

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marko D. Prokić

**PARAMETRI ANTIOKSIDACIONOG  
SISTEMA U TKIVIMA ŽABA *Pelophylax  
esculentus* KOMPLEKSA KAO  
BIOMARKERI IZLAGANJA METALIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marko D. Prokić

**PARAMETERS OF ANTIOXIDATIVE  
DEFENSE SYSTEM IN TISSUES OF THE  
FROGS FROM THE *Pelophylax esculentus*  
COMPLEX EXPOSURE TO METALS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

**MENTORI:**

Dr Slavica Borković-Mitić, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

Dr Nebojša Jasnić, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI  
KOMISIJE:**

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

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

Dr Imre Krizmanić, docent, 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 Slavici Borković-Mitić, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, dragom mentoru, na neizmernoj pomoći u kreiranju i realizaciji ideje, na svim savetima i uloženom trudu tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije. Posebno hvala na izuzetnom strpljenju, podršci i prijateljstvu.

Dr Nebojši Jasniću, docentu Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, mentoru, na smernicama i sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije kao i na kritičkoj analizi.

Dr Zorici S. Saičić, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, na ukazanoj prilici da budem deo njenog naučno istraživačkog tima. Posebno hvala na podsticaju i optimizmu, kao i na uloženom vremenu i konstruktivnim diskusijama koje su mi pomogle tokom izrade ove doktorske disertacije.

Dr Slađanu Pavloviću, naučnom savetniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, na stručnoj pomoći tokom eksperimentalnog rada, uloženom vremenu i korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ovog rada.

Dr Imreu Krizmaniću, docentu Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na velikoj pomoći prilikom realizovanaja terenskih istraživanja, kao i na sugestijama tokom pregleda doktorske disertacije.

Dr Jeleni Mutić, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na pomoći tokom realizacije dela eksperimentalnog rada, kao i na svim savetima.

Mojim dragim koleginicama iz Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu, dr Tijani Radovanović, dr Branki Gavrilović, dr

Svetlani Despotović i dr Jeleni Gavrić naučnim saradnicama i kolegi Mohammedu Nasia na pozitivnoj atmosferi, drugarstvu i dosadašnjoj saradnji.

Zahvaljujem se i sestri Jeleni, roditeljima Zorici i Draganu na razumevanju i podršci kroz sve godine mog školovanja i rada. Posebnu zahvalnost dugujem mojoj Tamari na neizmernoj pomoći, ljubavi i strpljenju.

U Beogradu, 2016. godina

Istraživač saradnik

**PARAMETRI ANTIOKSIDACIONOG SISTEMA U TKIVIMA ŽABA  
*Pelophylax esculentus* KOMPLEKSA KAO BIOMARKERI IZLAGANJA  
METALIMA**

**Rezime**

Organizmi su u životnoj sredini izloženi različitim zagađivačima i sredinskim faktorima. Metali su obeleženi kao rastući problem zbog svoje postojanosti i toksičnosti. Oksidacioni stres je jedan od glavnih načina delovanja metala na organizme. Redoks aktivni (Cu, Co, Cr, Fe, Ni i Zn) metali izazivaju direktno oksidacioni stres kroz Fentonovu i Haber-Vajsovu reakciju, dok redoks neaktivni metali (As, Cd, Hg i Pb) indirektno dovode do oksidacionog stresa kroz promenu aktivnosti antioksidacionog sistema (AOS).

*Pelophylax esculentus* hibridni kompleks se sastoji od tri vrste semiakvatičnih žaba (od roditeljskih vrsta *Pelophylax ridibundus* i *Pelophylax lessonae* i njihovog hibrida *Pelophylax* kl. *esculentus*) koje koegzistiraju i mogu da stupaju u reproduktivne odnose. Žabe su zbog svojih životnih karakteristika (složen životni ciklus, polupropustljiva koža, prisutnost u vodenoj i terestričnoj sredini) podložne akumulaciji metala preko vode i kroz lanac ishrane i zato predstavljaju potencijalno dobre bioindikatore.

Ciljevi ove doktorske disertacije su bili utvrđivanje razlika u bioakumulaciji metala, aktivnosti i koncentracijama parametara antioksidacionog sistema i aktivnosti holinesteraze u tkivima jetre, kože i mišića vrsta *P. esculentus* kompleksa sa četiri različita lokaliteta, zatim promene parametara antioksidacionog sistema pod uticajem različitih koncentracija akumuliranih metala, i na kraju potencijalna upotreba ovih parametara kao biomarkera efekata metala. Lokaliteti sa kojih su žabe izlovljavane su: jezero Popovica u okviru Nacionalnog parka "Fruška gora", Specijalni rezervat prirode "Obedska Bara", Park prirode "Ponjavica" i Veliki Bački kanal kao deo kanala Dunav-Tisa-Dunav. Parametri antioksidacionog sistema koji su analizirani u okviru enzimskih komponenti su: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-reduktaza (GR), enzim faze II biotransformacije glutation-S-transferaza (GST), a od neenzimskih komponenti: ukupni glutation (GSH) i slobodne

sulfhidrilne grupe (SH). Određivana je i koncentracija metala (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn) u tkivima i vodi.

Rezultati bioakumulacije metala u tkivu jetre, kože i mišića vrste *Pelophylax esculentus* kompleksa pokazali su da je vrsta *P. ridibundus* akumulirala najveće količine metala, a zatim slede *P. esculentus* i *P. lessonae*. Razlike u bioakumulaciji metala mogu se povezati sa životnim navikama, hibernacijom, izborom plena i veličinom tela ovih vrsta. *P. ridibundus* je najkrupnija i uvek hibernira u vodi, dok ostale dve vrste imaju sitnije telo, drugačiji diverzitet plena i/ili hiberniraju na kopnu.

Od svih ispitivanih parametara antioksidacionog sistema, enzimi SOD, GSH-Px i koncentracija SH grupa pokazali su najveću varijabilnost kod vrsta *Pelophylax esculentus* kompleksa. Dok je odnos enzima CAT i GSH-Px u jetri odvojio *P. esculentus* od roditeljskih vrsta. *P. esculentus* je imala veću aktivnost CAT i značajno manju aktivnost GSH-Px u odnosu na *P. ridibundus* i *P. lessonae*. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se pored različitih interakcija sa spoljašnom sredinom (razlike u akumulaciji metala) i fizioloških razlika (u bazalnom metabolizmu) vrste ovog kompleksa razlikuju i u parametrima antioksidacionog sistema.

Ispitivanje međutkivnih razlika u parametrima AOS, aktivnosti holinesteraze i akumulaciji metala između jetre, kože i mišića vrsta *P. esculentus* kompleksa pokazalo je da jetra ima najveće vrednosti ispitivanih parametara, kao i da akumulira najveći broj i najveće koncentracije metala (posebno izraženo u koncentracijama Fe, Cu, Al, Cd, Hg, i Ni). Zatim sledi koža, dok su najniže vrednosti AOS parametara i koncentracije metala zabeležene u mišićima.

Efekti različitih lokaliteta na vrste *P. esculentus* kompleksa pokazuju da se koncentracije akumuliranih metala u tkivima razlikuju od koncentracija metala izmerenih u vodi, što ukazuje da postoji povremeno zagađenje, ili su metali u tkiva dospeli na neki drugi način (npr., ishranom preko plena, ili su u nekom trenutku u toku svog životnog ciklusa bile izložene povećanim koncentracijama metala). Opšti trend je da povećanje zagađenja prati i veća akumulacija metala u tkivima žaba, dok se kod parametara AOS ne uočava jasan obrazac promene.

Odnos koncentracija metala i parametara AOS pokazuje da vrsta *P. esculentus* ima najveći broj Pirsonovih korelacija, zatim sledi *P. ridibundus*, dok je najmanji broj korelacija zabeležen kod *P. lessonae*. Redoks aktivni metali koji pokazuju najveći

efekat na ispitivane parametre kod žaba su: Cr, As, Ni, Fe i Cu, a redoks neaktivni: Hg i Cd. Među parametrima AOS najveći broj korelacija sa metalima pokazuju SH grupe, zatim SOD i GR. Od svih parametara antioksidacionog sistema koji se koriste kao biomarkeri, tri navedena (SH grupe, SOD i GR) se izdvajaju kao vrlo efikasni u biomonitoringu efekta različitih metala na tkiva žaba *P. esculentus* kompleksa.

Aktivnost holinesteraze kao parametar neurotoksičnosti pokazao je promene koje su u direktnoj vezi sa promenama koncentracija akumuliranih metala, i to pozitivne sa Al, Zn i Cu i negativne sa As i Hg. Ovo ukazuje da se i ChE može koristiti kao biomarker u studijama koje prate prisustvo i efekte metala kod žaba.

Istraživanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji pokazala su da se vrste *P. esculentus* kompleksa razlikuju u akumulaciji metala i parametrima antioksidacionog sistema, kao i da se ispitivani parametri mogu koristiti kao biomarkeri izlaganja i efekata metala. Na osnovu svega što je zabeleženo može se zaključiti da su vrste *P. esculentus* kompleksa pogodni bioindikatori prisustva i efekta metala u životnoj sredini.

**Ključne reči:** antioksidacioni sistem; oksidacioni stres; holinesteraza; metali; žabe; *Pelophylax esculentus* kompleks; *Pelophylax ridibundus*; *Pelophylax lessonae*; biomarker; biomonitoring.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija

**UDK broj:** 77.152.1:597.851(497.11)(043.3)



# PARAMETERS OF ANTIOXIDATIVE DEFENSE SYSTEM IN TISSUES OF THE FROGS FROM THE *Pelophylax esculentus* COMPLEX EXPOSURE TO METALS

## ABSTRACT

Organisms are exposed to different environmental factors and contaminants. Metals are marked as a major problem due to their ubiquitous and toxicity. The oxidative stress has been suggested as one of the main mechanisms of metal toxicity effects on organisms. The redox active metals (Fe, Cu, Cr and Ni), induce oxidative stress directly through the Fenton and Haber-Weiss reactions, while the redox inactive metals (Cd, Pb, Zn, and Hg) act indirectly through alterations of the antioxidant defense system (AOS).

The *Pelophylax esculentus* hydride complex is comprised of three semiaquatic frog species (parent species *Pelophylax lessonae* and *Pelophylax ridibundus* and their hybrid *Pelophylax* kl. *esculentus*) that coexist and can crossbreed. Frogs are distinguished by a number of properties (biphasic life- aquatic and terrestrial, complex life cycle and semipermeable skin) that make them highly susceptible to metal accumulation trough water and food chain and are therefore potentially useful bioindicator species.

The aims of this doctoral dissertation were to determine: differences in metals bioaccumulation, activities and concentration of antioxidative defense system parameters and activity of cholinesterases in the liver, skin and muscle tissues of *P. esculentus* complex species from four localities; the changes in antioxidative defense system parameters and activity of cholinesterases induced by different metals concentration, and in the end potential usefulness of examined parameters as biomarkers of metals effects. Frogs were caught from next localities: Lake Popovica as a part of National Park "Fruška Gora", Special Nature Reserve "Obedska Bara", Nature Park "Ponjavica" and the Grand Canal as part of the Danube-Tisa-Danube canal. Analyzed parameters of antioxidative defense system included enzymatic components: activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), enzyme of phase II biotransformation glutathione-S-transferase (GST), and non-enzymatic components: the concentration of glutathione

(GSH) and free sulfhydryl groups (SH). The concentrations of metals (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn) were measured in the water and tissues.

The results of metals accumulation in liver, skin and muscle of *P. esculentus* complex frogs showed that *P. ridibundus* accumulated highest concentrations of metals, then *P. esculentus* and *P. lessonae*. Differences in metals accumulation of examined frogs could be related with some interspecies differences in life history, hibernation, prey diversity and body size. *P. ridibundus* is the largest and always hibernates in water, while other two have smaller body, different prey diversity and/or hibernate on land.

Among the all examined AOS parameters, enzymes SOD, GSH-Px and concentration of SH groups displayed the highest level of variability. Relationship between activities of CAT and GSH-Px in liver denoted of hydride *P. esculentus* from its parental species. *P. esculentus* had higher activity of CAT and lower activity of GSH-Px in comparison to *P. ridibundus* and *P. lessonae*. The results indicate that beside differences in interaction with environment and in some physiological processes the species of this complex also differ in parameters of AOS.

Intertissue differences in AOS, cholinesterase activity and metals accumulation between liver, skin and muscle of *P. esculentus* frogs point out liver as tissue with highest values of all parameters and highest number and concentration of metals, then followed by skin and the lowest were for muscle.

The effects of different localities on *P. esculentus* complex species revealed that the concentrations of metals in tissues and water differ, this can be the result of the exposure of frogs to elevated concentrations of metals in the past, and/or to indirect accumulation of these elements via food intake. The general trend showed that the increased locality pollution is in compliance with increased metal accumulation, this trend was not observed for changes in AOS.

Relationship between concentration of metals and AOS parameters showed that *P. esculentus* exhibited the highest number of correlations, this was followed by *P. ridibundus* and by *P. lessonae* which exhibited the lowest number of correlations. The highest effects on frogs antioxidative defense system had next redox active metals: Cr, As, Ni, Fe i Cu, and redox inactive metals: Hg i Cd. The highest number of correlations were determined for the following biomarkers: SH groups, SOD and GR. This

parameters (SH groups, SOD and GR) can be used as biomarkers of metal pollution-induced oxidative stress in frogs tissues.

Cholinesterase activity correlated with concentration of metals, positively with Al, Zn and Cu and negatively with As and Hg, this indicate that cholinesterase could be included in biomonitoring studies of metals effects.

Research conducted in this doctoral dissertation showed: that the species of *P. esculentus* complex differ in concentration of accumulated metals and antioxidative defense system parameters; and that used parameters can be good biomarkers of exposure and effects of metals. In the light of these findings we can suggest the use of *P. esculentus* complex species as a biomonitoring species in studies of metal accumulation and metal-induced oxidative stress.

**Key words:** antioxidative defense system; oxidative stress; cholinesterase; metals; frog; *Pelophylax esculentus* complex, *Pelophylax ridibundus*; *Pelophylax lessonae*; biomarkers, biomonitoring.

**Scientific field:** Biology

**Special topic:** Physiology

**UDC number:** 77.152.1:597.851(497.11)(043.3)

## SKRAĆENICE

$^1\text{O}_2$	singlet kiseonik
8-OH-G	8-hidroksiguanozina
AChE	acetilholinesteraza
Al	aluminijum
AOS	antioksidacioni sistem
As	arsen
$\text{As}^{3+}$	arsenit
$\text{As}^{5+}$	arsenat
Au	zlato
BChE	butirilholinesteraza
BM	body mass (težina tela)
Bi	bizmut
BSA	goveđi serum albumin
Ca	kalcijum
CAT	katalaza
Cd	kadmijum
CDNB	1-hloro-2,4-dinitrobenzen
ChE	holinesteraze
Co	kobalt
-COOH	karboksilna grupa
Cr	hrom
Cu	bakar
$\text{CuSO}_4$	bakar sulfat
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	bakar sulfat pentahidrat
CuZn SOD	bakar cink sadržavajuća superoksid-dismutaza
DMA	dimeti-arsenova kiselina
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTD	Dunav-Tisa-Dunav
DTNB	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoična kiselina)
EC SOD	ekstracelularna superoksid-dismutaza
EDTA	etilendiamintetraacetat
F	fluor
FAD	flavin adenin dinukleotid
Fe	gvožđe
Fe SOD	gvožđe sadržavajuća superoksid-dismutaza
Ga	galijum
GC	guanozin-citozin
GIT	gastrointestinalni trakt
GR	glutation-reduktaza
GSH	redukovani glutation
GSH-Px	glutation-peroksidaza
GSSG	oksidovani glutation
GST	glutation-S-transferaza
$\text{H}_2\text{O}$	voda
$\text{H}_2\text{O}_2$	vodonik peroksid
HCl	hlorovodonična kiselina

Hg	živa
HNO <sub>2</sub>	azotna kiselina
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	hidroperoksil radikal
HOCl	hipohlorna kiselina
KCN	kalijum cijanid
kl.	klepton
L <sup>•</sup>	lipidni radikal
LH	lipid
Li	litijum
LO <sup>•</sup>	lipidni alkoksil radikal
LOH	lipidni aldehid
LOO <sup>•</sup>	lipidni peroksil radikal
LOOH	lipidni hidroperoksid
LPO	lipidniperoksidi
M	metal
MDA	malondialdehid
MMA	metil-arsenova kiselina
Mn	mangan
Mn SOD	mangan sadržavajuća superoksid-dismutaza
Mo	molibden
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	dinitro trioksid
N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	dinitro tetraoksid
Na	natrijum
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	natrijum karbonat
NADP <sup>+</sup>	oksidovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	natrijum dihidrogen fosfat
NaHCO <sub>3</sub>	natrijum bikarbonat
NaN <sub>3</sub>	natrijum azid
NaOH	natrijum hidroksid
Ni	nikal
Ni SOD	nikal sadržavajuća superoksid-dismutaza
NO	azot-monoksid
NO <sup>-</sup>	nitroksil anjon
NO <sup>+</sup>	nitrozonijum jon
NO <sup>•</sup>	azot monoksid
NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	nitronium (nitril) katjon
NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	azot dioksid
NO <sub>2</sub> Cl	nitril (nitronium) hlorid
O <sub>2</sub>	molekularni kiseonik
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	superoksid anjon radikal
O <sub>3</sub>	ozon
-OH	hidroksilna grupa
OH <sup>•</sup>	hidroksil radikal
ONOO <sup>-</sup>	peroksinitrit
ONOOH	peroksinitritna kiselina
PAH	policiklični aromatični ugljovodonici
Pb	olovo

PBB	polibrominovani bifenoli
PCB	polihlorinovani bifenoli
PCD	dibenzo- <i>p</i> -dioksini
PCDF	polihlorinovani dibenzofurani
PCT	polihlorinovani terfenoli
PH GSH-Px	fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza
Pt	platina
RNK	ribonukleinska kiselina
RNS	reaktivne vrste azota
RO <sup>•</sup>	alkoksil radikal
RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	peroksil radikal
ROH	oksisgenisani produkt reakcije
ROOH	organski peroksid
ROONO	alkil peroksinitrit
ROS	reaktivne vrste kiseonika
R-SSG	protein-glutation mešani disulfid
R-X	elektrofilni supstrat
Se	selen
SH	sulfhidrilna grupa
Sn	kalaj
S-NO	S-nistrozilacija
SO <sub>2</sub> H	sulfinska kiselina
SO <sub>3</sub> H	sulfonska kiselina
SOD	superoksid-dismutaza
SVL	snout vent lenth (dužina od njuške do kloake)
TA	timin-adenin
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TNB	2-nitro-5-tiobenzoična kiselina
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UNEP	<i>United Nations of Environment Programme</i> (Program za životnu sredinu Ujedinjenih nacija)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Svetska zdravstvena organizacija)
Zn	cink

## Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Oksidacioni stres	1
1.1.1. Reaktivne vrste kiseonika i azota	3
1.1.2. Oksidaciona oštećenja	6
1.2. Antioksidacioni sistem (AOS)	8
1.2.1. Enzimi antioksidacionog sistem	9
1.2.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD)	9
1.2.1.2. Katalaza (CAT)	9
1.2.1.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px)	10
1.2.1.4. Glutation-reduktaza (GR)	11
1.2.1.5. Enzim faze II biotransformacije glutacion-S-transferaza (GST)	12
1.2.2. Neenzimske komponente antioksidacionog sistema	13
1.2.2.1. Glutation (GSH)	13
1.2.2.2. Sulfhidrilne (SH) grupe	15
1.3. Parametri neurotoksičnosti- Holinesteraze	16
1.4. Biomonitoring, bioindikator i biomarkeri	17
1.5. Metali u životnoj sredini	20
1.5.1. Metali u vodenoj sredini	20
1.5.2. Metali u živim sistemima	21
1.6. Žabe kao bioindikator	28
1.6.1. <i>Pelophylax esculentus</i> ( <i>Rana esculentus</i> ) kompleks	29
2. Cilj istraživanja	35
3. Materijal i metode	37
3.1. Karakteristike ispitivanih lokaliteta i sakupljanje uzoraka	37
3.2. Priprema tkiva za biohemijske analize	40
3.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina	41
3.4. Određivanje aktivnosti enzimskih komponenti antioksidacionog sistema	42
3.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)	42
3.4.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	43
3.4.3. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze (GSH-Px)	43
3.4.4. Određivanje aktivnosti glutacion-reduktaze (GR)	44

3.4.5. Određivanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST)	45
3.5. Određivanje koncentracije neenzimskih komponenti antioksidacionog sistema	46
3.5.1. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)	46
3.5.2. Određivanje koncentracije slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa	47
3.6. Određivanje aktivnosti holinesteraze (ChE)	48
3.7. Određivanje koncentracije metala u vodi i tkivima	48
3.7.1. Hemikalije	48
3.7.2. Instrumenti	49
3.7.3. Priprema uzoraka	49
3.7.4. Analiza uzorka	49
3.8. Statistička obrada rezultata	50
4. Rezultati	51
4.1. Fizičko-hemijski parametri i koncentracije metala u vodi	51
4.2. Prikaz rezultata dobijenih u tkivima vrsta <i>Pelophylax esculentus</i> kompleksa	53
4.2.1. Koncentracije metala u tkivima vrsta <i>Pelophylax esculentus</i> kompleksa	53
4.2.2. Parametri antioksidacionog sistema, enzim faze II biotransformacije (GST) i aktivnost holinesteraze (ChE) u tkivima vrsta <i>Pelophylax esculentus</i> kompleksa	62
4.3. Efekti različitih lokaliteta na ispitivane parametre kod vrsta <i>Pelophylax esculentus</i> kompleksa	101
4.3.1.1. Akumulacija metala u tkivima vrste <i>P. ridibundus</i> na ispitivanim lokalitetima	101
4.3.1.2. Parametri AOS i aktivnost holinesteraze kod vrste <i>P. ridibundus</i> sa različitih lokaliteta	109
4.3.2.1. Akumulacija metala u tkivima vrste <i>P. esculentus</i> na ispitivanim lokalitetima	131
4.3.2.2. Parametri AOS i aktivnost holinesteraze kod vrste <i>P. esculentus</i> sa različitih lokaliteta	134



4.4.3. Odnos između parametara AOS, holinesteraze i koncentracije metala	152
5. Diskusija	157
5.1. Razlike između vrsta <i>Pelophylax esculentus</i> kompleksa	157
5.1.1. Razlike u bioakumulaciji vrsta <i>P. esculentus</i> kompleksa	158
5.1.2. Parametri antioksidacionig sistema i aktivnost holinesteraze u tkivima vrsta <i>P. esculentus</i> kompleksa	160
5.2. Razlike u koncentraciji metala u tkivima vrsta <i>P. esculentus</i> kompleksa na različitim lokalitetima	162
5.2.1. AOS i aktivnost holinesteraze kod vrsta <i>P. esculentus</i> kompleksa	168
5.2.2. Odnosi između koncentracije metala i parametara AOS i aktivnosti holinesteraze	170
6. Zaključci	177
7. Literatura	180
Prilozi	

## 1. Uvod

Brzim razvojem industrije čovek je sebi u mnogome olakšao život, ali je u tom procesu istovremeno narušio ravnotežu životne sredine koja je u prirodi postojala vekovima. Teško je zamisliti moderan život bez različitih hemijskih proizvoda i hemijske industrije. Farmaceutska, agrohemijska, petrohemijska, metalna industrija kao i brojni hemijski proizvodi su sastavni deo našeg načina života. Prekomerna upotreba ovih proizvoda dovodi do njihovog povećanog prisustva u životnoj sredini i rizika po zdravlje ljudi i drugih organizama (Shafi, 2005). Međutim, ne smatraju se sve prisutne hemikalije zagađivačima. Pod zagađivačima se podrazumevaju samo one hemikalije koje pokazuju neke toksične efekte. Opšta podela hemijskih zagađivača je na dve velike kategorije: organske i neorganske. Pod organskim zagađivačima se smatraju sve hemijske supstance organskog porekla koje u nekoj koncentraciji pokazuju toksične efekte i kao najčešće se navode različite vrste pesticida (dibenzo-*p*-dioksini (PCD) i polihlorinovani dibenzofurani (PCDF), polihlorinovani bifenoli (PCB), policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), polibrominovani bifenoli (PBB), polihlorinovani terfenoli (PCT), organohlorini i piretroidni pesticidi i biocidi), deterdženti, farmaceutski proizvodi (antibiotici, lekovi) i drugi. Neorganski zagađivači su supstance mineralnog (neorganskog) porekla i dele se na: metale, metaloide i nemetale (Singer, 1970). Jedan od mehanizama preko kojeg zagađivači dovode do promena u normalnom funkcionisanju organizma povezani su sa oksidacionim stresom (Stolyar i Lushchak, 2012).

### 1.1. Oksidacioni stres

Tokom evolucije, prelaskom sa anaerobnog načina života na aerobni način, živi organizmi se sreću sa problemom izlaganja potencijalno opasnim oksidacionim procesima (Dröge, 2002). Slobodan kiseonik je omogućio aerobnim ćelijama korišćenje znatno većih količina energije u odnosu na anaerobne. Ovakvu energetske ugodnost aerobni organizmi su morali da plate nizom poremećaja i oštećenja nastalih delovanjem slobodnih radikala (reaktivnih vrsta kiseonika eng. *Reactive Oxygen Species*- ROS i

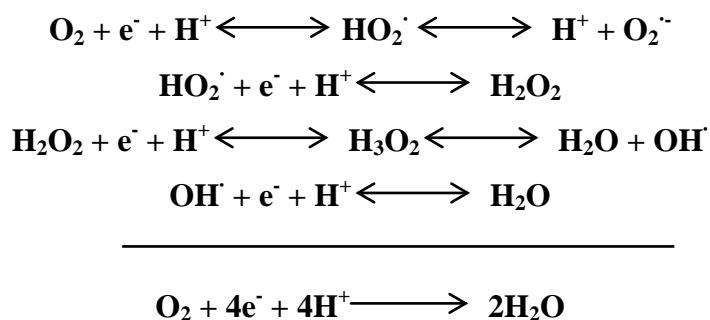
reaktivnih vrsta azota eng. *Reactive Nitric Species- RNS*) koji nastaju kao produkt metabolizma (Štajn i sar., 2007).

Slobodni radikali poseduju jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali. Ovaj elektron ili elektroni su odgovorni za nestabilnost i reaktivnost svih slobodnih radikala. Slobodni radikali se proizvode iz neradikala koji su po prirodi slabo reaktivni. Neradikal se može prevesti u oblik slobodnog radikala primanjem ili gubitkom elektrona, pri čemu se menjaju njegova fizička i hemijska svojstva (Halliwell i Gutteridge, 1999b). Štetno delovanje slobodnih radikala potiče iz potrebe da postignu elektronsku stabilnost i zato reaguju sa prvim susednim stabilnim molekulom uzimajući njegov elektron i započinjući na taj način lančanu reakciju koja dovodi do biohemijskih, strukturnih i funkcionalnih promena biomolekula. Slobodni radikali mogu nastati kao posledica delovanja različitih faktora iz spoljašnje sredine: visokoenergetska zračenja, prisustvo teških metala, neke otpadne materije, pesticidi, hiperoksija, dim cigarete, alkohol, anestetici, citostatici i uopšte aromatična ugljovodonična jedinjenja koja izazivaju oštećenja ćelija (Dröge, 2002). Slobodni radikali mogu nastati i u procesima koji se odvijaju u samim organizmima, na primer u procesu aerobne respiracije koja se odvija u mitohondrijama, pri čemu nepotpunom redukcijom  $O_2$  nastaju slobodni radikali kiseonika. U organizmu se proizvode i slobodni radikali azota, a u metabolizmu ksenobiotika mogu da nastanu i slobodni radikali ugljenika i sumpora. Pored toga što nastaju u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, slobodni radikali se proizvode i u procesu fagocitoze, biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatičnom retikulumu, metabolizmu etanola, u reakcijama koje katalizuju oksidaze, sintezi eikosanoida i u reakcijama oksidoredukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Oksidacioni stres prema Halliwell i Gutteridge (1999b) predstavlja ozbiljno narušen balans između produkcije reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i reaktivnih vrsta azota (RNS) sa jedne strane i antioksidacionog sistema sa druge strane. Dok Sies (1991) definiše oksidacioni stres kao poremećaj prooksidaciono-antioksidacione ravnoteže u pravcu prve što dovodi do potencijanih oštećenja.

### 1.1.1. Reaktivne vrste kiseonika i azota

Slobodni radikali ili druge vrste aktiviranog kiseonika prema Halliwell-u i Guttridge-u (1989) nazivaju se reaktivne vrste kiseonika (ROS) (Tabela 1). Kod aerobnih organizama u procesu respiracije koji se odigrava na unutrašnjoj membrani mitohondrija, najveći deo molekuskog kiseonika se redukuje do vode. Svaki molekul kiseonika za sebe vezuje četiri elektrona, u ovaj proces je uključen kompleksa citohrom-oksidade. Jednačina redukcije kiseonika do vode je:

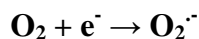


Prilikom redukcije molekuskog kiseonika manjim brojem elektrona u oko 2-5% slučajeva nastaju delimično redukovani i toksični međuproizvodi nazvani reaktivne vrste kiseonika (Halliwell i Gutteridge, 1999b).

**Tabela 1.** Reaktivne vrste kiseonika (Halliwell i Gutteridge, 1999b)

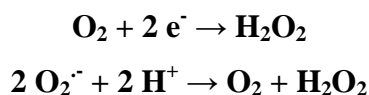
Reakcije	Produkti
$\text{O}_2 + 1\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2^-$	Superoksid anjon radikal
$\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HO}_2\cdot$	Hidroperoksil radikal
$\text{O}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	Vodonik preoksid
$\text{O}_2 + 3\text{e}^- \rightarrow \cdot\text{OH}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$	Hidroksil radikal
$\text{OH}^- + \text{RH} \text{ ili } \text{LH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{R}\cdot \text{ ili } \text{L}\cdot$	Oksidacija masnih kiselina ili drugih organskih molekula
$\text{R}\cdot \text{ ili } \text{L}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LO}_2\cdot \text{ ili } \text{RO}_2\cdot$	Peroksil radikal
$\text{LO}_2\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$	Organski hidroperoksid
$\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \cdot\text{OH}$	Singlet kiseonik
$\text{O}_3$	Ozon

Superoxid anjon radikal nastaje jedoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika ili jedoelektronskom oksidacijom vodonik peroksida u respiratornom lancu mitohondrija, hloroplasta i u endoplazmatičnom retikulumu (Halliwell i Gutteridge, 1999b).



Superoxid anjon radikal stvara se u nefagocitnim i fagocitnim ćelijama aerobnih organizama delovanjem enzima NAD(P)H oksidaze i ksantin oksidaze, ali i neenzimski, delovanjem redoks reaktivnih jedinjenja. Aktivnošću enzima superoxid dismutaze konvertuje se u  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sa kojim u prisustvu jona redoks aktivnih metala kroz Fenton-ovu odnosno Haber-Weiss-ovu reakciju daje visokoreaktivni hidroksil radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ) (Liu i Hotchkiss, 1995; Gebicki, 1997).

Vodonik peroxid nema nesparenih elektrona pa je zato jedan od najstabilnijih međuproizvoda redukcije kiseonika. On i nije u pravom smislu slobodan radikal. Nastaje direktno dvoelektronskom redukcijom kiseonika, jedoelektronskom redukcijom superoxid anjon radikala ili njegovom konverzijom u reakciji katalizovanoj enzimom superoxid dismutazom (SOD) (Halliwell, 2000; Dröge, 2002).



$\text{H}_2\text{O}_2$  se produkuje u ćelijama u peroksizomima, mikrozmima, mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu i ćelijskim membranama. Obzirom da peroksizomi produkuju najveće količine  $\text{H}_2\text{O}_2$  karakterišu se i visokom aktivnošću katalaze, enzima koji štiti ćeliju od njegovih toksičnih efekata (Halliwell, 2000).

Halliwell i Gutteridge (2007) su NO svrstali u posebnu grupu reaktivnih vrsta azota, a smatra se da je NO glavni izvor svih drugih RNS (Tabela 2). Azot-monoksid može da nitroziliše tiol grupe, pri čemuse konvertuje u nitrozonijum jon ( $\text{NO}^+$ ). Ovaj jon zatim reaguje sa tiol grupama, stvarajući nitrozo-tiole (Hogg, 2000), koji mogu da prenose  $\text{NO}^+$  grupu na druge sulfhidrilne grupe ciljanih proteina, formirajući stabilnije

kovalentne veze. Metali sa promenljivom valencom su takođe biološke “mete” za NO, pri čemu nastaju NO-metal kompleksi. Jedan od takvih metala je gvožđe, ugrađeno u molekule hema.

**Tabela 2.** Reaktivne vrste azota (Halliwell i Whiteman, 2004).

Slobodni radikali	Neradikalske reaktivne vrste
Azot monoksid NO <sup>•</sup>	Azotna kiselina HNO <sub>2</sub>
Azot dioksid NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Nitrozil katjon NO <sup>+</sup>
	Nitroksil anjon NO <sup>-</sup>
	Dinitro tetraoksid N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
	Dinitro trioksid N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	Peroksinitrit ONOO <sup>-</sup>
	Peroksinitritna kiselina ONOOH
	Nitronium (nitril) katjon NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>
	Alkil peroksinitrit ROONO
	Nitril (nitronium) hlorid NO <sub>2</sub> Cl

U ostvarivanju bioloških uloga NO, važnu ulogu imaju i njegovi derivati: azot-dioksid (NO<sub>2</sub>), peroksi-nitritna kiselina (ONOOH), peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) i azot-trioksid (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Pacher i sar., 2007). U biološkim sistemima azot monoksid međutim, pre reaguje sa superoksid anjon radikalom (O<sup>-</sup>), stvarajući snažnan oksidant, peroksinitritni radikal (ONOO<sup>-</sup>):



Brzina ove reakcije je tri puta veća od one kojom superoksid dismutaza katalizuje dismutaciju O<sub>2</sub><sup>-</sup> u vodonik-peroksid. Stvoreni peroksinitrit reaguje sa brojnim biomolekulima, delujući kao selektivni oksidant i nitrišući agens. On vrši nitrovanje tirozina i tirozinskih ostataka, stvarajući nitrotirozin.

### 1.1.2. Oksidaciona oštećenja

Oksidacioni stres remeti aktivnosti antioksidacionih enzima i dovodi do oštećenja DNK, stvaranja produkata oksidacije proteina i lipidne peroksidacije. Koji će deo ćelije (proteini, nukleinske kiseline, membranski lipidi ili citosolni molekuli), ili koja vanćelijska komponenta (hijaluronska kiselina i kolagen) reagovati sa slobodnim radikalima zavisi od prirode radikala, kao i mesta i izvora njegovog stvaranja (npr. citosolne komponente, mitohondrije, endoplazmatski retikulum, peroksizomi, ćelijska membrana) (Sies i sar., 1985).

Lipidna peroksidacija predstavlja oksidaciono oštećenje koje je izazvano delovanjem reaktivnih vrsta kiseonika na ćelijske membrane, lipide (fosfolipide, glukolipide i holesterol), lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide. Proces lipidne peroksidacije uključuje stvaranje lipidnih peroksil radikala ( $LOO^\cdot$ ) i lipidnih hidroperoksida ( $LOOH$ ) koji nastaju u interakciji bioloških makromolekula sa ROS, na prvom mestu dejstvom  $ON^\cdot$ . Ovo ima za posledicu modifikacije propustljivosti ćelijske membrane i promenu metabolizma membranskih proteina i lipida. Lipidni peroksidi u reakcijama koje su katalizovane metalima stvaraju alkoksi radikale ( $LO^\cdot$ ), holesterol hidroperokside, epokside holesterola i masnih kiselina i druge aldehide (Radi i sar., 1991). U procesu lipidne peroksidacije možemo izdvojiti tri faze:

- Prva faza je faza inicijacije koja podrazumeva izdvajanje vodonika iz polinezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u sastavu membrana i nastanak lipidnih radikala ( $L^\cdot$ ).

- U drugoj fazi, fazi propagacije dolazi do stvaranja velikih količina peroksil radikala i organskih hidroperoksida koji nastaju usled lančanih slobodno-radikalnih reakcija.

- Treća faza, faza terminacije lipidnih hidroperoksida, podrazumeva isecanje oksidaciono-modifikovanih nezasićenih masnih kiselina ili alkohola nastalog redukcijom LPO. Enzimi koji učestvuju u ovoj fazi su: glutathion-peroksidaza, fosfolipid hidroperoksid, glutathion-peroksidaza i selen nezavisna glutathion-S-transferaza (Štajn i sar., 2007).

Posledice lipidne peroksidacije su strukturno-funkcionalne promene ćelijske membrane. Oštećenjem membranskih lipida smanjuje se hidrofobnost lipidnog dvosloja

i menja se afinitet i interakcija proteina i lipida. Usled narušene lipo-proteinske interakcije remeti se homeostaza ćelije, što dovodi do disfunkcije ćelijskih procesa (deljenje, diferencijacija, endocitoza, egzocitoza, fagocitoza, transport jona, prijem i prenos signala, međućelijski kontakt) (Halliwell i Gutteridge, 2007). LPO dovodi do promena u fluidnosti bioloških membrana, opadanja vrednosti membranskog potencijala, povećanja propustljivosti prema jonima  $H^+$  i drugim jonima (Gutteridge i Halliwell, 1999b).

Proteini su važni ćelijski konstituenti i značajni ciljni molekuli ROS. Relativno male strukturne modifikacije proteina mogu da dovedu do značajnih promena u njihovoj ćelijskoj aktivnosti. Aminokiselinski ostaci proteina razlikuju se po stepenu osetljivosti na ROS, a aminokiseline koje su najosetljivije na oksidaciju su cistein i metionin (Bounous i Gold, 1991). Slično lipidnoj peroksidaciji,  $OH^\cdot$  predstavlja najreaktivniji ROS koji uzrokuje oksidaciona oštećenja proteina. Proces oksidacije proteina najčešće dovodi do nastanka novih funkcionalnih grupa, kao što su hidrosilne i karbonilne grupe (Kruidenier i Verspaget, 2002). Karbonilacija proteina je ireverzibilan proces i koristi se kao biomarker oksidacionog stresa (Valko i sar., 2007). Sekundarni efekti oksidacije proteina uključuju nastanak alkil, alkoksil i alkil-peroksil radikala, zatim fragmentaciju polipeptidnog lanca, promenu naelektrisanja proteina, povećanu osetljivost na proteolizu, protein-protein interakcije i agregaciju nastalih produkata. Narušavanje tercijarne strukture i funkcije različitih proteina (promene u aktivnosti enzima, receptornih i transportnih proteina) može da dovede do smrti ćelije (Almroth i sar., 2008).

ROS mogu da reaguju sa svim komponentama DNK molekula (purinske i pirimidinske baze, dezoksiriboza osnova) i dovedu do različitih oštećenja DNK, kao što su jednolančani i dvolančani prekidi molekula DNK, modifikacije purinskih i pirimidinskih baza i dezoksiriboze, delecije, mutacije i translokacije DNK, unakrsna povezivanja u okviru jednog ili oba lanca DNK, kao i unakrsna povezivanja DNK i proteina. Najviše proučavana lezija DNK je modifikacija purinske baze guanozina i formiranje 8-hidroksiguanozina (8-OH-G), koji je dobar biomarker oksidacionog stresa. Rezultat ovog procesa je zamena guanozin-citozin (GC) baznog para u timin-adenin (TA) bazni par nakon dva replikaciona ciklusa. Oštećenja DNK pod dejstvom različitih ROS dovode do sprečavanja indukcije transkripcije, grešaka u replikaciji i genomske



nestabilnosti, što predstavlja prvi korak uključen u mutagenezu, karcinogenezu i starenje (Halliwell i Gutteridge, 1999b; Kryston i sar., 2011).

## **1.2. Antioksidacioni sistem (AOS)**

Antioskidaciona zaštita je fiziološki proces koji u zdravom organizmu funkcioniše neprekidno i ima za cilj da spreči štetno delovanje prooksidativnih faktora (Halliwell i Gutteridge, 1989). Antioksidaciona zaštita se ostvaruje antioksidacionim sistemom (AOS) koji se razvio kod aerobnih organizama u toku evolucije sa ciljem da spreči, ograniči ili popravi oštećenja nastala delovanjem slobodnih radikala (Halliwell i Gutteridge, 1999b). Osnovu ovog sistema čine antioksidansi, odnosno svaka supstanca koja može, kada je prisutna u malim koncentracijama u odnosu na oksidovani supstrat, da spreči ili smanji oksidaciju supstrata (Halliwell i Gutteridge, 2007).

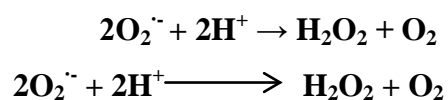
Prema prirodi i načinu delovanja razlikuje se primarna i sekundarna antioksidaciona zaštita. Primarna antioksidaciona zaštita se ostvaruje delovanjem neenzimskih i enzimskih komponenti AOS (Dröge, 2002). U enzimске komponente spadaju sledeći enzimi: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST). Van Der Oost i sar. (2003) su predložili koncept prema kome se enzim glutation-S-transferaza (GST) svrstava u grupu enzima faze II biotransformacije i tako izdvaja iz sistema zaštite od oksidacionih oštećenja. Neenzimsku antioksidacionu zaštitu ostvaruju supstance male molekulske mase, koje se prema rastvorljivosti dele na: supstance rastvorljive u vodi (vitamin C, glutation, metionin, cistein, albumin, bilirubin, biliverdin, mokraćna kiselina, transferin, ceruloplazmin, histidin, feritin), i supstance rastvorljive u mastima (vitamin E, vitamin A,  $\beta$ -karoten, koenzim Q) (Cadenas i sar., 1989).

Sekundarnu antioksidacionu zaštitu čine protein-specifične oksido-reduktaze (tiol-transferaze), protein-ADP-ribozil-transferaze i ATP i  $\text{Ca}^{2+}$  nezavisne proteaze (Cadenas i sar., 1989). U antioksidanse ubrajaju još i melatonin, metalotioneini, poliamini, urati, flavonoidi, polifenoli, fitoestrogeni, estrogeni, rezveratrol, piruvat,  $\alpha$ -ketoglutarat, melanin, dihidrolipoinna i lipoinna kiselina, karnozin, homokarnozin, taurin i anserin (Mates, 2000; Halliwell i Gutteridge, 2007).

## 1.2.1. Enzimi antioksidacionog sistema

### 1.2.1.1. Superoksid-dismutaza (SOD)

Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) predstavlja prvu liniju odbrane od ROS i ima ključnu ulogu u zaštiti ćelije od oksidacionih oštećenja. Superoksid-dismutaza katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala u kiseonik i vodonik peroksid, prema sledećoj jednačini (McCord i Fridovich, 1988):



Tokom evolucije nastalo je više klasa enzima SOD, što je povezano sa dostupnošću odgovarajućih metala u biosferi u različitim geološkim erama (Alscher i sar., 2002). Na osnovu metala koji je prisutan u aktivnom centru enzima, kao i lokacije u ćeliji, opisano je pet izoenzimskih formi SOD u živom svetu:

- ❖ 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).

Kod ljudi, svih sisara i skoro svih hordata prisutne su tri izoforme ovog enzima: bakar-cink zavisna (CuZnSOD), mangan zavisna (MnSOD) i ekstracelularna (ECSOD).

### 1.2.1.2. Katalaza (CAT)

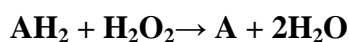
Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je jedan od najefikasnijih enzima u živom svetu, prisutan kod skoro svih eukariotskih i prokariotskih organizama izloženih molekularnom kiseoniku. Ovaj enzim ima ulogu u katalizi procesa razgradnje vodonik-peroksida do vode i kiseonika (Chelikani i sar., 2004). Katalaza u zavisnosti od koncentracije supstrata može da pokaže reakciju po katalaznom (brzom) ili peroksidaznom (sporum)

tipu (Sichak i Dounce, 1986). U katalaznom tipu reakcije, kao donor vodonika koristi se drugi molekul  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pri čemu nastaju  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$ .



Ovaj tip reakcije se odvija pri većim koncentracijama vodonik-peroksida.

U peroksidaznom tipu reakcije donori vodonika su različita organska i neorganska jedinjenja, a krajnji produkti su nativni enzim, oksidovani kosupstrat i voda.

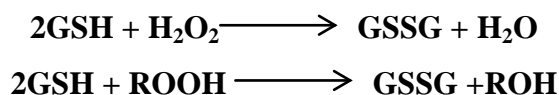


Reakcija se odvija kada su prisutne manje koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sichak i Dounce, 1986).

U eukariotskim ćelijama CAT se predominantno nalazi u peroksizomima, a prisutna je i u citosolu i mitohondrijama. Mnogi peroksizomalni enzimi, kao što je enzimski sistem za  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, dovode do produkcije velike količine  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zbog toga je uloga katalaze u ovim organelama od presudnog značaja za zaštitu ćelije od oksidacionih oštećenja (Fidaleo, 2010).

### 1.2.1.3. Glutation-peroksidaza (GSH-Px)

Glutation-peroksidaza (GSH-Px, EC 1.11.1.9) ima široku distribuciju u biljnom i životinjskom svetu, dok je prisustvo ovog enzima u prokariotskim ćelijama detektovano samo kod nekoliko vrsta (Halušková i sar., 2009; Arenas i sar., 2010). Kod eukariotskih organizama nalazi se u različitim ćelijskim kompartmentima, kao što su citosol, mitohondrije, peroksizomi i intermembranski prostor i prisutna je u gotovo svim ćelijama. GSH-Px katalizuje redukciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{H}_2\text{O}$  i organskih hidroperoksida (ROOH) u alkohole (ROH), pri čemu kao kofaktor koristi glutation (GSH):



GSH-Px ima veći afinitet za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na katalazu, tako da ima važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok je katalaza značajniji enzim u uslovima izrazitog oksidacionog stresa (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Opisane su tri forme ovog enzima: selen-zavisna glutation-peroksidaza (Se GSH-Px), selen-nezavisna glutation-peroksidaza (non-Se GSH-Px) i fosfolipid hidroperoksid glutation-peroksidaza (PH GSH-Px) (Halliwell i Gutteridge, 1999a).

#### 1.2.1.4. Glutation-reduktaza (GR)

Glutation-reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) je detektovana u svim grupama živog sveta. Prisutna je u prokariotskim ćelijama i u citosolu i mitohondrijama eukariotskih ćelija. Ovaj enzim katalizuje reakciju redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani glutation (GSH) uz učešće NADPH kao redukujućeg kofaktora (Heffner i Repine, 1989):

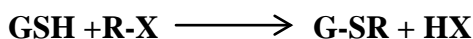


Enzim GR je homodimerni flavoprotein koji u aktivnom centru ima redoks aktivan disulfid. Svaka subjedinica sadrži prostetičku grupu flavin adenin dinukleotid (FAD). Dimerna priroda enzima neophodna je za njegovu funkciju, jer obe subjedinice učestvuju u formiranju aktivnog centra enzima. Katalitički ciklus GR ima dve faze, prvo NADPH redukuje FAD, pri čemu se redukujući ekvivalent prenosi na redoks aktivan disulfid, a zatim dolazi do redukcije GSSG u aktivnom centru enzima (Tandoğan i Ulusu, 2006).

Povećanje aktivnosti GR u odgovoru na oksidacioni stres rezultat je indukcije sinteze specifične GR mRNK kao i uspostavljanja ravnoteže sa ostalim komponentama antioksidacionog zaštitnog sistema. GR je značajan enzim u sistemu antioksidacione odbrane ćelije zato što učestvuje u održavanju visokog odnosa GSH/GSSG i redoks ravnoteže u ćeliji. Pored toga, svojim delovanjem obezbeđuje potrebnu količinu GSH kao kosupstrata za GSH-Px i GST (Mullineaux i Creissen, 1997).

### 1.2.1.5. Enzim faze II biotransformacije glutation-S-transferaza (GST)

Glutation-S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18) je važan deo detoksikacionog sistema ćelije. Najvažniji je enzim faze II detoksikacije i ima centralnu ulogu u odbrani protiv različitih sredinskih zagađivača. GST ima važnu ulogu u detoksikaciji jakih elektrofila koji imaju toksične, mutagene i karcinogene osobine. Ovaj enzim je prisutan u gotovo svim živim sistemima. Detektovan je u prokariotskim ćelijama i u citoplazmi, mitohondrijama i mikrozmima eukariotskih ćelija. Većina GST izoenzima su solubilni proteini, dok su u manjoj meri zastupljene forme koje su vezane za različite membrane u ćeliji (Hayes i sar., 2005). Najznačajnija reakcija enzima GST je konjugacija GSH sa različitim elektrofilnim supstratima (R-X), pri čemu se smanjuje njihova potencijalna reaktivnost sa ćelijskim makromolekulima:



GST ispoljava više različitih funkcija: detoksikacionu, transportnu i sintetičku.

Svaka subjedinica enzima GST poseduje dva funkcionalna regiona u aktivnom centru, hidrofilni G-region koji vezuje GSH i hidrofobni H-region koji vezuje strukturno različite elektrofilne supstrate. G-region enzima ima visoku evolutivnu očuvanost, dok se H-region razlikuje kod različitih izoformi u zavisnosti od supstrata koje vezuje. Nakon vezivanja GSH i elektrofilnog supstrata u aktivnom centru proteina, aktivira se sulfhidrilna grupa GSH, što omogućava nukleofilni "napad" na atom ugljenika, azota ili sumpora elektrofilnog jedinjenja. Formacija tioetarske veze između GSH i elektrofila, odnosno nastanak GSH konjugata rezultuje u manjoj reaktivnosti i većoj rastvorljivosti supstrata u vodi, tako da je ova reakcija uglavnom detoksikacione prirode. Međutim, kod jedinjenja kao što su halogeni alkeni i alkani, GSH konjugati su najčešće nestabilni i mogu da formiraju različite izrazito reaktivne intermedijarne strukture (Eaton i Bammler, 1999).

Osim detoksikacije različitih egzogenih jedinjenja, konjugacione reakcije sa GSH su ključne i za metabolizam endogenih reaktivnih međuprodukata. Svojom aktivnošću GST može da detoksikuje štetne produkte lipidne peroksidacije kao što je HNE, tako da ovaj enzim ima važnu fiziološku ulogu u zaštiti ćelije od oksidacionog

stresa koji je indukovano endogenim lipidnim peroksidima. GST takođe uklanja i jedinjenja koja nastaju oksidacionom degradacijom DNK (Wang i Ballatori, 1998). Pojedine izoforme enzima pokazuju GSH-Px aktivnost i katalizuju redukciju organskih hidroperoksida do odgovarajućih alkohola.

Do sada je identifikovano 15 klasa GST izoenzima: alfa, kapa, mi, pi, omega, sigma, teta i zeta koje su pronađene kod sisara, dok su beta, delta, epsilon, lambda, fi, tau i ro detektovane kod različitih nesisarskih vrsta (bakterije, gljive, biljke, mekušci, zglavkari, ribe, vodozemci, ptice) (Park i sar., 2009).

## **1.2.2. Neenzimske komponente antioksidacionog sistema**

### **1.2.2.1. Glutation (GSH)**

Tripeptid glutation (L-glutamicil-cisteinil-glicin) je niskomolekulsko tiolno jedinjenje koje čini 90% ukupnih neproteinskih sulfhidrilnih jedinjenja ćelije. Glutation se sintetiše iz aminokiselina (cisteina, glutamata i glicina) reakcijom koju katalizuju enzimi glutamilcistein-sintetaza i GSH- sintetaza (Griffith, 1999). Glutation predstavlja najzastupljeniji neproteinski, odnosno niskomolekulski tiol u ćelijama. Široko je rasprostranjen u životinjama, biljkama i mikroorganizmima i kao hidrofilno jedinjenje nalazi se u ćelijskom citosolu i drugim vodenim fazama živih sistema. On je antioksidans koji sprečava oštećenja ćelijskih komponenti koja mogu da uzrokuju formiranje reaktivnih vrsta kiseonika i azota, poput slobodnih radikala i peroksida (Pompella i sar., 2003). Prisutan je u svim ćelijama u citosolu, mitohondrijama, jedru i endoplazmatičnom retikulumu (Forman i sar., 2009). GSH reaguje brzo sa reaktivnim vrstama kiseonika i azota. Njegova zaštitna uloga se zasniva na sposobnosti sulfhidrilne grupe (-SH) cisteina da se reverzibilno oksiduje (Meister, 1992). Indirektno dejstvo može da ostvari kao kofaktor glutation-peroksidaze i glutation-S-transferaze u reakcijama detoksikacije vodoničnih i lipidnih peroksida (Mates, 2000).

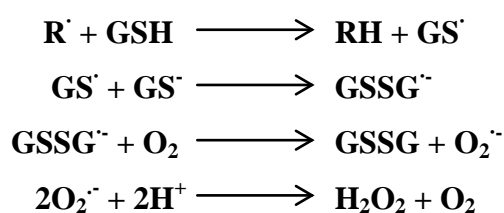
Glutation može da postoji u dva oblika, redukovanom (GSH) ili oksidovanom (GSSH). U redukovanom obliku koji je biološki aktivan, tiol grupe cisteina su sposobne da doniraju redukujući ekvivalent ( $H^+$ ,  $e^-$ ) drugim nestabilnim molekulima, kao što su reaktivne vrste kiseonika ili azota. Doniranjem elektrona, GSH postaje i sam reaktivan,

ali brzo reaguje sa drugim reaktivnim glutathionom gradeći glutathion disulfid (GSSG), odnosno oksidovani glutathion. Oksidovani glutathion je potencijalno toksičan, zato se jednim delom ekskretuje iz ćelije, dok se ostatak redukuje dejstvom enzima glutathion reduktaze (GR) uz učešće NADPH kao redukujućeg faktora do GSH, sledećom reakcijom (Huang i Huang, 2002):



Glutathionski redoks par (GSSG/GSH) je jedan od redoks sistema ćelije. U normalnim uslovima više od 90% glutathiona je u redukovanom obliku u ćelijama. U uslovima oksidacionog stresa odnos GSH/GSSG se smanjuje u smislu favorizovanja GSSG (Griffith, 1980). GSH u antioksidacionoj zaštiti funkcioniše na više nivoa. Pored toga što je kofaktor pojedinih antioksidacionih enzima, GSH direktno uklanja slobodne radikalske vrste  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  i  $ONOO^{\cdot-}$ , kao i lipidne radikale i hidroperokside, regeneriše važne neenzimske antioksidante (askorbinska kiselina,  $\alpha$ -tokoferol) do njihovih aktivnih formi, uključen je u direktnu popravku oksidacionih oštećenja molekula DNK i sprečava apoptozu izazvanu ROS i citokinima (Kruidenier i Verspaget, 2002).

GSH može da učestvuje u antioksidacionoj zaštiti u neenzimskim reakcijama, zahvaljujući sposobnosti da reaguje sa organskim radikalima ( $R^{\cdot}$ ) i tako zajedno sa enzimom SOD funkcioniše u prevenciji oksidacionih oštećenja:



GSH takođe može neenzimski da formira metalne komplekse. GSH je jedan od značajnih liganada koji vezuju metale, tako da ima važnu ulogu u transportu, deponovanju i metabolizmu metala. GSH funkcioniše u mobilizaciji i transportu metala između liganada, kao i kroz ćelijske membrane, izvor je cisteina za vezivanje metala i služi kao reduktant ili kofaktor u redoks reakcijama koje uključuju metale. Sulfhidrilna grupa cisteina u molekulu GSH ima visok afinitet za metale i formira merkaptide sa

nekoliko endogenih metala, kao što su živa, kadmijum, bakar, selen, hrom, olovo i cink (Mates, 2000).

Jedna od važnih uloga GSH je skladištenje i transport cisteina. Aminokiselina cistein brzo autooksiduje u cistin i tako dolazi do proizvodnje toksičnih radikala kiseonika. Da bi se sprečila toksičnost ove autooksidacione reakcije, većina neproteinskog cisteina se nalazi u formi GSH (Wang i Ballatori, 1998).

Pored toga što je jedan od značajnijih endogenih antioksidansa, GSH prema Dickinson-u i Forman-u (2002) ima i ulogu u:

- ❖ održavanju u redukovanju egzogenih antioksidanasa kao što su vitamin E i C,
- ❖ regulaciji ciklusa azot-monoksida,
- ❖ metaboličkim i biohemijskim reakcijama sinteze i reparacije DNK,
- ❖ u metabolizmu gvožđa u organizmu,
- ❖ regulaciji sinteze i degradacije proteina i
- ❖ regulaciji ćelijskog ciklusa i genskoj ekspresiji.

#### **1.2.2.2. Sulfhidrilne (SH) grupe**

Svako organsko jedinjenje koje sadrži sulfhidrilnu (SH) grupu vezanu za ugljenik naziva se tiol (R-SH). Funkcionalna SH grupa aminokiseline cistein ima najvažniju ulogu u živim sistemima. Osim najzastupljenijeg niskomolekulskog tiola u ćeliji GSH, veliki broj proteina sadrži aminokiselinu cistein koja zbog postojanja funkcionalne SH grupe može da bude modifikovana kroz različite redoks reakcije (Kemp i sar., 2008). 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).

Redoks modifikacija SH grupa proteina obuhvata različite reakcije, kao što su nitrozilacija (S-NO), hidroksilacija (S-OH), glutationilacija (S-SG) i formiranje proteinskih disulfida (S-S). Nitrozilacija SH grupa ima važnu ulogu u procesu prenosa signala sa površine ćelije u unutarćelijske kompartmente, kao što su jedro i mitohondrije. Hidroksilacija proteina može da dovede do dalje oksidacije u štetne



sulfinske (SO<sub>2</sub>H) i sulfonske (SO<sub>3</sub>H) kiseline. Glutationilacija predstavlja zaštitni mehanizam koji učestvuje u prevenciji formiranja ovih kiselina, ali ima i regulatornu funkciju u aktivnosti proteina. Intraproteinski disulfidni mostovi imaju važnu ulogu u određivanju tercijarne strukture proteina, a samim tim i njegove funkcije (Janssen-Heininger i sar., 2008).

Mnogi proteini su aktivni kada su SH grupe koje su ključne za njihovo funkcionisanje u redukovanoj, tiolnoj formi, dok je za druge potrebno da budu u oksidovanoj, disulfidnoj formi. Tiol-disulfidne promene su bidirekzione, tako da je njihova ravnoteža određena ćelijskim redoks statusom (Schafer i Buettner, 2001). U velikom broju studija se došlo do zaključka da izlaganje metalima izaziva značajne promene tiolnih jedinjenja u živim organizmima, pa su predloženi za efektivne biomarkere zagađenosti voda (Espin i sar., 2014). Još jedna važna osobina sulfhidrilnih grupa je da njihova količina predstavlja marker proteinske oksidacije (Labieniec i Gabryelak, 2007).

### **1.3. Parametri neurotoksičnosti- Holinesteraze**

Holinesteraze (ChE) su široko rasprostranjeni enzimi prisutni u holinergičkim i neholinergičkim tkivima kao i u plazmi i drugim telesnim tečnostima. ChE se smatraju biomarkerima neurotoksičnosti. Na osnovu specifičnosti vezivanja za supstrat podeljene 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 (Çokuğraş, 2003). AChE hidrolizuje neurotransmiter acetilholin u sinaptičkom prostoru na acetat i holin. Oslobođeni holin se preuzima i koristi za sintezu acetilholina. Mnogi zagađivači na prvom mestu organski pesticidi, inhibiraju aktivnost ovog enzima, otežavajući neurotransmisiju. Fiziološka funkcija enzima BChE još uvek nije jasno definisana, mada se smatra da je uključen u detoksikacione procese, odnosno da je sposoban da hidrolizuje širok spektar ksenobiotika (Taylor, 1991). Poslednjih godina, promene aktivnosti ChE se sve više povezuju sa toksičnim delovanjem različitih metala (Triquet-Amiard i sar., 2012).

#### 1.4. Biomonitoring, bioindikatori i biomarkeri

Sveprisutnost različitih zagađivača u životnoj sredini zahteva kontinuirano praćenje njenog stanja. Monitoring predstavlja svako ponovljeno merenje jednog ili više hemijskih ili bioloških parametara tokom dužeg ili kraćeg vremenskog perioda u određenom prostoru, korišćenjem uporedivih i standardizovanih metoda (definicija Programa za životnu sredinu Ujedinjenih nacija (*United Nations Environmental Program*, UNEP). Monitoring se na osnovu ove definicije može podeliti na hemijski i biološki monitoring (De Zwart, 1995).

Hemijski monitoring podrazumeva procenu izloženosti organizama zagađivačima na osnovu merenja nivoa određenog seta hemijskih parametara u životnoj sredini. Biološki monitoring ili biomonitoring prati specifične biološke odgovore organizama, koje predstavljaju posledice promena u kvalitetu životne sredine. Monitoring se može dalje podeliti u četiri grupe:

- ❖ Bioakumulacioni monitoring – vrši procenu izloženosti merenjem koncentracija zagađivača u živim bićima i njihovim životnim sredinama.
- ❖ Monitoring biološkog efekta – podrazumeva procenu izloženosti i efekta na osnovu ranog utvrđivanja nepovoljnog efekta u biološkim sistemima koji je delimično ili potpuno reverzibilan.
- ❖ Zdravstveni monitoring – procena stanja organizma praćenjem nepovratnih oštećenja i bolesti.
- ❖ Monitoring ekosistema – procenjivanje stanja ekosistema kroz posmatranje biodiverziteta, gustine i veličine populacije.

Za razliku od hemijskog monitoringa koji pruža informacije kojima se karakterizuju zagađivači, biološki monitoring ukazuje na efekat zagađivača na neki od aspekata ekosistema. Biološki monitoring meri efekat jedinjenja koji je povezan sa njegovom koncentracijom u organizmu i toksičnošću. Ipak, mana biološkog monitoringa je teško povezivanje zapaženih efekata sa specifičnim aspektima zagađenja zato što su organizmi u prirodi izloženi širokom spektru zagađivača. Najpouzdanije informacije pruža nam integrativni monitoring, koji se sastoji od kombinovane primene hemijskog i biološkog monitoringa (Van der Oost i sar., 2003). Zagađivači kroz interakciju životne sredine i živih organizama dospevaju u žive sisteme gde remete

homeostazu i prouzrokuju različite promene. Bioindikator se definiše kao organizam koji svojim prisustvom, odsustvom ili ponašanjem pruža informacije o uslovima u životnoj sredini koju nastanjuje, a ekološki indikator je ekosistemski parametar koji opisuje strukturu i funkcionisanje ekosistema. Prema Zhou i sar., (2008) idealni bioindikator bi trebalo da ima sledeće karakteristike:

- ❖ sposobnost akumulacije visokih koncentracija zagađivača i odsustvo štetnog dejstva zagađivača na sam organizam;
- ❖ život u sesilnoj zajednici i reprezentativnost za celu populaciju;
- ❖ brojnu i prostornu zastupljenost koja omogućava ponavljanje uzorkovanja i poređenje dobijenih rezultata;
- ❖ dovoljno dugačak život, što omogućava poređenje efekata zagađivača na bioindikator u različitim dobima;
- ❖ pogodan za lako uzorkovanje i uzgajanje u laboratoriji;
- ❖ značajno mesto u lancu ishrane;
- ❖ mogućnost lakog uočavanja odnosa između zagađujuće supstance i efekta koji ona ima;
- ❖ lako prepoznavanje organizma od strane nestručnih lica.

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (*World Health Organization*- WHO, 1993) biomarker podrazumeva svako merenje koje oslikava interakciju između biološkog sistema i potencijalne hemijske, fizičke ili biološke opasnosti. Prema Peakall-u (1994) biomarker se definiše kao promena u biološkom odgovoru (od molekularnog, preko ćelijskog i fiziološkog odgovora, pa do promena u ponašanju), koja može biti povezana sa izloženošću zagađivačima u životnoj sredini ili nastalim toksičnim efektima usled prisustva tih zagađivača. Biomarkeri se mogu podeliti u tri grupe (WHO, 1993):

- ❖ Biomarkeri izloženosti podrazumevaju detektovanje i merenje egzogenih supstanci ili njihovih metabolita ili produkata interakcije između ksenobiotika i ciljnog molekula ili ćelije, koji se mere unutar organizma. Biomarkeri izloženosti mogu da se koriste za potvrdu ili procenu izloženosti jedinke ili populacije određenoj supstanci, obezbeđujući vezu između spoljašnje izloženosti

i unutrašnjeg merenja. Bioakumulacija određenih kontaminanata u životinjskim tkivima spada u biomarkere izloženosti.

- ❖ Biomarkeri efekta uključuju merljive biohemijske, fiziološke ili druge promene u tkivima ili telesnim tečnostima organizma, koje mogu biti povezane sa utvrđenim ili mogućim pogoršanjem zdravlja ili bolešću. Biomarkeri efekta imaju upotrebu u potvrđivanju prekliničkih promena ili različitih efekta na zdravlje na osnovu izloženosti i apsorpcije hemijskih supstanci.
- ❖ Biomarkeri osetljivosti ukazuju na nasleđenu ili stečenu sposobnost organizma da odgovori na izloženost specifičnim ksenobioticima, uključujući genetičke faktore i promene u receptorima koji menjaju osetljivost organizma na tu izloženost. Biomarkeri osetljivosti pomažu u rasvetljavanju variranja stepena odgovora na izloženost zagađivačima kod različitih jedinki.

Za razliku od hemijskog monitoringa koji kvantifikuje nivo zagađivača u životnoj sredini, biomarkeri daju informacije o biološkom efektu tih zagađivača. Stres u organizmu koji nastaje usled prisustva zagađivača deluje kao okidač za kaskadu bioloških odgovora, od kojih svaki teorijski može da bude bioindikator (Mc Carthy i sar., 1991). Promene u biomarkerima pružaju rani upozoravajući signal i mogu se manifestovati na svim nivoima biološke organizacije. Za uspešno korišćenje nekog biomarkera, neophodno je utvrditi izvesne informacije, odnosno ispuniti sledeće kriterijume, po Viarengu i sar. (2007), biomarkeri moraju ispuniti sledeće uslove:

- ❖ biomarkeri treba da budu osetljivi na stres na molekularnom i ćelijskom nivou (da mogu brzo da se aktiviraju i da daju rane upozoravajuće signale efekata toksičnih supstanci na životinje);
- ❖ biomarkeri mogu da pokažu oštećenje nastalo od zagađivača i na nivou tkiva;
- ❖ biomarkeri mogu da budu osetljivi na stres na nivou organizma, dajući podatke o potencijalnom kapacitetu preživljavanja životinja, kao i njihove reproduktivne sposobnosti. Ovi biomarkeri su esencijalni za procenjivanje efekta zagađenja na pojedinca, kao i moguće promene na nivou populacije.

## **1.5. Metali u životnoj sredini**

U životnoj sredini uočen je porast koncentracije i distribucije metala. Od svih poznatih elemenata preko 80% njih pripadaju grupi metala, dok su ostali nemetali i metaloidi. Metali predstavljaju posebnu grupu toksičnih supstanci s obzirom da se u prirodi ne mogu razgraditi do netoksičnih formi. Jednom kada je ekosistem kontaminiran metalima, oni postaju potencijalna pretnja za žive organizme tokom niza godina. Metali i metaloidi grade veliki broj minerala i prirodno su zastupljeni u životnom okruženju. Eksploatacijom ovih minerala i njihovom daljom preradom dobija se širok spektar jedinjenja i kompleksa koji se koriste u različite svrhe. Veliki broj metala ima negativno dejstvo na žive organizme, pa se stoga njihovo oslobađanje u životnu sredinu mora redukovati, a ukoliko to nije moguće neophodno je efikasno lokalizovanje kontaminacije (Shafi, 2005).

### **1.5.1. Metali u vodenoj sredini**

Poslednjih godina problem zagađenja metalima je u žiži mnogih ekotoksikoloških i toksikoloških studija, zato što povećane koncentracije metala u vodenim ekosistemima predstavljaju problem na globalnom nivou. Vodeni ekosistemi su najviše pogođeni povećanim zagađenjem jer pored direktnog izlaganja kroz različite zagađivače koji se ispuštaju u njih, trpe i indirektan uticaj supstanci koje spiranjem iz vazduha i zemljišta završavaju u njima (Triquet-Amiard i sar., 2012). Metali su opasni jer su postojani, teško razgradivi i imaju tendenciju da se akumuliraju u živim sistemima gde u povećanim koncentracijama prouzrokuju različite toksične efekte. Metali u vodenu sredinu dospevaju prirodnim aktivnostima (ispiranjem zemljišta, stena) i/ili različitim ljudskim aktivnostima kao što su rudarstvo, poljoprivreda, metalna i farmaceutska industrija, saobraćaj, hemijska sredstva i otpad. U vodi se metali mogu naći u tri stanja: rastvorenim, koloidnim, i suspendovanim (vezanim). Stanje metala zavisi od karakteristika samog metala ali i u velikoj meri od fizičko-hemijskih karakteristika vodene sredine (Vicente-Martorell i sar., 2009). Parametri vode koji najviše utiču na stanje u kome će se naći metali su: pH, redoks stanje, količina kiseonika, helantni agensi i koncentracija liganada. Niske vrednosti pH uz dobru

aerisanost vode povećavaju rastvorljivost metala, dok povećanje pH dovodi do njihovog prelaska u nerastvorljiva ili manje rastvorljiva stanja. Redoks stanje vodene sredine može dovesti do promene aktivnosti redoks aktivnih metala. Helanti i ligandi vezuju metale i inaktiviraju njihovu aktivnost. U vodama se metali vezuju i za sediment u obliku teško rastvorljivih karbonata, sulfata ili sulfida, međutim taj proces je reverzibilan. Postoji dnevna, mesečna, sezonska i godišnja dinamika promena koncentracije vezanih i slobodnih metala koja prati dinamiku promene karakteristika vode. Živi organizmi mogu da usvajaju metale samo u rastvorenom obliku (Sharma, 2014).

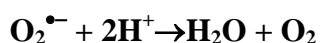
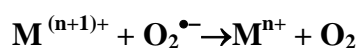
### **1.5.2. Metali u živim sistemima**

Kada govorimo o zagađenju metalima, uobičajan termin koji se primenjuje je teški metali, međutim još uvek ne postoji jedinstvena definicija teških metala. Po jednim su to svi metali koji imaju specifičnu gustinu veću od  $5 \text{ g/cm}^3$ , dok se kod drugih odnosi na metale i metaloide zajedno sa njihovim jedinjenjima koja su toksična ili ekotoksična i smatra se da zagađuju životnu sredinu (Krenkel, 2013). Međutim, mnogi metali su važni za normalno funkcionisanje organizama. Važni su delovi mnogih enzima i učestvuju u procesima oksido-redukciji. Neki od najbitnijih tzv. esencijalnih metala za žive organizme su gvožđe (Fe), selen (Se), bakar (Cu), cink (Zn), mangan (Mn), magnezijum (Mg) i molibden (Mo). Bakar je esencijalni metal za više biljke i životinje. Obzirom da bakar u svom elektronskom omotaču može lako primiti ili dati elektron, kofaktor je oksidaza i enzima koji su uključeni u eliminaciju slobodnih radikala. Nekoliko enzima sadrži Zn (alkohol-dehidrogenaza, RNK polimeraza, superoksid-dismutaza), a Zn je takođe neophodan i za održavanje ribozoma. Nikl je komponenta enzima ureaze, koja je esencijalna za normalan život životinja. Mn ima važnu ulogu u reakciji enzima kao što je npr. oksalosukcinat-dekarboksilaza. Takođe i Fe je deo mnogih značajnih proteina (hemoglobin, mioglobin) (Nagajyoti i sar., 2010). Ovi metali su do određene koncentracije potrebni organizmu za normalno funkcionisanje, dok veće koncentracije izazivaju različite toksične efekte. Postoje i metali koji pokazuju isključivo toksične efekte kad se nađu u organizmu. U ovu grupu se ubrajaju: aluminijum (Al), arsen (As), kadmijum (Cd), kobalt (Co), olovo (Pb), živa

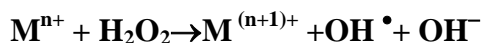
(Hg), nikel (Ni) i kalaj (Sn). Treća grupa metala je ona koja se intenzivno koristi u medicini u terapijama različitih bolesti: bizmut (Bi), fluor (F), zlato (Au), galijum (Ga), litijum (Li) i platina (Pt) (Valko i sar., 2005).

Brojne studije su pokazale da metali u organizmu mogu dovesti do brojnih neurodegenerativnih i endokrinih promena, kancerogeneze, poremećaja u metabolizmu, teratogenih i mutagenih efekata. Tačni mehanizmi dejstva metala nisu u potpunosti istraženi, ali se kao jedan od glavnih mehanizama navodi njihova sposobnost da izazovu oksidacioni stres u ćelijama (Tchounwou i sar., 2012).

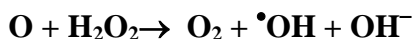
Metali mogu izazvati oksidacioni stres direktno ili indirektno u zavisnosti od njihove redoks aktivnosti. Redoks aktivni (Cu, Co, Cr, Fe, Ni i Zn) metali direktno izazivaju oksidacioni stres. Oni imaju promenljive valence i stupaju u Fentonovu i Haber-Vajsovu reakciju, tokom kojih se proizvode slobodni radikali kiseonika (M-metal) (Slika 1.) (Valko i sar., 2005).



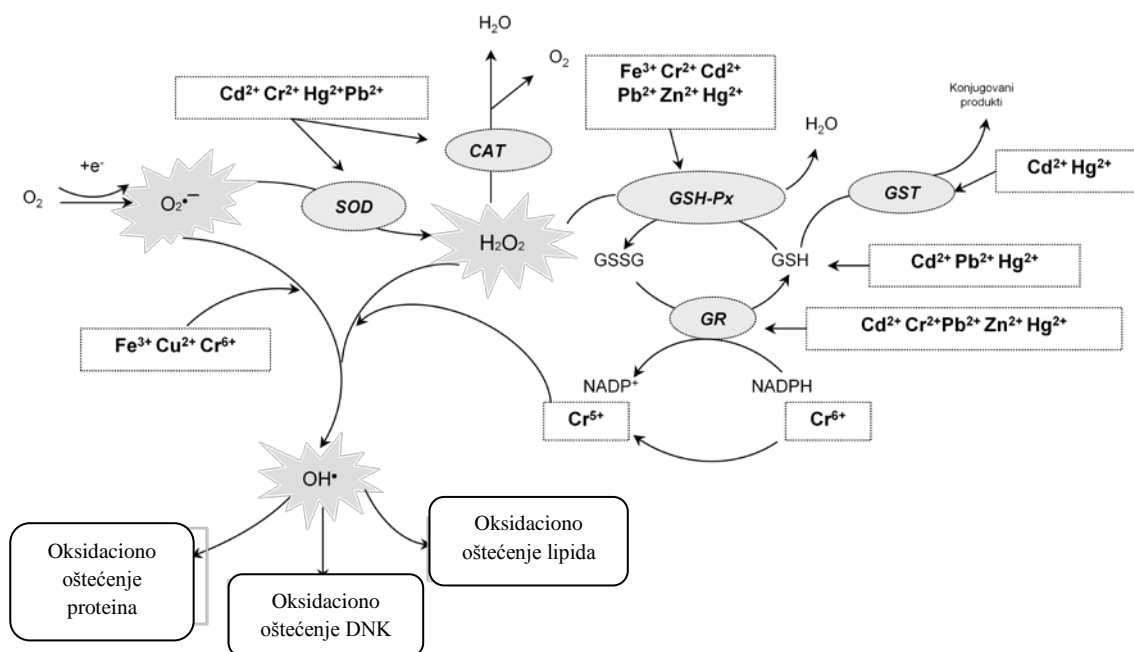
Fentonova reakcija



Haber-Vajsova reakcija

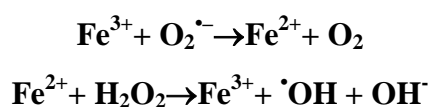


Redoks neaktivni metali (As, Cd, Hg i Pb) indirektno dovode do oksidacionog stresa kroz promenu aktivnosti antioksidacionog sistema (AOS) ili dovode do povećanja koncentracije metala koji su direktni uzročnici oksidacionog stresa (Ercal i sar., 2001).

