7.88 F= 0.65	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 18.47 F= 3.37 F= 5.99



Grafik 8. Aktivnost Uk SOD izražena u Jed/mg proteinu mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 18. Aktivnosti CuZn SOD (Jed/mg proteina) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

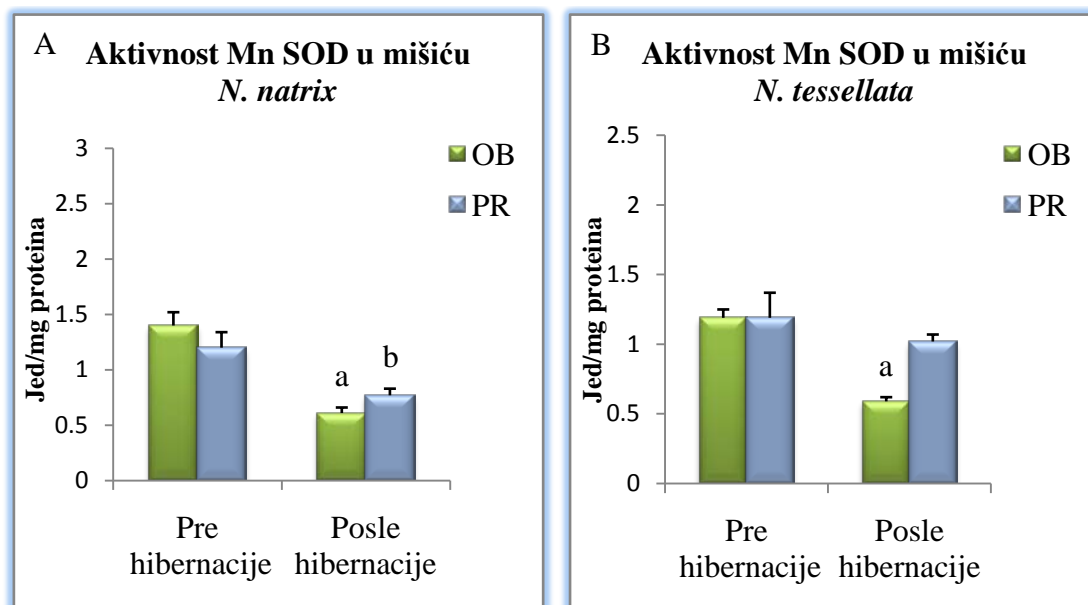
CuZn SOD MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	1.36 \pm 0.13	2.94 \pm 0.32 ^a	2.40 \pm 0.17	3.66 \pm 0.55 ^a
Pančevački rit	2.62 \pm 0.11*	3.37 \pm 0.38 ^b	2.27 \pm 0.45	4.86 \pm 0.17 ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 20.69 F= 10.87 F= 2.61	S: p<0.05 L: nd SxL: nd	F= 29.93 F= 2.31 F= 3.57



Grafik 9. Aktivnost CuZn SOD izražena u Jed/mg proteina u mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 19. Aktivnosti Mn SOD (Jed/mg proteina) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

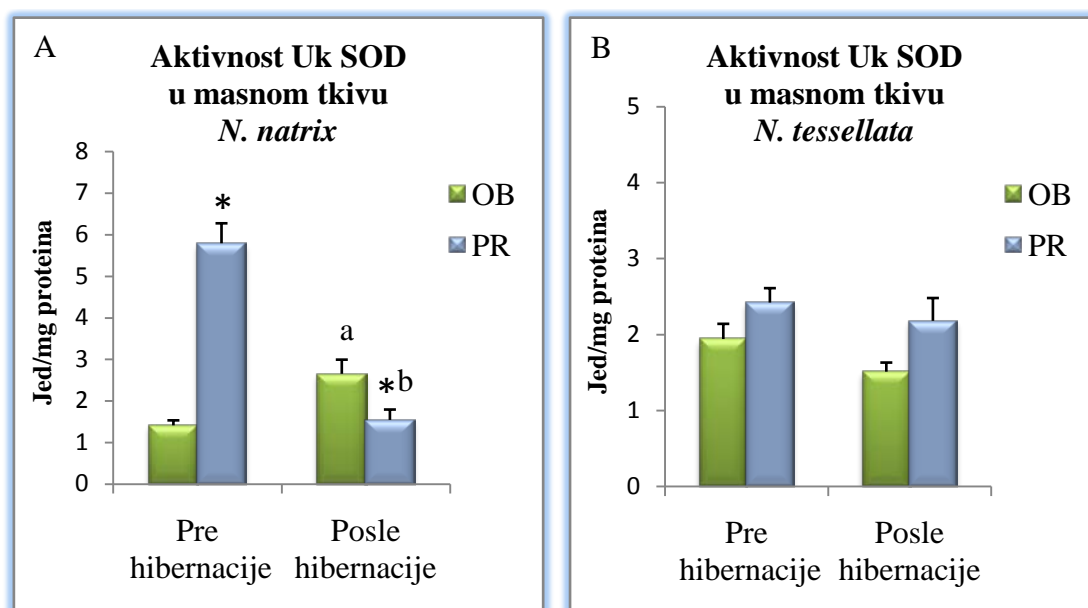
Mn SOD MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	1.40 \pm 0.12	0.61 \pm 0.05 ^a	1.19 \pm 0.06	0.59 \pm 0.03 ^a
Pančevački rit	1.20 \pm 0.14	0.77 \pm 0.06 ^b	1.19 \pm 0.18	1.02 \pm 0.05
ANOVA efekti	S: p<0.05	F= 25.52	S: p<0.05	F= 11.67
	L: nd	F= 0.05	L: nd	F= 3.80
	SxL: nd	F= 2.22	SxL: nd	F= 3.71



Grafik 10. Aktivnost Mn SOD izražena u Jed/mg proteina u mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 20. Aktivnosti Uk SOD (Jed/mg proteina) u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

Uk SOD MASNO TKIVO	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	1.41 \pm 0.12	2.65 \pm 0.34 ^a	1.94 \pm 0.20	1.51 \pm 0.12
Pančevački rit	5.79 \pm 0.48*	1.54 \pm 0.25* ^b	2.42 \pm 0.19	2.18 \pm 0.30
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 19.90 F= 23.77 F= 66.86	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 2.12 F= 6.29 F= 0.18



Grafik 11. Aktivnost Uk SOD izražena u Jed/mg proteinu masnom tkivu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

4.6.2. Aktivnost katalaze (CAT)

4.6.2.1. Aktivnost katalaze (CAT) u krvi

U Tabeli 24 i Grafikonima 12A i 12B prikazana je aktivnost CAT u krvi vrsta *N. natrix* i *N. tessellata* izlovljenih pre i posle hibernacije na lokalitetima Pančevački rit i Obedska bara. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajan uticaj oba ispitivana faktora (sezone i lokaliteta), kao i njihove interakcije na aktivnost ovog enzima kod obe ispitivane vrste. Dobijeni podaci pokazuju da kod vrste *N. natrix* iz Pančevačkog rita postoji značajno smanjenje aktivnosti ovog enzima u periodu posle hibernacije (83.41 ± 6.53 Jed/g Hb) u odnosu na prehibernacijski period (240.63 ± 24.12 Jed/g Hb). Kod iste vrste pre hibernacije konstatovana je statistički veća aktivnost kod zmija iz Pančevačkog rita (240.63 ± 24.12 Jed/g Hb) u poređenju sa životinjama iz Obedske bare (119.98 ± 17.15 Jed/g Hb). Kod vrste *N. tessellata* iz Obedske bare u posthibernacijskom periodu aktivnost CAT iznosila je 45.31 ± 17.8 Jed/g Hb i bila značajno smanjena u odnosu na prehibernacijski period (220.74 ± 23.12 Jed/g Hb). Takođe, kod iste vrste pre hibernacije postoji značajna razlika između ispitivanih lokaliteta. Naime, aktivnost enzima je manja kod jedinki iz Pančevačkog rita (84.30 ± 6.20 Jed/g Hb) u poređenju sa onima iz Obedske bare (220.74 ± 23.12 Jed/g Hb).

4.6.2.2. Aktivnost katalaze (CAT) u tkivima

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da na aktivnost CAT u jetri obe ispitivane vrste, slično kao i u krvi, utiču i sezona i lokalitet, kao i interakcija ova dva faktora. Statistički podaci ukazuju da u jetri vrste *N. natrix* (Tabela 22, Grafik 13A) iz Obedske bare i *N. tessellata* (Tabela 22, Grafik 13B) iz Pančevačkog rita postoji značajno povećanje aktivnosti posle hibernacije u odnosu na period pre hibernacije. Aktivnost ispitivanog enzima kod *N. natrix* iz Obedske bare iznosila je 4.79 ± 0.59 Jed/mg proteina pre i 11.81 ± 1.39 Jed/mg proteina posle hibernacije, dok je kod vrste *N. tessellata* iz Pančevačkog rita iznosila 13.62 ± 1.97 Jed/mg proteina pre a 23.92 ± 1.45 Jed/mg proteina posle hibernacije. Konstatovana je povećana aktivnost ovog enzima kod *N. natrix* iz Pančevačkog rita u poređenju sa onima iz Obedske bare u periodu pre hibernacije (14.73 ± 1.33 Jed/mg proteina i 4.79 ± 0.59 Jed/mg proteina),

kao i kod *N. tessellata* u periodu posle hibernacije (23.92 ± 1.45 Jed/mg proteina i 10.73 ± 1.04 Jed/mg proteina).

Na osnovu dobijenih podataka za aktivnost CAT u bubregu *N.natrix* i *N. tessellata* koji su prikazani u Tabeli 23 i Grafiku 14A nije pronađena statistički značajna razlika između lokaliteta. Dvofaktorska analiza varijanse u bubregu *N. natrix* pokazala je samo značajan uticaj sezone, dok je kod *N. tessellata* pored uticaja sezone pokazan i značajan uticaj interakcije sezone i lokaliteta na aktivnost ovog enzima. Konstatovano je povećanje aktivnosti u vreme posle hibernacije na oba ispitivana lokaliteta u poređenju sa prehibernacijskom fazom. Aktivnost je kod zmija iz Obedske bare pre i posle hibernacije iznosila redom 6.97 ± 0.48 Jed/mg proteina i 14.61 ± 1.31 Jed/mg proteina, dok je kod onih iz Pančevačkog rita pre hibernacije iznosila 8.65 ± 0.38 Jed/mg proteina a posle 14.22 ± 0.55 Jed/mg proteina. Aktivnost CAT kod vrste *N. tessellata* (Tabela 23 i Grafik 14B) značajno je povećana u posthibernacijskom periodu (17.01 ± 2.24 Jed/mg proteina) u odnosu na prehibernacijski (5.01 ± 1.23 Jed/mg proteina) na lokalitetu Pančevački rit. Posle hibernacije aktivnost u Pančevačkom ritu značajno je veća u poređenju sa Obedskom barom, gde iznosi 10.12 ± 0.65 Jed/mg proteina.

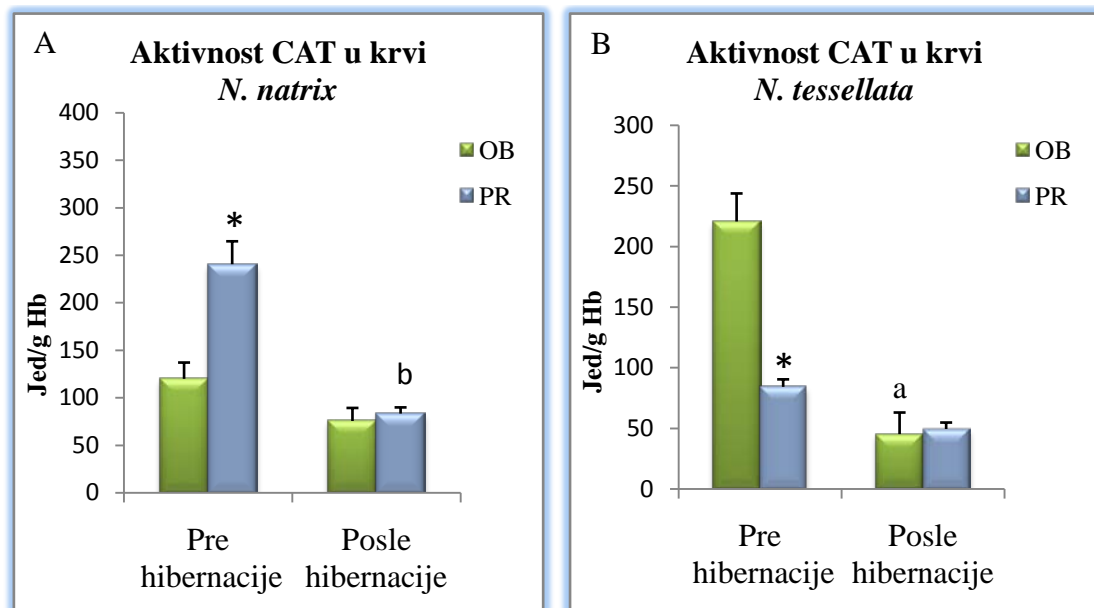
Na aktivnost CAT u mišiću *N. natrix* značajno utiče samo lokalitet dok oba faktora (sezona i lokalitet) kao i njihova interakcija utiču na aktivnost CAT u mišiću vrste *N. tessellata*. Aktivnost CAT u mišiću *N. natrix* (Tabeli 24 i Grafiku 15A) značajno je povećana u Pančevačkom ritu (8.74 ± 1.61 Jed/mg proteina) u odnosu na Obedsku baru (4.1 ± 0.28 Jed/mg proteina) u prehibernacijskoj fazi. Na osnovu aktivnosti ispitivanog enzima kod vrste *N. tessellata* koja je prikazana u Tabeli 24 i Grafiku 15B konstatovano je značajno povećanje u posthibernacijskom periodu (7.92 ± 0.45 Jed/mg proteina) u poređenju sa periodom pre hibernacije (4.95 ± 0.58 Jed/mg protein) na lokalitetu Pančevački rit. Takođe, posle hibernacije aktivnost u Pančevačkom ritu značajno je veća u odnosu na Obedsku baru (4.86 ± 0.65 Jed/mg proteina).

U masnom tkivu *N. natrix* dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da na aktivnost CAT ispitivani faktori nemaju značajan uticaj (Tabela 25, Grafik 16A). Kod ribarice je dobijen značajan uticaj sezone i interakcije sezone i lokaliteta. Najveća aktivnost CAT u masnom tkivu ribarice izmerena je u periodu posle hibernacije u

Pančevačkom ritu (17.01 ± 2.24 Jed/mg proteina), i bila je značajno veća u odnosu na aktivnost izmerenu kod jedinki iz Obedske bare (10.12 ± 0.65 Jed/mg proteina) u istoj sezoni, kao i u odnosu na aktivnost izmerenu kod jedinki iz Pančevačkog rita u periodu pre hibernacije (5.01 ± 1.23 Jed/mg proteina).

Tabela 21. Aktivnosti CAT (Jed/g Hb) u krvi *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

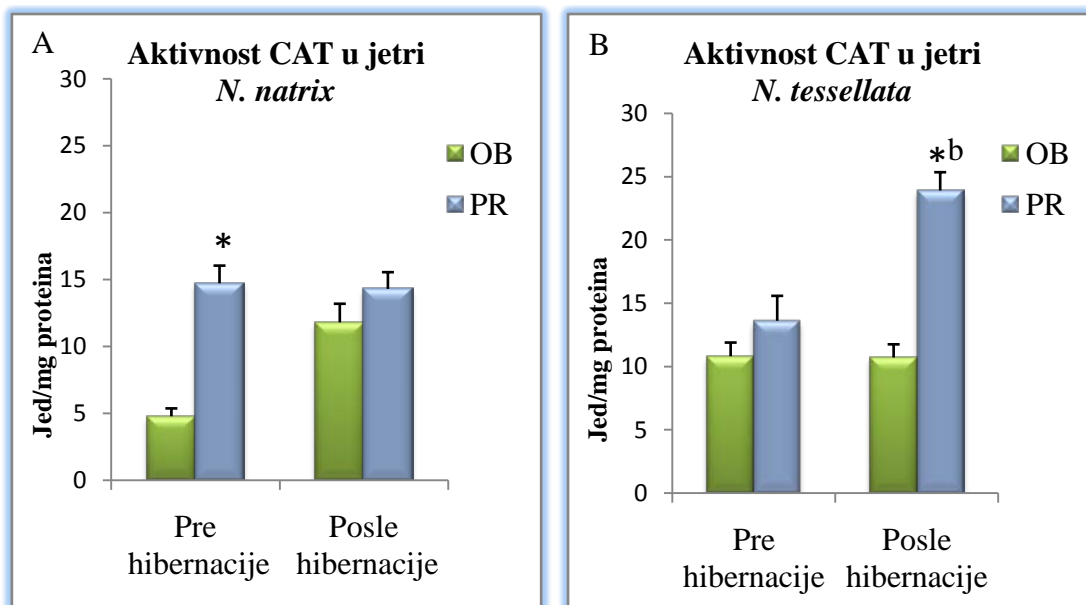
CAT KRV	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	119.98 \pm 17.15	75.62 \pm 13.74	220.74 \pm 23.12	45.31 \pm 17.8 ^a
Pančevački rit	240.63 \pm 24.12*	83.41 \pm 6.53 ^b	84.30 \pm 6.20*	49.54 \pm 5.33
ANOVA efekti	S: p<0.05 F=27.62 L: p<0.05 F=11.21 SxL: p<0.05 F=8.66		S: p<0.05 F= 29.25 L: p<0.05 F=11.57 SxL: p<0.05 F=13.10	



Grafik 12. Aktivnost CAT izražena u Jed/g Hb u krvi A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 22. Aktivnosti CAT (Jed/mg proteina) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

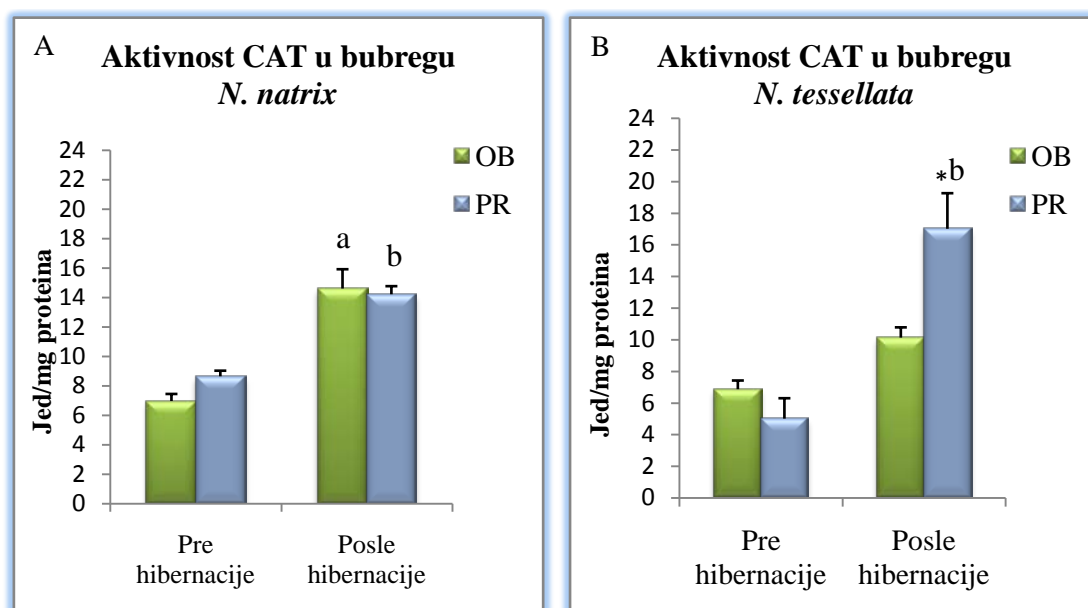
CAT JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	4.79 \pm 0.59	11.81 \pm 1.39 ^a	10.82 \pm 1.08	10.73 \pm 1.04
Pančevački rit	14.73 \pm 1.33*	14.31 \pm 1.25	13.62 \pm 1.97	23.92 \pm 1.45* ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 F=7.48 L: p<0.05 F=26.52 SxL: p<0.05 F=9.84		S: p<0.05 F=13.17 L: p<0.05 F=32.36 SxL: p<0.05 F=13.66	



Grafik 13. Aktivnost CAT izražena u Jed/mg proteina u jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 23. Aktivnosti CAT (Jed/mg proteina) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

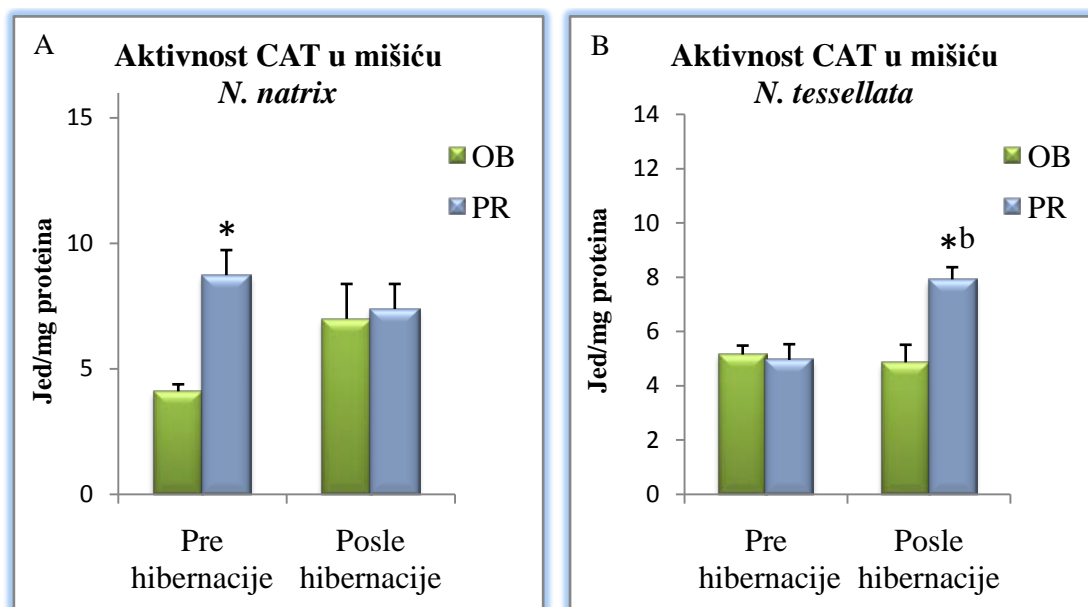
CAT BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	6.97 \pm 0.48	14.61 \pm 1.31 ^a	6.87 \pm 0.55	10.12 \pm 0.65
Pančevački rit	8.65 \pm 0.38	14.22 \pm 0.55 ^b	5.01 \pm 1.23	17.01 \pm 2.24 ^{*b}
ANOVA efekti	S: p<0.05	F=112.43	S: p<0.05	F=38.14
	L: nd	F=1.08	L: nd	F=4.14
	SxL: nd	F=2.75	SxL: p<0.05	F=12.51



Grafik 14. Aktivnost CAT izražena u Jed/mg proteina u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 24. Aktivnosti CAT (Jed/mg proteina) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

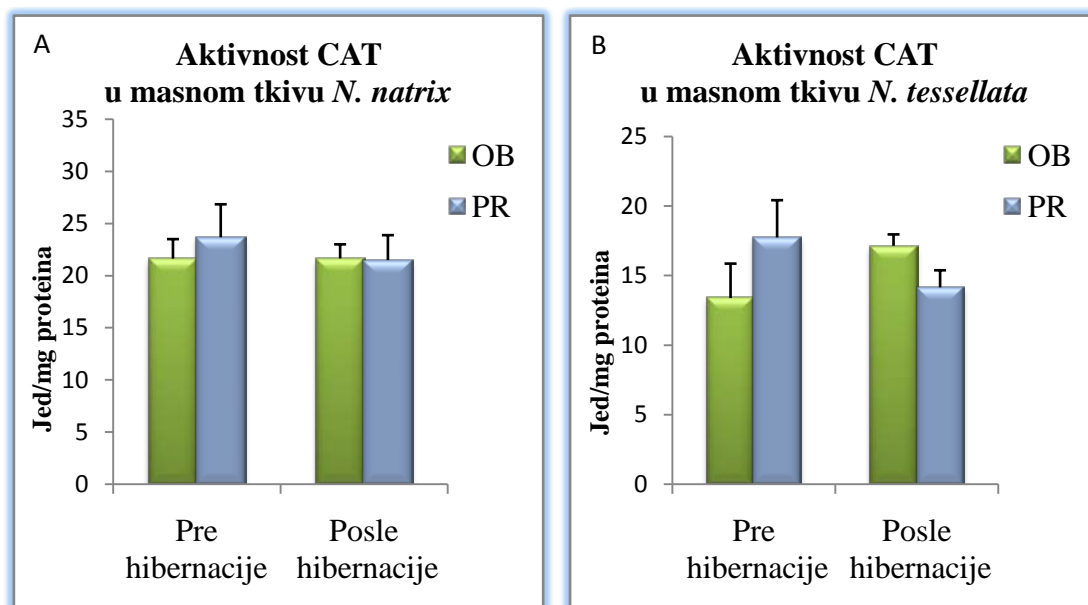
CAT MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	4.1 \pm 0.28	6.99 \pm 1.39	5.15 \pm 0.32	4.86 \pm 0.65
Pančevački rit	8.74 \pm 1.61*	7.38 \pm 0.56	4.95 \pm 0.58	7.92 \pm 0.45* ^b
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F=0.50 F=5.34 F=3.81	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F=7.46 F=8.50 F=11.08



Grafik 15. Aktivnost CAT izražena u Jed/mg proteina u mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 25. Aktivnosti CAT (Jed/mg proteina) u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

CAT MASNO TKIVO	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	21.64 \pm 1.87	21.66 \pm 1.35	13.39 \pm 2.48	17.15 \pm 0.82
Pančevački rit	23.69 \pm 3.16	21.50 \pm 2.39	17.75 \pm 2.68	14.16 \pm 1.23
ANOVA efekti	S: nd	F=0.20	S: nd	F=0.00
	L: nd	F=0.15	L: nd	F=0.09
	SxL: nd	F=0.21	SxL: nd	F=2.58



Grafik 16. Aktivnost CAT izražena u Jed/mg proteina u masnom tkivu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

4.6.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px)

4.6.3.1. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) u krvi

Aktivnost GSH-Px u krvi belouške kretala se od 5.43 ± 0.39 Jed/g Hb kod zmija iz Pančevačkog rita posle hibernacije do 7.59 ± 0.96 Jed/g Hb na lokalitetu Obedska bara u prehibernacijskoj sezoni. U krvi ribarice iz Obedske bare ove vrednosti bile su između 3.72 ± 0.54 Jed/g Hb u poslehibernacijskoj sezoni i 6.10 ± 0.59 Jed/g Hb kod primeraka ove vrste iz Pančevačkog rita u periodu posle hibernacije. U Tabeli 26 prikazane su vrednosti dobijene dvofaktorskom analizom varijanse za aktivnost enzima GSH-Px u krvi ispitivanih vrsta zmija. Statistička analiza pokazala je značajan efekat interakcije sezone i lokaliteta kod obe ispitivane vrste. Poređenjem aktivnosti između grupa (Grafik 17A i 17B) Fišerovim post-hoc testom utvrđeno je da je aktivnost GSH-Px značano smanjena u periodu posle hibernacije u odnosu na prehibernacijski period na lokalitetu Obedska bara kod obe ispitivane vrste. Takođe aktivnost ovog enzima u prehibernacijskom periodu niža je na lokalitetu Pančevački rit u odnosu na Obedsku baru kod obe ispitivane vrste. Kod vrste *N. tessellata* na lokalitetu Pančevački rit u periodu posle hibernacije aktivnost je značajno povećana u odnosu na period pre hibernacije i takođe značajno povećana u odnosu na Obedsku baru u istoj sezoni.

4.6.3.2. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) u tkivima

Aktivnost GSH-Px u jetri prikazana je u Tabeli 27 i Grafiku 18A i 18B. Dvofaktorska analiza varijansi u jetri obe ispitivane vrste pokazala je da postoji jasno izražen efekat sezone na aktivnost enzima GSH-Px. Kod vrste *N. natrix* zabeležen je i značajan efekat interakcije sezone i lokaliteta, dok je kod vrste *N. tessellata* zapažen efekat lokaliteta. Fišerovim post-hoc testom analizirane su razlike između ispitivanih grupa. Kod obe ispitivane vrste aktivnosti GSH-Px bile su značajno povećane u posthibernacijskom periodu u odnosu na period pre hibernacije na oba ispitivana lokaliteta. Vrednosti GSH-Px u jetri kod belouške kretale su se u opsegu od 12.72 ± 1.27 Jed/mg proteina u periodu pre hibernacije na lokalitetu Obedska bara do 34.23 ± 4.38 J/mg proteina u periodu posle hibernacije na istom lokalitetu. Aktivnosti ovog enzima kod ribarice pokazuju da je najniža vrednost izmerena na lokalitetu Obedska

bara pre hibernacije (10.64 ± 0.65 Jed/mg proteina), dok je najviša vrednost izmerena u Pančevačkom ritu u periodu posle hibernacije (29.31 ± 2.11 Jed/mg proteina). Fišerovim post-hoc testom utvrđene su i značajne razlike u aktivnosti enzima između ispitivanih lokaliteta u posthibernacijskom periodu kod vrste *N. natrix*, dok su kod ribarice razlike između ispitivanih lokaliteta zabeležene u periodu pre hibernacije.

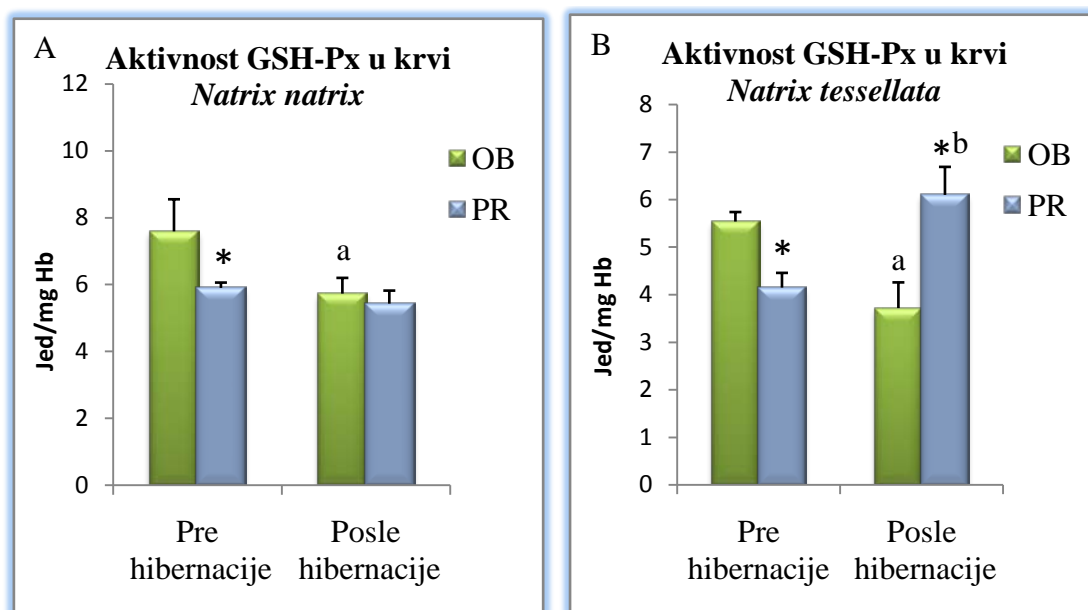
U bubregu belouške dobijen je statistički značajan samo efekat sezone (Tabela 28, Grafik 19A), dok su kod ribarice zabeleženi efekti sezone, lokaliteta kao i njihove interakcije (Grafik 19B). Kod vrste *N. natrix* aktivnosti enzima u posthibernacijskom periodu iznosile su redom 24.96 ± 6.81 Jed/mg proteina i 34.55 ± 3.51 Jed/mg proteina na lokalitetima Obedska bara i Pančevački rit i statistički su bile značajno veće od aktivnosti koje su izmerene u periodu pre hibernacije na ovim lokalitetima (11.67 ± 0.76 i 12.82 ± 0.67 Jed/mg proteina). Kod ribarice iz Obedske bre najveća aktivnost izmerena je posle hibernacije (63.40 ± 6.08 Jed/mg proteina) i statistički se razlikovala od aktivnosti izmerene u periodu pre hibernacije na istom lokalitetu (8.58 ± 0.53 Jed/mg proteina). Aktivnost izmerena kod primeraka ove vrste iz Pančevačkog rita posle hibernacije iznosila je 16.08 ± 1.56 Jed/mg proteina i bila značajno smanjena u odnosu na onu zabeleženu kod životinja iz Obedske bare u istom periodu.

Analizom varijanse potvrđeni su značajni efekti sezone na aktivnost GSH-Px u mišiću obe ispitivane vrste (Tabela 29, Grafik 20A i 20B). Kod *N. natrix* zapažen je i efekat lokaliteta, a kod *N. tessellata* značajan efekat interakcija sezone i lokaliteta. Post-hoc Fišerovim testom pokazano je da je kod belouške aktivnost GSH-Px značajno smanjena u posthibernacijskom periodu u odnosu na period pre hibernacije na oba ispitivana lokaliteta, kao i da je aktivnost ovog enzima kod jedinki iz Pančevačkog ritaznačajno niži u odnosu na jedinke iz Obedske bare u periodu pre hibernacije. Kod ove vrste aktivnost GSH-Px kretala se u opsegu od 3.60 ± 0.30 Jed/mg proteina kod jedinki iz Pančevačkog rita posle hibernacije do 5.95 ± 0.32 Jed/mg proteina kod onih izlovljenih na lokalitetu Obedska bara u prehibernacijskoj sezoni. Najviša aktivnost GSH-Px u mišiću ribarice izmerena je kod zmija iz Pančevačkog rita u posthibernacijskoj sezoni (5.39 ± 0.48 Jed/mg proteina) i statistički je bila povećana u odnosu na aktivnost dobijenu u periodu pre hibernacije kod životinja sa istog lokaliteta (2.05 ± 0.23 Jed/mg proteina).

Aktivnosti GSH-Px u masnom tkivu *N. natrix* prikazane su u Tabeli 30 i Grafiku 21A. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da na aktivnost ovog enzima značajan uticaj ima interakcija sezone i lokaliteta. Najveća aktivnost izmerena je kod životinja iz Obedske bare u periodu posle hibernacije (9.82 ± 2.28 Jed/mg proteina), i statistički se razlikovala od aktivnosti izmerene u prehibernacijskom periodu (5.72 ± 0.56 Jed/mg proteina). Aktivnost GSH-Px u Pančevačkom ritu posle hibernacije kod belouške iznosila je 3.84 ± 0.57 Jed/mg proteina i bila značajno manja u odnosu na vrednost izmerenu u Obedskoj bari u istoj sezoni kao i u odnosu na aktivnost izmerenu kod jedinki iz Pančevačkog rita u periodu pre hibernacije (8.04 ± 0.43 Jed/mg proteina). Aktivnost enzima GSH-Px u masnom tkivu *N. tessellata* prikazane su u Tabeli 30 i Grafiku 21B. Dvofaktorska analiza varijanse potvrdila je značajan uticaj sezone. Statistička razlika između sezona registrovana je na lokalitetu Obedska bara, gde su aktivnosti GSH-Px u periodu pre i posle hibernacije iznosile redom 3.73 ± 0.41 Jed/mg proteina i 6.76 ± 1.81 Jed/mg proteina.

Tabela 26. Aktivnosti GSH-Px (Jed/mg Hb) u krvi *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

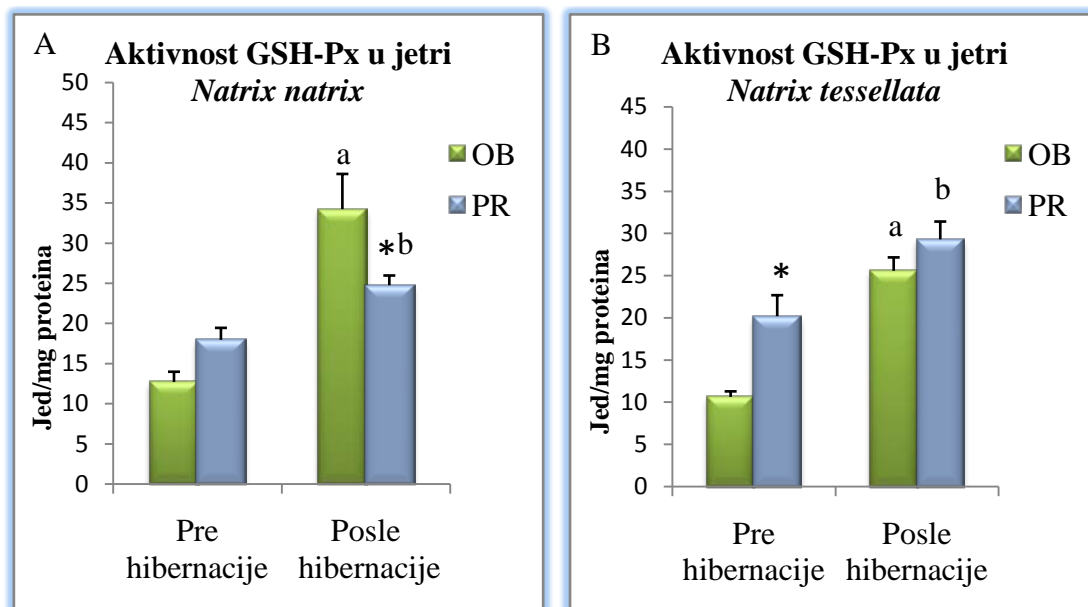
GSH-Px KRV	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	7.59 \pm 0.96	5.73 \pm 0.47 ^a	5.54 \pm 0.20	3.72 \pm 0.54 ^a
Pančevački rit	5.90 \pm 0.16*	5.43 \pm 0.39	4.15 \pm 0.32*	6.10 \pm 0.59* ^b
ANOVA efekti	S: nd	F= 2.24	S: nd	F=0.03
	L: nd	F=0.08	L: nd	F=1.66
	SxL: p<0.05	F= 6.46	SxL: p<0.05	F=24.69



Grafik 17. Aktivnost GSH-Px izražena u Jed/mg Hb u krvi A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 27. Aktivnosti GSH-Px (Jed/mg proteina) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

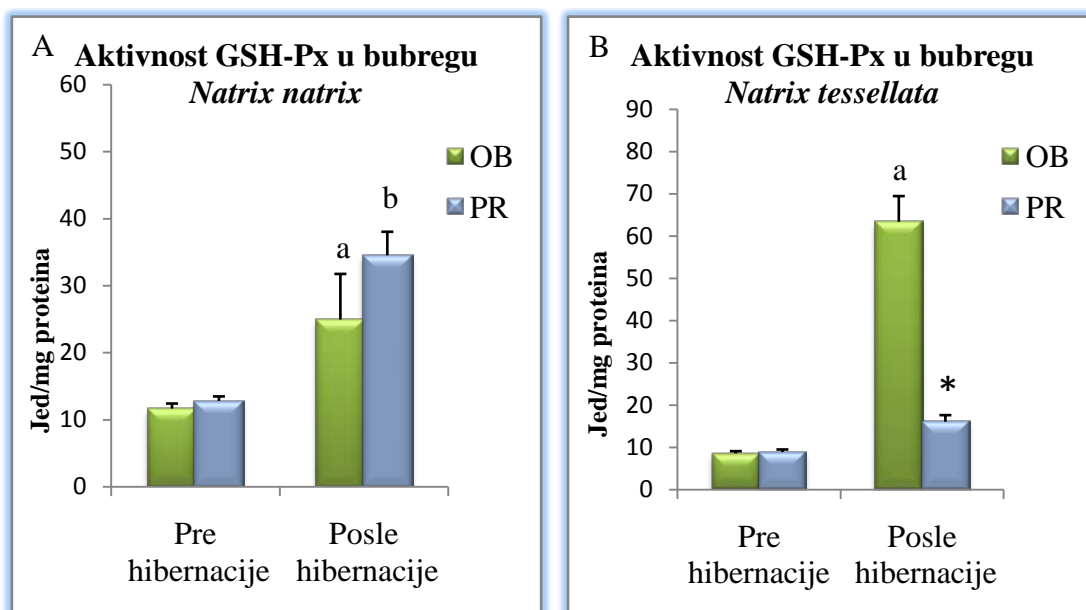
GSH-Px JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	12.72 \pm 1.27	34.23 \pm 4.38 ^a	10.64 \pm 0.65	25.58 \pm 1.59 ^a
Pančevački rit	17.96 \pm 1.49	24.76 \pm 1.21 ^{*b}	20.20 \pm 2.49*	29.31 \pm 2.11 ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: nd SxL: p<0.05	F= 51.30 F= 1.14 F= 13.87	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 50.51 F= 15.41 F= 2.97



Grafik 18. Aktivnost GSH-Px izražena u Jed/mg proteina u jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 28. Aktivnosti GSH-Px (J/mg proteina) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

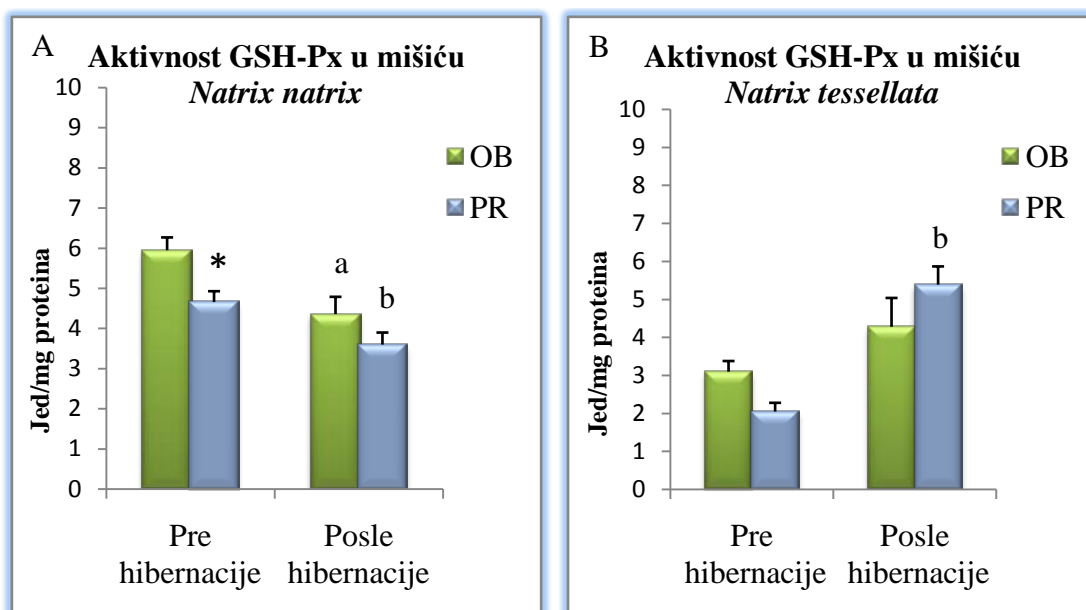
GSH-Px BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	11.67 \pm 0.76	24.96 \pm 6.81 ^a	8.58 \pm 0.53	63.40 \pm 6.08 ^a
Pančevački rit	12.82 \pm 0.67	34.55 \pm 3.51 ^b	8.92 \pm 0.59	16.08 \pm 1.56*
ANOVA efekti	S: p<0.05	F= 41.15	S: p<0.05	F= 145.95
	L: nd	F= 3.87	L: p<0.05	F= 83.87
	SxL: nd	F= 2.39	SxL: p<0.05	F= 86.35



Grafik 19. Aktivnost GSH-Px izražena u Jed/mg proteina u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 29. Aktivnosti GSH-Px (Jed/mg proteina) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

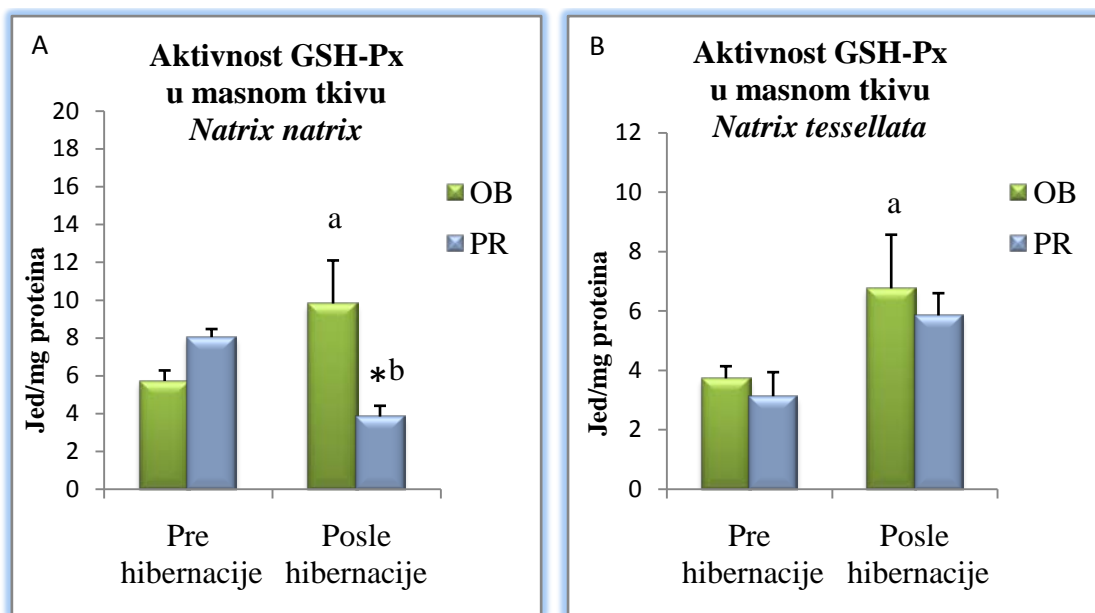
GSH-Px MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	5.95 \pm 0.32	4.36 \pm 0.43 ^a	3.10 \pm 0.28	4.28 \pm 0.76
Pančevački rit	4.66 \pm 0.27*	3.60 \pm 0.30 ^b	2.05 \pm 0.23	5.39 \pm 0.48 ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 16.36 F= 9.68 F= 0.63	S: p<0.05 L: nd SxL: p<0.05	F= 25.12 F= 0.01 F= 5.80



Grafik 20. Aktivnost GSH-Px izražena u Jed/mg proteina u mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 30. Aktivnosti GSH-Px (Jed/mg proteina) u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

GSH-Px MASNO TKIVO	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	5.72 \pm 0.56	9.82 \pm 2.28 ^a	3.73 \pm 0.41	6.76 \pm 1.81 ^a
Pančevački rit	8.04 \pm 0.43	3.84 \pm 0.57 ^{*b}	3.13 \pm 0.81	5.85 \pm 0.75
ANOVA efekti	S: nd L: nd SxL: p<0.05	F= 0.00 F= 3.71 F=19.12	S: p<0.05 L: nd SxL: nd	F= 9.17 F= 0.64 F= 0.03



Grafik 21. Aktivnost GSH-Px izražena u Jed/mg proteina u masnom tkivu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

4.6.4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR)

4.6.4.1. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u krvi

Rezultati aktivnosti enzima GR u krvi ispitivanih vrsta prikazane su u tabeli 31 i na Grafiku 22A i 22B. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da kod vrste *N. natrix* na aktivnost enzima značajno utiče sezona, lokalitet kao i njihova interakcija, dok kod *N. tessellata* nije registrovan uticaj lokaliteta. Podaci dobijeni Fišerovim post-hoc testom pokazuju da je aktivnost ovog enzima u periodu pre hibernacije značajno manja kod obe ispitivane vrste na lokalitetu Pančevački rit. Pre hibernacije aktivnost ovog enzima u krvi *N. natrix* iznosila je 4019.95 ± 413.90 Jed/g Hb u jedinkama iz Obedske bare, dok je u jedinkama iz Pančevačkog rita iznosila 882.92 ± 68.54 Jed/g Hb. Posle hibernacije u krvi vrste *N. natrix* iz Obedske bare aktivnosti ovog enzima iznosile su 2029.87 ± 227.92 Jed/g Hb dok su kod jedinki iz Pančevačkog rita bile 1414.90 ± 123.41 Jed/g Hb. Kod ove vrste aktivnost GR u krvi značajno je smanjena u periodu posle hibernacije u odnosu na period pre hibernacije na lokalitetu Obedska bara. Aktivnost GR u krvi *N. tessellata* pre hibernacije iznosila je 2163.59 ± 177.98 Jed/g Hb kod jedinki iz Obedke bare i 815.29 ± 124.78 Jed/g Hb kod onih iz Pančevačkog rita. U periodu posle hibernacije aktivnost ovog enzima bila je statistički značajno povećana kod jedinki vrste *N. tessellata* izlovljenih u Pančevačkom ritu (4249.72 ± 602.01 Jed/g Hb) u odnosu na jedinke iz Obedske bare (1776.47 ± 233.52 Jed/g Hb). Kod ove vrste iz Pančevačkog rita aktivnost GR značajno je povećana u periodu posle hibernacije u odnosu na prehibernacijski period.

