

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

«ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ»

«Εποχικά πρότυπα αντιοξειδωτικής άμυνας και βασικού μεταβολισμού του είδους *Seria officinalis* (Linnaeus, 1758) σε διαφορετικούς οικοτόπους στο βόρειο Αιγαίο»

Γεώργιος Ευθυμιάδης

Βόλος, 2020

«Εποχικά πρότυπα αντιοξειδωτικής άμυνας και βασικού μεταβολισμού του είδους *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) σε διαφορετικούς οικοτόπους στο βόρειο Αιγαίο»

«Seasonal antioxidant defense and intermediate metabolic patterns of the species *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) in different habitats of the north Aegean Sea»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :

1) Βαφειδής 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) Χατζηιωάννου Μαριάνθη, Επίκουρη Καθηγήτρια (Δρ.)- Εκτροφή Σαλιγκαριών και Βατράχων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών 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 προσαρμογή τους σε αυτές τις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

Αφιερωμένο
στον πατέρα μου Κοσμά και στη μητέρα μου Ιωάννα
για την αγάπη και την στήριξη τους

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Προτού ξεκινήσει η επιστημονική ανάλυση της Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, θα ήθελα με μεγάλη μου χαρά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της συγκεκριμένης εργασίας Δημήτριο Βαφείδη και τον Κωνσταντίνο Φειδάντση, τόσο για την υποστήριξη που μου έδειξαν στο να φέρω εις πέρας το παρακάτω πείραμα όσο και για την επιπλέον βοήθεια τους στα περεταίρω θέματα που αφορούν τη σχολή και την επιστήμη μου, καθώς και το προσωπικό του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος που με τη βοήθεια τους κατάφερα να θέσω τα θεμέλια των μελλοντικών μου στόχων.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου Κοσμά και Ιωάννα για την ανιδιοτελή αγάπη και υποστήριξη τους, όχι μόνο στα χρόνια της φοίτησής μου στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, αλλά και στην έως τώρα πορεία της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κλιματική αλλαγή έχει άμεσες επιπτώσεις στους υδάτινους οργανισμούς που αφορούν κυρίως τις κυτταρικές λειτουργίες και τη φυσιολογία τους, επιδρώντας στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και τη θνησιμότητα τους. Οι αλλαγές του κλίματος μπορεί να έχουν διαφορετική επίπτωση χωρικά με αποτέλεσμα να εντοπίζονται περιοχές με ευνοϊκότερες κλιματικές συνθήκες (**refugia**). Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η εύρεση και οριοθέτηση τέτοιων περιοχών με στόχο τη διατήρηση σημαντικά εμπορικών θαλάσσιων ειδών. Η λήψη του τελικού συμπεράσματος θα διεξαχθεί, βάσει των βιοχημικών και φυσιολογικών αποκρίσεων του οργανισμού στόχου, που θα μελετηθεί. Βάση των παραπάνω, πραγματοποιήθηκαν εποχικές δειγματοληψίες (χειμώνας, άνοιξη, καλοκαίρι, φθινόπωρο) με στόχο τη συλλογή ατόμων του είδους *Sepia officinalis* (κοινή σουπιά) από το Βιστωνικό, το Θερμαϊκό, και τον Παγασητικό κόλπο. Το πείραμα περιλάμβανε φασματοφωτομετρική ανάλυση, και καταγραφή της δραστηριότητας βασικών ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας, δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT) και ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR), και του οξειδωτικού στρες με τη μέθοδο TBARS, αλλά και ενζύμων του βασικού μεταβολισμού, συγκεκριμένα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (L-LDH), συνθετάση του κιτρικού (CS) και της 3-υδροξυ-CoA αφυδρογονάσης (HOAD), σε δείγματα βραγχίων και μανδύα. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια αλλαγή στη δραστηριότητα των ενζύμων μεταξύ των εποχικών δειγματοληψιών του καλοκαιριού, της άνοιξης και του φθινοπώρου. Όσον αφορά τις τοποθεσίες συλλογής, υψηλότερες τιμές δραστηριότητας παρατηρήθηκαν στον Παγασητικό και χαμηλότερες στο Βιστωνικό.

Λέξεις κλειδιά: *Sepia officinalis* (L.), refugia, κλιματική αλλαγή, οξειδωτικό στρες, αντιοξειδωτικά ένζυμα, μεταβολικά ένζυμα, TBARS.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Κλιματική αλλαγή και ενδιαιτήματα διατήρησης (refugia).....	8
1.2. Κύτταρο	8
1.2.1 Χημική σύσταση κυττάρου.....	9
1.3. Οξειδωτικό στρες και Αντιοξειδωτική άμυνα	10
1.4 Βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα.....	11
1.5 Βασικά ένζυμα του οργανισμού	12
1.6. Βιολογία της Κοινής Σουπιάς (<i>Sepia officinalis L.</i>)	13
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	15
2.1 Εφαρμογή πρωτοκόλλου TBARS.....	15
2.2 Αναλώσιμα.....	15
2.3 Ομογενοποίηση.....	15
2.4 Φυγοκέντρηση	16
2.5 Φασματοφωτόμετρο.....	17
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
3.1 Αποτελέσματα βραγχίων (Gills)	27
3.2 Αποτελέσματα μανδύα (Mantle).....	33
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	38
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40
6. ABSTRACT	43

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Κλιματική αλλαγή και ενδαιτήματα διατήρησης (*refugia*)

Ο πλανήτης μας αποτελείται από μια πληθώρα οικοσυστημάτων που χαρακτηρίζονται από σύνολα βιοτικών και αβιοτικών παραμέτρων. Οι παράμετροι αυτοί επιδρούν καθοριστικά στην ανάπτυξη και φυσιολογία του κάθε οργανισμού, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Από την εποχή της Βιομηχανικής Επανάστασης τον 18^ο αιώνα, έχει παρατηρηθεί, μια διαταραχή της αλληλουχίας των παραγόντων που καθορίζουν την ομαλή λειτουργία του περιβάλλοντος. Η περιβαλλοντική αυτή διαταραχή έχει κορυφωθεί τις τελευταίες δεκαετίες, ως επί το πλείστον από την ανθρώπινη δραστηριότητα. Το παραπάνω φαινόμενο που είναι γνωστό και ως **κλιματική αλλαγή**, αφορά τις μεταβολές του κλίματος σε παγκόσμιο επίπεδο, με τις επιπτώσεις της σε οικολογικό αλλά και οικονομικό επίπεδο, να είναι πλέον άμεσα εμφανής.

Επιπλέον η κλιματική αλλαγή, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία διατήρησης ή εξαφάνιση διαφόρων βιολογικών οργανισμών, με έμμεσο ή άμεσο αντίκτυπο στην ορθή λειτουργία του περιβάλλοντος και των υπόλοιπων οργανισμών. Το πρόβλημα αυτό οδήγησε τον σύγχρονο άνθρωπο στην ανάπτυξη της ιδέας των *κατάλληλων ενδαιτημάτων διατήρησης* ή αλλιώς *refugia*. Τα ενδαιτήματα αυτά αποτελούν λιγότερο επηρεασμένες περιοχές από την κλιματική αλλαγή, συνιστώντας ιδανικότερα οικοσυστήματα διατήρησης οργανισμών.

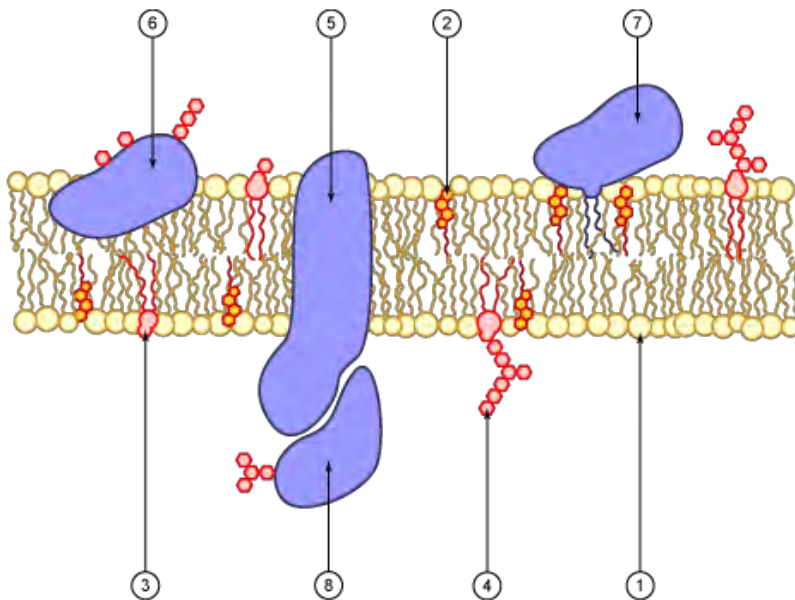
1.2. Κύτταρο

Ως **κύτταρο** νοείται το μικρότερο δομικό συστατικό της έμβιας ύλης που συνιστά τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα που εκδηλώνει το φαινόμενο της ζωής. Απαρτίζεται από ένα σύστημα οργανιδίων, που βρίσκονται σε άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Αναλόγως του συνολικού αριθμού των κυττάρων οι οργανισμοί διακρίνονται σε **μονοκύτταρους** (π.χ. *Amoeba proteus*) και **πολυκύτταρους** (π.χ. *Homo sapiens sapiens*). Ο πυρήνας αποτελεί το βασικότερο οργανίδιο (και συνήθως το μεγαλύτερο) λειτουργώντας ως το κέντρο ελέγχου του κυττάρου. Ανάλογα με το αν διαθέτουν σχηματισμένο πυρήνα ή όχι, τα κύτταρα διακρίνονται σε **ευκαρυωτικά** και **προκαρυωτικά** αντίστοιχα. Η περαιτέρω ανάλυση των οργανιδίων του κυττάρου αποτελεί πεδίο μελέτης πέραν αυτής της εργασίας, παρόλα αυτά θα αποσαφηνιστεί η χημική του σύσταση η οποία κατέχει κεντρικό ρόλο στην συγκεκριμένη εργασία.

1.2.1 Χημική σύσταση κυττάρου

Στο φλοιό της Γης απαντώνται 92 χημικά στοιχεία, εκ των οποίων τα 27 μόνο είναι απαραίτητα για τη ζωή. Τα βασικότερα από αυτά, είναι ο άνθρακας (C), το υδρογόνο (H), το οξυγόνο (O) και το άζωτο (N), που είναι και τα επικρατέστερα στους οργανισμούς σε ποσοστό περίπου 96%.

