

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

«ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»

«Εποχικά πρότυπα αντιοξειδωτικής άμυνας και βασικού μεταβολισμού του είδους *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1791) σε διαφορετικούς οικότοπους στο βόρειο Αιγαίο.»

Λιάκου Ελένη, Πανταζής Χρήστος

ΒΟΛΟΣ 2020

«Εποχικά πρότυπα αντιοξειδωτικής άμυνας και βασικού μεταβολισμού του είδους *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1791) σε διαφορετικούς οικότοπους στο βόρειο Αιγαίο.»

«Seasonal antioxidant defense and intermediate metabolic patterns of the species *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1791) in different habitats of the north Aegean Sea. »

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) Βαφείδης Δημήτριος, Καθηγητής (Δρ.)- Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση – έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Επιβλέπων.

2) Χατζηγιάννου Μαριάνθη, Επίκουρη Καθηγήτρια (Δρ.)- Εκτροφή Σαλιγκαριών και Βατράχων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

3) Φειδάντης Κωνσταντίνος, Βιολόγος (Δρ.)- Μελέτη της επίδρασης ποικίλων περιβαλλοντικών παραγόντων σε κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμοί προσαρμογής, στη φυσιολογία, στην ομοιόσταση ποικίλων ζωικών οργανισμών (ιχθείς, θαλάσσια και χερσαία ασπόνδυλα, αμφίβια, θηλαστικά) και συγκεκριμένα στην προσαρμογή τους σε αυτές τις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος.**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κλιματική αλλαγή έχει άμεσες επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς που αφορούν κυρίως τις κυτταρικές λειτουργίες και τη φυσιολογία, και μπορεί να μεταβάλουν την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και τη θνησιμότητα τους. Οι αλλαγές του κλίματος μπορεί να έχουν διαφορετική επίπτωση χωρικά με αποτέλεσμα να εντοπίζονται περιοχές με ευνοϊκότερες κλιματικές συνθήκες (refugia). Σκοπός της παρούσας εργασίας, βάσει βιοχημικών και φυσιολογικών αποκρίσεων, είναι ο εντοπισμός και η οριοθέτηση τέτοιων περιοχών με στόχο τη διατήρηση σημαντικά εμπορικών θαλάσσιων ειδών. Υπό αυτό το πρίσμα, συλλέχθηκαν εποχικά (χειμώνας, άνοιξη, καλοκαίρι, φθινόπωρο) άτομα του είδους *Holothuria tubulosa* (ολοθούριο) από το Θερμαϊκό, Παγασητικό και Βιστωνικό κόλπο. Σε δείγματα βραγχίων και μυός έγινε φασματοφωτομετρική ανάλυση της δραστηριότητας ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας όπως δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT) και ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR), και ανάλυση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες με τη μέθοδο TBARS, καθώς και φασματοφωτομετρική ανάλυση της δραστηριότητας μεταβολικών ενζύμων όπως γαλακτική αφυδρογονάση (L-LDH), συνθετάση του κιτρικού (CS) και αφυδρογονάση του β-υδροξυάκυλο-CoA (HOAD). Οι υψηλότερες τιμές των συγκεκριμένων ενζύμων, σε δείγματα ιστού βραγχίων καθώς και μυός του είδους *H.tubulosa*, βρίσκονται στον Παγασητικό κόλπο και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες. Αυτό μας υποδεικνύει ότι ο Παγασητικός κόλπος είναι πιο ακατάλληλος σε σύγκριση με τον Θερμαϊκό και τον Βιστωνικό κόλπο. Στον αντίποδα, το γεγονός ότι οι χαμηλότερες τιμές των συγκεκριμένων ενζύμων, σε δείγματα ιστού βραγχίων καθώς και μυός του είδους *H.tubulosa*, βρίσκονται στον Βιστωνικό κόλπο, μας υποδεικνύει ότι ο Βιστωνικός κόλπος είναι ένα καλύτερο ενδιαίτημα για το συγκεκριμένο είδος, σύμφωνα πάντα με τα τωρινά δεδομένα. Η εποχικότητα δεν φαίνεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων των συγκεκριμένων μεταβολικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ιστό βραγχίων και μυός, στο είδος *H.tubulosa*. Η ανάλυση επιπλέον βιοχημικών και μοριακών δεικτών θα δώσει μια σαφέστερη εικόνα για τον προσδιορισμό των “refugia” για το παραπάνω είδος.

Λέξεις κλειδιά: Κλιματική αλλαγή, *Holothuria tubulosa*, Οξειδωτικό Στρες, Αντιοξειδωτικά ένζυμα, Μεταβολικά ένζυμα, TBARS, Ευνοϊκότερες περιοχές (refugia).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Κλιματική αλλαγή και η επίδραση της στους οργανισμούς	1
1.2 Ευνοϊκότερες περιοχές (refugia)	2
1.3 Ελεύθερες ρίζες	3
1.4 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα – Μεταβολισμός	3
1.5 Ένζυμα	5
1.6 <i>Holothuria tubulosa</i> (Gmelin, 1791)	7
2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	9
2.1 Πρωτόκολλο TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)	9
2.2 Ομογενοποίηση	9
2.3 Φυγοκέντρωση	10
2.4 Φασματοφωτομετρία	11
2.5 Νόμος Beer – Lambert	11
2.6 Προετοιμασία ομογενοποιημάτων	12
3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	17
4) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	31
5) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	33
6) ABSTRACT	36

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κλιματική αλλαγή και η επίδραση της στους οργανισμούς

Το κλίμα είναι το σύνολο των μέσων τιμών που ορίζουν τον καιρό, όπως είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, οι βροχές, οι άνεμοι, το χιόνι καθώς και βίαια μετεωρολογικά φαινόμενα όπως είναι οι καταιγίδες, οι τυφώνες κλπ., που προκύπτει από τις μακροχρόνιες παρατηρήσεις των διάφορων μετεωρολογικών στοιχείων. Όλα αυτά είναι εκδηλώσεις των κινήσεων και μεταβολών της κατώτερης ατμόσφαιρας (τροπόσφαιρα) που αλληλεπιδρούν με τις διάφορες φυσικοχημικές διεργασίες, τη δράση των ζωντανών οργανισμών και έκτακτα περιστατικά όπως είναι οι εκρήξεις των ηφαιστείων (Χατζημπίρος, 2007).

Με τον όρο κλιματική αλλαγή αναφερόμαστε στη μεταβολή του παγκοσμίου κλίματος και ειδικότερα σε μεταβολές των μετεωρολογικών συνθηκών που εκτείνονται σε μεγάλη χρονική κλίμακα. Τέτοιου τύπου μεταβολές περιλαμβάνουν στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις ως προς τη μέση κατάσταση του κλίματος ή τη μεταβλητότητά του, που εκτείνονται σε βάθος χρόνου δεκαετιών ή περισσότερων ακόμα ετών. Οι κλιματικές αλλαγές οφείλονται σε φυσικές διαδικασίες, καθώς και σε ανθρώπινες δραστηριότητες με επιπτώσεις στο κλίμα, όπως η τροποποίηση της σύνθεσης της ατμόσφαιρας (Thomas Lin, 2009).

Η κλιματική αλλαγή κατά τη Διακυβερνητική Διάσκεψη για την Κλιματική Αλλαγή (Intergovernmental Panel on Climate Change -IPCC), αποτελεί μια κατάσταση του κλίματος η οποία μπορεί να αναγνωριστεί από αλλαγές στο μέσο όρο και/ή τη μεταβλητότητα των ιδιοτήτων της και η οποία επιμένει για εκτεταμένη χρονική περίοδο, συνήθως δεκαετίες ή περισσότερο.

Η όξυνση των θαλασσών και η άνοδος της θερμοκρασίας είναι λίγες μόνο από τις επιπτώσεις που έχει η κλιματική αλλαγή. Η κλιματική αλλαγή έχει επίσης άμεσες επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς που αφορούν κυρίως τις μακρομοριακές κυτταρικές δομές και λειτουργίες τους καθώς και γενικότερα τη φυσιολογία τους, και μπορεί να μεταβάλουν την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή καθώς και τη θνησιμότητα τους. Έτσι δημιουργείται μια ανάγκη για τους οργανισμούς να προσαρμόσουν τον μεταβολισμό τους στις νέες συνθήκες διαβίωσης.

Οι οργανισμοί διαθέτουν συγκεκριμένους μηχανισμούς για να αποκρίνονται στις οικολογικές πιέσεις και έχει αναπτυχθεί από τους επιστήμονες πληθώρα διαφορετικών βιοδεικτών και βιομαρτύρων για την εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων ιδιαίτερα στα υδάτινα οικοσυστήματα (Adams 2002).

Οι βιοχημικές και μεταβολικές αποκρίσεις των οργανισμών χρησιμοποιούνται ευρέως ως δείκτες του στρες των οργανισμών (Wikelski & Cooke 2006). Το περιβαλλοντικό στρες επιδρά, όχι μόνο στους οργανισμούς ατομικά, αλλά και στην «Υγεία του Οικοσυστήματος» ως σύνολο (σε επίπεδο πληθυσμού ή βιοκοινότητας και στις σχέσεις των λειτουργικών ομάδων) (Adams 2002).

Οι πρωτεΐνες είναι συστατικά του κυττάρου, τα οποία είναι ευαίσθητα στις υψηλές θερμοκρασίες. Οι ανώτερες διαμορφώσεις της δομής μιας πρωτεΐνης (δευτεροταγής, τριτοταγής και

τεταρτοταγής) σταθεροποιούνται σε μεγάλο βαθμό από ασθενείς αλληλεπιδράσεις, οι οποίες επηρεάζονται από αλλαγές της θερμοκρασίας (Somero 1997). Η αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι μια τιμή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας των πρωτεϊνών, αλλά η αύξηση της θερμοκρασίας πέρα από αυτή την τιμή οδηγεί σε αναστολή της λειτουργίας τους (Somero 1997). Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες, των οποίων η δομή αποσταθεροποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, στα νουκλεϊκά οξέα συμβαίνει το ακριβώς αντίθετο (Hochachka & Somero 2002, Pörtner 2001, Pörtner 2002, Pörtner & Knust 2007).

Οι κυτταρικές μεμβράνες και κυρίως τα λιπιδικά τους τμήματα είναι επίσης ιδιαίτερα ευαίσθητα σε αλλαγές της θερμοκρασίας. Οι αλλαγές αυτές στις υψηλές θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του κυλινδρικού σχήματος των μεμβρανών σε κωνικό σχήμα, το οποίο δεν επιτρέπει τη σωστή διάταξη των λιπιδίων (Hazel 1997). Η μείωση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε μια άλλη φάση που ονομάζεται φάση γέλης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ασθενών δεσμών μεταξύ των φωσφολιπιδίων, τη μείωση της ρευστότητάς τους και τον περιορισμό της κινητικότητας των πρωτεϊνών στο λιπιδικό στρώμα (Somero 1997, Hochachka & Somero 2002).

Σε ποικίλους οργανισμούς οι αλλαγές της θερμοκρασίας του σώματος συνοδεύονται από αλλαγές στο pH. Για την πλειοψηφία των οργανισμών, οι τιμές του pH στα εξωτερικά και ενδοκυτταρικά υγρά μειώνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Somero 1997, Hochachka & Somero 2002).

Οι προαναφερθείσες καταστάσεις είναι κάποιες από τις επιρροές που έχει η αλλαγή της θερμοκρασίας που είναι άμεση συνέπεια της κλιματικής αλλαγής, εντός του κυττάρου, στους ζώντες οργανισμούς. Είναι ευνόητα κατανοητό λοιπόν, ότι η κλιματική αλλαγή είναι κομβικής και ζωτικής σημασίας για την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και κατά συνέπεια των οργανισμών γενικότερα.

1.2 Ευνοϊκότερες περιοχές (refugia)

Οι αλλαγές του κλίματος μπορεί να έχουν διαφορετική επίπτωση χωρικά με αποτέλεσμα να εντοπίζονται περιοχές με ευνοϊκότερες κλιματικές συνθήκες (refugia). Ο όρος Refugia έχει χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό περιοχών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη προστατευόμενων περιοχών για την προστασία των ειδών από την αλλαγή του κλίματος (Ashcroft, M. B. 2010). Πιο συγκεκριμένα, ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για να αναφέρεται σε περιοχές που θα επιτρέψουν στα είδη που υπάρχουν σε μια περιοχή να παραμείνουν εκεί ακόμα και όταν αλλάζουν οι συνθήκες (Ashcroft, M. B. 2010).

Τα Refugia λοιπόν, είναι ενδιαιτήματα στα οποία η βιοποικιλότητα εξακολουθεί να υφίσταται και ενδέχεται να επεκταθεί παρόλο των μεταβαλλόμενων περιβαλλοντικών συνθηκών (Keppel et al., 2012) διευκολύνοντας την επιβίωση των οργανισμών κατά τη διάρκεια των ακραίων κλιματικών αλλαγών (Médail & Diadema, 2009).

Επομένως, ορίζονται ως θέσεις που παρέχουν χωρική και / ή χρονική προστασία ή πλεονεκτήματα σε βιοτικές αλληλεπιδράσεις σε οικολογικές χρονικές περιόδους (δηλ. Εντός της διάρκειας ζωής του σχετικού οργανισμού)

Σκοπός της παρούσας εργασίας, βάσει βιοχημικών και φυσιολογικών αποκρίσεων, είναι ο εντοπισμός και η οριοθέτηση περιοχών-refugia με στόχο τη διατήρηση σημαντικά εμπορικών θαλάσσιων ειδών.

1.3 Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερη ρίζα είναι οποιοδήποτε άτομο, μόριο ή ιόν, που διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα, είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια (Halliwell & Gutteridge 1990). Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, τότε το μόριο γίνεται ασταθές, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση, κι έτσι είναι πιο δραστικό από άλλα μόρια. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων και μεταβολή του αριθμού οξείδωσης των ατόμων των στοιχείων που συμμετέχουν (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις). Είναι πολύ δραστικές, λόγω της παρουσίας των ασύζευκτων ηλεκτρονίων και τείνουν να "αποσπασούν" ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell & Gutteridge 1990). Το υπόβαθρο για τη διεργασία αυτή αποτελεί η εγγενής τάση ενεργειακών συστημάτων να διατηρούνται στην κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (ground state or atomic unexcited state). Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al. 2004; Pani et al. 2010; AICR 2007), το θείο (Battin & Brumaghim 2009; Pani et al. 2010) ή τον άνθρακα.

Η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν σε προληπτικούς μηχανισμούς, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, σε φυσικά μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007).

1.4 Οξειδωτικό Στρες – Αντιοξειδωτική Άμυνα – Μεταβολισμός

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρος του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες (Pisoschi & Pop 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είτε από αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου και οξυγόνου (Pisoschi & Pop 2015). Στην πρώτη περίπτωση, παρατηρούνται διάφορες μεταλλάξεις και τοξικοί παράγοντες

που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, εξάντληση των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων λόγω πιθανής παθολογικής κατάστασης, καθώς και μείωση των αντιοξειδωτικών ουσιών που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής. Στη δεύτερη περίπτωση, έχουμε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS και RNS ή ύπαρξη παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή τους (Pisoschi & Pop 2015).

Σε περίπτωση που δημιουργηθεί οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, τότε είναι πιθανόν να παρατηρηθούν και σημαντικές αλλοιώσεις-τροποποιήσεις κυρίως των νουκλεϊκών οξέων (πρόκληση μεταλλάξεων και διαφόρων γενετικών επιπτώσεων), των κυτταρικών μεμβρανών (διακοπή της διακυτταρικής επικοινωνίας), των μιτοχονδρίων (αποσύζευξη ενεργειακής παραγωγής), των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να προκληθεί αποσύνθεση και θάνατος των κυττάρων και κατ' επέκταση ανάπτυξη πολλών σοβαρών ασθενειών (Pisoschi & Pop 2015). Το οξειδωτικό στρες αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της ηλικίας και έτσι αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της γήρανσης του οργανισμού (Rinnenthaler et al. 2015).

