

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά ασπόνδυλων της
μεσοπαραλιακής και της ανώτερης υποπαραλιακής ζώνης»**

Ανδρέας Βρατσίστας

ΒΟΛΟΣ 2016

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY
AND AQUATIC ENVIRONMENT**

POSTGRADUATE MASTER'S THESIS

**"Ecophysiological characteristics of midlittoral and upper sublittoral
marine invertebrates"**

Andreas Vratsistas

VOLOS 2016

**«Οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά ασπόνδυλων της μεσοπαραλιακής και της
ανώτερης υποπαραλιακής ζώνης»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Δημήτριος Βαφείδης**, Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση - έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*
- 2) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.
- 3) **Βασίλειος Μιχαηλίδης**, Καθηγητής, Φυσιολογία Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, *Μέλος*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κύριο Δημήτριο Βαφείδη καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους κύριο Αθανάσιο Εξαδάκτυλο και τον κύριο Βασίλειο Μιχαηλίδη.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την όλη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το επιστημονικό ενδιαφέρον για τους οργανισμούς που αντιμετωπίζουν ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες είναι ιδιαίτερο μεγάλο. Η βασική έρευνα που προκύπτει μελετώντας αυτούς τους οργανισμούς βοηθάει στην πρόβλεψη των επιπτώσεων φυσικών φαινομένων στους οργανισμούς όπως επίσης και στη διαχείρισή τους ενώ ενδέχεται να δώσει νέα ερεθίσματα σε εφαρμοσμένα πεδία όπως η βιοτεχνολογία και η μηχανική. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η οξειδωτική καταπόνηση στο μεσογειακό μύδι *Mytilus galloprovincialis*, σε εργαστηριακές συνθήκες έκθεσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες (18 °C, 24 °C, 26 °C, 28 °C, 30 °C) για χρονικό διάστημα 30 ημερών με παράλληλη εκτίμηση των βιομετρικών - αλλομετρικών χαρακτηριστικών. Η μελέτη της οξειδωτικής καταπόνησης πραγματοποιήθηκε μέσω της διερεύνησης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού με μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης και της καταλάσης. Τα αποτελέσματα δείχνουν μια επαγωγή του αντιοξειδωτικού μηχανισμού σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών με τις επιμέρους διακυμάνσεις της δραστηριότητας των ενζύμων να εξηγούνται με βάση τον ενεργειακό μεταβολισμό του μυδιού, την απόκριση θερμικού πλήγματος και το φαινόμενο της υποξίας, ενώ γίνεται παράλληλα μια ανάλυση της συσχέτισης των μορφομετρικών χαρακτηριστικών με την ενζυμική δραστηριότητα και τη θερμοκρασία. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμπληρώνουν άλλες μελέτες πάνω στη φυσιολογία του μυδιού σε σχέση με τη θερμική καταπόνηση και ενισχύουν την υπόθεση της προετοιμασίας για το οξειδωτικό στρες που προτάθηκε το 1998. Τέλος, σχετίζονται άμεσα με την απόκριση και την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος μέσα σε μια γενικότερη εικόνα ενός ενδιάμεσου μεταβολισμού, στον οποίο υπάρχει μια δυσαρμονία μεταξύ των απαιτήσεων σε ενέργεια και της παραγωγής ενέργειας.

Λέξεις κλειδιά: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Θαλάσσια Βιολογία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Θερμοκρασία και οργανισμοί	1
1.2 Ο κυτταρικός μεταβολισμός.....	3
1.3 Εφαρμογές των οικοφυσιολογικών μελετών.....	4
1.4 Η κυτταρική απόκριση σε καταπονήσεις (στρες)	5
1.5 Ένζυμα	6
1.6 Οξειδωτική καταπόνηση: Δραστικές μορφές οξυγόνου	7
1.7 Σκοπός.....	9
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	10
2.1 Υλικά	10
2.1.1 Βιολογικό υλικό - το είδος <i>Mytilus galloprovincialis</i>	10
2.1.2 Συνθήκες διατήρησης - διεξαγωγής πειράματος.....	13
2.1.3 Όργανα και χημικά αντιδραστήρια.....	14
2.2 Μέθοδοι	15
2.2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας	15
2.2.2 Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD, EC 1.15.1.1).....	16
2.2.3 Ρεδοκτάση της Γλουταθειόνης (GR, (EC 1.8.1.7))	17

2.2.4 Καταλάση (CAT, EC 1.11.1.6)	18
2.2.5 Μορφομετρικά χαρακτηριστικά	18
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	19
3.1. Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη θνησιμότητα του <i>Mytilus galloprovincialis</i>	19
3.2 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, στο μανδύα του <i>Mytilus galloprovincialis</i>	21
3.3 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της καταλάσης, στο μανδύα του <i>Mytilus galloprovincialis</i>	23
3.4 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης, στο μανδύα του <i>Mytilus galloprovincialis</i>	25
3.5 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) του <i>Mytilus galloprovincialis</i>	27
3.6 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της καταλάσης (CAT) στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) του <i>Mytilus galloprovincialis</i>	29
3.7 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) του <i>Mytilus galloprovincialis</i>	31
3.8 Βιομετρικές συσχετίσεις	33

3.9 Συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής δραστηριότητας, των μορφομετρικών χαρακτηριστικών και της θερμοκρασίας.....	36
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	49
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51
7. ABSTRACT.....	55

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Θερμοκρασία και οργανισμοί

Οι αλλαγές του εξωτερικού περιβάλλοντος οδηγούν σε αλλαγές στη φυσιολογία των οργανισμών. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε άμεσες, χρόνιες και εξελικτικές (Hill et al., 2008). Οι άμεσες εμφανίζονται τα πρώτα λεπτά ή τις πρώτες ώρες μετά από μια αλλαγή μιας περιβαλλοντικής παραμέτρου. Οι άμεσες αλλαγές στη φυσιολογία είναι αντιστρεπτές. Οι χρόνιες αποκρίσεις εμφανίζονται σε χρονικό πλαίσιο ημερών, εβδομάδων ή μηνών. Είναι και αυτές αντιστρεπτές. Τέλος, οι εξελικτικές αποκρίσεις αφορούν αλλαγές σε γονιδιακές συχνότητες μετά από έκθεση σε περιβαλλοντικές αλλαγές πολλαπλών γενεών. Σε αυτήν την περίπτωση οι αλλαγές είναι μη αντιστρεπτές. Οι άμεσες και χρόνιες αποκρίσεις αφορούν άτομα ενώ οι εξελικτικές αναφέρονται σε πληθυσμούς. Τα άτομα εγκλιματίζονται σε αλλαγές περιβαλλοντικών παραγόντων είτε σε επίπεδο εργαστηρίου είτε στο φυσικό περιβάλλον. Ο εγκλιματισμός διαφέρει στη μία και την άλλη περίπτωση και αφορά άτομα. Ο εγκλιματισμός δηλαδή αναφέρεται κυρίως σε φυσιολογικές αποκρίσεις ατόμων που εκτίθενται για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (ημέρες, εβδομάδες, μήνες) σε μια παράμετρο που έχει μεταβληθεί, όπως η θερμοκρασία. Τα θαλάσσια ασπόνδυλα είναι εξώθερμοι οργανισμοί. Η θερμοκρασία του σώματός τους είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη θερμοκρασία του εξωτερικού περιβάλλοντος. Το θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο ζουν είναι στενό, ιδιαίτερα εάν το συγκρίνουμε με τις θερμοκρασίες τις οποίες αντιμετωπίζουν οι χερσαίοι και προκαρυωτικοί οργανισμοί. Αξίζει να αναφερθεί, ότι η μέγιστη θερμοκρασία στην οποία μπορούν να ζήσουν θαλάσσια ασπόνδυλα για μικρό χρονικό διάστημα, είναι 49 βαθμοί Κελσίου και πρόκειται για μια ομάδα εξειδικευμένων οστρακωδών καρκινοειδών. (Wilmer et al., 2009). Οι θαλάσσιοι οργανισμοί, στην πλειονότητά τους, δεν αντιμετωπίζουν

μεγάλες θερμοκρασιακές διακυμάνσεις. Αυτό συμβαίνει καθώς το θαλάσσιο περιβάλλον παρουσιάζει θερμοκρασιακή ομοιογένεια και για να αλλάξει αυτή η θερμοκρασιακή ισορροπία απαιτούνται μεγάλα ποσά ενέργειας. Γίνεται κατανοητό, ότι ακόμη και μια μικρή θερμοκρασιακή μεταβολή στο υδάτινο περιβάλλον μπορεί να οδηγήσει σε αισθητές μεταβολές της οικοφυσιολογίας των οργανισμών που ζουν σε αυτό. Η θερμοκρασία, λοιπόν, σε οποιοδήποτε μέσο, μπορεί να οριστεί ως μέτρο της έντασης των τυχαίων κινήσεων σε ατομικό και μοριακό επίπεδο. Σε υψηλές θερμοκρασίες τα άτομα και τα μόρια κινούνται με μεγαλύτερη ένταση. Το αντίθετο συμβαίνει σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στους εξώθερμους οργανισμούς υπάρχει αντιστοιχία της εξωτερικής θερμοκρασίας του περιβάλλοντος με την εσωτερική του σώματός τους. Αυτό δε συμβαίνει με τους ενδόθερμους οργανισμούς όπως είναι τα πτηνά και τα θηλαστικά. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι οργανισμοί αυτοί ξοδεύουν μεγάλα ποσά ενέργειας στη διατήρηση της θερμοκρασίας τους σε σταθερά επίπεδα. Οι εξώθερμοι οργανισμοί ή ποικιλόθερμοι εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας αυτής της αντιστοιχίας της μοριακής κίνησης των ατόμων του εξωτερικού περιβάλλοντος και των ατόμων και μορίων σε επίπεδο ιστών των οργανισμών. Ένας άλλος, καθοριστικός για τη ζωή ,παράγοντας είναι το οξυγόνο. Οι μεταβολικές ανάγκες ενός οργανισμού για την παραγωγή ενέργειας σχετίζονται άμεσα με το οξυγόνο καθώς η διάσπαση των οργανικών συστατικών οδηγεί σε παραγωγή ατόμων υδρογόνου τα οποία ενώνονται με το οξυγόνο που λαμβάνεται από το περιβάλλον με αποτέλεσμα την παραγωγή νερού. Τα άτομα υδρογόνου σε διαφορετική περίπτωση θα συσσωρεύονταν μέσα στα κύτταρα. Το οξυγόνο, δηλαδή, είναι ο τελικός αποδέκτης ατόμων υδρογόνου στο μεταβολισμό του κυττάρου. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι θαλάσσιοι οργανισμοί που λαμβάνουν το οξυγόνο μέσω του νερού

αντιμετωπίζουν μεγαλύτερες προκλήσεις σε σχέση με τους χερσαίους καθώς η διαλυτότητα του νερού είναι μεγαλύτερη στον αέρα παρά στο νερό (Hill et al., 2008).

1.2 Ο κυτταρικός μεταβολισμός

Ο μεταβολισμός αναφέρεται στο σύνολο των χημικών μετατροπών που συμβαίνουν σε επίπεδο κυττάρου ή οργανισμού. Στα μεταβολικά μονοπάτια, διάφορα ένζυμα ρυθμίζουν την προσθήκη, αφαίρεση ή μεταφορά ατόμων ή ομάδων σε κάθε βήμα. (Lehninger et al., 2005) Ο καταβολισμός αφορά τη διάσπαση πολύπλοκων ουσιών σε απλούστερες με απελευθέρωση ενέργειας ενώ ο αναβολισμός αφορά τη βιοσύνθεση πολύπλοκων ουσιών από απλούστερες και σε αυτήν την περίπτωση καταναλώνεται συνήθως ενέργεια. Η σύζευξη των εξώθερμων (καταβολικές) με τις ενδόθερμες (αναβολικές) αντιδράσεις αποτελεί έναν τρόπο εξοικονόμησης ενέργειας. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), γνωστή και ως ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου, χρησιμοποιείται κυρίως για τη μεταφορά ενέργειας από τις εξώθερμες στις ενδόθερμες αντιδράσεις και περιέχει στο μόριο της δεσμούς υψηλής ενέργειας.

Η διαδικασία παραγωγής ενέργειας από τη διάσπαση γλυκόζης (υδατανθράκων) ξεκινά από το κυτταρόπλασμα με τη διαδικασία της γλυκόλυσης που καταλήγει στην παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος. Στη συνέχεια, το πυροσταφυλικό οξύ, παρουσία οξυγόνου, εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, υφίσταται οξείδωση (κύκλος του Krebs, οξειδωτική φωσφορυλίωση) και μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό (αερόβια αναπνοή). Σε περίπτωση που δεν υπάρχει διαθέσιμο οξυγόνο, ξεκινάει η διαδικασία της αναερόβιας αναπνοής όπου το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε γαλακτικό. Και στις δύο περιπτώσεις παράγεται ενέργεια. Στην αερόβια αναπνοή, από την οξείδωση ενός μορίου γλυκόζης, παράγονται συνολικά 36 μόρια ATP. Στα μετάζωα, με την αύξηση της θερμοκρασίας, αρχικά φαίνεται να περιορίζεται η

αερόβια ικανότητα ολόκληρου του οργανισμού και αυτό φαίνεται να συσχετίζεται με τον αερισμό και την κυκλοφορία (Poertner, 2001). Σε υψηλές θερμοκρασίες, οι ανάγκες του οργανισμού σε οξυγόνο είναι ιδιαίτερα υψηλές. Μετά την κρίσιμη θερμοκρασία T_c , ο οργανισμός μεταπίπτει σε αναερόβιο μεταβολισμό και τελικά αν το θερμικό στρες συνεχιστεί, αναλαμβάνουν δράση οι προστατευτικοί μηχανισμοί του κυττάρου όπως οι HSPs και η αντιοξειδωτική άμυνα (Poertner, 2001). Υπό τέτοιες συνθήκες όμως, ο οργανισμός βρίσκεται στα άκρα των θερμικών ορίων ανοχής και μπορεί να επιβιώσει για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Φαίνεται δηλαδή ότι το θερμικό παράθυρο της απόδοσης σε οργανισμούς που λαμβάνουν το οξυγόνο μέσα στο νερό αντιστοιχεί στο παράθυρο της αερόβιας ικανότητάς τους. Η απώλεια της απόδοσης λόγω θερμικού στρες αντικατοπτρίζει τη σταδιακή αποσύνδεση του ρυθμού παροχής οξυγόνου και απαιτήσεων σε οξυγόνο. Υπάρχει δηλαδή άμεση συσχέτιση μεταξύ υποξαιμίας και θερμοκρασίας. Λόγω της υποξαιμίας, αρχίζει η απόκριση των κυττάρων και του οργανισμού συνολικά στο στρες μέσω κυτταρικών σημάτων, όπως οι ορμόνες ή το οξειδωτικό στρες. Σε αυτό το σημείο ενεργοποιούνται και οι προστατευτικοί μηχανισμοί όπως η απόκριση θερμικού πλήγματος. (Poertner, 2010)

