



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αλληλεπίδραση Βαρέων Μετάλλων και Πρωτεϊνών σε
Θαλάσσιους Βενθικούς Οργανισμούς**

**ΟΛΓΑ ΧΑΛΚΙΑΔΑΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αλληλεπίδραση Βαρέων Μετάλλων και Πρωτεϊνών σε Θαλάσσιους Βενθικούς Οργανισμούς

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΟΛΓΑ ΧΑΛΚΙΑΔΑΚΗ

A.M.: 001012

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Εμμανουήλ Δασενάκης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Εμμανουήλ Δασενάκης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Αθανάσιος Βαλαβανίδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Νικόλαος Λυδάκης-Σημαντήρης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΤΕΙ Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Εμμανουήλ Δασενάκης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Αθανάσιος Βαλαβανίδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Νικόλαος Λυδάκης-Σημαντήρης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΤΕΙ Κρήτης

Μιχαήλ Σκούλλος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Δημήτριος Νικολέλης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Χριστίνα Ζέρη, Ερευνήτρια Β' ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

Ελευθερία Κατσίβελα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΤΕΙ Κρήτης

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ / /2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ρύπανση του θαλάσσιου περιβάλλοντος από ανθρωπογενείς δραστηριότητες ολοένα εντείνεται, με σημαντικές συνέπειες για το οικοσύστημα αλλά και τον ίδιο τον άνθρωπο. Ένας από τους σημαντικούς ρυπογόνους παράγοντες είναι τα βαρέα μέταλλα, ορισμένα εκ των οποίων (π.χ. Ni, Fe, Cu) σε μικρές συγκεντρώσεις βοηθούν στο γενικότερο μεταβολισμό των οργανισμών, ενώ άλλα όχι (π.χ. Cd, Cr, Hg, Pb, κλπ). Οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει αμυντικούς μηχανισμούς για την ελαχιστοποίηση της επίδρασης των τοξικών μετάλλων σε αυτούς. Η πολύπλευρη μελέτη για την κατανόηση των μηχανισμών της τοξικής δράσης των μετάλλων σε κάθε οργανισμό και των μηχανισμών άμυνάς τους είναι πολύ σημαντική για την εκτίμηση της “υγείας” των οικοσυστημάτων.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή στοχεύει στη μελέτη της επίδρασης των βαρέων μετάλλων σε βενθικούς οργανισμούς και ιδιαίτερα στην ανάπτυξη των αμυντικών μηχανισμών τους. Κατά την υλοποίησή της πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διαφορετικούς οργανισμούς (*Mytilus galloprovincialis*, *Callista chione*, *Venus verrucosa*) οι οποίοι συλλέχθηκαν από το φυσικό τους περιβάλλον, καλλιεργήθηκαν σε ενυδρεία υπό ελεγχόμενες συνθήκες και αφού εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων (Pb, Cd, Ni), προσδιορίστηκε ο βαθμός και ο ρυθμός βιοσυσσώρευσής τους στα βράγχια, το μανδύα, το πεπτικό σύστημα και το σώμα τους. Κατόπιν έγινε απομόνωση και προσδιορισμός των πρωτεϊνών που επάγονται από τα βαρέα μέταλλα στους ιστούς αυτούς. Ο σημαντικότερος ίσως μηχανισμός άμυνας των οργανισμών που εκτέθηκαν στις παραπάνω συνθήκες είναι η έκφραση μεγάλων ποσοτήτων μεταλλοθειονινών. Παράλληλα με την υπερέκφραση μεταλλοθειονινών, βρέθηκε ότι υπό αυτές τις συνθήκες στρες, τα κύτταρα υπερέκφραζαν ή αδρανοποιούσαν κάποια ένζυμα τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες βοηθούν στην ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Μελέτηθηκαν τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσής καθώς και τα ένζυμα: ακετυλοχολινεστεράση, S μεταφοράση της γλουταθειόνης, αναγωγή της γλουταθειόνης και καταλάση. Βρέθηκε ότι οι μεταλλοθειονίνες, τα ένζυμα αλλά και η λιπιδική υπεροξειδωση εξαρτώνται από το είδος του μετάλλου, την συγκέντρωση έκθεσης, τον χρόνο έκθεσης αλλά και τον υπό μελέτη ιστό.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Περιβαλλοντική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: βαρέα μέταλλα, βιοδείκτες, θαλάσσια δίθυρα, βιοσυσσώρευση

ABSTRACT

The pollution of the marine environment from human activities increased during the past decades, with serious consequences to ecosystems and humans. Heavy metals are major pollutants, some of which (eg Ni, Fe, Cu) in small concentrations assist in the organisms' metabolism, while others do not (eg Cd, Cr, Hg, Pb, etc.). Organisms have developed defense mechanisms to minimize the effects of toxic metals to them. A multiparametric study is very important in order to understand the toxicity mechanisms of heavy metals in each organism as well as the defense mechanisms organisms have developed in order to evaluate the "health" of ecosystems.

This Thesis aims to study the effect of heavy metals in benthic organisms and particularly the development of their defense mechanisms. During its implementation, experiments were performed with different organisms (*Mytilus galloprovincialis*, *Callista chione*, *Venus verrucosa*) which were collected from their natural environment, cultivated in aquariums under controlled conditions and then exposed to high concentrations of heavy metals (Pb, Cd, Ni). Their bioaccumulation was determined in the gills, mantle, digestive system and body. Isolation and identification of proteins induced by heavy metals in these tissues followed. Perhaps, the most important defense mechanism of the exposed organisms was the expression of large amounts of metallothioneins. In addition, it was found that under these conditions of stress, cells overexpressed or inactivated enzymes that normally help in cells' function. The levels of lipid peroxidation, acetylcholinesterase, glutathione S transferase, glutathione reductase and catalase were studied. It was found that metallothionein, enzyme and lipid peroxidation levels depend on the type of metal, the exposure concentration, the duration of exposure and the tissue under study.

SUBJECT AREA: Environmental Chemistry

KEYWORDS: heavy metals, biomarkers, bioindicators, marine bivalves, bioaccumulation

*Στους γονείς μου, για όλα όσα μου πρόσφεραν
και φυσικά
Στον Γιώργο μου, που ήταν και είναι ΠΑΝΤΑ δίπλα μου*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε μερικούς ανθρώπους, οι οποίοι με τον τρόπο τους συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Μάνο Δασενάκη για την πρόταση που μου έκανε να δουλέψω τον παρόν θέμα, την υποστήριξη και κατανόηση που επέδειξε καθ' όλη τη διάρκειά της, αλλά και για την άψογη συνεργασία μας από το 2006.

Τον Καθηγητή μου, κ. Νίκο Λυδάκη-Σημαντήρη γιατί η ιδέα του προγράμματος ήταν δική του και με εμπιστεύτηκε εξ' αρχής, όταν ακόμα εγώ είχα τις αμφιβολίες μου, γιατί με έκανε να αγαπήσω την Βιοχημεία, έναν τομέα δύσκολο και σχεδόν άγνωστο σε μένα.

Και στους δύο παραπάνω Καθηγητές θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου για την υπομονή που επέδειξαν, τις πολύ χρήσιμες συμβουλές τους και την υποστήριξή τους, ακόμα και όταν εγώ ήμουν δύσπιστη, νευριασμένη, κουρασμένη ή και απογοητευμένη. Γιατί μαζί τους κατάφερα πολλά πράγματα, τα οποία δεν πίστευα πως θα καταφέρω. Αλήθεια σας *Ευχαριστώ* και ζητάω *Συγγνώμη* αν κάποιες φορές σας στεναχώρησα.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη της Επιτροπής Εξέτασης για τον χρόνο που αφιέρωσαν στο να μελετήσουν την Διδακτορική μου Διατριβή και να μου υποδείξουν εύστοχες παρατηρήσεις.

Επίσης ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή Αθ. Βαλαβανίδη για τις πολύ χρήσιμες συμβουλές του ιδιαίτερα πάνω στο θέμα της διατήρησης οργανισμών σε ενυδρεία καθώς και τον προσδιορισμό των βιοδεικτών.

Ευχαριστώ πολύ τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Χημείας Περιβάλλοντος, Καθηγητή Μ. Σκούλλο, για την άριστη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια. Εδώ πρέπει να πω, πως η αγάπη και οι γνώσεις του πάνω στα θέματα Περιβάλλοντος με έκαναν να επιλέξω τον συγκεκριμένο τομέα έρευνας, ήδη από την πτυχιακή μου εργασία.

Ευχαριστώ πολύ την Καθηγήτρια Ελ. Κατσίβελα για το κουράγιο που μου έδινε για να συνεχίσω τα πειράματα και τις χρήσιμες συμβουλές της. Οφείλω όμως να της ζητήσω Συγγνώμη για την απότομη συμπεριφορά μου στην αρχή της συνεργασίας μας. Ήμουν τόσο πολύ αγχωμένη με τα πειράματά μου!

Ευχαριστώ πολύ: α) τα (μεγάλα) παιδιά από τα Χανιά που με βοηθούσαν είτε στο καθημερινό μου νερο-κουβάλημα, είτε απλά πίνοντας καφέ μαζί μου όταν ήθελα να ξεφύγω

λιγάκι, αλλά και β) τα μικρότερα παιδιά (Λητώ, Ραφαέλλα και Οδυσσέα) για τις σοκολάτες, τις κρέπες και τα παιχνίδια μας (και να ξέρετε, μου λείπετε!).

Ευχαριστώ πολύ την Δρ. Βίκη Παρασκευοπούλου για την βοήθεια με τις μετρήσεις στην ατομική απορρόφηση, τη στατιστική επεξεργασία, τις παρατηρήσεις της, τα αστεία και την γκρίνια της στο διπλανό γραφείο.

Ευχαριστώ πολύ όλα τα παιδιά από το Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος γιατί συζητώντας το άγχος μειώνεται (...), αλλά special thanks στην Έλια Λουροπούλου.

Ευχαριστώ πολύ τους *γονείς μου*, για όλα τα χρόνια της συνεχούς τους στήριξης, υπομονής και αγάπης. Χωρίς αυτούς δεν θα γινόμουν ποτέ ο άνθρωπος που είμαι.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον άντρα μου, *Γιώργο*, γιατί όλα αυτά τα χρόνια έκανε πραγματικά απίστευτη υπομονή. Άντεξε νεύρα, κούραση και απογοητεύσεις. Θυσίασε τις διακοπές και τα ρεπό του για να μου κάνει παρέα και να με βοηθήσει στα ατελειώτα πειράματα. Πάνω από όλα όμως άντεξε να μείνει για 2,5 χρόνια, 195 μίλια μακριά μου, απλά για να πραγματοποιήσω εγώ το όνειρό μου (κάτι που δεν ξέρω αν θα μπορούσα να αντέξω αν ήμουν στην θέση του).

Σε αυτό τον άνθρωπο ένα μονάχα «*Ευχαριστώ*» μοιάζει τόσο λίγο...

Σας ευχαριστώ πολύ όλους για όλα!

Ειλικρινά, άξιζε τόσο μα τόσο πολύ τον κόπο.....

Και κάπως έτσι, αυτό το όμορφο και κουραστικό ταξίδι τελειώνει...

Όλγα

ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ II και χρηματοδοτήθηκε κατά 70% από Κοινοτικούς πόρους και κατά 30% από Εθνικούς πόρους στα πλαίσια του ΕΣΠΑ 2007-2013.

Το πειραματικό μέρος της Διδακτορικής Διατριβής υλοποιήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Χημείας και Βιοχημικών Διεργασιών του Τμήματος Μηχανικών Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος του ΤΕΙ Κρήτης με έδρα τα Χανιά.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	33
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
1.1 Εισαγωγή	35
1.2 Βαρέα μέταλλα	36
1.2.1 Ορισμοί, Επίπεδα και Μορφές στο θαλάσσιο περιβάλλον	36
1.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα των βαρέων μετάλλων	36
1.2.3 Κάδμιο.....	38
1.2.4 Μόλυβδος	39
1.2.5 Νικέλιο	40
1.2.6 Ψευδάργυρος.....	41
1.2.7 Σίδηρος.....	41
1.2.8 Νομοθετικά όρια και επίπεδα τοξικότητας για τα εξεταζόμενα μέταλλα	42
1.3 Βιοχημεία της τοξικής δράσης των βαρέων μετάλλων	43
1.3.1 Γενικά στοιχεία τοξικότητας μετάλλων	43
1.3.2 Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμοί παραγωγής τους	44
1.3.3 Λιπιδική και πρωτεϊνική υπεροξειδωση	47
1.3.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	49
1.4 Βιοδείκτες και περιβαλλοντικός έλεγχος	50
1.4.1 Οργανισμοί-βιοδείκτες.....	50
1.4.2 Ενώσεις-βιοδείκτες.....	52
1.4.2.1 Μεταλλοθειονίνες	54
1.4.2.2 Ενζυμική δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης (EC 3.1.1.7)	56
1.4.2.3 Κατάλυση (EC 1.11.1.6).....	57
1.4.2.4 S μεταφοράση της γλουταθειόνης (EC 2.5.1.18)	58
1.4.2.5 Αναγωγή της γλουταθειόνης (EC 1.8.1.7)	59
1.5 Τα δίθυρα μαλάκια	61
1.5.1 Ανατομία	61
1.5.2 Το Μεσογειακό μύδι (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	63
1.5.3 Γυαλιστερή (<i>Callista chione</i>).....	65
1.5.4 Κυδώνι (<i>Venus verrucosa</i>)	66
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	68
2.1 Πειραματική διαδικασία	68
2.2 Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό.....	71

2.3	Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στα δείγματα άμμου	71
2.4	Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων σε βιολογικά δείγματα	71
2.5	Προσδιορισμός ενώσεων-βιοδεικτών	72
2.6	Προσδιορισμός δραστικότητας καταλάσης	72
2.7	Προσδιορισμός δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης	72
2.8	Προσδιορισμός δραστικότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.....	72
2.9	Προσδιορισμός δραστικότητας της S μεταφοράσης του γλουταθείου	72
2.10	Προσδιορισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης των κυττάρων.....	72
2.11	Προσδιορισμός μεταλλοθειονινών.....	72
2.12	Ηλεκτροφόρηση.....	72
2.13	Προσδιορισμός ποσότητας πρωτεΐνης.....	72
2.14	Στατιστική ανάλυση δεδομένων	73
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ .	74
3.1	Προσδιορισμός συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό.....	74
3.2	Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στα σωματίδια.....	75
3.3	Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στο ίζημα	75
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΜΟΛΥΒΔΟ	77
4.1	Έκθεση <i>Mytilus galloprovincialis</i> σε μόλυβδο	77
4.1.1	Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα μολύβδου στο θαλασσινό νερό	77
4.1.2	Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	80
4.1.3	Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	82
4.1.4	Καταλάση σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	85
4.1.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	87
4.1.6	Αναγωγάση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	89
4.1.7	Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	91
4.1.8	Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	94
4.1.9	Ψευδάργυρος σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	95
4.1.10	Συσχέτιση μολύβδου με βιοδείκτες	96
4.1.11	Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	96
4.2	Έκθεση <i>Callista chione</i> σε μόλυβδο	98
4.2.1	Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα μολύβδου στο θαλασσινό νερό	98

4.2.2	Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	101
4.2.3	Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	103
4.2.4	Καταλάση σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	106
4.2.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	108
4.2.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	110
4.2.7	Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	112
4.2.8	Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	114
4.2.9	Ψευδάργυρος σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	115
4.2.10	Συσχετίσεις μόλυβδου με βιοδείκτες	116
4.2.11	Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	116
4.3	Έκθεση <i>Venus verrucosa</i> σε μόλυβδο.....	119
4.3.1	Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα μόλυβδου στο θαλασσινό νερό	119
4.3.2	Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	123
4.3.3	Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	125
4.3.4	Καταλάση σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	127
4.3.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	129
4.3.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	131
4.3.7	Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	133
4.3.8	Ολική Πρωτεΐνη σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	135
4.3.9	Ψευδάργυρος σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	136
4.3.10	Συσχέτιση μόλυβδου με βιοδείκτες	137
4.3.11	Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	137
4.4	Σύγκριση των τριών οργανισμών.....	140
4.4.1	Επίπεδα και κατανομή μόλυβδου	140
4.4.2	Λιπιδική υπεροξειδωση	142
4.4.3	Ακετυλοχολινεστεράση	142
4.4.4	Καταλάση	143
4.4.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης	145
4.4.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης	146
4.4.7	Μεταλλοθειονίνες	146
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΝΙΚΕΛΙΟ	148

5.1	Έκθεση <i>Mytilus galloprovincialis</i> σε νικέλιο.....	148
5.1.1	Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα νικελίου στο θαλασσινό νερό.....	148
5.1.2	Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	151
5.1.3	Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	153
5.1.4	Καταλάση σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	155
5.1.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	157
5.1.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	160
5.1.7	Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	162
5.1.8	Ψευδάργυρος σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	164
5.1.9	Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	164
5.1.10	Συσχέτιση νικελίου με βιοδείκτες.....	164
5.1.11	Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	165
5.2	Έκθεση <i>Callista chione</i> σε νικέλιο	167
5.2.1	Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα νικελίου στο θαλασσινό νερό.....	167
5.2.2	Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	169
5.2.3	Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	171
5.2.4	Καταλάση σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	173
5.2.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο....	175
5.2.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>Callista chione</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	177
5.2.7	Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	179
5.2.8	Ψευδάργυρος σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	182
5.2.9	Ολική Πρωτεΐνη σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	182
5.2.10	Συσχετίσεις νικελίου με βιοδείκτες.....	182
5.2.11	Συσχετίσεις βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	182
5.3	Έκθεση <i>Venus verrucosa</i> σε νικέλιο	184
5.3.1	Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα νικελίου στο θαλασσινό νερό.....	184
5.3.2	Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	186
5.3.3	Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	188
5.3.4	Καταλάση σε ιστούς <i>Venus verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	190

5.3.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	192
5.3.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	194
5.3.7	Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	196
5.3.8	Ψευδάργυρος σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	198
5.3.9	Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	198
5.3.10	Συσχέτιση νικελίου με βιοδείκτες.....	199
5.3.11	Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε νικέλιο	199
5.4	Σύγκριση των τριών οργανισμών.....	201
5.4.1	Επίπεδα και κατανομή νικελίου	201
5.4.2	Λιπιδική υπεροξειδωση	202
5.4.3	Ακετυλοχολινεστεράση	202
5.4.4	Καταλάση.....	203
5.4.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης	204
5.4.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης	204
5.4.7	Μεταλλοθειονίνες	205
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΚΑΔΜΙΟ	206
6.1	Έκθεση <i>Mytilus galloprovincialis</i> σε κάδμιο	206
6.1.1	Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα καδμίου στο θαλασσινό νερό	206
6.1.2	Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	209
6.1.3	Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	211
6.1.4	Καταλάση σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	213
6.1.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	214
6.1.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	216
6.1.7	Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	218
6.1.8	Ψευδάργυρος σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	220
6.1.9	Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	220
6.1.10	Συσχέτιση καδμίου με βιοδείκτες.....	221
6.1.11	Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	221
6.2	Έκθεση <i>Callista chione</i> σε κάδμιο	222
6.2.1	Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα καδμίου στο θαλασσινό νερό	222

6.2.2	Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	225
6.2.3	Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	227
6.2.4	Καταλάση σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	229
6.2.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	231
6.2.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο..	233
6.2.7	Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	235
6.2.8	Ψευδάργυρος σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	237
6.2.9	Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	237
6.2.10	Συσχετίσεις καδμίου με βιοδείκτες	237
6.2.11	Συσχετίσεις των βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	238
6.3	Έκθεση <i>Venus verrucosa</i> σε κάδμιο	240
6.3.1	Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα καδμίου στο θαλασσινό νερό	240
6.3.2	Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	243
6.3.3	Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	245
6.3.4	Καταλάση σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	247
6.3.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	249
6.3.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο...	251
6.3.7	Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	253
6.3.8	Ψευδάργυρος σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	255
6.3.9	Συσχέτιση καδμίου με βιοδείκτες	255
6.3.10	Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε κάδμιο	255
6.4	Σύγκριση των τριών οργανισμών.....	258
6.4.1	Επίπεδα και κατανομή καδμίου	258
6.4.2	Λιπιδική υπεροξειδωση	259
6.4.3	Ακετυλοχολινεστεράση	259
6.4.4	Καταλάση.....	260
6.4.5	S μεταφοράση της γλουταθειόνης	261
6.4.6	Αναγωγή της γλουταθειόνης	262
6.4.7	Μεταλλοθειονίνες	262
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	264
7.1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	264

7.1.1	Επίπεδα και κατανομή μετάλλων.....	264
7.1.2	Ακετυλοχολινεστεράση.....	265
7.1.3	Λιπιδική υπεροξειδωση.....	266
7.1.4	S μεταφοράση της γλουταθειόνης.....	267
7.1.5	Αναγωγήση της γλουταθειόνης.....	267
7.1.6	Καταλάση.....	268
7.1.7	Μεταλλοθειονίνες.....	269
7.2	<i>Callista chione</i>	269
7.2.1	Επίπεδα και κατανομή μετάλλων.....	269
7.2.2	Ακετυλοχολινεστεράση.....	271
7.2.3	Λιπιδική υπεροξειδωση.....	272
7.2.4	S μεταφοράση της γλουταθειόνης.....	272
7.2.5	Αναγωγήση της γλουταθειόνης.....	273
7.2.6	Καταλάση.....	274
7.2.7	Μεταλλοθειονίνες.....	274
7.3	<i>Venus verrucosa</i>	275
7.3.1	Επίπεδα και κατανομή μετάλλων.....	275
7.3.2	Ακετυλοχολινεστεράση.....	276
7.3.3	Λιπιδική υπεροξειδωση.....	277
7.3.4	S μεταφοράση της γλουταθειόνης.....	278
7.3.5	Αναγωγήση της γλουταθειόνης.....	279
7.3.6	Καταλάση.....	279
7.3.7	Μεταλλοθειονίνες.....	280
8.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	281
9.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	295
10.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	297

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Στάδια παραγωγής ελευθέρων ριζών.	46
Σχήμα 2: Αντιδράσεις Fenton και Haber Weiss. $M^{(n)}$: οξειδωμένο μέταλλο, $M^{(n-1)}$: ανηγμένο μέταλλο, $O_2^{\cdot-}$: υπεροξειδικό ανιόν, H_2O_2 : υπεροξείδιο του υδρογόνου, HO^{\cdot} : υδροξυλική ρίζα, OH^- : ιόν υδροξυλίου ¹²³	47
Σχήμα 3: Οξείδωση λιπιδίου (το πολυακόρεστο λιπαρό οξύ οξειδώνεται και παράγεται υδροϋπεροξειδίο ή μηλονική διαλδεύδη)	48
Σχήμα 4: Ενολική μορφή MDA (η MDA εναλλάσσεται ταχέως ανάμεσα σε δύο ενδομοριακές ασυμμετρικές μορφές μέσω μιας συμμετρικής μεσομερικής δομής).....	48
Σχήμα 5: α) Αντίδραση MDA με πρωτεΐνη, β) Αντίδραση MDA με βάση νουκλεϊκού οξέος ^{131,138}	49
Σχήμα 6: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του μολύβδου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των μυδιών.....	79
Σχήμα 7: Box-plots των συγκεντρώσεων του μολύβδου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των μυδιών .	79
Σχήμα 8: Ποσοστιαία κατανομή μολύβδου στους ιστούς των μυδιών την 10η ημέρα έκθεσης σε Pb	80
Σχήμα 9: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	82
Σχήμα 10: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεΰδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	82
Σχήμα 11: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) με στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	84
Σχήμα 12: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) σε ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	85
Σχήμα 13: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	86
Σχήμα 14: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	87
Σχήμα 15: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της S μεταφοράση της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	88
Σχήμα 16: Box-plots των επιπέδων της S μεταφοράση της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w}$) σε ιστούς μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	89
Σχήμα 17: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	91
Σχήμα 18: Box-plots των επιπέδων της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	91
Σχήμα 19: Χρονική μεταβολή των μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/ g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	93

Σχήμα 20: Box-plots των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/ g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	94
Σχήμα 21: Box-plots των επιπέδων της ολικής πρωτεΐνης (mg/ mL διαλύματος) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	95
Σχήμα 22: Box-plots των επιπέδων ψευδαργύρου ($\mu\text{g/ g d.w.}$) τους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	95
Σχήμα 23: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του μολύβδου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών.....	100
Σχήμα 24: Box-plots των συγκεντρώσεων του μολύβδου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών.....	101
Σχήμα 25: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	103
Σχήμα 26: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεΐδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	103
Σχήμα 27: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	105
Σχήμα 28: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	105
Σχήμα 29: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	107
Σχήμα 30: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	107
Σχήμα 31: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	109
Σχήμα 32: Box-plots των επιπέδων της GST ($\mu\text{mol/ min/ g w.w}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	110
Σχήμα 33: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	111
Σχήμα 34: Box-plots των επιπέδων της GR ($\mu\text{mol/ min/ g w.w}$) ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	112
Σχήμα 35: Χρονική μεταβολή των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/ g w.w.}$) ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	114
Σχήμα 36: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/ g w.w.}$) ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	114
Σχήμα 37: Χρονική μεταβολή των επιπέδων ολικής πρωτεΐνης (mg/mL) στα βράγχια και το μανδύα των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	115
Σχήμα 38: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων ψευδαργύρου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Pb	115

Σχήμα 39: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του μολύβδου (μg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών	120
Σχήμα 40: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του μολύβδου (μg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών	121
Σχήμα 41: Box-plots των συγκεντρώσεων του μολύβδου (μg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών	121
Σχήμα 42: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	124
Σχήμα 43: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεϋδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	125
Σχήμα 44: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	126
Σχήμα 45: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	127
Σχήμα 46: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	128
Σχήμα 47: Box-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	129
Σχήμα 48: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	130
Σχήμα 49: Box-plots των επιπέδων GST (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	131
Σχήμα 50: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	132
Σχήμα 51: Box-plots των επιπέδων GR (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	133
Σχήμα 52: Χρονική μεταβολή των τιμών των μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	135
Σχήμα 53: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	135
Σχήμα 54: Μεταβολή της συγκέντρωσης ψευδαργύρου (μg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο	136
Σχήμα 55: Box-plots των επιπέδων μολύβδου (μg/g d.w.) για α) βράγχια, β) μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Pb.....	140
Σχήμα 56: Box-plots των επιπέδων μολύβδου (μg/g d.w.) για α) σώμα, β) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb.....	140
Σχήμα 57: Box-plots των επιπέδων μολύβδου (μg/g d.w.) για α) μανδύα, β) σώμα, γ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb	141

Σχήμα 58: Box-plots των επιπέδων μολύβδου (μg/g d.w.) για α) βράγχια, β) μανδύα, γ) σώμα, δ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb	141
Σχήμα 59: Box-plots των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/ g w.w.) για α) βράγχια, β) μανδύα, γ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Pb....	142
Σχήμα 60: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/min/g w.w) για α) βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Pb, β) μανδύας των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb, γ) μανδύας των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb, δ) σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb, ε) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb, στ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb	143
Σχήμα 61: Box-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/min/g w.w) στους τέσσερις ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb (β, δ, στ, ζ), στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb (α), στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Pb (γ) και στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb (ε)	144
Σχήμα 62: Box-plots των επιπέδων GST (μmol/min/g w.w) στα βράγχια (α), το μανδύα (γ) και το πεπτικό σύστημα (στ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb, στα βράγχια (β) και το σώμα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb και στο σώμα (ε) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb	145
Σχήμα 63: Box-plots των επιπέδων GR (μmol/min/g w.w) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb (α), στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb (β), στο σώμα (γ) και το πεπτικό σύστημα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Pb ...	146
Σχήμα 64: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w) στα βράγχια (α), το σώμα (γ) και το πεπτικό σύστημα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb και στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb (β).....	147
Σχήμα 65: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων νικελίου (μg/g d.w.) στους ιστούς των μυδιών	149
Σχήμα 66: Σχήμα: Box-plots των συγκεντρώσεων νικελίου (μg/g d.w.) στους ιστούς των μυδιών	150
Σχήμα 67: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	152
Σχήμα 68: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεϋδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	153
Σχήμα 69: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	155
Σχήμα 70: : Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	155
Σχήμα 71: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	157
Σχήμα 72: Box-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	157

Σχήμα 73: Box-plots των επιπέδων της S μεταφοράση της γλουταθειόνης (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	158
Σχήμα 74: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της S μεταφοράση της γλουταθειόνης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	159
Σχήμα 75: Box-plots των επιπέδων της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	160
Σχήμα 76: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	161
Σχήμα 77: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	163
Σχήμα 78: Box-plots των επιπέδων των μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	164
Σχήμα 79: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νικελίου (μg/g d.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών	168
Σχήμα 80: Box-plots των συγκεντρώσεων του νικελίου (μg/g d.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών	169
Σχήμα 81: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	170
Σχήμα 82: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεϋδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	171
Σχήμα 83: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	172
Σχήμα 84: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	173
Σχήμα 85: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	174
Σχήμα 86: Box-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	175
Σχήμα 87: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	176
Σχήμα 88: Box-plots των επιπέδων της GST (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	177
Σχήμα 89: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR (μmol/min/g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	178
Σχήμα 90: Box-plots των επιπέδων της GR (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	179
Σχήμα 91: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	180

Σχήμα 92: Χρονική μεταβολή των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	181
Σχήμα 93: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων νικελίου (μg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών	186
Σχήμα 94: Box-plots των συγκεντρώσεων νικελίου στους ιστούς των κυδωνιών	186
Σχήμα 95: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	187
Σχήμα 96: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεΐδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	188
Σχήμα 97: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	189
Σχήμα 98: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	190
Σχήμα 99: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	191
Σχήμα 100: Box-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	192
Σχήμα 101: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	193
Σχήμα 102: Box-plots των επιπέδων GST (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.....	194
Σχήμα 103: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	195
Σχήμα 104: Box-plots των επιπέδων GR (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	196
Σχήμα 105: Χρονική μεταβολή των τιμών των μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	197
Σχήμα 106: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο	198
Σχήμα 107: Box-plots των επιπέδων νικελίου (μg/g d.w.) για α) βράγχια, β) μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni και γ) για το σώμα, δ) για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni.....	201
Σχήμα 108: Box-plots των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/ g w.w.) για α) βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni, β) σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni, γ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Ni	202
Σχήμα 109: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/min/g w.w) για τα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni (α), το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Ni (β), το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni (γ).....	203

Σχήμα 110: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους τέσσερις ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni	204
Σχήμα 111: Box-plots των επιπέδων GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στα βράγχια (α) και το μανδύα (β) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni	204
Σχήμα 112: Box-plots των επιπέδων GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni (α) και 1,0 ppm Ni (β), στο σώμα (γ) και το πεπτικό σύστημα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni	205
Σχήμα 113: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol}/\text{g w.w}$) στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni (α) και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni (β)	205
Σχήμα 114: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του καδμίου ($\mu\text{g}/\text{g d.w.}$) στους ιστούς των μυδιών για κάθε επίπεδο έκθεσης	207
Σχήμα 115: Box-plots των συγκεντρώσεων καδμίου ($\mu\text{g}/\text{g d.w.}$) στους ιστούς των μυδιών.....	208
Σχήμα 116: Ποσοστιαία κατανομή του καδμίου στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5- 1,0- 2,5 και 20 ppm Cd με τις μέρες έκθεσης	209
Σχήμα 117: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης ($\text{nmol MDA}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	211
Σχήμα 118: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεϋδης ($\text{nmol MDA}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	211
Σχήμα 119: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	212
Σχήμα 120: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	213
Σχήμα 121: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	213
Σχήμα 122: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	214
Σχήμα 123: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	215
Σχήμα 124: Box-plots των επιπέδων της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	216
Σχήμα 125: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	217
Σχήμα 126: Box-plots των επιπέδων της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	218
Σχήμα 127: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	219
Σχήμα 128: Box-plots των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	220

Σχήμα 129: Box-plots των επιπέδων των συγκεντρώσεων του ψευδαργύρου ($\mu\text{g/g d.w.}$) σε α) στα βράγχια, β) στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου	220
Σχήμα 130: Χρονική μεταβολή συγκεντρώσεων καδμίου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών	224
Σχήμα 131: Box-plots των συγκεντρώσεων του καδμίου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών	224
Σχήμα 132: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	226
Σχήμα 133: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεΐδης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	227
Σχήμα 134: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	228
Σχήμα 135: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	229
Σχήμα 136: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	230
Σχήμα 137: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	231
Σχήμα 138: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	232
Σχήμα 139: Box-plots των επιπέδων της GST ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	233
Σχήμα 140: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	234
Σχήμα 141: Box-plots των επιπέδων της GR ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	235
Σχήμα 142: Χρονική μεταβολή των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	236
Σχήμα 143: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/ g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	237
Σχήμα 144: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων καδμίου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών	241
Σχήμα 145: Box-plots των συγκεντρώσεων καδμίου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών	242
Σχήμα 146: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	244
Σχήμα 147: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεΐδης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	245
Σχήμα 148: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	246

Σχήμα 149: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	247
Σχήμα 150: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	248
Σχήμα 151: Box-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	249
Σχήμα 152: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	250
Σχήμα 153: Box-plots των επιπέδων GST (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	251
Σχήμα 154: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	252
Σχήμα 155: Box-plots των επιπέδων GR (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο.....	253
Σχήμα 156: Χρονική μεταβολή των μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	254
Σχήμα 157: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο	255
Σχήμα 158: Box-plots επιπέδων καδμίου (μg/g d.w.) για το α) μανδύα οργανισμών που εκτέθηκαν α) σε 1,0 ppm Cd, β) σε 2,5 ppm Cd, γ) πεπτικό σύστημα οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd.....	258
Σχήμα 159: Box-plots των επιπέδων καδμίου (μg/g d.w.) για α) βράγχια, β) σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd.....	258
Σχήμα 160: Box-plots των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/ g w.w.) για το α) σώμα, β) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Cd.....	259
Σχήμα 161: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/min/g w.w) σε α) βράγχια, β) μανδύα και γ) σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd, δ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd.....	259
Σχήμα 162: Box-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/min/g w.w) α) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd, β) στους τέσσερις ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd (β, γ, δ, στ), ε) στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd.....	260
Σχήμα 163: Box-plots των επιπέδων GST (μmol/min/g w.w) στα βράγχια (α) και το μανδύα (στ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd, στο σώμα (β), το πεπτικό σύστημα (γ) και το μανδύα (ε) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd, στο μανδύα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd και στο μανδύα (ζ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd	261
Σχήμα 164: Box-plots των επιπέδων GR (μmol/min/g w.w) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd (α), στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd (β, γ) και στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd (δ).	262

Σχήμα 165: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd, β) στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd, γ) στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd, δ) στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd	263
Σχήμα 166: Συγκριτική απεικόνιση συγκέντρωσης των τριών μετάλλων σε <i>M. galloprovincialis</i> μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο (Day 0)	265
Σχήμα 167: Συγκριτική απεικόνιση βιοσυσσώρευσης των τριών μετάλλων σε <i>M. galloprovincialis</i> την 20 ^η ημέρα έκθεσης	265
Σχήμα 168: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης στους ιστούς των <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	266
Σχήμα 169: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσής στους ιστούς των <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	266
Σχήμα 170: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων S μεταφοράς της γλουταθειόνης στους ιστούς των <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	267
Σχήμα 171: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων αναγωγής της γλουταθειόνης στους ιστούς των <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	268
Σχήμα 172: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων καταλάσης στους ιστούς των <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	268
Σχήμα 173: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων μεταλλοθειονινών στους ιστούς των <i>M. galloprovincialis</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	269
Σχήμα 174: Συγκριτική απεικόνιση συγκέντρωσης των τριών μετάλλων σε <i>C. chione</i> μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο (Day 0).....	270
Σχήμα 175: Συγκριτική απεικόνιση βιοσυσσώρευσης των τριών μετάλλων σε <i>C. chione</i> την ημέρα 20	271
Σχήμα 176: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης στους ιστούς των <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	271
Σχήμα 177: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσής στους ιστούς των <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	272
Σχήμα 178: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων S μεταφοράς της γλουταθειόνης στους ιστούς των <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	273
Σχήμα 179: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων αναγωγής της γλουταθειόνης στους ιστούς των <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	273

Σχήμα 180: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων καταλάσης στους ιστούς των <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης.....	274
Σχήμα 181: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων μεταλλοθειονινών στους ιστούς των <i>C. chione</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	275
Σχήμα 182: Συγκριτική απεικόνιση συγκέντρωσης των τριών μετάλλων σε <i>V. verrucosa</i> μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο (Day 0).....	276
Σχήμα 183: Συγκριτική απεικόνιση βιοσυσσώρευσης των τριών μετάλλων σε <i>V. verrucosa</i> την 20 ^η ημέρα του πειράματος έκθεσης	276
Σχήμα 184: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης στους ιστούς των <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης.....	277
Σχήμα 185: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσής στους ιστούς των <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης.....	278
Σχήμα 186: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων S μεταφοράς της γλουταθειόνης στους ιστούς των <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	278
Σχήμα 187: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων αναγωγής της γλουταθειόνης στους ιστούς των <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	279
Σχήμα 188: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων καταλάσης στους ιστούς των <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης	280
Σχήμα 189: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων μεταλλοθειονινών στους ιστούς των <i>V. verrucosa</i> που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20 ^η ημέρα έκθεσης.....	280

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Μύδι (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	63
Εικόνα 2: <i>M. galloprovincialis</i> σε σχοινιά, σε υδατοκαλλιέργεια.....	63
Εικόνα 3: Γυαλιστερή (<i>Callista chione</i>)	65
Εικόνα 4: Γυαλιστερή (ο πόδας και ο σίφωνας είναι εμφανή στη φωτογραφία).....	65
Εικόνα 5: Κυδώνι (<i>Venus verrucosa</i>).....	66
Εικόνα 6: Σαρωνικός Κόλπος (μυδοκαλλιέργειες στα σημεία "Βουρκάρι" και "Λουτρόπυργος")	70
Εικόνα 7: α) <i>M. galloprovincialis</i> , β) <i>C. chione</i> , γ) <i>V. verrucosa</i> , δ) ενυδρεία που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων.....	70

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Νομοθετικά όρια για το κάδμιο, το μόλυβδο και το νικέλιο	42
Πίνακας 2: Τιμές LC50 από δοκιμασίες οξείας τοξικότητας με κάδμιο σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς.....	42
Πίνακας 3: Τιμές LC50 από δοκιμασίες οξείας τοξικότητας με μόλυβδο σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς.....	43
Πίνακας 4: Τιμές LC50 από δοκιμασίες οξείας τοξικότητας με νικέλιο σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς.....	43
Πίνακας 5: Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου	45
Πίνακας 6: Πιστοποιημένη τιμή των μετάλλων Cd, Pb, Ni, Zn, Fe και Cu καθώς και η % ανάκτηση των προτύπων υλικών αναφοράς NIST 2976 (mussel tissue) και IAEA 452 (scallop)	71
Πίνακας 7: Βαρέα μέταλλα στο θαλασσινό νερό (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) στους σταθμούς των μυδοκαλλιεργειών (S1-S2) και στη θαλάσσια περιοχή συλλογής νερού για τα πειράματα (CH1-CH2)	74
Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις μολύβδου στους ιστούς των <i>Mytilus galloprovincialis</i>	77
Πίνακας 9: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA (nmol MDA/g w.w.) για τον πληθυσμό αναφοράς.....	80
Πίνακας 10: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστράσης (nmol/ min/g w.w.) στους ιστούς των μυδιών αναφοράς.....	83
Πίνακας 11: Αύξηση των επιπέδων των μεταλοθειονινών (C_{DayX}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς.....	92
Πίνακας 12: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών	97
Πίνακας 13: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών	97
Πίνακας 14: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών	98
Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις μολύβδου (μg/g) σε ιστούς των <i>C. chione</i>	98
Πίνακας 16: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης μολύβδου (μg/g d.w.) στους ιστούς των οργανισμών του πληθυσμού αναφοράς.....	98
Πίνακας 17: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA για τον πληθυσμό αναφοράς	101
Πίνακας 18: Επίπεδα μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w.) κατά τη διάρκεια του πειράματος στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς.....	112
Πίνακας 19: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών	117
Πίνακας 20: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών	118

Πίνακας 21: : Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών	118
Πίνακας 22: : Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών	118
Πίνακας 23: Συγκεντρώσεις μολύβδου στους ιστούς των <i>Venus verrucosa</i>	119
Πίνακας 24: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης μολύβδου (μg/g d.w.) στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς.....	119
Πίνακας 25: Συντελεστής βιοσυσσώρευσης κατά τη διάρκεια του πειράματος έκθεσης στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.....	122
Πίνακας 26: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς.....	123
Πίνακας 27: Αύξηση των μεταλοθειονινών (C_{DayX}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς	133
Πίνακας 28: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων ψευδαργύρου (μg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών αναφοράς.....	136
Πίνακας 29: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών	138
Πίνακας 30: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών	139
Πίνακας 31: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών	139
Πίνακας 32: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών	139
Πίνακας 33: Συντελεστής βιοσυσσώρευσης στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν στα διάφορα επίπεδα νικελίου.....	150
Πίνακας 34: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA για τον πληθυσμό αναφοράς	151
Πίνακας 35: Αύξηση των επιπέδων των μεταλοθειονινών (C_{DayX}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς.....	162
Πίνακας 36: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών	166
Πίνακας 37: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών	166
Πίνακας 38: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών	167
Πίνακας 39: Αύξηση των επιπέδων των μεταλοθειονινών (C_{DayX}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς.....	180
Πίνακας 40: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών	184

Πίνακας 41: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών	184
Πίνακας 42: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών	184
Πίνακας 43: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών	184
Πίνακας 44: Αύξηση των επιπέδων των μεταλοθειονινών (C_{Dayx}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς.....	196
Πίνακας 45: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών	200
Πίνακας 46: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών	200
Πίνακας 47: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών	200
Πίνακας 48: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών	201
Πίνακας 49: Συγκεντρώσεις καδμίου στους ιστούς των <i>M. galloprovincialis</i>	206
Πίνακας 50: Συντελεστής βιοσυσώρευσης για τους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα καδμίου	208
Πίνακας 51: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA (nmol MDA/g w.w.) για τον πληθυσμό αναφοράς.....	209
Πίνακας 52: Αύξηση των επιπέδων των μεταλοθειονινών (C_{Dayx}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς.....	219
Πίνακας 53: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών	222
Πίνακας 54: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών	222
Πίνακας 55: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών	222
Πίνακας 56: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς.....	225
Πίνακας 57: Αύξηση των μεταλοθειονινών (C_{Dayx}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς	236
Πίνακας 58: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών	239
Πίνακας 59: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών	239
Πίνακας 60: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών	239

Πίνακας 61: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών	240
Πίνακας 62: Συντελεστής βιοσυσσώρευσης τις 20 μέρες του πειράματος έκθεσης στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου.....	243
Πίνακας 63: Αύξηση των μεταλοθειονινών (C_{DayX}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς	253
Πίνακας 64: Πίνακας συχτίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών	257
Πίνακας 65: Πίνακας συχτίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών	257
Πίνακας 66: Πίνακας συχτίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών	257
Πίνακας 67: Πίνακας συχτίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών	257
Πίνακας 68: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων	294

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ένα πολύ σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα είναι η αλληλεπίδραση των ρύπων με τους οργανισμούς και τα οικοσυστήματα. Υπάρχει μεγάλος όγκος εργασιών, μελετών και τοξικολογικών δεδομένων σε διάφορους οργανισμούς με εξειδικευμένους κάθε φορά στόχους αλλά συνολικό σκοπό την αειφόρο ανάπτυξη. Όμως η ποικιλότητα των οργανισμών και των ρύπων στους οποίους μπορεί να εκτεθούν καθιστά χρήσιμη κάθε τέτοια μελέτη.

Για την παρούσα διατριβή στο πλαίσιο της γενικότερης μελέτης των επιδράσεων των μετάλλων στους οργανισμούς ελέγξαμε την αντίδραση τριών θαλάσσιων οργανισμών στην έκθεσή τους σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων επιλεγμένων βαρέων μετάλλων (Pb, Cd, Ni). Τα είδη που επιλέχθηκαν ήταν *Mytilus galloprovincialis* (μύδι), *Callista chione* (γυαλιστερή) και *Venus verrucosa* (κυδώνι), τα οποία είναι θαλάσσια δίθυρα και διηθητές οργανισμοί, αλλά διαφέρουν ελαφρώς ως προς τον οικότοπό τους. Η διαφοροποίηση στο περιβάλλον το οποίο αναπτύσσονται οι οργανισμοί επηρεάζει την επικοινωνία τους με τον κύριο φορέα βαρέων μετάλλων, το θαλασσινό νερό.

Και οι τρεις οργανισμοί είναι μεσογειακά είδη και καταναλώνονται και στη χώρα μας. Έχουν παραπλήσιους μηχανισμούς φυσιολογίας (αναπνοή, λήψη τροφής και απέκκριση), αλλά και βιοχημικούς μηχανισμούς. Πρέπει να σημειωθεί η πρωτοτυπία της παρούσας διατριβής έγκειται και στο γεγονός ότι οι γυαλιστερές (*Callista chione*) και τα κυδώνια (*Venus verrucosa*) δεν έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί σε τέτοιου είδους πειράματα έκθεσης σε βαρέα μέταλλα σε εργαστηριακές συνθήκες.

Το κάδμιο και ο μόλυβδος θεωρούνται ρύποι προτεραιότητας για τη Μεσόγειο, έχει βρεθεί ότι έχουν αυξημένη τοξικότητα και είναι μη απαραίτητα στοιχεία για τους οργανισμούς. Το νικέλιο χρησιμοποιήθηκε παρ' όλο που θεωρείται λιγότερο τοξικό στοιχείο (γι' αυτό και δεν έχει θεσπιστεί νομοθετικό όριο από την Ευρωπαϊκή Ένωση) γιατί έχει βρεθεί σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο θαλάσσιο περιβάλλον κυρίως κοντά σε περιοχές όπου υπάρχουν μεταλλουργικές δραστηριότητες.

Το γενικό ερώτημα στο οποίο επιχειρεί να απαντήσει η παρούσα διατριβή είναι η απόκριση των θαλάσσιων δίθυρων στη ρύπανση από βαρέα μέταλλα.

Τα ειδικότερα θέματα που περιλαμβάνει η μελέτη είναι:

- ο βαθμός βιοσυσσώρευσης του κάθε στοιχείου στους ιστούς των οργανισμών ώστε αφενός να δούμε ποια όργανα επηρεάζονται περισσότερο αφετέρου να δούμε την επικινδυνότητα στον άνθρωπο από την κατανάλωση τέτοιων οργανισμών
- η επίδραση της ρύπανση στην υγεία των οργανισμών μέσω της μελέτης βιοχημικών δεικτών
- η δυνατότητα αποτοξίνωσης των οργανισμών όταν μειωθεί ή εξαλειφθεί η ρύπανση
- η εισαγωγή νέων οργανισμών/ιστών ή/και ενώσεων-βιοδεικτών στα προγράμματα παρακολούθησης της θαλάσσιας ρύπανσης (monitoring).

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων, οι υπό μελέτη οργανισμοί εκτέθηκαν σε εργαστηριακές πειραματικές διατάξεις σε διαφορετικά επίπεδα μετάλλων. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα έκθεσης προσδιορίζονταν τα επίπεδα των μετάλλων και γνωστών ενώσεων-βιοδεικτών σε διάφορους ιστούς.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων συνάγεται ότι η έκθεση σε μέταλλα επάγει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών αποκρίσεων, το οποίο εξαρτάται από το μέταλλο, το χρόνο έκθεσης και το επίπεδο της βιοσυσσώρευσης αυτού στους ιστούς των οργανισμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Η σημασία του θαλάσσιου περιβάλλοντος είναι αδιαμφισβήτητη δεδομένου ότι οι ωκεανοί και οι θάλασσες καλύπτουν το 71% της γήινης επιφάνειας, διαθέτουν πλούσια βιοποικιλότητα και συνεισφέρουν στο 50% του παραγόμενου οξυγόνου στον πλανήτη. Τα θαλάσσια οικοσυστήματα διαθέτουν μία τεράστια ποικιλία ενδοιτημάτων και παρουσιάζουν μεγάλο εύρος φυσικών, χημικών και γεωλογικών χαρακτηριστικών. Η κλιματική αλλαγή, η ρύπανση, η οξίνιση, η υπερεκμετάλλευση των θαλάσσιων πόρων, τα εισβάλλοντα ξενικά είδη, διαταράσσουν τις ισορροπίες στο θαλάσσιο περιβάλλον και υποβαθμίζουν τα οικοσυστήματα¹.

Ως ρύπανση νοείται η άμεση ή έμμεση εισαγωγή ουσιών ή ενέργειας στο θαλάσσιο περιβάλλον ως αποτέλεσμα ανθρώπινων δραστηριοτήτων. Οι επιπτώσεις της ρύπανσης είναι πιθανόν να είναι επιβλαβείς στους θαλάσσιους οργανισμούς και τα θαλάσσια οικοσυστήματα, οδηγώντας στην απώλεια βιοποικιλότητας, να θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία, να εμποδίζουν δραστηριότητες όπως η αλιεία, ο τουρισμός και η αναψυχή, να υποβαθμίζουν ποιοτικά τη χρήση του θαλάσσιου νερού ή γενικότερα να υποβαθμίζουν την αειφόρο χρήση των θαλάσσιων αγαθών και υπηρεσιών².

Οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες επιβαρύνουν τους ωκεανούς με ένα τεράστιο αριθμό χημικών ουσιών. Σύμφωνα με διαθέσιμα δεδομένα², 63.000 διαφορετικές χημικές ουσίες είναι αυτή τη στιγμή σε χρήση για διάφορες δραστηριότητες παγκοσμίως με τις 3.000 από αυτές να αποτελούν το 90% της παγκόσμιας παραγωγής, ενώ περίπου 1.000 νέες ουσίες προστίθενται κάθε χρόνο στην παγκόσμια αγορά². Η παρουσία ρύπων όπως PAHs, οργανοχλωριωμένων ενώσεων, αζωτούχων-φωσφορούχων λιπασμάτων, ραδιενεργών στοιχείων καθώς και βαρέων μετάλλων (Cd, Hg, Pb, Zn, Ni, Cr, Cu κλπ) αποτελεί απειλή για την υγεία και βιωσιμότητα των θαλάσσιων οικοσυστημάτων καθώς μπορεί να προκαλέσει πληθυσμιακή μείωση ή ακόμα και την εξαφάνιση κάποιου είδους και συνεπώς τη διατάραξη των αλληλεξαρτήσεων μεταξύ των ειδών.

Λόγω του αυξανόμενου προβληματισμού σε ότι αφορά την κατάσταση των ωκεανών και των θαλασσών της Ευρώπης, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα έχει αναπτύξει δράσεις/αποφάσεις προστασίας από τη ρύπανση για όλες τις θάλασσες που την περιβάλλουν (Βόρεια, Βαλτική, Μαύρη, Μεσόγειο και Βορειοανατολικό Ατλαντικό). Το 6^ο Πρόγραμμα Δράσης για το Περιβάλλον της Ευρωπαϊκής Ένωσης έθεσε ως συνολικό στόχο την «προαγωγή της αειφόρου χρήσης των θαλασσών και τη διατήρηση των θαλάσσιων οικοσυστημάτων». Η οδηγία-πλαίσιο για τη θαλάσσια στρατηγική² αποσκοπεί στην επίτευξη της καλής περιβαλλοντικής κατάστασης των θαλάσσιων υδάτων της Ευρωπαϊκής Ένωσης μέχρι το 2020 και στην προστασία των θαλάσσιων πόρων από τους οποίους εξαρτώνται οικονομικές και κοινωνικές δραστηριότητες που σχετίζονται με τη θάλασσα. Δύο από τα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά που ορίζει η Θαλάσσια Στρατηγική αφορούν ρύπους, μεταξύ των οποίων και τα βαρέα μέταλλα, στο αβιοτικό αλλά και στο έμβιο θαλάσσιο περιβάλλον (ψάρια και θαλασσινά). Η καλή περιβαλλοντική κατάσταση θα αξιολογηθεί με κριτήρια που θα λαμβάνουν υπόψη και τα επίπεδα των ρύπων, αλλά και τις επιπτώσεις τους στα θαλάσσια οικοσυστήματα.

Ένας ρύπος βιοσυσσωρεύεται όταν ο ρυθμός πρόσληψής του από έναν οργανισμό είναι μεγαλύτερος από τον ρυθμό αποβολής³. Η βιοσυσσώρευση ρύπων στους οργανισμούς οδηγεί

στην βιομεγέθυνση κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας με απώτερο και τελικό καταναλωτή τον άνθρωπο.

1.2 Βαρέα μέταλλα

1.2.1 Ορισμοί, Επίπεδα και Μορφές στο θαλάσσιο περιβάλλον

Τα βαρέα μέταλλα συνιστούν μαζί με τα συνθετικά οργανικά τις δύο κύριες ομάδες ρύπων στο περιβάλλον. Σαν βαρέα μέταλλα χαρακτηρίζονται τα μέταλλα που έχουν πυκνότητα μεγαλύτερη από $5,0 \text{ gr/cm}^3$ ⁴ ή κατ' άλλους ατομικό βάρος μεγαλύτερο του 20, που είναι το ατομικό βάρος του Ca ⁵. Από την ομάδα αυτή των μετάλλων εξαιρούνται τα αλκάλια, οι αλκαλικές γαίες, οι λανθανίδες και οι ακτινίδες.

Τα βαρέα μέταλλα είναι φυσικά συστατικά του στερεού φλοιού της γης, και αντίθετα από τους συνθετικούς οργανικούς ρύπους δεν αποικοδομούνται με φυσικές διεργασίες στο περιβάλλον. Λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους σε διάφορες ανθρώπινες δραστηριότητες η συγκέντρωσή τους στο περιβάλλον σε κάποιες περιπτώσεις αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με τα φυσικά επίπεδα, και η συνακόλουθη αυξημένη τοξικότητα και βιοσυσώρευση στους οργανισμούς αποτελούν απειλή και για τα οικοσυστήματα, αλλά και για την δημόσια υγεία.

Από πλευράς φυσικής αφθονίας, τα βαρέα μέταλλα καλύπτουν μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Κάποια από αυτά, όπως το αργίλιο και ο σίδηρος, είναι από τα αφθονότερα στοιχεία της λιθόσφαιρας, ενώ τα περισσότερα και πλέον τοξικά απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα φυσικά συστήματα και χαρακτηρίζονται σαν ιχνοστοιχεία. Συγκεκριμένα, ως ιχνοστοιχεία αναφέρονται τα στοιχεία με συγκέντρωση μικρότερη του 0,1% στη λιθόσφαιρα⁴ ή με συγκέντρωση μικρότερη του 1,0 ppm στο θαλασσινό νερό^{6, 7}, ενώ από άλλους έχει προταθεί σαν ορισμός η περιοχή συγκεντρώσεων 0,005 έως 50 nM στο θαλασσινό νερό⁸.

Οι κύριες μορφές των μετάλλων στα φυσικά ύδατα είναι ως ελεύθερα ενυδατωμένα ιόντα, τα διαλυτά ανόργανα σύμπλοκα, τα διαλυτά οργανικά σύμπλοκα, αλλά και οι μορφές όπου τα μέταλλα είναι προσροφημένα στην κolloειδή ή αιωρούμενη ύλη.

Στα φυσικά ύδατα μικρό ποσοστό των ολικών διαλυτών μετάλλων απαντάται με την μορφή των ελεύθερων ενυδατωμένων ιόντων γιατί τα μέταλλα σχηματίζουν σχετικά εύκολα μεγάλη ποικιλία σταθερών συμπλόκων με ανόργανους και οργανικούς υποκαταστάτες. Η συμπλοκοποίηση επιδρά στη βιοδιαθεσιμότητα, την τοξικότητα και την κινητικότητα των μετάλλων.

Τέλος, το μεγαλύτερο ποσοστό των μετάλλων που μεταφέρονται στα ύδατα από την ξηρά είναι προσροφημένο σε σωματίδια ορυκτών είτε απευθείας ή πάνω σε οργανικά επιστρώματα. Κατά την μεταφορά η κατανομή των μορφών των μετάλλων ανάμεσα στη στερεή και τη διαλυτή φάση μπορεί να αλλάξει λόγω της αλλαγής στις φυσικοχημικές συνθήκες του νερού⁹.

1.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα των βαρέων μετάλλων

Με τον όρο βιοδιαθεσιμότητα εννοούμε το κλάσμα της συνολικής συγκέντρωσης των μετάλλων σε ένα αβιοτικό περιβάλλον, το οποίο προσλαμβάνεται από τους οργανισμούς⁹. Οι διαδικασίες που επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των μετάλλων στους οργανισμούς του υδάτινου οικοσυστήματος είναι οι ακόλουθες:

- η συγκέντρωση των μετάλλων στο αβιοτικό περιβάλλον

- οι βιοχημικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό των οργανισμών

Τα προσλαμβανόμενα μέταλλα συναντώνται σε διάφορες μορφές: διαλύματα ιόντων, οργανικών/ ανόργανων ενώσεων, οργανικά/ ανόργανα σύμπλοκα που συμμετέχουν σε αντιδράσεις ιονταλλαγής, χημικά σύμπλοκα με διάφορες οργανικές ουσίες, αδιάλυτες ενώσεις που έχουν προσροφηθεί σε βιολογικά υλικά ή έχουν εγκλωβιστεί στις κρυσταλλικές δομές των ορυκτών¹⁰.

Τα βαρέα μέταλλα μπορούν να προσληφθούν από τους οργανισμούς με διάφορους μηχανισμούς, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η σύνδεση σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια της μεμβράνης, η ενδοκύτωση και η διείσδυση από διάφορες διόδους¹⁰.

Τα βαρέα μέταλλα παρά τις ιδιαίτερα χαμηλές τους συγκεντρώσεις, επιδρούν στη ζωή των οργανισμών θετικά ή αρνητικά, παρεμβαίνοντας στις βιοχημικές τους λειτουργίες, συμμετέχοντας έτσι στις μεταβολικές διαδικασίες και επηρεάζοντας τη φυσιολογία των οργανισμών¹². Ανάλογα με τη σημασία τους για την ανθρώπινη ζωή τα βαρέα μέταλλα διακρίνονται σε απαραίτητα και μη απαραίτητα. Απαραίτητα θεωρούνται τα βαρέα μέταλλα όταν ανιχνεύονται σε σταθερές συγκεντρώσεις στους υγιείς ιστούς και η έλλειψή τους εμποδίζει έναν οργανισμό να αναπτυχθεί πλήρως ή να συμπληρώσει τον κύκλο ζωής του. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τα 30 απαραίτητα για τη ζωή στοιχεία, 17 είναι μέταλλα και 4 μεταλλοειδή¹².

Στις κυτταρικές μεμβράνες μπορούν να διεισδύσουν ελεύθερα μεταλλικά ιόντα (M^{2+}), ενυδατωμένα ιόντα [$M(H_2O)_6^{2+}$], φορτισμένα σύμπλοκα [$MCl(H_2O)^{1+}$], μη φορτισμένα ανόργανα σύμπλοκα (MCl_2) και οργανομεταλλικά σύμπλοκα (RM^+). Τα βιολογικά σημαντικά στοιχεία (H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες με εξειδικευμένους φορείς και διόδους. Ο Fe^{3+} μεταφέρεται επίσης με εξειδικευμένο ενζυμικό σύστημα, το Μh μπορεί να εισέρχεται από διόδους για το Ca. Μέταλλα όπως ο Cu και ο Zn που είναι απαραίτητα εισέρχονται στα κύτταρα είτε με παθητική διάχυση είτε μέσω εξειδικευμένων μηχανισμών που δεν έχουν διευκρινιστεί απόλυτα. Οργανομεταλλικές ενώσεις του Hg, Sn και Pb αντιδρούν με τα λιπίδια των μεμβρανών και εισέρχονται με αυτό τον τρόπο. Το Cd εισέρχεται με απλή διάχυση ή από διόδους του Μh και το ίδιο ισχύει και για ανόργανες μορφές του Pb. Τα μέταλλα που σχηματίζουν ανιονικά σύμπλοκα (Mo, V, Cr) εισέρχονται στα κύτταρα από διόδους ανιόντων (Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , HPO_4^{2-}).

Τα μέταλλα κατατάσσονται σε 3 ομάδες, Α, Β και Ενδιάμεσα (Borderline) με κριτήριο τις προτιμήσεις στην σύνδεση με υποκαταστάτες. Κάποια από τα μέταλλα της Ομάδας Α δίνουν κατιόντα στα διαλύματα. Αυτά είναι τα: K^+ , Li^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} και Al^{3+} που είναι σταθερά και γενικά σχηματίζουν ασθενή σύμπλοκα με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Τα στοιχεία K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} είναι «μακροθρεπτικά» και έχουν σημαντικούς βιολογικούς ρόλους γι' αυτό και βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και σε ποικιλία μορφών στα σωματικά υγρά, ενώ επιπλέον τα Ca^{2+} , Mg^{2+} αποτελούν σημαντικά συστατικά οστών και σκελετών.

Τα παραπάνω στοιχεία σχηματίζουν ασθενείς δεσμούς με τα στοιχεία $O > P > N > S$ με αυτή την μειούμενη σειρά ισχύος και συνήθως δεν αποτελούν συστατικά βιολογικά σημαντικών μακρομορίων αλλά οι ενώσεις τους δρουν σαν συμπαραγόντες που ενισχύουν τη δράση ή τη σταθερότητα κύριων ενζύμων^{9, 13}.

Τα μέταλλα στην Ομάδα Β σχηματίζουν κυρίως ομοιοπολικούς δεσμούς και η σειρά προτίμησης είναι αντίθετη από των μετάλλων Α ($S > N > P > O$). Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται τα Ag^+ , Au^+ , Pt^+ , Hg^{2+} , B^{3+} , Tl^{3+} . Γενικά είναι μη απαραίτητα και τοξικά ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις^{9, 13}.

Τα Ενδιάμεσα (Bordeline) μέταλλα παρουσιάζουν ιδιότητες που είναι ενδιάμεσες ανάμεσα στις άλλες δύο κατηγορίες. Τα μέταλλα που περιλαμβάνονται εδώ είναι Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} . Ο Cu και το Cd είναι πιο κοντά στη συμπεριφορά στα μέταλλα της Ομάδας Β. Τα ενδιάμεσα μέταλλα συμμετέχουν σε πολλά σημαντικά βιολογικά μακρομόρια και άρα είναι «απαραίτητα». Παρά το γεγονός αυτό, τα ενδιάμεσα μέταλλα μπορεί να εμφανίσουν τοξικότητα και συγκεκριμένα, το νικέλιο, το βανάδιο και το σελήνιο, σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ το κοβάλτιο, ο σίδηρος, ο χαλκός και ο ψευδάργυρος σε υψηλότερες συγκεντρώσεις^{4, 9, 13}. Τέλος, ο μόλυβδος, ο υδράργυρος και το κάδμιο θεωρούνται μη απαραίτητα και τοξικά, βέβαια έχει βρεθεί ότι το κάδμιο σε χαμηλές συγκεντρώσεις και κάτω από συνθήκες έλλειψης ψευδαργύρου μπορεί να είναι απαραίτητο σε ένα θαλάσσιο μονοκύτταρο άλγος, την *Thalassiosira weissflogii*^{14, 15}.

1.2.3 Κάδμιο

Το κάδμιο συγκαταλέγεται στα σπανιότερα ιχνημέταλλα. Στη θάλασσα το 66% του καδμίου απαντάται με τη μορφή του ελεύθερου κατιόντος Cd^{2+} , και σε μικρότερα ποσοστά απαντάται στα εξής σύμπλοκα $CdCO_3$ (6%), $Cd(OH)_2$ (5%), $CdCl_2$ (1%), $CdSO_4$ (1%). Στο γλυκό νερό, τις εκβολές και τα παράκτια ύδατα συνδέεται σημαντικά και στην αιωρούμενη ύλη ενώ απαντάται και συνδεδεμένο σε κολλοειδή σύμπλοκα¹⁶.

Οι κυριότερες πηγές ρύπανσης της ατμόσφαιρας και των υδάτων με κάδμιο είναι οι εξής:

- Τα μεταλλεία, οι μεταλλουργικές βιομηχανίες καθώς και βιομηχανίες χρωμάτων και παραγωγής πλαστικού και επικαλυπτικών υλικών μέσω των υγρών αποβλήτων τους.
- Τα χυτήρια των σουλφιδίων του χαλκού, μολύβδου, νικελίου και ψευδαργύρου. Στις αέριες εκπομπές των χυτηρίων οι συγκεντρώσεις του καδμίου μπορεί να είναι ιδιαίτερα αυξημένες εξαιτίας της υψηλής πτητικότητας του μετάλλου.
- Αστικά απόβλητα (επεξεργασμένα από βιολογικούς καθαρισμούς και νερά απορροής από απόπλυση δρόμων-αγωγούς ομβρίων).
- Νερά απορροής από ρυπασμένα αγροτικά εδάφη, δεδομένου ότι τα φωσφορούχα λιπάσματα που χρησιμοποιούνται περιέχουν κάδμιο.
- Η καύση και αποτέφρωση οικιακών αποβλήτων καθώς και η σκόνη των πόλεων και των αυτοκινητόδρομων^{16, 17}.

Το κάδμιο δεν είναι απαραίτητο στοιχείο για τους οργανισμούς, αν και έχει βρεθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις από ένα θαλάσσιο μονοκύτταρο φύκος, το *Thalassiosira weissflogii* κάτω από συνθήκες έλλειψης ψευδαργύρου^{14, 15}. Μελέτες σε θαλάσσιους οργανισμούς, έχουν δείξει ότι το κάδμιο μπορεί να συσσωρευτεί σε μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών¹⁸⁻²¹. Στα δίθυρα μαλάκια συσσωρεύεται σε σημαντικό βαθμό ακόμα και όταν οι συγκεντρώσεις στο νερό είναι χαμηλές και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται σε προγράμματα παρακολούθησης της ποιότητας νερού μέσω βιοελέγχων (biomonitoring)²²⁻²⁵. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει κατατάξει το κάδμιο στη λίστα των επικίνδυνων ουσιών που χρήζουν αντιμετώπισης²⁶

και επίσης έχει θεσπίσει όρια για τις συγκεντρώσεις του στο πόσιμο νερό, τα φυσικά ύδατα (επιφανειακά, παράκτια) και σε τρόφιμα στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι βρώσιμοι θαλάσσιοι οργανισμοί (ψάρια και μαλάκια).

Τα πρώτα συμπτώματα της οξείας έκθεσης ενός οργανισμού με κάδμιο εμφανίζονται με στομαχικές διαταραχές όταν η δόση πρόσληψης είναι χαμηλή, ενώ ακολουθούν πόνοι στα κόκκαλα, δημιουργία σαρκωμάτων και τελικά επέρχεται ο θάνατος με έκθεση σε πολύ υψηλή συγκέντρωση. Εργαζόμενοι στην βιομηχανία Cd/Ni εμφανίζουν πρωτεϊνουρία, σύμπτωμα που καταδεικνύει τη μη σωστή λειτουργία του ουροποιητικού συστήματος²⁷.

Σοβαρό συμβάν με επίδραση του καδμίου σε πληθυσμό είναι η ασθένεια itai-itai η οποία εμφανίστηκε στην περιοχή Toyama της Ιαπωνίας²⁸. Η αιτία της αποδόθηκε στην κατανάλωση ρυζιού και ψαριών με αυξημένη περιεκτικότητα σε κάδμιο. Το νερό του ποταμού με το οποίο ποτίζονταν οι ορυζώνες της περιοχής και από το οποίο ψάρευαν οι κάτοικοι ήταν επιβαρυσμένο λόγω της λειτουργίας ορυχείων από τα οποία αρχικά εξορυσσόταν χρυσός, μετά άργυρος και έπειτα Pb, Cu, Zn. Παραπροϊόν, το οποίο ελευθερωνόταν σε μεγάλες ποσότητες στο περιβάλλον ήταν το κάδμιο. Η ασθένεια πρωτοεμφανίστηκε το 1912 και είναι επώδυνη καθώς προκαλεί οστεομαλακία, πολλαπλά κατάγματα και νεφρική δυσλειτουργία^{28, 29}.

1.2.4 Μόλυβδος

Ο μόλυβδος χρησιμοποιήθηκε στη Μεσοποταμία και την Αίγυπτο για την κατασκευή νομισμάτων, αγαλμάτων και αντικειμένων οικιακής χρήσης³⁰. Επίσης χρησιμοποιήθηκε από τους Ρωμαίους για την κατασκευή οικιακών σκευών καθώς και στους αγωγούς ύδρευσης.

Ο μόλυβδος είναι ισχυρά τοξικό μέταλλο όταν εισέρχεται στο ανθρώπινο σώμα. Εισαγωγή στον οργανισμό συγκεντρώσεως μεγαλύτερης του 1 mg/ημέρα προκαλεί μολυβδίαση που συνοδεύεται από εντερικές διαταραχές. Έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου μπορεί να προκαλέσει εγκεφαλοπάθεια, βλάβη στα τύμπανα, διαταραχές συμπεριφοράς, βλάβη στα νεφρά, αναιμία (γιατί παρεμποδίζει τον σχηματισμό της αιμογλοβίνης) και προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα (για επίπεδα μολύβδου στο αίμα 25-40 μg/L), στα παιδιά δε μπορεί να προκαλέσει νοητική υστέρηση³¹. Στην ιατρική βιβλιογραφία έχει αναφερθεί συσχετισμός του μολύβδου με καρδιαγγειακές παθήσεις όπως αρτηριοσκλήρωση και έμφραγμα του μυοκαρδίου. Γενικά θάνατοι από μόλυβδο δεν παρατηρούνται πια. Εξαίρεση αποτελεί η Ταϊβάν όπου η δηλητηρίαση από μόλυβδο αποτελεί την τρίτη πιο συχνά απαντώμενη αιτία θανάτου³². Τέλος έχουν αναφερθεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ μολύβδου και ψευδαργύρου σε τμήματα ενζύμων³³.

Οι ανθρωπογενείς προσθήκες στις θάλασσες πιστεύεται ότι είναι δεκαπλάσιες αυτών που προέρχονται από τη φυσική διάβρωση και φτάνουν στους $390 \cdot 10^3$ τόνους το χρόνο, δηλαδή πάνω από το 1/10 του συνολικά εξορυσσόμενου μολύβδου σε ολόκληρο τον πλανήτη καταλήγει κάθε χρόνο στις θάλασσες³⁴.

Η τοξικότητά του μολύβδου εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του στην τροφή και το νερό και επηρεάζεται από το pH και τη σκληρότητα του νερού, την παρουσία άλλων μετάλλων και τις χημικές μορφές στις οποίες βρίσκεται³⁵.

Οι περισσότερες ανθρωπογενείς εκπομπές του μολύβδου είναι αποτέλεσμα της εξόρυξης και κατεργασίας των μεταλλευμάτων του. Ευρεία χρήση του μολύβδου γίνεται σε ποικίλες

βιομηχανικές δραστηριότητες όπως στην παραγωγή ηλεκτρικών στοιχείων (μπαταριών), στα διυλιστήρια πετρελαίου, στα χυτήρια κ.α. Τα απόβλητα των εργοστασίων και τα αστικά απορρίμματα επίσης συνεισφέρουν στον εμπλουτισμό των θαλασσών με μόλυβδο. Η χρήση του μολύβδου αυξήθηκε γύρω στο 1940, εξαιτίας της χρήσης των αλκυλιωμένων παραγώγων του σαν αντικροτικά πρόσθετα στη βενζίνη των αυτοκινήτων, με αποτέλεσμα την απότομη αύξηση της συγκέντρωσής του στην ατμόσφαιρα³⁰. Η εκπομπή του από τα καυσαέρια των οχημάτων, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ρύπανσης της ατμόσφαιρας, μειώθηκε σημαντικά τα τελευταία χρόνια με τη χρήση της αμόλυβδης βενζίνης. Στις ΗΠΑ η μείωση ήταν της τάξης του 80% τη δεκαετία 1975-1985³⁶.

Οι φυσικές εκπομπές του μολύβδου στην ατμόσφαιρα από ηφαίστεια, πυρκαγιές δασών, σκόνη εδάφους, σταγονίδια κυμάτων θαλάσσης κ.λπ. είναι αρκετά μικρότερες σε μέγεθος από τις ανθρωπογενείς³⁷.

Η ατμοσφαιρική οδός είναι η σημαντικότερη στον κύκλο μεταφοράς του μολύβδου. Σε παγκόσμια κλίμακα, δηλαδή για το σύνολο των θαλάσσιων υδάτων, το 98% του μολύβδου που τελικά διαλύεται σε αυτά εισέρχεται από την ατμόσφαιρα³⁷. Οι ατμοσφαιρικές κατακρημνίσεις αυξάνουν τη συγκέντρωση του μολύβδου στις παραλιακές περιοχές κυρίως το χειμώνα (υγρές κατακρημνίσεις), ενώ στην ανοιχτή θάλασσα κυρίως το καλοκαίρι (ξηρές κατακρημνίσεις)³⁸.

Μελέτες έχουν δείξει ότι πολύ σημαντικές αυξήσεις σημειώνονται στο επιφανειακό στρώμα ιζημάτων (5-15cm) ιδιαίτερα κοντά σε βιομηχανικές περιοχές^{30,39}. Παρά τις σημαντικές μειώσεις των επιπέδων μολύβδου λόγω του περιορισμού της χρήσης του στα καύσιμα, συνεχίζει να είναι ένας από τους κύριους ρύπους για τα οικοσυστήματα⁴⁰.

1.2.5 Νικέλιο

Είναι το έβδομο πιο άφθονο στοιχείο στη Γη (αποτελεί 10% του πυρήνα). Είναι σιδηρόφιλο και λιγότερο άφθονο στο φλοιό. Απαντάται σε οξειδία και θειούχα ορυκτά⁴¹. Η αποσάθρωση των θειούχων ορυκτών ελευθερώνει Ni^{+2} που έχει παρόμοιο μέγεθος με το Mg^{+2} και το αντικαθιστά σε πυριτικά ορυκτά. Βρίσκεται επίσης σε σιδηρούχα και μη σιδηρούχα κράματα και χρησιμοποιείται για επιμεταλλώσεις. Οι φυσικές περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις είναι γενικά χαμηλές αλλά μεγάλες περιεκτικότητες υπάρχουν σε εδάφη γύρω από περιοχές εξορύξεων και επεξεργασίας ορυκτών⁴²⁻⁴⁵.

Είναι απαραίτητο στοιχείο για τα βιολογικά συστήματα, αλλά στα θηλαστικά συμμετέχει μόνο σε ένα ένζυμο, την ουρεάση η οποία καταλύει την αποσύνθεση της ουρίας σε αμμωνία⁴⁶. Το νικέλιο είναι πιο σημαντικό στα βακτήρια τα οποία διαθέτουν ένζυμα που περιέχουν νικέλιο, όπως η ουρεάση, η υδρογενάση, η υπεροξειδική δισμουτάση του Ni, η cis-trans ισομεράση και άλλα. Το συνένζυμο F-430 περιέχει Ni σε δακτύλιο παρόμοιο με αυτό του Fe στην αίμη και καταλύει την αντίδραση σχηματισμού μεθανίου από υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Συχνά υψηλές περιεκτικότητες Ni μπορεί να βρεθούν στο πετρέλαιο και θεωρείται η ότι προέλευσή τους είναι το συνένζυμο F-430 από τα μεθανογενή βακτήρια⁴⁷⁻⁴⁹.

Επειδή είναι πολύ διαδεδομένο στοιχείο στη φύση και βρίσκεται σε αφθονία σε διάφορα είδη διατροφής, δεν παρατηρείται ποτέ έλλειψή του στους ανώτερους οργανισμούς. Από τα παραπάνω προκύπτει μια αβεβαιότητα για το αν τελικά το νικέλιο είναι απαραίτητο στους οργανισμούς ή όχι. Έχει βρεθεί βέβαια από εργαστηριακά πειράματα ότι έλλειψη νικελίου από την διατροφή των

ποντικών μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες στους ιστούς τους, τόσο στα ίδια, όσο και στους απογόνους τους (περιγεννητικές ανωμαλίες, μειωμένη ανάπτυξη, αναιμία)⁵⁰. Αυξημένη πρόσληψη νικελίου έχει βρεθεί πως οδηγεί σε τερατογενέσεις και καρκινογενέσεις και σε μείωση μαγνησίου και ψευδαργύρου στους ιστούς (από πειράματα σε γουρούνια⁵¹) αλλά και σε μείωση των επιπέδων του σιδήρου⁵².

Το Ni είναι αρκετά τοξικό, η έκθεση σε σκόνες με Ni έχει αναγνωριστεί ως πιθανή αιτία καρκίνου του πνεύμονα⁵³. Επίσης μπορεί να προκαλέσει δερματίτιδα (χρήση σε κοσμήματα) και κάποιοι άνθρωποι είναι περισσότερο ευαίσθητοι από άλλους ή γίνονται πιο ευαίσθητοι μετά από παρατεταμένη επαφή με Ni⁵³. Το νικέλιο έχει βρεθεί ότι παράγει ελεύθερες ρίζες στα κύτταρα των οργανισμών⁵⁴. Στα κύτταρα έχουν βρεθεί αρκετές πρωτεΐνες με μεγάλη χημική συγγένεια προς το νικέλιο. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την μεταφορά, αποτοξίνωση και αποβολή του νικελίου⁵⁵. Είναι βέβαια πολύ ενδιαφέρον ότι οι μεταλλοθειονίνες, το κατεξοχήν κέντρο πρόσδεσης βαρέων μετάλλων στα κύτταρα δεν αποτελούν κύριο φορέα πρόσδεσης του νικελίου στους ιστούς των οργανισμών⁵⁰.

1.2.6 Ψευδάργυρος

Ο ψευδάργυρος είναι από τα αρκετά μελετημένα μέταλλα στη φύση γιατί μετέχει σε ενζυμικές αντιδράσεις, έχει την τάση να συσσωρεύεται στους ιστούς διαφόρων οργανισμών και το ραδιενεργό του ισότοπο Zn-65 θεωρείται ρύπος. Το μέταλλο αυτό έχει μεγάλη τάση σχηματισμού συμπλόκων (π.χ. με χλωριόντα, θειούχα και φωσφορικά). Επίσης αξιοσημείωτο είναι ότι συσσωρεύεται σε ορισμένα θαλάσσια ορυκτά, όπως οι κόνδυλοι μαγγανίου-σιδήρου και οι φωσφορίτες και βιοσυσσωρεύεται σε πολλούς θαλάσσιους οργανισμούς⁵⁶⁻⁵⁸. Μερικοί συγγραφείς υποστηρίζουν ότι ο ρυθμός βιομεγέθυνσης στα ανώτερα στάδια της τροφικής αλυσίδας είναι πολύ μικρός ή και αρνητικός^{30, 39}.

Οι σημαντικότερες πηγές ρύπανσης από ψευδάργυρο είναι διάφορες ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως χημικές βιομηχανίες, οι βιομηχανίες μετάλλων, αυτοκινήτων και άλλων μηχανών, βαφεία, τυπογραφεία, ηλεκτροαποθέσεις και ηλεκτρολύσεις κάθε μορφής. Υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται επίσης σε ναυπηγεία καθώς και σε χώρους καθαρισμού και ελλιμενισμού πλοίων⁵⁹.

Γενικά οι συγκεντρώσεις στις ανοιχτές θάλασσες δε δείχνουν μια συστηματική αύξηση του επιπέδου του ψευδαργύρου. Σε κλειστές λεκάνες όμως και κόλπους έχει παρατηρηθεί αύξηση του επιπέδου τόσο στο υδάτινο περιβάλλον (σε διαλυτή και σωματιδιακή μορφή) όσο και σε ιζήματα και στους ιστούς διαφόρων, βενθικών κυρίως, οργανισμών⁵⁶⁻⁵⁸.

1.2.7 Σίδηρος

Ο σίδηρος απαντάται στη ζώσα ύλη στην αιμοσφαιρίνη και σε διάφορα ένζυμα. Η συγκέντρωση του σιδήρου ποικίλλει ευρύτατα από ~1mg/L ως 50 mg/L περίπου. Ο σίδηρος μπορεί να αποτελεί κρίσιμο παράγοντα ανάπτυξης του φυτοπλαγκτού και βρίσκεται πολλές φορές συγκεντρωμένος μέσα σε αυτό. Τα ορυκτά του είναι ευρύτατα διαδεδομένα στο έδαφος. Το πιο διαδεδομένο είναι ο πυρίτης FeS₂ ενώ πολλά ορυκτά είναι οξειδία και υδροξειδία σιδήρου. Είναι το αφθονότερο στοιχείο σαν σύνολο στη γη. Αποτελεί το 30% της ολικής μάζας και κατέχει πάνω από το 80% του πυρήνα της γης³⁰.

Η διάβρωση των διάφορων ορυκτών είναι η κυριότερη πηγή σιδήρου στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η κατανομή του σιδήρου δεν είναι ομοιόμορφη, αλλά παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση στα παραλιακά ύδατα, η οποία αυξομειώνεται εποχιακά ανάλογα με τις ατμοσφαιρικές κατακρημνίσεις^{60,61}.

Η μορφή του σιδήρου η οποία επικρατεί στο θαλασσινό νερό είναι αυτή των λεπτών κολλοειδών αιωρημάτων του τύπου $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ή άλλων υδροξυ-συμπλόκων. Μια ποσότητα πάντως της τάξης του 10^{-6} M βρίσκεται σε καθαρά διαλυτές μορφές, όπως: $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, αλλά και μορφές φωσφορικών, χουμικών και λοιπών οργανικών συμπλόκων του σιδήρου, οι οποίες θεωρείται ότι έχουν σημαντικό βιολογικό και γεωλογικό ρόλο^{30,62,63}.

Όσο αφορά τα ιζήματα των θαλασσών, ο σίδηρος απαντάται με τη μορφή ένυδρων οξειδίων σε λεπτές επιστρώσεις πάνω σε αργίλους ή άλλα σωματίδια, όπως επίσης και σε ενώσεις με φωσφορικά και θειούχα^{64,65}.

1.2.8 Νομοθετικά όρια και επίπεδα τοξικότητας για τα εξεταζόμενα μέταλλα

Πίνακας 1: Νομοθετικά όρια για το κάδμιο, το μόλυβδο και το νικέλιο

	Cd (μg/L)	Pb (μg/L)	Ni (μg/L)	Αναφορά
Πόσιμο νερό	5	10	20	65
Θαλασσινό νερό	40 (δείκτης CMC)	210 (δείκτης CMC)	74 (δείκτης CMC)	67
Θαλασσινό νερό	8,8 (δείκτης CCC)	8,1 (δείκτης CCC)	8,2 (δείκτης CCC)	67
Θαλασσινό νερό και Οργανισμός	5	Δεν αναφέρεται	610	67
Τρόφιμο	1 (mg/kg w.w.)	1,5 (mg/kg w.w.)	Δεν αναφέρεται	68
Προστασία της θαλάσσιας ζωής			8,0	69
Προστασία της θαλάσσιας ζωής			30	70

Πίνακας 2: Τιμές LC50 από δοκιμασίες οξείας τοξικότητας με κάδμιο σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς

Υδρόβιος Οργανισμός	Χρόνος Έκθεσης	Μέταλλο	LC ₅₀	Αναφορά
<i>M. phillipinarum</i>	48 h	Cd	0,566 mg/ L	71
<i>M. phillipinarum</i>	96h	Cd	0,221 mg/ L	71
<i>T. fuscatus</i>	48 h	Cd	136,71 mg/ L	72
<i>T. fuscatus</i>	96h	Cd	28,25 mg/ L	72
<i>C. africanus</i>	48 h	Cd	36,51 mg/ L	72
<i>C. africanus</i>	96h	Cd	13,423 mg/ L	72
<i>S. huzardi</i>	48 h	Cd	275,57 mg/ L	72
<i>S. huzardi</i>	96h	Cd	122,998 mg/ L	72
<i>P. viridis</i>	24h	Cd	1,53 mg/L	18
<i>L. consobrinus</i>	48h	Cd	1,863 mg/L	73
<i>D. trunculus</i>	96h	Cd	2,59 mg/L	74
<i>C. gigas</i>	48h	Cd	424 μg/L	75

Πίνακας 3: Τιμές LC50 από δοκιμασίες οξείας τοξικότητας με μόλυβδο σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς

Υδρόβιος Οργανισμός	Χρόνος Έκθεσης	Μέταλλο	LC ₅₀	Αναφορά
<i>M. philipinarum</i>	48 h	Pb	11,071 mg/ L	71
<i>M. philipinarum</i>	96h	Pb	2,876 mg/ L	71
<i>T. fuscatus</i>	48 h	Pb	922,58 mg/ L	72
<i>T. fuscatus</i>	96h	Pb	609,779 mg/ L	72
<i>C. africanus</i>	48 h	Pb	292,11 mg/ L	72
<i>C. africanus</i>	96h	Pb	370,76 mg/ L	72
<i>S. huzardi</i>	48 h	Pb	2371,56 mg/ L	72
<i>S. huzardi</i>	96h	Pb	2320,13 mg/ L	72
<i>P. viridis</i>	24h	Pb	4,12 mg/L	18
<i>P. viridis</i>	168h	Pb	4,46 mg/L	76
<i>M. galloprovincialis</i> (4.0-5.9 cm)	96h	Pb	43 mg/L	77

Πίνακας 4: Τιμές LC50 από δοκιμασίες οξείας τοξικότητας με νικέλιο σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς

Υδρόβιος Οργανισμός	Χρόνος Έκθεσης	Μέταλλο	LC ₅₀	Αναφορά
<i>C. virginica</i>	48 h	Ni	1180 µg/ L	78
<i>C. magister (larvae)</i>	96h	Ni	2,15-6,60 mg/ L	79
<i>C. labrosus</i>	96 h	Ni	108,3 mg/ L	80
<i>M. arenaria</i>	96 h	Ni	320 mg/ L	81
<i>A. forbesi</i>	96 h	Ni	150 mg/ L	81

1.3 Βιοχημεία της τοξικής δράσης των βαρέων μετάλλων

1.3.1 Γενικά στοιχεία τοξικότητας μετάλλων

Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων προκύπτει όταν η συγκέντρωσή τους στα κύτταρα φτάνει σε ένα κρίσιμο επίπεδο όπου τα μέταλλα αυτά μπορούν να προσδεθούν μη εκλεκτικά σε μόρια-στόχους (όπως οι σουλφυδρυλομάδες των πρωτεϊνών) ή να υποκαταστήσουν άλλα μέταλλα απαραίτητα σε μεταλλοένζυμα ή μεταλλοπρωτεΐνες⁸². Τα όρια τοξικότητας των βαρέων μετάλλων ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των θαλάσσιων οργανισμών με κάποιους να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι, ενώ άλλους να έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ανοχής⁸³. Τοξικές επιπτώσεις λόγω των βαρέων μετάλλων έχουν παρατηρηθεί έπειτα από πειράματα τόσο χρόνιας, όσο και οξείας τοξικότητας σε διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς (για βιβλιογραφία βλ. αναφορές σε Πίνακες 2, 3 και 4) καθώς και από οικολογικές παρατηρήσεις σε επιβαρυμένα οικοσυστήματα όπου εμφανίζεται σοβαρή μείωση ή εξαφάνιση των μη ανθεκτικών ειδών κάτι το οποίο έχει αντίκτυπο στα τροφικά πλέγματα και την οικολογική σταθερότητα⁸⁴.

Σύμφωνα με τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες μπορούν να διακριθούν τρεις διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί τοξικότητας των βαρέων μετάλλων⁸⁵:

α) κάποια από τα μέταλλα (πχ. σίδηρος, χρώμιο, μόλυβδος και κάδμιο) συμμετέχουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών (δραστικών μορφών οξυγόνου –ROS και αζώτου RNS) στα κύτταρα. Φυσιολογικά υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην ποσότητα των ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται και στους μηχανισμούς εξουδετέρωσής τους από τα κύτταρα. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών με ρυθμούς μεγαλύτερους από τους ρυθμούς δραστηριοποίησης αντιοξειδωτικών μηχανισμών προκαλεί ανισορροπία η οποία ονομάζεται οξειδωτικό stress. Οι ROS αντιδρούν με σημαντικά κυτταρικά συστατικά (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA), με αποτέλεσμα η συνεχής και σωρευτική οξειδωτική δράση τους να οδηγεί σε μεταβολή κυτταρικών λειτουργιών, παθολογικές καταστάσεις, κυτταρική καταστροφή και θάνατο⁸⁶⁻⁸⁸.

β) η συμπλοκοποίηση λειτουργικών ομάδων σε βιομόρια, μέσω σχηματισμού χηλικών ενώσεων των μεταλλοϊόντων με τις ενεργές ομάδες των ενζύμων, αναστέλλοντας τη δράση τους. Η αντίδραση αυτή έχει κυρίως αναφερθεί για μη οξειδοαναγωγικά ενεργά βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο, ο μόλυβδος και ο υδράργυρος. Μπορούν επίσης να αντιδράσουν με τις μεμβράνες των κυττάρων παρεμποδίζοντας ή διακόπτοντας την αντλία Na^+/K^+ .

γ) αντικατάσταση των απαραίτητων μεταλλικών ιόντων σε βιομόρια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα των αλλαγή της δομής του μορίου (π.χ. πρωτεΐνης) με αποτέλεσμα να αλλάξει η δραστηριότητά του. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η αντικατάσταση του ψευδαργύρου που φυσιολογικά είναι προσδεμένος στην καρβονική ανυδράση (carbonic anhydrase) από άλλα μέταλλα, όπως το κοβάλτιο, το νικέλιο, το κάδμιο ή το μαγγάνιο που οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας κατά 44, 95, 96, και 96% αντίστοιχα⁸⁹.

Οι οργανισμοί διαθέτουν ομοιοστατικούς μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να ανέχονται μικρές διακυμάνσεις στην έκθεση σε μη απαραίτητα μέταλλα. Αλλά η μακροχρόνια έκθεση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία των μηχανισμών να ανταπεξέλθουν και τελικά την εμφάνιση τοξικότητας, που μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατο⁹⁰.

Το κάδμιο, σε κυτταρικό επίπεδο, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις διαταράσσει τις φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες μέσω της επαγωγής οξειδωτικού στρες⁹¹⁻⁹³. Αυτό συμβαίνει γενικά μέσω τριών μονοπατιών που περιλαμβάνουν διαταραχές στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, πρόκληση βλαβών στα αντιοξειδωτικά ένζυμα και επαγωγή της δράσης οξειδασών, όπως η οξειδάση του NADPH⁹⁴.

Το οξειδωτικό stress που προκαλείται από το νικέλιο προέρχεται είτε ως συνέπεια της δημιουργίας ελευθέρων ριζών μέσω του κύκλου Haber-Weiss ή των αντιδράσεων Fenton που περιλαμβάνουν το οξειδοαναγωγικό ζεύγος $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ ^{95,96}, είτε λόγω της έλλειψης των ουσιών που δρουν ως δευστευτές ελευθέρων ριζών, όπως είναι το GSH⁹⁷ μέσω της δημιουργίας συμπλόκων Ni-GSH. Μία τρίτη πιθανή αιτία πρόκλησης οξειδωτικού στρες λόγω του νικελίου είναι η αναστολή της αντιοξειδωτικής απόκρισης του οργανισμού, η οποία περιλαμβάνει μείωση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η καταλάση, η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)^{98,99}.

1.3.2 Ελεύθερες ρίζες και μηχανισμοί παραγωγής τους

Κάθε μόριο, το οποίο φέρει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική ηλεκτρονική στιβάδα του, μπορεί να θεωρηθεί ως ελεύθερη ρίζα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού του κυττάρου καθώς εμφανίζονται σε κάθε βιοχημική διαδικασία¹⁰⁰. Οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο αναφέρονται ως δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive

Oxygen Species-ROS), ενώ εκείνες που περιέχουν άζωτο είναι οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species-RNS). Το οξυγόνο αποτελεί το κύριο μόριο παραγωγής ROS¹⁰¹⁻¹⁰⁵.

Στις ROS ανήκουν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, καθώς και όλα τα παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ελεύθερες ρίζες, αλλά προκύπτουν δευτερογενώς κατά τις διάφορες χημικές αντιδράσεις με στοιχεία του κυτταρικού περιβάλλοντος. Οι υδροξυλικές ρίζες μάλιστα, είναι τα πιο δραστικά οξειδωτικά παράγωγα^{101, 102}. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να δημιουργηθούν στα κύτταρα είτε κατά την διάσπαση ομοιοπολικού δεσμού, είτε κατά την προσθήκη ηλεκτρονίων σε κάποιο μόριο, είτε κατά την απομάκρυνση του υδρογόνου από άλλες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παράγονται λοιπόν ως υποπροϊόντα, κατά την διάρκεια παραγωγής ενέργειας με την χρησιμοποίηση οξυγόνου.

Οι μεταβολικές διαδικασίες μέσω των οποίων μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες είναι:

- 1) η φυσιολογική αερόβια αναπνευστική διαδικασία που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, τα οποία αποτελούν για το κύτταρο, το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας. Στα κυτταρικά αυτά οργανίδια λαμβάνει χώρα η οξείδωση των τροφών (η μετατροπή δηλαδή της τροφής σε ενέργεια).
- 2) η φαγοκυττάρωση, κατά την οποία παράγονται ρίζες οξυγόνου και H₂O₂, συμμετέχοντας στην καταπολέμηση βακτηρίων και ιών,
- 3) η διάσπαση λιπαρών οξέων στα υπεροξειδοσωμάτια και η διάσπαση μεμβρανικών δομών, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής μεμβράνης,
- 4) η δράση του κυτοχρώματος P450 και
- 5) η ενεργοποίηση της οξειδάσης NAD(P)H^{101,106-110}.

Πίνακας 5: Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου

	Χημικός τύπος	Ονομασία
Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)	·OH	Ρίζα υδροξυλίου
	O ₂ ⁻	Ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος
	RO·	Ρίζα αλκοξυλίου
	ROO·	Ρίζα υπεροξυλίου
	HOO·	Ρίζα υδροϋπεροξειδίου
	H ₂ O ₂	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
Δραστικές μορφές αζώτου (RNS)	NO·	Ρίζα μονοξειδίου του αζώτου
	NO ₂ ·	Ρίζα διοξειδίου του αζώτου
	ONOO ⁻	Υπεροξυνιτρώδες ανιόν

Έχει δείχθει ότι η παρουσία των ROS είναι απαραίτητη για διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα κύτταρα χρησιμεύουν για την μεταγωγή σημάτων, την κυτταρική διαφοροποίηση, τη μεταγραφή γονιδίων, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς και την απόπτωση των γηρασμένων κυττάρων^{107, 111-113}. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η απόλυτη στέρηση των ενδογενών ROS (είτε με αύξηση των αναγωγικών παραγόντων ή με μείωση των οξειδωτικών) αναστέλλει τη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων σε διάφορες κυτταρικές σειρές¹¹⁴. Ακόμη, η ευεργετική τους δράση σχετίζεται και με την προστασία έναντι των παθογόνων

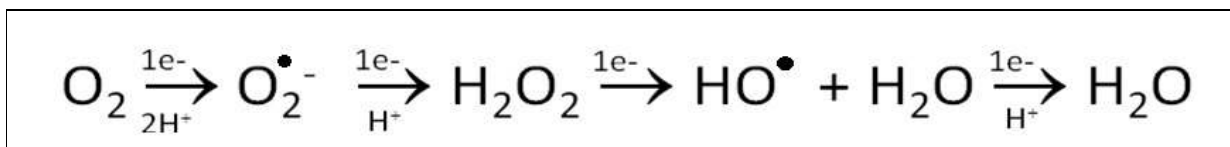
μικροοργανισμών. Σε περιπτώσεις προσβολής από βακτήρια, η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, επάγει την παραγωγή ROS σε ποσότητες ικανές να σκοτώσουν τα βακτήρια¹¹⁵.

Σε υψηλές συγκεντρώσεις και λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου που διαθέτουν, αποσπούν ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια, δημιουργώντας νέες ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα να ξεκινούν μια καταστρεπτικά ενεργή αλυσίδα προκαλώντας βλάβη σε κυτταρικές δομές μεγάλης σημασίας (πρωτεΐνες, κυτταρική μεμβράνη, DNA), γι' αυτό και θεωρούνται πολύ ενεργά μόρια που δρουν ως ισχυρά οξειδωτικά και μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων^{100, 117, 118}.

Οι παράγοντες που ευθύνονται για την παραγωγή ROS μπορούν να διαχωριστούν σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, χημικές ενώσεις, το οξειδωτικό στρες, και σε εσωτερικούς παράγοντες, στους οποίους συγκαταλέγονται αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες και κυτοκίνες¹¹⁹⁻¹²¹.

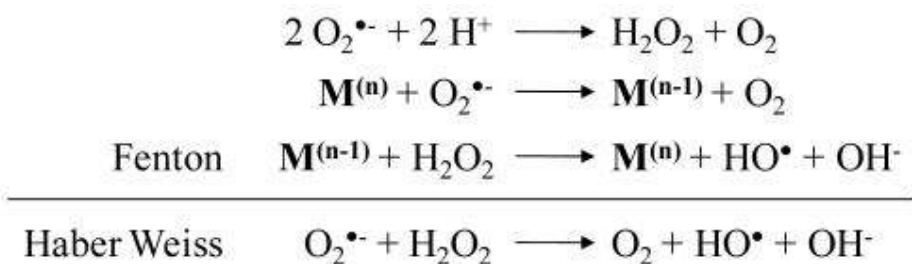
Επειδή είναι δύσκολο να μετρηθεί η ενεργότητα των ελευθέρων ριζών σε κύτταρα οργανισμών, προσδιορίζεται η επίδρασή τους σε ουσίες που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο. Τέτοιες ουσίες είναι οι πρωτεΐνες, το DNA, αλλά κυρίως τα λιπίδια^{101, 102}.

Η παραγωγή των ROS συμβαίνει με τη σταδιακή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1: Στάδια παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Μελέτες πρότειναν την πιθανότητα ότι οι ρίζες υπεροξειδίου ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους για να παραχθεί η πιο δραστική ρίζα υδροξυλίου (OH). Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, άμεση αλληλεπίδραση αυτών των δύο ριζών δεν είναι πιθανή. Ωστόσο, υπό την παρουσία ορισμένων μετάλλων, ιδιαίτερα ιόντων σιδήρου ή χαλκού, τα οποία δρουν ως προ-οξειδωτικά, λαμβάνει χώρα μία αλληλουχία αντιδράσεων (Fenton, Haber-Weiss), η οποία απεικονίζεται στο Σχήμα 2 και έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ρίζας υδροξυλίου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να παράγει την ρίζα υδροξυλίου με απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου του μετάλλου (αυτή η αντίδραση μπορεί να δημιουργήσει και άλλα προϊόντα, αλλά η ρίζα υδροξυλίου φαίνεται να είναι το κύριο¹²²). Τα αρχικά μεταλλικά ιόντα αναγεννώνται, έτσι ώστε να ξαναγίνουν διαθέσιμα για να αντιδράσουν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Από την αντίδραση των ελευθέρων ριζών με άλλα μόρια προκύπτουν νέες ελεύθερες ρίζες (διάδοση). Έτσι, με αυτό τον τρόπο οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών τείνουν να είναι αλυσιδωτές, παράγοντας συνεχώς νέες ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Αυτός ο συνδυασμός των δύο χημικών αντιδράσεων φαίνεται να αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής ριζών υδροξυλίου σε βιολογικά συστήματα και εξηγεί, τουλάχιστον εν μέρει, γιατί τα μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός προάγουν το οξειδωτικό stress.



Σχήμα 2: Αντιδράσεις Fenton και Haber Weiss. $\text{M}^{(n)}$: οξειδωμένο μέταλλο, $\text{M}^{(n-1)}$: ανηγμένο μέταλλο, $\text{O}_2^{\bullet-}$: υπεροξειδικό ανιόν, H_2O_2 : υπεροξειδίο του υδρογόνου, HO^\bullet : υδροξυλική ρίζα, OH^- : ιόν υδροξυλίου¹²³.

Οξειδοαναγωγικά ενεργά μέταλλα, όπως ο σίδηρος, ο χαλκός και το χρώμιο, υφίστανται οξειδοαναγωγή (και συμμετέχουν σε αντιδράσεις τύπου Fenton και Haber-Weiss^{124, 125} ενώ οξειδοαναγωγικά ανενεργά μέταλλα, όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο, ο υδράργυρος και άλλα προκαλούν την παραγωγή ROS έμμεσα. Συγκεκριμένα, τα μη οξειδοαναγωγικά μέταλλα ενισχύουν την προ-οξειδωτική κατάσταση (pro-oxidant status) καθώς δρουν αναστέλλοντας ή καταστρέφοντας τη λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών¹²⁶ ή αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων των κυττάρων, ιδιαίτερα εκείνων που περιέχουν σουλφυδρυλομάδες¹²⁷, όπως το ανηγμένο γλουταθειό το οποία είναι ο κύριος στόχος των ελευθέρων ιόντων Cd^{2+128} . Επίσης μπορούν να αντικαταστήσουν οξειδοαναγωγικώς ενεργά ιόντα (π.χ. Fe^{2+} και Cu^{2+}) σε πρωτεΐνες ή άλλα μόρια, αυξάνοντας την ενδοκυτταρική συγκέντρωση αυτών. Έτσι, αυτά είναι ελεύθερα να παράγουν ROS μέσω της αντίδρασης Fenton. Και στις δυο περιπτώσεις, τα μέταλλα επάγουν την αύξηση παραγωγής των ROS, (HO) και σουπεροξειδίο (O_2^-)¹²⁷. Το υπεροξειδικό ανιόν μπορεί να αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως NO προς σχηματισμό δραστικών μορφών αζώτου (Nitrogen Reactive Species) ή με τη δράση της σουπεροξειδικής δισμουτάσης να σχηματίσει H_2O_2 .

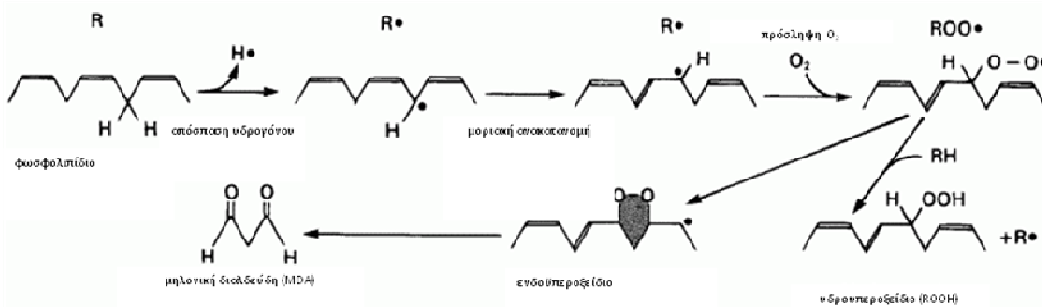
1.3.3 Λιπιδική και πρωτεϊνική υπεροξειδωση

Οι βιολογικές μεμβράνες αποτελούνται από λιπίδια και πρωτεΐνες, των οποίων η σύσταση και η περιεκτικότητα παρουσιάζουν μεταβολές, ανάλογα με το είδος και τη λειτουργία κάθε μεμβράνης και ανάλογα με την ένταση και την ποσότητα των λειτουργιών του οργανισμού¹²⁹. Στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς αφθονούν στις κυτταρικές μεμβράνες τους τα γλυκεροφωσfolιπίδια, τα οποία αποτελούνται από εστέρες της γλυκερόλης με φωσφορικό οξύ και λιπαρά οξέα (πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, PUFAs). Ως PUFAs θεωρούνται τα λιπαρά οξέα που περιέχουν δύο ή περισσότερους μη συζευγμένους διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα (της μορφής $-\text{CH}=\text{CH}-$). Ειδικότερα στα βιολογικά συστήματα τα PUFAs φέρουν τους διπλούς δεσμούς κάθε τρίτο μόριο άνθρακα ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$)¹³⁰. Ο δεσμός C-H είναι πολύ ευπρόσβλητος από οξειδωτικά αντιδραστήρια λόγω της ύπαρξης του διπλού δεσμού δίπλα του¹³¹.

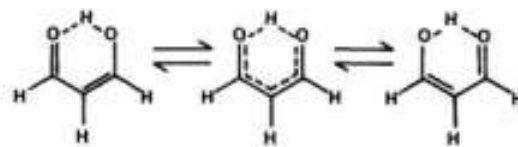
Όταν τα λιπίδια οξειδώνονται στα κύτταρα κατά την αναπνευστική διαδικασία στα μιτοχόνδρια παράγεται ενέργεια και το οξυγόνο ανάγεται σε νερό¹³². Η διαδικασία οξειδωσης των λιπιδίων χωρίς την παραγωγή ενέργειας ονομάζεται λιπιδική υπεροξειδωση¹³³. Λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να προκληθεί από κάθε ένωση που διαθέτει ικανοποιητική ενέργεια για την αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από τα PUFAs.

Η αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης ξεκινά με την προσβολή των -C-H- ομάδων των λιπιδίων από τις ελεύθερες ρίζες, δημιουργώντας μία υδροϋπεροξειδική ρίζα (LOOH)¹³⁴ (Σχήμα 3). Αν αυτά τα υδροϋπεροξειδία δεν καταφέρουν να απομακρυνθούν από τα κύτταρα, μπορούν να συμμετάσχουν σε περαιτέρω αντιδράσεις οι οποίες εντείνουν την τοξικότητά τους. Η υδροϋπεροξειδική ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από το διπλό δεσμό του ακόρεστου λιπιδικού μορίου, σχηματίζοντας υπεροξειδικές (LOO·) και αλκοξυλικές (LO·) ρίζες¹³⁵. Τα προϊόντα αυτά αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας επιπλέον υδροϋπεροξειδικές λιπιδικές ρίζες ικανές να συνεχίσουν την οξείδωση η οποία τελικά μπορεί να διακόψει τον φυσιολογικό κυτταρικό μεταβολισμό και/ή προκαλώντας ακόμα και τον κυτταρικό θάνατο. Δευτερογενή προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι κετόνες, εποξειδία και αλδεΐδες¹³⁶ και μία από τις πιο σημαντικές είναι η μηλονική διαλδεΐδη ή MDA, η οποία είναι και ο πιο δημοφιλής βιομάρτυρας προσδιορισμού οξειδωτικής βλάβης σε κύτταρα και ιστούς.

Η μηλονική διαλδεΐδη, C₃H₄O₂, είναι μια χαμηλού μοριακού βάρους 1,3-δικαρβονυλική ένωση, η οποία αποτελείται από τρεις άνθρακες και είναι ένα μέτρια ασθενές οξύ (pK_a=4,46) (). Η MDA βρίσκεται σε ενολική μορφή και εναλλάσσεται ταχέως ανάμεσα σε δύο ενδομοριακές ασυμμετρικές μορφές μέσω μιας συμμετρικής μεσομερικής δομής. Μπορεί να δράσει είτε σαν ηλεκτρονιόφιλο είτε σαν πυρηνόφιλο μόριο και αυτό την καθιστά ιδιαίτερα τοξική για τα κύτταρα¹³⁷.



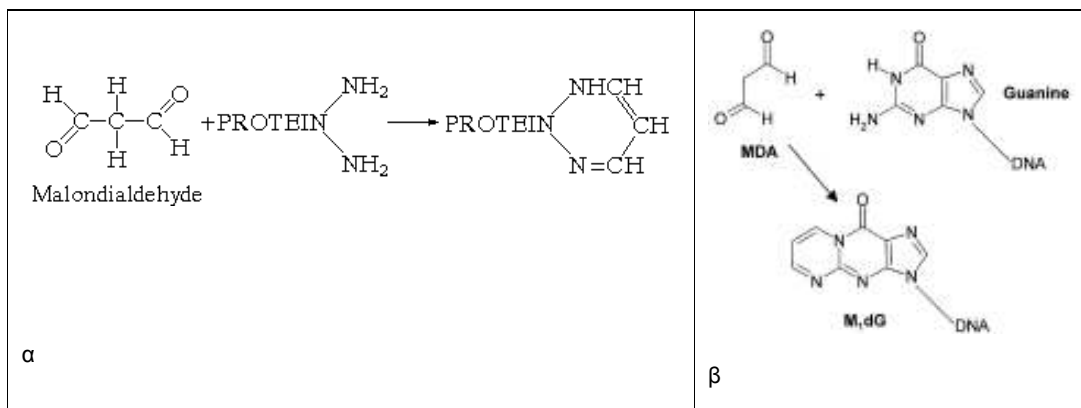
Σχήμα 3: Οξείδωση λιπιδίου (το πολυακόρεστο λιπαρό οξύ οξειδώνεται και παράγεται υδροϋπεροξειδίο ή μηλονική διαλδεΐδη)



Σχήμα 4: Ενολική μορφή MDA (η MDA εναλλάσσεται ταχέως ανάμεσα σε δύο ενδομοριακές ασυμμετρικές μορφές μέσω μιας συμμετρικής μεσομερικής δομής)

Η MDA στα κύτταρα μπορεί να σχηματιστεί και από την χημική αποικοδόμηση άλλων βιολογικών μορίων εκτός από λιπίδια, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και υδαάνθρακες. Παρόλα αυτά ο σχηματισμός της από μη λιπιδικά μακρομόρια συμπεραίνεται έμμεσα και δεν έχει καταδειχτεί άμεσα¹³⁷.

Η MDA έχει τοξική και μεταλλαξιγόνο/ καρκινογόνο δράση γιατί μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω με: α) πρωτεΐνες και β) βάσεις των νουκλεϊκών οξέων και να τις καταστρέψει σχηματίζοντας in vivo σταθερά παράγωγα όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις (Σχήμα 5)^{131,138}.



Σχήμα 5: α) Αντίδραση MDA με πρωτεΐνη, β) Αντίδραση MDA με βάση νουκλεϊκού οξέος^{131,138}

Μετρώντας τη συγκέντρωση της MDA στα κύτταρα προσδιορίζεται το τελικό προϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης (MDA) και η οξειδωτική βλάβη που έχουν ήδη υποστεί τα κύτταρα από βαρέα μέταλλα και άλλες ξеноβιοτικές ουσίες. Ταυτόχρονα γίνεται εκτίμηση και του κινδύνου από την τοξικότητα της ίδιας της MDA^{86, 139}.

Η μεγάλη αφθονία των πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυτάρου τις καθιστά ιδιαίτερα σημαντικούς στόχους των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Αντιδρούν κυρίως με υδροξυλικές ρίζες και μπορούν να υποστούν υπεροξειδωση, αλλαγές στην τεταρτοταγή δομή τους, καταστροφή αμινοξέων. Οι πρωτεΐνες χάνουν την δραστηριότητά τους, οι κυτταρικές λειτουργίες αλλοιώνονται καθώς αλλάζει το δυναμικό λειτουργίας των μεμβρανών και η παραγωγή ενέργειας. Παράγωγα της πρωτεϊνικής οξειδωσης είναι αλδεΐδες, κετόνες και καρβονύλια¹³⁸.

1.3.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Για την προστασία τους από τις ελεύθερες ρίζες τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μια σειρά μηχανισμών, οι οποίοι υπό κανονικές συνθήκες μπορούν να τους εξασφαλίσουν την προστασία που χρειάζονται ώστε να μην υπόκεινται σε βλάβες. Το αντιοξειδωτικό σύστημα των κυττάρων αποτελείται από μια σειρά ουσιών μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες καθώς και από μια σειρά αντιοξειδωτικών ενζύμων¹⁴⁰. Οι μηχανισμοί προστασίας περιλαμβάνουν προληπτικούς μηχανισμούς, μηχανισμούς επιδιόρθωσης, φυσικά μέτρα προστασίας και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξειδωση αυτών των υποστρωμάτων. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως προκύπτει από τον ορισμό, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.

Η αδυναμία των κυττάρων να παράξουν αντιοξειδωτικές ουσίες ώστε να ανταπεξέλθουν στον έλεγχο των παραγόμενων ROS για να διατηρηθεί η φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των

κυττάρων μπορεί να αποβεί μοιραία¹⁴¹ είτε να οδηγηθούν τα κύτταρα σε διαταραχές τόσο σε βιοχημικό, όσο και σε γενετικό επίπεδο¹⁴²⁻¹⁴⁴.

Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: α) τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, β) τα αντιοξειδωτικά που διακόπτουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και γ) τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα. Αντιοξειδωτικά ένζυμα που διαθέτει το κύτταρο είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση, η υπεροξειδάση και η αναγωγάση του γλουταθείου, καθώς και διάφορα μόρια, όπως η α-τοκοφερόλη ή βιταμίνη Ε, που προστατεύει τα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών από τη δράση των ROS, το γλουταθείο, το ουρικό οξύ που υπάρχει στα ερπετά και στα πτηνά, και η βιταμίνη C που χαρακτηρίζεται από αντιοξειδωτική δράση¹⁴⁵. Οι κύριες πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα είναι οι μεταλλοθειονίνες¹⁴⁶.

1.4 Βιοδείκτες και περιβαλλοντικός έλεγχος

1.4.1 Οργανισμοί-βιοδείκτες

Η χρήση οργανισμών-βιοδεικτών (bioindicators) είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στην εκτίμηση της υγείας ενός οικοσυστήματος καθώς με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει παρακολούθηση της γενικότερης οικολογικής επιβάρυνσης μιας περιοχής από διάφορους ρύπους.

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό συχνά εμφανίζει προβλήματα τα οποία πρέπει να αντιμετωπιστούν. Σε δείγματα νερών, κυρίως ανοιχτής θάλασσας, τα βαρέα μέταλλα έχουν χαμηλές συγκεντρώσεις (εκτός από περιπτώσεις ατυχημάτων-ύπαρξης σημειακών πηγών ρύπανσης), οι οποίες βρίσκονται κοντά στα όρια ανίχνευσης των περισσότερων τεχνικών και για να προσδιοριστούν θα πρέπει τα δείγματα να προσυγκεντρωθούν, μια διαδικασία που είναι αρκετά χρονοβόρα. Λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων είναι συχνές οι επιμολύνσεις των δειγμάτων τόσο κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, όσο και της ανάλυσης. Επίσης, οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στη διαλυτή φάση επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως ο κύκλος της παλίρροιας, η απορροή γλυκού νερού στην περιοχή μελέτης (η οποία επηρεάζεται από την εποχή) καθώς και τα ρεύματα. Έτσι οι μετρήσεις του νερού αντανακλούν συνήθως μόνο τις συγκεντρώσεις την στιγμή της δειγματοληψίας. Επίσης ένα ακόμα μειονέκτημα της απευθείας μέτρησης βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό είναι ότι δεν μπορεί να προσδιοριστεί αποκλειστικά το βιοδιαθέσιμο τμήμα των μετάλλων το οποίο μπορεί να είναι δυνητικά τοξικό για τους οργανισμούς.

Η ανάλυση των ιζημάτων καλύπτει κάποια από τα παραπάνω μειονεκτήματα. Με μέτρηση των μετάλλων στα ιζήματα μπορούμε να προσδιορίσουμε την χρονική εξέλιξη της ρύπανσης (αν είναι γνωστός και ο ρυθμός ιζηματογένεσης). Οι συγκεντρώσεις όμως των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα επηρεάζονται και από τα χαρακτηριστικά του ίδιου του ιζήματος στην περιοχή μελέτης, όπως η κοκκομετρία και η ορυκτολογία¹⁴⁷. Και παρά το ότι μπορούν να εφαρμοστούν εκλεκτικές εκχυλίσεις στο ίζημα και να υπάρξει πληροφορία για το ποσοστό των ευκίνητων μορφών των μετάλλων σε αυτό, πάλι δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός του κλάσματος των μετάλλων που είναι βιοδιαθέσιμο στους οργανισμούς¹⁴⁸.

Τα βαρέα μέταλλα συσσωρεύονται στους θαλάσσιους οργανισμούς σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις στους διάφορους ιστούς τους. Οι συγκεντρώσεις αυτές αντανακλούν την συσσώρευση έπειτα από κάποιο χρονικό διάστημα έκθεσης, το οποίο εξαρτάται από το είδος που

μελετάται και τον κύκλο ζωής του. Οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων σε δείγματα οργανισμών είναι αρκετά εύκολο να προσδιοριστούν γιατί είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες στο θαλασσινό νερό και αλλά και πιο χρήσιμες, για την εκτίμηση οικοτοξικολογικού κινδύνου και επιπτώσεων, επειδή παρέχουν μια χρονικά ολοκληρωμένη μέτρηση βιοδιαθεσιμότητας των μετάλλων, η οποία αντιπροσωπεύει το περιβαλλοντικό φορτίο που έχουν δεχτεί και δυνητικά μπορεί να τους προκαλέσει βλάβες εφόσον έχει ενσωματωθεί στους ιστούς τους^{149, 150}.

Οι οργανισμοί που επιλέγονται ονομάζονται βιοδείκτες (bioindicators). Ο τρόπος πρόσληψης της τροφής από τους οργανισμούς, καθώς και ο οικότοπός τους πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν κατά την επιλογή τους ως δείκτες ρύπανσης μιας περιοχής. Μέτρηση βαρέων μετάλλων σε θαλάσσια φύκη για παράδειγμα, τα οποία δεν έρχονται σε επαφή με το ίζημα θα αντανάκλουν μόνο την συσσώρευση από το θαλασσινό νερό¹⁵¹, ενώ οργανισμοί διηθηματοφάγοι θα επηρεάζονται τόσο από την συγκέντρωση στο νερό, όσο και από τα αιωρούμενα σωματίδια. Μέτρηση σε αιωρηματοφάγους οργανισμούς αντανάκλα την συγκέντρωση στο θαλασσινό νερό αλλά και στα νέο-αποτιθέμενα σωματίδια στο ίζημα¹⁵². Η φυσιολογία επίσης του οργανισμού-βιοδείκτη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα των μετρήσεων. Οργανισμοί που διαθέτουν κέλυφος είναι πιο προστατευμένοι από άλλους που δεν διαθέτουν. Επίσης μεταξύ των δίθυρων, αυτά που ζουν μέσα στην άμμο είναι πιο προστατευμένα από εκείνα που ζουν προσκολλημένα σε κάποιο σκληρό υπόστρωμα ενώ αυτά που ανοίγουν τις δύο θυρίδες τους για να φιλτράρουν το νερό είναι λιγότερο προστατευμένα από εκείνα που βγάζουν τον σίφωνά τους για να φιλτράρουν.

Έχει αποδειχτεί ότι οι οργανισμοί-βιοδείκτες επηρεάζονται περισσότερο από αυξομειώσεις στα επίπεδα οργανικών και ανόργανων ρύπων, παρά από τις αυξομειώσεις σε φυσικές ή φυσικοχημικές παραμέτρους¹⁵³. Όμως, η πρόσληψη και διαθεσιμότητα των μετάλλων από τους οργανισμούς, ακόμα και του ίδιου είδους, επηρεάζεται από βιολογικούς και γεωλογικούς παράγοντες. Στους βιολογικούς παράγοντες συγκαταλέγονται η ηλικία, το μέγεθος, το φύλο, ο τρόπος πρόσληψης της τροφής καθώς και το αναπαραγωγικό στάδιο στο οποίο βρίσκεται ένας οργανισμός¹⁵⁴. Οι γεωχημικοί παράγοντες είναι η συγκέντρωση οργανικού υλικού¹⁵⁵, η σκληρότητα του νερού, η θερμοκρασία (της οποίας οι αλλαγές μπορεί να μεταβάλλουν την αναπαραγωγική φάση των οργανισμών, άρα και τον ρυθμό πρόσληψης τροφής, οπότε και την συγκέντρωση ρύπων στους ιστούς), το pH¹⁵⁶, το διαλυμένο οξυγόνο, η κοκκομετρία του ιζήματος (κυρίως για τους αιωρηματοφάγους οργανισμούς)¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

Πολλοί οργανισμοί-βιοδείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες παρακολούθησης και ελέγχου υδρόβιων οικοσυστημάτων. Τέτοιοι οργανισμοί είναι τα ψάρια, τα καρκινοειδή και τα δίθυρα μαλάκια. Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων στους ιστούς των οργανισμών είναι ένας συνδυασμός διαφόρων παραγόντων, κυριότεροι από τους οποίους είναι το είδος του μετάλλου, η μορφή με την οποία εισέρχεται το μέταλλο στον οργανισμό, το επίπεδο έκθεσης, η διάρκεια έκθεσης καθώς και η κινητική του στον οργανισμό¹⁶⁰.

Οι οργανισμοί που θα χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα ελέγχου ρύπανσης από βαρέα μέταλλα πρέπει να πληρούν κάποια κριτήρια¹⁶¹⁻¹⁶⁴:

- Να μπορούν να αναγνωριστούν και να συλλεχθούν σχετικά εύκολα.

- Στις περιοχές μελέτης να αποτελούν κυρίαρχα και εξαπλωμένα είδη καθώς και να έχουν πυκνούς πληθυσμούς ώστε να υπάρχει η δυνατότητα επαναλαμβανόμενων δειγματοληψιών και συνεχούς παρακολούθησης του υδάτινου περιβάλλοντος.
- Να ζουν προσκολλημένοι και να παραμένουν σε συγκεκριμένα σημεία το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους ώστε να αποτελούν αντιπροσωπευτικούς οργανισμούς της περιοχής μελέτης.
- Να παρουσιάζουν αρκετά μεγάλη αντοχή σε περιβαλλοντικούς ρύπους.
- Να έχουν αρκετά μεγάλη διάρκεια ζωής ώστε να μπορούν να γίνουν εποχιακές και ετήσιες παρακολουθήσεις της περιοχής μελέτης ώστε να προσδιοριστούν τυχόν μεταβολές καθώς και για να μπορούν να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ηλικιακών σταδίων.
- Να έχουν χαμηλό επίπεδο ενζυμικής δραστηριότητας ώστε να μην μπορούν να μεταβολίσουν ρυπογόνες ουσίες (π.χ. PAHs, PCBs) και οι συγκεντρώσεις που προσδιορίζονται στους ιστούς να είναι όσο πιο αντιπροσωπευτικές γίνεται της ρύπανσης του περιβάλλοντος.
- Να υπάρχει η δυνατότητα μεταφοράς και διατήρησης των πληθυσμών σε περιοχές αναφοράς χωρίς υδάτινη ρύπανση.

Καλό θα ήταν επίσης οι επιλεγόμενοι οργανισμοί-βιοδείκτες να αποτελούν διατροφική πηγή για τον άνθρωπο ώστε η ανάγκη ελέγχου του οικοτόπου τους και των ίδιων να είναι επιτακτική εφόσον σχετίζεται και με την ανθρώπινη υγεία.

Για την μελέτη της ρύπανσης υδάτινων συστημάτων από βαρέα μέταλλα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι οργανισμοί, όπως φύκη, καρκινοειδή, μαλάκια, ψάρια κλπ. Η ικανότητα των δίθυρων μαλάκιων να βιοσυσσωρεύουν βαρέα μέταλλα καθώς και το ότι πληρούν όλα τα παραπάνω κριτήρια, τα έχει φέρει στην πρώτη θέση χρήσης σε προγράμματα παρακολούθησης της θαλάσσιας ρύπανσης^{149, 165}. Δίθυρα που έχουν χρησιμοποιηθεί ως οργανισμοί βιοδείκτες είναι το μεσογειακό *Mytilus galloprovincialis*¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ καθώς και μύδια του ίδιου γένους όπως *edulis*, *californianus*, *trossulus*^{170, 171}, στρείδια (*Ostrea edulis*), και οστρακοειδή όπως *Ruditapes decussates*¹³⁹, *Pinctada radiata*¹⁷², *Crassostrea rhizophorae*¹⁷³ ή *gigas*¹⁷⁴, *Perna perna*¹⁷⁵ καθώς και αρκετά άλλα, ανάλογα με την περιοχή μελέτης.

Τα βαρέα μέταλλα δεν συγκεντρώνονται με τους ίδιους ρυθμούς σε όλους τους οργανισμούς, αλλά φαίνεται η συσσώρευση να εξαρτάται από το είδος τους¹⁷⁶ και επίσης υπάρχει διαφοροποίηση ακόμα και στους ιστούς του ίδιου οργανισμού. Ανάλογα με τον οργανισμό οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορεί να προσδιοριστούν στα βράγχια, το μανδύα, τον πεπτικό σωλήνα κ.α.^{177, 178}. Τα βράγχια αποτελούν ένα από τα κύρια όργανα για την συσσώρευση μετάλλων¹⁷⁹. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα βράγχια του μυδιού βιοσυσσωρεύουν υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων όπως Cd, Pb, Zn, σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς¹⁸⁰⁻¹⁸³. Η συσσώρευση μετάλλων σε συγκεκριμένους ιστούς πιθανόν να οφείλεται είτε στην παρουσία συγκεκριμένων θέσεων πρόσδεσης σε αυτούς είτε σε μηχανισμούς αποτοξίνωσης που υπάρχουν στον συγκριμένο ιστό³. Η συσσώρευση όμως φαίνεται να εξαρτάται και από το είδος του μετάλλου.

1.4.2 Ενώσεις-βιοδείκτες

Η χημική ανάλυση των περιβαλλοντικών δειγμάτων δεν είναι αρκετή για την εκτίμηση της επικινδυνότητας ενός ρύπου στο θαλάσσιο οικοσύστημα, καθώς δεν μπορούν να εκτιμηθούν και

να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς και γενικά στην βιοκοινωνία. Ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση βιολογικών αλλαγών που συμβαίνουν στους ιστούς των οργανισμών που εκτίθενται σε βαρέα μέταλλα είναι ζωτικής σημασίας για την εκτίμηση της σταθερότητας και βιωσιμότητας ενός οικοσυστήματος. Έτσι μετρώντας ουσίες, που ονομάζονται βιοδείκτες (biomarkers), στα υγρά του σώματος, ιστών ή κυττάρων μπορεί να γίνει αντιληπτό το μέγεθος της επίδρασης των ρύπων σε έναν οργανισμό. Επομένως, τα επίπεδα κατάλληλων βιοδεικτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα ευαίσθητο προειδοποιητικό εργαλείο για τον έλεγχο και την εκτίμηση της περιβαλλοντικής ποιότητας¹⁸⁴⁻¹⁸⁷.

Ένωση-βιοδείκτης είναι η ένωση της οποίας η συγκέντρωση ή η ενεργότητα μεταβάλλεται σε ένα οργανισμό που έχει εκτεθεί ή εκτίθεται σε τουλάχιστον ένα ρυπογόνο παράγοντα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο προειδοποίησης και πρόβλεψης των επιπτώσεων της ρύπανσης. Οι ενώσεις βιοδείκτες (βιοχημικοί, μοριακοί και κυτταρικοί) διακρίνονται σε δύο κατηγορίες¹⁸⁷⁻¹⁸⁹:

- *Γενικού stress*: οι μεταβολές οφείλονται στην επίδραση διαφόρων ρυπογόνων/τοξικών ουσιών, χωρίς να προσδιορίζεται άμεσα η φύση τους, όπως για παράδειγμα η ανίχνευση μικροπυρήνων και άλλων ανωμαλιών, όπως είναι η τεχνική “Stress on Stress”.
- *Ειδικού stress*: οι μεταβολές οφείλονται στην επίδραση κατά κύριο λόγο συγκεκριμένων ρυπογόνων/τοξικών ουσιών, η φύση των οποίων μπορεί να προσδιοριστεί, όπως για παράδειγμα είναι η ενζυμική δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), καθώς επίσης και η εκτίμηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με βάση τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA).

Η μεταβολή των επιπέδων των ουσιών αυτών αποδεικνύει την έκθεση των οργανισμών σε ρύπους ή/και προσδιορίζει το μέγεθος της απόκρισης του οργανισμού στο ρύπο. Μάλιστα, η χρήση μιας σειράς βιομαρτύρων έχει περισσότερα πλεονεκτήματα από ότι η χρήση ενός και μόνο βιομάρτυρα. Η εφαρμογή των βιοδεικτών στηρίζεται στο ότι μια τοξική συνέπεια θα εκδηλωθεί πρώτα σε υποκυτταρικό επίπεδο πριν γίνει αντιληπτή σε υψηλότερα επίπεδα οργάνωσης. Έτσι λοιπόν, με τον προσδιορισμό των επιπέδων διαφόρων ουσιών-βιοδεικτών στους ιστούς των οργανισμών μπορούν να ανιχνευτούν πρόωρες παθολογικές αποκρίσεις πριν εμφανιστούν σοβαρότερα προβλήματα τα οποία μπορούν να αποβούν μοιραία αρχικά για τον ίδιο τον οργανισμό αλλά και να οδηγήσουν σε πληθυσμιακές αλλαγές¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

Η σημασία της χρήσης βιοδεικτών στηρίζεται στο ότι¹⁹¹:

- Ανιχνεύουν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους οργανισμούς και τους ρύπους και μετρούν επιπτώσεις οι οποίες όμως δεν είναι θανατηφόρες (sub lethal).
- Ανιχνεύουν την παρουσία ρύπων ανεξάρτητα από την χημική φύση τους.
- Η πρώιμη ανίχνευση των επιπτώσεων των ρύπων παρέχει την δυνατότητα ανάληψης επιδιορθωτικών ή προληπτικών δράσεων.
- Εκτός της εκτίμησης της ρύπανσης για το συγκεκριμένο μέρος όπου ζουν οι οργανισμοί που μετρήθηκαν, μπορούν να εκτιμηθούν και εποχιακές διακυμάνσεις της ρύπανσης.
- Με εφαρμογή σε είδη από διαφορετικά τροφικά επίπεδα μπορεί να γίνει κατανοητή η βιομεγέθυνση ώστε να σχεδιαστούν στρατηγικές παρέμβασης ή και επιδιόρθωσης.
- Η μέτρηση και ο προσδιορισμός τους μπορεί να γίνει τόσο σε οργανισμούς που έχουν συλλεχθεί από περιβάλλοντα εκτεθειμένα ή όχι σε ρύπους, όσο και σε οργανισμούς που

έχουν εκτεθεί εργαστηριακά σε ρύπους διαφόρων συγκεντρώσεων προσπαθώντας να προβλεφθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις ενός ατυχήματος.

