

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙ-
ΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

«ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»

**«Μελέτη βιοχημικών και φυσιολογικών αποκρίσεων του είδους
Callinectes sapidus για αναζήτηση περιοχών με ευνοϊκότερες
κλιματικές συνθήκες»**

Μπαλά Μαρία

Βόλος, 2020

«Μελέτη βιοχημικών και φυσιολογικών αποκρίσεων του είδους *Callinectes sapidus* για αναζήτηση περιοχών με ευνοϊκότερες κλιματικές συνθήκες»

“Study of biochemical and physiological responses of *Callinectes sapidus* for the identification of areas with more favorable climatic conditions”

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

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

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

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

Αφιερωμένο
στη καλή μου φίλη Αγγελίνα,
που ήταν ανέκαθεν στο πλάι μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας αυτή τη Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Δημήτριο Βαφείδη που δέχτηκε να είναι ο επιβλέπων καθηγητής της πτυχιακής μου και που με ενέπνευσε να ασχοληθώ με το παρακάτω θέμα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κωνσταντίνο Φειδάντση για την πολύτιμη στήριξη και καθοδήγηση του, καθώς και την συμβολή του για την ορθότερη κατανόηση του επιστημονικού αντικειμένου. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλο το προσωπικό του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αγάπη, την κατανόηση και την στήριξη τους σε όλα μου τα βήματα.

Περίληψη

Οι αλλαγές του κλίματος μπορεί να έχουν διαφορετική επίπτωση χωρικά με αποτέλεσμα να εντοπίζονται περιοχές με ευνοϊκότερες κλιματικές συνθήκες (refugia). Με την επίδραση της κλιματικής αλλαγής τόσο στα υδάτινα οικοσυστήματα όσο και οργανισμούς, δημιουργήθηκε η ανάγκη, βάσει βιοχημικών και φυσιολογικών αποκρίσεων, εντοπισμού και η οριοθέτησης τέτοιων περιοχών με στόχο τη διατήρηση σημαντικά εμπορικών θαλάσσιων ειδών. Έτσι, συλλέχτηκαν εποχικά (χειμώνας, άνοιξη, καλοκαίρι, φθινόπωρο) άτομα του είδους *Callinectes sapidus* (μπλε καβούρι) από το Θερμαϊκό, Παγασητικό και Βιστωνικό κόλπο. Σε δείγματα βραγχίων και μυός έγινε φασματοφωτομετρική ανάλυση της δραστηριότητας ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας όπως δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT) και ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR), και ανάλυση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες με τη μέθοδο TBARS, και φασματοφωτομετρική ανάλυση της δραστηριότητας ενζύμων του βασικού μεταβολισμού όπως αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH), αφυδρογονάση του β-υδροξυάκυλο-CoA (HOAD) και συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS). Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση των δραστηριοτήτων των μεταβολικών ενζύμων και αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού σε σχέση με τις δειγματοληψίες της άνοιξης και του φθινοπώρου. Όσον αφορά τις τοποθεσίες συλλογής, υψηλότερες τιμές δραστηριότητας παρατηρήθηκαν στον Παγασητικό, και χαμηλότερες στο Βιστωνικό. Η ανάλυση επιπλέον βιοχημικών και μοριακών δεικτών θα δώσει μια σαφέστερη εικόνα για τον προσδιορισμό των “refugia” για το παραπάνω είδος.

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

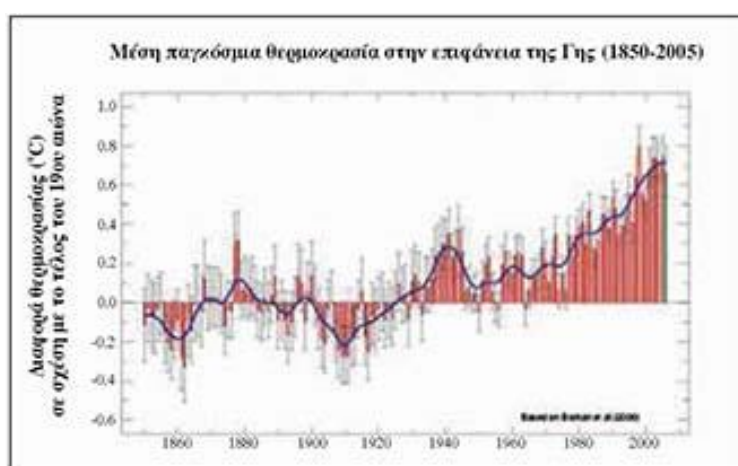
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Η κλιματική αλλαγή και τα refugia	9
1.2. Το μπλε καβούρι.....	10
1.3. Το Κύτταρο	12
1.4. Οξειδωτικό στρες και Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)	12
1.5. Αντιοξειδωτική άμυνα και ένζυμα.....	14
1.6. Βασικά ένζυμα	15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
2.1. Εφαρμογή πρωτοκόλλου TBARS	16
2.2. Ομογενοποίηση	16
2.3. Φυγοκέντρωση	17
2.4. Φασματοφωτόμετρο.....	18
2.5. Προετοιμασία ομογενοποιημάτων για τον προσδιορισμό της δραστικότητάς των μεταβολικών ενζύμων	19
2.5. Προετοιμασία ομογενοποιημάτων για τον προσδιορισμό της δραστικότητάς των μεταβολικών ενζύμων	22
2.7. Στατιστική ανάλυση	24
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
3.1. Θερμοκρασία.....	26
3.2 Αποτελέσματα βραγχίων (Gills)	27
3.3 Αποτελέσματα μυών (Muscle)	34
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	41
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42
6. ABSTRACT	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η κλιματική αλλαγή και τα refugia

Οι επιπτώσεις της αλλαγής του κλίματος παρατηρούνται ήδη σε διάφορους τομείς και οι απειλές της για την ανθρώπινη κοινωνία και τα φυσικά οικοσυστήματα έχουν αναδειχθεί σε ύψιστη προτεραιότητα από τη δημοσίευση της τέταρτης έκθεσης αξιολόγησης της Διακυβερνητικής Επιτροπής για την Κλιματική Αλλαγή (IPCC) το 2007 (Εικόνα 1). Η κλιματική αλλαγή αναφέρεται σε οποιαδήποτε αλλαγή του κλίματος στην πάροδο του χρόνου, εξ αιτίας της ανθρώπινης δραστηριότητας. Είναι μια αλλαγή στην κατάσταση του κλίματος, που μπορεί να προσδιοριστεί από τις αλλαγές στις μέσες τιμές και / ή στη μεταβλητότητα των ιδιοτήτων του και ότι εξακολουθεί να υφίσταται για μεγάλο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 1. Η αύξηση της μέσης θερμοκρασίας της γης κατά τα τελευταία 140 χρόνια (Πηγή: Intergovernmental Panel on Climate Change, O.H.E.)

Η κλιματική αλλαγή έχει άμεσες επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς που αφορούν κυρίως τις κυτταρικές λειτουργίες και τη φυσιολογία, και μπορεί να μεταβάλουν την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και τη θνησιμότητά τους.

Ενώ η σημασία της αλιείας και της υδατοκαλλιέργειας συχνά υποτιμάται, οι επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής για αυτούς τους τομείς και για τις παράκτιες και παραποτάμιες κοινότητες γενικά είναι δύσκολο να αγνοηθούν. Είτε άμεσα είτε έμμεσα, η κλιματική αλλαγή αναμένεται να επηρεάσει ευρέως τα οικοσυστήματα και τις κοινωνίες, αυξάνοντας την πίεση σε όλα τα μέσα διαβίωσης και τις προμήθειες τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων στον τομέα της αλιείας και της υδατοκαλλιέργειας.

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, αναπτύχθηκε η ιδέα των *refugia*, τα οποία είναι κατάλληλα ενδιαιτήματα διατήρησης ειδών, καθώς οι αλλαγές του κλίματος μπορεί να έχουν διαφορετική επίπτωση χωρικά. Γενικά ως *refugia* μπορούν να οριστούν βιότοποι ή περιβαλλοντικοί παράγοντες που συνδέονται με μορφολογικά, ιστορικά και χαρακτηριστικά συμπεριφοράς των οργανισμών που

μειώνουν τις επιπτώσεις διαταραχής (Lancaste, Belyea, 1997). Στη συγκεκριμένη έρευνα γίνεται αναφορά στα ενδιαιτήματα αυτά ανήκουν περιοχές λιγότερο επηρεασμένες από την κλιματική αλλαγή, καθώς συνίστανται ιδανικότερα οικοσυστήματα για την διατήρηση οργανισμών. Ο στόχος της παρούσας εργασίας, είναι ο εντοπισμός και η οριοθέτηση τέτοιων περιοχών με στόχο τη διατήρηση σημαντικά εμπορικών θαλάσσιων ειδών, όπως το μπλε καβούρι με βάσει βιοχημικών και φυσιολογικών αποκρίσεων.

Ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν τις παράκτιες περιοχές σε κάθε γεωγραφικό πλάτος, πέρα από την υπεραλίευση και την απώλεια ενδιαιτημάτων, συμβαίνει να είναι η εισαγωγή μη αυτόχθονων ειδών από πολικές σε εύκρατες και τροπικές ζώνες (Molnar et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρουσιαστεί αύξηση της συχνότητας εισαγωγής σε καρκινοειδή, όπως το μπλε καβούρι.

1.2. Το μπλε καβούρι

Το μπλε καβούρι (*Callinectes sapidus*) (Εικόνα 1.2) είναι ένα είδος καβουριού που προέρχεται από τα νερά του δυτικού Ατλαντικού Ωκεανού και του Κόλπου του Μεξικού και εισάγεται διεθνώς. Παρουσιάζει αρκετά υψηλή εμπορική αξία, καθώς έχει εδραιωθεί στην αγορά ανά τον κόσμο. Αποτελεί ένα είδος ευρύαλο και ευρύθερμο και είναι ικανό να αξιοποιεί μεταβατικά συστήματα, ποτάμια και παράκτιες περιοχές μέχρι τα βάθη των 90 μέτρων. Τα ενήλικα καβούρια έχουν τη τάση να παραμένουν σε βαθιά νερά, αλλά τα νεαρά, ειδικά, έρχονται στην ακτή σε ένα σημείο όπου το νερό έχει βάθος μόνο κάποια εκατοστά. Γενικά, όσο πιο κοντά στην ξηρά γίνονται οι παρατηρήσεις, τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των καβουριών.



