



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Υδατοκαλλιέργειες» -
«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»

ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

“CYP19A1 και CYP1A2 ως βιοδείκτες φυλετικής ωρίμανσης και ρύπανσης: πειραματική διερεύνηση της έκφρασής τους σε πεταλούδες (*Carassius gibelio*) της Λίμνης Κάρλας και της Λίμνης Παμβώτιδας”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

Αλεξίου Ιωάννης

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Πατπάς Ιωάννης

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2012



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM

“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”

***IN COLLABORATION WITH
THE DEPARTMENT OF AQUACULTURE & FISHERIES, TEI OF EPIRUS***

Thesis:

“*CYP19A2* and *CYP1A2* as bioindicators of sexual maturation and pollution: experimental investigation of their expression in gibel carp (*Carassius gibelio*) from Lake Karla and Lake Pamvotis ”

POSTGRADUATE STUDENT
Alexiou Ioannis

SUPERVISOR
Pappas Ioannis

KARDITSA 2012

*Αφιερώνεται στους γονείς μου
Απόστολο και Μαγδαληνή
για την αγάπη, την συμπαράσταση
και τα εφόδια που μου έδωσαν*

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών (primers) έγινε η ποσοτικοποίηση του mRNA του *CYP1A2* του ήπατος και της *CYP19A1* των γονάδων με real time PCR σε πεταλούδες (*Carassius gibelio*) με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τα επίπεδα μόλυνσης των λιμνών Παμβώτιδας και Κάρλας από ρυπαντές που επηρεάζουν τα αναφερόμενα γονίδια. Παράλληλα, έγινε μια συνοπτική έρευνα που αφορά τη φύση των ρυπαντών στα δύο λιμναία οικοσυστήματα με βάση και τη λεκάνη απορροής αυτών. Επίσης, παρατέθηκαν πληροφορίες για την κατανόηση του όρου “βιοδείκτης”, αλλά και την ανάπτυξη αντοχής ενός οργανισμού στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών και έγινε εκτενής ανάλυση του ρόλου των ενζύμων βιομετασχηματισμού στα οποία ανήκει το *CYP1A2* και το *CYP19A* για καλύτερη εκτίμηση και αξιοποίηση των ευρημάτων που θα αποτελέσουν κίνητρο για περαιτέρω έρευνα και λήψη μέτρων για την αποκατάσταση των δύο οικοσυστημάτων. Στη συνέχεια, αναλύθηκαν οι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, όπως τα ξενοβιοτικά που επηρεάζουν την έκφραση της αρωματάσης με παραδείγματα από άλλα οικοσυστήματα και μελέτες. Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη έκφραση του *CYP1A2* αλλά και της αρωματάσης των γονάδων στους ιχθύες από τη Λίμνη Κάρλα σε σχέση με τους ιχθύες από τη Λίμνη Παμβώτιδα. Συστήνεται η συνδυασμένη χρήση διαγνωστικών εργαλείων, αλλά και η λήψη διαχειριστικών μέτρων για την αποκατάσταση των δύο οικοσυστημάτων.

Λέξεις κλειδιά: *CYP1A2*, *CYP19A*, ξενοβιοτικά, *Carassius gibelio*, Παμβώτιδα, Κάρλα

Abstract

In this thesis primers for the quantification of liver *CYP1A2* mRNA and gonadal *CYP19A1* mRNA were used for real time PCR on gibel carp (*Carassius gibelio*) in order to create a genetic expression profile. Through this profile we may be able to make conclusions about the pollution in the Lake Pamvotis and Lake Karla. Concurrently we made a summary concerning the variety of pollutants in these two lakes based on data from the lake basins. Information about biomarkers and bioindicators are also given. An extended analysis on biotransformation enzymes such as *CYP1A2* and multixenobiotic resistance is given in order to evaluate our findings as a motive for further research and taking measures for the rehabilitation of the ecosystem. Endogenous and exogenous factors affecting aromatase expression are analysed with the use of examples from other ecosystems and similar studies. Our first results showed increased *CYP1A2* and aromatase gene expression, which is greater in Lake Karla. The combined use of diagnostic techniques and management measures is recommended for the rehabilitation of these ecosystems.

Key words: *CYP1A2*, *CYP19A*, xenobiotics, *Carassius gibelio*, Pamvotis, Karla

Ευχαριστίες....

Για τη ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τα άτομα που με στήριξαν σε αυτό. Κατ' αρχάς ευχαριστώ την υπεύθυνη του Φορέα Διαχείρισης Λίμνης Κάρλας, Δρ.Παπαδημητρίου Δότη για την πολύτιμη βοήθειά της κατά την αρχική δειγματοληψία και τη μετέπειτα καθοδήγηση για την εξαλίευση των ιχθύων. Ευχαριστώ, επίσης, τον κ, Κώστα για την εξαλίευση των ιχθύων στην Λίμνη Κάρλα, αλλά και τον κ. Πέτσιο Τάσσο που με βοήθησε στη Λίμνη Παμβώτιδα. Επίσης, ευχαριστώ και τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Παππά Ιωάννη για τη γνώση που μου μετέδωσε κατά τη διενέργεια του πειράματος. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου για την στήριξη που μου παρείχε και παρέχει μέχρι και σήμερα στους δύσκολους καιρούς που διανύουμε, καθώς και τους μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου για τις ωραίες στιγμές που περάσαμε...

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	σελ.8
1.1. Βιοδείκτες.....	σελ.8
1.2.Οι λίμνες.....	σελ.11
1.3. Το κυτόχρωμα P450.....	σελ.16
1.4. Το γονίδιο <i>CYP1A2</i>	σελ.18
1.5. Το γονίδιο <i>CYP19A2</i>	σελ.25
1.6. Καθορισμός φύλου.....	σελ.26
1.7. Το γονίδιο <i>FOXL2</i>	σελ.27
1.8. Υποδοχείς Οιστρογόνων.....	σελ.30
1.9. Ξενοοιστρογόνα.....	σελ.31
2. Υλικά και μέθοδοι.....	σελ.43
2.1. Δειγματοληψία- Λήψη οργάνων.....	σελ.43
2.2. Απομόνωση mRNA.....	σελ.44
2.3.Παρασκευή μονόκλωνου δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (cDNA).....	σελ.45
2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt PCR, qPCR).....	σελ.46
2.5. Στατιστική Επεξεργασία.....	σελ.51
3. Αποτελέσματα.....	σελ.51
4. Συμπεράσματα.....	σελ.55
5. Βιβλιογραφία.....	σελ.61

1.Εισαγωγή

Η επιβάρυνση του περιβάλλοντος με ανόργανους και οργανικούς (π.χ. ξενοβιοτικά) ρυπαντές είναι όλοένα αυξανόμενη ιδιαίτερα μετά τη λεγόμενη βιομηχανική επανάσταση. Τις τελευταίες δεκαετίες, πολλές επιστημονικές έρευνες αναφέρονται στις πιθανές αλληλεπιδράσεις αυτών των ρυπαντών με τα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της επιφάνειας του πλανήτη Γη καλύπτεται από νερό, τότε γίνεται κατανοητό ότι το υδάτινο οικοσύστημα είναι ο τελικός αποδέκτης αυτών των ρυπαντών μέσω ατμοσφαιρικών και υδρογεωλογικών φαινομένων (κατακρήμνιση κ.α.). Μεγάλο ποσοστό των οργανικών ρυπαντών αποτελούν τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), τα οργανοχλωριωμένα ζιζανιοκτόνα (OCPs), οι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), τα πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (PCDFs) και οι διβενζοδιοξίνες (PCDDs). Οι επιδράσεις αυτών έχουν άμεσο ή και έμμεσο αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία. Για μια πρόωμη εκτίμηση αυτών των επιδράσεων σε διάφορους οργανισμούς που χρησιμοποιούνται ως βιολογικά μοντέλα έχει καθιερωθεί η έννοια των βιολογικών δεικτών. Οι βιοδείκτες είναι μετρήσιμοι δείκτες στους ιστούς και τα υγρά του σώματος. Οι βιοδείκτες είναι ενδεικτικοί βιοχημικών και κυτταρικών τροποποιήσεων εξ' αιτίας της παρουσίας ή του αντίκτυπου των τοξικών ουσιών ή της επίδρασης του ξενιστή σε αυτές (NRC 1987). Ως βιοδείκτες στους ιχθύες χρησιμοποιούνται τα ένζυμα βιομετασχηματισμού (φάσης I και II), παραμέτροι οξειδωτικού στρες, προϊόντα βιομετασχηματισμού, πρωτεΐνες στρες, αιματολογικές παράμετροι, ανοσολογικές, αναπαραγωγικές και ενδοκρινικές, γενοτοξικές, νευρομυϊκές, φυσιολογικές, ιστολογικές και μορφολογικές παράμετροι.

1.1 Βιοδείκτες

Στα βιολογικά μοντέλα εντάσσεται η χρήση οργανισμών οι οποίοι είναι έμβια όντα που εντοπίζονται εύκολα στο οικοσύστημα, βρίσκονται σε αφθονία, είναι αντιπροσωπευτικά του οικοσυστήματος, συσσωρεύουν ρυπαντές αντανακλώντας τα επίπεδα μόλυνσης και είναι

γνωστή η βιολογία, η οικολογία και η κατανομή τους. Για να εκτιμηθεί αυτή η επίδραση χρησιμοποιούνται μετρήσιμοι βιολογικοί παράγοντες σε μοριακό κυτταρικό ή επίπεδο οργανισμού και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το αν μετρούν το βαθμό έκθεσης, επίδρασης ή ευαισθησίας (Wolfe, 2006). Οι βιολογικοί δείκτες έκθεσης σχετίζονται με την εντόπιση και μέτρηση μιας εξωγενούς ουσίας ή του μεταβολίτη της ή του προϊόντος αλληλεπίδρασης ενός ξеноβιοτικού παράγοντα και ενός μορίου στόχου ή κυττάρου στόχου. Οι μετρήσιμες βιοχημικές, φυσιολογικές ή άλλες μεταβολές σε έναν οργανισμό ενδεικτικοί νόσου ή βλάβης καλούνται βιοδείκτες δράσης. Γενετικοί παράγοντες και αλλαγές στους υποδοχείς ενός οργανισμού συνιστούν τους βιοδείκτες ευαισθησίας. Η σημασία του κάθε παράγοντα για την εξαγωγή συμπερασμάτων έγκειται στην ειδικότητα, την ευαισθησία, την απλότητα και τη σταθερότητα αυτού του παράγοντα (Walker *et al.* 1998) και στην πρόωμη ανίχνευση τυχόν μεταβολών. Οι βιοδείκτες δεν ποσοτικοποιούν τους ρυπαντές αλλά την επίδραση αυτών. Το είδος, το στάδιο ανάπτυξης του οργανισμού, οι ατομικές ιδιαιτερότητες, η τροφική του συμπεριφορά, το περιβάλλον (φωτοπερίοδος, θερμοκρασία, οξυγόνο) πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν. Είναι χαρακτηριστικό ότι ο ίδιος βλαπτικός παράγοντας μπορεί να επιδράσει π.χ. σε ένα γονίδιο διαφορετικά *in vitro* από ότι *in vivo*. Τα ενζυμικά συστήματα του ήπατος και τα συστήματα απέκκρισης στους τελεόστεους ιχθύες έχουν ομοιότητες με τα αντίστοιχα των θηλαστικών.

Το είδος που χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό μοντέλο στη παρούσα εργασία για την διερεύνηση έκφρασης των δύο γονιδίων είναι η πεταλούδα (*C. gibelio*). Το είδος αυτό θεωρείται εισβολικό στην Ελλάδα και λόγω των χαρακτηριστικών του επιβιώνει και κυριαρχεί εις βάρος των γηγενών ειδών (Perdikaris *et al.*, 2011). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που τη διακρίνουν από τον κυπρίνο (*Carassius carassius*) έχουν ως εξής: Η πεταλούδα έχει χρυσο-καφέ χρωματισμό (αντί χρυσοπράσινο του κυπρίνου), το τελευταίο απλό εδρικό και τα ραχιαία πτερύγια είναι οδοντωτά, φέρουν 39-50 βραγχιακά δόντια (αντί 23-35 του κυπρίνου), το ελεύθερο άκρο του ραχιαίου πτερυγίου είναι κυρτό ή ευθύ (αντι

κοίλο), φέρει 5^{1/2} διακλαδισμένα εδρικά πτερύγια (αντί 6^{1/2}) και το περιτόναιο έχει χρώμα μαύρο (αντί λευκό) (Ozulug *et al.*, 2004) και δεν φέρει “μουστάκια”. Αναπαράγεται γυνογενετικά χρησιμοποιώντας το σπέρμα άλλων ειδών για να ενεργοποιήσει τα αυγά του (παρασιτισμός σπέρματος). Κυριαρχούν σχεδόν κατά αποκλειστικότητα τα θηλυκά και τα τριπλοειδή, τα οποία είναι στείρα, αναπτύσσονται ταχύτερα, έχουν ευρεία προσαρμοστικότητα και μεγάλη αντοχή. Είναι ευκαιριακά σαρκοβόρο και ανταγωνίζεται τα γηγενή είδη τροφικά και σε σχέση με τα αναπαραγωγικά υποστρώματα (Innal, 2011). Αναπτύσσεται σε ρηχά και θερμά ύδατα και ευτροφικές λίμνες με χαμηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο. Η επιλογή του συγκεκριμένου είδους έγινε διότι βρίσκεται σε αφθονία στις δύο λίμνες και είναι γνωστός ο τρόπος αναπαραγωγής του και η δυνατότητα επιβίωσης του σε επιβαρυσμένο οικοσύστημα. Η διατροφή του από το βένθος όπου συσσωρεύονται ρυπαντές στο ίζημα και η ανθεκτικότητα της πεταλούδας την καθιστά κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη επιδράσεων διαφόρων ρύπων. Μετά από τη χορήγηση άδειας από το Φορέα Διαχείρισης Λίμνης Κάρλας εξαλειύτηκαν με τη βοήθεια βάρκας και τη χρήση διχτυού 12 ιχθύες του είδους από τη Λίμνη Κάρλα και συλλέχθηκαν επίσης 12 ιχθύες με τη βοήθεια αλιέων στη Λίμνη Παμβώτιδα. Κατά τη συλλογή δειγμάτων ήπατος και γονάδων διενεργήθηκε και νεκροτομική εξέταση των ιχθύων.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση δύο ένζυμων βιομετασχηματισμού, του *CYP1A2* και του *CYP19A1* σε πεταλούδες (*C. gibelio* Bloch, 1872) από τις λίμνες Παμβώτιδα στο νομό Ιωαννίνων και Κάρλα στη Θεσσαλία. Το *CYP1A2* είναι μονοξυγενάση του κυττοχρώματος P-450, της οποίας η έκφραση επηρεάζεται από πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Το *CYP1A2* βρίσκεται στο ήπαρ του ανθρώπου και σε πληθώρα άλλων ζώων. Την έκφρασή του στον άνθρωπο επηρεάζουν επίσης η καφεΐνη, ο καπνός του τσιγάρου, η κατανάλωση σταυρανθών λαχανικών αλλά και πληθώρα φαρμάκων όπως η φαιντοΐνη, η φαινοβαρβιτάλη και η ομεπραζόλη (Gunes *et al.*, 2008; Djordjevic *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2001). Υπο την επιστήμη της περιβαλλοντικής τοξικολογίας, η έκφραση

του *CYP1A* έχει χρησιμοποιηθεί για έρευνα στο μηχανισμό δράσης των ξενοβιοτικών, στον έλεγχο τοξικότητας ως πρώιμος δείκτης για την επίδραση στην υγεία και το οικοσύστημα, στην προσπάθεια ταυτοποίησης περιβαλλοντικών ρύπων και στην ποσοτικοποίηση του αντίκτυπου και του βαθμού έκθεσης σε οργανικούς ρύπους. Αντίστοιχα το γονίδιο της αρωματάσης μετέχει στη στεροειδογένεση και δη στη μετατροπή της τεστοστερόνης σε οιστραδιόλη και της ανδροστενεδιόνης σε οιστρόνη και η έκφρασή του επηρεάζεται από πληθώρα ουσιών που περιέχουν στο μόριό τους αρωματικό δακτύλιο και μπορούν να ενταχθούν στην κατηγορία των ενδοκρινικών διαταρακτών. Στους ιχθύες το ένζυμο απαντάται σε δύο ισομορφές. Την ισομορφή *CYP19A2* στον εγκέφαλο και την ισομορφή *CYP19A1* στις ωοθήκες.

1.2 Οι λίμνες

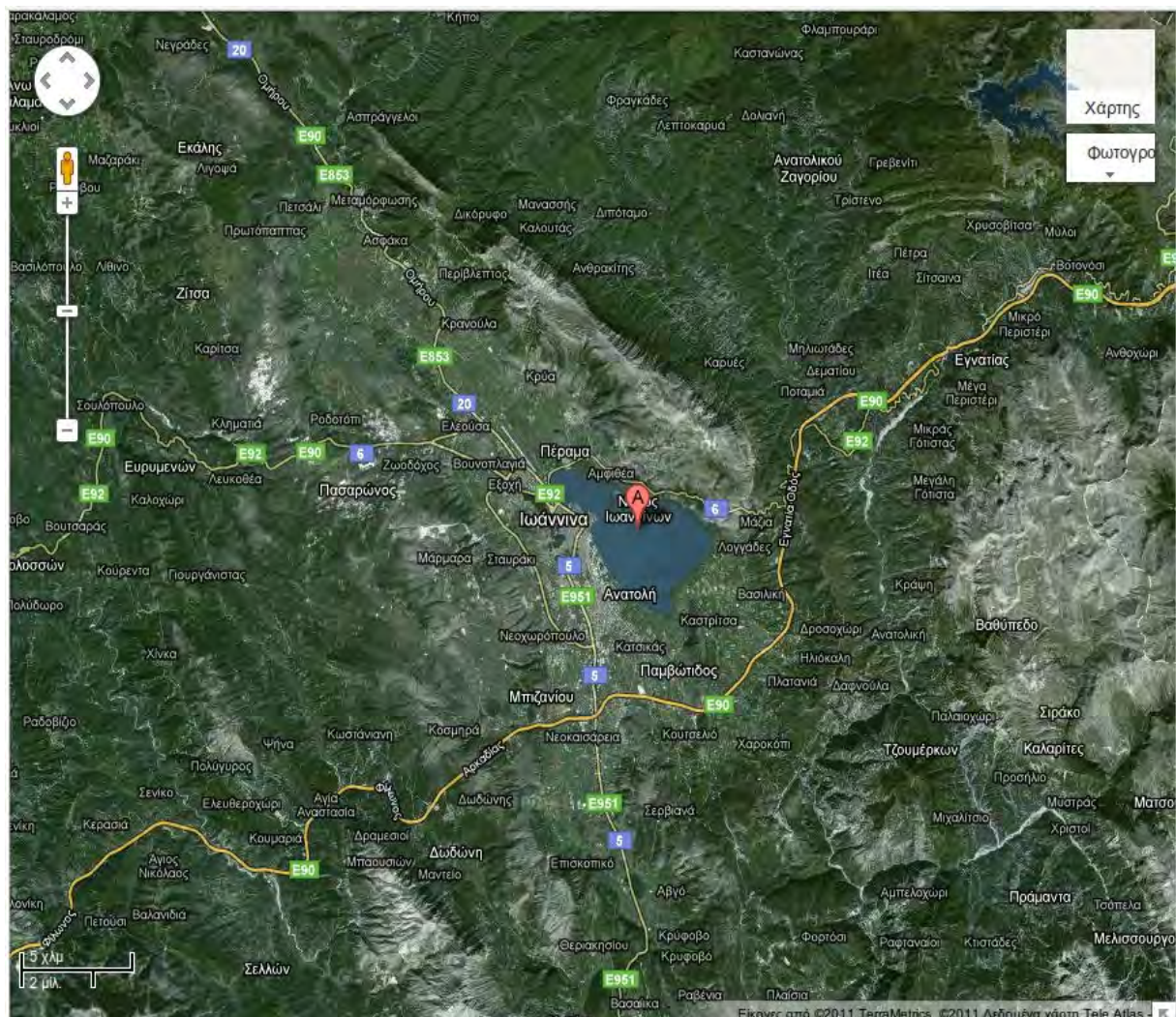
Οι λίμνες από τις οποίες λήφθηκαν οι ιχθύες με βάση τα στοιχεία που έχουν καταγραφεί από πληθώρα μελετών, θεωρούνται μολυσμένες από ευρύ φάσμα ρυπαντών. Η Λίμνη Παμβώτιδα δημιουργήθηκε πριν από περίπου 5 εκ. χρόνια. Ως οικοσύστημα χαρακτηρίζεται ευτροφικό έως υπερτροφικό. Καταλαμβάνει έκταση περί τα 22 km², το μέσο βάθος της είναι 4m και το μέγιστο 8,5m. Ο όγκος νερού κυμαίνεται μεταξύ 80 και 120 εκ. m³, με μέσο υδραυλικό χρόνο ανανέωσης του νερού μεγαλύτερο των 11 μηνών. Η λεκάνη απορροής της αποτελείται από ένα δυτικό και ορεινό τμήμα και από ένα ανατολικό επίπεδο τμήμα. Η Παμβώτιδα υδροδοτείται από τις πηγές της Ασφάκας και του Αγίου Ιωάννη αλλά και από το όρος Μιτσικέλι. Αποστραγγίζεται μέσα από ένα δίκτυο καταβόθρων στους ποταμούς Άραχθο, Λούρο και Καλαμά. Μέχρι τη δεκαετία του 1960 αποτελούσε ενιαίο οικοσύστημα μαζί με τη Λίμνη Λαψίστα. Η μετέπειτα όμως αποξήρανση της Λίμνης Λαψίστα σε συνδυασμό με τη δημιουργία αναχωμάτων, μετέτρεψαν την Παμβώτιδα σε κλειστό οικοσύστημα με αντίστοιχες επιδράσεις στη βιοποικιλότητα. Τα όρια της Λίμνης Παμβώτιδας περιγράφονται επ' ακριβώς με νομοθετικό πλαίσιο (ΦΕΚ 385/24.08.2007). Η χαρτογράφηση της περιοχής είναι ενδεικτική των πηγών μόλυνσης της λίμνης. Λόγω της γειννίας της

πόλης των Ιωαννίνων με τη λίμνη αυξάνει ο κίνδυνος εισροής αστικών λυμάτων στη λίμνη. Άλλη πηγή ρύπανσης είναι τα ζωικά απόβλητα κυρίως από χοιροστάσια και πτηνοτροφεία, εργοστάσια επεξεργασίας γάλακτος και κρέατος που ευθύνονται σε μεγάλο βαθμό για το πρόβλημα ευτροφισμού της Παμβώτιδας. Μετρήσεις που έγιναν από το ΑΠΘ έδειξαν υψηλές τιμές φωσφόρου. Σε ποταμούς της ευρύτερης περιοχής οι εστίες ρύπανσης ποικίλουν. Ο ποταμός Καλαμάς ρυπαίνεται από υπολείμματα σφαγείων, φυτοφαρμάκων και το βιολογικό καθαρισμό της πόλης των Ιωαννίνων, ο Άραχθος από ανεπεξέργαστα απόβλητα φρουτοβιομηχανίας και ο Λούρος έχει υψηλές τιμές COD και αμμωνίας εξ αιτίας των ζωικών αποβλήτων (Σαγιάς *et al.*, 2010; Σακκάς, 2011). Άλλη μια μελέτη που έγινε έδειξε την παρουσία βαρέων μετάλλων συγκεκριμένα χαλκό (Cu) και ψευδάργυρο (Zn) τα οποία μετρήθηκαν με φασματοφωτομερία ατομικής απορρόφησης στους μύς, το ήπαρ και τις γονάδες τεσσάρων ειδών ιχθύων (*Cyprinus carpio*, *Silurus aristotelis*, *Rutilus ylikiensis*, *C. gibelio*) (Paragiannis *et al.*, 2004) και βρέθηκαν κάτω από το ελάχιστο επιτρεπτό όριο στη σάρκα για ανθρώπινη κατανάλωση.