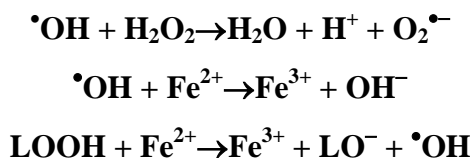


**Slika 1.** Efekti metala na produkciju ROS i aktivnost antioksidacionog sistema (modifikovano od Valko i sar., 2005).

**Gvožđe (Fe)** se u biološkim sistemima može naći u tri oblika  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{4+}$ , pri čemu su prva dva oblika najčešća. U povećanoj koncentraciji gvožđe izaziva oštećenje jetre, srca, učestvuje u procesu kancerogeneze, neurodegenerativnih bolesti i dijabetesa. Gvožđe je jedan od najproučavanijih metala, kao redoks aktivni metal dovodi do produkcije hidrosil radikala kroz Fentonovu reakciju (Fraga i Oteiza, 2002):

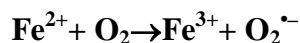


Hidrosil radikal kao jedan od najreaktivnijih oblika slobodnih radikala može da oštećuje DNK, proteine i lipide. Reakcija sa organskim jedinjenima:





Joni gvožđa mogu takođe da redukuju molekularni kiseonik i dovedu do nastanka superoksida anjon radikala (Valko i sar., 2004):



**Bakar (Cu)** je aktivno uključen u oksido-redukcijske procese u organizmu i može se naći u dva oblika  $\text{Cu}^+$  nestabilan i  $\text{Cu}^{2+}$  stabilan.  $\text{Cu}^+$  u reakciji sa vodonik-peroksidom produkuje hidroksil radikal (Fentonova reakcija):

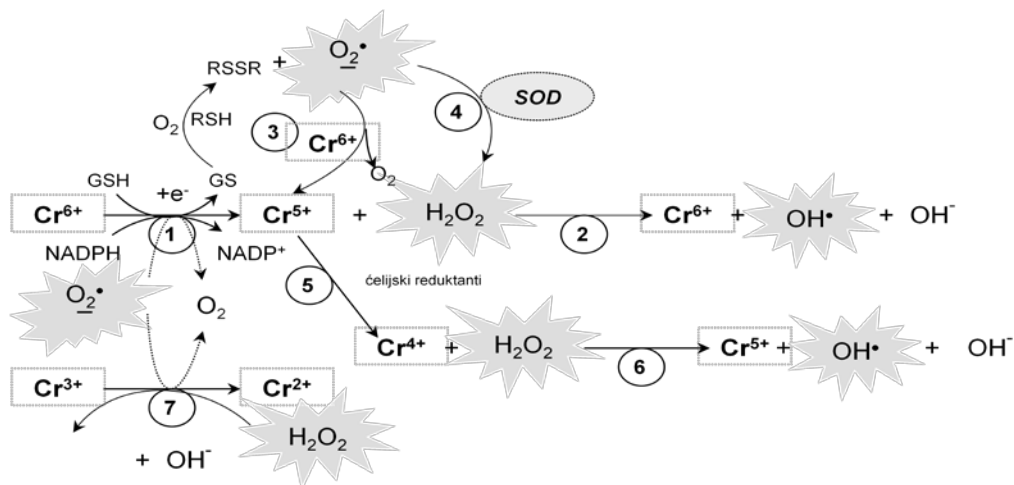


Bakar je i integralni deo proteina neophodnih za neurološke funkcije i njegova toksičnost se povezuje najčešće sa neurodegenerativnim oštećenjima izazvanih oksidacionim stresom. Oba oblika bakra dovode do raskidanja veza u DNK strukturi, a njihova reaktivnost je znatno veća od drugih redoks aktivnih metala (Fe, Cr, Zn) (Buettner i Jurkiewicz, 1996).

**Hrom (Cr)** je metal koji se može naći u seriji različitih oblika od 2- do 6+, ali se u biološkim sistemima nalazi kao 3+ i 6+.  $\text{Cr}^{3+}$  spada u bioelemente i neophodan je za normalno funkcionisanje insulina i regulacije metabolizma glukoze, dok je  $\text{Cr}^{6+}$  najtoksičnije valentno stanje hroma. Hrom se najčešće taloži u jetri, kostima, plućima i limfnim čvorovima (Stearns i Wetterhahn, 1997). U ovim organima pokazuje najveći toksični efekat i na prvom mestu se povezuje sa kancerogenezom.  $\text{Cr}^{6+}$  može da ulazi u seriju oksido-redukcionih procesa koji za rezultat imaju produkciju hidroksil radikala (Slika 2):

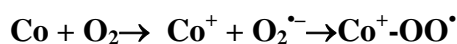
1. redukciju  $\text{Cr}^{6+}$  jona favorizuju prvenstveno GSH, askorbat i NADPH flavoenzimi (reakcija 1),
2. nastali dugoživeći  $\text{Cr}^{5+}$  joni zatim reaguju sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  u Fentonovoj reakciji, gradeći veoma reaktivne  $\text{OH}^\bullet$ , čime bi se mogla objasniti i citotoksičnost  $\text{Cr}^{6+}$  (reakcija 2),
3. redukovani oblik glutationa  $\text{GS}^\bullet$ , osim što i sam može izazvati oštećenje ćelije, može dalje da reaguje sa tiolnim grupama pri čemu nastaje  $\text{O}_2^{\bullet -}$  (reakcija 3).
4. superoksidni radikal može dalje da redukuje  $\text{Cr}^{6+}$  do  $\text{Cr}^{5+}$  (reakcija 4) koji zatim u reakciji sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  ponovo daje  $\text{OH}^\bullet$ ,

5. petovalentni Cr se takođe može redukovati u prisustvu ćelijskih reduktanata (reakcija 5) pri čemu nastaje  $\text{Cr}^{4+}$  koji zatim ulazi u Fentonovu reakciju (reakcija 6),
6. iako se do nedavno smatralo da je  $\text{Cr}^{3+}$  netoksičan, novija istraživanja ukazuju da u prisustvu bioloških reduktanata može doći do njegove redukcije do  $\text{Cr}^{2+}$  koji takođe u Fentonovoj reakciji daje  $\text{OH}^\bullet$  (reakcija 7).

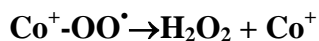


**Slika 2.** Mehanizam kojim hrom indukuje oksidacioni stres u ćeliji (modifikovano od Valko i sar., 2005)

**Kobalt (Co)** je element koji je u malim količinama prisutan kao sastavni deo zemljišta. U životnu sredinu dospeva rastvaranjem iz zemljišta ili antropogenim aktivnostima koje su najčešće povezane sa proizvodnjom uglja. Može biti u  $2+$  i  $3+$  obliku u organskim i neorganskim jedinjenjima.  $\text{Co}^{2+}$  je oblik koji ulazi u Fentonovu reakciju, međutim Co može u organskim sistemima da nagradi  $\text{Co}^+ - \text{OO}^\bullet$  kompleks kao međuproizvod u produkciji slobodnih radikala (Kubrak i sar., 2011).



Dalje u prisustvu SOD se katalizuje  $\text{Co}^+ - \text{OO}^\bullet$

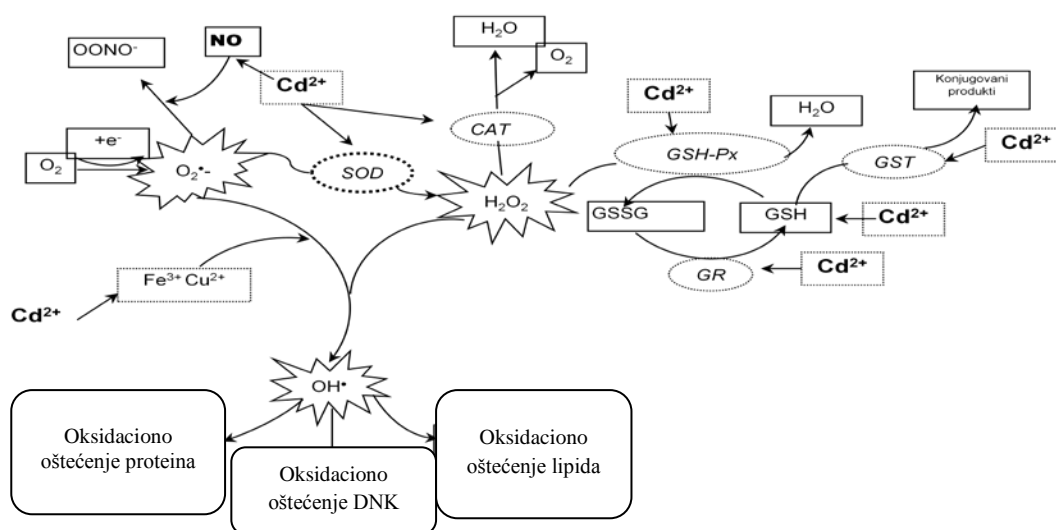


Co<sup>+</sup> dalje može da stupi u Fentonovu reakciju



**Nikl (Ni)** je metal sa promenljivom valencom (od 1- do 4+) ali u biološkim sistemima je prisutan kao 2+. Njegova redistribucija u životnoj sredini zavisi od fizičko-hemijskih procesa. Pokazano je da je na pH < 6.5 nikl jako solubilan, rastvara se u mastima i prolazi ćelijske membrane, a takođe se transportuje i kroz kalcijumske kanale. Nikl u povećanoj koncentraciji utiče na metabolizam kalcijuma smanjujući njegovu količinu u ćelijama. Izbacivanje nikla se vrši preko urina i fecesa. Nikl produkuje hidroksil radikal kroz Fentonovu reakciju (Chen i sar. 2003).

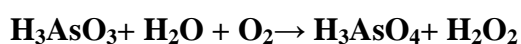
**Kadmijum (Cd)** spada u grupu najispitivnijih metala i označen je kao jedan od najtoksičnijih zbog izraženog kumulativnog dejstva. Kadmijum izaziva niz štetnih efekata u organizmu posebno u tkivima bubrega, pluća i skeletnog sistema, a može biti i uzročnik različitih karcinoma. Indirektno utiče na nastank slobodnih radikala kroz uticaj na enzimske i neenzimske komponente antioksidacionog sistema organizma i povećanje sadržaja redoks aktivnih metala (Fe i Cu) pri trovanju kadmijumom. Kadmijum može stupati u kompeticiju sa metalima koji su sastavni deo samih enzima i na taj način inhibirati aktivnost enzima, dok istiskujući druge metale kadmijum povećava njihovu koncentraciju u ćeliji (Slika 3) (Cuypers i sar., 2010).



**Slika 3.** Mehanizam indukcije oksidacionog stresa kadmijumom (modifikovano od Valko i sar., 2005)

**Živa (Hg)** je u prirodi jako postojana i nalazi se u brojnim hemijskim i fizičkim oblicima: elementarna (metalna živa i živine pare), u obliku neorganskih jedinjenja koja mogu biti 1+ i 2+ i u obliku organskih jedinjenja žive od kojih je najznačajnija metil živa (nastaje prvenstveno metilacijom neorganskih jedinjenja mikroorganizmima u zemljištu i vodi). Svi oblici žive izazivaju brojne štetne efekte uključujući nefrotoksičnost, neurotoksičnost i poremećaje gastrointestinalnog trakta tako što neorganska jedinjenja koja dominantno oštećuju bubrege dok organska nervni sistem (Ercal i sar., 2001). Iako se efekti neorganskih i organskih jedinjenja žive na organizam razlikuju, obe grupe jedinjenja mogu uzrokovati oksidacioni stres. Neorganska jedinjenja žive izazivaju smanjenje nivoa slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa i tako indukuju pojavu oksidacionih oštećenja tkiva, takođe, ona deluje i na homeostazu kalcijuma. Za organska jedinjenja žive, karakteristično je da oštećuju nervni sistem, što se objašnjava interakcijom sa gvožđem i drugim metalima koji katalizuju produkciju slobodnih radikala (Tan i sar., 1993).

**Arsen (As)** kao i živa, može se naći u neorganskim i organskim jedinjenjima. U neorganskim jedinjenjima je prisutan kao arsenit ( $\text{As}^{3+}$ ) i arsenat ( $\text{As}^{5+}$ ), dok su organska jedinjenja metil-arsenova kiselina (MMA) i dimeti-arsenova kiselina (DMA). U životnoj sredini As je najprisutniji u vodenim sredinama, jako je toksičan i kancerogen. Kancerogenezu izaziva kroz produkciju slobodnih radikala koji oštećuju strukturu DNK. Arsen utiče na produkciju superoksid anjona ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), singlet kiseonika ( $^1\text{O}_2$ ), peroksil radikal ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), azot monoksida ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), dimetilarsenik peroksil radikala ( $[(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}^{\bullet}]$ ) i dimetilarsenik radikala ( $[(\text{CH}_3)_2\text{As}^{\bullet}]$ ).  
Produkcija vodonik peroksida:



Pored direktne produkcije slobodnih radikala, As indirektno utiče na aktivnost AOS (Huang i sar., 2002).

**Olovo (Pb)** pored žive i kadmijuma spada u grupu najznačajnijih zagađivača životne sredine. Olovo je opšte prisutno u životnoj sredini kao rezultat prirodnih procesa ali u značajnijoj meri i kao rezultat antropogenih aktivnosti (sagorevanje fosilnih goriva, rudarstvo, proizvodnja baterija, cevi i kablova). Prisustvo olova u živim sistemima

uzrokuje oksidacioni stres, međutim tačan mehanizam produkcije nije jasan, a pretpostavlja se da inhibira aktivnost AOS (Lushchak, 2011).

### 1.6. Žabe kao bioindikatori

Tokom poslednjih 30 godina brojnost žaba značajno opada na globalnom nivou. Kao najčešći uzroci za takvo stanje navode se: uništena staništa, zagađenje, predatori, klimatske promene, bolesti i njihova upotreba kao izvor hrane i kućnih ljubimaca (Blaustein i Wake, 1995). Hemijski stresori su doveli do sve intezivnijeg korišćenja i ispitivanja žaba u ekotoksikološkim studijama. Žabe su prepoznate kao jednistveni organizmi među kičmenjacima zato što su prisutni i u vodenoj i kopnenoj sredini. Prema Loumbourdis-u i Wray-u (1998) karakteristike koje izdvajaju žabe su:

- ❖ složen životni ciklus (jaja i larve koje su vezane za vodenu sredinu, metamorfoza iz larve u juvenilni stadijum i fiziološki zahtevi povezani sa metamorfozom, stadijum adulta koji je prisutan u akvatičnoj i terestričnoj sredini),
- ❖ način ishrane,
- ❖ polupropustljiva koža,
- ❖ lako gajenje u laboratorijskim uslovima,
- ❖ jednostavna manipulacija,
- ❖ ograničen areal kretanja
- ❖ dugovečnost, velika brojnost populacija i široka distribucija.

Žabe ispunjavaju skoro sve kriterijume za dobre bioindikatore koje su predložili Zhou i sar. (2008). Zbog svih navedenih karakteristika žabe su na različite načine izložene zagađivačima. Postoje tri osnovna puta unosa ksenobiotika:

- ❖ preko vode, odnosno kože i kapsule jaja,
- ❖ preko hrane odnosno gastrointestinalnog trakta (GIT) i
- ❖ preko vazduha, odnosno pluća.

Organske i neorganske supstance iz vode kroz kožu koja je uključena u procese razmene gasova i jona dospevaju u organizam adulta, dok u jaja dospevaju kroz zaštitnu kapsulu. Kod vrsta koje se ukopavaju u zemlju zabeleženo je usvajanje ksenobiotika preko kože iz zemljišta ali u minimalnom stepenu. Ishranom se usvajaju supstance preko GIT, adulti se hrane terestričnim i akvatičnim beskičmenjacima dok su larve

isključivi herbivori. Dešava se i slučajno gutanje dela zemlje, pa se i ovaj način navodi u literaturi. Gasovi se usvajaju preko pluća. Usvajanje i akumulacija supstanci zavisi od brojnih faktora: temperature, pH, vlažnosti, oblika u kom su supstance, načina unosa, dužine izlaganja, sinergističkih i antagonističkih efekata (Sparling i sar., 2010).

### **1.6.1. *Pelophylax esculentus* (*Rana esculentus*) kompleks**

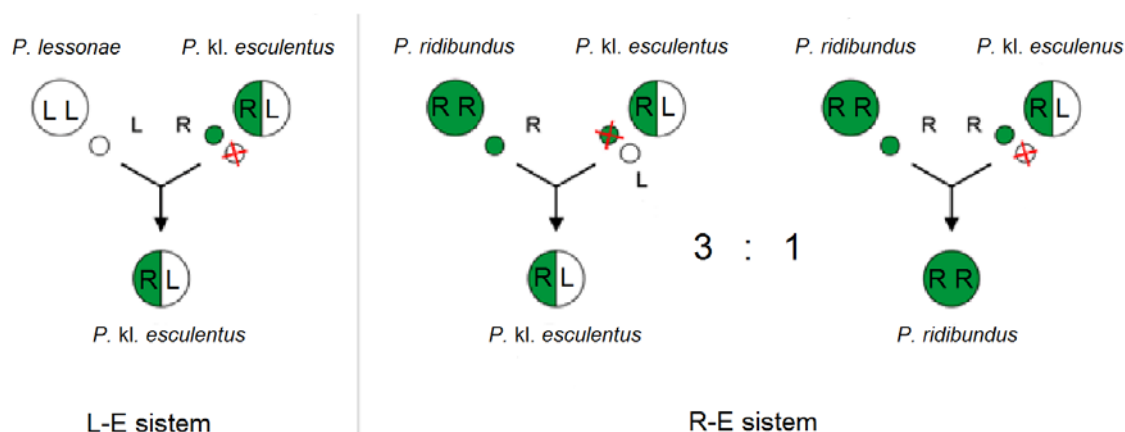
Zelene žabe roda *Pelophylax/Rana* naseljavaju skoro celu Evropu, izuzev njenih krajnjih severnih delova. Ima ih i u severnoj Africi i delovima jugozapadne Azije do Pakistana i Tadžikistana. Ove žabe su od prvog opisa vrsta svrstane u rod *Rana* Linnaeus, 1758 (Günther i Plotner, 1994) zajedno sa vrstama poznatim kao „mrke žabe”. Od Dubois i Ohler (1994) postoji trend svrstavanja grupe zelenih žaba u novi podrod u okviru roda *Rana*, pod nazivom *Pelophylax*. Sve do danas, postoje nesuglasice oko uvođenja novog imena i samog taksonomskog statusa ove grupe iako značajan broj današnjih autora, u novom filogenetskom pristupu rešavanja taksonomskih i sistematskih pitanja zelenih žaba, usvaja i novu nomenklaturu i izdvaja ovu grupu žaba u novi rod *Pelophylax* Fitzinger, 1843. U okviru zapadno palearktičkih zelenih žaba, shodno svom jedinstvenom reproduktivnom modelu izdvajaju se zelene žabe *Pelophylax esculentus* kompleks. Kompleks se sastoji od tri morfološke forme koje koegzistiraju, od kojih dve – *Pelophylax ridibundus* (*Rana ridibunda*) Pallas, 1771 i *Pelophylax lessonae* (*Rana lessonae*) Camerano, 1882 predstavljaju roditeljske “dobre” vrste a treća sa intermedijernim karakteristikama – *Pelophylax* kl. *esculentus* (*Rana* kl. *esculenta*) Linnaeus, 1758 predstavlja njihov hibrid (Berger, 1968). Značajno je naglasiti da su u literaturi prihvaćeni termini „kompleks“ i „sistem“. Termin „kompleks“ (eng. *complex*) koristi se prvenstveno radi sumiranja i zajedničkog označavanja različitih evropskih zelenih žaba *sensu stricto*. Uzell i Berger (1975) prvi uvode termin kompleks kojim označavaju populaciju sa različitom genetičkom strukturom, odnosno razlike populacija u pogledu prisustva roditeljskih vrsta (*P. ridibundus* i *P. lessonae*) i njihovog prirodnog hibridogenetskog hibrida (*P. kl. esculentus*). Termin „klepton“ (skraćenica kl.) uvode Dubois i Günther (1982) da bi označili taksone klonalne ili hemiklonalne reprodukcije u rang vrste, koji se od tzv. „dobrih“ vrsta razlikuju po specifičnom tipu

reprodukcije. Pri tome opstanak ovih taksona je uslovljen prisustvom roditeljskih vrsta, čiji genetski materijal bez rekombinacije preuzimaju tokom mejoze.

Kod *Pelophylax esculentus* kompleks vrsta u reprodukciji izostaje rekombinacija i razmnožavanje se odvija hibridogenezom (Slika 4). Tokom mejoze kod hibrida ne dolazi do nezavisne segregacije hromozoma tako se samo jedan set hromozoma prenosi u gamete. Hibridogeni mogu, stoga, biti označeni i kao „seksualni paraziti” jer poseduju klonalni genom nasleđen od jednog hibridnog roditelja i jedan seksualni genom koji „pozajmljuju” od roditeljske vrste samo u jednoj generaciji (Vorburger, 2001). Regulatorni mehanizmi hibridogenetskog načina nasleđivanja nisu do kraja poznati. Naročito podaci koji ukazuju na učešće rekombinacija između parentalnih genoma (Plötner i sar., 1994) ne idu u prilog definisanju hibridogeneze *sensu stricto*.

Tri alternativna mehanizma hibridogenetskog sistema nasleđivanja (Uzzell i sar. 1976) i danas predstavljaju osnov istraživanja:

- ❖ Ovakav sistem nasleđivanja je rezultat gubitka jednog ili drugog hromozomskog seta roditelja tokom mejoze.
- ❖ Produkcija većeg broja rekombinovanih gameta i zigota koji mogu biti eliminisani gametskom selekcijom ili selektivnim mortalitetom.
- ❖ Gametociti u kojima se odvija rekombinacija ne formiraju funkcionalne gamete.

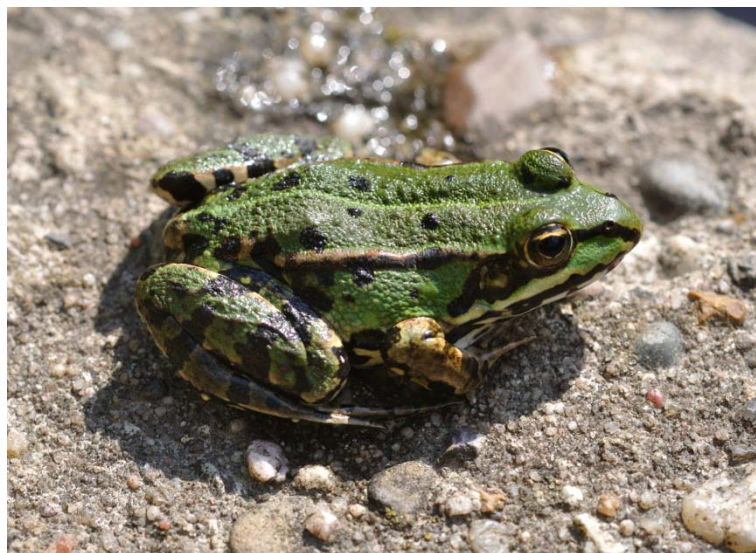


**Slika 4.** Hibridogeneza žaba *Pelophylax esculentus* kompleksa (modifikovano od Vorburger i Reyer, 2003).

Zelene žabe, usled specifičnog načina života kao i reprodukcije, odnosno vezanosti za određeni tip staništa, organizovane su po principu metapopulacionog sistema. Lokalna staništa koja pružaju optimalne uslove za život ovih životinja predstavljaju diskretne reproduktivne jedinice odnosno deme. Nekoliko deme, između

kojih postoji razmena jedinki putem disperzije i samim tim ograničen protok gena, čine metapopulaciju (Levins, 1969).

Vrsta *Pelophylax ridibundus*- velika zelena žaba (Slika 5) naseljava mešovite i listopadne šume, šumostepe, stepe, poluaridne i aridne predele. Kao semiakvatična vrsta naseljava i veoma raznolike tekuće i stajaće vode od plitkih bara, lokvi, svih vrsta veštačkih vodenih ekosistema do velikih reka i jezera. Tolerantna je i na relativno visok salinitet (Katz, 1975) i na nekim mestima razmnožava se i u blizini zapadnih obala Kaspijskog mora. U osnovi velika zelena žaba preferira otvorena, dobro osunčana staništa sa obiljem vegetacije. Izuzetke čine delovi velikih reka sa manje vegetacije u priobalju, ali i u tim slučajevima ne udaljava se previše od mirnijih i zaklonjenijih delova toka (meandri, limani).



**Slika 5.** Velika zelena žaba (*Pelophylax ridibundus*)

(preuzeto sa [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pelophylax\\_ridibundus\\_qtl3.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pelophylax_ridibundus_qtl3.jpg)).

Ova žaba, generalno, spada u vodozemce koji imaju veoma brojne populacije. U rekama srednje i južne Evrope njihova populaciona gustina može biti od više stotina do više od hiljadu jedinki na kilometru obale (Kuzmin, 1999).

Hibernacijski period je od septembra – oktobra do početka juna (severni delovi areala) ili novembra i decembra do januara ili februara (južni delovi areala). U delovima areala u Srbiji postoje mikrostaništa u kojima je ova vrsta registrovana i tokom cele zime u nezaleđenim vodenim basenima, što je inače redovna pojava u južnim delovima areala. Po pravilu hibernacija se odvija u vodi ali na nekim mestima dešava se i u



rupama i jamama na rečnim i jezerskim obalama i nasipima. Parenje, u odnosu na delove areala i vremenske okolnosti, počinje u periodu od nekoliko dana do mesec dana nakon završetka hibernacijskog perioda. Mužjaci i ženke provode nekoliko dana u amplexusu a broj položenih jaja varira od nekoliko stotina do više hiljada (Krizmanić i Ivanović, 2010).

Vreme metamorfoze zavisi od vremenskih uslova, karakteristika staništa i geografske širine, ali se obično dešava u periodu april – novembar. U nekim delovima areala u Evropi i Aziji registrovana su prezimljavanja punoglavaca (i do nekoliko hiljada jedinki po lokalitetu). U takvim slučajevima registrovani su i punoglavci velikih dužina (Kuzmin, 1999) koji metamorfoziraju sledećeg proleća. Dostizanje polne zrelosti za *P. ridibundus* se kreće u proseku od prve do četvrte godine života, dok je ukupni životni vek od pet do jedanaest godina (Yilmaz i sar., 2005).

Punoglavci se hrane detritusom, algama, višim biljkama kao i beskičmenjacima i njihovim leševima. Adulti se hrane pretežno kopnenim i akvatičnim insektima. Ishrana se ne prekida u reproduktivnom periodu a jedinke ove vrste su veoma proždrljive i napadaju i sve pokretne predmete u svom vidokrugu (lišće, grane ili neki drugi objekt koji se pomera na vetru). Hrane se i sitnim ribama, gmizavcima, pticama, sisarima kao i drugim vrstama vodozemaca uključujući i pripadnike svoje vrste (Krizmanić i Ivanović, 2010).

*Pelophylax lessonae*- mala zelena žaba (Slika 6) generalno naseljava vodene ekosisteme u listopadnim i mešovitim šumama. Naseljava i stepe unutar šumskih kompleksa i žbunovitih područja. Primarno se registruje u stajaćim vodama (jezera, ribnjaci, močvare, bare, kanali i sl.) obraslim vodenom vegetacijom. Vodena staništa mogu biti unutar ili na ivicama šumskih ekosistema, na proplancima, poljima i poplavnim livadama. Povremeno može se naći i u manjim barama pored vodenih tokova. Prisustvo stalnih vodenih biotopa je neophodno za opstanak ove vrste. Iako su jedinke prvenstveno slabo migratorne (Holenweg i sar., 2001), u šumskim ekosistemima, pri visokoj vlažnosti vazduha, mogu se naći i na kopnu daleko od vodenih staništa. Smatra se da mogu migrirati i do 8 kilometara (Kuzmin, 1999).



**Slika 6.** Mala zelena žaba (*Pelophylax lessonae*)

(preuzeto sa <https://commons.wikimedia.org/wiki/pelophylax-lessonae.jpg>)

Na mnogim mestima ova vrsta predstavlja uobičajenog predstavnika batrahofaune, čije gustine populacija mogu biti značajne. Hibernacioni period je, u zavisnosti od lokalnih uslova, od septembra – novembra do marta – maja meseca. Širom areala hiberniraju i u vodi i na kopnu. Reproductivni period je ograničen na period mart –jun. Ženke polažu jaja u grupama od nekoliko stotina do nekoliko hiljada. Metamorfoza se dešava od juna do oktobra. Juvenilne forme ponekad prezimljuju. Polnu zrelost dostižu u drugoj odnosno trećoj godini života. Životni vek jedinki je oko 12 godina (Pruvost i sar., 2013).

Punoglavci se najčešće hrane algama. Juvenilne jedinke jedu velike količine muva i letećih insekata. Ishrana adulta je pretežno sastavljena od terestičnih i vodenih beskičmenjaka (shodno svojim telesnim dimenzijama, ova žaba je manje proždrljiva od ekološki slične vrste *P. ridibundus*). Pored navedenog, u ishrani koriste i manje primerke različitih vodozemaca i gmizavaca (Kuzmin, 1999).

*Pelophylax* kl. *esculentus*- zelena žaba (Slika 7) je hibrid između vrsta *P. ridibundus* i *P. lessonae* (Berger, 1968). U prethodnom periodu smatrana je validnom vrstom ili podvrstom (Graf i Polls-Pelaz, 1989; Ogielska, 1994). Saglasno prihvaćenom shvatanju, predstavlja sistematsku kategoriju “klepton” (Dubois i Günther, 1982), koja podrazumeva specifičan tip reprodukcije koji je uslovljen prisustvom roditeljskih vrsta, čiji genetski materijal se nasleđuje bez rekombinacija. Pokazuje izraženu morfološku intermedijarnost u odnosu na roditeljske vrste *P. ridibundus* i *P. lessonae*. Na

celokupnom arealu nalazi se u različitim kvantitativnim i reproduktivnim odnosima sa roditeljskim vrstama. U okviru hibridnih populacija, pored diploidnih jedinki javljaju se i triploidi, kao i populacije sa različitom polnom strukturom (Pruvost i sar., 2013).



**Slika 7.** Zelena žaba (*Pelophylax kl. esculentus*)

(preuzeto sa [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pelophylax\\_esculentus.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pelophylax_esculentus.jpg)).

Hibridni takson, uzimajući u obzir generalno rasprostranjenje, naseljava staništa obe roditeljske vrste: poplavna područja uz vodotokove, reke, kanale, jarkove, bare i močvare, kao i veštačke vodene biotope, s tim da je preferenca staništa sličnija vrsti *P. lessonae*. Naseljava i antropogeno značajno izmenjena staništa (Krizmanić i Ivanović, 2010).

Hibernacioni period je od septembra – oktobra do marta odnosno maja meseca (Holenweg i Reyer, 2000). Ishrana je slična kao i kod roditeljskih vrsta, i u slučaju juvenilnih i adultnih oblika. Punoglavci provode više vremena u ishrani, uzimaju znatno više hrane i ispoljavaju višu stopu rasta od juvenilnih oblika obe roditeljske vrste (Rist i sar., 1997).

## 2. Cilj istraživanja

Organizmi su u životnoj sredini izloženi različitim zagađivačima i sredinskim faktorima. Metali su obeleženi kao rastući problem zbog postojanosti i visoke toksičnosti. Postoji puno podataka o toksičnim efektima metala ali i dalje se ne zna kako sve metali mogu da deluju na organizam a naročito kakav je efekat izlaganja kombinacijama različitih metala. Većina današnjih studija je ograničena na laboratorijske uslove i ispitivanje efektata samo jednog metala. Nasuprot njima, terenske studije pružaju podatke o mogućim interaktivnim efektima na žive organizme. Jedan od načina delovanja metala na organizme je kroz sposobnost da izazovu oksidacioni stres. Zato se parametri antioksidacionog sistema koriste kao biomarkeri izlaganja metalima u biomonitoringu i ekotoksikološkim studijama. Žabe su zbog svojih životnih karakteristika (složen životni ciklus, polupropustljiva koža) podložne akumulaciji metala preko vode i kroz lanac ishrane. U literaturi nema mnogo podataka o hroničnim efektima metala u tkivima žaba iz prirodnih sredina. Radi proučavanja organizacije i funkcionisanja antioksidacionog sistema, odabrane su vrste žaba *Pelophylax esculentus* kompleksa (*Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax lessonae*, *Pelophylax* kl. *esculentus*). Životinje su sakupljane na četiri lokaliteta: jezero Popovica u okviru Nacionalnog parka "Fruška gora", lokalitet Krstonošića okno u okviru specijalnog rezervata prirode "Obedska Bara", Park prirode "Ponjavica" i Veliki Bački kanal kod Bečeja kao deo kanalske mreže Dunav-Tisa-Dunav. Za analizu su odabrana sledeća tkiva: jetra, mišić i koža. Određivani su sledeći parametri:

1. Enzimi antioksidacionog sistema: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-reduktaza (GR),
2. enzim faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST),
3. neenzimske komponente antioksidacionog sistema: ukupni glutation (GSH) i slobodne sulfhidrilne grupe (SH),
4. parametar neurotoksičnosti: holinesteraza (ChE) i
5. koncentracije metala (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn) u vodi i ispitivanim tkivima.

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- ❖ utvrđivanje mogućih razlika u bioakumulaciji metala u tkivima ispitivanih vrsta sa različitim lokaliteta,
- ❖ određivanje parametara antioksidacionog sistema i aktivnosti holinesteraze između tri ispitivane vrste žaba na ispitivanim lokalitetima,
- ❖ utvrđivanje promena parametara antioksidacionog sistema i aktivnosti holinesteraze pod uticajem različitih koncentracija akumuliranih metala na ispitivanim lokalitetima;
- ❖ ispitivanje potencijalne upotrebe parametara antioksidacionog sistema i holinesteraze u biomonitoringu kao pouzdanih biomarkera koji jasno određuju uticaj različitih koncentracija metala na ispitivane vrste žaba, kao i moguća upotreba vrsta *P. esculentus* kompleksa u bioindikaciji.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Karakteristike ispitivanih lokaliteta i sakupljanje uzoraka

Adultne žabe *Pelophylax esculentus* kompleksa (*P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. kl. esculentus*) su izlovljavane u proleće (posthibernacija) tokom maja 2013. i 2014. godine i u jesen (prehibernacija) tokom oktobra 2014. godine. Sakupljane su na četiri različita lokaliteta: jezero Popovica u okviru Nacionalnog parka "Fruška gora", Specijalni rezervat prirode "Obedska Bara", Park prirode "Ponjavica" i Veliki Bački kanal kao deo kanalske mreže Dunav-Tisa-Dunav (Slika 8). Izlovljavanje ovih vrsta žaba odobreno od Ministarstva eneretike, razvoja i zaštite životne sredine kao i Pokrajinskog zavoda za zaštitu prirode (br. dozvola za 2013. godinu 353-01-446/2013-08 i 03-539/2; br. dozvola za 2014. godinu 353-01-364/2014-08 i 03-299/2). Sve jedinke su lovljene ručnim mrežama u jutarnjim časovima i transportovane u plastičnim kantama sa nativnom vodom do laboratorije. U laboratoriji su proverene zbog eventualnih povreda ili znakova bolesti, a samo zdrave jedinke su žrtvovane dekapitacijom. Izolovana je jetra, mišići zadnjih nogu i koža sa ventralnog dela tela. Merene su dužina jedinki (SVL- *snout vent lenght*- od njuške do kloake) i težina tela (*body mass*- BM). Mereni su i fizičko-hemijski parametri vode u *in situ* uslovima: temperatura, pH, koncentracija kiseonika i elektroprovodljivost korišćenjem pokretnog uređaja WTW Multi 340i.

Jezero Popovica ili Popovičko jezero (45°11'1.95" N i 19°49'11.07" E) nalazi se u okviru Nacionalnog parka „Fruška gora“. NP Fruška gora je osnovan 1960. godine, na površini od 25,393 ha, nalazi se na južnom obodu Panonske nizije, uz samu desnu obalu Dunava. Zaštićen prostor zauzima najviše grebenske delove brdskog masiva Fruške gore, sa najvišim vrhom od 539 m nadmorske visine. Fruška gora je dugačka 78 km, a široka 15 km i u geološkom smislu predstavlja jedinstveni prirodni fenomen. Izgrađena je od stena iz skoro svih geoloških perioda, počev od najstarijeg paleozoika (perioda pre 500 miliona godina), preko mezozoika, neogena pa do kvartara. Jezero Popovica je zaštićeno i nema direktnog antropogenog uticaja. Formirano je kao zaštita od poplava i spiranja zemljišta. Danas je mrestilište šarana, i raznih vrsta vodozemaca koji su tu

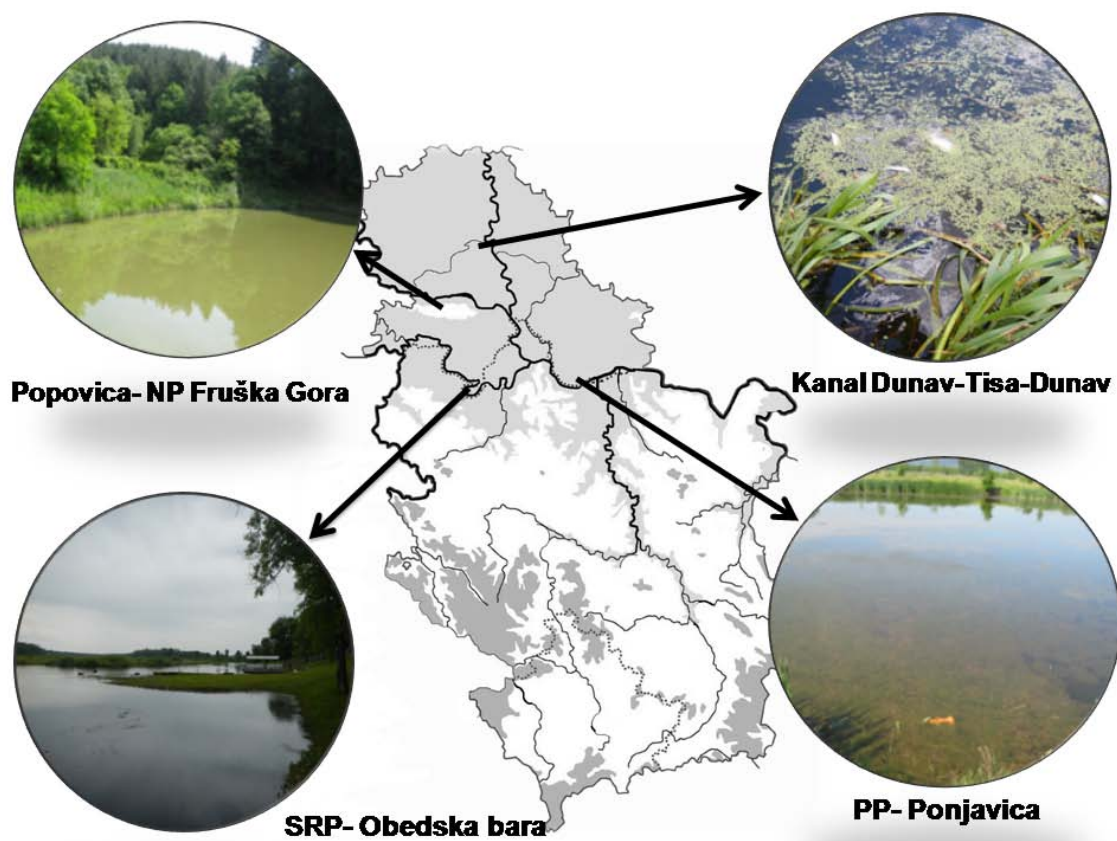
stalno prisutni ili samo tokom sezone parenja. Fizičko-hemijski sastav vode jezera zavisi od prirodnih procesa spiranja tla (Popović i sar., 2009).

Specijalni rezervat prirode "Obedska Bara" (44°44'8.89" N i 19°59'15.67" E) je najstarije zaštićeno područje u našoj zemlji, a takođe i jedno od najstarijih prirodnih dobara na svetu. Pod zaštitom je od 1874. godine i predstavlja najveće plavno područje u Srbiji sa autentičanim spletom mrtvaja, bara, okana, močvarne vegetacije, vlažnih livada i šuma koje se odlikuje izuzetnim bogatstvom biološke raznovrsnosti sa značajnim prisustvom retkih i ugroženih vrsta od nacionalnog i međunarodnog značaja. U njemu se nalaze brojni osetljivi ekosistemi, posebno vlažna staništa, prastare šume hrasta lužnjaka i slatine. Obedska Bara ima poseban značaj za reku Savu zbog mresta riba, reprodukcije vodozemaca i gmizavaca, kao i za opstanak retkih i ugroženih vodenih vrsta biljaka. Obedska Bara je povezana sa rekam Savom preko Reveničkog kanala. Zbog svog značaja upisana je na Ramsarsku listu od 1977. godine. Osnovne vrednosti flore i faune Obedske Bare su lokvanji, testerica, barska paprat, barske kornjače, žabe, mrmoljci i zmije, kolonije čaplji, gnezda orla belorepana, crnih roda, crnih lunja. Takođe ovo područje predstavlja centar reprodukcije slepih miševa, divlje mačke, kune i mnogih drugih biljnih i životinjskih vrsta. Prostrano plavno područje rezervata je prirodno mrestilište za veliki broj vrsta riba i njihova je hranidbena baza (Ljetić i sar., 2008).

Park prirode "Ponjavica" (44°44'56.03" N i 20°44'22.44" E) je zaštićeno prirodno dobro u južnom Banatu, na teritoriji opštine Pančevo. Nalazi se između Omoljice i Banatskog Brestovca, na levoj obali donjeg toka reke Dunav. U zakonskim propisima kategorisan je kao park prirode i pod zaštitom države je od 1995. godine. Ambijentalnu odliku Ponjavice karakteriše jedinstvenost stalne vodene površine i kontrast strme leve i niske desne obale koje omeđuje korito reke sa mozaičnim rasporedom biljnih zajednica vodenog, barsko-močvarnog i šumskog tipa vegetacije. Poseban kvalitet ovom tipu ekosistema daje prostorna smena šumskog zelenila, žbunastih drveća i grmlja, stabala voća, kao i neposredna blizina dva naselja i postojeće zone vikend naselja. U geološkom pogledu radi se o višim položajima i odsecima lesne terase Banata, odnosno zaravnjenim terenima aluvijalne ravni Dunava. Reka Ponjavica teče u okviru parka prirode Ponjavica, kao sporotekuća ravničarska reka čiji je donji tok skoro potpuno usporen (Karadžić i sar., 2013).



Veliki bački kanal ili Kišov kanal ( $45^{\circ}36'11.95''$  N i  $20^{\circ}3'7.42''$  E) je deo kanalskog sistema Dunav-Tisa-Dunav. Dugačak je 118 km i povezuje Dunav (kod Bezdana) sa Tisom (kod Bečeja). Kanal se koristi za plovidbu i vodosnabdevanje dela Bačke u doba suše. Korito Velikog bačkog kanala je široko 17 m, a pri vrhu kanal je širok oko 25 m. Prosečna dubina kanala je 3 m. Na obalama kanala se nalaze naselja Vrbas, Kula i Crvenka. Zbog zagađenja i taloženja mulja, kanal je danas suviše plitak za rečna plovila i brodove, a i opasan je za kupanje. Ministarstvo zaštite životne sredine Srbije ga je svrstalo među tri „crne tačke“ Srbije. Do zagađenja kanala došlo je u drugoj polovini XX veka zbog naglog razvoja industrije i neodgovarajućeg tretmana industrijskih voda koje su se izlivala u kanal. Veliki bački kanal se smatra najzagađenijim vodotokom u Evropi i predstavlja zdravstveni rizik po ljude koji žive u blizini kanala. Smatra se da se u kanalu nalazi preko 400.000 m<sup>3</sup> mulja koji je zagađen teškim metalima, derivatima nafte i patogenim bakterijama koji potiču iz fabrika za preradu mesa i kože, farmi svinja, šećerane, komunalnih voda, metalne industrije i rafinerije suncokretovog ulja. Kanal, takođe, predstavlja problem i za reke Dunav i Tisu zbog toga što deo zagađenja iz kanala otiče u ove dve reke (NIVA, 2006).



Slika 8. Mapa lokaliteta sa kojih su izlovljene žabe.



### 3.2. Priprema tkiva za biohemijske analize

Za određivanje koncentracije ukupnih proteina, aktivnosti enzima SOD, CAT, GSH-Px, GR, GST, ChE i koncentracije GSH i SH grupa, tkiva jetre, kože i mišića su najpre macerirana i homogenizovana 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 x 15 sekundi pri brzini 20000 rpm (De Waziers i Albrecht, 1987). Dobijeni homogenati su zatim sonifikovani na frekvenciji od 20 KHz, u intervalu 3 x 10 sekundi sa pauzama od po 10 sekundi između svakog sonifikovanja (Takada i sar., 1982). Od sonifikata je odvojen deo za određivanje koncentracije ukupnog GSH a ostatak sonifikata je dalje centrifugiran 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.

Priprema sonifikata za određivanje količine ukupnog glutationa: pomeša se 250 µL sonifikata tkiva i 125 µL 10% sulfosalicilne kiseline (da bi se proteini istaložili), centrifugira se 10 minuta na 5000 rpm. Dobijeni supernatant se čuva na -80 °C i koristi za dalju analizu određivanja koncentracije GSH.

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

Instrumenti i aparati koji su korišćeni za pripremu tkiva:

- ❖ Homogenizer (Ultra-Turrax, IKA-Werk, Janke & Kunkel, Staufen, Nemačka),
- ❖ Sonifikator (Vibra Cell, Sonics and Materials Inc., SAD),
- ❖ Ultra-Centrifuga (L7-55, Beckman, SAD),
- ❖ Centrifuga za ependof epruvete (Mini Spin, Eppendorf, Nemačka).

Instrumenti koji su korišćeni za biohemijske analize:

- ❖ Analitička vaga (Mettler, Švajcarska),
- ❖ Tehnička vaga (Precisa, Švajcarska),
- ❖ pH-metar (WTW, Nemačka),
- ❖ Elektrovibrator (Heidolf Reax Top, Nemačka) i
- ❖ Spektrofotometar (Shimadzu UV 160, Japan).

### 3.3. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Koncentracija ukupnih proteina određivana je metodom Lowry-ja i sar. (1951). Standard za određivanje koncentracije proteina je goveđi serum albumin (*Bovine Serum Albumin* – BSA) od koga je pripremana serija razblaženja za standardnu krivu raspona finalnih koncentracija od 100-600  $\mu\text{l}$ . Postupak se zasniva na biuretskoj reakciji kupri ( $\text{Cu}^{2+}$ ) 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  $\text{Cu}^{2+}$  redukuju se u kupro jone ( $\text{Cu}^+$ ) i formira se kompleks  $\text{Cu}^+$ -protein, koji reaguje sa dodatim Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu se stvara plavo obojen kompleks. Intenzitet boje proporcionalan je sadržaju proteina i meri se spektrofotometrijski na 500 nm.

Rastvori:

- ❖ 0,2 M NaOH,
- ❖ Reagens I (2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0,2 M NaOH),
- ❖ 0,13 M  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ,
- ❖ 0,13 M K, Na-tartarat,
- ❖ Reagens II (1 mL 0,13 M  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  + 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.

Eksperimentalni postupak:

U staklenu epruvetu sipano je 3 mL Reagens II, 0,1 mL 0,2 M NaOH i 0,1 mL razblaženog uzorka ( $R=11$ ) i sadržaj je promućkan. Za blankove, umesto uzoraka pipetirano je 0,1 mL dejonizovane vode. Posle inkubacije od 15 minuta, na sobnoj temperaturi, dodano je 0,6 mL Folin-Ciocalteu reagensa, promućkano i inkubirano još 30 minuta na sobnoj temperaturi. ApSORBANCA je merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 500 nm.

### 3.4. Određivanje aktivnosti enzimskih komponenti antioksidacionog sistema

#### 3.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD je određivana adrenalinskom metodom (Misra i Fridovich, 1972), koja se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u adrenohrom u alkalnoj sredini. Autooksidacija adrenalina zavisna je od prisustva  $O_2^-$ , a SOD prisutna u uzorku uklanja  $O_2^-$  i tako inhibira reakciju autooksidacije. Smanjenje brzine autooksidacije adrenalina meri se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 480 nm i na temperaturi od 25 °C, a promena apsorbance potiče od roze obojenog adrenohroma.

Rastvori:

- ❖  $3 \times 10^{-4}$  M adrenalin u 0,1 M HCl,
- ❖ Karbonatni pufer (0,05 M  $Na_2CO_3$  +  $10^{-4}$  M EDTA, pH 10,2 sa HCl) i
- ❖ 8 mM KCN.

Eksperimentalni postupak:

U staklenu kivetu sipa se 3 mL karbonatnog pufera, odgovarajuća zapremina prethodno podešenog adrenalina i ona količina uzorka koja izaziva inhibiciju autooksidacije adrenalina u opsegu od 16,66% do 66,66%. Za izračunavanje aktivnosti SOD koristi se vrednost promene apsorbance uzorka prema slepoj probi (pufer i podešen adrenalin).

Jedinica aktivnosti SOD definiše se kao količina enzima koja dovodi do 50% inhibicije autooksidacije adrenalina u linearnom delu promene apsorbance u minuti. Aktivnost SOD, u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

### 3.4.2. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost CAT u ispitivanim uzorcima određivana je metodom koju je opisao Claiborne (1984). Metoda se zasniva na praćenju brzine razgradnje  $\text{H}_2\text{O}_2$  do  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$  pod dejstvom enzima CAT. Smanjenje apsorbance usled potrošnje  $\text{H}_2\text{O}_2$  detektuje se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 240 nm.

Rastvori:

- ❖ 0,05 M fosfatni pufer (pH 7,0) i
- ❖ 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Eksperimentalni postupak:

Rastvor  $\text{H}_2\text{O}_2$  u fosfatnom puferu podešava se tako da apsorbance slepe probe na talasnoj dužini od 240 nm bude između 0,525 i 0,550. U kvarcnu kivetu sipa se 1,5 mL podešenog rastvora  $\text{H}_2\text{O}_2$  u fosfatnom puferu, a zatim dodaje ona količina uzorka koja dovodi do srednje vrednosti promene apsorbance u opsegu od 0,03 do 0,06. Dodavanjem uzorka započinje reakcija razgradnje  $\text{H}_2\text{O}_2$  usled prisustva CAT u uzorku, a smanjenje apsorbance prati se spektrofotometrijski na 240 nm svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Za izračunavanje aktivnosti CAT koristi se molarni ekstinkcioni koeficijent za  $\text{H}_2\text{O}_2$  na talasnoj dužini od 240 nm koji iznosi  $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Jedinica aktivnosti CAT definiše se kao broj milimolova  $\text{H}_2\text{O}_2$  redukovanih u minuti ( $\text{mmol H}_2\text{O}_2/\text{min}$ ). Aktivnost enzima u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

### 3.4.3. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px)

Aktivnost GSH-Px određivana je metodom koju su razvili Tamura i sar. (1982). Princip metode zasniva se na spregnutoj aktivnosti GSH-Px (katalizuje oksidaciju GSH u GSSG uz redukciju organskih hidroperoksida) i GR (katalizuje redukciju GSSG u GSH uz oksidaciju NADPH kao koenzima). U reakcionu smešu dodaju se organski

peroksid terc-butil hidroperoksid, NADPH i GR, a aktivnost enzima GSH-Px detektuje se spektrofotometrijski praćenjem oksidacije NADPH u NADP<sup>+</sup> na 340 nm.

Rastvori:

- ❖ 1mM GSH,
- ❖ 0,2 mM NADPH u 1% NaHCO<sub>3</sub>,
- ❖ 1 mM NaN<sub>3</sub>,
- ❖ 1 mM EDTA,
- ❖ 0,03 M terc-butil hidroperoksid,
- ❖ 0,5 M fosfatni pufer (pH 7,0) i
- ❖ GR.

Eksperimentalni postupak:

U kvarenu kivetu sipa se 1,6 mL H<sub>2</sub>O (ili manja zapremina u zavisnosti od količine dodatog uzorka), 0,3 mL 1mM GSH, 0,6 mL 0,2 mM NADPH, 0,1 mL 1mM NaN<sub>3</sub> (kojim se inaktivira CAT), 0,1 mL 1 mM EDTA, 0,3 mL 0,5M fosfatnog pufera (pH 7,0), 0,1 mL 0,03 M terc-butil hidroperoksida, odgovarajuća količina uzorka i 5 $\mu$ L GR. Smanjenje apsorbance prati se spektrofotometrijski na 340 nm svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25°C. Aktivnost GSH-Px određuje se prema slepoj probi (svi rastvori osim uzorka), uz korišćenje molarnog ekstinkcionog koeficijenta za NADPH na 340 nm od  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Jedinica enzimske aktivnosti GSH-Px definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH/min), a aktivnost GSH-Px u ispitivanim tkivima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

#### **3.4.4. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze (GR)**

Za određivanje aktivnosti GR u ispitivanim uzorcima koristili smo metodu po Glatzle i sar. (1974), koja se zasniva na sposobnosti GR da katalizuje reakciju redukcije GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH do NADP<sup>+</sup>. U reakcionu smešu dodaju se GSSG i NADPH, a aktivnost GR se meri spektrofotometrijski preko smanjenja koncentracije NADPH, odnosno opadanja apsorbance na talasnoj dužini od 340 nm.

Rastvori:

- ❖ 0,5 M fosfatni pufer (pH 7,4),
- ❖ 2 mM GSSG,
- ❖ 0,5 mM EDTA i
- ❖ 0,1 mM NADPH u 1% NaHCO<sub>3</sub>.

Eksperimentalni postupak:

U kvarcnu kivetu dodaje se 0,6 mL 0,5 M fosfatnog pufera (pH 7,4), 0,1 mL 2mM GSSG, 0,1 mL 0,5 mM EDTA i 2 mL H<sub>2</sub>O (ili manja zapremina u zavisnosti od zapremine uzorka koji se dodaje) i 0,1 mL 0,1 mM NADPH, a zatim se sipa odgovarajuća količina uzorka. Za slepu probu koriste se isti rastvori samo bez uzorka. Spektrofotometrijski se apsorbance meri na talasnoj dužini od 340 nm na svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Za izračunavanje aktivnosti GR koristi se molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH na 340 nm od  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Jedinica aktivnosti enzima GR definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti (nmol NADPH). Aktivnost ovog enzima u ispitivanim uzorcima predstavljena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

### **3.4.5. Određivanje aktivnosti enzima faze II biotransformacije glutation-S-transferaze (GST)**

Aktivnost enzima faze II biotransformacije GST određivana je metodom koju su opisali Habig i sar. (1974). Princip metode zasniva se na sposobnosti enzima GST da katalizuje reakciju vezivanja 1-hloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) za sulfhidrilnu grupu cisteina koji ulazi u sastav tripeptida GSH, pri čemu se formira CDNB-GSH konjugat. Stopa porasta apsorbance usled nastalog CDNB-GSH konjugata direktno je proporcionalna aktivnosti biotransformacionog enzima GST u uzorku i detektuje se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm.

Rastvori:

- ❖ 0,5 M fosfatni pufer (pH 6,5),
- ❖ 25 mM CDNB u 95% etanolu i
- ❖ 20 mM GSH.

Eksperimentalni postupak:

U kvarcnu kivetu za analizu sipa se 2 mL H<sub>2</sub>O (ili manja zapremina u zavisnosti od količine uzorka koji se dodaje), 0,1 mL 25 mM CDNB u 95% etanolu, 0,6 mL 0,5 M fosfatnog pufera (pH 6,5), 0,3 mL 20 mM GSH i određena količina uzorka. Povećanje apsorbance prati se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 340 nm na svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C. Aktivnost GST određuje se prema slepoj probi (isti rastvori samo bez uzorka), uz korišćenje molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDNB-GSH konjugat na 340 nm od  $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Jedinica aktivnosti enzima faze II biotransformacije GST izražava se kao broj nanomolova CDNB-GSH konjugata nastalog u minuti (nmol CDNB-GSH/min). Aktivnost GST izražena je u jedinicama po miligramu proteina (Jed/mg proteina).

### **3.5. Određivanje koncentracije neenzimskih komponenti antioksidacionog sistema**

#### **3.5.1. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)**

Metoda koju je opisao Griffith (1980) korišćena je za određivanje koncentracije ukupnog GSH u ispitivanim uzorcima. Princip ove metode zasniva se na cikličnom enzimskom procesu: 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoična kiselina) (DTNB) oksiduje GSH, pri čemu nastaju GSSG i 2-nitro-5-tiobenzoična kiselina (TNB), a zatim enzim GR redukuje GSSG u GSH uz oksidaciju koenzima NADPH. Stopa formiranja žuto obojenog jedinjenja TNB prati se spektrofotometrijski na 412 nm i proporcionalna je koncentraciji ukupnog GSH u uzorku.

Rastvori:

- ❖ Standard GSH,
- ❖ 10% sulfosalicilna kiselina,
- ❖ 0,3 mM NADPH,
- ❖ 6 mM DTNB,
- ❖ GR i
- ❖ Pufer (125 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 6mM EDTA, pH 7,5 sa NaOH).

Eksperimentalni postupak:

U kvarcnu kivetu dodaje se 0,7 mL 0,3 mM NADPH, 0,1 mL 6 mM DTNB, uzorak, H<sub>2</sub>O do 1 mL reakcione smeše i 5 $\mu$ L GR. Za slepu probu koriste se isti rastvori samo bez uzorka, a za standarde umesto uzorka se sipaju odgovarajuće zapremine standardnih rastvora sa poznatom koncentracijom GSH. Povećanje apsorbance prati se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 412 nm na svakih 30 sekundi u toku 3 minute na temperaturi od 25 °C.

Koncentracija ukupnog GSH u uzorku izražena je u nanomolima GSH po gramu tkiva (nmol GSH/g tkiva).

### **3.5.2. Određivanje koncentracije slobodnih sulfhidrilnih (SH) grupa**

Koncentracija slobodnih SH grupa u ispitivanim uzorcima određivana je metodom koju je opisao Ellman (1959). DTNB oksiduje slobodne SH grupe prisutne u uzorku, pri čemu nastaju mešani disulfidi i žuto obojeni TNB, čija se apsorbance meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 412 nm.

Rastvori:

- ❖ 0,1 M fosfatni pufer (pH 7,3) i
- ❖ 3 mM DTNB u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7,3).

Eksperimentalni postupak:

U epruvetu se dodaje 0,5 mL uzorka, 0,5 mL 0,1 M fosfatnog pufera (pH 7,3) i 0,2 mL DTNB. Posle inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi očitava se apsorbance na talasnoj dužini od 412 nm. Za izračunavanje koncentracije slobodnih SH grupa koristi se molarni ekstinkcioni koeficijent od 14150 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Koncentracija slobodnih SH grupa u uzorku određuje se prema slepoj probi i proporcionalna je koncentraciji nastalog TNB.

Koncentracija slobodnih SH grupa u uzorku izražena je u mikromolima SH grupa po gramu tkiva ( $\mu$ mol SH/g tkiva).



### 3.6. Određivanje aktivnosti holinesteraze (ChE)

Aktivnost holinesteraze u tkivima određena je metodom po Ellmanu i sar. (1961). Metoda se zasniva na hidrolizi acetil-tioholina pri čemu oslobođeni tiol reaguje sa DTNB i nastaje žuto obojeni TNB. Aktivnost je merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 406 nm.

Rastvori:

- ❖ 0,05 M fosfatnog pufera (pH 7,9) sa 0,25 mM DTNB i
- ❖ 0,156 M acetil-tioholin jodid.

Eksperimentalni postupak:

U kvarcnu kivetu sipano je 3 mL 0,05 M fosfatnog pufera (pH 7,9), 0,1 mL acetil-tioholina jodida i određena zapemina uzorka. Promena apsorbance se prati spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 406 nm na svakih 15 sekundi u toku 1 minuta sa odlaganjem od 1 minut na temperaturi od 25 °C. Aktivnost je određena prema slepoj probi i proporcionalna je koncentraciji nastalog TNB, a izražena je  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  tkiva.

### 3.7. Određivanje koncentracije metala u vodi i tkivima

#### 3.7.1. Hemikalije

Sve hemikalije i reagensi korišćeni za određivanje koncentracija metala u vodi i tkivima bile su analitičke čistoće. Posude je pre upotrebe potopljeno u 10%  $\text{HNO}_3$  tokom 12 časova a potom isparano destilovanom vodom. Za mikrotalasno rastvaranje uzoraka korišćena je 65% azotna kiselina i 30% vodonik peroksid. Za pripremanje standardnih rastvora, korišćen je multi-elementalni rastvor (ICP *multi-element standard solution* IV, Merck) koncentracije 1,000 g/L kao i multi-elementalni rastvor (*Semiquantitative Standard 1*, Specture) koncentracije 0,010 g/L.

### 3.7.2. Instrumenti

Mikrotalasna digestija je urađena na aparatu Ethos 1 (*Advanced Microwave Digestion System, Milestone, Italy*), koji je opremljen rotorom koji može da primi 10 teflonskih (PTFE) kiveta.

Za određivanje sadržaja metala u uzorcima korišćen je Indukovano-Kuplovan Plazma Atomički Emisioni Spektrometar, ICP-OES (Thermo Scientific, United Kingdom), model 6500 Duo, opremljen sa CID86 chip detektorom. Ovaj instrument simultano koristi i radijalni i aksijalni pogled na plamenik. Ceo sistem kontroliše Iteva software. Uslovi rada instrumenta i uslovi snimanja dati su u tabeli 3.

**Tabela 3.** Uslovi rada instrumenta prilikom određivanja.

Spektrometar	iCAP 6500 Thermo scientific
Nebulajzer	Concentric
Sprej komora	Cyclonic
Snaga RF generatora (W)	1150
Brzina protoka gasa za hlađenje (L/min)	12
Brzina protoka aksijalnog gasa (L/min)	0,5
Brzina protoka nebulajzer gasa (L/min)	0,5
Brzina unošenja uzorka	1,0
Detektor	CID86

### 3.7.3. Priprema uzoraka

Uzorci su, nakon odmeravanja (0,5 g), preneti u teflonske kivete u koje je dodato 7 ml 65% azotne kiseline (HNO<sub>3</sub>) i 1 ml 30% vodonik peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Digestija je vršena prema sledećem programu: postizanje temeprature od 180°C tokom 10 min, održavanje temeprature od 180°C tokom 15 min, ventilacija sistema tokom 10 min. Primenjena snaga iznosila je 1100 W. Nakon perioda hlađenja uzorci su preneti u normalne sudove od 25 ml i razblaženi destilovanom vodom.

### 3.7.4. Analiza uzorka

Određivanje sadržaja metala u uzorcima je vršeno pomoću ICP-OES metode. Izabrane talasne dužine željenih elemenata su date u tabeli 4.

**Tabela 4.** Određivani elementi sa odgovarajućim  $\lambda$  spektralnih linija.

Element	Talasna dužina $\lambda$	Element	Talasna dužina $\lambda$
Al	167,0	Ga	294,3
As	193,7	Hg	184,9
Ba	455,4	In	230,6
Ca	393,3	Li	670,7
Cd	214,4	Mn	259,3
Co	228,6	Ni	231,6
Cr	267,7	Pb	220,3
Cu	224,7	Sr	407,7
Fe	259,9	Zn	213,8

Standardni rastvori su pripremani razblaživanjem osnovnog multielementog rastvora i zakišeljavani dodatkom azotne kiseline tako da je njena koncentracija bila 2%.

### 3.8. Statistička obrada rezultata

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su predstavljeni kao srednja vrednost sa standardnom greškom ( $\bar{X} \pm SG$ ). Za sve rezultate proverena je normalnost raspodele korišćenjem Kolmogorov-Smirnov testa, a za utvrđivanje ekstrema primenjen je Grabov test. Nakon što su uklonjeni potencijalni ekstremi i utvrđeno da je prisutna normalna raspodela podataka, primenjeni su standardni parametrijski testovi. One-way Anova korišćena je prilikom poređenja AOS parametara kao i prilikom poređenja koncentracija metala u tkivu. Kako bi se utvrdila veza između AOS parametara i akumuliranih metala primenjena je linerana regresija i Pirsonove korelacije. Za uočavanje razlika između ispitivanih vrsta kao i tkivnih razlika primenjena je kanonijska diskriminaciona analiza, takođe korišćenjem klaster analize svi ispitivani parametri grupisani su u homogene grupe, a rezultati su prikazani grafički u vidu dendrograma. Kao najmanji stepen značajnosti uzeta je vrednost  $p < 0,05$ . Svi testovi su urađeni u programu za obradu podataka STATISTICA 8.0.

## 4. Rezultati

### 4.1. Fizičko-hemijski parametri i koncentracije metala u vodi

Fizičko-hemijski parametri vode (temperatura, pH, koncentracija kiseonika i provodljivost) i koncentracije metala (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn) merene su u vodi na lokalitetima DTD, Ponjavica, Fruška Gora i Obedska Bara tokom sezona proleće 2013., proleće 2014. i jesen 2014. (Tabela 5 i Tabela 6).

Tokom sezone 2013. temperatura vode bila je slična na lokalitetima DTD i Fruška Gora dok je na lokalitetu Ponjavica bila nešto niža. Voda na svim lokalitetima bila je baznog karaktera i najveću vrednost je imala na Ponjavici. Najveća koncentracija kiseonika bila je u vodi iz kanala DTD a najniža na reci Ponjavica. Najveću provodljivost imala je voda iz Ponjavice a najmanju iz jezera Popovica sa Fruške Gore (Tabela 5).

Fizičko-hemijski parametri vode sa lokaliteta iz proleća 2014. nisu se značajno razlikovali od istih iz sezone 2013. Temperatura je bila najviša na kanalu DTD, zatim sledi Ponjavica i Obedska Bara. Voda je isto baznog karaktera i najviša vrednost je bila na Ponjavici, dok je najniža na Obedskoj Bari. Rastvoren kiseonik u vodi imao je najviše vrednosti na lokalitetu DTD a najnižu na Ponjavici. Provodljivost je bila najveća na Ponjavici dok su ostala dva lokaliteta imala slične vrednosti (Tabela 5).

Tokom sezone jesen 2014. meren je kvalitet vode sa lokaliteta DTD i Ponjavica. Poređenje između ova dva lokaliteta pokazala su da voda sa kanala DTD ima više vrednosti za pH i O<sub>2</sub>, dok je voda iz Ponjavice imala višu temperaturu i provodljivost (Tabela 5). Poređenje parametara vode sa parametrima sa istih lokalitetima tokom drugih sezona (proleće 2013. i 2014.) pokazalo je da koncentracija rastvorenog kiseonika opada tokom sezone jesen 2014.

**Tabela 5.** Temperatura (°C), pH, koncentracija kiseonika (mg/L) i provodljivost ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) u vodi. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. T- temperatura; P- provodljivost.

	Proleće 2013			Proleće 2014			Jesen 2014	
	DTD	Ponjavica	Fruška Gora	DTD	Ponjavica	Obedska Bara	DTD	Ponjavica
T	20,00 $\pm$ 0,12	18,06 $\pm$ 0,09	20,26 $\pm$ 0,03	20,3 $\pm$ 0,17	18,31 $\pm$ 0,08	16,77 $\pm$ 0,15	20,8 $\pm$ 0,1	21,3 $\pm$ 0,2
pH	8,82 $\pm$ 0,02	9,05 $\pm$ 0,02	8,42 $\pm$ 0,01	8,62 $\pm$ 0,04	8,84 $\pm$ 0,02	7,69 $\pm$ 0,10	8,73 $\pm$ 0,06	8,38 $\pm$ 0,04
O <sub>2</sub>	8,41 $\pm$ 0,04	6,00 $\pm$ 0,04	7,83 $\pm$ 0,02	8,11 $\pm$ 0,04	6,51 $\pm$ 0,04	6,94 $\pm$ 0,23	4,53 $\pm$ 0,05	4,44 $\pm$ 0,07
P	741,5 $\pm$ 11,2	1395,3 $\pm$ 28,3	432,1 $\pm$ 6,5	763,4 $\pm$ 13,4	940,3 $\pm$ 17,1	783,2 $\pm$ 13,1	821,1 $\pm$ 13,4	980,4 $\pm$ 26,1

**Tabela 6.** Koncentracije metala (mg/L) u vodi sa različitih lokaliteta i iz različitih sezona. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	Proleće 2013			Proleće 2014			Jesen 2014	
	DTD	Ponjavica	Fruška Gora	DTD	Ponjavica	Obedska Bara	DTD	Ponjavica
Al	234,2 $\pm$ 1,6	228,6 $\pm$ 0,3	271,75 $\pm$ 0,07	982,1 $\pm$ 2,7	165,4 $\pm$ 0,1	120,9 $\pm$ 2,5	581,6 $\pm$ 3,1	40,25 $\pm$ 1,01
As	2,21 $\pm$ 0,82	24,6 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 1,2	13,5 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 1,3	7,1 $\pm$ 0,7	14,8 $\pm$ 1,8
Cd	/	0,012 $\pm$ 0,001	/	0,80 $\pm$ 0,11	1,20 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,01	0,048 $\pm$ 0,004
Co	/	/	/	0,406 $\pm$ 0,106	/	/	/	/
Cr	/	/	/	1,78 $\pm$ 0,27	0,24 $\pm$ 0,03	0,479 $\pm$ 0,037	2,39 $\pm$ 0,51	0,238 $\pm$ 0,032
Cu	10,9 $\pm$ 0,2	12,1 $\pm$ 0,3	9,3 $\pm$ 0,2	18,83 $\pm$ 0,64	22,00 $\pm$ 0,57	44,5 $\pm$ 0,4	44,2 $\pm$ 2,2	21,9 $\pm$ 1,4
Fe	125,7 $\pm$ 4,3	256,0 $\pm$ 1,3	227,5 $\pm$ 1,6	1298,3 $\pm$ 8,2	167,9 $\pm$ 2,3	95,6 $\pm$ 1,2	1140,2 $\pm$ 6,3	197,2 $\pm$ 3,4
Hg	/	/	/	/	/	/	/	/
Mn	60,2 $\pm$ 0,3	95,9 $\pm$ 0,3	120,5 $\pm$ 0,4	119,8 $\pm$ 0,5	53,4 $\pm$ 0,5	14,42 $\pm$ 0,12	107,3 $\pm$ 5,7	49,4 $\pm$ 1,9
Ni	/	/	/	/	/	/	/	0,460 $\pm$ 0,083
Pb	/	/	/	3,45 $\pm$ 1,05	/	/	4,98 $\pm$ 0,74	0,217 $\pm$ 0,053
Zn	19,57 $\pm$ 0,06	16,03 $\pm$ 0,05	16,07 $\pm$ 0,03	17,16 $\pm$ 0,10	4,39 $\pm$ 0,08	18,75 $\pm$ 0,04	18,8 $\pm$ 0,5	6,31 $\pm$ 0,32

Upoređivanje koncentracija metala u vodi sa ispitivanih lokaliteta tokom sezone proleće 2013. pokazalo je da je koncentracija Zn bila najveća na lokalitetu DTD, zatim da je u vodi iz Ponjavice najveća koncentracija bila za As, Cd, Cu i Fe, a ostali metali (Al, Mn) su imali najveću koncentraciju u vodi jezera Popovica sa Fruške Gore.

Merenja koncentracije metala u vodi tokom sezone proleće 2014. pokazala su da lokalitet DTD karakteriše najveća koncentracija: Al, Co, Cr, Fe, Mn i Pb; dok vodu sa Ponjavice karakterišu: As i Cd; najveće koncentracije Cu i Zn uočene su u vodi iz Obedske Bare.

Koncentracija metala u vodi sa lokaliteta DTD i Ponjavica u jesen 2014. pokazale su razlike koje su se ogledale u većim koncentracijama sledećih metala: Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb i Zn u vodi sa lokaliteta DTD dok je samo koncentracija As bila povećana u vodi iz Ponjavice.

## **4.2. Prikaz rezultata dobijenih u tkivima vrsta *Pelophylax esculentus* kompleksa**

### **4.2.1. Koncentracije metala u tkivima vrsta *Pelophylax esculentus* kompleksa**

Koncentracije metala u vrstama *Pelophylax esculentus* kompleksa prikazane su tabelarno po lokalitetima i sezonama.

Na lokalitetu DTD tokom proleća 2013. i 2014. godine, merene su koncentracije metala u koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* (Tabela 7 i Tabela 8). Rezultati za 2013. godinu pokazuju da su koncentracije Cd, Fe i Hg u koži bile značajno veće kod *P. ridibundus* u odnosu na *P. esculentus*. Takođe su i u mišićima *P. ridibundus* zabeležene veće koncentracije Cd i Hg. Metali koji su prisutni samo kod jedne od vrsta su: As u mišićima *P. ridibundus* i Co u mišićima *P. esculentus*. Olovo nije detektovano u mišićima vrste *P. ridibundus*.

**Tabela 7.** Koncentracije metala (mg/kg) u koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu DTD tokom sezone proleće 2013. godine. “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu *P. esculentus*.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
Al	12,6 $\pm$ 2,1	14,34 $\pm$ 1,96	27,33 $\pm$ 11,64	10,13 $\pm$ 3,02
As	/	/	0,32 $\pm$ 0,08	/
Cd	0,097 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup>	0,060 $\pm$ 0,009	0,033 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>	0,013 $\pm$ 0,005
Co	/	/	/	0,019 $\pm$ 0,004
Cr	0,65 $\pm$ 0,05	0,742 $\pm$ 0,052	0,297 $\pm$ 0,004	0,407 $\pm$ 0,056
Cu	2,19 $\pm$ 0,16	2,06 $\pm$ 0,14	1,29 $\pm$ 0,08	1,12 $\pm$ 0,07
Fe	65,15 $\pm$ 14,37 <sup>b</sup>	35,58 $\pm$ 2,22	24,49 $\pm$ 2,58	22,17 $\pm$ 1,37
Hg	0,178 $\pm$ 0,063 <sup>b</sup>	0,021 $\pm$ 0,006	0,102 $\pm$ 0,023 <sup>b</sup>	0,043 $\pm$ 0,010
Mn	15,41 $\pm$ 1,46	13,36 $\pm$ 1,98	0,78 $\pm$ 0,06	0,74 $\pm$ 0,08
Ni	0,483 $\pm$ 0,079	0,384 $\pm$ 0,073	0,269 $\pm$ 0,024	0,255 $\pm$ 0,032
Pb	0,463 $\pm$ 0,095	0,363 $\pm$ 0,037	/	0,047 $\pm$ 0,017
Zn	141,83 $\pm$ 20,16	168,00 $\pm$ 15,94	22,18 $\pm$ 0,86	23,81 $\pm$ 1,74

Tokom proleća 2014. godine u koži jedinki *P. ridibundus* koncentracije Fe i Mn bile su veće od onih u koži jedinki *P. esculentus*, dok je koncentracija Cr bila veća u koži *P. esculentus*. Rezultati merenja u mišićima pokazali su povećane koncentracije Al i Cr kod vrste *P. esculentus*. As je detektovan samo u mišićima *P. ridibundus*. Kod ove vrste je uočeno prisustvo Pb i odsustvo Hg u koži.

**Tabela 8.** Koncentracije metala (mg/kg) u koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu DTD tokom proleća 2014. godine. “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu *P. esculentus*.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
Al	49,1 $\pm$ 7,3	72,3 $\pm$ 17,3	10,8 $\pm$ 2,2	24,4 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>
As	/	/	0,361 $\pm$ 0,047	/
Cd	0,090 $\pm$ 0,013	0,094 $\pm$ 0,027	0,402 $\pm$ 0,190 <sup>b</sup>	0,033 $\pm$ 0,010
Co	/	/	/	/
Cr	0,859 $\pm$ 0,087	1,74 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	0,307 $\pm$ 0,059	1,11 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>
Cu	2,12 $\pm$ 0,22	3,67 $\pm$ 1,55	2,64 $\pm$ 1,29	1,39 $\pm$ 0,15
Fe	49,8 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	31,6 $\pm$ 4,1	26,9 $\pm$ 6,4	20,4 $\pm$ 2,8
Hg	/	0,137 $\pm$ 0,028	0,080 $\pm$ 0,017	0,102 $\pm$ 0,028
Mn	30,6 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	19,95 $\pm$ 2,55	0,693 $\pm$ 0,113	0,910 $\pm$ 0,197
Ni	0,775 $\pm$ 0,191	1,69 $\pm$ 0,66	0,323 $\pm$ 0,040	0,485 $\pm$ 0,083
Pb	0,417 $\pm$ 0,117	/	/	/
Zn	188,4 $\pm$ 21,9	149,9 $\pm$ 25,2	21,5 $\pm$ 1,9	25,2 $\pm$ 3,2

U jesen 2014. godine na lokalitetu DTD koncentracije metala izmerene su u jetri, koži i mišićima jedinki *P. ridibundus* i *P. esculentus* (Tabela 9). U jetri jedinki *P. ridibundus* zabeležene su veće koncentracije Cr, Hg i Mn nego u jetri *P. esculentus*. Veća koncentracija metala Cd, Cu, Fe, i Ni izmerena je i u koži *P. ridibundus* u odnosu *P. esculentus*. U mišićima nije bilo značajnih razlika u akumulaciji između ispitivanih vrsta, jedino su koncentracije Mn bile značajno veće kod *P. ridibundus*. Arsen je detektovan samo u mišićima jedinki *P. ridibundus*. Metali koji nisu detektovani u nekim od tkiva su: Cd u mišićima *P. ridibundus*, Co u koži i mišićima *P. esculentus*, takođe kod vrste *P. esculentus* Pb nije detektovan u jetri i koži.