Εικόνα 1.2. Απεικόνιση ατόμου του είδους *Callinectes sapidus* (Πηγή: <https://www.nwf.org/Educational-Resources/Wildlife-Guide/Invertebrates/Blue-Crab>)

Τόσο το υψηλό αναπαραγωγικό δυναμικό του *Callinectes sapidus*, η ταχύτατη γεννητική ωρίμανση και σωματική αύξηση, όσο και η ανταγωνιστική φύση του για πόρους και χώρο, αιτιολογούν την εξάπλωση του είδους. Ταυτόχρονα συμβάλουν στην εξάπλωση αυτή και η κλιματική αλλαγή στα φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα.

Κατά τη διάρκεια έρευνας της επιτροπής αξιολόγησης αποθεμάτων Chesapeake Bay (CBSAC) (Rugolo et al., 1997), αποκαλύφθηκαν στοιχεία ότι τα μπλε καβούρια επιτυγχάνουν ηλικία τουλάχιστον πέντε ετών, με βάση μια μελέτη επισημάνσεων της Βόρειας Καρολίνας (Fischler, 1965). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή καθώς και άλλα μη δημοσιευμένα δεδομένα προσθήκης ετικετών, η αξιολόγηση αποθεμάτων CBSAC υπέθεσε τη μέγιστη θεωρητική ηλικία είναι τα οκτώ έτη. Παρόλο που εμφανίζεται στα περισσότερα σημεία σε αυτό το τμήμα της ακτής, είναι ιδιαίτερα άφθονο στους κόλπους και τις εκβολές των ποταμών. Βρίσκεται κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού σε σχετικά ρηχά νερά αλλά σε μεγαλύτερα βάθη το χειμώνα. Αν και το φυσικό του μέσο είναι αλμυρό νερό, είναι γνωστές περιπτώσεις στις οποίες δείγματα έχουν βρεθεί σε υφάλμυρο. Τα ενήλικα καβούρια τείνουν να παραμένουν σε βαθιά νερά, αλλά οι νέοι, ειδικά, έρχονται στην ακτή σε ένα σημείο όπου το νερό έχει βάθος μόνο μερικές ίντσες. Γενικά, όσο πιο κοντά γίνεται η παρατήρηση, τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των καβουριών. Αναγνωρίζεται εύκολα από το χρώμα του σώματός του, που είναι γενικά έντονο μπλε κατά μήκος της μετωπικής περιοχής και των ποδιών, ειδικά κατά μήκος των δαγκάνων. Το μέγιστο πλάτος του κελύφους, όπως μετρείται στις άκρες των πλευρικών σπονδυλικών στηλών, είναι περίπου 25 εκατοστά. Στα αρσενικά τα πλάτη του καβουκιού φτάνουν συνήθως έως 20,9 εκατοστά και το μήκος φτάνει σε 9,1. Αντίστοιχα στα θηλυκά φτάνουν σε 20,4 εκατοστά πλάτος και 7,5 μήκος.

Το μπλε καβούρι είναι ένα πολύ προσαρμόσιμο είδος που έχει πολλές στρατηγικές αρπαγής και χαρακτηρίζεται από επιθετική συμπεριφορά (Millikin and Williams, 1984) έχει παρατηρηθεί ότι καταναλώνει ένα ευρύ φάσμα λείας όπως ζωντανά και νεκρά ψάρια, άλλα καβούρια, μύδια, σαλιγκάρια, χέλια, θαλάσσια φυτά και αποσυντεθειμένη βλάστηση. Γενικά τα ενήλικα άτομα του είδους αυτού τρέφονται με μαλάκια, καβούρια με μαλακό κέλυφος, ψάρια, στρείδια και οτιδήποτε άλλο μπορούν να συλλάβουν ή να σαρώσουν με επιτυχία. Τρώνε επίσης και άλλα μπλε καβούρια που είναι ακόμα μαλακά μετά από την έκδυση.

Η συχνότητα της ωοτοκίας εξαρτάται από το γεωγραφικό πλάτος, με δύο περιόδους ωοτοκίας, την άνοιξη και το καλοκαίρι. Τα αυγά του παραπάνω είδους μπορούν να είναι 750.000 με 8 εκατομμύρια και γεννιούνται δύο με εννέα μήνες μετά την γονιμοποίηση. Εκκολάπτονται σε υψηλής αλατότητας νερά από όρμους, ύδατα παράκτιων ζωνών, και εκβολές ποταμών και μεταφέρονται στον ωκεανό με την υποχώρηση παλιρροιών. Τα καβούρια ωριμάζουν στους 12 με 18 μήνες.

Το είδος αυτό είναι ένα από τα πιο επιτυχημένα αλλόχθονα δεκάποδα καρκινοειδή όσον αφορά τον βαθμό εγκλιματισμού, εγκατάστασης, εξάπλωσης καθώς και διαχρονικής παρουσίας του στις Ελληνικές θάλασσες (Κεβρεκίδης 2010). Με βάση διάφορων αναφορών από αλιεύσεις στον Όρμο Μεθώνης εντοπίστηκε η αύξηση της αφθονίας του είδους παρουσιάστηκε κατά τις δεκαετίες του 1950 και

1960, όπου σημειώθηκε και αντίστοιχη σημαντική εμπορική εκμετάλλευση. Ωστόσο, από τότε μέχρι πρόσφατα, ο πληθυσμός του καβουριού παρέμεινε σχετικά σε χαμηλά επίπεδα.

Συστηματική Ταξινόμηση του Μπλε Καβουριού

Βασίλειο (Kingdom)	Animalia
Φύλο (Phylum)	Arthropoda
Υποφύλο (Subphylum)	Crustacea
Κλάση (Class)	Malacostraca
Τάξη (Order)	Decapoda
Οικογένεια (Family)	Portunidae
Γένος (Genus)	<i>Callinectes</i>
Είδος (Species)	<i>C. sapidus</i>

1.3. Το Κύτταρο

Το κύτταρο είναι η βασική δομική και λειτουργική μονάδα όπου εκδηλώνεται το φαινόμενο της ζωής. Αντιπροσωπεύεται από μια συστηματικά οργανωμένη ομάδα μορίων, που βρίσκονται σε δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Το κύτταρο οργανώνεται φυσικοχημικά και μορφολογικά και φέρει την ικανότητα της αφομοίωσης, ανάπτυξης και αναπαραγωγής. Οι οργανισμοί διακρίνονται σε μονοκύτταρους και πολυκύτταρους, ανάλογα με το συνολικό αριθμό των κυττάρων τους. Μεγάλες ομάδες ομοειδών κυττάρων δημιουργούν ιστούς. Το κυριότερο οργανίδιο του κυττάρου είναι ο πυρήνας και λειτουργεί σαν τον εγκέφαλο του και ανάλογα με την ύπαρξη του πυρήνα ή μη τα κύτταρα διακρίνονται σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά.

1.4. Οξειδωτικό στρες και Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS)

Προκειμένου τα κύτταρα να διατηρήσουν την ομοιόσταση και τη λειτουργικότητά τους, επιβάλλεται να ανταλλάσσουν αδιάκοπα ουσίες από και προς το περιβάλλον τους (εισαγωγή και αποβολή χρησίμων και άχρηστων ουσιών αντίστοιχα). Ωστόσο, πέρα από την ανταλλαγή των ουσιών, για την κάλυψη κυρίως των μεταβολικών αναγκών, συμβαίνει και ανταλλαγή «μηνυμάτων» για την επικοινωνία του κυττάρου με το περιβάλλον, με στόχο την ρύθμιση και εναρμόνιση των λειτουργιών των επιμέρους τμημάτων του. Αυτή η αμφίδρομη ανταλλαγή πραγματοποιείται μέσω της πλασματικής ή κυτταρικής μεμβράνης, η οποία περιβάλλει το κύτταρο, ξεχωρίζοντας το από το περιβάλλον. Η μεμβράνη αυτή λιποειδές υγρό καθώς δομείται ως επί το πλείστον από πρωτεΐνες (55%),

φωσφολιπίδια και χοληστερόλη (42%) και σάκχαρα (3%). Τα φωσφολιπίδια της πλασματικής μεμβράνης οργανώνονται σε δύο στιβάδες, όπου ανάμεσα είναι ενσωματωμένες οι πρωτεΐνες. Ανάλογα με τον ρόλο τους, οι πρωτεΐνες αυτές καταλαμβάνουν διαφορετικές θέσεις. Τα κύτταρα αποτελούνται από μόρια ενωμένα μεταξύ τους. Η ένωση των μορίων επιτυγχάνεται χάρη στην ικανότητα των ηλεκτρονίων (e-) να δημιουργεί χημικούς δεσμούς μεταξύ τους. Οι δεσμοί αυτοί συμβαίνει να διασπώνται με αποτέλεσμα την δημιουργία ασταθών μορίων, με ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο διαθέσιμο για τη δημιουργία νέου δεσμού. Τα προκύπτοντα αυτά μόρια ονομάζονται **ελεύθερες ρίζες** (Oxygen Free Radical / ORFs). Το ηλεκτρόνιο που έμεινε διαθέσιμο για δεσμό των ελεύθερων ριζών, σχηματίζει ζεύγος με άλλα ηλεκτρόνια γειτονικών μορίων, το οποίο οδηγεί στη δημιουργία νέων ασταθών μορίων. Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όχι μόνο από τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, κατά τη διάρκεια της αναπνοής και του μεταβολισμού, αλλά επηρεάζονται και από εξωγενείς παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, η ραδιενεργός ακτινοβολία, το όζον, η περιβαλλοντική μόλυνση, τα φάρμακα. Σε έναν βαθμό ο οργανισμός τις χρησιμοποιεί για την άμυνά του (π.χ. για να καταστρέψει κάποιο βακτηρίδιο). Υπό κανονικές συνθήκες, ο οργανισμός διατηρεί αυτές τις ρίζες σε πολύ στενό έλεγχο και ισορροπία.

