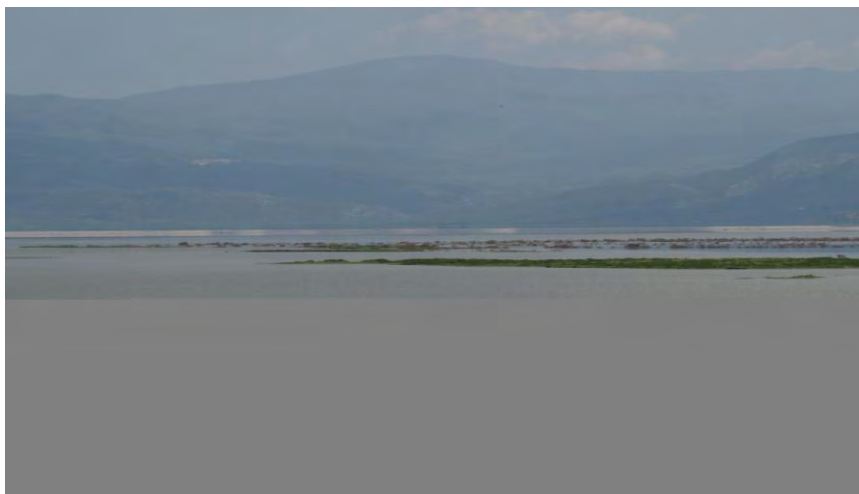


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη παρουσίας κυανοτοξινών στο λιμναίο οικοσύστημα της λίμνης Κάρλας
και επιπτώσεις στους ιχθυοπληθυσμούς»**



Αμαλία Μήτσουρα

ΒΟΛΟΣ 2011

**«Μελέτη παρουσίας κυανοτοξινών στο λιμναίο οικοσύστημα της λίμνης Κάρλας
και επιπτώσεις στους ιχθυοπληθυσμούς»**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- 1) **Κάγκαλου Ιφιγένεια**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδρολογία, Λιμνολογία και Ποταμολογία, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**,
- 2) **Κορμάς Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**,
- 3) **Γκολομάζου Ελένη**, Λέκτορας, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

*Στον αδελφό μου Βασίλη,
που πάντα με ωθεί να εκπληρώνω τα όνειρα και τις φιλοδοξίες μου.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους, που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παπαϊωάννου Νικόλαο (Παθολογική ανατομική, Κτηνιατρική σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης) για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του, καθώς επίσης την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μεντέ Ελένη, για την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τέλος, ευχαριστώ τον Λέκτορα Βερίλλη Παναγιώτη για την βοήθεια, που πρόσφερε στα αποτελέσματα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον αδελφό μου Βασίλειο Μήτσουρα για την οικονομική στήριξη και την συμπαράσταση, που μου παρείχε για να ολοκληρώσω τις σπουδές μου, καθώς επίσης και την συμφοιτήτρια μου Ζήσου Α. Χρυσώ για τη σημαντική βοήθεια της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Θεοδότη Παπαδημητρίου για την συμπαράσταση και τη βοήθεια που μου προσέφερε.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου και στις φίλες μου Χανδρή Ευαγγελία και Χανδρή Ιουλία για την ψυχολογική και συναισθηματική συμπαράσταση, βοήθεια, κατανόηση και ανοχή τους καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κυανοβακτήρια είναι φυτοπλαγκτονικοί οργανισμοί που εντοπίζονται στα περισσότερα οικοσυστήματα (χερσαία και υδάτινα). Ορισμένοι από τους οργανισμούς αυτούς περιέχουν στα κύτταρα τους διάφορες τοξικές ουσίες, οι οποίες δρώντας με ποικίλους παθογενετικούς δρόμους, προκαλούν νοσηρές καταστάσεις. Έτσι, έχουν καταγραφεί πληθώρα περιστατικών δηλητηριάσεων στους χερσαίους οργανισμούς, ενώ περιορισμένες καταγραφές αφορούν τους υδρόβιους οργανισμούς. Ωστόσο, γνωστή είναι η ικανότητά τους να βιοσυσσωρεύονται και να βιομεγεθύνονται εντός των τροφικών αλυσίδων ή και πλεγμάτων. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούν σημαντικά προβλήματα, τόσο στην δημόσια υγεία, όσο και στο ίδιο το οικοσύστημα. Όταν τα κυανοβακτήρια βρεθούν κάτω από κατάλληλες συνθήκες, παράγουν τοξικές ουσίες. Στις τοξικές ουσίες που παράγονται από τα κυανοβακτήρια συγκαταλέγονται και οι μικροκυστίνες (MCYST), οι οποίες είναι πεπτιδικά μόρια με ηπατοτοξική δράση. Στη φύση ανευρίσκονται διάφορα ανάλογα τους, με ποικίλη τοξικότητα, ενώ γενικώς αποδεκτό είναι ότι η μικροκυστίνη – LR είναι η πιο συχνά καταγεγραμμένη τοξίνη, η οποία συνδέεται με δηλητηριάσεις έμβιων όντων.

Η παρούσα ερευνητική εργασία προσπάθησε να διερευνήσει τις αλλοιώσεις που προκαλούν οι MCYST στους κυπρίνους του λιμναίου οικοσυστήματος της Κάρλας. Έτσι αποδείχτηκε η παρουσία των μικροκυστινών, τόσο εντός της υδάτινης στήλης, όσο και στη δημιουργία scum, οι συγκεντρώσεις των οποίων έφτασαν το 3,01 μg/l και 5,5 μg/l αντίστοιχα. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε άμεση μικροσκόπηση επιχρισμάτων στομαχικού περιεχομένου των ψαριών. Κατά την εξέταση διαπιστώθηκε ότι πλήθος κυανοβακτηρίων καταναλώνονταν από τα ψάρια κατά το διάστημα της δειγματοληψίας. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η συγκέντρωση των μικροκυστινών στο ήπαρ, τους νεφρούς και τους μύες των μελετώμενων ψαριών. Ο

υπολογισμός των τοξινών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ELISA, η οποία και κατέδειξε αυξημένα ποσοστά MCYST στα παραπάνω όργανα. Αναλυτικότερα κατά την πρώτη δειγματοληψία τη μεγαλύτερη συγκέντρωση MCYST – LR εμφάνιζε το ήπαρ, με συγκέντρωση 731,7 ng/g. Ενώ κατά την δεύτερη δειγματοληψία τη μέγιστη συγκέντρωση παρουσίασε ο νεφρός, με απόλυτη τιμή 696 ng/g. Σημαντικό είναι το στοιχείο ότι, στους μύες ανευρέθηκαν ποσοστά μικροκυστινών, που κυμάνθηκαν από τα 113,78 ng/g ως και 108,41 ng/g μεταξύ των δειγματοληψιών.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η μακροσκοπική εξέταση των ιχθύων, καθώς και η μικροσκοπική εξέταση των οργάνων τους. Τα αποτελέσματα αυτών δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των δυο δειγματοληπτικών προσπαθειών. Κατά τη νεκροτομική διαδικασία πιστοποιήθηκαν αλλοιώσεις που αφορούσαν το ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό τους νεφρούς. Με την χρήση του οπτικού μικροσκοπίου εξετάστηκαν, το ήπαρ, οι νεφροί, η καρδιά, οι μύες και ο εγκέφαλος των ψαριών. Αν και μόνο κάποιες μη ειδικές αλλοιώσεις παρουσιάστηκαν στην καρδιά, στους μύες και στον εγκέφαλο, δεν συνέβαινε το ίδιο στο ήπαρ και στο νεφρικό παρέγχυμα. Έτσι στο ήπαρ αποδείχθηκε η απώλεια της αρχιτεκτονικής δομής του, ενώ στο νεφρικό παρέγχυμα σημειώθηκε η σπειραματοσκλήρυνση, με την καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων των ουροφόρων σωληναρίων. Τελικά με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διελεύσεως εξετάστηκαν οι αλλοιώσεις σε ενδοκυτταρικό επίπεδο. Έτσι, τόσο στα κύτταρα του ήπατος, όσο και του νεφρού ανευρέθηκαν στοιχεία που συνηγορούν στη νέκρωση των κυττάρων.

Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν ιχθύες άμεσα από το φυσικό τους περιβάλλον. Αυτό συνεπάγεται ότι πιθανότατα, ποικίλοι παράγοντες μπορεί να διαμορφώνουν την παθολογική εικόνα των μελετώμενων βιολογικών οργανισμών. Έτσι, στο μέλλον θα πρέπει να καθοριστούν οι παράγοντες,

που πιθανόν επηρεάζουν την υγεία των ψαριών και να αποδειχθεί σε πιο ποσοστό ευθύνονται οι MCYST.

Λέξεις κλειδιά: ιστοπαθολογική εξέταση, κυανοβακτήρια, μικροκυστίνες, τοξίκωση κυπρίνων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ & ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΕΣ	1
1.2 ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΝΕΣ (MCYSTs)	3
1.3 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΟΞΙΚΩΣΗΣ (MCYSTs) ΣΤΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	5
1.4 ΒΟΥΣΣΩΡΕΥΣΗ – ΒΟΜΕΓΕΘΥΝΣΗ ΤΩΝ MCYST ΣΤΙΣ ΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΕΣ	9
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	11
2.1 ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	11
2.1.1 Η ΛΙΜΝΗ ΚΑΡΛΑ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΠΟΞΗΡΑΝΣΗ	11
2.1.2 Αποξήρανση και οι επιπτώσεις της.....	13
2.1.3 Ο υπό σύσταση ταμιευτήρας της πρώην λίμνης Κάρλας	15
2.2 ΜΕΛΕΤΩΜΕΝΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	15
ΚΥΠΡΙΝΟΣ Η ΓΡΙΒΑΔΙ (CYPRINUS CARPIO L.)	15
2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	18
2.3.1 Δειγματοληψία και ανάλυση MCYST σε δείγματα νερού	18
2.3.2 Δειγματοληψία ιχθύων.....	20
2.4 ΝΕΚΡΟΤΟΜΗ ΙΧΘΥΩΝ.....	21
2.5 ΕΞΕΤΑΣΗ ΣΤΟΜΑΧΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ.....	24
2.6 ΑΝΑΛΥΣΗ MCYST ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΙΣΤΩΝ.....	27
2.7 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΙΣΤΩΝ.....	27
2.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων οπτικού μικροσκοπίου.....	28
2.7.2 Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διελεύσεως.....	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
3.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ MCYST.....	36
3.2 ΕΞΕΤΑΣΗ ΣΤΟΜΑΧΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ.....	37
3.3 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	41
3.4 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ.....	46
3.4.1 Οπτικό μικροσκόπιο	46
3.4.2 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως.....	52
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	78
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	82
7. ABSTRACT.....	83

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κυανοβακτήρια & Κυανοτοξίνες

Η παρουσία των κυανοβακτηρίων υπολογίζεται από την εποχή του Προκάμβιου και είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, που μπορούν να φωτοσυνθέτουν. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγουν οργανική ύλη και απελευθερώνουν οξυγόνο (O₂) στην ατμόσφαιρα (Gupta & Guha 2006; Γκέλης 2006; Butrer *et al.* 2009). Επιπλέον, τα κυανοβακτήρια ανευρίσκονται στα περισσότερα υδάτινα οικοσυστήματα (αλμυρά, υφάλμυρα ή και γλυκά νερά) (Kagalou *et al.* 2008). Παρόλη τη χρησιμότητά τους, όταν βρεθούν κάτω από κατάλληλες συνθήκες, πολλαπλασιάζονται γρήγορα και υπέρμετρα, προκαλώντας διάφορα προβλήματα (Nicholson & Burch 2001). Τα προβλήματα αυτά σχετίζονται με την παραγωγή του επίπαγου (scum) και των τοξινών τους (Butrer *et al.* 2009).

Η τοξικότητα τους διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος των κυανοβακτηρίων ή και με τα διαφορετικά στελέχη των τοξινών τους (Γκέλης 2006). Η αύξηση της τοξικής δράσης τους συμπίπτει με την κατάρρευση των ανθίσεων, αφού οι παραγόμενες τοξίνες βρίσκονται ενδοκυτταρικά (Nicholson & Burch 2001). Μόνο λίγες από αυτές τις ουσίες οδηγούνται εξωκυττάρια κατά τη διάρκεια της άνθισης, οι οποίες και αδρανοποιούνται από μικρόβια ικανά να τις μεταβολίζουν (Butrer *et al.* 2009). Τέλος, δεν παράγουν όλα τα κυανοβακτήρια τοξίνες, ενώ η τοξικότητα τους διαφοροποιείται ανάλογα το γένος, το είδος ή και το στέλεχος. Στο πίνακα 1 που είναι στο παράρτημα αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένα από τα γένη που παράγουν κυανοτοξίνες, τοξικά γένη με άγνωστες τοξίνες και τα πλέον συχνά απαντώμενα είδη

κυανοβακτηρίων (Nicholson & Burch 2001; Cummings 2002; Γκέλης 2006; van Apeldoorn *et al.* 2007; Papadimitriou *et al.* 2009).

Κυανοτοξίνες ονομάζονται οι τοξίνες που παράγονται από τα κυανοβακτήρια, οι οποίες ανευρίσκονται σε όλα τα εύτροφα συστήματα (Kagalou *et al.* 2008), ενώ διακρίνονται σε ηπατοτοξίνες, σε νευροτοξίνες και σε ερεθιστικές ουσίες. Η μικροκυστίνη, η νοντουλαρίνη και η κυλινδροσπερμοψίνη είναι ηπατοτοξίνες (van Apeldoorn *et al.* 2007), ενώ η σαξοτοξίνη, η ανατοξίνη – α, η ανατοξίνη - α(s) είναι νευροτοξίνες. Τέλος, στις ερεθιστικές ουσίες ανήκουν η απλυσιατοξίνη, η λυνκμπυατοξίνη – α και οι πολυσακχαρίτες (LPS), οι οποίες προκαλούν τοπικό ερεθισμό ή και αλλεργικές αντιδράσεις (Chorus & Bartram 1999). Στο παράρτημα εμπεριέχονται τα γενικά χαρακτηριστικά των κυανοτοξινών (Πίν. 2) (Γκέλης 2006).

Παγκοσμίως οι πλέον συχνές αναφορές για περιστατικά τοξίκωσης ανθρώπων και ζώων, οφείλονται σε MCYST (Fischer & Dietrich 2000). Οι MCYST, πρώτη φορά, απομονώθηκαν από το είδος *Microcystis aeruginosa*, στο οποίο οφείλουν την ονομασία τους (Nicholson & Burch 2001; Γκέλης 2006; Butrer *et al.* 2009). Έχουν ενοχοποιηθεί για πολλούς θανάτους, τόσο σε ζώα (οικόσιτα και άγρια), όσο και σε ιχθυοπληθυσμούς. Στους ανθρώπους, όμως, δεν έχουν επιβεβαιωθεί θάνατοι, εκτός από ένα περιστατικό στην Βραζιλία, όπου μετά από τη διενέργεια αιμοδιάλυσης, τα άτομα εκδήλωσαν τοξίκωση. Ορισμένοι εκ των νοσούντων κατέληξαν, εξαιτίας του συνδρόμου που ανέπτυξαν (Caruaru syndrome) (van Apeldoorn *et al.* 2007). Αναλυτικότερα, στα θηλαστικά η δηλητηρίαση προκαλεί αιμορραγία του ήπατος, η οποία καταλήγει στον θάνατο εξαιτίας του υποογκαιμικού σοκ, που υφίσταται ο οργανισμός. Ανθεκτικότερα φαίνεται να είναι τα ψάρια, αφού δεν εκδηλώνουν ηπατική αιμορραγία, παρά τις ιστολογικές αλλοιώσεις διαφόρων οργάνων τους (Fischer *et al.* 2000; Malbrouck & Kestemont 2006; Γκέλης 2006).

1.2 Μικροκυστίνες (MCYSTs)

Οι MCYST είναι οι τοξίνες, που κυρίως απομονώνονται από περιστατικά τοξικότητας ανθρώπων και ζώων. Οι τοξίνες αυτές αποτελούνται από επτά αμινοξέα, εκ των οποίων τα ακραία (1^ο & 7^ο), συστρέφονται και ενώνονται προσδίδοντας κυκλική μορφή στο μόριο. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί περισσότερα από 80 ανάλογα των MCYST (Atencio *et al.* 2008a; Butrer *et al.* 2009), τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική τοξικότητα. Όμως, όλα τα ανάλογα παρουσιάζουν μια γενική χημική δομή:



Όπου: X & Z = μεταβλητά L-αμινοξέα,

D-MeAsp = D-έρυθρο-β-μεθυλ-ασπαρτικό οξύ,

Mdha = μεθυλ-δεϋδροαλανίνη,

Adda = (3-αμινο-9-μεθοξυ-2,6,8-τριμεθυλο-10-φενυλοδεκα-4,6-διενοϊκό οξύ) (Li *et al.* 2001; Atencio *et al.* 2008a).

Το Adda ανευρίσκεται μόνο στις MCYST και τις νοντουλαρίνες, το οποίο και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα τους (Fischer & Dietrich 2000). Τα X και Z αντιπροσωπεύουν τις θέσεις εκείνες στις οποίες συνδέονται διαφορετικά αμινοξέα, δημιουργώντας έτσι τα διαφορετικά ανάλογα των MCYST (Chorus & Bartram 1999; Γκέλης 2006).

Οι MCYST είναι πολύ ανθεκτικές ουσίες και στο φυσικό περιβάλλον αντέχουν στην υδρόλυση και στην οξειδωση, ενώ δεν επιβιώνουν σε pH μεγαλύτερο του 9 και μικρότερο του 1, καθώς, και σε θερμοκρασίες άνω των 40°C (Butrer *et al.* 2009). Επίσης, καταστρέφονται από κάποιες βακτηριακές πρωτεάσες, οι οποίες όμως συνήθως απουσιάζουν (Nicholson & Burch 2001; Γκέλης 2006), με αποτέλεσμα να

αντέχουν για μήνες ή και χρόνια σε κρύα και σκοτεινά νερά (Butrer *et al.* 2009). Οι MCYST πιστεύεται ότι ασκούν την τοξική τους δράση με δύο κυρίως μηχανισμούς, με αναστολή της ικανότητας φωσφοριλίωσης / αποφωσφοριλίωσης των κυττάρων και με αύξηση του οξειδωτικού stress (Carbis *et al.* 1997; Molina *et al.* 2005; Atencio *et al.* 2008b; Jiang *et al.* 2011). Όταν τα κυανοβακτήρια καταναλωθούν, οι MCYST απελευθερώνονται και συνδέονται με τα χολικά οξέα, έτσι φθάνουν στο ήπαρ, όπου αναστέλλουν τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες με δύο τρόπους σύνδεσης (ταχεία αναστρέψιμη σύνδεση και βραδεία μη αναστρέψιμη σύνδεση) (Atencio *et al.* 2008b).

Αρχικά, συνδέονται ταχύτατα με την καταλυτική ομάδα των πρωτεϊνικών φωσφατασών σερίνης/ θρεονίνης (PPs, PP1, 2A, 4A, 5A), διαμέσου ενός υδρόφοβου ομολόγου τους (Carbis *et al.* 1997; Molina *et al.* 2005; Zurawell *et al.* 2005; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009). Έπειτα, ακολουθεί μια αργή (μετά από αρκετές ώρες) σύνδεση, με ομοιοπολική αντίδραση των ριζών της δεϋδροαλανίνης των MCYST και των καταλυτικών υποομάδων των PP. Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω συνδέσεων, είναι η αναστολή της δράσης των φωσφατασών και έτσι η προκαλούμενη υπερφωσφοριλίωση των κυττάρων, με πρόκληση ποικίλων κυτταρικών διαδικασιών, όπως η διαταραχή του κυτταροσκελετού και η ρήξη του κυττάρου (Lance *et al.* 2010).

Η αύξηση του οξειδωτικού stress επιτυγχάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων ριζών O₂ (ROS), αλλά και με την αύξηση διάφορων ουσιών που ασκούν οξειδωτική δράση, όπως τα υπεροξείδια των λιπιδίων. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα ROS στους ιστούς αναστέλλονται από την δράση του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος (ένζυμα, υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές βιταμίνες) (Atencio *et al.* 2008b). Αντίθετα, αν αυξηθεί η συγκέντρωση των ROS στον οργανισμό οδηγούμαστε σε καταστροφή των ενδοκυτταρικών στοιχείων, των

λιπιδίων των μεμβρανών, του DNA και των πρωτεϊνών (Carbis *et al.* 1997; Molina *et al.* 2005; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2011).

1.3 Επιπτώσεις τοξίκωσης (MCYST) στους οργανισμούς

Το πρώτο περιστατικό τοξίκωσης από κυανοβακτήρια, αναφέρθηκε το 1878 στην Αυστραλία από τον George Francis, από τότε η ύπαρξη τοξικών ανθίσεων κυανοβακτηρίων έχει αποδειχθεί σε παγκόσμιο επίπεδο. Πληθώρα περιστατικών δηλητηριάσεων έχουν καταγραφεί, κυρίως οικόσιτων και άγριων ζώων, ενώ το 50 – 70% των ανθίσεων των κυανοβακτηρίων είναι τοξικό (Nicholson & Burch 2001). Ευρύτερα αποδεκτό είναι το γεγονός ότι οι MCYST σε μεγάλες δόσεις είναι θανατηφόρες, ενώ σε μικρότερες δόσεις προκαλούν χρόνιες επιπτώσεις στην υγεία (Nicholson & Burch 2001; van Apeldoorn *et al.* 2007). Αναφορές δεικνύουν περιστατικά τοξίκωσης σε Βόρεια Αμερική, Ηνωμένο Βασίλειο, Αφρική, Βραζιλία και Κίνα (Nicholson & Burch 2001; van Apeldoorn *et al.* 2007; Kagalou *et al.* 2008). Στην Ελλάδα, η πρώτη αναφορά για άνθιση κυανοβακτηρίων πραγματοποιήθηκε το 1987 (Lanaras *et al.* 1989). Συγχρόνως, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας όρισε το 1 μg – MCYST/Lt ως το ανώτερο επιτρεπτό όριο MCYST στο πόσιμο νερό (Cumplings 2002; Butrer *et al.* 2009).

Στους υδρόβιους οργανισμούς, όλες οι κυανοβακτηριακές τοξίνες εισέρχονται, είτε με την κατάποση, ή δια των βραγχίων κατά την διάρκεια της αναπνευστικής λειτουργίας (Carbis *et al.* 1996). Αντίθετα, τα θηλαστικά και ο άνθρωπος τις προσλαμβάνουν με τους ακόλουθους τρόπους: την άμεση επαφή δια των βλεννογόνων, την κατάποση, καθώς και την εισπνοή τους (Chorus & Bartram 1999; Chorus 2001; Γκέλης 2006). Ανεξάρτητα με την οδό λήψης των τοξινών, προκαλούνται ζημιές στο ήπαρ, οι οποίες είναι εξαρτώμενες τόσο από την ποσότητα

και την τοξικότητα των MCYST, όσο και από το χρονικό διάστημα της έκθεσης (Nicholson & Burch 2001). Αναλυτικότερα, οι χρόνιες εκθέσεις σε MCYST ενοχοποιούνται ότι προάγουν την καρκινογένεση στα θηλαστικά (Cummings 2002; Butrer *et al.* 2009), ενώ οι οξείες τοξικώσεις εμφανίζουν συμπτωματολογία ανάλογα με την ποσότητα και το είδος των τοξινών που ο οργανισμός προσλαμβάνει, η οποία μπορεί να οδηγήσει στον θάνατο (Fischer *et al.* 2000; Malbrouck & Kestemont 2006; Γκέλης 2006; Jiang *et al.* 2011).

Γενικότερα, δεν υπάρχουν πολλές αναφορές τοξικώσεων, εξαιτίας του γεγονότος ότι στον άνθρωπο δεν προκαλείται θάνατος και ταυτόχρονα, η συμπτωματολογία που αναπτύσσουν είναι όμοια με πολλές άλλες νοσηρές καταστάσεις (Butrer *et al.* 2009). Περισσότερο έχουν μελετηθεί οι επιπτώσεις στα χερσαία ζώα, ενώ πολύ λίγα είναι γνωστά για τους υδρόβιους οργανισμούς (Papadimitriou *et al.* 2009). Οι τελευταίοι όμως εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις MCYST (Fischer & Dietrich 2000). Επιπλέον, σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι MCYST έχουν την ιδιότητα να βιοσυσσωρεύονται¹ και βιομεγεθύνονται² στους ιστούς των υδρόβιων οργανισμών σύμφωνα με κάποιες έρευνες (Chorus & Bartram 1999; Chorus 2001; Malbrouck & Kestemont 2006; Γκέλης 2006). Με αυτό τον τρόπο εισέρχονται στις τροφικές αλυσίδες και έτσι, βρίσκεται σε μεγαλύτερο κίνδυνο ο άνθρωπος, ο οποίος είναι στην ανώτερη βαθμίδα κατανάλωσης (Ibelings & Chorus 2007; Kagalou *et al.* 2008). Ωστόσο, υπάρχει σχετική αναφορά, η οποία αποδεικνύει το γεγονός ότι οι MCYST δεν εμφανίζουν την παραπάνω ιδιότητα (Ibelings *et al.* 2005).

¹ Βιοσυσσώρευση: Η αύξηση της ποσότητας μιας χημικής ουσίας ή τοξίνης εντός ενός υδρόβιου οργανισμού. Η είσοδος της ουσίας επιτυγχάνεται από όλες τις οδούς απορρόφησης (γαστρεντερική – αναπνευστική – δια του δέρματος επαφή).

² Βιομεγέθυνση: Είναι η αύξηση της συγκέντρωσης μιας χημικής ουσίας ή τοξίνης μέσω της τροφικής αλυσίδας από τους παραγωγούς προς τους καταναλωτές. Έτσι το ποσοστό μέσα στον οργανισμό ξεπερνά αυτό της τροφής του.

Στους υδρόβιους οργανισμούς έχουν αναφερθεί θάνατοι σε παγκόσμιο επίπεδο, αν και κυρίως, εκδηλώνουν χρόνια τοξίκωση (Butrer *et al.* 2009), ενώ οι MCYST συγκεντρώνονται στους ακόλουθους ιστούς τους: ήπαρ, έντερο, νεφροί, εγκέφαλο, γονάδες, μύες (Kagalou *et al.* 2008). Παρά τη σπουδαιότητα των κυανοβακτηριακών τοξικών, πολύ περιορισμένη και πρόσφατη είναι η διερεύνηση των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που προκαλούν στους ιχθυοπληθυσμούς. Η πρώτη ερευνητική διαδικασία για την κατάδειξη των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων σε κυπρίνους ύστερα από την πρόσληψη MCYST, πραγματοποιήθηκε το 1991. Τότε, οι Rabegh *et al.*, μελέτησαν τις μικροσκοπικές αλλοιώσεις που προκαλούν οι τοξίνες της *Microcystis aeruginosa* στον κοινό κυπρίνο. Έπειτα, το οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε ξανά στη διαγνωστική των αλλοιώσεων από MCYST το 1996, όταν οι Garbis *et al.* επιχείρησαν να μελετήσουν τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο ίδιο είδος.

Ταυτόχρονα, οι Kotak *et al.* μελέτησαν τις επιπτώσεις (ήπαρ και νεφροί) της MCYST – LR στην ιριδίζουσα πέστροφα. Ένα χρόνο αργότερα παρουσίασαν οι Carbis *et al.* (1997) τις επιπτώσεις σε ψάρια ενός φυσικό περιβάλλοντος, οι οποίες προκαλούνται από τις κυανοβακτηριακές τοξίνες. Η μελέτη έγινε μετά από τη λήψη ιχθύων από την λίμνη Mokoan, όπου και είχε παρατηρηθεί η δημιουργία κυανοβακτηριακής άνθισης. Τα στοιχεία που συλλέχθηκαν τα σύγκριναν με δεδομένα που προέκυψαν από μια λίμνη που δεν είχε παρατηρηθεί ως τότε καμία άνθιση. Έπειτα, το 1999, μελετήθηκαν οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο ουροποιητικό σύστημα, τον εντερικό βλεννογόνο και το ηπατοπάγκρεας κυπρίνων μετά την λήψη MCYST –LR (Fisher & Dietrich, 1999). Την ίδια χρονιά, μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της τοξίκωσης στην ιριδίζουσα πέστροφα (Fisher *et al.*, 1999).