4.6.4.2. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u tkivima

Rezultati dobijeni u našim istraživanjima pokazuju da je aktivnost GR u jetri (Grafik 32, Tabela 23A i 23B) ispitivanih vrsta bila statistički značajno povećana jedino kod vrste *N. natrix* iz Pančevačkog rita I to u prehibernacijskom periodu.

U bubregu vrste *N. natrix*, dvofaktorska analiza varijansi pokazala je značajan uticaj oba ispitivana faktora (Tabela 33, Grafik 24A). Post-hoc testiranje pokazalo je da je aktivnost enzima GR značajno smanjena u posthibernacijskom periodu u odnosu na

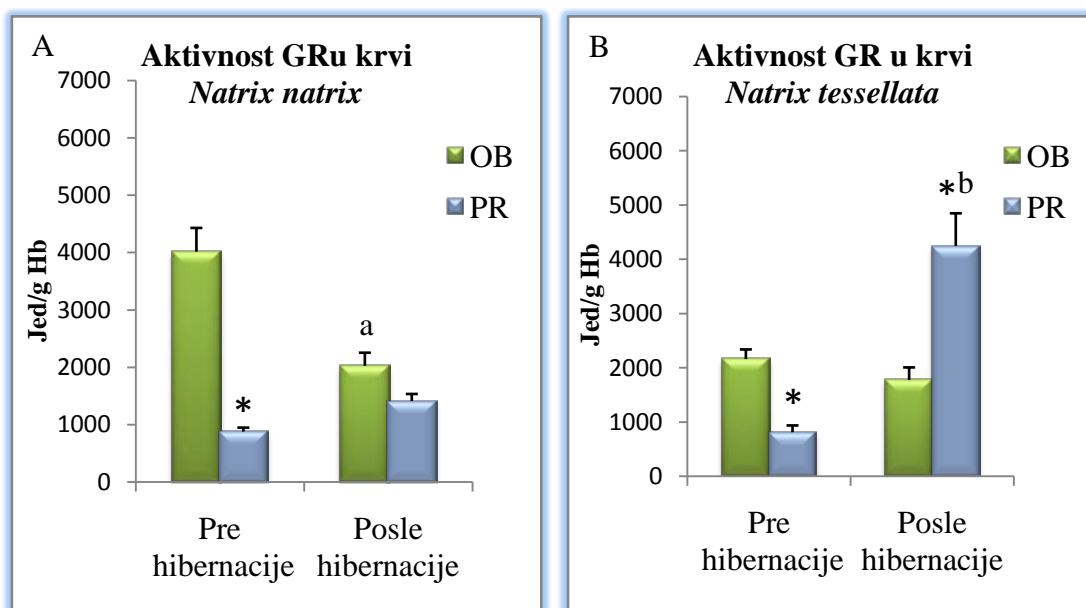
period pre hibernacije na oba ispitivana lokaliteta. U Obedskoj bari, aktivnost GR kod ove vrste pre hibernacije iznosila je 78.49 ± 5.20 Jed/mg proteina dok je posle hibernacije izmerena aktivnost 61.22 ± 6.61 Jed/mg proteina. U Pančevačkom ritu izmerene aktivnosti GR pre i posle hibernacije iznosile su redom 107.71 ± 4.44 Jed/mg proteina i 74.80 ± 3.55 Jed/mg proteina. Kod vrste *N. natrix* zabeleženo je i značajno povećanje aktivnosti ovog enzima na lokalitetu Pančevački rit u odnosu na Obedsku baru u prehibernacijskom periodu. Kod vrste *N. tessellata* u oba ispitivana perioda na lokalitetu Pančevački rit aktivnost GR bila značajno povećana u odnosu na Obedsku baru (Tabela 33, Grafik 24B). Aktivnosti ovog enzima pre hibernacije iznosile su 71.40 ± 4.45 Jed/mg proteina u Obedskoj bari i 92.16 ± 8.36 Jed/mg proteina u Pančevačkom ritu, dok je posle hibernacije aktivnost kod zmija iz Obedskoe bare iznosila 62.65 ± 2.34 Jed/mg proteina a na Pančevačkom ritu 80.74 ± 5.09 Jed/mg proteina.

Ispitivani faktori nisu imali značajan uticaj na aktivnost GR u mišiću *N. natrix* (Tabela 34, Grafik 25A). Aktivnost GR u mišiću *N. tessellata* bila je statistički povećana u periodu posle hibernacije na oba ispitivana lokaliteta (Tabela 34, Grafik 25B). Aktivnost GR u mišiću *N. tessellata* iz Obedskoe bare pre i posle hibernacije iznosila je redom 3.61 ± 0.47 J/mg proteina i 6.41 ± 0.55 Jed/mg proteina, dok je u Pančevačkom ritu iznosila 3.90 ± 0.18 Jed/mg proteina u periodu pre hibernacije i 6.82 ± 0.71 Jed/mg proteina u periodu posle hibernacije.

Aktivnost GR u masnom tkivu *N. natrix* kao i rezultati dobijeni dvofaktorskom analizom varijanse prikazani su u Tabeli 35 i Grafiku 26A. Značajan uticaj na aktivnost ovog enzima imala je interakcija sezone i lokaliteta. U periodu pre hibernacije aktivnost GR u masnom tkivu zmija iz Pančevačkog rita ($23,62 \pm 2,09$ Jed/mg proteina) bila je značajno veća od aktivnosti koje su izmerene kod jedinki iz Obedske bare ($14,35 \pm 1,43$ Jed/mg proteina). U periodu posle hibernacije aktivnost enzima bila je značajno manja kod jedinki iz Pančevačkog rita ($12,10 \pm 0,75$ Jed/mg proteina) u odnosu na jedinke iz Obedske bare ($21,33 \pm 4,09$ Jed/mg proteina). Takođe je konstatovano da je aktivnost GR kod zmija iz Obedske bare bila veća u periodu posle hibernacije, dok je u Pančevačkom ritu zabeležen suprotan trend promene aktivnosti. Kod vrste *N. tessellate* nisu konstatovane značajne razlike u promeni aktivnosti GR između ispitivanih grupa (Tabela 35, Grafik 26B).

Tabela 31. Aktivnosti GR (Jed/g Hb) u krvi *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

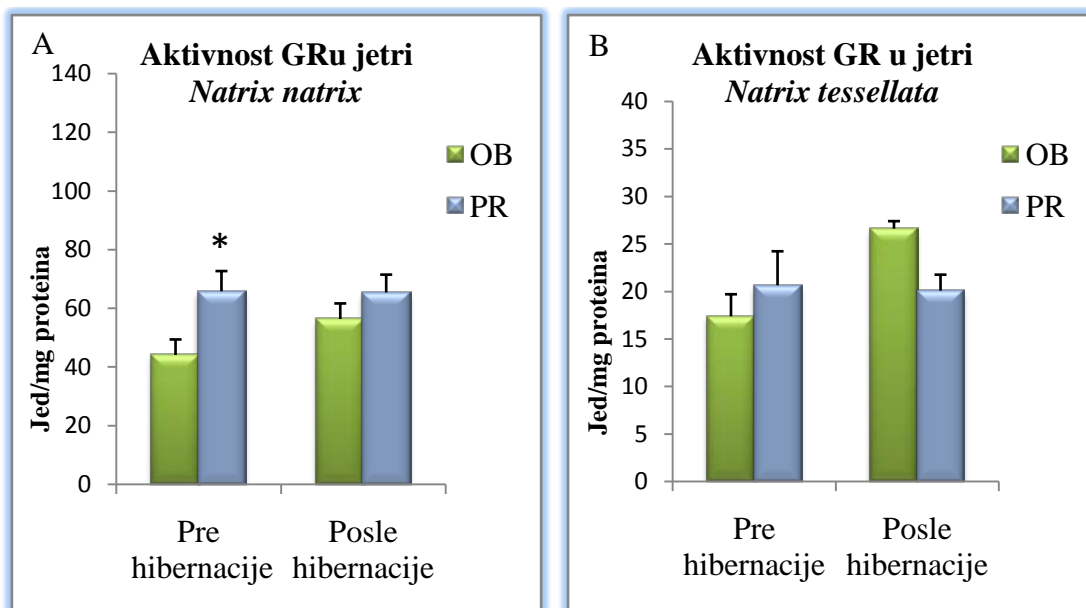
GR KRV	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	4019.95 \pm 413.90	2029.87 \pm 227.92 ^a	2163.59 \pm 177.98	1776.47 \pm 233.52
Pančevački rit	882.92 \pm 68.54*	1414.90 \pm 123.41	815.29 \pm 124.78*	4249.72 \pm 602.01 ^{*b}
ANOVA efekti	S: p<0.05 F=6.24 L: p<0.05 F=41.34 SxL: p<0.05 F=18.68		S: p<0.05 F= 15.65 L: nd F= 2.13 SxL: p<0.05 F= 24.62	



Grafik 22. Aktivnost GR izražena u Jed/g Hb u krvi A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* sa Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 32. Aktivnosti GR (Jed/mg proteina) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

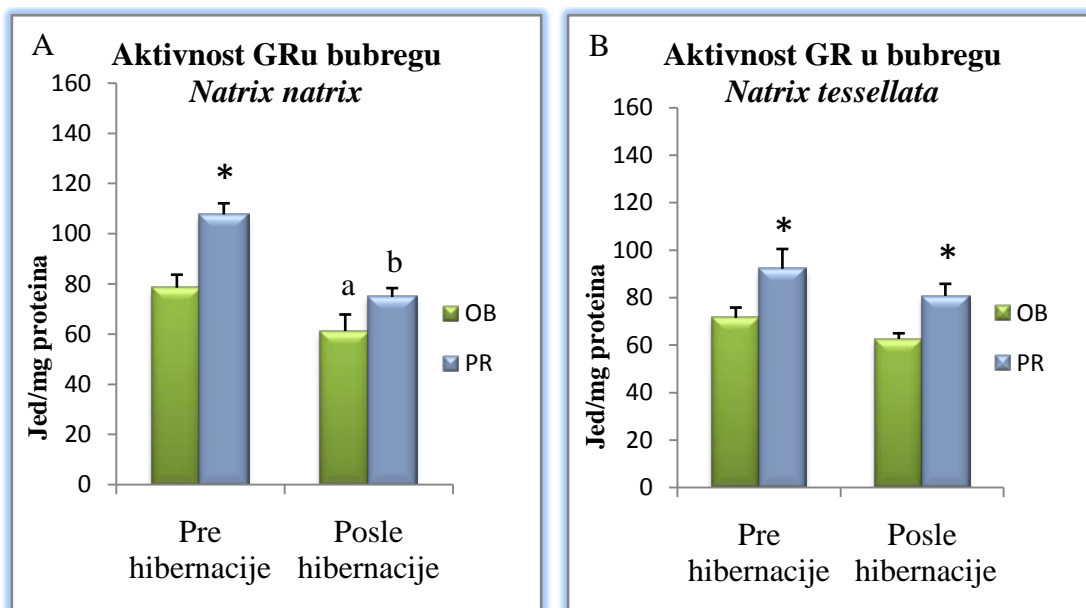
GR JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	44.16 \pm 5.29	56.42 \pm 5.31	17.39 \pm 2.32	26.61 \pm 0.79
Pančevački rit	65.87 \pm 6.89*	65.47 \pm 6.08	20.65 \pm 3.58	20.08 \pm 1.69
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 0.86 F=5.75 F=0.97	S: nd L: nd SxL: nd	F= 3.04 F= 0.43 F= 3.91



Grafik 23. Aktivnost GR izražena u Jed/mg proteina u jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 33. Aktivnosti GR (J/mg proteina) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

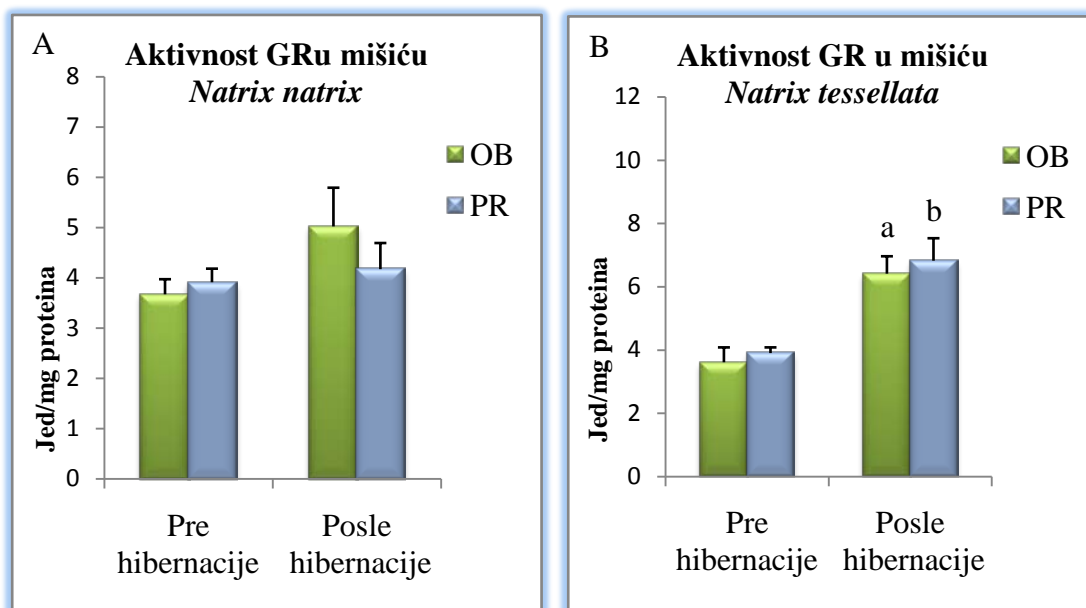
GR BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	78.49 \pm 5.20	61.22 \pm 6.61 ^a	71.40 \pm 4.45	62.65 \pm 2.34
Pančevački rit	107.71 \pm 4.44*	74.80 \pm 3.55 ^b	92.16 \pm 8.36*	80.74 \pm 5.09*
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 24.79 F= 18.05 F= 2.41	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 5.39 F= 16.60 F= 0.0313



Grafik 24. Aktivnost GR izražena u Jed/mg proteina u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 34. Aktivnosti GR (Jed/mg proteina) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

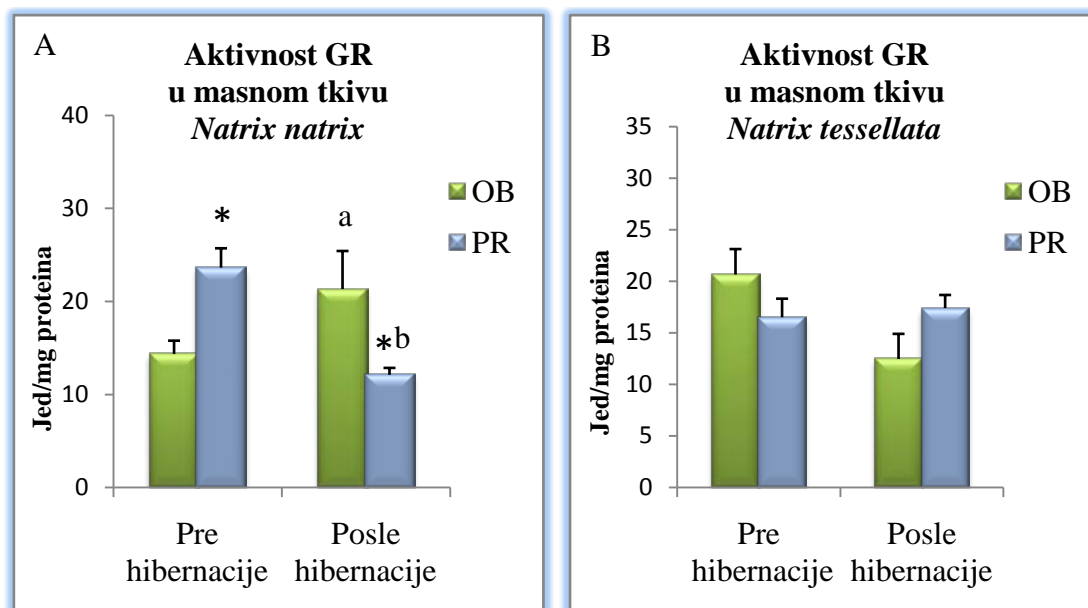
GR MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	3.67 \pm 0.30	5.02 \pm 0.77	3.61 \pm 0.47	6.41 \pm 0.55 ^a
Pančevački rit	3.91 \pm 0.27	4.17 \pm 0.52	3.90 \pm 0.18	6.82 \pm 0.71 ^b
ANOVA efekti	S: nd	F= 3.30	S: p<0.05	F= 28.45
	L: nd	F= 0.49	L: nd	F= 0.42
	SxL: nd	F= 1.53	SxL: nd	F= 0.012



Grafik 25. Aktivnost GR izražena u Jed/mg proteina u mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 35. Aktivnosti GR (J/mg proteina) u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

GR MASNO TKIVO	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	14.35 \pm 1.43	21.33 \pm 4.09 ^a	20.64 \pm 2.47	12.45 \pm 2.44
Pančevački rit	23.62 \pm 2.09 [*]	12.10 \pm 0.75 ^{*b}	16.50 \pm 1.80	17.39 \pm 1.27
ANOVA efekti	S: nd L: nd SxL: p<0.05	F= 1.20 F= 0.00 F=19.94	S: nd L: nd SxL: nd	F= 2.59 F= 0.03 F= 4.01



Grafik 26. Aktivnost GR izražena u Jed/mg proteina u masnom tkivu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije

4.7. Koncentracija neenzimskih komponenti sistema zaštite od oksidacionih oštećenja

4.7.1. Koncentracija glutaciona (GSH) u krvi

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da na koncentraciju GSH u krvi *N. natrix* značajno utiču sezona, lokalitet i interakcija ova dva faktora (Tabela 36 i Grafik 27A). Koncentracija GSH u krvi vrste *N. natrix* na lokalitetu Pančevački rit iznosila je 5.63 ± 0.45 nmol/L plazme i bila je značajno povećana u odnosu na primerke iz Obedske bare (3.17 ± 0.29 nmol/L plazme) u prehibernacijskoj fazi. U posthibernacijskoj fazi koncentracija GSH je takođe bila povećana u krvi zmija iz Pančevačkog rita u odnosu na one iz Obedske bare i iznosila je 9.15 ± 0.89 nmol/L plazme i 2.35 ± 0.40 nmol/L plazme. Pored jasne razlike između lokaliteta konstatovana je i povećana koncentracija GSH u krvi životinja iz Pančevačkog rita u posthibernacijskom periodu u odnosu na period pre hibernacije. Izmerena koncentracija u Pančevačkom ritu pre hibernacije iznosila je 5.63 ± 0.45 nmol/L plazme. Na koncentraciju GSH u krvi vrste *N. tessellata* (Tabela 36 i Grafik 27B) značajno utiče lokalitet. Fišerov post-hoc test pokazao je da je koncentracija GSH kod zmija iz Pančevačkog rita pre hibernacije iznosila 4.20 ± 0.66 nmol/L plazme i bila značajno povećana u odnosu na koncentraciju izmerenu u Obedskoj bari (2.59 ± 0.29 nmol/L plazme) u istom periodu.

4.7.2. Koncentracija glutaciona (GSH) u tkivima

U tabeli 37 i Grafiku 28A prikazana je koncentracija GSH u jetri *N. natrix*. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da na koncentraciju ovog parametra kod vrste *N. natrix* značajan uticaj imaju sezona, lokalitet i interakcija ova dva faktora. U jetri zmija iz Pančevačkog rita u prehibernacijskom periodu izmerena je najveća koncentracija GSH koja je iznosila 2546.10 ± 123.46 nmol/g tkiva i bila značajno povećana u odnosu na koncentraciju izmerenu u istom tkivu životinja iz Obedske bare (811.38 ± 62.43 nmol/g tkiva) u istom periodu istraživanja kao i u odnosu na rezultate sa lokaliteta Pančevački rit u posthibernacijskom periodu gde je iznosila 249.56 ± 23.26 nmol/g tkiva. Koncentracija GSH u jetri *N. tessellata* prikazana je u Tabeli 37 i Grafiku 28B. Konstatovano je da lokalitet i interakcija sezone i lokaliteta značajno utiču na

koncentraciju ovog parametra. Značajno smanjenje koncentracije posle hibernacije u odnosu na prehibernacijski period konstatovano je na oba ispitivana lokaliteta. Koncentracija GSH u jetri primeraka iz Obedske bare pre hibernacije iznosila je 704.83 ± 53.96 nmol/g tkiva, a posle hibernacije 409.28 ± 18.15 nmol/g tkiva. U uzorcima iz Pančevačkog rita pre hibernacije izmerena je koncentracija 837.85 ± 35.60 nmol/g tkiva, dok je posle hibernacije bila 257.61 ± 32.49 nmol/g tkiva. Na osnovu dobijenih rezultata uočene su i razlike između lokaliteta u istom periodu istraživanja, tako da je pre hibernacije koncentracija GSH u jetri zmija iz Pančevačkog rita povećana, a posle hibernacije značajno smanjena u odnosu na one iz Obedske bare u odgovarajućem periodu.

Koncentracije GSH u bubregu *N. natrix*, predstavljene u Tabeli 38 i Grafiku 29A pokazuju značajan uticaj sezone. Registrovane su značajno veće vrednosti na oba ispitivana lokaliteta u periodu posle hibernacije u odnosu na period pre hibernacije. U bubregu zmija izlovljenih posle hibernacije u Obedskoj bari, koncentracija GSH iznosila je 304.72 ± 62.35 nmol/g tkiva, dok je na istom lokalitetu pre hibernacije izmerena koncentracija 23.10 ± 2.71 nmol/g tkiva. Kod zmija iz Pančevačkog rita izlovljenih posle hibernacije, koncentracija GSH je bila 290.17 ± 44.03 nmol/g tkiva dok je pre hibernacije iznosila 2.49 ± 0.67 nmol/g tkiva. Isti trend promene koncentracije GSH zabeležen je i u bubregu vrste *N. tessellata* (Tabeli 38 i Grafiku 29B), ali je pokazano da na rezultate istraživanja značajno utiču oba ispitivana faktora kao i njihova interakcija. Na lokalitetu Obedsko bara, posle hibernacije koncentracija GSH je bila 447.52 ± 40.99 nmol/g tkiva, a pre hibernacije 35.23 ± 5.19 nmol/g tkiva. U uzorcima iz Pančevačkog rita posle hibernacije izmerena je koncentracija 122.05 ± 10.71 nmol/g tkiva, dok je pre hibernacije iznosila 8.45 ± 2.48 nmol/g tkiva. Konstatovano je i značajno smanjenje koncentracije GSH nu uzorcima iz Pančevačkog rita u poređenju sa onima iz Obedske bare posle hibernacije.

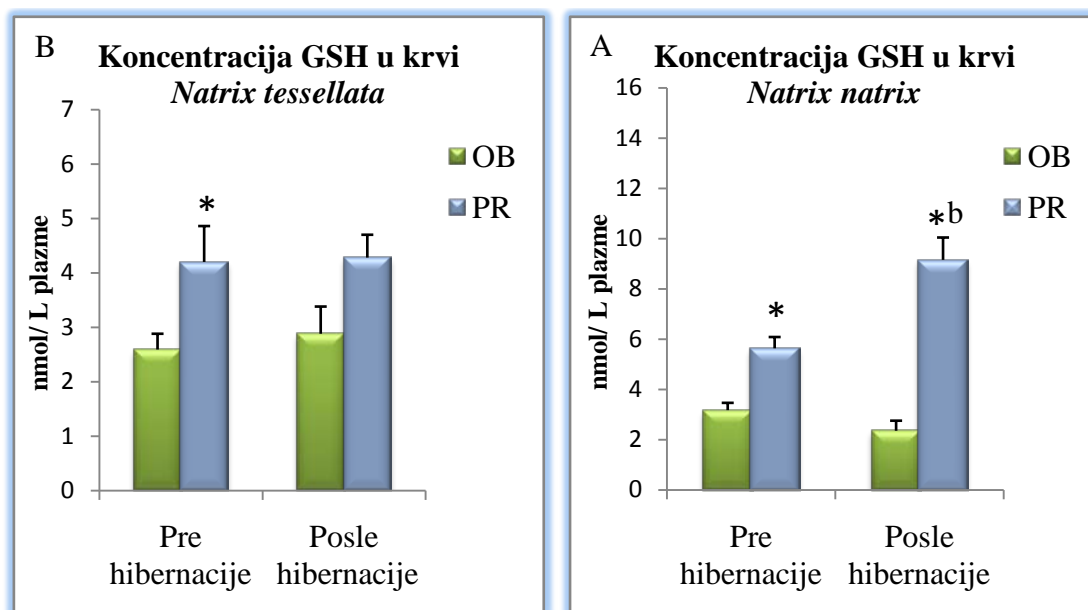
Koncentracija GSH u mišiću *N. natrix* (Tabela 39 i Grafik 30A) u prehibernacijskom periodu na lokalitetu Obedska bara iznosila je 954.39 ± 82.26 nmol/g tkiva, a u Pančevačkom ritu 763.99 ± 58.83 nmol/g tkiva. U posthibernacijskom periodu u Obedskoj bari i Pančevačkom ritu izmerena koncentracija iznosila je redom 291.80 ± 58.86 nmol/g tkiva i 349.49 ± 47.34 nmol/g tkiva. Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajan uticaj sezone, a Fišerovim post-hoc testom registrovano je da

postoji značajno smanjenje koncentracije GSH u posthibernacijskoj fazi u poređenju sa periodom pre hibernacije na oba ispitivana lokaliteta. Kod vrste *N. tessellata* (Tabela 39 i Grafik 30B) značajan uticaj na koncentraciju GSH imala je sezona i interakcija sezone i lokaliteta. Kod jedinki izlovljenih u Pančevačkom ritu koncentracija GSH je značajno povećana posle hibernacije (509.64 ± 131.30 nmol/g tkiva) u odnosu na period pre hibernacije (246.76 ± 32.19 nmol/g tkiva). Pre hibernacije koncentracija GSH u uzorcima iz Obedske bare iznosila je 88.26 ± 6.35 nmol/g tkiva, dok je posle hibernacije iznosila 160.54 ± 15.61 nmol/g tkiva. Kod ove vrste u oba perioda istraživanja koncentracije izmerene u jedinkama iz Pančevačkog rita značajno su veće od koncentracija izmerenih kod jedinki iz Obedske bare.

Dvofaktorskom analizom varijanse za koncentraciju GSH u masnom tkivu vrste *N. natrix* konstatovan je značajan uticaj sezone. Koncentracija GSH značajno je smanjena u uzorcima iz Pančevačkog rita u poređenju sa onima iz Obedske bare, kako u periodu pre, tako i posle hibernacije. GSH koncentracije za ovu vrstu prikazane su u Tabeli 40 i Grafiku 31A i iznose u periodu pre hibernacije za Obedsku baru i Pančevački rit redom 71.91 ± 4.09 nmol/g tkiva i 19.19 ± 1.90 nmol/g tkiva, a u periodu posle hibernacije 68.96 ± 17.77 nmol/g tkiva na Obedskoj bari i 33.05 ± 3.28 nmol/g tkiva na Pančevačkom ritu. U masnom tkivu *N. tessellata* konstatovan je značajan uticaj sezone, lokaliteta kao i njihove interakcije (Tabela 40, Grafik 31B). Koncentracija GSH bila je povećana u uzorcima iz Pančevačkog rita posle hibernacije (112.79 ± 21.25 nmol/g tkiva) u odnosu na period pre hibernacije (26.22 ± 3.95 nmol/g tkiva). U posthibernacijskoj fazi u uzorcima zmija iz Obedske bare izmerena je koncentracija 38.17 ± 8.47 nmol/g tkiva i bila je značajno manja u odnosu na koncentraciju izmerenu u uzorcima iz Pančevačkog rita u istom periodu.

Tabela 36. Aktivnosti GSH (nmol/L plazme) u krvi *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

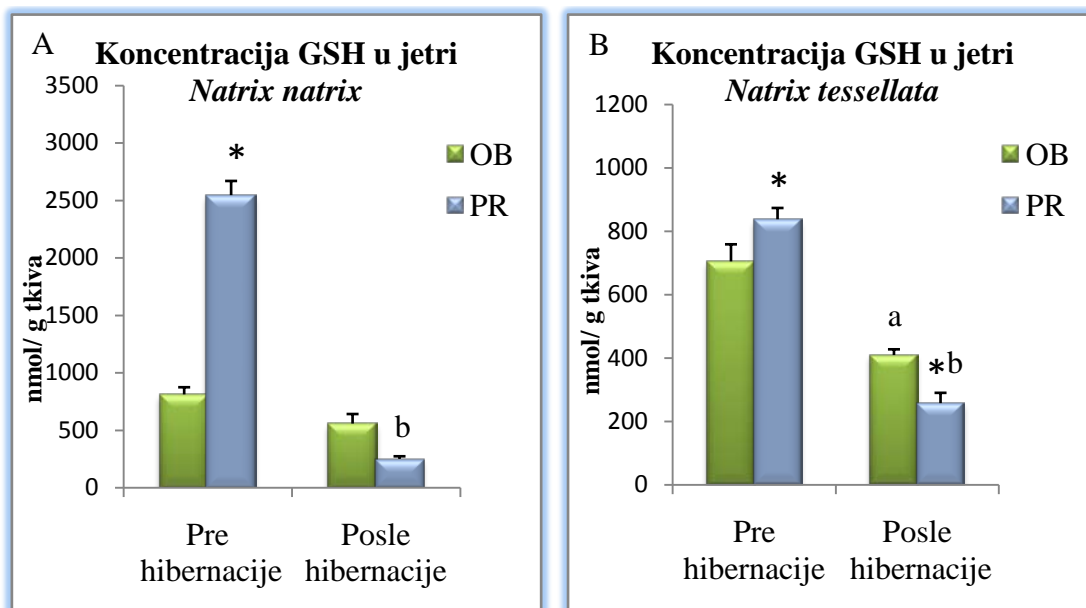
GSH KRV	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	3.17 \pm 0.29	2.35 \pm 0.40	2.59 \pm 0.29	2.88 \pm 0.50
Pančevački rit	5.63 \pm 0.45*	9.15 \pm 0.89* ^b	4.20 \pm 0.66*	4.28 \pm 0.42
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 4.39 F= 51.64 F= 11.35	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 0.12 F= 8.34 F= 0.04



Grafik 27. Aktivnost GSH izražena u nmol/L plazme u krvi A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 37. Aktivnosti GSH (nmol/g tkiva) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

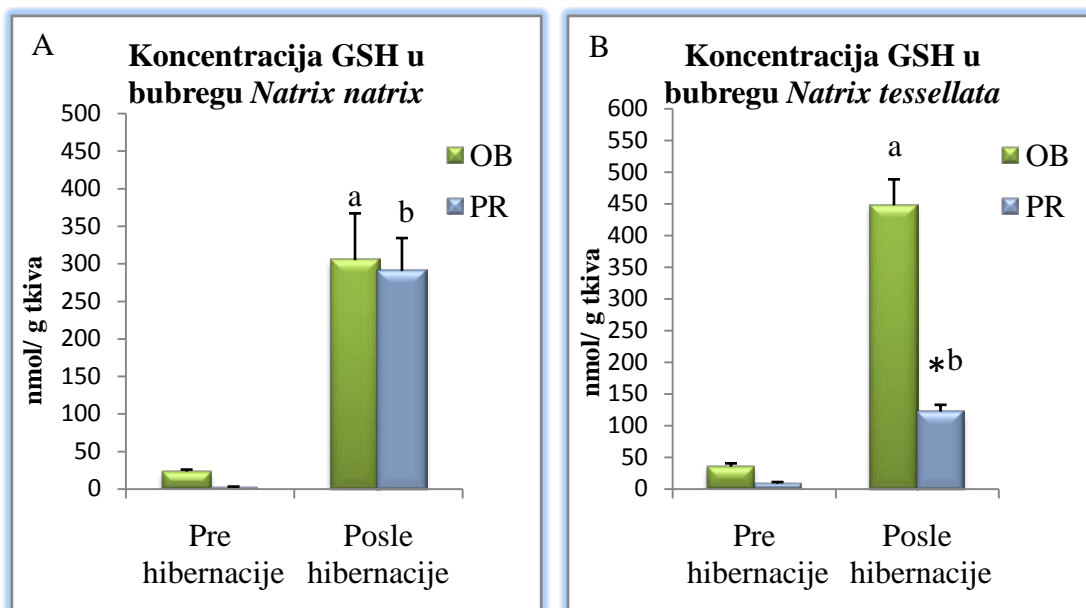
GSH JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	811.38 \pm 62.43	557.60 \pm 83.07	704.83 \pm 53.96	409.28 \pm 18.15 ^a
Pančevački rit	2546.10 \pm 123.46*	249.56 \pm 23.26 ^b	837.85 \pm 35.60*	257.61 \pm 32.49* ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 F= 175.23 L: p<0.05 F= 60.47 SxL: p<0.05 F= 111.42		S: p<0.05 F= 86.33 L: nd F= 0.04 SxL: p<0.05 F= 9.13	



Grafik 28. Aktivnost GSH izražena u nmol/g tkiva u jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 38. Aktivnosti GSH (nmol/g tkiva) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

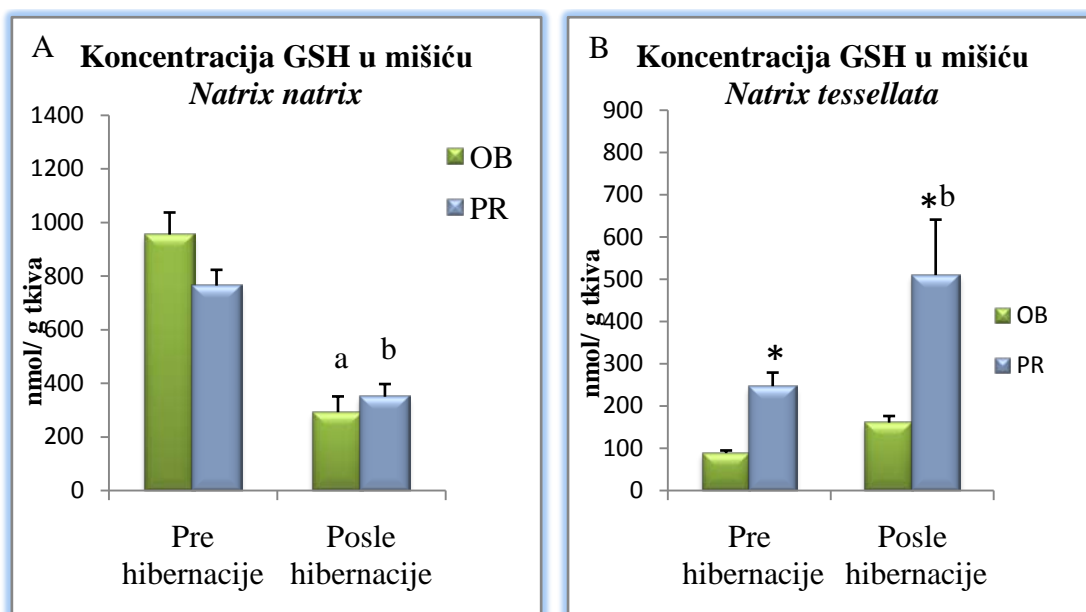
GSH BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	23.10 \pm 2.71	304.72 \pm 62.35 ^a	35.23 \pm 5.19	447.52 \pm 40.99 ^a
Pančevački rit	2.49 \pm 0.67	290.17 \pm 44.03 ^b	8.45 \pm 2.48	122.05 \pm 10.71 ^{*b}
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: nd SxL: nd	F= 63.85 F= 0.24 F= 0.01	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 227.72 F= 102.16 F= 73.46



Grafik 29. Aktivnost GSH izražena u nmol/g tkiva u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p<0.05$. * $p<0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p<0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p<0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 39. Aktivnosti GSH (nmol/g tkiva) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

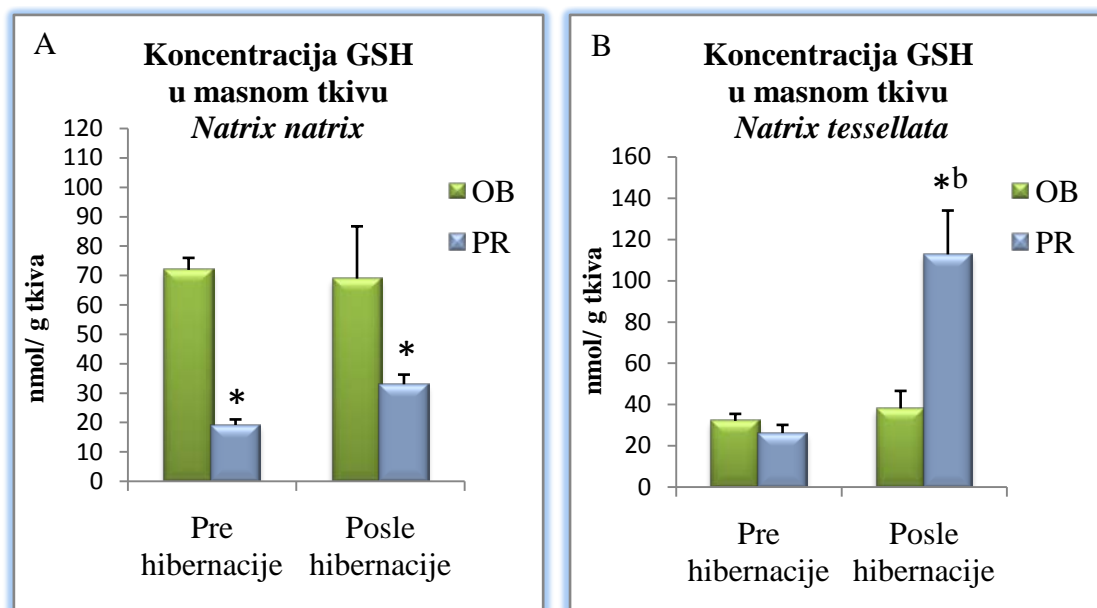
GSH MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	954.39 \pm 82.26	291.80 \pm 58.86 ^a	88.26 \pm 6.35	160.54 \pm 15.61
Pančevački rit	763.99 \pm 58.83	349.49 \pm 47.34 ^b	246.76 \pm 32.19*	509.64 \pm 131.30* ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: nd SxL: nd	F= 66.90 F= 1.02 F= 3.55	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: nd	F= 8.48 F= 19.45 F= 2.74



Grafik 30. Aktivnost GSH izražena u nmol/g tkiva u mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 40. Aktivnosti GSH (nmol/g tkiva) u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

GSH MASNO TKIVO	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	71.91 \pm 4.09	68.96 \pm 17.77	32.11 \pm 3.40	38.17 \pm 8.47
Pančevački rit	19.19 \pm 1.90*	33.05 \pm 3.28*	26.22 \pm 3.95	112.79 \pm 21.25* ^b
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 0.61 F= 40.23 F=1.45	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 21.42 F= 11.79 F= 16.18



Grafik 31. Aktivnost GSH izražena u nmol/g tkiva u masnom tkivu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

4.7.3. Koncentracija slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa

Koncentracije slobodnih SH grupa kao i efekti ispitivanih faktora u jetri belouške i ribarice prikazane su u Tabeli 41 i Graficima 32A i 32B. Kod vrste *N. natrix* značajan uticaj imao je lokalitet i interakcija sezone i lokaliteta, dok je kod *N. tessellata* zabeležen i uticaj sezone. U jetri ribarice najveća koncentracija izmerena je u Obedskoj bari pre hibernacije ($519.22 \pm 38.83 \mu\text{mol/g}$ tkiva), i bila je značajno povećana u odnosu na koncentraciju izmerenu u Pančevačkom ritu u istoj sezoni ($269.68 \pm 10.03 \mu\text{mol/g}$ tkiva) kao i u odnosu na koncentraciju izmerenu u Obedskoj bari u peridu posle hibernacije ($377.05 \pm 4.99 \mu\text{mol/g}$ tkiva). Na lokalitetu Pančevački rit koncentracija je bila statistički značajno povećana posle hibernacije ($408.07 \pm 12.38 \mu\text{mol/g}$ tkiva) u odnosu na prehibernacijsku fazu. Kod *N. tessellata* najveća koncentracija izmerena je u uzorcima iz Obedske bare posle hibernacije ($403.76 \pm 15.13 \mu\text{mol/g}$ tkiva) i statistički se razlikovala u odnosu na one iz Pančevačkog rita u istoj sezoni, kao i u odnosu na koncentraciju izmerenu u Obedskoj bari pre hibernacije.