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι: Ετήσιες Ποσότητες Παραγόμενων Αποβλήτων από Πτηνοτροφικές Μονάδες Κατανεμημένες στις Υδρολογικές Λεκάνες του Ν. Ιωαννίνων (Σακκάς, 2011)

Υδρολογική λεκάνη	Ποσότητα στερεών αποβλήτων (tn/έτος)	Ολικό άζωτο (N) (tn/έτος)	Στοιχεικός φώσφορος (P) (tn/έτος)	Στοιχειακό κάλιο (K) (tn/έτος)
Βόρειο Λεκανοπέδιο Ιωαννίνων	32773	918	324	462
Νότιο Λεκανοπέδιο Ιωαννίνων	85020	2381	842	1200
Λεκάνη Καλαμά	19399	543	192	274
Λεκάνη Άραχθου	26220	734	260	370
Λεκάνη Αώου	4439	124	44	63
Λεκάνη Λούρου	2121	59	20	29

Με την μέθοδο της ELISA στο έντερο, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο, το ήπαρ και τους μύς (κατά σειρά φθίνουσας συγκέντρωσης) από πεταλούδες της Λίμνης Παμβώτιδας βρέθηκαν μικροκυστίνες (MCYST) με συγκεντρώσεις στη σάρκα της τάξης 0.096 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{ημέρα}$ και το ανώτατο επιτρεπτό όριο για ανθρώπινη κατανάλωση στα 0.04 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{ημέρα}$. Οι ιχθύες ήταν ηλικίας 4-5 ετών. ELISA έγινε και στο νερό της Λίμνης και βρέθηκαν τιμές μικροκυστινών ανώτερες από αυτές που προβλέπει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) στο νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση (Kagalou *et al.*, 2006). Στο φυτοπλαγκτόν της λίμνης κυριαρχούν τα είδη *Microcystis* και *Anabaena*.



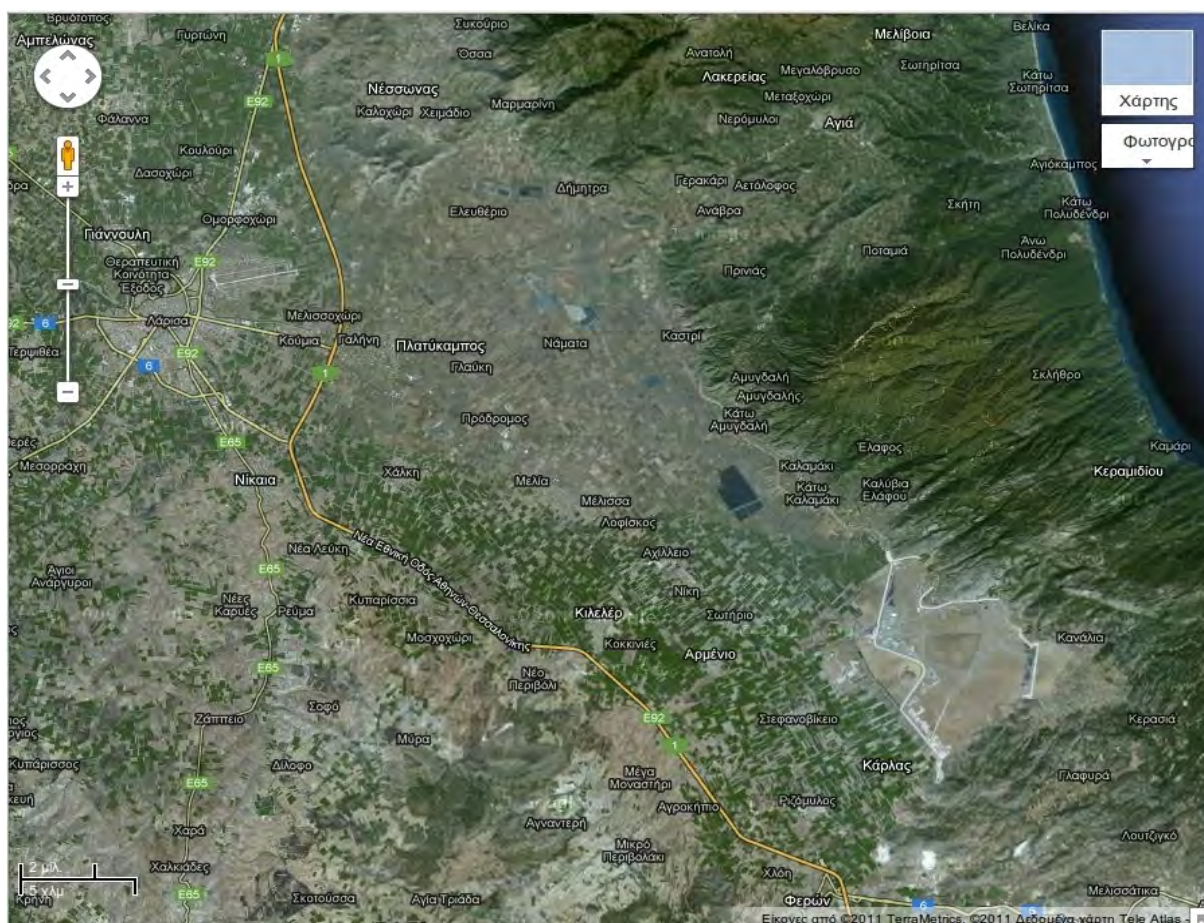
Εικόνα 1: Παμβώτιδα, εικόνα από δορυφόρο(πηγή Terra Metrics, Google Maps 2011)

Η ανασυσταθείσα Λίμνη Κάρλα βρίσκεται στο νοτιοανατολικό τμήμα της Θεσσαλικής πεδιάδας στη θέση της παλαιάς Λίμνης η οποία αποξηράνθηκε το 1962. Η κύρια υδάτινη εισροή για την πλήρωση της Λίμνης είναι η άντληση υδάτων από τον Πηνειό ποταμό και

έπονται οι εισροές από βροχοπτώσεις. Η ευρύτερη λεκάνη απορροής της λίμνης είναι η Θεσσαλική πεδιάδα που οριοθετείται ανατολικά από τα όρη Πήλιο και Κίσσαβο, βόρεια από τον Όλυμπο, βορειοδυτικά από την Πίνδο και νότια από την Όθρυ. Χαρακτηριστικό της ευρύτερης περιοχής είναι η εντατική καλλιέργεια βαμβακιού και σιτηρών αλλά και οι δενδροκομικές καλλιέργειες. Η εκτιμώμενη έκταση της νέας λίμνης είναι 38 km² με μέσο βάθος τα 6 m. Η ανασύσταση της λίμνης συμβάλλει και στην αναπλήρωση των υδάτων του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα (Loukas *et al.*, 2007). Η λίμνη εμπλουτίζεται με νερό μέσω καναλιού από το Ασμάκι που αποτελεί αποστραγγιστική τάφρο με δύο κλάδους που ξεκινούν ο ένας από το Ομόρφοχωρι και εμπλουτίζεται από τον Πηνειό ενώ ο δεύτερος ξεκινάει από την περιοχή Χασάμπαλη και εμπλουτίζεται από πηγαία ύδατα. Η παροχή νερού είναι μικρή και σε συνδυασμό με τα απόβλητα από βιομηχανίες οινοπνεύματος και χαρτοποιίας οι οποίες υπήρχαν στην περιοχή του Ασμακίου και του Ομορφοχωρίου, αλλά και κτηνοτροφικών μονάδων μειώνεται το διαλυμένο οξυγόνο ιδίως το καλοκαίρι. Σημαντική είναι η ρύπανση που δέχεται η λίμνη από τη γεωργική δραστηριότητα με τα λιπάσματα και τα φυτοφάρμακα που απορρέουν με τις βροχοπτώσεις.

Τα είδη και οι αριθμοί των ψαριών της περιοχής άρχισαν να μειώνονται από τη δεκαετία του 1980. Οι δειγματοληψίες για τον έλεγχο του νερού γίνονται στο Καλαμάκι και τη Λίμνη Κάρλα. Σε γενικές γραμμές από τις μετρήσεις των παραπάνω δειγμάτων έχουν προκύψει τα ακόλουθα συμπεράσματα: Η ηλεκτρική αγωγιμότητα κυμαίνεται από 1.700 έως 8.630 μmhos/cm. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα του νερού αναφέρεται στην ικανότητά του να μεταφέρει - άγει ηλεκτρικά φορτία και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών, των διαλυμένων δηλαδή στο νερό αλάτων. Η ηλεκτρική αγωγιμότητα εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση ιόντων στο νερό, το σθένος τους και την ευκινησία τους. Αυξημένες τιμές ηλεκτρικής αγωγιμότητας αντιστοιχούν σε μεγάλες συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών (ευτροφικές καταστάσεις), σε αύξηση συνεπώς της παραγωγικότητας του οικοσυστήματος και υποδηλώνουν την ενηλικίωση (παλαίωση) της υδάτινης μάζας. Οι τιμές αυτές είναι

ιδιαίτερα μεγάλες και ακατάλληλες για τη διαβίωση ιχθύων.



Εικόνα 2: Λίμνη Κάρλα υπο κατασκευή(κάτω αριστερά). Πηγή: Terra metrica, Google maps 2011.

Το διαλυμένο οξυγόνο κυμαίνεται από 28% έως 109%, τιμές ικανοποιητικές για την άρδευση και τη διαβίωση ιχθύων. Οι τιμές νατρίου, χλωρίου και νιτρικών ιόντων είναι αυξημένες. Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD) κυμαίνεται από 4-94 mg/L, με όριο για τη διαβίωση των ψαριών τα 25mg/L. Τα επίπεδα χαλκού και μολύβδου είναι πάνω από τα επιτρεπτά όρια. Επίσης στην είσοδο και την έξοδο της σήραγγας στράγγισης της Κάρλας οι τιμές του BOD και της NH είναι αυξημένες και ακατάλληλες σε πολλές περιπτώσεις για τη διαβίωση των ψαριών (Τσιάκαλου, 2008). Σε μια έρευνα που έγινε το Μάρτιο και τον Απρίλιο του 2010 οι Οικονομοί *et al.* διερεύνησαν μαζικούς θανάτους ιχθύων που συνέβησαν στη Λίμνη Κάρλα κατά τους μήνες αυτούς. Οι εν λόγω ερευνητές μέσω άμεσης μικροσκόπησης και PCR ταυτοποίησαν πληθώρα κυανοβακτηρίων και άλλων ευκαρυωτικών μονοκύτταρων οργανισμών. Τέτοια τοξικά κυανοβακτήρια που ανιχνεύθηκαν ανήκουν στα

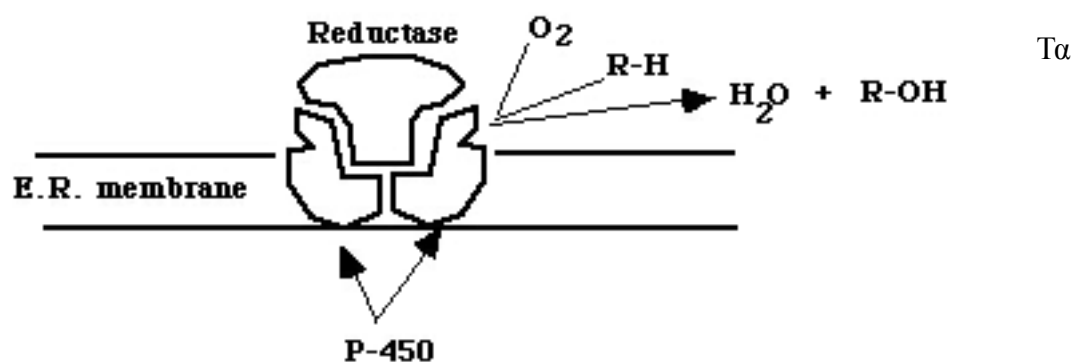
είδη *Planktothrix* και *Anabaena*. Κατέληξαν επίσης σε μια αναφορά μοναδικής συνύπαρξης στα εσωτερικά νερά δύο τοξικών ευκαρυωτικών παρασίτων των *Prymnesium parvum* και *Pfiesteria cf piscicida*. Βρέθηκαν επίσης είδη από Ευγληνόφυτα, Χλωρόφυτα και διάτομα ενδεικτικά ευτροφικών οικοσυστημάτων. Εκτός από τους αιφνίδιους θανάτους η παρουσία αυτών των μικροοργανισμών ευθύνεται για μειωμένη ανάπτυξη και αναπαραγωγική ικανότητα των ιχθύων. Χαρακτηριστική της ρύπανσης του εδάφους που τώρα αποτελεί τον πυθμένα της λίμνης από κόπρανα ζώων είναι η αυξημένη αλατότητα της λίμνης. Η αυξημένη αλατότητα της λίμνης ευνοεί την ανάπτυξη παθογόνων που βρίσκονται σε υφάλμυρα και θαλάσσια ύδατα. Προέλευση αυτών των μικροοργανισμών υπεύθυνων για το θάνατο ιχθύων είναι το έδαφος αλλά και ο Πηνειός ποταμός.

Οι ήδη υπάρχουσες μελέτες είναι ενδεικτικές της ποιότητας του νερού των δύο λιμνών και πρέπει να αποτελέσουν αφορμή για περαιτέρω έρευνα ώστε να γίνουν επιτυχείς προσπάθειες αποκατάστασης του οικοσυστήματος. Διαλυμένο οξυγόνο, κολοβακτηριοειδή, pH, BOD 5 ημερών, θερμοκρασία, φωσφορικά άλατα, νιτρικά άλατα, θολερότητα και στερεό υπόλειμμα (TDS) είναι παράμετροι που καθορίζουν το δείκτη ποιότητας νερού (WQI) και πρέπει να ελέγχονται τακτικά.

1.3 Το κυτόχρωμα P450

Το κυτόχρωμα P450 αποτελείται από αιμοπρωτείνες που εντοπίζονται σε μεμβράνες των κυττάρων του ήπατος καθώς και σε κύτταρα του εντέρου. Οι μονο-οξυγενάσες του P450 αποτελούν βιολογικούς δείκτες έκθεσης καθ' ότι επηρεάζονται από πληθώρα ρυπαντών. Βρίσκονται κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων αλλά παράγονται και σε άλλους ιστούς. Αυτά τα ένζυμα προκαλούν αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης κατά τη φάση I του μεταβολισμού και έχουν ως ρόλο τη βιοσύνθεση στεροϊδών, λιπαρών οξέων και προσταγλανδινών με τη τακτική του σχηματισμού συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος (Van der Oost *et al.*, 2003). Σε αυτή την καταλυτική αντίδραση μετέχει το NADPH ένζυμο και το μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα την οξειδωση. Για να επιτευχθεί

αυτό απαιτείται αναγωγή του σιδήρου της αίμης με μεταφορά ηλεκτρονίων από τη φλαβοπρωτεΐνη P450 RED και κατα περίπτωση από το cyt b₅. Όμως ουσίες με οξειδοαναγωγική δράση όπως οι αρωματικές διόλες και κινόνες, οι αρωματικές υδροξυλαμίνες, συγκεκριμένα χηλικά μέταλλα κ.α. υπό τη επίδραση αναγωγικών ενζύμων που εξαρτώνται από το NADPH όπως cyt P450 RED προκαλούν διπλή βλάβη στον οργανισμό. Η βλάβη συνίσταται στην οξείδωση ενός δότη ηλεκτρονίου και την παραγωγή ξενοβιοτικής ρίζας.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της θέσης του P450 στο ενδοπλασματικό δίκτυο (E.R.) Πηγή: http://zoology.muohio.edu/oris/ZOO462/notes/03a_462.html

ένζυμα του P450 ταξινομούνται ανάλογα με την τρισδιάστατη δομή τους, τη συγγένεια για τα υποστρώματα και τη αλληλουχία αμινοξέων και με το πως το NADPH μεταφέρει τα ηλεκτρόνια για τη καταλυτική αντίδραση. Με βάση αυτό έχουμε τέσσερις κλάσεις εκ των οποίων η I και II είναι οι πιο συχνές στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και σχετίζονται με το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών. Στους ιχθύες απαντώνται 34 ισομορφές του P450 με 8 οικογένειες και 19 υπόοικογένειες. Η ταυτοποίηση και η περιγραφή τους γίνεται με καταλυτικές δοκιμές, ανοσοενζυμικές τεχνικές και με ποσοτικοποίηση του mRNA (real time PCR). Κάποιες ομάδες φαίνεται να παίζουν ρόλο στο σεξουαλικό προσδιορισμό και τη διαφοροποίηση του φύλου.

Κατά τη φάση I του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών οι αντιδράσεις αρχικά καταλύονται από τα μικροσομικά ένζυμα μονοοξυγενάσης (MO) γνωστά ως μικτής λειτουργίας οξειδάσες (MFO). Τα λιπόφιλα ξενοβιοτικά μετατρέπονται έτσι σε ποιο υδατοδιαλυτά συστατικά αφού ενεργοποιήσουν συγκεκριμένα ισοένζυμα και

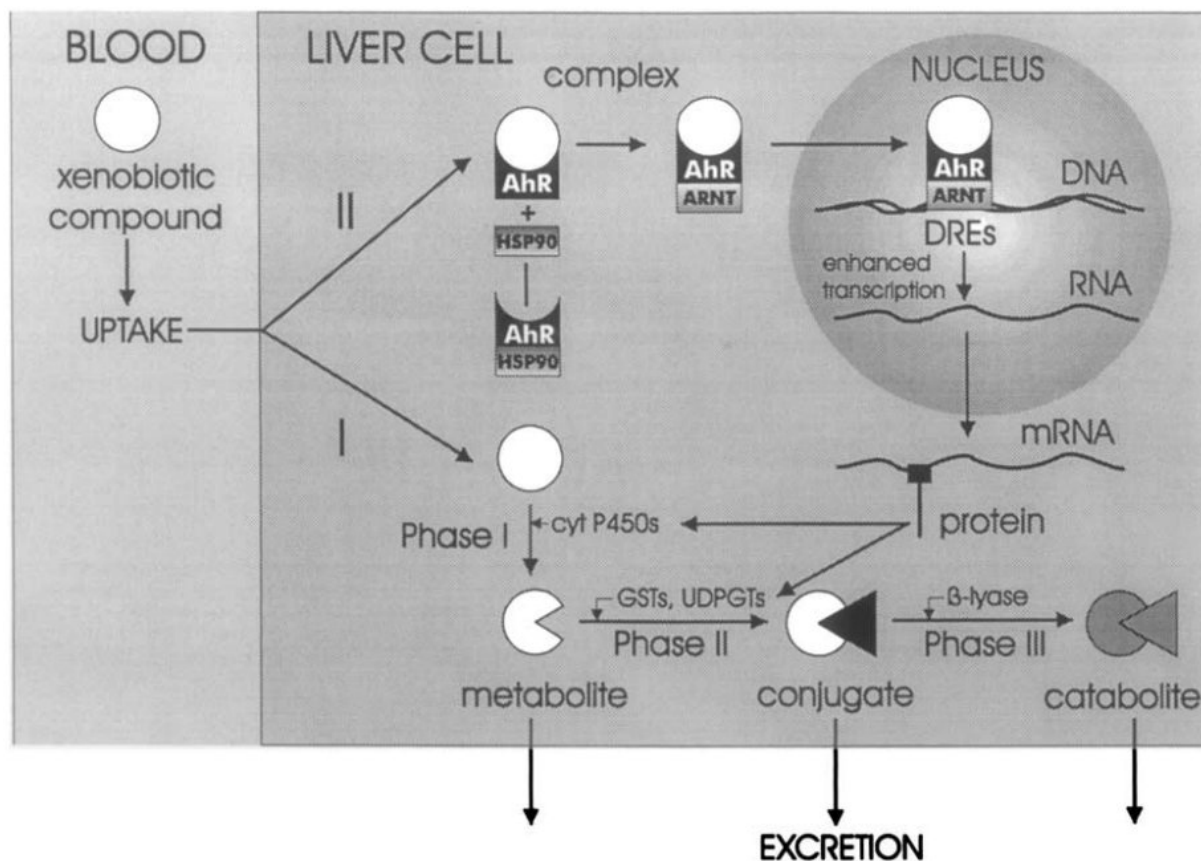
αδρανοποιήσουν άλλα.

Κατά τη φάση II του μεταβολισμού γίνεται σύνδεση ενός κύριου τμήματος του μορίου του ξενοβιοτικού παράγοντα με μια ενδογενή, μεγάλη και συχνά πολική χημική ομάδα όπως σάκχαρα και αμινοξέα π.χ. γλουταθειόνη (GSH) και γλυκουρονικό οξύ (GA). Μερικά ξενοβιοτικά περιέχουν στο μόριό τους καρβοξυλιομάδες (COOH), υδροξυλιομάδες (OH) ή αμινομάδες (NH₂) και μεταβολίζονται απ' ευθείας στη φάση II παρακάμπτοντας τη φάση I. Τα ενζυμικά συστήματα της φάσης II κατέχουν ρόλο στην κάθαρση και μείωση της τοξικότητας των ξενοβιοτικών. Τα ηλεκτρόφιλα μόρια και μεταβολίτες συζεύγνυνται με τη γλουταθειόνη ενώ τα πυρηνόφιλα έχουν ως κύρια μεταβολική οδό τη σύζευξη με το γλυκουρονικό οξύ (Van der Oost *et al.*, 2003). Ο μηχανισμός επαγωγής των περισσότερων ενζύμων της φάσης II γίνεται μέσω των υποδοχέων αρωματικών υδρογονανθράκων (Ah receptors). Οι υποδοχείς αρωματικών υδρογονανθράκων (Ah receptors) και οι ισομορφές του *CYP1A* συνεργάζονται με τα ενζυμικά συστήματα της φάσης II. Τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων της φάσης II επηρεάζονται και αυτά από περιβαλλοντικούς ρύπους και ακόμη και μικρές αποκλίσεις τους από το φυσιολογικό μπορεί να είναι επιβλαβείς για τον οργανισμό. Η επαγωγή των ενζύμων αυτών μπορεί να επισκιαστεί από παράγοντες όπως το φύλο, η ωριμότητα, η διατροφή, η εποχή και η θερμοκρασία.