Όταν η ισορροπία αυτή διαταράσσεται, λόγω της πολλαπλής δημιουργίας ελεύθερων ριζών, προκαλείται η οξειδωση των κυττάρων του οργανισμού και συμβαίνει αυτό που ονομάζεται **οξειδωτικό στρες**. Στην ουσία προκαλείται διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να διορθώνει τις βλάβες που προκαλούν. Αυτές οξειδωτικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν τα συστατικά του κυττάρου, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA του. Έτσι το οξειδωτικό στρες οδηγεί στην καταστροφή των κυττάρων και κατά συνέπεια στη φθορά του ιστού.

Οι **δραστικές μορφές οξυγόνου** (Reactive Oxygen Species / ROS) που αποτελούν κάποια από τα βασικότερα είδη ασταθών μορίων που οδηγούν στη δημιουργία του παραπάνω φαινομένου, ταξινομούνται στις παρακάτω τέσσερις κατηγορίες:

- **Ελεύθερες ρίζες**, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$)
- **Ιόντα**, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσταση του υποχλωριώδους οξέως (HClO),
- **Συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων**, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$)
- **Μόρια**, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

1.5. Αντιοξειδωτική άμυνα και ένζυμα

Προκειμένου να διατηρηθεί η κυτταρική ομοιόσταση, είναι απαραίτητο να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ δημιουργίας και αδρανοποίησης των ROS. Η άμυνα των οργανισμών εναντίον των σχηματιζόμενων ριζών περιλαμβάνει μία σειρά

ουσιών, οι οποίες καλούνται αντιοξειδωτικά. Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν φυσικές ή τεχνητές ουσίες του οργανισμού που βοηθούν στη δέσμευση ελεύθερων δραστικών ριζών, γι' αυτό και αλλιώς ονομάζονται περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών. Αποτελούν μέσο προσφοράς του ηλεκτρονίου που αναζητούν οι ελεύθερες ρίζες. Η παραπάνω δέσμευση έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας και τη διαφύλαξη του κυττάρου. Περιλαμβάνουν βιταμίνες, ιχνοστοιχεία μετάλλων, φυτικές ουσίες και ένζυμα, ιδιαίτερα δραστικά, που προσλαμβάνει με τη διατροφή. Ικανοποιητικά επίπεδα αντιοξειδωτικών παραγόντων μπορούν να αντιμετωπίσουν σύντομες περιόδους οξειδωτικού στρες, ενώ παρατεταμένες περιόδους οξειδωτικού στρες εξαντλούν τα αποθέματα των αντιοξειδωτικών παραγόντων του οργανισμού.

Τα βασικότερα ένζυμα της αντιοξειδωτικής άμυνας που προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες, που διαθέτει το κύτταρο είναι τα εξής:

- **Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)**, που καταλύει την αντίδραση:
 $\cdot\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ είναι ένα ένζυμο που παρέχει ισχυρή αντιοξειδωτική άμυνα στα περισσότερα ζωντανά κύτταρα που εκτίθενται σε οξυγόνο. Ανάλογα με το μέταλλο που απαιτείται για την εκδήλωση της ενζυμικής δράσης, χωρίζεται και σε επιπρόσθετες υποκατηγορίες ειδών SOD όπως Mn-SOD και Fe-SOD. Το SOD καταλύει τη διάσπαση της ρίζας υπεροξειδίου, O_2^- , είτε σε μοριακό οξυγόνο (O_2) είτε σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Το H_2O_2 παράγεται ως υποπροϊόν του μεταβολισμού του οξυγόνου και αν η περιεκτικότητά του δεν ρυθμίζεται, προκαλεί κυτταρικές βλάβες.
- **Η καταλάση (CAT)** που καταλύει την αντίδραση:
 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, είναι ένα ένζυμο που ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα και βρίσκεται στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς που εκτίθενται σε οξυγόνο. Καταλύει την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2). Ένα μόριο του ενζύμου αυτού είναι ικανό να μετατρέψει εκατομμύρια μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο ανά δευτερόλεπτο. Αποτελεί τετραμερές βιομόριο τεσσάρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, με μήκος πάνω από 500 αμινοξέα. Η ενεργή περιοχή κάθε υπομονάδας της καταλάσης περιέχει ένα μόριο NADPH.
- **Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR)** που καταλύει την αντίδραση:
 $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$. Εξειδικεύεται στην μείωση της λιπιδικής υπεροξειδίωσης χρησιμοποιώντας την γλουταθειόνη, η οποία οξειδώνεται. Όλες οι γνωστές GPxs περιέχουν σελήνιο (Se). Χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα για την κατάλυση τη σουλφυδρυλική μορφή της γλουταθειόνης (GSH). Πέραν του υπεροξειδίου του υδρογόνου ανάγει και άλλα είδη υπεροξειδίων όπως το ROOH σε ROH.

1.6. Ένζυμα του βασικού μεταβολισμού

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που καταλύουν χημικές αντιδράσεις (ενζυμικές αντιδράσεις) στους οργανισμούς και συμμετέχουν στον μεταβολισμό τους. Ως καταλύτες επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις μειώνοντας την ενέργεια

ενεργοποίησης. Τα ένζυμα παρουσιάζουν διαφόρων βαθμών εξειδίκευση προς το αντιδρών.

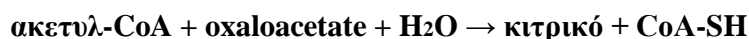
Ορισμένα ένζυμα που συμμετέχουν σε διεργασίες του βασικού μεταβολισμού είναι τα παρακάτω:

- Η **αφυδρογονάση γαλακτικού οξέος (L-LDH)**, είναι το κυτταροπλασματικό ένζυμο που καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ στον κύκλο της γλυκόλυσης. Σε περίπτωση διατάραξης της ομοιόστασης εντοπίζονται αυξημένα επίπεδα LDH στο αίμα, από περιβαλλοντικούς ή παθολογικούς παράγοντες. Ο ρόλος της γαλακτικής αφυδρογονάσης είναι η κατάλυση του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ ενώ παράλληλα των το NAD^+ σε NADH και αντίστροφα.

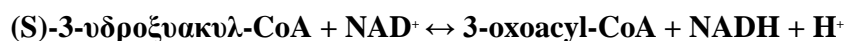


Σε περίπτωση παρουσίασης υψηλών συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος στον οργανισμό, το ένζυμο αναστέλλεται μέσα από το φαινόμενο της αντίστροφης ανάδρασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού μετατροπής του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό.

- Το ένζυμο **συνθετάση του κιτρικού (CS)**, δρα στο πρώτο από τα οκτώ βήματα του του κιτρικού οξέος ή κύκλου Krebs, βοηθά την ακετυλομάδα του ακετυλο-CoA μεταφέρεται στο οξαλοξικό κατά την μετατροπή του κιτρικού οξέος 13 σε ισοκιτρικό. Η δράση του σχετίζεται την κατάλυση της αντίδρασης συμπύκνωσης δύο ατόμων άνθρακα, χάρη στο ακετυλο-CoA και ένα μόριο τεσσάρων ατόμων άνθρακα οξαλοξικού οξέος, που περιέχει, για το σχηματισμό κιτρικού με έξι άτομα άνθρακα.



- Η αφυδρογονάση του **β -υδροξυακυλο-CoA (HOAD)** συμμετέχει στο τρίτο βήμα της β -οξειδωσης των λιπαρών οξέων, στην οξείδωση του L-3-υδροξυακυλ CoA από NAD^+ .



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πραγματοποιήθηκαν εποχικές δειγματοληψίες, τον Απρίλιο, τον Ιούνιο, τον Νοέμβριο και τον Ιανουάριο, ατόμων του είδους *Callinectes sapidus* από το Θερμαϊκό, Παγασητικό και Βιστωνικό κόλπο.

2.1. Εφαρμογή πρωτοκόλλου TBARS

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την έρευνα ήταν η μέθοδος TBARS ή Ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ. Ο προσδιορισμός των TBARS υπολογίζει την μηλονική διαλδεύδη (MDA) που περιέχεται στο δείγμα, όπως επίσης και την MDA που δημιουργείται από τις λιπιδικές υδροπεροξειδάσες κάτω από τις υδρολυτικές συνθήκες της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας θειοβαρβιτουρικό οξύ ως αντιδραστήριο. Το πρωτόκολλο TBARS εφαρμόστηκε στα βράγχια και τους μυς του μπλε καβουριού και προκειμένου να πραγματοποιηθεί το πείραμα έγινε χρήση διάφορων αναλώσιμων.

Το πρωτόκολλο ακολουθήθηκε ως εξής:

1. Ιστός βάρους 1/10 w/w ομογενοποιήθηκε σε φωσφορικό buffer 50 mM pH 7,4
2. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε αρχικά σε 2.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C.
3. Το βασικό χημικό μείγμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε σε 1l: 250ml TCA (20%) + 500ml Θειοβαρβιτουρικό οξύ (0.67%) σε 0,25N HCl που περιείχαν 10mM Βούτυλο-υδροξυτολουένη (διαλυμένη σε 100% αιθανόλη).
4. Το δείγμα βράζεται για 60 λεπτά
5. Αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου
6. Προστίθεται σε κάθε δείγμα 1 ml βουτανόλης
7. Επόμενη φυγοκέντρηση σε 3.000 g για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου
8. Αφαιρείται η υπερκείμενη φάση της βουτανόλης και μετρούνται τα επίπεδα TBARS στα 532 nm.

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες 100 – 1.000 μl, ομογενοποιητής, ζυγαριά ακριβείας, φυγόκεντρος, πλαστική κυψελίδα και tubes καθώς και πολλά αναλώσιμα. Αναλυτικότερα, το βασικό χημικό μείγμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε σε 1l: 250ml TCA (20%) + 500ml Θειοβαρβιτουρικό οξύ (0.67%) μέσα σε 0,25N HCl που περιείχαν 10mM Βούτυλο-υδροξυτολουένη (διαλυμένη σε 100% αιθανόλη). Έπειτα τοποθετήθηκε το ομογενοποιημένο δείγμα ιστού, του οποίου το βάρος ήταν το 1/10 w/w του συνολικού μείγματος, στην πλαστική κυψελίδα. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε αναλύεται παρακάτω πιο διεξοδικά.