1.3 Εφαρμογές των οικοφυσιολογικών μελετών

Είναι φανερό λόγω των παραπάνω στοιχείων το πόσο σημαντική είναι η χρησιμοποίηση βιοχημικών και μοριακών δεικτών σε οικολογικές εφαρμογές όπως η εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης μιας περιοχής, ή η κατανόηση της απόκρισης ενός ολόκληρου πληθυσμού ενός είδους σε μια περιβαλλοντική παράμετρο που αλλάζει μέσω μοριακών και φυσιολογικών δεικτών. Η ύπαρξη ενζύμων-κλειδιά σε αναβολικά (βιοσυνθετικά) και καταβολικά μονοπάτια του μεταβολισμού μπορεί να

αξιοποιηθεί και να έχουμε έτσι μια πλήρη εικόνα της ενεργειακής κατάστασης ενός οργανισμού. Αντίστοιχα, η ύπαρξη αντιοξειδωτικών ενζύμων και η αντίστοιχη μέτρηση της δραστηρότητας τους μπορεί να δώσει πληροφορίες για το οξειδωτικό στρες και τα αποτελέσματα να εφαρμοστούν στην εκτίμηση της κατάστασης ενός πληθυσμού που εκτίθενται σε συγκεκριμένους στρεσογόνους παράγοντες. Συγκεκριμένα, η εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης ενός οργανισμού μπορεί να δώσει πληροφορίες για την επιβίωση ή για το πως ένα είδος ή ένας πληθυσμός θα αλληλεπιδράσει με θηρευτές ή ανταγωνιστές (Dahlhoff, 2004). Μελέτες φυσιολογικών και βιοχημικών μηχανισμών έχουν βρει εφαρμογή στη δημιουργία μοντέλων που μπορούν να προβλέψουν την αφθονία και κατανομή των ειδών. Επίσης, είναι εφικτή η δημιουργία μοντέλων για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ λείας-θηρευτή ή μεταξύ ανταγωνιστών (Dahlhoff, 2004).

1.4. Η κυτταρική απόκριση σε καταπονήσεις (στρες)

Όσον αφορά τη σχέση της φυσιολογίας με την καταπόνηση (στρες) υπάρχουν δύο κατηγορίες αποκρίσεων των οργανισμών: αρχικά, σε επίπεδο οργανισμού ασκείται ορμονικός έλεγχος, ενώ δεύτερον σε επίπεδο κυττάρου σημαντικό ρόλο για τη διατήρηση της λειτουργίας και κατ' επέκταση της επιβίωσης του κυττάρου και του οργανισμού απέναντι σε παράγοντες που ενδέχεται να απειλήσουν την ομοιόσταση, κατέχει η διαδικασία της κυτταρικής απόκρισης στο στρες. Η απόκριση αυτή δεν προκαλείται συγκεκριμένα από κάποιον παράγοντα. Αντ' αυτού αποκρίνεται σε οτιδήποτε προσπαθεί να διαταράξει τη δομή των μακρομορίων. Μεγαλύτερη ειδικότητα απόκρισης - παράγοντα που την προκαλεί φαίνεται να υπάρχει σε μετέπειτα μηχανισμούς, σκοπός των οποίων είναι η επαναφορά της ομοιόστασης (Kueltz, 2005).

Οι κυτταρικές λειτουργίες που σχετίζονται με την κυτταρική απόκριση στην καταπόνηση είναι ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απομάκρυνση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί καταστροφή, η σταθεροποίηση χρωματίνης και DNA, συγκεκριμένα σημεία του μεταβολισμού, η συνοδεία πρωτεϊνών και επιδιόρθωση (Kueltz, 2003)

Η μελέτη της κυτταρικής απόκρισης σε καταπονήσεις (στρες) μπορεί να εφαρμοστεί στην εκτίμηση οικολογική κινδύνου, στον έλεγχο παγκόσμιων περιβαλλοντικών αλλαγών καθώς και σε κλινικές εφαρμογές της εξαιρετικής και ταχύτατης ικανότητας προσαρμογής που εμφανίζουν ορισμένα είδη.

Μια ακόμη συνέπεια της έκθεσης σε στρεσογόνους παράγοντες είναι η παραγωγή οξειδωτικού στρες και η αλλαγή του κυτταρικού δυναμικού οξειδοαναγωγής, που αναφέρεται ως αναπνευστική έκρηξη (Kueltz, 2005)

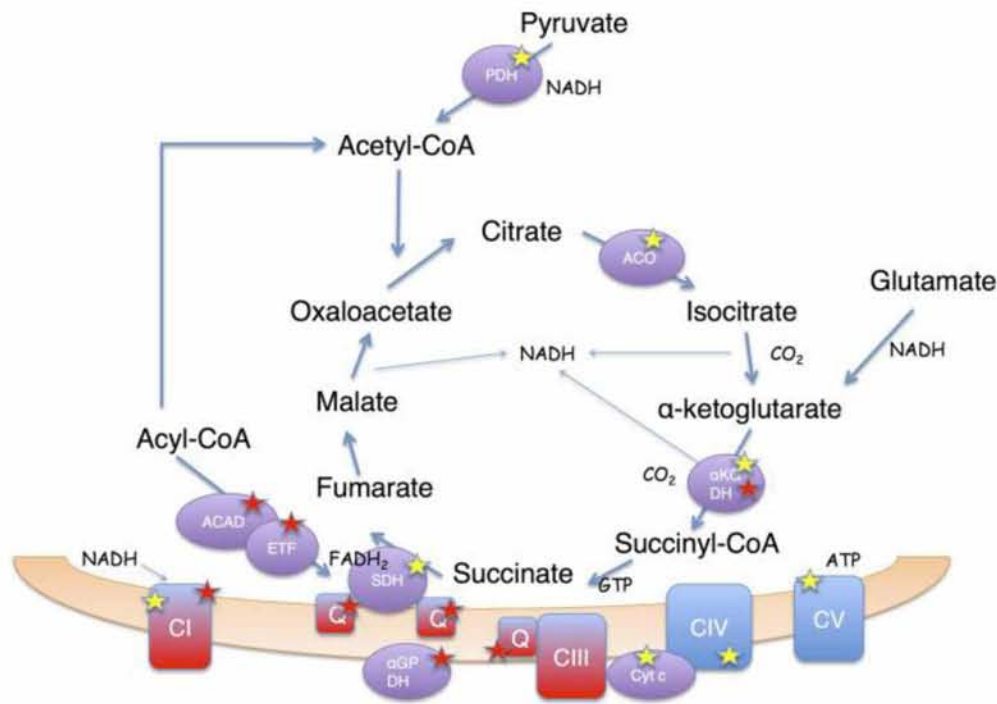
1.5. Ένζυμα

Η βιοχημεία του κυττάρου ρυθμίζεται από τα ένζυμα, τα οποία αποτελούν καταλυτικές πρωτεΐνες με διττό ρόλο, αυτόν της επιτάχυνσης των χημικών αντιδράσεων και αυτόν της ρύθμισης. Ένα βασικό χαρακτηριστικό των ενζύμων είναι ότι παραμένουν αναλλοίωτα μετά το τέλος της αντίδρασης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ξανά. Το υπόστρωμα δηλαδή τα αντιδρώντα συστατικά σχηματίζουν με το ένζυμο το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Η περιοχή του ενζύμου στην οποία δεσμεύεται το υπόστρωμα ονομάζεται ενεργό κέντρο. Καθώς δημιουργούνται τα προϊόντα, σχηματίζεται το σύμπλοκο ενζύμου-προϊόντος. (Hill et al., 2008). Οι χημικές αντιδράσεις χρειάζονται ενέργεια για να πραγματοποιηθούν. Ουσιαστικά, τα ένζυμα μειώνουν αυτήν την ενέργεια ενεργοποίησης για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Αξίζει να αναφερθεί, η ύπαρξη ενός ειδικού μικροπεριβάλλοντος γύρω από το ολοένζυμο το οποίο ονομάζεται καταλυτικό

κενοτόπιο και αποτελεί σημαντικό παράγοντα αύξησης της ταχύτητας της χημικής αντίδρασης (Hochachka & Somero, 1999).

1.6 Οξειδωτική καταπόνηση: Δραστικές μορφές οξυγόνου

Το μοριακό οξυγόνο διαθέτει δύο μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια. Εξαιτίας αυτού του χαρακτηριστικού, η ικανότητα του να αλληλεπιδρά με οργανικά μόρια είναι περιορισμένη. Στην ενεργοποιημένη του μορφή το οξυγόνο υφίσταται άνιση αναγωγή και έτσι παράγονται διάφορα δραστικά ενδιάμεσα. (Lesser, 2006). Το ανιόν σουπεροξειδίου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου και άλλες ενδιάμεσες μορφές, που προκύπτουν από την άνιση αναγωγή, ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Η αναγωγή δηλαδή το κέρδος σε ηλεκτρόνια, σημαίνει ότι όταν το μοριακό οξυγόνο ανάγεται, προσλαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο και μετατρέπεται σε ανιόν σουπεροξειδίου. Το ανιόν σουπεροξειδίου έχει διπλή δράση καθότι μπορεί να υφίσταται είτε ως οξειδωτικός είτε ως αναγωγικός παράγοντας. Μεταφορά δύο ηλεκτρονίων οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου. Κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, το μιτοχόνδριο διαθέτει μηχανισμούς που αποτρέπει τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου κατά τη μετατροπή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Παρόλα αυτά το 0,1% - 2% του μοριακού οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα υπεροξειδίου. (Boveris & Chance, 1973). Το μονήρες οξυγόνο αποτελεί μια δραστική μορφή που συνήθως παράγεται από αντιδράσεις όπου τα μόρια απορροφούν συγκεκριμένου μήκους κύματος φως και μεταπίπτουν σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Η ρίζα υδροξυλίου αποτελεί την πιο δραστική μορφή οξυγόνου. Αντιδρά με όλα τα βιομόρια και η ικανότητα βλάβης του είναι πολύ μεγάλη. Μπορεί να προκαλέσει αλυσιδωτές αντιδράσεις δημιουργίας ελευθέρων ριζών, αποικοδόμηση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων καθώς και οξείδωση μεμβρανικών λιπιδίων (Cadenas 1989, Lesser 2006).



Εικόνα 1. Σχηματισμός οξειδωτικών παραγόντων και κύριοι οξειδωτικοί στόχοι κατά τη μιτοχονδριακή σύνθεση του ATP. Οι θέσεις όπου σχηματίζονται οι οξειδωτικοί παράγοντες επισημαίνονται με κόκκινο αστέρι. Ενδεικτικές θέσεις είναι τα σύμπλοκα I και III της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Προσαρμοσμένο από Quijano et al., 2016.

Πιο συγκεκριμένα, οι επιδράσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου στο υποκυτταρικό επίπεδο περιλαμβάνουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια, κάτι που μπορεί να επηρεάζει το μεταβολισμό και την παραγωγή ATP και να οδηγήσει στην απόπτωση, ενώ όσον αφορά τις πρωτεΐνες, η οξειδωτική βλάβη προκαλεί τροποποιήσεις συγκεκριμένων αμινοξέων, διαφορετικό ηλεκτρικό φορτίο, κατακερματισμό της πεπτιδικής αλυσίδας και ευαισθησία στην αποικοδόμηση (Lesser, 2006). Σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, κατέχουν τα ένζυμα δισμουτάση του υπεροξειδίου και καταλάση. Σε ευκαρυωτικά κύτταρα, η δισμουτάση του υπεροξειδίου συναντάται τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο κυτταρόπλασμα. Η μιτοχονδριακή μορφή περιέχει μαγγάνιο ενώ η κυτταροπλασματική περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου

καταλύει αντιδράσεις αυτοοξειδοαναγωγής και μετατρέπει δύο ρίζες υπεροξειδίου σε μοριακό οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. (Berg & Tymoczko ,2002). Η καταλάση είναι μια αιμοπρωτεΐνη η οποία με τη σειρά της, συγκεντρώνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου και καταλύει την αυτοοξειδοαναγωγή του σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο το οποίο μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό, συμπληρώνοντας έτσι τη δράση της καταλάσης. Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης ανακυκλώνει την οξειδωμένη γλουταθειόνη στην ανηγμένη της μορφή χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια από το NADPH. Το NADPH, σχηματίζεται είτε από τον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών είτε από την τρανσυδρογονάση του νικοτιναμίδο-νουκλεοτιδίου. Η ανηγμένη γλουταθειόνη δίνει ηλεκτρόνια για την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό. (Lehninger et al., 2005)

1.7 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην κυτταρική φυσιολογία του μεσογειακού μυδιού και η συσχέτιση με τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά. Αυτή η μελέτη εντάσσεται σε ένα γενικότερο πλαίσιο πρόβλεψης των επιδράσεων φαινομένων όπως η κλιματική αλλαγή στους οργανισμούς. Η κλιματική αλλαγή που συνδέεται με την αύξηση της παγκόσμιας θερμοκρασίας καθώς και με διάφορες αλλαγές σε ωκεανογραφικές διεργασίες καθιστά αναγκαία την πρόβλεψη με στόχο τη διαχείριση. Η μελέτη των καταπονήσεων και ο καθορισμός των θερμικών ορίων ανοχής του συγκεκριμένου είδους μπορεί να ωφελήσει τους διαχειριστές αλλά και τους εμπλεκόμενους με τις υδατοκαλλιέργειες παράγοντες με την υιοθέτηση τακτικών βελτίωσης της διαχείρισης και της παραγωγής.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Βιολογικό υλικό - το είδος *Mytilus galloprovincialis*

