

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ »

Σταμάτης Τσικόγιας

Αξιολόγηση βιοχημικών δεικτών για τη μελέτη της
βιοσυσσώρευσης των μικροκυστινών στην ιχθυοπανίδα των
λιμνών



Λάρισα, Φεβρουάριος 2011

**Αξιολόγηση βιοχημικών δεικτών για τη μελέτη της
βιοσυσσώρευσης των μικροκυστινών στην ιχθυοπανίδα των
λιμνών**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Αικατερίνη Μούτου: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών (Επιβλέπουσα)
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Ζήσης Μαμούρης: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Ιφιγένεια Κάγκαλου: Επίκουρος Καθηγήτρια Υδρολογίας, Λιμνολογίας και Ποταμολογίας
Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Με το τέλος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μα ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της διατριβής αυτής κ.Αικατερίνη Μούτου για τις συμβουλές και την υποστήριξή της κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους και τη συγγραφή της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Στέλλα Γεωργίου που στάθηκε σημαντική σύμβουλος και που χωρίς τη βοήθειά της όλα θα έμοιαζαν πιο δύσκολα...

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τη Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών Θεολογία Σαραφίδου και τον υποψήφιο διδάκτορα και μέλος του τεχνικού προσωπικού Κώστα Σταμάτη για τις συμβουλές τους και την άριστη συνεργασία μας.

Περιεχόμενα

Περίληψη

Abstract

Εισαγωγή

- i) Το φαινόμενο του ευτροφισμού στις Μεσογειακές λίμνες
- ii) Δομή – Ιδιότητες Μικροκυστινών
- iii) Βιοδείκτες που τεκμηριώνουν τη δράση των μικροκυστινών
 - A) Καταλάση
 - B) Γλουταθειόνη
 - Γ) Οξειδωμένα Λιπίδια (TBARS)
- iv) Στοιχεία βιολογίας κυπρίνου (*Cyprinus carpio*)
- v) Χώρος μελέτης
- vi) Σκοπός της μελέτης

Υλικά και Μέθοδοι

- i) Συλλογή δειγμάτων
- ii) Προετοιμασία δειγμάτων
- iii) Προσδιορισμός της δραστηριότητας της Καταλάσης
- iv) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης
- v) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)
- vi) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των TBARS
- vii) Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου
- viii) Στατιστική Ανάλυση

Αποτελέσματα

- i) Συγκέντρωση μικροκυστινών στο νερό και το φυτοπλαγκτόν
- ii) Συγκέντρωση μικροκυστινών στους ιστούς
- iii) Καταλάση
- iv) Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)
- v) Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG)
- vi) Οξειδωμένα λιπίδια (TBARS)
- vii) Συσχετίσεις (correlations)

Συζήτηση

Βιβλιογραφία

Περίληψη

Ο ευτροφισμός των λιμνών που παρατηρείται όλο και περισσότερο στις ρηχές μεσογειακές λίμνες, αναφέρεται στη συσσώρευση θρεπτικών, κυρίως από ανθρωπογενείς επεμβάσεις (αστικοποίηση, εντατική γεωργία). Η υπερσυγκέντρωση αζώτου, φωσφόρου και άλλων χημικών διαταράσσει το οικολογικό σύστημα της λίμνης και παρατηρείται δραματική αύξηση του πληθυσμού των αλγών και υδρόβιων φυτών. Ο ευτροφισμός σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία, το pH και άλλες περιβαλλοντικές παραμέτρους ευνοεί την αύξηση των κυανοβακτηρίων τα οποία παράγουν τις μικροκυστίνες, ηπατοτοξίνες που μετακινούνται μέσα στην τροφική αλυσίδα προς τους ανώτερους καταναλωτές όπως πουλιά, ψάρια και θηλαστικά.

Οι δραστηριότητες κάποιων ενζυμικών και μη παραγόντων έχει αποδειχτεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες οξειδωτικού στρες για την παρουσία μικροκυστινών. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η δραστηριότητα της καταλάσης και η συγκέντρωση των TBARS (δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέως), GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη) και GSSG (οξειδωμένη γλουταθειόνη) στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και στον νεφρό ατόμων κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) στη λίμνη Παμβώτιδα.

Αξιολογήθηκε η απόκριση αντιοξειδωτικών συστημάτων του κυπρίνου σε τρεις διαφορετικές περιόδους στη διάρκεια ενός έτους φυσικής έκθεσης σε μικροκυστίνες. Όλοι οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες διέφεραν σημαντικά ανάλογα με την περίοδο του έτους, ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ μικροκυστινών στους ιστούς και των παραγόντων που μετρήθηκαν. Η καταλάση εμφάνισε την υψηλότερη δραστηριότητά της στο ήπαρ, ενώ στον νεφρό και τον εγκέφαλο δεν εμφάνισε εποχιακές διακυμάνεις. Τα TBARS, η GSH και η GSSG εμφάνισαν περίπου την ίδια διακύμανση σε όλους τους ιστούς και στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκε έντονη εποχιακή μεταβλητότητα.

Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως αντίθετα με τις μελέτες που γίνονται υπό εργαστηριακές συνθήκες, στην παρούσα μελέτη οι αντιοξειδωτικοί δείκτες στους ιστούς δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική συσχέτιση με τις συγκεντρώσεις μικροκυστινών και ως εκ τούτου δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστοι δείκτες έκθεσης σε μικροκυστίνες υπό φυσικές συνθήκες.

Abstract

Eutrophication is referred to the accumulation of the nutrients mainly by anthropogenic interference (urbanization, intensive agriculture) and is common in many Mediterranean lakes. High concentrations of nitrogen, phosphorus and other nutrients disturb the ecological system of lakes where dramatic growth of algae and aquatic plantation is observed. The eutrophication in combination with temperature, pH and other environmental parameters enhance the growth of cyanobacteria that produce microcystins, which are hepatotoxins that are transferred through the trophic chain to higher consumers like birds, fish and mammals.

The activity of enzymatic and non-enzymatic parameters has been proved to be a valuable biomarker of oxidative stress evoked in the presence of microcystins. In the present study the activities of catalase, TBARS, GSH and GSSG in liver, brain and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*) in lake Pamvotis were evaluated.

The response of antioxidant systems of common carp to natural yearly fluctuations of total microcystin concentration in three different periods within a year was evaluated. All the antioxidant parameters varied significantly throughout the year, yet correlations between the microcystin concentration and the antioxidant markers were not observed. Catalase activity was significantly higher in the liver compared with brain and kidney where it did not present any seasonal variation. TBARS, GSH and GSSG exhibited almost the same seasonal variation in all tissues.

Conclusively, the above results suggest that there were no significant correlations between the microcystin concentration and the markers of antioxidant capacity in contrast to previous studies generated under controlled laboratory conditions. Thus, the abovementioned markers can not be used reliably to infer exposure to microcystins under natural conditions.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

i) Το φαινόμενο του ευτροφισμού στις Μεσογειακές λίμνες

Ο όρος ευτροφισμός αναφέρεται στην υπέρμετρη αύξηση πρωτογενούς φυτικής βιομάζας (φυτοπλαγκτόν, υδροχαρή βλάστηση και φυτά) σε ένα κλειστό οικολογικό υδάτινο σύστημα. Ο ευτροφισμός των λιμνών είναι αποτέλεσμα της έντονης συσσώρευσης θρεπτικών, κυρίως αζώτου και φωσφόρου, από φυσικές επεμβάσεις όπως οι κλιματολογικές συνθήκες, τα υδρολογικά χαρακτηριστικά λιμνών και τα γεωγραφικά χαρακτηριστικά, αλλά κυρίως από ανθρωπογενείς επεμβάσεις (Jeppesen & Sammalkorpi 2002). Οι αβαθείς λίμνες οι οποίες βρίσκονται κυρίως σε χαμηλού υψόμετρου περιοχές όπως είναι οι παραμεσόγειες, είναι πολύ ευαίσθητες στον εμπλουτισμό από θρεπτικά στοιχεία λόγω της ολοένα και αυξανόμενης μετατροπής των φυσικών περιοχών σε αγροτική, αστική ή ημιαστική γη, το οποίο επιφέρει δραματικές αλλαγές στην τροφική αλυσίδα (Jeppesen et al. 2003). Σε παγκόσμια κλίμακα η κύρια αρνητική επίπτωση στις λίμνες είναι ο ευτροφισμός λόγω της υψηλής συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών από εξωτερικές πηγές όπως τα οικιακά απόβλητα και η έντονη αγροτική και βιομηχανική δραστηριότητα, η οποία διασπά τη στενή τροφική αλυσίδα των χερσαίων οικοσυστημάτων (Moss 1998, Jeppesen & Sammalkorpi 2002).

Ο ευτροφισμός οδηγεί σε μία μεγάλη σειρά βιολογικών αλλαγών στις λίμνες, με αρνητικά αποτελέσματα για την οικολογική τους ισορροπία. Ο ευτροφισμός επίσης επιφέρει πρακτικές επιπλοκές στη χρήση του νερού των λιμνών από ιχθυοκαλλιεργητικές μονάδες λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης τοξικών αλγών. Ειδικά στη σημερινή εποχή πολλές αναπτυσσόμενες χώρες αντιμετωπίζουν το πρόβλημα του ευτροφισμού ως απόρροια της γρήγορης οικονομικής ανάπτυξης και την εφαρμογή λανθασμένων στρατηγικών συντήρησης (Jeppesen & Sammalkorpi 2002).