Η **κυτταρική ή πλασματική μεμβράνη** αποτελεί την εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει ένα κύτταρο και το ξεχωρίζει από το περιβάλλον του. Είναι *ημιπερατή* και ο ρόλος της είναι ο έλεγχος των εξερχόμενων και εισερχόμενων ουσιών που ορίζουν την **ομοιόσταση** του κυττάρου. Η δομή της απαρτίζεται από λιπίδια, κατά κόρον από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη (42%), πρωτεΐνες (55%) και σάκχαρα (3%). Ουσιαστικά η κυτταρική μεμβράνη αποτελεί ένα *λιποειδές υγρό πάχους δύο μορίων*. Τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης είναι οργανωμένα σε δύο στιβάδες. Μέσα σε αυτήν την φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα είναι ενσωματωμένες οι πρωτεΐνες της μεμβράνης. Μάλιστα, καταλαμβάνουν διαφορετικές θέσεις ανάλογα με τον ρόλο που καλούνται να παίξουν. Τα παραπάνω απεικονίζονται στην Εικόνα 1:



Εικόνα 1.1 Απεικόνιση κυτταρικής μεμβράνης 1) Φωσφολιπίδια, 2) Χοληστερόλη, 3) Γλυκολιπίδια, 4) Σάκχαρα, 5,6,7,8) Πρωτεΐνες

(Πηγή: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_membrane_scheme.png)

1.3. Οξειδωτικό στρες και Αντιοξειδωτική άμυνα

Κάθε πολυκύτταρος οργανισμός *συνιστάται από δισεκατομμύρια κύτταρα*. Η κάθε ομάδα κυττάρων εξειδικεύεται στη διεκπεραίωση μιας συγκεκριμένης λειτουργίας με στόχο τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Τα κύτταρα με τη σειρά τους αποτελούνται από *μόρια ενωμένα μεταξύ τους*. Η ενότητα των μορίων αναπτύσσεται χάρη στις ιδιότητες των **ηλεκτρονίων** (e^-) να δημιουργούν χημικούς δεσμούς μεταξύ τους. Κάποιες φορές οι δεσμοί αυτοί 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 διαθέσιμο για δεσμό ηλεκτρόνιο των ελεύθερων ριζών, σχηματίζει ζεύγος με άλλα ηλεκτρόνια γειτονικών μορίων, το οποίο οδηγεί στη δημιουργία νέων *ασταθών μορίων* (δηλαδή ελεύθερων ριζών). Αυτό προκαλεί διαταραχή της ισορροπίας των συστατικών του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA του. Η πολλαπλή δημιουργία ελεύθερων ριζών προκαλεί την οξείδωση των κυττάρων του οργανισμού, γνωστή ως **οξειδωτικό στρες**. Το οξειδωτικό στρες οδηγεί στην καταστροφή των κυττάρων και στη συνέχεια στη φθορά του **ιστού** (ιστός = αποτελείται από κύτταρα με όμοια λειτουργία). Οι **δραστικές μορφές οξυγόνου** (Reactive Oxygen Species / ROS) αποτελούν κάποια από τα βασικότερα είδη ασταθή μορίων που οδηγούν στη δημιουργία του φαινομένου αυτού. Ο σχηματισμός των δραστικών μορφών οξυγόνου οφείλεται σε μια πληθώρα παραγόντων, όπως το βιολογικό στρες, η έλλειψη απαραίτητων θρεπτικών συστατικών από την τροφή κλπ.

Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	
Κατηγορίες	Παραδείγματα
Ελεύθερες ρίζες	$\cdot O_2^-$, $\cdot OH$, $HO_2\cdot$, $NO\cdot$, $ROO\cdot$
Ιόντα και Μόρια	H_2O_2 , $ONOO^-$, $HOCl$, $ROOH$

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση των Δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και αναφορά χαρακτηριστικών παραδειγμάτων κάθε κατηγορίας.

Ο καταλληλότερος τρόπος για την εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες και τη διαφύλαξη του βιολογικού συστήματος είναι με τη βοήθεια των **αντιοξειδωτικών ουσιών**. Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν φυσικές (του οργανισμού) ή τεχνητές ουσίες που βοηθούν στη δέσμευση ελεύθερων δραστικών ριζών, αποτελώντας μέσο

προσφοράς του ηλεκτρονίου που αναζητούν οι τελευταίες. Ονομάζονται αλλιώς και *περισυλλέκτες ελευθέρων ριζών*. Η παραπάνω δέσμευση έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας και τη διαφύλαξη του κυττάρου. Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά του κυττάρου είναι τα ένζυμα *δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD)*, η *καταλάση (CAT)* και *υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)* (τα παραπάνω ένζυμα, αλλά και επιπλέον θα αναφερθούν αναλυτικότερα στο υποκεφάλαιο 1.5). Οι *λιποδιαλυτές A, D, E* και *υδατοδιαλυτές βιταμίνες C* και κάποιες του συμπλέγματος *B*, καθώς και διάφορα *φυτοχημικά* (π.χ. φαινόλες), αποτελούν επίσης αντιοξειδωτικά μέσα που βοηθούν στη διαφύλαξη του οργανισμού από το οξειδωτικό στρες.

1.4 Βασικά αντιοξειδωτικά ένζυμα

Στο συγκεκριμένο υποκεφάλαιο θα γίνει συνοπτική ανάλυση της επίδρασης τους στην άμυνα του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες. Τα παρακάτω τρία ένζυμα είναι τα βασικά της αντιοξειδωτικής άμυνας που προστατεύουν τον οργανισμό από το οξειδωτικό στρες.

Το **υπεροξειδίου της δισμουτάσης (SOD)**, είναι ένα ένζυμο που προσφέρει σημαντική αντιοξειδωτική άμυνα σχεδόν όλα τα ζωντανά κύτταρα που εκτίθενται στο οξυγόνο. Διαχωρίζεται σε επιπλέον υποκατηγορίες ενζύμων που ανάλογα με το μέταλλο που απαιτούν για την εκδήλωση της ενζυμικής τους δράσης ταξινομούνται σε διάφορα είδη SOD π.χ. Fe-SOD, Mn-SOD κλπ. Καταλύει τη διάσπαση της ρίζας υπεροξειδίου, O_2^- , είτε σε μοριακό οξυγόνο (O_2) είτε σε υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Το υπεροξειδίου παράγεται ως υποπροϊόν του μεταβολισμού του οξυγόνου και αν η περιεκτικότητά του δεν ρυθμίζεται, προκαλεί κυτταρικές βλάβες διαφόρων τύπων. Το υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι επίσης επιβλαβές και αποικοδομείται από άλλα ένζυμα όπως η καταλάση.

Η **καταλάση (CAT)** είναι ένα συχνά απαντώμενο ένζυμο που βρίσκεται σε όλους σχεδόν τους ζώντες οργανισμούς που εκτίθενται σε οξυγόνο. Στον άνθρωπο εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα. Μέσα σε διάφορα είδη κυττάρων βρίσκεται στα *υπεροξυσώματα*. Καταλύει την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Επίσης, η καταλάση έχει έναν από τους υψηλότερους αριθμούς κύκλου εργασιών όλων των ενζύμων. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει εκατομμύρια μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο κάθε δευτερόλεπτο. Είναι τετραμερές βιομόριο τεσσάρων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, με μήκος πάνω από 500 αμινοξέα. Η ενεργή περιοχή κάθε υπομονάδας του ενζύμου αυτού

περιέχει ένα μόριο NADPH. Η βέλτιστη θερμοκρασία και pH για την δράση της, ποικίλλει ανά είδος.

Η **ρεδουκτάση ή υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)** μαζί με την καταλάση αποτελούν ένζυμα που εξειδικεύονται στην ρύθμιση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα κύτταρα. Όπως το υπεροξείδιο της δισμουτάσης έτσι και η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης διαχωρίζεται σε επιπλέον ένζυμα ανάλογα με την καταλυτική δράση. 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.

ANTIOXEIDΩΤΙΚΑ ENZYMA	
Ένζυμο	Χημική αντίδραση
Δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD)	$\cdot\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Καταλάση (CAT)	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$

Πίνακας 2. Κατηγοριοποίηση των προαναφερθέντων αντιοξειδωτικών ενζύμων και αναφορά στους μηχανισμούς δράσης του καθενός.

1.5 Βασικά ένζυμα του οργανισμού

Σε αντίθεση με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα παρακάτω, αποτελούν ένζυμα του βασικού μεταβολισμού, μη συμμετέχοντας στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού αλλά σε διεργασίες που αφορούν το μεταβολισμό του.

Η **γαλακτική αφυδρογονάση (L-LDH)**, αποτελεί ένζυμο κατά τον κύκλο της γλυκολύσεως, καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ. Αυξημένα επίπεδα LDH στο αίμα παρατηρούνται σε περιπτώσεις διατάξης της ομοιόστασης, από περιβαλλοντικούς ή παθολογικούς παράγοντες. Η γαλακτική αφυδρογονάση είναι υπεύθυνη για την κατάλυση του πυροσταφυλικού σε γαλακτικού οξέος με ταυτόχρονη αλληλομετατροπή των συνενζύμων NADH σε NAD⁺. Σε περίπτωση παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος στον οργανισμό, το ένζυμο αναστέλλεται (μέσω του φαινομένου της **αντίστροφης ανάδρασης**) με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού μετατροπής του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό.

Το ένζυμο **συνθετάση του κιτρικού (CS)**, εμφανίζεται στο πρώτο βήμα του κύκλου του κιτρικού οξέος (κύκλου Krebs), κατά την μετατροπή του κιτρικού οξέος σε ισοκιτρικό. Εντοπίζεται εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων στη μιτοχονδριακή μήτρα, αλλά κωδικοποιείται από πυρηνικό DNA και όχι από μιτοχονδριακό. Συντίθεται χρησιμοποιώντας κυτταροπλασματικά ριβοσώματα και στη συνέχεια μεταφέρεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Η λειτουργία του αφορά 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 (Wiegand G, Remington SJ, 1986).

Το **3-υδροξυ-CoA αφυδρογονάση (HOAD)**, είναι ένα ένζυμο που ταξινομείται ως οξειδοοδουκτάση, συμμετέχοντας στις μεταβολικές διεργασίες των λιπαρών οξέων. Ο ρόλος του ενζύμου αυτού είναι ο μεταβολισμός λιπαρών οξέων μεσαίας και βραχείας αλύσου (Genetics Home Reference, 2010). Συγκεκριμένα καταλύει το τρίτο βήμα της βήτα οξειδωσης, στην οξειδωση του L-3-υδροξυακυλ CoA από NAD⁺.

ENZYMA METABOLISMOY	
Ένζυμο	Χημική αντίδραση
Γαλακτική αφυδρογονάση (L-LDH)	<p>πυροσταφυλικό οξύ</p> $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$ <p>γαλακτικό οξύ</p>
Συνθετάση του κιτρικού (CS)	$\text{ακετυλ-CoA} + \text{oxaloacetate} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{κιτρικό} + \text{CoA-SH}$
3-υδροξυ-CoA αφυδρογονάση (HOAD)	$\text{(S)-3-υδροξυακυλ-CoA} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{3-oxoacyl-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Πίνακας 3. Κατηγοριοποίηση των προαναφερθέντων μεταβολικών ενζύμων και αναφορά στους μηχανισμούς δράσης του καθενός.