Το μεσογειακό μύδι, *Mytilus galloprovincialis* ανήκει στην κλάση των δίθυρων ή ελασματοβράγχιων μαλακίων. Είναι ζώο γονοχωριστικό και ωοτόκο. Η περίοδος γαμετογένεσης είναι η άνοιξη και το καλοκαίρι. Το χρώμα του μπορεί να είναι βαθύ μπλε, καφέ ή μαύρο. Οι δύο θυρίδες αποτελούν το κέλυφος των ζώων, συνδέονται μέσω των ελαστικών συνδέσμων και είναι παρόμοιες σε μέγεθος. Το σχήμα τους είναι σχεδόν τριγωνικό. Ο πρόσθιος προσαγωγός μυς είναι κατά πολύ μειωμένος σε σχέση με τον οπίσθιο. Στον οπίσθιο προσαγωγό μυ οφείλεται το ανοιγοκλείσιμο των θυρίδων. Όσον αφορά τον ιστό του μανδύα, αυτός είναι δίλοβος, έγχρωμος και αποτελείται από συνδετικό ιστό, αγγεία αιμολέμφου, μύες και νεύρα. Οι άκρες του είναι σκουρόχρωμες και σχετίζονται με προστασία από την ηλιακή ακτινοβολία. (Seed, 1971). Ο καθορισμός της ηλικίας των ατόμων του είδους μπορεί να γίνει μέσω των συγκεντρικών γραμμών αύξησης του κελύφους μόνο σε ορισμένες γεωγραφικές περιοχές. Οι τομές του κελύφους αποτελούν την πιο αξιόπιστη μέθοδο καθορισμού της ηλικίας για τα είδη του γένους *Mytilus* (Gosling, 2007). Το μέσο μέγεθος κυμαίνεται στα 5-10 εκατοστά. Τα μεγαλύτερα σε μήκος άτομα βρίσκονται συνήθως βυθισμένα στην υποπαραλιακή ζώνη. Στην ανώτερη μεσοπαραλιακή ζώνη, όπου τα άτομα ενδέχεται να εκτίθενται στον αέρα το μήκος κυμαίνεται μεταξύ 2-3 εκατοστών ακόμη και μετά από μια δεκαετία. Χαρακτηριστικό στοιχείο του μεσογειακού μυδιού αποτελεί η προσκόλληση. Η διαδικασία της προσκόλλησης ξεκινά όταν η προνύμφη συναντήσει ένα κατάλληλο υπόστρωμα και εκκρίνει ένα νημάτιο από τον αδένα του βύσσου με το πόδι να προεξέχει. Τα νημάτια που εκκρίνονται αυξάνονται σε αριθμό με την αύξηση της ηλικίας του μυδιού. (Seed

1976, Gosling 2007). Τα βράγχια των μυδιών παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπνοή και την πρόσληψη της τροφής. Επίσης, σχετίζονται με τη βιοσυσσώρευση διαφόρων βαρέων μετάλλων και τοξικών ουσιών με συνέπεια τα μύδια να είναι πολύτιμα σε τοξικολογικές έρευνες.



Εικόνα 2. Το μεσογειακό μύδι *Mytilus galloprovincialis*

Αξίζει να αναφερθεί ότι, το μεσογειακό μύδι ζει σε δυναμικά περιβάλλοντα, όπως είναι οι παράκτιες περιοχές. Οι συνθήκες του νερού παρουσιάζουν σημαντική μεταβλητότητα και μπορεί να αλλάζουν μέσα σε ώρες ή χρόνια. Έτσι αντιμετωπίζουν αλλαγές που σχετίζονται με τον κυματισμό, τα ρεύματα, τον καιρό, τη φυσιολογική άνοδο ψυχρών υδάτων. Έτσι, επηρεάζονται οι παράμετροι της θερμοκρασίας του νερού, της αλατότητας, του pH, της συγκέντρωσης του οξυγόνου και άλλων περιβαλλοντικών παραμέτρων. (Carrington, 2014). Η χωρική κατανομή των μυδιών φαίνεται να επηρεάζεται συνεργιστικά από τη θερμοκρασία και την αλατότητα. Η θερμοκρασία που απαιτείται για την αναπαραγωγή είναι μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία που χρειάζεται για την ανάπτυξη. Τα περισσότερα είδη του γένου

Mytilus είναι ευρύαλα, δηλαδή εμφανίζουν ανοχή σε μεγάλο εύρος τιμών αλατότητας. Επίσης, τα μύδια εμφανίζουν την ιδιότητα της ευρυθερμίας, όπως και πολλοί οργανισμοί που ζουν στη μεσοπαραλιακή ζώνη. Η ιδιότητα αυτή αφορά την ικανότητά τους να επιβιώνουν ενώ εκτίθενται σε μεγάλο εύρους θερμοκρασιακές διακυμάνσεις. Η θερμοκρασιακή μεταβολή μπορεί να φτάσει ακόμη και τους 20-30 βαθμούς Κελσίου. Η γεωγραφική κατανομή μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κατηγορίες. Την υποπαραλιακή κατανομή όπου τα μύδια βρίσκονται βυθισμένα στο νερό και στην ανώτερη μεσοπαραλιακή όπου συχνά εκτίθενται στον αέρα. (Gosling, 2007).

Πίνακας 1.1: Συστηματική ταξινόμηση του είδους *Mytilus galloprovincialis*

Βασίλειο: Animalia
Κλάδος: Protostomia
Υπέρφυλο: Eutrochozoa
Φύλο: Mollusca
Κλάση: Bivalvia
Υπόκλαση: Metabranhia
Υπέρταξη: Filibranchia
Τάξη: Pteriomorpha
Υπεροικογένεια: Mytiloidea
Οικογένεια: Mytilidae
Γένος: <i>Mytilus</i>
Είδος: <i>Mytilus galloprovincialis</i>

2.1.2 Συνθήκες διατήρησης - διεξαγωγής πειράματος

Ενήλικα άτομα μυδιών συλλέχθηκαν από την περιοχή της Χαλάστρας, στο Θερμαϊκό κόλπο, του Νομού Θεσσαλονίκης, στο τέλος της άνοιξης του 2015. Η μέση θερμοκρασία του θαλασσινού νερού ήταν 21 βαθμοί Κελσίου. Έπειτα, τα μύδια διατηρήθηκαν σε δεξαμενές 250 λίτρων με φυσικό οξυγονωμένο θαλασσινό νερό. Η θερμοκρασία του νερού ήταν 18 βαθμοί Κελσίου. Στις δεξαμενές, τα μύδια διατηρήθηκαν για μια εβδομάδα πριν την άνοδο της θερμοκρασίας. Τα μύδια χωρίστηκαν σε πέντε ομάδες των 90-100 ατόμων και τοποθετήθηκαν έπειτα σε πέντε γυάλινες δεξαμενές που περιείχαν 250 λίτρα φυσικού θαλασσινού νερού και στα οποία εγκλιματίστηκαν για δύο ημέρες στους 18 βαθμούς Κελσίου. Οι θερμοκρασίες των τεσσάρων δεξαμενών προσαρμόστηκαν στους 24, 26, 28 και 30 βαθμούς Κελσίου ενώ το πέμπτο ήταν αυτό του μάρτυρα με θερμοκρασία 18 βαθμών Κελσίου, και τα μύδια αφέθηκαν εκεί για 30 ημέρες ώστε να εγκλιματιστούν. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος τα μύδια εκτέθηκαν σε 10 ώρες φως και 14 ώρες σκοτάδι. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 0, 5, 10, 15, 20 και 30 ημέρες. Το πείραμα διήρκησε 30 ημέρες. Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας αφαιρέθηκαν οι ιστοί του μανδύα και του προσαγωγού μυός και ακολούθως ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο. Κατόπιν, αποθηκεύτηκαν σε υπερκαταψύκτη με θερμοκρασία -80 βαθμών Κελσίου. Η θνησιμότητα ελεγχόταν σε καθημερινή βάση όπως και η θερμοκρασία. Νεκρά ζώα θεωρούνταν αυτά που δεν έκλειναν το κέλυφος μετά από εξωτερικό ερέθισμα. Ο αριθμός των νεκρών ατόμων (% θνησιμότητα) εκφράστηκε ως % ποσοστό του συνολικού αριθμού και αναφέρεται σε κάθε δεξαμενή ξεχωριστά. Τα ζώα στη δεξαμενή των 18°C, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



Εικόνα 3. Ο χώρος και τα ενδρεία στα οποία πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

2.1.3 Όργανα και χημικά αντιδραστήρια

Χημικά αντιδραστήρια. Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία προέρχονται από τις εταιρίες Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), Applichem (Darmstadt, Germany) και Merck (Darmstadt, Germany).

Όργανα. Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν:

- Φασματοφωτόμετρο (Camspec M501 Single Beam Scanning UV/Visible, Oxford, UK)
- Ομογενοποιητής (Micra D9, Art Moderne)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (Heraeus, DJB Labcare, U.K.)

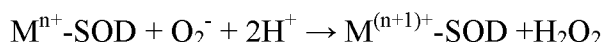
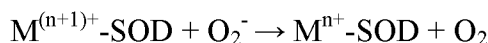
2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων για τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας

Το διάλυμα ομογενοποίησης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από φωσφορικά 50 mM σε pH 7,4 στους 24°C. Η διατήρηση του διαλύματος γίνεται στο ψυγείο ενώ κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης βρίσκεται σε πάγο. Για την ομογενοποίηση των ιστών χρησιμοποιήθηκε δεκαπλάσιος όγκος διαλύματος σε σχέση με το βάρος του ιστού (10% w/v), ενώ η ομογενοποίηση των ιστών πραγματοποιήθηκε σε γυάλινο ομογενοποιητή. Ακολούθησε φυγόκέντρωση του ομογενοποιημένου στα 2.000g για 15 λεπτά, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο θερμοκρασίας 4 βαθμών Κελσίου. Αφού απομονώθηκε το υπερκείμενο ακολούθησε ψύξη και απόψυξη του ιστού για τρεις φορές. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται διάσπαση των μιτοχονδριακών μεμβρανών και απελευθέρωση των ενζύμων. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγόκέντρωση στα 6.000 g, στους 4 βαθμούς Κελσίου για 15 λεπτά. Έπειτα αφού ενεργοποιηθεί και ρυθμιστεί το φωτόμετρο ξεκινά η διαδικασία προσθήκης των αντιδραστηρίων και αυτά αναδεύονται με γυάλινη πιπέττα Pasteur. Η ποσότητα του ομογενοποιημένου ιστού προστίθεται τελευταία στην κυψελίδα και έτσι ξεκινά η διαδικασία της φωτομέτρησης και ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου σύμφωνα με τους Passonneau & Lowry, 1993 (Φειδάντσης, 2012)

2.2.2 Δισμουντάση του υπεροξειδίου (SOD, EC 1.15.1.1)

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



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

Η μέγιστη δραστηριότητα (U_{max}) των ενζύμων, σε μmoles/g υγρού βάρους ιστού/λεπτό, υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$U_{\max} = \frac{\Delta_{OD\text{δειγμ.}} - \Delta_{OD\text{τυφλού}}}{\epsilon \Delta t} \times \frac{1}{V_{\text{δειγμ.}}} \times \frac{m_{\text{ιστού}} + V_{\text{διαλ.ομογενοποίησης}}}{m_{\text{ιστού}}}$$

όπου Δ_{OD} δειγμ. η οπτική πυκνότητα του δείγματος, Δ_{OD} 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.

2.2.3 Ρεδοκτάση της Γλουταθειόνης (GR, (EC 1.8.1.7))

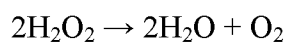
Η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 340nm ($\epsilon_{340}=6,22$), από την μεταβολή της απορρόφησης του NADPH, σύμφωνα με την αντίδραση:



Σε κυψελίδα τελικού όγκου 1ml προστέθηκαν 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50mM, pH=7,4), 0,01ml NADPH (0,15mM), 0,02ml EDTA (2mM) και 0,01-0,02ml δείγματος και 0,450ml απιονισμένου H_2O . Η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη 0,01ml GSSG (oxidized glutathione – οξειδωμένη γλουταθειόνη) (1mM). Στο τυφλό δε χρησιμοποιήθηκε GSSG. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2 λεπτά (Paglia & Valentine 1967).

2.2.4 Καταλάση (CAT, EC 1.11.1.6)

Η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 240nm ($\epsilon_{240}=0,03941$), από την μεταβολή της απορρόφησης του H_2O_2 , σύμφωνα με την αντίδραση:



Στην κυψελίδα τελικού όγκου προστέθηκαν 1ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (50mM, pH=7,4), 0,3ml H_2O_2 (30mM) (0,34ml 30% H_2O_2 σε 100ml του παραπάνω διαλύματος φωσφορικών) και 0,01ml δείγματος ιστού.

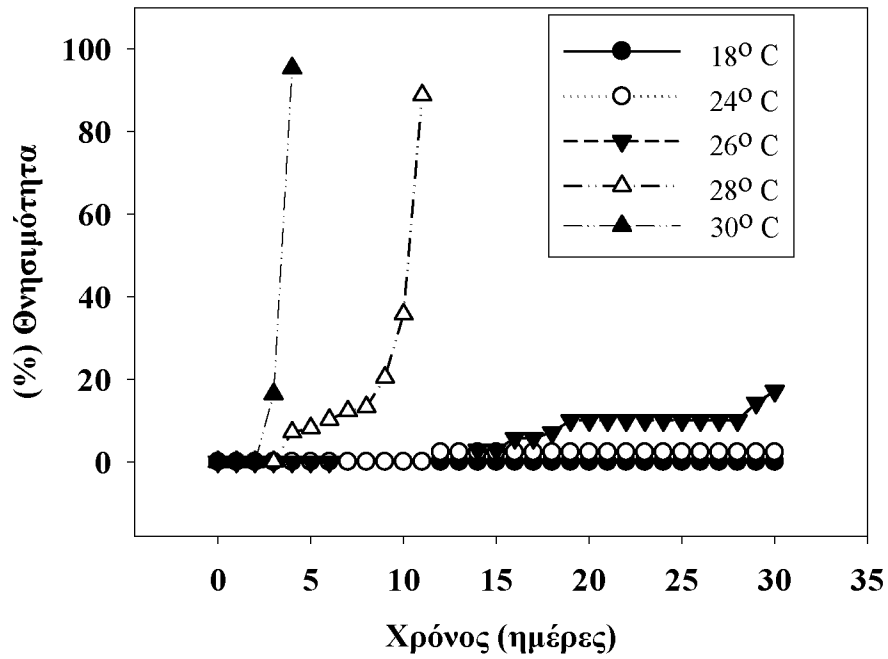
2.2.5 Μορφομετρικά χαρακτηριστικά

Τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά εκτιμήθηκαν με βάση το μήκος, το ύψος και το βάρος του κελύφους, το ολικό βάρος καθώς και το καθαρό βάρος. Οι βιομετρικές συσχετίσεις βασίστηκαν στην εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης $y=a+bx$ και η επεξεργασία έγινε σε πρόγραμμα υπολογιστικών φύλλων της Microsoft. Οι μη παραμετρικές συσχετίσεις έγιναν με το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας SPSS.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη θνησιμότητα του *M. galloprovincialis*