**Tabela 9.** Koncentracije metala (mg/kg) u tkivima (jetra, koža, mišić) vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu DTD u jesen 2014. godine. “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	jetra		koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
Al	39,7 $\pm$ 3,4	20,7 $\pm$ 4,6	5,04 $\pm$ 0,59	5,68 $\pm$ 0,57	7,92 $\pm$ 1,14	3,58 $\pm$ 0,27
As	/	/	/	/	0,048 $\pm$ 0,010	/
Cd	0,443 $\pm$ 0,076	0,336 $\pm$ 0,071	0,20 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,073 $\pm$ 0,009	/	0,034 $\pm$ 0,007
Co	0,391 $\pm$ 0,089	0,197 $\pm$ 0,046	0,029 $\pm$ 0,013	/	0,157 $\pm$ 0,023	/
Cr	0,742 $\pm$ 0,063 <sup>b</sup>	0,425 $\pm$ 0,066	1,05 $\pm$ 0,12	0,880 $\pm$ 0,123	0,647 $\pm$ 0,078	0,446 $\pm$ 0,070
Cu	88,5 $\pm$ 9,0	125,1 $\pm$ 17,8	3,00 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	2,28 $\pm$ 0,16	1,68 $\pm$ 0,23	1,20 $\pm$ 0,14
Fe	618,4 $\pm$ 88,5	410,2 $\pm$ 92,7	41,3 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	33,2 $\pm$ 1,9	31,7 $\pm$ 10,6	12,4 $\pm$ 0,7
Hg	0,281 $\pm$ 0,054 <sup>b</sup>	0,081 $\pm$ 0,014	0,064 $\pm$ 0,008	0,071 $\pm$ 0,017	0,138 $\pm$ 0,016	0,057 $\pm$ 0,010
Mn	6,80 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>	3,11 $\pm$ 0,39	29,0 $\pm$ 4,0	19,1 $\pm$ 3,3	0,62 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,213 $\pm$ 0,053
Ni	0,794 $\pm$ 0,178	0,164 $\pm$ 0,11	1,09 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	0,258 $\pm$ 0,066	0,422 $\pm$ 0,065	0,231 $\pm$ 0,044
Pb	0,414 $\pm$ 0,134	/	1,47 $\pm$ 0,39	/	0,294 $\pm$ 0,076	0,300 $\pm$ 0,044
Zn	64,3 $\pm$ 5,6	71,1 $\pm$ 6,4	160,2 $\pm$ 15,8	182,0 $\pm$ 23,5	28,14 $\pm$ 3,31	43,87 $\pm$ 22,74

Na lokalitetu Ponjavica tokom proleća 2013. i 2014. godine merene su koncentracije metala u koži i mišićima vrste *P. ridibundus* i njenog hibrida *P. esculentus*. Rezultati su predstavljeni u tabeli 10 i tabeli 11. Tokom 2013. godine značajne razlike su uočene samo za koncentracije Cu i Ni u koži. Koncentracije ovih metala bile su veće kod jedinki *P. ridibundus*. U koži *P. ridibundus* su detektovani živa i olovo, dok su njihove koncentracije kod *P. esculentus* bile ispod limita detekcije. U mišićima *P. esculentus* nije zabeleženo prisustvo As, dok Cd nije detektovan kod *P. ridibundus*. Koncentracija ostalih metala u oba tkiva nije se značajno razlikovala. Tokom 2014. zabeležene su značajne razlike između ispitivanih vrsta, u pogledu akumulacije metala. U koži jedinki *P. esculentus* bile su veće koncentracije Cr i Hg u odnosu na *P. ridibundus*. Veće koncentracije metala detektovane su i u mišićima *P. esculentus*, i to za: Al, Cr, Hg i Mn. Jedino je koncentracija Ni bila veća u mišićima *P. ridibundus*. Cd i Co nisu detektovani u mišićima, dok Ni nije detektovan u koži *P. ridibundus*. Kod *P. esculentus* nije zabeležen As u koži.

**Tabela 10.** Koncentracije metala (mg/kg) u koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu Ponjavica lovljenih u proleće 2013. godine. “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu *P. esculentus*.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
Al	12,0 $\pm$ 1,2	24,8 $\pm$ 7,0	11,6 $\pm$ 1,8	167,3 $\pm$ 79,2
As	0,104 $\pm$ 0,034	0,136 $\pm$ 0,043	0,312 $\pm$ 0,137	/
Cd	0,018 $\pm$ 0,003	0,012 $\pm$ 0,002	/	0,032 $\pm$ 0,005
Cr	0,567 $\pm$ 0,027	0,638 $\pm$ 0,103	0,432 $\pm$ 0,059	0,413 $\pm$ 0,042
Cu	2,00 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	1,42 $\pm$ 0,08	1,20 $\pm$ 0,07	1,23 $\pm$ 0,081
Fe	43,8 $\pm$ 2,7	41,9 $\pm$ 6,1	29,4 $\pm$ 2,1	25,5 $\pm$ 1,8
Hg	0,083 $\pm$ 0,007	/	0,092 $\pm$ 0,016	0,91 $\pm$ 0,86
Mn	17,2 $\pm$ 2,4	15,92 $\pm$ 2,02	1,030 $\pm$ 0,104	0,987 $\pm$ 0,094
Ni	0,470 $\pm$ 0,057 <sup>b</sup>	0,306 $\pm$ 0,042	0,219 $\pm$ 0,034	0,174 $\pm$ 0,028
Pb	0,796 $\pm$ 0,201	/	/	/
Zn	124,5 $\pm$ 15,9	106,0 $\pm$ 12,1	24,7 $\pm$ 1,7	22,2 $\pm$ 1,6

**Tabela 11.** Koncentracije metala (mg/kg) u koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu Ponjavica izlovljenih u proleće 2014. godine. “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu *P. esculentus*.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
Al	80,5 $\pm$ 23,6	68,8 $\pm$ 14,9	15,8 $\pm$ 1,7	31,4 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>
As	0,140 $\pm$ 0,030	/	0,325 $\pm$ 0,081	0,286 $\pm$ 0,083
Cd	0,021 $\pm$ 0,005	0,019 $\pm$ 0,004	/	0,147 $\pm$ 0,057
Co	0,101 $\pm$ 0,071	0,145 $\pm$ 0,061	/	0,215 $\pm$ 0,091
Cr	0,723 $\pm$ 0,045	2,21 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	0,347 $\pm$ 0,053	1,05 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
Cu	2,30 $\pm$ 0,38	2,49 $\pm$ 0,26	1,83 $\pm$ 0,29	1,20 $\pm$ 0,15
Fe	86,3 $\pm$ 19,1	68,5 $\pm$ 13,1	14,2 $\pm$ 2,2	42,7 $\pm$ 15,2
Hg	0,030 $\pm$ 0,006	0,122 $\pm$ 0,027 <sup>a</sup>	0,046 $\pm$ 0,008	0,136 $\pm$ 0,041 <sup>a</sup>
Mn	15,8 $\pm$ 1,5	18,1 $\pm$ 2,1	0,373 $\pm$ 0,064	1,21 $\pm$ 0,184 <sup>a</sup>
Ni	/	1,42 $\pm$ 0,34	2,35 $\pm$ 0,711 <sup>b</sup>	0,725 $\pm$ 0,147
Zn	179,1 $\pm$ 19,0	183,6 $\pm$ 16,9	19,3 $\pm$ 2,6	25,9 $\pm$ 1,8

U jedinkama ulovljenim tokom jeseni 2014., metali su izmereni u jetri, koži i mišićima *P. ridibundus* i *P. esculentus* (Tabela 12). U jetri *P. ridibundus* je izmerena značajno veća koncentracija Al, dok su u koži i mišićima ove vrste zabeležene veće

koncentracije Cd, Cu, Fe i Mn u odnosu na ista tkiva vrste *P. esculentus*. Međutim, u mišićima *P. esculentus* je bila značajno veća koncentracija aluminijuma u poređenju sa *P. ridibundus*. Nikl nije uočen u jetri, kao ni Cr i Hg u koži i mišićima *P. ridibundus*, dok kod *P. esculentus* As nije zabeležen u koži i mišićima.

**Tabela 12.** Koncentracije metala (mg/kg) u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu Ponjavica izlovljenih tokom jeseni 2014. “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu *P. esculentus*.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	jetra		koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
Al	12,7 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	7,39 $\pm$ 1,01	3,13 $\pm$ 0,63	4,07 $\pm$ 0,663	1,20 $\pm$ 0,170	3,80 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>
As	/	/	1,04 $\pm$ 0,16		1,04 $\pm$ 0,143	
Cd	0,757 $\pm$ 0,173	0,464 $\pm$ 0,038	0,138 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>	0,076 $\pm$ 0,01	0,146 $\pm$ 0,019 <sup>b</sup>	0,027 $\pm$ 0,008
Co	0,446 $\pm$ 0,114	0,396 $\pm$ 0,037	/	/	/	/
Cr	0,200 $\pm$ 0,039	0,217 $\pm$ 0,025	/	0,523 $\pm$ 0,042	/	0,320 $\pm$ 0,029
Cu	93,7 $\pm$ 14,1	107,22 $\pm$ 20,41	2,49 $\pm$ 0,13b	2,07 $\pm$ 0,131	1,39 $\pm$ 0,085 <sup>b</sup>	0,970 $\pm$ 0,057
Fe	425,1 $\pm$ 80,2	408,3 $\pm$ 60,4	40,4 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>	24,4 $\pm$ 1,5	23,4 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	13,3 $\pm$ 1,5
Hg	0,230 $\pm$ 0,058	0,223 $\pm$ 0,023	/	0,124 $\pm$ 0,061		0,121 $\pm$ 0,024
Mn	3,20 $\pm$ 0,566	2,64 $\pm$ 0,241	23,20 $\pm$ 3,14 <sup>b</sup>	11,35 $\pm$ 1,71	1,73 $\pm$ 0,574 <sup>b</sup>	0,142 $\pm$ 0,022
Ni	/	0,167 $\pm$ 0,058	0,188 $\pm$ 0,062	0,179 $\pm$ 0,035	0,397 $\pm$ 0,126	0,187 $\pm$ 0,066
Pb	/	/	0,406 $\pm$ 0,198	/	/	/
Zn	58,0 $\pm$ 8,8	46,6 $\pm$ 1,8	164,9 $\pm$ 18,7	146,2 $\pm$ 19,3	21,2 $\pm$ 1,2	19,1 $\pm$ 0,7

Na lokalitetu Obedska Bara tokom proleća 2014. izlovljene su sve tri vrste *Pelophylax esculentus* kompleksa. Prisustvo metala ispitivano je u koži i mišićima sve tri vrste, a dok su koncentracije u jetri merene kod *P. ridibundus* i *P. esculentus*. Rezultati za jetru, kožu i mišiće su prikazani u tabeli 13. Jetra *P. esculentus* se odlikuje većom koncentracijom Cr i Ni, dok je kod *P. ridibundus* to bio slučaj sa koncentracijom Fe. Mn nije detektovan u jetri *P. esculentus*, dok Pb nije bilo prisutno u jetri *P. ridibundus*. Što se tiče razlika u koncentracijama metala u koži, rezultati su pokazali da su žabe *P. esculentus* imale najveće koncentracije Cd, Cr i Pb. *P. esculentus* je imala veće koncentracije Ni u odnosu na roditeljsku vrstu *P. lessonae*. Koncentracije Hg su bile najveće kod jedinki *P. ridibundus*, dok je Cu u najvećoj koncentraciji bio prisutan kod jedinki *P. lessonae*. *P. lessonae* je akumulirala veće koncentracije Zn u odnosu na *P. ridibundus*. Kod mišićnog tkiva žabe *P. ridibundus* nađene su veće koncentracije Cr i

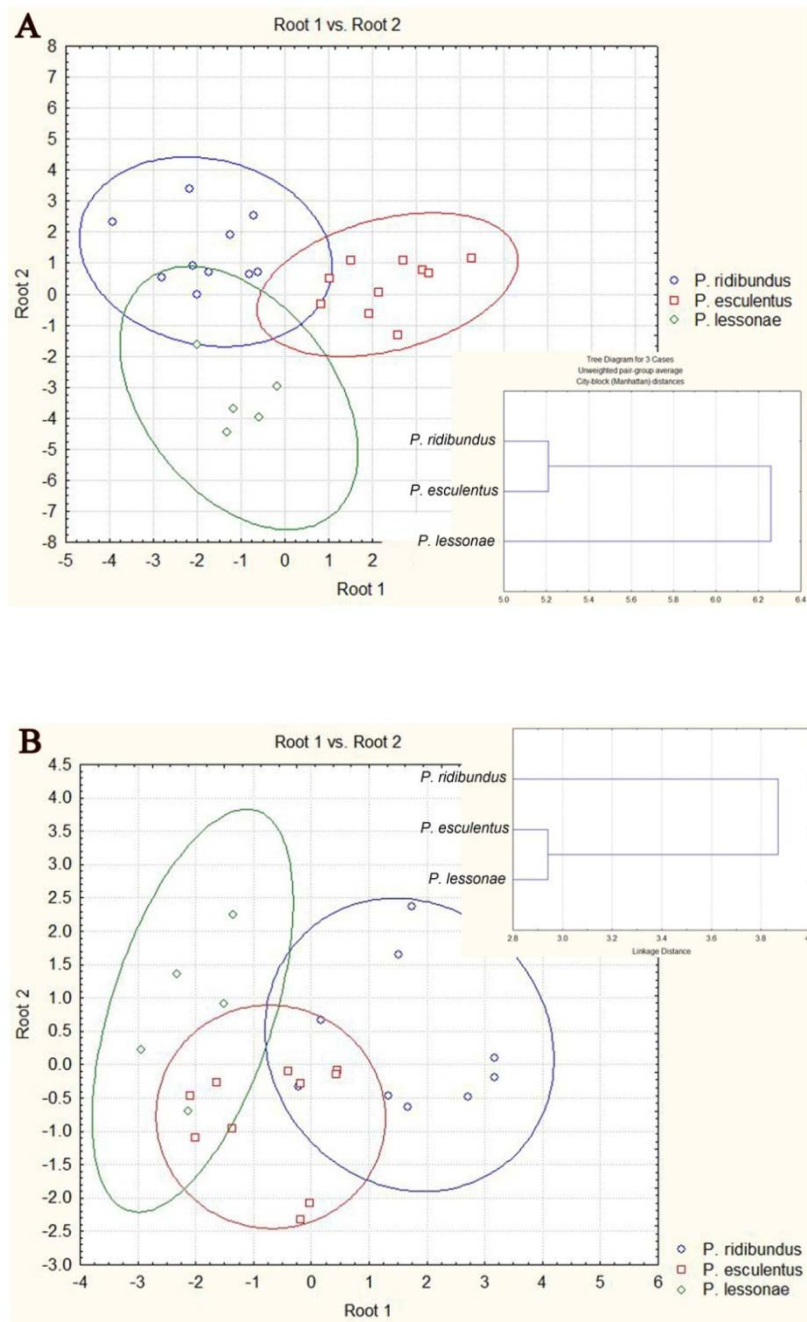
Mn u odnosu na *P. esculentus*. *P. ridibundus* je imala i najveću koncentraciju Zn u odnosu na druge dve vrste, dok su za Hg najniže koncentracije detektovane kod *P. lessonae*. Mn nije detektovan kod *P. lessonae* u mišićima.

Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza su primenjene kako bi se ispitale razlike i sličnosti u akumulaciji metala između vrsta *P. esculentus* kompleksa sa lokaliteta Obedska Bara (Grafikon 1). Za akumulaciju u tkivu kože, prva kanonijska funkcija (Root 1) pokazala je 55,1 % od ukupne heterogenosti, dok je druga kanonijska funkcija (Root 2) pokazala 44,9 % (Grafikon 1A). Po prvoj funkciji hibrid *P. esculentus* se odvajao od roditeljskih vrsta (*P. ridibundus* i *P. esculentus*), a po drugoj funkciji došlo je do razdvajanja između roditeljskih vrsta. Metali koji su najviše doprineli razdvajanju po prvoj i drugoj osi su Cd, Pb i Cu. Klaster analiza je pokazala da *P. esculentus* i *P. ridibundus* imaju sličniji obrazac akumulacije metala u koži nego kod *P. lessonae*.

Kanonijska diskriminaciona analiza metala u mišićima ispitivanih vrsta pokazala je izvesno preklapanje (Grafikon 1B). Generalno odvajanje je uočeno po prvoj funkciji (84,6%) za *P. esculentus* i *P. lessonae* sa jedne strane i *P. ridibundus* sa druge. Metali koji su doprineli razdvajanju su Zn, As i Fe. Druga funkcija pokazala je manji procenat heterogenosti, svega 15,4 % i po ovoj funkciji *P. esculentus* se odvojio od *P. lessonae*. Metali koji su najviše doveli do tog razdvajanja su Cr, Ni i As. Klaster analizom je potvrđena veća sličnost u akumulaciji metala između *P. esculentus* i *P. lessonae* u odnosu na *P. ridibundus*.

**Tabela 13.** Koncentracije metala (mg/kg) u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus*, *P. esculentus* i *P. lessonae* sa lokaliteta Obedska Bara- proleće 2014. “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “c” u odnosu na *P. lessonae*.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	jetra		koža			mišić		
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. lessonae</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. lessonae</i>
Al	19,43 $\pm$ 3,82	19,1 $\pm$ 3,4	20,3 $\pm$ 2,4	20,5 $\pm$ 4,3	27,6 $\pm$ 4,1	15,7 $\pm$ 2,4	129,9 $\pm$ 38,8	18,5 $\pm$ 2,6
As	1,07 $\pm$ 0,25	1,14 $\pm$ 0,23	0,449 $\pm$ 0,056	0,604 $\pm$ 0,208	0,389 $\pm$ 0,050	1,12 $\pm$ 0,27	1,49 $\pm$ 0,26	1,45 $\pm$ 0,27
Cd	0,532 $\pm$ 0,092	0,350 $\pm$ 0,04	0,021 $\pm$ 0,002	0,138 $\pm$ 0,010 <sup>ac</sup>	0,016 $\pm$ 0,006	/	/	/
Co	0,587 $\pm$ 0,092	0,461 $\pm$ 0,05	0,106 $\pm$ 0,034	/	/	0,019 $\pm$ 0,007	0,007 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,005
Cr	0,233 $\pm$ 0,016	0,345 $\pm$ 0,041 <sup>a</sup>	0,891 $\pm$ 0,113	1,35 $\pm$ 0,14 <sup>ac</sup>	0,843 $\pm$ 0,156	0,671 $\pm$ 0,152 <sup>b</sup>	0,213 $\pm$ 0,016	0,406 $\pm$ 0,069
Cu	92,5 $\pm$ 13,7	84,5 $\pm$ 24,5	2,15 $\pm$ 0,12	2,25 $\pm$ 0,16	3,04 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup>	1,52 $\pm$ 0,12	1,39 $\pm$ 0,04	1,32 $\pm$ 0,11
Fe	306,9 $\pm$ 26,0 <sup>b</sup>	235,2 $\pm$ 11,9	33,0 $\pm$ 1,5	29,1 $\pm$ 2,7	29,1 $\pm$ 3,8	18,6 $\pm$ 1,6	18,5 $\pm$ 0,9	22,6 $\pm$ 3,1
Hg	1,09 $\pm$ 0,18	1,15 $\pm$ 0,26	0,168 $\pm$ 0,015 <sup>bc</sup>	0,105 $\pm$ 0,009	0,030 $\pm$ 0,018	0,334 $\pm$ 0,045 <sup>c</sup>	0,238 $\pm$ 0,041 <sup>c</sup>	0,063 $\pm$ 0,012
Mn	4,14 $\pm$ 0,24	/	15,3 $\pm$ 1,9	17,1 $\pm$ 0,9	17,6 $\pm$ 4,0	0,671 $\pm$ 0,085 <sup>b</sup>	0,473 $\pm$ 0,024	/
Ni	0,67 $\pm$ 0,18	5,10 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	0,707 $\pm$ 0,091	0,998 $\pm$ 0,180 <sup>c</sup>	0,513 $\pm$ 0,096	0,586 $\pm$ 0,074	0,452 $\pm$ 0,072	0,739 $\pm$ 0,135 <sup>b</sup>
Pb	/	1,69 $\pm$ 0,69	0,555 $\pm$ 0,098	1,12 $\pm$ 0,21 <sup>ac</sup>	0,026 $\pm$ 0,006	/	/	/
Zn	62,1 $\pm$ 3,6	63,4 $\pm$ 3,9	120,2 $\pm$ 11,7	85,9 $\pm$ 6,8	157,6 $\pm$ 30,3 <sup>b</sup>	27,6 $\pm$ 1,8 <sup>bc</sup>	20,3 $\pm$ 1,3	18,1 $\pm$ 0,4



**Grafikon 1.** Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza za akumulirane metale A) u koži i B) u mišićima vrsta *P. esculentus* kompleksa sa lokaliteta Obedska Bara (proleće 2014. godine).

#### 4.2.2. Parametri antioksidacionog sistema, enzim faze II biotransformacije (GST) i aktivnost holinesteraze (ChE) u tkivima vrsta *Pelophylax esculentus* kompleksa

Svi rezultati parametara AOS i holinesteraze predstavljeni su po tkivima, sezonama i lokalitetima, tabelarno i grafički.

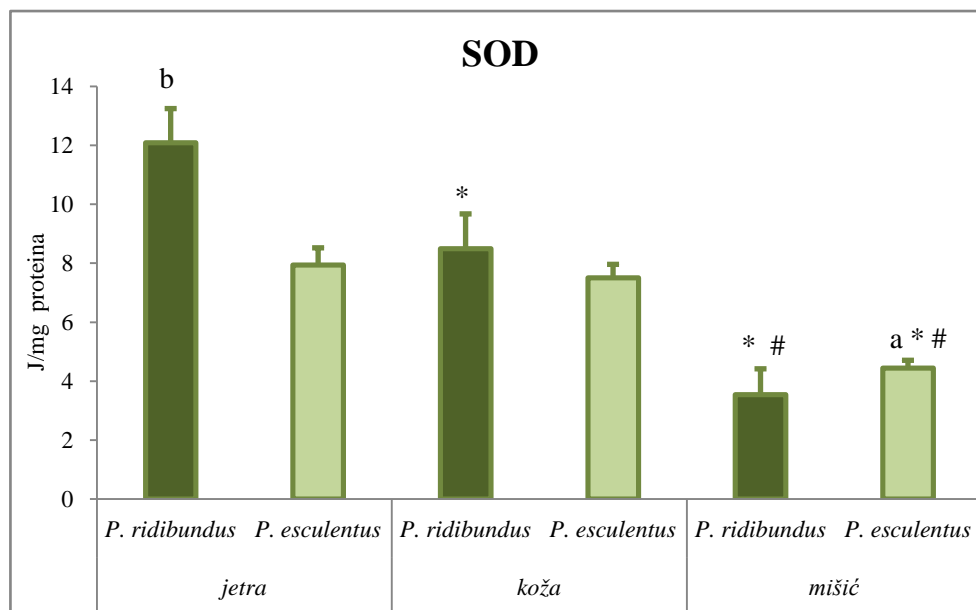
Za jedinke sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2013.) rezultati su dati u tabeli 14.

**Tabela 14.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu DTD- proleće 2013. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

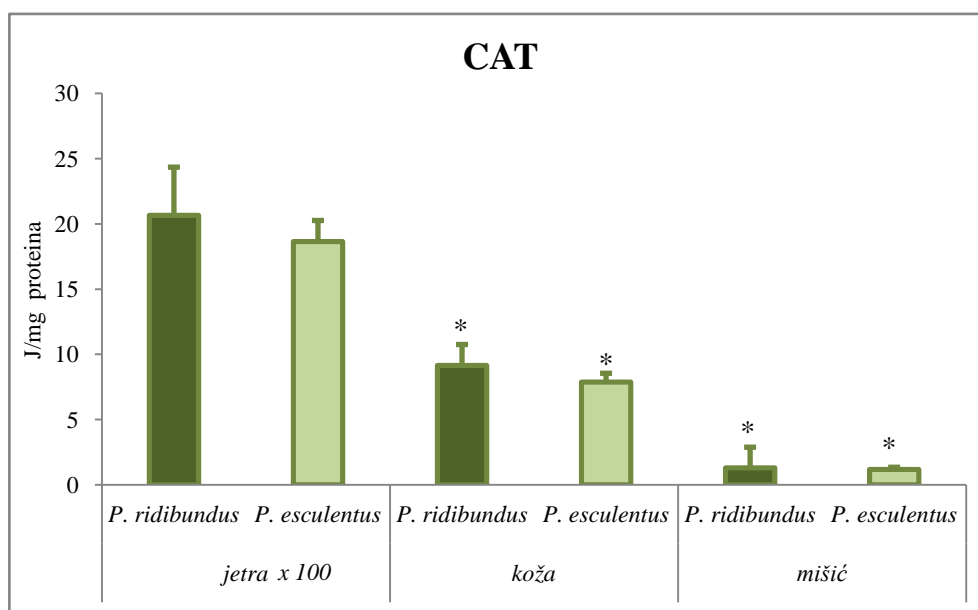
	jetra		koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
SOD	12,09 $\pm$ 1,15	7,94 $\pm$ 0,57	8,49 $\pm$ 0,32	7,50 $\pm$ 0,45	3,54 $\pm$ 0,27	4,44 $\pm$ 0,25
CAT	2066,6 $\pm$ 367,7	1865,4 $\pm$ 160,3	9,15 $\pm$ 0,75	7,87 $\pm$ 0,67	1,30 $\pm$ 0,13	1,19 $\pm$ 0,15
GSH-Px	28,0 $\pm$ 3,3	18,2 $\pm$ 2,4	10,9 $\pm$ 0,4	11,42 $\pm$ 0,76	3,64 $\pm$ 0,36	3,35 $\pm$ 0,24
GR	12,22 $\pm$ 1,14	9,05 $\pm$ 0,72	11,8 $\pm$ 1,0	9,98 $\pm$ 0,72	0,58 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,09
GST	213,6 $\pm$ 31,1	125,8 $\pm$ 8,2	281,6 $\pm$ 18,4	230,2 $\pm$ 23,9	28,4 $\pm$ 2,4	33,6 $\pm$ 2,6
GSH	897,3 $\pm$ 119,3	1135,5 $\pm$ 64,8	137,3 $\pm$ 14,7	113,7 $\pm$ 15,2	96,3 $\pm$ 12,1	104,6 $\pm$ 10,1
SH	90,8 $\pm$ 11,1	73,1 $\pm$ 3,2	66,4 $\pm$ 1,4	73,3 $\pm$ 2,2	114,5 $\pm$ 2,3	118,8 $\pm$ 4,9
ChE	3,27 $\pm$ 0,17	3,51 $\pm$ 0,25	0,50 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,07

Aktivnosti SOD, GSH-Px i GR u jetri bile su statistički značajno veće kod vrste *P. ridibundus* (Grafikoni 2, 4 i 5). Od parametara u koži, samo je koncentracija SH grupa bila veća kod jedinki *P. esculentus* (Grafikon 8), dok su u mišićima ove vrste zabeležene veće aktivnosti SOD i GR (Grafikon 2 i 5).

Međutkivna razlika kod vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* je pokazala da su aktivnosti SOD, GSH-Px, GR i GST manje u mišićima u poređenju sa aktivnostima u jetri i koži (Grafikon 2, 4, 5 i 6). Aktivnosti CAT, GSH-Px i ChE kao i koncentracije GSH bile su značajno manje u koži ispitivanih vrsta u poređenju sa jetrom (Grafikoni 3, 4, 9 i 7). Jedino su koncentracije SH grupa bile značajno manje u jetri i koži kada se uporede sa koncentracijama u mišićima (Grafikon 8).

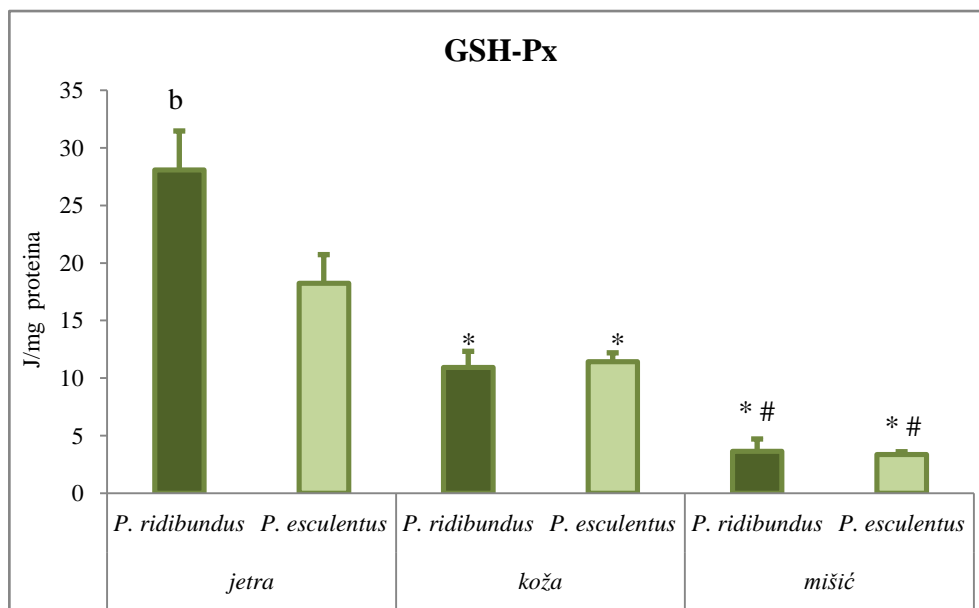


**Grafikon 2.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

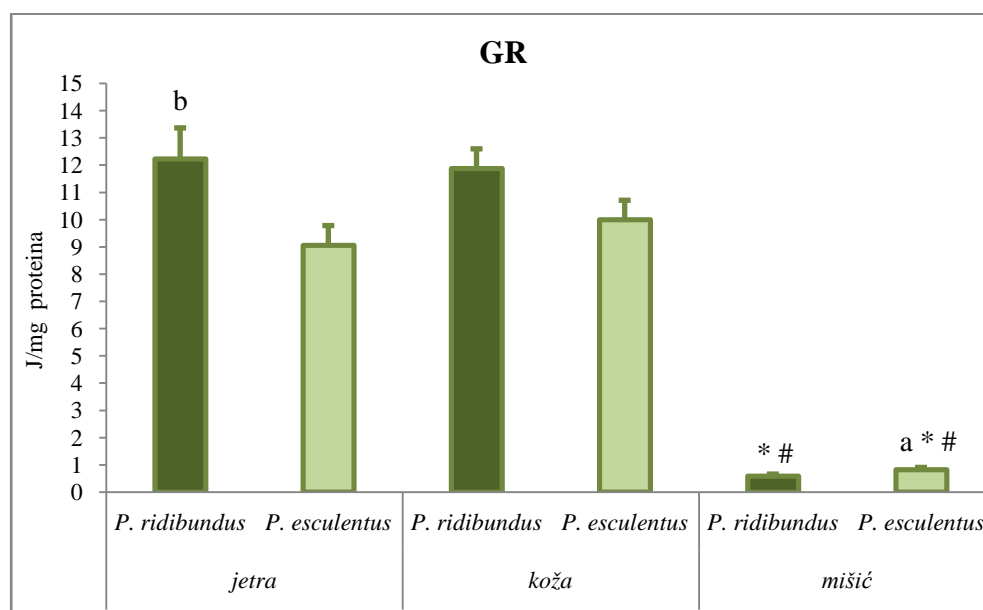


**Grafikon 3.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2013.). “\*” u odnosu na jetru;  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti katalaze u jetri podeljene su sa 100 radi jasnijeg prikaza.

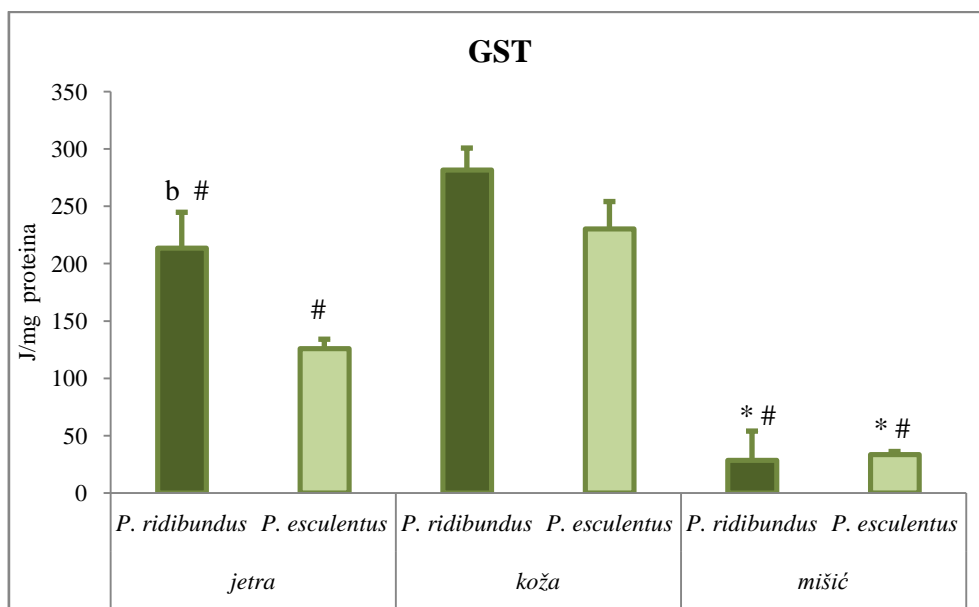




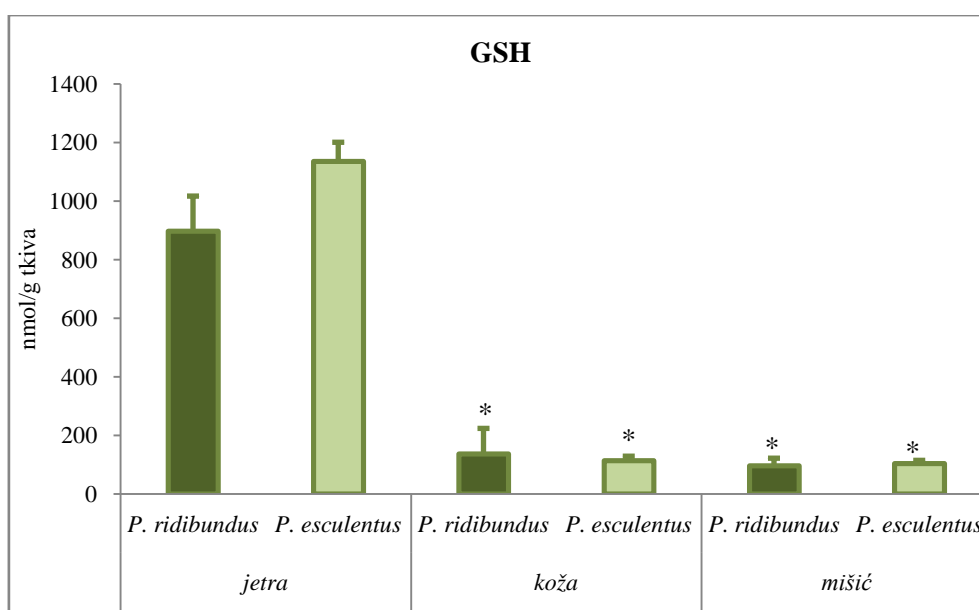
**Grafikon 4.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



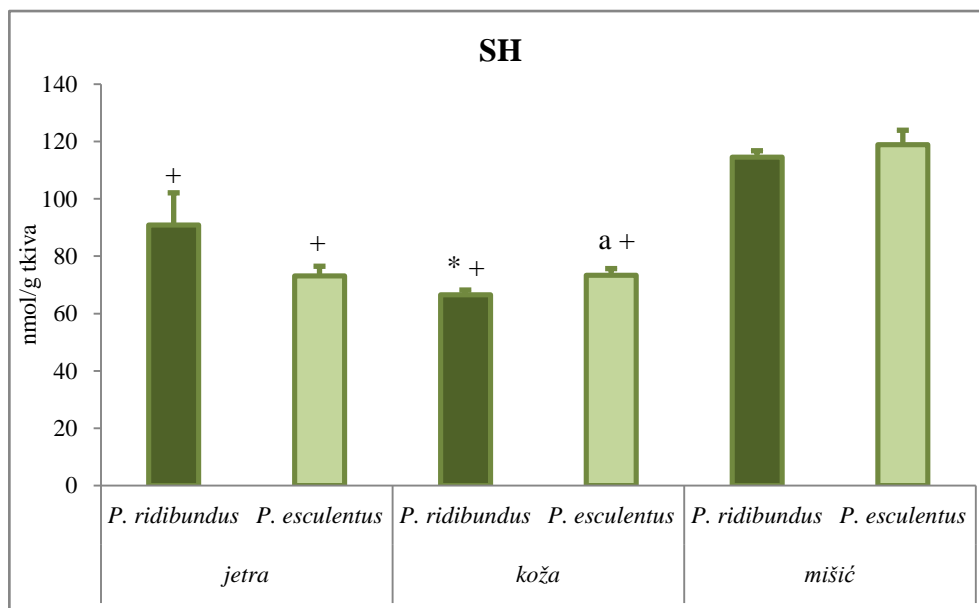
**Grafikon 5.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



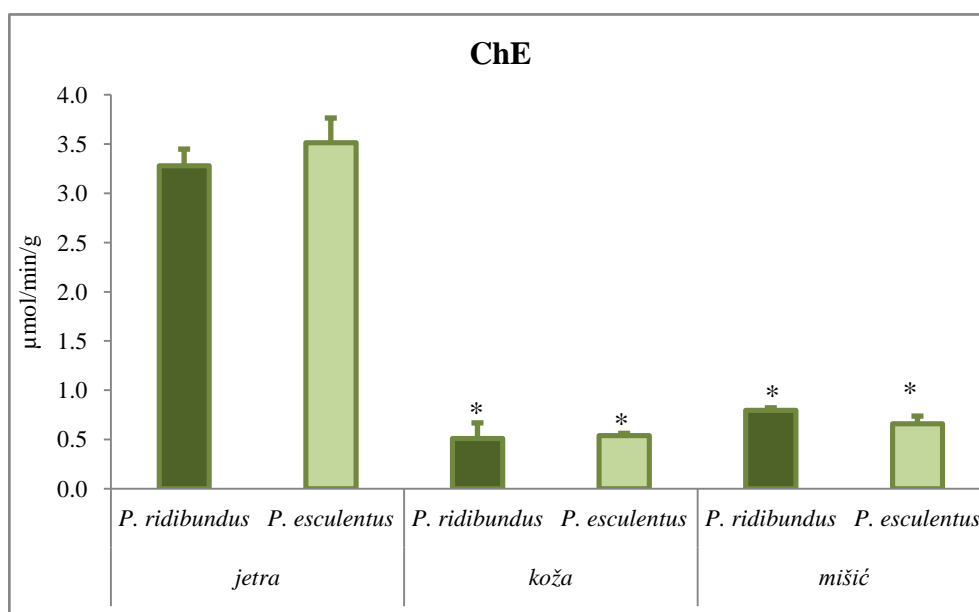
**Grafikon 6.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 7.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 8.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “+” u odnosu na mišić.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 9.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2013.). “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

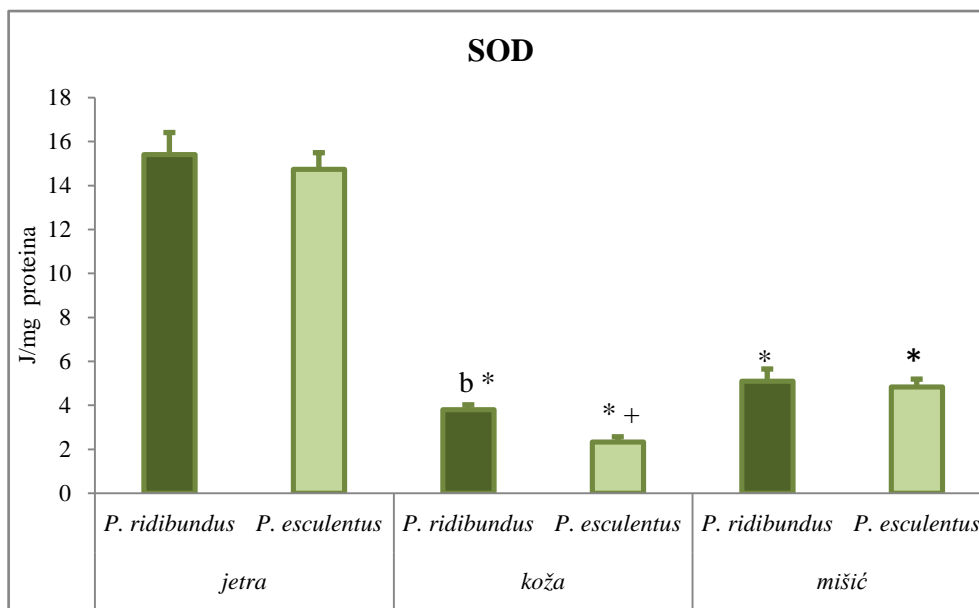
Parametri AOS i aktivnost holinesteraze u tkivima jedinki *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa DTD (sezona proleće 2014.) prikazani su u tabeli 15.

**Tabela 15.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu DTD u proleće 2014.

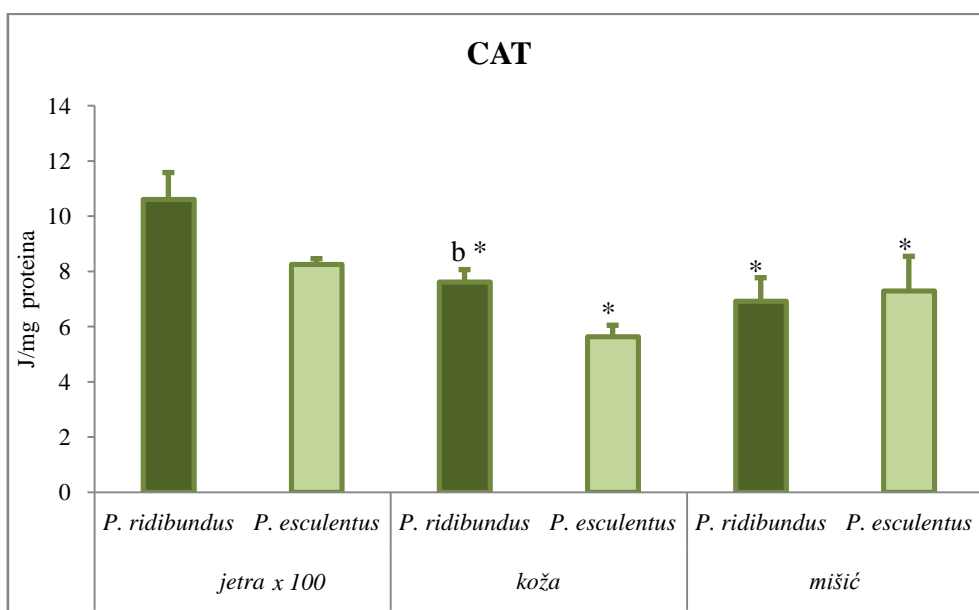
	jetra		koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
SOD	15,39 ± 1,00	14,72 ± 0,75	3,80 ± 0,21	2,33 ± 0,23	5,09 ± 0,54	4,83 ± 0,35
CAT	1060,2 ± 97,3	825,8 ± 202,2	7,61 ± 0,44	5,62 ± 0,42	6,92 ± 0,85	7,28 ± 1,25
GSH-Px	19,69 ± 2,74	26,23 ± 1,11	7,52 ± 0,74	5,25 ± 0,34	6,82 ± 0,28	4,95 ± 0,45
GR	10,96 ± 1,08	13,95 ± 1,02	8,18 ± 0,47	7,01 ± 0,48	2,01 ± 0,24	1,28 ± 0,08
GST	364,2 ± 37,0	373,5 ± 35,6	118,1 ± 6,0	94,0 ± 4,8	92,6 ± 8,6	60,8 ± 3,6
GSH	1301,7 ± 151,6	757,4 ± 52,1	129,2 ± 11,7	116,5 ± 12,4	52,8 ± 4,1	58,0 ± 6,0
SH	822,0 ± 2,6	822,9 ± 3,9	822,0 ± 2,6	622,4 ± 21,0	649,2 ± 16,6	602,1 ± 12,1
ChE	2,43 ± 0,13	2,99 ± 0,22	0,62 ± 0,08	0,35 ± 0,01	0,68 ± 0,11	0,445 ± 0,05

Jetra vrste *P. esculentus* je imala značajno veće aktivnosti GSH-Px, GR i ChE u poređenju sa jetrom *P. ridibundus* (Grafikoni 12, 13 i 17). Nasuprot tome, koncentracije GSH bile su značajno veće kod *P. ridibundus* (Grafikon 15). U koži *P. ridibundus* su uočene veće aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px i ChE, kao i veće koncentracije SH grupa, u odnosu na *P. esculentus* (Grafikoni 10, 11, 12, 17 i 16). Slična situacija je zabeležena u mišićima, i to za aktivnosti GSH-Px, GR i GST i koncentracije SH grupa koje su bile značajno veće kod *P. ridibundus* (Grafikoni 12, 13, 14 i 16).

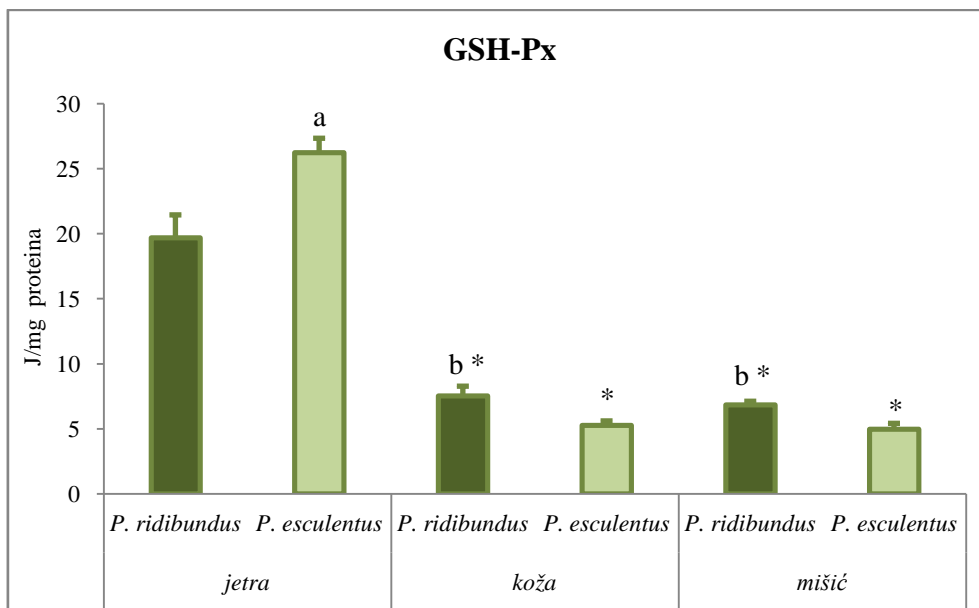
Poređenje parametara AOS između tkiva obe vrste pokazalo je da jetra ima najviše vrednosti za sve parametre, sa izuzetkom SH grupa u jetri *P. ridibundus* koja se nije značajnije razlikovala od kože (Grafikon 16). Koža obe vrste imala je značajno veću aktivnost GR od mišića, kao i veću koncentraciju SH grupa kod *P. esculentus* (Grafikoni 13 i 16). U mišićima *P. esculentus* zabeležena je značajno veća aktivnost SOD u odnosu na kožu (Grafikon 10).



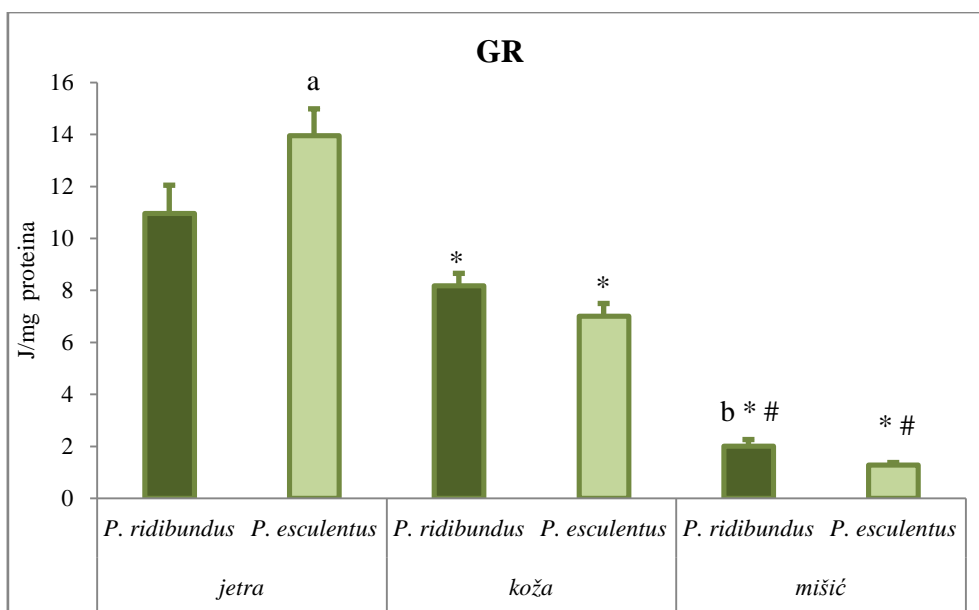
**Grafikon 10.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “+” u odnosu na mišić.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



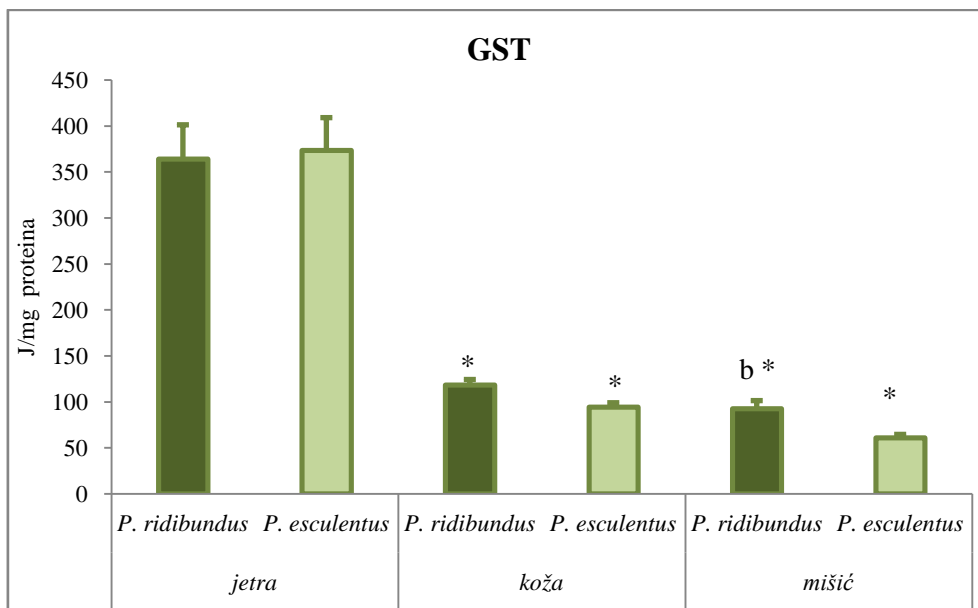
**Grafikon 11.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti katalaze u jetri podeljene su sa 100 radi jasnijeg prikaza.



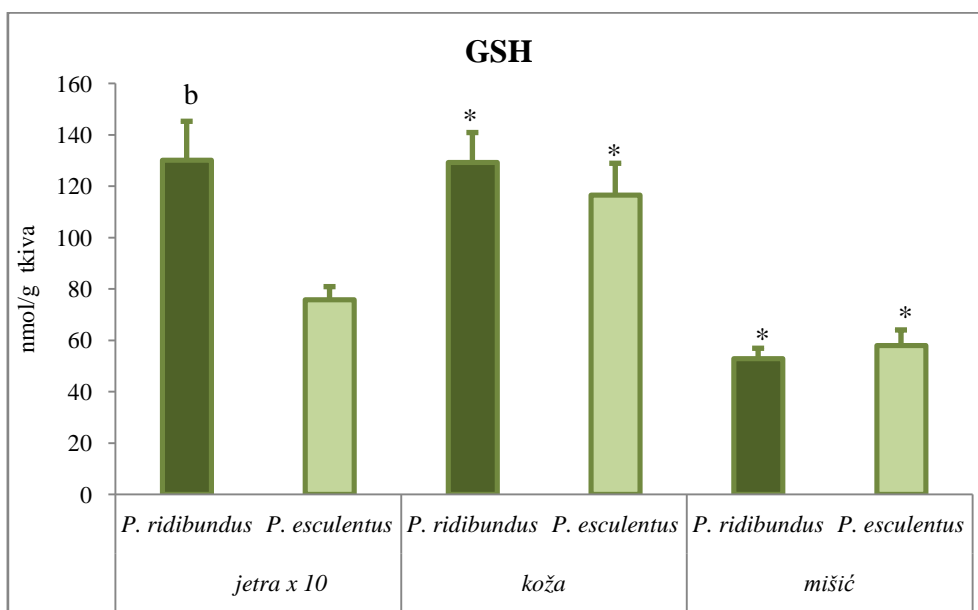
**Grafikon 12.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



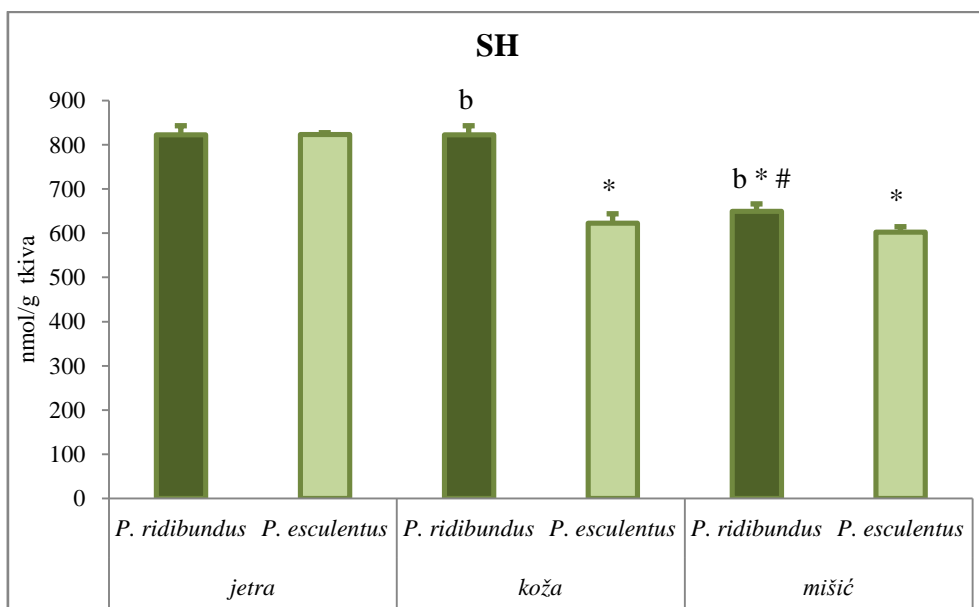
**Grafikon 13.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



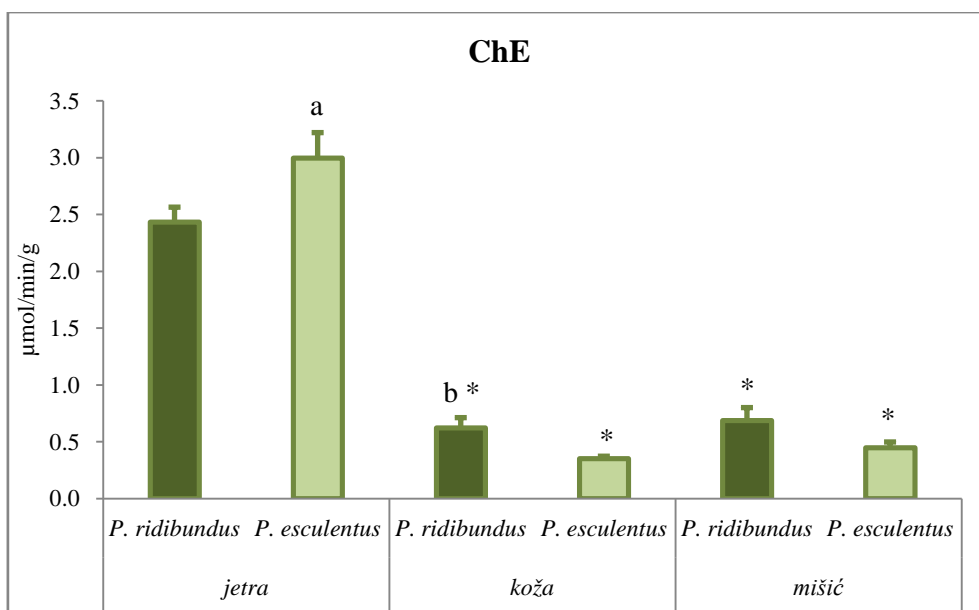
**Grafikon 14.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 15.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti glutationa u jetri podeljene su sa 10 radi jasnijeg prikaza.



**Grafikon 16.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 17.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



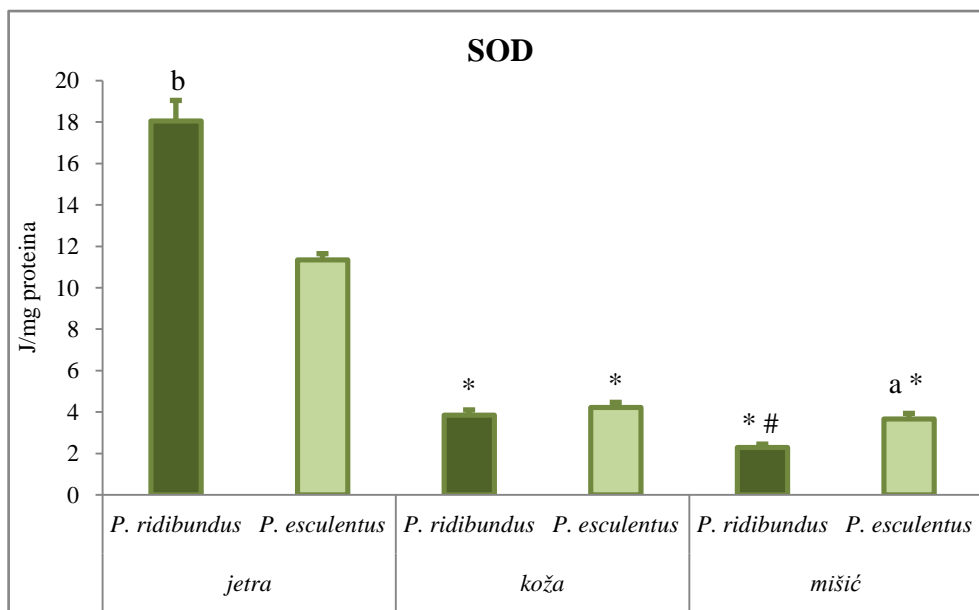
U tabeli 16 su prikazani parametri AOS i aktivnost ChE koji su izmereni za jedinke izlovljene u jesen 2014. na lokalitetu DTD. Parametri su mereni u tkivima (jetra, koža i mišić) vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus*.

**Tabela 16.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu DTD u jesen 2014. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

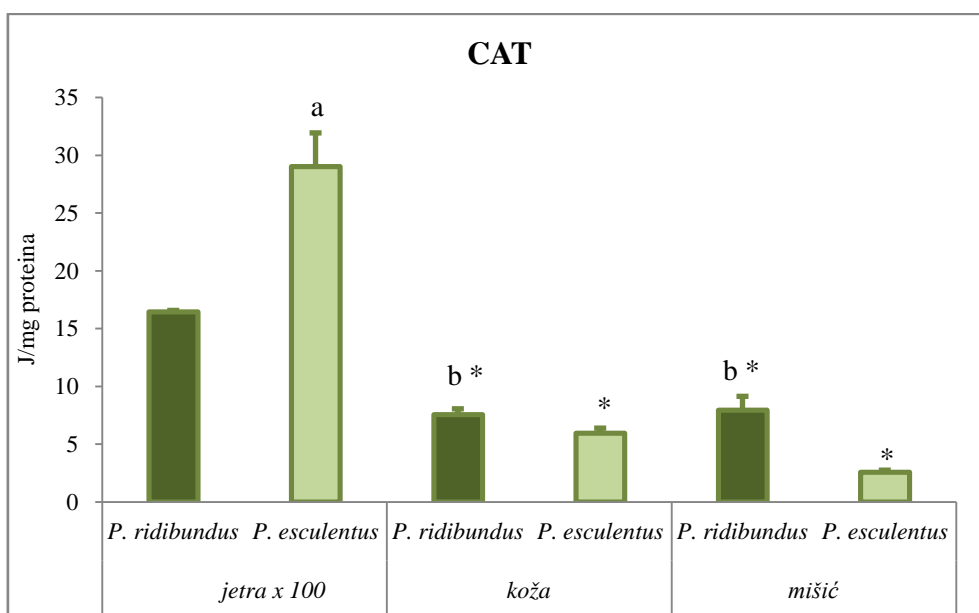
	jetra		koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
SOD	18,05 $\pm$ 0,98	11,3 $\pm$ 0,3	3,84 $\pm$ 0,24	4,2 $\pm$ 0,2	2,28 $\pm$ 0,15	3,6 $\pm$ 0,3
CAT	1644,7 $\pm$ 115,7	2901,7 $\pm$ 290,2	7,5 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,4	7,9 $\pm$ 1,1	2,5 $\pm$ 0,2
GSH-Px	33,68 $\pm$ 2,54	4,9 $\pm$ 0,4	10,5 $\pm$ 0,8	5,72 $\pm$ 0,62	4,4 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,4
GR	17,66 $\pm$ 2,21	19,2 $\pm$ 1,5	4,32 $\pm$ 0,27	5,0 $\pm$ 0,3	0,86 $\pm$ 0,10	0,75 $\pm$ 0,11
GST	436,0 $\pm$ 53,8	427,5 $\pm$ 53,3	73,4 $\pm$ 4,2	74,4 $\pm$ 4,9	26,5 $\pm$ 1,1	60,9 $\pm$ 3,6
GSH	933,0 $\pm$ 109,3	1038,2 $\pm$ 59,6	46,9 $\pm$ 2,5	53,7 $\pm$ 8,8	157,3 $\pm$ 17,9	189,1 $\pm$ 16,1
SH	258,2 $\pm$ 3,1	341,6 $\pm$ 5,1	222,7 $\pm$ 8,1	245,1 $\pm$ 8,1	271,0 $\pm$ 1,2	300,2 $\pm$ 2,0
ChE	2,02 $\pm$ 0,15	2,9 $\pm$ 0,2	0,45 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,07	0,42 $\pm$ 0,03

Aktivnosti SOD i GSH-Px u ispitivanoj sezoni bile su značajno veće u jetri jedinki *P. ridibundus* (Grafikoni 18 i 20), dok su u jetri *P. esculentus* bile veće aktivnosti CAT i ChE i koncentracija SH grupa (Grafikoni 19, 25 i 24). Koža *P. ridibundus* i *P. esculentus* se razlikovala na osnovu aktivnosti CAT i GSH-Px, pri čemu je veća aktivnost zabeležena kod *P. ridibundus* (Grafikoni 19 i 20). U mišićima su uočene veće aktivnosti SOD i koncentracije SH grupa kod *P. esculentus* (Grafikoni 18 i 24), dok je u mišićima *P. ridibundus* bila veća aktivnost CAT (Grafikon 19).

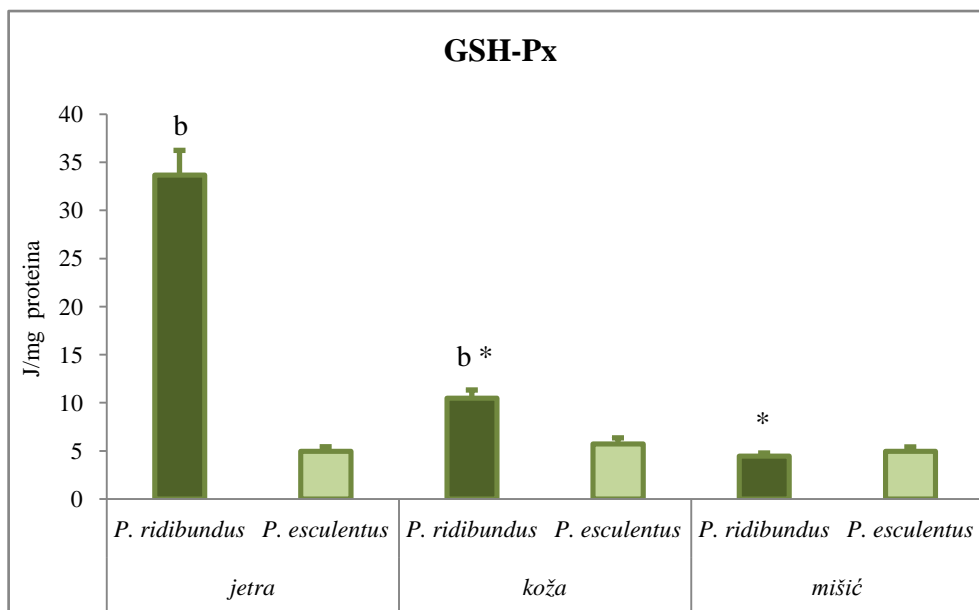
Razlike između tkiva pokazale su da jetra ima najveću aktivnost SOD, CAT, GR, GST, GSH i ChE kod obe ispitivane vrste (Grafikoni 18, 19, 22, 23 i 25). U jetri *P. esculentus* su pored ovih parametara dobijene i visoke vrednosti koncentracije SH grupa, a kod *P. ridibundus* je izmerena i povećana aktivnost GSH-Px (Grafikoni 24 i 20). Koža je imala veće aktivnosti GR kod obe vrste i veću aktivnost SOD kod *P. ridibundus* u poređenju sa istim parametrima u mišićima (Grafikoni 21 i 18). U mišiću su zabeležene veće koncentracije SH grupa u odnosu na kožu kod obe vrste, kao i u odnosu na jetru *P. ridibundus* (Grafikon 24).



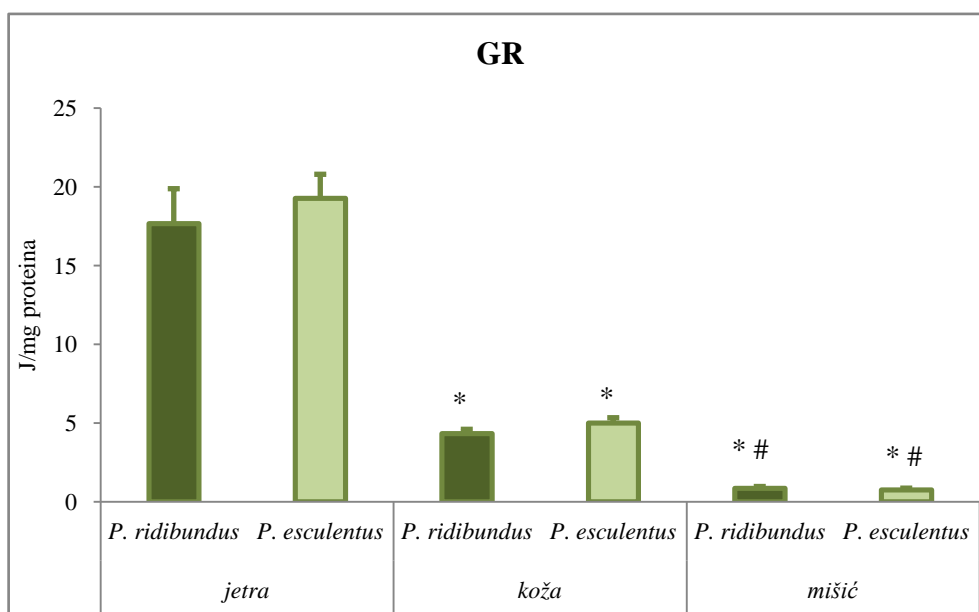
**Grafikon 18.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



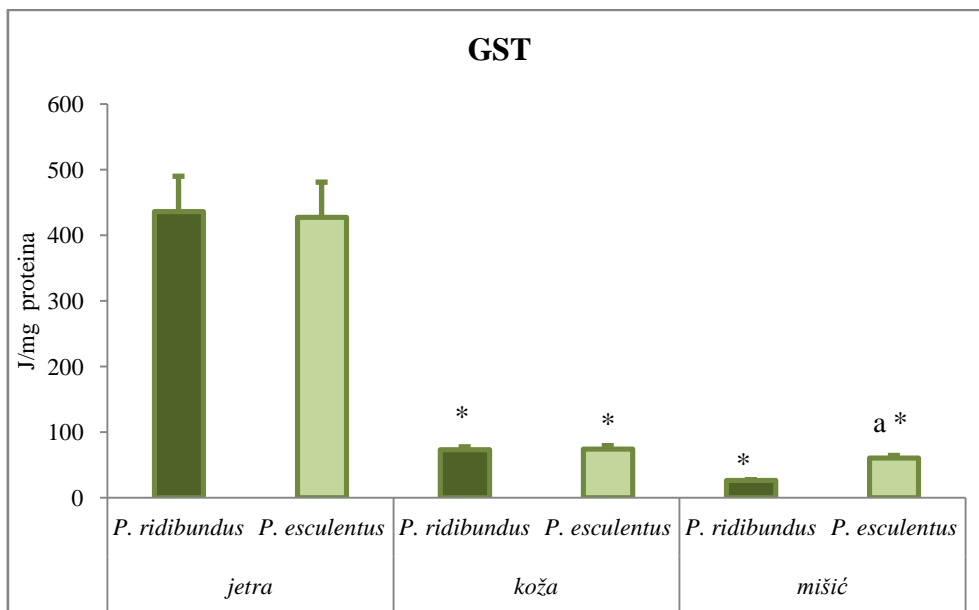
**Grafikon 19.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti katalaze u jetri podeljene su sa 100 radi jasnijeg prikaza.



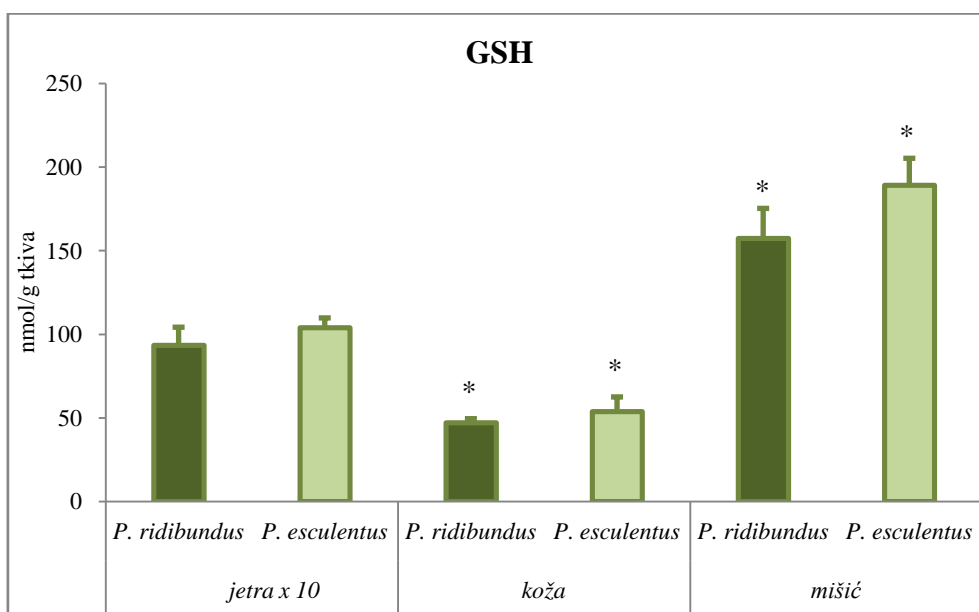
**Grafikon 20.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



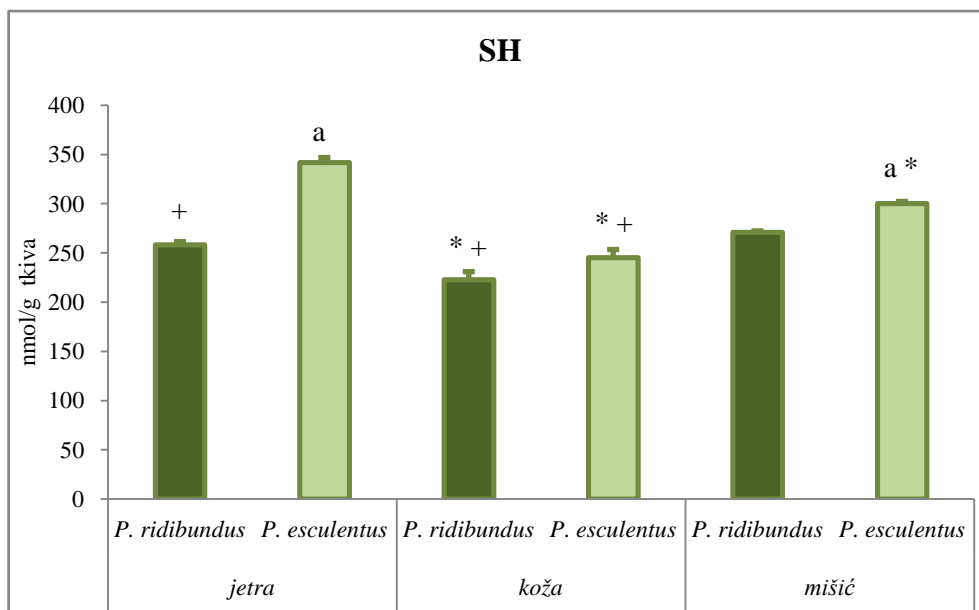
**Grafikon 21.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona jesen 2014.). “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



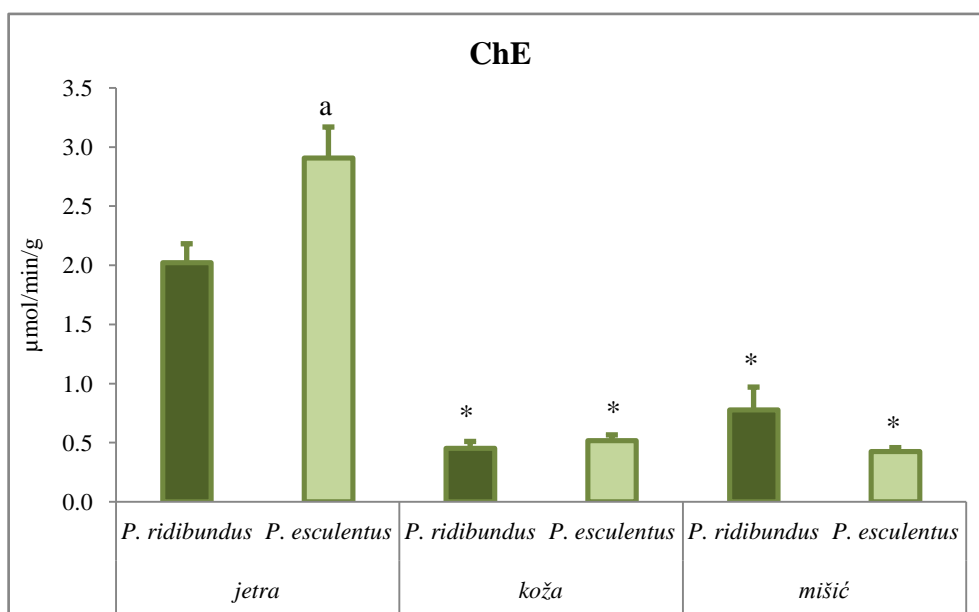
**Grafikon 22.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 23.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona jesen 2014.). “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti glutationa u jetri podeljene su sa 10 radi jasnijeg prikaza.