2.2. Ομογενοποίηση

Για την ομογενοποίηση έγινε χρήση κοινού ομογενοποιητή (Εικόνα 2.1) με φωσφορικό buffer (50mM pH 7,4) και το 1/10 της ποσότητας ιστού από βράγχια ή μυ του είδους *Callinectes sapidus* που συλλέχθηκε από τον Βισθωνικό, τον Θερμαϊκό και τον Παγασητικό κόλπο. Το βάρος των δειγμάτων του ιστού υπολογίστηκε με ζυγαριά ακριβείας.



Εικόνα 2.1. Απεικόνιση ομογενοποιητή (Από: <https://www.manischemicals.com>)

2.3. Φυγοκέντρωση

Στη συνέχεια, η φυγοκέντρωση (Εικόνα 2.2) έγινε με στόχο τον διαχωρισμό του δείγματος μέτρησης από τα υπόλοιπα συστατικά του μείγματος. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε φυγόκεντρο ψύξης. Το δείγμα, έπειτα από την ομογενοποίηση του δείγματος ιστού με φωσφορικό buffer, προστέθηκε σε μικρά tubes. Τα τελευταία, τοποθετήθηκαν στις εσοχές στη φυγόκεντρο αντιδιαμετρικά και φυγοκεντρήθηκαν σε πρώτη φάση σε 2.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C. Έπειτα, τα tubes μεταφέρθηκαν με πιπέτα 250 μl του υπερκείμενου δείγματος, και τους προστέθηκαν 250 μl TCA και 500 μl Θειοβαρβιτουρικό οξύ (0.67%) μέσα σε 0,25N HCl που περιείχαν 10mM Βούτυλο-υδροξυτολουένη (διαλυμένη σε 100% αιθανόλη), και μπήκε για βράσιμο στους 90°C. Αφότου έβρασε για 60 λεπτά, εμφανίστηκε η επιθυμητή χρωματική αλλαγή το πέρας ογκομέτρησης και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγκο μέχρι να κρυώσουν. Αφότου έφτασαν σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε σε κάθε δείγμα 1 ml βουτανόλης, και τα δείγματα τοποθετήθηκαν εκ νέου σε μικρά tubes, φυγοκεντρήθηκαν για άλλη μια φορά στις 3.000 στροφές για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ψύξη.



Εικόνα 2.2. Απεικόνιση τυπικής φυγόκεντρου ψύξης. (Από: <https://www.digas.gr>)

2.4. Φασματοφωτόμετρο

Έπειτα από την τελευταία φυγοκέντρωση, αφαιρέθηκε η υπερκείμενη φάση της βουτανόλης και για κάθε μείγμα τοποθετήθηκε σε ξεχωριστές πλαστικές κυψελίδες. Στη συνέχεια μετρήθηκε η φάση της βουτανόλης στο φασματοφωτόμετρο, στα 532 nm. Το φασματοφωτόμετρο (Εικόνα 2.3) είναι όργανο το οποίο μετρά την ένταση μιας επιλεγμένης συχνότητας ακτινοβολίας.



Εικόνα 2.3. Απεικόνιση ενός τυπικού φασματοφωτόμετρου. (Από <https://www.analytika.gr>)

2.5. Προετοιμασία ομογενοποιημάτων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητάς των μεταβολικών ενζύμων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία ομογενοποιημάτων για τον προσδιορισμό των παρακάτω δραστηριοτήτων των ενζύμων:

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

Το διάλυμα ομογενοποίησης για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων αποτελείται από

- 1 mM EDTA,
- 2 mM MgCl₂,
- 50 mM ιμιδαζολίου, σε pH=7,6 στους 24°C, το οποίο διατηρείται σε ψυγείο. Το ομογενοποίημα έπειτα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 7.000 στροφές.

Με βάση το μοριακό βάρος των παραπάνω ουσιών και της γραμμομοριακότητας τους, σε 0,1 λίτρο διαλύματος αντιστοιχούν:

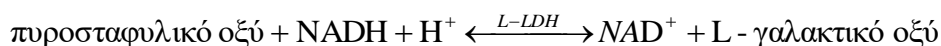
- EDTA: 0,037224gr
- MgCl₂: 0,04066gr
- Ιμιδαζολίο: 0,3404gr

Το διάλυμα ομογενοποίησης διατηρείται σε θερμοκρασία 4-8 °C, όσο λαμβάνει χώρα η ομογενοποίηση των ιστών παραμένει σε πάγο. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε γυάλινο ομογενοποιητή ο οποίος περιείχε τετραπλάσιο όγκο διαλύματος ομογενοποίησης. Όσον αφορά την L-LDH η αραιώση ήταν 1:5. Το ομογενοποίημα στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 7.000 στροφές. Στην περίπτωση της L-LDH, το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται για 15min στους 5°C στις 13.000 στροφές σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο αφότου συλλεχτεί, χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων.

Ρυθμίζεται το φωτόμετρο ως προς τη θερμοκρασία και το μήκος κύματος, και τοποθετούνται τα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου στην πλαστική κυψελίδα και αναδεύουμε με γυάλινη πιπέτα Pasteur. Στο τέλος προστίθεται το διάλυμα του ομογενοποιημένου ιστού στην κυψελίδα. Έπειτα λαμβάνει χώρα η φωτομέτρηση και προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου σύμφωνα με τους Passonneau & Lowry (1993).

Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)

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



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

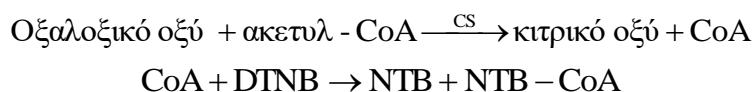
ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (L-LDH) E.C. 1.1.1.27
--

0,5	ml Imidazole Buffer 50mM (pH=7, θ=37°C)
0,01	ml NADH 0,15mM
0,02	ml Pyruvate 1mM
0,02	ml KCN 1mM
0,002	ml δείγματος
0,448	ml 2d-H₂O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm για 5 λεπτά.

Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)

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



Το CoA μειώνει στοιχειομετρικά το αντιδραστήριο του Ellman διθειο-1,4-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB), αυξάνοντας έτσι την απορρόφηση, λόγω παραγωγής του 2-νιτρο-5-θειο-βενζοϊκού οξέος (NTB), το οποίο έχει έντονο κίτρινο χρώμα. Στην κυψελίδα τελικού όγκου 1ml προστέθηκαν 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης (50mM, pH=7,5 στους 37°C), 0,02ml DTNB (0,25mM), 0,02ml οξαλοξικού οξέος (0,5mM), 0,01ml ακετυλ-CoA (0,4mM), 0,02ml KCN (1mM), 0,02ml δείγματος ιστού και 0,410ml 2d-H₂O. Στον μάρτυρα δεν προστέθηκε οξαλοξικό οξύ. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2 λεπτά (Kanatous *et al.* 2002).

ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (CS)

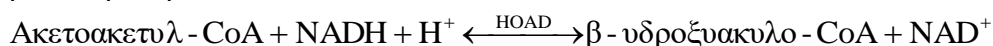
E.C. 4.1.3.7

0,5	ml Imidazole Buffer 50mM (pH=7,5, θ=37°C)
0,02	ml DTNB 0,25mM
0,01	ml ακετυλ-CoA 0,4mM
0,02	ml KCN 1mM
0,02	ml Oxaloacetate 0,5mM
0,02	ml δείγματος
0,410	ml 2d-H₂O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 412nm για 2 λεπτά.

Αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο-CoA (HOAD)

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



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

ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ ΤΟΥ Β-ΥΔΡΟΞΥΑΚΥΛΟ-CoA (HOAD)

E.C. 1.1.1.35

0,5	ml Imidazole Buffer 50mM (pH=7, θ=37°C)
0,01	ml NADH 0,15mM
0,02	ml EDTA 1mM
0,01	ml ακετοακυλο-CoA 0,1mM
0,02	ml KCN 1mM
0,02	ml δείγματος
0,420	ml 2d-H₂O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm για 10 λεπτά για το λευκό μυ και 2 λεπτά για τον ερυθρό και τον καρδιακό μυ.

2.6. Προετοιμασία ομογενοποιημάτων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητάς των αντιοξειδωτικών ενζύμων

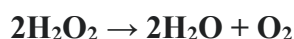
Προετοιμασία ομογενοποιημάτων για τον προσδιορισμό των ενζυμικών δραστηριοτήτων των παρακάτω αντιοξειδωτικών ενζύμων:

- Καταλάση (CAT)
- Ρεδουκτάση της Γλουταθειόνης (GR)
- Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Το διάλυμα ομογενοποίησης για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελείται από φωσφορικά 50 mM σε pH=7,4 στους 24°C, το οποίο διατηρείται σε ψυγείο. Το διάλυμα ομογενοποίησης διατηρείται σε θερμοκρασία 4-8°C, και κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης των ιστών παραμένει σε πάγο. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ενζύμων οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε γυάλινο ομογενοποιητή που περιείχε 10πλάσιο όγκο διαλύματος ομογενοποίησης (10% w/v). Έπειτα φυγοκεντρήθηκε το ομογενοποίημα για 15 λεπτά στα 2.000g στους 4°C. Αφότου απομονώθηκε το υπερκείμενο, ψύχθηκε και αποψύχθηκε 3 φορές ώστε να σπάσουν οι μιτοχονδριακές μεμβράνες. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 6.000 στροφές στους 4°C. Μετά τη ρύθμιση του φωτομέτρου όσον αφορά τη θερμοκρασία και το μήκος κύματος, τοποθετήθηκαν τα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου στην κυψελίδα και αναδεύτηκαν με γυάλινη πιπέτα Pasteur. Στο τέλος προστέθηκε το διάλυμα του ομογενοποιημένου ιστού στην πλαστική κυψελίδα. Έπειτα ακολούθησε φωτομέτρηση και προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου σύμφωνα με τους Passonneau & Lowry (1993).

Καταλάση (CAT)

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



Στην κυψελίδα τελικού όγκου προστέθηκαν 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50 mM, pH=7,4), 0,3 ml H₂O₂ (30 mM) (0,34 ml 30% H₂O₂ σε 100 ml του παρα-πάνω διαλύματος φωσφορικών) και 0,01 ml δείγματος ιστού. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 240 nm.