U Tabeli 42 i Grafiku 33A prikazane su koncentracije slobodnih SH grupa u bubregu *N. natrix*. Statistička obrada podataka pokazala je da lokalitet značajno utiče na razlike u koncentracijama. Post-hoc testiranjem pokazano je da je koncentracija izmerena u uzorcima iz Pančevačkog rita ($345.87 \pm 24.09 \mu\text{mol/g}$ tkiva) značajno smanjena u odnosu na koncentraciju izmerenu u Obedskoj bari ($421.27 \pm 13.01 \mu\text{mol/g}$ tkiva) u periodu pre hibernacije. Kod ribarice, sezona, lokalitet kao i njihova interakcija značajno su uticale na razlike koje su dobijene između ispitivanih grupa (Tabela 42 i Grafik 33A). Najniža koncentracija iznosila je $260.42 \pm 1.03 \mu\text{mol/g}$ tkiva i izmerena je u uzorcima iz Pančevačkog rita posle hibernacije. Ova koncentracija se statistički značajno razlikovala u odnosu na onu izmerenu kod zmija iz Obedske bare u istom periodu, gde je izmerena koncentracija od $464.40 \pm 23.48 \mu\text{mol/g}$ tkiva. Ovo je bila i najveća izmerena koncentracija slobodnih SH grupa kod ribarice i značajno se razlikovala u odnosu na koncentraciju izmerenu u Obedskoj bari pre hibernacije ($312.42 \pm 22.19 \mu\text{mol/g}$ tkiva).

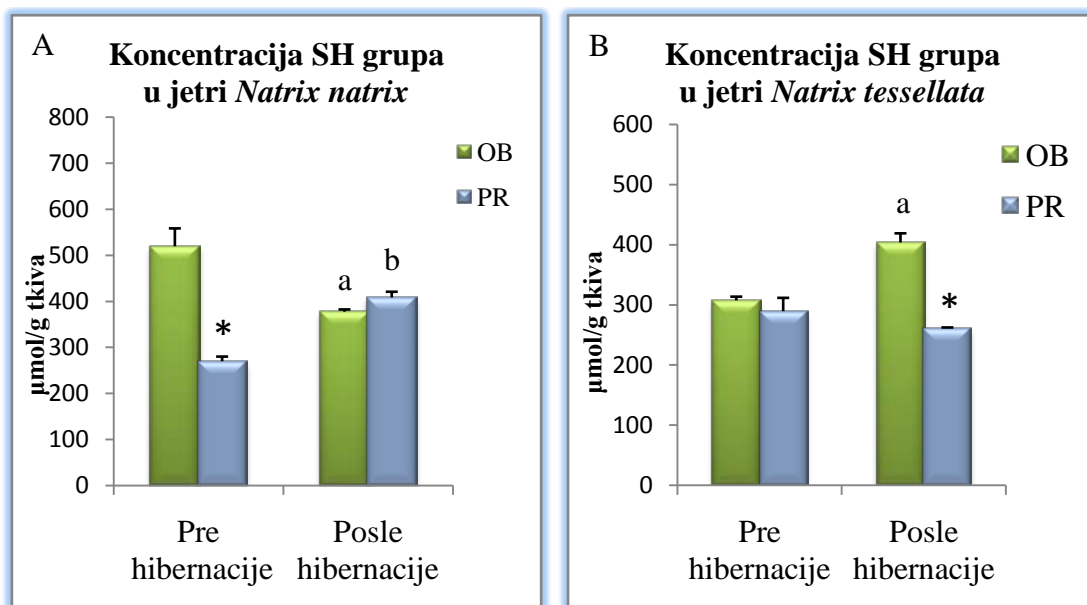
U mišiću belouške zapažen je samo uticaj lokaliteta (Tabela 43 i Grafik 34A). Koncentracija slobodnih SH grupa u uzorcima iz Pančevačkog rita ($340.92 \pm 20.84 \mu\text{mol/g}$ tkiva) pre hibernacije bila značajno smanjena u odnosu na one iz Obedske bare

u istoj sezoni ($436.16 \pm 13.70 \mu\text{mol/g}$ tkiva). Kod ribarice, lokalitet i interakcija sezone i lokaliteta (Tabela 43 i Grafik 34A) značajno su uticale na koncentracije slobodnih SH grupa. Najveće vrednosti izmerene su kod primeraka iz Obedske bare posle hibernacije ($465.41 \pm 28.95 \mu\text{mol/g}$ tkiva) i statistčki su se razlikovale u odnosu na koncentracije izmerene u Obedskoj bari pre hibernacije ($366.57 \pm 17.96 \mu\text{mol/g}$ tkiva) kao i u odnosu na koncentracije izmerene na lokalitetu Pančevaki rit posle hibernacije ($252.72 \pm 2.45 \mu\text{mol/g}$ tkiva).

U masnom tkivu belouške dvofaktorska analiza varijanse pokazala je značajan uticaj lokaliteta na koncentraciju slobodnih SH grupa izmerenih u periodu pre i posle hibernacije na lokalitetima Pančevački rit i Obedska bara (Tabela 44 i Grafik 35A). Fišerovim post-hoc testom registrovano je da je koncentracija SH grupa izmerena u uzorcima iz Pančevačkog rita ($315.95 \pm 13.22 \mu\text{mol/g}$ tkiva) značajno smanjena u odnosu na one iz Obedske bare ($387.69 \pm 6.43 \mu\text{mol/g}$ tkiva) u periodu pre hibernacije. Kod *N. tessellata* zabeležen je značajan uticaj lokaliteta i interakcije sezone i lokaliteta na koncentraciju slobodnih SH grupa (Tabela 44 i Grafik 25B). Na lokalitetu Obedska bara, izmerene koncentracije pre i posle hibernacije iznosile su redom $350.72 \pm 21.50 \mu\text{mol/g}$ tkiva i $430.39 \pm 19.29 \mu\text{mol/g}$ tkiva, dok su u Pančevačkom ritu istim redom iznosile $329.77 \pm 17.67 \mu\text{mol/g}$ tkiva i 254.06 ± 6.43 . Post-hoc testiranjem ustanovljeno je da je koncentracija slobodnih SH grupa u Obedskoj bari značajno povećana u posthibernacijskom periodu u odnosu na period pre hibernacije, dok je u Pančevačkom ritu zabeležen suprotan trend. Takođe, koncentracija izmerena na lokalitetu Pančevački ritt značajno je smanjena u odnosu na koncentraciju izmerenu u Obedskoj bari u periodu posle hibernacije.

Tabela 41. Koncentracija slobodnih SH grupa ($\mu\text{mol/g}$ tkiva) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

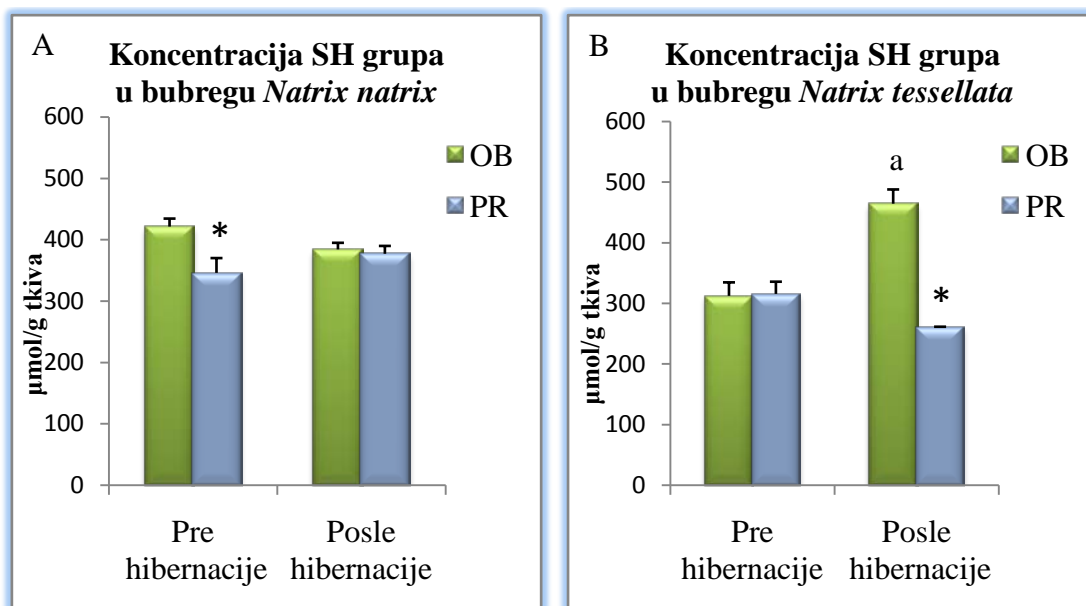
SH grupe JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	519.22 \pm 38.83	377.05 \pm 4.99 ^a	307.46 \pm 6.16	403.76 \pm 15.13 ^a
Pančevački rit	269.68 \pm 10.03*	408.07 \pm 12.38 ^b	289.49 \pm 22.15	261.70 \pm 0.70*
ANOVA efekti	S: nd	F= 0.00	S: p<0.05	F= 6.46
	L: p<0.05	F= 17.14	L: p<0.05	F= 35.23
	SxL: p<0.05	F= 28.26	SxL: p<0.05	F= 21.18



Grafik 32. Koncentracija slobodnih SH grupa izražena u $\mu\text{mol/g}$ tkiva u jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 42. Koncentracija slobodnih SH grupa ($\mu\text{mol/g}$ tkiva) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

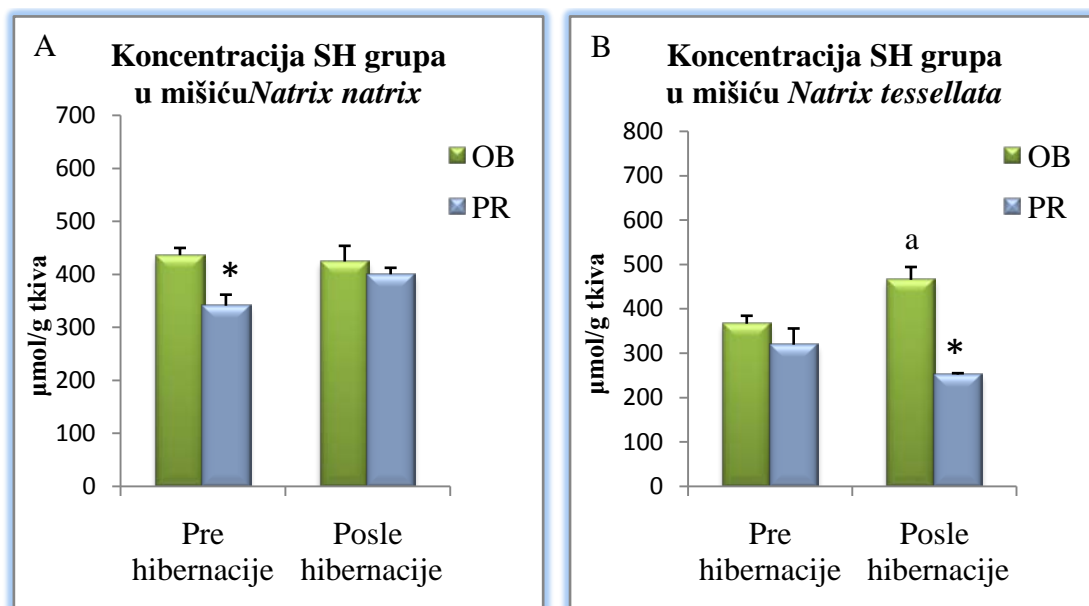
SH grupe BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	421.27 \pm 13.01	384.08 \pm 10.74	312.42 \pm 22.19	464.40 \pm 23.48 ^a
Pančevački rit	345.87 \pm 24.09*	376.96 \pm 12.80	315.60 \pm 20.13	260.42 \pm 1.03*
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 0.03 F= 5.32 F= 3.64	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 5.10 F= 21.93 F= 23.34



Grafik 33. Koncentracija SH grupa izražena u $\mu\text{mol/g}$ tkiva u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 43. Koncentracija slobodnih SH grupa ($\mu\text{mol/g}$ tkiva) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

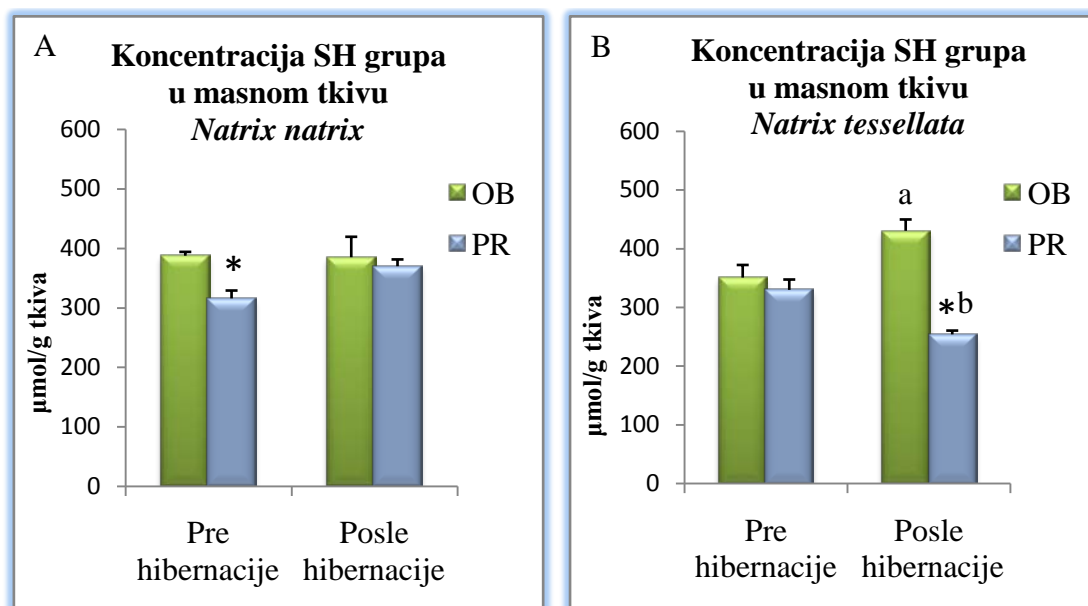
SH grupe MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	436.16 \pm 13.70	424.28 \pm 29.55	366.57 \pm 17.96	465.41 \pm 28.95 ^a
Pančevački rit	340.92 \pm 20.84*	400.14 \pm 12.24	319.35 \pm 36.54	252.72 \pm 2.45*
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 1.56 F= 9.93 F= 3.52	S: nd L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 0.40 F= 26.06 F= 10.56



Grafik 34. Koncentracija slobodnih SH grupa izražena u $\mu\text{mol/g}$ tkiva u mišiću A) *N. natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 44. Koncentracija slobodnih SH grupa ($\mu\text{mol/g}$ tkiva) u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

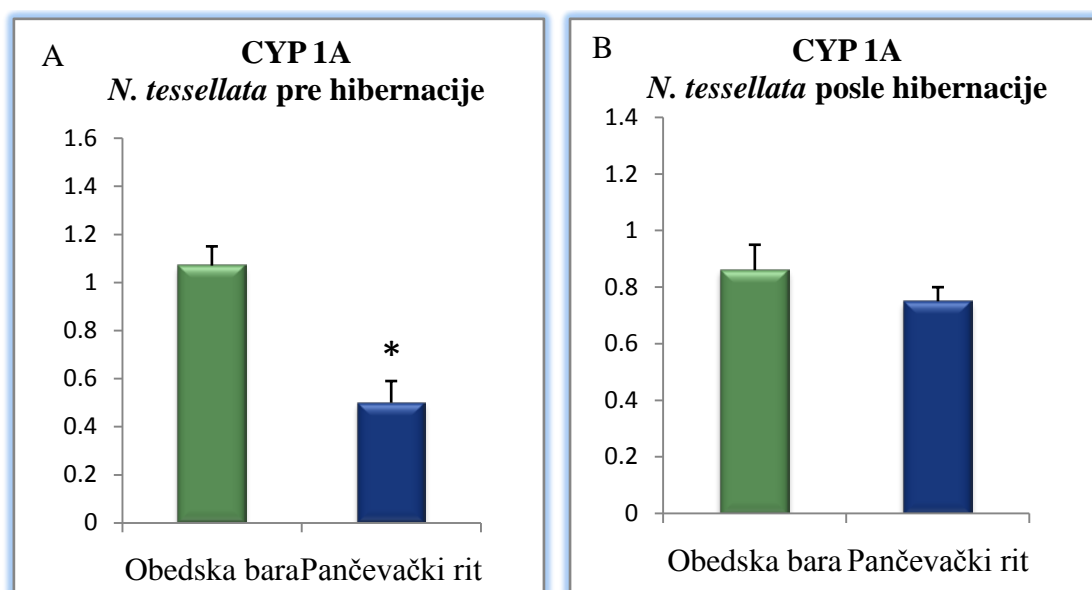
SH grupe MASNO TKIVO	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	387.69 \pm 6.43	385.10 \pm 34.39	350.72 \pm 21.50	430.39 \pm 19.29 ^a
Pančevački rit	315.95 \pm 13.22*	370.03 \pm 11.40	329.77 \pm 17.67	254.06 \pm 6.43* ^b
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 2.99 F= 8.48 F=3.62	S: nd L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 0.01 F= 26.18 F= 16.24



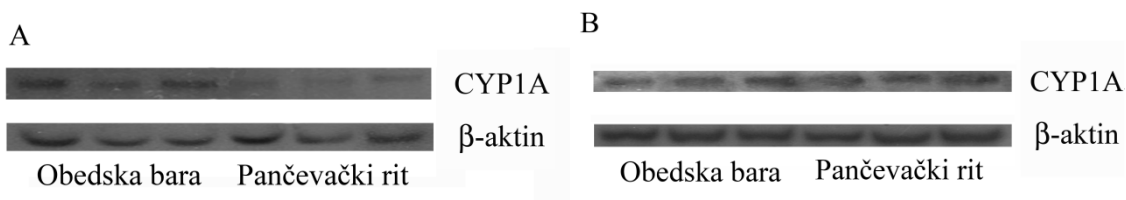
Grafik 35. Koncentracija slobodnih SH grupa izražena u $\mu\text{mol/g}$ tkiva u masnom tkivu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p<0.05$. * $p<0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p<0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p<0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

4.8. Nivo ekspresije enzima faze I biotransformacije citohroma P₄₅₀1A (CYP1A) u jetri

Nivo ekspresije CYP1A u jetri *N. tessellata* u periodu pre hibernacije bio je značajno manji kod jedinki iz Pančevačkog rita (Grafik 36A, Slika 9A). Posle hibernacije nisu konstatovane značajne razlike u nivou ekspresije CYP1A između ispitivanih lokaliteta (Grafik 36B, Slika 9B). U jetri *N. natrix* CYP1A nije mogao da se detektuje.



Grafik 36. Nivo ekspresije CYP1A u jetri vrste *N. tessellata* A) pre hibernacije i B) posle hibernacije izražen u arbitrarnim jedinicama u odnosu na β -aktin. Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost * $p < 0.05$.



Slika 9. Reprezentativni Western blot detektovanog CYP1A u jetri *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita A) pre hibernacije i B) posle hibernacije. β -aktin korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka na gel.

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

4.9.1. Aktivnost enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST) u plazmi

Na aktivnost GST u plazmi *N. natrix* značajno su uticala oba ispitivana faktora kao i njihova interakcija, dok kod *N. tessellata* nije bilo statistički značajnih razlika (Tabela 45 i Grafik 37A, Tabela 45 i Grafik 37B). Najveća aktivnost registrovana je kod belouške u periodu posle hibernacije na lokalitetu Pančevački rit i iznosila je 167.50 ± 25.87 nmol GSH/min/ml plazme. Post-hoc Fišerov test pokazao je da se ona statistički značajno razlikuje u odnosu na prehibernacijski period (47.37 ± 5.37 nmol GSH/min/mL plazme), kao i u odnosu na aktivnost enzima koji je izmeren kod životinja iz Obedske bare u periodu posle hibernacije (54.37 ± 12.83 nmol GSH/min/mL plazme).

4.9.2. Aktivnost enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST) u tkivima

U jetri kod obe ispitivane vrste registrovan je značajan uticaj sezone i interakcije sezone i lokaliteta na aktivnost GST (Tabela 46 i Grafik 38A, Tabela 46 i Grafik 38B). Kod obe vrste uzorkovane na lokalitetu Obedska bara registrovano je značajno smanjenje aktivnosti GST u periodu posle hibernacije u odnosu na period pre hibernacije. Na ovom lokalitetu izmerene aktivnosti GST kod belouške pre i posle hibernacije iznosile su redom 2078.79 ± 209.66 Jed/mg proteina i 1294.81 ± 70.03 Jed/mg proteina, a kod ribarice 1263.97 ± 132.10 Jed/mg proteina i 801.95 ± 58.23 Jed/mg proteina. U prehibernacijskom periodu kod belouške aktivnost GST bila je značajno niža kod zmija iz Pančevačkog rita (1528.88 ± 55.76 Jed/mg proteina) u odnosu na one iz Obedske bare u istom periodu. Kod ribarice je zabeležen suprotan trend, odnosno aktivnost GST bila je statistički značajno povećana u jetri zmija iz Pančevačkog rita (1565.52 ± 77.52 Jed/mg proteina) u odnosu na vrednost izmerenu u jetri životinja iz Obedske bare u prehibernacijskoj sezoni. Kod ribarice iz Pančevačkog rita zabeleženo je i značajno smanjenje aktivnosti enzima u posthibernacijskom periodu.

Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti GST u bubregu pokazala je da kod obe vrste postoje statistički značajne razlike kada se u obzir uzme interakcija sezone i lokaliteta. Kod belouške registrovan je i uticaj sezone, a kod ribarice i uticaj lokaliteta. U bubregu *N. natrix* je najveća aktivnost GST izmerena u tkivima zmija iz Obedske bare u periodu pre hibernacije i iznosila je 2377.07 ± 88.32 Jed/mg proteina (Tabela 47 i Grafik 39A). Kod *N. tessellata* najveća aktivnost registrovana je u periodu posle hibernacije na lokalitetu Pančevački rit (1829.41 ± 88.82 Jed/mg proteina) (Tabela 47 i Grafik 39B). Kod obe ispitivane vrste post-hoc testiranje pokazalo je da je aktivnost GST na lokalitetu Obedska bara značajno smanjena u posthibernacijskoj fazi u odnosu na period pre hibernacije. Isti trend aktivnosti zabeležen je kod obe vrste u periodu posle hibernacije, gde je utvrđeno da je aktivnost GST u bubregu značajno veća na lokalitetu Pančevački rit u poređenju sa Obedskom barom. Suprotno, kod belouške u periodu pre hibernacije aktivnost je u Pančevačkom ritu bila značajno niža u odnosu na Obedsku baru.

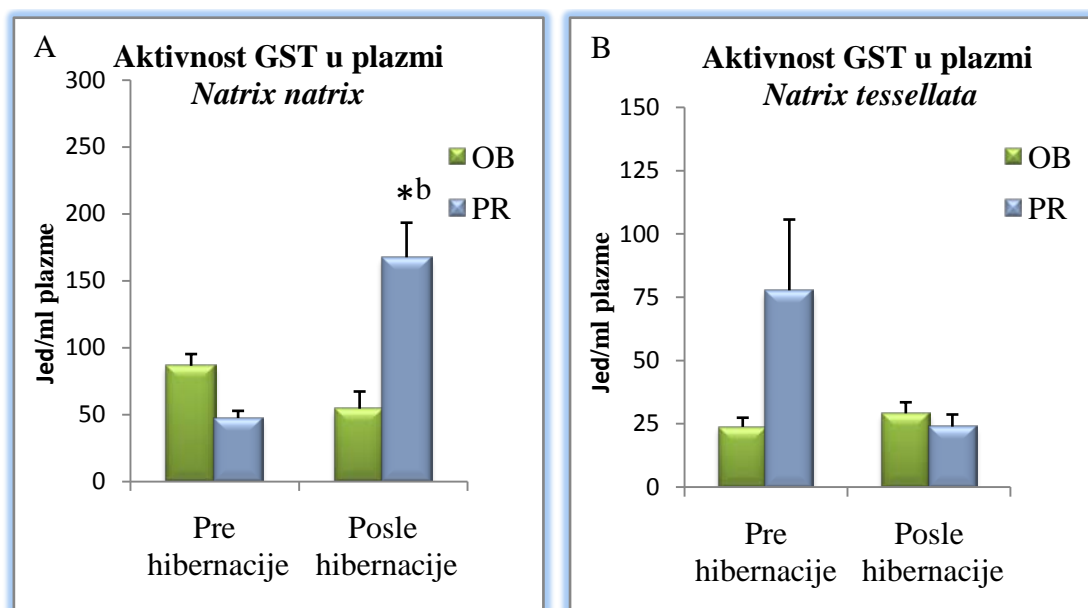
U mišiću belouške dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da statistički značajne razlike postoje samo kada se u obzir uzmu oba ispitivana faktora (Tabela 48 i Grafik 40A). Post-hoc testiranje je pokazalo da postoji značajno povećanje aktivnosti GST kod zmija iz Pančevačkog rita u periodu posle hibernacije (6.89 ± 0.88 Jed/mg proteina) u odnosu na period pre hibernacije (4.48 ± 0.50 Jed/mg proteina). Na aktivnost GST kod ribarice značajno utiče lokalitet i interakcija sezone i lokaliteta (Tabela 48 i Grafik 40B). Kod ove vrste 27.19 ± 2.70 Jed/mg proteina je najveća izmerena aktivnost enzima i ona je registrovana na lokalitetu Pančevački rit u periodu posle hibernacije. Ovaj parametar je statistički značajno povećana u odnosu na prehibernacijsku fazu na istom lokalitetu. Kod ribarice u prehibernacijskoj fazi aktivnost enzima GST na lokalitetu Obedska bara (24.68 ± 1.89 Jed/mg proteina) bila je značajno veća u poređenju sa aktivnošću koja je izmerena na lokalitetu Pančevački rit u istoj sezoni (15.77 ± 1.07 Jed/mg proteina).

Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti GST u masnom tkivu belouške pokazala je značajan uticaj oba faktora kao i njihove interakcije (Tabela 49 i Grafik 41A). Najveća aktivnost izmerena kod zmija iz Pančevačkog rita u periodu pre hibernacije (127.69 ± 8.74 Jed/mg proteina) i bila je značajno povećana u odnosu na aktivnost izmerenu kod jedinki iz Obedske bare u istom periodu (48.88 ± 4.99 Jed/mg

proteina). Na oba lokaliteta registrovana je statistički značajna razlika između ispitivanih perioda, ali sa suprotnim trendom. Najveća izmerena aktivnost GST u masnom tkivu ribarice iznosila je 57.47 ± 7.12 Jed/mg proteina, a između ispitivanih grupa nije bilo statistički značajnih razlika (Tabela 49 i Grafik 41B).

Tabela 45. Aktivnosti GST (Jed/ml plazme) u plazmi *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

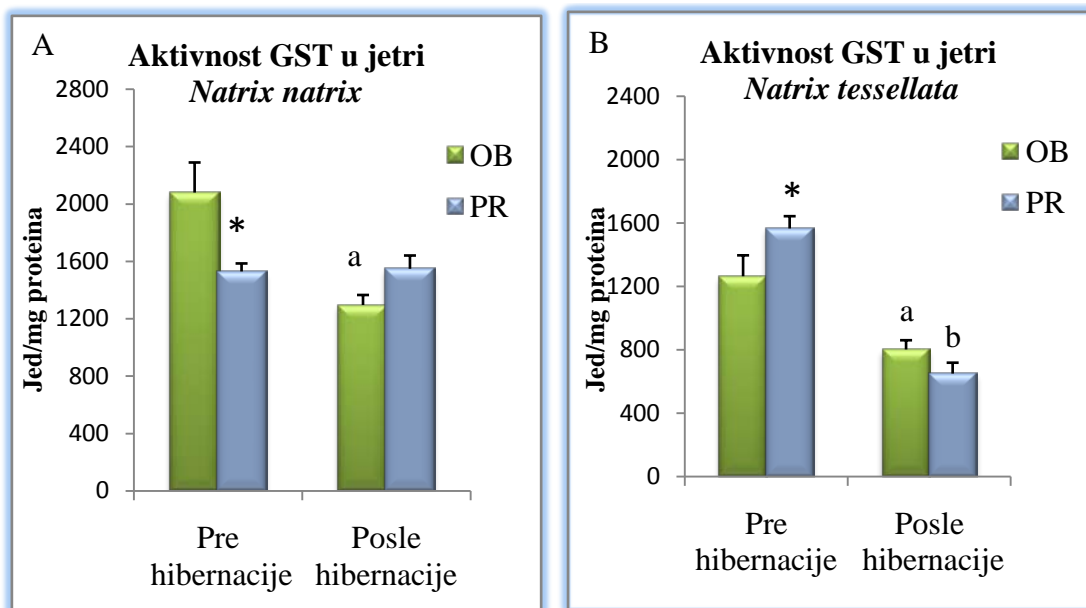
GST PLAZMA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	86.41 \pm 8.78	54.37 \pm 12.83	23.79 \pm 3.63	29.14 \pm 4.38
Pančevački rit	47.37 \pm 5.37	167.50 \pm 25.87 ^{*b}	77.75 \pm 27.97	23.91 \pm 4.78
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 6.53 F= 4.62 F= 19.49	S: nd L: nd SxL: nd	F= 1.71 F= 1.72 F= 2.54



Grafik 37. Aktivnost GST izražena u Jed/g Hb u krvi A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 46. Aktivnosti GST (Jed/mg proteina) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

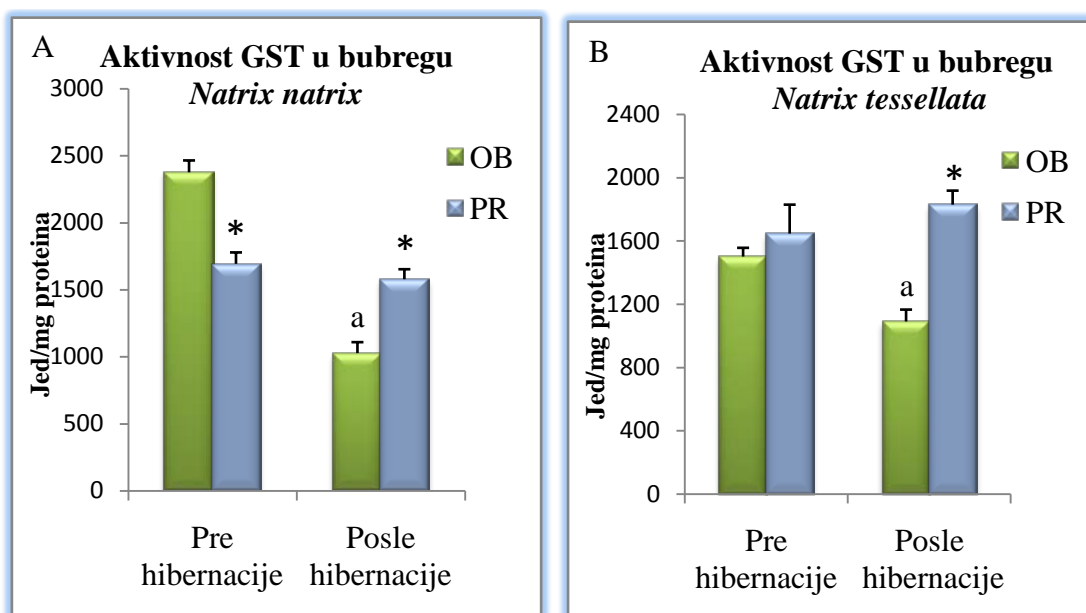
GST JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	2078.79 \pm 209.66	1294.81 \pm 70.03 ^a	1263.97 \pm 132.10	801.95 \pm 58.23 ^a
Pančevački rit	1528.88 \pm 55.76*	1547.45 \pm 92.59	1565.52 \pm 77.52*	649.70 \pm 68.71 ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 F= 8.10 L: nd F= 1.22 SxL: p<0.05 F= 8.91		S: p<0.05 F= 41.60 L: nd F= 0.49 SxL: p<0.05 F= 4.51	



Grafik 38. Aktivnost GST izražena u Jed/mg proteina u jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 47. Aktivnosti GST (Jed/mg proteina) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

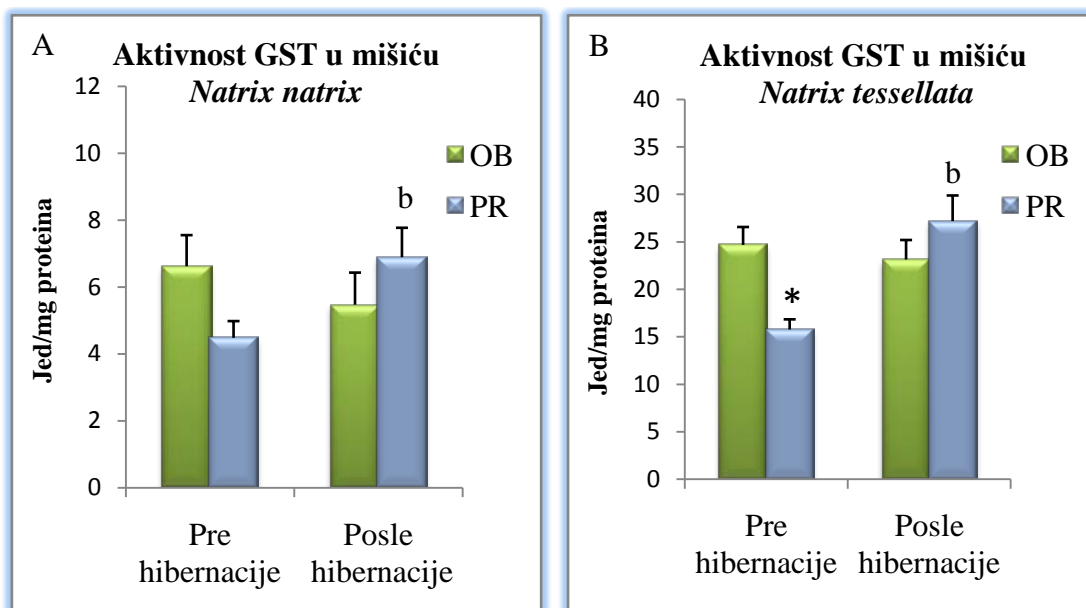
GST BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	2377.07 \pm 88.32	1027.73 \pm 81.72 ^a	1501.37 \pm 55.29	1091.18 \pm 75.02 ^a
Pančevački rit	1693.78 \pm 85.30*	1579.15 \pm 74.45*	1646.51 \pm 183.10	1829.41 \pm 88.82*
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: nd SxL: p<0.05	F= 72.12 F= 0.59 F= 51.30	S: nd L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 1.25 F= 18.95 F= 8.54



Grafik 39. Aktivnost GST izražena u Jed/mg proteina u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 48. Aktivnosti GST (Jed/mg proteina) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

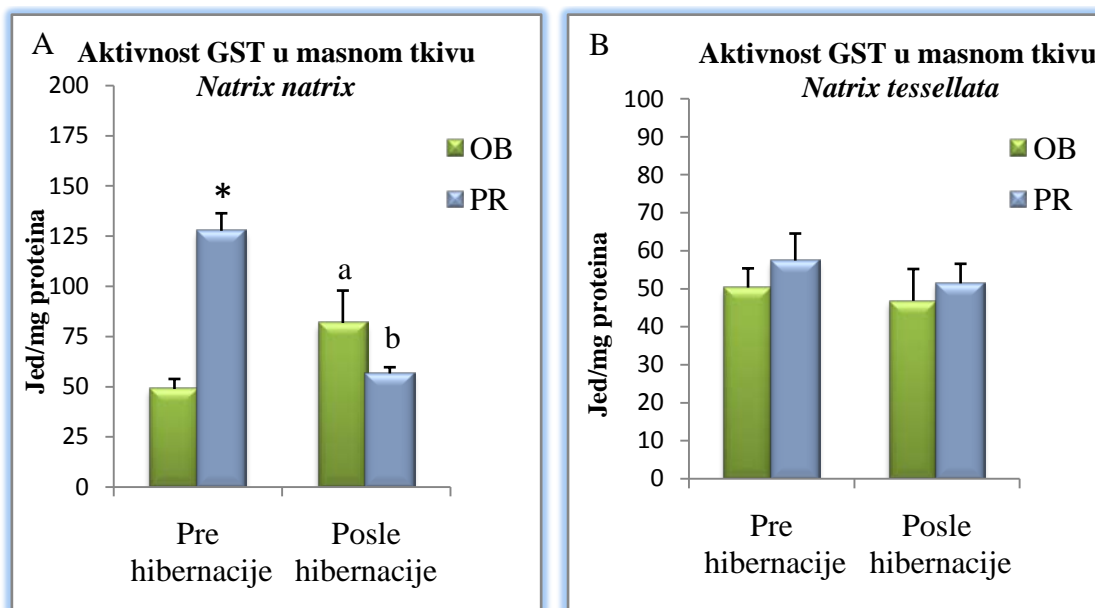
GST MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	6.62 \pm 0.93	5.47 \pm 0.96	24.68 \pm 1.89	23.14 \pm 2.06
Pančevački rit	4.48 \pm 0.50	6.89 \pm 0.88 ^b	15.77 \pm 1.07*	27.19 \pm 2.70 ^b
ANOVA efekti	S: nd	F= 0.55	S: p<0.05	F= 5.31
	L: nd	F= 0.18	L: nd	F= 1.29
	SxL: p<0.05	F= 4.38	SxL: p<0.05	F= 9.15



Grafik 40. Aktivnost GST izražena u Jed/mg proteina u mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 49. Aktivnosti GST (Jed/mg proteina) u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

GST MASNO TKIVO	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	48.88 \pm 4.99	81.76 \pm 16.16 ^a	50.36 \pm 5.06	46.87 \pm 8.38
Pančevački rit	127.69 \pm 8.74*	56.62 \pm 3.10 ^b	57.47 \pm 7.12	51.47 \pm 5.15
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 5.48 F= 10.83 F= 40.60	S: nd L: nd SxL: nd	F= 0.56 F= 0.85 F= 0.04



Grafik 41. Aktivnost GST izražena u Jed/mg proteina u masnom tkivu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

4.10. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije(TBARS)

4.10.1. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u krvi

Dobijene koncentracije TBARS u krvi *N. natrix* (Tabela 50, Grafik 42A i 42B) kretale su se u opsegu od 0.83 ± 0.13 nmoL TBARS/ml krvi kod primeraka iz Obedske bare posle hibernacije do 8.83 ± 0.50 nmoL TBARS/ml krvi životinja ulovljenih pre hibernacije na istom lokalitetu. Dvofaktorskom analizom varijanse utvrđeno je da na dobijene rezultate značajan uticaj imaju sezona, lokalitet kao i njihova interakcija. U periodu posle hibernacije koncentracija TBARS bila je značajno smanjena u odnosu na period pre hibernacije na oba ispitivana lokaliteta. Na lokalitetu Pančevački rit koncentracija TBARS bila je značajno manja od koncentracije izmerene u Obedskoj bari u prehibernacijskoj fazi. Slični rezultati dobijeni su i za vrstu *N. tessellata*, gde je takođe pokazano da sezona, lokalitet i njihova interakcija značajno utiču na dobijene rezultate. Vrednosti su se kretale od 1.11 ± 0.34 nmol TBARS/mL krvi zmija iz Obedske bare posle hibernacije do 6.26 ± 0.47 nmol TBARS/mL krvi primeraka iz Pančevačkog rita u istom periodu. Kao i kod belouške, u posthibernacijskom periodu koncentracija TBARS bila je značajno niža u odnosu na preiod pre hibernacije na lokalitetu Obedska bara, dok je u Pančevačkom ritu zabeležen suprotan trend. U periodu pre hibernacije, koncentracija TBARS je u Pančevačkom ritu značajno niža u odnosu na Obedsku baru, dok je u periodu posle hibernacije registrovan suprotan trend.

4.10.2. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u tkivima

Koncentracije TBARS u jetri ispitivanih vrsta prikazane su u Tabeli 51i Grafiku 43A i 43B. Dvaofaktorska analiza varijanse pokazala je da na koncentraciju ovog parametra kod *N. natrix* značajno utiče lokalitet, a kod *N. tessellata* sezona. Koncentracije TBARS pre hibernacije na lokalitetima Obedskoia bara i Pančevački rit pre hibernacije iznosile su 3.41 ± 0.10 nmol MDA/mg tkiva i 2.15 ± 0.26 nmol MDA/mg tkiva, dok su posle hibernacije istim redom iznosile 2.81 ± 0.49 MDA/mg tkiva i 1.90 ± 0.12 MDA/mg tkiva. Fišerov post-hoc test pokazao je da je u obe ispitivane sezone koncentracija TBARS značajno niža u jetri životinja iz Pančevačkog rita u odnosu na one iz Obedske bare. Kod vrste *N. tessellata* najveća koncentracija

izmerena je na lokalitetu Pančevački rit i to posle hibernacije (3.25 ± 0.53 MDA/mg tkiva), kada je bila značajno veća u odnosu na odnosu na koncentraciju izmerenu na ovom lokalitetu u periodu pre hibernacije (1.46 ± 0.20 MDA/mg tkiva).