1.4. Το γονίδιο *CYP1A2*

Η κύρια λειτουργία του κυτοχρώματος P450 είναι η σύνθεση στεροειδών ορμονών, η οξυγόνωση των εικοσανοειδών και η οξειδωτική καταστροφή διαφόρων χημικών ουσιών και τοξινών. Ο χημικός του ρόλος είναι η οξειδοαναγωγή και η σύζευξη και απέκκριση μεταβολιτών. Τα κυτοχρώματα *CYP1A1* και *CYP1A2* κωδικοποιούν ισοένζυμα τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μεταβολισμού των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) και προκαρκινογόνων ουσιών. Κατα την έκθεση ενός οργανισμού σε υδρογονάνθρακες που περιέχουν ομάδα αλογόνου (παράγωγα διοξινών) ή σε αρωματικούς πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες (βενζοπυρένια) διεγείρεται η έκφραση αυτών

των γονιδίων. Η αύξηση της ποσότητας του *CYP1A* mRNA που μπορεί να ανιχνευθεί με PCR προηγείται της αύξησης των ισοενζύμων του *CYP1A*. Εντός του κυτταροπλάσματος υπάρχουν υποδοχείς αλογονομένων υδατανθράκων (AHR) (Aryl Hydrocarbons Receptor) οι οποίοι συνδέονται με ουσίες τύπου διοξινών. Μετά από αυτή τη σύνδεση το σύμπλεγμα αυτό μετατοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου διμερίζεται με μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο ARNT (Aryl Receptor Nuclear Translocator). Στη συνέχεια το ετεροδιμερές σύμπλοκο AHR – πρωτεΐνης συνδέεται στο τμήμα του γονιδιώματος που είναι υπεύθυνο για την ανταπόκριση στη δράση των διοξινών (DRE) (Dioxin Responsive Element) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου στόχου. Το γονίδιο στόχος, στην προκειμένη περίπτωση το *CYP1A1*, γειτνιάζει στο γονιδίωμα με την DRE περιοχή (Whitlock, 1999; Hankinson, 1995). Η ύπαρξη των DRE περιοχών του γονιδιώματος έχει ταυτοποιηθεί μόνο στο *CYP1A1* γονίδιο με έρευνες που έγιναν σε γονιδίωμα επίμυος και ανθρώπου. Στο γονίδιο *CYP1A2* έχουν βρεθεί υποδοχείς (X1, X2, XRE II) για την δράση των ξενοοιστρογόνων με έρευνες που έγιναν σε γονιδίωμα αρουραίου και ανθρώπου, Ωστόσο στο γονίδιο *CYP1A2* δεν έχουν ανιχνευθεί DRE περιοχές με αποτέλεσμα ο μηχανισμός της επίδρασης των διοξινών στο γονίδιο αυτό να μην είναι απόλυτα διευκρινισμένος (Nukaya & Bradfield, 2008). Η δυσκολία μελέτης του *CYP1A2* έγκειται στο ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται κυρίως σε ηπατικά κύτταρα και το mRNA του εκφράζεται σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Οι δε πρωτεΐνες του *CYP1A2* ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ή και καθόλου σε ιστούς εκτός του ήπατος. Σε μια έρευνα (Black & Quattrochi, 2004) που έγινε σε ομόλογες κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου (GPC16) ινδικών χοιριδίων διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η ύπαρξη περιοχών σύνδεσης του ετεροδιμερούς AHR/ARNT στο γονίδιο *CYP1A2* άρα και δράσης των διοξινών μέσω των AHR υποδοχέων. Σε περιοχές με έντονη και μακροχρόνια μόλυνση όπως στο New Bradford Harbor στις Η.Π.Α. έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην επαγόμενη ποσότητα του *CYP1A* mRNA (Bello *et al.*, 2001) λόγω αλλαγής της αγωγής σήματος από τους AHR υποδοχείς εξ' αιτίας της χρόνιας



Εικόνα 4: Απλοποιημένο διάγραμμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών στο ηπατικό κύτταρο (Van der Oost et al., 2003)

έκθεσης σε υψηλά επίπεδα HAHs. Εκτός από την real time PCR έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες τεχνικές για την μέτρηση των βιοδεικτών όπως η Western blot, η ELISA, ενζυμικές μέθοδοι που επιτρέπουν τη μέτρηση του ισοενζύμου και της καταλυτικής δραστηριότητας του *CYP1A* η οποία μετρείται ως εθοξυρεσορουφίνη-*o*-διεθυλάση (EROD) ή αρυλ-υδροκαρβονική υδροξυλάση (AHH). Γενικά υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των πρωτεϊνών του *CYP1A* και της δραστηριότητας της εθοξυρεσορουφίνης σε μολυσμένο περιβάλλον. Παρ' όλα αυτά έχει παρατηρηθεί μειωμένη δράση της εθοξυρεσορουφίνης κατά την έκθεση σε οργανοτίνες (ουσίες που χρησιμοποιούνται για επάλειψη και προστασία των δικτυών) ομοίως υπήρχε μείωση της AHH σε *guppies* (*Poecilia reticulata*) υπό την επίδραση φαινοβαρβιτάλης. Ειδικά για τις οργανοτίνες οι οποίες λόγω της παλαιότερης χρήσης τους στα δίχτυα των υδατοκαλλιεργειών αλλά και ως μυκητοκτόνων και απωθητικών για τους αρουραίους υπήρξαν προβληματισμοί για την δημόσια υγεία. Αρχικά με βάση παρατηρήσεις σε θαλάσσια γαστερόποδα υπήρχε η αντίληψη ότι αναστέλλουν και την αρωματάση. Μελέτη

όμως σε κύτταρα ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος έδειξαν ότι οι οργανοτίνες ενισχύουν την βιοσύνθεση των οιστρογόνων αυξάνοντας τη δραστηριότητα της αρωματάσης και της 17 β-υδροξυστεροειδούς δευδρογονάσης τύπου I μετατρέποντας την χαμηλής δραστηριότητας οιστρόνη στη βιολογικά πιο ενεργή οιστραδιόλη. Παρ' όλα αυτά τα όργανα στόχοι των οργανοτινών παραμένουν ασαφή (Nakanishi, 2008). Η τριμπουτιλίνη και η τριφαινυλίνη φαίνεται ότι δρουν ως αγωνιστές του ρετινοειδούς X υποδοχέα και του peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ, μελών της υπερικογένειας πυρηνικών υποδοχέων.

Η δράση του *CYP1A2* ποικίλλει. Στον άνθρωπο έχει ταυτοποιηθεί η δράση του στο μεταβολισμό της καφεΐνης, της ακεταμινοφαΐνης, καρκινογόνων ουσιών και οιστρογόνων (Goodman *et al.*, 2003). Από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 που έχουν μελετηθεί στον άνθρωπο 57 εξ' αυτών παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό φαρμάκων και τοξικών ουσιών. Το ένα τρίτο εξ' αυτών εμπλέκεται στο μεταβολισμό των λεγόμενων ξеноβιοτικών χημικών ουσιών και των στερολών οι οποίες είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Υπάρχουν οργανισμοί που δεν φέρουν τα συγκεκριμένα γονίδια συσσωρεύοντας έτσι μεγαλύτερες ποσότητες φαρμάκου ή τοξικών ουσιών όπως προκύπτει από μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους και αρουραίους. Αυτά τα ενζυμικά συστήματα μπορούν να αδρανοποιήσουν πληθώρα ουσιών μειώνοντας τη βιολογική τους επίδραση και επιταχύνοντας την απέκκρισή τους από τον οργανισμό. Έχει όμως παρατηρηθεί και ενίσχυση της δράσης διαφόρων ουσιών (βιοενεργοποίηση) με τροποποίηση των κυτταρικών στοιχείων και την πρόκληση βλάβης καταλύοντας την σύζευξη ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους που υπάρχουν εντός του κυττάρου ή καταλύοντας αντιδράσεις υδρόλυσης (Guengerich, 2005). Έχει παρατηρηθεί ότι ουσίες όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινόλια (PCBs) και τα διχλωροδιφαινυλτριχλωροαιθάνια (DDTs) είναι δύσκολο να μεταβολιστούν με αποτέλεσμα την βιοσυσσώρευσή τους σε αντίθεση με τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) που μεταβολίζονται κατά τη φάση I σε υδρόφιλα παράγωγα όπως φαινόλες, διυδροδιόλες, κινόνες και εποξειδία τα οποία απεκκρίνονται εύκολα (Van der Oost *et al.*,

2003). Σε αντίθεση με τους αλογονομένους υδρογονάνθρακες όπως οι PCBs και τα χλωριωμένα ζιζανιοκτόνα που έχουν δείξει να μειώνονται στο περιβάλλον, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες παρουσιάζουν αύξηση στο περιβάλλον των αστικών περιοχών. Κύρια πηγή των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων είναι η ατελής καύση του άνθρακα.

Κατά τον μεταβολισμό των PAHs και των ετεροκυκλικών αρωματικών αμινών (HAA) παράγονται ηλεκτρόφιλες ουσίες όπως τα arene oxide και diolperoxide τα οποία σχηματίζουν ενώσεις DNA και πρωτεϊνών μέσω των DNA adducts οδηγώντας στο σχηματισμό νεοπλασιών. Μετά από έκθεση γατόψαρων (*Ictalurus punctatus*) σε 2-αμινοανθρακένιο (AA) και του zebrafish (*Danio rerio*) σε αφλατοξίνη B1 που ανήκουν στις καρκινογόνες ουσίες (Troxel *et al.*, 1997) παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας του P450 και των DNA adducts. Δηλαδή τα ένζυμα της φάσης I και II μαζί με την μέτρηση των DNA adducts στο ήπαρ μπορούν να αποτελέσουν ένα διαγνωστικό εργαλείο ενδεικτικό της έκθεσης σε γενοτοξικές ουσίες. Τα DNA adducts μπορούν να μετρηθούν με HPLC, ανοσολογικές δοκιμές ή ³²P – postlabeling η οποία θεωρείται ακριβής αλλά χρονοβόρα και δαπανηρή μέθοδος ενδεικτική της χρόνιας έκθεσης σε γενοτοξικές ουσίες σε αντίθεση με τη μέτρηση μεταβολιτών στη χολή που αποτελούν πρώιμο δείκτη έκθεσης σε καρκινογόνες ουσίες (Van der Oost *et al.*, 2003).

Με βάση μελέτες που έγιναν (Juliano & King, 1976; Kurelec, 1992; Epel, 1998) παρατηρήθηκε ότι πολλοί ιχθύες κατορθώνουν να επιβιώνουν σε πολύ μολυσμένο περιβάλλον καθ' ότι έχουν αναπτύξει ένα φαινόμενο ενεργής αποβολής πληθώρας ενδογενών και ξενοβιοτικών χημικών από τον οργανισμό τους (Multixenobiotic Resistance, MXR). Αντίστοιχο με το φαινόμενο MXR είναι και το MDR (Multidrug Resistance) που αφορά την μη ανταπόκριση στα φάρμακα π.χ. αντικαρκινικά. Υπεύθυνες για τον μη μεταβολισμό και την απ' ευθείας απέκκριση των ξενοβιοτικών είναι οι P γλυκοπρωτεΐνες (PGP). Είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και βρίσκονται σε επιθηλιακούς ιστούς του εντέρου του ήπατος

και των νεφρών και στο ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων (Bard, 2000). Οι PGP's έχουν τη δυνατότητα μετατόπισης υδρόφοβων, επίπεδων, φυσικών ή ανθρωπογενών μορίων που μπορεί να δράσουν ως υποστρώματα μεταβολισμού για το P450. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της γλυκοπρωτεΐνης ρυθμίζονται από παράγοντες που δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως παρά τις μελέτες που έχουν γίνει (Chaudhary & Roninson, 1992; Bard, 2000). Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί τυχόν επιπλέον ρύπανση σε ήδη μολυσμένες περιοχές έχει μικρότερο αντίκτυπο από ότι αν εκδηλωθεί σε περιοχές παρθένας από ρύπανση (Bard, 2000). Πάντως δεν μπορεί να συσχετιστεί η έκφραση του *CYP1A* με αύξηση της έκφρασης της P – γλυκοπρωτεΐνης (Bard, 2000) με πειράματα που έγιναν έως τώρα διότι υπάρχουν και ουσίες που δρουν ως αναστολείς του MXR συστήματος. Αυτή η αναστολή μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση των ξενοβιοτικών καθιστώντας τα κυτταροτοξικά, γενετοξικά και νευροτοξικά ακόμη και αν ως περιβαλλοντικοί ρύποι ήταν σχετικά ακίνδυνοι. Κατά τη έκθεση του ιχθύος *Anoplarchus* sp. σε αργό πετρέλαιο παρατηρήθηκε επαγωγή του *CYP1A* αλλά και της P – γλυκοπρωτεΐνης (Bard *et al.*, 1998) ενώ κατά την έκθεση κυπρίνων σε χαμηλή συγκέντρωση πετρελαίου παρουσία βεραπαμίλης (αναστολέα του MXR) παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας του *CYP1A* αλλά όχι της P – γλυκοπρωτεΐνης (Kurelec, 1995).

Η έκφραση και η δραστηριότητα ενζύμων που δραστηριοποιούνται κατά το μεταβολισμό φαρμάκων και διαφόρων χημικών ουσιών επηρεάζεται από εξωγενείς (διατροφή, περιβάλλον διαβίωσης) και ενδογενείς παράγοντες στους οποίους συγκαταλέγονται το είδος, η φυλή, ο γενετικός πολυμορφισμός, η ηλικία, το φύλο, η φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού (π.χ. εγκυμοσύνη) και η αντίδραση οξείας φάσης σε μικροβιολογικούς, φυσικούς και παρασιτολογικούς κινδύνους. Διαφορές στο ρυθμό απορρόφησης, σύνδεσης με πρωτεΐνες του πλάσματος, κατανομής, βιομετασχηματισμού και απέκκρισης παρατηρούνται μεταξύ ατόμων διαφορετικής ηλικίας με το ρυθμό του μεταβολισμού των διαφόρων ουσιών να μειώνεται όσο αυξάνει η ηλικία. Αυτό έδειξε έρευνα που έγινε σε τσιπούρες (*Sparus Aurata*) για να ταυτοποιηθούν τέτοια ενζυμικά συστήματα με

τη χρήση ενζυμικών μεθόδων σε πληθυσμούς τσιπούρας που διαβιούν σε περιβάλλον επιβαρυνόμενο με οργανικούς ανθρωπογενείς λιπόφιλους ρύπους (διοξίνες, PAHs κ.α.) επηρεάζοντας την αποτελεσματικότητα των χορηγούμενων θεραπειών (ορμόνες, φάρμακα) και διατροφικών συμπληρωμάτων που χορηγούνται στους ιχθύες (Akdogan, 2010). Εξ'αιτίας της αρνητικής επίδρασης των PAHs στην αναπαραγωγή, αυτοί μπορούν να ενταχθούν και στην κατηγορία των ενδοκρινικών διαταρακτών.

Σε μια έρευνα (Fitzgerald *et al.*, 2005) που έγινε σε ιθαγενείς Mohawk στη Νέα Υόρκη και στο Οντάριο του Καναδά επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα άλλων μελετών που έδειξαν ότι το κάπνισμα, το φύλο και η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών από τις γυναίκες επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου *CYP1A2*. Οι ιθαγενείς ζουν σε περιβάλλον επιβαρυνόμενο από απόβλητα μεταλλουργίας και άλλων βιομηχανιών που εναποθέτουν λύματα με Arochlor 1248, ένα μείγμα πολυχλωριωμένων διφαινύλιων (PCBs), μολύνοντας τον ποταμό St. Lawrence και τον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα. Στη συγκεκριμένη έρευνα μετρήθηκε η ποσότητα των PCBs στο αίμα πληθυσμιακού δείγματος ιθαγενών ανδρών και γυναικών και για την εκτίμηση της έκφρασης του *CYP1A2* χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση καφεΐνης στην αναπνοή (Caffeine Breath Test) (CBT). Οι ιθαγενείς διατρέφονταν με ιχθύες και πτηνά που διαβιούν στον ποταμό και στα οποία έχουν ανιχνευθεί PCBs πάνω από τα επιτρεπτά όρια με βάση τον FDA ήτοι πάνω από 2 ppm για τους ιχθύες και πάνω από 3 ppm στο λίπος των πτηνών. Το κάπνισμα επιδρά στο *CYP1A2* λόγω των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και άλλων καρκινογόνων που περιέχει ο καπνός. Τα αντισυλληπτικά χάπια *in vivo* έδειξαν να αναστέλλουν τη δραστηριότητα του *CYP1A2* ως εκ τούτου καθυστερώντας τον μεταβολισμό της καφεΐνης. Η έρευνα των Fitzgerald *et al.* έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας PCBs στο αίμα και της έκφρασης του *CYP1A2* που εκτιμήθηκε με το CBT παρά τη χαμηλή συγκέντρωση των PCBs στο αίμα. Συνεπώς μπορεί να γίνει έτσι έγκαιρη εκτίμηση ενδεχόμενης αύξησης των PCBs στον οργανισμό παρά τους δύο περιορισμούς που έθεσαν οι ερευνητές. Ο πρώτος περιορισμός είναι ότι δεν έγινε μελέτη του

πολυμορφισμού του *CYP1A2* μεταξύ των ιθαγενών και ο δεύτερος περιορισμός ότι δεν διερευνήθηκε η παρουσία ομοειδών με τα PCBs ουσιών π.χ. διοξινών οι οποίες με *in vitro* δοκιμές σε ζωικά πειραματικά μοντέλα αποδείχθηκε ότι επηρεάζουν το *CYP1A2*.

1.5 Το γονίδιο *CYP19A2*

Εκτός από τα δείγματα ήπατος στα οποία διερευνήθηκε η έκφραση του *CYP1A* έγινε και λήψη δειγμάτων από τις γονάδες για τη διερεύνηση της έκφρασης των *CYP19As* των ωοθηκών που κωδικοποιούν το ένζυμο της αρωματάσης. Σε αντίθεση με τη δράση του *CYP1A* η μελέτη του γονιδίου της αρωματάσης παρουσιάζει μεγαλύτερη πολυπλοκότητα εξ' αιτίας των δύο ισομορφών της στους ιχθύες και στο πως αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αλλά και των πολύπλοκων μηχανισμών δράσης των ορμονών που επηρεάζουν την έκφρασή της. Στους τελεόστεους ιχθύες έχουν ανιχνευθεί δύο ισομορφές της αρωματάσης εκ των οποίων η *CYP19A2* έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα στον εγκέφαλο ενώ η *CYP19A1* έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα στις ωοθήκες. Το *CYP19A2* εντοπίζεται στα κύτταρα της ακτινωτής γλοίας αλλά και στην ωοθήκη. Εκφράζεται επίσης στην υπόφυση και σε περιοχές του εγκεφάλου όπως ο υποθάλαμος και ο τελεγκέφαλος όπως έδειξαν πειράματα *in situ* υβριδισμού. Με τεχνικές συμβατικής ή ποσοτικής RT-PCR έγινε ανίχνευση αυτού του γονιδίου στον ιστό που περιβάλλει την κοιλιακή αορτή. Ο ιστός αυτός κατέχει τον ρόλο του θυροειδούς αδένου στους ιχθύες επηρεάζοντας την τοπική συγκέντρωση της οιστραδιόλης E_2 τοπικά. Πιθανόν ο ιστός που φέρει το γονίδιο είναι τα θυλάκια του θυροειδούς και ενδεχομένως ο θύμος αδένου (Kazeto & Grant, 2005). Το *CYP19A1* εκφράζεται στην ωοθήκη και βρίσκεται στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων. Σε μελέτη που έγινε σε θηλυκά άτομα ενός κυπρινοειδούς του zebrafish (*D. rerio*) παρατηρήθηκε ότι τα ποσοστά έκφρασης της αρωματάσης στον εγκέφαλο ήταν μεγαλύτερα από τα ποσοστά έκφρασης της αρωματάσης των ωοθηκών εξ' αιτίας της μεγαλύτερης καταλυτικής δράσης του *CYP19A2* (Hinfrey *et al.*, 2006). Έχει παρατηρηθεί ότι η δραστηριότητα της αρωματάσης στον εγκέφαλο και η έκφραση του *CYP19A2* είναι μεγαλύτερη από την έκφραση στις γονάδες των ιχθύων πιθανόν εξ' αιτίας του ρόλου της στην

αναπαραγωγή, την νευρογένεση που ελέγχεται από τα οιστρογόνα και τη ρύθμιση της σεξουαλικής συμπεριφοράς. Στον άνθρωπο το γονίδιο *CYP19* περιλαμβάνει διαφορετικά εξώνια στο 5' άκρο του γονιδίου τα οποία δεν μετέχουν στη κωδικοποίηση των πρωτεϊνών του *CYP19*. Η παρουσία των εξωνίων αυτών συνδέεται με την παρουσία του *CYP19* σε πληθώρα ιστών στον άνθρωπο όπως ο πλακούντας, ο λιπώδης ιστός, οι ωοθήκες και ο εγκέφαλος (Simpson *et al.*, 1994). Για να γίνουν κατανοητές πολλές από τις παρακάτω μελέτες και επιδράσεις πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν τις έννοιες του καθορισμού του φύλου και των παραγόντων διαμόρφωσης του φύλου. Και τα δύο υπόκεινται στην επίδραση γενετικών, περιβαλλοντικών παραγόντων και στο συνδυασμό αυτών. Στα πτηνά και στα θηλαστικά κυριαρχούν οι γενετικοί παράγοντες (Blazquez & Somoza, 2010). Άλλη μια βασική αρχή είναι η μετατροπή των C_{19} ανδρογόνων σε C_{18} οιστρογόνα υπό την επίδραση της αρωματάσης και ότι τα οιστρογόνα ευθύνονται για τα θηλυκά ενώ τα ανδρογόνα για τα αρρενωπά χαρακτηριστικά των δύο φύλων.

1.6. Καθορισμός Φύλου

Στους τελεόστεους ιχθύες και στα ερπετά το φύλο δεν καθορίζεται μόνο γενετικά αλλά σημασία έχει και η δράση περιβαλλοντικών παραγόντων. Στα γονοχωριστικά είδη τελεόστεων ιχθύων έχουν παρατηρηθεί όλοι οι συνδυασμοί γονιδίων από αρσενικά ή θηλυκά ετεροζυγωτά μέχρι και την πλήρη απουσία φυλετικών χρωμοσωμάτων ή την παρουσία πολλών ζευγών εξ' αυτών. Παράγοντες όπως η ιχθυοπυκνότητα, το pH, η υποξία, το “κοινωνικό” περιβάλλον και κυρίως η θερμοκρασία καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό το φύλο. Στο γένος ιχθύων *Oryzias* sp. έχει γίνει γνωστή η ύπαρξη του γονιδίου *dmrt1* το οποίο στα αρσενικά άτομα φέρει ένα Y-αντίγραφο (*dmrt1bY*). Στο ίδιο είδος παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό μεθυλίωσης του DNA του εκκινητή του *CYP19A1* στα αρσενικά από ότι στα θηλυκά. Αυτή η διαπίστωση μπορεί να συνηγορήσει σε πιθανή χρήση της μεθυλίωσης του DNA ως βιοδείκτη περιβαλλοντικής μόλυνσης. Οι Contractor *et al.* (2004) συνέλεξαν δείγματα ήπατος, γονάδων και εγκεφάλων από αρσενικά και θηλυκά medaka μετά την έκθεσή

τους σε 17 α-αιθυνυλοιστραδιόλη στο νερό για 14 ημέρες. Βρέθηκε αυξημένο πρωτεϊνικό στοιχείο σε ότι αφορά τους υποδοχείς οιστρογόνων της αρωματάσης και στα δύο φύλα. Η δραστηριότητα της αρωματάσης ήταν αυξημένη στον εγκέφαλο θηλυκών και αρσενικών ατόμων αλλά και στους όρχεις . Αυτό δείχνει τη δυνατότητα ανθρωπογενούς επίδρασης στην έκφραση του γονιδίου της αρωματάσης αλλά και ειδικότητα ιστού και φύλου. Σημαντικό είναι ότι η μεθυλίωση του DNA μπορεί να μεταβιβαστεί και στους απογόνους. Σε περίπτωση καταστολής έκφρασης του γονιδίου *CYP19A1*, αναστολής της έκφρασης της αρωματάσης ή φραγή της δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων παρατηρείται αρρενοποίηση των γονάδων. Καταστολή του *CYP19A1* παρατηρείται και στην περίπτωση της αρρενοποίησης που προκαλείται από τη θερμοκρασία και στην αλλαγή φύλου στα πρωτόγυνα ερμαφρόδιτα είδη (Page *et al.*, 2010). Σε είδη που η θερμοκρασία επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τα χαρακτηριστικά του φύλου παρατηρήθηκε ότι η αυξημένη θερμοκρασία οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του *CYP19A1* και αυξημένη συγκέντρωση της κορτιζόλης, της 11-κετοτεστοστερόνης και της τεστοστερόνης. Αυτό σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των όρχεων από το θερμικά προκαλούμενο στρες (Blazquez & Somoza, 2010; Hattori *et al.* 2009). Αυτό σημαίνει ότι ο εγκέφαλος των τελεόστεων ιχθύων διατηρεί κοινά χαρακτηριστικά καθ'όλη του τη ζωή με τον εμβρυϊκό εγκέφαλο των θηλαστικών σε ότι αφορά την παρουσία και έκφραση των γονιδίων της αρωματάσης στα προγονικά αδιαφοροποίητα κύτταρα που σχετίζονται με την νευρογένεση, όπως αυτά της ακτινωτής γλοίας στον εγκέφαλο, αλλά και με τη στεροειδογένεση. Στα θηλαστικά όμως η δραστηριότητα της αρωματάσης μειώνεται μετά τη γέννηση. Παρά την δράση της οιστραδιόλης στην ισομορφή της αρωματάσης στον εγκέφαλο και την αυξημένη δραστηριότητα του *CYP19A2* πριν από τη διαφοροποίηση των γονάδων, δεν έχει αποδειχθεί η συμμετοχή του *CYP19A2* στη διαμόρφωση των χαρακτηριστικών του φύλου.