Ο 21^{ος} αιώνας χαρακτηρίζεται από την ραγδαία αύξηση της ερευνητικής δραστηριότητας όσον αφορά θέματα τοξίκωσης των ιχθυοπληθυσμών, εξαιτίας των ανθίσεων. Αρχικά, το 2001, προσδιορίζονται οι αλλοιώσεις σε ηπατοκυτταρικό επίπεδο, με έμφαση στις κυτταρικές μεμβράνες, εξαιτίας της πρόσληψης MCYST – LR (Li *et al.*, 2001). Ενώ, οι Molina *et al.* (2005) μελέτησαν τις επιπτώσεις των MCYST σε τιλάπιες μετά από την υποκλινική δηλητηρίαση τους, καθώς και οι Zurawell *et al.* (2005) παρουσίασαν μια ανασκόπηση της βιολογικής σημασίας των MCYST στα υδάτινα οικοσυστήματα, εστιάζοντας στις ως τότε διαβεβαιωμένες ιστολογικές αλλοιώσεις στα ψάρια. Ακολούθως, το 2006, μελετήθηκαν οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εξαιτίας της τοξίκωσης με MCYST στο είδος *Heteropneustes fossilis*. Ενώ οι Ernst *et al.* (2006) ερεύνησαν τις αλλοιώσεις που προκαλούν οι ίδιες τοξίνες στα ψάρια του είδους *Loregonus lavaretus*.

Δύο χρόνια αργότερα, το 2008, οι Atencio *et al.* παρατήρησαν τις επιπτώσεις που προκλήθηκαν στο είδος *Tinca tinca* μετά από την πρόσληψη MCYST. Την ίδια χρονιά μελετήθηκαν οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, οι οποίες προκαλούνται κατά την οξεία τοξίκωση σε τιλάπιες (Atencio *et al.* 2008a). Στα δύο επόμενα χρόνια (2009 – 2010), οι Pierto *et al.* (2009) ερεύνησαν την αναγεννητική ικανότητα των αναλόγων της βιταμίνης E στις αλλοιώσεις, που προκαλούν οι τοξίνες, σε τιλάπιες. Επίσης εξετάστηκαν οι επιπτώσεις των MCYST σε τιλάπιες αλλά και το πώς αναγεννιόνταν αυτές μετά την χορήγηση σεληνίου (Se) (Atencio *et al.* 2009) και ακετυλοκυστεΐνης (NAC) (Puerto *et al.* 2010). Τέλος, το 2011, οι Jiang *et al.*, παρουσίασαν τις ιστολογικές αλλοιώσεις που αναπτύσσονται σε κυπρίνους και δεν οφείλονται μόνο στην αναστολή των πρωτεϊνικών φωσφατασών αλλά και στην οξειδωτική ικανότητα των μικροκυστινών.

1.4 Βοσυσσώρευση – Βομεγέθυνση των MCYST στις τροφικές αλυσίδες

Η άνθιση των κυανοβακτηρίων αποτελεί ένα φυσικό φαινόμενο, το οποίο συμβαίνει στα υδάτινα οικοσυστήματα, η ανθρώπινη, όμως, δραστηριότητα (αύξηση θρεπτικών ουσιών) και η κλιματολογική αλλαγή, οδήγησε σε αύξηση της δριμύτητας και συχνότητας του φαινομένου (Zurawell *et al.* 2005). Παράλληλα οι υδρόβιοι οργανισμοί σπάνια πεθαίνουν από την προκαλούμενη δηλητηρίαση (Butrer *et al.* 2009), αντίθετα οι MCYST συσσωρεύονται στους διάφορους ιστούς και όργανα τους (Molina *et al.* 2005; Ibelings & Chorus 2007; Valdor & Aboal 2007; Atencio *et al.* 2008a; Butrer *et al.* 2009; Prieto *et al.* 2009; Lance *et al.* 2010).

Τα ψάρια προσλαμβάνουν τις MCYST, είτε άμεσα (βρώση φυτοπλαγκτού, δια του δέρματος ή δια των βλεννογόνων), είτε έμμεσα καταναλώνοντας άλλα είδη που διηθούν το νερό (πχ. μύδια) ή και που τρώνε το φυτοπλαγκτόν (Ibelings & Chorus 2007; Atencio *et al.* 2008a). Επίσης έρευνες δεικνύουν την παρουσία μεγαλύτερων συγκεντρώσεων MCYST σε φυτοφάγα ψάρια σε σχέση με τα σαρκοφάγα, γεγονός που εστιάζεται τη διαφορετική ανατομία του εντέρου τους. Αντίθετα άλλες έρευνες έχουν αποδείξει το εντελώς αντίθετο, αποδεικνύοντας τα σαρκοφάγα είδη, ως είδη με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, αποτέλεσμα που κρίθηκε ότι συνδέεται άμεσα με την ποσότητα των MCYST στο περιβάλλοντα χώρο. Έτσι σήμερα, πιστεύεται ότι η συγκέντρωση των τοξινών στα ψάρια δεν εξαρτάται από τις διατροφικές συνήθειες αυτών (Ibelings & Chorus 2007).

Στα δίθυρα (μύδια, κυδώνια, κ.α.) βρέθηκαν συγκεντρώσεις MCYST στους ιστούς τους και μάλιστα σε ίδιες αναλογίες με αυτές των ψαριών (Ibelings & Chorus 2007). Τα δίθυρα καταναλώνονται εξ ολοκλήρου, οπότε αποτελούν διατροφικά είδη με ιδιαίτερη σημασία. Επίσης, συγκεντρώσεις τοξινών βρέθηκαν σε γαρίδες και καραβίδες, καθώς και σε άλλα γαστερόποδα, τα οποία καταναλώνονται, είτε από

ανθρώπους, είτε από ψάρια (Lance *et al.* 2010). Τέλος, συγκεντρώσεις εντοπίστηκαν σε σαλιγκάρια και συγκεκριμένα, οι μεγαλύτερες ποσότητες των τοξινών βρέθηκαν στα εντόσθια τους και όχι στο πόδι. Τα σαλιγκάρια, όμως, καταναλώνονται από τον άνθρωπο, με ποικίλους τρόπους μαγειρέματος και έτσι οι τοξίνες μπορεί να περάσουν στον καταναλωτή τους (Ibelings & Chorus 2007).

1.5 Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας αποτελούν τα ακόλουθα: 1) η μελέτη της παρουσίας των μικροκυστινών στο υδάτινο οικοσύστημα της λίμνης Κάρλας και 2) η διερεύνηση των επιπτώσεων της παρουσίας των MCYST στο είδος *Cyprinus carpio*, εστιάζοντας στη μελέτη ιστοπαθολογικών ευρημάτων. Έτσι, από την παρούσα εργασία προσδοκάται να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα, όσον αφορά το ρόλο των MCYST στα υδάτινα οικοσυστήματα, αλλά την σύνδεση τους με ζητήματα δημόσιας υγείας. Ταυτόχρονα το οικοσύστημα της Κάρλας, ως ένα υπό καθίδρυση οικοσύστημα με μεγάλη κοινωνικοοικονομική σημασία, έχει συγκεντρώσει τα βλέμματα της επιστημονικής κοινότητας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ

2.1.1 Η ΛΙΜΝΗ ΚΑΡΛΑ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΠΟΞΗΡΑΝΣΗ

Η λίμνη Κάρλας ή Βοιβής ήταν ένας από τους σημαντικότερους υδροβιότοπους, τόσο της Ελλάδας, όσο και διεθνώς (Ζαλίδης 1995; Εξαρχόπουλος 1999; Ζαχίδου 2000; Ανώνυμος 2004). Εντοπίζεται στο νοτιοανατολικό άκρο της πεδιάδας της Λάρισας, με την μορφή κλειστής επιμήκους λεκάνης (μήκος 35 χλμ. και πλάτος 9 – 15 χλμ.) (Ζαλίδης 1995; Τζιάτζιος 2010). Η σπουδαιότητα της λίμνης διαφαίνεται από το πλήθος των βιβλιογραφικών αναφορών, οι οποίες τη συνδέουν με την μυθολογία αλλά και με την ιστορική εξέλιξη των Ελλήνων (Εξαρχόπουλος 1999; Ζαχίδου 2000), παρόλο που ελάχιστα είναι γνωστά για τη βιολογία της λίμνης. Επίσης πιστεύεται, ότι αν δεν είχε αποξηρανθεί, θα είχε ενταχθεί στον κατάλογο υδροτόπων διεθνούς σημασίας καθώς και στη συνθήκη Ραμσάρ. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι από τα 143 είδη πουλιών που είχαν καταγραφεί σε αυτήν, τα 55 από αυτά σήμερα ανήκουν στην κατηγορία «προστατευμένα» σύμφωνα με την οδηγία 79/409/ΕΟΚ (Ζαλίδης 1995).

Αναλυτικότερα, η λίμνη βρισκόταν στην πεδιάδα της Λάρισας και συνόρευε με τα ακόλουθα γεωγραφικά σημεία: στο βορρά με τον Πηνειό και τον ορεινό όγκο της Όσσας (Κίσσαβος), στο νότο με το Χαλκοδόσιο όρος και το Μεγαβούνι, ανατολικά με τους ορεινούς όγκους Μαυροβουνίου και Πηλίου και στη δύση με το Φυλλήϊον όρος (Λογάτζη) (Ζαλίδης 1995; Τζιάτζιος 2010). Διοικητικά το μεγαλύτερο τμήμα της ανήκει στο νομό Λαρίσης και το υπόλοιπο στο νομό Μαγνησίας (Ζαλίδης 1995;

Εξαρχόπουλος 1999). Η φυσική λεκάνη απορροής της λίμνης καταλάμβανε 1.663 Km² (συνολική έκταση), η οποία όμως τροποποιούνταν ανάλογα τις εισροές και τις εκροές κάθε χρονιάς (Πιν.1) (Τζιάτζιος 2010). Επιπλέον, σε περιόδους ανομβρίας κάλυπτε περίπου 45 Km², ενώ σε περιόδους έντονων βροχοπτώσεων περίπου 180 Km² (Εξαρχόπουλος 1999).

Πίνακας 1: Το μέγεθος της λεκάνης απορροής της λίμνης Κάρλας από το 1937 ως το 1952

Χρονολογική περίοδος	Λεκάνη απορροής (μέγεθος σε Km ²)
Πριν το 1937	Μεγαλύτερο από 1.672 Km ²
1937 – 1945	1.672 Km ²
1945 – 1949	1.334 Km ²
1949 – 1952	1.075 Km ²

Ο υγρότοπος της Κάρλας ήταν ένας από τους πέντε σπουδαιότερους υγροτόπους της Ευρώπης, ο οποίος φημιζόταν για τη σπουδαία βιοποικιλότητα του (ορνιθοπανίδα, τσακάλια, Λίγκες κ.α.), αλλά και για την ιχθυοπανίδα του (Εξαρχόπουλος 1999). Αναλυτικότερα στη λίμνη ζούσαν οι ακόλουθοι ιχθυοπληθυσμοί (Εξαρχόπουλος 1999; Τζιάτζιος 2010):

- ο Οικογένεια *Cyprinidae*:
 1. Κυπρίνος ή γριβάδι (τοπικά ζαζάνι), *Cypronus carpio* (L.)
 2. Τσιρόνι (τοπικά πλατίτσα ή ασπρίτσα), *Rutilus rutilus* (L.)
 3. Κοκκινόφτερο (τοπικά τσερνίτσα, караπλατιτσα κα.) *Scardinius erythrophthalmus* (L.)
 4. Σίρκο (τοπικά ούγλη ή πράσινη σαρδέλα), *Alburnus alburnus theassalicus, stephanidis* 1950
 5. Κέφαλος (τοπικά μουστακάτο ή σκαρούνι), *Barbus graecus, Karaman*
 6. Πεταλούδα, *Carassius carassius* (L.)

7. Σύρτης (τοπικά γουρουνομούτης, ασπρόψαρο, μπουρνόψαρο), *Chondrostoma nasus vardaresbe* ή *Squalius agassizi*

ο Οικογένεια *Gobiidae*:

1. Γοβιός, *Gobio gobio* (L.)

2. Ταινία, *Gobitis taenia* (L.)

ο Οικογένεια *Anguillidae*:

1. Χέλι *Anguilla Anguilla* (L.)

Πιστεύεται ότι σχεδόν 1.000 οικογένειες ζούσαν από την αλιεία, αφού το σύστημα εμφάνιζε παραγωγικότητα που άγγιζε τους 600 – 800 τόνους ετησίως (Ζαχίδου 2000). Εξαιτίας όμως των συχνών μεταβολών της στάθμης της λίμνης και των πλημμυρικών φαινομένων, που παρουσίαζε η περιοχή, δημιουργούνταν έλη με άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση των κρουσμάτων της ελονοσίας. Ταυτόχρονα, έντονη υπήρξε η ανάγκη για αύξηση των καλλιεργήσιμων εκτάσεων στην παρακείμενη περιοχή (Εξαρχόπουλος 1999). Έτσι αποφασίστηκε από την ελληνική κυβέρνηση, η αποξήρανση της λίμνης, με την παραμονή ενός ταμειυτήρα 64,7 km². Το έργο άρχισε να εκτελείται το 1962 και ολοκληρώθηκε με την ολική αποξήρανση τελικά της λίμνης το 1964 (Τζιάτζιος 2010), με ολέθριες συνέπειες για το οικοσύστημα της περιοχής (Ζαλίδης 1995; Εξαρχόπουλος 1999; Ζαχίδου 2000).

2.1.2 Αποξήρανση και οι επιπτώσεις της

Η αποξήρανση της λίμνης Κάρλας επιτεύχθηκε με τη δημιουργία μιας σήραγγας, η οποία διοχέτευε τα νερά της λίμνης στον Παγασητικό Κόλπο (Ζαλίδης 1995; Εξαρχόπουλος 1999). Η σήραγγα αυτή κατασκευάστηκε το διάστημα 1957 – 1960, είχε μήκος 10,5 Km και παροχετευτική ικανότητα 8,5 m³/sec (Ζαλίδης 1995), ύψος στομίου στα 38,23 m και κλίση 1,5% (Εξαρχόπουλος 1999). Αρχικά, ο σχεδιασμός

προϋπέθετε ότι θα παρέμενε ένας ταμιευτήρας, τελικά όμως η λίμνη αποξηράνθηκε εντελώς. Η ολική αποξήρανση προήλθε, ως αποτέλεσμα της πίεσης που δέχτηκε η τότε κυβέρνηση από μερίδα πολιτών, που επιθυμούσε να χρησιμοποιήσει τις πρώην εκτάσεις της λίμνης, σαν καλλιεργήσιμες εκτάσεις (Ανώνυμος 2004).

Οι εκτάσεις, όμως, της πρώην λίμνης δεν δόθηκαν σε ντόπιους πληθυσμούς αλλά σε πλούσιους γαιοκτήμονες, με άμεσο αποτέλεσμα οι ντόπιοι που εξαρτιόνταν από την λίμνη να οδηγηθούν σε μεταναστεύσεις. Επιπλέον, οι εκτάσεις που παραχωρήθηκαν δεν μπόρεσαν να αξιοποιηθούν τελικά γιατί η λίμνη είχε υφάλμυρα νερά και τα εδάφη της ήταν ακατάλληλα για καλλιέργεια. Έπειτα, η σήραγγα, εξαιτίας της μικρής αποχετευτικής της ικανότητας, δεν μπορούσε να παροχετεύσει μεγάλες ποσότητες νερού. Αποτέλεσμα αυτού ήταν πλημμυρικά φαινόμενα και τα νερά των πλημμυρών να κατακλύζουν τις νέες γεωργικές εκτάσεις. Το μόνο ίσως θετικό σημείο της αποξήρανσης ήταν ότι μειώθηκαν τα περιστατικά ελονοσίας που συνδέονταν με την περιοχή. Ωστόσο, ολέθριες ήταν οι επιπτώσεις στην πανίδα της περιοχής αλλά και στο οικοσύστημα γενικότερα (Εξαρχόπουλος 1999; Ανώνυμος 2004).

Όσον αφορά τους ιχθυοπληθυσμούς, η μείωση τους υπήρξε ραγδαία (Εξαρχόπουλος 1999; Ζαχίδου 2000) και μόνο λίγοι κυπρίνοι ανευρέθηκαν σε υδατοσυλλογές κυρίως κοντά στη σήραγγα το 1980, αλλά και αυτοί είχαν άσχημη οσμή. Ταυτόχρονα, πιέσεις δέχθηκαν τα ζώα που διαβιούσαν στη γύρω περιοχή και είχαν θέση στο τροφικό πλέγμα της λίμνης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, σε έρευνα το 1992 ανευρέθηκαν μόνο 70 είδη πτηνών (παρυδάτια, υδρόβια, αρπακτικά) στον υπό σύσταση υγρότοπο (Τζιάτζιος 2010). Ενώ ακολούθως, το 1997, παρατηρήθηκε φαινόμενο άνθισης φυτοπλαγκτού, στον Παγασητικό κόλπο, εξαιτίας της ποιότητας του νερού που δεχόταν από τη βιομηχανική περιοχή της Λάρισας

(Πηνειός) (Εξαρχόπουλος 1999). Η υποβάθμιση του οικοσυστήματος και οι τοπικές πιέσεις που δέχτηκαν οι κάτοικοι οδήγησε νωρίς (μόλις το 1982) στην απόφαση για την αποκατάσταση μέρους τουλάχιστον του υγροτόπου, ενώ το 1995 διαπιστώθηκε η ικανότητα αναβίωσης του βιότοπου (Τζιάτζιος 2010).

2.1.3 Ο υπό σύσταση ταμιευτήρας της πρώην λίμνης Κάρλας

Η υποβάθμιση του οικοσυστήματος καθώς και οι πιέσεις των τοπικών πληθυσμών οδήγησαν στην προσπάθεια αποκατάστασης του οικοσυστήματος. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν δύο αναχώματα κοντά στο χωριό Κανάλια, ένα στην ανατολική πλευρά και ένα στο δυτικό μέρος (Ζαλίδης 1995; Τζιάτζιος 2010). Τα αναχώματα αυτά εμφανίζουν συνολικό μήκος 13,5 Km (ανατολικό 2.660 m και δυτικό 10.840 m) (Ζαλίδης 1995). Σήμερα, ο ταμιευτήρας της πρώην λίμνης καταλαμβάνει έκταση 38km² (Τζιάτζιος 2010) και έχει μέγιστο βάθος τα 2 m. Επιπλέον, ο ταμιευτήρας δέχεται εισροές κυρίως από τον Πηνειό ποταμό αλλά και από τις βροχοπτώσεις, τις πηγές του Βελεστίνου και το Ασμάκι. Αντίθετα, το σύστημα εμφανίζει την εξάτμιση και την βαθιά διήθηση, ως κυριότερες εκροές του (Ζαχίδου 2000).

2.2 Μελετώμενος οργανισμός

Κυπρίνος ή γριβάδι (*Cyprinus carpio L.*)

Ο κυπρίνος (Εικ. 1 & Εικ. 2) είναι γνωστός και ως γριβάδι, ζαζάνι, γκοτζάρι και τσουκάνι, ενώ η ταξινομική κατάταξη του είναι η ακόλουθη:

Ομοταξία: *Osteichthyes*

Υφομοταξία: *Actinopterygii*

Τάξη: *Cyprinoformes*

Υπόταξη: *Cyprinoidei*

Οικογένεια: *Cyprinadea* (Φώτης Δ.Γ. & Αγγελίδης Γ.Π. 2003; Ανώνυμος 2011)



Εικόνα 1: Κυπρίνος 1^{ης}
δειγματοληψίας.
Προσωπικό
αρχείο



Εικόνα 2: Κυπρίνος 2^{ης}
δειγματοληψίας.
Προσωπικό
αρχείο

Ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) αρχικά εμφανιζόταν από την Ευρώπη ως και την Ασία, ενώ σήμερα διασπείρεται σε όλο τον κόσμο (Ανώνυμος 2011). Συγκεκριμένα πιστεύεται ότι προήλθε από τις θερμές περιοχές μεταξύ της Μαύρης Θάλασσας και της Ιαπωνίας, από όπου και εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο (Φώτης Δ.Γ. & Αγγελίδης Γ.Π. 2003). Σήμερα άγριοι πληθυσμοί πιστεύεται ότι υπάρχουν στους ποταμούς που εκβάλουν στη Μαύρη Θάλασσα και την Κασπία Θάλασσα, καθώς και στην λίμνη Αράλη. Αντίθετα το άγριο είδος που σήμερα συναντάται στο Δούναβη αναφέρεται ως το είδος από το οποίο προήλθε ο Ευρωπαϊκός κυπρίνος (Ανώνυμος 2011).

Η ευρεία διασπορά οφείλεται στην οικολογία του είδους. Αρχικά, στην εξάπλωση, καίριο ρόλο έπαιξαν οι μοναχοί, οι οποίοι τον εξέτρεφαν, από τον μεσαίωνα ακόμα, ενώ η εισαγωγή και εκτροφή του ξεκίνησε στην Τσεχοσλοβακία (Φώτης Δ.Γ. & Αγγελίδης Γ.Π. 2003). Έτσι ο κυπρίνος προσαρμόζεται σε γλυκά και

υφάλμυρα νερά (12 ‰), εμφανίζει μεγάλη παραγωγικότητα και προσαρμοστικότητα (ευρύαλο) στα διάφορα οικοσυστήματα. Ταυτόχρονα, αναπτύσσεται σε εύρη θερμοκρασιών και pH από 3°C ως 35°C και 7,0 – 7,5 αντίστοιχα (Ανώνυμος 2011). Ο κυπρίνος δεν είναι απαιτητικό ψάρι, ενώ χαρακτηρίζεται ως δειλό και νυκτόβιο είδος. Έτσι, προτιμάει λίμνες χαμηλών περιοχών και ποτάμια με έντονη βλάστηση (για προστασία και εύρεση τροφής), αν και το χειμώνα μετακινείται σε βαθύτερες περιοχές, όπου όταν η θερμοκρασία πέσει στους 3°C, πέφτει σε ένα είδος χειμέριας νάρκης. Γενικότερα, όμως, το ψάρι έχει τους 20 - 25°C ως τιμές της θερμοκρασίας ευζωίας του. Τέλος, το είδος αναπαράγεται τη χρονική περίοδο από τον Μάιο ως τον Ιούλιο, όταν η θερμοκρασία του νερού κυμαίνεται από 18 ως 20°C (Φώτης Δ.Γ. & Αγγελίδης Γ.Π. 2003).

Η μεγάλη εξάπλωση είχε ως συνέπεια να δημιουργηθούν διαφορετικά υποείδη αλλά ακόμα και ποικιλίες του ίδιου υποείδους. Στην Ελλάδα, εκτός από την ποικιλία του λεπιδωτού κυριαρχούν και οι ακόλουθες: 1) Ο καθρεπτοειδής: χαρακτηριστικό του γνώρισμα η σειρά από λέπια κατά μήκος της ράχης. 2) Ο γραμμωτός: χαρακτηριστικό του η σειρά από λέπια κατά μήκος της πλάγιας γραμμής (μπορεί να φέρει 2 ή και 3 σειρές). 3) Ο γυμνός: διακρίνεται από την απουσία των λεπιών. Παρόλη την ποικιλομορφία του, ο κυπρίνος είναι μεγαλόσωμος, με ωοειδές σχήμα και ο χρωματισμός του κυμαίνεται από συνδυασμό κίτρινου, γκρι, καφέ και γαλάζιου χρώματος. Η μεγάλη ποικιλία του χρωματισμού του οφείλεται σε παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η τροφή, η κληρονομικότητα κ.α. (Φώτης Δ.Γ. & Αγγελίδης Γ.Π. 2003).

Το ψάρι φέρει τα παρακάτω πτερύγια (μονά και διπλά): 1) δύο θωρακικά στην κάτω και πλάγια επιφάνεια του σώματος του, αμέσως πίσω από το βραγχιακό κάλυμμα, 2) δύο κοιλιακά, τα οποία εντοπίζονται μεταξύ των θωρακικών πτερυγίων

και της έδρας του ζώου και έχουν συχνά κοκκινωπό χρωματισμό, 3) το εδρικό, μονό πτερύγιο αμέσως πίσω από την έδρα, 4) το ουραίου στο πίσω άκρο του ψαριού, το οποίο είναι διχαλωτό και τέλος 5) το ραχιαίο, το οποίο αποτελείται από 16 – 22 ακτίνες με την πρώτη ευρύτερη και πριονωτή. Ωστόσο, το χαρακτηριστικό γνώρισμα του ψαριού είναι τα γένια τα οποία εντοπίζονται στο άνω χείλος του στόματος. Τα γένια αυτά είναι 4, τα 2 από αυτά είναι μεγαλύτερα από τα άλλα (Ανώνυμος 2011).

Τα θηλυκά γενούν 200.000 – 250.000 αυγά/κίλο σωματικού βάρους, τα οποία και εναποθέτουν σε ρηγά και υπήνεμα σημεία του οικοσυστήματος τους. Τα αυγά των κυπρίνων εμφανίζουν διάμετρο λίγο μεγαλύτερη του 1 mm, διαθέτουν μαργαριταρένια όψη, είναι διαφανή και κολλημένα πάνω σε υδρόβια φυτά. Αυτά εκκολάπτονται μετά από 5 – 6 ημέρες από την ημέρα ωοτοκίας τους και έχουν μήκος 5 – 6 mm, ενώ το στόμα τους παραμένει κλειστό σχεδόν ως την τρίτη ημέρα της ζωής τους. Τα αρσενικά ωριμάζουν μετά το τρίτο έτος της ηλικίας τους, ενώ τα θηλυκά μετά το τέταρτο ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν από την ημέρα εκκόλαψης τους και μετά (Φώτης Δ.Γ. & Αγγελίδης Γ.Π. 2003).

2.3 Μέθοδος δειγματοληψίας

2.3.1 Δειγματοληψία και ανάλυση MCYST σε δείγματα νερού

Οι μικροκυστίνες υπολογίστηκαν, στο υδάτινο περιβάλλον του λιμναίου οικοσυστήματος της λίμνης Κάρλας, με την βοήθεια της ενζυμοσυνδεδεμένης ανοσοπροσοροφητικής τεχνικής (ELISA) (Mathys 2004). Έτσι, συλλέχθηκαν δείγματα νερού από βάθος 20 – 30 cm κάτω από την επιφάνεια του νερού. Τα δείγματα νερού συλλέχθηκαν σε δοχεία πολυαιθυλενίου και μεταφέρθηκαν, εντός φορητού ψυγείου, στο εργαστήριο. Στο διαλυμένο νερό, το εξωκυτταρικό κλάσμα των MCYST

μελετήθηκε για τις ανάγκες της παρούσας ερευνητικής εργασίας (extracellular, dissolved in water Microcystins).

Αναλυτικότερα από κάθε δείγμα νερού, χρησιμοποιήθηκε όγκος νερού ίσος με 500 ml, ο οποίος διηθήθηκε υπό κενό (συσκευή διήθησης νερού KNF LAB) και διήλθε μέσω ηθμών Whatman GF / C (0.45 μm). Έπειτα, το διήθημα χρησιμοποιήθηκε απευθείας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των εξωκυττάρων MCYST στα δείγματα νερού, με τη βοήθεια της ELISA. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ABRAXIS – Microcystin ELISA kit (520011, USA) με σκοπό να υπολογιστεί η συγκέντρωση των MCYST με την ενζυμοσυνδεδεμένη ανοσοπροσροφητική τεχνική (Carmichael & An 1999).

Το παραπάνω σύστημα (ABRAXIS – Microcystin ELISA kit (520011, USA)) βασίζεται σε μια νέα τεχνική, η οποία αναπτύχθηκε από τους Fischer *et al.*, (2001). Στην πραγματικότητα πρόκειται για μια έμμεσα – ανταγωνιστική μέθοδο, η οποία χρησιμοποιεί ειδικά αντισώματα ικανά να αναγνωρίζουν ως επίτοπο (αντιγόνο) το αμινοξύ ADDA. Το συγκεκριμένο αμινοξύ αποτελεί μέρος του μορίου όλων των MCYST και των νοντουλαρινών και έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνο για την τοξική δράση των παραπάνω τοξινών (Carmichael & An 1999).