Statističkom analizom podataka pokazano je da sezona značajno utiče na koncentraciju TBARS u bubregu *N. natrix* (Tabela 52, Grafik 44A). Koncentracije TBARS kod ove vrste kretale su se u opsegu 1.15 ± 0.12 nmol MDA/mg tkiva koliko je izmereno kod primeraka iz Pančevačkog rita posle hibernacije do 2.77 ± 0.23 nmol MDA/mg tkiva na istom lokalitetu pre hibernacije. Fišerov pos-hoc test pokazao je da su razlike između ove dve grupe statistiki značajne. Kod vrste *N. tessellata* registrovan je značajan uticaj oba ispitivana faktora i njihove interakcije (Tabela 52, Grafik 44B). Na oba ispitivana lokaliteta kod ove vrste koncentracija TBARS bila je značajno niža u periodu posle hibernacije u odnosu na period pre hibernacije. Takođe pokazano je da je u prehibernacijskoj fazi koncentracija TBARS značajno veća u Pančevačkom ritu u odnosu na Obedsku baru.

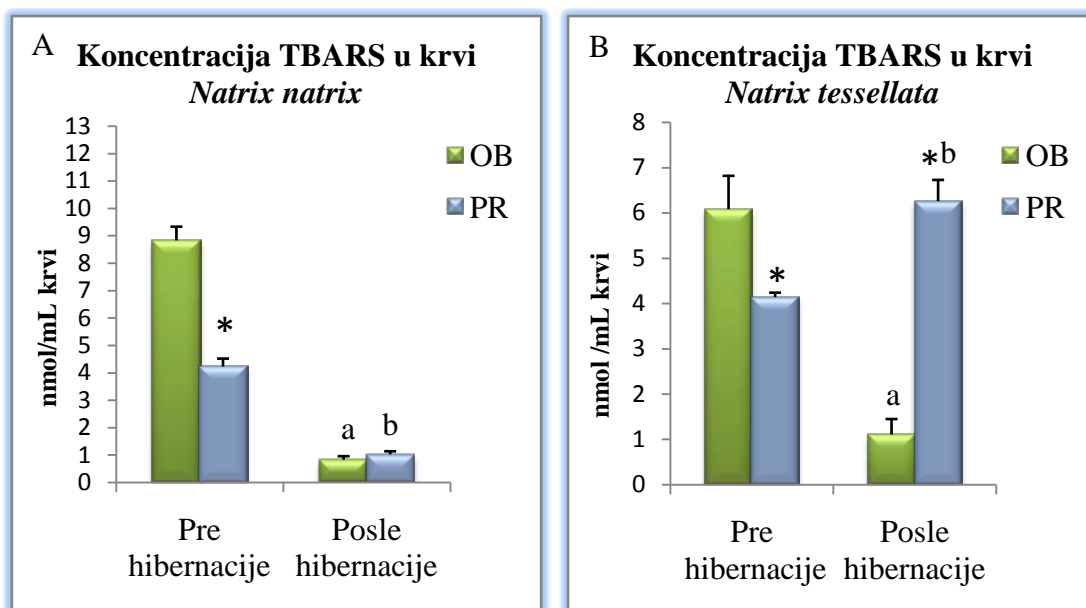
Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je da na koncentraciju TBARS u mišiću belouške značajno utiče sezona i interakcija sezone i lokaliteta (Tabela 53, Grafik 45 A). Najveća koncentracija izmerena je u uzorcima prikupljenim u Pančevačkom ritu pre hibernacije (2.07 ± 0.33 nmol MDA/mg tkiva) i bila je značajno veća u odnosu na koncentraciju izmerenu na ovom lokalitetu posle hibernacije (0.54 ± 0.15 nmol MDA/mg tkiva). Kod ribarice nije registrovan uticaj ni jednog ispitivanog faktora na koncentraciju TBARS (Tabela 53, Grafik 45B).

Koncentracije TBARS u masnom tkivu ispitivanih vrsta prikazane su u Tabeli 54 i Graficima 46A i 46B. Dvofaktorskom analizom varijanse registrovano je da kod obe vrste na koncentraciju TBARS značajno utiču oba ispitivana faktora kao i njihova interakcija. Najmanja koncentracija TBARS kod belouške izmerena je na lokalitetu Obedska bara posle hibernacije (0.75 ± 0.32 nmol MDA/mg tkiva) a najveća na istom lokalitetu pre hibernacije (30.86 ± 6.33 nmol MDA/mg tkiva). U posthibernacijskom periodu koncentracije TBARS bile su značajno niže u odnosu na period pre hibernacije na oba ispitivana lokaliteta. Takođe, u periodu pre hibernacije koncentracija TBARS izmerena na lokalitetu Pančevački rit značajno je niža u odnosu na onu dobijenu u Obedskoj bari u istom periodu. Koncentracije TBARS kod ribarice iz Obedskoe bare pre i posle hibernacije redom su iznosile 1.92 ± 0.30 nmol MDA/mg tkiva i 1.51 ± 0.23

nmol MDA/mg tkiva, dok su u Pančevačkom ritu istim redom iznosile 21.47 ± 5.15 nmol MDA/mg tkiva i 61.72 ± 4.87 nmol MDA/mg tkiva. Statističkom analizom utvrđeno je da su koncentracije TBARS u Pančevačkom ritu bile značajno povećane u odnosu na Obedsku baru u oba ispitivana perioda. Takođe, konstatovano je da je koncentracija TBARS u Pančevačkom ritu posle hibernacije bila značajno povećana u odnosu na koncentraciju pre hibernacije na istom lokalitetu.

Tabela 50. TBARS (nmol/ml krvi) u krvi *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

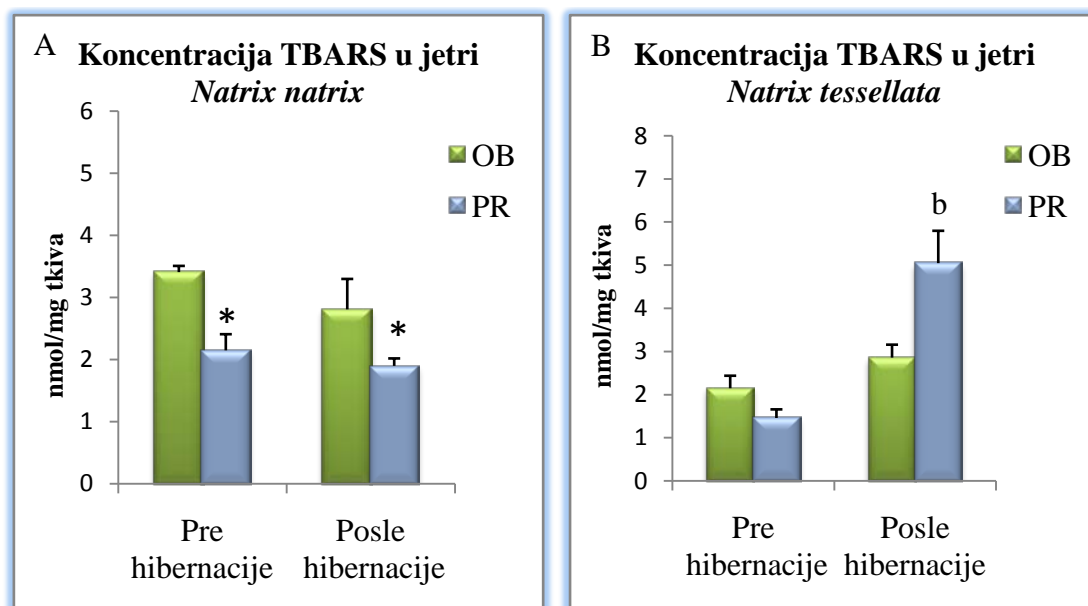
TBARS KRV	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	8.83 \pm 0.50	0.83 \pm 0.13 ^a	6.08 \pm 0.74	1.11 \pm 0.34 ^a
Pančevački rit	4.23 \pm 0.29*	1.03 \pm 0.11 ^b	4.14 \pm 0.10*	6.26 \pm 0.47* ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 F= 134.28	L: p<0.05 F= 20.66	S: p<0.05 F= 6.44	L: p<0.05 F= 8.16
	SxL: p<0.05 F= 24.67		SxL: p<0.05 F= 39.84	



Grafik 42. TBARS izražena u nmol /mL krvi u krvi A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 51. TBARS (nmol/mg tkiva) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

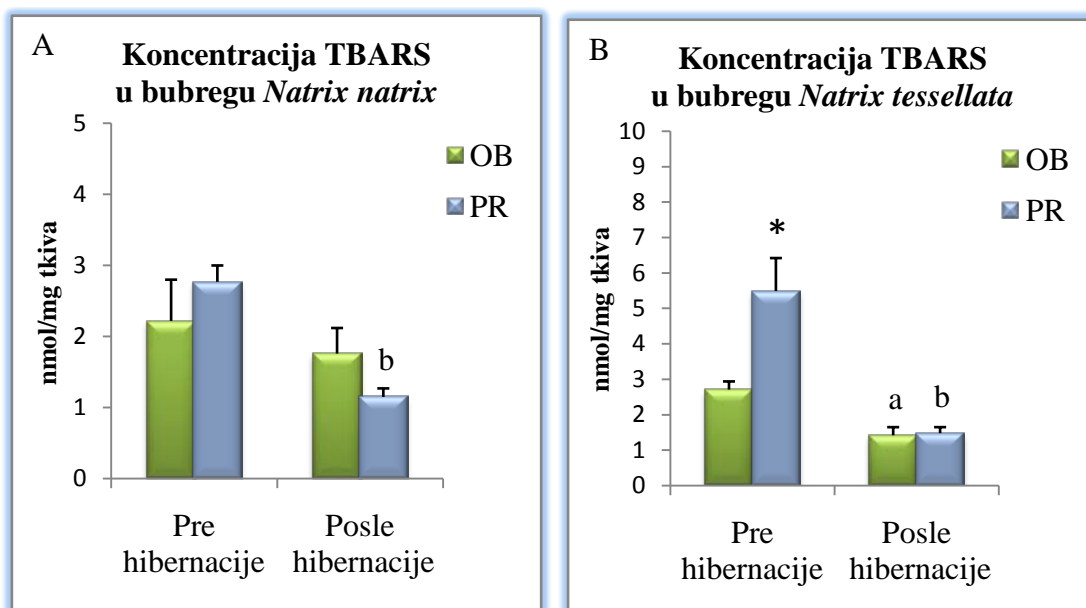
TBARS JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	3.41 \pm 0.10	2.81 \pm 0.49	2.15 \pm 0.29	2.86 \pm 0.30
Pančevački rit	2.15 \pm 0.26*	1.90 \pm 0.12*	1.46 \pm 0.20	5.05 \pm 0.75 ^b
ANOVA efekti	S: nd L: p<0.05 SxL: nd	F= 3.08 F= 20.12 F= 0.52	S: p<0.05 L: nd SxL: nd	F= 6.74 F= 0.10 F= 1.27



Grafik 43. TBARS izražena u nmol/mg tkiva u jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 52. TBARS (nmol/mg tkiva) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

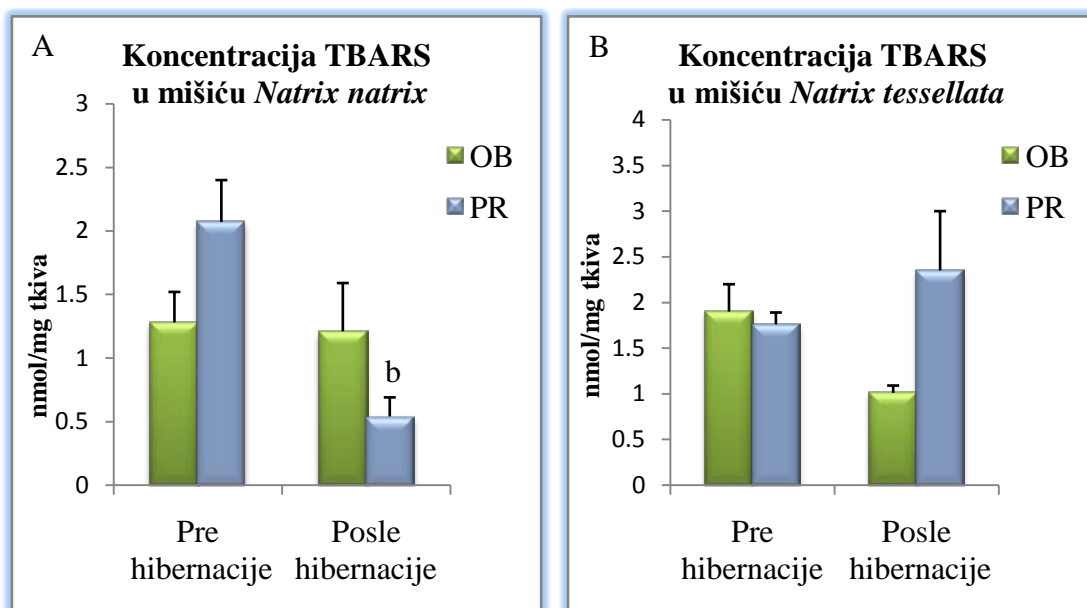
TBARS BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	2.22 \pm 0.58	1.76 \pm 0.36	2.71 \pm 0.23	1.42 \pm 0.23 ^a
Pančevački rit	2.77 \pm 0.23	1.15 \pm 0.12 ^b	5.49 \pm 0.93*	1.48 \pm 0.17 ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05	F= 9.86	S: p<0.05	F= 55.04
	L: nd	F= 0.01	L: p<0.05	F= 15.81
	SxL: nd	F= 3.07	SxL: p<0.05	F= 14.40



Grafik 44. TBARS izražena u nmol/mg tkiva u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 53. TBARS (nmol/mg tkiva) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

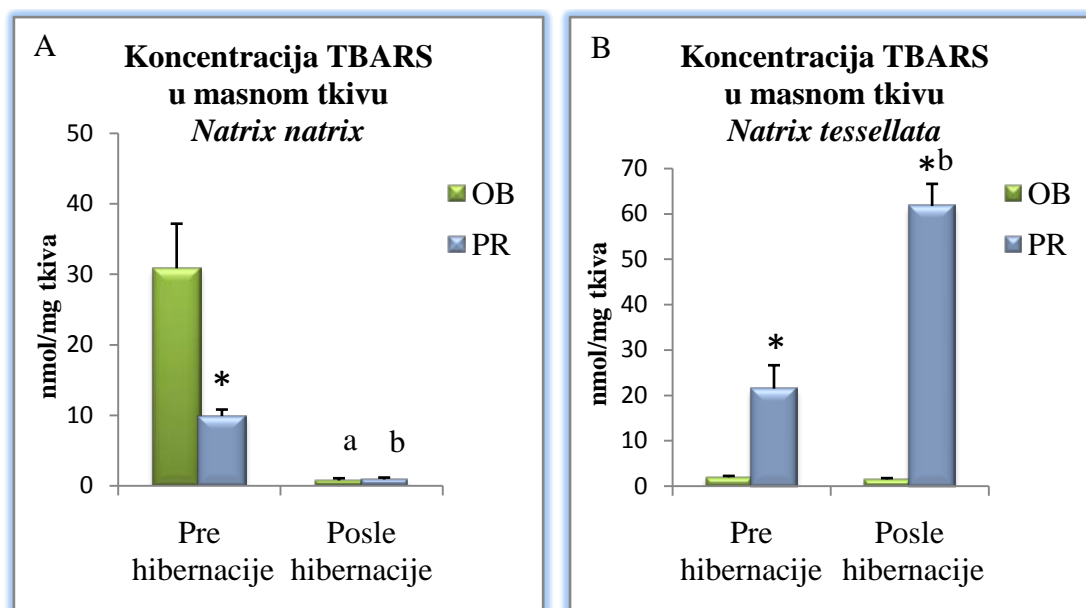
TBARS MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	1.28 \pm 0.24	1.21 \pm 0.38	1.90 \pm 0.30	1.01 \pm 0.08
Pančevački rit	2.07 \pm 0.33	0.54 \pm 0.15 ^b	1.76 \pm 0.13	2.35 \pm 0.65
ANOVA efekti	S: p<0.05	F= 6.08	S: nd	F= 0.14
	L: nd	F= 0.03	L: nd	F= 2.25
	SxL: p<0.05	F= 4.96	SxL: nd	F= 3.40



Grafik 45. TBARS izražena u nmol/mg tkiva u mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 54. TBARS (nmol/mg tkiva) u masnom tkivu *N. tessellata* i *N. natrix* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom ANOV-om.

TBARS MASNO TKIVO	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	30.86 \pm 6.33	0.75 \pm 0.32 ^a	1.92 \pm 0.30	1.51 \pm 0.23
Pančevački rit	9.89 \pm 0.93*	0.89 \pm 0.28 ^b	21.47 \pm 5.15*	61.72 \pm 4.87* ^b
ANOVA efekti	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 36.66 F= 10.40 F= 10.68	S: p<0.05 L: p<0.05 SxL: p<0.05	F= 33.46 F= 134.12 F= 34.85



Grafik 46. TBARS izražena u nmol MDA/mg tkiva u masnom tkivu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je p<0.05. * p<0.05: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^ap<0.05: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^bp<0.05: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

4.11. Aktivnost holinesteraza (ChE)

4.11.1. Aktivnost holinesteraza (ChE) u plazmi

Dvofaktorskom anovom utvrđeno je da sezona i interakcija sezone i lokaliteta značajno utiču na aktivnost ChE u plazmi belouške (Tabela 55 i Grafik 47A). Međutim kod ribarice na aktivnost ovog enzima značajno je uticao samo lokalitet. Post-hoc testiranje utvrdilo je da kod belouške aktivnost ChE značajno opada u posthibernacijskoj fazi u odnosu na period pre hibernacije na lokalitetu Obedska bara ($372.21 \pm 24.11 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ plazme i $188.76 \pm 19.59 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ plazme). U periodu pre hibernacije aktivnost ChE bila je značajno povećana na lokalitetu Pančevački rit, dok je u periodu posle hibernacije aktivnost bila značajno smanjena na ovom lokalitetu u odnosu na Obedsku baru. U krvi ribarice (Tabela 55 i Grafik 47A) statistička analiza pokazala je značajan uticaj lokaliteta. U oba ispitivana perioda aktivnost ovog enzima u krvi bila je značajno manja na lokalitetu Pančevački rit u odnosu na Obedsku baru. Najveća aktivnost ChE izmerena je u posthibernacijskoj fazi na lokalitetu Obedska bara ($358.02 \pm 63.24 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ plazme) dok je najniža aktivnost izmerena u tkivima životinja iz Pančevačkog rita pre hibernacije ($191.88 \pm 14.14 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ plazme).

4.11.2. Aktivnost holinesteraza (ChE)

Za aktivnost ChE u jetri ispitivanih vrsta postoje statistički značajne razlike u odnosu na lokalitet i interakciju sezone i lokaliteta (Tabela 56 i Grafik 48A i 48B). Kod belouške, aktivnost ChE na lokalitetu Obedska bara u periodu posle hibernacije iznosila je $1.39 \pm 0.23 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva i bila je značajno povećana u odnosu na period pre hibernacije ($1.00 \pm 0.04 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva). Kod iste vrste iz Pančevačkog rita zabeležen je suprotan trend, odnosno aktivnost ChE posle hibernacije ($0.69 \pm 0.04 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) bila je značajno manja u odnosu na period pre hibernacije ($0.99 \pm 0.07 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva). Takođe, zabeležene su i značajne razlike aktivnosti enzima u posthibernacijskom periodu između lokaliteta. Kod ribarice, najniža aktivnost ChE izmerena je u periodu posle hibernacije na lokalitetu Pančevački rit ($0.61 \pm 0.06 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) a najveća u istom periodu na lokalitetu Obedska bara (1.01 ± 0.16

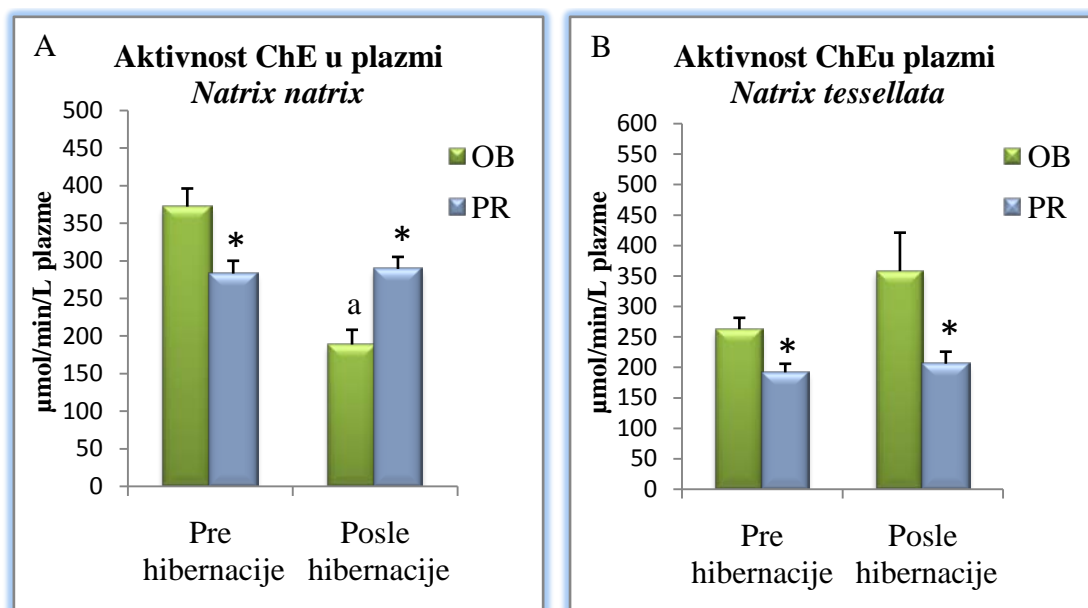
$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva). Post-hoc testiranje pokazalo je da su ove razlike i statistički značajne.

Za aktivnost ChE u bubregu *N. natrix* utvrđeno je da postoji značajan uticaj sezone, kao i interakcije sezone i lokaliteta (Tabela 57 i Grafik 49A). Na lokalitetu Pančevački rit pre hibernacije izmerena je najveća aktivnost ovog enzima (2.30 ± 0.56 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) i utvrđeno je da je ona značajno povećana u odnosu na Obedsku baru u istoj sezoni (0.77 ± 0.05 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) kao i u odnosu na aktivnost izmerenu na Pančevačkom ritu u posthibernacijskom periodu (0.51 ± 0.04 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva). Sezona, lokalitet i interakcija sezone i lokaliteta značajno utiče na aktivnost ChE u bubregu *N. tessellata* (Tabela 57 i Grafik 49B). Najveća aktivnost izmerena je na lokalitetu Pančevački rit posle hibernacije (28.29 ± 6.34 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) i značajno se razlikovala od aktivnosti izmerene u prehibernacijskom periodu na istom lokalitetu (2.83 ± 0.28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva), kao i od aktivnosti izmerene u Obedskoj bari u periodu posle hibernacije (3.59 ± 0.47 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva).

Na aktivnost ChE u mišiću belouške značajno utiču sezona i interakcija sezone i lokaliteta, dok kod ribarice nema uticaja ni jednog ispitivanog faktora (Tabela 58 i Grafik 50A i 50B). Kod *N. natrix* najveća enzimaska aktivnost izmerena je u Pančevačkom ritu pre hibernacije (1.30 ± 0.11 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) i bila je značajno povećana u odnosu na period posle hibernacije na istom lokalitetu (0.55 ± 0.05 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva), kao i u odnosu na Obedsku baru u prehibernacijskoj fazi (0.84 ± 0.04 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva).

Tabela 55. Aktivnosti ChE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ plazme) u krvi *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

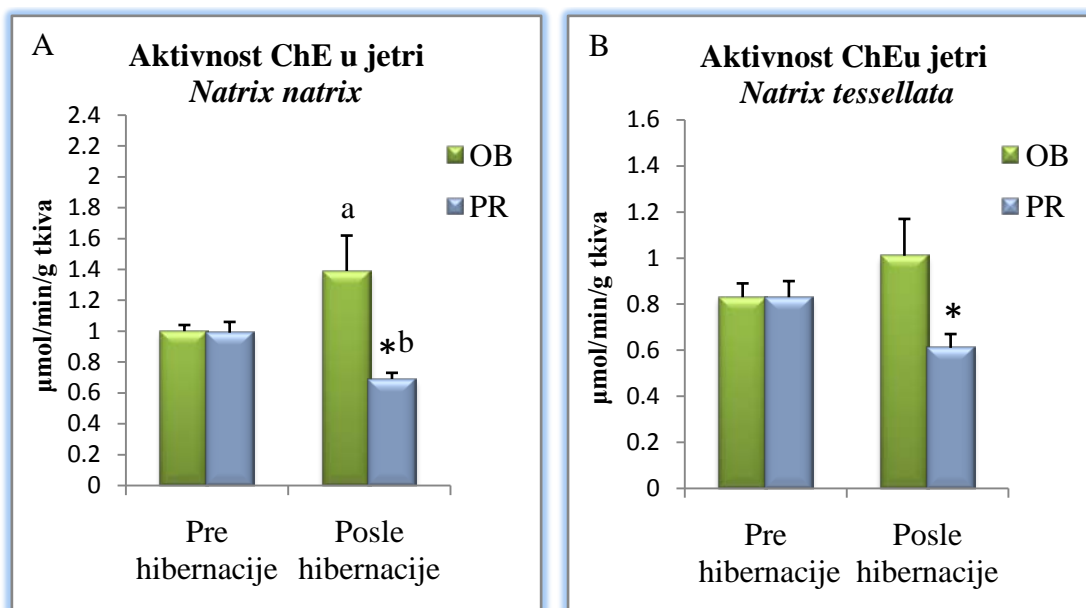
ChE PLAZMA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	372.21 \pm 24.11	188.76 \pm 19.59 ^a	262.78 \pm 18.65	358.02 \pm 63.24 ^a
Pančevački rit	283.14 \pm 17.02*	289.28 \pm 16.04*	191.88 \pm 14.14*	206.12 \pm 19.73*
ANOVA efekti	S: p<0.05	F= 15.50	S: nd	F= 4.21
	L: nd	F= 0.06	L: p<0.05	F= 17.42
	SxL: p<0.05	F= 17.72	SxL: nd	F= 2.30



Grafik 47. Aktivnost ChE izražena u $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$ plazme u krvi A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p<0.05$. * $p<0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p<0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p<0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 56. Aktivnosti ChE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

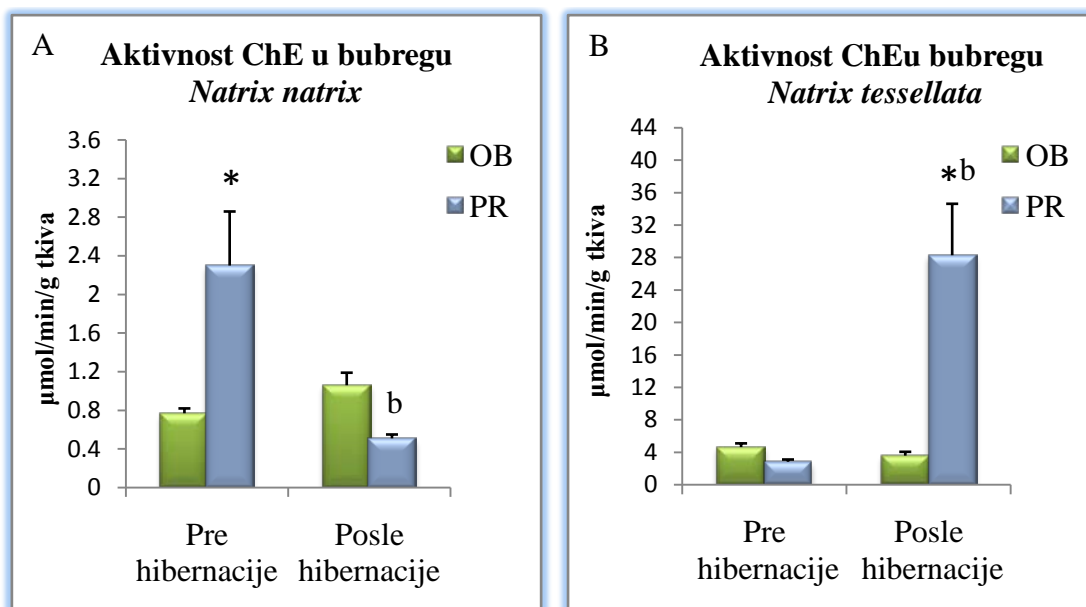
ChE JETRA	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	1.00 ± 0.04	1.39 ± 0.23^a	0.83 ± 0.06	1.01 ± 0.16
Pančevački rit	0.99 ± 0.07	$0.69 \pm 0.04^{*b}$	0.83 ± 0.07	$0.61 \pm 0.06^*$
ANOVA efekti	S: nd	F= 0.33	S: nd	F= 0.05
	L: $p < 0.05$	F= 16.46	L: $p < 0.05$	F= 5.47
	SxL: $p < 0.05$	F= 15.48	SxL: $p < 0.05$	F= 5.31



Grafik 48. Aktivnost ChE izražena u $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkivau jetri A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 57. Aktivnosti ChE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

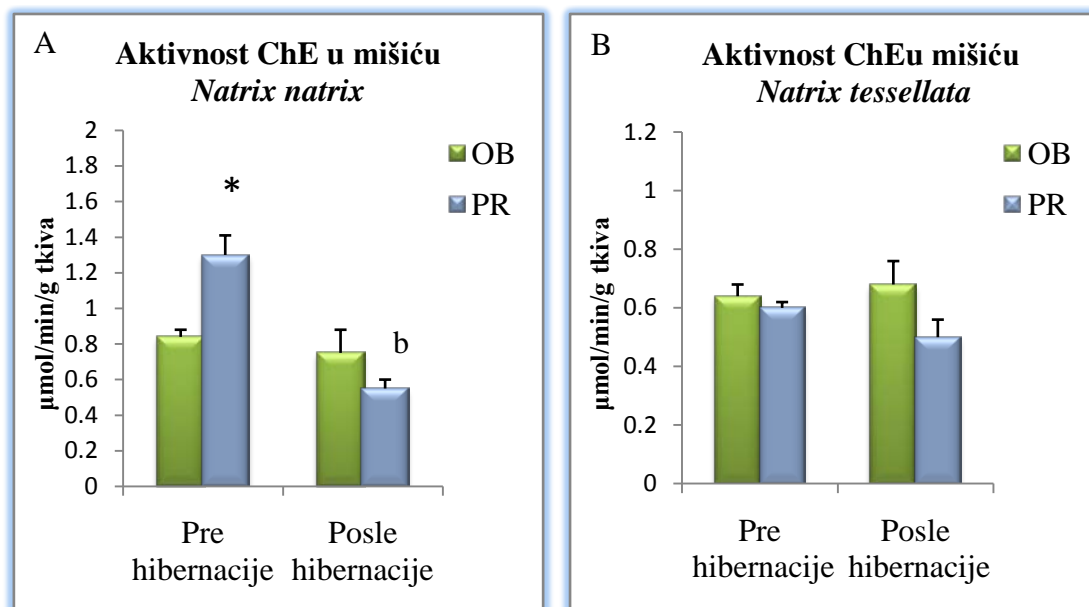
ChE BUBREG	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	0.77 ± 0.05	1.06 ± 0.13	4.64 ± 0.46	3.59 ± 0.47
Pančevački rit	$2.30 \pm 0.56^*$	0.51 ± 0.04^b	2.83 ± 0.28	$28.29 \pm 6.34^{*b}$
ANOVA efekti	S: $p < 0.05$ L: nd SxL: $p < 0.05$	F= 6.53 F= 2.77 F= 12.72	S: $p < 0.05$ L: $p < 0.05$ SxL: $p < 0.05$	F= 19.44 F= 17.10 F= 22.93



Grafik 49. Aktivnost ChE izražena u $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva u bubregu A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

Tabela 58. Aktivnosti ChE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva) u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SG. Statistička značajnost uticaja sezone (S) i lokaliteta (L) analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA).

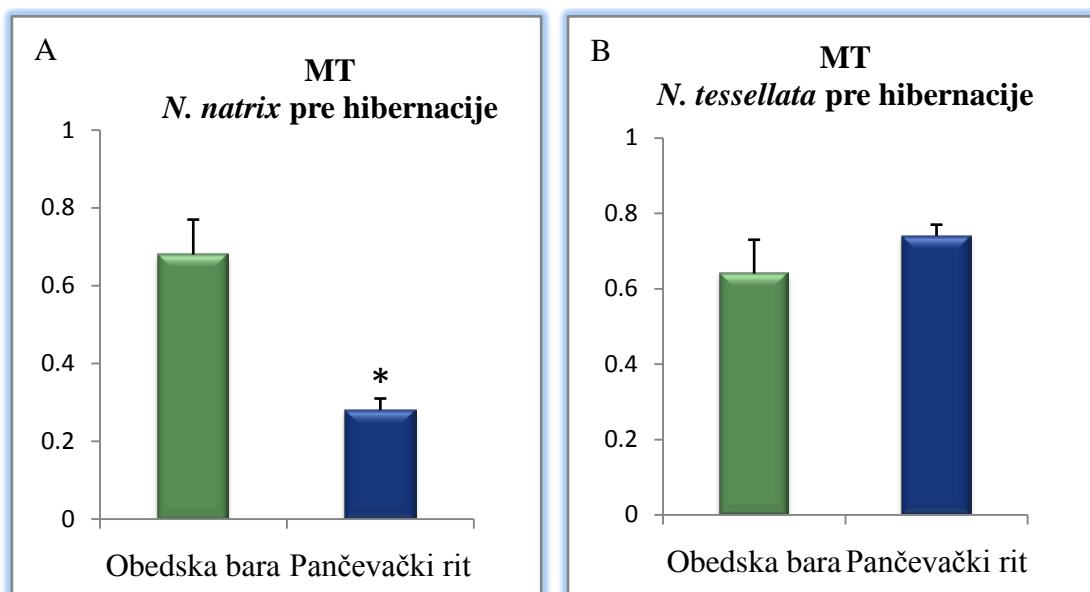
ChE MIŠIĆ	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Pre hibernacije	Posle hibernacije	Pre hibernacije	Posle hibernacije
Obedska bara	0.84 ± 0.04	0.75 ± 0.13	0.64 ± 0.04	0.68 ± 0.08
Pančevački rit	$1.30 \pm 0.11^*$	0.55 ± 0.05^b	0.60 ± 0.02	0.50 ± 0.06
ANOVA efekti	S: $p < 0.05$	F= 25.26	S: nd	F= 3.60
	L: nd	F= 2.46	L: nd	F= 0.31
	SxL: $p < 0.05$	F= 15.93	SxL: nd	F= 1.42



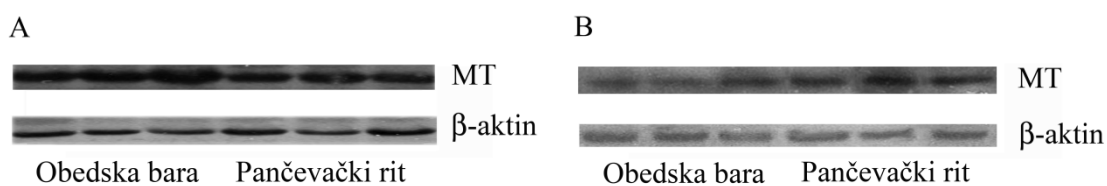
Grafik 50. Aktivnost ChE izražena u $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ tkiva u mišiću A) *N.natrix* i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre i posle hibernacije. Post-hoc testiranje je obavljeno Fišerovim F-testom. Statistički značajno kada je $p < 0.05$. * $p < 0.05$: razlika između ispitivanih lokaliteta u istoj sezoni; ^a $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Obedske bare pre i posle hibernacije; ^b $p < 0.05$: razlika između jedinki iz Pančevačkog rita pre i posle hibernacije.

4.12. Nivo ekspresije metalotioneina (MT)

Na Graficima 59 i 60 kao i na Slikama 10 i 11 predstavljeni su rezultati ekspresije MT u jetri ispitivanih vrsta zmija.

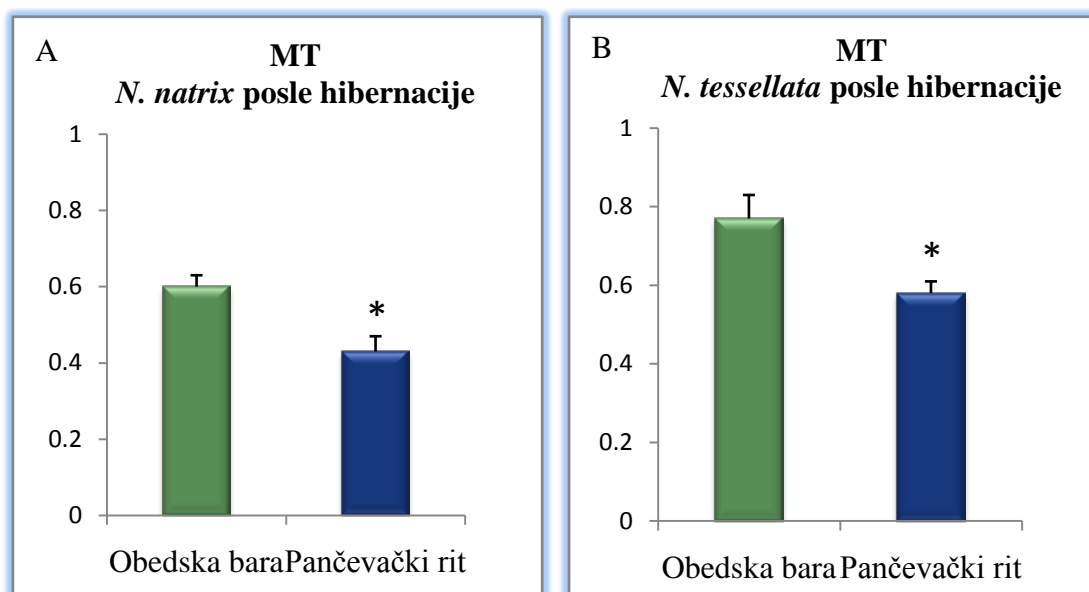


Grafik 59. Nivo ekspresije MT u jetri A) *N. natrix* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije izražen u arbitrarnim jedinicama u odnosu na β -aktin. Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost * $p < 0.05$.

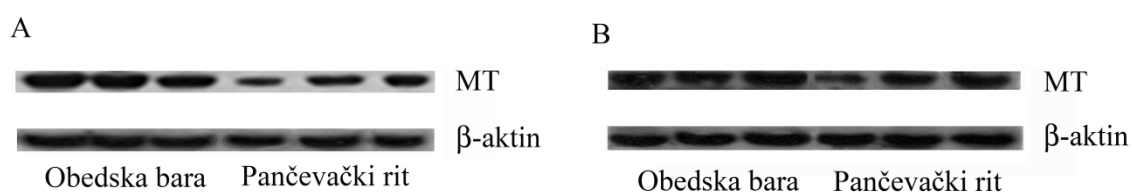


Slika 10. Reprezentativni Western blot detektovanih MT u jetri A) *N. natrix* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije. β -aktin korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka na gel.

U periodu pre hibernacije nivo ekspresije MT bio je značajno manji u jetri *N. natrix* iz Pančevačkog rita (Grafik 59A, Slika 10A), dok kod *N. tessellata* nije bilo značajne razlike između ispitivanih lokaliteta (Grafik 59A, Slika 10B). U periodu posle hibernacije kod obe ispitivane vrste nivo ekspresije MT bio je značajno niži kod jedinki iz Pančevačkog rita (Grafik 60A i 60B, Slika 11A i 11B).



Grafik 60. Nivo ekspresije MT u jetri A) *N. natrix* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije izražen u arbitrarnim jedinicama u odnosu na β -aktin. Za najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost * $p < 0.05$.



Slika 11. Reprezentativni Western blot detektovanih MT u jetri A) *N. natrix* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije i B) *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije. β -aktin korišćen kao kontrola nanošenja uzoraka na gel.

4.13. Kanonijska diskriminaciona analiza – grupisanje po vrstama i lokalitetima

Interspecijske razlike između *N. natrix* i *N. tessellata* sa područja Obedske bare i Pančevačkog rita ispitivane su kanonijskom diskriminacionom analizom za enzimske i neenzimske komponente antioksidacione zaštite, aktivnost enzima faze II biotransformacije (GST), biomarker oksidacionih oštećenja (koncentraciju TBARS) i biomarker neurotoksičnosti (aktivnost ChE) za svako tkivo pojedinačno u periodu pre i posle hibernacije. Grupisanjem po vrstama sa dva ispitivana lokaliteta dobijene su tri kanonijske diskriminacione funkcije, pri čemu su prve dve najbitnije za objašnjavanje razlika između grupa i uzete su u obzir za tumačenje dobijenih rezultata.

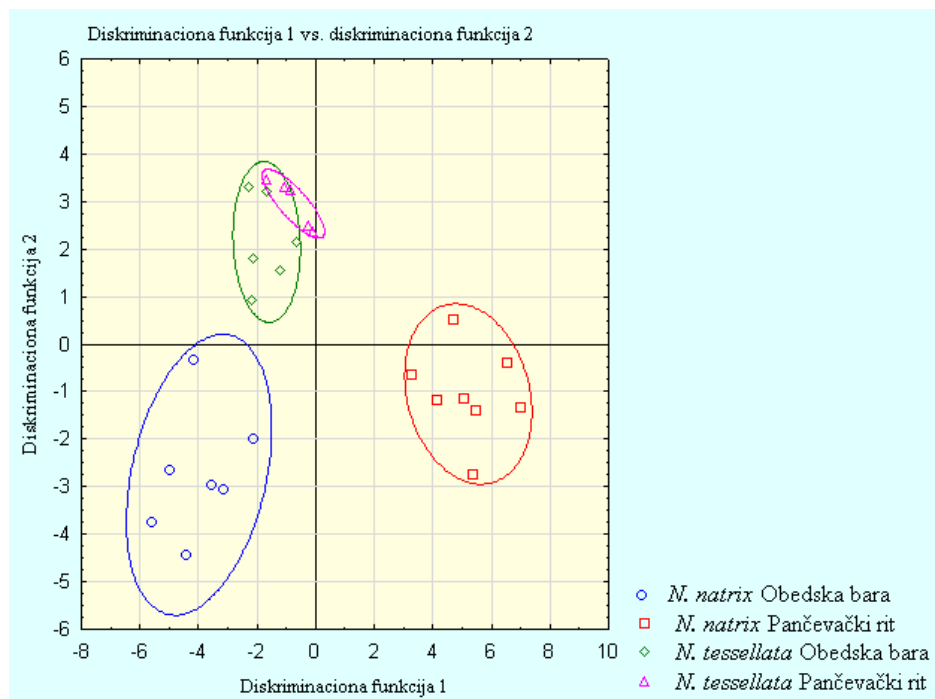
U periodu pre hibernacije u jetri (Grafik 61, Tabele 59 i 60) najizraženije je odvajanje *N. natrix* iz Obedske bare i *N. natrix* iz Pančevačkog rita, dok su uočena delimična preklapanja varijabilnosti za *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita. Prve dve diskriminacione funkcije opisuju 95.18% diskriminacije za ispitivane parametre. Za razdvajanje po prvoj diskriminacionoj funkciji najveći značaj ima koncentracija GSH, dok koncentracija TBARS i aktivnost GST najviše doprinose razdvajanju po drugoj diskriminacionoj funkciji. U periodu posle hibernacije u jetri (Grafik 62, Tabele 61 i 62) postoji razdvajanje *N. natrix* i *N. tessellata* sa oba lokaliteta. Prema prvoj diskriminacionoj funkciji najizraženije je odvajanje *N. tessellata* iz Pančevačkog rita, dok se prema drugoj diskriminacionoj funkciji odvajaju *N. natrix* sa Obedske bare i *N. natrix* sa Pančevačkog rita. Prve dve funkcije diskriminacione analize objašnjavaju 94.42% ukupnog odvajanja. Razdvajanju između ispitivanih grupa prema prvoj diskriminacionoj funkciji najviše doprinose aktivnosti GST i SH, dok prema drugoj diskriminacionoj funkciji najviše doprinose GSH-Px i GST.