1.7. Το Γονίδιο *FOXL2*

Σημαντική είναι η ταυτοποίηση ενός γονιδίου του *FOXL2* που κωδικοποιεί έναν

παράγοντα που τροποποιεί τη μεταγραφή του *CYP19A1*. Η δράση και η παρουσία του *FOXL2* έχει ταυτοποιηθεί για το medaka, την τιλάπια του Νείλου (*Oreochromis niloticus*) και την ιριδιζούσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Nakamoto *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007 ; Vizziano *et al.*, 2008). Ο *FOXL2* ανήκει σε μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκεται στην ανάπτυξη των ωοθηκών σε διάφορα σπονδυλωτά. Οι Nakamoto *et al.* απομόνωσαν το cDNA του *FOXL2* και ανέλυσαν το μοτίβο έκφρασής του σε κύτταρα γονάδων του medaka που μόλις άρχισαν να διαφοροποιούνται σε ωοθήκες. Η έκφραση του *FOXL2* άρχισε στα σωματικά κύτταρα που περιβάλλουν τα βλαστικά κύτταρα της ωοθήκης και διατηρήθηκε σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της ωοθήκης. Στην ωοθήκη ενήλικων medaka το *FOXL2* συνέχισε να εκφράζεται στα πρό- και λεκιθογόνα ωοθυλάκια αλλά όχι στα μεταλεκιθογόνα στάδια των ωοθυλακίων. Σε μερικά σωματικά κύτταρα των γονάδων το *FOXL2* συνυπήρχε με το mRNA της αρωματάσης. Το *FOXL2* δεν ανιχνεύθηκε στους όρχεις. Οι Vizzianno *et al.* (2007) διενήργησαν πειράματα αρρενοποίησης σε γενετικά θηλυκά άτομα ιριδιζούσας πέστροφας χρησιμοποιώντας σε μια ομάδα την 11 β-υδροξυανδροστενεδιόνη και στην άλλη ομάδα έναν αναστολέα της αρωματάσης και με ομάδα ελέγχου πληθυσμό γενετικά αρσενικών ατόμων. Το γονιδιακό προφίλ έκφρασης μετρήθηκε με τη χρήση real time RT-PCR. Και στις δύο ομάδες θηλυκών παρατηρήθηκε αναστολή των κατα κύριο λόγο “θηλυπρεπών” γονιδίων *CYP19A1*, *FOXL2A*, *FST*, και *FSHB* με σκοπό την διατήρηση έκφρασης της αρωματάσης. Η αναστολή αυτή επήλθε λόγω της ταυτόχρονης αύξησης της δραστηριότητας των *DMRT1*, *NR0B1 (DAX1)*, και *PDGFRA* γονιδίων που κατ' εξοχήν κυριαρχούν στα αρσενικά άτομα. Η δράση του αναστολέα της αρωματάσης στα γονίδια που σχετίζονται με την στεροειδογένεση (*CYP11B2.1*, *CYP11B2.2*, *HSD3B1*, *CYP17A*, *STAR*, και *NR5A1*) και σε γονίδια δείκτες της δράσης των κυττάρων του Sertoli είχε αποτελέσματα έκφρασης των εν λόγω γονιδίων εφάμιλλα με την ομάδα ελέγχου των γενετικά αρσενικών σε ότι αφορά την αρρενοποίηση. Αυτό καθιστά πιο “φυσιολογική” την αρρενοποίηση γενετικά θηλυκών ατόμων με τη χρήση αναστολέων της αρωματάσης άρα και την αναστολή σύνθεσης

οιστρογόνων από ότι η χορήγηση ανδρογόνων. Οι ιχθύες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ηλικίας 53 εως 144 ημερών μετά την εκκόλαψη και βρισκόταν σε ελεγχόμενο περιβάλλον απο την ηλικία των 24 ημερών. Έχουν γίνει μετρήσεις για τον έλεγχο τυχόν ενδογενούς παραγωγής ανδρογόνων σε αυτή την ηλικία. Σε ανάλογο πείραμα των Vizziano-Cantonnet *et al.* (2008) χρησιμοποιήθηκαν γενετικά αρσενικά άτομα ιριδιζουσας πέστροφας στα οποία χορηγήθηκε 17 α-αιθυνυλοιστραδιόλη στην τροφή για δύο μήνες και με ομάδες ελέγχου θηλυκών και αρσενικών ατόμων. Οι ιχθύες ήταν ηλικίας μεγαλύτερης των 53 ημερών. Στα θηλυκά της ομάδας ελέγχου η ιστολογική διαφοροποίηση των γονάδων άρχισε την 69 ημέρα, στα άρρενα άτομα την 116 και οι γονάδες της ομάδας των άρρενων ατόμων στα οποία χορηγήθηκε οιστραδιόλη άρχισε να παρουσιάζει ιστολογική εικόνα θηλυκού την 144 ημέρα. Η χορήγηση της οιστραδιόλης ώθησε την δράση των *FOXL2A*, *FOXL2B*, *FST*, *BMP4*, και *FSHB* γονιδίων αλλά και των *NR0B1*, *SOX9A1* και *PAX2A* γονιδίων που θεωρούνται βασικά στη διαφοροποίηση των όρχεων. Κατέστειλε τα γονίδια των κυττάρων του Leydig, τα οποία παράγουν ανδρογόνα, αλλά και τα *amh* και *SOX9A2* γονίδια των κυττάρων του Sertoli χωρίς να καταστείλουν τα *DMRT1*, *NR0B1*, *SOX9A1* και *PAX2A*. Δηλαδή τα οιστρογόνα υποβοηθούν την δράση των γονιδίων που είναι ειδικά των ωθηκών χωρίς να καταστέλλουν ταυτόχρονα τη δράση γονιδίων που διαφοροποιούν τα άτομα σε αρσενικά. Το γονίδιο *FOXL2* με έρευνα που έγινε σε γόνο τιλάπιας βρέθηκε να έχει σεξουαλικά διμορφική έκφραση. Συνυπάρχει με το *CYP19A1* και την ad4 συζευκτική πρωτεΐνη/ στεροειδογόνου παράγοντα SF-1 στα βασικά και διάμεσα κύτταρα των γονάδων XX και με ανεστραμένο φύλο XY ατόμων πριν τη διαφοροποίηση του φύλου. Το *FOXL2* αλληλεπιδρά με την Ad4BP/SF-1 επηρεάζοντας τη μεταγραφή του *CYP19A1*. Υπερέκφραση του στα XX άτομα οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του *CYP19A2* και μείωση της 17β-οιστραδιόλης και της 11 κετοτεστοστερόνης. Τα XY άτομα αν και δεν έδειξαν πλήρη αντιστροφή του φύλου παρουσίασαν εκφύλιση των όρχεων και επαγωγή της αρωματάσης με αυξημένα επίπεδα 17β-οιστραδιόλης και 11 κετοτεστοστερόνης (Wang *et al.*, 2007) . Και απο άλλες μελέτες

προκύπτει ότι η επίδραση της εξωγενούς οιστραδιόλης E2 στο *CYP19A2* γίνεται έμμεσα μέσω της σύνδεσης του *FOXL2* στο *CYP19A2*. Σημειώτέο ότι το *FOXL2* ανιχνεύθηκε στον εγκέφαλο και την υπόφυση διαφόρων ειδών ιχθύων. Σε μια μελέτη που έγινε και αφορά ένα κυπρινοειδές το *Gobiocypris rarus* οι Jiang *et al.* (2011) διαπίστωσαν την ύπαρξη δύο μορφών του *FOXL2* τις *FOXL2A* και *FOXL2B*. Η ημιποσοτική RT-PCR έδειξε την παρουσία του στον οφθαλμό, τον εγκέφαλο, τα βράγχια και τις γονάδες. Η οιστραδιόλη βρέθηκε ότι αυξάνει τα ποσοστά έκφρασης του *FOXL2* mRNA σε αντίθεση με την 2-μεθυλ-τεστοστερόνη που τα μειώνει. Αυτή η διαπίστωση καθιστά το *FOXL2* ιδανικό μοριακό δείκτη για την παρουσία ενδοκρινικών διαταρακτών.

1.8. Υποδοχείς Οιστρογόνων

Στους τελεόστεους ιχθύες υπάρχουν τρία γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς δράσης των οιστρογόνων και είναι τα *ESR1*, *ESR2A* και *ESR2B* αν και νεότερα δεδομένα δείχνουν την παρουσία δύο υπότυπων για το *ESR1* και το *ESR2*. Οι υποδοχείς αυτοί κυριαρχούν στα κύτταρα της ακτινωτής νευρογλοίας πράγμα που αποδεικνύεται κατά τη χρήση οιστρογόνων και ανταγωνιστή των υποδοχέων οιστρογόνων που εμποδίζουν την έκφραση του γονιδίου *CYP19A2*. Για να καθοριστεί αν η δράση της τεστοστερόνης στην έκφραση του *CYP19A2* είναι άμεση, έμμεση ή συνδυασμός διαφόρων οδών έγιναν μελέτες *in vitro* (Mouriec *et al.*, 2009). Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η δράση της τεστοστερόνης στο εν λόγω γονίδιο δεν γίνεται μέσω των υποδοχέων των ανδρογόνων (AR) αλλά αυτών των οιστρογόνων. Επίσης η διυδροτεστοστερόνη μεταβολίζεται στον εγκέφαλο από τη 3β-υδροξυστεροειδή αφυδρογονάση των αστροκυττάρων σε β-διόλη η οποία έχει ισχυρή οιστρογόνο δράση. Η β-διόλη δρα κυρίως στους *esr2* υποδοχείς. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η 11-κετοτεστοστερόνη η οποία δεν υπόκειται στην επίδραση της αρωματάσης δεν επιδρά στην έκφραση του *CYP19A2* ούτε *in vitro* ούτε *in vivo* (Mouriec *et al.*, 2009). Σε αντιπαράβολή κατά την έκθεση γόνου του zebrafish (*D. rerio*) σε αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στη δραστηριότητα του *CYP19A1* ενώ σε ενήλικα άτομα του

ίδιου είδους παρατηρήθηκε αναστολή της μεταγραφής του εν λόγω γονιδίου. Η δράση αυτή οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στην αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση που ασκεί η οιστραδιόλη στην έκκριση των γοναδοτροπινών. Οι γοναδοτροπίνες με τη σειρά τους διεγείρουν την έκφραση της αρωματάσης στις ωοθήκες (Gen et al., 2001; Kagawa et al., 2003).

1.9. Ξενοοιστρογόνα

Υπάρχουν χημικές ουσίες που κατα την είσοδό τους σε έναν οργανισμό μιμούνται τη δράση των οιστρογόνων έχοντας οιστρογόνο ή αντι-οιστρογόνο δράση. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται ενδοκρινικοί διαταράκτες ή ξενοοιστρογόνα. Ως τέτοιες θεωρούνται εξωγενείς ουσίες ή μείγματα ουσιών οι οποίες τροποποιούν λειτουργίες του ενδοκρινικού συστήματος προκαλώντας ανεπιθύμητες ενέργειες σε έναν οργανισμό, τους απογόνους του ή και πληθυσμούς αυτών (IPCS, 2002). Προέρχονται από φυσικές πηγές όπως ζώα, φυτά, μύκητες και άλγη αλλά και από χημικές πηγές όπως πλαστικά, απορρυπαντικά, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, φάρμακα και προϊόντα ατομικής υγιεινής. Συνοπτικά οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα ξενοοιστρογόνα διαταράσσουν την στεροειδογένεση έχουν ως εξής: 1) Μειωμένη σύνθεση της GnRH από τον υποθάλαμο 2) μειωμένη απελευθέρωση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) από τον υποθάλαμο 3) μειώνοντας την διαθέσιμη για την στεροειδογένεση χολοστερόλη 4) τροποποιώντας τα ένζυμα που απαιτούνται για την στεροειδογένεση όπως η αρωματάση 5) τροποποιώντας τον αριθμό και τη λειτουργία των κυτταρικών υποδοχέων. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη δράση των οιστρογόνων στη διαμόρφωση των χαρακτηριστικών του φύλου, στη μορφολογία του αναπαραγωγικού συστήματος και στη σεξουαλική διαφοροποίηση του εγκεφάλου είναι εύλογη η επίδραση των ξενοοιστρογόνων στη γονιμότητα του αρσενικού, το μειωμένο μέγεθος των γονάδων μέχρι και την πλήρη αντιστροφή του φύλου. Κατ' επέκταση τα ξενοοιστρογόνα επιδρούν και στο κυτόχρωμα *CYP19* υπεύθυνο για την κωδικοποίηση του ενζύμου της αρωματάσης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ: Ουσίες που δρούν ως οιστρογονικοί ενδοκρινικοί διαταράκτες (Iwanowicz & Blazer, 2011)

Επίμονα Οργανοαλογόνα	Συνθετικά Οιστρογόνα
Διοξίνες-Φουράνια	Χλωροτρανισεν
Πολυβρωμιωμένα διφαινύλια (PBB)	Διενοιστρόλη
Πολυχλωριωμένα Διφαινύλια (PCB)	Διαιθυλστιλβεστρόλη
	Αιθυνολοιστραδιόλη
Αντιοξειδωτικά Τροφίμων	Φωσφοιστρόλη
BHA	Μοιστρανόλη
Propyl gallate	Φωσφορική Πολοιστραδιόλη
	Κινοιστρόλη
Ζιζανιοκτόνα	
Αλδρίνη	Ειδικό Ρυθμιστές Υποδοχέων Οιστρογόνων
Αλεθρίνη, δ-ισομερές	Αφιμοξιφαίνη
Διγλωροδιφαινυλτριγλωροαιθάνιο (DDT)	Αρζοξιφαίνη
Δικοφώλ	Βαζεδοξιφαίνη
Διελδρίν	Χλωμιφαίνη
Ενδοσουλφάν	Φεμαρέλλη
Φεναριμόλ	Λασοφοξιφαίνη
Φενβαλερεϊτ	Ορμελοξιφαίνη
Χλωρντεκον	Ραλοξιφαίνη
Λινδάνη	Ταμοξιφαίνη
Μεθοξυχλώρ	Τορεμιφαίνη
Νοραχλώρ	
Περμεθρίνη	Φθαλικά
Τριαδιμεθιφόν	Βουτυλ-βενζυλ-φθαλικά (BBP)
Τοξαφέν	Δι-n-βουτυλ-φθαλικά (DBP)
	Δι-αιθυλεξυλ-φθαλικά (DEHP)
Υλικά Πλαστικών	Διαιθυλφθαλικά
Βενζοφαινόνη	Φυτοοιστρογόνα
Διφαινόλη Α	Ισοφλαβόνες
Διφαινόλη F	Λιγνάνες
Νολυφαινόλη	
Οκτωφαινόλη	Μυκοοιστρογόνα
Στυρένιο	Ζεαραλενόνη

Η αναστολή της αρωματάσης στους ιχθύες, τα ερπετά και τα πτηνά οδήγησε σε αρρενοποίηση των θηλυκών. Στην ιριδίζουσα πέστροφα (*O. mykiss*) η αρωματάση ήταν ανιχνεύσιμη τρεις εβδομάδες πριν από την ιστολογική διαφοροποίηση των γονάδων χωρίς να αποδεικνύεται ο ρόλος της στη διαφοροποίηση των γονάδων. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά η διαφοροποίηση των γονάδων γίνεται αργότερα και στα γονοχωριστικά είδη ιχθύων όπως το χρυσόψαρο με τους κατάλληλους ορμονικούς χειρισμούς το φύλο μπορεί να αντιστραφεί (Page *et al.*, 2010). Επίσης όπως προαναφέρθηκε ο καθορισμός του φύλου γίνεται υπο την επίδραση περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων που εν τέλει οδηγούν στη σεξουαλική διαφοροποίηση. Το ενδοκρινικό σύστημα συμβάλλει σε αυτό και με τον άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – γονάδες μέσω της παραγωγής γοναδοτροφινών και στεροειδών ορμονών που παράγονται στις γονάδες. Η οιστραδιόλη 17β οδηγεί στη διαφοροποίηση σε ωθήκες ενώ η 11- κετοτεστοστερόνη σε όρχεις. Στον άνθρωπο που φέρει μόνο μια μορφή του γονιδίου της αρωματάσης αυτό επιτυγχάνεται με την τροποποίηση της μεταγραφής του RNA και την προσθήκη εξωνίων και συνδυασμό εκκινητών ενώ στους ιχθύες υπάρχουν δύο ισομορφές του γονιδίου της αρωματάσης στον εγκέφαλο και στις ωθήκες που κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο στη βιοσύνθεση των οιστρογόνων (Kuhl *et al.*, 2005). Οι Kuhl *et al.* με μελέτες που έγιναν σε ιχθύες του είδους *Oryzias latipes* έδειξαν ότι η έκθεση του γόνου αυτού του είδους σε συγκέντρωση 5,5 μg/l ο,p'-DDT για 14 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία θηλυκών ατόμων σε ποσοστό 96%. Αυτό πιθανολογείται ότι συμβαίνει εξ' αιτίας της δράσης του ο,p'-DDT σε περιοχές του γονιδίου *CYP19A2* στον εγκέφαλο υπεύθυνες για τη δράση των οιστρογόνων (ERE, Estrogen-Responsive Elements) με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση της αρωματάσης. Η 17β-αιθυνυλοιστραδιόλη παρατηρήθηκε ότι επιδρά ανάλογα στις γονάδες του ίδιου είδους και ανάλογα επιδρούν τα ξενοοιστρογόνα δισφαινόλη και νολυφαινόλη και η 17β-οιστραδιόλη στο ήπαρ (Sanderson, 2006). Είναι γνωστό ότι η αιθυνυλοιστραδιόλη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ανωοθυλακιορρηξίας και επικουρικά στην εμμηνόπαυση, στη θεραπεία της οστεοπόρωσης και του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο

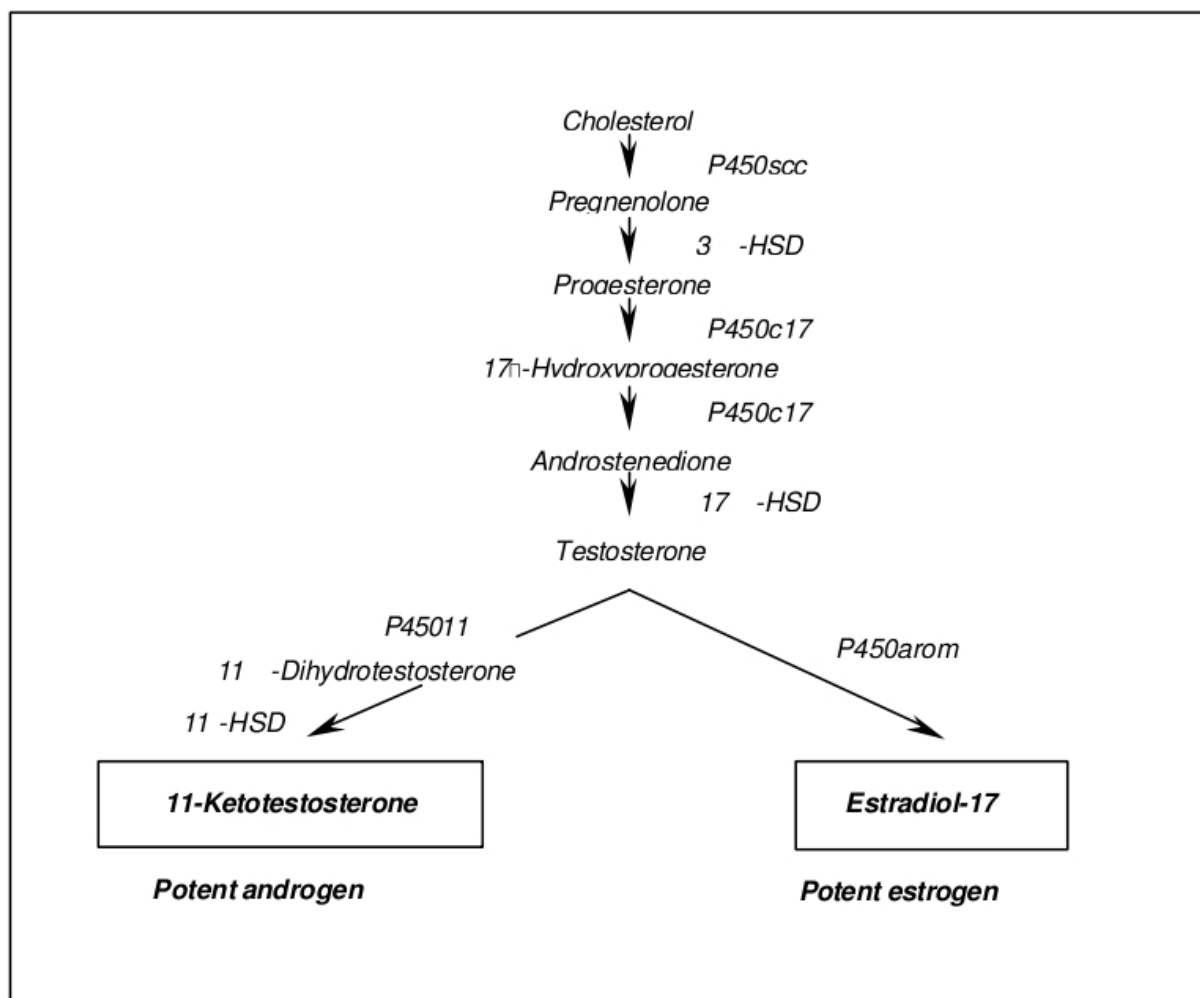
εξ' αιτίας της δράσης της στους υποδοχείς οιστρογόνων.