Ως αντιοξειδωτική ουσία ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Vaya J. and Aviram M. 2001; Krinsky 2002). Αυτές μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους:

1. Εμποδίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών.
2. Καθυστερούν ή σταματούν τις οξειδωτικές διαδικασίες αφότου αρχίσουν, δηλαδή τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό γίνεται με την εξουδετέρωση και την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών τελικά.
3. Απενεργοποιούν τα μέταλλα μέσω της σύνδεσής τους με αυτά και έτσι δεν τα αφήνουν να δράσουν (μεταλλο-δεσμευτικές πρωτεΐνες).
4. Δρουν συνεργειακά, δηλαδή η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού.

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή λιπόφιλα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική).

Μεταβολισμός

Μεταβολισμός χαρακτηρίζεται το αθροιστικό σύνολο των χημικών διεργασιών που γίνονται στα κύτταρα ενός ζωικού οργανισμού κατά τις οποίες είτε αποθηκεύεται ενέργεια (διαδικασία αναβολισμού), είτε απελευθερώνεται από τα μόρια ενέργεια (περίπτωση καταβολισμού) (Boron, W., & Boulpaep, E., 2006). Ο μεταβολισμός περιλαμβάνει όλες εκείνες τις χημικές διαδικασίες που εμπλέκονται στην παραγωγή και απελευθέρωση της ενέργειας, καθώς και στην αύξηση.

Όλες οι μεταβολικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε διάφορα χρονικά στάδια όπου δημιουργούνται ή διασπώνται βαθμιαία χημικές ενώσεις. Κάθε τέτοιο στάδιο της "μεταβολικής οδού" καταλύεται από διαφορετικό κάθε φορά ένζυμο η δομή του οποίου κωδικοποιείται από

συγκεκριμένο γονίδιο. Το τελικό προϊόν κάθε τέτοιας διαδικασίας ονομάζεται μεταβολίτης (Boron, W., & Boulraep, E., 2006).

Το πρώτο βήμα στον ενεργειακό καταβολισμό είναι η διάσπαση του γλυκογόνου ή των τριγλυκεριδίων σε απλούστερες ενώσεις. Το δεύτερο στάδιο του καταβολισμού των υδατανθράκων είναι η γλυκόλυση ενώ αυτού των τριγλυκεριδίων είναι η β οξείδωση των λιπαρών οξέων. Το τελικό, στάδιο είναι ο κύκλος του κιτρικού οξέος και η οξειδωτική φωσφορυλίωση.

1.5 Ένζυμα

Τα ένζυμα είναι ειδικές ,πρωτεϊνικής φύσης, πολύπλοκες οργανικές ενώσεις, που αποτελούνται από πολυμερή των αμινοξέων, οι οποίες δρουν ως καταλύτες στις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον μεταβολισμό των οργανισμών, εξού και η συνώνυμη ονομασία τους βιοκαταλύτες. Σχεδόν όλες οι χημικές αντιδράσεις στα κύτταρα απαιτούν τη ρυθμιστική δράση των ενζύμων. Όπως όλοι οι καταλύτες, έτσι και τα ένζυμα λειτουργούν αυξομειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης. Τα περισσότερα ένζυμα επιταχύνουν την αντίδραση εκατομμύρια φορές σε σχέση με την ταχύτητα της χωρίς αυτά. Ωστόσο, τα ένζυμα διαφέρουν από τους υπόλοιπους καταλύτες ως προς την εξειδίκευση, καθώς είναι πολύ πιο περιοριστικά εξειδικευμένα από αυτούς - κάθε ένζυμο μπορεί να καταλύσει μια συγκεκριμένη μόνο αντίδραση.

Στη συγκεκριμένη έρευνα, σε δείγματα βραγχίων και μυός από άτομα του είδους *H.tubulosa*, έγινε φασματοφωτομετρική ανάλυση της δραστηριότητας ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας όπως δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT) , ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR). Επίσης μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά τα παρακάτω μεταβολικά ένζυμα: γαλακτική αφυδρογονάση (L-LDH) , συνθετάση του κιτρικού (CS) και αφυδρογονάση του β-υδροξυάκυλο-CoA (HOAD).

Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) είναι ένα ένζυμο που προσφέρει σημαντική αντιοξειδωτική άμυνα σχεδόν σε όλα τα ζωντανά κύτταρα που εκτίθενται στο οξυγόνο. Καταλύει τη διάσπαση της ρίζας σουπεροξειδίου, O_2^- , είτε σε μοριακό οξυγόνο (O_2) είτε σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007). Το υπεροξείδιο παράγεται ως υποπροϊόν του μεταβολισμού του οξυγόνου και αν η περιεκτικότητά του δεν ρυθμίζεται, προκαλεί κυτταρικές βλάβες διαφόρων τύπων. Μετατρέπει το O_2^- σε H_2O_2 και οξυγόνο (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007).

Η καταλάση (CAT) με τη σειρά της μετατρέπει το H_2O_2 σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007). Επίσης, η καταλάση έχει έναν από τους υψηλότερους αριθμούς κύκλου εργασιών όλων των ενζύμων. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει εκατομμύρια μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο κάθε δευτερόλεπτο (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007). Είναι τετραμερές βιομόριο τεσσάρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, με μήκος πάνω από 500 αμινοξέα.

Η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) μειώνει την λιπιδική υπεροξειδωση και ανάγει το H_2O_2 σε νερό και παράλληλα μετατρέπει δυο ανηγμένα μόρια γλουταθειόνης σε ένα μόριο οξειδωμένης. μαζί με την καταλάση αποτελούν ένζυμα που εξειδικεύονται στην ρύθμιση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα κύτταρα (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007). Όπως το υπεροξείδιο της δισμουτάσης έτσι

και η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης διαχωρίζεται σε επιπλέον ένζυμο ανάλογα με την καταλυτική δράση.

Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007). Επειδή η ρίζα αυτή είναι τόσο τοξική, οι οργανισμοί που ζουν παρουσία οξυγόνου διαθέτουν ισομορφές του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) το οποίο μετατρέπει το ανιόν σουπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο ή υπεροξειδίο υδρογόνου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από το ένζυμο καταλάση σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Ε. Γιαννακοπούλου, 2007).

Η συντονισμένη δράση των παραπάνω αντιοξειδωτικών ενζύμων έχει ως αποτέλεσμα την τελική αναγωγή του O₂ σε H₂O, χωρίς ανεξέλεγκτες οξειδώσεις των κυτταρικών συστατικών.

Μεταβολικά ένζυμα

Η γαλακτική αφυδρογονάση (L-LDH) είναι το κυτταροπλασματικό ένζυμο που καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ στον κύκλο της γλυκολύσεως (Γ.Τσουφάκης, 2001). Η μεγαλύτερη ποσότητα του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέος εισέρχεται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου και μεταβολίζεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος Krebs) προς παραγωγή CO₂, H₂O και επιπρόσθετης ενέργειας. Σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης του κυττάρου, μικρό μόνο μέρος του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέος μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ με την καταλυτική δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) (Γ.Τσουφάκης, 2001). Η γαλακτική αφυδρογονάση καταλύει τη μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ. Το NAD⁺ ανάγεται σε NADH κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Η αρχική ταχύτητα σχηματισμού του NADH είναι ευθέως ανάλογη της καταλυτικής δραστηριότητας της LDH. Η γαλακτική αφυδρογονάση, είναι δείκτης του ρυθμού αναερόβιας οξείδωσης των υδατανθράκων μέσω της γλυκόλυσης (Johnston & Temple 2002, Pörtner 2002).

Η συνθετάση του κιτρικού (CS) υπάρχει σχεδόν σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Εμφανίζεται στο πρώτο βήμα του κύκλου του κιτρικού οξέος (κύκλου Krebs). Εντοπίζεται εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων στα μιτοχόνδρια, αλλά κωδικοποιείται από πυρηνικό DNA και όχι από μιτοχονδριακό (Wiegand, G., & Remington, S. J., 1986). Καταλύει την αντίδραση συμπύκνωσης του υπολείμματος οξικού από το ακετύλιο συνένζυμο Α και ένα μόριο οξαλοξικού οξέος για τον σχηματισμό του κιτρικού.

Η αφυδρογονάση του β-υδροξυάκυλο-CoA (HOAD) είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη χημική αντίδραση: (S)-3-υδροξυακυλ-CoA + NAD⁺ ↔ 3-οξοακυλ-CoA + NADH + H⁺. (Lehninger, A. L., & Greville, G. D., 1953). Αυτό το ένζυμο ανήκει στην οικογένεια των οξειδορεδουκτασών, και πιο συγκεκριμένα σε εκείνα που δρουν στην ομάδα CH-OH του δότη με NAD⁺ ή NADP⁺ ως αποδέκτη.

Πίνακας 1. Ένζυμα και οι αντίστοιχες χημικές αντιδράσεις που συμμετέχουν.

Ένζυμο	Χημική αντίδραση
Δισμουτάση του υπεροξειδίου	$\cdot\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Καταλάση	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Ρεδοκτάση της γλουταθειόνης	$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$
Γαλακτική αφυδρογονάση	$\text{L-γαλακτικό} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{πυροσταφυλικό} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Συνθετάση του κιτρικού	$\text{ακετυλο-CoA} + \text{οξαλοξικό} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{κιτρικό} + \text{CoA-SH}$
Αφυδρογονάση του β-υδροξυάκυλο-CoA (HOAD)	$\text{HOAD} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{3-οξοακυλ-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+$

1.6 *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1791).

Συστηματική κατάταξη του είδους *Holothuria tubulosa*:

Βασίλειο:	Animalia
Φύλο:	Echinodermata
Κλάση:	Holothuroidea
Τάξη:	Aspidochirotida
Οικογένεια:	Holothuriidae
Γένος:	Holothuria
Υπογένος:	<i>Holothuria</i>
Είδος:	<i>H. tubulosa</i>



Εικόνα 1 Απεικόνιση ατόμων του είδους *H. tubulosa*.

Το *Holothuria tubulosa* είναι ένα από τα πιο άφθονα είδη της ακτής της Μεσογείου (Brava, C. 2005). Ζει σε βραχώδη υποστρώματα, μαλακά ιζήματα και υποστρώματα από θαλάσσια φύκια, σε βάθη που κυμαίνονται μεταξύ 5 και 100 μέτρων (Brava, C. 2005). Το μέγεθος του σώματος του *H. tubulosa* φτάνει σε μήκος έως 35 εκατοστών και πλάτος 8 εκατοστών καθώς ο μέσος όρος του βάρους τους 340 γραμμάρια (Brava, C. 2005). Το σώμα του είναι σκούρο καφέ, αν και μερικές φορές παρατηρείται με γκριζωπό χρώμα. (Brava, C. 2005). Το σώμα τους έχει στρογγυλή διατομή και στην κοιλιακή όψη φέρει 3 σειρές παραπόδων (Brava, C. 2005). Το *H. tubulosa* στερείται σωλήνων του Vat και επίσης δεν υπάρχει φυλετικός διμορφισμός (Despalatovic, et al.). Χαρακτηρίζονται ως αιωρηματοφάγα και ιζηματοφάγα. Εισάγουν από τη στοματική κοιλότητα τις βρώσιμες οργανικές ουσίες και απορρίπτουν από την έδρα τα στοιχεία που δεν μεταβολίζονται, και ιδιαίτερα την άμμο, με τη μορφή επιμηκυμένων εκκρίσεων (Brava, C. 2005).

Συνήθως βρίσκεται στις θερμές και στις εύκρατες θάλασσες. Εμφανίζεται ιδιαίτερα στα σημεία χαμηλής παλίρροιας. Απαραίτητες συνθήκες ωτοκίας φάνηκαν να είναι η πανσέληνος και θερμοκρασία θάλασσας περίπου 25 ° (Despalatovic, et al., 2004). Κάθε απελευθέρωση του γενετικού υλικού διαρκεί περίπου 30 λεπτά (Despalatovic, et al., 2004). Τα γονιμοποιημένα αυγά εκκολάπτονται σε περίπου 24 ώρες και οι αναπτυσσόμενες προνύμφες είναι πλαγκτονικές (Despalatovic, et al., 2004). Τρέφονται με μικροσκοπικούς φυτικούς οργανισμούς και περνούν από διάφορα στάδια μέσα σε λίγες εβδομάδες, πριν εγκατασταθούν στον θαλάσσιο βυθό και υποστούν μεταμόρφωση σε νεαρά άτομα (Despalatovic, et al., 2004).

2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη παρούσα έρευνα, συλλέχτηκαν εποχικά (χειμώνας, άνοιξη, καλοκαίρι, φθινόπωρο) άτομα του είδους *Holothuria tubulosa* (ολοθούριο). Η συλλογή τους πραγματοποιήθηκε από 3 διαφορετικούς οικότοπους στο βόρειο Αιγαίο, το Θερμαϊκό, τον Παγασητικό και τον Βιστωνικό κόλπο. Σε δείγματα βραγχιών και μυός έγινε φασματοφωτομετρική ανάλυση της δραστηριότητας ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας καθώς και φασματοφωτομετρική ανάλυση μεταβολικών ενζύμων.

2.1 Πρωτόκολλο TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

Το πρωτόκολλο TBARS αποσκοπεί στην ποσοτικοποίηση του οξειδωτικού στρες μετρώντας την υπεροξειδωτική βλάβη στα λιπίδια που επιτυγχάνεται με την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Η βλάβη που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στα λιπίδια έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή MDA, η οποία αντιδρά με το TBA υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και οξύτητας και έτσι μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά. Η δοκιμασία TBARS χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της οξειδωτικής βλάβης (υπεροξείδωση λιπιδίων) σε δείγματα μυός και βραγχιών ατόμων του είδους *Holothuria tubulosa*.

Στο συγκεκριμένο ερευνητικό πείραμα χρησιμοποιήθηκαν πληθώρα αναλώσιμων υλικών. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 250μl TCA συγκέντρωσης 20% και 500μl Θειοβαρβιτουρικό οξύ συγκέντρωσης 0.67% μέσα σε 0,25N HCl που περιείχαν 10mM Βούτυλο-υδροξυτολουένη (διαλυμένη σε 100% αιθανόλη). Επιτεύχθηκε ομογενοποίηση του ιστού, σε δεκαπλάσια

ποσότητα φωσφορικού buffer 50mM με $\text{pH}=7,4$. Για την επίτευξη της παραπάνω διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες χωρητικότητας 100 – 1.000 μl .

2.2 Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση αποτέλεσε το πρώτο βήμα το πειράματος. Στόχος της ήταν η ομογενοποίηση του ιστού με το φωσφορικό buffer 50mM με $\text{pH}=7,4$. Ο ιστός αποτελούταν από μύες και βράγχια αντίστοιχα, ατόμων του είδους *Holothuria tubulosa*. Αρχικά το κάθε δείγμα ιστού μετρήθηκε ξεχωριστά σε ζυγαριά ακριβείας, στη συνέχεια προστέθηκε στη φιάλη, του κοινού ομογενοποιητή, στην οποία είχε τοποθετηθεί ήδη το buffer και τελικώς επιτεύχθηκε η ομογενοποίηση για λίγα λεπτά έως το σημείο του επιθυμητού αποτελέσματος ομογενοποίησης.



