

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος

Μάριος Α. Κλάμπερ

Αξιολόγηση βιοχημικών δεικτών στην εκτίμηση της
βιοσυσσώρευσης κυανοβακτηριακών τοξινών στο είδος
Cyprinus carpio Linnaeus 1758, στη λίμνη Κάρλα



2012

Αξιολόγηση βιοχημικών δεικτών στην εκτίμηση της βιοσυσσώρευσης μικροκυστινών
στο είδος *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758, στη λίμνη Κάρλα

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αικατερίνη Μούτου^{1,2}, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζήσης Μαμούρης², Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ιφιγένεια Κάγκαλου², Επίκουρη Καθηγήτρια Υδρολογίας, Λιμνολογίας και Ποταμολογίας, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

¹: Επιβλέπουσα

²: Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Ευχαριστίες

Το θέμα της μεταπτυχιακής εργασίας μου ανατέθηκε από την Αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Αικατερίνη Μούτου την οποία ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την επιστημονική καθοδήγηση και την υπομονή της.

Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την ευμενή τους κρίση.

Ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα και μέλος του τεχνικού προσωπικού Κώστα Σταμάτη για την άριστη συνεργασία μας.

Ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα Στέλλα Γεωργίου για τις συμβουλές, την συντροφιά και τη βοήθεια κατά την πειραματική διαδικασία,.

Ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Θέμη Γιαννούλη για την υποστήριξη και τη παρέα του.

Τέλος, ευχαριστώ με όλη μου την καρδιά την οικογένειά και τους όλους τους φίλους μου, ιδιαίτερα τον Γιάννη Σωφρονά, τον Δημήτρη Τσακνάκη και τον Δημήτρη Γκριτζαλιώτη, την συγκάτοικο μου Ελένη και την κοπέλα μου, Βάσω.

*“Όπου φυσάει πάω και τρέχει ο άνεμος μπροστά
Τον ήλιο ακολουθάω και ο μήνας έχει εννιά”*

Παύλος Σιδηρόπουλος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Τίτλος μεταπτυχιακής διατριβής.....	1
Τριμελής εξεταστική επιτροπή	2
Ευχαριστίες	3
Περιεχόμενα.....	4
Περίληψη	5
Summary	6
Εισαγωγή.....	7
ευτροφισμός.....	7
Αιτίες δημιουργίας και ανάπτυξης ευτροφισμού.....	7
Παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη ευτροφισμού στις λίμνες.....	7
Επιπτώσεις του ευτροφισμού στα υδάτινα οικοσυστήματα	8
Ευτροφισμός στις μεσογειακές λίμνες.....	9
Μικροκυστίνες.....	10
Κυανοβακτήρια.....	10
Ιδιότητες κυανοβακτηριακών τοξινών.....	10
Δομή – ιδιότητες μικροκυστινών	11
Τρόποι έκθεσης σε μικροκυστίνες.....	12
Βιοδείκτες που τεκμηριώνουν τη δράση μικροκυστινών.....	13
Καταλάση	13
Ανηγμένη και οξειδωμένη γλουταθειόνη.....	14
Οξειδωμένα λιπίδια	15
Στοιχεία βιολογίας <i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus 1758.....	16
Σκοπός της μελέτης.....	17
Υλικά και μέθοδοι	18
Συλλογή δειγμάτων	18
Προετοιμασία δειγμάτων.....	18
Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης.....	19
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ανηγμένης γλουταθειόνης	19
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης οξειδωμένης γλουταθειόνης	20
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης TBARS	20
Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου	21
Στατιστική ανάλυση	21
Αποτελέσματα	22
Λιμνολογικά χαρακτηριστικά	22
Δραστηριότητα καταλάσης.....	22
Συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης.....	23
Συγκέντρωση οξειδωμένης γλουταθειόνης.....	24
Συγκέντρωση TBARS (οξειδωμένα λιπίδια)	25
Συζήτηση.....	27
Βιβλιογραφία.....	30

Περίληψη

Η απόκριση κάποιων ενζύμων και μορίων που ενέχονται στο οξειδωτικό στρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την εκτίμηση της έκθεσης σε τοξίνες των κυανοβακτηρίων. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν η δραστηριότητα της καταλάσης, η οξείδωση των λιπαρών οξέων ως συγκέντρωση δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέως (TBARS), η συγκέντρωση ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης (GSSG) γλουταθειόνης στο ήπαρ, τον εγκέφαλο και το νεφρό ατόμων κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) στη λίμνη Κάρλα. Η απόκριση αντιοξειδωτικών συστημάτων του κυπρίνου προσδιορίστηκε σε έξι διαφορετικές περιόδους στη διάρκεια ενός έτους φυσικής έκθεσης σε κυανοβακτηριακές τοξίνες και συσχετίστηκε με τα λιμνολογικά χαρακτηριστικά που καταγράφηκαν στη διάρκεια του έτους.

Παρατηρήθηκε σημαντική εποχιακή μεταβολή σε όλους τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Ωστόσο, κάθε ιστός παρουσίασε το δικό του πρότυπο εποχιακής διακύμανσης. Σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες, η συγκέντρωση TBARS σε όλους τους ιστούς έφτασε στο μέγιστο κατά το μήνα με την υψηλότερη θερμοκρασία. Για τις υπόλοιπες παραμέτρους, το πρότυπο μεταβολών τους στο νεφρό δεν ακολούθησε καμία από τις λιμνολογικές παραμέτρους.

Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως η διακύμανση των λιμνολογικών χαρακτηριστικών (εποχιακή διακύμανση της θερμοκρασίας, συγκέντρωση οξυγόνου, pH, χλωροφύλλη-α) καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη διακύμανση των αντιοξειδωτικών δεικτών αποδυναμώνοντας την αξιοπιστία τους ως ειδικούς δείκτες για την έκθεση σε κυανοβακτηριακές τοξίνες.

Summary

Cyanobacteria in aquatic environment produce toxins of high potential risk to aquatic organisms. The physiological responses and pathobiological developments they elicit in fish have been extensively studied, mainly through acute toxicity experiments. This study was designed to examine the seasonal fluctuation of biochemical markers of oxidative stress in different tissues of a natural population of *Cyprinus carpio* inhabiting a shallow Mediterranean lake, namely lake Karla, and being exposed to natural fluctuations of cyanobacterial toxins.

Catalase activity, GSH/GSSH relative concentrations and lipid peroxidation were used as biochemical markers. All the antioxidant parameters varied significantly throughout the year. Fluctuations happened at a tissue-specific manner. Hepatic TBARS and GSH/GSSG contents followed the fluctuations of major limnological parameters, i.e. water temperature, oxygen concentration and chlorophyll-a. In all tissues tested, TBARS peaked in July, when the temperature was the highest. Overall, the present results suggest that there is a significant effect of limnological parameters on the biochemical markers studies that render them unreliable candidates for monitoring exposure to cyanobacterial toxins in natural freshwater ecosystems.

1. Εισαγωγή

1.1. Ευτροφισμός

Ο ευτροφισμός είναι η περίπλοκη διαδικασία κατά την οποία η υπέρμετρη αύξηση της πρωτογενούς φυτικής βιομάζας διαταράσσει τα υδάτινα οικοσυστήματα (Bonnefoy, 2002).

- *Αιτίες δημιουργίας και ανάπτυξης ευτροφισμού*

Πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, αντιμετωπίζουν το πρόβλημα του ευτροφισμού εξαιτίας της εφαρμογής λανθασμένων στρατηγικών προστασίας του περιβάλλοντος (Jeppesen & Sammalkorpi, 2002). Κύριες αιτίες δημιουργίας και ανάπτυξης του ευτροφισμού είναι η υψηλή συγκέντρωση θρεπτικών προερχόμενων από την απορροή, τη διάβρωση και την απόπλυση υδάτων, εντατικά καλλιεργούμενων περιοχών, αστικών και βιομηχανικών λυμάτων (Bonnefoy, 2002). Δευτερεύουσες αιτίες δημιουργίας και ανάπτυξης ευτροφισμού είναι ο εμπλουτισμός φυσικής προέλευσης, η ατμοσφαιρική εναπόθεση αζώτου προερχόμενου από τη βιομηχανική εκτροφή ζώων και τα καυσαέρια. Επίσης, οι ιχθυοκαλλιέργειες εμπλουτίζουν τα ύδατα με την απόρριψη περιττωμάτων και ζωοτροφών (Jonge, 2002).

Ενδημικά είδη τοξικών φυκιών και κυανοβακτηρίων μεταφέρονται, κυρίως μέσω των έρμων των μεγάλων πλοίων, σε περιοχές εκτός εξάπλωσης τους. Το περιβάλλον εισαγωγής μπορεί να είναι ευνοϊκό για την υπέρμετρη αύξηση των πληθυσμών τους, η οποία δύναται να προκαλέσει ευτροφισμό. Τέλος, η κατασκευή ταμιευτήρων με σκοπό την αποθήκευση υδάτων που προέρχονται από την αποστράγγιση των λεκανών απορροής τους, οδηγεί σε εμπλουτισμό των υδάτων και ευνοεί την δημιουργία ευτροφισμού (Bonnefoy, 2002).

- *Παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη ευτροφισμού στις λίμνες*

Χημικά και βιολογικά δεδομένα που έχουν συλλεχθεί από όλο τον κόσμο τους τελευταίους δύο αιώνες, δείχνουν θετική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης θρεπτικών σε υδάτινα οικοσυστήματα και της παραγωγής των καλλιεργειών στη λεκάνη απορροής τους. Μελέτες οικοσυστημάτων σε όλο τον κόσμο δείχνουν πως κάθε οικοσύστημα αποκρίνεται με διαφορετικό τρόπο στον ευτροφισμό (Jonge et al, 2002).

Σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη ευτροφισμού είναι η συγκράτηση των υδάτων, η οποία ορίζεται ως χρόνος ανανέωσης των υδάτων. Υψηλή συγκράτηση συνεπάγεται μεγαλύτερο χρόνο παραμονής των θρεπτικών στη λίμνη και επομένως μεγαλύτερη πιθανότητα ευτροφισμού. Επίσης, η θερμική στρωμάτωση των λιμναζόντων υδάτων (διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των οριζοντίων ζωνών της λίμνης) ευνοεί τη δημιουργία ευτροφισμού. Γι' αυτό το λόγο ο ευτροφισμός παρατηρείται συχνότερα τους θερινούς και εαρινούς μήνες, κατά τους οποίους ευνοείται η δημιουργία θερμικής στρωμάτωσης (Bonnefoy, 2002).

- *Επιπτώσεις του ευτροφισμού στα υδάτινα οικοσυστήματα*

Η σημαντικότερη επίπτωση του ευτροφισμού είναι η μείωση της διαθεσιμότητας οξυγόνου. Η συσσώρευση μεγάλης ποσότητας βιομάζας, προκαλεί τον σχηματισμό ιζήματος στον πυθμένα. Η οξείδωση της οργανικής ουσίας του ιζήματος, καταναλώνει το σύνολο του διαθέσιμου οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένου αυτού που περιέχεται σε θειικά άλατα (SO_4^{2-}), το οποίο καταναλώνεται από ορισμένα βακτήρια. Η διαδικασία οξείδωσης των θειικών αλάτων προκαλεί απελευθέρωση θειούχων ιόντων (S^{2-}), τα οποία δεσμεύουν οξυγόνο από τα ανώτερα στρώματα και καθιστούν το σύνολο του ύδατος ανοξικό, εξαφανίζοντας τη ζωή. (Bonnefoy, 2002; Jonge et al., 2002).

Η ανάπτυξη υδροχαρούς βλάστησης στην επιφάνεια μειώνει τη διείσδυση του φωτός στο εσωτερικό, μειώνοντας τους πληθυσμούς υδρόβιων φυτών και επομένως τη φωτοσύνθεση στα βαθύτερα στρώματα του νερού, ευνοώντας την ανάπτυξη φυκιαδων (Bonnefoy, 2002). Η αύξηση του εμπλουτισμού και της βιομάζας του φυτοπλαγκτού συνεπάγεται αύξηση του λόγου αυτότροφης προς ετερότροφης βιομάζας (Gasol & Del Giorgio, 1995). Οι πληθυσμοί μακροφύκων, φυτοπλαγκτού (διάτομα, δινωμαστιγωτά, χλωρόφυτα) και κυανοβακτηρίων, η ανάπτυξη των οποίων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών, το φως, τη θερμοκρασία και τη ροή του νερού, παρουσιάζουν υπερβολική ανάπτυξη. (Ærtebjerg et al., 2003; Sand-Jensen & Borum, 1991).

Οι πληθυσμοί ζωοπλαγκτού, ψαριών και οστρακοειδών είναι οι πρώτοι στους οποίους παρατηρείται μείωση, η οποία οφείλεται στην αδυναμία προσαρμογής σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και σε περιβάλλον υψηλής αλκαλικότητας, το οποίο δημιουργείται κατά τη διάρκεια έντονης φωτοσύνθεσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα

αποτελεί η δηλητηρίαση των ψαριών από αμμωνία, η οποία είναι συχνότερη σε αλκαλικά νερά (Bonnefoy, 2002). Επιπλέον, ο ευτροφισμός επιφέρει πρακτικές επιπλοκές στη χρήση του νερού των λιμνών από ιχθυοκαλλιεργητικές μονάδες λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης τοξικών αλγών (Jeppesen & Sammalkorpi, 2002).

- *Ευτροφισμός στις Μεσογειακές λίμνες*

Οι αβαθείς λίμνες, οι οποίες απαντώνται κυρίως σε περιοχές με χαμηλό υψόμετρο όπως οι Μεσογειακές, είναι ευαίσθητες στον εμπλουτισμό λόγω της συνεχώς αυξανόμενης χρήσης των εδαφών (Jeppesen et al., 2003). Οι Μεσογειακές λίμνες εμφανίζουν υψηλή διακύμανση της στάθμης τους, η οποία σύμφωνα με έρευνες που περιελάμβαναν λίμνες από τις βορειότερες περιοχές της Ευρώπης έως την Μεσόγειο, αποτελεί σημαντικό παράγοντα σταθερότητας του οικοσυστήματος (Coops et al., 2003). Υψηλή στάθμη κατά την αυξητική περίοδο μειώνει τη διαθεσιμότητα σε φως στα υδρόβια φυτά, ενώ χαμηλή στάθμη εκθέτει τους φυτικούς οργανισμούς στους παγετούς και τα κύματα που δημιουργούνται στη λίμνη (Fernandez-Alaez et al., 2004).

Οι υδρολογικές παράμετροι αποτελούν σημαντικό παράγοντα ισορροπίας των θρεπτικών στοιχείων. Αλλαγές των υδρολογικών παραμέτρων μπορεί να διαταράξουν την ισορροπία των ιόντων και τη δυναμική των θρεπτικών άμεσα ή έμμεσα (Downing & Mc Cauley, 1992; Downing et al., 1999). Άμεση διαταραχή της ιοντικής ισορροπίας αποτελεί η αύξηση της συγκέντρωσης θρεπτικών που προκαλείται από τη μείωση της στάθμης κατά τη διάρκεια της ξηρής περιόδου (Beklioglu & Tan, 2008). Κατά τη διάρκεια βροχερών ετών, η αλατότητα και η συγκέντρωση θρεπτικών παρουσιάζει ισχυρή εποχικότητα, ενώ σε ξηρές περιόδους η αλατότητα και το ανόργανο άζωτο δύναται να αυξηθούν (Jeppesen et al., 1994). Οι αλλαγές των υδρολογικών παραμέτρων προκαλούν και έμμεση διαταραχή της ιοντικής ισορροπίας, μέσω της διαφοροποίησης του τροφικού πλέγματος, συμπεριλαμβανομένων αλλαγών στην κοινωνία των μακροφύτων (Liboriussen & Jeppesen, 2009). Τέλος, η υψηλή αλατότητα και η θολερότητα αυξάνουν την πιθανότητα δημιουργίας και ανάπτυξης ευτροφισμού (Jeppesen et al., 1994). Επομένως, η μείωση της στάθμης των λιμνών λόγω ξηρασίας δύναται να προκαλέσει ευτροφισμό (Romo et al. 2004), επειδή προκαλεί αύξηση της αλατότητας και της περιεκτικότητας σε θρεπτικά.

1.2. Μικροκυστίνες

▪ *Κυανοβακτηρια*

Τα κυανοβακτήρια είναι τα πιο συχνά παρατηρούμενα είδη βακτηρίων σε λιμναία οικοσυστήματα. Παράγουν τριών ειδών τοξίνες, λιποπολυσακχαρίτες, αλκαλοειδή και κυκλικά πεπτίδια. Οι τοξίνες δρουν σε μοριακό επίπεδο επιφέροντας βλάβες στα κύτταρα, τους ιστούς και τα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, των νευρικών συνάψεων και αξόνων, το δέρμα και το γαστρεντερικό σύστημα. (Stillman, 2010).

Ο συνδυασμός του ευτροφισμού των λιμνών με περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υψηλή θερμοκρασία και το αλκαλικό pH, δύναται να προκαλέσει άνθηση των κυανοβακτηρίων και έντονο πολλαπλασιασμό των κυανοβακτηριακών κυττάρων. Οι τοξίνες που απελευθερώνονται μετά τη λύση ενός κυανοβακτηριακού κυττάρου μπορούν να επιδράσουν σε πολλούς οργανισμούς από μικροάλγη έως και θηλαστικά (De Figueiredo et al., 2004)

Τα κυανοβακτήρια έχουν μελετηθεί ενδελεχώς σε λιμναία οικοσυστήματα, λόγω της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας μεγάλα αφρώδη συσσωματώματα στην επιφάνεια και να παράγουν τοξίνες επικίνδυνες για την υγεία (Bonnefoy, 2002). Οι τοξίνες που παράγονται από κυανοβακτήρια ονομάζονται κυανοβακτηριακές τοξίνες, εκ των οποίων οι πιο γνωστές είναι οι μικροκυστίνες (De Figueiredo et al., 2004).

▪ *Ιδιότητες κυανοβακτηριακών τοξινών*

Ορισμένα είδη κυανοβακτηρίων έχουν την ικανότητα να παράγουν τοξίνες, οι οποίες υπάρχουν είτε απελευθερωμένες μέσα στο νερό είτε εντός των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης, το 70-90% των τοξινών βρίσκονται εντός των κυττάρων. Με το πέρας της φάσης ανάπτυξης, το 70% των τοξινών απελευθερώνεται στο νερό, όπου είναι δύσκολο να αφαιρεθεί με τις συνήθεις διαδικασίες επεξεργασίας για σκοπούς κατανάλωσης, καθιστώντας το μη πόσιμο (Bonnefoy, 2002).

Η αντοχή και η ανθεκτικότητα των τοξινών εξαρτάται από τη δομή τους. Γενικά, με την έκθεση των τοξινών στο φυσικό περιβάλλον υποβαθμίζεται η τοξικότητά τους μετά από μια έως τρεις εβδομάδες. Σε φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα, υπό συνθήκες έλλειψης φωτός η τοξικότητα μπορεί να επιμείνει για αρκετούς μήνες ή και χρόνια.

