

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βιοτεχνολογία - Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος

Βαϊνά Πωλίνα

Βιοχημικοί δείκτες για την παρακολούθηση
επιβαρυνμένων εσωτερικών νερών.



Λάρισα, Οκτώβριος 2012

Βιοχημικοί δείκτες για την παρακολούθηση επιβαρυνμένων
εσωτερικών νερών.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Αικατερίνη Μούτου**^{1,2}, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Ζήσης Μαμούρης**², Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Ιφιγένεια Κάγκαλου**², Επίκουρος Καθηγήτρια Υδρολογίας, Λιμνολογίας και Ποταμολογίας, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

¹: Επιβλέπουσα , ²: Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Ευχαριστίες

Με το τέλος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για την ευμενή τους κρίση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της διατριβής αυτής κ.Αικατερίνη Μούτου για τις συμβουλές και την υποστήριξή της κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους και την συγγραφή της εργασίας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Στέλλα Γεωργίου και τον MSc Κλάϊμπερ Μάριο που στάθηκαν σημαντικοί σύμβουλοι και που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους θα έμοιαζαν όλα πιο δύσκολα..

Τέλος, ευχαριστώ με όλη μου την καρδιά την οικογένειά μου για την υποστήριξη, την υπομονή και την αγάπη τους καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή

- 1.1 Ευτροφισμός
Ευτροφισμός στις μεσογειακές λίμνες
- 1.2 Μικροκυστίνες
Κυανοβακτήρια
Δομή – ιδιότητες μικροκυστινών, τρόποι έκθεσης
- 1.3 Βιοδείκτες που τεκμηριώνουν τη δράση μικροκυστινών
Γλουταθειόνη
- 1.4 Στοιχεία βιολογίας *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758
- 1.5 Χώρος μελέτης
- 1.6 Σκοπός της μελέτης

2. Υλικά και μέθοδοι

- 2.1 Συλλογή δειγμάτων
- 2.2 Προετοιμασία δειγμάτων
- 2.3 Προσδιορισμός της δραστηρότητας της μεταφοράς της γλουταθειόνης
- 2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης
- 2.3 Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου
- 2.4 Στατιστική ανάλυση

3. Αποτελέσματα

- 3.1 Λιμνολογικά χαρακτηριστικά
- 3.2 Δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης
- 3.3 Δραστηριότητα της μεταφοράς της γλουταθειόνης
- 3.4 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών
- 3.5 Συσχετίσεις

4. Συζήτηση

Βιβλιογραφία

Περίληψη

Ο ευτροφισμός των λιμνών που παρατηρείται όλο και περισσότερο στις ρηχές μεσογειακές λίμνες, αναφέρεται στην υπέρμετρη αύξηση της πρωτογενούς παραγωγικότητας, στην υπέρμετρη δηλαδή αύξηση της βιομάζας των παραγωγών (φυτοπλαγκτόν, υδρόβια, υδροχαρής βλάστηση) μιας "κλειστής υδάτινης μάζας". Ο ευτροφισμός των λιμνών οφείλεται στη διοχέτευση σε αυτές μεγάλης ποσότητας θρεπτικών αλάτων, κυρίως αζώτου και φωσφόρου και μπορεί να οφείλεται σε φυσικούς παράγοντες (γεωγραφικά, γεωμορφολογικά, κλιματολογικά, υδροδυναμικά, και άλλα χαρακτηριστικά της λίμνης) ή σε ανθρωπογενείς επιδράσεις (αστικά λύματα, κτηνοτροφικά και βιομηχανικά απόβλητα, αποπλύσεις γεωργικών εδαφών). Τα αποτελέσματα του ευτροφισμού είναι δυσμενή για τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του νερού. Ο ευτροφισμός σε συνδυασμό με την θερμοκρασία, το pH, και άλλες περιβαλλοντικές παραμέτρους, ευνοεί την αύξηση των κυανοβακτηρίων τα οποία παράγουν μικροκυστίνες, ηπατοτοξίνες οι οποίες μετακινούνται μέσα στην τροφική αλυσίδα προς τους ανώτερους καταναλωτές όπως ψάρια, πουλιά και θηλαστικά.

Η απόκριση κάποιων ενζύμων και μορίων που ενέχονται στο οξειδωτικό στρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για την εκτίμηση της έκθεσης των ζωντανών οργανισμών σε κυανοτοξίνες. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης στο ήπαρ, το νεφρό και τον εγκέφαλο ατόμων κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) στη λίμνη Κάρλα. Η απόκριση αντιοξειδωτικών συστημάτων του κυπρίνου προσδιορίστηκε σε πέντε διαφορετικές περιόδους στη διάρκεια ενός έτους φυσικής έκθεσης σε κυανοβακτηριακές τοξίνες και συσχετίστηκε με τα λιμνολογικά χαρακτηριστικά που καταγράφηκαν στη διάρκεια του έτους.

Παρατηρήθηκε σημαντική εποχιακή μεταβολή σε όλους τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Ωστόσο, κάθε ιστός παρουσίασε το δικό του πρότυπο εποχιακής διακύμανσης.

Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως η διακύμανση των λιμνολογικών χαρακτηριστικών (εποχιακή διακύμανση της θερμοκρασίας, συγκέντρωση οξυγόνου,

pH, χλωροφύλλη-α) καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη διακύμανση των αντιοξειδωτικών δεικτών αποδυναμώνοντας την αξιοπιστία τους ως ειδικούς δείκτες για την έκθεση σε κυανοβακτηριακές τοξίνες.

Summary

The eutrophication of lakes that is more and more observed in the shallow Mediterranean lakes, is referred to the immoderate increase of primary productivity, and more exactly to the immoderate increase of plant biomass (phytoplankton, hydrophytes, amphibious vegetation) to a “closed aquatic mass”. The eutrophication of lakes is owed to a great quantity of nutritious salts in the aquatic mass, mainly nitrogen and phosphor. It can also come from natural factors (geographical, geomorphologic, climatic, hydrodynamic, and other characteristics of the lake) or in anthropogenic effects (urban wastewater, farmland industrial waste, rinsing of geographic soil).

The results of eutrophication are unfavourable for physicochemical and biological characteristics of water. The eutrophication combined with the temperature, pH, and other environmental parameters, encourages the increase of cyanobacteria that produce microcystines; these are hepatotoxins that move in the food chain to the superior consumers as birds, fish and mammals.

The response of certain enzymes and molecules that are included in the oxidising stress can be used as biomarkers for the estimate of report in cyanobacteria's toxins. In the present study, the effectiveness of glutathione peroxidase and transferase in the liver, the kidney and the brain of individual carps (*Cyprinus carpio*) in lake Karla was determined. The response of antioxidant systems of carp was determined in five different periods during a year of natural report in cyanobacteria's toxins; it was also connected to the lake-like characteristics that were recorded during this year. Important seasonal changes were observed in the anti-oxidising factors. However, each tissue presented its own model of seasonal fluctuation.

From the results we conclude to the fact that the fluctuation of lake-like characteristics (seasonal fluctuation of temperature, oxygen concentration, pH, chlorophyll-a) determines to a great extent the fluctuation of anti-oxidising indicators, and thus undermining their reliability as special indicators for the report in cyanobacteria's toxins.

1. Εισαγωγή

1.1. Ευτροφισμός

Ο όρος ευτροφισμός μίας υδατοσυλλογής μπορεί να σημαίνει δύο πράγματα:

Στον πιο γενικό του ορισμό που ισχύει τόσο για τα εσωτερικά ύδατα όσο και για την θάλασσα, σημαίνει την διεργασία του εμπλουτισμού (φυσικού ή ανθρωπογενούς) μιας υδατοσυλλογής με θρεπτικά στοιχεία, κυρίως άζωτο, φώσφορο και άνθρακα που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή οργανικής ύλης μέσω της αυξημένης πρωτογενούς παραγωγής (Vollenweider 1998).

Κατά τους λιμνολόγους, η τύχη όλων των λιμνών είναι κοινή: σταδιακή ωρίμανση και γηρασμός ώπου να πάψουν να υπάρχουν, να χαθεί δηλαδή όλο το ελεύθερο επιφανειακό νερό, φαινόμενο που ονομάζεται οικολογική διαδοχή.

Ο χρόνος της φυσιολογικής ζωής μίας λίμνης εξαρτάται από τον τρόπο δημιουργίας της, γεωλογικούς, υδρολογικούς, κλιματικούς, γεωμορφικούς και βιολογικούς παράγοντες (Τσιούρης 1999).

Κάθε λίμνη κατά την πάροδο των αιώνων περνά από διάφορα στάδια ευτροφισμού τα οποία συνοψίζονται ως εξής:

- Καθώς τα νερά ρέουν από την λεκάνη απορροής, μεταφέρουν στην λίμνη θρεπτικά στοιχεία με τα οποία εμπλουτίζεται το νερό.
- Αποτέλεσμα του εμπλουτισμού είναι η αύξηση της πρωτογενούς παραγωγικότητας και κατ' επέκταση αύξηση της βιομάζας.
- Καθώς αυξάνεται η βιομάζα, τόσο πιο ρηχή γίνεται η λίμνη εξαιτίας της εναπόθεσης οργανικής ύλης στον πυθμένα, με αποτέλεσμα θερμότερα νερά και υψηλότερη συγκέντρωση σε θρεπτικά. Άρα γίνεται πιο παραγωγική.
- Με την πάροδο του χρόνου, δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες ώστε εγκαθίστανται ανώτερα φυτά με ρίζες στον πυθμένα.
- Έτσι το λιμναίο οικοσύστημα αποκτά ολοένα και μεγαλύτερη παραγωγικότητα με αποτέλεσμα να γίνεται έλος, ώπου τελικά να μην υπάρχουν λιμνάζοντα νερά.

(Τσιούρης 1999)

Ο ευτροφισμός μιας λίμνης είναι μια διεργασία της φύσης. Υπάρχουν όμως κάποιοι παράγοντες που ευνοούν και εντείνουν αυτήν την διεργασία.