ΚΑΤΑΛΑΣΗ (CAT)	
1	ml phosphate Buffer 50 mM (pH=7,4)
0,3	ml H₂O₂ 30 mM
0,01	ml δείγματος

Ρεδοκτάση της Γλουταθειόνης (GR)

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



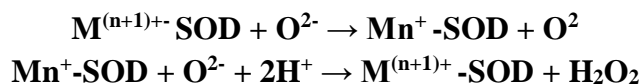
Σε κυψελίδα τελικού όγκου 1 ml προστέθηκαν 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50mM, pH=7,4), 0,01 ml NADPH (0,15 mM), 0,02 ml EDTA (2 mM) και 0,01 ml δείγματος και 0,450 ml απιονισμένου H₂O. Με την προσθήκη 0,01 ml GSSG (oxidized glutathione – οξειδωμένη γλουταθειόνη) (1 mM) ξεκίνησε η αντίδραση.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

ΠΕΔΟΥΚΤΑΣΗΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GR)

0,5	ml phosphate Buffer 50 mM (pH=7,4)
0,01	ml NADPH 0,15 mM
0,02	ml EDTA 2 mM
0,01	ml GSSG 1mM
0,01	ml δείγματος
0,460	ml 2d-H₂O

Δισμουτάση του Υπεροξειδίου (SOD)

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



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

ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ ΤΟΥΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ (SOD)

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

Σε όλα τα παραπάνω μεταβολικά και αντιοξειδωτικά, η μέγιστη δραστηκότητα (U_{max}) των ενζύμων, σε $\mu\text{moles/g}$ υγρού βάρους ιστού/λεπτό, υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

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

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

2.7. Στατιστική ανάλυση

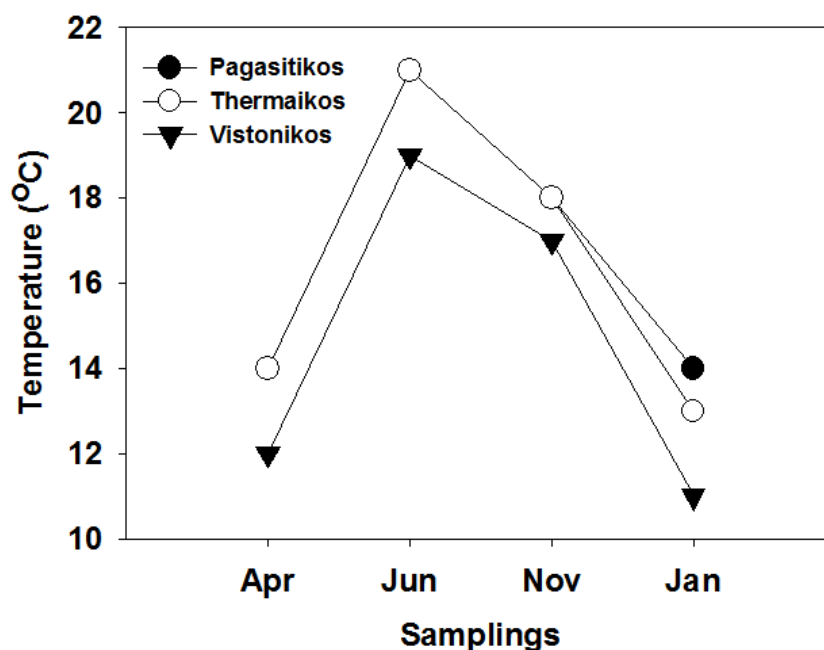
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την βοήθεια του στατιστικού προγράμματος Graphpad Istat 3.0 όσον αφορά τα αποτελέσματα με την ανάλυση διακύμανσης, 1 Way ANOVA και το Graphpad Prism 5.0 όσον αφορά την ανάλυση των αποτελεσμάτων με την ανάλυση διακύμανσης, 2 Way ANOVA. Για τον επανέλεγχο των αποτελεσμάτων που αναλύθηκαν με 2 Way ANOVA, χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Friedman test με το Dunn για post test. Ενώ για τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν με 1 Way ANOVA το post test που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Bonferroni. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται τα στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η αυξημένη παραγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων, που εκφράζεται ως αυξημένη συγκέντρωση του βιολογικού στρες στον οργανισμό, παριστάνεται μαθηματικά με την αποτύπωση του Νόμου **Beer – Lambert** ($A=E \times d \times C$), συγκεκριμένα με την αύξηση της συγκέντρωσης C. Από το νόμο αυτόν, διαπιστώνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης C, οδηγεί στη γραμμική αύξηση της τιμής της απορρόφησης A. Το d που είναι η απόσταση που διανύει η ακτινοβολία στο διάλυμα, ήταν ίδιο για όλα τα δείγματα, εφόσον μετρήθηκαν σε πλαστικές κυψελίδες ίδιου μεγέθους, καθώς επίσης και η σταθερά E, που εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την πίεση, το διάλυμα και το διαλύτη, που ήταν σταθερά για κάθε δείγμα. Η αυξημένη συγκέντρωση υποδεικνύει την αυξημένη παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων. Επομένως προκύπτει το συμπέρασμα ότι όσο πιο μεγαλύτερη η τιμή της απορρόφησης ανά περιοχή για κάθε δείγμα, τόσο πιο έντονο το βιολογικό στρες που βιώνει ο οργανισμός στην περιοχή εκείνη. Η παρουσία έντονου βιολογικού στρες των οργανισμών, με τη σειρά τους υποδεικνύουν την ακαταλληλότητα του περιβάλλοντος διαβίωσης. Κατά αυτόν τον τρόπο μέσα από την σύγκριση των αποτελεσμάτων του φασματοφωτόμετρου, εντοπίζεται η χαμηλότερη κατά μέσο όρο απορροφητικότητα των δειγμάτων μιας περιοχής σε σχέση με μια άλλη σηματοδοτεί τις περισσότερο ιδανικές περιβαλλοντικές συνθήκες διαβίωσης που επικρατούν για το μπλε καβούρι (*Callinectes sapidus*).

Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση των δραστικότητας των ενζύμων κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (π.χ. L-LDH βράγχια - Παγασητικός: $5,67 \pm 0,97$, Θερμαϊκός: $3,87 \pm 1,07$, Βιστωνικός: $5,87 \pm 1,24$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$) σε σχέση με τις δειγματοληψίες της άνοιξης (π.χ. L-LDH βράγχια - Παγασητικός: $10,28 \pm 2,39$, Θερμαϊκός: $8,35 \pm 0,59$, Βιστωνικός: $8,29 \pm 2,2$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$) και του φθινοπώρου (π.χ. L-LDH βράγχια - Παγασητικός: $15,51 \pm 2,03$, Θερμαϊκός: $13,06 \pm 3,03$, Βιστωνικός: $15,43 \pm 1,53$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$). Όσον αφορά τις τοποθεσίες συλλογής, υψηλότερες τιμές δραστικότητας παρατηρήθηκαν στον Παγασητικό (π.χ. άνοιξη – βράγχια, L-LDH: $10,28 \pm 2,39$, HOAD: $0,93 \pm 0,01$, CS: $1,36 \pm 0,07$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$), και χαμηλότερες στο Βιστωνικό (π.χ. άνοιξη – βράγχια, L-LDH: $8,29 \pm 2,1$, HOAD: $0,61 \pm 0,09$, CS: $0,97 \pm 0,04$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$).

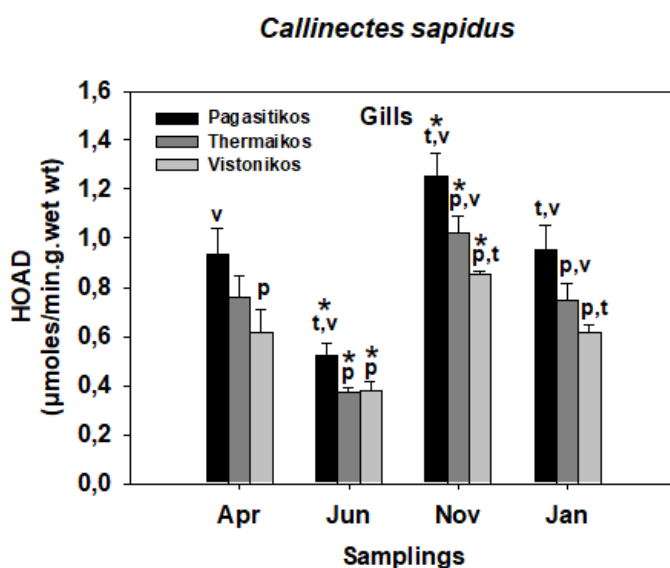
3.1. Θερμοκρασία



Εικόνα 3.1. Η θερμοκρασία της θάλασσας των δειγματοληπτικών περιοχών, ως προς τις εποχές της δειγματοληψίας

Από τη μέτρηση της θερμοκρασίας της θάλασσας στις περιοχές δειγματοληψίας, φάνηκε διαφορά σε όλη την περίοδο του έτους ανάμεσα στους κόλπους που μελετήθηκαν. Δηλαδή τα επίπεδα της θερμοκρασίας του Βιστωνικού κόλπου μετρήθηκαν σταθερά χαμηλότερα σε όλες τις εποχές σε σχέση με τον Θερμαϊκό και τον Παγασητικό κόλπο. Παράλληλα φαίνεται πως στους τελευταίους κόλπους οι θερμοκρασίες είναι ίδιες σε όλες τις εποχές εκτός της δειγματοληψίας του χειμώνα, όπου στον Θερμαϊκό παρουσιάζεται χαμηλότερη θερμοκρασία από εκείνη του Παγασητικού.