**Grafikon 24.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “+” u odnosu na mišić.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 25.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta DTD (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

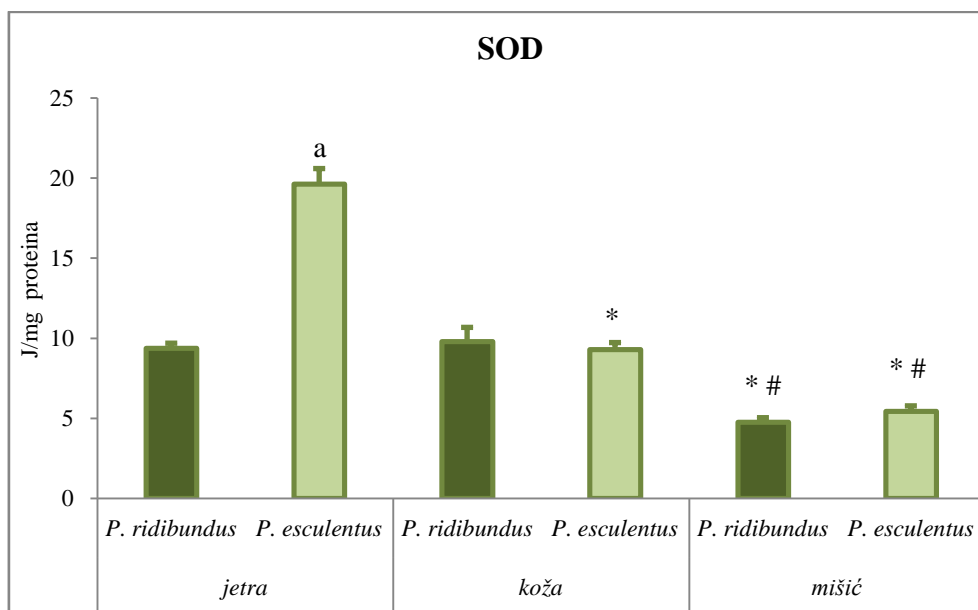
Rezultati parametara antioksidacionog sistema i holinesteraze žaba *P. ridibundus* i *P. esculentus* iz parka prirode Ponjavica izlovljenih tokom proleća 2013. predstavljeni su u Tabeli 17.

**Tabela 17.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu Ponjavica u proleće 2013. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

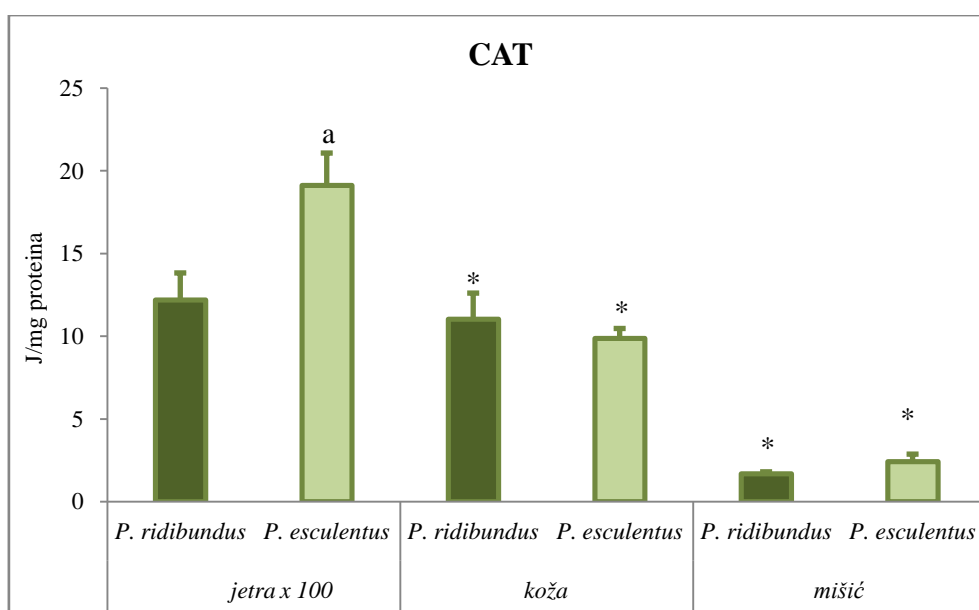
	jetra		koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
SOD	9,37 $\pm$ 0,31	19,63 $\pm$ 0,96	9,80 $\pm$ 0,87	9,29 $\pm$ 0,43	4,75 $\pm$ 0,28	5,42 $\pm$ 0,34
CAT	1219,3 $\pm$ 162,3	1911,3 $\pm$ 195,2	11,01 $\pm$ 1,58	9,87 $\pm$ 0,58	1,67 $\pm$ 0,12	2,41 $\pm$ 0,44
GSH-Px	18,12 $\pm$ 0,83	30,50 $\pm$ 2,78	13,03 $\pm$ 1,05	13,02 $\pm$ 0,94	4,32 $\pm$ 0,25	4,14 $\pm$ 0,14
GR	10,42 $\pm$ 0,74	13,47 $\pm$ 1,15	12,17 $\pm$ 1,74	12,86 $\pm$ 0,90	0,95 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,08
GST	132,4 $\pm$ 6,1	166,4 $\pm$ 10,0	247,9 $\pm$ 25,5	212,2 $\pm$ 11,2	36,38 $\pm$ 2,25	31,43 $\pm$ 1,4
GSH	765,9 $\pm$ 90,9	907,0 $\pm$ 66,3	144,0 $\pm$ 25,8	104,3 $\pm$ 16,8	90,8 $\pm$ 9,3	72,4 $\pm$ 8,1
SH	70,6 $\pm$ 1,96	80,52 $\pm$ 4,07	53,85 $\pm$ 2,17	60,33 $\pm$ 3,34	70,64 $\pm$ 1,75	64,19 $\pm$ 1,92
ChE	3,52 $\pm$ 0,22	3,49 $\pm$ 0,25	0,51 $\pm$ 0,026	0,46 $\pm$ 0,03	0,594 $\pm$ 0,029	0,56 $\pm$ 0,01

Upoređivanjem ispitivanih parametara u jetri *P. ridibundus* i *P. esculentus* utvrđeno je da su aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px, GST i koncentracija SH grupa imale više vrednosti kod vrste *P. esculentus* (Grafikoni 26, 27, 28, 30 i 32). U koži nisu uočene značajne razlike između parametara na ispitivanom lokalitetu, dok su u mišićima koncentracije SH grupa bile veće kod vrste *P. ridibundus* (Grafikon 32).

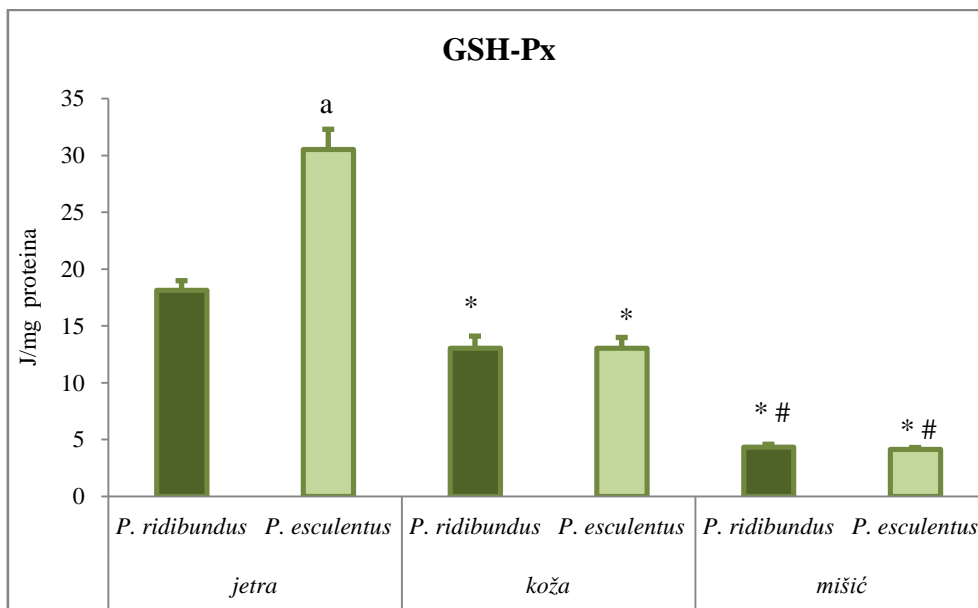
Analiza međutkivnih razlika pokazala je da jetra ispitivanih vrsta ima značajno veće aktivnosti CAT, GSH-Px, GST, ChE i veće koncentracije GSH u odnosu na ostala dva tkiva (Grafikoni 27, 28, 30, 33 i 32). Aktivnosti GR, GST i GSH-Px su bile značajno veće u koži u odnosu na mišiće (Grafikoni 28, 29 i 30), a koncentracije SH grupa u mišićima i jetri *P. ridibundus* u odnosu na koncentraciju SH grupa u koži (Grafikon 32).



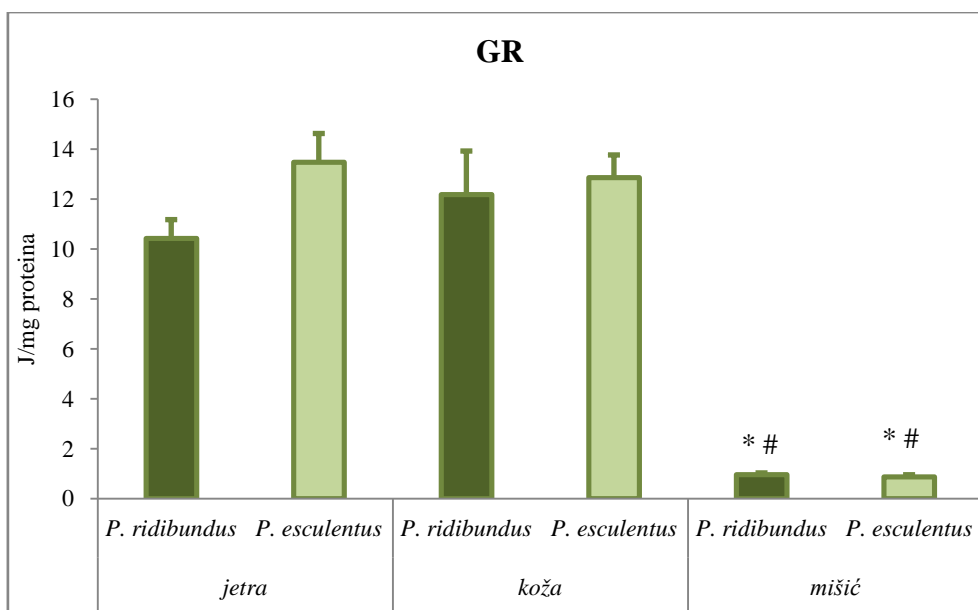
**Grafikon 26.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 27.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti katalaze u jetri podeljene su sa 100 radi jasnijeg prikaza.

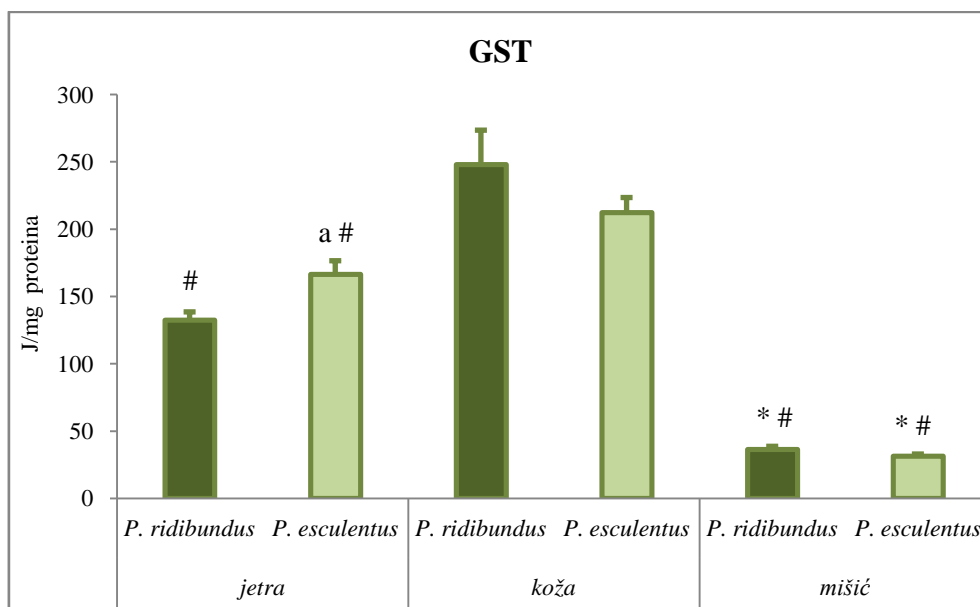


**Grafikon 28.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

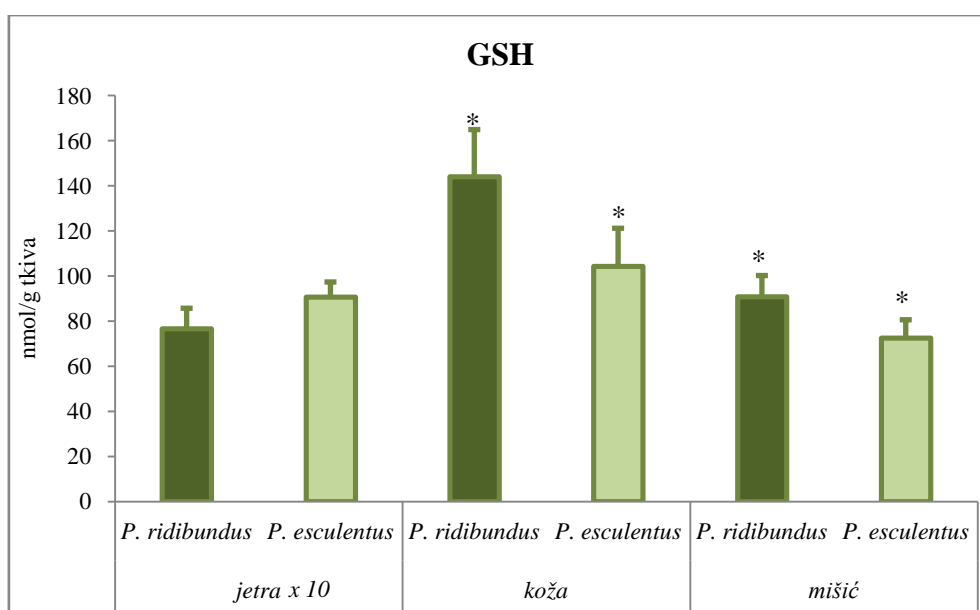


**Grafikon 29.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2013.). “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

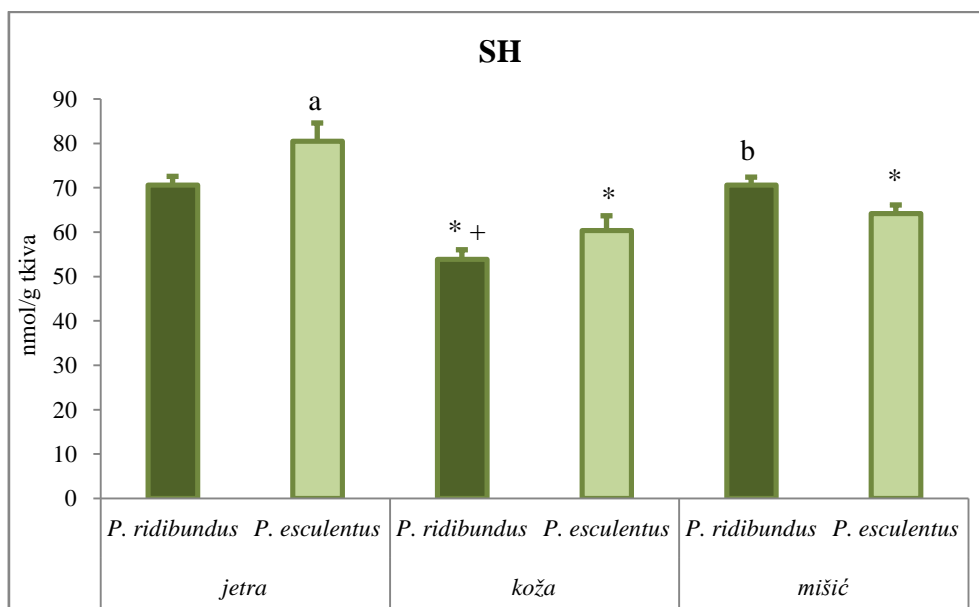




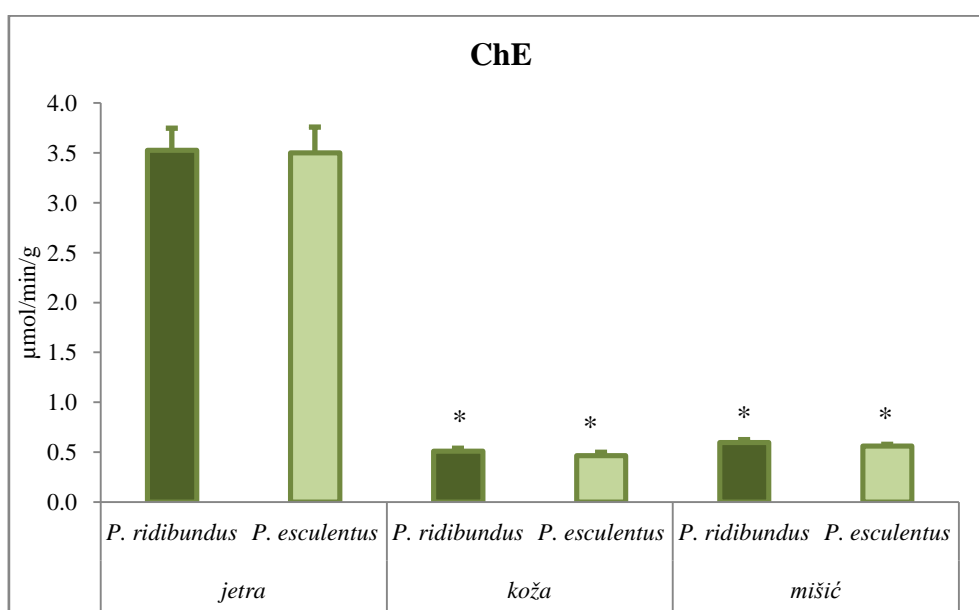
**Grafikon 30.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 31.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2013.). “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti glutaciona u jetri podeljene su sa 10 radi jasnijeg prikaza.



**Grafikon 32.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2013.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “+” u odnosu na mišić.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 33.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2013.). “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

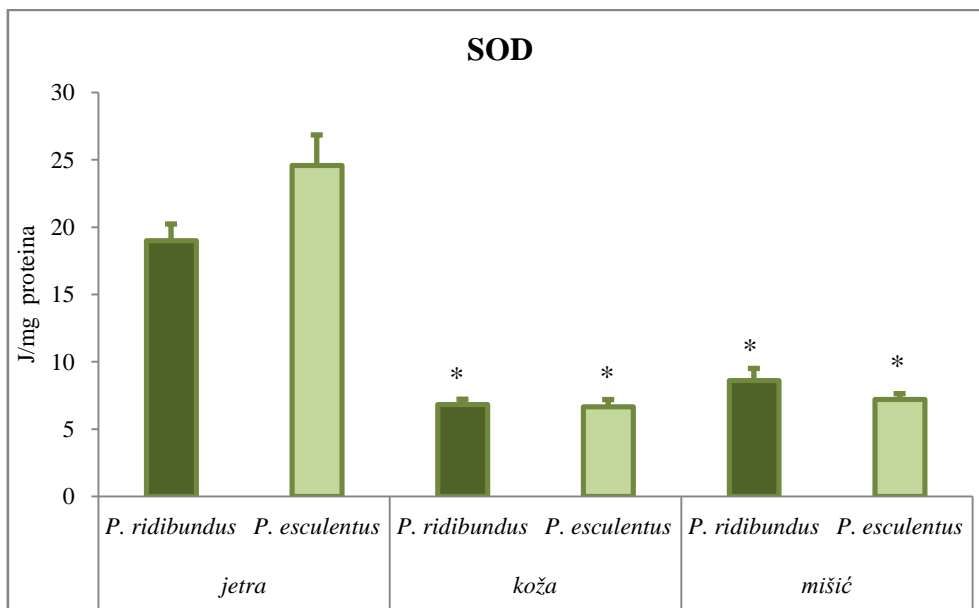
U proleće 2014. na lokalitetu Ponjavica mereni su parametri AOS i holinesteraze u tkivima žaba *P. ridibundus* i *P. esculentus*, a rezultati su predstavljeni u tabeli 18.

**Tabela 18.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu Ponjavica u proleće 2014. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

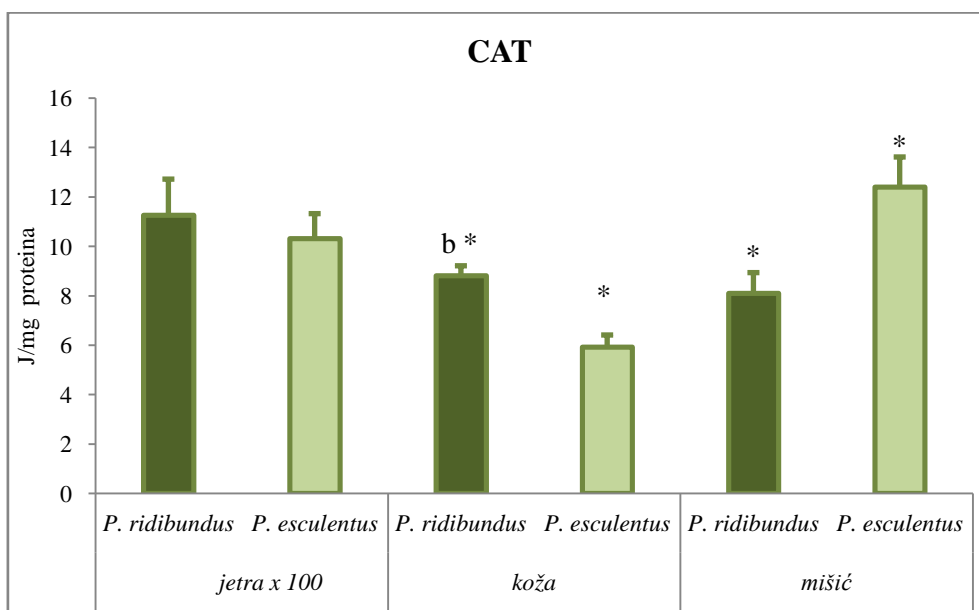
	jetra		koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
SOD	19,0 $\pm$ 3,2	24,59 $\pm$ 2,25	6,82 $\pm$ 0,38	6,65 $\pm$ 0,53	8,60 $\pm$ 0,89	7,19 $\pm$ 0,43
CAT	1125 $\pm$ 146	1032,0 $\pm$ 101,1	8,80 $\pm$ 0,41	5,91 $\pm$ 0,50	8,09 $\pm$ 0,84	12,4 $\pm$ 2,7
GSH-Px	19,86 $\pm$ 1,20	26,5 $\pm$ 3,0	5,47 $\pm$ 0,41	6,01 $\pm$ 0,41	8,77 $\pm$ 0,71	11,2 $\pm$ 1,5
GR	14,85 $\pm$ 1,02	26,48 $\pm$ 2,24	9,73 $\pm$ 0,82	7,93 $\pm$ 0,61	2,34 $\pm$ 0,23	3,08 $\pm$ 0,38
GST	351,7 $\pm$ 25,2	389,8 $\pm$ 33,3	132,0 $\pm$ 9,7	96,0 $\pm$ 6,8	87,7 $\pm$ 7,9	98,6 $\pm$ 8,9
GSH	831,5 $\pm$ 62,9	614,6 $\pm$ 60,9	128,1 $\pm$ 14,3	227,5 $\pm$ 16,8	105,7 $\pm$ 3,2	94,3 $\pm$ 8,5
SH	822,9 $\pm$ 3,1	816,8 $\pm$ 2,4	674,4 $\pm$ 17,3	565,7 $\pm$ 29,8	563,1 $\pm$ 22,1	542,7 $\pm$ 24,1
ChE	3,40 $\pm$ 0,15	3,45 $\pm$ 0,23	0,562 $\pm$ 0,016	0,562 $\pm$ 0,009	0,52 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,03

Enzimi GSH-Px i GR imali su veće aktivnosti u jetri *P. esculentus* (Grafikoni 36 i 37), dok je veća koncentracija GSH zabeležena u jetri *P. ridibundus* (Grafikon 39). Razlike u koži uočene su za CAT, GST i SH grupe, ovi parametri su imali više vrednosti bile kod jedinki *P. ridibundus* (Grafikoni 35, 38 i 40), dok je koncentracija GSH bila veća u koži *P. esculentus* (Grafikon 39). U mišićima je aktivnost ChE, bila veća kod *P. ridibundus* (Grafikon 40).

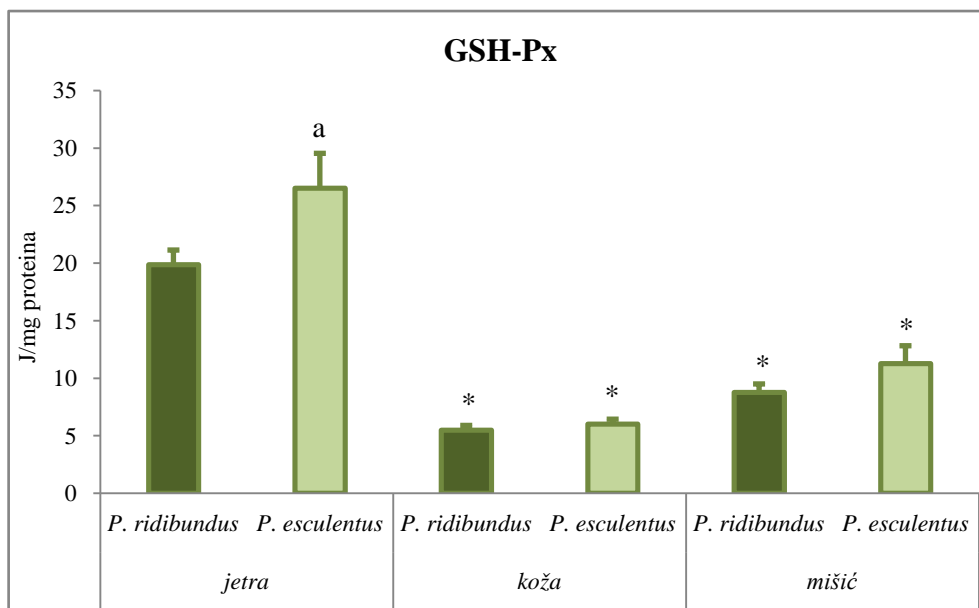
Ispitivane razlike između jetre, mišića i kože pokazale su da jetra ima najveće vrednosti svih parametrima u poređenju sa ostalim (Grafikoni 34-41). Koža je imala veću aktivnost GR kod obe vrste u odnosu na mišiće (Grafikoni 36 i 37). Dok je koncentracija SH grupa bila veća samo kod *P. ridibundus* u koži u poređenju sa mišićima (Grafikon 40).



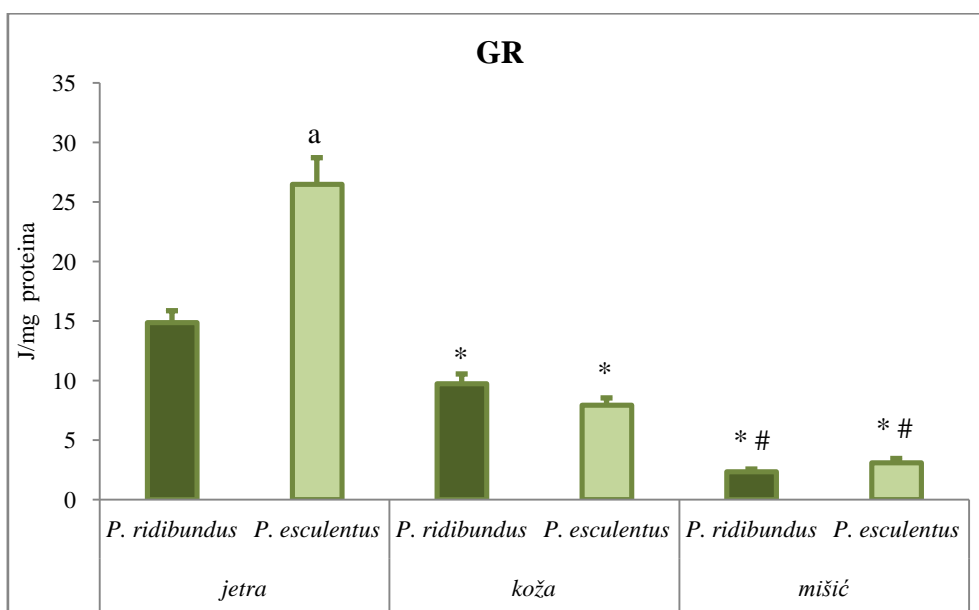
**Grafikon 34.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2014.). “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



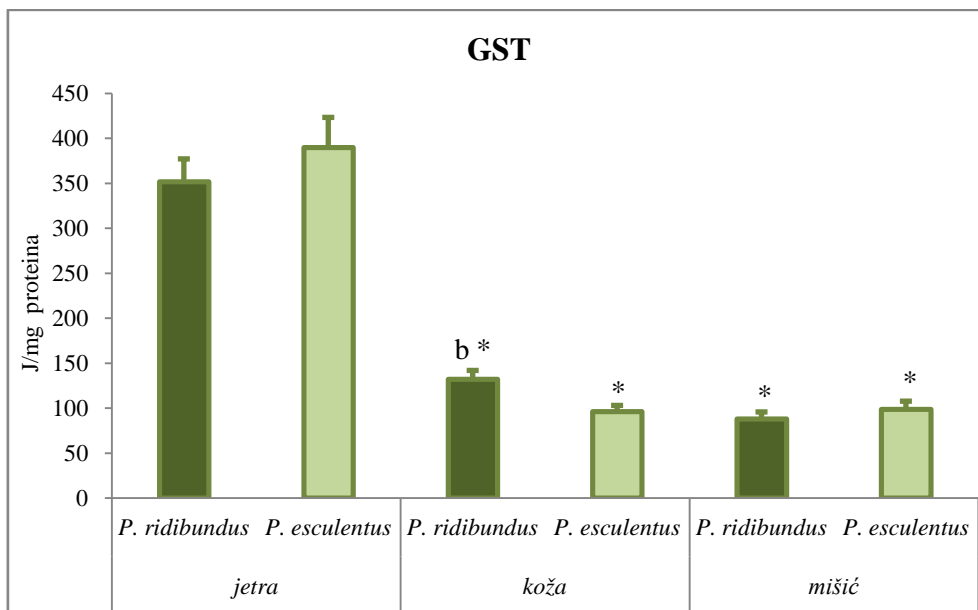
**Grafikon 35.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti katalaze u jetri podeljene su sa 100 radi jasnijeg prikaza.



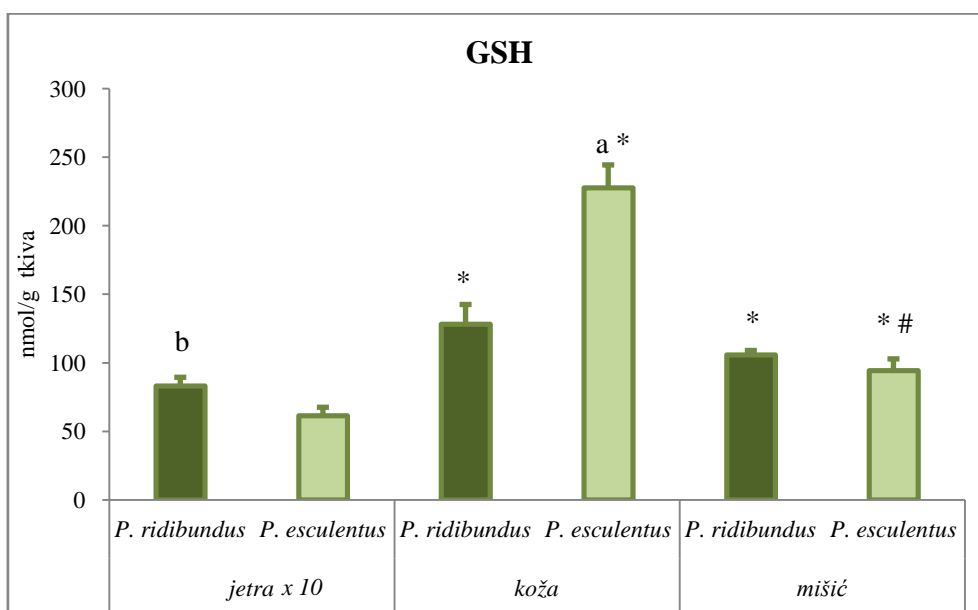
**Grafikon 36.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



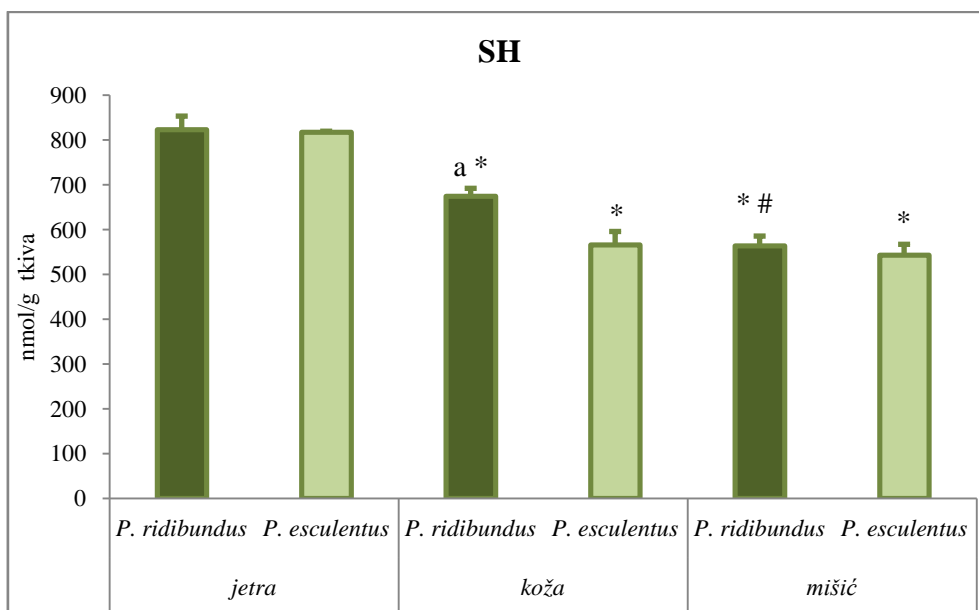
**Grafikon 37.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



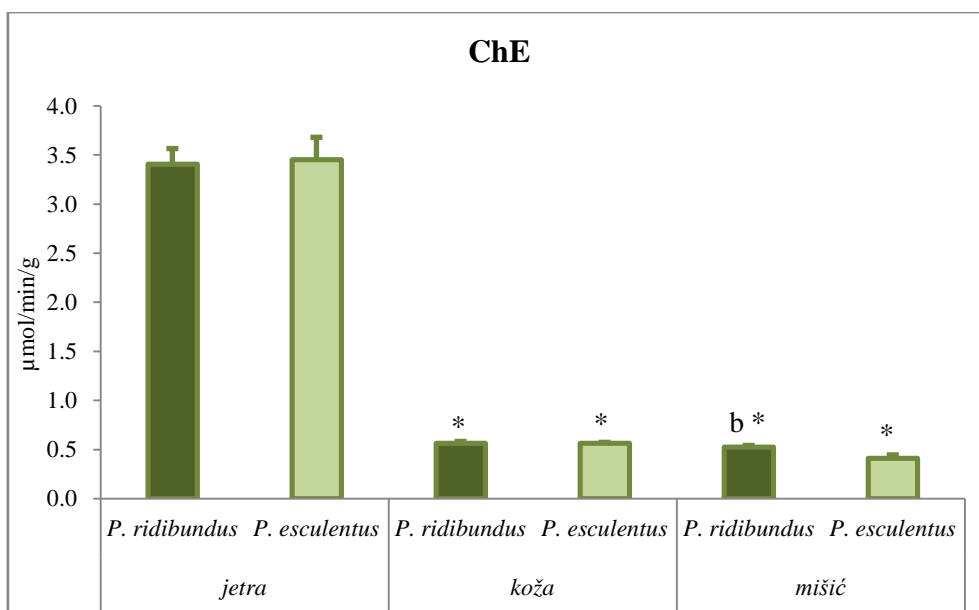
**Grafikon 38.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 39.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti glutationa u jetri podeljene su sa 10 radi jasnijeg prikaza.



**Grafikon 40.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 41.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona proleće 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

Svi ispitivani biohemijski parametri u tkivima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* iz sezone jesen 2014. na lokalitetu Ponjavica prikazani su u tabeli 19.

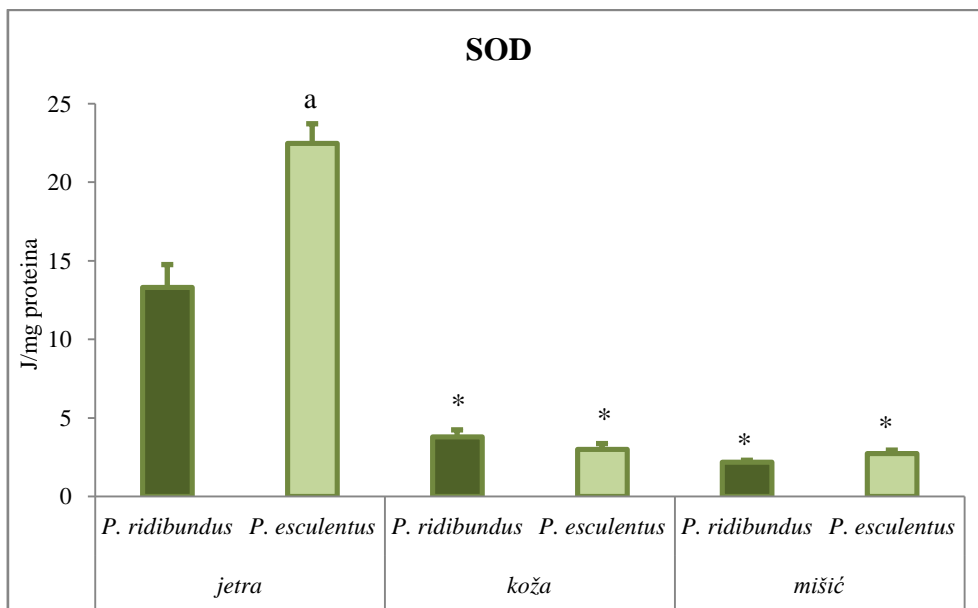
**Tabela 19.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* na lokalitetu Ponjavica u jesen 2014. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	jetra		koža		mišić	
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
SOD	13,30 $\pm$ 1,45	22,46 $\pm$ 1,25	3,77 $\pm$ 0,45	2,98 $\pm$ 0,36	2,16 $\pm$ 0,12	2,71 $\pm$ 0,22
CAT	2495,8 $\pm$ 162,2	1754,2 $\pm$ 152,2	5,45 $\pm$ 0,54	6,38 $\pm$ 0,91	2,14 $\pm$ 0,41	2,08 $\pm$ 0,33
GSH-Px	32,49 $\pm$ 3,23	25,38 $\pm$ 2,02	11,03 $\pm$ 0,98	11,53 $\pm$ 1,27	5,03 $\pm$ 0,27	4,91 $\pm$ 0,45
GR	13,40 $\pm$ 1,46	8,70 $\pm$ 0,63	3,64 $\pm$ 0,24	3,33 $\pm$ 0,21	0,80 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,04
GST	377,0 $\pm$ 35,8	285,5 $\pm$ 22,8	72,32 $\pm$ 3,73	63,81 $\pm$ 5,84	91,45 $\pm$ 7,82	98,67 $\pm$ 7,99
GSH	950,2 $\pm$ 144,3	710,3 $\pm$ 62,2	45,19 $\pm$ 5,65	49,2 $\pm$ 5,4	152,2 $\pm$ 6,3	119,8 $\pm$ 11,6
SH	324,3 $\pm$ 11,0	377,3 $\pm$ 24,0	227,3 $\pm$ 14,3	249,6 $\pm$ 5,5	273,1 $\pm$ 1,4	307,0 $\pm$ 1,3
ChE	2,01 $\pm$ 0,17	1,70 $\pm$ 0,10	0,42 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,02	0,513 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,03

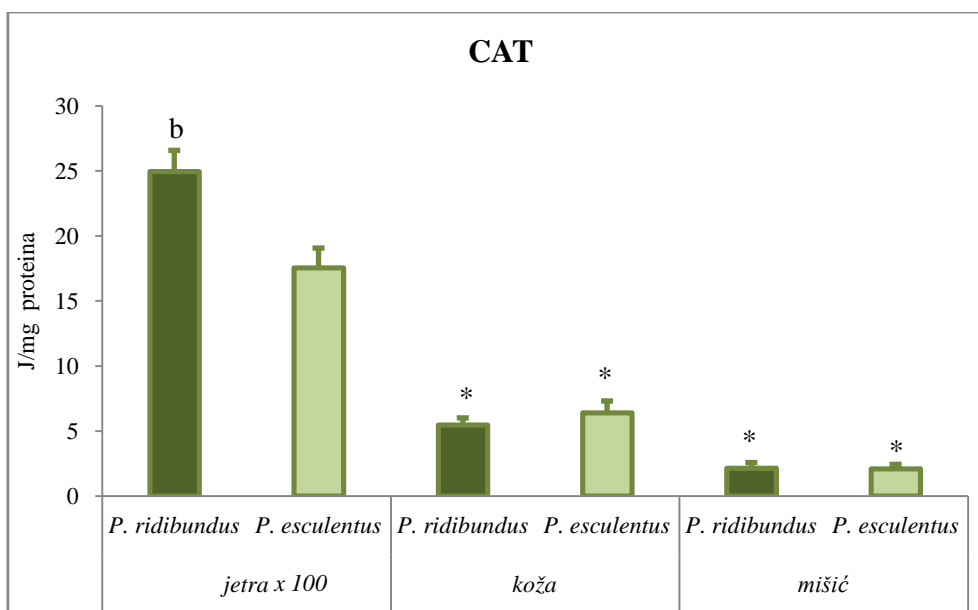
Primenom ANOVA testa dobijene su značajne razlike između parametara u jetri, pri čemu su veće aktivnosti CAT, GR i GST bile kod *P. ridibundus*, a za SOD kod *P. esculentus* (Grafikoni 43, 45, 46 i 42). Parametri u koži se nisu razlikovali značajno između vrsta. U mišićima su koncentracije slobodnih SH grupa bile značajno veće kod *P. ridibundus* (Grafikon 48).

Vrednosti svih merenih parametara u jetri su bile veće u poređenju sa kožom i mišićima. U koži su veće aktivnosti GSH-Px i GR u odnosu na mišiće, dok je koncentracija SH grupa bila veća u mišiću (Grafikoni 44, 45 i 48).

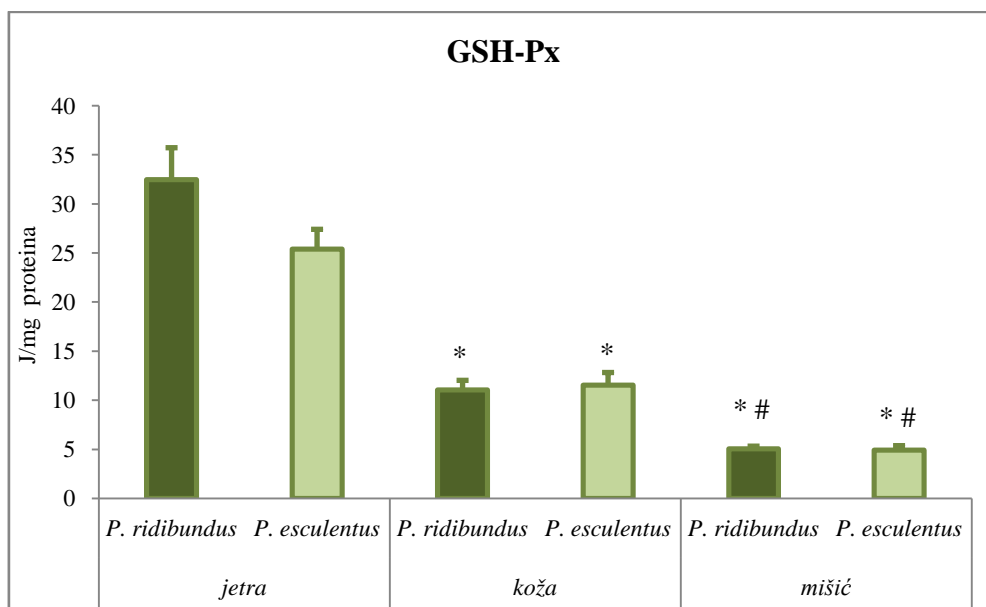




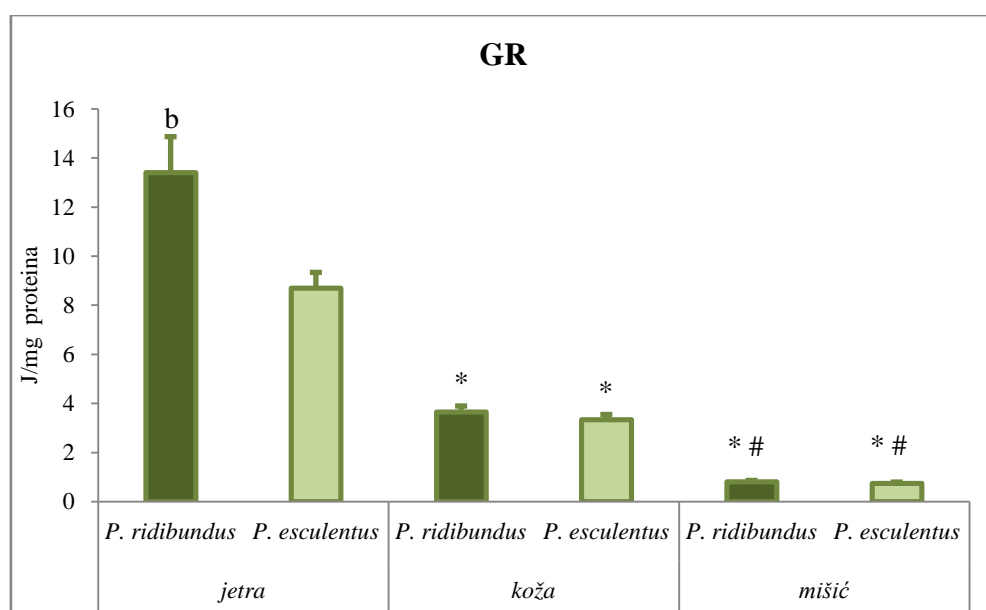
**Grafikoni 42.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



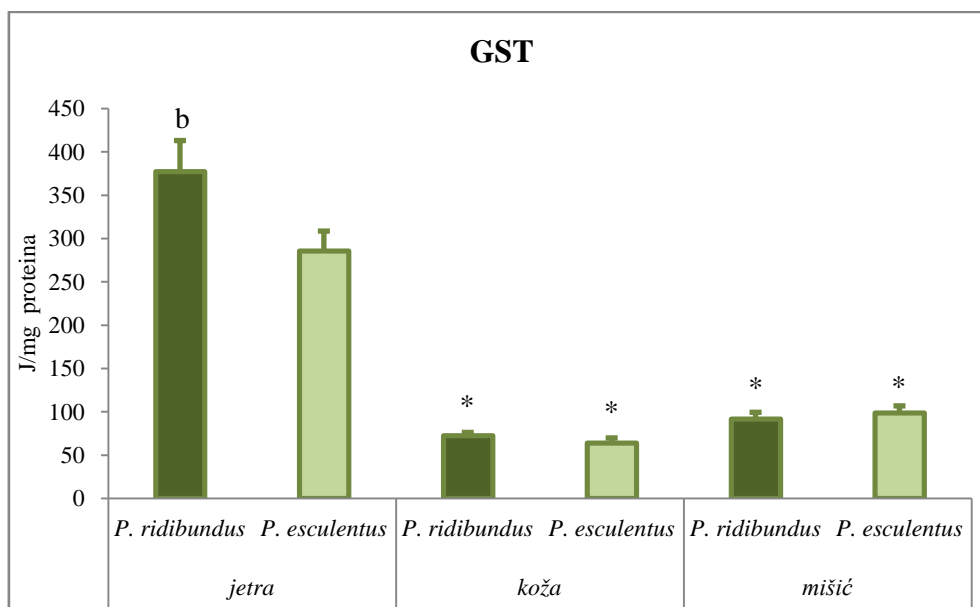
**Grafikon 43.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti katalaze u jetri podeljene su sa 100 radi jasnijeg prikaza.



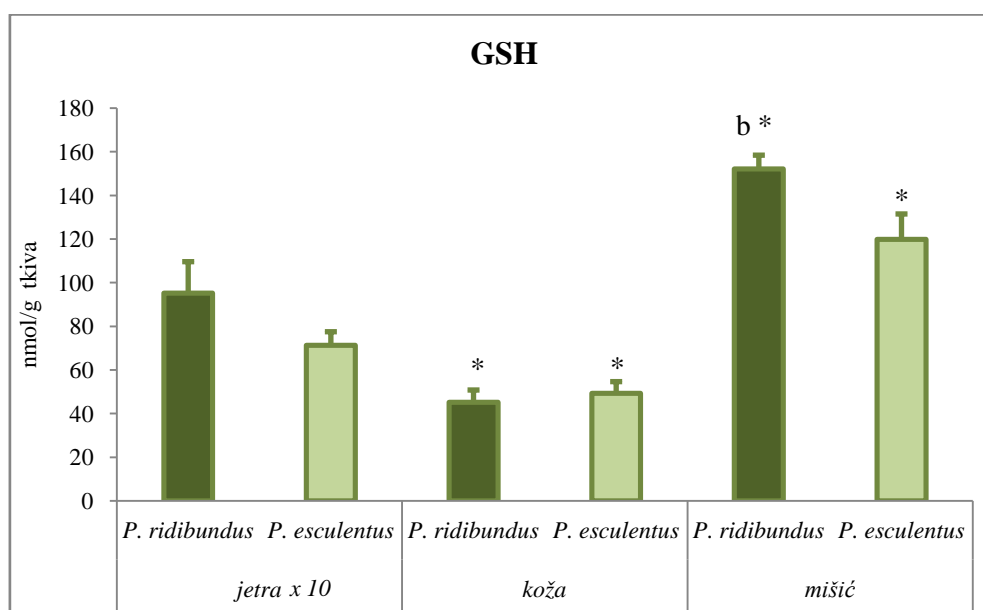
**Grafikon 44.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona jesen 2014.). “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



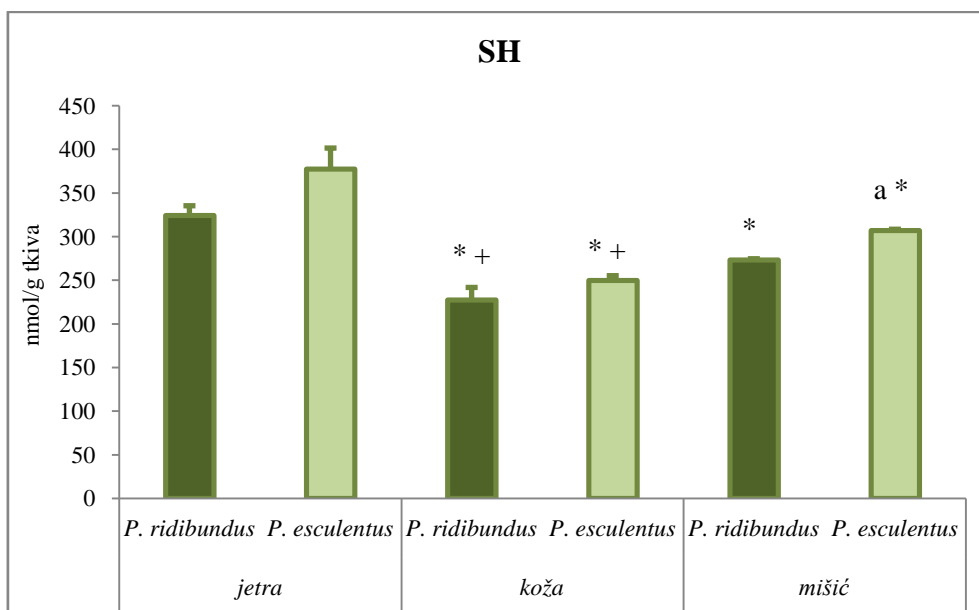
**Grafikon 45.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru; “#” u odnosu na kožu.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



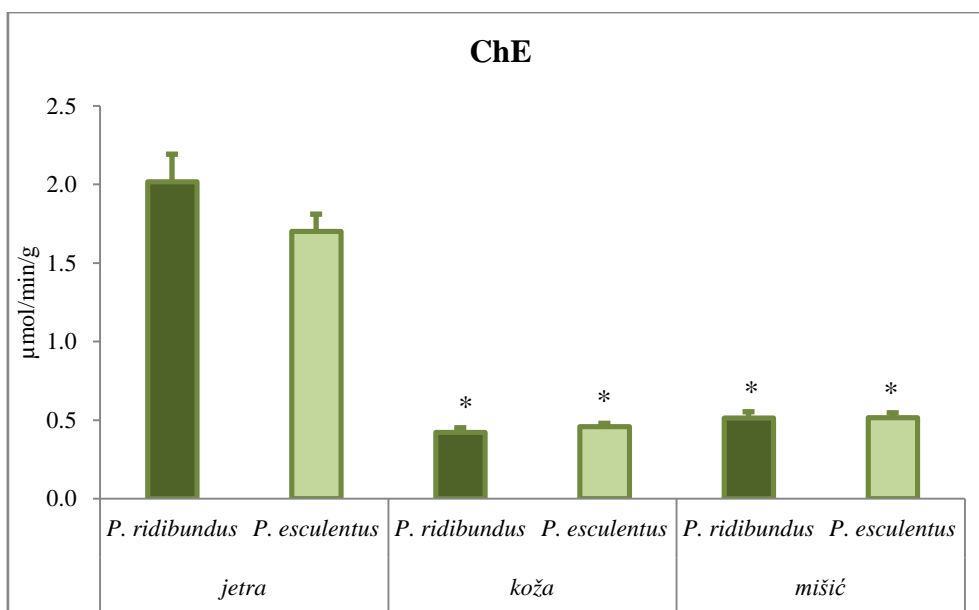
**Grafikon 46.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 47.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica- sezona jesen 2014. “a” u odnosu na *P. ridibundus*; “b” u odnosu na *P. esculentus*; “\*” u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška. Napomena: vrednosti glutationa u jetri podeljene su sa 10 radi jasnijeg prikaza.



**Grafikon 48.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona jesen 2014.). "a" u odnosu na *P. ridibundus*; "b" u odnosu na *P. esculentus*; "\*" u odnosu na jetru; "+" u odnosu na mišiće.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 49.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus* i *P. esculentus* sa lokaliteta Ponjavica (sezona jesen 2014.). "\*" u odnosu na jetru.  $p < 0,05$  je uzeto kao kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

**Tabela 20.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus* na lokalitetu Obeska Bara u proleće 2014.

	jetra			koža			mišić		
	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. lessonae</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. lessonae</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>	<i>P. lessonae</i>
SOD	9,98 ± 0,86	17,15 ± 3,74	17,54 ± 2,39	6,95 ± 0,45	4,23 ± 0,13	5,62 ± 0,38	10,38 ± 0,87	9,94 ± 0,44	9,55 ± 1,12
CAT	26,60 ± 1,27	44,06 ± 4,38	26,83 ± 3,94	9,27 ± 0,23	10,17 ± 0,72	9,30 ± 0,83	2,84 ± 0,23	2,80 ± 0,29	4,14 ± 0,65
GSH-Px	17,95 ± 2,70	13,07 ± 1,35	18,03 ± 1,17	10,66 ± 0,51	9,98 ± 0,43	9,04 ± 1,30	9,97 ± 0,92	8,51 ± 0,84	11,88 ± 1,96
GR	18,52 ± 1,39	22,59 ± 2,30	16,13 ± 1,42	10,03 ± 0,52	11,53 ± 1,04	13,10 ± 1,08	2,14 ± 0,15	2,14 ± 0,15	2,23 ± 0,20
GST	435,9 ± 37,9	528,7 ± 48,8	439,3 ± 45,4	125,8 ± 7,2	121,5 ± 8,1	151,5 ± 10,8	74,17 ± 6,82	72,60 ± 3,41	82,64 ± 9,67
GSH	672,4 ± 75,5	616,6 ± 75,0	638,6 ± 94,4	125,7 ± 8,4	187,98 ± 14,41	191,3 ± 11,6	138,2 ± 11,4	152,3 ± 11,2	228,4 ± 28,6
SH	800,8 ± 3,9	800,5 ± 0,8	810,1 ± 5,6	619,9 ± 21,8	572,2 ± 26,3	591,0 ± 27,2	615,7 ± 21,9	645,5 ± 16,0	690,9 ± 25,6
ChE	1,68 ± 0,18	2,06 ± 0,20	2,52 ± 0,38	0,487 ± 0,019	0,633 ± 0,035	0,54 ± 0,05	0,359 ± 0,273	0,585 ± 0,05	0,58 ± 0,03

Na lokalitetu Obedska Bara tokom proleća 2014. izlovljene su sve tri vrste *P. esculentus* kompleksa (*P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus*). U tabeli 20 prikazani su parametri AOS i holinesteraze u jetri, koži i mišićima.

U jetri jedinki *P. esculentus* kompleksa uočene su razlike u aktivnosti SOD, CAT, GSH-Px, GR i koncentracijama SH grupa (Grafikoni 50, 51, 53 i 56). Aktivnost SOD bila je najmanja kod *P. ridibundus*, dok je aktivnost CAT bila najveća kod hibrida *P. esculentus* (Grafikoni 50 i 51). Nasuprot aktivnosti CAT, aktivnost GSH-Px bila je najmanja kod *P. esculentus* (Grafikoni 51 i 52), dok je aktivnost GR bila veća kod *P. esculentus* u odnosu na roditelja *P. lessonae* (Grafikon53). Koncentracija SH grupa u jetri vrste *P. lessonae* bila je veća u odnosu na ostale dve ispitivane vrste (Grafikon56). Aktivnost SOD u koži bila je najniža kod vrste *P. esculentus*. U isto vreme, aktivnost SOD bila je značajno veća u koži *P. ridibundus* u poređenju sa *P. lessonae* (Grafikon 50). Nasuprot tome, GR je imala veće aktivnosti kod vrste *P. lessonae* (Grafikon 53). Veće aktivnosti GST zabeležene su u koži vrste *P. lessonae* u poređenju sa *P. esculentus* (Grafikon 54). Koncentracije GSH bile su najniže u koži *P. ridibundus* u poređenju sa istim tkivom druge dve ispitivane vrste (Grafikon 55). Veća aktivnost ChE zabeležena je u koži jedinki *P. esculentus* u poređenju sa *P. ridibundus* (Grafikon 57). U našim eksperimentima, najviše vrednosti aktivnosti CAT i koncentracije ukupnog GSH u mišiću dobijene su kod vrste *P. lessonae* (Grafikoni 51 i 55). *P. lessonae* je takođe imala veće koncentracije SH grupa u odnosu na jedinke vrste *P. ridibundus* (Grafikon 56). Značajno veće aktivnosti ChE u mišiću zabeležene su kod *P. esculentus* i *P. lessonae* u odnosu na *P. ridibundus* (Grafikon 57).

Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza je primenjena radi utvrđivanja razlika i/ili sličnosti između parametara AOS i aktivnosti holinesteraze u jetri, koži i mišićima vrsta *P. esculentus* kompleksa sa lokaliteta Obedska Bara izlovljenih u proleće 2014. (Grafikon 58 A, B i C).

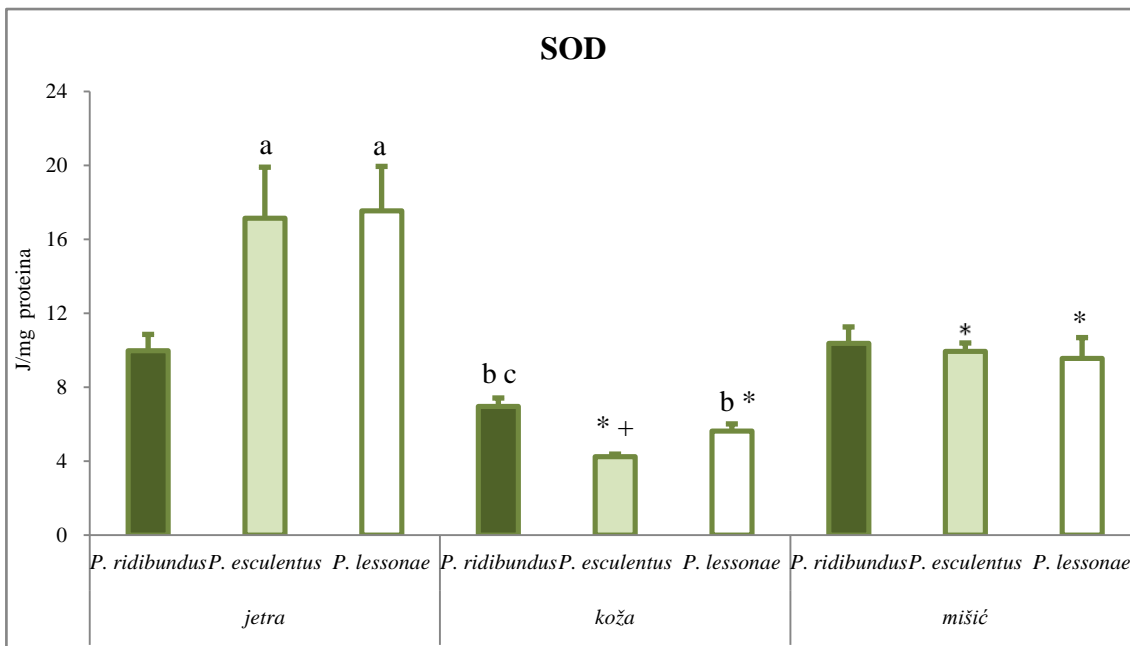
Kanonijska diskriminaciona analiza za parametre u jetri pokazala je razdvajanje hibridne vrste *P. esculentus* od roditeljskih vrsta *P. ridibundus* i *P. lessonae* po prvoj kanonijskoj funkciji koja nosi 73,8 % heterogenosti (Grafikon 58A). Enzimi koji su doveli do ovakve razlike su GSH-Px, CAT i GR. Roditeljske vrste su se razdvojile po drugoj funkciji (26,2 %) i to na osnovu parametara GR, ChE i SH grupe. Klaster analiza

je pokazala, kao i kod prve funkcije, da roditeljske vrste pokazuju veću sličnost za ispitivane parametre u jetri (Grafikon 58A).

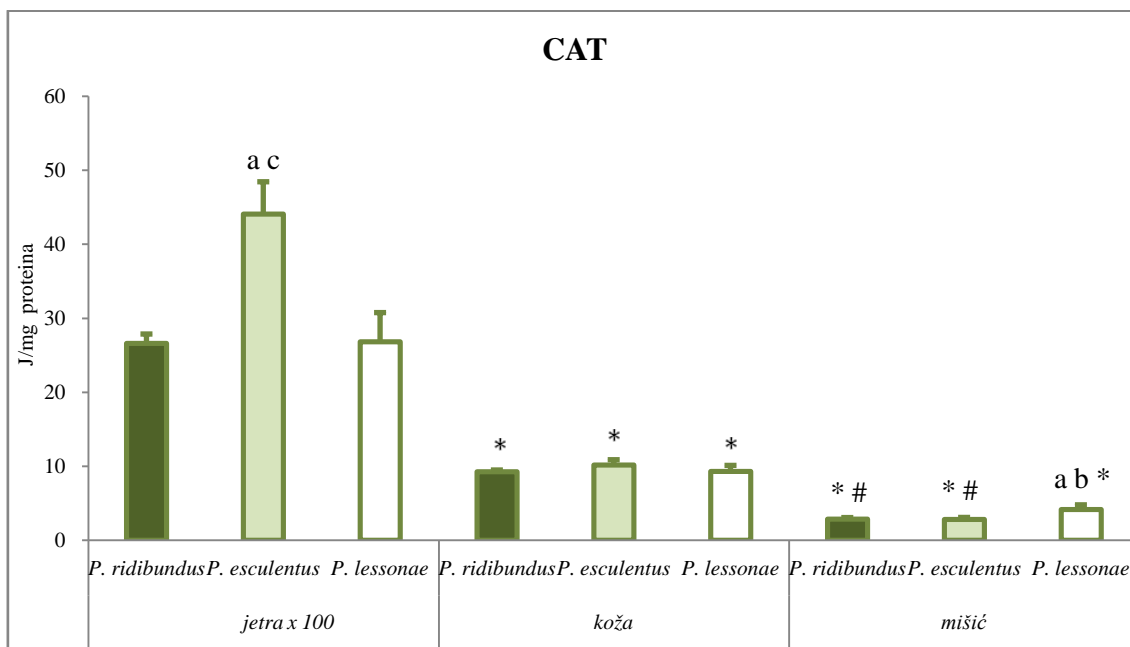
Za ispitivane biomarkere u koži, prva kanonijska funkcija pokazala je 82,2 % od ukupne heterogenosti dok je za drugu funkciju uočeno 17,8 %. Prva funkcija odvojila je *P. esculentus* od *P. ridibundus* i to na osnovu aktivnosti SOD, GSH-Px i ChE. *P. lessonae* se odvojila od druge dve vrste po drugoj kanonijskoj funkciji. Razdvajanju su najviše doprinele vrednosti CAT, GR i ChE. Veći stepen sličnosti u ispitivanim parametrima na osnovu klaster analize dobijen je za *P. esculentus* i *P. lessonae* (Grafikon 58B).

Kanonijska diskriminaciona analiza za vrednosti u mišićima pokazala je preklapanje između nekih jedinki ispitivanih vrsta. Razdvajanje je izvršeno po prvoj funkciji (57,6 %) gde se izdvojila vrsta *P. lessonae*, i po drugoj funkciji (42,4 %) koja je razdvojila *P. esculentus* od *P. ridibundus*. GSH, SOD i GSH-Px su doveli do razdvajanja po prvoj osi, a GSH-Px, ChE i SOD po drugoj. Klaster analiza je na osnovu kanonijskih vrednosti pokazala veću sličnost između *P. esculentus* i *P. ridibundus* (Grafikon 58C).

Kao što je uočeno za prethodne lokalitete, jetra je tkivo koje ima najviše vrednosti svih ispitivanih parametara (Grafikoni 50-57), sa nekim izuzecima za aktivnost SOD u koži *P. ridibundus*, GSH-Px u koži *P. esculentus* i GR kod *P. lessonae* (Grafikoni 50, 52 i 53). CAT i GR su imali veću aktivnost u koži nego u mišićima kod svih ispitivanih vrsta. Koncentracije SH grupa imale su najveće vrednosti u mišićima *P. esculentus* i *P. lessonae* u poređenju sa kožom istih vrsta (Grafikoni 51, 53 i 56).

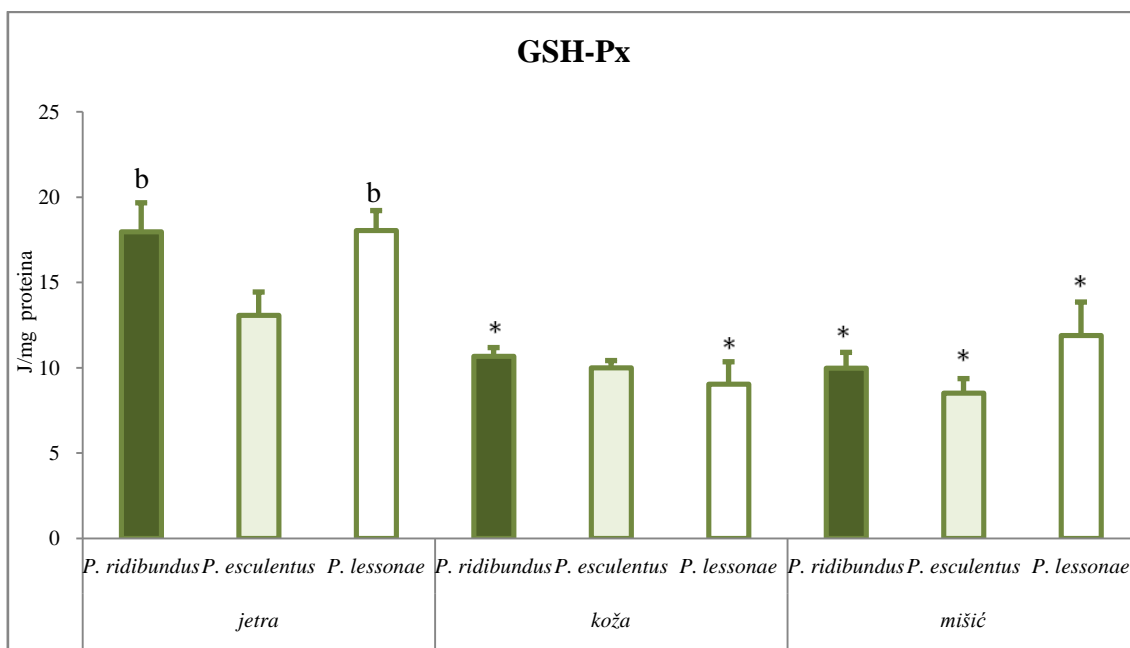


**Grafikon 50.** Aktivnost SOD u tkivima vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus*, Obedska Bara (proleće 2014.). “a”- *P. ridibundus*; “b”- *P. esculentus*; “c”- *P. lessonae*; “\*”- jetra; “+”- mišići.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

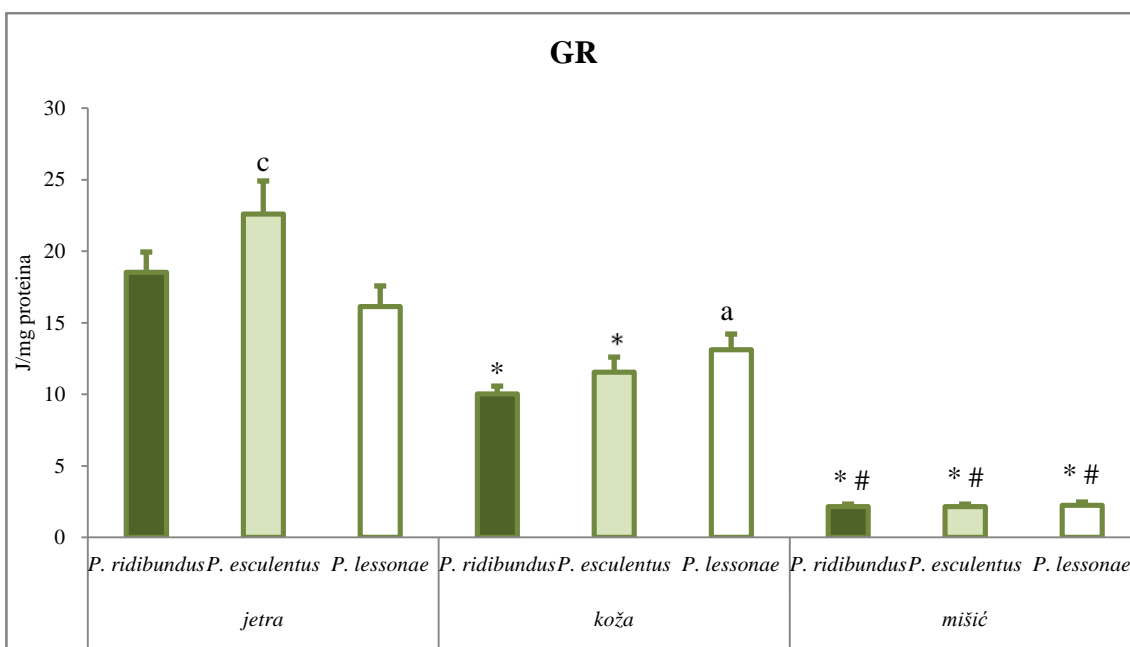


**Grafikon 51.** Aktivnost CAT u tkivima vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus*, Obedska Bara (proleće 2014.). “a”- *P. ridibundus*; “b”- *P. esculentus*; “c”- *P. lessonae*; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Napomena: vrednosti katalaze u jetri podeljene su sa 100 radi jasnijeg prikaza.