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

Επίσης, οι ανθρώπινες δραστηριότητες είναι αυτές που εντείνουν το φαινόμενο του ευτροφισμού μιας και προκαλούν αύξηση της εισροής θρεπτικών στοιχείων και ιδιαίτερα αζώτου, φωσφόρου και άνθρακα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι: ρίψη αποβλήτων από τις αποχετεύσεις οικισμών και βιομηχανιών καθώς και γεωργικές και κτηνοτροφικές δραστηριότητες στην λεκάνη απορροής, όταν δεν παίρνουν υπόψη τους την ανάγκη προστασίας του λιμναίου οικοσυστήματος, όταν γίνεται δηλαδή αλόγιστη χρήση λιπασμάτων, λανθασμένη κατεργασία αγρών, υπερβόσκηση (Τσιούρης 1999). Τέλος, η κατασκευή ταμιευτήρων με σκοπό την αποθήκευση υδάτων που προέρχονται από την αποστράγγιση των λεκανών απορροής τους, οδηγεί σε εμπλουτισμό των υδάτων και ευνοεί την δημιουργία ευτροφισμού (Bonnefooy 2002).

Ο ευτροφισμός έχει πολλές δυσμενείς επιδράσεις στο οικοσύστημα όπως: αποσύνθεση της οργανικής ύλης, κατανάλωση οξυγόνου, θάνατος ζωικών οργανισμών, έκλυση αέριων ενώσεων (μεθάνιο, υδρόθειο, αμμώνιο), ανάπτυξη τοξικών μικροφυκών, επιμήκυνση της ζωής ετερότροφων μικροοργανισμών χερσαίας προέλευσης, παθογόνοι μικροοργανισμοί και μείωση της βιοποικιλότητας (Καρύδης 2010).

Η σημαντικότερη επίπτωση του ευτροφισμού είναι η μείωση της διαθεσιμότητας οξυγόνου στο νερό. Η υπερβολική ανάπτυξη της χλωρίδας έχει αποτέλεσμα να αναπτύσσονται πολυάριθμοι μικροοργανισμοί οι οποίοι καταναλώνουν πολύ

οξυγόνο, το οποίο πλέον δεν επαρκεί για άλλους οργανισμούς. Έτσι πολλοί ζωικοί οργανισμοί (ψάρια, γαρίδες, βένθος) πεθαίνουν από ασφυξία, με αποτέλεσμα πολλά είδη να εξαφανίζονται, να αντικαθίστανται από άλλα πιο ανθεκτικά (π.χ. πολύχαιτους) και να διαταράσσεται η ισορροπία και η βιοποικιλότητα των υδάτινων συστημάτων.

Η ανάπτυξη των παραγωγών στην επιφάνεια μειώνει τη διείσδυση του φωτός στο εσωτερικό, μειώνοντας τους πληθυσμούς υδρόβιων φυτών και επομένως τη φωτοσύνθεση στα βαθύτερα στρώματα του νερού, ευνοώντας την ανάπτυξη φυκιάδων (Bonnefoy, 2002). Οι πληθυσμοί μακροφυκών, φυτοπλαγκτού(διάτομα, δινωμαστιγωτά, χλωρόφυτα) και κυανοβακτηρίων, η ανάπτυξη των οποίων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών, το φως, τη θερμοκρασία και τη ροή του νερού, παρουσιάζουν υπερβολική ανάπτυξη (Ærtebjerg et al. 2003; Sand-Jensen & Borum 1991). Η έντονη ανάπτυξη των φυκών όμως είναι πολύ επικίνδυνη για τους ζωντανούς οργανισμούς του οικοσυστήματος, καθώς οι τοξικές ουσίες που παράγουν μπορούν να προκαλέσουν θάνατο τους.

Έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις δηλητηρίασης ψαριών καθώς και κατοικίδιων ζώων με υψηλές συγκεντρώσεις αλγών (Ανδρεαδάκης & Αφραιταίος, 1986). Τα άλγη τέλος έχουν την δυνατότητα να προσλαμβάνουν και να συγκεντρώνουν διαλυμένα μέταλλα, σταθερά ή ραδιενεργά, τα οποία βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο νερό. Τα ραδιενεργά αυτά στοιχεία μπορεί να είναι ακίνδυνα για τα ίδια τα άλγη, αλλά μέσω των ψαριών, των καλλιιεργειών (χρήση νερού που περιέχει άλγη για άρδευση) και των ζώων (που πίνουν νερό με άλγη) μπορεί να φτάσουν μέχρι τον άνθρωπο (Ανδρεαδάκης & Αφραιταίος 1986).

- **Ευτροφισμός στις Μεσογειακές λίμνες**

Οι αβαθείς λίμνες οι οποίες βρίσκονται κυρίως σε χαμηλού υψόμετρου περιοχές όπως είναι οι παραμεσόγειες, είναι πολύ ευαίσθητες στον εμπλουτισμό από θρεπτικά στοιχεία λόγω της ολοένα και αυξανόμενης μετατροπής των φυσικών περιοχών σε αγροτική αστική ή ημιαστική γη, το οποίο επιφέρει δραματικές αλλαγές στην τροφική αλυσίδα (Jeppesen et al. 2003).

Ένα από τα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν οι μεσογειακές λίμνες, είναι ότι εμφανίζουν υψηλή διακύμανση της στάθμης τους. Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τις βορειότερες περιοχές της Ευρώπης έως και τις υποτροπικές, η στάθμη του νερού μπορεί να επιφέρει δραστικές συνέπειες στο οικοσύστημα των λιμνών (Coops et al. 2003). Έτσι, ένα υψηλό επίπεδο στη στάθμη της λίμνης κατά την αυξητική περίοδο μπορεί να μειώσει τη διαθεσιμότητα σε φως στα υδρόβια φυτά, ενώ η χαμηλή στάθμη μπορεί να προκαλέσει ζημιά στους φυτικούς οργανισμούς μέσω του παγετού ή των κυμάτων που δημιουργούνται στη λίμνη (Fernandez – Alaez et al. 2004).

Οι υδρολογικές παράμετροι αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα που παίζει ρόλο και στην ισορροπία των θρεπτικών στοιχείων (Downing & McCauley 1992, Downing et al. 1999). Αλλαγές στα υδρολογικά χαρακτηριστικά μπορεί να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην ισορροπία των ιόντων αλλά και τη δυναμική των θρεπτικών όχι μόνο άμεσα αλλά και έμμεσα διαμέσου διαφοροποιήσεων στην τροφική αλυσίδα περιλαμβάνοντας αλλαγές στην κοινωνία των μακρόφυτων (Jeppesen et al., 2009a, 2009b). Η συγκέντρωση των βασικών ιόντων και θρεπτικών (αζώτου και φωσφόρου) διαφέρει ανάλογα με τη στάθμη του νερού της λίμνης και παρουσιάζει αξιοσημείωτη αύξηση κατά τη διάρκεια μιας ξηράς περιόδου (Beklioglu & Ozen 2008). Κατά τη διάρκεια βροχερών ετών, η αλατότητα και η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά, παρουσιάζει ισχυρή εποχικότητα ενώ σε ξηρές περιόδους η αλατότητα και το ανόργανο άζωτο δύναται να αυξηθούν (Jeppesen et al., 1994).

Ένας τελευταίος παράγοντας που αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας και ανάπτυξης ευτροφισμού είναι η υψηλή αλατότητα, καθώς επίσης και η θολερότητα (Jeppesen et al., 1994). Έτσι, η μείωση της στάθμης των λιμνών εξαιτίας της ξηρασίας μπορεί να προκαλέσει ευτροφισμό (Romo et al. 2004) επειδή προκαλεί αύξηση της αλατότητας και της περιεκτικότητας σε θρεπτικά.

1.2. Μικροκυστίνες

- **Κυανοβακτήρια**

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν την μεγαλύτερη, την πιο ποικιλόμορφη και την ευρύτερα εξαπλωμένη ομάδα φωτοσυνθετικών προκαρυωτικών οργανισμών. Είναι οι μοναδικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί που διεξάγουν οξυγονική φωτοσύνθεση παρόμοια με αυτήν των ανωτέρων φυτών, σχετιζόμενη με τα φωτοσυστήματα I και II (Mur at al. 1999). Τα περιβάλλοντα στα οποία απαντώνται άφθονα τα κυανοβακτήρια είναι τα υδάτινα οικοσυστήματα κάθε τύπου. Αναπτύσσονται σε εσωτερικά ύδατα, παράκτια, αλλά και ωκεάνια συστήματα (Mur at al. 1999). Η ικανότητά τους να εποικίζουν ακραία περιβάλλοντα είναι γενικά εντυπωσιακή. Μπορούν να εποικήσουν οποιοδήποτε οικοσύστημα, κάθε χερσαίο και υδάτινο περιβάλλον, ακόμα και ακραία ενδιαιτήματα, όπως είναι οι έρημοι και οι θερμοπηγές. Είναι γνωστή η ύπαρξη ειδών που είναι ικανά να επιβιώσουν στο απόλυτο σκοτάδι για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ενώ άλλα είδη ανθίζουν σε συνθήκες ευτροφισμού (Fay 1983).

Τα κυανοβακτήρια θεωρούνται βασικό πρόβλημα ποιότητας νερού, καθώς παράγουν μία σειρά τοξινών, γνωστές ως κυανοτοξίνες που είναι επιβλαβείς για την δημόσια υγεία. Στο υδάτινο περιβάλλον, και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες όπως υψηλή θερμοκρασία και αλκαλικό pH, οι πληθυσμοί των κυανοβακτηρίων μπορεί να παρουσιάσουν εκθετική αύξηση, φαινόμενο γνωστό ως άνθιση. Το φαινόμενο αυτό είναι στενά συνυφασμένο με τον ευτροφισμό, την υπερβολική δηλαδή παραγωγή φυτοπλαγκτού, που οφείλεται με τη σειρά της σε μεγάλο βαθμό στην αστικοποίηση και στις καλλιεργητικές τεχνικές, που συνεχώς αναπτύσσονται στον ελληνικό χώρο. (Γκέλης 2006).