Εικόνα 2 Απεικόνιση ομογενοποιητή που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

2.3 Φυγοκέντρηση

Η φυγοκέντρηση είναι μία διαδικασία διαχωρισμού μιγμάτων κατά την οποία γίνεται χρήση της φυγοκέντρου δυνάμεως και αποτελεί το δεύτερο βήμα της όλης διαδικασίας του συγκεκριμένου πειράματος. Η διαδικασία αυτή επιτελέστηκε σε φυγόκεντρο ψύξης στις 2000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C. Μετά την ομογενοποίηση του ιστού, το μείγμα αυτό, προστέθηκε σε μικρά tubes, τα οποία τοποθετήθηκαν διαμετρικά αντίθετα το ένα από το άλλο μέσα στην φυγόκεντρο. Σκοπός αυτού του βήματος ήταν ο διαχωρισμός του δείγματος μέτρησης από τα υπόλοιπα υλικά του μείγματος. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε με πιπέτα 250 μl το υπερκείμενο υγρό, και προστέθηκε σε αυτό 250 μl TCA και 500 μl Θειοβαρβιτουρικό οξύ (0.67%) μέσα σε 0,25N HCl που περιείχαν 10mM Βούτυλο-υδροξυτολουένη (διαλυμένη σε 100% αιθανόλη). Το επόμενο βήμα της διαδικασίας ήταν η τοποθέτησή των tubes σε νερό που βράζει στους 90 °C για 60 λεπτά. Μετά τα 60 λεπτά, παρατηρήθηκε η επιθυμητή χρωματική αλλαγή των δειγμάτων. Στη συνέχεια ήταν επιθυμητό για τα δείγματα να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Προστέθηκε σε κάθε δείγμα 1 ml βουτανόλης, σε διαφορετικά από τα αρχικά tubes, και φυγοκεντρήθηκαν για τελευταία φορά στις 3.000 στροφές για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 3 Απεικόνιση φυγόκεντρου που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

2.4 Φασματοφωτομετρία

Μετά την ολοκλήρωση της τελευταίας φυγοκέντρωσης ,αφαιρέθηκε η υπερκείμενη φάση της βουτανόλης ,και τοποθετήθηκε σε πλαστική κυψελίδα (μία κυψελίδα για κάθε δείγμα). Η φάση βουτανόλης, μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο, στα 532 nm. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν συγκρίθηκαν με τυφλά δείγματα που περιείχαν απιονισμένο νερό , τα οποία είχαν και εκείνα φασματομετρηθεί στα 532 nm.



Εικόνα 4 Απεικόνιση φασματοφωτόμετρου που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

2.5 Νόμος Beer – Lambert

Ο νόμος αυτός σχετίζεται με την ποσότητα (ένταση) του φωτός που προσπίπτει σε ένα διάλυμα, και την ποσότητα του φωτός που απορροφάται από αυτό, σε σχέση με την περιεκτικότητα σε διαλυμένη ουσία. Συγκεκριμένα εκφράζεται από τον τύπο: $A = E \times d \times C$. Συνεπώς η αύξηση της συγκέντρωσης C , οδηγεί στη γραμμική αύξηση της τιμής της απορρόφησης A . Το d (απόσταση που διανύει η ακτινοβολία στο διάλυμα), ήταν ίδιο για όλα τα δείγματα, όπως και η σταθερά E η οποία εξαρτάται από την πίεση, τη θερμοκρασία, που ήταν ίδια στο κάθε δείγμα.

2.6 Προετοιμασία ομογενοποιημάτων

Προετοιμασία ομογενοποιημάτων για τον προσδιορισμό των ενζυμικών δραστηριοτήτων των ενζύμων:

1. Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)
2. Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)
3. Αφυδρογονάση του β-υδροξυάκυλο-CoA (HOAD)

Το διάλυμα ομογενοποίησης για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελείται από 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 50 mM ιμιδαζόλιου, σε pH=7,6 στους 24°C, το οποίο διατηρείται σε ψυγείο. Το ομογενοποίημα στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 7.000g. Το διάλυμα ομογενοποίησης διατηρείται σε θερμοκρασία 4-8°C, και κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης των ιστών παραμένει σε πάγο. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε γυάλινο ομογενοποιητή που περιείχε τετραπλάσιο όγκο διαλύματος ομογενοποίησης. Για την L-LDH η αραιώση ήταν 1:5. Το ομογενοποίημα στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 7.000g. Στην περίπτωση της L-LDH, το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται για 15min στους 5°C στα 13.000g σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο συλλέγεται και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων.

Αφού ρυθμιστεί το φωτόμετρο (θερμοκρασία, μήκος κύματος), τοποθετούνται τα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου στην κυψελίδα και αναδεύουμε με γυάλινη πιπέττα Pasteur. Τελευταίο προστίθεται το διάλυμα του ομογενοποιημένου ιστού στην κυψελίδα. Στη συνέχεια ακολουθεί φωτομέτρηση και προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου σύμφωνα με τους Passonneau & Lowry (1993).

1. Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)

Μέρος του υπερκειμένου αραιώθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης, με αραιώση 1:30 (Boutillier 1993). Η μέγιστη δραστηριότητα της L-LDH προσδιορίστηκε σε σπεκτροφωτόμετρο (Pharmacia LKB - Ultrospec III) στα 340nm ($\epsilon_{340}=6,22$), από τη μεταβολή (πτώση) της απορρόφησης, εξαιτίας της οξειδωσης του NADH, σύμφωνα με την αντίδραση:

Στην κυψελίδα τελικού όγκου 1ml προστέθηκαν 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης (50 mM, pH=7 στους 37°C), 0,01 ml NADH (0,15 mM), 0,02 ml πυροσταφυλικού οξέος (1 mM), 0,02 ml KCN (1 mM), 0,002 ml δείγματος ιστού και 0,448 ml απιονισμένου H₂O. Στο τυφλό δεν προστέθηκε πυροσταφυλικό οξύ. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 5 min (Kanatous, 2002).

Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)

0,5	ml Imidazole Buffer 50 mM (pH=7, θ=37°C)
0,01	ml NADH 0,15 mM
0,02	ml Pyruvate 1 mM
0,02	ml KCN 1 mM
0,002	ml δείγματος
0,448	ml 2d-H ₂ O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm για 5 λεπτά.

2.Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)

Η μέγιστη δραστηκότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 412nm ($\epsilon_{412}=13,6$), σύμφωνα με τις αντιδράσεις:

Το CoA μειώνει στοιχειομετρικά το αντιδραστήριο του Ellman διθειο-1,4-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB), αυξάνοντας έτσι την απορρόφηση, λόγω παραγωγής του 2-νιτρο-5-θειο-βενζοϊκού οξέος (NTB), το οποίο έχει έντονο κίτρινο χρώμα.

Στην κυψελίδα τελικού όγκου 1 ml προστέθηκαν 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης (50 mM, pH=7,5 στους 37°C), 0,02 ml DTNB (0,25 mM), 0,02 ml οξαλοξικού οξέος (0,5 mM), 0,01 ml ακετυλ-CoA (0,4 mM), 0,02 ml KCN (1 mM), 0,02 ml δείγματος ιστού και 0,410 ml 2d-H₂O. Στο τυφλό δεν προστέθηκε οξαλοξικό οξύ. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2 λεπτά (Kanatous, 2002).

Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)

0,5	ml Imidazole Buffer 50 mM (pH=7,5, $\theta=37^{\circ}\text{C}$)
0,02	ml DTNB 0,25 mM
0,01	ml ακετυλ-CoA 0,4 mM
0,02	ml KCN 1 mM
0,02	ml Oxaloacetate 0,5 mM
0,02	ml δείγματος
0,410	ml 2d-H ₂ O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 412nm για 2 λεπτά.

3.Αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο-CoA (HOAD)

Η μέγιστη δραστηκότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 340nm, από την πτώση της απορρόφησης, λόγω της οξειδωσης του NADH, σύμφωνα με την αντίδραση:

Στην κυψελίδα τελικού όγκου 1 ml προστέθηκαν 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης (50 mM, pH=7 στους 37°C), 0,01 ml NADH (0,15 mM), 0,02 ml EDTA (1 mM), 0,01 ml ακετοακετυλ-CoA (0,1 mM), 0,02 ml KCN (1 mM), 0,02 ml δείγματος ιστού και 0,420 ml απιονισμένου H₂O. Στο τυφλό δεν προστέθηκε ακετοακετυλ-CoA. Ο χρόνος αντίδρασης για το λευκό μυ ήταν 10 min, ενώ για τον ερυθρό και τον καρδιακό μυ ήταν 2 λεπτά (Kanatous, 2002).

Αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο-CoA (HOAD)

0,5	ml Imidazole Buffer 50 mM (pH=7, $\theta=37^{\circ}\text{C}$)
0,01	ml NADH 0,15 mM
0,02	ml EDTA 1 mM
0,01	ml ακετοακυλο-CoA 0,1 mM
0,02	ml KCN 1mM
0,02	ml δείγματος
0,420	ml 2d-H ₂ O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm για 2 λεπτά.

Η μέγιστη δραστηριότητα (U_{max}) των ενζύμων, σε $\mu\text{moles/g}$ υγρού βάρους ιστού/λεπτό, υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$U_{max} = \frac{\Delta_{OD \text{ δειγμ.}} - \Delta_{OD \text{ τυφλού}}}{\epsilon} \times \frac{1}{V_{\text{δειγμ.}}} \times \frac{m_{\text{ιστού}} + V_{\text{διαλ. ομογενοποίησης}}}{m_{\text{ιστού}}}$$

όπου $\Delta_{OD \text{ δειγμ.}}$ η οπτική πυκνότητα του δείγματος, $\Delta_{OD \text{ τυφλού}}$ η οπτική πυκνότητα του τυφλού, Δt ο χρόνος φωτομέτρησης, ϵ ο συντελεστής απορρόφησης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, $V_{\text{δειγμ.}}$ ο όγκος του δείγματος, $m_{\text{ιστού}}$ η μάζα του ιστού και $V_{\text{διαλ. ομογενοποίησης}}$ ο όγκος του διαλύματος ομογενοποίησης που χρησιμοποιήθηκε. Στις περιπτώσεις των L-LDH, MDH λήφθηκαν υπόψη οι αραιώσεις που έγιναν.

Για τον προσδιορισμό των σταθερών U_{max}/km και K_{cat} της κινητικής των παραπάνω ενζύμων, χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και καταγραφόταν η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα με τον τύπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Στη συνέχεια οι σταθερές της κινητικής U_{max}/km και K_{cat} προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Graph Pad Prism. 5.0.

Προετοιμασία ομογενοποιημάτων για τον προσδιορισμό των ενζυμικών δραστηριοτήτων των παρακάτω αντιοξειδωτικών ενζύμων:

4.Καταλάση (CAT)

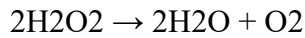
5.Ρεδοκτάση της Γλουταθειόνης (GR)

6.Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Το διάλυμα ομογενοποίησης για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελείται από φωσφορικά 50 mM σε pH=7,4 στους 24°C, το οποίο διατηρείται σε ψυγείο. Το διάλυμα ομογενοποίησης διατηρείται σε θερμοκρασία 4-8°C, και κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης των ιστών παραμένει σε πάγο. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε γυάλινο ομογενοποιητή που περιείχε 10πλάσιο όγκο διαλύματος ομογενοποίησης (10% w/v). Το ομογενοποίημα στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στα 2.000g στους 4°C. Απομονώθηκε το υπερκείμενο και στη συνέχεια ψύχθηκε και αποψύχθηκε 3 φορές ώστε να σπάσουν οι μιτοχονδριακές μεμβράνες. Ακόλουθη φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 6.000g στους 4°C. Αφού ρυθμιστεί το φωτόμετρο (θερμοκρασία, μήκος κύματος), τοποθετούνται τα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου στην κυψελίδα και αναδεύουμε με γυάλινη πιπέττα Pasteur. Τελευταίο προστίθεται το διάλυμα του ομογενοποιημένου ιστού στην κυψελίδα. Στη συνέχεια ακολουθεί φωτομέτρηση και προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου σύμφωνα με τους Passonneau & Lowry (1993).

4.Καταλάση (CAT)

Η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 240nm ($\epsilon_{240}=0,03941$), από την μεταβολή της απορρόφησης του H₂O₂, σύμφωνα με την αντίδραση:



Στην κυψελίδα τελικού όγκου προστέθηκαν 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50 mM, pH=7,4), 0,3 ml H₂O₂ (30 mM) (0,34 ml 30% H₂O₂ σε 100 ml του παραπάνω διαλύματος φωσφορικών) και 0,01 ml δείγματος ιστού.

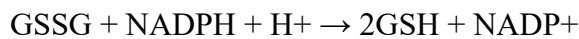
Καταλάση (CAT)

1	ml phosphate Buffer 50 mM (pH=7,4)
0,3	ml H ₂ O ₂ 30 mM
0,01	ml δείγματος

Η φωτομέτρηση έγινε στα 240nm

5.Ρεδουκτάση της Γλουταθειόνης (GR)

Η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 340nm ($\epsilon_{340}=6,22$), από την μεταβολή της απορρόφησης του NADPH, σύμφωνα με την αντίδραση:



Σε κυψελίδα τελικού όγκου 1 ml προστέθηκαν 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50mM, pH=7,4), 0,01 ml NADPH (0,15 mM), 0,02 ml EDTA (2 mM) και 0,01 ml δείγματος και 0,450 ml απιονισμένου H₂O. Η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη 0,01 ml GSSG (oxidized glutathione – οξειδωμένη γλουταθειόνη) (1 mM). Στο τυφλό δε χρησιμοποιήθηκε GSSG. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2 λεπτά (Paglia & Valentine 1967).

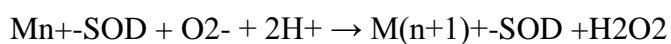
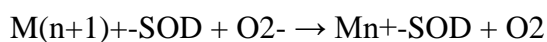
Ρεδουκτάση της Γλουταθειόνης (GR)

0,5	ml phosphate Buffer 50 mM (pH=7,4)
0,01	ml NADPH 0,15 mM
0,02	ml EDTA 2 mM
0,01	ml GSSG 1 mM
0,01	ml δείγματος
0,460	ml 2d-H ₂ O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm

6.Δισμουτάση του Υπεροξειδίου (SOD)

Η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 340nm ($\epsilon_{340}=6,22$), από την μεταβολή της οξειδωσης του NADH, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η ενζυμική δραστηριότητα της SOD μετρήθηκε από την αναστολή της οξειδωσης του NADH χρησιμοποιώντας β-μερκαπτοαιθανόλη παρουσίας EDTA και Mn ως υπόστρωμα. Σε κυψελίδα

προστέθηκαν 0,8 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50 mM, pH=7,4), 0,055 ml EDTA/Mn διαλύματος (100 mM και 50 mM αντίστοιχα), 0,04 ml NADH (7,5 mM) και διαφορετικοί όγκοι δείγματος. Η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη 0,1 ml διαλύματος β-μερκαπτοαιθανόλης (10 mM). Μια μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας της SOD ισούται με την ποσότητα του ενζύμου που καταστέλλει την επαγόμενη από το υπεροξειδίο οξείδωση του NADH κατά 50% (IC50). Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται περισσότερες από μια κυψελίδες με διαφορετικές ποσότητες δείγματος (10-100 μl), κατασκευάζεται το διάγραμμα «όγκος δείγματος» - «ταχύτητα αντίδρασης» και υπολογίζεται η IC50. από το τυφλό απουσιάζει η μερκαπτοαιθανόλη. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2 λεπτά (Paoletti & Mocali 1990).

Δισμουτάση του Υπεροξειδίου (SOD)

0,8	ml phosphate Buffer 50 mM (pH=7,4)
0,04	ml NADH 7,5 mM
0,055	ml EDTA/Mn 100 mM/50 mM
0,01-0,1	ml δείγματος
0,1	ml β-mercaptoethanol (10 mM)

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm

Η μέγιστη δραστηριότητα (U_{max}) των ενζύμων, σε μmoles/g υγρού βάρους ιστού/λεπτό, υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$U_{max} = \frac{\Delta_{OD \text{ δειγμ.}} - \Delta_{OD \text{ τυφλού}}}{\epsilon} \times \frac{1}{V_{\text{δειγμ.}}} \times \frac{m_{\text{ιστού}} + V_{\text{διαλ. ομογενοποίησης}}}{m_{\text{ιστού}}}$$

όπου $\Delta_{OD \text{ δειγμ.}}$ η οπτική πυκνότητα του δείγματος, $\Delta_{OD \text{ τυφλού}}$ η οπτική πυκνότητα του τυφλού, Δt ο χρόνος φωτομέτρησης, ϵ ο συντελεστής απορρόφησης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, $V_{\text{δειγμ.}}$ ο όγκος του δείγματος, $m_{\text{ιστού}}$ η μάζα του ιστού και $V_{\text{διαλ. ομογενοποίησης}}$ ο όγκος του διαλύματος ομογενοποίησης που χρησιμοποιήθηκε.