Σύμφωνα, με τη χρησιμοποιούμενη τεχνική, στα μικροπηγαδάκια τιτλοδότησης του ELISA kit βρίσκονται ακινητοποιημένα σύμπλοκα ADDA – πρωτεΐνης, τα οποία ανταγωνίζονται με τις MCYST των δειγμάτων για περιορισμένο αριθμό αντισωμάτων. Ειδικό φωτόμετρο (ELISA photometer Bio – Tek MWGAG) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της απορρόφησης, ενώ με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (KCjunior, Bio – Tek Instruments) και βάση της πρότυπης καμπύλης υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των MCYST. Τελικά τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μικρογραμμάρια ισοδύναμων μικροκυστίνης – LR ανά λίτρο.

2.3.2 Δειγματοληψία ιχθύων

Η αλιεία των κυπρίνων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διχτύων από ντόπιους αλιείς, μετά τη χορήγηση ειδικής άδειας και κάτω από την επίβλεψη του Φορέα Διαχείρισης Περιοχής Οικοανάπτυξης Κάρλας – Μαυροβουνίου – Κεφαλόβρυσου – Βελεστίνου. Η δειγματοληψία διενεργήθηκε σε δύο διαφορετικές περιόδους (20 Μαΐου και 13 Ιουνίου) από το ίδιο σημείο της λίμνης και από κάθε αλιευτική διαδικασία συλλέχτηκαν με τυχαίο τρόπο 15 οργανισμοί. Κατά την πρώτη δειγματοληψία (20 Μαΐου) πιάστηκαν 32 ψάρια (κυπρίνοι και πεταλούδες) μεταξύ των ωρών 8:00 – 10:00. Επίσης, στη διάρκεια της δεύτερης δειγματοληψίας (13 Ιουνίου) συλλέχτηκαν 45 κατά την διάρκεια των ίδιων ωρών.

Οι κυπρίνοι που συλλέχτηκαν, αφού τους δόθηκε ένας αριθμός από το 1 ως το 15, μεταφέρθηκαν άμεσα και νεκροτομήθηκαν. Κατά την διάρκεια της νεκροτομής καταγράφονταν οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις που έφεραν τα ψάρια, καθώς επίσης λαμβάνονταν φωτογραφίες και δείγματα ιστών. Οι ιστοί από τους οποίους πάρθηκαν δείγματα είναι οι ακόλουθοι: το ήπαρ, οι νεφροί, η καρδιά, ο μυϊκός ιστός και ο εγκέφαλος. Με την ολοκλήρωση της νεκροτομής του κάθε οργανισμού, συνεχής ήταν η μέριμνα για τον καθαρισμό των χρησιμοποιούμενων εργαλείων με τη χρήση αποσταγμένου νερού.

Ταυτόχρονα, λαμβάνονταν δείγματα στομαχικού περιεχομένου, τα οποία τοποθετούνταν σε πλαστικά φιαλίδια μαζί με 2 – 3 σταγόνες διαλύματος lugol. Το διάλυμα lugol χρησιμοποιήθηκε για να επιτευχθεί η χρώση των φυτοπλαγκτονικών οργανισμών, οι οποίοι περιέχονταν εντός του δείγματος. Εν συνεχεία, τα φιαλίδια τοποθετούνταν και συντηρούνταν κάτω από συνθήκες ψύξης (4°C). Δυστυχώς δεν κατορθώθηκε να ληφθεί δείγμα από όλα τα ψάρια, εξαιτίας του γεγονότος ότι

ορισμένοι κυπρίνοι κατά τη σύλληψη τους με δίχτυα, κάνουν εμετό, κάτι που οδηγούσε στο άδειασμα του στομαχικού περιεχομένου.

Τα δείγματα των ιστών, τα οποία θα εξετάζονταν με το οπτικό μικροσκόπιο, τοποθετούνταν μέσα σε δοχεία με διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα ουδέτερης φορμόλης είναι κατάλληλο για τη διατήρηση των ιστοτεμαχίων, αποφεύγοντας τις αυτολυτικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μετά τον θάνατο. Αντίθετα τα τεμάχια, τα οποία προορίζονταν για την ηλεκτρονική μικροσκοπία τοποθετούνταν σε γυάλινα φιαλίδια με διάλυμα γλουταραλδεύδης 2,5% και στη συνέχεια τοποθετούνταν σε θερμοκρασία ψύξης.

2.4 Νεκροτομή ιχθύων

Για τη λήψη των δειγμάτων, διενεργήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία, νεκροτομή καθενός οργανισμού ξεχωριστά. Έτσι, κατά τη διενέργεια της νεκροτομής, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- κυπρίνοι αριθμημένοι από το 1 ως το 15.
- αποστειρωμένο σετ χειρουργικών εργαλείων (νυστέρι, ανατομικό ψαλίδι και ανατομικές λαβίδες),
- αποσταγμένο νερό, για τον καθαρισμό των εργαλείων μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών που νεκροτομούνται,
- νερό βρύσης για το ξέπλυμα του τραπέζιου νεκροτομής

Αρχικά, κατά τη νεκροτομή, ανοιγόταν η κοιλιακή κοιλότητα του κάθε οργανισμού με τη βοήθεια του ανατομικού ψαλιδιού. Η τομή αυτή επιτυγχανόταν με την εισαγωγή του ψαλιδιού από την αμάρα του ψαριού και στη συνέχεια, κινούμενοι προς τα άνω και αριστερά, στο ύψος της σπονδυλικής στήλης. Εν συνεχεία, η τομή

επεκτεινόταν προς το κεφάλι και οπισθίως του πλάγιου πτερυγίου, κατευθύνονταν και πάλι προς την λευκή γραμμή³. Σκοπός ήταν να δημιουργηθεί έτσι, ένα αποσπώμενο τμήμα ιστού με τη βοήθεια του θώρακα και των πλευρών, το οποίο όμως εξακολουθούσε να είναι ενωμένο με το σώμα στην κάτω επιφάνεια. Συχνά βέβαια γινόταν τρώση της νηκτικής κύστης κατά την τομή αυτή. Έπειτα, το τμήμα του θώρακα ανασύρονταν προς τα κάτω και αποκαλύπτονταν τα εσωτερικά όργανα (Εικ. 3).



Εικόνα 3: Τεχνική διάνοιξης της σπλαχνικής κοιλότητας.

Με τον παραπάνω τρόπο διάνοιξης, επιτυγχανόταν ο έλεγχος της κοιλιακής κοιλότητας. Αναλυτικότερα ελέγχονταν η παρουσία ενδοκοιλιακού υγρού, καθώς και η ανατομική εικόνα και θέση των σπλάχνων. Εν συνεχεία, αφαιρούταν ο γαστρεντερικός σωλήνας του ψαριού, εξάγοντας το τμήμα του εντέρου από την περιοχή της αμάρας και κινούμενη κεφαλικά προς τον οισοφάγο, εντοπιζόταν το

³ Λευκή γραμμή: είναι το σημείο ένωσης των ετερόπλευρων μυών και του δέρματος στην κάτω κοιλιακή επιφάνεια. Το σημείο αυτό χαρακτηρίζεται από φτωχή αιμάτωση και κινείται παράλληλα με την σπονδυλική στήλη.

στομάχι. Στη φάση αυτή, λαμβανόταν δείγμα ήπατος, αφού το ήπαρ των ιχθύων κινείται ενδιάμεσα των εντερικών καμπών. Για τη λήψη του τεμαχίου, αποχωριζόταν με τη βοήθεια της λαβίδας ένα μεγάλο κομμάτι ήπατος, τοποθετούταν σε πλάκα κοπής και λαμβανόταν, με τη βοήθεια του νυστεριού, τεμάχιο ιστού από τη μεσότητα του αρχικού τεμαχίου. Με αυτόν τον τρόπο, μειώνονταν οι αλλοιώσεις που τυχόν δημιουργούνταν κατά την προσπάθεια λήψης του δείγματος.

Στη συνέχεια, δένονταν δύο σημεία, τα οποία εντοπίζονταν προσθίως και οπισθίως της καμπής του στομάχου. Το παραπάνω τμήμα αφαιρούταν από τον υπόλοιπο εντερικό αυλό και ακολούθως, ανοιγόταν η μια πλευρά και λαμβανόταν το περιεχόμενο, το οποίο και αποθηκευόταν σε πλαστικά σωληνάκια. Ακολούθως, εντοπίζονταν οι νεφροί και λαμβανόταν δείγμα από το μέσο τους, με σκοπό να μειωθούν οι αλλοιώσεις κατά τη δειγματοληψία. Συνήθως δε, τμήμα των νεφρών αποκολλούταν κατά τη διάνοιξη της κοιλιακής κοιλότητας και κρεμόταν πάνω στο αποσπώμενο τμήμα του θώρακα.

Εν συνεχεία, γινόταν αποκάλυψη της καρδιάς, η οποία αφαιρούταν μαζί με το περικάρδιο και κοβόταν τμήμα, το οποίο και περιείχε την κορυφή της καρδιάς, χωρίς το περικάρδιο. Έτσι, για να γίνει αποκάλυψη της καρδιάς, ανασηκωνόταν το βραγχιακό κάλυμμα και αφού πραγματοποιούταν τομή στο μέσο του πλάγιου πτερυγίου, εντοπίζονταν το τελευταίο βραγχιακό ζεύγος. Στην βάση του παραπάνω βραγχιακού ζεύγους, βρίσκεται η καρδιά των ιχθύων. Έπειτα, με τη βοήθεια του ψαλιδιού, κοβόταν ένα τετράγωνο τμήμα των θωρακικών μυών, και εν συνεχεία πάλι με το νυστέρι, λαμβανόταν μικρότερο δείγμα ιστού από το ενδιάμεσο τμήμα.

Τέλος, αποκαλυπτόταν ο εγκέφαλος του ψαριού και αφαιρούταν από την κρανιακή κοιλότητα. Στην πλάκα κοπής, λαμβανόταν τεμάχιο ολικού πάχους στο μέσο των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Η προσπέλαση του κρανίου γινόταν με τομή, η

οποία ξεκινούσε από το στόμα του ψαριού και πορεύονταν κατά μήκος της ρινικής κοιλότητας, με κατεύθυνση προς τη σπονδυλική στήλη. Στο ύψος των ματιών, η τομή διαχωρίζονταν σε δύο άλλες, οι οποίες και επεκτείνονταν, η μια προς τα δεξιά και η άλλη προς τα αριστερά. Οι δύο αυτές τομές ξαναενώνονταν στο ύψος που ξεκινούσε η σπονδυλική στήλη. Κατά αυτόν τον τρόπο, δημιουργούταν ένα αποσπώμενο κρανιακό τεμάχιο και αποκαλυπτόταν ο εγκέφαλος, χωρίς να αλλοιώνεται το εγκεφαλικό παρέγχυμα.

2.5 Εξέταση στομαχικού περιεχομένου

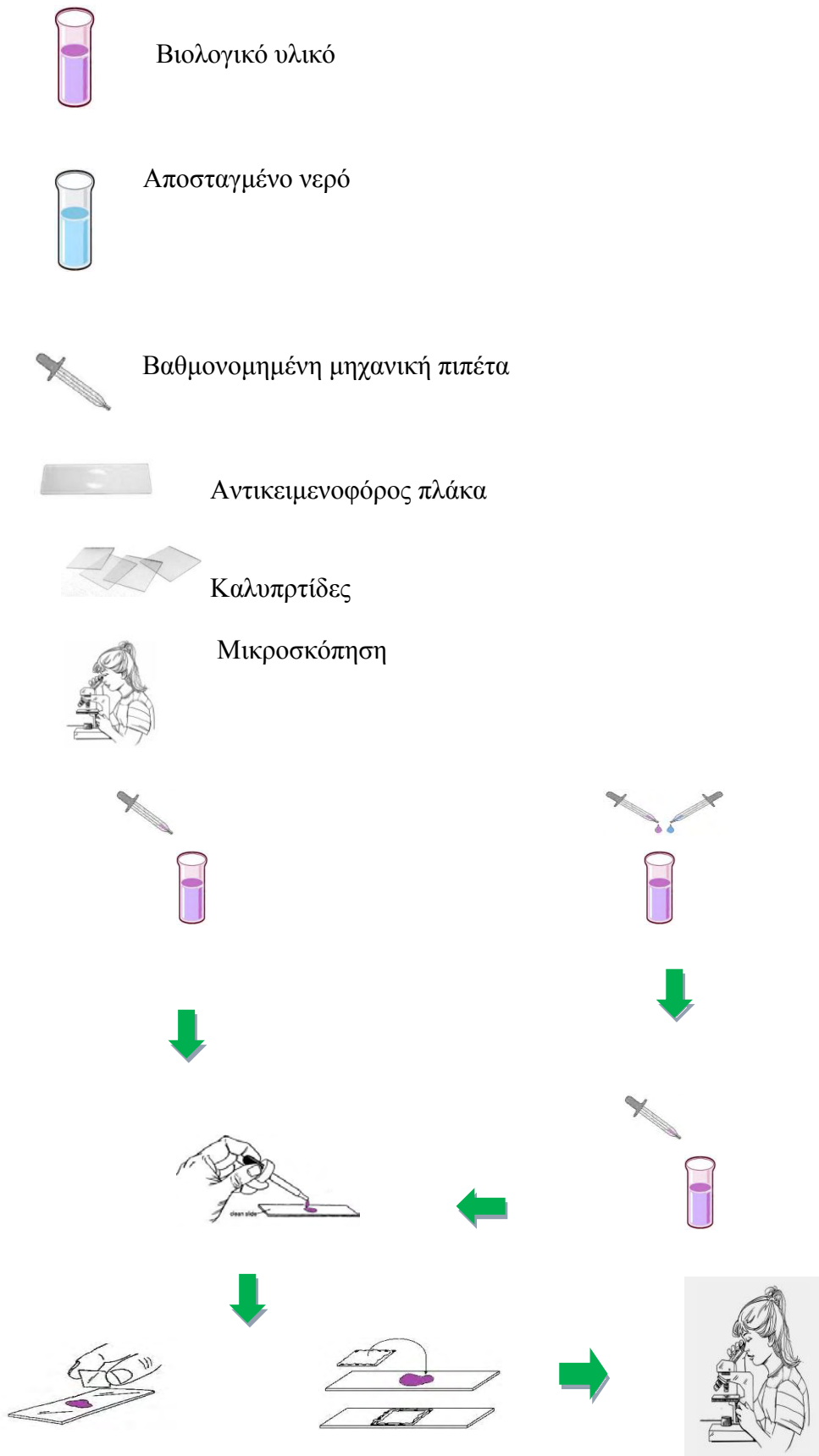
Η εξέταση του στομαχικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκε μέσω άμεσων επιχρισμάτων από τα δείγματα που είχαν ληφθεί. Μετά τη λήψη τους, τα δείγματα έμειναν μερικές ώρες σε συνθήκες ψύξης και έπειτα, παρασκευάστηκαν τα άμεσα επιχρίσματα από αυτά. Για την παρασκευή των επιχρισμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- αντικειμενοφόρες πλάκες (2,6cm x 7,6cm),
- καλυπτρίδες (1,8cm x 1,8cm),
- ηλεκτρονική μηχανική πιπέτα (λήψη 0,33ml),
- φρέσκο αποσταγμένο νερό,
- στομαχικό περιεχόμενο,
- γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.

Από κάθε δείγμα δημιουργήθηκαν δύο πεδία, από τα οποία στο πρώτο πεδίο τοποθετούταν ποσότητα δείγματος χωρίς να αραιωθεί, ενώ στο δεύτερο πεδίο το δείγμα αραιωνόταν με φρέσκο, αποσταγμένο νερό (Σχ. 1).

Αρχικά, λήφθηκε ποσότητα στομαχικού περιεχομένου ίση με 0,33 ml, με την βοήθεια ηλεκτρονικής πιπέτας και το δείγμα σκεπάστηκε με καλυπτρίδα, ώστε να

είναι έτοιμο για την μικροσκοπική παρατήρηση. Η καλυπτρίδα τοποθετούταν υπό γωνία (45°) πάνω στο δείγμα, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων αέρα. Στην ίδια αντικειμενοφόρο πλάκα και στο άλλο άκρο της τοποθετήθηκε και πάλι ποσότητα δείγματος 0,33 ml, αλλά αυτή τη φορά το δείγμα είχε προηγουμένως αραιωθεί. Κατά την παρασκευή, τώρα, του αραιωμένου δείγματος, μέσα σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνταν, με τη βοήθεια της πιπέτας, 0,33 ml από το στομαχικό περιεχόμενο και στην συνέχεια, το δείγμα αραιώνονταν με ίση ποσότητα φρέσκου, αποσταγμένου νερού. Έπειτα, το δείγμα αναμιγνύονταν και λαμβάνονταν ποσότητα 0,33 ml, η οποία και τοποθετούταν στο άλλο άκρο της αντικειμενοφόρου πλάκας και καλυπτόταν και πάλι με καλυπτρίδα. Ακολούθως, όλα τα επιχρίσματα εξετάστηκαν με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου, καταγράφηκαν τα αποτελέσματα και λήφθηκαν φωτογραφίες.



2.6 Ανάλυση MCYST σε δείγματα ιστών

Η συγκέντρωση των MCYST υπολογίστηκε στο ήπαρ, τους νεφρούς και τους μύες των συλλεγόμενων δειγμάτων. Κάθε ιστός, ο οποίος εξήχθει από τους ιχθύες, ζυγίστηκε και ομογενοποιήθηκε ξεχωριστά με τη βοήθεια ομογενοποιητή. Στη συνέχεια οι MCYST, που περιέχονταν στο ομογενοποιημένο υλικό των ιστών, εκχυλίστηκαν τρεις φορές με μεθανόλη 100% (Freitas de Magalhães *et al.* 2001). Το ελαιώδη μετά την ομογενοποίηση του, υπέστη κατεργασία με υπέρηχους (Vibra Cell Sonicator, Sonics and Material Inc.) για χρονικό διάστημα 15 λεπτών και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για το ίδιο χρονικό όριο στις 1300 rpm. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές και τελικά, το υπερκείμενο υλικό συλλέχθηκε και αποθηκεύθηκε στους 4 °C για 12 ώρες (Sipia *et al.* 2002).

Ακολούθως συλλέχθηκε ποσότητα ίση με 5 μl (περίπου) από το υπερκείμενο υλικό της προηγούμενης διαδικασίας και τοποθετήθηκε σε ρεύμα αζώτου προκειμένου να εξατμιστεί πλήρως η μεθανόλη. Έπειτα το προσυγκεντρωμένο δείγμα αρχικώς επαναδιαλύθηκε σε ελάχιστο όγκο μεθανόλης 100% και εν συνεχεία αραιώθηκε με αποσταγμένο νερό, έτσι ώστε να μειωθεί ο όγκος της μεθανόλης στο 2% περίπου. Τελικά, το δείγμα διηθήθηκε μέσω μεμβρανώδους ηθμού (μεγέθους πόρων: 0,45 μm, διάμετρος: 4 mm) και υποβλήθηκε στην τεχνική της ELISA. Η συγκέντρωση των MCYST εκφράστηκε ως νανογραμμάρια ισοδυνάμων μικροκυστίνης – LR / γραμμάριο ιστού.

2.7 Ιστοπαθολογική εξέταση ιστών

Η εξέταση των ιστοτεμάχια των οργάνων που λήφθηκαν είχε σαν στόχο την διαπίστωση αποκλίσεων της ιστολογικής τους εικόνας από την φυσιολογική

αρχιτεκτονική δομή των οργάνων αυτών. Η ιστολογική εξέταση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου (Axiostar Plus Carl Zeiss light Microscopy, Carl Zeiss Ltd, Göttingen, Germany), αρχικώς με τον προσοφθάλμιο φακό X10 και ακολούθως με τον X40. Οι αλλοιώσεις καταγράφηκαν με τη βοήθεια προσαρτώμενης κάμερας και αναλύθηκαν με το πρόγραμμα ProgRes Capture Pro (Version 2.1). Έπειτα, μετά την πιστοποίηση των αλλοιώσεων των ιστών (εγκέφαλος, καρδιά, ήπαρ νεφροί, μύες), θέλοντας να καταγραφούν και αλλοιώσεις σε κυτταρικό επίπεδο, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τύπου διελεύσεως (Philips CM10), ενώ και πάλι οι αλλοιώσεις καταγράφηκαν με την βοήθεια προσαρτώμενης κάμερας.

2.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων οπτικού μικροσκοπίου

Μετά τη νεκροτομή των ιχθύων και τη λήψη των ιστοτεμαχίων, ακολούθησε περαιτέρω προετοιμασία των δειγμάτων με σκοπό τον εγκλεισμό τους σε κύβους παραφίνης και τη λήψη των τελικών τομών πάχους 3 – 5 μm . Για τη δημιουργία των τομών αυτών ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων.
- Αφυδάτωση – καθαρισμός – διαύγαση
- Εγκλεισμός σε παραφίνη.
- Λήψη τελικών τομών πάχους 3 – 5 μm με τη βοήθεια μικροτόμου.
- Χρώση των τομών.

Μία μέρα μετά την αρχική δειγματοληψία τα δοχεία της παραφίνης ανοίχτηκαν και με τη βοήθεια νυστεριού και λαβίδας, λήφθηκαν τομές ιστοτεμαχίων πάχους 0,5 – 1 cm. Τα ιστοτεμάχια αυτά τοποθετήθηκαν σε ειδικές πλαστικές θήκες (“κασετίνες”), στις οποίες δόθηκε ένας κωδικός, με σκοπό τον προσδιορισμό των δειγμάτων. Οι κασετίνες κάθε πειραματικής διαδικασίας τοποθετήθηκαν σε γυάλινα

δοχεία με καπάκι, σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης (10%) και έλαβε χώρα η διαδικασία της μονιμοποίησης. Κατόπιν ακολουθήθηκε η αφυδάτωση των ιστών, ο καθαρισμός – η διαύγαση και τελικά η τοποθέτηση τους σε διάλυμα παραφίνης με το παρακάτω 15ώρο πρωτόκολλο της ιστοκινέτας:

- 1 ώρα σε 1^ο διάλυμα φορμόλης 10%.
- 2 ώρες σε 2^ο διάλυμα φορμόλης 10%.
- 30 λεπτά σε αποσταγμένο νερό.
- 1 και ½ της ώρας σε 1^ο διάλυμα αιθανόλης 96%.
- 1 ώρα σε 2^ο διάλυμα αιθανόλης 96%.
- 2 ώρες σε 3^ο διάλυμα αιθανόλης 96%.
- 1 και ½ της ώρας σε διάλυμα αιθανόλης 100%.
- 1 ώρα σε διάλυμα ακετόνης.
- 1 ώρα σε 1^ο διάλυμα ξυλόλης.
- 1 και ½ της ώρας σε 2^ο διάλυμα ξυλόλης.
- 1 ώρα σε 1^ο διάλυμα της παραφίνης.
- 2 ώρες σε 2^ο διάλυμα της παραφίνης.

Η ιστοκινέτα χρησιμοποιήθηκε σε δύο διαφορετικούς χρόνους, ενώ τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, ανάλογα με την ημερομηνία δειγματοληψίας τους. Τα δείγματα από τα ψάρια – μάρτυρες επεξεργάστηκαν μαζί με αυτά του πρώτου πειραματισμού. Έτσι, μετά την αρχική τοποθέτηση σε διάλυμα φορμόλης, προετοιμάστηκαν τα δοχεία της ιστοκινέτας και τοποθετήθηκαν στην ειδική θυρίδα, με σκοπό να αρχίσει η διαδικασία της σκήνωσης των ιστών. Έπειτα, η ιστοκινέτα ρυθμίστηκε με στόχο να επιτρέπει την παραμονή των δειγμάτων σε κάθε δοχείο, σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο. Ταυτόχρονα, το μηχάνημα είχε την δυνατότητα να ανακινεί τη θυρίδα με τα δείγματα μέσα σε κάθε κυτίο ανά

διαστήματα, ώστε το κάθε διάλυμα να προσεγγίζει όλες τις κασετίνες με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Με το πέρας του πρωτοκόλλου της ιστοκινέτας, τα δείγματα μεταφέρονταν μέσα σε κυτίο με λιωμένη παραφίνη θερμοκρασίας 60°C, το οποίο τοποθετούνταν μέσα σε φούρνο, ώστε να διατηρηθεί η παραφίνη υγρή. Έπειτα ανοίγονταν με σειρά οι κασετίνες και το κάθε ιστοτεμάχιο τοποθετούνταν σε ειδικές μήτρες (καλούπια) και καλυπτόταν με λιωμένη παραφίνη. Η διαδικασία πραγματοποιούνταν πάνω σε θερμαινόμενη μεταλλική πλάκα (40°C), με στόχο να διατηρείται η υγρή μορφή της παραφίνης και έτσι, παρασκευαζόταν το κάθε καλούπι (παραφίνη – ιστούς). Στη συνέχεια, τα καλούπια τοποθετούνταν μέσα σε κατάψυξη (- 12°C), ώστε να στερεοποιηθεί η παραφίνη και να καταστεί δυνατό το ξεφορμάρισμα των παραφινωμένων ιστών.

Ακολούθως, κάθε καλούπι (παραφίνη με τον ιστό) τοποθετούνταν στη μικροτόμο, ο οποίος ρυθμιζόταν, αρχικώς, να κόβει παχύτερα κομμάτια, με στόχο να αφαιρεθεί το επιφανειακό στρώμα παραφίνης και να αποκαλυφθεί τμήμα του μελετώμενου ιστού. Έπειτα, ο μικροτόμος ρυθμιζόταν να κόβει στα 3 – 5 μm, ενώ δίπλα από το μικροτόμο υπήρχε υδατόλουτρο 40°C, όπου και τοποθετούνταν τα τεμάχια του ιστού. Με τη διαδικασία αυτή, απλώνονταν το ιστοτεμάχιο και μειώνονταν οι αναδιπλώσεις του ιστού, ενώ οι τομές επέπλεαν πάνω στο νερό. Εν συνεχεία, μέσα στο υδατόλουτρο βυθιζόταν η αντικειμενοφόρος πλάκα και ανασυρόταν υπό γωνία ώστε μια σειρά από ιστοτεμάχια (4 – 8) να κολλήσουν στην επιφάνεια της. Ακολούθως, οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνταν πάνω σε μεταλλική θερμαινόμενη πλάκα (40°C) για 8 - 11 ώρες (over night), ώστε να επιτελεστεί η αποπαραφίνωση των ιστοτεμαχίων και να είναι έτοιμα προς χρώση.

Ιδιαίτερη προσοχή δίνονταν κατά τη διαδικασία της αποπαραφίνωσης, ώστε να μην καταστραφεί το ιστοτεμάχιο. Επομένως, η επιφάνεια που έφερε το ιστοτεμάχιο τοποθετούνταν, έτσι, ώστε να βρίσκεται από την πλευρά του αέρα, σε σχέση με την επιφάνεια επαφής. Εν συνεχεία, επιτελούνταν η χρώση των δειγμάτων με στόχο να μπορούν να απεικονιστούν τα ιστοτεμάχια με τη βοήθεια του οπτικού μικροσκοπίου. Η χρώση αιματοξυλίνης – εωσίνης είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη για τη βαφή ιστοτεμαχίων και είναι αυτή που ακολουθήθηκε στην προκείμενη ερευνητική διαδικασία. Η χρώση των ιστοτεμαχίων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- 1^η εμβάπτιση για 3 λεπτά σε διάλυμα ξυλόλης.
- 2^η εμβάπτιση για 3 λεπτά σε διάλυμα ξυλόλης.
- 1^η εμβάπτιση για 2 λεπτά σε διάλυμα αλκοόλης 100%.
- 2^η εμβάπτιση για 2 λεπτά σε διάλυμα αλκοόλης 100%.
- 1^η εμβάπτιση για 1 λεπτά σε διάλυμα αλκοόλης 96%.
- 2^η εμβάπτιση για 1 λεπτά σε διάλυμα αλκοόλης 96%.
- Εμβάπτιση για 1 λεπτά σε διάλυμα αλκοόλης 70%.
- Ξέπλυμα με εμβάπτιση σε νερό βρύσης για 1 λεπτό.
- Εμβάπτιση για 5 – 15 λεπτά σε διάλυμα αιματοξυλίνης.
- Ξέπλυμα για 5 λεπτά σε τρεχούμενο νερό.
- 1 – 3 εμβαπτίσεις σε διάλυμα οξικής αλκοόλης.
- Εμβάπτιση για 5 λεπτά σε νερό.
- Εμβάπτιση για 5 λεπτά σε διάλυμα εωσίνης.
- 1 – 2 εμβαπτίσεις σε νερό.
- 1 – 2 εμβαπτίσεις σε αλκοόλη 70%.
- 1 – 2 εμβαπτίσεις σε αλκοόλη 96% (1^ο διάλυμα).