Ορισμένες μάλιστα κυανοβακτηριακές τοξίνες ανταπεξέρχονται φυσικοχημικά και βιολογικά σε ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες (έως 300 ° C) (Bonnefoy, 2002).

- *Δομή – Ιδιότητες Μικροκυστινών*

Οι μικροκυστίνες (MCs) είναι μία οικογένεια ηπατοτοξικών επταπεπτιδίων, τα οποία παράγονται από τα περισσότερα είδη των γενών κυανοβακτηρίων *Microcystis* και *Planktonthrix*. Παραγωγή μικροκυστινών παρατηρείται επίσης στα γένη *Nostoc*, *Anabaena*, *Synechocystis* και τα είδη *Cyanobium bacillare*, *Arthrospira fusiformis*, *Limnothrix redekei*, *Phormidium formosum* και *Hapalosiphon hibernicus* (Sivonen & Jones, 1999; Cronberg et al., 2003; Odebrecht et al., 2002; Ballot et al., 2004; Gkelis et al., 2001; Steffensen et al., 2001)

Οι μικροκυστίνες είναι καρκινογόνες (Chorus & Bartram, 1999). Υπάρχουν περισσότερες από 75 μορφές μικροκυστινών οι οποίες διαφοροποιούνται βάσει της τοξικότητας τους και των βαθμών μεθυλίωσης, υδροξυλίωσης και επιμερισμού της ακολουθίας των πεπτιδίων τους. Η γενική τους δομή είναι κυκλική (-D-Ala-L-X-erythro-b-methy l-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).

Τα συμπτώματα που βιώνουν άνθρωποι οι οποίοι προσβλήθηκαν από μικροκυστίνες, περιλαμβάνουν κόπωση, κεφαλαλγία, διάρροια, έμετο, πόνο στο λαιμό, πυρετό, και δερματικούς ερεθισμούς (Bonnefoy, 2002).

δραστηριότητάς τους, η οποία προκαλεί υπερφωσφορλίωση μίας μεγάλης ομάδας δομικών πρωτεϊνών και εν τέλει κυτταρική απόπτωση ή νέκρωση (Amado & Moserrat, 2010).

Πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν πως οι μικροκυστίνες μπορούν να μεταβάλλουν στοιχεία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του κυττάρου και να επάγουν το οξειδωτικό στρες σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς (Amado & Monserrat, 2010). Η απορρόφηση των μικροκυστινών έχει συσχετιστεί με την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) (Ding et al., 2000), η οποία δύναται να προκαλέσει οξείδωση των λιπαρών οξέων (Pinho et al., 2005), βλάβες στο DNA (Žegura et al. 2003), μιτοχονδριακές βλάβες (Ding & Ong, 2003) και διαφοροποιήσεις στο αντιοξειδωτικό σύστημα (Vinagre et al. 2003).

1.3. Βιοδείκτες που τεκμηριώνουν τη δράση των μικροκυστινών

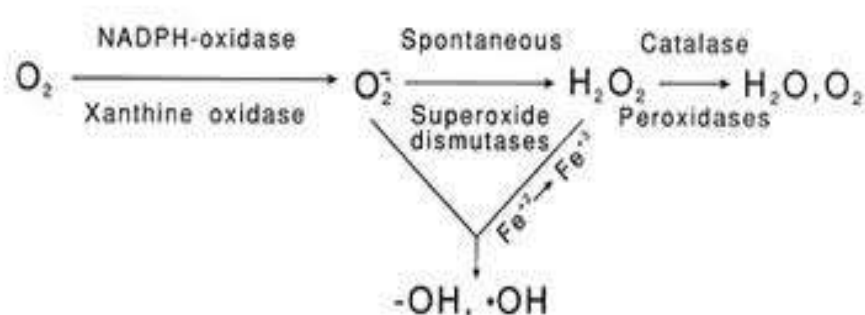
Η χρησιμότητα των βιοδεικτών για την παρακολούθηση της ποιότητας του περιβάλλοντος και της υγείας ορισμένων οργανισμών είναι υπό διερεύνηση (Lopes et al. 2001). Η έκθεση των οργανισμών ενός υδάτινου οικοσυστήματος σε ξενοβιοτικές ουσίες δύναται να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις. Η απόκριση διάφορων οργανισμών (συμπεριλαμβανομένων των ψαριών) στη μόλυνση δύναται να αντικατοπτριστεί σε ορισμένες ενζυμικές δραστηριότητες, κυρίως ενζύμων-κλειδιών, τα οποία αποτελούν βιοδείκτες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα εργαλείο ανίχνευσης κινδύνων μόλυνσης των υδάτινων οικοσυστημάτων (Osmen et al. 2000).

▪ Καταλάση

Ως ROS (reactive oxygen species-δραστικές ρίζες οξυγόνου) αναφέρονται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και οι παράγωγες ελεύθερες ρίζες του, όπως το υδροξύλιο ($-OH$) (Li et al. 2007). Όταν ένας ιστός ή ένα κύτταρο εκτίθεται σε οξειδωτικά, ιδιαίτερα σε ελεύθερες ρίζες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, επέρχεται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες.(Ding & Ong, 2003).

Σημαντική για την άμυνα του κυττάρου ενάντια στο οξειδωτικό στρες είναι η λειτουργία των δισμουτασών του υπεροξειδίου, οι οποίες καταλύουν τη μετατροπή δυο ριζών σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Στη συνέχεια, το υπεροξείδιο του υδρογόνου περισυλλέγεται από την καταλάση, μια αιμοπρωτεΐνη που

βρίσκεται σχεδόν παντού και καταλύει την αυτοοξειδοαναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Εικόνα 1.2). Συνεπώς η καταλάση αποδεικνύεται μεγίστης σημασίας ένζυμο για την υπεράσπιση του κυττάρου από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου.



Εικόνα 1.2 Διάσπαση του H₂O₂ μέσω της καταλάσης.

- *Ανηγγμένη και οξειδωμένη Γλουταθειόνη*

Η γλουταθειόνη συναντάται σε δύο μορφές, την ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG). Η ανηγμένη γλουταθειόνη συμβάλλει στη μείωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου αποτελώντας υπόστρωμα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), καταστέλλει τις ελεύθερες ρίζες και αντιδρά με το υδροξύλιο (OH), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και τα υπεροξείδια (Halliwell & Gutteridge, 1999), γι' αυτό ενδεχόμενη ελάττωση της συνοδεύεται από αύξηση των δραστικών ριζών οξυγόνου..

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μικροκυστίνες διαταράζουν τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, ευνοώντας την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (Ding et al., 2000). 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 ανηγμένη γλουταθειόνη ένα ευρέως διαδεδομένο στα κύτταρα τριπεπτίδιο, με δυο ειδικούς παράγοντες: την παρουσία του γ-γλουταμυλικού δεσμού και μίας ελεύθερης σουλφοδρυλικής ομάδας (-SH). Η ικανότητά της ανηγμένης γλουταθειόνης (οξειδοαναγωγικό δυναμικό E⁰ = -0,24V) να οξειδώνεται σε GSSG, την καθιστά σημαντικό «καθαριστή» ROS για το κύτταρο. Τα μιτοχόνδρια δεν παράγουν γλουταθειόνη. Επομένως, η μιτοχονδριακή γλουταθειόνη είναι

κυτταροπλασματικής προέλευσης (Meister, 1995). Κατά συνέπεια, μείωση της γλουταθειόνης συνεπάγεται αύξηση των δραστικών ριζών οξυγόνου στα μιτοχόνδρια (Aon et al. 2007). Η οξείδωση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης δύναται να προκαλέσει εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και αύξηση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας με αρνητικές συνέπειες για την παραγωγή ATP (Chernyak, 1997).

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

Οι μικροκυστίνες μεταβολίζονται σε μύδια (Karlsson et al., 2005), ψάρια (Wiegand et al., 1999), τρωκτικά (Kondo et al. 1996) και φυτά (Pflugmacher et al., 1999, 2001) από το αποτοξικοποιητικό ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) (Pflugmacher et al., 1998) το οποίο καταλύει την προσθήκη των μικροκυστινών στην ομάδα θιόλης του τριπεπτιδίου γλουταθειόνης (GSH). Αυτό μπορεί να εξουδετερώσει τις ηλεκτρονιόφιλες θέσεις των μικροκυστινών, να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα τους και επομένως, να αυξήσει την απέκκριση των προϊόντων μεταβολισμού τους, όπως το σύμπλοκο GSH – MC-LR (Pflugmacher et al., 1998; Wiegand et al., 1999). Η ανηγμένη γλουταθειόνη είναι σημαντική για τη ρύθμιση της κυτοσκελετικής οργάνωσης (Pflugmacher et al. 1998). Οι μικροκυστίνες μπορούν να συζευχτούν με την ανηγμένη γλουταθειόνη και την κυστεΐνη με τη βοήθεια της GST (glutathione S-transferase) (Kondo et al., 1992, 1996; Wiegand et al., 1999).

Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες η ανηγμένη γλουταθειόνη μπορεί να οξειδωθεί δημιουργώντας οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Η οξείδωση καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPOx) και η αναγωγή της οξειδωμένης σε ανηγμένη γλουταθειόνη καταλύεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η οποία δρα οξειδώνοντας το NADPH σε NADP⁺ (Tramboo et al. 2011). Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι σημαντική για να διατηρηθεί η ισορροπία GSH/GSSG υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Ο λόγος GSH/GSSG χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης οξειδωτικής κατάστασης κατά την παρουσία δραστικών ριζών οξυγόνου στα κύτταρα (Wu et al. 2004).