Οι αποκρίσεις των ιστών και κατ' επέκταση των οργανισμών στην επίδραση περιβαλλοντικών ρύπων εκτιμώνται χρησιμοποιώντας ποικίλους βιομάρτυρες. Οι πλέον καθιερωμένοι και ευρέως εφαρμοζόμενοι είναι: το περιεχόμενο σε μεταλλοθειονίνες, η ενεργότητα στα ένζυμα: καταλάση, ακετυλοχολινεστεράση, S μεταφοράση της γλουταθειόνης, αναγωγή της γλουταθειόνης, υπεροξειδική δισμουτάση, το οξειδωτικό στρες (εκφρασμένο ως συγκέντρωση μηλονικής διαλδεΰδης) και η σταθερότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε το περιεχόμενο σε μεταλλοθειονίνες ως πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται λόγω των βαρέων μετάλλων, η ενεργότητα των εξής ενζύμων: ακετυλοχολινεστεράση, ως δείκτης νευροτοξικότητας, καταλάση και S μεταφοράση της γλουταθειόνης (glutathione S transferase), ως ένζυμα του μεταβολισμού οξειδωτικών παραπροϊόντων, αναγωγή της γλουταθειόνης (glutathione reductase), καθώς και το οξειδωτικό στρες που έχουν υποστεί οι οργανισμοί (εκφρασμένο ως συγκέντρωση μηλονικής διαλδεΰδης).

1.4.2.1 Μεταλλοθειονίνες

Οι μεταλλοθειονίνες (MTs) είναι μία οικογένεια πρωτεϊνών οι οποίες εμφανίζουν ιδιαίτερα βιοχημικά χαρακτηριστικά. Βρίσκονται σε όλους σχεδόν τους ευκαρυωτικούς και σε αρκετούς προκαρυωτικούς οργανισμούς¹⁹². Εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και στα λυσοσώματα, αλλά μπορούν να μεταφερθούν στον πυρήνα ακόμα και στην ενδιάμεση μεμβράνη που διαθέτουν τα μιτοχόνδρια¹⁹³. Είναι θερμοσταθερές (thermostable) πρωτεΐνες οι οποίες έχουν χαμηλό μοριακό βάρος (6.000-8.000 Da) και αποτελούνται είτε από 58-60 αμινοξέα αν αναφερόμαστε στις μεταλλοθειονίνες των οστρακόδερμων, είτε από 61 για θηλαστικά¹⁹⁴. Είναι υδατοδιαλυτές και πλούσιες σε ελεύθερες σουλφιδρυλομάδες (SH), καθώς 30% περίπου των αμινοξέων τους αποτελείται από κυστεΐνες¹⁹². Τα μόρια κυστεΐνης που βρίσκονται στο μόριο των μεταλλοθειονινών παίζουν καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία τους¹⁹⁵. Η αλληλουχία των αμινοξέων στις μεταλλοθειονίνες είναι η εξής: Cys-Cys ή Cys-X-Cys ή Cys-X-X-Cys, όπου ως X συμβολίζεται οποιοδήποτε άλλο αμινοξύ εκτός της κυστεΐνης¹⁹⁶. Εμφανίζουν διάφορες ισομορφές στα κύτταρα των οργανισμών. Στο μύδι *Mytilus edulis* έχουν βρεθεί δύο ισομορφές των μεταλλοθειονινών, η MT-10 και η MT-20 με μοριακό βάρος 10 και 20 kDa αντίστοιχα¹⁹⁷.

Τα βαρέα μέταλλα έχουν την τάση να ενώνονται σε σουλφιδρυλομάδες και αμινομάδες διαφόρων μορίων¹⁹⁸, άρα λόγω της δομής τους οι μεταλλοθειονίνες παρουσιάζουν μεγάλη τάση να προσδένουν μεταλλικά ιόντα¹⁹⁹. Έχει βρεθεί μάλιστα ότι το κάθε μόριο μεταλλοθειονίνης μπορεί να προσδέσει έως επτά άτομα βαρέως μετάλλου¹⁹⁵. Οι μεταλλοθειονίνες έχουν φυσιολογικά προσδεδεμένα μέταλλα στο μόριό τους. Τα μέταλλα αυτά είναι ο ψευδάργυρος και ο χαλκός [Zn(II) και/ή Cu(I)]¹⁹². Ο δεσμός που έχουν μεταξύ του μετάλλου και του θείου των κυστεϊνών, προσδίδει στις μεταλλοθειονίνες τα ιδιαίτερα στερεοσκοπικά χαρακτηριστικά τους. Η χημική συμπεριφορά των μεταλλοθειονινών εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από τις ιδιότητες των σουλφιδρυλομάδων που έχουν στο μόριό τους. Έτσι, οποιοδήποτε μέταλλο έχει χαρακτηριστικά που μοιάζουν με του χαλκού ή του ψευδαργύρου μπορεί επίσης να προσδεθεί στις μεταλλοθειονίνες¹⁹⁹.

Η χημική συγγένεια των μεταλλοθειονινών για τα βαρέα μέταλλα ακολουθεί τη σειρά: Hg⁺²> Ag⁺¹>Cu⁺>Cd⁺²>Pb⁺²> Co⁺²≈Zn⁺²>Fe⁺² 87, 193. Επίσης τα ιόντα νικελίου έχουν πολύ μεγάλη τάση

ένωσης με την κυστεΐνη²⁰⁰. Έτσι οι μεταλλοθειονίνες μπορούν να ανταλλάξουν τα μέταλλα τα οποία φυσιολογικά έχουν συμπλοκοποιήσει, με μη απαραίτητα μέταλλα όπως το κάδμιο, ο υδράργυρος, το αρσενικό, το κοβάλτιο, ο σίδηρος, ο μόλυβδος, ο λευκόχρυσος και ο άργυρος (όλα στην ιοντική μορφή τους) μέσω συμπλεγμάτων τετραθειολικών κυστεΐνών. Λόγω της σειράς της χημικής συγγένειας των μεταλλοθειονινών για τα βαρέα μέταλλα, οι μεταλλοθειονίνες που φυσιολογικά προσδένουν ψευδάργυρο είναι πιο ενεργές στην υποκατάσταση από εκείνες που προσδένουν χαλκό²⁰¹.

Λόγω των βιοχημικών και λειτουργικών τους χαρακτηριστικών (μεγαλύτερη χημική συγγένεια με τα μη απαραίτητα βαρέα μέταλλα σε σχέση με τα απαραίτητα, καθώς και μεγάλη ικανότητα σύμπλεξης βαρέων μετάλλων στο μόριό τους) οι μεταλλοθειονίνες είναι ικανές να προστατεύουν κυτταρικές δομές από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις με κατιόντα βαρέων μετάλλων που εισχωρούν μέσα στο κύτταρο²⁰²⁻²⁰⁴. Έτσι, σε περιπτώσεις τοξικότητας, μπορούν να λειτουργήσουν ως αποτοξινωτές (detoxifying agents) των κυττάρων καθώς προσδένουν τα τοξικά μέταλλα, μειώνοντας την δυνατότητά τους να βρίσκονται σε ιονική ή άλλη χαμηλού μοριακού βάρους ιονανταλλάξιμη μορφή στο κυτταρόπλασμα μειώνοντας τελικά την τοξικότητά τους^{203, 205}.

Η φυσιολογική λειτουργία των μεταλλοθειονινών στα κύτταρα είναι :

- η ομοίωση των απαραίτητων μετάλλων στον κυτταρικό μεταβολισμό, δίνοντας χαλκό ή ψευδάργυρο στα μόρια υποδοχείς που τα χρειάζονται²⁰⁶, γι' αυτό και οι μεταλλοθειονίνες μπορούν να απελευθερώσουν αρκετά εύκολα τον ψευδάργυρο και τον χαλκό που έχουν φυσιολογικά προδεμένο στο μόριό τους¹⁹⁶,
- η σύμπλεξη βαρέων μετάλλων με σκοπό την αποτοξίνωση του οργανισμού από αυτά²⁰⁴ γι' αυτό και η χημική συγγένεια των δύο απαραίτητων μετάλλων που έχουν οι μεταλλοθειονίνες με αυτά δεν είναι τόσο μεγάλη και
- η απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών (radical scavenging)^{195, 207}.

Κατιόντα βαρέων μετάλλων που έχουν συσσωρευτεί στα κύτταρα διεγείρουν την σύνθεση μεταλλοθειονινών²⁰⁸. Γενικά όμως έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης μεταλλοθειονινών σε οργανισμούς που εκτίθενται σε βαρέα μέταλλα εξαρτώνται από το επίπεδο έκθεσης. Παρόλα αυτά, όταν η συγκέντρωση βαρέων μετάλλων ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο όριο, η απόκριση του οργανισμού σε μεταλλοθειονίνες παύει να είναι γραμμική και η συσχέτιση της μετρούμενης συγκέντρωσης του μετάλλου με την συγκέντρωση μεταλλοθειονινών δεν είναι θετική²⁰⁹.

Παρότι συνήθως οι είκοσι σουλφυδρυλομάδες οι οποίες υπάρχουν στο μόριο των μεταλλοθειονινών είναι συμπλεγμένες με μέταλλο, η ικανότητά τους να εγκλωβίζουν ελεύθερες ρίζες είναι 300 φορές μεγαλύτερη από εκείνη του γλουταθείου²⁰⁷. Έχει βρεθεί στο καρκινοειδές *Charybdis japonica* ότι οι μεταλλοθειονίνες αντιδρούν με τις ρίζες υδροξυλίου (OH) περίπου 10.000 φορές πιο γρήγορα από ότι η υπεροξειδική δισμουτάση, προσπαθώντας έτσι να αποτοξινώσουν τον οργανισμό από τις ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου²¹⁰.

Η δραστηριότητα των μεταλλοθειονινών μπορεί να συνοψιστεί στα παρακάτω²¹¹:

- 1) πρόσληψη και απελευθέρωση του μετάλλου
- 2) ανταλλαγή μετάλλου
- 3) μεταφορά του μετάλλου σε άλλες πρωτεΐνες ή βιομόρια

4) οξειδοαναγωγική δραστηριότητα

Η έκφραση μεταλλοθειονινών επηρεάζεται από την αναπαραγωγική φάση που βρίσκονται οι οργανισμοί, ίσως γιατί με κάποιο τρόπο συμμετέχουν σε αυτή. Στο δίθυρο *Crassostrea gigas* βρέθηκε αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών στα αρσενικά άτομα, κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των γονάδων τους, ενώ στα θηλυκά η αύξηση συνεχίστηκε μέχρι και την ολοκλήρωση της ωρίμανσης των ωαρίων τους και έπειτα μετά την γέννα μειώθηκαν δραματικά²¹². Συσχέτιση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών με την ωρίμανση των γονάδων έχει επίσης βρεθεί και από τους Zorita et al²¹³. Υψηλότερα επίπεδα μεταλλοθειονινών έχουν μετρηθεί σε ζώα των Μάιο σε σχέση με Σεπτέμβριο, αποδεικνύοντας ότι οι μεταλλοθειονίνες συμμετέχουν στην διαδικασία σεξουαλικής ωρίμανσης των οργανισμών^{161, 214, 215}.

Επαγωγή μεταλλοθειονινών μετά από έκθεση σε βαρέα μέταλλα έχει βρεθεί σε διάφορους θαλάσσιους βενθικούς οργανισμούς τις τελευταίες δεκαετίες^{203, 208, 216-220}. Εξαιτίας την απόκρισης που εμφανίζουν οι μεταλλοθειονίνες σε οργανισμούς που εκτίθενται σε βαρέα μέταλλα, έχουν προταθεί ως βιοδείκτες ρύπανσης από βαρέα μέταλλα και χρησιμοποιούνται αρκετά σε διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς σε προγράμματα παρακολούθησης ποιότητας υδάτων (UNEP, MEDPOL, Mussel watch κλπ).

Οι μεταλλοθειονίνες δεν περιέχουν αρωματικά αμινοξέα, οπότε στην UV περιοχή από 230-300nm δεν εμφανίζεται κάποια απορρόφηση λόγω των αμινοξέων τους, έτσι στη συγκεκριμένη περιοχή μπορούν να μετρηθούν οι απορροφήσεις που προέρχονται από την σύνδεση των μετάλλων στις θειολομάδες των κυστεϊνών των μεταλλοθειονινών (θειολικά συμπλέγματα με διάφορα μέταλλα στα 212-254 nm κυρίως)²²¹.

1.4.2.2 Ενζυμική δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης (EC 3.1.1.7)

Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) ανήκει σε μια μεγάλη ομάδα εστερασών, που ονομάζονται χολινεστεράσες. Οι χολινεστεράσες αποτελούν ένζυμα των νευρομυϊκών συνάψεων με ποικίλη δράση. Στα ασπόνδυλα, τα επίπεδα του ενζύμου επηρεάζονται από φυσικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η αναπαραγωγική δραστηριότητα, μυϊκές κινήσεις και άλλες παραμέτρους, όπως η ηλικία και το μέγεθος.

Η ομάδα των χολινεστερασών περιλαμβάνει δύο ομάδες, την ακετυλοχολινεστεράση (AChE), τη βουτυροχολινεστεράση (BChE)^{222, 223} και μια τρίτη κατηγορία, τις καρβοξυλεστεράσες (CbEs) ή αλιεστεράσες²²⁴. Οι χολινεστεράσες ανιχνεύτηκαν στο σώμα σπονδυλωτών, σε ιστούς και στην αιμόλεμφο μαλακίων και εντόμων, καθώς και σε ιστούς ερπετών²²⁵⁻²²⁷. Στα δίθυρα μαλάκια, και συγκεκριμένα στο μύδι *Mytilus galloprovincialis*, η AChE αφθονεί στην αιμόλεμφο, στα βράγχια και στον πεπτικό αδένα, ενώ η BChE και η CbE μετρήθηκαν κυρίως στον πεπτικό αδένα. Η AChE και η BChE αποτελούν μία ομάδα εστερασών, συνδεδεμένων στην επιφάνεια των χολινεργικών περιοχών, και είναι σημαντικές για τη μεταβίβαση των νευρικών ώσεων στις νευρομυϊκές συνάψεις²²⁸.

Η ακετυλοχολινεστεράση υδρολύει τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη σε χολίνη και οξικό οξύ, στις νευρομυϊκές συνάψεις, ενώ η BChE καταλύει την υδρόλυση της βουτυροχολίνης^{229, 230}. Ο χρόνος ανακύκλωσης του ενζύμου αυτού είναι 150 μsec που ισοδυναμεί με υδρόλυση περισσότερων από 5000 μορίων ακετυλοχολίνης ανά μόριο ενζύμου ανά δευτερόλεπτο και γι' αυτό ακριβώς το λόγο θεωρείται ένα από τα πιο αποτελεσματικά γνωστά ένζυμα. Το ενεργό του κέντρο

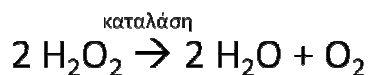
έχει δυο κύριες θέσεις. Μια ανιονική θέση που έλκει το θετικό φορτίο της ακετυλοχολίνης και μια εστερική θέση που συνδέεται μέσω του υδροξυλίου μιας σερίνης που διαθέτει με το άτομο του άνθρακα του καρβοξυλίου της ακετυλοχολίνης²³¹.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η ακετυλοχολινεστεράση είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε διάφορες χημικές ενώσεις η τοξική δράση των οποίων προκαλεί μείωση της δραστηριότητάς της²³². Τέτοιες τοξικές ουσίες μπορεί να είναι οργανοφωσφορικές ή καρβαμιδικές ενώσεις^{233, 234}, ουσίες που περιέχονται σε απορρυπαντικά²³⁵, σε εντομοκτόνα²³⁶⁻²³⁸, σε τοξίνες²³⁹ και τέλος, βαρέα μέταλλα. Όλα τα παραπάνω μπορεί να επηρεάσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει τόσο σε ψάρια²⁴⁰, όσο και σε δίθυρα μαλάκια^{241, 242}.

Υδρόβιοι οργανισμοί οι οποίοι εκτίθενται σ' αυτές τις χημικές ενώσεις παρουσιάζουν αναστολή της δράσης των ενζύμων τους, με αποτέλεσμα την δημιουργία συνεχούς ροής σημάτων και νευρομυϊκών ώσεων προκαλώντας νευροφυσιολογικές και νευροτοξικές διαταραχές. Το γεγονός αυτό αποτελεί την αρχή της χρήσης της παραμέτρου αυτής ως βιομάρτυρα σε διάφορες μελέτες σε υδρόβιους οργανισμούς, όπως τα δίθυρα μαλάκια. Έτσι η ακετυλοχολινεστεράση έχει προταθεί ως βιομάρτυρας ώστε να προσδιορίζεται το στρες που υφίστανται οι θαλάσσιοι οργανισμοί²³⁹ καθώς το Διεθνές Συνέδριο Μελέτης των Βιολογικών Επιπτώσεων (International Workshop on Biological Effects) έδειξε την αποτελεσματικότητα της χρησιμοποίησης της μεθόδου προσδιορισμού της δραστηριότητας της AChE σε προγράμματα βιοπαρακολούθησης της θαλάσσιας ρύπανσης, με τη χρήση του οργανισμού βιοδείκτη *Mytilus galloprovincialis*²⁴³⁻²⁴⁵.

1.4.2.3 Καταλάση (EC 1.11.1.6)

Η παραγωγή H₂O₂ είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται στους οργανισμούς, όμως το H₂O₂ δρα οξειδωτικά στα κύτταρα. Το H₂O₂ απομακρύνεται σε αερόβιους οργανισμούς με τη δράση δύο τύπων ενζύμων: τις καταλάσες και τις υπεροξειδάσες. Η καταλάση είναι ένα τετραμερές αποτελούμενο από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες. Η κάθε υπομονάδα έχει μοριακό βάρος 60 kDa και περιέχει μια ομάδα αίμης και NADPH στο ενεργό κέντρο της²⁴⁶. Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μοριακό οξυγόνο και νερό σύμφωνα με την αντίδραση:



Σε αντίθεση με άλλες υπεροξειδάσες οι οποίες μπορούν να ανάγουν διάφορα υπεροξειδία, η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει ως υπόστρωμά της μόνο το υπεροξειδίο του υδρογόνου^{247, 248}. Αρχικά θεωρήθηκε ότι η αντίδραση αναγωγής υπεροξειδίου γίνεται μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών²⁴⁹. Κατά τη διάρκεια των επόμενων δεκαετιών, ανακαλύφθηκε ότι η κατάλυση πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ατόμου σιδήρου της πορφυρίνης²⁵⁰⁻²⁵². Έτσι λοιπόν προτάθηκε ότι η καταλάση εκτελεί ταχεία καταστροφή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε δύο στάδια. Πρώτα, ένα μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου δεσμεύεται από την καταλάση και διασπάται. Ένα άτομο οξυγόνου παράγεται και συνδέεται με το άτομο του σιδήρου που διαθέτει η καταλάση, και το υπόλοιπο κομμάτι του υπεροξειδίου του υδρογόνου που διασπάστηκε απελευθερώνεται ως νερό στο κυτταρικό περιβάλλον. Στη συνέχεια, ένα δεύτερο μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου δεσμεύεται από το ίδιο μόριο καταλάσης. Διασπάται και αυτό το μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου και το άτομο του οξυγόνου που παράγεται ενώνεται με αυτό

που ήδη βρισκόταν συνδεδεμένο με το σίδηρο του μορίου της καταλάσης, απελευθερώνοντας αέριο οξυγόνο και νερό. Η ιστοιδίνη (His 74) και η ασπαραγίνη (N147), δύο από τα αμινοξέα της καταλάσης είναι τα ενεργά αμινοξέα της καταλάσης για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση²⁵³.

Τα περισσότερα αερόβια κύτταρα περιέχουν το ένζυμο καταλάση, όμως ο κάθε τύπος κυττάρου περιέχει διαφορετική μορφή καταλάσης. Η καταλάση είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά ένζυμα που βρίσκονται στα κύτταρα. Κάθε μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει σε αβλαβές νερό και οξυγόνο εκατομμύρια μορίων του υπεροξειδίου του υδρογόνου κάθε δευτερόλεπτο²⁵⁴.

Η καταλάση στους ιστούς ζώων και φυτών βρίσκεται ειδικά στο ήπαρ το οποίο διαθέτει υποκυτταρικά οργανίδια, όπου δεσμεύεται η καταλάση από απλές μεμβράνες που είναι γνωστές ως υπεροξειδοσώματα (peroxisomes)^{255, 256}. Τα υπεροξειδοσώματα περιέχουν αρκετά ένζυμα πολλά εκ των οποίων παράγουν H₂O₂, οπότε έχουν μεγάλες συγκεντρώσεις καταλάσης για να προστατευτούν. Στα ερυθροκύτταρα η καταλάση προστατεύει από την οξειδωτική δράση του H₂O₂ ως αποτέλεσμα της αυτοοξειδωσης της αιμοσφαιρίνης. Επειδή το H₂O₂ διαχέεται εύκολα, τα ερυθροκύτταρα με αυτό τον τρόπο προστατεύουν και άλλους ιστούς από οξειδωτικές βλάβες, όπως τον εγκέφαλο, την καρδιά και τους μύς του σκελετού που περιέχουν μικρότερες συγκεντρώσεις καταλάσης απ' ότι το ήπαρ. Τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο περιέχουν ελάχιστη καταλάση καθώς υπό φυσιολογικές συνθήκες στα κύτταρα αυτά δεν παράγονται μεγάλες ποσότητες H₂O₂¹⁰⁰.

Ανεπάρκεια καταλάσης έχει βρεθεί τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε άλλους ζωικούς ιστούς. Υπάρχουν δύο είδη ανεπάρκειας καταλάσης: η ακαταλασαιμία (acatalasemia), κατά την οποία η δραστηριότητα της καταλάσης είναι λιγότερη από 10% από τα φυσιολογικά επίπεδα και η υποκαταλασαιμία (hyrocatalasemia), στην οποία η μετρούμενη δραστηριότητα είναι 50% χαμηλότερη από τα φυσιολογικά επίπεδα²⁵⁷. Έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα της καταλάσης μειώνεται στο ήπαρ όταν υπάρχει όγκος²⁵⁸. Αυξημένη επίσης δραστηριότητα της καταλάσης έχει βρεθεί σε κύτταρα που υφίστανται οξειδωτικό στρες²⁵⁹, ενώ έχει βρεθεί ότι η δραστηριότητα της καταλάσης παρεμποδίζεται από αζίδια, κυανιούχα άλατα, υδροξυλαμίνη, αμινοτριαζόλη²⁶⁰, υπεροξειδίο²⁶¹, νιτρο- και νιτροδω- ενώσεις²⁶².

1.4.2.4 S μεταφοράση της γλουταθειόνης (EC 2.5.1.18)

Ο μηχανισμός αποτοξίνωσης των οργανισμών περιλαμβάνει δύο φάσεις. Η Φάση I καταλύεται από τις μονοοξυγενάσες του κυτοχρώματος P450 και περιλαμβάνει την προσθήκη δραστικών ομάδων σε λιπόφιλα ξενοβιοτικά μόρια ώστε να καταστούν υδατοδιαλυτά και να μπορέσουν να απεκκριθούν από τα κύτταρα. Οι μεταβολίτες που προκύπτουν κατά την Φάση I μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα από τα ένζυμα της Φάσης II²⁶³. Η Φάση II περιλαμβάνει τη σύζευξη της ξενοβιοτικής ουσίας ή των μεταβολιτών της με υποκαταστάτες οι οποίοι υπάρχουν φυσιολογικά στα κύτταρα (ενδογενής υποκαταστάτης). Η πλειοψηφία των ενζύμων της Φάσης II καταλύοντας αυτές τις αντιδράσεις προσπαθούν να αποβάλλουν τις ουσίες αυτές από τα κύτταρα με την προσθήκη πιο πολικών ομάδων, όπως του γλουταθείου στο μόριο της ξενοβιοτικής ουσίας²⁶⁴. Τα ένζυμα της Φάσης II παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση και την αποτοξίνωση των κυττάρων από διάφορες δυνητικά τοξικές ουσίες²⁶⁴ και η S-μεταφοράση της

γλουταθειόνης (GST, glutathione S transferase) ανήκει στην Φάση II της διαδικασίας αποτοξίνωσης.

Η πιο άφθονη θειόλη των κυττάρων που μπορεί να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες είναι το GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη), ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γ-γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη με μοριακό βάρος 307 Da. Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) διαθέτει μία ελεύθερη σουλφυδρυλική ομάδα και λόγω αυτής, είναι ο σπουδαιότερος ρυθμιστής της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων καθώς συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οξειδώνοντας αντιστρεπτά την ενεργή αυτή θειολική ομάδα²⁶⁵, μετατρέπόμενο σε GSSG (οξειδωμένη γλουταθειόνη)²⁶⁶. Έτσι μπορεί να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, προσπαθώντας να προστατεύσει το κύτταρο¹⁰⁰.

Ο πρωταρχικός ρόλος των GST στα κύτταρα είναι η ενδοκυτταρική μεταφορά καθώς και η βιοσύνθεση λευκοτριενίων και προσταγδαδινών²⁶⁴. Όμως η S-μεταφορά της γλουταθειόνης έχει την ικανότητα να καταλύει την σύζευξη της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) με ξενοβιοτικά υποστρώματα κατά τη διαδικασία αποτοξίνωσης των κυττάρων.

Οι GST μπορεί να αποτελούν έως και το 10% της πρωτεΐνης που βρίσκεται στο κυτοσόλιο σε ορισμένους ιστούς θηλαστικών²⁶⁷. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη σύζευξη της GSH, μέσω μιας ομάδας σουλφυδρυλίου, με ηλεκτρονιόφιλα κέντρα προκειμένου να καταστούν οι ενώσεις περισσότερο διαλυτές ώστε να αποτοξινωθεί ο οργανισμός από διάφορες ενώσεις όπως τα οξειδωμένα λιπίδια²⁶⁸. Καταλύουν δηλαδή την πυρηνόφιλη προσβολή του GSH από ηλεκτρονιόφιλο άτομο άνθρακα, αζώτου ή θείου που περιέχεται στις ουσίες αυτές (ονομάζονται μεταβολίτες Φάσης I) εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδραση τους με κυτταρικές πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα²⁶⁹ και βοηθώντας στην απέκκρισή τους από τα κύτταρα.

Η S μεταφορά της γλουταθειόνης ανάγει τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία σε αλκοόλες με ταυτόχρονη οξείδωση του GSH σε GSSG, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η οικογένεια των GST αποτελείται από τρεις υπεροικογένειες: την κυτοσολική, την μιτοχονδριακή και την μικροσωμική²⁷⁰. Οι GSTs κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες σύμφωνα με τον καταλυτικό τύπο τους: τυροσίνης, σερίνης ή κυστεΐνης, ανάλογα με το αμινοξύ το οποίο οδηγεί την σύνδεση του GSH με την ξενοβιοτική ουσία χαμηλώνοντας το pKa του GSH σταθεροποιώντας το θειολικό ανιόν μέσω δεσμού υδρογόνου^{270, 271}.

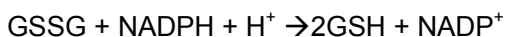
Αύξηση της ενεργότητας των GST στα κύτταρα θεωρείται ως ένας μηχανισμός προσαρμογής στις αλλαγές που συμβαίνουν στο περιβάλλον τους (ρύπανση), ενώ μείωσή τους αποτελεί ένδειξη τοξικότητας και κυτταρικής βλάβης²⁷². Μελέτες σε ψάρια που έχουν εκτεθεί σε PAHs και PCBs έχουν δείξει αυξημένη δραστηριότητα GST, όμως οι περισσότερες μελέτες δεν έδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις²⁶⁴. Μελέτες όμως σε μύδια έδειξαν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ικανοποιητικά ως ένωση-βιοδείκτης της ρύπανσης²⁷³⁻²⁷⁵.

1.4.2.5 Αναγωγή της γλουταθειόνης (EC 1.8.1.7)

Όπως αναφέρθηκε, δύο μόρια γλουταθειόνης (ανηγμένης) οξειδώνονται και σχηματίζουν δισουλφιδική γέφυρα (δημιουργία μορίου GSSG). Εκτός όμως από την οξείδωση με τον εαυτό του,

το μόριο της γλουταθειόνης μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα μικρού μοριακού βάρους μόρια όπως η ελεύθερη κυστεΐνη, το συνένζυμο A, καθώς και με θειολικές ομάδες πρωτεϊνών αποτελώντας προστατευτικό παράγοντα των κυττάρων και επιπλέον δρώντας ως συμπαράγοντας σε πολλά ένζυμα, όπως γλυοξυλάσες και ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των λευκοτριενίων²⁷⁶.

Η χημική συγγένεια που έχουν τα βαρέα μέταλλα με τις σουλφυδρυλομάδες δεν επηρεάζει μόνο τις μεταλλοθειονίνες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλλά και το ανηγμένο γλουταθειό (GSH), το οποία περιέχει ελεύθερες SH- ομάδες, οι οποίες οξειδώνονται προς δημιουργία οξειδωμένου γλουταθειού (GSSG)²⁷⁷, είτε δημιουργούνται σύμπλοκα της μορφής GS-Me μέσω του ατόμου του θείου που διαθέτει²⁷⁸, τα οποία είναι αρκετά σταθερά και αποτρέπουν την περαιτέρω δημιουργία ελευθέρων ριζών. Τέτοιο σύμπλοκο είναι το Cu(I)-SG το οποίο προκύπτει από την αναγωγή του χαλκού (II) από το GSH^{279, 280} η δημιουργία του οποίου αποτρέπει την περαιτέρω δημιουργία ελευθέρων ριζών²⁸⁰. Το GSH αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού εναντίον της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων στα κύτταρα καθώς είναι ικανό να συμπλέξει και να αδρανοποιήσει κατιόντα βαρέων μετάλλων σχεδόν μόλις εισέλθουν στα κύτταρα²⁸¹. Η πρόσληψη βαρέων μετάλλων από τα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη διαθεσιμότητα της ανηγμένης γλουταθειόνης εξαιτίας τόσο της οξειδωσής της, όσο και της συμπλοκοποίησής της. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχτεί ότι, οργανισμοί που έχουν εκτεθεί σε Cd⁺², Pb⁺², Hg⁺² αυξάνουν τα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στους ιστούς τους^{282, 283} κάτι που συμβαίνει γιατί στα κύτταρα είναι απαραίτητο να διατηρείται σταθερός ο λόγος GSH/GSSG ώστε να μην διαταράσσεται η οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) μετατρέπεται σε ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) με τη βοήθεια της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (glutathione reductase-GR), μια φλαβινοπρωτεΐνη που χρησιμοποιεί NADPH ως πηγή ηλεκτρονίων. Το ένζυμο αυτό δεν ανήκει στα αντιοξειδωτικά ένζυμα καθώς δεν συμμετέχει τόσο ενεργά στην αντιοξειδωτική προστασία του κυττάρου συλλέγοντας ελεύθερες ρίζες ή αποτοξινώνοντας τα κύτταρα, είναι όμως απαραίτητο για την διατήρηση σταθερού του λόγου GSH/GSSG στα κύτταρα, ο οποίος κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες διαταράσσεται²⁸⁴. Η αντίδραση που καταλύεται από την αναγωγάση της γλουταθειόνης χρειάζεται NADPH, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ένα βασικό συστατικό του αντιοξειδωτικού συστήματος²⁸⁵. Η αντίδραση αυτή είναι η εξής:



Η πρόσληψη βαρέων μετάλλων από τα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα ανηγμένης γλουταθειόνης, τόσο λόγω της οξειδωσής της σε GSSG, είτε λόγω της σύμπλεξής της. Επειδή τα σύμπλοκα των μετάλλων με τη γλουταθειόνη είναι πολύ σταθερά, για να συνεχίσει να υπάρχει ο συγκεκριμένος αμυντικός μηχανισμός θα πρέπει τα κύτταρα είτε να παράγουν περισσότερη αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) ώστε να μπορέσουν να ανάγουν ξανά την οξειδωμένη γλουταθειόνη, είτε να παράγουν πιο μεγάλες ποσότητες ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH). Πράγματι, έχει βρεθεί αύξηση της ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (glutathione reductase-GR) σε ψάρια που έχουν εκτεθεί σε PAHs και PCBs σε εργαστηριακές συνθήκες²⁶⁴ καθώς και σε δίθυρα που έχουν εκτεθεί σε βαρέα μέταλλα και άλλους ρύπους²⁸⁶⁻²⁸⁸.

Όταν προκύπτουν μεγάλες συγκεντρώσεις GSSG στο κύτταρο, ώστε να μην μπορεί η αναγωγάση της γλουταθειόνης (glutathione reductase-GR) να τις μετατρέψει σε ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH),

τότε αποβάλλεται από το κύτταρο με τη βοήθεια κάποιων πρωτεϊνών οι οποίες ονομάζονται multidrug resistance associated proteins (MRP)²⁸⁹.

1.5 Τα δίθυρα μαλάκια

Τα μαλάκια είναι μια μεγάλη συνομοταξία ασπόνδυλων ζώων, στην οποία συγκαταλέγονται καλαμάρια, χταπόδια, σουπιές, σαλιγκάρια, πεταλίδες, μύδια, στρείδια, χτένια και πολλά άλλα λιγότερο γνωστά ζώα. Υπολογίζεται πως υπάρχουν περισσότερα από 100.000 είδη. Τα μαλάκια εμφανίζουν διαφορές, όχι μόνο στο μέγεθος και στην ανατομική δομή, αλλά και στη συμπεριφορά τους και στο ενδιαίτημα διαβίωσής τους. Είναι το μεγαλύτερο θαλάσσιο φύλο και αποτελεί περίπου το 23% του συνόλου των γνωστών θαλάσσιων οργανισμών. Πολυάριθμα μαλάκια ζουν επίσης σε γλυκά ή υφάλμυρα νερά.

Τα δίθυρα μαλάκια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ευρεία κλίμακα ως βιοδείκτες θαλάσσιας ρύπανσης διότι παρουσιάζουν ευαισθησία στις αλλαγές των συγκεντρώσεων των ρύπων στο περιβάλλον τους καθώς και αυξημένη δυνατότητα συσσώρευσής τους στους ιστούς τους²⁹⁰⁻²⁹³ με συνέπεια να αποτελούν αντικείμενο πολλών περιβαλλοντικών μελετών. Ως απόκριση του οργανισμού σε ένα ρυπασμένο περιβάλλον μπορούν να ανιχνευτούν διαταραχές/αλλαγές που σχετίζονται με την άμυνα του οργανισμού, γενετοξικές, κυτταροτοξικές και ιστοπαθολογικές επιπτώσεις^{58, 161-163, 294-297}. Έτσι, η καλή γνώση της φυσιολογίας και της συμπεριφοράς τους σε συνδυασμό με την εκτεταμένη μελέτη τους σε κυτταρικό, γενετικό και βιοχημικό επίπεδο, τα καθιστούν κατάλληλα εργαλεία σε μελέτες ρύπανσης περιβάλλοντος^{58, 161-163, 294-297}.

Είδη του γένους *Mytilus* χρησιμοποιούνται ευρέως σε εργαστηριακό επίπεδο, και στο πεδίο (Mussel Watch Programmes) για την εκτίμηση διαφόρων ρυπογόνων παραγόντων σε προγράμματα ελέγχου ρύπανσης²⁹⁸⁻³⁰⁰.

1.5.1 Ανατομία

Μανδύας³⁰¹

Ο μανδύας βρίσκεται στο εσωτερικό των θυρίδων, αμφιπλευρικά και αποτελείται από ένα εσωτερικό και εξωτερικό επιθήλιο, με συνδετικό ιστό που συνδέει τα δύο στρώματα, ο οποίος διασχίζεται από αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και μυς που εξυπηρετούν στη συστολή και διαστολή του μανδύα. Τα δύο μισά του μανδύα συνδέονται με το κέλυφος από την άρθρωση, αλλά είναι ελεύθερα στις άκρες τους. Τα άκρα του μανδύα γενικά χωρίζονται σε τρεις πτυχές (folds): η εξωτερική πτυχή εκκρίνει τις δύο εξωτερικές στρώσεις του κελύφους, η μεσαία πτυχή λειτουργεί ως αισθητήριο και η εσωτερική ελέγχει τις κινήσεις του νερού. Στην οικογένεια *Veneridae* υπάρχουν τέσσερις πτυχές³⁰². Ο μανδύας προστατεύει τα μαλακά μέρη του ζώου, δημιουργώντας μεταξύ αυτών και της σπλαχνικής μάζας μία κοιλότητα. Στην οικογένεια *Veneridae* οι λοβοί του μανδύα είναι ελεύθεροι στην κοιλιακή περιοχή, ακολουθώντας το σχήμα του κελύφους, ενώ στην οπίσθια περιοχή συγκρατούνται, σχηματίζοντας τους δύο σίφωνες του ζώου.

Μυϊκό Σύστημα³⁰¹

Τα δίθυρα διαθέτουν δύο προσαγωγούς μύες, πρόσθιους και οπίσθιους, οι οποίοι συγκρατούν τις θυρίδες στη θέση τους όταν είναι πλήρως ή μερικώς κλειστά. Επίσης διαθέτουν και το «γρήγορο μυ» (quick muscle) ο οποίος αναλαμβάνει να κλείσει τις θυρίδες. Υπάρχει επίσης και ένας άλλος

σύνδεσμος που ονομάζεται resilium και κρατά ανοιχτές τις θυρίδες του οστράκου όταν οι μύες χαλαρώνουν. Ο πόδας στα σκαπτικά δίθυρα (οικογένεια *Veneridae*) είναι ένα καλά αναπτυγμένο όργανο που αποτελείται από νεύρα και μυϊκό ιστό και χρησιμοποιείται για να εισέλθουν μέσα στο υπόστρωμα ενώ στα δίθυρα της οικογένειας *Mytilidae* ως άγκυρα για να κρατά το ζώο στη θέση του. Ο πόδας των ζώων που ανήκουν στην οικογένεια *Mytilidae* είναι βραχύς, φαιόχρωμος με βαθιές αύλακες, στις οποίες υπάρχει ο βυσσογόνος αδένας που εκκρίνει τα νημάτια με τη βοήθεια των οποίων το μύδι παραμένει προσκολλημένο σε στερεό υπόστρωμα (βράχια, πέτρες), σχηματίζοντας μεγάλους πληθυσμούς.

Κυκλοφορικό Σύστημα³⁰¹

Τα δίθυρα έχουν ένα απλό ανοιχτό κυκλοφορικό σύστημα, το οποίο είναι μάλλον δύσκολο να εντοπιστεί. Η καρδιά βρίσκεται στην περικαρδιακή κοιλότητα ή περικάρδιο το οποίο εντοπίζεται στο μέσον της ραχιαίας περιοχής, κοντά στη γραμμή άρθρωσης του κελύφους. Τα μαλάκια δεν διαθέτουν αίμα, αλλά αιμολέμφο (hemolymph). Το κυκλοφορικό σύστημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην ικανότητα σκαψίματος των *Veneridae*.

Βράγχια³⁰¹

Τα βράγχια χρησιμοποιούνται εν μέρει για την αναπνοή και εν μέρει για το φιλτράρισμα των τροφών από το νερό. Όσον αφορά τη δεύτερη λειτουργία, τα βράγχια είναι υπεύθυνα για την επιλογή των σωματιδίων που εισέρχονται μέσω του σίφωνα εισόδου (inhalant siphon). Τα σωματίδια αυτά μεταφέρονται προς τις χειλικές προσακτρίδες (labial palps), όπου επιλέγεται η τροφή κατάλληλου μεγέθους, και στη συνέχεια μεταφέρονται στο στόμα.

Πεπτικό Σύστημα³⁰¹

Αποτελείται από το στόμα, τον οισοφάγο, το στομάχι, τον πεπτικό αδένα, το έντερο και την έδρα-πρωκτό. Η τροφή εισέρχεται στο στόμα, το οποίο ανοίγει εξωτερικά, στο οποίο φτάνει μέσω των χειλικών προσακτρίδων από τα βράγχια. Ένας μικρός οισοφάγος οδηγεί την τροφή από το στόμα στο στομάχι, το οποίο είναι ένας σάκος ακανόνιστου σχήματος και χωρίζεται σε τρία τμήματα: το τμήμα του οισοφάγου, το καρδιακό και το πυλωρικό τμήμα. Το στομάχι περιβάλλεται από τον πεπτικό αδένα, όπου πραγματοποιείται η ενδοκυτταρική πέψη. Ένα άνοιγμα στο στομάχι οδηγεί στο έντερο, το οποίο έχει μια σειρά βρόγχων όπου καταλήγουν στο ορθό και τον πρωκτό.

Νευρικό Σύστημα³⁰¹

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από τρία ζεύγη νευρώνων (εγκεφαλικό, ποδός και σπλαχνικό), που διακλαδώνονται και καταλήγουν σε διαφορετικά μέρη του σώματος.

Απεκκριτικό Σύστημα³⁰¹

Το σύστημα απέκκρισης σχηματίζεται από ένα ή δύο νεφρά, ανάλογα με το είδος, και περικαρδιακούς αδένες. Ωστόσο, η επιφάνεια του σώματος, και κυρίως τα βράγχια, μπορούν επίσης να αποβάλλουν τα προϊόντα απέκκρισης (Bayne et al., 1976). Το νεφρό αποβάλλει τα ούρα στο θάλαμο του μανδύα.

Αναπαραγωγικό Σύστημα³⁰¹

Οι γονάδες σχηματίζουν μία μάζα που περιβάλλει τον εντερικό βρόχο στην σπλαχνική περιοχή. Διαθέτουν ένα ζευγάρι σωλήνων (gonoducts) το οποίο διακλαδίζεται σε διάφορα δευτερεύοντα



κανάλια που καταλήγουν σε ένα δίκτυο θυλακίων ή κυψελίδων τα οποία είναι υπεύθυνα για την απελευθέρωση των γαμετών. Ο γεννητικός αδένας (gonadal follicle) είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό των γαμετών στα αρσενικά (σπερματογένεση) και στα θηλυκά άτομα (δημιουργία ωαρίων), διαθέτοντας μια σειρά διαφορετικών κυττάρων, ανάλογα με την αναπαραγωγική φάση στην οποία βρίσκονται οι οργανισμοί, η οποία τελικά θα οδηγήσει στην παραγωγή των σπερματοζωαρίων και ώριμων ωοκυττάρων.

1.5.2 Το Μεσογειακό μύδι (*Mytilus galloprovincialis*)

Το είδος *Mytilus galloprovincialis* ανήκει στην κατηγορία των δίθυρων μαλακίων και αν και ονομάζεται μεσογειακό μύδι, έχει ευρεία γεωγραφική εξάπλωση αφού ανήκει στους οργανισμούς κατακτητές³⁰³ και συχνά μεταφέρεται σε άλλες περιοχές κυρίως μέσω του νερού έρματος των πλοίων³⁰⁴. Βρίσκεται κυρίως κατά μήκος των ακτών της Μεσογείου³⁰⁵, καθώς και σε περιοχές με μεγάλα λιμάνια στο ίδιο γεωγραφικό μήκος (Δυτικές περιοχές των ΗΠΑ και Ανατολικές περιοχές της Ασιατικής ηπείρου, από την Ιρλανδία ως το Μαρόκο, την Κίνα, την Κορέα, την Χαβάη, το Μεξικό, την Καλιφόρνια, τις ανατολικές ακτές του Καναδά)³⁰³.

Καλλιεργείται σε πολλές χώρες, κυρίως των ακτών της Μεσογείου, αφού είναι εδωδιμο είδος, μπορεί να συλλεχθεί εύκολα και δεν έχει την ικανότητα μετανάστευσης³⁰⁶. Η καλλιέργειά του έχει αρχίσει να εξαπλώνεται και στις ακτές της Μαύρης Θάλασσας, αν και ακόμα είναι περιορισμένη³⁰⁷. Με βάση τα στοιχεία του έτους 2005³⁰⁸ η παγκόσμια παραγωγή μυδιών πλέον είναι περίπου 1.800.000 t, εκ των οποίων περίπου 100.000 t αποτελούν την παραγωγή του μεσογειακού μυδιού *Mytilus galloprovincialis*, και η Ελλάδα παρουσιάζει το 1/5 της ευρωπαϊκής παραγωγής.

Συστηματική κατάταξη του είδους *Mytilus galloprovincialis*

<p>ΒΑΣΙΛΕΙΟ: Animalia ΦΥΛΟ: Mollusca ΚΛΑΣΗ :Bivalvia ΥΠΟΚΛΑΣΗ: Pteriomorphia ΤΑΞΗ: Lamellibranchia ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Mytilidae ΓΕΝΟΣ: <i>Mytilus</i></p>	 <p>Εικόνα 1: Μύδι (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)</p>
<p>ΕΙΔΟΣ: <i>Mytilus galloprovincialis</i></p> <p>Το γένος <i>Mytilus</i> περιλαμβάνει επίσης και άλλα είδη όπως <i>M. edulis</i>, <i>M. trossulus</i>, <i>M. californianus</i>.</p>	 <p>Εικόνα 2: <i>M. galloprovincialis</i> σε σχοινιά, σε υδατοκαλλιέργεια</p>

Τα μύδια είναι ευρύαλοι οργανισμοί, καθώς αντέχουν σε αλατότητες από 5-40‰ και θερμοκρασίες 15-25 °C, αλλά το βέλτιστο εύρος είναι από 20-35‰ για την αλατότητα και θερμοκρασία νερού όχι υψηλότερη από 25 °C³⁰⁹. Είναι προσαρμοσμένοι στους παλιρροιακούς ρυθμούς και συσσωρεύουν

στους ιστούς τους πληθώρα τοξικών ουσιών, σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τις αντίστοιχες του θαλασσινού νερού³¹⁰. Η γνώση της φυσιολογίας και της συμπεριφοράς τους, σε συνδυασμό με την μελέτη τους σε γενετικό και βιοχημικό επίπεδο, δίνει τη δυνατότητα στους ερευνητές να προχωρήσουν σε διαπιστώσεις που σχετίζονται με την κατάσταση του θαλάσσιου οικοσυστήματος, καθώς και τις επιπτώσεις διαφόρων ουσιών/ρύπων στους οργανισμούς^{58, 162, 294, 310, 312}. Εάν συνυπολογιστεί και η οικονομική του αξία, καθώς αποτελεί είδος διατροφής του ανθρώπου, γίνεται κατανοητή η επιλογή και η χρήση του σε εργαστηριακές μελέτες.

Το μύδι τρέφεται φιλτράροντας το νερό με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους του και της θερμοκρασίας του νερού. Έχει βρεθεί ότι ένα μύδι μεγέθους 5 εκατοστών μπορεί να φιλτράρει 5L νερού/ h³¹³. Προσλαμβάνει νερό και στη συνέχεια το φιλτράρει με τη χρήση των βραγχίων. Έτσι απομονώνει τα κατάλληλα μερίδια τροφής διαστάσεων 1-25 μm με τα οποία τρέφεται, αποβάλλοντας τα υπόλοιπα ως ψευδοκόπρανα³¹⁴.

Το μέγεθός του, ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία και την περιοχή διαβίωσης και τείνει να είναι μεγαλύτερο από τα συγγενή είδη του. Το μύδι φτάνει τα 72,84 ± 0,74 mm μήκος σε 18 μήνες στην Μαύρη θάλασσα (Τουρκία), ενώ στην Ιταλία μπορεί να φτάσει σε μήκος 50,00 mm σε περίπου 14,5 μήνες από την εγκατάσταση³¹⁵. Στη Μεσόγειο συνήθως απαντάται από 5 έως 8 εκατοστά. Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία το εμπορεύσιμο μέγεθος των μυδιών *M. galloprovincialis* πρέπει να είναι μεγαλύτερο των 5 cm³¹⁶.

Έχει αμφιπλευρική συμμετρία ζει προσκολλημένο συνήθως στην κατώτερη παλιρροιακή ζώνη και μετακινείται ελάχιστα με τη βοήθεια του πόδα του εντός του οποίου υπάρχει ο βυσογόνοσ αδένας που εκκρίνει τα νημάτια με τη βοήθεια των οποίων το μύδι παραμένει προσκολλημένο σε στερεό υπόστρωμα (βράχια, πέτρες). Η μέση πυκνότητα των πιο πυκνών αποικιών μπορεί να φτάσει και τα 24.000 μύδια/m²³¹⁷. Το όστρακό του είναι σκοτεινόχρωμο ως ανοιχτό υποκόανο και πάνω στις θυρίδες του υπάρχουν παράλληλες εγκάρσιες γραμμές, οι οποίες υποδηλώνουν τη διαδοχική εποχική αύξηση του οστράκου.

Τα μύδια είναι γονοχωριστικά, απελευθερώνουν το γεννητικό υλικό τους στη θάλασσα και η γονιμοποίησή τους πραγματοποιείται εξωτερικά στο υδάτινο περιβάλλον³¹⁸. Ο χρόνος επώασης είναι ανάλογος με τη θερμοκρασία του νερού. Στις υψηλές θερμοκρασίες διαρκεί λιγότερο χρόνο, ενώ στις χαμηλές περισσότερο. Η γονιμότητα και η αναπαραγωγική προσπάθεια (reproductive effort) αυξάνεται με την ηλικία και το μέγεθος, τα ανήλικα μύδια ξοδεύουν την ενέργειά τους στην ταχεία ανάπτυξη παρά στην αναπαραγωγή.

Η θερμοκρασία είναι μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που καθορίζουν την έναρξη της ωοτοκίας. Συνήθως, ο κύκλος αναπαραγωγής αρχίζει το φθινόπωρο και στις αρχές του χειμώνα όταν αναπτύσσονται τα πρώτα ωοκύτταρα και τα ενήλικα θηλυκά επιτυγχάνουν το μέγιστο βάρος τους. Κάθε θηλυκό απελευθερώνει τα αυγά καθ' όλη τη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού που ακολουθεί, με τον Ιούλιο να είναι ο μήνας όπου ολοκληρώνεται. Ένα μόνο θηλυκό (περίπου 70 χιλιοστά) μπορεί να παράγει 7-8 εκατομμύρια αυγά, ενώ ένα μεγαλύτερο άτομο, μπορεί να παράγει ως 40 εκατομμύρια αυγά³¹⁹. Αμέσως μετά την αναπαραγωγική περίοδο το μύδι μπορεί να έχει χάσει έως και το 70% του ιστού του³²⁰. Γι' αυτό όταν τα μύδια βρίσκονται λίγο πριν αλλά και αμέσως μετά την αναπαραγωγική περίοδο, δεν θα πρέπει να συλλέγονται.

Τις περισσότερες φορές είναι δύο οι περίοδοι αναπαραγωγής, μία την άνοιξη και μία το φθινόπωρο³¹⁸. Όμως η αναπαραγωγική απόδοση αλλά και ο χρόνος που θα διαρκέσει η αναπαραγωγική περίοδος επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, την διαθεσιμότητα της τροφής και της εκθέσεις στην παλίρροια και συνεπώς ποικίλει ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή που βρίσκεται όσο και από έτος σε έτος. Έτσι λοιπόν, το είδος *M. galloprovincialis* στις ακτές της Βόρειας Ισπανίας (Ατλαντικός), εμφανίζει τα μέγιστα της ωοτοκίας του την άνοιξη και στις αρχές του καλοκαιριού. Το πρώτο μέγιστο εμφανίζεται μεταξύ Μαρτίου και Απριλίου και το δεύτερο μεταξύ Μαΐου και Ιουνίου^{321, 322}. Στη Βόρεια Αδριατική το μύδι αναπαράγεται όλο το χρόνο. Η έναρξη της ωοτοκίας τοποθετείται μεταξύ Οκτωβρίου-Νοεμβρίου με μέγιστη δραστηριότητα το Δεκέμβριο – Ιανουάριο – Φεβρουάριο³²³. Στη νότια Καλιφόρνια η ωοτοκία του *M. galloprovincialis* εμφανίζεται το Φεβρουάριο, Μάρτιο και Απρίλιο και ξανά το Σεπτέμβριο και τον Οκτώβριο³²⁴.

1.5.3 Γυαλιστερή (*Callista chione*)

Συστηματική κατάταξη του είδους *Callista chione*

<p>ΒΑΣΙΛΕΙΟ: Animalia ΦΥΛΟ: Mollusca ΚΛΑΣΗ: Bivalvia ΥΠΟΚΛΑΣΗ: Heterodonta ΤΑΞΗ: Veneroida ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Veneridae ΓΕΝΟΣ: <i>Callista</i> ΕΙΔΟΣ: <i>Callista chione</i></p>	 <p>Εικόνα 3: Γυαλιστερή (<i>Callista chione</i>)</p>
	 <p>Εικόνα 4: Γυαλιστερή (ο πόδας και ο σίφωνας είναι εμφανή στη φωτογραφία)</p>

Είναι ένα οικονομικά ενδιαφέρον είδος το οποίο συναντάται στις παραλιακές περιοχές της Μεσογείου και του Ατλαντικού Ωκεανού από τις Βόρειες ακτές της Ευρώπης έως τις ακτές του Μαρόκου³²⁵. Στην Ελλάδα περιοχές όπου βρίσκονται γυαλιστερές είναι ο Ευβοϊκός, ο Σαρωνικός και ο Θερμαϊκός κόλπος καθώς και η Κρήτη αλλά και περιοχές του Ιονίου και του Αιγαίου και ο κόλπος της Πάτρας³²⁶. Αλιεύεται επαγγελματικά στις ισπανικές-καταλονικές και γαλλικές ακτές της Μεσογείου, στον κόλπο της Τεργέστης και στην Ελλάδα³²⁶.

Το μήκος της μπορεί να φτάνει και να ξεπεράσει τα 11 εκατοστά, συνήθως όμως εμπορεύεται σε μέγεθος 6-8 εκατοστά. Η Ελληνική Κυβέρνηση έχει θεσπίσει με νόμο ότι απαγορεύεται η αλίευση και εμπορία γυαλιστερής (*Callista chione*) μικρότερης των 4,5 εκατοστών³²⁷

Η γυαλιστερή (*C. chione*) είναι αιωρηματοφάγος οργανισμός (suspension-feeding) και μπορεί να καταναλώσει μεγάλη ποικιλία αιωρούμενων σωματιδίων όπως είναι φύκη, βακτήρια και υπολείμματα οργανικής ύλης (detritus)³²⁶.

Το όστρακό της είναι σκληρό, παχύ, μεγάλο και ωσειδές. Το περίοστρακο είναι λείο και γυαλιστερό με λεπτές συγκεντρικές γραμμές και εμφανή στάδια αύξησης. Το όστρακο της γυαλιστερής αποτελείται από δύο ξεχωριστές θυρίδες. Οι θυρίδες είναι όμοιες και εξωτερικά το χρώμα τους είναι καστανό με κάθετες ανοιχτόχρωμες ραβδώσεις, ενώ εσωτερικά είναι λευκό υποκίτρινο, θαμπό στο μέσον και γυαλιστερό στα άκρα με μεγάλα μυϊκά αποτυπώματα.


Ανήκει στην κατηγορία των σκαπτικών δίθυρων, οπότε ζει εντός του ιζήματος σε αμμώδεις βυθούς με βιογενή θρύμματα στην υποπαραλιακή ζώνη ως και το βάθος των 200 μέτρων. Κινείται εντός του ιζήματος με τη βοήθεια του πόδα της, ο οποίος είναι αρκετά μεγάλος. Καθώς βρίσκεται μέσα στο ιζημα, για να επικοινωνεί με το θαλάσσιο περιβάλλον (ώστε να μπορεί να προσλάβει νερό, σωματίδια τροφής και οξυγόνο) διαθέτει δύο σίφωνες (σίφωνα εισόδου, σίφωνα εξόδου), οι οποίοι φαίνονται σαν δύο μικρές τρύπες στην επιφάνεια του ιζήματος.

Είναι γονοχωριστικό είδος και είναι γεννητικά ώριμη στο 2^ο με 3^ο έτος της ηλικίας της. Η έναρξη ωοτοκίας της τοποθετείται μεταξύ Απριλίου και Μαΐου. Η αναπαραγωγική περίοδος της στο Αιγαίο διαρκεί από την άνοιξη έως συχνά και τέλη φθινοπώρου (πιο σύνηθες είναι να διαρκεί μέχρι αρχές Σεπτεμβρίου)³²⁶ ενώ στον κόλπο της Μάλαγα η απελευθέρωση των γαμετών της πραγματοποιείται από τον Φεβρουάριο έως τον Μάρτιο³²⁸.

Η διάρκεια ζωής της γυαλιστερής είναι αρκετά μεγάλη, καθώς στο Ηνωμένο Βασίλειο έχουν βρεθεί ζώα ηλικίας 40 ετών³²⁹, ενώ στην Ελλάδα, μελέτη της Metaxatos³²⁶ προσδιόρισε την ηλικία των ζώων που συνέλλεξε περίπου στα 17 χρόνια. Ο ρυθμός ανάπτυξης της γυαλιστερής είναι αρκετά μεγάλος τα πρώτα χρόνια της ζωής της και φτάνει στο εμπορεύσιμο μέγεθός της σε ηλικία περίπου 3 με 4 ετών, ενώ μετά το 5^ο έτος της ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται³³⁰.

1.5.4 Κυδώνι (*Venus verrucosa*)

Συστηματική κατάταξη του είδους *Venus verrucosa*

<p>ΒΑΣΙΛΕΙΟ: Animalia ΦΥΛΟ: Mollusca ΚΛΑΣΗ: Bivalvia ΥΠΟΚΛΑΣΗ: Heterodonta ΤΑΞΗ: Veneroida ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Veneridae ΓΕΝΟΣ: <i>Venus</i> ΕΙΔΟΣ: <i>Venus verrucosa</i></p>	 <p>Εικόνα 5: Κυδώνι (<i>Venus verrucosa</i>)</p>
---	---

Το κυδώνι (*Venus verrucosa*) ανήκει στα σκαπτικά δίθυρα μαλάκια. Το μέγεθός τους φθάνει τα 6 εκατοστά. Η Ελληνική Κυβέρνηση έχει θεσπίσει με νόμο ότι απαγορεύεται η αλίευση και εμπορία κυδωνιών (*Venus spp*) μικρότερα των 4 εκατοστών³²⁷.

Τα κυδώνια βρίσκονται σε πολλές παραλίες σε όλο τον κόσμο, ιδίως στη Μεσόγειο³³¹. Ζουν εντός του ιζήματος σε αμμώδεις πυθμένες ή καλυμμένους από κοραλλιογενείς ροδόλιθους ή ανάμεσα σε λιβάδια Ποσειδωνίας (*Posidonia oceanica*) σε βάθη περίπου 30 μέτρων³³². Μετακινούνται με τη

βοήθεια του πόδα τους. Το *V. verrucosa* αποτελεί σημαντικά εκμεταλλεύσιμο είδος από τον άνθρωπο καθώς η αλιεία του κυμαίνεται περίπου στους 4.500 τόνους το χρόνο στις ακτές της Νορμανδίας και της Βρετανίας, 500 τόνους στις ακτές της Αδριατικής και περίπου 500 τόνους στις ελληνικές θάλασσες³³².

Το χρώμα των κυδωνιών είναι σταχτί με μελανές ή πράσινες αποχρώσεις. Τα στρογγυλά όστρακα των κυδωνιών έχουν ιδιαίτερη μορφή: είναι συμμετρικά, και στα περισσότερα γένη έχουν ραβδώσεις. Κάθετα σε αυτές βρίσκονται ημικυκλικές γραμμές αύξησης. Ο μανδύας τους έχει τρία στρώματα για την έξοδο του νερού. Η τροφή τους προσλαμβάνεται με την αναρρόφηση νερού, το οποίο το εκβάλλουν με τη βοήθεια του μανδύα και μένει το πλαγκτόν.

Ο ρυθμός ανάπτυξης του έχει μελετηθεί μόνο στην νότια Αδριατική³³³ και στην Αγγλία^{334, 335} όπου οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι διαφορετικές από τις ελληνικές. Η αναλογία των δύο φύλων είναι συνήθως 1:1 και δεν έχουν βρεθεί ερμαφρόδιτα ζώα.

Η αναπαραγωγή έχει μελετηθεί από τους Valli και Cester³³⁶ και Marano et al.³³⁷. Στην Ελλάδα, η αναπαραγωγή έχει μελετηθεί από τους Galinou-Mitsoudi et al.³¹⁴ σε πληθυσμούς από τον κόλπο της Θεσσαλονίκης και τον Θερμαϊκό. Η περίοδος αναπαραγωγής του κυδωνιού δεν είναι σταθερή σε όλες τις περιοχές της Μεσογείου. Στην Μάλαγα έχει βρεθεί ότι η διάρκεια αναπαραγωγής πραγματοποιείται από τον Μάρτιο έως τον Αύγουστο³³⁸, ενώ στον κόλπο της Τεργέστης (βόρεια Αδριατική) από τον Δεκέμβριο έως τον Σεπτέμβριο³³⁹. Πιο νότια στην Αδριατική διαρκεί από τον Ιούνιο έως τον Οκτώβριο^{337,338}, ενώ στο Αιγαίο από τον Μάιο έως τον Νοέμβριο^{314,332}.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Πειραματική διαδικασία

Τα πειράματα έκθεσης σε βαρέα μέταλλα των οργανισμών σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες πραγματοποιήθηκαν από τον Οκτώβριο 2011 έως τον Ιούνιο 2013 στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Χημείας και Βιοχημικών Διεργασιών του τμήματος Μηχανικών Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος της Σχολής Εφαρμοσμένων Επιστημών με έδρα τα Χανιά του ΤΕΙ Κρήτης.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 4 ενυδρεία των 80L και 8 ενυδρεία των 40 λίτρων (Εικόνα 7δ) που περιείχαν φυσικό θαλασσινό νερό (αλατότητας περίπου 35-37‰ και θερμοκρασίας 16-17 °C με διαλυμένο οξυγόνο 7-8 mg/L) (Η προετοιμασία των ενυδρείων και η συλλογή των οργανισμών παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα, σελίδες 1-3). Σε κάθε ενυδρείο τοποθετήθηκαν 2,5 μύδια ανά λίτρο θαλασσινού νερού ή 1 γυαλιστερή ή 1 κυδώνι ανά λίτρο θαλασσινού νερού και κατανεμήθηκαν οι οργανισμοί του ίδιου είδους σε 5 ομάδες.

Μόλις οι οργανισμοί έφταναν στο εργαστήριο, επιλέγονταν τυχαία 30 από το κάθε είδος και θανατώνονταν. Στα μύδια, για το κάθε ζώο, διαχωρίζονταν τα βράγχια και ο μανδύας από το υπόλοιπο σώμα. Στις γυαλιστερές και τα κυδώνια διαχωρίζονταν 4 διαφορετικοί ιστοί, τα βράγχια, ο μανδύας το πεπτικό σύστημα και το σώμα. Το σώμα περιελάμβανε τον προσαγωγό μυ και τον πόδα, ενώ το πεπτικό σύστημα περιελάμβανε τον πεπτικό σωλήνα, το στομάχι, το έντερο, την καρδιά και το νεφρό. Ο διαχωρισμός των ιστών γινόταν με πλαστική λαβίδα και χειρουργικό νυστέρι με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην επιμολυνθούν τα δείγματα, αλλά ούτε να συμπεριληφθεί τμήμα του ενός ιστού σε κάποιον άλλο. Κάθε ιστός μετά το διαχωρισμό εμβαπτιζόταν σε υπερκάρθο νερό (milli Q) και στεγνωνόταν με διηθητικό χαρτί.

Έτσι, για το κάθε είδος οργανισμού προέκυπταν τρεις δεκάδες από τον κάθε ιστό οι οποίες αναλύονταν ξεχωριστά η κάθε μία ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις υποβάθρου των βαρέων μετάλλων στους ιστούς τους. Το κάθε τρυβλίο που περιείχε τους προς ανάλυση ιστούς φυλασσόταν σε θερμοκρασία -24 °C μέχρι τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων. Οι τιμές των βαρέων μετάλλων την ημέρα αυτή παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο «Αποτελέσματα - Συζήτηση αποτελεσμάτων» ως «Ημέρα 0».

Αφού οι οργανισμοί έμειναν για προσαρμογή στις εργαστηριακές συνθήκες για 5 ημέρες [χρονικό διάστημα αρκετό ώστε να σταθεροποιηθεί η καλλιέργεια και να μην εμφανίζεται θνησιμότητα (<1%)], σε σταθερή θερμοκρασία (16-17°C) και αλατότητα (36±1‰), οι ομάδες 1, 2 3 και 4 εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων (Cd, Ni, Pb) 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,5 mg/L και 20 mg/L. Η ομάδα 5 παρέμεινε καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής έκθεσης ως ομάδα ελέγχου (control). Η προσθήκη των βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό γινόταν από stock πυκνά διαλύματα νιτρικών αλάτων του κάθε μετάλλου 1000 mg/L.

Το πείραμα έκθεσης των οργανισμών στην συγκέντρωση καθενός από τα τρία βαρέα μέταλλα διήρκεσε 20 ημέρες. Κατά τη διάρκεια του 20 ημερου πειράματος έκθεσης, συλλέγονταν τυχαία από κάθε επίπεδο έκθεσης 30 οργανισμοί την 5^η, 10^η, 15^η και 20^η ημέρα έκθεσης και διαχωρίζονταν οι ιστοί τους όπως περιγράφηκε παραπάνω για την «Ημέρα 0», με τη διαφορά ότι κάθε δεκάδα από τους ιστούς χωριζόταν σε δύο τμήματα και το ένα τμήμα φυλασσόταν στους -

24°C μέχρι τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων, ενώ το άλλο φυλασσόταν στους -80°C μέχρι τον προσδιορισμό των βιομαρτύρων. Στο Κεφάλαιο 3 «Αποτελέσματα - Συζήτηση» οι τιμές των βαρέων μετάλλων των ημερών αυτών αναφέρονται ως «Ημέρα 5», «Ημέρα 10», «Ημέρα 15», «Ημέρα 20».

Μετά το τέλος του πειράματος έκθεσης, οι οργανισμοί μεταφέρθηκαν σε ενυδρεία με φυσικό θαλασσινό νερό, στα οποία δεν προστέθηκαν βαρέα μέταλλα, ώστε να ελεγχθεί η απελευθέρωση του μετάλλου από τους ιστούς των οργανισμών (πείραμα αποτοξίνωσης). Το πείραμα αποτοξίνωσης διήρκησε για τα μύδια και τις γυαλιστερές 10 ημέρες, ενώ για τα κυδώνια 30 ημέρες. Δείγμα οργανισμών (για τα μύδια και της γυαλιστερές) πάρθηκε την 10^η ημέρα της αποτοξίνωσης, η οποία ήταν και το τέλος του πειράματος, ενώ για τα κυδώνια πάρθηκε την 10^η, 20^η και 30^η ημέρα αποτοξίνωσης. Η διαδικασία διαχωρισμού των ιστών και αποθήκευσής τους είναι η ίδια όπως παραπάνω. Στο Κεφάλαιο 3 «Αποτελέσματα - Συζήτηση» οι τιμές των βαρέων μετάλλων των ημερών αυτών αναφέρονται ως «Αποτοξίνωση Ημέρα 10», «Αποτοξίνωση Ημέρα 20», «Αποτοξίνωση Ημέρα 30».

Πολλές φορές ημερησίως γινόταν σχολαστικός έλεγχος της θνησιμότητας των οργανισμών κάθε ενυδρείου και απομακρύνονταν τυχόν νεκρά άτομα (νεκροί οργανισμοί παρατηρήθηκαν στα πειράματα έκθεσης σε κάδμιο). Μετά την απομάκρυνση των νεκρών ατόμων, γινόταν αλλαγή του νερού και προσθήκη εκ νέου κατάλληλης ποσότητας μετάλλου. Ελέγχονταν επίσης οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού (δηλ. pH και θερμοκρασία) προκειμένου να βρίσκονται οι οργανισμοί σε ιδανικές και σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος.

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα έκθεσης των οργανισμών είναι υψηλές, θεωρούνται όμως περιβαλλοντικά σχετικές καθώς σε ορυχεία εξόρυξης μετάλλων, σε πετρελαιοκηλίδες, σε λιμάνια και σε περιοχές με ορυκτά συγκεκριμένων τύπων μπορεί να μετρηθούν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, τιμές Ni 600 μg/L έχουν μετρηθεί σε θαλασσινό νερό που περνά μέσα από ορυκτά νικελίου³⁴¹ ενώ τιμές έως 2.500 μg/L έχουν μετρηθεί σε ρυπασμένα γλυκά νερά, ενώ έως 27.200 μg/L έχουν μετρηθεί σε απόβλητα ορυχείου και εργοστασίων εκμετάλλευσης νικελίου³⁴². Πολύ υψηλές τιμές μολύβδου έχουν μετρηθεί σε ιζήματα από διάφορα λιμάνια, όπως της Ταιβάν (ανώτερη τιμή 470 mg/kg)³⁴³, της Ισπανίας (ανώτερη τιμή 516 mg/kg)³⁴⁴, της Νορβηγίας (ανώτερη τιμή 1920 mg/kg)³⁴⁵, του Σίδνευ (ανώτερη τιμή 1050 mg/kg)³⁴⁶ καθώς και του Καναδά (ανώτερη τιμή 1250 mg/kg)³⁴⁷. Κοντά στο Roughkeepsie των ΗΠΑ μετρήθηκαν πολύ υψηλές τιμές καδμίου στα ιζήματα, οι οποίες έφταναν ως και τα 6,9 mg/kg, ενώ στο Oslofjord στο Όσλο, οι τιμές που προσδιορίστηκαν σε κάποια σημεία ήταν ως και 3 φορές υψηλότερες³⁴⁸. Στο λιμάνι Sutton στο Plymouth (UK), οι τιμές του καδμίου κυμάνθηκαν από 1,0-5,0 mg/kg στα ιζήματα που αναλύθηκαν³⁴⁹. Υψηλές τιμές μολύβδου και καδμίου σε νερό των Δαρδανελλίων με τιμές που κυμάνθηκαν από 3,3-4,4 mg/L Pb για το επιφανειακό στρώμα, 3,0-4,5 mg/L για το ενδιάμεσο στρώμα και 3,0-4,1 mg/L για το χαμηλότερο στρώμα³⁵⁰. Οι αντίστοιχες τιμές για το κάδμιο ήταν 2,2-3,4, 2,4-3,0, 2,0-3,0 mg/L³⁵⁰.

Πειράματα σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου (0,5 mg/L) έχουν ξαναγίνει σε θαλάσσιους οργανισμούς χωρίς να παρουσιαστεί θνησιμότητα³⁵¹⁻³⁵³ αλλά όχι στα είδη που επιλέχθηκαν για την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής. Εργαστηριακά πειράματα έκθεσης δίθυρων όπως η *Corbicula fluminea* σε μολύβδο συγκέντρωσης 640 μg/L για 15 ημέρες δεν έδειξαν υπερέκφραση μεταλλοθειονινών³⁵⁴ και επειδή ο σκοπός της μελέτης μας ήταν να εξεταστούν οι αντιδράσεις των

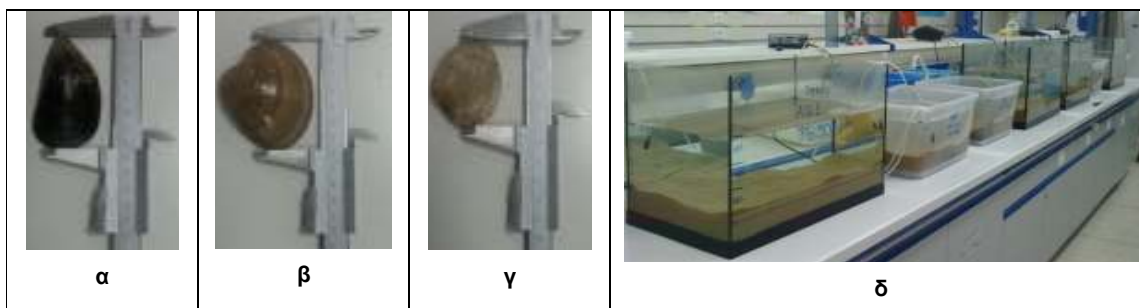
μηχανισμών αποτοξικοποίησης των οργανισμών, κρίναμε σκόπιμο να εκθέσουμε τους οργανισμούς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από εκείνες που έχουν προσδιοριστεί ακόμα και στις πλέον ρυπασμένες θαλάσσιες περιοχές. Δίθυρα όπως η *Crassostrea gigas* έδειξαν υπερέκφραση μεταλλοθειονινών όταν εκτέθηκαν σε 1000 µg/L κάδμιο για 21 ημέρες χωρίς να παρουσιάσουν θνησιμότητα³⁵⁵, ενώ μύδια *Mytilus edulis* που εκτέθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου (200 µg/L), ακόμα και στις ίδιες (1.000 µg/L) δεν έδειξαν κάποια απόκριση στις μεταλλοθειονίνες τους, αλλά δεν παρουσίασαν καμία θνησιμότητα³⁵⁶. Ο οργανισμός *Orchestia gammarellus*, ο οποίος εκτέθηκε σε κάδμιο 31,6 µM (που αντιστοιχεί σε 3.551 µg/L) για 17 ημέρες δεν παρουσίασε ούτε θνησιμότητα, ούτε υπερέκφραση μεταλλοθειονινών³⁵⁷.

Η χρήση λοιπόν τόσο υψηλών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων έγινε γιατί σκοπός μας ήταν να εξεταστούν οι αντιδράσεις των οργανισμών σε υψηλές συγκεντρώσεις ώστε να ελέγξουμε τη θνησιμότητα, την βιοσυσσώρευση και την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των οργανισμών.

Κάθε φορά που συλλέγονταν οργανισμοί από τις μυδοκαλλιέργειες (Νέα Πέραμος, Νεράκι, Αττική) συλλεγόταν και δείγμα νερού σε πλαστικά μπουκάλια προκατεργασμένα με νιτρικό οξύ 2N ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό από την περιοχή ώστε να γνωρίζουμε τις συγκεντρώσεις υποβάθρου. Θαλασσινό νερό που χρησιμοποιούταν για τη διατήρηση των οργανισμών στα ενυδρεία (Κουλούρα ή Αγ. Κυριακή, Χανιά, Κρήτη) συλλεγόταν σε πλαστικά μπουκάλια προκατεργασμένα με νιτρικό οξύ 2N κάθε φορά που ξεκινούσε νέο πείραμα. Δείγμα άμμου (Καλαθάς ή Σταυρός, Χανιά-Κρήτη), η οποία θα χρησιμοποιούνταν στα ενυδρεία με τις γυαλιστερές ή τα κυδώνια, συλλεγόταν κάθε φορά που ξεκινούσε νέο πείραμα ώστε να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων.



Εικόνα 6: Σαρωνικός Κόλπος (μυδοκαλλιέργειες στα σημεία "Βουρκάρι" και "Λουτρόπυργος")



Εικόνα 7: α) *M. galloprovincialis*, β) *C. chione*, γ) *V. verrucosa*, δ) ενυδρεία που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων

2.2 Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό

Μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, τα δείγματα διηθήθηκαν σε προζυγισμένους ηθμούς, διαμέτρου πόρων 0,45 μm για την συγκράτηση των αιωρούμενων σωματιδίων. Για τον προσδιορισμό των διαλυτών ιχνοστοιχείων, τα δείγματα προσυγκεντρώθηκαν με ρητίνη Chelex-100, ώστε οι συγκεντρώσεις τους να φτάσουν σε μετρήσιμα επίπεδα. Αναλυτικότερα οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στα δείγματα του θαλασσινού νερού δίνονται στο Παράρτημα, σελίδες 3-5. Το κάδμιο, το νικέλιο, ο μόλυβδος και ο χαλκός προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φούρνο γραφίτη, με το όργανο Varian SpectraAA-640Z GTA 100, ενώ ο ψευδάργυρος προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φλόγα στο όργανο Varian SpectraAA-200.

2.3 Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στα δείγματα άμμου

Τα δείγματα αφού συλλέχθηκαν, καταψύχθηκαν στους -24 °C, λυοφιλοποιήθηκαν, κοσκινίστηκαν με κόσκινο διαμέτρου οπών 63 μm. Από το πιο λεπτόκοκκο κλάσμα των δειγμάτων έγινε χώνευση με μίγμα πυκνών οξέων (HNO₃-HF-HClO₄) σύμφωνα με την μέθοδο ISO 14869-1:2000. Αναλυτικά οι μεθοδολογία παρατίθεται στο Παράρτημα, σελίδες 5-6. Το κάδμιο, το νικέλιο, ο μόλυβδος και ο χαλκός προσδιορίστηκαν με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φούρνο γραφίτη, με το όργανο Varian SpectraAA-640Z GTA 100.

2.4 Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων σε βιολογικά δείγματα

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν λυοφιλοποιήθηκαν και χωνεύθηκαν με πυκνό HNO₃. Στο προκύπτον χώνευμα προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φούρνο γραφίτη ή φλόγα. Αναλυτικότερα η μεθοδολογία παρατίθεται στο Παράρτημα, σελίδες 6-7. Η ακρίβεια των μεθόδων ελέγχθηκε με την χρήση πρότυπων υλικών αναφοράς (certified reference materials), NIST 2976 (mussel tissue) και IAEA 452 (scallop). Η ανάκτηση για όλα τα μέταλλα ήταν μεταξύ 85 και 107% με πολύ χαμηλή διακύμανση (standard deviation).

Πίνακας 6: Πιστοποιημένη τιμή των μετάλλων Cd, Pb, Ni, Zn, Fe και Cu καθώς και η % ανάκτηση των προτύπων υλικών αναφοράς NIST 2976 (mussel tissue) και IAEA 452 (scallop)

Μέταλλο	IAEA 452 (scallop)		NIST 2976 (mussel)	
	Πιστοποιημένη τιμή (mg/kg)	% Ανάκτηση	Πιστοποιημένη τιμή (mg/kg)	% Ανάκτηση
Cd	29,6	85	0,82	107
Pb	2,31	87	X	X
Ni	2,99	102	X	X
Zn	166	95	137	96
Fe	X	X	171	94
Cu	10,8	86	X	X

2.5 Προσδιορισμός ενώσεων-βιοδεικτών

Η προκατεργασία των ιστών ώστε να προσδιοριστεί η δραστικότητα των ενώσεων-βιοδεικτών παρατίθεται αναλυτικά στο Παράρτημα, σελίδες 7-9.

2.6 Προσδιορισμός δραστικότητας καταλάσης

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της καταλάσης πραγματοποιήθηκε με μέτρηση του ρυθμού κατανάλωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου^{55, 232, 360, 361, 362}.

2.7 Προσδιορισμός δραστικότητας της ακετυλοχολινεστεράσης

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) ήταν συνδυασμός των 359, 363-365 αλλά με τροποποιήσεις και των τεσσάρων δημοσιεύσεων.

2.8 Προσδιορισμός δραστικότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (glutathione reductase-GR) ήταν συνδυασμός των 170, 358, 366, 367 αλλά με τροποποιήσεις των τεσσάρων δημοσιεύσεων.

2.9 Προσδιορισμός δραστικότητας της S μεταφοράσης του γλουταθείου

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της S μεταφοράσης της γλουταθειόνης [Glutathione-S-transferase (GST)] βασίστηκε στην συμπλοκοποίησή της με το 1-χλωρο-2,4 δινιτροβενζόλιο (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB))^{368, 369, 370, 371, 372}.

2.10 Προσδιορισμός επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσής των κυτάρων

Ο προσδιορισμός των επιπέδων υπεροξειδωσής των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε μέσω σχηματισμού θειοβαρβιτουρικών ενώσεων (TBARs), ποσοτικά εκφρασμένες ως ισοδύναμα μηλονικής διαλδεύδης (MDA)^{360, 373, 374, 375, 376, 377}.

2.11 Προσδιορισμός μεταλλοθειονινών

Οι μεταλλοθειονίνες στους ιστούς των οργανισμών προσδιορίστηκαν ποσοτικά (μέθοδος με φωτομέτρηση^{161, 215, 378}) αλλά και ποιοτικά (με ηλεκτροφόρηση σύμφωνα με τις μεθόδους^{161, 215, 378}).

Αναλυτικά όλες οι μέθοδοι προσδιορισμού των βιομαρτύρων δίνονται στο Παράρτημα, σελίδες 9-18.

2.12 Ηλεκτροφόρηση

Οι γενικές αρχές της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης καθώς η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τα δείγματα που ηλεκτροφόρήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζονται στο Παράρτημα και στηρίχτηκαν στις παρακάτω αναφορές: 215, 379, 380, 381, 382, 383, 384.

2.13 Προσδιορισμός ποσότητας πρωτεΐνης

Ο προσδιορισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford³⁹¹ και όχι με τη μέθοδο Lowry³⁸⁶ για λόγους που αναφέρονται από τους^{387, 388, 389}. Η μέθοδος Bradford και τα στάδια που ακολουθήθηκαν περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα της παρούσας Διατριβής, σελίδες 31-33.

2.14 Στατιστική ανάλυση δεδομένων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του λογισμικού SPSS 17.0 Inc. Όλα τα δεδομένα για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων και των βιοδεικτών εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση από 3 ανεξάρτητες μετρήσεις και με τον τρόπο αυτό απεικονίζονται στα ραβδογράμματα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0,05 για όλους τους ελέγχους. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας με το τεστ Kolmogorov-Smirnov για όλες τις ομάδες τιμών καθώς και το τεστ του Levene για έλεγχο της υπόθεσης των ίσων διακυμάνσεων (equality of variances). Στην περίπτωση όπου τα «δείγματα» ήταν δύο και ανεξάρτητα μεταξύ τους, χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος t για ανεξάρτητα «δείγματα» (independent samples t-test).

Για τη σύγκριση των μέσων τιμών περισσότερων από δύο πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διασποράς μίας κατεύθυνσης (one-way analysis of variance, ANOVA). Η ανάλυση διασποράς μπορεί να ελέγξει τη μηδενική αυτή υπόθεση, αλλά για να πραγματοποιηθούν ανά δύο συγκρίσεις μεταξύ των μέσων απαιτείται επιπλέον η εφαρμογή μιας post hoc μεθόδου πολλαπλής σύγκρισης. Εφαρμόστηκαν τα κριτήρια Tukey, LSD, Tamhane και Bonferroni. Στην περίπτωση όπου τα «δείγματα» ήταν δύο και ανεξάρτητα μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκε ο στατιστικός έλεγχος Mann-Whitney U. Στην περίπτωση όπου τα «δείγματα» ήταν περισσότερα από δύο και ανεξάρτητα μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Kolmogorov-Smirnov και Mann Whitney.

Το είδος και το μέγεθος της γραμμικής σχέσης μεταξύ δύο ποσοτικών μεταβλητών που ακολουθούν την κανονική κατανομή εκτιμήθηκε με το συντελεστή συσχέτισης του Pearson (Pearson's coefficient of correlation). Εάν το μέγεθος της μιας μεταβλητής αυξανόταν σύμφωνα με το μέγεθος και της άλλης μεταβλητής, τότε υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών και ο συντελεστής συσχέτισης ήταν >0 . Αντίθετα, εάν το μέγεθος της μιας μεταβλητής τείνει να αυξανόταν ενώ ελαττωνόταν το μέγεθος της άλλης μεταβλητής, τότε υπήρχε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών και ο συντελεστής συσχέτισης ήταν <0 . Ορισμένες πληροφορίες για το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας, τις ποσοτικές μεταβλητές, το Levene test, τις παραμετρικές και μη μεθόδους, τις συσχετίσεις και τα box-plot που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων δίνονται στις σελίδες 33-38 του Παραρτήματος.

Στην παρούσα εργασία, οι συγκρίσεις μεταξύ των ιστών του ίδιου οργανισμού για το ίδιο επίπεδο έκθεσης έγιναν με one way ANOVA και αν προέκυπταν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ιστών ($p < 0,05$), τότε εφαρμόστηκαν οι post hoc μέθοδοι πολλαπλής σύγκρισης με τα κριτήρια Tukey, LSD, Tamhane και Bonferroni. One way ANOVA και κριτήρια post hoc χρησιμοποιήθηκαν και στις συγκρίσεις μεταξύ των οργανισμών για το ίδιο μέταλλο και επίπεδο έκθεσης ή βιοδείκτη. Συγκρίσεις μεταξύ των επιπέδων έκθεσης για το ίδιο μέταλλο στον ίδιο ιστό των οργανισμών πραγματοποιήθηκαν με Kolmogorov-Smirnov και Mann Whitney. Συσχετίσεις των βιοδεικτών μεταξύ τους αλλά και με το εκάστοτε μέταλλο πραγματοποιήθηκαν με το συντελεστή συσχέτισης Pearson. Για κάθε ιστό των οργανισμών που εκτέθηκε στο εκάστοτε επίπεδο έκθεσης μετάλλων η αποτοξίνωση με τις μέρες έκθεσης (μέσος όρος, χωρίς τις μέρες 0) συγκρίθηκαν στατιστικά μεταξύ τους με one sample t-test. Αν το αποτέλεσμα της σύγκρισης ήταν $p < 0,05$ τότε αυτό σημαίνει στατιστική διαφοροποίηση. Διαγράμματα box-plot χρησιμοποιήθηκαν ώστε να αναπαρασταθούν γραφικά οι τιμές του κάθε υπό μελέτη στοιχείου ή βιοδείκτη για κάθε επίπεδο μέτρησης σε κάθε οργανισμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

3.1 Προσδιορισμός συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι τιμές των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό από τους σταθμούς των μυδοκαλλιεργειών τόσο στην περιοχή Νεράκι (S1), όσο και στην περιοχή των Μεγάρων (S2), καθώς και οι τιμές από τους δύο σταθμούς στα Χανιά από τους οποίους συλλεγόταν νερό για τα ενυδρεία (CH1-«Κουλούρα» και CH2 Αγ. Κυριακή). Συνολικά έγιναν 12 δειγματοληψίες από τον 10/2011 έως τον 5/2013. Στον Πίνακα 7 παρατίθενται οι μέσοι όροι από όλες τις δειγματοληψίες.

Πίνακας 7: Βαρέα μέταλλα στο θαλασσινό νερό (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) στους σταθμούς των μυδοκαλλιεργειών (S1-S2) και στη θαλάσσια περιοχή συλλογής νερού για τα πειράματα (CH1-CH2)

ΣΤΑΘΜΟΙ	Pb		Cd		Ni		Cu	
	μg/L	±SD	μg/L	±SD	μg/L	±SD	μg/L	±SD
S1/0	0,174	0,024	0,055	0,007	0,646	0,108	0,844	0,186
S1/2m	0,139	0,040	0,065	0,037	0,884	0,200	1,20	0,247
S2/0	0,083	0,087	0,013	0,005	0,580	0,092	0,563	0,105
S2/2m	0,164	0,039	0,016	0,007	0,710	0,155	0,921	0,216
CH1	0,109	0,003	0,011	0,002	0,208	0,042	0,271	0,011
CH2	0,114	0,006	0,009	0,001	0,267	0,032	0,287	0,013

Και στους δύο σταθμούς του Σαρωνικού κόλπου παρατηρείται ότι μετρήθηκαν υψηλότερες τιμές μετάλλων στο βάθος από ότι στην επιφάνεια. Στατιστική διαφορά επιφάνειας βάθους αποδείχθηκε για το νικέλιο, τον χαλκό και τον μόλυβδο ($p < 0,05$). Οι τιμές όλων των διαλυτών μετάλλων είναι υψηλότερες στον Λουτρόπουργο (σταθμός S1) από ότι στα Μέγαρα (σταθμός S2). Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε ένα ναυάγιο το οποίο βρίσκεται πολύ κοντά στην περιοχή, αλλά και στην κοντινή απόσταση από τα διυλιστήρια της Ελευσίνας και τα νεώρια πλοίων.

Οι τιμές των διαλυτών μετάλλων είναι στατιστικά υψηλότερες ($p < 0,05$), στους σταθμούς του Σαρωνικού κόλπου (S1, S2), από ότι στους σταθμούς των Χανίων (CH1, CH2). Παρά τις ελαφρά χαμηλότερες τιμές των βαρέων μετάλλων στο σταθμό CH1 (Κουλούρα) σε σχέση με τον CH2 (Αγία Κυριακή), οι δυο σταθμοί δεν διαφοροποιούνταν στατιστικά.

Οι τιμές των διαλυτών μετάλλων στις μυδοκαλλιεργείες του Σαρωνικού κόλπου (S1, S2) είναι χαμηλότερες από τιμές που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία για περιοχές μυδοκαλλιεργειών στο Θερμαϊκό και στο Στρυμονικό κόλπο. Τα επίπεδα των διάφορων μετάλλων σε εκείνες τις περιοχές ήταν 0,2-1,9 μg/L για το Pb, 0,1-0,7 για το Cd, από 0,40-9,2 μg/L για το Cu και 4,0-79 μg/L για τον Zn.³⁹³

Τα επίπεδα των διαλυτών μετάλλων στις μυδοκαλλιεργείες του Σαρωνικού παρουσίασαν διαφοροποιήσεις σε σχέση με τιμές από παλαιότερες μελέτες. Συγκεκριμένα για το Pb παρατηρήθηκε μείωση σε σχέση με τα παλιότερα επίπεδα (0,33-0,42 μg/L)³⁹². Σημαντική μείωση

παρουσίασε και ο Ζη σε σχέση με επίπεδα του 2006 στην ίδια περιοχή (1,05-2,8 $\mu\text{g/L}$ ³⁹⁴) και με επίπεδα του 2005 σε άλλα σημεία της Ελευσίνας και στην Ψυτάλεια (2,9 - 5,7 $\mu\text{g/L}$ ³⁹²). Οι τιμές του διαλυτού νικελίου των σταθμών S1 και S2 είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές της Ψυτάλλειας αλλά χαμηλότερες από της Ελευσίνας, όπως προσδιορίστηκαν από την Γιαννοπούλου το 2006, είναι όμως χαμηλότερες από άλλες παράκτιες περιοχές, όπως τα Ίσθμια-Κεχρίδες³⁹⁷. Οι τιμές του διαλυτού χαλκού του σταθμού S1 (Νεράκι-Λουτρόπυργος) που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία είναι παρόμοιες-ελαφρά χαμηλότερες από αντίστοιχες τιμές παλαιότερων ετών στην ίδια περιοχή που κυμαίνονταν από 0,53-1,72 $\mu\text{g/L}$ ^{394, 395} αλλά υψηλότερες από συγκεντρώσεις στην Ελευσίνα την Ψυτάλεια σε πιο βαθιά νερά³⁹². Τέλος οι τιμές του καδμίου στην παρούσα εργασία είναι υψηλότερες από αντίστοιχες τιμές παλαιότερων ετών στην ίδια περιοχή (από 14-20 ng/L ^{394, 395}) καθώς και από τιμές για την Ελευσίνας και την Ψυτάλεια³⁹².

Στα υδατικά δείγματα συγκρίθηκαν οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων με τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί από την U.S. E.P.A. για οξεία (Criterion Maximum Concentration-CMC) και χρόνια τοξικότητα (Criterion Continuous Concentration) σε υδρόβιους οργανισμούς⁶⁷. Σύμφωνα με τις τιμές που έχει θέσει η U.S. E.P.A, οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν σε όλα τα μέταλλα στην παρούσα εργασία είναι πολύ χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις που έχει θέσει και για τα δύο είδη τοξικότητας.

3.2 Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στα σωματίδια

Οι τιμές για τον σωματιδιακό μόλυβδο (κατ' όγκο έκφραση) κυμάνθηκαν από 0,156 έως 0,164 $\mu\text{g/L}$ για την επιφάνεια του σταθμού S1, από 0,077 έως 0,084 $\mu\text{g/L}$ για το βάθος του, ενώ για τον S2 οι αντίστοιχες τιμές ήταν: 0,041-0,046 $\mu\text{g/L}$ και 0,097-0,102 $\mu\text{g/L}$. Για την Κουλούρα οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,045 έως 0,053 $\mu\text{g/L}$, ενώ για την Αγία Κυριακή από 0,061 έως 0,079 $\mu\text{g/L}$. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι για τον σωματιδιακό μόλυβδο η επιφάνεια του κάθε σταθμού ήταν διαφορετική από το βάθος του ($p < 0,05$). Οι τιμές για το σωματιδιακό κάδμιο, ψευδάργυρο και νικέλιο ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης σε όλους τους σταθμούς δειγματοληψίας.

Οι τιμές για τον σωματιδιακό χαλκό ήταν για την επιφάνεια του σταθμού S1 $0,141 \pm 0,039 \mu\text{g/L}$, για το βάθος του σταθμού $0,171 \pm 0,043 \mu\text{g/L}$, ενώ για τον σταθμό S2 οι τιμές ήταν $0,151 \pm 0,031 \mu\text{g/L}$ και $0,145 \pm 0,039 \mu\text{g/L}$ για την επιφάνεια και το βάθος αντίστοιχα. Στατιστική διαφορά ανάμεσα στην επιφάνεια και το βάθος του κάθε σταθμού δεν παρατηρήθηκε (one way ANOVA, $p > 0,05$), ούτε και ανάμεσα στους δύο σταθμούς ($p > 0,05$). Στους σταθμούς των Χανίων οι τιμές του σωματιδιακού χαλκού ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης σε όλες τις δειγματοληψίες.

3.3 Προσδιορισμός συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στο ίζημα

Επειδή οι γυαλιστερές (*C. chione*) και τα κυδώνια (*V. verrucosa*) τοποθετήθηκαν σε στρώμα άμμου από δύο παραλίες του νομού Χανίων, κρίθηκε αναγκαίο να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις υποβάθρου των βαρέων μετάλλων. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων πραγματοποιήθηκε στο κλάσμα $< 1\text{mm}$.

Οι συγκεντρώσεις του ολικού μολύβδου, καδμίου και ψευδαργύρου σε όλα τα ιζήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Η μέση τιμή του ολικού νικελίου ήταν 1,44 mg/kg για τα δείγματα του Καλαθά και 0,99 mg/kg για τα δείγματα του Σταυρού,

ενώ η μέση τιμή του ολικού χαλκού ήταν 0,42 mg/kg για τον Καλαθά και 0,30 mg/kg για τον Σταυρό, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τον ολικό σίδηρο ήταν 0,93 mg/kg και 0,78 mg/kg. Στατιστική διαφορά ανάμεσα στις τιμές του κάθε μετάλλου για τους δύο σταθμούς βρέθηκε μόνο για το ολικό νικέλιο ($p < 0,05$). Οι τιμές των μετάλλων που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία ήταν πολύ χαμηλότερες από αντίστοιχες τιμές άλλων περιοχών (Σαρωνικός, Λουτρόπυργος, Ίσθμια-Κεχριές)^{392, 394, 397}.

Οι περιεκτικότητες ολικών μετάλλων στα ιζήματα από τα Χανιά συγκρίθηκαν με τα κριτήρια ποιότητας ιζημάτων ERL (Effects Range-Low) και ERM (Effects Range Median). Συγκεντρώσεις που βρίσκονται κάτω από το ERL αντιπροσωπεύουν εύρος όπου σπάνια παρατηρούνται βιολογικές επιπτώσεις, για έκθεση σε συγκεντρώσεις ανάμεσα στο ERL και ERM προκαλούνται περιστασιακά βιολογικές επιπτώσεις, ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από το ERM παρατηρούνται συχνά βιολογικές επιπτώσεις³⁹⁸. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι περιεκτικότητες ολικών μετάλλων της περιοχής μελέτης ήταν μικρότερες τόσο από το ERL όσο και από το ERM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΜΟΛΥΒΔΟ

4.1 Έκθεση *Mytilus galloprovincialis* σε μόλυβδο

4.1.1 Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα μολύβδου στο θαλασσίνο νερό

Όταν οι οργανισμοί έφτασαν στο εργαστήριο, συλλέχθηκαν τυχαία τριάντα (πληθυσμός αναφοράς) και μετά από διαχωρισμό των ιστών, λυοφιλοποίηση και χώνευση έγινε μέτρηση Pb. Τα επίπεδα Pb που προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις μολύβδου στους ιστούς των *Mytilus galloprovincialis*

<i>M.galloprovincialis</i>	Pb (μg/g d.w.)	Pb (μg/g w.w.)
ΒΡΑΓΧΙΑ	9,7	4,7
ΜΑΝΔΥΑΣ	1,3	0,54
ΣΩΜΑ	1,5	0,68
ΟΛΙΚΟ ΖΩΟ	4,5	1,1
Όρια με βάση τη νομοθεσία ⁶⁸		
ΟΛΙΚΟ ΖΩΟ	-	1,5

Σύμφωνα με την νομοθεσία⁶⁸, η συγκέντρωση του μολύβδου στα μύδια που συλλέχθηκαν από τον Σαρωνικό κόλπο ήταν κάτω από τα επιτρεπτά όρια για την ανθρώπινη κατανάλωση. Οι συγκεντρώσεις του μολύβδου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς δεν παρουσίασαν αξιόλογες μεταβολές κατά τη διάρκεια του πειράματος και κυμάνθηκαν για τα βράγχια στα $8,2 \pm 1,1$ μg/g d.w., για το μανδύα στα $0,9 \pm 0,15$ μg/g d.w. και για το σώμα στα $1,0 \pm 0,05$ μg/g d.w. Από στατιστική σύγκριση προέκυψε ότι τα βράγχια είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα Pb σε σχέση με τους δύο άλλους ιστούς, οι οποίοι δεν διέφεραν μεταξύ τους.

Από το Σχήμα 6 όπου φαίνονται οι συγκεντρώσεις μολύβδου των ιστών των μυδιών μετά την έκθεσή τους σε μόλυβδο, είναι εμφανές ότι παρά τις όποιες αυξομειώσεις παρατηρήθηκαν, παράταση της έκθεσης των οργανισμών σε μόλυβδο, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση τις συγκεντρώσεις στους ιστούς τους. Για κάθε επίπεδο έκθεσης, τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις [ήταν το «όργανο-στόχος» (target-organ) για τον μόλυβδο στα μύδια], ενώ ο μανδύας είχε τις χαμηλότερες. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων για κάθε επίπεδο έκθεσης έδειξε ότι ισχύει η τάση: βράγχια > σώμα ≥ μανδύας.

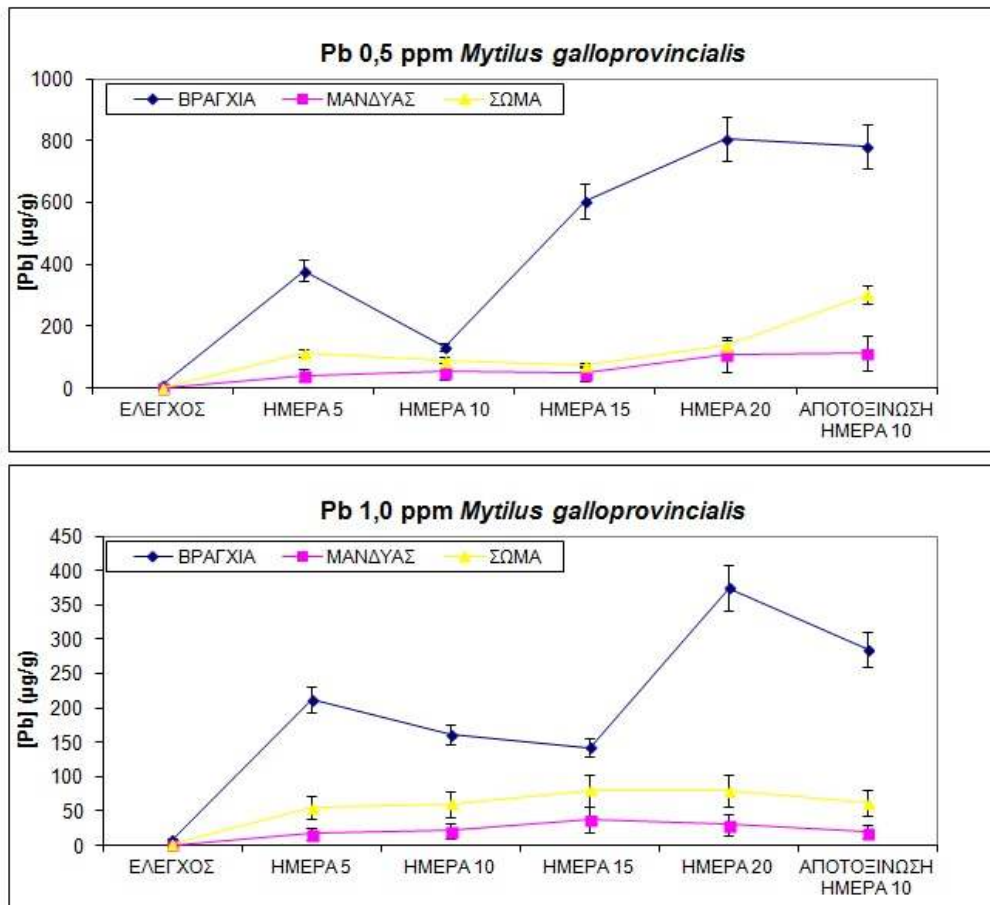
Ως προς το χρόνο μέγιστης βιοσυγκέντρωσης μετάλλου, για τα βράγχια προσδιορίστηκε πάντοτε την 20η ημέρα έκθεσης και το ίδιο ίσχυε σε γενικές γραμμές και για τους δύο άλλους ιστούς. Η συγκέντρωση μολύβδου την 20^η ημέρα έκθεσης σε σχέση με την ημέρα άφιξης ήταν κατά 83-39-246-1.192 φορές μεγαλύτερη στα τα βράγχια, κατά 83-23-251-812 φορές για το μανδύα και κατά 91-52-316-936 φορές για το σώμα για τα επίπεδα έκθεσης 0,5-1,0-2,5 και 20 ppm Pb, αντίστοιχα. Γενικά βρέθηκε γραμμική θετική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων μολύβδου στον κάθε ιστό και τις ημέρες έκθεσης για κάθε επίπεδο έκθεσης.

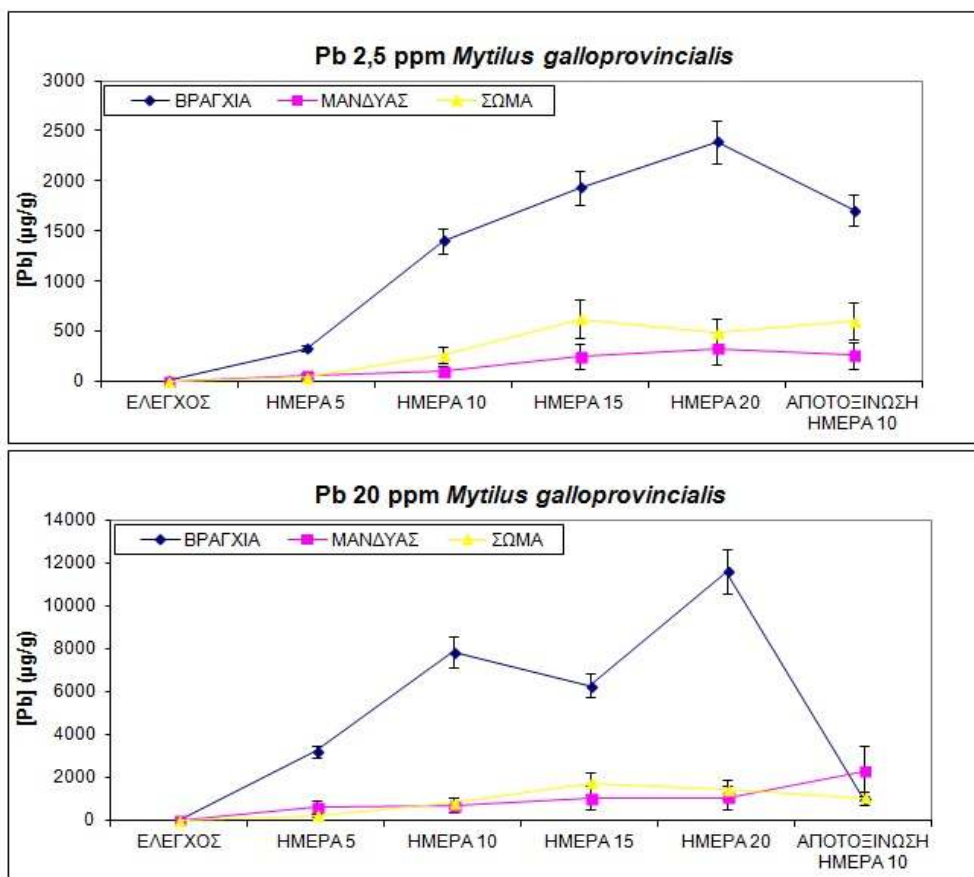
Στατιστική σύγκριση των συγκεντρώσεων Pb σε κάθε ιστό, με τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς απέδειξε την προφανή διαφορά καθώς η αύξηση του μολύβδου κατά την έκθεση

κυμάνθηκε από 2200% έως και 119.000%. Για τους εκτεθειμένους πληθυσμούς προέκυψε ότι ο συσσωρευμένος Pb (μέσοι όροι και διάμεσες τιμές των 20 ημερών έκθεσης) ήταν στατιστικά μικρότερος σε κάθε επίπεδο έκθεσης σε σχέση με το αμέσως υψηλότερο, με εξαίρεση τα βράγχια και το σώμα των ζώων που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1 ppm, όπου τα επίπεδα συσσωρευμένου Pb στους ιστούς εκείνων που εκτέθηκαν σε 1,0 mg Pb /L ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα για έκθεση σε 0,5 mg Pb /L (Σχήμα 7). Αυτό έχει παρατηρηθεί και από τους Attig et al. 2014⁵⁵ σε μύδια του ίδιου είδους που είχαν εκτεθεί σε διαφορετικές συγκεντρώσεις νικελίου.

Κατά την αποτοξίνωση (10ήμερο μεταφοράς των οργανισμών σε καθαρό θαλασσινό νερό), παρατηρήθηκε γενικά μικρή μείωση στα επίπεδα Pb στους ιστούς των οργανισμών, χωρίς να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα. Η μείωση αυτή είναι πολύ μεγάλη στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg Pb/L ($p < 0,05$). Τάση μείωσης δεν παρατηρήθηκε στο μανδύα και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Pb καθώς και στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 και 20 mg Pb/L, κάτι που ίσως συμβαίνει λόγω μεταφοράς του μετάλλου από τον έναν ιστό στον άλλο (translocation), κυρίως από τα βράγχια, όπου παρατηρήθηκαν και οι μεγαλύτερες μειώσεις (οι οποίες έφτασαν το 91% στην περίπτωση των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg Pb/L).

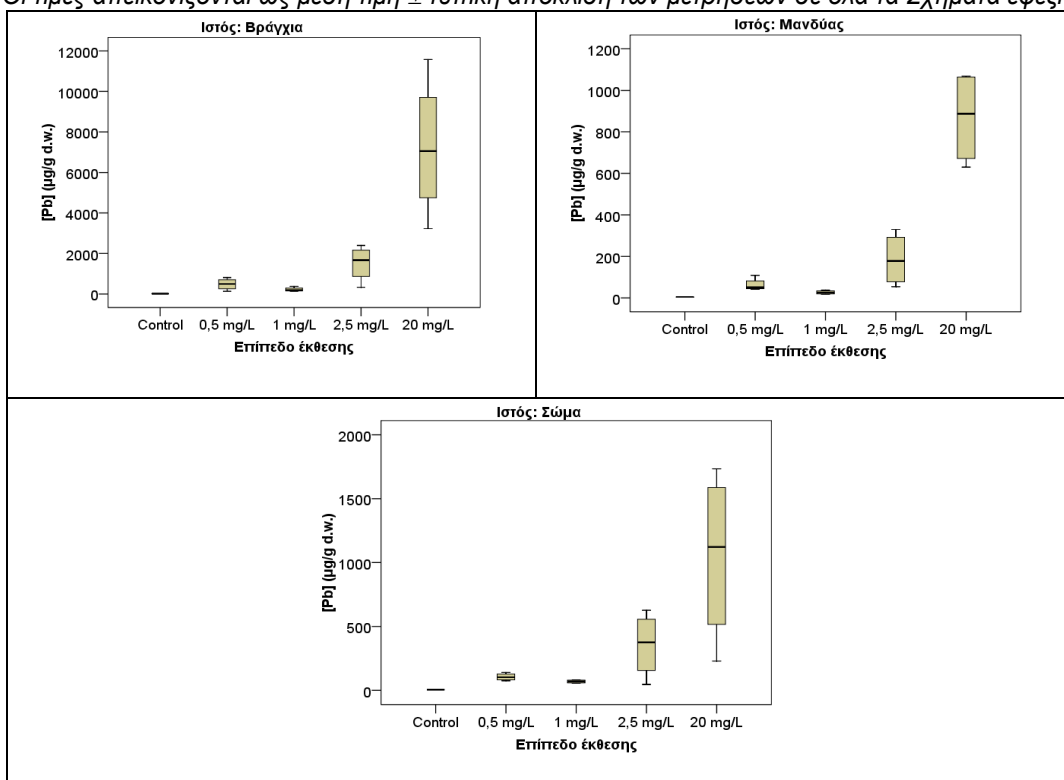
Αξιοσημείωτο είναι ότι παρά τις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου που μετρήθηκαν στους ιστούς των οργανισμών (και κυρίως στα βράγχια την 20η ημέρα έκθεσης), δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι, παρά κάποιοι ελάχιστοι (<2%) στην αρχή του πειράματος.





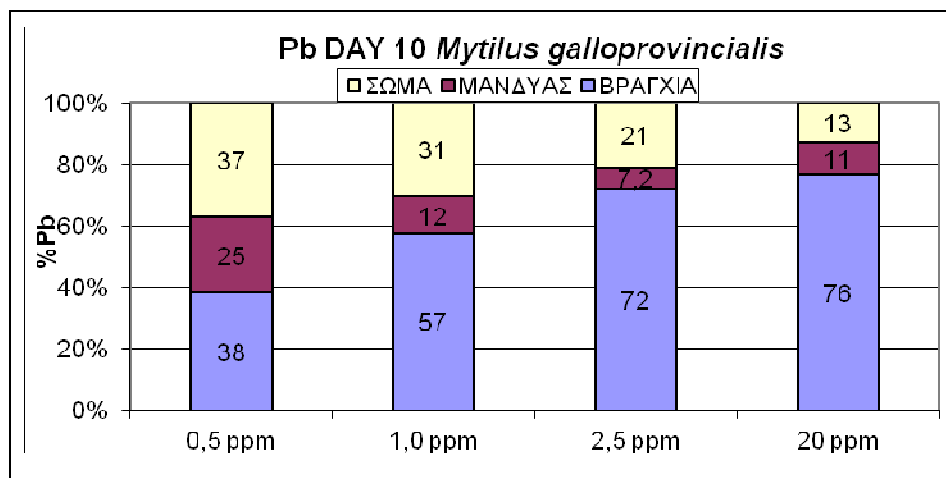
Σχήμα 6: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του μολύβδου (µg/g d.w.) στους ιστούς των μυδιών

Σημ.: Οι τιμές απεικονίζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση των μετρήσεων σε όλα τα Σχήματα εφεξής



Σχήμα 7: Box-plots των συγκεντρώσεων του μολύβδου (µg/g d.w.) στους ιστούς των μυδιών

Τα βράγχια, αν και αποτελούν το μικρότερο ποσοστό της συνολικής μάζας του ζώου, είχαν πολύ υψηλές περιεκτικότητες σε μόλυβδο. Γενικά, για την ίδια ημέρα έκθεσης, όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, αυξανόταν και το ποσοστό περιεκτικότητας μολύβδου στα βράγχια ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στο μανδύα και το σώμα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.



Σχήμα 8: Ποσοστιαία κατανομή μολύβδου στους ιστούς των μυδιών την 10η ημέρα έκθεσης σε Pb

4.1.2 Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 9 με την πάροδο των ημερών η συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεϋδης (MDA) (εκφρασμένη ως nmol MDA/ g w.w.) παρουσίασε μείωση στα βράγχια και το μανδύα του πληθυσμού αναφοράς. Στο σώμα, τα επίπεδα MDA παρέμειναν αμετάβλητα. Στα βράγχια των οργανισμών είχε προσδιοριστεί η υψηλότερη συγκέντρωση μολύβδου και προσδιορίστηκε και η υψηλότερη συγκέντρωση MDA, άρα είναι ο ιστός που έχει υποστεί την σημαντικότερη οξειδωτική βλάβη, κάτι που αποτελεί ένδειξη συσχέτισης της συγκέντρωσης του μετάλλου με την οξειδωτική βλάβη την οποία προκαλεί.

Πίνακας 9: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA (nmol MDA/g w.w.) για τον πληθυσμό αναφοράς

Control (nmol MDA/ g w.w.)	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10
Βράγχια	4215	4018	4015	4012	4005
Μανδύας	3235	3201	3175	3035	3004
Σώμα	1139	1139	1139	1139	1139

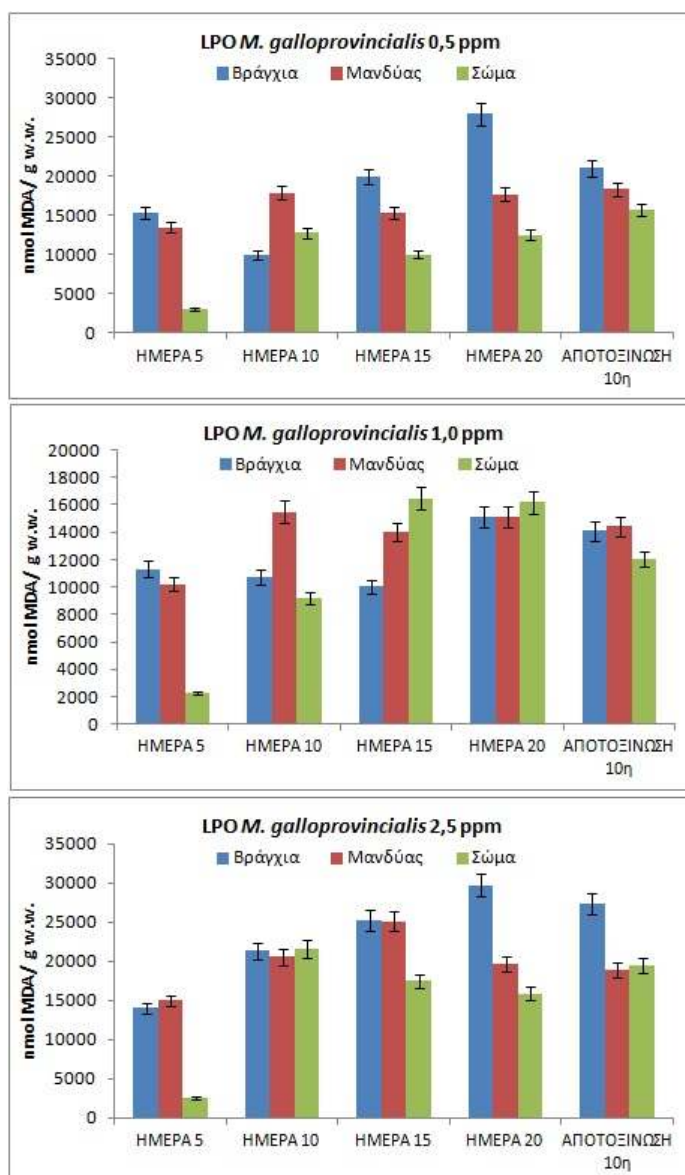
Σημείωση: ο συντελεστής διακύμανσης(%RSD) κυμάνθηκε από 2,6-9,3%

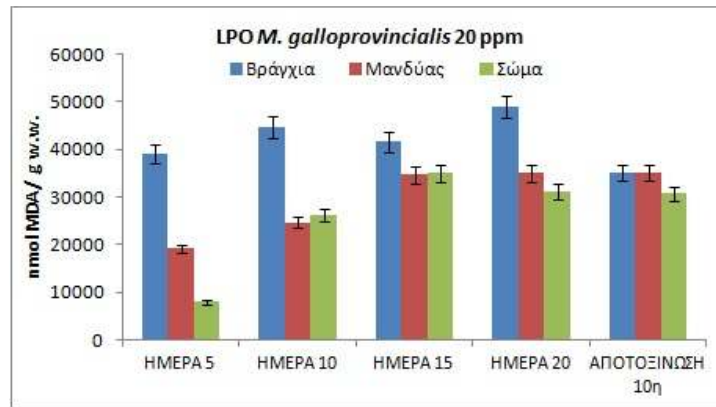
Οι τιμές MDA στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε Pb ήταν πολύ υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς (οργανισμοί που δεν εκτέθηκαν σε μόλυβδο). Παρατηρήθηκε επίσης πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκαλεί αύξηση των τιμών της MDA (Σχήμα 10). Εξαιρέση αποτελούν οι τιμές της MDA στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg Pb/L, οι οποίες ήταν χαμηλότερες από από τις αντίστοιχες του προηγούμενου επιπέδου έκθεσης, κάτι που παρατηρήθηκε και στη συγκέντρωση του μολύβδου. Όπως είναι εμφανές από το Σχήμα 10α, η μέγιστη διάμεση τιμή MDA παρατηρήθηκε στους ιστούς των οργανισμών που

εκτέθηκαν σε 20 mg Pb/L και για τους τρεις ιστούς. Η έκθεση σε αυτό το επίπεδο προκάλεσε τη μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη.

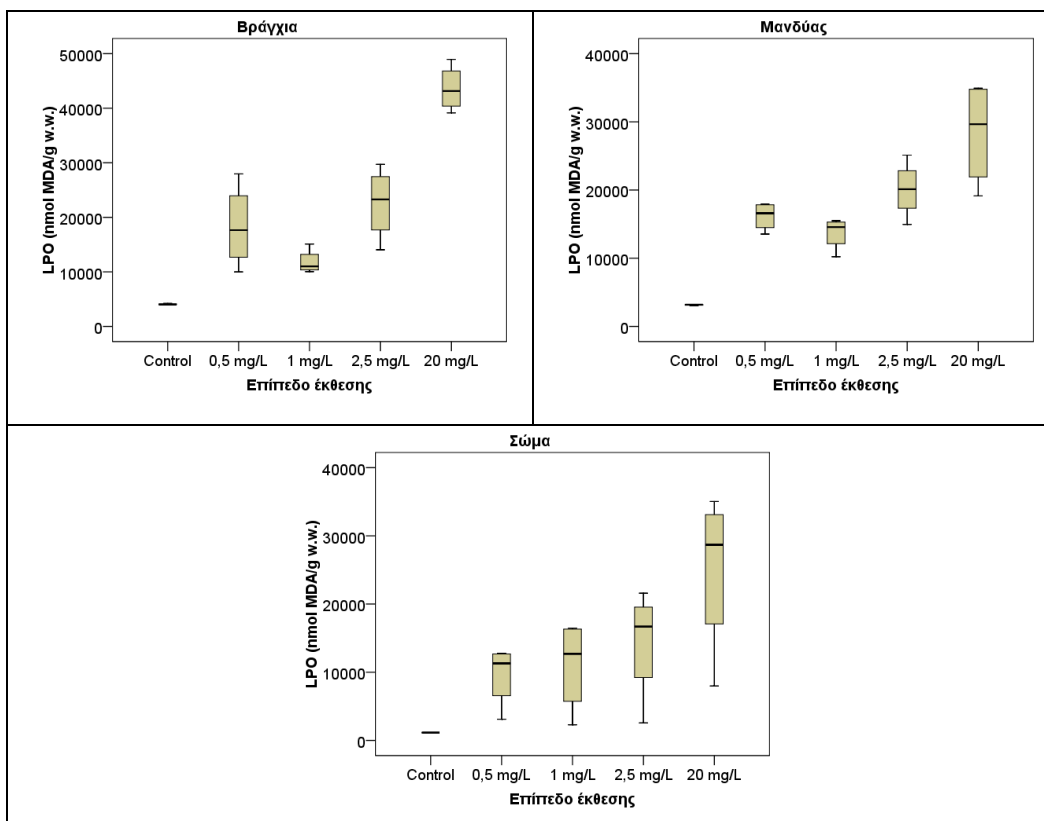
Από τους τρεις ιστούς, οι υψηλότερες τιμές MDA προσδιορίστηκαν στα βράγχια, αλλά μόνο για τα επίπεδα έκθεσης 0,5 και 20 mg Pb/L. Στα υπόλοιπα επίπεδα έκθεσης δεν μετρήθηκε συστηματικά υψηλότερη MDA επιλεκτικά σε κάποιον ιστό. Γενικά η λιπιδική υπεροξειδωση φαίνεται να ακολουθεί την τάση του μολύβδου στους ιστούς των οργανισμών για κάθε επίπεδο έκθεσης. Αυτό αποδεικνύεται από τη θετική συσχέτιση των τιμών του μολύβδου με τις τιμές της MDA ιδιαίτερα για τα βράγχια των μυδιών σε κάθε επίπεδο έκθεσης.

Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης, τα επίπεδα MDA γενικά μειώθηκαν σε όλους τους ιστούς των οργανισμών και όλα τα επίπεδα έκθεσης, εκτός από το σώμα εκείνων που εκτέθηκαν σε 0,5 και 2,5 ppm Pb και το μανδύα των πρώτων, κάτι που πιθανά σχετίζεται με την ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης μολύβδου εκείνη την περίοδο και στους δύο ιστούς. Ιδιαίτερη μείωση παρατηρήθηκε στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb καθώς η MDA μειώθηκε στατιστικά σημαντικά, κατά 28% σε σχέση με την 20η ημέρα έκθεσης.





Σχήμα 9: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 10: Box-plots των επιπέδων μηνιακής διαδεύδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.1.3 Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 10 για τον πληθυσμό αναφοράς, με την πάροδο των ημερών η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης (εκφρασμένη ως nmol/min /g w.w.) παρέμεινε σχεδόν σταθερή και η τάση ήταν: μανδύας> βράγγια≥ σώμα.

Πίνακας 10: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/g w.w.) στους ιστούς των μυδιών αναφοράς

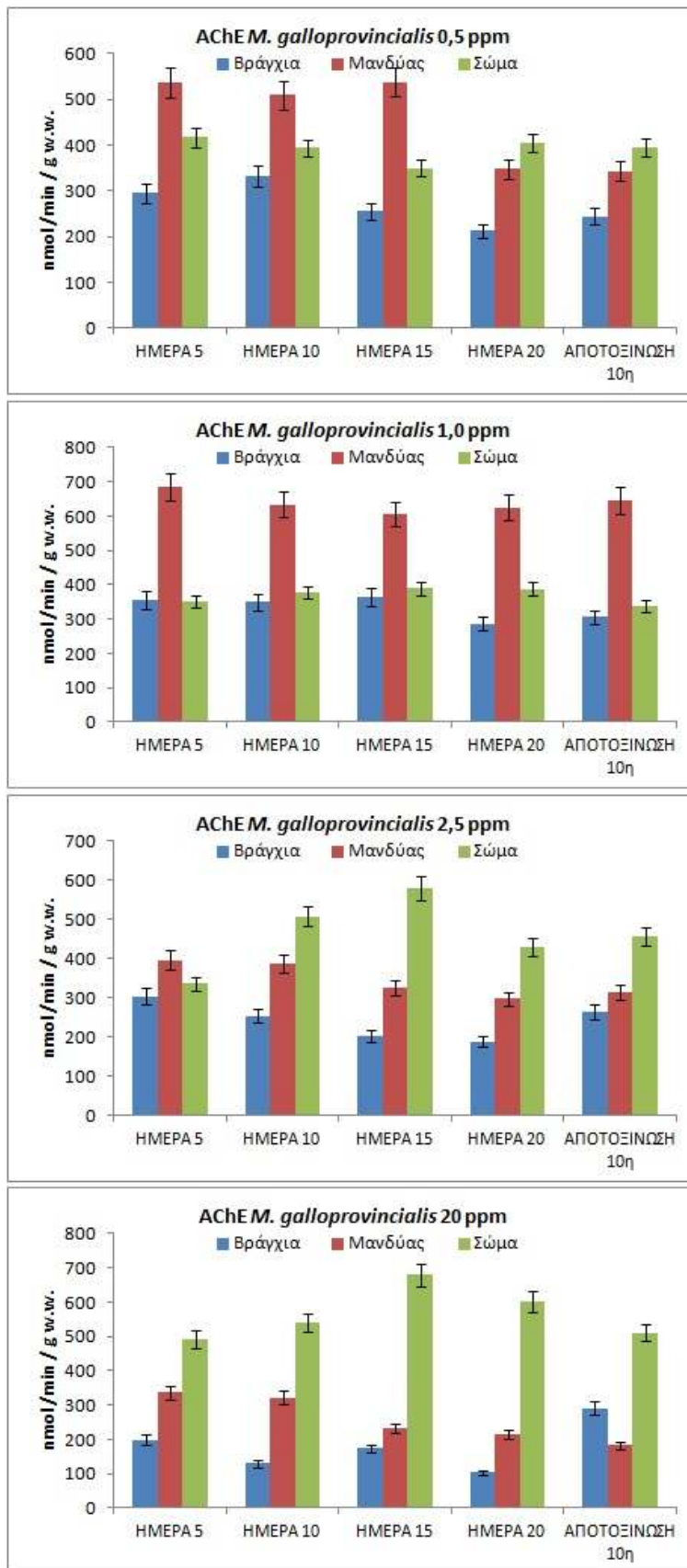
	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10
Βράγχια	184	193	199	201	200
Μανδύας	735	730	731	731	712
Σώμα	168	170	172	175	173

Έπειτα από στατιστική σύγκριση των τιμών του ενζύμου ανάμεσα στους τρεις ιστούς για τα δύο πρώτα επίπεδα έκθεσης προέκυψε η εξής τάση: μανδύας \geq σώμα > βράγχια, ενώ για τα δύο υψηλότερα επίπεδα: σώμα > μανδύας > βράγχια.

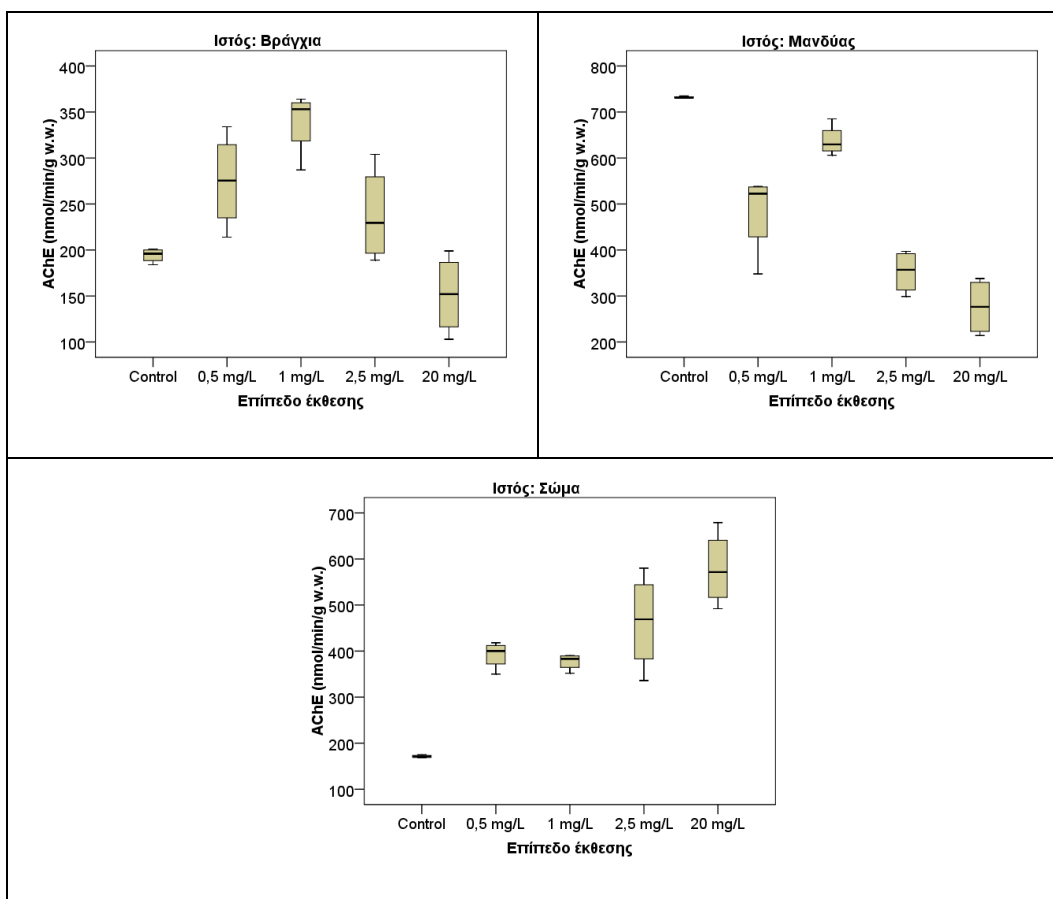
Η τάση της AChE με το χρόνο έκθεσης δεν ήταν συγκεκριμένη (Σχήμα 11). Γενικά όμως παρατηρήθηκε ότι ανεξάρτητα με το επίπεδο έκθεσης, ελάχιστη τιμή για τα βράγχια και το μανδύα προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα του πειράματος, ενώ για το σώμα, την 5^η. Γενικά, η έκθεση των οργανισμών σε ρύπους μπορεί να προκαλέσει μείωση των επιπέδων του ενζύμου στους ιστούς των οργανισμών, κάτι που αποτελεί ένδειξη νευροτοξικότητας^{236-238,241,242}. Από το Σχήμα 12 για τα βράγχια, φαίνεται ότι η δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης για τα τρία πρώτα επίπεδα έκθεσης είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς. Για τα δύο πρώτα επίπεδα έκθεσης, η AChE αυξήθηκε ανάλογα με την συγκέντρωση μολύβδου στον ιστό (χαμηλότερη συγκέντρωση μετάλλου στον ιστό οδήγησε σε μεγαλύτερη ενεργοποίηση της AChE), γι' αυτό και παρατηρήθηκε στο επίπεδο έκθεσης 1,0 ppm που είχαν προσδιορισθεί οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις μολύβδου, να προσδιορίζεται η υψηλότερη δραστικότητα της AChE. Στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm, η AChE με την πάροδο των ημερών μειωνόταν. Στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm μολύβδου η διάμεση τιμή ήταν αρκετά χαμηλότερη από εκείνη του πληθυσμού αναφοράς, κάτι που δείχνει την πιθανή νευροτοξικότητα του μετάλλου στον ιστό αυτών των οργανισμών.