- 1 – 2 εμβάπτισεις σε αλκοόλη 96% (2^ο διάλυμα).
- 1^η εμβάπτιση για 2 λεπτά σε διάλυμα αλκοόλης 100%.
- 2^η εμβάπτιση για 2 λεπτά σε διάλυμα αλκοόλης 100%.
- 1^η εμβάπτιση για 2 λεπτά σε διάλυμα ξυλόλης.
- 2^η εμβάπτιση για 2 λεπτά σε διάλυμα ξυλόλης.

2.7.2 Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διελεύσεως

Επόμενο βήμα, ήταν η προετοιμασία των δειγμάτων του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Μονιμοποίηση.
- Αφυδάτωση.
- Ενσωμάτωση σε ρητίνη.
- Τομή των δειγμάτων.
- Χρώση των δειγμάτων.

Τα δείγματα, μετά την αρχική λήψη τους, αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα 2,5% γλουταλδεΰδης σε 0,1 M κακοδυλικό νάτριο pH 7,4 μέσα σε ψυγείο (4°C). Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχανόταν η μονιμοποίηση τους. Εν συνεχεία, επεξεργάστηκαν με σκοπό να ληφθούν τα κατάλληλα σε μέγεθος ιστοτεμάχια (0,05 – 0,1 cm). Έπειτα, τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε γυάλινα δοχεία, τα οποία περιείχαν διάλυμα 1% τετροξειδίου του οσμίου σε 0,1 M κακοδυλικό νάτριο pH 7.4 και παρέμειναν σε συνθήκες ψύξης για 2 ώρες. Ακολούθως, μεταφέρθηκαν κάτω από απορροφητήρα και συνεχίστηκε η επεξεργασία τους με σκοπό την αφυδάτωση τους. Έτσι, πρώτο βήμα ήταν αυτά να ξεπλυθούν με αποσταγμένο νερό σε δύο χρόνους. Κάθε φορά τα ιστοτεμάχια παρέμειναν μέσα στο αποσταγμένο νερό για 5 λεπτά της ώρας και ακολούθησε η διαδικασία αφυδάτωσης τους.

Η αφυδάτωση των ιστοτεμαχίων πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση των δειγμάτων σε διαφορετικής πυκνότητας διαλύματα αλκοόλης σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά, τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αλκοόλης 50% για 10 λεπτά της ώρας και η διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά δύο φορές. Ακολούθως, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αλκοόλης 70% και πάλι σε δύο διαφορετικά διαλύματα, ενώ σε κάθε διάλυμα παρέμειναν και πάλι για 10 λεπτά της ώρας. Η ίδια διαδικασία συνεχίστηκε σε διαλύματα αλκοόλης πυκνότητας 90% και 100%, με τη διαφορά, ότι αυτή τη φορά τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν στο κάθε διάλυμα (4 διαλύματα) για 15 λεπτά της ώρας. Επόμενο βήμα, ήταν η προετοιμασία των δειγμάτων για την ενσωμάτωσή τους σε ρητίνη.

Μετά την αφυδάτωση των δειγμάτων, αυτά τοποθετούνταν σε διάλυμα οξειδίου του προπυλενίου σε δύο διαδοχικούς χρόνους των 15 λεπτών της ώρας. Τελικά, τοποθετούνταν σε διάλυμα οξειδίου του προπυλενίου και ρητίνης σε αναλογία 1:1 και παρέμεναν στο διάλυμα αυτό για 24 ώρες. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιούνταν σε συνθήκες δωματίου και τα ιστοτεμάχια βρίσκονταν εντός ανοιχτών γυάλινων φιαλιδίων. Το επόμενο πρωί, προετοιμαζόταν φρέσκια ρητίνη, στην οποία θα ενσωματωνόταν κάθε ιστοτεμάχιο. Η ενσωμάτωση σε ρητίνη πραγματοποιούνταν εντός κυτίων από καουτσούκ γεγονός που διευκόλυνε, στο τελικό στάδιο, την αφαίρεση των δειγμάτων από αυτά. Έτσι, αναλυτικότερα, στα βοηθία τοποθετούνταν στο ένα άκρο το ιστοτεμάχιο, ενώ στο βάθος κάθε βοηθίου εισάγονταν τεμάχιο χαρτιού με τον κωδικό του δείγματος. Έπειτα, με τη βοήθεια πιπέτας τοποθετούνταν σε κάθε κυτίο ποσότητα ρητίνης τέτοια, ώστε να δημιουργείται ένας λοφίσκος προς την άνω επιφάνεια (επιφάνεια επαφής με αέρα).

Τα βοηθία παρέμεναν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 – 30 λεπτά της ώρας, ώστε να ανεβούν στην επιφάνεια οι φυσαλίδες παγιδευμένου αέρα. Ακολούθως, με τη

βοήθεια μεταλλικής βελόνας (20G), απομακρύνονταν οι φυσαλίδες από τη ρητίνη, ενέργεια απαραίτητη για την αποφυγή προβλημάτων κατά την κοπή των τεμαχίων. Έπειτα, πραγματοποιούνταν ο πολυμερισμός της ρητίνης και η μετατροπή της σε στερεό υλικό κατάλληλο για κοπή. Για τον πολυμερισμό της, τα κυττάρια τοποθετούνταν σε φούρνο για 48 ώρες, του οποίου η θερμοκρασία ρυθμιζόταν στους 60°C. Μετά την παρέλευση του χρόνου πολυμερισμού πραγματοποιούνταν η απομάκρυνση των δειγμάτων από τα κυττάρια καουτσούκ στα οποία και βρίσκονταν. Τέλος, τα δείγματα προετοιμάζονταν για την κοπή τους με τη βοήθεια υπερμικροτόμου.

Η κοπή των δειγμάτων πραγματοποιούνταν, αφού πρώτα, αφαιρούνταν η εξωτερική στρώση ρητίνης με στόχο να προσεγγιστεί το ιστοτεμάχιο. Έπειτα, τοποθετούνταν τα δείγματα στον υπερμικροτόμο και πραγματοποιούνταν οι τομές, μεγέθους της τάξεως των 60 – 90 nm. Οι τομές, κατά την λήψη τους, έχουν χρώμα γκρι ή χρυσίζον και επιπλέουν σε υδατόλουτρο, από όπου και τοποθετούνταν πάνω στα grids⁴. Έτσι, για να τοποθετηθούν οι τομές πάνω στα grids, με τη βοήθεια λαβίδας, βυθιζόταν αυτά υπό γωνία και ανασύρονταν με τέτοιο τρόπο ώστε να μείνει πάνω στην επιφάνεια τους το τεμάχιο. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, από κάθε δείγμα λήφθηκαν 3 τομές. Έπειτα, τα grids τοποθετούνταν πάνω σε διηθητικό χαρτί με την επιφάνεια που φέρει το βιολογικό υπόστρωμα προς τα πάνω. Εν συνεχεία, αφού στεγνώσουν τα grids, πραγματοποιείται η χρώση των τομών, με τη βοήθεια βαρέων μετάλλων.

Η χρώση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση δύο διαφορετικών υδατικών διαλυμάτων βαρέων μετάλλων, ενός διαλύματος οξικού ουρανυλίου ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 - 2\text{H}_2\text{O}$) και ενός κιτρικού μολύβδου ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_{14}\text{Pb}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Αναλυτικότερα, πάνω σε ένα κομμάτι οδοντιατρικού κεριού τοποθετείται, αρχικά, μια σταγόνα οξικού

⁴ Grid: ονομάζονται τα πλέγματα διαμέτρου 3 mm, κατασκευασμένα από χαλκό, νικέλιο, χρυσό ή άνθρακα, πάνω στα οποία τοποθετούνται τα δείγματα που προορίζονται για απεικονιστική μελέτη με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

ουρανυλίου (uranyl acetate) και πάνω σε αυτήν τοποθετείται το grid για 15 λεπτά της ώρας. Το grid πρέπει να τοποθετηθεί με την επιφάνεια που φέρει τον ιστό να εφάπτεται στη σταγόνα της χρωστικής ουσίας (δηλαδή στραμμένο προς τα κάτω). Ακολούθως, ανασύρουμε το grid και το ξεπλένουμε με μικρές σταγόνες αποσταγμένου νερού. Έπειτα, η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται (σε διαφορετικό σημείο) για το διάλυμα του κιτρικού μολύβδου, μόνο που, αυτή τη φορά, το grid παρέμενε για 5 λεπτά της ώρας και εν συνεχεία ξεπλενόταν ομοίως με παραπάνω.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

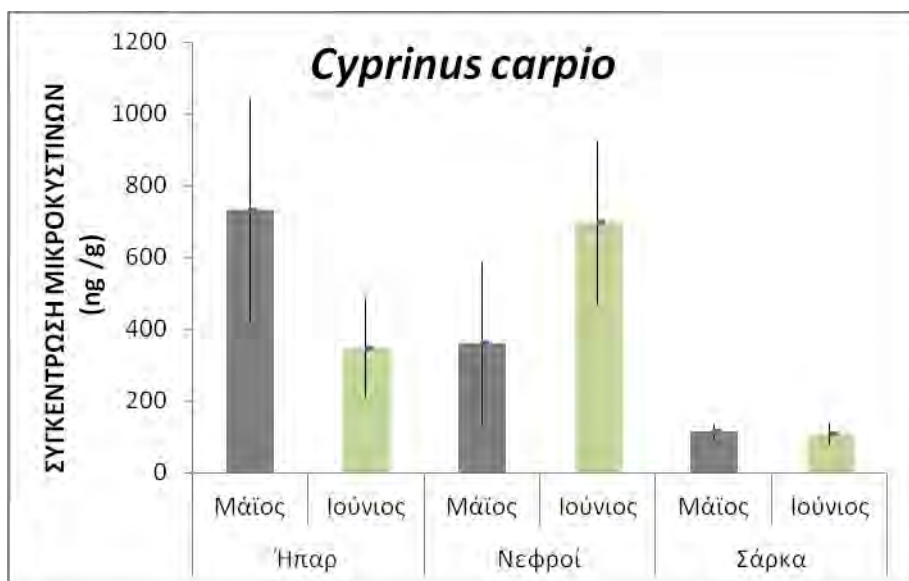
3.1 Συγκέντρωση MCYST

Στην παρούσα ερευνητική προσπάθεια η παρουσία των MCYST αποδείχτηκε, τόσο στο λιμναίο οικοσύστημα, όσο και στους διάφορους ιστούς (ήπαρ, νεφροί και μύες) και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους με την τεχνική της ανοσοπροσοροφητικής ανάλυση στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (ELISA). Έτσι, σύμφωνα με την παραπάνω τεχνική, αποδείχτηκε ότι μεταξύ των δύο δειγματοληψιών, υπήρξε αύξηση της συγκέντρωσης των MCYST, τόσο μέσα στο νερό, όσο και στην παρουσία του scum σχεδόν κατά 1 µg/l. Επίσης, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των MCYST στο ήπαρ, στους νεφρούς και στους μύες των μελετώμενων βιολογικών οργανισμών (Σχ. 2).

Τα παραπάνω όργανα επιλέχτηκαν γιατί, από τη μια, το ήπαρ και οι νεφροί είναι όργανα που παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση και στην απέκκριση των διάφορων ουσιών από τους ζωντανούς οργανισμούς. Αντίθετα, από την άλλη, οι μυς των ιχθύων είναι το κυρίως εδώδιμο μέρος των ψαριών, που ο άνθρωπος καταναλώνει. Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα κατέδειξαν την αύξηση των MCYST στο περιβάλλον των ιχθύων, αφού οι MCYST στο νερό αυξήθηκαν και από 2,03 µg/l, έφτασαν στα μέσα του Ιουνίου τα 3,01 µg/l. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για το ποσοστό MCYST στο scum, το οποίο, από 4,19 µg/l το Μάιο, έφτασε τα 5,5 µg/l στην δειγματοληψία του Ιουνίου.

Επιπλέον, μεταβολές παρατηρήθηκαν στη συγκέντρωση των MCYST στο ήπαρ και στους νεφρούς μεταξύ των δυο δειγματοληψιών, ενώ σχεδόν σταθερή παρουσιάστηκε η συγκέντρωση των τοξινών στους μύες. Αναλυτικότερα, το Μάιο, η

συγκέντρωση των MCYST προσέγγισε στο ήπαρ τα 713,7 ng/g, στους νεφρούς τα 362,4 ng/g και στους μύες τα 113,78 ng/g. Αντίθετα, στη δειγματοληψία του Ιουνίου, το ποσοστό αυτών ήταν στο ήπαρ 346,15 ng/g, στους νεφρούς 678,68 ng/g και στους μύες 108,41 ng/g.



Σχήμα 2: Η συγκέντρωση των MCYST (ng/g) στο ήπαρ, στους νεφρούς και στους μύες κατά τη διάρκεια του πειραματισμού.

3.2 Εξέταση στομαχικού περιεχομένου

Κατά την εξέταση του στομαχικού περιεχομένου πιστοποιήθηκε ότι τα κυανοβακτηρία αποτελούσαν διατροφικό είδος του κυπρίνου το διάστημα που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Αναλυτικότερα, βρέθηκαν στο 100% των δειγμάτων διαφορετικά είδη κυανοβακτηρίων, με επικράτηση των *Microcystis aeruginosa* και *Planktothrix agarrdii* σύμφωνα με την απεικονιστική μελέτη (Εικ. 4, Εικ. 5 & Εικ. 6). Τα κυανοβακτήρια ήταν πιο εύκολο να διακριθούν στο αραιωμένο

τμήμα του επιχρίσματος, γεγονός που επεξηγείται από τον μεγάλο πληθυσμό που παρουσίαζαν αυτά εντός του αρχικού δείγματος.

Αντίθετα, στο μη αραιωμένο τμήμα ήταν δύσκολο να διακριθούν οι διάφοροι πλαγκτονικοί οργανισμοί εξαιτίας του μεγάλου ποσοστού διατροφικών ειδών που υπήρχαν σε αυτό (Εικ. 7 & Εικ. 8). Αυτό δείχνει, ίσως, ότι πολλά ίδια κύτταρα συνυπρόβαλλαν και έτσι, ήταν δύσκολο να καθοριστεί με σαφήνεια η εικόνα.



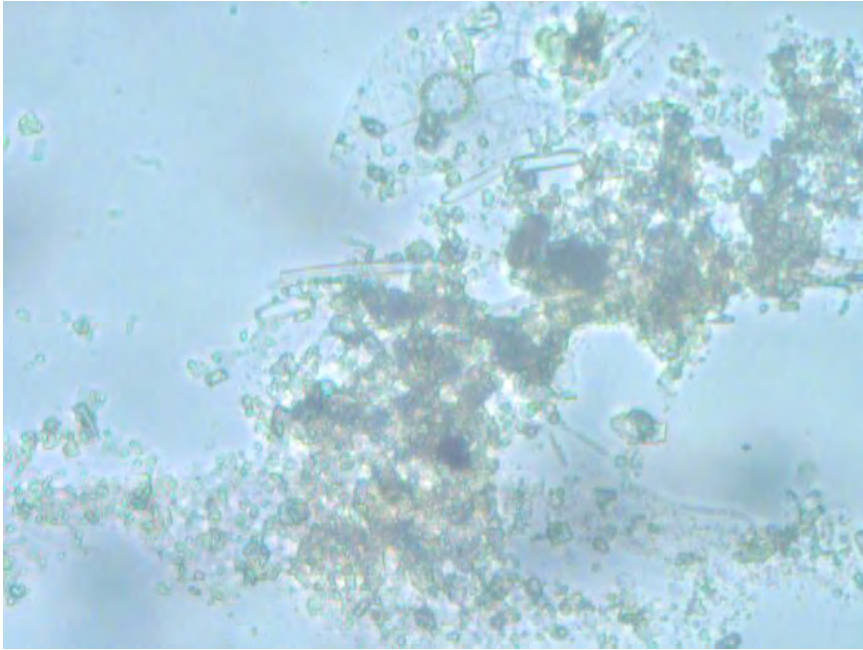
Εικόνα 4: Άμεσο επίχρισμα στομαχικού περιεχομένου, στο οποίο διακρίνονται κύτταρα *Microcystis aeruginosa* (κύκλος) & νήματα *Planktothrix agardhii* (βέλος) X40.



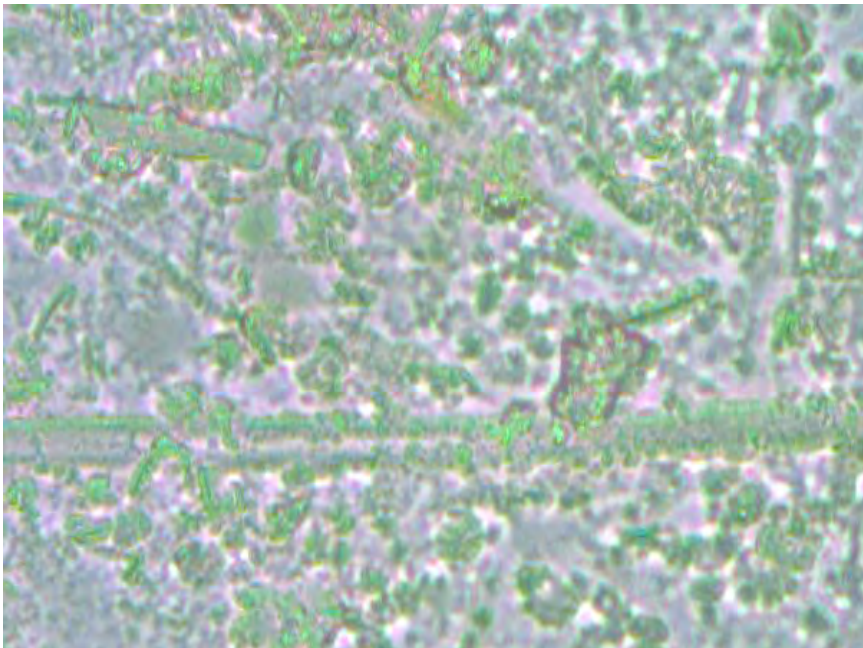
Εικόνα 5: Άμεσο επίχρισμα αραιωμένου στομαχικού περιεχομένου, στο οποίο αναγνωρίζετε συγκέντρωση κυττάρων της *Microcystis aeruginosa* (βέλος) X40.



Εικόνα 6: Άμεσο επίχρισμα αραιωμένου στομαχικού περιεχομένου, στο οποίο αναγνωρίζετε κύτταρο της *Planktothrix agardhii* (βέλος) X40.



Εικόνα 7: Άμεσο επίχρισμα στομαχικού περιεχομένου, στο οποίο διακρίνεται συνωστισμός φυτοπλαγκτονικών οργανισμών X40.



Εικόνα 8: Άμεσο επίχρισμα μη αραιωμένου στομαχικού περιεχομένου – μη διαγνωστική εικόνα X40.

3.3 Μακροσκοπικές αλλοιώσεις

Κατά την πρώτη δειγματοληπτική διαδικασία εξετάστηκαν 15 οργανισμοί, εκ των οποίων μόνο ο ένας είχε μια εξωτερική αλλοίωση στο αριστερό μέρος της κεφαλής και κοντά στη γωνία του στόματος (Εικ. 9). Μετά από τη διάνοιξη και την επιπλέον εξέτασή του πιστοποιήθηκε η ύπαρξη κύστης, πιθανότατα παρασιτικής αιτιολογίας. Οι λοιποί οργανισμοί, εξωτερικά, ήταν φυσιολογικοί (Εικ. 10), αν και μετά την αποκάλυψη της σπλαχνικής κοιλότητας, τα αποτελέσματα διέφεραν μεταξύ τους. Έντονου βαθμού αλλοιώσεις εμφάνιζαν το ήπαρ και οι νεφροί, ενώ δεν αναγνωρίζονταν παθολογικές μακροσκοπικές αλλοιώσεις στα υπόλοιπα όργανα εξέτασης (έντερο, καρδιά κ.α.).



Εικόνα 9: Ψάρι της 1^{ης} δειγματοληψίας που φέρει αλλοίωση στην κάτω γωνία του στόματος (βέλος).

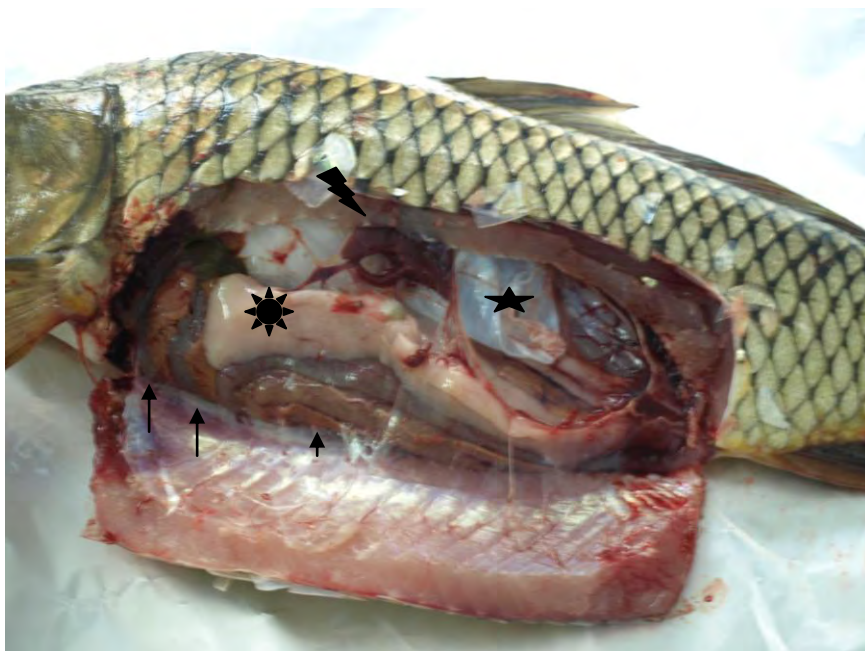


Εικόνα 10: Φυσιολογική εικόνα ψαριού.

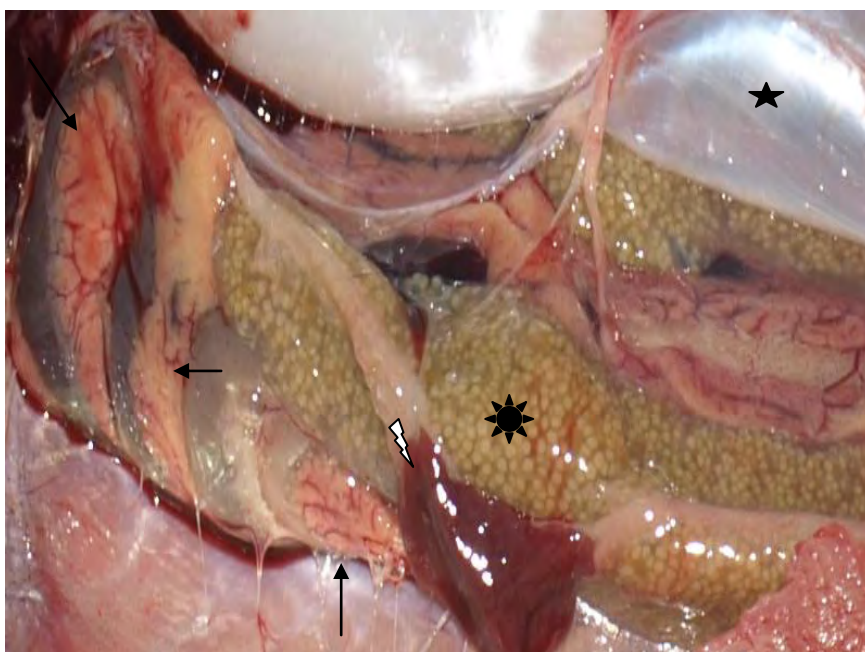
Αναλυτικότερα, το σύνολο των ιχθύων εμφάνιζε ήπαρ αποχρωματισμένο, εύθρυπτο και ατροφικό (Εικ. 11). Επίσης, παρατηρήθηκαν, πετέχειες⁵, εκχυμώσεις⁶ ή/και μικροαιμορραγίες (Εικ. 12 & Εικ. 13). Αντίθετα, οι νεφροί εμφανίζονταν εύθρυπτοι με φυσιολογικό χρωματισμό (Εικ. 14). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε έναν από τους οργανισμούς ήταν αδύνατο να ληφθεί δείγμα ιστού. Αυτό γιατί σε κάθε προσπάθεια λήψης του ιστού, αυτός διαλύονταν, εξαιτίας πιθανότατα, του έντονου βαθμού αλλοιώσεων που εμφάνιζε. Ωστόσο οι λοιποί ιστοί δεν εμφάνιζαν καμία απόκλιση σε σχέση με την φυσιολογική εικόνα τους.

⁵ Πετέχεια: αιμορραγική κηλίδα του δέρματος ή των βλεννογόνων μικρού μεγέθους

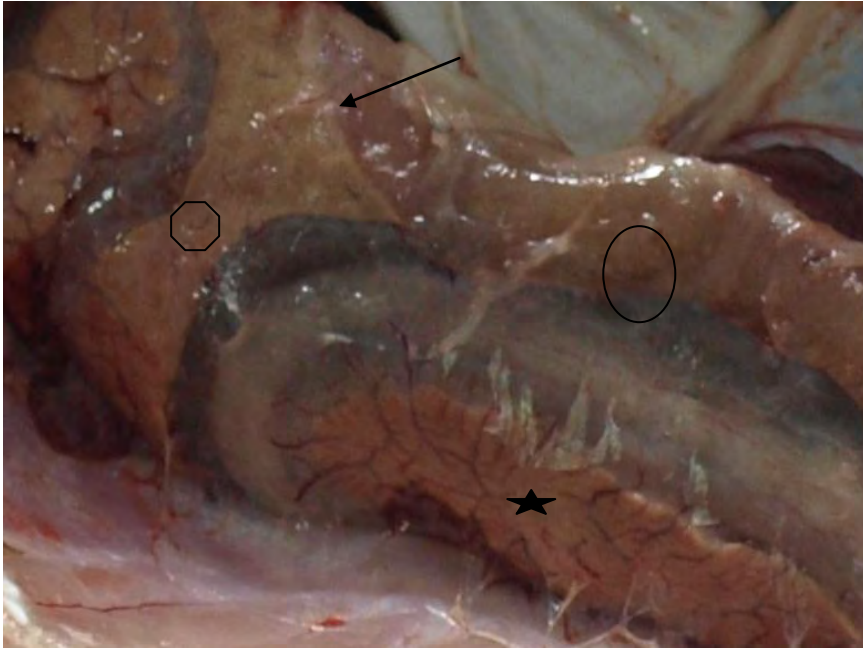
⁶ Εκχύμωση: αιμορραγική κηλίδα του δέρματος ή των βλεννογόνων μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με την πετέχεια.



Εικόνα 11: Εικόνα νεκροτομημένου ιχθύος, στην οποία διακρίνεται το ήπαρ (βέλη) έντονα αποχρωματισμένο και ατροφικό, οι όρχεις (ήλιος), η νηκτική κύστη (αστερίσκος) και μέρος του νεφρού (κεραυνός)



Εικόνα 12: Εικόνα σπλαχνικής κοιλότητας, στην οποία διακρίνεται το ήπαρ (βέλη) αποχρωματισμένο και με αιμορραγίες, εκχυμώσεις και πετέχειες, οι γονάδες (ήλιος), η νηκτική κύστη (αστερίσκος), κομμάτι νεφρού (κεραυνός) το οποίο αποσπάστηκε κατά την νεκροτομή.