- *Οξειδωμένα Λιπίδια (TBARS)*

Μία βιοχημική διαταραχή από το οξειδωτικό στρες είναι η υπέρμετρη οξείδωση των λιπαρών οξέων, η οποία υπολογίζεται ως ποσότητα των δραστικών ουσιών του

θειοβαρβιτουρικού οξέως (TBARS) και αποτελεί καθιερωμένο βιοδείκτη σε πολυάριθμες μελέτες (Ando & Yanagida, 1999, Wilhelm Filho et al. 2001). Τα οξειδωμένα λιπίδια είναι το αποτέλεσμα της καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών από το οξειδωτικό στρες. Η διαδικασία οξείδωσης ξεκινά με την απομάκρυνση ενός ατόμου υδρογόνου από μία μεθυλ-ομάδα ενός πολυακόρεστου λιπαρού οξέως μέσω της αντίδρασής του με ένα OH (υδροξύλιο). 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. Η μέθοδος TBARS μετρά τα τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων που μπορεί να δημιουργηθούν από την άμεση επίθεση στα λιπίδια από την ρίζα του υπεροξειδίου και χρησιμοποιούνται από πλήθος μελετών ως έμμεσος αντιοξειδωτικός δείκτης (Halliwell 1995). Τα παράγωγα της οξείδωσης των λιπαρών οξέων σχηματίζονται με την απορρόφηση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ. Το MDA (Malondialdehyde) αποτελεί το κύριο προϊόν της οξείδωσης των PUFAs (πολυακόρεστων λιπαρών οξέων) (Liu et al., 1997). Τα λιπαρά οξέα είναι ιδιαίτερα ευπαθή στις ρίζες υδροξυλίου λόγω της γεινίασης των καρβονυλικών δεσμών, γεγονός που επιτρέπει την εύκολη απορρόφηση ατόμων υδρογόνου από μία μεθυλική ομάδα (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.4. Στοιχεία βιολογίας *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

Ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) ανήκει στην οικογένεια Cyprinidae, η οποία αποτελεί τη μεγαλύτερη οικογένεια ψαριών, με πάνω από 2000 είδη. Η οικογένεια διακρίνεται από τα άλλα μέλη της τάξης των Cypriniformes από τα φαρυγγικά δόντια (μία έως τρεις σειρές, αλλά ποτέ πάνω από οκτώ δόντια ανά σειρά) και τα λεπτά χείλη. Τα περισσότερα είδη έχουν μόνο μαλακές ακτίνες στα πτερύγια, όμως υπάρχουν είδη με αγκαθωτά πτερύγια, όπως ο κυπρίνος.

Εύρος φυσικής εξάπλωσης: Μαύρη, Κασπία και Αράλη θάλασσα. Προτιμά θερμά, βαθιά, ήρεμα νερά με αργή ροή, στα κατάντη ποταμών και μεγάλες, λίμνες με πυκνή βλάστηση. Λόγω της γρήγορης αύξησης σε μεγέθη αλίευσης, με διαίτα αποτελούμενη από φυτά, οργανική λάσπη και μικρά ασπόνδυλα, έχει εισαχθεί σε όλο τον κόσμο και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά είδη για την ιχθυοκαλλιέργεια παγκοσμίως. (Moyle & Cech, 1996). Στην Ευρώπη, οι ιχθυοκαλλιέργειες έχουν

ξεκινήσει το Μεσαίωνα και το είδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η άγρια μορφή του Δούναβη (Freyhof & Kottelat, 2008). Υπάρχουν ενδείξεις πως τα τελευταία 60 με 75 χρόνια οι αυτόχθονες πληθυσμοί έχουν παρουσιάσει μείωση της τάξης του 30%, η οποία οφείλεται αφενός στον υβριδισμό και αφετέρου στη διευθέτηση των ποταμών και την κατασκευή φραγμάτων, τα οποία στερούν από τα είδη πλημμυρισμένες περιοχές αναγκαίες για την επιτυχημένη παραγωγή (Freyhof & Kottelat, 2008).

Λόγω των διατροφικών του προτιμήσεων εκτίθεται σε πολλούς παράγοντες περιβαλλοντικής μόλυνσης συμπεριλαμβανομένων των κυανοβακτηρίων (Falfushynska & Stolyar, 2009). Η ευρεία εξάπλωση, οι θέσεις στο τροφικό πλέγμα των οικοσυστημάτων που απαντάται, η εύκολη εκτροφή και η κατανάλωσή από τον άνθρωπο, καταστούν τον κυπρίνο ένα σημαντικό πειραματικό είδος για την οικοτοξικολογία σε μελέτες πεδίου όσο και εργαστηριακές συνθήκες (Oguc & Üner 2002, Sakamoto et al. 2003).

1.5. Σκοπός της μελέτης

Η αύξηση των τοξικών κυανοβακτηρίων στις ελληνικές λίμνες είναι γνωστό φαινόμενο πλέον (Gkelis et al. 2005). Στο πλαίσιο της προστασίας της δημόσιας υγείας αλλά και της παρακολούθησης της ποιότητας των εσωτερικών νερών βάση της οδηγίας 2000/60/EK είναι η απαραίτητη η αξιολόγηση βιοχημικών δεικτών ως οικοτοξικολογικών εργαλείων για την εκτίμηση των επιπτώσεων των μικροκυστινών στα βιολογικά συστήματα. Προς αυτή την κατεύθυνση απαιτείται η μελέτη της ανταπόκρισης αναγνωρισμένων βιοχημικών δεικτών σε φυσικές συνθήκες και οι τυχόν μεταβολές τους από άλλες παραμέτρους πέραν των μικροκυστινών στους ιστούς. Πρόδρομη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη λίμνη Παμβώτιδα Ιωαννίνων (Moutou et al., submitted) ανέδειξε ότι στο πληθυσμό κυπρίνων της λίμνης, οι μεταβολές των δεικτών του οξειδωτικού στρες σχετίζονταν άμεσα με τα εποχικά λιμνολογικά χαρακτηριστικά και όχι με τη συγκέντρωση μικροκυστινών στους ιστούς.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της εποχικής διακύμανσης των λιμνολογικών χαρακτηριστικών και η συσχέτιση αυτών με τους συνδεόμενους με την απόκριση στο οξειδωτικό στρες παρουσία μικροκυστινών βιοχημικούς δείκτες στους

κυπρίνους της λίμνης Κάρλα σε δίμηνα διαστήματα στη διάρκεια ενός ημερολογιακού έτους .

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Συλλογή δειγμάτων

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν έξι δειγματοληψίες μέσα στο 2011. Σε κάθε δειγματοληψία συλλέγονταν νερό, φυτοπλαγκτόν και δέκα άτομα κυπρίνου. Αμέσως μετά τη δειγματοληψία γινόταν καταγραφή του βάρους, αιμοληψία, συλλογή στομάχου, πρόσθιου και οπίσθιου εντέρου, ήπατος, νεφρού, εγκέφαλου και λευκού μυ. Εν συνεχεία όλοι οι ιστοί εμβαπτιζόνταν άμεσα σε υγρό άζωτο και μεταφέρονταν στο εργαστήριο όπου αποθηκευόταν στους -80°C .

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λίμνης κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών καταγράφονταν από το Φορέα Διαχείρισης Περιοχής Οικοανάπτυξης Κάρλας - Μαυροβουνίου – Κεφαλόβρυσου – Βελεστίνου.

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

2.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε δοχείο με υγρό άζωτο. τοποθετήθηκαν σε σωλήνες erpendorf των 2ml και προστέθηκε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 σε αναλογία ιστού-διαλύματος 1:5. Ακολούθησε ομογενοποίηση των ιστών μηχανικά, σε ομογενοποιητή ULTRA TURRAX, IKA-WERKE (17.000 rpm, 30 sec.). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (10.000 rpm, 30 min, 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 (ως επί το πλείστον) ήταν η $1/2$, $1/4$ και $1/6$.

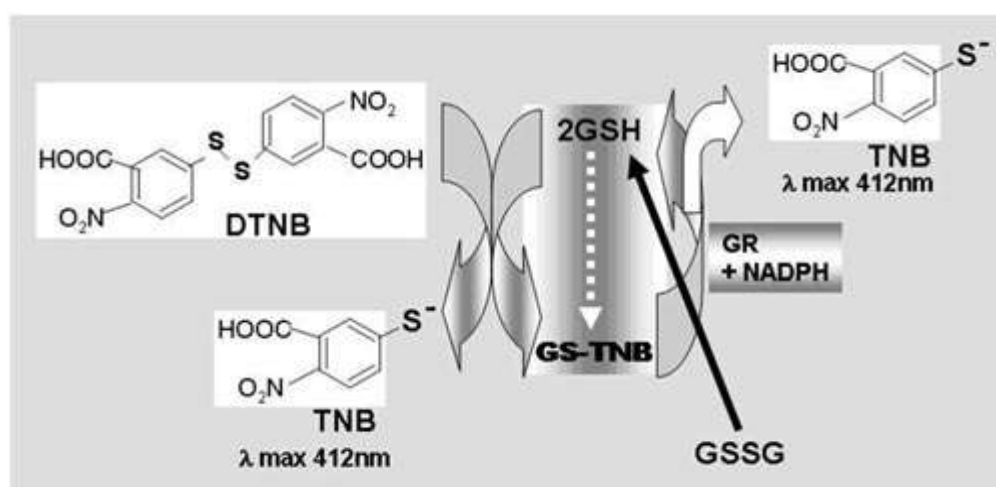
Οι ενζυμικές δραστηριότητες προσδιορίστηκαν φωτομετρικά σε φασματοφωτόμετρο CARY 50Bio.