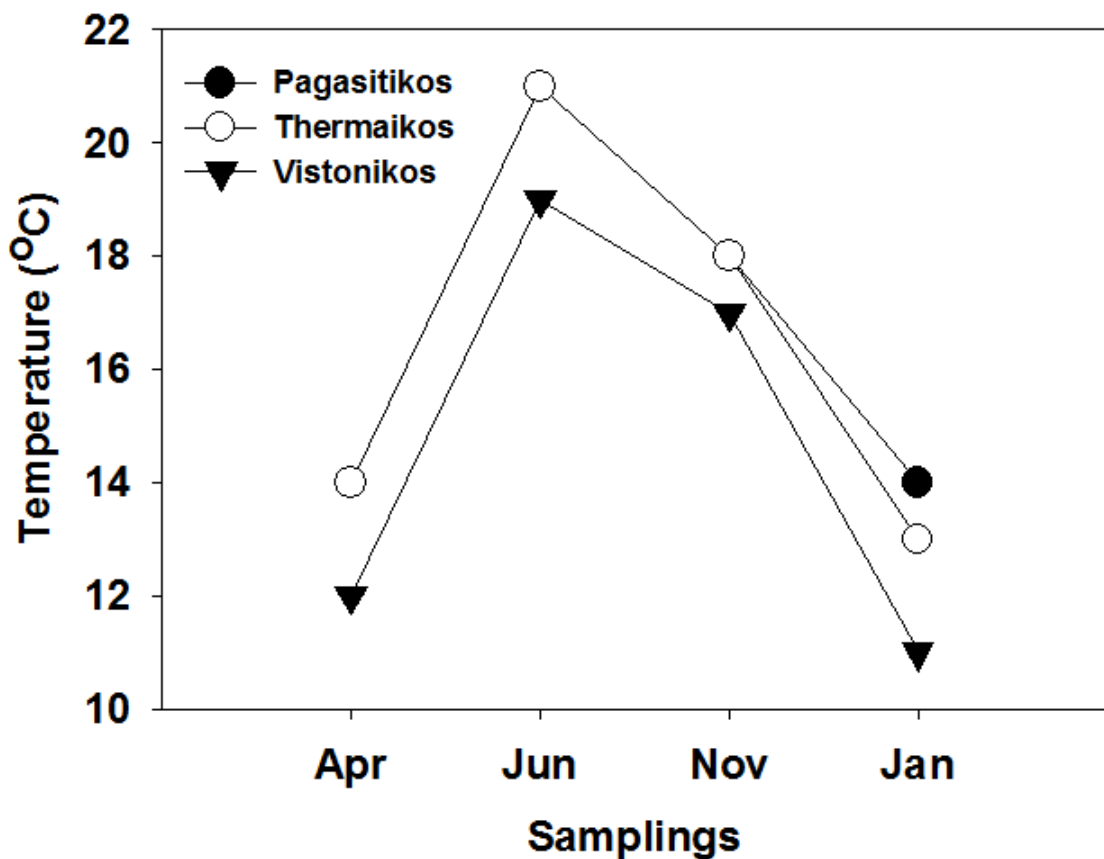
Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Graphpad Istat 3.0 για ανάλυση των αποτελεσμάτων με 1 Way ANOVA (ανάλυση διακύμανσης) και το Graphpad Prism 5.0 για ανάλυση των αποτελεσμάτων με 2 Way ANOVA (ανάλυση διακύμανσης). Ο επανέλεγχος των αποτελεσμάτων έγινε με το μη παραμετρικό Friedman test με post test το Dunn για τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν με 2 Way ANOVA. Το post test που χρησιμοποιήθηκε για τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν με 1 Way ANOVA είναι το Bonferroni. Τα στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) αποτελέσματα σημειώνονται στα διαγράμματα.

3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αυξημένη συγκέντρωση C στην προαναφερθείσα αποτύπωση του νόμου Beer – Lambert ($A = E \times d \times C$) σηματοδοτεί την αυξημένη ενζυμική παραγωγή αντιοξειδωτικών και μεταβολικών ενζύμων, η οποία μεταφράζεται ως αυξημένη συγκέντρωση του βιολογικού στρες στον οργανισμό. Έτσι, διεξάγεται το συμπέρασμα ότι όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή της απορρόφησης για κάθε δείγμα, τόσο πιο έντονο το βιολογικό στρες που βιώνει ο οργανισμός στην εκάστοτε περιοχή πράγμα που καθιστά αυτήν την περιοχή ακατάλληλη για διαβίωση του συγκεκριμένου είδους. Κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του φασματοφωτόμετρου, η χαμηλότερη κατά μέσο όρο απορροφητικότητα των δειγμάτων μιας περιοχής σε σχέση με μια άλλη μαρτυράει τις ιδανικότερες περιβαλλοντικές συνθήκες διαβίωσης των ατόμων του είδους *Holothuria tubulosa*.

Η θερμοκρασία της θάλασσας κατά τις εποχικές δειγματοληψίες, στις δειγματοληπτικές περιοχές, φαίνονται στο σχήμα 1.

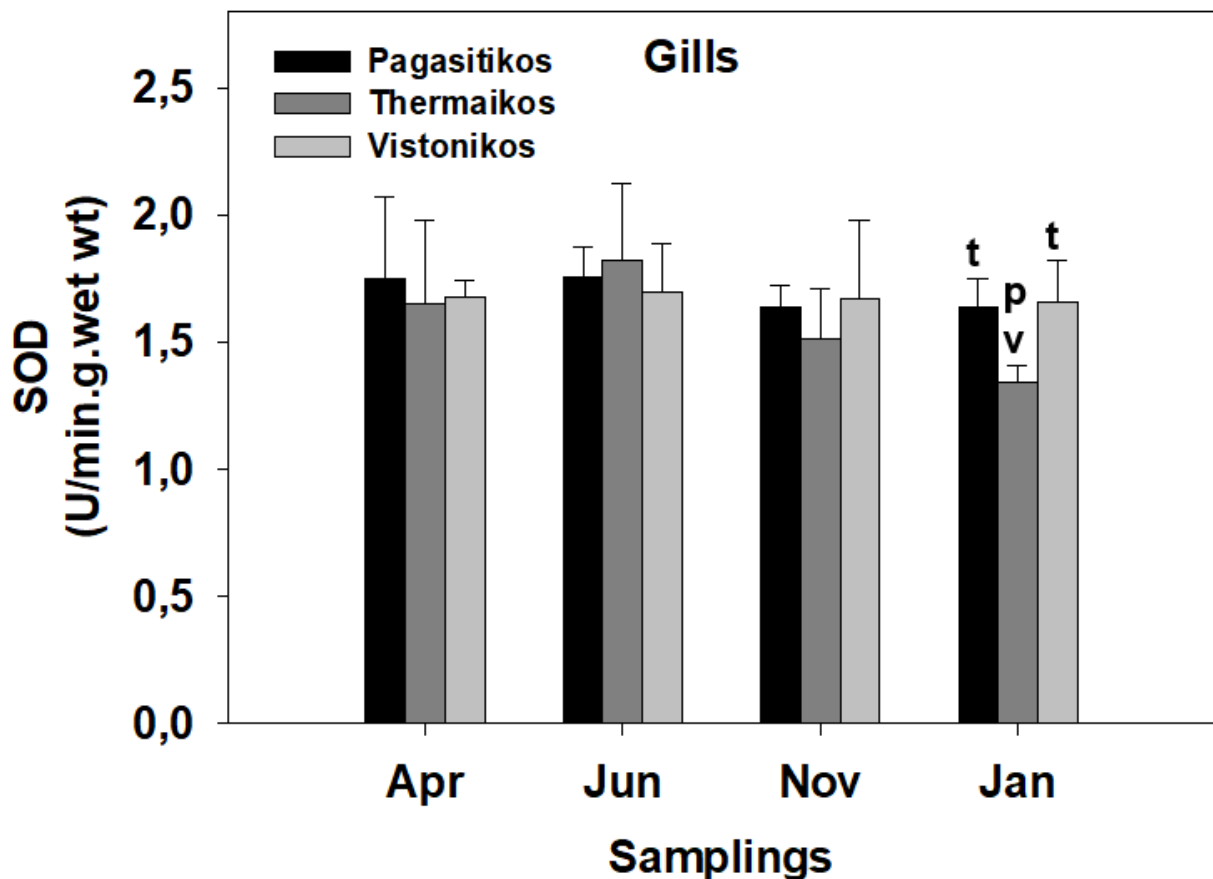


Σχήμα 1. Θερμοκρασία της θάλασσας κατά τις εποχικές δειγματοληψίες, στις δειγματοληπτικές περιοχές

Η μέτρηση της θερμοκρασίας της θάλασσας στις περιοχές δειγματοληψίας, έδειξε διαφορά σε όλη την περίοδο του έτους μεταξύ των μελετώμενων Κόλπων. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία του Βιστωνικού παρέμεινε σταθερά πιο χαμηλά σε σύγκριση με το Θερμαϊκό και τον Παγασητικό. Όσον αφορά τους δύο τελευταίους κόλπους, η μόνη διαφορά παρουσιάστηκε κατά τη δειγματοληψία του χειμώνα με τον Θερμαϊκό να παρουσιάζει χαμηλότερη θερμοκρασία σε σχέση με το Παγασητικό.

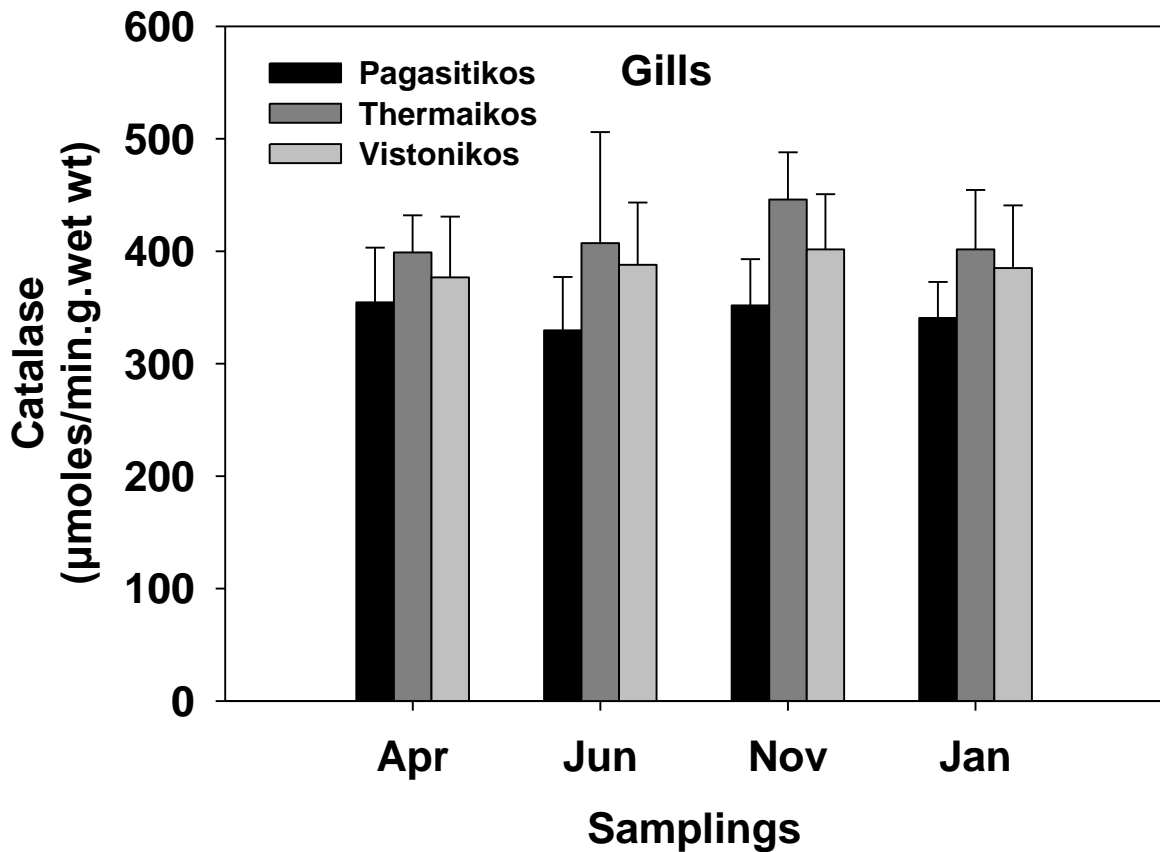
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δεν έδειξαν κάποια αλλαγή στη δραστικότητα των ενζύμων μεταξύ των εποχικών δειγματοληψιών του καλοκαιριού, της άνοιξης και του φθινοπώρου. Πιο συγκεκριμένα, οι μετρήσεις της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) στους μύες, ήταν Παγασητικός: $0,87 \pm 0,18$, Θερμαϊκός: $0,89 \pm 0,12$, Βιστωνικός: $1,03 \pm 0,16$ U/min.g.wet.wt το καλοκαίρι, SOD μυς - Παγασητικός: $1 \pm 0,13$, Θερμαϊκός: $1,1 \pm 0,23$, Βιστωνικός: $1,02 \pm 0,26$ U/min.g.wet.wt την άνοιξη, και SOD μυς - Παγασητικός: $0,86 \pm 0,14$, Θερμαϊκός: $0,96 \pm 0,15$, Βιστωνικός: $1,09 \pm 0,16$ U/min.g.wet.wt το φθινόπωρο αντιστοίχως. Ακόμη, δεν υπήρχε αλλαγή στην δραστικότητα των ενζύμων, μεταξύ των τοποθεσιών συλλογής όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα νούμερα των αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις των ενζύμων σε βράγχια : Παγασητικός άνοιξη – βράγχια, SOD: $1,74 \pm 0,32$ U/min.g.wet.wt, CAT: $345,57 \pm 48,57$, GR: $0,43 \pm 0,05$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$, Θερμαϊκός άνοιξη – βράγχια, SOD: $1,65 \pm 0,32$ U/min.g.wet.wt, CAT: $398,89 \pm 33$, GR: $0,39 \pm 0,08$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$, Βιστωνικός άνοιξη – βράγχια, SOD: $1,67 \pm 0,06$ U/min.g.wet.wt, CAT: $376,74 \pm 53,99$, GR: $0,42 \pm 0,05$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$).