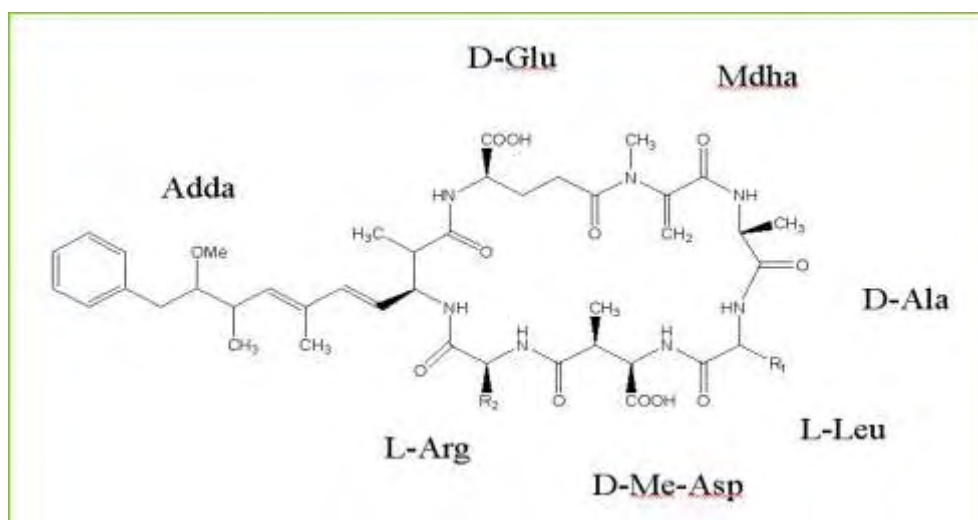
Κατά την άνθιση των κυανοβακτηρίων συγκεντρώνονται μεγάλες ποσότητες κυανοτοξινών στο οικοσύστημα, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για τη χλωρίδα, την πανίδα, αλλά και τη δημόσια υγεία (Codd et al. 2010). Οι πιο γνωστές κυανοτοξίνες που παράγονται από τα κυανοβακτήρια είναι οι μικροκυστίνες (Carmichael 1997). Έχει αναφερθεί έντονη ανάπτυξη των τοξικών κυανοβακτηρίων σε πολλά μέρη παγκοσμίως και έχουν σημειωθεί διάφορα περιστατικά δηλητηρίασης ζώωντων οργανισμών.(Falconer 2005)

- Δομή-Ιδιότητες μικροκυστινών

Οι μικροκυστίνες (MIC) είναι κυκλικά επταπεπτίδια (κυκλικά πεπτίδια με επτά αμινοξέα) και πήραν το όνομά τους από το κυανοβακτήριο *Microcystis aeruginosa*, από όπου απομονώθηκαν για πρώτη φορά (Carmichael 1997). Παραγωγή μικροκυστινών παρατηρείται επίσης στα γένη *Nostoc* *Anabaena*, *Synechocystis* και τα είδη *Cyanobium bacillare*, *Arthrospira fusiformis*, *Limnothrix redekei*, *Phormidium formosum*, *Hapalosiphon hibernicus* (Sivonen & Jones, 1999).

Οι περισσότερες μικροκυστίνες έχουν τη γενική χημική δομή: κυκλο-(D-alanine-X-D-MeAsp-Z-Adda-D-glutamate-Mdha), όπου X και Z είναι μεταβλητά αμινοξέα, το D-MeAsp είναι το D-ερυθρο-β-μεθυλασπαρτικό οξύ, το Mdha είναι η N-μεθυλδεϋδροαλανίνη και το Adda είναι το 3-αμινο-9-μεθοξυ-2,6,8-τριμεθυλ-10-φαινυλδεκα-4,6-διενικό οξύ. Έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής πάνω από 80 διαφορετικές μικροκυστίνες και όλες έχουν ηπατοτοξική δράση. Το αμινοξύ Adda είναι αυτό που θεωρείται υπεύθυνο για την ηπατοτοξική δράση των μικροκυστινών. (De Figueiredo et al. 2004).

Η μικροκυστίνη-LR (MC-LR, Εικόνα 1.1) που περιλαμβάνει τα αμινοξέα λευκίνη και αργινίνη είναι το πιο κοινό και τοξικό παράγωγο. Πρόσφατα, λόγω της αυξανόμενης ανησυχίας σχετικά με τις επιπτώσεις των μικροκυστινών για την δημόσια υγεία, επειδή λειτουργούν ως καρκινογόνα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας θέσπισε ως όριο το 1 µg/L για την τοξίνη αυτήν στο πόσιμο νερό. (Falconer 2005)



Εικόνα 1.1. Δομή της μικροκυστίνης LR

Οι μικροκυστίνες που απελευθερώνονται μετά τη λύση ενός κυανοβακτηριακού κυττάρου έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να επιδράσουν σε πολλούς οργανισμούς από μικροάλγη έως και θηλαστικά (de Figueiredo et al. 2004). Η παρουσία τους έχει αναφερθεί σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των δίθυρων, γαστεροπόδων, δεκαπόδων και των ψαριών (William et al. 1997c). Μαζικοί θάνατοι ψαριών έχουν συνδεθεί με τοξικούς επιπολασμούς, αλλά άλλοι παράγοντες που συνδέονται με τους επιπολασμούς όπως το υψηλό pH λόγω της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και χαμηλές τιμές οξυγόνου, θα μπορούσαν επίσης να συμβάλλουν (Rodger et al. 1994). Μετά την πρόσληψη και εντερική απορρόφηση οι μικροκυστίνες μεταφέρονται στα ηπατοκύτταρα μέσω συστήματος μεταφορέων όπου προκαλούν αναστολή πρωτεϊνικών φωσφατασών. Τα κύρια όργανα που επηρεάζονται είναι το ήπαρ και οι νεφροί με συμπτώματα την πλήρη αποδόμηση της αρχιτεκτονικής του ηπατικού ιστού που προκαλεί ηπατική δυσλειτουργία και ακολούθως ηπατική νέκρωση (Carbis et al. 1996). Η μεγαλύτερη ποσότητα των μικροκυστινών συσσωρεύεται στο ήπαρ λόγω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, εντούτοις ικανές ποσότητες μπορούν να διέλθουν από το ήπαρ και σε άλλα όργανα όπως οι μυς, οι νεφροί και ο εγκέφαλος. (William et al. 1997a).

Το γεγονός ότι οι μικροκυστίνες συσσωρεύονται σε είδη ζωοπλαγκτού (Mohamed 2001), μύδια (Eriksson et al. 1989), οστρακόδερμα (Chen & Xie 2005), είδη ιχθύων (Soares et al. 2009) και άλλα σπονδυλωτά (Chen et al. 2009), αποδεικνύει ότι ένας τρόπος έκθεσης σε τοξίνες για υδρόβια και χερσαία είδη, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, είναι η κατανάλωση υδρόβιων ειδών τα οποία είχαν εκτεθεί σε μικροκυστίνες και τις βιοσυσσώρευσαν (Zhang et al. 2009). Τα συμπτώματα που βιώνουν άνθρωποι οι οποίοι προσβλήθηκαν από μικροκυστίνες, περιλαμβάνουν κόπωση, κεφαλαλγία, διάρροια, έμετο, πόνο στο λαιμό, πυρετό, και δερματικούς ερεθισμούς (Bonnefoy, 2002). Η ανθρώπινη έκθεση στις κυανοτοξίνες συμβαίνει κυρίως μέσω του πόσιμου νερού, γι' αυτό και η έκθεση στα τοξικά κυανοβακτήρια αποτελεί την κύρια ανησυχία για την υγεία του ανθρώπου όσον αφορά τόσο τις οξείες όσο και τις χρόνιες επιδράσεις (Fitzgerald 2001).

Λόγω του υψηλού μοριακού τους βάρους που κυμαίνεται από 900 έως 1100 Da, οι μικροκυστίνες δεν μπορούν να διαπεράσουν στις βιολογικές μεμβράνες και να

συσσωρευτούν στους ιστούς (Svrcek & Smith 2004). Αντιθέτως κάποια είδη κυττάρων διαθέτουν μεμβρανικούς μεταφορείς (organic anion transporters, OATPs) μέσω των οποίων εισέρχονται οι μικροκυστίνες και συσσωρεύονται (Amando & Monserrat 2010). Συνήθως η τοξικότητα του κυττάρου που έχει μολυνθεί με μικροκυστίνες θεωρείται ότι προσδιορίζεται από την ικανότητα του κυττάρου να δέχεται τις τοξίνες, με άλλα λόγια να έχει στη μεμβράνη του τους κατάλληλους μεταφορείς της τοξίνης. Μελέτες απέδειξαν πως η ενσωμάτωση των μικροκυστινών αναστάλθηκε από το χολικό οξύ και άλλες ενώσεις, προτείνοντας έτσι τη συμμετοχή ενός ή περισσότερων μη ειδικών μεταφορέων στη διαδικασία εισόδου των μικροκυστινών στο κύτταρο (Runnegar et al. 1995).

Σε μοριακό επίπεδο ο μηχανισμός τοξικότητας των μικροκυστινών είναι ο εξής: Μετά την είσοδό τους στο κύτταρο οι μικροκυστίνες δεσμεύονται ομοιοπολικά στις πρωτεϊνικές φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης1 και 2A(PP1,PP2A) και αναστέλλουν την λειτουργικότητά τους (Honkanen et al. 1990,Runnegar et al. 1993). Η αναστολή αυτήν διαταράσσει την ισορροπία στην κυτταρική φωσφορυλίωση και προκαλεί υπερ φωσφορυλίωση μιας σειράς λειτουργικών πρωτεϊνών που οδηγεί στην απόπτωση ή νέκρωση των υπατοκυττάρων (Amado & Moserrat 2010).

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες αποδεικνύουν πως οι μικροκυστίνες μπορούν να μεταβάλλουν το οξειδωτικό σύστημα και να επάγουν το οξειδωτικό στρες σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς. Μεταξύ των αποτελεσμάτων του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου είναι η απώλεια μεμβρανικού μηχανισμού και της διαπερατότητας της μεμβράνης των μιτοχονδρίων, βήματα που επίσης οδηγούν στην απόπτωση (Ding et al. 2000).