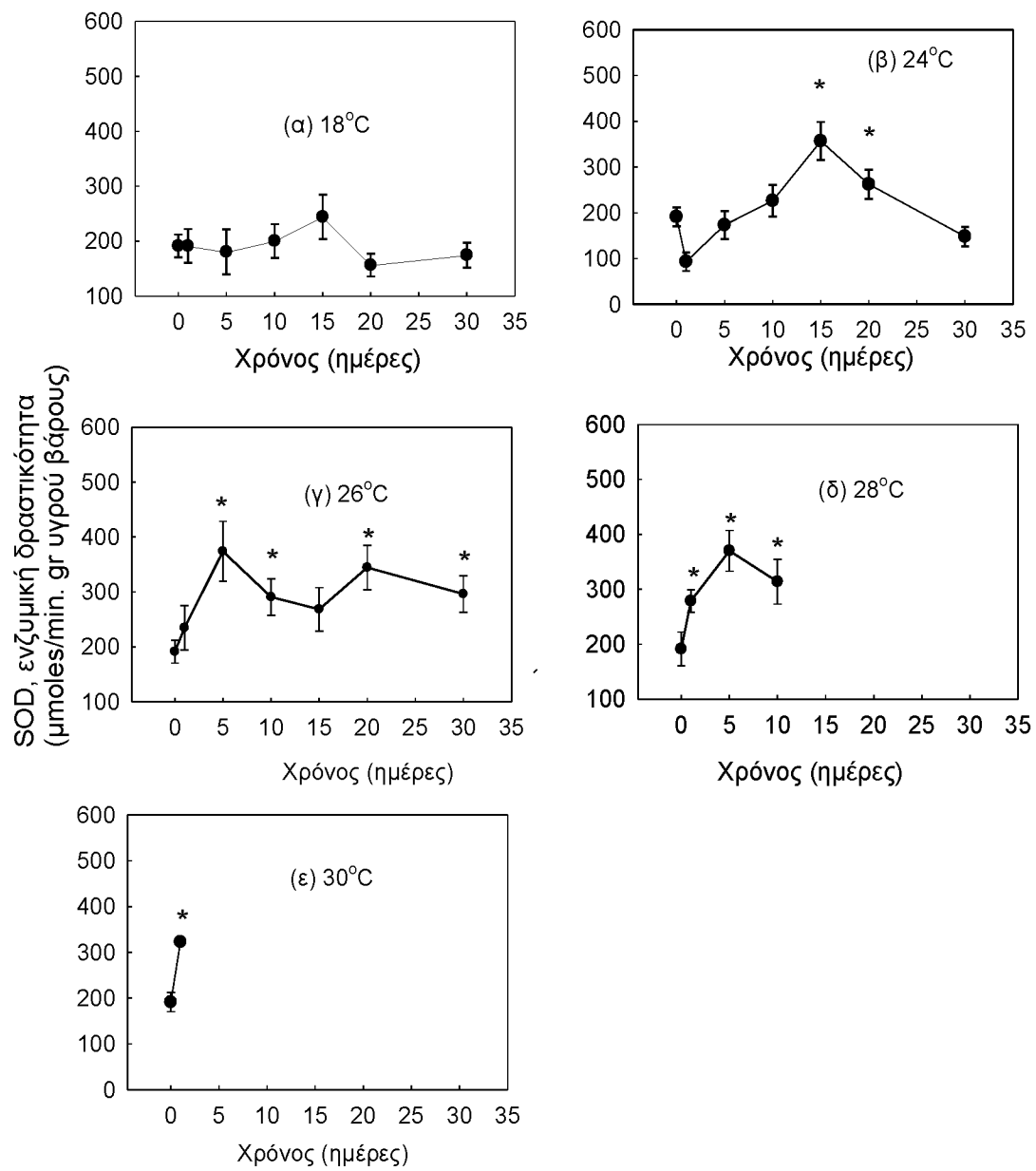
Στο Σχήμα 1, φαίνεται η θνησιμότητα του είδους κάτω από εργαστηριακές πειραματικές συνθήκες έκθεσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες νερού. Στους 18 °C (θερμοκρασία που χρησιμεύει σα μάρτυρας), η θνησιμότητα είναι μηδενική ενώ στους 24 °C είναι αμελητέα, μετά τις 10 ημέρες. Η θνησιμότητα στους 26 °C αρχίζει να αυξάνεται στις 10 ημέρες για να φτάσει περίπου το 10% την 20η ημέρα του πειράματος. Στις 30 ημέρες, στους 26 °C, η θνησιμότητα φτάνει το 20%. Κατά τον εγκλιματισμό των μυδιών στη θερμοκρασία των 28 °C η θνησιμότητα αυξάνεται σταδιακά από την 3η ημέρα για να φτάσει το 40% τη 10η ημέρα και σχεδόν το 100% τη 12 ημέρα του πειράματος. Τα μύδια, στους 30 °C, μετά την 3η ημέρα εμφάνισαν θνησιμότητα 20%, ενώ την 4η ημέρα η θνησιμότητα έφτασε το 100%.



Σχήμα 1. Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη θνησιμότητα του *M.galloprovincialis* μετά από 30 ημέρες εγκλιματισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

3.2 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, στο μανδύα του *Mytilus galloprovincialis*.

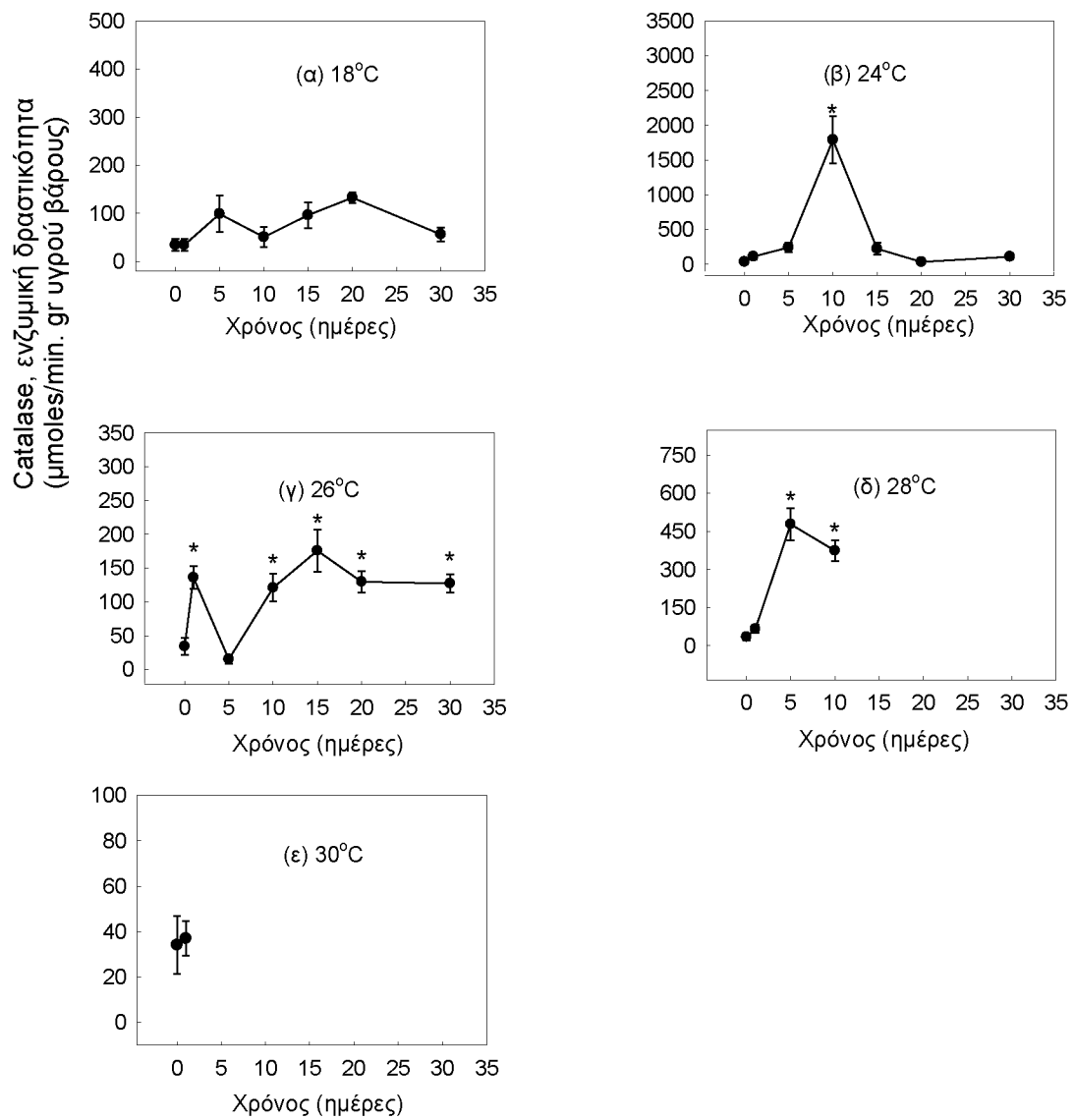
Όπως φαίνεται στο σχήμα 2, στους 24 °C η δραστικότητα της SOD αυξάνεται σημαντικά κατά την πρώτη ημέρα έκθεσης. Έπειτα την 5η ημέρα σχεδόν διπλασιάζεται σε σχέση με τη δραστικότητα στους 18 °C (μάρτυρας). Στο διάστημα των 5 με 15 ημερών, η δραστικότητα της SOD φαίνεται να μειώνεται, ενώ την 20η ημέρα αυξάνεται με δραστικότητα σχεδόν διπλάσια από αυτή του μάρτυρα, για να μειωθεί στα επίπεδα των 300 mmol/min.gr ιστού την 30η ημέρα. Στους 26 °C, εμφανίζεται ένα πρότυπο όπου η δραστικότητα της SOD αυξάνεται σταδιακά από την 1η μέχρι την 15η ημέρα, όπου διπλασιάζεται σε σχέση με αυτήν στους 18 °C, ενώ έπειτα από την 15η μέχρι την 30η ημέρα, μειώνεται και φτάνει στα επίπεδα του μάρτυρα. Στους 28 °C, όπου το πείραμα διήρκησε 10 ημέρες λόγω θνησιμότητας, παρατηρείται μια αύξηση στη δραστικότητα μέχρι τις 5 ημέρες ενώ κατά τη 10η ημέρα, παρατηρείται μια αισθητή πτώση με τα επίπεδα να είναι τα ίδια με αυτά της 1ης ημέρας έκθεσης στους 28 °C.



Σχήμα 2. Επίδραση της θερμοκρασίας στην δραστικότητα της SOD στο μανδύα του *Mytilus galloprovincialis*.

3.3 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της καταλάσης, στο μανδύα του *Mytilus galloprovincialis*.

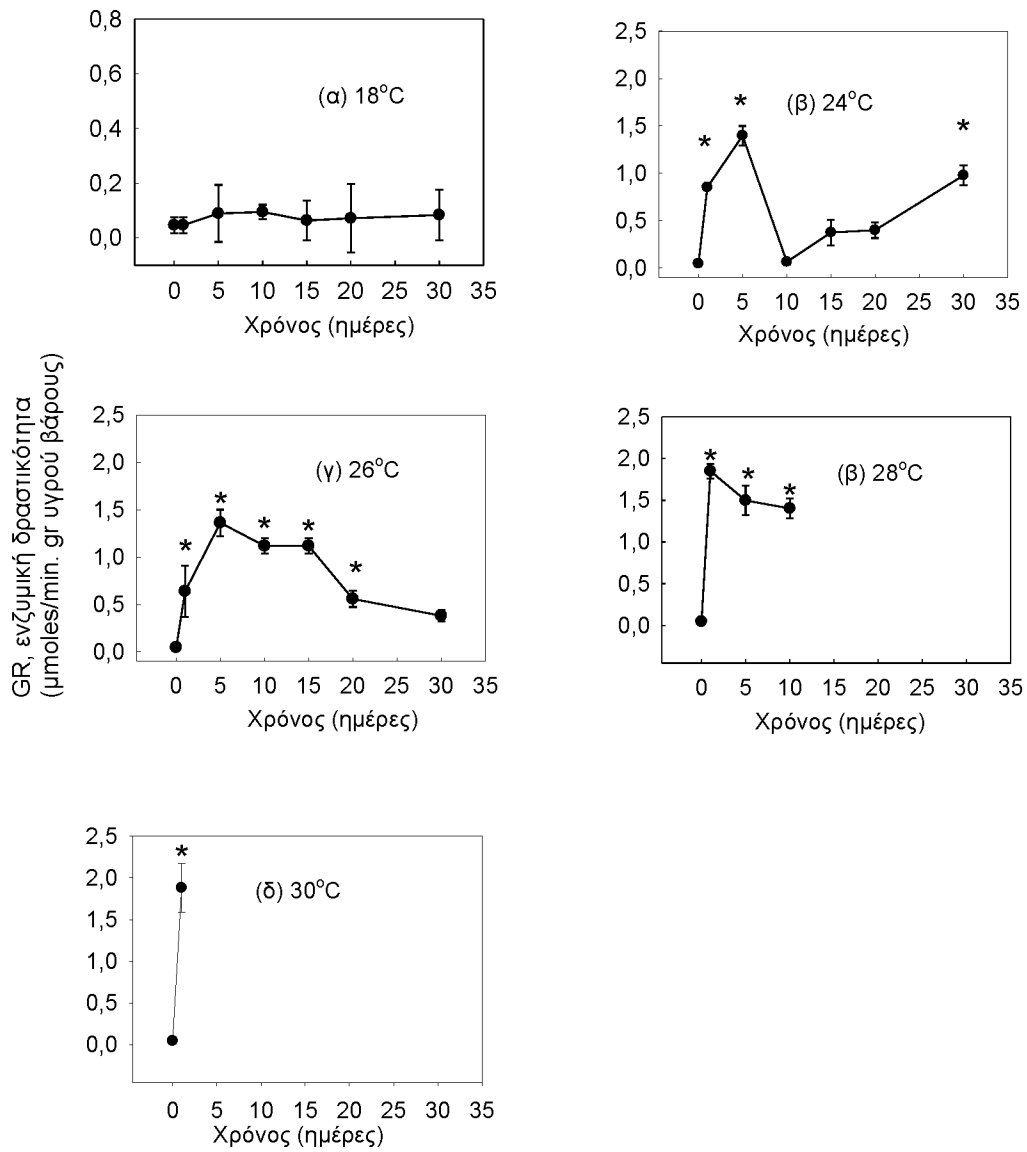
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3, στους 24°C, την 10 ημέρα, η δραστικότητα της καταλάσης αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα, για να μειωθεί έπειτα και να επανέλθει στα επίπεδα δραστικότητας που εμφανίζει η καταλάση στους 18 °C. Στους 26 °C, μετά από μια αρχική αύξηση της δραστικότητας την 1η ημέρα, παρατηρείται μια πτώση κατά την 5η ημέρα σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά του μάρτυρα. Στη συνέχεια, η δραστικότητα της καταλάσης αυξάνεται μέχρι την 15η ημέρα, σε επίπεδα σχεδόν τετραπλάσια σε σχέση με αυτά του μάρτυρα, για να μειωθεί σημαντικά μέχρι την 30η ημέρα. Στους 28 °C, τα επίπεδα δραστικότητας αυξάνονται σημαντικά μέχρι την 5η ημέρα (αύξηση 400%) και στη συνέχεια παρουσιάζουν μια μικρή πτώση.