Rezultati kanonijske diskriminacione analize u bubregu ispitivanih vrsta zmija iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije prikazani su na Grafiku 63 i Tabelama 63 i 64. Najizraženije razdvajanje postoji između *N. natrix* iz Obedske bare i *N. tessellata* iz Obedske bare, dok postoji delimično preklapanje varijabilnosti *N. natrix* i *N. tessellata* iz Pančevačkog rita. U ovoj analizi prve dve diskriminacione funkcije objašnjavaju 86.53% odvajanja za ispitivane parametre. Za razdvajanje po prvoj diskriminacionoj funkciji najviše doprinosi aktivnost GST i SH, dok za razdvajanju po drugoj diskriminacionoj funkciji najviše doprinosi koncentracija GSH i ChE. Rezultati kanonijske diskriminacione analize u bubregu posle hibernacije prikazani su na Grafiku

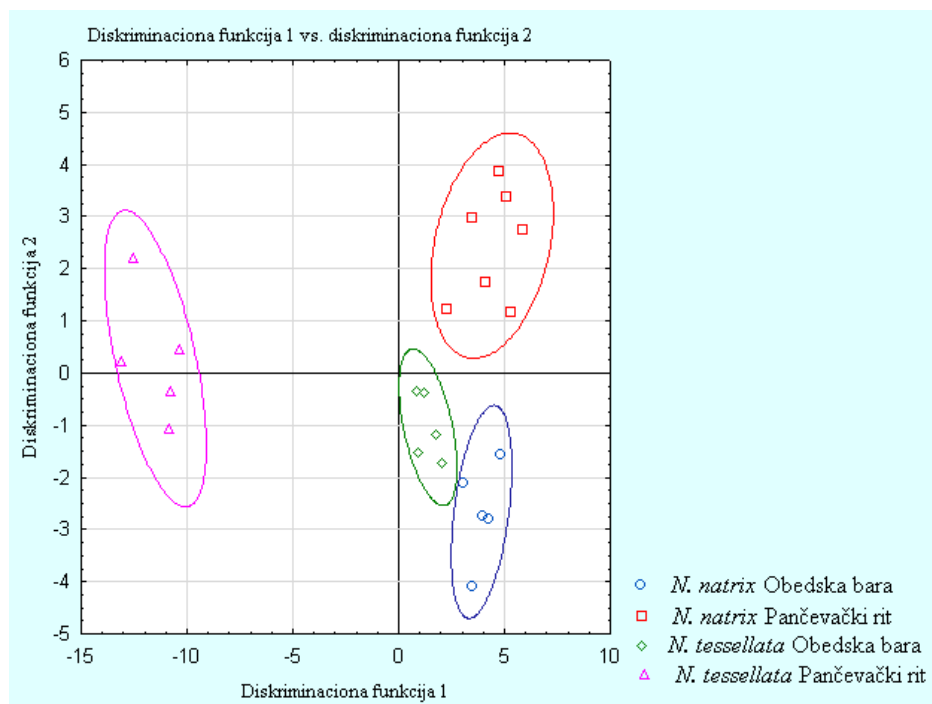
64 i Tabelama 65 i 66. Prema prvoj diskriminacionoj funkciji odvajaju se *N. tessellata* sa lokaliteta Obedska bara i *N. tessellata* sa lokaliteta Pančevački rit. Razdvajanju po prvoj diskriminacionoj funkciji najviše doprinosi aktivnost ChE i koncentracija TBARS, dok razdvajanju po drugoj diskriminacionoj funkciji najviše doprinose aktivnosti GST i Uk SOD. Prve dve diskriminacione funkcije objašnjavaju 92.35% odvajanja za ispitivane parametre.

Rezultati diskriminacione analize u mišiću pre i posle hibernacije, veoma su slični rezultatima dobijenim analizom varijabli u jetri. U periodu pre hibernacije (Grafik 65, Tabele 67 i 68), prve dve diskriminacione funkcije objašnjavaju 98.75% odvajanja za ispitivane parametre. Za razdvajanje po prvoj diskriminacionoj funkciji najviše doprinose aktivnost GSH-Px i koncentracija GSH, a prema drugoj koncentracija TBARS. U periodu posle hibernacije (Grafik 66, Tabele 69 i 70) u mišiću kumulativni procenat odvajanja za prve dve diskriminacione funkcije iznosi 98.99%. Koncentracija slobodnih SH grupa kao i aktivnost CAT najviše doprinose razdvajanju po prvoj diskriminacionoj funkciji, dok za razdvajanje po drugoj diskriminacionoj funkciji najveći značaj imaju CAT i Uk SOD.

U masnom tkivu, pre hibernacije (Grafik 67, Tabele 71 i 72) takođe se uočava delimično preklapanje varijabilnosti *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita, dok u periodu posle hibernacije postoji potpuno odvajanje grupa (Grafik 68, Tabele 73 i 74). Pre hibernacije, prve dve diskriminacione funkcije objašnjavaju 94.65%, dok posle hibernacije objašnjavaju 99.22% ukupne diskriminacije ispitivanih parametara u masnom tkivu. Pre hibernacije aktivnost GST najviše doprinosi odvajanju po prvoj diskriminacionoj funkciji, dok koncentracija TBARS najviše doprinosi razdvajanju po drugoj diskriminacionoj funkciji. Posle hibernacije razdvajanju po prvoj diskriminacionoj funkciji doprinose TBARS i GR, a po drugoj diskriminacionoj funkciji GST i GR.



Grafik 61. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama i lokalitetima na osnovu parametara ispitivanih u jetri zmija pre hibernacije.



Grafik 62. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama i lokalitetima na osnovu parametara ispitivanih u jetri zmija posle hibernacije.

Tabela 59. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos ispitivanih parametara diskriminaciji u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije.

JETRA pre hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
Uk SOD	0.10245	0.013971	-0.477998
CAT	0.39539	0.108704	0.393688
GSH-Px	0.27760	0.277642	0.557322
GR	-0.18603	-0.470586	-0.012137
GST	-0.22020	-0.582873	0.429986
GSH	1.01470	-0.325419	-0.142690
SH	-0.43328	-0.451838	0.427962
TBARS	0.12595	-0.68214	-0.554841
ChE	-0.02598	-0.124887	0.574826
Eigen-vrednost	15.81550	6.049735	1.106989
Kumulativni %	0.68846	0.951812	1.000000

Tabela 60. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za ispitivane parametre u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije.

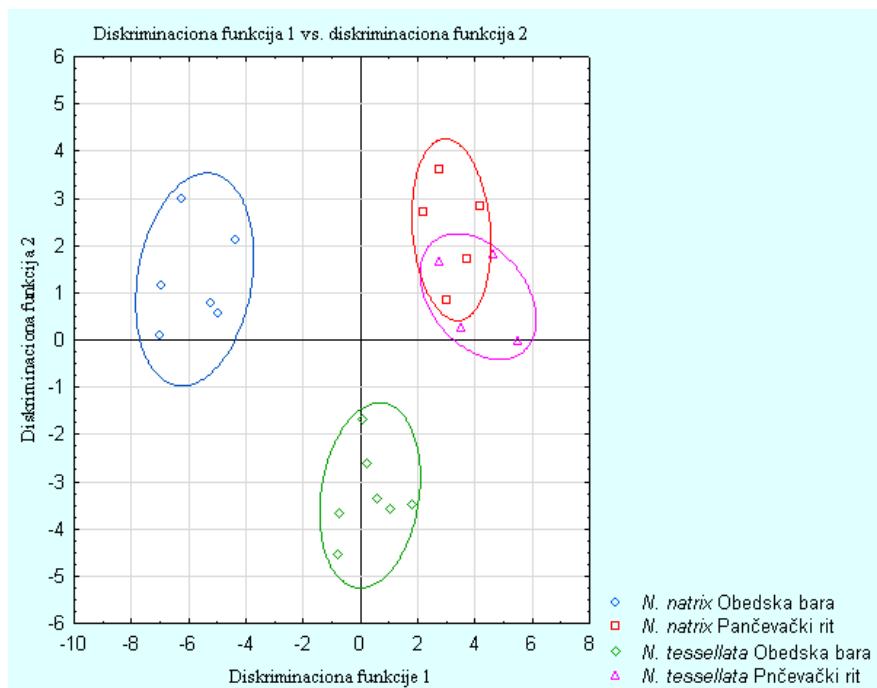
JETRA pre hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>N. natrix</i> Obedska bara	-3.97884	-2.7508	0.22302
<i>N. natrix</i> Pančevački rit	5.21309	-1.05004	-0.06005
<i>N. tessellata</i> Obedska bara	-1.67371	2.14759	-1.44301
<i>N. tessellata</i> Pančevački rit	-0.76212	2.95407	1.51546

Tabela 61. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos ispitivanih parametara diskriminaciji u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije.

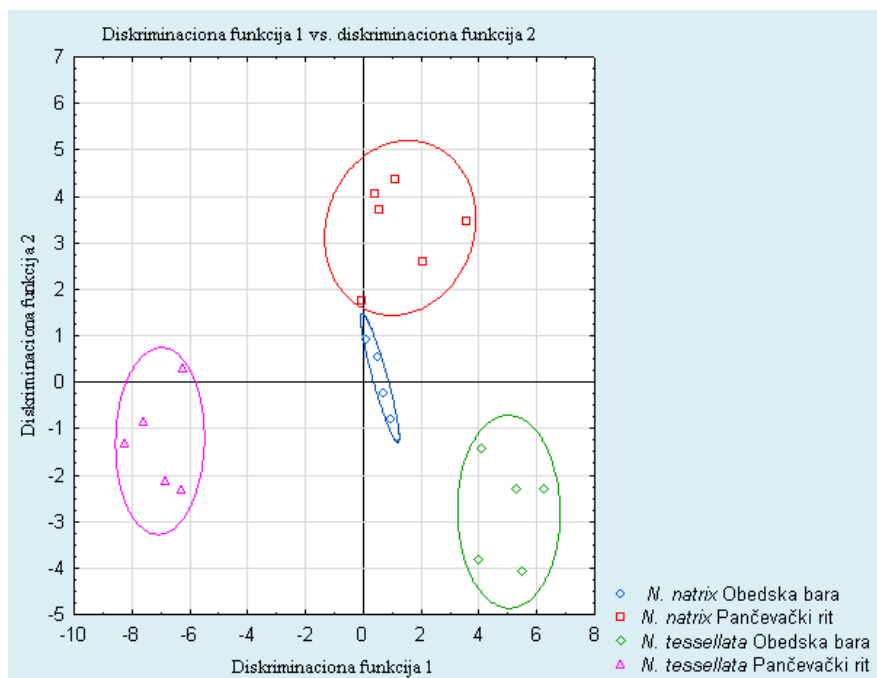
JETRA posle hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
Uk SOD	0.17442	0.31376	-0.468611
CAT	-1.40884	0.49531	-0.208965
GSH-Px	0.40281	-1.01019	-0.305272
GR	-0.44657	0.12066	-0.530159
GST	1.85798	-0.16881	-0.037084
GSH	-0.30967	-0.05400	-0.121009
SH	1.47725	-0.00490	0.457675
TBARS	0.70237	-0.70472	-0.204352
ChE	0.84904	-1.00933	-0.330520
Eigen-vrednost	49.10021	4.60718	3.173368
Kumulativni %	0.86321	0.94421	1.000000

Tabela 62. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za ispitivane parametre u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije.

JETRA posle hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>N. natrix</i> Obedska bara	3.9198	-2.66042	-1.72034
<i>N. natrix</i> Pančevački rit	4.4162	2.44217	-0.44178
<i>N. tessellata</i> Obedska bara	1.3932	-1.039	2.82112
<i>N. tessellata</i> Pančevački rit	-11.4957	0.28038	-0.48229



Grafik 63. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama i lokalitetima na osnovu parametara ispitivanih u bubregu zmiya pre hibernacije.



Grafik 64. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama i lokalitetima na osnovu parametara ispitivanih u bubregu zmiya posle hibernacije.

Tabela 63. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos ispitivanih parametara diskriminaciji u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije.

BUBREG pre hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
Uk SOD	-1.02540	0.14346	0.237250
CAT	0.07707	-0.227133	-1.060790
GSH-Px	0.18757	0.402966	-0.682890
GR	0.44944	0.454000	0.137940
GST	-1.61046	0.433567	0.395030
GSH	-0.14686	-0.712086	-0.039900
SH	-1.09876	0.013366	-0.068700
TBARS	0.63869	0.433051	0.943850
ChE	-0.16506	-0.591351	-0.342380
Eigen-vrednost	17.77447	6.453336	3.770320
Kumulativni %	0.63484	0.865337	1.000000

Tabela 64. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za ispitivane parametre u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije.

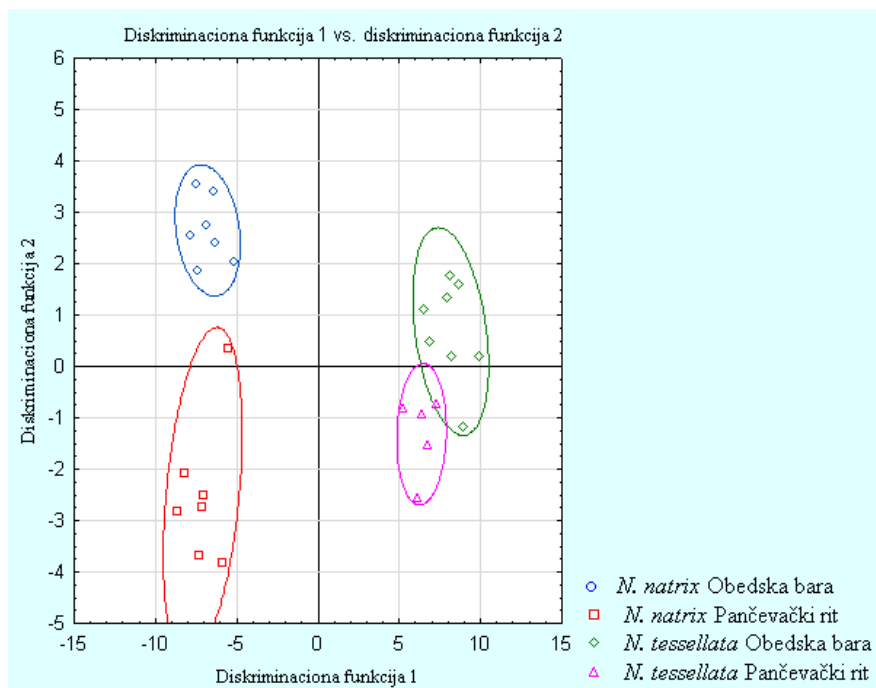
BUBREG pre hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>N. natrix</i> Obedska bara	-5.78651	1.27953	0.40874
<i>N. natrix</i> Pančevački rit	3.17789	2.33384	-2.27242
<i>N. tessellata</i> Obedska bara	0.33836	-3.28901	-0.51565
<i>N. tessellata</i> Pančevački rit	4.11528	0.91918	3.1298

Tabela 65. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos ispitivanih parametara diskriminaciji u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije.

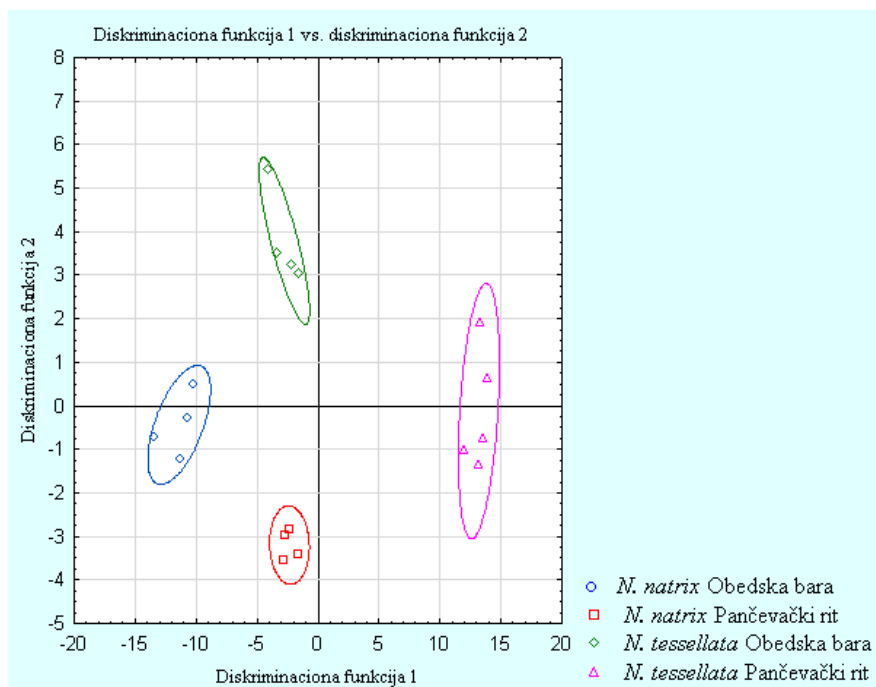
BUBREG posle hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
Uk SOD	-0.32255	-1.00215	-0.634650
CAT	-0.14373	0.41924	0.185061
GSH-Px	0.79214	-0.28037	-0.364089
GR	0.39243	-0.30711	0.234198
GST	-0.17900	1.28767	-0.581208
GSH	0.11483	-0.17416	0.001609
SH	0.76313	0.57138	0.372581
TBARS	-0.80435	-0.46635	0.596424
ChE	-0.86141	-0.93543	0.077855
Eigen-vrednost	24.05573	7.05776	2.578682
Kumulativni %	0.71399	0.92346	1.000000

Tabela 66. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za ispitivane parametre u bubregu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije.

BUBREG posle hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>N. natrix</i> Obedska bara	0.57645	0.09186	2.865847
<i>N. natrix</i> Pančevački rit	1.28051	3.31682	-0.786292
<i>N. tessellata</i> Obedska bara	5.03225	-2.78856	-0.795685
<i>N. tessellata</i> Pančevački rit	-7.03003	-1.2651	-0.553442



Grafik 65. Kanonijska diskriminaciona analiza – grupisanje po vrstama i lokalitetima na osnovu parametara ispitivanih u mišiću zmiya pre hibernacije.



Grafik 66. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama i lokalitetima na osnovu parametara ispitivanih u mišiću zmiya posle hibernacije.

Tabela 67. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos ispitivanih parametara diskriminaciji u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije.

MIŠIĆ pre hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
Uk SOD	-0.53124	-0.294245	0.010114
CAT	-0.07888	-0.615229	0.177212
GSH-Px	-1.38240	0.653301	0.572666
GR	-0.23544	-0.481565	-0.500825
GST	0.83459	0.564951	0.620081
GSH	-0.99782	0.206063	-0.098912
SH	0.64165	0.031498	-0.010076
TBARS	0.02854	-0.815451	0.038079
ChE	-0.56119	-0.176589	0.631808
Eigen-vrednost	61.34591	4.552433	0.834559
Kumulativni %	0.91928	0.987494	1.000000

Tabela 68. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za ispitivane parametre u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije.

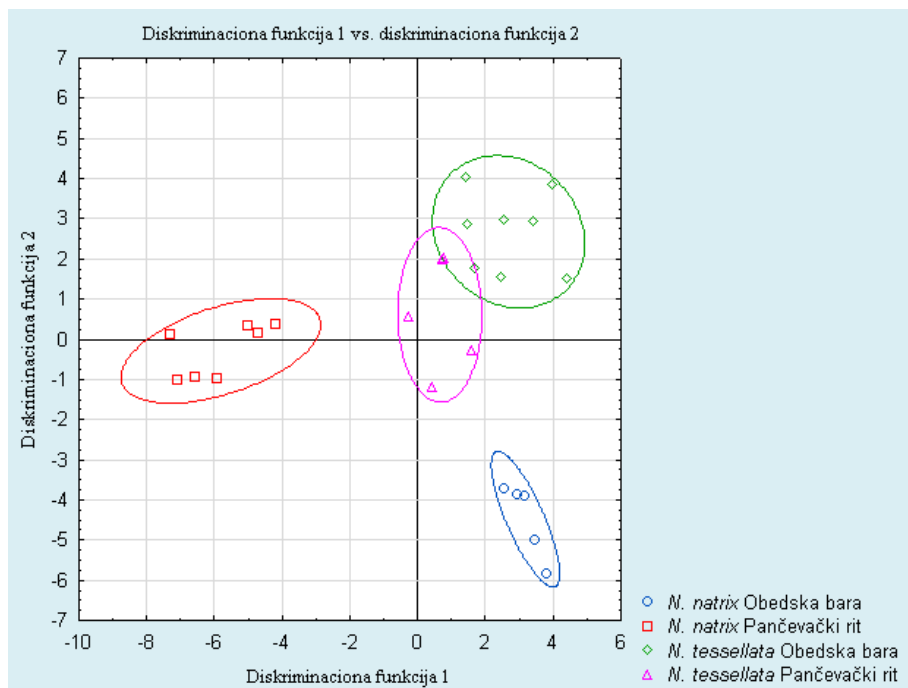
MIŠIĆ pre hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>N. natrix</i> Obedska bara	-6.78496	2.64872	-0.34467
<i>N. natrix</i> Pančevački rit	-7.09583	-2.48331	0.46444
<i>N. tessellata</i> Obedska bara	8.16792	0.68071	0.8342
<i>N. tessellata</i> Pančevački rit	6.36444	-1.3207	-1.50241

Tabela 69. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos ispitivanih parametara diskriminaciji u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije.

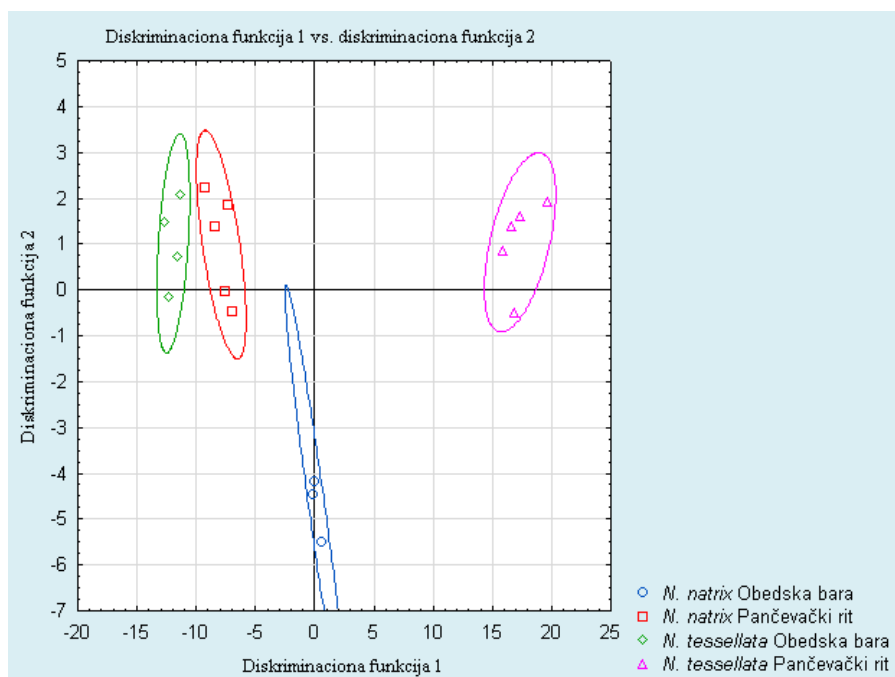
MIŠIĆ posle hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
Uk SOD	0.70510	-1.27467	0.173540
CAT	-2.87870	1.38462	-0.647820
GSH-Px	-0.20620	0.66470	-0.427900
GR	-0.34340	0.01304	-0.026540
GST	1.75450	1.09164	0.084000
GSH	2.00080	-0.07648	0.513520
SH	-3.55970	1.26719	0.058540
TBARS	-1.86280	0.94497	-1.050510
ChE	-1.46230	0.42491	-1.007740
Eigen-vrednost	110.90000	7.63348	1.208670
Kumulativni %	0.92620	0.98991	1.000000

Tabela 70. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za ispitivane parametre u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije.

MIŠIĆ posle hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>N. natrix</i> Obedska bara	-11.3889	-0.43716	-1.249
<i>N. natrix</i> Pančevački rit	-2.3408	-3.2003	1.15
<i>N. tessellata</i> Obedska bara	-2.763	3.78911	0.8046
<i>N. tessellata</i> Pančevački rit	13.1941	-0.12131	-0.56448



Grafik 67. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama i lokalitetima na osnovu parametara ispitivanih u masnom tkivu zmija pre hibernacije.



Grafik 68. Kanonijska diskriminaciona analiza - grupisanje po vrstama i lokalitetima na osnovu parametara ispitivanih u masnom tkivu zmija posle hibernacije.

Tabela 71. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos ispitivanih parametara diskriminaciji u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije.

MASNO TKIVO pre hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
Uk SOD	-0.52956	-0.062789	0.215173
CAT	-0.19232	-0.209979	-0.606186
GSH-Px	-0.54412	-0.139099	0.568828
GR	0.41072	0.557389	0.318432
GST	-0.69560	-0.513306	-0.197736
GSH	0.37140	-0.667086	0.467446
SH	0.53362	-0.029056	0.265013
TBARS	-0.14167	-0.813891	-0.589474
Eigen-vrednost	16.52186	7.619848	1.364213
Kumulativni %	0.64777	0.946514	1.000000

Tabela 72. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za ispitivane parametre u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije.

MASNO TKIVO pre hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>N. natrix</i> Obedska bara	3.18178	-4.48018	0.39276
<i>N. natrix</i> Pančevački rit	-5.81183	-0.29000	0.37767
<i>N. tessellata</i> Obedska bara	2.68669	2.67457	0.74727
<i>N. tessellata</i> Pančevački rit	0.65609	0.60687	-2.11714

Tabela 73. Standardizovani koeficijenti za kanonijske varijable - doprinos ispitivanih parametara diskriminaciji u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije.

MASNO TKIVO posle hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
Uk SOD	0.4476	-0.37482	-0.335143
CAT	0.7612	-0.02796	-0.632064
GSH-Px	-0.8053	-0.3649	0.601323
GR	1.7396	-1.049480	-0.060372
GST	1.4138	-1.08566	-0.095178
GSH	1.4361	0.14696	0.064160
SH	-1.2164	0.08122	0.681866
TBARS	1.9964	0.21367	0.321744
Eigen-vrednost	183.3724	6.26672	1.489931
Kumulativni %	0.9594	0.9922	1.000000

Tabela 74. Srednje vrednosti kanonijskih varijabli za ispitivane parametre u masnom tkivu *N. natrix* i *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije.

MASNO TKIVO posle hibernacije	Diskriminaciona funkcija 1	Diskriminaciona funkcija 2	Diskriminaciona funkcija 3
<i>N. natrix</i> Obedska bara	0.1742	-4.72882	0.01399
<i>N. natrix</i> Pančevački rit	7.8909	0.98589	-1.41331
<i>N. tessellata</i> Obedska bara	-11.9360	1.01725	1.51635
<i>N. tessellata</i> Pančevački rit	17.3352	1.03761	0.19184

4.12. Koncentracije metala u vodi i tkivima ispitivanih vrsta

4.12.1. Koncentracije metala u uzorcima vode iz Pančevačkog rita i Obedske bare

U Tabeli 75. su prikazani rezultati dobijeni merenjem koncentracije metala u uzorcima vode sa lokaliteta Obedska bara i Pančevački rit u periodu pre hibernacije.

Tabela 75. Koncentracije metala u vodi ($\mu\text{g/L}$) sa lokaliteta Obedska bara i Pančevački rit u jesenjem periodu (pre hibernacije zmijsa).

Element	Lokalitet		Granica detekcije
	Obedska bara	Pančevački rit	
Ag	n.d.	n.d.	0.471
Al	581.54 ± 9.24	13276.40 ± 140.26	3.091
As	22.50 ± 2.15	29.01 ± 1.89	6.666
B	158.45 ± 0.90	302.90 ± 2.30	0.226
Ba	112.64 ± 0.58	198.28 ± 1.7	0.016
Bi	n.d.	n.d.	4.638
Ca	129508.77 ± 897.76	177432.10 ± 8195.31	1.721
Cd	n.d.	n.d.	0.238
Co	n.d.	n.d.	0.829
Cr	n.d.	10.05 ± 0.04	0.490
Cu	15.34 ± 0.32	49.28 ± 0.98	10.458
Fe	619.15 ± 5.25	18193.30 ± 88.96	13.234
Hg	n.d.	n.d.	2.211
In	n.d.	n.d.	3.669
K	4221.62 ± 30.86	20768.08 ± 195.91	6.434
Li	2.55 ± 0.01	15.07 ± 0.07	2.771
Mg	53521.53 ± 202.07	25788.33 ± 152.78	5.753
Mn	77.42 ± 0.63	1425.36 ± 6.09	7.305
Mo	n.d.	3.99 ± 0.20	6.573
Na	43866.27 ± 213.13	52836.27 ± 8.22	6.593
Ni	2.70 ± 0.07	26.38 ± 0.13	11.352
Pb	n.d.	80.50 ± 0.43	2.996
Sr	280.21 ± 0.79	275.08 ± 1.86	3.325
Tl	n.d.	n.d.	1.947
Zn	50.40 ± 0.16	225.04 ± 2.33	0.362

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.G.

n.d. - označava vrednosti koje su bile ispod praga detekcije.

Dobijeni rezultati pokazuju da pojedini metali nisu detektovani ni na jednom od dva ispitivana lokaliteta. U te metale spadaju: srebro, bizmuta, kadmijum, kobalt, živa, indijum i talijum. Sa druge strane, hrom, molibden i olovo su detektovani samo na lokalitetu Obedska bara. Jedino je koncentracija magnezijuma bila veća u vodi sa lokaliteta Obedska bara, dok su svi ostali metali imali veće koncentracije na lokalitetu Pančevački rit u odnosu na lokalitet Obedska bara.

Tabela 76. Koncentracija metala u vodi ($\mu\text{g/L}$) sa lokaliteta Obedska bara i Pančevački rit u prolećnom periodu (posle hibernacije zmijsa).

Element	Lokalitet		
	Obedska bara	Pančevački rit	Granica detekcije
Ag	1.50 ± 0.05	1.76 ± 0.07	0.471
Al	n.d.	47.37 ± 9.96	3.091
As	8.85 ± 0.73	n.d.	6.666
B	141.97 ± 0.35	126.27 ± 1.42	0.226
Ba	36.56 ± 0.13	47.66 ± 0.31	0.016
Bi	61940.33 ± 176.99	68016.00 ± 162.57	1.721
Ca	n.d.	0.39 ± 0.03	0.238
Cd	n.d.	n.d.	0.829
Co	n.d.	n.d.	0.49
Cr	n.d.	n.d.	10.458
Cu	32.68 ± 0.12	619.23 ± 15.14	13.234
Fe	91.66 ± 0.67	88.55 ± 1.27	2.056
Hg	n.d.	n.d.	3.669
In	2700.83 ± 12.57	4748.50 ± 45.55	6.434
K	11.65 ± 0.04	14.59 ± 0.46	2.771
Li	26954.17 ± 107.73	15374.33 ± 19.37	5.753
Mg	n.d.	1730.50 ± 2.65	7.305
Mn	n.d.	nd	6.573
Mo	3765.67 ± 70.99	4568.50 ± 164.41	6.593
Na	n.d.	n.d.	11.352
Ni	n.d.	n.d.	2.996
Pb	n.d.	n.d.	9.027
Sr	177.10 ± 0.59	250.83 ± 1.59	3.325
Tl	n.d.	n.d.	1.947
Zn	n.d.	n.d.	0.362

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm S.G.

n.d. - označava vrednosti koje su bile ispod praga detekcije.

U Tabeli 76 su prikazani rezultati dobijeni merenjem koncentracije metala u uzorcima vode sa lokaliteta Obedska bara i Pančevački rit u periodu posle hibernacije. U periodu posle hibernacije, kadmijum, kobalt, hrom, mangan, natrijum, nikl, olovo, talijum i cink nisu zabeleženi ni na jednom od dva ispitivana lokaliteta. Arsen je detektovan samo u Obedskoj bari, dok su aluminijum, kalcijum i magnezijum detektovani samo u Pančevačkom ritu. Koncentracije bora, gvožđa i litijuma su bile neznatno veće u vodi sa lokaliteta Obedska bara, dok su svi ostali metali imali, u manjem ili većem stepenu, veće koncentracije u vodi sa lokaliteta Pančevački rit.

4.12.2. Koncentracije metala u tkivima *N. natrix* i *N. tessellata*

4.12.2.1. Koncentracije metala u jetri *N. natrix* i *N. tessellata*

Koncentracije metala u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* pre i posle hibernacije prikazane su u Tabelama 77 i 78. Studentovim t-testom analizirane su razlike između jedinki sa različitih lokaliteta u istoj sezoni, razlike između vrsta iz Obedske bare u istoj sezoni i razlike između vrsta iz Pančevačkog rita u istoj sezoni. Konstatovano je da je u periodu pre hibernacije u jetri jedinki *N. natrix* iz Pančevačkog rita akumulirana veća koncentracija aluminijuma, dok je koncentracija mangana bila značajno veća u jedinkama *N. natrix* iz Obedske bare. U jetri *N. tessellata* u periodu pre hibernacije koncentracije gvožđa, kalijuma, magnezijuma, molibdena i cinka bile su veće u jedinkama iz Obedske bare u odnosu na jedinke iz Pančevačkog rita. U periodu pre hibernacije u jetri jedinki *N. natrix* iz Obedske bare akumulirale su se veće koncentracije mangana, nikla i olova u poređenju sa jedinkama *N. tessellata* sa istog lokaliteta. Izmerene koncentracije nikla i cinka bile su takođe veće u jetri jedinki *N. natrix* u odnosu na *N. tessellata* iz Pančevačkog rita pre hibernacije.

Posle hibernacije, u jetri *N. natrix* nisu zabeležene statistički značajne razlike u bioakumulaciji ispitivanih elemenata između lokaliteta. Koncentracije bakra, kalijuma, mangana, molibdena i cinka bile su značajno veće u jetri jedinki *N. tessellata* koje su izlovljene na području Obedske bare. Jedinke *N. tessellata* iz Obedske bare u jetri su akumulirale značajno veće koncentracije mangana u odnosu na jedinke *N. natrix* sa istog lokaliteta. Posle hibernacije, jedinke *N. tessellata* u jetri su akumulirale značajno

veće koncentracije kalcijuma i mangana i značajno manju koncentraciju bakra u odnosu na jedinke *N. natrix* na području Pančevačkog rita.

Tabela 77. Koncentracije metala u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* sa područja Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije izražene u µg/g suve mase.

JETRA	Pre hibernacije			
	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Obedska bara	Pančevački rit	Obedska bara	Pančevački rit
Al	9.597 ± 2.488	24.358 ± 5.099*	22.079 ± 11.719	17.717 ± 5.398
As	10.192 ± 4.358	16.256 ± 9.163	16.954 ± 6.405	n.d.
Ba	1.066 ± 0.117	3.514 ± 1.175	n.d.	n.d.
Ca	359.167 ± 16.597	372.717 ± 24.271	266.677 ± 41.924	267.52 ± 62.23
Cd	0.361 ± 0.079	0.491 ± 0.099	0.257 ± 0.061	n.d.
Co	0.352 ± 0.063	0.201 ± 0.037	0.248 ± 0.05	n.d.
Cr	0.558 ± 0.064	0.568 ± 0.026	0.591 ± 0.084	0.496 ± 0.127
Cu	30.643 ± 8.037	30.614 ± 4.355	28.243 ± 4.334	17.304 ± 3.82
Fe	2694.694 ± 619.14	2605.969 ± 441.73	3302.393 ± 507.242	1446.211 ± 254.33*
K	7195.725 ± 405.409	6701.887 ± 416.53	7250.823 ± 247.917	6359.461 ± 94.816*
Li	13.255 ± 0.316	13.032 ± 0.932	13.897 ± 2.2	n.d.
Mg	617.119 ± 27.738	544.607 ± 25.363	614.456 ± 18.501	516.222 ± 7.089*
Mn	5.388 ± 0.268	4.113 ± 0.237*	3.86 ± 0.053 ^a	4.339 ± 1.467
Mo	2.999 ± 0.467	7.17 ± 4.198	3.993 ± 0.733	1.755 ± 0.364*
Ni	0.418 ± 0.05	0.419 ± 0.065	0.19 ± 0.032 ^a	0.037 ± 0.01 ^b
Pb	0.654 ± 0.123	0.859 ± 0.176	0.122 ± 0.075 ^a	n.d.
Zn	102.757 ± 7.707	103.237 ± 7.224	93.209 ± 3.609	73.31 ± 3.187* ^b

*p<0.05 Razlika između ispitivanih lokaliteta; ^ap<0.05 Razlika između ispitivanih vrsta iz Obedske bare u istoj sezoni;

^bp<0.05 Razlika između ispitivanih vrsta iz Pančevačkog rita u istoj sezoni; n.d. - označava vrednosti koje su bile ispod praga detekcije.

Tabela 78. Koncentracije metala u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* sa područja Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije izražene u $\mu\text{g/g}$ suve mase.

JETRA	Posle hibernacije			
	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Obedska bara	Pančevački rit	Obedska bara	Pančevački rit
Al	12.348 ± 3.789	8.936 ± 2.370	4.177 ± 0.758	9.841 ± 6.197
As	19.024 ± 8.716	4.095 ± 1.554	7.358 ± 2.036	5.461 ± 0.641
Ba	0.761 ± 0.223	n.d.	n.d.	n.d.
Ca	238.553 ± 34.485	199.488 ± 24.504	285.68 ± 32.155	292.53 ± 25.249 ^b
Cd	0.324 ± 0.065	0.355 ± 0.083	n.d.	0.252 ± 0.051
Co	0.177 ± 0.021	n.d.	0.317 ± 0.067	0.311 ± 0.058
Cr	1.461 ± 0.826	0.587 ± 0.013	0.47 ± 0.058	0.619 ± 0.094
Cu	42.671 ± 2.619	37.446 ± 4.626	36.096 ± 3.12	14.708 ± 2.144* ^b
Fe	2472.169 ± 468.47	2024.787 ± 238.817	3454.3 ± 523.131	1908.722 ± 348.901
K	7144.062 ± 211.842	6929.514 ± 361.43	7560.037 ± 248.55	6641.344 ± 304.184*
Li	11.884 ± 1.449	8.542 ± 0.194	12.993 ± 1.639	n.d.
Mg	634.161 ± 24.114	622.085 ± 42.56	673.833 ± 15.586	608.56 ± 40.416
Mn	5.001 ± 0.536	3.954 ± 0.38	7.484 ± 0.544	5.481 ± 0.377* ^b
Mo	2.624 ± 0.363	2.384 ± 0.435	3.408 ± 0.334 ^a	1.933 ± 0.115*
Ni	1.052 ± 0.92	0.133 ± 0.032	0.574 ± 0.351	0.115 ± 0.019
Pb	n.d.	0.467 ± 0.063	0.318 ± 0.011	0.36 ± 0.056
Zn	99.509 ± 6.112	87.711 ± 6.29	96.253 ± 6.382	69.511 ± 3.617*

* $p < 0.05$ Razlika između ispitivanih lokaliteta; ^a $p < 0.05$ Razlika između ispitivanih vrsta iz Obedske bare u istoj sezoni;

^b $p < 0.05$ Razlika između ispitivanih vrsta iz Pančevačkog rita u istoj sezoni; n.d. - označava vrednosti koje su bile ispod praga detekcije

4.12.2.2. Koncentracije metala u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata*

Koncentracije metala u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* pre i posle hibernacije prikazane su u Tabelama 79 i 80. Pre hibernacije, koncentracije kalcijuma, kalijuma i mangana u mišićnom tkivu *N. natrix* bile su značajno veće kod jedinki iz Obedske bare. U mišićnom tkivu *N. tessellata* koncentracije kalcijuma i cinka u periodu pre hibernacije takođe su bile veće kod jedinki iz Obedske bare. U Obedskoj bari, u periodu pre hibernacije, koncentracija kalcijuma bila je veća u mišiću *N. natrix*, dok su koncentracije gvožđa i nikla bile veće u mišiću *N. tessellata*. U Pančevačkom ritu, pre hibernacije, jedinke *N. natrix* u mišićnom tkivu akumulirale su veće koncentracije cinka u odnosu na jedinke *N. tessellata*. U periodu posle hibernacije u mišićnom tkivu *N. natrix* veća koncentracija aluminijuma akumulirala se u jedinkama iz Obedske bare, dok je veća koncentracija gvožđa akumulirana u jedinkama iz Pančevačkog rita. U mišićnom tkivu *N. tessellata* u periodu posle hibernacije veće koncentracije magnezijuma izmerene su kod jedinki sa lokaliteta Pančevački rit, dok su značajno veće koncentracije mangana akumulirane u jedinkama iz Obedske bare. Magnezijum se posle hibernacije na lokalitetu Obedska bara više akumulirao u mišiću *N. natrix*. U Pančevačkom ritu, posle hibernacije, značajno veće koncentracije kalcijuma i mangana izmerene su u mišiću *N. natrix*.

Tabela 79. Koncentracije metala u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* sa područja Obedske bare i Pančevačkog rita pre hibernacije izražene u $\mu\text{g/g}$ suve mase.