Από το Σχήμα 12 για το μανδύα, φαίνεται ότι αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου προκάλεσε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου, κάτι που πιθανά υποδηλώνει τη νευροτοξικότητα του μετάλλου. Για το σώμα των οργανισμών (Σχήμα 12) φαίνεται πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μολύβδου στον ιστό, αυξάνεται και η ακετυλοχολινεστεράση, κάτι που δεν έχει ξαναβρεθεί στη βιβλιογραφία. Γενικά η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης φαίνεται να έχει τάση αντίστροφη από εκείνη του μολύβδου στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών, ενώ στο σώμα παρόμοια. Για τους εκτεθειμένους οργανισμούς προέκυψε ότι οι τιμές του ενζύμου για τους τρεις ιστούς των ζώων που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1 ppm μολύβδου ήταν στατιστικά διαφορετικές από τις τιμές των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm, αλλά όχι μεταξύ τους.

Κατά την αποτοξίνωση (Σχήμα 11) η δραστικότητα της ακετυλοχολινεστεράσης αυξήθηκε ελαφρά σε όλους τους ιστούς, εκτός από το σώμα των οργανισμών, όπου η ενεργότητα του ενζύμου μειώθηκε.



Σχήμα 11: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) με στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 12: Βox-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) σε ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

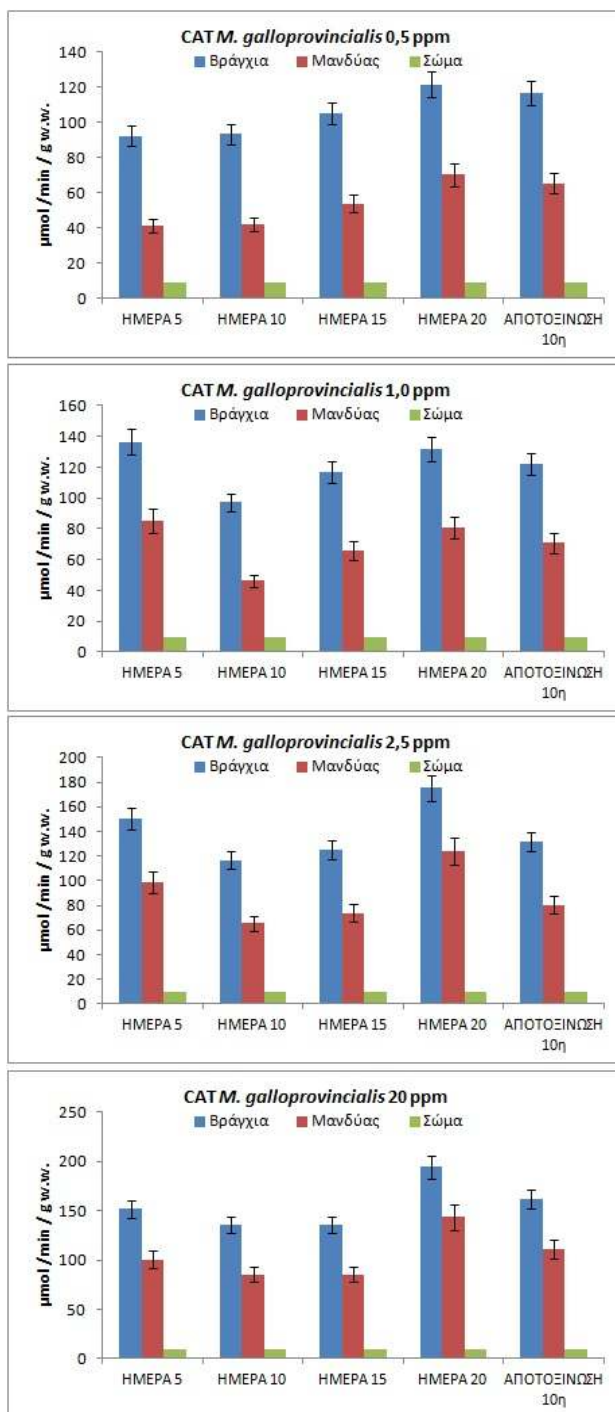
4.1.4 Καταλάση σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Για τον πληθυσμό αναφοράς η ενεργότητα της καταλάσης (εκφρασμένη ως $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) ήταν σχεδόν σταθερή στους ιστούς των οργανισμών. Στα βράγχια η ενεργότητα ήταν 56-57, στο μανδύα 16-18 και στο σώμα 19-20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$ Η καταλάση είναι αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο διασπά το H_2O_2 που παράγεται στα κύτταρα ώστε να μην προκαλέσει οξειδωτικές βλάβες σε αυτά. Το γεγονός ότι στα βράγχια προσδιορίζεται η μέγιστη ενεργότητα καταλάσης ίσως είναι ένδειξη της προσπάθειας των οργανισμών να ανταπεξέλθουν στη πίεση από τις αυξημένες τιμές μόλυβδου.

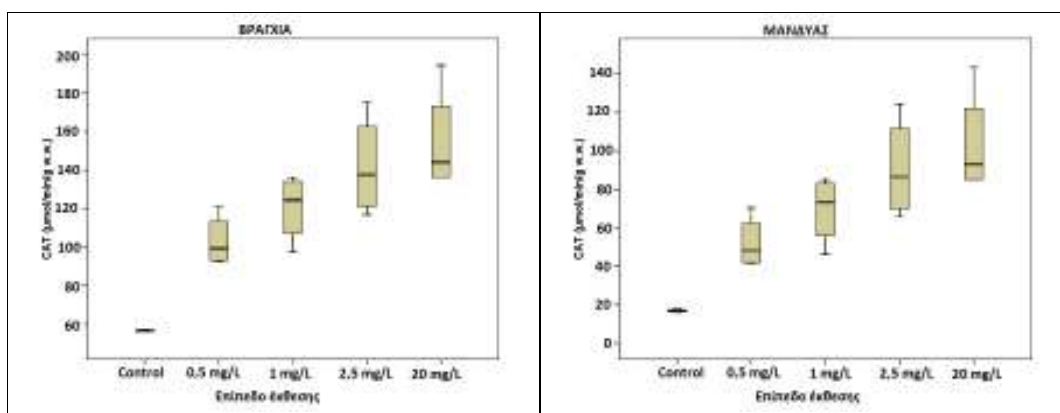
Για κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης, έπειτα από σύγκριση της καταλάσης ανάμεσα στους τρεις ιστούς των οργανισμών προέκυψε η τάση: βράγχια > μανδύας > σώμα (Σχήμα 13). Οι τιμές της καταλάσης αυξήθηκαν στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Pb καθ' όλη την διάρκεια έκθεσης. Στα υπόλοιπα επίπεδα έκθεσης παρουσιάστηκε μείωση την 10η ημέρα (αλλά τιμές παρέμειναν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς) και μετά συνεχίστηκε η τάση αύξησης μέχρι το τέλος της έκθεσης (20η ημέρα) (Σχήμα 13).

Από το Σχήμα 14 φαίνεται ότι η δραστηριότητα της καταλάσης στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μόλυβδου, είχε υψηλότερες τιμές σε σχέση με τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς και πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης αυξάνονταν και οι τιμές του ενζύμου. Η ενεργότητα της καταλάσης στο σώμα των μυδιών, βρίσκεται κάτω από το

όριο ανίχνευσης της μεθόδου, γι' αυτό και παρουσιάζεται πολύ χαμηλή και σταθερή (Σχήμα 14). Την 5η ημέρα έκθεσης μειώθηκε στο μισό σε σχέση με την τιμή του πληθυσμού αναφοράς και δεν παρουσίασε καμία μεταβολή με το χρόνο και το επίπεδο έκθεσης. Από τη μέθοδο προσδιορισμού της καταλάσης, τιμές κάτω από 18 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$ είναι αυτές που οριακά μπορούν να προσδιοριστούν. Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης παρατηρήθηκε ότι κατά την αποτοξίνωση η καταλάση στα βράγχια και στο μανδύα μειώθηκε, όμως παρέμεινε πολύ υψηλότερη από τις τιμές αναφοράς. Η ενεργότητα του ενζύμου στο σώμα παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα και κατά την αποτοξίνωση.



Σχήμα 13: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



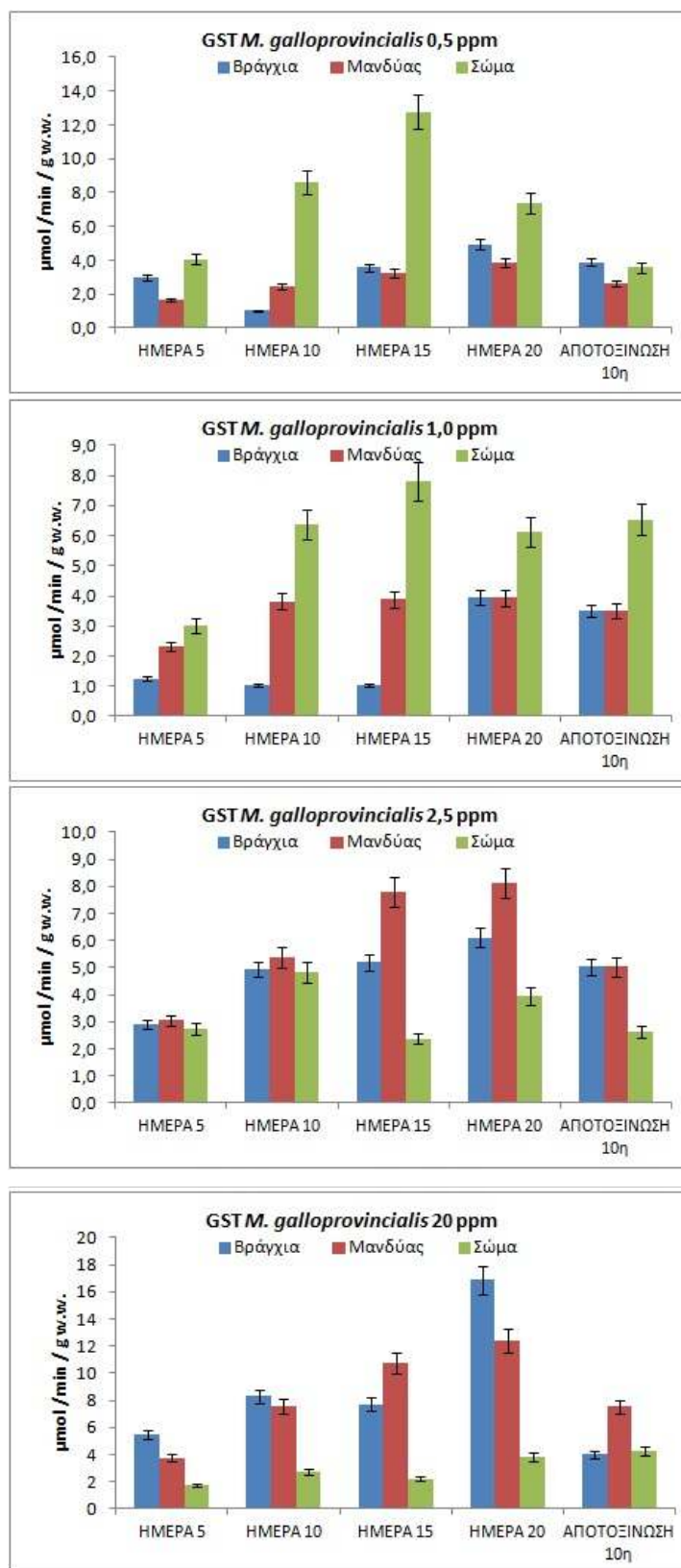
Σχήμα 14: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.1.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

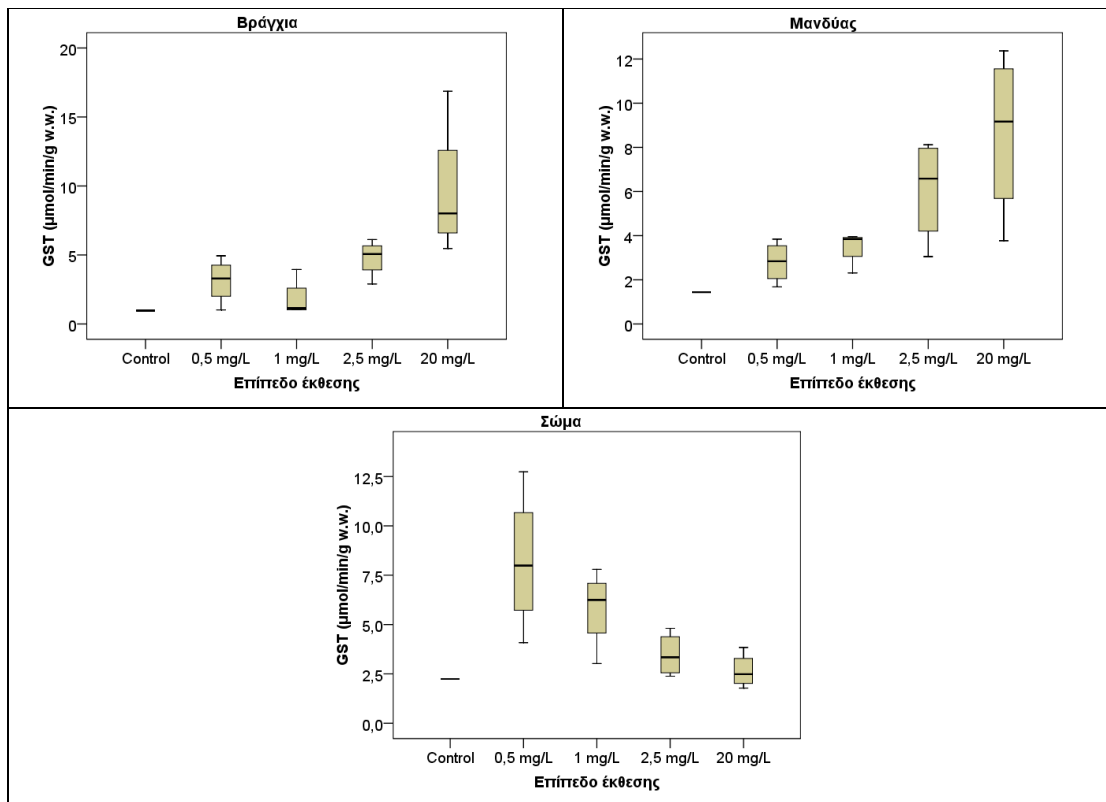
Για τον πληθυσμό αναφοράς στο πείραμα έκθεσης σε μόλυβδο η ενεργότητα της S μεταφοράσης της γλουταθειόνης (GST) δεν μεταβλήθηκε με το χρόνο (τιμές: Βράγχια 0,97, μανδύας 1,44 και σώμα 2,24 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$). Αύξηση της ενεργότητας των GST στα κύτταρα θεωρείται ως μηχανισμός προσαρμογής στη ρύπανση, ενώ μείωσή της αποτελεί ένδειξη τοξικότητας και κυτταρικής βλάβης²⁷². Μελέτες σε ψάρια που έχουν εκτεθεί σε PAHs και PCBs δεν έδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις της GST²⁶⁴. Η GST έχει την ικανότητα να καταλύει την σύζευξη της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) με ξενοβιοτικά υποστρώματα κατά τη διαδικασία αποτοξίνωσης των κυττάρων καθώς ανάγει τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία σε αλκοόλες με ταυτόχρονη οξειδωση της GSH σε GSSG (οξειδωμένη γλουταθειόνη)²⁷².

Από Σχήμα 16 είναι εμφανές ότι η τιμή της GST σχεδόν σε όλα τα επίπεδα έκθεσης και στους τρεις ιστούς είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς, εκτός από το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Pb. Για τα επίπεδα έκθεσης 0,5 και 1,0 ppm Pb, επεξεργασία των δεδομένων έδειξε πως το σώμα είχε στατιστικά υψηλότερες τιμές GST από τους άλλους ιστούς, με την τάση της διάμεσης τιμής να είναι η εξής: σώμα > βράγχια \geq μανδύας. Για τα επίπεδα 2,5 και 20 ppm η τάση ήταν η εξής: βράγχια = μανδύας > σώμα.

Στα βράγχια και το μανδύα των μυδιών που εκτέθηκαν σε διάφορα επίπεδα μολύβδου (Σχήμα 16), προκύπτει ότι αύξηση της συγκέντρωσης μολύβδου ενεργοποιεί την GST. Αντίθετα στο σώμα, οι υψηλότερες τιμές GST μετρήθηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm και όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης μειώνονταν. Οι τιμές που μετρήθηκαν στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg Pb/L ήταν πολύ υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές για τα υπόλοιπα επίπεδα. Οι τιμές της GST στο μανδύα των μυδιών που εκτέθηκαν σε 20 mg Pb/L ήταν οι υψηλότερες σε σχέση με τα υπόλοιπα επίπεδα έκθεσης, ενώ οι τιμές για το σώμα ήταν οι χαμηλότερες. Θετική συσχέτιση στατιστικά σημαντική βρέθηκε ανάμεσα στη συγκέντρωση μολύβδου και την GST στα βράγχια και το μανδύα των μυδιών σε κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης. Στο σώμα παρατηρήθηκε αρνητική τάση. Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης η τιμή της GST στους ιστούς μειώθηκε χωρίς όμως να επανέλθει στα αρχικά της επίπεδα.



Σχήμα 15: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της S μεταφοράς της γλουταθειόνης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 16: Box-plots των επιπέδων της S μεταφοράση της γλουταθειόνης (μmol/ min/ g w.w) σε ιστούς μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.1.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

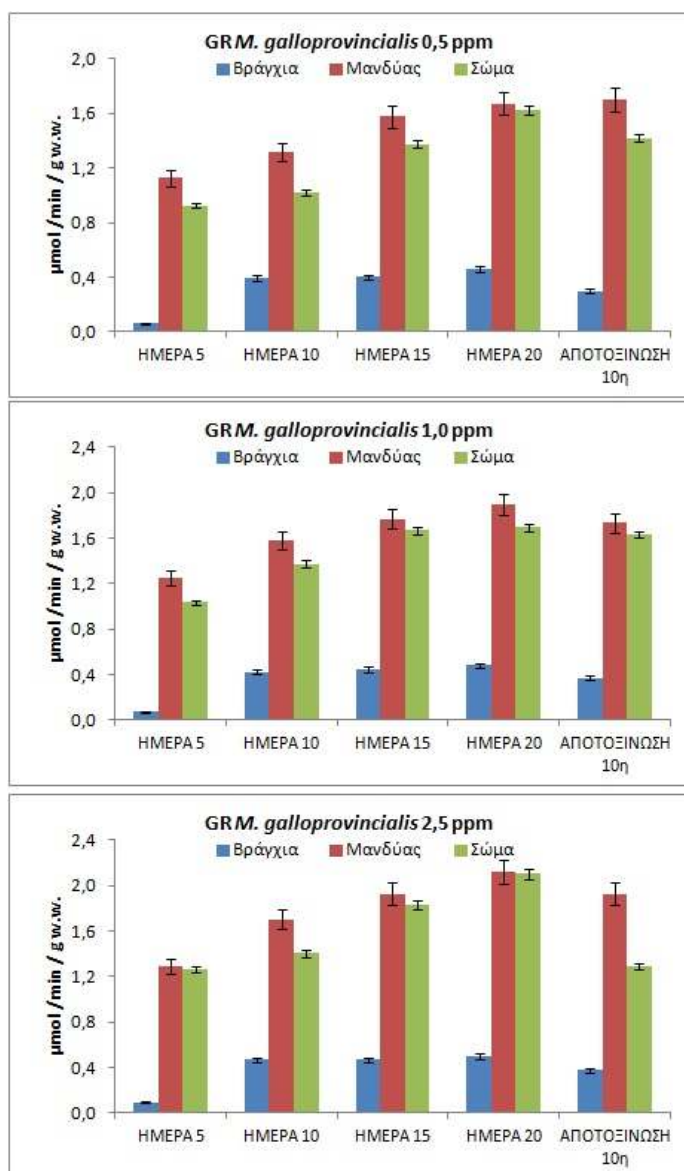
Η πρόσληψη βαρέων μετάλλων από τα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), τόσο λόγω της οξειδωσής της σε GSSG, είτε λόγω της σύμπλεξής της. Επειδή τα σύμπλοκα των μετάλλων με τη γλουταθειόνη είναι πολύ σταθερά, για να συνεχίσει να υπάρχει ο συγκεκριμένος αμυντικός μηχανισμός θα πρέπει τα κύτταρα να παράγουν περισσότερη αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) ώστε να μπορέσουν να ανάγουν ξανά την οξειδωμένη γλουταθειόνη. Έτσι, αύξηση της συγκέντρωσης της GR υποδηλώνει έκθεση σε ρύπους, καθώς τα φυσιολογικά επίπεδα της GR αυξάνονται ώστε να μπορέσει να γίνει η αναγωγή της GSSG σε GSH. Αύξηση της ενεργότητας της αναγωγής της γλουταθειόνης (glutathione reductase-GR) έχει βρεθεί σε βράγχια, πεπτικούς αδένες και ολική σάρκα διθύρων που έχουν εκτεθεί σε βαρέα μέταλλα και άλλους ρύπους²⁸⁶⁻²⁸⁸.

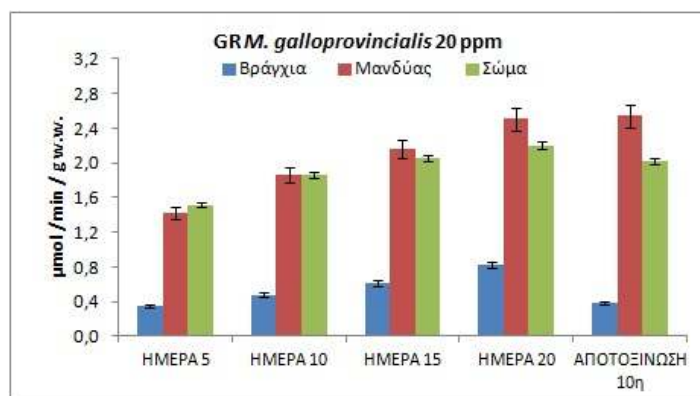
Στον πληθυσμό αναφοράς τα επίπεδα αναγωγής της γλουταθειόνης (GR) παρέμειναν αμετάβλητα στα βράγχια, ενώ μικρή μεταβολή προσδιορίστηκε στο μανδύα και το σώμα (0,54 σε 0,50 μmol/min /g w.w. και στις δύο περιπτώσεις). Ο μανδύας και το σώμα του πληθυσμού αναφοράς δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους ως προς τα επίπεδα GR, όμως διέφεραν από τα βράγχια, τα οποία είχαν πολύ χαμηλότερες τιμές (σχεδόν 8 φορές χαμηλότερες $p < 0,05$).

Από το Σχήμα 18 φαίνεται ότι η τιμή GR σε όλα τα επίπεδα έκθεσης είχε υψηλότερες τιμές από τον πληθυσμό αναφοράς. Στον ίδιο ιστό φαίνεται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της GR, μικρή στα βράγχια, λίγο μεγαλύτερη στο μανδύα και το σώμα.

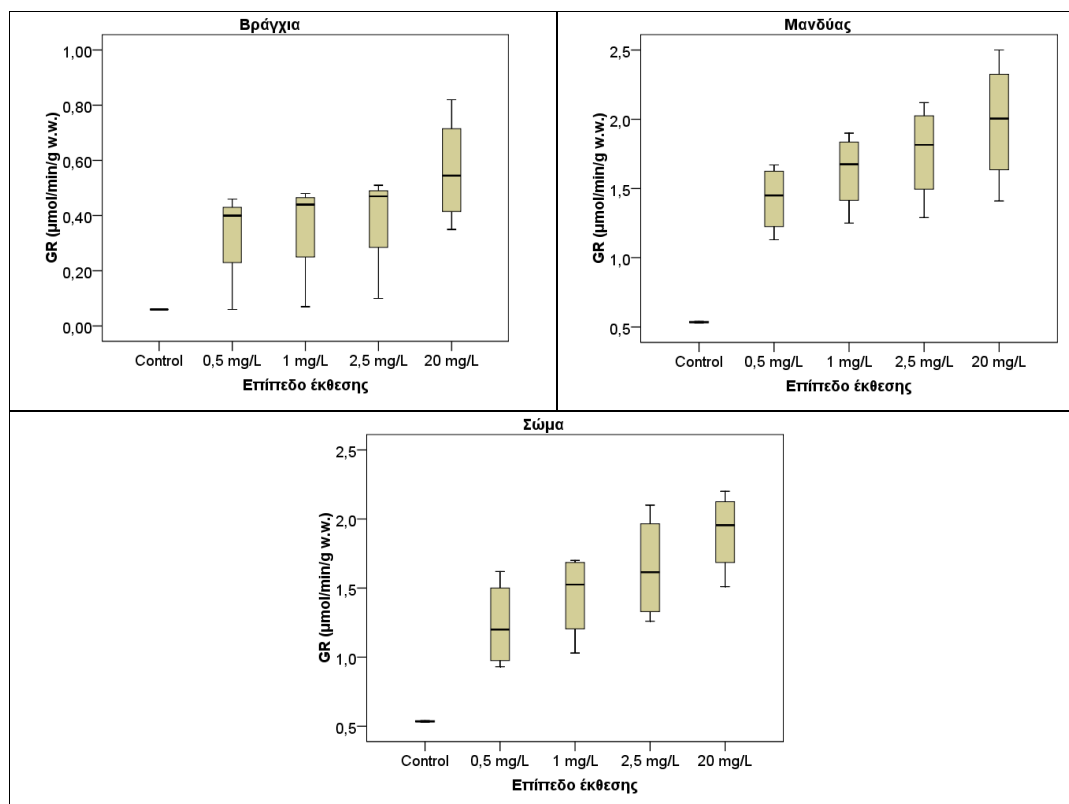
Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης παρατηρείται πως τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές GR, πολύ χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές στους άλλους δύο ιστούς, ενώ ο μανδύας και το σώμα είχαν τιμές υψηλότερες, αλλά σχεδόν παρόμοιες μεταξύ τους (ελαφρά υψηλότερες οι τιμές του μανδύα). Συνολικά λοιπόν, για την περίοδο έκθεσης, για όλα τα επίπεδα έκθεσης, η τάση ήταν η εξής: μανδύας \geq σώμα $>$ βράγχια. Η συγκέντρωση του μολύβδου στους ιστούς των οργανισμών παρουσίασε ακριβώς αντίστροφη τάση.

Και οι τρεις ιστοί σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, παρουσίασαν αύξηση της GR με τις μέρες έκθεσης, με μέγιστες τιμές να προσδιορίζονται γενικά την 20^η ημέρα έκθεσης (Σχήμα 17). Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης των οργανισμών οι τιμές της GR μειώθηκαν σχεδόν σε όλους τους ιστούς, χωρίς να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα με εξαίρεση το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm και 20 ppm Pb.





Σχήμα 17: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 18: Box-plots των επιπέδων της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.1.7 Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Οι μεταλλοθειονίνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες φυσιολογικά περιέχουν Zn και Cu και μπορούν να λειτουργήσουν ως αποτοξινωτές προσδένοντας ιόντα βαρέων μετάλλων στις σουλφυδρυλομάδες των μορίων τους. Για τον πληθυσμό αναφοράς, τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες και στατιστικά διαφορετικές τιμές μεταλλοθειονινών (MTs) σε σχέση με τους δύο άλλους ιστούς, με την τάση να διαμορφώνεται ως εξής: μανδύας ($0,07 \mu\text{mol}/\text{g w.w.}$) \geq σώμα ($0,06 \mu\text{mol}/\text{g w.w.}$) $>$ βράγχια ($0,017 \mu\text{mol}/\text{g w.w.}$). Παρότι τα βράγχια, σε σχέση με τους δύο άλλους ιστούς, είχαν την υψηλότερη

συγκέντρωση μολύβδου καθώς και την υψηλότερη συγκέντρωση μηλονικής διαλδεύδης, άρα είχαν υποστεί την μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη στο πεδίο, δεν είχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταλλοθειονινών, όπως δεν είχαν και τις υψηλότερες ενεργότητες S μεταφοράς της γλουταθειόνης και αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR).

Από τον Πίνακα 11 παρατηρήθηκε ότι σε όλους τους ιστούς η αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ήταν πολύ μεγάλη σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς. Γι' αυτό και αποδείχτηκε ότι ο πληθυσμός αναφοράς διέφερε στατιστικά από τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μολύβδου. Από τον ίδιο πίνακα φαίνεται επίσης πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης αλλά και των ημερών έκθεσης, αυξάνει τις τιμές των μεταλλοθειονινών σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς. Εξαιρέση αποτελούν τα βράγχια των μυδιών και στα τέσσερα επίπεδα έκθεσης, στα οποία η αύξηση είναι μεγαλύτερη την 5^η ημέρα από ότι την 20^η.

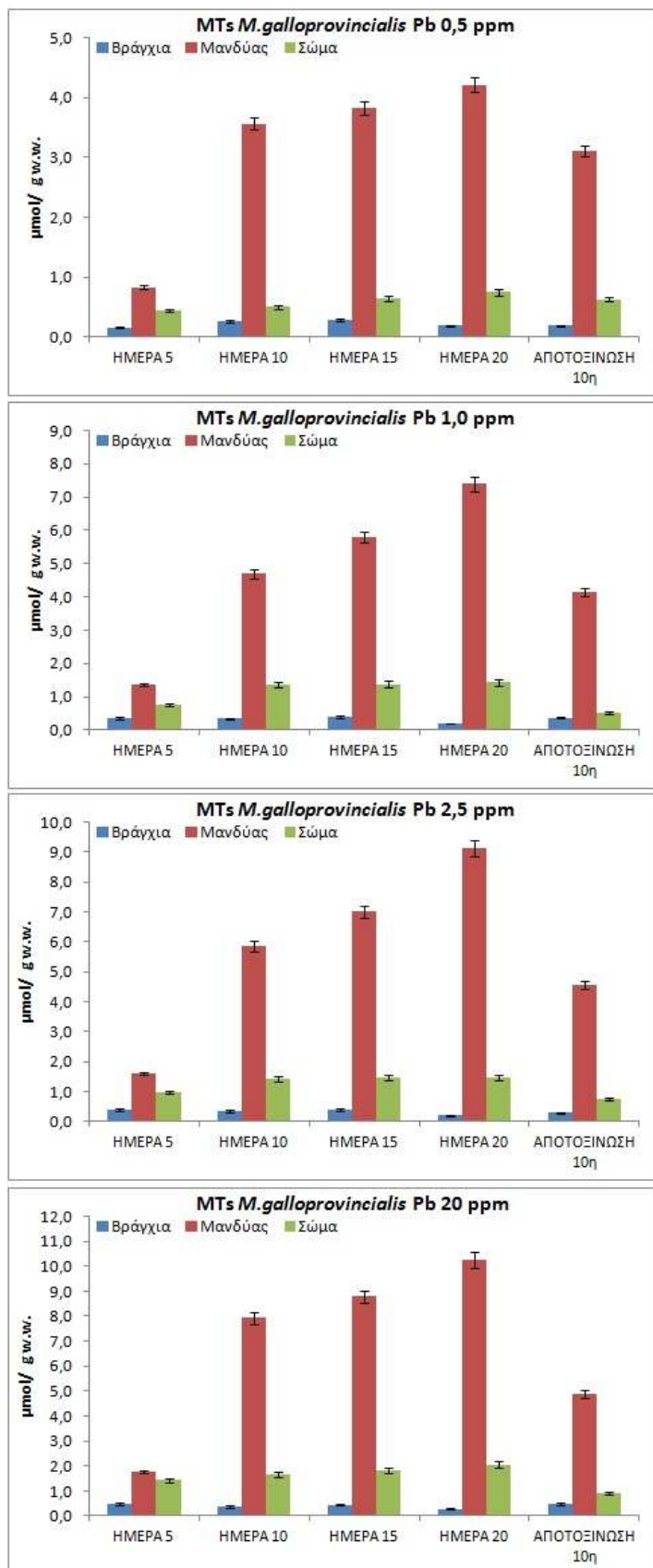
Γενικά είναι εμφανές από όλα τα διαγράμματα, αλλά και από τον Πίνακα 11 πως η αύξηση των μεταλλοθειονινών ήταν πολύ μεγαλύτερη στο μανδύα (ο οποίος είχε όμως τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου) σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς.

Πίνακας 11: Αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών (C_{DayX}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς

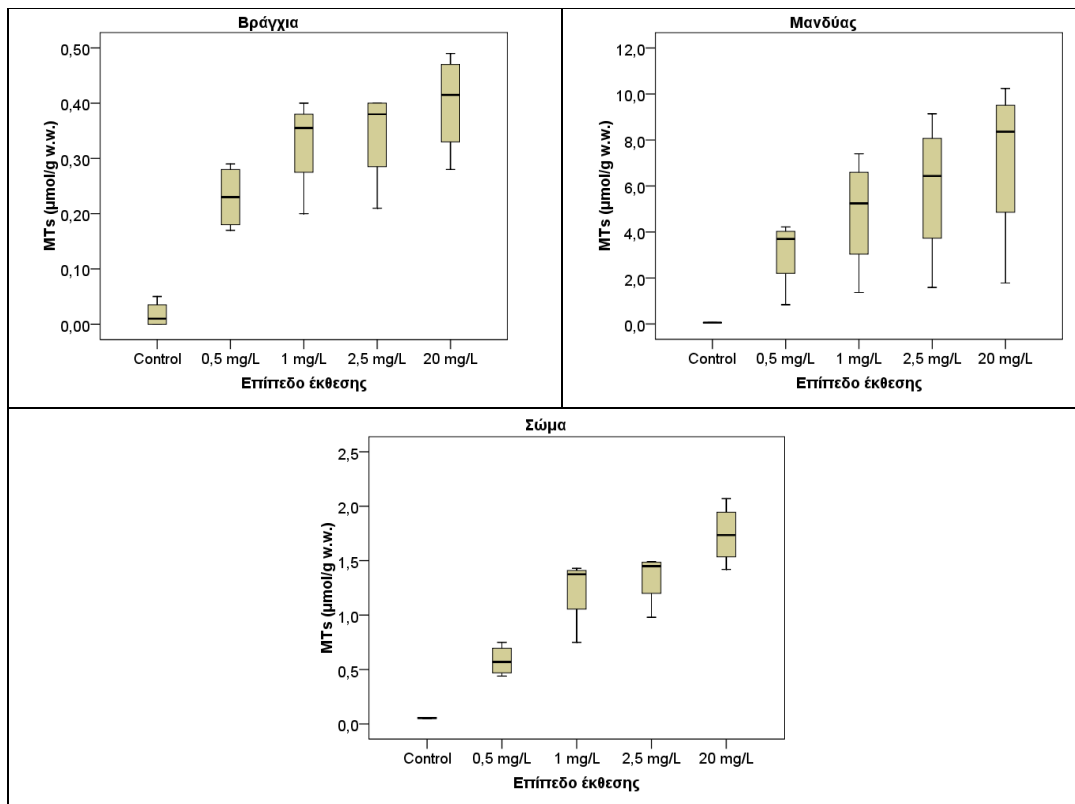
	0,50ppm		1,0ppm		2,5ppm		20ppm	
	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20
βράγχια	10	4,2	22	4,3	24	4,6	29	9,9
μανδύας	12	59	19	103	22	127	25	142
σώμα	7,8	13	13	26	17	27	25	37

Από το Σχήμα 20 και για τους τρεις ιστούς, φαίνεται πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, αυξάνονταν οι τιμές των MTs, με τη μεγαλύτερη αύξηση από το επίπεδο έκθεσης 0,5 ppm στο 1,0 ppm. Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 19), τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές MTs, ενώ ο μανδύας τις υψηλότερες. Συνολικά για την περίοδο έκθεσης, η τάση για κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης ήταν η εξής: μανδύας > σώμα ≥ βράγχια. Και στα τέσσερα επίπεδα έκθεσης, ο μανδύας και το σώμα, παρουσίασαν μέγιστες τιμές την 20^η ημέρα έκθεσης, ενώ τα βράγχια την 15^η ημέρα (Σχήμα 19). Η τάση των μεταλλοθειονινών έμοιαζε με την τάση του μολύβδου στο μανδύα και το σώμα των οργανισμών για κάθε επίπεδο έκθεσης, ενώ στα βράγχια δεν φάνηκε ξεκάθαρη τάση.

Κατά την περίοδο αποτοξίνωσης, οι τιμές των μεταλλοθειονινών μειώθηκαν στο μανδύα και το σώμα, χωρίς όμως να επανέλθουν στα αρχικά τους επίπεδα, ενώ τα βράγχια όλων των οργανισμών, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, παρουσίασαν μέγιστο στην αποτοξίνωση. Στα βράγχια, ίσως λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης μολύβδου, ο οργανισμός να είναι ικανός να παράξει μεγαλύτερες ποσότητες μεταλλοθειονινών ώστε να αντεπεξέλθει καλύτερα στη ρύπανση.



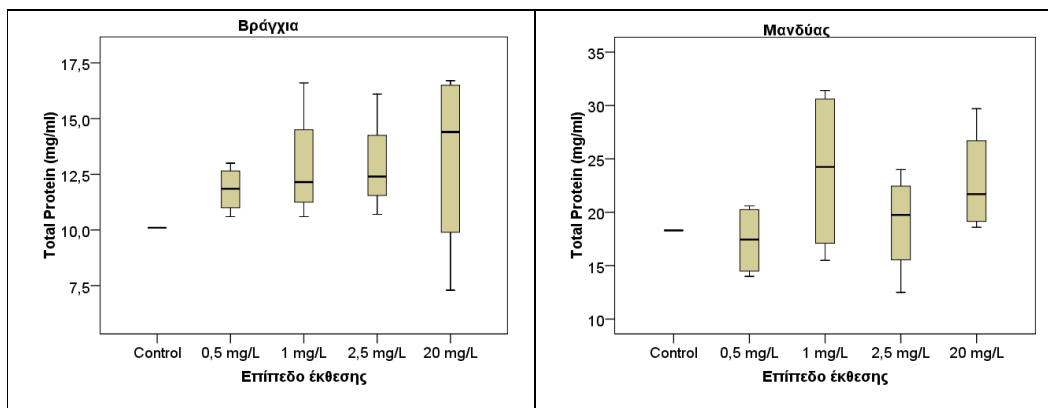
Σχήμα 19: Χρονική μεταβολή των μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

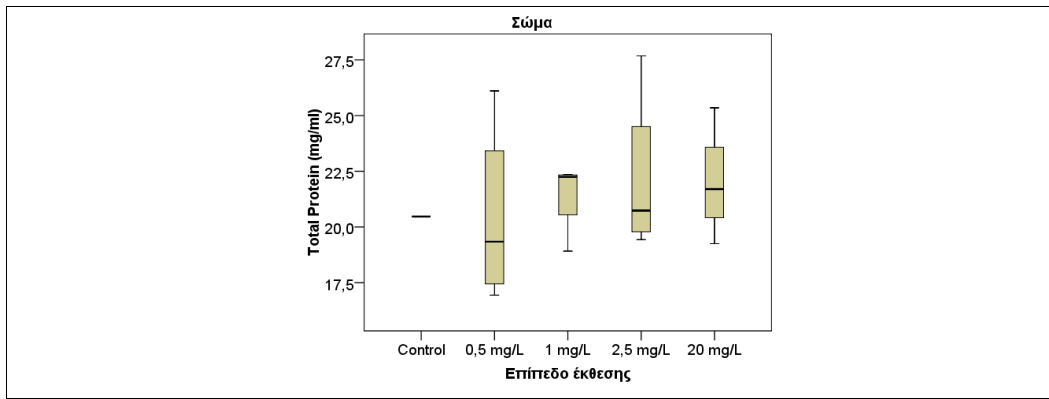


Σχήμα 20: Βοξ-plots των επιπέδων των μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.1.8 Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ολικής πρωτεΐνης στους ιστούς των οργανισμών όπως περιγράφεται από τη μέθοδο Bradford³⁹¹ με σκοπό να διαπιστωθεί αν οι μεταβολές των ενεργοτήτων των ενζύμων επηρέασαν την ολική πρωτεΐνη στους ιστούς των οργανισμών. Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης παρατηρήθηκε πως τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές ολικής πρωτεΐνης, αρκετά χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές για το μανδύα και το σώμα. Ο μανδύας ήταν ο ιστός που είχε τις υψηλότερες τιμές σε όλες τις ημέρες έκθεσης (Σχήμα 21). Παρά τις όποιες αυξομειώσεις παρατηρήθηκαν ανά ιστό και επίπεδο έκθεσης, δεν προέκυψαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων για τον ίδιο ιστό.



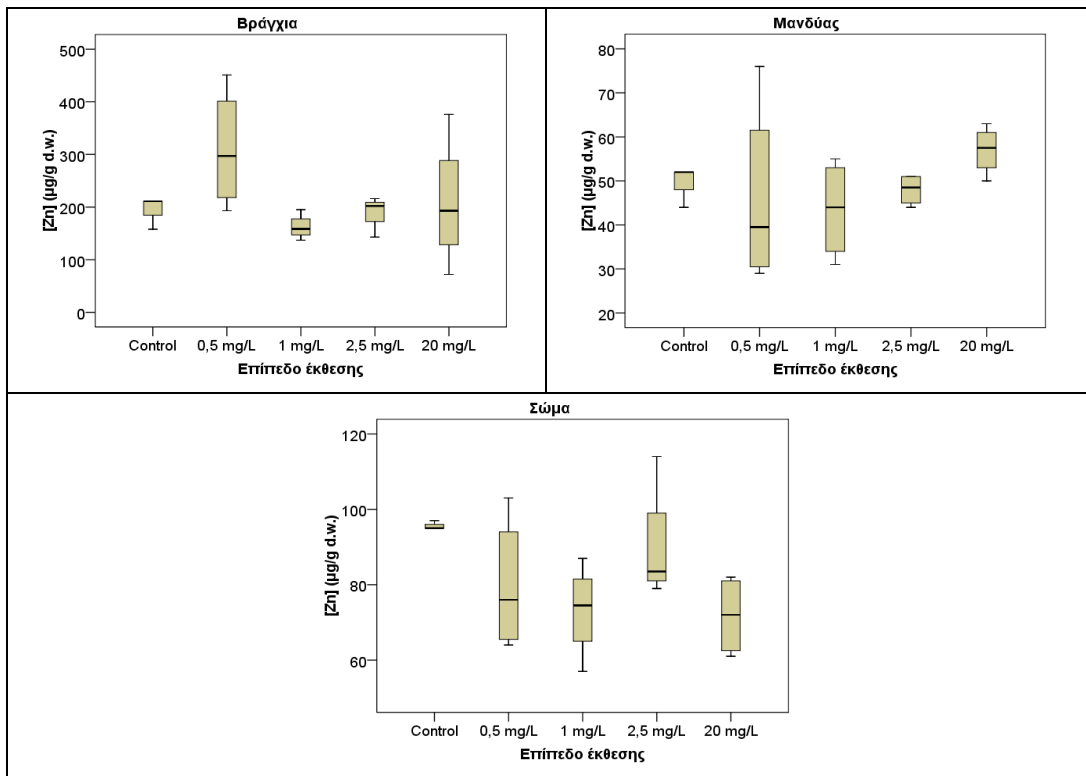


Σχήμα 21: Box-plots των επιπέδων της ολικής πρωτεΐνης (mg/ mL διαλύματος) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.1.9 Ψευδάργυρος σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Ο ψευδάργυρος βρίσκεται φυσιολογικά προσδεμένος στο μόριο των μεταλλοθειονινών και έχει βρεθεί πως μπορεί να υποκατασταθεί από διάφορα βαρέα μέταλλα, ένα από τα οποία είναι και ο μόλυβδος. Προσδιορίζοντας τις μεταβολές των συγκεντρώσεων του ψευδαργύρου στους ιστούς των οργανισμών προσπαθήσαμε να δούμε αν συσχετίζονται με τις μεταβολές της συγκέντρωσης του μολύβδου.

Τόσο στον πληθυσμό αναφοράς, όσο και σε όλα τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 22) παρατηρήθηκε πως τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες τιμές ψευδαργύρου, αρκετά υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές για το μανδύα και το σώμα. Συνολικά για την περίοδο έκθεσης, για κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης, η τάση ήταν η εξής: βράγχια > σώμα ≥ μανδύας.



Σχήμα 22: Box-plots των επιπέδων ψευδαργύρου (µg/ g d.w.) τους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.1.10 Συσχέτιση μολύβδου με βιοδείκτες

Όπως φαίνεται από τους Πίνακες 12-14, συσχέτιση (Pearson correlation) όλων των τιμών του μολύβδου, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε έναν από τους τρεις ιστούς, με τους παρακάτω βιοδείκτες, για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% εμφάνισε τις εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις:

- Αρνητική συσχέτιση με την ακετυλοχολινεστεράση στα βράγχια και το μανδύα, ενώ στο σώμα η συσχέτιση ήταν θετική.
- Θετική συσχέτιση με την λιπιδική υπεροξειδωση και στους τρεις ιστούς.
- Θετική συσχέτιση με την S μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST) στα βράγχια και το μανδύα.
- Θετική συσχέτιση με την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και στους τρεις ιστούς.
- Θετική συσχέτιση με την καταλάση (CAT) στα βράγχια και το μανδύα.
- Θετική συσχέτιση με τις μεταλλοθειονίνες (MTs) στο μανδύα και το σώμα. Στα βράγχια η συσχέτιση δεν ήταν στατιστικά σημαντική

4.1.11 Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Επειδή οι βιοδείκτες συσχετίζονται με το μόλυβδο, υπάρχει περίπτωση να συσχετίζονται και μεταξύ τους. Στόχος της έρευνας συσχετίσεων μεταξύ των τιμών των βιοδεικτών ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει κοινή συμπεριφορά-τάση των βιοδεικτών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο τρόπος αντίδρασης στην έκθεση σε μόλυβδο είναι παρόμοιος. Έτσι βρέθηκαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% και ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης

- Αρνητική συσχέτιση της AChE με την LPO στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών, ενώ θετική στο σώμα τους.
- Αρνητική συσχέτιση της AChE με την GST, την GR και την CAT στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών, ενώ στο σώμα τους η συσχέτιση AChE-GST ήταν αρνητική, η συσχέτιση AChE-GR θετική.
- Αρνητική συσχέτιση της AChE με τις MTs στο μανδύα των οργανισμών, ενώ στο σώμα η συσχέτιση ήταν θετική. Στο μανδύα βρέθηκε επίσης αρνητική συσχέτιση στατιστικά σημαντική της ακετυλοχολινεστεράσης με τον ψευδάργυρο.
- Θετική συσχέτιση της LPO με την GST, την GR και την CAT στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών. Το σώμα εμφάνισε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μόνο ανάμεσα στην LPO και την GR.
- Θετική συσχέτιση της LPO με τις MTs στο μανδύα και το σώμα των οργανισμών.
- Θετική συσχέτιση της GST με την GR και την CAT στα βράγχια και στο μανδύα των οργανισμών, αλλά όχι στο σώμα.

- Θετική συσχέτιση των MTs με την GST και την GR, στο μανδύα των οργανισμών.
- Θετική συσχέτιση της GR με την CAT στο μανδύα των οργανισμών.

Οι παραπάνω συσχετίσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές αν οι τιμές των βιοδεικτών για καθένα από τους ιστούς συσχετιστούν μεταξύ τους σε κάθε επίπεδο έκθεσης.

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

Για να καταλήξουμε στο ποιος βιοδείκτης είναι πιο κατάλληλος να χρησιμοποιείται ώστε να προσδιοριστεί η βλάβη που έχουν υποστεί οι ιστοί του *M. gallorprovincialis* μετά από έκθεσή του σε μόλυβδο, πρέπει να έχει καλή συσχέτιση με το μέταλλο σε όλα τα επίπεδα έκθεσης και με γενικά λίγες μετρήσεις (χαμηλό επίπεδο=απόκριση βιοδείκτη και στις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις, υψηλό επίπεδο=δεν καταρρέει ο βιοδείκτης ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις).

Έτσι, αν χρησιμοποιηθούν τα βράγχια ως ιστός ελέγχου, τα οποία βρέθηκε πως βιοσυσσωρεύουν περισσότερο μέταλλο από τους άλλους ιστούς, η ακετυλοχολινεστεράση, η λιπιδική υπεροξειδωση αλλά και η GST είναι οι καταλληλότεροι βιοδείκτες καθώς εμφανίζουν ξεκάθαρη τάση με το χρόνο έκθεσης, στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το μόλυβδο και στα χαμηλότερα αλλά και στα υψηλότερα επίπεδα έκθεσης. Αν χρησιμοποιηθεί ο μανδύας ή το σώμα ιστός ελέγχου, ο κατάλληλος βιοδείκτης είναι η ακετυλενοχολυνεστάση (αναμένεται μείωση στο μανδύα και αύξηση στο σώμα) και οι μεταλλοθειονίνες (αναμένεται αύξηση και στους δύο ιστούς).

Πίνακας 12: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	-0,844**	1							
LPO	0,901**	-0,960**	1						
GST	0,937**	-0,889**	0,880**	1					
GR	0,664**	-0,633**	0,617*	0,698**	1				
CAT	0,661**	-0,635**	0,653**	0,735**	0,409	1			
MTs	0,193	-0,058	0,222	-0,003	0,013	0,127	1		
Zn	-0,282	-0,115	0,090	-0,196	-0,151	-0,297	-0,117	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,426	-0,309	0,231	0,479	0,366	0,252	-0,376	-0,460	1

Πίνακας 13: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	-0,776**	1							
LPO	0,902**	-0,828**	1						
GST	0,850**	-0,772**	0,933**	1					
GR	0,669**	-0,593*	0,785**	0,916**	1				
CAT	0,633**	-0,606*	0,505*	0,663**	0,614*	1			
MTs	0,596*	-0,528*	0,740**	0,873**	0,965**	0,496	1		
Zn	0,383	-0,535*	0,326	0,334	0,428	0,379	0,356	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,149	0,052	0,120	0,212	0,371	0,120	0,439	0,292	1

Πίνακας 14: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	0,904**	1							
LPO	0,861**	0,836**	1						
GST	-0,438	-0,530*	-0,176	1					
GR	0,735**	0,665**	0,794**	-0,260	1				
MTs	0,717**	0,720**	0,775**	-0,480	0,857**	. ^a	1		
Zn	-0,043	-0,084	-0,126	-0,259	0,105	. ^a	-0,132	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,354	0,429	0,320	-0,231	0,112	. ^a	0,264	-0,371	1

* δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

** δηλώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

4.2 Έκθεση *Callista chione* σε μόλυβδο

4.2.1 Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα μολύβδου στο θαλασσινό νερό

Οι τιμές του μολύβδου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών αμέσως μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις μολύβδου (μg/g) σε ιστούς των *C. chione*

<i>C. chione</i>	Pb (μg/g d.w.)	Pb (μg/g w.w.)
ΒΡΑΓΧΙΑ	6,7	4,3
ΜΑΝΔΥΑΣ	3,3	1,5
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	3,5	2,0
ΣΩΜΑ	2,9	1,4
ΟΛΙΚΟ ΖΩΟ	3,7	2,5
Όρια με βάση τη νομοθεσία ⁶⁸		
ΟΛΙΚΟ ΖΩΟ	-	1,5

Τα επίπεδα Pb στις γυαλιστερές που συλλέχθηκαν από το Σαρωνικό κόλπο ήταν πάνω από το επιτρεπτό όριο για την ανθρώπινη κατανάλωση⁶⁸.

Οι συγκεντρώσεις του μολύβδου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς παρουσιάζονται στον Πίνακα 16. Η συγκέντρωση στα βράγχια ήταν στατιστικά υψηλότερη ($p < 0,05$) ενώ στους άλλους ιστούς δεν υπήρχε διαφορά ($p > 0,05$). Η συγκέντρωση του μολύβδου στα βράγχια και το μανδύα των γυαλιστερών αναφοράς μειώθηκε αρκετά στο τέλος του πειράματος σε σχέση με την τιμή που προσδιορίστηκε στους ιστούς των οργανισμών όταν έφτασαν στο εργαστήριο, κάτι που αποδείχτηκε και στατιστικά. Το πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών δεν παρουσίασαν αξιόλογες μεταβολές κατά την διάρκεια του πειράματος.

Πίνακας 16: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης μολύβδου (μg/g d.w.) στους ιστούς των οργανισμών του πληθυσμού αναφοράς

	DAY0	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10
ΒΡΑΓΧΙΑ	6,7	5,9	4,6	4,6	4,5	4,4
ΜΑΝΔΥΑΣ	3,3	2,8	2,3	2,5	2,5	1,5
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	3,5	3,5	3,4	3,9	3,9	2,2
ΣΩΜΑ	2,9	3,8	1,9	3,0	3,0	2,9

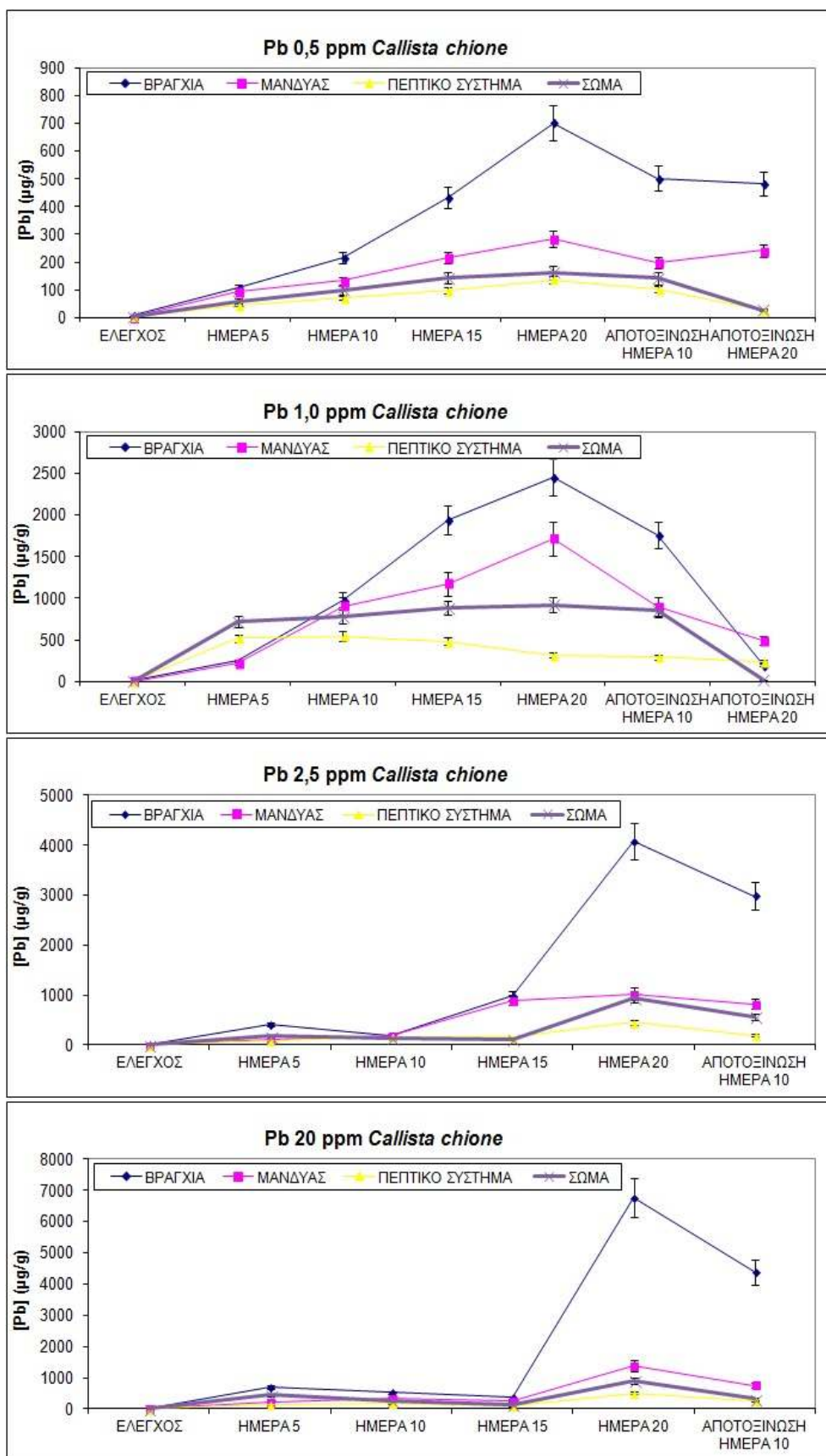
Από το Σχήμα 23 φαίνεται πως οι γυαλιστερές που εκτέθηκαν σε μόλυβδο ανταποκρίθηκαν στην αύξηση συγκέντρωσης μετάλλου στο περιβάλλον τους προσροφώντας το και αποθηκεύοντάς το στους ιστούς τους. Για κάθε επίπεδο έκθεσης, τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις [ήταν το «όργανο-στόχος» (target-organ) για τον μόλυβδο], ενώ το πεπτικό σύστημα και το σώμα είχαν χαμηλότερες τιμές και παρόμοιες μεταξύ τους. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων για όλα τα επίπεδα έκθεσης έδειξε την τάση: βράγχια > μανδύας ≥ σώμα ≥ πεπτικό σύστημα.

Ως προς το χρόνο μέγιστης βιοσυγκέντρωσης μετάλλου, προσδιορίστηκε σε όλους τους ιστούς των οργανισμών την 20^η ημέρα έκθεσης, και μάλιστα στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης η αύξηση ως την 20^η ημέρα ήταν γραμμική (Σχήμα 23). Για τα δύο υψηλότερα επίπεδα έκθεσης, στατιστικά σημαντική γραμμικά θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε στο μανδύα και στο πεπτικό σύστημα των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm αλλά και 20 ppm Pb. Στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα μολύβδου φαίνεται πως η αύξηση της συγκέντρωσης του μολύβδου αρχικά ήταν μικρή, ενώ αυξήθηκε πολύ από την 15^η στην 20^η ημέρα έκθεσης.

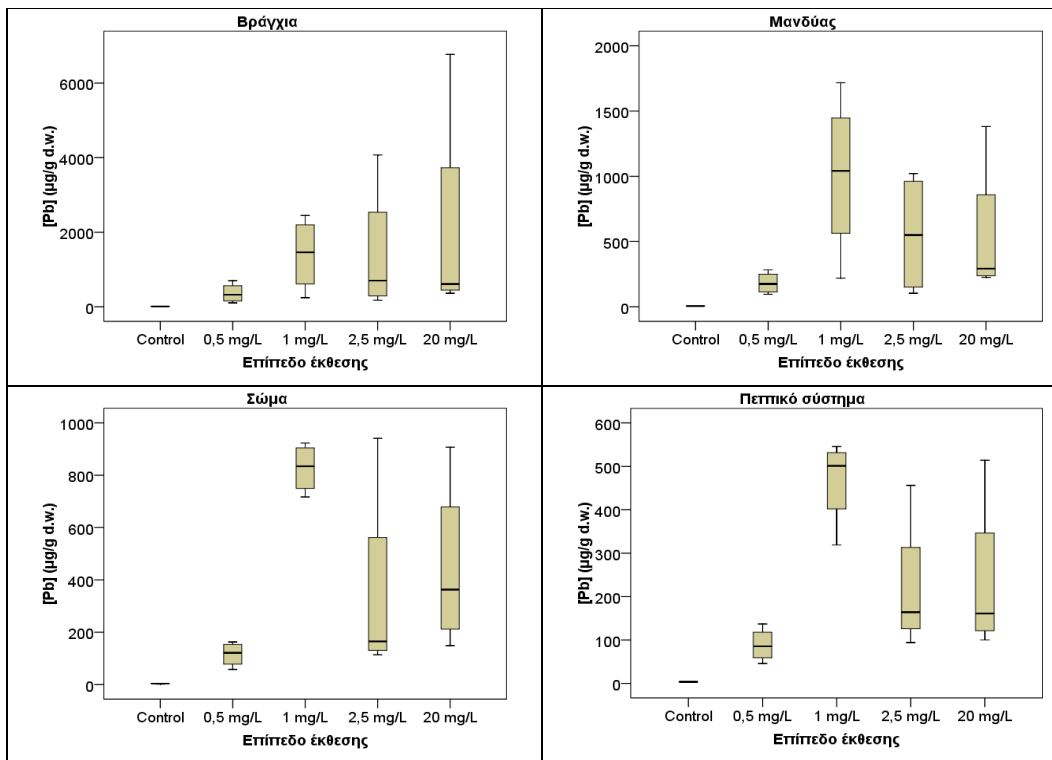
Η αύξηση της συγκέντρωσης μολύβδου την 20^η ημέρα έκθεσης σε σχέση με την αντίστοιχη τη μέρα άφιξης (Day 0) ήταν κατά 105-365-611-1016 φορές μεγαλύτερη στα τα βράγχια, κατά 85-515-306-414 φορές για το μανδύα κατά 39-92-131-148 φορές για το πεπτικό σύστημα και κατά 57-322-328-316 φορές για το σώμα για τα επίπεδα έκθεσης 0,5-1,0-2,5 και 20 mg Pb/L, αντίστοιχα. Αξιοσημείωτο είναι ότι παρά τις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου που μετρήθηκαν στους ιστούς των οργανισμών (και κυρίως στα βράγχια την 20^η ημέρα έκθεσης), δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι. Αύξηση του επιπέδου έκθεσης φαίνεται να οδηγεί σε αύξηση στην συγκέντρωση του μολύβδου σε όλους τους ιστούς των οργανισμών (Σχήμα 24). Ειδικά στο επίπεδο 1,0 ppm, προσδιορίστηκαν υψηλότερες τιμές και από το επίπεδο έκθεσης 20 ppm σε όλους τους ιστούς, εκτός από τα βράγχια.

Το πρώτο 10ήμερο της αποτοξίνωσης παρατηρήθηκε μείωση στην μετρούμενη τιμή συγκέντρωσης μολύβδου σε όλους τους ιστούς. Η συγκέντρωση στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Pb μειώθηκε κατά 28%, στο μανδύα κατά 30%, στο πεπτικό σύστημα κατά 25%, και στο σώμα κατά 13%. Αντίστοιχη μείωση για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 1,0-2,5 και 20 ppm Pb ήταν 28-27-35% για τα βράγχια, 48-19-45% για το μανδύα, 8,9-56-49% για το πεπτικό σύστημα και 7,6-40-65% για το σώμα. Παρά τα αρκετά υψηλά ποσοστά μείωσης, οι τιμές κατά την αποτοξίνωση παρέμειναν πολύ υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές που μετρήθηκαν στους ιστούς των οργανισμών «την Ημέρα 0».

Το πείραμα αποτοξίνωσης των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε 0,5 και 1,0 ppm Pb συνεχίστηκε για ακόμα 10 ημέρες επειδή διαθέταμε περισσότερους οργανισμούς. Στο χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης, την 20^η ημέρα της αποτοξίνωσης, παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση στο πεπτικό σύστημα και το σώμα των γυαλιστερών (75 και 81% αντίστοιχα). Για τα βράγχια η μείωση ήταν 3,6%, ενώ στο μανδύα παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του μολύβδου, πιθανόν λόγω μεταφοράς του μετάλλου (translocation) από άλλο ιστό. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Pb, η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στα βράγχια και το σώμα (88 και 97% αντίστοιχα).



Σχήμα 23: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του μολύβδου (µg/g d.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών



Σχήμα 24: Box-plots των συγκεντρώσεων του μολύβδου ($\mu\text{g/g d.w.}$) στους ιστούς των γαλιστερών

Συγκρίνοντας τα ποσοστά του μολύβδου στους ιστούς των οργανισμών, βρέθηκε πως ο μανδύας είχε τα υψηλότερα ποσοστά σε όλα τα επίπεδα έκθεσης ενώ η αμέσως χαμηλότερη περιεκτικότητα προσδιορίστηκε στο σώμα. Η μέση περιεκτικότητα μολύβδου στα βράγχια των οργανισμών ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, κυμάνθηκε από 15-25%, στο μανδύα από 28-34%, στο πεπτικό σύστημα από 19-23% και στο σώμα από 24-32%.

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης

Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης ($C_{\text{μετρ}} - C_{\text{αναφ}} / C_{\text{νερού}}$) στα τέσσερα επίπεδα έκθεσης ήταν μεγαλύτερος στα βράγχια σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς. Γενικά, παρατηρήθηκε αύξησή του με την πάροδο των ημερών έκθεσης σε μόλυβδο, με μέγιστη τιμή την 20η ημέρα έκθεσης.

4.2.2 Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

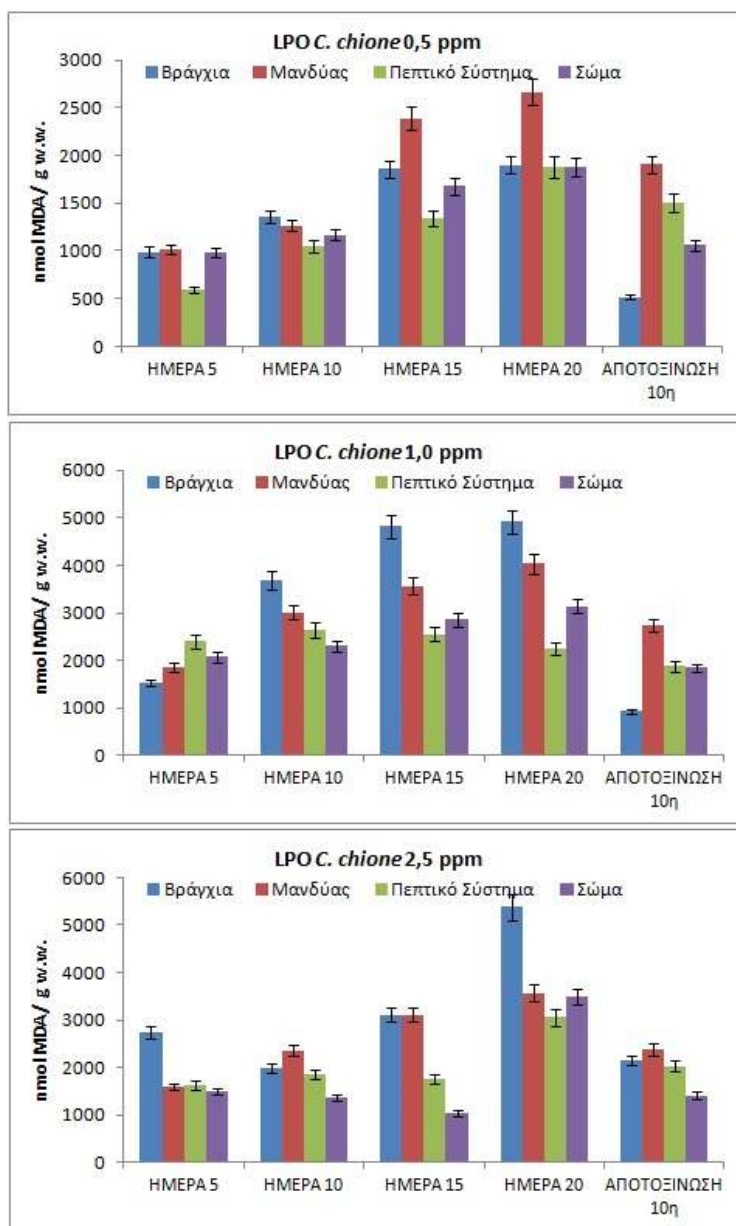
Από τον Πίνακα 17, φαίνεται ότι σε όλους τους ιστούς, εκτός από το σώμα, η συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΰδη στον πληθυσμό αναφοράς μειωνόταν, πιθανά λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στο νερό των Χανίων ενώ στο σώμα οι τιμές ήταν σταθερές. Για τον πληθυσμό αναφοράς η τάση ήταν η εξής: πεπτικό σύστημα \approx βράγχια $>$ σώμα \approx μανδύας.

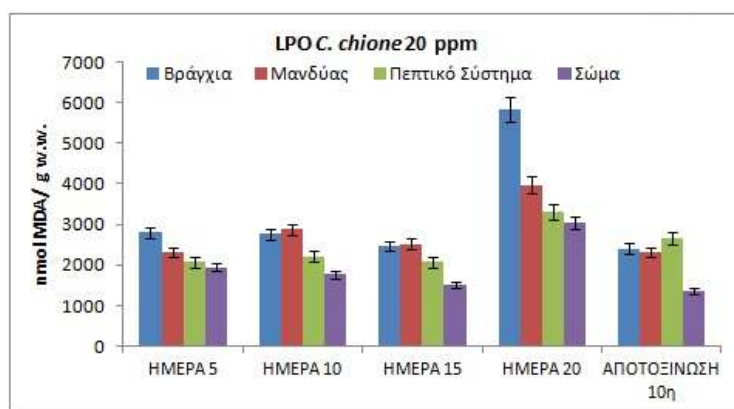
Πίνακας 17: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA για τον πληθυσμό αναφοράς

Control (nmol MDA/ g w.w.)	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10
Βράγχια	480	450	412	400	382
Μανδύας	689	609	613	589	579
Πεπτικό Σύστημα	426	425	422	421	416
Σώμα	604	604	604	604	604

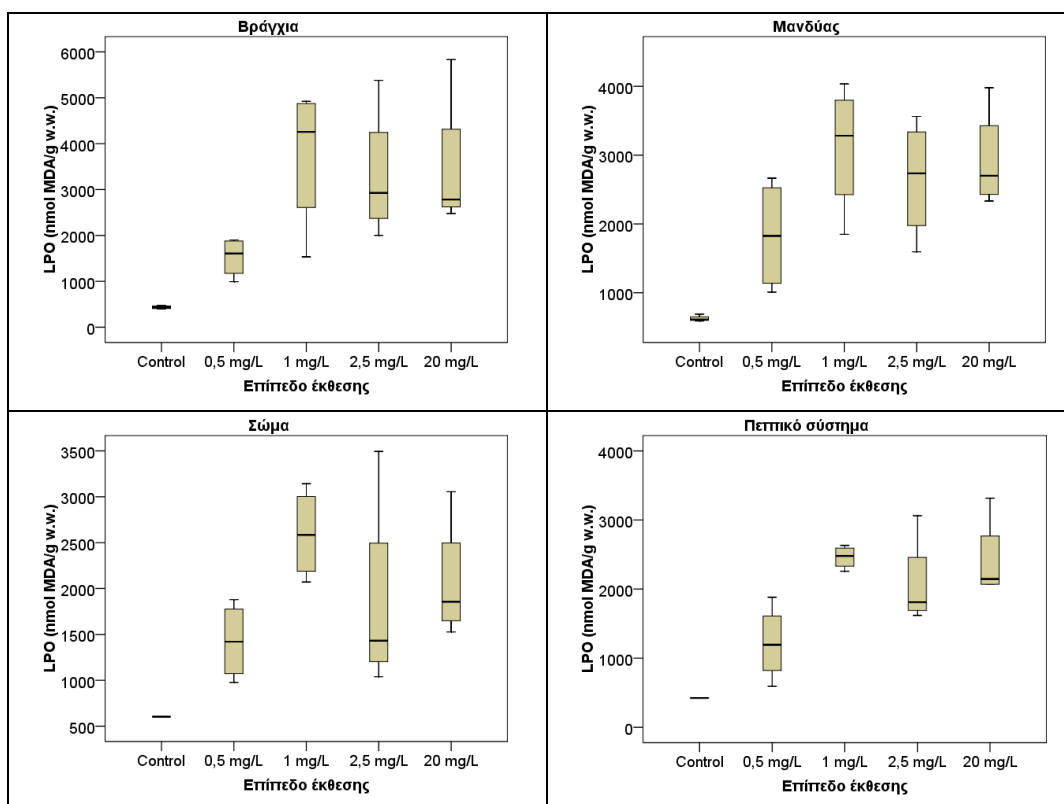
Οι τιμές μηλονικής διαλδεΐδης που μετρήθηκαν στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο ήταν πολύ υψηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 26). Γενικά, δεν ξεχώρισε συστηματικά κάποιος ιστός με υψηλότερες τιμές από τους υπόλοιπους (Σχήμα 25). Παραμονή των οργανισμών σε ρυπασμένο από μόλυβδο νερό προκάλεσε αντίστοιχη αύξηση της μηλονικής διαλδεΐδης στον κάθε ιστό. Γενικά, μέγιστη τιμή προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα έκθεσης (Σχήμα 25). Την ίδια τάση παρουσίασε και η συγκέντρωση του μολύβδου.

Στο Σχήμα 26 φαίνεται πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, αυξανόταν και η διάμεση τιμή. Εξαίρεση αποτελεί το επίπεδο 1,0 ppm Pb, στο οποίο οι τιμές ήταν οι υψηλότερες από όλες. Κατά την αποτοξίνωση, οι τιμές της μηλονικής διαλδεΐδης μειώθηκαν σε σχέση με την 20^η ημέρα έκθεσης σε όλους τους ιστούς. Η μείωση κυμάνθηκε στο 73- 81- 60-35% στα βράγχια, 29- 32- 33- 45% στο μανδύα, 20- 17- 34-49% στο πεπτικό σύστημα και 44- 41- 60-65% στο σώμα για τα επίπεδα έκθεσης 0,5-1,0- 2,5 και 20 mg Pb/L αντίστοιχα.





Σχήμα 25: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 26: Box-plots των επιπέδων μηνονικής διαλδεϋδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.2.3 Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) στις γυαλιστερές αναφοράς, δεν παρουσίασε συγκεκριμένη τάση με την πάροδο του χρόνου σε κανέναν ιστό, και κυμάνθηκε στα βράγχια 60-65, στο μανδύα 700-710, στο πεπτικό 511-519 και στο σώμα 460-466 nmol/min/g w.w.). Άρα η τάση του ενζύμου μεταξύ των ιστών ήταν: μανδύας> πεπτικό σύστημα> σώμα> βράγχια.

Στα βράγχια, τα οποία είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση μολύβδου και μηνονικής διαλδεϋδης, προσδιορίστηκε η χαμηλότερη ενεργότητα ακετυλοχολινεστεράσης, κάτι που πιθανά να υποδηλώνει την νευροτοξικότητα του μετάλλου στον ιστό αυτό. Οι τιμές ακετυλοχολινεστεράσης

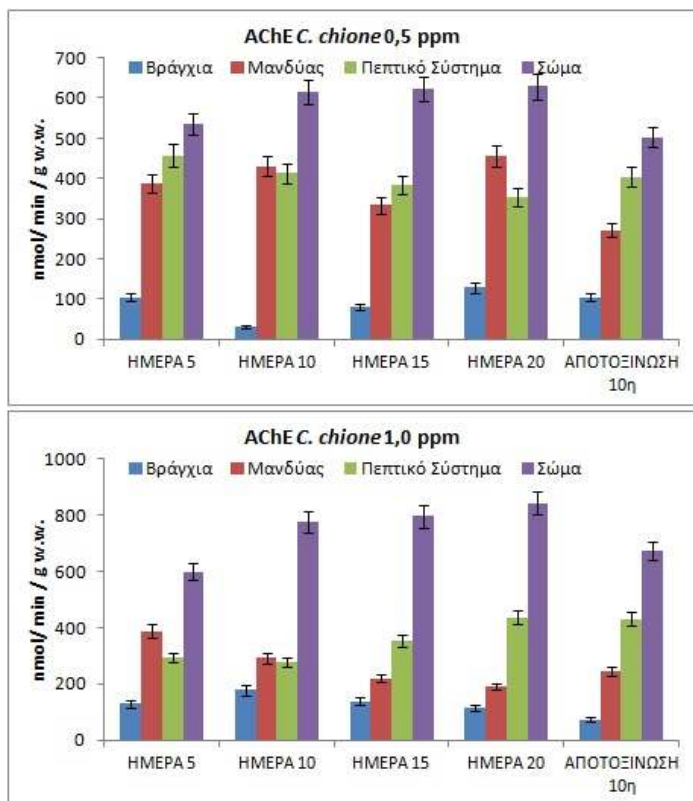
που μετρήθηκαν στους ιστούς των γυαλιστερών εκτέθηκαν σε μόλυβδο ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς για το μανδύα και το πεπτικό σύστημα, αλλά υψηλότερες για τα βράγχια και το σώμα (το ίδιο είχε παρατηρηθεί και στα μύδια).

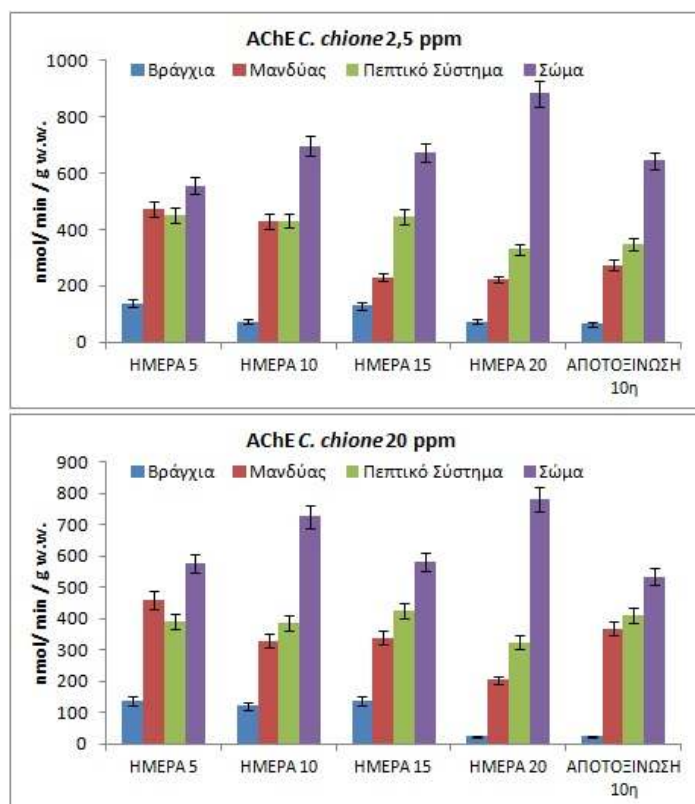
Από τους υπό μελέτη ιστούς, για τα τρία χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης, τις υψηλότερες τιμές ακετυλοχολινεστεράσης είχε το σώμα, οι οποίες γενικά αυξάνονταν με την πάροδο των ημερών έκθεσης, με μέγιστη τιμή την 20η ημέρα έκθεσης και μείωση στην αποτοξίνωση (Σχήμα 27). Την αντίθετη ακριβώς τάση εμφάνισε η ακετυλοχολινεστεράση στο πεπτικό σύστημα και στο μανδύα (Σχήμα 27). Το ένζυμο στα βράγχια των οργανισμών δεν εμφάνισε κάποια ιδιαίτερη τάση. Από το Σχήμα 27 φαίνεται πως η τάση ήταν η εξής: σώμα > πεπτικό σύστημα > μανδύας > βράγχια.

Από το Σχήμα 28 φαίνεται ότι οι τιμές του ενζύμου στα βράγχια και στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, ενώ στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα χαμηλότερες, κάτι που αποτελεί ένδειξη νευροτοξικότητας.

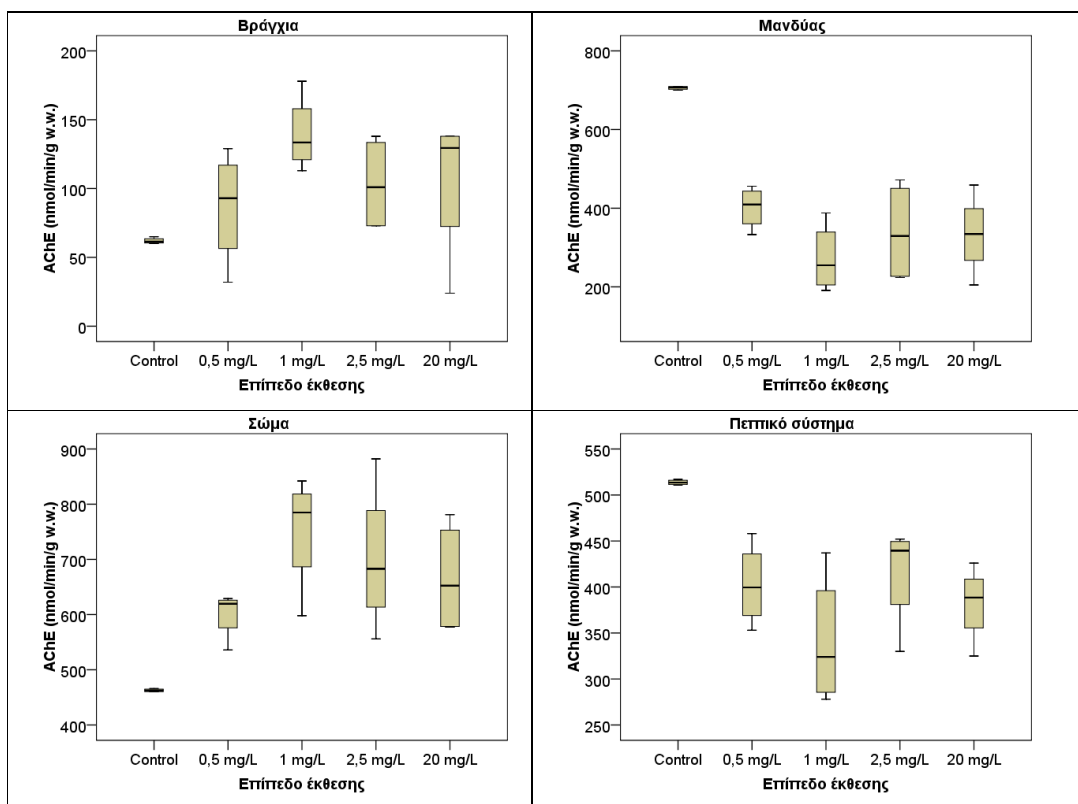
Αρνητική συσχέτιση, στατιστικά σημαντική βρέθηκε ανάμεσα στο μόλυβδο και την ακετυλοχολινεστεράση στο μανδύα και στο πεπτικό σύστημα. Ίδια συσχέτιση παρατηρήθηκε και στα βράγχια των οργανισμών που έχουν εκτεθεί σε 20 ppm μολύβδου και στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 και 2,5 ppm.

Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης η τιμή της ακετυλοχολινεστεράσης στα βράγχια και το σώμα των οργανισμών παρουσίασε μείωση, προσπαθώντας να επανέλθει στα φυσιολογικά της επίπεδα, καθώς μείωση είχε παρουσιάσει και συγκέντρωση του μολύβδου. Οι υπόλοιποι ιστοί παρουσίασαν αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου κατά την αποτοξίνωση (Σχήμα 27).





Σχήμα 27: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 28: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

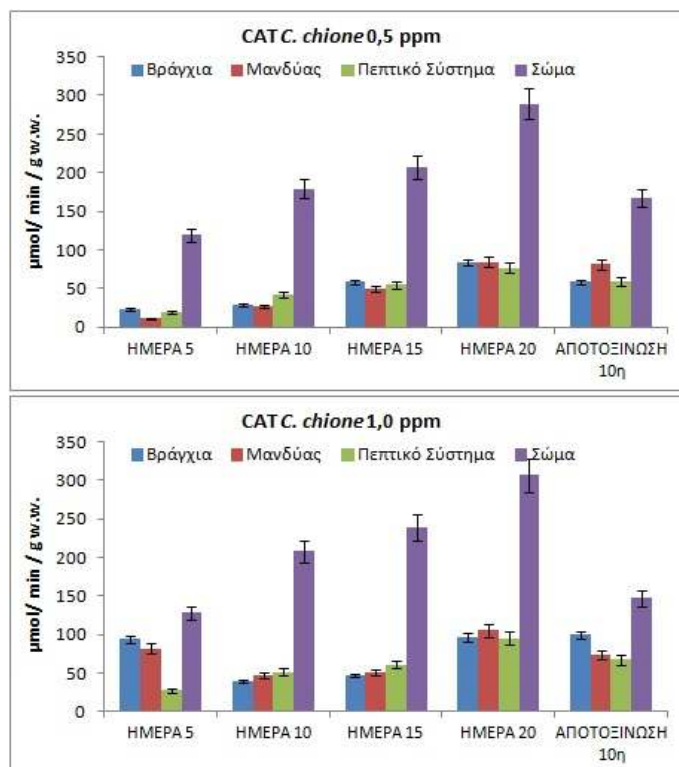
4.2.4 Καταλάση σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

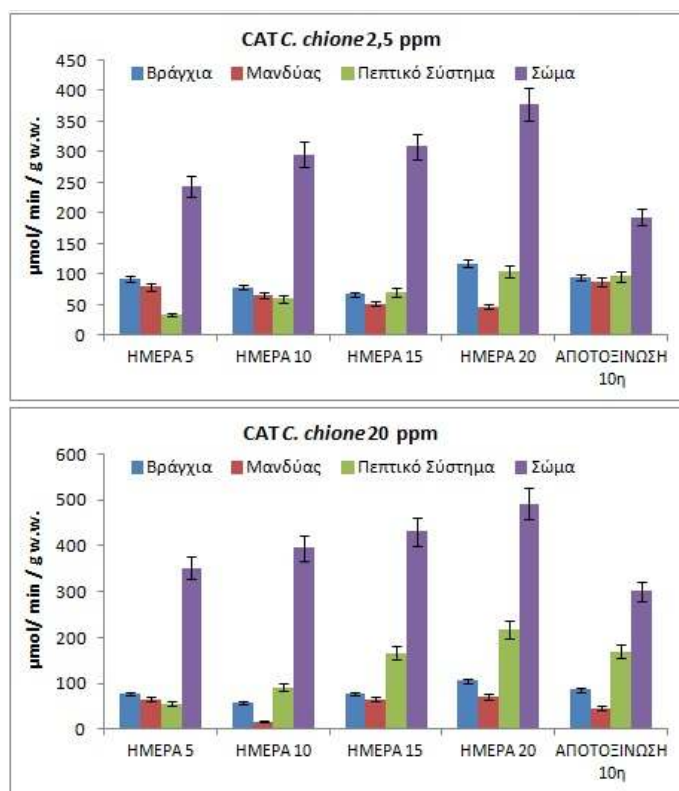
Με την πάροδο των ημερών στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών αναφοράς η ενεργότητα της καταλάσης ήταν σχεδόν σταθερή (34-35 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ w.w. για τα βράγχια και 22-24 για το μανδύα). Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών αναφοράς η καταλάση αυξήθηκε κατά 24% (από 13-17 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ w.w.), ενώ στο σώμα μειώθηκε κατά 9% (από 90 σε 83 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ w.w.).

Οι τιμές καταλάσης (CAT) που μετρήθηκαν στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο ήταν γενικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 29, μεταξύ των ιστών, οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο σώμα, οι οποίες αυξάνονταν σταθερά με την πάροδο του χρόνου. Στο πεπτικό σύστημα η τάση ήταν επίσης αυξητική αλλά με τιμές χαμηλότερες από του σώματος. Οι άλλοι δύο ιστοί, κυρίως για τα υψηλότερα επίπεδα μετάλλου παρουσίασαν αυξομειώσεις τις πρώτες 10 ημέρες του πειράματος και μετά αυξητική τάση με το χρόνο. Γενικά, μέγιστη τιμή προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα έκθεσης. Συνολικά για την περίοδο έκθεσης η τάση ήταν: σώμα >> βράγχια \approx πεπτικό σύστημα \approx μανδύας.

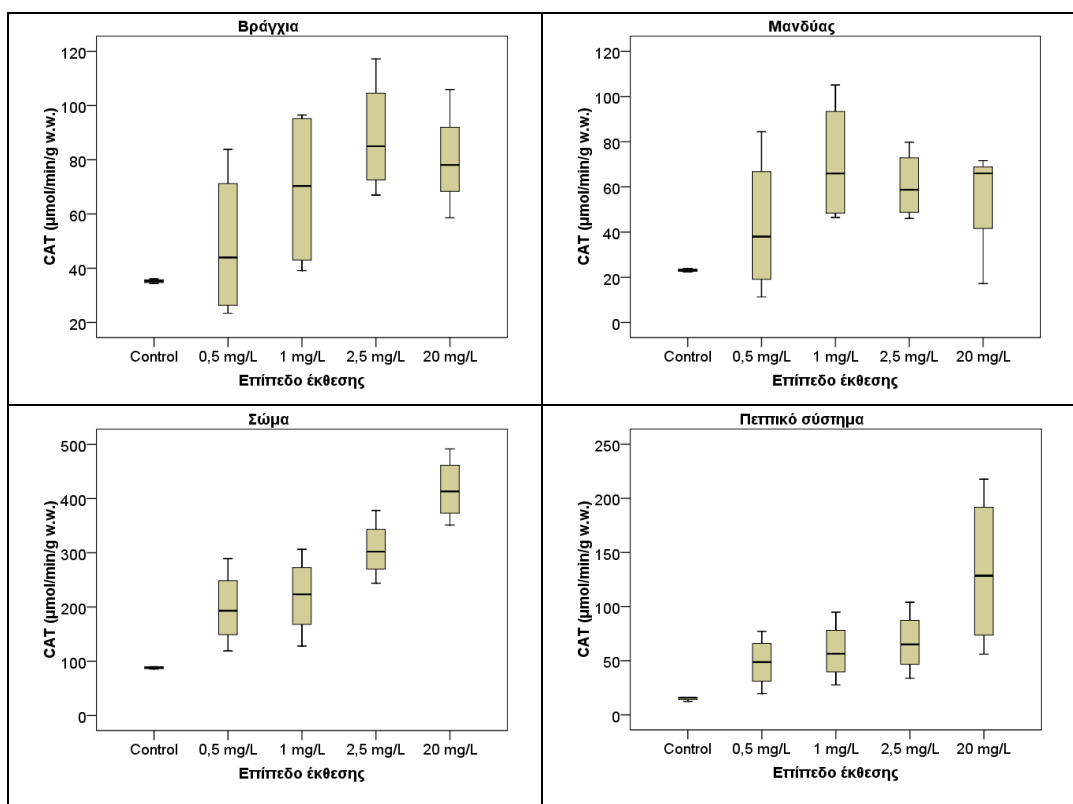
Γενικά, οι τιμές της καταλάσης αυξήθηκαν στους ιστούς κατά την έκθεση, ενώ στην αποτοξίνωση μειώθηκαν (Σχήμα 29). Από το Σχήμα 30 για τα βράγχια και το μανδύα είναι εμφανές ότι η δραστηριότητα της καταλάσης για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης, αυξήθηκε όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Τα δύο υψηλότερα επίπεδα είχαν παρόμοιες τιμές μεταξύ τους. Για το πεπτικό σύστημα και το σώμα, παρατηρήθηκε αύξηση με το επίπεδο έκθεσης και μείωση κατά την αποτοξίνωση. Η υψηλότερη ενεργότητα καταλάσης τόσο στο πεπτικό σύστημα, όσο και στο σώμα προσδιορίστηκε στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν στο υψηλότερο επίπεδο μολύβδου.

Από τα παραπάνω μπορεί να προκύψει το συμπέρασμα ότι η ενεργότητα της καταλάσης αυξανόταν στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο (αναποκρίνεται το ένζυμο), όμως φαίνεται να υπήρχε ένα όριο, πάνω από το οποίο η καταλάση δεν μπορούσε να αυξηθεί.





Σχήμα 29: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 30: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.2.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

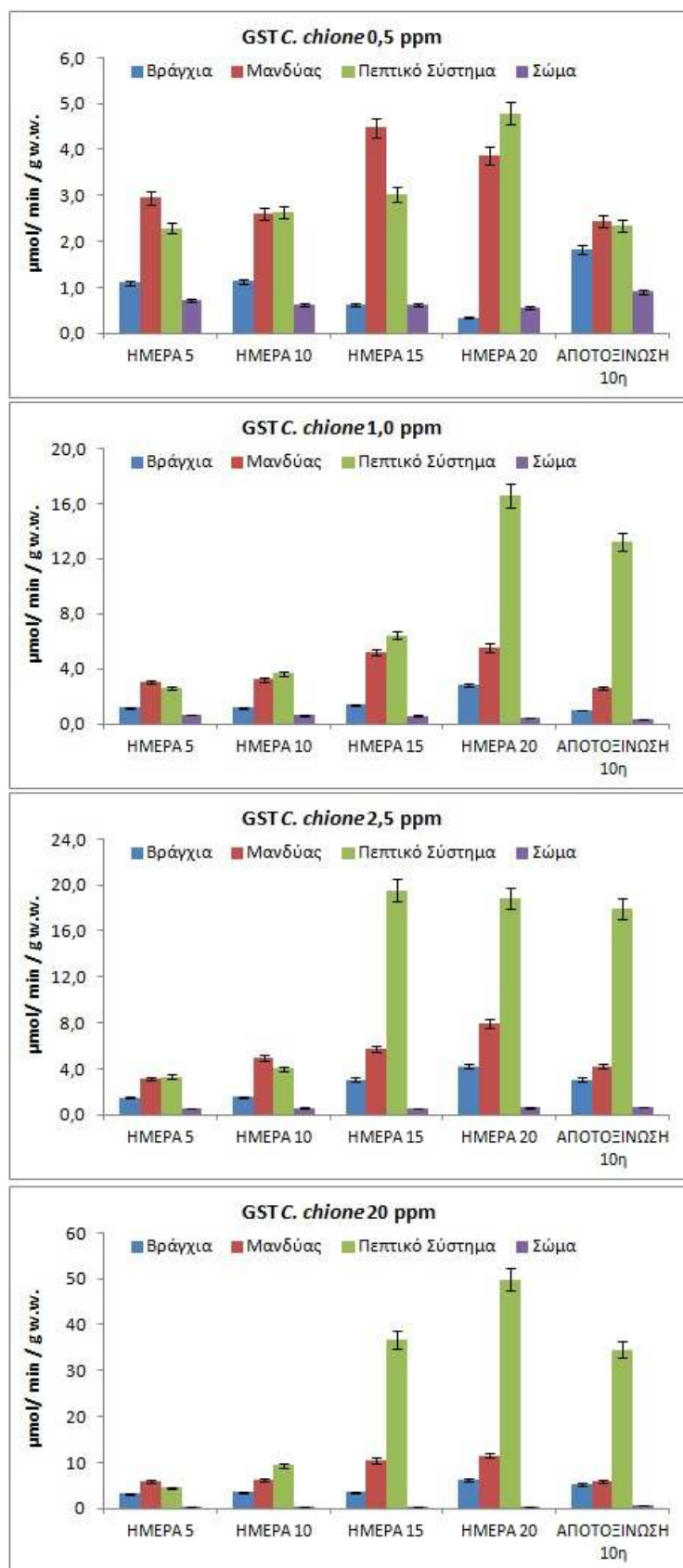
Με την πάροδο των ημερών στα βράγχια και το σώμα των οργανισμών αναφοράς η συγκέντρωση της S μεταφοράσης της γλουταθειόνης (εκφρασμένη ως $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) παρέμεινε σταθερή (0,98-1,02 για τα βράγχια και 0,90 για το σώμα), ενώ στο μανδύα και στο πεπτικό σύστημα μειωνόταν ελαφρά, κατά 10 και 19% αντίστοιχα (από 2,26 για το μανδύα φτάνει το 2,03 και από το 2,0 για το πεπτικό σύστημα φτάνει το 1,61). Άρα η τάση μεταξύ των ιστών ήταν η εξής: μανδύας> πεπτικό σύστημα> βράγχια> σώμα.

Στα βράγχια των οργανισμών προσδιορίστηκε η υψηλότερη συγκέντρωση μολύβδου, όχι όμως και η υψηλότερη ενεργότητα της GST και της καταλάσης σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς, κάτι που ίσως να αποτελεί ένδειξη κυτταρικής βλάβης²⁷². Οι τιμές GST στο σώμα των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μολύβδου, ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς και με την πάροδο των ημερών μειώνονταν (Σχήμα 31 και 32). Αντίθετα, οι τιμές των υπόλοιπων ιστών ήταν υψηλότερες, με μέγιστη τιμή την 15η και 20η ημέρα, ανάλογα με τον ιστό και το επίπεδο έκθεσης. Στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Pb, οι τιμές του ενζύμου ήταν σχεδόν παρόμοιες με τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 32).

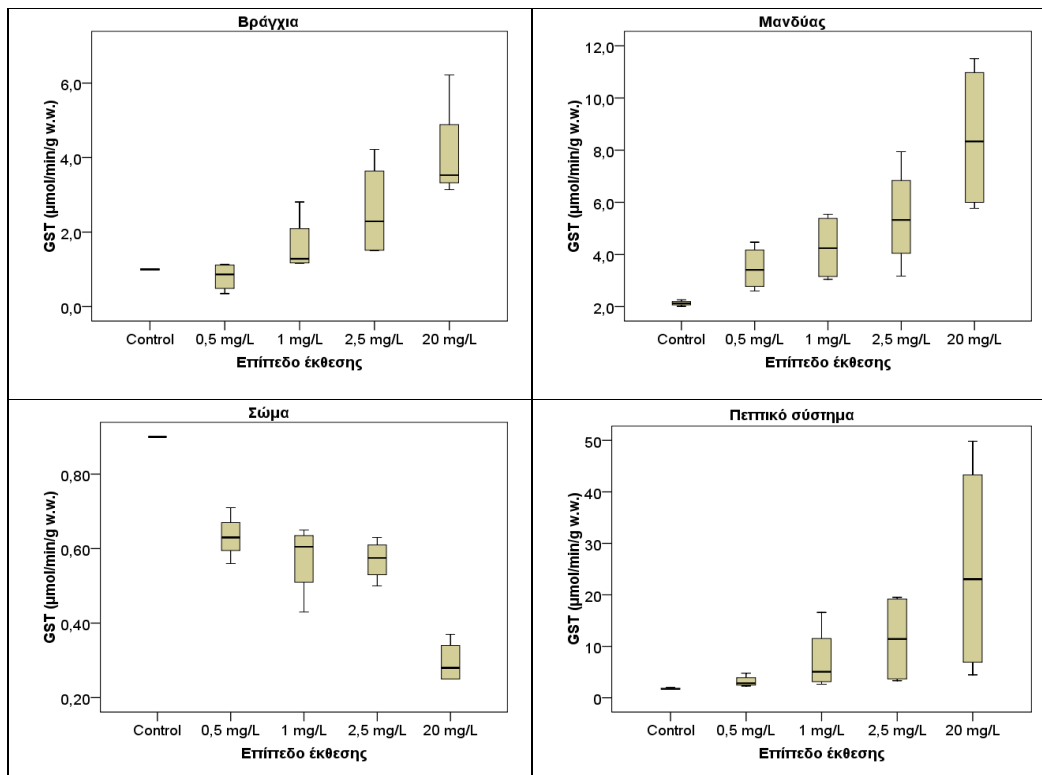
Οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών για όλα τα επίπεδα έκθεσης εκτός από το 0,5 ppm Pb, στο οποίο ο μανδύας και το πεπτικό σύστημα είχαν τις υψηλότερες τιμές ενζύμου, οι οποίες ήταν και παρόμοιες μεταξύ τους. Η διάμεση τιμή της GST για τον κάθε ιστό, μειώνεται κατά την σειρά μανδύας≥ πεπτικό σύστημα> βράγχια≥ σώμα, για την περίοδο έκθεσης, για το χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης, ενώ σε όλα τα υπόλοιπα, η τάση μπορεί να παρουσιαστεί ως εξής: πεπτικό σύστημα≥ μανδύας≥ βράγχια≈ σώμα (Σχήμα 31).

Παρά τις όποιες αυξομειώσεις, κατά την περίοδο έκθεσης, οι τιμές στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα αυξάνονταν, με μέγιστη τιμή την 20^η ημέρα έκθεσης για όλα σχεδόν τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 31). Αντίθετα, στο σώμα οι τιμές μειώνονταν συνεχώς, με ελάχιστο την 20^η ημέρα και τιμή κατά 1/3 μικρότερη από την αντίστοιχη του πληθυσμού αναφοράς. Για τον ίδιο ιστό αύξηση παρατηρήθηκε με την αύξηση του επιπέδου έκθεσης (Σχήμα 32).

Κατά την αποτοξίνωση, παρατηρήθηκε μείωση στα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα, ενώ αύξηση παρατηρήθηκε στο σώμα τους (Σχήμα 31). Η αποτοξίνωση δεν ήταν στατιστικά διαφορετική από την περίοδο έκθεσης για κανέναν από τους ιστούς των γυαλιστερών. Στο σώμα κατά την έκθεση οι τιμές της GST μειώνονταν συνεχώς, αλλά κατά την αποτοξίνωση αυξήθηκαν, κάτι που πιθανά αποτελεί ένδειξη ότι ανακάμπτει ο οργανισμός.



Σχήμα 31: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 32: Box-plots των επιπέδων της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.2.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

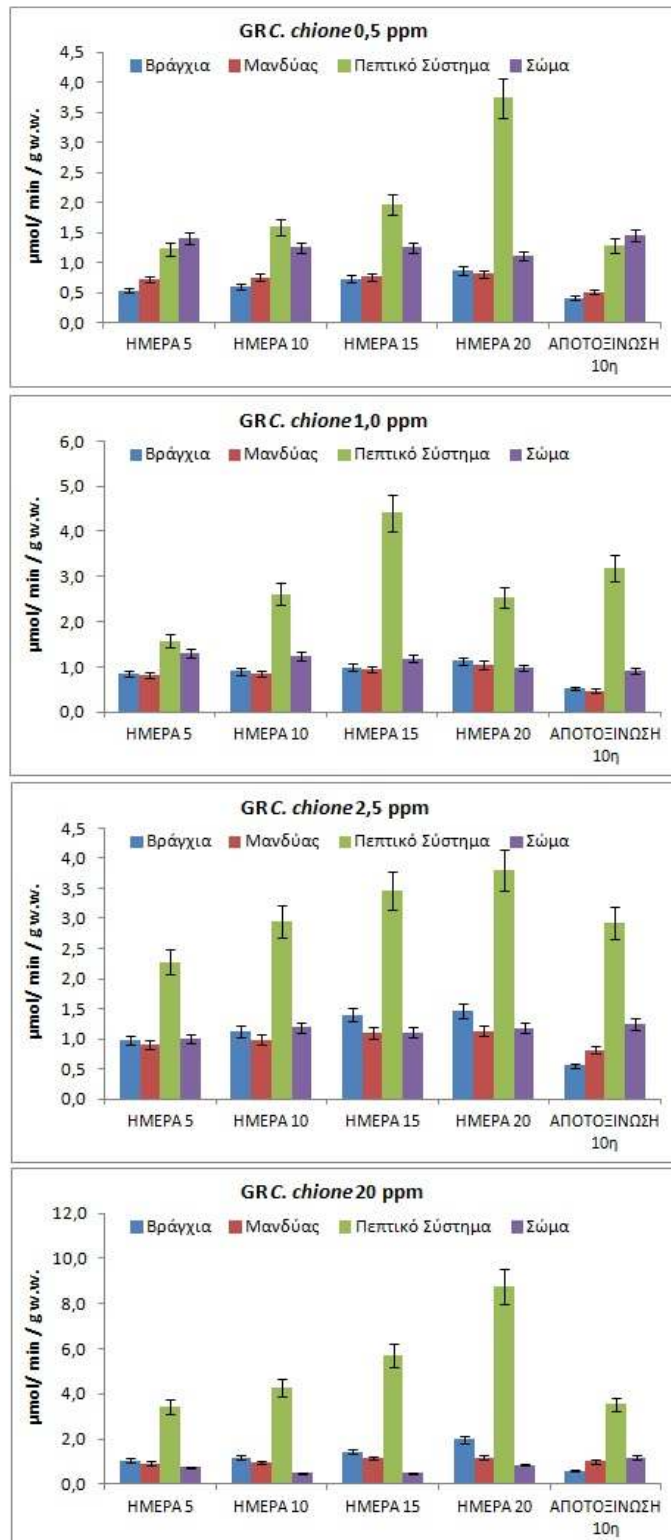
Για τον πληθυσμό αναφοράς, με την πάροδο των ημερών στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των οργανισμών η ενεργότητα της GR δεν παρουσίασε μεταβολές, ενώ στο πεπτικό σύστημα οι τιμές μειώθηκαν κατά 1,7 φορές στο τέλος του πειράματος.

Συνολικά για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης, η τάση ήταν: πεπτικό σύστημα > σώμα \geq μανδύας \geq βράγχια, ενώ για τα δύο υψηλότερα επίπεδα: πεπτικό σύστημα > βράγχια \approx σώμα \approx μανδύας. Την αντίστροφη ακριβώς τάση εμφάνισε η συγκέντρωση του μολύβδου, με μέγιστες συγκεντρώσεις στα βράγχια και τις μικρότερες στο πεπτικό σύστημα σε όλα τα επίπεδα έκθεσης.

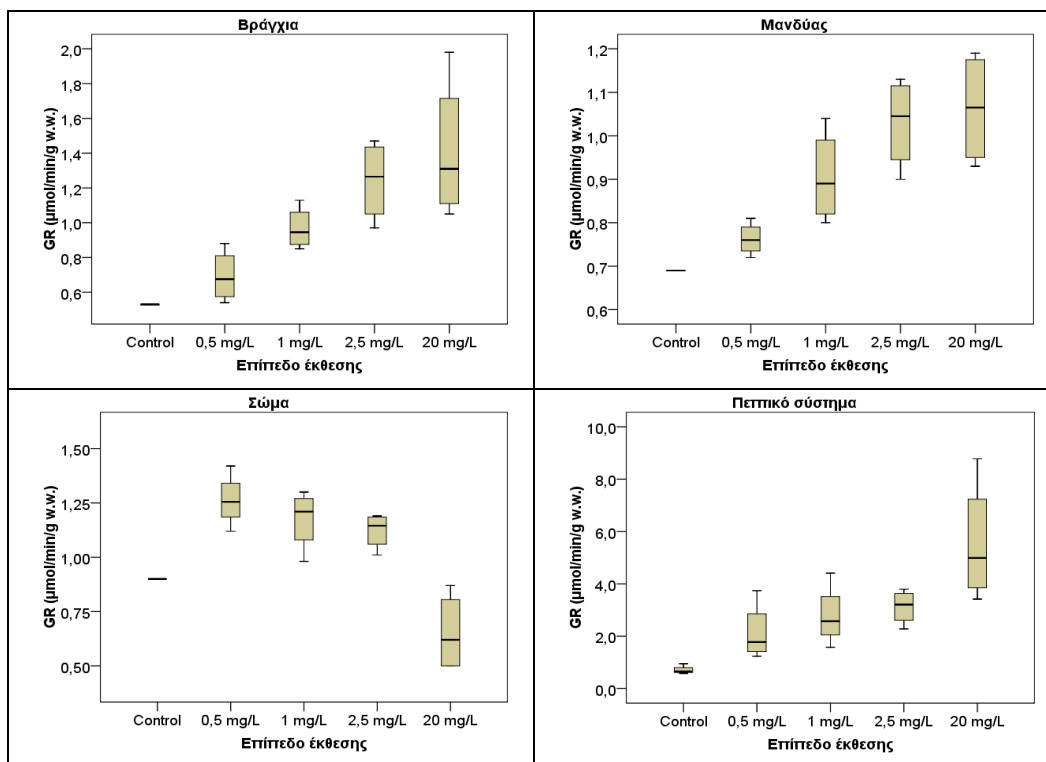
Από τα Σχήματα 33 και 34 φαίνεται ότι η τιμή της GR για τα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα, είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς, οι οποίες γενικά αυξάνονταν κατά την έκθεση και μειώνονταν κατά την αποτοξίνωση. Για το σώμα, φαίνεται ότι η τιμή GR στα τρία χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς, οι οποίες μειώνονταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, καταλήγοντας σε τιμές μικρότερες του πληθυσμού αναφοράς για τις γυαλιστερές που εκτέθηκαν σε 20 ppm μολύβδου.

Γενικά, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, όλοι οι ιστοί των οργανισμών εκτός από το σώμα, εμφάνισαν μέγιστες τιμές την 20η ημέρα έκθεσης και συνακόλουθη μείωση στην αποτοξίνωση. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν την 20η ημέρα έκθεσης είναι ως και τετραπλάσιες σε σχέση με τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς. Κατά την αποτοξίνωση, οι τιμές της GR στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών μειώθηκαν σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, εκτός από το 1,0 ppm, όπου παρατηρήθηκε

αύξηση. Στο σώμα παρατηρήθηκε αντίθετη τάση. Η αύξηση που παρατηρήθηκε στο σώμα ήταν σημαντική γιατί οι τιμές κατά την έκθεση ήταν πολύ χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, κάτι που αποτελούσε ένδειξη τοξικότητας του μετάλλου στον ιστό. Οι οργανισμοί όμως φαίνεται πως όταν βρεθούν σε καθαρό θαλασσινό νερό ανακάμπτουν.



Σχήμα 33: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 34: Box-plots των επιπέδων της GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.2.7 Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Από τον Πίνακα 18 φαίνεται ότι όταν οι οργανισμοί έφτασαν στο εργαστήριο, οι υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών προσδιορίστηκαν στα βράγχια, οι αμέσως χαμηλότερες στο μανδύα, μετά στο πεπτικό σύστημα και οι χαμηλότερες στο σώμα. Όταν όμως παρέμειναν σε νερό με χαμηλότερες συγκεντρώσεις μολύβδου, οι τιμές στα βράγχια και στο μανδύα μειώθηκαν, ενώ στο πεπτικό σύστημα αυξήθηκαν, φτάνοντας στο τέλος του πειράματος να είναι ο ιστός με τις υψηλότερες τιμές. Στο σώμα, τα επίπεδα μεταλλοθειονινών παρέμειναν σταθερά.

Πίνακας 18: Επίπεδα μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol}/\text{g w.w.}$) κατά τη διάρκεια του πειράματος στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς

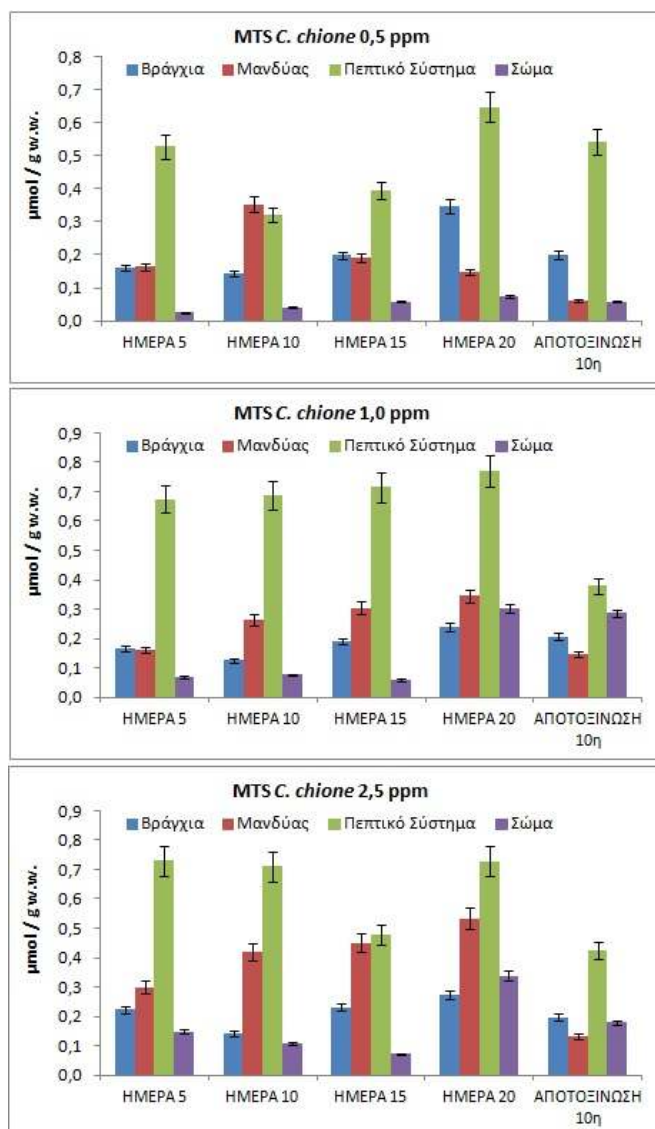
	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10
Βράγχια	0,046	0,042	0,040	0,025	0,029
Μανδύας	0,037	0,059	0,046	0,038	0,029
Πεπτικό Σύστημα	0,032	0,053	0,048	0,043	0,044
Σώμα	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001

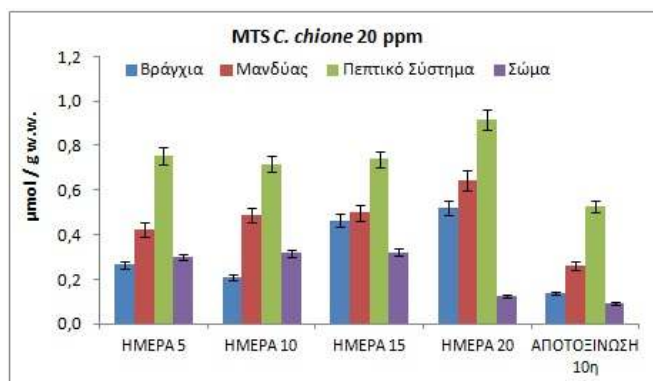
Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 35) παρατηρήθηκε πως το σώμα είχε τις χαμηλότερες τιμές. Το πεπτικό σύστημα ήταν ο ιστός με τις υψηλότερες τιμές. Στο Σχήμα 36 παρατηρείται γενικά ότι όσο αυξάνεται το επίπεδο έκθεσης, αυξάνεται και η τιμή των μεταλλοθειονινών. Γενικά είναι εμφανές πως η αύξηση των μεταλλοθειονινών ήταν μεγαλύτερη στο πεπτικό σύστημα (το οποίο είχε τις

χαμηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου) από τους υπόλοιπους ιστούς. Για την περίοδο έκθεσης, η τάση ήταν η εξής: πεπτικό σύστημα > μανδύας ≈ βράγχια > σώμα.

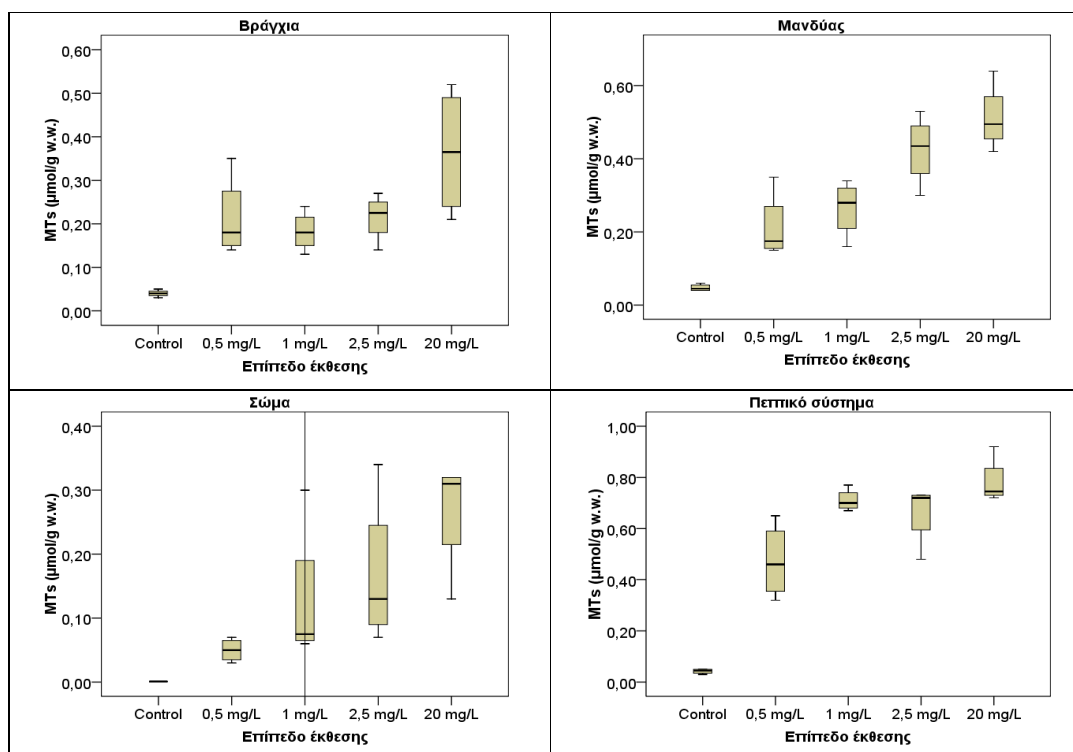
Η υψηλότερη συγκέντρωση μολύβδου στους ιστούς των οργανισμών προσδιορίστηκε στα βράγχια και η χαμηλότερη στο πεπτικό σύστημα. Φαίνεται πως ο οργανισμός αύξησε την παραγωγή μεταλλοθειονινών κατά την έκθεση σε σχέση με την αντίστοιχη του πληθυσμού αναφοράς, δεν ήταν σε θέση να παράξει όμως μεγαλύτερη ποσότητα όσο αυξανόταν η συγκέντρωση μολύβδου. Γι' αυτό και παρατηρήθηκε στον ιστό με την υψηλότερη συγκέντρωση μολύβδου (βράγχια), η χαμηλότερη συγκέντρωση μεταλλοθειονινών. Το πλατώ αυτό φαίνεται ανάμεσα στην 5η και την 15η ημέρα στο σώμα των γυαλιστερών που έχουν εκτεθεί σε 20 ppm Pb.

Το σώμα είχε πολύ χαμηλές τιμές μεταλλοθειονινών, όμως στα επίπεδα έκθεσης 1,0 και 2,5 ppm φαίνεται πως οι MTs αυξήθηκαν την 20^η ημέρα σε σχέση με την 15η ημέρα (περίπου 5 φορές). Παρ' ότι η συγκέντρωση μολύβδου αυξήθηκε σε σχέση με τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς, παρατηρήθηκε πως η αύξηση των μεταλλοθειονινών δεν ήταν ανάλογη. Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης των οργανισμών οι τιμές των μεταλλοθειονινών μειώθηκαν σε όλους τους ιστούς, χωρίς να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα (Σχήμα 35).





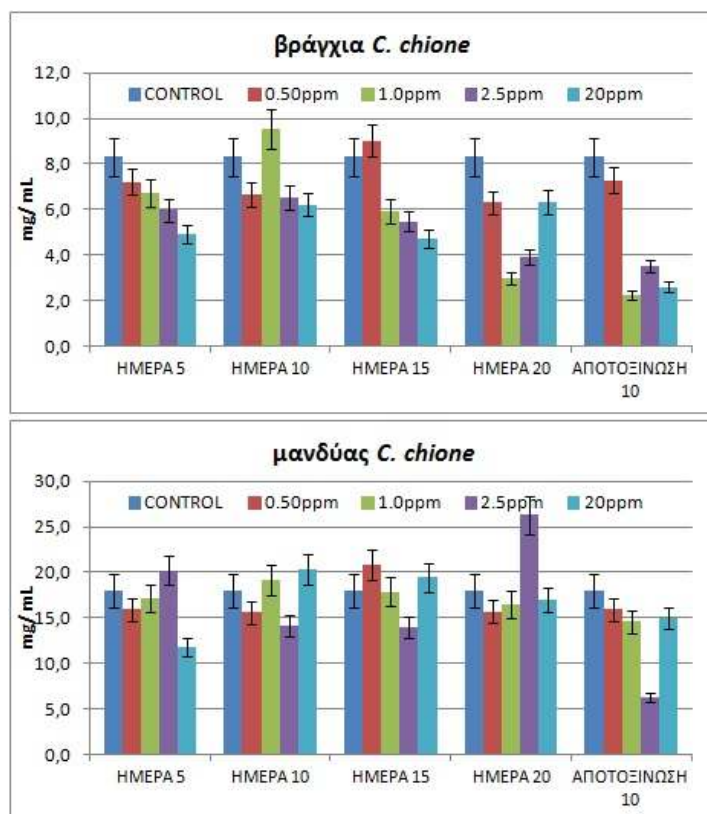
Σχήμα 35: Χρονική μεταβολή των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 36: Βοξ-plotς των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.2.8 Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

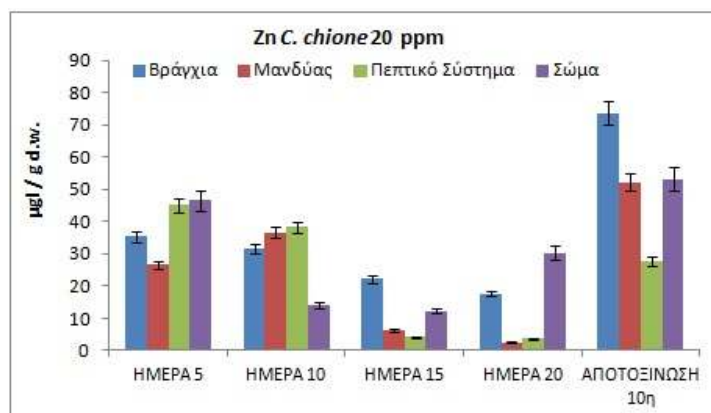
Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές ολικής πρωτεΐνης, μεταξύ των ιστών, χωρίς όμως να υπάρχει ξεκάθαρη τάση με τις ημέρες έκθεσης.



Σχήμα 37: Χρονική μεταβολή των επιπέδων ολικής πρωτεΐνης (mg/mL) στα βράγχια και το μανδύα των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.2.9 Ψευδάργυρος σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Στατιστικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου με την πάροδο των ημερών έκθεσης σε μόλυβδο βρέθηκε μόνο στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε 20 ppm μολύβδου, κάτι που υποδεικνύει ότι η συγκέντρωση του ψευδαργύρου στους ιστούς των γυαλιστερών επηρεάζεται μόνο όταν οι οργανισμοί εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου.



Σχήμα 38: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων ψευδαργύρου (μg/g d.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Pb

4.2.10 Συσχετίσεις μολύβδου με βιοδείκτες

Όλες οι τιμές του μολύβδου, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε έναν από τους τέσσερις ιστούς, συσχετίστηκαν με τη βοήθεια του συντελεστή Pearson (Pearson correlation, SPSS 17.0), με τις αντίστοιχες τιμές βιοδεικτών και προέκυψαν για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, όπως φαίνεται και από τους Πίνακες 19-22:

- αρνητική συσχέτιση με την ακετυλοχολινεστεράση στο μανδύα και στο πεπτικό σύστημα, ενώ στο σώμα η συσχέτιση ήταν θετική.
- θετική συσχέτιση με την λιπιδική υπεροξειδωση σε όλους τους ιστούς.
- θετική συσχέτιση με την S μεταφοράση της γλουταθειόνης (GST) στα βράγχια των γυαλιστερών.
- θετική συσχέτιση με την αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών.
- θετική συσχέτιση με την καταλάση (CAT) στα βράγχια των οργανισμών.
- θετική συσχέτιση με τις μεταλλοθειονίνες (MTs) στα βράγχια και στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών.

4.2.11 Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Επειδή οι βιοδείκτες συσχετίζονται με το μόλυβδο, υπάρχει περίπτωση να συσχετίζονται και μεταξύ τους. Στόχος της εύρεσης συσχετίσεων μεταξύ των τιμών των βιοδεικτών ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει κοινή συμπεριφορά-τάση των βιοδεικτών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο τρόπος αντίδρασης στην έκθεση σε μόλυβδο είναι παρόμοιος. Έτσι από την συσχέτιση όλων των τιμών του βιοδεικτών μεταξύ τους, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε έναν από τους τέσσερις ιστούς, και επίπεδο εμπιστοσύνης >95%, βρέθηκαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις:

- αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με την λιπιδική υπεροξειδωση για το μανδύα και το πεπτικό σύστημα, ενώ θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε στο σώμα.
- αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με την GST και την GR στο μανδύα
- θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με τις GST και GR στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα
- θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με την CAT, στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα
- θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με τις μεταλλοθειονίνες, στα βράγχια και στο πεπτικό σύστημα
- θετική συσχέτιση της GST με την GR, την CAT, και τις MTs στα βράγχια, το μανδύα και στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών. Ενώ συσχέτιση της GST με τον ψευδάργυρο έδωσε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση για τα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών. Συσχέτιση της GST με τους παραπάνω βιοδείκτες είχε την ακριβώς αντίθετη τάση στο σώμα των οργανισμών.

- θετική συσχέτιση της GR με την CAT, και τις μεταλλοθειονίνες στα βράγχια, το μανδύα (όχι με την καταλάση) και στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών. Συσχέτιση της GR με τον ψευδάργυρο έδωσε αρνητική συσχέτιση για τα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών. Στο σώμα των οργανισμών οι τάσεις ήταν οι αντίθετες.
- θετική συσχέτιση της CAT με τις τις μεταλλοθειονίνες για τα βράγχια, το πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών. Ενώ συσχέτιση της CAT με τον ψευδάργυρο έδωσε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών.
- αρνητική συσχέτιση των μεταλλοθειονινών με τον ψευδάργυρο, στα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα.

Οι παραπάνω συσχετίσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές αν οι τιμές των βιοδεικτών για καθένα από τους τρεις υπό μελέτη ιστούς συσχετιστούν μεταξύ τους σε κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης (ή ήταν στατιστικά σε κάποια επίπεδα έκθεσης, ενώ σε κάποια άλλα όχι).

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

Οι μεταλλοθειονίνες είναι ένας αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων που λειτουργεί στην αιτία (είσοδος μετάλλου στους οργανισμούς) καθώς παράγονται όταν εισέρχονται μέταλλα στους ιστούς. Σε κάθε ιστό παρατηρείται αύξηση των μεταλλοθειονινών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο αμυντικός μηχανισμός βρίσκεται σε λειτουργία. Προφανώς όμως δεν επαρκεί, ή δεν είναι αρκετά αποτελεσματικός, καθώς οι μετρήσεις των βιοδεικτών (AChE, GST, GR, CAT, LPO) φαίνεται πως επηρεάζονται από τα βαρέα μέταλλα.

Αν χρησιμοποιηθεί ο μανδύας ή το σώμα των γυαλιστερών ως ιστός ελέγχου, ο κατάλληλος βιοδείκτης είναι η λιπιδική υπεροξειδωση (αναμένεται αύξηση και στους δύο ιστούς) και η ακετυλοχολινεστεράση (αναμένεται μείωση) καθώς εμφανίζουν ξεκάθαρη τάση με το χρόνο έκθεσης και στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το μόλυβδο σε όλα επίπεδα έκθεσης)

Αν χρησιμοποιηθεί το πεπτικό σύστημα ως ιστός ελέγχου, ο κατάλληλος βιοδείκτης είναι η ακετυλοχολινεστεράση και η λιπιδική υπεροξειδωση (αναμένεται μείωση και για τους δύο βιοδείκτες), ενώ αν χρησιμοποιηθούν τα βράγχια ως ιστός ελέγχου, τα οποία βιοσυσσωρεύουν περισσότερο μέταλλο, καταλληλότερος βιοδείκτης είναι η λιπιδική υπεροξειδωση, η GST, η GR και οι μεταλλοθειονίνες.