Τα αναλυτικά διαγράμματα των αποτελεσμάτων δίνονται παρακάτω:



Σχήμα 2. Αποτελέσματα της δραστικότητας του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p, 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

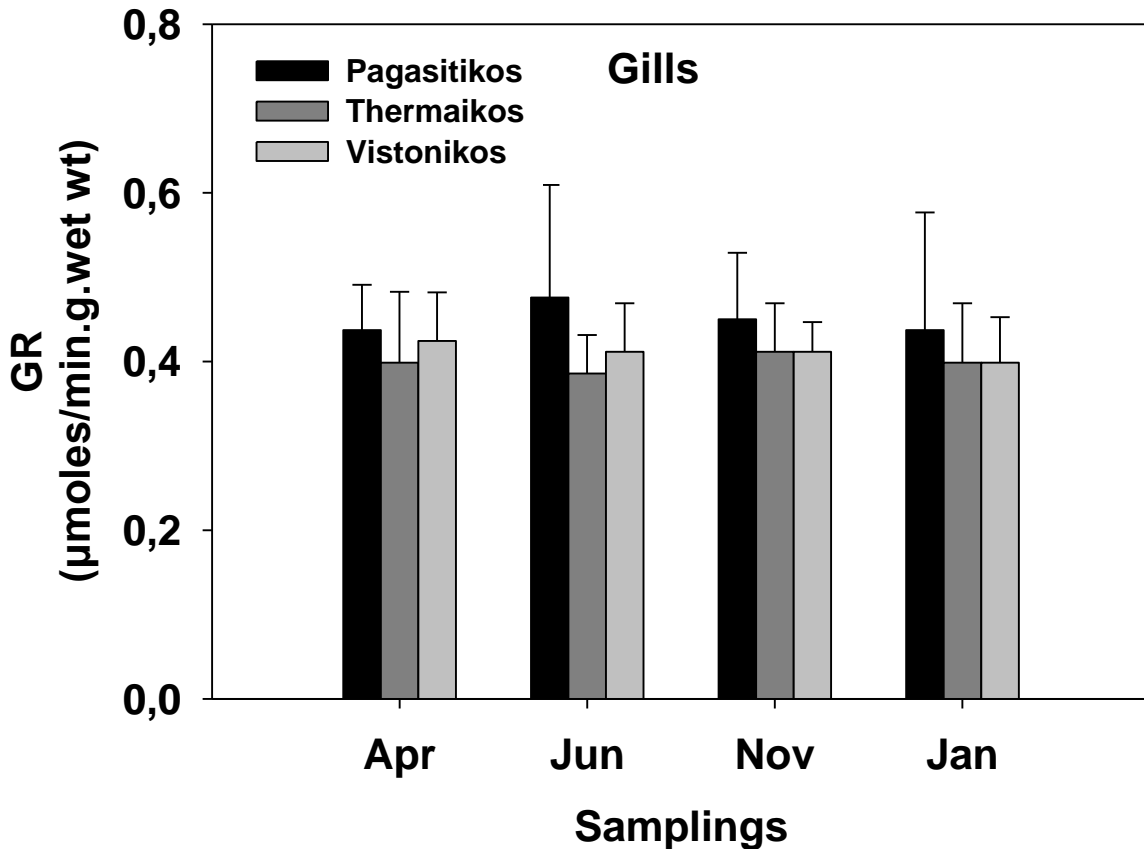
Στο σχήμα 2 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Παγασητικό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου, τον Βιστωνικό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Θερμαϊκό. Δεν συμβαίνει το ίδιο κατά τον μήνα Ιούνιο, στον οποίο, ο Θερμαϊκός κόλπος είναι αυτός στον οποίο παρατηρούμε τη μεγαλύτερη δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου, αμέσως μετά παρατηρούμε τον Παγασητικό κόλπο, και τελικώς τον Βιστωνικό. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Βιστωνικός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστηριότητας του ενζύμου με τον Παγασητικό και τον Θερμαϊκό να ακολουθούν μετέπειτα αντιστοίχως. Το ίδιο συμβαίνει και τον μήνα Ιανουάριο. Η πιο υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τον μήνα Ιούνιο στον Θερμαϊκό κόλπο ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Ιανουάριο πάλι στον Θερμαϊκό κόλπο.



Σχήμα 3. Αποτελέσματα της δραστηριότητα του ενζύμου καταλάσης από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p,0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

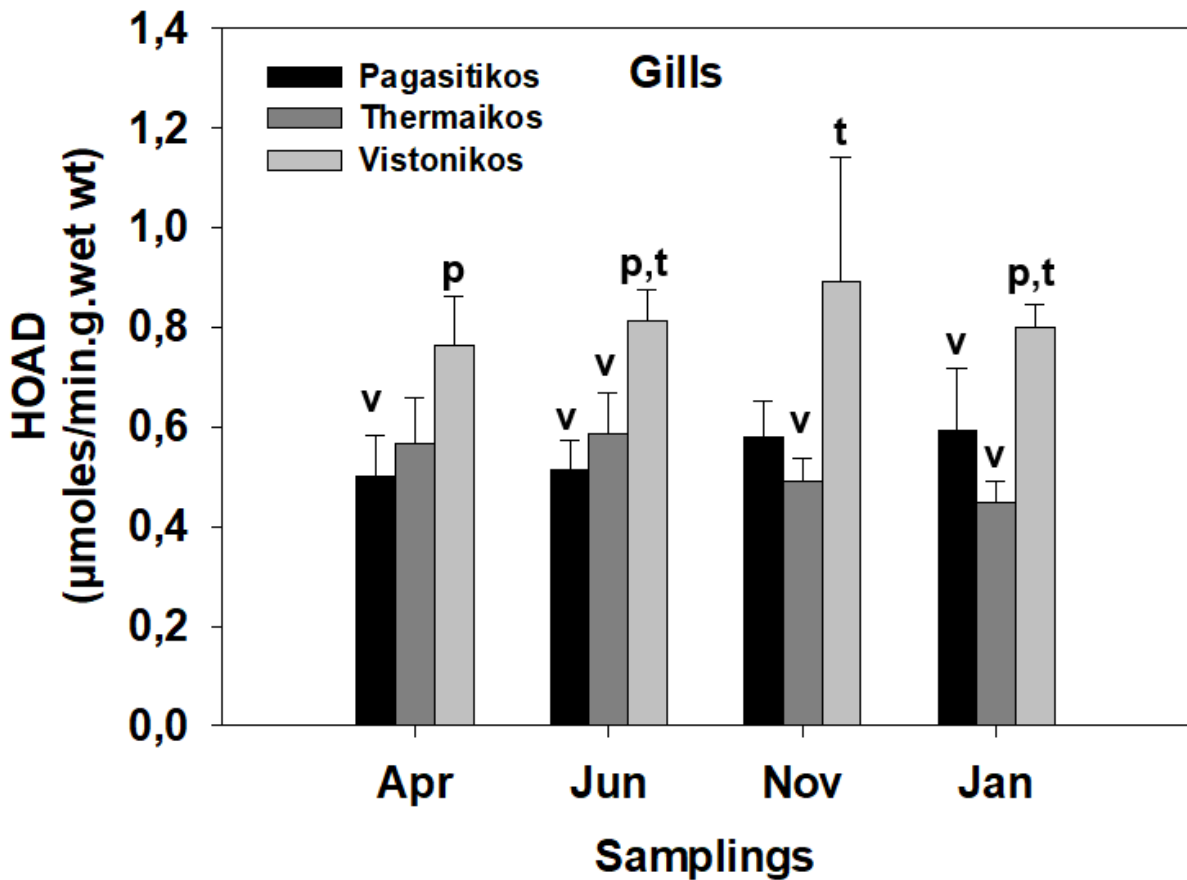
Στο σχήμα 3 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες., παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Θερμαϊκό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου, τον Βιστωνικό να κατέχει την αμέσως

επόμενη θέση και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Παγασητικό. Το ίδιο συμβαίνει κατά τον μήνα Ιούνιο. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Θερμαϊκός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστηριότητας του ενζύμου με τον Βιστωνικό και τον Παγασητικό να ακολουθούν μετέπειτα αντιστοίχως. Το ίδιο συμβαίνει και τον μήνα Ιανουάριο. Η πιο υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τον μήνα Νοέμβριο στον Θερμαϊκό κόλπο ενώ η χαμηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Ιούνιο στον Παγασητικό κόλπο.



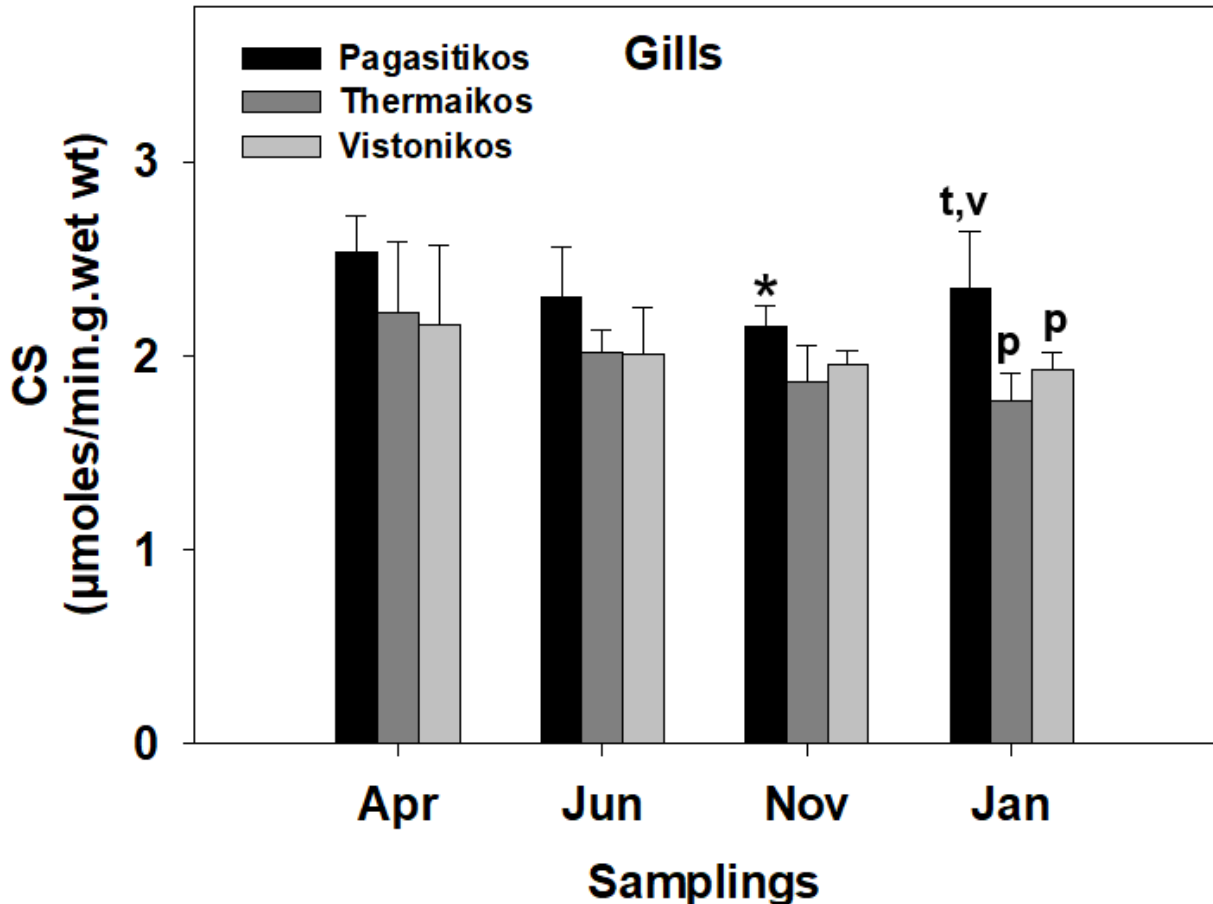
Σχήμα 4. Αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της ρεκδουτάσης της γλουταθειόνης από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p,0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 4 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της ρεκδουτάσης της γλουταθειόνης από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Παγασητικό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου, τον Βιστωνικό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Θερμαϊκό. Το ίδιο συμβαίνει κατά τον μήνα Ιούνιο. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Παγασητικός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστηριότητας του ενζύμου με τον Θερμαϊκό και Βιστωνικό να κυμαίνονται στις ίδιες τιμές δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου. Το ίδιο συμβαίνει και τον μήνα Ιανουάριο. Η πιο υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τον μήνα Ιούνιο στον Παγασητικό κόλπο ενώ η χαμηλότερη συγκέντρωση του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Ιούνιο στον Θερμαϊκό κόλπο.



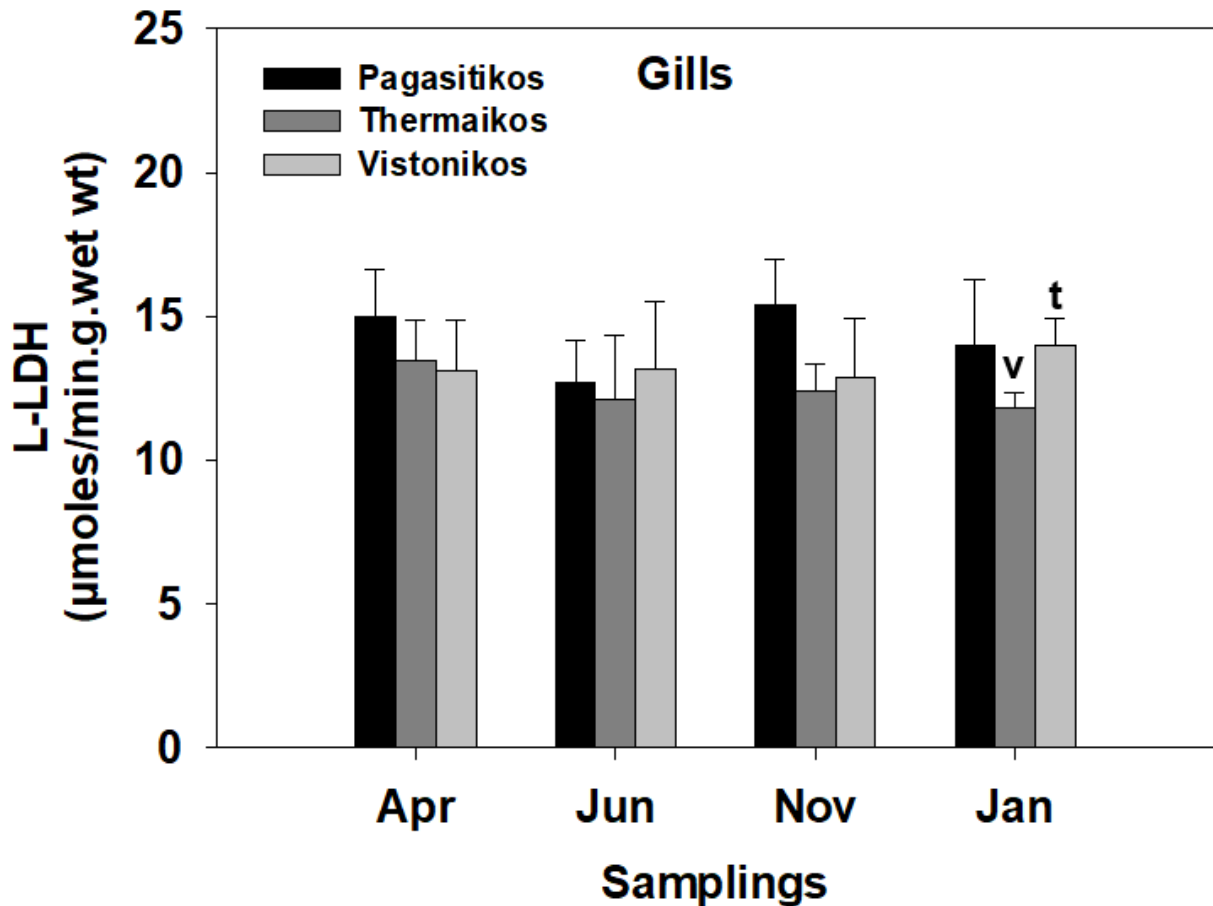
Σχήμα 5. Αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της 3-υδροξυ-CoA δεϋδρογονάσης από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (*p,0,05 σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 5 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της 3-υδροξυ-CoA δεϋδρογονάσης από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Βιστωνικό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου, τον Θερμαϊκό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Παγασητικό. Το ίδιο συμβαίνει κατά τον μήνα Ιούνιο. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Βιστωνικός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστηριότητας του ενζύμου με τον Παγασητικό και Θερμαϊκό να ακολουθούν μετέπειτα αντιστοίχως. Το ίδιο συμβαίνει και τον μήνα Ιανουάριο. Η πιο υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τον μήνα Νοέμβριο στον Βιστωνικό κόλπο ενώ η χαμηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Ιανουάριο στον Θερμαϊκό κόλπο.