1.6. Βιολογία της Κοινής Σουπιάς (*Sepia officinalis* L.)

Φτάνοντας σε μήκος μανδύα έως και 49 cm και αγγίζοντας τα 4 kg σε βάρος, η κοινή σουπιά, *Sepia officinalis* (Carl Linnaeus 1758), αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα και γνωστότερα είδη σουπιάς παγκοσμίως. Διαβιεί σε αμμώδη περιβάλλοντα, βάθους έως και 200 m και απαντάται στη Μεσόγειο Θάλασσα, στη Βόρεια Θάλασσα και τη Βαλτική Θάλασσα. Αναφορές υποειδών, έχουν γίνει επίσης

και στην περιοχή της Νότιας Αφρικής. Ως κεφαλόποδο, χαρακτηρίζεται από τα γενικά χαρακτηριστικά που διακατέχουν την τάξη του. Μερικά από αυτά είναι το κλειστό κυκλοφορικό σύστημα (σε σύγκριση με τις υπόλοιπες τάξεις μαλακίων που έχουν ανοιχτό κυκλοφορικό σύστημα), το ζύστρο (απαντάται σχεδόν σε όλα τα μαλάκια), το εξελιγμένο νευρικό τους σύστημα που αποτελείται από εγκέφαλο (πέραν των κεφαλόποδων όλες οι άλλες τάξεις μαλακίων περιορίζονται σε γάγγλια που νευρώνουν συγκεκριμένα ζωτικά όργανα και χαρακτηρίζονται από την απουσία εγκεφάλου). Είναι επίσης θηρευτές, και τρέφονται κυρίως με καρκινοειδή. Είναι ενεργά την νύχτα ενώ το πρωί κρύβονται μέσα στην άμμο. Κατέχουν σημαντικό ρόλο στην τροφική αλυσίδα αφού αποτελούν τροφή διαφόρων θηρευτών όπως καρχαρίες, δελφίνια, μεγαλύτερα ψάρια κ.λ.π. πέραν του ανθρώπου. Έχουν προσδόκιμο ζωής 1-2 χρόνια και αναπαράγονται σε ηλικία 14 με 18 μηνών κατά την περίοδο μεταξύ άνοιξης και καλοκαιριού. Τα θηλυκά άτομα παράγουν από 100 έως 1.000 αυγά.

Η σουπιιά είναι ένα είδος σημαντικής εμπορικής αξίας για τον άνθρωπο, γεγονός που χρήζει τη διατήρηση της απαραίτητη. Εκτός της χρήσης της ως τροφή, η σημαντικότητα της επεκτείνεται σε επιπλέον τομείς της ανθρώπινης καθημερινότητας. Το εσωτερικό όστρακο της (σουπιοκόκκαλο), είναι διαδεδομένο ευρέως στην εμπορία πτηνών, χρησιμεύοντας ως μέσο προσφοράς ασβεστίου (Ca) σε κατοικίδια πτηνά. Παλαιότερα χρησίμευε και ως πρόσθετο σε οδοντόκρεμες. Μαζί με το μελάνι κατέχουν επίσης ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και πιθανώς αντικαρκινικές ιδιότητες. Το μελάνι επιπλέον χρησιμοποιείται στη χρήση της γραφής, και ως καλλυντικό.

ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	
<i>Επικράτεια (Domain):</i>	Eukaryota
<i>Βασίλειο (Kingdom):</i>	Animalia
<i>Φύλο (Phylum):</i>	Mollusca
<i>Κλάση (Class):</i>	Cephalopod
<i>Τάξη (Order):</i>	Sepiida
<i>Οικογένεια (Family):</i>	Sepiidae
<i>Γένος (Genus):</i>	Sepia
<i>Είδος (Species):</i>	<i>S. officinalis</i>
Διωνυμική ονομασία	

Sepia officinalis

Linnaeus, 1758

Εικόνα 1.2 Απεικόνιση ατόμου του είδους *S.officinalis* (L.) (Πηγή: <https://www.pinterest.it/pin/561401909780065184/>)



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εφαρμογή πρωτοκόλλου TBARS

Από τις μεθόδους μέτρησης των τελικών προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης περισσότερο δημοφιλής είναι η μέθοδος TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), ευρύτερα γνωστή ως Ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (Γεώργιος Α. Παπαγεωργίου 2005). Η παραγωγή Μηλονικής Αλδεϋδης (MDA), λόγω της υπεροξειδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), υπό την επίδραση συγκεκριμένων συνθηκών θερμοκρασίας και πίεσης, μετά από την κατάλληλη επεξεργασία των δειγμάτων (τα βήματα επεξεργασίας αναφέρονται στην συνέχεια του Κεφαλαίου 2). Όσον αφορά τα άτομα *S. officinalis* (L.) που χρησιμοποιήθηκαν, η εφαρμογή της μεθόδου έγινε στα βράγχια και στο μανδύα των δειγμάτων.

2.2 Αναλώσιμα

Χρησιμοποιήθηκε πληθώρα αναλώσιμων για την πραγματοποίησή του πειράματος. Όπως υποδηλώνει και το όνομα της τεχνικής που ακολουθήθηκε, TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), το κύριο 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). Το βάρος του ιστού του δείγματος που τοποθετήθηκε στην πλαστική κυψελίδα ήταν το 1/10 w/w του συνολικού μείγματος, αφού πρώτα ομογενοποιήθηκε σε δεκαπλάσια ποσότητα φωσφορικού buffer 50mM pH 7.4. Η μεταφορά των απαραίτητων συστατικών για το πείραμα, μεταφέρθηκαν στην πλαστική κυψελίδα με πιπέτες 100 – 1.000 μl.

2.3 Ομογενοποίηση

Η ομογενοποίηση, επιτεύχθηκε σε κοινό ομογενοποιητή και αποτέλεσε το πρώτο βήμα το πειράματος. Με τη βοήθεια του φωσφορικού buffer (50mM pH 7.4) και

το 1/10 της ποσότητας του ιστού από μανδύα ή βράγχιο του είδους *Sepia officinalis* (L.), δημιουργήθηκε το αρχικό ομογενοποιημένο μείγμα. Το κάθε δείγμα ιστού ξεχωριστά μετρήθηκε αρχικά σε ζυγαριά ακριβείας.



Εικόνα 2.1 Ενδεικτική απεικόνιση τυπικού ομογενοποιητή ιστών και των μαχαιριών που χρησιμοποιούνται (Αρχείο από: <https://www.omni-inc.com/omni-tissue-homogenizer-th-package.html>)

2.4 Φυγοκέντρωση

Η φυγοκέντρωση έγινε με σκοπό τον διαχωρισμό του δείγματος μέτρησης με τα υπόλοιπα υλικά του μείγματος. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε φυγόκεντρο ψύξης. Αφού ομογενοποιήθηκε το δείγμα ιστού με τη δεκαπλάσια ποσότητα φωσφορικού buffer (50mM pH 7.4), προστέθηκε σε μικρά tubes, τα οποία τοποθετήθηκαν διαμετρικά αντίθετα το ένα από το άλλο, φυγοκεντρήθηκαν αρχικά σε 2.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκαν 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 τοποθετήθηκαν για να βράσουν στους 90 °C για 60 λεπτά. Μετά τα 60 λεπτά, παρατηρήθηκε η επιθυμητή χρωματική αλλαγή (πέρας ογκομέτρησης) και τα δείγματα αφέθηκαν στον πάγκο έως ότου να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν αυτό έγινε, προστέθηκε σε κάθε δείγμα 1 ml βουτανόλης, και τα δείγματα

τοποθετήθηκαν πάλι σε tubes, φυγοκεντρήθηκαν για τελευταία φορά στα 3.000 g για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 2.2 Ενδεικτική απεικόνιση τυπικής φυγόκεντρος ψύξης. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας και ο αριθμός των στροφών το λεπτό εξαρτάται από το εκάστοτε πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται (Αρχείο από: <https://www.overstocklabequipment.com/Hermle-Z216-MK-Refrigerated-Centrifuge-p/z216-mk.htm>)

2.5 Φασματοφωτόμετρο

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου. Μετά την ολοκλήρωση της τελευταίας φυγοκέντρωσης (3.000 g 15 λεπτά), αφαιρέθηκε η υπερκείμενη φάση της βουτανόλης (butanol phase), και τοποθετήθηκε σε πλαστική κυψελίδα (μία κυψελίδα για κάθε δείγμα). Η φάση βουτανόλης, μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο, στα 532 nm. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Διαπιστώνουμε, από το νόμο του Beer – Lambert, $A = E \times d \times C$, ότι η αύξηση της συγκέντρωσης C, οδηγεί στη γραμμική αύξηση της τιμής της απορρόφησης A. Το d (απόσταση που ταξιδεύει η ακτινοβολία στο διάλυμα), ήταν ίδιο για όλα τα δείγματα, από τη στιγμή που μετρήθηκαν σε κυψελίδες ίδιου μεγέθους, όπως και η σταθερά E η οποία εξαρτάται από την πίεση, τη θερμοκρασία, το διάλυμα και το διαλύτη, που ήταν σταθερά για κάθε δείγμα. Η αυξημένη συγκέντρωση σηματοδοτεί

την αυξημένη ενζυμική παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων, η οποία μεταφράζεται ως αυξημένη συγκέντρωση του βιολογικού στρες στον οργανισμό. Οπότε διεξάγεται 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 συγκεκριμένη περιοχή. Η αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων σηματοδοτεί την ακαταλληλότητα του περιβάλλοντος διαβίωσης. Οπότε κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του φασματοφωτόμετρου, η χαμηλότερη κατά μέσο όρο απορροφητικότητα των δειγμάτων μιας περιοχής σε σχέση με μια άλλη μαρτυράει τις περισσότερες ιδανικές περιβαλλοντικές συνθήκες διαβίωσης.



Εικόνα 2.3 Ενδεικτική απεικόνιση τυπικού φασματοφωτόμετρου. Το φάσμα μέτρησης που απαιτεί η κάθε ερευνά καθορίζει και τη ρύθμιση του μήκους κύματος (σε nm) (Αρχείο από: <https://www.amazon.com/UNICO-SQ2800-VIS-Spectrophotometer-110V-220V/dp/B00EJ9BFN4>)

2.6 Προετοιμασία ομογενοποιημάτων

Προετοιμασία ομογενοποιημάτων για τον προσδιορισμό των ενζυμικών δραστηριοτήτων των ενζύμων:

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

Το διάλυμα ομογενοποίησης για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας 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 στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 7.000g. Το διάλυμα ομογενοποίησης διατηρείται σε θερμοκρασία 4-8oC, 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 τετραπλάσιο όγκο διαλύματος ομογενοποίησης. Για την L-LDH η αραιώση ήταν 1:5. Το ομογενοποίημα στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στα 7.000g. Στην περίπτωση της L-LDH, το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται για 15min στους 5°C στα 13.000g σε ψυχώμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο συλλέγεται και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων.