Πίνακας 19: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	-0,472	1							
LPO	0,857**	-0,102	1						
GST	0,760**	-0,332	0,677**	1					
GR	0,758**	-0,236	0,716**	0,906**	1				
CAT	0,540*	-0,142	0,498*	0,534*	0,660**	1			
MTs	0,594*	-0,203	0,410	0,682**	0,746**	0,547*	1		
Zn	-0,209	0,477	0,004	-0,576*	-0,532*	-0,198	-0,503*	1	
Ολική πρωτεΐνη	-0,300	0,058	-0,426	-0,510*	-0,458	-0,582*	-0,376	0,208	1

Πίνακας 20: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	-0,894**	1							
LPO	0,887**	-0,822**	1						
GST	0,427	-0,515*	0,612*	1					
GR	0,568*	-0,591*	0,710**	0,878**	1				
CAT	0,317	-0,031	0,359	0,155	0,292	1			
MTs	0,377	-0,419	0,512*	0,827**	0,870**	-0,033	1		
Zn	-0,298	0,247	-0,444	-0,657**	-0,574*	-0,438	-0,533*	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,135	-0,326	0,216	0,214	0,178	-0,173	0,130	-0,042	1

Πίνακας 21: : Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	0,776**	1							
LPO	0,937**	0,824**	1						
GST	-0,058	-0,066	-0,149	1					
GR	0,031	-0,008	-0,071	0,972**	1				
CAT	0,219	0,388	0,386	-0,819**	-0,784**	1			
MTs	0,266	0,310	0,403	-0,686**	-0,751**	0,683**	1		
Zn	0,135	0,202	0,114	0,614*	0,607*	-0,351	-0,404	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,400	0,370	0,609*	-0,246	-0,170	0,413	0,489	-0,072	1

Πίνακας 22: : Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	-0,812**	1							
LPO	0,837**	-0,687**	1						
GST	0,256	-0,064	0,542*	1					
GR	0,326	-0,240	0,667**	0,867**	1				
CAT	0,260	-0,159	0,609*	0,954**	0,924**	1			
MTs	0,513*	-0,293	0,756**	0,501*	0,639**	0,565*	1		
Zn	-0,234	0,151	-0,527*	-0,818**	-0,802**	-0,860**	-0,550*	1	
Ολική πρωτεΐνη	-0,152	0,162	-0,166	-0,330	-0,209	-0,252	-0,009	0,120	1

* δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

** δηλώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

4.3 Έκθεση *Venus verrucosa* σε μόλυβδο

4.3.1 Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα μολύβδου στο θαλασσίνο νερό

Τα επίπεδα Pb που προσδιορίστηκαν στον αρχικό πληθυσμό κυδωνιών, αμέσως μετά την άφιξη στο εργαστήριο παρουσιάζονται στον Πίνακα 23. Όπως φαίνεται, υπάρχει υπέρβαση του νομοθετικού ορίου⁶⁸ για τα κυδώνια που συλλέχθηκαν από το Σαρωνικό κόλπο.

Πίνακας 23: Συγκεντρώσεις μολύβδου στους ιστούς των *Venus verrucosa*

<i>V. verrucosa</i>	Pb (μg/g d.w.)	Pb (μg/g w.w.)
ΒΡΑΓΧΙΑ	1,6	1,4
ΜΑΝΔΥΑΣ	7,8	5,4
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	7,7	5,1
ΣΩΜΑ	0,90	0,63
ΟΛΙΚΟ ΖΩΟ	4,92	3,0
Όρια με βάση τη νομοθεσία ⁶⁸		
ΟΛΙΚΟ ΖΩΟ	-	1,5

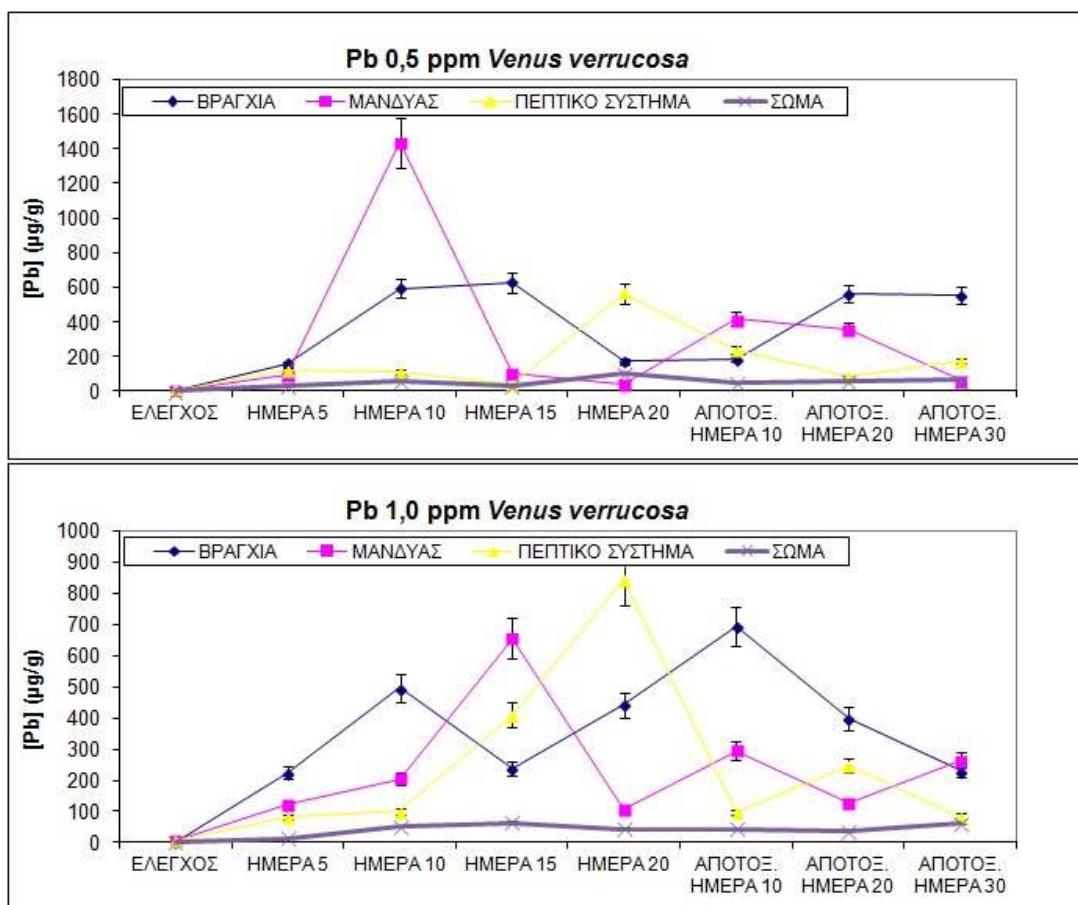
Οι συγκεντρώσεις του μολύβδου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς κατά την διάρκεια του πειράματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 24. Η συγκέντρωση του μολύβδου στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα των κυδωνιών μειώθηκε αρκετά στο τέλος του πειράματος σε σχέση με την τιμή της DAY0 (6 και 7 φορές αντίστοιχα). Στα βράγχια η συγκέντρωση μολύβδου αυξήθηκε, ($p>0,05$), πιθανά λόγω μεταφοράς του μετάλλου από τον ένα ιστό στον άλλο.

Πίνακας 24: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης μολύβδου (μg/g d.w.) στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς

	ΕΛΕΓΧΟΣ	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10	αποτοξίνωση DAY 20	αποτοξίνωση DAY 30
ΒΡΑΓΧΙΑ	1,6	2,0	2,9	2,0	2,2	2,2	2,2	2,2
ΜΑΝΔΥΑΣ	7,8	6,9	6,27	2,0	1,4	1,3	1,3	1,3
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	7,7	7,25	5,1	1,99	1,1	1,0	1,1	1,1
ΣΩΜΑ	0,90	0,6	3,5	1,0	0,7	0,71	0,72	0,70

Όσον αφορά τις δύο χαμηλές συγκεντρώσεις (Σχήμα 39), οι ιστοί δεν εμφάνισαν κάποια ξεκάθαρη τάση, αλλά αυξομειώνονταν με την πάροδο του χρόνου έκθεσης. Επίσης δεν ξεχώριζε κάποιος από τους ιστούς με πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις. Οι τιμές που μετρήθηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Pb ήταν γενικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Pb.

Μετά από σύγκριση των συγκεντρώσεων του μολύβδου κατά το 20ήμερο έκθεσης με τις τιμές των 30 ημερών αποτοξίνωσης προέκυψε ότι οι τιμές δεν ήταν στατιστικά διαφορετικές ($p>0,05$) σε κανέναν από τους τέσσερις υπό μελέτη ιστούς για κανένα από τα δύο επίπεδα έκθεσης.

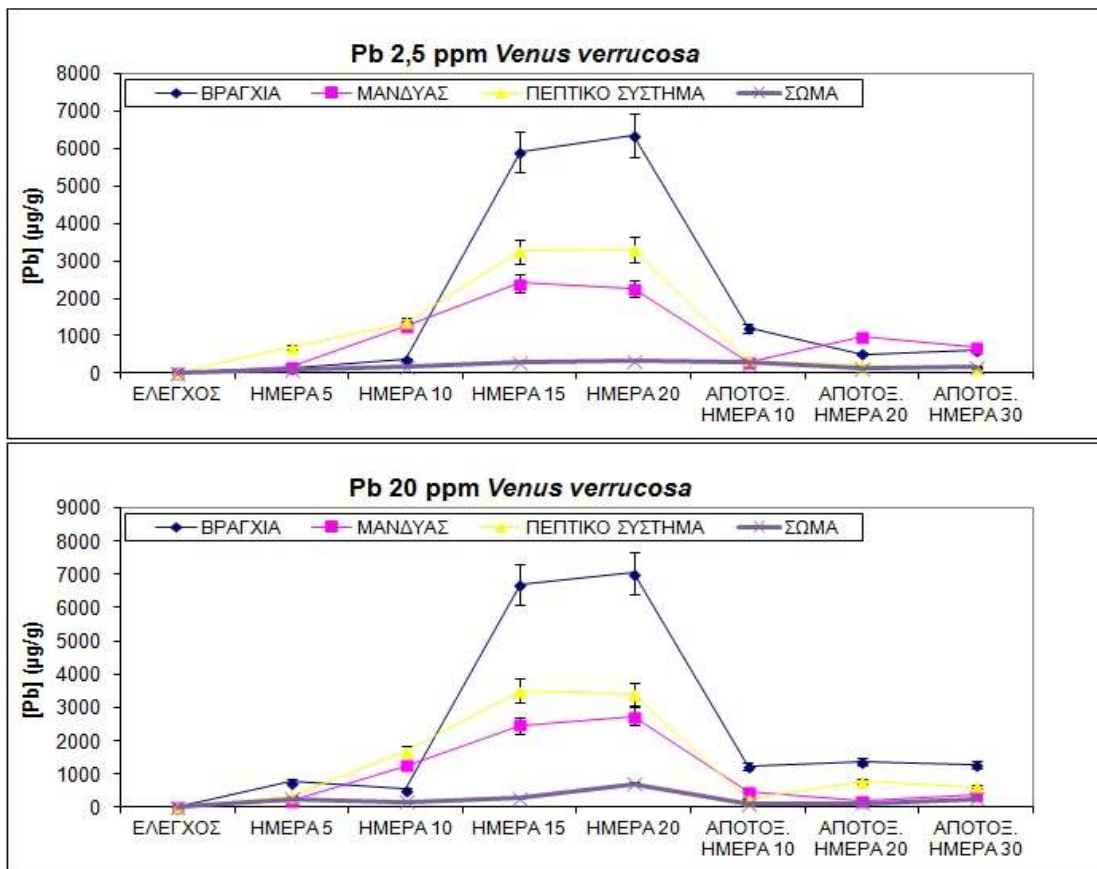


Σχήμα 39: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του μολύβδου (μg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών

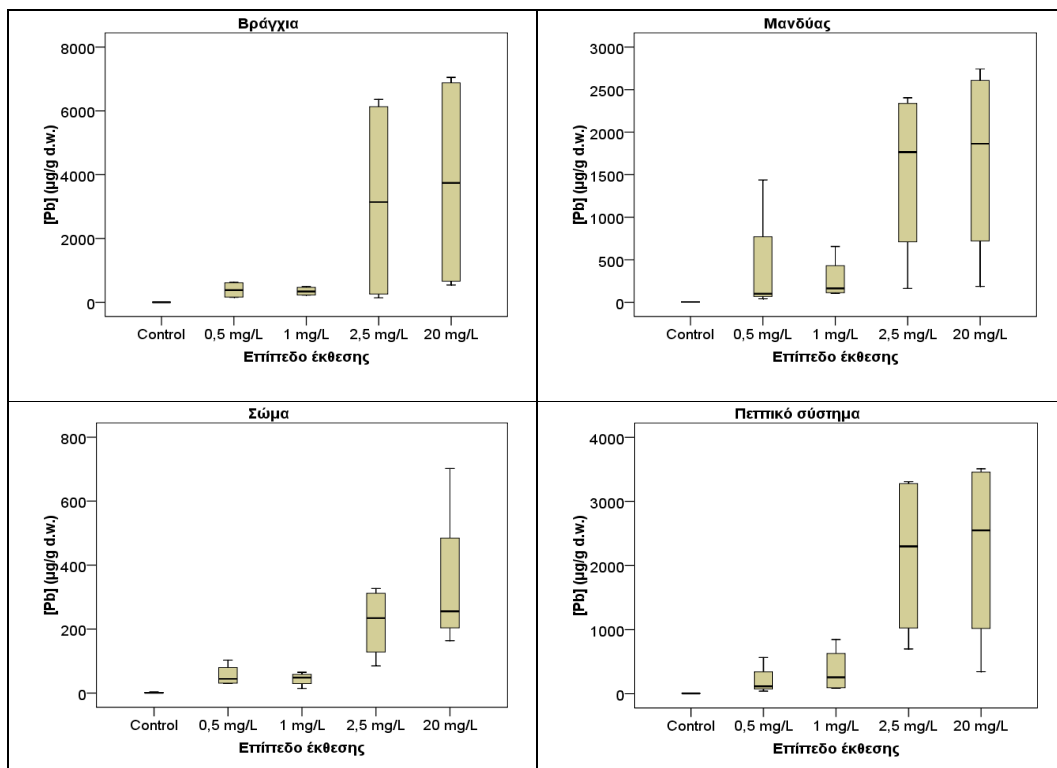
Για τα δύο υψηλότερα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 40), φαίνεται πως παράταση της έκθεσης των οργανισμών σε μολύβδο, οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου στους ιστούς, έως και 4.400 φορές, σε σχέση με του πληθυσμού αναφοράς. Ανάμεσα στους ιστούς, για τα δύο αυτά επίπεδα έκθεσης, τα βράγχια των οργανισμών βιοσυγκέντρωναν περισσότερο μολύβδο ανά μονάδα ξηρής μάζας, το πεπτικό σύστημα και ο μανδύας είχαν τις αμέσως χαμηλότερες τιμές και το σώμα τις πιο χαμηλές. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έδειξε ότι μόνο τα βράγχια ήταν στατιστικά διαφορετικά από τους υπόλοιπους ιστούς ($p < 0,05$).

Τα βράγχια φαίνεται πως για τα κυδώνια που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα μολύβδου, ήταν το όργανο-στόχος. Στα δύο υψηλότερα επίπεδα έκθεσης, το μέγιστο της συγκέντρωσης μολύβδου παρατηρήθηκε σε όλους τους υπό μελέτη ιστούς την 20^η ημέρα έκθεσης και μάλιστα η αύξηση ως την 20^η ημέρα ήταν σε ορισμένες περιπτώσεις γραμμική (Σχήμα 40). Οι τιμές βέβαια σε όλους τους ιστούς και στα δύο επίπεδα έκθεσης ήταν γενικά χαμηλές έως την 10^η ημέρα, ενώ στα βράγχια και το μανδύα αυξήθηκαν πολύ την 15^η και 20^η ημέρα. Κυρίως για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 2,5 και 20 ppm Pb φαίνεται ότι αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης μολύβδου σε κάθε ιστό των οργανισμών (Σχήμα 41).

Κατά το πρώτο 10ήμερο της αποτοξίνωσης μειώθηκε η συγκέντρωση μολύβδου σε όλους τους ιστούς και για τα δύο επίπεδα έκθεσης. Την 20^η και 30^η ημέρα της αποτοξίνωσης η τάση δεν ήταν τόσο ξεκάθαρη καθώς παρουσιάστηκαν διάφορες αυξομειώσεις πιθανόν λόγω μεταφοράς του μετάλλου από τον ένα ιστό στον άλλο κατά την διαδικασία αποτοξίνωσης.



Σχήμα 40: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του μολύβδου (µg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών



Σχήμα 41: Box-plots των συγκεντρώσεων του μολύβδου (µg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών

Κατανομή μολύβδου μεταξύ των ιστών των οργανισμών

Η ποσοστιαία κατανομή του μολύβδου μεταξύ των ιστών των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης κατά την περίοδο έκθεσης, παρουσίασε αυξομειώσεις. Γενικά όμως, ο μανδύας είχε πολύ υψηλά ποσοστά μολύβδου τα οποία αυξάνονταν με τις ημέρες έκθεσης (από 32 σε 61%). Την 20^η ημέρα, το ποσοστό του μολύβδου στο μανδύα μειώθηκε (σε 5% και 8,3% αντίστοιχα) και αυξήθηκε στο πεπτικό σύστημα (από 14% σε 77% για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Pb και από 40% σε 75% για εκείνους που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Pb). Τα ποσοστά του μολύβδου στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm Pb μειώθηκαν κατά το πρώτο δεκαπενθήμερο έκθεσης σε σχέση με την ημέρα που έφτασαν στο εργαστήριο (από 51% σε 36% και 20% αντίστοιχα).

Οι οργανισμοί που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα μολύβδου είχαν υψηλότερα ποσοστά μολύβδου στο πεπτικό τους σύστημα (ως 73% οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Pb και ως 59% οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε 20 ppm Pb) και ελαφρά χαμηλότερα στο μανδύα (ως 65% και 43% αντίστοιχα). Τα βράγχια και το σώμα είχαν τα χαμηλότερα ποσοστά μολύβδου, παρά το γεγονός ότι σε αυτά είχε μετρηθεί η υψηλότερη συγκέντρωση μετάλλου.

Συντελεστής Βιοσυσσώρευσης

Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης ($C_{\text{μετρ}}-C_{\text{αναφ}}/C_{\text{νερού}}$) και στα τέσσερα επίπεδα έκθεσης ήταν μεγαλύτερος στα βράγχια σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς. Γενικά, παρατηρήθηκε αύξηση του συντελεστή βιοσυσσώρευσης με την πάροδο των ημερών έκθεσης σε μολύβδο. Λόγω του τρόπου υπολογισμού του συντελεστή βιοσυσσώρευσης, αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκαλούσε μείωση του συντελεστή (εκτός από το επίπεδο 2,5 ppm που είχε πολύ υψηλές τιμές).

Πίνακας 25: Συντελεστής βιοσυσσώρευσης κατά τη διάρκεια του πειράματος έκθεσης στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μολύβδο

		DAY5	DAY10	DAY15	DAY20
Pb 0,5 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	312	1186	1250	341
	ΜΑΝΔΥΑΣ	178	2859	190	67
	ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	223	204	64	1115
	ΣΩΜΑ	58	112	61	204
Pb 1,0 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	222	495	236	440
	ΜΑΝΔΥΑΣ	114	197	648	97
	ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	75	94	402	836
	ΣΩΜΑ	13	52	64	44
Pb 2,5 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	55	151	2360	2543
	ΜΑΝΔΥΑΣ	63	501	958	905
	ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	276	537	1296	1320
	ΣΩΜΑ	34	69	118	130
Pb 20 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	39	27	335	352
	ΜΑΝΔΥΑΣ	9	62	123	137
	ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	17	84	175	170
	ΣΩΜΑ	12	8	13	35

4.3.2 Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 26 με την πάροδο των ημερών σε όλους τους ιστούς, η συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεϋδης (εκφρασμένη ως nmol MDA/ g w.w.) στον πληθυσμό αναφοράς μειώθηκε ελαφρά τις πρώτες 20 ημέρες του πειράματος και έπειτα σταθεροποιήθηκε.

Πίνακας 26: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς

	DAY 5	DAY 10	DAY 15	DAY 20	αποτοξίνωση DAY 10	αποτοξίνωση DAY 20	αποτοξίνωση DAY 30
Βράγχια	2012	2010	2009	2000	1999	2000	2000
Μανδύας	306	306	306	300	302	300	300
Πεπτικό Σύστημα	800	798	790	790	791	786	785
Σώμα	912	912	911	906	904	903	903

Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έδειξε ότι όλοι οι ιστοί του πληθυσμού αναφοράς ήταν στατιστικά διαφορετικοί μεταξύ τους ($p < 0,05$) με την τάση: βράγχια > σώμα > πεπτικό σύστημα > μανδύας.

Ο μανδύας και το πεπτικό σύστημα είχαν το υψηλότερο ποσοστό μόλυβδου, παρ' όλα αυτά δεν είχαν υποστεί τόσο μεγάλη οξειδωτική βλάβη, όσο τα βράγχια και το σώμα τα οποία είχαν χαμηλότερα ποσοστά μόλυβδου, αλλά υψηλότερη συγκέντρωση ανά μονάδα υγρής μάζας.

Οι τιμές μηλονικής διαλδεϋδης που μετρήθηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μόλυβδου, ήταν πολύ υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς (από διπλάσιες έως και 10πλάσιες) (Σχήμα 43).

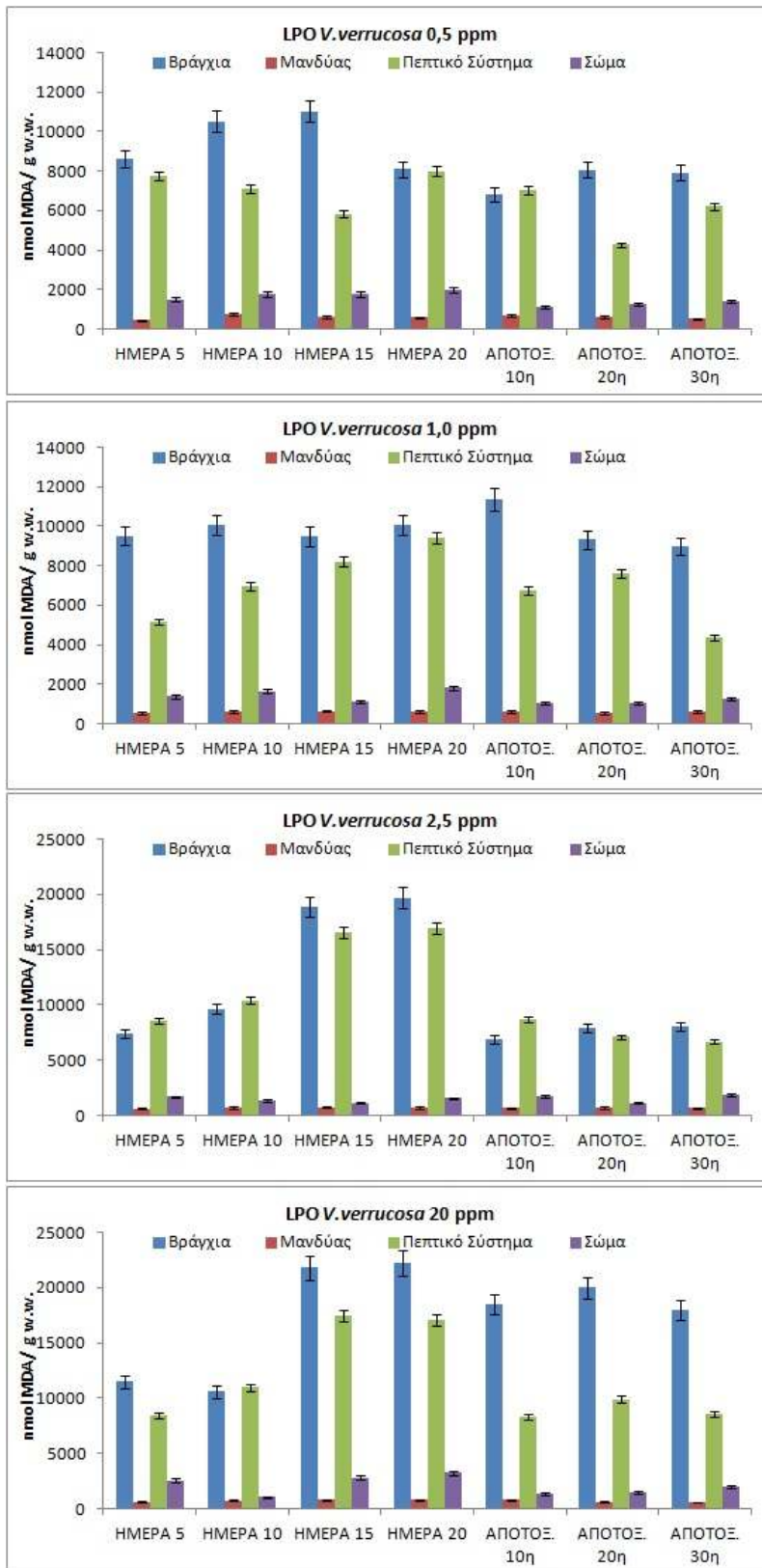
Γενικά, οι πιο υψηλές τιμές μηλονικής διαλδεϋδης προσδιορίστηκαν στα βράγχια των οργανισμών και οι πιο χαμηλές στο μανδύα και για τα τέσσερα επίπεδα έκθεσης, με την τάση να διαμορφώνεται ως εξής: βράγχια > πεπτικό σύστημα > σώμα ≈ μανδύας (Σχήμα 42).

Στα χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης η λιπιδική υπεροξειδωση αυξανόταν με την πάροδο των ημερών έκθεσης σε μόλυβδο, αλλά σχεδόν γραμμική αύξηση παρατηρήθηκε στο σώμα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών, ενώ οι υπόλοιποι ιστοί παρουσίασαν αυξομειώσεις με το χρόνο. Παρόμοιες βέβαια αυξομειώσεις, παρουσίασε και η συγκέντρωση μόλυβδου. Στα υψηλότερα επίπεδα έκθεσης όσο αυξάνονταν οι μέρες έκθεσης αυξανόταν και η λιπιδική υπεροξειδωση σε όλους τους ιστούς των οργανισμών, εκτός από το σώμα, το οποίο εμφάνισε κάποιες διακυμάνσεις. Μετά από μια συνεχώς αυξανόμενη τάση με τον χρόνο έκθεσης, η μέγιστη τιμή της μηλονικής διαλδεϋδης μετρήθηκε στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα την 20^η ημέρα έκθεσης.

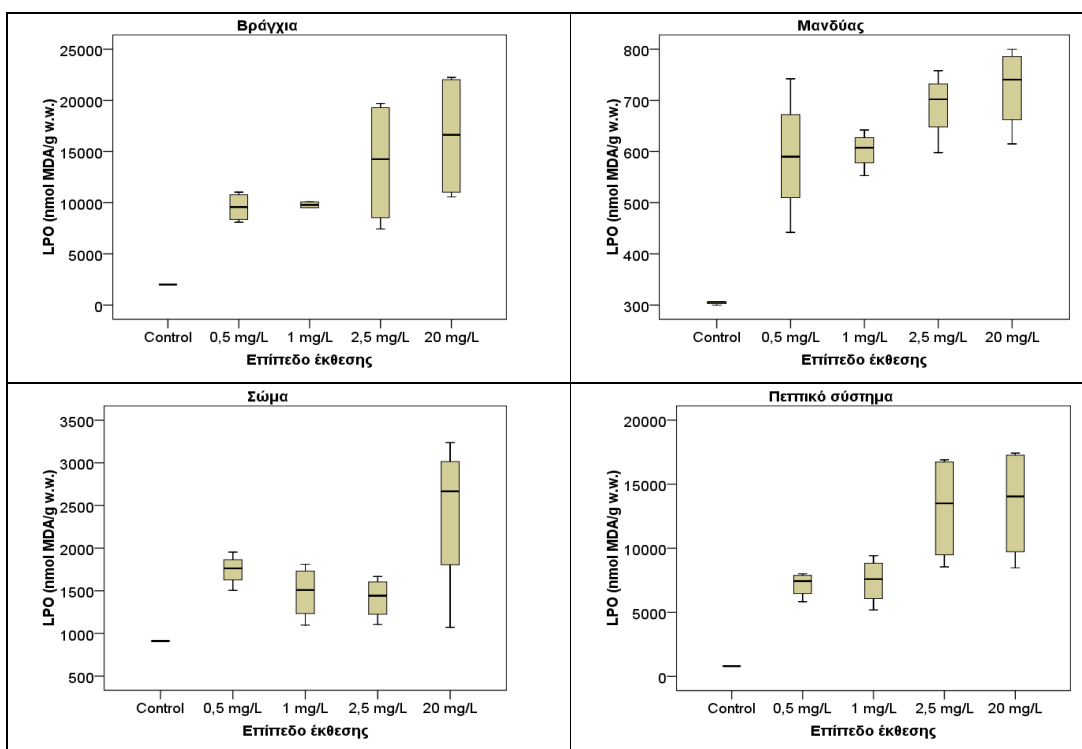
Στο Σχήμα 43 φαίνεται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Με την πάροδο του χρόνου έκθεσης των οργανισμών σε μόλυβδο, φαίνεται ότι τα δυο υψηλότερα επίπεδα ξεχώρισαν με υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα δύο χαμηλότερα (δύο ομάδες τιμών, εκτός από το σώμα).

Κατά την αποτοξίνωση παρατηρήθηκε μείωση της τιμής της μηλονικής διαλδεϋδης σε σχέση με τις μετρούμενες μέγιστες τιμές κατά την διάρκεια έκθεσης, σε όλους τους ιστούς. Παρότι η

αποτοξίνωση διήρκεσε 30 ημέρες, η μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης δεν ήταν γραμμική, αλλά παρουσίασε αυξομειώσεις, κάτι που είχε παρατηρηθεί και στο μόλυβδο.



Σχήμα 42: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 43: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεϋδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.3.3 Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

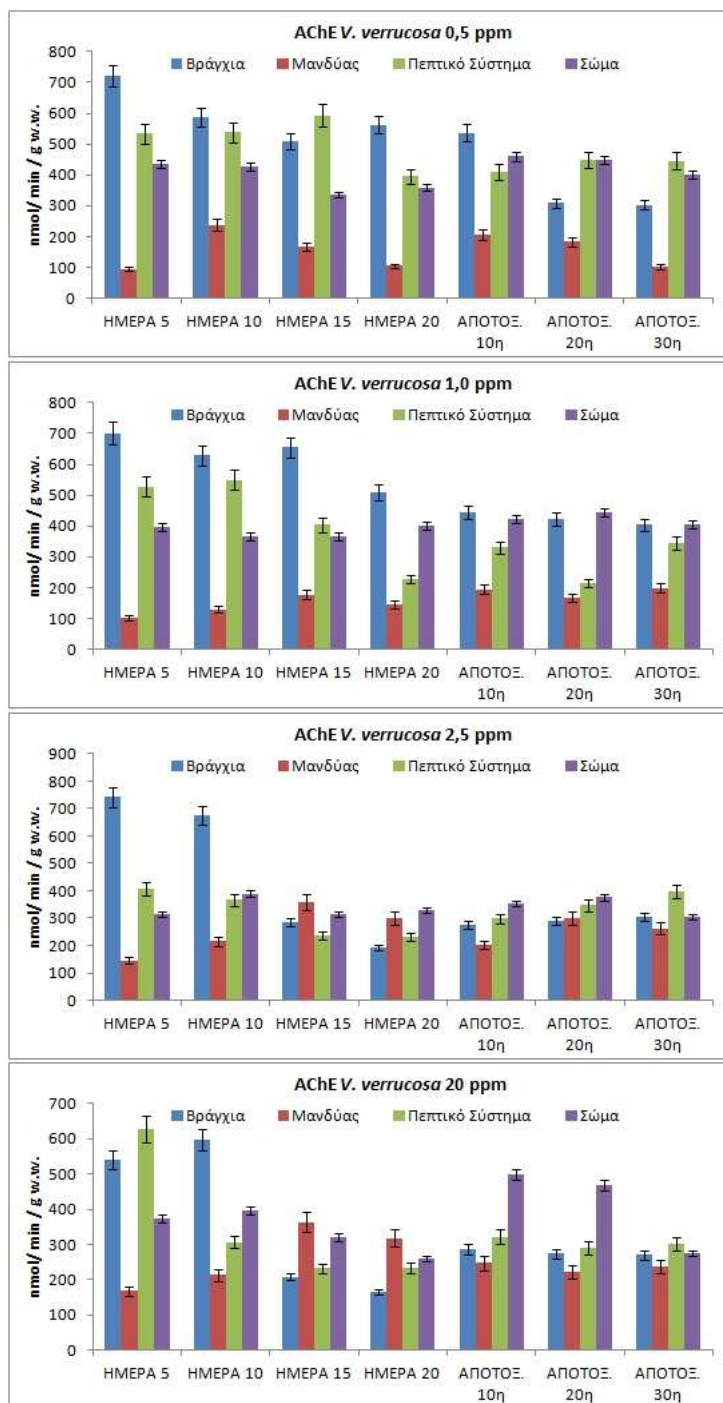
Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης που προσδιορίστηκε στα κυδώνια αναφοράς εμφάνισε μόνο στα βράγχια μικρές αυξομειώσεις με την πάροδο των ημερών. Οι τιμές για τα βράγχια κυμάνθηκαν από 895-899 nmol/min/g w.w., ενώ στους υπόλοιπους ιστούς ήταν σταθερές, με τιμές 62 nmol/min/g w.w. στο μανδύα, 450 στο πεπτικό σύστημα και 526 στο σώμα. Η τάση ήταν η εξής: βράγχια > σώμα > πεπτικό σύστημα > μανδύας.

Οι τιμές ακετυλοχολινεστεράσης που μετρήθηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μόλυβδου ήταν στατιστικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς, ο οποίος γενικά είχε τις υψηλότερες τιμές ενζύμου σε όλους τους ιστούς, εκτός από το μανδύα (Σχήμα 45). Από το Σχήμα 45 φαίνεται ότι η δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης μειωνόταν, όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, ενώ αντίστροφη τάση παρατηρήθηκε στο μανδύα.

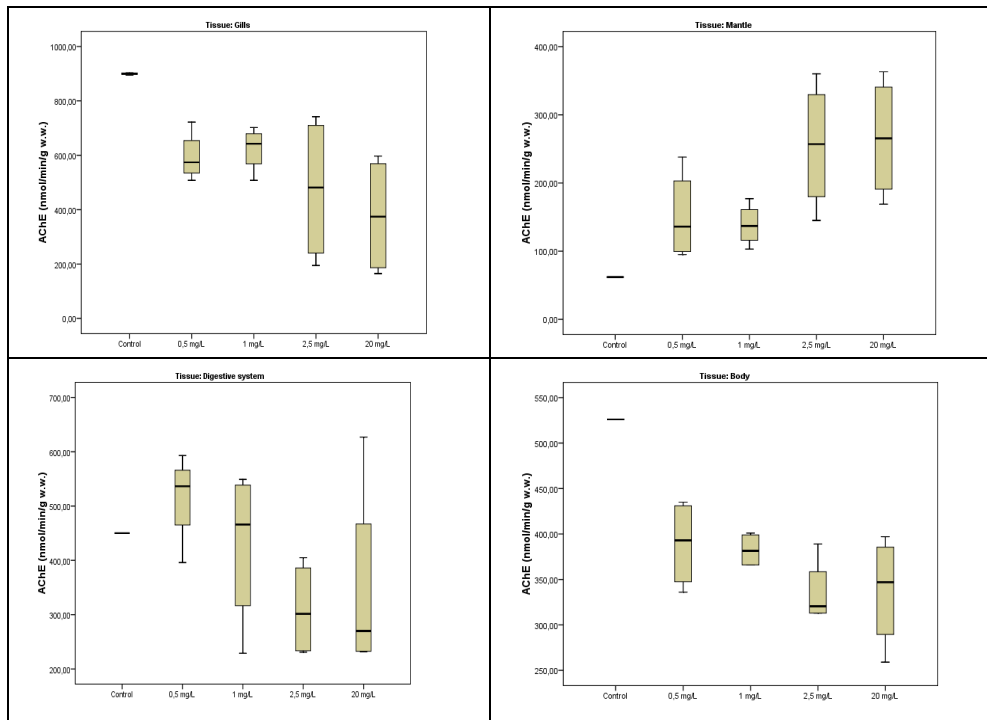
Στο πεπτικό σύστημα (Σχήμα 45) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm Pb, αρχικά οι τιμές του ενζύμου ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, μετά όμως μειώθηκαν. Η συνεχής μείωση του ενζύμου και το γεγονός ότι οι τιμές ήταν αρκετά χαμηλότερες από τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς υποδηλώνει τη νευροτοξικότητα του μόλυβδου στον οργανισμό. Από τους υπό μελέτη ιστούς, οι υψηλότερες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα, ενώ οι χαμηλότερες στο μανδύα. Συνολικά για την περίοδο έκθεσης για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα, η τάση ήταν: βράγχια > πεπτικό σύστημα > σώμα > μανδύας, ενώ στα δύο υψηλότερα επίπεδα οι ιστοί δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους (Σχήμα 44).

Οι τιμές της AChE βρέθηκε πως είχαν αντίστροφη σχέση από τις αντίστοιχες του μολύβδου για όλους τους ιστούς, εκτός από τον μανδύα. Στο μανδύα, η τάση ήταν η ίδια με του μολύβδου. Η αντίστροφη σχέση της δραστηριότητας του ενζύμου με την συγκέντρωση του μετάλλου υποδηλώνει την πιθανή νευροτοξικότητα που προκάλεσε ο μόλυβδος στους ιστούς.

Κατά την αποτοξίνωση η ακετυλοχολινεστεράση σε κάποιους ιστούς αυξήθηκε, ενώ σε άλλους μειώθηκε, ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης, όμως η μείωση ή η αύξηση που παρατηρήθηκε στους υπόλοιπους ιστούς πλην των βραγχίων, δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 44: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 45: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.3.4 Καταλάση σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

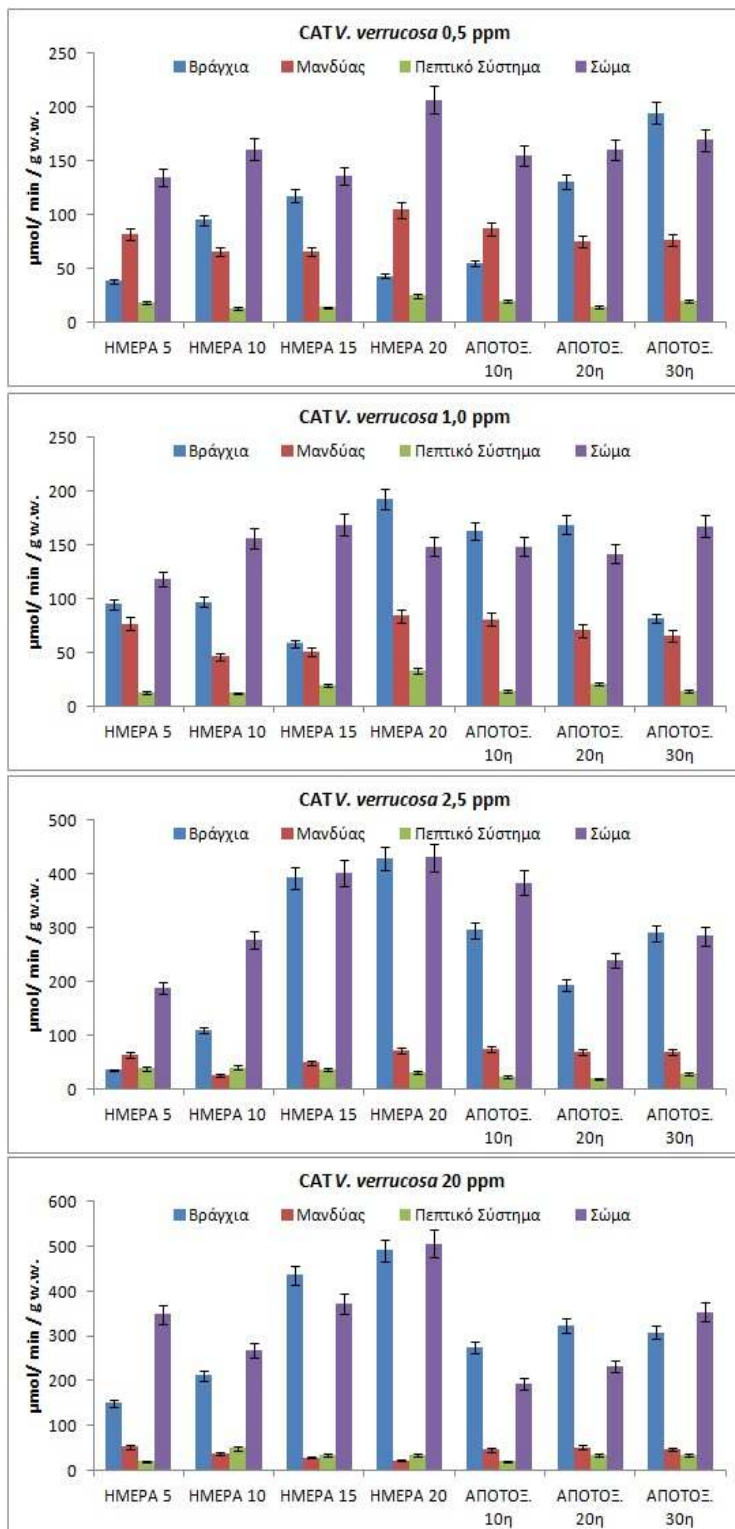
Στα κυδώνια αναφοράς, στα βράγχια και το μανδύα, η ενεργότητα της καταλάσης παρά τις όποιες μικρές αυξομειώσεις ήταν σχεδόν σταθερή (35-34 μmol/min /g w.w. για τα βράγχια και 11 μmol/min /g w.w. για το μανδύα), στο πεπτικό σύστημα αυξήθηκε λίγο (11-12,4 μmol/min /g w.w.), ενώ στο σώμα μειώθηκε (90-83 μmol/min /g w.w.). Άρα η τάση ανάμεσα στους ιστούς ήταν η εξής: σώμα> βράγχια> πεπτικό σύστημα≥ μανδύας. Ο μανδύας και το πεπτικό σύστημα, παρ' ότι είχαν τα υψηλότερα ποσοστά μόλυβδου, δεν εμφάνισαν και την υψηλότερη ενεργότητα καταλάσης. Η υψηλότερη ενεργότητα του αντιοξειδωτικού αυτού ενζύμου προσδιορίστηκε στο σώμα των οργανισμών, το οποίο είχε την χαμηλότερη συγκέντρωση μόλυβδου.

Οι τιμές καταλάσης στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μόλυβδου ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς για τα όλους τους ιστούς, από 2-14 φορές για τα βράγχια, 2-7,5 φορές για το μανδύα, 1,1-4,3 φορές για το πεπτικό σύστημα και 1,3-6 φορές για το σώμα. Για την περίοδο έκθεσης των οργανισμών σε 0,5 ppm Pb, η τάση μεταξύ των ιστών μπορεί να παρουσιαστεί ως εξής: σώμα> μανδύας≈ βράγχια> πεπτικό σύστημα, ενώ για τα τρία υπόλοιπα επίπεδα έκθεσης: σώμα≥ βράγχια>μανδύας≥ πεπτικό σύστημα (Σχήμα 46).

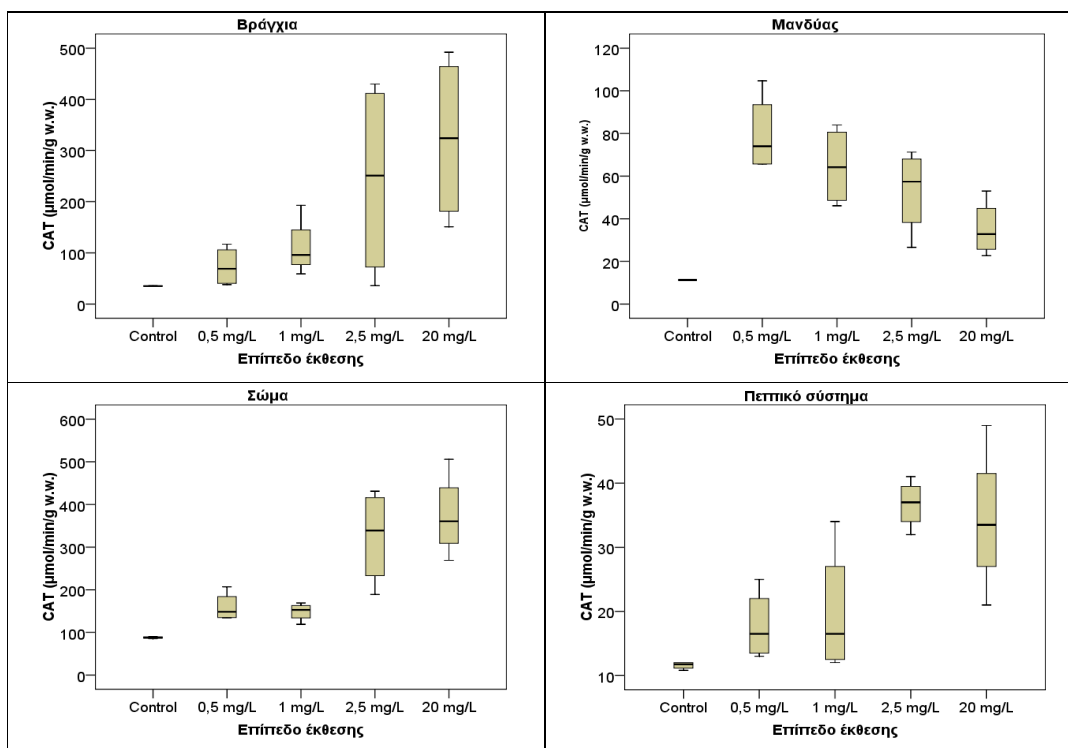
Η τάση της καταλάσης με τις μέρες έκθεσης σε κάθε ιστό και επίπεδο, ήταν ίδια με εκείνη του μόλυβδου, εκτός από το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μόλυβδου και στο πεπτικό σύστημα εκείνων που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Pb, όπου ήταν αντίστροφη. Αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση και της ενεργότητας της καταλάσης στα βράχια, το πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών (Σχήμα 47). Για το μανδύα φαίνεται ότι των όσο αυξανόταν

το επίπεδο έκθεσης η ενεργότητα της καταλάσης μειωνόταν, όμως για όλα τα επίπεδα έκθεσης η καταλάση είχε μεγαλύτερη ενεργότητα από ότι στο μανδύα αναφοράς (Σχήμα 47).

Κατά την αποτοξίνωση παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις ανάλογα με τον ιστό και το επίπεδο έκθεσης, χωρίς κάποια ξεκάθαρη τάση.



Σχήμα 46: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 47: Βox-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.3.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

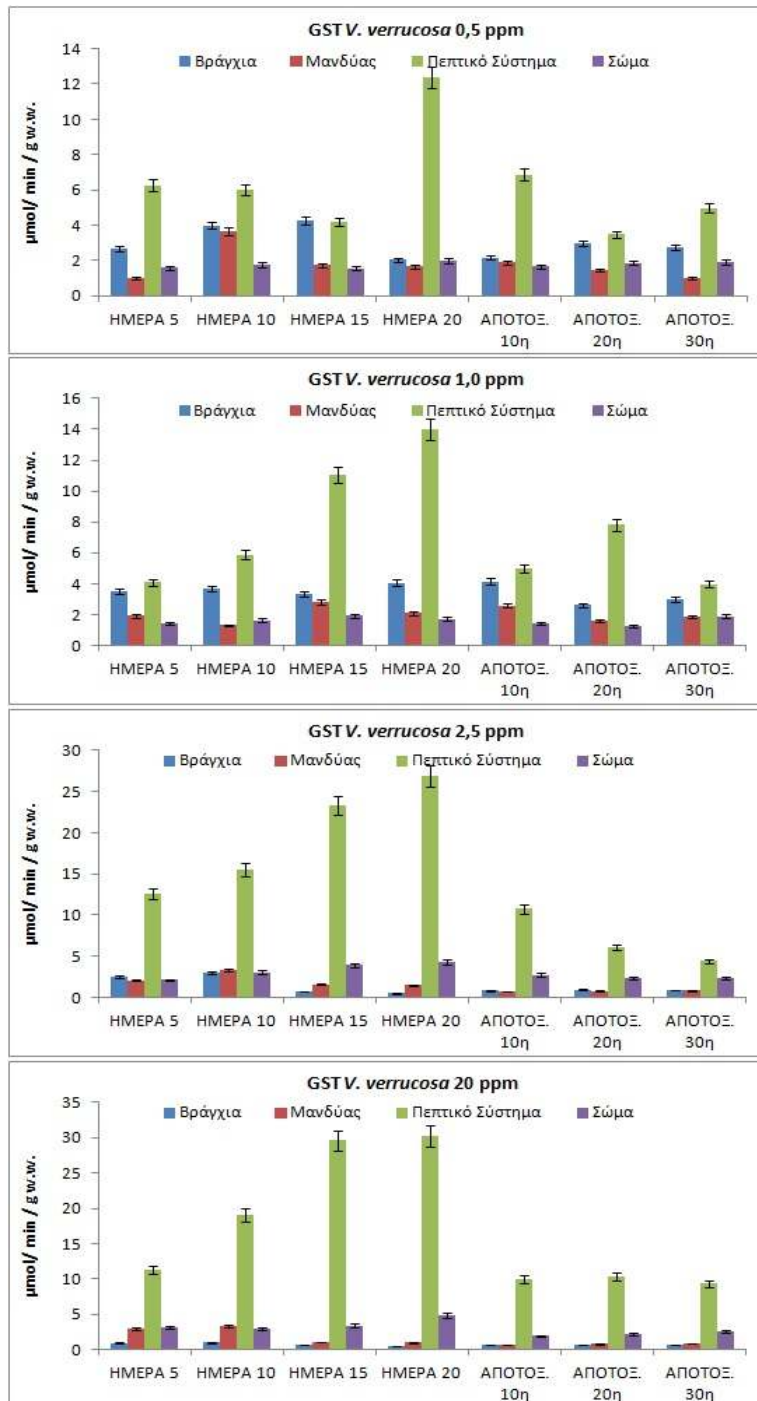
Η ενεργότητα της GST σε όλους τους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς ήταν σταθερή, με τιμές 1,2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$. στα βράγχια, 0,80 στο μανδύα, 2,5 στο πεπτικό σύστημα και 0,5 στο σώμα. Άρα η τάση ήταν η εξής: πεπτικό σύστημα> βράγχια> μανδύας> σώμα.

Οι τιμές GST που μετρήθηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μολύβδου ήταν στατιστικά υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς για όλες τις μέρες έκθεσης (Σχήμα 49). Εξαιρέση αποτελούσαν τα βράγχια των οργανισμών όπου εκτέθηκαν σε 2,5 και 20 ppm Pb, όπου η GST μειωνόταν με την πάροδο των ημερών έκθεσης, καταλήγοντας την 20^η ημέρα σε τιμές χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς. Οι υψηλότερες τιμές σε όλα τα επίπεδα έκθεσης προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών. Η διάμεση τιμή της GST για τον κάθε ιστό, φαίνεται να μειωνόταν κατά την σειρά: πεπτικό σύστημα> βράγχια> μανδύας≈ σώμα, για την περίοδο έκθεσης (Σχήμα 48).

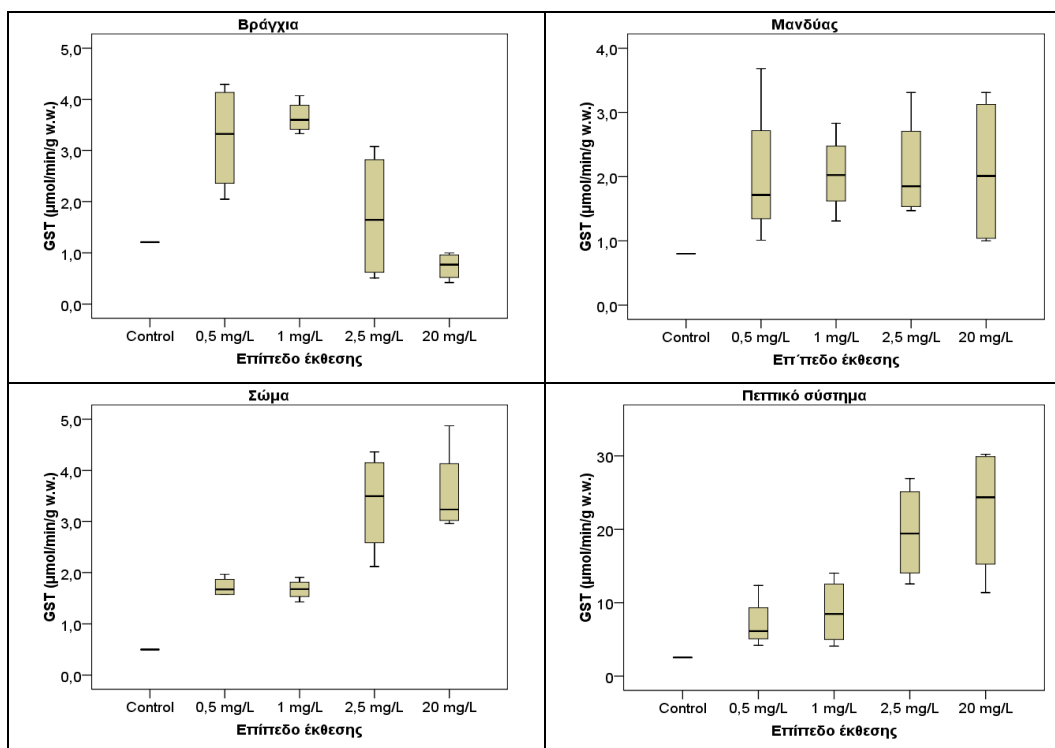
Τα βράγχια, ο μανδύας και το σώμα των οργανισμών δεν εμφάνισαν συγκεκριμένη τάση με το χρόνο έκθεσης (Σχήμα 48). Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών βρέθηκε αύξηση κατά τη διάρκεια έκθεσης σε όλα τα επίπεδα μολύβδου, εκτός από το 0,5 ppm Pb, και συνακόλουθη μείωση κατά την αποτοξίνωση. Τα βράγχια και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm και 1,0 ppm Pb ήταν στατιστικά διαφορετικά ($p < 0,05$) τους αντίστοιχους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν 2,5 και 20 ppm μολύβδου. Στατιστικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων έκθεσης για το τόσο για το μανδύα, όσο και για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών δεν προέκυψαν ($p > 0,05$). Η τάση της GST με τις μέρες έκθεσης για καθέναν ιστό και επίπεδο έκθεσης

ήταν ίδια με του μολύβδου και μάλιστα σε όλους τους ιστούς η συσχέτιση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($R_{exp} > R_{theor}$, Pearson correlation).

Κατά την αποτοξίνωση, οι τιμές της GST παρουσίασαν αυξομειώσεις. Όμως, οι τιμές της GST στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα μολύβδου, μειώνονταν συνεχώς (Σχήμα 48). Οι τιμές που προσδιορίστηκαν στο τέλος της αποτοξίνωσης ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, εκτός από τις τιμές στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Pb, οι οποίες ήταν χαμηλότερες.



Σχήμα 48: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μολύβδο



Σχήμα 49: Box-plots των επιπέδων GST (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.3.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Η ενεργότητα της GR στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς ήταν σταθερή, με τιμές 0,50 μmol/min /g w.w. για τα βράγχια, 0,69 για το μανδύα, 0,95 για το πεπτικό σύστημα και 0,90 για το σώμα.

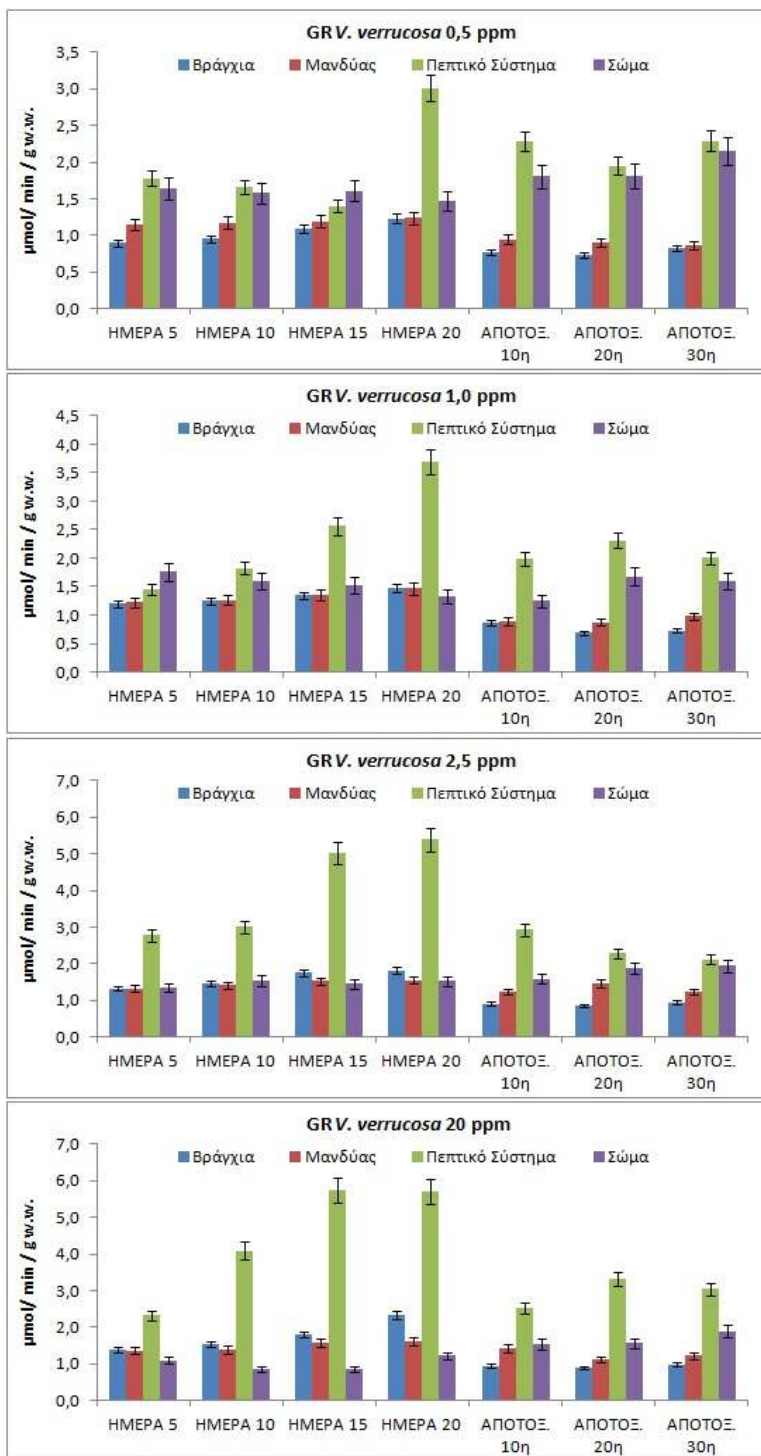
Οι τιμές GR στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 51). Και στα τέσσερα επίπεδα έκθεσης, οι τιμές της GR στα βράγχια και το μανδύα αυξάνονταν με την πάροδο των ημερών έκθεσης (Σχήμα 50), κάτι που ισχύει για το πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα τρία υψηλότερα επίπεδα μετάλλου. Στο χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις (Σχήμα 50).

Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης η υψηλότερη τιμή προσδιορίστηκε στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών, με μέγιστη τιμή την 20^η ημέρα έκθεσης (Σχήμα 50). Παρατηρήθηκε ακόμα ότι αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση των τιμών του ενζύμου στους ιστούς των οργανισμών (Σχήμα 51). Από συσχέτιση των τιμών της GR με τις αντίστοιχες τιμές μολύβδου σε κάθε ιστό, διαπιστώθηκε ότι για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης το πεπτικό σύστημα είχε την ίδια τάση με εκείνη του μολύβδου, ενώ το σώμα την αντίθετη ($R_{exp} > R_{theor}$, Pearson correlation). Στα δύο υψηλότερα επίπεδα έκθεσης, οι τιμές της GR είχαν αντίστροφη τάση σε σχέση με του μολύβδου για όλους τους ιστούς μελέτης, κάτι που πιθανά δηλώνει την τοξικότητα του μολύβδου.

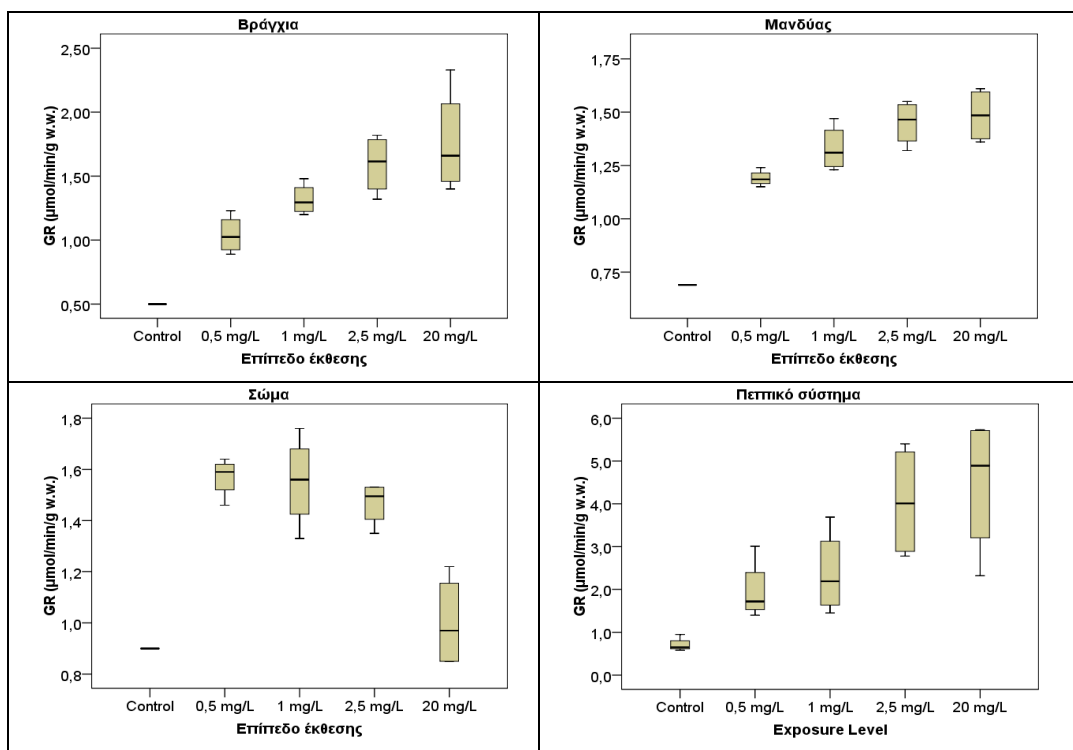
Κατά την αποτοξίνωση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 51, οι τιμές της GR μειώθηκαν σε όλους τους ιστούς, εκτός από το σώμα, χωρίς συγκεκριμένη τάση με τις ημέρες αποτοξίνωσης. Η GR στο

σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάθε ένα από τα επίπεδα μόλυβδου αυξήθηκε κατά την αποτοξίνωση, καθώς η συγκέντρωση του μετάλλου στον ιστό μειώθηκε. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν στο χαμηλότερο επίπεδο μόλυβδου

Αύξηση της GR υποδηλώνει έκθεση σε ρύπους, καθώς τα φυσιολογικά επίπεδα της GR αυξάνονται ώστε να μπορέσει να γίνει η αναγωγή του GSSG σε GSH. Άρα ο οργανισμός δεν έχει υποστεί βλάβη ανεπανόρθωτη λόγω του μόλυβδου ώστε τα ένζυμά του να αδρανοποιηθούν.



Σχήμα 50: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 51: Box-plots των επιπέδων GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.3.7 Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Με την πάροδο του χρόνου παραμονής των οργανισμών σε λιγότερο επιβαρυσμένο θαλασσινό νερό, οι τιμές των μεταλλοθειονινών στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς ήταν σχεδόν σταθερές. Τα βράγχια και το πεπτικό σύστημα του πληθυσμού αναφοράς είχαν παρόμοιες τιμές, χαμηλότερες από τους δύο άλλους ιστούς. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν ήταν 0,022 $\mu\text{mol}/\text{g w.w.}$ για τα βράγχια και το πεπτικό σύστημα, 0,025 για το μανδύα, 0,032 για το σώμα.

Από τον Πίνακα 27 παρατηρείται ότι σε όλους τους ιστούς η αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ήταν πολύ μεγάλη σε σχέση με του πληθυσμού αναφοράς και μάλιστα αυξάνοταν με αύξηση του επιπέδου και ημερών έκθεσης. Η μεγαλύτερη αύξηση μεταλλοθειονινών παρατηρήθηκε στο σώμα των οργανισμών, στο οποίο προσδιορίστηκαν και οι χαμηλότερες τιμές μολύβδου σε όλα τα επίπεδα έκθεσης. Στα βράγχια παρατηρήθηκε το αντίστροφο.

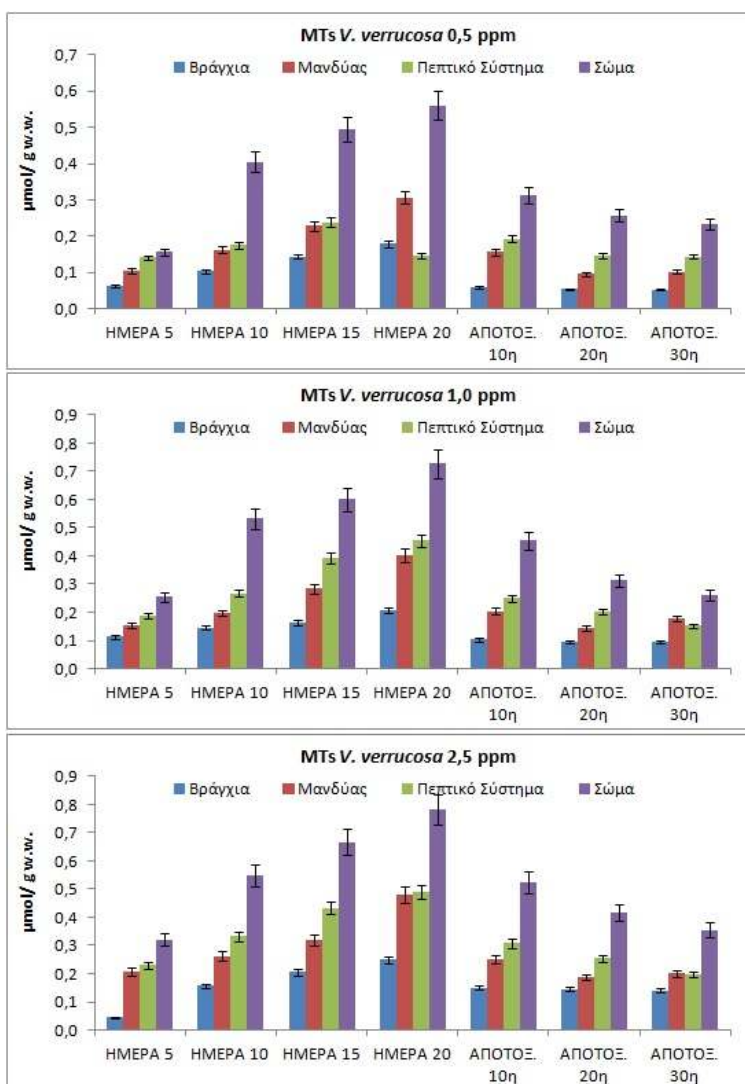
Πίνακας 27: Αύξηση των μεταλλοθειονινών ($C_{\text{DayX}}/C_{\text{Day0}}$) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς

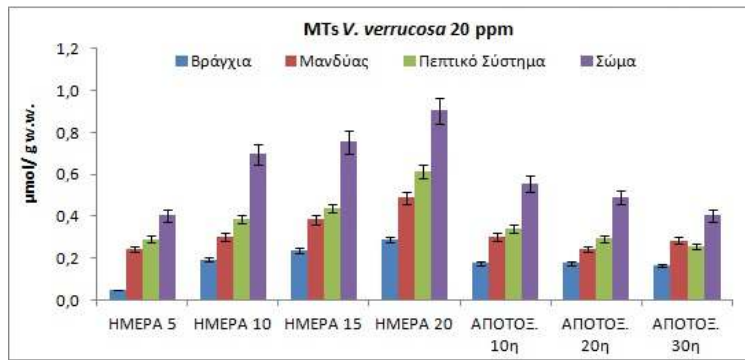
Ιστός	0,50ppm		1,0ppm		2,5ppm		20ppm	
	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20
βράγχια	2,8	7,9	5,1	9,1	2,1	11	2,2	13
μανδύας	4,2	13	6,3	17	8,4	20	9,9	20
πεπτικό σύστημα	6,5	6,9	8,7	21	11	23	14	29
σώμα	4,9	18	8,0	23	10	25	13	28

Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 52) παρατηρήθηκε πως τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών, ενώ το σώμα τις υψηλότερες. Οι διάμεσες τιμές των μεταλλοθειονινών των ιστών για κάθε επίπεδο έκθεσης, φαίνεται να μειώνονται κατά την σειρά: σώμα- πεπτικό σύστημα-μανδύας- βράγχια. Μέγιστη τιμή μεταλλοθειονινών για όλους τους ιστούς και επίπεδα έκθεσης προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα, εκτός από το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Pb όπου η μέγιστη τιμή μετρήθηκε την 15^η ημέρα έκθεσης (Σχήμα 52).

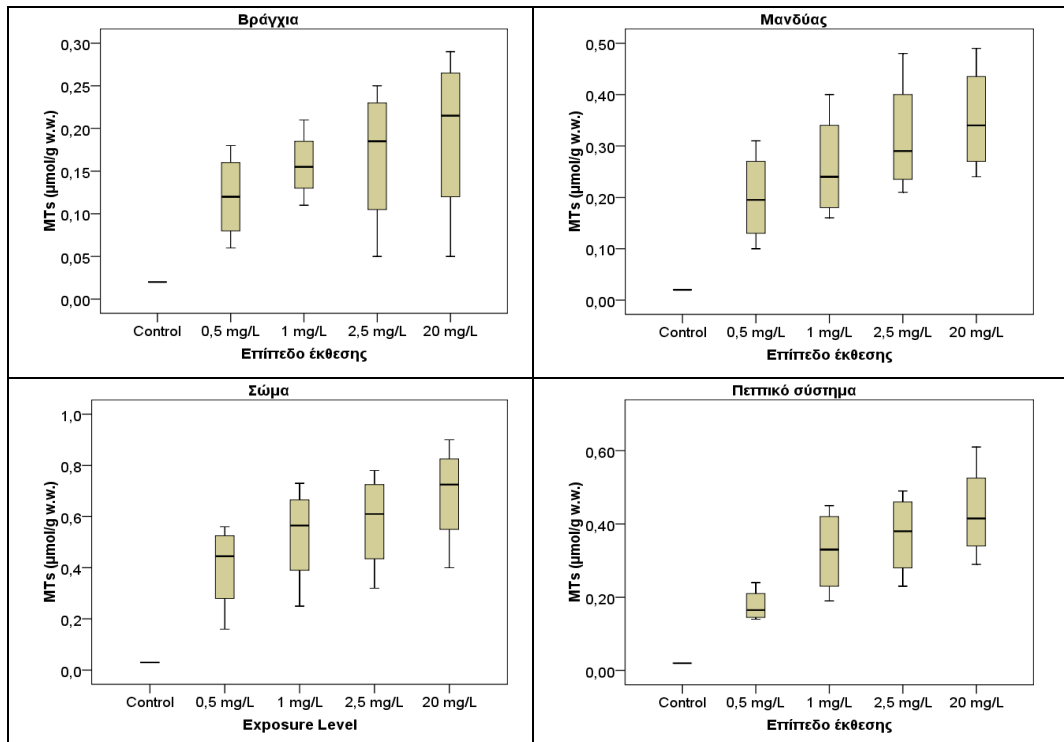
Παρ' ότι σε όλους τους ιστούς η συγκέντρωση του μολύβδου αυξήθηκε πολύ, παρατηρήθηκε πως δεν προκλήθηκε ανάλογη αύξηση των μεταλλοθειονινών (και στα μύδια το ίδιο). Οι συγκεντρώσεις των μεταλλοθειονινών αυξήθηκαν σε σχέση με του πληθυσμού αναφοράς, όμως παρατηρήθηκε πως ο ιστός που είχε την μεγαλύτερη συγκέντρωση μολύβδου (βράγχια) είχε και την μικρότερη συγκέντρωση μεταλλοθειονινών. Στο Σχήμα 53 φαίνεται ότι όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, αυξανόταν και η διάμεση τιμή των μεταλλοθειονινών. Γενικά είναι εμφανές από όλα τα διαγράμματα πως η αύξηση των μεταλλοθειονινών ήταν πολύ μεγαλύτερη στο σώμα (το οποίο είχε τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου) σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς.

Για κάθε επίπεδο έκθεσης, κατά την αποτοξίνωση των οργανισμών, οι τιμές των μεταλλοθειονινών μειώνονταν συνεχώς σε όλους τους ιστούς, χωρίς να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα.





Σχήμα 52: Χρονική μεταβολή των τιμών των μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο



Σχήμα 53: Βοξ-πλοτς των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.3.8 Ολική Πρωτεΐνη σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Τα Kolmogorov-Smirnov και Mann-Whitney έδειξαν πως οι τιμές ολικής πρωτεΐνης όλων των ιστών του πληθυσμού αναφοράς ήταν στατιστικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες όλων των επιπέδων έκθεσης. Για τον πληθυσμό αναφοράς, τα βράγχια να έχουν τις υψηλότερες τιμές, το πεπτικό σύστημα τις αμέσως χαμηλότερες και ακολουθεί ο μανδύας και τέλος το σώμα. Οι τιμές ήταν 20 $\mu\text{g/mL}$ για τα βράγχια, 11 για το μανδύα, 17 για το πεπτικό σύστημα και 11 για το σώμα. Ξεκάθαρη τάση αύξησης ή μείωσης με τις ημέρες έκθεσης στον ίδιο ιστό και στο ίδιο επίπεδο έκθεσης δεν παρατηρήθηκε.

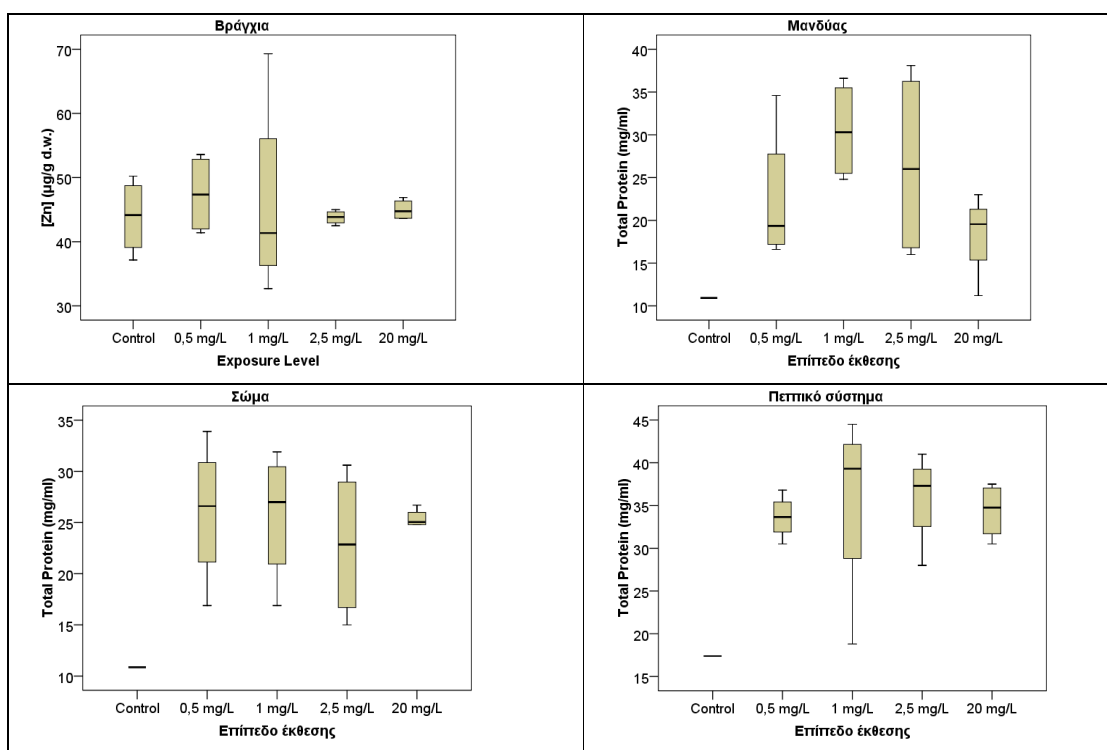
4.3.9 Ψευδάργυρος σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς και σε όλα τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 54) παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις στις τιμές του ψευδαργύρου, εκτός από το πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών αναφοράς, στους οποίους βρέθηκε μείωση των τιμών με τις μέρες. Παρά τις αυξομειώσεις, σε όλους τους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς, στο τέλος του πειράματος, η τιμή που προσδιορίστηκε ήταν στατιστικά χαμηλότερη από την αρχική τιμή (day0).

Πίνακας 28: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων ψευδαργύρου (μg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών αναφοράς

	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10	αποτοξίνωση DAY 20	αποτοξίνωση DAY 30
Βράγχια	47	50	41	37	34	30	26
Μανδύας	85	106	67	101	92	93	94
Πεπτικό Σύστημα	35	35	28	28	24	21	18
Σώμα	28	28	22	25	22	20	18

Βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ μόλυβδου και ψευδαργύρου, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 και σε 2,5 ppm Pb. Ο ψευδάργυρος βρίσκεται φυσιολογικά προσδεμένος στα μόρια των μεταλλοθειονινών. Φαίνεται λοιπόν ότι οι μεταλλοθειονίνες ανταλλάσσουν τον ψευδάργυρο που περιέχουν (αφού βρέθηκε αρνητική συσχέτιση των δύο μετάλλων), με το μόλυβδο, αλλά ίσως όχι πλήρως, καθώς η συσχέτιση δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 54: Μεταβολή της συγκέντρωσης ψευδαργύρου (μg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

4.3.10 Συσχέτιση μολύβδου με βιοδείκτες

Συσχέτιση (Pearson correlation, Πίνακες 29-32) όλων των τιμών του μολύβδου, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε έναν από τους ιστούς των κυδωνιών, με τους βιοδείκτες, για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% εμφάνισε τις εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις:

- αρνητική συσχέτιση με την ακετυλοχολινεστεράση (στα βράγχια, το πεπτικό σύστημα και το σώμα, ενώ στο μανδύα η συσχέτιση ήταν θετική.
- θετική συσχέτιση με την λιπιδική υπεροξειδωση και στους τέσσερις ιστούς.
- αρνητική συσχέτιση με την S μεταφοράση της γλουταθειόνης στα βράγχια των οργανισμών, ενώ στο πεπτικό σύστημα και στο σώμα η συσχέτιση ήταν θετική.
- σημαντική θετική συσχέτιση με την αναγωγή της γλουταθειόνης στα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών, αλλά όχι στο σώμα.
- θετική συσχέτιση με την καταλάση στα βράγχια, το πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών, ενώ στο μανδύα, η συσχέτιση αυτή ήταν αρνητική.
- θετική συσχέτιση με τις μεταλλοθειονίνες σε όλους τους ιστούς.

4.3.11 Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε μόλυβδο

Επειδή οι βιοδείκτες συσχετίζονται με το μόλυβδο, υπάρχει περίπτωση να συσχετίζονται και μεταξύ τους. Έτσι βρέθηκαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% και ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης

- αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης, με τη λιπιδική υπεροξειδωση στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών, ενώ θετική στο μανδύα τους. Ακριβώς ίδια εικόνα έδωσε και συσχέτιση ακετυλοχολινεστεράση- αναγωγή της γλουταθειόνης.
- θετική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης, με την GST στα βράγχια των οργανισμών, ενώ στο πεπτικό σύστημα και το σώμα η συσχέτιση ήταν αρνητική.
- αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης, με την καταλάση σε όλους τους ιστούς των οργανισμών.
- αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με τις μεταλλοθειονίνες σε όλους τους ιστούς των οργανισμών, εκτός από το μανδύα, όπου εμφάνισε θετική.
- θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με την GR, την CAT και τις μεταλλοθειονίνες στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών. Στο μανδύα οι συσχετίσεις ήταν οι ίδιες, εκτός από την συσχέτιση ανάμεσα σε LPO και CAT η οποία ήταν αρνητική.
- αρνητική συσχέτιση της S μεταφοράσης της γλουταθειόνης με την GR και την CAT στα βράγχια των οργανισμών, ενώ στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν θετική. Στο σώμα στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση βρέθηκε μόνο ανάμεσα στην GST και την CAT.
- θετική συσχέτιση της GST και των μεταλλοθειονινών για το πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών.

- θετική συσχέτιση της GR και της CAT αλλά και της GR με τις MTs για τα βράγχια και το πεπτικό σύστημα των κυδωνιών. Στο μανδύα και το σώμα η συσχέτιση GR-CAT ήταν αρνητική.

θετική συσχέτιση των μεταλλοθειονινών, με την καταλάση, στα βράγχια, το πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών.

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

Οι μεταλλοθειονίνες είναι ένας αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων που λειτουργεί στην αιτία (είσοδος μετάλλου στους οργανισμούς) καθώς παράγονται όταν εισέρχονται μέταλλα στους ιστούς. Σε κάθε ιστό παρατηρείται αύξηση των μεταλλοθειονινών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο αμυντικός μηχανισμός βρίσκεται σε λειτουργία. Προφανώς όμως δεν επαρκεί, ή δεν είναι αρκετά αποτελεσματικός, καθώς οι μετρήσεις των βιοδεικτών (AChE, GST, GR, CAT, LPO) φαίνεται πως επηρεάζονται από τα βαρέα μέταλλα.

Αν χρησιμοποιηθούν τα βράγχια ως ιστός ελέγχου (τα οποία βιοσυσσωρεύουν περισσότερο μέταλλο) η λιπιδική υπεροξειδωση είναι ο κατάλληλος βιοδείκτης γιατί εμφανίζει ξεκάθαρη τάση με το χρόνο έκθεσης, στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το μόλυβδο και στα χαμηλότερα αλλά και στα υψηλότερα επίπεδα έκθεσης. Αν τα δείγματα είναι πολλά τότε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και η αναγωγή της γλουταθειόνης, η καταλάση, οι μεταλλοθειονίνες, και η ακετυλοχολινεστεράση. Αν χρησιμοποιηθεί ο μανδύας των οργανισμών, όταν οι τιμές είναι αρκετές, τότε ως βιοδείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν η ακετυλοχολινεστεράση, η λιπιδική υπεροξειδωση, η αναγωγή της γλουταθειόνης και οι μεταλλοθειονίνες. Αν χρησιμοποιηθεί το πεπτικό σύστημα των οργανισμών ως ιστός ελέγχου, ο κατάλληλος βιοδείκτης είναι η ακετυλοχολινεστάση (αρνητική συσχέτιση με το μόλυβδο), η αναγωγή της γλουταθειόνης και η S μεταφοράση της γλουταθειόνης (θετική συσχέτιση με το μόλυβδο). Αν χρησιμοποιηθεί το σώμα των οργανισμών ως ιστός ελέγχου, ο κατάλληλος βιοδείκτης είναι η S μεταφοράση της γλουταθειόνης και η καταλάση (θετική συσχέτιση με το μόλυβδο).

Πίνακας 29: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	-0,947**	1							
LPO	0,987**	-0,958**	1						
GST	-0,738**	0,673**	-0,712**	1					
GR	0,834**	-0,810**	0,834**	-0,731**	1				
CAT	0,961**	-0,953**	0,974**	-0,735**	0,888**	1			
MTs	0,739**	-0,802**	0,746**	-0,451	0,801**	0,801**	1		
Zn	-0,079	0,059	-0,041	0,262	-0,223	-0,092	-0,155	1	
Ολική πρωτεΐνη	-0,300	0,254	-0,253	0,473	-0,344	-0,312	-0,336	0,297	1

Πίνακας 30: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	0,960**	1							
LPO	0,881**	0,899**	1						
GST	-0,157	-0,125	0,152	1					
GR	0,773**	0,788**	0,731**	-0,223	1				
CAT	-0,608*	-0,617*	-0,680**	-0,126	-0,548*	1			
MTs	0,650**	0,636**	0,641**	-0,279	0,883**	-0,273	1		
Zn	0,449	0,405	0,498*	0,116	0,082	-0,051	0,128	1	
Ολική πρωτεΐνη	-0,590*	-0,644**	-0,611*	0,146	-0,339	0,194	-0,453	-0,309	1

Πίνακας 31: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	-0,838**	1							
LPO	0,989**	-0,824**	1						
GST	0,972**	-0,863**	0,974**	1					
GR	0,967**	-0,910**	0,967**	0,989**	1				
CAT	0,628**	-0,764**	0,610*	0,700**	0,703**	1			
MTs	0,811**	-0,785**	0,815**	0,842**	0,846**	0,553*	1		
Zn	0,054	0,039	0,042	0,011	-0,022	-0,172	-0,204	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,044	-0,311	0,096	0,163	0,176	0,375	0,355	-0,413	1

Πίνακας 32: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του μολύβδου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών

	Pb	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Pb	1								
AChE	-0,725**	1							
LPO	0,611*	-0,487	1						
GST	0,928**	-0,667**	0,393	1					
GR	-0,427	0,273	-0,444	-0,464	1				
CAT	0,934**	-0,683**	0,485	0,988**	-0,504*	1			
MTs	0,673**	-0,575*	0,313	0,698**	-0,494	0,683**	1		
Zn	-0,298	0,085	-0,057	-0,305	0,362	-0,313	-0,549*	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,144	-0,254	0,096	0,151	-0,108	0,210	0,537*	-0,436	1

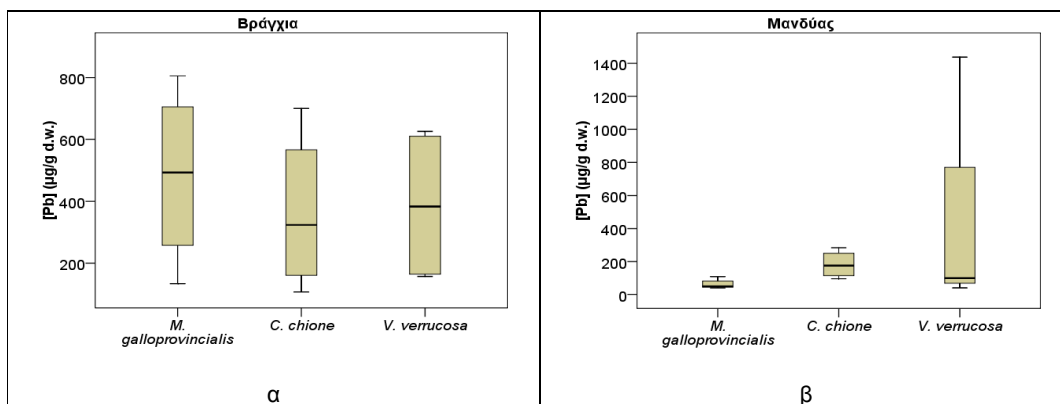
* δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

** δηλώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

4.4 Σύγκριση των τριών οργανισμών

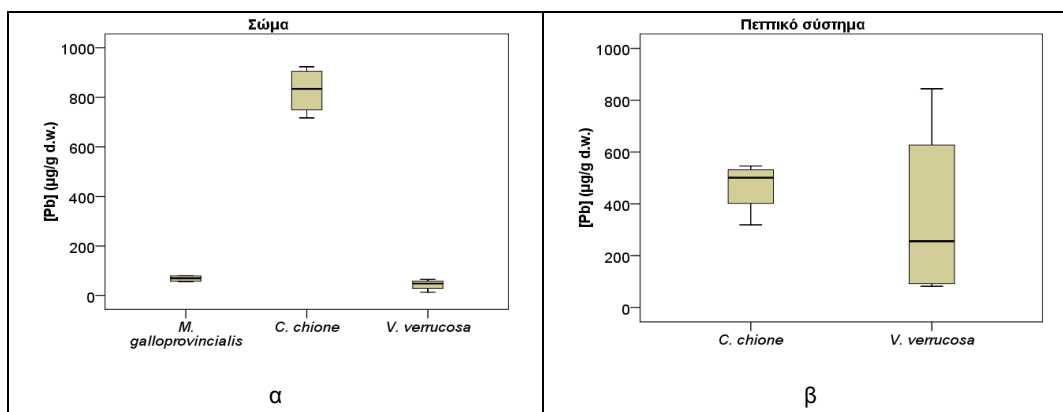
4.4.1 Επίπεδα και κατανομή μολύβδου

Έπειτα από στατιστική επεξεργασία των δεδομένων των τριών οργανισμών ανά ιστό για το χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης βρέθηκε ότι οι τιμές του μολύβδου που προσδιορίστηκαν στα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα σε κάθε ιστό των οργανισμών δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους ($p>0,05$). Η μοναδική στατιστικά σημαντική διαφορά προέκυψε στο σώμα των οργανισμών, όπου οι τιμές του μολύβδου ήταν στατιστικά διαφορετικές για την γυαλιστερή και το κυδώνι, με τιμές χαμηλότερες για το κυδώνι από τις τιμές της γυαλιστερής.



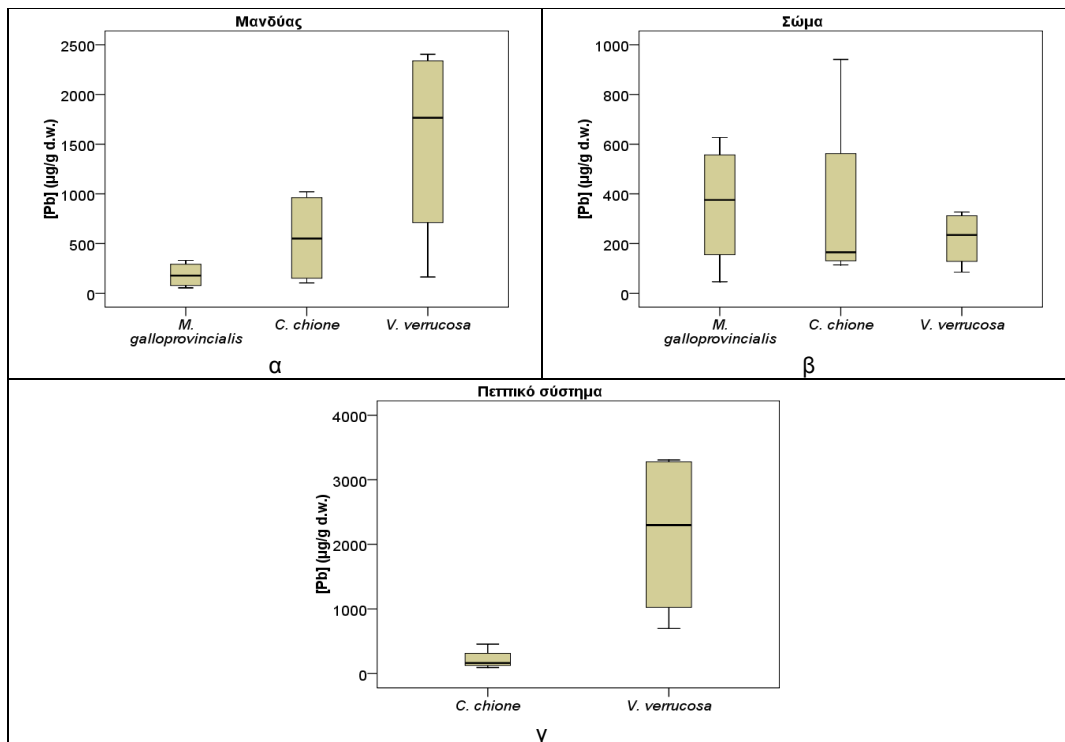
Σχήμα 55: Box-plots των επιπέδων μολύβδου ($\mu\text{g/g d.w.}$) για α) βράγχια, β) μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε $0,5 \text{ mg/L Pb}$

Έπειτα από την ίδια σύγκριση για το επίπεδο $1,0 \text{ ppm}$ βρέθηκε πως στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα, η γυαλιστερή διέφερε στατιστικά από τους άλλους οργανισμούς με υψηλότερες τιμές, ενώ οι άλλοι οργανισμοί είχαν παρόμοιες τιμές. Οι τιμές του μολύβδου στο πεπτικό σύστημα της γυαλιστερής και του κυδωνιού δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους, αν και ελαφρά υψηλότερη διάμεση τιμή με βρέθηκε στους ιστούς των γυαλιστερών.



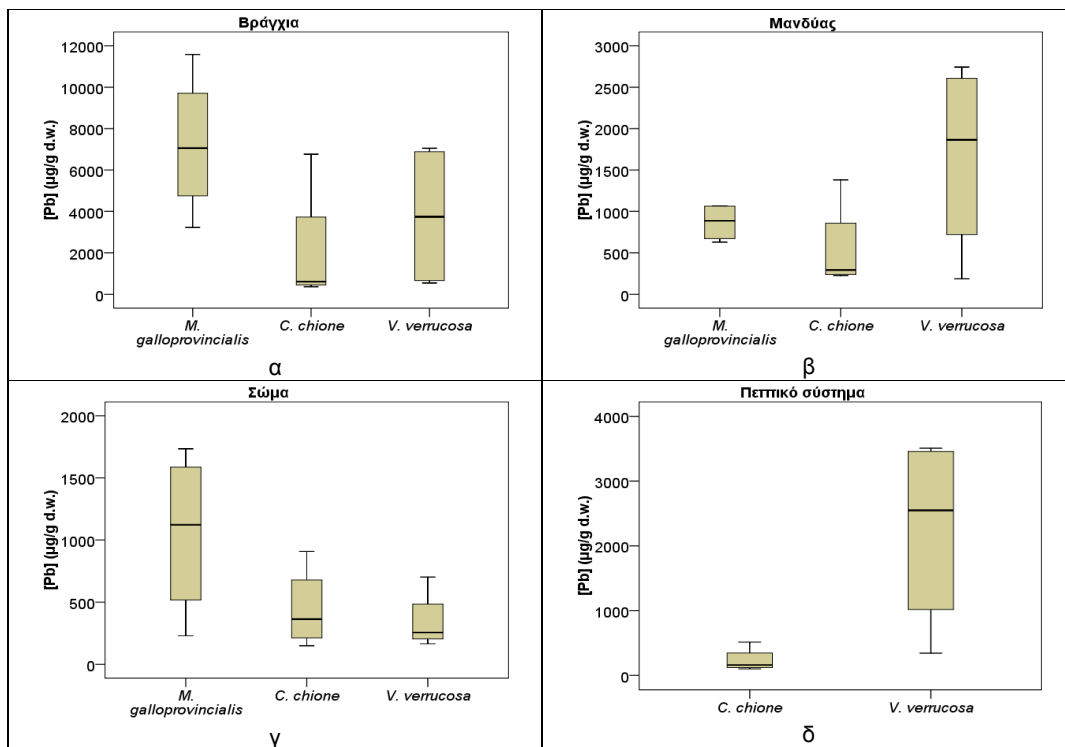
Σχήμα 56: Box-plots των επιπέδων μολύβδου ($\mu\text{g/g d.w.}$) για α) σώμα, β) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε $1,0 \text{ mg/L Pb}$

Στο επίπεδο $2,5 \text{ ppm}$ βρέθηκε ότι οι τιμές του μολύβδου που προσδιορίστηκαν στα βράγχια και το μανδύα των κυδωνιών ήταν υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές τιμές σε σχέση με τους δύο άλλους οργανισμούς, οι οποίοι δεν διέφεραν μεταξύ τους. Στο σώμα όλοι οι οργανισμοί είχαν παρόμοιες τιμές μεταξύ τους, ενώ στο πεπτικό σύστημα, οι τιμές των κυδωνιών ήταν υψηλότερες.



Σχήμα 57: Box-plots των επιπέδων μολύβδου (µg/g d.w.) για α) μανδύα, β) σώμα, γ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb

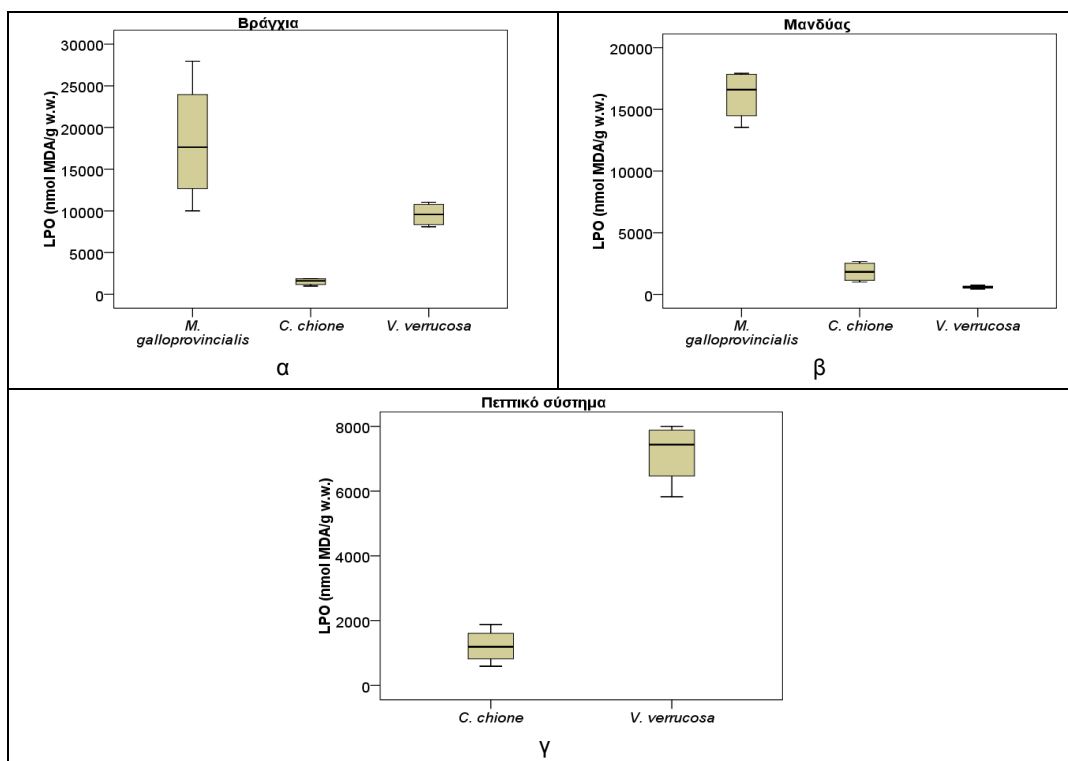
Για το υψηλότερο επίπεδο έκθεσης βρέθηκαν οι εξής τάσεις: για τα βράγχια: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* > *C. chione*, για το μανδύα: *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* > *C. chione* και για το σώμα *M. galloprovincialis* > *C. chione* > *V. verrucosa*.



Σχήμα 58: Box-plots των επιπέδων μολύβδου (µg/g d.w.) για α) βράγχια, β) μανδύα, γ) σώμα, δ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb

4.4.2 Λιπιδική υπεροξειδωση

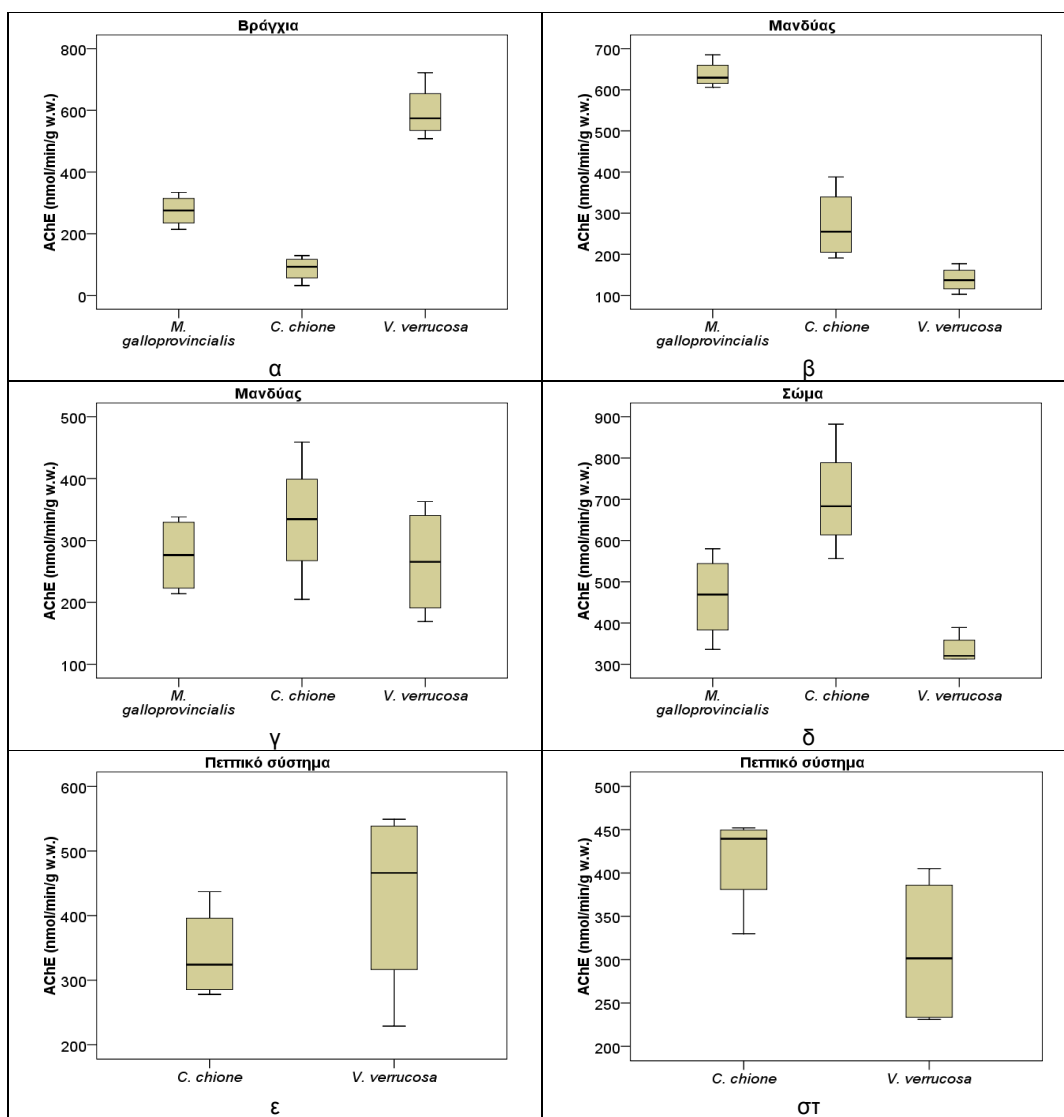
Η σειρά των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης στα βράγχια των οργανισμών για κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης ήταν η εξής: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* > *C. chione*. Για το μανδύα και το σώμα: *M. galloprovincialis* > *C. chione* > *V. verrucosa*, ενώ στο πεπτικό σύστημα, υψηλότερη οξειδωτική βλάβη είχε υποστεί ο ιστός αυτός στο κυδώνι, από ότι στην γυαλιστερή.



Σχήμα 59: Box-plots των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/ g w.w.) για α) βράγχια, β) μανδύα, γ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Pb

4.4.3 Ακετυλοχολινεστεράση

Η τάση στα βράγχια ήταν η εξής *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* > *C. chione*. Στο μανδύα η τάση για τα τρία πρώτα επίπεδα έκθεσης ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* > *V. verrucosa*, ενώ στο σώμα η τάση για όλα τα επίπεδα έκθεσης είναι: *C. chione* > *M. galloprovincialis* ≈ *V. verrucosa*. Στο μανδύα και στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν στο υψηλότερο επίπεδο μόλυβδου, υψηλότερες τιμές βρέθηκαν στη γυαλιστερή και χαμηλότερες στο κυδώνι. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα των γυαλιστερών που εκτέθηκαν στα δύο χαμηλότερα επίπεδα μετάλλου ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες κυδωνιών, ενώ για τα επίπεδα έκθεσης 2,5 και 20 ppm παρατηρήθηκε η αντίστροφη τάση.



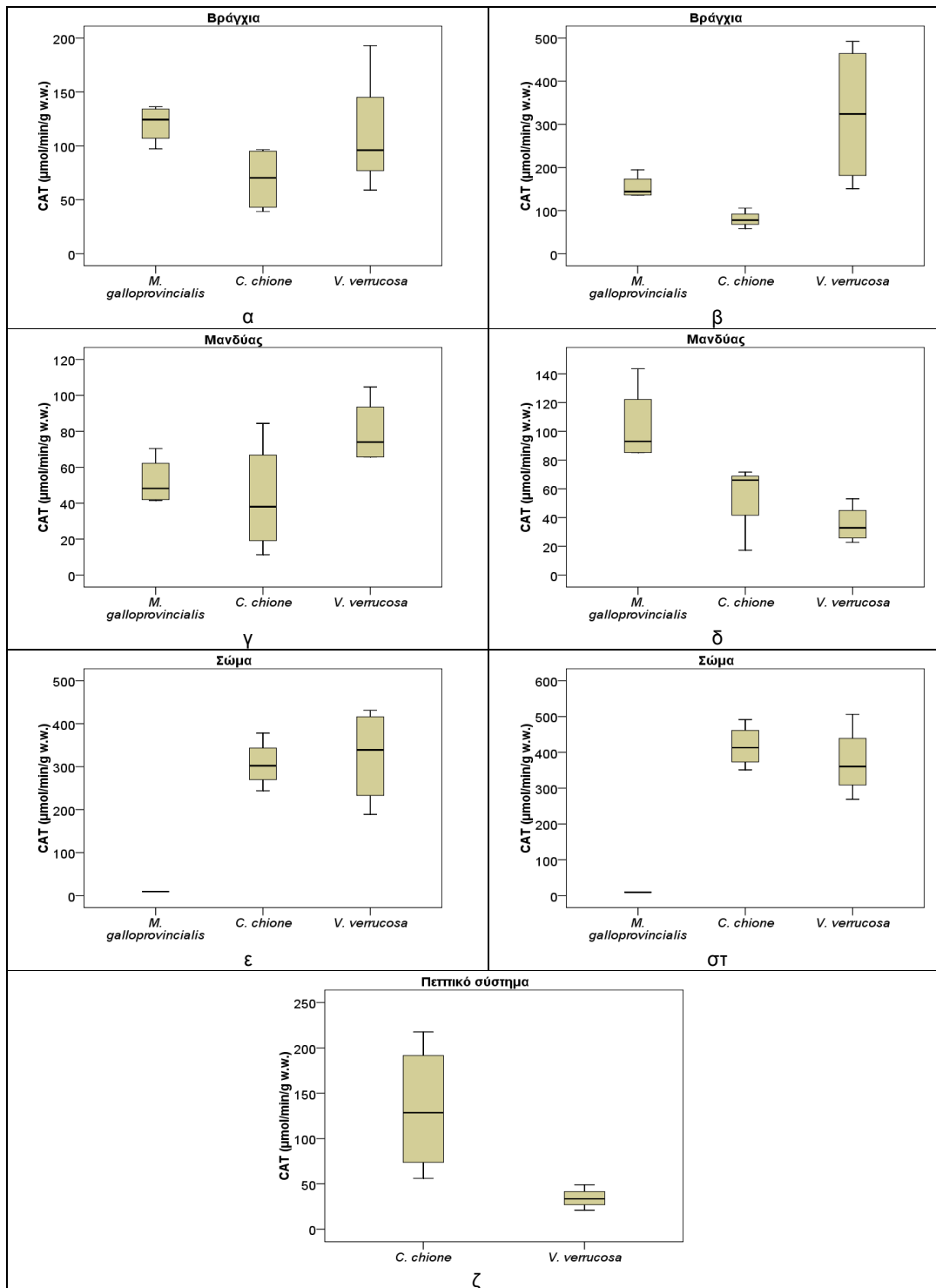
Σχήμα 60: Βοξ-πlots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/min/g w.w) για α) βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Pb, β) μανδύας των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb, γ) μανδύας των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb, δ) σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb, ε) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb, στ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb

4.4.4 Καταλάση

Για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης η τάση της καταλάσης στα βράγχια ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* ≈ *C. chione*, ενώ στο σώμα ίσχυε το αντίστροφο. Η γυαλιστερή και το κυδώνι δεν εμφάνισαν στατιστική διαφορά μεταξύ τους στις τιμές του ενζύμου στα βράγχια και το σώμα τους, ενώ στο πεπτικό σύστημα είχαν, με τις τιμές της γυαλιστερής να είναι υψηλότερες. Στο μανδύα η τάση ήταν η εξής: *V. verrucosa* ≥ *M. galloprovincialis* ≥ *C. chione*.

Για τα δύο υψηλότερα επίπεδα έκθεσης η τάση στα βράγχια ήταν η εξής: *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* > *C. chione*. Στο μανδύα η τάση ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* > *V. verrucosa*. Στο πεπτικό σύστημα δεν υπήρχε στατιστική διαφορά ανάμεσα στα δύο δίθυρα, αν και οι τιμές που προσδιορίστηκαν στην γυαλιστερή ήταν υψηλότερες από ότι στο κυδώνι. Η τάση στο

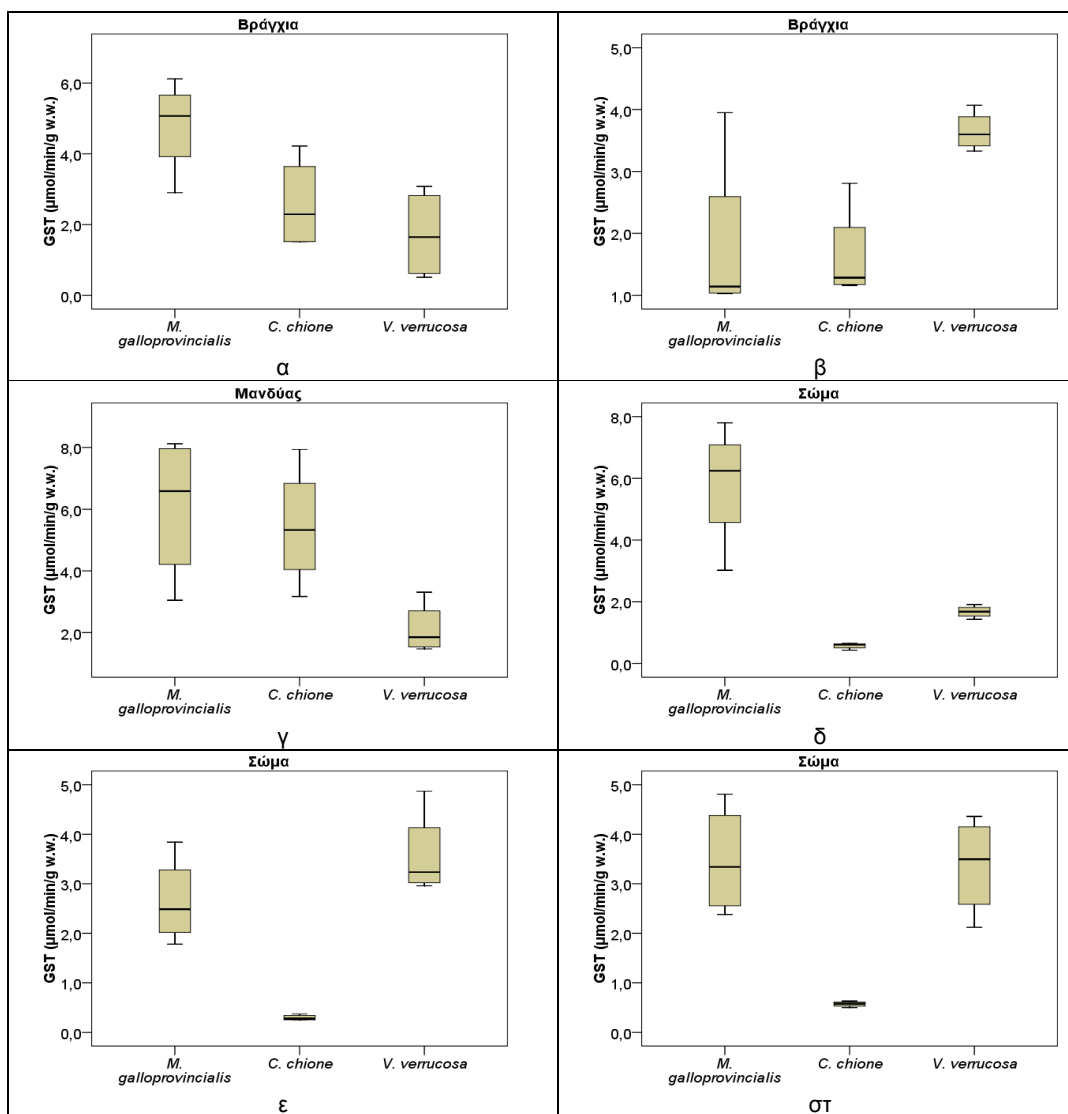
σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα έκθεσης ήταν η εξής: $C. chione \approx V. verrucosa > M. galloprovincialis$.



Σχήμα 61: Βox-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/min/g w.w) στους τέσσερις ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb (β, δ, στ, ζ), στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb (α), στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Pb (γ) και στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb (ε)

4.4.5 Σ μεταφοράση της γλουταθειόνης

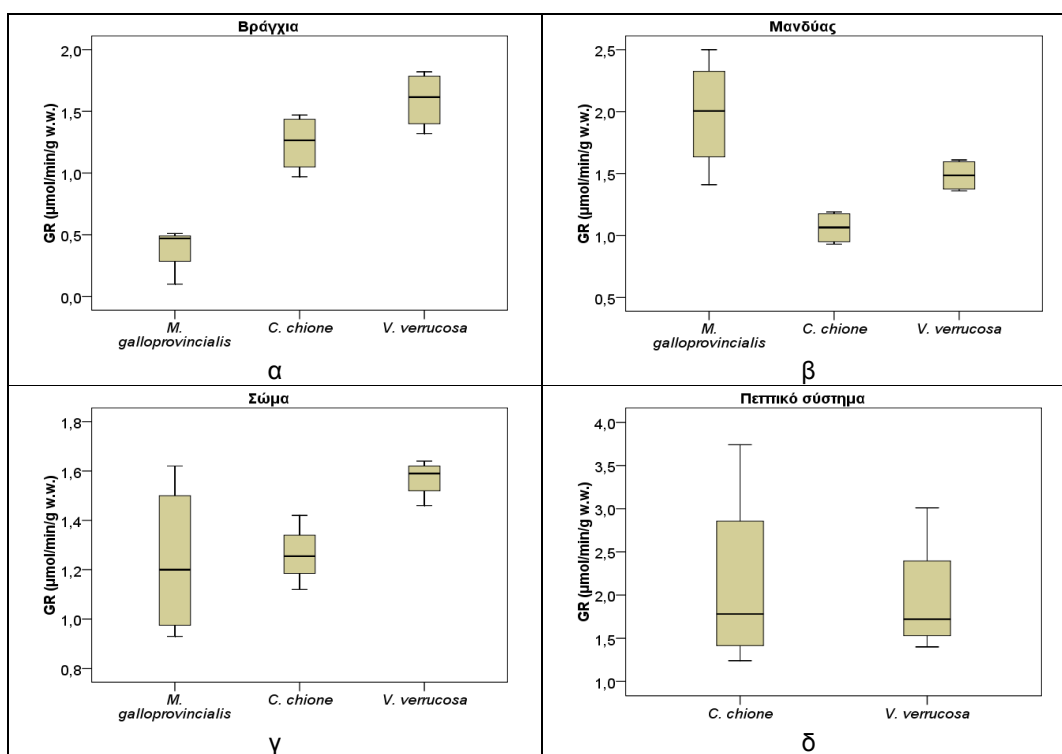
Η τάση στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5-2,5 και 20 ppm Pb ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* > *V. verrucosa*. Στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Pb οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο κυδώνι, ενώ οι δύο άλλοι οργανισμοί δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους. Στο μανδύα των οργανισμών, η GST στο κυδώνι είχε τις χαμηλότερες τιμές και το μύδι τις υψηλότερες. Στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα τρία χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης η τάση ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* ≈ *C. chione*, ενώ στο 20 ppm Pb, οι υψηλότερες τιμές του ενζύμου προσδιορίστηκαν στο κυδώνι και οι χαμηλότερες στη γυαλιστερή. Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών δεν βρέθηκε καμία στατιστική διαφορά, αν και το κυδώνι είχε υψηλότερες τιμές GST.



Σχήμα 62: Box-plots των επιπέδων GST (μmol/min/g w.w) στα βράγχια (α), το μανδύα (γ) και το πεπτικό σύστημα (στ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb, στα βράγχια (β) και το σώμα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb και στο σώμα (ε) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb

4.4.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης

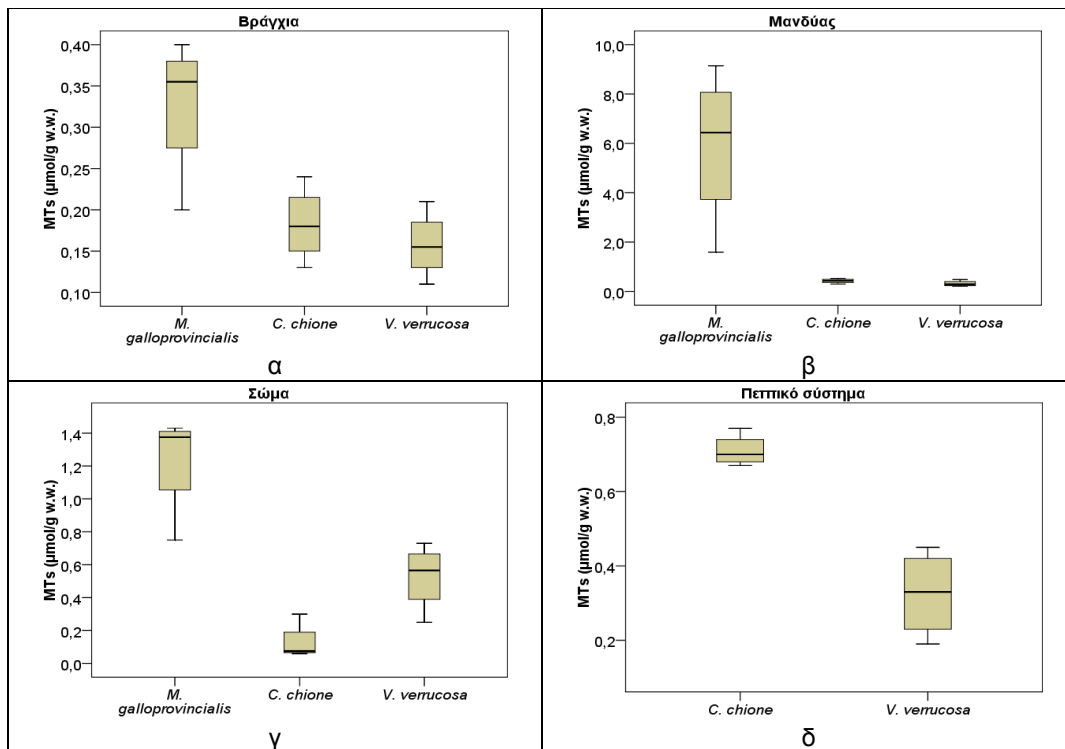
Για κάθε επίπεδο έκθεσης, η σύγκριση των οργανισμών μεταξύ τους ανά ιστό έδειξε πως στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα, όλοι οι οργανισμοί διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους. Στα βράγχια η τάση ήταν η εξής: *V. verrucosa* > *C. chione* > *M. galloprovincialis*. Στο μανδύα η τάση ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* > *C. chione*. Ίδια τάση βρέθηκε και στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα μολύβδου, ενώ σε εκείνους που εκτέθηκαν στα δύο χαμηλότερα ήταν *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* > *C. chione*. Οι τιμές της GR στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών δεν ήταν στατιστικά διαφορετικές.



Σχήμα 63: Box-plots των επιπέδων GR (μmol/min/g w.w) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb (α), στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg/L Pb (β), στο σώμα (γ) και το πεπτικό σύστημα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Pb

4.4.7 Μεταλλοθειονίνες

Μετά από στατιστική σύγκριση των τιμών για τα βράγχια των τριών οργανισμών για κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης, οι τιμές των μεταλλοθειονινών που προσδιορίστηκαν στα βράγχια των μυδιών ήταν υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές από τις τιμές των υπόλοιπων οργανισμών. Δεύτερη σε περιεκτικότητα μεταλλοθειονινών έρχεται η γυαλιστερή και τρίτο το κυδώνι, τα οποία όμως δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους. Στο μανδύα το μύδι είχε τις υψηλότερες τιμές από τους τρεις οργανισμούς, με τους άλλους δύο να μην διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους, καθώς οι τιμές ήταν παρόμοιες. Η γυαλιστερή είχε τις υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών στο πεπτικό σύστημα για κάθε επίπεδο έκθεσης, ενώ στο σώμα, οι υψηλότερες τιμές μετρήθηκαν στο μύδι και οι χαμηλότερες στη γυαλιστερή, με τους τρεις οργανισμούς να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους.



Σχήμα 64: Βox-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w) στα βράγχια (α), το σώμα (γ) και το πεπτικό σύστημα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg/L Pb και στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 mg/L Pb (β)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΝΙΚΕΛΙΟ

5.1 Έκθεση *Mytilus galloprovincialis* σε νικέλιο

5.1.1 Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα νικελίου στο θαλασσινό νερό

Οι τιμές του νικελίου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των μυδιών όταν έφτασαν στο εργαστήριο ήταν 3,0 μg/g d.w. για τα βράγχια, 0,69 για το μανδύα και 2,0 για το σώμα, ενώ για το ολικό ζώο οι τιμές ήταν 1,8 μg/g d.w. και 1,0 μg/g w.w. Στη νομοθεσία δεν έχουν θεσπιστεί όρια για την συγκέντρωση νικελίου σε δίθυρα μαλάκια.

Οι συγκεντρώσεις του νικελίου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς παρουσίασαν μείωση κατά την διάρκεια διατήρησής τους σε ενυδρεία με νερό λιγότερο επιβαρυσμένο από ότι της περιοχής όπου ζουν. Οι τιμές κυμάνθηκαν για τα βράγχια από 3,0-1,8 μg/g d.w., για το μανδύα στα 0,69-0,30 μg/g d.w. και για το σώμα στα 2,0-0,90 μg/g d.w.

Από το Σχήμα 65 φαίνεται πως τα μύδια που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου, ανταποκρίθηκαν στην αύξηση συγκέντρωσης μετάλλου στο περιβάλλον τους προσροφώντας το και αποθηκεύοντάς το στους ιστούς τους με τάση αυξανόμενη με τις μέρες έκθεσης και μέγιστη τιμή την 20^η ημέρα έκθεσης. Η αύξηση του νικελίου με τις μέρες έκθεσης σε κάθε ιστό και επίπεδο έκθεσης αποδείχτηκε γραμμική και στατιστικά σημαντική. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά τις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις νικελίου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι.

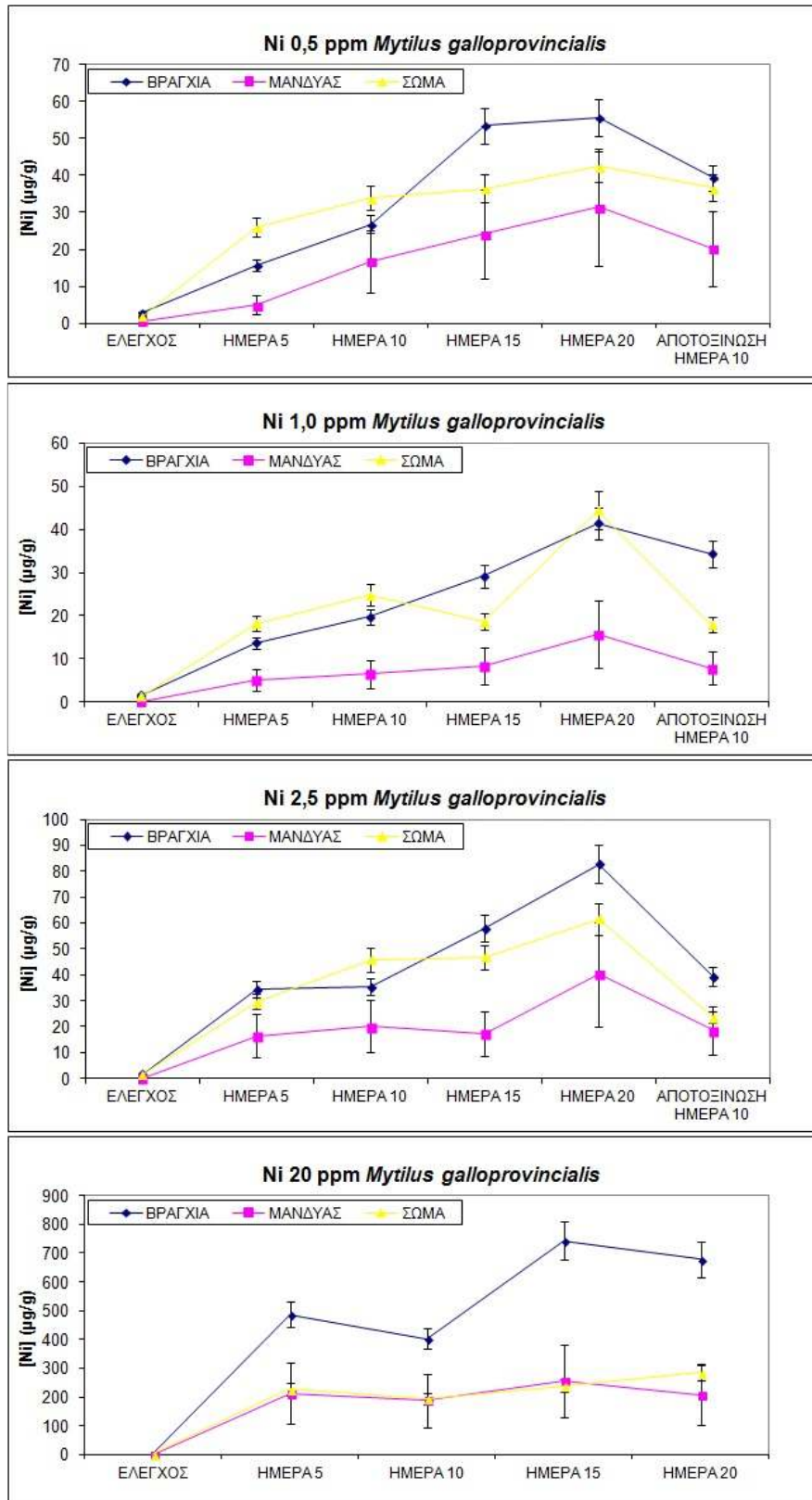
Και στους τρεις ιστούς παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της διάμεσης τιμής στον κάθε ιστό (Σχήμα 66). Παρατηρήθηκε βέβαια και στους τρεις ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Ni, ότι οι συγκεντρώσεις νικελίου ήταν χαμηλότερες από των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni. Παρόμοια συμπεριφορά από μύδια *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο έχει βρεθεί και από τους Attig et al., 2014⁵⁵, καθώς και από την παρούσα μελέτη για το μόλυβδο (βλ. προηγούμενο κεφάλαιο).

Ανάμεσα στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0-2,5 ppm Ni, το νικέλιο αρχικά συσσωρευόταν στο σώμα. Την 15^η και 20^η ημέρα, τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου, ενώ οι χαμηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο μανδύα. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni, τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου ($p < 0,05$), ενώ οι δύο άλλοι ιστοί είχαν παρόμοιες τιμές μεταξύ τους ($p > 0,05$).

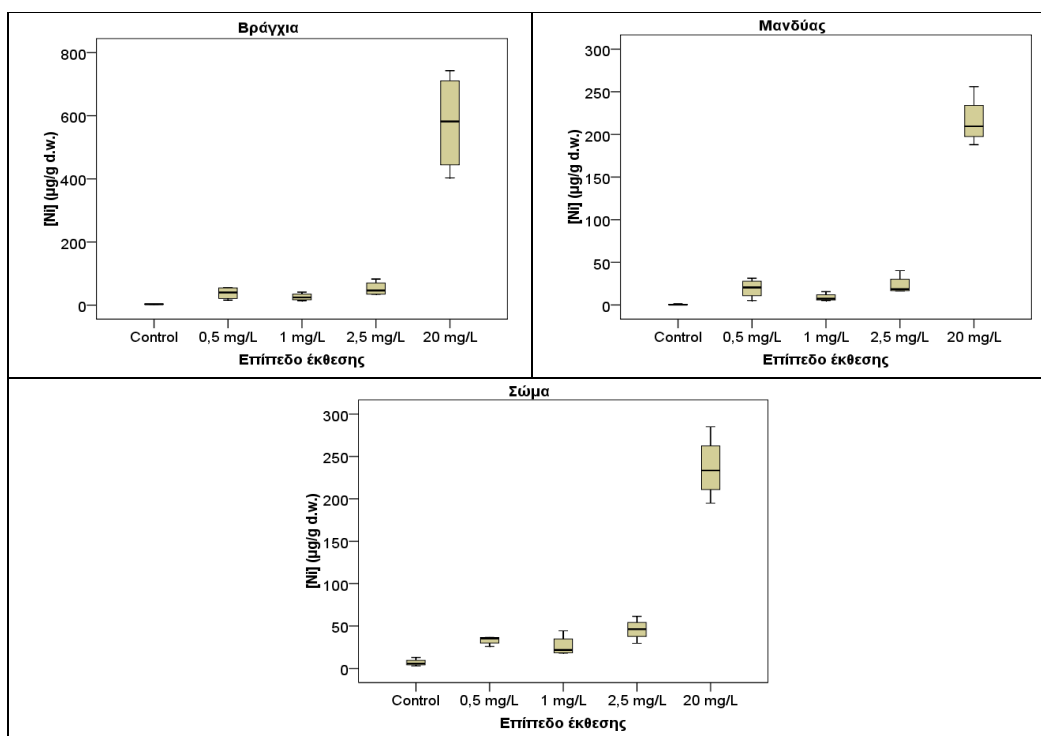
Παρ' ότι στα βράγχια των μυδιών προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου, ο ιστός με το υψηλότερο ποσοστό μετάλλου ήταν το σώμα. Ανά επίπεδο έκθεσης, με την πάροδο του χρόνου η περιεκτικότητα του Ni στα βράγχια αυξανόταν με αντίστοιχη μείωση του ποσοστού του μετάλλου στο σώμα, ενώ στο μανδύα τα ποσοστά παρέμειναν σταθερά. Από το Σχήμα 66 παρατηρείται πως για κάθε ιστό, τα χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης είχαν παρόμοιες τιμές μεταξύ τους, πολύ χαμηλότερες από το επίπεδο έκθεσης 20 mg Ni/L.