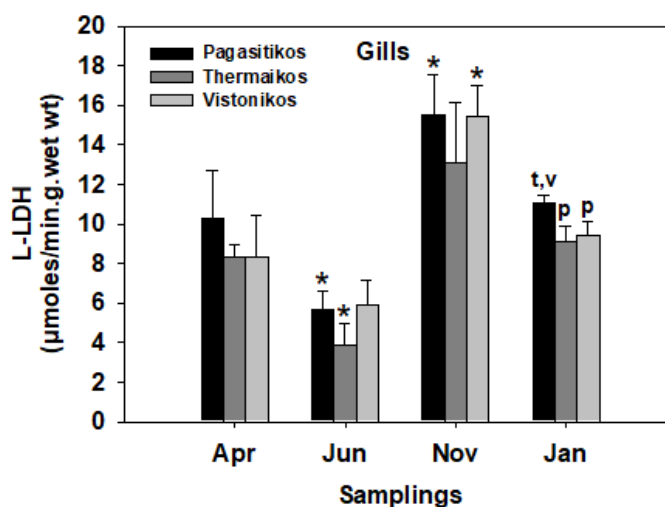
3.2. Αποτελέσματα βραγχίων



Εικόνα 3.2. Αποτελέσματα της δραστηριότητας της 3-υδροξυ-CoA αφυδρογονάση (HOAD) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρείται η ιδιαίτερα αυξημένη τιμή της δραστηριότητας της HOAD στην περιοχή του Παγασητικού κόλπου και στις τέσσερις εποχές δειγματοληψίας, ιδίως τον Νοέμβριο, ενώ τον Ιούνιο σημειώνονται οι χαμηλότερες τιμές δραστηριότητας. Στις δειγματοληψίες του Απριλίου, του Νοεμβρίου και του Ιανουαρίου φαίνεται πως οι τιμές δραστηριότητας της HOAD του Θερμαϊκού είναι πιο αυξημένες από αυτές του Βιστωνικού, ενώ τον Ιούνιο δε παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά.

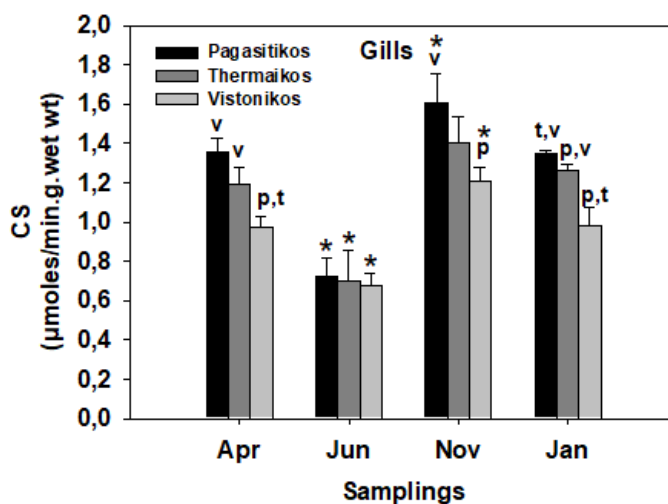
Callinectes sapidus



Εικόνα 3.3. Αποτελέσματα της δραστηριότητας της γαλακτικής αφυδρογονάση (L-LDH) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. ($p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).*

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται οι έντονα αυξημένες τιμές της δραστηριότητας της L-LDH τον μήνα του Νοεμβρίου κυρίως στον Παγασητικό και τον Βισθωνικό κόλπο, ενώ τον Ιούνιο παρουσιάζονται οι χαμηλότερες τιμές δραστηριότητας της L-LDH, ιδίως στον Θερμαϊκό. Στις δειγματοληψίες του Απριλίου και τον Ιανουαρίου φαίνεται πως οι τιμές δραστηριότητας του ενζύμου είναι υψηλότερες στον Παγασητικό, ενώ στους άλλους δύο δε παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά.

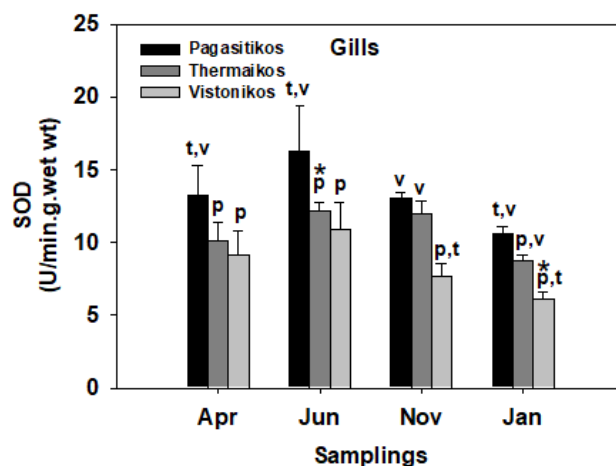
Callinectes sapidus



Εικόνα 3.4. Αποτελέσματα της δραστηριότητας της **συνθετάσης του κιτρικού (CS)** ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην εικόνα 3.4. παρατηρούνται οι χαμηλότερες τιμές δραστηριότητας της συνθετάσης του κιτρικού οξέος (CS) στη δειγματοληψία του Ιουνίου και οι υψηλότερες στη δειγματοληψία του Νοεμβρίου, κυρίως στον Παγασητικό. Γενικά ο Παγασητικός παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές δραστηριότητας CS, ενώ ο Βιατωνικός τις μικρότερες.

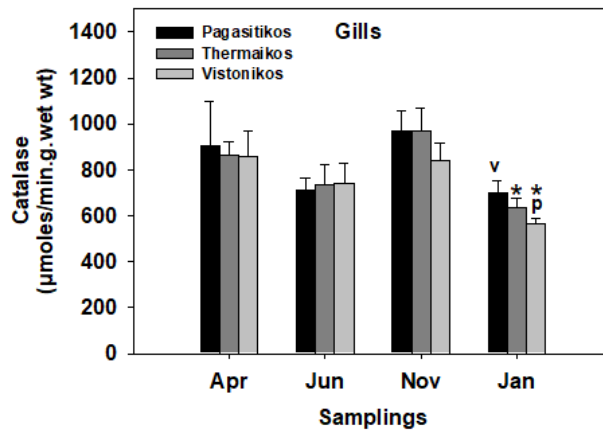
Callinectes sapidus



Εικόνα 3.5. Αποτελέσματα της δραστικότητας της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην εικόνα 3.5 παρουσιάζεται η δραστικότητα της SOD, που σε όλες τις εποχές φαίνεται πως η πιο αυξημένη είναι στον Παγασητικό, ιδίως στην δειγματοληψία του Ιουνίου. Ακολουθεί η αυξημένη δραστικότητα SOD στον Θερμαϊκό και τέλος στον Βιστωνικό, η μικρότερη δραστικότητα παρουσιάζεται τον Ιανουάριο.

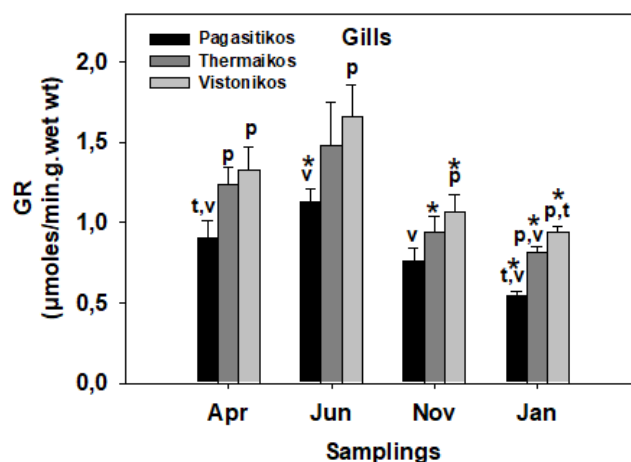
Callinectes sapidus



Εικόνα 3.6. Αποτελέσματα της δραστηριότητας της καταλάσης (Catalase) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην εικόνα 3.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της καταλάσης (Catalase). Μεταξύ των κόλπων δε παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Μικρότερη δραστηριότητα του ενζύμου εντοπίζεται στην δειγματοληψία του Ιανουάριου και η μεγαλύτερη δραστηριότητα παρατηρείται στην εκείνη του Νοεμβρίου, χωρίς ωστόσο να υπάρχει έντονη διαφορά.

Callinectes sapidus

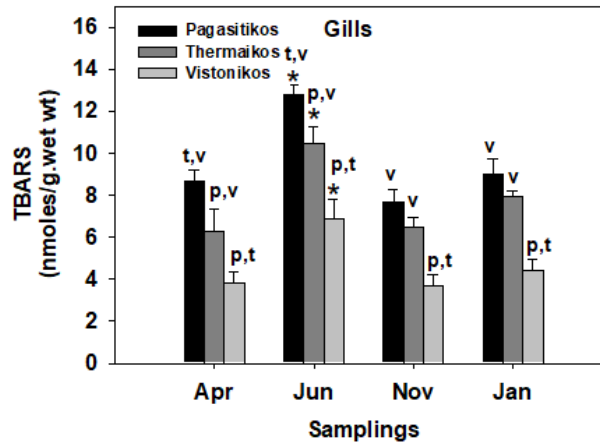


Εικόνα 3.7. Αποτελέσματα της δραστηριότητας της ρεδοκτάση ή υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GR) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών.

(* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η ιδιαίτερα αυξημένη δραστηριότητα της GR στον Βιστωνικό κόλπο ιδιαίτερα κατά τη δειγματοληψία του Ιουνίου. Με μικρή διαφορά ακολουθεί αυξημένη δραστηριότητα της GR στον Θερμαϊκό κόλπο και η μικρότερη δραστηριότητα παρουσιάζεται στον Παγασητικό σε σχέση με τους άλλους κόλπους, ενώ η κατώτερη δραστηριότητα του ενζύμου παρουσιάζεται τον Ιανουάριο στον Παγασητικό.

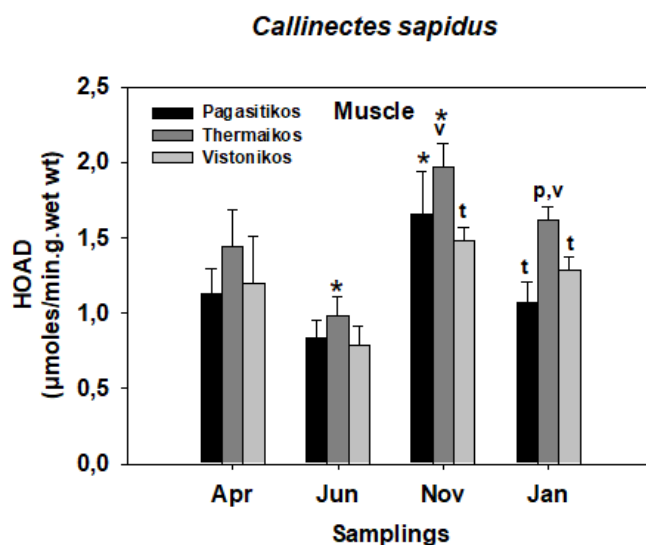
Callinectes sapidus



Εικόνα 3.8. Αποτελέσματα των επιπέδων *TBARS* (ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ) ιστού βραγχίων διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην εικόνα 3.8. τα επίπεδα *TBARS* παρουσιάζονται ξεκάθαρα πιο αυξημένα τον Ιούνιο, κυρίως στον Παγασητικό και έπειτα στον Θερμαϊκό. Σε κάθε εποχή δειγματοληψίας τα επίπεδα *TBARS* ήταν πιο αυξημένα στον Παγασητικό και σταθερά χαμηλότερα στον Βιστωνικό σε σχέση με τους υπόλοιπους κόλπους.