1.3.Βιοδείκτες που τεκμηριώνουν την δράση των μικροκυστινών

Ως βιοδείκτες ορίζονται μετρήσιμες ουσίες σε ένα βιολογικό σύστημα που οι διαφορές στην συγκέντρωσή τους αντανακλούν διαταραχές στην φυσιολογική

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

- **Γλουταθειόνη**

Η ιστορία της γλουταθειόνης αρχίζει το 1888, όταν ο de Ray Pailhand ανακάλυψε την ουσία “hydrogenant de souffre”, η οποία είχε την ιδιότητα να ανάγει το στοιχειακό θείο, και την οποία ονόμασε “philothion” (Sies H. 1999). Αργότερα, η ουσία αυτή απομονώθηκε από το χημικό Hopkins και ονομάστηκε γλουταθειόνη (Meister A. 1988). Τέλος, η ανακάλυψη της γλουταθειονυλοσπερμιδίνης από τους Tabor και Tabor το 1975 και της τρυπανοθειόνης από τους Fairlamb et al το 1985 αποτέλεσε την αρχή των μελετών για τις αντιοξειδωτικές δράσεις της γλουταθειόνης.

Η γλουταθειόνη, ένα τριπεπτίδιο με αναγωγικές και νουκλεόφιλες ιδιότητες, αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και τον κύριο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Masella R. ,Di Benedetto R. ,Vari R. , Filesi C.,Giovannini C. 2005). Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα από τα αμινοξέα L-γλουταμικό, L-κυστεΐνη και γλυκίνη σε δύο διαδοχικά βήματα, που καταλύονται από τα ένζυμα συνθετάση του διπεπτιδίου γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη και συνθετάση της γλουταθειόνης (Arrigo Ap. 1999). Απαντά είτε ως αναχθείσα (GSH) είτε ως οξειδωμένη (GSSG) μορφή και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της (Jamieson Dj. 1998). Ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού (Dickinson D. ,Forman H. 2002).

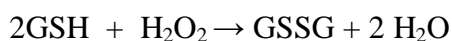
Σε κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε stress, το μεγαλύτερο μέρος (99%) αυτού του οξειδοαναγωγικού ρυθμιστή βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή (Arrigo Ap. 1999). Η ανηγμένη γλουταθειόνη συμβάλλει στη μείωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου αποτελώντας υπόστρωμα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), καταστέλλει τις ελεύθερες ρίζες και αντιδρά με το υδροξύλιο (OH), το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και τα υπεροξείδια (Halliwell & Gutteridge, 1999), γι' αυτό ενδεχόμενη ελάττωση της συνοδεύεται από αύξηση των δραστικών ριζών οξυγόνου. Αποτελεί βασικό συστατικό του αμυντικού συστήματος των κυττάρων ενάντια στο οξειδωτικό στρες με δυο ειδικούς παράγοντες: την παρουσία του γ-γλουταμυλικού δεσμού και μίας ελεύθερης σουλφοδρυλικής ομάδας (-SH). Η ικανότητά της ανηγμένης γλουταθειόνης (οξειδοαναγωγικό δυναμικό $E^0 = -0,24V$) να οξειδώνεται σε GSSG, την καθιστά σημαντικό «καθαριστή» ROS για το κύτταρο.

Μία από τις κύριες προστατευτικές δράσεις της γλουταθειόνης στο οξειδωτικό stress είναι η εξής:

– Η γλουταθειόνη δρα ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου, όπως υπεροξειδάσες γλουταθειόνης και τρανσφεράσες γλουταθειόνης (Arrigo Ap. 1999).

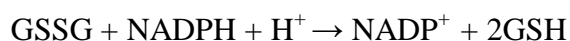
- **Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης**

Η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης αναγνωρίστηκε από τον Mills το 1957 και αποδόθηκε το 1973 σε ένα σεληνοένζυμο από τους Flohe et al και Rotruck et al. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Η GPx μεταφέρει υδρογόνο στο υπεροξείδιο του υδρογόνου προκειμένου να σχηματιστεί νερό με απαραίτητη την παρουσία της γλουταθειόνης στην ανηγμένη της μορφή (GSH). Δηλαδή, η GSH λειτουργεί ως υπόστρωμα για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. (Jamieson Dj. 1998)



Η ανηγμένη γλουταθειόνη μετατρέπεται σε οξειδωμένη, η οποία θα πρέπει πάλι να μετατραπεί σε ανηγμένη προκειμένου να χρησιμοποιηθεί εκ νέου από τον οργανισμό. Για να γίνει αυτό θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μία αντίδραση στην οποία η παρουσία του συνενζύμου FAD είναι απαραίτητη στο ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτήν, το οποίο λέγεται αναγωγάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR). Η GR είναι σημαντική για να διατηρηθεί η ισορροπία GSH/GSSH υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Ο λόγος GSH/GSSH χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης οξειδωτικής κατάστασης κατά την παρουσία δραστικών ριζών οξυγόνου στα κύτταρα (Wu et al. 2004). Αν και η αναγωγή του H₂O₂ γίνεται και από την καταλάση, τα σχετικά επίπεδα GPx και καταλάσης διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης και υψηλά επίπεδα δραστηριότητας GPx, ενώ το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων.

Επιπλέον το NADPH είναι το αναγωγικό μέσο της αντίδρασης (Tramboo et al. 2011)



Τέλος, η GPx ανάγει τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) σε αλκοόλες (ROH)



- **Τρανσφεράση της γλουταθειόνης**

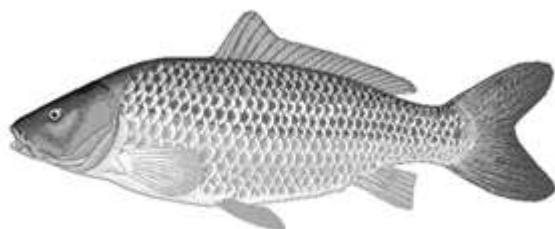
Η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) είναι ένζυμο με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ανήκει στη οικογένεια των ενζύμων που αποτελούνται από μιτοχονδριακές και μικροσωμικές πρωτεΐνες. Απαντάται τόσο σε ευκαρυώτες όσο και προκαρυώτες όπου καταλύει ποικιλία αντιδράσεων και αποδέχεται ενδογενή και ξενοβιοτικά υποστρώματα (Allocati N., Federici L., Masulli M., Di Ilio C. 2009). Τα περισσότερα θηλαστικά ισοένζυμα έχουν συνάφεια για το υπόστρωμα 1-chloro-2,4-dinitrobenzene και φασματοφωτομετρικές αναλύσεις με αυτό το υπόστρωμα χρησιμοποιούνται κυρίως για να προσδιορίσουν την δραστηριότητα της GST. (Habig Wh., Pabst MJ., Fleischner G., Gatmaitan Z., Arias Im., Jakoby WB. 1974).

Λειτουργεί ως περισυλλέκτης ελευθέρων ριζών, αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστά ακίνδυνες. Δρα καταλύοντας την σύζευξη της γλουταθειόνης σε διάφορες ηλεκτρονιόφιλε ενώσεις.

Στα ψάρια η GST μεταβολίζει τις μικροκυστίνες καταλύοντας την προσθήκη τους στην ομάδαθειόλης του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης. Αυτό μπορεί να εξουδετερώσει τις ηλεκτρονιόφιλε θέσεις των μικροκυστινών, να αυξήσει την υδατοδιαλυτότητα τους και επομένως, να αυξήσει την απέκκριση των προϊόντων μεταβολισμού τους, όπως το σύμπλοκο GSH – MC-LR (Pflugmacher et al, 1998; Wiegand et al., 1999).

1.4 Στοιχεία βιολογίας *Cyprinus carpio* Linneus, 1758

Το όνομα κυπρίνος είναι ελληνικό και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Αριστοτέλη το 384–322π.Χ. Πιθανόν να προέρχεται από την λέξη "Κυπρίς" η οποία αποτελούσε το δεύτερο όνομα της θεάς Αφροδίτης και υποδήλωνε την γονιμότητα και τον θόρυβο της αναπαραγωγής.



EIKONA: Κυπρίνος (*Cyprinus carpio*)

Ταξινόμηση Κυπρίνου

Κοινό όνομα : Κυπρίνος, σαζάνι, γριβάδι, κάρπα, τσάφα, καρλιώτικο,μποτσικάρι, γκοτζάρι, τσουκάνι.

Οικογένεια: Cyprinidae

Γένος: *Cyprinus*

Είδος : *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758)

Μορφολογία: ψάρι δυνατό, μακρόστενο σε σχήμα "οβίδας" με μεγάλα λέπια και χρώμα κίτρινο–καφέ.

Ο κυπρίνος ή γριβάδι ή σαζάνι ή μπουτσκάρι (*Cyprinus carpio*) κατάγεται απ' την Ασία. Είναι κοινότατο είδος στην Κίνα όπου εκτρέφεται στους ορυζώνες και σε ειδικά έλη, είναι δε πολυάριθμο σε όλα σχεδόν τα νερά, στάσιμα ή τρεχούμενα, της νότιας και κεντρικής Ασίας. Απ' την Μικρά Ασία, σύμφωνα με όσα λένε κάποιοι ο κυπρίνος μεταφέρθηκε στην Ευρώπη. Τώρα είναι κοινότατος στην Ουγγαρία, στα ποτάμια της Αυστρίας, της Σερβίας, της Ρουμανίας και γενικά σε όλη την Ευρώπη όπως και στην Ελλάδα που υπάρχει σε όλες τις λίμνες μας. Απαντάται σε διάφορες ποικιλίες: λεπιδωτός, καθρεπτοειδής, γραμμικός, γυμνός.(carpmania.gr)

Κατάλληλες συνθήκες για την ομαλή διαβίωσή του είναι:

pH: 6,5-9,0 ,θερμοκρασία: 3-35 °C (μέγιστη ανάπτυξη μεταξύ 23-30 °C)

Ο κυπρίνος προτιμά ρηχά νερά (π.χ.λίμνες), χωρίς πολύ κινητικότητα, με αρκετό ίζημα πλούσια σε πλαγκτόν αλλά και βλάστηση. Ψάχνει την τροφή του κυρίως στον πάτο του βυθού, αλλά θα κινηθεί και στο μεσαίο αλλά και στα υψηλότερα στρώματα νερού. Είναι παμφάγο είδος ψαριού, μπορεί να τραφεί σαν φυτοφάγο με φύλλα από υδρόβια φυτά ή σπόρους, αλλά προτιμάει να ψάχνει το βυθό για έντομα, γαρίδες, ζωοπλαγκτόν, σκουλήκια και γαρίδες, ή καραβίδες.