Σχήμα 3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην δραστηριότητα της καταλάσης (catalase) στον μανδύα του *Mytilus galloprovincialis*.

3.4 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης, στο μανδύα του *Mytilus galloprovincialis*.

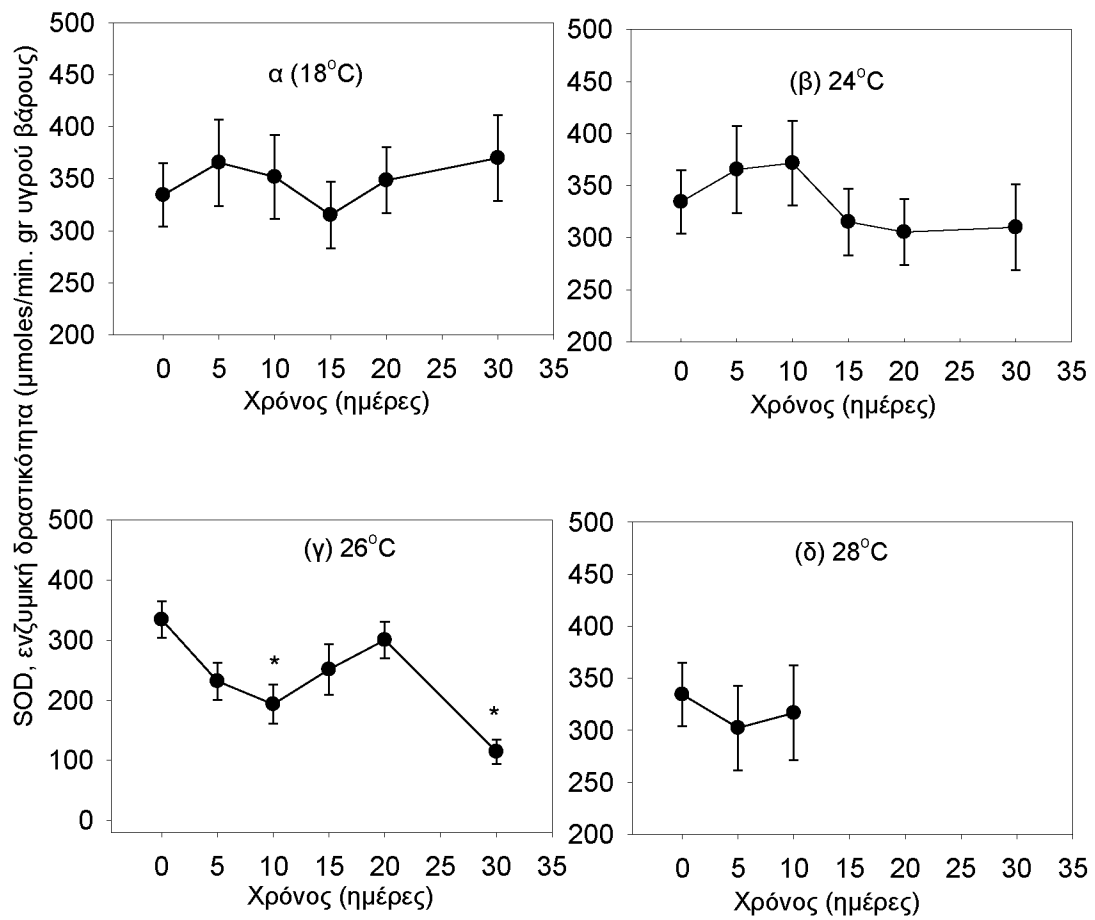
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4, τα επίπεδα δραστικότητας της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης, στους 24 °C, αυξάνονται σημαντικά την πρώτη ημέρα και φτάνουν περίπου το 1 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{gr}$ ιστού. Η αύξηση συνεχίζεται μέχρι την 5η ημέρα, με τα επίπεδα της δραστικότητας να αυξάνονται κατά 50% σε σχέση με την 1η ημέρα. Στους 26 °C, μετά από μια σημαντική αύξηση της δραστικότητας την 1η ημέρα, που ξεπερνά το 1 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{gr}$ ιστού, παρατηρείται μια σταδιακή πτώση της δραστικότητας μέχρι την 30η ημέρα σε σχέση με τη δραστικότητα της 1ης ημέρας, με τα επίπεδα της δραστικότητας να είναι αισθητά αυξημένα σε σχέση με αυτά του μάρτυρα σε όλες τις δειγματοληψίες. Η πτώση της δραστικότητας μετά τη 15η ημέρα είναι απότομη. Το πρότυπο αυτό, έρχεται σε αντίθεση με αυτό των 24 °C, διότι ενώ τα επίπεδα δραστικότητας στους 26 °C είναι αυξημένα σε σχέση με τους 24 °C μέχρι την 15η ημέρα του πειράματος, παρατηρείται μια αντιστροφή κατά την 20η και 30η ημέρα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της δραστικότητας της ρεδουκτάσης, στους 24 °C, παρουσιάζουν αύξηση μετά τις 15 ημέρες, ενώ στους 26 °C παρατηρείται πτώση, με τα επίπεδα δραστικότητας να είναι αυξημένα στους 24 °C σε σχέση με τους 26 °C. Στους 28 °C, τα επίπεδα δραστικότητας είναι αυξημένα σε σχέση με αυτά του μάρτυρα, μειωμένα όμως μέχρι τη 10η ημέρα σε σχέση με τα αποτελέσματα των αναλύσεων ενζυμικής δραστικότητας μετά από έκθεση στις μικρότερες θερμοκρασίες νερού.



Σχήμα 4. Επίδραση της θερμοκρασίας στην δραστικότητα της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (GR) στον μανδύα του *Mytilus galloprovincialis*.

3.5 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) του *Mytilus galloprovincialis*.

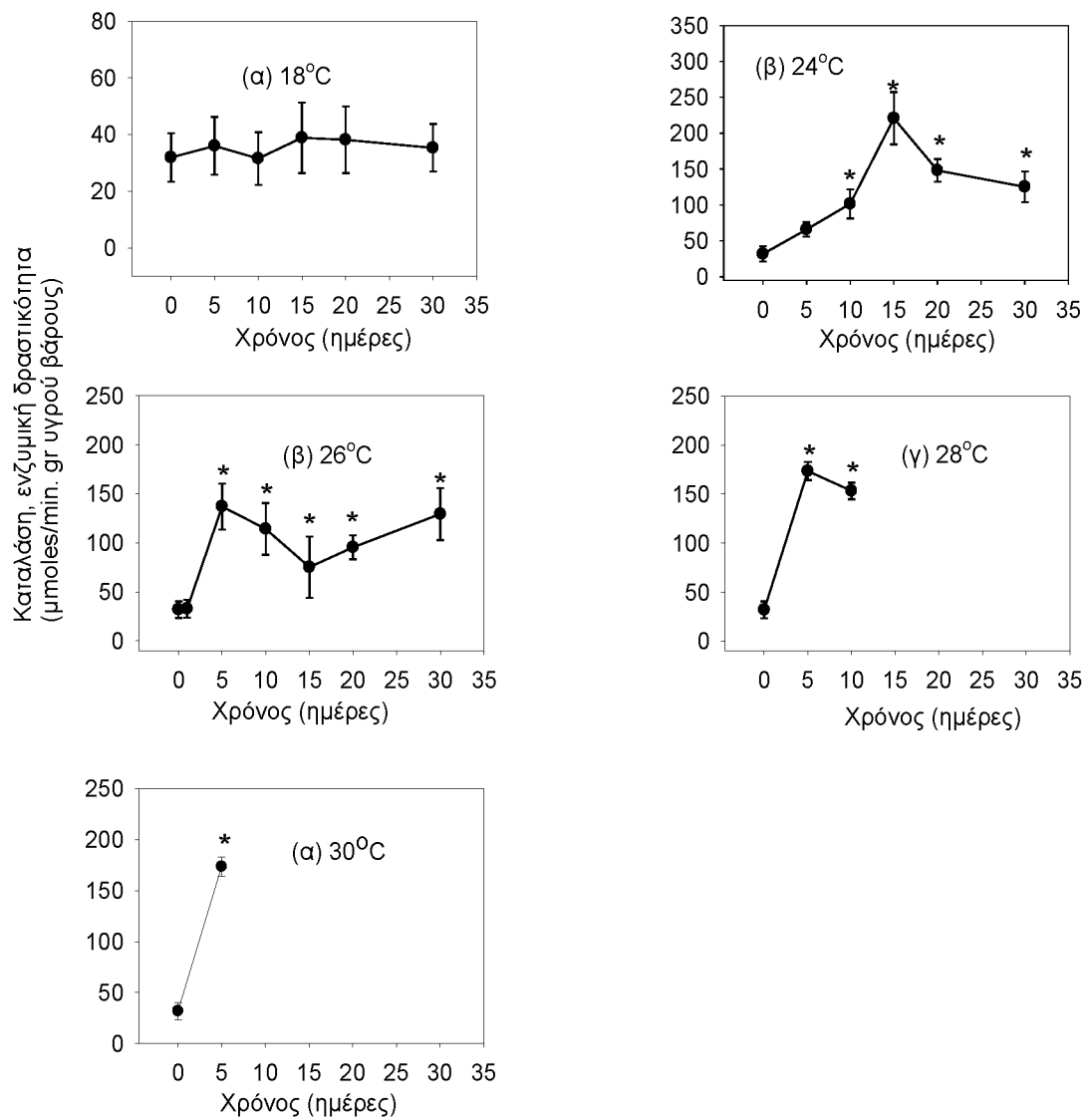
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5, η δραστικότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, στους 24 °C αυξάνεται μέχρι τη 10η ημέρα σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα, ενώ μειώνεται σημαντικά κατά τη 15η μέχρι την 30η ημέρα, με τα επίπεδα δραστικότητας να βρίσκονται κάτω από αυτά του μάρτυρα (18 °C). Όσον αφορά τους 26 °C, η δραστικότητα της SOD μειώνεται μέχρι τη 10η ημέρα όπου σχεδόν υποδιπλασιάζεται σε σχέση με τα επίπεδα δραστικότητας του μάρτυρα. Στη συνέχεια, η δραστικότητα αυξάνεται μέχρι την 20η ημέρα για να μειωθεί σημαντικά την 30η σε επίπεδα σχεδόν υποτετραπλάσια σε σχέση με αυτά του μάρτυρα. Στους 28 °C, η δραστικότητα του ενζύμου εμφανίζεται μειωμένη κατά την 5η και 10η ημέρα σε σχέση με τα επίπεδα δραστικότητας του μάρτυρα.



Σχήμα 5. Επίδραση της θερμοκρασίας στην δραστηριότητα της SOD στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) του *Mytilus galloprovincialis*.

3.6 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της καταλάσης (CAT) στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) του *Mytilus galloprovincialis*.

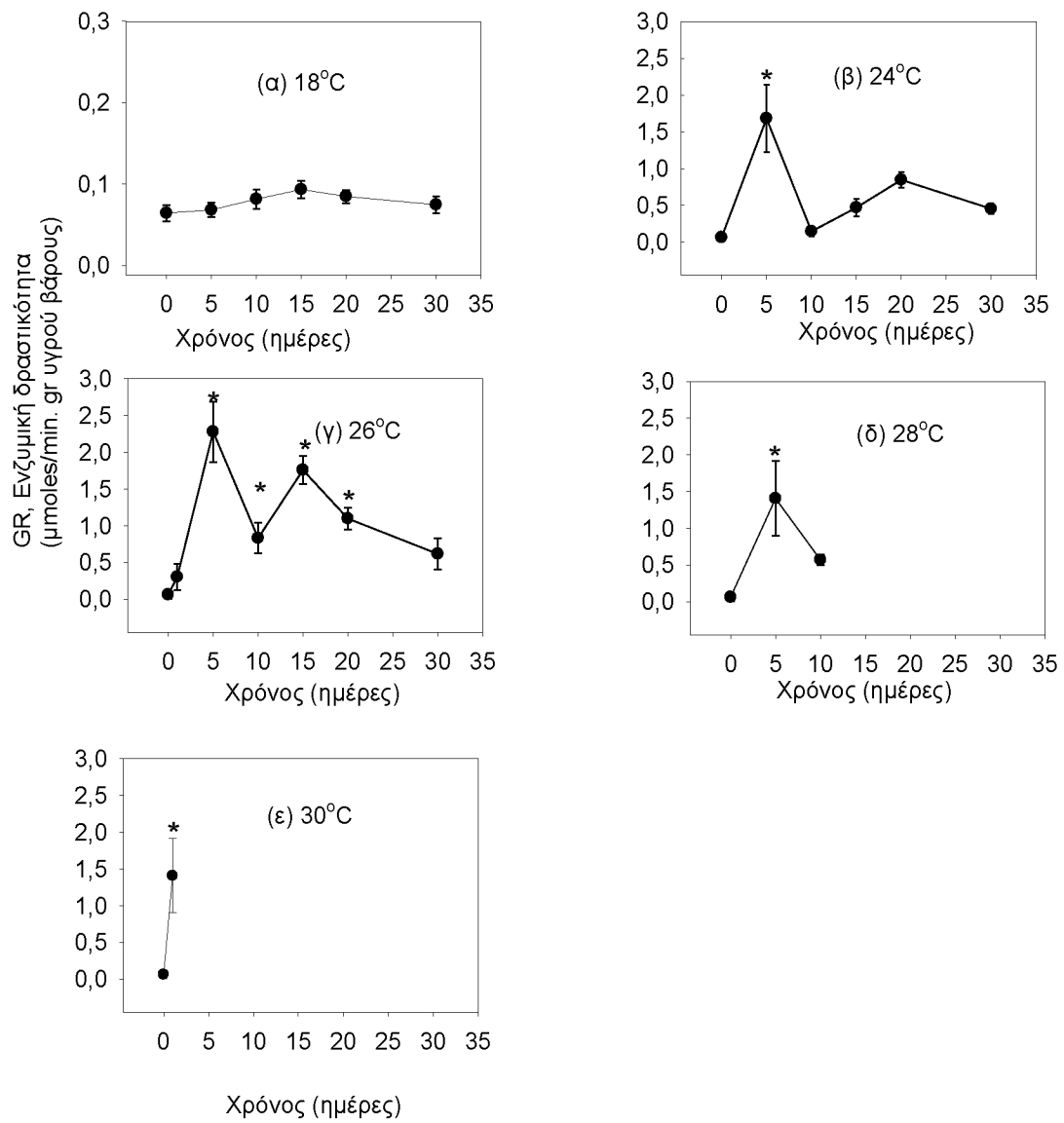
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6, στους 24 °C, τα επίπεδα δραστικότητας της καταλάσης αυξάνονται σημαντικά μέχρι τη 15η ημέρα, όπου φτάνουν σχεδόν τα 250 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{g}$ ιστού. Στη συνέχεια, μετά τη 15η ημέρα και μέχρι την 30η η ενζυμική δραστικότητα μειώνεται σε σχέση με αυτήν των 15 ημερών, είναι όμως σημαντικά υψηλότερη (σχεδόν τριπλάσια στις 30 ημέρες) σε σχέση με αυτή του μάρτυρα (18 °C). Στους 26 °C, μετά από σχεδόν καμία αύξηση της δραστικότητας την 1η ημέρα, αυτή αυξάνεται σε τριπλάσια επίπεδα την 5η ημέρα και μειώνεται σταδιακά μέχρι την 15η ημέρα. Από την 15η ημέρα του πειράματος, μέχρι την 30η η ενζυμική δραστικότητα αυξάνεται σε τριπλάσια επίπεδα σε σχέση με αυτά του μάρτυρα. Η χαμηλότερη δραστικότητα συνεπώς, παρατηρείται τη 15η ημέρα του πειράματος. Στους 28 °C η ενζυμική δραστικότητα της καταλάσης αυξάνεται την 5η ημέρα και στη συνέχεια μειώνεται την 10η. Τα επίπεδα της παρόλα αυτά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα στις συγκεκριμένες ημέρες, σε θερμοκρασίες νερού 24 °C, 26 °C.