Έγιναν προσπάθειες χαρτογράφησης των περιοχών έκφρασης της αρωματάσης στον εγκέφαλο σε διάφορα είδη τελεόστεων ιχθύων. Μια έρευνα των Callard *et al.* το 1990 έδειξε ότι η δραστηριότητα της αρωματάσης στον υποθάλαμο των τελεόστεων ιχθύων είναι 100 με 1000 φορές μεγαλύτερη από ότι στα θηλαστικά κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα αυξημένα επίπεδα m-RNA (Gelinis *et al.*, 1998). Μια έρευνα όμως των Gelinis και Callard το 1997 στο χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) έρχεται να προσθέσει επιπλέον δεδομένα. Σε αυτή την έρευνα χρησιμοποιήθηκε αντιορός της αρωματάσης του ανθρώπινου πλακούντα με σκοπό τον εντοπισμό των νευρώνων που περιέχουν αρωματάση με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας. Εξ' αιτίας όμως της χρήσης ανθρώπινης αρωματάσης και λόγω της παραλλακτικότητας του γονιδίου τα αποτελέσματα δεν ήταν ακριβή. Τα χρυσόψαρα που χρησιμοποιήθηκαν δε βρισκόταν σε αναπαραγωγική περίοδο κάτι που επηρεάζει την έκφραση της αρωματάσης και δεν υπήρξαν σημαντικά επίπεδα δραστηριότητας του γονιδίου. Οι Forlano *et al.* το 2001 χρησιμοποίησαν στοιχεία από την GenBank για το σχεδιασμό ενός αντιγόνου για το γονίδιο της αρωματάσης από ιχθύες όπως *Oreochromis sp.*, *Carassius sp.* και *Denio sp.* είτε για την αρωματάση στις γονάδες είτε στον εγκέφαλο. Έπειτα παρήχθησαν αντιοροί (μονοκλωνικά αντισώματα) σε λαγούς και ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό της προέλευσης της αρωματάσης που αντιδρά ανοσολογικά, δηλαδή αν αυτή βρίσκεται στη νευρογλοία ή έντος του νευρώνα. Για την χαρτογράφηση των περιοχών του εγκεφάλου που περιέχουν αρωματάση χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του *in situ* ανοσοφθορισμού. Οι ιχθύες που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν σε ένα είδος βατραχόψαρου (*Porichthys notatus*) και η τεχνική του ανοσοφθορισμού εφαρμόστηκε σε διάφορα τμήματα του εγκεφάλου αλλά και στις γονάδες. Τα αντισώματα που παρήχθησαν χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς σε εγκέφαλο τιλάπιας (*Oreochromis spp.*) και σε γονάδες χρυσόψαρου αλλά ανεπιτυχώς σε εγκέφαλο χρυσόψαρου λόγω χαμηλής αντιστοιχίας των νουκλεοτιδίων (P. Forlano & A. Bass, unpublished data). Σε ένα άλλο είδος βατραχόψαρου ανιχνεύθηκαν από άλλη ομάδα

ερευνητών υποδοχείς οιστρογόνων στον πρόσθιο εγκέφαλο και στο διεγκέφαλο (κοιλιακή μοίρα τελεγκέφαλου, προοπτική περιοχή και περιοχές κοιλιακά του υποθαλάμου) ταυτόσημες με τις περιοχές που η αρωματάση παρουσιάζει αυξημένη έκφραση. Στα θηλαστικά κατά τα τελικά στάδια της εμβρυογένεσης λίγο πριν τον τοκετό, καταγράφονται αυξημένα επίπεδα αρωματάσης στον εγκέφαλο, τα οποία σχετίζονται με την νευροτροφική δράση των οιστρογόνων και την σεξουαλική διαφοροποίηση του προοπτικού πυρήνα του εγκεφάλου. Στα πτηνά παρατηρήθηκε διακύμανση των επιπέδων της αρωματάσης στο τμήμα του εγκεφάλου που σχετίζεται με τις φωνητικές λειτουργίες (κελάδημα). Στους τελεόστεους ιχθύες ο εγκέφαλος αναπτύσσεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, υπάρχει διαρκής αναγέννηση των νευρώνων και αύξηση του αριθμού των περιφερικών κινητικών και αισθητικών δομών (Zupanc, 1999). Έχει αποδειχθεί η δράση των οιστρογόνων στην πλαστικότητα των συνάψεων, η ρύθμιση του παράγοντα IGF (Insulin-like Growth Factor) και την ενεργοποίηση της νευρογλοίας. Συνεπώς η παρουσία της αρωματάσης στη νευρογλοία είναι ενδεικτική της ρυθμιστικής δράσης της αρωματάσης στα στεροειδή (Forlano *et al.*, 2001). Μια μελέτη που έγινε και αφορά ένα είδος ιχθύος που ζεί στα μαγκρόβια έλη των τροπικών περιοχών της Κεντρικής και Λατινικής Αμερικής, το *Rivulus marmoratus* έδειξε ότι σε αυτό τον ερμαφρόδιτο ιχθύ διάφοροι ενδοκρινικοί διαταράκτες επηρεάζουν διαφορετικά τις δύο ισομορφές της αρωματάσης ανάλογα με το φύλο (Lee *et al.*, 2006). Οι εν λόγω ερευνητές χρησιμοποίησαν έμβρυα του *R. marmoratus* και παρατήρησαν ότι η έκφραση του *CYP19A2* αυξανόταν μέχρι και την 12η ημέρα μετά την γονιμοποίηση και μειώθηκε απότομα μετά την εκκόλαψη. Αντιθέτως η μεταγραφή και έκφραση του *CYP19A1* ανιχνεύθηκε την 9η ημέρα μετά την γονιμοποίηση και μειώθηκε σταδιακά μέχρι την εκκόλαψη. Η έκθεση ερμαφρόδιτων ατόμων και δευτερογενών αρσενικών σε 4 νολυφαινόλη οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του *CYP19A2* και μείωση του *CYP19A1*. Στα αρσενικά άτομα δεν παρατηρήθηκε δραστηριότητα του *CYP19A1* στις γονάδες. Η έκθεση σε 4 τεταρτ-οκτυλφαινόλη και διφαινόλη A είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης και των δύο ισομορφών της

αρωματάσης. Η δράση της διφαινόλης A και του triclocarban κατά την έκθεση εμβρύων zebrafish σε αυτές είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση έκφρασης του *CYP19A2*. Αξιοσημείωτο είναι ότι κατά την ταυτόχρονη έκθεση σε διφαινόλη A και triclocarban η δράση του δεύτερου παρεμπόδισε τη δράση της διφαινόλης στη αρωματάση (Chung et al., 2011). Αυτή η παρατήρηση δείχνει ποσο δύσκολη είναι η όποια επιτυχής πρόβλεψη της δράσης σε συνδυασμό διάφορων ενδοκρινικών διαταρακτών. Η διφαινόλη αποτελεί μέρος των πλαστικών περιεκτών που χρησιμοποιούνται για τη συσκευασία τροφίμων ενώ το triclocarban αλλά και το triclosan χρησιμοποιούνται κατα κόρον ως αντιμικροβιακά σε σαπύνια και προϊόντα περιποίησης συνεπώς χρήζει ενδιαφέροντος η μελέτη τυχόν επίδρασής του στην ανθρώπινη αρωματάση.

Τα ένζυμα που μετέχουν στη στεροειδογένεση είναι υπεύθυνα για την σύνθεση πλειάδας ουσιών. Τα επινεφρίδια, οι όρχεις και οι ωοθήκες συνθέτουν *de novo* στεροειδή. Στεροειδή συντίθενται επίσης στον εγκέφαλο, τον πλακούντα και το λιπώδη ιστό. Στους ιστούς που γίνεται *de novo* σύνθεση στεροειδών η αρχή γίνεται με την μετατροπή της χολοστερόλης από το *CYP11A* σε πρεγνενολόνη. Η πρεγνενολόνη είναι ανταγωνιστής του GABA και συμμετέχει στην νευρογένεση. Η 3β υδροξυστεροειδής αφυδρογονάση (3β HSD) μετατρέπει την πρεγνενολόνη σε προγεστερόνη με την βοήθεια ενζύμων του P450 που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια και το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η 3β HSD συνίσταται από δύο ισοένζυμα εκ των οποίων η 2 3β HSD εντοπίζεται σε ιστούς που συνθέτουν *de novo* στεροειδή. Η αρωματάση είναι υπεύθυνη για την μετατροπή της τεστοστερόνης σε οιστραδιόλη και της ανδροστενεδιόνης σε οιστρόνη. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις αλληπάλληλες υδροξυλιώσεις της 19-μεθυλομάδας των ανδρογόνων με παράλληλη εξάλειψη της ως φορμικό οξύ και δημιουργία διπλού δεσμού (αρωματοποίηση) στον A-δακτύλιο των ανδρογόνων. Στα θηλαστικά τα κύτταρα της έσω θήκης του ωοθυλακίου περιέχουν προγεστερόνη και ανδρογόνα που αποτελούν πρόδρομες μορφές των οιστρογόνων τα οποία συντίθενται στα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας του αναπτυσσόμενου ωοθυλακίου.



Εικόνα 5: Η οδός της στεροειδογένεσης και η θέση του CYP19A (Nagahama, 2003)

Είναι γνωστό ότι η LH και η FSH επηρεάζουν την έκφραση της αρωματάσης και ότι καθώς τα επίπεδα της LH μειώνονται, μειώνεται και η έκφραση της αρωματάσης άρα και η παραγωγή οιστρογόνων ενώ αυξάνεται η δραστηριότητα του CYP11A και των 3 β -HSD και κατ' επέκταση η παραγωγή της προγεστερόνης.

Σε κυτταροκαλλιέργειες κυττάρων από επινεφρίδια βοοειδών υπο την επίδραση της τετραχλωροδιβενζοδιοξίνης (TCDD) παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής κορτιζόλης και εξάλειψη της χολοστερόλης από τα μιτοχόνδρια. Αυτή η διαταραχή της στεροειδογένεσης προκύπτει μέσω μείωσης της επίδρασης της επινεφριδιοφλοιοτρόπου ορμόνης (ACTH) και του c-AMP στη σύνθεση της κορτιζόλης χωρίς αναστολή του CYP11A. Σε επίμυες που χορηγήθηκε ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη και εκτέθηκαν σε TCDD παρατηρήθηκε μείωση της παραγόμενης τεστοστερόνης από τους όρχεις. Με τη χορήγηση πρεγνενολόνης η

τεστοστερόνη επανήλθε στα επιθυμητά επίπεδα και περαιτέρω διερεύνηση έδειξε ότι η αρχική μείωση οφειλόταν σε μειωμένη δυνατότητα χρήσης της χολοστερόλης από τα μιτοχόνδρια. Έκθεση επίμυων σε TCDD για 4 εβδομάδες οδήγησε σε μείωση του μεγέθους των κυττάρων Leydig στους όρχεις αλλά και του λείου ενδοπλασματικού δικτυωτού και των μιτοχονδρίων, οργανυλίων υπεύθυνων για τη σύνθεση στεροειδών (Sanderson, 2006). Με γνωστό το ρόλο της τεστοστερόνης στην σεξουαλική εγκεφαλική διαφοροποίηση, την ενεργοποίηση της σεξουαλικής συμπεριφοράς του αρσενικού και την παλίνδρομη ρύθμιση έκκρισης της γοναδοτροφίνης από τα στεροειδή φαίνεται ότι το γονίδιο της αρωματάσης ελέγχει τη σεξουαλική συμπεριφορά και την αναπαραγωγή. Σε μελέτες που έγιναν σε επίμυες παρατηρήθηκε ότι η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα του mRNA της αρωματάσης στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθυλακίων σε αντίθεση με την ωχρινοτρόπο ορμόνη (LH). Η έκθεση άνηβων επίμυων σε πολυχλωριωμένες διβενζοδιοξίνες είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του βάρους των ωοθηκών και πρόιμη αύξηση έκκρισης της LH και FSH εντός 24 ωρών με αποτέλεσμα την μείωση αυτών σε 72 ώρες οπότε επίκειται η αναμενόμενη ωοθυλακιορρηξία. Στους επίμυες χορηγήθηκε γοναδοτροπίνη. Τα επίπεδα οιστραδιόλης ήταν σταθερά αυξημένα ακόμη και πριν την ωορρηξία σε αντίθεση με τους επίμυες της ομάδας ελέγχου. Μέχρι την ωορρηξία δεν υπήρξε άλλη μεταβολή στην οιστραδιόλη, την προγεστερόνη και την έκκριση της ανδροστενεδιόνης. Οι TCDDs έχουν ισχυρή αντιοιστρογονική δράση, διαταράσσουν την ωορρηξία και την παραγωγή σπέρματος και επηρεάζουν τα επίπεδα στεροειδών ορμονών δρώντας στους υποδοχείς αρωματικών υδρογονανθράκων και όχι μέσω της αρωματάσης αλλά επηρεάζοντας το γονίδιο *CYP11A* και την μεταβολική οδό της πρωτεϊνικής κινάσης (PKA) που εξαρτάται από το c-AMP. Στους τελεόστεους ιχθύες υπάρχουν δύο μορφές των γοναδοτροπινών (GTH), η GTH-I ομόλογη της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης και η GTH-II ομόλογη της ωχρινοτρόπου. Στα σολομοειδή παρατηρήθηκε ότι η GTH-I και η έκφραση της αρωματάσης αυξάνουν κατά την περίοδο εναπόθεσης της λεκίθου (vitellogenesis). Στο λαβράκι το οποίο ωοτοκεί κάθε ημέρα

κατα την περίοδο ωοτοκίας παρατηρήθηκε ότι η GTH-II σε αντίθεση με την GTH-I, ήταν αυξημένη κατά την περίοδο της λεκιθογένεσης μέχρι και την περίοδο της ωοτοκίας, σε διαφοροποίηση με τα σολομοειδή (Gen *et al.*, 2001). Οι Gen *et al.* τοποθέτησαν εμφυτεύματα που απελευθερώνουν GnRHα καθ'όλη την περίοδο ωογένεσης αναλύοντας την έκφραση της αρωματάσης με Northern blot αφού σαν πρώτο βήμα απομόνωσαν cDNA της αρωματάσης στις ωοθήκες. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν για πρώτη φορά σε τελεόστεους ιχθύες όπως το λαβράκι ότι στα ωοθυλάκια που περιέχουν λέκιθο τα αυξημένα επίπεδα αρωματάσης και οιστραδιόλης συνάδουν με την αυξημένη έκφραση του αντίστοιχου mRNA κάτι που παρατηρήθηκε κατά τη σεξουαλική ωρίμανση στο γατόψαρο. Η έκφραση του mRNA μειώνεται κατά την μετακίνηση του πυρήνα και την ωρίμανση του ωοθυλακίου. Κατά την συλλογή των ιχθύων παρατηρήθηκε ιστολογικά ότι πριν από τα GnRH εμφυτεύματα υπήρχαν ωοκύτταρα στο περιπυρηνικό στάδιο ενώ στην όγδοη ημέρα περιείχαν λέκιθο. Ο γοναδοσωματικός δείκτης παρουσίαζε αύξηση. Το λαβράκι ανήκει στους πολλαπλούς αποθέτες συνεπώς οι ωοθήκες περιείχαν ωοθυλάκια διαφόρων σταδίων με αποτέλεσμα η Northern blot ανάλυση να γίνεται για κάθε στάδιο. Σε ένα άλλο είδος ιχθύ το *Fundulus heteroclitus* χρησιμοποιήθηκε ο *in situ* υβριδισμός για την ιστική και κυτταρική διερεύνηση της έκφρασης του *CYP19A1* mRNA. Στο *F. Heteroclitus* οι ωοθήκες είναι ασύγχρονες και κατά την αναπαραγωγική περίοδο υπάρχουν σε αυτές ωοθυλάκια σε όλα τα στάδια ωρίμανσης. Στα ωοκύτταρα τύπου I η έκφραση της αρωματάσης εντοπίζεται διάχυτα σε όλο το ωόπλασμα μέχρι τον τρίτο μήνα ηλικίας ενώ στα ώριμα ωοκύτταρα εντοπίζεται στη μεμβράνη του ωοθυλακίου και το φάκελο της λεκιθίνης. Κατά την έκθεση ατόμων *F. heteroclitus* σε βενζο(α)πυρένιο παρατηρήθηκε αναστολή της μεταγραφής του *CYP19A1* στα ωοκύτταρα τύπου I στις ηλικίες μικρότερες των 3 μηνών ενώ στα ωοκύτταρα τύπου I των ενήλικων ιχθύων παρατηρήθηκε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας της αρωματάσης χωρίς μείωση της μεταγραφής της. Η υπόθεση που θα μπορούσαμε να εξάγουμε από αυτή την παρατήρηση εάν υπήρχαν επαρκή στοιχεία (φυσιολογικά επίπεδα στεροειδών ορμονών και

αναπαραγωγική ωρίμανση) θα ήταν η καθυστέρηση της σεξουαλικής ωρίμανσης κατά την έκθεση σε βενζο(α)πυρένιο (Dong, *et al.* 2008). Η φυσιολογική ρύθμιση της μεταγραφής του *CYP19A1* στις ωοθήκες γίνεται μέσω της αύξησης που προκαλείται στο c-AMP από τις γοναδοτροφίνες. Το c-AMP δρα στους CRE υποδοχείς του *CYP19A1*. Σύμφωνα με τους Kazeto *et al.* (2001) η 5'-περιοχή του *CYP19A1* που έχει απομονωθεί από το γονιδίωμα του zebrafish (*D. rerio*) αποτελούνται από τις εξής αλληλουχίες: τρεις υποδοχείς για το c-AMP, έναν υποδοχέα για τη δράση υδρογονανθράκων (AhR/Arnt), μια περιοχή δράσης των στεροειδών (SF-1 site) και μια αλληλουχία εκκινητών της μεταγραφής του (TATA box). Στην αντίστοιχη περιοχή του *CYP19A2* υπάρχει αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων που οδηγεί στο σχηματισμό RNA (εξόνιο) αλλά και ένας CRE υποδοχέας, ένας υποδοχέας οιστρογόνων (ERE responsive element), μια αλληλουχία που κωδικοποιεί γονίδια που σχετίζονται με την χρησιμοποίηση διάφορων λιπαρών οξέων (PPARalpha/RXRalpha) και μια αλληλουχία εκκινητών της μεταγραφής του (TATA box). Έτσι προκύπτει ότι η έκφραση του *CYP19A1* δεν επηρεάζεται άμεσα από τα οιστρογόνα και μένει να διερευνηθεί η επίδραση του βενζο(α)πυρενίου στους AhR υποδοχείς του εν λόγω γονιδίου. Παρ' όλα αυτά ο ρόλος της τεστοστερόνης στην σεξουαλική διαφοροποίηση γίνεται έμμεσα μέσω των οιστρογόνων. Σε αρσενικά ποντίκια που αφαιρέθηκε το γονίδιο της αρωματάσης (Honda *et al.*, 1998) αλλά και σε άλλα που διαγράφηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί τους υποδοχείς δράσης των οιστρογόνων η συμπεριφορά αρσενικού ήταν αναστάλθηκε (Ogawa *et al.*, 1997). Παρ' ότι η οιστραδιόλη είναι η κύρια θηλυκή ορμόνη στους τελεόστεους ιχθύες, η τεστοστερόνη δεν είναι η κύρια ορμόνη στους άρρενες πληθυσμούς. Με την έκφραση της 11β-υδροξυλάσης και της 11β-υδροξυστεροϊδούς αφυδρογονάσης έχουμε την παραγωγή της 11-κετοτεστοστερόνης και της 11β-υδροξυτεστοστερόνης, ουσίες με ανδρογόνο δράση που σε μικρή ποσότητα υπάρχουν και σε θηλυκούς τελεόστεους ιχθύες (Lokman *et al.*, 2002). Είναι πιο αποτελεσματικά από την τεστοστερόνη στο να καθορίζουν τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου, την αναπαραγωγική συμπεριφορά και τη σπερματογένεση (Borg, 1994).

Αντιμυκητιακά και μυκητοκτόνα φάρμακα όπως η φαδροζόλη έχει διαπιστωθεί ότι αναστέλλουν αναστρέψιμα την αρωματάση στα μικροσωμάτια του ανθρώπινου πλακούντα. Κατά την εμβρυική ανάπτυξη σε κοτόπουλα η φαδροζόλη ανέστειλε την αρωματάση προκαλώντας φαινοτυπική αρρενοποίηση σε γενοτυπικά θηλυκά. Τα θηλυκά ανέπτυξαν γονάδες που μοιάζουν με όρχεις και φέρουν άτυπα σπερματικά σωληνάκια. Καμιά όμως μελέτη δεν έδειξε αυξημένη έκφραση της αρωματάσης στους ιχθύες κατά την έκθεση σε φαδροζόλη (Dong *et al.*, 2008). Η χορήγηση φαδροζόλης σε λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) με αδιαφοροποίητο φύλο οδήγησε στην παραγωγή αρσενικών ατόμων σε ποσοστό 95% μειώνοντας την έκφραση της αρωματάσης *CYP19A1* ενώ με τη χορήγηση 17 α -μεθυλδιυδροτεστοστερόνης επετεύχθη το ίδιο αποτέλεσμα σε ποσοστό 100% αλλά με διαφορετικό μηχανισμό, δρώντας στους υποδοχείς ανδρογόνων (Navarro-Martin *et al.*, 2009). Ζιζανιοκτόνα της οικογένειας της τριαζίνης από την οποία παράγεται και η μελαμίνη έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στη Βόρεια Αμερική αλλά και στην Δυτική Ευρώπη στην οποία σταδιακά έχουν απαγορευθεί. Τέτοιες ουσίες είναι η ατραζίνη, η σιμαζίνη και η προπαζίνη. Στη χημική τους δομή φέρουν αρωματικό δακτύλιο και επειδή δεν βιοδιασπώνται εύκολα συσσωρεύονται στο περιβάλλον και κατ' επέκταση στις υδάτινες συλλογές. Κατά τη μακρόχρονη έκθεση σε αυτές τις ουσίες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν αυξημένο κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών σε γυναίκες στην Ιταλία και καρκίνου του στήθους στο Κεντάκι των Ηνωμένων Πολιτειών (Sanderson, 2006). Πληθώρα μελετών σε αρουραίους ενοχοποιούν την ατραζίνη για αυξημένα ποσοστά εμφάνισης όγκων στο μαστό, τα γεννητικά όργανα και την υπόφυση, κάτι που συμβαίνει και κατά την χορήγηση οιστρογόνων. Νεότερες μελέτες έδειξαν ότι η έκθεση αρουραίων σε ατραζίνη ευθύνεται για παρατεταμένο δίοιστρο, καθυστέρηση στην ενήβωση και στη διαστολή του κόλπου, καταστολή της έκλυσης προλακτίνης κατά το θηλασμό και αυξημένη συχνότητα εμφάνισης προστατίτιδας σε αρσενικούς αρουραίους που γεννήθηκαν από θηλυκά που εκτέθηκαν σε ατραζίνη κατά την εγκυμοσύνη (Sanderson, 2006). Η ατραζίνη και πληθώρα άλλων ενδοκρινικών διαταρακτών προκάλεσαν διαταραχή

στην ισορροπία των ανδρογόνων σε αλιγάτορες της Λίμνης Απόγκα (Aporoka) στη Φλόριδα των Ηνωμένων Πολιτειών και σε μια περιοχή με εντατικές καλλιέργειες. Μετρήθηκαν αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων σε σχέση με την τεστοστερόνη στο πλάσμα του αίματος. Η αναλογία αυτή ρυθμίζεται και από την αρωματάση. Οι θηλυκοί αλιγάτορες είχαν πολυκυστικές ωοθήκες και πολυπύρηννα ωοθυλάκια και στα αρσενικά άτομα παρατηρήθηκε μικροφαλλία και αλλοίωση της δομής των όρχεων (Guillette *et al.*, 1994). Επίσης οι αλιγάτορες που εκκολάφθηκαν από τα αυγά που ελήφθησαν από τη Λίμνη Απογκα (Aporoka) είχαν μικρότερη βιωσιμότητα. Οι Guillette *et al.* συνέλεξαν αυγά αλιγατόρων από την Λίμνη Απογκα και τη Λίμνη Γούντραφ (Woodruff) τα οποία επώαστηκαν σε τεχνητές φωλιές και μετά την εκκόλαση αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο περιβάλλον μέχρι την ηλικία των έξι μηνών οπότε και λήφθηκαν τα δείγματα αίματος και γονάδων. Στο αίμα έγινε η μέτρηση της τεστοστερόνης και της οιστραδιόλης ενώ έγινε και ιστολογική εξέταση των γονάδων για τον προσδιορισμό του φύλου και για την παρατήρηση ιστικών αλλοιώσεων. Η Λίμνη Woodruff προστατεύεται ως υδροβιότοπος και θεωρήθηκε ως Λίμνη ελέγχου για την εξαγωγή συγκρίσιμων αποτελεσμάτων. Οι αλιγάτορες που προήλθαν από αυτή δεν παρουσίαζαν τις προαναφερθείσες αλλοιώσεις. Τα ευρήματα όμως δεν μπόρεσαν να τεκμηριώσουν την δράση των ζιζανιοκτόνων της τριαζίνης στους υποδοχείς οιστρογόνων (ERE). Παρ' όλα αυτά μετρήθηκε αυξημένη έκφραση της αρωματάσης υπό την επίδραση αυτών των ουσιών *in vitro* σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές H295R καρκινικών κυττάρων του φλοιού των επινεφριδίων (Sanderson *et al.*, 2000). Σε αυτή την έρευνα οι κυτταρικές σειρές H295R εκτέθηκαν σε ατραζίνη και σε 8-βρομο-κυκλική μονοφωσφορική αδενosίνη, η οποία είναι επαγωγέας της μεταβολικής οδού της πρωτεϊνικής κινάσης που επάγει την αρωματάση. *In vivo* η επινεφριδιοφλοιοτρόπος ορμόνη (ACTH) δρα σε κυτταρικούς υποδοχείς στα επινεφρίδια του ανθρώπου αυξάνοντας το ενδοκυτταρικό c-AMP που με τη σειρά του προκαλεί αντιδράσεις καταρράκτη και αυξημένη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων. Τα H295R κύτταρα δεν φέρουν υποδοχείς για την ACTH συνεπώς η πιο πιθανή οδός ενεργοποίησης της αρωματάσης είναι

μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης. Η επαγωγή της αρωματάσης των επινεφριδίων δεν ήταν στατιστικά σημαντική και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη δράση των τριαζινών και σε άλλους ιστούς που συνθέτουν στεροειδή *in vitro* και *in vivo* (Sanderson *et al.*, 2000). Εν τέλει οι Sanderson *et al.* το 2002 έδειξαν ότι η ατραζίνη αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της φωσφοδιεστεράσης στα κύτταρα H295R δρα επαγωγικά στη δραστηριότητα της αρωματάσης. Παράλληλα οι *in vivo* μελέτες που έδειξαν αύξηση της οιστρονής και της οιστραδιόλης σε σχέση με την τεστοστερόνη απεμπλέκουν την αρωματάση των ωοθηκών και εμπλέκουν την αρωματάση των επινεφριδίων και του λιπώδους ιστού στον άνθρωπο ως υπεύθυνη για αυτή την μεταβολή (Sanderson, 2006).