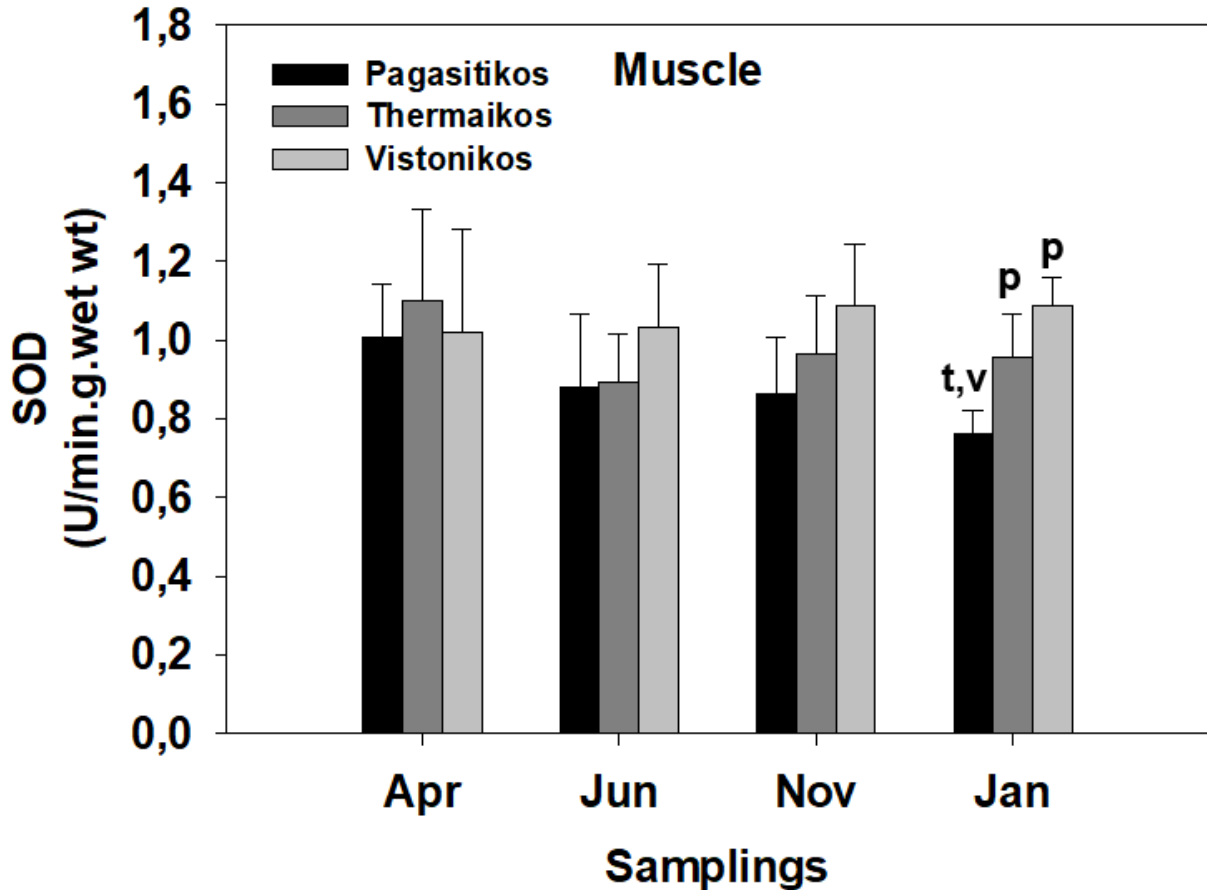
Σχήμα 6. Αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της συνθετάσης του κιτρικού από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p,0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 6 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της συνθετάσης του κιτρικού από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Παγασητικό κόλπο να είναι ο οικοτόπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου, τον Θερμαϊκό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Βιστωνικό. Το ίδιο συμβαίνει κατά τον μήνα Ιούνιο με ελάχιστη διαφορά στον Θερμαϊκό και Βιστωνικό κόλπο. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Παγασητικός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστηριότητας του ενζύμου με τον Βιστωνικό και Θερμαϊκό να ακολουθούν μετέπειτα αντιστοίχως. Το ίδιο συμβαίνει και τον μήνα Ιανουάριο. Η πιο υψηλή συγκέντρωση του ενζύμου, παρατηρήθηκε τον μήνα Απρίλιο στον Παγασητικό κόλπο ενώ η χαμηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Ιανουάριο στον Θερμαϊκό κόλπο.



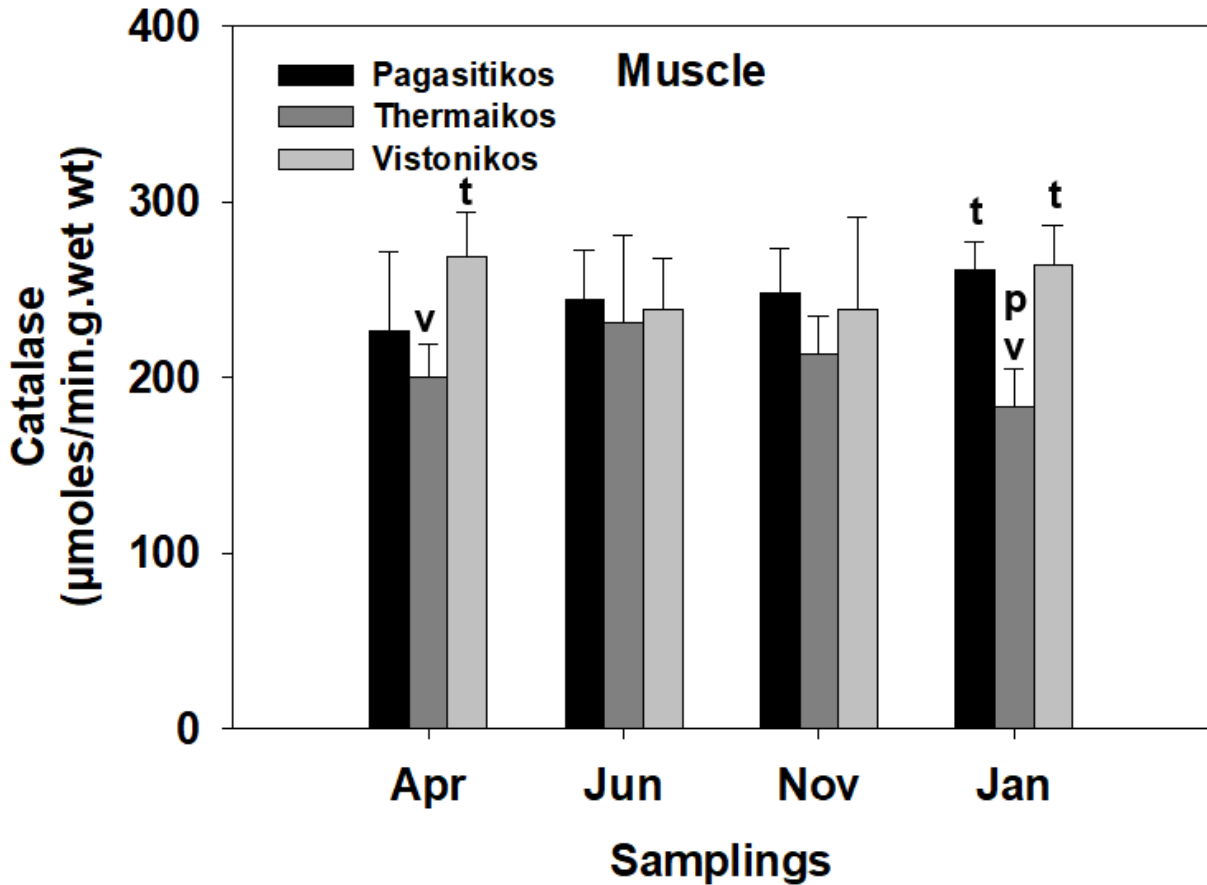
Σχήμα 7. Αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 7 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης από ιστό βραγχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Παγασητικό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου, τον Θερμαϊκό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση με μικρή διαφορά από τον Θερμαϊκό παρατηρούμε τον Βιστωνικό. Δεν συμβαίνει το ίδιο κατά τον μήνα Ιούνιο όπου παρατηρούμε στην θέση με την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου τον Βιστωνικό κόλπο, μετέπειτα τον Παγασητικό και τελικώς τον Θερμαϊκό κόλπο. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Παγασητικός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστηριότητας του ενζύμου με τον Βιστωνικό και Θερμαϊκό να ακολουθούν μετέπειτα αντιστοίχως. Το ίδιο συμβαίνει και τον μήνα Ιανουάριο. Η πιο υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τον μήνα Νοέμβριο στον Παγασητικό κόλπο ενώ η χαμηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Ιανουάριο στον Θερμαϊκό κόλπο.



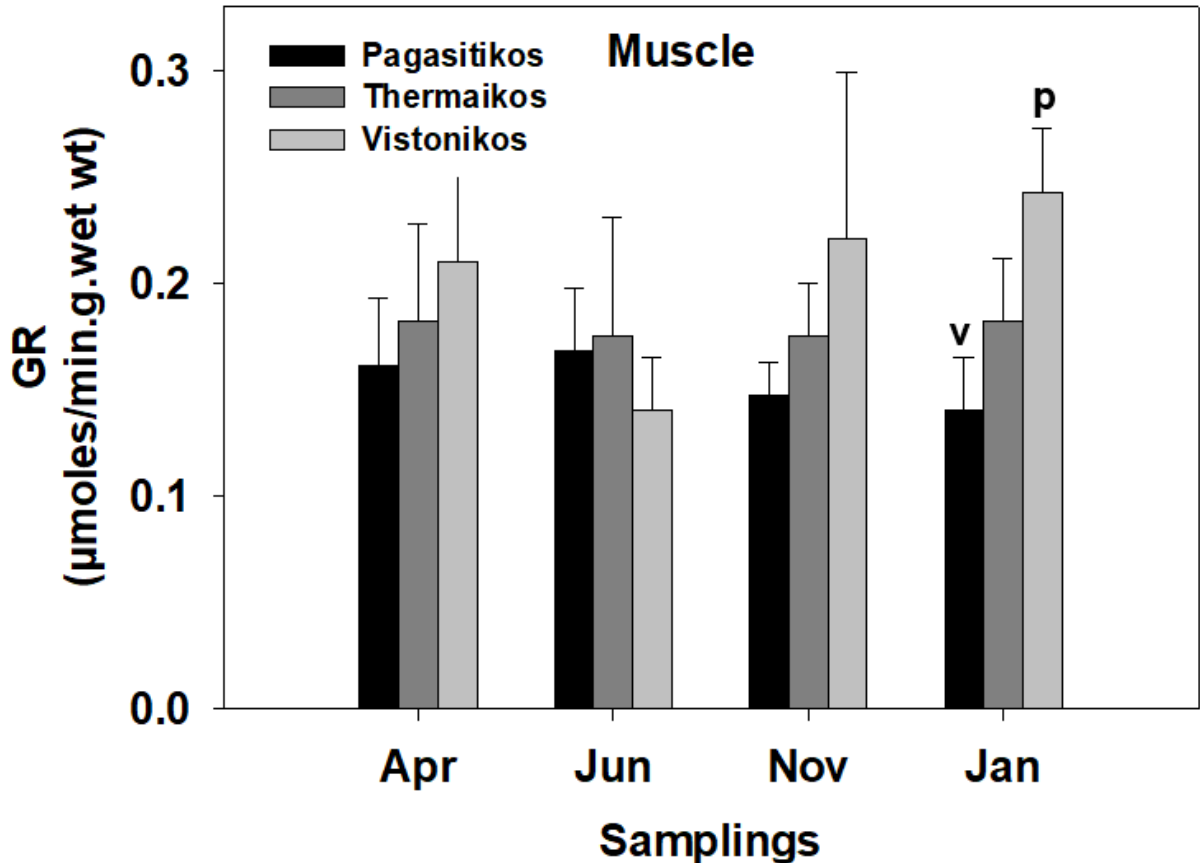
Σχήμα 8. Αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου από ιστό μύος σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 8 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου από ιστό μύος σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Θερμαϊκό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου, τον Βιστωνικό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Παγασητικό. Δεν συμβαίνει το ίδιο κατά τον μήνα Ιούνιο, στον οποίο, ο Βιστωνικός κόλπος είναι αυτός στον οποίο παρατηρούμε τη μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου του συγκεκριμένου ενζύμου, αμέσως μετά παρατηρούμε τον Θερμαϊκό κόλπο, και τελικώς τον Παγασητικό με μικρή διαφορά από τον Θερμαϊκό. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Βιστωνικός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστηριότητας του ενζύμου με τον Θερμαϊκό και τον Παγασητικό να ακολουθούν μετέπειτα αντιστοίχως. Το ίδιο συμβαίνει και τον μήνα Ιανουάριο. Οι πιο υψηλές δραστηριότητες του ενζύμου, παρατηρήθηκαν τον μήνα Απρίλιο, στον Θερμαϊκό κόλπο, και Νοέμβριο, Ιανουάριο στον Βιστωνικό ενώ η χαμηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Ιανουάριο στον Παγασητικό κόλπο.



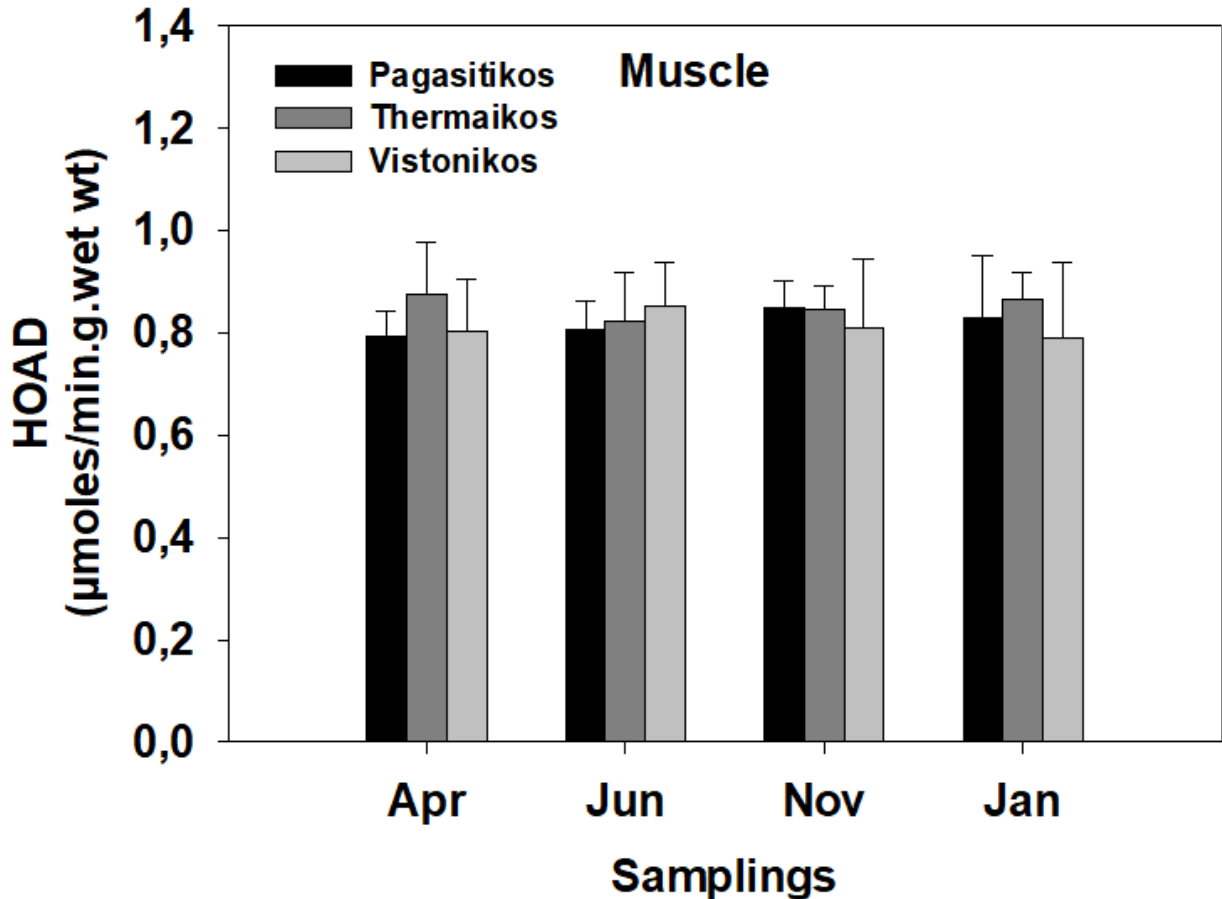
Σχήμα 9. Αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της καταλάσης από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 9 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου καταλάσης από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες., παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Βιστωνικό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου, τον Παγασητικό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Θερμαϊκό κόλπο. Δεν συμβαίνει το ίδιο κατά τον μήνα Ιούνιο όπου παρατηρούμε στην θέση με την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου τον Παγασητικό κόλπο, μετέπειτα τον Βιστωνικό και τελικώς τον Θερμαϊκό κόλπο. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Παγασητικός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστηριότητας του ενζύμου με τον Βιστωνικό και Θερμαϊκό να ακολουθούν μετέπειτα αντιστοίχως. Τον μήνα Ιανουάριο, ο Βιστωνικός είναι ο κόλπος που παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση του συγκεκριμένου ενζύμου ενώ ακολουθεί με μικρή διαφορά ο Παγασητικός και τελικώς ο Θερμαϊκός. Η πιο υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τον μήνα Απρίλιο στον Βιστωνικό κόλπο ενώ η χαμηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Ιανουάριο στον Θερμαϊκό κόλπο.