Αφού ρυθμιστεί το φωτόμετρο (θερμοκρασία, μήκος κύματος), τοποθετούνται τα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου στην κυψελίδα και αναδεύουμε με γυάλινη πιπέττα Pasteur. Τελευταίο προστίθεται το διάλυμα του ομογενοποιημένου ιστού στην κυψελίδα. Στη συνέχεια ακολουθεί φωτομέτρηση και προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου σύμφωνα με τους Passonneau & Lowry (1993).

1.Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)

Μέρος του υπερκειμένου αραιώθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης, με αραιώση 1:30 (Boutilier 1993). Η μέγιστη δραστηριότητα της L-LDH προσδιορίστηκε σε σπεκτροφωτόμετρο (Pharmacia LKB - Ultrospec III) στα 340nm ($\epsilon_{340}=6,22$), από τη μεταβολή (πτώση) της απορρόφησης, εξαιτίας της οξειδωσης 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 τυφλό δεν προστέθηκε πυροσταφυλικό οξύ. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 5 min (Kanatous, 2002).

Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (L-LDH)

0,5	ml Imidazole Buffer 50 mM (pH=7, θ=37°C)
0,01	ml NADH 0,15 mM

0,02	ml Pyruvate 1 mM
0,02	ml KCN 1 mM
0,002	ml δείγματος
0,448	ml 2d-H ₂ O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm για 5 λεπτά.

2.Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)

Η μέγιστη δραστηκότητα 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 1 ml προστέθηκαν 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης (50 mM, pH=7,5 στους 37°C), 0,02 ml DTNB (0,25 mM), 0,02 ml οξαλοξικού οξέος (0,5 mM), 0,01 ml ακετυλ-CoA (0,4 mM), 0,02 ml KCN (1 mM), 0,02 ml δείγματος ιστού και 0,410 ml 2d-H₂O. Στο τυφλό δεν προστέθηκε οξαλοξικό οξύ. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2 λεπτά (Kanatous, 2002).

Συνθετάση του κιτρικού οξέος (CS)

0,5	ml Imidazole Buffer 50 mM (pH=7,5, $\theta=37^{\circ}\text{C}$)
0,02	ml DTNB 0,25 mM
0,01	ml ακετυλ-CoA 0,4 mM
0,02	ml KCN 1 mM
0,02	ml Oxaloacetate 0,5 mM
0,02	ml δείγματος
0,410	ml 2d-H ₂ O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 412nm για 2 λεπτά.

3.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 1 ml προστέθηκαν 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζόλης (50 mM, pH=7 στους 37°C), 0,01 ml NADH (0,15 mM), 0,02

ml EDTA (1 mM), 0,01 ml ακετοακετυλ-CoA (0,1 mM), 0,02 ml KCN (1 mM), 0,02 ml δείγματος ιστού και 0,420 ml απιονισμένου H₂O. Στο τυφλό δεν προστέθηκε ακετοακετυλ-CoA. Ο χρόνος αντίδρασης για το λευκό μυ ήταν 10 min, ενώ για τον ερυθρό και τον καρδιακό μυ ήταν 2 λεπτά (Kanatous, 2002).

Αφυδρογονάση του β-υδροξυακυλο-CoA (HOAD)

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

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm για 2 λεπτά.

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

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

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

Για τον προσδιορισμό των σταθερών U_{max}/km και K_{cat} της κινητικής των παραπάνω ενζύμων, χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και καταγραφόταν η μέγιστη ενζυμική δραστηκότητα με τον τύπο που αναφέρθηκε παραπάνω. Στη συνέχεια οι σταθερές της κινητικής U_{max}/km και K_{cat} προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Graph Pad Prism. 5.0.

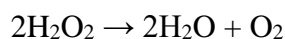
Προετοιμασία ομογενοποιήματος για τον προσδιορισμό των ενζυμικών δραστηριοτήτων των παρακάτω αντιοξειδωτικών ενζύμων:

4. Καταλάση (CAT)
5. Ρεδοκτάση της Γλουταθειόνης (GR)
6. 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). Το ομογενοποίημα στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στα 2.000g στους 4°C. Απομονώθηκε το υπερκείμενο και στη συνέχεια ψύχθηκε και αποψύχθηκε 3 φορές ώστε να σπάσουν οι μιτοχονδριακές μεμβράνες. Ακόλουθησε φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στα 6.000g στους 4°C. Αφού ρυθμιστεί το φωτόμετρο (θερμοκρασία, μήκος κύματος), τοποθετούνται τα αντιδραστήρια του πρωτοκόλλου στην κυψελίδα και αναδεύουμε με γυάλινη πιπέτα Pasteur. Τελευταίο προστίθεται το διάλυμα του ομογενοποιημένου ιστού στην κυψελίδα. Στη συνέχεια ακολουθεί φωτομέτρηση και προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου σύμφωνα με τους Passonneau & Lowry (1993).

4.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 αντίδραση:



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 παραπάνω διαλύματος φωσφορικών) και 0,01 ml δείγματος ιστού.

Καταλάση (CAT)

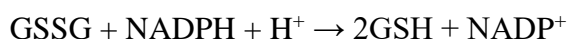
1	ml phosphate Buffer 50 mM (pH=7,4)
0,3	ml H ₂ O ₂ 30 mM

0,01	ml δείγματος
------	--------------

Η φωτομέτρηση έγινε στα 240nm

5. Ρεδουκτάση 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 αντίδραση:



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. Η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη 0,01 ml GSSG (oxidized glutathione – οξειδωμένη γλουταθειόνη) (1 mM). Στο τυφλό δε χρησιμοποιήθηκε GSSG. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2 λεπτά (Paglia & Valentine 1967).

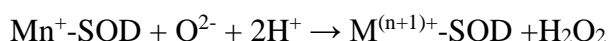
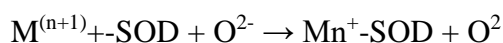
Ρεδουκτάση της Γλουταθειόνης (GR)

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 1 mM
0,01	ml δείγματος
0,460	ml 2d-H ₂ O

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm

6. 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 δραστηρότητας της SOD ισούται με την ποσότητα του ενζύμου που καταστέλλει την επαγόμενη από το υπεροξειδίου οξειδωση 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. από το τυφλό απουσιάζει η μερκαπτοαιθανόλη. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 2 λεπτά (Paoletti & Mocali 1990).

Δισμουτάση του Υπεροξειδίου (SOD)

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

Η φωτομέτρηση έγινε στα 340nm

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

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

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.

Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Graphpad Istat 3.0 για ανάλυση των αποτελεσμάτων με 1 Way ANOVA (ανάλυση διακύμανσης) και το Graphpad Prism 5.0 για ανάλυση των αποτελεσμάτων με 2 Way ANOVA (ανάλυση διακύμανσης). Ο επανέλεγχος των αποτελεσμάτων έγινε με το μη παραμετρικό Friedman test με post test το Dunn για τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν με 2 Way ANOVA. Το post test που χρησιμοποιήθηκε για τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν με 1 Way ANOVA είναι το Bonferroni. Τα στατιστικά σημαντικά ($P < 0,05$) αποτελέσματα σημειώνονται στα διαγράμματα.

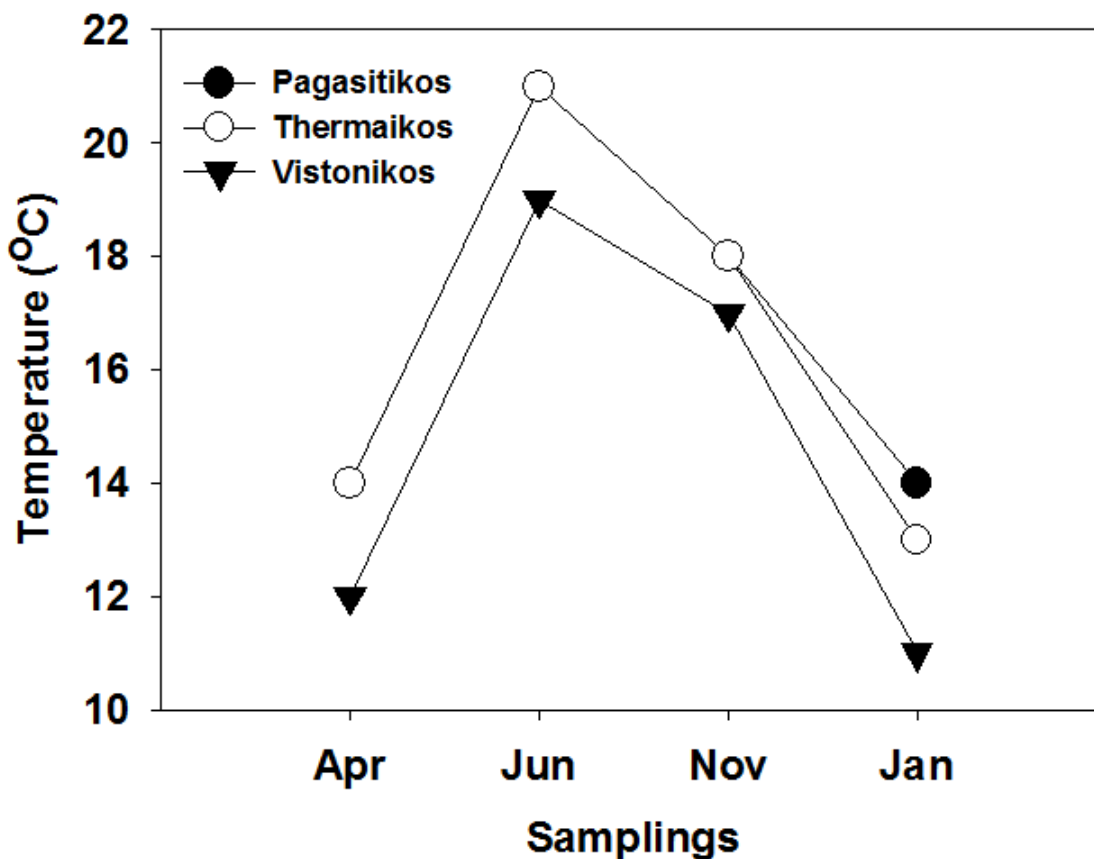
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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 . Όπως προαναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 2.5, όσο μεγαλύτερη η τιμή της απορρόφησης του κάθε δείγματος, τόσο εντονότερη η πίεση και παράλληλα το βιολογικό στρες, που υφίσταται ο οργανισμός από το εκάστοτε περιβάλλον, μαρτυρώντας συνάμα την ακαταλληλότητα του οικοσυστήματος διαβίωσης. Μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων του φασματοφωτόμετρου, μπορεί να βρεθεί η κατά μέσο όρο χαμηλότερη απορροφητικότητα των δειγμάτων μιας περιοχής σε σχέση με τις υπόλοιπες αποκαλύπτοντας έμμεσα το περιβάλλον με τις ιδανικότερες επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες για το είδος *S. officinalis* (L.).