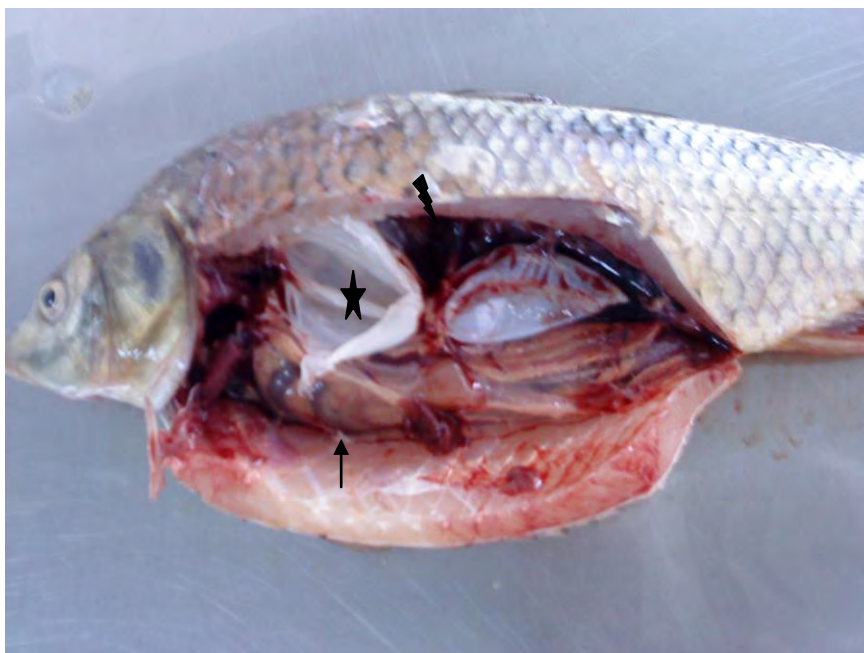


Εικόνα 13: Εικόνα σπλαχνικής κοιλότητας, στην οποία διακρίνεται το ήπαρ το οποίο είναι έντονα αποχρωματισμένο (βέλος), με μικροαιμορραγίες (αστερίσκος), εκχύμωση (εντός του κύκλου), πετέχεια (εντός του οκταγώνου)



Εικόνα 14: Εικόνα σπλαχνικής κοιλότητας στην οποία διακρίνεται τμήμα του νεφρού (βέλος).

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα από τη δεύτερη δειγματοληπτική διαδικασία, με τη διαφορά ότι εδώ όλοι οι οργανισμοί παρουσίαζαν φυσιολογική εξωτερική εμφάνιση. Αντίθετα, οι αλλοιώσεις των σπλάχνων και πάλι αφορούσαν μόνο το ήπαρ και τους νεφρούς. Πιο συγκεκριμένα, το ήπαρ και οι νεφροί, εμφάνιζαν παρόμοιες αλλοιώσεις με αυτά της 1^{ης} δειγματοληψίας (Εικ. 15 & Εικ.16), ενώ και πάλι δεν υπήρξαν παρεκκλίσεις της μακροσκοπικής εικόνας των λοιπών υπό εξέταση ιστών. Αντίθετα, στα ψάρια μάρτυρες δεν παρατηρήθηκε καμιά μεταβολή στους ιστούς, η οποία να φανερώνει απόκλιση από την φυσιολογική εικόνα των οργάνων.



Εικόνα 15: Εικόνα ιχθύ από την 2^η δειγματοληψία, στην οποία διακρίνεται το ήπαρ (βέλος) έντονα αποχρωματισμένο, οι νεφροί (κεραυνός), η νηκτική κύστη (αστερίσκος) η οποία έχει τρωθεί κατά την νεκροτομή.



Εικόνα 16: Εικόνα ιχθύος 2^{ης} δειγματοληψίας στην οποία διακρίνονται: το ήπαρ (βέλος) ατροφικό και αποχρωματισμένο, οι όρχεις (ήλιος), η νηκτική κύστη (αστερίσκος) και ο νεφρός (κεραυνός)

3.4 Ιστοπαθολογική εξέταση

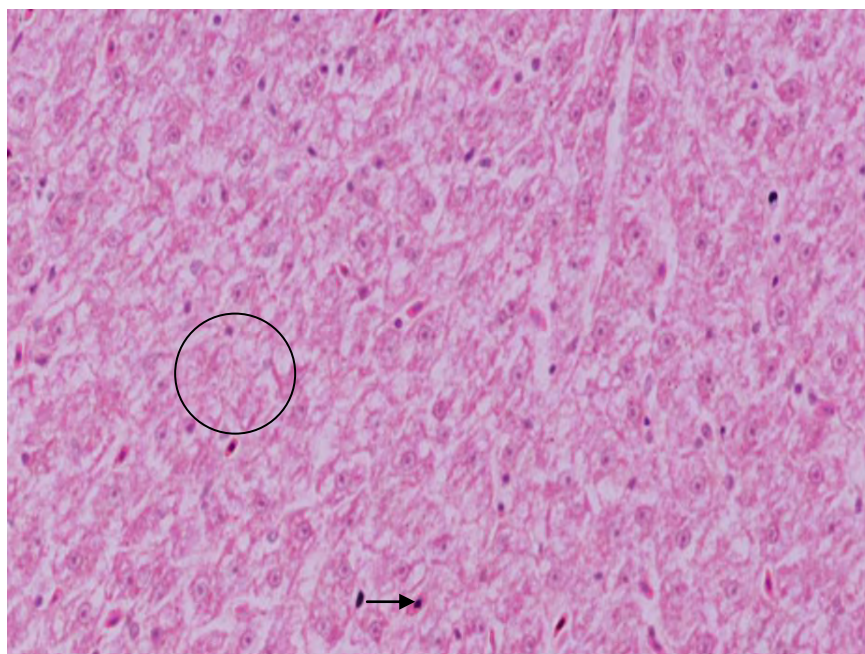
3.4.1 Οπτικό μικροσκόπιο

Η ιστοπαθολογική εξέταση των ιστοτεμαχίων, από τα όργανα που εξετάστηκαν (ήπαρ, νεφρός, μυϊκός ιστός, καρδιά, εγκέφαλος), αποκάλυψε αλλοιώσεις που αφορούσαν το ήπαρ και τους νεφρούς. Η ένταση των αλλοιώσεων αυτών δε διέφερε στα διάφορα όργανα, ανάλογα με το χρόνο της δειγματοληψίας. Συνολικά, εξετάστηκαν 30 ψάρια παρόμοιου μεγέθους, τα οποία συλλέχτηκαν σε δύο διαφορετικές δειγματοληψίες (20/5 και 13/6).

Οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του ήπατος χαρακτηρίζονται από απώλεια της αρχιτεκτονικής δομής του οργάνου. Έτσι, τα ηπατικά κύτταρα εμφάνιζαν θολερή

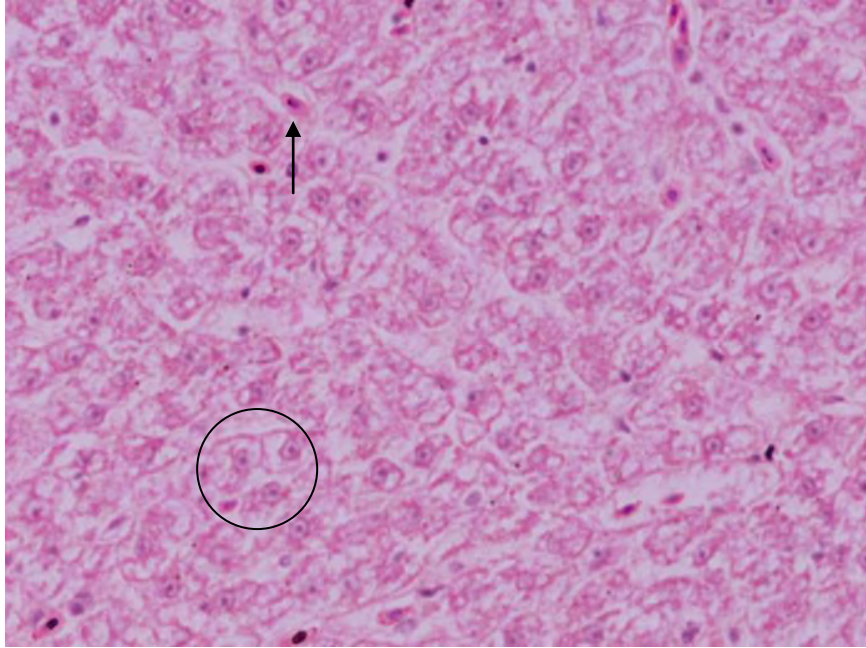
εξοίδηση⁷ και εστιακή νέκρωση σε ορισμένες περιοχές, ενώ οι αιμορραγίες του παρεγχύματος κρίνονται δευτερεύουσες και μη ειδικές. Τέλος, παρατηρήθηκαν ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις γλυκογόνου, καθώς και ποσοστό ενδοκυτταρικών κενотоπίων. Ταυτόχρονα, καταγράφηκαν μικροαιμοραγίες εξαιτίας της τρώσης των αγγείων. Στις εικόνες που ακολουθούν περιέχονται οι αλλοιώσεις του ήπατος, ενώ ταυτόχρονα επισυνάπτεται και εικόνα του ήπατος των ψαριών μαρτύρων (Εικ. 17, Εικ. 18 & Εικ. 19).

Η ιστοπαθολογική εικόνα των τομών των νεφρών, κατέδειξε την παρουσία αλλοιώσεων, που χαρακτηρίζονται από την υδρωπική εκφύλιση των επιθηλιακών κυττάρων των εγγύς και άπω εσπειραμένων σωληναρίων, με διατήρηση της βασικής μεμβράνης αυτών καθώς και σπειραματοσκλήρυνση (Εικ. 20, Εικ. 21 & Εικ. 22).

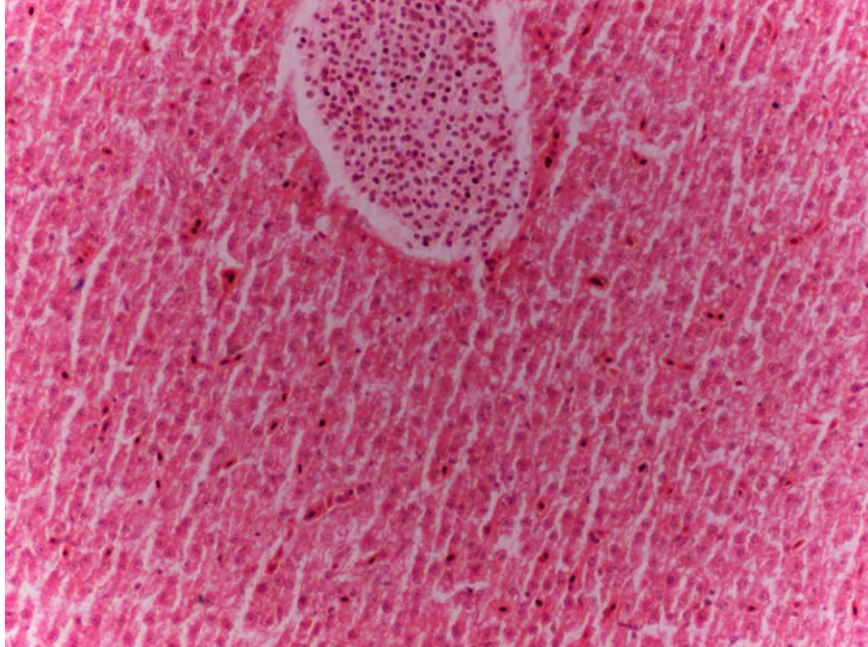


Εικόνα 17: Ιστοπαθολογική εικόνα ήπατος με υδρωπική εκφύλιση, στην οποία διακρίνεται: η έντονη απώλεια της αρχιτεκτονικής δομής του οργάνου, καθώς και συγκέντρωση γλυκογόνου (κύκλος). Η – Ε, X320.

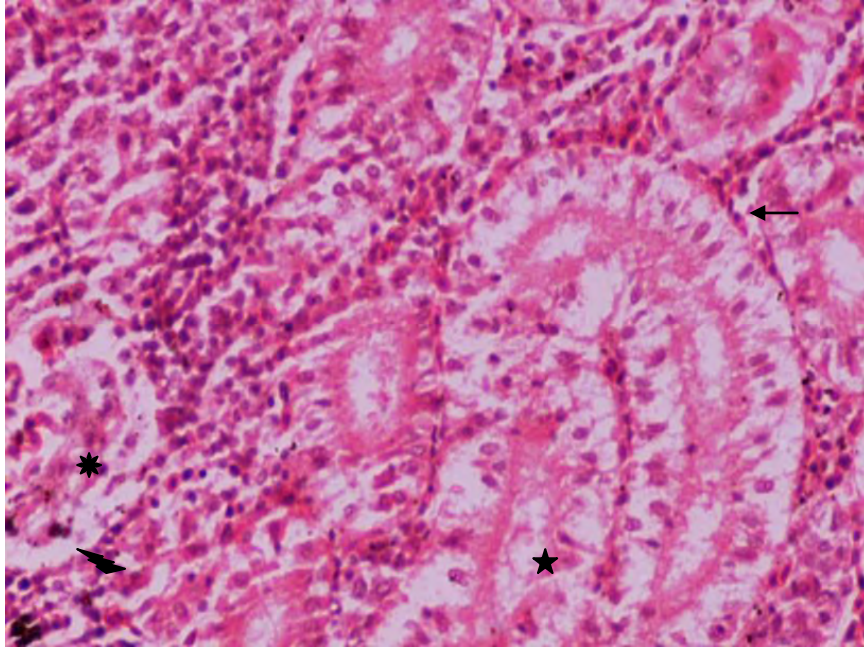
⁷ Θολερή εξοίδηση: Η παρουσία κενотоπίων εντός των κυττάρων. Τα κενотоπία αυτά περιέχουν νερό. Υδρωπική εκφύλιση του ήπατος.



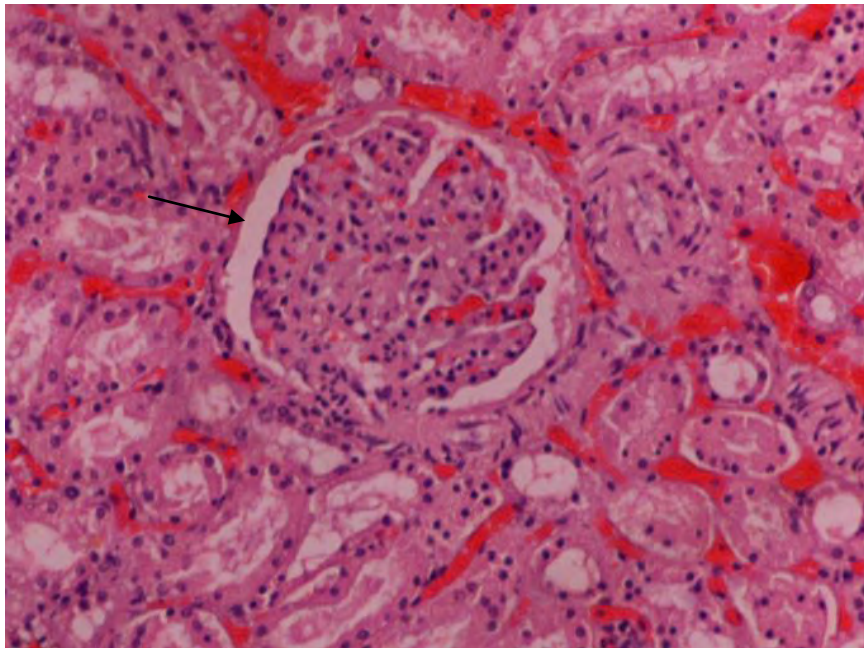
Εικόνα 18: Ιστοπαθολογική εικόνα ήπατος: εκφύλιση ηπατικών κυττάρων (onion – like cells) (κύκλος) απώλεια αρχιτεκτονικής δομής, υδρωπική εκφύλιση ηπατικών κυττάρων και ερυθρά αιμοσφαίρια (βέλος). H – E, X320



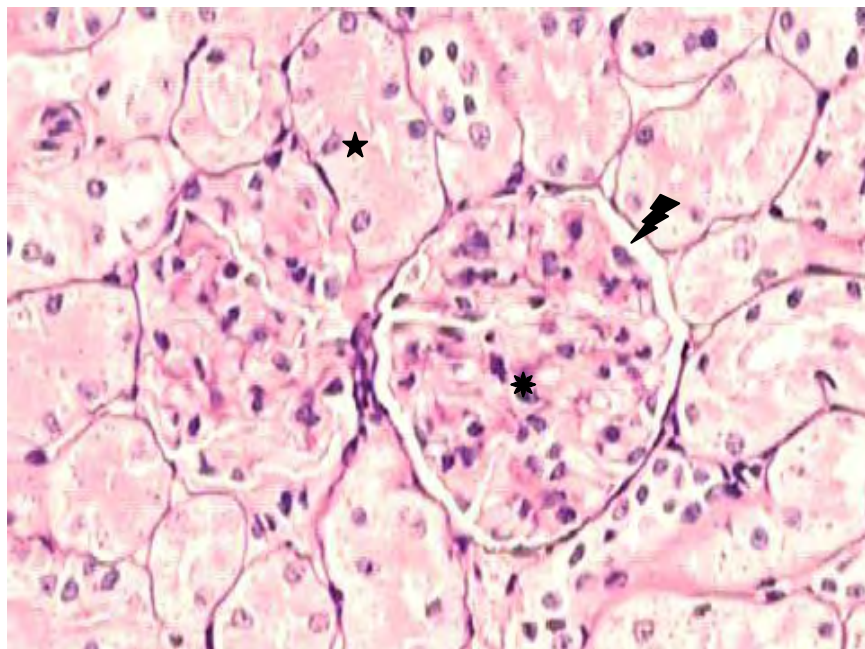
Εικόνα 19: Εικόνα ήπατος στην οποία διακρίνεται η φυσιολογική δομή του οργάνου. H – E, X320.



Εικόνα 20: Ιστοπαθολογική εικόνα του νεφρού, στην οποία διακρίνεται: έντονη εκφύλιση των επιθηλιακών κυττάρων των εσπειραμένων σωληναρίων (αστερίσκος), διατήρηση της βασικής μεμβράνης (βέλος), σπειραματοσκλήρυνση (ήλιος) και διάταση του χώρου του Bohman (κεραυνός). Η – Ε , X320.

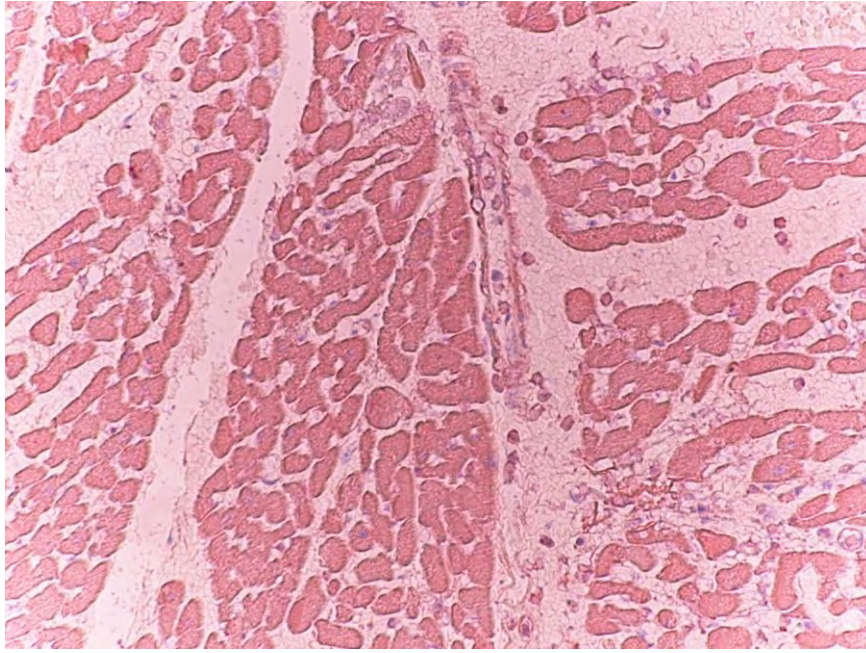


Εικόνα 21: Ιστοπαθολογική εικόνα νεφρού, στην οποία αναγνωρίζεται η διάταση του χώρου του Bowman (βέλος), καθώς και η σπειραματοπάθεια και υπεραϊμία των αγγείων. Η – Ε, X460.

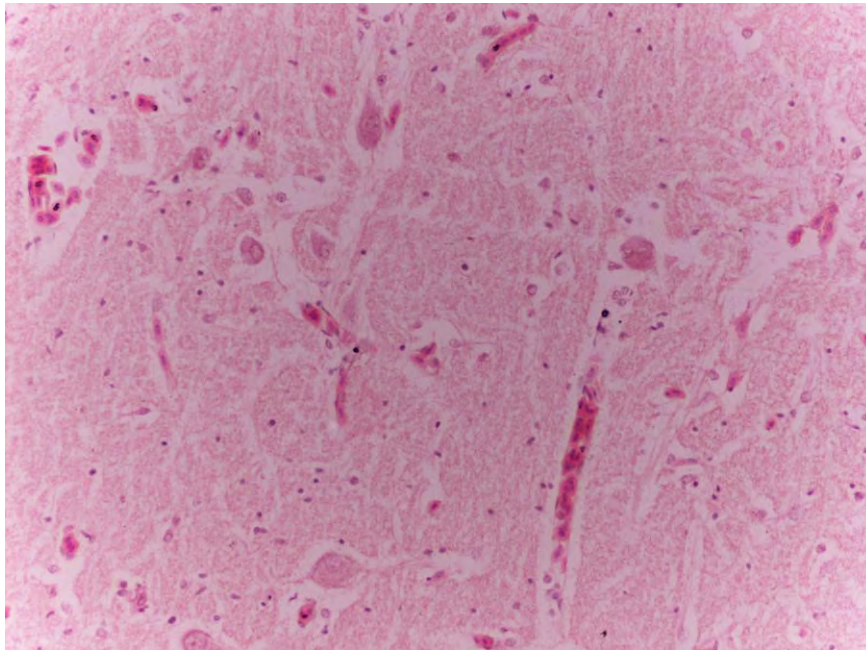


Εικόνα 22: Εικόνα φυσιολογικού νεφρού, στην οποία διακρίνονται: τα εσπειραμένα σωληνάρια (αστερίσκος) καθώς και η συσκευή του Bowman (ήλιος) με τον χώρο του Bowman (κεραυνός). E – H, X460.

Η ιστοπαθολογική εικόνα από τους μύες, την καρδιά (Εικ. 23) και τον εγκέφαλο (Εικ. 24), δεν κατέδειξε παθολογικές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Ωστόσο, δεν κατορθώθηκε να ληφθεί εικόνα από τους μύες των ψαριών. Επίσης, η εξέταση των τομών όλων των ιστών από τα ψάρια μάρτυρες δεν κατέδειξε καμία παρέκκλιση από την φυσιολογική εικόνα των ιστών.



Εικόνα 23: Εικόνα καρδιακού μυ στην οποία αναγνωρίζονται η φυσιολογική εικόνα των καρδιακών μυικών ινών. Η – Ε X320.



Εικόνα 24: Εικόνα εγκεφάλου χωρίς ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις. Η - Ε X320.

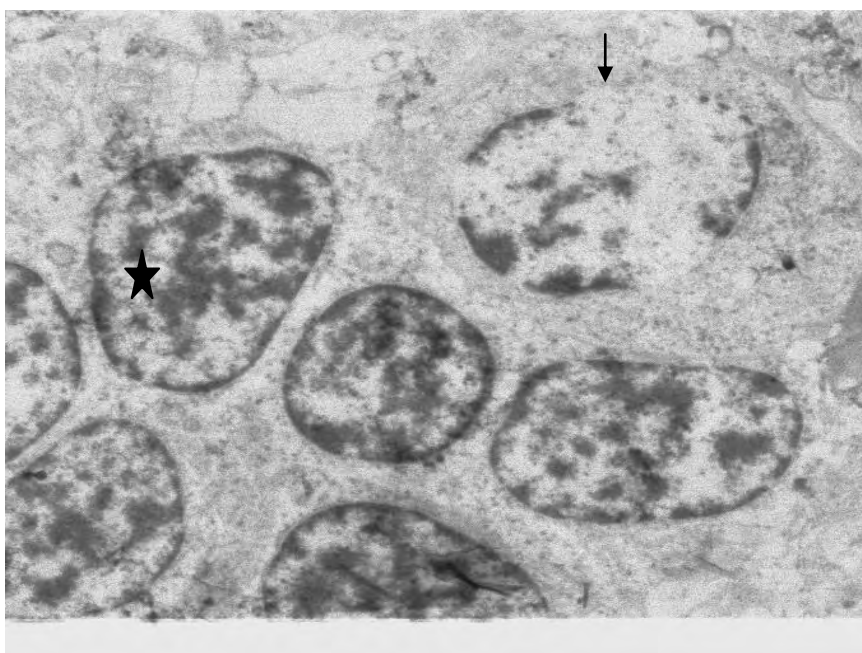
3.4.2 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως

Η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου τύπου διελεύσεως απέδειξε την εκφύλιση των κυττάρων του ήπατος και των νεφρών. Τα κύτταρα παρουσίαζαν έντονου βαθμού νέκρωση. Τα στοιχεία που συνηγορούν στην υφιστάμενη νέκρωση είναι τα ακόλουθα:

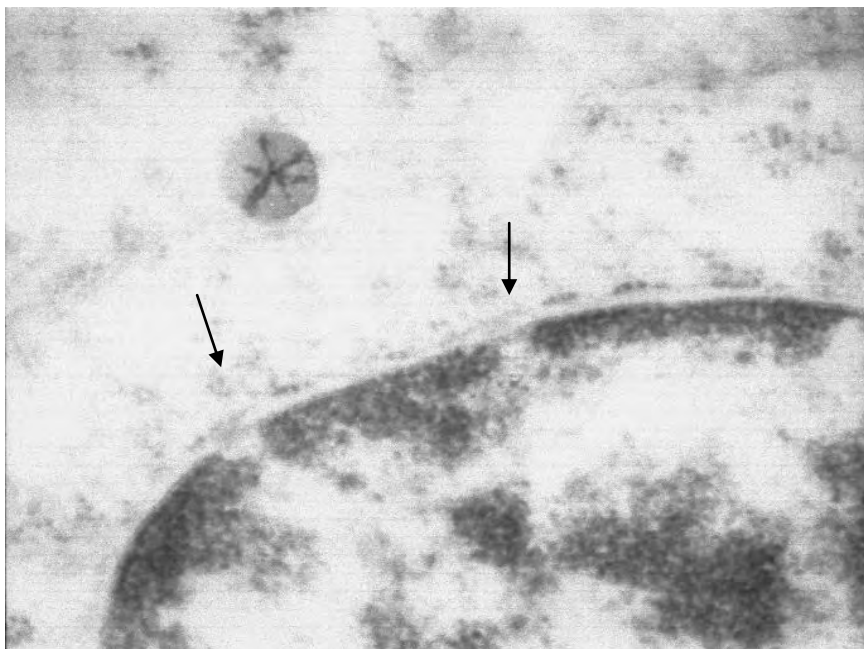
- Ασαφή κυτταρικά όρια – απουσία κυτταροπλασματικής μεμβράνης και στους δύο ιστούς (Εικ. 25 & Εικ. 30).
- Ύπαρξη λυσοσωμάτων (μαύρες κηλίδες) στο ήπαρ (Εικ. 29) και στο νεφρικό παρέγχυμα, τα οποία περιείχαν τεμάχια οργανιδίων αυτοφαγίας (Εικ. 31).
- Θραύση πυρηνικής μεμβράνης, τόσο στο ήπαρ, όσο και στο νεφρό (Εικ. 26 ήπαρ & Εικ. 32 νεφρός). Ταυτόχρονα στο νεφρό εντοπίστηκαν πυκνωτικοί πυρήνες (Εικ. 30), καθώς και πυρήνες με μη φυσιολογική δομή (εγκόλπωση) (Εικ. 30 & Εικ. 33).
- Διάταση ενδοπλασματικού δικτυωτού και στους δύο ιστούς. Όμως, στο ηπατικό παρέγχυμα ήταν τόσο έντονη η διάταση που το σκληρό ενδοπλασματικό δικτυωτό αποδιατασσόταν και με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των πολυριβοσωματίων (Εικ.31 ήπαρ).
- Διάταση των μιτοχονδρίων, καθώς και απώλεια των εσωτερικών μεμβρανών τους στα ηπατοκύτταρα (Εικ. 27), ενώ στα νεφρικά κύτταρα δεν εντοπίστηκαν μιτοχόνδρια.
- Κενοτοποίηση του κυτταροπλάσματος (Εικ. 28 ήπαρ & Εικ. 34 νεφρός).