Οι Μεσογειακές λίμνες είναι πολύ ευαίσθητες σε αλλαγές των υδρολογικών τους χαρακτηριστικών όπως η διακύμανση του επιπέδου του νερού. Μελέτες που έγιναν από τις βορειότερες περιοχές της Ευρώπης έως και τις υποτροπικές έδειξαν ότι

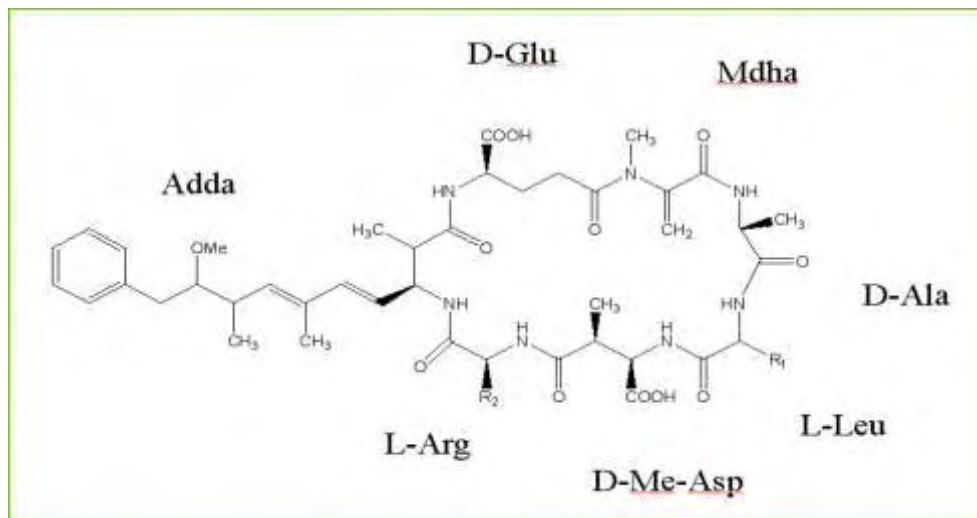
η στάθμη του νερού μπορεί να επιφέρει δραστικές συνέπειες στο οικοσύστημα των λιμνών (Coops et al. 2003). Ένα υψηλό επίπεδο στη στάθμη της λίμνης κατά την αυξητική περίοδο μπορεί να μειώσει τη διαθεσιμότητα σε φως στα υδρόβια φυτά, ενώ η χαμηλή στάθμη μπορεί να προκαλέσει ζημιά στους φυτικούς οργανισμούς μέσω του παγετού ή των κυμάτων που δημιουργούνται στη λίμνη (Fernandez – Alaez et al. 2004). Από την άλλη μεριά, η υδρολογικές παράμετροι είναι ένας σημαντικός παράγοντας που διαδραματίζει ρόλο και στην ισορροπία των θρεπτικών στοιχείων (Downing & McCauley 1992, Downing et al. 1999). Οι αλλαγές στα υδρολογικά συστήματα μπορεί να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην ισορροπία των ιόντων αλλά και τη δυναμική των θρεπτικών όχι μόνο άμεσα αλλά και έμμεσα διαμέσου διαφοροποιήσεων στην τροφική αλυσίδα περιλαμβάνοντας αλλαγές στην κοινωνία των μακροφύτων (Jeppesen et al., 2009a, 2009b). Η συγκέντρωση των βασικών ιόντων και θρεπτικών (αζώτου και φωσφόρου) διαφέρει ανάλογα με τη στάθμη του νερού της λίμνης και παρουσιάζει αξιοσημείωτη αύξηση κατά τη διάρκεια μιάς ξηράς περιόδου (Beklioglu et al. 2008). Κατά τη διάρκεια βροχερών ετών, η αλατότητα και η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά, παρουσιάζει ισχυρή εποχικότητα ενώ σε ξηρές περιόδους η αλατότητα και το ανόργανο άζωτο μπορεί να αυξηθούν σταδιακά.

Το φαινόμενο της ξηρασίας που επιφέρει μείωση στη στάθμη των λιμνών, ενδέχεται να προκαλέσει ευτροφισμό στις ρηχές λίμνες της Μεσογείου (Romo et al. 2004). Μία αύξηση σε θρεπτικά στοιχεία και αύξηση στην αλατότητα διαταρράσει την οικολογική ισορροπία διότι οι αλατούχες λίμνες τείνουν να εμφανίζουν περισσότερο το φαινόμενο του ευτροφισμού όπως και τα θολωμένα νερά σε αντίθεση με τα ρέοντα, με την ίδια περιεκτικότητα θρεπτικών ουσιών (Jeppesen et al., 1994).

Επιπρόσθετα, άλλες περιβαλλοντικές παράμετροι όπως η θερμοκρασία και το pH των λιμνών σε συνδυασμό με τον ευτροφισμό έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να οδηγήσει σε άνθηση των κυανοβακτηρίων που ακολουθείται από έντονο πολλαπλασιασμό των κυανοβακτηριακών κυττάρων. Τα κυανοβακτήρια παράγουν διαφόρων ειδών τοξίνες αλλά τα πιο γνωστά μέλη της ομάδας είναι οι μικροκυστίνες (de Figueiredo et al. 2004).

ii) Δομή – Ιδιότητες Μικροκυστινών

Οι μικροκυστίνες (MIC), οι πιο συχνά παρατηρούμενες τοξίνες, είναι μία οικογένεια ηπατοτοξικών επταπεπτιδίων που παράγονται από συγκεκριμένα είδη κυανοβακτηρίων όπως τα *Anaeba*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Planktonthrix* αλλά κυρίως από τα *Microcystis* (Chorus & Bartram 1999). Υπάρχουν περισσότερες από 75 μορφές μικροκυστινών οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα με το βαθμό μεθυλίωσης, υδροξυλίωσης, επιμερισμού, της ακολουθίας των πεπτιδίων και της τοξικότητάς τους. Η γενική τους δομή είναι κυκλική (–D-Ala–L-X–erythro-β-methyl-DisoAsp–L-Y–Adda–D-isoGlu–N-methyldehydro-Ala). Το αμινοξύ Adda (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4, 6-dienoic acid) είναι εκείνο που θεωρείται υπεύθυνο για την ηπατοτοξική δράση των μικροκυστινών (de Figueiredo et al. 2004). Η πιο γνωστή τοξίνη είναι η μικροκυστίνη-LR (MC-LR) που περιλαμβάνει τα αμινοξέα λευκίνη και αργινίνη (Εικόνα 1.1, Amado et al 2010).



Εικόνα 1.1) Δομή της μικροκυστίνης LR

Οι τοξίνες που απελευθερώνονται μετά τη λύση ενός κυανοβακτηριακού κυττάρου έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να επιδράσουν σε πολλούς οργανισμούς από μικροάλγη έως και θηλαστικά (de Figueiredo et al. 2004).

Οι υδρόβιοι οργανισμοί εκτίθενται σε μικροκυστίνες μέσω διάφορων οδών. Μπορούν να έρθουν σε άμεση επαφή με τις τοξίνες μετά τη λύση του βακτηριακού κυττάρου. Επίσης, κάποια παμφάγα και κάποια είδη που τρέφονται με με φυτοπλαγκτόν μπορούν να προσλάβουν τα κυανοβακτήρια ως τροφή (Li et al. 2004). Το γεγονός ότι οι μικροκυστίνες συσσωρεύονται σε είδη ζωοπλαγκτού (Mohamed 2001), σε μύδια (Eriksson et al. 1989), σε οστρακόδερμα (Chen & Xie 2005), σε μερικά είδη ιχθύων (Soares et al. 2009) και κάποια άλλα σπονδυλωτά (Chen et al. 2009), αποδεικνύει ότι ένας άλλος δρόμος έκθεσης για τις τοξίνες για τα υδρόβια αλλά και τα χερσαία είδη, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, είναι η κατανάλωση υδρόβιων ειδών που προηγουμένως είχαν εκτεθεί σε μικροκυστίνες και τις είχαν βιοσυσσωρεύσει στους ιστούς τους (Zhang et al. 2009).

Οι επιπτώσεις των μικροκυστινών στα θηλαστικά περιλαμβάνουν διατάραξη του ηπατικού κυτταροσκελετού, απόπτωση, νέκρωση και εσωτερική αιμορραγία στο ήπαρ που μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο μέσω αιμορραγικού σοκ σε συνθήκες άμεσης τοξικότητας (Dawson 1998). Χρόνια χορήγηση μικροκυστινών μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του βάρους του ήπατος, ηπατο-ιστολογική βλάβη (Heinze 1999) καρκίνο του ήπατος (Hu et al. 2008, Li et al. 2009) και βλάβη στον νεφρό (Milutinovi et al. 2003). Σε μερικά είδη ψαριών παρατηρήθηκαν παρόμοια αλλά όχι ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα (Fischer et al. 2000). Μελέτες έδειξαν ότι η χρόνια έκθεση διάφορων ειδών ψαριών σε μικροκυστίνες επηρεάζει κυρίως την αύξηση (Bury et al. 1995), κάποιους αιματολογικούς δείκτες (Li et al. 2004), την ιοντική ρύθμιση (Gaete et al. 1994), εγείρει ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά (Fischer & Diedrich 2000a), τον καρδιακό ρυθμό (Best et al. 2001), την κινητική ικανότητα και συμπεριφορά (Beganz et al. 2004). Επίσης έχει αναφερθεί θάνατος ψαριών μετά από έκθεση σε μικροκυστίνες λόγω ηπατικής νέκρωσης και όχι λόγω ηπατικής αιμορραγίας όπως στα θηλαστικά (Falconer et al. 1994).

Λόγω του υψηλού μοριακού τους βάρους που κυμαίνεται από 900 έως 1100 Da, οι μικροκυστίνες δεν μπορούν να διαπεράσουν στις βιολογικές μεμβράνες και να συσσωρευτούν στους ιστούς (Svrcek & Smith 2004). Αντιθέτως κάποια είδη κυττάρων διαθέτουν μεμβρανικούς μεταφορείς μέσω των οποίων εισέρχονται οι μικροκυστίνες και συσσωρεύονται (Amando & Monserrat 2010). Συνήθως η τοξικότητα του κυττάρου που έχει μολυνθεί με μικροκυστίνες θεωρείται ότι

προσδιορίζεται από την ικανότητα του κυττάρου να δέχεται τις τοξίνες, με άλλα λόγια να έχει στη μεμβράνη του τους κατάλληλους μεταφορείς της τοξίνης. Μελέτες απέδειξαν πως η ενσωμάτωση των μικροκυστινών αναστάληκε από το χολικό οξύ και άλλες ενώσεις, προτείνοντας έτσι τη συμμετοχή ενός ή περισσότερων μη ειδικών μεταφορέων στη διαδικασία εισόδου των μικροκυστινών στο κύτταρο (Runnegar et al. 1995).

Σε μοριακό επίπεδο, ο κλασικός μηχανισμός τοξικότητας των μικροκυστινών είναι η δέσμευση των πρωτεϊνικών φωσφατασών PP1 και PP2A και αναστολή της δραστηριότητάς τους. Η αναστολή αυτή διασπά τη φωσφορυλική ισορροπία και προκαλεί υπερφωσφορυλίωση μίας μεγάλης ομάδας δομικών πρωτεϊνών που οδηγεί σε απόπτωση ή νέκρωση των κυττάρων (Amado & Moserrat 2010).

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες αποδεικνύουν πως οι μικροκυστίνες μπορούν να μεταβάλλουν το οξειδωτικό σύστημα και να επάγουν το οξειδωτικό στρες σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς. Η απορρόφηση των μικροκυστινών έχει συσχετιστεί με την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS, Ding et al. 2000a), το οποίο οδηγεί σε οξείδωση των λιπαρών οξέων (Pinho et al., 2005), βλάβη στο DNA (Zegura et al. 2003), μιτοχονδριακή βλάβη (Ding & Ong 2003) και διαφοροποιήσεις στο αμυντικό οξειδωτικό σύστημα (Vinagre et al. 2003).