Σχήμα 6. Επίδραση της θερμοκρασίας στην δραστικότητα της καταλάσης (catalase) στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) του *Mytilus galloprovincialis*.

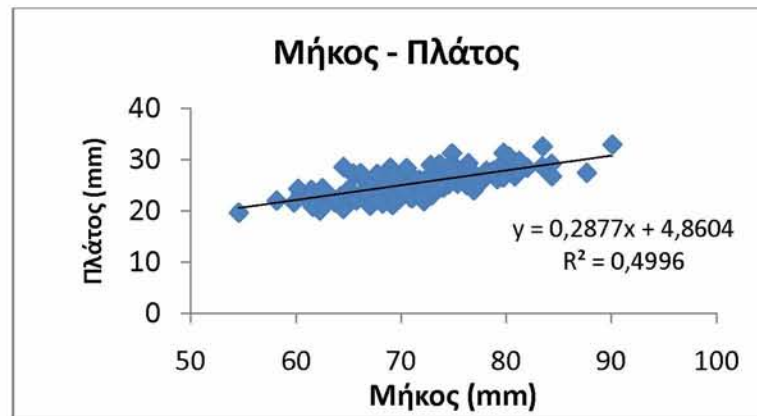
3.7 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στη δραστικότητα του ενζύμου της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) του *Mytilus galloprovincialis*.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7, στους 24°C, η δραστικότητα εμφανίζεται μεγαλύτερη στις 5 ημέρες του πειράματος και έπειτα μειώνεται απότομα στη 10η ημέρα. Στη συνέχεια, τα επίπεδα δραστικότητας διπλασιάζονται από τη 10η μέχρι την 20η ημέρα για να μειωθούν στα περίπου 0,5μmol/min.gr ιστού κατά την 30η ημέρα. Στους 26 °C, εμφανίζεται ένα παρόμοιο πρότυπο με αυτό των 24 °C, με τα επίπεδα όμως δραστικότητας να είναι μεγαλύτερα. Η μέγιστη δραστικότητα εμφανίζεται κατά την 5η ημέρα ενώ στη συγκεκριμένη θερμοκρασία η μείωση της δραστικότητας συμβαίνει κατά την 15η ημέρα και όχι την 20η όπως συμβαίνει στους 24 °C. Τέλος, στους 28 °C, η ενζυμική δραστικότητα της ρεδουκτάσης ακολουθεί σχεδόν το ίδιο πρότυπο σε ποσοτικό επίπεδο όπως και στους 24 °C μέχρι τις 10 ημέρες. Δηλαδή, αρχικά αυξάνεται έως τα περίπου 1,5μmol/min.gr ιστού και στη συνέχεια σχεδόν υποτριπλασιάζεται κατά τη 10η ημέρα.

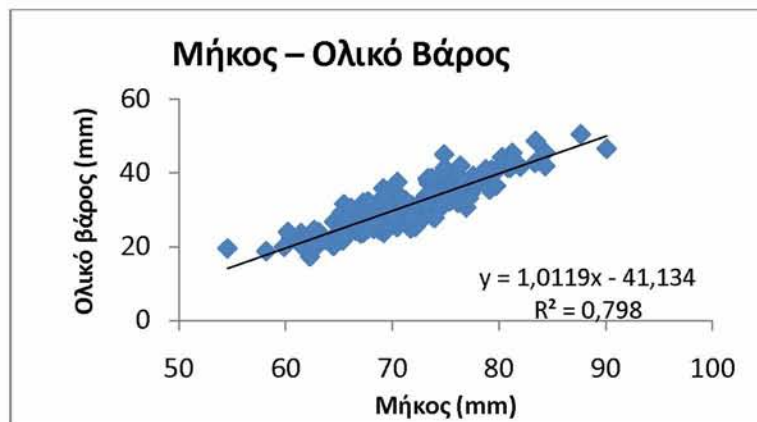


Σχήμα 7. Επίδραση της θερμοκρασίας στην δραστικότητα της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (GR) στον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) του *Mytilus galloprovincialis*.

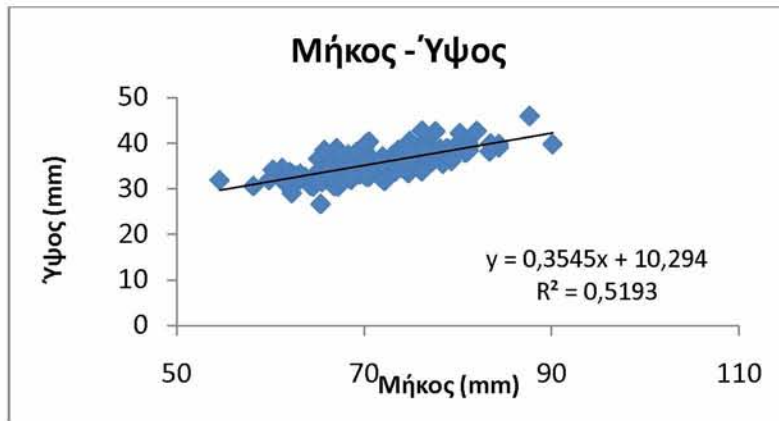
3.8 Βιομετρικές συσχετίσεις



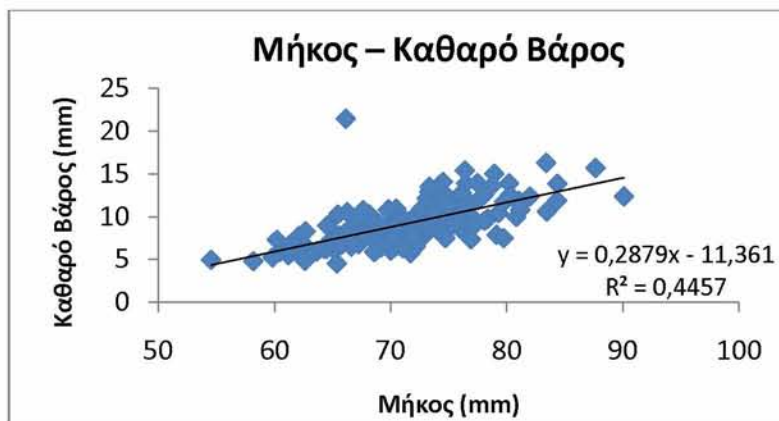
Σχήμα 8. Απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ του μήκους του κελύφους και του πλάτους του κελύφους των δειγμάτων.



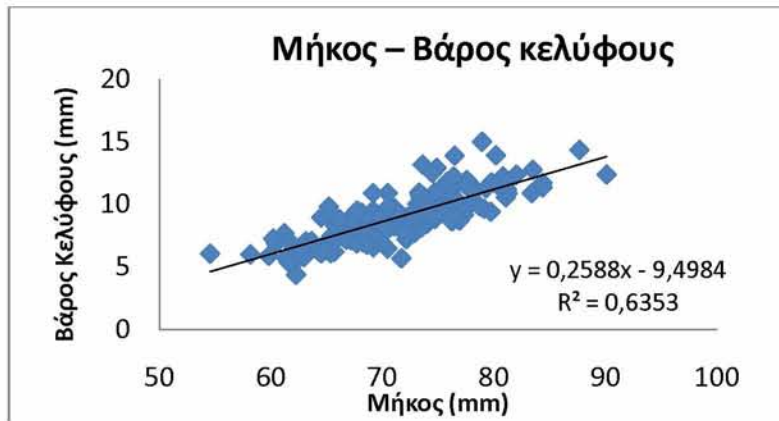
Σχήμα 9. Απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ του μήκους του κελύφους και του ολικού βάρους των δειγμάτων.



Σχήμα 10. Απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ του μήκους του κελύφους και του ύψους του κελύφους των δειγμάτων.



Σχήμα 11. Απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ του μήκους του κελύφους και του καθαρού βάρους των δειγμάτων.



Σχήμα 12. Απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ του μήκους του κελύφους και του βάρους του κελύφους των δειγμάτων.

3.9 Συσχέτιση μεταξύ της ενζυμικής δραστηριότητας, της θερμοκρασίας και των μορφομετρικών χαρακτηριστικών.

Πίνακας 3.1: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - ύψους κελύφους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του μανδύα.

	Height	SOD.Mantle	GR.Mantle
SOD.Mantle	-,170 ,084		
GR.Mantle	,095 ,372	-,075 ,484	
CAT.Mantle	,082 ,466	-,144 ,201	-,164 ,177

Πίνακας 3.2: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - μήκους κελύφους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του μανδύα.

	Length	SOD.Mantle	GR.Mantle
SOD.Mantle	-,133 ,179		
GR.Mantle	,109 ,306	-,075 ,484	
CAT.Mantle	,109 ,334	-,144 ,201	-,164 ,177

Πίνακας 3.3: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - ολικού βάρους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του μανδύα.

	Weight.Whole	SOD.Mantle	GR.Mantle
SOD.Mantle	-,154 ,119		
GR.Mantle	,064 ,549	-,075 ,484	
CAT.Mantle	,080 ,480	-,144 ,201	-,164 ,177

Πίνακας 3.4: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - βάρους κελύφους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του μανδύα.

	Weight.Shell	SOD.Mantle	GR.Mantle
SOD.Mantle	-,145 ,142		
GR.Mantle	,096 ,370	-,075 ,484	
CAT.Mantle	,002 ,988	-,144 ,201	-,164 ,177

Πίνακας 3.5: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - πλάτους κελύφους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του μανδύα.

	Width	SOD.Mantle	GR.Mantle
SOD.Mantle	-,149 ,132		
GR.Mantle	,021 ,844	-,075 ,484	
CAT.Mantle	,066 ,559	-,144 ,201	-,164 ,177

Πίνακας 3.6: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - μήκους κελύφους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του προσαγωγού μυός.

	LengthP	SOD.PAM	GR.PAM
SOD.PAM	,101 ,431		
GR.PAM	-,142 ,249	-,212 ,108	
CAT.PAM	,165 ,212	-,021 ,879	,044 ,746

Πίνακας 3.7: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - πλάτους κελύφους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του προσαγωγού μύος.

	WidthP	SOD.PAM	GR.PAM
SOD.PAM	,180 ,158		
GR.PAM	-,157 ,201	-,212 ,108	.
CAT.PAM	,061 ,644	-,021 ,879	,044 ,746

Πίνακας 3.8: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - ύψους κελύφους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του προσαγωγού μύος.

	HeightP	SOD.PAM	GR.PAM
SOD.PAM	,082 ,523		
GR.PAM	-,175 ,153	-,212 ,108	
CAT.PAM	,035 ,792	-,021 ,879	,044 ,746

Πίνακας 3.9: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - ολικού βάρους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του προσαγωγού μύος.

	Weight.Flesh.P	SOD.PAM	GR.PAM
SOD.PAM	,137 ,286		
GR.PAM	-,048 ,695	-,212 ,108	
CAT.PAM	,163 ,217	-,021 ,879	,044 ,746

Πίνακας 3.10: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - βάρους κελύφους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του προσαγωγού μυός.

	Weight.Shell.P	SOD.PAM	GR.PAM
SOD.PAM	,126 ,325		
GR.PAM	-,180 ,142	-,212 ,108	
CAT.PAM	,034 ,800	-,021 ,879	,044 ,746

Πίνακας 3.11: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman ενζυμικής δραστηριότητας - καθαρού βάρους των δειγμάτων στα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του προσαγωγού μυός.

	Weight.Whole.P	SOD.PAM	GR.PAM
SOD.PAM	,129 ,312		
GR.PAM	-,194 ,113	-,212 ,108	
CAT.PAM	,157 ,234	-,021 ,879	,044 ,746

Πίνακας 3.12: Μη παραμετρική συσχέτιση Spearman θερμοκρασίας - μορφομετρικών χαρακτηριστικών σε δείγματα από τα οποία αφαιρέθηκε ο ιστός του προσαγωγού μυός.

	Length	HeightP	WidthP	Weight.Whole.P	Weight.Flesh.P	Weight.Shell.P
Temperature.PAM	-,164	-,130	-,260*	-,286*	-,337**	-,254*
	,168	,277	,027	,015	,004	,031

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεταφορά ηλεκτρονίων από ανηγμένα οργανικά μόρια σε μόρια δέκτες όπως είναι το νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NAD^+), το φωσφορο-νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NADP^+), ή το οξυγόνο, αποτελεί βασικό κομμάτι του ενεργειακού μεταβολισμού. (Quijano et al., 2016). Η ενέργεια που αποθηκεύεται με αυτόν τον τρόπο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ATP. Το μονοπάτι της γλυκόλυσης το οποίο δεν απαιτεί την ύπαρξη οξυγόνου, είναι μια ακολουθία αντιδράσεων που μπορεί να δημιουργήσει δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος με παραγωγή δύο μορίων ATP. Το πυροσταφυλικό μπορεί να ακολουθήσει την αναερόβια διαδρομή και να μετατραπεί τελικώς σε μόρια όπως το γαλακτικό, ή να οξειδωθεί αεροβίως σε διοξείδιο του άνθρακα (Berg & Tymoczko, 2002). Η παραγωγή ενδιάμεσων, δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) μπορεί να συμβεί σε διάφορα σημεία της αναπνευστικής αλυσίδας.