Έτσι, στις εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, εντοπίζονται σημεία όπου υπάρχουν πολλοί πυρήνες συγκεντρωμένοι, ο ένας δίπλα στον άλλον. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της απουσίας των κυτταρικών μεμβρανών, που έχει ως αποτέλεσμα την ασάφεια των κυτταρικών ορίων και τη διάχυση των κυτταρικών οργανιδίων στο

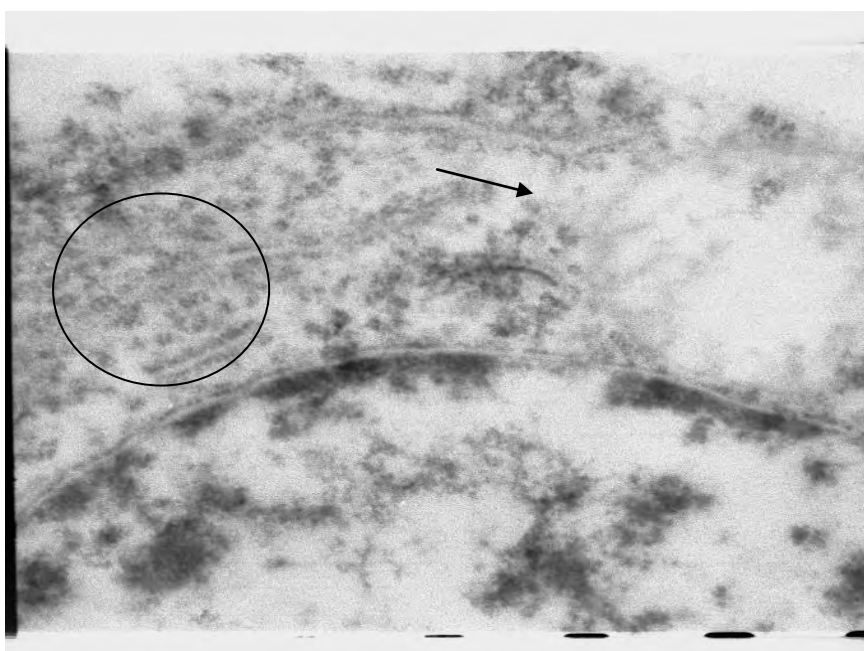
διάμεσο χώρο. Επιπρόσθετα, στις εικόνες διακρίνεται έντονη κενотоπίωση των κυττάρων, καθώς και συγκέντρωση λιποσταγονιδίων. Τέλος, οι έντονου βαθμού αλλοιώσεις εκφράζονται και με την κατακρήμνιση – θραύση της πυρηνικής μεμβράνης και την αποδόμηση του ενδοπλασματικού δικτυωτού. Όλα τα παραπάνω αποτελούν στοιχεία που δεικνύουν τη νέκρωση των κυττάρων των υπό μελέτη οργάνων και άρα στην απώλεια της φυσιολογικής ιστολογικής δομής τους.



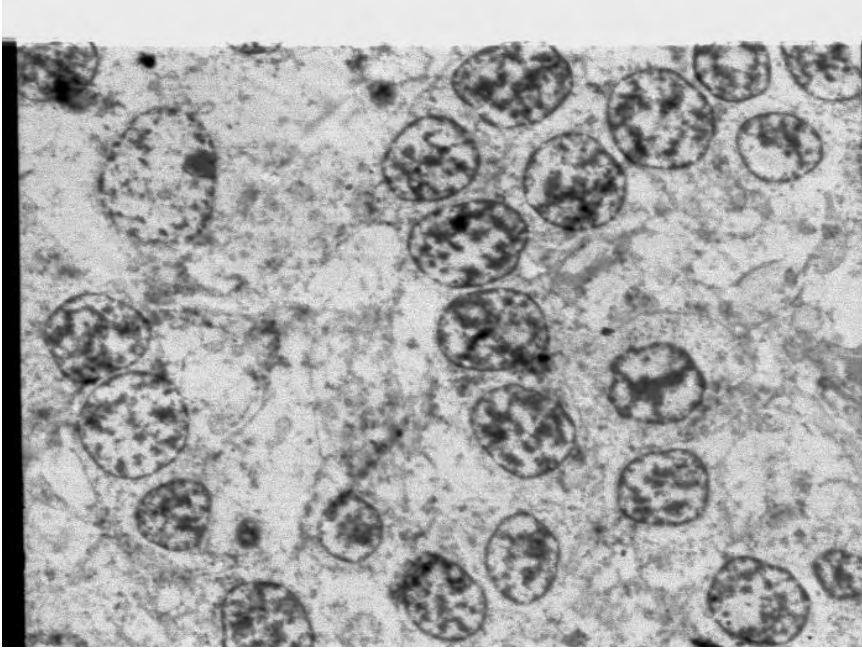
Εικόνα 25: Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ήπατος με απώλεια των ορίων των κυττάρων, λύση της πυρηνικής μεμβράνης (πυρηνορρηξία), εκφύλιση των πυρήνων (αστερίσκος), καθώς και θραύση των πυρήνων (βέλος). Liver 7 X8200.



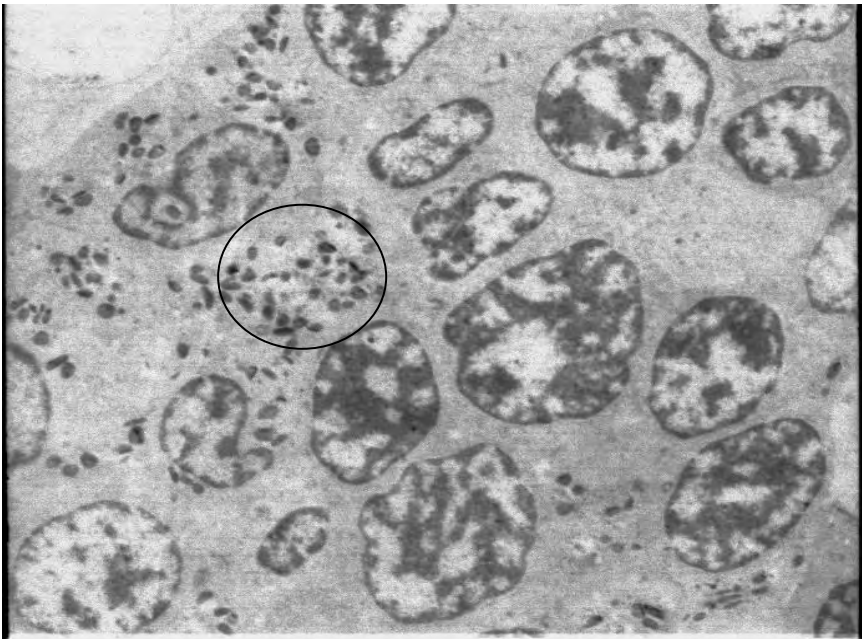
Εικόνα 26: Ηλεκτρονική απεικόνιση ηπατοκυττάρου με θραύση της πυρηνικής μεμβράνης (βέλη). Liver 1 X54000.



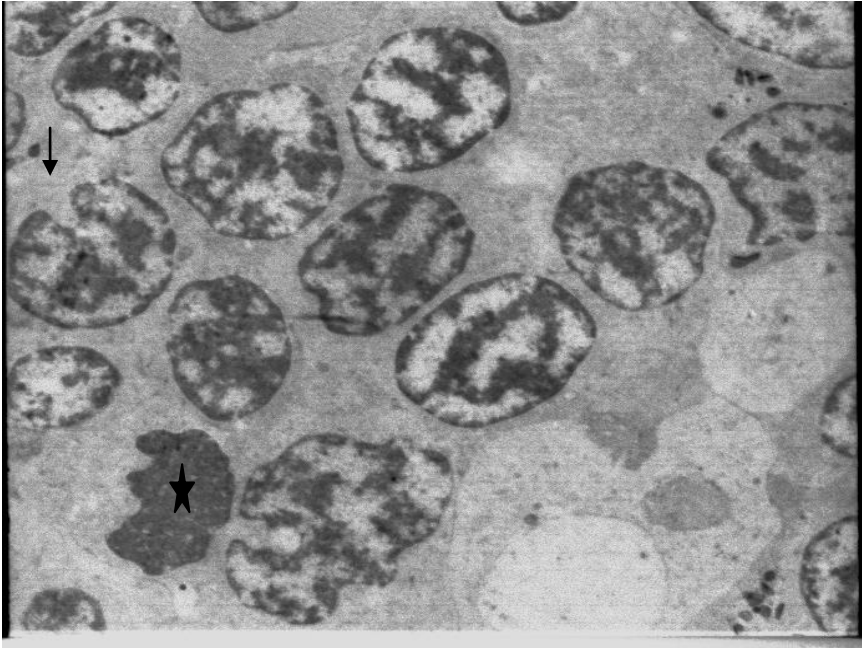
Εικόνα 27: Ηλεκτρονική απεικόνιση ηπατικού κυττάρου στο οποίο διακρίνονται: A) η αποδιοργάνωση του ενδοπλασματικού δικτυωτού και απελευθέρωση των ριβοσωματίων (κύκλος). B) διεύρυνση μιτοχόνδριο με χαρακτηριστική ακρολοφιόλυση, διατεταμένο και με απώλεια των εσωτερικών μεμβρανών του (βέλος). Liver 6 X32800



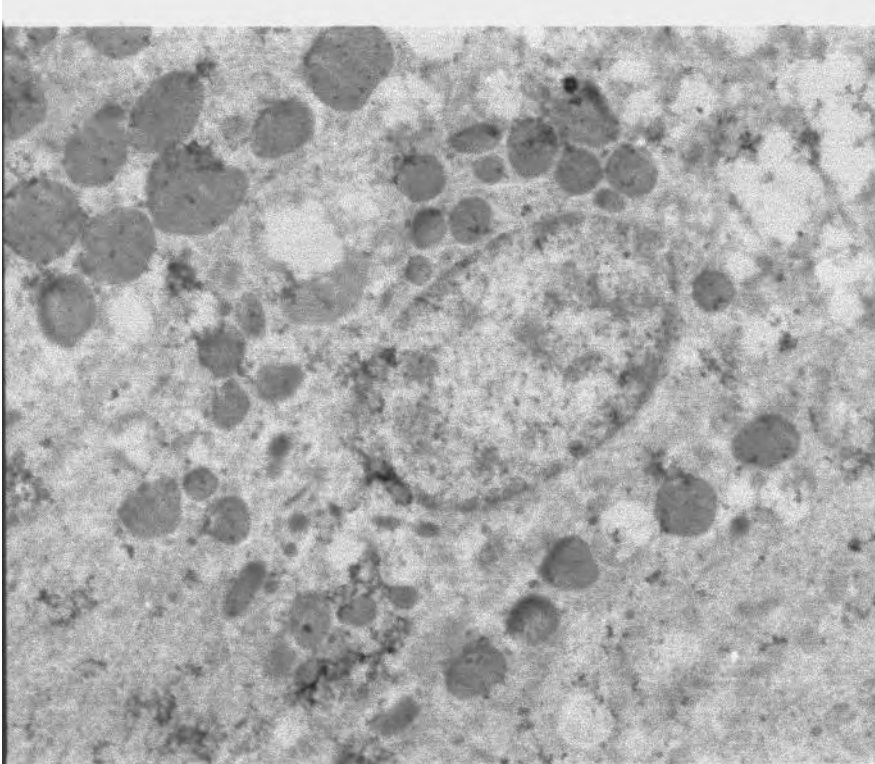
Εικόνα 28: Ηλεκτρονική απεικόνιση ηπατοκυττάρων με αυξημένη παρουσία κενωτοπίων. Liver 1 X5800.



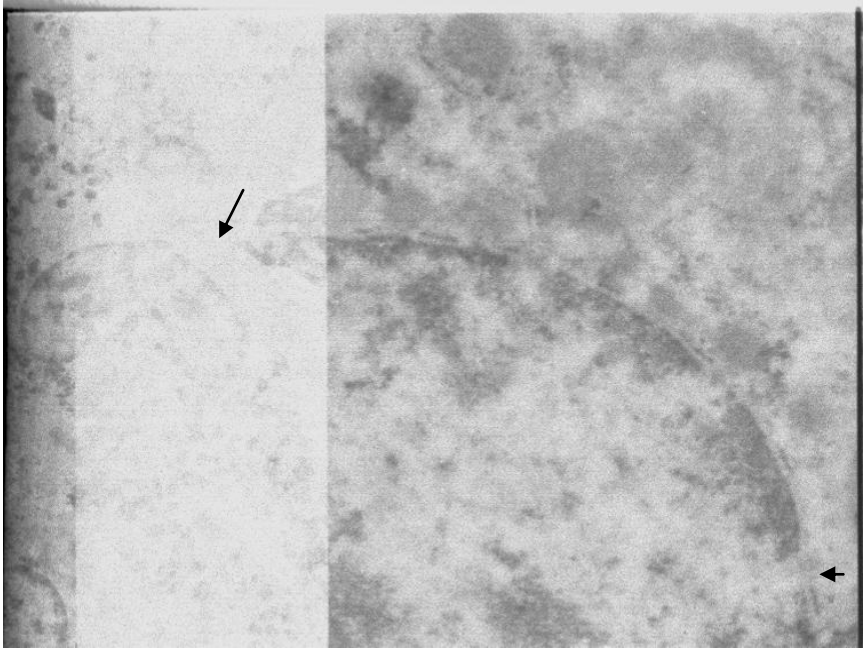
Εικόνα 29: Ηλεκτρονική εικόνα νεφρού, στην οποία διακρίνονται τα λυσοσώματα (κύκλος). Kidney 6 X5800.



Εικόνα 30: Ηλεκτρονική απεικόνιση νεφρού, στην οποία διακρίνεται: Α) η ασάφεια των κυτταρικών συνόρων με συγκέντρωση των πυρήνων Β) η εγκόλπωση των πυρήνων (βέλος) και Γ) πυκνωτικός πυρήνας (αστερίσκος). Kidney 5 X5800.



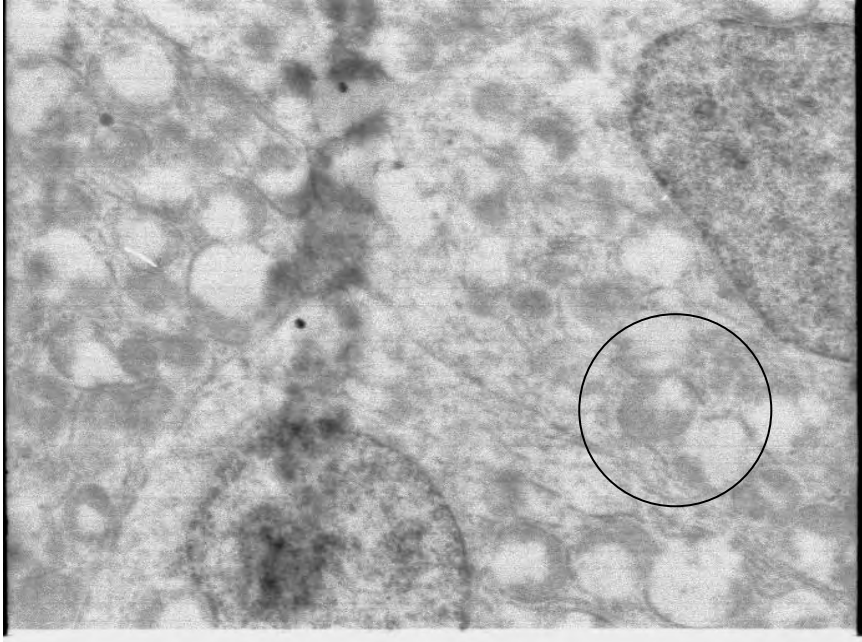
Εικόνα 31: Ηλεκτρονική απεικόνιση νεφρού στην οποία διακρίνονται τα λυσοσωματίων με τα οργανίδια αυτοφαγίας. Kindey 6 X21600.



Εικόνα 32: Ηλεκτρονική εικόνα νεφρικού κυττάρου με θραύση της πυρηνικής μεμβράνης (βέλη). Kidney 2 X21600.



Εικόνα 33: Ηλεκτρονική απεικόνιση νεφρικού πυρήνα με έντονου βαθμού εγκόλπωση. Kidney 2 X21600.



Εικόνα 34: Ηλεκτρονική απεικόνιση κυττάρων νεφρού με έντονου βαθμού κενотоπίωση (κύκλος). Kidney 1 X11600.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρουσία των κυανοτοξινών στη λίμνη της Κάρλας επιβεβαιώθηκε, για το διάστημα του πειραματισμού, με την τεχνική της ELISA. Σύμφωνα με την παρούσα έρευνα, η συγκέντρωση των MCYST κυμάνθηκε από 2,03 ως 3,01 $\mu\text{g/l}$ μέσα στο νερό, ενώ στο scum από 4,19 ως 5,5 $\mu\text{g/l}$. Το ποσοστό των MCYST μέσα στο νερό είναι ιδιαίτερα αυξημένο δεδομένου ότι σύμφωνα με τον WHO το ποσοστό για το πόσιμο νερό δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 $\mu\text{g/l}$ (Nicholson & Burch 2001; Cummings 2002). Ταυτόχρονα, το LD_{50} ⁸ σύμφωνα με τους Butler *et al.* (2009) για τους ιχθύες κυμαίνεται από 0,02 έως 1,5 $\mu\text{g/Kg}$ τροφής, ενώ σύμφωνα με τους Rabergh *et al.* (1991) 0,55 $\mu\text{g/g}$. Ωστόσο το LD_{50} των MCYST ανά κιλό σωματικού βάρους στους κυπρίνους αντιστοιχεί σε τιμή μικρότερη του 1,7 mg/kg .

Η συγκέντρωση των τοξινών παρουσίασε αύξηση κοντά στο 1 $\mu\text{g/l}$ μέσα σε χρονικό διάστημα μικρότερο του ενός μηνός. Αυτό αποτελεί απόδειξη, τόσο ότι τα κυανοβακτήρια υπήρχαν στο φυσικό περιβάλλον των κυπρίνων του λιμναίου οικοσυστήματος, όσο και ότι αυτά βρίσκονταν σε συνθήκες άνθισης. Την ταχεία αύξηση του ποσοστού των MCYST στο υδάτινο οικοσύστημα φανερώνει το γεγονός ότι στο οικοσύστημα αυτό επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό των κυανοβακτηρίων, με αποτέλεσμα την άνθισή τους; άρα και την πιθανότητα να εκδηλωθούν περιστατικά δηλητηρίασης από τις MCYST (Nicholson & Burch 2001). Αυτό συνδυάζεται με το γεγονός, ότι η περίοδος πραγματοποίησης της δειγματοληψίας ήταν στο τέλος της άνοιξης και στην αρχή του καλοκαιριού.

Την περίοδο αυτή στον ελλαδικό χώρο οι θερμοκρασίες είναι υψηλές και η ηλιοφάνεια εντονότερη, δύο ευνοϊκότεροι παράγοντες για την εκδήλωση φαινομένων

⁸ LD_{50} : είναι η (θανατηφόρος) δόση μιας ουσίας, η οποία πρέπει να καταναλωθεί από έναν πληθυσμό, ώστε το 50% από αυτών να πεθάνει.

ευτροφισμού. Επιπλέον, η λίμνη τροφοδοτείται κατά κύριο λόγο από τον Πηνειό, το οποίο είναι ένα ποτάμι με αμφιλεγόμενη ποιότητα νερό (Petalas *et al.* 2005). Αυτό συμβαίνει διότι διαρρέει μια έντονα καλλιεργούμενη γεωργική γη, καθώς και αστικές και ημιαστικές περιοχές. Γενικά, αποδεκτό είναι το γεγονός ότι εξαιτίας των αγροτικών και βιομηχανικών δραστηριοτήτων του ανθρώπου, φτάνουν στα υδάτινα οικοσυστήματα, τόσο φερτά υλικά, όσο και μεγάλες ποσότητες N₂ και P. Τα στοιχεία αυτά σε συνδυασμό με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που προαναφέρθηκαν, προάγουν επιπλέον τα φαινόμενα ευτροφισμού. Συνυπολογίζοντας το γεγονός ότι η Κάρλα είναι μια ρηχή λίμνη (2 m μέγιστο βάθος), συγκεντρώνονται πολλοί παράγοντες που ευνοούν την άνθιση των κυανοβακτηρίων (Οικονομου 2012).

Σύμφωνα με κάποιες αναφορές τα κυανοβακτήρια θεωρούνται, ως διατροφικό είδος των κυπρίνων σε ορισμένες περιόδους της ζωής τους. Ειδικά μάλιστα όταν παρουσιάζονται ανθίσεις, μιας και τότε αυτοί οι φυτοπλαγκτονικοί οργανισμοί επικρατούν και επομένως είναι δύσκολο να αποφευχθούν, αποτελώντας κύριο συστατικό της διατροφής των παμφάγων κυπρίνων (Nicholson & Burch 2001; Ibelings & Chorus 2007). Κατά την εξέταση του στομαχικού περιεχομένου, επιβεβαιώθηκε ότι τα κυανοβακτήρια αποτελούσαν διατροφικό είδος του κυπρίνου το διάστημα που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Αυτό το εύρημα επιβεβαιώθηκε με τη δημιουργία των άμεσων επιχρισμάτων του στομαχικού περιεχομένου. Αναλυτικότερα, βρέθηκαν στο 100% των δειγμάτων διαφορετικά είδη κυανοβακτηρίων, με επικράτηση του *Microcystis aeruginosa* και *Planktothrix agarrdii*, σύμφωνα με την απεικονιστική μελέτη (Εικ. 4, Εικ. 5, Εικ. 6).

Τα κυανοβακτήρια ήταν πιο εύκολο να διακριθούν στο αραιωμένο τμήμα του επιχρίσματος, γεγονός που επεξηγείται από το μεγάλο πληθυσμό που παρουσίαζαν αυτά εντός του αρχικού δείγματος. Ωστόσο, η εικόνα πολλών ειδών κυανοβακτηρίων

είναι παρόμοια μεταξύ τους και έτσι, ίσως είναι αυθαίρετος ο προσδιορισμός των ειδών μόνο με την απεικονιστική μελέτη τους. Για να επιβεβαιωθεί το είδος τους, θα πρέπει να συνεχιστεί η μελέτη και να συμπληρωθεί με ειδικές εργαστηριακές τεχνικές, ικανές να προσδιορίσουν τα είδη των πλαγκτονικών οργανισμών (π.χ. PCR). Ακόμα όμως και αν πιστοποιηθούν τα κυανοβακτήρια εντός της γαστρεντερικής οδού, θα πρέπει να γίνει κατανοητός ο τρόπος πέψης, αλλά και δράσης τους στους υδρόβιους οργανισμούς.

Οι Carbis *et al.* (1997) σε μια παρόμοια ερευνητική προσπάθεια, επέλεξαν να εξετάσουν το εντερικό περιεχόμενο, γιατί πιστεύεται ότι εκεί πραγματοποιείται η κυρίως πέψη στους κυπρίνους. Αυτοί διαπίστωσαν ότι οι κυπρίνοι από το Φεβρουάριο έως και τον Απρίλιο τρέφονταν με μεγάλες ποσότητες *M. aeruginosa*. Αντίθετα, κατά τους μήνες Ιανουάριο, Μάιο και Ιούνιο, εκτός από τις MCYST, οι κυπρίνοι τρέφονταν και με προνυμφικές μορφές εντόμων και μάλιστα σε ίση αναλογία. Τέλος, τη χρονική περίοδο από τον Ιούλιο ως και το Δεκέμβριο τα ψάρια δεν τρέφονταν με κυανοβακτήρια.

Στην παρούσα έρευνα, επιλέχθηκε να μελετηθεί το γαστρικό περιεχόμενο γιατί αντανakλά άμεσα τις διατροφικές συνήθειες του κυπρίνου, καθώς επίσης περιορίζονται με τον τρόπο αυτό οι αλλοιώσεις, που τυχόν θα υποστεί η τροφή, κατά την πορεία της δια της γαστρεντερικής οδού (διαδικασία πέψης). Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Iugol, ώστε να χρωματιστεί η μάζα των κυανοβακτηρίων και να πραγματοποιηθεί η μικροσκόπηση τους. Τα αποτελέσματα δεν διαφοροποιούνταν στατιστικά σημαντικά με αυτά των Carbis *et al.* (1997), αν και τροποποιούνταν πολύ οι περιβαλλοντικές συνθήκες, αφού η μελετώμενη περιοχή αυτών βρισκόνταν στην Αυστραλία. Παρόλα αυτά, καλό θα ήταν να πραγματοποιηθεί μια πιο ολοκληρωμένη ερευνητική διαδικασία, στην οποία θα εξεταζόταν τόσο το στομαχικό περιεχόμενο,

όσο και το εντερικό περιεχόμενο και τα αποτελέσματα αυτών να συγκρίνονταν μεταξύ τους σε μια πιο ευρεία ερευνητική προσπάθεια.

Εξαιτίας της φτωχής ερευνητικής δραστηριότητας, υπάρχουν ακόμα και σήμερα σημαντικές ελλείψεις στη διαδικασία και στην τοποθεσία πέψης των κυανοβακτηρίων (Carbis *et al.* 1997; Chorus & Bartram 1999; Ibelings & Chorus 2007). Είναι, λοιπόν, πιθανό, εφόσον αυτά καταποθούν, είτε με τη διαδικασία της πέψης να προκαλέσουν δηλητηρίαση στον οργανισμό, είτε αυτή να είναι αποτέλεσμα της βρώσης ή διήθησης των ίδιων των τοξινών. Επίσης, μόνο υποθέσεις μπορεί να γίνουν για την διαφορά της τοξικότητας μεταξύ σαρκοφάγων ιχθύων και παμφάγων, γεγονός που εστιάζεται επίσης στην ελλιπή γνώση της διαδικασίας της πέψης. Για να περιοριστούν οι ασάφειες αυτές συνδυάστηκε η απεικονιστική μελέτη με την καταμέτρηση της συγκέντρωσης των MCYST στον περιβάλλοντα χώρο, αλλά και σε διάφορα όργανα των κυπρίνων.

Επίσης, σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι οι κυπρίνοι, αν και έτρωγαν τοξικά κυανοβακτήρια σε μεγάλες ποσότητες, αυτό δεν είχε άμεσο αντίκτυπο στη διαβίωση τους, γεγονός που υποδηλώνει την ικανότητα διαβίωσής των σε υπό – θανατογόνες συγκεντρώσεις (sub – lethal) για έτη. Επιπλέον, σημαντικό είναι το γεγονός ότι αμέσως μετά την αλιεία τους δεν έδειχναν σημάδια εξασθενημένου οργανισμού. Αυτό συνάδει με τη βιβλιογραφία, η οποία αναφέρει τους ιχθύες ως περισσότερο ανθεκτικούς σε σχέση με τους χερσαίους οργανισμούς (Fischer & Dietrich 2000). Το ξεχωριστό αυτό χαρακτηριστικό πιστεύεται ότι έγκειται στο γεγονός της διαφορετικής εκδήλωσης της υφιστάμενης δηλητηρίασης. Αναλυτικότερα, ο θάνατος των χερσαίων οργανισμών οφείλεται στην ενδοηπατική αιμορραγία και το προκαλούμενο ολιγαιμικό σοκ (Fischer *et al.* 2000). Αντίθετα, στα ψάρια ο θάνατος

επέρχεται εξαιτίας της καταστροφής του ήπατος και της αδυναμίας εκ μέρους του οργάνου να επιτελέσει το ρόλο του (Lance *et al.* 2010).