Οι μικροκυστίνες έχουν κατηγορηθεί ότι διαταρράσουν τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ευνοώντας την παραγωγή ROS (Ding et al. 2002). Τα μιτοχόνδρια είναι οι κύριοι στόχοι των δραστικών ριζών οξυγόνου, γι' αυτό η διατήρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο (Aon et al. 2007). Ένα βασικό συστατικό του αμυντικού συστήματος των κυττάρων ενάντια στο οξειδωτικό στρες είναι η γλουταθειόνη (GSH). Η ικανότητά της να οξειδώνεται σε GSSG (οξειδοαναγωγικό δυναμικό $E_0' = -0,24V$), την καθιστά σημαντικό «καθαριστή» ROS για το κύτταρο. Τα μιτοχόνδρια ωστόσο, δεν παράγουν GSH με αποτέλεσμα η μιτοχονδριακή γλουταθειόνη είναι κυτταροπλασματικής προέλευσης (Meister, 1995). Κατά συνέπεια, μείωση της κυτταροπλασματικής GSH λόγω αύξησης των ROS συνεπάγεται μειωμένη συγκέντρωση GSH και αύξηση των ROS στα μιτοχόνδρια (Aon et al. 2007). Το οξειδωτικό στρες διαμέσου της οξείδωσης της ενδοκυττάριας GSH οδηγεί πιθανά σε εκπόλωση της κυτταρικής

μεμβράνης και αύξηση της μιτοχονδριακή διαπερατότητα με δραματικές συνέπειες για την παραγωγή ATP από αυτό (Chernyak, 1997).

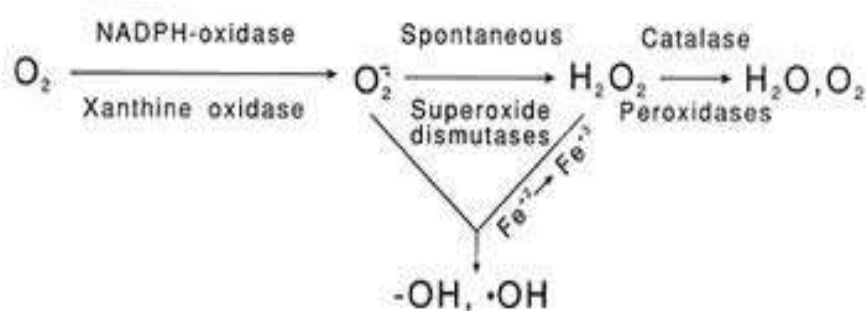
iii) Βιοδείκτες που τεκμηριώνουν τη δράση των μικροκυστινών

Εάν θέλουμε να βελτιώσουμε την ποιότητα των υδάτινων οικοσυστημάτων πρέπει να γνωρίζουμε ποια ποτάμια και λίμνες μολύνονται και ποιοι παράγοντες ευθύνονται γι'αυτή τη μόλυνση. Η ρύπανση των υδάτινων πηγών λόγω των όλο και περισσότερο χρησιμοποιούμενων χημικών παίζει τον πρωταρχικό ρόλο στην καταστροφή των οικοσυστημάτων, αλλά μία χημική ανάλυση από μόνη της δεν είναι αρκετή ώστε να αναλύσει τις αλληλεπιδράσεις των πολυπληθών οργανισμών ή ακόμα και των πολυπληθών και πολύπλοκων μιγμάτων χημικών που βρίσκονται εκεί. Η πιθανή χρησιμότητα των βιοδεικτών για την παρακολούθηση της ποιότητας του περιβάλλοντος και της υγείας ορισμένων οργανισμών έλαβε μεγάλης προσοχής τα τελευταία χρόνια. (Lopez et al. 2001). Η έκθεση σε ξενοβιοτικές ουσίες σε υδάτινα οικοσυστήματα σημαίνει δραματικές επιπτώσεις για τους ήδη υπάρχοντες οργανισμούς. Η απόκριση στη μόλυνση αντανακλάται σε μερικές ενζυμικές δραστηριότητες, κυρίως σε ένζυμα – κλειδιά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες ιδιαίτερος ευαίσθητους στη μόλυνση. Αυτοί οι βιοδείκτες συνεπώς, περιέχουν ένα εργαλείο που μας προειδοποιεί για τον πιθανό κίνδυνο μόλυνσης στα υδάτινα οικοσυστήματα ακόμα και σε πληθυσμούς ψαριών (Osmen et al. 2000).

A) Κατάληση

Ως ROS (reactive oxygen species –δραστικές ρίζες οξυγόνου) αναφέρονται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και ελεύθερες ρίζες που μπορούν να παραχθούν από αυτό όπως $-OH$ (Li et al. 2007). Όταν ένας ιστός ή ένα κύτταρο εκτίθεται σε οξειδωτικά, ιδιαίτερα σε ελεύθερες ρίζες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τότε ο ιστός ή το κύτταρο βρίσκεται σε καθεστώς οξειδωτικού στρες.(Ding et al. 2003)

Σημαντικό ρόλο στην άμυνα του κυττάρου ενάντια στο οξειδωτικό στρες κατέχουν οι δισμουτάσες του υπεροξειδίου, οι οποίες καταλύουν τη μετατροπή δυο ριζών σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Στη συνέχεια, το υπεροξείδιο του υδρογόνου που σχηματίζεται περισυλλέγεται από την καταλάση, μια αιμοπρωτεΐνη που βρίσκεται σχεδόν παντού και η οποία καταλύει την αυτοοξειδοαναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο.



Εικόνα 1.2) Διάσπαση του H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο μέσω της καταλάσης.

Συνεπώς η καταλάση αποδεικνύεται μεγίστης σημασίας ένζυμο για την υπεράσπιση του κυττάρου από τα ROS.

B) Γλουταθειόνη

Οι αντιδράσεις σύζευξης μπορούν να μελετηθούν μετρώντας τα επίπεδα γλουταθειόνης, η οποία εμπλέκεται στην άμυνα ενάντια στο οξειδωτικό στρες (Osmen et al. 2000).

Η γλουταθειόνη συναντάται σε δύο μορφές, την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG). Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) είναι ευρέως διαδεδομένη στα κύτταρα. Είναι ένα τριπεπτίδιο με δυο ειδικούς παράγοντες: την παρουσία του γ-γλουταμυλικού δεσμού και μίας ελεύθερης σουλφοδρυλικής ομάδας (-SH).

Η GSH μπορεί να συμμετέχει στην αποτοξικοποιητική διαδικασία με έμμεσο ή άμεσο τρόπο. Στην πρώτη περίπτωση η GSH χρησιμεύει ως υπόστρωμα στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης έτσι ώστε να μειώσει το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Επιπρόσθετα, η GSH δρά άμεσα ως καταστολέας των ελευθέρων ριζών και αντιδρά με το OH, το HOCl και τα υπεροξειδία (Halliwell et al. 1999). Γι' αυτό το λόγο η ελάττωση της GSH συνοδεύεται από αύξηση των ROS. Στη δεύτερη περίπτωση η GSH θεωρείται σημαντική για τη ρύθμιση της κυττοσκελετικής οργάνωσης. Έχει αποδειχτεί ότι οι μικροκυστίνες μπορούν να συζευχτούν με την GSH και την κυστεΐνη με τη βοήθεια της GST (glutathione S-transferase) (Pflumacher et al. 1998). Όλα τα παραπάνω στοιχεία αποδεικνύουν την κρισιμότητα του ρόλου της GSH στην αποτοξικοποίηση από τις κυανοβακτηριακές τοξίνες.

Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες η GSH μπορεί να οξειδωθεί δημιουργώντας την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Η οξείδωση της GSH σε GSSG καταλύεται από το ένζυμο GPOx και η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή η αναγωγή της GSH από GSSG γίνεται με τη βοήθεια της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) (Trambo et al. 2010). Η GR είναι σημαντική για να διατηρηθεί ισορροπία στο λόγο GSH/GSSG κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες και καταλύει το μετασχηματισμό της οξειδωμένης μορφής GSSG στην ανηγμένη μορφή GSH, οξειδώνοντας το NADPH σε NADP+. Ο λόγος GSH/GSSG χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης οξειδωτικής κατάστασης κατά την παρουσία ROS στα κύτταρα (Wu et al. 2004).

Γ) Οξειδωμένα Λιπίδια (TBARS)

Μία σοβαρή βιοχημική διαταραχή από το οξειδωτικό στρες είναι η αυξημένη οξείδωση των λιπαρών οξέων. Στα ψάρια η οξείδωση μετριέται ως δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέως (TBARS) και αποτελεί καθιερωμένο βιοδείκτη σε πολυάριθμες μελέτες (Ando & Yanagida 1999, Wilhelm Filho et al. 2001a). Τα παράγωγα της οξείδωσης των λιπαρών οξέων σχηματίζονται με την απορρόφηση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ. Πιθανή επίθεση από μοριακό οξυγόνο παράγει ένα οξειδωμένο λιπίδιο που μπορεί να αφαιρέσει ένα άτομο

υδρογόνου από ένα διπλανό λιπίδιο ώστε να δημιουργήσει ένα λιπιδικό υπεροξειδίο. Το MDA (Malondialdehyde) αποτελεί το κύριο προϊόν της οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) (Liu et al., 1997). Τα PUFAs είναι πολύ ευαίσθητα στις ρίζες υδροξυλίου λόγω της γειννίασης των καρβονυλικών δεσμών, το οποίο επιτρέπει την εύκολη απορρόφηση ατόμων υδρογόνου από μία μεθυλική ομάδα (Halliwell & Gutteridge, 1991).

Η οξείδωση των λιπαρών οξέων επηρεάζει την πλαστικότητα της μεμβράνης όπως και την ακεραιότητα των βιομορίων που σχετίζονται με τη μεμβράνη. Από τη στιγμή που τα λιπίδια στα ψάρια αντιτίθενται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και τις αιμοπρωτείνες του σιδήρου, το οποίο μπορεί να δράσει ως ριζοσπαστική μορφή οξυγόνου κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα λιπίδια μπορεί να προκαλούν μεγάλο ποσοστό φθοράς στα κύτταρα. Αυτά τα οξειδωμένα λιπίδια μπορεί να επιτεθούν σε κοντινές πρωτείνες προκαλώντας τη δημιουργία καρβονύλια πρωτεϊνών (Almroth et al. 2005).

iv) Στοιχεία βιολογίας κυπρίνου (Cyprinus carpio)

Ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα ψάρια των γλυκών νερών σε παγκόσμια κλίμακα λόγω της γρήγορης ανάπτυξης και εύκολης προσαρμογής του. Απαντάται σχεδόν σε όλο τον κόσμο, από τις λίμνες και τα ποτάμια της Ευρώπης έως την Αμερική και την Ασία. Καταναλώνεται σε όλο τον κόσμο και αυτό μαρτυρά το έντονο οικονομικό ενδιαφέρον που παρουσιάζει η εκτροφή του συγκεκριμένου ψαριού. Ο τόπος προέλευσής του θεωρείται ο Δούναβης, ενώ είναι ένα από τα πρώτα είδη που εισχώρησαν σε άλλες χώρες.