Έπειτα από την μεταφορά των οργανισμών σε «καθαρό» θαλασσινό νερό, μειώθηκε η συγκέντρωση νικελίου σε όλους τους ιστούς. Οι τιμές κατά την αποτοξίνωση παρέμειναν πολύ υψηλές σε σχέση με εκείνες που προσδιορίστηκαν όταν οι οργανισμοί ήρθαν στο εργαστήριο. Οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni δεν έχουν τιμή μετάλλου, ούτε και βιοδεικτών για την

αποτοξίνωση, καθώς ένας λάθος υπολογισμός του πληθυσμού που θα χρειαζόταν για να πραγματοποιηθεί το πείραμα καθώς και κάποιοι θάνατοι κατά τον εγκλιματισμό οδήγησαν στην ύπαρξη λιγότερων οργανισμών και μη ολοκλήρωση του πειράματος.



Σχήμα 65: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων νικελίου (μg/g d.w.) στους ιστούς των μυδιών



Σχήμα 66: Σχήμα: Box-plots των συγκεντρώσεων νικελίου (µg/g d.w.) στους ιστούς των μυδιών

Συντελεστής Βιοσυσσώρευσης

Αύξηση της συγκέντρωσης του νικελίου στους ιστούς των οργανισμών με την πάροδο των ημερών έκθεσης προκάλεσε και αντίστοιχη αύξηση του συντελεστή βιοσυσσώρευσης. Σε κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης και σε κάθε ιστό φαίνεται πως όσο αυξάνονταν οι μέρες έκθεσης των οργανισμών σε νικέλιο, αυξανόταν και ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης. Αυτό δεν ισχύει για το επίπεδο έκθεσης 20ppm. Σε κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης, φαίνεται επίσης πως ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης ήταν μεγαλύτερος στα βράγχια σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς.

Πίνακας 33: Συντελεστής βιοσυσσώρευσης στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν στα διάφορα επίπεδα νικελίου

		DAY5	DAY10	DAY15	DAY20
Ni 0,5 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	22	42	96	102
	ΜΑΝΔΥΑΣ	10	31	47	61
	ΣΩΜΑ	40	48	54	59
Ni 1,0 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	10	15	27	38
	ΜΑΝΔΥΑΣ	4,8	5,2	8,3	15
	ΣΩΜΑ	13	12	16	38
Ni 2,5 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	12	12	22	32
	ΜΑΝΔΥΑΣ	6,5	7,5	6,8	16
	ΣΩΜΑ	9,6	13	18	22
Ni 20 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	24	20	37	34
	ΜΑΝΔΥΑΣ	11	9	13	10
	ΣΩΜΑ	11	9	12	14

5.1.2 Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 34 με την πάροδο των ημερών σε όλους τους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς η συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΐδης (εκφρασμένη ως $\mu\text{mol MDA/g w.w.}$) παρουσίασε μείωση. Στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έδειξε για τα επίπεδα MDA την εξής τάση: βράγχια > μανδύας > σώμα (ίδια εικόνα με το μόλυβδο). Στα βράγχια των οργανισμών, όπου είχε προσδιοριστεί η υψηλότερη συγκέντρωση νικελίου, προσδιορίστηκε και η υψηλότερη συγκέντρωση MDA, άρα είναι ο ιστός που έχει υποστεί την σημαντικότερη οξειδωτική βλάβη. Οι τιμές μηλονικής διαλδεΐδης που μετρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος διατήρησης οργανισμών σε ενυδρεία χωρίς να έχουν εκτεθεί σε νικέλιο είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες τιμές των οργανισμών αναφοράς του πειράματος του μολύβδου.

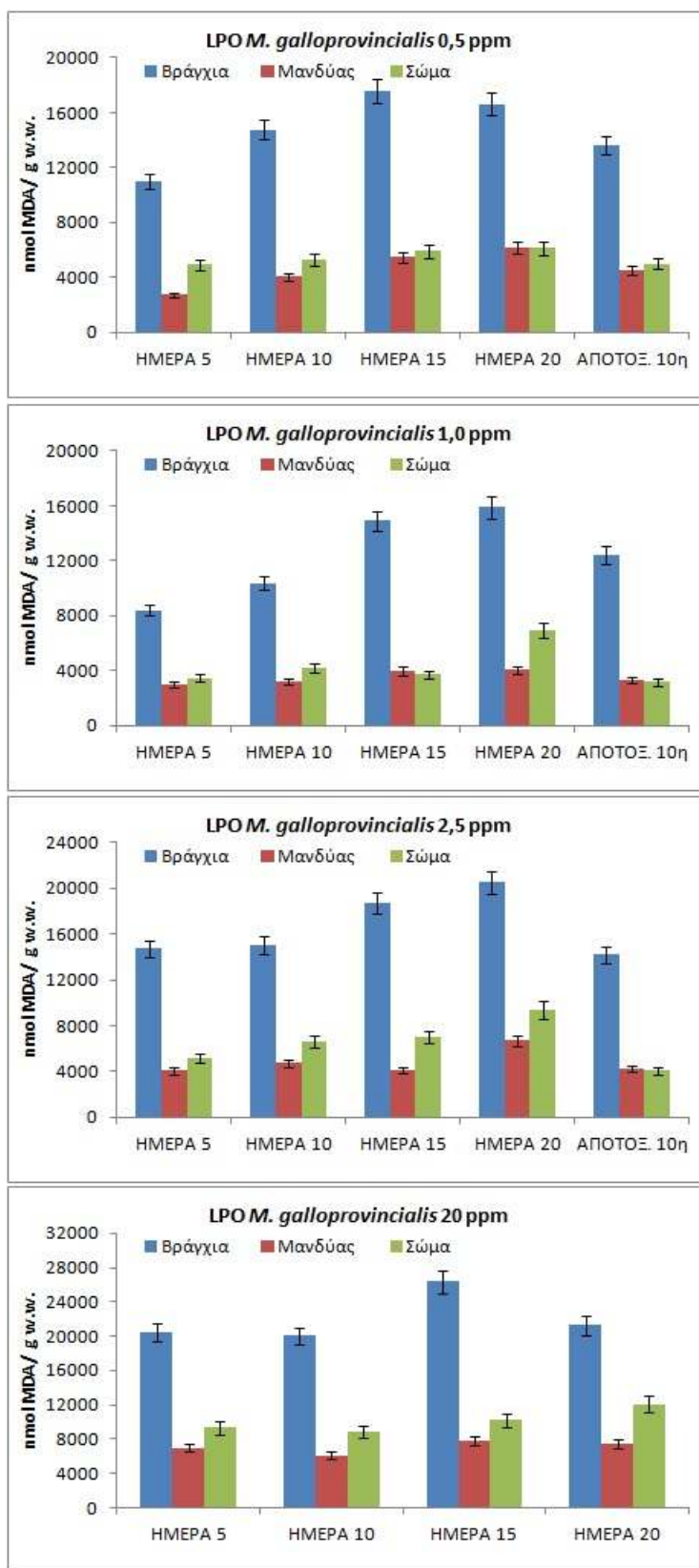
Πίνακας 34: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA για τον πληθυσμό αναφοράς

	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10
Βράγχια	4299	4206	4102	4002	4001
Μανδύας	2611	2601	2580	2501	2456
Σώμα	1917	1900	1900	1867	1807

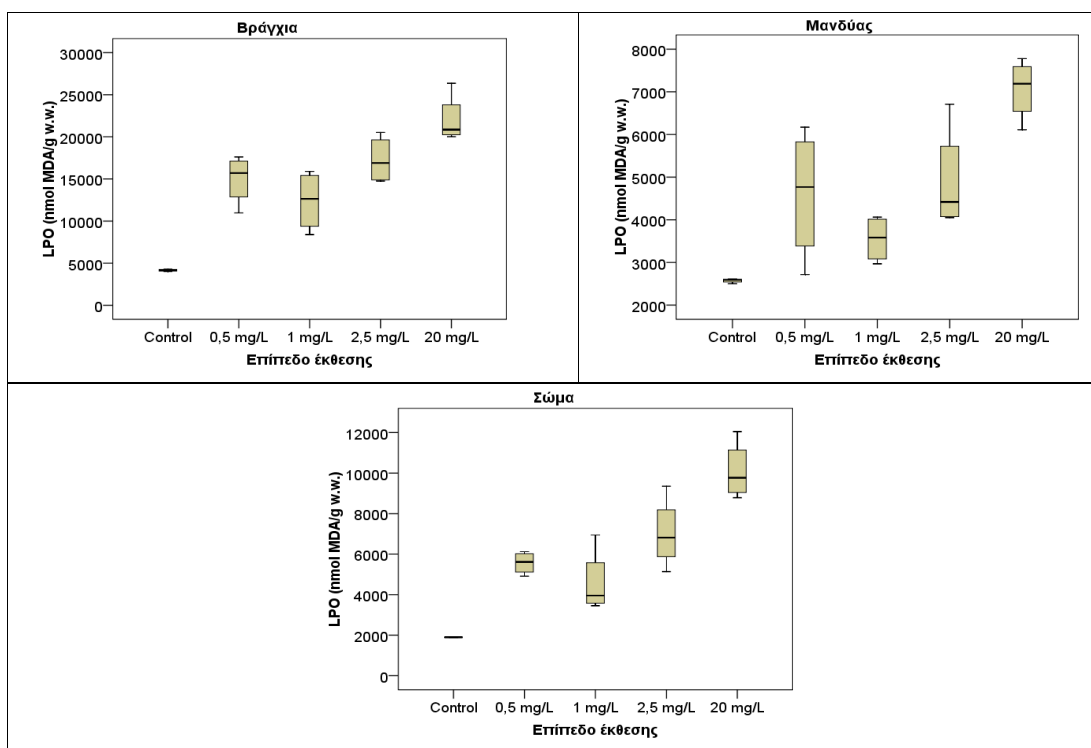
Οι τιμές MDA στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο ήταν υψηλότερες, από 2-6 φορές ανάλογα με τον ιστό και το επίπεδο έκθεσης, και στατιστικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς. Παρατηρήθηκε επίσης πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση των τιμών της MDA (Σχήμα 68). Εξαιρέση αποτελούν οι τιμές της MDA στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 mg Ni/L, οι οποίες ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του προηγούμενου επιπέδου έκθεσης, κάτι που παρατηρήθηκε και στη συγκέντρωση του μετάλλου. Όπως είναι εμφανές από το Σχήμα 68, η μέγιστη διάμεση τιμή MDA παρατηρείται στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 mg Ni/L. Η έκθεση σε αυτό το επίπεδο προκάλεσε τη μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη. Παρά τις όποιες διαφοροποιήσεις στα επίπεδα και τις μέσες τιμές της MDA, στα χαμηλά επίπεδα έκθεσης δεν αποδείχθηκε στατιστική διαφοροποίηση. Θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η βλάβη που προκλήθηκε στους ιστούς ήταν σχεδόν ίδια είτε οι οργανισμοί εκτέθηκαν σε 0,5, είτε σε 1,0 είτε σε 2,5 mg/L Ni.

Από τους τρεις ιστούς, οι υψηλότερες τιμές MDA προσδιορίστηκαν στα βράγχια, με την τάση η οποία αποδεικνύεται στατιστικά να διαμορφώνεται ως εξής: βράγχια > σώμα ≥ μανδύας (Σχήμα 67). Γενικά, η λιπιδική υπεροξειδωση ακολουθούσε την τάση του νικελίου στους ιστούς των οργανισμών για κάθε επίπεδο έκθεσης. Έτσι, παρατηρήθηκε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης όταν προσδιορίστηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις μετάλλου (Pearson correlation), κάτι που υποδεικνύει ότι η οξειδωτική βλάβη που προκλήθηκε στους ιστούς των οργανισμών οφείλεται στο μέταλλο.

Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης η τιμή της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε όλους τους ιστούς των οργανισμών ανεξάρτητα από το επίπεδο που εκτέθηκαν, μειώθηκε, όμως η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



Σχήμα 67: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 68: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεΐδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.1.3 Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης για τον πληθυσμό αναφοράς, με την πάροδο των ημερών παρέμεινε σταθερή με τιμές 199 nmol/min /g w.w. για τα βράγχια, 730 για το μανδύα και 186 για το σώμα. Στο μανδύα είχαν προσδιοριστεί οι χαμηλότερες τιμές νικελίου και προσδιορίστηκε η υψηλότερη ενεργότητα ενζύμου, κάτι που πιθανά υποδηλώνει την αντίστροφη τάση μετάλλου-βιοδείκτη και κατ' επέκταση την νευροτοξικότητα του μετάλλου.

Στατιστική σύγκριση των τιμών του ενζύμου απέδειξε την διαφοροποίηση στον πληθυσμό αναφοράς από όλα τα επίπεδα για όλους τους ιστούς. Μεταξύ των ιστών αποδείχτηκε πως ο μανδύας ήταν στατιστικά διαφορετικός, ενώ οι υπόλοιποι ιστοί δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους. Συνολικά, για τα επίπεδα 0,5 και 1,0 ppm Ni η τάση ήταν η εξής: μανδύας > σώμα > βράγχια. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni η τάση ήταν: μανδύας > βράγχια > σώμα, ενώ για εκείνους που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni: βράγχια > μανδύας > σώμα.

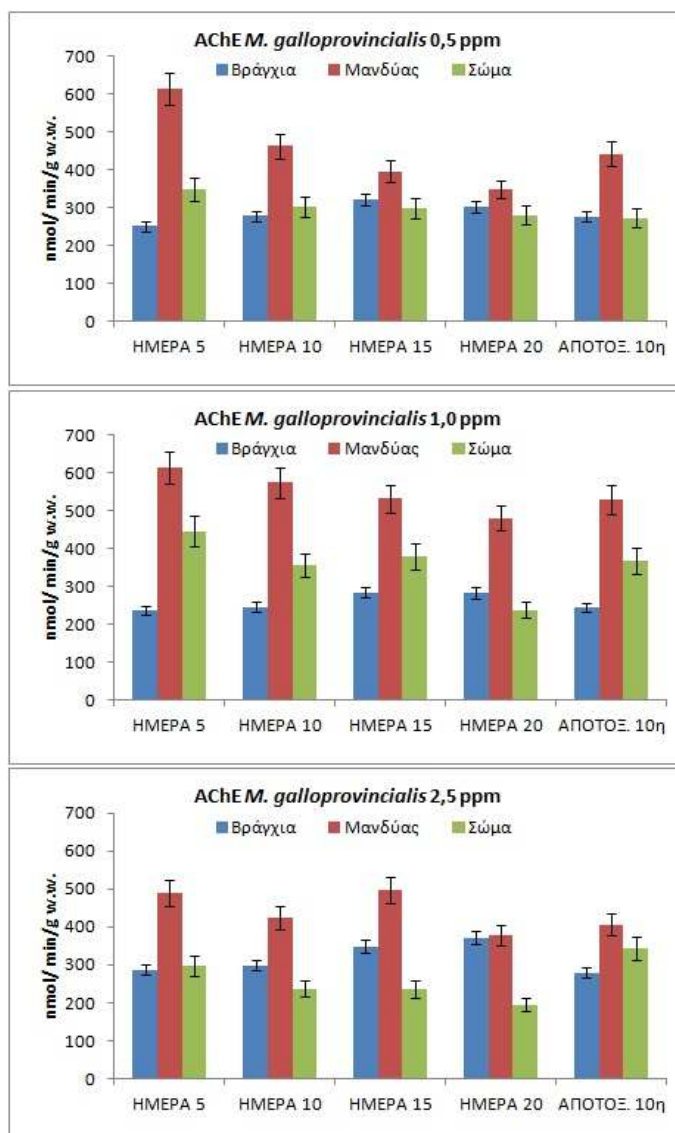
Από το Σχήμα 69 φαίνεται ότι η δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης στα βράγχια είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς, οι οποίες γενικά αυξάνονταν με την πάροδο του χρόνου έκθεσης σε όλα τα επίπεδα έκθεσης. Από το Σχήμα 70 φαίνεται ότι η AChE στα βράγχια των οργανισμών αυξήθηκε ανάλογα με την συγκέντρωση νικελίου στον ιστό. Στο επίπεδο έκθεσης 1,0 ppm που είχαν προσδιοριστεί οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου, προσδιορίστηκε η χαμηλότερη δραστηριότητα της AChE.

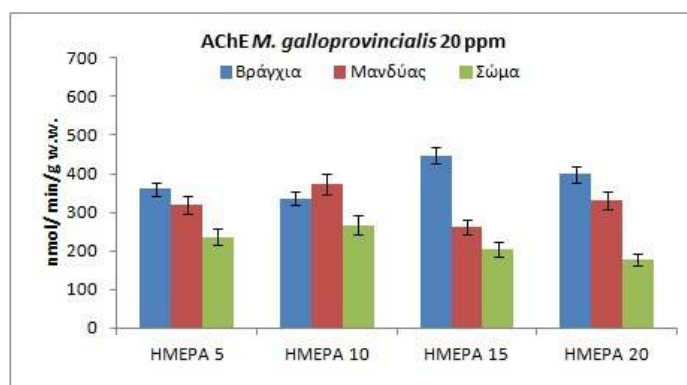
Οι τιμές του μανδύα για κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης μειώνονταν με την πάροδο των ημερών έκθεσης, με ελάχιστη τιμή την 20^η ημέρα έκθεσης και συνακόλουθη αύξηση στην

αποτοξίνωση. Από το Σχήμα 70 φαίνεται ότι για το μανδύα των οργανισμών, αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου προκάλεσε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου, κάτι που πιθανά υποδηλώνει τη νευροτοξικότητα του νικελίου. Για το σώμα των οργανισμών (Σχήμα 70) που εκτέθηκαν στα δύο χαμηλότερα επίπεδα νικελίου προκλήθηκε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου με αύξηση του επιπέδου έκθεσης, ενώ περαιτέρω αύξηση του επιπέδου (2,5 και 20 ppm Ni), προκάλεσε μείωση της ενεργότητας.

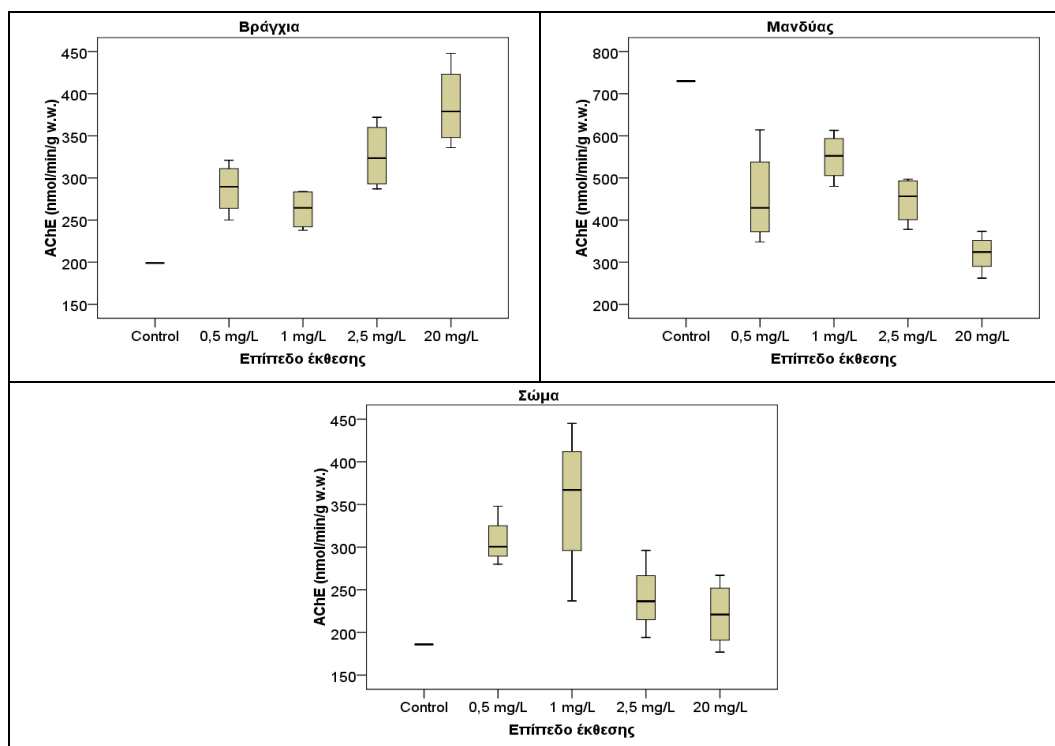
Θετική συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στο νικέλιο και την ακετυλονοχολινεστεράση στα βράγχια των μυδιών, ενώ αρνητική συσχέτιση, παρατηρήθηκε στο μανδύα και στο σώμα των οργανισμών, κάτι που ίσως είναι ένδειξη νευροτοξικότητας, καθώς έχει βρεθεί και από άλλους ερευνητές μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου μετά από έκθεση σε ρύπους^{236-238,241,242}.

Κατά την αποτοξίνωση η τιμή της ακετυλονοχολινεστεράσης στα βράγχια των οργανισμών μειώθηκε, ενώ στο μανδύα αυξήθηκε, προσπαθώντας σε κάθε περίπτωση να επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα, καθώς μειώθηκε και η συγκέντρωση του νικελίου. Η αύξηση στο μανδύα και το σώμα κατά την αποτοξίνωση είναι ενθαρυντική, δείχνοντας πως πιθανά το νικέλιο δεν έχει προκαλέσει μόνιμη βλάβη στο ένζυμο και κατ' επέκταση στον οργανισμό.





Σχήμα 69: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 70: : Βox-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

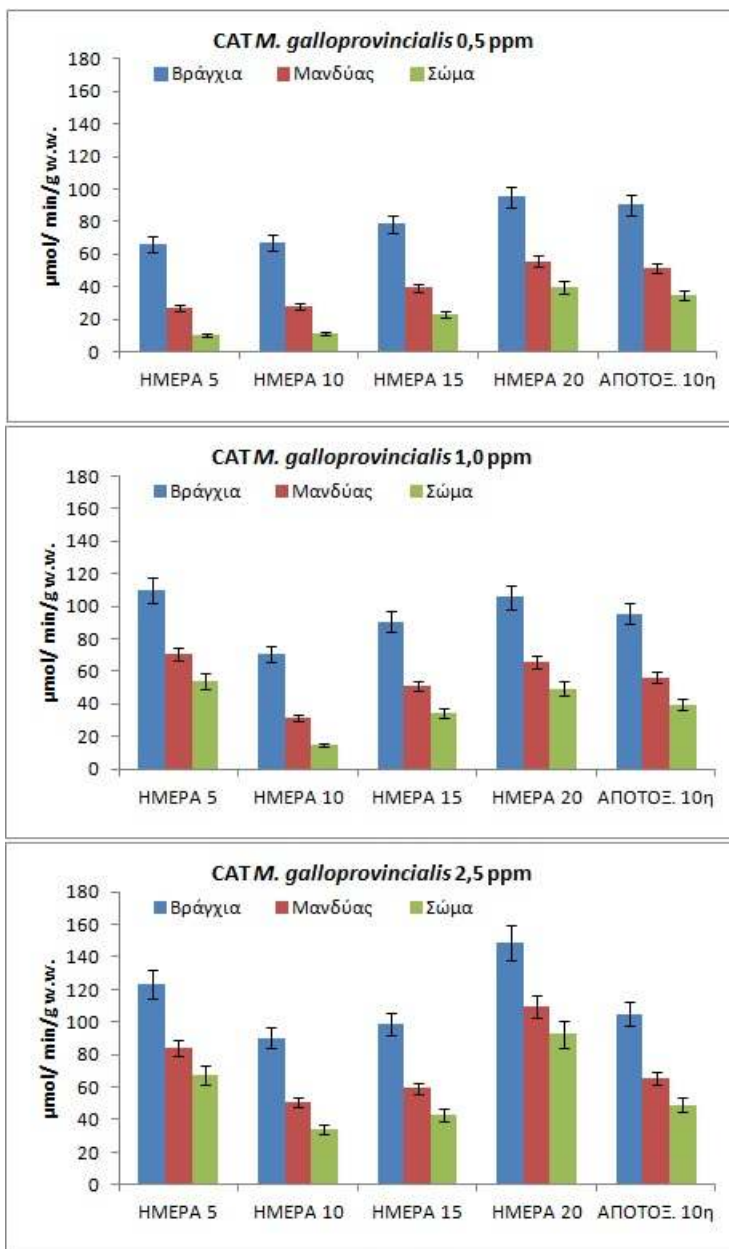
5.1.4 Καταλάση σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

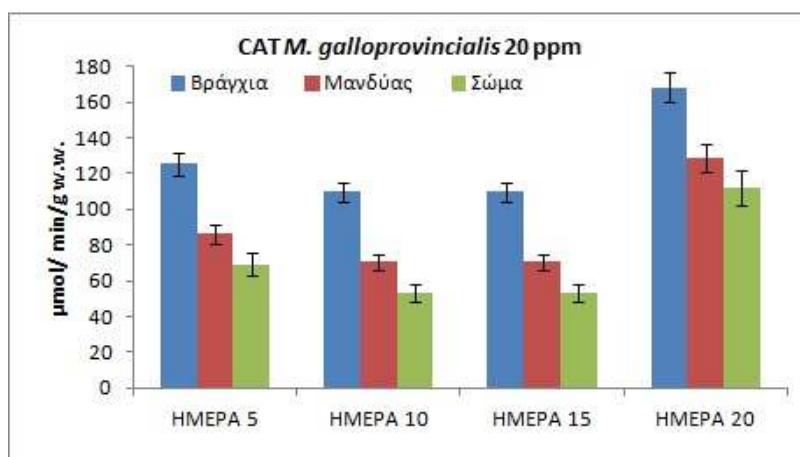
Για τον πληθυσμό αναφοράς η ενεργότητα της καταλάσης (εκφρασμένη ως $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) αυξήθηκε και στους τρεις ιστούς των οργανισμών σε σχέση με τις τιμές της «Ημέρας 0», κατά 16,5% στα βράγχια, 41% στο μανδύα και 53% στο σώμα. Στα βράγχια η ενεργότητα κυμάνθηκε 55-67, στο μανδύα 16-29 και στο σώμα 9,7-22 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$

Οι τιμές καταλάσης στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου, ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 72), και αυξάνονταν με την πάροδο του χρόνου έκθεσης σε νικέλιο, αλλά και με την αύξηση του επιπέδου έκθεσης. Μεταξύ των ιστών, για κάθε επίπεδο έκθεσης, η τάση ήταν η εξής: βράγχια > μανδύας ≥ σώμα.

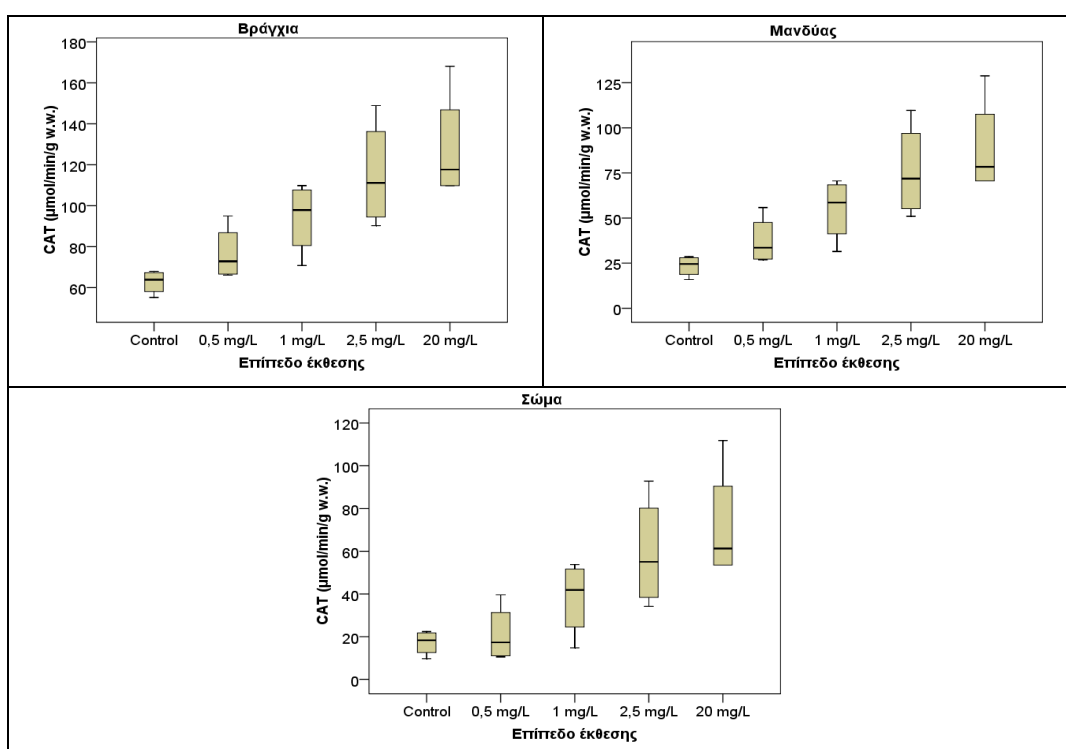
Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά την γενική αύξηση που παρατηρήθηκε κατά την περίοδο έκθεσης, την 10^η ημέρα οι τιμές στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Ni μειώθηκαν πολύ (κατά 36% στα βράγχια, 55% στο μανδύα και 73% στο σώμα) και μάλιστα στο σώμα μειώθηκαν τόσο, που έφτασαν την τιμή του πληθυσμού αναφοράς. Οι τιμές του ενζύμου αυξήθηκαν τις επόμενες μέρες έκθεσης, χωρίς όμως να φτάνουν τις τιμές της 5^{ης} ημέρας. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Pearson correlation) δεν βρέθηκε ανάμεσα στο νικέλιο και την καταλάση στους ιστούς των οργανισμών για κάθε επίπεδο έκθεσης.

Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης των οργανισμών οι τιμές της καταλάσης μειώθηκαν σε όλους τους ιστούς, σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, χωρίς να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα, γι' αυτό και δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο περιόδων.





Σχήμα 71: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης (μολ/ min/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 72: Box-plots των επιπέδων καταλάσης (μολ/ min/ g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.1.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

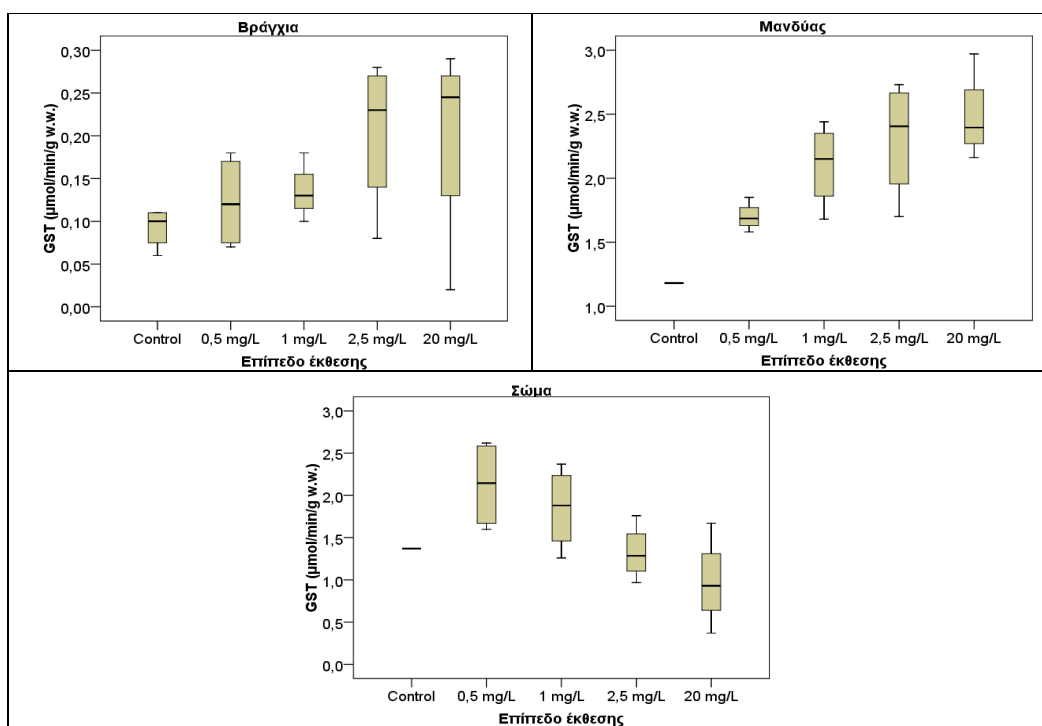
Για τον πληθυσμό αναφοράς, η ενεργότητα της S μεταφοράσης της γλουταθειόνης στο μανδύα και το σώμα δεν μεταβλήθηκε με το χρόνο, ενώ στα βράγχια σχεδόν διπλασιάστηκε (τιμές: βράγχια 0,06-0,11, μανδύας 1,2 και σώμα 1,4 μολ/min /g w.w.). Η στατιστική σύγκριση ανάμεσα στους τρεις ιστούς έδειξε την τάση: σώμα> μανδύας> βράγχια.

Οι τιμές GST που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου, ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, εκτός από κάποιες τιμές στα βράγχια και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni (Σχήμα 73). Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης οι χαμηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στα βράγχια, ενώ οι υψηλότερες τιμές για το 0,5 ppm προσδιορίστηκαν στο σώμα, ενώ για τα υπόλοιπα επίπεδα στο μανδύα (Σχήμα 74).

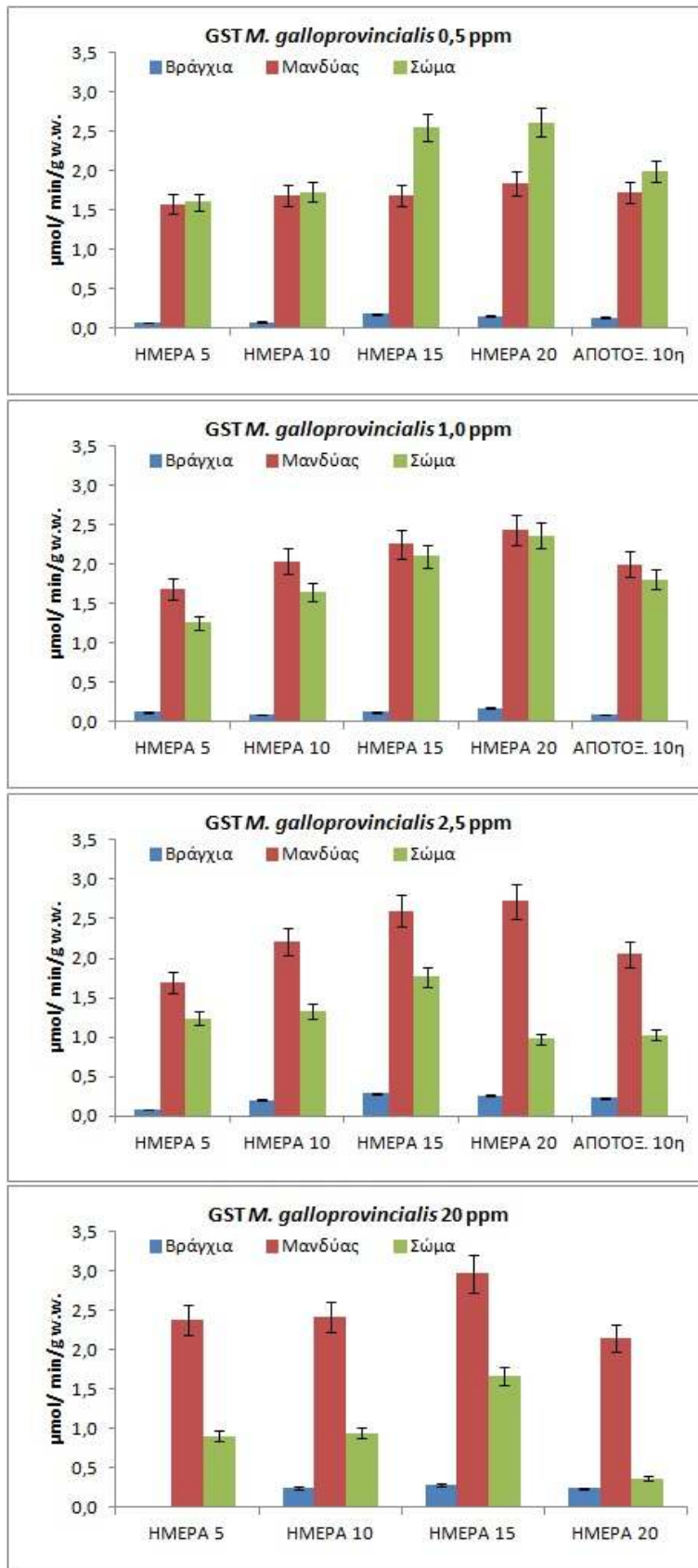
Η τάση του ενζύμου με τις μέρες έκθεσης, για τα επίπεδα 0,5 και 1,0 ppm Ni, ήταν αυξητική και στους τρεις ιστούς, με μέγιστη τιμή την 20^η ημέρα έκθεσης. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm νικελίου, η αύξηση στα βράγχια και το σώμα διήρκησε ως την 15^η ημέρα, ενώ στο σώμα ως την 20^η. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm νικελίου, η αύξηση σε όλους τους ιστούς διήρκησε ως την 15^η ημέρα (Σχήμα 74).

Από σύγκριση των τιμών της GST στα βράγχια των μυδιών (Σχήμα 73), προκύπτει ότι αύξηση της συγκέντρωσης νικελίου στον ιστό ενεργοποιούσε την GST. Στο μανδύα, αύξηση του επιπέδου έκθεσης, προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης της GST, ανεξάρτητα με την μετρούμενη συγκέντρωση του μετάλλου στον ιστό (Σχήμα 73). Στο σώμα (Σχήμα 73), το επίπεδο 0,5 ppm είχε υψηλότερες τιμές GST από όλα τα επίπεδα έκθεσης, και όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, μειώνονταν οι τιμές του ενζύμου, φτάνοντας οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε 2,5 και 20 ppm Ni να έχουν τιμές χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς.

Αύξηση της ενεργότητας των GST στα κύτταρα θεωρείται ως ένας μηχανισμός προσαρμογής στις αλλαγές που συμβαίνουν στο περιβάλλον τους (ρύπανση), ενώ μείωσή τους αποτελεί ένδειξη κυτταρικής βλάβης^{262, 274}. Το ότι δεν παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργότητα GST στα βράγχια των οργανισμών όπου προσδιορίστηκε η υψηλότερη συγκέντρωση νικελίου και είχε υποστεί την μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη, ίσως να αποτελεί ένδειξη κυτταρικής βλάβης. Κατά την αποτοξίνωση, η τιμή της GST σε όλους τους ιστούς μειώθηκε και για τα τρία επίπεδα έκθεσης.



Σχήμα 73: Box-plots των επιπέδων της S μεταφοράση της γλουταθειόνης (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



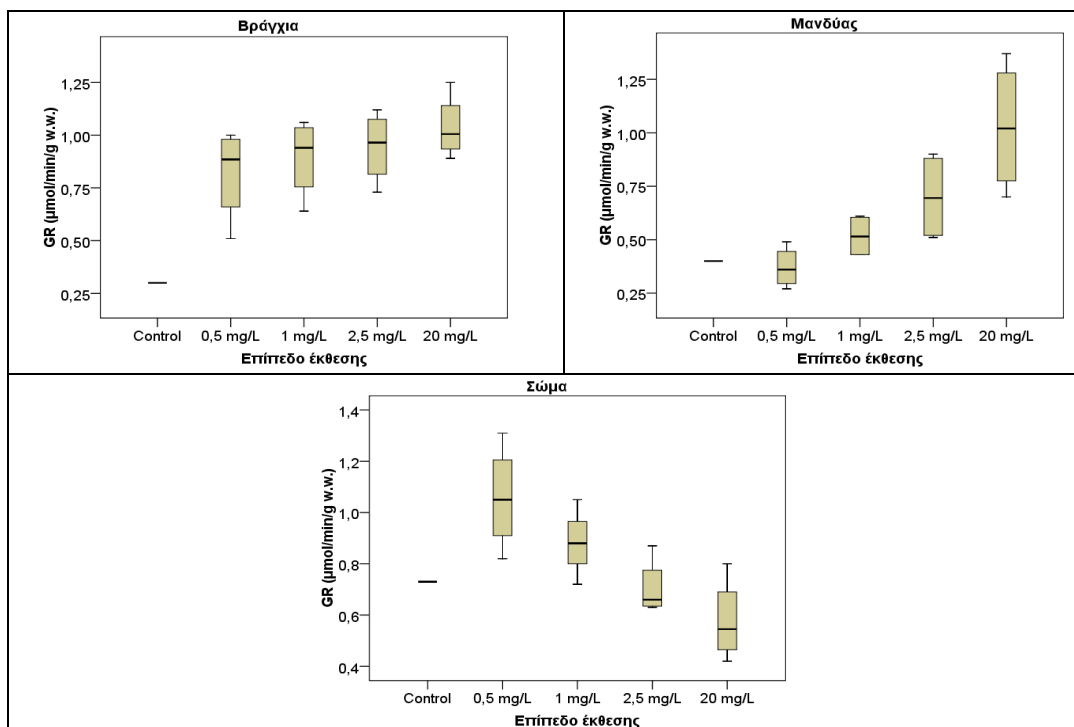
Σχήμα 74: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της S μεταφοράς της γλουταθειόνης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.1.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

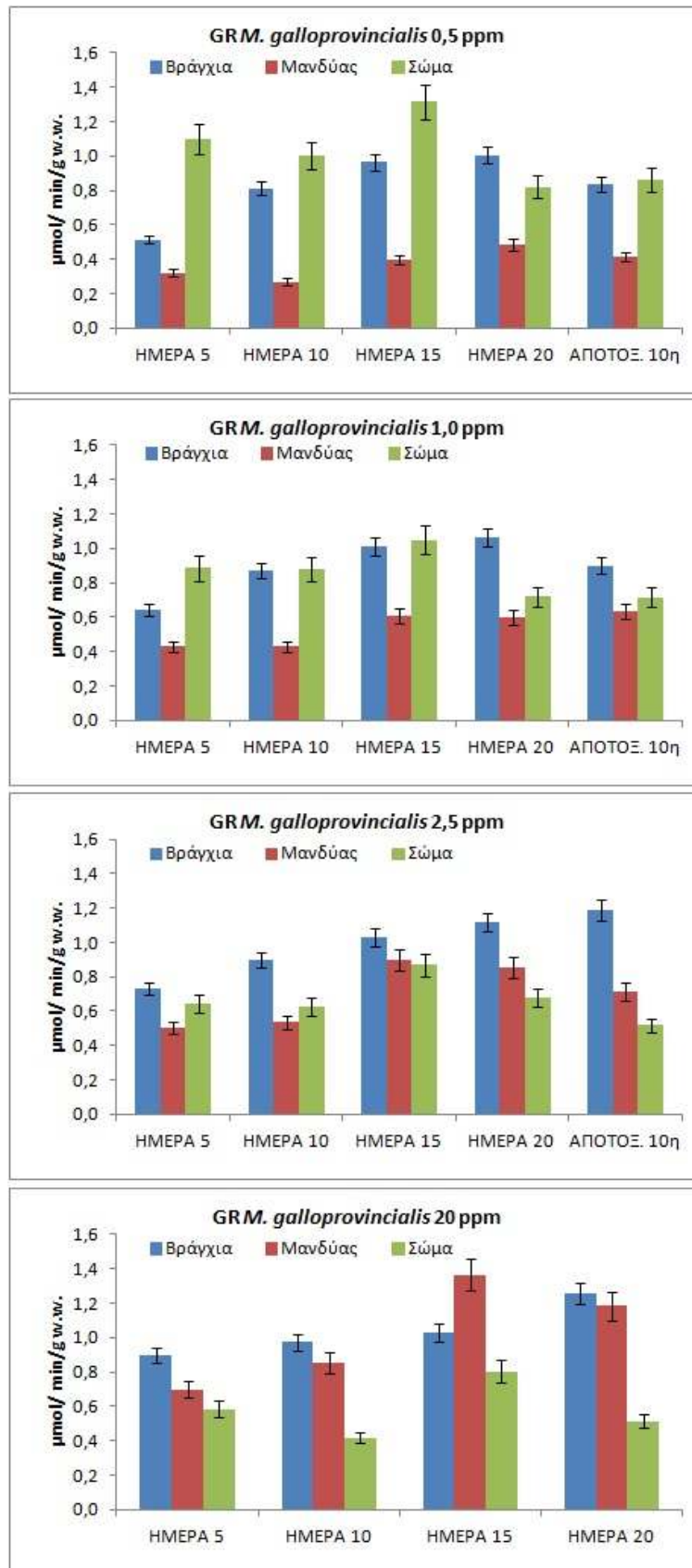
Για τα μύδια αναφοράς, με την πάροδο των ημερών, η ενεργότητα της GR σε κάθε ιστό παρέμεινε σταθερή με τιμές 0,30 για τα βράγχια, 0,40 για το μανδύα και 0,73 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$ για το σώμα. Στα βράγχια είχαν προσδιοριστεί οι υψηλότερες τιμές νικελίου και προσδιορίστηκαν οι πιο χαμηλές τιμές GR, οι οποίες όμως παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια διατήρησης των οργανισμών σε λιγότερο επιβαρυσμένο θαλασσινό νερό, ενώ το μέταλλο στον ιστό μειωνόταν.

Στα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης, ο μανδύας είχε την χαμηλότερη τιμή GR σε σχέση με τους άλλους ιστούς και ήταν στατιστικά διαφορετικός από αυτούς, ενώ οι υπόλοιποι ιστοί είχαν γενικά παρόμοιες τιμές, με ελαφρά υψηλότερες τις τιμές του σώματος (Σχήμα 76). Για τα δύο υψηλότερα επίπεδα έκθεσης τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες τιμές, αλλά δεν βρέθηκε στατιστική διαφορά ανάμεσα στους τρεις ιστούς για κανένα από τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 76).

Οι τιμές της GR στα βράγχια των οργανισμών αυξάνονταν με το χρόνο έκθεσης σε νικέλιο, με μέγιστο την 20^η μέρα για όλα τα επίπεδα. Αντίστοιχη αυξητική τάση παρουσίασε το ένζυμο στο σώμα, με μέγιστο την 15^η ημέρα έκθεσης. Αυτό παρατηρήθηκε και στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα νικελίου. Από το Σχήμα 75, για τα βράγχια και το μανδύα, φαίνεται ότι η τιμή GR σε όλα τα επίπεδα είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς, και επίσης όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης αυξανόταν και η GR. Για το σώμα των οργανισμών, φαίνεται ότι τα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης είχαν υψηλότερη διάμεση τιμή GR από του πληθυσμού αναφοράς, ενώ τα δύο υψηλότερα επίπεδα είχαν χαμηλότερη. Κατά την αποτοξίνωση, οι τιμές του ενζύμου μειώθηκαν σε όλους τους ιστούς, εκτός από το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni και τα βράγχια εκείνων που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni.



Σχήμα 75: Box-plots των επιπέδων της αναγωγής της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 76: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της αναγωγής της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.1.7 Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Οι τιμές των μεταλλοθειονινών και στους τρεις ιστούς των μυδιών αναφοράς, ήταν σταθερές κατά τη διάρκεια του πειράματος με τιμές 0,022 για τα βράγχια, 0,019 για το μανδύα και 0,024 για τα σώμα (εκφρασμένες ως $\mu\text{mol/g w.w.}$).

Παρότι τα βράγχια, είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση νικελίου και είχαν υποστεί την μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη, δεν είχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταλλοθειονινών.

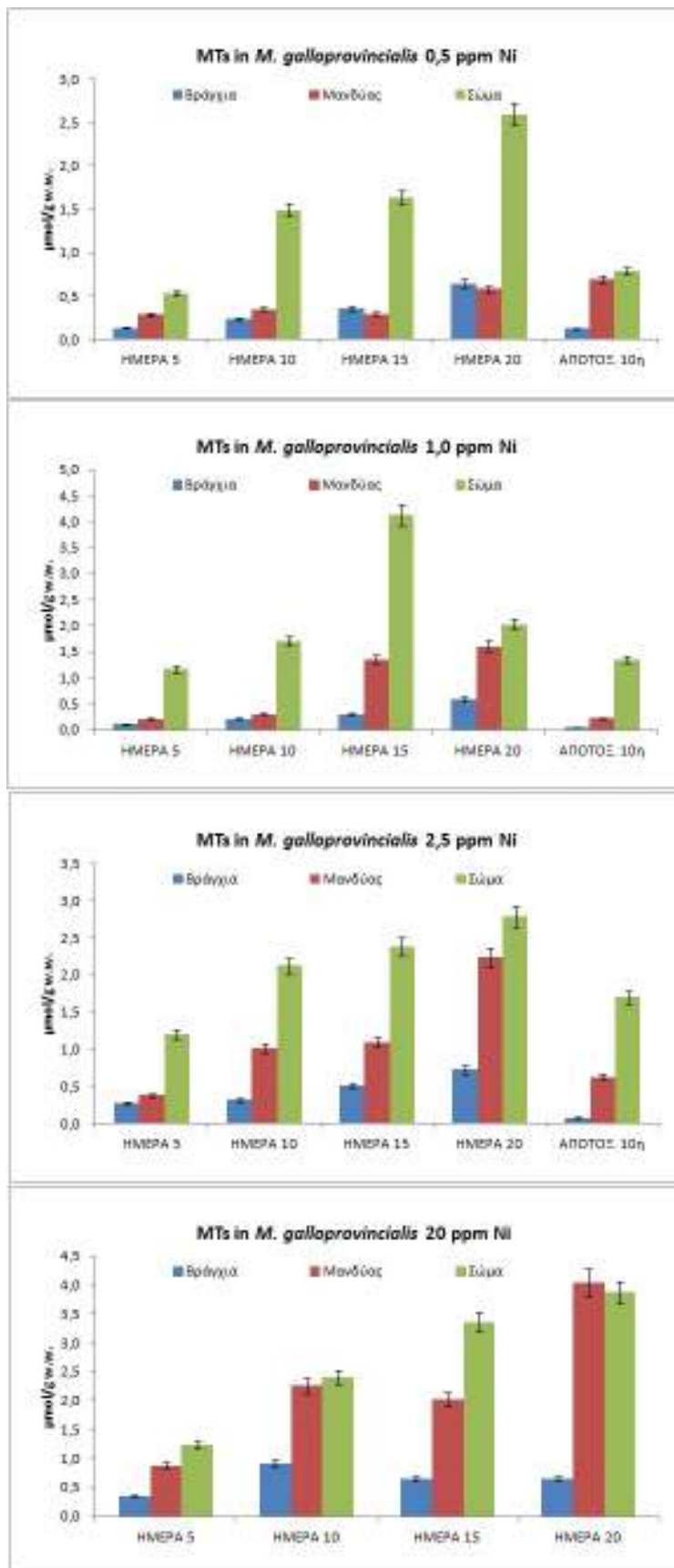
Οι τιμές στον Πίνακα 35 υποδεικνύουν ότι σε όλους τους ιστούς η αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ήταν πολύ μεγάλη σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς. Από τον ίδιο πίνακα, φαίνεται επίσης πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης και οι μέρες έκθεσης, αυξάνονταν και οι τιμές των μεταλλοθειονινών σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς. Εξαιρέση αποτελούν τα βράγχια των μυδιών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Ni, όπου η τιμή που μετρούνται είναι υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, αλλά χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των οργανισμών που έχουν εκτεθεί σε 0,5 ppm. Αυτό συνάδει με την συγκέντρωση νικελίου που προσδιορίστηκε στους ιστούς των εν λόγω οργανισμών.

Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 77), τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών, ενώ το σώμα τις υψηλότερες. Για όλα τα επίπεδα έκθεσης βρέθηκε ότι το σώμα και τα βράγχια ήταν στατιστικά διαφορετικά από το μανδύα ($p < 0,05$). Μέγιστη τιμή και για τους τρεις ιστούς σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, εκτός από το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Ni προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα έκθεσης, οπότε και παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές νικελίου.

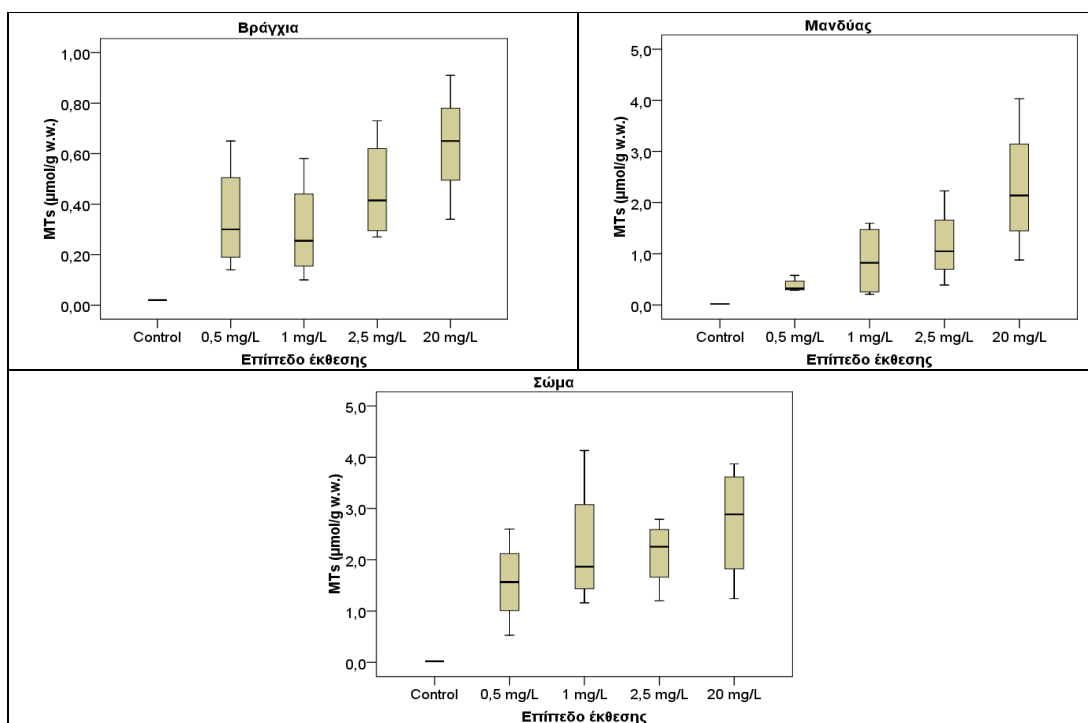
Πίνακας 35: Αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ($C_{\text{Day}x}/C_{\text{Day}0}$) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς

	0.50ppm			1.0ppm			2.5ppm			20ppm	
	day 5	day 20	depuration	day 5	day 20	depuration	day 5	day 20	depuration	day 5	day 20
βράγχια	6,1	29	5,7	4,6	26	1,8	12	33	3,6	16	29
μανδύας	15	31	37	11	86	12	21	119	33	47	216
σώμα	22	109	33	49	85	56	50	117	71	52	162

Από το Σχήμα 78 φαίνεται ότι η συγκέντρωση των μεταλλοθειονινών για καθένα από τους υπό μελέτη ιστούς σε όλα τα επίπεδα έκθεσης είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς και ότι στον ίδιο ιστό, αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης των μεταλλοθειονινών. Το τελευταίο δεν ισχύει στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm. Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης, οι τιμές των μεταλλοθειονινών σε όλους τους ιστούς, εκτός από το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni, μειώθηκαν, χωρίς όμως να επανέλθουν στα αρχικά τους επίπεδα. Η μεγαλύτερη μείωση στην αποτοξίνωση παρατηρήθηκε στα βράγχια των οργανισμών, με τιμές κατά 5, 14 και 9 φορές μειωμένες για τα επίπεδα 0,5-1,0 και 2,5 ppm Ni.



Σχήμα 77: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 78: Βox-plots των επιπέδων των μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.1.8 Ψευδαργύρος σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Οι τιμές του ψευδαργύρου στο μανδύα και στο σώμα του πληθυσμού αναφοράς μειώθηκαν με την παραμονή των οργανισμών σε λιγότερο επιβαρυσμένο θαλασσινό νερό. Η μείωση αυτή ήταν 3,4 φορές για το μανδύα και 2,4 φορές για το σώμα ($C_{day5}/C_{deuration}$). Τόσο στον πληθυσμό αναφοράς, όσο και σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, για την περίοδο έκθεσης, η τάση ήταν η εξής: βράγχια > σώμα ≈ μανδύας.

5.1.9 Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Η ολική πρωτεΐνη στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, σε όλους τους ιστούς των οργανισμών.

Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης οι διάμεσες τιμές των τριών ιστών δεν διέφεραν μεταξύ τους και δεν παρατηρήθηκε ξεκάθαρη τάση αύξησης ή μείωσης με τις ημέρες έκθεσης στον ίδιο ιστό και επίπεδο έκθεσης.

5.1.10 Συσχέτιση νικελίου με βιοδείκτες

Συσχέτιση όλων των τιμών του νικελίου, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε έναν από τους ιστούς των μυδιών, με τους παρακάτω βιοδείκτες, για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% εμφάνισε τις εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακες 36-39):

- αρνητική συσχέτιση με την ακετυλοχολινεστεράση στο μανδύα και το σώμα, ενώ στα βράγχια η συσχέτιση ήταν θετική.

- θετική συσχέτιση με την λιπιδική υπεροξειδωση και στους τρεις ιστούς.
- θετική συσχέτιση με την S μεταφοράση της γλουταθειόνης και την αναγωγή της γλουταθειόνης στο μανδύα, και αρνητική στο σώμα
- θετική συσχέτιση με την καταλάση σε όλους τους ιστούς.
- θετική συσχέτιση με τις μεταλλοθειονίνες στα βράγχια και στο μανδύα.
- αρνητική συσχέτιση με τον ψευδάργυρο στο μανδύα.

5.1.11 Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Επειδή οι βιοδείκτες συσχετίζονται με το νικέλιο, εξετάστηκε και η μεταξύ τους συσχέτιση ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε ιστό, και επίπεδο εμπιστοσύνης >95%. Στόχος της εύρεσης συσχετίσεων μεταξύ των τιμών των βιοδεικτών ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει κοινή συμπεριφορά-τάση των βιοδεικτών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο τρόπος αντίδρασης στην έκθεση σε νικέλιο ήταν παρόμοιος. Έτσι προέκυψαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις:

- θετική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης, με κάθε έναν βιοδείκτη (όχι με τον ψευδάργυρο και την ολική πρωτεΐνη) για τα βράγχια. Αρνητική συσχέτιση ανάμεσα σε όλους τους βιοδείκτες πλην της GST (και του ψευδαργύρου και της ολικής πρωτεΐνης) βρέθηκε για το μανδύα, ενώ στο σώμα η ακετυλοχολινεστεράση συσχετίστηκε με την λιπιδική υπεροξειδωση και την καταλάση αρνητικά ενώ με την GR θετικά.
- θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, με κάθε έναν βιοδείκτη (όχι με τον ψευδάργυρο) βρέθηκε στα βράγχια των οργανισμών και στο μανδύα. Αρνητική συσχέτιση στο σώμα των οργανισμών βρέθηκε με την GST και την GR, αλλά θετική με την καταλάση.
- θετική συσχέτιση της GST με την GR και τις μεταλλοθειονίνες στα βράγχια, το μανδύα και στο σώμα των οργανισμών. Στο σώμα βρέθηκε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην GST και την καταλάση.
- θετική συσχέτιση της GR με την καταλάση και τις μεταλλοθειονίνες στα βράγχια και το μανδύα. Στο σώμα η GR συσχετίστηκε αρνητικά μόνο με την καταλάση.
- θετική σημαντική συσχέτιση της καταλάσης με τις μεταλλοθειονίνες στα βράγχια και στο μανδύα.

Οι παραπάνω συσχετίσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές αν οι τιμές των βιοδεικτών για καθένα από τους ιστούς συσχετιστούν μεταξύ τους σε κάθε επίπεδο έκθεσης (ή είναι στατιστικά σε κάποια επίπεδα έκθεσης, ενώ σε κάποια άλλα δεν είναι).

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

Οι μεταλλοθειονίνες είναι ένας αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων που λειτουργεί στην αιτία (είσοδος μετάλλου στους οργανισμούς) καθώς παράγονται όταν εισέρχονται μέταλλα στους ιστούς. Σε κάθε ιστό παρατηρείται αύξηση των μεταλλοθειονινών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο αμυντικός μηχανισμός βρίσκεται σε λειτουργία. Προφανώς όμως δεν επαρκεί, ή δεν είναι αρκετά αποτελεσματικός, καθώς οι μετρήσεις των βιοδεικτών (AChE, GST, GR, CAT, LPO) φαίνεται πως επηρεάζονται από τα βαρέα μέταλλα.

Αν χρησιμοποιηθούν τα βράγχια ως ιστός ελέγχου, τα οποία βιοσυσσωρεύουν περισσότερο μέταλλο ανά μονάδα ξηρής μάζας, η ακετυλοχολινεσάση είναι ο καταλληλότερος βιοδείκτης καθώς εμφανίζει ξεκάθαρη τάση με το χρόνο έκθεσης και στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το νικέλιο στα χαμηλότερα αλλά και στα υψηλότερα επίπεδα έκθεσης. Έκθεση στο νικέλιο προκάλεσε αύξηση στα επίπεδα της ακετυλοχολινεστεράσης στα βράγχια των οργανισμών, σε αντίθεση με το μόλυβδο, όπου η συσχέτιση ήταν αρνητική. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθεί και η λιπιδική υπεροξειδωση. Οι μεταλλοθειονίνες και η καταλάση είναι κατάλληλοι βιοδείκτες μόνο αν οι τιμές είναι πολλές (n>20). Αν χρησιμοποιηθεί ο μανδύας ή το σώμα ως ιστός ελέγχου, ο κατάλληλος βιοδείκτης είναι επίσης η ακετυλοχολινεστεράση (αναμένεται μείωση), ή η λιπιδική υπεροξειδωση, η οποία εμφάνισε θετική συσχέτιση με το νικέλιο.

Πίνακας 36: Πίνακας συσχέτισεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Ni	1								
AChE	0,826**	1							
LPO	0,775**	0,968**	1						
GST	0,361	0,639**	0,606*	1					
GR	0,458	0,683**	0,710**	0,676**	1				
CAT	0,567*	0,615*	0,535*	0,375	0,551*	1			
MTs	0,515*	0,685**	0,761**	0,744**	0,759**	0,525*	1		
Zn	-0,049	-0,121	-0,085	-0,341	-0,484	-0,338	-0,150	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,316	0,433	0,543*	0,567*	0,537*	-0,039	0,653**	0,059	1

Πίνακας 37: Πίνακας συσχέτισεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Ni	1								
AChE	-0,765**	1							
LPO	0,817**	-0,968**	1						
GST	0,533*	-0,530*	0,572*	1					
GR	0,778**	-0,653**	0,743**	0,804**	1				
CAT	0,536*	-0,507*	0,637**	0,436	0,675**	1			
MTs	0,641**	-0,559*	0,666**	0,603*	0,820**	0,754**	1		
Zn	-0,542*	0,182	-0,300	-0,430	-0,622*	-0,344	-0,446	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,109	-0,202	0,191	0,433	0,185	0,173	0,158	-0,154	1

Πίνακας 38: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Ni	1								
AChE	-0,611*	1							
LPO	0,876**	-0,886**	1						
GST	-0,588*	0,289	-0,523*	1					
GR	-0,594*	0,539*	-0,617*	0,688**	1				
CAT	0,614*	-0,566*	0,723**	-0,660**	-0,695**	1			
MTs	0,400	-0,399	0,454	-0,052	-0,220	0,428	1		
Zn	-0,200	0,056	-0,161	0,120	0,014	-0,361	-0,640**	1	
Ολική πρωτεΐνη	-0,081	0,081	-0,038	-0,205	0,243	-0,069	-0,516*	0,119	1

* δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

** δηλώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

5.2 Έκθεση *Callista chione* σε νικέλιο

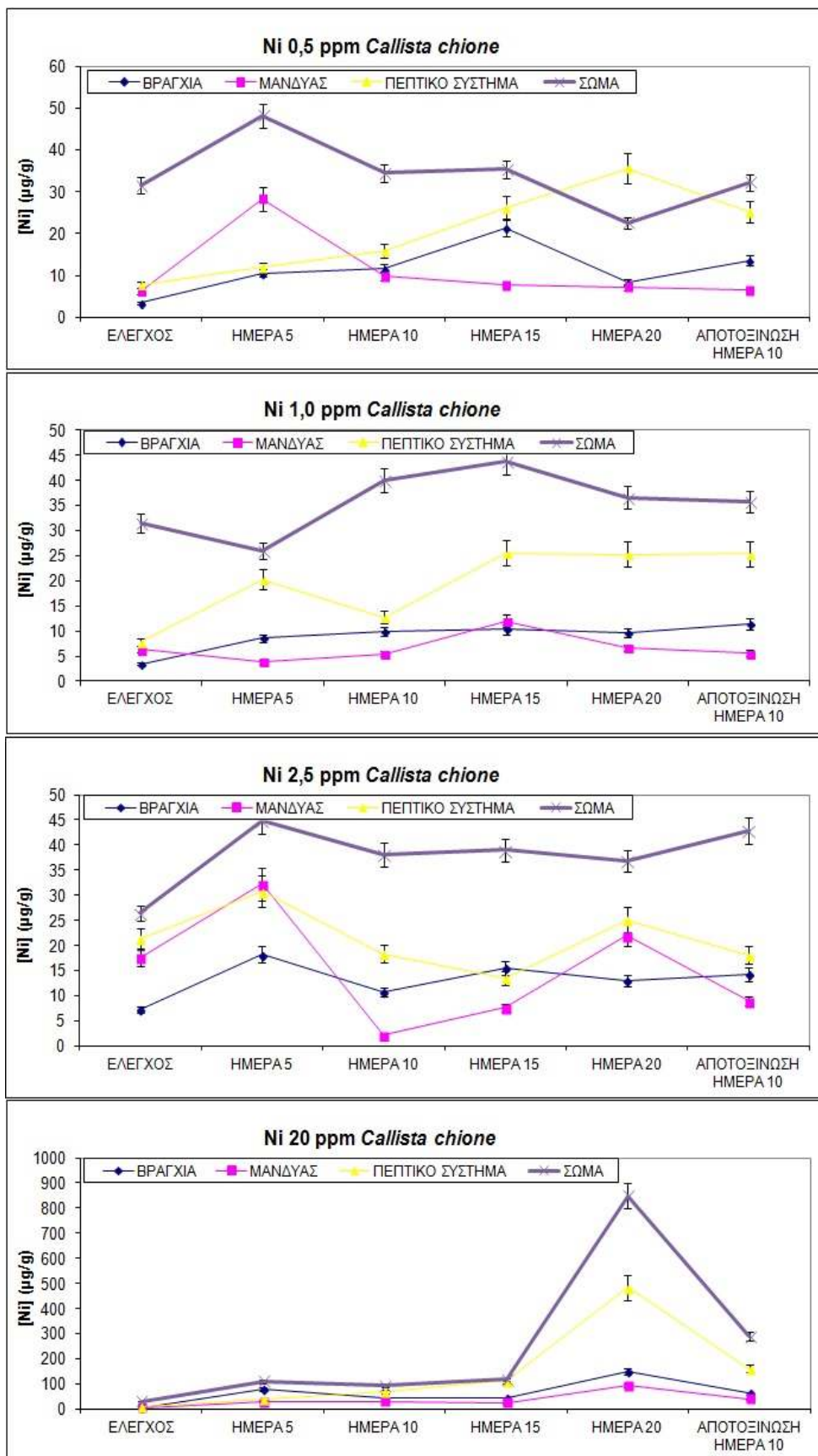
5.2.1 Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα νικελίου στο θαλασσινό νερό

Οι τιμές νικελίου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών όταν έφτασαν στο εργαστήριο ήταν 3,5 µg/g d.w. στα βράγχια, 6 στο μανδύα, 8 στο πεπτικό σύστημα, 32 στο σώμα και 14 µg/g d.w στο ολικό ζώο. Παρ' ότι οι τιμές νικελίου στο ολικό ζώο ήταν αρκετά υψηλές, δεν θεωρούνται απαγορευτικές ώστε να πωληθούν και να καταναλωθούν, αφού δεν έχουν τεθεί ανώτερα όρια για την συγκέντρωση νικελίου στα θαλάσσια δίθυρα που καταναλώνονται⁶⁸.

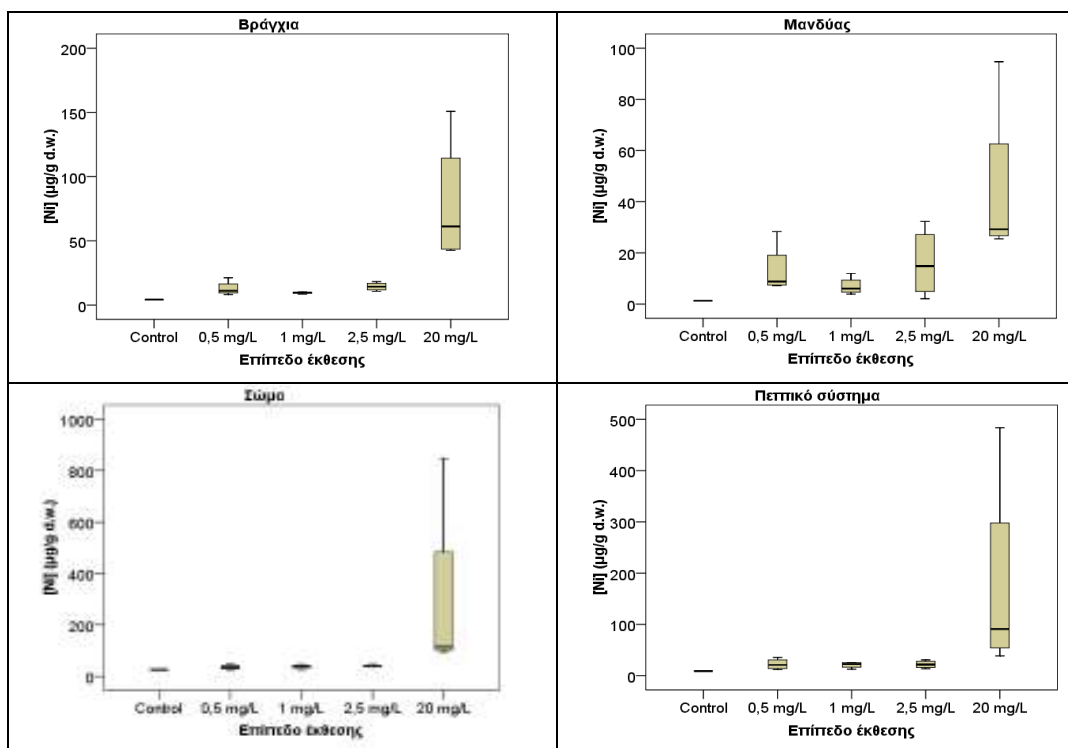
Η συγκέντρωση του νικελίου σε όλους τους ιστούς των οργανισμών αναφοράς μειώθηκε ελαφρά με την πάροδο των ημερών σε σχέση με την τιμή της DAY0. Μεγάλη μείωση (61%), η οποία αποδείχθηκε και στατιστικά παρατηρήθηκε στο σώμα των οργανισμών στο τέλος του πειράματος. Η τάση ανάμεσα στους ιστούς ήταν η εξής: σώμα> πεπτικό σύστημα> μανδύας ≥ βράγχια. Από το Σχήμα 79 φαίνεται ότι δεν ανταποκρίθηκαν όλοι οι ιστοί στην αύξηση συγκέντρωσης μετάλλου στο περιβάλλον τους. Στα τρία χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης, καθ' όλη τη διάρκεια έκθεσης, οι ιστοί των γυαλιστερών δεν είχαν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους, ενώ όταν οι οργανισμοί εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni η βιοσυσσώρευση ήταν πολύ μεγαλύτερη (Σχήμα 80). Αξιοσημείωτο είναι ότι παρά τις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις νικελίου που μετρήθηκαν στους ιστούς των οργανισμών, δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι.

Γενικά, δεν υπήρχε συγκεκριμένη τάση με τον χρόνο έκθεσης, αλλά κατέληξαν σε τιμές ελαφρά υψηλότερες από εκείνες που προσδιορίστηκαν την 5^η ημέρα. Μεταξύ των ιστών, για κάθε επίπεδο έκθεσης, το σώμα είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου, αλλά και την μεγαλύτερη εκατοστιαία περιεκτικότητα μετάλλου και αυτό αποδείχθηκε και στατιστικά. Ίσως το σώμα ήταν το όργανο-στόχος του νικελίου για την γυαλιστερή. Η τάση του νικελίου στους ιστούς των γυαλιστερών ήταν η εξής: σώμα> πεπτικό σύστημα> βράγχια≈ μανδύας.

Κατά την αποτοξίνωση δεν παρατηρήθηκε συγκεκριμένη τάση της συγκέντρωσης νικελίου, αλλά σε κάποιους ιστούς, ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης, παρατηρήθηκε μείωση ή ακόμα και αύξηση πιθανόν λόγω μεταφοράς του μετάλλου (translocation) μεταξύ των ιστών κατά την αποτοξίνωση.



Σχήμα 79: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νικελίου (µg/g d.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών



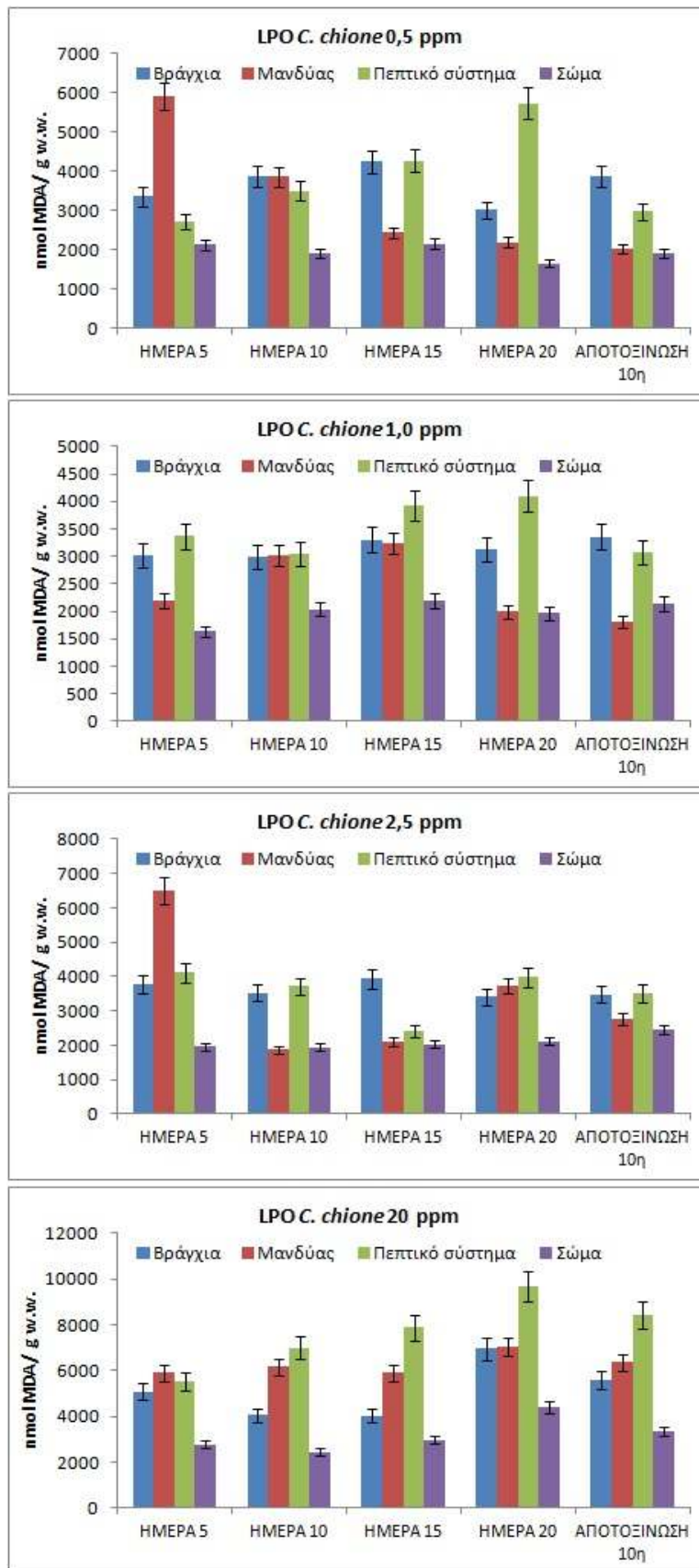
Σχήμα 80: Box-plots των συγκεντρώσεων του νικελίου (μg/g d.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών

5.2.2 Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

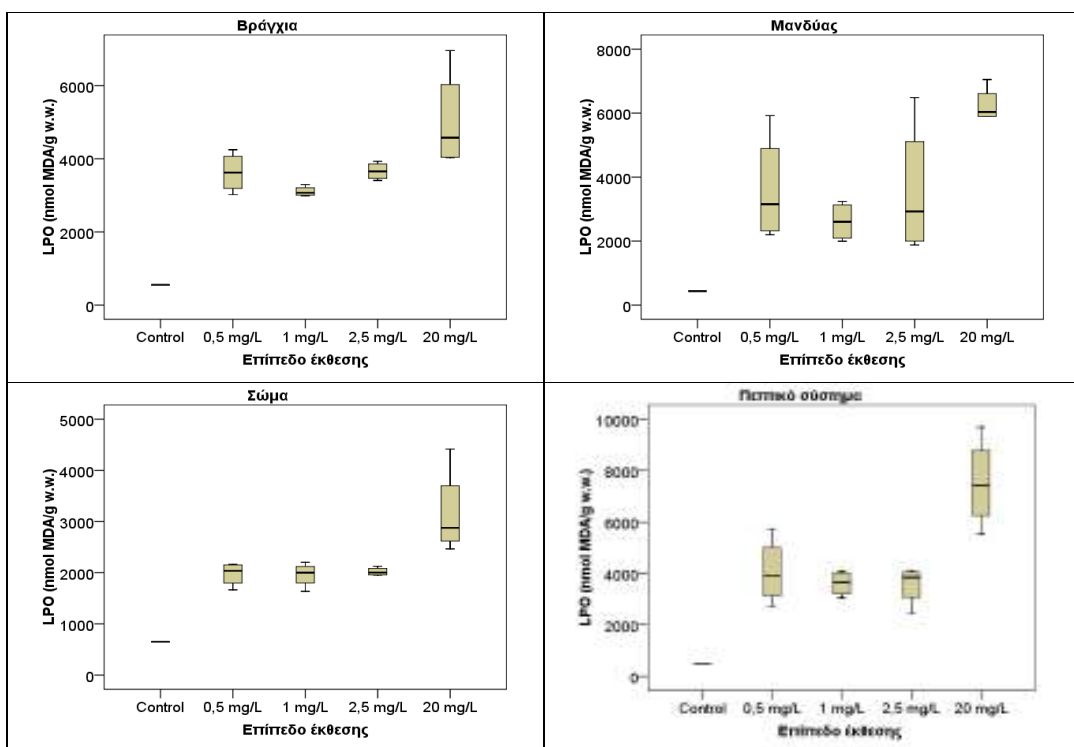
Με την πάροδο των ημερών, στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα του πληθυσμού αναφοράς, η συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΰδης μειώθηκε σταδιακά με τιμές 553-544 nmol MDA/ g w.w. στα βράγχια, 477-447 στο πεπτικό σύστημα. Στο μανδύα και το σώμα η λιπιδική υπεροξειδωση είχε σταθερές τιμές (435 για το μανδύα και 651 nmol MDA/ g w.w. για το σώμα). Ίδια εικόνα παρατηρήθηκε και στις γυαλιστερές αναφοράς του πειράματος του μολύβδου. Η τάση της λιπιδικής υπεροξειδωσης για τον πληθυσμό αναφοράς, ήταν η εξής: σώμα > βράγχια > πεπτικό σύστημα > μανδύας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σώμα είχε την υψηλότερη τιμή νικελίου και είχε υποστεί την μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη.

Από το Σχήμα 82 φαίνεται ότι οι τιμές μηλονικής διαλδεΰδης που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου ήταν υψηλότερες, από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς. Τα τρία χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης είχαν παρόμοιες διάμεσες τιμές μεταξύ τους, χαμηλότερες από του επιπέδου 20 ppm.

Γενικά, με τις ημέρες έκθεσης δεν υπήρξε συγκεκριμένη τάση των ιστών και δεν ξεχώρισε συστηματικά κάποιος ιστός με υψηλότερες τιμές μηλονικής διαλδεΰδης, αλλά το σώμα είχε τις χαμηλότερες τιμές για κάθε επίπεδο έκθεσης (Σχήμα 81). Γενικά όμως φαίνεται πως η τάση τη λιπιδικής υπεροξειδωσης ακολουθούσε την τάση του μετάλλου (συντελεστής Pearson), κάτι που παρατηρήθηκε και κατά το 10ήμερο της αποτοξίνωσης.



Σχήμα 81: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 82: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεϋδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

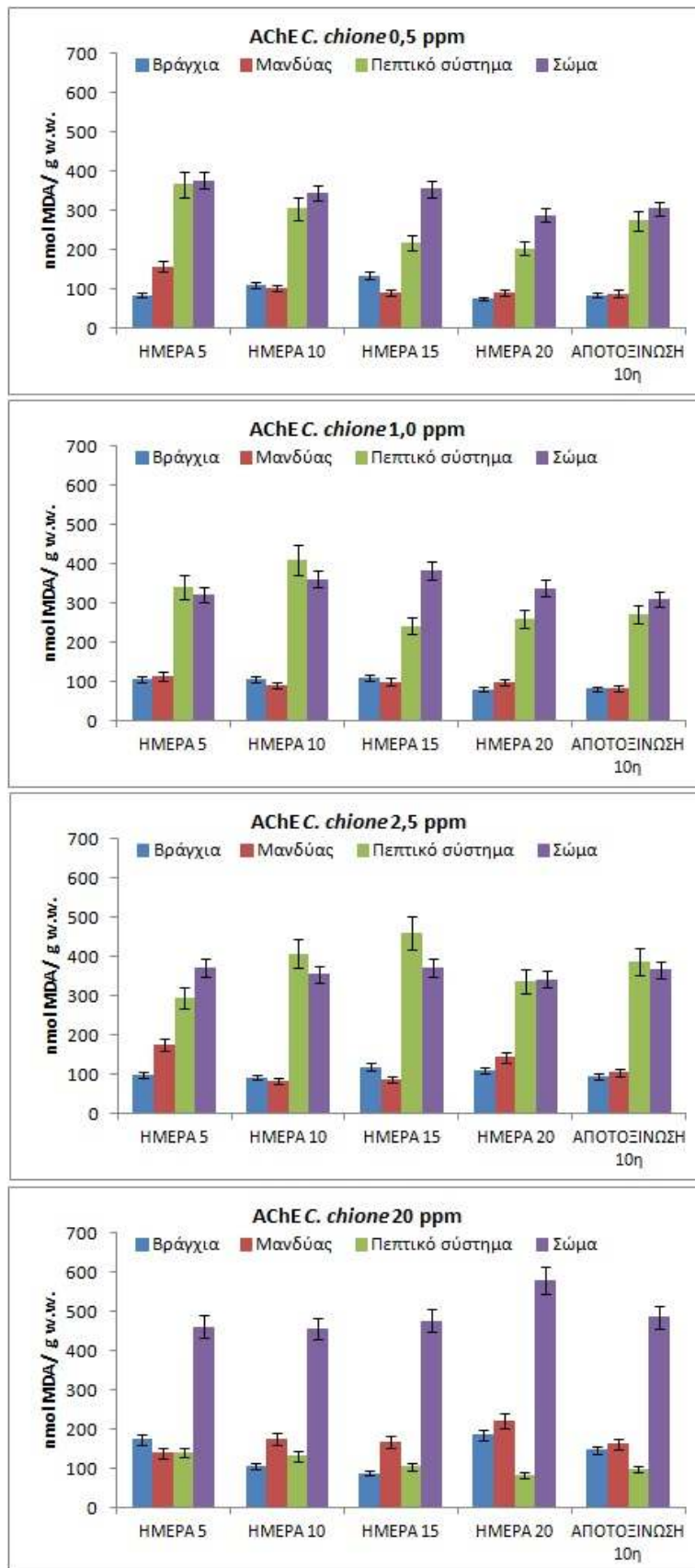
5.2.3 Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης που προσδιορίστηκε στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς είχε σχεδόν σταθερές τιμές που κυμάνθηκαν από 82-84 nmol/min /g w.w. για τα βράγχια, 122-127 για το μανδύα, 592-597 για το πεπτικό σύστημα και 308 για το σώμα. Άρα η τάση ανάμεσα στους ιστούς ήταν η εξής: πεπτικό σύστημα> σώμα> μανδύας> βράγχια.

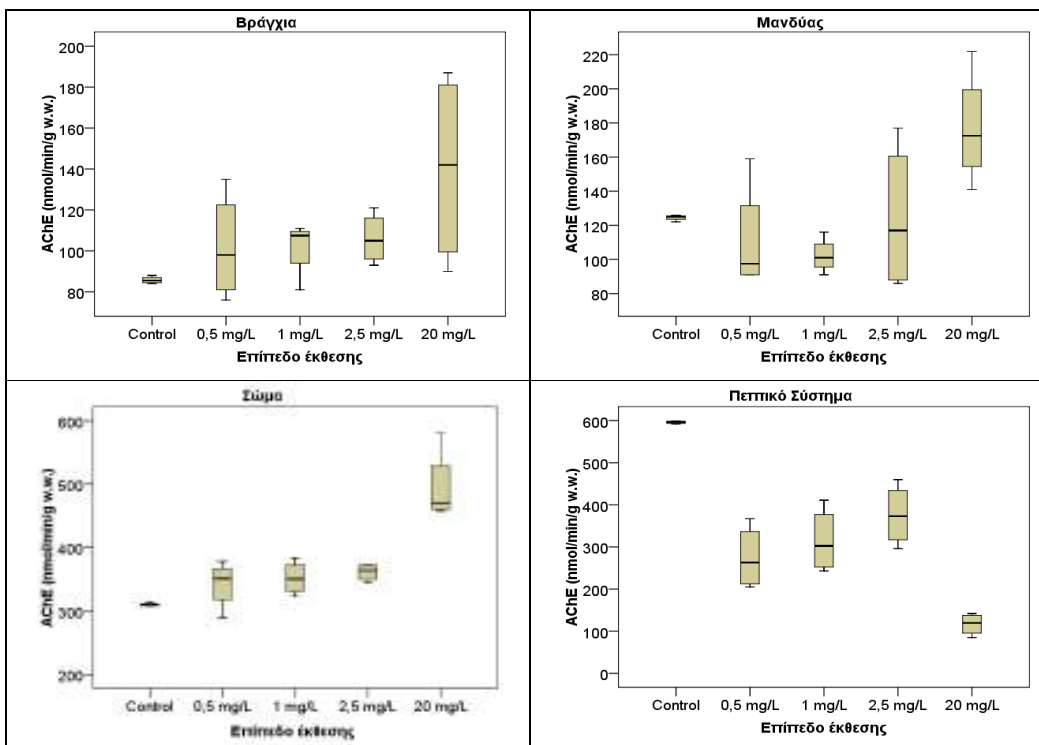
Όπως φαίνεται από το Σχήμα 83, συνολικά για την περίοδο έκθεσης η τάση ανάμεσα στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου ήταν η εξής: σώμα≥ πεπτικό σύστημα> μανδύας≈ βράγχια.

Οι τιμές ακετυλοχολινεστεράσης που προσδιορίστηκαν στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου, εκτός από το 20 ppm, παρουσίασε αυξομειώσεις με τις μέρες έκθεσης φτάνοντας την 20^η ημέρα σε τιμές χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς. Οι τιμές στους παραπάνω ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni ήταν υψηλότερες από τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 84). Στο πεπτικό σύστημα οι τιμές όλων των οργανισμών ήταν χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, με τις τιμές των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm να είναι οι χαμηλότερες (Σχήμα 84).

Αξίζει να σημειωθούν τα εξής: α) στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών προσδιορίστηκαν χαμηλότερες τιμές ενζύμου από του πληθυσμού αναφοράς, μετρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές νικελίου κάτι που υποδηλώνει την νευροτοξικότητα του μετάλλου, β) κατά την έκθεση και την αποτοξίνωση των οργανισμών η ακετυλοχολινεστεράση ακολουθούσε την τάση του νικελίου σε όλους τους ιστούς, εκτός από το πεπτικό σύστημα, όπου η τάση ήταν η αντίθετη.



Σχήμα 83: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



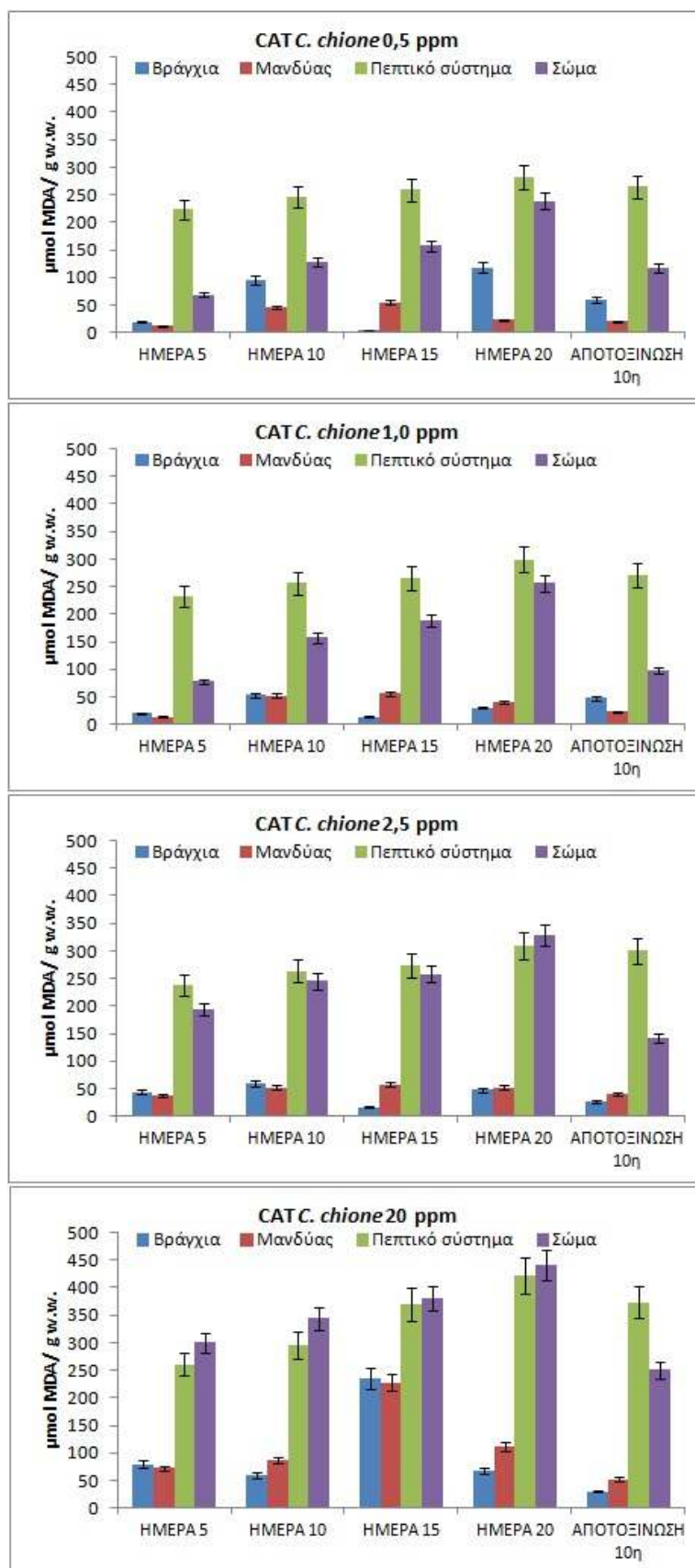
Σχήμα 84: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.2.4 Καταλάση σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

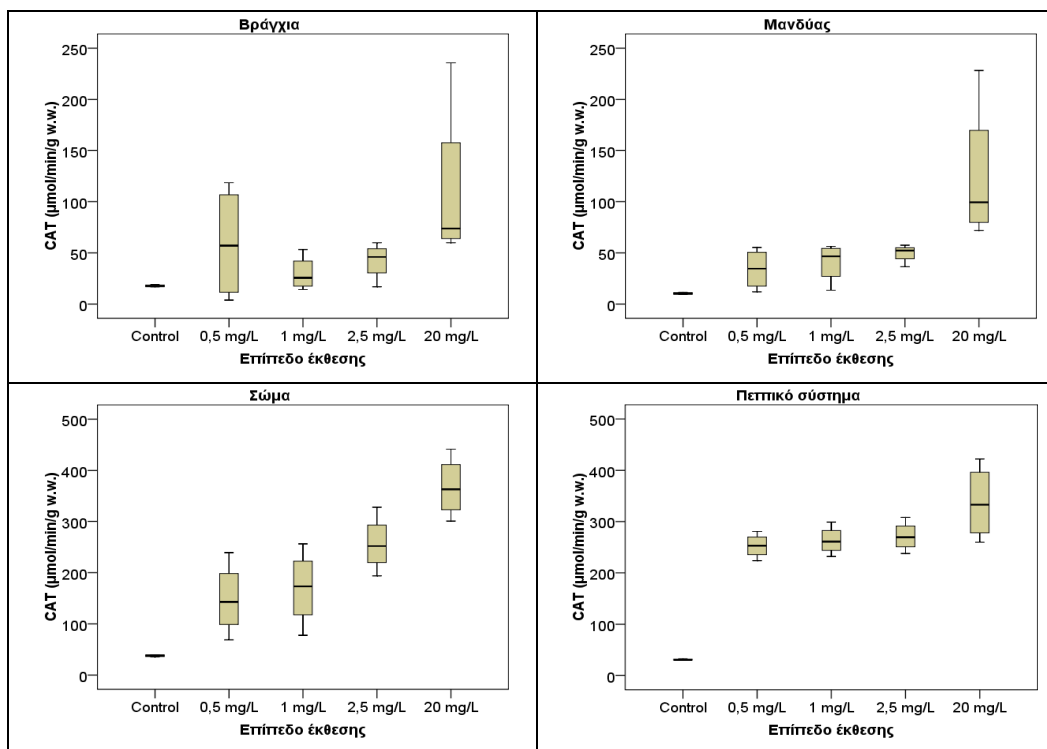
Η τάση του ενζύμου ανάμεσα στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς ήταν η εξής: σώμα > πεπτικό σύστημα βράγχια > μανδύας με τις τιμές να παραμένουν σχεδόν σταθερές και να κυμαίνονται από 18-17 μmol/min /g w.w. στα βράγχια, 9,5 στο μανδύα, 33-31 στο πεπτικό σύστημα και 40-33 στο σώμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σώμα, το οποίο είχε την υψηλότερη συγκέντρωση νικελίου εμφάνισε και την υψηλότερη ενεργότητα καταλάσης.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 85, και έπειτα από στατιστική σύγκριση, η τάση του ενζύμου μεταξύ των ιστών για κάθε επίπεδο ήταν: πεπτικό σύστημα ≈ σώμα > μανδύας ≈ βράγχια. Οι τιμές καταλάσης που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς κάτι που αποδείχτηκε και στατιστικά (Σχήμα 86). Γενικά, οι τιμές της καταλάσης σε όλους τους ιστούς αυξάνονταν κατά την έκθεση, ενώ στην αποτοξίνωση παρατηρήθηκε μείωση (Σχήμα 85). Παρατηρήθηκε ότι στα βράγχια των οργανισμών κατά την αποτοξίνωση, όσο υψηλότερο ήταν το επίπεδο νικελίου στο οποίο εκτέθηκαν οι οργανισμοί, τόσο μεγαλύτερη ήταν η μείωση στην ενεργότητα του ενζύμου.

Από το Σχήμα 85 για τα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών, φαίνεται ότι στον ίδιο ιστό, οι οργανισμοί που εκτέθηκαν στα τρία πρώτα επίπεδα νικελίου είχαν παρόμοιες τιμές ενζύμου, ενώ το επίπεδο 20 ppm είχε υψηλότερες. Στο σώμα, αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση στη δραστικότητα της καταλάσης.



Σχήμα 85: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 86: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

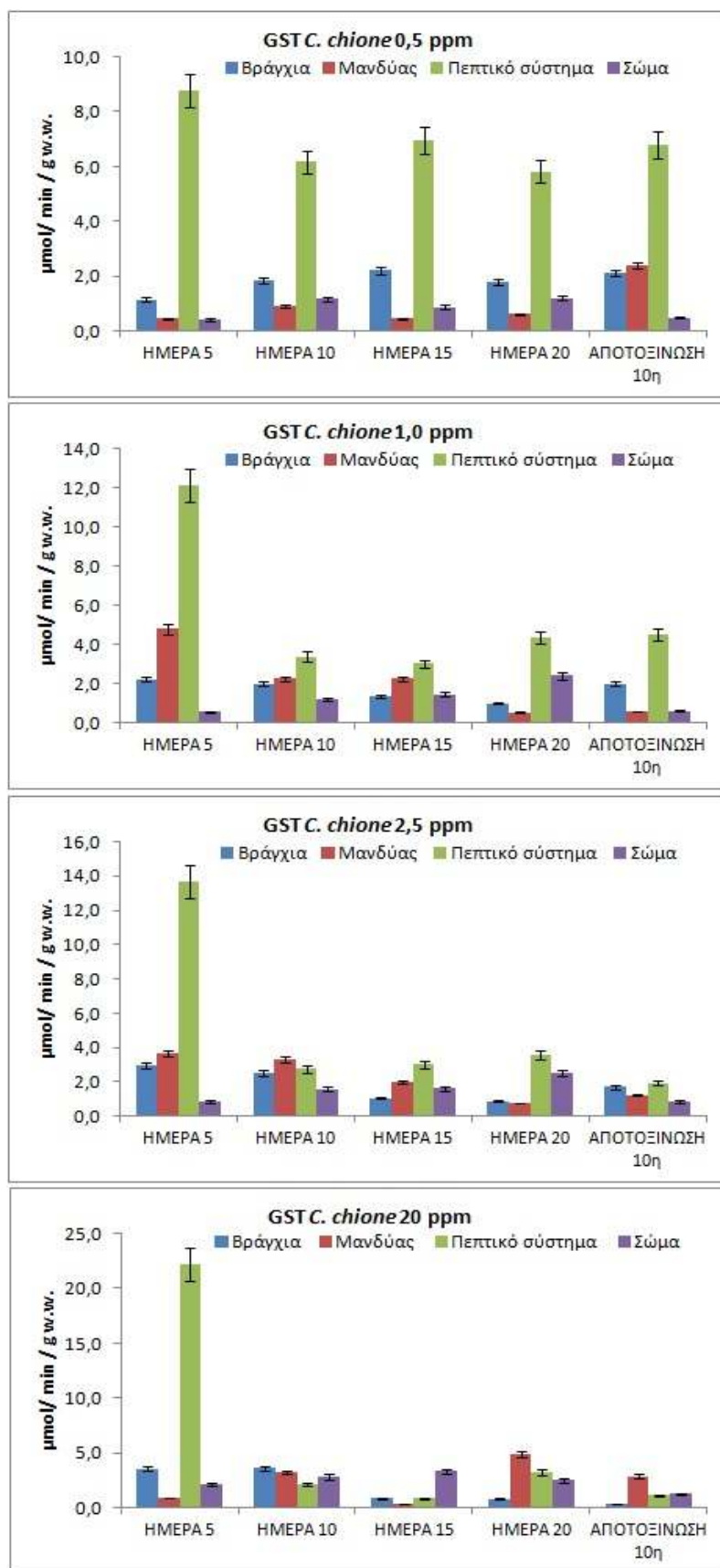
5.2.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Με την πάροδο των ημερών στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς η ενεργότητα της S μεταφοράσης της γλουταθειόνης δεν εμφάνισε αξιόλογες μεταβολές, με τιμές από 1,21-1,19 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$. για τα βράγχια, 0,88 για το μανδύα, 2,46-2,50 για το πεπτικό σύστημα και 0,42-0,40 για το σώμα. Στο σώμα των οργανισμών προσδιορίστηκαν οι χαμηλότερες τιμές ενζύμου και οι υψηλότερες μετάλλου. Μείωση της ενεργότητας των GST στα κύτταρα θεωρείται ως ένδειξη τοξικότητας και κυτταρικής βλάβης²⁷².

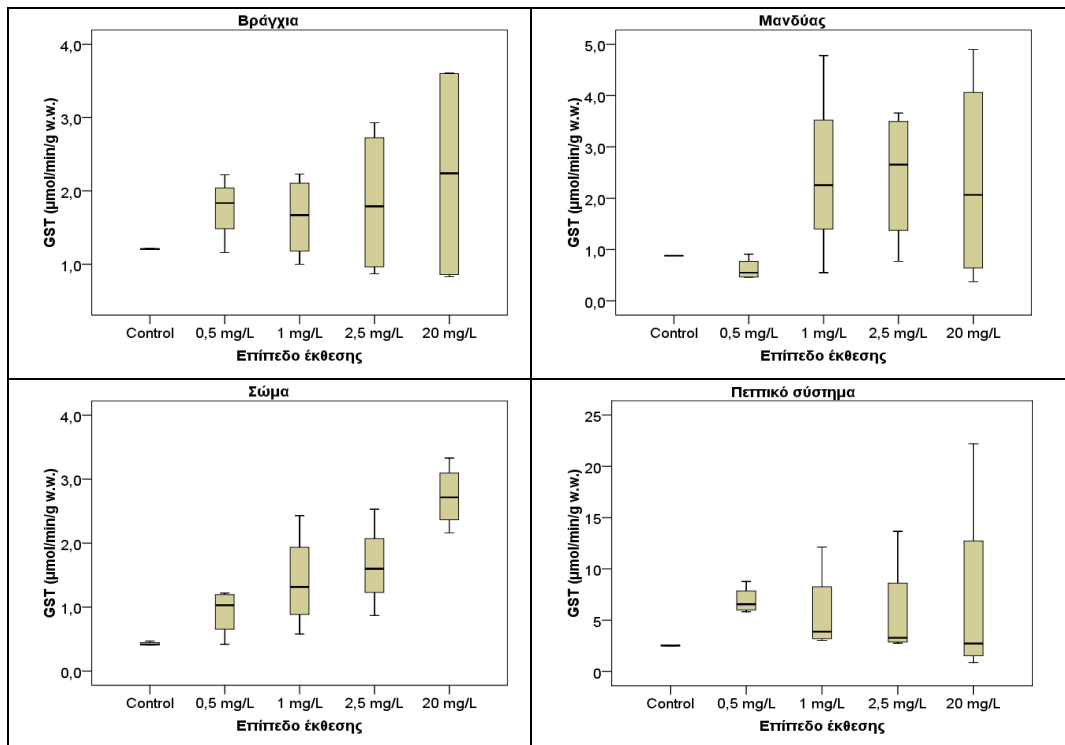
Όπως φαίνεται από το Σχήμα 87, αλλά αποδείχτηκε και στατιστικά, σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, υψηλότερες τιμές είχε το πεπτικό σύστημα, ενώ μεταξύ των υπόλοιπων ιστών δεν ξεχώρισε κάποιος, με την τάση να διαμορφώνεται ως εξής: πεπτικό σύστημα >> βράγχια ≈ σώμα ≈ μανδύας. Γενικά, η GST παρουσίασε αυξομειώσεις σε όλους τους ιστούς. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τις ημέρες που προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες τιμές GST είχαν προσδιοριστεί οι χαμηλότερες τιμές νικελίου, κάτι που αποτελεί ένδειξη της τοξικότητας του μετάλλου.

Στο Σχήμα 88 φαίνεται ότι οι διάμεσες τιμές της GST στα βράγχια, το σώμα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών για όλα τα επίπεδα έκθεσης ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς κάτι που αποδείχτηκε και στατιστικά. Το ίδιο ισχύει και για το μανδύα, εκτός από το επίπεδο 0,5 ppm Ni όπου η διάμεση τιμή ήταν μικρότερη από του πληθυσμού αναφοράς.

Κατά την περίοδο αποτοξίνωσης, οι τιμές της GST των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάθε επίπεδο έκθεσης μειώνονταν ή αυξάνονταν ώστε να επανέλθουν στα φυσιολογικά τους επίπεδα.



Σχήμα 87: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



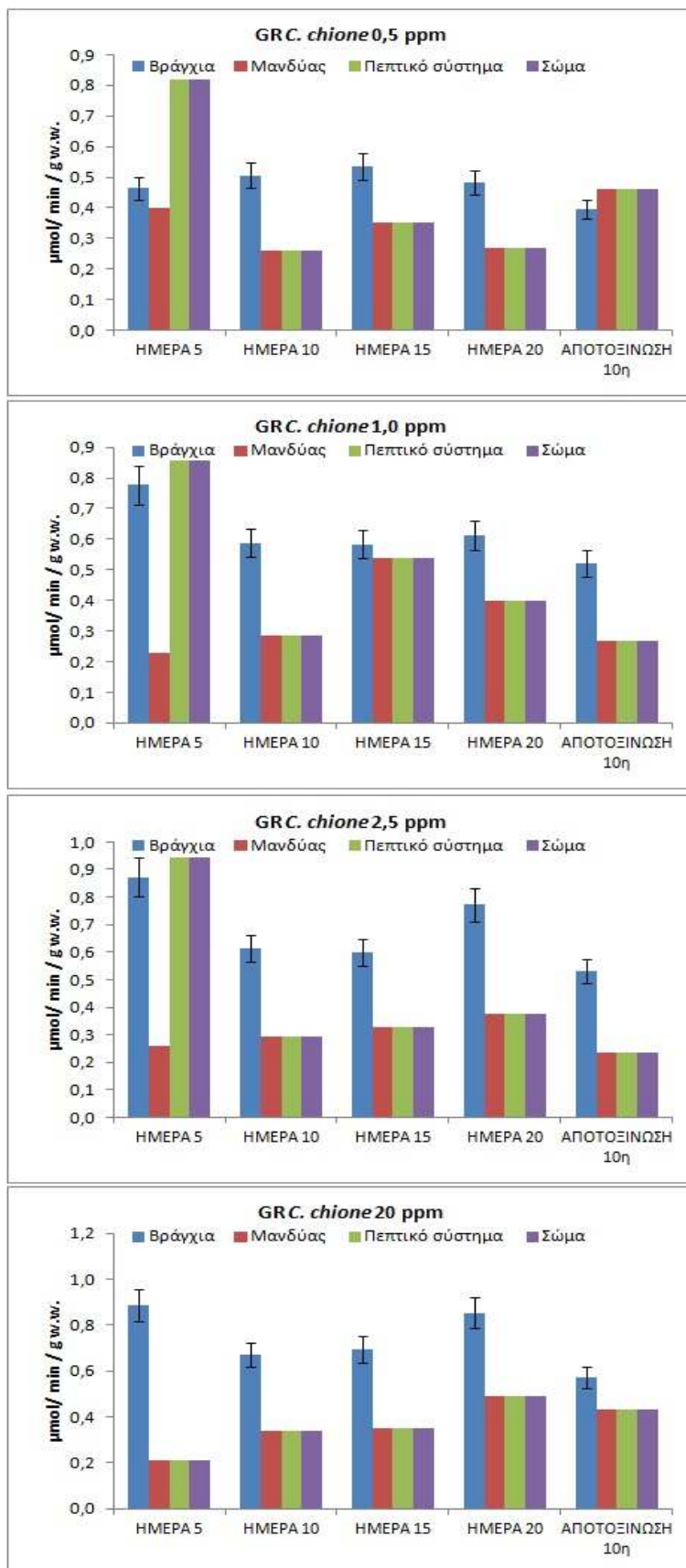
Σχήμα 88: Βox-plots των επιπέδων της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.2.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς *Callista chione* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

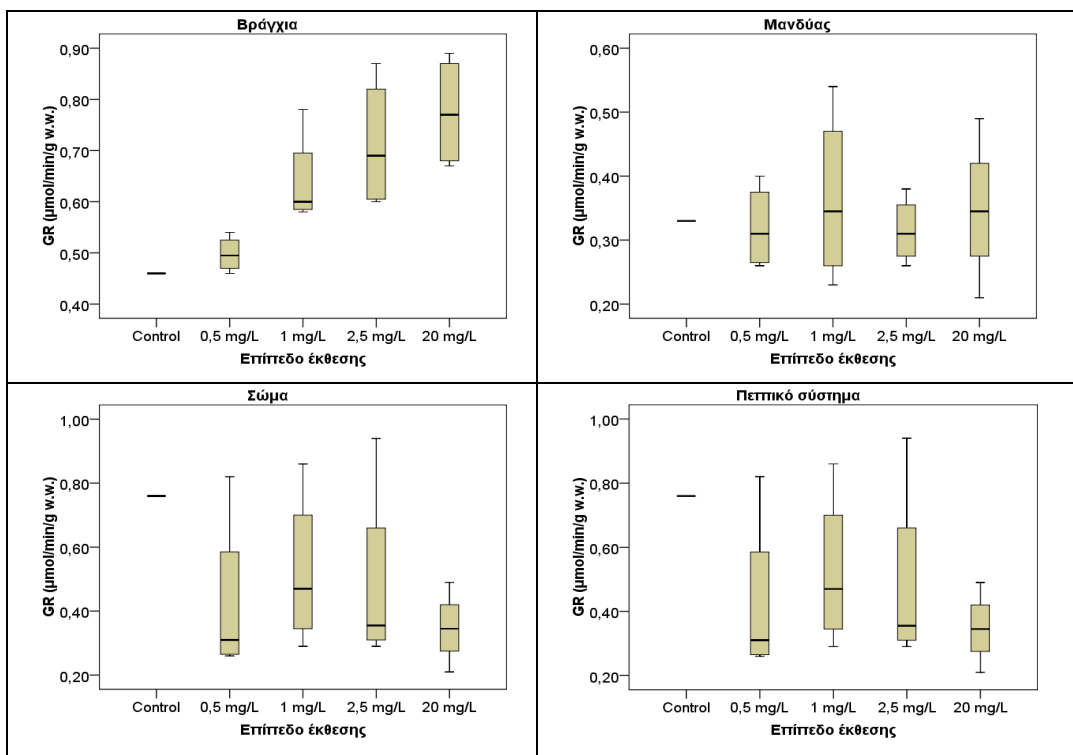
Η ενεργότητα της GR στον πληθυσμό αναφοράς ήταν σταθερή κατά τη διάρκεια του πειράματος με τιμές 0,46 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$. για τα βράγχια, 0,33 για το μανδύα και 0,76 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$. για το πεπτικό σύστημα και το σώμα.

Από το Σχήμα 89 φαίνεται ότι σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, τα βράγχια είχαν γενικά την υψηλότερη τιμή ενζύμου, ενώ σε κάθε επίπεδο έκθεσης, ο μανδύας, το πεπτικό σύστημα και το σώμα είχαν τις ίδιες τιμές μεταξύ τους, διαφορετικές σε κάθε επίπεδο έκθεσης. Η GR στα βράγχια των οργανισμών είχε υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές τιμές από του πληθυσμού αναφοράς και παρατηρήθηκε πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αντίστοιχη αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου (Σχήμα 90). Στους υπόλοιπους ιστούς (Σχήμα 90), οι τιμές της GR ήταν γενικά χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς.

Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης οι τιμές της GR μειώθηκαν σε όλους τους ιστούς των οργανισμών, εκτός από εκείνων που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni όπου αυξήθηκαν, χωρίς όμως να επανέλθουν στα αρχικά τους επίπεδα.



Σχήμα 89: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 90: Βox-plots των επιπέδων της GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.2.7 Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Οι μεταλλοθειονίνες στον πληθυσμό αναφοράς ήταν σταθερές με την πάροδο του χρόνου, με τιμές 0,027 $\mu\text{mol}/\text{g w.w}$ στα βράγγια, 0,030 στο μανδύα και το σώμα και 0,033 στο πεπτικό σύστημα. Στο πεπτικό σύστημα προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες τιμές νικελίου αλλά και μεταλλοθειονινών. Όπως είναι γνωστό, οι μεταλλοθειονίνες παράγονται στους οργανισμούς ως ένα μέσο αποτοξίνωσης από τα βαρέα μέταλλα, κάτι που πιθανά ισχύει και σε αυτή την περίπτωση.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 92, σε όλα τα επίπεδα έκθεσης βρέθηκε πως τα βράγγια είχαν πολύ χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών από τους υπόλοιπους ιστούς. Στα επίπεδα 0,5 και 1,0 ppm Ni, το σώμα ήταν εκείνο που είχε υψηλότερες τιμές, ενώ στα 2,5 και 20 ppm Ni, οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα. Από το ίδιο Σχήμα φαίνεται πως αύξηση των ημερών έκθεσης των οργανισμών σε νικέλιο προκάλεσε αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών σε όλους τους ιστούς, με μέγιστη τιμή την 20^η ημέρα έκθεσης.

Από το Σχήμα 91 φαίνεται πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, αυξάνονταν οι τιμές των μεταλλοθειονινών. Όμως, οι τιμές που προσδιορίστηκαν στο επίπεδο έκθεσης 1,0 ppm ήταν χαμηλότερες από των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni, κάτι που πιθανά οφείλεται στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου.

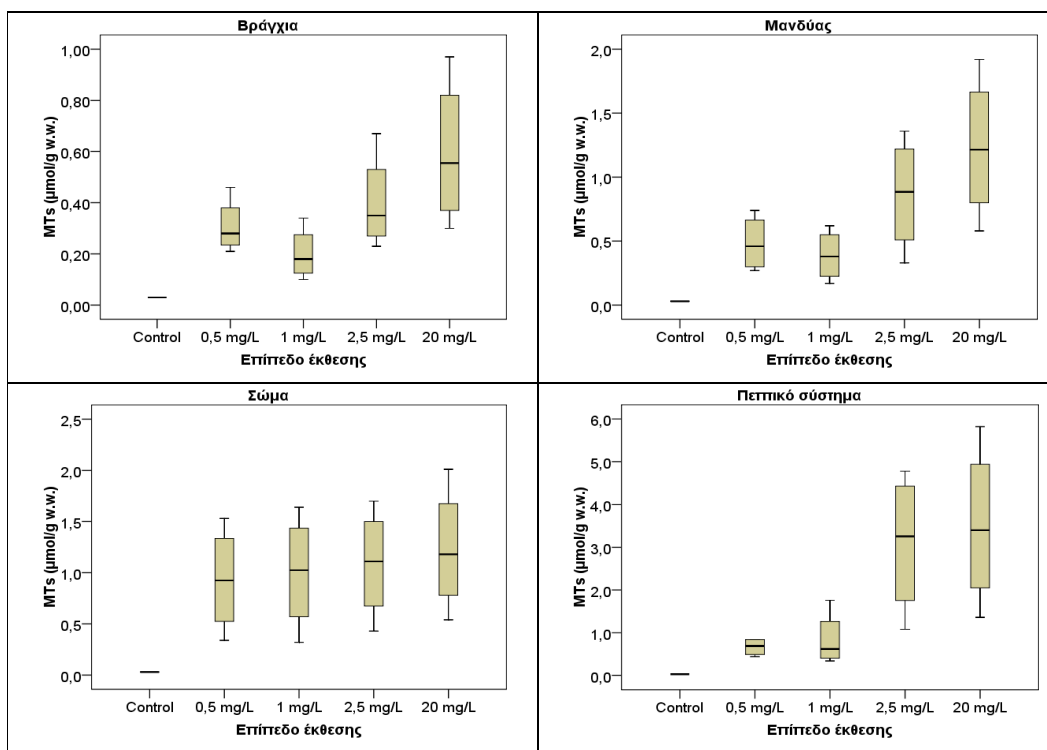
Από τον Πίνακα 39 παρατηρήθηκε ότι η αύξηση των μεταλλοθειονινών σε όλους τους ιστούς ήταν πολύ μεγάλη σε σχέση με του πληθυσμού αναφοράς. Επίσης, όσο αυξανόταν το επίπεδο αλλά και οι ημέρες έκθεσης, η αύξηση ήταν μεγαλύτερη. Στα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης, η

μεγαλύτερη αύξηση μεταλλοθειονινών παρατηρήθηκε στο σώμα, ενώ στα δύο υψηλότερα στο πεπτικό σύστημα.

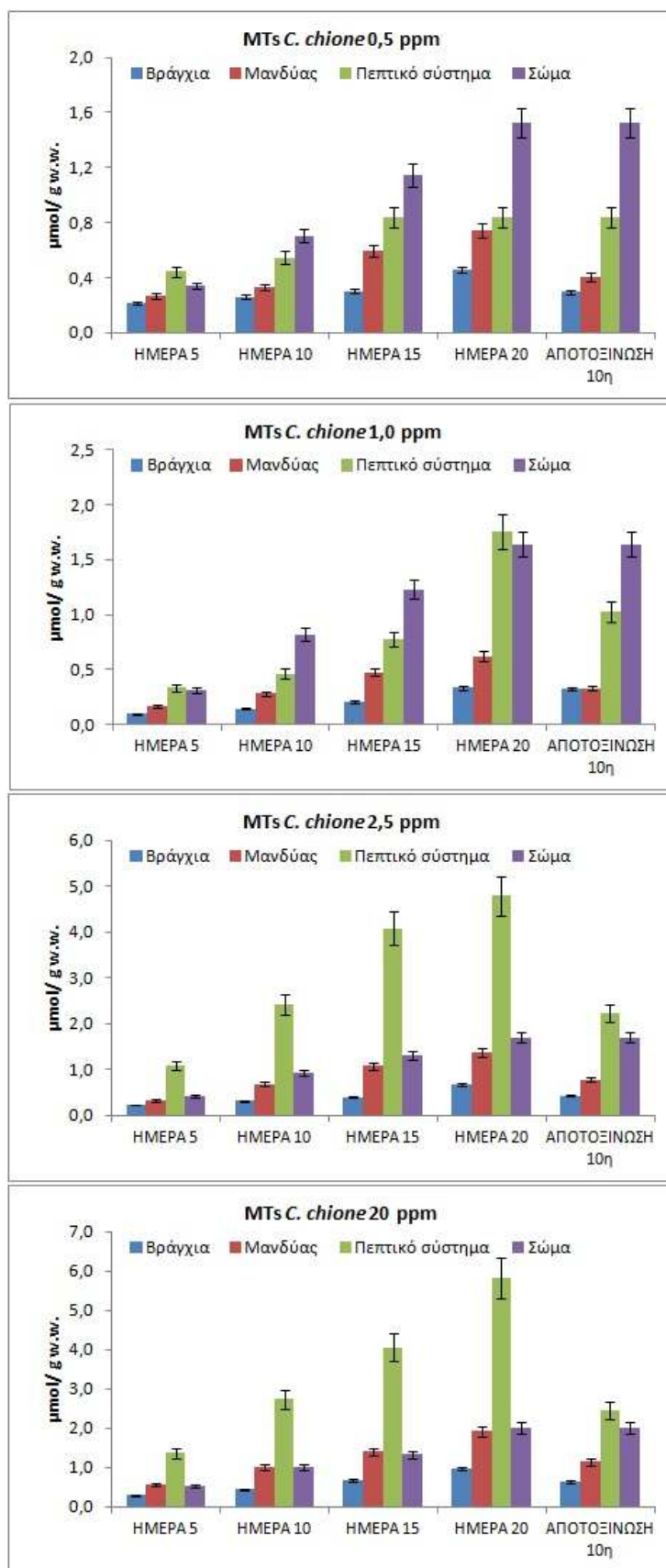
Πίνακας 39: Αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών (C_{DayX}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς

	0,50ppm		1,0ppm		2,5ppm		20ppm	
	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20
βράγχια	7,8	17	3,6	13	8,4	25	11	37
μανδύας	9,0	24	5,8	20	11	44	19	62
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	13	25	10	53	33	145	41	177
σώμα	12	52	11	56	15	58	18	68

Κατά την περίοδο αποτοξίνωσης, οι τιμές στο σώμα των οργανισμών, σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, δεν μεταβλήθηκαν. Στους υπόλοιπους ιστούς οι τιμές μειώθηκαν ελαφρά χωρίς όμως να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα.



Σχήμα 91: Βοx-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 92: Χρονική μεταβολή των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.2.8 Ψευδάργυρος σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Οι υψηλότερες τιμές ψευδαργύρου για τον πληθυσμό αναφοράς προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών, οι αμέσως χαμηλότερες στο σώμα, μετά στα βράγχια και οι πιο χαμηλές στο μανδύα. Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, στο σώμα και το πεπτικό σύστημα προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες τιμές από όλους τους ιστούς. Συνολικά λοιπόν, για την περίοδο έκθεσης, η τάση ήταν η εξής: σώμα>πεπτικό σύστημα> βράγχια> μανδύας. Συγκεκριμένη τάση του ψευδαργύρου στους ιστούς των οργανισμών δεν παρατηρήθηκε.

5.2.9 Ολική Πρωτεΐνη σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Οι τιμές ολικής πρωτεΐνης στον πληθυσμό αναφοράς παρέμεναν σταθερές κατά τη διάρκεια διατήρησής τους σε ενυδρεία, με τιμές 8,5 mg/mL για τα βράγχια, 0,6 για το μανδύα, 21 για το πεπτικό σύστημα και 9,1 για το σώμα.

Γενικά, σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές ολικής πρωτεΐνης, κάτι που αποδείχτηκε και στατιστικά ενώ οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν ή στο πεπτικό σύστημα ή στο σώμα, ανάλογα με τις ημέρες και το επίπεδο έκθεσης.

5.2.10 Συσχετίσεις νικελίου με βιοδείκτες

Όλες οι τιμές του νικελίου, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε ιστό των γυαλιστερών, συσχετίστηκαν με τη βοήθεια του συντελεστή Pearson (SPSS 17.0), με τις αντίστοιχες τιμές βιοδεικτών και προέκυψαν για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακες 40-43):

- θετική συσχέτιση με την ακετυλοχολινεστεράση στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα, ενώ στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν αρνητική.
- θετική συσχέτιση με την λιπιδική υπεροξειδωση και στους τέσσερις ιστούς των οργανισμών.
- θετική συσχέτιση με την αναγωγή της γλουταθειόνης μόνο όμως στα βράγχια των οργανισμών.
- θετική συσχέτιση με την καταλάση στο πεπτικό σύστημα και στο σώμα των οργανισμών.

5.2.11 Συσχετίσεις βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Επειδή οι βιοδείκτες συσχετίζονται με το νικέλιο, εξετάστηκε και η μεταξύ τους συσχέτιση ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε ιστό, και επίπεδο εμπιστοσύνης >95%. Στόχος της εύρεσης συσχετίσεων μεταξύ των τιμών των βιοδεικτών ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει κοινή συμπεριφορά-τάση τους, κάτι που υποδεικνύει ότι ο τρόπος αντίδρασης στην έκθεση σε νικέλιο είναι παρόμοιος. Έτσι προέκυψαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις:

- θετική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με την λιπιδική υπεροξειδωση για τα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των γυαλιστερών. Στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν αρνητική.
- θετική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης, με την GST, της λιπιδικής υπεροξειδωσης με την GST και της GST με την CAT στο σώμα των γυαλιστερών.
- θετική συσχέτιση της GR στα βράγχια των οργανισμών με την ακετυλοχολινεστεράση και την λιπιδική υπεροξειδωση.
- θετική συσχέτιση της καταλάσης στο σώμα και στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών με την ακετυλοχολινεστεράση, και με την λιπιδική υπεροξειδωση.

Οι παραπάνω συσχέτισεις δεν ήταν πάντοτε στατιστικά σημαντικές αν συσχετιζονταν οι τιμές των βιοδεικτών για ιστό μεταξύ τους σε κάθε επίπεδο έκθεσης.

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι μεταλλοθειονίνες είναι ένας αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων που λειτουργεί στην αιτία (είσοδος μετάλλου στους οργανισμούς) καθώς παράγονται όταν εισέρχονται μέταλλα στους ιστούς. Σε κάθε ιστό παρατηρείται αύξηση των μεταλλοθειονινών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο αμυντικός μηχανισμός βρίσκεται σε λειτουργία. Προφανώς όμως δεν επαρκεί, ή δεν είναι αρκετά αποτελεσματικός, καθώς οι μετρήσεις των βιοδεικτών (AChE, GST, GR, CAT, LPO) φαίνεται πως επηρεάζονται από τα βαρέα μέταλλα.

Αν χρησιμοποιηθούν τα βράγχια ή το σώμα ως ιστός ελέγχου και εξεταστεί η συσχέτιση του νικελίου με τους βιοδείκτες για κάθε ένα από τα επίπεδα έκθεσης, δεν υπήρχε κάποια συσχέτιση κοινή σε όλα τα επίπεδα έκθεσης. Αν όμως χρησιμοποιηθούν όλες οι τιμές, τότε ως καταλληλότεροι βιοδείκτες μπορεί να χρησιμοποιηθούν είτε η ακετυλοχολινεστεράση, είτε η λιπιδική υπεροξειδωση και για τους δύο ιστούς και επιπλέον η GR στα βράγχια και η καταλάση στο σώμα. Όλοι οι βιοδείκτες παρουσίασαν θετική συσχέτιση με το νικέλιο για επίπεδο εμπιστοσύνης >95%.

Στο μανδύα, στα χαμηλά επίπεδα έκθεσης συσχετίστηκε το νικέλιο με την ακετυλοχολινεστεράση, ενώ στα υψηλότερα το νικέλιο συσχετίστηκε με την λιπιδική υπεροξειδωση. Αν χρησιμοποιηθούν όλες οι τιμές τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι δύο βιοδείκτες, οι οποίοι παρουσίασαν θετική συσχέτιση με το νικέλιο, για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%.

Στο πεπτικό σύστημα, στα χαμηλά επίπεδα έκθεσης συσχετίστηκε το νικέλιο με τη λιπιδική υπεροξειδωση, ενώ στα υψηλότερα συσχετίστηκε με την ακετυλοχολινεστεράση (το ανάποδο από ότι στο μανδύα). Αν χρησιμοποιηθούν βέβαια όλες οι τιμές τότε μπορεί να χρησιμοποιηθούν και οι δύο βιοδείκτες, αλλά και η καταλάση.

Κοινοί βιοδείκτες και για τους τέσσερις ιστούς των γυαλιστερών που είχαν εκτεθεί σε όλα τα επίπεδα νικελίου είναι η ακετυλοχολινεστεράση και η λιπιδική υπεροξειδωση.