Ο κυπρίνος συνήθως ζει μέχρι 11 χρόνια, ενώ έχει καταγραφεί και ψάρι που έζησε 47 χρόνια μέσα σε τεχνητή λιμνούλα. Θεωρείται αναπαραγωγικά ώριμος μετά τα τέσσερα χρόνια ηλικίας. Η τεχνητή αναπαραγωγή γίνεται με την χρήση ορμονικής υποκατάστασης (υπόφυση). Η φυσική αναπαραγωγή του κυπρίνου εξαρτάται από τις εποχές και από τα ιδιαίτερα κλιματικά χαρακτηριστικά. Στις περιοχές με ηπειρωτικό κλίμα, συνήθως ο κυπρίνος είναι "γεννητικά ώριμος" την άνοιξη.

Ο κυπρίνος, μπορεί να αναπαραχθεί με φυσικό ή τεχνητό τρόπο σε οποιοδήποτε μέρος της γης, αν η θερμοκρασία του νερού, φθάνει στους 17 – 22 °C (ιδανικά 20 °C) για 3 – 4 μήνες και βρεθεί το κατάλληλο περιβάλλον αναπαραγωγής (Greek aquaponics Ενυδρειοπονία).

Σήμερα ο κυπρίνος είναι το πιο διαδεδομένο ψάρι στον κόσμο. Έχει εισαχθεί σε περισσότερες από 81 χώρες και αποτελεί κυρίαρχο ψάρι στις ιχθυοκαλλιέργειες (Moyle&Cech,1996).

Η εκτροφή του είδους στην Ελλάδα δεν έχει προχωρήσει ιδιαίτερα (συνολικά υπάρχουν 5 μονάδες), κυρίως λόγω του ανταγωνισμού με άλλα είδη, της ελλιπέστατης τεχνολογίας που χρησιμοποιήθηκε και τις περιορισμένες διαθέσιμες εκτάσεις. Σε αρκετές περιοχές συμπεριλαμβανομένων και της χώρας μας (Μακεδονία, Ήπειρο, Θεσσαλία) αποτελεί παραδοσιακό είδος διατροφής (www.cyprinus.gr).

Επομένως, η ευρεία εξάπλωση, οι θέσεις στο τροφικό πλέγμα των οικοσυστημάτων που απαντάται, η εύκολη εκτροφή και η κατανάλωσή από τον άνθρωπο, καθιστούν τον κυπρίνο ένα σημαντικό πειραματικό είδος για την οικοτοξικολογία σε μελέτες πεδίου όσο και εργαστηριακές συνθήκες (Oruc & Üner 2002, Sakamoto et al. 2003).

1.5 Χώρος μελέτης

Η μελέτη αφορούσε την λίμνη Κάρλα. Η Κάρλα βρίσκεται στην κεντρική Ελλάδα, νοτιοανατολικά της Λάρισας, κοντά στις βόρειες πλαγιές του Πηλίου, στα όρια των Νομών Λαρίσης και Μαγνησίας. Πριν την αποξήρανσή της κάλυπτε περίπου 180 Km². Στις αρχές τις δεκαετίας του 1960 η λίμνη απξηράνθηκε με διοχέτευση των νερών της στον παρακείμενο Παγασητικό Κόλπο μέσω μιας υπόγειας σήραγγας. Ήταν η πιο σημαντική λίμνη της Ελλάδας από ορνιθολογικής πλευράς. Τον τελευταίο χειμώνα του 1964 που ολοκληρώθηκε η αποξήρανση υπήρχαν στην περιοχή πάνω από 430.000 υδρόβια πουλιά και διαχείμαζε μεγάλος αριθμός από πάπιες και αγριόχηνες. Ωστόσο, μικρές υδατοσυλλογές με τη μορφή υγροτόπων παρέμειναν σε διάφορα σημεία της παλιάς λίμνης. Η δομή και λειτουργία της λίμνης συνδεόταν ανέκαθεν στενά με τον Πηνειό Ποταμό καθώς πλημμυρικά επεισόδια του ποταμού παρείχαν στη λίμνη νερό πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία. Αυτό, καθώς και μερικά άλλα βιολογικά και φυσικά-χημικά κριτήρια, έδωσαν έναν εύτροφο χαρακτήρα στη λίμνη ακόμη και πριν την αποξήρανσή της (www.org/wiki/Λίμνη-Κάρλα).

Στη δεκαετία του 1990 αποφασίστηκε από θεσμικούς παράγοντες η αποκατάσταση της λίμνης, μέσω επανπλήρωσής με νερό από τον Πηνειό Ποταμό μια έκταση περίπου 38 Km². Εν τέλει, η εισροή του νερού ξεκίνησε μόλις το Σεπτέμβριο 2009, ενώ από τον Φεβρουάριο του 2009, άρχισε να γεμίζει η λίμνη και πάλι με νερό, αλλά και με ψάρια μεταξύ των οποίων και ο κυπρίνος. Πουλιιά έχουν έρθει στην περιοχή και φαίνεται έτσι η δύναμη της φύσης για την αποκατάστασή της.

Από τις μέχρι σήμερα έρευνες, φαίνεται πως η νέα λίμνη, κατά τον πρώτο χρόνο επαναπλήρωσής της, φιλοξενεί μικροοργανισμούς που απαντώνται σε πολύ εύτροφα οικοσυστήματα και ανήκουν στις ομάδες των Ευγληνόφυτων και Χλωρόφυτων. Άλλοι πολύ σημαντικοί μικροοργανισμοί είναι τα τοξικά είδη *Prymnesium parvum* και *Pfiesteria piscicida*. Τα είδη αυτά έχουν προκαλέσει μαζικούς θανάτους ψαριών και πουλιών σε άλλες λίμνες και παράκτια νερά. Ειδικότερα, το *Pfiesteria piscicida* είναι ένα δινομαστιγωτό που μέχρι σήμερα δεν ήταν γνωστό ότι αναπτύσσεται σε λίμνες. Η παρουσία του στην Κάρλα πιθανώς οφείλεται στην αυξημένη αλατότητα του νερού. Επίσης, οι πρώτες μετρήσεις κυανοβακτηρίων στην Κάρλα έδειξαν ότι γνωστά τοξικά είδη είναι άφθονα. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι τα *Planktothrix agardhii* και *Anabaeonopsis elenkinii*, τα οποία κυριάρχησαν την άνοιξη του 2010. Επιπλέον, έχουν βρεθεί και ορισμένα άλλα γνωστά τοξικά καθώς και παρασιτικά είδη και νέα είδη για την επιστήμη (www.lakekarla).

1.6 Σκοπός μελέτης

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

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

Η εποχική διακύμανση και αξιολόγηση βιοχημικών δεικτών που σχετίζονται με την απόκριση στο οξειδωτικό στρες στους κυπρίνους της λίμνης Κάρλας, και η συσχέτιση τους με την εποχική διακύμανση μικροκυστινών στους ιστούς των ψαριών.

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Μέσα στο 2011 πραγματοποιήθηκαν συνολικά πέντε δειγματοληψίες. Σε κάθε δειγματοληψία συλλέχθηκε νερό, φυτοπλαγκτόν και δέκα άτομα κυπρίνου. Μετά την δειγματοληψία καταγράφηκε το βάρος, έγινε αιμοληψία, συλλογή πρόσθιου και οπίσθιου εντέρου, ήπατος, νεφρού, εγκεφάλου και λευκού μυ. Στην συνέχεια όλοι οι ιστοί εμβαπτίστηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο όπου και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

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

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

2.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε δοχείο με υγρό άζωτο. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες erpendorf των 2ml και προστέθηκε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 σε αναλογία ιστού-διαλύματος 1:5. Ακολούθησε ομογενοποίηση των ιστών μηχανικά, σε ομογενοποιητή ULTRA TURRAX, IKA-WERKE (17.000 rpm, 30 sec.). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (10.000 rpm, 30 min, 4°C). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέους σωλήνες erpendorf και αποθηκεύτηκε στους -80°C. Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν έγιναν εις τριπλούν (triplicate) και οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (ως επί το πλείστον) ήταν η $1/2$, $1/4$ και $1/6$. Οι ενζυμικές δραστηριότητες προσδιορίστηκαν φωτομετρικά σε φασματοφωτόμετρο CARY 50Bio.

2.3 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100mM, pH 6,5 το οποίο ρυθμίστηκε με προσθήκη HCl , GSH 30 mM και 1-chloro-2,4 dinitrobenzene 30mM.

Αρχικά, ρυθμίστηκε το φωτόμετρο στα 340nm και το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 25oC. Έπειτα, ετοιμάστηκαν 4 erpendorfs 1,5 ml, εκ των οποίων τα 3 αποτελούσαν το δείγμα μας (sample) εις τριπλούν και το τέταρτο ήταν το τυφλό (blank). Η ετοιμασία των δειγμάτων έγινε ως εξής:

	Samples(1,2,3)	Blank
30mM GSH	50μl	50μl
30mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene	50μl	50μl
100mM potassium phosphate buffer, pH 6,5	1390μl	1400μl

Στην συνέχεια αφού ανακινήθηκε καλά το περιεχόμενό τους, μεταφέρθηκε σε κυψελίδες, οι οποίες τοποθετήθηκαν στο φωτόμετρο και ξεκινούσε η μέτρηση.

Μετά το πέρας 2min μέτρησης, προστέθηκε το ενζυμικό εκχύλισμα στα δείγματά μας και προέκυψαν τα εξής δείγματα:

	Samples(1,2,3)	Blank
Ενζυμικό εκχύλισμα	10μl	-
Συνολικός όγκος	1500μl	1500μl

Συνεχίστηκε η μέτρηση ώστε να έχουμε 5min ανοδικής γραμμής στο δείγμα μας. Τέλος, έγινε καταγραφή αρχικής και τελικής απορρόφηση(OD) σε διάρκεια 3 min σύμφωνα με τον νόμο των Lambert-Beer:

$$OD = \text{extinction coefficient (mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times C \text{ (mM)} \times \text{path (cm)}$$

$$C \text{ (mM)} = OD / \text{extinction coefficient (mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) / \text{path (cm)}$$

$$C \text{ (cm)} = OD / 9.6$$

2.4 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης βασίστηκε στη μέθοδο Flohē και Günzler (1984). Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια: 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, + 1mM EDTA, 2.4 U/ml glutathione reductase (GR) σε buffer, την οποία ετοιμάζαμε και χρησιμοποιούσαμε πάντα φρέσκια πριν από κάθε μέτρηση. Ακόμα, χρησιμοποιήθηκαν 10 mM GSH σε H₂O, 1.5 mM NADPH και 1.5 mM H₂O₂.