Ταξινόμηση Κυπρίνου

- Οικογένεια : Cyprinidae
- Τάξη : Cypriniformes
- Κλάση : Actinopterygii



Εικόνα 1.3) Κυπρίνος (*Cyprinus carpio*)

Αποτελεί το σημαντικότερο μέλος μιας οικογένειας ψαριών του γλυκού νερού στην οποία έχει δώσει και το όνομά του (οικογένεια Κυπρινιδών). Ζει σε υφάλμυρα και γλυκά νερά με pH από 7,0 έως 7,5 και κλίμα υποτροπικό. Προτιμά αργά ρέοντα ύδατα και μαλακά ιζήματα. Αναπτύσσεται κυρίως σε μεγάλους ποταμούς και αβαθείς λίμνες. Είναι παμφάγο αλλά προτιμά τα υδροχαρή φυτά και άλγη και λιγότερο έντομα ή καρκινοειδή (www.fishbase.org). Λόγω των διατροφικών του προτιμήσεων εκτίθεται σε πολλούς παράγοντες περιβαλλοντικής μόλυνσης συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων (Falfushynska & Stolyar, 2009).

Η ευρεία εξάπλωση του, η θέση του στο τροφικό πλέγμα των οικοσυστημάτων που απαντάται, η εύκολη εκτροφή του και η κατανάλωσή του από τον άνθρωπο, έχουν καταστήσει τον κυπρίνο ένα σημαντικό πειραματικό είδος για την οικοτοξικολογία τόσο σε μελέτες πεδίου όσο και εργαστηριακές συνθήκες (Oruc & Uner 2002, Sakamoto et al. 2003).

ν) Χώρος μελέτης

Η μελέτη αφορούσε στη λίμνη Παμβώτιδα ή αλλιώς λίμνη των Ιωαννίνων. Η λίμνη Παμβώτιδα βρίσκεται στους πρόποδες του όρους Μητσικέλι στα Ιωάννινα. Έχει μέσο βάθος 4m (9m μέγιστο) και καλύπτει 22 km². Παρά το μικρό της μέγεθος και βάθος, αποτελεί οικοσύστημα μεγάλης σημασίας και γι'αυτό ανήκει στο Ευρωπαϊκό Δίκτυο Προστατευμένων Περιοχών (Natura 2000). Διατηρεί μεγάλη βιοποικιλότητα καθώς φιλοξενεί μεγάλο αριθμό ψαριών, πουλιών και αμφιβίων. Ένα από τα ψάρια που βρίσκονται σε αφθονία στη λίμνη είναι και ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*), ο οποίος είχε εισαχθεί το 1929 με διασπορά γόνου (www.lakepamvotis.gr).

Ωστόσο, η λίμνη των Ιωαννίνων δέχεται μεγάλες ανθρωπογενείς επεμβάσεις από αστικά λύματα και απόβλητα γεωργοκτηνοτροφικών μονάδων επιτείνοντας το πρόβλημα του ευτροφισμού και της χημικής και μικροβιακής ρύπανσης. (Kagalou et al. 2001). Η παρουσία κυανοβακτηρίων (φυτοπλακτονικοί μικροοργανισμοί) στις ευτροφικές λίμνες αποτελεί πεδίο μελέτης πολλών ερευνητών καθώς έχει αναδειχθεί ως πρόβλημα μείζονος σημασίας. Μαζικοί πληθυσμοί κυανοβακτηρίων συχνά παρατηρούνται σε ψάρια λόγω του διαιτολογίου τους σε φυτικά είδη.

νi) Σκοπός της μελέτης

Η αύξηση των τοξικών κυανοβακτηρίων στις ελληνικές λίμνες είναι γνωστό φαινόμενο πλέον (Gkelis et al. 2005). Τα κυανοβακτήρια όμως έχουν αναφερθεί ως εξαιρετικά επικίνδυνα και δηλητηριώδη για τους ζωικούς οργανισμούς εδώ και 120 χρόνια. Από τότε έχει αποδειχτεί ότι τα κυανοβακτήρια μπορούν να παράγουν διάφορες τοξίνες (ηπατοτοξίνες, νευροτοξίνες ή κυτοτοξίνες) με σοβαρές συνέπειες για ψάρια, πουλιά ακόμη και τον άνθρωπο (Pflungmacher et al. 1998), πράγμα που αποδεικνύει τη σοβαρότητα του θέματος για τη δημόσια υγεία. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

i) Η εποχική διακύμανση της βιοσυσσώρευσης των μικροκυστινών στους κυπρίνους της Παμβώτιδας, που αποτελούν και αλίευμα για τους κατοίκους της περιοχής

ii) Η εποχική διακύμανση και αξιολόγηση βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με την απόκριση στο οξειδωτικό στρες παρουσία μικροκυστινών στους κυπρίνους της λίμνης Παμβώτιδας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

i) Συλλογή δειγμάτων

Πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες, η πρώτη στις 10/10/2007, η δεύτερη στις 4/3/2008 και η τρίτη στις 2/6/2008. Σε κάθε δειγματοληψία συλλέγονταν νερό, φυτοπλαγκτόν και κυπρίνοι από τη λίμνη των Ιωαννίνων. Κατά την πρώτη δειγματοληψία συλλέχθηκαν 10 άτομα κυπρίνου, κατά τη δεύτερη 5 άτομα και κατά την τρίτη 8 άτομα. Καταγράφονταν το βάρος κάθε ατόμου, ακολουθούσε αιμοληψία και στη συνέχεια συλλογή στομάχου, πρόσθιου και οπίσθιου εντέρου, ήπατος, νεφρού, εγκεφάλου και λευκού μυ. Όλοι οι ιστοί εμβαπτιζόνταν άμεσα σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια μεταφέρονταν στο εργαστήριο όπου αποθηκευόταν στους -80°C. Στο νερό, το φυτοπλαγκτό και όλους τους ιστούς που ελέχθησαν προσδιορίστηκε η ολική συγκέντρωση μικροκυστινών από τους συνεργάτες μας στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις που αφορούσαν στους δείκτες οξειδωτικού στρες στο ήπαρ, το νεφρό και τον εγκέφαλο.

ii) Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα αφού ξεπάγωσαν σε πάγο, ζυγίστηκαν, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες erpendorf των 2ml και προστέθηκε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 σε αναλογία 1:5. Ομογενοποιήθηκαν μηχανικά σε ομογενοποιητή ULTRA TURRAX, IKA-WERKE, στις 17000 στροφές για 30 sec. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 rpm για 30 min στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέους σωλήνες erpendorf και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν (triplicate) και οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η 1/3, 1/6, 1/11.

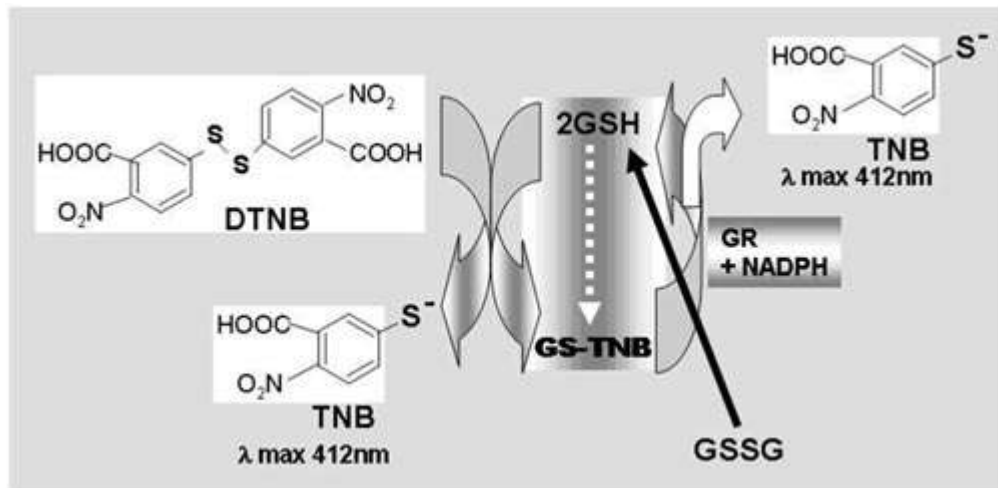
Οι ενζυμικές δραστηότητες προσδιορίστηκαν φωτομετρικά σε φασματοφωτόμετρο CARY 50Bio.

iii) Προσδιορισμός της δραστηότητας της Καταλάσης

Ο τρόπος αυτός προσδιορισμού της καταλάσης βασίστηκε στη μέθοδο των Beers & Sizer (1952). Η διαδικασία είχε ως εξής: παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 67 mM pH 7,4. Σε γυάλινους σωλήνες προστέθηκαν 2955 μ l PBS και 40 μ l ομογενοποιημένου ιστού. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν σε vortex και αμέσως μετά επώαστηκαν για 10 min στους 37°C σε υδατόλουτρο. Το περιεχόμενο του σωλήνα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα χαλαζία και προστέθηκαν 5 μ l H₂O₂ 30%. Αμέσως καλύφθηκε η κυψελίδα με parafilm και ανακινήθηκε καλά το δείγμα. Η κυψελίδα τοποθετήθηκε στο φωτόμετρο και καταγράφηκε η κινητική του ενζύμου για 5 min σε μήκος κύματος 240 nm. Η δραστηότητα της καταλάσης εκφράστηκε σε μ mol/mg πρωτεΐνης.

iv) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης

Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το DTNB οπότε παράγεται ένα χρωμοφόρο ιόν (Εικόνα 2.1). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67mM pH 7,95. Επίσης παρασκευάστηκε διάλυμα dithiobis-DTNB 1mM σε sodium citrate 1% .