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δειγματοληψία-Λήψη οργάνων

Για τη διενέργεια του πειράματος συλλέχθηκαν δείγματα ήπατος και γονάδων ιχθύων του είδους πεταλούδα (*Carassius gibelio* Bloch, 1872) από τη Λίμνη Κάρλα του Νομού Μαγνησίας και τη Λίμνη Παμβώτιδα του Νομού Ιωαννίνων. Ο αριθμός των ιχθύων ήταν 12 από τη κάθε λίμνη. Δύο εκ των δειγμάτων από την κάθε λίμνη κρίθηκαν ακατάλληλα για απομόνωση του RNA συνεπώς χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα ήπατος και 20 δείγματα γονάδων, αντιστοίχως. Για τη μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *CYP1A2* χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δείγματα ήπατος, διότι είναι το κύριο όργανο έκφρασης αυτού του γονιδίου. Το μέσο βάρος των ιχθύων που συλλέχθηκαν με τη χρήση διχτυών ήταν 1.200 g και οι μήνες συλλογής ήταν ο Αύγουστος και ο Σεπτέμβριος. Οι ιχθύες τοποθετήθηκαν σε νερό θερμοκρασίας 4°C, έγινε θανάτωσή τους με διατομή του νωτιαίου μυελού και η λήψη των ιστοτεμαχίων ήταν άμεση. Κάθε ιστοτεμάχιο τοποθετήθηκε σε 1 ml διαλύματος Trizol (Chomczynski & Sacchi, 2006) και καταψύχθηκε μέχρι την επεξεργασία του. Το διάλυμα Trizol αποτελείται από φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη και διατίθεται ως έτοιμο σκεύασμα. Η απομόνωση του RNA βασίζεται στο ότι σε όξινο διάλυμα οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια του ιστού μετά από φυγοκέντρηση καθιζάνουν, το DNA βρίσκεται στην διάμεση φάση

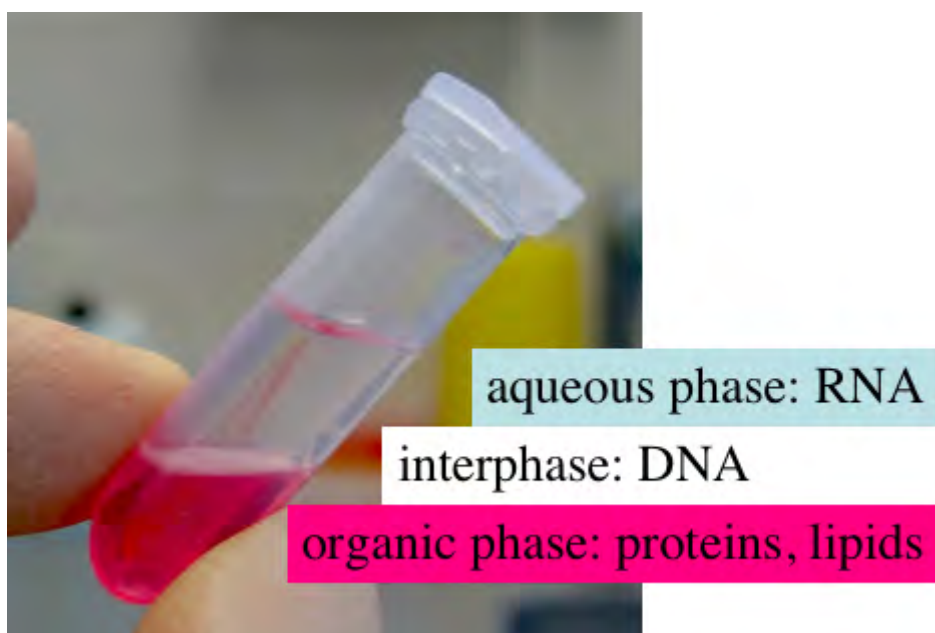
και το RNA στην υδατική φάση (ανώτερη στιβάδα).



Εικόνα 6: *Carassius gibelio*, Chinese Academy of Fishery Sciences, Information Center, <http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?StartRow=5&ID=6376&what=species&TotRec=7>

2.2 Απομόνωση mRNA

Έγινε



Εικόνα 7: Διαχωρισμός RNA, http://openwetware.org/wiki/Image:Trizol_phases.png
ομογενοποίηση του ιστού και λήψη του ιζήματος (300 µl) σε φιαλίδιο. Στο ομογενοποίημα

στη συνέχεια προστέθηκαν 300 μl χλωροφόρμιου ώστε να απομακρυνθεί η φαινόλη και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (Centrurion, Thermo) για 7 λεπτά σε 10.700 rpm στους 4°C. Το βήμα αυτό επαναλαμβανόταν μέχρι την διαύγαση του υπερκείμενου υγρού. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε άλλο φιαλίδιο και προστέθηκε οξικό νάτριο (3 M, pH 5.2) στο 1/10 του όγκου του και 2,5 όγκοι απόλυτης αιθανόλης. Η διαδικασία αυτή έγινε με σκοπό την κατακρήμνιση του RNA και γι' αυτό τα δείγματα παρέμειναν στους -20°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 10.000 rpm για 7 λεπτά στους 4°C, και το ίζημα που σχηματίστηκε πλύθηκε με 70% παγωμένης αιθανόλης, στέγνωσε στον αέρα για 20 λεπτά και διαλύθηκε σε νερό κατεργασμένο με DEPC. Στη συνέχεια η συγκέντρωση και η καθαρότητα κάθε δείγματος προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά 260 nm και 280 nm (Hitachi U-1900). Για την φασματοφωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκαν 5 μl δείγματος σε 500 μl νερού κατεργασμένου με DEPC. Λόγος OD₂₆₀/OD₂₈₀ που κυμαίνονταν στο 1,8 με 2 θεωρούνταν καθαρά ελεύθερα πρωτεϊνών και DNA. Με βάση τον τύπο OD_{260nm} X 40 ng/μl X συντελεστή αραιώσης (στην προκειμένη περίπτωση 500 μl/5 μl=100) έγινε ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA σε μg/μl.

2.3. Παρασκευή μονόκλωνου δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (cDna)

Σε σωληνάριο τοποθετήθηκαν:

- 1 μg mRNA
- 1 μl 10x DNase buffer
- 10 μονάδες RNase inhibitor
- 1 μονάδα DNase
- δις-απεσταγμένο H₂O (ddH₂O) μέχρι να συμπληρωθούν 10 μl. Το δείγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου επί το πολύ 15 λεπτά.

Στη συνέχεια προστέθηκε 1 μl EDTA 20 mM και το δείγμα επώαστηκε στους 65°C επί 10 λεπτά για να απενεργοποιηθούν τα ένζυμα. Κατόπιν, προστέθηκαν:

- 1 µl random hexamers (0,1 µg/µl)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 4 µl MMLV buffer
- 2 µl DTT 0,1M
- 0,5 µl RNase inhibitor (40 μονάδες/µl)
- 1 µl MMLV (200 μονάδες/µl)
- 0,5 µl ddH₂O (συνολικός όγκος 20 µl).

Το δείγμα τοποθετήθηκε στον κυκλοποιητή (Techne TC-312) και επώαστηκε στους 37°C επί 60 λεπτά και κατόπιν στους 65°C επί 10 λεπτά, και διατηρήθηκαν στους -20 ° C. Η διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής του mRNA/cDNA έγινε με βάση το πρωτόκολλο Omniscript (QIAGEN®, 2010) ώστε να καταστεί εφικτή η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου με real time PCR (Light Cyclor ®, Roche).

2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time pcr, qpcr)

Όλες οι αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν σε κυκλοποιητή Roche LightCycler 2.0 χρησιμοποιώντας KAPA SYBR Fast qPCR Kit. Η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος είχε ως εξής:

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν:

- 10 µl KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix (2x)
- 1 µl από καθένα από τους δύο εκκινητές (10 µM)
- 1 µl cDNA του δείγματος (10 ng/µl)
- 4 µl BSA 10%
- 3 µl ddH₂O

Τα υλικά τοποθετήθηκαν σε γυάλινο τριχοειδές σωληνάριο των 20 µl. Ο θερμικός κύκλος αποτελούνταν από ένα στάδιο αποδόμησης στους 95° C για 10 λεπτά, το στάδιο ανασύνθεσης που αποτελούνταν από 60 κύκλους στους 95°C για 10 sec, 57°C για 10 sec και

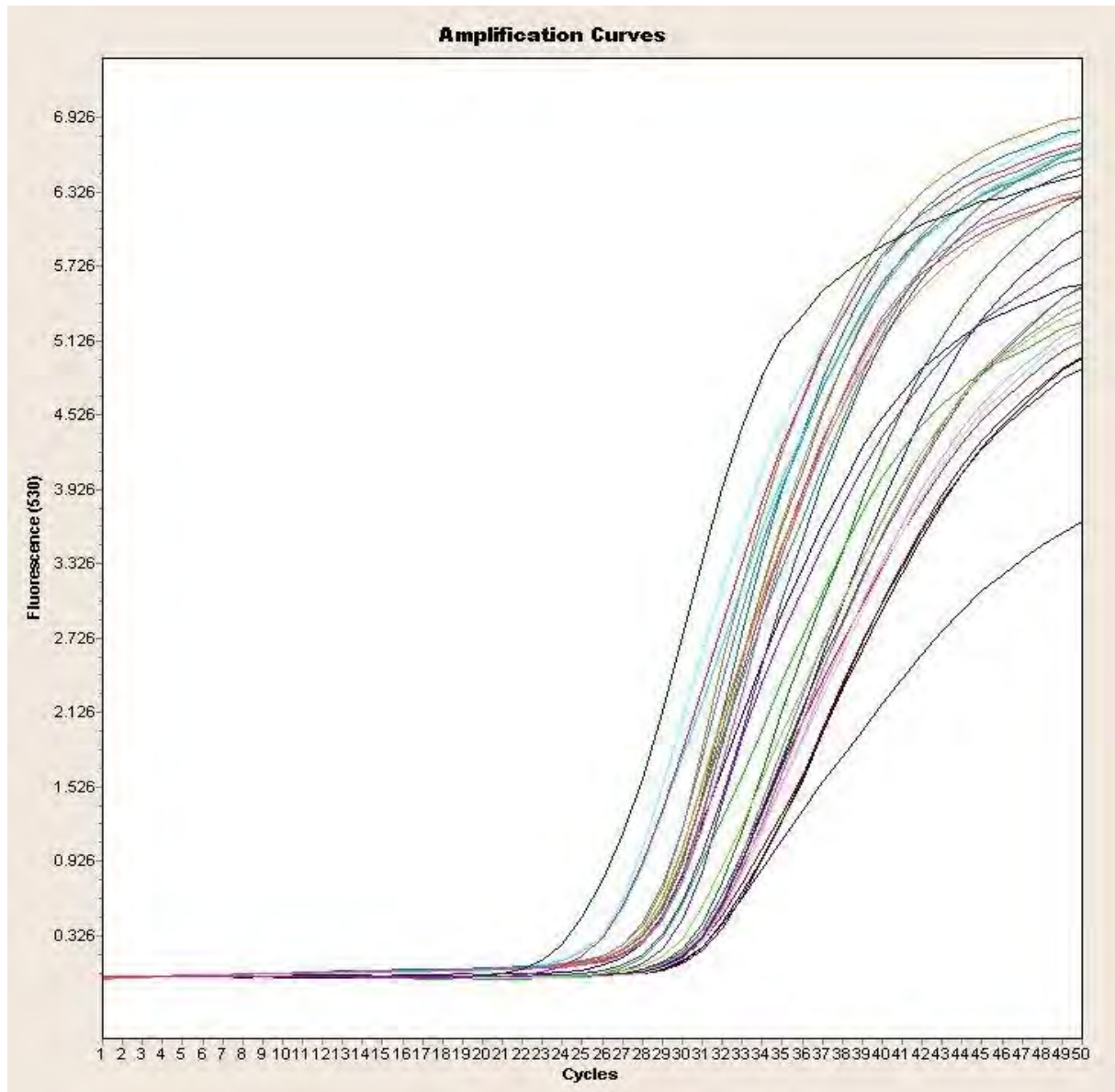
72°C για 15 sec, και ένα στάδιο τήξης σε θερμοκρασία κυμαινόμενη από 65°C έως 95°C. Στο τέλος των κύκλων της PCR, τα προϊόντα υποβλήθηκαν σε τήξη για να επαληθευτεί πως υπήρχε μόνο ένα προϊόν ανά αντίδραση, το οποίο ανιχνεύονταν με τη χρωστική SYBR Green. Οι ποσοτικές τιμές ορίστηκαν ως ο κύκλος της αλυσιδωτής αντίδρασης (Ct), όπου η αύξηση του τίτλου αρχίζει και γίνεται γεωμετρική. Το μέγεθος της έκφρασης του mRNA για το γονίδιο προς εξέταση υπολογίστηκε με της εξίσωση $1/\sqrt{Ct}$ και η τιμή που λήφθηκε διαιρέθηκε με το $1/\sqrt{Ct}$ της αντίστοιχης έκφρασης της β-ακτίνης.

Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν:

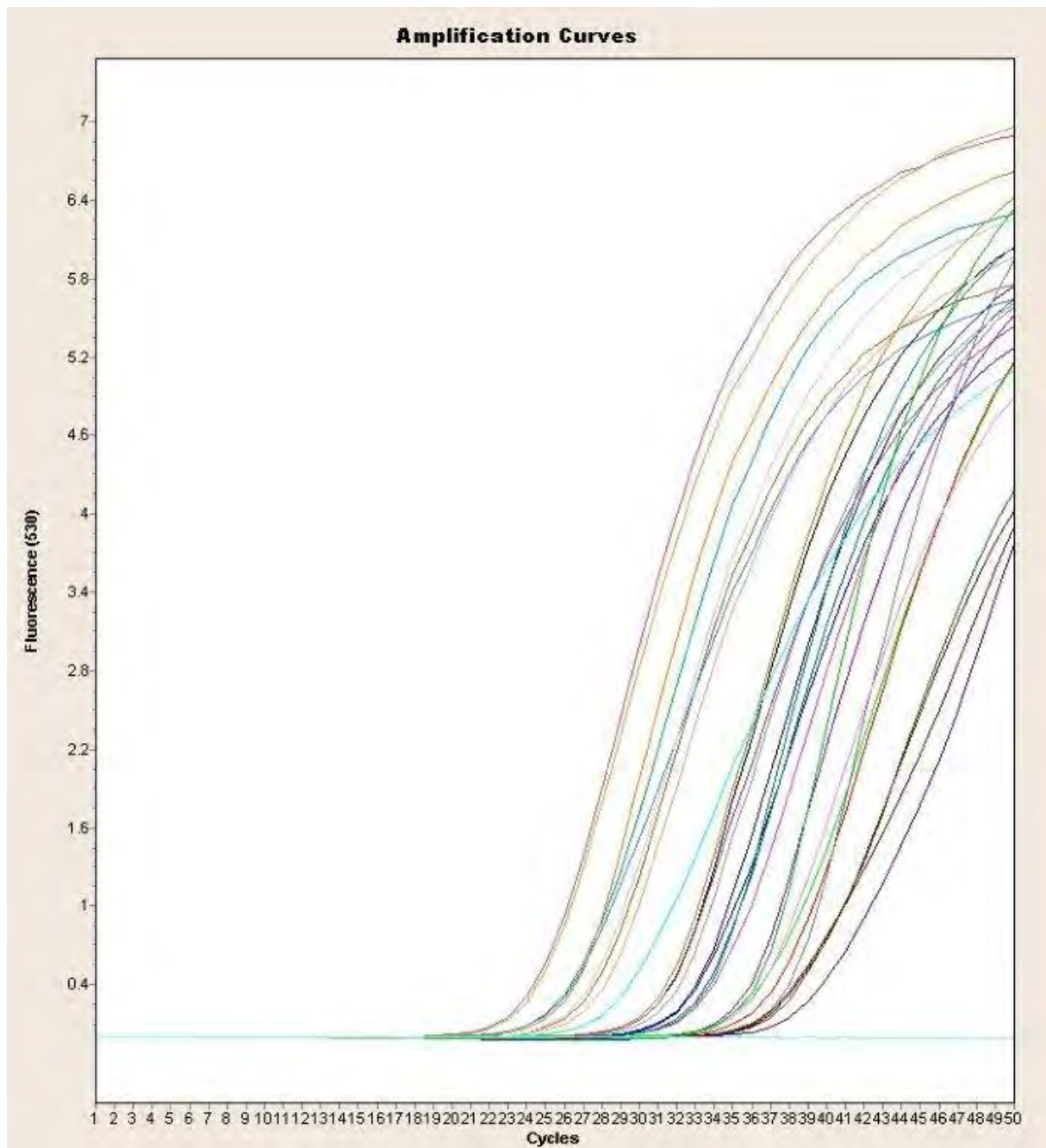
ΠΙΝΑΚΑΣ III: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

Εκκινητής	Αλληλουχία	Κωδικός Γονιδίου
cagCYP1A-F	CACTTCTCGAGGCCTTCATC	GQ353297
cagCYP1A-B	GAGGAATCGGTCCAGATTGAAGCTTGA	GQ353297
cagARO-F	CATCGGACGCATCCACAAG	U18974.1
cagARO-B	ACGGTGTTCCTCGAAGTTCTCC	U18974.1
cag-b-actin-F	GACCAACCCAAACCTCTCAA	AB039726
cag-b-actin-B	AGTCAATGCGCCAAACAGA	AB039726

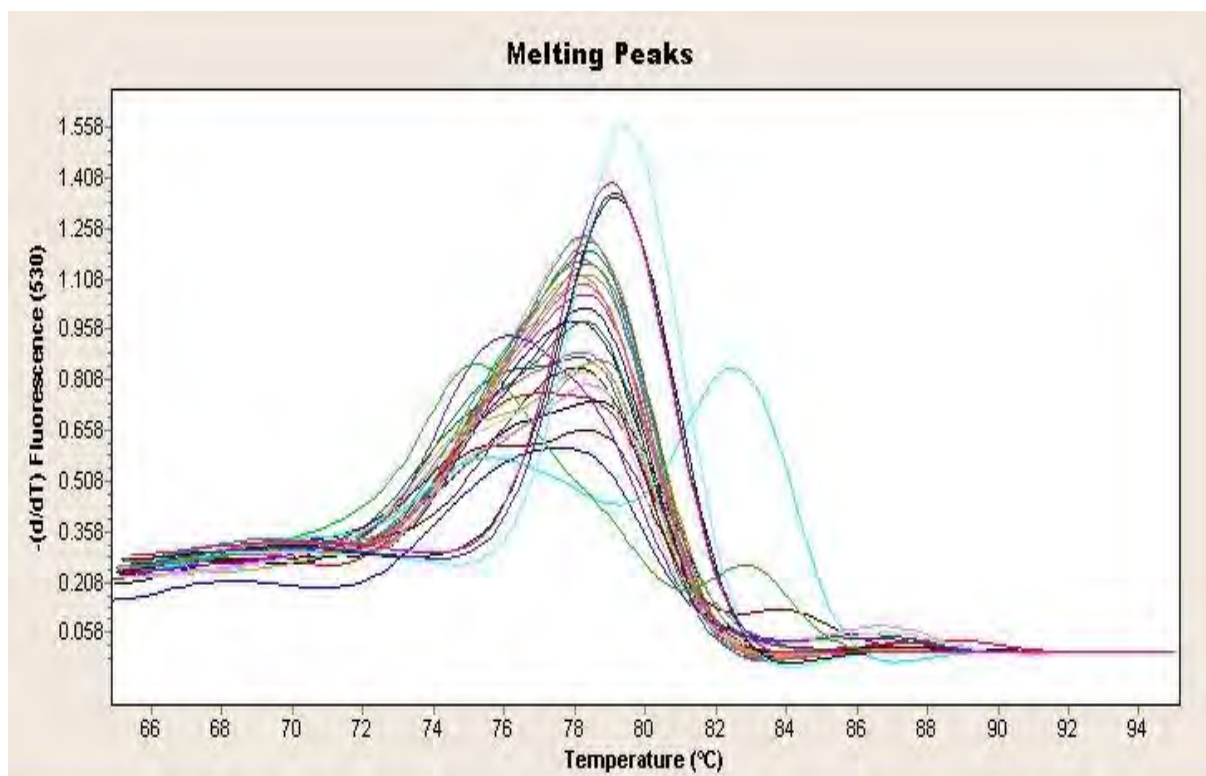
Οι καμπύλες θερμικού κύκλου της PCR έχουν την παρακάτω μορφή:



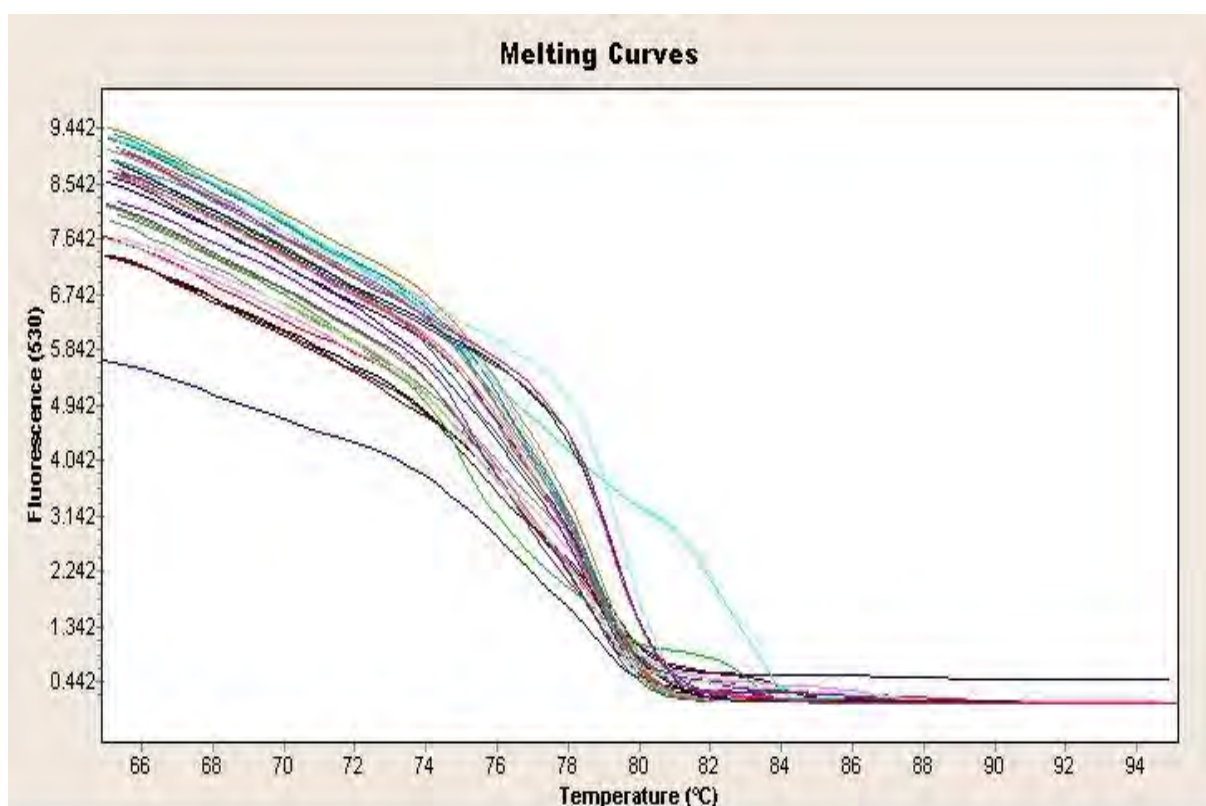
Εικόνα 8: Στάδιο επώασης



Εικόνα 9: Στάδιο επώασης



Εικόνα 10: Στάδιο ανασύνθεσης



Εικόνα 11: Στάδιο τήξης

2.5. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του t-test.