Αφού ρυθμίσαμε το φωτόμετρο στα 340 nm και το υδατόλουτρο στους 25°C ετοιμάσαμε τα δείγματά μας. Σε 4 eppendorfs 1,5 ml, εκ των οποίων τα 3 αποτελούσαν το δείγμα μας (sample) εις τριπλούν και το τέταρτο ήταν το τυφλό (blank), βάλαμε τα εξής αντιδραστήρια στις ακόλουθες ποσότητες:

	Samples(1,2,3)	Blank
100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, + 1mM EDTA	590μl	600μl
2.4 U/ml glutathione reductase (GR)	100μl	100μl
Ενζυμικό εκχύλισμα	10μl	-
10 mM glutathione reduced (GSH)	100μl	100μl

Στην συνέχεια, αφού ανακινήθηκε καλά το περιεχόμενο των eppendorfs μεταφέρθηκε σε κυψελίδες, οι οποίες τοποθετήθηκαν στο φωτόμετρο και επωάστηκαν για 10 min.

Μετά το πέρας των 10 min, προσθέσαμε 100 μl 1.5 mM NADPH και καταγράψαμε την απορρόφηση για 2 min. Τέλος, προσθέσαμε 100 μl 1.5 mM H₂O₂ προθερμασμένου στους 25°C και συνεχίσαμε την μέτρηση ώστε να έχουμε 5min καθοδικής πορείας.

Έγινε καταγραφή αρχικής και τελικής απορρόφηση (OD) σε διάρκεια 3 min σύμφωνα με τον νόμο των Lambert-Beer:

$$OD = \text{extinction coefficient (mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times C \text{ (mM)} \times \text{path (cm)}$$

$$C \text{ (mM)} = OD / \text{extinction coefficient (mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) / \text{path (cm)}$$

$$C \text{ (}\mu\text{M)} = OD / 0,00373$$

2.5 Προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου

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

2.6 Στατιστική Ανάλυση

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

3. Αποτελέσματα

3.1 Λιμνολογικά χαρακτηριστικά

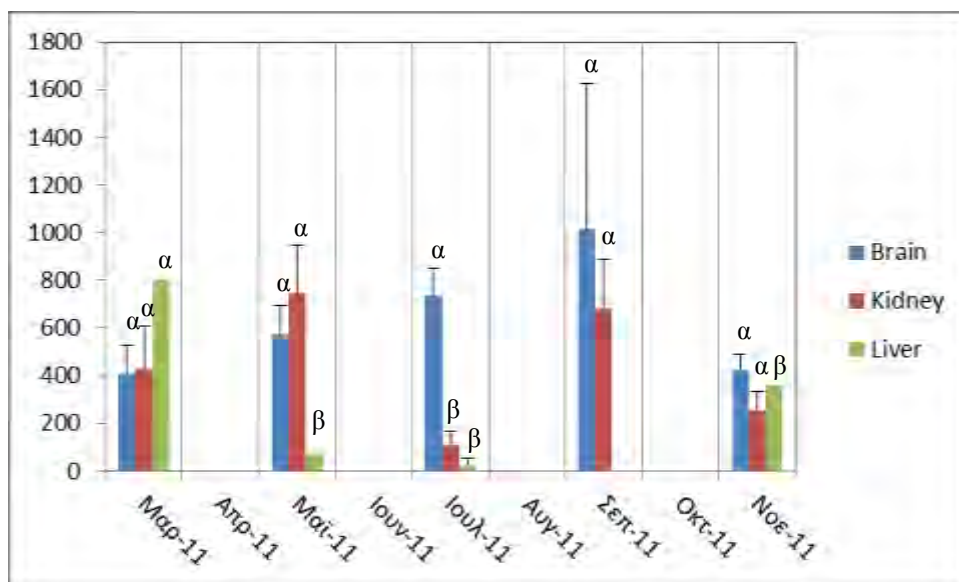
Στη διάρκεια του ημερολογιακού έτους των δειγματοληψιών τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λίμνης Κάρλας παρουσίασαν μεγάλη διακύμανση (Πίνακας 3.1). Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θρεπτικών (NO_3 , PO_4) καταγράφηκαν τους μήνες Ιούλιο και Σεπτέμβριο και συνοδεύτηκαν από υψηλές συγκεντρώσεις χλωροφύλλης α, ένδειξη μεγάλης συγκέντρωσης φυτοπλαγκτού. Όπως αναμενόταν, αυτό συνέπεσε με υψηλές θερμοκρασίες νερού και οδήγησε σε μείωση του διαλυμένου οξυγόνου και του pH (Πίνακας 1). Ασυνήθιστα υψηλή ήταν η συγκέντρωση NO_3 του Ιανουαρίου που εικάζεται ότι οφείλεται σε αυξημένη έκπλυση λόγω ισχυρών καιρικών φαινομένων.

Πίνακας 1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λίμνης Κάρλας το έτος 2011

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

3.2 Δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης

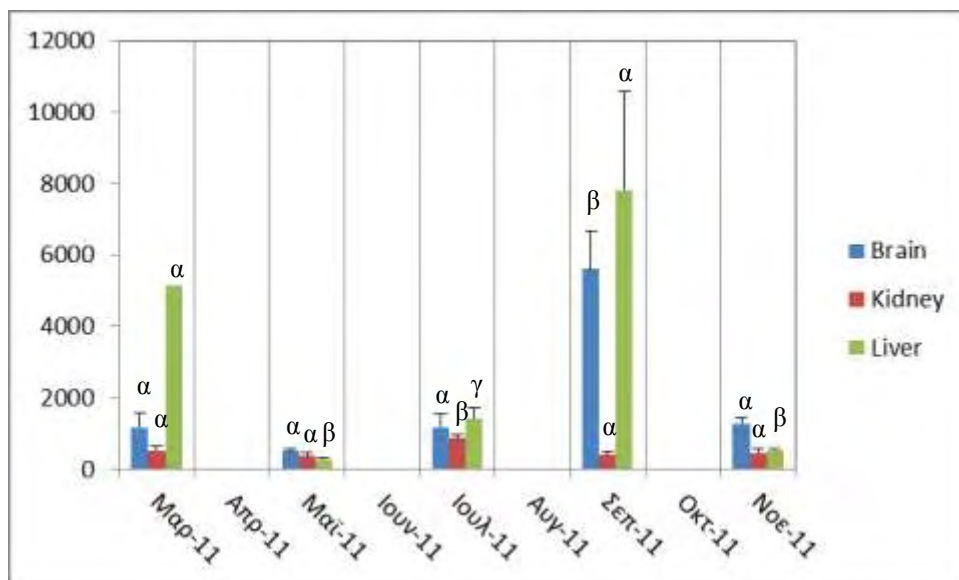
Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) στον εγκέφαλο παρουσίασε σταθερά την υψηλότερη δραστικότητα σε σχέση με τους άλλους ιστούς, με μέγιστη τιμή κατά τον μήνα Σεπτέμβριο, όταν το νερό έχει την μικρότερη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου. Στο ήπαρ παρουσίασε σημαντική εποχιακή διακύμανση, με μεγαλύτερη τιμή κατά τον μήνα Μάρτιο, ενώ τον Σεπτέμβριο δεν παρουσίασε καθόλου δραστικότητα. Τον Ιούλιο τόσο στο νεφρό όσο και στο ήπαρ, η GPx παρουσίασε πολύ μικρή δραστικότητα.



Εικόνα 3.1 Δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx, nmol NADPH/mg protein min) στον εγκέφαλο, το νεφρό και το ήπαρ του κυπρίνου σε πέντε διαφορετικές εποχές του χρόνου. Οι εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών εποχών σε κάθε ιστό.

3.3 Δραστικότητα της μεταφοράς της γλουταθειόνης.

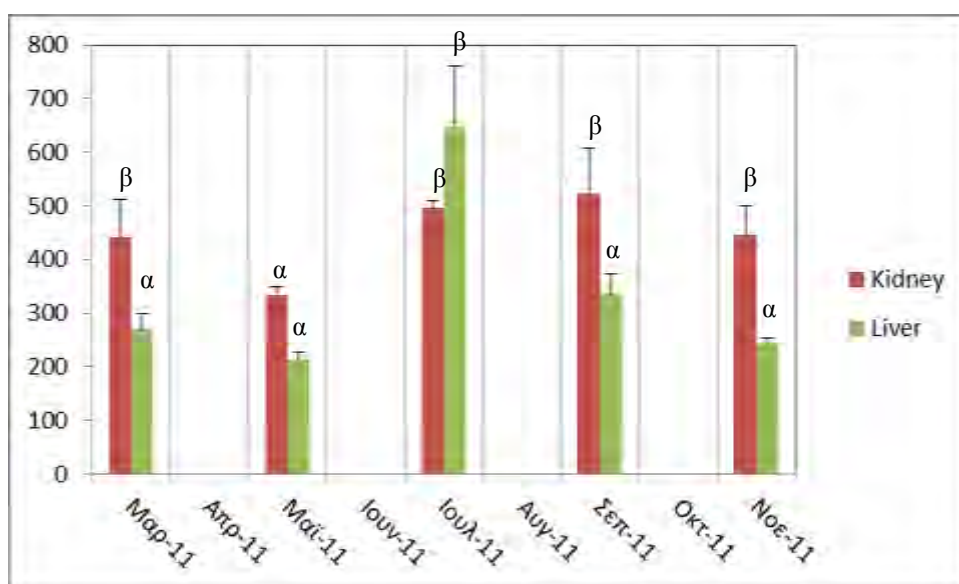
Καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου η δραστικότητα της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) παρουσίασε πολύ σημαντική διακύμανση στον εγκέφαλο και στο ήπαρ. Οι υψηλότερες τιμές σημειώνονται τον μήνα Σεπτέμβριο και για τους δύο ιστούς. Σε αντίθεση με τον εγκέφαλο και το ήπαρ η διακύμανση στο νεφρό ήταν πολύ ήπια, με μεγαλύτερη δραστικότητα τον Ιούλιο. Σε όλους τους ιστούς, οι μικρότερες δραστικότητες μεταφοράς της γλουταθειόνης καταγράφηκαν τον μήνα Μάιο, ενώ χαμηλές ήταν και οι τιμές κατά τους μήνες Ιούλιο και Νοέμβριο.