Εικόνα 2.1) Η ανακύκλωση της γλουταθειόνης (GSH) και της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) υπο την παρουσία DTNB

Η πειραματική διαδικασία ξεκινούσε τοποθετώντας σε σωλήνες erpendorf 660 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 330 μl DTNB και 20 μl δείγματος ιστού. Το τυφλό περιείχε dH₂O αντί για ιστό. Οι σωλήνες στη συνέχεια αφού αναδεύτηκαν σε vortex επώαστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Τέλος, το περιεχόμενο κάθε erpendorf μεταφέρθηκε σε κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφησή του στα 412 nm.

ν) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)

Ο προσδιορισμός της οξειδωμένης γλουταθειόνης έγινε με βάση τη μέθοδο Griffith (1980). Για τον προσδιορισμό της GSSG το pH σε όλα τα δείγματα ρυθμίστηκε σε επίπεδα 7,0-7,5 με προσθήκη NaOH 1 M. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 μl 2-vinylpiridine σε 50 μl δείγματος και τα δείγματα επώαστηκαν για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Στα 30 και στα 60 min επώασης τα δείγματα αναδεύτηκαν ξανά. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 14000 rpm για 10 min στους 4°C. Παράλληλα προετοιμάστηκαν τα διαλύματα που θα χρησιμοποιούνταν στην τελική φωτομέτρηση (PBS, GSSG 10 μmol/L, NADPH 3 mM).

Στη συνέχεια ετοιμάστηκαν οι αντιδράσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες για τα δείγματα, το τυφλό και το πρότυπο.

Πίνακας 1.1. Περιεχόμενα σωλήνων για προσδιορισμό της GSSG

	ΤΥΦΛΟ	ΠΡΟΤΥΠΟ	ΔΕΙΓΜΑ
Ρυθμιστικό διάλυμα	600 μl	600 μl	600 μl
NADPH	100 μl	100 μl	100 μl
DTNB	100 μl	100 μl	100 μl
dH ₂ O	199 μl	124 μl	194 μl
GSSG	-	75 μl	-
Δείγμα (κατάλληλα αραιωμένο)	-	-	5 μl

Οι σωλήνες αφού αναδεύτηκαν καλά, επώαστηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα και σ' αυτή προστέθηκε 1 μl αναγωγή της γλουταθειόνης. Η κυψελίδα αφού καλύφθηκε με parafilm ανακινήθηκε καλά και στο τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος στο φωτόμετρο σε μήκος κύματος 412 nm.

vi) Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των TBARS

Για τον προσδιορισμό των TBARS παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 200mM pH 7,4. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε Na₂SO₄ (2M)-TBA (55mM). Τέλος, παρασκευάστηκε τριχλωροοξικό οξύ, TCA 70% και TCA 35%.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 ml προσθέσαμε με τη σειρά που αναφέρονται α) 50 μl δείγματος, β) 500 μl TCA 35% και γ) 500μl ρυθμιστικού διαλύματος. Το τυφλό αντί για δείγμα περιείχε dH₂O.

Στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση και τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Με την πάροδο των 10 min προσθέσαμε 1 ml Na₂SO₄-TBA και εν συνεχεία τοποθετήσαμε τους σωλήνες στο υδατόλουτρο για να επωαστούν τα δείγματα στους 95°C για 45 min. Αφού βγάλαμε τα δείγματα από το υδατόλουτρο ψύχθηκαν στον πάγο για 5 min. Προσθέσαμε 1 ml TCA 70% και

αναδεύσαμε πάλι σε vortex. Από το νέο μίγμα μεταφέραμε 1 ml σε σωλήνες erpendorf και φυγοκεντρίσαμε σε 10000 rpm για 3 λεπτά στους 25°C. Υπερκείμενο 900 μl μεταφέρθηκε σε κυψελίδα UV και τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 530 nm.

Η συγκέντρωση των TBARs εκφράστηκε σε μmol/L.

vii) Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου

Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο κάθε δείγματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976) βάσει πρότυπης καμπύλης συγκέντρωσης BSA (bovine serum albumin).

viii) Στατιστική Ανάλυση

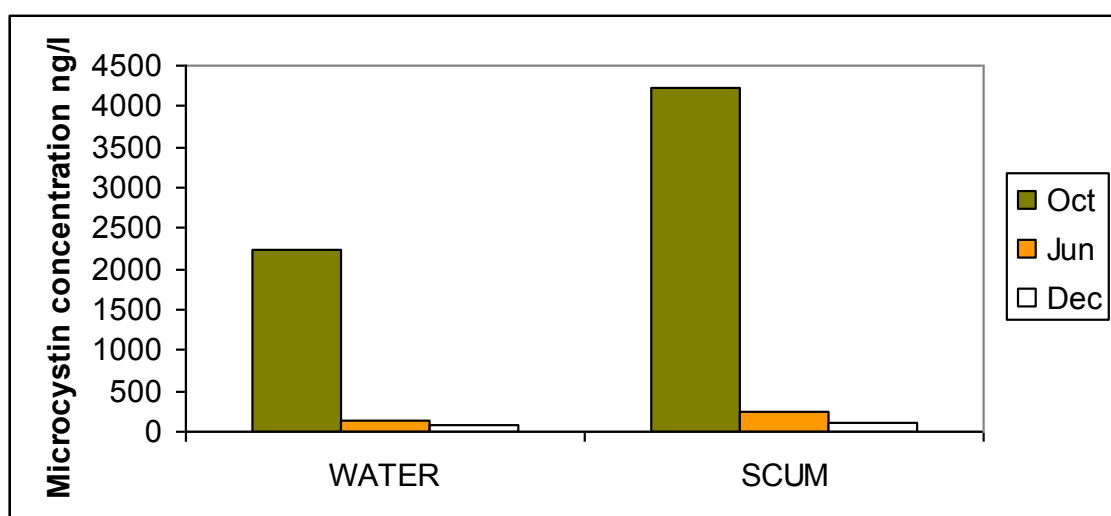
Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MS EXCEL (Office 2000), με το οποίο εκτελέστηκαν αναλύσεις ενός παράγοντα (one-way ANOVA) καθώς και το STATISTIKA (Office 2000). Ακόμη, έγινε χρήση του μη παραμετρικού συντελεστή Spearman, ενώ ως διάστημα εμπιστοσύνης ορίστηκε το 95% ($P < 0.05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ι) Συγκέντρωση μικροκυστινών (MC) στο νερό και το φυτοπλαγκτόν

Η συγκέντρωση των μικροκυστινών (MC) στο νερό, το φυτοπλαγκτόν και τους ιστούς που συλλέχθηκαν, προσδιορίστηκαν από το συνεργαζόμενο εργαστήριο του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

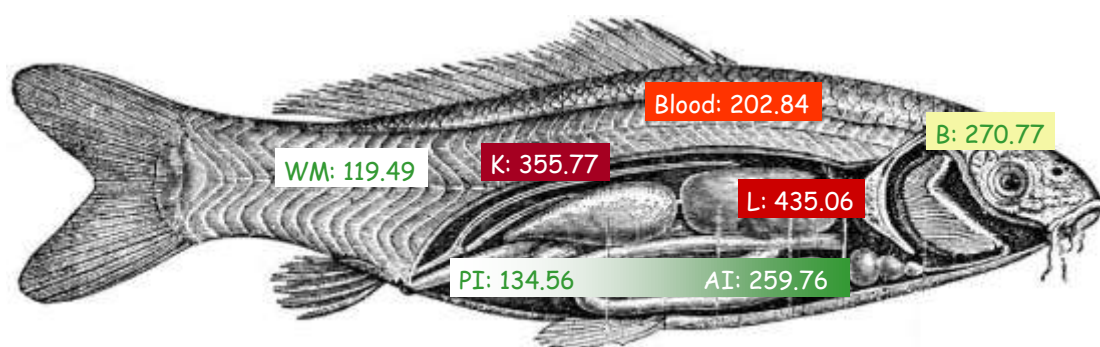
Η συγκέντρωση των MC στο νερό και το φυτοπλαγκτόν διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών περιόδων δειγματοληψίας (Εικ. 2.1). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση μικροκυστινών στο νερό της λίμνης παρουσιάστηκε τον μήνα Οκτώβριο, ακολούθησε ο Ιούνιος ενώ πολύ χαμηλή συγκέντρωση μικροκυστινών εμφάνισε ο Δεκέμβριος. Αντίστοιχα, όσον αφορά τη συγκέντρωση μικροκυστινών στο φυτοπλαγκτόν, ο Οκτώβριος παρουσίασε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και ακολούθησαν διαδοχικά ο μήνας Ιούνιος και Δεκέμβριος (Εικ. 2.1).



Εικόνα 2.1. Συγκέντρωση των MC στο νερό και στα συσσωματώματα φυτοπλαγκτού στις τρεις περιόδους δειγματοληψίας.

ii) Συγκέντρωση μικροκυστινών στους ιστούς

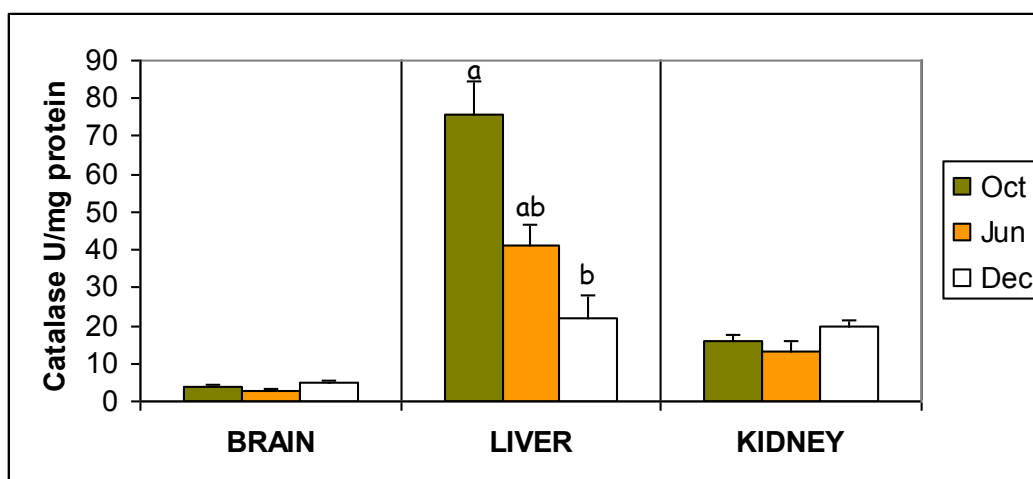
Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν παρατηρήθηκε σημαντική εποχιακή διακύμανση όσον αφορά στη συγκέντρωση των μικροκυστινών ανάμεσα στους ιστούς. Ωστόσο, το ήπαρ εμφάνισε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μικροκυστινών, ακολούθησε σε συγκέντρωση ο νεφρός και μετά ο εγκέφαλος. Κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα, η υψηλότερη συγκέντρωση μικροκυστινών στο πρόσθιο έντερο ανέδειξε την αυξημένη βακτηριακή συγκέντρωση του συγκεκριμένου τμήματος. Χαμηλότερη συγκέντρωση μικροκυστινών παρατηρήθηκε στο οπίσθιο έντερο και το λευκό μυ (Εικ. 2.2).