MIŠIĆ	Pre hibernacije			
	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Obedska bara	Pančevački rit	Obedska bara	Pančevački rit
Al	12.088 ± 4.864	41.644 ± 18.778	56.111 ± 19.687	29.468 ± 8.530
As	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ba	2.204 ± 0.453	1.173 ± 0.472	2.22 ± 0.743	1.012 ± 0.468
Ca	22953.245 ± 7206.449	1349.157 ± 455.652*	1536.447 ± 309.642 ^a	687.224 ± 45.773*
Cd	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Co	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cr	0.886 ± 0.24	0.585 ± 0.066	9.622 ± 4.128	9.487 ± 8.678
Cu	2.011 ± 0.1	1.962 ± 0.089	3.113 ± 0.496	2.237 ± 0.291
Fe	49.83 ± 10.204	85.843 ± 29.06	186.858 ± 36.219 ^a	138.373 ± 70.611
K	9075.057 ± 236.933	7840.75 ± 412.503*	9437.779 ± 200.67	9057.457 ± 440.277
Li	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mg	1349.553 ± 240.949	834.067 ± 47.234	903.533 ± 81.023	728 ± 48.102
Mn	6.416 ± 2.076	1.383 ± 0.414*	1.944 ± 0.245	1.436 ± 0.316
Mo	n.d.	0.168 ± 0.036	n.d.	n.d.
Ni	0.234 ± 0.102	0.387 ± 0.086	0.615 ± 0.058 ^a	0.441 ± 0.155
Pb	n.d.	0.8 ± 0.247	0.865 ± 0.301	n.d.
Zn	137.608 ± 3.951	132.096 ± 7.201	139.578 ± 6.513	115.177 ± 0.754* ^b

* $p < 0.05$ Razlika između ispitivanih lokaliteta; ^a $p < 0.05$ Razlika između ispitivanih vrsta iz Obedske bare u istoj sezoni;

^b $p < 0.05$ Razlika između ispitivanih vrsta iz Pančevačkog rita u istoj sezoni; n.d. - označava vrednosti koje su bile ispod praga detekcije.

Tabela 80. Koncentracije metala u mišiću *N. natrix* i *N. tessellata* sa područja Obedske bare i Pančevačkog rita posle hibernacije izražene u $\mu\text{g/g}$ suve mase.

MIŠIĆ	Posle hibernacije			
	<i>N. natrix</i>		<i>N. tessellata</i>	
	Obedska bara	Pančevački rit	Obedska bara	Pančevački rit
Al	29.165 ± 2.144	17.849 ± 2.179*	34.991 ± 9.247	21.222 ± 8.625
As	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ba	0.85 ± 0.369	0.743 ± 0.108	0.836 ± 0.184	0.558 ± 0.170
Ca	7004.323 ± 4394.108	3881.84 ± 1184.395	1910.235 ± 734.036	522.765 ± 79.815 ^b
Cd	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Co	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cr	0.855 ± 0.105	0.872 ± 0.099	1.078 ± 0.294	0.735 ± 0.116
Cu	2.204 ± 0.228	1.978 ± 0.025	1.999 ± 0.245	1.773 ± 0.143
Fe	51.847 ± 11.772	86.319 ± 5.69*	90.211 ± 12.895	73.085 ± 6.382
K	9247.726 ± 181.225	8624.457 ± 342.603	9310.378 ± 143.929	9649.533 ± 562.217
Li	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mg	1048.59 ± 105.285	827.676 ± 42.522	767.166 ± 17.049 ^a	836.49 ± 19.39*
Mn	2.215 ± 0.756	2.135 ± 0.281	1.712 ± 0.189	1.144 ± 0.066* ^b
Mo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ni	0.296 ± 0.078	0.173 ± 0.026	0.435 ± 0.213	0.132 ± 0.044
Pb	n.d.	0.453 ± 0.044	0.434 ± 0.049	0.475 ± 0.057
Zn	147.683 ± 5.472	135.647 ± 9.053	144.396 ± 5.685	124.867 ± 7.812

* $p < 0.05$ Razlika između ispitivanih lokaliteta; ^a $p < 0.05$ Razlika između ispitivanih vrsta iz Obedske bare u istoj sezoni;

^b $p < 0.05$ Razlika između ispitivanih vrsta iz Pančevačkog rita u istoj sezoni; n.d. - označava vrednosti koje su bile ispod praga detekcije.

5. DISKUSIJA

Prisustvo zagađujućih materija, posebno teških metala u različitim ekosistemima posledica je urbanizacije, izgradnje industrijskih postrojenja, eksploatacije prirodnih resursa, savremene poljoprivredne proizvodnje, kao i nedostatka ili odsustva primene ekoloških propisa. Ljudskim aktivnostima metali dospevaju u prirodnu sredinu i tako zagađuju šume, reke, jezera, okeane i druge ekosisteme (Larison i sar., 2000), što negativno utiče na brojnost i raznolikost biocenoza. Potencijalne opasnosti po živi svet potvrđene su u brojnim studijama o efektima izloženosti teškim metalima, kako u laboratorijskim uslovima, tako i u prirodnim staništima. Podatak da čak i u arktičkim pustinjama polarni medvedi akumuliraju visoke nivoe zagađujućih materija industrijskog porekla najbolje ilustruje ozbiljnost ovog problema (Willerroider, 2003).

Obedska bara predstavlja autentičan kompleks sa veoma izraženom raznolikošću kopnenih i vodenih biocenoza. Inicijalne mere zaštite ovog meandra reke Save donete su još 1974 god. Bez obzira što je ovo područje od međunarodnog značaja, zaštićeno Ramsarskom konvencijom, postoje literaturni podaci da je stalna ekspanzija okolnih poljoprivrednih površina zajedno sa fluktuacijom nivoa vode dovela do smanjenja brojnosti nekih vrsta riba (Marković i sar., 2010). Prema Carter i Turnock (2003) eutrofikacija Obedske bare predstavlja problem i zahteva razvoj različitih programa za rehabilitaciju.

Pančevački rit se nalazi na desnoj obali Dunava, u širem području grada Beograda. Posle Drugog svetskog rata počelo je isušivanje zemljišta i pretvaranje u obradive površine. Danas predstavlja poljoprivredno i industrijsko područje u koje se ipuštaju otpadne vode, što dovodi do zagađenja ekosistema i posledično izumiranja nekih organizama (Marković i sar., 2010). Proizvodnja motornih ulja i hemijska industrija registrovane su kao objekti i postrojenja sa određenim stepenom rizika na životnu sredinu (<http://www.sllistbeograd.rs/pdf/2011/38-2011.pdf>). Pančevački rit je kao područje pod izraženim antropogenim pritiskom proučavan u mnogim studijama (Arambašić i sar., 1989). Na ovom području nezakonito se odlaže otpad i vrši ekstrakcija šljunka, intenzivan ribolov i uvođenje alohtonih vrsta riba (Šukalo i sar., 2013; Cakić i Hristić, 1987).

U poslednjih nekoliko decenija, u mnogim razvijenim zemljama uvođenjem određenih regulativa ostvaren je pozitivan efekat na stanje životne sredine. Veliki značaj imalo je smanjenje količine zagađujućih supstanci koje se emituju u životnu sredinu npr. izgradnjom postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, ali i zabrana upotrebe nekih hemikalija (DDT, toksafen). Međutim, u mnogim zemljama emisija štetnih materija, bilo organskih ili neorganskih predstavlja ozbiljan problem.

Procena kvaliteta životne sredine podrazumeva praćenje biološkog efekta zagađujućih materija. Prema Adams i sar. (2001) biomarkeri se mogu okarakterisati kao funkcionalne mere izloženosti stresorima na subćelijskom nivou biološke organizacije. Ekotoksikologija kao multidisciplinarna nauka fokusira se na praćenje štetnih efekata zagađivača na različitim nivoima biološke organizacije. Međutim, veoma je važno otkriti rani biološki odgovor, posebno u slučajevima hronične izloženosti organizama niskim koncentracijama ksenobiotika. Zato je potrebno sprovođenje studija na biohemijskom i molekularnom nivou kako bi se razumeli subletalni efekti dugotrajnog izlaganja zagađivačima (Choi, 2004). Subćelijski odgovor na stresore životne sredine javlja se pre drugih poremećaja kao što su bolesti, smrt jedinki, promene na nivou populacije, i kao takvi predstavljaju rane upozoravajuće signale na uticaj zagađenja.

U terenskim istraživanjima veoma često se koriste morfološki parametri: hepatosomatski indeks (HSI) radi identifikacije potencijalnih promena i oštećenja jetre i kondicioni faktor (CF) kako bi se procenilo opšte stanje organizma (Ameur i sar., 2012). Prisustvo herbicida na agrikulturnim površinama utiče na zdravstveno stanje žaba, što je pokazano u studiji Thammachoti i sar. (2012) kroz smanjenje CF i povećanje HSI. CF je obično usko povezan sa kvalitetom hrane i reproduktivnim statusom jedinke. Prema rezultatima ove doktorske disertacije kod belouške nije bilo variranja morfoloških parametara između lokaliteta i sezona. Približno homogene vrednosti CF ukazuju na slične nutritivne uslove. Amaral i sar (2012) pokazali su da kod guštera sa poljoprivrednih područja koja su tretirana pesticidima postoji smanjenje CF iako se nisu mogle otkriti bilo kakve razlike u dostupnosti hrane između referentnog lokaliteta i lokaliteta tretiranog pesticidima.

U našoj studiji je zabeležen značajno veći HSI kod ribarice iz Pančevačkog rita u odnosu na one iz Obedske bare u periodu pre hibernacije. Posle hibernacije postoji značajno smanjenje HSI kod *N. tessellata* u Pančevačkom ritu u odnosu na period pre

hibernacije. Značajno manja vrednost HSI može može ukazivati na smanjene energetske rezerve u rano proleće, neposredno nakon perioda hibernacije. Al-Ghais (2013) je u studiji na *Tilapia mossambica* pokazao povećanje HSI u ribama koje su bile izložene komunalnim otpadnim vodama u odnosu na kontrolnu grupu gajenu u ribnjaku. Nakon prečišćavanja vode došlo je i do smanjenja HSI. Povećanje HSI na zagađenim lokalitetima u odnosu na referentni registrovano je i u studijama drugih autora (Ameur i sar., 2012; Corsi i sar., 2003; Mdegela i sar., 2010) koji ukazuju na značaj ovog indeksa kao potencijalnog biomarkera izloženosti hlorovanim i aromatičnim ugljovodonicima.

CF zbog veoma jednostavnog izračunavanja predstavlja vredan parametar u proceni stanja životne sredine. HSI i CF mogu pružiti informacije o potencijalnom uticaju zagađenja ali su veoma osetljivi na sezonske promene, bolesti, dostupnost hrane i tako daju informacije o energetske rezervama, izloženosti i efektima ksenobiotika.

Slobodni radikali pri niskim koncentracijama imaju fiziološku funkciju i uključeni su u metabolizam prostaglandina (Takahashi K., et al., 1992). Takođe ključni su u signalnim putevima imunološkog odgovora (Valko et al., 2007). Međutim kada proizvodnja ROS prevazilazi kapacitet enzimskih i neenzimskih antioksidanasa nastaje oksidacioni stres.

Poslednjih decenija predloženi su brojni ekotoksikološki biomarkeri koji se zasnivaju na praćenju disbalansa prooksidaciono/antioksidacionog statusa kao i posledica poremećene ravnoteže (oštećenje molekula DNK, lipida, enzimska inhibicija) i predstavljaju rane upozoravajuće signale (Ameur i sar., 2012). Promene u antioksidacionoj odbrani i oksidaciona oštećenja biomolekula veoma su korisni biomarkeri (Livingstone, 2001), a toksični efekti mnogih polutanata i njihovih metabolita povezani su sa oksidacionim stresom (Regoli and Principato, 1995).

Semiakvatične vrste zmija imaju neke osobine koje im daju prednost u biomonitoring studijama. Naime, one imaju manje radijuse kretanja u poređenju sa većinom riba i ptica, koriste kako vodene tako i kopnene resurse. Kako se nalaze na vrhu lanca ishrane predstavljaju i dobar model za praćenje bioakumulacije toksičnih materija. Prema raspoloživim literaturnim podacima, u tkivima više vrsta zmija proučavane su koncentracije teških metala i razmatrana mogućnost korišćenja ove grupe kičmenjaka u proceni kvaliteta životne sredine. Međutim, antioksidacioni zaštitni sistem ovih organizama je veoma malo proučavan. Do sada postoje podaci o mogućim

adaptivnim mehanizmima promene aktivnosti enzima antioksidacione zaštite severnoameričke vrste *Thamnophis sirtalis parietalis* koji su povezani sa mogućnošću preživljavanja anoksičnih uslova i izlaganja veoma niskoj temperaturi u laboratorijskim uslovima (Hermes-Lima i Storey, 1993).

Praktična primena biomarkera oksidacionog stresa u terenskim istraživanjima značajno je otežana zbog njihovih sezonskih varijacija. Čak je poznato da se životinje prilagode uslovima niskih koncentracija konstantno prisutnih zagađivača i da tada sezonski faktori mogu uticati na odgovor biomarkera u većoj meri. Da bi rezultate mogli da standardizujemo i izbegnemo efekat adaptacije na hronično zagađenje korisno je gde god je to moguće, paralelno izvoditi studije koje podrazumevaju gajenje vrsta u kontrolisanim laboratorijskim uslovima.

U terenskim istraživanjima veliki problem predstavlja izbor referentnih lokaliteta jer je zbog spontanosti ljudskih aktivnosti teško u pojedinim oblastima naći nezagađen lokalitet. Iako se zakonskim propisima ograničavaju ljudske aktivnosti na zaštićenim područjima, rezultati Hsu i sar. (2006) pokazali su da se teški metali akumuliraju u prirodnim populacijama gljiva, biljaka, kišnih glista, puževa, insekata, vodozemaca, zmija, guštera i slepih miševa na području nacionalnog parka na Tajvanu. Unošenje čak i tragova metala u životnu sredinu može imati uticaj na distribuciju, reprodukciju i opstanak vrsta.

Biomonitoring je veoma dragocen pristup u proceni uticaja ksenobiotika. U okviru različitih nadzornih projekata može se koristiti širom sveta. Ponovljena i kontrolisana merenja biomarkera u tkivima ili telesnim tečnostima odabranih bioindikatorskih vrsta daje informaciju o njihovoj trenutnoj izloženosti ali i o tome da li su u prošlosti bili izloženi hemijskim, fizičkim ili biološkim faktorima stresa, što u svom krajnjem cilju može dati saznanje i o potencijalnom štetnom dejstvu po zdravlje ljudi (Lionetto i sar., 2013).

Biohemijske analize krvi odražavaju fizičko-hemijske promene u organizmu i tako ukazuju na opšte metaboličko i fiziološko stanje. Hematološke studije na zmijama ograničene su na mali broj vrsta i obuhvataju proučavanje morfologije eritrocita i leukocita, određivanje koncentracije hemoglobina, hematokrita (Coz-Rakovac i sar., 2011, Tosunoğlu i sar., 2009), ali ne postoje detaljne studije o antioksidacionom statusu. Ispitivanje biomarkera oksidacionog stresa u krvi važno je zbog prisustva visokih

koncentracija kiseonika, hemoglobina i polinezasićenih masnih kiselina koje su podložne oksidacionim oštećenjima (Aguiló i sar., 2005). Korišćenje uzoraka krvi predstavlja odgovarajući biološki materijal za praćenje i procenu oksidacionog stresa čija je upotrebljivost potvrđena kod mnogih vrsta životinja (Fazio i sar., 2014).

Jetra je glavni detoksikacioni organ i ima važnu ulogu u regulaciji redoks metabolizma. U jetri se odvijaju višestruke oksidacione reakcije i maksimalna produkcija reaktivnih vrsta kiseonika. Iako je katalitička aktivnost enzima niža nego u jetri, bubrezi predstavljaju primarni put izlučivanja produkata metabolizma i stranih jedinjenja iz organizma (Lock i Reed, 1998). Bubrezi imaju veliki potencijal za produkciju ROS, omogućavaju održavanje acido-bazne ravnoteže i takođe imaju značajan doprinos u metabolizmu ksenobiotika. Različita hemijska jedinjenja kao i teški metali mogu biti direktni uzročnici renalne citotoksičnosti. Bubrezi i jetra predstavljaju ciljno mesto distribucije kadmijuma i drugih metala (Mani i sar., 2014). Pokazano je da postoji korelacija između koncentracije organskih zagađivača i teških metala u bubregu sa učestalošću pojave nekih vrsta tumora i drugih bolesti (Qin i sar., 2010).

Utvrđeno je da se u masnom tkivu deponuju organohlorni pesticidi, polihlorovani bifenili (PCB), policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), polibromovani difenil etri, metali i drugi toksini, koji se pri razgradnji masti u vreme povećane potrebe za energijom oslobađaju (Jin i sar., 2001). Izlaganje embriona pilića PCB 126 dovodi do dozno zavisnog povećanja nivoa lipidne peroksidacije u masnom tkivu, i to u većem nivou u odnosu na jetru, što ukazuje na njegovu izuzetnu osetljivost. Bryan i sar. (1987) su pokazali da vodena kornjača *Chelydra serpentina* predstavlja odličan model organizam za detekciju toksičnih supstanci koje su prisutne u tragovima u vodi, zbog izuzetne mogućnosti da u masnom tkivu skladišti visoke koncentracije PCB.

Životinje koje hiberniraju imaju razvijene adaptivne mehanizme koji im omogućavaju da pri izlasku iz hipometaboličkog stanja ne dođe do nepovratnog oštećenja ćelijskih struktura i da se uspostavi normalna ćelijska funkcija. Za razliku od njih kod nehibernatora ishemija i reperfuzija dovodi do ozbiljnih patoloških stanja. Tako su hibernatori adaptirani na anoksične ili hipoksične uslove kao i izuzetno niske temperature pa za njih ovi fiziološki procesi predstavljaju sastavni deo životnog ciklusa

(Orr i sar., 2009). Period same hibernacije bio je predmet istraživanja brojnih studija, posebno na sisarima (Vučetić i sar., 2013; Matthew 2007).

Hibernacija je važan deo životnog ciklusa gmizavaca koji naseljavaju predele umerene i hladne klimatske zone, a ovi organizmi prilagođeni su za preživljavanje niskih ambijentalnih temperatura i nedostatka hrane. Ipak, kod gmizavaca je ovaj proces nedovoljno proučen. Prema Pratihar i sar. (2010) u toku hibernacije aktivnost antioksidacionih enzima održava se na veoma visokom nivou i tako se sprečava povećanje nivoa lipidne peroksidacije. Period pre hibernacije, hibernacija i buđenje iz zimskog sna predstavljaju faze koje prate i odgovarajuće fiziološke i biohemijske specifičnosti (El-Deib, 2005). Međutim, prema našim saznanjima nema podataka koji se odnose na ispitivanje parametara oksidacionog stresa u pre- i posthibernacijskom periodu u tkivima *N. natrix* i *N. tessellata*, kao i odgovora ovih parametara na uticaj zagađivača prisutnih u životnoj sredini.

Kako zagađivači prisutni u životnoj sredini povećavaju unutarćelijsku produkciju ROS, važno je ispitati odgovor biomarkera oksidacionog stresa kod zmija. Jewell i sar. (1989) u *in vitro* studijama pokazali su da gmizavci imaju niži maksimum inducibilnosti u odnosu na druge vrste kičmenjaka. Međutim, prema Hecker i sar. (2006) zmije su na tretman 2,3,7,8-tetrahlorodibenzo-p-dioksinom i PCB 126 osetljive jednako kao ptice i sisari.

Enzimi antioksidacione zaštite mogu biti indukovani prisustvom različitih polutanata u prooksidacionim uslovima. Vlahogianni sar. (2007) među enzimskim komponentama antioksidacione zaštite izdvajaju SOD, CAT i enzim faze II biotransformacije GST. U prooksidacionim uslovima njihova aktivnost se u početku povećava kako bi se sprečio nastanak oksidacionog stresa. Međutim, dugotrajno izlaganje različitim ksenobioticima dovodi do iscrpljivanja ovih sistema zaštite što posledično dovodi do oštećenja ćelijskih molekula. Takođe, ovi autori su pokazali da postoji veza između aktivnosti antioksidacionih enzima i izlaganja teškim metalima i drugim ksenobioticima sa potencijalnim oksidacionim dejstvom. Povećanje SOD aktivnosti (čak 2-3 puta u odnosu na referentne vrednosti) predstavlja posledicu izloženosti zagađujućim materijama kod dagnji (Vlahogianni sar., 2007). Ovi autori, takođe su ispitivali i sezonske varijacije aktivnosti SOD i CAT i pokazali da od jeseni

do ranog proleća dolazi do smanjivanja aktivnosti ovih enzima, a zatim povećanja tokom letnjih meseci.

SOD i CAT predstavljaju prvu liniju odbrane od slobodnih radikala (Halliwell and Gutteridge, 2007). CuZn SOD predstavlja većinski deo Uk SOD. CuZn SOD i Mn SOD katalizuju istu reakciju, ali se ove dve izoforme razlikuju po strukturi i lokaciji u ćeliji. CuZn SOD se nalazi u citoplazmi a Mn SOD je enzim mitohondrijalnog matriksa (Pérey-Jiménez i sar., 2009).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da u jetri nije bilo statistički značajne razlike u aktivnosti Uk SOD između ispitivanih lokaliteta. U jetri vrste *N. natrix* aktivnost Uk SOD bila je značajno povećana na oba ispitivana lokaliteta u periodu posle hibernacije. Međutim kod *N. tessellata* u posthibernacijskom periodu dolazi do inhibicije aktivnost Uk SOD.

Tokom evolucije razvili su se različiti adaptacioni molekularni mehanizmi kako bi životinja bila pripremljena na stres koji nastaje usled uspostavljanja cirkulacije krvi bogate kiseonikom u vreme buđenja iz hibernacije. Povećanje aktivnosti SOD i koncentracije GSH su priprema za post-anoksični oksidacioni stres (Hermes-Lima i sar., 2001). Filho i sar. (2001) su pokazali da kod organizama sa nezagađenog lokaliteta u prolećnom periodu postoji povećana potrošnja kiseonika, veća aktivnost SOD i GST kao i veća koncentracija ukupnog GSH u poređenju sa jesenjim periodom.

SOD je, pored sezonskih uticaja, podložna i uticajima različitih ksenobiotika što je potvrđeno u brojnim studijama. Smer i intenzitet promena zavisi od mnogih faktora, kao što su starost životinja, dužina tretmana, koncentracija itd.

Rezultati Žikić i sar. (2001) su pokazali da se aktivnost SOD u eritrocitima *Carassius auratus gibelio* značajno smanjuje nakon 24h izlaganja kadmijumu. Međutim, nakon toga dolazi do porasta aktivnosti ovog enzima koji nakon četvorodnevno izlaganja dostiže nivo kontrolne grupe, a daljim produžavanjem izlaganja aktivnost SOD se značajno povećava iznad kontrolnih vrednosti, što predstavlja zaštitni mehanizam pri ukalnjaju O_2^- .

Biološki značaj CAT pokazan je u mnogim studijama i ogleda se u činjenici da uklanja H_2O_2 koji je glavni ćelijski prekursor za nastanak $HO\cdot$, visoko reaktivne i toksične vrste ROS.

Aktivnost CAT u jetri i mišiću *N. natrix* pre hibernacije i *N. tessellata* posle hibernacije bila je značajno povećana na području Pančevačkog rita u odnosu na Obedsku baru. U bubregu je značajno povećanje aktivnosti u Pančevačkom ritu registrovano samo kod *N. tessellata* u posthibernacijskoj fazi, dok u masnom tkivu ni sezona ni lokalitet nisu imali značajan uticaj na aktivnost ovog enzima. Prema rezultatima ove doktorske disertacije jedino je u krvi *N. tessellata* u periodu pre hibernacije došlo do značajne inhibicije aktivnosti CAT u Pančevačkom ritu. Povećanje aktivnosti CAT na zagađenom lokalitetu u odnosu na kontrolni lokalitet pokazali su Filho i sar. (2001) u studiji na slatkovodnoj vrsti ribe *Geophagus brasiliensis*, dok je aktivnost SOD imala suprotan trend i bila niža na zagađenom lokalitetu u odnosu na referentni. Indukcija aktivnosti CAT na zagađenom lokalitetu može odražavati povećanje nivoa endogenog H₂O₂. U jetri vrsta koje su ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji GSH-Px takođe pokazuje tendenciju povećanja aktivnosti u Pančevačkom ritu, izuzev kod *N. natrix* posle hibernacije, što naglašava potrebu za detoksikacijom peroksida. Suprotne rezultate aktivnost CAT na lokalitetima koji su pod izraženim antropogenim uticajem dobili su Tsangaris i sar. (2010) u studiji na školjkama. Prema Regoli i Principato (1995) inhibicija aktivnosti CAT predstavlja odgovor na akutno zagađenje. Povećanje aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px i GST u tkivima riba koje su izložene teškim metalima objavljeno je u više studija (Martínez-Álvarez i sar., 2005; Hansen i sar., 2006). Povećanje ili smanjenje aktivnosti antioksidacionih enzima potvrđeno je na nekim vrstama riba koje su bile izložene aromatičnim ugljovodonicima (Van der Oost i sar., 2003).

U krvi obe ispitivane vrste postoji trend smanjivanja aktivnosti CAT u poslehibernacijskoj fazi. Suprotne rezultate u eritrocitima slatkovodnih vrsta riba dobili su Gabryelak i sar. (1983) koji su, izučavajući enzime uključene u metabolizam peroksida, utvrdili da postoji povećanje aktivnosti u prolećnom periodu u odnosu na jesenji. Za razliku od rezultata dobijenih u krvi ispitivanih vrsta u ovoj doktorskoj disertaciji, u jetri, mišiću i bubregu se može uočiti suprotan trend aktivnosti ovog enzima, odnosno povećanje u prolećnom, poslehibernacijskom periodu. Kod vrste *Rana ridibunda* aktivnosti enzima primarne antioksidacione zaštite, SOD i CAT povećavaju se pri izlaganju većim temperaturama tokom oporavka od zimske hibernacije (Bagnyukova i sar., 2003). Hermes-Lima i Storey (1993) izneli su hipotezu

da gmizavci imaju veoma moćan antioksidacioni odbrambeni sistem koji ih štiti od post-anoksične produkcije ROS. Aktivnost CAT bila je veća u prolećnom periodu u odnosu na jesenji i u studiji Vlahogianni i sar. (2007) u škrgama jedinki vrste *Mytilus galloprovincialis* koje su uzorkovane na zagađenim lokalitetima. Prema ovim autorima, CAT se u odnosu na SOD smatra osetljivijim biomarkerom oksidacionog stresa u smislu otkrivanja biološkog efekta na redoks status organizma.

Mnoge vrste gmizavaca imaju sposobnost preživljavanja bez kiseonika izvestan period. Storey (1996) je pokazao da u stanju hibernacije, kada su zmije izložene veoma niskim temperaturama zapravo dolazi do aktiviranja odbrambenih mehanizama protiv povećane produkcije H₂O₂, odnosno do povećanja aktivnosti CAT u mišiću i plućima severnoameričke vrste *T. sirtalis parietalis*, dok anoksija dovodi do indukcije SOD. Yiğit (2008) je naglasio potrebu izvođenja komparativnih studija u kojima bi se pokazalo da li postoji korelacija između trajanja hipotermičkog perioda i aktivnosti enzima antioksidacione zaštite.

Prema rezultatima dobijenim u našoj studiji, sezona i lokalitet, kao pojedinačni faktori nisu imali uticaj na promenu GSH-Px aktivnosti u krvi obe ispitivane vrste zmija. Međutim, njihova interakcija značajno utiče na dobijene rezultate. Tako je u krvi *N. natrix* i *N. tessellata* u periodu pre hibernacije aktivnost GSH-Px značajno niža u Pančevačkom ritu, dok je u periodu posle hibernacije značajno viša na ovom lokalitetu u odnosu na Obedsku baru. U jetri se može uočiti trend povećanja aktivnosti GSH-Px u Pančevačkom ritu, izuzev kod *N. natrix* posle hibernacije. Kod vrste *N. natrix* značajno smanjenje aktivnosti GSH-Px u Pančevačkom ritu u odnosu na Obedsku baru dobijeno je u masnom tkivu posle hibernacije i mišiću pre hibernacije, dok je kod *N. tessellata* ovakav rezultat dobijen samo u bubregu, i to u periodu posle hibernacije. Prema nekim autorima, smanjena aktivnost GSH-Px može biti rezultat direktnog dejstva pesticida ili teških metala na sintezu enzima (Alkaladi, 2013). Prema Doyotte i sar. (1997) inhibicija aktivnosti GSH-Px može predstavljati samo prvi odgovor na prisustvo polutanata u životnoj sredini. Smanjenje aktivnosti GSH-Px na zagađenim lokalitetima pokazano je i u studijama drugih autora (Geret i sar., 2003; Cossu i sar., 1997). Prema Tkachenko i Kurhaluk (2013) između GSH-Px i ostalih komponenti antioksidacionog sistema, kao što su vitamin C, vitamin E, SOD postoje sinergističke interakcije, a GSH-Px je veoma koristan indikator oksidacionog stresa. Međutim, prema ovim autorima aktivnost GSH-

Px nije u direktnoj vezi sa zagađenjem teškim metalima, već češće reaguje na prisustvo drugih vrsta zagađivača u životnoj sredini.

GSH-Px pokazuje trend povećanja aktivnosti posle hibernacije u jetri i bubregu kod obe ispitivane vrste, kao i u mišiću i masnom tkivu ribarice. Kako buđenje iz hibernacije prati povećana produkcija ROS usled povećanja nivoa aerobnog metabolizma, povećanje aktivnosti enzima antioksidacione zaštite je efikasna adaptivna strategija u borbi protiv slobodnih radikala. Žabe koje su izlovljene u prolećnoj sezoni a zatim tretirane kadmijumom pokazale su manju toleranciju na ovaj toksični metal u poređenju sa jedinkama izlovljenim u jesenjoj sezoni. Ovo je uzrokovano prelaskom na aerobnu respiraciju posle zimskog sna (Sura i sar., 2006). Brucka-Jastrzębska i Kawcyuga (2011) tokom dvogodišnjeg ispitivanja pokazali su da GSH-Px u krvi *Cyprinus carpio* ima tendenciju povećanja aktivnosti u proleće i leto a smanjenje u jesen i zimu.

Hermes-Lima i sar (2001) primetili su da se u toku laboratorijskog izlaganja anoksičnim uslovima (10h na 5 °C) severnoameričke vrste *T. sirtalis parietalis* aktivnost SOD i koncentracija GSH značajno povećava u jetri i mišiću. Aktivnost CAT, Se GSH-Px i GST uglavnom su ostale neporomenjene.

GR ima indirektnu ulogu koja je od suštinskog značaja u prevenciji oksidacionih oštećenja jer omogućava održavanje odgovarajućeg nivoa redukovanog oblika GSH u ćeliji. Indukcija aktivnosti GR može nastati u prooksidacionim uslovima, kada postoji i povećana potreba za potrošnjom GSH, najvažnijeg ćelijskog niskomolekuskog antioksidansa. Aktivnost GR u krvi ima trend opadanja u uzorcima iz Pančevačkog rita u odnosu na Obedsku baru kod belouške u oba ispitivana perioda kao i kod ribarice u prehibernacijskom periodu. U posthibernacijskom periodu u krvi ribarice aktivnost GR je značajno povećana na lokalitetu Pačevački rit u odnosu na Obedsku baru. Slične rezultate su dobili Tkachenko i Kurhaluk (2013) koji su u studiji na pilićima *Ciconia ciconia* pokazali da je aktivnost GR u krvi bila najveća na kontrolnom lokalitetu, ali je u suburbanom području imala značajno manju aktivnost u odnosu na visoko zagađeno područje koje je kontaminirano i teškim metalima. Njihovi rezultati pokazali su i da je aktivnost GSH-Px bila značajno veća na zagađenom lokalitetu u odnosu na suburbani i kontrolni lokalitet.

Iako je jetra metabolički najaktivniji organ, u našoj studiji je pokazano da kod *N. tessellata* ni sezona, ni lokalitet kao ni njihova interakcija nemaju značajan uticaj na aktivnost GR. Jedina značajna razlika registrovana je između ispitivanih lokaliteta kod vrste *N. natrix* pre hibernacije. U ovom slučaju povećanje aktivnosti GR u uzorcima iz Pančevačkog rita može biti povezana sa potrebama povećane potrošnje GSH, čija je koncentracija takođe značajno veća u uzorcima iz Pančevačkog rita u odnosu na Obedsku baru.

U bubregu se takođe može uočiti trend povećanja aktivnosti GR kod zmija iz Pančevačkog rita kod obe ispitivane vrste u obe sezone. Prema našim rezultatima lokalitet nema uticaj na promenu GR aktivnosti u mišiću ispitivanih vrsta.

Cossu i sar. (1997) pokazali su da se aktivnosti Se GSH-Px i GR inhibiraju za čak 60 i 80 %, a koncentracija GSH se takođe smanjuje u škragama i digestivnoj žlezdi *Unio tumidus* 15 dana nakon što su transportovane duž rečnog toka koji prima otpadne komunalne i industrijske vode. Aktivnosti ovih enzima ostale su značajno smanjene i nakon 30 dana, što predstavlja adaptaciju na boravak u zagađenom ekosistemu, a autori ističu visoku osetljivost ovih biomarkera za praćenje stanja kontaminiranih lokaliteta.

Sezonske fluktuacije aktivnosti GR opisane su u više studija (Manduzio i sar., 2004, Verleccar i sar., 2008). Međutim, u našem istraživanju ne može se uočiti jedinstven obrazac sezonskog uticaja na aktivnost GR koji značajno varira u zavisnosti od ispitivanog tkiva ili vrste.

Enzimi faze I biotransformacije ksenobiotika, pre svega CYP1A, pripadaju grupi veoma osetljivih biomarkera, koji su odgovorni za biotransformaciju ksenobiotika, prvenstveno PCB i PAH. Njihova indukcija počinje vezivanjem liganda za AhR receptor što u krajnjem koraku dovodi do povećanja CYP1A katalitičke aktivnosti. CYP zavisne monooksigenaze imaju široku tkivnu distribuciju ali su im nivoi najveći u metabolički aktivnim tkivima: jetri, hepatopankreasu kod rakova, digestivnoj žlezdi školjki (Vidal i sar., 2001).

U toku naših istraživanja, u jetri *N. natrix* nismo mogli da detektujemo CYP1A, verovatno zbog toga što je njegova ekspresija bila znatno niža nego kod vrste *N. tessellata*. Prema našim rezultatima, u periodu pre hibernacije nivo ekspresije enzima faze I biotransformacije CYP1A bio je značajno veći u jetri *N. tessellata* iz Obedske bare. U poslehibernacijskoj fazi nije registrovana statistička razlika između nivoa

ekspresija CYP1A kod životinja iz Obedske bare i Pančevačkog rita kod ove vrste. Citohromi P₄₅₀ imaju važnu ulogu u oksidativnom metabolizmu i biotransformaciji hlorovanih i aromatičnih ugljovodonika, a pogodnost njihovog korišćenja u različitim programima monitoringa demonstrirana je u različitim studijama. Međutim, njegov metabolički put može biti značajno moduliran faktorima kao što su temperatura, fiziološko stanje, reproduktivni status, različit sezonski režim ishrane (Gorbi i sar., 2005). Pokazano je da teški metali takođe mogu da modifikuju funkciju CYP1A (Guilherme i sar., 2008). Međutim, teški metali nemaju strukturne sličnosti sa AhR ligandima i moguće je da oni aktiviraju druge endogene ligande koji se zatim vezuju za AhR receptor i tako dovede do inhibicije ekspresije CYP1A iRNA (Huang i sar., 2014).

Enzim faze II biotransformacije GST predložen je i široko korišćen kao biomarker potencijalno štetnih ksenobiotika kod vodenih organizama. Livingstone i sar. (2001) ističu da promene aktivnosti ovog enzima direktno odražavaju metaboličke poremećaje i oštećenja ćelija kod različitih vrsta riba. Pokazano je da se aktivnost ovog detoskikacionog enzima razlikuje u različitim organima riba i da pokazuje veliku zavisnost od faze razvoja gonada i stanja životne sredine. GST je multifunkcionalni enzim koji je, prema Gallagher i sar. (2001), odgovoran za degradaciju polnih steroida u hepatocitima, pa stoga njegova aktivnost može biti povezana i sa hormonskim promenama.

U ovoj studiji, GST pokazuje različit obrazac aktivnosti zavisno od vrste. Tako je u jetri *N. natrix* njegova aktivnost značajno smanjena u Pančevačkom ritu, dok je kod *N. tessellata* značajno povećana na istom lokalitetu u odnosu na Obedsku baru u periodu pre hibernacije. Isti trend može se uočiti i u krvi, s tim što kod belouške razlika u prehibernacijskom periodu nije statistički značajna, a u periodu posle hibernacije u Pančevačkom ritu dolazi do veoma izražene indukcije ovog enzima, tako da je na ovom lokalitetu aktivnost GST tri puta veća u odnosu na one u Obedskoj bari.

U jetri i bubregu obe ispitivane vrste sa Obedske bare aktivnost GST značajno je niža u posthibernacijskom periodu u odnosu na period pre hibernacije. Pavlović i sar. (2010) su pokazali da je aktivnost GST bila niža u proleće u odnosu na zimski period u jetri i mišiću *Mullus barbatus* iz Jadranskog mora.

Studija Carvalho-Neta i Abreu-Silva (2013) pokazala je da kod kontrolnih jedinki soma između nekih morfometrijskih podataka (dužine i mase ribe, mase gonada,

gonadosomatskog indeksa) postoje značane korelacije sa aktivnostima biotransformacionog enzima GST. Međutim, kod grupe uzorkovane u jednoj brazilskoj luci ove korelacije ne postoje jer dolazi do preusmeravanja energije na biotransformaciju raznih zagađivača koji su prisutni u vodi i sedimentu. Činjenica je da se ovaj lokalitet odlikuje višim nivoima koncentracija aluminijuma, kadmijuma, olova, hroma i žive koji mogu da dovedu do nastanka oksidacionog stresa rezultirala je značajnom razlikom u aktivnosti GST u jetri riba sa zagađenog lokaliteta u odnosu na referentni.

Kod ektotermnih životinja nivo enzima antioksidacione zaštite povezan je sa sezonskim temperaturnim promenama koje uslovljavaju i promene u metaboličkim zahtevima organizama. Nižu stopu metabolizma prati i niža aktivnost antioksidacione zaštite. Međutim, uloga pojedinih komponenti u održavanju homeostaze veoma je složena u prirodnim uslovima. Odgovor biomarkera je kompleksan i mogu se razviti adaptacioni mehanizmi posebno u slučaju izlaganja hroničnom zagađenju (Pavlović, 2010). Uticaj ksenobiotika zavisi od mnogih karakteristika uključujući sezonski i reproduktivni ciklus, hemijskih svojstava samog ksenobiotika, specifične stope bioakumulacije, biotransformacije kao i specifičnosti mehanizama izlučivanja (Filho i sar., 2001).

Iako su tkivne specifičnosti antioksidacione odbrane veoma izražene, one zapravo imaju sinergističko dejstvo (Filho i sar., 2001). Sezonski odgovor antioksidacionih i biotransformacionih enzima veoma je specifičan kod termokonformista koji žive u sredinama sa različitim nivoima zagađenja. U ovim slučajevima vreme izloženosti i nivo zagađivača imaju veliki uticaj na odgovor enzima zajedno sa funkcionalnom sposobnosti tkiva i organa (Filho i sar., 2001).

Mani i sar. (2014) ističu da se kod vodenih organizama aktivnosti enzima GST i CAT mogu smatrati osetljivim bioindikatorima kontaminacije metalima. Aktivnost GST može biti značajno povećana ili značajno smanjena u zavisnosti od vrste metala ili uslova izlaganja metalima.

U krvi i jetri koncentracija GSH pokazuje značajno povećanje kod zmija iz Pančevačkog rita u odnosu na Obedsku baru u prehibernacijskom periodu kod obe ispitivane vrste. U studiji na ribama koje su bile izložene kontaminantima iz otpadnih kanalizacionih voda, takođe je registrovano povećanje nivoa GSH kao rezultat

prilagođavanja organizama na štetno dejstvo hemijskih i bioloških zagađivača prisutnih u kanalizacionim vodama, što zahteva povećanje potrošnje GSH u procesima detoksikacije ksenobiotika (Al-Ghais, 2013). Smanjenje koncentracije GSH registrovano je u uzorcima iz Pančevačkog rita u odnosu na one iz Obedske bare u posle hibernacijskom periodu. Smanjenje koncentracije GSH u uzorcima iz kontaminiranih lokaliteta pokazano je u više studija (Torres i sar., 2002, Filho i sar., 2001). Poznato je da metali, poput kadmijuma, žive i olova mogu iscrpeti nivo GSH (Stohs i Bagchi, 1995).

Filho i sar. (2001) pokazali su značajno veće koncentracije, kako ukupnog GSH, tako i njegove oksidovane forme u prolećnom periodu u odnosu na jesenji. Viša ambijentalna temperatura vode i veća potrošnja kiseonika tokom toplijeg perioda predstavljaju sezonsko prilagođavanje antioksidacione odbrane termokonformista, i prema ovim autorima predstavlja uobičajenu adaptaciju kod ektotermnih životinja. Međutim, u jetri ribarice na oba ispitivana lokaliteta kao i jetri belouške u Pančevačkom ritu postoji značajno smanjenje koncentracije GSH u proleće, odnosno u poslehibernacijskom periodu u odnosu na jesenji (prehibernacijski). Hermes-Lima i sar. (2001) su pokazali da je koncentracija GSH značajno povećana kod zmija koje se nalaze u anoksičnim laboratorijskim uslovima na niskoj temperaturi, što je priprema za povećanu produkciju ROS koji nastaju tokom reperfuzije nakon prelaska na aerobni metabolizam, što bi odgovaralo uslovima koji postoje u toku buđenja iz hibernacije.

Homeostaza SH grupa je veoma važan faktor za održavanje redoks statusa u ćeliji. Ranije studije su pokazale da promena u koncentraciji SH grupa može da utiče na strukturu i funkciju proteina i izaziva promene u aktivnosti enzima antioksidacione zaštite (Kovačević i sar., 2006). Veliki broj proteina sadrži sulfhidrilne grupe čija je oksidacija rani odgovor ćelije na stres (Thomas i sar., 1995). Mnogi zagađivači modifikuju ćelijski odgovor na stres u reakciji sa SH grupama. Tako se na primer, toksični As^{3+} koji se mogu naći u mnogim pesticidima, herbicidima i insekticidima vezuju za SH grupe enzima inhibirajući njihovu aktivnost (Doruibe i sar., 2007).

U našim istraživanjima koncentracija SH grupa bila je značajno niža na lokalitetu Pančevački rit u odnosu na Obedsku baru u jetri, bubregu, mišiću i masnom tkivu kod vrste *N. natrix* u periodu pre hibernacije i kod vrste *N. tessellata* posle hibernacije. Pad

koncentracije koji je zabeležen kod zmija iz Pančevačkog rita može da ukazuje na narušenu regulaciju redoks zavisnih procesa.

Jedan od značajnih pokazatelja oksidacionog stresa je promena nivoa TBARS, koji se javlja kao posledica oksidacionih oštećenja lipida. Porast lipidne peroksidacije uglavnom je povezan sa smanjenjem aktivnosti selen zavisne GSH-Px u jetri i masnom tkivu embriona ptica i povećanjem GSSG:GSH odnosa u jetri (Jin i sar. 2001). Labrada-Martagón i sar. (2011) su pokazali da postoji pozitivna korelacija nivoa TBARS i koncentracije kadmijuma u krvi kornjače *Chelonia mydas*.