Πίνακας 40: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	GR	CAT	Zn
Ni	1						
AChE	0,815**	1					
LPO	0,956**	0,863**	1				
GST	0,006	0,159	0,018	1			
GR	0,574*	0,564*	0,515*	0,282	1		
CAT	0,220	-0,132	0,142	-0,100	0,078	1	
Zn	0,159	0,071	0,198	-0,026	0,348	0,104	1

Πίνακας 41: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	GR	CAT	Zn
Ni	1						
AChE	0,883**	1					
LPO	0,787**	0,923**	1				
GST	0,392	0,340	0,166	1			
GR	0,409	0,253	0,140	0,014	1		
CAT	0,371	0,439	0,442	-0,083	0,206	1	
Zn	0,042	0,181	0,155	0,025	0,355	-0,342	1

Πίνακας 42: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	GR	CAT	Zn
Ni	1						
AChE	-0,571*	1					
LPO	0,803**	-0,889**	1				
GST	-0,189	-0,082	-0,149	1			
GR	0,011	0,174	-0,196	0,287	1		
CAT	0,830**	-0,619*	0,847**	-0,461	-0,284	1	
Zn	-0,075	-0,432	0,322	-0,130	-0,223	0,235	1

Πίνακας 43: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	GR	CAT	Zn
Ni	1						
AChE	0,798**	1					
LPO	0,914**	0,952**	1				
GST	0,365	0,605*	0,575*	1			
GR	0,018	-0,081	-0,115	-0,486	1		
CAT	0,589*	0,700**	0,720**	0,908**	-0,430	1	
Zn	0,347	0,163	0,263	-0,281	0,324	-0,192	1

* δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

** δηλώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

5.3 Έκθεση *Venus verrucosa* σε νικέλιο

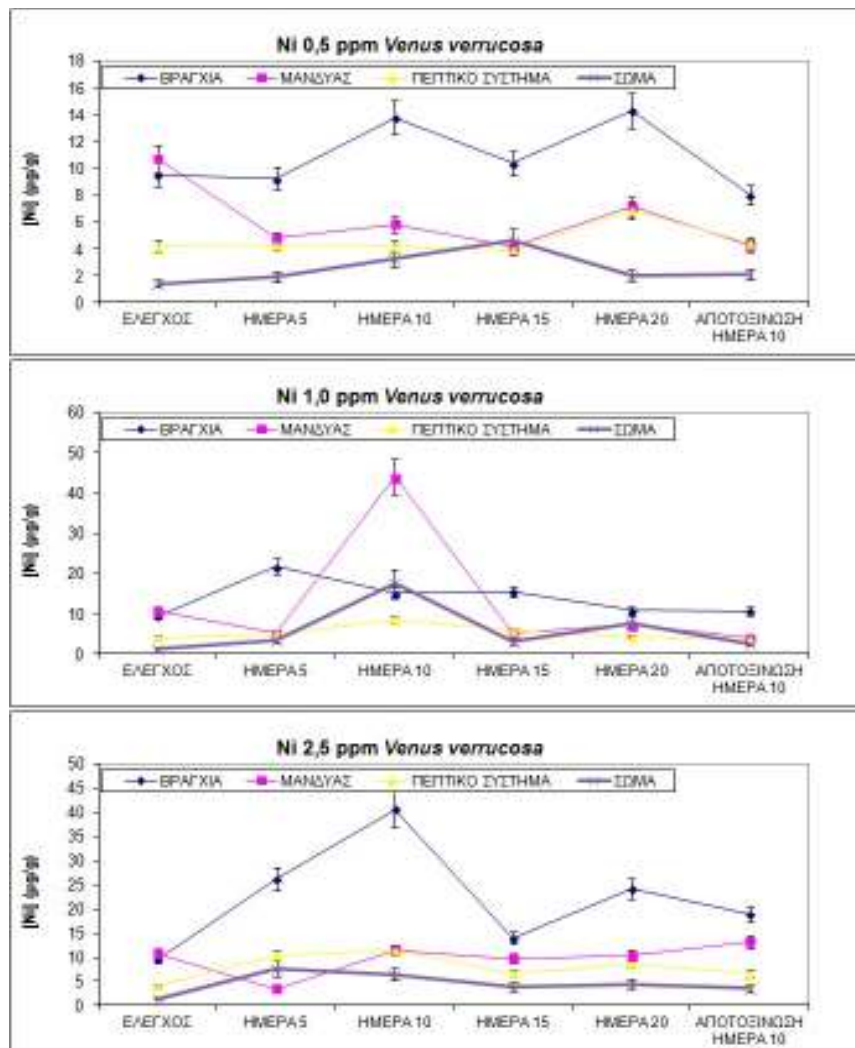
5.3.1 Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα νικελίου στο θαλασσινό νερό

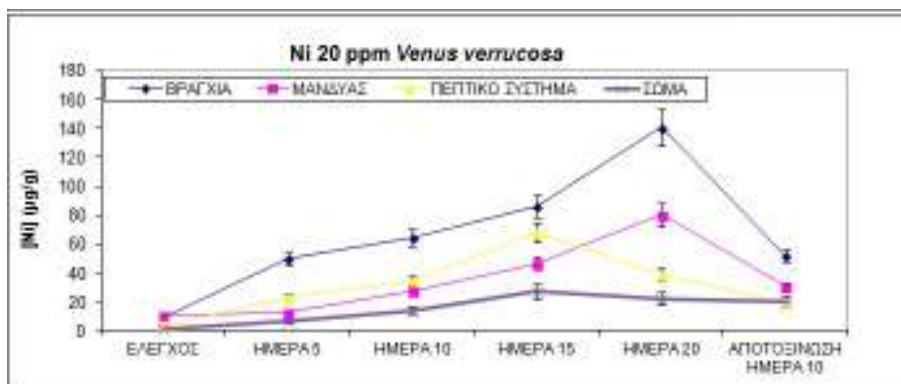
Οι τιμές νικελίου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών όταν εκείνοι έφτασαν στο εργαστήριο ήταν 9,6 μg/g d.w. για τα βράγχια, 11 για το μανδύα, 4,1 για το πεπτικό σύστημα και 1,4 για το σώμα. Νομοθετικά⁶⁸, δεν υπάρχουν ανώτερα όρια για τη συγκέντρωση του νικελίου,

οπότε τα 5,5 $\mu\text{g Ni/g d.w.}$ που προσδιορίστηκαν συνολικά στον οργανισμό, δεν τον καθιστούν απαγορευτικό για κατανάλωση. Οι συγκεντρώσεις του νικελίου στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς μειώθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος φτάνοντας στα 8,1 $\mu\text{g/g d.w.}$ στα βράγχια, 4,2 στο μανδύα, 4,0 στο πεπτικό σύστημα και 1,1 στο σώμα.

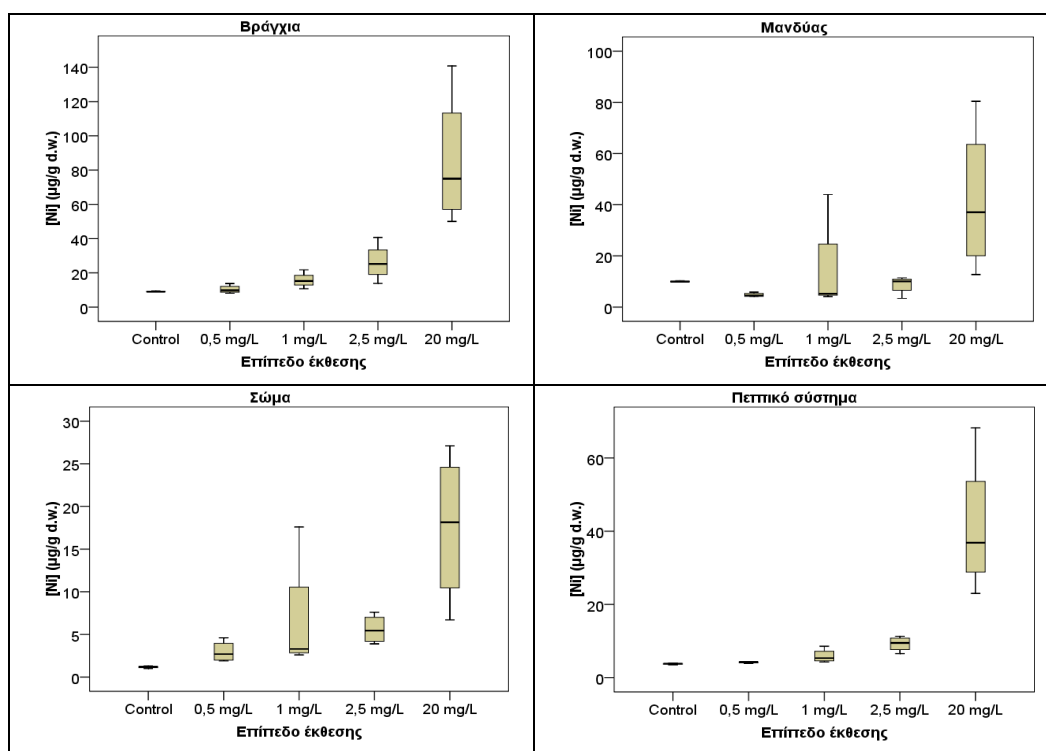
Από το Σχήμα 93 φαίνεται πως η συγκέντρωση του μετάλλου στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο συγκέντρωσης 0,5, 1,0 και 2,5 mg/L , παρουσίαζε αυξομειώσεις. Για το επίπεδο έκθεσης 20 ppm η συγκέντρωση του μετάλλου στους ιστούς αυξανόταν γραμμικά με τις μέρες έκθεσης. Από το ίδιο Σχήμα φαίνεται επίσης ότι για τα επίπεδα 0,5-2,5 και 20 ppm Ni τα βράγχια είχαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς, κάτι που αποδείχτηκε και στατιστικά ενώ οι υπόλοιποι ιστοί δεν διαφοροποιούνταν μεταξύ τους. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm δεν ξεχώριζε κάποιος ιστός με υψηλότερες τιμές ($p > 0,05$).

Γενικά, οι τιμές του νικελίου δεν αυξάνονταν ιδιαίτερα με αύξηση του επιπέδου έκθεσης (Σχήμα 94), εκτός από τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm . Όλες όμως οι τιμές ήταν υψηλότερες από τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς. Κατά το 10ήμερο της αποτοξίνωσης παρατηρήθηκε γενικά μείωση στην συγκέντρωση νικελίου σε σχέση με την 20^η ημέρα σε όλους τους ιστούς. Η μείωση κυμάνθηκε από 21-44% για τα βράγχια και το μανδύα, 14-35% για το πεπτικό σύστημα και 50-67% για το σώμα ανάλογα με το επίπεδο που εκτέθηκαν οι οργανισμοί.





Σχήμα 93: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων νικελίου (µg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών



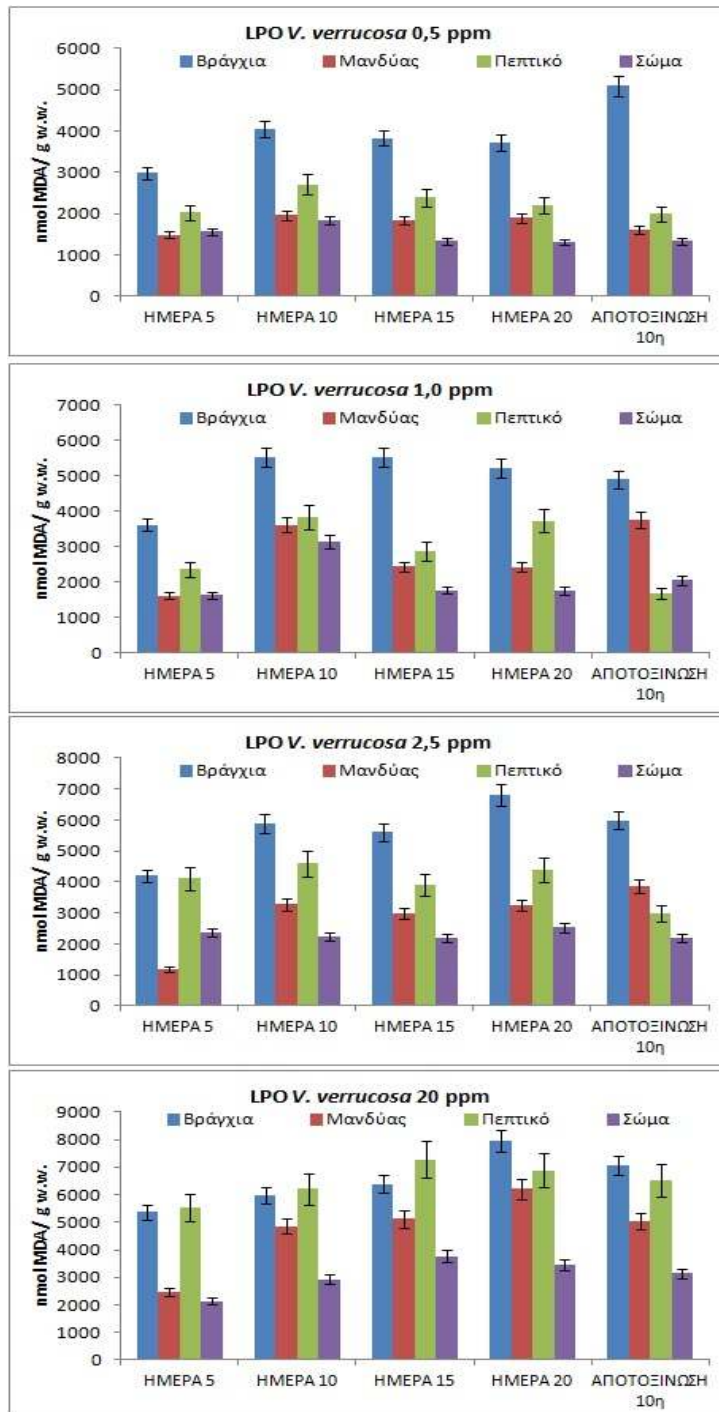
Σχήμα 94: Box-plots των συγκεντρώσεων νικελίου στους ιστούς των κυδωνιών

5.3.2 Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

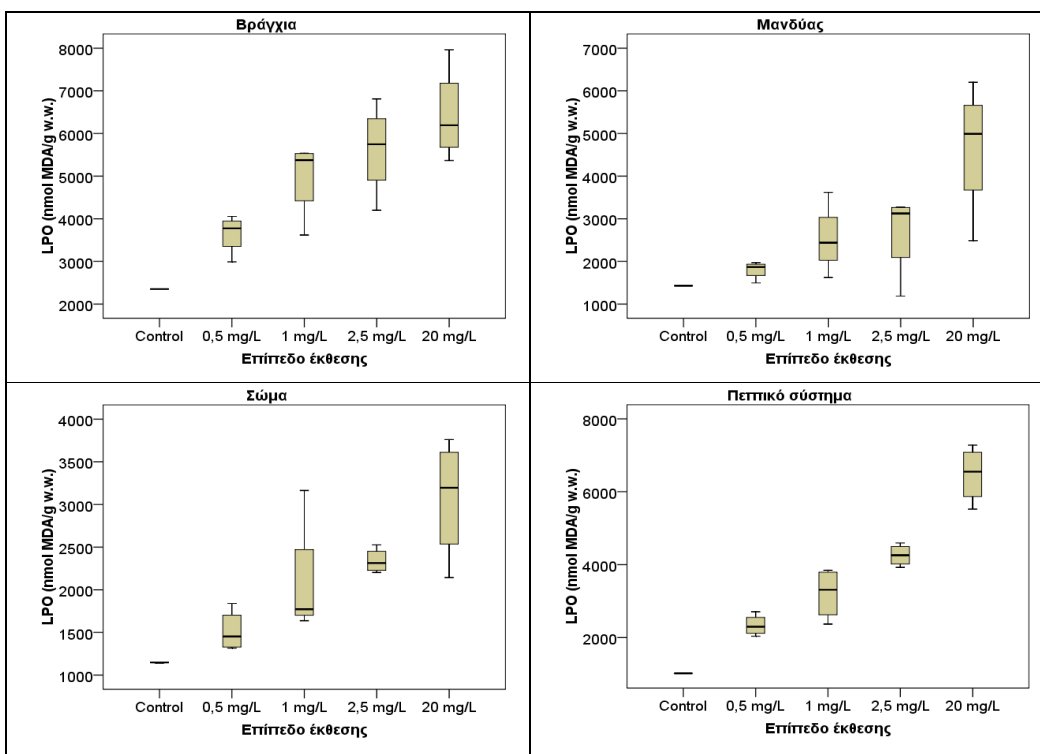
Με την πάροδο των ημερών, η συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεϋδης στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς παρέμενε σχεδόν σταθερή, με ελαφρά μείωση στο μανδύα και το σώμα. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν ήταν: 2353 nmol MDA/ g w.w. για τα βράγχια, 1422-1435 για το μανδύα, 1017 για το πεπτικό σύστημα και 1141-1151 για το σώμα.

Ο πληθυσμός αναφοράς είχε χαμηλότερες και στατιστικά διαφορετικές τιμές από τις αντίστοιχες των επιπέδων έκθεσης, κάτι αναμενόμενο αφού και η αύξηση της συγκέντρωσης του νικελίου στους ιστούς των κυδωνιών σε σχέση με του πληθυσμού αναφοράς ήταν μεγάλη. Γενικά, όπως φαίνεται από το Σχήμα 95, οι πιο υψηλές τιμές μηλονικής διαλδεϋδης προσδιορίστηκαν στα βράγχια των οργανισμών, στα οποία είχαν προσδιοριστεί και οι υψηλότερες τιμές νικελίου. Η τάση

μεταξύ των ιστών ήταν: βράγχια > πεπτικό σύστημα > μανδύας ≈ σώμα. Η λιπιδική υπεροξειδωση στους ιστούς των οργανισμών δεν αυξανόταν γραμμικά με το χρόνο έκθεσης σε νικέλιο, αλλά παρουσίασε αυξομειώσεις (Σχήμα 95). Η λιπιδική υπεροξειδωση συσχετίστηκε θετικά με την συγκέντρωση νικελίου σε κάθε ιστό και επίπεδο έκθεσης. Στο Σχήμα 96 και στους τέσσερις ιστούς, φαίνεται ότι όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης αυξανόταν και η μετρούμενη τιμή MDA. Κατά την αποτοξίνωση, γενικά παρατηρήθηκε μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, χωρίς όμως οι τιμές να φτάνουν τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς.



Σχήμα 95: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 96: Box-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεΐδης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

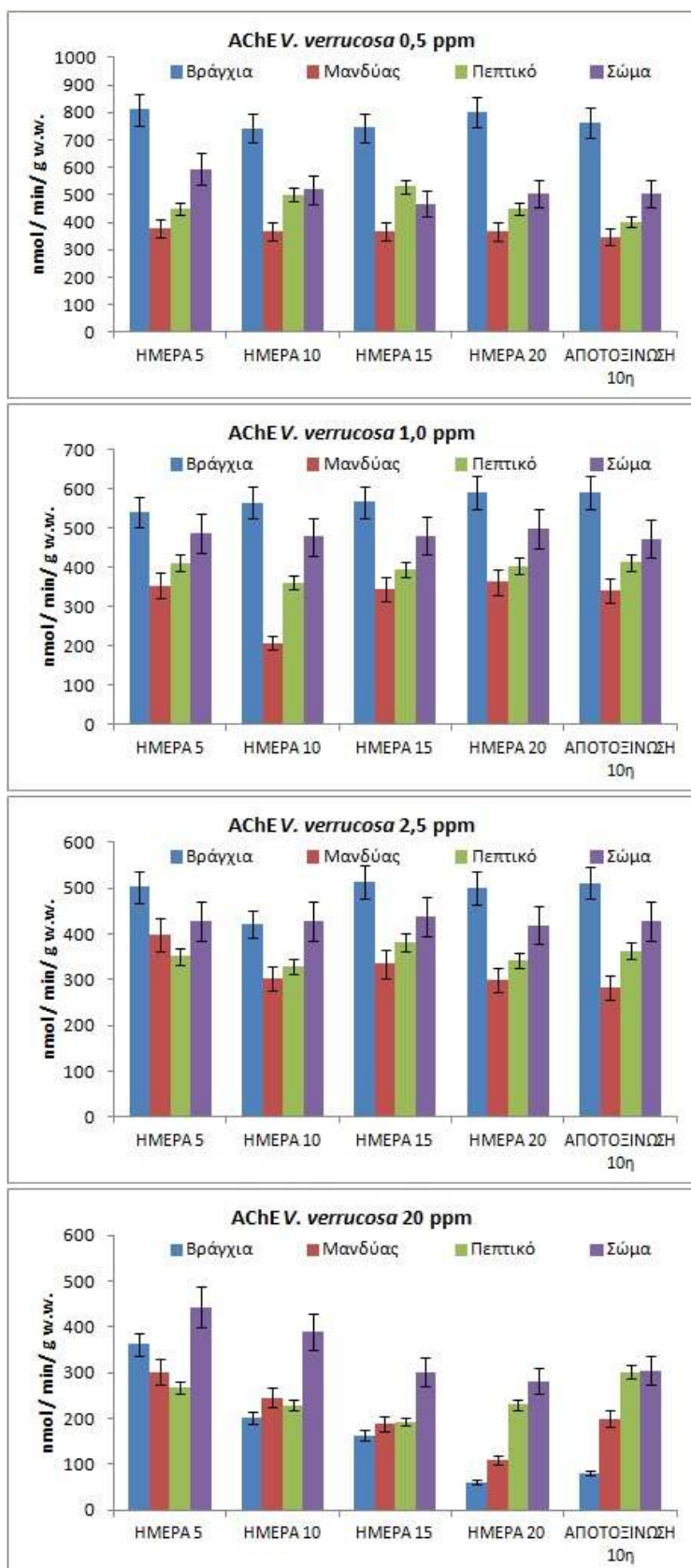
5.3.3 Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης που προσδιορίστηκε στον πληθυσμό αναφοράς, εμφάνισε σχετική αύξηση με την πάροδο των ημερών, με τιμές: 895-903 nmol/min/g w.w. για τα βράγχια, 335-338 για το μανδύα, 506-539 για το πεπτικό σύστημα και 536-537 για το σώμα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η τάση ήταν η εξής: βράγχια > σώμα ≈ πεπτικό σύστημα > μανδύας.

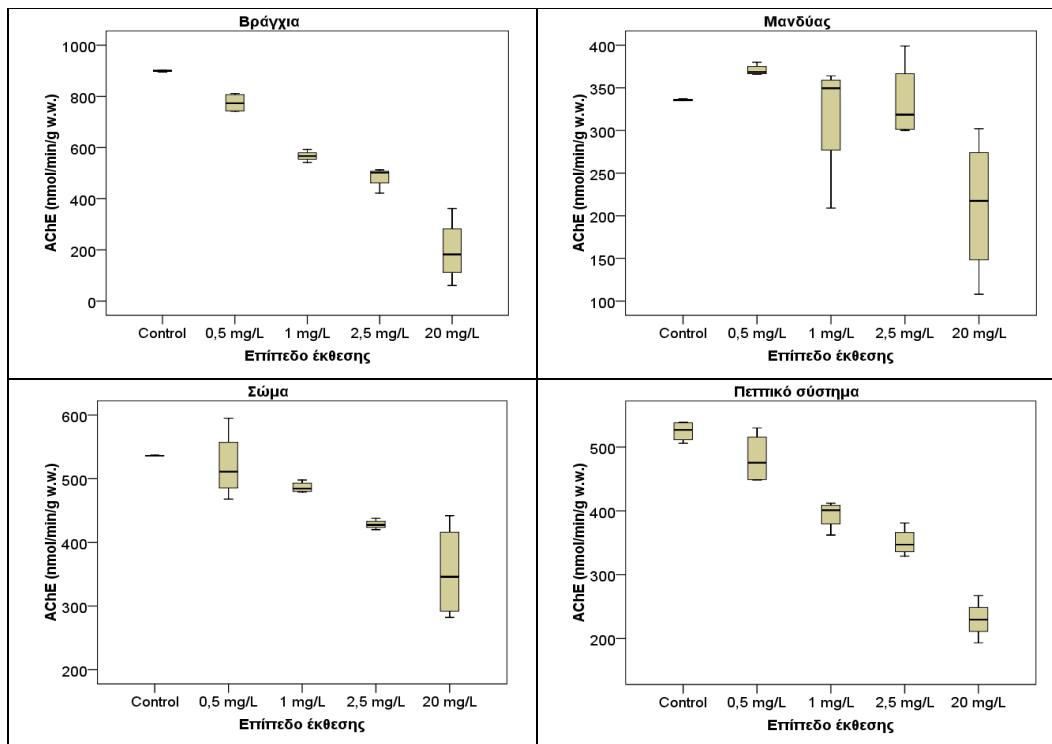
Όπως φαίνεται από το Σχήμα 98, οι τιμές ακετυλοχολινεστεράσης που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς για όλους τους ιστούς ($p > 0,05$), εκτός από το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα τρία χαμηλότερα επίπεδα νικελίου. Από το ίδιο Σχήμα, για τα βράγχια, το πεπτικό σύστημα και το σώμα φαίνεται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε μείωση στην ενεργότητα του ενζύμου, ενώ στο μανδύα, το παραπάνω ισχύει ξεκάθαρα μόνο για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni. Οι τιμές της ακετυλοχολινεστεράσης βρέθηκε ότι συσχετίζονται αρνητικά με τις αντίστοιχες του νικελίου για κάθε ιστό κάτι που αποτελεί ένδειξη νευροτοξικότητας.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 97, η τάση μεταξύ των ιστών για τα τρία χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης ήταν: βράγχια > σώμα ≈ πεπτικό σύστημα > μανδύας, ενώ για το υψηλότερο: σώμα > πεπτικό σύστημα ≈ μανδύας ≈ βράγχια.

Κατά την αποτοξίνωση οι τιμές του ενζύμου παρουσίασαν αυξομειώσεις ανάλογα με τον ιστό και το επίπεδο έκθεσης. Στους οργανισμούς όμως που εκτέθηκαν σε 20 ppm, οι τιμές της AChE αυξήθηκαν, προσπαθώντας πιθανώς να επανέλθουν στα αρχικά τους επίπεδα.



Σχήμα 97: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



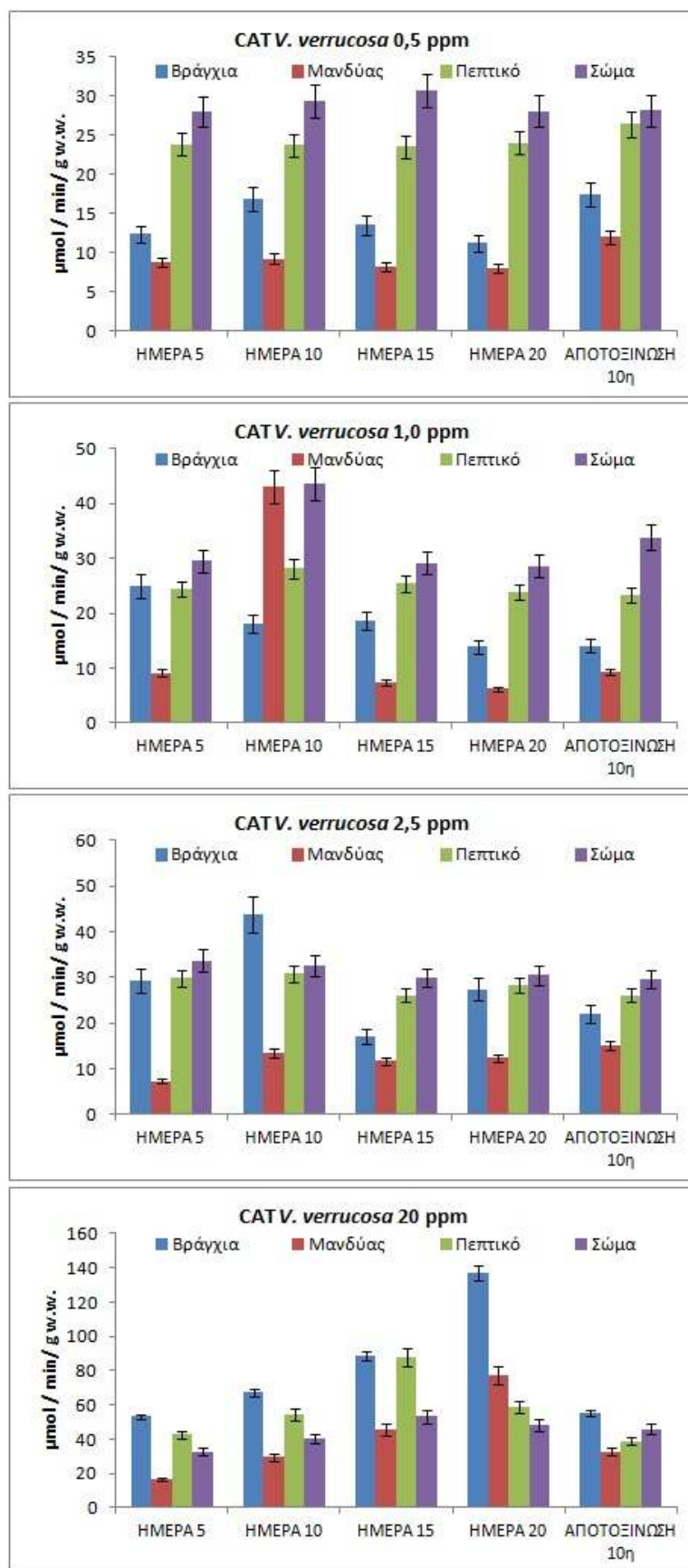
Σχήμα 98: Βox-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.3.4 Καταλάση σε ιστούς *Venus verrucosa* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

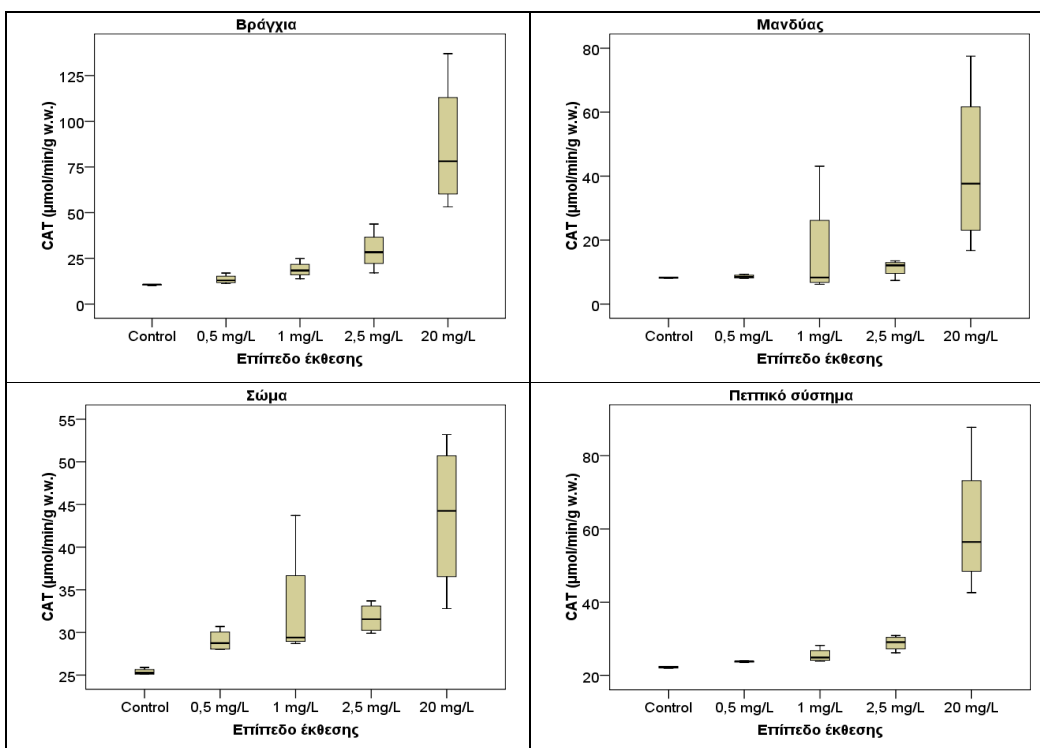
Η ενεργότητα της καταλάσης στους ιστούς των κυδωνιών αναφοράς με την πάροδο των ημερών ήταν σταθερή, με τιμές 11 μmol/min/g w.w. στα βράγχια, 8,2 στο μανδύα, 22 στο πεπτικό σύστημα και 25 στο σώμα.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 99, η τάση του ενζύμου μεταξύ των ιστών των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0 και 2,5 ppm Ni ήταν ίδια με του πληθυσμού αναφοράς (σώμα> πεπτικό σύστημα> βράγχια> μανδύας), ενώ στο επίπεδο 20 ppm Ni, τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ οι υπόλοιποι ιστοί δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους ($p>0,05$).

Οι τιμές καταλάσης που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου, ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 100). Γενικά, η δραστηριότητα της καταλάσης αυξανόταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Η καταλάση παρουσίασε αυξομειώσεις στους ιστούς των οργανισμών, αντίστοιχες με της συγκέντρωσης του νικελίου. Κατά την αποτοξίνωση, η τιμή της καταλάσης αυξήθηκε σε όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm Ni, ενώ μειώθηκε στους ιστούς που εκτέθηκαν σε 2,5 και 20 ppm Ni, χωρίς όμως οι τιμές να είναι χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς.



Σχήμα 99: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



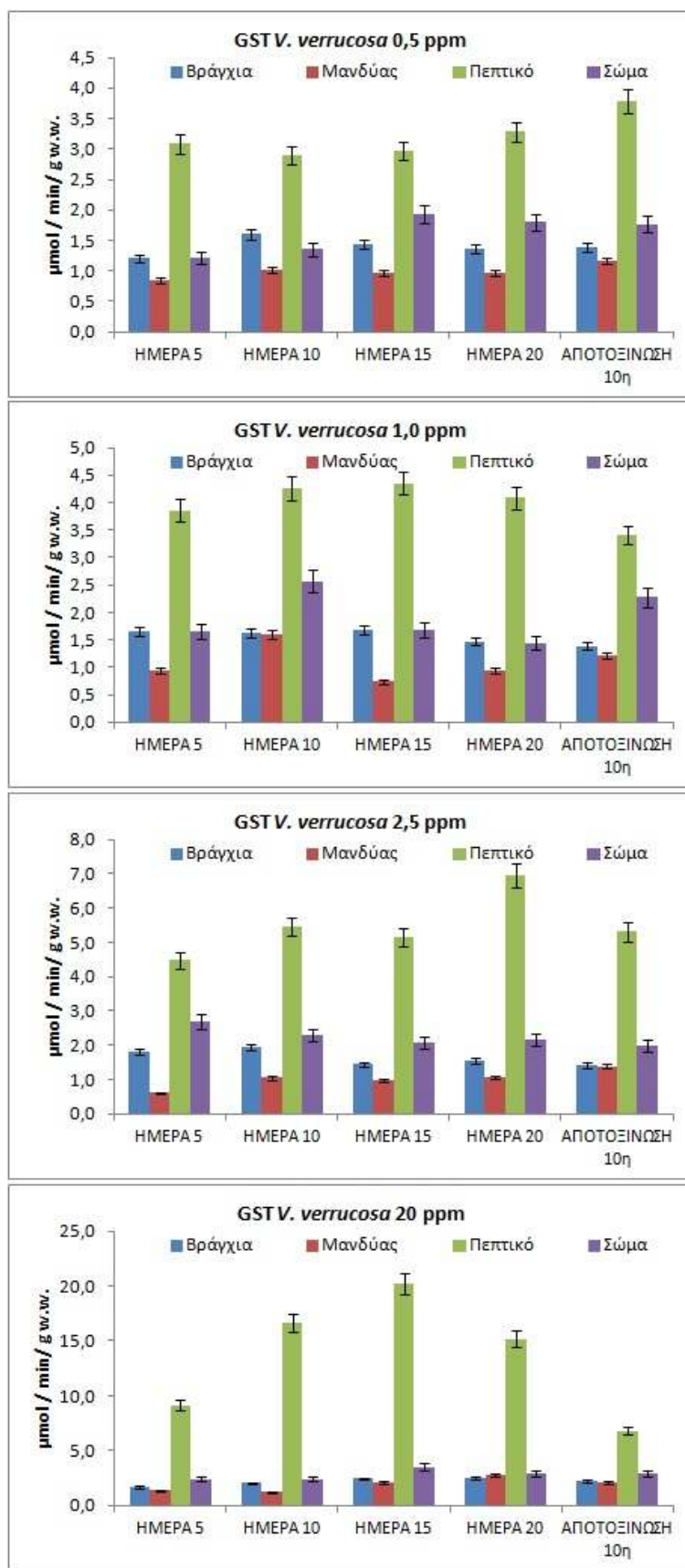
Σχήμα 100: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.3.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

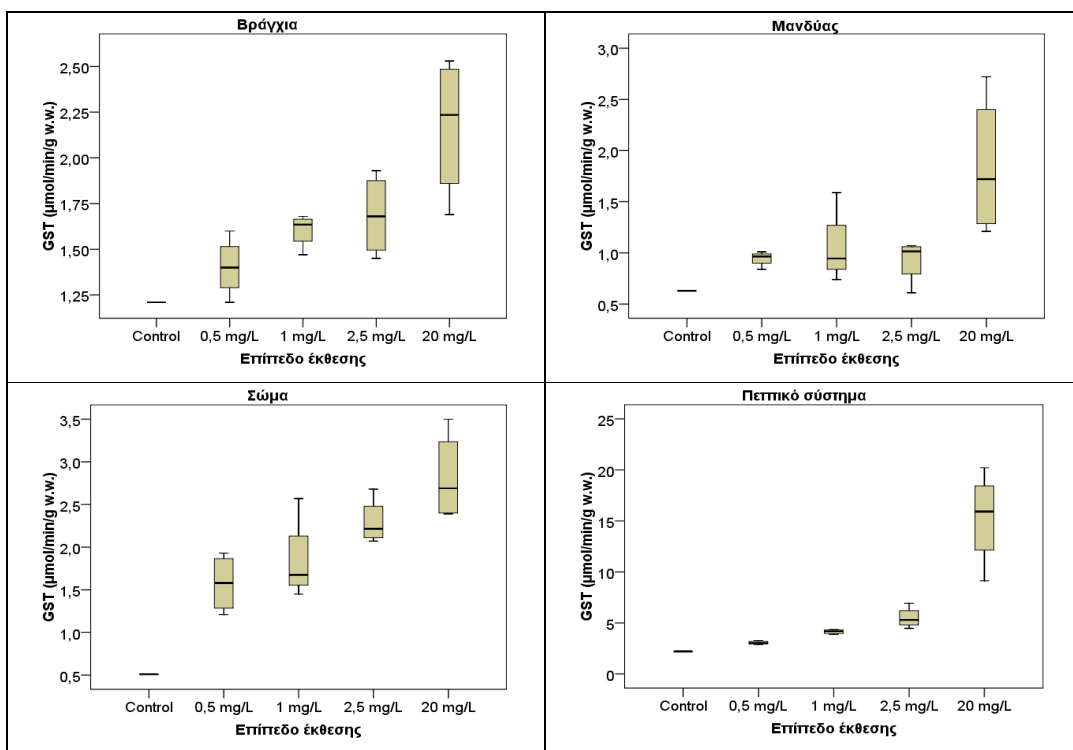
Η ενεργότητα της GST στον πληθυσμό αναφοράς, με την πάροδο των ημερών παρέμεινε σταθερή σε όλους τους ιστούς, με τιμές $1,2 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$ για τα βράγχια, $0,63$ για το μανδύα, $2,2$ για το πεπτικό σύστημα και $0,51$ για το σώμα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 101, η τάση της ενεργότητας του ενζύμου ανάμεσα στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε $0,5$ - $1,0$ και $2,5$ ppm Ni ήταν: πεπτικό σύστημα > σώμα \approx βράγχια > μανδύας. Στο επίπεδο 20 ppm Ni, το πεπτικό σύστημα είχε τις υψηλότερες τιμές ενζύμου σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς, οι οποίοι δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους.

Οι τιμές GST που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 102). Από το ίδιο Σχήμα φαίνεται ότι σε όλους τους ιστούς όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, αυξάνονταν και οι τιμές του ενζύμου. Βέβαια οι μεγαλύτερες διαφορές προσδιορίστηκαν ανάμεσα στο υψηλότερο επίπεδο έκθεσης και όλα τα χαμηλότερα. Η ενεργότητα του ενζύμου δεν παρουσίασε κάποια συγκεκριμένη τάση με τις μέρες έκθεσης, μειώθηκε όμως γενικά κατά την αποτοξίνωση και συσχετίστηκε θετικά με το νικέλιο σε όλα τα επίπεδα έκθεσης.



Σχήμα 101: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



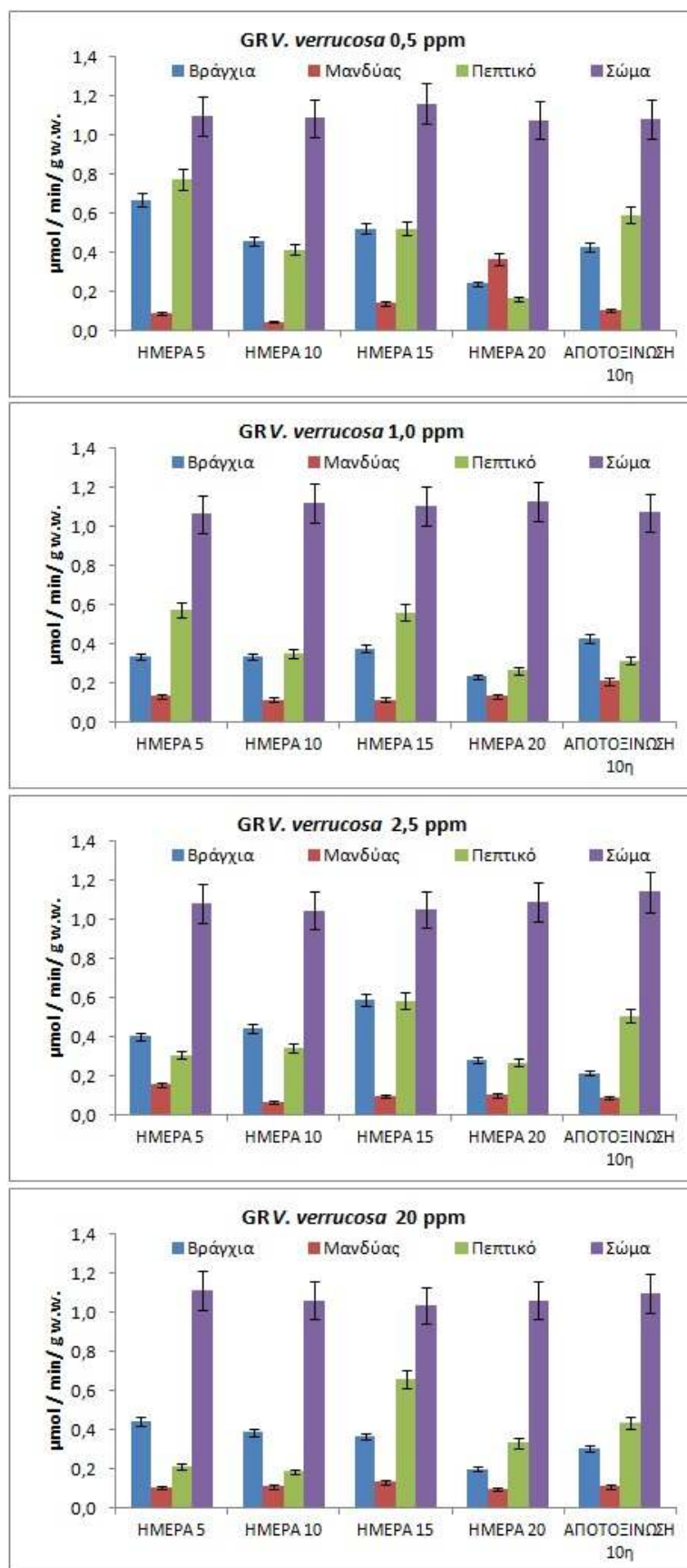
Σχήμα 102: Box-plots των επιπέδων GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.3.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

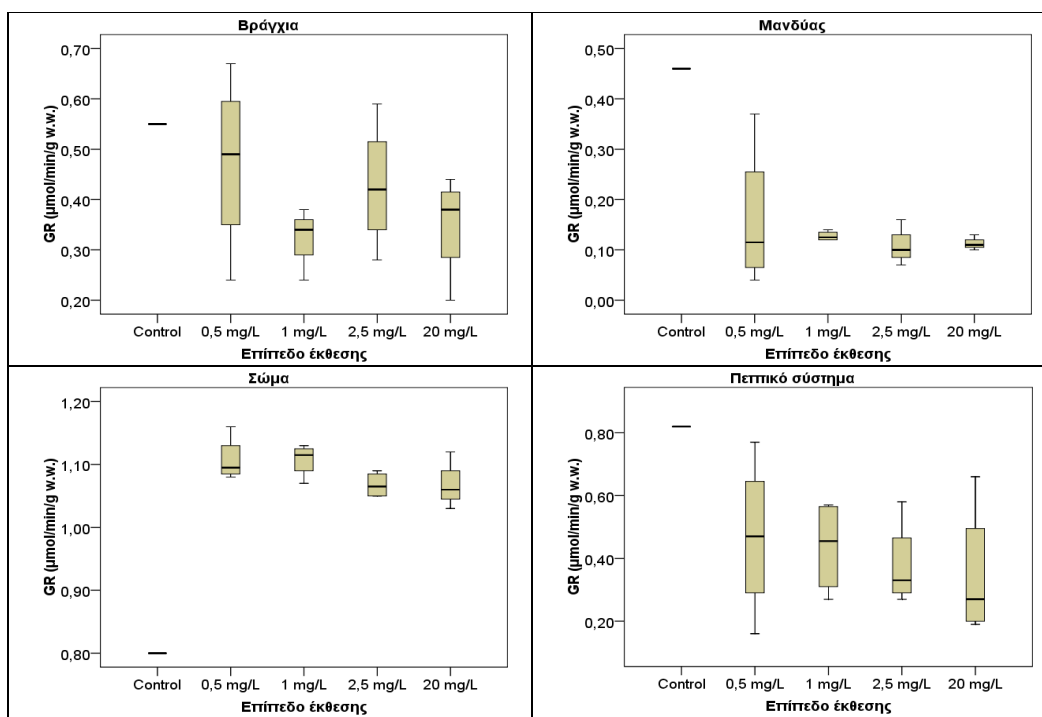
Η ενεργότητα της αναγωγής της γλουταθειόνης στα κυδώνια αναφοράς, με την πάροδο των ημερών και στους τέσσερις ιστούς παρέμεινε σταθερή με τιμές $0,55 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$ για τα βράγχια, $0,46$ για το μανδύα, $0,82$ για το πεπτικό σύστημα και $0,80$ για το σώμα.

Οι τιμές GR που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου (Σχήμα 104) ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς για όλους τους ιστούς, εκτός από το σώμα που ήταν υψηλότερες. Μεταξύ των επιπέδων έκθεσης δεν προέκυψαν στατιστικές διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα έκθεσης σε κάθε ιστό, κάτι που πιθανά σημαίνει ότι η βλάβη που προκαλείται στο συγκεκριμένο ένζυμο είναι η ίδια ανεξάρτητα από το επίπεδο του νικελίου.

Για κάθε επίπεδο έκθεσης ο ιστός που είχε την υψηλότερη ενεργότητα ενζύμου ήταν το σώμα. Συνολικά για την περίοδο έκθεσης η τάση ήταν: σώμα > πεπτικό σύστημα ≈ βράγχια > μανδύας (Σχήμα 103). Η ενεργότητα του ενζύμου δεν εμφάνισε κάποια συγκεκριμένη τάση με τις μέρες έκθεσης (Σχήμα 103). Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης η τιμή της GR γενικά αυξήθηκε στους ιστούς των οργανισμών, κάτι που ίσως φανερώνει την προσπάθεια του οργανισμού να ανακάμψει. Αξίζει να σημειωθεί για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν στην σε 20 ppm Ni ότι παρά την αύξηση κατά την αποτοξίνωση, στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα, οι τιμές παρέμειναν χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς.



Σχήμα 103: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 104: Box-plots των επιπέδων GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

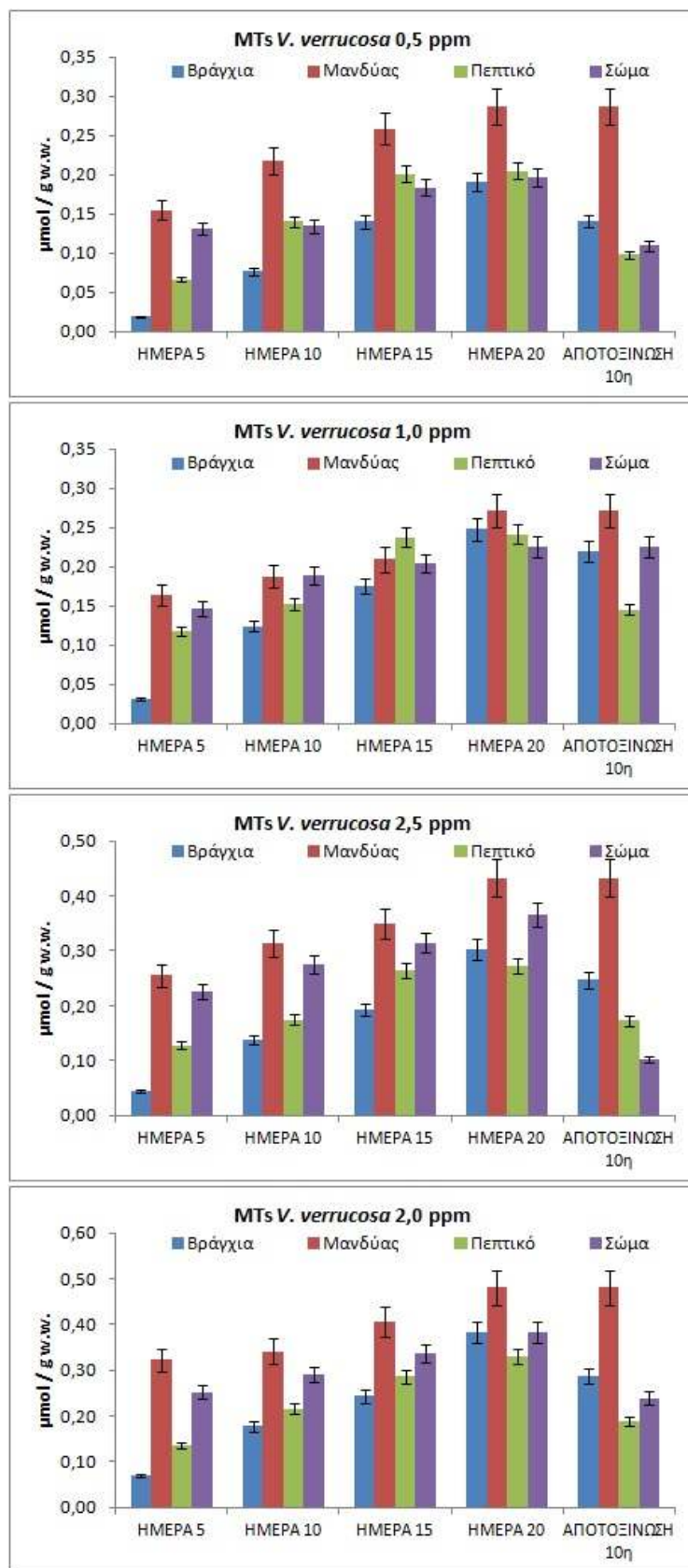
5.3.7 Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Η συγκέντρωση των μεταλλοθειονινών στα κυδώνια αναφοράς, παρέμεινε σταθερή με την πάροδο των ημερών, με τιμές 0,002 $\mu\text{mol}/\text{g w.w.}$ για τα βράγχια, 0,017 για το μανδύα και το πεπτικό σύστημα και 0,016 για το σώμα. Όπως φαίνεται, τα βράγχια είχαν κατά 7-8 φορές χαμηλότερες τιμές από τους υπόλοιπους ιστούς.

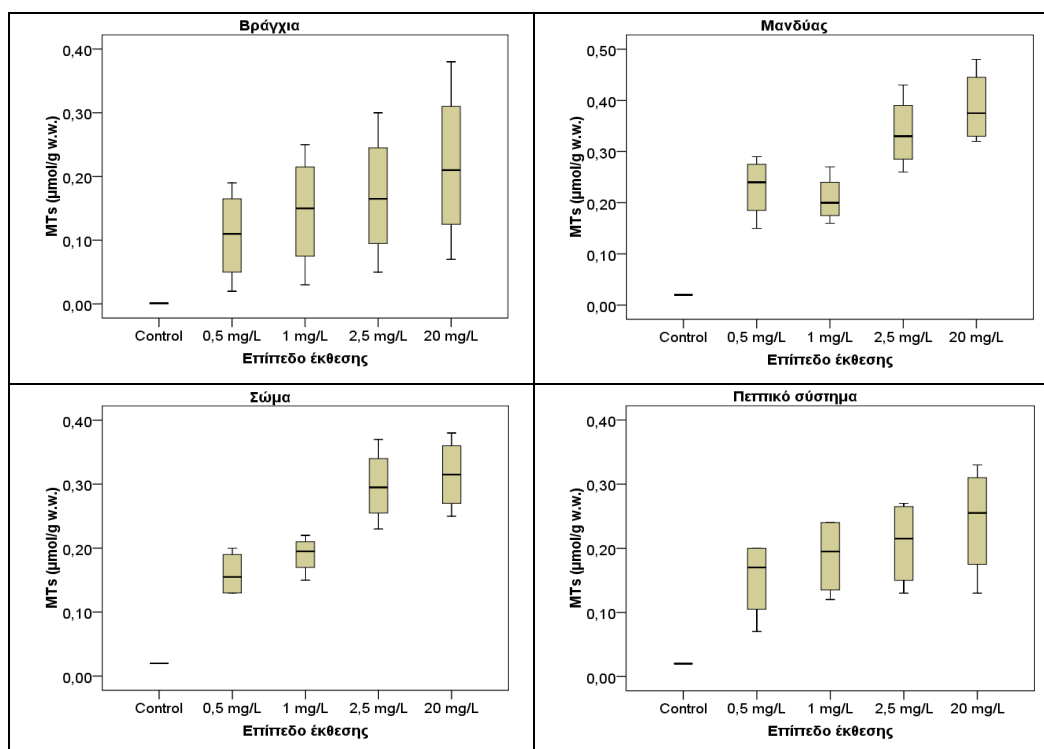
Από τον Πίνακα 44 και Σχήμα 106 παρατηρείται ότι σε όλους τους ιστούς η αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ήταν πολύ μεγάλη σε σχέση με τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς. Φαίνεται πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης και οι μέρες έκθεσης, η αύξηση ήταν μεγαλύτερη, με μέγιστη τιμή για τους ιστούς, την 20^η ημέρα. Στα βράγχια των οργανισμών, στα οποία είχαν προσδιοριστεί οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου, παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση των MTs, η οποία για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni την 20^η ημέρα, φτάνει τις 174 φορές. Η τάση λοιπόν μεταξύ των ιστών ήταν: μανδύας > σώμα > πεπτικό > βράγχια. Κατά την αποτοξίνωση οι τιμές των μεταλλοθειονινών σε όλους τους ιστούς των οργανισμών μειώθηκαν ή παρέμειναν σχετικά σταθερές.

Πίνακας 44: Αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ($C_{\text{DayX}}/C_{\text{Day0}}$) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς

	0,50ppm		1,0ppm		2,5ppm		20ppm	
	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20
βράγχια	8,5	86	14	112	21	137	32	174
μανδύας	8,9	17	9,5	16	15	25	19	28
πεπτικό σύστημα	4,0	12	7,0	14	7,6	16	8,0	20
σώμα	8,4	13	9,4	14	14	23	16	25



Σχήμα 105: Χρονική μεταβολή των τιμών των μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο



Σχήμα 106: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο

5.3.8 Ψευδάργυρος σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Οι συγκεντρώσεις ψευδαργύρου στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς παρέμειναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος με τιμές $72 \mu\text{g/g d.w.}$ για τα βράγχια, 152 για το μανδύα, 69 για το πεπτικό σύστημα και 52 για το σώμα.

Τόσο στον πληθυσμό αναφοράς, όσο και σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, ο μανδύας είχε τις υψηλότερες τιμές ψευδαργύρου, διπλάσιες από τις αντίστοιχες τιμές των βραγχίων, τα οποία είχαν τις αμέσως χαμηλότερες τιμές. Το σώμα ήταν ο ιστός που είχε τις χαμηλότερες τιμές σε όλες τις ημέρες έκθεσης. Δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές του νικελίου με τις τιμές του ψευδαργύρου σε κάθε ιστό, άρα ο ψευδάργυρος που φυσιολογικά βρίσκεται στις μεταλλοθειονίνες δεν επηρεάστηκε από την έκθεση του οργανισμού σε νικέλιο.

5.3.9 Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Στον πληθυσμό αναφοράς οι τιμές της ολικής πρωτεΐνης ήταν σταθερές με τον χρόνο διατήρησης των οργανισμών σε ενυδρεία, με τιμές 23 mg/mL στα βράγχια, 14 στο μανδύα, 16 στο πεπτικό σύστημα και 11 στο σώμα. Τόσο για τον πληθυσμό αναφοράς, όσο και για όλα τα επίπεδα έκθεσης παρατηρείται ότι τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες τιμές ολικής πρωτεΐνης, αρκετά υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές των υπόλοιπων ιστών. Ξεκάθαρη τάση με τις ημέρες έκθεσης στον ίδιο ιστό και επίπεδο δεν παρατηρήθηκε, φαίνεται όμως ότι οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε διάφορα επίπεδα νικελίου είχαν υψηλότερες τιμές ολικής πρωτεΐνης από τους οργανισμούς αναφοράς.

5.3.10 Συσχέτιση νικελίου με βιοδείκτες

Συσχέτιση (Pearson correlation) όλων των τιμών νικελίου, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε έναν από τους ιστούς των κυδωνιών, με τους παρακάτω βιοδείκτες, για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% εμφάνισε τις εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακες 45-48):

- αρνητική συσχέτιση με την ακετυλενοχολινεστεράση: σε όλους τους ιστούς.
- θετική συσχέτιση με την λιπιδική υπεροξειδωση σε όλους τους ιστούς.
- θετική συσχέτιση με την S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε όλους τους ιστούς.
- θετική συσχέτιση με την αναγωγή της γλουταθειόνης σε όλους τους ιστούς.
- θετική συσχέτιση με την καταλάση σε όλους τους ιστούς.
- θετική συσχέτιση με τις μεταλλοθειονίνες σε όλους τους ιστούς.

5.3.11 Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε νικέλιο

Επειδή οι βιοδείκτες συσχετίζονται με το νικέλιο, εξετάστηκε και η μεταξύ τους συσχέτιση ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε ιστό, και επίπεδο εμπιστοσύνης >95%. Στόχος της εύρεσης συσχετίσεων μεταξύ των τιμών των βιοδεικτών ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει κοινή συμπεριφορά-τάση, κάτι που υποδεικνύει ότι ο τρόπος αντίδρασης στην έκθεση σε νικέλιο είναι παρόμοιος. Έτσι προέκυψαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις:

- αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με τη λιπιδική υπεροξειδωση, την GST, την GR και την CAT σε όλους τους ιστούς.
- αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με τις μεταλλοθειονίνες για τα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των οργανισμών.
- θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, με την GST, την GR, την CAT και τις MTs για όλους τους ιστούς.
- θετική συσχέτιση της S μεταφοράσης του γλουταθείου με την GR, την CAT και τις MTs για όλους τους ιστούς, εκτός από τα βράγχια των οργανισμών όπου δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην GST και τις MTs.
- θετική συσχέτιση της CAT τις MTs για όλους τους.

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

Οι μεταλλοθειονίνες είναι ένας αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων που λειτουργεί στην αιτία (είσοδος μετάλλου στους οργανισμούς) καθώς παράγονται όταν εισέρχονται μέταλλα στους ιστούς. Σε κάθε ιστό παρατηρείται αύξηση των μεταλλοθειονινών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο αμυντικός μηχανισμός βρίσκεται σε λειτουργία. Προφανώς όμως δεν επαρκεί, ή δεν είναι αρκετά αποτελεσματικός, καθώς οι μετρήσεις των βιοδεικτών (AChE, GST, GR, CAT, LPO) φαίνεται πως επηρεάζονται από τα βαρέα μέταλλα.

Οποιοσδήποτε ιστός και αν χρησιμοποιηθεί ως ιστός ελέγχου η καταλάση είναι ο καταλληλότερος βιοδείκτης καθώς εμφανίζει ξεκάθαρη τάση με το χρόνο έκθεσης, πολύ ισχυρή στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το νικέλιο και στα χαμηλότερα αλλά και στα υψηλότερα επίπεδα έκθεσης και σε όλους τους ιστούς. Επίσης πολύ καλές θετικές συσχετίσεις με το νικέλιο σε όλους τους ιστούς εμφανίζουν

η λιπιδική υπεροξειδωση, η GST, αλλά και οι μεταλλοθειονίνες. Πολύ ισχυρή αρνητική συσχέτιση σε όλους τους ιστούς εμφανίζει η ακετυλοχολινεστεράση, η οποία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης.

Πίνακας 45: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	CAT	MTs	Zn	Fe	Ολική πρωτεΐνη
Ni	1								
AChE	-0,893**	1							
LPO	0,727**	-0,823**	1						
GST	0,917**	-0,908**	0,713**	1					
CAT	1,000**	-0,902**	0,728**	0,923**	1				
MTs	0,558 [†]	-0,515 [†]	0,807**	0,479	0,550 [†]	1			
Zn	-0,015	0,047	-0,144	0,066	-0,009	-0,320	1		
Ολική πρωτεΐνη	-0,355	0,143	-0,407	-0,144	-0,341	-0,587 [†]	0,008	-0,618 [†]	1

Πίνακας 46: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	CAT	MTs	Zn	Fe	Ολική πρωτεΐνη
Ni	1								
AChE	-,964**	1							
LPO	,890**	-,949**	1						
GST	,959**	-,939**	,862**	1					
CAT	,999**	-,960**	,883**	,961**	1				
MTs	,570 [†]	-,635**	,744**	,635**	,566 [†]	1			
Zn	,164	-,174	,279	,109	,147	-,025	1		
Ολική πρωτεΐνη	-,174	,079	-,005	-,076	-,191	,078	,115	,175	1

Πίνακας 47: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	CAT	MTs	Zn	Fe	Ολική πρωτεΐνη
Ni	1								
AChE	-,836**	1							
LPO	,882**	-,944**	1						
GST	,965**	-,882**	,918**	1					
CAT	1,000**	-,836**	,883**	,965**	1				
MTs	,499 [†]	-,452	,568 [†]	,566 [†]	,499 [†]	1			
Zn	-,136	-0,019	-0,090	-,125	-,136	,133	1		
Ολική πρωτεΐνη	-,136	,233	-,226	-,217	-,136	,211	,132	-,419	1

* δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

** δηλώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

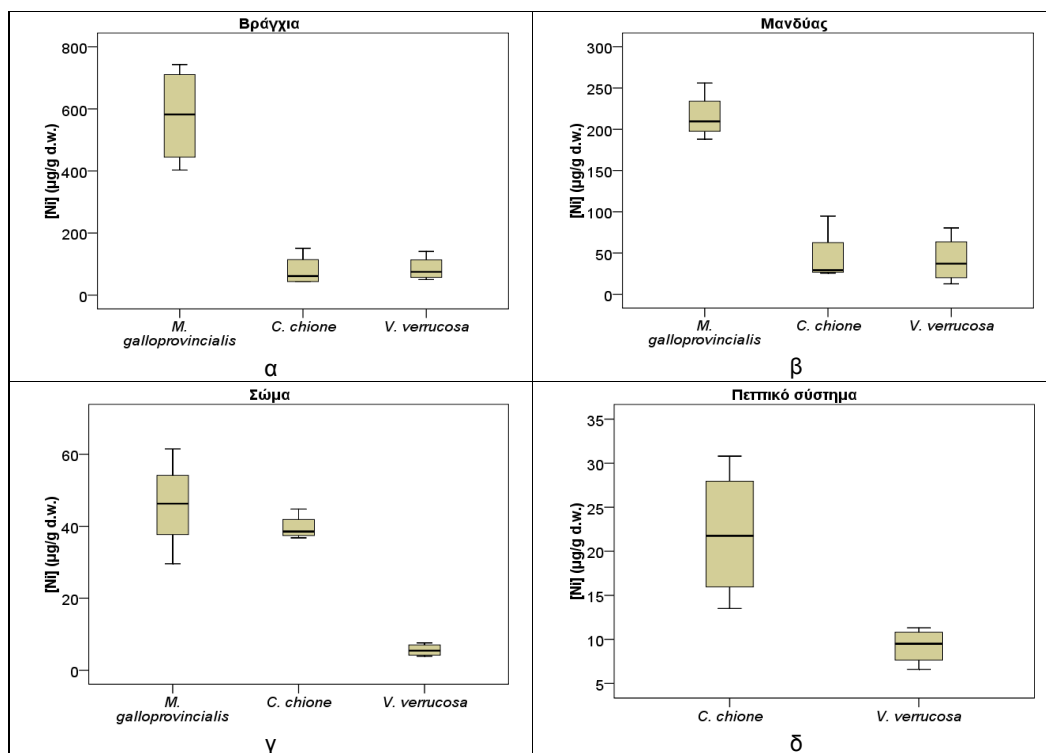
Πίνακας 48: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του νικελίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών

	Ni	AChE	LPO	GST	CAT	MTs	Zn	Fe	Ολική πρωτεΐνη
Ni	1								
AChE	-,800**	1							
LPO	,928**	-,814**	1						
GST	,877**	-,888**	,868**	1					
CAT	1,000**	-,800**	,929**	,877**	1				
MTs	,556*	-,858**	,705**	,713**	,555*	1			
Zn	-,449	,207	-,324	-,318	-,448	-,101	1		
Ολική πρωτεΐνη	,535*	-,432	,499*	,578*	,533*	,271	-,404	,300	1

5.4 Σύγκριση των τριών οργανισμών

5.4.1 Επίπεδα και κατανομή νικελίου

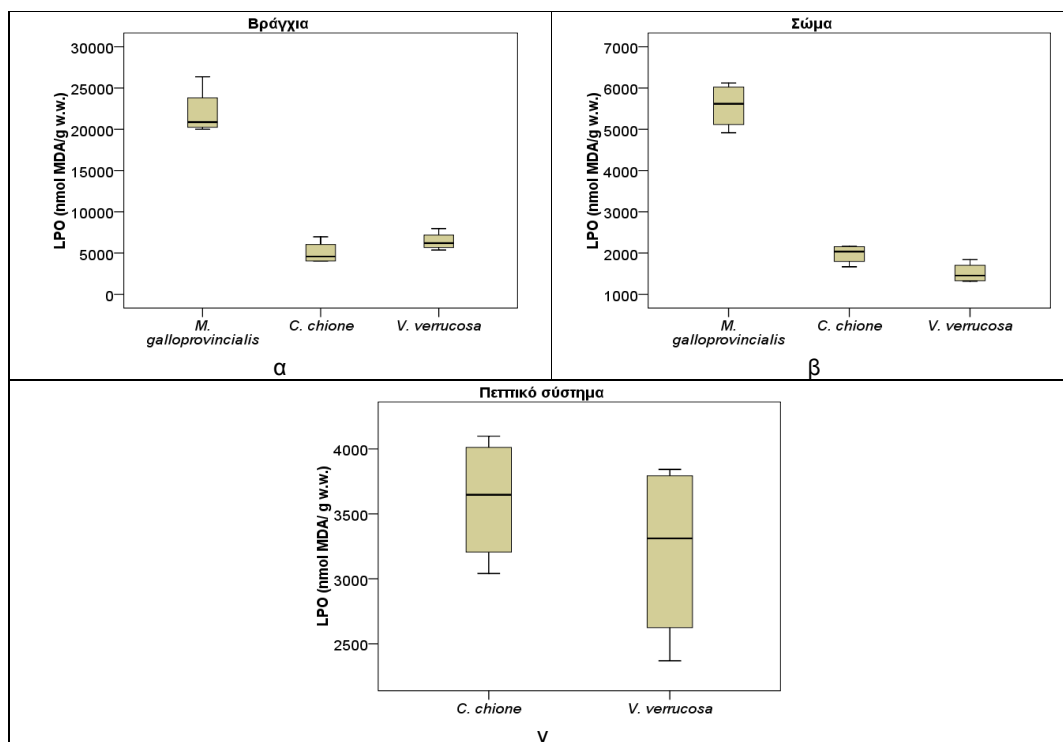
Οι τιμές του νικελίου που προσδιορίστηκαν στα βράγχια και το μανδύα των μυδιών ήταν υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες των άλλων οργανισμών, οι οποίοι δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους ($p>0,05$). Στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα νικελίου, παρόμοιες και υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο μύδι και τη γυαλιστερή σε σχέση με τις αντίστοιχες του κυδωνιού. Στο πεπτικό σύστημα οι τιμές που προσδιορίστηκαν στην γυαλιστερή ήταν υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες του κυδωνιού.



Σχήμα 107: Box-plots των επιπέδων νικελίου ($\mu\text{g/g d.w.}$) για α) βράγχια, β) μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni και γ) για το σώμα, δ) για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni

5.4.2 Λιπιδική υπεροξειδωση

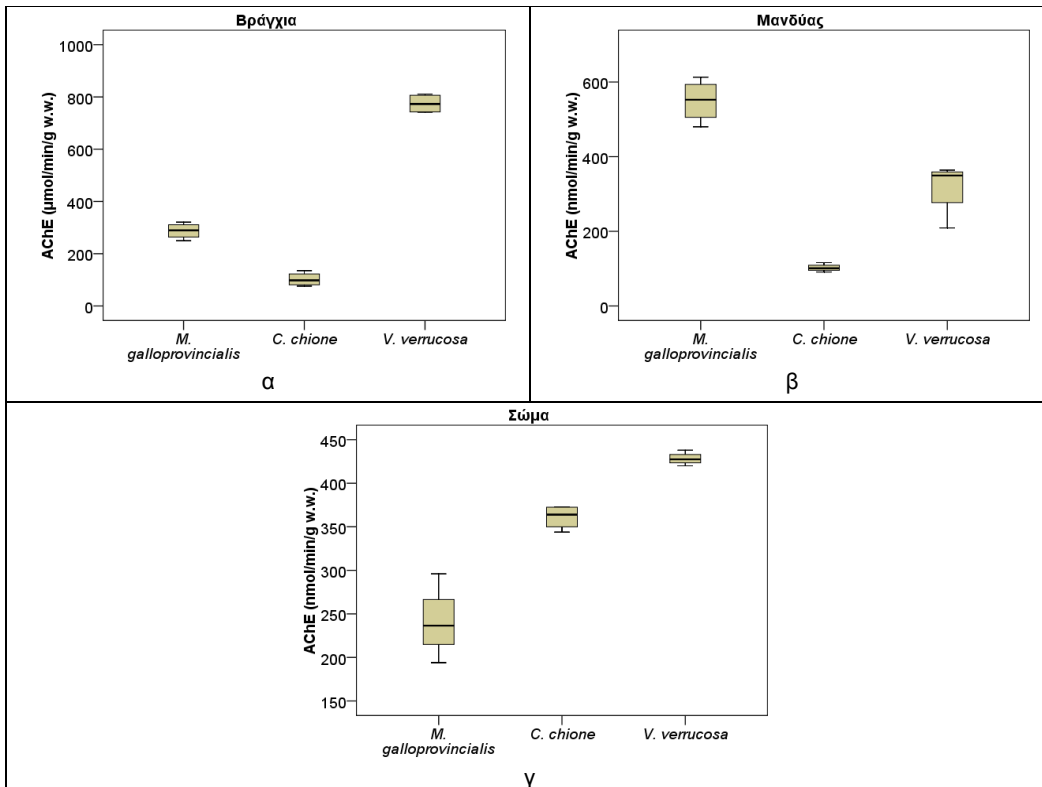
Σε όλους τους ιστούς των οργανισμών, για κάθε επίπεδο μετάλλου, υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στα μύδια, οι οποίες ήταν και στατιστικά διαφορετικές από τις τιμές των υπόλοιπων οργανισμών ($p < 0,05$), οι οποίοι δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους. Άρα, η σειρά των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης στα βράγχια των οργανισμών ήταν η εξής: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* ≈ *C. chione*, ενώ στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* ≈ *V. verrucosa*. Στο πεπτικό σύστημα η γυαλιστερή είχε ελαφρά υψηλότερες τιμές από το κυδώνι, αλλά οι δύο οργανισμοί δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους.



Σχήμα 108: Βοx-plots των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/ g w.w.) για α) βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni, β) σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni, γ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Ni

5.4.3 Ακετυλοχολινεστεράση

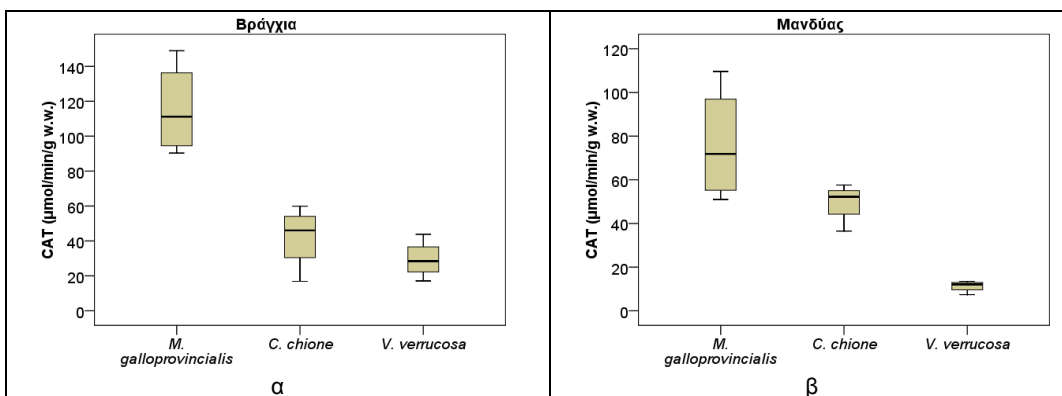
Η τάση της ακετυλοχολινεστασης στα βράγχια των τριών οργανισμών για τα τρία χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης ήταν: *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* > *C. chione*, ενώ για το υψηλότερο επίπεδο η τάση ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* ≥ *C. chione*. Στο μανδύα η τάση για όλα τα επίπεδα έκθεσης ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* > *C. chione*. Στο σώμα για τα τρία χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης: *V. verrucosa* > > *C. chione* > *M. galloprovincialis*, ενώ για το υψηλότερο επίπεδο: *C. chione* > *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* ($p < 0,05$). Σύγκριση των τιμών του ενζύμου στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών έδειξε ότι σε όλα τα επίπεδα έκθεσης οι τιμές του κυδωνιού ήταν υψηλότερες ($p < 0,05$).

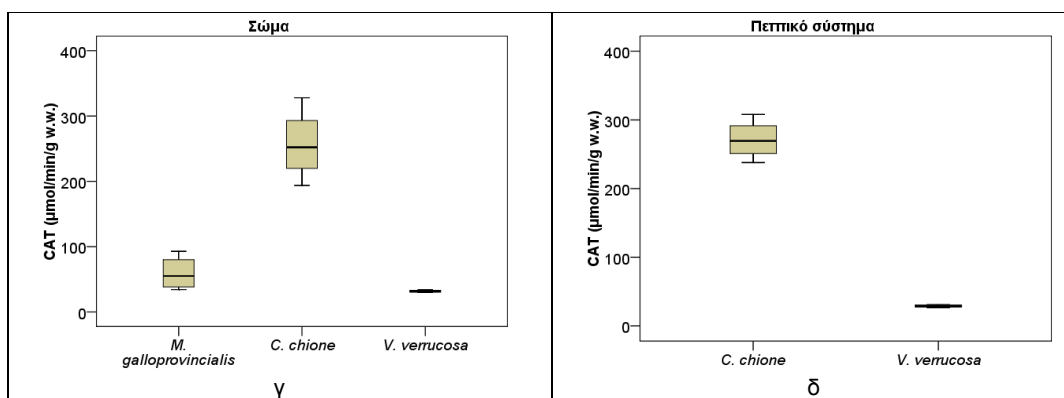


Σχήμα 109: Βοx-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/min/g w.w) για τα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni (α), το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Ni (β), το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni (γ)

5.4.4 Καταλάση

Για όλα τα επίπεδα έκθεσης στα βράγχια και το μανδύα ισχύει: *M. galloprovincialis* > *C. chione* ≥ *V. verrucosa* (one way ANOVA, $p < 0,05$). Στο σώμα των οργανισμών οι υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές τιμές προσδιορίστηκαν στη γυαλιστερή, με τους δύο άλλους οργανισμούς να μην διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ($p > 0,05$). Στο πεπτικό σύστημα, υψηλότερες τιμές καταλάσης προσδιορίστηκαν στη γυαλιστερή από ότι στο κυδώνι.

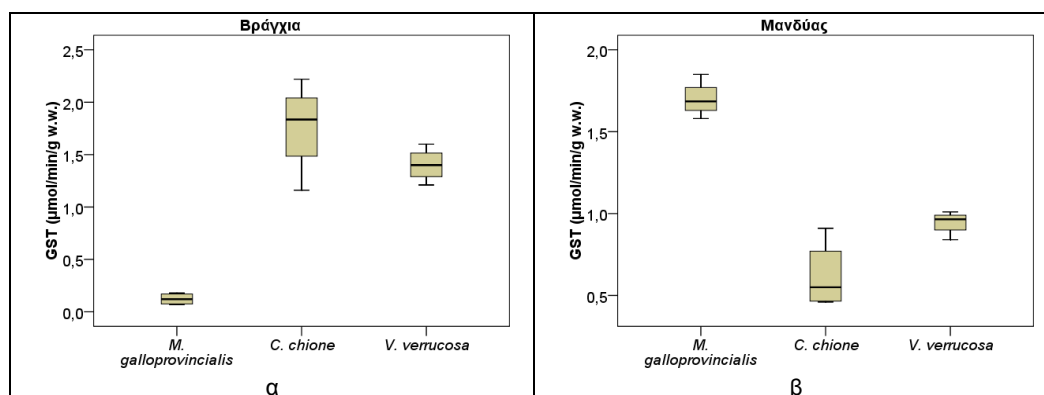




Σχήμα 110: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους τέσσερις ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni

5.4.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης

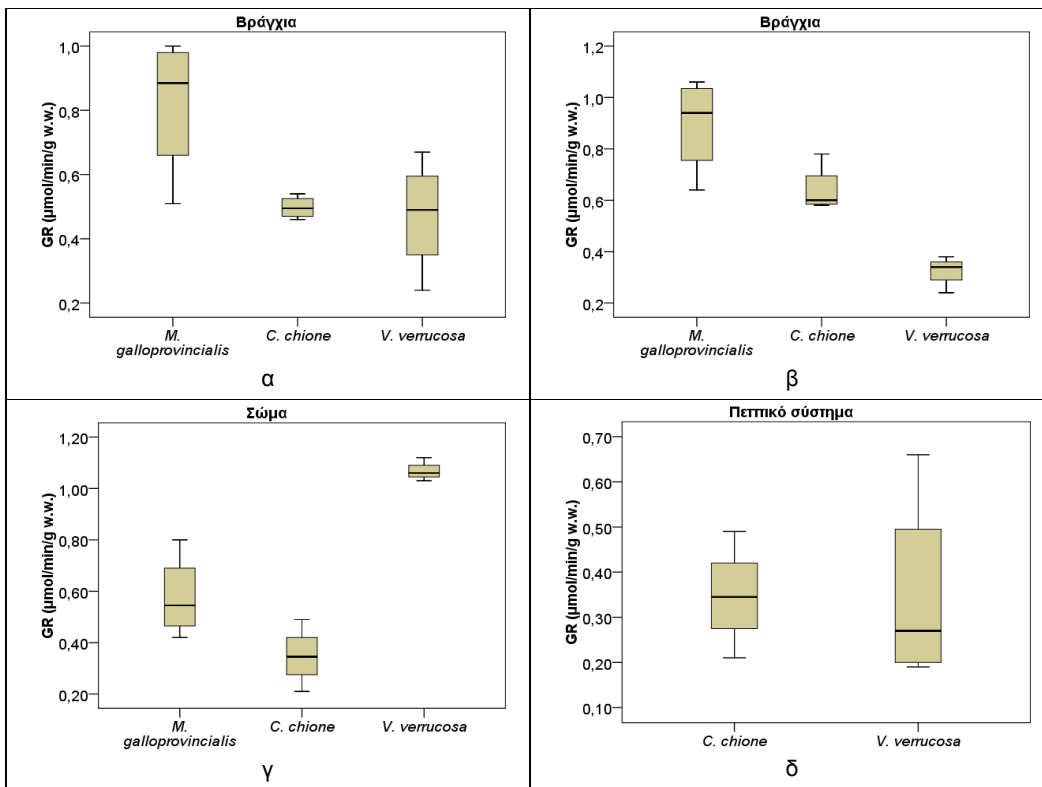
Στα βράγχια των οργανισμών οι χαμηλότερες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν στα μύδια, τα οποία διέφεραν στατιστικά από τους άλλους οργανισμούς, οι οποίοι δεν διέφεραν μεταξύ τους. Αντίθετα, στο μανδύα και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm Ni η τάση ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* \geq *C. chione*, ενώ για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα η τάση ήταν η αντίστροφη. Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών, υψηλότερες τιμές ενζύμου είχαν οι γυαλιστερές σε σχέση με τα κυδώνια.



Σχήμα 111: Box-plots των επιπέδων GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στα βράγχια (α) και το μανδύα (β) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni

5.4.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης

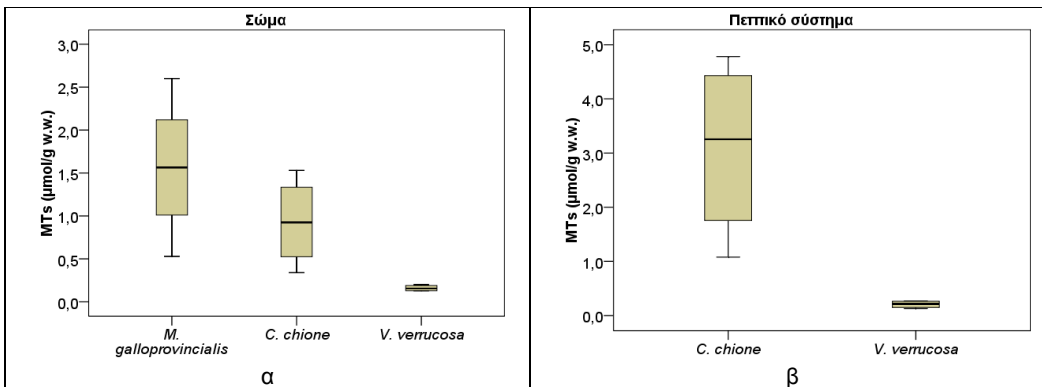
Στα βράγχια και το μανδύα όλοι οι οργανισμοί διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους με την τάση: *M. galloprovincialis* > *C. chione* > *V. verrucosa*. Στο σώμα η τάση για τα τρία υψηλότερα επίπεδα έκθεσης ήταν: *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* > *C. chione*, ενώ για το χαμηλότερο: *M. galloprovincialis* \approx *V. verrucosa* > *C. chione*. Οι τιμές της GR στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους ($p > 0,05$) για κανένα επίπεδο έκθεσης.



Σχήμα 112: Box-plots των επιπέδων GR (μmol/min/g w.w) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni (α) και 1,0 ppm Ni (β), στο σώμα (γ) και το πεπτικό σύστημα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni

5.4.7 Μεταλλοθειονίνες

Στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των οργανισμών για όλα τα επίπεδα έκθεσης, υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών προσδιορίστηκαν στα μύδια, ελαφρά χαμηλότερες στις γυαλιστερές και οι πιο χαμηλές στα κυδώνια. Στο πεπτικό σύστημα, η γυαλιστερή είχε τις υψηλότερες τιμές ($p < 0,05$).



Σχήμα 113: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w) στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Ni (α) και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Ni (β)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ ΚΑΔΜΙΟ

6.1 Έκθεση *Mytilus galloprovincialis* σε κάδμιο

6.1.1 Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα καδμίου στο θαλασσινό νερό

Στον Πίνακα 49 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του καδμίου στους ιστούς των μυδιών όταν αυτά συλλέχθηκαν από τον Σαρωνικό κόλπο, όπως και η ανώτερη επιτρεπτή τιμή που έχει τεθεί ως όριο για το κάδμιο στα θαλάσσια δίθυρα. Σύμφωνα με την νομοθεσία⁶⁸, τα μύδια που συλλέχθηκαν από τον Σαρωνικό κόλπο ήταν πάνω από τα επιτρεπτά όρια για την ανθρώπινη κατανάλωση.

Πίνακας 49: Συγκεντρώσεις καδμίου στους ιστούς των *M. galloprovincialis*

<i>M. galloprovincialis</i>	Cd (μg/g d.w.)	Cd (μg/g w.w.)
ΒΡΑΓΧΙΑ	3,6	1,4
ΜΑΝΔΥΑΣ	2,2	0,89
ΣΩΜΑ	2,3	0,92
ΟΛΙΚΟ ΖΩΟ	2,6	1,1
Όρια με βάση τη νομοθεσία ⁶⁸		
ΟΛΙΚΟ ΖΩΟ	-	1,0

Οι συγκεντρώσεις καδμίου που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς μειώθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος και κυμάνθηκαν για τα βράγχια από 3,6-2,2 μg/g d.w., για το μανδύα 2,2-0,6 μg/g d.w. και για το σώμα 2,3-1,1 μg/g d.w. Η μεγαλύτερη μείωση στο τέλος του πειράματος σε σχέση με την τιμή της DAY0 παρατηρήθηκε στο μανδύα (>50%) και αμέσως μετά στο σώμα. Η μείωση αυτή αποδείχθηκε και στατιστικά σημαντική.

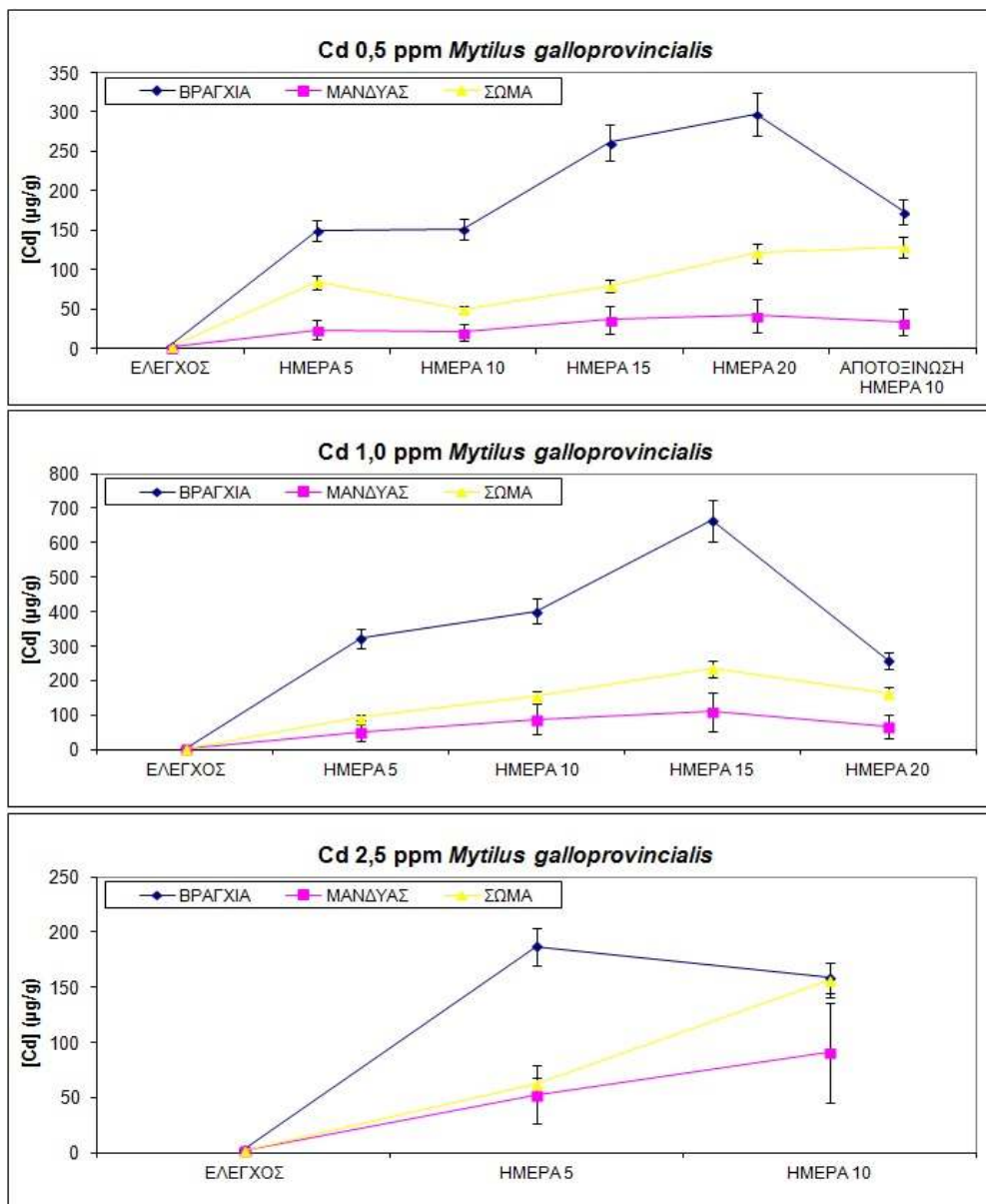
Έκθεση των *M. galloprovincialis* σε κάδμιο προκάλεσε μεγάλη θνησιμότητα στους οργανισμούς. Γι' αυτό το λόγο το πείραμα έκθεσης διήρκεσε 20 ημέρες για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd, 10 ημέρες για εκείνους που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd, και 5 ημέρες για εκείνους που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd. Οι τιμές των συγκεντρώσεων καδμίου προσδιορίστηκαν μόνο στους ιστούς των οργανισμών που παρέμειναν ζωντανοί κατά τη διάρκεια του πειράματος. Λόγω της γρήγορης αποσύνθεσης δεν προσδιορίστηκαν συγκεντρώσεις καδμίου σε νεκρούς οργανισμούς. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd δεν δίνεται διάγραμμα καθώς άντεξαν ως την 5^η ημέρα έκθεσης και οι τιμές που προσδιορίστηκαν στους ιστούς τους ήταν: 229 μg/g d.w. για τα βράγχια, 45 για το μανδύα και 94 για το σώμα.

Από το Σχήμα 114 φαίνεται πως τα μύδια που εκτέθηκαν σε κάδμιο, ανταποκρίθηκαν στην αύξηση συγκέντρωσης μετάλλου στο περιβάλλον τους προσροφώντας το και αποθηκεύοντάς το στους ιστούς τους σχεδόν γραμμικά. Ανάμεσα στους ιστούς, τα βράγχια των οργανισμών είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου, γι' αυτό και διαφοροποιήθηκαν στατιστικά από τους άλλους ιστούς, ενώ ο μανδύας είχε τις χαμηλότερες. Σύμφωνα με τα παραπάνω η τάση ήταν η εξής: βράγχια > σώμα ≥ μανδύας, κάτι που υποδεικνύει ότι τα βράγχια ήταν το όργανο-στόχος.

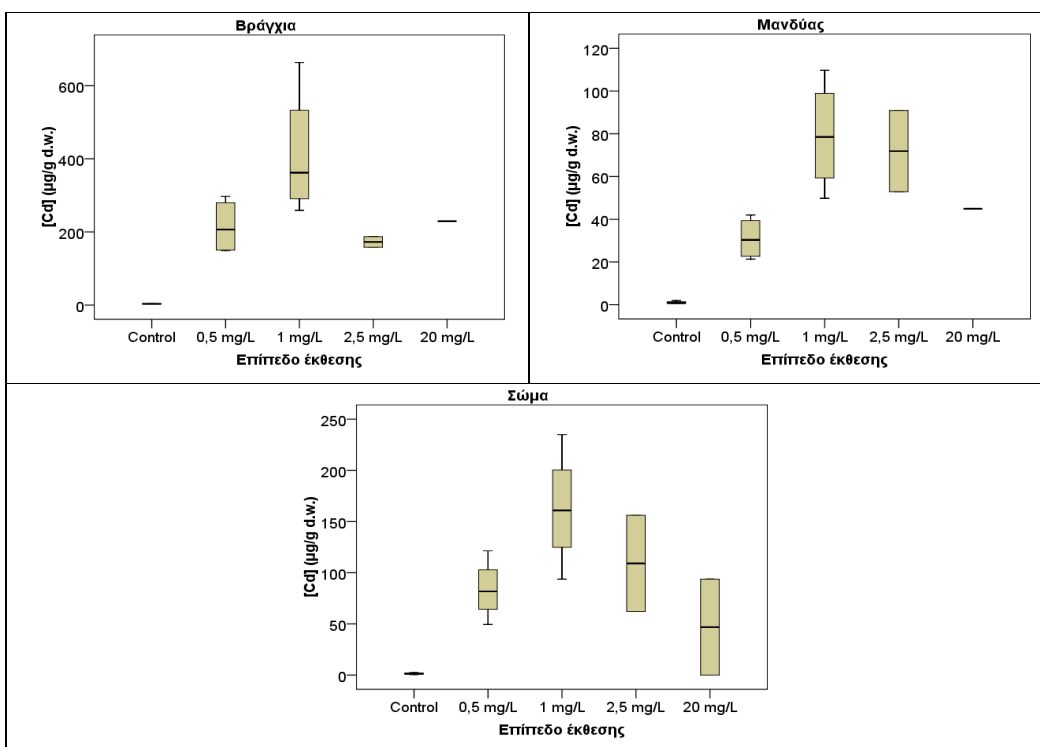
Όπως φαίνεται από το Σχήμα 114, μέγιστη συγκέντρωση καδμίου παρατηρήθηκε σε όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd την 20^η ημέρα έκθεσης, με τιμές υψηλότερες από την ημέρα άφιξής τους στο εργαστήριο (Day 0) κατά 82 φορές για τα βράγχια, 19 για το μανδύα και 53 φορές για το σώμα των οργανισμών. Τα μύδια που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd εμφάνισαν μέγιστο συγκέντρωση καδμίου την 15^η ημέρα έκθεσης, με τιμές υψηλότερες από την

Day 0 κατά 183 φορές για τα βράγχια, 50 για το μανδύα και 102 για το σώμα. Παρατηρείται στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 1,0 και 2,5 ppm Cd ότι την τελευταία μέρα του πειράματος (20^η και 10^η αντίστοιχα), οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στους ιστούς τους (κυρίως στα βράγχια) ήταν χαμηλότερες από την προηγούμενη μέρα που πάρθηκε δείγμα. Αυτό πιθανά να συνέβη γιατί οι βιολογικές λειτουργίες των οργανισμών είχαν διαταραχθεί καθώς οι οργανισμοί βρίσκονταν στα πρόθυρα της κατάρρευσης και ελαττώθηκε ο ρυθμός με τον οποίο φιλτράριζαν το θαλασσινό νερό.

Στο Σχήμα 115 για τα επίπεδα 0,5 και 1,0 ppm Cd φαίνεται ότι όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης αυξάνονταν και οι τιμές. Στα επίπεδα 2,5 και 20 ppm οι τιμές μειωνόταν ίσως επειδή οι οργανισμοί άντεξαν ως την 10^η ή 5^η ημέρα έκθεσης και οι βιολογικές τους λειτουργίες είχαν διαταραχθεί. Κατά την αποτοξίνωση για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd, παρατηρήθηκε μείωση στην συγκέντρωση καδμίου στα βράγχια και το μανδύα (42% και 20% αντίστοιχα), αλλά ελαφρά αύξηση στο σώμα, πιθανόν λόγω μεταφοράς του μετάλλου από άλλο ιστό.



Σχήμα 114: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων του καδμίου (µg/g d.w.) στους ιστούς των μυδιών για κάθε επίπεδο έκθεσης



Σχήμα 115: Box-plots των συγκεντρώσεων καδμίου (µg/g d.w.) στους ιστούς των μυδιών

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης

Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης ($C_{\text{μετρ}} - C_{\text{αναφ}} / C_{\text{νερού}}$) και στα τέσσερα επίπεδα έκθεσης ήταν μεγαλύτερος στα βράγχια από τους υπόλοιπους ιστούς. Γενικά, παρατηρήθηκε αύξηση του συντελεστή βιοσυσσώρευσης με την πάροδο των ημερών έκθεσης στα δύο πρώτα επίπεδα καδμίου με μέγιστη τιμή την 20^η ημέρα για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd, ενώ 15^η ημέρα για εκείνους που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd.

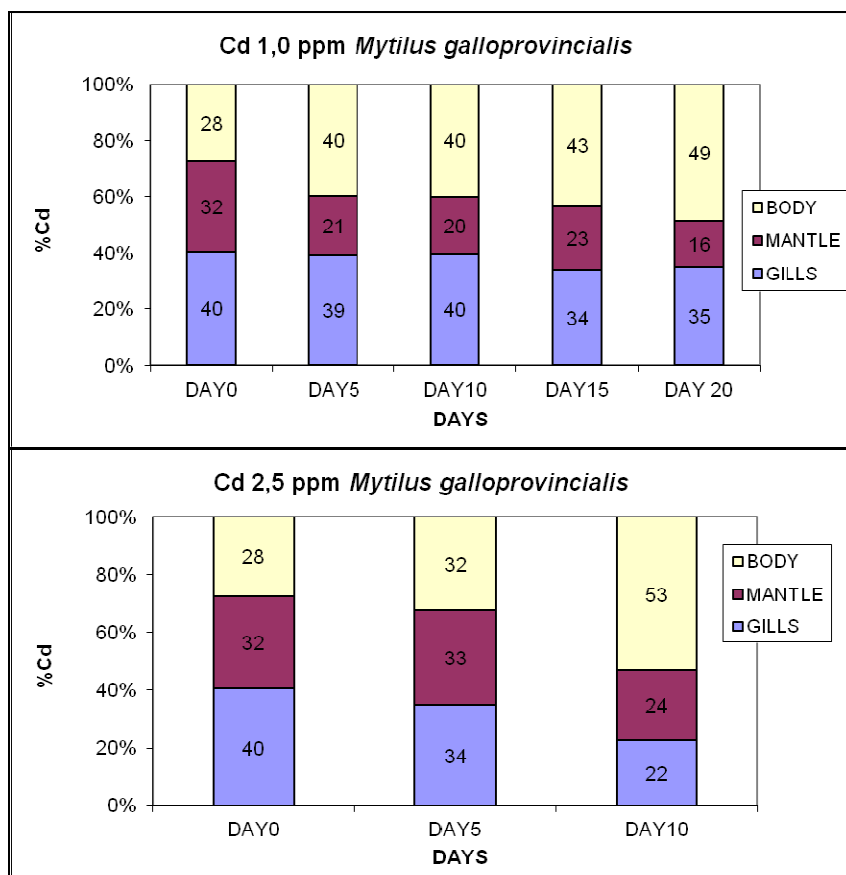
Λόγω του τρόπου υπολογισμού του συντελεστή βιοσυσσώρευσης, όσο αυξάνεται το επίπεδο έκθεσης, αναμένεται μείωση του συντελεστή. Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρατηρήθηκε αύξηση (η σύγκριση γίνεται ανάμεσα στο επίπεδο 0,5 και 1,0 ppm).

Πίνακας 50: Συντελεστής βιοσυσσώρευσης για τους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα καδμίου

		DAY5	DAY10	DAY15	DAY20
Cd 0,5 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	292	295	517	590
	ΜΑΝΔΥΑΣ	44	41	72	83
	ΣΩΜΑ	164	96	158	240
Cd 1,0 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	319	397	661	257
	ΜΑΝΔΥΑΣ	48	88	109	68
	ΣΩΜΑ	91	155	235	164
Cd 2,5 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	73	62		
	ΜΑΝΔΥΑΣ	20	36		
	ΣΩΜΑ	24	62		
Cd 20 ppm	ΒΡΑΓΧΙΑ	11			
	ΜΑΝΔΥΑΣ	2			
	ΣΩΜΑ	5			

Κατανομή καδμίου μεταξύ των ιστών των οργανισμών

Η περιεκτικότητα του καδμίου στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου αυξανόταν με τις μέρες έκθεσης, ενώ στα βράγχια και το μανδύα μανδύα μειωνόταν (Σχήμα 116).



Σχήμα 116: Ποσοστιαία κατανομή του καδμίου στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0- 2,5 και 20 ppm Cd με τις μέρες έκθεσης

6.1.2 Λιπιδική υπεροξείδωση σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

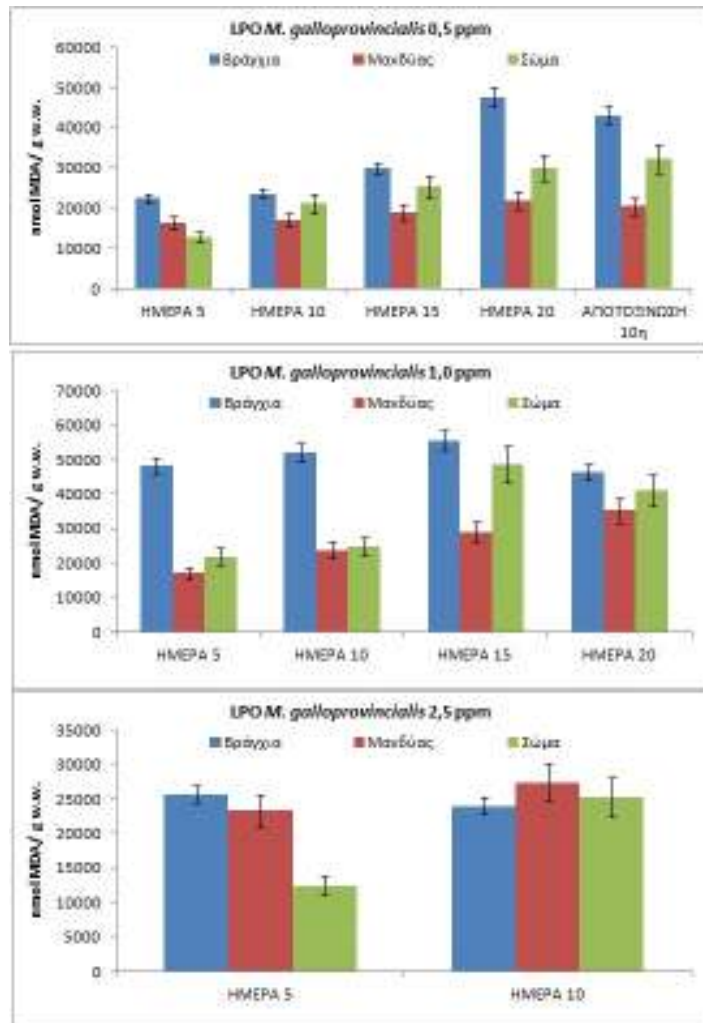
Από τον Πίνακα 51 φαίνεται ότι με την πάροδο των ημερών, η συγκέντρωση μηλονικής διαλδεϋδης στον πληθυσμό αναφοράς μειωνόταν, πιθανώς λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στο νερό των Χανίων σε σχέση με της Ελευσίνας. Η μείωση στο τέλος του πειράματος ήταν μικρή, της τάξης του 5% στα βράγχια, 11% στο μανδύα και 9% στο σώμα των οργανισμών.

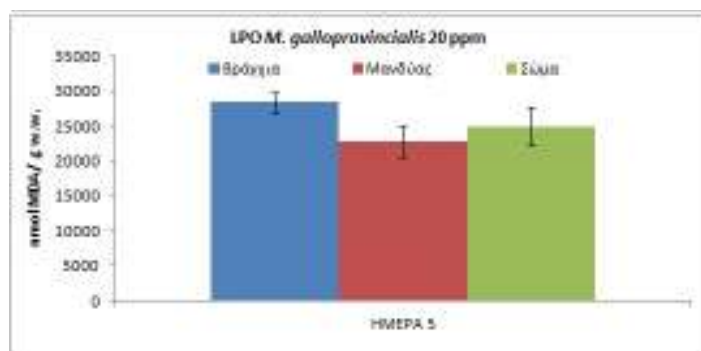
Πίνακας 51: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA (nmol MDA/g w.w.) για τον πληθυσμό αναφοράς

	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10
Βράγχια	4747	4707	4687	4597	4507
Μανδύας	3153	3103	2955	2906	2820
Σώμα	5746	5700	5546	5551	5231

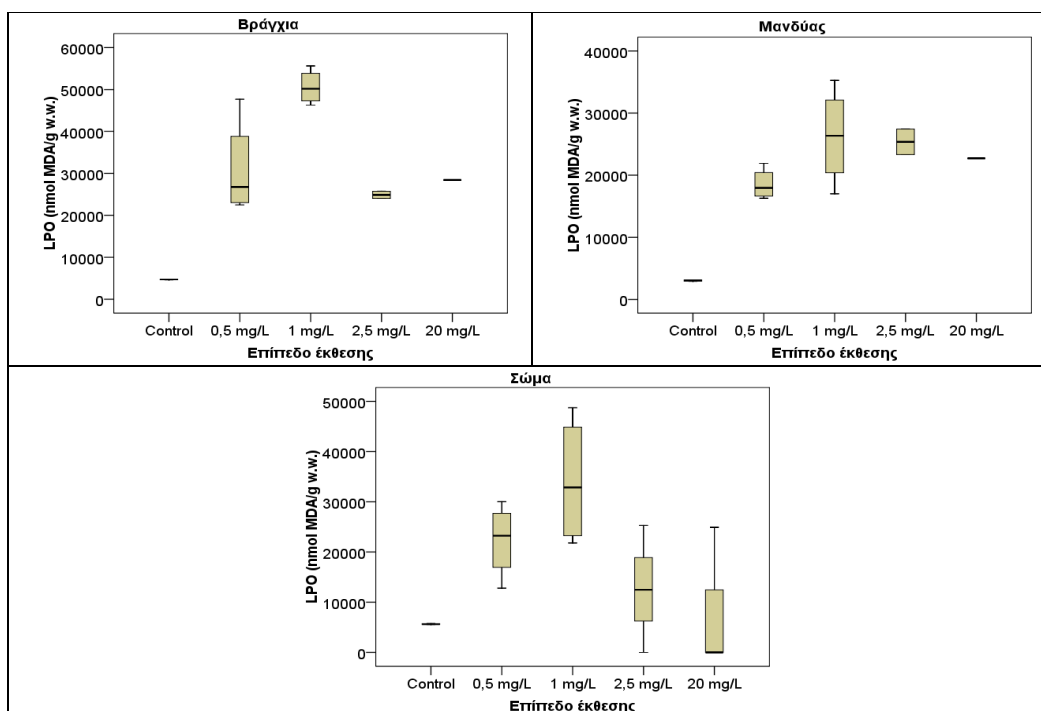
Οι τιμές μηνονικής διαλδεΰδης που μετρήθηκαν στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου ήταν στατιστικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς και αυξάνονταν, όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης (Σχήμα 118). Γενικά, οι πιο υψηλές τιμές μηνονικής διαλδεΰδης προσδιορίστηκαν στα βράγχια, και οι πιο χαμηλές στο μανδύα. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd η λιπιδική υπεροξειδωση ήταν παρόμοια στα βράγχια και το μανδύα αλλά υψηλότερη από το σώμα των οργανισμών (Σχήμα 117). Γενικά, όσο αυξάνονταν οι μέρες έκθεσης αυξανόταν και η λιπιδική υπεροξειδωση (Σχήμα 117) σε κάθε ιστό.

Η τάση της λιπιδικής υπεροξειδωσης στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm μετάλλου δεν ήταν συγκεκριμένη πιθανώς λόγω της κατάρρευσης των οργανισμών. Η αύξηση των τιμών της μηνονικής διαλδεΰδης την 20^η ημέρα έκθεσης στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd σε σχέση με τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς ήταν 10-7,5 και 5,4 φορές μεγαλύτερη στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα αντίστοιχα. Αντίστοιχη αύξηση στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd ήταν 12 φορές στα βράγχια και το μανδύα και 7,5 φορές στο σώμα. Κατά την αποτοξίνωση των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd, η συγκέντρωση της MDA μειώθηκε στα βράγχια και το μανδύα κατά 10%, αλλά όχι στο σώμα. Η μικρή μείωση της MDA δείχνει την βλάβη που προκάλεσε το κάδμιο στους ιστούς.





Σχήμα 117: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



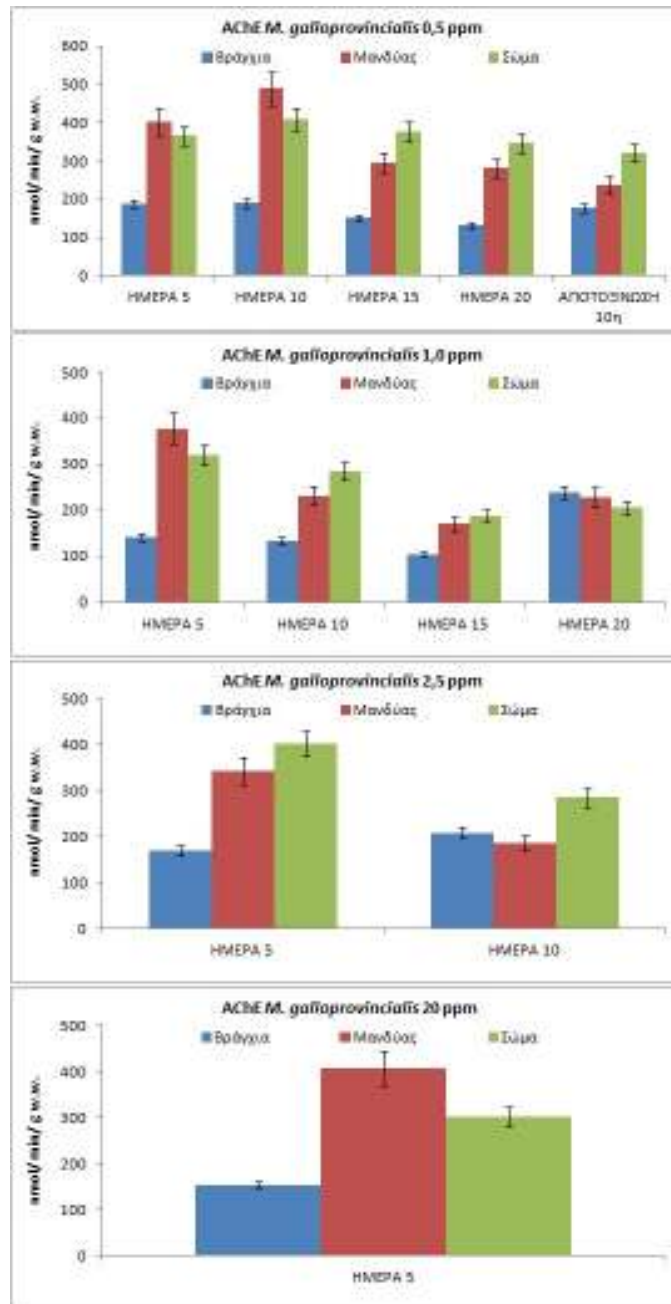
Σχήμα 118: Βox-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεΐδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.1.3 Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

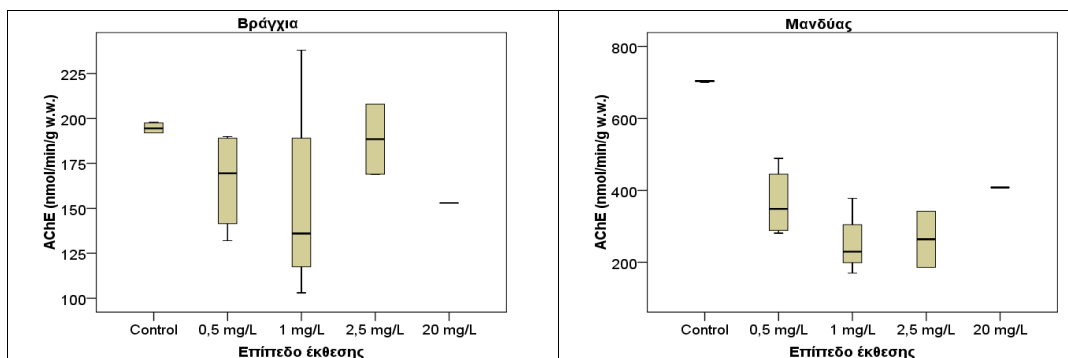
Η ακετυλοχολινεστεράση που προσδιορίστηκε στις μύδια αναφοράς, παρουσίασε μικρές αυξομειώσεις με την πάροδο των ημερών. Οι τιμές κυμάνθηκαν για τα βράγχια των οργανισμών από 191-198 nmol/min /g w.w., για το μανδύα 701-706 και για το σώμα 438-446. Στα βράγχια προσδιορίστηκε η υψηλότερη συγκέντρωση καδμίου και η χαμηλότερη ενεργότητα ενζύμου, κάτι που πιθανά να υποδηλώνει την νευροτοξικότητα του μετάλλου.

Οι τιμές του ενζύμου στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο ήταν χαμηλότερες από τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 120). Κυρίως στο μανδύα και στο σώμα φαίνεται ότι η ενεργότητα του ενζύμου μειωνόταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Και στα βράγχια παρατηρήθηκε γενικά η ίδια τάση, με κάποιες όμως αυξομειώσεις (Σχήμα 119). Η μείωση την 20^η

ημέρα για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd ήταν 31%, 60% και 22% για τα βράγχια, το μανδύα και το σώμα αντίστοιχα. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd η μείωση ήταν 48% για τα βράγχια, 76% στο μανδύα και 57% στο σώμα. Παρόμοια ήταν και η μείωση στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd. Μεταξύ των ιστών για κάθε επίπεδο έκθεσης, οι χαμηλότερες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν στα βράγχια, ενώ οι υψηλότερες κυρίως στο σώμα (Σχήμα 119). Η ενεργότητα της AChE συσχετίστηκε αρνητικά με την συγκέντρωση καδμίου σε κάθε ιστό, κάτι που υποδεικνύει την τοξικότητα του μετάλλου. Κατά την αποτοξίνωση, όπου μειώθηκε και η συγκέντρωση του καδμίου στους ιστούς των οργανισμών, αυξήθηκε η τιμή της ακετυλοχολινεστεράσης στα βράγχια προσπαθώντας να επανέλθει στα φυσιολογικά της επίπεδα, ενώ στο μανδύα και το σώμα μειώθηκε περαιτέρω (Σχήμα 119).



Σχήμα 119: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

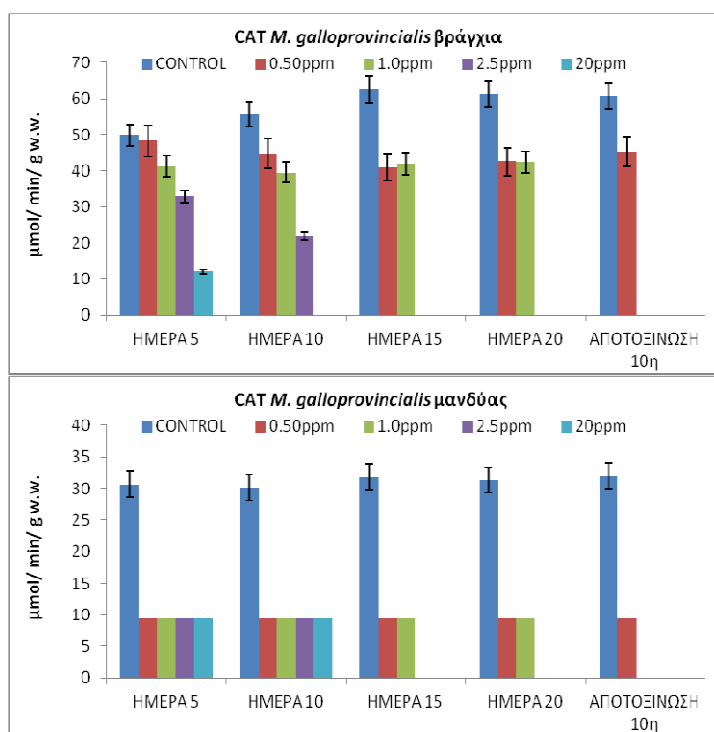


Σχήμα 120: Βox-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

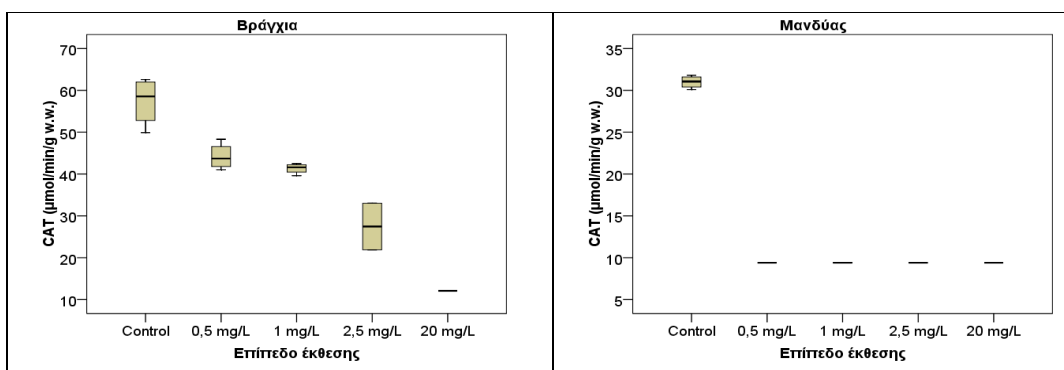
6.1.4 Καταλάση σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Η ενεργότητα της καταλάσης στα βράγχια των μυδιών αναφοράς αυξανόταν σε σχέση με την τιμή της ημέρας 0, από 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$ στα 61. Στο μανδύα, οι τιμές ήταν χαμηλότερες από των βραγγίων και παρέμειναν σχεδόν σταθερές (31-32 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$). Στο σώμα η καταλάση ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

Για κάθε επίπεδο έκθεσης, οι τιμές που προσδιορίστηκαν στα βράγχια ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες του μανδύα (Σχήμα 121). Στο σώμα, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί η καταλάση. Οι τιμές στο μανδύα ήταν σταθερές με το χρόνο έκθεσης, πολύ χαμηλές και ανεξάρτητες από το επίπεδο έκθεσης (Σχήμα 121, 122). Στα βράγχια των μυδιών, οι τιμές της καταλάσης μειώνονταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, με τιμές χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 121).



Σχήμα 121: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



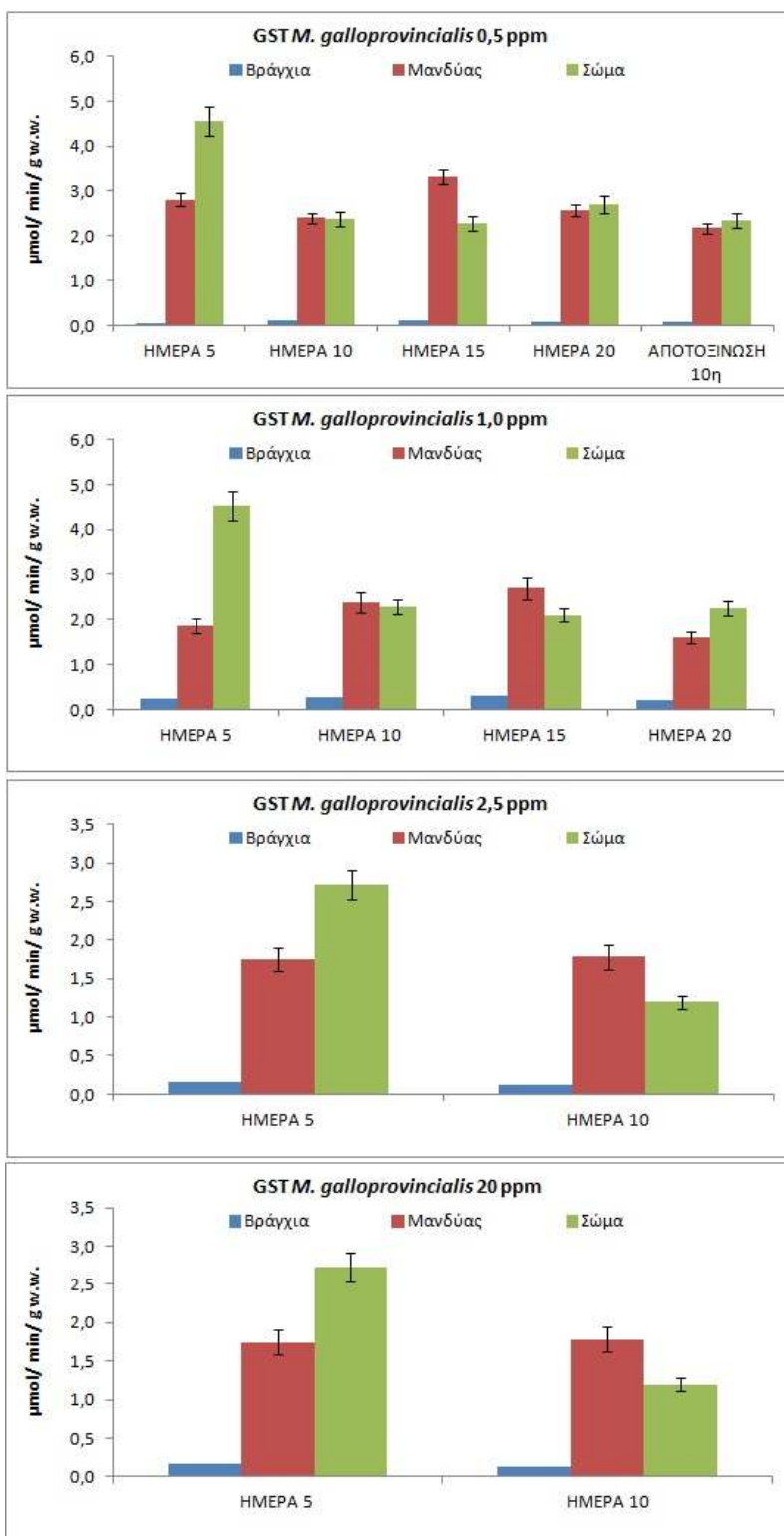
Σχήμα 122: Βox-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol/min/g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.1.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

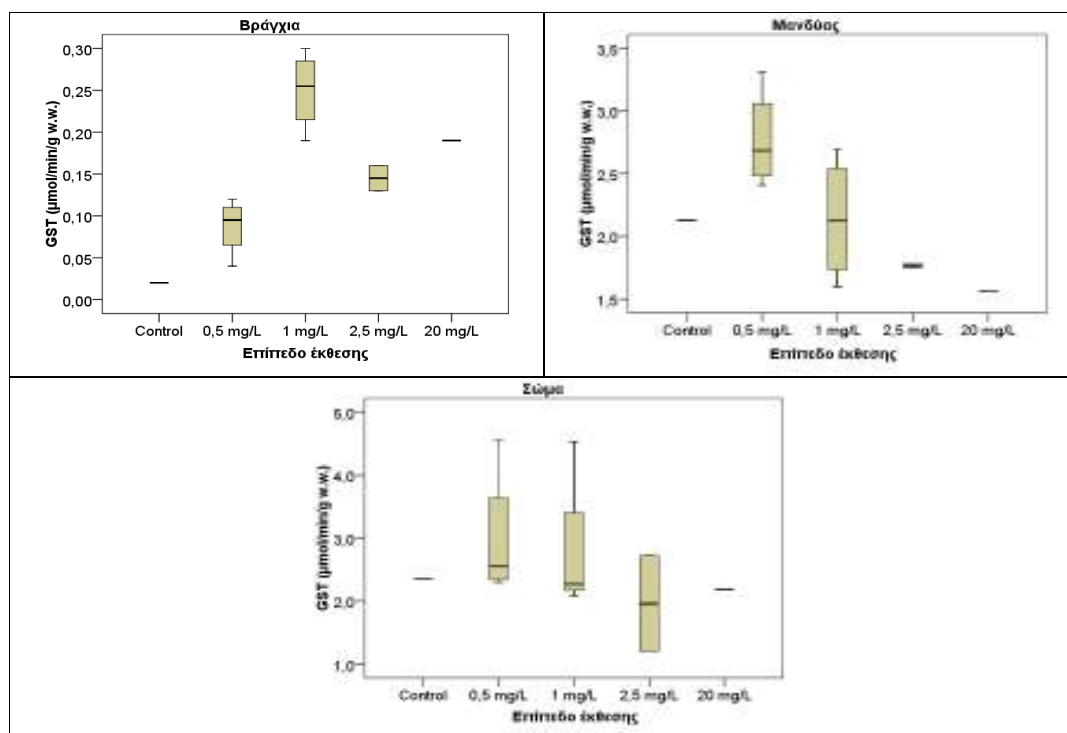
Η ενεργότητα της S μεταφοράσης της γλουταθειόνης σε όλους τους ιστούς των μυδιών αναφοράς παρέμεινε σταθερή σε σχέση με την τιμή που είχε στην αρχή του πειράματος, με τιμές 0,02 $\mu\text{mol/min/g w.w.}$ στα βράγχια, 2,13 στο μανδύα και 2,36 στο σώμα. Όπως προκύπτει, στα βράγχια οι τιμές ήταν 97 φορές χαμηλότερες από τις τιμές του μανδύα και 108 από του σώματος, γι' αυτό και βρέθηκε πως οι τιμές διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Στα βράγχια μετρήθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση καδμίου, και οι χαμηλότερες τιμές AChE και GST σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς κάτι που ίσως να αποτελεί ένδειξη κυτταρικής βλάβης²⁷².

Μεταξύ των ιστών, οι υψηλότερες τιμές GST για κάθε επίπεδο καδμίου, προσδιορίστηκαν στο μανδύα και στο σώμα (Σχήμα 123), οι οποίοι διέφεραν στατιστικά από τα βράγχια. Οι τιμές του ενζύμου στα βράγχια των οργανισμών (Σχήμα 124) ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς ($p < 0,05$), οι οποίες στα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης αυξάνονταν με το επίπεδο έκθεσης, ενώ στα δύο υπόλοιπα επίπεδα ήταν χαμηλότερες από των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 124 για το μανδύα και το σώμα των οργανισμών όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, η GST μειωνόταν, φτάνοντας για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα έκθεσης σε τιμές χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς.

Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης η τιμή της GST στο μανδύα και το σώμα μειώθηκε ώστε να επανέλθει στα φυσιολογικά της επίπεδα, ενώ στα βράγχια παρέμεινε σταθερή και μάλιστα με τιμές τριπλάσιες από του πληθυσμού αναφοράς.



Σχήμα 123: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



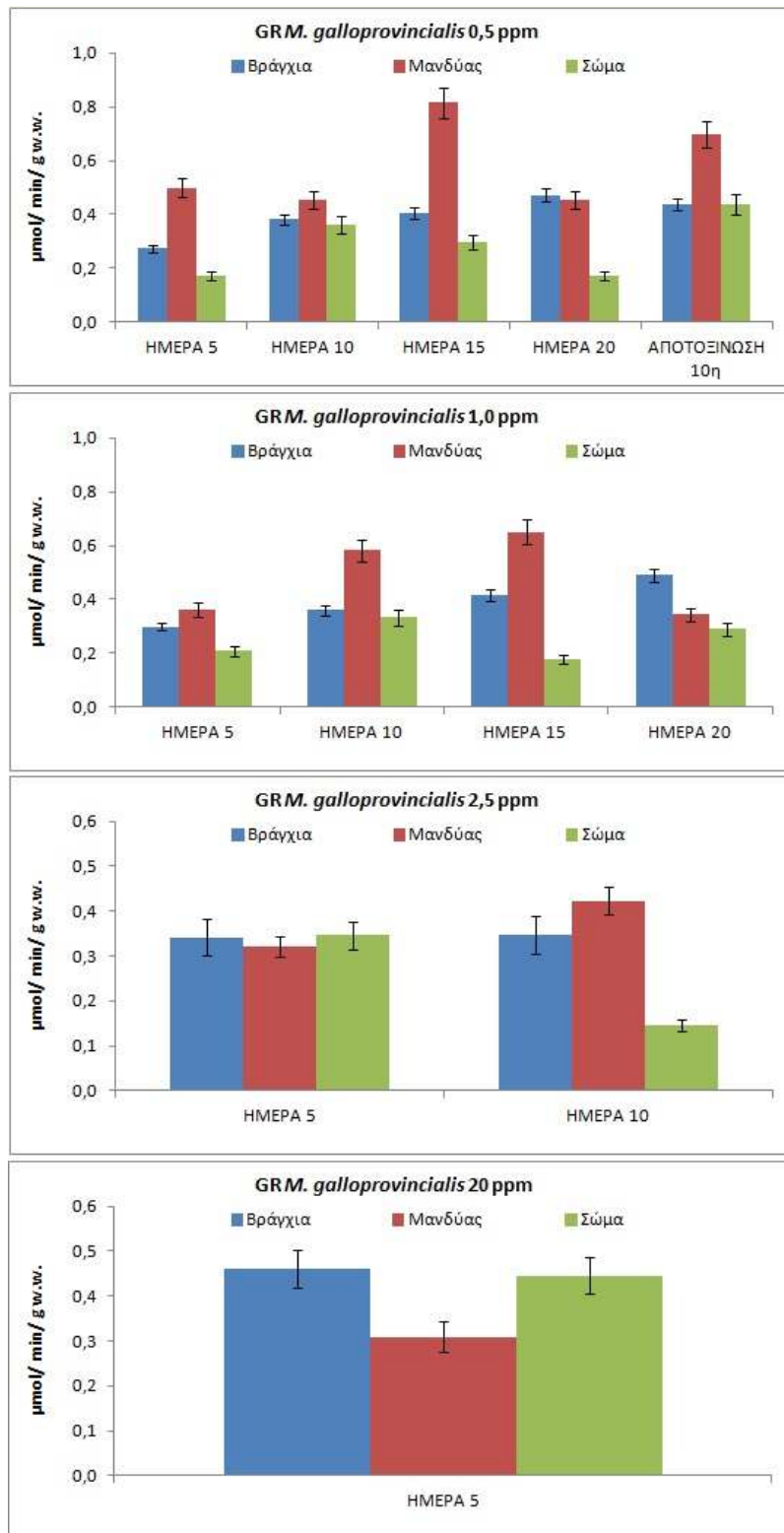
Σχήμα 124: Box-plots των επιπέδων της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.1.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

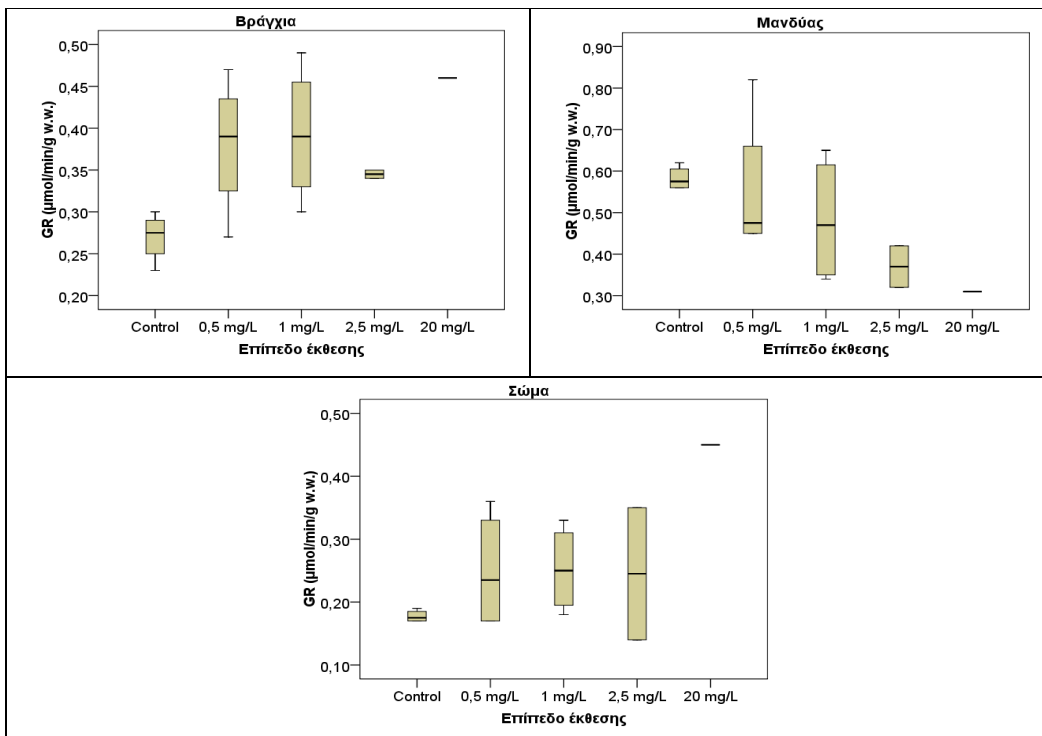
Η τάση του ενζύμου ανάμεσα στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς ήταν: μανδύας > βράγχια > σώμα. Οι τιμές της GR στο μανδύα και το σώμα του πληθυσμού αναφοράς ήταν σχεδόν σταθερές, ενώ στα βράγχια παρατηρήθηκε αύξηση της τάξης του 20% σε σχέση με την ημέρα 0. Η αύξηση της ενεργότητας της GR υποδηλώνει έκθεση σε ρύπους, καθώς τα φυσιολογικά επίπεδά της αυξάνονταν ώστε να μπορέσει να γίνει η αναγωγή της GSSG σε GSH. Αυτό έχει βρεθεί και από άλλους ερευνητές σε δίθυρα που έχουν εκτεθεί σε βαρέα μέταλλα και άλλους ρύπους^{232, 286, 288}.