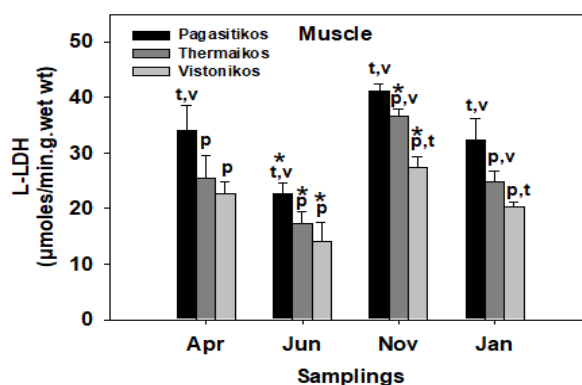
3.3. Αποτελέσματα μυών



Εικόνα 3.9. Αποτελέσματα της δραστικότητας της 3-υδροξυ-CoA αφυδρογονάσης (HOAD) ιστού μυών, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην εικόνα 3.9 παρατηρείται η ξεκάθαρα πιο αυξημένη δραστικότητα της HOAD των ιστών των μυών, στον Θερμαϊκό κόλπο σε σχέση με τους άλλους δύο, που δε παρουσιάζουν κάποια στατιστικά έντονη διαφορά. Παρατηρείται ότι τον Νοέμβριο η ενζυμική δραστηριότητα είναι ιδιαίτερα αυξημένη, ενώ τον Ιούνιο η δραστικότητα διατηρείται σε χαμηλότερα επίπεδα.

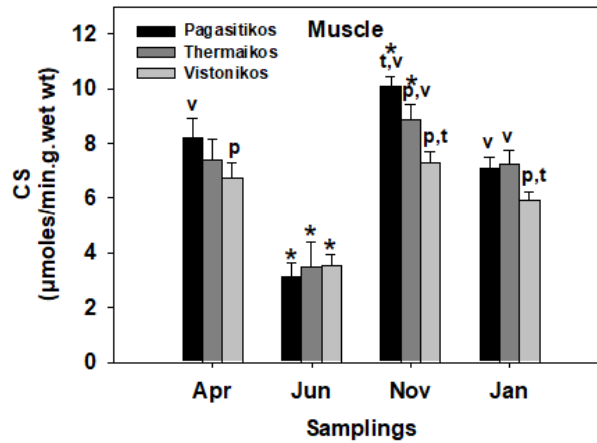
Callinectes sapidus



Εικόνα 3.10. Αποτελέσματα της δραστηριότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης (L-LDH) ιστού μυών, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

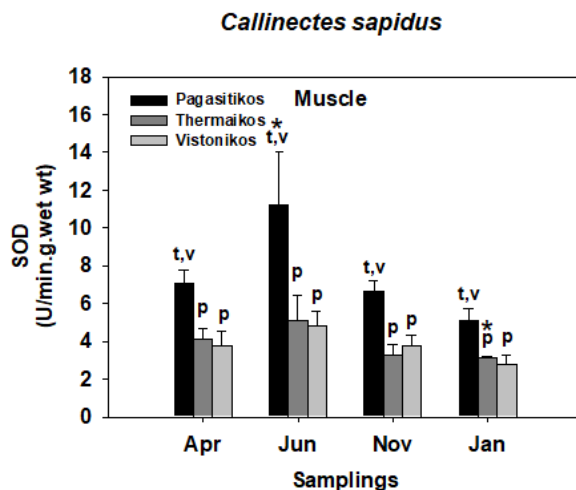
Στο παραπάνω διάγραμμα εμφανίζεται η αυξημένη δραστηριότητα της L-LDH στον Παγασητικό σε σχέση με τους υπόλοιπους κόλπους. Στη δειγματοληψία του καλοκαιριού η δραστηριότητα σε όλους τους κόλπους φαίνεται να είναι μικρότερη, ενώ σε εκείνη του Νοεμβρίου η μεγαλύτερη με πρώτο σε δραστηριότητα τον Παγασητικό και αρκετά κοντά τον Θερμαϊκό. Σε όλες τις εποχές στον Βιστωνικό κόλπο παρατηρούνται οι μικρότερες τιμές δραστηριότητας σε σύγκριση με τους άλλους δύο κόλπους.

Callinectes sapidus



Εικόνα 3.11. Αποτελέσματα της δραστικότητας της **συνθετάση του κιτρικού (CS)** ιστού μυών, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

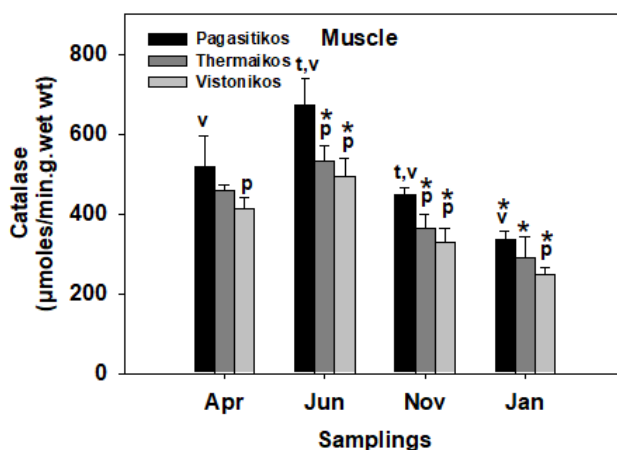
Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η ιδιαίτερα υψηλή δραστικότητα της CS τον Νοέμβριο στον Παγασητικό και έπειτα στον Θερμαϊκό. Στη δειγματοληψία του Ιουνίου παρατηρούνται οι χαμηλότερες τιμές δραστικότητας του ενζύμου αυτού, χωρίς να υπάρχει κάποια στατιστικά μεγάλη διαφορά, όπως επίσης δεν παρατηρείται έντονη διαφορά στην δραστικότητα της CS και τον Απρίλιο και τον Ιανουάριο.



Εικόνα 3.12. Αποτελέσματα της δραστηριότητας της δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) ιστού μύων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην εικόνα 3.12 διακρίνονται τα ξεκάθαρα αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) στον Παγασητικό σε όλες τις δειγματοληπτικές εποχές, αλλά κυρίως τον Ιούνιο, που παρατηρείται ιδιαίτερα αυξημένη δραστηριότητα της SOD. Μεταξύ των άλλων δύο κόλπων δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια στατιστικά έντονη διαφορά.

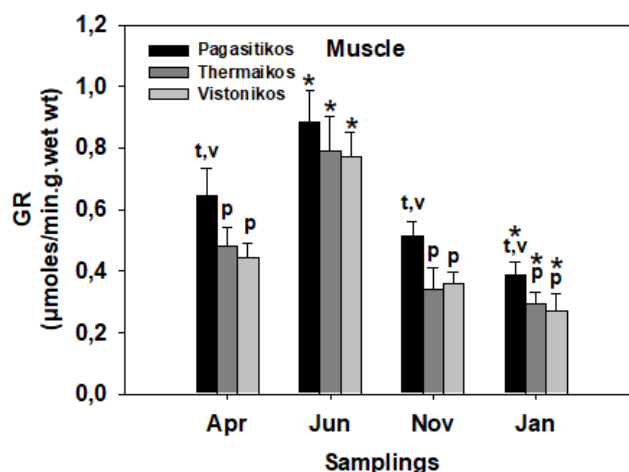
Callinectes sapidus



Εικόνα 3.13. Αποτελέσματα της δραστικότητας της καταλάσης (*Catalase*) ιστού μυών, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

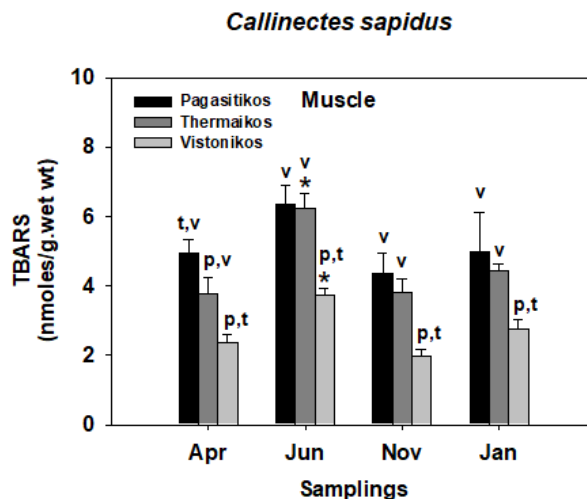
Τα αποτελέσματα της δραστικότητας της καταλάσης (*Catalase*) του ιστού των μυών παρουσιάζουν έντονα αυξημένη δραστικότητα την εποχή του καλοκαιριού σε όλους τους κόλπους, και ιδιαίτερα στον Παγασητικό. Γενικά στον Παγασητικό φαίνεται πως υπάρχει πιο αυξημένη δραστικότητα της καταλάσης ενώ δεν παρουσιάζεται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στον μεταξύ Θερμαϊκού και Βιστωνικού κόλπου. Στη δειγματοληψία του Ιανουαρίου παρουσιάζονται οι χαμηλότερες τιμές δραστικότητας.

Callinectes sapidus



Εικόνα 3.14. Αποτελέσματα της δραστικότητας της ρεδοουκτάση ή υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GR) ιστού μυών, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου $p =$ Παγασητικός, $t =$ Θερμαϊκός, $v =$ Βιστωνικός).

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η έντονα αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου GR και στους τρεις κόλπους κατά την δειγματοληψία του Ιουνίου, αλλά ακόμη πιο αυξημένη εντοπίζεται η δραστικότητα του ενζύμου στον Παγασητικό. Σε όλους τους μήνες της δειγματοληψίας φαίνεται πως η δραστικότητα της GR είναι υψηλότερη στον Παγασητικό, ενώ μεταξύ των άλλων δύο κόλπων δεν εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά.