Τα αποτελέσματα λήφθηκαν, από τα βράγγια και το μανδύα των δειγμάτων. Η συλλογή δειγμάτων *S.officinalis* το καλοκαίρι, ήταν αδύνατη για την περιοχή του Παγασητικού καθώς δεν βρεθήκαν άτομα. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στη διαφορά των ενζύμων το καλοκαίρι, (π.χ. Θερμαϊκός: $48,71 \pm 2,78$, Βιστωνικός: $45,34 \pm 7,92$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$), την άνοιξη (π.χ. CAT μανδύας - Παγασητικός: $72,06 \pm 14,08$, Θερμαϊκός: $50,01 \pm 5,1$, Βιστωνικός: $47,08 \pm 8,38$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$) και το φθινόπωρο φθινοπώρου (π.χ. CAT μανδύας- Παγασητικός: $76,12 \pm 7,17$, Θερμαϊκός: $45,13 \pm 5,45$, Βιστωνικός: $52,32 \pm 5,34$ $\mu\text{moles}/\text{min.g.wet.wt}$).

Η ανάλυση επιπλέον βιοχημικών και μοριακών δεικτών θα δώσει μια σαφέστερη εικόνα για τον προσδιορισμό των «refugia» για το παραπάνω είδος. Όσον αφορά τα αποτελέσματα των βραγχιών, παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις στον Παγασητικό ήταν οι υψηλότερες, σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του Βιστωνικού που κατά μέσο όρο έδειξαν τη χαμηλότερη δραστηριότητα των ενζύμων μεταξύ των εποχικών δειγματοληψιών. Η παραπάνω προσέγγιση ισχύει και για τα αποτελέσματα του μανδύα. Στους παρακάτω πίνακες απεικονίζονται και αναλύονται οι συγκεντρώσεις των ενζύμων, ανάλογα την περιοχή και το δείγμα για τα αποτελέσματα των **Βραγχιών** (Gills) και του **Μανδύα** (Mantle).

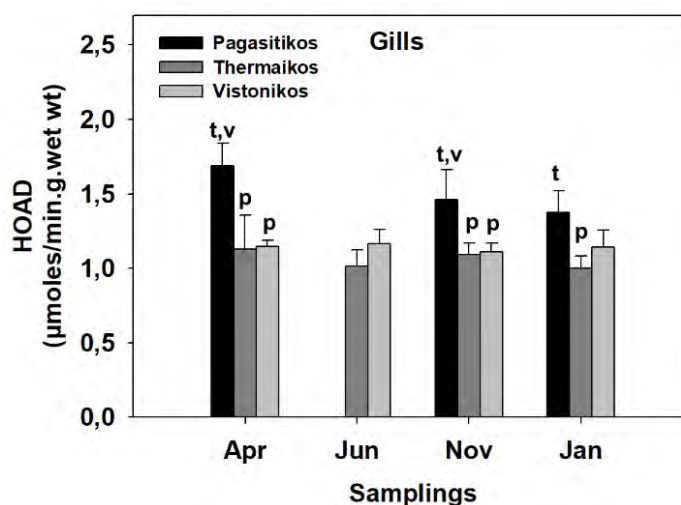
Η θερμοκρασία της θάλασσας κατά τις εποχικές δειγματοληψίες, στις δειγματοληπτικές περιοχές, φαίνονται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. Θερμοκρασία της θάλασσας κατά τις εποχικές δειγματοληψίες, στις δειγματοληπτικές περιοχές

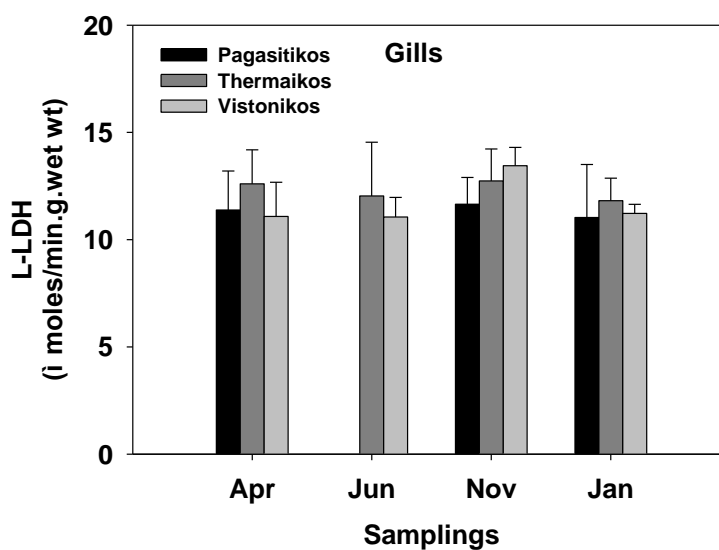
Η μέτρηση της θερμοκρασίας της θάλασσας στις περιοχές δειγματοληψίας, έδειξε διαφορά σε όλη την περίοδο του έτους μεταξύ των μελετώμενων Κόλπων. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία του Βιστωνικού παρέμεινε σταθερά πιο χαμηλά σε σύγκριση με το Θερμαϊκό και τον Παγασητικό. Όσον αφορά τους δύο τελευταίους κόλπους, η μόνη διαφορά παρουσιάστηκε κατά τη δειγματοληψία του χειμώνα με τον Θερμαϊκό να παρουσιάζει χαμηλότερη θερμοκρασία σε σχέση με το Παγασητικό.

3.1 Αποτελέσματα βραγχίων (Gills)



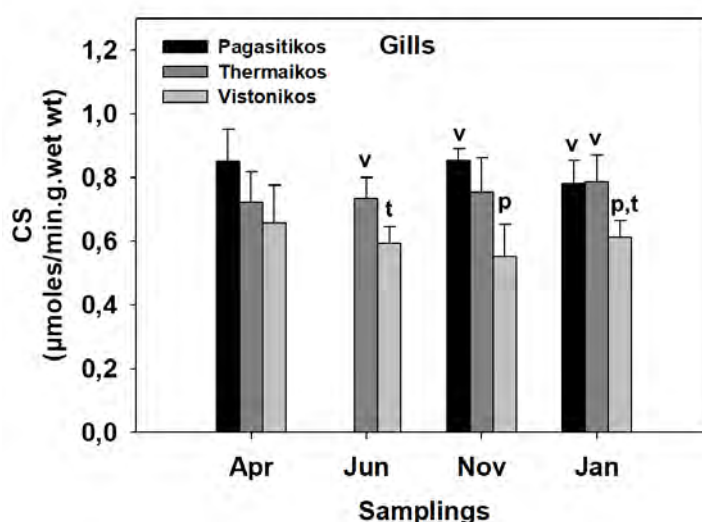
Εικόνα 3.1 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της HOAD (3-υδροξυ-CoA αφυδρογονάση) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην Εικόνα 3.1 φαίνεται η ξεκάθαρα αυξημένη τιμή της δραστηριότητας της HOAD στην περιοχή του Παγασητικού, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες δύο, για όλες τις εποχικές δειγματοληψίες. Οι τιμές του Θερμαϊκού και του Βιστωνικού, δεν παρουσιάζουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά για όλες τις εποχικές δειγματοληψίες.



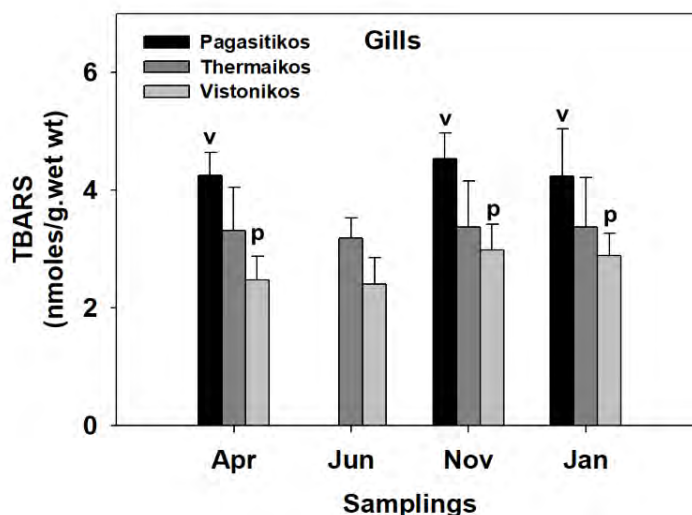
Εικόνα 3.2 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της L-LDH (γαλακτική αφυδρογονάση) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός,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

Στην Εικόνα 3.2, τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της L-LDH, δεν παρουσιάζουν κάποια διαφορά για όλες τις περιοχές σε κάθε εποχιακή δειγματοληψία.



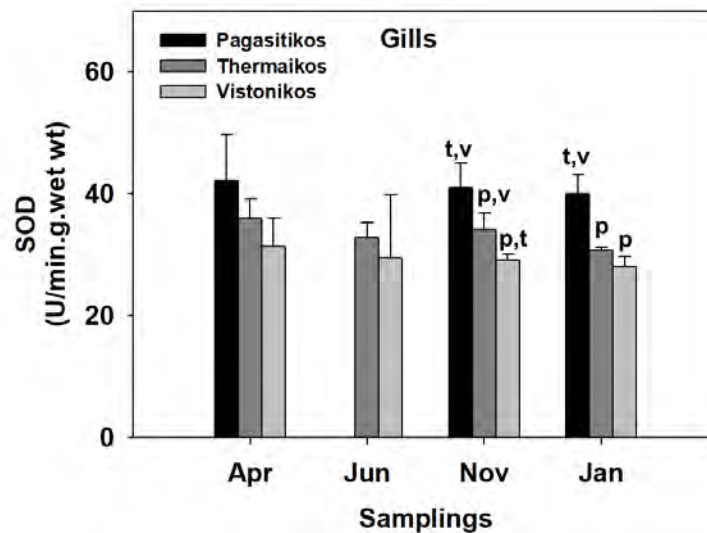
Εικόνα 3.3 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της CS (συνθετάση του κιτρικού) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός,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

Στην Εικόνα 3.3, παρατηρούμε ότι τον Απρίλιο οι τιμές της δραστηριότητας της CS απεικονίζονται ανάλογες για όλες τις περιοχές. Τον Ιούνιο, οι συγκεντρώσεις CS του Θερμαϊκού, παρουσιάζονται μεγαλύτερες από αυτές του Βιστωνικού. Το Νοέμβριο, η τιμή του Βιστωνικού είναι η χαμηλότερη σε σύγκριση με τις τιμές του Παγασητικού και του Θερμαϊκού, οι οποίες μεταξύ τους έχουν αμελητέα διαφορά. Τέλος τον Ιανουάριο τα αποτελέσματα του Βιστωνικού διαφέρουν πάλι από αυτά του Θερμαϊκού και του Παγασητικού τα οποία παρουσιάζονται ανάλογα.