Προηγούμενες μελέτες (Ανέστης, 2008), έδειξαν ότι αρχικά, καθώς το δίθυρο *M. galloprovincialis* αντιμετωπίζει συνθήκες θερμικής καταπόνησης, μειώνει το ρυθμό ανοίγματος των θυρίδων και μεταπίπτει σε αναερόβιο μεταβολισμό. Το μεσογειακό μύδι όμως όπως και άλλοι οργανισμοί της μεσοπαραλιακής ζώνης που αντιμετωπίζουν ακραίες συνθήκες στη φύση, δεν ακολουθεί το αναερόβιο ζυμωτικό μονοπάτι που καταλήγει στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αντί αυτού, μπορεί να χρησιμοποιήσει πιο αποδοτικά μονοπάτια που παράγουν περισσότερα μόρια ATP για κάθε μόριο γλυκόζης. Έτσι λοιπόν, ακολουθώντας εναλλακτικά μονοπάτια, τα τελικά προϊόντα του αναερόβιου μεταβολισμού είναι το ηλεκτρικό και το προπιονικό οξύ με παραγωγή 6 μορίων ATP ανά μόριο γλυκόζη αντί για 2 μόρια ATP που παράγονται στο μονοπάτι του γαλακτικού. (Hochachka & Mustafa, 1972). Όταν ένας εξώθερμος οργανισμός βρίσκεται στα άκρα των θερμικών ορίων ανοχής του, παρατηρείται

μείωση της αερόβιας ικανότητάς του και αυτό με τη σειρά του οφείλεται στη δυσαρμονία μεταξύ των απαιτήσεων σε οξυγόνο και παροχής σε οξυγόνο. (Poertner, 2001). Σε υψηλές θερμοκρασίες, λοιπόν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ενεργοποιείται ο αναερόβιος μεταβολισμός. Σε προηγούμενες μελέτες (Ανέστης, 2008) είναι φανερό ότι κατά την αύξηση σε θερμοκρασίας μέχρι τους 24 βαθμούς Κελσίου, σε εργαστηριακές συνθήκες, παρατηρείται πτώση του αερόβιου μεταβολισμού κάτι που φαίνεται από τη μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου της κινάσης του πυροσταφυλικού. Η κινάση του πυροσταφυλικού συμμετέχει στον έλεγχο της γλυκολυτικής πορείας και συγκεκριμένα στην εκροή από αυτήν την πορεία. Άλλα σημαντικά ένζυμα ελέγχου της γλυκόλυσης είναι η εξοκινάση και η φωσφοφρουκτοκινάση. Όλα τα προαναφερθέντα ένζυμα ελέγχουν μη αντιστρεπτές αντιδράσεις. Η αύξηση του ATP είναι ένας τρόπος αναστολής των ενζύμων αυτών μέσω αλλοστερικής τροποποίησης. Η κινάση του πυροσταφυλικού, επειδή ελέγχει την εκροή από τη γλυκολυτική πορεία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σα δείκτης για το μεταβολικό μονοπάτι που θα ακολουθήσει ο ιστός του οργανισμού. Η μετάπτωση σε αναερόβιο μεταβολισμό στους 24 βαθμούς Κελσίου συνδέεται με μια μείωση στον ενεργειακό μεταβολισμό. Αυτό συνδέεται με την υποξία την οποία αντιμετωπίζει το μύδι σε αυτές τις θερμοκρασίες λαμβάνοντας υπόψη τις κλειστές θυρίδες. Η πτώση στο μεταβολικό ρυθμό, ή μεταβολική καταστολή όπως ονομάζεται συνδέεται με την αποθήκευση ενέργειας μέχρι να επανέλθουν οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επιτρέπουν την επαναφορά της φυσιολογικής μεταβολικής δραστηριότητας. (Brand et al, 1993). Τα αποτελέσματα από τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων δείχνουν ότι στους 24 βαθμούς Κελσίου, τη θερμοκρασία δηλαδή όπου ο οργανισμός βρίσκεται σε καταστολή της μεταβολικής δραστηριότητας, στο μανδύα, παρατηρείται μια αύξηση της δραστικότητας της δισμουτάσης του υπεροξειδίου. Πιο πάνω

αναφέρθηκε η συσχέτιση μεταξύ υψηλού αερόβιου μεταβολισμού και οξειδωτικού στρες. Το γεγονός ότι η δραστηριότητα τόσο της SOD όσο και της καταλάσης αυξάνεται φαίνεται να σχετίζεται με μια υπόθεση που έχει περιγραφεί ως "προετοιμασία για το οξειδωτικό στρες". Οι δραστικές μορφές οξυγόνου, τις οποίες προσπαθούν να μετατρέψουν σε μη δραστικές μορφές, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, παράγονται στις εξής καταστάσεις: ως αποτέλεσμα υπεροξίας, δηλαδή μεγάλης συγκέντρωσης και πρόσληψης οξυγόνου, σε περιπτώσεις υψηλών επίπεδων λειτουργίας του μεταβολισμού, μετά από μεταπτώσεις στη διαθεσιμότητα του οξυγόνου και τέλος σε καταστάσεις όπου ο μεταβολισμός υπολειτουργεί με συνέπεια την αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών και ενζύμων (Welker et al., 2013) Σύμφωνα με την υπόθεση της προετοιμασίας για το οξειδωτικό στρες (Hermes-Lima et al., 1998), κατά τη μεταβολική καταστολή δεν υπάρχουν αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου. Αυτό, παρόλα αυτά, έρχεται σε αντίθεση με τα αυξημένα επίπεδα δραστηριότητας της δισμουτάσης του υπεροξειδίου που παρατηρούνται στο μανδύα καθόλη τη διάρκεια, και τον οπίσθιο προσαγωγό μυ (PAM) μέχρι τη 10η ημέρα του πειράματος, σε σχέση με το μάρτυρα. Αντίθετα, στον οπίσθιο προσαγωγό μυ, η καταλάση παρουσιάζει αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας καθόλη τη διάρκεια του πειράματος με τη μέγιστη δραστηριότητα να εμφανίζεται στις 15 ημέρες. Στο μανδύα, εμφανίζεται σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης κατά τη 10 ημέρα και μετά εμφανίζεται πτώση. Υπάρχει δηλαδή ένα αντίστροφο πρότυπο μεταξύ δισμουτάσης του υπεροξειδίου και καταλάσης σε δύο διαφορετικούς ιστούς. Οι οργανισμοί που ζουν στη μεσοπαραλιακή ζώνη, έρχονται αντιμέτωποι με διάφορες καταστάσεις καταπόνησης. Ο αναερόβιος μεταβολισμός των μυδιών, η υποξία και κατ' επέκταση η μεταβολική καταστολή είναι προσαρμοστικές καταστάσεις τις οποίες έχει διαμορφώσει με

εξαιρετικά λεπτό τρόπο η εξελικτική πορεία. Τις καταστάσεις αυτές, θα ακολουθήσει η επανοξυγόνωση του οργανισμού. Ο οργανισμός, δηλαδή, φαίνεται να περιμένει την επαναφορά του οξυγόνου στα φυσιολογικά επίπεδα στους ιστούς του και επάγει τη σύνθεση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ένας τρόπος να σχηματιστούν δραστικές μορφές οξυγόνου κατά την καταστολή του μεταβολισμού είναι η διαρροή ηλεκτρονίων από την επιβράδυνση της αλυσίδας μεταφοράς των ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Παρόλα αυτά, δεν είναι γνωστή η ποσότητα των ROS που μπορούν να δημιουργηθούν με αυτόν τον τρόπο. Ένας άλλος τρόπος να δημιουργηθούν ROS, είναι λόγω της συσσώρευσης ηλεκτρικού οξέος, που όπως αναφέρθηκε αποτελεί εναλλακτικό και πιο αποδοτικό μονοπάτι της αναεροβίωσης σε σχέση με το μονοπάτι του γαλακτικού. Το ηλεκτρικό αποτελεί ένα πιθανό υπόστρωμα από το οποίο μπορούν να δημιουργηθούν ROS, μιας και παρέχει ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του δυναμικού της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης ΔΨ. Η αλλαγή αυτή του δυναμικού σχετίζεται με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Welker, 2013). Ο Welker (2013) προτείνει ότι κατά τη φάση της υποξίας, οι δραστικές μορφές οξυγόνου αυξάνονται και αυτός είναι ο τρόπος με τον οποίο ενεργοποιούνται τα γονίδια που κωδικοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Παρόλα αυτά, μια νέα ανασκόπηση (Hermes-Lima et al., 2015) φαίνεται να δίνει μια νέα εκδοχή στην "προετοιμασία για το οξειδωτικό στρες". Έτσι λοιπόν, καθώς οι ζωικοί οργανισμοί εκτίθενται σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, υπάρχει ένα σημείο pO_2 όπου η δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου αυξάνεται προσωρινά λόγω συσσώρευσης ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτό έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης (όπως Sirt3) που προκαλούν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στα αντιοξειδωτικά ένζυμα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Αυτό που διατηρεί

την αντιοξειδωτική άμυνα ενεργή παρά την μείωση των δραστικών μορφών οξυγόνου είναι ίσως τα προϊόντα υπεροξειδίωσης των λιπών τα οποία συνεχίζουν να δρουν στους μεταγραφικούς παράγοντες (Hermes-Lima et al., 2015). Σε απομονωμένα μιτοχόνδρια θηλαστικών φαίνεται ότι η παραγωγή ROS αυξάνεται σημαντικά κυρίως στο σύμπλοκο I, σε δύο περιπτώσεις: i) όταν τα μιτοχόνδρια δεν παράγουν ATP και έχουν υψηλό Δp (Η δύναμη που ωθεί τα πρωτόνια μέσα στα μιτοχόνδρια) και μειωμένο απόθεμα συνεχζύμου Q, και ii) όταν η αναλογία NADH/NAD⁺ είναι υψηλή στη μιτοχονδριακή μήτρα (Murphy et al., 2009). Ο μηχανισμός με τον οποίο ενεργοποιείται η γονιδιακή μεταγραφή κατά την υποξία, σχετίζεται με τον παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor -1, Παράγοντας επαγόμενος από την υποξία -1). Ο παράγοντας αυτός, αποτελεί βασικό ρυθμιστικό παράγοντα για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου φαίνεται να έχουν σταθεροποιητικό ρόλο στον HIF-1a (Guzy et al., 2003, Welker, 2013), αναδεικνύοντας με αυτόν τρόπο τη ρυθμιστική δράση που έχουν οι ROS σε κυτταρικά γεγονότα.

Στους 26 και 28 βαθμούς Κελσίου, μετά την 20η ημέρα στον ιστό του μανδύα και μετά την 15η στον ιστό του οπίσθιου προσαγωγού μυός, η δραστηριότητα της κινάσης του πυροσταφυλικού αυξάνεται (Ανέστης, 2008). Ο αερόβιος μεταβολισμός φαίνεται να ενεργοποιείται ξανά, χωρίς αυτό να σημαίνει την παύση του αναερόβιου μεταβολισμού. Από πρόσφατες έρευνες (An and Choi, 2010) που πραγματοποιήθηκαν στην αιμόλεμφο του διθύρου *Scapharca broughtonii* φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου μεταβολισμού και αυξημένων επιπέδων ROS. Φαίνεται, ότι μετά από τις 15 ημέρες έκθεσης σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 26 βαθμών Κελσίου, ο ρυθμός ανοίγματος του κελύφους αυξάνεται. Αυτό πιθανώς σχετίζεται και με τη συσσώρευση μεταβολικών απεκκρίσεων. Μετά τις συγκεκριμένες ημέρες, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (SOD, καταλάση) μειώνουν τη

δραστηκότητά τους όπως φαίνεται στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Σε αυτό το σημείο εισέρχεται η διαδικασία της απόκρισης θερμικού πλήγματος. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα στις συγκεκριμένες θερμοκρασίες φαίνεται ακολουθούν το πρότυπο μείωσης που εμφανίζουν οι πρωτεΐνες θερμικού πλήγματος (Hsps) μετά από έκθεση ατόμων του είδους *M. galloprovincialis* σε θερμικό στρες για 30 ημέρες (Anestis et al., 2007). Φαίνεται δηλαδή ότι η δραστηκότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων μειώνεται παράλληλα με τη μείωση των επίπεδων των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος σε αυτές τις θερμοκρασίες. Οι Hsps ανήκουν στο μηχανισμό κυτταρικής επιδιόρθωσης, επιδιορθώνοντας τις μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες πέρα από άλλες λειτουργίες τους. Η εξήγηση για το ότι η ενεργοποίηση του αερόβιου μεταβολισμού σημαίνει πτώση στα επίπεδα των Hsps και των αντιοξειδωτικών ενζύμων, σε θερμοκρασία νερού πάνω από 26 βαθμούς, έχει να κάνει με τη σχέση των απαιτήσεων των κυττάρων σε ATP και των αποθεμάτων ή το ρυθμό παραγωγής ενέργειας. Ο οργανισμός μετά από παρατεταμένο εγκλιματισμό σε υψηλές θερμοκρασίες επιβραδύνει το μεταβολικό του ρυθμό. Φαίνεται ότι εκτός από τις διεργασίες της ανάπτυξης, κίνησης και αναπαραγωγής οι οποίες περιορίζονται σημαντικά, επηρεάζεται ακόμη και η ενέργεια που απαιτείται για τη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου (Sokolova et al., 2012). Αυτό επιτυγχάνεται με μείωση του αερισμού, της κυκλοφορίας, της μείωσης της ενεργητικής μεταφοράς ιόντων κατά μήκος των μεμβρανών καθώς και της σύνθεσης μακρομορίων (Sokolova et al., 2012). Μελέτες σε στρείδια, έχουν δείξει ότι η διατήρηση της βαθμίδωσης πρωτονίων και η αποφυγή διαρροής απαιτεί το 22-38% της συνολικής κατανάλωσης οξυγόνου (Cherkasov et al., 2006). Επίσης, η πρωτεϊνοσύνθεση απαιτεί το 6-17% της συνολικής κατανάλωσης οξυγόνου. (Cherkasov et al., 2006). Φαίνεται, από μελέτες στο *Helix aspersa*, ότι σε κατάσταση καταστολής του μεταβολισμού, η μιτοχονδριακή αναπνοή