Οι τιμές GR που προσδιορίστηκαν στα βράγχια και το σώμα των μυδιών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς για όλες τις μέρες έκθεσης. Για τα βράγχια, βρέθηκε επίσης ότι όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης αυξανόταν και η ενεργότητα του ενζύμου (Σχήμα 126). Οι τιμές στο μανδύα των οργανισμών αυξάνονταν όσο μειωνόταν το επίπεδο έκθεσης (Σχήμα 126), καταλήγοντας για τα επίπεδα 2,5 και 20 ppm σε τιμές πολύ χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς ($p < 0,05$).

Όπως και στον πληθυσμό αναφοράς, έτσι και για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα καδμίου οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο μανδύα και οι χαμηλότερες στο σώμα (Σχήμα 125). Στο επίπεδο 2,5 ppm την 5^η ημέρα όλοι οι ιστοί είχαν παρόμοιες τιμές ενζύμου, ενώ την 10^η, η τιμή του σώματος μειώθηκε πολύ. Στο επίπεδο 20 ppm Cd οι τιμές για τα βράγχια και το σώμα ήταν παρόμοιες μεταξύ τους, ελαφρά υψηλότερες από του μανδύα. Κατά την αποτοξίνωση, η ενεργότητα του ενζύμου αυξήθηκε στο μανδύα και το σώμα, μειώθηκε όμως στα βράγχια.



Σχήμα 125: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της αναγωγής της γλουταθειόνης (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 126: Βοx-plots των επιπέδων της αναγωγάσης της γλουταθειόνης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.1.7 Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Όλες τις ημέρες δειγματοληψίας τα βράγχια και ο μανδύας είχαν παρόμοιες τιμές μεταλλοθειονινών μεταξύ τους, οι οποίες ήταν χαμηλότερες και στατιστικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες του σώματος και όλες ήταν σταθερές με την πάροδο των ημερών, με τιμές για τα βράγχια και το μανδύα $0,05 \mu\text{mol}/\text{g w.w}$. και στο σώμα $0,07 \mu\text{mol}/\text{g w.w}$.

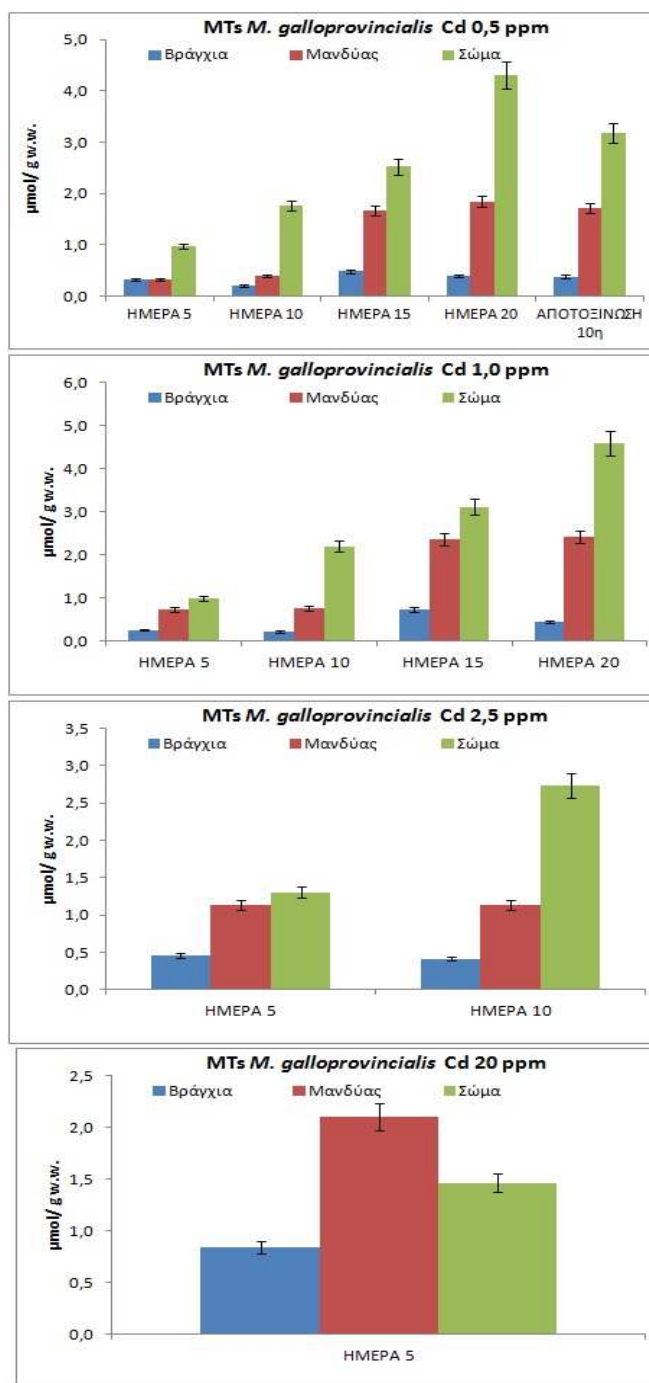
Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, εκτός από το υψηλότερο (Σχήμα 127), παρατηρήθηκε πως τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών, ενώ το σώμα τις υψηλότερες. Υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών, για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm καδμίου προσδιορίστηκαν στο μανδύα και χαμηλότερες στα βράγχια. Ακριβώς την αντίθετη τάση είχε το κάδμιο.

Μέγιστη τιμή στους ιστούς των οργανισμών, προσδιορίστηκαν στο τέλος της περιόδου έκθεσης (Σχήμα 127). Η τάση των μεταλλοθειονινών σε κάθε ιστό με τις μέρες έκθεσης συσχετίστηκε θετικά με τις τιμές του καδμίου. Από τον Πίνακα 52 παρατηρείται ότι σε όλους τους ιστούς η αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ήταν πολύ μεγάλη σε σχέση με τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς και πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης και οι μέρες έκθεσης η αύξηση ήταν μεγαλύτερη. Η μεγαλύτερη αύξηση στα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης παρατηρήθηκε στο σώμα των οργανισμών, ενώ στα δύο υψηλότερα στο μανδύα.

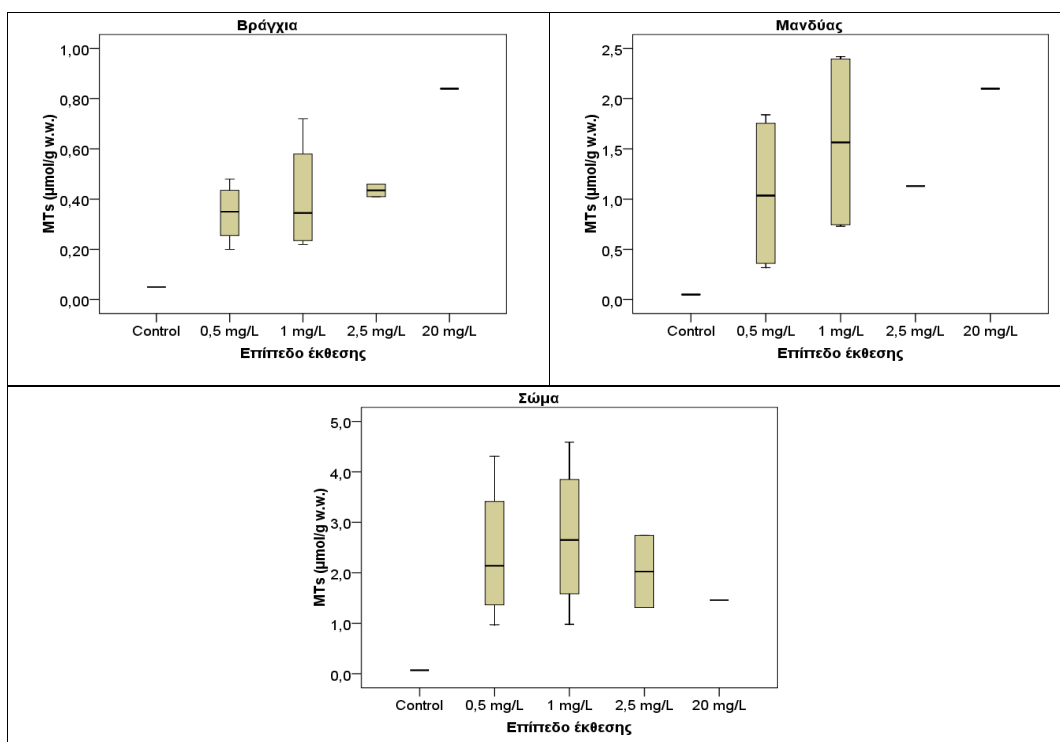
Κατά την αποτοξίνωση, οι τιμές των μεταλλοθειονινών παρέμειναν σχεδόν σταθερές στα βράγχια και το μανδύα, ενώ στο σώμα η τιμή μειώθηκε, παραμένοντας όμως κατά 47 φορές υψηλότερη από του πληθυσμού αναφοράς.

Πίνακας 52: Αύξηση των επιπέδων των μεταλλοθειονινών (C_{DayX}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς

	0,50 ppm		1,0 ppm		2,5 ppm		20 ppm	
	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20
βράγχια	6,8	8,6	5,5	9,7	10		18	
μανδύας	7,0	40	16	53	25		46	
σώμα	14	63	14	67	19		21	



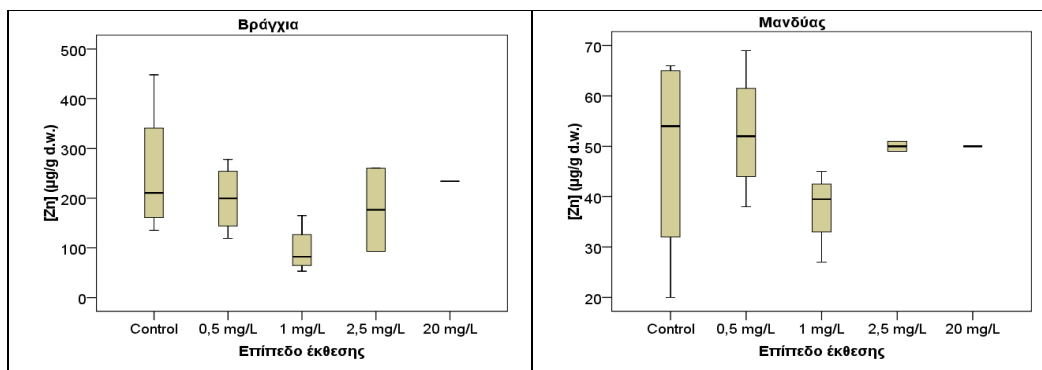
Σχήμα 127: Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 128: Box-plots των επιπέδων των μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.1.8 Ψευδάργυρος σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Τόσο στον πληθυσμό αναφοράς, όσο και σε όλα τα επίπεδα έκθεσης τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες τιμές ψευδαργύρου και ο μανδύας τις χαμηλότερες. Διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων του μετάλλου μεταξύ των επιπέδων έκθεσης δεν προέκυψε, αν και στα βράγχια φάνηκε τάση μείωσης με αύξηση του επιπέδου έκθεσης (Σχήμα 129).



Σχήμα 129: Box-plots των επιπέδων των συγκεντρώσεων του ψευδαργύρου ($\mu\text{g/g d.w.}$) σε α) στα βράγχια, β) στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου

6.1.9 Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Για τον πληθυσμό αναφοράς οι τιμές ολικής πρωτεΐνης δεν μεταβλήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, με τιμές 8,6 mg/ml για τα βράγχια, 23 για το μανδύα και 13 για το σώμα. Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, εκτός από το υψηλότερο παρατηρήθηκε πως τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες

τιμές και ο μανδύας τις υψηλότερες. Μέγιστη τιμή για τα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα έκθεσης, ενώ στο μανδύα και στο σώμα, την 15^η. Για όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 και 2,5 ppm Cd μέγιστη τιμή ολικής πρωτεΐνης προσδιορίστηκε την 5^η ημέρα έκθεσης.

6.1.10 Συσχέτιση καδμίου με βιοδείκτες

Συσχέτιση (Pearson correlation) όλων των τιμών του καδμίου, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε έναν από τους ιστούς, με τους παρακάτω βιοδείκτες, για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% εμφάνισε τις εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακες 53-55):

- αρνητική συσχέτιση με την ακετυλοχολινεστεράση σε όλους τους ιστούς των οργανισμών.
- θετική συσχέτιση με την λιπιδική υπεροξειδωση σε όλους τους ιστούς των οργανισμών.

6.1.11 Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Επειδή οι βιοδείκτες συσχετίζονται με το κάδμιο, εξετάστηκε και η μεταξύ τους συσχέτιση ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε ιστό, και επίπεδο εμπιστοσύνης >95%. Στόχος της εύρεσης συσχετίσεων μεταξύ των τιμών των βιοδεικτών ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει κοινή συμπεριφορά-τάση των βιοδεικτών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο τρόπος αντίδρασης στην έκθεση σε κάδμιο είναι παρόμοιος. Έτσι προέκυψαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις:

- θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, με την GST στα βράγχια των οργανισμών.
- θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με τις μεταλλοθειονίνες για το μανδύα και το σώμα των οργανισμών.
- θετική συσχέτιση της GST με την GR για το μανδύα των οργανισμών

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

Οι μεταλλοθειονίνες είναι ένας αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων που λειτουργεί στην αιτία (είσοδος μετάλλου στους οργανισμούς) καθώς παράγονται όταν εισέρχονται μέταλλα στους ιστούς. Σε κάθε ιστό παρατηρείται αύξηση των μεταλλοθειονινών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο αμυντικός μηχανισμός βρίσκεται σε λειτουργία. Προφανώς όμως δεν επαρκεί, ή δεν είναι αρκετά αποτελεσματικός, καθώς οι μετρήσεις των βιοδεικτών (AChE, GST, GR, CAT, LPO) φαίνεται πως επηρεάζονται από τα βαρέα μέταλλα.

Όποιος ιστός και να χρησιμοποιηθεί ως ιστός-ελέγχου, η ακετυλοχολινεστεράση και η λιπιδική υπεροξειδωση είναι οι καταλληλότερος βιοδείκτης.

Πίνακας 53: Πίνακας συχτίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών

	Cd	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Cd	1							
LPO	0,830**	1						
GST	0,786**	0,729*	1					
GR	0,247	0,342	0,164	1				
CAT	0,202	0,315	-0,137	-0,215	1			
MTs	0,334	0,029	0,281	0,525	-0,599	1		
Zn	-0,516	-0,691*	-0,510	-0,451	-0,108	0,077	1	
Ολική πρωτεΐνη	-0,150	-0,172	-0,329	-0,183	-0,088	-0,004	0,534	1

Πίνακας 54: Πίνακας συχτίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών

	Cd	LPO	GST	GR	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Cd	1						
LPO	0,722*	1					
GST	-0,201	-0,429	1				
GR	0,131	-0,163	0,895**	1			
MTs	0,412	0,714*	-0,141	0,051	1		
Zn	-0,195	-0,084	0,516	0,525	0,222	1	
Ολική πρωτεΐνη	-0,341	-0,449	0,478	0,472	-0,121	0,077	1

Πίνακας 55: Πίνακας συχτίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών

	Cd	LPO	GST	GR	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Cd	1						
LPO	0,891**	1					
GST	-0,400	-0,448	1				
GR	-0,432	-0,213	-0,211	1			
MTs	0,586	0,746**	-0,508	-0,280	1		
Zn	-0,440	-0,356	0,259	-0,057	0,015	1	
Ολική πρωτεΐνη	-0,225	-0,018	0,207	0,040	-0,352	-0,110	1

* δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

** δηλώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

6.2 Έκθεση *Callista chione* σε κάδμιο

6.2.1 Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα καδμίου στο θαλασσινό νερό

Η συγκέντρωση του καδμίου την ημέρα που έφτασαν στο εργαστήριο οι οργανισμοί ήταν 0,45 μg/g d.w. και 0,24 μg/g w.w. (ολικός οργανισμός). Σύμφωνα με την νομοθεσία⁶⁸, το όριο για το κάδμιο στα θαλάσσια δίθυρα είναι 1,0 mg/g w.w. Άρα οι γυαλιστερές που συλλέχθηκαν από τον Σαρωνικό κόλπο ήταν κάτω από τα επιτρεπτά όρια για την ανθρώπινη κατανάλωση.

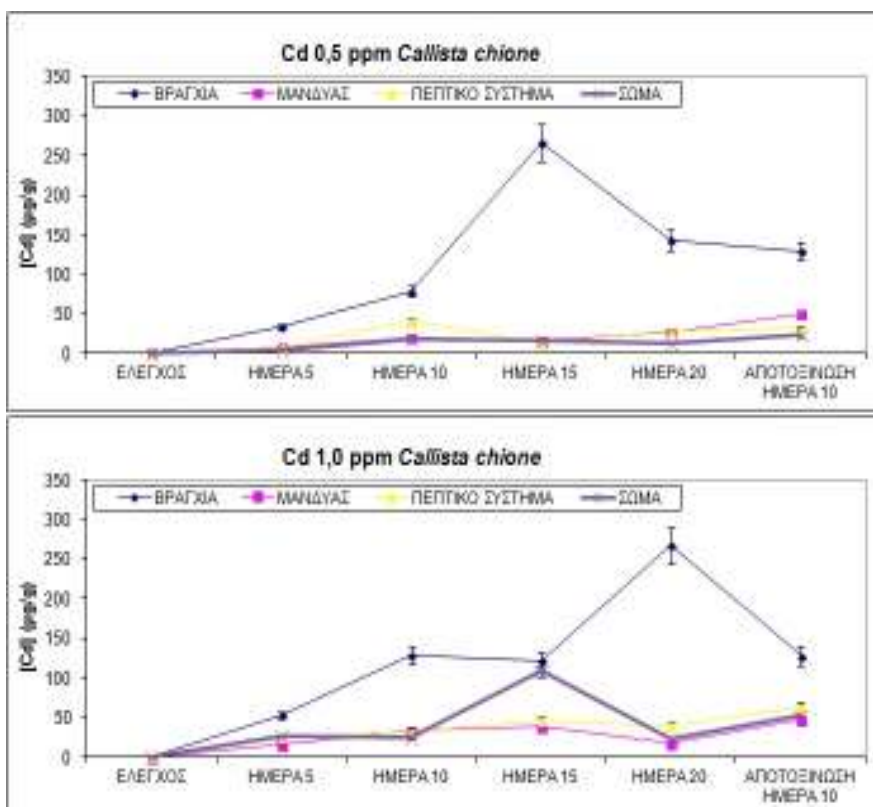
Οι συγκεντρώσεις του καδμίου στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς κατά την διάρκεια του πειράματος μειώνονταν, εκτός από τα βράγχια. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,53-0,84 μg/g d.w. για

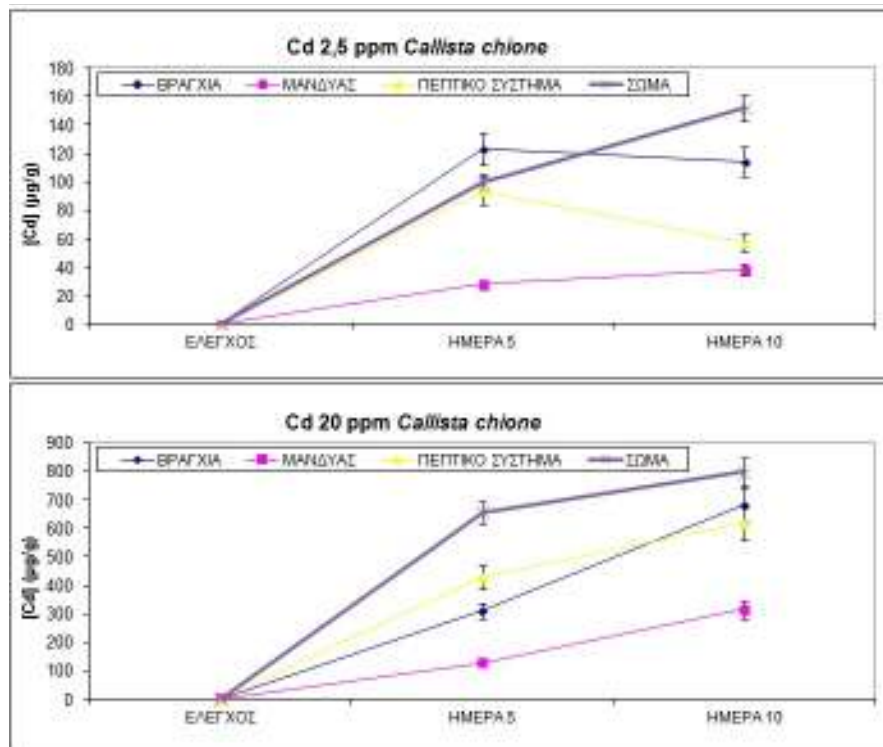
τα βράγχια, 0,52-0,31 για το μανδύα και 0,36-0,10 για το σώμα. Η αύξηση στα βράγχια πιθανά οφειλόταν σε μεταφορά του Cd από τους υπόλοιπους ιστούς ώστε να αποτοξινωθεί ο οργανισμός.

Από το Σχήμα 130 φαίνεται πως οι γυαλιστερές που εκτέθηκαν σε κάδμιο συγκέντρωσης 0,5 και 1,0 ppm, ανταποκρίθηκαν στην αύξηση συγκέντρωσης μετάλλου στο περιβάλλον τους, με τα βράγχια να προσροφούν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Οι γυαλιστερές που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα καδμίου λόγω της πολύ μεγάλης συγκέντρωσης μετάλλου άντεξαν ως την 10^η ημέρα του πειράματος. Από το Σχήμα 130 φαίνεται ότι όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, ο ιστός που προσροφούσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετάλλου ήταν το σώμα.

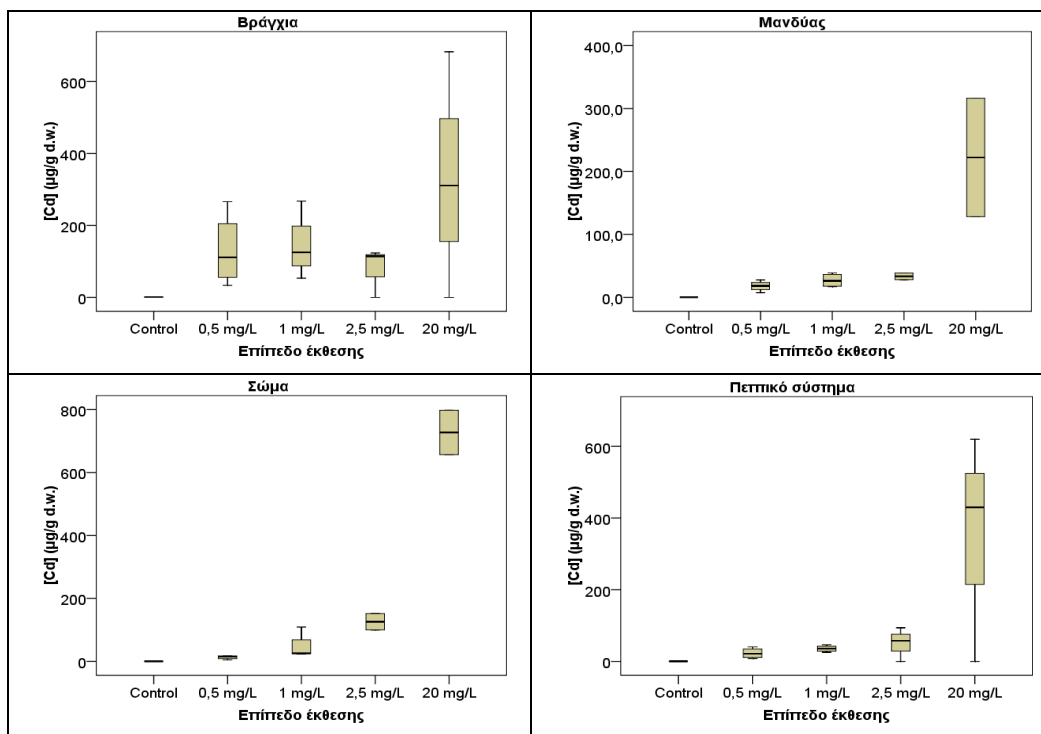
Όπως προκύπτει από το Σχήμα 131 και στους τέσσερις ιστούς, τα χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης είχαν παρόμοιες τιμές καδμίου μεταξύ τους, ενώ το επίπεδο 20 ppm είχε πολύ υψηλότερες. Η συγκέντρωση καδμίου ήδη από την 5^η ημέρα έκθεσης ήταν μεγαλύτερη από την τιμή που είχε προσδιοριστεί στους ιστούς των γυαλιστερών κατά την άφιξή τους στο εργαστήριο κατά 63-583 φορές για τα βράγχια, 15-246 για το μανδύα, 19—1.010 για το πεπτικό σύστημα και 12-1.809 φορές για το σώμα των οργανισμών ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης. Γενικά όμως, από το Σχήμα 130 φαίνεται ότι η πρόσληψη του μετάλλου από τους ιστούς των οργανισμών δεν ήταν γραμμική.

Κατά την αποτοξίνωση των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm Cd παρατηρήθηκε μείωση στην μετρούμενη συγκέντρωση μετάλλου στα βράγχια των οργανισμών, ενώ αύξηση παρατηρήθηκε στους υπόλοιπους ιστούς. Η μείωση ήταν 10% για τα βράγχια των πρώτων, 50% για τα βράγχια των δεύτερων, ενώ η αύξηση στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm Cd ήταν 45% και 60% αντίστοιχα, ενώ στο πεπτικό σύστημα 12% και 39% αντίστοιχα. Αυτό συνέβη γιατί πιθανά κατά την αποτοξίνωση μεταφέρθηκε μέταλλο από τα βράγχια τόσο προς το περιβάλλον τους, όσο και προς τους υπόλοιπους ιστούς.





Σχήμα 130: Χρονική μεταβολή συγκεντρώσεων καδμίου (µg/g d.w.) στους ιστούς των γαλιστερών



Σχήμα 131: Box-plots των συγκεντρώσεων του καδμίου (µg/g d.w.) στους ιστούς των γαλιστερών

Κατανομή καδμίου μεταξύ των ιστών των οργανισμών

Η ποσοστιαία κατανομή του καδμίου μεταξύ των ιστών των οργανισμών που εκτέθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα καδμίου δεν παρουσίασε κάποια συγκεκριμένη τάση με τον χρόνο έκθεσης.

Γενικά, τα βράγχια είχαν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα μετάλλου σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς, στο χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης, ενώ στα υψηλότερα επίπεδα, αυξήθηκε η περιεκτικότητα στο σώμα, καταλήγοντας να είναι ο ιστός με τις υψηλότερες περιεκτικότητες.

Συντελεστής βιοσυσσώρευσης

Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης ($C_{\text{μετρ}}-C_{\text{αναφ}}/C_{\text{νερού}}$) στα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης ήταν μεγαλύτερος στα βράγχια των οργανισμών σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς, ενώ στα δύο υψηλότερα επίπεδα ήταν μεγαλύτερος στο σώμα. Στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης κυμάνθηκε από 65-286, ενώ εκείνων που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd κυμάνθηκε από 52-267. Στους υπόλοιπους ιστούς, και για τα δύο επίπεδα έκθεσης ήταν μικρότερος από 55.

Γενικά, παρατηρήθηκε αύξηση του συντελεστή βιοσυσσώρευσης με την πάροδο των ημερών έκθεσης σε κάδμιο. Λόγω του τρόπου υπολογισμού του συντελεστή βιοσυσσώρευσης, όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, μειωνόταν ο συντελεστής.

6.2.2 Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Στον Πίνακα 56 φαίνεται ότι με την πάροδο των ημερών σε όλους τους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς η συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΐδης (ως nmol MDA/g w.w.) μειωνόταν, πιθανώς λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στο νερό των Χανίων σε σχέση με της Ελευσίνας. Από τον ίδιο Πίνακα και έπειτα από στατιστική σύγκριση, η τάση μεταξύ των ιστών ήταν: σώμα > μανδύας > πεπτικό σύστημα > βράγχια.

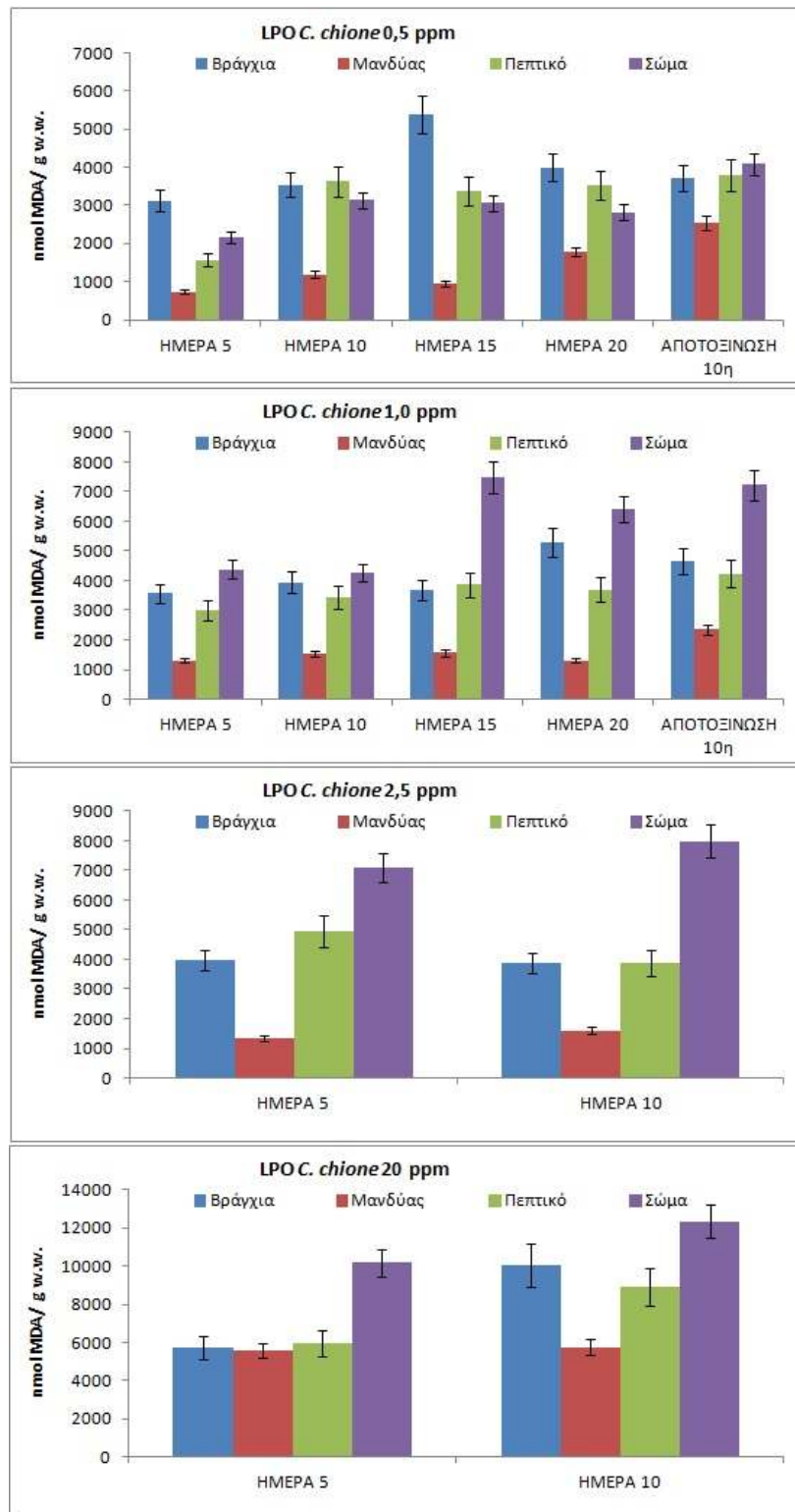
Πίνακας 56: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων MDA (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς

	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20	αποτοξίνωση DAY 10
Βράγχια	514	510	512	509	501
Μανδύας	630	627	621	620	610
Πεπτικό	558	558	548	540	528
Σώμα	635	635	630	626	615

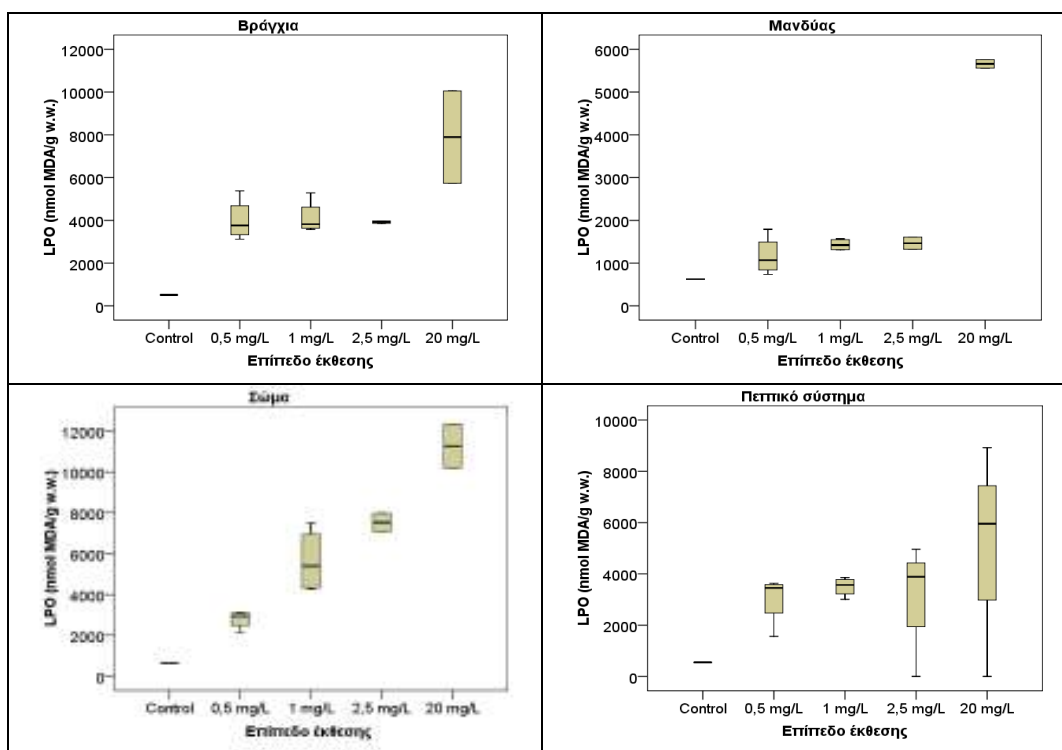
Οι τιμές μηλονικής διαλδεΐδης που μετρήθηκαν στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου, ήταν υψηλότερες από τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς ήδη από την 5^η ημέρα έκθεσης, κατά 6-11 φορές για τα βράγχια και 3-11 φορές για το πεπτικό σύστημα και 3-16 φορές για το σώμα, ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης. Στα βράγχια, το πεπτικό σύστημα και το σώμα, αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης της μηλονικής διαλδεΐδης, ενώ στο μανδύα οι τιμές για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν στα τρία χαμηλότερα επίπεδα, ήταν παρόμοιες μεταξύ τους, χαμηλότερες από του επιπέδου 20 ppm (Σχήμα 133).

Για το χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης, οι υψηλότερες τιμές μηλονικής διαλδεΐδης προσδιορίστηκαν στα βράγχια των οργανισμών και οι πιο χαμηλές στο μανδύα. Για τα υπόλοιπα επίπεδα, οι πιο υψηλές τιμές προσδιορίστηκαν στο σώμα των οργανισμών, ενώ οι χαμηλότερες στο μανδύα (Σχήμα 132). Οι τιμές της λιπιδικής υπεροξειδωσης για κάθε ιστό και επίπεδο έκθεσης είχαν την ίδια τάση με την συγκέντρωση καδμίου, κάτι που αποδείχτηκε και στατιστικά και δείχνει τη σχέση του μετάλλου με την βλάβη που προκλήθηκε.

Κατά την αποτοξίνωση, στο επίπεδο 0,5 και 1,0 ppm Cd παρατηρήθηκε μείωση της τιμής της μηλονικής διαλδεΰδης σε σχέση με την 20^η ημέρα έκθεσης μόνο στα βράγχια, ενώ στους υπόλοιπους ιστούς παρατηρήθηκε αύξηση, κάτι που οφείλεται στην αύξηση της συγκέντρωσης καδμίου στους παραπάνω ιστούς (βλ. υποκεφάλαιο 6.2.1)



Σχήμα 132: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των γαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



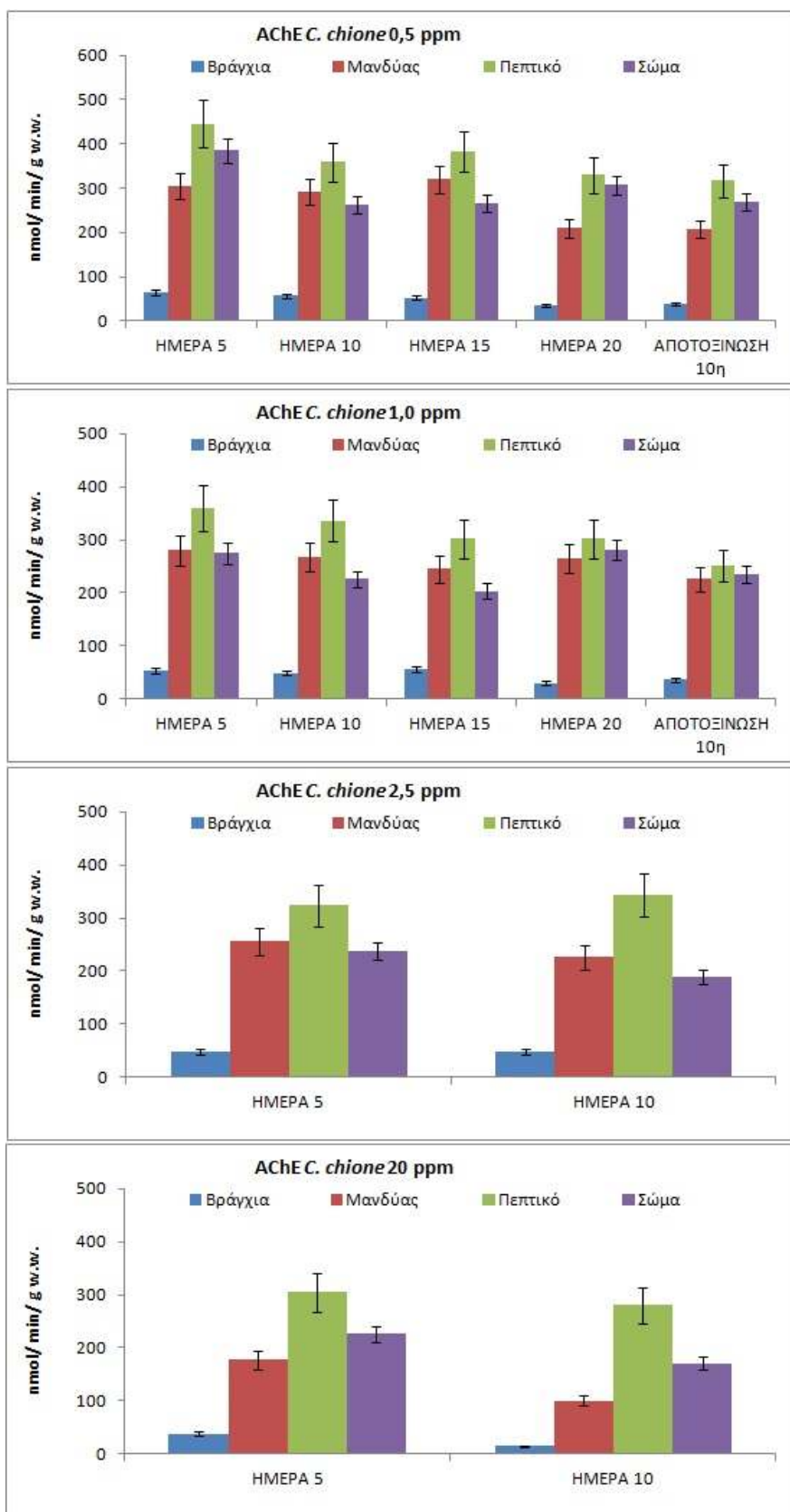
Σχήμα 133: Βox-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεϋδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.2.3 Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

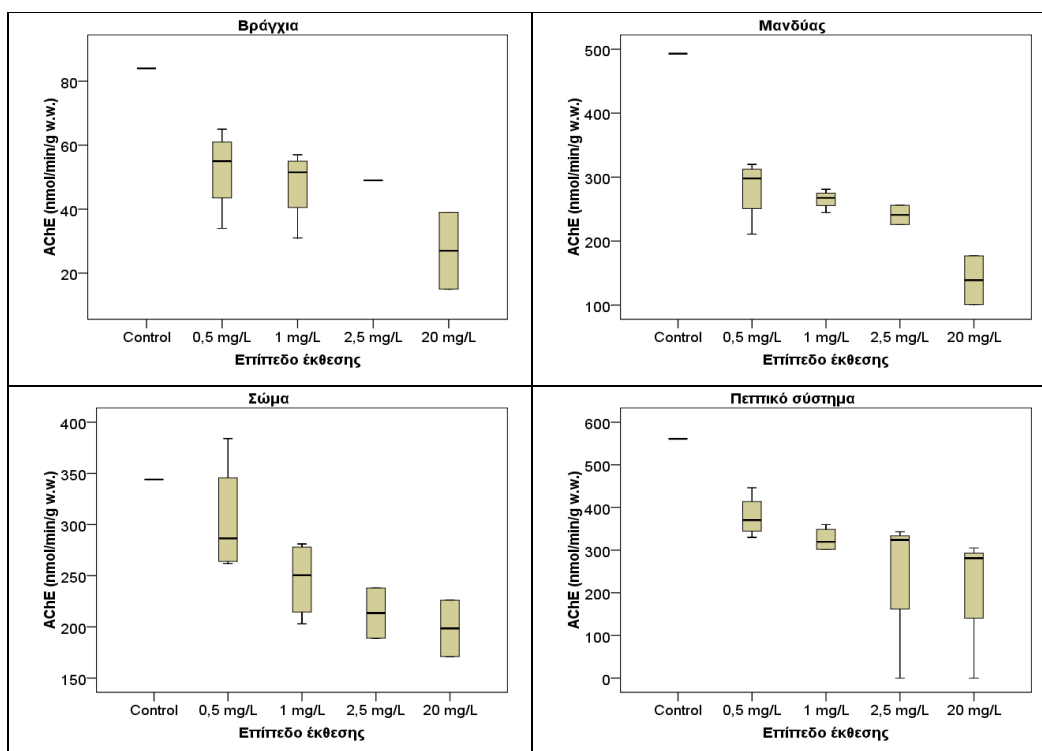
Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης στον πληθυσμό αναφοράς παρέμεινε σταθερή με την πάροδο των ημερών σε όλους τους ιστούς, με τιμές 84 ηmol/min /g w.w. για τα βράγχια, 493 στο μανδύα, 561 στο πεπτικό σύστημα και 344 στο σώμα. Στα βράγχια, τα οποία είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση καδμίου, προσδιορίστηκε η χαμηλότερη ενεργότητα ενζύμου, κάτι που πιθανά να υποδηλώνει την νευροτοξικότητα του μετάλλου στον ιστό αυτό.

Σε όλους τους ιστούς και επίπεδα έκθεσης, η ακετυλοχολινεστεράση είχε τιμές στατιστικά χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 135), οι οποίες μειώνονταν όσο αυξανόταν το επίπεδο και οι ημέρες έκθεσης, καταλήγοντας την 20^η ημέρα σε τιμές μειωμένες σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του πληθυσμού αναφοράς κατά 43-83% στα βράγχια, 54-80% στο μανδύα, 39-55% στο πεπτικό σύστημα και 32-50% στο σώμα. Η μείωση της ενεργότητας του ενζύμου με την πάροδο των ημερών έκθεσης σε κάδμιο ήταν σχετικά γραμμική και βρέθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση με τις τιμές του καδμίου.

Μεταξύ των ιστών, η τάση ήταν η εξής: πεπτικό σύστημα > σώμα ≈ μανδύας > βράγχια (Σχήμα 134). Κατά την αποτοξίνωση οι οργανισμοί δεν φαίνεται ξεκάθαρα να ανακάμπτουν, καθώς η μείωση της ενεργότητας του ενζύμου συνεχίστηκε σε όλους τους ιστούς, εκτός από τα βράγχια, στα οποία η τιμή που προσδιορίστηκε ήταν ελαφρά υψηλότερη από της 20^{ης} ημέρας έκθεσης.



Σχήμα 134: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 135: Βox-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

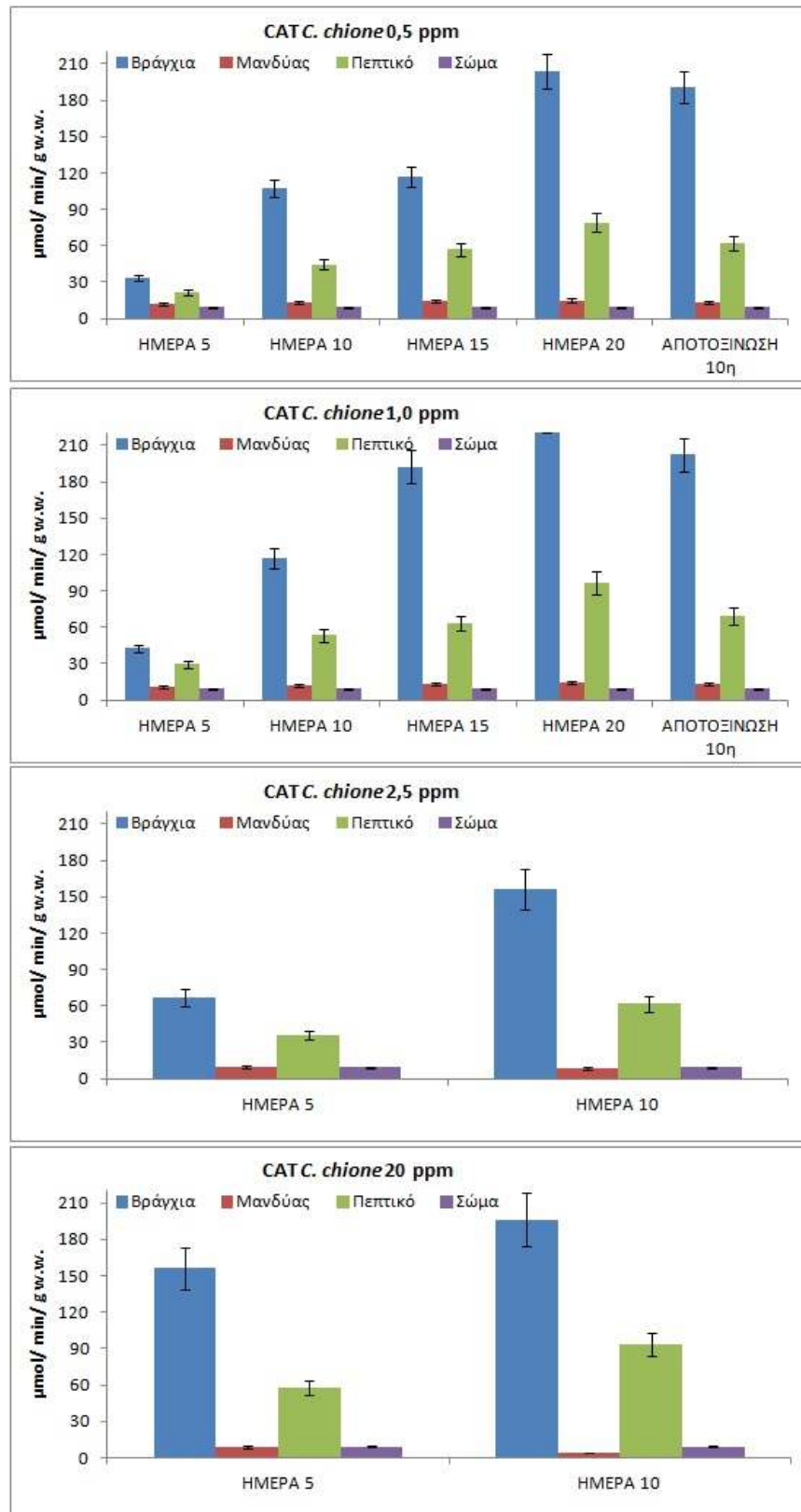
6.2.4 Καταλάση σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Η ενεργότητα της καταλάσης στον πληθυσμό αναφοράς, με την πάροδο των ημερών σε όλους τους ιστούς, ήταν σχεδόν σταθερή, ενώ στο πεπτικό σύστημα αυξήθηκε κατά 28%. Οι τιμές ήταν 29-22 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$ στα βράγχια, 9,7-11 στο μανδύα, 15-19 στο πεπτικό σύστημα και 35-36 στο σώμα.

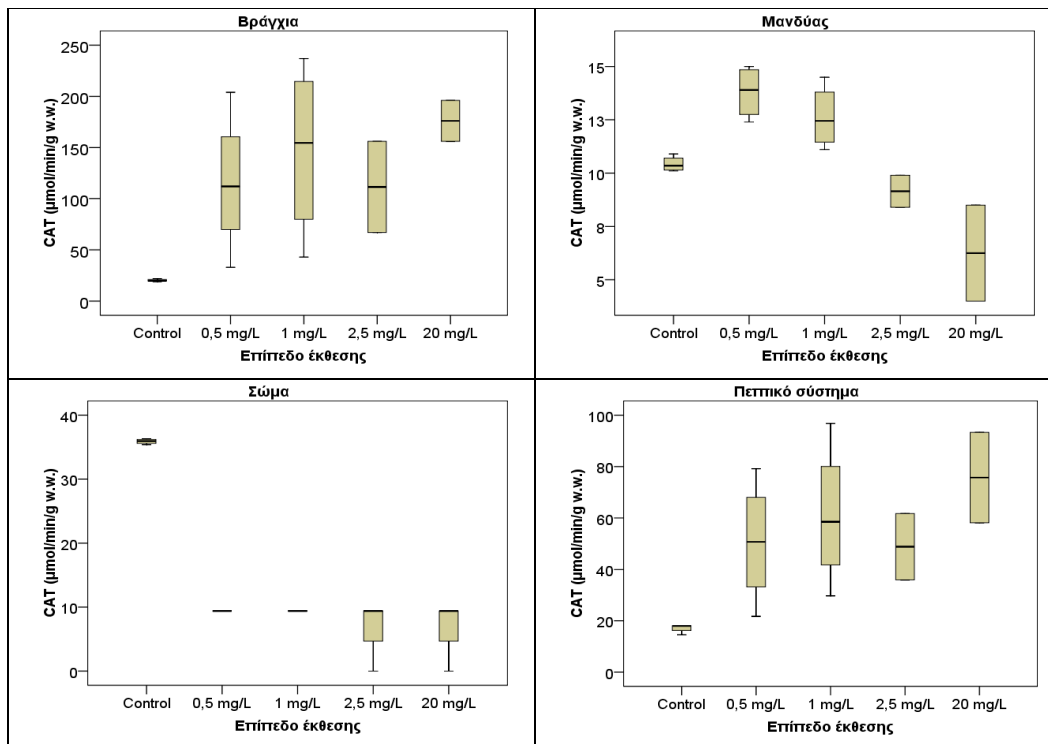
Από τους ιστούς μελέτης, οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στα βράγχια και οι χαμηλότερες στο σώμα. Η τάση για κάθε επίπεδο έκθεσης ήταν: βράγχια > πεπτικό σύστημα > μανδύας \approx σώμα. Για όλους τους ιστούς, εκτός από το σώμα, οι τιμές της καταλάσης αυξάνονταν με τις ημέρες έκθεσης, με μέγιστη τιμή στο τέλος του πειράματος έκθεσης και συνακόλουθη μείωση κατά την αποτοξίνωση (Σχήμα 136).

Η ενεργότητα της καταλάσης στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς, οι οποίες αυξάνονταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης (Σχήμα 137). Η τιμή της καταλάσης στο σώμα των οργανισμών σε όλα τα επίπεδα έκθεσης ήταν χαμηλότερη από του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 137) και μάλιστα παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η ενεργότητα της καταλάσης στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο χαμηλότερα επίπεδα είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς, οι οποίες αυξάνονταν με τις μέρες έκθεσης. Υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd, από εκείνους που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm. Άρα παρατηρείται πως η καταλάση στο μανδύα των οργανισμών ενεργοποιούνταν όταν τα δίθυρα εκτίθονταν σε κάδμιο, η μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου στο νερό προκάλεσε σταδιακή μείωση της ενεργότητας του

ενζύμου, φτάνοντας σε τιμές χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα καδμίου (Σχήμα 137).



Σχήμα 136: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 137: Βox-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

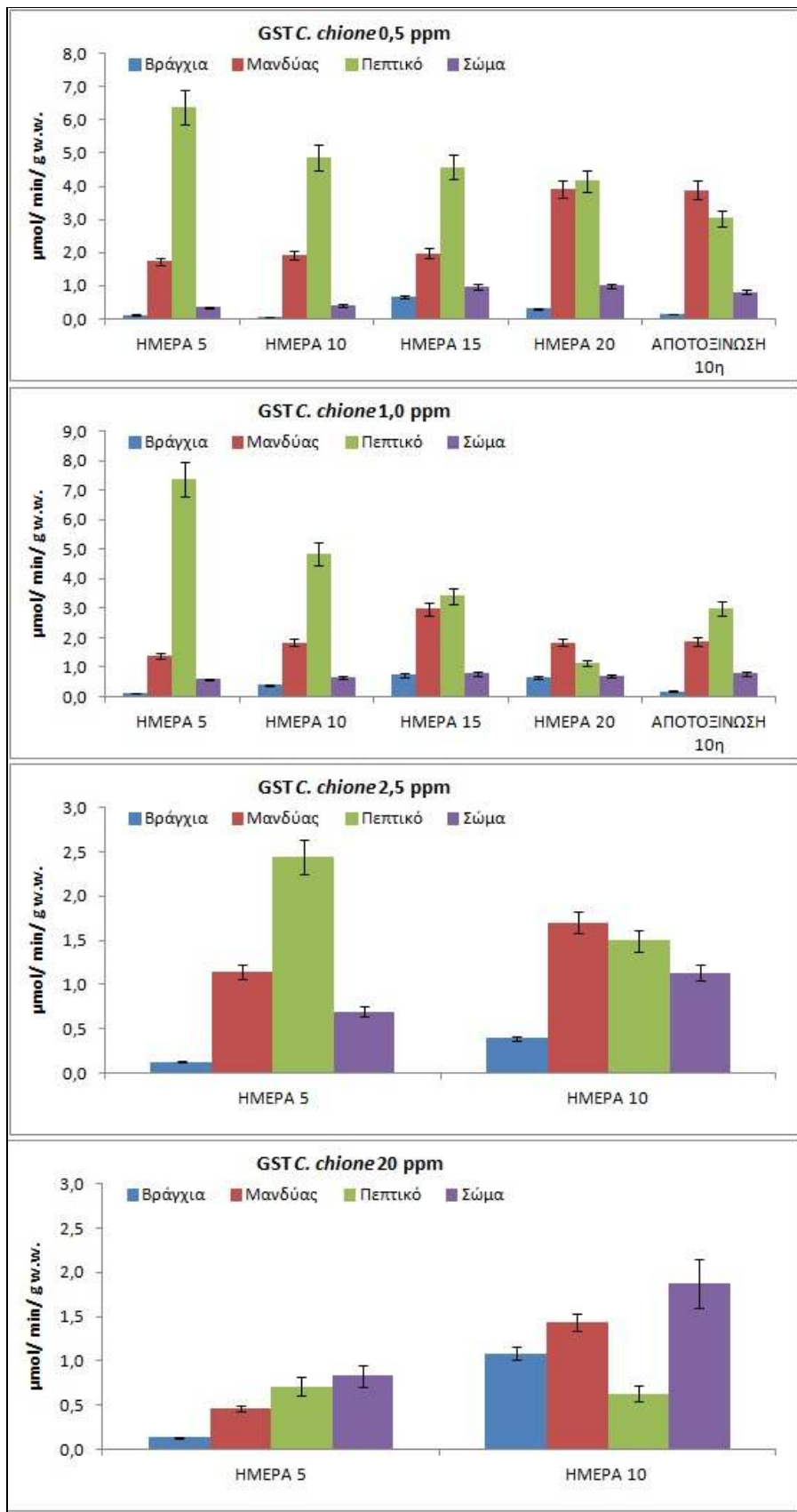
6.2.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Με την πάροδο των ημερών, η ενεργότητα της S μεταφοράσης της γλουταθειόνης στο μανδύα και στο σώμα του πληθυσμού αναφοράς, ήταν σταθερή, ενώ στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα παρουσίασε αύξηση κατά 35 και 6% αντίστοιχα. Οι τιμές ήταν 0,13-0,20 μmol/min/g w.w. στα βράγχια, 1,77 στο μανδύα, 1,98-2,10 στο πεπτικό σύστημα και 0,33 στο σώμα.

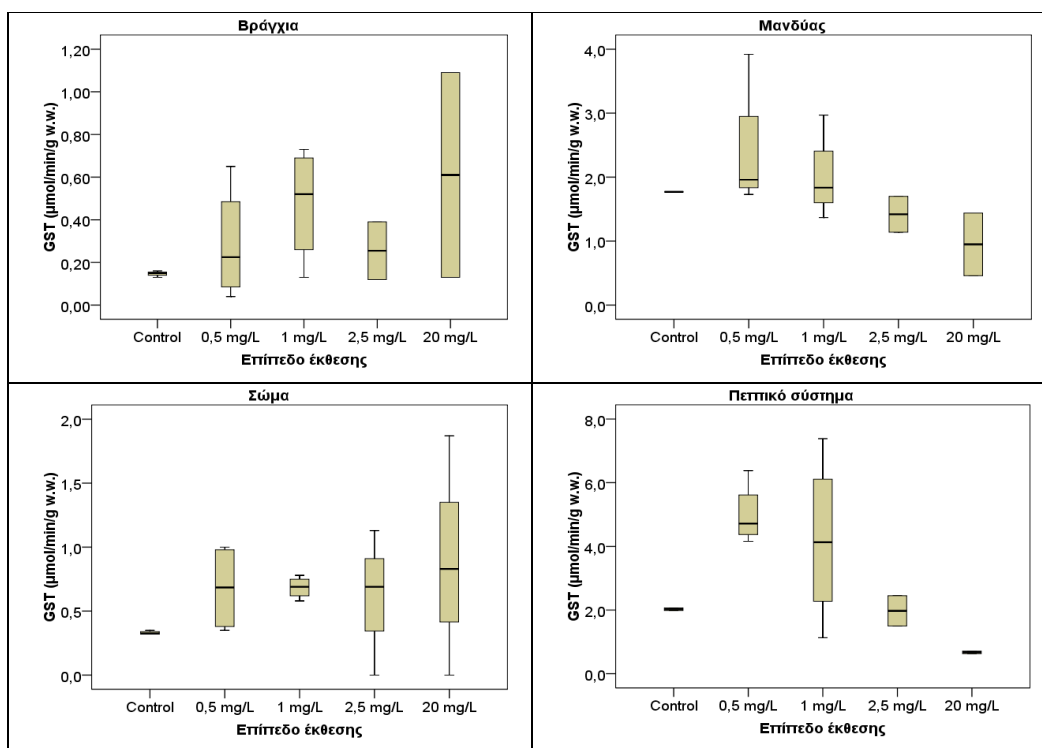
Οι τιμές GST που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm Cd, ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 139). Το ίδιο ισχύει και για τα βράγχια και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 και 20 ppm μετάλλου (Σχήμα 139).

Η τάση της GST για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης ήταν η εξής: πεπτικό σύστημα > μανδύας ≥ σώμα ≈ βράγχια (Σχήμα 138). Μεταξύ των ιστών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd, τις υψηλότερες τιμές είχε το πεπτικό σύστημα την 5^η ημέρα και ο μανδύας την 10^η, ενώ για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd, τις υψηλότερες τιμές είχε το σώμα (Σχήμα 138).

Κατά την αποτοξίνωση, για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd, η τιμή της GST μειώθηκε σε όλους τους ιστούς, παραμένοντας όμως υψηλότερη από του πληθυσμού αναφοράς, ενώ στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd αυξήθηκε, εκτός από τα βράγχια, φτάνοντας τα επίπεδα του πληθυσμού αναφοράς.



Σχήμα 138: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 139: Box-plots των επιπέδων της GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.2.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

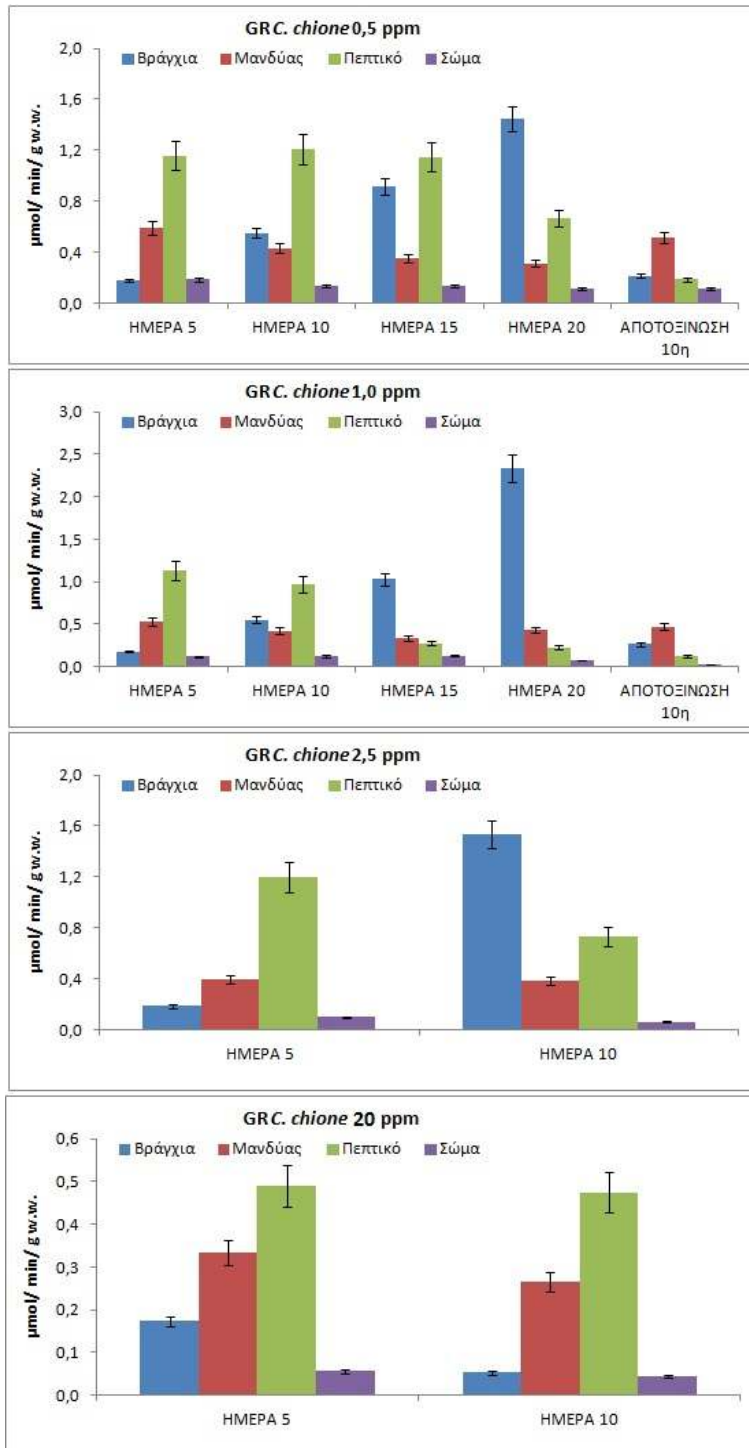
Η ενεργότητα της GR στον πληθυσμό αναφοράς παρέμεινε σταθερή με την πάροδο των ημερών σε όλους τους ιστούς, με τιμές $0,18 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$ στα βράγχια, $0,71$ στο μανδύα, $1,01$ στο πεπτικό σύστημα και $0,11$ στο σώμα.

Οι τιμές GR που προσδιορίστηκαν στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο συγκέντρωσης $0,5 \text{ ppm}$, ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς για όλους τους ιστούς με αυξανόμενη τάση με τις μέρες έκθεσης, εκτός από το μανδύα όπου ήταν χαμηλότερες, με τάση μείωσης μέχρι την $20^{\text{η}}$ ημέρα του πειράματος. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε $1,0 \text{ ppm}$, οι τιμές ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς στα βράγχια και το σώμα. Στο μανδύα ήδη από την $5^{\text{η}}$ ημέρα έκθεσης και στο πεπτικό σύστημα από την $10^{\text{η}}$ ημέρα και μετά οι τιμές ήταν χαμηλότερες από τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς, φτάνοντας στο τέλος του πειράματος σε τιμές μειωμένες κατά 50% και 40% αντίστοιχα.

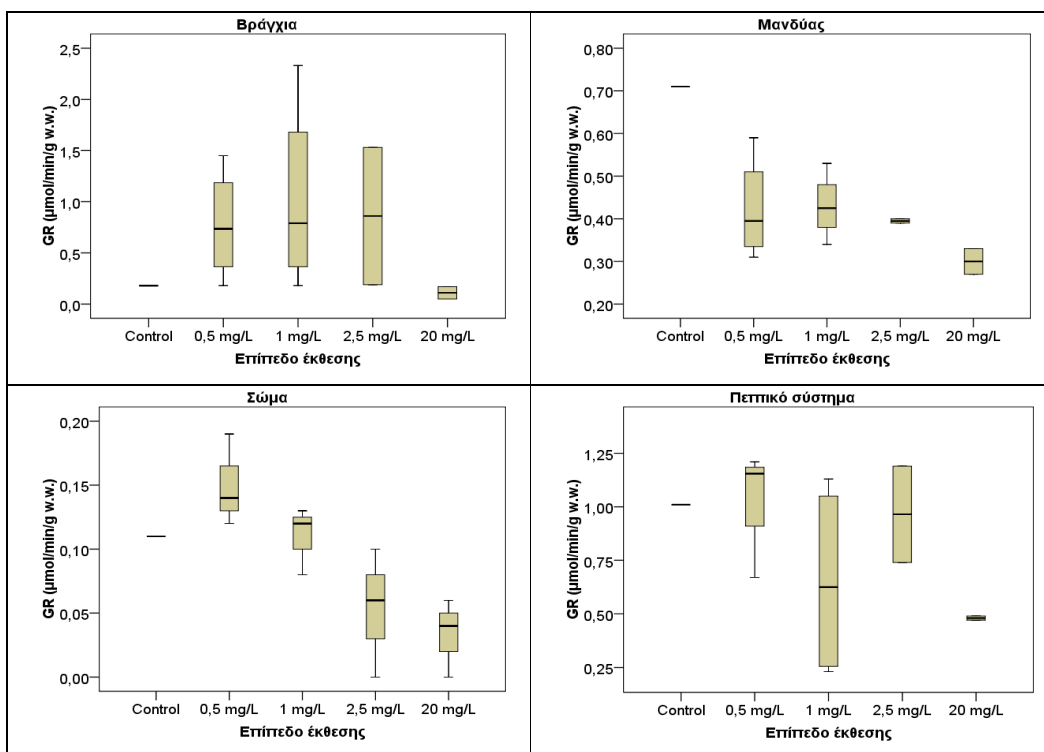
Οι τιμές του ενζύμου στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε $2,5 \text{ ppm Cd}$ αυξήθηκαν κατά 8 φορές σε σχέση με του πληθυσμού αναφοράς. Στους υπόλοιπους ιστούς η ενεργότητα του ενζύμου μειώθηκε στο τέλος του πειράματος ως και κατά 50% σε σχέση με του πληθυσμού αναφοράς. Σε όλους τους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd βρέθηκε μείωση των τιμών της GR στο τέλος του πειράματος, σε σχέση με τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς, η οποία ήταν 71% στα βράγχια, 63% στο μανδύα, 53% στο πεπτικό σύστημα και 61% στο σώμα. Για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης, δεν ξεχώρισε κάποιος ιστός με υψηλότερες τιμές από τους υπόλοιπους, ενώ το σώμα είχε τις χαμηλότερες τιμές (Σχήμα 140). Μεταξύ των ιστών των οργανισμών που εκτέθηκαν σε $2,5 \text{ ppm Cd}$, υψηλότερες τιμές είχε το πεπτικό σύστημα

την 5^η ημέρα και τα βράγχια την 10^η, ενώ για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd η τάση ήταν: πεπτικό σύστημα> μανδύας> βράγχια> σώμα.

Κατά την αποτοξίνωση και στα δύο επίπεδα έκθεσης η τιμή της GR στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα μειώθηκε. Στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd η τιμή παρέμεινε σχεδόν σταθερή και περίπου ίση με του πληθυσμού αναφοράς, ενώ στο σώμα εκείνων που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd η τιμή μειώθηκε.



Σχήμα 140: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 141: Box-plots των επιπέδων της GR (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.2.7 Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

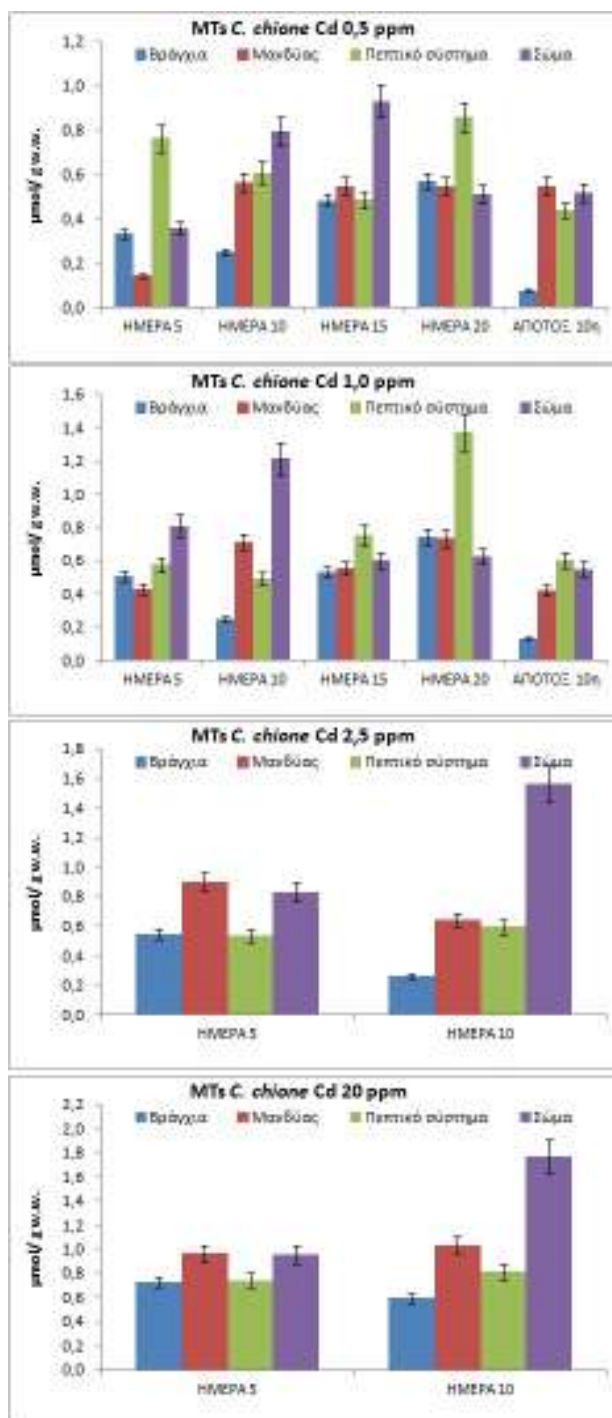
Οι τιμές των μεταλλοθειονινών στους ιστούς του πληθυσμού αναφοράς παρέμειναν σταθερές, εκτός από το μανδύα όπου παρατηρήθηκε μείωση. Οι τιμές ήταν 0,059 για τα βράγχια, 0,059-0,034 για το μανδύα, 0,063 για το πεπτικό σύστημα και 0,034 μmol/g w.w. για το σώμα.

Από τα Σχήματα 142, 143 φαίνεται ότι η συγκέντρωση των μεταλλοθειονινών σε όλα τα επίπεδα έκθεσης είχε υψηλότερες τιμές από του πληθυσμού αναφοράς, οι οποίες αυξάνονταν κατά την έκθεση ενώ μειώθηκαν στην αποτοξίνωση. Εξαιρέση αποτελεί ο μανδύας και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm Cd, όπου παρουσίασαν μέγιστο την 10^η ημέρα. Επίσης φαίνεται γενικά πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, αυξάνονταν οι τιμές των μεταλλοθειονινών. Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 142) παρατηρήθηκε πως τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών. Στο επίπεδο 0,5 και 1,0 ppm Cd, το πεπτικό σύστημα και το σώμα είχαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ στα επίπεδα 2,5 και 20 ppm Cd, οι τιμές του σώματος και του μανδύα ήταν οι υψηλότερες.

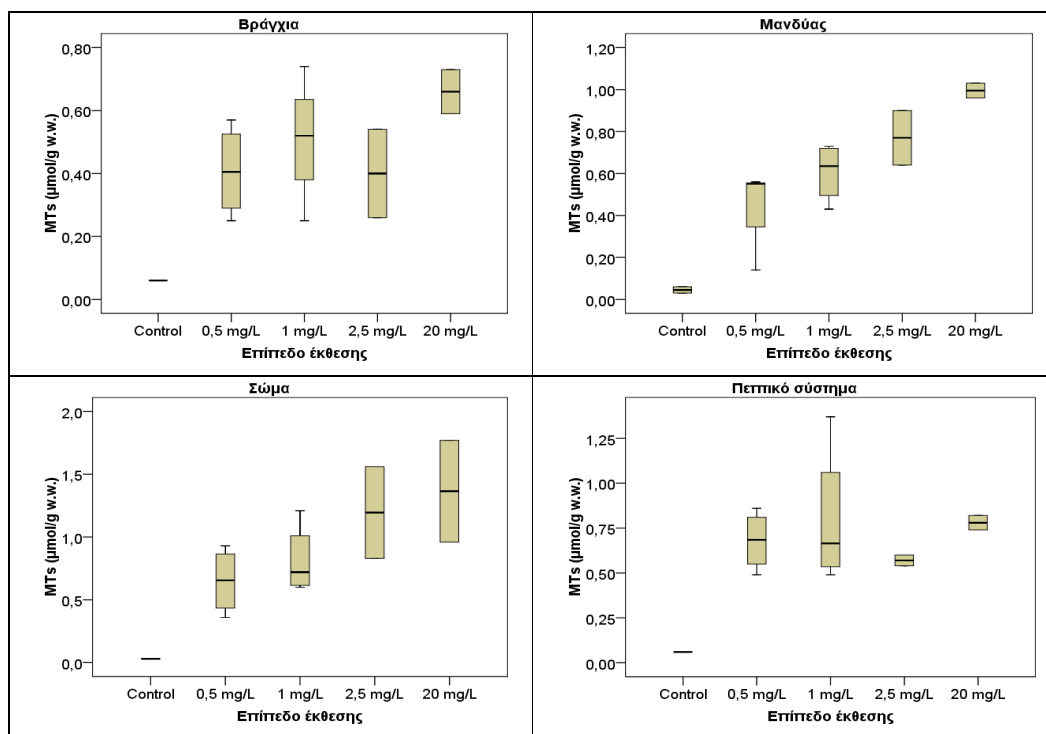
Από τον Πίνακα 57, αλλά και το Σχήμα 143 παρατηρείται ότι η αύξηση των μεταλλοθειονινών ήταν πολύ μεγάλη σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς και πως όσο αυξανόταν το επίπεδο και οι μέρες έκθεσης, η αύξηση ήταν μεγαλύτερη. Παρατηρήθηκε πως ο ιστός που είχε την μεγαλύτερη συγκέντρωση καδμίου (βράγχια), είχε την μικρότερη συγκέντρωση μεταλλοθειονινών (αυτό παρατηρήθηκε και στο μόλυβδο). Κατά την αποτοξίνωση οι τιμές των μεταλλοθειονινών μειώθηκαν σε όλους τους ιστούς. Στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν και στα δύο επίπεδα καδμίου, προσδιορίστηκε η μεγαλύτερη μείωση η οποία ήταν 87 και 82% αντίστοιχα.

Πίνακας 57: Αύξηση των μεταλλοθειονινών (C_{Dayx}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς

	0,50ppm		1,0ppm		2,5ppm		20ppm	
	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20
βράγχια	5,7	10	8,7	13	9,3	-	12	-
μανδύας	2,4	16	7,3	21	15	-	16	-
ΠΕΠΤΙΚΟ	12	14	9,1	22	8,5	-	12	-
σώμα	10	15	24	18	24	-	28	-



Σχήμα 142: Χρονική μεταβολή των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 143: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των γυαλιστερών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.2.8 Ψευδάργυρος σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Τόσο στον πληθυσμό αναφοράς, όσο και σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, ο μανδύας είχε τις χαμηλότερες τιμές ψευδαργύρου, ενώ οι υψηλότερες προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών, τα οποία είχαν παρόμοιες τιμές μεταξύ τους.

6.2.9 Ολική πρωτεΐνη σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές ολικής πρωτεΐνης ενώ το πεπτικό σύστημα τις υψηλότερες, παρόμοιες με του σώματος. Ξεκάθαρη τάση αύξησης ή μείωσης με τις ημέρες έκθεσης στον ίδιο ιστό και στο ίδιο επίπεδο έκθεσης δεν παρατηρήθηκε.

6.2.10 Συσχετίσεις καδμίου με βιοδείκτες

Όλες οι τιμές του καδμίου, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε ιστό, συσχετίστηκαν με τη βοήθεια του συντελεστή Pearson, με τις αντίστοιχες τιμές βιοδεικτών και προέκυψαν για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακες 58-61):

- αρνητική συσχέτιση με την ακετυλοχολινεστεράση στα βράγχια και το μανδύα
- θετική συσχέτιση με την λιπιδική υπεροξειδωση και στους τέσσερις ιστούς
- θετική συσχέτιση με την GST στα βράγχια και το σώμα, ενώ στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν αρνητική.
- αρνητική συσχέτιση με την GR στο μανδύα και το σώμα
- αρνητική συσχέτιση με την καταλάση στο μανδύα

- θετική συσχέτιση με τις μεταλλοθειονίνες στο μανδύα και το σώμα

6.2.11 Συσχετίσεις των βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς *C. chione* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Επειδή οι βιοδείκτες συσχετίζονται με το κάδμιο, εξετάστηκε και η μεταξύ τους συσχέτιση ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, για κάθε ιστό, και επίπεδο εμπιστοσύνης >95%. Στόχος της εύρεσης συσχετίσεων μεταξύ των τιμών των βιοδεικτών ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει κοινή συμπεριφορά-τάση των βιοδεικτών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο τρόπος αντίδρασης στην έκθεση σε κάδμιο είναι παρόμοιος. Έτσι προέκυψαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις:

- Αρνητική συσχέτιση στατιστικά της ακετυλοχολινεστεράσης με την λιπιδική υπεροξειδωση σε όλους τους ιστούς, εκτός από το πεπτικό σύστημα των οργανισμών.
- Αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με την GST στα βράγχια και το σώμα των οργανισμών, ενώ στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν θετική.
- Θετική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με την GR σε όλους τους ιστούς των οργανισμών εκτός από τα βράγχια.
- Αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με την καταλάση στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών, ενώ στο μανδύα η συσχέτιση ήταν θετική.
- Αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης με τις μεταλλοθειονίνες σε όλους τους ιστούς εκτός από το πεπτικό σύστημα των οργανισμών.
- Θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με την GST στα βράγχια και το σώμα των οργανισμών, ενώ στο μανδύα η συσχέτιση ήταν αρνητική.
- Αρνητική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με την GR στο μανδύα και το σώμα, ενώ στους ίδιους ιστούς η συσχέτιση ήταν θετική.
- Αρνητική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με την καταλάση στο μανδύα των οργανισμών.
- Θετική συσχέτιση της GST με την καταλάση στο μανδύα και το σώμα των οργανισμών, ενώ στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν αρνητική.
- Αρνητική συσχέτιση των μεταλλοθειονινών με την GR στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα, ενώ στο σώμα η συσχέτιση ήταν θετική.
- Αρνητική συσχέτιση των μεταλλοθειονινών με την καταλάση στο μανδύα και το σώμα, ενώ στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν θετική.

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

Οι μεταλλοθειονίνες είναι ένας αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων που λειτουργεί όταν το μέταλλο εισέλθει στους οργανισμούς. Σε κάθε ιστό παρατηρείται αύξηση των μεταλλοθειονινών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο αμυντικός μηχανισμός βρίσκεται σε λειτουργία. Προφανώς όμως δεν επαρκεί, ή δεν είναι αρκετά αποτελεσματικός, καθώς οι μετρήσεις των βιοδεικτών (AChE, GST, GR, CAT, LPO) φαίνεται πως επηρεάζονται από τα βαρέα μέταλλα.

Όποιος ιστός και να χρησιμοποιηθεί ως ιστός-ελέγχου, η λιπιδική υπεροξειδωση και η ακετυλοχολινεστεράση είναι οι καταλληλότεροι βιοδείκτες. Η GST μπορεί να χρησιμοποιηθεί

επίσης στα βράγχια, το πεπτικό σύστημα και το σώμα των οργανισμών ενώ οι μεταλλοθειονίνες και η GR στο μανδύα και το σώμα των οργανισμών.

Πίνακας 58: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών

	Cd	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Cd	1								
AChE	-0,843**	1							
LPO	0,995**	-0,830**	1	**					
GST	0,742**	-0,586*	0,723**	1					
GR	-0,109	-0,177	-0,164	0,269	1				
CAT	0,526	-0,695*	0,462	0,650*	0,661*	1			
MTs	0,497	-0,608*	0,462	0,300	0,162	0,490	1		
Zn	0,331	-0,010	0,296	0,420	-0,020	0,308	0,345	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,256	-0,353	0,214	0,442	0,219	0,616*	-0,007	0,127	1

Πίνακας 59: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών

	Cd	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Cd	1								
AChE	-0,885**	1							
LPO	0,895**	-0,892**	1						
GST	-0,292	0,114	-0,400	1					
GR	-0,581*	0,698*	-0,604*	-0,217	1				
CAT	-0,814**	0,755**	-0,751**	0,594*	0,292	1			
MTs	0,661*	-0,712**	0,722**	-0,393	-0,727**	-0,601*	1		
Zn	-0,327	0,016	-0,045	0,261	-0,200	0,321	-0,037	1	
Ολική πρωτεΐνη	0,110	-0,225	0,202	0,198	-0,546	0,154	0,351	0,310	1

Πίνακας 60: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών

	Cd	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Cd	1								
AChE	,054	1							
LPO	,829**	,460	1						
GST	-,632*	,743**	-,726**	1					
GR	-,410	,732**	-,430	,685*	1				
CAT	,415	-,725**	,540	-,698*	-,802**	1			
MTs	,122	-,348	,097	-,420	-,711**	,654*	1		
Zn	-,130	-,220	-,125	-,260	-,224	,117	,073	1	
Ολική πρωτεΐνη	-,753**	,493	-,717**	,562	,584*	-,574	-,489	,377	1

Πίνακας 61: Πίνακας συσχετίσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών

	Cd	AChE	LPO	GST	GR	MTs	Zn	Ολική πρωτεΐνη
Cd	1							
AChE	-,563	1						
LPO	,870**	-,773**	1					
GST	,704*	-,631*	,694*	1				
GR	-,719**	,752**	-,868**	,061	1			
MTs	,610	-,789**	,652	,745**	-,723**	1		
Zn	-,047	-,614*	,225	,125	-,235	,171	1	
Ολική πρωτεΐνη	-,673	,222	-,401	-,607*	,267	-,368	,230	1

* δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

** δηλώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

6.3 Έκθεση *Venus verrucosa* σε κάδμιο

6.3.1 Έκθεση σε διαφορετικά επίπεδα καδμίου στο θαλασσινό νερό

Η ολική συγκέντρωση καδμίου στα κυδώνια όταν έφτασαν στο εργαστήριο ήταν 0,70 μg/g d.w. και 0,45 μg/g w.w. Σύμφωνα με την νομοθεσία⁶⁸, το όριο για τον κάδμιο στα θαλάσσια δίδυρα είναι 1,0 μg/g w.w. Άρα τα κυδώνια που συλλέχθηκαν από τον Σαρωνικό κόλπο ήταν εντός των επιτρεπτών ορίων για την ανθρώπινη κατανάλωση.

Οι συγκεντρώσεις του καδμίου μειώνονταν στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς κατά την διάρκεια του πειράματος, εκτός από το σώμα. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 1,07-0,86 μg/g d.w. για τα βράγχια, 0,67-0,53 για το μανδύα και 0,64-0,55 για το πεπτικό σύστημα και 0,55-0,71 για το σώμα.

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα των κυδωνιών στο κάδμιο, οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd άντεξαν ως την 15^η ημέρα, σε αντίθεση με τα μύδια και τις γυαλιστερές τα οποία άντεξαν λιγότερο, ενώ οι οργανισμοί που εκτέθηκαν στα υπόλοιπα επίπεδα καδμίου άντεξαν και τις 20 ημέρες έκθεσης και ακόμα 30 ημέρες αποτοξίνωσης.

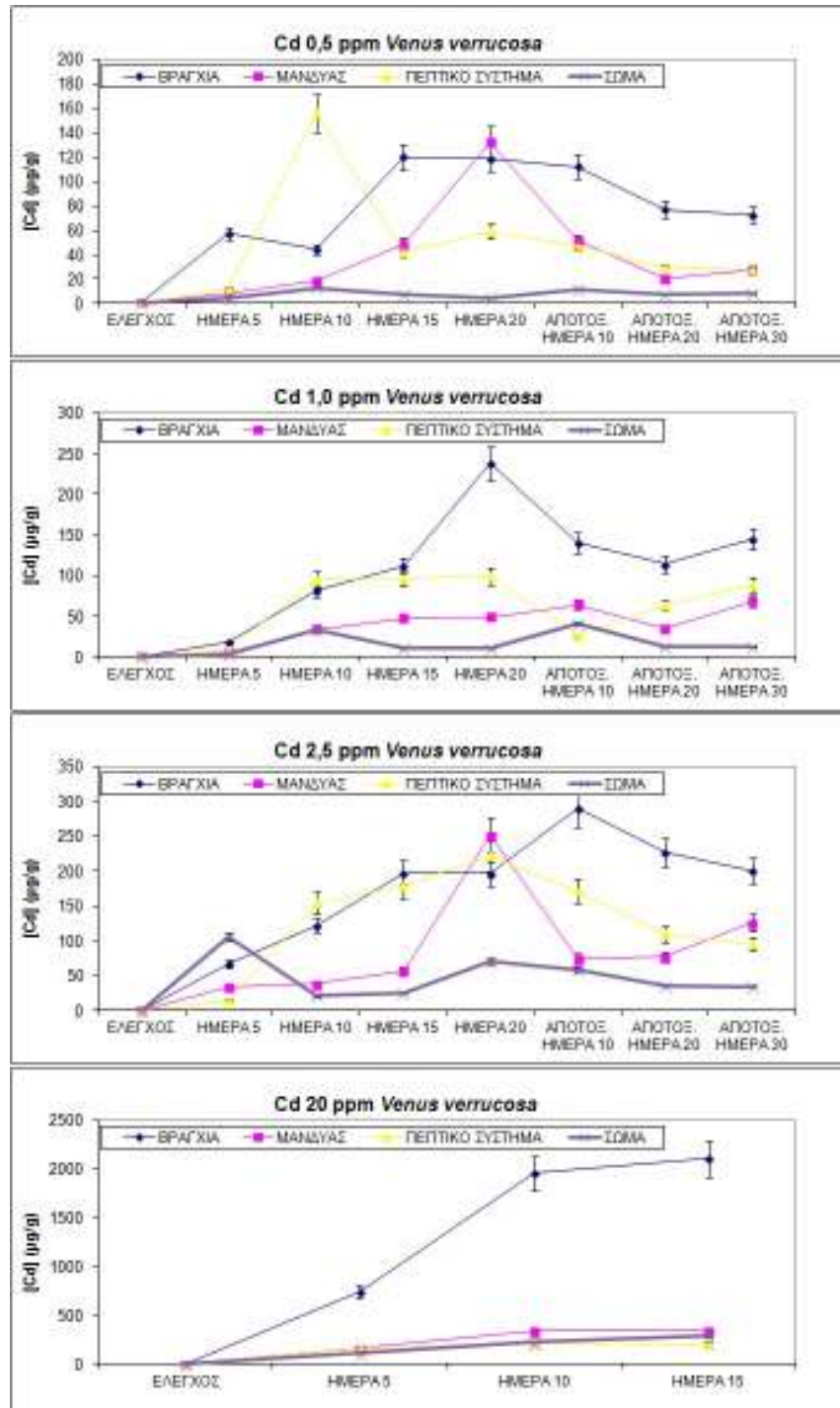
Γενικά, παρατηρήθηκε πολύ μεγάλη αύξηση και σε όλους τους ιστούς των οργανισμών σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς. Οι τιμές που προσδιορίστηκαν την 20^η ημέρα ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης ήταν υψηλότερες από τις αρχικές τιμές κατά 184-1.975 φορές στα βράγχια, 5-509 φορές υψηλότερη στο μανδύα, 2-347 για το πεπτικό σύστημα και 22- 532 για το σώμα.

Για τα επίπεδα έκθεσης 0,5 και 2,5 ppm Cd, δεν ξεχώρισε κάποιος ιστός με υψηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ οι χαμηλότερες προσδιορίστηκαν στο σώμα. Στο επίπεδο 1,0 και 20 ppm τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι οποίες αυξάνονταν με τις ημέρες έκθεσης (Σχήμα 144). Όπως φαίνεται από το Σχήμα 145, και στους τέσσερις ιστούς, τα χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης είχαν παρόμοιες τιμές καδμίου ($p > 0,05$), ενώ το επίπεδο 20 ppm είχε πολύ υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές από όλα τα επίπεδα έκθεσης ($p < 0,05$).

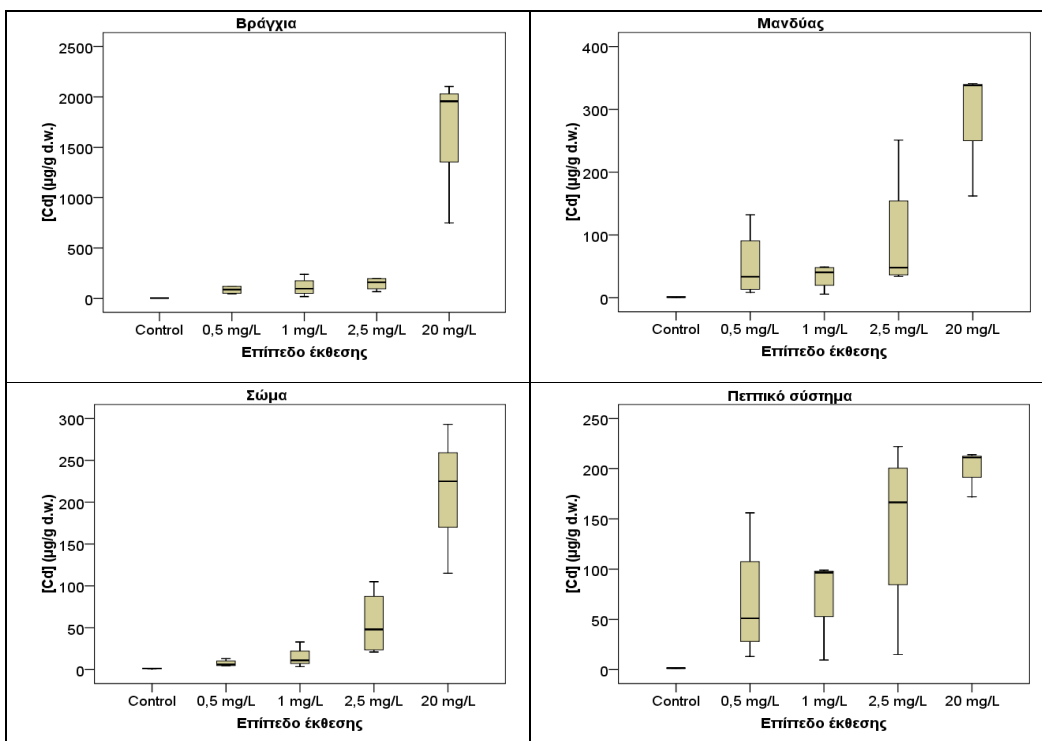
Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd, μόνο στο μανδύα η συγκέντρωση του μετάλλου αυξανόταν με την πάροδο του χρόνου, με μέγιστη τιμή την 20^η ημέρα. Ίδια εικόνα είχαν και τα βράγχια, ο μανδύας και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 και 2,5 ppm Cd. Στο πεπτικό σύστημα παρατηρήθηκε γενικά αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου και

σταθεροποίηση. Τα κυδώνια που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd, προσροφούσαν το κάδμιο σχεδόν γραμμικά ως την 10^η ημέρα, ενώ η συγκέντρωση του μετάλλου παρέμεινε σχεδόν σταθερή την 15^η ημέρα έκθεσης, κάτι που πιθανά υποδηλώνει κορεσμό των ιστών.

Το πείραμα της αποτοξίνωσης διήρκεσε 30 ημέρες και παρατηρήθηκε γενικά αυξομείωση στην συγκέντρωση καδμίου στους ιστούς των οργανισμών. Γενικά, οι τιμές στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 2,5 ppm Cd μειώνονταν ως την 30^η ημέρα αποτοξίνωσης. Ίδια εικόνα παρουσίασε το σώμα των οργανισμών και για τα τρία επίπεδα έκθεσης.



Σχήμα 144: Χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων καδμίου (µg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών



Σχήμα 145: Box-plots των συγκεντρώσεων καδμίου (µg/g d.w.) στους ιστούς των κυδωνιών

Κατανομή καδμίου μεταξύ των ιστών των οργανισμών

Γενικά, στο χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης τα βράγχια είχαν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα καδμίου, ενώ στα επίπεδα 1,0 και 2,5 ppm το πεπτικό σύστημα είχε τις υψηλότερες περιεκτικότητες. Η μέγιστη περιεκτικότητα καδμίου στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν στα τρία χαμηλότερα επίπεδα μετάλλου προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα έκθεσης. Στο υψηλότερο επίπεδο έκθεσης φαίνεται ότι αυξανόταν το ποσοστό του καδμίου στα βράγχια με τις ημέρες έκθεσης. Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, το σώμα ήταν ο ιστός με τα χαμηλότερα ποσοστά περιεκτικότητας καδμίου.

Συντελεστής Βιοσυσσώρευσης

Ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης ($C_{\text{μετρ}} - C_{\text{αναφ}} / C_{\text{νερού}}$) στα τρία χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης ήταν μεγαλύτερος στα βράγχια σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς την 5^η και 15^η ημέρα, ενώ την 10^η ήταν μεγαλύτερος στο πεπτικό σύστημα και την 20^η στο μανδύα. Στο υψηλότερο επίπεδο έκθεσης, ήταν υψηλότερος στα βράγχια σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς όλες τις ημέρες έκθεσης. Πάροδος των ημερών έκθεσης σε κάδμιο αύξανε την τιμή του συντελεστή σε όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd, κάτι που ίσχυε και στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης.

Πίνακας 62: Συντελεστής βιοσυσσώρευσης τις 20 μέρες του πειράματος έκθεσης στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου

0,5 ppm	DAY5	DAY10	DAY15	DAY20
ΒΡΑΓΧΙΑ	112	87	238	235
ΜΑΝΔΥΑΣ	16	35	97	263
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	24	311	84	117
ΣΩΜΑ	8	25	14	8
1,0 ppm				
ΒΡΑΓΧΙΑ	17	80	111	236
ΜΑΝΔΥΑΣ	5	33	47	49
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	9	95	96	98
ΣΩΜΑ	3	33	11	10
2,5 ppm				
ΒΡΑΓΧΙΑ	26	49	79	78
ΜΑΝΔΥΑΣ	13	15	23	100
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	6	61	71	89
ΣΩΜΑ	42	8	10	28
20 ppm				
ΒΡΑΓΧΙΑ	37	98	105	
ΜΑΝΔΥΑΣ	8	17	17	
ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	9	11	11	
ΣΩΜΑ	6	11	15	

6.3.2 Λιπιδική υπεροξειδωση σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

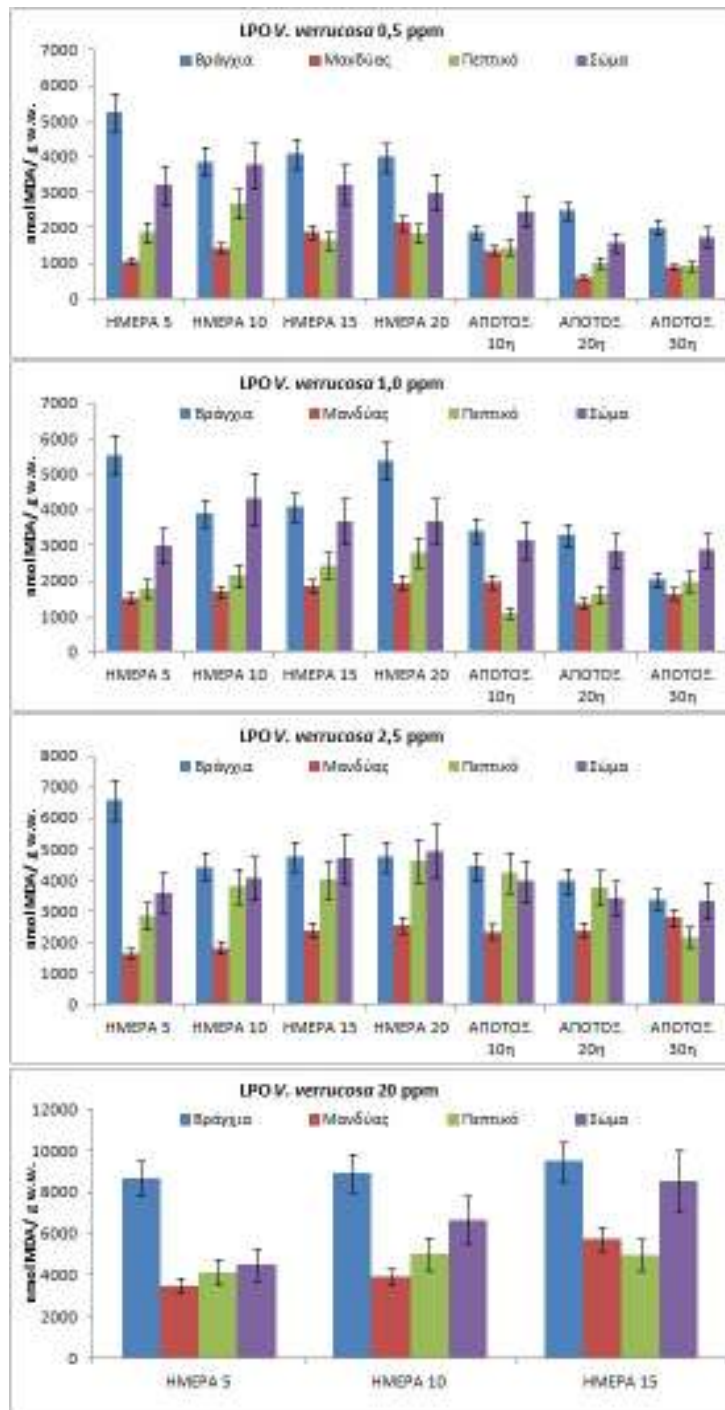
Οι συγκεντρώσεις της μηλονικής διαλδεΐδης στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς κατά την διάρκεια του πειράματος μειώνονταν σταδιακά, εκτός από το πεπτικό σύστημα, στο οποίο παρέμειναν σταθερές. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 1332-1202 nmol MDA/ g w.w. για τα βράγχια, 282-272 για το μανδύα, 168 για το πεπτικό σύστημα και 208-201 για το σώμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα βράγχια είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση καδμίου και παρατηρείται πως είχαν υποστεί την μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 147 για όλους τους ιστούς εκτός από το πεπτικό σύστημα, τα χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης είχαν παρόμοιες τιμές λιπιδικής υπεροξειδωσης μεταξύ τους, αρκετά υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς. Το επίπεδο 20 ppm είχε πολύ υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές τιμές από τα υπόλοιπα. Αξίζει να σημειωθεί ότι από την 5^η κιόλας ημέρα έκθεσης, η τιμή της λιπιδικής υπεροξειδωσης των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε 20 ppm Cd αυξήθηκε σε σχέση με την τιμή του πληθυσμού αναφοράς κατά 7 φορές στα βράγχια, 12 στο μανδύα, 25 φορές στο πεπτικό σύστημα και 22 στο σώμα. Γενικά, οι πιο υψηλές τιμές μηλονικής διαλδεΐδης παρατηρήθηκαν στα βράγχια των οργανισμών και οι πιο χαμηλές στο μανδύα. Η τάση της μηλονικής διαλδεΐδης ήταν η εξής: βράγχια> σώμα> πεπτικό σύστημα> μανδύας (Σχήμα 146).

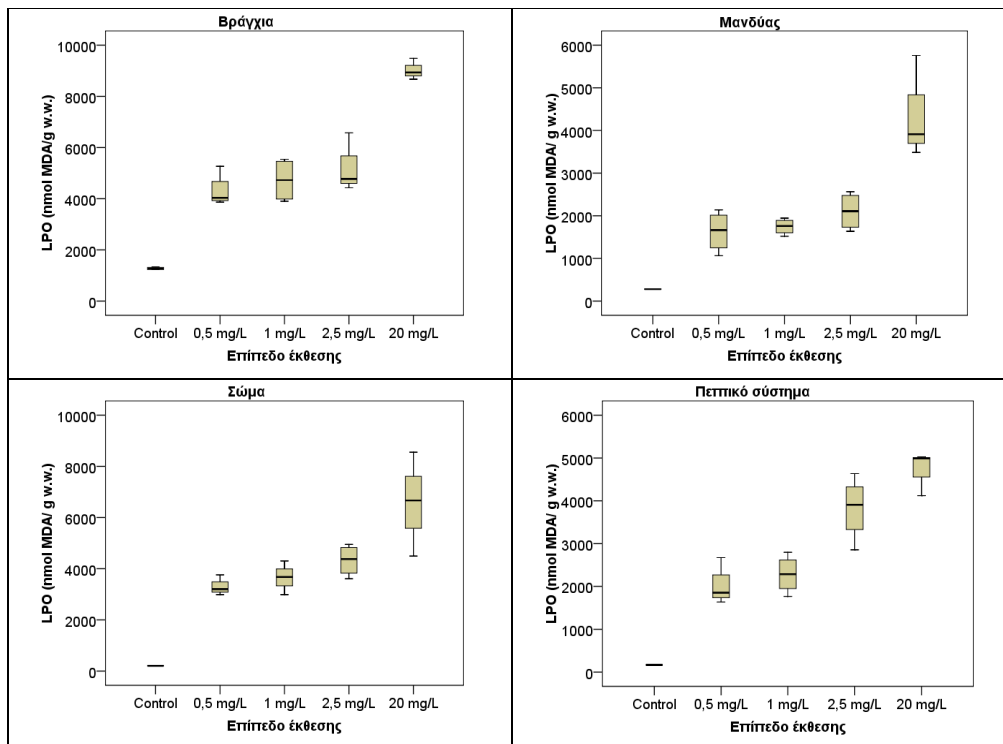
Γενικά ξεκάθαρη τάση με τις μέρες έκθεσης στους ιστούς δεν παρατηρήθηκε. Μόνο στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, παρατηρήθηκε αύξηση κατά την έκθεση και συνακόλουθη μείωση την αποτοξίνωση (Σχήμα 146). Αύξηση με το χρόνο έκθεσης παρουσίασε η LPO στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd (Σχήμα 146). Θετική συσχέτιση,

στατιστικά σημαντική βρέθηκε ανάμεσα στη λιπιδική υπεροξειδωση και την συγκέντρωση καδμίου σε κάθε ιστό, για όλα τα επίπεδα έκθεσης.

Κατά την αποτοξίνωση, παρατηρήθηκε μείωση της μηλονικής διαλδεΰδης σε όλους τους ιστούς σε σχέση με την 20^η ημέρα έκθεσης. Η μείωση αυτή ήταν μεγαλύτερη στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd, η οποία ήταν 50% στα βράγχια, 58% στο μανδύα, 50% στο πεπτικό σύστημα και 42% στο σώμα. Παρατηρείται λοιπόν πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης η βλάβη που είχε προκληθεί στους ιστούς δεν ήταν εύκολα αντιστρέψιμη.



Σχήμα 146: Χρονική μεταβολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 147: Βox-plots των επιπέδων μηλονικής διαλδεΐδης (nmol MDA/g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

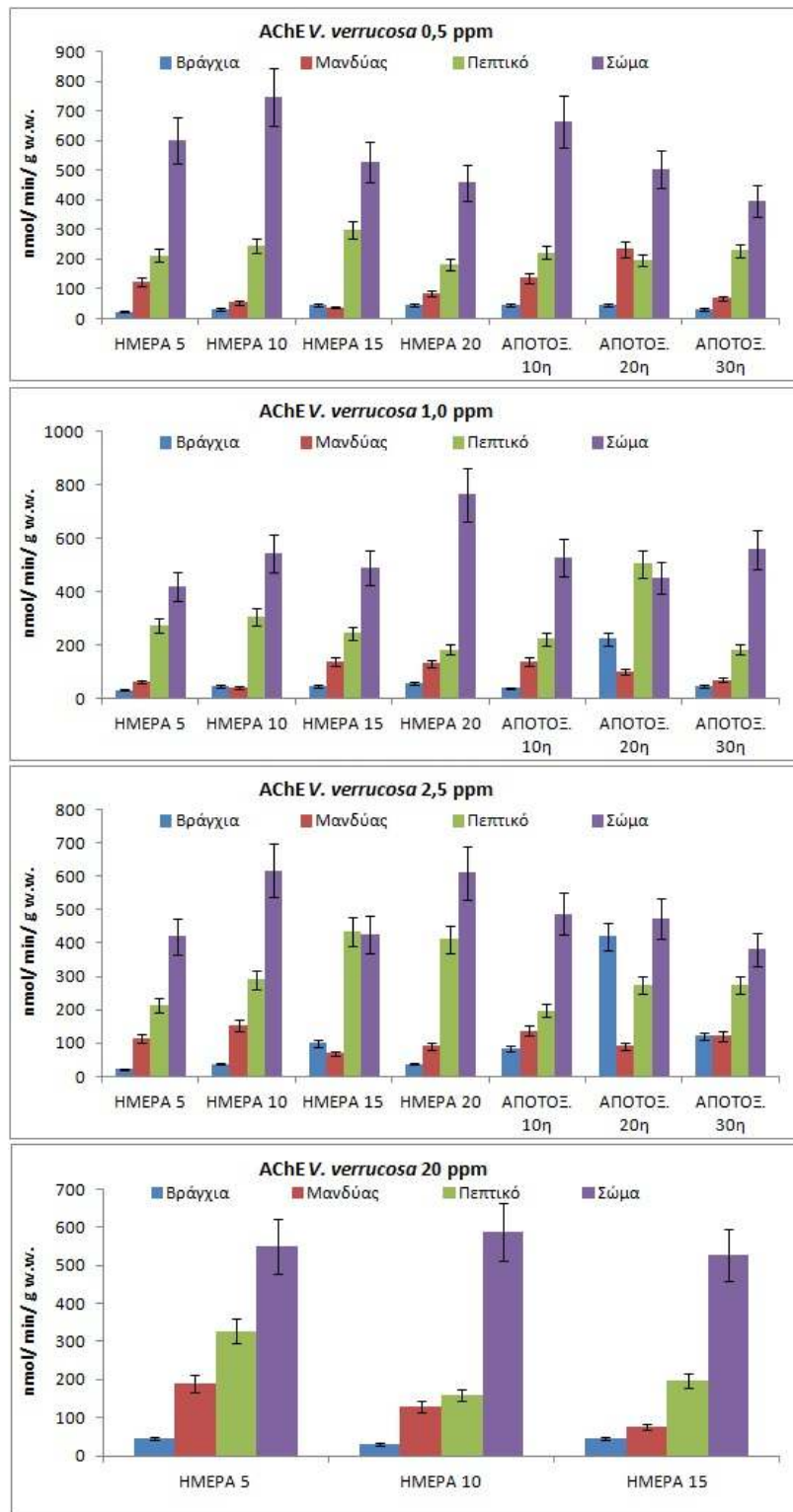
6.3.3 Ακετυλοχολινεστεράση σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης στους ιστούς των οργανισμών αναφοράς κατά την διάρκεια του πειράματος αυξανόταν σταδιακά, εκτός από το μανδύα, όπου παρέμειναν σταθερές. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 61-65 nmol/ min/ g w.w. για τα βράγχια, 61 για το μανδύα, 450-457 για το πεπτικό σύστημα και 526-533 για το σώμα. Τα βράγχια είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση καδμίου και μηλονικής διαλδεΐδης και την χαμηλότερη ενεργότητα ακετυλοχολινεστεράσης, κάτι που πιθανά υποδηλώνει την νευροτοξικότητα του Cd στον ιστό.

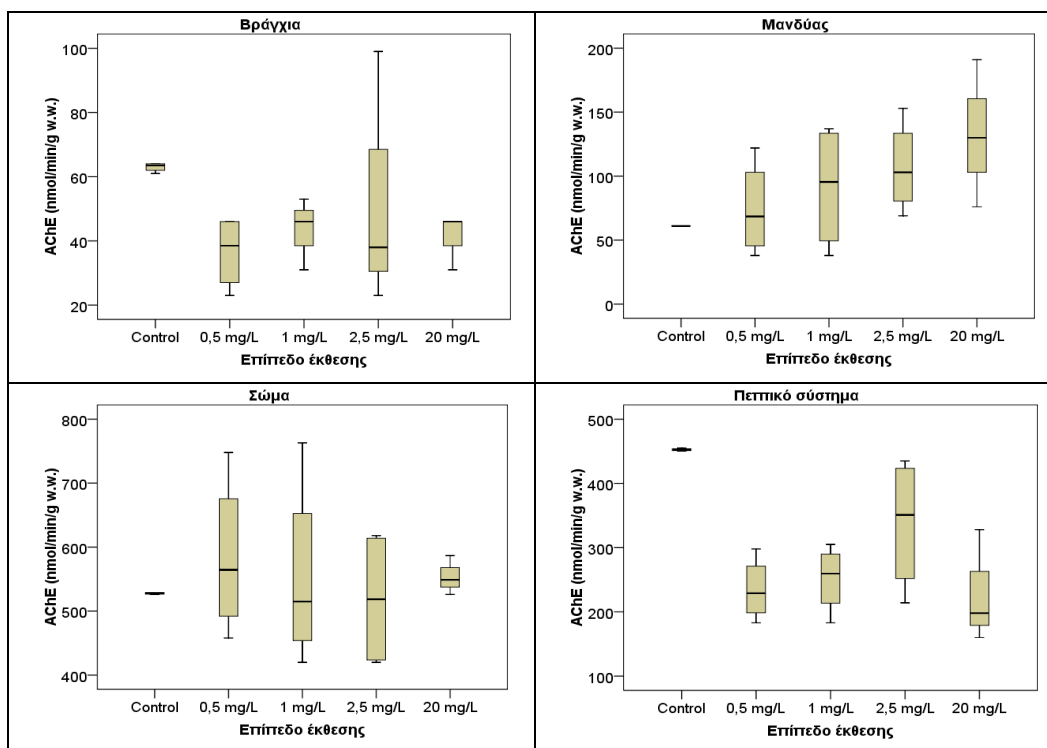
Οι τιμές ακετυλοχολινεστεράσης που μετρήθηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο συγκέντρωσης 0,5-1,0 και 2,5 ppm, δεν εμφάνισαν ξεκάθαρη τάση, με τις μέρες έκθεσης (Σχήμα 148). Οι τιμές στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος έκθεσης ήταν χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, ενώ στο μανδύα και στο σώμα ήταν υψηλότερες.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 149 για τα βράγχια και το πεπτικό σύστημα, όλα τα επίπεδα έκθεσης είχαν τιμές παρόμοιες μεταξύ τους αλλά χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς. Οι τιμές στο μανδύα ήταν όλες υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς και παρατηρήθηκε πως όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης αυξάνονταν και οι τιμές του ενζύμου. Στο σώμα, η διάμεση τιμή των επιπέδων έκθεσης ήταν ελαφρά υψηλότερη από του πληθυσμού αναφοράς, αλλά οι τιμές των επιπέδων έκθεσης είχαν μεγάλο εύρος καθώς κατά την διάρκεια των πειραμάτων έκθεσης παρουσιάζονται αυξομειώσεις, ενώ όλες ήταν παρόμοιες μεταξύ τους. Συνολικά, για την περίοδο έκθεσης, η τάση ήταν η εξής: σώμα > πεπτικό σύστημα > μανδύας ≥ βράγχια (Σχήμα 148).

Η όξι και τόσο ξεκάθαρη τάση σε κάθε ιστό με τις ημέρες έκθεσης παραπέμπει στην τάση του καδμίου. Βρέθηκε θετική συσχέτιση της AChE με την συγκέντρωση καδμίου σε όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν στα τρία χαμηλότερα επίπεδα καδμίου. Αντίθετα, η συσχέτιση στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd ήταν αρνητική.



Σχήμα 148: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



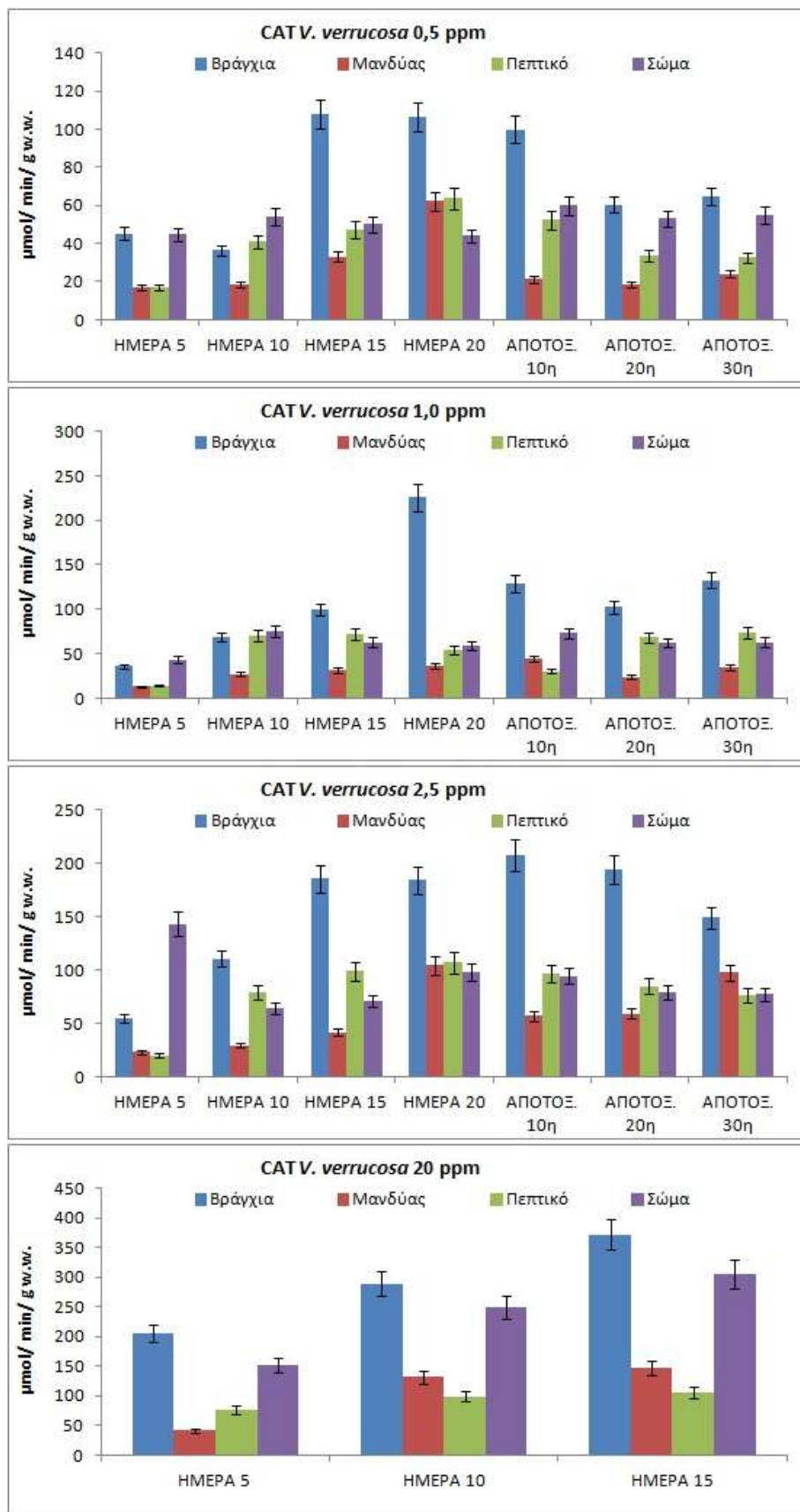
Σχήμα 149: Βοx-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.3.4 Καταλάση σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

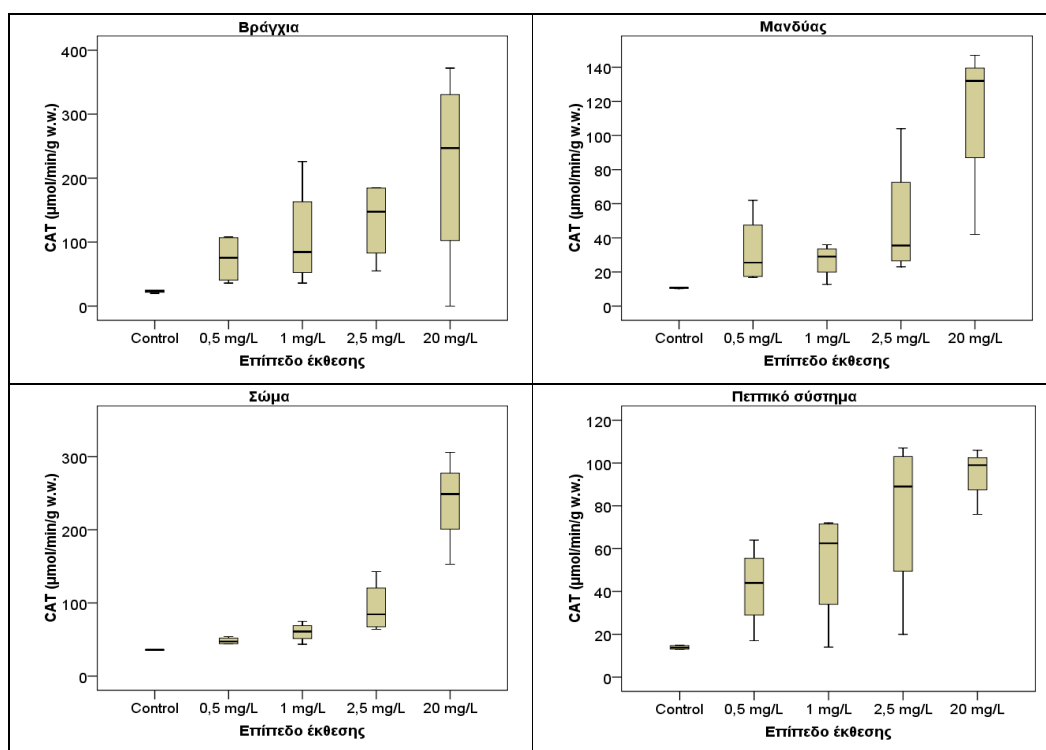
Οι συγκεντρώσεις της καταλάσης σε όλους τους ιστούς των οργανισμών αναφοράς κατά την διάρκεια του πειράματος μειώνονταν σταδιακά. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 25-21 $\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$ για τα βράγχια, 11-10 για το μανδύα, 15-13 για το πεπτικό σύστημα και 36-34 για το σώμα. Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στα βράγχια με 16% μείωση και η μικρότερη στο μανδύα (6%).

Οι τιμές του ενζύμου για όλους τους ιστούς και επίπεδα έκθεσης ήταν υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς, με τιμές υψηλότερες κατά 79-94% για τα βράγχια, 78-94% για το μανδύα, 79-88% για το πεπτικό σύστημα και 43-88% για το σώμα ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης. Από το Σχήμα 151 φαίνεται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση στη διάμεση τιμή των τιμών του ενζύμου σε όλους τους ιστούς. Η γενική τάση ανάμεσα στους ιστούς ήταν η ίδια με του πληθυσμού αναφοράς, με υψηλότερες τιμές στα βράγχια, αμέσως χαμηλότερες στο σώμα και τις πιο χαμηλές στο μανδύα (Σχήμα 150).

Οι τιμές καταλάσης που μετρήθηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν 0,5-1,0-2,5 ppm Cd δεν εμφάνισαν ξεκάθαρη τάση, ενώ για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm μετάλλου η ενεργότητα αυξήθηκε με τις μέρες έκθεσης (Σχήμα 150). Η θετική συσχέτιση της καταλάσης με τις τιμές του καδμίου σε κάθε ιστό και επίπεδο έκθεσης αποδείχθηκε στατιστικά στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των οργανισμών για όλα τα επίπεδα καδμίου. Θετική συσχέτιση βρέθηκε και στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 και 2,5 ppm Cd. Κατά την περίοδο αποτοξίνωσης η τιμή της καταλάσης σε όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm μετάλλου μειώθηκε ελαφρά.



Σχήμα 150: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 151: Box-plots των επιπέδων καταλάσης ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

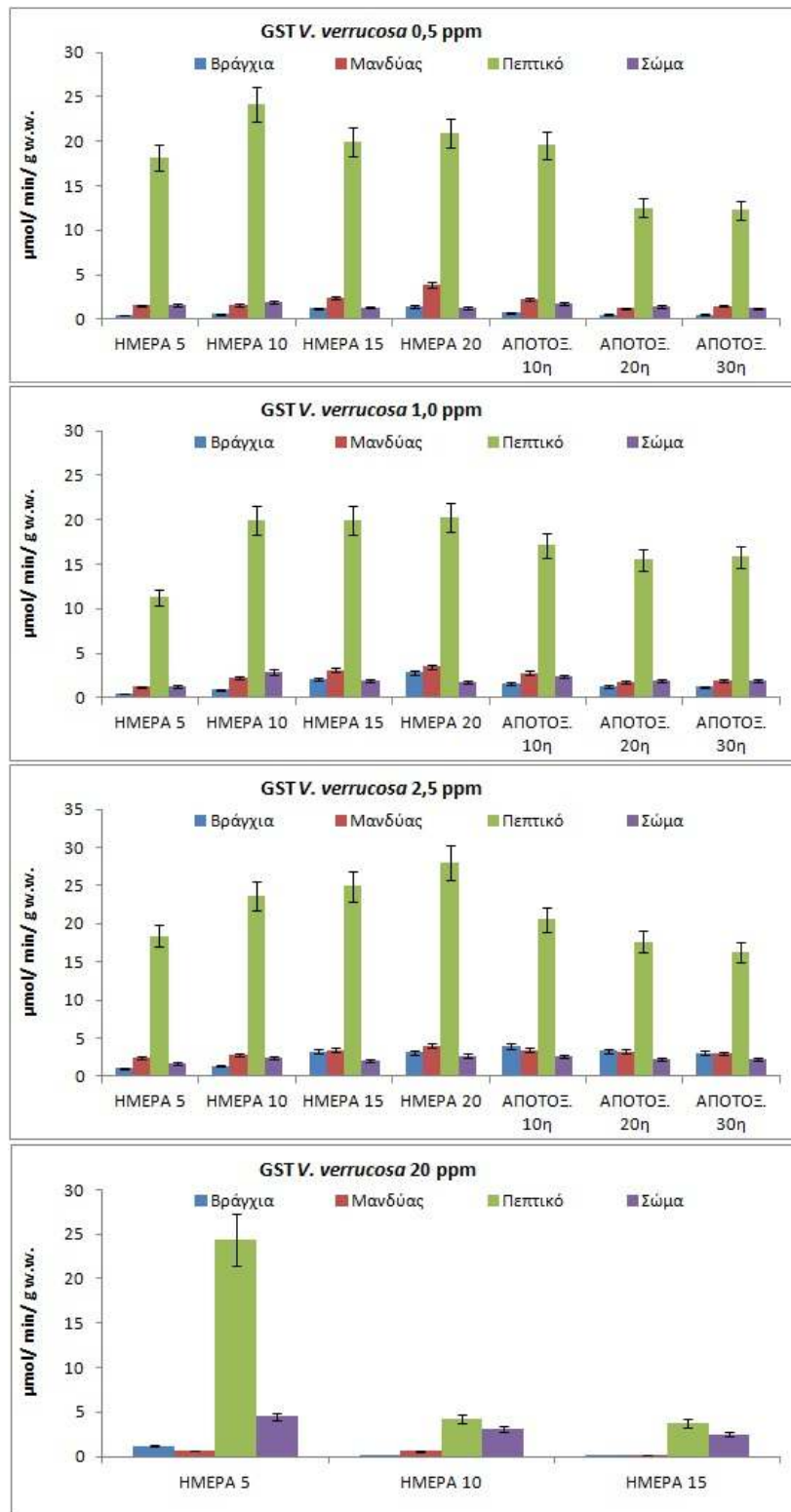
6.3.5 S μεταφοράση της γλουταθειόνης σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Οι τιμές της GST σε όλους τους ιστούς των οργανισμών αναφοράς κατά την διάρκεια του πειράματος παρέμειναν σταθερές, με τιμές 0,46 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w}$. για τα βράγχια, 0,66 για το μανδύα, 2,42 για το πεπτικό σύστημα και 0,59 για το σώμα.