Εικόνα 2.2. Συγκέντρωση μικροκυστινών (ng/g ιστού) στους ιστούς: αίμα (**B**lood) εγκέφαλος (**B**rain), ήπαρ (**L**iver), νεφρός (**K**idney), λευκός μυς (**W**hite **M**uscle), εμπρόςθιο (**A**nterior) και οπίσθιο έντερο (**P**osterior **I**ntestine).

iii) Δραστικότητα Καταλάσης

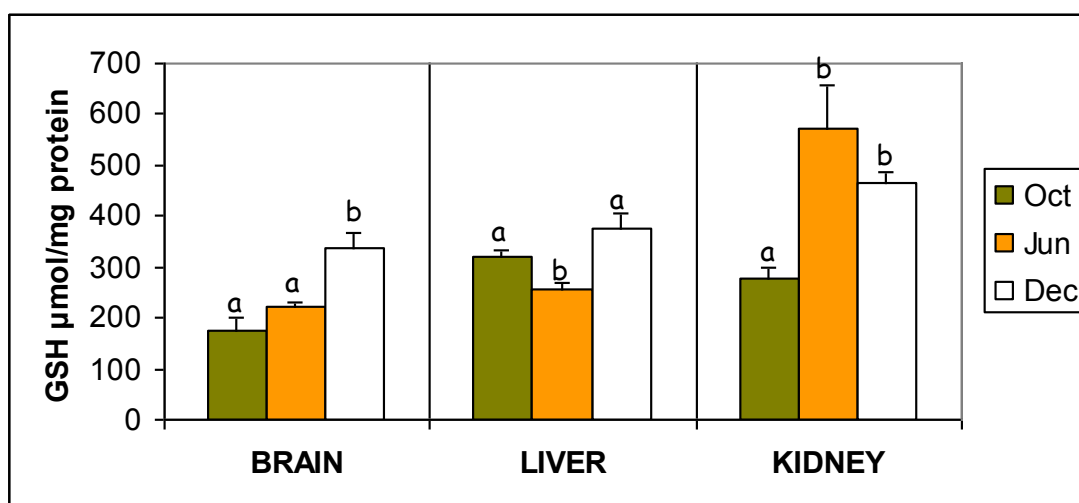
Η δραστικότητα της καταλάσης ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη στο ήπαρ (46,329 U/mg πρωτεΐνης) συγκρινόμενη με εκείνη του εγκεφάλου (3,856 U/mg πρωτεΐνης) ή του νεφρού (16,278 U/mg πρωτεΐνης) σε όλες τις περιόδους δειγματοληψίας. Η δραστικότητα της καταλάσης στον εγκέφαλο και το νεφρό δεν παρουσίασε σημαντική εποχιακή διακύμανση, ενώ στο ήπαρ παρουσίασε τη στατιστικώς υψηλότερη τιμή κατά το μήνα Οκτώβριο και τη χαμηλότερη το μήνα Δεκέμβριο. Όσον αφορά στον εγκέφαλο και τον νεφρό, η καταλάση παρουσιάζει την υψηλότερη δραστικότητα κατά το μήνα Δεκέμβριο, και ακολουθεί ο Οκτώβριος και ο Ιούνιος (Εικ.2.3).



Εικόνα 2.3. Δραστικότητα καταλάσης (U/mg πρωτεΐνης) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό σε τρεις διαφορετικές εποχές του χρόνου.

iv) GSH (Ανηγγμένη γλουταθειόνη)

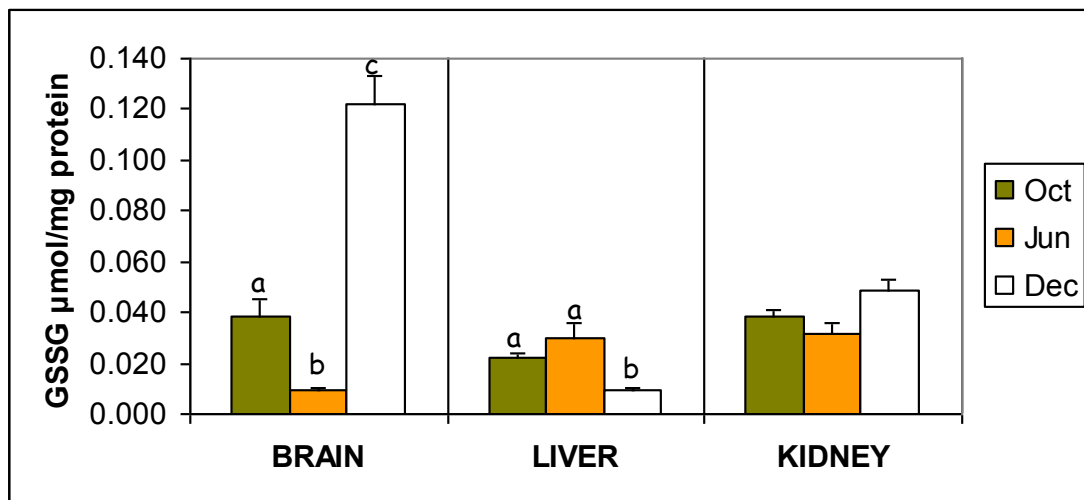
Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν μία έντονη εποχιακή διακύμανση της συγκέντρωσης της ανηγγμένης γλουταθειόνη (GSH) στους ιστούς που εξετάστηκαν με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις να καταγράφονται στον νεφρό. Πιο συγκεκριμένα, ο νεφρός τον Ιούνιο εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση GSH, όπου η τελική τιμή της υπερβαίνει τα 571 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης, ακολουθεί ο Δεκέμβριος με 466 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης και τέλος ο Οκτώβριος με 278 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης. Αντιθέτως στον εγκέφαλο και το ήπαρ η μεγαλύτερη συγκέντρωση GSH εμφανίστηκε κατά το μήνα Δεκέμβριο, όπου στον εγκέφαλο ακολουθείται από τον Ιούνιο και τον Οκτώβριο, ενώ στο ήπαρ ακολουθεί σε συγκέντρωση GSH ο Οκτώβριος και ο Ιούνιος αντίστοιχα (Εικ. 2.6).



Εικόνα 2.6. Συγκέντρωση GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό σε τρεις διαφορετικές εποχές του χρόνου.

ν) GSSG (Οξειδωμένη γλουταθειόνη)

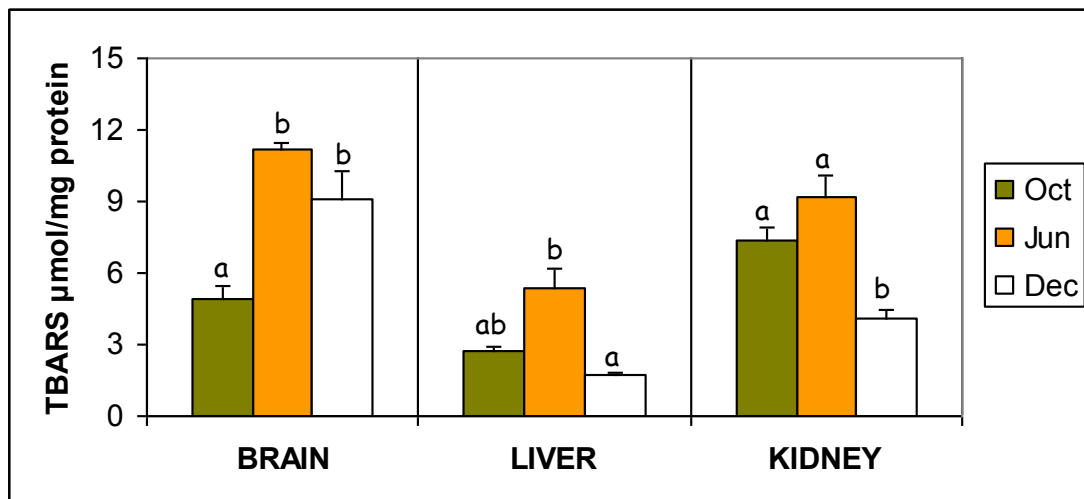
Κατά τη μέτρηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) παρατηρήθηκαν έντονες εποχιακές διακυμάνσεις στη συγκέντρωσή της ανάμεσα στους ιστούς που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, στον εγκέφαλο του κυπρίνου πολύ μεγάλη συγκέντρωση της GSSG παρατηρήθηκε το μήνα Δεκέμβριο, η οποία προσδιορίστηκε στα 0,122 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης και ακολουθεί σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά ο Οκτώβριος με 0,038 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης και ο Ιούνιος με τελική συγκέντρωση 0,009 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης. Στο ήπαρ η μεγαλύτερη συγκέντρωση GSSG εμφανίστηκε τον Ιούνιο και η χαμηλότερη το Δεκέμβριο (Εικ. 2.5). Στον νεφρό δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση οξειδωμένης γλουταθειόνης μεταξύ των περιόδων δειγματοληψίας.



Εικόνα 2.5. Συγκέντρωση GSSG ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό σε τρεις διαφορετικές εποχές του χρόνου.

vi) TBARS (Οξειδωμένα λιπίδια)

Ο εγκέφαλος και ο νεφρός εμφάνισαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέως (TBARS). Στον εγκέφαλο η υψηλότερη συγκέντρωση των TBARS παρουσιάστηκε τον Ιούνιο και η χαμηλότερη τον Οκτώβριο, ενώ στον νεφρό η υψηλότερη τον Ιούνιο και η χαμηλότερη το Δεκέμβριο. Ωστόσο, οι ιστοί εμφάνισαν μεγάλη εποχιακή διακύμανση. Στο ήπαρ η συγκέντρωση των TBARS παρουσιάζεται μειωμένη σε σχέση με τον εγκέφαλο και τον νεφρό. Ο Ιούνιος και εδώ εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση TBARS με μεγάλη διαφορά από τον Οκτώβριο και το Δεκέμβριο που ακολουθούν (Εικ. 2.4).