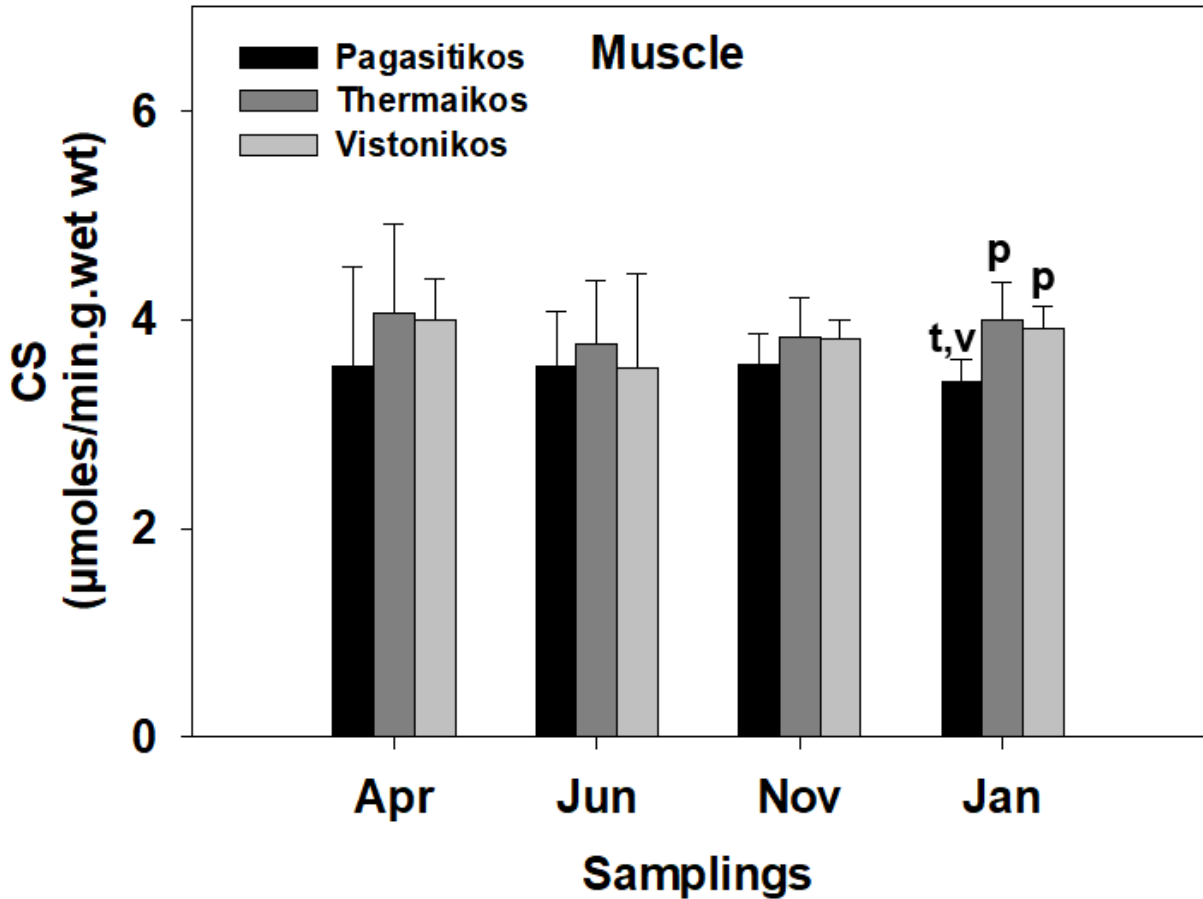
Σχήμα 10. Αποτελέσματα της δραστικότητας του ενζύμου της ρεκδουτάσης της γλουταθειόνης από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 10 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστικότητας του ενζύμου της ρεκδουτάσης της γλουταθειόνης από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Βιστωνικό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου, τον Θερμαϊκό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Παγασητικό κόλπο. Δεν συμβαίνει το ίδιο κατά τον μήνα Ιούνιο όπου παρατηρούμε στην θέση με την μεγαλύτερη ω του ενζύμου τον Θερμαϊκό κόλπο, μετέπειτα με μικρή διαφορά τον Παγασητικό κόλπο και τελικώς τον Βιστωνικό κόλπο. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Βιστωνικός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστικότητας του ενζύμου με τον Θερμαϊκό και Παγασητικό να ακολουθούν μετέπειτα αντιστοίχως. Τον μήνα Ιανουάριο, ο Βιστωνικός είναι ο κόλπος που παρατηρείται μεγαλύτερη δραστικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου ενώ ακολουθεί ο Θερμαϊκός και τελικώς ο Παγασητικός κόλπος. Η πιο υψηλή δραστικότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τον μήνα Ιανουάριο στον Βιστωνικό κόλπο ενώ η χαμηλότερη δραστικότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τον ίδιο μήνα στον Παγασητικό κόλπο.



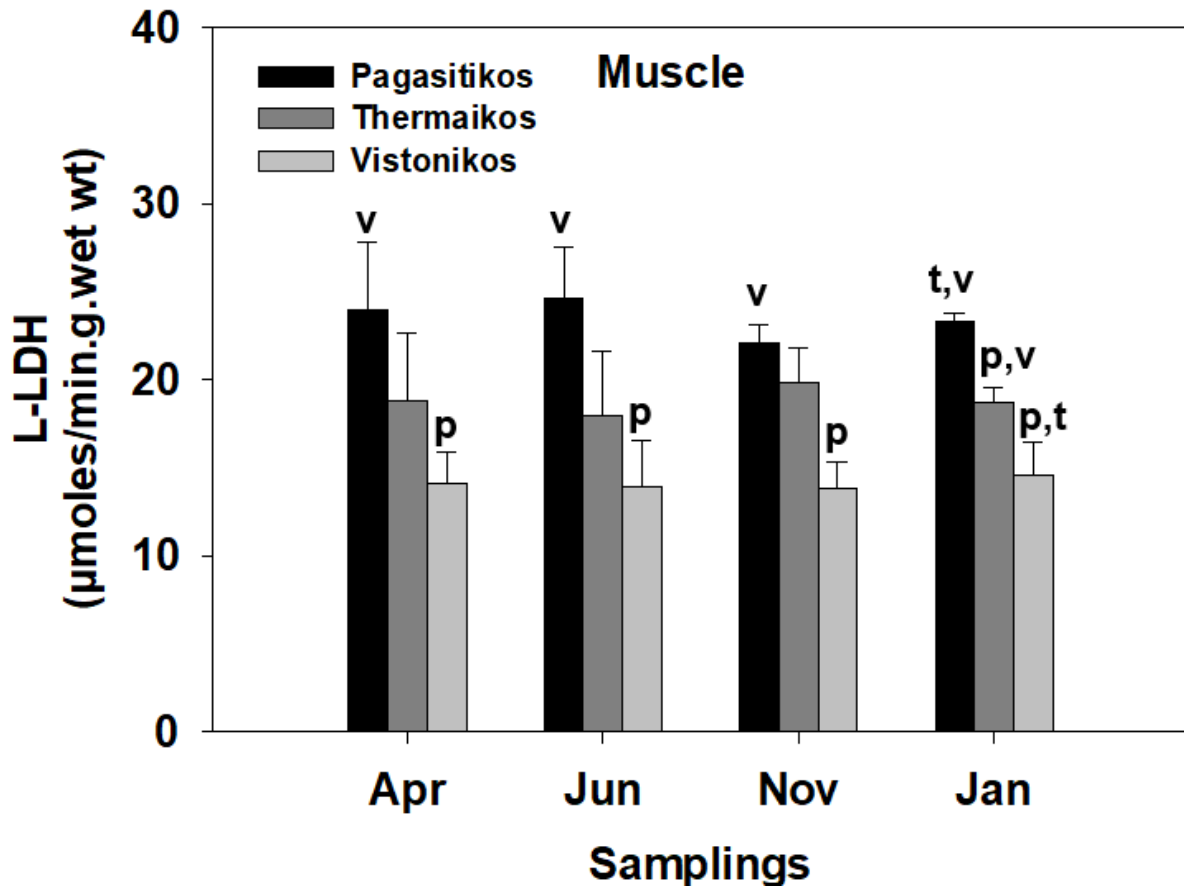
Σχήμα 11. Αποτελέσματα της δραστικότητας του ενζύμου της 3-υδροξυ-CoA δεϋδρογονάσης από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 11 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστικότητας του ενζύμου της 3-υδροξυ-CoA δεϋδρογονάσης από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Θερμαϊκό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου, τον Βιστωνικό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση με μικρή διαφορά από τον Βιστωνικό παρατηρούμε τον Παγασητικό κόλπο. Δεν συμβαίνει το ίδιο κατά τον μήνα Ιούνιο όπου παρατηρούμε στην θέση με την μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου τον Βιστωνικό κόλπο, μετέπειτα με μικρή διαφορά τον Θερμαϊκό κόλπο και τελικώς τον Παγασητικό κόλπο. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Παγασητικός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστικότητας του ενζύμου με μικρή διαφορά από τον Θερμαϊκό και Παγασητικό που ακολουθούν μετέπειτα αντιστοίχως. Τον μήνα Ιανουάριο, ο Θερμαϊκός είναι ο κόλπος που παρατηρείται μεγαλύτερη δραστικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου ενώ ακολουθεί ο Παγασητικός και τελικώς ο Βιστωνικός κόλπος. Η πιο υψηλή δραστικότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τους μήνες Απρίλιο και Ιανουάριο στον Θερμαϊκό κόλπο ενώ η χαμηλότερη δραστικότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Απρίλιο στον Παγασητικό κόλπο.



Σχήμα 12. Αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της συνθετάσης του κιτρικού από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

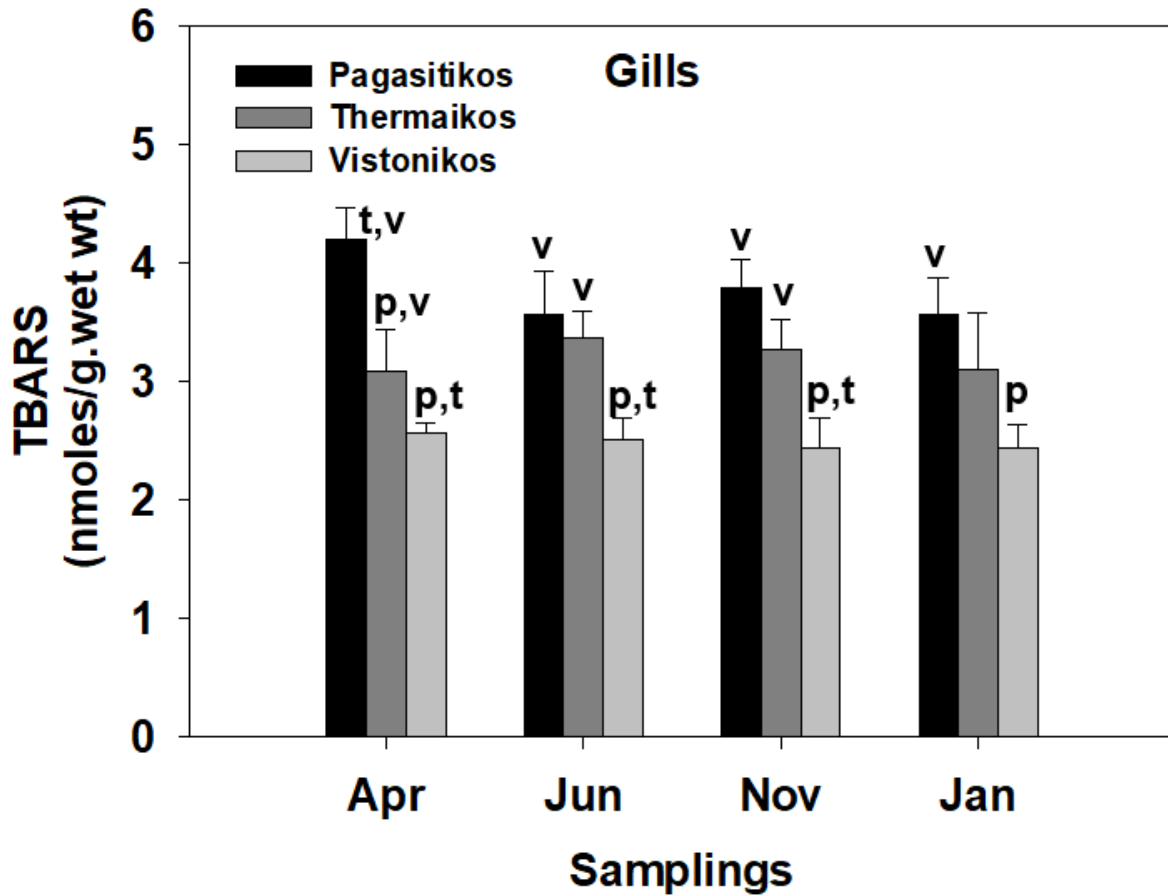
Στο σχήμα 12 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστηριότητας του ενζύμου της συνθετάσης του κιτρικού από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Θερμαϊκό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου, τον Βιστωνικό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση με μικρή διαφορά και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Παγασητικό κόλπο. Το ίδιο συμβαίνει κατά τον μήνα Ιούνιο όπου παρατηρούμε στην θέση με την μεγαλύτερη δραστηριότητα του ενζύμου τον Θερμαϊκό κόλπο και μετέπειτα με ελάχιστη διαφορά μεταξύ τους ακολουθούν ο Παγασητικός και Βιστωνικός κόλπος. Κατά τον μήνα Νοέμβριο, ο Θερμαϊκός κόλπος, έχει μεγαλύτερα ποσοστά δραστηριότητας του ενζύμου με μικρή διαφορά από τον Βιστωνικό και ακολουθεί μετέπειτα ο Παγασητικός. Τον μήνα Ιανουάριο, ο Θερμαϊκός είναι ο κόλπος που παρατηρείται μεγαλύτερη δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου ενώ ακολουθεί με μικρή διαφορά ο Βιστωνικός και τελικώς ο Παγασητικός κόλπος. Η πιο υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τους μήνες Απρίλιο και Ιανουάριο στον Θερμαϊκό κόλπο ενώ η χαμηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τον μήνα Ιανουάριο στον Παγασητικό κόλπο.