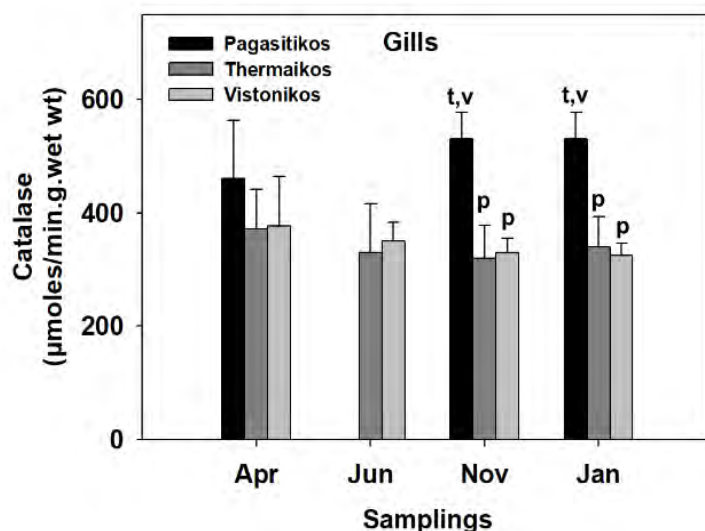
Εικόνα 3.4 Αποτελέσματα των επιπέδων των TBARS (ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην Εικόνα 3.4, βλέπουμε τα αποτελέσματα από τη μέθοδο TBARS. Στη δειγματοληψία του Απριλίου, φαίνεται ότι ο Παγασητικός κατέχει την πρώτη θέση, ο Θερμαϊκός τη δεύτερη και τέλος ο Βιστωνικός με την χαμηλότερη συγκέντρωση. Τον Ιούνιο τα αποτελέσματα Βιστωνικού και Θερμαϊκού είναι ανάλογα. Στα αποτελέσματα του Νοεμβρίου, ο Παγασητικός δείχνει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ ο Θερμαϊκός με το Βιστωνικό δε διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Τέλος, τον Ιανουάριο, ο Παγασητικός παρουσιάζει πάλι το μεγαλύτερο ποσό συγκέντρωσης σε σύγκριση με αυτά του Θερμαϊκού και του Βιστωνικού που είναι ανάλογα.



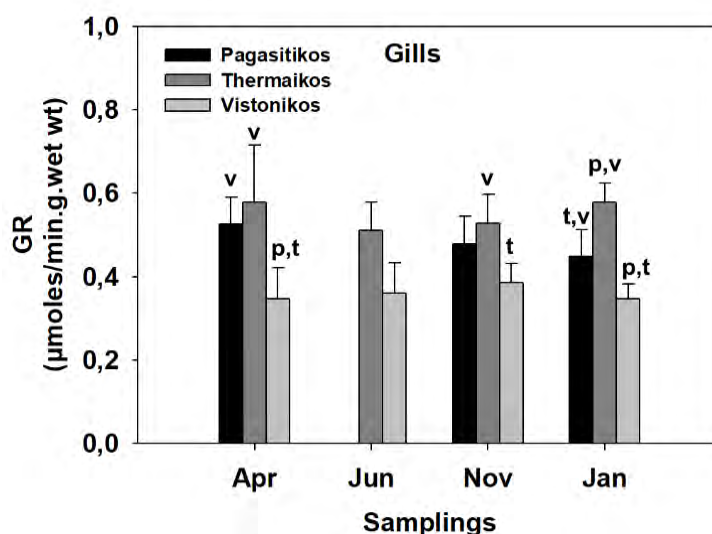
Εικόνα 3.5 Αποτελέσματα της δραστηρότητας της SOD (δισμουτάση του υπεροξειδίου) ιστού βραγχίων, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός,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

Στην Εικόνα 3.5, όσον αφορά τη δραστηρότητα της SOD, την εποχική δειγματοληψία του Απριλίου δεν απεικονίζεται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ όλων των περιοχών δειγματοληψίας. Τον Ιούνιο επίσης. Το Νοέμβριο η μεγαλύτερη δραστηρότητα SOD βρέθηκε στα δείγματα του Παγασητικού, εν συνεχεία στους Θερμαϊκού και τέλος σε αυτά του Βιστωνικού. Στην τελευταία δειγματοληψία του Ιανουαρίου, ο Παγασητικός φαίνεται να κατέχει πάλι το μεγαλύτερο ποσό δραστηρότητας, σε αντίθεση με τις περιοχές του Θερμαϊκού και του Βιστωνικού, οι οποίες μεταξύ τους παρουσιάζουν αμελητέα διαφορά, όχι όμως συγκρινόμενες με τον Παγασητικό.



Εικόνα 3.6 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της Catalase (καταλάση) 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).

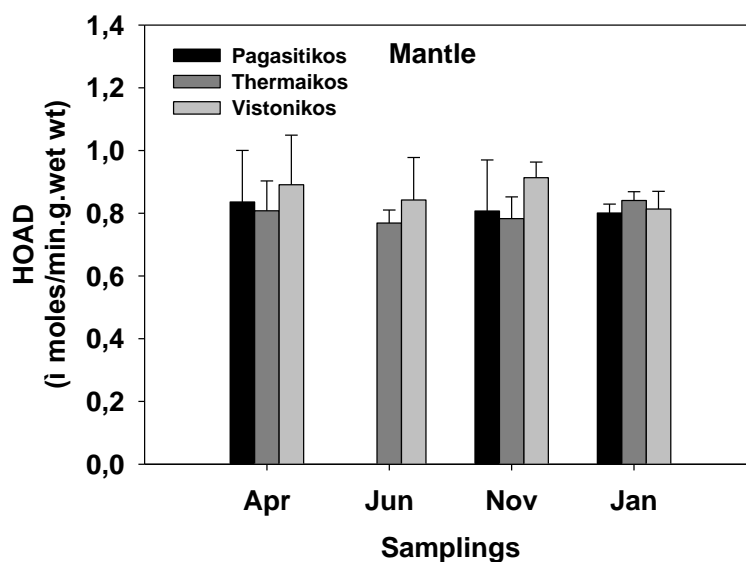
Στην Εικόνα 3.6, οι δειγματοληψίες τόσο του Απριλίου όσο και του Ιουνίου δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων. Αντιθέτως, και στις δύο δειγματοληψίες του Νοεμβρίου και του Ιανουαρίου, τα αποτελέσματα του Παγασητικού είναι κατά πολύ μεγαλύτερα από αυτά του Θερμαϊκού και του Βιστωνικού, τα οποία με τη σειρά τους δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά.



Εικόνα 3.7 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της GR (ρεδουκτάση ή υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) 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).

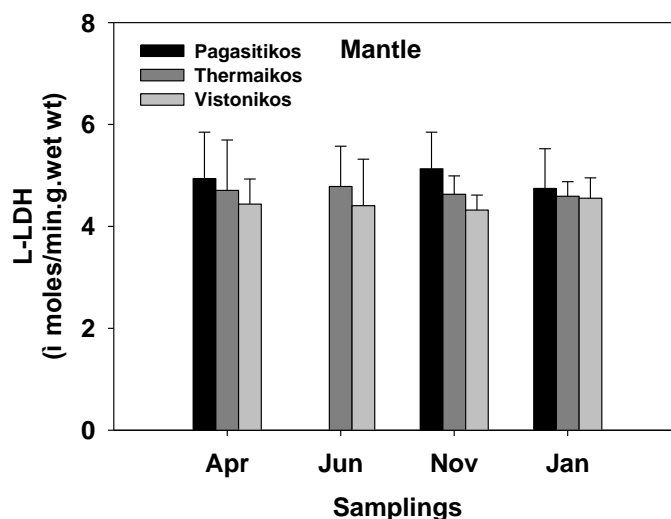
Στην Εικόνα 3.7, τα αποτελέσματα GR, για την δειγματοληψία του Απριλίου, δείχνουν ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση βρέθηκε στον Θερμαϊκό, η δεύτερη μεγαλύτερη στον Παγασητικό και η μικρότερη στο Βιστωνικό. Τον Ιούνιο, δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των περιοχών δειγματοληψίας. Το Νοέμβριο, ο Θερμαϊκός παρουσίασε ξανά τα μεγαλύτερα ποσά συγκέντρωσης τα οποία δεν είχαν στατιστική διαφορά με τον Παγασητικό, παρά μόνο με το Βιστωνικό, του οποίου ήταν και τα χαμηλότερα. Τέλος στη δειγματοληψία του Ιανουαρίου, ο Θερμαϊκός πάλι έδειξε τα υψηλότερα αποτελέσματα, ο Παγασητικός τα δεύτερα υψηλότερα και τέλος ο Βιστωνικός τα χαμηλότερα.

3.2 Αποτελέσματα μανδύα (Mantle)



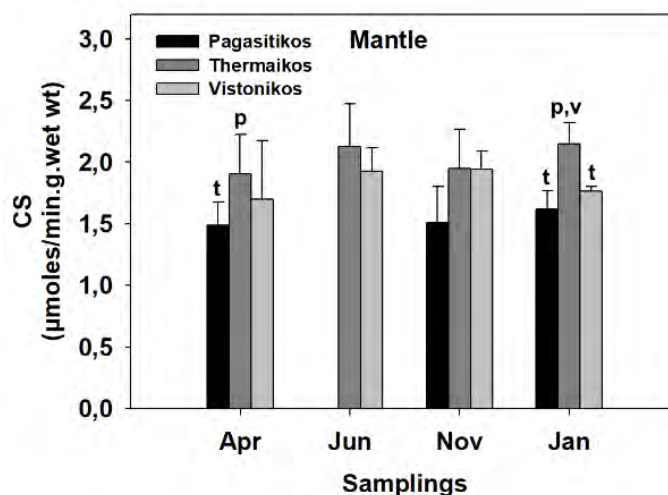
Εικόνα 3.8 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της HOAD (3-υδροξυ-CoA αφυδρογονάση) ιστού μανδύα, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην Εικόνα 3.8, τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της HOAD, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των περιοχών για κάθε εποχιακή δειγματοληψία.