ΠΙΝΑΚΑΣ IV: Στατιστική επεξεργασία και τιμές τυπικής απόκλισης (Standard Deviation)

	ARO Liver	ARO Repr	CYP1A2	SD ARO	SD CYP1A2
Λ. Κάρλας	100	100	100	6,7	31,52
Λ. Ιωαννίνων	22	3,65	67,54	1,83	32,28
Κάρλα/Ιωάννινα	4,55	27,4	1,48		

3.Αποτελέσματα

Κατά τη συλλογή δειγμάτων ήπατος και γονάδων διενεργήθηκε και νεκροτομική εξέταση των ιχθύων. Σε ότι αφορά τους ιχθύες που προερχόταν από τη Λίμνη Κάρλα χαρακτηριστικά ευρήματα ήταν το εύθρυπτο και εκφυλισμένο ήπαρ και ο κενός πεπτικός σωλήνας σε όλα τα δείγματα που εξεταστήκαν. Στους ιχθύες από τη Λίμνη Παμβώτιδα δεν παρατηρήθηκε απόκλιση του χρώματος του ήπατος από το φυσιολογικό και ο πεπτικός σωλήνας ήταν πλήρης. Οι γονάδες των ιχθύων από τη Λίμνη Κάρλα είχαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ώριμα γεννητικά προϊόντα. Εκτός από την real time PCR δεν έγιναν περαιτέρω εργαστηριακές εξετάσεις για τη διερεύνηση υποκείμενης νόσου.

Στους παρακάτω πίνακες καταγράφονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης του RNA στα 260 και στα 280 nm και ο λόγος τους. Καταγράφονται επίσης η ποσότητα του RNA σε ένα μl στην τελευταία στήλη ο όγκος του διαλύματος που περιέχει 1 μg RNA. Για τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του και τη σχετική ποσοτικοποίηση του RNA χρησιμοποιήθηκαν τα 10 δείγματα για κάθε ιστο ήτοι 40 δείγματα και οι τιμές απορρόφησης πριν και μετά τις κατάλληλες αραιώσεις φαίνονται στους παρακάτω πίνακες και όπου Cl_x και CO_x είναι η σήμανση των δειγμάτων ήπατος και ωοθηκών αντίστοιχα για τους ιχθύες της Λίμνης Παμβώτιδας και SL_x και SO_x η σήμανση των δειγμάτων ιστοτεμαχίων από τη Λίμνη Κάρλα. Όπως φαίνεται από τις αρχικές τιμές απορρόφησης το RNA από τα δείγματα ήπατος από τους ιχθύες της Λίμνης Κάρλας βρισκόταν εξαρχής σε επιθυμητά επίπεδα “καθαρότητας” για την

ποσοτικοποίηση του RNA. Για τα υπόλοιπα δείγματα έγινε επανάληψη της διαδικασίας κατακρήμνισης του RNA και της φασματοφωτομέτρησης και ακολούθησε η real time PCR.

ΠΙΝΑΚΑΣ V: Τιμές φασματικής απορρόφησης και ποσότητα RNA απο δείγματα ήπατος (CL) και (CO) γονάδων ιχθύων απο την Λίμνη Παμβώτιδα

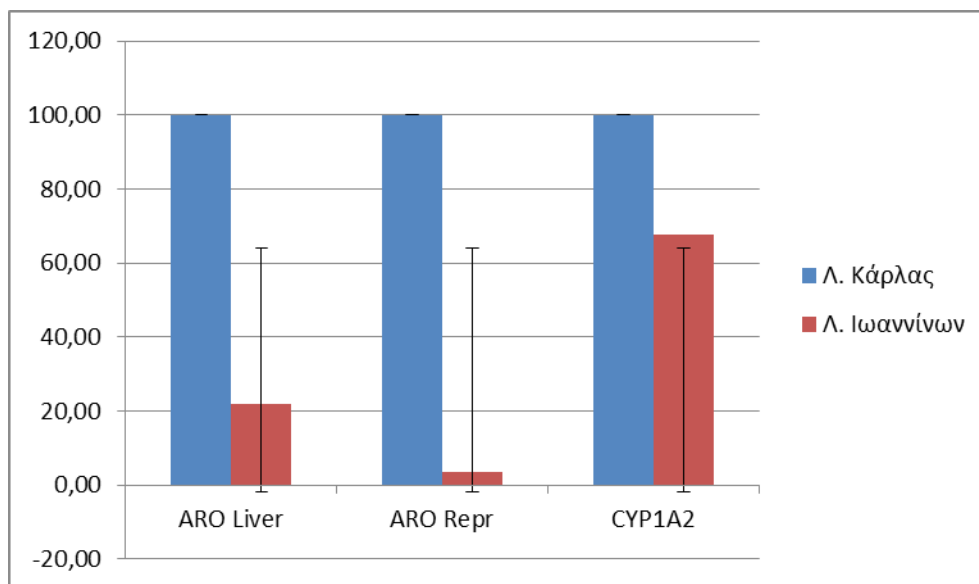
Δείγμα	Φασματική απορρόφηση OD _{260nm}	Φασματική απορρόφηση OD _{280nm}	Λόγος απορρόφησης OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Συγκέντρωση RNA μg/μl	Ποσότητα 1μg RNA σε 1 μl
CL1	0,155	0,074	2,095	0,620	1,612
CL2	0,668	0,375	1,780	2,672	0,374
CL3	0,054	0,028	1,946	0,216	4,629
CL4	0,135	0,080	1,668	0,540	1,852
CL5	0,089	0,050	1,780	0,356	2,809
CL6	0,137	0,072	1,905	0,548	1,824
CL7	0,066	0,036	1,857	0,264	3,787
CL8	0,053	0,026	2,039	0,212	4,717
CL9	0,777	0,440	1,767	3,108	0,322
CL10	0,003	0,008	0,347	0,012	83,330
CO1	0,355	0,194	1,827	1,420	0,704
CO2	0,563	0,304	1,850	2,252	0,444
CO3	0,470	0,244	1,928	1,880	0,531
CO4	0,363	0,186	1,951	1,452	0,689
CO5	0,362	0,193	1,880	1,448	0,691
CO6	0,672	0,360	1,865	2,688	0,372
CO7	0,827	0,454	1,822	3,308	0,302
CO8	0,848	0,453	1,873	3,392	0,294
CO9	0,773	0,424	1,825	3,092	0,323
CO10	0,657	0,353	1,859	2,628	0,308

ΠΙΝΑΚΑΣ VI: Τιμές φασματικής απορρόφησης και ποσότητα RNA απο δείγματα ήπατος (SL) και (SO) γονάδων ιχθύων απο την Λίμνη Κάρλα

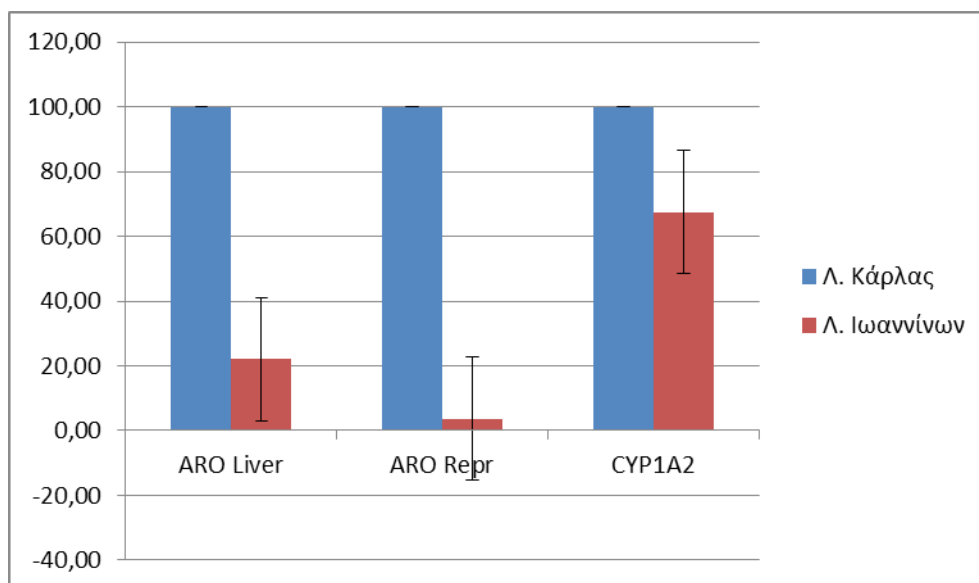
Δείγμα	Φασματική απορρόφηση OD _{260nm}	Φασματική απορρόφηση OD _{280nm}	Λόγος απορρόφησης OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	Συγκέντρωση RNA μg/μl	Ποσότητα 1μg RNA σε 1 μl
SO1	0,490	0,261	1,880	1,960	0,510
SO2	0,949	0,958	1,589	3,796	0,263
SO3	0,810	0,462	1,753	3,240	0,309
SO4	0,905	0,548	1,650	3,620	0,276
SO5	0,396	0,193	2,054	1,584	0,631
SO6	1,046	0,838	1,247	4,184	0,239
SO7	0,930	0,517	1,799	3,720	0,268
SO8	0,693	0,377	1,839	2,772	0,361
SO9	0,751	0,394	1,906	3,004	0,332
SO10	0,773	0,430	1,800	3,092	0,323
SL1	0,178	0,098	1,829	0,712	1,404
SL2	0,175	0,090	1,937	0,700	1,428
SL3	0,066	0,035	1,895	0,264	3,787
SL4	0,091	0,048	1,889	0,364	2,747
SL5	0,124	0,067	1,844	0,496	2,016
SL6	0,269	0,014	1,939	1,076	0,929
SL7	0,272	0,145	1,877	1,088	0,919
SL8	0,163	0,077	2,105	0,652	1,534
SL9	0,163	0,085	1,908	0,652	1,734
SL10	0,223	0,118	0,000	0,892	1,121

Στο διάγραμμα φαίνεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του *CYP1A2* και της αρωματάσης είναι μεγαλύτερα στη Λίμνη Κάρλα από ότι στη Λίμνη Παμβώτιδα. Έχοντας γνώση του ρόλου του *CYP1A2* και των παραγόντων που το επηρεάζουν μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα οτι τα επίπεδα ρυπαντών που σχετίζονται με το *CYP1A2* όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι μεγαλύτερα στη Λίμνη Κάρλα. Κατα πολύ μεγαλύτερα είναι τα ποσοστά έκφρασης της αρωματάσης. Γι' αυτό πιθανόν να ευθύνεται μεγαλύτερη συγκέντρωση ουσιών με αρωματικό δακτύλιο π.χ. ενδοκρινικών διαταρακτών στην Λίμνη

Κάρλα.



Εικόνα 12 Ποσοτική έκφραση του CYP19A1 στο ήπαρ και τις γονάδες και του CYP11A2 στο ήπαρ πεταλούδων από τη Λίμνη Κάρλα και Παμβώτιδα και γραμμές σφάλματος με τυπική απόκλιση (SD)



Εικόνα 13 Ποσοτική έκφραση του CYP19A1 στο ήπαρ και τις γονάδες και του CYP11A2 στο ήπαρ πεταλούδων από τη Λίμνη Κάρλα και Παμβώτιδα και γραμμές σφάλματος με τυπικό σφάλμα.

4. Συμπεράσματα

Έχοντας γνώση των αποτελεσμάτων της έκφρασης των δύο γονιδίων απώτερος στόχος είναι η εξαγωγή συμπερασμάτων και στοιχείων για περαιτέρω διερεύνηση και προβληματισμό. Ο προσδιορισμός της ηλικίας ενδεικτικός της διάρκειας έκθεσης σε κάποιον τοξικό παράγοντα, δεν κατέστη εφικτός. Η επιλογή τους πέρα από τα κριτήρια που αναφέρθηκαν για το είδος (βλ. Υλικά και μέθοδοι) έγινε με βάση το σωματικό βάρος και την ομοιομορφία μεγέθους. Έχοντας τα πρώτα αποτελέσματα για το βαθμό έκφρασης των δύο γονιδίων στους δύο ιχθυοπληθυσμούς καλό θα ήταν σε μετέπειτα εργασίες να γίνει προσδιορισμός του ποσοστού έκφρασης και για την ισομορφή της αρωματάσης *CYP19A2* με τη λήψη δειγμάτων από εγκεφάλους ιχθύων των εν λόγω λιμνών. Δεδομένου του τρόπου αναπαραγωγής της πεταλούδας η εν λόγω μέτρηση θα είχε ενδιαφέρον σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό της τεστοστερόνης και των οιστρογόνων στο αίμα. Επίσης μπορούν να γίνουν ιστολογικά παρασκευάσματα από τις γονάδες για τον προσδιορισμό του αναπαραγωγικού σταδίου που βρίσκονται οι ιχθύες και ιστολογική εξέταση του ήπατος για την διερεύνηση παρουσίας αλλοιώσεων σε κυτταρικό επίπεδο. Ως βάση αναφοράς για τα βασικά ποσοστά έκφρασης των *CYP1A2* και *CYP19A1* και τον αποκλεισμό υποκείμενης νόσου μπορούν να χρησιμοποιηθούν πεταλούδες ανάλογης ηλικίας που αναπτύχθηκαν σε ελεγχόμενο και καθαρό περιβάλλον ως ομάδα ελέγχου ή και να γίνει χορήγηση διαφόρων ουσιών που αποδείχθηκε για άλλα είδη ότι επηρεάζουν τα δύο γονίδια.

Γνωρίζοντας ότι το *CYP1A2* φέρει υποδοχείς (X1, X2, XRE II) υπεύθυνους για τη δράση ξενοβιοτικών αλλά δεν φέρει υποδοχείς DRE (Dioxin Responsive Element) (Nukyaya & Bradfield, 2008) μπορούμε να εξάγουμε το εξής συμπέρασμα. Η πιθανότητα αυξημένης συγκέντρωσης τέτοιων ουσιών στο νερό των δύο Λιμνών μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη συγκέντρωσή τους στους ιχθύες που διαβιούν εκεί. Η συσσώρευσή τους στον οργανισμό

πιθανόν οδηγεί και σε αυξημένη έκφραση του *CYP1A2* με σκοπό την απέκκριση και το μεταβολισμό τους ή την αδρανοποίησή τους. Ο μεταβολισμός, όμως, αυτών μπορεί να έχει απρόβλεπτες επιδράσεις στον οργανισμό λαμβάνοντας υπ' όψιν το φαινόμενο της βιοενεργοποίησης (Guengerich, 2005) αλλά και της ενεργούς αποβολής πληθώρας ενδογενών και ξеноβιοτικών χημικών από τον οργανισμό (Multixenobiotic Resistance, MXR) (Navarro *et al.*, 2011).

Αντίστοιχα, το *CYP19A2* έχει ως κύριο ρόλο την παραγωγή ενζύμων που μετατρέπουν τα C_{19} ανδρογόνα σε C_{18} οιστρογόνα επηρεάζοντας τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου. Συνεπώς, η μεγαλύτερη έκφραση του *CYP19A2* στη Λίμνη Κάρλα μπορεί να οφείλεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενδοκρινικών διαταρακτών σε αυτή από ότι στην Παμβώτιδα. Αυτοί μπορεί να προέρχονται από φυσικές πηγές (άλγη, ζώα, φυτά, μύκητες) η και από χημικές πηγές (απορρυπαντικά, ζιζανιοκτόνα, πλαστικά, φάρμακα κ.α.) (IPCS, 2002).

Η φύση των ρυπαντών στα δύο λιμναία οικοσυστήματα μπορεί να ταυτοποιηθεί με την ακριβή χαρτογράφηση της λεκάνης απορροής των δύο λιμνών και την καταγραφή όλων των πιθανών σημειακών πηγών ρύπανσης καθ'όλη τη διάρκεια του έτους και αυτό γιατί η εποχικότητα είναι πολύ σημαντική παράμετρος. Με βάση μελέτη που έγινε στον Πηνειό ποταμό έχει παρατηρηθεί ότι το καλοκαίρι λόγω μείωσης του όγκου των υδάτων εντείνεται ο ευτροφισμός. Επίσης, κατά την αρχή της χειμερινής περιόδου οι βροχοπτώσεις ξεπλένουν υπολείμματα φυτοφαρμάκων από το έδαφος στο υδάτινο οικοσύστημα και η αποσύνθεση των φυτών το φθινόπωρο αυξάνει το οργανικό φορτίο. Τα επίπεδα νιτρικών στους τέσσερις παραπόταμους του Πηνειού ποικίλλουν, αλλά είναι βέβαιο ότι τα επίπεδα μόλυνσης αυξάνουν μετά από τη διέλευση του ποταμού από τη Λάρισα, σημείο που γίνεται και η τροφοδοσία της Λίμνης Κάρλας (Bellos *et al.*, 2004). Εδώ υπάρχει και επιβάρυνση από τα αστικά απόβλητα της Λάρισας. Αυτό είναι ενδεικτικό της πολυπλοκότητας του προβλήματος. Στη Λίμνη Παμβώτιδα δε υπάρχει το πρόβλημα του υδατικού ισοζυγίου. Δηλαδή η τροφοδοσία της Λίμνης από το Μιτσικέλι είναι μειωμένη όπως μειωμένη είναι και η

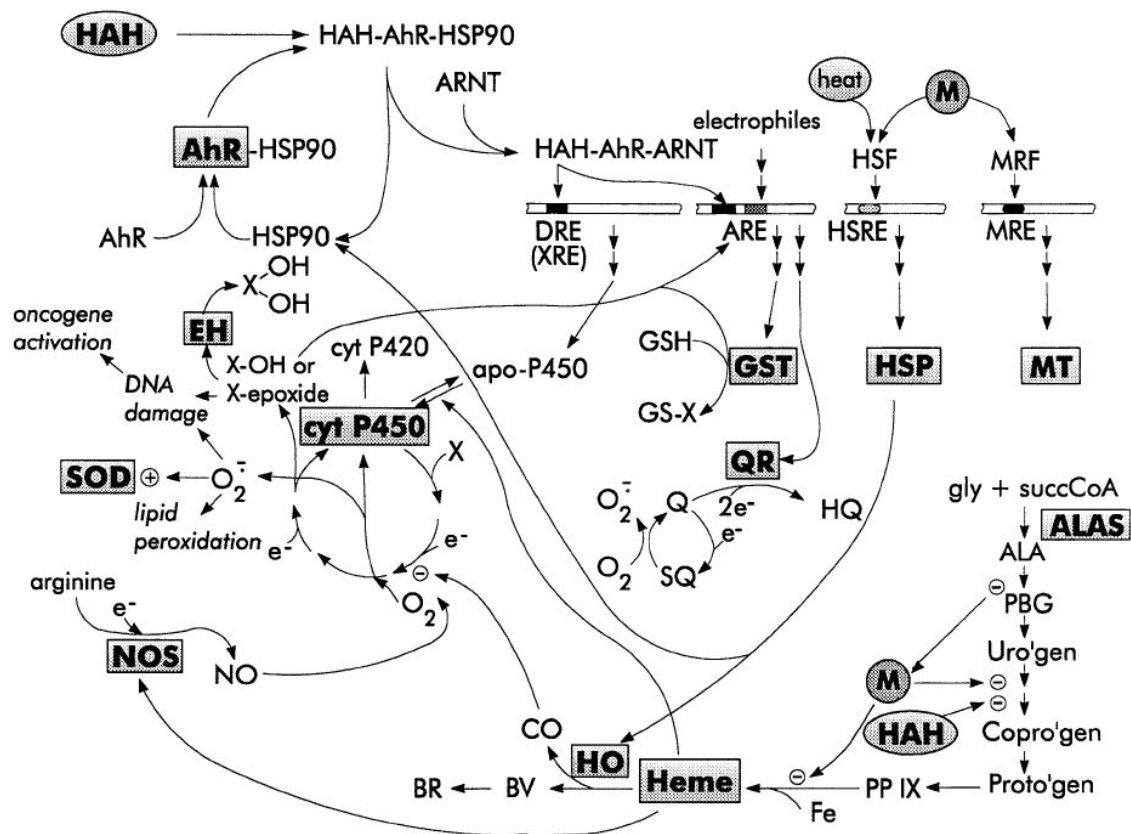
απομάκρυνση του νερού από τις καταβόθρες της Λίμνης οι οποίες δε λειτουργούν. Στις προτάσεις περιλαμβάνεται η ανασύσταση της Λαψίστας, ο έλεγχος του θυροφράγματος και η τροποποίηση του αναχώματος για την αποκατάσταση του υδροβιότοπου (wetlands) (Παρατηρητής Άρτας, 2001).