Επόμενο βήμα της παρούσας εργασίας ήταν, να υπολογιστεί η συγκέντρωση των MCYST σε διάφορους ιστούς των βιολογικών οργανισμών. Από τους ιχθύες εξετάστηκαν το ήπαρ, οι νεφροί και οι μύες με σκοπό να ταυτοποιηθεί το ποσοστό MCYST που περιέχουν. Έτσι, συνδυάζοντας το γεγονός ότι τα ψάρια έτρωγαν τα κυανοβακτήρια, καθώς και της αυξημένης συγκέντρωσης των τοξινών στους μελετώμενους ιστούς, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα ψάρια δηλητηριάζονται κατά την διαδικασία της πέψης. Όμως, ίσως η συγκέντρωση τους να μην οφείλεται εξ ολοκλήρου στην διαδικασία της πέψης, αλλά να είναι συνδυασμός της ικανότητας των MCYST να διαπερνούν το δέρμα και τα βράγχια των ψαριών (Ibelings & Chorus 2007; Atencio *et al.* 2008a). Ανεξάρτητα με τον τρόπο λήψης των MCYST, αυξημένες συγκεντρώσεις αυτών βρέθηκαν στα όργανα που εξετάστηκαν και κατά τις δύο δειγματοληψίες.

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία δεικνύεται ότι οι MCYST αθροίζονται στα ακόλουθα όργανα των ιχθύων κατά φθίνουσα πορεία: ήπαρ, έντερο, νεφροί, εγκέφαλος, γονάδες και μύες (Kagalou *et al.* 2008). Στην παρούσα ερευνητική διαδικασία, αν και κατά την πρώτη δειγματοληψία, η συγκέντρωση αυτών συμφωνούσε με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, δεν συνέβαινε το ίδιο και στην δεύτερη. Έτσι, αρχικά η μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανιζόταν στο ήπαρ, ακολουθούσε σε ποσοστό το νεφρό και τέλος το μικρότερο ποσοστό συγκέντρωσης εμφάνιζε ο μυϊκός ιστός. Το αντίθετο παρατηρήθηκε κατά την δεύτερη δειγματοληπτική προσπάθεια, όπου τη μεγαλύτερη συγκέντρωση τοξινών εμφάνιζαν οι νεφροί, ακολουθούσε το ήπαρ και τέλος οι μύες. Αυτή η αντιστροφή των δεδομένων τεκμηριώνει την

υπόθεση, με την οποία οι νεφροί (πολλές φορές) θεωρούνται εξ ίσου όργανα – στόχοι των MCYST.

Μάλιστα τα αποτελέσματα ήταν σχεδόν ανεστραμμένα, δηλαδή αρχικά την μέγιστη συγκέντρωση εμφάνιζε το ήπαρ και υποχωρούσε σχεδόν στο μισό στα αποτελέσματα του νεφρού, ενώ αντίθετη ήταν η εικόνα που παρατηρήθηκε στη δεύτερη περίοδο. Έτσι στη δεύτερη περίοδο η μέγιστη συγκέντρωση παρουσιάστηκε στους νεφρούς (696 ng/g), ενώ υποχωρούσε σχεδόν στο μισό στα αποτελέσματα από το ήπαρ (346,15 ng/g). Ταυτόχρονα σχεδόν σταθερή παρουσιάστηκε η συγκέντρωση των MCYST στο μυϊκό ιστό των ιχθύων, η οποία κυμάνθηκε στο 113,78 ng/g το Μάιο και στο 108,41 ng/g τον Ιούνιο.

Τα προαναφερόμενα στοιχεία απαιτούν επιπλέον διερεύνηση, γιατί αν και κατά τη δεύτερη δειγματοληπτική προσπάθεια η συγκέντρωση των μικροκυστινών στο περιβάλλοντα χώρο είχε αυξηθεί (κατά 1 μg/l), δεν αυξήθηκε και η συγκέντρωση στο ήπαρ. Το ήπαρ αποτελεί την πύλη εισόδου για τις MCYST, αφού για να εισέλθουν οι τοξίνες στον οργανισμό συνδέονται με τα χολικά οξέα και ακολουθούν την ίδια πορεία. Παρά ταύτα υπάρχουν ενδείξεις για την παράκαμψη της εν λόγω πορείας και κυκλοφορία των MCYST σε άλλα όργανα και ιστούς (Atencio *et al.* 2008a; Papadimitriou *et al.* 2009).

Έτσι, παρά την κατάσταση του ήπατος και των νεφρών η συγκέντρωση στους μύες δε μεταβάλλεται σε τόσο στενή χρονική περίοδο. Επίσης, παρά το γεγονός ότι τα μέγιστα ποσοστά που εμφανίζονται στο ήπαρ και στους νεφρούς (713,7 μg/g και 678,68 μg/g αντίστοιχα), το ποσοστό που εμφανίζεται στους μύες είναι σχεδόν το 1/6 από την μέγιστη συγκέντρωση και το 1/3 από την ενδιάμεση (Σχ. 2) και στις δυο περιόδους. Οπότε, η σχέση της συγκέντρωσης των τοξινών στους μύες σε σχέση με αυτές του ήπατος και των νεφρών παραμένει σταθερή. Ίσως όμως να χρειάζεται

περισσότερο χρόνο για να επηρεαστεί η συγκέντρωση των τοξινών στου μύες των ιχθύων. Ωστόσο, παρά τη μικρή συγκέντρωση των τοξινών στο μυϊκό ιστό, η ποσότητα τους θεωρείται επικίνδυνη αν καταναλωθεί από τον άνθρωπο.

Η μέγιστη ανεκτή ποσότητα των μικροκυστινών (TDI), που ο άνθρωπος μπορεί να προσλάβει (ποσότητα που δεν είναι τοξική), κυμαίνεται στα μεν παιδιά από 500 mgr – 5 mgr, αν κάποιος υδρόβιος οργανισμός εμφανίζει συγκέντρωση MCYST από 100 ως 1000 µg ανά κιλό σωματικού βάρους. Στον δε ενήλικα, οι τιμές αυτές κυμαίνονται από 1500 mgr – 15 mgr για τις ίδιες συγκεντρώσεις MCYST στους οργανισμούς. Επίσης, αν η μάζα των κυανοβακτηρίων στη λίμνη κυμαίνεται από 100 ως 1000 µg/ l τα παιδιά μπορούν να καταναλώσουν από 500 – 50 ml χωρίς να εμφανίσουν κάποιο πρόβλημα, ενώ οι ενήλικες από 1500 ml – 150 ml αντίστοιχα. Τέλος, για πόσιμο νερό με περιεκτικότητα 1 µg/l – 100 µg/l, οι τιμές του TDI κυμαίνονται στα παιδιά από 50.000 ml – 500 ml, ενώ στους ενήλικες από 150000 ml – 150 ml (Fromme *et al.* 2000). Επίσης ο Παγκόσμιος Οργανισμός υγείας ορίζει το TDI για το πόσιμο νερό στο 0,04 µg/kg σωματικού βάρους (Chorus & Bartram 1999).

Στην παρούσα διατριβή θέλοντας να διαπιστωθεί η λειτουργική κατάσταση σημαντικών οργάνων των ιχθύων ακολούθησε, τόσο μακροσκοπική, όσο και μικροσκοπική εξέταση τους. Η μακροσκοπική εικόνα των ιχθύων δεν τροποποιήθηκε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο δειγματοληψιών. Επίσης, η εικόνα του ήπατος και των νεφρών ήταν σύμφωνη με τα αποτελέσματα που δηλώνονται στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Η σύγκριση όμως αυτή ίσως και να μην ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, αφού εκτός από μια μόνο αναφορά σε μελέτη στο πεδίο (Carbis *et al.* 1997), όλες οι λοιπές μελέτες αφορούσαν κλειστά συστήματα με απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες (Råbergh *et al.* 1991; Carbis *et al.* 1996; Kotak *et al.* 1996; Fischer & Dietrich 2000; Molina *et al.* 2005; Ernst *et al.* 2006; Gupta & Guha

2006; Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2009; Butrer *et al.* 2009; Prieto *et al.* 2009; Puerto *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2011). Αντίθετα, στην παρούσα διατριβή εξαιτίας του ότι ελέγχθησαν ιχθύες άμεσα από το φυσικό περιβάλλον τους, κανείς θα μπορούσε να καταλήξει στο γεγονός ότι πολλαπλοί παράγοντες μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο στην παθολογία των ιχθύων. Όμως, τόσο η μακροσκοπική, όσο και η μικροσκοπική εικόνα φαίνεται να έχουν άμεση σχέση με την παρουσία των MCYST.

Έτσι κατά τη νεκροτομική εξέταση διαπιστώθηκε ότι οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις αφορούσαν κατά κύριο λόγο το ήπαρ, το οποίο ήταν αποχρωματισμένο (κιτρινωπή χροιά), οίδηματικό, εύθρυπτο με πολλαπλές πετέχειες και εκχυμώσεις. Επίσης, το νεφρικό παρέγχυμα ήταν ιδιαίτερος εύθρυπτο, στοιχείο που δεν συνδυαζόταν με αλλοιώσεις της μακροσκοπικής εικόνας αυτών. Κατά την λοιπή εξέταση δεν παρουσιάστηκαν αποκλίσεις από τη φυσιολογική εικόνα των οργάνων καθώς και στους μάρτυρες, που η εικόνα ήταν απόλυτα φυσιολογική. Τα παραπάνω στοιχεία συμφωνούν με τις περιορισμένες βιβλιογραφικές αναφορές, όσον αφορά την νεκροτομική εικόνα των ιχθύων. Τρεις μόνο συγγραφείς αναφέρουν στοιχεία της μακροσκοπικής εικόνας των ιχθύων, χωρίς αυτό να κρίνεται σημαντικό σημείο των αποτελεσμάτων που σημειώνουν (Kotak *et al.* 1996; Fischer & Dietrich 2000; Molina *et al.* 2005).

Αναλυτικότερα, μόνο σε τρεις ερευνητικές διαδικασίες έγινε αναφορά στην μακροσκοπική εικόνα του ήπατος, ενώ ελάχιστα αφορούν τα λοιπά όργανα. Έτσι, οι Kotak *et al.* το 1996 διαπίστωσαν ότι σε δόση 1 μg/g μικροτοξινών το ήπαρ ήταν υγροποιημένο, μαλακό, αποχρωματισμένο και με πολλαπλές πετέχειες, ενώ σε δόση 0,4 μg/g το ήπαρ ήταν κοκκινόμαυρο και στικτό. Ταυτόχρονα σημείωσαν την ικτερική χροιά (βλεννογόνος οφθαλμού, πτερύγια, μύες) του υπό μελέτη οργανισμού. Έπειτα, το 2000, οι Fisher *et al.* πιστοποίησαν την κιτρινωπή χροιά του ήπατος

εξαιτίας τις τοξίνωσης σε πειράματα με πέστροφες, ενώ έκριναν τις αλλοιώσεις των νεφρών ως δευτερεύουσες. Τέλος, την ίδια μακροσκοπική εικόνα του ήπατος σε τιλάπιες σημείωσαν οι Molina *et al.* το 2005.

Παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες πειραματισμού άλλαζαν και πάλι τα αποτελέσματα δε διαφοροποιούνται από αυτά που σημειώνουν οι προηγούμενοι συγγραφείς. Επίσης, η νεκροτομική εικόνα στην παρούσα διατριβή είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, εξαιτίας της άμεσης δειγματοληψίας από το φυσικό τους περιβάλλον. Ταυτόχρονα, πρέπει να σημειωθεί το γεγονός της ελλιπούς βιβλιογραφίας σχετικά με την νεκροτομική εικόνα των ιχθύων που έχουν αυξημένα ποσοστά MCYST στους ιστούς τους. Σαφώς, πιο ενδελεχής έρευνα θα ήταν απαραίτητη για να καταγραφούν οι προκαλούμενες νεκροτομικές αλλοιώσεις.

Επόμενο βήμα στην προκείμενη μελέτη ήταν να διαπιστωθούν οι αλλοιώσεις που αφορούσαν την αρχιτεκτονική δομή των οργάνων των υπό μελέτη ιχθύων. Οι αλλοιώσεις της ιστοπαθολογικής εικόνας των οργάνων αφορούσαν κατά κύριο λόγο το ήπαρ και τους νεφρούς, ενώ στα λοιπά όργανα δεν αποδείχτηκαν παρεκκλίσεις από την φυσιολογική δομή τους. Οι αλλοιώσεις που αναβρέθηκαν πρώτη φορά συνδυάστηκαν με την συγκέντρωση των MCYST σε σημαντικά όργανα, τόσο για την εκδήλωση της δηλητηρίασης (ήπαρ, νεφροί), όσο και για τη δημόσια υγεία (μυϊκός ιστός). Αυτό θεωρήθηκε εξαιρετικά σημαντικό γιατί γενικά είναι αποδεκτό το γεγονός της ικανότητας των MCYST να βιοσυσσωρεύονται και να βιομεγεθύνονται καθώς αυτές εισέρχονται εντός των τροφικών αλυσίδων (Ibelings & Chorus 2007; Butrer *et al.* 2009).

Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι, στις προηγούμενες μελέτες εξετάστηκε η ιστολογική εικόνα των οργάνων ανάλογα με τη μέθοδο χορήγησης των MCYST, το ποσοστό αυτών που χορηγούνταν, καθώς και το χρονικό διάστημα που μεσολαβούσε

από τη στιγμή χορήγησης, έως την ημέρα νεκροτομής και λήψης των ιστοτεμαχίων (Råbergh *et al.* 1991; Kotak *et al.* 1996; Carbis *et al.* 1997; Fischer & Dietrich 2000; Molina *et al.* 2005; Ernst *et al.* 2006; Gupta & Guha 2006; Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009; Butrer *et al.* 2009; Puerto *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2011). Επίσης, σημαντική θεωρείται η διαφορά του μελετώμενου βιολογικού οργανισμού, αφού αυτή έγκειται στις διατροφικές συνήθειες των διαφορετικών ιχθύων (Chorus & Bartram 1999; Fischer & Dietrich 2000). Έχει καταγραφεί ότι υπάρχει διαφορετική ευπάθεια ανάλογα με το αν το ψάρι είναι φυτοφάγο, σαρκοφάγο ή και παμφάγο. Η διαφορετικότητα αυτή επεξηγείται από το διαφορετικό μήκος εντέρου που διαθέτουν τα είδη αυτά, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η ικανότητά τους να πέπτουν τα κυανοβακτήρια (Ibelings & Chorus 2007).

Παρόλα αυτά, οι αλλοιώσεις που καταγράφηκαν στο ήπαρ και στους νεφρούς επιβεβαιώνονται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Råbergh *et al.* 1991; Kotak *et al.* 1996; Carbis *et al.* 1997; Fischer & Dietrich 2000; Molina *et al.* 2005; Ernst *et al.* 2006; Gupta & Guha 2006; Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009; Butrer *et al.* 2009; Puerto *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2011). Αντίθετα, τα αποτελέσματα των λοιπών οργάνων, άλλοτε συμβαδίζουν με αυτά των βιβλιογραφικών αναφορών και άλλοτε διαφοροποιούνται (Råbergh *et al.* 1991; Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2008b; Prieto *et al.* 2009). Παράγοντες που ενδέχεται να επηρεάζουν τις αλλοιώσεις, που καταγράφονταν στα λοιπά όργανα, είναι η δόση των MCYST που καταναλώνουν τα ψάρια, καθώς και ο χρόνος που διανύεται από την ημέρα αρχικής χορήγησης. Αντίθετα, στις μελέτες πεδίου δεν είναι δυνατόν να καταγραφούν οι παραπάνω παράγοντες.

Αναλυτικότερα, στην παρούσα εργασία καταγράφηκε η θολερή εξοίδηση του ήπατος, με έντονη κενотоπίωση των ηπατοκυττάρων, η απώλεια της αρχιτεκτονικής

του δομής και η συγκέντρωση γλυκογόνου εντός των κυττάρων του. Οι αλλοιώσεις αυτές πιστοποιούνται και από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Råbergh *et al.* 1991; Kotak *et al.* 1996; Carbis *et al.* 1997; Fischer & Dietrich 2000; Molina *et al.* 2005; Ernst *et al.* 2006; Gupta & Guha 2006; Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009; Butrer *et al.* 2009; Puerto *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2011). Σαφώς υπάρχουν διαφορές ως προς την ένταση των αλλοιώσεων που επισημαίνουν κάποιοι από τους συγγραφείς. Οι διαφορές, όμως, αυτές εντοπίζονται στα διαφορετικά πρωτόκολλα πειραματισμών, αφού μερικοί καταγράφουν τις αλλοιώσεις ως δόσοεξαρτώμενες (Carbis *et al.* 1996; Zurawell *et al.* 2005), ενώ άλλοι ως χρονοεξαρτώμενες (Råbergh *et al.* 1991). Έτσι αρχικά το 1991 ο Råbergh *et al.* κατέδειξαν αλλοιώσεις που κυμαίνονταν από την θολερή εξοίδηση του ήπατος (130 – 150 µg/kg) ως και την απώλεια της αρχιτεκτονικής δομής και την νέκρωση ορισμένων περιοχών (550 µg/kg).

Επιπλέον, κάποιοι συγγραφείς κατέδειξαν τη διήθηση του οργάνου με μονοπύρηνα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (εωσινόφιλα) (Carbis *et al.* 1997; Ernst *et al.* 2006; Jiang *et al.* 2011). Επίσης, σημειώθηκε ότι οι αλλοιώσεις εντείνονταν, όσο πλησιέστερα στα αγγεία εντοπιζόταν η περιοχή που εξεταζόταν (Carbis *et al.* 1996), καθώς παρατηρήθηκε και έντονη υπεραϊμία του οργάνου (Atencio *et al.* 2008b). Αντιλογία υπάρχει στη συγκέντρωση ή όχι γλυκογόνου στο ήπαρ, αφού ορισμένες εργασίες δεικνύουν τη συσσώρευση γλυκογόνου στο ήπαρ (Atencio *et al.* 2009; Prieto *et al.* 2009; Puerto *et al.* 2010), ενώ άλλες εργασίες υποστηρίζουν την μειωμένη παρουσία αυτού (Råbergh *et al.* 1991; Gupta & Guha 2006). Τέλος, συχνά σημειώνονται onion - like κύτταρα, με πύκνωση των πυρήνων τους και διαυγές κυτταρόπλασμα (Atencio *et al.* 2009; Prieto *et al.* 2009).

Στα παρόντα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκε διακύμανση των αλλοιώσεων μεταξύ των οργάνων που εξετάστηκαν. Ταυτόχρονα, εξαιτίας του πειραματισμού σε ανοικτό πεδίο είναι πιθανόν να τροποποιούνται οι αλλοιώσεις, από πολλαπλούς παράγοντες. Σε αυτό συνηγορεί το γεγονός ότι ορισμένες ουσίες, όπως τα ανάλογα της βιταμίνης E, το σελήνιο (Se) καθώς και η N – ακετυλοκυστεΐνη αντιστρέφουν τις αλλοιώσεις των MCYST (Atencio *et al.* 2009; Puerto *et al.* 2010). Επίσης, είναι άγνωστο το πώς δρουν στο ήπαρ οι MCYST σε βάθος χρόνου, δηλαδή ποιά είναι η πορεία των αλλοιώσεων στα περιστατικά βιοσυσσώρευσης των τοξινών.

Παράλληλα, οι αλλοιώσεις των νεφρών δεν εμφανίζουν απόκλιση από τα στοιχεία που δίδονται από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση (Råbergh *et al.* 1991; Kotak *et al.* 1996; Carbis *et al.* 1997; Fischer & Dietrich 2000; Molina *et al.* 2005; Ernst *et al.* 2006; Gupta & Guha 2006; Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009; Butrer *et al.* 2009; Puerto *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2011). Έτσι, γενικά αποδεκτό είναι το γεγονός ότι οι αλλοιώσεις των νεφρών είναι δευτερογενείς και έπονται αυτών του ήπατος. Επίσης, σχεδόν πάντα σημειώνεται η σπειραματοπάθεια, καθώς και η εκφύλιση των ουροφόρων σωληναρίων. Σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς, η εκφύλιση των επιθηλιακών κυττάρων των ουροφόρων σωληναρίων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία εκμαγείων εντός αυτών (Kotak *et al.* 1996; Ernst *et al.* 2006). Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, ίσως γιατί τα επιθηλιακά κύτταρα ήταν τόσο πολύ αλλοιωμένα, που στα ουροφόρα σωληνάκια εξαφανίζονταν εντελώς ο αυλός. Ταυτόχρονα, πρώτη φορά σημειώθηκε η διατήρηση της βασικής στοιβάδας τους, γεγονός που σηματοδοτεί την προσπάθεια αναγέννησης του ιστού.

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία παρατηρήθηκαν στους νεφρούς συγκέντρωση μεσογλοιακών κυττάρων (Atencio *et al.* 2009; Prieto *et al.* 2009), αιμορραγίες στο

παρέγχυμα, κενотоπίωση των κυττάρων και διάσπαρτη νέκρωση (Puerto *et al.* 2010). Τέτοια στοιχεία δεν παρατηρήθηκαν στα νεφρικά παρεγχύματα που εξετάστηκαν, γεγονός που είτε οφείλεται στη διαφορετική συγκέντρωση των τοξινών στα όργανα, είτε δεικνύει χρονοεξαρτώμενα αποτελέσματα των τοξινών. Σημαντικό βέβαια είναι το γεγονός, ότι δεν τροποποιήθηκαν οι αλλοιώσεις των νεφρών, τόσο μεταξύ ατόμων της ίδιας δειγματοληψίας, όσο και ατόμων της 2^{ης} πειραματικής προσπάθειας. Επομένως, δεν εντάθηκαν οι αλλοιώσεις των νεφρών, ούτε και κατά την περίοδο που παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση τοξινών εντός αυτών. Στοιχείο που επιβεβαιώνει μάλλον την άποψη ότι οι αλλοιώσεις των νεφρών είναι δευτερεύουσες.

Αν και στις περισσότερες εργασίες εξετάστηκαν το ήπαρ και οι νεφροί, δεν συνέβαινε το ίδιο και για τα λοιπά όργανα που επιλέχθηκαν να μελετηθούν. Έτσι, σε περιορισμένο αριθμό εργασιών εξετάστηκε ο καρδιακός μυς (Råbergh *et al.* 1991; Carbis *et al.* 1996; Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009; Prieto *et al.* 2009), μερικές μόνο αναφορές υπάρχουν για τον εγκέφαλο (Råbergh *et al.* 1991; Carbis *et al.* 1996), ενώ δεν εξετάστηκε ο μυϊκός ιστός σε καμία από τις παραπάνω εργασίες. Επιπλέον, παρά τις αναφορές στον καρδιακό μυ, υπάρχει αμφισημία μεταξύ των αποτελεσμάτων. Έτσι, αν και ορισμένοι συγγραφείς δεν εντόπισαν αλλοιώσεις στον καρδιακό μυ (Råbergh *et al.* 1991; Carbis *et al.* 1996), άλλοι κατέγραψαν τη μυοπάθεια του οργάνου, με οίδημα των κυττάρων και μικροαιμορραγίες (Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009). Ταυτόχρονα, μόνο μία εργασία σημειώνει την καταστροφή της παρεγκεφαλίδας και των οπτικών νεύρων, ενώ σε κάποια άλλη σημειώνεται το γεγονός ότι ο εγκέφαλος δεν παρουσίασε καμία αλλοίωση (Carbis *et al.* 1996).

Αν και παρατηρείται διχογνωμία, ως προς τις αλλοιώσεις του εγκεφάλου και του καρδιακού μυός, δε θεωρείται ασφαλές να κριθεί ότι οι συγγραφείς καταλήγουν σε

άκρως διαφορετικά αποτελέσματα. Αυτό γιατί κάθε φορά άλλαζαν οι συνθήκες πειραματισμού, ο μελετώμενος οργανισμός και το χρονικό διάστημα της δειγματοληψίας. Ταυτόχρονα, γενικά αποδεκτό είναι το γεγονός διαφορετικής ευπάθειας των διάφορων υδρόβιων ειδών, καθώς και αυτών σε σχέση με τα χερσαία (θηλαστικά). Γενικά για την αυξημένη ευπάθεια των κυπρινοειδών έχει ενοχοποιηθεί, ως μηχανισμός παθογένειας, ο πρώιμος κυτταρικός θάνατος και η απόπτωση των κυττάρων του ήπατος (Fischer & Dietrich 2000). Επιπρόσθετα, αν και οι αλλοιώσεις εντείνονται κατά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση των τοξινών, αυτό δεν αντικατοπτρίζει και τα αποτελέσματα της καρδιάς (Carbis *et al.* 1996).

Παράλληλα, οι συγγραφείς που κατέληξαν σε αλλοιώσεις της καρδιάς, μελετούσαν, ως είδος την τιλάπια και το γλύνι (Atencio *et al.* 2008b; Prieto *et al.* 2009). Οπότε στον κοινό κυπρίνο, είτε οι MCYST δεν μπορούν να βλάψουν το μυ της καρδιάς, είτε δρουν με πολύ αργό ρυθμό. Στην τελευταία περίπτωση οι αλλοιώσεις ίσως να εμφανιστούν σε δεύτερο χρόνο πειραματισμού. Τέλος, ίσως ο κυπρίνος, στο φυσικό του περιβάλλον, να έχει την δυνατότητα να αυτοπεριορίζει τις αλλοιώσεις της καρδιάς. Ότι και αν συμβαίνει από τα παραπάνω καλό θα ήταν να συνεχιστεί η ερευνητική δραστηριότητα. Έτσι, θα αποδειχθεί τι συμβαίνει στην πραγματικότητα, στοιχείο πολύ σημαντικό, αφού η καρδιά είναι ένα από τα σημαντικότερα όργανα, για την διατήρηση στην ζωή ενός οργανισμού.

Σε διάφορες εργασίες σημειώνεται ότι οι MCYST διαπερνούν τον αιματογκεφαλικό φραγμό (Kagalou *et al.* 2008; Papadimitriou *et al.* 2009), μάλιστα αποδεικνύονται ποσοστά συγκέντρωσης μεγαλύτερα από αυτά που καταγράφονται στους μύες των ιχθύων. Ωστόσο, αυτό δε φαίνεται να προκαλεί αλλοιώσεις του εγκεφαλικού παρεγχύματος, γεγονός που επαληθεύει τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειραματισμού. Εξαιρέση αποτελεί η αναφορά σχετικά με την

καταστροφή της παρεγκεφαλίδας και των οπτικών νεύρων, περιστατικό, όμως, που συνδυαζόταν με δοσοεξαρτώμενα αποτελέσματα ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης (Carbis *et al.* 1996). Να σημειωθεί ότι κατά την παρούσα έρευνα λήφθηκαν δείγματα ολικού πάχους από τη μεσότητα των εγκεφαλικών ημισφαιρίων.

Έτσι, μόνο υποθέσεις μπορούν να διατυπωθούν για να επεξηγήσουν τα αποτελέσματα αυτά. Από την μία πλευρά, ίσως οι τοξίνες να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και έτσι να φτάνουν στο παρέγχυμα. Εκεί όμως, να μην μπορούν να βλάψουν τα εγκεφαλικά κύτταρα του παρεγχύματος και μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες (μεγάλες συγκεντρώσεις) να μπορούν να βλάψουν την παρεγκεφαλίδα και τα οπτικά νεύρα. Από την άλλη πλευρά, ίσως, οι τοξίνες τελικά να μη διαπερνούν τον παραπάνω φραγμό και να παραμένουν εντός των αγγείων. Σε αυτό ίσως να συνηγορεί και η διαδικασία που ακολουθείται ώστε να καταμετρηθεί η συγκέντρωσή τους στον εγκέφαλο. Κατά την διαδικασία αυτή λαμβάνεται όλος ο εγκέφαλος του ψαριού, ομογενοποιείται και στο εκχύλισμα υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους (Freitas de Magalhães *et al.* 2001; Sîpia *et al.* 2002).