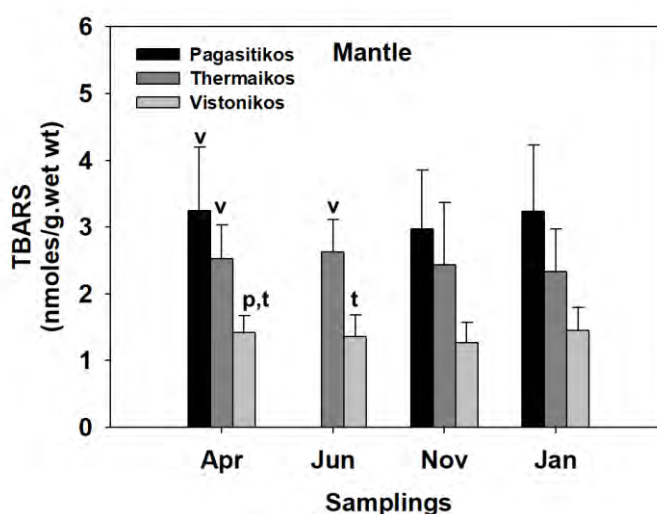
Εικόνα 3.9 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της L-LDH (γαλακτική αφυδρογονάση) ιστού μανδύα, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός, t = Θερμαϊκός, v = Βιστωνικός).

Στην Εικόνα 3.9, τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της L-LDH, επίσης δεν δείχνουν κάποια διαφορά μεταξύ των περιοχών κάθε εποχιακής δειγματοληψίας.



Εικόνα 3.10 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της CS (συνθετάση του κιτρικού) ιστού μανδύα, 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).

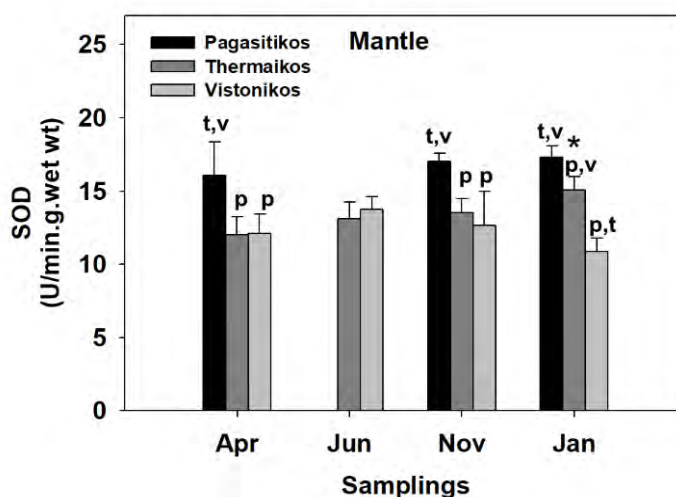
Στην Εικόνα 3.10, τα αποτελέσματα του Απριλίου δείχνουν ότι ο Θερμαϊκός παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση μη διαφέροντας στατιστικά από ο Βιστωνικό επίσης. Αντιθέτως ο Παγασητικός φαίνεται να κατέχει τη χαμηλότερη ποσοτική συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα του Ιουνίου και του Νοεμβρίου δε φαίνεται να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τέλος ο Ιανουάριος, παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του Απριλίου, με τη διαφορά ότι τα υψηλότερα ποσά συγκέντρωσης του Θερμαϊκού διαφέρουν στατιστικά τόσο με του Παγασητικού όσο και με του Βιστωνικού. Τα τελευταία δύο, δεν κατέχουν κάποια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ τους.



Εικόνα 3.11 Αποτελέσματα των επιπέδων TBARS (ουσίες που αντιδρούν μεθειοβαρβιτουρικό οξύ) ιστού μανδύα, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών.

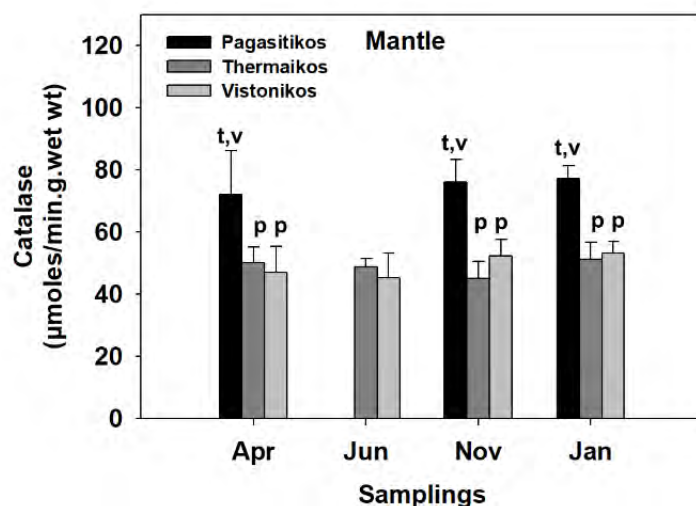
Στην Εικόνα 3.11, απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μεθόδου TBARS για τα δείγματα του μανδύα. Κατά τη δειγματοληψία του Απριλίου, φαίνεται η υψηλότερη συγκέντρωση του Παγασητικού, η οποία δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά με την αμέσως επόμενη υψηλότερη, του Θερμαϊκού, ενώ το ίδιο δεν ισχύει για την χαμηλότερη του Βιστωνικού. Στην δειγματοληψία του Ιουνίου, οι συγκεντρώσεις του Θερμαϊκού διαφέρουν χαρακτηριστικά από αυτές του Βιστωνικού.

Στις δειγματοληψίες του Νοεμβρίου και του Ιανουαρίου δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων.



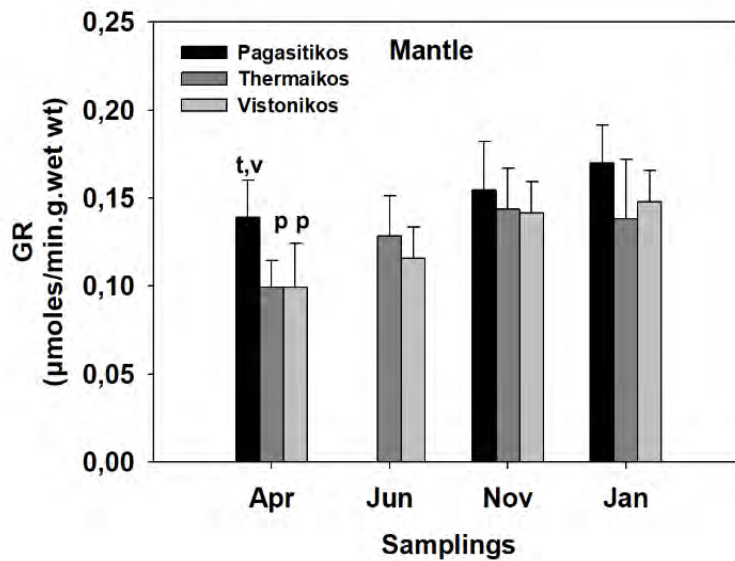
Εικόνα 3.12 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της SOD (δισμουτάση του υπεροξειδίου) ιστού μανδύα, διαφορετικών εποχιακών δειγματοληψιών. (* $p < 0,05$ σε σχέση με τη δειγματοληψία του Απριλίου, ενώ τα μικρά γράμματα συμβολίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τόπων δειγματοληψίας, όπου p = Παγασητικός,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

Στην Εικόνα 3.12, τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της SOD του μανδύα, κατά την δειγματοληψία του Απριλίου, φαίνεται να είναι αυξημένα στην περιοχή του Παγασητικού σε αντίθεση με αυτά του Θερμαϊκού και το Βιστωνικού που είναι ανάλογα. Τα αποτελέσματα του Ιουνίου δεν διαφέρουν μεταξύ τους. Στα αποτελέσματα του Νοεμβρίου, ο Παγασητικός κατέχει την υψηλότερη συγκέντρωση, ενώ ο Θερμαϊκός και ο Βιστωνικός δεν παρουσίασαν κάποια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ τους. Τέλος, στη δειγματοληψία του Ιανουαρίου, ο Παγασητικός και πάλι παρουσιάζει τα υψηλότερα ποσά συγκέντρωσης, με δεύτερα μεγαλύτερα αυτά του Θερμαϊκού και τέλος τα χαμηλότερα του Βιστωνικού.



Εικόνα 3.13 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της *Catalase* (καταλάση) ιστού μανδύα, 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 3.13, παρατίθενται τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της *Catalase* σε ιστό μανδύα. Στη δειγματοληψία του Απριλίου, ο Παγασητικός παρουσίασε τα υψηλότερα ποσά συγκέντρωσης, ενώ τα αποτελέσματα του Θερμαϊκού και του Βιστωνικού ήταν ανάλογα. Τον Ιούνιο δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων. Το Νοέμβριο και τον Ιανουάριο ο Παγασητικός κατέχει τα υψηλότερα ποσά συγκέντρωσης σε σύγκριση με αυτά του Θερμαϊκού και του Βιστωνικού.



Εικόνα 3.14 Αποτελέσματα της δραστηριότητας της GR (ρεδουκτάση ή υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) ιστού μανδύα, 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 3.14, απεικονίζονται τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της GR για ιστό μανδύα. Πέραν των αποτελεσμάτων του Απριλίου, όπου ο Παγασητικός κατέχει τα υψηλότερα ποσά συγκέντρωσης σε αντίθεση με τον Θερμαϊκό και τον Βιστωνικό, που δεν κατέχουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους, παρα μόνο με τον πρώτο, οι υπόλοιπες δειγματοληψίες (Ιουνίου, Νοεμβρίου και Ιανουαρίου) παρουσίασαν μια αναλογία μεταξύ των τελικών αποτελεσμάτων των συγκεντρώσεων.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η κοινή σουπιά, *Sepia officinalis* (L.), αποτελεί ένα βασικό κομμάτι της αλιευτικής δραστηριότητας για τον άνθρωπο. Η χρησιμότητα του είδους αυτού αποδίδεται σε μια ποικιλία τομέων, όπως η σίτιση, η φαρμακευτική και το εμπόριο. Επίσης, η οικολογική συμμετοχή του στα οικοσύστημα που απαντάται, αποτελεί επαγόμενο παράγοντα σημαντικότητας, που χρήζει την ανάγκη διατήρησης του. Με την εφαρμογή διάφορων βιοχημικών δεικτών, γίνεται δυνατός ο εντοπισμός του καταλληλότερου περιβάλλοντος διαβίωσης (refugia), το οποίο αποτελεί πρωταρχικό βήμα στην προαναφερθείσα ανάγκη. Η μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα, μαρτυράει

την όλο και μειωμένη παρουσία βιολογικού στρες, η οποία συνεπάγεται με την ύπαρξη των περισσότερο βέλτιστων συνθηκών διαβίωσης.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από δείγματα ιστού βραχίων και μανδύα του είδους *Sepia officinalis* (L.), από διαφορετικές εποχικές δειγματοληψίες και οικοτόπους, μας αποδεικνύει ότι οι μεγαλύτερες δραστηριότητες τόσο των μεταβολικών όσο και των αντιοξειδωτικών ενζύμων, αλλά και τα επίπεδα των TBARS παρατηρούνται στον Παγασητικό κόλπο. Αντιθέτως οι μικρότερες τιμές των δραστηριοτήτων των ενζύμων βρέθηκαν στον Βιστωνικό κόλπο. Το γεγονός ότι οι υψηλότερες τιμές των συγκεκριμένων ενζύμων, παρατηρήθηκαν στον Παγασητικό κόλπο, μαρτυράει ότι το συγκεκριμένο περιβάλλον διαβίωσης είναι το ακαταλληλότερο σε σύγκριση με τον Θερμαϊκό και τον Βιστωνικό κόλπο. Αντιθέτως, οι χαμηλότερες τιμές των συγκεκριμένων ενζύμων, σε δείγματα ιστού βραγχίων και μανδύα από δείγματα του Βιστωνικού κόλπου, μας υποδεικνύει ότι ο Βιστωνικός κόλπος αποτελεί το ενδιαίτημα με τις καταλληλότερες συνθήκες για το συγκεκριμένα είδος, τουλάχιστον σε σύγκριση των τριών περιβάλλοντων μελέτης (Παγασητικός, Θερμαϊκός και Βιστωνικός).