2.3. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της Καταλάσης

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας βασίστηκε στη μέθοδο των Beers and Sizer (1952). Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67 mM, pH 7.4 (PBS). Σε γυάλινους σωλήνες προστέθηκαν 2955 μ l PBS και 40 μ l ομογενοποιημένου ιστού. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν σε vortex και επώαστηκαν σε υδατόλουτρο (10 min, 37°C). Στη συνέχεια, το περιεχόμενο των σωλήνων μεταφέρθηκε σε κυψελίδα χαλαζία και προστέθηκαν 5 μ l H₂O₂ 30%. Η κυψελίδα καλύφθηκε με parafilm, ανακινήθηκε καλά και τοποθετήθηκε στο φωτόμετρο. Ακολούθησε φωτομέτρηση της κινητικής του ενζύμου (5 min, 240 nm). Η δραστηριότητα της καταλάσης εκφράστηκε σε μ mol/mg πρωτεΐνης.

2.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης ανηγμένης γλουταθειόνης

Η μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης ανηγμένης γλουταθειόνης βασίζεται στην οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης από το 5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), κατά την οποία παράγεται ένα χρωμοφόρο ιόν (Εικόνα 2.1). Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67mM pH 7,95 και διάλυμα DTNB 1mM sodium citrate 1%. Στη συνέχεια, σε σωλήνες erpendorf 1,5 ml τοποθετήθηκαν 660 μ l ρυθμιστικού διαλύματος, 330 μ l DTNB 1mM και 20 μ l δείγματος ιστού. Στο τυφλό ο ιστός αντικαταστάθηκε από δις αποσταγμένο νερό. Οι σωλήνες στη συνέχεια αναδεύτηκαν σε vortex και επώαστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Τέλος, το περιεχόμενο κάθε erpendorf μεταφέρθηκε σε κυψελίδα UV και μετρήθηκε η απορρόφησή στα 412 nm.



Εικόνα 2.1 Ενζυμική ανακύκλωση της GSH - GSSG υπό την παρουσία DTNB (Rahman & Kode, 2007).

2.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης οξειδωμένης γλουταθειόνης έγινε με βάση τη μέθοδο Griffith (1980). Για τον προσδιορισμό της GSSG το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε σε επίπεδα 7,0-7,5 με προσθήκη NaOH 0,25 M. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 μl 2-vinylpyridine σε 50 μl δείγματος και τα δείγματα επώαστηκαν (60 min., 25°C). Στο τριακοστό και στο εξηκοστό λεπτό της επώασης τα δείγματα αναδεύτηκαν. Με το τέλος της επώασης, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (14000 rpm, 10 min, 4°C). Παράλληλα προετοιμάστηκαν τα απαραίτητα για την φωτομέτρηση διαλύματα (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).

Πίνακας 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	-	-	5 μl

Οι σωλήνες αναδεύτηκαν και επώαστηκαν (10 min, 25°C). Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα μεταφέρθηκε σε κυψελίδα και προστέθηκε 1 μl αναγωγή της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR), η κυψελίδα καλύφθηκε με parafilm, ανακινήθηκε καλά και μετρήθηκε η απορρόφηση του περιεχόμενου της (412 nm).

2.6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης TBARS

Παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα: Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 200mM pH 7.4, Na₂SO₄ (2M)-TBA (55mM), τριχλωροοξικό οξύ TCA 70% w/v και τριχλωροοξικό οξύ TCA 35% w/v. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 ml προστέθηκαν με τη σειρά που αναφέρονται α) 50 μl δείγματος, β) 500 μl TCA 35% και γ) 500μl ρυθμιστικού διαλύματος. Στο τυφλό, το δείγμα αντικαταστάθηκε από δις αποσταγμένο νερό. Τα δείγματα αναδεύτηκαν στο VORTEX και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για

10 min. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml Na₂SO₄-TBA και οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 95°C για 45 min. Με το πέρας της επώασης τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για 5 min, προστέθηκε σε αυτά 1 ml TCA 70% και έγινε ανάδευση τους στο VORTEX. Από το νέο μίγμα μεταφέρθηκε 1 ml σε σωλήνες erpendorf 1,5 ml και φυγοκεντρήθηκε (10000 rpm, 3 min., 25°C). 900 μl από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα UV και φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 530 nm. Η συγκέντρωση των TBARs εκφράστηκε σε μmol/L.

2.7. Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου

Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο κάθε δείγματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry (Lowry, 1951) βάση πρότυπης καμπύλης συγκέντρωσης BSA (bovine serum albumin).

2.8. 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).

3. Αποτελέσματα

3.1. Λιμνολογικά χαρακτηριστικά

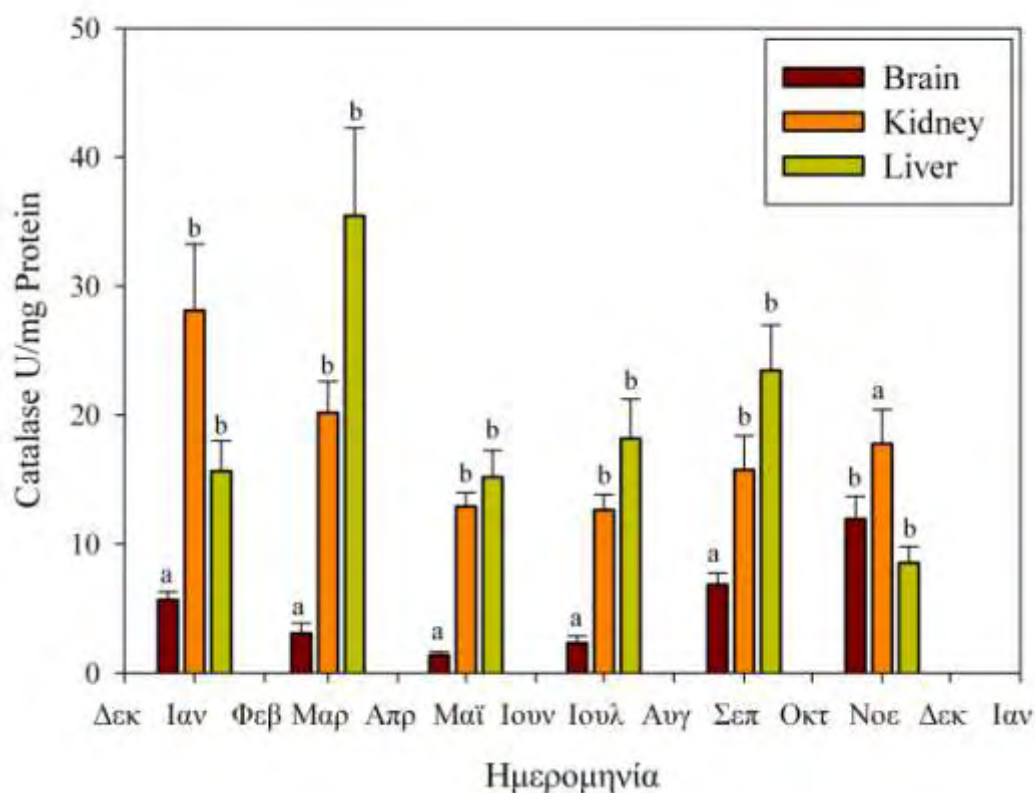
Στη διάρκεια του ημερολογιακού έτους των δειγματοληψιών τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λίμνης Κάρλας παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση (Πίνακας 3.1). Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θρεπτικών (NO_3 , PO_4) καταγράφηκαν τους μήνες Ιούλιο και Σεπτέμβριο και συνοδεύτηκαν από υψηλές συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α, ένδειξη μεγάλης συγκέντρωσης φυτοπλαγκτού. Όπως αναμενόταν, αυτό συνέπεσε με υψηλές θερμοκρασίες νερού και οδήγησε σε μείωση του διαλυμένου οξυγόνου και του pH (Πίνακας 2). Ασυνήθιστα υψηλή ήταν η συγκέντρωση NO_3 του Ιανουαρίου που εικάζεται ότι οφείλεται σε αυξημένη έκπλυση λόγω ισχυρών καιρικών φαινομένων.