Εικόνα 2.4. Συγκέντρωση TBARS (μmol/mg πρωτεΐνης) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό σε τρεις διαφορετικές εποχές του χρόνου.

vii) Συσχετίσεις

Η αλληλεξάρτηση των δεικτών που προσδιορίστηκαν ανά ιστό, μεταξύ τους και με τη συγκέντρωση μικροκυστινών εκτιμήθηκε με τη συσχέτιση Spearman σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,05$ και παρουσιάζεται στον Πίνακα που ακολουθεί:

	Spearman Rank Coefficient	P
Μικροκυστίνες (MC)		
Ήπαρ – Εγκέφαλος	0,689***	0,0003
Ήπαρ – Νεφρός	0,263	0,224
Εγκέφαλος – Νεφρός	0,445***	0,033
ΚΑΤΑΛΑΣΗ		
Εγκέφαλος – Νεφρός	0,375	0,168
Ήπαρ – Εγκέφαλος	0,264	0,341
Ήπαρ – Νεφρός	-0,089	0,686
GSH		
Εγκέφαλος – Νεφρός	0,086	0,761
Ήπαρ – Εγκέφαλος	0,175	0,532
Ήπαρ – Νεφρός	-0,068	0,757
GSSG		
Εγκέφαλος – Νεφρός	0,427	0,190
Ήπαρ – Εγκέφαλος	-0,718**	0,013
Ήπαρ – Νεφρός	-0,226	0,367
TBARS		
Εγκέφαλος – Νεφρός	-0,412	0,162
Ήπαρ – Εγκέφαλος	0,088	0,775
Ήπαρ – Νεφρός	0,206	0,344
ΗΠΑΡ		
MC - TBARS	0,281	0,192
MC - Catalase	-0,281	0,192
MC – GSH	-0,036	0,868
MC - GSSG	0,053	0,818

Catalase – GSH	0,094	0,670
Catalase – GSSG	0,579***	0,006
GSH - GSSG	0,044	0,849
TBARS – Catalase	0,109	0,618
TBARS – GSH	-0,087	0,689
TBARS – GSSG	0,605***	0,003
ΕΓΚΕΦΑΛΟΣ		
MC - TBARS	-0,665	0,0132
MC - Catalase	-0,125	0,657
MC – GSH	-0,004	0,989
MC - GSSG	-0,406	0,168
Catalase – GSH	0,618***	0,043
Catalase – GSSG	0,928***	0,0008
GSH - GSSG	0,633	0,067
TBARS – Catalase	-0,127	0,709
TBARS – GSH	0,285	0,425
TBARS – GSSG	0,095	0,822
ΝΕΦΡΟΣ		
MC - TBARS	0,332	0,122
MC - Catalase	-0,127	0,562
MC – GSH	-0,294	0,172
MC - GSSG	0,233	0,322
Catalase – GSH	0,026	0,907
Catalase – GSSG	0,421	0,064
GSH - GSSG	0,369	0,108
TBARS – Catalase	0,066	0,764
TBARS – GSH	-0,217	0,319
TBARS – GSSG	-0,171	0,469

Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση κατά Spearman ($P < 0.05$) παρουσιάζουν οι εξής παράγοντες:

A) Στον εγκέφαλο παρουσιάζεται θετική συσχέτιση μεταξύ της καταλάσης με την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), δηλαδή όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της καταλάσης στον εγκέφαλο, ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση και στην

περιεκτικότητα σε GSH. Επίσης, θετική συσχέτιση παρουσιάζεται και στη σχέση καταλάσης με την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), δηλαδή όταν αυξάνεται η καταλάση στον εγκέφαλο, αύξηση παρουσιάζει και η συγκέντρωση της GSSG.

B) Στο ήπαρ η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) παρουσίασε σημαντική θετική συσχέτιση με τα TBARS και την καταλάση. Αύξηση της GSSG στο ήπαρ συνοδευόταν με αύξηση και στα επίπεδα των TBARS και της καταλάσης.

Γ) Στον νεφρό δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις παραμέτρους που προσδιορίστηκαν.

Δ) Όσον αφορά στις μικροκυστίνες παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα σε όλους τους ιστούς. Ωστόσο, η συσχέτιση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική μόνο ανάμεσα στον εγκέφαλο και στο ήπαρ καθώς και στον εγκέφαλο και στο νεφρό.

E) Τέλος, αρνητική συσχέτιση παρουσιάστηκε μεταξύ της συγκέντρωσης της GSSG στο ήπαρ και στον εγκέφαλο, υποδηλώνοντας ότι άτομα με υψηλή συγκέντρωση GSSG στο ήπαρ εμφάνιζαν χαμηλές συγκεντρώσεις στον εγκέφαλο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι τοξίνες των κυανοβακτηρίων προκαλούν σοβαρές επιπλοκές στα βιοχημικά συστήματα διαφόρων οργανισμών όπως φυτά, θηλαστικά, πτηνά και ψάρια (Paskona et al. 2007). Σε μελέτες που έγιναν σε υδρόβιους οργανισμούς αποδείχτηκε ότι κάτω από εργαστηριακές συνθήκες οι οργανικοί μικροκυστίνες μπορούν να προκαλέσουν αύξηση των αντιδραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS), να μειώσουν την ενζυμική δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων των μελετούμενων οργανισμών και να επιφέρουν μεγάλη οξειδωτική βλάβη στα βιολογικά τους συστήματα (Ahmad, Oliveira, Pacheco & Santos 2005. Shi et al. 2005).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των μικροκυστινών σε δείκτες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες στο ήπαρ, το νεφρό και τον εγκέφαλο κυπρίνων που συλλέχθηκαν από τη λίμνη Παμβώτιδα. Προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών που θεωρούνται στο πλαίσιο της μελέτης ο παράγοντας που προκαλεί οξειδωτικό στρες, το ένζυμο καταλάση, η ανηγμένη και η οξειδωμένη γλουταθειόνη που θεωρούνται παράγοντες άμυνας ενάντια στο οξειδωτικό στρες και τα οξειδωμένα λιπίδια, που είναι το αποτέλεσμα το οξειδωτικού στρες. Η δραστικότητα των παραγόντων που μελετήθηκαν δε φαίνεται να επηρεάστηκε σημαντικά από την έκθεση στις συγκεκριμένες κυανοτοξίνες καθώς η εποχιακή διαφοροποίηση στη συγκέντρωση μικροκυστινών στο νερό δεν φαίνεται να επέδρασε σημαντικά στους συγκεκριμένους ιστούς.

Πιο συγκεκριμένα, η καταλάση είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό αφού καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Αρκετές μελέτες τονίζουν πως τα επίπεδα καταλάσης σε ηπατοκύτταρα μειώνονται σημαντικά μετά την έκθεσή τους σε κυανοτοξίνες, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από τη μειωμένη ικανότητα αντίδρασης στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (Huang et al. 2007). Όπως αναμενόταν σε όλους τους ιστούς που μελετήθηκαν η καταλάση εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με τη συγκέντρωση των μικροκυστινών σε αυτούς αν και η συσχέτιση αυτή η συσχέτιση δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Τα επίπεδα δραστικότητας της καταλάσης στους ιστούς συμβάδιζαν με τις συγκεντρώσεις μικροκυστινών με την υψηλότερη συγκέντρωση και δραστικότητα αντίστοιχα, να

παρατηρείται στο ήπαρ σε όλη τη διάρκεια του χρόνου. Το ήπαρ ήταν και ο μόνος ιστός που η δραστικότητα της καταλάσης εμφάνισε κάποια εποχιακή διακύμανση.

Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ενδέχεται να είναι ένας ισχυρός τρόπος αντίστασης των ιστών στις μικροκυστίνες (Qiu et al., 2007). Οι μικροκυστίνες έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να εμποδίσουν την πρωτεϊνική φωσφατάση τύπου 1 και 2A αφού η παραγόμενη κυανοτοξίνη μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα μέσω των χολικών μεταφορέων που βρίσκονται πάνω στην κυτταρική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων διαταρράσσοντας έτσι τη φωσφορυλική ισορροπία. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται αύξηση των ROS και απομάκρυνση της GSH από τα ηπατοκύτταρα (Bouaicha & Maatouk, 2004). Σε πλήθος μελετών η συγκέντρωσή της GSH στο ήπαρ και τον εγκέφαλο δείχνει να αυξάνεται μετά από άμεση ή έμμεση έκθεση σε μικροκυστίνες υποδεικνύοντας την σημαντικότητά της στην προστασία ενάντια σε αυτές τις κυανοτοξίνες (Bouaicha & Maatouk, 2004). Ειδικότερα, μία μεγάλη αύξηση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης παρατηρήθηκε σε πειράματα που έγιναν με έκθεση ηπατοκυττάρων ποντικού σε μικροκυστίνες (Bouaicha & Maatouk, 2004) και σε ηπατοκύτταρα κυπρίνου που εκτέθηκαν σε νερό με τις συγκεκριμένες τοξίνες (Blaha et al. 2004; Li et al. 2007). Στην παρούσα μελέτη οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών και της GSH παρουσίασαν αρνητική συσχέτιση, ενώ οι συγκεντρώσεις της GSH παρουσίασαν και έντονη εποχιακή διακύμανση σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση των μικροκυστινών. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι σε φυσικά συστήματα η ρύθμιση των συγκεντρώσεων της GSH εξαρτάται και από άλλους παράγοντες πέραν των μικροκυστινών.

Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες παρατηρείται έκπλυση της GSH λόγω απώλειας των προσαρμοστικών μηχανισμών που συνδυάζεται με ταυτόχρονη οξείδωση της GSH στην GSSG οξειδωμένη της μορφή η οποία σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να επιφέρει σοβαρές βλαβες στο κύτταρο. Η οξείδωση της GSH σε GSSG καταλύεται από το ένζυμο GPOx και η αντίστροφη διαδικασία δηλαδή η επαναδημιουργία της GSH από GSSG καταλύεται από το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR, glutathione reductase) σε βάρος της συγκέντρωσης σε NADPH. Αν η αναγέννηση της GSSG είναι υψηλότερη από τη δημιουργία της GSH, τότε η GSSG αρχίζει να συσσωρεύεται και να μετατοπίζεται έξω από το κύτταρο από

ειδικούς μεταφορείς ώστε να αποφευχθεί η εξάντληση από NADPH το οποίο οδηγεί σε μεγάλη απώλεια της GSH. Η τελική συγκέντρωση σε GSSG φαίνεται να αυξάνεται μετά από ένα χρόνο έκθεσης σε οξειδωτικούς παράγοντες σε μελέτες που έγιναν σε σολομοειδή υποδεικνύοντας τις συνέπειες της μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου μετά από ένα χρόνο επίδραση στρεσογόνων παραγόντων (Almroth et al. 2010). Στην παρούσα μελέτη αυτό δεν αποδεικνύεται καθώς στον νεφρό δεν είχαμε σημαντικές εποχιακές αυξομειώσεις στη συγκέντρωση της GSSG, στο ήπαρ η τελική συγκέντρωση φαίνεται αρκετά μειωμένη σε σχέση με την αρχική, ενώ μόνο στον εγκέφαλο φαίνεται μία σημαντική αύξηση της τελικής συγκέντρωσης σε GSSG δείχνοντας πιθανώς ότι ο εγκέφαλος έχει την ικανότητα μεγαλύτερης συσσώρευσης οξειδωμένης γλουταθειόνης.