Εικόνα 3.2 Δραστικότητα της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST, nmol GSH-product/mg protein min) στον εγκέφαλο, το νεφρό και το ήπαρ του κυπρίνου σε πέντε διαφορετικές εποχές του χρόνου. Οι εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών εποχών σε κάθε ιστό.

3.4 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών

Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στο ήπαρ και το νεφρό ήταν σταθερές σε όλη την διάρκεια του χρόνου. Ο νεφρός παρουσίασε υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών όλον τον χρόνο σε σχέση με το ήπαρ, εκτός απ τον Ιούλιο, μήνα κατά τον οποίο το ήπαρ σημείωσε και την υψηλότερη συγκέντρωση. Τον μήνα αυτόν όλα σχεδόν τα φυτικοχημικά χαρακτηριστικά της λίμνης είχαν τις υψηλότερες τιμές τους. Και οι δύο ιστοί τον Μάιο παρουσίασαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών.



Εικόνα 3.3 Συγκεντρώσεις μικροκυστινών (MCYST, ng/g ιστού) στο νεφρό και το ήπαρ του κυπρίνου σε πέντε διαφορετικές εποχές του χρόνου. Οι εκθέτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών εποχών σε κάθε ιστό.

3.5 Συσχετίσεις

Πίνακας 2. Συσχέτιση κατά Spearman μεταξύ της δραστηρότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST), της συγκέντρωσης μικροκυστινών (MCYST), της συγκέντρωσης οξειδωμένης (GSSG) και ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό του κυπρίνου. Οι στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις υποδεικνύονται με σκίαση.

	Εγκέφαλος	Ήπαρ	Νεφρός
GPx- MCYST	-	0,962	0,259
GPx - GSH	0,170	-0,309	-0,129
GPx - GSSG	0,531	-0,560	-0,334
GST – MCYST	-	0,211	-0,035
GST- GSH	0,270	-0,115	-0,067
GST – GSSG	0,025	-0,044	0,091
GST - GPx	0,475	-0,321	-0,460
GSH - GSSG	0,014	0,840	0,299
GSH – MCYST	-	-0,190	0,318
GSSG - MCYST	-	-0,324	-0,195

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) επηρεάστηκε θετικά και σημαντικά από την συγκέντρωση μικροκυστινών και συνοδεύτηκε από αρνητική συσχέτιση με την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) υποδεικνύοντας σημαντικό ρόλο της αναγωγής της γλουταθειόνης στο ήπαρ. Ανάλογη είναι και η εικόνα στο νεφρό. Υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) τόσο στο ήπαρ όσο και στο νεφρό. Ενώ, στον εγκέφαλο θετική είναι η συσχέτιση μεταξύ της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) και της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).

Στο νεφρό, η GSH παρουσίασε σημαντική θετική συσχέτιση με την GSSG και τις μικροκυστίνες. Αύξηση της GSH στο νεφρό συνδεόταν με αύξηση και στα επίπεδα της GSSG και των μικροκυστινών.

Όσον αφορά την μεταφορά της γλουταθειόνης (GST) παρουσίασε θετική συσχέτιση με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) μόνο στον εγκέφαλο και αρνητική στο ήπαρ και στο νεφρό.

Τέλος, σημαντική και αρνητική είναι η συσχέτιση μεταξύ GSSG και μικροκυστινών στο ήπαρ.

4. Συζήτηση

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

Τα ψάρια που διηθούν το νερό, προκειμένου να συλλέξουν την τροφή τους (όπως ο κυπρίνος), διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να καταναλώσουν τοξικά κυανοβακτήρια, σε σχέση με άλλα είδη. Όλα τα ψάρια συσσωρεύουν ποσότητες μικροκυστινών κυρίως στο συκώτι, αλλά και σε άλλους εδώδιμους (σάρκα) και μη εδώδιμους (νεφρός, εντόσθια, εγκεφαλος) ιστούς τους. (www.ecologysalonika.org).

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

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη λίμνη Παμβώτιδα Ιωαννίνων (Moutou et al., submitted) ανέδειξε ότι στο πληθυσμό κυπρίνων της λίμνης, οι μεταβολές των δεικτών του οξειδωτικού στρες σχετίζονταν άμεσα με τα εποχικά λιμνολογικά χαρακτηριστικά και όχι με τη συγκέντρωση μικροκυστινών στους ιστούς.

Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και από μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην λίμνη Κάρλα (Κλάϊμπερ 2012).

Σε μελέτες που έχουν γίνει η συγκέντρωσή της GSH στο ήπαρ και τον εγκέφαλο δείχνει να αυξάνεται μετά από άμεση ή έμμεση έκθεση σε μικροκυστίνες υποδεικνύοντας την σημαντικότητά της στην προστασία ενάντια σε αυτές τις κυανοτοξίνες (Bouaicha and Maatouk, 2004). Ειδικότερα, μία μεγάλη αύξηση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης παρατηρήθηκε σε πειράματα που έγιναν με έκθεση ηπατοκυττάρων ποντικού σε μικροκυστίνες (Bouaicha & Maatouk, 2004) και σε ηπατοκύτταρα κυπρίνου που εκτέθηκαν σε νερό με τις συγκεκριμένες τοξίνες (Blaha et al. 2004, Li et al. 2007).

Σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες παρατηρείται έκπλυση της ανηγμένης γλουταθειόνης λόγω απώλειας των προσαρμοστικών μηχανισμών που συνδυάζεται με ταυτόχρονη οξείδωση της σε οξειδωμένη γλουταθειόνη η οποία σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να επιφέρει σοβαρές βλάβες στο κύτταρο. Η οξείδωση της GSH σε GSSG καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPOx) και η αντίστροφη διαδικασία δηλαδή η επαναδημιουργία της GSH από GSSG καταλύεται από το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR). Αν η δημιουργία οξειδωμένης γλουταθειόνης είναι μεγαλύτερη από τη δημιουργία ανηγμένης, τότε η οξειδωμένη γλουταθειόνη συσσωρεύεται και μετατοπίζεται έξω από το κύτταρο από ειδικούς μεταφορείς ώστε να αποφευχθεί η εξάντληση του NADPH, η οποία οδηγεί σε μεγάλη απώλεια της ανηγμένης γλουταθειόνης. Σε μελέτες που έγιναν σε σολομοειδή διαπιστώθηκε πως η τελική συγκέντρωση οξειδωμένης γλουταθειόνης αυξάνεται μετά από ένα χρόνο έκθεσης σε οξειδωτικούς παράγοντες υποδεικνύοντας τις συνέπειες της μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου λόγω επίδρασης παραγόντων στρες (Almroth et al. 2010).

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

Προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της τρανφεράσης της γλουταθειόνης στο νεφρό, το ήπαρ και στον εγκέφαλο του κυπρίνου, που θεωρούνται παράγοντες άμυνας ενάντια στο οξειδωτικό στρες, σε 5

διαφορετικές εποχές του χρόνου, όπως και οι συγκεντρώσεις μικροκυστινών στο νεφρό και το ήπαρ του κυπρίνου. Επίσης, έγινε συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), της συγκέντρωσης μικροκυστινών (MCYST), της συγκέντρωσης οξειδωμένης (GSSG) και ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στον εγκέφαλο, το ήπαρ και το νεφρό του κυπρίνου.

Η GST παρουσίασε σημαντική διακύμανση στην διάρκεια του χρόνου στον εγκέφαλο και το ήπαρ, σε αντίθεση με το νεφρό όπου η διακύμανση ήταν πολύ ήπια. Η GPx παρουσίασε σταθερά την υψηλότερη δραστικότητα στον εγκέφαλο σε σχέση με τους άλλους ιστούς, με μέγιστη τιμή όταν το νερό έχει την μικρότερη ποσότητα διαλυμένου οξυγόνου. Τέλος, οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών στους ιστούς ήταν σταθερές σε όλη την διάρκεια του χρόνου.

Αξίζει να αναφερθεί ότι παρατηρήθηκαν διαφορετικές συσχετίσεις στους ιστούς, με το ήπαρ να παρουσιάζει στατιστικώς σημαντικότερες συσχετίσεις σε αντίθεση με το νεφρό όπου δεν ήταν και τόσο καλές.

Ανάμεσα στην GST και GPx σημειώθηκαν σημαντικές συσχετίσεις σε όλους τους ιστούς, με αρνητικές συσχετίσεις τόσο στο ήπαρ όσο και στο νεφρό, το οποίο είναι αναμενόμενο, λόγω οξείδωσης. Το ίδιο συνέβει και ανάμεσα στην GPx και GSH. Ενώ αναμενόμενη ήταν και η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της GSH και GST στο ήπαρ και το νεφρό αφού αυξάνεται η GST που χρειάζεται την GSH σαν υπόστρωμα. Τέλος, η GPx στο ήπαρ επηρεάστηκε θετικά και σημαντικά από την συγκέντρωση μικροκυστινών και συνοδεύτηκε από αρνητική με την GSSG υποδεικνύοντας σημαντικό ρόλο της αναγωγής της γλουταθειόνης στο ήπαρ. Ανάλογη είναι η εικόνα και στο νεφρό.