Πίνακας 2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λίμνης Κάρλας το έτος 2011

	Θερμοκρασία °C	pH	Διαλυμένο οξυγόνο (mg/l)	Chl-a (mg/m ³)	NO_3 (mg/l)	PO_4 (mg/l)
Ιανουάριος	8,67	8,81	11,53	17,00	0,54	0,06
Μάρτιος	20,83	8,83	7,20	49,33	0,01	0,08
Μάιος	25,83	8,37	7,70	98,05	0,40	0,13
Ιούλιος	31,50	7,92	4,52	268,57	0,72	0,39
Σεπτέμβριος	22,88	8,21	4,27	266,98	0,60	0,20
Νοέμβριος	6,85	9,20	7,24	45,74	0,01	0,07

3.2. Δραστικότητα Καταλάσης

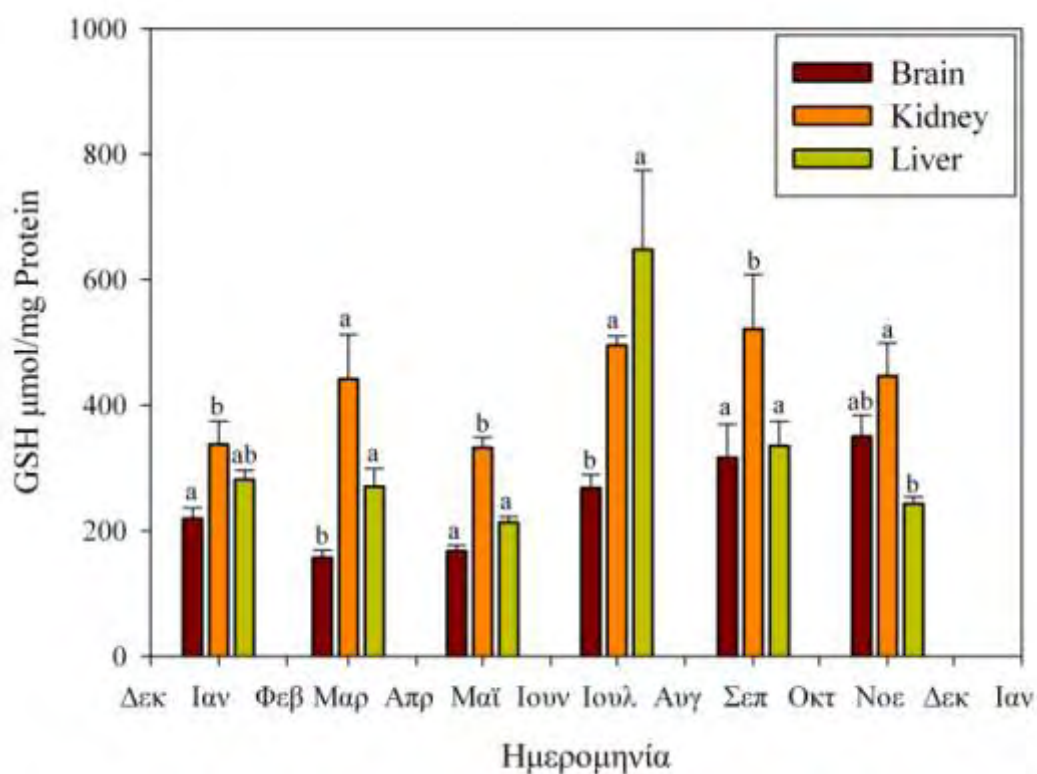
Η δραστικότητα της καταλάσης στον εγκέφαλο ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη συγκρινόμενη με εκείνη του ήπατος ή του νεφρού σε όλες τις περιόδους δειγματοληψίας εκτός από το Νοέμβριο. Η δραστικότητα της καταλάσης στον εγκέφαλο και το νεφρό παρουσίασε σημαντική εποχιακή διακύμανση. Σε όλους τους ιστούς, οι χαμηλότερες δραστικότητες καταλάσης καταγράφηκαν τους μήνες Μάιο και Ιούλιο, τους μήνες των υψηλότερων θερμοκρασιών (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1 Δραστικότητα καταλάσης (U/mg πρωτεΐνης) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό σε έξι διαφορετικές εποχές του χρόνου. Τα a,b συμβολίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ιστών

3.3. Συγκέντρωση Ανηγμένη Γλουταθειόνης

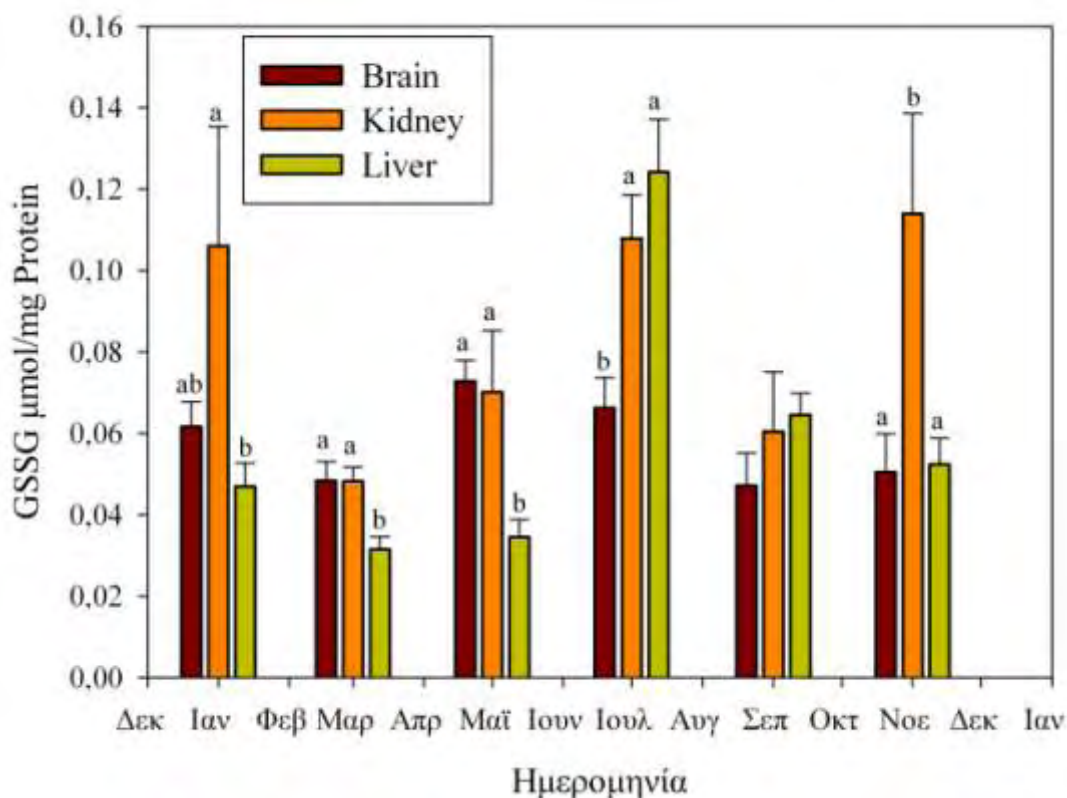
Οι συγκεντρώσεις GSH παρουσίασαν σημαντική εποχιακή μεταβολή στο ήπαρ και στον εγκέφαλο. Ο νεφρός εμφάνισε σταθερά τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις GSH σε σχέση με τους άλλους δύο ιστούς εκτός από το μήνα Ιούλιο, κατά τον οποίο η ανώτατη τιμή καταγράφηκε (>630 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) στο ήπαρ. Στο ήπαρ η GSH εμφάνισε σταθερές τιμές όλο το χρόνο εκτός από τον Ιούλιο, που αυξήθηκε σημαντικά παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων φυτοπλαγκτού. Στον εγκέφαλο παρατηρήθηκε ένας ετήσιος κύκλος με υψηλότερες συγκεντρώσεις το φθινόπωρο και χαμηλότερες την άνοιξη (Εικ. 3.2).



Εικόνα 3.2 Συγκέντρωση GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ πρωτεΐνης) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό σε έξι διαφορετικές εποχές του χρόνου. Τα a,b συμβολίζουν στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ ιστών

3.4. Συγκέντρωση GSSG (Οξειδωμένη γλουταθειόνη)

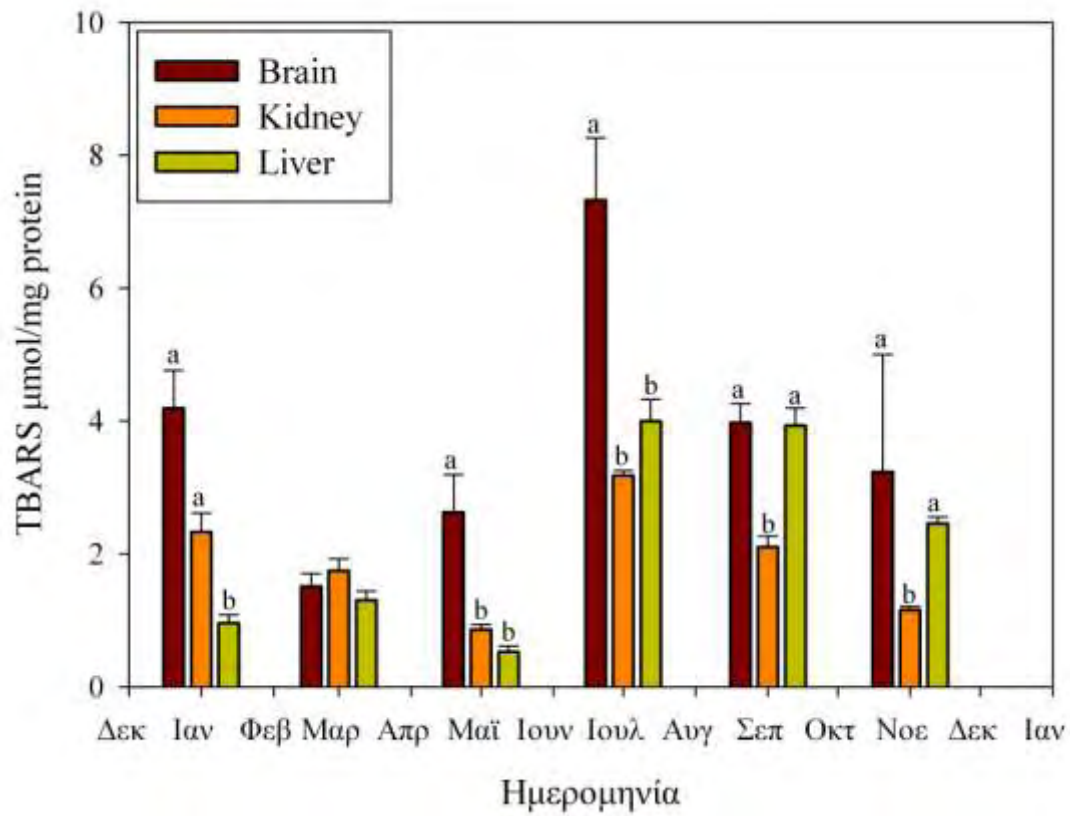
Κατά τη μέτρηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) παρατηρήθηκαν έντονες εποχιακές διακυμάνσεις στο ήπαρ και το νεφρό. Οι συγκεντρώσεις GSSG στο νεφρό δεν ακολουθούν το πρότυπο διακύμανσης κάποιας από τις λιμνολογικές παραμέτρους. Αντιθέτως, οι υψηλότερες τιμές GSSG στον εγκέφαλο και το ήπαρ συνέπεσαν με την υψηλότερη θερμοκρασία, το χαμηλότερο οξυγόνο και την υψηλότερη συγκέντρωση φυτοπλαγκτού (Εικ. 3.3).