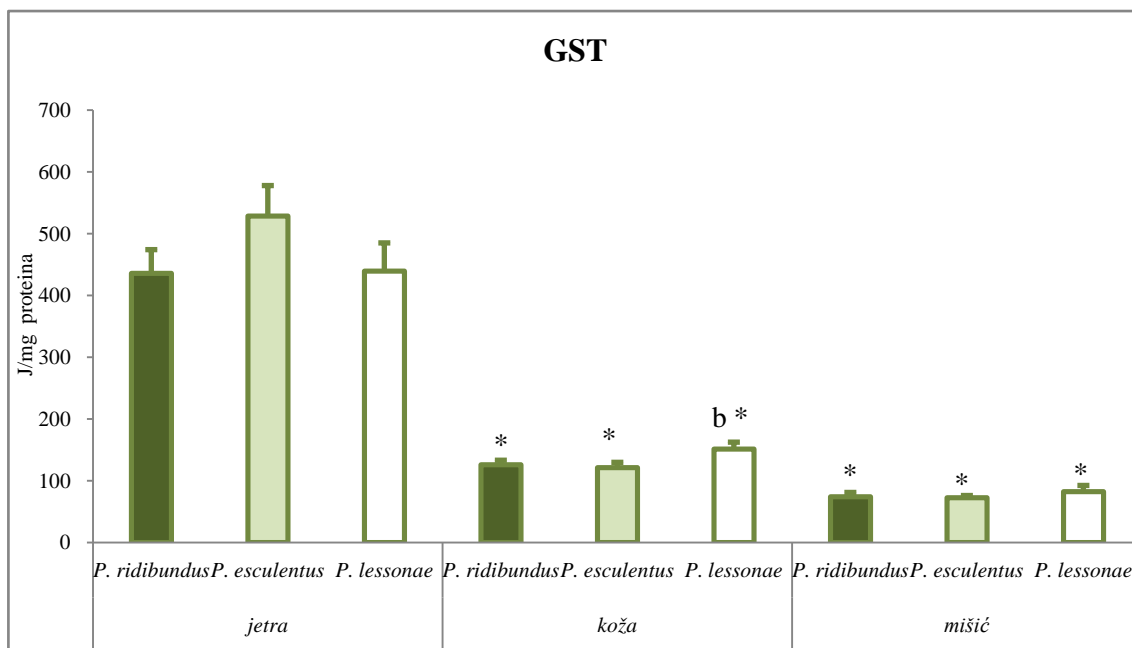




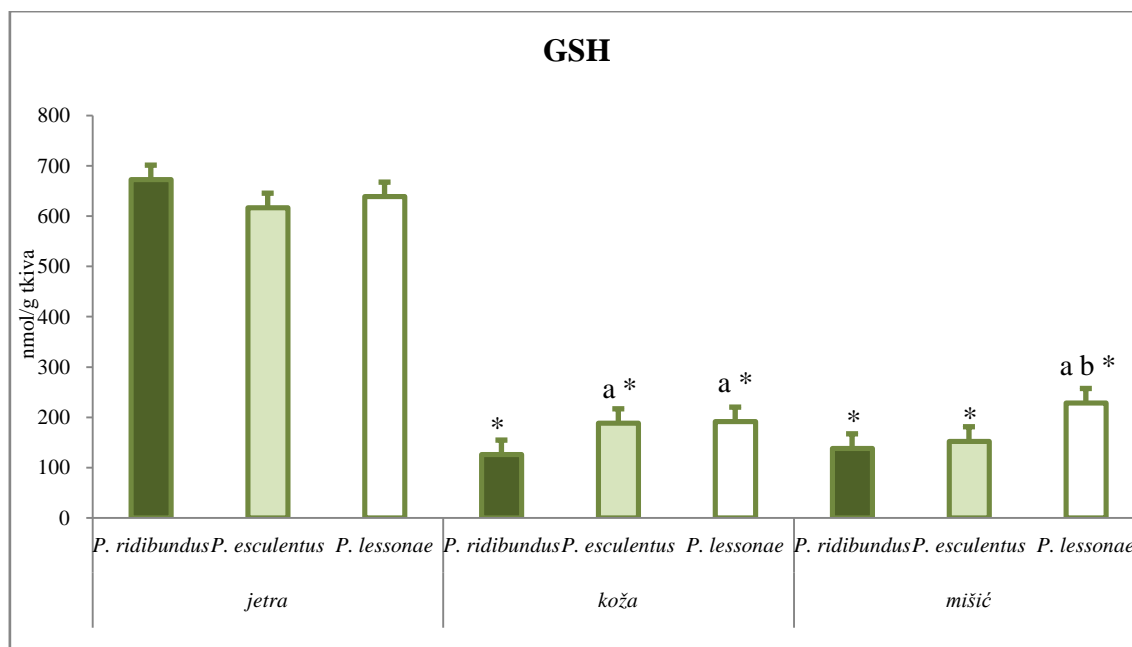
**Grafikon 52.** Aktivnost GSH-Px u tkivima vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus*, Obedska Bara (proleće 2014.). “a”- *P. ridibundus*; “b”- *P. esculentus*; “c”- *P. lessonae*; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



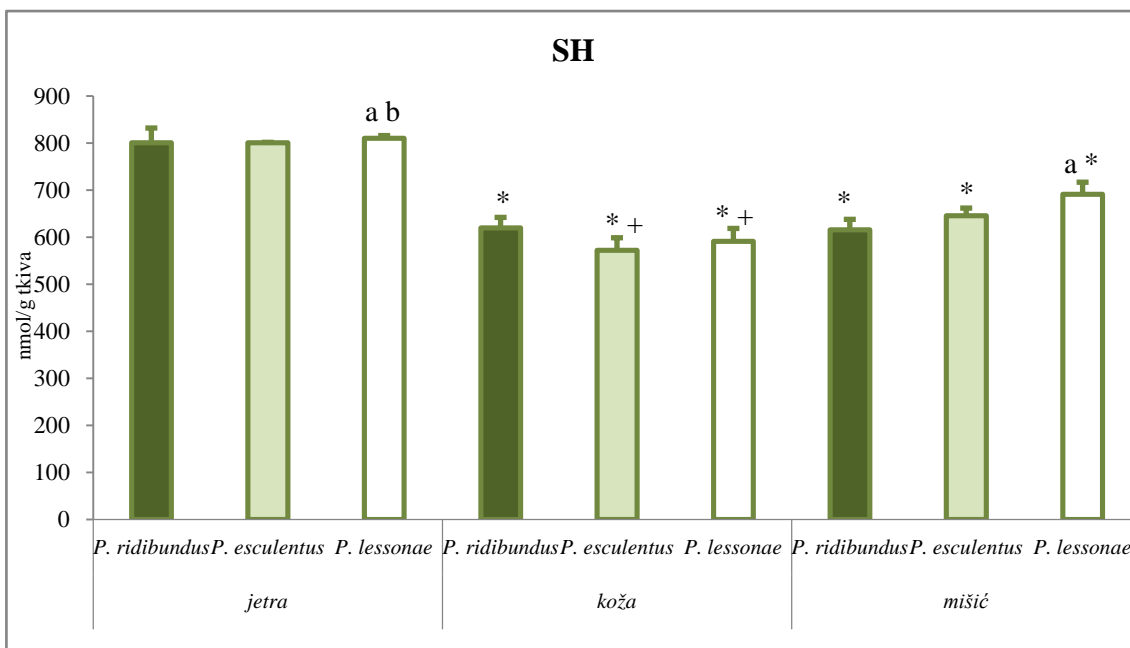
**Grafikon 53.** Aktivnost GR u tkivima vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus*, Obedska Bara (proleće 2014.). “a”- *P. ridibundus*; “b”- *P. esculentus*; “c”- *P. lessonae*; “\*”- jetra; “#” - koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



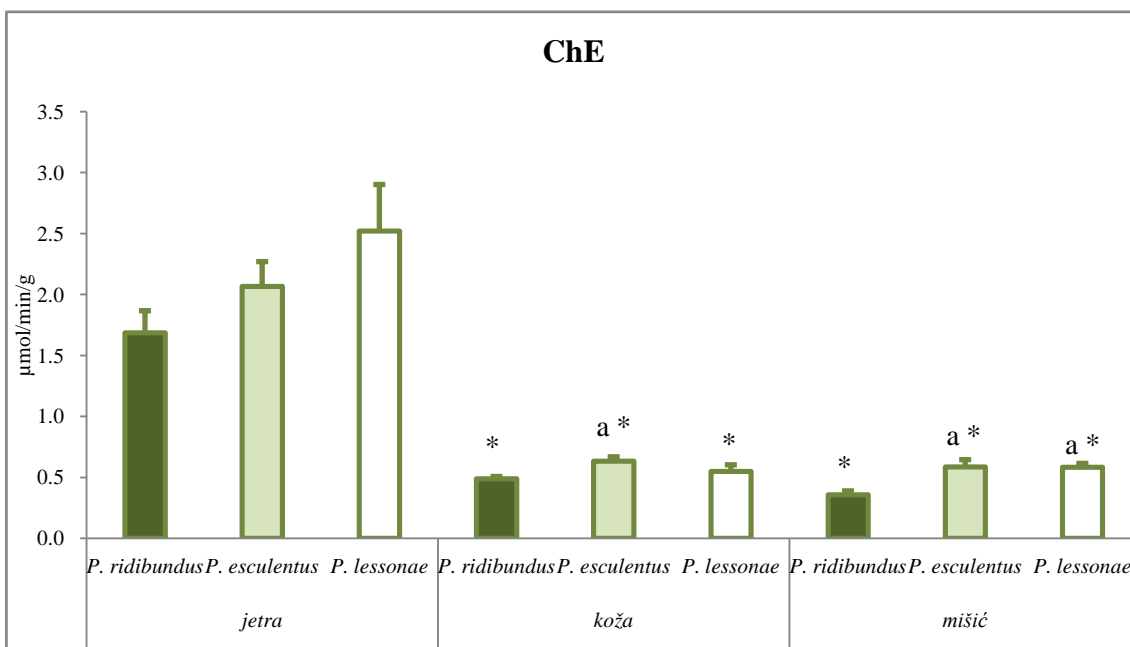
**Grafikon 54.** Aktivnost GST u tkivima vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus*, Obedska Bara (proleće 2014.). a”- *P. ridibundus*; “b”- *P. esculentus*; “c”- *P. lessonae*; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



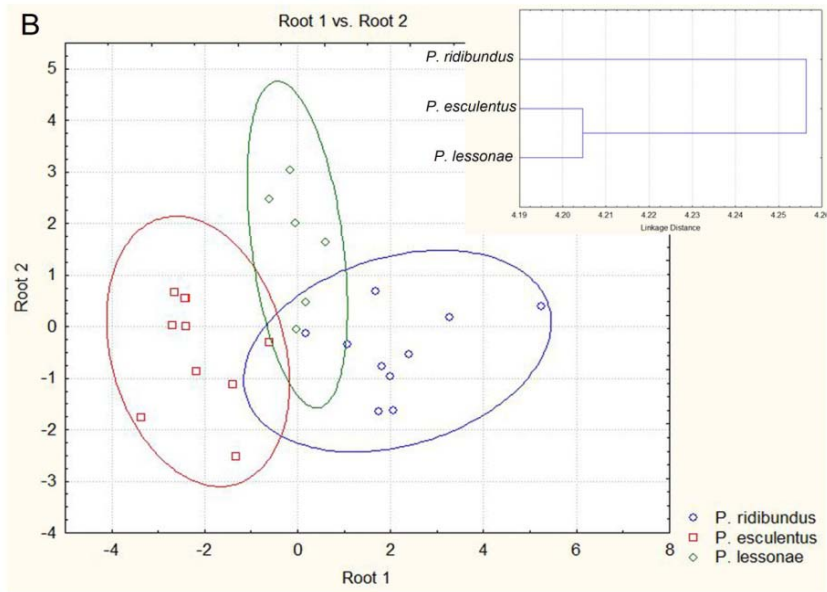
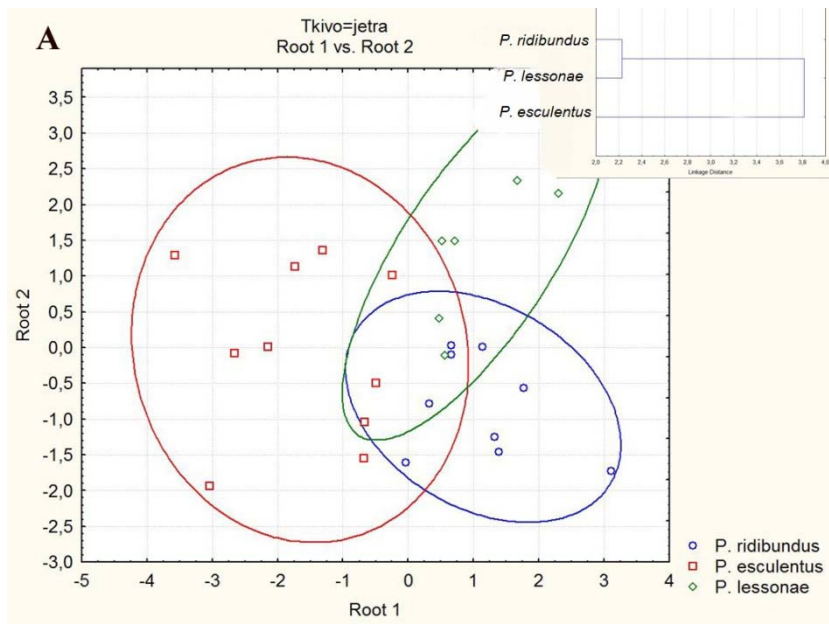
**Grafikon 55.** Koncentracija GSH u tkivima vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus*, Obedska Bara (proleće 2014.). a”- *P. ridibundus*; “b”- *P. esculentus*; “c”- *P. lessonae*; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

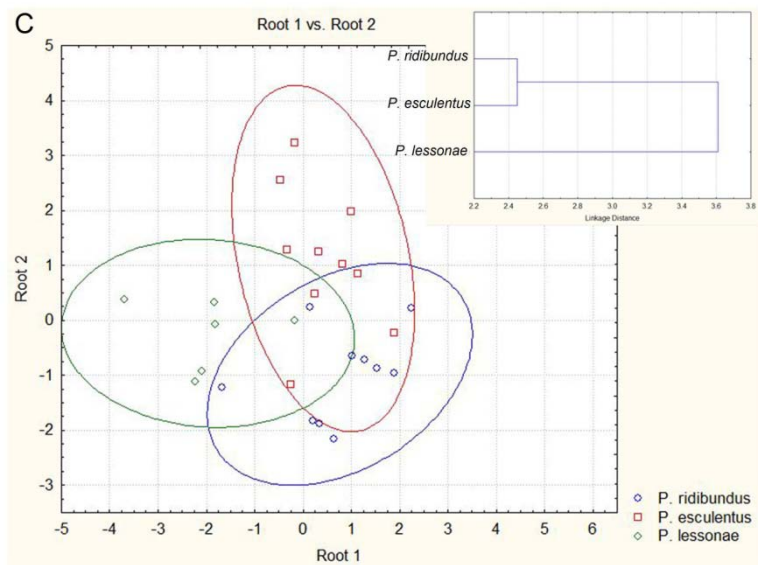


**Grafikon 56.** Koncentracija SH grupa u tkivima vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus*, Obedska Bara (proleće 2014.). a”- *P. ridibundus*; “b”- *P. esculentus*; “c”- *P. lessonae*; “\*”- jetra; “+”- mišići.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.



**Grafikon 57.** Aktivnost ChE u tkivima vrsta *P. ridibundus*, *P. lessonae* i *P. esculentus*, Obedska Bara (proleće 2014.). a”- *P. ridibundus*; “b”- *P. esculentus*; “c”- *P. lessonae*; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.





Grafikon 58. Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza za parametre antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) A) u jetri, B) u koži i C) u mišićima vrsta *P. esculentus* kompleksa sa lokaliteta Obedska Bara (proleće 2014.)

### **4.3. Efekti različitih lokaliteta na ispitivane parametre kod vrsta *Pelophylax esculentus* kompleksa**

Koncentracija metala, parametri antioksidacionog sistema i aktivnost holinesteraze u tkivima žaba *Pelophylax esculentus* kompleksa u ovom delu rezultata biće predstavljeni po vrstama (*P. ridibundus* i *P. esculentus*) na svim lokalitetima tokom sezona izlovljavanja (proleće 2013. proleće 2014. i jesen 2014.). Ovakav načina prikazivanja omogućava bolje uočavanja efekata različitih lokaliteta na svaku pojedinačnu vrstu ovog kompleksa.

#### **4.3.1.1. Akumulacija metala u tkivima vrste *P. ridibundus* na ispitivanim lokalitetima**

U proleće 2013. godine izmerene su koncentracije metala u tkivu jetre i dobijene su statistički veće koncentracije Cd, Fe, Hg i Mn u jedinkama sa lokaliteta Fruška Gora u poređenju sa jedinkama iz kanala DTD, dok je samo Cu akumuliran u većoj koncentraciji u jetri jedinki sa kanala DTD (Tabela 21). U jetri žaba iz Fruške Gore nije zabeleženo prisustvo As, Ni i Pb.

Koncentracije metala su određivane u koži i mišićima tokom proleća 2013. na sledećim lokalitetima: DTD, Ponjavica i Fruška Gora (Tabela 21). Rezultati dobijeni na uzorcima kože pokazuju da je koncentracija Al veća u koži jedinki sa Fruške Gore u odnosu na jedinke sa lokaliteta Ponjavica, kao i da je koncentracija Cr bila najveća kod jedinki sa lokaliteta Fruška Gora. Koncentracija Cd je bila najveća u koži žaba sa kanala DTD, dok su dobijene veće koncentracije Zn u jedinkama sa DTD, u odnosu na jedinke izlovljene na Fruškoj Gori. Metali koji nisu detektovani u koži žaba na lokalitetu DTD su As i Co, dok Co nije detektovan ni kod jedinki sa lokaliteta Ponjavica.

**Tabela 21.** Koncentracija akumuliranih metala u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa kanala DTD, Ponjavice i Fruške Gore u proleće 2013. “a” u odnosu na DTD; “b” u odnosu na Ponjavicu; “c” u odnosu na Fruška Gora.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

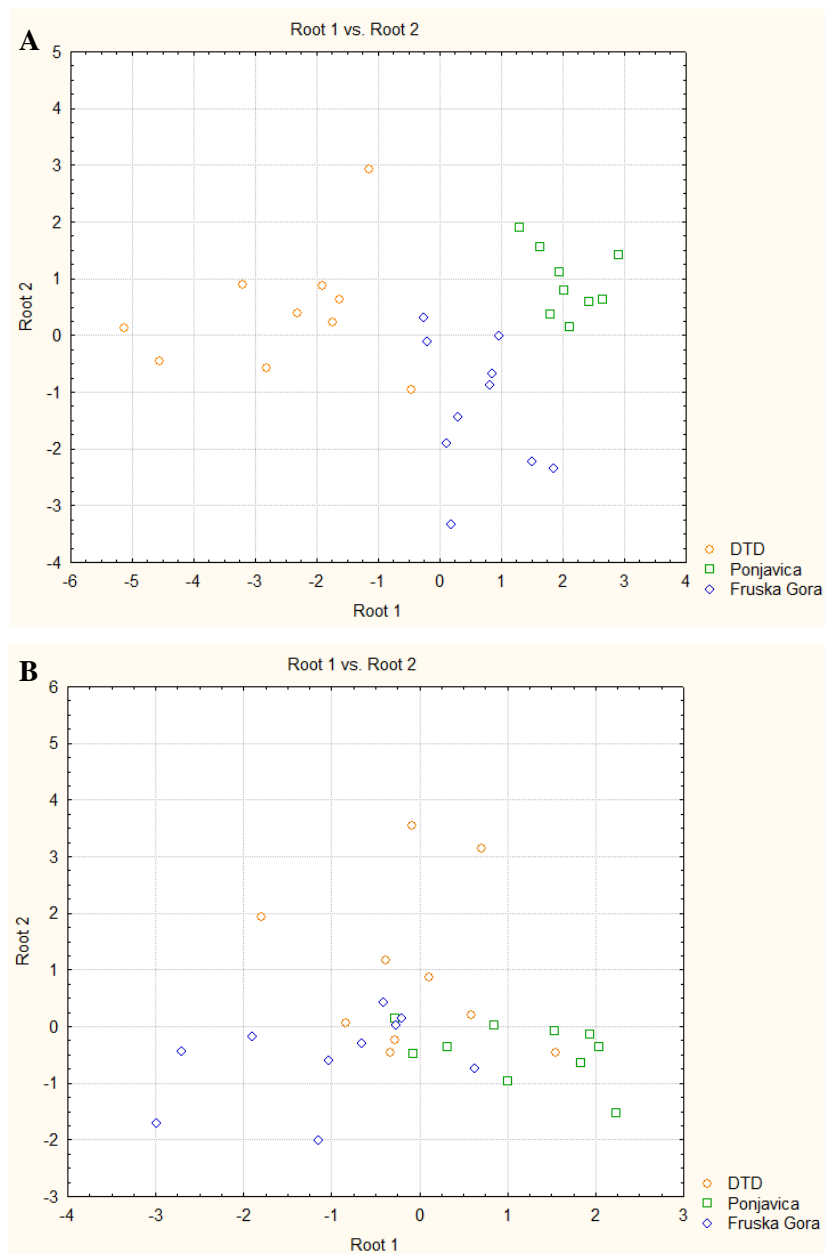
	jetra		koža			mišić		
	DTD	Fruška Gora	DTD	Ponjavica	Fruška Gora	DTD	Ponjavica	Fruška Gora
Al	33,3 $\pm$ 4,2	48,1 $\pm$ 4,7	12,6 $\pm$ 2,1	12,0 $\pm$ 1,1	20,8 $\pm$ 4,3 <sup>b</sup>	27,3 $\pm$ 11,6 <sup>c</sup>	11,6 $\pm$ 1,8	6,1 $\pm$ 0,7
As	0,568 $\pm$ 0,176	/	/	0,104 $\pm$ 0,034	0,110 $\pm$ 0,021	0,326 $\pm$ 0,114	0,312 $\pm$ 0,137	0,109 $\pm$ 0,044
Cd	0,437 $\pm$ 0,07	0,848 $\pm$ 0,108 <sup>a</sup>	0,097 $\pm$ 0,01 <sup>bc</sup>	0,018 $\pm$ 0,003	0,052 $\pm$ 0,004	0,033 $\pm$ 0,004	/	0,0297 $\pm$ 0,004
Co	0,454 $\pm$ 0,094	0,322 $\pm$ 0,046	/	/	0,068 $\pm$ 0,016	/	/	0,0188 $\pm$ 0,004
Cr	0,944 $\pm$ 0,207	1,16 $\pm$ 0,133	0,654 $\pm$ 0,053	0,567 $\pm$ 0,027	0,96 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	0,297 $\pm$ 0,004	0,432 $\pm$ 0,059 <sup>a</sup>	0,365 $\pm$ 0,044 <sup>a</sup>
Cu	227,0 $\pm$ 14,0 <sup>c</sup>	155,8 $\pm$ 23,6	2,19 $\pm$ 0,163	2,00 $\pm$ 0,136	2,35 $\pm$ 0,198	1,29 $\pm$ 0,085	1,20 $\pm$ 0,068	1,66 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>
Fe	326,0 $\pm$ 29,8	636,0 $\pm$ 66,3 <sup>a</sup>	65,1 $\pm$ 14,3	43,8 $\pm$ 2,7	63,1 $\pm$ 8,9	24,5 $\pm$ 2,6	29,5 $\pm$ 2,1	26,3 $\pm$ 1,5
Hg	0,175 $\pm$ 0,028	0,389 $\pm$ 0,041 <sup>a</sup>	0,178 $\pm$ 0,063	0,083 $\pm$ 0,007	0,124 $\pm$ 0,025	0,102 $\pm$ 0,023	0,092 $\pm$ 0,016	0,101 $\pm$ 0,022
Mn	6,02 $\pm$ 0,53	9,04 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	15,4 $\pm$ 1,4	17,2 $\pm$ 2,4	19,5 $\pm$ 1,5	0,783 $\pm$ 0,064	1,03 $\pm$ 0,104	1,16 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
Ni	4,57 $\pm$ 1,11	/	0,483 $\pm$ 0,079	0,470 $\pm$ 0,057	0,596 $\pm$ 0,029	0,269 $\pm$ 0,024	0,219 $\pm$ 0,034	0,286 $\pm$ 0,044
Pb	0,921 $\pm$ 0,459	/	0,463 $\pm$ 0,095	0,796 $\pm$ 0,201	0,455 $\pm$ 0,072	/	/	/
Zn	74,6 $\pm$ 2,8	66,6 $\pm$ 3,5	141,8 $\pm$ 20,1 <sup>c</sup>	124,5 $\pm$ 15,9	79,6 $\pm$ 8,0	22,2 $\pm$ 0,8	24,7 $\pm$ 1,8	25,1 $\pm$ 1,7

Diskriminaciona kanonijska analiza za ispitivane metale u koži žaba za prvu funkciju pokazala je 71,8 % od ukupne heterogenosti dok je preostala heterogenost na drugoj funkciji (28,2%). Prva funkcija odvojila je jedinke sa lokaliteta DTD od ostalih i to na osnovu koncentracija Cd, Cr i Fe. Jedinke sa Fruške Gore odvajaju se od jedinki sa lokaliteta Ponjavica po drugoj diskriminacionoj funkciji; ovom razdvajanju najviše su doprinele vrednosti koncentracija Zn i Cr (Grafikon 59A).

Kada se uporede koncentracije metala u mišićima, statistički značajno veća koncentracija Cr i Mn je uočena kod jedinki sa lokaliteta Fruška Gora u odnosu na jedinke sa kanala DTD. Koncentracija Cr bila je veća u jedinkama sa lokaliteta Ponjavica u poređenju sa koncentracijom ovog metala kod jedinki sa kanala DTD. Veće koncentracije Al zabeležene su u mišiću jedinki sa kanala DTD, u odnosu na one sa Fruške Gore. Najviše koncentracije bakra detektovane su u mišiću jedinki izlovljenih na Fruškoj Gori. Kobalt nije detektovan u mišićima žaba sa kanala DTD, kao ni sa Ponjavice, dok Cd nije detektovan samo u mišiću žaba izlovljenih na Ponjavici (Tabela 21).

Diskriminaciona kanonijska analiza primenjena na rezultatima dobijenim u mišićima, pokazala je veći stepen preklapanja između jedinki sa različitih lokaliteta. Razdvajanje je izvršeno po prvoj diskriminacionoj funkciji (63,0 %), gde se razdvajaju jedinke sa Fruške Gore i Ponjavice, dok po drugoj diskriminacionoj funkciji nije došlo do jasnog odvajanja (47,0 %). Razdvajanju po prvoj funkciji, najviše su doprineli Cu i Fe (Grafikon 59B).





**Grafikon 59.** Kanonijska diskriminaciona analiza za akumulirane metale A) u koži i B) u mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora (proleće 2013. godine).

U sezoni proleće 2014. koncentracije metala merene su u jetri jedinki sa lokaliteta DTD i Obedska Bara, dok su za mišiće i kožu merene još i u jedinkama sa lokaliteta Ponjavica. Rezultati u jetri *P. ridibundus* za metale pokazali su da jedinke sa kanala DTD imaju veće koncentracije Al, Cr, Fe i Mn. Živa je više akumulirana u jetri žaba sa lokaliteta Obedska Bara (Tabela 22).

Za kožu jedinki sa kanala DTD karakteristične su najveće koncentracije Cd i Mn, dok su koncentracije Fe bile najveće kod jedinki iz Ponjavice. Živa i arsen su akumulirani u većim koncentracijama u koži jedinki iz Obedske Bare u poređenju sa istim iz Ponjavice. Suprotno je uočeno za koncentraciju Al. Jedinke iz DTD i Ponjavice su imale veće koncentracije Zn nego jedinke iz Obedske Bare (Tabela 22).

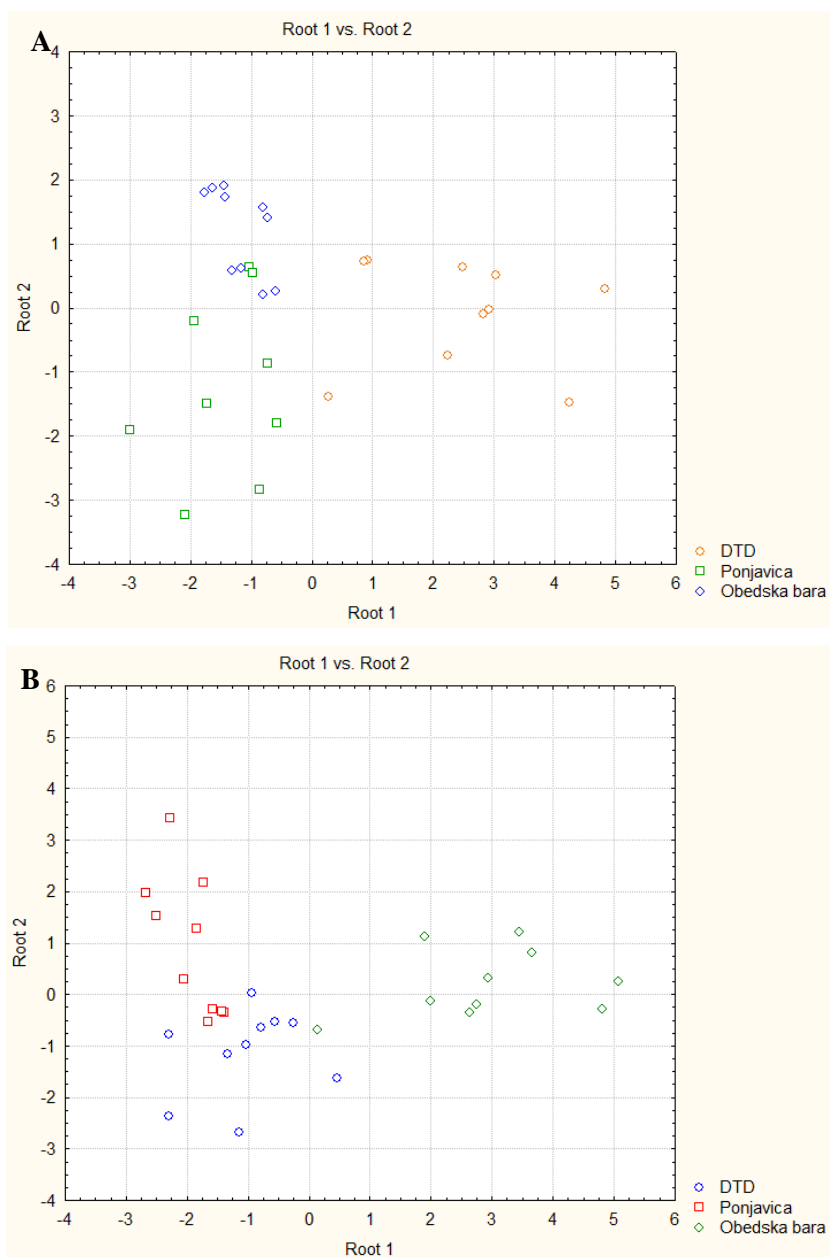
Akumulirani metali u mišićima koji su doveli do razlika između jedinki sa ispitivanih lokaliteta su As, Cr, Fe, Hg, Ni i Zn. Prva tri metala (As, Cr i Hg) su se najviše akumulirala kod jedinki iz Obedske Bare, dok se Ni ima najviše akumulirao u mišićima žaba sa lokaliteta Ponjavica. Vrednost Zn je bila veća kod jedinki sa Ponjavice u odnosu na one iz Obedske Bare, dok je Fe imalo veće koncentracije kod jedinki sa Ponjavice u odnosu na iste sa kanala DTD. Co je detektovan samo u mišićima jedinki iz Obedske Bare, a Cd sa kanala DTD (Tabela 22).

Kanonijska diskriminaciona analiza za metale u koži jedinki sa različitih lokaliteta je pokazala razdvajanje po prvoj funkciji (76,7 %) između jedinki sa DTD i druga dva lokaliteta, dok se po drugoj (23,3 %) odvajaju Obedska Bara i Ponjavica. Cd, Mn i Fe su najviše doprineli razdvajanju po prvoj funkciji dok su Cr, Fe i Ni najzaslužniji za odvajanje po drugoj (Grafikon 60A).

Kanonijska diskriminaciona analiza za mišiće pokazala je jasno razdvajanje po obe funkcije. Po prvoj (86,0 %) funkciji su se izdvojile jedinke iz Obedske Bare i to na osnovu koncentracije Hg, As i Cr, dok se po drugoj funkciji (14,0 %) razdvajaju jedinke sa DTD i Ponjavice i to na osnovu koncentracije Al i Fe (Grafikon 60B).

**Tabela 22.** Koncentracija akumuliranih metala u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa DTD, Ponjavice i Obedske Bare (u proleće 2014.). “a” u odnosu na DTD; “b” u odnosu na Ponjavicu; “c” u odnosu na Obedska Bara.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	jetra		koža			mišić		
	DTD	Obedska Bara	DTD	Ponjavica	Obedska Bara	DTD	Ponjavica	Obedska Bara
Al	32,0 $\pm$ 3,4 <sup>c</sup>	19,4 $\pm$ 3,8	49,0 $\pm$ 7,3	80,5 $\pm$ 23,6 <sup>c</sup>	20,3 $\pm$ 2,4	10,8 $\pm$ 2,2	15,9 $\pm$ 1,8	15,7 $\pm$ 2,4
As	0,237 $\pm$ 0,021	1,07 $\pm$ 0,251	/	0,140 $\pm$ 0,030	0,449 $\pm$ 0,056 <sup>b</sup>	0,36 $\pm$ 0,047	0,325 $\pm$ 0,081	1,12 $\pm$ 0,27 <sup>ab</sup>
Cd	0,836 $\pm$ 0,119	0,532 $\pm$ 0,092	0,090 $\pm$ 0,013 <sup>bc</sup>	0,021 $\pm$ 0,005	0,021 $\pm$ 0,002	0,40 $\pm$ 0,19	/	/
Co	0,392 $\pm$ 0,031	0,587 $\pm$ 0,092	/	0,101 $\pm$ 0,071	0,106 $\pm$ 0,034	/	/	0,019 $\pm$ 0,007
Cr	0,699 $\pm$ 0,151 <sup>c</sup>	0,233 $\pm$ 0,016	0,859 $\pm$ 0,087	0,723 $\pm$ 0,045	0,891 $\pm$ 0,113	0,307 $\pm$ 0,059	0,347 $\pm$ 0,053	0,671 $\pm$ 0,152 <sup>ab</sup>
Cu	171,0 $\pm$ 38,4	92,6 $\pm$ 13,8	2,12 $\pm$ 0,22	2,30 $\pm$ 0,38	2,15 $\pm$ 0,125	2,64 $\pm$ 1,29	1,83 $\pm$ 0,29	1,52 $\pm$ 0,12
Fe	739,4 $\pm$ 59,3 <sup>c</sup>	306,9 $\pm$ 26,0	49,8 $\pm$ 4,7	86,3 $\pm$ 19,0 <sup>ac</sup>	33,0 $\pm$ 1,5	26,9 $\pm$ 6,4 <sup>b</sup>	14,26 $\pm$ 2,21	18,68 $\pm$ 1,63
Hg	0,193 $\pm$ 0,028	1,09 $\pm$ 0,188 <sup>a</sup>	/	0,030 $\pm$ 0,006	0,168 $\pm$ 0,015 <sup>b</sup>	0,080 $\pm$ 0,017	0,046 $\pm$ 0,008	0,334 $\pm$ 0,045 <sup>ab</sup>
Mn	8,04 $\pm$ 0,73 <sup>c</sup>	4,14 $\pm$ 0,24	30,6 $\pm$ 3,6 <sup>bc</sup>	15,8 $\pm$ 1,5	15,3 $\pm$ 1,9	0,693 $\pm$ 0,113	0,373 $\pm$ 0,064	0,671 $\pm$ 0,085
Ni	0,683 $\pm$ 0,151	0,670 $\pm$ 0,187	0,77 $\pm$ 0,19	/	0,707 $\pm$ 0,091	0,32 $\pm$ 0,04	2,35 $\pm$ 0,71 <sup>ac</sup>	0,586 $\pm$ 0,074
Pb	/	/	0,417 $\pm$ 0,117	/	0,555 $\pm$ 0,098	/	/	/
Zn	71,6 $\pm$ 2,9	62,1 $\pm$ 3,6	188,4 $\pm$ 21,9 <sup>c</sup>	179,1 $\pm$ 19,0 <sup>c</sup>	120,2 $\pm$ 11,7	21,5 $\pm$ 1,9	19,4 $\pm$ 2,7	27,6 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>



**Grafikon 60.** Kanonijska diskriminaciona analiza za akumulirane metale A) u koži i B) u mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara (proleće 2014. godine).

Tokom jeseni 2014. žabe vrste *P. ridibundus* su ulovljene na lokalitetima DTD i Ponjavica. Merenja akumuliranih metala pokazala su da jedinke sa kanala DTD imaju veće vrednosti Cr i Mn u jetri i Al i Cu u mišićima. U koži jedinki sa oba lokaliteta nisu uočene značajne razlike. Manji broj detektovanih metala uočen je za sva tkiva kod

jedinki sa Ponjavice, u jetri nisu detektovani Ni i Pb, zatim u mišićima i koži Co, Cu i Hg, dok u koži nije detektovano olovo. U isto vreme, u mišićima jedinki sa DTD nije bio prisutan Cd (Tabela 23).

**Tabela 23.** Koncentracija akumuliranih metala u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica (sezona jesen 2014.). “a” u odnosu na DTD; “b” u odnosu na Ponjavicu.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	jetra		koža		mišić	
	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica
Al	39,7 $\pm$ 3,4	12,7 $\pm$ 2,2	5,04 $\pm$ 0,59	3,13 $\pm$ 0,63	7,9 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	1,20 $\pm$ 0,17
As	/	/	/	1,04 $\pm$ 0,16	0,048 $\pm$ 0,021	1,04 $\pm$ 0,14
Cd	0,443 $\pm$ 0,076	0,757 $\pm$ 0,173	0,199 $\pm$ 0,040	0,138 $\pm$ 0,008	/	0,146 $\pm$ 0,019
Co	0,391 $\pm$ 0,089	0,44 $\pm$ 0,11	0,029 $\pm$ 0,013	/	0,157 $\pm$ 0,023	/
Cr	0,74 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,200 $\pm$ 0,039	1,05 $\pm$ 0,11	/	0,647 $\pm$ 0,078	/
Cu	88,54 $\pm$ 9,06	93,7 $\pm$ 14,1	3,00 $\pm$ 0,11	2,49 $\pm$ 0,13	1,68 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	1,39 $\pm$ 0,08
Fe	618,4 $\pm$ 88,5	425,1 $\pm$ 80,2	41,3 $\pm$ 3,2	40,4 $\pm$ 4,8	31,7 $\pm$ 10,6	23,4 $\pm$ 1,9
Hg	0,281 $\pm$ 0,054	0,230 $\pm$ 0,058	0,064 $\pm$ 0,008	/	0,138 $\pm$ 0,016	/
Mn	6,80 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>	3,20 $\pm$ 0,56	29,02 $\pm$ 4,03	23,20 $\pm$ 3,14	0,627 $\pm$ 0,045	1,73 $\pm$ 0,57
Ni	0,794 $\pm$ 0,178	/	1,09 $\pm$ 0,27	0,188 $\pm$ 0,062	0,422 $\pm$ 0,065	0,397 $\pm$ 0,126
Pb	0,414 $\pm$ 0,134	/	1,47 $\pm$ 0,39	0,406 $\pm$ 0,198	0,294 $\pm$ 0,076	/
Zn	64,3 $\pm$ 5,6	58,3 $\pm$ 8,8	160,2 $\pm$ 15,8	164,9 $\pm$ 18,7	28,1 $\pm$ 3,3	21,2 $\pm$ 1,2

#### **4.3.1.2. Parametri AOS i aktivnost holinesteraze kod vrste *P. ridibundus* sa različitim lokaliteta**

Tokom 2013. godine jedinke *P. ridibundus* su izlovljene sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora. Parametri AOS i aktivnost holinesteraze mereni su u jetri, koži i mišićima (Tabela 24).

Upoređivanjem vrednosti AOS i holinesteraze u jetri primećene su razlike između žaba sa različitih lokaliteta. Jedinke sa DTD imale su najveće vrednosti GSH-Px i GSH u odnosu na jedinke sa ostala dva lokaliteta (Grafikoni 63 i 66), a takođe i veće vrednosti aktivnosti CAT, GST i koncentracije SH grupa u odnosu na jedinke sa Ponjavice (Grafikoni 62, 65 i 67). Enzim SOD je imao najveću aktivnost kod jedinki sa Fruške Gore (Grafikon 61), a veća je bila i aktivnost enzima GST u odnosu na jedinke sa Ponjavice (Grafikon 65). Nasuprot tome, enzim GSH-Px je imao veću aktivnost kod jedinki sa Ponjavice u odnosu na one sa Fruške Gore (Grafikon 63). Najmanja aktivnost GR i ChE bila je u jetri jedinki sa Fruške Gore (Grafikoni 64 i 68).

U koži je uočen znatno manji broj značajnih razlika u antioksidacionim parametrima nego u jetri. Aktivnost enzima SOD bila je veća u koži jedinki sa Ponjavice u poređenju sa aktivnošću enzima kod jedinki sa Fruške Gore (Grafikon 61). CAT je imala veću aktivnost kod jedinki sa Fruške Gore u odnosu na jedinke sa kanala DTD (Grafikon 62). Koncentracija SH grupa bila je najveća kod jedinki sa Fruške Gore. Takođe u koži žaba sa DTD veća je koncentracija SH grupa u odnosu na iste sa Ponjavice (Grafikon 67).

U mišićnom tkivu jedinki sa lokaliteta Ponjavica najvećesu bile aktivnosti SOD, GR i GST (Grafikoni 61, 64 i 65). Jedike sa Fruške Gore imale su najveću aktivnost ChE (Grafikon 68), kao i veću aktivnost CAT u odnosu na jedinke sa kanala DTD (Grafikon 62). Aktivnost ChE bila je veća i kod jedinki sa DTD u odnosu na aktivnost u mišićima jedinki sa Ponjavice (Grafikon 68). Što se tiče koncentracije SH grupa, ona je bila veća kod jedinki na lokalitetima DTD i Fruška Gora u odnosu na iste sa lokaliteta Ponjavica (Grafikon 67).

**Tabela 24.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima jedinki vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora (sezona proleće 2013.). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	jetra			koža			mišić		
	DTD	Ponjavica	Fruška Gora	DTD	Ponjavica	Fruška Gora	DTD	Ponjavica	Fruška Gora
SOD	12,09 $\pm$ 1,15	9,37 $\pm$ 0,31	14,69 $\pm$ 1,17	8,49 $\pm$ 0,32	9,80 $\pm$ 0,87	8,00 $\pm$ 0,41	3,54 $\pm$ 0,27	4,75 $\pm$ 0,28	3,66 $\pm$ 0,13
CAT	2066,6 $\pm$ 367,7	1219,3 $\pm$ 162,3	1509,4 $\pm$ 159,7	9,15 $\pm$ 0,75	11,01 $\pm$ 1,58	14,54 $\pm$ 1,46	1,30 $\pm$ 0,13	1,67 $\pm$ 0,12	1,80 $\pm$ 0,16
GSH-Px	28,09 $\pm$ 3,36	18,12 $\pm$ 0,83	10,9 $\pm$ 1,3	10,9 $\pm$ 0,4	13,03 $\pm$ 1,05	11,24 $\pm$ 1,01	3,64 $\pm$ 0,36	4,32 $\pm$ 0,25	3,67 $\pm$ 0,35
GR	12,22 $\pm$ 1,14	10,42 $\pm$ 0,74	7,17 $\pm$ 0,71	11,87 $\pm$ 1,05	12,17 $\pm$ 1,74	10,66 $\pm$ 1,03	0,58 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,06	0,69 $\pm$ 0,07
GST	213,6 $\pm$ 31,1	132,4 $\pm$ 6,11	197,3 $\pm$ 19,1	281,6 $\pm$ 18,4	247,9 $\pm$ 25,5	232,8 $\pm$ 16,9	28,4 $\pm$ 2,4	36,3 $\pm$ 2,2	27,0 $\pm$ 1,2
GSH	897,3 $\pm$ 119,3	765,9 $\pm$ 90,9	680,7 $\pm$ 86,5	137,3 $\pm$ 14,7	144,0 $\pm$ 25,8	129,9 $\pm$ 11,6	96,3 $\pm$ 12,1	90,8 $\pm$ 9,3	123,9 $\pm$ 6,3
SH	90,8 $\pm$ 11,1	70,6 $\pm$ 1,9	88,7 $\pm$ 1,6	66,5 $\pm$ 1,5	53,8 $\pm$ 2,2	81,87 $\pm$ 4,75	114,5 $\pm$ 2,3	70,6 $\pm$ 1,7	120,2 $\pm$ 3,0
ChE	3,27 $\pm$ 0,17	3,52 $\pm$ 0,22	2,29 $\pm$ 0,15	0,509 $\pm$ 0,022	0,51 $\pm$ 0,02	0,491 $\pm$ 0,019	0,793 $\pm$ 0,025	0,594 $\pm$ 0,029	1,034 $\pm$ 0,09

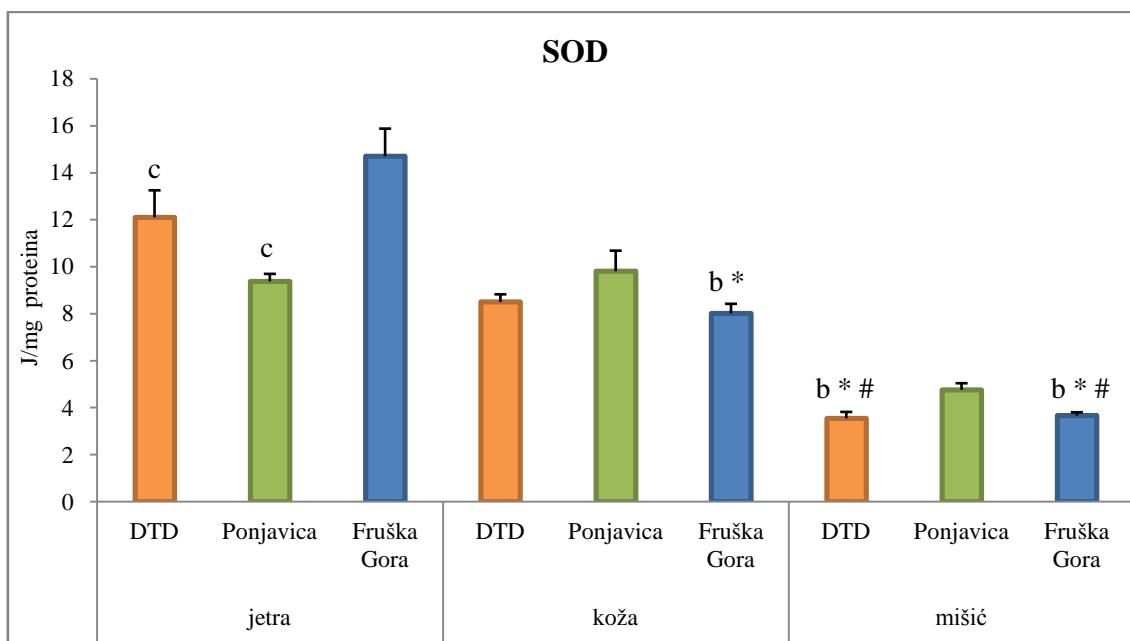
Međutkivna razlika je pokazala da jetra jedinki sa svih lokaliteta ima veću aktivnost CAT, GSH i ChE u odnosu na kožu i mišić, veća aktivnost je i za SOD, GSH-Px i GR u odnosu na one u mišićima. Koža je pokazala veću aktivnost u poređenju sa mišićima za enzime SOD, GSH-Px, GR i GST i ChE. Mišići su imali najveću koncentraciju slobodnih SH grupa.

Kanonijska diskriminaciona analiza za jetru pokazala je razdvajanje jedinki sa lokaliteta Fruška Gora od jedinki sa DTD i Ponjovice po prvoj kanonijskoj funkciji koja nosi 87,5 % heterogenosti (Grafikon 69A). Enzimi čije aktivnosti su najviše dovele do ovakve razlike su GSH-Px i SOD. Između jedinki sa DTD i Ponjovice došlo je do razdvajanja po drugoj funkciji (12,5 %) i to na osnovu vrednosti GST, GSH-Px i ChE. Međutim, uočeno je i delimično preklapanje nekih jedinki sa ova dva lokaliteta (Grafikon 69A).

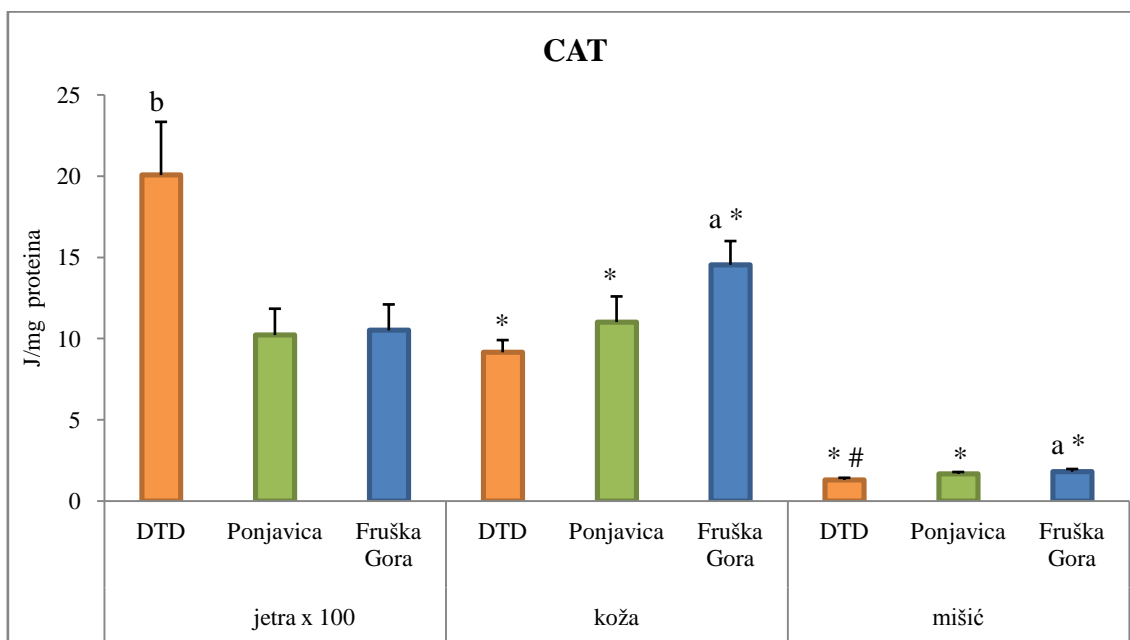
Kanonijska analiza diskriminaciona za biohemijske parametre u koži jedinki sa različitih lokaliteta odvojila je po prvoj funkciji (63,6 %) jedinice sa Ponjovice, dok se po drugoj funkciji (36,4 %) odvajaju jedinice sa Fruške Gore i DTD. Vrednosti SOD, GST i SH grupe su najviše doprinele razdvajanju po prvoj funkciji dok su SOD, CAT i GST najzaslužniji za odvajanje po drugoj (Grafikon 69B).

Kanonijska diskriminaciona analiza za mišićno tkivo pokazala je jasno razdvajanje po obe funkcije kod jedinki sa različitih lokaliteta. Prva (94,0 %) funkcija je izdvojila jedinice sa Ponjovice i to na osnovu koncentracije GSH i SH grupa. Po drugoj funkciji, koja je nosila svega 6,0 % heterogenosti, razdvojile su se jedinice sa kanala DTD od jedinki sa Fruške Gore i to na osnovu aktivnosti enzima CAT, GR, GST i ChE (Grafikon 69C).

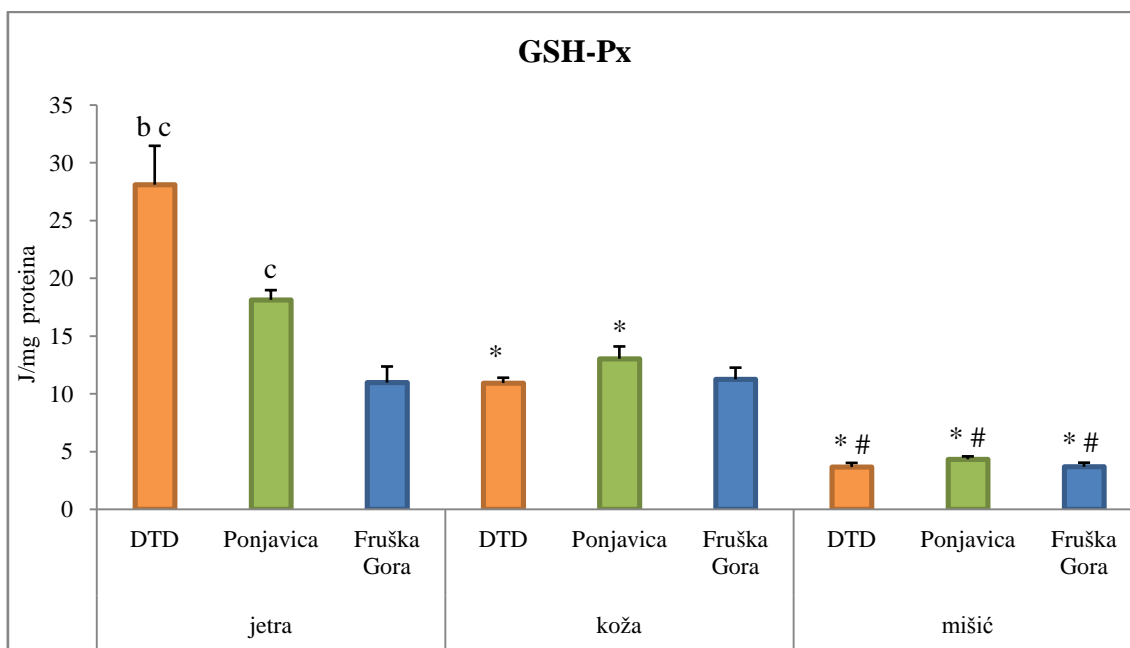




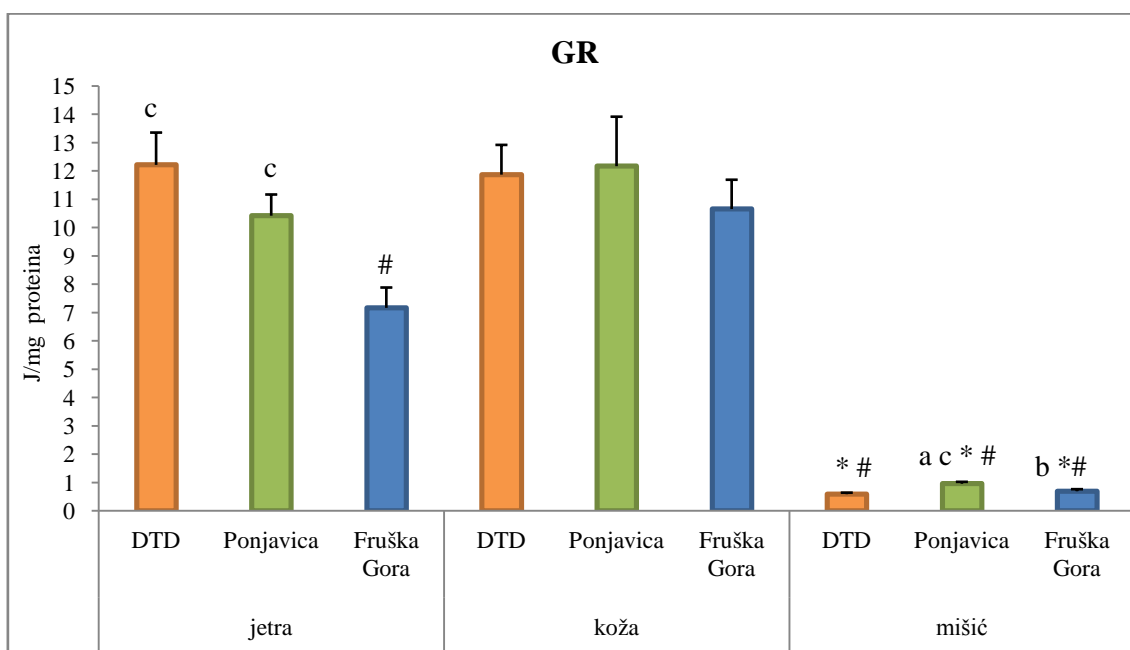
**Grafikon 61** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora tokom sezone proleće 2013. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Fruška Gora; “\*”- jetru; “#”- kožu.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni kao  $\bar{X} \pm SG$ .



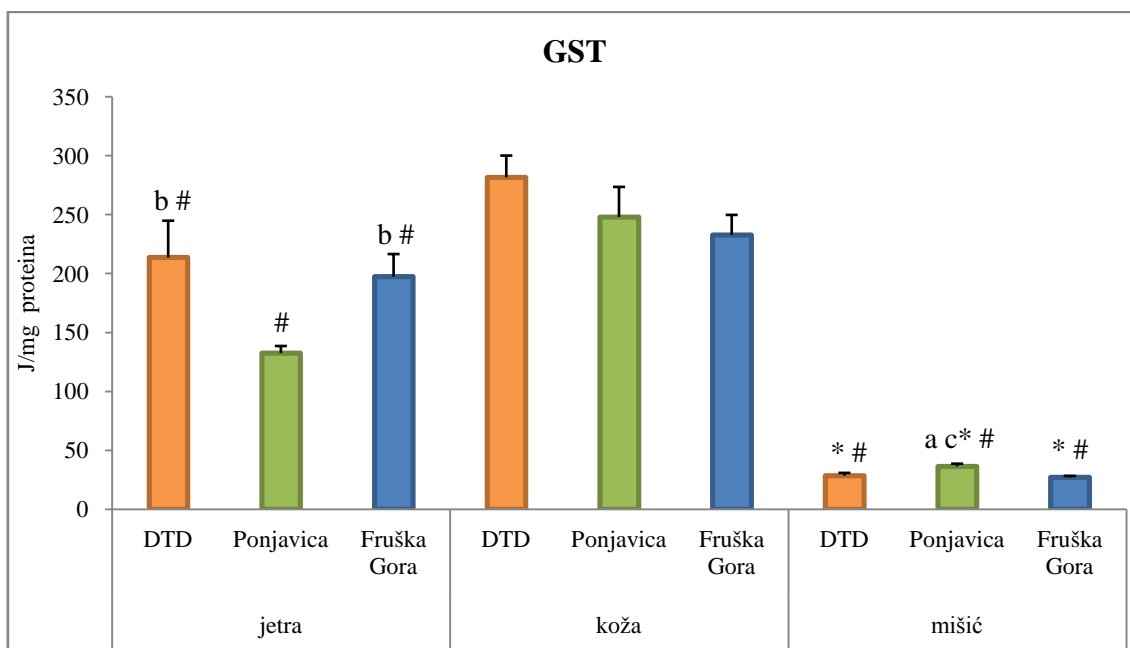
**Grafikon 62.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora tokom sezone proleće 2013. a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Fruška Gora; “\*”- jetru; “#”- kožu.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljenje sa 100 radi jasnijeg prikaza.



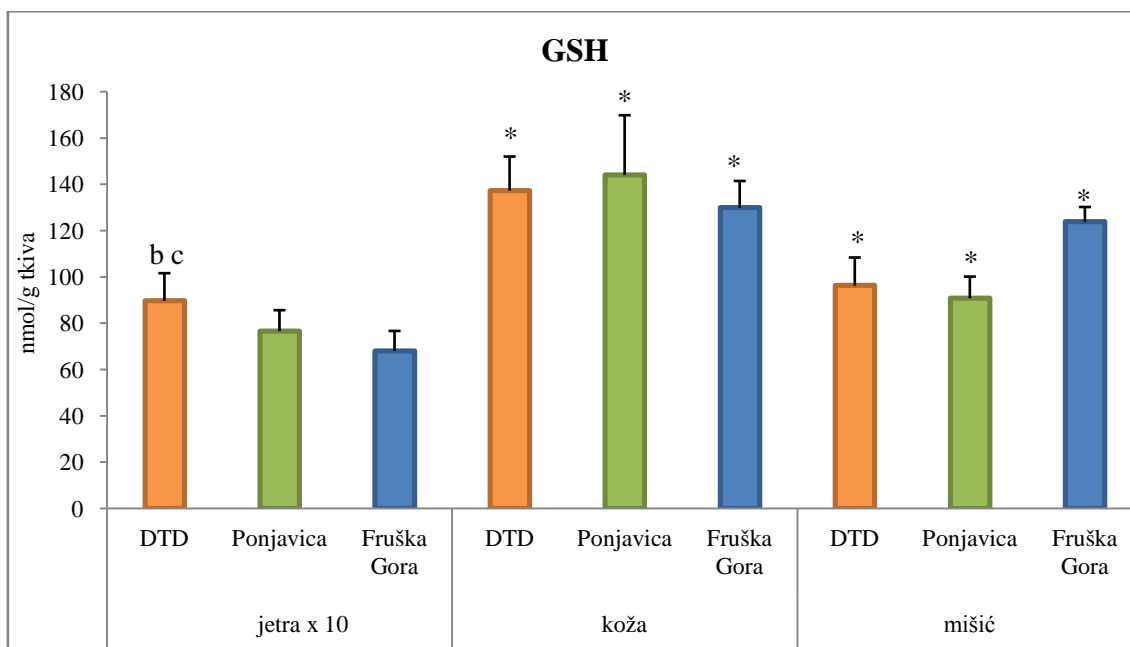
**Grafikon 63.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora tokom sezone proleće 2013. a”- DTD; “b- Ponjavica; “c”- Fruška Gora; “\*”- jetru; “#”- kožu.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljani  $\bar{X}_{sr} \pm SG$ .



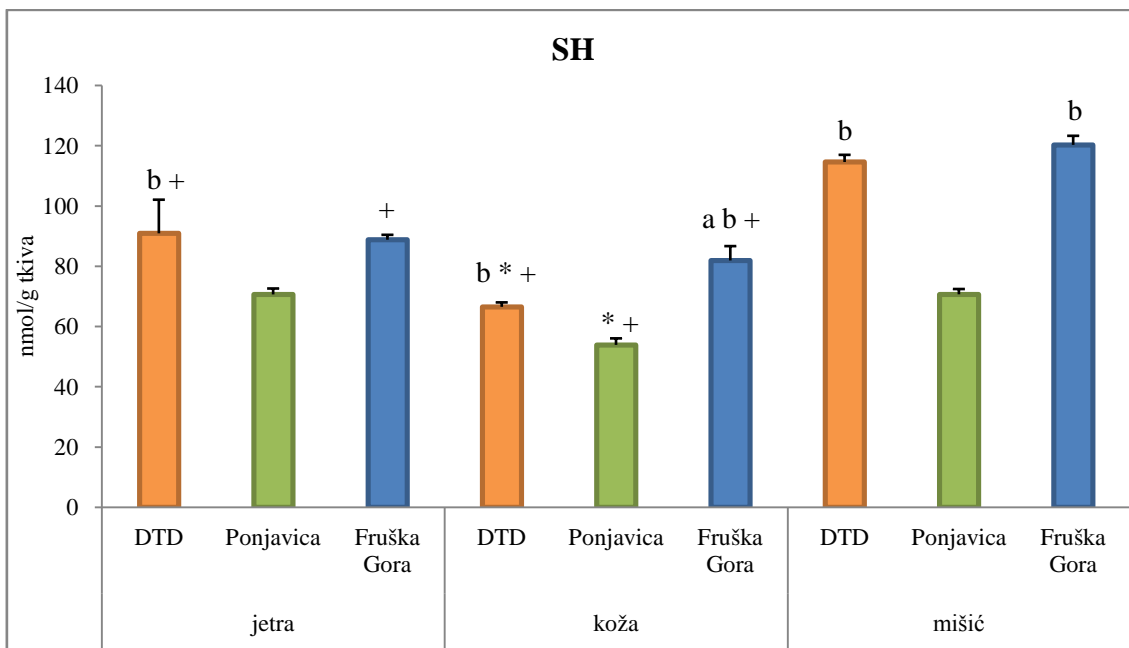
**Grafikon 64.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora tokom sezone proleće 2013. a”- DTD; “b- Ponjavica; “c”- Fruška Gora; “\*”- jetru; “#”- kožu.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljani  $\bar{X}_{sr} \pm SG$ .



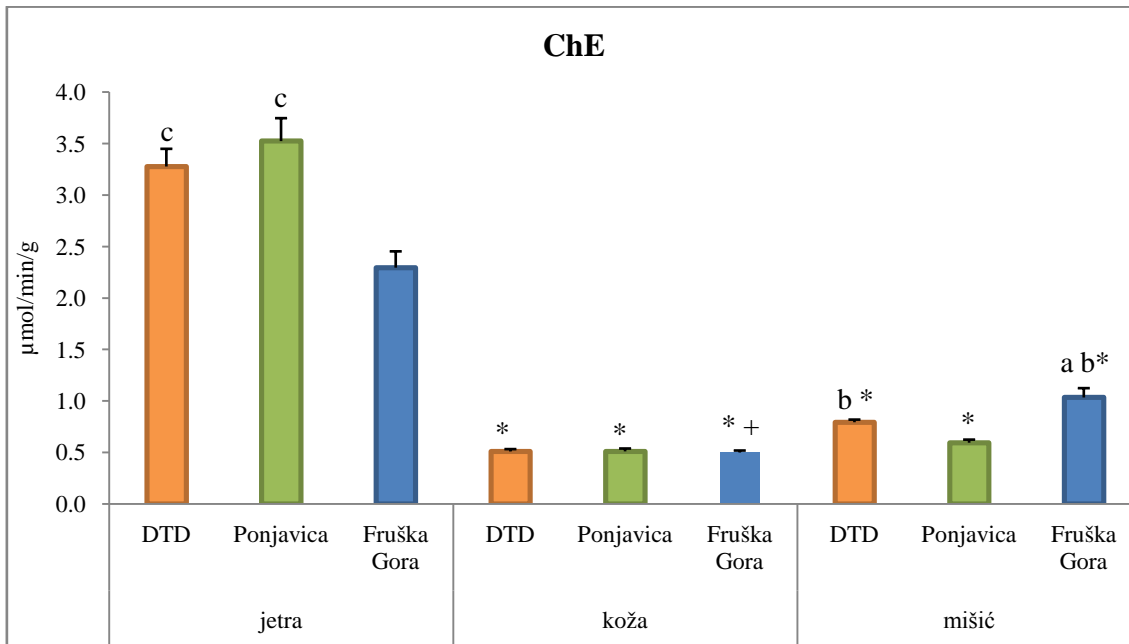
**Grafikon 65.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora tokom sezone proleće 2013. a”- DTD; “b- Ponjavica; “c”- Fruška Gora; “\*”- jetru; “#”- kožu.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X}_{sr} \pm SG$ .



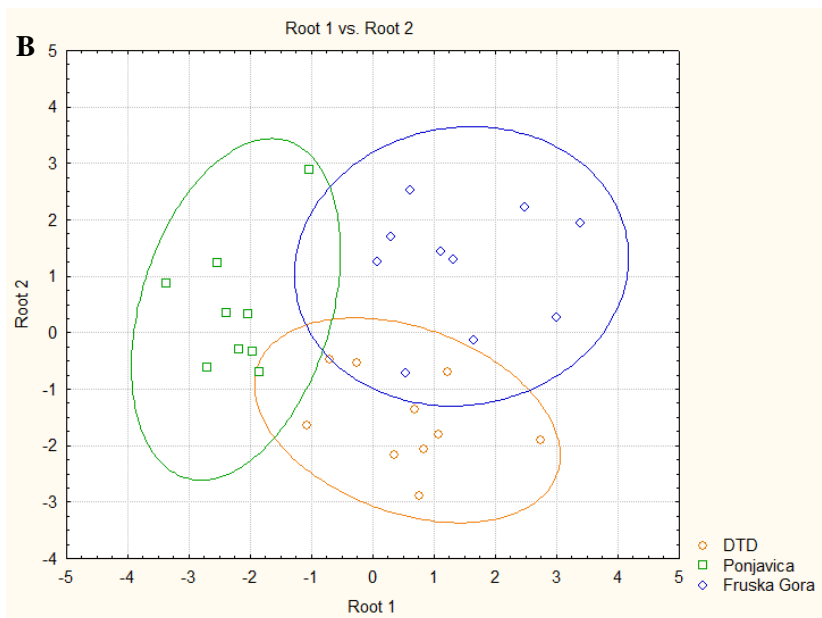
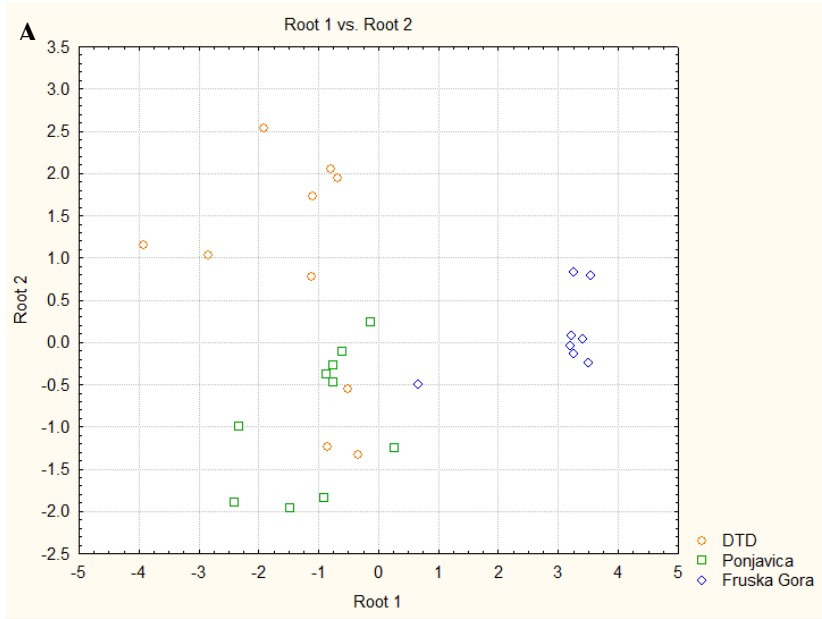
**Grafikon 66.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora tokom sezone proleće 2013. a”- DTD; “b- Ponjavica; “c”- Fruška Gora; “\*”- jetru;  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X}_{sr} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 10 radi jasnijeg prikaza.

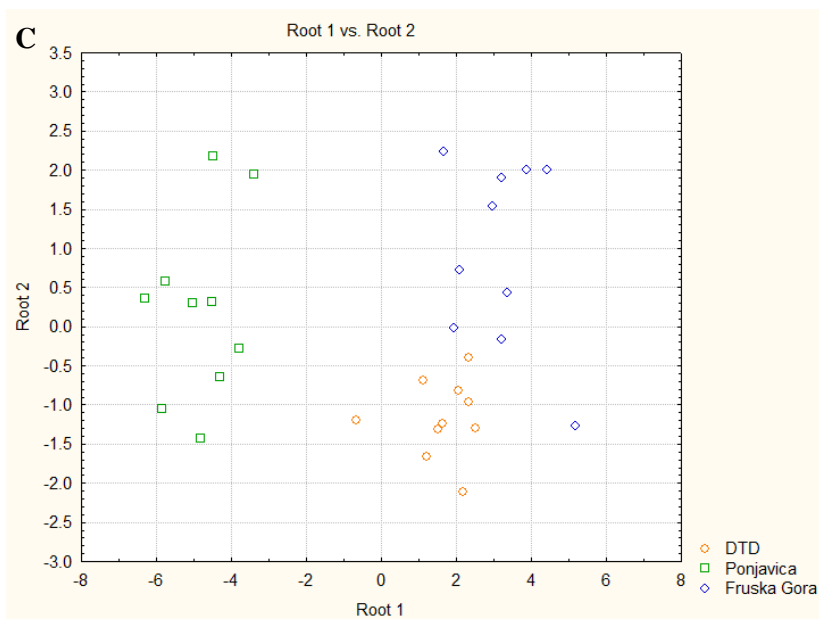


**Grafikon 67.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora tokom sezone proleće 2013. a”- DTD; “b- Ponjavica; “c”- Fruška Gora; “\*”- jetru; “+”- mišić.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



**Grafikon 68.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora tokom sezone proleće 2013. a”- DTD; “b- Ponjavica; “c”- Fruška Gora; “\*”- jetra; “+”- mišić.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .





**Grafikon 69.** Kanonijska diskriminaciona analiza za parametre AOS i aktivnost holinesteraze A) u jetri, B) u koži i C) u mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Fruška Gora (proleće 2013. godine).

Parametri AOS i aktivnost holinesteraze mereni su u jetri, koži i mišićima žaba vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom proleća 2014. Svi rezultati su predstavljeni u tabeli 25.

U jetri jedinki sa Ponjavice zabeležena je najveća aktivnost enzima SOD i ChE, dok je za iste enzime veća aktivnost bila kod jedinki sa DTD u odnosu na jedinke iz Obedske Bare (Grafikoni 70 i 77). Koncentracija SH grupa bila je veća kod jedinki sa kanala DTD i Ponjavica nego koncentracija kod jedinki iz Obedske Bare (Grafikon 76). Najveća koncentracija GSH zabeležena je u jetri jedinki ulovljenih na kanalu DTD (Grafikon 75). Aktivnost enzima GR je bila veća u jetri žaba iz Obedske Bare u odnosu na iste sa kanala DTD (Grafikon 73). Ono što je karakteristično za jedinke iz Obedske Bare je i najmanja aktivnost enzima CAT (Grafikon 71).

Kanonijska diskriminaciona analiza za tkivo jetre jedinki sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska bara pokazala je razdvajanje jedinki sa lokaliteta Obedska Bara od druga dva lokaliteta po prvoj kanonijskoj funkciji (87,1 %) i to najviše na osnovu aktivnosti CAT i ChE. Između jedinki sa DTD i Ponjavice došlo je do razdvajanja po drugoj funkciji (12,9 %) i to na osnovu vrednosti GR i GSH (Grafikon 78A).

**Tabela 25.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima jedinki vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavice i Obedske Bare sezona proleće 2014. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška.

	jetra			koža			mišić		
	DTD	Ponjavica	Obedska Bara	DTD	Ponjavica	Obedska Bara	DTD	Ponjavica	Obedska Bara
SOD	15,39 $\pm$ 1,00	19,0 $\pm$ 3,2	9,98 $\pm$ 0,86	3,8 $\pm$ 0,2	6,8 $\pm$ 0,4	6,9 $\pm$ 0,4	5,09 $\pm$ 0,54	8,6 $\pm$ 0,9	10,4 $\pm$ 0,9
CAT	1060,2 $\pm$ 97,3	1125,9 $\pm$ 146,9	26,6 $\pm$ 1,2	7,6 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,4	9,2 $\pm$ 0,2	6,9 $\pm$ 0,8	8,09 $\pm$ 0,84	2,8 $\pm$ 0,2
GSH-Px	19,7 $\pm$ 2,7	19,8 $\pm$ 1,2	17,9 $\pm$ 2,7	7,5 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 0,4	10,6 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,3	8,7 $\pm$ 0,7	10,0 $\pm$ 0,9
GR	10,9 $\pm$ 1,0	14,85 $\pm$ 1,02	18,5 $\pm$ 1,3	8,18 $\pm$ 0,47	9,7 $\pm$ 0,8	10,0 $\pm$ 0,5	2,01 $\pm$ 0,24	2,3 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1
GST	364,2 $\pm$ 37,1	351,8 $\pm$ 25,3	435,9 $\pm$ 37,9	118,2 $\pm$ 6,0	132,0 $\pm$ 9,7	125,8 $\pm$ 7,3	92,6 $\pm$ 8,6	87,7 $\pm$ 7,9	74,1 $\pm$ 6,8
GSH	1301,7 $\pm$ 151,6	831,5 $\pm$ 62,9	672,4 $\pm$ 75,6	129,2 $\pm$ 11,7	128,1 $\pm$ 14,3	125,7 $\pm$ 8,4	52,8 $\pm$ 4,1	105,7 $\pm$ 3,2	138,2 $\pm$ 11,4
SH	822,0 $\pm$ 2,6	822,9 $\pm$ 3,1	800,9 $\pm$ 3,9	822,0 $\pm$ 2,6	674,4 $\pm$ 17,3	619,9 $\pm$ 21,8	649,2 $\pm$ 16,6	563,1 $\pm$ 22,1	615,7 $\pm$ 21,9
ChE	2,43 $\pm$ 0,13	3,40 $\pm$ 0,15	1,68 $\pm$ 0,18	0,626 $\pm$ 0,081	0,562 $\pm$ 0,016	0,487 $\pm$ 0,019	0,683 $\pm$ 0,112	0,527 $\pm$ 0,017	0,359 $\pm$ 0,273

U koži je najveća aktivnost enzima GSH-Px uočene kod jedinki sa Obedske Bare, zatim kod jedinki sa kanala DTD (Grafikon 72). Jedinke sa kanala DTD imale su najveću koncentraciju SH grupa, dok su jedinke sa Ponjavice imale veću koncentraciju od onih sa Obedske Bare (Grafikon 76). Aktivnost SOD i CAT bila je veća kod žaba sa Ponjavice i Obedske Bare u odnosu na žabe sa DTD-a (Grafikoni 70 i 71).

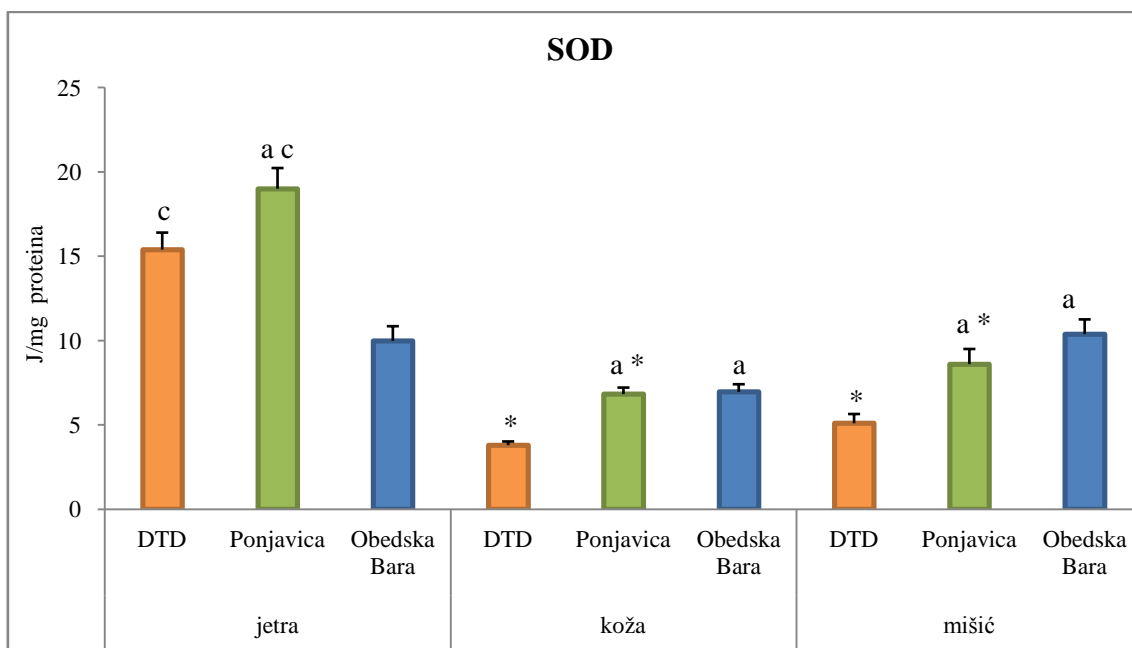
Na osnovu kanonijske analize za parametre AOS i holinesteraze u koži po prvoj funkciji (76,5%) su se odvojile jedinke iz Obedske Bare od jedinki sa DTD, dok se po drugoj (23,5 %) izdvajaju jedinke sa Ponjavice. Parametri GSH-Px, GSH i SH grupe su najviše doprineli razdvajanju po prvoj funkciji dok su SOD, GSH-Px i ChE najzaslužniji za odvajanje po drugoj (Grafikon 78B).

U mišićnom tkivu, aktivnost SOD je bila veća kod jedinki sa Ponjavice i Obedske Bare nego kod jedinki sa kanala DTD (Grafikon 70). Aktivnost CAT kod jedinki sa lokaliteta DTD i Ponjavice je bila veća nego aktivnost kod jedinki iz Obedske Bare (Grafikon 71). Enzim GR je imao je veću aktivnost u mišićima žaba iz Obedske Bare nego kod žaba sa kanala DTD (Grafikon 73). Najveća koncentracija GSH zabeležena je kod jedinki iz Obedske Bare, a zatim kod jedinki iz Ponjavice (Grafikon 75). Vrednost koncentracije SH grupa i aktivnost ChE bile su najveće kod jedinki sa lokaliteta DTD (Grafikoni 76 i 77).