Συμπερασματικά, αντίθετα με τα αποτελέσματα που δημοσιεύονται κάτω από ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες σχετικά με την επίδραση των μικροκυστινών σε δείκτες οξειδωτικού στρες, αποδείχτηκε ότι οι βιοχημικοί παράγοντες που σχετίζονται με την απόκριση σε οξειδωτικό στρες παρουσία μικροκυστινών ακολουθούν τις μεταβολές των αβιοτικών και βιοτικών λιμνολογικών παραμέτρων (εποχιακή διακύμανση της θερμοκρασίας, συγκέντρωση οξυγόνου, pH, χλωροφύλλη-α) κάνοντας πιθανή την χρήση τους ως βιοδείκτες για την παρουσία μικροκυστινών σε κλειστά υδρολογικά συστήματα. Θα πρέπει να γίνονται έρευνες πεδίου οι οποίες

θα συλλέγουν μεγαλύτερο όγκο δεδομένων ώστε να αξιολογηθούν οι παραπάνω παράγοντες.

Βιβλιογραφία Ελληνική

- Ανδρεαδάκης και Αφραιταίος, (Μελέτη του φαινομένου του ευτροφισμού με εφαρμογή την λίμνη Παμβώτιδα,1986).
- Γκέλις Σπυρίδων 2006,Πλαγκτικά κυανοβακτήρια:χαρακτηρισμός και παραγόμενα βιοδραστικά πεπτίδια(Α.Π.Θ).
- Καρύδης Μιχαήλ (Ρύπανση του παράκτιου περιβάλλοντος,2010).
- Κλάϊμπερ Μάριος (Αξιολόγηση βιοχημικών δεικτών στην εκτίμηση της βιοσυσσώρευσης στο είδος *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758, στην λίμνη Κάρλα, 2012)
- Τσιούρης Σ.Ε. 1999 (Θέματα προστασίας Περιβάλλοντος).

Βιβλιογραφία αγγλική

1. Allocati N, Federici L, Masulli M, Di Ilio C (January 2009).("Glutathione transferases in bacteria". FEBS J. 276 (1): 58–75.)
2. Amado, L.L., Monserrat, J.M. (2010) Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why & How. Environ. Int. 36: 226-235.
3. Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. Free Radic Biol Med 1999, 27:936–944.
4. Ærtebjerg, G., Andersen, J.H., Hansen, O.S. (eds) (2003) Nutrients & Eutrophication in Danish Marine Waters. A Challenge for Science & Management. National Environmental Research Institute. 126 pp.
5. Beklioglu, M., Tan, C.O. (2008) Restoration of a shallow Mediterranean lake by biomanipulation complicated by drought. Fundam. Appl. Limnol. 171:105-118.
6. Bonnefoy, X. (2002) Eutrophication & health. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities 28 pp.
7. Bouaicha, N., Maatouk, I. (2004) Microcystin-LR & nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production & lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. Toxicol. Lett. 148:53-63.
8. Carbis, C.D., Mitchel, G.F., Anderson, J.W., Mc Cauley I. 1996. The effects of microcystins on the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio* L., when the toxins are administered by gavage, immersion and intraperitoneal routes. J. Fish Dis. 19, 151-159.
9. Carmichael W., (1997). "The Cyanotoxins". Advances in Botanical Research 27: 211-256. doi:doi:10.1016/S0065-2296(08)60282-7.
10. Chen, J., Xie, P. (2005) Tissue distributions & seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR & -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* & *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China. Toxicon 45:615-625.
11. Gkelis, S., Harjunpää, V., Lanaras, T., Sivonen, K. (2005) Diversity of hepatotoxic microcystins & bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters. Environ. Toxicol. 20, 249–256.
12. Codd G., Bell S., Kaya K., Ward C., Beattie K., Metcalf J., (2010). 'Cyanobacterial toxins, exposure routes and human health'. (European journal of phycology 34 (4):405-415. doi:10.1080/09670269910001736462).
13. Coops, H., Beklioglu, M., Crimson TL. (2003) The role of water level fluctuations in shallow lake ecosystems, workshop conclusions. Hydrobiologia 506: 23-27.
14. De Figueiredo, D.R., Azeteiro, U.M., Esteves, S.M., Goncalves, F.J.M., Pereira, M.J (2004) Microcystin producing blooms – a serious global public health issue. Ecot. Envir. Saf. 59:151-163.
15. Dickinson D, Forman H. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem Pharmacol 2002, 64:1019–1026.

16. Ding, W., Shen, H.M, Ong, C.N. (2000) The critical role of ROS & mitochondrial membrane permeability in microcystin-LR induced rapid apoptosis in primary rat hepatocytes . *Hepatology* 32, 547-555.
17. Downing, J.A., Mc Clain, M., Twilley, R. (1999) The impact of accelerating land-use change on the N-cycle of tropical aquatic ecosystems: current conditions & projected changes. *Biogeochemistry* 46:109-148.
18. Downing, J.A., Mc Cauley, E. (1992) The nitrogen: phosphorus relationship in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 37: 936-945.
19. Eriksson, J.E., Jussi Meriluoto, A.O., Lindholm, T. (1989) Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anadonta cygnea*. *Hydrobiologia* 183:211-216.
20. Fay,P.1983. The blue-greens(cyanophyta,cyanobacteria).Studies in Biology/institute of biology? No.160,Edward Arnold Publishers Ltd.,Soythampton,UK.
21. Fernandez-Alaez, M., Fernandez-Alaez, C., Becares, E. (2004) A two year experimental study on nutrient & predator influences on food web constituents in a shallow lake of north-west Spain. *Freshwater Biol.* 49:1574-1592.
22. Habig WH, Pabst MJ, Fleischner G, Gatmaitan Z, Arias IM, Jakoby WB (October 1974). "The Identity of Glutathione S-Transferase B with Ligandin, a Major Binding Protein of Liver".*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71 (10): 3879–82.
23. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (eds) (1999) *Free radicals in Biology & Medicine* (3rd edn). Oxford University Press, New York 22-26.
24. I.R. Falconer,cyanobacterial toxins of drinking water supplies,CRC press,Boca Raten,Florida,Usa, 2005.
25. Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998, 14:1511–1527.
26. Jeppesen, E., Jensen, J.P., Jensen C. (2003) The impact of nutrient state & lake depth on top-down control in the pelagic zone of lakes: a study of 466 lakes: from the temperature zone to the Arctic. *Ecosystems* 6:313-325.
27. Jeppesen, E., Sammalkorpi, I. (2002) *Lakes in Perrow Davy, M.T (eds). Handbook of Restoration Ecology*, Cambridge University Press, Cambridge.
28. Lopes, P.A.; Pinheiro, T.; Santos, M.C.; da Luz Mathias, M.; Collares-Pereira, M.J.; Viegas-Crespo, A.M. (2001) Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Sci. Total Environ.* 280:153-63.

29. MASELLA R, DI BENEDETTO R, VARI R, FILESI C, GIOVANNINI C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005, 16:577–586.
30. Meister A. On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci* 1988, 13:185–188.
31. Mohamed, A.Z. (2001) Accumulation of Cyanobacterial Hepatotoxins by *Daphnia* in Some Egyptian Irrigation Canals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 50:4-8.
32. Mur, L.R., Skulberg, O.M. Utkilen, H. 1999 cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J (Eds) *Toxic Cyanobacteria in Water*, World health organization, E&FN Spon, London, pp 179-209
33. Moutou K.A., Tsikogias, S., Papadimitriou, Th., Kagalou, I. Oxidative stress in *Cyprinus carpio* to analyze microcystin impact in eutrophic shallow lakes: a preliminary study. *J. Environ. Monitor.*, submitted.
34. Oruç, E.Ö., Üner, N. (2002) Marker enzyme assesment in the liver of *cyprinus carpio* (L.) exposed to 2,4-D & azinphosmethyl. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16:182-188.
35. Paskova, V., Adamovsky, O., Pikula, J., Skocovska, B., Bandouchova, H., Horakova, J., Babica, B., Marsalek, B., Hilscherova, K. (2007) Detoxification & oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Sci. Total Environ.* 398:34-47.
36. Pflugmacher, S., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. (1999) Effects of the cyanobacterial toxin microcystin-LR on detoxication enzymes in aquatic plants. *Environ. Toxicol.* 14, 111–117.
37. Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E.W. (1998) Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxification. *Biochim. Biophys. Acta* 1425, 527–533.
38. Romo, S., Miracle, M.A.R., Jose Villena, M.A., Rueda, J., Ferriol, C., Vicente, E. (2004) Mesocosm experiments on nutrient & fish effects on shallow lake food webs in a Mediterranean climate. *Freshwater Biol.* 49:1593-1607.
39. Runnegar, M.T., Berndt, N., Kaplowitz, N. (1995) Microcystin uptake & inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants & self-inhibition in relation to known hepatic transporters. *Toxicol. Appl. Pharm.* 134: 793-803.
40. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999, 27:916–921.
41. Sivonen & Jones, 1999; Cronberg et al., 2003; Odebrecht et al., 2002; Ballot et al., 2004; Gkelis et al., 2001; Steffensen et al., 2001.

42. Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins in: Chorus, I., Bartman, J. (EDS). Toxin cyanobacteria in water. World health organization, E&FN spoon, London and New York
43. Soares, M.C.S., Rocha, M.I.A., Marinho, M.M. et al. (2009) Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients & grazing effects. *Aquat. Microb. Ecol.*, 57:137–149.
44. Svrcek, C., Smith, D.W (2004) Cyanobacteria toxins & the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J. Envir. Eng. Sci.* 2004:155-158.
45. Trambo, S.M., Yousuf, A.R., Akbar S. (2011) Oxidative stress-inducing potential of butachlor in a freshwater fish, *Cyprinus carpio* (L). *Toxicol. Environ. Chem.* 93:285-295.
46. Williams, D.E., Craig M., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.J., Holmes, C.B.F., 1997a. 14c-labeled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin –LR in salmon livers. *Toxicon* 35, 985-989
47. Williams, D.E., Dawe, S.C., Kent, M.L., Andersen, R.L., Craig, M., Holmes, C.F.B., 1997c . Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystin in mussel tissues. *Toxicon* 35, 1617-1625
48. Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton J.R., Turner N.D. (2004) Glutathione Metabolism & Its Implications for Health. *J. Nutr.* 134:489-492.
49. Zhang, D., Liu, P.X.Y. , Qiu, T. Transfer, distribution & bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Sci. Total Environ.* 407:2191-2199.
50. www.carpamania.gr
51. greek aquaponics Ενυδρείοπονία
52. www.cyprinus.gr
53. www.ecologysalonika.org.