Σχήμα 13. Αποτελέσματα της δραστικότητας του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p,0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 13 που απεικονίζει τα αναλυτικά αποτελέσματα της δραστικότητας του ενζύμου γαλακτικής αφυδρογονάσης από ιστό μυός σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρείται μία διαφορά στις τιμές, κατά τον μήνα Απρίλιο, με τον Παγασητικό κόλπο να είναι ο οικότοπος που κατέχει την μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου, τον Θερμαϊκό να κατέχει την αμέσως επόμενη θέση και στην τελευταία θέση παρατηρούμε τον Βιστωνικό κόλπο. Το ίδιο συμβαίνει κατά τον μήνα Ιούνιο, Νοέμβριο και Ιανουάριο. Η πιο υψηλή δραστικότητα του ενζύμου, παρατηρήθηκε τον μήνα Ιούνιο στον Παγασητικό κόλπο ενώ η χαμηλότερη δραστικότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε τους μήνες Ιούνιο και Νοέμβριο στον Βιστωνικό κόλπο.

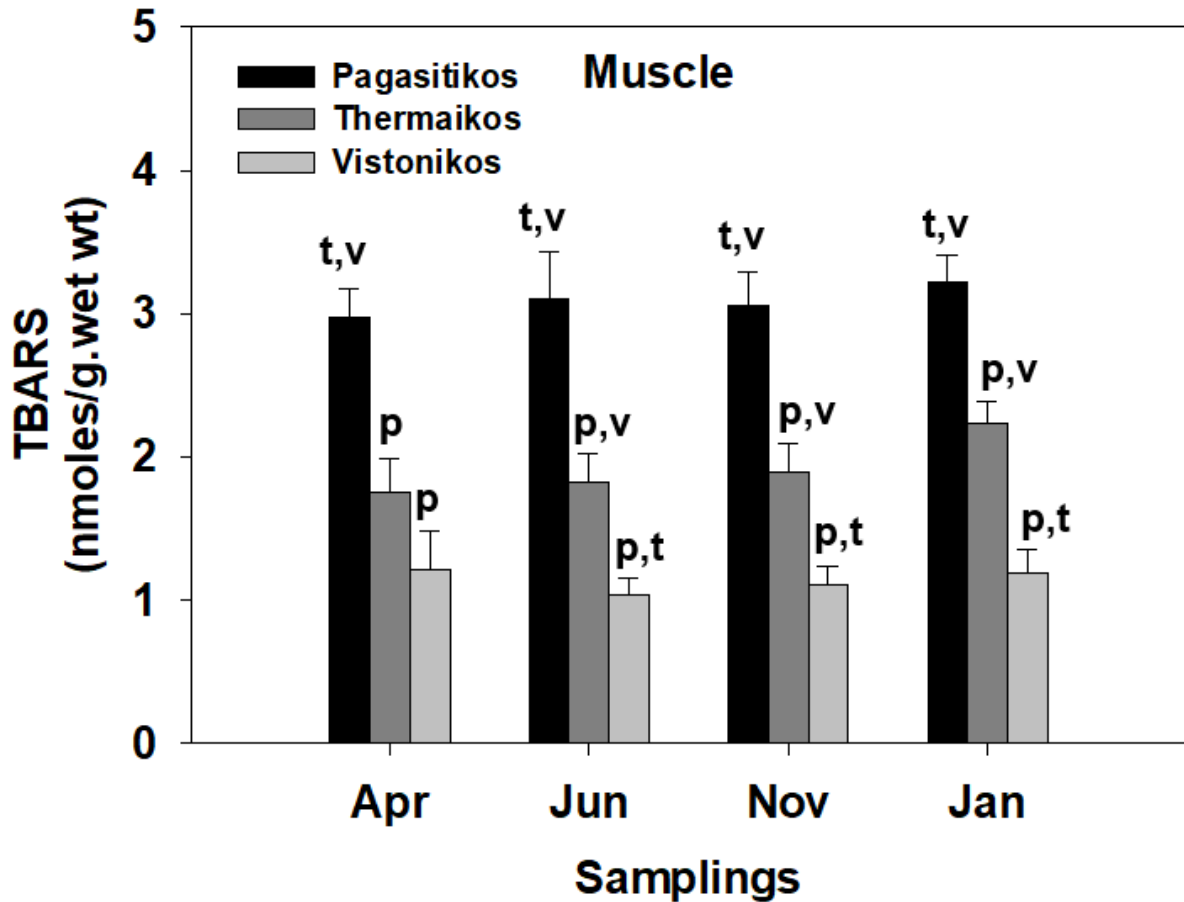
Holothuria tubulosa



Σχήμα 14. Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της μεθόδου TBARS που εφαρμόστηκε σε δείγματα ιστού βραχίων σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (*p,0,05 σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Στο σχήμα 14 που απεικονίζει το σύνολο των αποτελεσμάτων της μεθόδου TBARS που εφαρμόστηκε σε δείγματα ιστού βραχίων του είδους *H. tubulosa* σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρούμε ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκονται στον Παγασητικό κόλπο και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες, ενώ οι μικρότερες τιμές των συγκεντρώσεων βρίσκονται στον Βιστωνικό κόλπο, και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες.

Holothuria tubulosa



Σχήμα 15. Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της μεθόδου TBARS που εφαρμόστηκε σε δείγμα ιστού μύος σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες του είδους *Holothuria tubulosa*. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός)

Τέλος, στο σχήμα 15 που απεικονίζει το σύνολο των αποτελεσμάτων της μεθόδου TBARS που εφαρμόστηκε σε δείγματα ιστού μύος του είδους *H.tubulosa* σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, παρατηρούμε ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκονται στον Παγασητικό κόλπο και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες με μεγάλη διαφορά από τους υπόλοιπους κόλπους, ενώ οι μικρότερες τιμές των συγκεντρώσεων βρίσκονται στον Βιστωνικό κόλπο, και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες.

4) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το είδος *Holothuria tubulosa* αποτελεί ένα βασικό κομμάτι των οικοτόπων της Ελλάδας ,καθώς αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι της βιοποικιλότητας του Ελλαδικού χώρου. Επίσης, είναι βασικό κομμάτι και της αλιευτικής δραστηριότητας λόγω της χρηστικότητας του είδους αυτού που αποδίδεται σε μια ποικιλία τομέων, όπως η χρήση του ως δόλωμα, και η εξαγωγή του μέσω του εμπορίου εκτός Ελλάδος καθώς είναι εδώδιμο είδος σε ορισμένες χώρες της Ασίας και στην Κίνα και σε χώρες, όπως η Μαλαισία και η Ινδονησία χρησιμοποιείται για τις θεραπευτικές του ιδιότητες και για την παραγωγή λαδιών, κρεμών και λοιπόν καλλυντικών. Πιστεύεται μάλιστα ότι το είδος αυτό περιέχει όλα τα λιπαρά οξέα που είναι απαραίτητα για την επανόρθωση των ιστών. Επίσης, η οικολογική συμμετοχή του στα οικοσύστημα που απαντάται, χρήζει την ανάγκη διατήρησης του. Η κλιματική αλλαγή έχει άμεσες επιπτώσεις στις κυτταρικές λειτουργίες και τη φυσιολογία των οργανισμών , και μπορεί να μεταβάλουν την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και τη θνησιμότητα τους. Αυτό συνεπώς, επηρεάζει άμεσα την ανάγκη που υπάρχει για διατήρηση των ειδών. Οι αλλαγές του κλίματος μπορεί να έχουν διαφορετική επίπτωση χωρικά με αποτέλεσμα να εντοπίζονται περιοχές με ευνοϊκότερες κλιματικές συνθήκες (refugia). Σκοπός της παρούσας εργασίας, βάσει βιοχημικών και φυσιολογικών αποκρίσεων, είναι ο εντοπισμός και η οριοθέτηση τέτοιων περιοχών με στόχο τη διατήρηση. Το σύνολο των αποτελεσμάτων σε δείγματα ιστού βραγχιών του είδους *H.tubulosa* σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, μας υπέδειξε ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των μεταβολικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων, αλλά και τα επίπεδα των TBARS βρίσκονται στον Παγασητικό κόλπο και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες, ενώ οι μικρότερες τιμές των συγκεντρώσεων των ενζύμων βρίσκονται στον Βιστωνικό κόλπο, και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες. Επίσης, το σύνολο των αποτελεσμάτων σε δείγματα ιστού μύος του είδους *H.tubulosa* σε διαφορετικές εποχικότητες και τοποθεσίες, μας υπέδειξε ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των μεταβολικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων, αλλά και τα επίπεδα των TBARS βρίσκονται στον Παγασητικό κόλπο και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες με μεγάλη διαφορά από τους υπόλοιπους κόλπους, ενώ οι μικρότερες τιμές των συγκεντρώσεων των ενζύμων βρίσκονται στον Βιστωνικό κόλπο, και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες. Το γεγονός ότι οι υψηλότερες τιμές των συγκεκριμένων ενζύμων, σε δείγματα ιστού βραγχιών καθώς και μύος του είδους *H.tubulosa*, βρίσκονται στον Παγασητικό κόλπο και στις τέσσερις διαφορετικές εποχικότητες, μας δείχνει ότι ο Παγασητικός κόλπος είναι πιο ακατάλληλος σε σύγκριση με τον Θερμαϊκό και τον Βιστωνικό κόλπο. Στον αντίποδα, το γεγονός ότι οι χαμηλότερες τιμές των συγκεκριμένων ενζύμων, σε δείγματα ιστού βραγχιών καθώς και μύος του είδους *H.tubulosa*, βρίσκονται στον Βιστωνικό κόλπο, μας υποδεικνύει ότι ο Βιστωνικός κόλπος είναι ένα καλύτερο ενδιαίτημα για το συγκεκριμένο είδος, σύμφωνα πάντα με τα τωρινά δεδομένα. Η εποχικότητα δεν φαίνεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων των συγκεκριμένων μεταβολικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ιστό βραγχιών και μύος, στο είδος *H.tubulosa*. Κάτι τέτοιο μας υποδεικνύει την μη επιρροή που έχει το θερμοκρασιακό εύρος, (και όλες τις φυσιολογικού περιεχομένου διαδικασίες που επηρεάζει αυτό), που κυμαίνεται κατά την αλλαγή της εποχικότητας. Η ανάλυση επιπλέον βιοχημικών και μοριακών δεικτών θα δώσει μια σαφέστερη εικόνα για τον προσδιορισμό των “refugia” για το παραπάνω είδος.

5) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Thomas Lin, Andrew C. Revkin, Jeff Roth, Lisa Tarchak, Spencer Weart, «Science and politics of climate change», New York Times, December 2009
- WGII, I. (2007). Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability. Working Group II, IPCC 4th Assessment Report, <http://www.ipcc.ch>.
- Hazel J. R., 1997. Thermal Biology. In: The Physiology of Fishes, Second Edition. Evans H. D. Chapter 14: 427-467.
- Ashcroft, M. B. (2010). Identifying refugia from climate change. *Journal of biogeography*, 37(8), 1407-1413.
- Somero G. N., 1997. Temperature relationships from molecules to biogeography. Hopkins Marine Station, Stanford University, Pacific Grove, California. In: *Handbook of Physiology*, Vol. II, Section 13: Comparative Physiology. Oxford University Press. Chapter 19: 1392-1444
- Wikelski M. & Cooke, S.J. 2006. Conservation physiology. *Trends Ecol Evol*. 21: 38-46.
- Hochachka P.W. & Somero G.N. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Pages: i-xi, 1-466.
- Pörtner H.O. 2001. Climate change and temperature dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals, *Naturwissenschaften*. 88: 137-146.
- Pörtner H.O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 132: 739-761.

- Pörtner H.O. & Knust R. 2007. Climate change affects marine fishes through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. *Science* 315:95 – 97
- Brava, C. (2005). Spawning of *Holothuria tubulosa* (Holothurioidea, Echinodermata) in the Alboran Sea (Mediterranean Sea). *Zool. baetica*, 16, 147-150.
- Johnston I. A. & Temple G. K., 2002. Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. *J. Exp. Biol.* 205: 2305-2322.
- Γιαννακοπούλου, Ε. (2009). Οξειδωτικό stress–αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 26(1), 23-35.
- Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2001, 18(5):451-456 - Γ. Τσουφάκης - Γαλακτική οξέωση.
- Van der Heiden C, Bais R, Gerhardt W, Lorentz K, Rosalki S. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32:639-655.
- Schumann G et al. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37°C – Part 3. Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Concentrations of Lactate Dehydrogenase. *Clin Chem Lab Med* 2002, 40 (6):643-648.
- Adams S.M. 1990. Status and use of bioindicators for evaluating effects of chronic stress on fish. *Amer. Fish. Soc. Sym.* 8: 1-8.
- Keppel, G., Van Niel, K. P., Wardell-Johnson, G. W., Yates, C. J., Byrne, M., Mucina, L., ... & Franklin, S. E. (2012). Refugia: identifying and understanding safe havens for biodiversity under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, 21(4), 393-404.
- Médail, F., & Diadema, K. (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of biogeography*, 36(7), 1333-1345.

- Kanatous S.B., Davis R.W., Watson R., Polasek L., Williams T.M. & MathieuCostello O. 2002. Aerobic capacities in the skeletal muscles of Weddell seals: key to longer dive durations? *J. Exp. Biol.* 205 (23): 3601-3608
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in biochemical sciences*, 15(4), 129-135.
- Battin, T. J., S. Luysaert, L. A. Kaplan, A. K. Aufdenkampe, A. Richter, and L. J. Tranvik (2009): The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience* 2:598-600.
- Rinnenthaler, W., & Benesovsky, F. (1973). Microdeformation of Mo. *Planseeber. Pulvermet.*, 21(4), 253-270.
- Paglia D.E. & Valentin W.N. 1967. Studies on quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70 (1): 158
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Despalatovic, M., Grubelic, I., Simunovic, A., Antolic, B., & Zuljevic, A. (2004). Reproductive biology of the holothurian *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in the Adriatic Sea. *Marine Biological Association of the United Kingdom. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 84(2), 409.
- Paoletti F. & Mocali A. 1990. Determination of Superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods in enzymology*. 186: 209-220
- Boron, W., & Boulpaep, E. (2006). *Ιατρική Φυσιολογία. εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης.*
- Wiegand, G., & Remington, S. J. (1986). Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 15(1), 97-117.
- Lehninger, A. L., & Greville, G. D. (1953). The enzymic oxidation of d-and l-β-hydroxybutyrate. *Biochimica et biophysica acta*, 12(1-2), 188-202.

6) ABSTRACT

Changes in environmental variables have a direct impact on marine organisms that primarily affect the cellular functions and physiology of individuals, and thus resulting to changes in their growth, reproduction and mortality. Climate changes may have different spatial impact, and as a result, areas with more favorable climatic conditions (refugia) can be identified. The aim of the present study, based on biochemical and physiological responses, is the demarcation of these areas and the preservation of commercially important marine species. Under this prism, individuals of the species *Holothuria tubulosa* (sea cucumber) from Thermaikos, Pagasitikos and Vistonikos gulf were collected seasonally (winter, spring, summer, autumn). The phasmatophotometric analysis of the activity of enzymes of the antioxidant defense such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR), and also indicators of oxidative stress (TBARS) was performed in the gills and muscle tissue. Also, phasmatophotometric analysis of the activity of metabolic enzymes such as lactate dehydrogenase (L-LDH), Citrate synthase (CS) and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HOAD) was performed in the gills and muscle tissue. The highest values of these enzymes, in samples of gill tissue as well as muscle of the species *H. tubulosa*, are found in the Pagasitikos gulf and in the four different seasons. This suggests that Pagasitikos gulf is more unsuitable than Thermaikos and Vistonikos gulfs. On the contrary, the fact that the lowest values of these enzymes, in specimens of gill tissue as well as *H. tubulosa* muscle, are found in Vistonikos gulf, suggests that Vistonikos gulf is a better habitat for this species, always according to current data. Seasonality does not appear to affect the results of measurements of specific metabolic and antioxidant enzymes in gill tissue and muscle, in the *H. tubulosa* species. The analysis of additional biochemical and molecular markers is expected to provide a clearer picture for the definition of "refugia" for the above species.

Keywords: Climate change, *Holothuria tubulosa*, Oxidative stress, Antioxidant enzymes, Metabolic enzymes, TBARS, Refugia.