Εικόνα 3.15. Αποτελέσματα των επιπέδων **TBARS** (ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ) ιστού μυών διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Τα πιο αυξημένα επίπεδα TBARS ιστού μυών φαίνεται πως εντοπίζονται κατά τη δειγματοληψία του Ιουνίου, στον Παγασητικό και τον Θερμαϊκό. Παράλληλα σε κάθε μήνα δειγματοληψίας τα χαμηλότερα επίπεδα TBARS παρατηρούνται στον Βιστωνικό κόλπο. Γενικά τα επίπεδα TBARS δε παρουσιάζουν κάποια στατιστικά έντονη διαφορά μεταξύ του Παγασητικού και Θερμαϊκού κόλπου.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Γενικά το είδος *Callinectes sapidus*, μπλε καβούρι, φαίνεται πως παρουσιάζει ποικιλία ιδιαίτερων χαρακτηριστικών. Προσαρμόζεται εύκολα καθώς είναι ευρύαλο, ευρύθερμο, ανθεκτικό, παμφάγο, ελίσσεται και θηρεύει τη λεία του με ευκολία, ενώ δεν έχει πολλούς θηρευτές. Έτσι, δικαιολογείται η σημαντική αύξηση της αφθονίας του καβουριού και την «επικράτησή» του στη μακροβενθική πανίδα του Όρμου Μεθώνης, σε συνδυασμό όμως και με τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες που ευνοούν την επιβίωση και την αύξηση του πληθυσμού του (Κεβρεκίδης 2010). Για αυτόν τον λόγο, δημιουργείται η ανάγκη για τη διατήρηση του είδους αυτού καθώς, αποτελεί αρκετά σημαντικό είδος τόσο της ελληνικής όσο και της παγκόσμιας αγοράς.

Εφαρμόζοντας κάποιους βιοχημικούς δείκτες, επιτρέπεται ο εντοπισμός του ευνοϊκότερου περιβάλλοντος, ούτως ώστε να καλυφθεί η ανάγκη για τη διατήρηση του μπλε καβουριού. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης της δραστηριότητας των ενζύμων του βασικού μεταβολισμού διαπιστώθηκε μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων κατά τη διάρκεια του Ιουνίου συγκριτικά με τις δειγματοληψίες του Απριλίου και του Νοεμβρίου, γεγονός που υποδεικνύει ότι η εποχή του καλοκαιριού, οι συνθήκες διαβίωσης είναι ευνοϊκότερες.

Όσον αφορά τις τοποθεσίες συλλογής των δειγμάτων, στον Παγασητικό κόλπο εντοπίστηκαν οι υψηλότερες τιμές δραστηριότητας των ενζύμων, σε ιστούς βραγχίων και μυών. Αυτό υπονοεί ότι ο Παγασητικός κόλπος είναι το λιγότερο κατάλληλο περιβάλλον διαβίωσης του μπλε καβουριού, τουλάχιστον σε σχέση με τους άλλους δύο κόλπους. Σχετικά με τον Θερμαϊκό κόλπο, σε πολλές περιπτώσεις οι αναλύσεις, υπέδειξαν ότι υπήρξε αρκετά αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων, όπως της HOAD σε ιστούς μυών. Για τον λόγο αυτόν βγαίνει το συμπέρασμα ότι ούτε ο Θερμαϊκός είναι το ευνοϊκότερο περιβάλλον διαβίωσης του είδους. Από την άλλη, στον Βιστωνικό, παρατηρήθηκαν χαμηλότερες τιμές δραστηριότητας των ενζύμων, σε δείγματα ιστών βραγχίων, γεγονός που καθιστά το συγκεκριμένο περιβάλλον διαβίωσης το καταλληλότερο για τον είδος *Callinectes sapidus*.

Η ανθρώπινη δραστηριότητα ασκούν σοβαρότατες πιέσεις σχεδόν σε όλα τα οικοσυστήματα. Όσο οι επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής στα θαλάσσια οικοσυστήματα αυξάνονται, τόσο δημιουργείται πιο έντονα η ανάγκη διατήρησης των οικοσυστημάτων αυτών. Η πρόταση για να επιτευχθεί η διατήρηση του οικοσυστήματος, είναι τα λεγόμενα refugia, που στοχεύει στην διατήρηση της βιοποικιλότητας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ADC Change, T Blair, R Pachauri (2006) Avoiding Dangerous Climate Change, pp 123

Anson H. Hines, Romuald N. Lipcius* & A. Mark Haddon, Population dynamics and habitat partitioning by size, sex, and molt stage of blue crabs *Callinectes sapidus* in a subestuary of central Chesapeake Bay (1987) (Marine Ecology Progress USA, Vo 36: 55-64, 1987)

Archambault, J. A.; Wenner, E. L.; Whitaker, J. D. (1997) Life History and Abundance of Blue Crab, *Callinectes Sapidus* Rathbun, at Charleston Harbor, South Carolina Bulletin of Marine Science, Volume 46, Number 1, January 1990, pp. 145-158(14)

C Stagg, M Whilden. The history of Chesapeake Bay's blue crab (*Callinectes sapidus*): fisheries and management (1997) (Invest. Mar. Valparaíso, 25: 93-104, 1997)

Charlotte P. Mangum Journal of Crustacean Biology (1985): Molting in the Blue Crab *Callinectes sapidus*: A Collaborative Study of Intermediary Metabolism, Respiration and Cardiovascular Function, and Ion Transport. (Journal of Crustacean Biology, Vol. 5, No. 2 (May, 1985), pp. 185-187)

David W. Engel, Marius Brouwer (1993): Crustaceans as models for metal metabolism: I. Effects of the molt cycle on Blue Crab Metal Metabolism and Metallothionein, (Marine Environmental Research 35 1-5)

Francois H. Lallier, Patrick J. Walsh (1991): Metabolic Potential in Tissues of the Blue Crab, *Callinectes Sapidus*, (BULLETIN OF MARINE SCIENCE, 48(3): 665~69)

J. Lancaster, L. R. Belyea. Nested Hierarchies and Scale-Dependence of Mechanisms of Flow Refugium Use (1997) (Freshwater Science Volume 16, Number 1, Mar., 1997)

John D. Costlow Jr.: The effect of salinity and temperature on survival and metamorphosis of megalops of the blue crab *Callinectes sapidus*

José M. Matés, Cristina Pérez-Gómez, Ignacio Núñez De Castro (1999) Antioxidant enzymes and human diseases Clinical Biochemistry, Volume 32, Issue 8, November 1999, Pages 595-603

Marius Brouwer, Rachel Syring, Thea Hoexumn Brouewer (2002): Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin, (Journal of Inorganic Biochemistry 88 228–239)

Michael S. Hutcheson: The effect of temperature and salinity on cadmium uptake by the blue crab, *Callinectes sapidus* (Belle W. Baruch Coastal Research Institute and the Department of Biology University of South Carolina, Columbia, South Carolina 29208)

Millikin, Mark R.; Williams, Austin B. (March 1984). "Synopsis of Biological Data on the Blue Crab *Callinectes sapidus* Rathbun". (NOAA Technical Report NMFS 1: 1–32.)

R. Gillies (1973): Oxygen consumption as related to the amino-acid metabolism during osmoregulation in the blue crab *Callinectes sapidus*. (Netherlands Journal of Sea Research 7:280-289 7th European Symposium on Marine Biology)

Richard T. Di Giulio Peter C. Washburn Richard J. Wenning Gary W. Winston Catherine S. Jewell (1989). Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress (Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 8, pp. 1103-1123, 1989)

Rugolo, L. J. Knotts, K. S. Lange, A. M. Crecco, V. A. Stock assessment of Chesapeake Bay blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) Journal of Shellfish Research 1998 Vol.17 No.3 pp.906-930 ref.29

S Nehring (2011) Invasion History and Success of the American Blue Crab *Callinectes sapidus* in European and Adjacent Waters In the Wrong Place - Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts pp 607-624

Thodoros E. Kampouris, Joanne S. Porter, William G. Sanderson (2019) *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896 (Brachyura: Portunidae): An assessment on its diet and foraging behaviour, Thermaikos Gulf, NW Aegean Sea, Greece: (Evidence for ecological and economic impacts Crustacean Research 2019 Vol.48: 23–37)

Tracey B. Schock, David A. Stancyk, Lindy Thibodeaux, Karen G. Burnett, Louis E. Burnett, Arezue F. B. Boroujerdi, Daniel W. Bearden (2010): Metabolomic analysis of Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*, hemolymph following oxidative stress (Metabolomics 6:250–262)

Κεβρεκίδης, Κ., (2010) *Callinectes sapidus* (Decapoda, Brachyura): ένα αλλόθρονο είδος στον Θερμαϊκό κόλπο. Αλιευτικά Νέα, 340: 44-49 (Ιανουάριος 2010)

<http://www.fao.org/fishery/species/2632/en>

[https://en.wikipedia.org/wiki/Refugium_\(population_biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Refugium_(population_biology))

<https://www.climaterefugia.org/>

ABSTRACT

Climate changes may have different spatial impact, and as a result, areas with more favorable climatic conditions (refugia) can be identified. With the impact of climate change on both aquatic ecosystems and organisms, it became necessary, based on biochemical and physiological responses, is the demarcation of such areas and the preservation of commercially important marine species. Therefore, individuals of the species *Callinectes sapidus* (blue crab) from Thermaikos, Pagasitikos and Vistonikos gulf were collected seasonally (winter, spring, summer, autumn). The phasmatophotometric analysis of the activity of enzymes of the antioxidant defense such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR), and also indicators of oxidative stress (TBARS), and the activity of basic metabolic enzymes such as lactate dehydrogenase (L-LDH), β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HOAD) and citrate synthetase (CS) was performed in the gills and muscle tissue. The results showed a decrease in the activity of metabolic enzymes and an increase in the activity of antioxidant enzymes during the summer sampling in relation to the spring and autumn samplings. Regarding collection sites, higher activity levels for metabolic enzymes were observed in Pagasitikos, and lower in Vistonikos. The analysis of additional biochemical and molecular markers is expected to provide a clearer picture for the definition of "refugia" for the above species.

Keywords: *Callinectes sapidus*, climate change, refugia, oxidative stress, antioxidant enzymes, metabolic enzymes, TBARS.