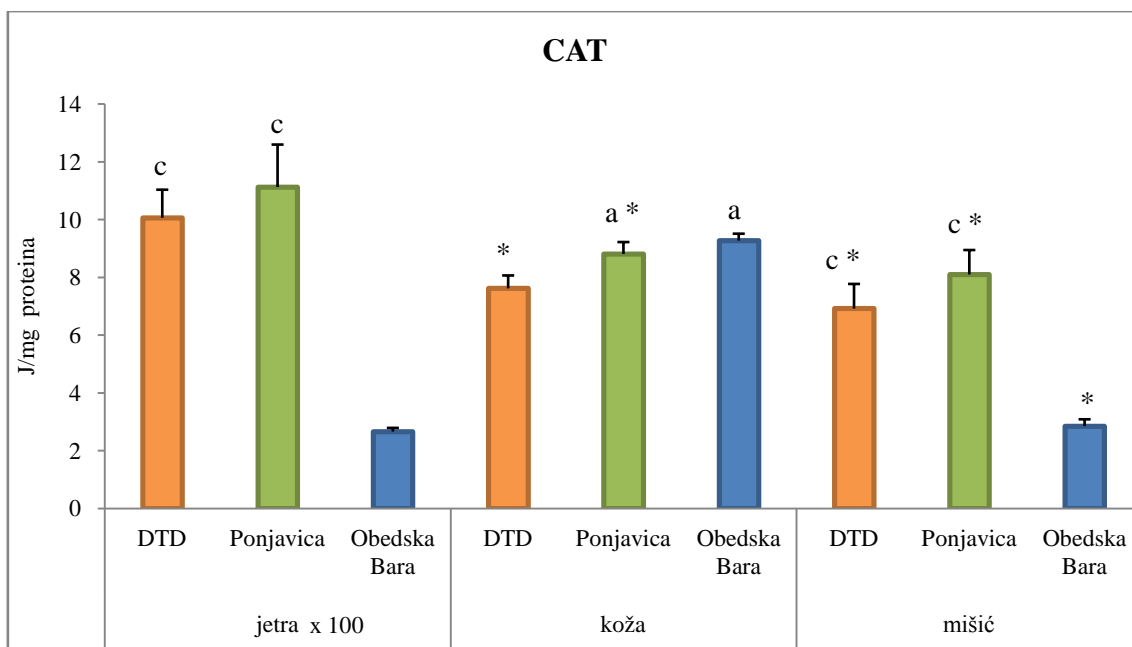
Kanonijska diskriminaciona analiza za biohemijske parametre u mišićima pokazala je razdvajanje po obe funkcije za jedinke sa različitih lokaliteta. Jedinke iz Obedska Bare i one sa lokaliteta DTD razdvojile su se po prvoj (82,5 %) osi na osnovu koncentracije GSH i aktivnosti SOD, a po drugoj osi (27,5 %) su se razdvojile jedinke sa kanala DTD i Obedske Bare od jedinki sa Ponjavice i to na osnovu vrednosti CAT, GST i SH grupa (Grafikon 78C).

Upoređivanje parametara AOS i holinesteraze između tkiva ponovo ističe jetru u prvi plan, kao tkivo koje ima najveću vrednost svih merenih parametara. Izuzetak su vrednosti SOD i CAT kod jedinki iz Obedske Bare kao i vrednosti GR i SH grupa u koži jedinki sa lokaliteta DTD (Grafikoni 70, 71, 73 i 76). Aktivnost GR je bila veća u koži nego u mišićima na svim lokalitetima, kao i koncentracija SH grupa za žabe iz kanala DTD i Ponjavice (Grafikoni 76).

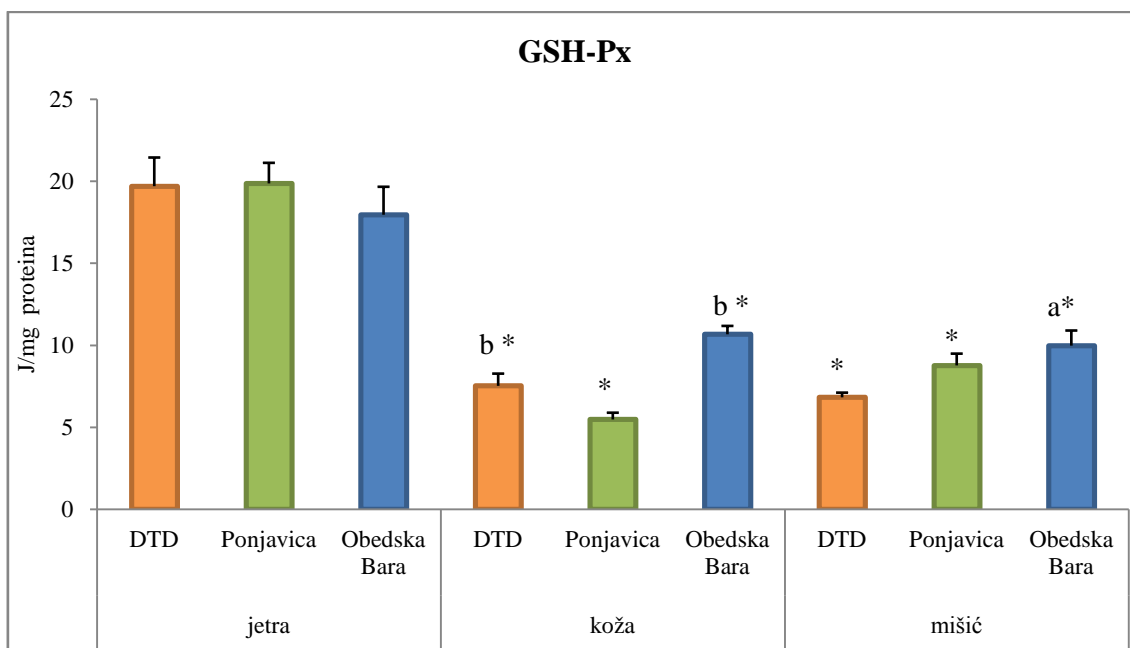




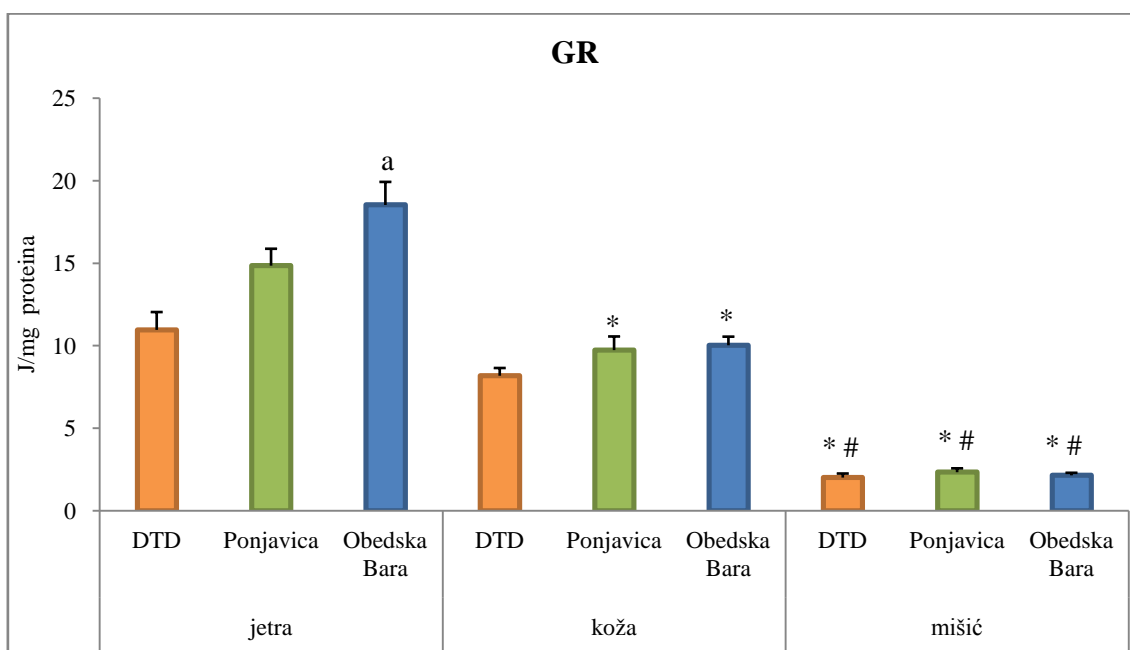
**Grafikon 70.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



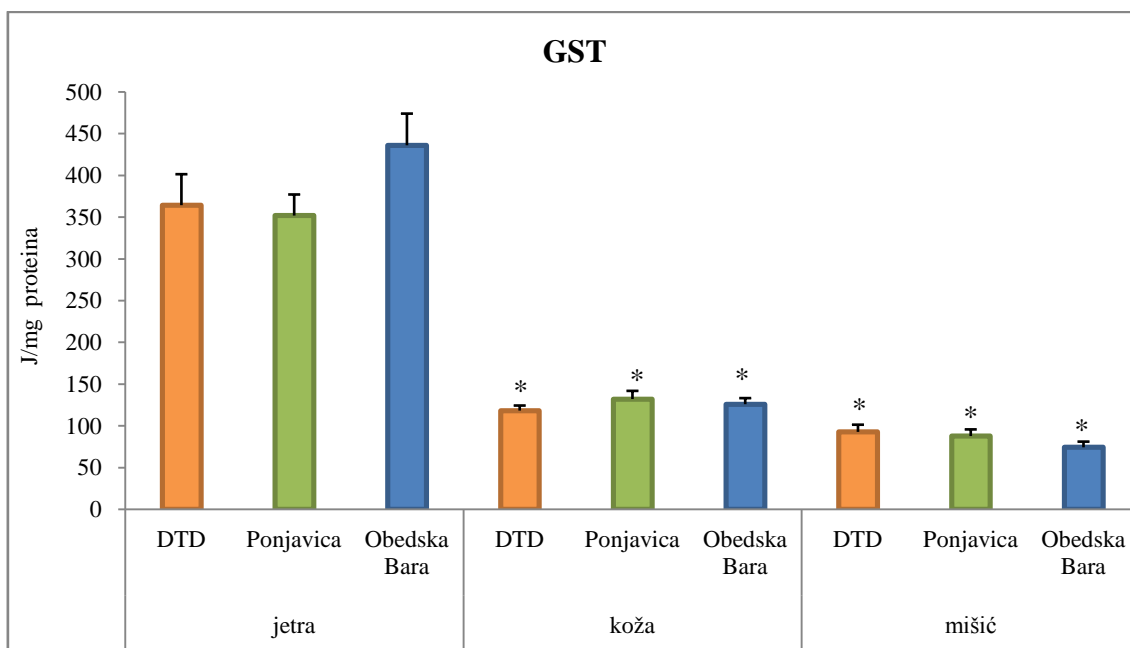
**Grafikon 71.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 100 radi jasnijeg prikaza.



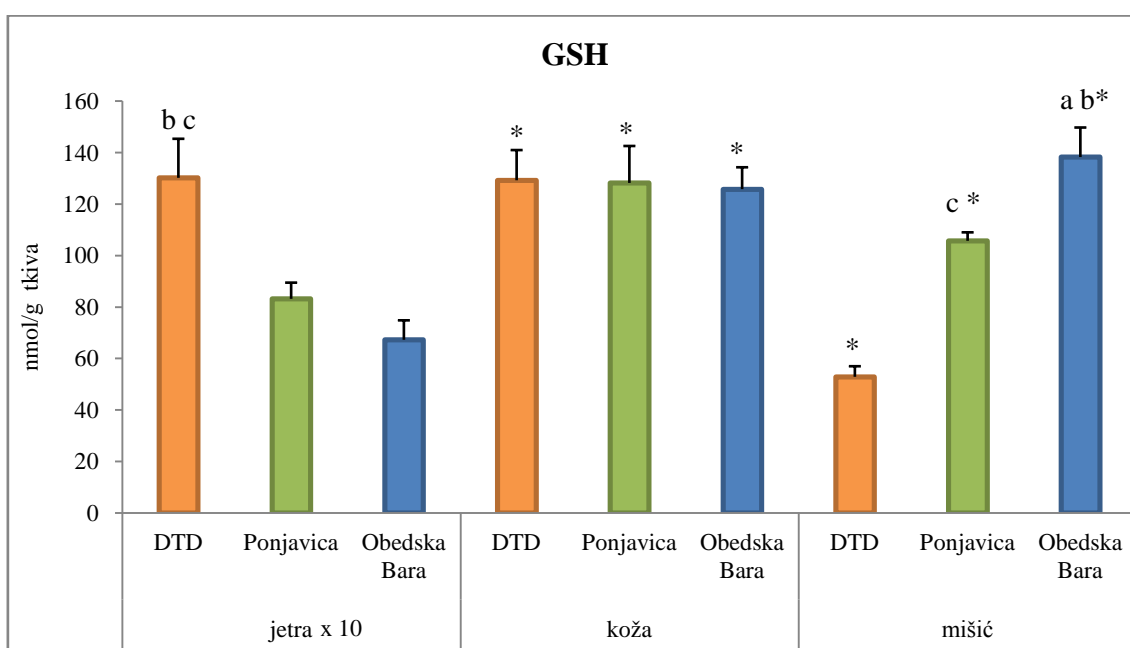
**Grafikon 72.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



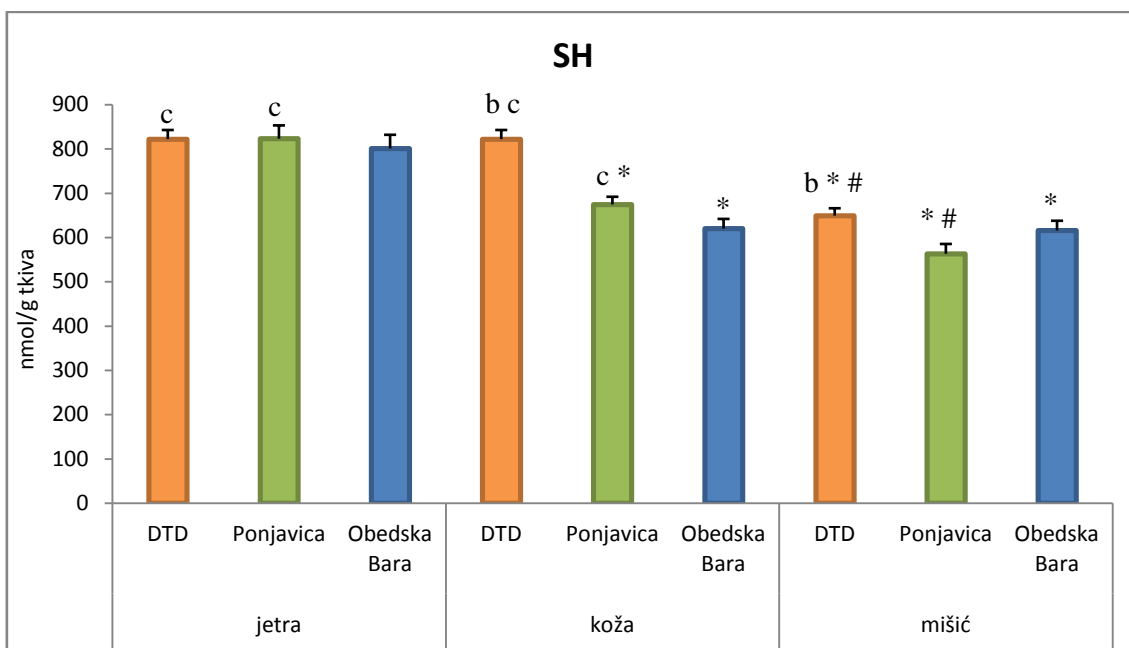
**Grafikon 73.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



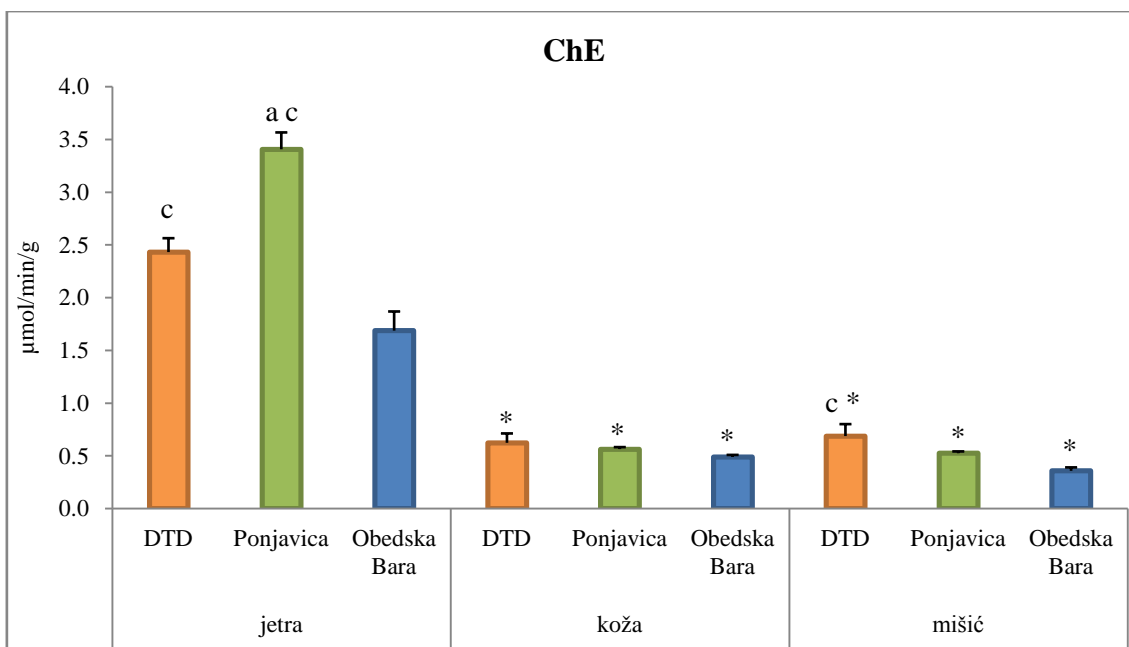
**Grafikon 74.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $X_{sr} \pm SG$ .



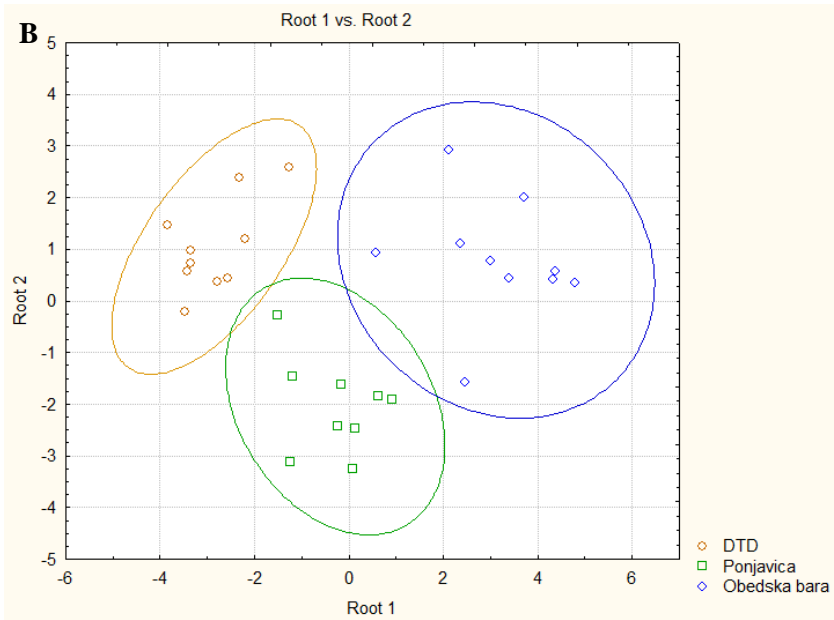
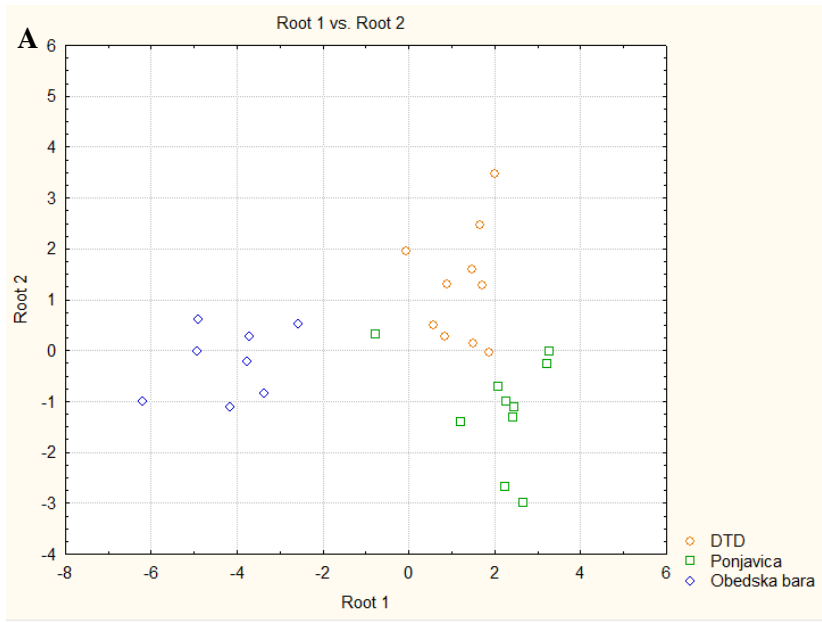
**Grafikon 75.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $X_{sr} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 10 radi jasnijeg prikaza.

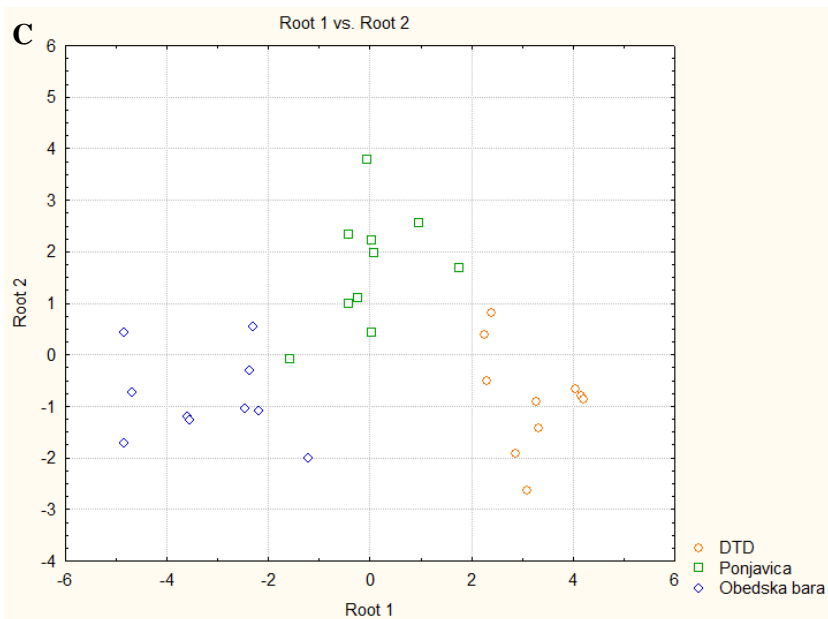


**Grafikon 76.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



**Grafikon 77.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .





**Grafikon 78.** Kanonijska diskriminaciona analiza za parametre AOS i aktivnost holinesteraze A) u jetri, B) u koži i C) u mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara (proleće 2014. godine).

*P. ridibundus* vrsta je u toku jeseni 2014. ulovljena na lokalitetima DTD i Ponjavica. U jetri, koži i mišićima su mereni parametri antioksidacionog sistema i aktivnost holinesteraze. Svi rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

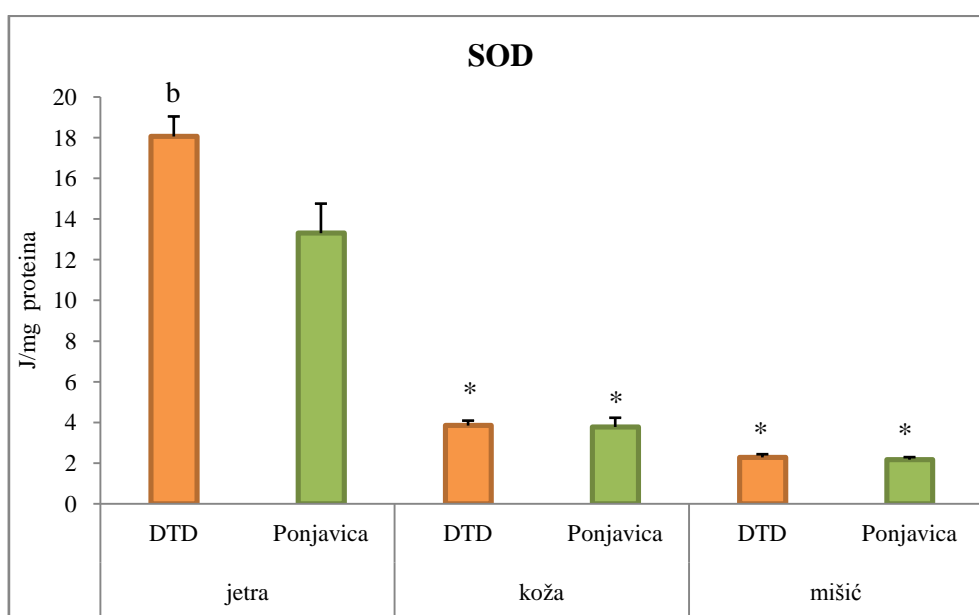
**Tabela 26.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima jedinki vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica (sezona jesen 2014. godine).

	jetra		koža		mišić	
	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica
SOD	18,05 ± 0,98	13,30 ± 1,45	3,84 ± 0,24	3,7 ± 0,4	2,28 ± 0,15	2,16 ± 0,12
CAT	1644,7 ± 115,7	2495,8 ± 162,2	7,5 ± 0,5	5,45 ± 0,54	7,9 ± 1,1	2,14 ± 0,41
GSH-Px	33,6 ± 2,5	32,4 ± 3,2	10,5 ± 0,8	11,03 ± 0,98	4,48 ± 0,29	5,03 ± 0,27
GR	17,6 ± 2,2	13,4 ± 1,4	4,32 ± 0,27	3,64 ± 0,24	0,86 ± 0,10	0,80 ± 0,05
GST	436,0 ± 53,8	377,0 ± 35,8	73,4 ± 4,2	72,3 ± 3,7	26,5 ± 1,1	91,4 ± 7,8
GSH	933,0 ± 109,3	950,2 ± 144,3	46,9 ± 2,5	45,2 ± 5,6	157,3 ± 17,9	152,2 ± 6,3
SH	258,2 ± 3,1	324,3 ± 11,0	222,7 ± 8,1	227,3 ± 14,3	271,0 ± 1,2	273,1 ± 1,4
ChE	2,02 ± 0,15	2,01 ± 0,17	0,45 ± 0,05	0,42 ± 0,02	0,77 ± 0,07	0,513 ± 0,03

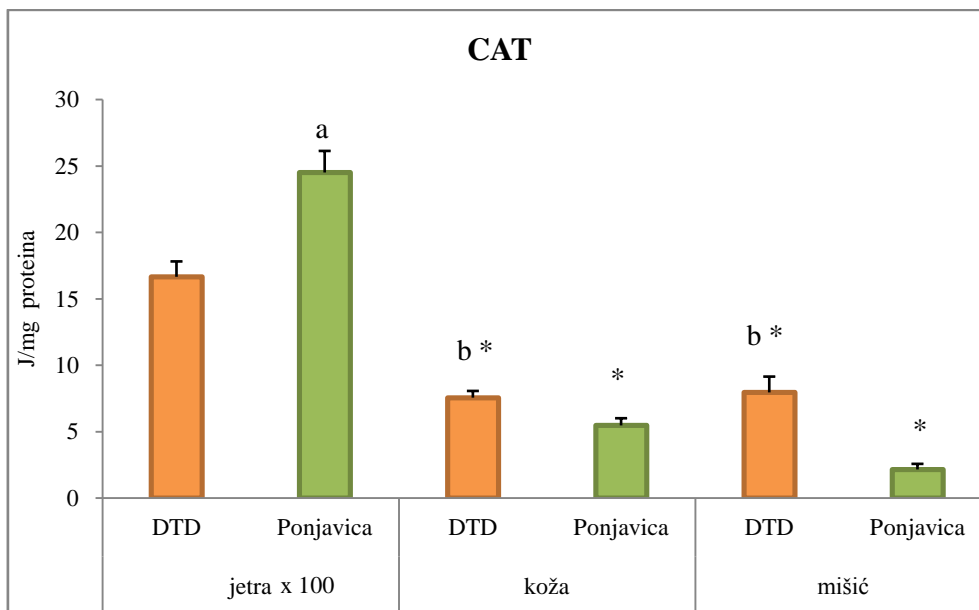
Što se tiče rezultata merenih parametara u jetri veća aktivnost dobijena je za aktivnost SOD kod jedinki sa DTD, a aktivnosti CAT i koncentracija SH grupa bile su veće kod jedinki sa lokaliteta Ponjavica (Grafikoni 79, 80 i 85). U koži su izmerene

veće aktivnosti GR kod jedinki sa kanala DTD. CAT je takođe imala veću aktivnost i u mišićima jedinki sa istog lokaliteta (Grafikoni 80 i 82). Aktivnost enzima GST u mišićima bila je veća kod žaba iz kanala DTD (Grafikon 83).

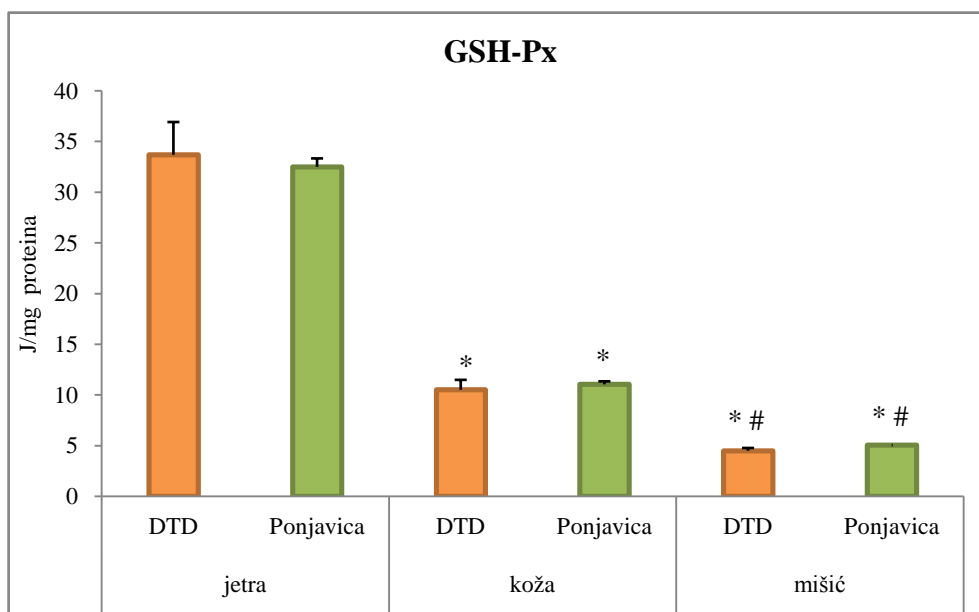
Međutkivna razlika pokazala je da su svi parametri imali više vrednosti u jetri u odnosu na kožu i mišiće. Izuzetak je koncentracija SH grupa koja se nije razlikovala značajno u poređenju sa mišićima (Grafikon 85). Koža je imala veće vrednosti za enzime GSH-Px i GR u odnosu na mišiće, dok su mišići imali veću koncentraciju SH grupa (Grafikoni 81, 82 i 85).



**Grafikon 79.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. "a"- DTD; "b"- Ponjavica; "\*" - jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $X_{sr} \pm SG$ .

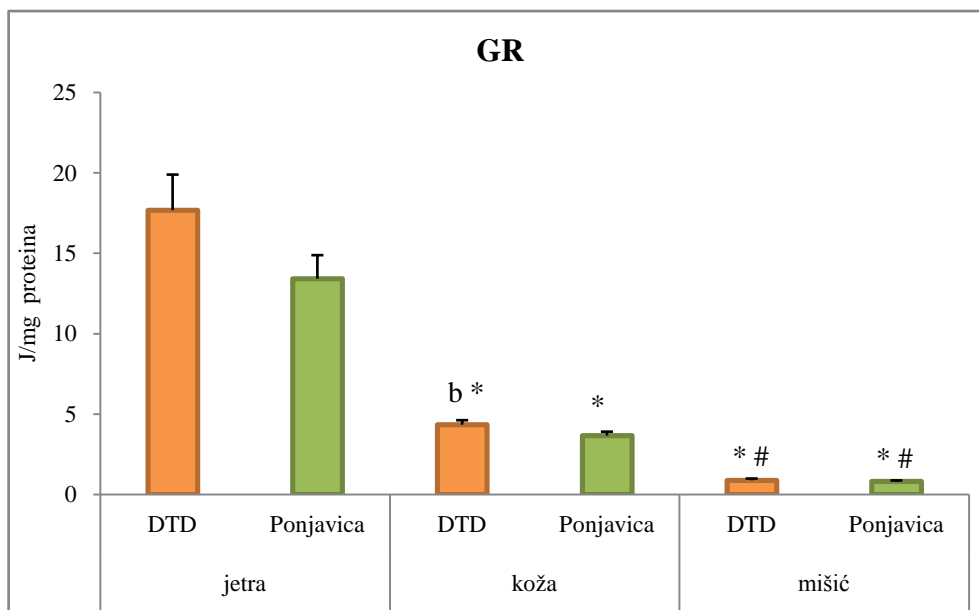


**Grafikon 80.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 100 radi jasnijeg prikaza.

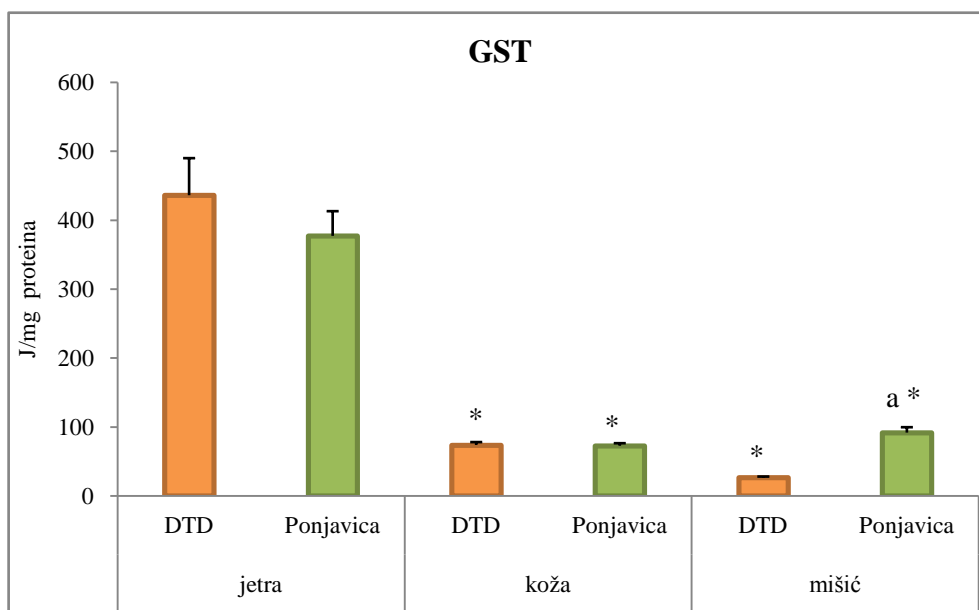


**Grafikon 81.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

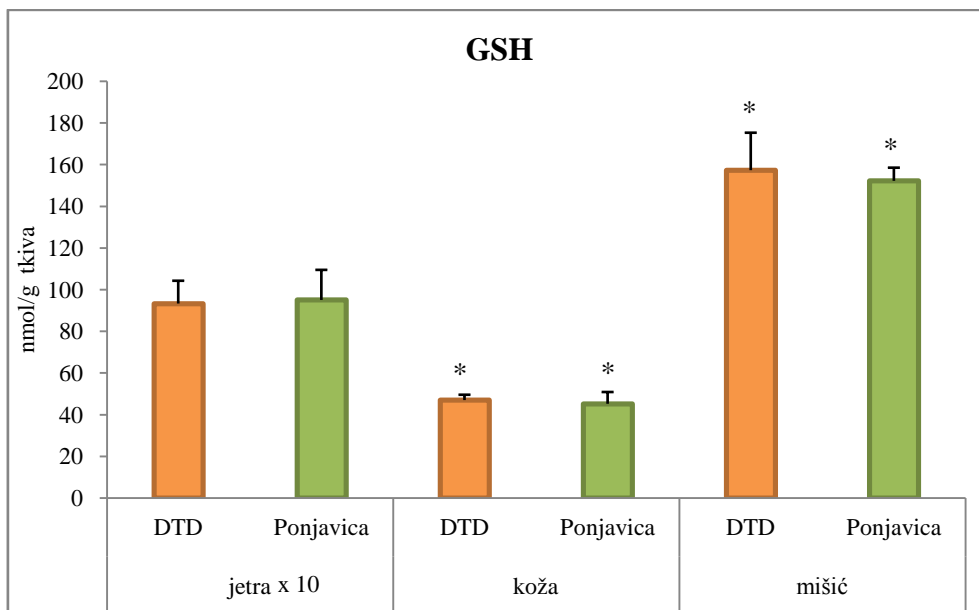




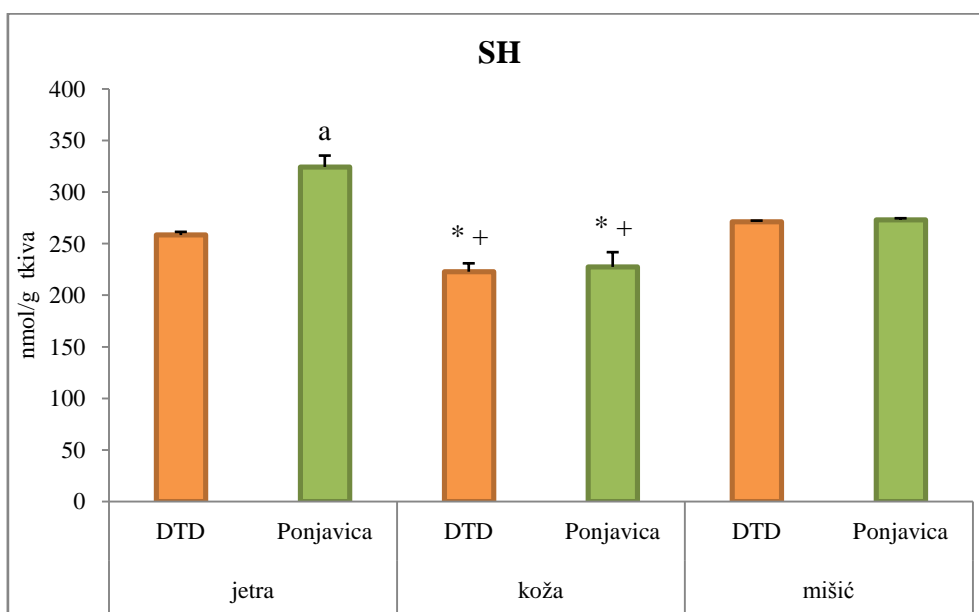
**Grafikon 82.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



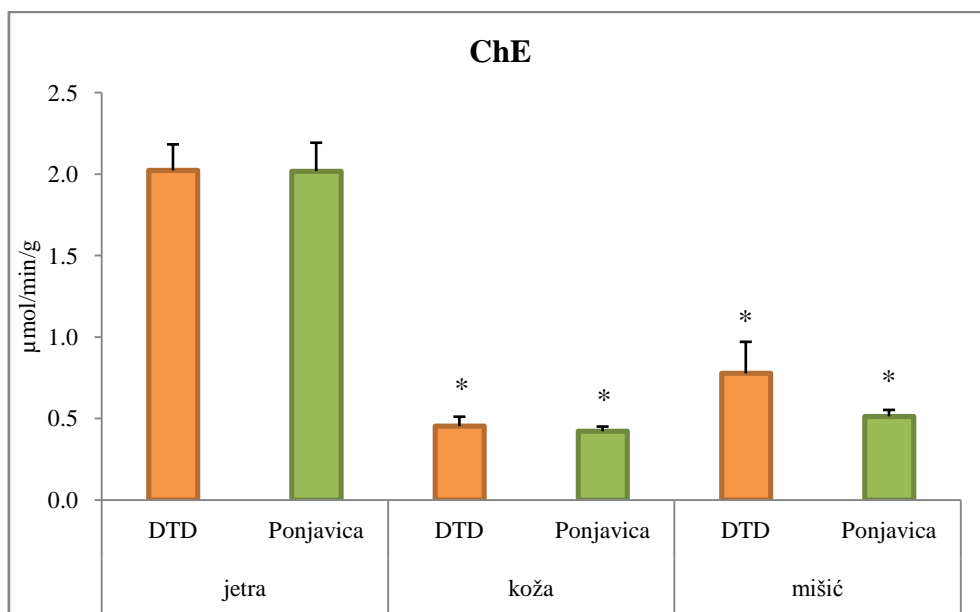
**Grafikon 83.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



**Grafikon 84.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “\*“- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 10 radi jasnijeg prikaza.



**Grafikon 85.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*“- jetra; “+“- mišić.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



**Grafikon 86.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrste *P. ridibundus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

#### 4.3.2.1. Akumulacija metala u tkivima vrste *P. esculentus*

Tokom 2013. godine koncentracije metala merene su u koži i mišićima jedinki sa lokaliteta DTD i Ponjavica. Rezultati pokazuju da je koncentracija Cd, Cu i Zn u koži veća kod jedinki na lokalitetu DTD, dok kod istih jedinki As nije bio uočen. U koži žaba sa Ponjavice nije detektovano prisustvo Hg i Pb. Za mišiće, jedina razlika je bila veća koncentracija Cd kod jedinki sa Ponjavice. Co i Pb nisu bili prisutni u mišićima žaba sa Ponjavice (Tabela 27).

**Tabela 27.** Koncentracija akumuliranih metala u koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica, sezona proleće 2013. "a"- DTD; "b"- Ponjavica. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

	koža		mišić	
	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica
Al	14,3 ± 1,9	24,8 ± 7,0	10,1 ± 3,0	167,3 ± 79,2
As	/	0,136 ± 0,043	/	/
Cd	0,060 ± 0,009 <sup>b</sup>	0,012 ± 0,002	0,013 ± 0,005	0,032 ± 0,005 <sup>a</sup>
Co	/	/	0,019 ± 0,004	/
Cr	0,742 ± 0,052	0,638 ± 0,103	0,407 ± 0,056	0,413 ± 0,042
Cu	2,06 ± 0,143 <sup>b</sup>	1,42 ± 0,083	1,12 ± 0,069	1,23 ± 0,081
Fe	35,5 ± 2,2	42,0 ± 6,0	22,17 ± 1,37	25,5 ± 1,8
Hg	0,021 ± 0,006	/	0,043 ± 0,010	0,911 ± 0,86
Mn	13,3 ± 1,9	15,9 ± 2,0	0,738 ± 0,081	0,987 ± 0,094
Ni	0,384 ± 0,073	0,306 ± 0,042	0,255 ± 0,032	0,174 ± 0,028
Pb	0,363 ± 0,037	/	0,047 ± 0,017	/
Zn	168,0 ± 15,9 <sup>b</sup>	106,0 ± 12,1	23,8 ± 1,7	22,2 ± 1,7

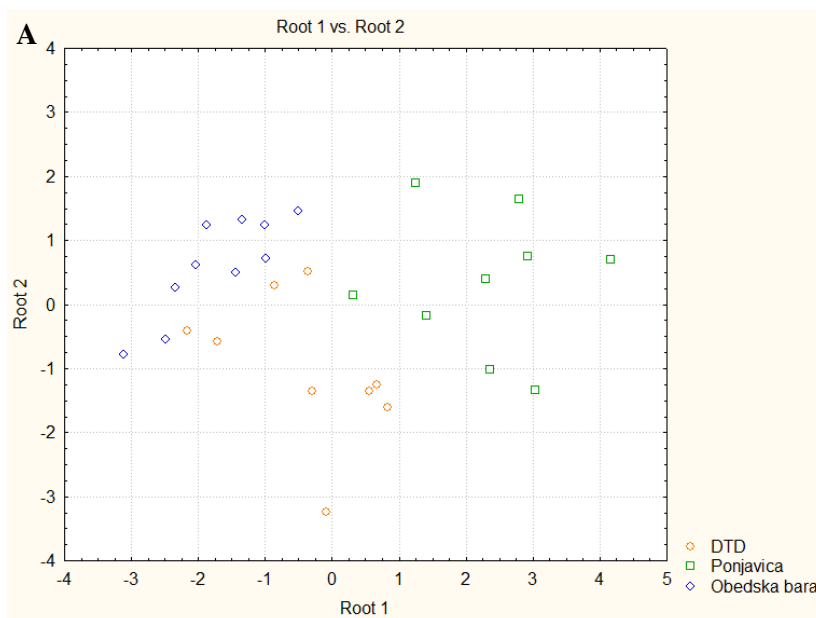
Tokom sezone proleće 2014. akumulirani metali su mereni u koži i mišićima jedinki sa lokaliteta DTD, Ponjavice i Obedske Bare (Tabela 28). Kadmijum je bio najviše akumuliran u koži jedinki iz Obedske Bare. Isto važi i za koncentraciju Fe kod jedinki sa Ponjavice. Koncentracija Zn je bila najniža kod žaba iz Obedske Bare. Koža žaba iz Obedske Bare je akumulirala As i Pb, dok ovi metali nisu bili prisutni u koži žaba sa drugih lokaliteta. Takođe je Co detektovan samo kod žaba sa Ponjavice.

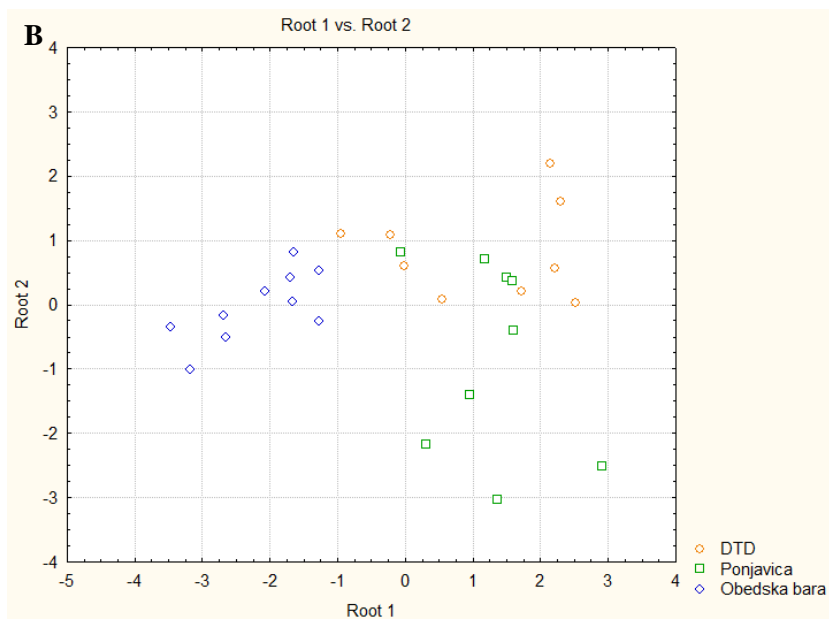
Kanonijska diskriminaciona analiza za metale u koži jedinki sa različitih lokaliteta je pokazala razdvajanje po prvoj funkciji (85,0 %) između jedinki sa Ponjavice i Obedske Bare, dok po drugoj (15,0 %) nema jasnog razdvajanja zbog mešanja jedinki

sa DTD i Obedske Bare. Koncentracije Cd, Al i Fe su najviše doprinele razdvajanju po prvoj funkciji (Grafikon 87A).

U mišićima žaba *P. esculentus* sa ispitivanih lokaliteta, veće koncentracije Cr i Mn zabeleženesu kod jedinki sa kanala DTD i Ponjavice u odnosu na jedinke sa Obedske Bare. Veća koncentracija je uočene za As kod jedinki iz Obedske Bare u poređenju sa mišićima jedinki sa Ponjavice i za Hg u odnosu na jedinke sa kanala DTD. Poređenje akumuliranih metala u mišićima žaba sa DTD i Ponjavice, pokazalo je značajno veću koncentraciju Cd kod onih sa Ponjavice. Arsen i kobalt nisu detektovani u mišićnom tkivu žaba sa kanala DTD, dok Cd nije detektovan kod žaba iz Obedske Bare (Tabela 28).

Prva funkcija kanonijske diskriminacione analize sa 81,9 % od ukupne heterogenosti za mišiće pokazala je jasno razdvajanje jedinki iz Obedske Bare od jedinki sa druga dva lokaliteta. Razdvajanje po prvoj funkciji je najviše rezultat koncentracija Cr i Cu. Po drugoj funkciji (18,1 %) su se razdvojili lokaliteti DTD i Ponjavica i to na osnovu koncentracija Cr i Mn. Takođe, tokom ove analize uočeno je da su tri jedinke sa kanala DTD bile pomešane sa jedinkama sa Ponjavice (Grafikon 87B).





**Grafikon 87.** Kanonijska diskriminaciona analiza za akumulirane metale A) u koži i B) u mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara (proleće 2014. godine).

**Tabela 28.** Koncentracija akumuliranih metala u koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara (sezona proleće 2014. godine). “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara. Rezultati su predstavljeni  $X_{sr} \pm SG$ .

	koža			mišić		
	DTD	Ponjavica	Obedska Bara	DTD	Ponjavica	Obedska Bara
Al	72,3 ± 17,3	68,8 ± 14,9	20,50 ± 4,35	24,45 ± 2,70	31,48 ± 6,36	12,96 ± 3,88
As	/	/	0,604 ± 0,208	/	0,286 ± 0,083	1,49 ± 0,26 <sup>b</sup>
Cd	0,09 ± 0,02	0,019 ± 0,004	0,138 ± 0,010 <sup>ab</sup>	0,033 ± 0,010	0,147 ± 0,057 <sup>a</sup>	/
Co	/	0,14 ± 0,06	/	/	0,215 ± 0,091	0,007 ± 0,001
Cr	1,74 ± 0,40	2,21 ± 0,63	1,35 ± 0,14	1,11 ± 0,33 <sup>c</sup>	1,05 ± 0,16 <sup>c</sup>	0,213 ± 0,016
Cu	3,67 ± 1,55	2,49 ± 0,26	2,25 ± 0,16	1,39 ± 0,15	1,20 ± 0,15	1,39 ± 0,04
Fe	31,69 ± 4,10	68,5 ± 13,1 <sup>ac</sup>	29,11 ± 2,79	20,45 ± 2,85	42,71 ± 15,27	18,52 ± 0,92
Hg	0,13 ± 0,02	0,122 ± 0,027	0,105 ± 0,009	0,102 ± 0,028	0,136 ± 0,041	0,238 ± 0,041 <sup>a</sup>
Mn	19,95 ± 2,55	18,14 ± 2,16	17,13 ± 0,97	0,910 ± 0,197 <sup>c</sup>	1,21 ± 0,184 <sup>c</sup>	0,473 ± 0,024
Ni	1,69 ± 0,66	1,42 ± 0,34	0,998 ± 0,180	0,485 ± 0,083	0,725 ± 0,147	0,452 ± 0,072
Pb	/	/	1,12 ± 0,21	/	/	/
Zn	149,9 ± 25,2 <sup>c</sup>	183,6 ± 16,9 <sup>c</sup>	85,9 ± 6,8	25,25 ± 3,22	25,93 ± 1,84	20,31 ± 1,37

U tabeli 29 prikazane su koncentracije metala izmerene u jetri, koži i mišićima kod jedinki sa lokaliteta DTD i Ponjavica iz sezone jesen 2014. Rezultati su pokazali da jedinke sa lokaliteta Ponjavica imaju veću koncentraciju Co i Hg u jetri i Fe u koži u

poređenju sa istim tkivima kod žaba sa kanala DTD. Nasuprot tome, veća vrednost Al, Cr i Zn u jetri, Mn u koži i Cr u mišićima bila je karakteristična za jedinke sa DTD-a.

**Tabela 29.** Koncentracija akumuliranih metala u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica (sezona jesen 2014. godine). “a”- DTD; “b”- Ponjavica. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

	jetra		koža		mišić	
	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica
Al	20,7 ± 4,6 <sup>b</sup>	7,39 ± 1,01	5,7 ± 0,6	4,07 ± 0,66	3,58 ± 0,27	3,80 ± 0,35
Cd	0,33 ± 0,07	0,46 ± 0,04	0,073 ± 0,009	0,076 ± 0,015	0,0335 ± 0,007	0,027 ± 0,008
Co	0,19 ± 0,04	0,396 ± 0,037 <sup>a</sup>	/	/	/	/
Cr	0,42 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,217 ± 0,025	0,880 ± 0,123	0,523 ± 0,042	0,446 ± 0,070	0,32 ± 0,03 <sup>a</sup>
Cu	125,1 ± 17,8	107,2 ± 20,4	2,28 ± 0,16	2,07 ± 0,13	1,20 ± 0,14	0,97 ± 0,05
Fe	410,2 ± 92,7	408,3 ± 60,4	33,2 ± 1,9	24,5 ± 1,5	12,49 ± 0,76	13,3 ± 1,5 <sup>b</sup>
Hg	0,08 ± 0,01	0,22 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,071 ± 0,017	0,124 ± 0,061	0,057 ± 0,010	0,12 ± 0,02
Mn	3,11 ± 0,396	2,64 ± 0,24	19,1 ± 3,4 <sup>b</sup>	11,3 ± 1,7	0,213 ± 0,053	0,14 ± 0,02
Ni	0,164 ± 0,11	0,17 ± 0,06	0,25 ± 0,06	0,179 ± 0,035	0,23 ± 0,04	0,19 ± 0,06
Pb	/	/	/	/	0,30 ± 0,04	/
Zn	71,1 ± 6,5 <sup>b</sup>	46,6 ± 1,9	182,0 ± 23,4	146,3 ± 19,3	43,9 ± 22,7	19,18 ± 0,76

#### 4.3.2.2. Parametri AOS i aktivnost holinesteraze kod vrste *P. esculentus* sa različitim lokaliteta

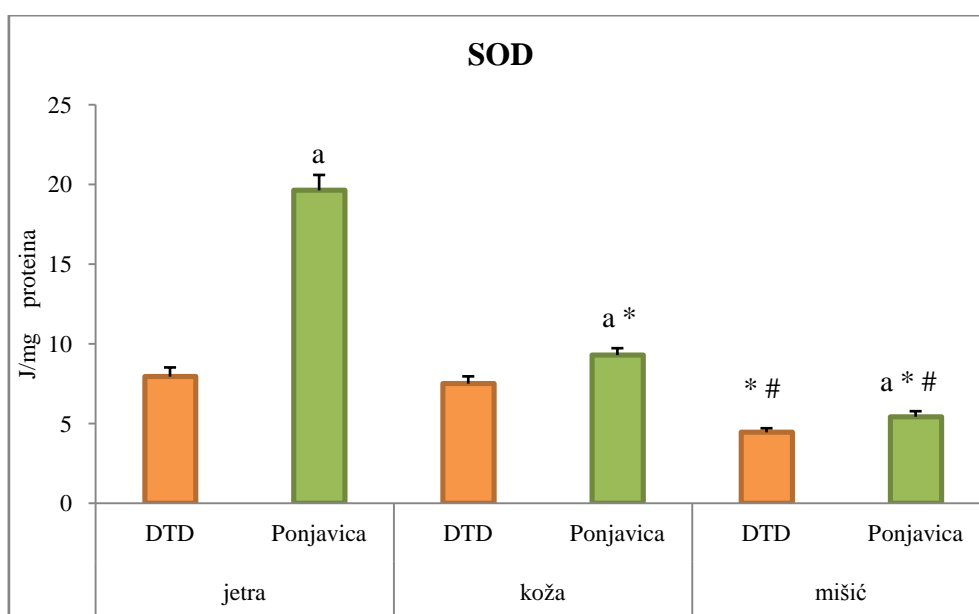
Kod vrste *P. esculentus* vrednosti parametara AOS i aktivnost holinesteraze u proleće 2013. prikazane su po lokalitetima u tabeli 30.

**Tabela 30.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima jedinki vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica (sezona proleće 2013. godine). Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

	jetra		koža		mišić	
	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica
SOD	7,9 ± 0,5	19,6 ± 0,9	7,5 ± 0,4	9,3 ± 0,4	4,4 ± 0,2	5,4 ± 0,3
CAT	1865,4 ± 160,3	1911,3 ± 195,2	7,87 ± 0,67	9,87 ± 0,58	1,19 ± 0,15	2,41 ± 0,44
GSH-Px	18,2 ± 2,5	30,5 ± 2,7	11,42 ± 0,76	13,02 ± 0,94	3,35 ± 0,24	4,14 ± 0,14
GR	9,05 ± 0,72	13,47 ± 1,15	9,98 ± 0,72	12,8 ± 0,9	0,81 ± 0,09	0,86 ± 0,08
GST	125,8 ± 8,2	166,4 ± 10,0	230,2 ± 23,9	212,2 ± 11,2	33,6 ± 2,6	31,4 ± 1,4
GSH	1135,5 ± 64,8	907,0 ± 66,3	113,7 ± 15,2	104,3 ± 16,8	104,6 ± 10,1	72,4 ± 8,1
SH	73,1 ± 3,2	80,5 ± 4,0	73,3 ± 2,2	60,3 ± 3,3	118,8 ± 4,9	64,1 ± 1,9
ChE	3,51 ± 0,25	3,49 ± 0,25	0,54 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,65 ± 0,07	0,56 ± 0,01

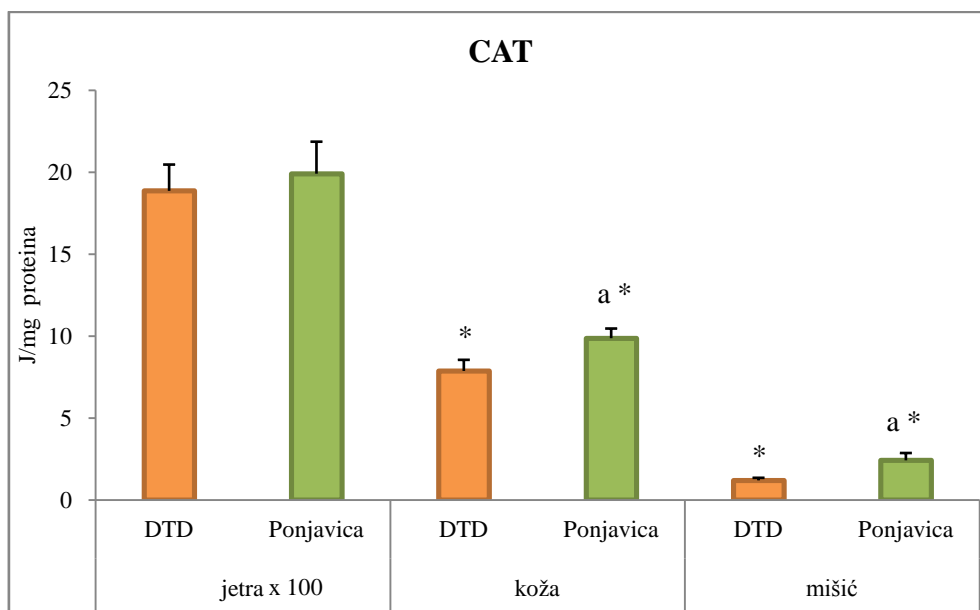
Vrednosti ispitivanih parametara u tkivima pokazali su sličan trend između lokaliteta. Aktivnost SOD je bila veća za sva tkiva kod jedinki sa Ponjavice; a isto važi i za aktivnost CAT u koži i mišićima, zatim za GSH-Px i GR u jetri i mišićima i GST u jetri (Grafikoni 88, 89, 90, 91 i 92). Nasuprot tome, veća koncentracija GSH u jetri i mišićima, i SH grupa u koži i mišićima zabeležena je kod jedinki sa kanala DTD (Grafikoni 93 i 94).

U jetri je veća aktivnost u odnosu na kožu i mišić za sledeće parametre: CAT, GSH-Px, GSH i ChE (Grafikoni 89, 93 i 95). Enzimi SOD, GSH-Px i GR imali su značajno veće aktivnosti u jetri i koži u odnosu na mišiće (Grafikoni 88, 90 i 91).

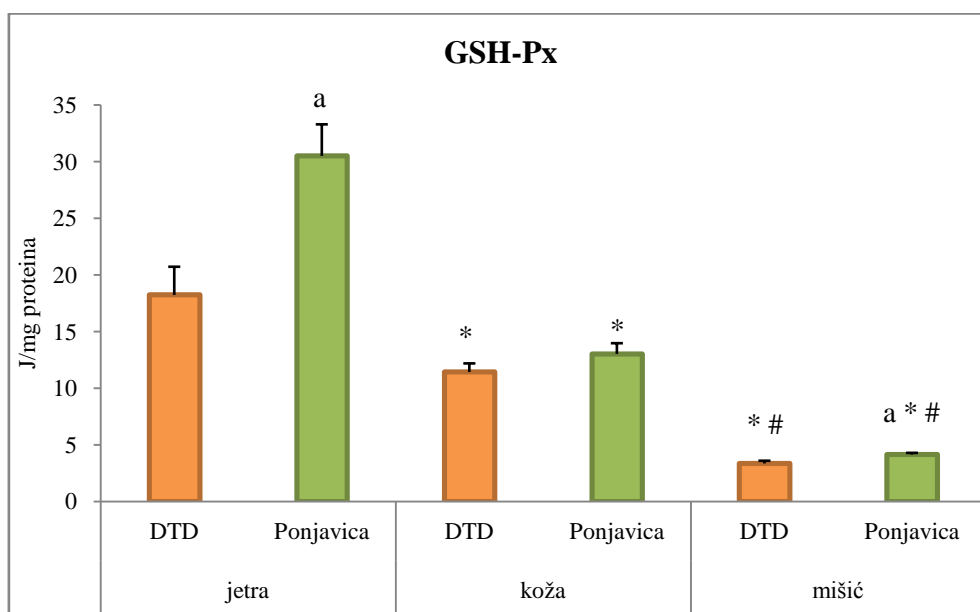


**Grafikon 88.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, i Ponjavica tokom sezone proleće 2013. "a"- DTD; "b"- Ponjavica; "\*" - jetra; "#"- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

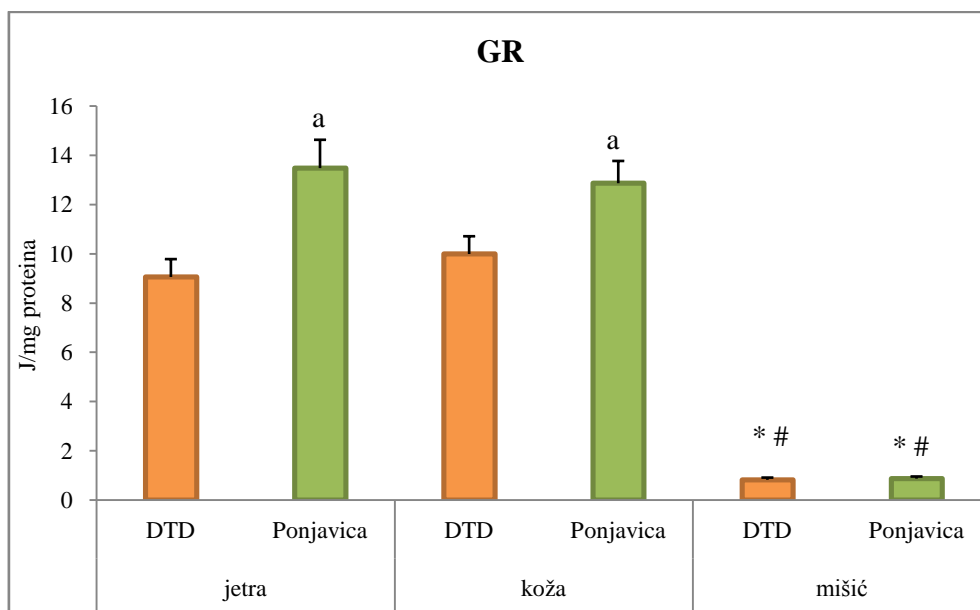




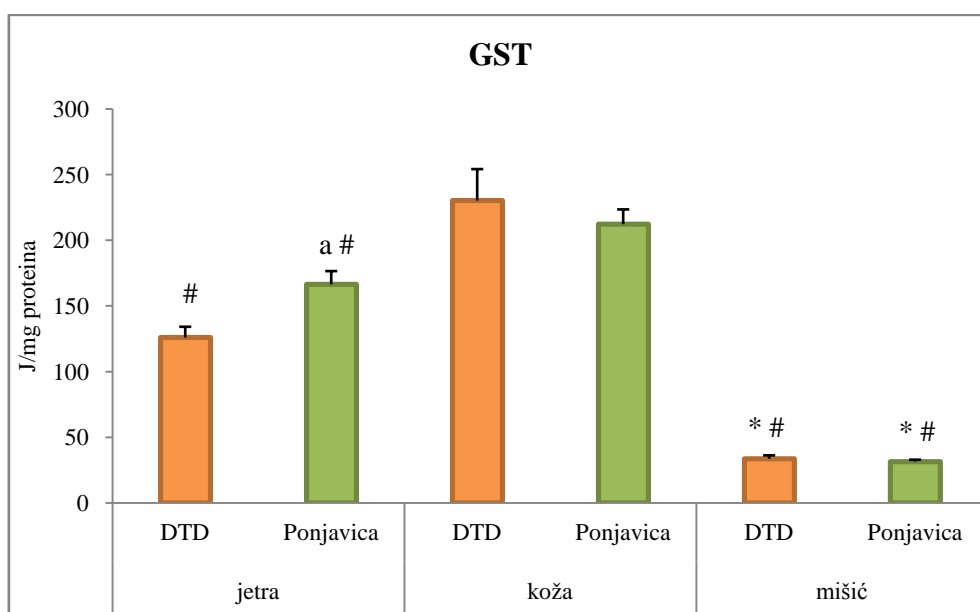
**Grafikon 89.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, i Ponjavica tokom sezone proleće 2013. "a"- DTD; "b"- Ponjavica; "\*" - jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 100 radi jasnijeg prikaza.



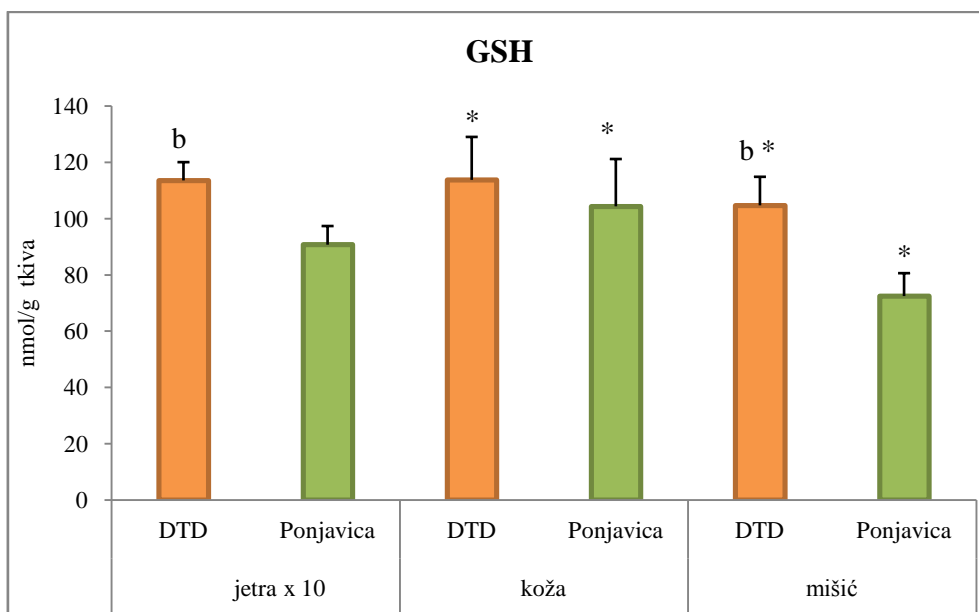
**Grafikon 90.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, i Ponjavica tokom sezone proleće 2013. "a"- DTD; "b"- Ponjavica; "\*" - jetra; "#"- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



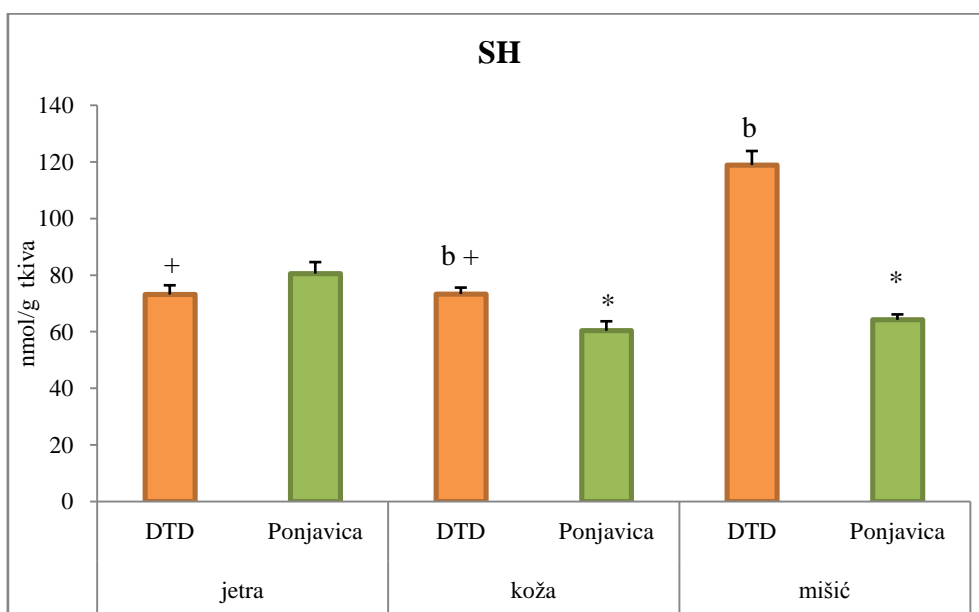
**Grafikon 91.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, i Ponjavica tokom sezone proleće 2013. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



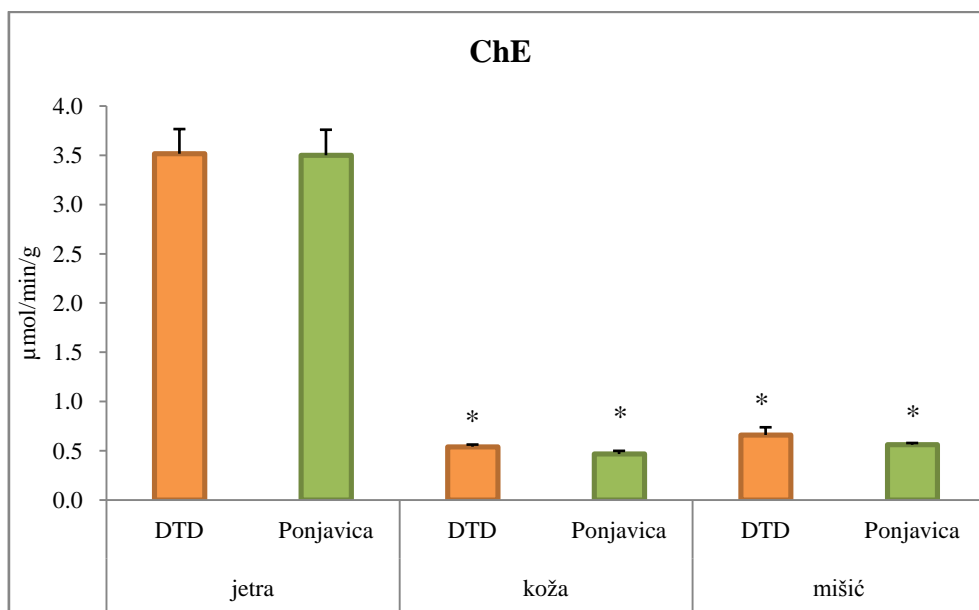
**Grafikon 92.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, i Ponjavica tokom sezone proleće 2013. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



**Grafikon 93.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, i Ponjavica tokom sezone proleće 2013. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljani  $\bar{X} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 10 radi jasnijeg prikaza.



**Grafikon 94.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, i Ponjavica tokom sezone proleće 2013. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra; “+”- mišić.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljani  $\bar{X} \pm SG$ .



**Grafikon 95.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, i Ponjavica tokom sezone proleće 2013. “\*“- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

Vrednosti parametara AOS i aktivnosti holinesteraze tokom proleća 2014. mereni su kod sva tri tkiva vrste *P. esculentus* na lokalitetima DTD, Ponjavica i Obedska Bara. Tabelarni prikaz rezultata za jetru, kožu i mišiće je dat u tabeli 31.

Upoređivanjem parametara AOS i aktivnosti ChE među žabama sa ispitanih lokaliteta za jetru dobijeni su sledeći rezultati: veća aktivnost SOD na lokalitetu Ponjavica nego na DTD (Grafikon 96); najniže vrednosti parametara CAT, GSH-Px, SH i ChE na Obedskoj Bari (Grafikoni 97, 98, 102 i 103); kao i najveća aktivnost GST kod jedinki iz Obedske Bare (Grafikon 100); aktivnost enzima GR bila je veća kod jedinki sa Ponjavice i Obedske Bare u odnosu na jedinke sa kanala DTD (Grafikon 99). Rezultati koji su se odnosili na kožu jedinki sa različitih lokaliteta pokazali su da je najveća aktivnost SOD kod jedinki sa Ponjavice, zatim kod jedinki iz Obedske Bare u odnosu na iste sa DTD (Grafikon 96). Enzimi CAT, GSH-Px, GR i GST su imali najveće aktivnosti u koži jedinki iz Obedske Bare (Grafikoni 97, 98, 99 i 100). Koncentracija GSH i aktivnost ChE bile su najniže kod jedinki sa DTD u odnosu na ostala dva lokaliteta (Grafikoni 101 i 103). Aktivnost SOD i koncentracija GSH bila je najveća u mišićima kod jedinki iz Obedske Bare, takođe isti parametri imali su veću vrednost kod jedinki sa Ponjavice nego kod onih sa kanala DTD (Grafikoni 96 i 101).

Značajno veća aktivnost u mišićima ispitivanih žaba zabeležena je za CAT, GSH-Px, GR i GST kod jedinki sa Ponjavice u poređenju sa ostala dva lokaliteta (Grafikoni 97, 98, 99 i 100). Dalje poređenje između lokaliteta DTD i Obedska Bara za iste enzime pokazalo je veću aktivnost za GSH-Px i GR u koži jedinki iz Obedske bare (Grafikoni 98 i 99). Koncentracija SH grupa bila je najniža u mišićima žaba sa Ponjavice (Grafikon 102), jedinke sa Ponjavice su u mišićima imale i nižu vrednost ChE u poređenju sa istim iz Obedske Bare (Grafikon 103).

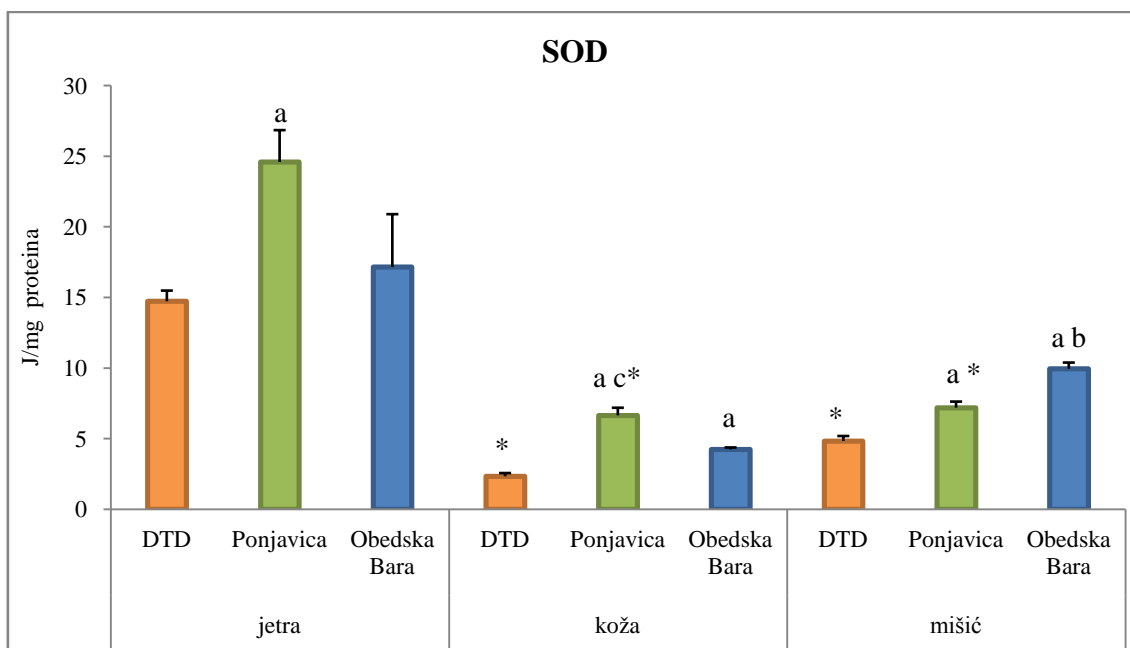
Kanonijska diskriminaciona analiza biomarkera u jetri pokazala je razdvajanje žaba iz Obedske Bare od žaba sa lokaliteta DTD i Ponjavica po prvoj kanonijskoj funkciji koja nosi 68,4 % heterogenosti (Grafikon 104A). Aktivnost enzima GSH-Px i GST je dovela do ovakve slike. Lokaliteti DTD i Ponjavica su se odvojili po drugoj funkciji (31,6 %) i to na osnovu sledećih parametara GR, GST i SH grupe (Grafikon 104A).