Εικόνα 3.3 Συγκέντρωση GSSG ($\mu\text{mol/mg}$ πρωτεΐνης) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό σε έξι δειγματοληψίες. Τα a,b συμβολίζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ιστών

3.5. Συγκέντρωση TBARS (Οξειδωμένα λιπίδια)

Οι συγκεντρώσεις TBARS παρουσίασαν σημαντική εποχιακή μεταβολή σε όλους τους ιστούς, με τις χαμηλότερες τιμές να καταγράφονται τον Μάρτιο και οι υψηλότερες τον Ιούλιο, το μήνα με τη μέγιστη θερμοκρασία. Ο εγκέφαλος διαφοροποιήθηκε από τους άλλους ιστούς και παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές σε όλη τη διάρκεια του έτους εκτός του Μαρτίου. (Εικ. 3.4).



Εικόνα 3.4 Συγκέντρωση TBARS ($\mu\text{mol/mg}$ πρωτεΐνης) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό σε έξι δειγματοληψίες. Τα a,b συμβολίζουν στατιστικές σημαντικές διαφορές μεταξύ ιστών

4. Συζήτηση

Οι τοξίνες των κυανοβακτηρίων προκαλούν σοβαρές επιπλοκές στα βιοχημικά συστήματα διαφόρων οργανισμών όπως φυτά, θηλαστικά, πτηνά και ψάρια (Paskova et al. 2007). Σε μελέτες που έγιναν σε υδρόβιους οργανισμούς αποδείχτηκε ότι κάτω από εργαστηριακές συνθήκες οι μικροκυστίνες μπορούν να προκαλέσουν αύξηση των δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS), να μειώσουν την ενζυμική δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων των οργανισμών και να επιφέρουν μεγάλη οξειδωτική βλάβη στα βιολογικά τους συστήματα (Ahmad et al. 2005, Shi et al. 2005). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη λίμνη Παμβώτιδα Ιωαννίνων (Moutou et al., submitted) ανέδειξε ότι στο πληθυσμό κυπρίνων της λίμνης, οι μεταβολές των δεικτών του οξειδωτικού στρες σχετίζονταν άμεσα με τα εποχικά λιμνολογικά χαρακτηριστικά και όχι με τη συγκέντρωση μικροκυστινών στους ιστούς.

Τα ψάρια εκτίθενται σε μικροκυστίνες μέσω της τροφής και του περιβάλλοντος καθώς τα μεταβολικά προϊόντα των κυανοβακτηρίων είναι γνωστό πως μεταφέρονται διαμέσου του υδάτινου περιβάλλοντος (Xie et al., 2005). Τα κυανοβακτήρια θεωρούνται χαμηλής προτίμησης τροφή για ένα ευρύ φάσμα φυτοφάγων λόγω της τοξικότητας καθώς και της φτωχής διατροφικής αξίας τους (Pearl & Paul, 2011). Παρόλα αυτά, τα κυανοβακτήρια είναι συχνά κομμάτι της διατροφής των κυπρινίδων (Northcott et al., 1991). Πιο συγκεκριμένα το *M. aeruginosa* καταλαμβάνει ένα σημαντικό κομμάτι της διατροφής του κυπρίνου την περίοδο που εμφανίζονται αφρώδη συσσωματώματα (Carbis et al., 1997).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση λιμνολογικών χαρακτηριστικών με τη δραστηριότητα ενζύμων και τη συγκέντρωση ενώσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες στο ήπαρ, το νεφρό και τον εγκέφαλο ατόμων *C. carpio* της λίμνης Κάρλα.

Προσδιορίστηκε η κινητικότητα της καταλάσης και οι συγκεντρώσεις ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης που θεωρούνται παράγοντες άμυνας ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Τέλος, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις οξειδωμένων λιπιδίων (δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέως), τα οποία αποτελούν προϊόν του οξειδωτικού στρες.

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. 2006).

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 and 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).

Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες παρατηρείται έκπλυση της ανηγμένης γλουταθειόνης λόγω απώλειας των προσαρμοστικών μηχανισμών που συνδυάζεται με ταυτόχρονη οξείδωση της σε οξειδωμένη γλουταθειόνη η οποία σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να επιφέρει σοβαρές βλάβες στο κύτταρο. Η οξείδωση της GSH σε GSSG καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPOx) και η αντίστροφη διαδικασία δηλαδή η επαναδημιουργία της GSH από GSSG καταλύεται από το ένζυμο αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Αν η δημιουργία οξειδωμένης γλουταθειόνης είναι μεγαλύτερη από τη δημιουργία ανηγμένης, τότε η οξειδωμένη γλουταθειόνη συσσωρεύεται και μετατοπίζεται έξω από το κύτταρο από ειδικούς μεταφορείς ώστε να αποφευχθεί η εξάντληση του NADPH, η οποία οδηγεί σε μεγάλη απώλεια της ανηγμένης γλουταθειόνης. Σε μελέτες που έγιναν σε σολομοειδή διαπιστώθηκε πως η τελική συγκέντρωση οξειδωμένης γλουταθειόνης αυξάνεται μετά από ένα χρόνο έκθεσης σε οξειδωτικούς παράγοντες υποδεικνύοντας τις συνέπειες της μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου λόγω επίδρασης παραγόντων στρες (Almroth et al. 2010). Στην παρούσα μελέτη τα υψηλότερα επίπεδα GSSG στον εγκέφαλο και το ήπαρ παρατηρήθηκαν την περίοδο της άνθησης του φυτοπλαγκτού, γεγονός που υποδεικνύει και αυξημένο οξειδωτικό στρες. Στο νεφρό δεν παρουσιάστηκε το ίδιο πρότυπο, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε διαφορετική ικανότητα πρόσληψης μικροκυστινών και άλλων ξеноβιοτικών σε σχέση με το ήπαρ και τον εγκέφαλο.

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. 2002). 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 Ιούλιο, όμως η έντονη εποχιακή διαφοροποίηση 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 διαφοροποιήσεων των λιμνολογικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια του έτους, τη διαφοροποίησης των διατροφικών συνηθειών του ψαριού (Oakes et al. 2002) και την υψηλή θερμοκρασία που φαίνεται να διαδραματίζει μεγάλο ρόλο στην τελική συγκέντρωση των TBARS στα ψάρια.

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε σημαντική εποχιακή μεταβολή σε όλους τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Ωστόσο, κάθε ιστός παρουσίασε το δικό του πρότυπο εποχιακής διακύμανσης. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως η διακύμανση των λιμνολογικών χαρακτηριστικών (εποχιακή διακύμανση της θερμοκρασίας, συγκέντρωση οξυγόνου, pH, χλωροφύλλη-α) καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη διακύμανση των αντιοξειδωτικών δεικτών αποδυναμώνοντας την αξιοπιστία τους ως ειδικούς δείκτες για την έκθεση σε κυανοβακτηριακές τοξίνες.

Βιβλιογραφία

- Ærtebjerg, G., Andersen, J.H., Hansen, O.S. (eds) (2003) Nutrients & Eutrophication in Danish Marine Waters. A Challenge for Science & Management. National Environmental Research Institute. 126 pp.
- Almroth, B.C., Johansson, A., Forlin, L., Sturve, J. (2010) Early age changes in Oxidative – Antioxidative stress in brown trout, *Salmo trutta*. Comp. Biochem. Physiol., Part B 155: 442-448.
- Amado, L.L., Monserrat, J.M. (2010) Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why & How. Environ. Int. 36: 226-235.
- Ando, S., Yanagida K. (1999) Susceptibility to oxidation of copper-induced plasma lipoproteins from Japanese eel: protective effect of vitellogenin on the oxidation of very low density lipoprotein. Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol. 123:1-7.
- Aon, M.A., 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.
- Ballot, A., Krienitz, L., Kiplagat, K., Wiegand, C., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher S. (2004) Cyanobacteria & cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya—Lakes Bogoria, Nakuru & Elmenteita. J. Plankton Res. 26:925-935.
- Beklioglu, M., Tan, C.O. (2008) Restoration of a shallow Mediterranean lake by biomanipulation complicated by drought. Fundam. Appl. Limnol. 171:105-118.
- Blahá, 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.
- Bonnefoy, X. (2002) Eutrophication & health. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities 28 pp.
- Bouaicha, N., Maatouk, I. (2004) Microcystin-LR & nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production & lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. Toxicol. Lett. 148:53-63.
- Chen, H., Burke, M.J., Mosindy, T., Fedorak, M.P., Prepas, E.E. (2009) Cyanobacteria & microcystin-LR in a complex lake system representing a range in trophic status: Lake of the Woods, Ontario, Canada. J. Plankton Res. 31:993-1008.
- Chen, J., Xie, P. (2005) Tissue distributions & seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR & -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* & *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. Toxicon 45:615-625.
- Chernyak, B.V. (1997) Redox Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. Biosci. Rep. 17:293-302.
- Chorus, I., Bartram, J. (1999) Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health significance, monitoring & 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.
- Cronberg, G., Carpenter, E.J., Carmichael, W.W. (2003). Taxonomy of harmful cyanobacteria. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae*, G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, & A.D. Cembella (eds), UNESCO Publishing.