Τα οξειδωμένα λιπίδια είναι το αποτέλεσμα της καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών από το οξειδωτικό στρες. Η διαδικασία ξεκινά με την απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου από μία μεθυλ-ομάδα ενός πολυακόρεστου λιπαρού οξέως μεσω της αντίδρασης του με ένα OH. Στη συνέχεια σχηματίζεται μία ρίζα λιπαρού οξέως με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η καινούρια ρίζα αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο και σχηματίζει τις ρίζες των λιπαρών οξέων. Τελικά, το λιπιδικό υπεροξειδίο αντιδρά με την α-τοκοφερόλη και μ' αυτόν τον τρόπο ξεκινά η αντίδραση υπεροξειδωσίας των λιπαρών οξέων.. Τα TBARS μετρούν τα τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων που μπορεί να δημιουργηθούν από την άμεση επίθεση στα λιπίδια από την ρίζα του σουπεροξειδίου και χρησιμοποιούνται από πλήθος μελετών ως έμμεσος αντιοξειδωτικός δείκτης (Halliwell 1995). Τα TBARS έχουν μελετηθεί σε πλήθος ψαριών και χρησιμοποιούνται ως βιοχημικός δείκτης αντίστασης σε οξειδωτικό στρες (Almroth et al. 2005. 2008). Σε παλιότερες μελέτες που έγιναν σε ψάρια αποδείχτηκε ότι οι συγκεντρώσεις των TBARS αυξάνονταν σημαντικά σε περιοχές περιβαλλοντικά μολυσμένες και ότι η υψηλότερη συγκέντρωση εμφανιζόταν κυρίως κατά τους θερινούς μήνες (Filho et al. 2001a-b, Oakes et al. 2004). Ωστόσο σε μελέτες που έγιναν *in vivo* στο ήπαρ του είδους *Zoarces viviparous* δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των TBARS μεταξύ μολυσμένων και μη περιοχών απορρίπτοντας τα TBARS ως κατάλληλο δείκτη περιβαλλοντικής ρύπανσης και πιθανού δείκτη οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τις προηγούμενες στο ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση των TBARS παρατηρήθηκε κατά τον Ιούνιο, αλλά το

γεγονός της έντονης εποχιακής διαφοροποίησης ανάμεσα στις συγκεντρώσεις στους ιστούς και στη συγκέντρωση μικροκυστινών δεν καθιστά τα TBARS ως αξιόπιστο δείκτη περιβαλλοντικής ρύπανσης από κυανοτοξίνες. Τα υψηλά επίπεδα των TBARS κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών μπορούν να εξηγηθούν λόγω των φυσικών διαφοροποιήσεων από χρόνο σε χρόνο, της διαφοροποίησης των διατροφικών συνθηκών του ψαριού (Oakes et al. 2002), αλλά κυρίως λόγω της θερμοκρασίας που φαίνεται να διαδραματίζει μεγάλο ρόλο στην τελική συγκέντρωση των TBARS στα ψάρια.

Συμπερασματικά, αντίθετα με τα αποτελέσματα που δημοσιεύονται κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες σχετικά με την επίδραση των μικροκυστινών σε δείκτες του οξειδωτικού στρες, η παρούσα μελέτη απέδειξε πως στο πεδίο τα πράγματα είναι εντελώς διαφορετικά. Δεν υπήρξε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των βιοχημικών – αντιοξειδωτικών δεικτών και της βιοσυσσώρευσης μικροκυστινών στους συγκεκριμένους ιστούς. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι οι ενζυμικοί ή μη παράγοντες στους ιστούς μπορεί να βρίσκονται υπό την επίδραση άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η εποχιακή διακύμανση της θερμοκρασίας ή άλλη πηγή ρύπανσης, διατροφικών ή βιολογικών παραγόντων όπως η ηλικία και το αναπαραγωγικό καθεστώς. Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει ότι είναι παρακινδυνευμένο να χρησιμοποιείται άμεσα γνώση που έχει αποκτηθεί υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες για την εκτίμηση μιας κατάστασης σε φυσικά οικοσυστήματα.

Για μία πιο σφαιρική και αναλυτική εικόνα, οι μελλοντικές κατευθύνσεις της έρευνας πρέπει να κινηθούν προς τη μελέτη των βιοχημικών δεικτών υπό φυσικές συνθήκες και όχι υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Μόνο έτσι θα επιτευχθεί ο αρχικός στόχος που είναι η αξιοποίηση ενός αξιόπιστου δείκτη, ικανού να μας δίνει αποτελέσματα για την “υγεία” των υδάτινων οικοσυστημάτων.

Βιβλιογραφία

- Almroth B.C., Johansson A., Forlin L., Sturve J. (2010) Early age changes in Oxidative – Antioxidative stress in brown trout, *Salmo trutta*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 155: 442-448
- Amado LL., Monserrat JM. (2010) Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and How. *Environment International* 36: 226-235
- Aon MA., Cortassa S., Maack C., O'Rourke B. (2007) Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status. *Biol Chem* 282: 21889-21900
- Belioglu M., Tan C.O. (2008) Restoration of a shallow Mediterranean lake by biomanipulation complicated by drought. *Fundamental Appl. Limnology* 171:105-118
- Best JH., Pflumacher S., Wiegand C., Eddy FB., Metcalf JS., Codd GA. (2000) Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish. *Aquatic Toxicology* 60:223-231
- Blaha L., Kopp R., Simkova K., Mares J. (2004) Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp exposed to microcystin-producing cyanobacteria water bloom. *Acta Vet Brno* 73: 477-482
- Chorus I., Bartram J. (1999) *Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring and management*, London: WHO pp.416
- Coops H., Beklioglu M., Crimson TL. (2003) The role of water level fluctuations in shallow lake ecosystems, workshop conclusions. *Hydrobiologia* 506: 23-27
- De Figueiredo., Azeteiro UM., Esteves SM., Goncalves FJM., Pereira MJ (2004) Microcystin producing blooms – a serious global public health issue. *Ecot. Envir. Saf* 34:417-424

- Ding W & Ong C. N. (2003) Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria- induced apoptosis and hepatotoxicity. FEMS Microbiology Letters 220:1-7
- Ding W., Shen H.M & Ong C.N. (2000) The critical role of ROS and mitochondrial membrane permeability in microcystin-LR induced rapid apoptosis in primary rat hepatocytes . Hepatology 32, 547-555
- Downing J.A., Mc Cauley E. (1992) The nitrogen: phosphorus relationship in lakes. Limnol Oceanogr 37: 936-945
- Downing J.A., Mc Clain M., Twilley R (1999) The impact of accelerating land-use change on the N-cycle of tropical aquatic ecosystems: current conditions and projected changes. Biogeochemistry 46:109-148
- Fernandez-Alaez M., Fernandez-Alaez C., Becares E. (2004) A two year experimental study on nutrient and predator influences on food web constituents in a shallow lake of north-west Spain. Freshw Biol 49:1574-1592
- Griffith O (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal. Biochem. 106:207-212
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (1999) Free radicals in Biology and Medicine 3rd Edition , pp22-26, Oxford University Press, New York
- Huang D., Zhang Y., Song G., Long J., Liu J., Ji H. (2006) Contaminants-Induced Oxidative Damage on the Carp *Cyprinus carpio* Collected from Upper Yellow River, China. Envir. Monit Assess 128:483-488
- Jeppesen E., Jensen JP., Jensen C. (2003) The impact of nutrient state and lake depth on top-down control in the pelagic zone of lakes: a study of 466 lakes: from the temperature zone to the Arctic. Ecosystems 6:313-325
- Jeppesen E., Sammalkorpi I. (2002) Lakes in Perrow M, Davy T (eds). Handbook of Restoration Ecology, Cambridge University Press, Cambridge
- Jeppesen E., Sondergaard M., Kanstrup E. (1994) Does the impact of nutrients on the biological structure and function of brackish and freshwater lakes differ? Hydrobiologia 275/276:15-30
- Kagalou I., Tsimarakis G., Paschos I. (2001) Water chemistry and Biology in a Shallow lake (Lake Pamvotis – Greece) Present State and Perspectives. Global Nest pp.85 – 94

- Kasperoviciene J., Koreiviene J., Paskavskas R. (2005) Cyanoprocaryotes and Microcystins dynamics in shallow hypertrophic lake (south – eastern Lithuania). *Oceanological and Hydrobiological studies* 3 pp.93 – 104
- Keleti G & Sykora J. (1981) Production and Properties of Cyanobacterial Endotoxins. *Appl. and Envirom. Microbiology* p. 104-109
- Oakes K., Van Der Kraak. (2002) Utility of TBARS essay in detecting oxidative stress in white sucker populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* 63:447-463
- Li L., Xie P., Chen J. (2007) Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake. *Toxicon* 49:1042-1053
- Li X., Liu Y., Song L., Liu J. (2003) Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio*) to the toxicity of microcystine-LR. *Toxicon* 42:85-89
- Li X., Chuang I-K., Kim J. (2004) A subchronic oral toxicity of microcystins in common carp *Cyprinus carpio* exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon* 44:821-827
- Liu J., Yeo H., Daniger S., Ames B.N., (1997) Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography- mass spectrometry compared with thiobarbituric acid. *Anal. Biochem* 245:161-166
- Oruc E.O. & Uner N. (2002) Marker enzyme assessment in the liver of *Cyprinus carpio* exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 16:182-188
- Paskova V., Adamovsky O., Pikula J., Skocovska B., Bandouchova H., Horakova J., Babica B., Marsalek B., Hilscherova K. (2007) Detoxification and oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Science of the Total Enviroment* 398:34-47
- Pflugmacher S., Wiegand C., Oberemm A., Beattie K.A., Krause E., Codd G.A., Steinberg C.E. (1998) Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527-533

- Runnegar M.T., Andrews J., Gerdes R.G. & Falconer I.R.(1987) Injury of hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 25, 1235-1239
- Runnegar M.T., Berndt N., Kaplowitz N. (1995) Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol. Appl. Pharm.* 134: 793-803
- Svrcek C., Smith DW (2004) Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J Envir. Eng Sci* 2004:155-158
- www.fishbase.org
- www.lakepavotis.gr