Za ispitivane parametre u koži prva funkcija pokazala je 68,9 % od ukupne heterogenosti dok je ostalo uočeno za drugu funkciju (31,1%). Prva funkcija je odvojila jedinke iz Obedske Bare od druga dva lokaliteta i to na osnovu aktivnosti CAT i GSH-Px i koncentracije GSH. Dok su se jedinke sa Ponjavice odvojile od jedinki sa ostalih lokaliteta po drugoj funkciji. Razdvajanju su najviše doprinele vrednosti SOD i ChE (Grafikon 104B).

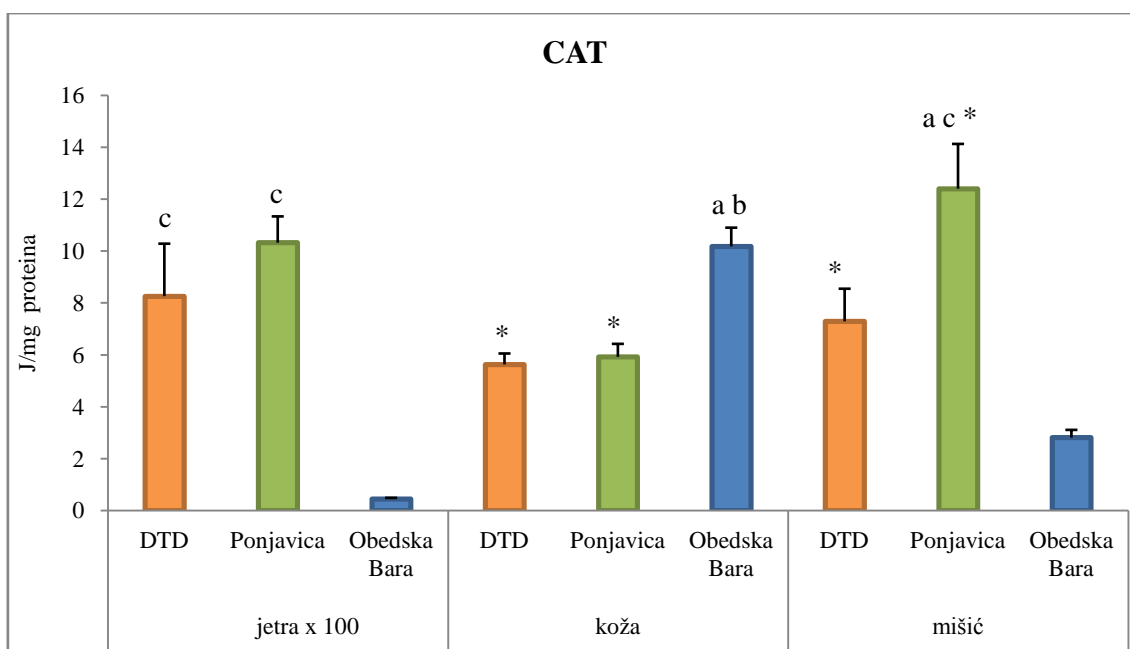
Kanonijska diskriminaciona analiza za mišiće pokazala je isto razdvajanje kao kod parametara u koži. Prva osa nosi 85,8 % heterogenosti i to najviše zbog SOD, GSH-Px i GR. Druga osa (14,2 %), a GR i SH grupe su označeni kao glavni nosioci razdvajanja (Grafikon 104C).

**Tabela 31.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara (sezona proleće 2014. godine).

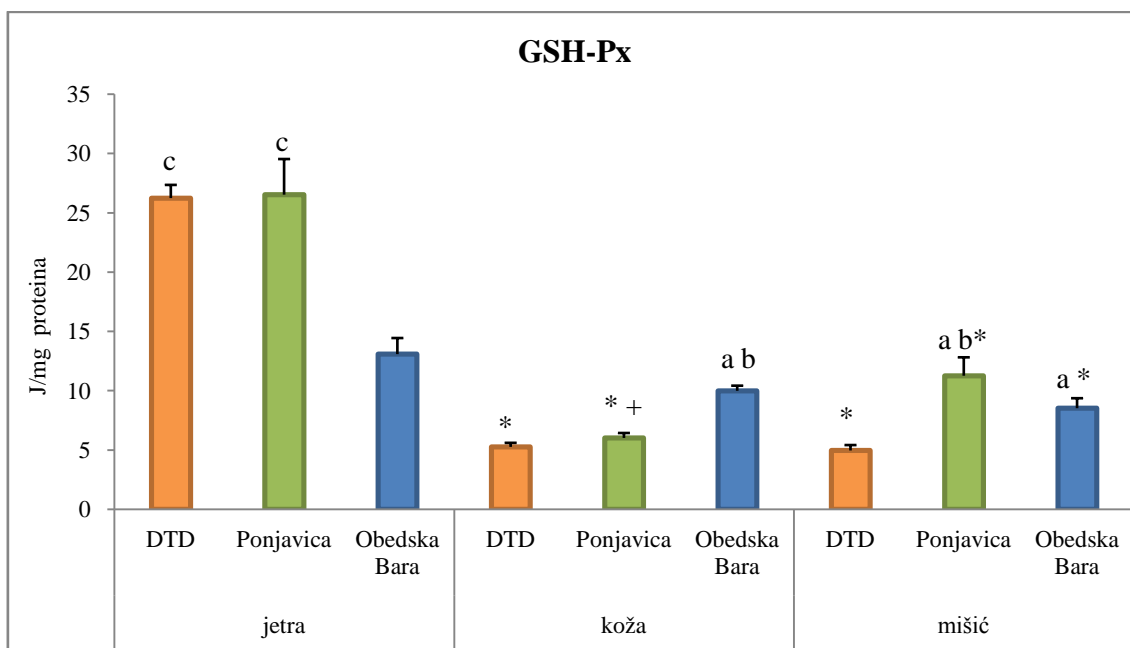
	jetra			koža			mišić		
	DTD	Ponjavica	Obedska Bara	DTD	Ponjavica	Obedska Bara	DTD	Ponjavica	Obedska Bara
SOD	14,7 ± 0,8	24,6 ± 2,2	17,1 ± 3,7	2,33 ± 0,23	6,65 ± 0,53	4,23 ± 0,13	4,83 ± 0,35	7,19 ± 0,43	9,94 ± 0,44
CAT	825,8 ± 202,3	1032,0 ± 101,2	44,0 ± 4,4	5,62 ± 0,42	5,91 ± 0,50	10,17 ± 0,72	7,28 ± 1,25	12,40 ± 2,72	2,80 ± 0,29
GSH-Px	26,23 ± 1,11	26,5 ± 3,0	13,0 ± 1,3	5,25 ± 0,34	6,01 ± 0,41	9,98 ± 0,43	4,95 ± 0,45	11,25 ± 1,55	8,51 ± 0,84
GR	13,9 ± 1,0	26,4 ± 2,2	22,5 ± 2,3	7,01 ± 0,48	7,93 ± 0,61	11,5 ± 1,0	1,28 ± 0,08	3,08 ± 0,38	2,14 ± 0,15
GST	373,5 ± 35,6	389,8 ± 33,3	528,7 ± 48,8	94,0 ± 4,8	96,0 ± 6,8	121,5 ± 8,1	60,8 ± 3,6	98,6 ± 8,9	72,6 ± 3,4
GSH	757,5 ± 52,1	614,6 ± 60,9	616,6 ± 75,0	116,5 ± 12,4	227,5 ± 16,8	187,9 ± 14,4	58,0 ± 6,0	94,3 ± 8,5	152,3 ± 11,2
SH	822,9 ± 3,9	816,8 ± 2,4	800,5 ± 0,8	622,4 ± 21,0	565,7 ± 29,8	572,2 ± 26,3	602,1 ± 12,1	542,7 ± 24,1	645,5 ± 16,0
ChE	3,0 ± 0,2	3,45 ± 0,22	2,06 ± 0,20	0,352 ± 0,019	0,562 ± 0,009	0,633 ± 0,035	0,445 ± 0,05	0,410 ± 0,03	0,585 ± 0,05



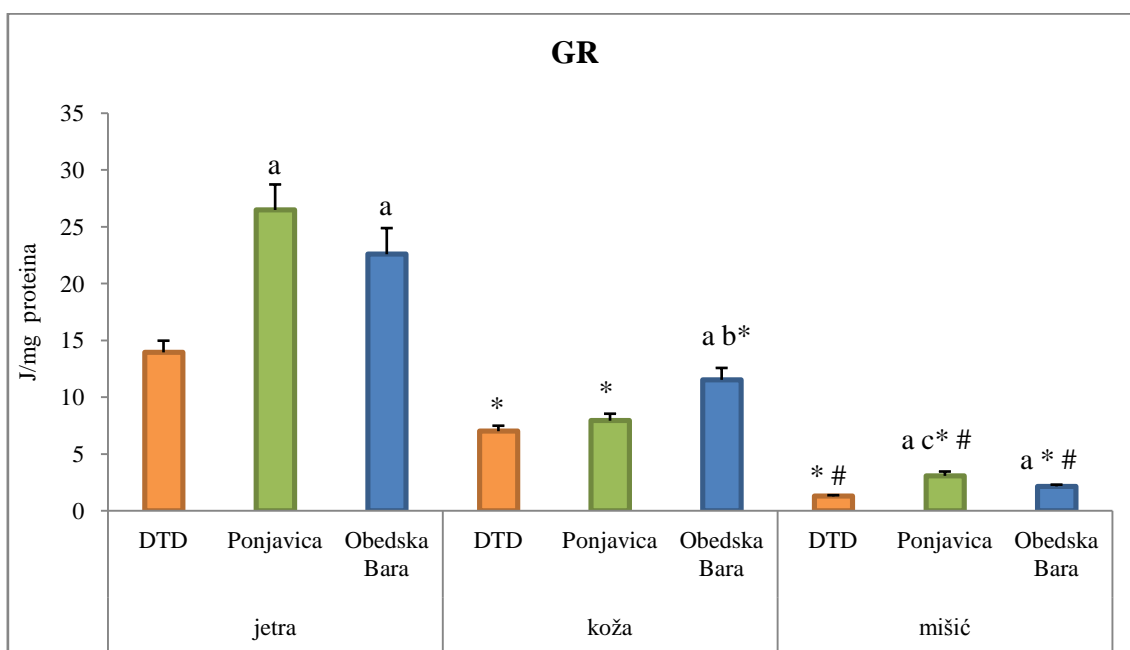
**Grafikon 96.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



**Grafikon 97.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 100 radi jasnijeg prikaza.

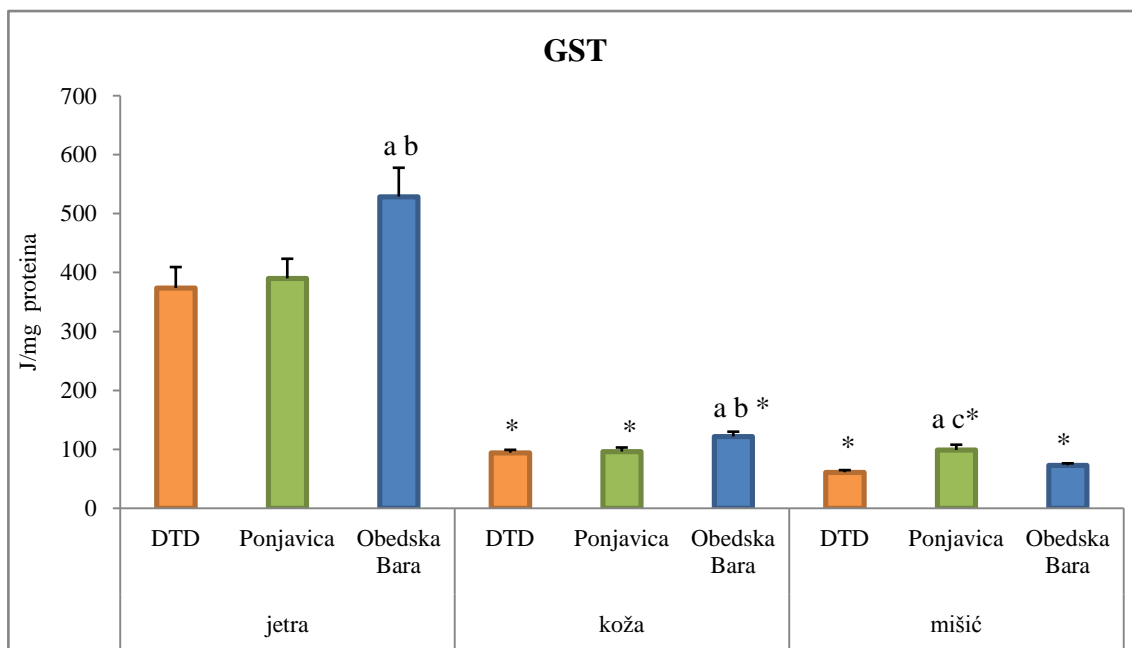


**Grafikon 98.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra; “+”- mišić.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

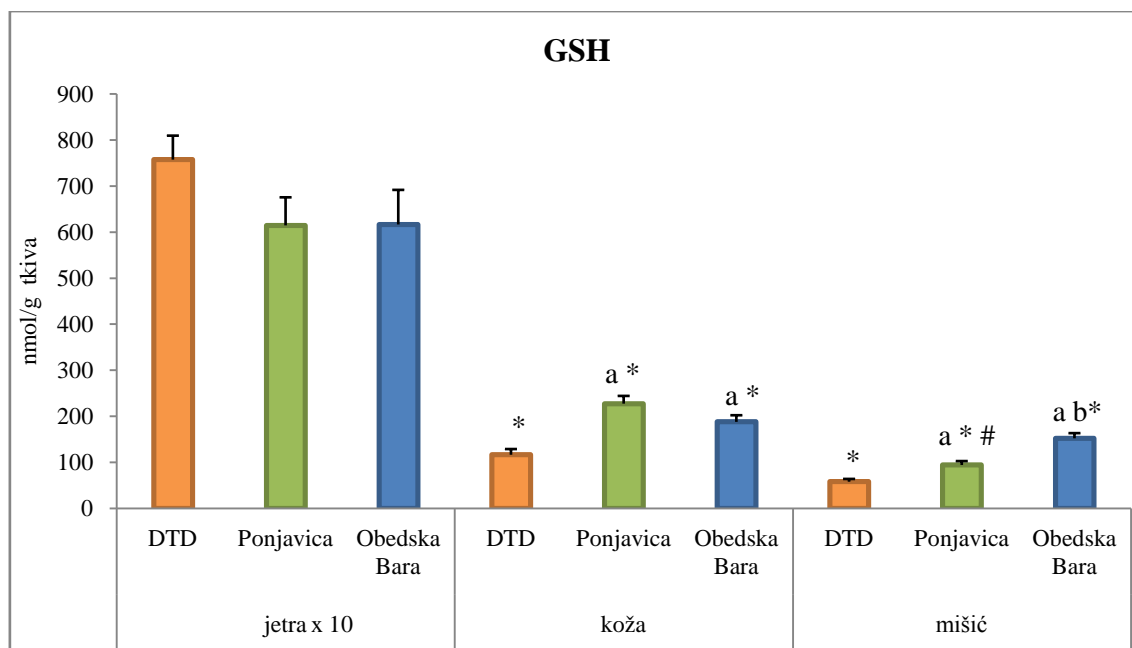


**Grafikon 99.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

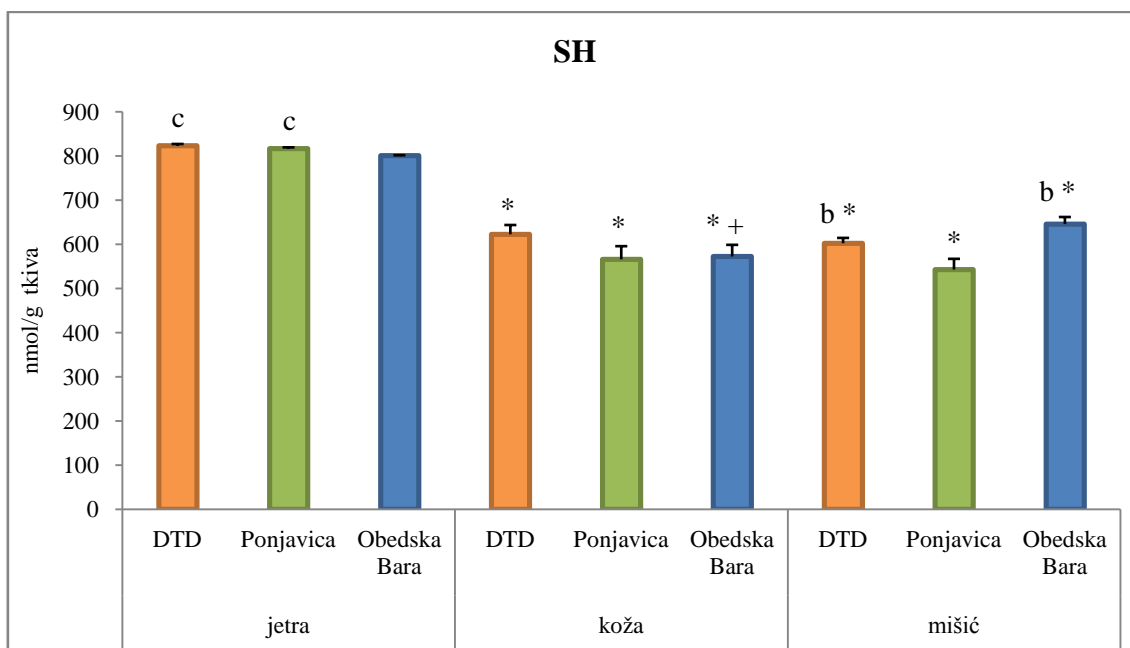




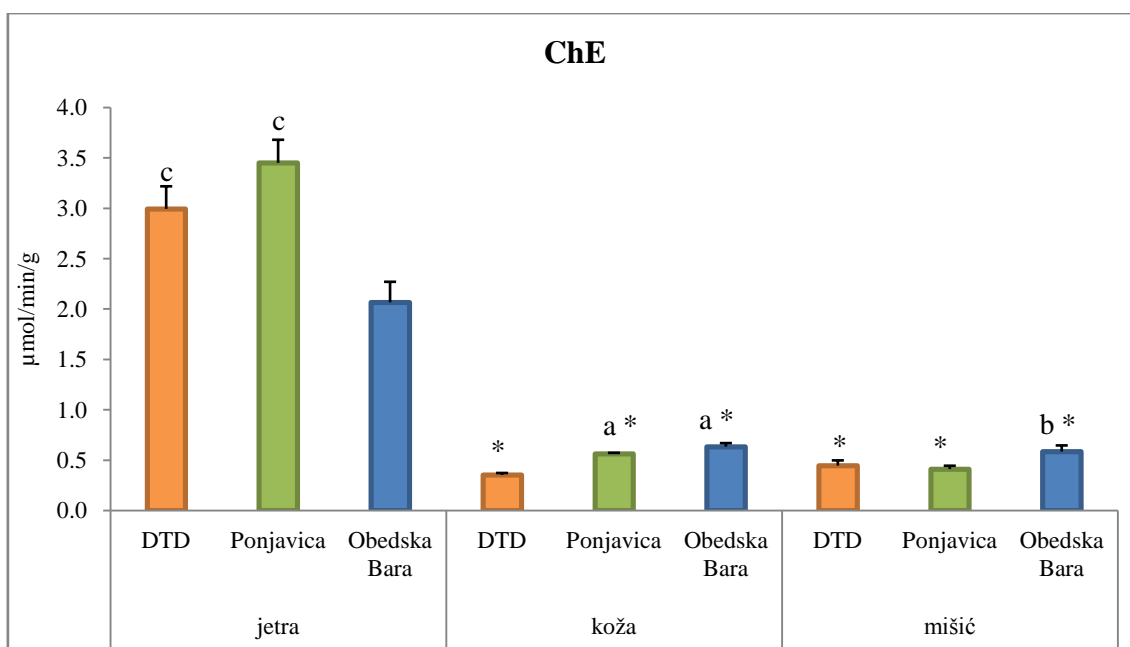
**Grafikon 100.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $X_{sr} \pm SG$ .



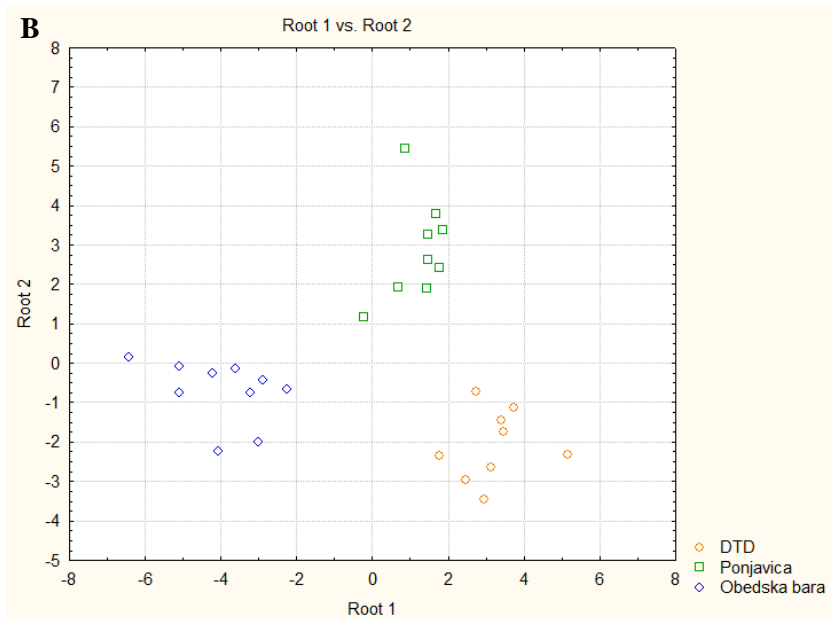
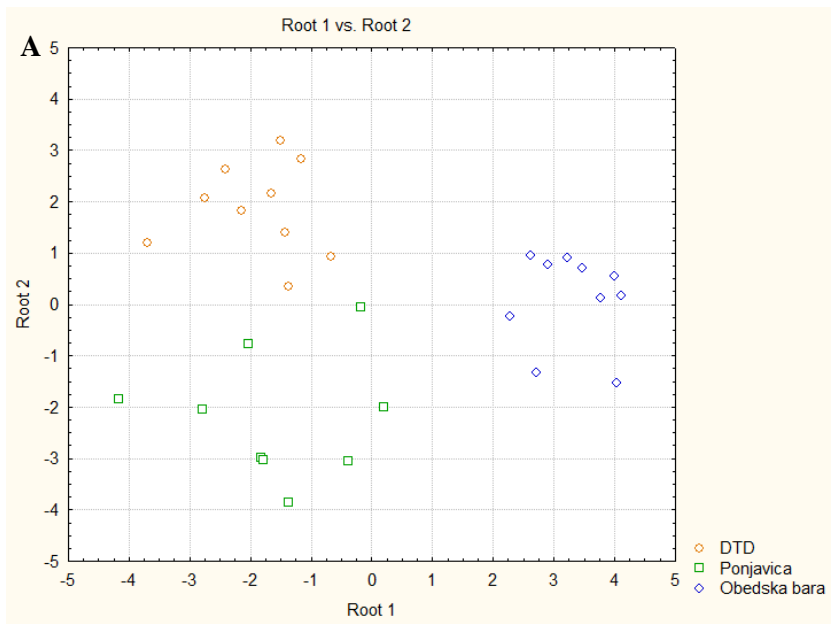
**Grafikon 101.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $X_{sr} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 10 radi jasnijeg prikaza.

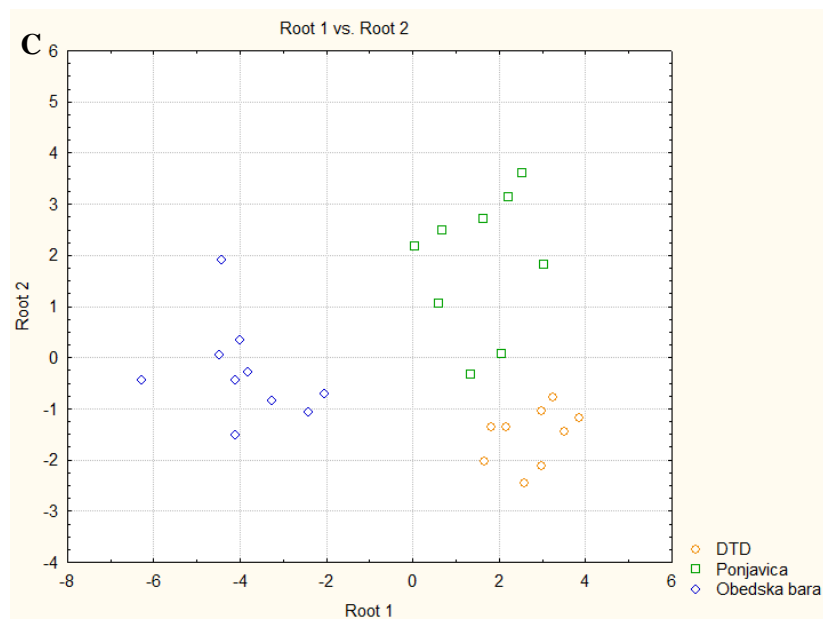


**Grafikon 102.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra; “+”- mišić.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



**Grafikon 103.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara tokom sezone proleće 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “c”- Obedska Bara; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .





**Grafikon 104.** Kanonijska diskriminaciona analiza za parametre AOS i aktivnost holinesteraze A) u jetri, B) u koži i C) u mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD, Ponjavica i Obedska Bara (proleće 2014. godine).

U jesen 2014. godine žabe *P. esculentus* su izlovljene sa lokaliteta DTD i Ponjavica. U njihovim tkivima (jetra, koža i mišić) mereni su parametri AOS i aktivnost holinesteraze (Tabela 32).

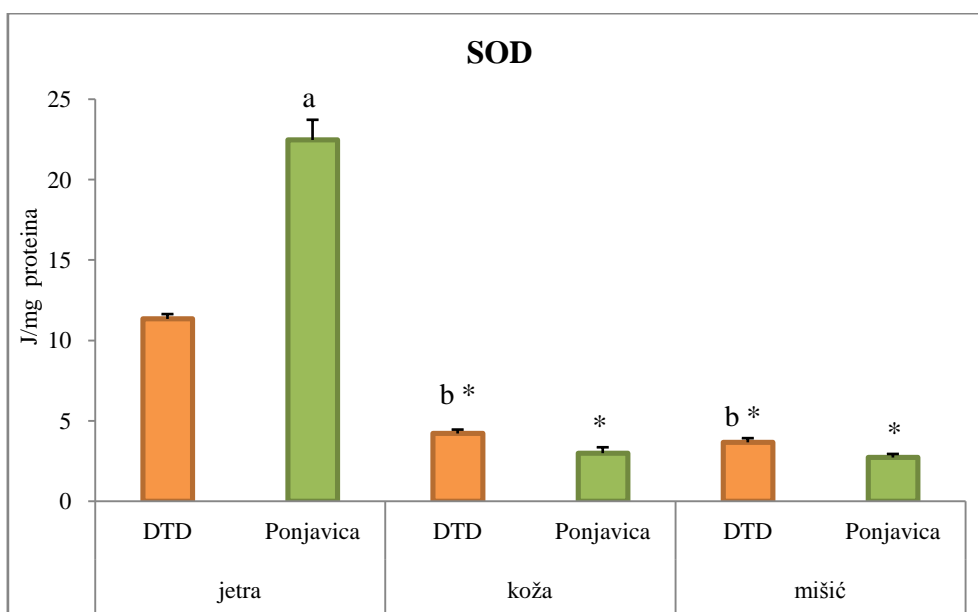
**Tabela 32.** Parametri antioksidacionog sistema, enzima faze II biotransformacije (GST), kao i aktivnost holinesteraze (ChE) u jetri, koži i mišićima jedinki vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica (sezona jesen 2014. godine).

	jetra		koža		mišić	
	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica	DTD	Ponjavica
SOD	11,3 ± 0,3	22,4 ± 1,2	4,21 ± 0,24	2,98 ± 0,36	3,66 ± 0,25	2,71 ± 0,22
CAT	2901,7 ± 290,2	1754,2 ± 152,2	5,9 ± 0,4	6,3 ± 0,9	2,55 ± 0,18	2,08 ± 0,33
GSH-Px	4,9 ± 0,4	25,4 ± 2,0	5,7 ± 0,6	11,5 ± 1,3	4,95 ± 0,45	4,91 ± 0,45
GR	19,2 ± 1,5	8,7 ± 0,6	5,0 ± 0,3	3,3 ± 0,2	0,75 ± 0,11	0,74 ± 0,04
GST	427,5 ± 53,3	285,5 ± 22,8	74,4 ± 4,9	63,8 ± 5,8	60,8 ± 3,6	98,6 ± 7,99
GSH	1038,2 ± 59,6	710,3 ± 62,2	53,7 ± 8,8	49,2 ± 5,4	189,1 ± 16,1	119,8 ± 11,6
SH	341,6 ± 5,1	377,3 ± 24,0	245,1 ± 8,1	249,6 ± 5,5	300,2 ± 2,0	307,0 ± 1,3
ChE	2,90 ± 0,26	1,7 ± 0,1	0,51 ± 0,04	0,45 ± 0,02	0,42 ± 0,03	0,51 ± 0,03

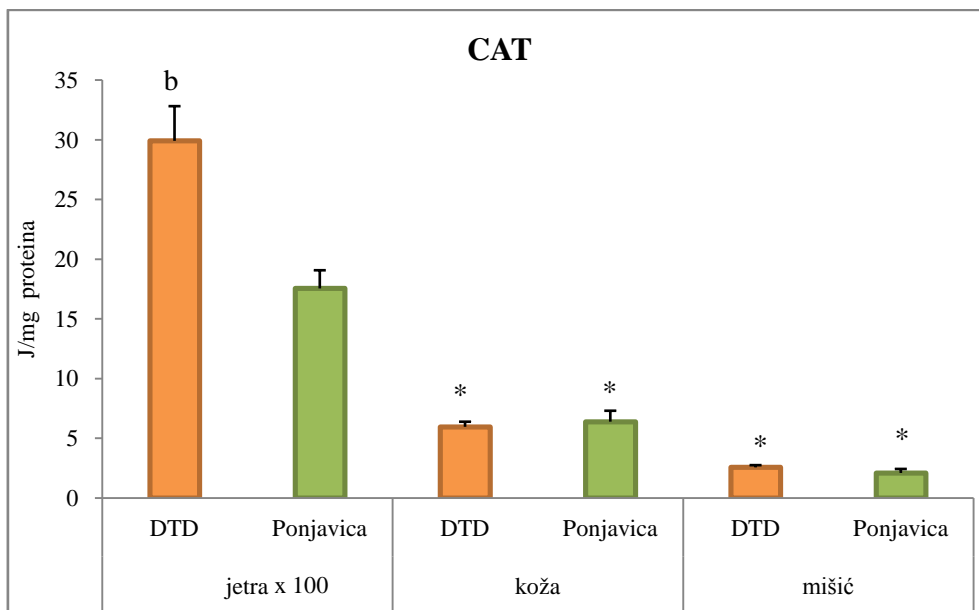
U jetri jedinki sa kanala DTD zabeležene su veće aktivnosti CAT, GR, GST, GSH i ChE (Grafikoni 106, 108, 109, 110 i 112), dok su veće vrednosti dobijene za SOD i GSH-Px u jetri jedinki sa Ponjavice (Grafikoni 105 i 107). U koži su veće

aktivnosti SOD i GR bile u jedinkama sa DTD (Grafikoni 105 i 108), dok je GSH-Px imao veću aktivnost u jedinkama sa Ponjavice (Grafikon 107). Aktivnost SOD bila je veća u mišićima jedinki sa kanala DTD (Grafikon 105), a isto je uočeno i za koncentraciju GSH (Grafikon 110), dok je aktivnost GST i koncentracija SH grupa bila veća kod žaba sa Ponjavice (Grafikoni 109 i 111).

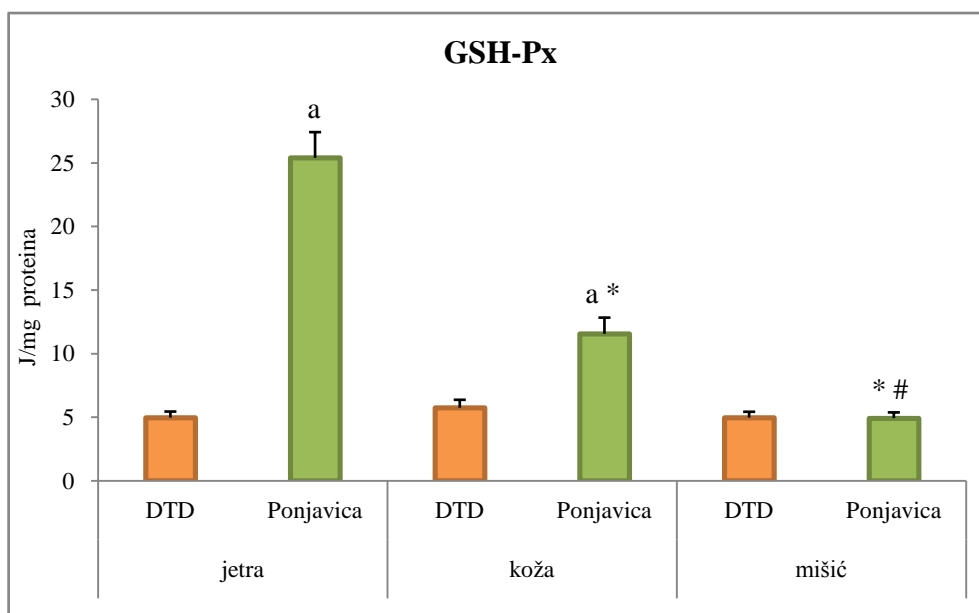
Jetra je imala veću vrednost merenih parametara u odnosu na kožu i mišiće za SOD, CAT, GR, GST, SH grupe i ChE (Grafikoni 105, 106, 108, 109, 111 i 112). Koža je imala veću aktivnost GR u odnosu na mišiće (Grafikon 108), dok su mišići imali veću koncentraciju SH grupa (Grafikon 111).



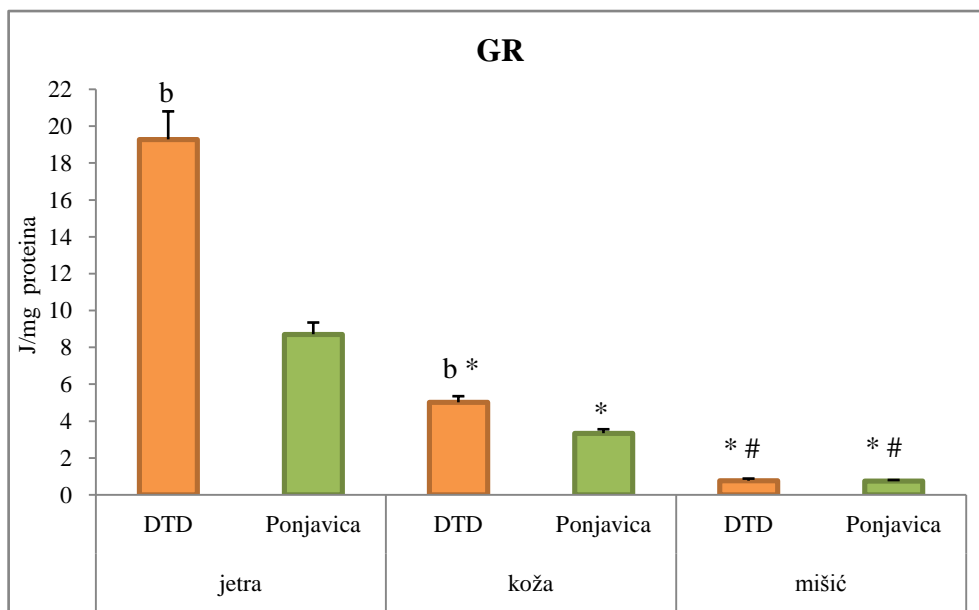
**Grafikon 105.** Aktivnost SOD u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. "a"- DTD; "b"- Ponjavica; "\*" - jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



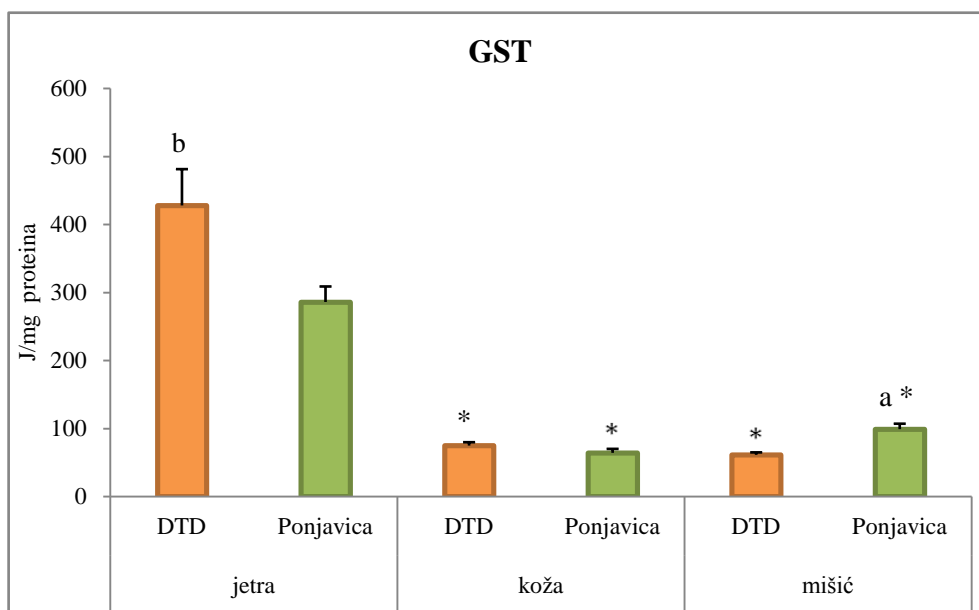
**Grafikon 106.** Aktivnost CAT u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ . Napomena: vrednosti za jetru su podeljene sa 100 radi jasnijeg prikaza.



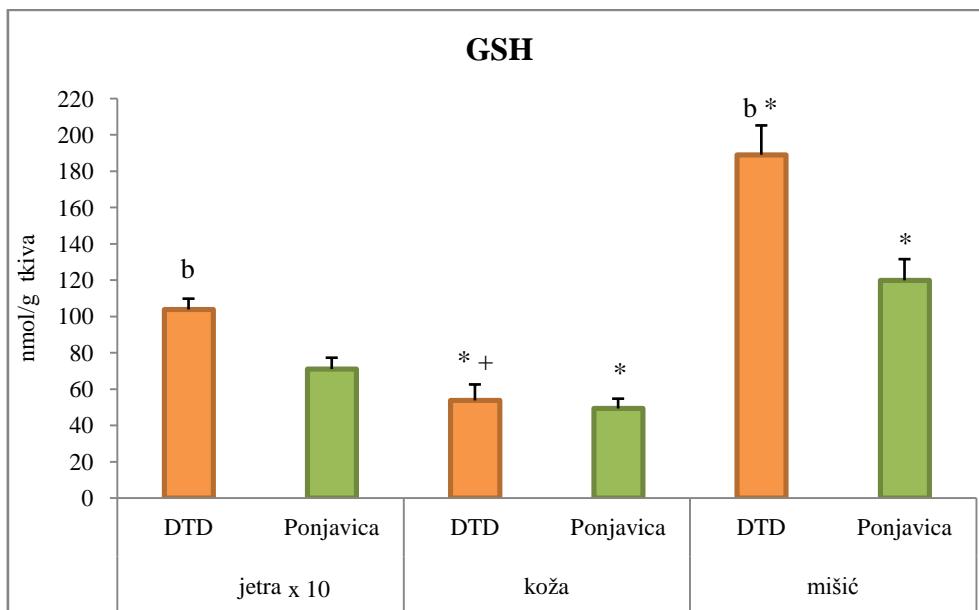
**Grafikon 107.** Aktivnost GSH-Px u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



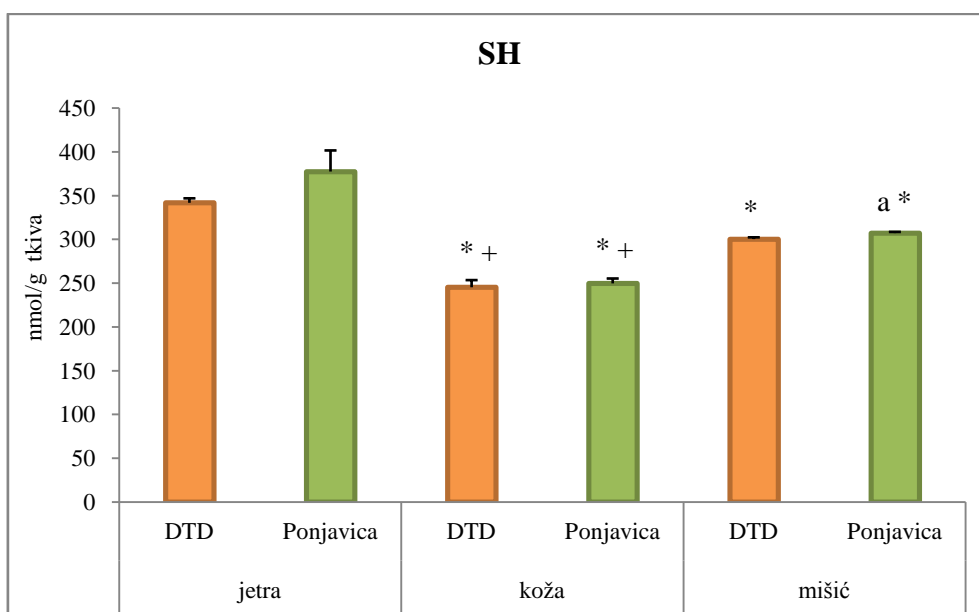
**Grafikon 108.** Aktivnost GR u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .



**Grafikon 109.** Aktivnost GST u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra; “#”- koža.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

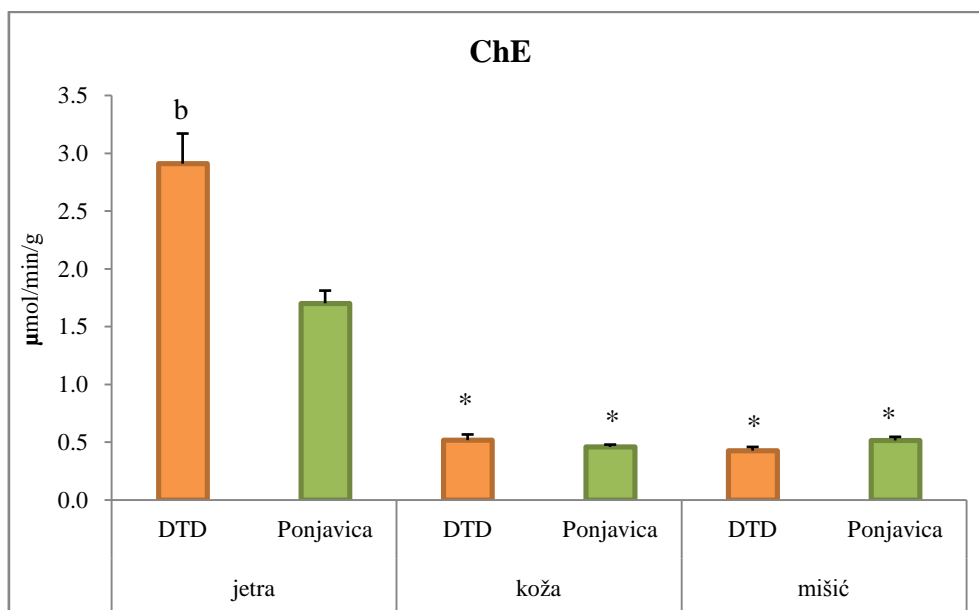


**Grafikon 110.** Koncentracija GSH u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra; “+”- mišić.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ . Napomena vrednosti za jetru su podeljene sa 10 radi jasnijeg prikaza.



**Grafikon 111.** Koncentracija SH grupa u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra; “+”- mišić.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .





**Grafikon 112.** Aktivnost ChE u jetri, koži i mišićima vrste *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Ponjavica tokom sezone jesen 2014. “a”- DTD; “b”- Ponjavica; “\*”- jetra.  $p < 0,05$  kriterijum za statistički značajnu razliku. Rezultati su predstavljeni  $\bar{X} \pm SG$ .

#### 4.4.3. Odnos između parametara AOS, holinesteraze i koncentracije metala

Radi utvrđivanja odnosa biomarkera i metala izračunate su Pirsonove korelacije, a značajne korelacije za svaku vrstu *P. esculentus* kompleksa prikazane su u tabelama 33, 34 i 35.

Pirsonove korelacije i linerana regresija su pokazale korelacije u jedinkama *P. ridibundus* za jetru, kožu i mišiće (Tabela 33). Pozitivne korelacije u jetri su uočene između SOD-Fe; CAT-Cr i Ni; GR-Co; GSH-Fe i Mn; SH-Hg i ChE-Ni, dok su negativne korelacije bile prisutne između sledećih parametara i metala: CAT-Hg i Al; GSH-Px-Al; GR-Cr, Cu i Mn; GST-Ni; GSH-Hg; SH-Cr i Ni; ChE-Co i Hg. Koža je pokazala pozitivne korelacije samo između SH grupa i Al i Zn. Negativne korelacije su pokazane između SOD i metala Cd, Mn, Zn i As; CAT i Zn i As; GSH-Px i Al; GR i Cd, Mn i As; GST i Cd, Zn, As; koncentracija GSH i Cd, As i Pb. U mišićima, pozitivno su korelirali SOD-Ni i Hg, GSH-Px-Ni i Hg, GR-Ni kao i SH-Cd. Negativne korelacije u mišićima su bile za SOD i Mn; CAT i Mn; GSH-Px i Fe i Mn; GR i Fe i Mn; SH i Mn; ChE i As i Hg.

Korelacije između biomarkera i metala u tkivima vrste *P. esculentus* predstavljene su u tabeli 34. Za jetru su bile karakteristične sledeće pozitivne korelacije: GSH-Px sa metalima Co, Cu i Mn; SH grupe sa Hg; ChE sa Al, Cr, Cu, Fe, Zn i Mn. Negativne korelacije zabeležene su između CAT-Hg i Ni; GST-Cr, Cu, Fe, Mn; SH-Al, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn. U koži žaba *P. esculentus* prisutne su pozitivne i negativne korelacije ispitivanih parametara sa koncentracijama metala, od pozitivnih to su SOD-Fe; GSH-Al, Cr, Fe, Hg, Ni; SH-Al, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni i Pb dok su negativne između SOD-Cd i Cu; GSH-Px-Cr, Cu, Hg, Mn, Ni; GST-Cu i Hg. Parametri AOS i holinesteraza su u mišićima pozitivno korelirali sa koncentracijama metala, jedina negativna korelacija bila je između GSH i Mn. Pozitivne korelacije su bile između SOD-Cr, Fe, Mn, Ni; CAT i GR su korelirali sa istim metalima Cd, Cr, Cu, Hg, Mn i Ni; GSH-Px-Cd, Fe i Ni; GST-Cd i Hg; SH-Cr, Hg i Ni.

Kod vrste *P. lessonae* statistički značajne korelacije date su u tabeli 35. Za jetru su uočene sledeće pozitivne korelacije SOD i Zn; CAT i As, Cd i Fe; GSH-Px i As, dok su negativne korelacije bile između GSH i Fe kao i SH i Ni. U koži je zabeležen veći broj korelacija nego u jetri, od pozitivnih korelacija to su: GSH-Px-Zn; GR-Al i Zn; GST-Al; GSH-Al, SH-Al i Zn; ChE-Al i Zn. Negativna korelacija prisutna je za GR i Cd; GSH i Cd; SH i ChE i As i Cd. U mišićima su uočene samo pozitivne korelacije i to za Al sa SOD, CAT, GR, GST i SH. SH grupe su pozitivno korelirale i sa Cd.

**Tabela 33.** Pirsonove korelacije između parametara AOS, holinesteraze i koncentracije akumuliranih metala u tkivima jetre, kože i mišića vrste *P. ridibundus*. B- biomarker, M- metal, r- stepen korelacije, *p*- statistička značajnost. Debljim slovima su označene negativne korelacije.

<i>Pelophylax ridibundus</i>											
jetra				koža				mišić			
<b>B</b>	<b>M</b>	<b>r</b>	<b>p</b>	<b>B</b>	<b>M</b>	<b>r</b>	<b>p</b>	<b>B</b>	<b>M</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
SOD	Fe	0,57	0,00006	<b>SOD</b>	<b>Cd</b>	<b>-0,48</b>	<b>0,000008</b>	<b>SOD</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,36</b>	<b>0,001105</b>
CAT	Cr	0,45	0,00268	<b>SOD</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,40</b>	<b>0,000276</b>	SOD	Ni	0,29	0,009386
<b>CAT</b>	<b>Hg</b>	<b>-0,59</b>	<b>0,00268</b>	<b>SOD</b>	<b>Zn</b>	<b>-0,34</b>	<b>0,002204</b>	SOD	Hg	0,44	0,000154
CAT	Ni	0,44	0,00332	<b>SOD</b>	<b>As</b>	<b>-0,54</b>	<b>0,000315</b>	<b>CAT</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,39</b>	<b>0,000352</b>
<b>GSH-Px</b>	<b>Al</b>	<b>-0,40</b>	<b>0,00757</b>	<b>CAT</b>	<b>Zn</b>	<b>-0,37</b>	<b>0,000927</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>Fe</b>	<b>-0,23</b>	<b>0,043952</b>
GR	Co	0,45	0,00235	<b>CAT</b>	<b>As</b>	<b>-0,44</b>	<b>0,004456</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,29</b>	<b>0,009743</b>
<b>GR</b>	<b>Cr</b>	<b>-0,48</b>	<b>0,00114</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>Al</b>	<b>-0,46</b>	<b>0,000032</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>Ni</b>	0,32	0,004299
<b>GR</b>	<b>Cu</b>	<b>-0,44</b>	<b>0,00326</b>	<b>GR</b>	<b>Cd</b>	<b>-0,47</b>	<b>0,000019</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>Hg</b>	0,41	0,000400
<b>GR</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,46</b>	<b>0,00178</b>	<b>GR</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,32</b>	<b>0,005058</b>	<b>GR</b>	<b>Fe</b>	<b>-0,29</b>	<b>0,009172</b>
<b>GST</b>	<b>Ni</b>	<b>-0,39</b>	<b>0,00882</b>	<b>GR</b>	<b>As</b>	<b>-0,51</b>	<b>0,000752</b>	<b>GR</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,39</b>	<b>0,000407</b>
GSH	Fe	0,45	0,00265	<b>GST</b>	<b>Cd</b>	<b>-0,33</b>	<b>0,003322</b>	GR	Ni	0,33	0,002966
<b>GSH</b>	<b>Hg</b>	<b>-0,41</b>	<b>0,00673</b>	<b>GST</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,30</b>	<b>0,007214</b>	<b>SH</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,34</b>	<b>0,002260</b>
GSH	Mn	0,44	0,00342	<b>GST</b>	<b>Zn</b>	<b>-0,32</b>	<b>0,004491</b>	SH	Cd	0,43	0,002988
<b>SH</b>	<b>Cr</b>	<b>-0,52</b>	<b>0,00030</b>	<b>GST</b>	<b>As</b>	<b>-0,55</b>	<b>0,000209</b>	<b>ChE</b>	<b>As</b>	<b>-0,39</b>	<b>0,005238</b>
SH	Hg	0,39	0,01074	<b>GSH</b>	<b>Cd</b>	<b>-0,46</b>	<b>0,000031</b>	<b>ChE</b>	<b>Hg</b>	<b>-0,33</b>	<b>0,005549</b>
<b>SH</b>	<b>Ni</b>	<b>-0,56</b>	<b>0,00010</b>	<b>GSH</b>	<b>As</b>	<b>-0,51</b>	<b>0,000852</b>				
<b>ChE</b>	<b>Co</b>	<b>-0,47</b>	<b>0,00162</b>	<b>GSH</b>	<b>Pb</b>	<b>-0,35</b>	<b>0,006761</b>				
<b>ChE</b>	<b>Hg</b>	<b>-0,59</b>	<b>0,00003</b>	SH	Al	0,48	0,000009				
ChE	Ni	0,55	0,00012	<b>SH</b>	<b>Zn</b>	<b>0,35</b>	<b>0,002055</b>				

**Tabela 34.** Pirsonove korelacije između parametara AOS, holinesteraze i koncentracije akumuliranih metala u tkivima jetre, kože i mišića vrste *P. esculentus*. B- biomarker, M- metal, r- stepen korelacije, *p*- statistička značajnost. Debljim slovima su označene negativne korelacije.

<i>Pelophylax esculentus</i>											
jetra				koža				mišić			
B	M	r	<i>p</i>	B	M	r	<i>p</i>	B	M	r	<i>p</i>
CAT	Hg	<b>-0,59</b>	<b>0,000079</b>	SOD	Cd	<b>-0,51</b>	<b>0,000012</b>	SOD	Cr	0,46	0,000307
CAT	Ni	<b>-0,57</b>	<b>0,000134</b>	SOD	Cu	<b>-0,35</b>	<b>0,004095</b>	SOD	Fe	0,56	0,000005
GSH-Px	Co	0,54	0,000364	SOD	Fe	0,35	0,003302	SOD	Mn	0,69	0,000000
GSH-Px	Cu	0,46	0,003398	<b>GSH-Px</b>	<b>Cr</b>	<b>-0,34</b>	<b>0,004602</b>	SOD	Ni	0,49	0,000091
GSH-Px	Mn	0,50	0,005273	<b>GSH-Px</b>	<b>Cu</b>	<b>-0,31</b>	<b>0,010940</b>	CAT	Cd	0,51	0,000060
<b>GST</b>	<b>Cr</b>	<b>-0,42</b>	<b>0,007050</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>Hg</b>	<b>-0,39</b>	<b>0,000981</b>	CAT	Cr	0,64	0,000000
<b>GST</b>	<b>Cu</b>	<b>-0,59</b>	<b>0,000077</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,36</b>	<b>0,002405</b>	CAT	Cu	0,34	0,009608
<b>GST</b>	<b>Fe</b>	<b>-0,50</b>	<b>0,001314</b>	<b>GSH-Px</b>	<b>Ni</b>	<b>-0,29</b>	<b>0,017734</b>	CAT	Hg	0,34	0,009949
<b>GST</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,59</b>	<b>0,000823</b>	<b>GST</b>	<b>Cu</b>	<b>-0,31</b>	<b>0,011853</b>	CAT	Mn	0,50	0,000069
<b>SH</b>	<b>Al</b>	<b>-0,54</b>	<b>0,000405</b>	<b>GST</b>	<b>Hg</b>	<b>-0,32</b>	<b>0,007435</b>	CAT	Ni	0,67	0,000000
<b>SH</b>	<b>Cr</b>	<b>-0,63</b>	<b>0,000019</b>	GSH	Al	0,40	0,000772	GSH-Px	Cd	0,44	0,000594
<b>SH</b>	<b>Cu</b>	<b>-0,69</b>	<b>0,000001</b>	GSH	Cr	0,38	0,001646	GSH-Px	Fe	0,43	0,000815
<b>SH</b>	<b>Fe</b>	<b>-0,69</b>	<b>0,000001</b>	GSH	Fe	0,37	0,001923	GSH-Px	NI	0,45	0,000426
SH	Hg	0,55	0,000256	GSH	Hg	0,32	0,009243	GR	Cd	0,38	0,003575
<b>SH</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,93</b>	<b>0,000000</b>	GSH	Ni	0,42	0,000371	GR	Cr	0,44	0,000651
ChE	Al	0,59	0,000089	SH	Al	0,42	0,000478	GR	Fe	0,48	0,000149
ChE	Cr	0,64	0,000010	SH	Cd	0,40	0,000866	GR	Hg	0,35	0,007049
ChE	Cu	0,49	0,001367	SH	Cr	0,51	0,000012	GR	Mn	0,50	0,000089
ChE	Fe	0,46	0,003606	SH	Cu	0,45	0,000161	GR	Ni	0,64	0,000000
ChE	Zn	0,49	0,001358	SH	Hg	0,58	0,000000	GST	Cd	0,34	0,009857
ChE	Mn	0,55	0,001962	SH	Ni	0,55	0,000001	GST	Hg	0,48	0,000161
				SH	Pb	0,48	0,000293	<b>GSH</b>	<b>Mn</b>	<b>-0,43</b>	<b>0,000939</b>
								SH	Cr	0,50	0,000086
								SH	Hg	0,45	0,000430
								SH	Ni	0,49	0,000120

**Tabela 35.** Pirsonove korelacije između parametara AOS, holinesteraze i koncentracije akumuliranih metala u tkivima jetre, kože i mišića vrste *P. lessonae*. B- biomarker, M- metal, r- stepen korelacije, *p*- statistička značajnost. Debljim slovima su označene negativne korelacije.

<i>Pelophylax lessonae</i>											
jetra				koža				mišić			
B	M	r	<i>p</i>	B	M	r	<i>p</i>	B	M	r	<i>p</i>
SOD	Zn	0,72	0,018513	GSH-Px	Zn	0,62	0,012775	SOD	Al	0,70	0,005430
CAT	As	0,81	0,004261	GR	Al	0,74	0,001609	CAT	Al	0,87	0,000063
CAT	Cd	0,80	0,005656	<b>GR</b>	<b>Cd</b>	<b>-0,72</b>	<b>0,002240</b>	GR	Al	0,87	0,000053
CAT	Fe	0,77	0,009523	GR	Zn	0,61	0,015444	GST	Al	0,80	0,000648
GSH-Px	As	0,75	0,012010	GST	Al	0,66	0,007707	SH	Al	0,82	0,000342
<b>GSH</b>	<b>Fe</b>	<b>-0,78</b>	<b>0,007398</b>	GSH	Al	0,80	0,000381	SH	Cd	0,76	0,017607
<b>SH</b>	<b>Ni</b>	<b>-0,85</b>	<b>0,014577</b>	<b>GSH</b>	<b>Cd</b>	<b>-0,74</b>	<b>0,001650</b>				
				SH	Al	0,86	0,000034				
				<b>SH</b>	<b>As</b>	<b>-0,74</b>	<b>0,001493</b>				
				<b>SH</b>	<b>Cd</b>	<b>-0,83</b>	<b>0,000118</b>				
				SH	Zn	0,67	0,006658				
				ChE	Al	0,72	0,002381				
				<b>ChE</b>	<b>As</b>	<b>-0,65</b>	<b>0,008403</b>				
				<b>ChE</b>	<b>Cd</b>	<b>-0,64</b>	<b>0,010317</b>				
				ChE	Zn	0,69	0,004477				

## 5. Diskusija

*Pelophylax esculentus* kompleks čine roditeljske vrste *P. ridibundus* i *P. lessonae* i njihov hibrid *P. kl. esculentus*. Vrste iz ovog kompleksa zanimljive su sa genetičkog aspekta i veliki broj studija posvećen je proučavanju genetičke strukture i distribucije populacija ovih žaba. Danas su sve brojnije i ekološke i fiziološke studije, posvećene ispitivanju razlika u preferenciji staništa i pojedinačnih spoljašnjih faktora, kao i razlikama u hibernaciji i metabolizmu. Ekološke studije pokazuju da je ovaj kompleks široko zastupljen po celoj Evropi. Na najvećem broju lokaliteta možemo govoriti o populacijama sastavljenim samo od jedne od roditeljskih vrsta i hibrida, odnosno o *P. ridibundus- esculentus* (RE) ili *P. lessonae- esculentus* (LE) populacijama, dok su lokaliteti na kojima su prisutne sve tri vrste relativno retki (RLE) (Berger, 1990; Borkin i sar., 2002).

Prvi deo ove doktorske disertacije bavi se ispitivanjem potencijalnih razlika u koncentracijama akumuliranih metala i parametrima antioksidacionog sistema i holinesteraze između vrsta *P. esculentus* kompleksa. Drugi deo se odnosi na ispitivanje akumulacije metala i promene AOS parametara i holinesteraze u tkivima svake vrste pojedinačno, u zavisnosti od lokaliteta (stepena zagađenja). U ovom delu analizirane su veze između akumuliranih metala i ovih parametara, kako bi se odredile posledice hroničnog izlaganja metalima.

### 5.1. Razlike između vrsta *Pelophylax esculentus* kompleksa

Sveprisutnost hibridne vrste na arealima obe roditeljske vrste navelo je mnoge naučnike na pretpostavku da je hibrid *P. kl. esculentus* na neki način otporniji od svojih roditelja, odnosno na hipotezu o heterozigotnoj superiornosti (eng. *general purpose genotypes- heterozygote superiority*). Ova hipoteza se zasniva na heterotičkom efektu-pozitivnom heterozisu po kojem je potomak (hibrid) bolji od svojih roditelja za neku osobinu (ima veću fenotipsku plastičnost) (Van Doninck i sar., 2002; Voituron i sar., 2005). Veća fenotipska plastičnost hibrida čini ga prilagodljivijim na promene u sredini. Hibrid može da produkuje više različitih fenotipova i na taj način se bolje uklopi u spektar različitih sredina (Scheiner, 1993). Ispitujući ovu hipotezu, različite studije su

pokazale da je *P. esculentus* vrsta zaista superiornija od roditelja i to kada su u pitanju vijabilnost i fekunditet (Hotz i sar., 1999). Takođe, hibrid pokazuje veću tolerantnost na promene u spoljašnjoj sredini kao što su variranje koncentracije kiseonika u vodi (Boutilier i sar. 1992), isušivanje staništa, ograničen izvor hrane i interspecijska kompeticija (Semlitsch i sar., 1997). *P. kl. esculentus* je manje osetljiva na prisustvo pesticida trifenitina u vodi (Fioramonti i sar., 1997).

Nasuprot hipotezi o superiornosti hibrida, jedan deo naučnika smatra da je uspeh hibrida zasnovan na intermedijernosti, odnosno da je hibrid po osobinama između roditeljskih vrsta (Rist i sar., 1997; Plenet i sar., 2000a, 2000b). Prema hipotezi o intermedijernosti u nišama, koju je postavio Moor (1984), hibridi zauzimaju nišu koja je između roditelja i na taj način izbegavaju direktnu kompeticiju, a sa druge strane mogu da budu prisutni i u roditeljskim nišama. Intermedijernost je prisutna u rastu punoglavaca, u veličini tela adultnih žaba, kao i u tolerantnosti na niske temperature i hipoksiju (Rist i sar., 1997; Plenet i sar., 2000a, 2000b). Plenet i sar. (2000a) kao i Voituron i sar. (2005) ispitivali su otpornost ovih vrsta na zamrzavanje i anoksiju, pri čemu su pokazali da je hibrid *P. esculentus* po ispitivanim karakteristikama između roditelja. *P. lessonae* je bila najosetljivija na hipoksične uslove, ali je zato najtolerantnija na smrzavanje, dok je za *P. ridibundus* zabeležen suprotan obrazac. Ovakve fiziološke prilagođenosti povezane su sa izborom staništa i navikama za prezimljavanje (hibernaciju), pa zbog toga *P. lessonae* uvek hibernira na kopnu, dok je *P. ridibundus* uvek u vodi. *P. esculentus* pokazuje intermedijernost i u zavisnosti od spoljašnjih uslova može da prezimi ili na kopnu ili u vodi.

### **5.1.1. Razlike u bioakumulaciji vrsta *P. esculentus* kompleksa**

Kod semiakvatičnih žaba kojima pripadaju i vrste *P. esculentus* kompleksa postoje dva glavna načina unosa metala. Prvi način unosa je preko kože, i podrazumeva usvajanje metala iz vode. Drugi način unosa je putem ishrane, odnosno gastrointestinalnim sistemom (Papadimitriou i Loumbourdis, 2002). Žabe najveći deo dana provode u vodi, a preko polupropustljive kože vrše razmenu gasova, jona i usvajaju potrebnu vodu. Ono što bi moglo da dovede do razlika u bioakumulaciji metala između ovih vrsta su razlike u hibernaciji. Kao što je već pomenuto, *P. lessonae*

hibernira na kopnu, *P. ridibundus* u vodi, a *P. esculentus* pokazuje oba obrazca. Hibernacija kod žaba počinje kada temperatura u spoljašnjoj sredini određeni period bude ispod +6 °C. U našim krajevima period hibernacije počinje od početka novembra i traje do marta (Krizmanić i Ivanović, 2010). Iako je tokom hibernacije metabolizam sveden na minimum, ipak je period od 4 meseca sasvim dovoljan da utiče na razlike u akumulaciji metala. Fagotti i sar. (2005) su uočili da je glavni razlog za razlike u koncentraciji akumuliranih organohlorinih pesticida između *P. esculentus* i *P. lessonae* posledica navika povezanih sa hibernacijom i nekim dnevnim aktivnostima. Jedinke *P. esculentus* su imale veće koncentracije pesticida u mozgu, jetri i ovarijumima u odnosu na ista tkiva kod jedinki *P. lessonae*. Takođe, autori su uočili da je *P. lessonae* tokom leta više vremena provodila van vode.

Akumulacija metala može da se poveže i sa tipom ishrane (Loumbourdis i Wray, 1998). Žabe *P. esculentus* kompleksa hrane se različitim vrstama invertebrata, pa metali mogu i kroz lanac ishrane da dospeju u njihov organizam. Veličina tela kao i taktika lova uslovljava i razlike u izboru plena svake od vrsta iz ovog kompleksa. Paunović i sar. (2010) analizirali su diverzitet plena vrsta iz *P. esculentus* kompleksa sa lokaliteta Petrovaradinski rit. Njihovi rezultati su pokazali da su kod vrste *P. ridibundus* primaran plen vrste iz reda Coleoptera, zatim vrste Diptera i Gastropoda. Kod *P. lessonae* to su bile vrste Gastropoda, onda Coleoptera i Hymenoptera. Za ishranu žaba *P. esculentus* karakterističan je plen iz grupe Coleoptera, zatim Gastropoda i Aranea. Većina vrsta kojima se hrane žabe ovog kompleksa pripadaju terestričnim invertebratama, a manji procenat su akvatične vrste. Na taj način ove žabe su uključene u oba trofička sistema (terestrični i akvatični) (Mollov i sar., 2010). Drugačiji načini ishrane mogu da dovedu do različitog stepena akumulacije metala u tkivima, jer se i same grupe plena odlikuju razlikama u koncentraciji nekih metala. Pored gore pomenutih mogućih razloga za razlike u akumulaciji metala, treba uzeti u obzir i još jedan ništa manje bitan a to je veličina tela (Wang i sar., 1997). Prema ovim razlikama *P. ridibundus* kao najveća i *P. esculentus* kao nešto manja vrsta bi trebale da akumuliraju više metala od najsitnije vrste *P. lessonae*. Veće telo podrazumeva i veću apsorpcionu površinu kože, unos veće količine hrane i krupnijeg plena.

Obedska Bara je bila jedini lokalitet gde su sve tri vrste *P. esculentus* kompleksa istovremeno izlovljene, dok su na ostalim lokalitetima bile prisutne samo *P. ridibundus*



i *P. esculentus*. Zato ovaj lokalitet može da nam pruži najdetaljniji i najkompletniji uvid u razlike i sličnosti ispitivanih vrsta. Merene su koncentracije dvanaest odabranih metala (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn) u koži i mišićima za sve tri vrste *P. esculentus* kompleksa i u jetri za *P. ridibundus* i *P. esculentus*. Koncentracije akumuliranih metala pokazale su sličan obrazac kod sve tri vrste, u jetri su se razlikovale koncentracije Fe, Cr i Ni. U koži metali koji su najviše doprineli razlikama bili su Cd, Pb, Cu i Hg. Kadmijum i Pb su bili karakteristični za *P. esculentus*, Cu za *P. lessonae* a Hg za *P. ridibundus*. U mišićima metali koji su se najviše razlikovali između vrsta bili su As i Hg. Arsen je karakterisao *P. ridibundus* a Hg drugu roditeljsku vrstu *P. lessonae*. Sve tri vrste bile su izložene istim uslovima sredine i istoj koncentraciji metala u vodi.

Razlike u akumulaciji metala praćene su i na drugim lokalitetima, ali su tamo bile prisutne samo vrste *P. esculentus* i *P. ridibundus*. Na lokalitetu DTD tokom svih sezona jedinke *P. ridibundus* su imale veće koncentracije nekih metala u svim tkivima. Metali koji su doveli do razlika bili su Cd, Hg i Fe. Analiza koncentracije metala na lokalitetu Ponjavica pokazala je manje razlike između vrsta i nešto drugačije sezonske razlike. Tokom 2013. godine i u jesen 2014. godine, vrsta *P. ridibundus* je imala nešto veće koncentracije metala u tkivima i to 2013. za Cu i Ni, a 2014. za Cd, Cu, Fe i Mn. Žabe vrste *P. esculentus* su jedino u proleće 2014. imale značajnije veće koncentracije i to Cr i Hg u koži, i Al, Cr, Hg i Mn u mišićima. Rezultati koncentracija akumuliranih metala kod vrsta *P. esculentus* kompleksa pokazuju da postoje razlike u akumulaciji nekih metala a te razlike su najverovatnije posledica različitih životnih navika (hibernacije i dnevnih razlika), različitog izbora plena i različite veličine tela. Takođe, do nekih manjih i finijih razlika mogle su da dovedu i moguće razlike u starosti jedinki mada smo se trudili da uzorak bude što ujednačeniji (veličina tela jedinke je usko povezana sa njenom starošću).

### **5.1.2. Parametri antioksidacionog sistema i aktivnost holinesteraze u tkivima vrsta *P. esculentus* kompleksa**

Antioksidacioni sistem predstavlja sistem za odbranu organizma od produkcije slobodnih radikala i oksidacionog stresa. Oksidacioni stres se povezuje sa preko 200

različitih poremećaja, promena i oštećenja DNK, lipida i proteina (Winston i Di Giulio, 1991). Razlike u AOS parametrima između *P. esculentus* vrsta ukazale bi na različitu otpornost ili različitu strategiju u odbrani ovih žaba od oksidacionog stresa. Prema hipotezi o hibridnoj superiornosti *P. esculentus* bi trebala da se izdvoji od roditeljskih vrsta.

Kanonijska diskriminaciona i klaster analiza urađene su za tkiva sve tri vrste žaba na lokalitetu Obedska Bara. Rezultati su pokazali da se vrsta *P. esculentus* izdvojila od oba roditelja po prvoj funkciji koja nosi najveći procenat heterogenosti i to najviše na osnovu aktivnosti GSH-Px, CAT i GR u jetri. *P. esculentus* se odvojila od *P. ridibundus* po prvoj funkciji i na osnovu aktivnosti enzima u koži, a enzimi koji su doveli do toga su SOD, GSH-Px i ChE. Isti enzimi bili su zaslužni i za razdvajanje ove dve vrste u mišićima ali je ovo razdvajanje bilo po drugoj funkciji. Razlike su bile prisutne u parametrima AOS i aktivnost holinesteraza i na druga dva lokaliteta- DTD i Ponjavica. Na ovim lokalitetima su upoređivane samo vrste *P. ridibundus* i *P. esculentus* a parametri koji su pokazali najveću varijabilnost bili su GSH-Px, SOD i SH grupe. Razlike u koncentracijama slobodnih SH grupa mogu da se dovedu u direktnu vezu sa razlikama u koncentracijama akumuliranih metala, čiji su biomarker. Ono što povezuje SOD i GSH-Px je funkcija, jer SOD konvertuje superoksid anjon radikal, koji je prvi proizvod Fentonove reakcije, do vodonik peroksida koji se daljim delovanjem GSH-Px prevodi do vode i kiseonika (Halliwell i Gutteridge, 1999b).

Još jedan obrazac koji se uočava kada su razlike u pitanju je odnos enzima CAT i GSH-Px u jetri. Ova dva enzima imaju funkciju u neutralisanju  $H_2O_2$ . Njihove aktivnosti se mogu menjati sinhrono (oba pokazuju povećanu ili smanjenu aktivnost) ili da imaju suprotan trend (jedan enzim pokazuje, porast a drugi smanjenje aktivnosti) (Chattopadhyay i sar., 2007). U jetri jedinki *P. esculentus* sa lokaliteta DTD i Obedska Bara zapažena je značajno veća aktivnost CAT u odnosu na roditeljske vrste i značajno manja aktivnost GSH-Px. Ovo može da ukaže da hibrid *P. esculentus* više preferira CAT u eliminaciji vodonik peroksida dok roditeljske vrste više koriste GSH-Px, odnosno da ove vrste imaju različite strategije za uklanjanje vodonik peroksida. Takođe se smatra da je CAT uključena u eliminaciju većih koncentracija  $H_2O_2$ , dok se pri manjim aktivira GSH-Px zbog svog visokog afiniteta prema  $H_2O_2$  (Kruidenier i Verspaget, 2002). Jedan od razloga za razlike u aktivnostima CAT i GSH-Px

roditeljskih vrsta i *P. esculentus* vrste može biti i razlika u koncentraciji produkovanog vodonik peroksida.

Uočene razlike u aktivnosti AOS parametara između vrsta *P. esculentus* kompleksa na prvom mestu *P. esculentus* i *P. ridibundus*, mogu biti rezultat različite interakcije sa spoljašnom sredinom (razlike u akumulaciji metala i organskih jedinjenja), ali i posledica nekih fizioloških razlika. Hochachka (1980) je pokazala da pored razlika u otpornosti na uslove anoksije, između vrsta ovog kompleksa postoje i razlike u metabolizmu koje su prisutne u normoksiji. Naime, vrste *P. esculentus* i *P. lessonae* se odlikuju većim koncentracijama glikogena i nižim bazalnim metabolizmom u odnosu na *P. ridibundus*. Razlike u metabolizmu mogu dovesti do različite produkcije slobodnih radikala, direktno ili indirektno, a samim tim i do razlika u AOS (Sohal i Weindruch, 1996).

## **5.2. Razlike u koncentraciji metala u tkivima vrsta *P. esculentus* kompleksa na različitim lokalitetima**

Kao što je u uvodnom delu napisano, koncentracije metala u vodi zavise od prirodnih odlika samog lokaliteta, sezonske dinamike, fizičko-hemijskih parametara vode i antropogenih faktora. Najveći uticaj na kvalitet vode i na žive organizme imaju ljudske aktivnosti (Shafi, 2005). U ovoj disertaciji praćen je fizičko-hemijski sastav i koncentracije metala u vode na četiri lokaliteta: DTD, Ponjavica, Fruška Gora i Obedska Bara.

Na lokalitetu DTD voda je uzorkovana kod ušća ovog kanala u reku Tisu. Ovaj kanal se smatra jednim od najzagađenijih vodotokova u Srbiji ali i u Evropi a do ovih rezultata se došlo na osnovu studija koje su sproveli Norveški institut za istraživanje voda (NIVA, 2006) i Dekonta projekta 2004. godine. Kao najveći zagađivači obeleženi su: fabrika šećera "Crvenka", fabrika alkohola "Panon" i fabrika biskvita "Jafa" u Crvenki, fabrika štofova "Sloboda", fabrika kože "Eterna", fabrika sanitarnih armatura "Istra" u Kuli, fabrika šećera "Bačka", mesna industrija "Carnex", svinjogojska farma "Farmacoop" i "Vital" u Vrbasu, kao i komunalne otpadne vode naselja Crvenka, Kula i Vrbas. Svi navedeni zagađivači u svom proizvodnom procesu oslobađaju različite količine zagađujućih materija među kojima su i metali čije su koncentracije merene

(Dekonta, 2005; NIVA, 2006). Visoke koncentracije Al, As, Cd i Cu u vodi bile su karakteristične za ovaj lokalitet.