- De Figueiredo, D.R., Azeteiro, U.M., Esteves, S.M., Goncalves, F.J.M., Pereira, M.J (2004) Microcystin producing blooms – a serious global public health issue. *Ecot. Envir. Saf.* 59:151-163.
- De Jonge, V.N., Elliott, M., Orive, E. (2002) Causes, historical development, effects & future challenges of a common environmental problem: eutrophication. *Hydrobiologia* 475/476: 1–19.
- Ding, W., Ong, C.N. (2003) Role of oxidative stress & mitochondrial changes in cyanobacteria- induced apoptosis & hepatotoxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 220:1-7.
- Ding, W., Shen, H.M, Ong, C.N. (2000) The critical role of ROS & 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 & projected changes. *Biogeochemistry* 46:109-148.
- Eriksson, J.E., Jussi Meriluoto, A.O., Lindholm, T. (1989) Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anadonta cygnea*. *Hydrobiologia* 183:211-216.
- Falfushynska, H.I., Stolyar, O.B. (2009) Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72:729-736.
- Fernandez-Alaez, M., Fernandez-Alaez, C., Becares, E. (2004) A two year experimental study on nutrient & predator influences on food web constituents in a shallow lake of north-west Spain. *Freshwater Biol.* 49:1574-1592.
- Freyhof, J., Kottelat, M. (2008). *Cyprinus carpio*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 November 2011.
- Gasol, J.M., del Giorgio, P.A. (1995) Biomass distribution in marine planktonic communities. *Limnol. & Oceanogr.* 42:1353 -1363.
- Gkelis, S., Harjunpää, V., Lanaras, T., Sivonen, K. (2005) Diversity of hepatotoxic microcystins & bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters. *Environ. Toxicol.* 20, 249–256.
- Gkelis, S., Vardaka, E., Moustaka–Gouni, M., Lanaras, T. (2001) The two most abundant toxic cyanobacteria in Greek lakes & their impact on water quality. *Phycologia* 40:123.
- Griffith, O (1980) Determination of glutathione & glutathione disulfide using glutathione reductase & 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106:207-212.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (eds) (1999) *Free radicals in Biology & Medicine* (3rd edn). Oxford University Press, New York 22-26.
- 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. *Environ. Monit. Assess.* 128:483-488.
- Jeppesen, E., Jensen, J.P., Jensen C. (2003) The impact of nutrient state & 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 Davy, M.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 & function of brackish & freshwater lakes differ? *Hydrobiologia* 275/276:15-30.

- Karlsson, K.M., Spooft, L.E.M., Meriluoto, J.A.O. (2005) Quantitative LC-ESI-MS analyses of microcystins & nodularin-R in animal tissue—Matrix effects & method validation. *Environ. Toxicol.* 20:381-389.
- Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Okumura, M., Ishikawa, N., Harada, K.-I., Matsuura, K., Murata, H., Suzuki, M. (1992) Formation, characterization & toxicity of the glutathione conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 591–596.
- Kondo, F., Matsumoto, H., Yamada, S., Ishikawa, N., Ito, E., Nagata, S., Ueno, Y., Suzuki, M., Harada, K.-I. (1996) Detection & identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse & rat livers. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1355–1359.
- Li, L., Xie, P., Chen, J. (2007) Biochemical & ultrastructural changes of the liver & kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake. *Toxicon* 49:1042-1053.
- 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.
- Liboriussen L., Jeppesen E. (2009) Periphyton biomass, potential production & respiration in a shallow lake during winter & spring. *Hydrobiologia* 632:201-210.
- 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.
- Lopes, P.A.; Pinheiro, T.; Santos, M.C.; da Luz Mathias, M.; Collares-Pereira, M.J.; Viegas-Crespo, A.M. (2001) Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Sci. Total Environ.* 280:153-63.
- Lowry, OH., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275
- Meister, A. (1995) Glutathione metabolism. *Methods in Enzymology* 251:3-7.
- Mohamed, A.Z. (2001) Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by *Daphnia* in Some Egyptian Irrigation Canals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 50:4-8.
- Moutou K.A., Tsikogias, S., Papadimitriou, Th., Kagalou, I. Oxidative stress in *Cyprinus carpio* to analyze microcystin impact in eutrophic shallow lakes: a preliminary study. *J. Environ. Monitor.*, submitted.
- Moyle P.B., Cech J.J. (eds) (1996) *Fishes: an introduction to ichthyology* (3rd edn). Prentice Hall 151-153.
- Oderbrecht, C., Azevedo, S.M.F.O., Garcia, V.M.T., Huszar, V.L.M., Magalhaes, V.F., Menenez, M., Proenca, L.A., Rorig, L.R., Tenenbaum, D.R., Villac, R.A., & Yunes, J.S. (2002). Floraciones de microalgas nocivas en Brasil: Estrado del arte y proyectos en curso. In: Floraciones Algas Nocivas en el Como Sur Americano. Sar, E.A., Ferrerio, M.E., Reguera, B. (eds) pp. 219–233, Instituto Espanol de Oceanographia, Madrid.
- Oruç, E.Ö., Üner, N. (2002) Marker enzyme assesment in the liver of *cyprinus carpio* (L.) exposed to 2,4-D & azinphosmethyl. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16:182-188.
- Paskova, V., Adamovsky, O., Pikula, J., Skocovska, B., Bandouchova, H., Horakova, J., Babica, B., Marsalek, B., Hilscherova, K. (2007) Detoxification & oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Sci. Total Environ.* 398:34-47.
- Pflugmacher, S., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. (1999) Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environ. Toxicol.* 14, 111–117.

- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Beattie, K.A., Krause, E., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A. (2001) Uptake, effects, & metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex Steud. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 846–852.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. (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.
- Pinho, G.L.L., Moura da Rosa, C., Maciel, F.E., Bianchini, A., Yunes, J.S., Proença, L.A.O., Monserrat, J.M. (2005) Antioxidant responses & oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61:353-360.
- 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.
- Qiu, T., Xie, P., Ke, Z., Li, L., Guo, L. (2007) In situ studies on physiological & biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake. *Toxicon* 50:365-376.
- Rahman, I., Kode, A. (2007) Assay for quantitative determination of glutathione & glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* doi:10. www.nature.com.
- Romo, S., Miracle, M.A.R., Jose Villena, M.A., Rueda, J., Ferriol, C., Vicente, E. (2004) Mesocosm experiments on nutrient & fish effects on shallow lake food webs in a Mediterranean climate. *Freshwater Biol.* 49:1593-1607.
- Runnegar, M.T., Berndt, N., Kaplowitz, N. (1995) Microcystin uptake & inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants & self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol. Appl. Pharm.* 134: 793-803.
- Sand-Jensen, K., Borum, J. (1991) Interactions among phytoplankton, periphyton, & macrophytes in temperate freshwaters & estuaries. *Aquat. Bot.* 41:137-175.
- Sivonen, K., Jones, G. (1999) Cyanobacterial toxins. pp. 41-111. In: I., Chorus & J. Bartram (ed.) – *Toxic Cyanobacteria in Water: a guide line to public health significance, monitoring & management*. World Health Organization, London & New York.
- Soares, M.C.S., Rocha, M.I.A., Marinho, M.M. et al. (2009) Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients & grazing effects. *Aquat. Microb. Ecol.*, 57:137–149.
- Steffensen, D., Humpage, A., Nicholson, B., Baker, P., Christy, P., Falconer, I., Lanthois, B., Ferguson, K., Saint, C. (2001). Toxicity of the benthic cyanobacterium *Phormidium* in South Australia, 5th International Conference on Toxic Cyanobacteria Noosa, Queensland, Australia.
- Stillman, L. (2010) Pollution & Public Health in a Shrinking World: Concentrated Animal Feeding Operations as a Paradigm for Emergent Needs in Environmental & Public Health Policy" Self-Designed Majors Honors Papers, Paper 2.
- Svrcek, C., Smith, D.W (2004) Cyanobacteria toxins & the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J. Envir. Eng. Sci.* 2004:155-158.
- Tramboo, S.M., Yousuf, A.R., Akbar S. (2011) Oxidative stress-inducing potential of butachlor in a freshwater fish, *Cyprinus carpio* (L). *Toxicol. Environ. Chem.* 93:285-295.

- Vinagre, T.M., Alciati, J.C., Regoli, F., Bocchetti, R., Yunes, J.S., Bianchini, A., Monserrat, J.M. (2003) Effect of microcystin on ion regulation & antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 135:67-75.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, A.K., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A. (1999) Uptake & effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 14:89-95.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.B., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L. (2001) Influence of season & pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar (*Geophagus brasiliensis*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34:719-726.
- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton J.R., Turner N.D. (2004) Glutathione Metabolism & Its Implications for Health. *J. Nutr.* 134:489-492.
- Žegura, B., Sedmak, B., Filipič, M. (2003) Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicol.* 41:41-48.
- Zhang, D., Liu, P.X.Y. , Qiu, T. Transfer, distribution & bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Sci. Total Environ.* 407:2191-2199.