Η αύξηση της μέσης θερμοκρασίας του πλανήτη, η ρύπανση του περιβάλλοντος κυρίως από ανθρώπινα μέσα, η υποβάθμιση των υδατικών πόρων, αποτελούν μόνο μερικές από τις πολλές αρνητικές συνέπειες των ανθρωπίνων δραστηριοτήτων, προς τον πλανήτη. Η ποιοτική βελτίωση των πλέον ακατάλληλων παραμέτρων που επικρατούν, εξαιτίας της ανθρώπινης δραστηριότητας, αποτελεί πλέον επιτακτική ανάγκη του είδους μας, τόσο για τη διασφάλιση της δικής μας μελλοντικής πορείας όσο και για των ειδών που απειλούνται. Η ιδέα των refugia, θα μπορούσε να παίξει κεντρικό ρόλο τόσο στη διατήρηση της βιοποικιλότητας όσο και στην βελτίωση του οικοσυστήματος συνολικά.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Magdalena A. Gutowska, F. Melzner, M. Langenbuch, C. Bock, G. Claireaux, H. O. Portner Acid – base regulatory of *Sepia officinalis* in response to environmental hypercapnia (J Comp Physiol B (2010) 180:323–335)
2. H. BLASCHKO, From the Station Maritime, Arcachon, and the Physiological Laboratory Cambridge AMINE OXIDASE IN SEPIA OFFICINALIS (J. Physiol. (1941) 99, 364-369)
3. V. Bettencourt á A. Guerra Carbon- and oxygen-isotope composition of the cuttlebone of *Sepia officinalis*: a tool for predicting ecological information? (Marine Biology (1999) 133: 651±657)
4. H. O. Portner Coordination of metabolism, acid-base regulation and haemocyanin function in cephalopods (Mar. Fresh. Behav. Physiol., Vol25 pp.131-148)
5. Naourez Ktari , Nahed Fakhfakh , Rafik Balti , Hayet Ben Khaled , Moncef Nasri & Ali Bougatef Effect of Degree of Hydrolysis and Protease Type on the Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates From Cuttlefish (*Sepia officinalis*) By-Products (Journal of Aquatic Food Product Technology)
6. Ben Speers-Roesch, Neal I. Callaghan, Tyson J. MacCormack, Simon G. Lamarre, Antonio V. Sykes, William R. Driedzic Enzymatic capacities of metabolic fuel use in cuttlefish (*Sepia officinalis*) and responses to food deprivation: insight into the metabolic organization and starvation survival strategy of cephalopods (J Comp Physiol B (2016) 186:711–725)
7. Rui Rosa, Katja Trübenbach, Tiago Repolho, Marta Pimentel, Filipa Faleiro, Joana Boavida-Portugal, Miguel Baptista, Vanessa M. Lopes, Gisela Dionísio, Miguel Costa Leal, Ricardo Calado, Hans O. Pörtner Lower hypoxia thresholds of cuttlefish early life stages living in a warm acidi-fied ocean
8. B. G. Castro*, J. L. Garrido and C. G. Sotelo Changes in composition of digestive gland and mantle muscle of the cuttlefish *Sepia officinalis* during starvation [Marine Biology 114, 11-20 (1992)]
9. Mourad Jridia, Rim Nasria, Imen Lassoued, Nabil Souissi Aïcha Mbarekc, Ahmed Barkia, Moncef Nasri Chemical and biophysical properties of gelatins extracted from alkali-pretreated skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using pepsin (Volume 54, Issue 2, December 2013, Pages 1680-1687)

10. Sohair R. Fahmy and Amel M. Soliman (Department of Zoology, Faculty of Science, Cairo University, Egypt) In vitro antioxidant, analgesic and cytotoxic activities of *Sepia officinalis* ink and *Coelatura aegyptiaca* extracts (Vol. 7(22), pp. 1512-1522, 15 June, 201)
11. Rafik Balti, Naima Nedjar-Arroume, Ali Bougateg, Didier Guillochon, Moncef Nasri Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases (Food Research International 43 (2010) 1136–1143)
12. Rafik Balti, Ali Bougateg, Assaâd Sila, Didier Guillochon, Pascal Dhulster, Naima Nedjar-Arroume Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats (Food chemistry 170 (2015) 519-525)
13. Rudolf Schipp, Stephan Mollenhauer, and Sigurd von Boletzky Electron Microscopical and Histochemical Studies of Differentiation and Function of the Cephalopod Gill (*Sepia officinalis* L.)* (Zoomorphologie 93, 193-207 (1979))
14. Simon G. Lamarre, Delphine Ditlecadet, David J. McKenzie, Laure Bonnaud and William R. Driedzic Mechanisms of protein degradation in mantle muscle and proposed gill remodeling in starved *Sepia officinalis* (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 303: R427–R437, 2012. First published May 30, 2012; doi:10.1152/ajpregu.00077.2012)
15. Kenneth B. STOREY and Janet M. STOREY Kinetic Characterization of Tissue-Specific Isozymes of Octopine Dehydrogenase from Mantle Muscle and Brain of *Sepia officinalis* [Eur. J. Biochem. 93, 545-552 (1979)]
16. Rafik Balti, Naima Nedjar-Arroume, Estelle Yaba Adje, Didier Guillochon, and Moncef Nasri Analysis of Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Cuttlefish (*Sepia officinalis*) Muscle Proteins (J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 3840–3846 DOI:10.1021/jf904300q)
17. Kenneth B. Storey and Janet M. Storey Octopine Metabolism in the Cuttlefish, *Sepia officinalis*: Octopine Production by Muscle and Its Role as an Aerobic Substrate for Non-Muscular Tissues (J. Comp. Physiol. 131,311-319 (1979))
18. Susanne Zielinski, Hans-O. Portner Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age? (Comparative Biochemistry and Physiology Part B 125 (2000) 147–160)

19. 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)
20. Zsuzsanna Hracsko, Zsolt Safar, Hajnalka Orvos, Zoltan Novak, Attila Pal & Ilona S. Varga (2007). Evaluation of Oxidative Stress Markers after Vaginal Delivery or Caesarean Section (vol. 21 no. 4 703-706)
21. William R. Driedzic, Bruce D. Sidell, J. M. Stewart, and Ian A. Johnston (1990). Maximal Activities of Enzymes of Energy Metabolism in Cephalopod Systemic and Branchial Hearts (Physiological Zoology (1928-1998) & Physiological and Biochemical Zoology (1999-present)).
22. Patricia Mulcahy, Anne Cullina & Pádraig O'Carra (1996). Both- and-specific Lactate Dehydrogenases Co-exist in Individual Cephalopods (Biochem. Physiol. Vol. 116A, No. 2, pp. 143–148, 1997)
23. Brandon A. Sheafor (2003). Metabolic enzyme activities across an altitudinal gradient: an examination of pikas (genus Ochotona) (Journal of Experimental Biology 2003 206: 1241-1249)
24. Genetics Home Reference (2010). Your Guide to Understanding Genetic Conditions
25. https://en.wikipedia.org/wiki/3-hydroxyacyl-CoA_dehydrogenase
26. https://en.wikipedia.org/wiki/Citrate_synthase#cite_note-Weigand_1986-5
27. https://en.wikipedia.org/wiki/Lactate_dehydrogenase#cite_note-3
28. Γεώργιος Ε. Παπαγεωργίου (2005). Βιοχημεία Ελεύθερων Ριζών Αντιοξειδωτικά και Λιπιδική Υπεροξειδωση (UNIVERSAL STUDIO PRESS).

6. ABSTRACT

Environmental changes have a dire impact on marine organisms, affecting the cellular and physiological functions of many species, thus resulting to the disorder of their growth, reproduction and mortality. Climate changes vary between different environments. Due to that, habitats with more suitable climatic conditions (**refugia**) can be observed. Objective of the present study is, based on biochemical and physiological responses, to locate these habitats, for the purpose of the preservation of commercially important marine species. Individuals of the species *Sepia officinalis* (L.) (common cuttlefish) from three different gulfs of Greece: (1) Thermaikos, (2) Pagasitikos and (3) Vistonikos, were collected at different seasons (winter, spring, summer, autumn). Phasmatophotometric analysis was applied, in order to determine the activity of antioxidant enzymes, which contribute to the antioxidant defense of the organism, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR). Moreover, oxidative stress was evaluated via the TBARS assay. Also, the phasmatophotometric determination of metabolic enzymes such as lactate dehydrogenase (L-LDH), Citrate synthase (CS) and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HOAD) was performed. For both enzymatic analyses, tissues from gills and mantle were used. The highest values of the activities of these enzymes and higher TBARS levels, in samples of gills as well as mantle tissue of the species *Sepia officinalis*, were observed from the species of the Pagasitikos gulf, which suggests that this gulf is the most unsuitable compared with Thermaikos and Vistonikos gulfs. On the contrary, the fact that the lowest values of these enzymes and TBARS levels, were found in the Vistonikos gulf, suggests that is a well suited habitat for *Sepia officinalis* (L.), at least in comparison with the other two (Pagasitikos, Thermaikos). Seasonal sampling does not appear to affect the results of measurements of specific metabolic and antioxidant enzymes in gill and mantle tissue, of *Sepia officinalis* (L.) species. Further analysis of additional biochemical and molecular markers, is expected to provide a more completed conclusion for the definition of "refugia" for the above species.

Keywords: *Sepia officinalis* (L.), refugia, climate change, oxidative stress, antioxidant enzymes, metabolic enzymes, TBARS.