Lokalitet Ponjavica se odlikuje visokim stepenom eutrofikacije, velikim količinama mulja i usporenim tokom. Sve ovo može da utiče na koncentraciju metala u vodi i sedimentu, iako nema većih industrijskih zagađivača, metali koji dospevaju sa obližnjih njiva i naselja u reku Ponjavicu, dugo se u njoj zadržavaju (Karadžić i sar., 2013). U vodi Ponjavice je izmerena najveća koncentracija As tokom svih sezona u odnosu na ostale lokalitete. Obzirom da je arsen jedan od glavnih sastojaka brojnih pesticida, njegovo prisustvo na ovakvom lokalitetu je očekivano.

Obedska Bara je zbog svoje blizine i povezanosti sa rekom Savom preko Reveničkog kanala, ali i tokom poplava pod velikim uticajem ove reke. Pokazano je da sezonska dinamika u Obedskoj Bari prati promene koje se dešavaju u reci Savi (Ljetić i sar., 2008). Sa druge strane, voda u Obedskoj Bari se ne kreće ili se jako sporo kreće što utiče na koncentrisanje metala u vodi, ali na prvom mestu u sedimentu. Republički hidrometeorološki zavod meri jednom mesečno kvalitet vode u reci Savi na lokaciji koja je nešto uzvodno od same Obedske Bare i njihovi rezultati pokazuju slične koncentracije u reci Savi sa onim u samoj Obedskoj Bari (RHMZ, 2014). Prema koncentraciji metala u vodi, Obedska Bara se može smatrati najčistijim od sva tri ispitivana lokaliteta. Jedino je koncentracija bakra na ovom lokalitetu bila veća u odnosu na druga dva. Povećane koncentracije bakra u Obedskoj Bari se mogu dovesti u vezu sa intenzivnom primenom pesticida plavi kamen u tretiranju bolesti šumske vegetacije u tom području (Vasin i sar., 2004).

Lokalitet Fruška Gora podrazumeva jezero Popovicu koje se nalazi u okviru Nacionalnog parka Fruška Gora. Ovaj lokalitet je van direktnog antropogenog uticaja i kvalitet vode u najvećoj meri zavisi od prirodnih faktora (sastava zemljišta i stena, količine vode). Samo jezero je jako podložno sezonskim promenama zbog svoje male veličine, tako da usled visokih temperatura nivo jezera značajno opada. Smanjenje količine vode u jezeru utiče na koncentrisanje metala u vodi. Obzirom da nema ni pritoka ni otoka, opstanak jezera zavisi od vode koja dospeva kišom i topljenjem snega, a koja nosi rastvorene metale iz vazduha i zemljišta (Popović i sar., 2009). U jezeru Popovica izmerene su veće koncentracije metala koji su sastavni deo stena i zemljišta (Mn, Fe i Al).

Koncentracije metala u vodi pokazuju sezonsku dinamiku. Analizom vode su utvrđene visoke koncentracije arsena i bakra na svim lokalitetima, kao i prisustvo kadmijuma. Nasuprot prisustvu u tkivima *P. esculentus* žaba, metali Co, Hg, Pb, nisu zabeleženi u vodi. Ovakvi rezultati navode na zaključak da je prisutno povremeno zagađenje, ili da su metali dodatno akumulirani iz nekih drugih izvora (ishranom). Stolyar i sar. (2008) su ispitivali bioakumulaciju metala u tkivima vrste *P. ridibundus* na dva različita lokaliteta, i dobili povišene koncentracije nekih metala u tkivima i pored toga što su isti bili ispod limita detekcije u vodi. Ovo nam ukazuje na značaj biomonitoringa i njegovu prednost u odnosu na hemijske analize.

Bioakumulacija metala u tkivima i ćelijama živih organizama može dovesti do poremećaja normalne funkcije i na kraju do smrti. Ono što predstavlja najveći problem kod unosa metala je činjenica da se akumuliraju tokom celog života, ne eliminišu se ili se eliminišu u jako malim količinama preko telesnih izlučevina (Van der Oost i sar., 2003). Stepem akumulacije metala u organizmu zavisi od spoljašnjih faktora, kao što su količina rastvorenih metala, fizičko-hemijske karakteristike, interakcija između metala, količine metala u hrani, godišnji sezonski efekti i unutrašnji faktori kao što su individualna varijabilnost, starost, faza razvoja, veličina i pol (Olgunoğlu i sar., 2015).

Prvo što se uočava prilikom posmatranja rezultata akumuliranih metala u tkivima vrsta *P. esculentus* kompleksa jeste prisustvo toksičnih metala (Cd, Hg, Cr, Pb, Cu i As), kao i da je na svim lokalitetima prisutan određeni stepen zagađenja metalima.

Različiti toksični efekti, bolesti i poremećaji se povezuju sa povećanim koncentracijama metala u organizmu. Kadmijum i olovo nemaju poznate biološke funkcije i pokazuju toksične efekte čak i ako su prisutni samo u tragovima (Duruibe i sar., 2007). Kadmijum je veoma toksičan neesencijalni element koji oštećuje ćelijske membrane, dovodi do biohemijskih promena, što može rezultirati ćelijskom smrću, a izaziva i anemiju (Al-Kahtani, 2009). Olovo je sveprisutno u životnoj sredini, a glavni uzrok za to je njegova široka upotreba u industriji. Duža izloženost olovu dovodi do reproduktivnih poremećaja i poremećaja funkcije bubrega, izaziva se usporavanje provođenja nervnih impulsa i menja homeostaza kalcijuma, dolazi do inhibicije enzima i indukcije sinteze vezujućih proteina (Bölcck i sar., 2014). Živa je prisutna u različitim električnim uređajima u termometrima, barometrima, koristila se i u stomatološkoj i farmaceutskoj industriji i sastojak je nekih pesticida. Živa se povezuje najviše sa

poremećajima u funkcionisanju nervnog sistema, prenosu nervnog impulsa i oštećenjima nervnih ćelija (Shanker i sar., 2003). Vodeni organizmi pokazuju visok stepen akumulacije bakra iz životne sredine. Visoke koncentracije ovog metala povezuju se sa brojnim morfološkim i biohemijskim promenama (Al-Kahtani, 2009). Arsen je prisutan u mnogim proizvodima, aktivan je sastojak pesticida, koristi se u farmaceutskoj industriji i u zaštiti drveća. Široka upotreba je uzrok povećanja njegove koncentracije u životnoj sredini, a posebno su pogođene vodene sredine. Hronično izlaganje arsenu izaziva različite neuro i genotoksične efekte, dovodi do poremećaja funkcije bubrega i kancerogeneze (Rodrigez i sar., 2003). Hrom je sastavni deo metalnih proizvoda, koristi se za ojačavanje, poliranje i presvlačenje metalnih površina. Intoksikacija hromom se najviše povezuje sa poremećajima u reproduktivnom sistemu (Ernst, 1990).

*Pelophylax ridibundus* ili velika zelena žaba je najispitivanija vrsta ovog kompleksa u kontekstu bioakumulacije metala. Brojne studije su ovu vrstu označile kao potencijalno dobru za ispitivanje bioakumulacije metala (Vogiatzis i Loumbourdis, 1998; Papadimitriou i Loumbourdis, 2002; Stolyar i sar., 2008). Vogiatzis i Loumbourdis i sar. (1998) su pokazali da *P. ridibundus* ispunjava sledeće kriterijume dobrog bioindikatora koje su definisali Lower i Kendall (1990): ima široku geografsku i ekološku distribuciju; ograničen areal kretanja u okviru staništa; prisutnost na lokalitetima sa različitim stepenom zagađenja; laku i jednostavnu identifikaciju; mogućnost korišćenja u laboratorijskim uslovima. Međutim, sve ove studije pratile su akumulaciju jednog ili dva metala u laboratorijskim uslovima ili akumulaciju manjeg broja metala na jednom ili dva lokaliteta. U ovoj studiji se po prvi put prati akumulacija 12 različitih metala u tkivima *P. ridibundus* (Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn) na četiri lokaliteta tokom tri uzorkovana perioda.

Analiza metala u tkivima za sezonu 2013. pokazala je, na prvi pogled neočekivane rezultate kad su u pitanju jedinke sa lokaliteta Fruška Gora koje su imale veće koncentracije Cd, Fe, i Hg u jetri od jedinki sa DTD kanala. Takođe, primećene su veće koncentracije Cr u koži i Cu u mišićima. Ono što je karakteristično za jezero Popovica na Fruškoj Gori je mala količina vode, veliko spiranje zemljišta i variranje temperature. Svi ovi faktori pogoduju akumulaciji metala u vodi i sedimentu direktno, a indirektno na akumululaciju u tkivima žaba. Takođe se ne sme isključiti mogućnost

nekog antropogenog zagađenja. Popović i sar. (2009) analizirali su sastav zemljišta na Fruškoj Gori kako bi utvrdili povećane koncentracije metala kao i stepen zagađenja nastalog usled bombardovanja 1999. godine. Ono što su uočili jesu visoke koncentracije Cd i Cu u obliku koji je lako mobilan, a bile su prisutne i visoke koncentracije Fe koji je glavni supstrat za vezivanje metala kao što su Ni i Cr. U koži jedinki sa lokaliteta DTD bili su prisutni Cd i Cr, na Fruškoj Gori i Fe, dok su u mišićima jedinki sa različitih lokaliteta koncentracije metala bile više ujednačene.

Koncentracije metala za sezonu proleće 2014. kod žaba *P. ridibundus* pokazale su da jedinke iz Obedske Bare imaju generalno niže koncentracije metala u odnosu na DTD, dok su koncentracije bile približne onima sa Ponjavice. Obedsku Baru je karakterisala visoka koncentracija As u koži i mišićima, kao i Hg u koži. Visoke koncentracije As su takođe zabeležene u tkivima zmija *N. natrix* i *N. tessellata* sa Obedske Bare tokom 2012. godine (Gavrić i sar., 2015). Ove zmije se hrane žabama iz *P. esculentus* kompleksa, što ukazuje i na akumulaciju metala kroz lanac ishrane. Arsen je stalno prisutan i u reci Savi sa kojom je ovaj lokalitet usko povezan (RHMZ, 2014). Za jedinke sa lokaliteta DTD karakteristične su povećane koncentracije Cd, a ono što je 2013. i 2014. godine izdvajalo jedinke sa Ponjavice jesu visoke koncentracije gvožđa u tkivima.

Tokom jeseni 2014. merene su koncentracije metala na lokalitetima DTD i Ponjavica. Značajnije razlike su primećene samo za koncentracije Cr i Mn u jetri i za Al i Cu u mišićima. Jedinke sa lokaliteta DTD su imale veće vrednosti akumuliranih metala.

Hibridna vrsta *P. esculentus* je za razliku od svoje roditeljske vrste, znatno manje zastupljena u studijama koje se bave bioakumulacijom metala. Samo dve studije su proučavale akumulaciju različitih metala kod zelenih žaba, Oyeleke i sar. (2012) u mišićima i u kontekstu njihove upotrebe u ishrani i Shaopera i sar. (2013) u cilju biomonitoringa reke Guma u Nigeriji.

Rezultati u ovoj disertaciji su pokazali da *P. esculentus* ima manje variranje u akumulaciji ispitivanih metala između različitih lokaliteta u odnosu na *P. ridibundus*. Ono što je uočeno je da se svaki lokalitet izdvaja po koncentracijama nekog metala. Jedinke *P. esculentus* iz Ponjavice su imale visoke koncentracije gvožđa, dok je u tkivu jedinki iz Obedske Bare izmerena visoka koncentracija arsena. Jedinke sa kanala DTD

imale su visoke koncentracije bakra i kadmijuma. Po sezonama, jedinke *P. esculentus* iz Ponjavice su kao i kod *P. ridibundus* imale niže koncentracije metala u tkivima nego jedinke sa kanala DTD za sezonu 2013. i jesen 2014. godine. Tokom sezone proleće 2014. jedinke iz Obedske Bare su se izdvajale od ostala dva lokaliteta.

Akumulacija metala pokazuje i međutkivne razlike, a rezultati ovih poređenja nam pružaju informacije o sposobnosti tkiva da bioakumulira neki metal, i o stepenu oštećenja koje može da se očekuje. Akumulacija zavisi od načina izlaganja (preko kože, pluća ili ishranom), dužine izlaganja, od fizioloških i biohemijskih karakteristika metala i tkiva, funkcije i prokrvljenosti tkiva (Vogiatzis i Loumbourdis, 1998). Ono što je jasno uočljivo, jeste da se jetra žaba *P. esculentus* kompleksa izdvaja po bioakumulaciji metala, zatim sledi koža, dok su najniže koncentracije prisutne u mišićima. Metali koji su imali najveće koncentracije u jetri su Fe, Cu, Al, Cd, Hg, i Ni u poređenju sa ostala dva proučavana tkiva. Jetra žaba je često ispitivano tkivo u kontekstu bioakumulacije. Loumbourdis i Wray (1998) su ispitivali akumulaciju metala u jetri i trupu jedinki *P. ridibundus* iz reke Tafros u severnoj Grčkoj. Ustanovili su da jetra akumulira i do 100 veće koncentracije Cu, a uočeno je i da su koncentracije Cu bile 5-50 puta veće nego kod drugih akvatičnih vrsta (Stolyar i sar., 2008). Visoke koncentracije Cu u jetri iste vrste zabeležili su Stolyar i sar. (2008) ispitujući bioakumulaciju na urbanom i ruralnom lokalitetu u Ukrajini. Oni su ustanovili sledeći redosled akumuliranih metala u jetri Fe>Cu~Zn>Mn>Cd. Shaopera i sar. (2013) su upoređivali akumulaciju metala u različitim tkivima vrste *P. esculentus* i ustanovili da najviše akumulira jetra, zatim koža a najmanji stepen bioakumulacije registrovan je u crevima. Koncentracija metala u tkivima (jetra, bubrezi, kosti, mišići i koža) srodne vrste *P. perezi* analiziranih iz deaktiviranog rudnika uranijuma u Portugalu pokazale su da jetra akumulira najveće koncentracije metala, zatim slede bubrezi, koža, mišići, a najmanje se akumulira u kostima (Marques i sar., 2011). Jetra se izdvajala po koncentracijama Fe, Cu, As i Cd. Rezultati svih navedenih autora su u saglasnosti sa rezultatima ove studije. Jetra je zbog svoje funkcije u detoksikaciji različitih ksenobiotika i dobre prokrvljenosti najizložena metalima. Povezanost sa gastrointestinalnim sistemom, utiče na to da metali iz hrane dospevaju direktno u jetru, a takođe jetra predstavlja i mesto produkcije metaloenzima.

Koža i mišići kao periferni organi manje su izloženi metalima. Ono što je bilo karakteristično za tkivo kože su visoke koncentracije Mn i Zn, a takođe je i koncentracija



Cr je na nekim lokalitetima bila najveća u koži. Shaopera i sar. (2013) su takođe uočili visoke koncentracije Mn i Zn u koži vrste *P. esculentus*. Slični rezultati za kožu su dobijeni kod vrste *P. perezi* (Marques i sar., 2011). Koža žaba akumulira najveći deo metala iz vode, zbog direktnog kontakta i zato što se preko nje vrši razmena gasova. Respiracija koja se obavlja delom preko kože praćena je i većom prokrvljenošću kože, tako da se usvojeni metali dalje redistribuiraju do ostalih organa. Međutim metali iz drugih delova tela mogu preko cirkulacije da dospevaju do kože.

Mišići generalno ne predstavljaju dobro tkivo za proučavanje akumulacije metala, ali su za nas zanimljivi sa aspekta upotrebe u ishrani. Mišići zadnjih ekstremiteta se smatraju delikatesom u nekim kulturama. Zemlje Evropske unije (Francuska, Belgija, Holandija i Italija) su označene kao najveći korisnici i uvoznici žabljih bataka (Schlaepfer i sar., 2005). Podaci opsežne studije sprovedene od 1996-2006 pokazali su da je iskorišćeno više od 100,000 metričkih tona žabljih nogu, a jedinke su bile izlovljene iz prirode i/ili sa farmi za uzgoj (Gratwicke i sar., 2010). Među vrstama čije se meso koristi su i vrste iz *P. esculentus* kompleksa. UN su u svom izveštaju iz 2007. obeležile i našu zemlju kao jednu iz koje se krijumčari žablje meso. Prisustvo jako toksičnih metala (As, Cd, Co i Hg) u mišićima predstavlja problem za zdravlje ljudi koji ih konzumiraju. Moriarty i sar. (2013) su ispitali akumulaciju arsena u mišićima žaba i pokazali da mišići imaju tendenciju da ga akumuliraju u visokim koncentracijama.

### **5.2.1. AOS i aktivnost holinesteraze kod vrsta *P. esculentus* kompleksa**

Antioksidacioni sistem, prisutan u svim aerobnim ćelijama, neutralizuje hemijski reaktivne intermedijere proizvedene u endogenim putevima i/ili metabolizmu ksenobiotika (Winston i Di Giulio, 1991). Aktivnost antioksidacionih enzima i koncentracije neenzimskih komponenti se mogu povećavati ili inhibirati pod uticajem nekog hemijskog stresa. Ova dva različita odgovora zavise od intenziteta i trajanja stresa sa jedne i osetljivosti živih organizama sa druge strane. Indukcija može podrazumevati adaptaciju organizama na promenjenu i zagađenu sredinu. Deficijencija u aktivnosti je stanje koje karakteriše visoka osetljivost prema sredinskom stresu i može se očekivati potencijalni negativan efekat (Lushchak, 2011). Promene u AOS i

oksidaciona oštećenja biomolekula veoma su korisni biomarkeri (Livingstone, 2001), a toksični efekti mnogih zagađivača i njihovih metabolita povezani su sa oksidacionim stresom (Regoli i Principato, 1995). Biomarkeri AOS daju nespecifičan odgovor na određeni zagađivač, pa zato predstavljaju biomarkere izlaganja (Cossu i sar., 1997).

Oksidacioni stres može biti izazvan brojnim unutrašnjim i spoljašnjim faktorima, te je i odgovor antioksidacionog sistema povezan sa njima. Brojne studije su pokazale da pored brojnih ksenobitika variranje faktora spoljašnje sredine (temperatura, koncentracija kiseonika), dostupnost hrane i mnogi drugi faktori mogu značajno da utiču na sam AOS (Filho i sar., 2000; Vidal i sar., 2002). Najveći broj studija posvećen je ispitivanju oksidacionog stresa kod vodenih beskičmenjaka i riba (Pavlović i sar., 2010; Borković-Mitić i sar., 2013; Gavrilović i sar., 2014; Radovanović i sar., 2015), dok su žabe mnogo manje proučene u ovom kontekstu (Falfushinska i sar., 2008; Marques i sar., 2011; Taiwo i sar., 2014; Borković-Mitić i sar., 2016; Prokić i sar., 2016a; Prokić i sar., 2016b)

Falfushinska i sar. (2008) pratili su nivo oksidacionog stresa i odgovor antioksidacionog sistema u jetri vrste *P. ridibundus* na dva lokaliteta sa različitim stepenom zagađenja tokom sezona proleće, leto i jesen. Njihovi rezultati su pokazali da se aktivnost AOS drugačije menja kod jedinki sa nezagađenog u poređenju sa jedinkama sa zagađenog lokaliteta u zavisnosti od sezone, kao i da na zagađenom lokalitetu SOD i CAT pokazuju najveću varijabilnost sa promenom sezona. Tokom proleća kod žaba sa zagađenog lokaliteta zabeležen je pad aktivnosti SOD i CAT kao i pad koncentracije GSH i povećanje koncentracije LPO.

Parametari AOS i holinesteraza pokazali su veliku varijabilnost kod žaba *P. ridibundus* u ovoj studiji, a zbog velike varijabilnosti nije se izdvojio nijedan jedinstven obrazac koji bi karakterisao neki lokalitet ili neku sezonu. Za razliku od *P. ridibundus* kod hibridne vrste *P. esculentus* je uočena veća konzistentnost u odgovoru antioksidacionog sistema. Jedinke sa lokaliteta Ponjavica su tokom proleća 2013. imale generalno veće aktivnosti enzimskih komponenti antioksidacionog sistema (SOD, CAT, GSH-Px i GR) u odnosu na jedinke sa DTD koje je karakterisala veća koncentracija neenzimskih komponenti (GSH i SH grupe). Tokom jeseni 2014. je uočen drugačiji obrazac u poređenju jedinki sa lokaliteta Ponjavica i DTD. Jedinke sa DTD su imale značajno veće koncentracije skoro svih parametara (SOD, CAT, GSH-Px, GR i GSH), a

odgovor je posebno bio izražen u jetri. Prema rezultatima za proleće 2014. izdvojile su se jedinke iz Obedske Bare i to na osnovu parametara AOS u jetri, gde su imale najmanju aktivnost CAT, GSH-Px i koncentraciju SH, dok su u koži pokazale najveću aktivnost CAT, GSH-Px, GR i GST. Mišići jedinki sa Ponjavice izdvojili su se na osnovu najvećih vrednosti CAT, GSH-Px, GR i GST. Zbog kompleksnosti same životne sredine, promene aktivnosti AOS je teško povezati samo sa jednim faktorom i teško je predvideti tačnu promenu kod jedinki iz prirodnih populacija. Sa druge strane, ispitivanja u laboratorijskim uslovima nikada ne mogu dati dovoljno realističan odgovor (Van der Oost i sar., 2003).

### **5.2.2. Odnosi između koncentracije metala i parametara AOS i aktivnosti holinesteraze**

Prirodne populacije žaba izložene su različitim koncentracijama i vrstama metala, a jedan od glavnih mehanizama preko kojeg metali štetno deluju na organizam je kroz sposobnost da izazovu oksidacioni stres. Zato je jako važno utvrditi odnos između koncentracije metala i aktivnosti antioksidacionog sistema. Parametri AOS i holinesteraze označeni su kao nespecifični biomarkeri i reaguju i na druge faktore, zbog čega su primenjene linearna regresija i Pirsonove korelacije kako bi se ograničili samo na dejstvo metala. Ove analize prate promenu ispitivanih biomakera u zavisnosti od promene koncentracije akumuliranih metala, dajući uvid u snagu i značajnost te promene. Takođe, one nam daju slobodu da spojimo jedinke sa različitih lokaliteta i sezona formirajući reprezentativan uzorak od po najmanje 60 jedinki po tkivu i vrsti.

Antioksidacioni sistem i njegovi parametri imaju ključnu ulogu u procesu otklanjanja štetnog delovanja redoks aktivnih i neaktivnih metala. Kao glavne komponente u ovom sistemu označene su slobodne SH grupe i glutation, jer imaju ulogu u održavanju homeostaze metala, antioksidacionoj odbrani kao i u signalizaciji metal indukovanog stresa (Hall, 2002). Tiol (SH) grupe su sastavni deo aminokiseline cistein i pokazuju visok stepen interakcije sa metalima. Kompleks metal-SH grupa inaktivira toksično dejstvo metala. Međutim, kada se formira ovaj kompleks sa redoks aktivnim metalima, može doći do Fentonove reakcije i oksidacionog stresa, pri čemu glutation ima ulogu da stabilizuje ovaj kompleks vezivanjem glutamata i/ili glicina. Na

ovaj način se održava koncentracija slobodnih SH grupa i koncentracije slobodnih metala (Jozefczak i sar., 2012). Glutation ima i antioksidacionu ulogu, donirajući elektron i redukujući slobodne radikale. Prilikom ovog procesa glutacion prelazi iz redukovane u oksidovanu formu (GSSG). Da bi GSH normalno funkcionisao, odnosno da bi se vraćao iz oksidovane u redukovanu formu, najbitnija je aktivnost enzima GR (Kovářová i Svobodová, 2009). Često se dešava da metal nije slobodan već je vezan za neku organsku supstancu ili za drugi metal. Da bi GSH mogao da spreči štetno dejstvo ovog kompleksa potrebna je funkcija enzima GST. GST vrši konjugaciju GSH sa ovim jedinjenjima (Oliva i sar., 2012). Redoks aktivni metali koji se nisu vezali za SH grupe i GSH dovode do produkcije radikala kiseonika koji se uklanjaju najpre dejstvom SOD, a dalje CAT i GSH-Px. Dok redoks aktivni metali povećavaju aktivnost enzima, redoks neaktivni inhibiraju aktivnost tako što se vezuju za aktivne centre enzima (Miller i sar., 1993).

Od ukupnog broja značajnih korelacija u diskusiji će fokus biti samo na onim metalima i biomarkerima koji pokazuju najveći broj korelacija. U jetri vrste *P. ridibundus* od 19 korelacija parametri koji pokazuju najviše veza sa metalima su GR, CAT, GSH i SH, dok su među metalima to Hg, Cr i Ni. Katalaza je bitna za uklanjanje vodonik peroksida koji je jedan od proizvoda Fentonove i Haber-Vajsove reakcije. Korelacija GSH i SH sa metalima potvrđuje važnu ulogu ovih komponenti u eliminisanju metala, dok je aktivnost GR povezana sa glutationom. U koži žaba je zabeležen isti broj korelacija kao i u jetri. Parametri sa najviše korelacija u koži su nešto drugačiji: pored GSH i GR tu su i SOD i GST. Prilikom delovanja redoks aktivnih metala prvi slobodni radikal koji nastaje je superoksid anjon radikal, koji se neutrališe delovanjem SOD. GST je uključen u uklanjanje metala sa GSH. Metali koji u koži najviše koreliraju sa AOS su As, Cd i Zn. U mišićima je uočen znatno manji broj korelacija u odnosu na ostala dva tkiva i iznosi 14 korelacija. Enzimi koji su se izdvojili su SOD, GSH-Px i GR. SOD i GSH-Px su aktivno uključeni u otklanjanje radikala kiseonika. Od metala najviše korelacija pokazuju Mn, zatim Hg i Ni.

Hibridna vrsta *P. esculentus* pokazuje veći broj korelacija nego *P. ridibundus* što nas dovodi do zaključka da njen AOS bolje reaguje na prisustvo metala. U jetri, od 21 korelacije, najviše njih je povezano sa koncentracijom SH grupa i aktivnostima enzima GST i GSH-Px. Jetra ove vrste kao i *P. ridibundus* pokazuje slične korelacije, odnosno

kod obe vrste značajno mesto zauzimaju očekivano SH grupe, zatim GST, dok je GSH-Px bio prisutan umesto CAT. Metali koji najviše interaguju sa biomarkerima su redoks aktivni metali Cr, Cu i Fe, a od redoks neaktivnih samo Hg. Koža je pokazala 19 korelacija, a najviše njih je bilo povezano sa koncentracijom SH grupa i GSH, zatim sa enzimima SOD i GSH-Px. U koži je zapažen zaokružen proces eliminacije i zaštite od metala. Neenzimske komponente uklanjaju najveći deo metala, dok enzimske komponente neutrališu slobodne radikale. Od metala se ističu Hg, Cd, Cu i Cr. Ono što je najzanimljivije kod *P. esculentus* vrste jesu korelacije biomarkera sa metalima u mišićima gde je zabeležen najveći broj korelacija čak 25 i ujedno najveći broj jakih korelacija (0,6-0,8). Najveću promenu u zavisnosti od koncentracije metala pokazali su SOD, CAT, GR i SH grupe. Od redoks aktivnih metala najviše korelacija su pokazali Ni i Cr kao, a od redoks neaktivnih Hg i Cd.

Odnos između biomarkera i metala utvrđivan je i za vrstu *P. lessonae*. Kod *P. lessonae* broj jedinki bio je ograničen na 16 i na lokalitet Obedska Bara, zbog čega je i broj korelacija bio niži kod ove vrste. U jetri je najviše korelacija pokazala CAT, a od metala As i Fe. Koža je imala nešto više korelacija i kod nje su se izdvojili parametri SH, GR i ChE, a među akumuliranim metalima Al, Zn, Cd i As. SH grupe, Al i Cd su imale najviše korelacije u mišićima. Ono što je bilo karakteristično je da su i pored malog broja korelacija sve bile veoma jake (>0,8).

Redoks aktivni metali koji pokazuju najveći efekat na parametre AOS i holinesterazu u tkivima žaba *P. esculentus* kompleksa su Cr, As, Ni, Fe i Cu. Ono što karakteriše redoks aktivne metale su njihove promenljive valence zbog kojih lako mogu da primaju ili otpuštaju elektrone, što u organskim sistemima dovodi do produkcije slobodnih radikala. Glavni mehanizam za nastanak oksidacionog stresa redoks aktivnim metalima je kroz Fentonovu reakciju, dok manja količina nastaje i Haber-Vajsovom reakcijom. Studije koje su ispitivale efekte metala na biomarkere oksidacionog stresa kod žaba nisu mnogobrojne, za razliku od onih sprovedenih na ribama i pticama (Lushchak, 2011; Espin i sar., 2014). Kostaropoulos i sar. (2005) su ispitivali efekte Cr i Cd na aktivnost citohrom P450 monooksigenaze kao komponente biotransformacionog sistema faze 1 i GST kao komponente faze 2 u jetri, bubrezima i crevima vrste *P. ridibundus*. Rezultati su pokazali da oba metala pojedinačno, ali i zajedno smanjuju aktivnost ova dva enzima u jetri i bubrezima i da negativno korelišu. Boncompagni i

sar. (2004) su pokazali da hrom u koncentraciji od 4 ppm indukuje oksidacioni stress u jetri *P. esculentus* i da je odgovor najizraženiji kroz povećanje aktivnosti CAT. Pozitivne korelacije zabeležene su i između Cd, Pb i Cr i aktivnosti GST kod punoglavaca vrste *Rana temporaria* koja je srodna sa našim ispitivanim vrstama (Johansen, 2013). Hrom je u ovoj studiji pokazao pozitivne korelacije sa parametrima (SH grupe, GSH, GR, SOD i CAT) u koži i mišićima, dok su negativne korelacije zabeležene u jetri za SH grupe, GR i GST. Arsen, pored direktne produkcije slobodnih radikala, utiče i indirektno na AOS (Nordenson i Beckman, 1991). Koncentracije arsena su se menjale zajedno sa aktivnostima CAT i GSH-Px u jetri žaba *P. esculentus* kompleksa, dok su u koži uočene suprotne promene za CAT, GSH, SH i GST. Efekti As ispitivani su na punoglavcima žaba vrste *Rhinella arenarum*, pri čemu je zabeleženo smanjenje ukupnog antioksidacionog potencijala, ali sa druge strane povećanje koncentracije GSH i aktivnosti GST, na osnovu čega je pretpostavljeno da GSH vezuje As i na taj način ga eliminiše (Mardirosian i sar., 2015). Ventura-Lima i sar. (2011) uradili su komparativnu studiju efekta As na različite organizme i naveli da je jedan od glavnih mehanizama preko kojeg As ostvaruje toksične efekte izazivanje oksidacionog stresa. U odbrani od arsena primarno su uključeni GSH i glutation zavisni enzimi (GR i GST). Marques i sar. (2011) ispitivali su efekte akumuliranih metala na aktivnost AOS različitih tkiva kod žaba *Pelophylax perezi* iz deaktiviranog rudnika uranijuma u Španiji. Arsen je u ovoj studiji negativno korelirao sa CAT u bubrezima, dok je Ni pokazao pozitivnu korelaciju sa GSH-Px u jetri ispitivanih žaba. Nikl preko Fentonove reakcije dovodi do oksidacionog stresa u tkivima. U ovoj studiji su kao reakcija na povećanu produkciju slobodnih radikala izazvane niklom uočene pozitivne korelacije u mišićima i koži između biomarkera SH grupa, SOD, CAT, GSH-Px, GR i ovog metala. Međutim, u jetri su zabeležene negativne korelacije i to sa SH grupama, CAT i GST što ukazuje na samanjenu antioksidacionu odbranu. Jetra je zbog svoje funkcije veoma specifično tkivo i izložena je visokim koncentracijama akumuliranih metala. Taiwo i sar. (2014) uočili su negativne korelacije Ni sa koncentracijama GSH i aktivnosti SOD kod žabe *Hoplobatrachus occipitalis*. Gvožđe i bakar su sledeći redoks aktivni metali koji pokazuju korelacije sa parametrima AOS. Oba metala su esencijalna za rast i normalno funkcionisanje organizma, međutim mnogobrojne studije su pokazale da zbog svog redoks potencijala povećane koncentracije dovode do oksidacionog stresa. U bubrezima

jedinki *P. perezi* koncentracije Fe su pokazale pozitivnu korelaciju sa aktivnošću GST (Marques i sar., 2011). Taiwo i sar. (2014) su dobili pozitivnu korelaciju između koncentracija GSH i koncentracija Fe i Cu, dok je nasuprot tome aktivnost SOD imala negativan odnos sa ova dva metala. Gvožđe je kod *P. esculentus* vrsta pokazalo najveći broj pozitivnih korelacija sa SOD, većina ostalih parametara je pokazala pozitivne korelacije, ali se ni jedan nije posebno izdvojio. U jetri vrste *P. ridibundus* Cu indukuje povećanje koncentracija GSH i MDA (Papadimitriou i Loumbourdis, 2002). Satnos i sar. (2013) ispitivali su efekte Cu i NaCl na embrione i punoglavce vrste *P. perezi* i jedan od rezultata bila je povećana aktivnost CAT usled Cu-izazvanog oksidacionog stresa. Falfushinska i sar. (2008) su akumulirane koncentracije Cu označili kao glavni uzrok za promenu aktivnosti enzima AOS u jetri žaba vrste *P. ridibundus*. Ferreira je 1978. godine pokazao da tretiranje kože grupe ranidnih žaba (*P. ridubundus*, *R. temporaria* i *R. pipens*) dovodi do povećanja koncentracije slobodnih SH grupa kao odgovor na stres izazvan sa Cu. Rezultati ove studije nisu pokazali jasan obrazac korelacija Cu sa parametrima AOS jer su se korelacije menjale u zavisnosti od tkiva. CAT je pozitivno korelirala sa Cu u mišićima, SH grupe u koži, dok su negativne korelacije uočene za jetru i parametre GR, GST i SH grupe. Negativne korelacije mogu biti izazvane visokim koncentracijama Cu u jetri i nemogućnosti organizma da se izbori sa njima. Povećane koncentracije akumuliranih metala u tkivima dovode do povećanja aktivnosti AOS kao prvi odgovor, međutim ukoliko koncentracije nastave da se povećavaju ili stres dugo traje organizam ne uspeva da se izbori i kao rezultat dolazi do smanjenja vrednosti parametara AOS (Espin i sar., 2014). U ovoj doktorskoj disertaciji uočavamo da u jetri koja akumulira najveće koncentracije metala, često dolazi do negativnih korelacija parametara AOS sa metalima, dok je u ostala dva tkiva odgovor suprotan.

Redoks neaktivni metali utiču na oksidacioni stres indirektno kroz interakciju i promenu funkcije AOS, čineći na ovaj način organizam podložnijim efektima slobodnih radikala (Valko i sar., 2005). Dva metala iz ove grupe koja su pokazala najviše korelacija su živa i kadmijum, a ovo su ujedno i dva najtoksičnija metala. Živa je kod vrsta *P. esculentus* kompleksa pokazala pozitivne korelacije sa SH grupama, GR i GSH-Px, dok su negativne korelacije uočene za GSH i CAT u jetri. U studiji Kaczor-Kamińska i sar. (2013) zabeležena je negativna korelacija SH grupa i GSH sa

koncentracijama Hg u tkivima (mišić, kozak, jetra) kod žaba vrste *Xenopus leavis*. Najveći deo studija koji prati efekte Cd na AOS kod žaba sproveden je u laboratorijskim uslovima, dok se o efektima u prirodnim populacijama malo zna. U ovoj disertaciji Cd pokazuje najviše pozitivnih korelacija sa SH grupama i CAT, a od negativnih najviše sa SOD i GSH. Povišene koncentracije CdCl<sub>2</sub> u jetri, mozgu i mišićima vrste *P. ridibundus* dovele do povećanja koncentracije GSH (Sura i sar., 2006a). Isti autori Sura i sar. (2006b) su pokazali da jedinke ulovljene u proleće manje reaguju na povišene koncentracije Cd nego one ulovljene u jesen. Povišene koncentracije GSH nakon tretmana Cd uočene su i u testisima vrste *R. limnocharis* (Zhang i sar., 2012). Jia i sar. (2010) merili su akumulaciju Cd i njegove efekte na oksidacioni stres u jetri vrste *R. nigromaculata* nakon 4, 10 i 30 dana. Koncentracije GSH, metalotioneina i MDA rastle su sa porastom koncentracija akumuliranog Cd. Na istoj vrsti Wang i sar. (2006) ispitivali su hronične efekte Cd na AOS jetre i bubrega i dobili su da GSH u jetri pozitivno korelira, dok je negativna korelacija bila u bubrezima, a takođe je utvrđeno da aktivnost SOD opada nakon 20 dana izlaganja. Kod žaba iz prirode uočeno je da u bubrezima *P. perezii* Cd negativno korelira sa GR, dok je slaba negativna korelacija zabeležena sa SOD u jetri *H. occipitalis*, nasuprot pozitivnoj korelaciji sa GSH kod iste vrste (Marques i sar., 2011; Tiawo i sar., 2014).

Holinesteraza je važan enzim za normalno funkcionisanje nervnog sistema kičmenjaka i danas se koristi kao biomarker neurotoksičnosti (Frasco i sar., 2005). Dosadašnje studije su pokazale da se aktivnost holinesteraze može koristiti kao biomarker za organofosfatne i karbamatne pesticide. Pored pesticida, sve češće se pominju i drugi ksenobiotici, među kojima i metali, koji mogu da ometaju funkciju ovog enzima. Studije koje su pratile efekte Hg na ovaj enzim pokazale su da, u zavisnosti od koncentracije, živa može da stimuliše ili inhibira aktivnost ChE (Devi i Fingerman, 1995; Frasco i sar., 2005). Romani i sar. (2003) pokazali su da Cu povećava aktivnost holinesteraze, dok su Olson i Christensen (1980) pokazali suprotan efekat Cu. Aluminijum hlorid je u mozgu pacova povećao aktivnost ChE (Zatta i sar., 2002), dok je u serumu ljudi uočeno smanjenje aktivnosti ovog enzima (Sarkarati i sar., 1999). Kod riba tretiranih kadmijumom aktivnost ChE je značajno opala (Beauvais i sar., 2001). De Lima i sar. (2013) radili su studiju o efektima metala (Fe, Pb, Cu i Cd) na aktivnost ChE zebra riba, a njihovi rezultati su pokazali da Pb i Cd inhibiraju aktivnost



ChE, Fe je ne menja, dok je Pb stimuliše. Tačan mehanizam delovanja metala na aktivnost ChE nije još uvek poznat, a trenutno postoje tri pretpostavke. Prva podrazumeva vezivanje metala za cisteinske (tiol) ostatke kod ChE (Frasco i sar., 2007), druga se odnosi na interakciju metala sa aminokiselinama koje su deo strukture samog enzima (Vioque-Fernández i sar., 2007), dok poslednja pretpostavka podrazumeva da se metali vezuju za receptore ChE sprečavajući njegovo vezivanje, što dovodi do nagomilavanja ChE u sinaptičkom prostoru i ima za posledicu manju produkciju enzima (Bainy i sar., 2006). Kod žaba *P. esculentus* aktivnost ChE je pokazala najveći broj korelacija sa Al, As, Zn, Hg i Cu. Pozitivne korelacije su bile sa Al, Zn i Cu dok je ChE negativno korelirao sa As i Hg.

## 6. Zaključci

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Vrste *Pelophylax esculentus* kompleksa (*P. ridibundus*, *P. lessonae* i njihov hibrid *P. esculentus*) razlikuju se u bioakumulaciji metala u tkivu jetre, kože i mišića. Vrsta *P. ridibundus* je akumulirala najveće količine metala, a zatim slede *P. esculentus* i *P. lessonae*. Razlike u bioakumulaciji metala mogu se povezati sa životnim navikama, hibernacijom, izborom plena i veličinom tela ovih vrsta. *P. ridibundus* je najkrupnija i uvek hibernira u vodi, dok ostale dve vrste imaju sitnije telo, drugačiji diverzitet plena i/ili hiberniraju na kopnu.

2. Vrste *Pelophylax esculentus* kompleksa razlikovale su se u parametrima antioksidacionog sistema i aktivnosti holinesteraze. Enzimi SOD, GSH-Px i koncentracija SH grupa su pokazali najveću varijabilnost od svih ispitivanih parametara kod vrsta *Pelophylax esculentus* kompleksa. Odnos enzima CAT i GSH-Px u jetri je odvojio *P. esculentus* od roditeljskih vrsta. *P. esculentus* je imala veću aktivnost CAT i značajno manju aktivnost GSH-Px u odnosu na *P. ridibundus* i *P. lessonae*. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se pored različitih interakcija sa spoljašnom sredinom (razlike u akumulaciji metala) i fizioloških razlika (u bazalnom metabolizmu) vrste ovog kompleksa razlikuju i u parametrima antioksidacionog sistema.

3. Međutkivne razlike u akumulaciji metala između jetre, kože i mišića, kao i AOS parametrima i aktivnosti holinesteraze vrsta *P. esculentus* kompleksa pokazale su da jetra akumulira najveći broj i najveće koncentracije metala (posebno izraženo u koncentracijama Fe, Cu, Al, Cd, Hg, i Ni), zatim sledi koža koja se izdvajala po visokim koncentracijama Mn, Zn i Cr, dok su najniže koncentracije metala zabeležene u mišićima. Parametri AOS i aktivnost holinesteraze su imali najveće vrednosti u jetri, zatim u koži i u mišićima, što je u skladu sa koncentracijama akumuliranih metala.

4. Efekti različitih lokaliteta na vrste *P. esculentus* kompleksa pokazuju da se koncentracije akumuliranih metala u tkivima razlikuju od koncentracija metala izmerenih u vodi, što ukazuje na to da postoji povremeno zagađenje, ili su metali u tkiva dospeli na neki drugi način (npr., ishranom preko plena, ili su u nekom trenutku u toku svog životnog ciklusa bile izložene povećanim koncentracijama metala). Opšti trend je da povećanje zagađenja prati i veća akumulacija metala u tkivima žaba, dok se kod parametara AOS ne uočava jasan obrazac promene.

5. Odnos koncentracija metala i parametara AOS pokazuje da vrsta *P. esculentus* ima najveći broj korelacija, zatim sledi *P. ridibundus*, dok je najmanji broj korelacija zabeležen kod *P. lessonae*. Redoks aktivni metali koji pokazuju najveći efekat na ispitivane parametre kod žaba su: Cr, As, Ni, Fe i Cu, a redoks neaktivni: Hg i Cd. Među parametrima AOS najveći broj korelacija sa metalima pokazuju SH grupe, zatim SOD i GR. Od svih parametara antioksidacionog sistema koji se koriste kao biomarkeri, tri navedena (SH grupe, SOD i GR) se izdvajaju kao vrlo efikasni u biomonitoringu efekta različitih metala na tkiva žaba *P. esculentus* kompleksa.

6. Aktivnost holinesteraze kao parametra neurotoksičnosti pokazala je promene koje su u direktnoj vezi sa promenama koncentracija akumuliranih metala, i to pozitivne sa Al, Zn i Cu i negativne sa As i Hg. Ovo pokazuje da se i ChE može koristiti kao biomarker u studijama koje prate prisustvo i efekte metala kod žaba.

## Opšti zaključak

Novi pristup primenjen u ispitivanju ovog hibridnog kompleksa pokazao je da se tri veoma bliske vrste razlikuju u akumulaciji metala i parametrima antioksidacionog sistema. Ove razlike predstavljaju važnu osnovu za dalja ispitivanja kako ovog kompleksa, tako i drugih hibridnih vrsta, i treba da pruže dodatne informacije u ekološkim i ekotoksikološkim studijama.

Ispitivane promene antioksidacionog sistema pokazuju da se ovi parametri, na prvom mestu SH grupe, SOD i GR, mogu koristiti kao biomarkeri izlaganja i efekata metala. Merenje bioakumulacije metala u tkivima žaba *P. esculentus* kompleksa ukazuje da ove vrste imaju dobar potencijal za praćenje bioakumulacije metala i da se mogu koristiti kao dobre bioindikatorske vrste.

Na osnovu svega što je u ovoj studiji zabeleženo može se zaključiti da su vrste *P. esculentus* kompleksa pogodni bioindikator prisustva metala u životnoj sredini. Dalja istraživanja bi podrazumevala kontinuirano višegodišnje praćenje stanja životne sredine na ispitivanim lokalitetima, veći broj jedinki, kao i ispitivanja u laboratorijskim uslovima.

## 7. Literatura

- Al-Kahtani, M. A. (2009). Accumulation of heavy metals in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) from Al-Khadoud Spring, Al-Hassa, Saudi Arabia. *American Journal of Applied Sciences*, 6(12), 2024-2029.
- Almroth, B. C., Sturve, J., Förlin, L. (2008). Oxidative damage in rainbow trout caged in a polluted river. *Marine Environmental Research*, 66(1), 90-91.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341.
- Arenas, F. A., Díaz, W. A., Leal, C. A., Pérez-Donoso, J. M., Imlay, J. A., Vásquez, C. C. (2010). The Escherichia coli btuE gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(4), 690-694.
- Bainy, A. C. D., De Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., de Almeida, E. A. (2006). In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. *Biotemas*, 19(1), 35-39.
- Berger, L. (1968). Morphology of the F1 generation of various crosses within *Rana esculenta*-complex. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 13(13), 301-324.
- Berger, L. (1990). On the origin of genetic systems in European water frog hybrids. *Zoologica Poloniae*, 35(1-4), 5-32.
- Beauvais, S. L., Jones, S. B., Parris, J. T., Brewer, S. K., Little, E. E. (2001). Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(1), 84-90.
- Blaustein, A. R., Wake, D. B. (1995). The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American*, 272(4), 52-57.
- Bölck, B., Ibrahim, M., Lu-Hesselmann, J., Steinritz, D., Suhr, F., Bloch, W. (2014). Detection of free radical reaction products and activated signalling molecules as biomarkers of cell damage in human keratinocytes upon lead exposure. *Journal of Molecular Biomarkers and Diagnosis*, 5(4), 1-18.

- Boncompagni, E., Fenoglio, C., Vaccarone, R., Chiari, P., Milanesi, G., Fasola, M., Barni, S. (2004). Toxicity of chromium and heptachlor epoxide on liver of *Rana* kl. *esculenta*: A morphological and histochemical study. *Italian Journal of Zoology*, 71, 163-167.
- Borkin, L. J., Litvinchuk, S. N., Mannapova, E. I., Pestov, M. V., Rosanov, J. M. (2002). The distribution of green frogs (*Rana esculenta* complex) in Nizhny Novgorod province, central European Russia. *Russian Journal of Herpetology*, 9(3), 195-207
- Borković-Mitić, S. S., Prokić, M. D., Krizmanić, I. I., Mutić, J., Trifković, J., Gavrić, J., Despotović, S. G., Gavrilović, B. R., Radovanović, T. B., Pavlović, S. Z., Saičić, Z. S. (2016). Biomarkers of oxidative stress and metal accumulation in marsh frog (*Pelophylax ridibundus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.
- Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Perendija, B., Despotović, S., Gavrić, J., Gačić, Z., Saičić, Z. (2013). Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidant enzymes and concentrations of vitamin E and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River. *Ecological indicators*, 32, 212-221.
- Bounous, G., Gold, P. (1991). The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clinical Investigation Medicine*, 14(4), 296-309.
- Boutilier, R. G., Stiffler, D. F., Toews, D. P. (1992). Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians. *Environmental physiology of the amphibians*, pp. 81-124. University of Chicago Press.
- Buettner, G. R., Jurkiewicz, B. A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*, 145(5), 532-541.
- Cadenas, E., Simic, M. G., Sies, H. (1989). Antioxidant activity of 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindole, and DOPA against microsomal lipid peroxidation and its dependence on vitamin E. *Free Radical Research Communications*, 6(1), 11-17.
- Chattopadhyay, S., Sahoo, D. K., Subudhi, U., Chainy, G. B. N. (2007). Differential expression profiles of antioxidant enzymes and glutathione redox status in

- hyperthyroid rats: a temporal analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(3), 383-391.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.
- Chen, C. Y., Wang, Y. F., Lin, Y. H., Yen, S. F. (2003). Nickel-induced oxidative stress and effect of antioxidants in human lymphocytes. *Archives of Toxicology*, 77(3), 123-130.
- Claiborne, A.(1984) Catalase activity. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. pp. 283-284, CRC Press, Boca Raton, USA,.
- Çokuğraş, A. N. (2003). Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turkische Journal of Biochemistry*, 28(2), 54-61.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M. C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P. (1997). Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38(2), 122-131.
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., K. Opendakker. Nair, A.R., Munters, E., Artois, T. J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K. (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23(5), 927-940.
- De Lima, D., Roque, G. M., de Almeida, E. A. (2013). In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Environmental Research*, 91, 45-51.
- De Waziers, I., Albrecht, R. (1987). The effects of vitamin A nutritional status on glutathione, glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in rat intestine. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 43(4), 394-395.
- De Zwart, D. (1995). Monitoring water quality in the future, *Biomonitoring*. Bilthoven Netherland RIVM.
- Dekonta 2004 (2005). Clean up and revitalisation of Veliki Backi Canal in the city of Vrbas, Serbia and Montenegro. Report No 1., Dekonta Inc., Czech Republic.
- Devi, M., Fingerman, M. (1995). Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, by

- mercury, cadmium, and lead. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(5), 746-750.
- Dickinson, D. A., Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64(5), 1019-1026.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Dubois, A., Günther, R. (1982). Klepton and synklepton: two new evolutionary systematics categories in zoology. *Zoolgy Jahrbücher Systematics*, 109(2), 290-305.
- Dubois, A., Ohler, A. (1994). Frogs of the subgenus *Pelophylax* (Amphibia, Anura, genus *Rana*): A catalogue of available and valid scientific names, with comments on name-bearing types, complete synonymies, proposed common names, and maps showing all type localities. *Zoologica Poloniae*, 3(39) 139-204.
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., Egwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5), 112-118.
- Eaton, D. L., Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*, 49(2), 156-164.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholin-esterase activity *Biochemical Pharmacology*, 7,88–95.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 529-539.
- Ernst, E. (1990). Testicular toxicity following short-term exposure to tri-and hexavalent chromium: an experimental study in the rat. *Toxicology Letters*, 51(3), 269-275.
- Espin, S., Martinez-Lopez, E., Jimenez, P., Maria-Mojica, P., Garcia-Fernandez, A. J. (2014). Effects of heavy metals on biomarkers for oxidative stress in Griffon vulture (*Gyps fulvus*). *Environmental Research*, 129, 59-68.



- Fagotti, A., Morosi, L., Di Rosa, I., Clarioni, R., Simoncelli, F., Pascolini, R., Pellegrino R., Guex G. D. Hotz, H., (2005). Bioaccumulation of organochlorine pesticides in frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. *Amphibia-Reptilia*, 26(1), 93-104.
- Falfushinska, H., Loumbourdis, N., Romanchuk, L., Stolyar, O. (2008). Validation of oxidative stress responses in two populations of frogs from Western Ukraine. *Chemosphere*, 73(7), 1096-1101.
- Ferreira, K. T. G. (1978). The effect of copper on frog skin. The role of sulphhydryl groups. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 510(2), 298-304.
- Fidaleo, M. (2010). Peroxisomes and peroxisomal disorders: the main facts. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(6), 615-625.
- Filho, D., Torres, M. A., Marcon, J. L., Fraga, C. G., Boveris, A. (2000). Comparative antioxidant defenses in vertebrates-emphasis on fish and mammals. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, 7, 33-45.
- Fioramonti, E., Semlitsch, R. D., Reyer, H. U., Fent, K. (1997). Effects of triphenyltin and pH on the growth and development of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(9), 1940-1947.
- Forman, H. J., Zhang, H., Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1), 1-12.
- Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2002). Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 180(1), 23-32.
- Frasco, M. F., Colletier, J. P., Weik, M., Carvalho, F., Guilhermino, L., Stojan, J., Fournier, D. (2007). Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *FEBS Journal*, 274(7), 1849-1861.
- Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10(5), 360-375.
- Gavrić, J. P., Prokić, M. D., Anđelković, M. Z., Despotović, S. G., Gavrilović, B. R., Borković-Mitić, S. S., Pavlović, Z. S. Saičić, Z. S. (2015). Effects of metals on blood oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in dice

- snakes (*Natrix tessellata*) from Serbia. *Archives of Biological Sciences, (Belgrade)* 67(1), 303-315.
- Gavrilović, B. R., Despotović, S. G., Gavrić, J. P., Borković-Mitić, S. S., Ognjanović, B. I., Pavlović, S. Z., Saičić, Z. S. (2014). Changes in antioxidant enzyme activities in the livers and gills of three cyprinids after exposure to a cyanobacterial bloom in the Gruža Reservoir, Serbia. *Ecological Indicators*, 38, 141-148.
- Gebicki, J. M. (1997). Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species. *Redox Report*, 3(2), 99-110.
- Glatzle, D., Vuilleumier, J. P., Weber, F., Decker, K. (1974). Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia*, 30(6), 665-667.
- Graf, J. D., Polls Pelaz, M. (1989). Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*, 466, 289-302.
- Gratwicke, B., Evans, M. J., Jenkins, P. T., Kusrini, M. D., Moore, R. D., Sevin, J., Wildt, D. E. (2010). Is the international frog legs trade a potential vector for deadly amphibian pathogens? *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8(8), 438-442.
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106(1), 207-212.
- Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9), 922-935.
- Gunther, R., Plotner, J. (1994). Morphometric, enzymological and bioacoustic studies in Italian water frogs (Amphibia, Ranidae). *Zoologica Poloniae*, 39(3-4), 287-415.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1976). Glutathione S-transferase AA from rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 175(2), 710-716.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1-11.
- Halliwell, B. (2000). The antioxidant paradox. *The Lancet*, 355(9210), 1179-1180.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989). Free radicals, ageing and disease. *Free Radicals in Biology and Medicine*, second ed. Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Halliwell, B., i Gutteridge, J., (1999a). Antioxidant defence enzymes: the glutathione peroxidase family. *Free Radical Biology Medicine* third ed. pp 140–146, 170–172. Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999b). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press Inc., New York, USA.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231-255.
- Halušková, L. U., Valentovičová, K., Huttová, J., Mistrík, I., Tamás, L. (2009). Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(11), 1069-1074.
- Hansen, R. E., Roth, D., Winther, J. R. (2009). Quantifying the global cellular thiol–disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(2), 422-427.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88.
- Heffner, J. E., Repine, J. E. (1989). Pulmonary strategies of antioxidant defense. *American Review of Respiratory Disease*, 140(2), 531-554.
- Hochachka, P. W. (1980). Living without oxygen. *Closed and Open Systems in Hypoxia Tolerance*. Harvard University Press, New York
- Hogg, N. (2000). Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1478-1486.
- Holenweg P. A. K., Reyer, H. U., Abt Tietje, G. (2001). Homing behavior of *Rana lessonae*, *R. ridibunda* and their hybridogenetic associate *R. esculenta* after experimental displacement. *Amphibia Reptilia*, 22, 475-480.

- Holenweg, A. K., Reyer, H. U. (2000). Hibernation behavior of *Rana lessonae* and *R. esculenta* in their natural habitat. *Oecologia*, 123(1), 41-47.
- Hotz, H., Semlitsch, R. D., Gutmann, E., Guex, G. D., Beerli, P. (1999). Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclinal frog hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 2171-2176.
- Huang, H. S., Chang, W. C., Chen, C. J. (2002). Involvement of reactive oxygen species in arsenite-induced downregulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(6), 864-873.
- Huang, K. P., Huang, F. L. (2002). Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochemical Pharmacology*, 64(5), 1049-1056.
- Janssen-Heininger, Y. M., Mossman, B. T., Heintz, N. H., Forman, H. J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stamler, J. S., Rhee, S., Van der Vliet, A. (2008). Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(1), 1-17.
- Jia, X., Lui, X., Shi, C. (2010). Effects of Cadmium on oxidative stress and metallothionein of liver in frog *Rana nigromaculata*. *Acta Ecological Sinica*, 30(2):416-420.
- Johansen, S. L. (2013). Element accumulation and levels of four biomarkers in common frog (*Rana temporaria*) tadpoles in two sedimentation ponds and a naturally occurring pond. Master thesis- Norwegian University of Life Sciences pp.1-69.
- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2012). Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3145-3175.
- Kaczor-Kaminska, M., Sura, P., Wróbel, M. (2013). Changes in activity of three sulfurtransferases in response to exposure to cadmium, lead and mercury ions. *Journal of Environmental Protection*, 4, 19-28.
- Karadžić, V., Simić, G.S., Natić, D., Ržaničanin, A., Ćirić, M., Gačić, Z. (2013). Changes in the phytoplankton community and dominance of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia). *Hydrobiologia* 711, 43-60.

- Katz, U. (1975). NaCl adaptation in *Rana ridibunda* and a comparison with the euryhaline toad *Bufo viridis*. *Journal of Experimental Biology*, 63(3), 763-773.
- Kemp, M., Go, Y. M., Jones, D. P. (2008). Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(6), 921-937.
- Kostaropoulos, I., Kalmanti, D., Theodoropoulou, B., Loumbourdis, N. S. (2005). Effects of exposure to a mixture of cadmium and chromium on detoxification enzyme (GST, P450-MO) activities in the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicology*, 14(4), 439-447.
- Kovářová, J., Svobodová, Z. (2009). Can thiol compounds be used as biomarkers of aquatic ecosystem contamination by cadmium? *Interdisciplinary Toxicology*, 2(3), 177-183.
- Krenkel, P. A. (2013). Heavy Metals in the Aquatic Environment. Proceedings of the International Conference Held in Nashville, Tennessee, December 1973. Elsevier, 335-337.
- Krizmanić, I. I., Ivanović, A. T. (2010). Population systems of the *Pelophylax esculentus* complex in the southern part of its range. *Folia Zoologica*, 59(3), 215.
- Kruidenier, L. A., Verspaget, H. W. (2002). Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous? *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16(12), 1997-2015.
- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P., Georgakilas, A. G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1), 193-201.
- Kubrak, O. I., Husak, V. V., Rovenko, B. M., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I. (2011). Cobalt-induced oxidative stress in brain, liver and kidney of goldfish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 85(6), 983-989.
- Kuzmin, S. L. (1999). Amphibians of the Former Soviet Union. *Tovarischestvonauchnyh i zdani KMK*, pp. 1-538, Moscow (Russia).
- Labieniec, M., Gabryelak, T. (2007). Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected

- phenolic compounds in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or Cu<sup>2+</sup> ions. *Toxicology in Vitro*, 21(1), 146-156.
- Levins, R. (1969). Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 15(3), 237-240.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., Schettino, T. (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, 46(3), 324-330.
- Liu, R. H., Hotchkiss, J. H. (1995). Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(2), 73-89.
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 656-666.
- Ljeti , Lj.,  ekovi , V., Mihajlovi , B. (2008). Obedska Bara and its effect on water regime in “Kupinske Grede“. *Bulletin Faculty of Forestry*, 97,187–196.
- Loumbourdis, N. S. (1997). Heavy metal contamination in a lizard, *Agama stellio stellio*, compared in urban, high altitude and agricultural, low altitude areas of North Greece. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(6), 945-952.
- Loumbourdis, N. S., Wray, D. (1998). Heavy-metal concentration in the frog *Rana ridibunda* from a small river of Macedonia, Northern Greece. *Environment International*, 24(4), 427-431.
- Lower, W. R., Kendall, R. J. (1990). Sentinel species and sentinel bioassay. *Biomarkers of Environmental Contamination*, pp. 309-331, Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.

- Mardirosian, M. N., Lascano, C. I., Ferrari, A., Bongiovanni, G. A., Venturino, A. (2015). Acute toxicity of arsenic and oxidative stress responses in the embryonic development of the common South American toad *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5), 1009-1014.
- Marques, S. M., Antunes, S. C., Nunes, B., Gonçalves, F., Pereira, R. (2011). Antioxidant response and metal accumulation in tissues of Iberian green frogs (*Pelophylax perezi*) inhabiting a deactivated uranium mine. *Ecotoxicology*, 20(6), 1315-1327.
- Mates, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153(1), 83-104.
- McCarthy, J. F., Halbrook, R. S., Shugart, L. R. (1991). Conceptual Strategy for Design, Implementation, and Validation of a Biomarker-based Biomonitoring Capability. Oak Ridge National Lab., pp. 1-81 TN (United States).
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radical Biology and Medicine*, 5(5-6), 363-369.
- Meister, A. (1992). On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochemical Pharmacology*, 44(10), 1905-1915.
- Miller, J. K., Brzezinska-Slebozinska, E., Madsen, F. C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2812-2823.
- Misra, H. P., Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170-3175.
- Mollov, I., Boyadzhiev, P., Donev, A. (2010). Trophic role of the Marsh Frog *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771)(Amphibia, Anura) in the aquatic ecosystems. *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences*, 16, 298-306.
- Moore, W. S. (1984). Evolutionary ecology of unisexual fishes. *Evolutionary Genetics of Fishes*, pp. 329-398, Springer US.
- Moriarty, M. M., Koch, I., Reimer, K. J. (2013). Arsenic species and uptake in amphibians (*Rana clamitans* and *Bufo americanus*). *Environmental Science: Processes and Impacts*, 15(8), 1520-1528.
- Mullineaux, P. M., Creissen, G. P. (1997). Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 34, 667-713.

- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216.
- NIVA 2006 (2006). (Norwegian Institute for Water Research), *Revitalization of the DTD Grand Canal through Vrbas – Final Report*.
- Nordenson, I., Beckman, L. (1991). Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals? *Human Heredity*, 41(1), 71-73.
- Ogielska, M. (1994): II International symposium on ecology and genetics of European water frogs. *Zoology Poland*, 39,117-528.
- Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver Cu, Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38388-38393.
- Olgunoğlu, M. P., Olgunoğlu, İ. A., Bayhan, Y. K. (2015). Heavy metal concentrations (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) in giant red shrimp (*Aristaeomorpha foliacea* Risso 1827) from the Mediterranean Sea. *Liver*, 300(250), 200-212.
- Oliva, M., Vicente, J. J., Gravato, C., Guilhermino, L., Galindo-Riaño M. D., (2012). Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal and spatial variation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75, 151-162.
- Olson, D. L., Christensen, G. M. (1980). Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro). *Environmental Research*, 21(2), 327-335.
- Oyeleke, G. O., Salam, M. A., Adetoro, R. O. (2012) Nutritive potentials of male and female Edible frog (*Pelophylax esculentus*) II: selected trace elements and functional properties. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology* 1, 29-31
- Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315-424.
- Papadimitriou, E., Loumbourdis, N. S. (2002). Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(6), 0885-0891.
- Park, H., Ahn, I. Y., Kim, H., Lee, J., 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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 150(4), 528-536.
- Paunović, A., Bjelić-Čabrilo, O., Šimić, S. (2010). The diet of water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from the Petrovaradinski Rit marsh (Serbia). *Archives of Biological Sciences (Serbia)*, 62,797-804.
- Pavlović, S. Z., Mitić, S. S. B., Radovanović, T. B., Perendija, B. R., Despotović, S. G., Gavrić, J. P., Saičić, Z. S. (2010). Seasonal variations of the activity of antioxidant defense enzymes in the red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea. *Marine Drugs*, 8(3), 413-428.
- Peakall, D. W. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News* 1, 55-60.
- Plenet, S., Hervant, F., Joly, P. (2000a). Ecology of the hybridogenetic *Rana esculenta* complex: differential oxygen requirements of tadpoles. *Evolutionary Ecology*, 14(1), 13-23.
- Plenet, S., Pagano, A., Joly, P., Fouillet, P. (2000b). Variation of plastic responses to oxygen availability within the hybridogenetic *Rana esculenta* complex. *Journal of Evolutionary Biology*, 1(3), 20-28.
- Plötner, J., Becker, C., Plötner, K. (1994). Morphometric and DNA investigations into European water frogs (*Rana* kl. *esculenta* Synklepton (Anura, Ranidae)) from different population systems. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 32(3), 193-210.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 66(8), 1499-1503.
- Popović, A., Đorđević, D., Relić, D., Vukmirović, Z., Mihajlidi-Zelić, A., Polić, P. (2009). Speciation of heavy metals in geological matter of the serbian national parks, protected areas and cities within the danube river basin after the war conflict in 1999. *Environmental Consequences of War and Aftermath*, pp 283-319, Springer Berlin Heidelberg.
- Prokić, M. D., Borković-Mitić, S. S., Krizmanić, I. I., Mutić, J. J., Vukojević, V., Nasia, M., Gavrić, J., Despotović, S. G., Gavrilović, B. R., Radovanović, T. B., Pavlović, S. Z., Saičić, Z. S. (2016a). Antioxidative responses of the tissues of

- two wild populations of *Pelophylax* kl. *esculentus* frogs to heavy metal pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 21-29.
- Prokić, M. D., Borković-Mitić, S. S., Krizmanić, I. I., Mutić, J. J., Trifković, J., Gavrić, J., Despotović, S. G., Gavrilović, B. R., Radovanović, T. B., Pavlović, S. Z., Saičić, Z. S. (2016b). Bioaccumulation and effects of metals on oxidative stress and neurotoxicity parameters in the frogs from the *Pelophylax esculentus* complex. *Ecotoxicology*, DOI: 10.1007/s10646-016-1707-x.
- Pruvost, N., Hollinger, D., Reyer, H. U. (2013). Genotype temperature interactions on larval performance shape population structure in hybridogenetic water frogs (*Pelophylax esculentus* complex). *Functional Ecology*, 27(2), 459-471.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., Freeman, B. A. (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(2), 481-487.
- Radovanović, T. B., Prokić, M. D., Gavrić, J. P., Despotović, S. G., Gavrilović, B. R., Borković-Mitić, S. S., Pavlović, S. Z., Saičić, Z. S. (2015). Glutathione-dependent enzyme activities and concentrations of glutathione, vitamin E and sulfhydryl groups in barbel (*Barbus barbus*) and its intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Ecological Indicators*, 54, 31-38.
- Regoli, F., Principato, G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31(2), 143-164.
- Rist, L., Semlitsch, R. D., Hotz, H., Reyer, H. U. (1997). Feeding behaviour, food consumption, and growth efficiency of hemiclinal and parental tadpoles of the *Rana esculenta* complex. *Functional Ecology*, 11(6), 735-742.
- RHMZ(2014). Annual Program of the Republic Hydrometeorological Service of Serbia.
- Rodriguez V. M., Jimenez-Capdeville M. E., Giordano M.(2003). The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology Letters*, 145(1), 1-18.
- Romani, R., Antognelli, C., Baldracchini, F., De Santis, A., Isani, G., Giovannini, E., Rosi, G. (2003). Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interactions*, 145(3), 321-329.

- Santos, B., Ribeiro, R., Domingues, I., Pereira, R., Soares, A. M., Lopes, I. (2013). Salinity and copper interactive effects on perez's frog *Pelophylax perezii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(8), 1864-1872.
- Sarkarati, B., Çokuğraş, A. N., Tezcan, E. F. (1999). Inhibition kinetics of human serum butyrylcholinesterase by Cd 2+, Zn 2+ and Al 3+: comparison of the effects of metal ions on cholinesterases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122(2), 181-190.
- Schafer, F. Q., Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1191-1212.
- Scheiner, S. M. (1993). Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 35-68.
- Schlaepfer, M. A., Hoover, C., Dodd, C. K. (2005). Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *BioScience*, 55(3), 256-264.
- Semlitsch, R. D., Hotz, H., Guex, G. D. (1997). Competition among tadpoles of coexisting hemiclones of hybridogenetic *Rana esculenta*: support for the frozen niche variation model. *Evolution*, 1249-1261.
- Shaapera, U., Nnamonu, L. A., Eneji, I. S. (2013). Assessment of heavy metals in *Rana esculenta* organs from River Guma, Benue State Nigeria. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4(9), 496-506.
- Shafi, S. M. (2005). *Environmental Pollution*. Atlantic Publisher, New Delhi.
- Shanker, G., Syversen, T., Aschner, M. (2003). Astrocyte-mediated methylmercury neurotoxicity. *Biological Trace Element Research*, 95(1), 1-10.
- Sharma, S. K. (2014). *Heavy Metals in Water: Presence, Removal and Safety*. Royal Society of Chemistry.
- Sichak, S. P., Dounce, A. L. (1986). Analysis of the peroxidatic mode of action of catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 249(2), 286-295.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3), 31-38.

- Sies, H., Cadenas, E., Symons, M. C. R., Scott, G. (1985). Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 311(1152), 617-631.
- Singer, S. F. (1970). *Global Effects of Environmental Pollution*. Springer Science and Business Media, Dordrecht.
- Sohal, R. S., Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273(5271), 59-63.
- Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A., Krest, S. (2010). *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. CRC Press.
- Štajn, A. Š., Žikić, R. V., Saičić, Z. S. (2007). *Ekofiziologija i Ekotoksikologija Životinja*. pp. 1-449, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac.
- Stearns, D. M., Wetterhahn, K. E. (1997). Intermediates produced in the reaction of chromium (VI) with dehydroascorbate cause single-strand breaks in plasmid DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 10(3), 271-278.
- Stolyar, O. B., Lushchak, V. I. (2012). *Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish*. INTECH Open Access Publisher.
- Stolyar, O. B., Loumbourdis, N. S., Falfushinska, H. I., Romanchuk, L. D. (2008). Comparison of metal bioavailability in frogs from urban and rural sites of Western Ukraine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(1), 107-113.
- Sura, P., Ristic, N., Bronowicka, P., Wróbel, M. (2006a). Cadmium toxicity related to cysteine metabolism and glutathione levels in frog *Rana ridibunda* tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 142(1), 128-135.
- Sura, P., Wróbel, M., Bronowicka, P. (2006b). Season dependent response of the Marsh frog (*Rana ridibunda*) to cadmium exposure. *Folia Biologica*, 54(3-4), 159-165.
- Taiwo, I. E., Henry, A. N., Imbufe, A. P., Adetoro, O. O. (2014). Heavy metal bioaccumulation and biomarkers of oxidative stress in the wild African tiger frog, *Hoplobatrachus occipitalis*. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 8(1), 6-15.

- Takada, Y., Noguchi, T., Okabe, T., Kajiyama, M. (1982). Superoxide dismutase in various tissues from rabbits bearing the Vx-2 carcinoma in the maxillary sinus. *Cancer Research*, 42(10), 4233-4235.
- Tamura, M., Oshino, N., Chance, B. (1982). Some characteristics of hydrogen-and alkylhydroperoxides metabolizing systems in cardiac tissue. *Journal of Biochemistry*, 92(4), 1019-1031.
- Tan, X., Tang, C., Castoldi, A. F., Manzo, L., Costa, L. G. (1993). Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 38(2), 159-170.
- Tandoğan, B., Uluşu, N. N. (2006). Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31, 230-237.
- Taylor, P. (1991). The cholinesterases. *Journal of Biology and Chemistry*, 266(7), 4025-4028.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, pp. 133-164 Springer Basel.
- Triquet-Amiard, C., Amiard, J. C., Rainbow, P. S. (2012). Ecological Biomarkers. *Indicators of Ecotoxicological Effects*, pp. 125-183, CRC Press.
- Uzzell, T., Günther, R., Berger, L. (1976). *Rana ridibunda* and *Rana esculenta*: a leaky hybridogenetic system (Amphibia Salientia). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 147-171.
- Valko, M. M. H. C. M., Morris, H., Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1-2), 37-56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44-84.

- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Van Doninck, K., Schön, I., De Bruyn, L., Martens, K. (2002). A general purpose genotype in an ancient asexual. *Oecologia*, 132(2), 205-212.
- Vasin, J., Sekulić, P., Bogdanović, D. Pucarević, M. (2004) Contamination levels of non-agricultural and industrial soils in the Vojvodina. [http://www.bodenkunde2.unifreiburg.de/eurosoil/abstracts/id742\\_Vasin\\_full.pdf](http://www.bodenkunde2.unifreiburg.de/eurosoil/abstracts/id742_Vasin_full.pdf)
- Ventura-Lima, J., Bogo, M. R., Monserrat, J. M. (2011). Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: a comparative biochemical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), 211-218.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(3), 281-300.
- Vicente-Martorell, J. J., Galindo-Riaño, M. D., García-Vargas, M., Granado-Castro, M. D. (2009). Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2), 823-836.
- Vidal, M. L., Bassères, A., Narbonne, J. F. (2002). Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 132(1), 93-104.
- Vioque-Fernández, A., De Almeida, E. A., López-Barea, J. (2007). Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 145(3), 404-412.
- Vogiatzis, A. K., Loumbourdis, N. S. (1998). Cadmium accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionein and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl<sub>2</sub>. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(1), 64-68.

- Voituron, Y., Joly, P., Eugène, M., Barré, H. (2005). Freezing tolerance of the European water frogs: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(6), 1563-1570.
- Vorbürger, C. (2001). Non hybrid offspring from matings between hemiclinal hybrid waterfrogs suggest occasional recombination between clonal genomes. *Ecology Letters*, 4(6), 628-636.
- Vorbürger, C., Reyer, H. U. (2003). A genetic mechanism of species replacement in European waterfrogs? *Conservation Genetics*, 4(2), 141-155.
- Wang, M. Z., Jia, X. Y., Dong, A. H., He, X., Chu, J. (2006). Effects of cadmium on oxidative stress and antioxidative ability in frog *Rana nigromaculata* under a long term exposure. *Acta Ecologica Sinica*, 26(6), 1718-1724.
- Wang, W. X., Fisher, N. S. (1997). Modeling the influence of body size on trace element accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*, 161, 103-115.
- Wang, W., Ballatori, N. (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 335-356.
- WHO International programme on chemical safety - IPCS (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Winston, G. W., Di Giulio, R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19(2), 137-161.
- Yilmaz, N., Kutrup, B., Cobanoğlu, U., Özorun, Y. (2005). Age determination and some growth parameters of a *Rana ridibunda* population in Turkey. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 51(1), 67-74.
- Zatta, P., Ibn-Lkhatat-Idrissi, M., Zambenedetti, P., Kilyen, M., Kiss, T. (2002). In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. *Brain Research Bulletin*, 59(1), 41-45.
- Zhang, H., Cai, C., Shi, C., Cao, H., Han, Z., Jia, X. (2012). Cadmium-induced oxidative stress and apoptosis in the testes of frog *Rana limnocharis*. *Aquatic Toxicology*, 122, 67-74.

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*, 606(2), 135-150.



## BIOGRAFIJA



Marko D. Prokić, istraživač saradnik, rođen je 29.11.1988. godine u Jagodini. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Jagodini. Diplomirao je 2010. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu (studijska grupa Biologija), sa prosečnom ocenom 9,48. Iste godine je upisao Master akademske studije biologije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Kragujevcu i završio ih 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,87. Master rad pod nazivom „Prooksidacioni efekti aspartama u krvi pacova“ odbranio je 2012. godine pod mentorstvom Dr Branke Ognjanović, vanrednog profesora Prirodno-matematičkog fakulteta u Kragujevcu. Dobio je nagradu za najboljeg studenta iz fonda Prof. Dr Radoslava V. Žikića 2013. godine. Školske 2012/2013. godine upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Animalna i humana fiziologija. Od 2012. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabran je 2015. godine.

Od 2012. godine, angažovan 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 uradio je u Odeljenju za fiziologiju pod mentorstvom Dr Slavice Borković-Mitić, naučnog saradnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.

Do sada je objavio 13 bibliografskih jedinica: 10 naučnih radova u međunarodnim časopisima i 3 kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja.

**Изјава о ауторству**

Потписани/а \_\_\_\_\_ Марко Д. Прокић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3027/2012 \_\_\_\_\_

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

„Параметри антиоксидационог система у ткивима жаба *Pelophylax*  
*esculentus* комплекса као биомаркери излагања металима“

- 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 аутора**

У Београду, 12.09.2016.

\_\_\_\_\_

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Марко Д. Прокић

Број индекса Б3027/2012

Студијски програм Анимална и хумана физиологија

Наслов рада „Параметри антиоксидационог система у ткивима жаба *Pelophylax*  
*esculentus* комплекса као биомаркери излагања металима“

Ментор Др Славица Борковић-Митић, научни сарадник Института за биолошка  
истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду,

Др Небојша Јаснић, доцент Биолошког факултета Универзитета у  
Београду

Потписани/а Марко Д. Прокић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла да буде похрањена у **Дигиталном репозиторијуму 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 аутора**

У Београду, 12.09.2016.

\_\_\_\_\_

### Изјава о коришћењу

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

„Параметри антиоксидационог система у ткивима жаба *Pelophylax  
esculentus* комплекса као биомаркери излагања металима“

---

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

**Потпис аутора**

У Београду, 12.09.2016.

---

1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.