και ο ρυθμός μετατροπής του ATP μειώνονται (Bishop et al., 2002). Η ενεργοποίηση του αερόβιου μεταβολισμού παράλληλα με τη λειτουργία του αναερόβιου μετά τις 15 ημέρες έκθεσης σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 26 βαθμών δε συνεπάγεται ισορροπία της παραγωγής ATP με τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου. Ο οργανισμός έχει ανάγκες σε οξυγόνο και η έναρξη του αερόβιου μεταβολισμού προσπαθεί να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες. Πιθανώς, οι προστατευτικοί μηχανισμοί του κυττάρου που περιλαμβάνουν την αντιοξειδωτική άμυνα και τη σύνθεση των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος, απαιτούν μεγάλα ποσά ενέργειας και το κύτταρο επιλέγει να την καταναίμει σε διαφορετικές, περισσότερο βασικές για την επιβίωση λειτουργίες. Η επιδιόρθωση των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη καθώς και η αντιμετώπιση της αύξησης των δραστικών μορφών οξυγόνου πιθανώς μετατίθενται για τη στιγμή που οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνουν ξανά ανεκτές από τον οργανισμό. Ο οργανισμός, δηλαδή, πιθανώς συνεχίζει να βρίσκεται σε κατάσταση ενεργειακής οικονομίας με κύριο χαρακτηριστικό ότι δεν μπορεί να συνεχίσει αυτή τη στρατηγική για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης είναι το ένζυμο που ανακυκλώνει την οξειδωμένη γλουταθειόνη στην ανηγμένη της μορφή, η οποία χρησιμοποιείται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης για τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε υδρογόνο. Στους 24 °C, στον ιστό του μανδύα φαίνεται ότι ενώ η δραστηριότητα αυξάνεται σημαντικά τις πρώτες πέντε ημέρες, στη συνέχεια πέφτει στις 10 για να ακολουθήσει σταδιακή αύξηση με τα επίπεδα να είναι αυξημένα σε σχέση με αυτά του μάρτυρα. Αυτό δείχνει ότι κατά τη μεταβολική καταστολή των 24 °C, υπάρχει επαγωγή και αυτού του αντιοξειδωτικού ενζύμου. Στους 26 °C, στο μανδύα τα επίπεδα δραστηριότητας της ρεδουκτάσης αρχικά αυξάνονται ενώ στη συνέχεια παρατηρείται πτωτική πορεία ιδιαίτερα στις 20 με 30 ημέρες, με τις τιμές να είναι

πάνω από αυτές του μάρτυρα. Αυτό το αποτέλεσμα, μπορεί να εξηγηθεί με τον ίδιο τρόπο. Παρόλο δηλαδή που έχουμε επανέναρξη του αερόβιου μεταβολισμού, η κατανομή της ενέργειας δεν ευνοεί την επαγωγή της αντιοξειδωτικής άμυνας από την 20η ημέρα και μετά. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει και στους 28 °C μέχρι τη 10η ημέρα του πειράματος. Στον προσαγωγό μυ, στους 24 °C, η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης εμφανίζει μια αύξηση της δραστηριότητας σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση της δραστηριότητας την 5η ημέρα και 20η ημέρα. Στους 26 °C, στον προσαγωγό μυ, η ενζυμική δραστηριότητα της ρεδουκτάσης είναι αυξημένη σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα, καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Μετά από μια αύξηση την 15η ημέρα, σημείο ενεργοποίησης του αερόβιου μεταβολισμού όπως αναφέρθηκε παραπάνω, παρατηρείται πτώση της δραστηριότητας όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά ένζυμα που μελετήθηκαν.

Η μεγάλη θνησιμότητα που παρατηρήθηκε τις πρώτες ημέρες στους 28 και στους 30 βαθμούς Κελσίου έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενη καταγραφή σε άτομα του είδους *M. galloprovincialis* που εγκλιματίστηκαν σε παρόμοιες εργαστηριακές συνθήκες. Αυτή η διαφορά φαίνεται να σχετίζεται με το μήνα συλλογής των μυδιών από το πεδίο. Στην παρούσα εργασία, η συλλογή πραγματοποιήθηκε στις αρχές του Ιουνίου σε αντίθεση με προηγούμενα πειράματα (Ανέστης, 2008) όπου δεν παρατηρήθηκε σημαντική θνησιμότητα στις συγκεκριμένες θερμοκρασίες τις πρώτες ημέρες και η συλλογή έγινε το Μάρτιο. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με την αναπαραγωγική περίοδο η οποία συμβαίνει κατά τους μήνες Μάρτιο - Μάιο καθώς και με τις υψηλότερες θερμοκρασίες που παρατηρούνται.

Αναφορικά με τις βιομετρικές συσχετίσεις, η συσχέτιση μήκους – ολικού βάρους είναι καλή ($R^2=0,798$) Αντίστοιχη συσχέτιση έχει παρατηρηθεί και σε άλλους βενθικούς οργανισμούς (Vafidis et al., 2014) , (Antoniadou and Vafidis, 2009) . Όσον

αφορά τη συσχέτιση Spearman μεταξύ μορφομετρικών χαρακτηριστικών και ενζυμικής δραστηριότητας, αυτή εμφανίζεται τόσο θετική όσο και αρνητική. Η τιμή της σημαντικότητας όμως υποδηλώνει ότι οι συσχετίσεις δεν είναι τόσο σημαντικές όπως θα έδειχνε μια τιμή μικρότερη από 0,05. Τα κύτταρα των συγκεκριμένων ιστών είτε πρόκειται για άτομα με μικρότερες ή μεγαλύτερες τιμές μορφομετρικών χαρακτηριστικών, έχουν την ίδια αντιμετώπιση απέναντι στην οξειδωτική καταπόνηση αντιδρώντας με παρόμοια σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ανάλυση της συσχέτισης της θερμοκρασίας με τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά δείχνει μια αρνητική σχέση η οποία είναι στατιστικά σημαντική. Αυτό δείχνει μια πιθανή μείωση σε χαρακτηριστικά όπως το πλάτος του κελύφους, το καθαρό βάρος, το ολικό βάρος και το βάρος του κελύφους. Υπάρχει δηλαδή ένδειξη για μείωση των παραπάνω χαρακτηριστικών με την αύξηση της θερμοκρασίας.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν μια αρχική ενεργοποίηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού ενώ υπάρχει ξεκάθαρη μείωση του ενεργειακού μεταβολισμού σε σημείο καταστολής όπως υποδεικνύουν τα γλυκολυτικά ένζυμα. Η εξήγηση που πιθανώς ισχύει αφορά την προετοιμασία για το οξειδωτικό στρες. Ο οργανισμός φαίνεται να αναμένει τη στιγμή που θα επανοξυγονωθεί ή τη στιγμή που οι περιβαλλοντικές συνθήκες γίνουν πιο ομαλές. Σε αυτήν την περίπτωση μιας και οι ενεργειακές ανάγκες, καθώς και ο ρυθμός παραγωγής ATP θα είναι υψηλές, ο οργανισμός πρέπει να προετοιμαστεί για τις δραστικές μορφές οξυγόνου που θα δημιουργηθούν λόγω του αερόβιου μεταβολισμού. Όπως δείχνουν νέες προτάσεις (Hermes-Lima et al., 2015) φαίνεται να υπάρχει μια μικρή αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου λόγω υποξίας και αυτή φαίνεται να πυροδοτεί την ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Ο οργανισμός σε θερμοκρασίες 26 βαθμών Κελσίου και πάνω μετά τις 15 ημέρες ενεργοποιεί ξανά τον αερόβιο μεταβολισμό του παράλληλα με τον αναερόβιο, και αυτό φαίνεται να σχετίζεται με τις υψηλές θερμοκρασίες, σε μια προσπάθεια να καλύψει τις ενεργειακές απαιτήσεις. Η στρατηγική επιβίωσης του οργανισμού παρόλα αυτά πιθανώς κατανέμει την ενέργεια σε πιο βασικές διεργασίες μειώνοντας την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού πλήγματος καθώς και των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Φαίνεται δηλαδή ότι λόγω του θερμικού στρες και της επακόλουθης υποξίας, ο οργανισμός μεταθέτει την επιδιόρθωση των πρωτεϊνών και την αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων, καθώς και τη μείωση πιθανών δραστικών μορφών οξυγόνου που έχουν δημιουργηθεί, για τη στιγμή που ο οργανισμός επανέλθει σε

ομαλές συνθήκες θερμοκρασίας και οξυγόνωσης. Μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν να εστιάσουν στην ποσοτικοποίηση των δραστικών μορφών οξυγόνου ώστε να ελεγχθεί η εγκυρότητα των παραπάνω συμπερασμάτων και των υποθέσεων που υπάρχουν. Μια άλλη σημαντική πρόοδος θα επιτευχθεί από την ανάλυση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών που αποτελούν σημάδι οξειδωτικής καταπόνησης αλλά και κατ' επέκταση από την ποσοτικοποίηση των καρβονυλίων ώστε να υπάρχει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα. Επίσης, η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των αποπτωτικών δεικτών μπορούν να συμπληρώσουν τα παραπάνω αποτελέσματα. Οι βιομετρικές συσχετίσεις είναι θετικές ενώ υπάρχει συσχέτιση μεταξύ θερμοκρασίας και μορφομετρικών χαρακτηριστικών, η οποία μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω σε μελλοντικές μελέτες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία:

An, M. I., & Choi, C. Y. (2010). Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 155(1), 34-42.

Anestis, A., Lazou, A., Pörtner, H. O., & Michaelidis, B. (2007). Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(2), R911-R921.

Antoniadou, C., & Vafidis, D. (2009). Population structure and morphometric relationships of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in the South Aegean Sea. *Cahiers de biologie marine*, 50(4), 293-301.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. 5th edit. Biochemistry. W. H. Freeman.

Bishop, T., St-Pierre, J., & Brand, M. D. (2002). Primary causes of decreased mitochondrial oxygen consumption during metabolic depression in snail cells. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(2), R372-R382.
Blackwell Publishing Ltd.

Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134(3), 707-716.

Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 79-110.

Carrington, E., Waite, J. H., Sarà, G., & Sebens, K. P. (2015). Mussels as a model system for integrative ecomechanics. *Marine Science*, 7.

Cherkasov, A. S., Ringwood, A. H., & Sokolova, I. M. (2006). Combined effects of temperature acclimation and cadmium exposure on mitochondrial function in eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(9), 2461-2469.

Dahlhoff, E.P., 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. *Annual review of physiology*, 66, pp.183–207.

Feder, M.E. & Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61(1), pp.243–282.

Gosling, E. (2007). *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. John Wiley & Sons.

Guzy, R. D., & Schumacker, P. T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental physiology*, 91(5), 807-819.

Hermes-Lima, M., Moreira, D. C., Rivera-Ingraham, G. A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T. C., & Campos, É. G. (2015). Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1122-1143.

Hermes-Lima, M., Storey, J. M., & Storey, K. B. (1998). Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 120(3), 437-448.

Hill, R. W., Wyse, G. A., & Anderson, M. (2008). *Animal physiology*.

Hochachka, P. W., & Mustafa, T. (1972). Invertebrate Facultative Anaerobiosis A reinterpretation of invertebrate enzyme pathways suggests new approaches to helminth chemotherapy. *Science*, 178(4065), 1056-1060.

Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (1999). *Biochemical adaptation* (p. 1984). Princeton University Press.

Kültz, D. (2003). Evolution of the cellular stress proteome: From monophyletic origin to ubiquitous function. *Journal of Experimental Biology*, 206(18), 3119-3124. doi:10.1242/jeb.00549

Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 225-257.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*.

Müller, M., Mentel, M., Van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., . . . Martin, W. F. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 444-495. doi:10.1128/MMBR.05024-11

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13.

Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 70(1), 158-169.

Paoletti, F., Mocali, A., & Aldinucci, D. (1990). Superoxide-driven NAD (P) H oxidation induced by EDTA-manganese complex and mercaptoethanol. *Chemico-biological interactions*, 76(1), 3-18.

Passonneau, J. V., & Lowry, O. H. (1993). *Enzymatic analysis: a practical guide*. Springer Science & Business Media.

Pörtner, H. O. (2010). Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *The Journal of experimental biology*, 213(6), 881-893.

Pörtner, H. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88(4), 137–146. <http://doi.org/10.1007/s001140100216>

Quijano, C., Trujillo, M., Castro, L., & Trostchansky, A. (2016). Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox biology*, 8, 28-42.

Seed, R. (1971). A physiological and biochemical approach to the taxonomy of *Mytilus edulis* L. and *M. galloprovincialis* Lmk. from SW England. *Cahiers de biologie marine*, (3).

Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., & Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1-15.

Storey, K. B. (1993). Molecular mechanisms of metabolic arrest in mollusks. *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*, 253-271.

Vafidis, D., Antoniadou, C., Voultsiadou, E., & Chintiroglou, C. (2014). Population structure of the protected fan mussel *Pinna nobilis* in the south Aegean Sea (eastern Mediterranean). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94(04), 787-796.

Welker, A. F., Moreira, D. C., Campos, É. G., & Hermes-Lima, M. (2013). Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(4), 384-404.

Willmer, P., Stone, G., & Johnston, I. (2009). *Environmental physiology of animals*. John Wiley & Sons.

Ελληνική βιβλιογραφία:

Ανέστης Α. (2008) Βιοχημικές και μεταβολικές προσαρμογές των δίθυρων *Mytilus galloprovincialis* και *Modiolus barbatus* στην αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ. 71-74

Φειδάντσης Κ. (2012) Εποχιακές, βιοχημικές και φυσιολογικές αποκρίσεις της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Συσχέτιση με τη θερμοκρασία της θάλασσας και την κλιματική αλλαγή. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ABSTRACT

There is a significant interest in organisms that face harsh environmental conditions. The basic research that results from studying these organisms is helpful for the prediction of how the natural phenomena affect the living organisms and also for the management which is related to these phenomena. Studying these organisms can also be useful in applied research fields such as biotechnology and engineering. The main theme of the present study is the cellular response related to oxidative stress in a characteristic bivalve mollusk, the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after it was exposed at different temperatures (18 °C, 24 °C, 26 °C, 28 °C, 30 °C), in laboratory conditions for a 30-day time period. Meanwhile, in every sampling, the morphometric characteristics of the samples were measured in order to examine a possible correlation between them, temperature and the enzymatic activity. The study of the oxidative stress response was accomplished with the measurement of the activity of the enzymes: superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and catalase (CAT). The results show an induction of the antioxidant enzymatic defense in high temperatures. The oscillations that have been observed can be explained in terms of energy metabolism, the heat shock response and the hypoxic conditions. The results complement other studies related to mussel's thermal physiology and enhance the preparation for the oxidative stress hypothesis proposed in 1998. There is an obvious relation between the oxidative stress and the heat shock response in a general framework where the intermediate metabolism is characterized by an incoherence of the energy supply and the energy demands.

Keywords: Biochemistry, Physiology, Marine Biology