Rodríguez-Ariza i sar. (1993) su analizirali nekoliko biohemijskih parametara u jetri riba španske primorske oblasti na lokaciji u kojoj je dokazano prisustvo većih koncentracija metala kao što su gvožđe i bakar. U sedimentu su pronađene i visoke koncentracije PCB, PAH i pesticida. Parametri su upoređeni sa nivoima kod referentnih jedinki. Glutation redoks status u kontaminiranoj grupi pokazao je da su ovi organizmi izloženi oksidacionom stresu. Međutim, kod kontaminirane grupe je nađen nizak nivo malondialdehida što ukazuje da nije došlo do povećanja nivoa lipidne peroksidacije. Merenjem nivoa TBARS može se proceniti sposobnost organizma da prevaziđe negativne efekte slobodnih radikala. Istovremeno, u njihovoj studiji potvrđena je povećana aktivnosti enzima GSH-Px, SOD, CAT, glukozo-6-P-dehidrogenaze i GR u tkivima ribama sa kontaminiranog lokaliteta, što ukazuje da su ove jedinke dobro zaštićene od oksidacionog stresa.

U škragama i plaštu dagnji koje su izlovljene na zagađenim lokalitetima primećeno je povećanje aktivnosti CAT i nivoa TBARS. Ova činjenica ukazuje na prisustvo viška H_2O_2 koji difunduje u ćelije i izaziva oksidaciona oštećenja. Povećana koncentracija gvožđa u ispitivanim tkivima dagnji dovela je do produkcije OH^\cdot radikala preko Fentonove reakcije. Iako je došlo do indukcije aktivnosti CAT ona nije bila dovoljna da eliminiše H_2O_2 i spreči formiranje OH^\cdot što je posledično izazvalo intenziviranje procesa lipidne peroksidacije (Vlahogianni sar. 2007).

Značajno povećan nivo TBARS kod jedinki iz Pančevačkog rita u odnosu na one iz Obedske bare pronađeno je samo kod ribarice i to u krvi u periodu posle hibernacije, bubregu pre hibernacije i masnom tkivu u obe ispitivane sezone. Istovremeno se uočava da u krvi ribarice posle hibernacije između lokaliteta nije bilo značajne razlike u aktivnosti CAT, a da je aktivnost SOD značajno niža u Pančevačkom ritu u odnosu na

Obedsku baru. Najveći nivo TBARS, a istovremeno najmanja aktivnost CAT u bubregu ribarice izmereni su u Pančevačkom ritu u prehibernacijskom periodu. Uočava se da i u masnom tkivu kod ribarice nema značajne razlike u aktivnostima SOD i CAT između lokaliteta, a da je nivo TBARS izrazito povećan u Pančevačkom ritu. Merenjem ovog parametra kod belouške ustanovljeno je da u krvi, jetri i masnom tkivu postoji čak značajno smanjenje u Pančevačkom ritu, što ukazuje da se ova vrsta uspešnije suprostavlja oksidacionom stresu. Najverovatnije, ovo se postiže indukcijom enzima CAT i SOD koje se paralelno mogu uočiti u onim ispitivanim grupama u kojima se registruje značajno smanjenje nivoa TBARS kod belouške.

AChE ima ulogu u završavanju sinaptičke neurotransmisije, a merenje njegove inhibicije koristi se kao marker izlaganja organofosfatnim i karbamatnim pesticidima. Njegov značaj proističe iz činjenice da ispunjava brojne uslove potrebne za uspešnu primenu u proceni biološkog odgovora: lako i brzo se meri, pokazuje dozno-zavisnu promenu aktivnosti u odnosu na prisustvo polutanata, veoma je osetljiv, u vezi je sa štetnim efektima po zdravstveno stanje organizma (Lionetto i sar., 2013). Karbamati i organofosfati su u poređenju sa organohlorinim pesticidima manje postojani u životnoj sredini, a njihova degradacija je često ubrzana sa porastom temperature i alkalnosti. Bez obzira na razlike u hemijskim svojstvima ove grupe pesticida dovode do inhibicije AChE (Jebali i sar., 2013, Robillard et al., 2003).

Zagađivači životne sredine imaju direktne efekte na molekularnom, ćelijskom, kao i tkivnom nivou, ali rezultat promena na suborganizmalnom nivou na kraju su promene u osobinama organizama koje se manifestuju kroz promene u rastu, lokomotornoj aktivnosti, reprodukciji i preživljavanju. Zato su Hopkins i sar. (2005) ispitivali promene u plivačkim sposobnostima dve vrste zmija *Seminatrix pygaea* i *Nerodia rhombifer* nakon izlaganja karbarilu. Izlaganje je dovelo do promene u brzini plivanja ovih vrsta koje su bile znatno izraženije kod *S. pygaea*. Većina jedinki oporavila se nakon 96h od izlaganja, ali je oporavak bio sporiji kod *S. pygaea*. Autori iznose pretpostavku da *S. pygaea* ima znatno permeabilniji integument, što je izazvalo veću inhibiciju aktivnosti holinesteraza. Promene u lokomotornoj aktivnosti mogu biti relevantan pokazatelj izloženosti kod gmizavaca, a srodne vrste mogu imati različite ekološke i fiziološke karakteristike i tako, različito reaguju na izlaganje pesticidima.

Praćenje aktivnosti ChE može dati važne informacije o stanju životne sredine. Zbog toga je potrebno poznavati kako fluktuacije fizičko-hemijskih parametara vezanih za prisustvo zagađivača mogu uticati na aktivnost AChE.

U skladu sa činjenicom da i neke druge hemikalije kao što su PCB (Payne i sar., 1996) i teški metali (Bocquene' i sar., 1995) takođe mogu izazvati inhibiciju AChE, Lionetto i sar. (2005) sugerišu da je AChE veoma koristan biomarker mešavine neurotoksičnih zagađivača u životnoj sredini.

Prema rezultatima dobijenim u našim istraživanjima, posle hibernacije u jetri obe ispitivane vrste iz Pančevačkog rita uočava se značajno niža aktivnost ChE u odnosu na zmijske iz Obedske bare. Isti rezultati dobijeni su u krvi *N. tessellata* u obe sezone kao i u periodu pre hibernacije u krvi *N. natrix*. Inhibicija ovog enzima kod jedinki iz Pančevačkog rita može biti direktna posledica prisustva pesticida kojima se tretiraju obradive površine velikog poljoprivrednog kombinata koji se nalazi na ovom lokalitetu. Međutim, u krvi *N. natrix* iz Obedske bare u proleće je došlo do inhibicije ovog enzima, a isti rezultat smo dobili i u mišićnom tkivu pre hibernacije. Ovakvi rezultati potvrđuju da ekspanzija poljoprivrednih površina u okolini Specijalnog rezervata prirode „Obedska bara“ može imati negativan efekat na vrstu *N. natrix*. Dobijene sezonske promene aktivnosti ChE mogu biti povezane sa promenama temperature vode i količine padavina (Abdel-Halim i sar.; 2006, Chitmanat i sar., 2008).

MT predstavljaju familiju proteina veoma male molekulske mase (9-12 kDa) koji vezuju metale, učestvuju u njihovom metabolizmu i transportu. Studije o genskoj regulaciji ekspresije MT otkrile su da je njihova indukcija direktni odgovor na unutarćelijsko povećanje koncentracije metala (Dethloff i sar., 2001). Mihailović i sar. (2010) su ispitivali korelaciju nivoa MT i koncentracije toksičnih metala na tri lokaliteta u Jadranskom moru. Konstatovali su da je najveći izmereni nivo MT vrste *Merluccius merluccius* korelisan sa koncentracijom bakra, a kod vrste *Mullus barbatus* sa koncentracijom olova.

Prema rezultatima ove doktorske disertacije, kod vrste *N. natrix* u oba ispitivana perioda, kao i kod *N. tessellata* u periodu posle hibernacije registrovan je značajno povećan nivo ekspresije MT u jetri jedinki iz Obedske bare. U periodu pre hibernacije, nivo ekspresije bio je nešto veći kod zmijske iz Pančevačkog rita, međutim bez statističke

značajnosti. Ovakvi rezultati dobijeni su uprkos činjenici da su koncentracije metala bile mnogo veće u uzorcima vode iz Pančevačkog rita. Međutim, na osnovu analize bioakumulirane koncentracije metala u jetri i mišiću može se uočiti da je u većem broju slučajeva bioakumulirana koncentracija bila veća u jedinkama iz Obedske bare. Tako je u periodu pre hibernacije u jetri *N. natrix* koncentracija mangana značajno veća u jedinkama sa Obedske bare, dok je koncentracija aluminijuma bila veća u jetri jedinki iz Pančevačkog rita. U jetri jedinki vrste *N. tessellata* u periodu pre hibernacije koncentracije gvožđa, molibdena i cinka bile su takođe značajno veće na lokalitetu Obedska bara u odnosu na Pančevački rit. U jetri jedinki *N. narix* posle hibernacije nisu detektovane značajne razlike u bioakumulaciji elemenata između lokaliteta. Izmerene koncentracije bakra, mangana, molibdena i cinka u jetri *N. tessellata* posle hibernacije bile su takođe značajno veće u jedinkama iz Obedske bare.

Povećan nivo MT kao rezultat izlaganja različitim teškim metalima već je potvrđen u laboratorijskim studijama (George i Langston, 1994). U terenskim istraživanjima kod organizama koji naseljavaju kontaminirane lokalitete takođe je zabeležen povećan nivo MT, ali ove promene često nisu direktno u korelaciji sa izmerenim koncentracijama metala u životnoj sredini zbog prirodne varijabilnosti drugih faktora životne sredine (Roch i McCarter, 1984).

Iako MT obično ukazuju na izloženost metalima, na njihov nivo mogu uticati endogeni i egzogeni faktori, kao što su faze reproduktivnog ciklusa, prisustvo glukokortikoida, aspecifični stresni uslovi ili niske temperature (Langston i sar., 2002).

Prema Sevcikova i sar. (2011) ne postoji specifičan biomarker oksidacionog stresa izazvan metalima. MT su pogodni biomarkeri izlaganja u laboratorijskim uslovima, međutim u nekim terenskim studijama indukcija MT izostaje i nema značajne korelacije između MT i koncentracija nekih izuzetno toksičnih metala poput kadmijuma i žive zbog hroničnog efekta i uključivanja adaptivnih mehanizama organizama.

Iako se različito definišu (po visokoj atomskoj masi, gustini većoj od 6 g/cm^3 , toksičnosti), prema WHO (1996) poznato je preko 20 različitih teških metala (aluminijum, antimon, arsen, kadmijum, hrom, kobalt, olovo, mangan, živa, nikl, selen, kalaj, vanadijum, cink, bakar itd). Oni su najmanje pet puta gušći od vode, predstavljaju stabilne elemente. Termin “teški” odnosi se i na biološke efekte jer mogu biti toksični

za živi svet čak i ako su prisutni u tragovima, a bioakumuliraju se u lancima ishrane (Ezejiogr i sar., 2013).

Međutim, postoji nekoliko metala koji su u poslednje vreme posebno aktuelni. Tako kadmijum i olovo nemaju poznate biološke funkcije i mogu biti toksični za ljude čak i ako su prisutni samo u tragovima, pa stoga privlače veliko interesovanje (Narvaes, 2002; Nishihara i sar., 1985). Kadmijum je veoma toksičan neesencijalni element koji oštećuje ćelijske membrane, dovodi do pada aktivnosti enzima, što može rezultirati ćelijskom smrću, a kod sisara i riba izaziva anemiju (Al-Kahtani, 2009). Kod vodenih organizama postoje različiti načini usvajanja kadmijuma. Kod riba joni kadmijuma obično se apsorbuju preko škrge, pasivnom difuzijom ili aktivnim transportom. Kadmijum se može uneti hranom konzumacijom organske materije za koju se vezuje, a zatim u crevu dolazi do njegove apsorpcije. Kod riba oko 75% kadmijuma unetog u organizam deponuje se u jetri i bubrezima, ali može biti deponovan i u srcu, škragama i drugim tkivima (Mani i sar. 2014).

Olovo prisutno u atmosferi, vodi i hrani akumulira se u organizmima koji žive na kontaminiranim područjima. Akumulacija olova ubrzana je zbog industrijalizacije a glavni izvori povećane koncentracije olova su prašina, boje, kozmetička sredstva, lekovi i dodaci ishrani. Olovo izaziva hematološke, gastriontestinalne i neurološke disfunkcije. Duža izloženost dovodi do reproduktivnih poremećaja, usporava se provođenje nervnog impulsa i menja homeostaza kalcijuma, dolazi do inhibicije enzima i indukcije sinteze vezujućih proteina (Bölck i sar., 2014). Mnoge studije pokazuju da toksičnost teških metala zavisi od hemijskog oblika, načina unosa, doze i vremena izloženosti. Olovo ima veliku sposobnost akumulacije u organizmu. Njegova toksičnost uglavnom je vezana za uticaj na enzimski sistem ćelije, što dovodi do biohemijskih poremećaja. Olovo stupa u interakciju sa drugim metalima prisutnim u tragovima, posebno sa cinkom, u fazama njihove apsorpcije i distribucije. Olovo može da zameni druge metale u metaloenzimima što dovodi do njihove inhibicije. Ukoliko se pre tretmana olovom u ishrani poveća unos cinka, smanjuje se akumulacija i toksičnost olova, verovatno usled smanjene apsorpcije u gastrointestinalnom traktu. Olovo učestvuje u formiranju slobodnih radikala kiseonika i tako utiče na aktivnost antioksidacionih enzima (Kulikowska-Karpińska i Moniuszko-Jakoniuk 2001).

Vodeni organizmi akumuliraju bakar kada su izloženi njihovim toksičnim koncentracijama, što posledično dovodi do stvaranja slobodnih radikala, pa stoga izaziva morfološke i biohemijske promene (Al-Kahtani, 2009). Iako bakar i cink imaju ključnu ulogu u nekim enzimskim procesima, klasifikovani su u toksične metale koji se bioakumuliraju u vodenim organizmima, a pokazano je da u slučaju visoke koncentracije cinka u vodi kod slatkovodnih riba dolazi do smanjenja stope preživljavanja (Al-Kahtani, 2009).

Mnogi pesticidi sadrže arsen kao aktivan sastojak, što može biti uzrok povećanja njegove koncentracije u životnoj sredini i čemu se može pripisati toksičnost nekih pesticida. Hronično izlaganje arsenu dovodi do poremećaja funkcije bubrega i centralnog nervnog sistema. Aluminijuma ima u nekim đubrivima, farmakološkim i kozmetičkim sredstvima, emulgatorima i dodacima za hranu, a široko se koristi u i nekim granama industrije (Ezejifort i sar., 2013).

Stepen akumulacije teških metala u tkivima zavisi od spoljašnjih faktora, kao što su količina rastvorenih metala, fizičko-hemijskih karakteristika, interakcija između metala, količine metala u hrani, godišnjih sezonskih efekata i unutrašnjih faktora kao što su individualna varijabilnost, starost, faza razvoja, veličina, pol (Olgunoğlu i sar., 2015).

Zbog bioakumulacije i biomagnifikacije koncentracije elemenata veće su u organizmima koji se nalaze na vrhu lanca ishrane. Zmije su često vrhunski predatori, a to im daje dobre mogućnosti za ispitivanje u oblasti bioakumulacije i biomagnifikacije u lancu ishrane. Vodene zmije akumuliraju metale prisutne u životnoj sredini u različitom stepenu zavisno od lokaliteta na kojima su uzorkovane što potvrđuje njihovu pogodnost kao bioindikatora izlaganja zagađivačima. Zbog široke geografske distribucije nekih rodova zmija, one se mogu koristiti za poređenje različitih ekosistema (Burger i sar 2007). Ovakvim istraživanjima mogu da se utvrde interspecijske razlike i omogući selekcija dobrih bioindikatorskih vrsta.

Metali kao što su kadmijum, nikal, hrom, olovo i živa toksični su za akvatične organizme zbog svog oksidacionog potencijala, dok su gvožđe, cink, bakar, selen i mangan esencijalni metali, ali u visokim koncentracijama postaju toksični (Vlahogianni et al., 2007).

Postoje brojna istraživanja o uticaju metala na organizme. Tako je, na primer uništavanje staništa bio glavni uzrok opadanja brojnosti populacije endemične vrste

zmija *Thamnophis gigas* u centralnoj Kaliforniji, iako su efekti zagađivača bili nepoznati. Wylie i sar. (2009) su ispitivanjem koncentracije nekih metala u tkivima uginulih jedinki ove vrste, utvrdili da su srednje vrednosti koncentracije arsena (25.7 ppb) i hroma (1.02 ppb) u jetri bile veće od vrednosti izmerene u drugim studijama na zmijama. Glavni zagađivač u ovoj oblasti je živa a njena najveća koncentracija izmerena je u jetri (1.64 ppb). Autori ističu da izlaganje živi dovodi do smanjene neuromišićne i lokomotorne aktivnosti, bihevioralnih poremećaja, utiče na sposobnost kretanja između skloništa i hranilišta i tako negativno utiče na opstanak jedinki u divljini.

Vodena zmija *Nerodia sipedon* u jetri, bubregu, mišiću i koži akumulira značajno veće koncentracije arsena, kadmijuma, olova, mangana, žive i selena na ispitanom zagađenom lokalitetu u odnosu na referentni (Campbell i sar., 2005). Time je potvrđeno da ova vrsta može biti dobar bioindikator kontaminacije metalima. Koncentracije arsena, kadmijuma, hroma, olova, mangana, žive i selena ispitivane su u krvi i koži vodene zmije *Nerodia sipedon* a zatim je ispitivana korelacija sa koncentracijom metala koji su detektovani u jetri, bubregu i mišiću (Burger i sar., 2005). Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi koja je od ove dve nedestruktivne metode uzimanja uzorka (krv ili koža) bolji pokazatelj izlaganja teškim metalima i njihove akumulacije u unutrašnjim tkivima. Iako nije pronađen dosledan obrazac na svim ispitivanim lokalitetima, uzimanje dela kože pokazalo se kao korisna tehnika jer je pronađen veći broj značajnih korelacija za ispitivane elemente u odnosu na krv. Ispitivanje koncentracije metala u krvi je korisno kako bi se dobila saznanja o nedavnom izlaganju. Uzimanje dela mišića repa, što takođe može predstavljati nedestruktivnu metodu, bolji je pokazatelj stanja ekosistema i prisustva teških metala u dužem vremenskom periodu (Burger i sar., 2006).

Burger i sar. (2007) ispitivali su bioakumulaciju metala u različitim tkivima vodene zmije *Nerodia* spp. Arsen i selen najviše su se akumulirali u bubregu i jetri, kadmijum u jetri, najveće koncentracije hroma i olova detektovane su u koži, dok je mangana i žive najviše bilo u mišiću. Autori takođe ističu da nisu sva tkiva podjednako korisna kao indikatori izloženosti metalima. Međutim, ovi podaci imaju veliki značaj za razumevanje odnosa nivoa akumulacije metala u različitim tkivima.

U studiji Albrecht i sar. (2007) ispitivana je biomagnifikacija olova, bakra i kadmijuma, na osnovu određivanja njihovih koncentracija u celim telima zmije vrste

Thamnophis sauritus i larvama žaba vrsta *Rana catesbeiana*, *R. clamitans* i *Hyla cinerea*. U tkivu zmije pronađeni su znatno niži nivoi olova, bakra i kadmijuma u poređenju sa larvima žaba, što ukazuje da nije došlo do biomagnifikacije ovih metala u višem trofičkom nivou. Pored navedenih elemenata u telu *T. sauritus* merena je i koncentracija žive, pa je utvrđeno da je njen nivo kao i nivo bakra značajno korelisan sa starošću jedinki. Autori su istakli da je ispitivana populacija zmija pod minimalnim rizikom od izloženosti teškim metalima, ali i da zbog rasprostranjenosti, veličine i lakog uzorkovanja može biti dobar model organizam u biomonitoring studijama.

U istraživanjima na vrsti *Pituophis melanoleucus* ustanovljeno je da se olovo, živa i hrom u značajno većem nivou akumuliraju u koži u poređenju sa celim telom zmije (uključujući i kosti). Za razliku od ovih metala, koncentracija mangana i siena bila je veća u telu. Ova činjenica pokazuje da je periodično presvlačenje zmija metod eliminacije toksičnih metala iz organizma (Burger, 1992). Jones i Holladay (2006) sproveli su eksperiment u kome su zmije vrste *Elaphe guttata* hranili miševima kojima su injekcijama ubrizgavali određene koncentracije olova, kadmijuma i žive kako bi za mesec dana svaka jedinka unela ukupno 2mg/kg svakog ispitivanog elementa. Nakon 34 nedelje tretmana određivane su koncentracije metala u koži zmija i poređene sa kontrolnom grupom. Kod tretiranih jedinki srednji nivoi koncentracije iznosili su 234 ppb za olovo, 806 ppb za kadmijum i 403 ppb za živu, dok su srednji nivoi koncentracije u kontrolnoj grupi istim redom iznosili 6, 12 i 20 ppb.

Takođe postoje i polne razlike akumulacije metala. Pokazano je da su ženke *N. sipedon* veće od mužjaka, međutim u tkivima ne akumuliraju značajno veće koncentracije metala u poređenju sa mužjacima. Campbell i sar. (2005) ističu da je ovo u vezi sa transferom metala u jaja.

Prema rezultatima ove doktorske disertacije, koncentracije metala bile su veće u jetri u odnosu na mišić ispitivanih vrsta. Dok su arsen, kadmijum, kobalt i litijum detektovani u jetri većine ispitivanih grupa, u mišiću su bile ispod praga detekcije. Molibden je detektovan samo u mišiću belouške pre hibernacije.

Koncentracija aluminijuma izmerena u uzorcima vode iz Pančevačkog rita u jesen pre hibernacije bila je oko 22 puta veća od koncentracije izmerene u uzorcima sa Obedske bare. Analizom koncentracije metala u tkivima utvrđeno je da je u ovom periodu bioakumulirana koncentracija aluminijuma u jetri *N. natrix* iz Pančevačkog rita

značajno veća od vrednosti izmerene u uzorcima iz Obedskoe bare. U proleće, u vodi Obedske bare koncentracija aluminijuma bila je ispod praga detekcije a u Pančevačkom ritu iznosila je svega 47.37 ± 9.96 ppb. Međutim u mišićnom tkivu *N. natrix* registrovana je značajno veća koncentracija ovog metala u jedinkama iz Obedske bare u odnosu na jedinke iz Pančevačkog rita.

U jesen, u uzorcima vode iz Obedske bare i Pančevačkog rita izmerene su slične koncentracije arsena, dok je u proleće njegova koncentracija u Obedskoj bari iznosila 8.85 ± 0.73 ppb a u vodi Pančevačkog rita bila je ispod praga detekcije. Statistički značajne razlike u bioakumulaciji arsena između lokaliteta nisu registrovane u jetri ispitivanih vrsta, a u mišićnom tkivu nije bilo bioakumulacije arsena.

Kadmijum je izmeren samo u vodi iz Pančevačkog rita u prolećnom periodu. U jetri je došlo do bioakumulacije kadmijuma u svim ispitivanim grupama osim u jedinkama ribarice iz Pančevačkog rita u periodu pre hibernacije i u jedinkama sa Obedske bare u periodu posle hibernacije. Statistički značajne razlike između lokaliteta nisu registrovane. U mišićnom tkivu kadmijum nije registrovan ni u jednom ispitivanom uzorku.

Kobalt nije detektovan u vodi ni na jednom lokalitetu. U jetri je njegova koncentracija bila ispod praga detekcije samo kod ribarice pre hibernacije i kod belouške posle hibernacije. Statistički značajne razlike između lokaliteta nisu detektovane, a u mišiću nije registrovan ni u jednom ispitivanom uzorku.

Hrom je bio prisutan samo u uzorku vode iz Pančevačkog rita u jesenjoj sezoni. Međutim, možemo uočiti da je došlo do njegove bioakumulacije i u jetri i u mišiću svih ispitivanih grupa a statističke razlike nisu detektovane.

Koncentracije bakra u jesen (pre hibernacije) u vodi Obedske bare i Pančevačkog rita iznosila je redom 15.34 ± 0.32 i 49.28 ± 0.98 ppb, dok u proleće (posle hibernacije) nije detektovana u uzorcima vode. Pre hibernacije u jetri nije bilo statističke značajne razlike u bioakumulaciji bakra između lokaliteta kao ni između vrsta, dok je periodu posle hibernacije u jetri *N. tessellata* pokazana značajno veća koncentracija u jedinkama iz Obedske bare (36.096 ± 3.12 ppb) u odnosu na Pančevački rit (14.708 ± 2.144 ppb). Takođe, konstatovali smo da jedinke *N. natrix* akumuliraju značajno veće koncentracije ovog metala (37.446 ± 4.626 ppb) u odnosu na jedinke *N.*

tessellata na području Pančevačkog rita. U mišićnom tkivu nije bilo značajne razlike u bioakumulaciji bakra.

Koncentracija gvožđa u uzorcima vode takođe je izraženo manja u proleće na oba lokaliteta. U obe ispitivane sezone u uzorcima vode iz Pančevačkog rita koncentracija gvožđa veća je oko 20 puta u odnosu na koncentraciju izmerenu u vodi iz Obedske bare. Suprotno od činjenice da je u vodi iz Pančevačkog rita koncentracija gvožđa mnogo veća u odnosu na one iz Obedske bare, u jetri *N. tessellata* u prehibernacijskoj sezoni registrovana je značajno veća koncentracija ovog metala u jedinkama jedinkama ulovljenim u Obedskoj bari. U mišiću *N. natrix* posle hibernacije bioakumulirana koncentracija gvožđa bila je značajno veća u Pančevačkom ritu u odnosu na Obedsku baru. U mišićnom tkivu se takođe može uočiti da je u periodu pre hibernacije u Obedskoj bari *N. tessellata* akumulirala značajno veće koncentracije gvožđa u odnosu na *N. natrix* sa istog lokaliteta.

Izmerene koncentracije mangana u vodi iz Pančevačkog rita bile su približne u jesen i proleće (1425.36 ± 6.08 ppb \pm 1730.50 ± 2.65 ppb). U uzorku vode iz Obedske bare u jesen koncentracija mangana bila je 77.42 ± 0.63 ppb a u proleće ovaj metal nije registrovan. I u jetri i u mišiću *N. natrix* u periodu pre hibernacije bioakumulirane koncentracije mangana bile su značajno veće u jedinkama iz Obedske bare. U jetri životinja ulovljenih pre hibernacije u Obedskoj bari postoji i značajna razlika u koncentraciji akumuliranog mangana između ispitivanih vrsta. U jetri *N. natrix* izmerena je koncentracija 5.388 ± 0.268 ppb i ona je značajno veća od koncentracije koja je izmerena u jetri vrste *N. tessellata* (3.86 ± 0.053 ppb). Međutim, u periodu posle hibernacije na lokalitetu Obedska bara uočena je takođe značajna razlika između ispitivanih vrsta, ali je u ovoj sezoni *N. tessellata* u jetri akumulirala veću koncentraciju mangana u odnosu na jedinke *N. natrix*. Posle hibernacije kod vrste *N. tessellata* mangan je značajno više akumuliran u oba ispitivana tkiva u jedinkama uzorkovanim na Obedskoj bari. I u periodu posle hibernacije u Pančevačkom ritu postoji značajna razlika u akumulaciji mangana između vrsta u oba ispitivana tkiva. Tako se na ovom lokalitetu mangan više akumulira u jetri *N. tessellata* u odnosu na jetru jedinki *N. natrix*, dok je u mišiću dobijen suprotan odnos. Akumulirana koncentracija mangana u mišiću *N. natrix* (2.135 ± 0.281 ppb) statistički je veća od koncentracije izmerene u mišiću *N. tessellata* (1.144 ± 0.066).

U uzorcima vode molibden je registrovan samo u Pančevačkom rita u jesen (pre hibernacije), i njegova koncentracija iznosila je 3.99 ± 0.20 ppb. U jetri *N. tessellata* i u prehibernacijskom i u posthibernacijskom periodu značajno veće koncentracije akumulirane su u jedinkama iz Obedske bare u odnosu na jedinke iz Pančevačkog rita, dok je u mišićnom tkivu ovaj metal bio iznad praga detekcije samo kod jedinki vrste *N. natrix* koje su izlovljene na području Pančevačkog rita u periodu pre hibernacije.

Koncentracija nikla u vodi iz Pančevačkog rita u jesen (pre hibernacije) (26.38 ± 0.13 ppb) bila je skoro 10 puta veća u odnosu na koncentraciju izmerenu u vodi Obedskoe bare (2.70 ± 0.07 ppb). U periodu posle hibernacije, nikl nije detektovan u vodi ispitivanih lokaliteta. Nikl je detektovan u oba tkiva svih ispitivanih grupa, a statističkom analizom pokazano je da između lokaliteta nema razlike u bioakumulaciji. Pokazano je takođe da *N. tessellata* u jetri, u periodu pre hibernacije, na oba lokaliteta akumulira manje koncentracije ovog metala u odnosu na vrstu *N. natrix*. Pre hibernacije na lokalitetu Obedsko bara, u mišiću *N. tessellata* akumulirana je značajno veća koncentracija nikla (0.615 ± 0.058 ppb) u odnosu na koncentraciju izmerenu u mišiću *N. natrix* (0.234 ± 0.102 ppb).

Olovo je takođe detektovano samo u vodi Pančevačkog rita u jesen (period pre hibernacije) i njegova koncentracija iznosila je 80.50 ± 0.43 ppb. Ustanovljeno je da je u periodu pre hibernacije na lokalitetu Obedsko bara, u jetri *N. natrix* akumulirana veća koncentracija olova (0.654 ± 0.123 ppb) u odnosu na koncentraciju akumuliranu u jetri *N. tessellata* (0.122 ± 0.075 ppb). Olovo nije detektovano u jetri i mišiću *N. tessellata* iz Pančevačkog rita u periodu pre hibernacije, u jetri i mišiću *N. natrix* iz Obedske bare u periodu posle hibernacije, kao ni u mišiću *N. natrix* iz Obedske bare u periodu pre hibernacije.

Koncentracija cinka u vodi iz Pančevačkog rita bila je oko 4,5 puta veća od koncentracije u uzorku iz Obedske bare u jesen (pre hibernacije). U proleće (posle hibernacije) cink je bio ispod praga detekcije u uzorcima vode sa oba lokaliteta. U jetri i mišiću *N. tessellata* pre hibernacije, registrovana je veća koncentracija bioakumuliranog cinka u jedinkama iz Obedske bare. Uočava se da oba tkiva vrste *N. natrix* akumuliraju veće koncentracije cinka u odnosu na *N. tessellata* iz Pančevačkog rita u periodu pre hibernacije. Posle hibernacije jedinke *N. tessellata* iz Obedske bare u jetri akumuliraju veće koncentracije cinka u odnosu na jedinke *N. tessellata* iz Pančevačkog rita.

Prema Viarengo i sar. (1991), sezonske varijacije bioakumulacije metala mogu nastati zbog različitog fiziološkog statusa životinja (gametogeneza, rast, parenje, intenzivan unos hrane) što takođe utiče i na fluktuacije enzimske aktivnosti. Primećeno je da kod dagnji postoji manja tendencija bioakumulacije toksičnih metala u toplijem periodu, što se dovodi u vezu sa reproduktivnim ciklusom (Vlahogianni sar., 2007).

U škampima koncentracija teških metala u jetri i mišiću zavisi od sezone, tj. godišnjeg doba kada su ulovljeni. Veće koncentracije teških metala u jetri u odnosu na mišić povezane su sa fiziološkim aktivnostima ovih organa. Jetra ima važnu ulogu u akumulaciji i detoksikaciji teških metala (Olgunoğlu i sar., 2015). Manje koncentracije metala u mišiću, kao tkivu sa nižom metaboličkom aktivnošću, pokazali su Pakzadtochaei i sar. (2013). Jetra sadrži metal-vezujuće proteine, metalotionenine koji predstavljaju biomarker izlaganja teškim metalima. Ova činjenica potvrđuje da je jetra veoma dobar indikator kontaminacije metalima.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo pretpostaviti da je glavni uzrok varijabilnost u akumulaciji metala između ispitivanih vrsta prvenstveno različita ishrana ove dve vrste. Kako neki od elemenata nisu detektovani u uzorcima vode a detektovani su u tkivima, moguće je da su se oni akumulirali nekim drugim putem; kroz hranu, zemljište itd. Merenje koncentracije metala u tkivima organizama može biti indikator njihovog uticaja na sam organizam i stanje ekosistema. Međutim, pravu informaciju o potencijalnom štetnom efektu metala možemo dobiti samo sprovođenjem sveobuhvatnih studija biomarkera koji ukazuju na hemijske i fiziološke promene koje su direktna mera efekta kontaminacije na nivou organizma.

Zbog periodičnog presvlačenja koje može biti način eliminacije metala, i činjenice da su eksperimenti sprovedeni na ženjkama, koje mogu da vrše transfer teških metala u jaja, zmijske u izvesnom stepenu mogu biti tolerantne na ovu vrstu zagađenja.

Iz velikog broja studija koje su do sada sprovedene može se zaključiti da enzimi različito reaguju na prisustvo metala kao zagađivača. Nakon izlaganja metalima opisano je kako povećanje tako i smanjenje aktivnosti enzima i koncentracije neenzimskih komponenti antioksidacione zaštite. Pravilna upotreba biomarkera zahteva poznavanje fiziologije vrsta koje se ispituju, kao i ekoloških faktora koji regulišu biološki odgovor na prisutno zagađenje.

Stepen indukcije ili inhibicije određenog biomarkera zavisi od vrste, pola, nutritivnog statusa, faze reproduktivnog ciklusa, dužine izlaganja metalima, njihove koncentracije itd. Zato je u prirodnim uslovima u kojima su organizmi izloženi mešavini metala (ali i drugih supstanci), veoma teško jasno utvrditi specifičan uticaj svakog metala, kao i odgovor biomarkera. Situacija se dodatno komplikuje kumulativnim efektom, pa često samo možemo da zaključimo da je organizam došao u kontakt sa metalom ali ne i kada i koliko dugo je kontakt trajao.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu ispitivanih biomarkera oksidacionog stresa u krvi, jetri, bubregu, mišiću i masnom tkivu, kao i ispitivanja koncentracije metala u jetri i mišiću semiakvatičnih vrsta zmija *Natrix natrix* i *Natrix tessellata* sa područja Obedske bare i Pančevačkog rita u periodu pre i posle hibernacije mogu da se izvedu sledeći zaključci:

1. Postoji izražen sezonski uticaj na aktivnost Uk SOD i CuZn SOD. U jetri *N. natrix* na oba lokaliteta aktivnost je bila značajno veća u periodu posle hibernacije, dok je kod *N. tessellata* aktivnost Uk SOD i CuZn SOD značajno niža u periodu posle hibernacije. Aktivnosti Uk SOD i CuZn SOD u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* nisu se značajno razlikovale između lokaliteta u oba ispitivana perioda.
2. Aktivnost CAT u jetri, bubregu i mišiću *N. tessellata* iz Pančevačkog rita bila je veća u periodu posle hibernacije. Povećana aktivnost CAT u proleće dobijena je u jetri *N. natrix* sa Obedske bare, kao i u bubregu ove vrste sa oba ispitivana lokaliteta, predstavlja adaptaciju na povećanu stopu metabolizma posle izlaska iz stanja hibernacije. U periodu posle hibernacije aktivnost CAT u jetri, bubregu i mišiću *N. tessellata* bila je veća kod jedinki iz Pančevačkog rita. Na ovom lokalitetu aktivnost CAT bila je veća u odnosu na Obedsku baru u jetri i mišiću *N. natrix* pre hibernacije. Indukcija aktivnosti CAT ukazuje na potrebu za detoksikacijom vodonik peroksida na lokalitetu koji je izložen intenzivnom antropogenom uticaju.
3. Aktivnost GSH-Px bila je veća u periodu posle hibernacije u jetri *N. natrix* i *N. tessellata* sa oba ispitivana lokaliteta, mišiću *N. tessellata* iz Pančevačkog rita, bubregu *N. natrix* sa oba lokaliteta i bubregu *N. tessellata* iz Obedske bare. Izlazak iz hibernacije prati povećana produkcija reaktivnih vrsta kiseonika usled povećanja nivoa aerobnog metabolizma, pa povećana aktivnost GSH-Px

predstavlja efikasnu adaptivnu strategiju u borbi protiv slobodnih radikala. Smanjena aktivnost GSH-Px u Pančevačkom ritu detektovana u krvi obe vrste u periodu pre hibernacije, kao i u jetri i masnom tkivu *N. natrix* posle hibernacije, mišiću *N. natrix* pre hibernacije i bubregu *N. tessellata* posle hibernacije verovatno je rezultat dejstva teških metala ili pesticida na sintezu enzima.

4. Ne može se uočiti jedinstven obrazac sezonske promene aktivnosti GR koja značajno varira u zavisnosti od ispitivanog tkiva ili vrste. Indukcija aktivnosti GR u jetri, bubregu i masnom tkivu *N. natrix* pre hibernacije i bubregu *N. tessellata* u oba ispitivana perioda u Pančevačkom ritu rezultat je povećane potrošnje GSH, najvažnijeg ćelijskog niskomolekulskog antioksidansa, u prooksidacionim uslovima.
5. Značajno niža koncentracija SH grupa u Pančevačkom ritu u jetri, bubregu, mišiću i masnom tkivu *N. natrix* pre hibernacije i *N. tessellata* posle hibernacije može da ukazuje na narušenu regulaciju redoks zavisnih procesa izazvanu metalima.
6. Povećan nivo biomarkera oksidacionih oštećenja, TBARS, u Pančevačkom ritu zabeležen je kod *N. tessellata* u krvi u periodu posle hibernacije, bubregu pre hibernacije i masnom tkivu u obe ispitivane sezone. Kod *N. natrix* u krvi, jetri i masnom tkivu postoji značajno smanjenje nivoa TBARS u Pančevačkom ritu, što ukazuje da se ova vrsta uspešnije suprotstavlja oksidacionom stresu, najverovatnije indukcijom enzima SOD i CAT.
7. U periodu pre hibernacije, nivo ekspresije enzima faze I biotransformacije CYP1A u jetri *N. tessellata* bio je značajno veći kod zmija iz Obedske bare, dok u periodu posle hibernacije nije bilo značajne razlike između lokaliteta.
8. Aktivnost enzima faze II biotransformacije GST pokazuje različit obrazac promene aktivnosti u zavisnosti od vrste. U jetri i bubregu obe ispitivane vrste iz

Obedske bare, aktivnost GST značajno je niža u posthibernacijskom periodu u odnosu na period pre hibernacije.

9. U krvi *N. tessellata* u obe sezone, krvi *N. natrix* u periodu pre hibernacije i jetri obe ispitivane vrste u periodu posle hibernacije, aktivnost ChE bila je inhibirana kod jedinki iz Pančevačkog rita. Inhibicija ChE uočena je i na lokalitetu Obedsko bara, u krvi *N. natrix* posle hibernacije, bubregu i mišiću pre hibernacije kao i u bubregu *N. tessellata* posle hibernacije. Inhibicija ChE može biti direktna posledica prisustva pesticida kojima se tretiraju obradive površine.
10. U jetri jedinki *N. natrix* u oba ispitivana perioda, kao i kod *N. tessellata* u preiodu posle hibernacije zabeležen je značajno povećan nivo ekspresije MT na lokalitetu Obedska bara. Ovo može biti direktan odgovor na unutarćelijsko povećanje koncentracije metala.
11. U periodu pre hibernacije, u jetri *N. natrix* koncentracija mangana je bila značajno viša u jedinkama iz Obedske bare, dok je koncentracija aluminijuma bila viša u jetri jedinki iz Pančevačkog rita. U jetri jedinki vrste *N. tessellata* u periodu pre hibernacije, koncentracije gvožđa, molibdena i cinka bile su takođe značajno više u Obedskoj bari u odnosu na Pančevački rit. U jetri jedinki *N. narix* posle hibernacije nisu uočene značajne razlike u bioakumulaciji elemenata između lokaliteta. Izmerene koncentracije bakra, mangana, molibdena i cinka u jetri *N. tessellata* posle hibernacije bile su takođe značajno više u jedinkama iz Obedske bare.
12. Kanonijskom diskriminacionom analizom utvrđene su interspecijske razlike. Ovom analizom pokazano je da u sva četiri ispitivana tkiva u periodu posle hibernacije postoji izražena specifičnost vrsta sa jasnom diskriminacijom ispitivanih lokaliteta. U periodu pre hibernacije, u jetri, mišiću i masnom tkivu postoji delimično preklapanje varijabilnosti *N. tessellata* iz Obedske bare i Pančevačkog rita, dok je u bubregu zapaženo delimično preklapanje *N. natrix* i *N. tessellata* iz Pančevačkog rita.

OPŠTI ZAKLJUČAK

Istraživanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji pokazala su da biomarkeri oksidacionog stresa, biotransformacije i neurotoksičnosti u ispitivanim vrstama zmija - belouška (*Natrix natrix*) i ribarica (*Natrix tessellata*) ispoljavaju varijacije u zavisnosti od ispitivane vrste, sezone, tkiva (krv, jetra, bubreg, mišić i masno tkivo), kao i u zavisnosti od ispitivanog lokaliteta, a samim tim i kompozicije metala u životnoj sredini. Utvrđen je različit stepen akumulacije metala u ispitivanim tkivima, koji ne korelira u potpunosti sa koncentracijom metala izmerenom u životnoj sredini; ovo je rezultat individualne varijabilnosti i uticaja složenih ekoloških faktora. Pokazano je da metali prisutni u ćelijama mogu da moduliraju intenzitet i smer promena ispitivanih biomarkera. Obzirom da se radi o prvoj detaljnoj studiji istraživanih biomarkera kod navedene dve vrste ispitivanih zmija, rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju dobru polaznu osnovu za dalja istraživanja u oblasti ekofiziologije i ekotoksikologije zmija.

7. LITERATURA

1. ABDEL-HALIM, K.Y., SALAMA, A.K., EL-KHATEEB, E.N. and BAKRY, N.M. (2006): Organophosphorus pollutants (OPP) in aquatic environment at Damietta Governorate Egypt: Implications for monitoring and biomarker responses. *Chemosphere* 63, 1491-1489.
2. ADAMS, S.M., GIESY, J.P., TREMBLAY, L.A. and EASON, C.T. (2001): The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. *Biomarkers* 6, 1-6.
3. ALBRECHT, J., ABALOS, M. and RICE, T.M. (2007): Heavy metal levels in ribbon snakes (*Thamnophis sauritus*) and anuran larvae from the Mobile-Tensaw River Delta, Alabama, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 647-654.
4. AL-GHAIS, S.M. (2013): Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 74, 183-186.
5. AL-KAHTANI, M.A. (2009): Accumulation of heavy metals in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) from Al-Khadoud Spring, Al-Hassa, Saudi Arabia. *Am. J. Appl. Sci.* 6, 2024-2029.
6. ALKALADI, A., MOSLEH, Y.Y.I. and AFIFI, M. (2013): Biochemical and histological biomarkers of Zn pollution in Nile Tilapia, (*Oreochromis niloticus*). *Arch. Sci.* 66, 295-311.
7. AMARAL, M.J., BICHO, R.C., CARRETERO, M.A., SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C., FAUSTINO, A.M., SOARES, A.M. and MANN, R.M. (2012): The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies: part 2 - biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards. *Chemosphere* 87, 765-774.
8. AMARAL, M.J., SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C., BICHO, R.C., CARRETERO, M.A., VALENTE, R., FAUSTINO, A.M., SOARES, A.M. and MANN, R.M. (2012): Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei* Seoane) exposed to chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2345-2353.