Όπως προαναφέρθηκε πληθώρα μη μολυσματικών μεταβλητών επηρεάζει τα ενζυμικά συστήματα καθιστώντας δύσκολη την εκτίμηση των μετρήσιμων βιολογικών δεικτών. Για παράδειγμα η επίδραση της θερμοκρασίας του νερού έδειξε να συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα του *CYP1A* ενώ οι PCBs στο ίδιο περιβάλλον εμφάνιζαν θετική συσχέτιση με το *CYP1A* (Sleinderink *et al.*, 1995a). Οι Eggens *et al.* (1996) παρατήρησαν σημαντικές εποχικές διακυμάνσεις στην έκφραση του *CYP1A* στο ευρωπαϊκό πησσί (*Platichthys flesus*) ιδίως μετά την αναπαραγωγική περίοδο. Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση της θερμοκρασίας στην δραστηριότητα της αρωματάσης αλλά και στον καθορισμό των χαρακτηριστικών του φύλου στους ιχθείς και τα ερπετά.

Παρ' ότι το κυτόχρωμα P450 έχει ως κύριο ρόλο την αποτοξίκωση του οργανισμού, μπορεί με πολλούς τρόπους να εγείρει τοξικές δράσεις στον οργανισμό ως εξής: Αν τα ένζυμα της φάσης I όπως το *CYP1A* μεταβολίζουν προτοξικούς, προμεταλλαξιόγόνους και προκαρκινογόνους παράγοντες σε ηλεκτρόφιλους μεταβολίτες ενώ τα ένζυμα της φάσης II αδυνατούν να συζεύξουν αυτούς τους μεταβολίτες τότε τα ηλεκτόφιλα μόρια που παρήχθησαν συνδέονται με πυριηνόφιλα κέντρα στο DNA, RNA και στις πρωτεΐνες προκαλώντας κυτταροτοξική, μεταλλαξιγόνο ή και καρκινογόνο δράση. Επίσης η ατελώς ολοκληρωμένη καταλυτική αντίδραση μέσω της διαταραχής του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (redox cycle) οδηγεί στη συσσώρευση ελευθέρων ριζών οξυγόνου οι οποίες είναι τοξικές και μεταλλαξιόγόνες. Η επαγωγή των ενζύμων του P450 μπορεί να δράσει καταλυτικά ή ανταγωνιστικά μειώνοντας τα ανάλογα του P450 RED παρεμποδίζοντας τη δημιουργία στεροϊδών με αποτέλεσμα την αναπαραγωγική αποτυχία. Ακόμη οι υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση μερικών γονιδίων του P450 μπορούν να δράσουν τοξικά ασχέτως

με τον καταλυτικό ρόλο του P450. Τέλος η έμμεση αναστολή ή αδρανοποίηση του P450 από τα ενδογενή υποστρώματα μπορεί να επηρεάσει τη δυνατότητα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών (Stegeman & Hahn, 1994) με πιθανή τη βιοσυσσώρευση στους ιστούς.

Το P450 συνδέεται πολύπλοκα με άλλα βιοχημικά συστήματα καθιστώντας δύσκολη την εκτίμηση των τοξικών επιδράσεων από τη μακροχρόνια έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους. Πέρα από αυτό οι ιχθύες μπορούν να δημιουργήσουν μορφολογικούς φραγμούς για να μειώσουν την απορρόφηση των τοξικών αλλά και να αναπτύξουν μηχανισμούς αποτοξίκωσης. Αυτό μπορεί να εκτιμηθεί με τον δείκτη βιομετασχηματισμού (BTI) που εκφράζει την αναλογία μεταξύ φάσης I και II ως αναλογίες των EROD:UDPGT ή EROD:GST. Μεγάλη σημασία έχει το φαινόμενο της ανάπτυξης μηχανισμών αντοχής στα ξενοοιστρογόνα (Multixenobiotic Resistance, MXR) αλλά και της βιομεγένθυνσης που προαναφέρθηκαν. Σημαντική επίσης είναι η πρόσφατη ταυτοποίηση του *foxl2* γονιδίου μέσω του οποίου τα οιστρογόνα επιδρούν στο *CYP19A1*. Απόπειρα διερεύνησης της έκφρασης του *foxl2* θα μπορούσε να γίνει σε ιχθυοπληθυσμούς των δύο λιμνών.



Εικόνα 13: Σύνδεση του P450 με άλλα βιοχημικά συστήματα (Van der Oost et al., 2003)

Σύμφωνα με τον Van der Oost *et al.* (2003) για να ερμηνεύσουμε σωστά τα δεδομένα που μας δίνει ένας βιολογικός δείκτης θα πρέπει να έχουμε υπ' όψιν τις διαφορές των αποτελεσμάτων από το εργαστήριο και από το πεδίο, την βιολογική και τοξικολογική συσχέτιση επαγωγής της ενζυμικής δραστηριότητας και τυχόν συνυπάρχοντες παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα. Σύμφωνα με τους ίδιους συγγραφείς οι πιο χρήσιμοι δείκτες στους ιχθύες είναι τα ένζυμα της φάσης I, τα προϊόντα βιομετασχηματισμού, οι αναπαραγωγικές και γενετοξικές παράμετροι. Συνεπώς συνίσταται η συνδυασμένη χρήση βιοδεικτών όπως ο γοναδοσωματικός και ο ηπατοσωματικός δείκτης, αναπαραγωγικοί και μοριακοί δείκτες αλλά και να γίνεται προσπάθεια προσδιορισμού της φύσης των ρυπαντών του εκάστοτε οικοσυστήματος. Σημαντικό ρόλο έχει και η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της επαγωγής του P450. Προτού χρησιμοποιηθεί μια ισομορφή του P450 για την εκτίμηση ενός περιβαλλοντικού κινδύνου θα πρέπει να είναι γνωστός ο ενδογενής

ρόλος της στις μεταβολικές λειτουργίες και σε ποία όργανα διότι η δραστηριότητα του P450 μπορεί να επηρεαστεί από το φύλο, το εξελικτικό στάδιο, την διατροφή κ.α. (Arellano-Aguilar *et al.*, 2009). Χαρακτηριστική είναι η εργασία των Chung *et al.* (2011) που δείχνει την κυριαρχία της επίδρασης του triclocarban έναντι της δράσης της διφαινόλης A στο *CYP19A1* σε ταυτόχρονη παρουσία τους ενδεικτική του ανταγωνισμού που μπορεί να υπάρχει μεταξύ της ταυτόχρονης παρουσίας ενδοκρινικών διαταρακτών. Τέτοια φαινόμενα καθιστούν ακόμη δυσκολότερη την εξαγωγή συμπερασμάτων. Περαιτέρω αναλύσεις για κατάλοιπα μπορούν να γίνουν στους ιστούς των ιχθύων σε συνδυασμό με έρευνα για ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ενδεικτικές νόσου. Τα φυτά των δύο λιμνών μπορούν επίσης να αποτελέσουν εξαιρετικό βιολογικό δείκτη. Επίσης μπορούν μελλοντικά να μελετηθούν τυχόν επιπτώσεις των περιβαλλοντικών ρύπων στην υγεία του ζωικού κεφαλαίου το οποίο εκτρέφεται κοντά στις δύο λίμνες και καταναλώνει νερό από αυτές

Η επίλυση των παραπάνω προβλημάτων απαιτεί την ανάλυση και την διαχείριση του εκτιμώμενου κινδύνου δηλαδή τον προσδιορισμό και τη λύση του προβλήματος. Για να γίνει αυτό απαιτείται ταυτοποίηση του υπόπτου παράγοντα, εκτίμηση των επιδράσεων και της πιθανότητας έκθεσης σε αυτόν και χαρακτηρισμό του κινδύνου (Van Leeuwen & Hermens, 1995) και υλοποίηση των ληφθέντων αποφάσεων.

5. Βιβλιογραφία

Akdogan, H.A., Sen, A. (2010). Characterization of drug metabolizing enzymes and assessment of aging in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver . *Veterinari Medicina*, 55, (9): 463–471.

Arellano-Aguilar, O., Montero Montoya, R., Macías Garcia, C. (2009). Endogenous functions and expression of cytochrome P450 enzymes in teleost fish: A review . *Reviews in Fisheries Science*, 17(4):541–556.

Bard, S.M. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defence mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357-389.

Bard, S.M., Woodin, B., Stegeman, J.J. (1998). Induction of the multixenobiotic resistance transporter and cytochrome P450 1A in intertidal fish exposed to environmental contaminants. *Toxicol. Sci.* 42, 16-26.

Bello, S.M., Franks, D.G., Stegeman, J.J., Hahn, M.E. (2001). Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus Heteroclitus*) inhabiting a marine super fund site: *in vivo* and *in vitro* studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol. Sci.* 60, 77-91.

Bellos, D., Sawidis, T., Tsekos, I. (2004). Nutrient chemistry of River Pinios (Thessalia, Greece). *Environment International*, Volume 30, Issue 1, pp 105-115.

Black, V.H., Quattrochi, L.C. (2004). Molecular cloning of the guinea pig *CYP1A2* gene 5-flanking region: identification of functional aromatic hydrocarbon response element and characterization of *CYP1A2* expression in gpcl6 cells . *Drug Metabolism and Disposition*; 32:595–602.

Blazquez, M., Somoza, G.M. (2010). Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166(3):470-7.

Borg, B., (1994) Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109, 219-245.

Chaudhary, P.M., Roninson, I.B. (1992). Activation of MDR 1 (P – glycoprotein) gene expression in human cells by protein kinase C agonists. *Oncol. Res.* 4, 281-290.

Chinese Academy of Fishery Sciences, Information Center, (2008).

[http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?](http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?StartRow=5&ID=6376&what=species&TotRec=7)

[StartRow=5&ID=6376&what=species&TotRec=7](http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?StartRow=5&ID=6376&what=species&TotRec=7)

Chomczynski, P., Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 1, 581 – 585.

Chung, E., Genco, M.C., Megrelis, L., Ruderman, J.V. (2011). Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early zebrafish embryos. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1115187108 .

Contractor, R., Foran, C.M., Shuanfang, L., Willett, K. (2004). Evidence of Gender- and Tissue-Specific Promoter Methylation and the Potential for Ethinylestradiol-Induced Changes in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) Estrogen Receptor and Aromatase Genes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Vol. 67(1) DOI:10.1080/15287390490253633.

Djordjevic, N., Ghotbi, R., Jankovic, S., Aklillu, E. (2010). Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption is associated with the CYP1A2 –163C>A polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol*. 66:697–703 . DOI 10.1007/s00228-010-0823-4.

Dong, W., Wang, L., Thornton, C., Scheffler, B.E., Willet, K.L. (2008). Benzo(a)pyrene decreases brain and ovarian aromatase mRNA expression in *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology* 88, pp. 289-300.

Eggens, M.L., Opperhuizen, A., Boon, J.P. (1996). Temporal variation of *CYP1A* indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Waden Sea. *Environ. Toxicol. Chem*.

Epel, D. (1998). Use of multidrug transporters as first lines of defence against toxins in aquatic organisms. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120, 23-28.

Fitzgerald, E.F., Hwang, S.A., Lambert, G., Gomez, M., Tarbell, A. (2005). PCB exposure and in vivo *CYP1A2* activity among Native Americans. *Environmental Health Perspectives*, Vol.113 (3).

Forlano, P.M., Bass, A.H. (2001). Sex steroid modulation of brain aromatase mRNA

expression in a voal fish. Soc. Neurosci. Abstr. 27:1081.

Forlano, P.M., Deitcher, D.L., Bass, A.H. (2001). Distribution of aromatase mRNA in the brain and gonads of a polymorphic vocal teleost. Horm. Behav. 39:331.

Gelinas, D., Callard, G.V. (1997). Immunolocalization of aromatase and androgen receptor positive neurons in the goldfish brain. Gen. Comp. Endocrinol. 106:155-168.

Gelinas, D., Pitoc, G.A., Callard, G.V. (1998). Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during seasonal cycle and after steroid treatment. Mol. Cell. Endocrinol. 138:81-93.

Gen, K., Okuzawa, K., Kumakura, N., Yamaguchi, S., Kagawa, H. (2001). Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pargus major*). Biol. Reprod. 65:1186-1194.

Goodman, M.T., Tung, K.H., McDuffie, K., Wilkens, L.R., Donlon, T.A. (2004). Association of caffeine intake and cy1a2 genotype with ovarian cancer. Nutrition and Cancer, 46 (1), 23–29.

Guengerich, F.P. (2005). Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity. The AAPS Journal; 8 (1) Article 12 (<http://www.aapsj.org>).

Guillette, L. J., Jr, Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., Woodward, A. R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environ. Health Perspect. 102, 680–688.

Gunes, A., Dahl, M.L. (2008). Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. Pharmacogenomics, Vol. 9, No. 5, Pages 625-637. doi: 10.2217/14622416.9.5.625.

Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* ; 35:307-40.

Hattori, R.S., Fernandino, J.I., Kishii, A., Kimura, H., Kinno, T., Somoza, G.M., Yokota, M., Strüssmann, C.A., Watanabe, S. (2009). Cortisol-induced masculinization: does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination?. *PLoS One*. 4(8): e6548. doi:10.1371/journal.pone.0006548

Hinfray, N., Palluel, O., Turies, C., Cousin, C., Porcher, J.M., Brion, F. (2006). Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicolog* DOI 10.1002/tox.

Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y., Maeda, S. (1998). Disruption of sexual behavior in male aromatase deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *CYP19* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 445-449.

Innal, D. (2011). Distribution and impacts of species (Cyprinidae) in Turkey: a review. *Manag. Biolog. Invasions*. www.managementofbiologicalinvasions.net

IPCS (2002). The International Programme on Chemical Safety (IPCS): Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. World Health Organization, Geneva.

Iwanowicz, L.R., Blazer, V.S. (2011). An Overview Of Estrogen-Associated Endocrine Disruption In Fishes: Evidence Of Effects On Reproductive And Immune Physiology. <http://www.lsc.usgs.gov/files/Iwanowicz%20%26%20Blazer%202011.pdf>

Jiang, W., Yang, Y., Zhao, D., Liu, X., Duan, J., Xie, S., Zhao, H. (2011). Effects of sexual steroids on the expression of foxl2 in *Gobiocypris rarus*. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.*160(4):187-93.

Juliano, R.I., King, V.A. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary caell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152-162.

Kagalou, I., Papadimitriou, T., Bacopoulos, V., Leonardos, I. (2008). Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelio*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom. *Environ Monit Assess* 137:185–195 . DOI 10.1007/s10661-007-9739-6.

Kagawa, H., Gen, K., Okuzawa, K., Tanaka, H. (2003). Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream (*Pargus major*). Biol. Reprod. 68:1562-1568.

Kazeto, Y., Ljiri, S., Place, A.R., Zohar, Y., Trant, J.M. (2001). The 5'-flanking regions of *CYP19A1* and *CYP19A2* in zebrafish. Biochem. Biophys. Res. Commun. 288(3):503-8.

Kuhl, A.J., Manning, S., Brouwer, M. (2005). Brain aromatase in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Molecular characterization and role in xenoestrogen induced sex reversal. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 96: 67-77.

Kurelec, B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. Crit. Rev. Toxicol. 22, 23-43.

Kurelec, B. (1997). A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance. Environ. Health Perspect. 105 (suppl. 4), 855-860.

Lee, Y.M., Seo, J.S., Kim, I.C., Yoon, Y.D., Lee, J.S. (2006). Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 345(2):894-903.

Lokman, P.M., Harris, B., Kusakabe, M., Kime, D.E., Schulz, R.W., Adachi, S., Young, G. (2002). 11-oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. Gen. Comp. Endocrinol., 129, 1-12.

Loukas, A., Mylopoulos, N., Vasiliades, L. (2007). A modeling system for the evaluation of water resources management strategies in Thessaly, Greece. Water Resour Manage 21:1673–1702. DOI 10.1007/s11269-006-9120-5.

Mouriec, K., Guegen, M.M., Manuel, C., Percevault, F., Thieulant, M.L., Pakdel, F., Kah, O. (2009). Androgens upregulate *CYP19A1B* (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors. Biology of reproduction 80, 889-896.

Murray, S., Lake, B.G., Gray, S., Edwards, A.J., Springall, C., Bowey, A., Williamson, G.,

Boobis, A.R., Gooderham, N.J. (2001). Effect of cruciferous vegetable consumption on heterocyclic aromatic amine metabolism in man. *Carcinogenesis* vol.22 no.9 pp.1413–1420 .

Nagahama, Y. (2003). Genetic Approaches to Understanding the Basic Mechanisms of Endocrine Disruptor Actions on Sex Determination/Differentiation in the Medaka, *Oryzias latipes* . <http://www.env.go.jp/chemi/end/medaka.html>

Nakamoto, M., Matsuda, M., Wang, D. S., Nagahama, Y., Shibata, N. (2006). Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *FOXL2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 353-361.

Nakanishi, T. (2008). Endocrine disruption induced by organotin compounds: organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. *J. Toxicol. Sci.* Vol.33, No.3, 269-276 .

Navarro, M., Luckenbach, T., Pina, B., Barata, C. (2011). Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. [Aquat Toxicol.](#) 17;101(1):78-87.

Navarro-Martin, L., Blazquez, M., Piferrer, F. (2009). Masculinization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by treatment with an androgen or aromatase inhibitor involves different gene expression and has distinct lasting effects on maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 160(1):3-11.

NRC, (1987). Comitee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74, 3-9.

Nukaya, M., Bradfield, C.A. (2008). Conserved genomic structure of the *CYP1A1* and *CYP1A2* loci and their dioxin responsive elements cluster. *Biochemical Pharmacology*; 77:654-659.

Ogawa, S., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Pfaff, D.W. (1997). Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 1476-1481.

Oikonomou, A., Katsiapi, M., Karayanni, H., Moustaka-Gouni, M., Kormas, Ar., K. (2010).

Plankton microorganisms coinciding with two consecutive mass fish kills in a newly reconstructed lake. Unpublished Data. <http://downloads.mts.hindawi.com/MTS-Files/TSWJ/papers/regular/504135.v1.pdf?AWSAccessKeyId=0CX53QQSTHRYZZQRKA02&Expires=1329683427&Signature=H1ByJ64ezFeO8bTZjzWsD7h9yA0%3D>

Ozulug, M., Meric, N., Freyhof, J. (2004). The distribution of *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) (Teleostei: Cyprinidae) in Thrace (Turkey). *Zoology in The Middle East*; 31:63-66.

Page, Y., Diotel, N., Vailant, C., Pellegrini, E., Anglade, I., Merot, Y., Kah, O. (2010). Aromatase, brain sexualization and plasticity: the fish paradigm. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 32, pp. 2105-2115.

Papagiannis, I., Kagalou, I., Leonardos, J., Petridis, D., Kalfakakou, V. (2004). Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environment International*, Vol. 30 (3), 357-362.

Perdikaris, C., Ergolavou, A., Gouva, E., Nathanailides, C., Chantzaropoulos, A., Paschos, I. (2011). *Carassius gibelio* in Greece: The dominant naturalised invader of freshwaters. *Reviews In Fish Biology and Fisheries* DOI:10.1007/s11160-011-9216-8.

Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. W., and van den Berg, M. (2002). Induction and inhibition of aromatase (*CYP19*) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 44–54.

Sanderson, J. T., Seinen, W., Giesy, J. P., and van den Berg, M. (2000). 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (*CYP19*) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: A novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54, 121–127.

Sanderson, J.T. (2006). Review: The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Toxicological Sciences* 94(1), 3–21.

Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrinol. Rev.* 15:342-355.

Sleinderink, H.M., Beyer, J., Scholtens, E., Goksoyr, A., Nieuwenhuize, J., Van Liere, J.M., Everaarts, J.M., Boon, J. (1995a). Influence of temperature and polyaromatic contaminants on *CYP2A* levels in North Sea dab (*Limanda limanda*). *Aquat. Toxicol.* 32, 189-209.

Stegeman, J.J., Hahn, M.E. (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenase; current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In; Malins, D.C., Ostrander, G.K. (eds.), Aquatic toxicology, molecular, biochemical and cellular perspectives. Lewis Publishers, CRC press, Boca Raton, pp. 87-206.

Troxel, C.M., Buhler, D.R., Hendricks, J.D., Bailey, G.S. (1997). *CYP1A* induction by beta-nephtflavone, Arochlor 1254 and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its influence on aflatoxin B1 metabolism and DNA adduction in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 146, 69-78.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13 57-149.

Van Leeuwen, C.J., Hermens, J.L.M. (1995). Risk assessment of chemicals: an introduction. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., Guiguen, Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Dyn.* 236, 2198-2206.

Vizziano, D., Baron, D., Randuineau, G., Mahe, S., Cauty, C., Guiguen, Y. (2008). Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. *Biol. Reprod.* 78, 939-946.

Vizziano-Cantonnet, D., Baron, D., Mahe, S., Cauty, C., Fostier, A., Guiguen, Y. (2010). Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male- to-female gonadal transdifferentiation. *Journal of Molecular Endocrinology* 41, 277-288.

Walker, C., K. Kaiser, W. Klein, L. Lagadic, D. Peakall, S. Sheffield, T. Soldan, and Yasumo M. (1998). Thirteenth meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals (SGOM- SEC): Alternative testing methodologies of ecotoxicity. *Environmental Health Perspectives*, 106: 441-451.

Wang, DS, Kobayasi, T., Zhou, L.Y., Paul-Prasanth, B., Ljiri, S., Sakai, F., Okubo, K.,

Morohashi, K., Nagahama, Y. (2007). *FOXL2* up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 21(3):712-25.

Whitlock Jr, JP. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 39:103-25.

Wolfe D. (1992). Selection of bioindicators of pollution for marine monitoring programs. *Chemistry and Ecology*. Vol. 6, Iss. 1-4.

Zipanc, G.K.H. (1999). Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain. *J. Exp. Biol.* 202:1435-1446.

Σαγιάς, Ι., Ανδρεόπουλος, Δ., Καλιαμπάκος, Δ., Παναγιωτάτου, Ε. (2010). Αίτια και φύση των κοινωνικών αντιδράσεων στην κατασκευή ΧΥΤΑ του νομού Ιωαννίνων. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Μεταπτυχιακή Εργασία <http://hdl.handle.net/123456789/3382>

Σακκάς, Κ. (2011). Σημειακές πηγές ρύπανσης λεκανοπεδίου Ιωαννίνων, Τεχνικό Επαγγελματικό Επιμελητήριο, Ηγουμενίτσα. http://www.ecoioannina.gr/documents/Simiakes_Piges_Ripansis.ppt

Τσιάκαλου, Χ. (2008). Η διαφοροποίηση του αγροτικού τομέα την τελευταία 30ετία: η περίπτωση του αρδευτικού ύδατος στην πεδινή ζώνη του νομού . Πτυχιακή μελέτη, Τμήμα Οικιακής Οικονομίας και Οικολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών. <http://estia.hua.gr:8080/dspace/bitstream/123456789/728/1/tsiakalou.pdf>

Φύλο Εφημερίδας Κυβερνήσεως, (2007). Καθορισμός ορίων της όχθης, παλαιάς όχθης και παρόχθιας ζώνης στην περιοχή απο τις ιχθυολεκάνες του Δήμου Ιωαννιτών μέχρι και το Δήμο Παμβώτιδας, στη Λίμνη Παμβώτιδα στο Νομό Ιωαννίνων. ΦΕΚ 385/24.08.2007 <http://www.et.gr/>

Διαδίκτυο

<http://maps.google.com/>

http://www.doping.chuv.ch/en/lad_home/lad-recherche-developpement/lad-recherche-developpement-projets-actuels/lad-recherche-developpement-projets-actuels-nandrolone-sang.htm

http://zoology.muohio.edu/oris/ZOO462/notes/03a_462.html

QIAGEN (2010). Omniscript® Reverse Transcription Handbook.
<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=357&r=3683>

Suckale J. (2008) http://openwetware.org/images/5/58/Trizol_phases.png

Παρατηρητής Άρτας, (2001). http://www.paratiritis-artas.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=1787:2011-09-28-17-23-06&catid=23:articlesaopinions-category&Itemid=23