Κατά αυτόν τον τρόπο η τεχνική της ELISA εφαρμόζεται αφού ομογενοποιηθεί το εξεταζόμενο όργανο και άρα περιέχει, τόσο τα αγγεία, όσο και το εγκεφαλικό παρέγχυμα (Paradimitriou *et al.* 2009). Επομένως, υπολογίζεται η συγκέντρωση των τοξινών σε ολόκληρο το όργανο και εσφαλμένα θεωρείται ότι οι τοξίνες διαπερνούν τον αγγειακό φραγμό του εγκεφάλου. Σύμφωνα με το παραπάνω, οι αλλοιώσεις των οπτικών νεύρων μπορεί να οφείλονται στη διήθηση των τοξινών διαμέσου του οφθαλμού (επιπεφυκότα), είτε να διαδραματίζει ρόλο η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μεγάλης δόσης τοξινών (Carbis *et al.* 1996). Επομένως, για να επιβεβαιωθεί αν οι MCYST διαπερνούν ή όχι τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω εργαστηριακές εξετάσεις. Μια τέτοιου είδους εξέταση

είναι η ανοσοϊστοχημική εξέταση με χρήση πολύκλωνικων ή μονόκλωνικων αντισωμάτων.

Στον παρόντα πειραματισμό, μετά την κατάδειξη των έντονων αλλοιώσεων σε ιστολογικό επίπεδο (οπτικό μικροσκόπιο), κρίθηκε καλό να πραγματοποιηθεί και η εξέταση σε κυτταρικό επίπεδο (ηλεκτρονικό μικροσκόπιο). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μια πιο σφαιρική εικόνα στον τρόπο πρόκλησης, καθώς και της εκδήλωσης της τοξικότητας των MCYST. Ταυτόχρονα, μπορεί να γίνει πιο κατανοητή η ιστολογική εικόνα των οργάνων. Έτσι, σε κυτταρικό επίπεδο αποδείχθηκε η ασάφεια μεταξύ των κυτταρικών ορίων, η συγκέντρωση λιποσταγονιδίων και λυσοσωματίων, η εκφύλιση των πυρήνων (θραύση, εγκόλπωση, πύκνωση), η αποδόμηση του ενδοπλασματικού δικτυωτού (διάταση και απελευθέρωση των ριβοσωματίων) και η έντονη κενотоπίωση του κυτοπλάσματος.

Τα παραπάνω αποτελούν στοιχεία, που χαρακτηρίζουν τη νέκρωση των κυττάρων των οργάνων, τα οποία φυσικά και συνάδουν με τα αποτελέσματα του οπτικού μικροσκοπίου (απώλεια αρχιτεκτονικής δομής κ.α.). Επίσης, οι αλλοιώσεις είναι τέτοιου βαθμού που αναμφίβολα τα όργανα δε μπορούν να εκπληρώσουν τον φυσιολογικό τους ρόλο (Μιχαήλ Γ. Σωτ. 1996), στοιχείο που έρχεται σε αντίθεση με την μακροσκοπική εικόνα των ψαριών. Το ήπαρ και οι νεφροί παίζουν τον κύριο ρόλο στην απορρόφηση και στην απέκκριση των διάφορων ουσιών από έναν οργανισμό. Εύλογη απορία είναι το πώς γίνεται να διατηρούνται τα ψάρια στην ζωή και μάλιστα χωρίς σημεία κίρρωσης ή ουραιμίας με τέτοιου βαθμού κυτταρική αποδόμηση. Ταυτόχρονα, οι αλλοιώσεις σε κυτταρικό επίπεδο συνάδουν με τις αλλοιώσεις σε οργανικό επίπεδο.

Να σημειωθεί, ότι τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν σημαντικά σε καθένα από τα όργανα που εξετάστηκαν (ήπαρ και νεφροί). Γεγονός που, ίσως, με μια πρόχειρη

ματιά να έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που σημειώνονται σε προηγούμενες ερευνητικές μελέτες (Råbergh *et al.* 1991; Kotak *et al.* 1996; Zurawell *et al.* 2005; Skocovska *et al.* 2007; Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009; Puerto *et al.* 2010). Αλλά με μια πιο προσεκτική εξέταση πιστοποιείται το γεγονός ότι τα στοιχεία που αναδεικνύονται δε διαφέρουν σημαντικά. Αναλυτικότερα, στο ήπαρ αποδεικνύονται πυρήνες με πύκνωση, πυρηνολυσία ή πυρηνορρηξία που χαρακτηρίζουν την νέκρωση των κυττάρων. Αυτό συμβαίνει γιατί ο πυρήνας προγραμματίζει τις περισσότερες, αν όχι όλες τις λειτουργικές δραστηριότητες των κυττάρων.

Επίσης, σημαντικές αλλοιώσεις εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (ήπαρ, νεφροί). Έτσι, σημειώνεται άλλοτε η παρουσία κοκκίων γλυκογόνου και άλλοτε η έλλειψη αυτών. Έχει παρατηρηθεί, επιπλέον, η έντονου βαθμού κενотоπίωση με συγκέντρωση λιποσταγονιδίων. Αυτά τα στοιχεία, με εξαίρεση την κενотоπίωση που πιστοποιείται κάθε φορά, πιθανότατα να τροποποιούνται σε τέτοιο βαθμό ανάλογα τη φάση της πέψης, στην οποία βρισκόταν ο βιολογικός οργανισμός. Ταυτόχρονα, σημαντικό ρόλο, ίσως, παίζει και ο τρόπος αλιείας, αφού ο βιοχημικός κύκλος του γλυκογόνου επηρεάζεται από το βαθμό καταπόνησης (stress) που βιώνει το ψάρι, καθώς και κάθε βιολογικός οργανισμός (Τρακατέλλης Α. 2002).

Επιπρόσθετα, η ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών δηλώνει την οριοθέτηση του κυττάρου. Τα λειτουργικά κύτταρα περιβάλλονται από ακέραιη κυτταρική μεμβράνη, η οποία μάλιστα ρυθμίζει το είδος των ουσιών που θα εισέλθουν και θα εξέλθουν από ένα κύτταρο (Μιχαήλ Γ. Σωτ. 1996; Τρακατέλλης Α. 2002). Έτσι, ανάλογα με το βαθμό εκφύλισης των μεμβρανών αυτών παρατηρείται ή όχι, ο σαφής διαχωρισμός μεταξύ των κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη, συχνά εξαιτίας των προχωρημένων αλλοιώσεων διαπιστώθηκε η συσσώρευση των πυρήνων

με εντελώς ακαθόριστα όρια μεταξύ αυτών. Στοιχείο που συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Kotak *et al.* (1996) αν και οι παραπάνω πειραματίστηκαν σε πέστρφες.

Ακολούθως, ποικίλου βαθμού αλλοιώσεις εντοπίστηκαν στα κυτταρικά οργανίδια, στοιχείο που ολοκληρώνει την εικόνα εκφύλισης και αποδιοργάνωσης των κυττάρων. Το πιο συχνό εύρημα, τόσο στη βιβλιογραφία (Råbergh *et al.* 1991; Kotak *et al.* 1996; Zurawell *et al.* 2005; Skocovska *et al.* 2007; Atencio *et al.* 2008a), όσο και στην παρούσα μελέτη, ήταν η διάταση του ενδοπλασματικού δικτυωτού. Κυρίως δε, στο κοκκώδες ενδοπλασματικό δικτυωτό σημειώνονταν οι πιο εντυπωσιακές αλλοιώσεις, μιας και σε αυτό παρουσιάζονταν ως και η διαρραγή των μεμβρανών του και η απελευθέρωση των ριβοσωματίων. Στο ενδοπλασματικό δικτυωτό, φυσιολογικά, επιτελούνται οι λειτουργίες, τόσο της σύνθεσης λιπιδίων, λιπαρών οξέων, στεροειδών (λείο ενδοπλασματικό δικτυωτό), όσο και της σύνθεσης πρωτεϊνών και της παραγωγής μεμβράνης (Μιχαήλ Γ. Σωτ. 1996). Έτσι, κατανοητό γίνεται ότι η καταστροφή του οργανιδίου, επιφέρει πολλά προβλήματα σε κυτταρικό, αλλά και ιστολογικό επίπεδο.

Παράλληλα, σημειώθηκε η έλλειψη ή/και η αποδόμηση οργανιδίων όπως τα μιτοχόνδρια και η συσκευή του Golgi. Τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια που επιβαρύνονται με τη λειτουργία της παραγωγής ενέργειας (Τρακατέλλης Α. 2002), ενώ στην συσκευή του Golgi επιτελείται το πακετάρισμα μακρομορίων (πρωτεΐνες και λιπίδια) που συντίθενται στο κύτταρο (Μιχαήλ Γ. Σωτ. 1996). Για τους παραπάνω λόγους η πιστοποίηση των λίγων διατεταμένων μιτοχονδρίων έρχεται να συμπληρώσει την εικόνα καταστροφής των κυττάρων και κατ' επέκταση την λειτουργική τους ανεπάρκεια. Στοιχείο που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα των άλλων ερευνητικών διαδικασιών (Råbergh *et al.* 1991; Zurawell *et al.* 2005;

Skocovska *et al.* 2007; Atencio *et al.* 2008a). Αντίθετα, αν και σύμφωνα με παλαιότερη μελέτη (Atencio *et al.* 2008a) αποδείχθηκε η διάταση της συσκευής του Golgi, στην παρούσα μελέτη δεν κατορθώθηκε να εντοπιστεί το οργανίδιο.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι παρόμοιες αλλοιώσεις εντοπίστηκαν για πρώτη φορά και στα κύτταρα του νεφρικού παρεγχύματος. Αν και στα νεφρικά κύτταρα του παρεγχύματος ήταν εντονότερες από τις αλλοιώσεις στα ηπατικά κύτταρα, όσον αφορά τους πυρήνες, εξαιτίας της εντονότατης αποδιοργάνωσης παρατηρήθηκαν μεγαλύτερου βαθμού αλλοιώσεις. Ωστόσο, δεν κατορθώθηκε να παρατηρηθούν τα οργανίδια των κυττάρων, με εξαίρεση το ενδοπλασματικό δικτυωτό. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε η παρουσία λυσοσωματίων τα οποία περιείχαν υπολείμματα οργανιδίων, γεγονός που αντικατοπτρίζει την εκδήλωση αυτοφαγίας. Κάποιος θα μπορούσε να σημειώσει ότι τα αποτελέσματα παλαιότερων μελετών δείχνουν διαφορετικές αλλοιώσεις (Atencio *et al.* 2008a; Atencio *et al.* 2008b; Atencio *et al.* 2009; Prieto *et al.* 2009; Puerto *et al.* 2010). Κάτι τέτοιο όμως δεν ευσταθεί, μιας και αυτές οι μελέτες επικεντρώθηκαν στη λεπτή κατασκευή του νεφρού, χωρίς να επικεντρώνονται στα ίδια τα κύτταρα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το οικοσύστημα της Κάρλας είναι ένας σημαντικότερος υδροβιότοπος, με πολύτιμες χρήσεις και λειτουργίες, ενώ διακρίνεται για την αξία της βιοποικιλότητας του. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παρουσία των MCYST στο λιμναίο οικοσύστημα της Κάρλας και οι επιπτώσεις αυτών στους κυπρίνους της λίμνης. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τα ακόλουθα:

1. Τα κυανοβακτήρια βρίσκονται και αφθονούν στο υδάτινο οικοσύστημα της λίμνης Κάρλας.
2. Ο κοινός κυπρίνος (*Cyprinus carpio*), ένα από τα εμπορικά είδη της περιοχής, φαίνεται να καταναλώνει μεγάλες ποσότητες των ακόλουθων ειδών κυανοβακτηρίων: *Microcystis aeruginosa* και *Planktothrix agardii*.
3. Σημαντικές ποσότητες MCYST εντοπίζονται στο ήπαρ, το νεφρικό παρέγχυμα και τον μυϊκό ιστό των κυπρίνων του λιμναίου οικοσυστήματος.
4. Σοβαρές ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εντοπίζονται σε ζωτικά όργανα των ιχθύων, όπως το ήπαρ και τους νεφρούς. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι συμβατές με τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις που προκαλούν οι MCYST στα ψάρια σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία.
5. Περαιτέρω διερεύνηση χρειάζεται για την εξακρίβωση τυχόν ειδικής απόκρισης των ιστών του κυπρίνου σε κάθε έναν επιβαρυντικό περιβαλλοντικό παράγοντα.
6. Η συνεχής παρακολούθηση του επιπέδου των MCYST, αλλά και ευρύτερα των κυανοτοξινών στο σύστημα της Κάρλας αποτελεί επείγον θέμα προστασίας της δημόσιας υγείας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γκέλης, Α. Σ. (2006). Πλαγκτικά κυανοβακτήρια: χαρακτηρισμός και παραγόμενα βιοδραστικά πεπτίδια. Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών. Θεσσαλονίκη, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 303.
- Εξαρχόπουλος, Μ., Ed. (1999). Λίμνη Κάρλα: Η αρχαία Βοϊβίης. Η αποκατάσταση ενός υγροτόπου στην Ελλάδα από τους σημαντικότερους της Ευρώπης. Βόλος ΤΕΕ τμήμα Μαγνησίας, σελ. 189.
- Ζαλίδης, Χ. Γ., Δημητριάδης, Π.Ξ., Χατζηγιαννάκης, Λ.Σ. (1995). Ο ιδεότοπος της τέως λίμνης Κάρλας ως βάση αξιολόγησης των προτάσεων λύσεων κατασκευής του ομότιμου ταμιευτήρα. Ε. Κ. Β.-. Υγροτόπων. Θεσσαλονίκη, σελ. 91.
- Ζαχίδου, Β. Χ. (2000). Η επίδραση του ευτροφισμού στην ιχθυοπανίδα της τέως λίμνης Κάρλας. Τμήμα Φυτικής & Ζωϊκής παραγωγής, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών. Βόλος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 109.
- Μιχαήλ Γ. Σωτ. (1996). Ιστολογία. Αδελφοί Κυριακίδη Α.Ε, Θεσσαλονίκη, σελ. 410.
- Τζιάτζιος, Γ. (2010). Λίμνη Κάρλα: Παρελθόν, Παρών και Μέλλον. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Βόλος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 128.
- Τρακατέλλης Α. (2002). Βιοχημεία Αδελφοί Κυριακίδη Α.Ε, Θεσσαλονίκη, σελ. 656.
- Φώτης Δ.Γ. Αγγελίδης Γ.Π. (2003). Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων. Κεφ: Αναπαραγωγή και εκτροφή Κυπρίνων. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, σελ. 163 – 192.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Atencio, L., I. Moreno, A. Jos, S. Pichardo, R. Moyano, A. Blanco A. M. Cameán (2008b). Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon*, 52(1): 1-12.
- Atencio, L., I. Moreno, Á. Jos, A. I. Prieto, R. Moyano, A. Blanco A. M. Cameán (2009). Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Toxicon*, 53(2): 269-282.
- Atencio, L., I. Moreno, A. I. Prieto, R. Moyano, A. M. Molina A. M. Cameán (2008a). Acute Effects of Microcystins MC-LR and MC-RR on Acid and Alkaline Phosphatase Activities and Pathological Changes in Intraperitoneally Exposed Tilapia Fish (*Oreochromis* sp.). *Toxicologic Pathology*, 36(3): 449-458.
- Butrer, N., J. Carlisle, R. Linville B. Washburn (2009). Microcystins. Abrief overview of their toxicity and effects, with special reference to fish, wildlife and livestock. E. H. H. Assessment, California Environmental Protection Agency: 1-21.

- Carbis, C. R., G. T. Rawlin, P. Grant, G. F. Mitchell, J. W. Anderson I. McCauley (1997). A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *Journal of Fish Diseases*, 20(2): 81-91.
- Carbis, C. R., G. T. Rawlin, G. F. Mitchell, J. W. Anderson I. McCauley (1996). The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *Journal of Fish Diseases*, 19(3): 199-207.
- Carmichael, W. W. J. An (1999). Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins*, 7(6): 377-385.
- Chorus, I., Ed. (2001). *Cyanotoxins, occurrence, causes, consequences*. Springer, Berlin, pp 357.
- Chorus, I. J. Bartram, Eds. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water*. Spon press, London, pp 416.
- Cummings, M. (2002). Evaluation of microcystins enzyme - based analytic techniques and microcystin occurrence in the Metrophoenix arizona water supply system. Arizona, Arizona State University: 114.
- Ernst, B., S. J. Hoeger, E. O'Brien D. R. Dietrich (2006). Oral toxicity of the microcystin-containing cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). *Aquatic Toxicology*, 79(1): 31-40.
- Fischer, W. J. D. R. Dietrich (2000). Pathological and Biochemical Characterization of Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164(1): 73-81.
- Fischer, W. J., B. C. Hitzfeld, F. Tencalla, J. E. Eriksson, A. Mikhailov D. R. Dietrich (2000). Microcystin-LR Toxicodynamics, Induced Pathology, and Immunohistochemical Localization in Livers of Blue-Green Algae Exposed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicological Sciences*, 54(2): 365-373.
- Freitas de Magalhães, V., R. Moraes Soares S. M. F. O. Azevedo (2001). Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 39(7): 1077-1085.
- Fromme, H., A. Köhler, R. Krause D. Führling (2000). Occurrence of cyanobacterial toxins—microcystins and anatoxin-a—in Berlin water bodies with implications to human health and regulations. *Environmental Toxicology*, 15(2): 120-130.
- Gupta, S. U. S. Guha (2006). Microcystins toxicity in a freshwater fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Current Science*, 10(11): 1261-1271.
- Ibelings, B. W., K. Bruning, J. de Jonge, K. Wolfstein, L. M. D. Pires, J. Postma T. Burger (2005). Distribution of Microcystins in a Lake Foodweb: No Evidence for Biomagnification. *Microbial Ecology*, 49(4): 487-500.
- Ibelings, B. W. I. Chorus (2007). Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 150(1): 177-192.
- Ibelings, B. W. I. Chorus (2007). Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, 150(1): 177-192.
- Jiang, J., X. Gu, R. Song, Q. Zhang, J. Geng, X. Wang L. Yang (2011). Time-dependent oxidative stress and histopathological changes in <i>Cyprinus

- carpio L. exposed to microcystin-LR. *Ecotoxicology*, 20(5): 1000-1009.
- Kagalou, I., T. Papadimitriou, V. Bacopoulos I. Leonardos (2008). Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelio*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom. *Environmental Monitoring and Assessment*, 137(1): 185-195.
- Kotak, B. G., S. Semalulu, D. L. Fritz, E. E. Prepas, S. E. Hrudehy R. W. Coppock (1996). Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administered microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon*, 34(5): 517-525.
- Lanaras, T., S. Tsitsamis, C. Chlichlia C. Cook (1989). Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters. *Journal of Applied Phycology*, 1(1): 67-73.
- Lance, E., C. Josso, D. Dietrich, B. Ernst, C. Paty, F. Senger, M. Bormans C. Gérard (2010). Histopathology and microcystin distribution in *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) following toxic cyanobacterial or dissolved microcystin-LR exposure. *Aquatic Toxicology*, 98(3): 211-220.
- Li, X., Y. Liu L. Song (2001). Cytological alterations in isolated hepatocytes from common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystin-LR. *Environmental Toxicology*, 16(6): 517-522.
- Malbrouck, C. P. Kestemont (2006). Effects of microcystins on fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1): 72-86.
- Mathys, W., Surholt, B., (2004). Analysis of microcystins in freshwater samples using high performance liquid chromatography and an enzyme-linked immunosorbent assay. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207: 601 - 605.
- Molina, R., I. Moreno, S. Pichardo, A. Jos, R. Moyano, J. G. Monterde A. Cameán (2005). Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicon*, 46(7): 725-735.
- Nicholson, C. B. D. B. Burch (2001). Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines. Australia, pp 64.
- Oikonomou, A., Matsiapi, M., Karayanni, H., Moustaka - Gouni, M., Kormas, K.A. (2012). Plankton microorganisms coinciding with two consecutive mass fish kills in a newly reconstructed lake. *The Scientific World Journal*.
- Papadimitriou, T., I. Kagalou, V. Bacopoulos I. D. Leonardos (2009). Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek Lakes. *Environmental Toxicology*, 25(4): 418-427.
- Petalas, C., V. Pisinaras, K. Koltsida T. V. (2005). The hydrological regime of the East basin of Thessaly, Greece. 9th International conference CEST, Rodos, p 1206 – 1213.
- Prieto, A. I., A. Jos, S. Pichardo, I. Moreno, M. Á. de Sotomayor, R. Moyano, A. Blanco A. M. Cameán (2009). Time-dependent protective efficacy of Trolox (vitamin E analog) against microcystin-induced toxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, 24(6): 563-579.
- Puerto, M., A. I. Prieto, A. Jos, I. Moreno, R. Moyano, A. Blanco A. M. Cameán (2010). Dietary N-Acetylcysteine (NAC) prevents histopathological changes

- in tilapias (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Aquaculture*, 306(1-4): 35-48.
- Råbergh, C. M. I., G. Bylund J. E. Eriksson (1991). Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology*, 20(3): 131-145.
- Sipia, V., K. Lahti, H. T. Kankaanp, P. J. Vuorinen J. A. O. Meriluoto (2002). Screening for cyanobacterial hepatotoxins in herring and salmon from the Baltic Sea. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 5(4): 451-456.
- Skocovska, B., K. Hilscherova, P. Babica, O. Adamovsky, H. Bandouchova, J. Horakova, Z. Knotkova, B. Marsalek, V. Paskova J. Pikula (2007). Effects of cyanobacterial biomass on the Japanese quail. *Toxicon*, 49(6): 793-803.
- Valdor, R. M. Aboal (2007). Effects of living cyanobacteria, cyanobacterial extracts and pure microcystins on growth and ultrastructure of microalgae and bacteria. *Toxicon*, 49(6): 769-779.
- van Apeldoorn, M. E., H. P. van Egmond, G. J. Speijers G. J. Bakker (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research*, 51(1): 7-60.
- Zurawell, R. W., H. Chen, J. M. Burke E. E. Prepas (2005). Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 8(1): 1-37.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ανώνυμος (2004). Ιστορική Αναδρομή www.e-karla.com, Δήμος Κάρλας (πρόσβαση: 13-01-2012)
- Ανώνυμος (2011). *Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758 - Common carp, <http://www.fishbase.org/summary/Cyprinus-carpio+carpio.html>. (πρόσβαση: 13-01-2012)

7. ABSTRACT

The cyanobacters are phytoplanktonic, unicellar organisms found in terrestrial and aquatic ecosystems, whose cells include toxic substances, such as microcystins, nodularins and anatoxins. These substances show negative effects on various living organisms, such as gastrointestinal diseases, respiratory and neurological problems, and dermatological irritations. Cyanobacterials, which are the most common type of prokaryotic organisms, are also known for their capacity to bioaccumulate and biomagnify, thus finding their way to aquatic aquatic food chain. Poisoning is recorded in numerous occasions in mammals, but there are only a limited number of records for aquatic organisms, such as fish.

The toxicity of cyanobacters, is mainly affected by temperature, exposure to sunlight, nutrients (N₂ and P) and turbidity, factors that are related to eutrophication in freshwater. Eutrophication causes a sharp increase, on phytoplankton population called “bloom of cyanobacters”, which in some parts of a lake develop a gelatinous material called scum. Increased toxicity does not coincide with cyanobacters’ proliferation, but it is a consequence of the collapse of the bloom, as the toxins infect the organisms by contact (mucous, respiratory track and skin). This may be considered a threat for both omnivorous and herbivorous aquatic species consuming phytoplankton.

Microcystins are the most popular type of toxins responsible for poisoning humans and territorial animals. Microcystins are hepatotoxic peptides, of various toxicity levels among the different types which inhibit phosphatase and the amino acids of serine / threonine. The most common type found in the environment is the microcystin – LR. As extensively reported in the literature, intrahepatic hemorrhage and the hypovolemia shock are the most common reasons for mammals’ mortality.

However, available data on the effect of microcystins on aquatic organisms is scarce. Detrimental health effects to humans can occur after the consumption of infected fish, shrimps, mussels. Common carp is the most vulnerable fish to be poisoned from cyanobacterials. The aim of this field study is to investigate the effects of cyanobacterials poisoning in carp in the lake Karla.

The concentration of MCYST – LR in the lake (water column and scum) and fish tissues is measured by enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA). Stomach contents analysis is also conducted. The histopathological examination is carried out by light and electron microscopy and the tissue and cellular effects of cyanobacter in common carp are analyzed and compared with previous studies.

The results show high numbers of microcystins both in the environment and in the carp. In the short period of experimentation (25 days) the amount of MCYST – LR in water column and scum is found to be 3.01µg/l and 5.50µg/l respectively. The highest concentrations are found in fish kidney, during the second sampling, while the concentrations in fish flesh are similar throughout the study. The examination of fish stomach contents show very high amounts of cyanobacters. The macroscopic and microscopic examination of the fish reveals the toxic effect of microcystins in carp.

The necropsy reveals gross lesions in the liver and in the kidney while no lesion is detected in the other examined organs (heart, brain, muscles). The liver is found to be discolored with the presents of ecchymoses and petechiae. Histopathological lesions are detected in the liver and kidney. They found to be characterized by hydropic degeneration and necrosis. Additionally cellular degeneration and necrosis are detected by electron microscopy analysis. The above changes are similar with those which descript in other studies, explained by the different intakes of microcystin – LR.

This study shows the effects of poisoning in carp, but other factors than those discussed above can also play a role in these pathological changes. The mechanisms of expansion of microcystins and poisoning of aquatic organisms (e.g. fish) are not yet known in the ecosystem of the lake Karla. Future research may focus on indentifying the changes caused by microcystins and other factors which may cause similar changes in tissues and on identifying the overall combined effect on fish health.

Keywords: *Cyprinos carpio*, histopathological examination, cyanobacters, microcystins,

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1 Τοξικά κυανοβακτήρια

Γένη που παράγουν κυανοτοξίνες

<i>Anabaena</i>	<i>Anabeanopsis</i>
<i>Aphanizomenon</i>	<i>Hapaloshiphon</i>
<i>Microcystis</i>	<i>Cylindrospermopsis</i>
<i>Nodularia</i>	<i>Lyngbya</i>
<i>Nostoc</i>	<i>Schizothrix</i>
<i>Planktothrix (Oscillatoria)</i>	

Γένη με άγνωστες τοξίνες

<i>Coelosphaerium</i>	<i>Fisherella</i>
<i>Scytonema</i>	

Συχνότερα απαντώμενα είδη

<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Planktothrix agardhii</i>
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>Lyngbya spp.</i>
<i>Anabaena flos-aquae</i>	

Πίνακας 2		Γενικά χαρακτηριστικά των κυανοτοξινών		
Τοξίνες	Ιστοί στόχοι	Δράση	Προέλευση	
<u>Κυκλικά πεπτίδια</u>				
MCYST	Ήπαρ	Αναστολή πρωτεϊνικών φωσφατασών (PP1 & PP2A)	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Hapaloshiphon</i> , <i>Anabeanopsis</i> ,	
Νοντουλαρίνη	Ήπαρ	Αναστολή πρωτεϊνικών φωσφατασών (PP1 & PP2A)	<i>Nodularia</i>	
<u>Αλκαλοειδή</u>				
Ανατοξίνη – α	Νευρικές συνάψεις	Μη αναστρέψιμη δέσμευση με τους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i>	
Ανατοξίνη – α(S)	Νευρικές συνάψεις	Αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης	<i>Anabaena</i>	
Απλυσιατοξίνες	Δέρμα	Φλεγμονή	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Planktothrix</i>	
Κυλινδροσπερμοψίνες	Ήπαρ	Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, βλάβες στο DNA	<i>Anabaena</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Umezakia</i>	
Λυγκμπυατοξίνη – α	Δέρμα, γαστρεντερικός σωλήνας	Δερματίτιδες, φλεγμονές στοματικής κοιλότητας και γαστρεντερικού	<i>Lyngbya</i>	
Σαξιτοξίνες	Νευράξονες	Δέσμευση και παρεμπόδιση ιόντων νατρίου στα νευρικά κύτταρα	<i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i>	
<u>Πολυσακχαρίτες</u>				
Λιποπολυσακχαρίτες (LPS)	Οποιοσδήποτε εκτεθειμένος ιστός	Ερεθιστική και αλλεργική δράση	Όλα	