9. AMEUR, B.W., DE LAPUENTE, J., MEGDICHE, Y.E., BARHOUMI, B., TRABELSI, S., CAMPS, L., SERRET, J., RAMOS-LÓPEZ, D., LINARES, J.G., DRISS, M.R. and BORRÀS, M. (2012): Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). *Mar. Poll. Bull.* 64, 241-251.
10. ARENAS, F.A, DÍAZ, W.A., LEAL, C.A., PÉREZ-DONOSO, J.M., IMLAY, J.A. and VÁSQUEZ, C.C. (2010): The *Escherichia coli* *E* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 690-694.
11. ARNOLD, E.N. and OVENED. D. (2002): *Reptiles and Amphibians of Europe*. Pinceton University Press, Pinceton, USA.
12. AYALA, A., MUÑOZ, F.M. and ARGÜELLES, S. (2014): Review article lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* doi: 10.1155/2014/360438.
13. BAGENAL, T.B. and TESCH, F.W. (1978): Age and Growth. In: Begenal, T. (Ed.), *Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters*. 3rd ed. IBP Handbook No. 3, Oxford, Blackwell Science Publications, pp. 101-136.
14. BAGNYUKOVA, T.V., STOREY, K.B. and LUSHCHAK, V.I. (2003): Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *J. Therm. Biol.* 28, 21-28.
15. BANDIERA, S.M. (2001): Cytochrome P450 enzymes as biomarkers of PCB exposure and modulators of toxicity. In: *PCBs Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects*. (Eds. Robertson, L.W. , Hansen L.G), Lexington-Fayette: University Press of Kentucky pp. 185-192.
16. BAUDRIMONT, M., METIVAUD, J., MAURY-BRACHET, R., RIBEYRE, F. and BOUDOU, A. (1997): Bioaccumulation and metallothionein response in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2096-2105.
17. BAUWENS, D. (1981): Survivorship during hibernation in the European common lizard, *Lacerta vivipara*. *Copeia* 3, 741-744.

18. BOCQUENÉ, G., BELLANGER, C., CADIOU, Y. and GALGANI, F. (1995): Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* 4, 266-279.
19. BÖLCK, B., IBRAHIM, M., LU-HESSELMANN, J., STEINRITZ, D. and SUHR, F. (2014): Detection of free radical reaction products and activated signalling molecules as biomarkers of cell damage in human keratinocytes upon lead exposure. *J. Mol. Biomark. Diagn.* 5, 179. doi: 10.4172/2155-9929.1000179
20. BORCHERT, A., WANG, C.C., UFER, C., SCHIEBEL, H., SAVASKAN, N.E. and KUHN, H. (2006): The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase isoforms in murine embryogenesis. *J. Biol. Chem.* 281, 19655-19664.
21. BOULENGER, G.A. (2000). *The snakes of Europe*. Landisville, PA, Arment Biological Press.
22. BRUCKA-JASTRZEBSKA, E. and KAWCZUGA, D. (2011): Antioxidant status and lipid peroxidation in blood of common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Pol. J. Environ. Stud.* 20, 541-550.
23. BRUNO, S. AND MAUGERI, S. (1990): *Serpenti d'Italia e d'Europa*. Editoriale Giorgio Mondadori, Milano, Italy.
24. BRYAN, A.M., OLAFSSON, P.G. and STONE, W.B. (1987): Disposition of low and high environmental concentrations of PCBs in snapping turtle tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 1000-1005.
25. BUONOCORE, G., PERRONE, S. and TATARANNO, M.L. (2010): Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med.* 15, 186-190.
26. BURGER, J. (1992): Trace element levels in pine snake hatchlings: tissue and temporal differences. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 209-213.
27. BURGER, J. and GOCHFELD, M. (2004): Bioindicator for assessing human and ecological health. In: *Environmental Monitoring* (Ed. Wiersma, B.) CRC Press, pp. 541-567.
28. BURGER, J., CAMPBELL, K.R., CAMPBELL, T.S, SHUKLA, T., JEITNER, C. and GOCHFELD, M. (2005): Use of skin and blood as nonlethal indicators of heavy metal contamination in northern water snakes (*Nerodia sipedon*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 232-238.

29. BURGER, J., MURRAY, S., GAINES, K.F., NOVAK, J.M., PUNSHON, T., DIXON, C. and GOCHFELD, M.(2006): Element levels in snakes in South Carolina: difference between a control site and exposed site on the Savannah River site. *Environ. Monit. Assess.*112, 35-52.
30. BUSCHFORT, C.M., MÜLLER, R., SEEBER, S., RAJEWSKY, M.F. and THOMALE, J. (1997): DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res.* 57, 651-658.
31. CADENAS, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 79-110.
32. CAKIĆ, P. and HRISTIĆ,DJ. (1987): The ichthyofauna of Pančevački Rit wetlands (Belgrade) with special reference to the allochthonous fish species. *Bulletin of the Natural History Museum, Belgrade B* 42, 103-118.
33. CAMPBELL, K.R. and CAMPBELL T.S. (2001): The accumulation and effects of environmental contaminants on snakes: a review. *Environ.Monit. Assess.*, 70, 253-301.
34. CAMPBELL, K.R., CAMPBELL, T.S. and BURGER, J. (2005): Heavy metal concentrations in northern water snakes (*Nerodia sipedon*) from East Fork Poplar Creek and the Little River, East Tennessee, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49, 239-248.
35. CARLSSON, M., KARVEMO, S., TUDOR, M., SLOBODA, M. MIHALCA, A.D., GHIRA, I. BEL, L. and MODRY D. (2011): Monitoring a large population of dice snakes at Lake Sinoe in Dobrogea, Romania. *Mertensiella* 18, 237-244.
36. CARVALHO-NETA, R.N.F and ABREU-SILVA, A.L. (2013): Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 41, 217-225.
37. CHEN, C., WU, C., LU, X., YAN, Z., GAO, J., ZHAO, H. and LI, S. (2013): Coniferyl ferulate, a strong inhibitor of glutathione S-transferase isolated from radix *Angelicae sinensis*, reverses multidrug resistance and down regulates P-glycoprotein. *Evid. Based. Complement Alternat. Med.* 1-10.

38. CHEN, H. and JUCHAU, M.R. (1997): Glutathione S-transferases act as isomerases in isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro. *Biochem. J.* 327, 721-726.
39. CHERIAN, M.G., JAYASURYA, A and BAY, B.H. (2003): Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat. Res.* 533, 201-209.
40. CHITMANAT, C., PRAKOB SIN, N., CHAIBU, P. and TRAICHA IYAPORN, S. (2008): The use of acetylcholinesterase inhibition in river snails (*Sinotaia ingallsiana*) to determine the pesticide contamination in the upper Ping River. *Int. J. Agri. Biol.* 10, 658-660.
41. CHOI, J. (2004): Biomarkers in environmental monitoring and its application in *Chironomus* spp. In: *Ecological Issues in a Changing World: Status, Response and Strategy* (Eds. Hong S, Lee, J. A., Ihm, B., Farina, A., Son, Y., Kim, E., Choe, J.C.) pp. 425.
42. CLAIBORNE, A. (1984): Catalase activity. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (Ed. R.A. Greenwald), CRC Press Inc, Boca Raton. 283-284.
43. CLARKE R. (2002): Yugoslavia. In: *Environmental Problems of East Central Europe* (Eds. Carter, F.W and Turnock, D.) 2 nd edition. NY& London: Routledge pp. 396-416.
44. ÇOKUĞRAŞ, A.N. (2003): Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk. J. Biochem.* 28, 54-61.
45. CORSI, I., MARIOTTINI, M., SENSINI, C., LANCINI, L. and FOCARDI, S. (2003): Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon. Italy. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 203-212.
46. COSSU C., DOYOTTE, A., JACQUIN, M.C., BABUT, M., EXINGER, A. and 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. *Ecotox. Environ. Safe.* 38, 122-131.

47. COSSU, C., DOYOTTE, A., JACQUIN, M.C., BABUT, M., EXINGER, A. and 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 122-131.
48. DAVE, K.R., SYAL, A.R. and KATYARE, S.S. (2000): Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Z. Naturforsch. C.* 55, 100-108.
49. DETHLOFF, G.M., H.C. BAILEY and MAIER, K.J.(2001): Effects of dissolved copper on select hematological, biochemical and immunological parameters of wild rainbow trout (*Onchyrhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40: 371-380.
50. ĐORĐEVIĆ M., ANTUNOVIĆ M., RUSIĆ B., DENIĆ K. and ĐORĐEVIĆ S. (2014): Diagnostic value of cholinestase activity. *MD-Medical Data* 6, 143-146.
51. DOYOTTE, A., COSSU, C., JACQUIN, M.C., BABUT, M. and VASSEUR, P. (1997): Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* 39, 93-110.
52. DRABKIN, D.L. and AUSTIN, J.H. (1935): Spectrophotometric studies. Preparations from washed blood cells; Nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J. Biol. Chem.*,112, 51-65.
53. DÜRR, U.H.N., WASKELL, L. and RAMAMOORTHY, A. (2007): Review The cytochromes P450 and b5 and their reductases-Promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 3235-3259.
54. DURUIBE, J.O., OGWUEGBU, M.O.C. and EGWURUGWU, J.N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int. J. Phys. Sci.* 2, 112-118.
55. DVIR, H., SILMAN, I., HAREL, M., ROSENBERRY, T.L. and SUSSMAN J.L. (2010): Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem. Biol. Interact.* 187, 10-22.

56. EATON, D.L. and BAMMLER, T.K. (1999): Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.* 49, 156-164.
57. EL-BELTAGI, H.S. and MOHAMED, H.I. (2013): Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Not. Bot. Horti. Agrobi.* 41,44.
58. ELLMAN, G.L.(1959):Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
59. ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V.JR. and FEATHERSTONE, R.M. (1961). Determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
60. ERCAL, N., GURER-ORHAN, H. and AYKIN-BURNS, N. (2001): Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top Med. Chem.* 1, 529-539.
61. ESTERBAUER, H. and ZOLLNER, H. (1989): Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med.* 7, 197-203.
62. ESTERBAUER, H., ECKL, P. and ORTNER, A. (1990): Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat. Res.*, 238, 223-233.
63. EZEJIOFOR, T.I.N., EZEJIOFOR, A.N., UDEBUANI, A.C., EZEJI, E.U., AYALOGBU, E.A., AZUWUIKE, C.O, ADJERO, L.A., IHEJIRIKA, C.E. UJOWUNDU, C.O., NWAOGU, L.A. and NGWOGU, K.O. (2013): Environmental metals pollutants load of a densely populated and heavily industrialized commercial city of Aba, Nigeria. *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* 5, 1-11.
64. FAZIO, F., CECCHINI, S., FAGGIO, C., CAPUTO, A.R. and PICCIONE, G. (2014): Stability of oxidative stress biomarkers in flathead mullet, *Mugil cephalus*, serum during short-term storage. *Ecol. Indic.* 46, 188-192.
65. FILHO, D., TORRES, M.A., TRIBESS, T.B., PEDROSA, R.C. and SOARES, C.H.L. (2001): Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish Acara (*Geophagus brasiliensis*). *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 34, 719-726.
66. FILIPPI, E., CAPULA, M., LUSELLI, L. and AGRIMI, U. (1996): The prey spectrum of *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) and *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768) in sympatric populations (Squamata: Serpentes: Colubridae). *Herpetozoa* 8, 155-164.

67. FLORA, S.J., MITTAL, M. and MEHTA, A. (2008): Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128, 501-523.
68. GABRYELAK, T., PIATKOWSKA, M., LEYKO, W. and PÉRÈS, G. (1983): Seasonal variations in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol. C* 75, 383-385.
69. GALLAGHER, E.P., GROSS, T.S. and SHEEHY, K.M. (2001): Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in Lake Apopka brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). *Aquat. Toxicol.* 55, 223-237.
70. GALLOGLY, M.M. and MIEYAL, J.J. (2007): Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 381-391.
71. GEORGE, S.G. (1994): Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: *Aquatic Toxicology. Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives* (Eds. Malins, D.C., Ostrander, G.K.) CRC Press, Boca Raton, 37-85.
72. GEORGE, S.G. and LANGSTON, W.J. (1994) Metallothionein as an indicator of water quality: assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In: *Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Systems: Linking Levels of Organisation* (ed. Sutcliffe D.W.), Ambleside, Cumbria, pp 138–153.
73. GERET, F., SERAFIM, A. and BEBIANNO, M.J. (2003): Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicology*, 12, 417-426.
74. GHIRA, I., BUTANESCU, D. and MAROSI, B. (2009): Feeding behavior of the Dice Snake (*Natrix tessellata*). *Herpetologica Romanica*, 3, 1-7.
75. GLATZLE, D., VUILLEUMIER, J.P., WEBER, F. and 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.

76. GOCMEN, B., CICEK, K., YILDIZ, M.Z., ATATUR, M.K., DINCASLAN Y. E. and MEBERT, K. (2011): A Preliminary study on the feeding biology of the Dice Snake, *Natrix tessellata*, in Turkey. *Mertensiella* 18, 365-369.
77. GOEPTAR, A.R., SCHEERENS, H. and VERMEULEN, N.P.E. (1995): Oxygen reductase and substrate reductase activity of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 25-65.
78. GORBI, S., BALDINI, C. and REGOLI, F. (2005): Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and Striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49, 62-70.
79. GREGORY, P.T. and ISAAC, L.A. (2004): Food habits of the Grass Snake in southeastern England: Is *Natrix natrix* a generalist predator? *J. Herp.* 38. 88-95.
80. GRIFFITH, O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.
81. GRUSCHWITZ, M., LENZ, S., MEBERT, K. and LANKA, V. (1999): *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768) - Würfelnatter. In: *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*. (Ed. Böhme, W.), Band 3/IIA: Schlangen II, Aula, Wiebelsheim, Germany pp. 581-644.
82. GUCKIND, D. and JOGER, U. (2011): A range-wide molecular phylogeography of *Natrix tessellata*. *Mertensiella* 18, 1-10.
83. GUICKING, D., LAWSON, R., JOGER, U. and WINK, M. (2006): Evolution and phylogeny of the genus *Natrix* (Serpentes: Colubridae). *Biol. J. Linn. Soc.* 87, 127-143.
84. GUICKING, D., JOGER, U. and WINK, M. (2009): Cryptic diversity in a Eurasian water snake (*Natrix tessellata*, Serpentes: Colubridae): Evidence from mitochondrial sequence data and nuclear ISSR-PCR fingerprinting. *Org. Divers. Evol.* 9, 201-214.
85. GUILHERME, S., VÁLEGA M., PEREIRA M.E., SANTOS M.A. and PACHECO, M.(2008): Antioxidant and biotransformation responses in *Liza aurata* under environmental mercury exposure – Relationship with mercury accumulation and implications for public health. *Mar. Poll. Bull.* 56 845-859.

86. HABIG, W.H., PABST, M.J. and JAKOBY, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
87. HALL, R.J. (1980): Effects of environmental contaminants on reptiles: a review. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, special scientific report - wildlife. Washington D.C., USA.
88. HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. (2007): *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford University Press Inc., New York, USA.
89. HALLORAN, M., PARAKH, S. and ATKIN, J.D. (2013): The role of S-nitrosylation and S-glutathionylation of protein disulphide isomerase in protein misfolding and neurodegeneration. *Int. J. Cell Biol.*, 1-15.
90. HALUSKOVÁ, L., VALENTOVICOVÁ, K., HUTTOVÁ, J., MISTRÍK, I. and TAMÁS, L. (2009): Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 1069-1074.
91. HANSEN, B.H., ROMMA, S., GARMO, O.A., OLSVIK, P.A. and ANDERSEN, R.A. (2006): Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (*Salmo trutta*) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 263-274.
92. HANSEN, R.E., ROTH, D. and WINTHER, J.R. (2009): Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 13, 422-427.
93. HECKER, M., MURPHY, M.B., GIESY, J.P. and HOPKINS, W.A. (2006): Induction of cytochrome P4501A in African brown house snake (*Lamprophis fuliginosus*) primary hepatocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 496-502.
94. HELSEL, D.R. (1990): Less than obvious. Statistical treatment of data below the detection limit. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1767-1774.
95. HERMES-LIMA, M. and STOREY, K.B. (1993): Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol.* 265, 646-652.
96. HERMES-LIMA, M. and ZENTENO-SAVÍN, T. (2002): Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 537-556.

97. HOPKINS, W.A. (2000): Reptile toxicology: Challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environ.Toxicol. Chem.* 19, 2391-2393.
98. HOPKINS, W.A., WINNE, C.T. and DURANT, S.E. (2005): Differential swimming performance of two natricine snakes exposed to a cholinesterase-inhibiting pesticide. *Environ. Pollut.*, 133, 531-540.
99. HSU, M.J., SELVARAJ, K. and AGORAMOORTHY, G. (2006): Taiwan's industrial heavy metal pollution threatens terrestrial biota. *Environ. Pollut.*, 143, 327-334.
100. HUANG, G.Y., YING, G.G. LIANG Y.Q., LIU, S.S. and LIU, Y.S. (2014): Expression patterns of metallothionein, cytochrome P4501A and vitellogenin genes in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) in response to heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 105, 97-102.
101. HUIBREGTSE, J.M., ENGELKE, D.R. and THIELE, D.J. (1989): Copper-induced binding of cellular factors to yeast metallothionein upstream activation sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 65-69.
102. ICIEK, M. and WLODEK, L. (2001): Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol. J. Pharmacol.* 53, 215-225.
103. JAKIMSKA, A., KONIECZKA, P., SKORA, K. and NAMIESNIK, J. (2011): Bioaccumulation of metals in tissues of marine animals, part II: metal concentrations in animal tissues. *Environ. Stud.* 20, 1127-1146.
104. JANDZÍK, D. (2005): Record of a black-coloured *Natrix* in northeastern Turkey, with comments on the validity of the Bigheaded Grass Snake, *Natrix megaloccephala* Orlov & Tunijev, 1987. *Zool. Middle East* 34, 27-34.
105. JEBALI, J., KHEDHER, S.B., SABBAGH. M., KAMEL, N., BANNI, M. and BOUSSETTA, H. (2013): Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination. *JICZM*, 13, 525-537.
106. JELODAR, H.T. and FAZLI, H. (2012): Monthly changes in condition, hepatosomatic index and bioavailability in frogs (*Rana ridibunda*). *Res. J. Biol.* 2, 9-14.

107. JEWELL, C.S.E., CUMMINGS, L.E., RONIS, M.J.J. and WINSTON, G.W. (1989): The hepatic microsomal mixed-function oxygenase (MFO) system of *Alligator mississippiensis*: Induction by 3-methylcholanthrene (MC). *Xenobiotica* 19, 1181-1200.
108. JIN, X., KENNEDY, S.W., MUCCIO, T.D. and MOON, T.W. (2001): Role of oxidative stress and antioxidant defense in 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced toxicity and species-differential sensitivity in chicken and duck embryos. *Toxicol. Appl. Pharm.* 172, 241-248.
109. JOMOVA, K. and VALKO, M. (2011): Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65-87.
110. JONES, D.E. AND HOLLADAY, S.D. (2006): Excretion of three heavy metals in the shed skin of exposed corn snakes (*Elaphe guttata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 221-225.
111. KÄGI, J.H. (1991): Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* 205, 613-26.
112. KHANSARI, F.E., GHAZI-KHANSARI, M. and ABDOLLAHI, M. (2005): Heavy metals content of canned tuna fish. *Food Chem.* 93, 293-296.
113. KOVAČEVIĆ, T.B., BORKOVIĆ, S.B., PAVLOVIĆ, S.Z., RADOJIČIĆ, R.M. and SAIČIĆ, Z.S. (2006): The concentrations of antioxidant compounds in the hepatopancreas, the gills and muscle of some freshwater crayfish species. *Acta Biol. Hung.* 57, 449-458.
114. KRUIDENIER, L. and VERSPAGET, H.W. (2002): Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1997-2015.
115. KULIKOWSKA-KARPIŃSKA, E. and MONIUSZKO-JAKONIUK, J. (2001): Lead and zinc influence on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde concentrations. *Pol. J. Environ. Stud.* 10, 161-165.
116. KUMARI, K., KHARE, A. and DANGE, S. (2014): The applicability of oxidative stress biomarkers in assessing chromium induced toxicity in the fish *Labeo rohita*. *Biomed. Res. Int.* doi: 10.1155/2014/782493.

- 117.LABRADA-MARTAGÓN, V., TENORIO-RODRÍGUEZ, P.A., MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, L.C. and ZENTENO-SAVÍN, T. (2011): Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comp. Biochem. Physiol. C* 154, 65-75.
- 118.LANGSTON, W.J., CHASMAN, B.S., BURT, G.R., POPE, N.D. and MCEVOY, J. (2002): Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames estuary: an indicator of environmental quality? *Mar. Environ. Res.*, 53, 263-293.
- 119.LARISON, J.R., LIKENS, E., FITZPATRICK, J.W. and CROCK, J.G. (2000): Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado rocky mountains. *Nature*, 406,181-183.
- 120.LEE, H.S. and YANG, M. (2008): Applications of CYP-450 expression for biomonitoring in environmental health. *Environ. Health Prev. Med.*13, 84-93.
- 121.LEVIN, E.D., BRADY, T.C., HOCHREIN, E.C., OURY, T.D., JONSSON, L.M., MARKLUND, S.L. and CRAPO, J.D. (1998): Molecular manipulations of extracellular superoxide dismutase: functional importance for learning. *Behav. Genet.* 28, 381-390.
- 122.LIONETTO, M., CARICATO, R., GIORDANO, M. and SCHETTINO, T. (2005): Acetylcholinesterase as biomarker in environmental biomonitoring. In: *Recent trends in the acetylcholinesterase system*, (Eds. Parveen, M. and Kumar, S.) IOS Press, Amsterdam, pp. 91-102.
- 123.LIONETTO, M.G., CARICATO, R., CALISI, A., GIORDANO, M.E. and SCHETTINO, T. (2013): Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: New insights and future perspectives. *BioMed Res. Int.*, 2013, 1-8.
- 124.LIONETTO, M.G., CARICATO, R., GIORDANO, M.E., PASCARIELLO, M.F., MARINOSCI, L. and SCHETTINO, T. (2003): Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzyme activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar. Poll. Bull.* 46, 324-330.
- 125.LIVINGSTONE, D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.

126. LOCK, E.A. and REED, C.J. (1998): Xenobiotic metabolizing enzymes of the kidney. *Toxicol. Pathol.* 26, 18-25.
127. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
128. LUISELLI, L. and RUGIERO, L. (2005): Individual reproductive success and clutch size of a population of the semi-aquatic snake *Natrix tessellata* from central Italy: are smaller males and larger females advantaged? *Rev. Ecol.* 60, 77-81.
129. LUSHCHAK, V.I. (2011): Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 153, 175-190.
130. MADSEN, N.B. (1991): Glycogen phosphorylase and glycogen synthetase. In: *A Study of Enzymes, Vol. 2.* (Ed. Kuby, S.A.). CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A. pp. 139-158.
131. MADSEN, T. (1983): Growth rates, maturation and sexual size dimorphism in a population of grass snakes, *Natrix natrix*, in southern Sweden. *Oikos* 40, 277-282.
132. MANDUZIO, H., MONSINJON, T., GALAP, C., LÉBOULENGER, F. and ROCHER, B. (2004): Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn- superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat. Toxicol.*, 70, 83-93.
133. MANI, R., MEENA, B., VALIVITTAN, K. and SURESH, A. (2014): Glutathione-S-transferase and catalase activity in different tissues of marine catfish *Arius arius* on exposure to cadmium. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6, 326-332.
134. MARAL, J., PUGET, K. and MICHELSON, A.M. (1977): Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different mammals. *BBRC*, 77, 1525-1535.
135. MARGARITIS, A., PRIORA, R., FROSALI, S., DI GIUSEPPE, D., SUMMA, D., COPPO, L., DI STEFANO, A. and DI SIMPLICIO, P. (2011): The role of protein sulfhydryl groups and protein disulfides of the platelet surface in aggregation processes involving thiol exchange reactions. *Pharmacol. Res.* 63, 77-84.
136. MARGOSHES, M. and VALLEE, B.L. (1957): A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814.

137. MARKOVIĆ, G.S., ĆIRKOVIĆ, M.A., MALETIN, S.A. and MILOŠEVIĆ, N.J. (2010): A contribution to the data on tench (*Tinca tinca* L., cyprinidae, pisces) distribution in serbia. Proc. Nat. Sci, 118, 127-142.
138. MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., MORALES, A.E. and SANZ, A. (2005): Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Rev. Fish Biol. Fish. 15, 75-88.
139. MATÉS, J.M. (2001): Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 153, 83-104.
140. MATOVIĆ, V., PLAMENAC-BULAT, Z. i ĐUKIĆ, D. (2004): Uticaj povećanog unošenja kadmijuma na antioksidativni zaštitni sistem. Jugoslov. Med. Biohem. 23, 117-126.
141. MATTHEW T. A. (2007). Advances in molecular biology of hibernation in mammals. *BioEssays*, 29, 431-440.
142. MDEGELA, R.H., BRAATHEN, M., MOSHA, R.D., SKAARE, J.U. and SANDVIK, M. (2010): Assessment of pollution in sewage ponds using biomarker responses in wild African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) in Tanzania. *Ecotoxicology* 19, 722-734.
143. MEBERT, K. (2007): The dice snake at Lake Brienz. Annual Publication for the Conservation of the Lakes Brienz and Thun, UTB Thun, Switzerland.
144. MEBERT, K. (2011): Geographic variation of morphological characters in the dice snake (*Natrix tessellata*). *Mertensiella* 18, 11-19.
145. MEBERT, K. (2011): The Dice Snake, *Natrix tessellata*: Biology, Distribution and Conservation of a Palaearctic Species. *Mertensiella* 18, DGHT, Rheinbach, Germany.
146. MICHAEL, S., DENISON, M.S. and NAGY, S.R. (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 10, 309-334.

147. MIHAILOVIĆ, M., PETROVIĆ, M., GRDOVIĆ, N., DINIĆ, S., USKOKOVIĆ, A., VIDAKOVIĆ, M., GRIGOROV, I., BOGOJEVIĆ, D., IVANOVIĆ-MATIĆ, S., MARTINOVIĆ, V., ARAMBAŠIĆ, J., JOKSIMOVIĆ, D., LABUS-BLAGOJEVIĆ, S. and POZNANOVIĆ, G. (2010): CYP1A and metallothionein expression in the hepatopancreas of *Merluccius merluccius* and *Mullus barbatus* from the Adriatic Sea. J. Serb. Chem. Soc., 75, 1149-1159.
148. MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay of superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 247, 3170-3175.
149. MONOSTORY, M. and PASCUSI, J.M. (2008): Regulation of drug-metabolizing human cytochrome P450s. Acta. Chim. Slov. 55, 20-37.
150. NEUMANN, C. AND MEBERT, K. (2011): Migration behavior of endangered dice snakes (*Natrix tessellata*) at the River Nahe, Germany. Mertensiella 18, 39-48.
151. NIELSON, K. B. and WINGE, D. R. (1983): Order of metal binding in metallothionein. J. Biol. Chem. 258, 13063-13069.
152. NISHIHARA, T., SHIMAMATO, T., WEN, K.C. and KONDO M. (1985): Accumulation of lead, cadmium and chromium in several organs and tissues of carp. J. Hyg. Chem., 31, 119-123
153. OHKAWA, H., OKISHI, N. and YOGI, K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95, 351-358.
154. OLGUNOĞLU, M.P., OLGUNOĞLU, İ.A. and BAYHAN, Y.K. (2015): Heavy metal concentrations (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) in Giant Red Shrimp (*Aristaeomorpha foliacea* Risso 1827) from the Mediterranean Sea. Pol. J. Environ. Stud. 24, 631-635.
155. ORLOV, N.L. and TUNIJEV, B.S. (1987): Nowyj wid uza *Natrix megalcephala* sp. nov. s Kawkaza (Ophidia: Colubridae). Tr. Zool. Inst. AN USSR, 158, 116-130.
156. ORR, A.L., LOHSE, L.A., DREW, K.L. and HERMES-LIMA, M. (2009): Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. Comp. Biochem. Physiol. A 153, 213-221.

157. PAKZADTOOCHAEI, S., RIGHI, M., RAHDARI, A. and KARAMI, R. (2013). A study on concentration of heavy metals (Pb, Ni, Cu, Fe, and Zn) in liver and muscle tissues of loach fish (*Paracobitis rhadinaea*) in Sistan's Chahnimeh reservoirs, Iran. J. Nov. Appl Sci., 2, 644-649.
158. PARK, H., AHN, IY., KIM, H., LEE, J. and SHIN, S.C. (2009): Glutathione S-transferase as a biomarker in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* after exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254. Comp. Biochem. Physiol. C 150, 528-536.
159. PASTORE, A., FEDERICI, G., BERTINI, E. and PIEMONTE, F. (2003): Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. Clin. Chim. Acta, 333, 19-39.
160. PAYNE JF, MATHIEU A, MELVIN W, FANCEY LL (1996): Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. Mar. Poll. Bull., 32, 225-231.
161. POMPELLA, A., VISVIKIS, A., PAOLICCHI, A., DE TATA, V. and CASINI, A.F. (2003): The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem. Pharmacol. 66, 1499-1503.
162. POUGH, H.F., ANDREWS, R. M., CADLE, J. E., CRUMP, M. L., SAVITSKY, A. H. and WELLS, K. D. (2004): Herpetology; Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, pp. 726.
163. PRATI HAR, S. and BHATTACHARYA, T. (2010): Antioxidant activity and lipid peroxidation status during the period of hibernation in Indian Pond frog, *Euphlytes hexadactyla* Lesson, 1834. Russ. J. Herpet. 17, 101-104.
164. QIN, Y.Y., LEUNG, C.K.M. LEUNG, A.O.W., WU, S.C., ZHENG, J.S. and WONG, M.H. (2010). Persistent organic pollutants and heavy metals in adipose tissues of patients with uterine leiomyomas and the association of these pollutants with seafood diet, BMI, and age. Environ. Sci. Pollut. Res. 17, 229-240
165. REGOLI, F. and PRINCIPATO, G. (1995): Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metal under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. Aquatic Toxicol. 31, 143-164.

166. REZAIIE-ATAGHOLIPOUR, M., RIYAHIBAKHTIARI, A., SAJJADI, M., KONG YAP, C., GHAFFARI, S., EBRAHIMI-SIRIZI, Z. and GHEZELLOU, P. (2012): Metal concentrations in selected tissues and main prey species of the annulated sea snake (*Hydrophis cyanocinctus*) in the Hara Protected Area, northeastern coast of the Persian Gulf, Iran. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 416-421.
167. ROBILLARD, S., BEAUCHAMP, G. and LAULIER, M. (2003): The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anadonta cygnea* at three different exposure sites. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135, 49-59.
168. ROCH, M. and MCCARTER, J.A. (1984): Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Held in a series of contaminated lakes. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 77, 77-82.
169. RODRÍGUEZ-ARIZA, A. PEINADO, J. PUEYO, C. and LÓPEZ-BAREA, J. (1993): Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 2568-2573.
170. ROSSI, M.A., CECCHINI, G. and DIANZANI, M.M. (1983): Glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase in two different hepatomas and in normal liver. *IRCS Med. Sci. Biochem.*, 11, 805.
171. RUSIĆ, B., DENIĆ, K. and ĐORĐEVIĆ, S. (2014): The importance of enzyme cytochrome in drug metabolism. *MD-Medical Data* 6, 95-98.
172. SCANDALIOS, J.G. (2005): Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.
173. SCHNEIDER, C. (2009): An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 315-321.
174. SERES, T., RAVICHANDRAN, V., MORIGUCHI, T., ROKUTAN, K., THOMAS, J.A. and JOHNSTON, R.B. JR. (1996): Protein S-thiolation and dethiolation during the respiratory burst in human monocytes. A reversible post-translational modification with potential for buffering the effects of oxidant stress. *J. Immunol.* 156, 1973-1980.
175. SEVCIKOVA, M., MODRA, H., SLANINOVA, A. and SVOBODOVA Z. (2011): Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Vet. Med.*, 56, 537-546.

176. SEVRIOUKOVA, I.F. and POULOS, T.L. (2013): Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. *Dalton Trans.* 42, 3116-3126.
177. SHAHBAZ, M., HASHMI, M.Z, MALIK, R.N. and YASMIN, A. (2013): Relationship between heavy metals concentrations in egret species, their environment and food chain differences from two Headworks of Pakistan. *Chemosphere* 93. 274-282.
178. SHALINI, K.V. and JEYANTHI, G.P. (2014): Free Radical Scavenging Activity of Metallothioneins from Peripheral Blood Lymphocytes of Gold Jewellery Karigars. *Int. Res. J. Medical Sci.* 2, 15-20.
179. SHEEHAN, D., MEADE, G., FOLEY, V.M. and DOWD, C.A. (2001): Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1-16.
180. SHERRATT, P.J. and HAYES, J.D. (2001): Glutathione S-transferases, in: *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and other Xenobiotics* (Ed. Ioannides, C.), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester pp. 319-352.
181. SHUKLA, G.S. and CHANDRA, S.V. (1977): Levels of sulfhydryls and sulfhydryl-containing enzymes in brain, liver and testis of manganese treated rats. *Arch. Toxicol.* 37, 319-325.
182. SIES, H. (1991): *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. London: Academic.
183. ŠIROKÁ, Z. and DRASTICHOVA, J. (2004): Biochemical Markers of aquatic environment contamination - cytochrome P450 in fish. A review. *Acta Vet. Brno*, 73, 123-132.
184. SPARLING, D.W., LINDER, G. and BISHOP, C.A. (2000): *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. SETAC, Pensacola, FL, USA.
185. ŠTAJN, A.Š., ŽIKIĆ, R.V. I SAIČIĆ, Z.S. (2007): *Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja*. Udžbenik, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 1-449.
186. ŠTEFAN, L., TEPŠIĆ, T., ZAVIDIĆ, T., URUKALO, M., TOTA, D. I DOMITROVIĆ, D. (2007): Lipidna peroksidacija uzroci i posljedice. *Medicina*, 43, 84-93.

187. STEVENS, E.A., MEZRICH, J.D. and BRADFIELD, C.A. (2009): The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* 127, 299-311.
188. STOCKER, R. and KEANEY, J.F.JR. (2004): Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 84, 1381-1478.
189. STOHS, S.J. and BAGCHI D. (1995): Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
190. STOHS, S.J. and BAGCHI, D. (1995): Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol. Med.* 18, 321-336.
191. STOLIAR, B.S. and LUSHCHAK, V.I. (2012): Environmental pollution and oxidative stress in fish. In: *Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants* (Ed. V.I. Lushchak.), InTech 131-165.
192. STOREY, K.B. (1996): Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.
193. ŠUKALO, G., ĐORĐEVIĆ, S., GVOZDENOVIĆ, S., SIMOVIĆ, A., ANĐELKOVIĆ, M., BLAGOJEVIĆ, V. and TOMOVIĆ, LJ. (2014): Intra- and inter-population variability of food preferences of two *Natrix* species on the Balkan Peninsula. *Herpetol. Conserv. Biol.* 9, 123-136.
194. SURA, P., WRÓBEL, M. and BRONOWICKA, P. (2006): Season dependent Response of the Marsh Frog (*Rana ridibunda*) to Cadmium Exposure. *Folia Biol. (Kraków)* 54, 159-165.
195. TAKADA, Y., NOGUCHI, T. and KAYIYAMA, M. (1982). Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. *Cancer Res.* 42, 4233-4235.
196. TAMURA, M., OSHINO, N. and CHANCE, B. (1982): Some characteristics of hydrogen- and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *J. Biochem.* 92, 1019-1031.
197. THAMMACHOTI, P., KHONSUE, W., KITANA, J., VARANUSUPAKUL, P. and KITANA, N. (2012): Morphometric and gravimetric parameters of the rice frog *Fejervarya limnocharis* living in areas with different agricultural activity. *J. Environ. Prot.* 3, 1403-1408.

198. THAPLIYAL, J.P. and SHARAN, S. (1980): Seasonal variation in the oxygen consumption of tissues in the water snake *Natrix piscator* with special reference to hibernation. Indian J Exp Biol. 18, 236-239.
199. THIRUMOORTHY, N., SHYAM SUNDER, A., MANISENTHIL KUMAR, K.T., SENTHIL KUMAR, M., GANESH, G.N.K. and CHATTERJEE, M. (2011): A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology. World J. Surg. Oncol. 20, 9, 54.
200. THOMAS, D.D., FLORES-SANTANA, W., SWITZER, C.H., WINK, D.A., and RIDNOUR, L.A. (2010): Determinants of nitric oxide chemistry: impact of cell signaling processes. In: Nitric Oxide: Biology and Pathobiology (Ed. Ignarro LJ.) Macmillan Publishing. NY. NY. pp. 3-26.
201. THOMAS, J.A., POLAND, B. and HONZATKO, R. (1995): Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. Arch. Biochem. Biophys. 319, 1-9.
202. THORPE, R.S. (1984): Multivariate patterns of geographic variation between the island and mainland populations of the eastern grass snake (*Natrix natrix natrix*). J. Zool. 204, 551-561.
203. TORRES, M.A., TESTA, C.P., GASPARI, C, MASUTTI, M.B., PANITZ, C.M.N., CURI-PEDROSA, R., ALMEIDA, E.A., DI MASCIO, P. and FILHO, D.W. (2002): Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. Mar. Poll. Bull. 44 923-932.
204. TOWBIN, H. STAEHELIN, T. and GORDON J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. ,76, 4350-4354.
205. TOWNSEND, D. M. (2008): S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. Mol. Interventions, 7, 313-324.
206. TROBISCH, D. and GLABER-TROBISCH, A. (2011): The Rearing of Dice Snakes: Part of a Concept for the Sustainable Conservation of Endangered and Isolated Populations in Western Germany. Mertensiella, 18, 49-57.

207. TSANGARIS, C., KORMAS, K., STROGYLOUDI, E., HATZIANESTIS, I., NEOFITOU, C., ANDRAL, B. and GALGANIF. (2010): Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151, 369-378.
208. UFFUS, J.H. (2002): Heavy metals - a meaningless term. *Pure Appl. Chem.* 74, 793-807.
209. VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C.J. and TELSER, J. (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266, 37-56.
210. VALKO, M., MORRIS, H. and CRONIN, M.T.D. (2005): Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.
211. VAN DER OOST, R., BEYER, J. and VERMEULEN, N. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
212. VERLECAR, X.N., JENA, K.B. and CHAINY, G.B.N. (2008): Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea Estuarine. *Coastal Shelf. Sci.*, 76, 745-752.
213. VIDAL, M. L., BASSERES, A. and NARBONNE, J. F. (2001): Potential biomarkers of trichloroethylene and toluene exposure in *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 9, 87-97.
214. VITT, L.J. and CALDWELL, J.P. (2014): *Herpetology. An introductory biology of amphibians and reptiles.* 4th Ed. Elsevier, p. 776.
215. VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M.J. and VALAVANIDIS, A. (2007): Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pol. Bul.* 54, 1361-1371.
216. VLČEK, P., NAJBAR, B. and JABLONSKI, D. (2010): First records of the dice snake (*Natrix tessellata*) from the north-eastern part of the Czech Republic and Poland. *Herpetol. Notes* 3, 23-26.

- 217.VUČETIĆ M., STANČIĆ A., OTAŠEVIĆ V., JANKOVIĆ A., KORAC A., MARKELIĆ M., VELIČKOVIĆ K., GOLIĆ I., BUZADŽIĆ B., STOREY K.B. and KORAC B. (2013): The impact of cold acclimation and hibernation on antioxidant defenses in the ground squirrel (*Spermophilus citellus*): an update. *Free Radic. Biol. Med.*, 65, 916-924.
- 218.WEIPERTH, A., GAEBELE, T., POTYÓ, I. and PUKY, M. (2014): A global overview on the diet of the dice snake (*Natrix tessellata*) from a geographical perspective: foraging in atypical habitats and feeding spectrum widening helps colonisation and survival under suboptimal conditions for a piscivorous snake. *Zool. Stud.* 53, 42-51.
- 219.WILLERROIDER, M. (2003): Roaming polar bears reveal arctic role of pollutants. *Nature*, 426, 5.
- 220.WYLIE, G.D., HOTHEM, R.L., BERGEN, D.R., MARTIN, L.L., TAYLOR, R.J. and BRUSSEE, B.E. (2009): Metals and trace elements in Giant Garter Snakes (*Thamnophis gigas*) from the Sacramento Valley, California, USA. *Arch. Environ. Contam Toxicol* 56, 577-587.
- 221.ZHOU, Q., ZHANG, J., FU, J., SHI, J. and JIANG, G. (2008): Review biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta*, 606, 135-150.
- 222.ŽIKIĆ R.V., ŠTAJN, A.Š., SAIČIĆ, Z.S., SPASIĆ, M.B. i MILOVANOVIĆ, S.R. (2000): Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Monografija, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, str. 1-150.
- 223.ŽIKIĆ, R.V., ŠTAJN, A.Š., PAVLOVIĆ, S.Z., OGNJANOVIĆ, B.I. and SAIČIĆ, Z.S. (2001): Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of Goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium *Physiol. Res.* 50, 105-111.

BIOGRAFIJA



Jelena P. Gavrić, istraživač saradnik, rođena je 13.10.1985. godine u Užicu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Užicu. Diplomirala je 2009. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu (studijska grupa Biologija, smer Ekologija), sa prosečnom ocenom 9.52. Diplomski rad pod nazivom "Prirodni i turistički resursi Zlatiborskog okruga" odbranila je 02.07.2009. godine pod mentorstvom Dr Branke Ognjanović, vanrednog profesora Prirodno-matematičkog fakulteta u Kragujevcu. Dobila je nagradu za najboljeg diplomiranog studenta iz fonda Prof. Dr Radoslava V. Žikića 2010. godine. Školske 2009/2010 godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija. Od 2009. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 2010. godine, a reizabrana 2013. godine.

Od 2009. do 2010. godine bila je angažovana na projektu 143035B „Proučavanje poremećaja homeostaze i određivanje biomarkera oksidacionog stresa kod aerobnih organizama” finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od 2011. do 2015. godine, angažovana je na projektu 173041 „Molekularno fiziološki biomonitoring aerobnih organizama zasnovan na određivanju biohemijskih biomarkera oksidacionog stresa“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je u Odeljenju za fiziologiju pod mentorstvom Dr Slađana Z. Pavlovića, naučnog savetnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.

Do sada je objavila 26 bibliografskih jedinica: 12 naučnih radova u međunarodnim časopisima, 4 kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 9 kongresnih saopštenja na skupovima nacionalnog značaja. Prema Science Citation Index-u ima 20 citata i h-index 3.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јелена П. Гаврић

број уписа Б3201/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биомаркери оксидационог стреса и концентрација метала у одабраним ткивима
белушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*) са подручја

Обедске баре и Панчевачког рита“

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.05.2015.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена П. Гаврић

Број уписа Б3201/2009

Студијски програм Анимална и хумана физиологија

Наслов рада „Биомаркери оксидационог стреса и концентрација метала у одабраним ткивима белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*) са подручја Обеске баре и Панчевачког рита.

Ментори Научни саветник др Слађан Павловић, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

Ванредни професор др Синиша Ђурашевић, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Потписани Јелена П. Гаврић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.05.2015.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Биомаркери оксидационог стреса и концентрација метала у одабраним ткивима белоушке (*Natrix natrix*) и рибарице (*Natrix tessellata*) са подручја

Обедске баре и Панчевачког рита“

која је моје ауторско дело.

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

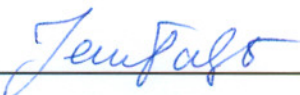
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.05.2015.



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

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

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

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

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

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