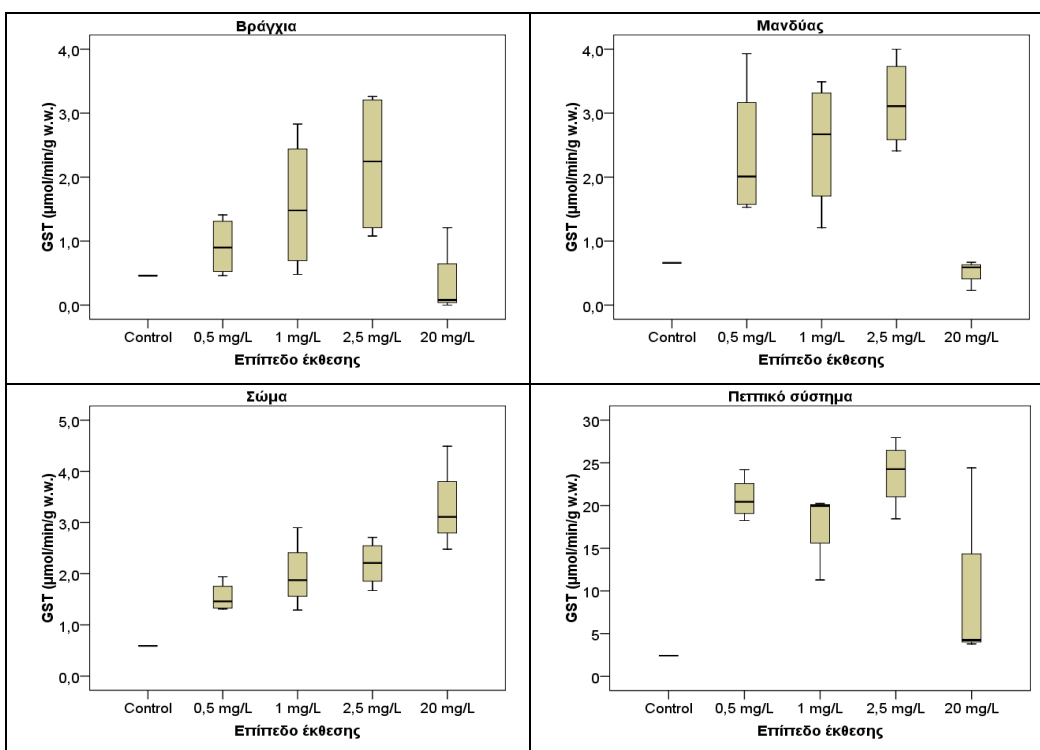
Οι τιμές GST που μετρήθηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0-2,5 ppm Cd δεν παρουσίασαν ξεκάθαρη τάση, ενώ για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm μετάλλου παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου με τις μέρες έκθεσης σε όλους τους ιστούς (Σχήμα 152). Οι τιμές του ενζύμου στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0-2,5 ppm Cd ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς (Σχήμα 153), με τιμές υψηλότερες κατά 67-88% για τα βράγχια, 81-84% για το μανδύα, 80-91% για το πεπτικό σύστημα και 70-80% για το σώμα ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης, όταν προσδιορίστηκε η μέγιστη τιμή ενζύμου στον κάθε ιστό. Για τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd την 5^η ημέρα του πειράματος έκθεσης, όλες οι τιμές του ενζύμου ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς κατά 62% για τα βράγχια, 90% για το πεπτικό σύστημα και 87% για το σώμα των οργανισμών. Από την 10^η ημέρα και ως το τέλος του πειράματος, μειώθηκε σε όλους τους με τη μείωση να φτάνει το 94% στα βράγχια, 66% στο μανδύα, 84% στο πεπτικό σύστημα και το 45% στο σώμα.

Από το Σχήμα 152 παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, ο ιστός με τις υψηλότερες τιμές ήταν το πεπτικό σύστημα, ενώ οι υπόλοιποι ιστοί είχαν χαμηλότερες τιμές. Από το Σχήμα 153 για τα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα φαίνεται γενικά πως η αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση των τιμών του ενζύμου, εκτός από το επίπεδο 20 ppm. Στο σώμα

παρατηρήθηκε αύξηση των τιμών του ενζύμου όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Κατά την αποτοξίνωση, η τιμή της GST σε όλους τους ιστούς μειώθηκε, χωρίς να φτάνει τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς. Αυτό δεν παρατηρήθηκε στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 και 1,0 ppm Cd και στα βράγχια εκείνων που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd



Σχήμα 152: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GST ($\mu\text{mol/ min/ g w.w.}$) στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 153: Box-plots των επιπέδων GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$) στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

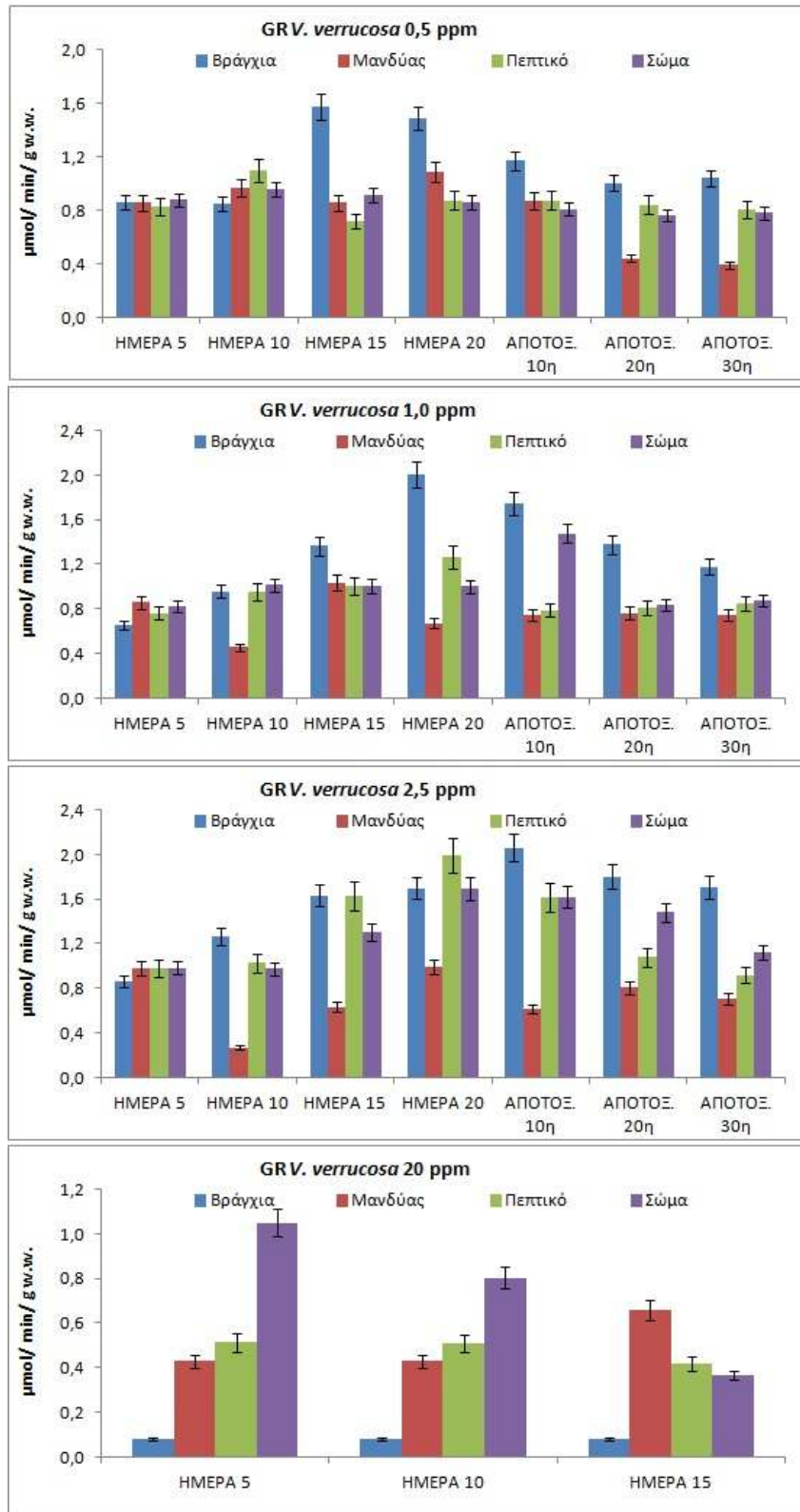
6.3.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Οι τιμές της GR σε όλους τους ιστούς των οργανισμών αναφοράς κατά την διάρκεια του πειράματος δεν μεταβλήθηκαν. Οι τιμές ήταν 0,55 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g w.w.}$ για τα βράγχια, 0,46 για το μανδύα, 0,72 για το πεπτικό σύστημα και 0,82 για το σώμα.

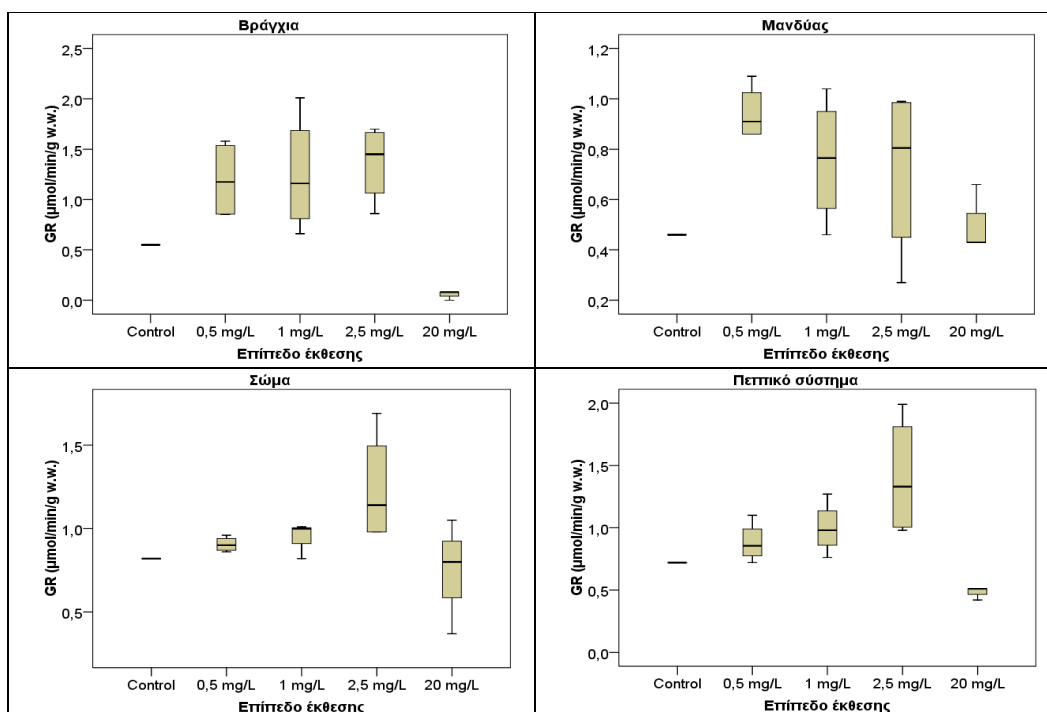
Οι τιμές GR που μετρήθηκαν στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0 και 2,5 ppm Cd, δεν παρουσίασαν ξεκάθαρη τάση με τις μέρες έκθεσης, είχαν όμως παρόμοια τάση με εκείνη του καδμίου και ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς. Αντίθετα, στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd βρέθηκε αρνητική συσχέτιση της GR με το κάδμιο. Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, δεν ξεχώρισε συστηματικά κάποιος ιστός με υψηλότερες τιμές (Σχήμα 154). Εκτός από τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm όπου ο μανδύας ήταν ο ιστός που είχε τις χαμηλότερες τιμές. Οι τιμές του ενζύμου για όλους τους ιστούς, και τα επίπεδα 0,5-1,0-2,5 ppm Cd ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς κατά 16-36% για τα βράγχια, 46-53% για το μανδύα, 6-27% για το πεπτικό σύστημα και 6-16% για το σώμα. Γενικά οι τιμές που προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm καδμίου παρουσίασαν συνεχή μείωση, κυρίως στα βράγχια που ήταν 7 φορές χαμηλότερη από του πληθυσμού αναφοράς.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 155, στον ίδιο ιστό οι τιμές της GR των τριών χαμηλότερων επιπέδων έκθεσης ήταν παρόμοιες μεταξύ τους και σχετικά υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, εκτός από το σώμα, ενώ οι τιμές του ενζύμου στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd ήταν χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς.

Κατά την αποτοξίνωση, η τιμή της GR σε όλους τους ιστούς μειώθηκε, χωρίς να φτάνει σε τιμές μικρότερες από του πληθυσμού αναφοράς, εκτός από το μανδύα και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd όπου οι τιμές ήταν μικρότερες από του πληθυσμού αναφοράς.



Σχήμα 154: Χρονική μεταβολή της ενεργότητας της GR (μmol/ min/ g w.w.) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 155: Box-plots των επιπέδων GR (μmol/ min/ g w.w) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.3.7 Μεταλλοθειονίνες σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Με την πάροδο των ημερών, σε κάθε ιστό των οργανισμών αναφοράς, η τιμή των μεταλλοθειονινών παρέμεινε σταθερή, με τιμές 0,016 μmol/g w.w. για τα βράγχια, 0,011 για το μανδύα, 0,010 για το πεπτικό σύστημα και 0,023 για το σώμα.

Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης (Σχήμα 156) παρατηρείται πως τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών και το σώμα τις υψηλότερες. Συνολικά, η τάση μεταξύ των ιστών ήταν η εξής: σώμα > μανδύα > πεπτικό σύστημα > βράγχια. Μέγιστη τιμή για όλους τους ιστούς προσδιορίστηκε την 20^η ημέρα, εκτός από τα βράγχια που προσδιορίστηκε την 15^η ημέρα.

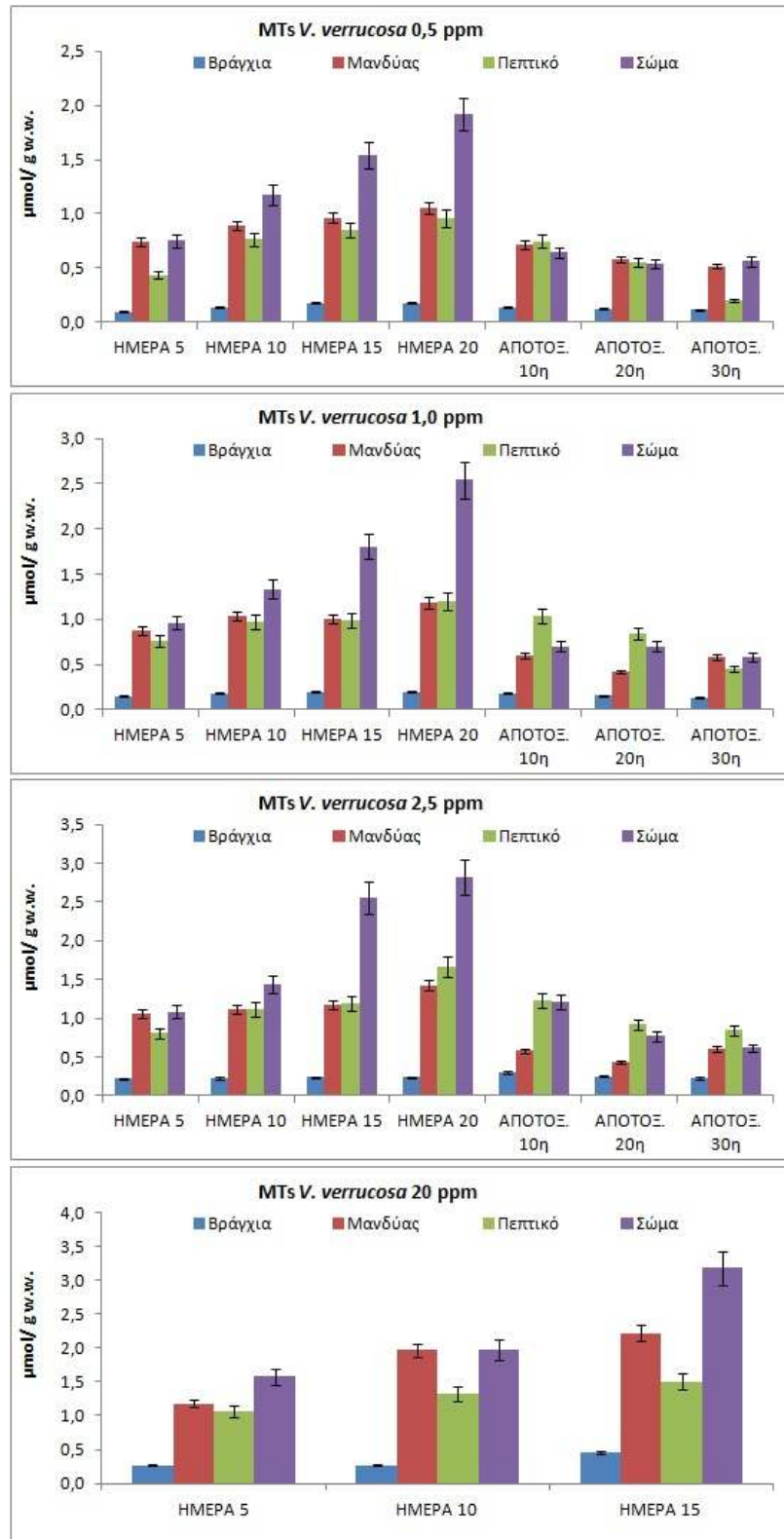
Από τον Πίνακα 64 παρατηρείται ότι όσο αυξανόταν το επίπεδο και οι μέρες έκθεσης η αύξηση ήταν μεγαλύτερη. Η μεγαλύτερη αύξηση προσδιορίστηκε την 5^η ημέρα στο μανδύα, ενώ στο τέλος του πειράματος στο πεπτικό σύστημα. Αξίζει να σημειωθεί πως ο ιστός που είχε την υψηλότερη συγκέντρωση καδμίου (βράγχια), είχε την μικρότερη συγκέντρωση μεταλλοθειονινών.

Πίνακας 63: Αύξηση των μεταλλοθειονινών (C_{DayX}/C_{Day0}) σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς

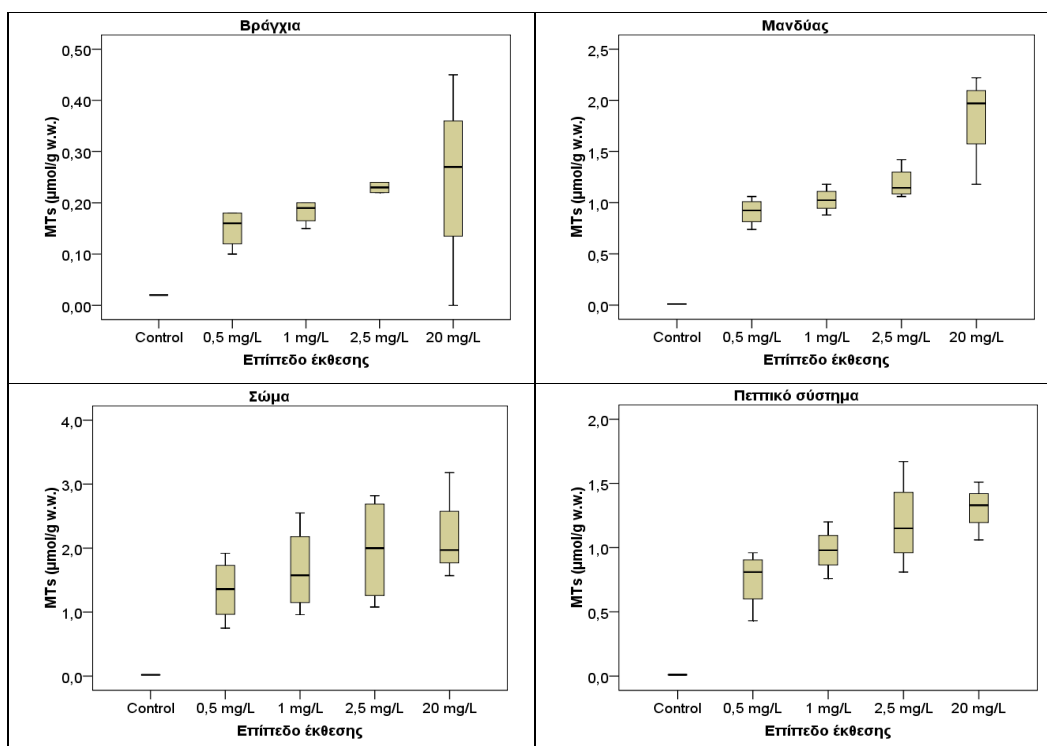
	0,50ppm		1,0ppm		2,5ppm		20ppm	
	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20	day 5	day 20
βράγχια	6	11	9	12	14	15	17	
μανδύας	67	95	79	106	95	128	106	
πεπτικό σύστημα	43	96	77	120	81	168	107	
σώμα	33	84	42	112	47	124	69	

Από το Σχήμα 156 φαίνεται ότι η συγκέντρωση των μεταλλοθειονινών σε όλα τα επίπεδα έκθεσης αυξανόταν καθόλη την διάρκεια των ημερών έκθεσης ενώ μειώθηκε κατά την αποτοξίνωση. Από το

Σχήμα 157 φαίνεται πως για κάθε ιστό όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, αυξήθηκαν και οι τιμές των μεταλλοθειονινών. Κατά την 10ήμερη περίοδο αποτοξίνωσης των οργανισμών οι τιμές των μεταλλοθειονινών γενικά μειώθηκαν σε όλους τους ιστούς.



Σχήμα 156: Χρονική μεταβολή των μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο



Σχήμα 157: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών ($\mu\text{mol/g w.w.}$) στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε κάδμιο

6.3.8 Ψευδαργύρος σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Σε όλα τα επίπεδα έκθεσης παρατηρήθηκε πως το μανδύας είχε τις υψηλότερες τιμές ψευδαργύρου ενώ οι υπόλοιποι ιστοί δεν διέφεραν μεταξύ τους. Στον ίδιο ιστό κάποια ιδιαίτερη τάση με αύξηση του επιπέδου έκθεσης αλλά και των ημερών έκθεσης δεν προέκυψε.

6.3.9 Συσχέτιση καδμίου με βιοδείκτες

Συσχέτιση των όλων των τιμών του Cd, για κάθε ιστό των κυδωνιών, με τους βιοδείκτες, για επίπεδο εμπιστοσύνης >95% εμφάνισε τις εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (Πίνακες 64-67):

- αρνητική συσχέτιση με την ακετυλοχολινεστεράση στα βράγχια και το μανδύα.
- θετική συσχέτιση με την λιπιδική υπεροξειδωση και στους τέσσερις ιστούς.
- θετική συσχέτιση με την GST στα βράγχια και το σώμα των οργανισμών, ενώ στο πεπτικό σύστημα αρνητική.
- αρνητική συσχέτιση με την GR στο μανδύα και το σώμα των οργανισμών.
- αρνητική συσχέτιση με την καταλάση στο μανδύα.
- θετική συσχέτιση με τις μεταλλοθειονίνες στο μανδύα και το σώμα.

6.3.10 Συσχέτιση βιοδεικτών μεταξύ τους σε ιστούς *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε κάδμιο

Επειδή οι βιοδείκτες συσχετίζονται με το κάδμιο, ελέγχθηκε και η μεταξύ τους συσχέτιση. Στόχος της εύρεσης συσχετίσεων μεταξύ των τιμών των βιοδεικτών ήταν να ελεγχθεί αν υπάρχει κοινή συμπεριφορά-τάση των βιοδεικτών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο τρόπος αντίδρασης στην έκθεση σε

κάδμιο είναι παρόμοιος. Έτσι βρέθηκαν οι εξής στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις για επίπεδο εμπιστοσύνης >95%:

- Αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης και της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε όλους τους ιστούς, εκτός από το πεπτικό σύστημα των οργανισμών.
- Αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης, και της GST στα βράγχια και το σώμα των οργανισμών, ενώ στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν θετική.
- Θετική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης και της GR σε όλους τους ιστούς των οργανισμών εκτός από τα βράγχια.
- Αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης και της καταλάσης στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών, ενώ στο μανδύα η συσχέτιση ήταν θετική.
- Αρνητική συσχέτιση της ακετυλοχολινεστεράσης και των μεταλλοθειονινών σε όλους τους ιστούς των οργανισμών εκτός από το πεπτικό σύστημα.
- Θετική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και της GST στα βράγχια και το σώμα των οργανισμών, ενώ στο μανδύα η συσχέτιση ήταν αρνητική.
- Αρνητική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και της GR στο μανδύα και στο σώμα, ενώ στους ίδιους ιστούς η συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης με τις μεταλλοθειονίνες ήταν θετική.
- Αρνητική συσχέτιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και της καταλάσης στο μανδύα.
- Θετική συσχέτιση της GST και της καταλάσης στο μανδύα και το σώμα των οργανισμών, ενώ στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν αρνητική.
- Οι μεταλλοθειονίνες συσχετίστηκαν με την GR αρνητικά στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών, ενώ στο σώμα η συσχέτιση ήταν θετική.
- Οι μεταλλοθειονίνες συσχετίστηκαν με την καταλάση αρνητικά σε μανδύα και σώμα, ενώ στο πεπτικό σύστημα η συσχέτιση ήταν θετική.

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

Οι μεταλλοθειονίνες είναι ένας αμυντικός μηχανισμός των κυττάρων που λειτουργεί στην αιτία (είσοδος μετάλλου στους οργανισμούς) καθώς παράγονται όταν εισέρχονται μέταλλα στους ιστούς. Σε κάθε ιστό παρατηρείται αύξηση των μεταλλοθειονινών, κάτι που υποδεικνύει ότι ο αμυντικός μηχανισμός βρίσκεται σε λειτουργία. Προφανώς όμως δεν επαρκεί, ή δεν είναι αρκετά αποτελεσματικός, καθώς οι μετρήσεις των βιοδεικτών (AChE, GST, GR, CAT, LPO) φαίνεται πως επηρεάζονται από τα βαρέα μέταλλα.

Όποιος ιστός και να χρησιμοποιηθεί ως ιστός ελέγχου, η λιπιδική υπεροξειδωση ή η καταλάση είναι οι καταλληλότεροι βιοδείκτες. Για τα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα, κατάλληλος βιοδείκτης είναι και οι μεταλλοθειονίνες.

Πίνακας 64: Πίνακας συχτιέσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για τα βράγχια των οργανισμών

	Cd	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn
Cd	1							
AChE	-0,024	1						
LPO	0,860**	-0,138	1					
GST	-0,425	0,633*	-0,416	1				
GR	-0,668**	0,393	-0,776**	0,819**	1			
CAT	0,860**	0,316	0,724**	0,160	-0,106	1		
MTs	0,814**	0,239	0,732**	0,126	-0,089	0,869**	1	
Zn	-0,309	-0,551*	-0,081	-0,183	-0,013	-0,266	0,026	1

Πίνακας 65: Πίνακας συχτιέσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το μανδύα των οργανισμών

	Cd	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn
Cd	1							
AChE	0,162	1						
LPO	0,893**	0,154	1					
GST	-0,327	-0,098	-0,489	1				
GR	-0,206	-0,336	-0,344	0,385	1			
CAT	0,978**	0,045	0,874**	-0,249	-0,162	1		
MTs	0,926**	0,100	0,932**	-0,377	-0,342	0,949**	1	
Zn	0,788**	0,131	0,692**	0,061	-0,059	0,837**	0,792**	1

Πίνακας 66: Πίνακας συχτιέσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το πεπτικό σύστημα των οργανισμών

	Cd	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn
Cd	1							
AChE	0,297	1						
LPO	0,894**	0,187	1					
GST	-0,021	0,618*	-0,212	1				
GR	0,196	0,619*	0,082	0,681**	1			
CAT	0,890**	0,329	0,792**	-0,036	0,206	1		
MTs	0,822**	0,252	0,813**	-0,107	0,301	0,883**	1	
Zn	-0,201	-0,272	-0,208	-0,216	-0,140	-0,020	-0,037	1

Πίνακας 67: Πίνακας συχτιέσεων των τιμών του καδμίου όλων των επιπέδων έκθεσης με τις τιμές των βιοδεικτών για το σώμα των οργανισμών

	Cd	AChE	LPO	GST	GR	CAT	MTs	Zn
Cd	1							
AChE	-0,069	1						
LPO	0,921**	0,046	1					
GST	0,498	0,176	0,494	1				
GR	-0,436	0,092	-0,323	0,156	1			
CAT	0,998**	-0,073	0,916**	0,510	-0,442	1		
MTs	0,472	0,093	0,660**	0,211	0,119	0,467	1	
Zn	-0,164	-0,281	-0,209	-0,343	-0,080	-0,185	0,141	1

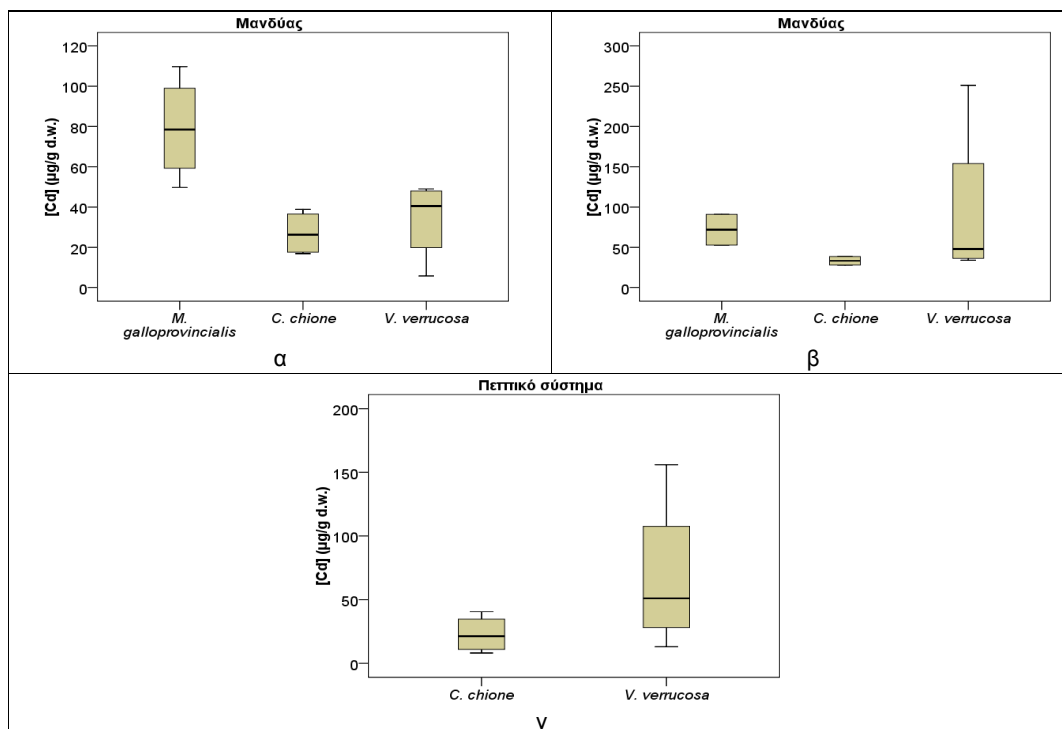
* δηλώνει στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

** δηλώνουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση για επίπεδο εμπιστοσύνης 99%

6.4 Σύγκριση των τριών οργανισμών

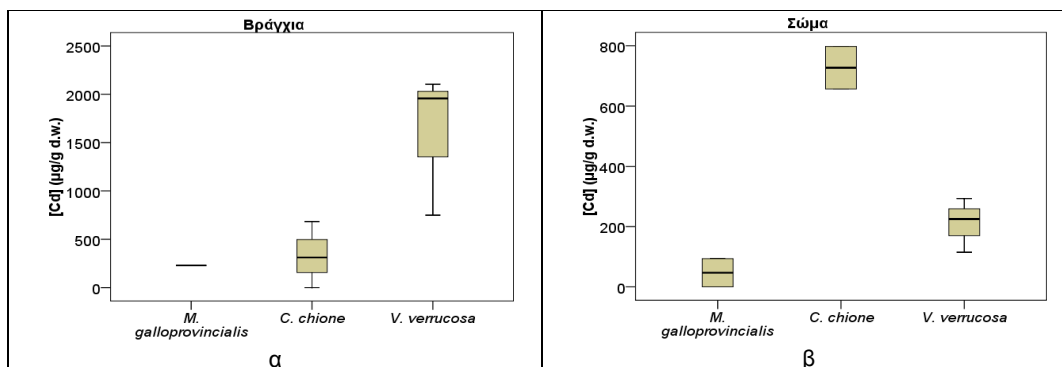
6.4.1 Επίπεδα και κατανομή καδμίου

Συγκρίνοντας τις τιμές του καδμίου μεταξύ των οργανισμών, βρέθηκε πως στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα τρία χαμηλότερα επίπεδα η τάση ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* ≈ *C. chione*. Εξαιρέση αποτελούσε ο μανδύας των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd, όπου δεν βρέθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των οργανισμών ($p > 0,05$). Στο πεπτικό σύστημα, οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο κυδώνι.



Σχήμα 158: Box-plots επιπέδων καδμίου (µg/g d.w.) για το α) μανδύα οργανισμών που εκτέθηκαν α) σε 1,0 ppm Cd, β) σε 2,5 ppm Cd, γ) πεπτικό σύστημα οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd

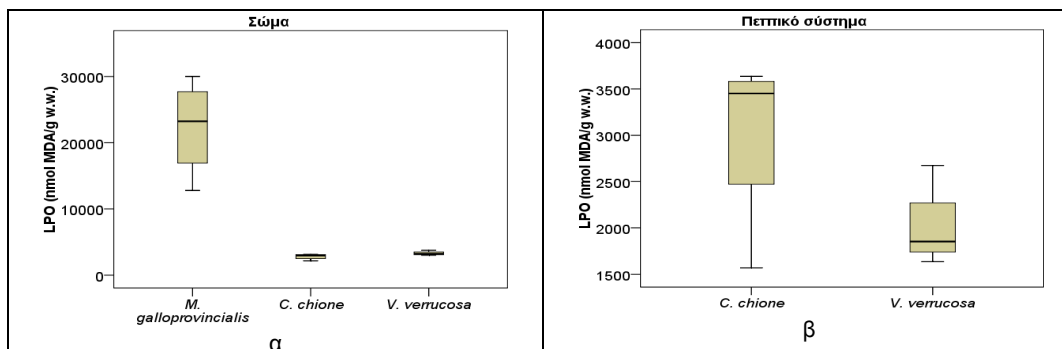
Για το υψηλότερο επίπεδο έκθεσης, οι υψηλότερες τιμές στα βράγχια και στο μανδύα, προσδιορίστηκαν στο κυδώνι, με την τάση: *V. verrucosa* > *C. chione* ≥ *M. galloprovincialis*, ενώ στο σώμα η τάση ήταν: *C. chione* > *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis*. Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στη γυαλιστερή σε σχέση με το κυδώνι.



Σχήμα 159: Box-plots των επιπέδων καδμίου (µg/g d.w.) για α) βράγχια, β) σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd

6.4.2 Λιπιδική υπεροξειδωση

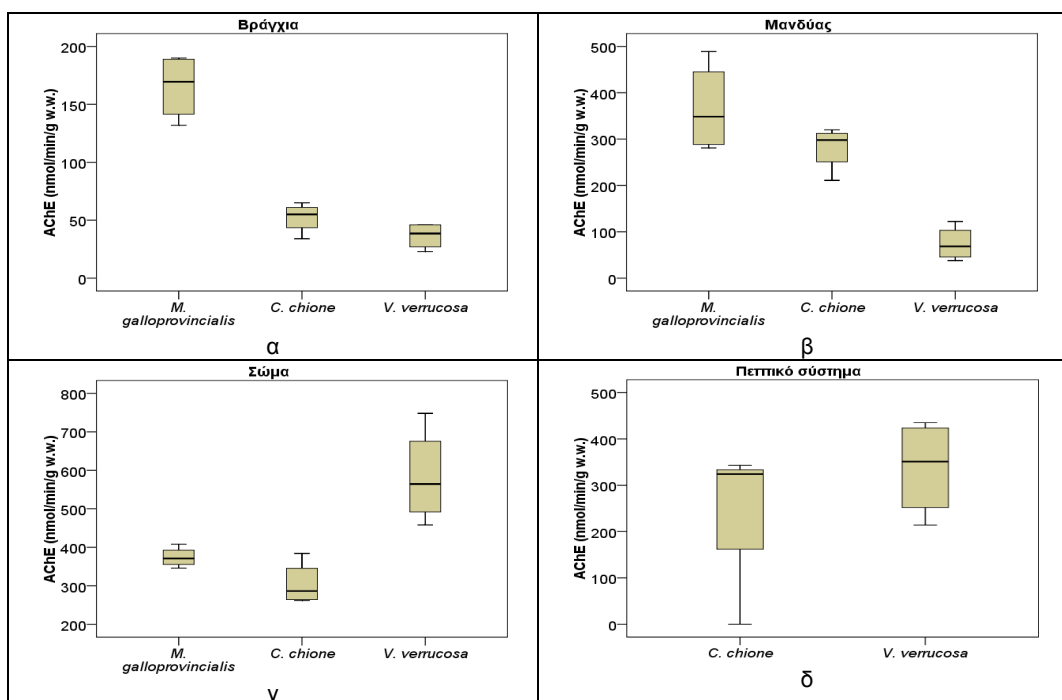
Στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των οργανισμών, η τάση της LPO ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* ≈ *V. verrucosa*. Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε 0,5 και 1,0 ppm Cd υψηλότερη οξειδωτική βλάβη είχε υποστεί ο ιστός της γυαλιστερής από ότι του κυδωνιού, ενώ για τα δύο υψηλότερα επίπεδα η τάση ήταν η αντίστροφη.



Σχήμα 160: Box-plots των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης (nmol MDA/ g w.w.) για το α) σώμα, β) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 mg/L Cd

6.4.3 Ακετυλοχολινεστεράση

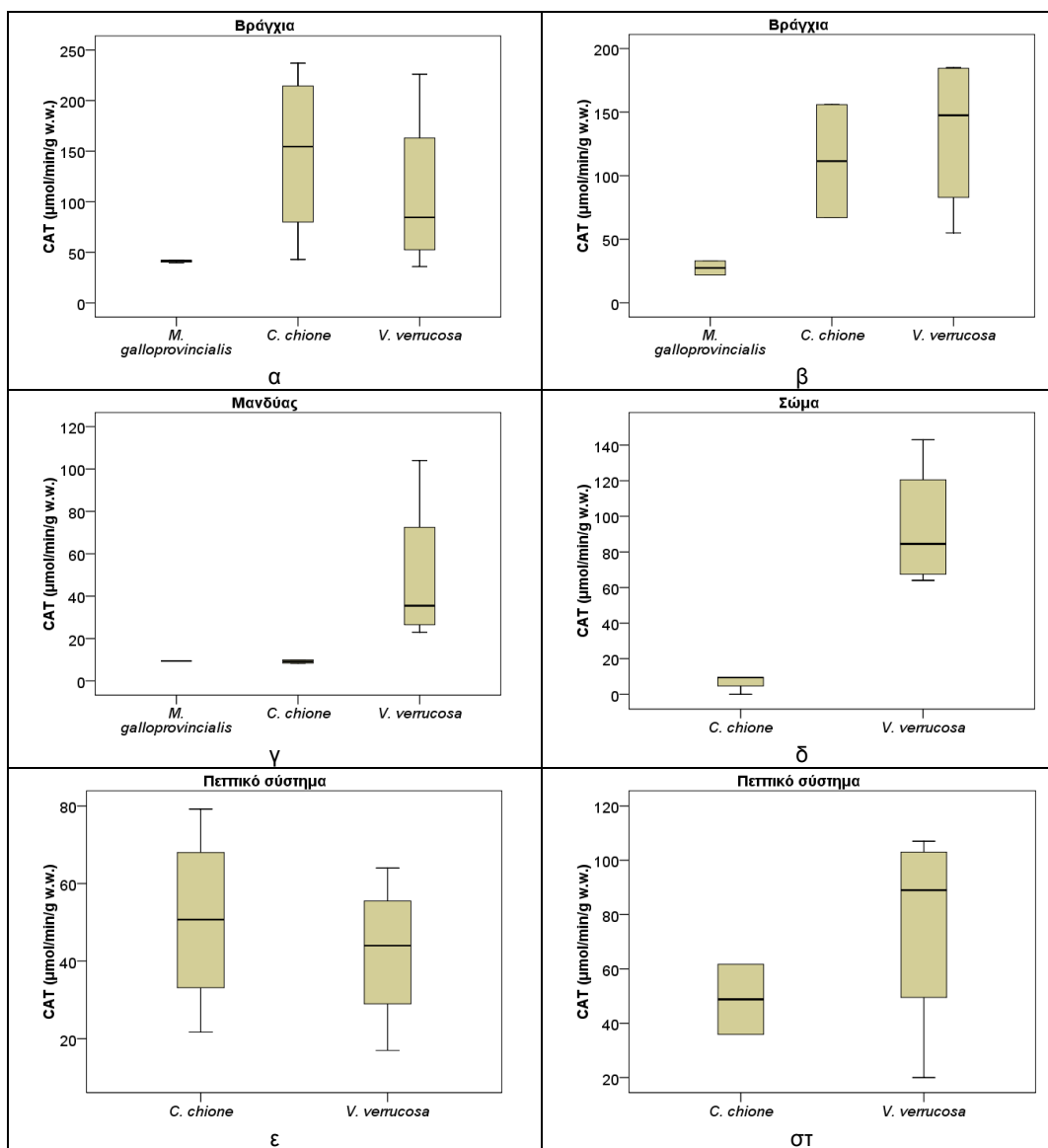
Η τάση για τα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάθε επίπεδο καδμίου ήταν η εξής *M. galloprovincialis* > *C. chione* ≈ *V. verrucosa*. Αντίστοιχα στο μανδύα η τάση ήταν: *M. galloprovincialis* ≥ *C. chione* > *V. verrucosa*, ενώ στο σώμα ήταν: *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* ≈ *C. chione*. Η διάμεση τιμή του ενζύμου στο πεπτικό σύστημα των κυδωνιών ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη των γυαλιστερών, χωρίς όμως να προκύπτει στατιστική διαφορά.



Σχήμα 161: Box-plots των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης (nmol/min/g w.w) σε α) βράγχια, β) μανδύα και γ) σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd, δ) πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd

6.4.4 Καταλάση

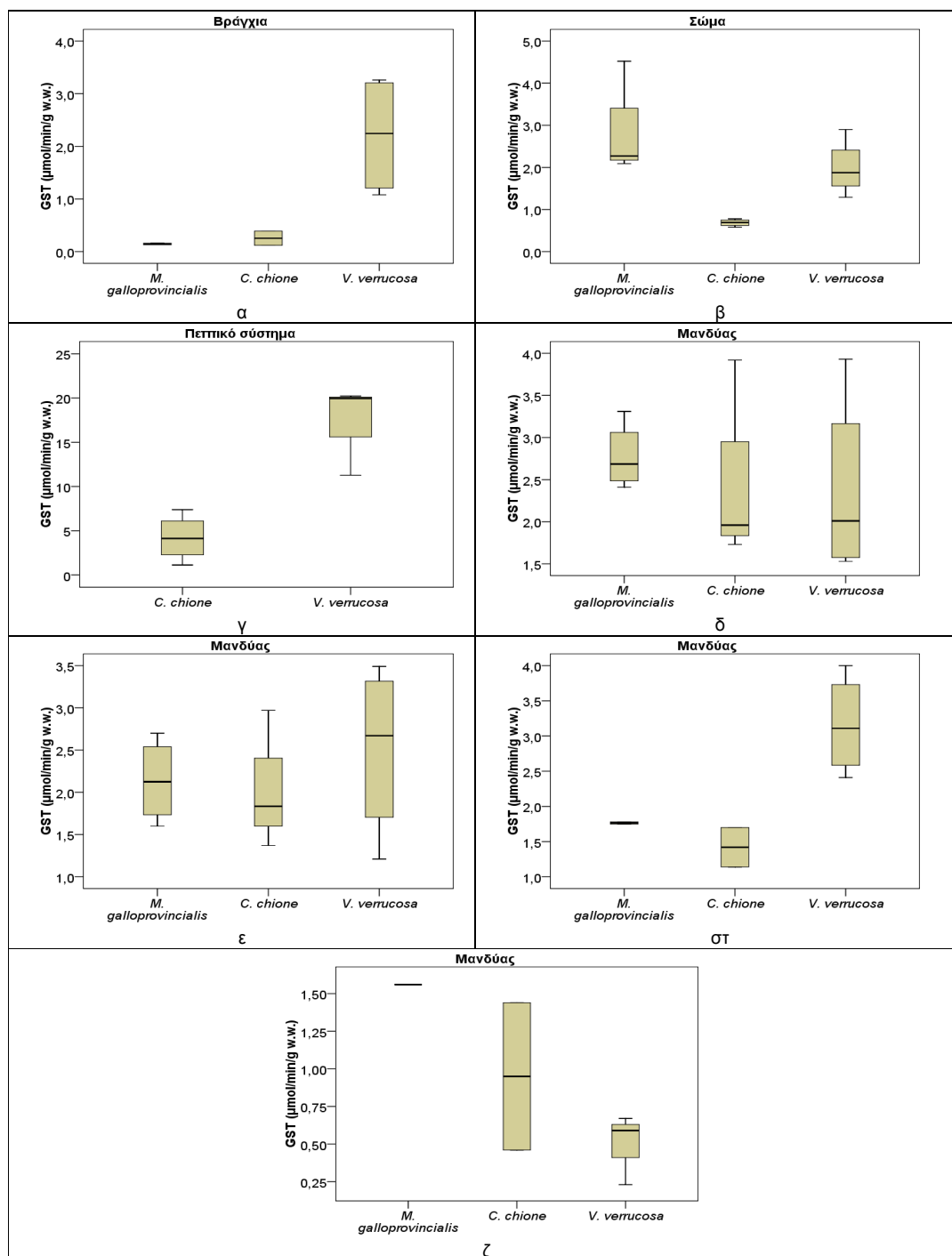
Για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης η τάση στα βράγχια ήταν: *C. chione* > *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis*, ενώ για τα δύο υψηλότερα επίπεδα έκθεσης το κυδώνι είχε ελαφρά υψηλότερη διάμεση τιμή από την γυαλιστερή, χωρίς όμως να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Η τάση στο μανδύα των οργανισμών για όλα τα επίπεδα έκθεσης ήταν: *V. verrucosa* > *C. chione* ≈ *M. galloprovincialis*. Οι τιμές στο σώμα των κυδωνιών ήταν στατιστικά ψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές των γυαλιστερών ($p < 0,05$) για όλα τα επίπεδα έκθεσης. Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο χαμηλότερα επίπεδα καδμίου οι τιμές ήταν παρόμοιες στα δύο δίθυρα που ζουν εντός της άμμου, ενώ στα δύο υψηλότερα επίπεδα το κυδώνι είχε στατιστικά υψηλότερες τιμές καταλάσης από την γυαλιστερή.



Σχήμα 162: Box-plots των επιπέδων καταλάσης (μmol/min/g w.w) α) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd, β) στους τέσσερις ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd (β, γ, δ, στ), ε) στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd

6.4.5 Σ μεταφοράση της γλουταθειόνης

Η τάση στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου ήταν: *V. verrucosa* > *C. chione* ≥ *M. galloprovincialis*, ενώ στο σώμα: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* > *C. chione*. Στο πεπτικό σύστημα, υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο κυδώνι. Στο μανδύα η τάση διέφερε ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης. Για τα επίπεδα 0,5 και 20 ppm Cd η τάση ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* ≈ *V. verrucosa*. Για το επίπεδο 1,0 ppm Cd, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικές διαφορές, ενώ στο 2,5 ppm Cd οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο κυδώνι.

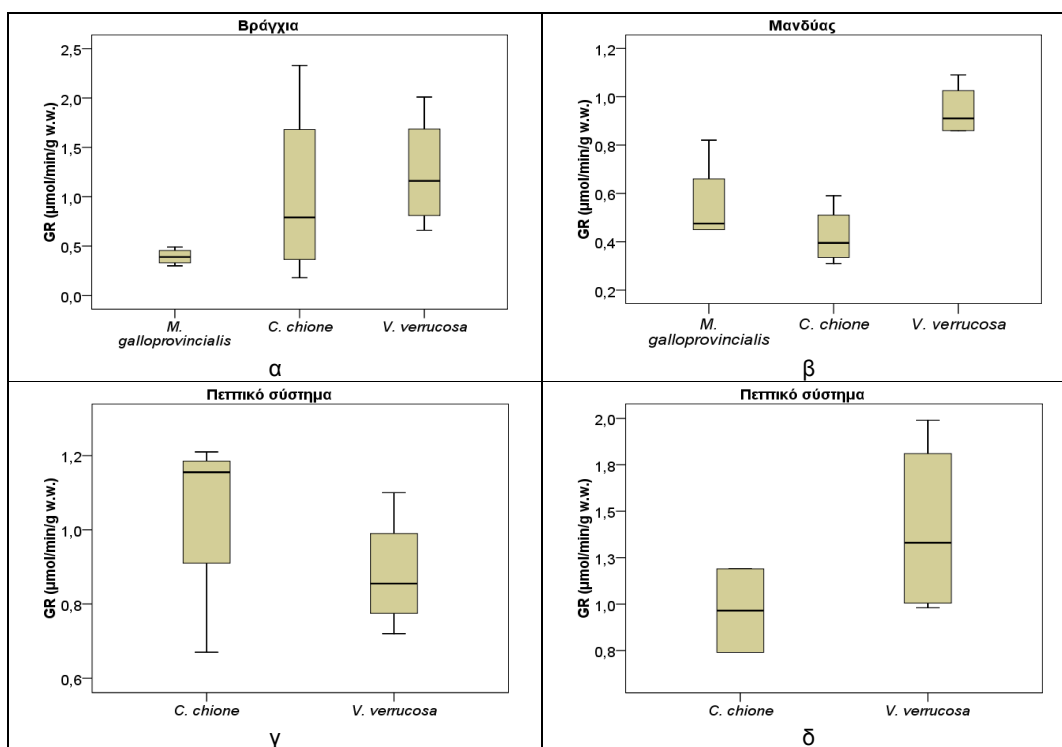


Σχήμα 163: Box-plots των επιπέδων GST (μmol/min/g w.w) στα βράγχια (α) και το μανδύα (στ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd, στο σώμα (β), το πεπτικό σύστημα (γ) και το μανδύα (ε)

των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd, στο μανδύα (δ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd και στο μανδύα (ζ) των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd

6.4.6 Αναγωγή της γλουταθειόνης

Στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0 και 2,5 ppm Cd η τάση ήταν η εξής: *V. verrucosa* ≥ *C. chione* > *M. galloprovincialis*, ενώ η τάση για εκείνους που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* ≥ *V. verrucosa*. Στο μανδύα και στο σώμα η τάση, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* ≥ *C. chione*. Οι τιμές της GR στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών δεν παρουσίασαν στατιστική διαφορά για κανένα επίπεδο έκθεσης, αν και στο χαμηλότερο επίπεδο οι γυαλιστερές είχαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ στα υπόλοιπα, το κυδώνι.

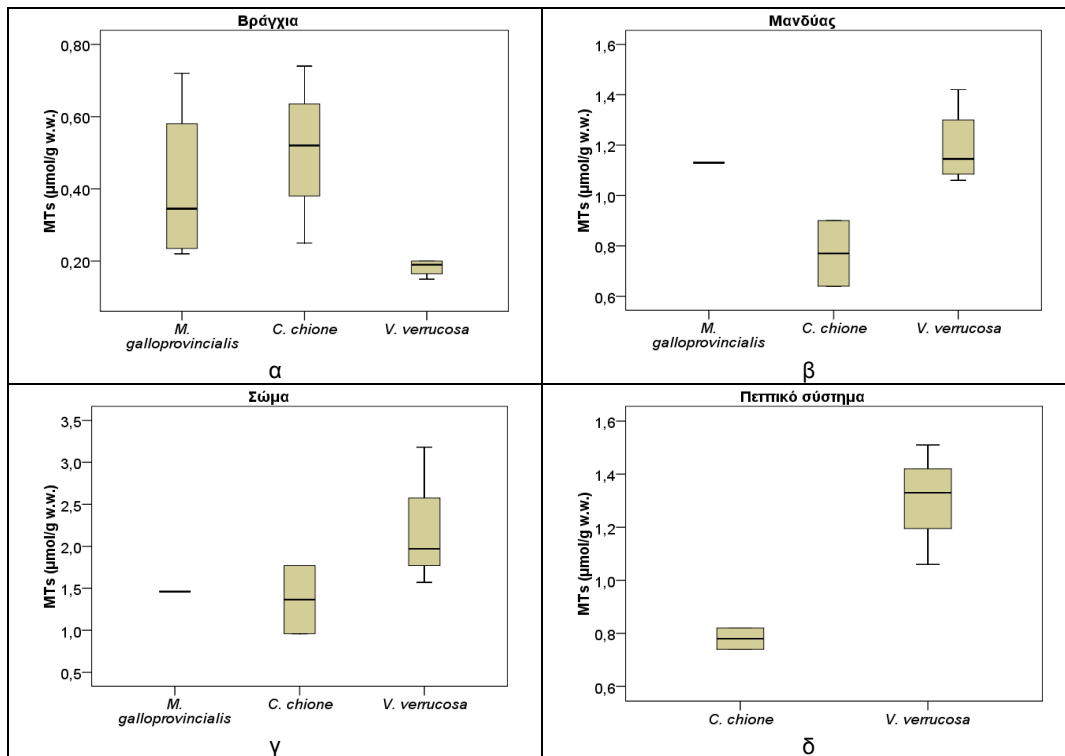


Σχήμα 164: Box-plots των επιπέδων GR (μmol/min/g w.w) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd (α), στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5 ppm Cd (β, γ) και στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd (δ).

6.4.7 Μεταλλοθειονίνες

Οι τιμές των μεταλλοθειονινών στα βράγχια των γυαλιστερών ήταν παρόμοιες με τις τιμές των μυδιών, αλλά χαμηλότερες και στατιστικά διαφορετικές ήταν οι τιμές του κυδωνιού. Στο μανδύα, για τα δύο χαμηλότερα επίπεδα, το μύδι είχε ελαφρά υψηλότερες τιμές από τους δύο άλλους οργανισμούς. Στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν στα δύο υψηλότερα επίπεδα η γυαλιστερή είχε χαμηλότερες και στατιστικά διαφορετικές τιμές ενώ οι άλλοι οργανισμοί δεν διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους. Στο σώμα των γυαλιστερών προσδιορίστηκαν οι χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών, ενώ οι υψηλότερες τιμές για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd προσδιορίστηκαν στο κυδώνι, ενώ για τους υπόλοιπους οργανισμούς, το μύδι με το κυδώνι

είχαν παρόμοιες τιμές. Το κυδώνι είχε τις υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών στο πεπτικό σύστημα για κάθε επίπεδο έκθεσης.



Σχήμα 165: Box-plots των επιπέδων μεταλλοθειονινών (μmol/g w.w) στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm Cd, β) στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 2,5 ppm Cd, γ) στο σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd, δ) στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ

Για να είναι ορθότερη η σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων διαφορετικών μετάλλων, οι συγκεντρώσεις εκφράστηκαν σε μολι μέταλλου/g d.w. Για τη σύγκριση των επιπέδων του κάθε βιοδείκτη στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν στα τρία μέταλλα χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της 20^{ης} ημέρας των πειραμάτων έκθεσης.

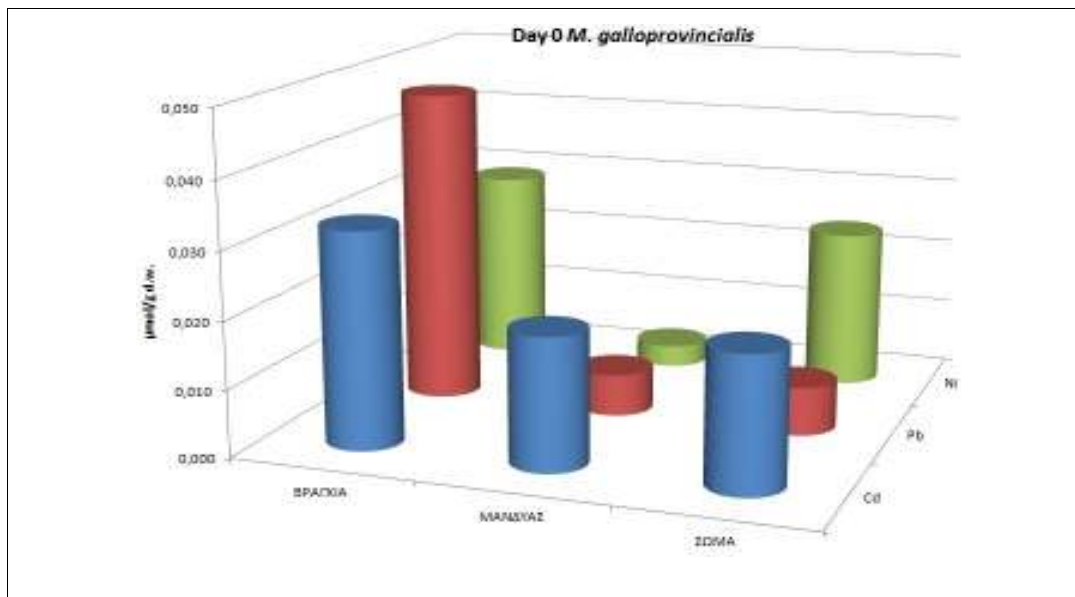
7.1 *Mytilus galloprovincialis*

7.1.1 Επίπεδα και κατανομή μετάλλων

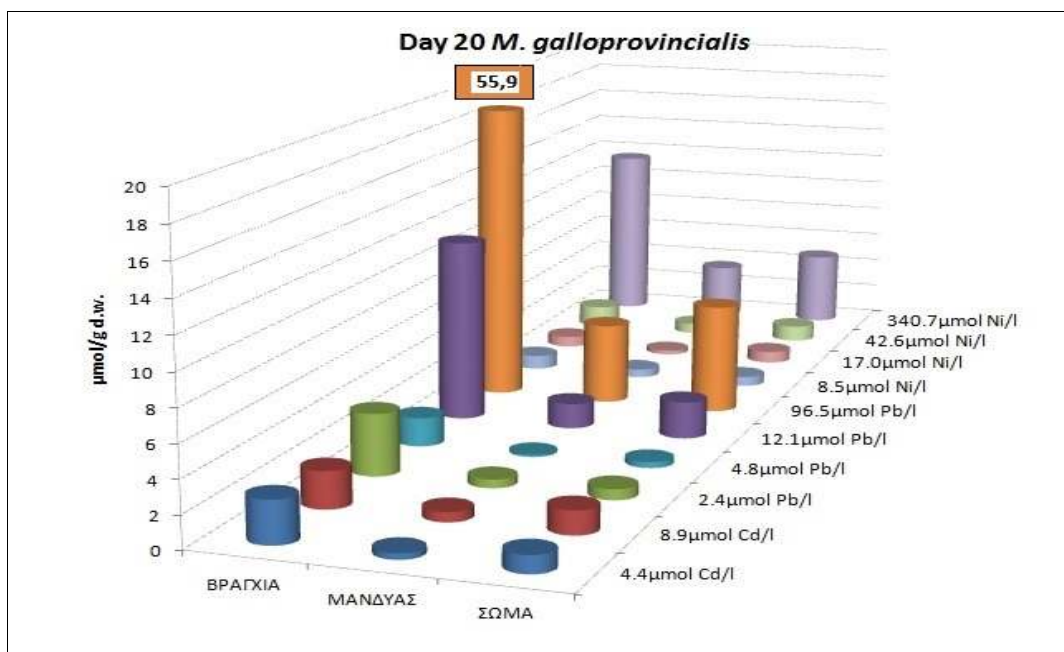
Την ημέρα 0 (Σχήμα 166) όπου τα μύδια έφτασαν στο εργαστήριο, υψηλότερες συγκεντρώσεις (μολι/g d.w.) στα βράγχια είχε ο μόλυβδος, στο μανδύα το κάδμιο και στο σώμα το νικέλιο. Για κάθε στοιχείο, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στα βράγχια.

Την 20^η ημέρα του πειράματος (Σχήμα 167), υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο. Έκθεση σε 340 μολι Ni/L οδήγησε σε παρόμοιο αποτέλεσμα την έκθεση σε 96,4 μολι Pb/L. Φαίνεται λοιπόν πως το νικέλιο για να βιοσυσσωρευτεί στους ιστούς των οργανισμών πρέπει να βρίσκεται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στο θαλασσινό νερό. Από το ίδιο Σχήμα φαίνεται ότι τα βράγχια βιοσυγκέντρωναν υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων και για τα τρία υπό μελέτη στοιχεία.

Κατά την αποτοξίνωση, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο, ενώ γενικά τα βράγχια ήταν ο ιστός με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις και των τριών στοιχείων. Παρατηρήθηκε σε όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν και στα τρία στοιχεία, ότι το ποσοστό της αποτοξίνωσης αυξανόταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο, το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης κατά την αποτοξίνωση προσδιορίστηκε στα βράγχιά τους, ενώ σε εκείνους που εκτέθηκαν σε νικέλιο, στο σώμα τους. Το υψηλότερο ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης μετάλλου κατά την αποτοξίνωση προσδιορίστηκε στα βράγχια των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε 96,5 μολι Pb/L και ήταν 91%, ενώ αντίστοιχα στο μανδύα και στο σώμα τα υψηλότερα ποσοστά προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 42,6 μολι Ni/L.



Σχήμα 166: Συγκριτική απεικόνιση συγκέντρωσης των τριών μετάλλων σε *M. galloprovincialis* μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο (Day 0)

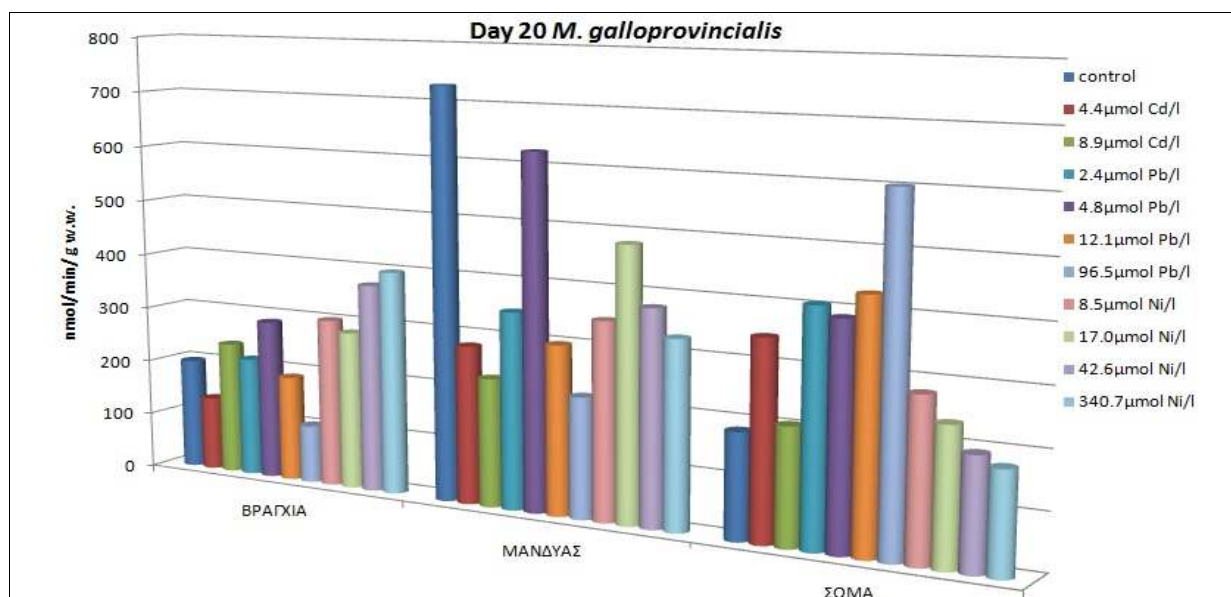


Σχήμα 167: Συγκριτική απεικόνιση βιοσυσσώρευσης των τριών μετάλλων σε *M. galloprovincialis* την 20^η ημέρα έκθεσης

Σημείωση: η τιμή του μολύβδου στα βράγχια των μυδιών που έχουν εκτεθεί σε 96,5 μmol Pb/L είναι 55,9 μmol/g d.w., αλλά για να είναι εμφανείς και οι τιμές των υπόλοιπων ημερών, μειώθηκε.

7.1.2 Ακετυλοχολινεστεράση

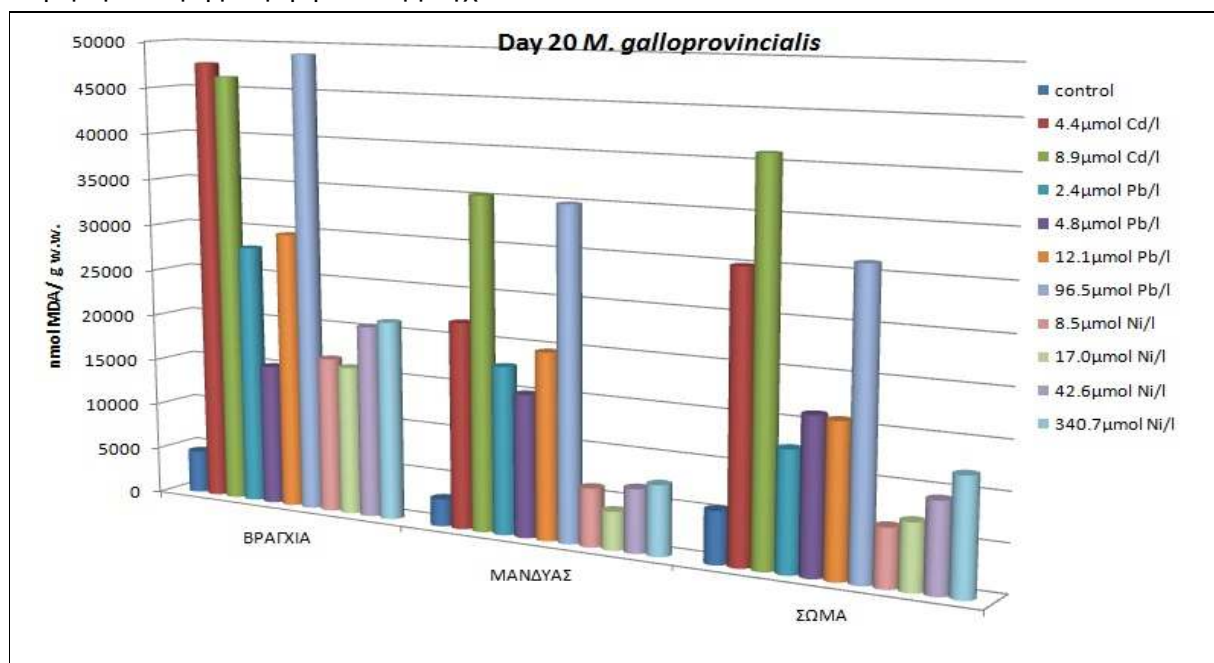
Από το Σχήμα 168 φαίνεται πως η τάση στα βράγχια και το σώμα ήταν αυξητική σε σχέση με τις τιμές του πληθυσμού αναφοράς, ενώ στο μανδύα οι τιμές ήταν χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς. Στα βράγχια, υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που είχαν εκτεθεί σε νικέλιο, ενώ στο σώμα σε εκείνους που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο.



Σχήμα 168: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης στους ιστούς των *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.1.3 Λιπιδική υπεροξειδωση

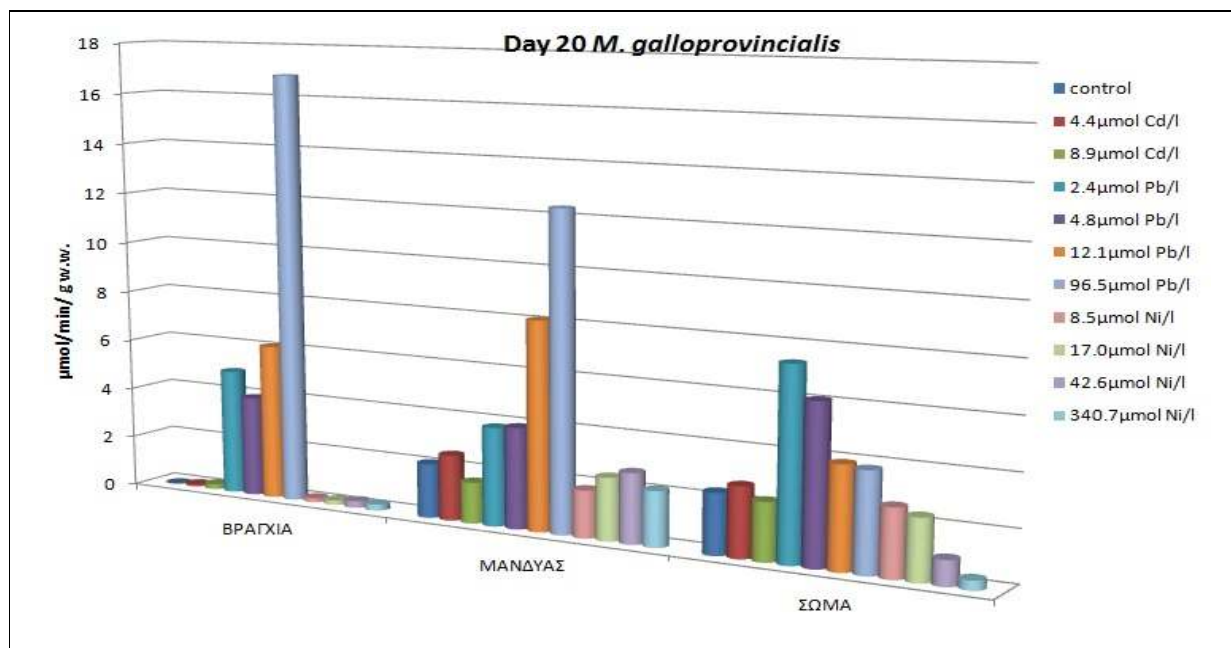
Η λιπιδική υπεροξειδωση σε όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μετάλλων, ήταν υψηλότερη από του πληθυσμού αναφοράς και μάλιστα αυξανόταν όσο αυξανόταν και το επίπεδο έκθεσης. Και στους τρεις ιστούς, μεγαλύτερη βλάβη είχαν υποστεί οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε κάδμιο και την μικρότερη οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε νικέλιο. Για όλους τους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το μέταλλο και το επίπεδο έκθεσης, ο ιστός που είχε υποστεί την μεγαλύτερη βλάβη ήταν τα βράγχια.



Σχήμα 169: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης στους ιστούς των *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.1.4 S μεταφοράση της γλουταθειόνης

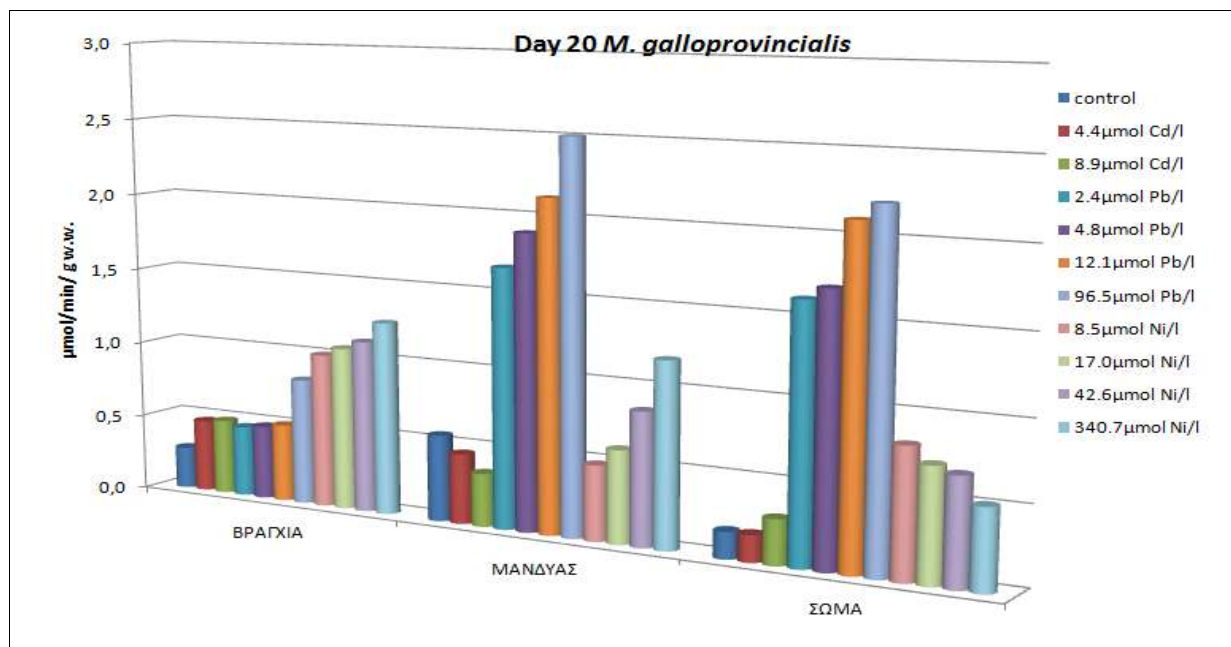
Και στους τρεις ιστούς, μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο από ότι στα άλλα δύο μέταλλα. Υψηλότερη ενεργότητα ενζύμου για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο προσδιορίστηκε στα βράγχια των οργανισμών, ενώ για εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο και νικέλιο στο σώμα, με τις τιμές όμως να μειώνονται στον ιστό αυτό όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης (Σχήμα 170).



Σχήμα 170: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων S μεταφοράσης της γλουταθειόνης στους ιστούς των *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.1.5 Αναγωγίαση της γλουταθειόνης

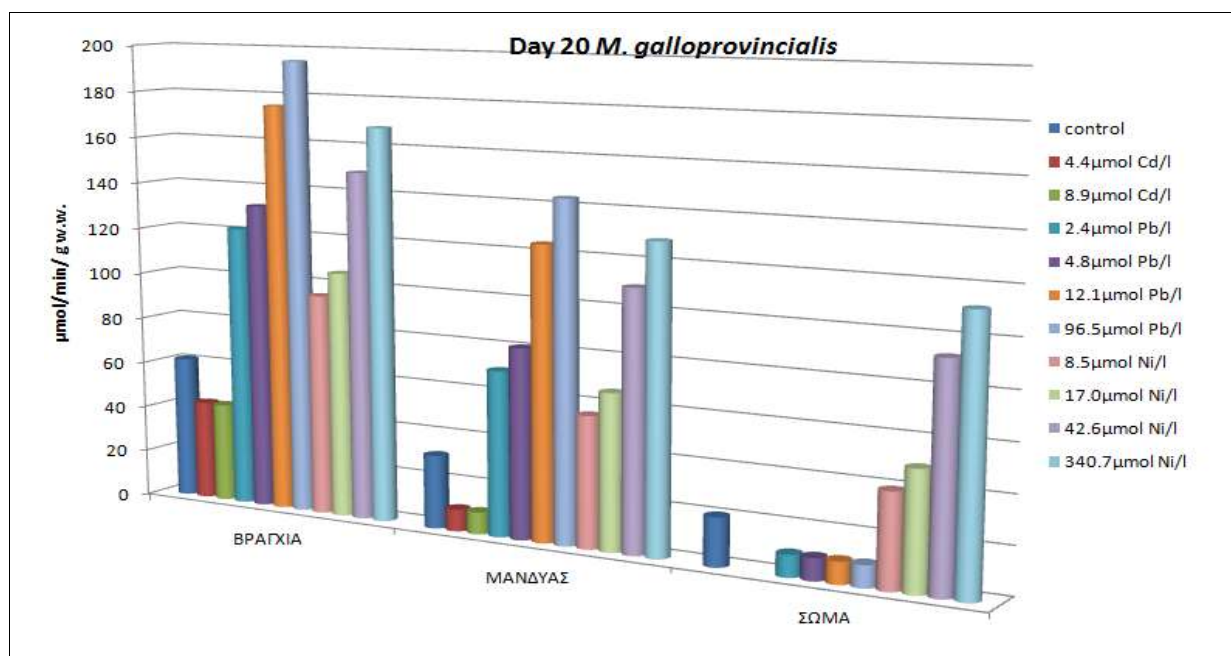
Στα βράγχια των οργανισμών, μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στους οργανισμούς που εκτέθηκαν νικέλιο από ότι στα άλλα δύο μέταλλα, ενώ στο μανδύα και στο σώμα υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο. Υψηλότερη ενεργότητα ενζύμου για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο προσδιορίστηκε στο μανδύα και το σώμα, ενώ για εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο και νικέλιο, στα βράγχια.



Σχήμα 171: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων αναγωγής της γλουταθειόνης στους ιστούς των *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.1.6 Κατάλυση

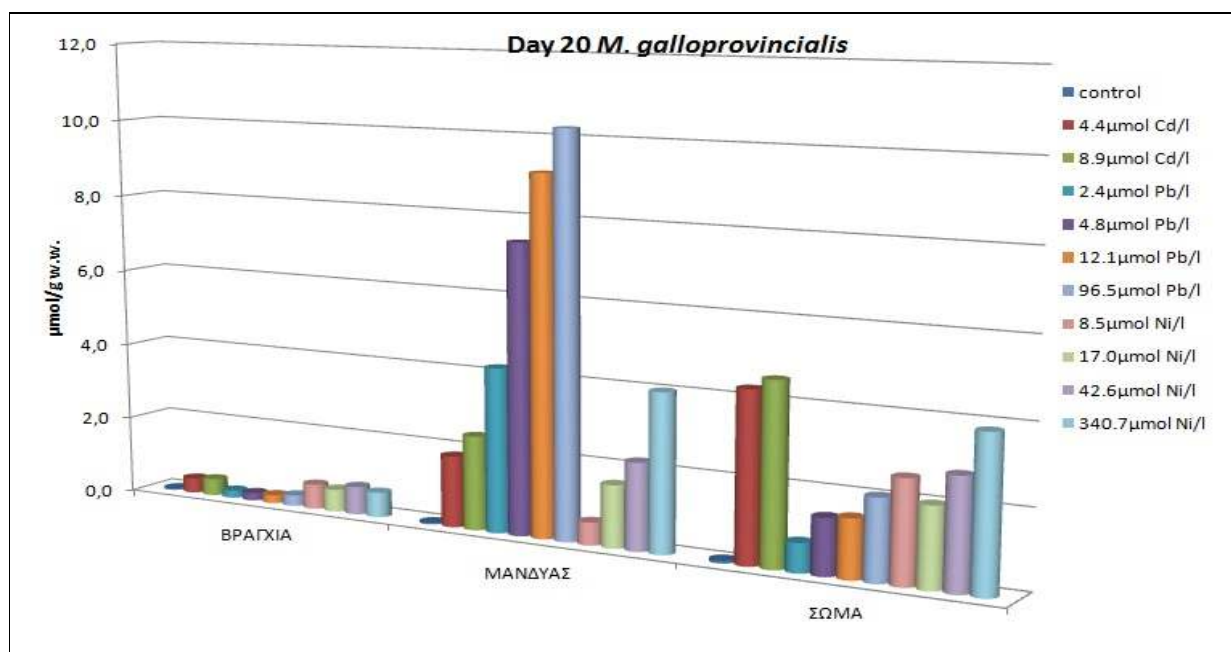
Στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών, μεγαλύτερη ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και νικέλιο, ενώ στο σώμα, στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο. Μεταξύ των ιστών, για κάθε μέταλλο, υψηλότερη ενεργότητα ενζύμου προσδιορίστηκε στα βράγχια των οργανισμών.



Σχήμα 172: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων κατάλυσης στους ιστούς των *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.1.7 Μεταλλοθειονίνες

Στα βράγχια, μεγαλύτερη συγκέντρωση μεταλλοθειονινών προσδιορίστηκε στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο, στο μανδύα σε εκείνους που εκτέθηκαν σε μόλυβδο, ενώ στο σώμα σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μεταλλοθειονινών, για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο, προσδιορίστηκαν στο μανδύα σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς, ενώ σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο και νικέλιο στο σώμα τους.



Σχήμα 173: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων μεταλλοθειονινών στους ιστούς των *M. galloprovincialis* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.2 *Callista chione*

7.2.1 Επίπεδα και κατανομή μετάλλων

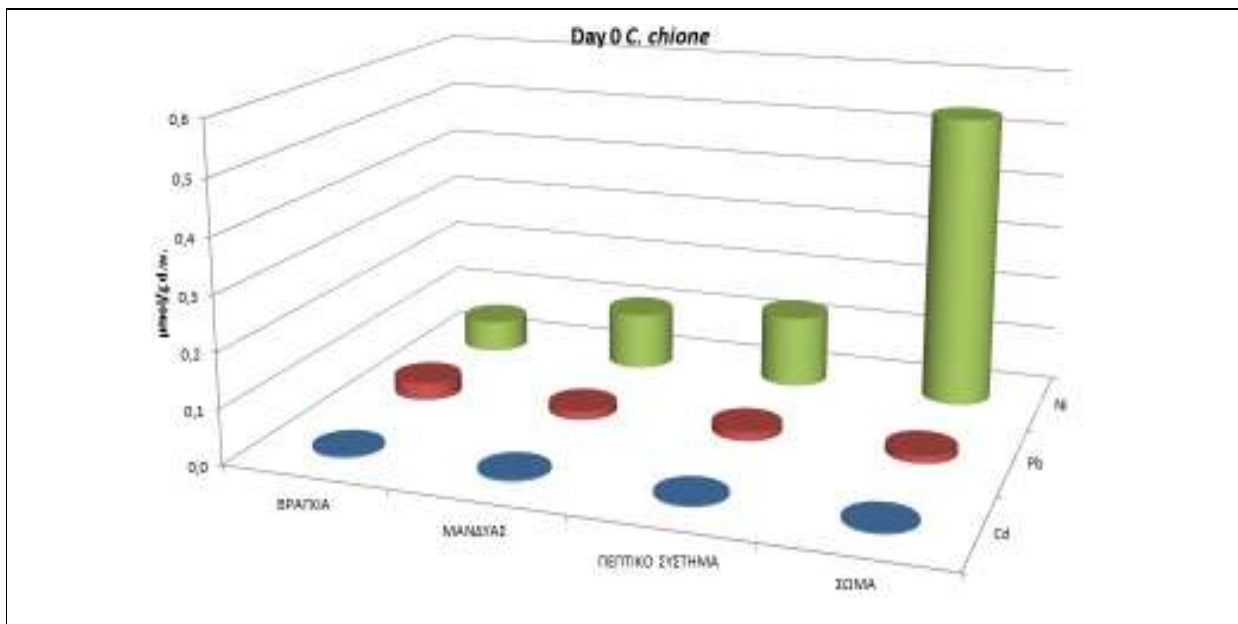
Στην περίπτωση των γυαλιστερών, στην έναρξη του πειράματος (Day 0, Σχήμα 174), από τα τρία μέταλλα, το νικέλιο είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε όλους τους ιστούς. Από σύγκριση της συγκέντρωσης του κάθε στοιχείου μεταξύ των ιστών προέκυψε ότι το κάδμιο και ο μόλυβδος είχαν συσσωρευτεί στα βράγχια, ενώ το νικέλιο στο σώμα.

Την 20^η ημέρα του πειράματος (Σχήμα 175), υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο από ότι σε κάδμιο και νικέλιο, εκτός από το σώμα των οργανισμών που είχαν εκτεθεί στο υψηλότερο επίπεδο νικελίου (340,7 μmol/L), όπου η τιμή ήταν η υψηλότερη από όλες. Μεταξύ των ιστών, υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου και μόλυβδου προσδιορίστηκαν στα βράγχια, ενώ νικελίου στο σώμα, όπως είχε παρατηρηθεί στους οργανισμούς απευθείας από το πεδίο. Ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά την

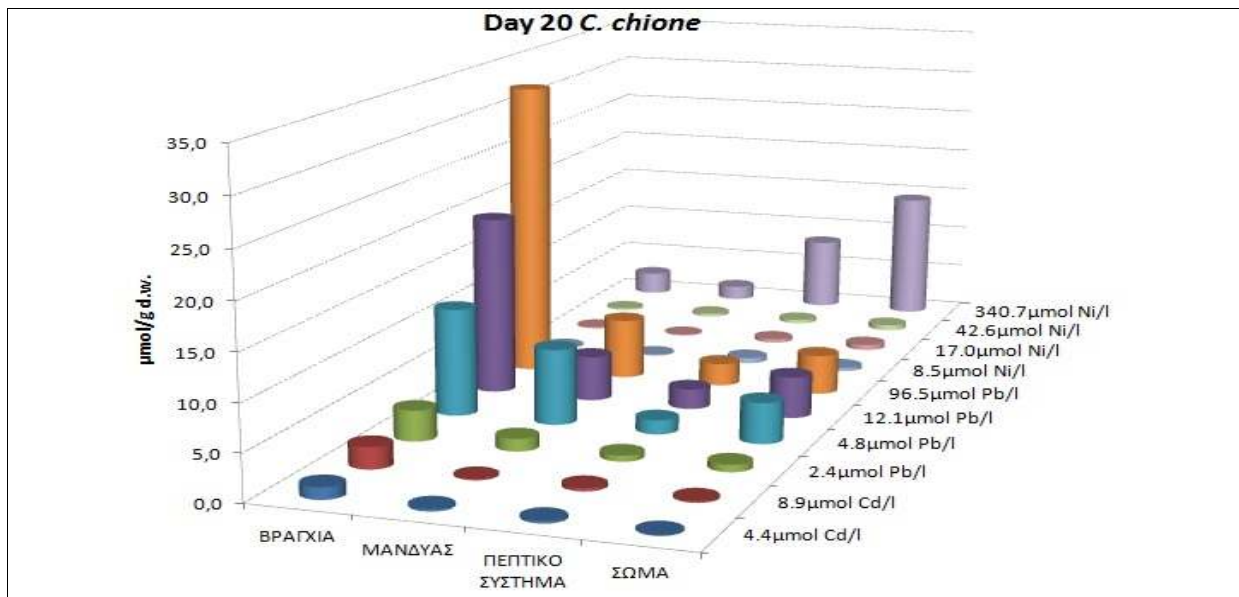
αποτοξίνωση. Συμπερασματικά, τα βράγχια των γυαλιστερών ήταν το όργανο-στόχος (target-organ) για τη βιοσυσσώρευση μολύβδου και καδμίου, ενώ το σώμα για το νικέλιο.

Κατά την αποτοξίνωση, σε όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν και στα τρία στοιχεία παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό της αποτοξίνωσης αυξανόταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο, το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης κατά την αποτοξίνωση προσδιορίστηκε στα βράγχιά τους, ενώ σε εκείνους που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και νικέλιο ο ιστός εξαρτώταν από το επίπεδο έκθεσης. Έτσι, στους οργανισμούς που εκτέθηκαν στα δύο χαμηλότερα επίπεδα μολύβδου, ο μανδύας ήταν ο ιστός που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση, για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 12,1 $\mu\text{mol Pb/L}$ ήταν το πεπτικό σύστημα, ενώ για εκείνους που εκτέθηκαν σε 96,5 $\mu\text{mol Pb/L}$ ήταν το σώμα. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο συγκέντρωσης 8,5 και 340,7 $\mu\text{mol Ni/L}$ ο ιστός με την μεγαλύτερη μείωση ήταν το πεπτικό σύστημα, ενώ για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν στα άλλα δύο επίπεδα νικελίου ήταν ο μανδύας.

Το υψηλότερο ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης μετάλλου κατά την αποτοξίνωση προσδιορίστηκε στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε 340,7 $\mu\text{mol Ni/L}$ και ήταν 91%, ενώ αντίστοιχα στο μανδύα και στο σώμα τα υψηλότερα ποσοστά προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 42,6 $\mu\text{mol Ni/L}$.



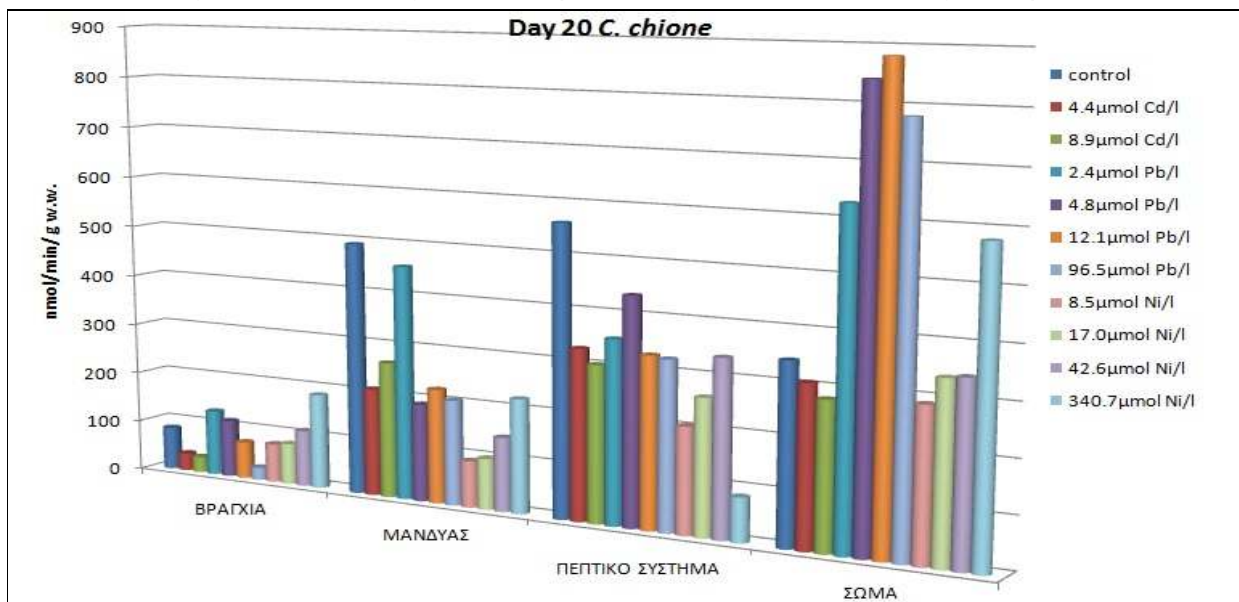
Σχήμα 174: Συγκριτική απεικόνιση συγκέντρωσης των τριών μετάλλων σε *C. chione* μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο (Day 0)



Σχήμα 175: Συγκριτική απεικόνιση βιοσυσσώρευσης των τριών μετάλλων σε *C. chione* την ημέρα 20

7.2.2 Ακετυλοχολινεστεράση

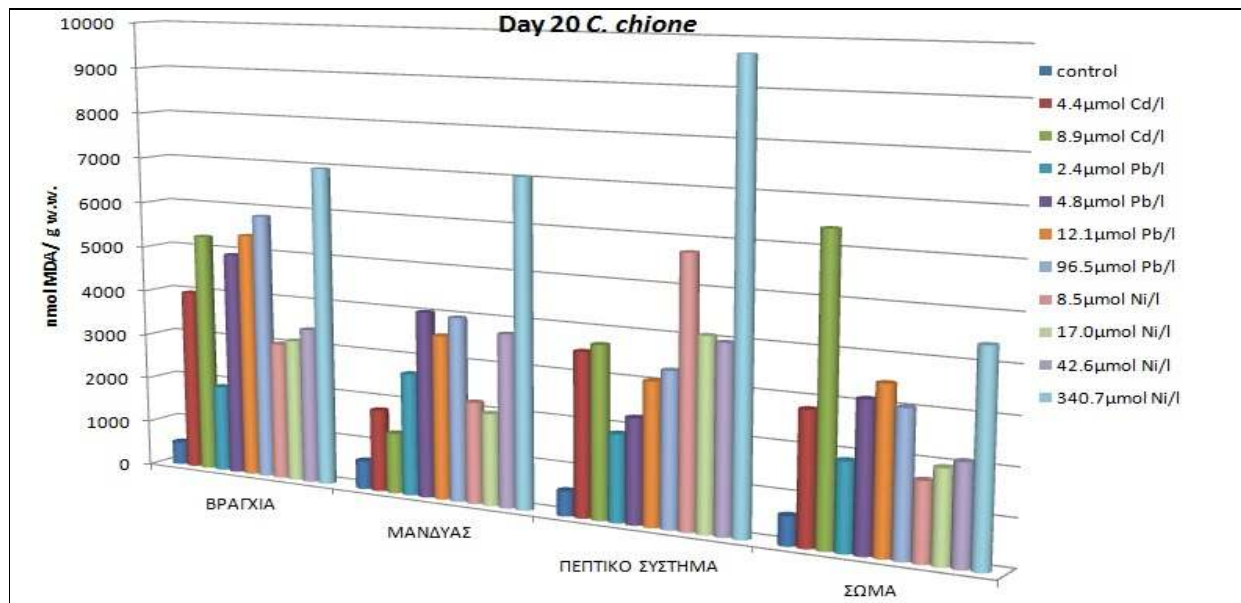
Στα βράγχια, η ενεργότητα του ενζύμου ήταν παρόμοια, ανεξάρτητα από το μέταλλο στο οποίο εκτέθηκαν οι οργανισμοί. Παρόμοια εικόνα είχε και ο μανδύας και το πεπτικό σύστημα των οργανισμών, με τιμές όμως χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς. Στο σώμα, υψηλότερες τιμές μετρήθηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο, οι οποίες ήταν πολύ υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, ενώ οι τιμές του ενζύμου στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο και νικέλιο ήταν παρόμοιες μεταξύ τους και με του πληθυσμού αναφοράς. Υψηλότερες τιμές μεταξύ των ιστών για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και νικέλιο προσδιορίστηκαν στο σώμα τους, ενώ για εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο στο πεπτικό τους σύστημα.



Σχήμα 176: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης στους ιστούς των *C. chione* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.2.3 Λιπιδική υπεροξειδωση

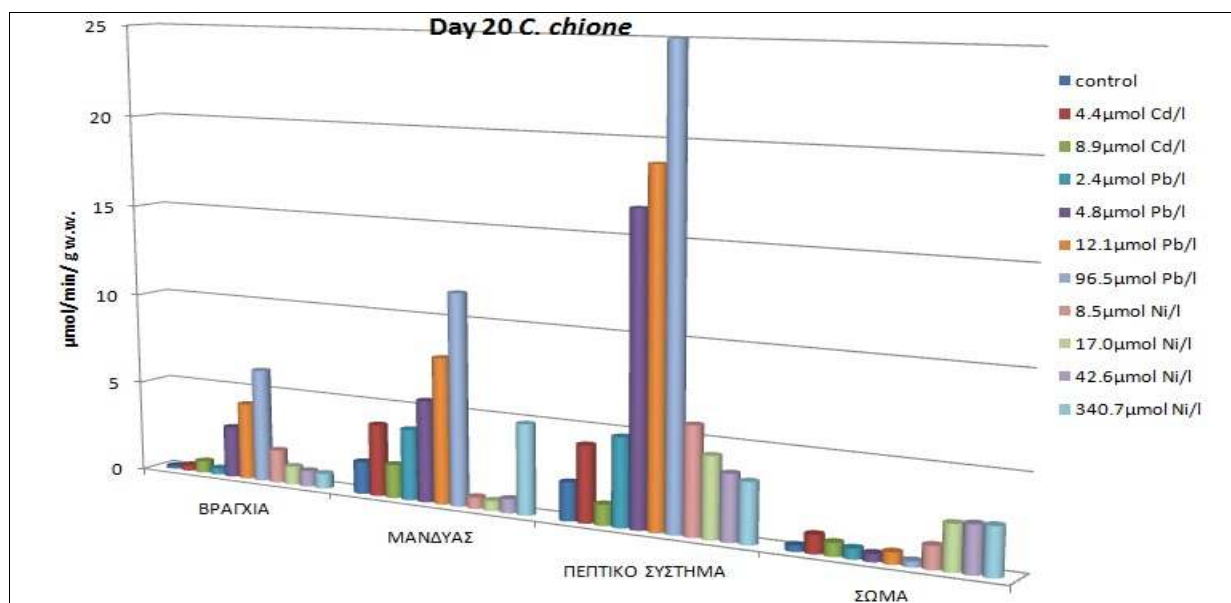
Σε κάθε ιστό των οργανισμών, τα επίπεδα μηλονικής διαλδεΐδης γενικά, δεν ήταν πολύ διαφορετικά ανάμεσα στα τρία μέταλλα. Σε όλους τους ιστούς, εκτός από το σώμα, ξεχώρισε το υψηλότερο επίπεδο νικελίου με υψηλότερες τιμές μηλονικής διαλδεΐδης. Υψηλότερες τιμές μηλονικής διαλδεΐδης στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο μετρήθηκαν στα βράγχια του, ενώ νικελίου στο πεπτικό τους σύστημα.



Σχήμα 177: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης στους ιστούς των *C. chione* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.2.4 S μεταφοράση της γλουταθειόνης

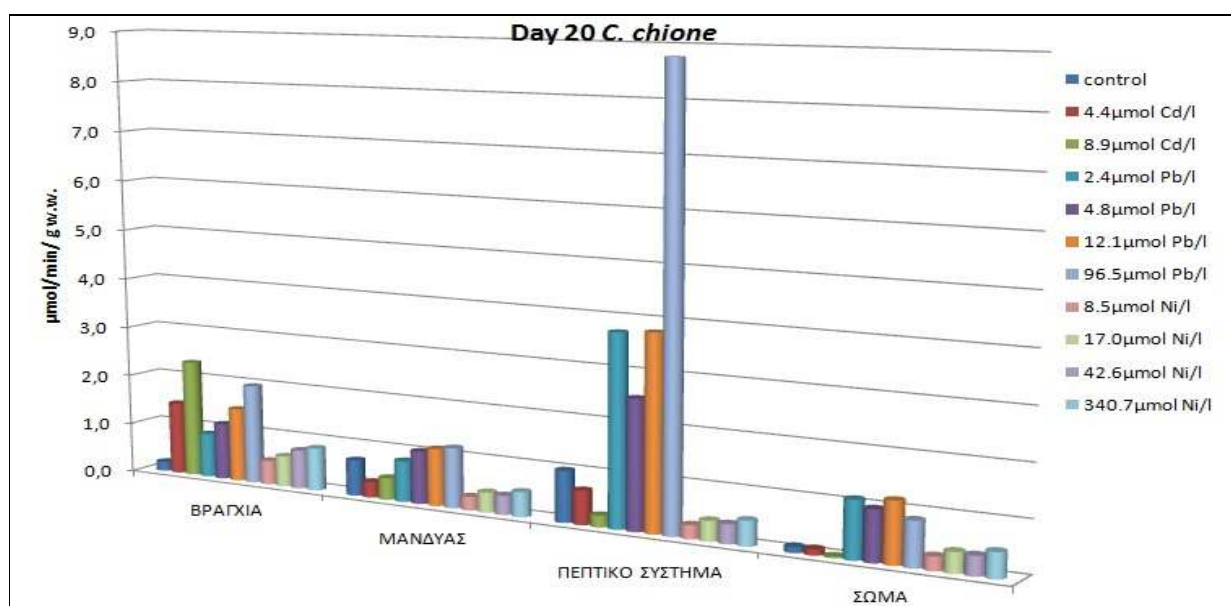
Υψηλότερες τιμές ενζύμου στα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μόλυβδου. Στο σώμα, οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο. Γενικά σε όλους τους ιστούς παρατηρείται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση στην ενεργότητα του ενζύμου και στα τρία μέταλλα. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν και στα τρία μέταλλα οι υψηλότερες τιμές S μεταφοράσης της γλουταθειόνης προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών.



Σχήμα 178: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων S μεταφοράσης της γλουταθειόνης στους ιστούς των *C. chione* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.2.5 Αναγωγή της γλουταθειόνης

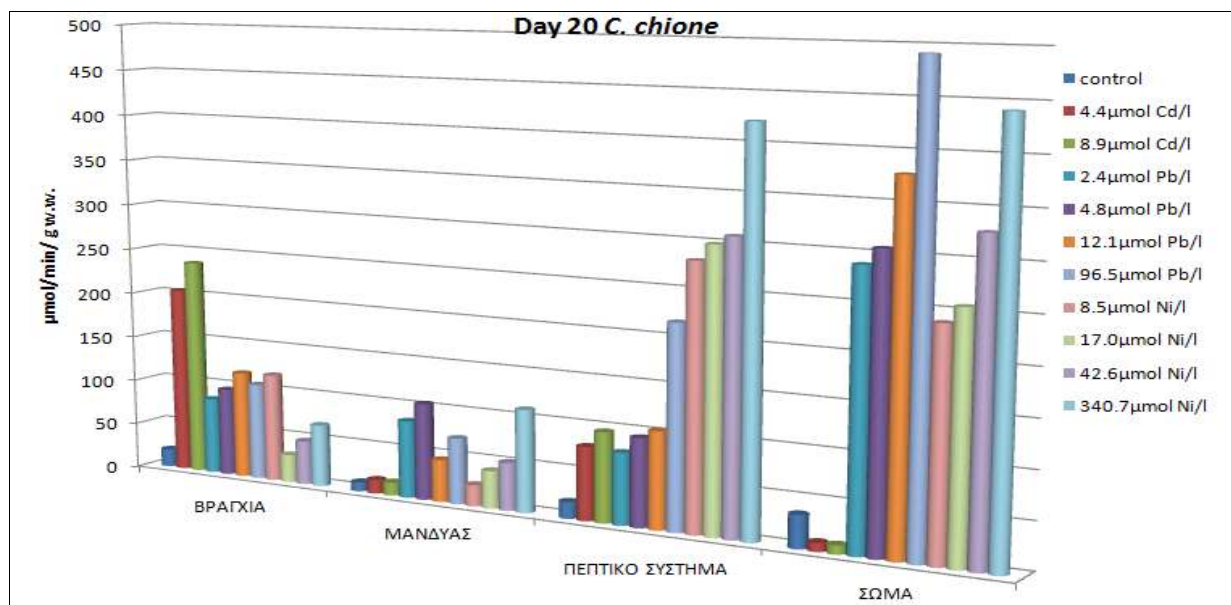
Υψηλότερες τιμές ενζύμου στο μανδύα, το πεπτικό σύστημα και το σώμα προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μόλυβδου. Στα βράγχια, οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο. Γενικά σε όλους τους ιστούς παρατηρείται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση στην ενεργότητα του ενζύμου και στα τρία μέταλλα. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν και στα τρία μέταλλα οι υψηλότερες τιμές αναγωγής της γλουταθειόνης προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών.



Σχήμα 179: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων αναγωγής της γλουταθειόνης στους ιστούς των *C. chione* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.2.6 Καταλάση

Στα βράγχια των οργανισμών, υψηλότερες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο, στο μανδύα σε εκείνους που εκτέθηκαν σε μόλυβδο, στο πεπτικό σύστημα σε εκείνους που εκτέθηκαν σε νικέλιο, ενώ στο σώμα παρόμοιες τιμές βρέθηκαν σε εκείνους που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και νικέλιο. Γενικά σε όλους τους ιστούς παρατηρείται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση στην ενεργότητα του ενζύμου και στα τρία μέταλλα. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και νικέλιο οι υψηλότερες τιμές αναγωγής της γλουταθειόνης προσδιορίστηκαν στο σώμα των οργανισμών, ενώ σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο, στα βράγχιά τους.

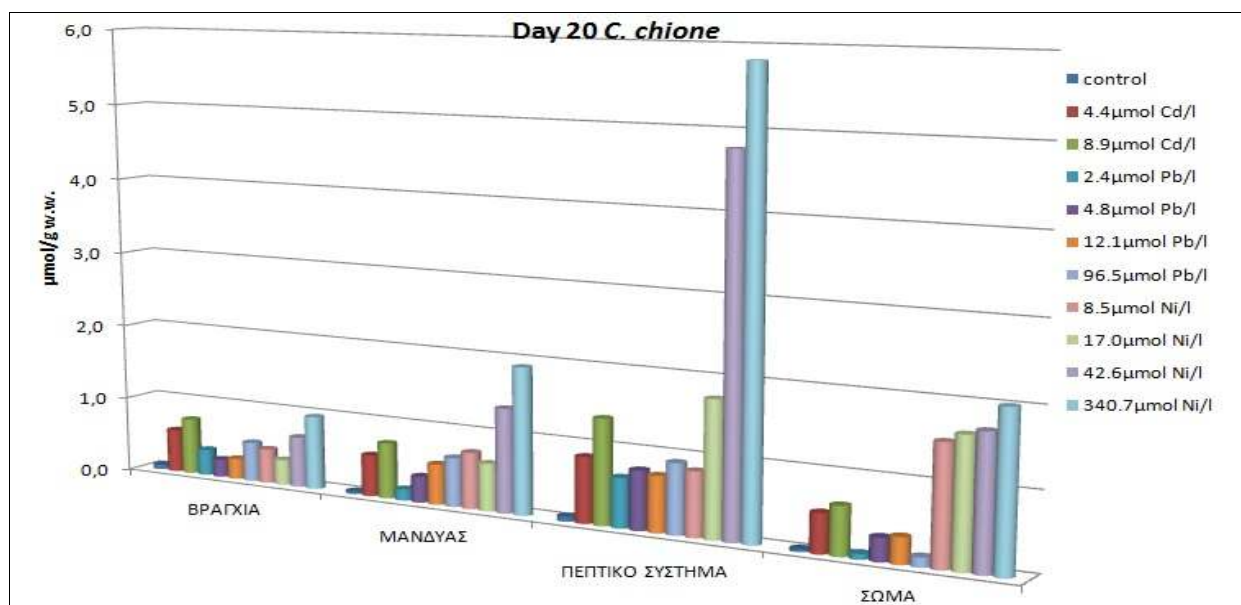


Σχήμα 180: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων καταλάσης στους ιστούς των *C. chione* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.2.7 Μεταλλοθειονίνες

Στα βράγχια και το μανδύα των οργανισμών, τα επίπεδα μεταλλοθειονινών δεν ήταν πολύ διαφορετικά ανάμεσα στα τρία μέταλλα, αν και οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε νικέλιο είχαν υψηλότερες τιμές, ενώ στο πεπτικό σύστημα και το σώμα, οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε νικέλιο είχαν πολύ υψηλότερες τιμές από τους υπόλοιπους.

Υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών σε όλους τους οργανισμούς, ανεξάρτητα από το μέταλλο και το επίπεδο έκθεσης, προσδιορίστηκαν στο πεπτικό τους σύστημα.



Σχήμα 181: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων μεταλλοθειονινών στους ιστούς των *C. chione* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.3 *Venus verrucosa*

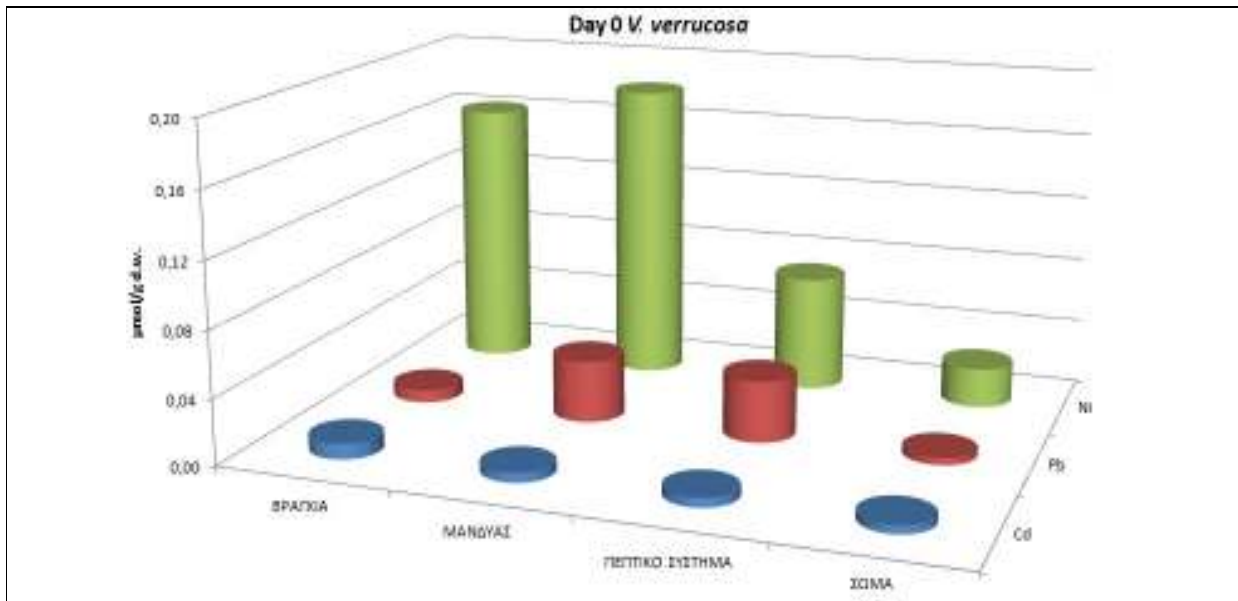
7.3.1 Επίπεδα και κατανομή μετάλλων

Όπως και στην περίπτωση των γυαλιστερών, έτσι και στα κυδώνια, στην έναρξη του πειράματος (Day 0, Σχήμα 182), το νικέλιο είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε όλους τους ιστούς σε σχέση με τα άλλα δύο μέταλλα. Σύγκριση των ιστών μεταξύ τους για κάθε μέταλο έδειξε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd στα βράγχια των οργανισμών, Pb στο πεπτικό σύστημα, ενώ Ni στο μανδύα.

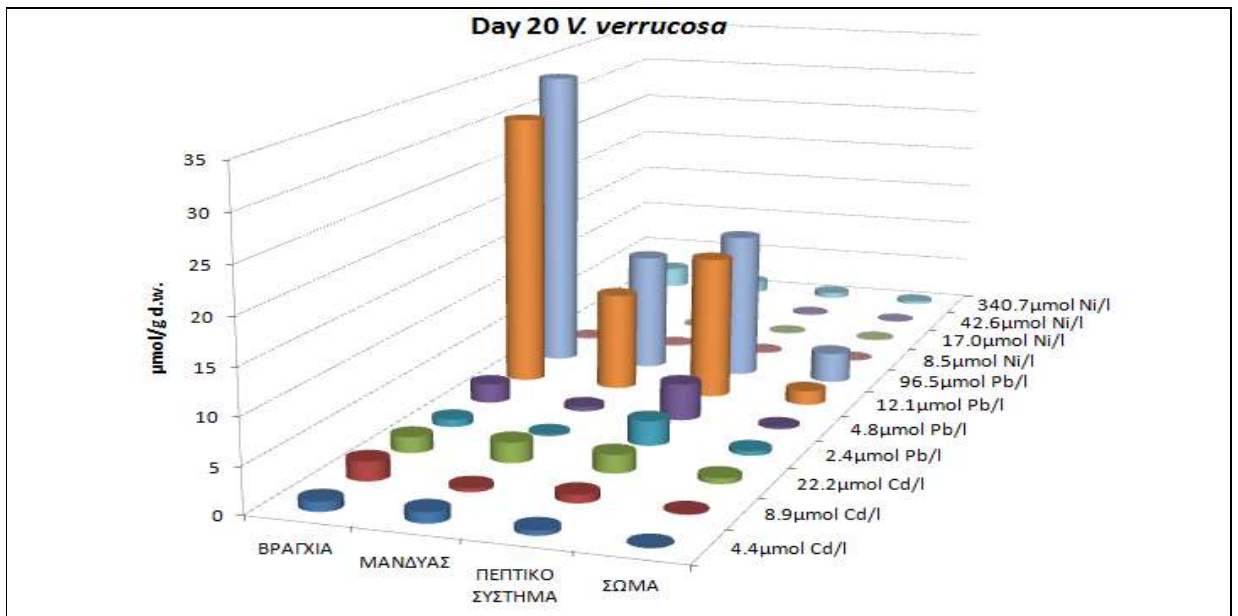
Την 20^η ημέρα (Σχήμα 183), οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο από ότι σε κάδμιο και νικέλιο. Η τάση μεταξύ των ιστών ήταν διαφορετική τόσο ανάμεσα στα τρία στοιχεία, όσο ανάμεσα και στα επίπεδα έκθεσης. Έτσι, για τα επίπεδα 4,4 και 22,2 μmol Cd/L ο μανδύας είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου, ενώ για το επίπεδο 8,9 μmol/L τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες τιμές. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν στα δύο χαμηλότερα επίπεδα μόλυβδου και νικελίου, το πεπτικό σύστημα είχε τις υψηλότερες τιμές, ενώ για τα δύο υψηλότερα επίπεδα, τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες τιμές.

Κατά την αποτοξίνωση, σε όλους τους ιστούς των οργανισμών παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό της αποτοξίνωσης αυξανόταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο, το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης προσδιορίστηκε στο πεπτικό τους σύστημα, ενώ σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο και νικέλιο ο ιστός εξαρτώταν από το επίπεδο έκθεσης. Έτσι, στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 4,4 και 22,2 μmol Cd/L ο μανδύας ήταν ο ιστός που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μείωση, για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 8,9 μmol Cd/L ήταν το πεπτικό σύστημα. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο συγκέντρωσης 8,5 ο ιστός με την μεγαλύτερη μείωση ήταν το σώμα, για εκείνους που εκτέθηκαν στο αμέσως υψηλότερο επίπεδο ήταν το σώμα, για εκείνους που εκτέθηκαν σε 42,6 μmol Ni/L ήταν το πεπτικό σύστημα, ενώ για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν 340,7 μmol Ni/L στα ήταν τα βράγχια. Παρ' ότι κατά την

αποτοξίνωση, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί στο υψηλότερο επίπεδο μολύβδου, σε αυτούς τους οργανισμούς προσδιορίστηκε και το μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης σε όλους τους ιστούς, με το υψηλότερο ποσοστό να προσδιορίζεται στο πεπτικό τους σύστημα, με τιμή 93%.



Σχήμα 182: Συγκριτική απεικόνιση συγκέντρωσης των τριών μετάλλων σε *V. verrucosa* μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο (Day 0)



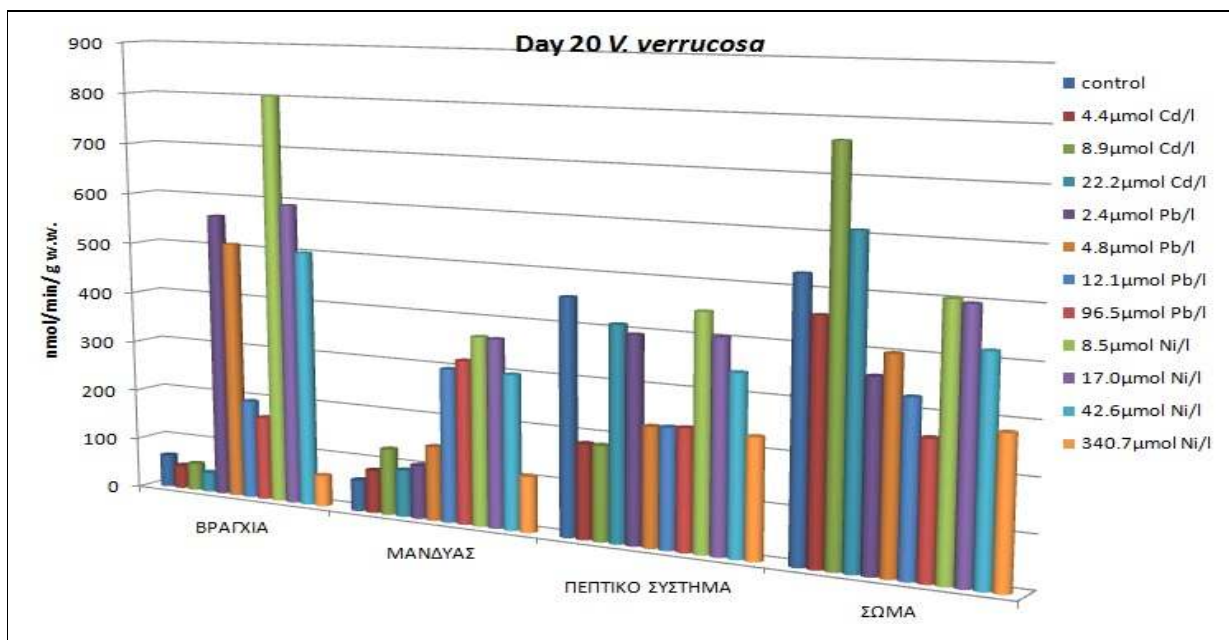
Σχήμα 183: Συγκριτική απεικόνιση βιοσυσσώρευσης των τριών μετάλλων σε *V. verrucosa* την 20^η ημέρα του πειράματος έκθεσης

7.3.2 Ακετυλοχολινεστεράση

Στα βράγχια των οργανισμών, υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στους οργανισμούς που εκτέθηκαν στα χαμηλότερα επίπεδα μολύβδου και νικελίου, ενώ στο μανδύα παρατηρείται το αντίθετο, με τιμές και στους δύο ιστούς υψηλότερες από του πληθυσμού

αναφοράς. Στο πεπτικό σύστημα όλων των οργανισμών όλες οι τιμές ήταν χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, με τις τιμές των οργανισμών που εκτέθηκαν σε νικέλιο να είναι ελαφρά υψηλότερες από των υπολοίπων. Στο σώμα των οργανισμών υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα καδμίου.

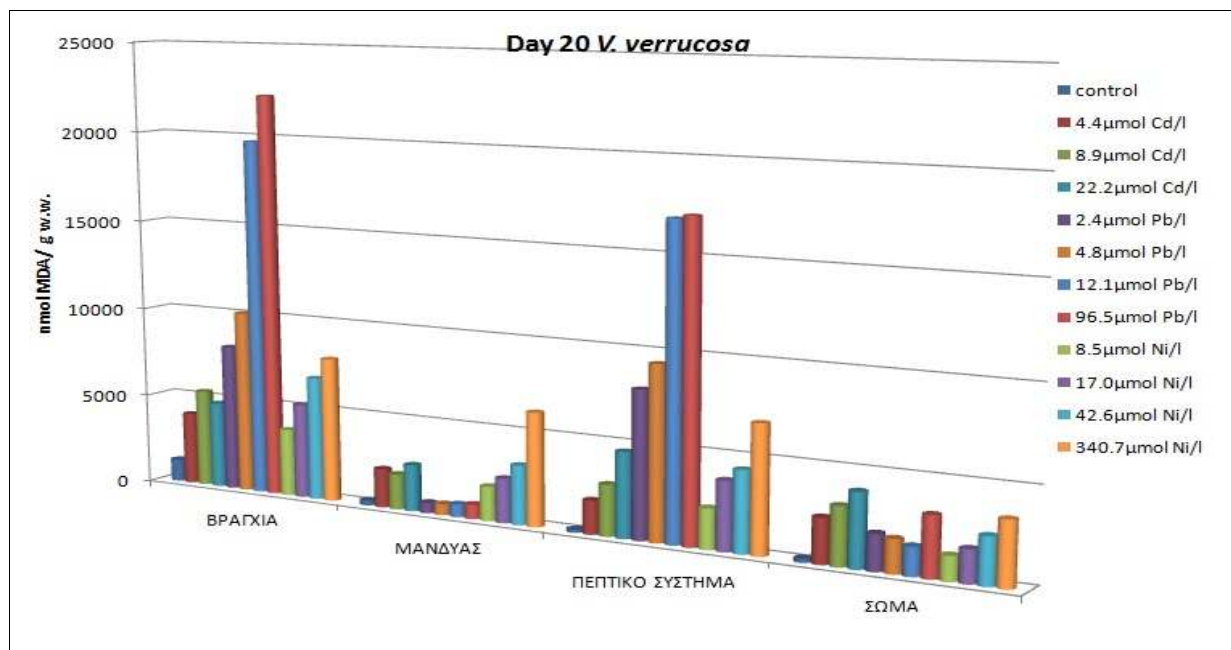
Η ενεργότητα του ενζύμου σε όλους τους ιστούς, εκτός από το μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο, φαίνεται να μειώνεται με αύξηση του επιπέδου έκθεσης. Στο μανδύα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο, παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου με αύξηση του επιπέδου έκθεσης. Υψηλότερες τιμές μεταξύ των ιστών για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο προσδιορίστηκαν στο σώμα τους, για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και νικέλιο προσδιορίστηκαν στα βράγχια.



Σχήμα 184: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων ακετυλοχολινεστεράσης στους ιστούς των *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.3.3 Λιπιδική υπεροξειδωση

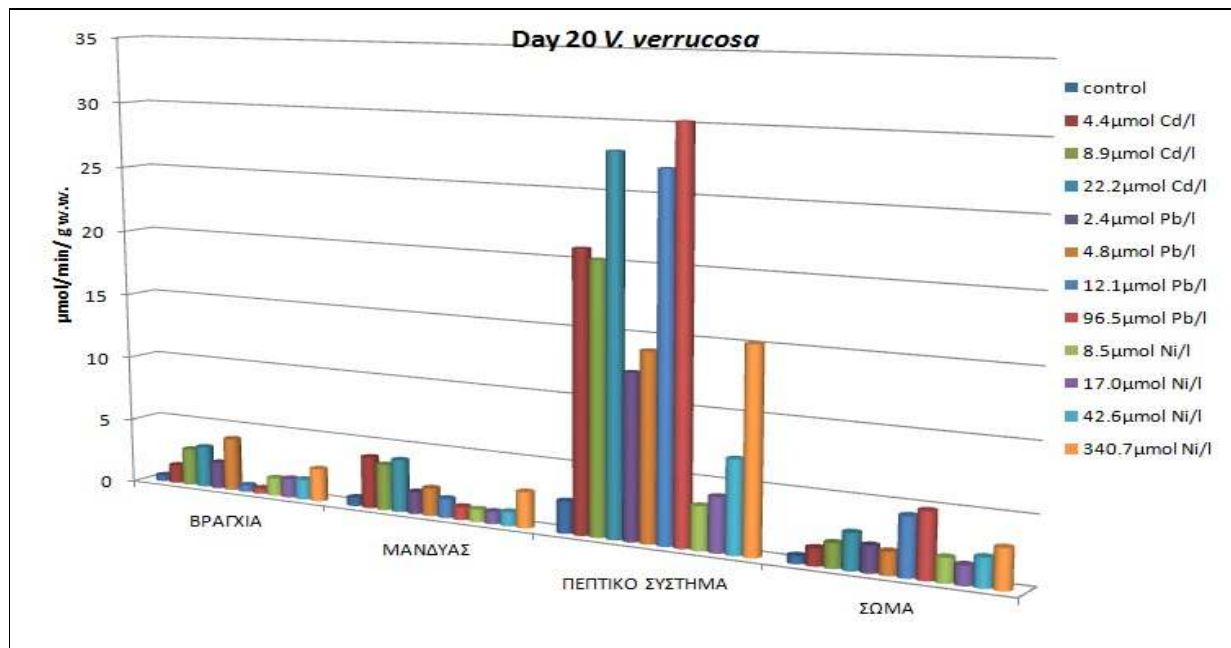
Όπως και στην περίπτωση των γυαλιστερών, υψηλότερες τιμές μηλονικής διαλδεϋδης στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο σε σχέση με τα άλλα δύο μέταλλα. Στο μανδύα οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο, ενώ στο σώμα οι τιμές ήταν παρόμοιες για όλους τους οργανισμούς, με ελαφρά υψηλότερες σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο. Υψηλότερες τιμές μεταξύ των ιστών για όλους τους οργανισμούς προσδιορίστηκαν στα βράγχια. Σε όλους τους ιστούς των οργανισμών, και για τα τρία μέταλλα, φαίνεται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκαλεί αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης.



Σχήμα 185: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης στους ιστούς των *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.3.4 S μεταφοράση της γλουταθειόνης

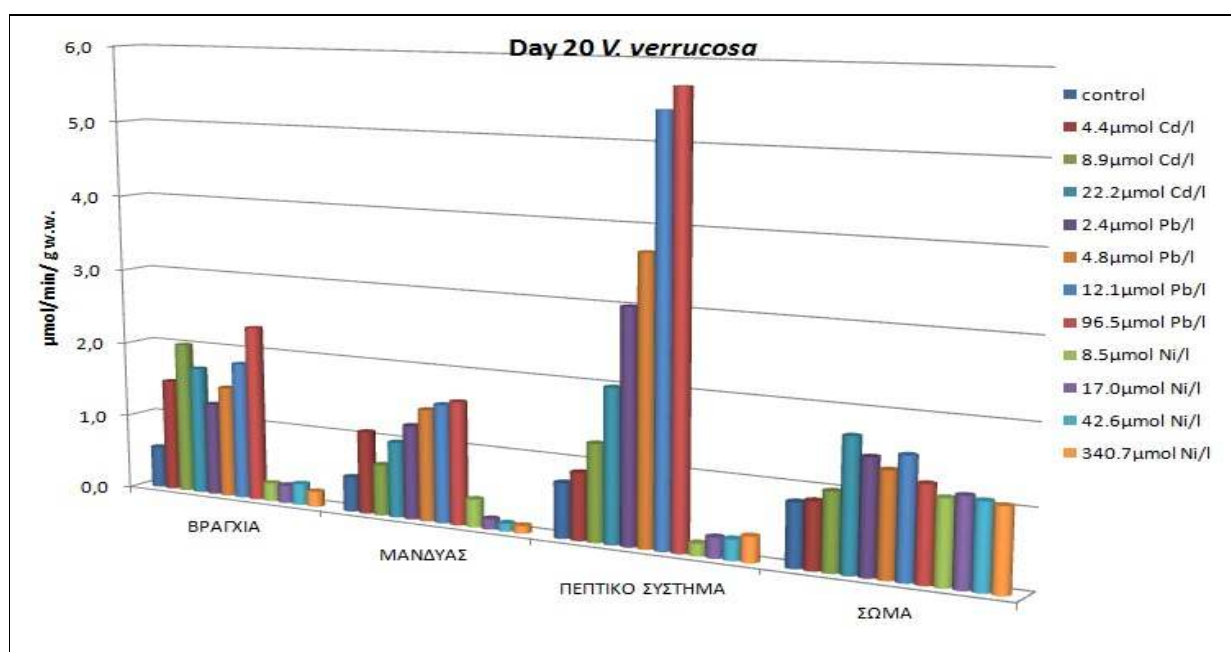
Υψηλότερες τιμές GST σε όλους τους ιστούς προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο, εκτός από το πεπτικό σύστημα και το σώμα όπου εξίσου υψηλές τιμές προσδιορίστηκαν και στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο. Υψηλότερες τιμές μεταξύ των ιστών για όλους τους οργανισμούς προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα.



Σχήμα 186: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων S μεταφοράσης της γλουταθειόνης στους ιστούς των *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.3.5 Αναγωγή της γλουταθειόνης

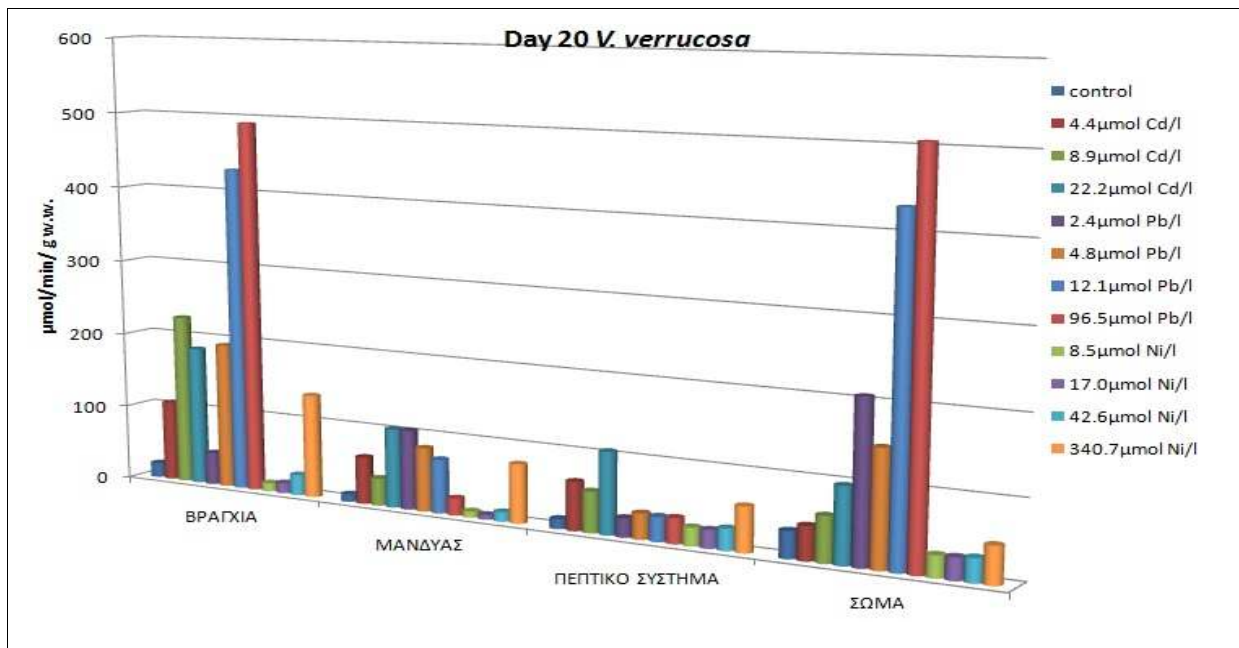
Υψηλότερες τιμές GR στο πεπτικό σύστημα προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο. Στο σώμα, παρόμοιες τιμές προσδιορίστηκαν σε όλους τους οργανισμούς, ενώ στα βράγχια και το μανδύα, παρόμοιες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο, υψηλότερες από τις αντίστοιχες των οργανισμών που εκτέθηκαν σε νικέλιο. Υψηλότερες τιμές μεταξύ των ιστών για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο προσδιορίστηκαν στα βράγχια, για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο στο πεπτικό σύστημα, ενώ για εκείνους που εκτέθηκαν σε νικέλιο στο σώμα. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο παρατηρείται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου σε κάθε ιστό. Για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο, σε κάθε ιστό φαίνεται πως αύξηση του επιπέδου έκθεσης δεν προκάλεσε ιδιαίτερη μεταβολή στην ενεργότητα του ενζύμου.



Σχήμα 187: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων αναγωγής της γλουταθειόνης στους ιστούς των *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.3.6 Κατάλυση

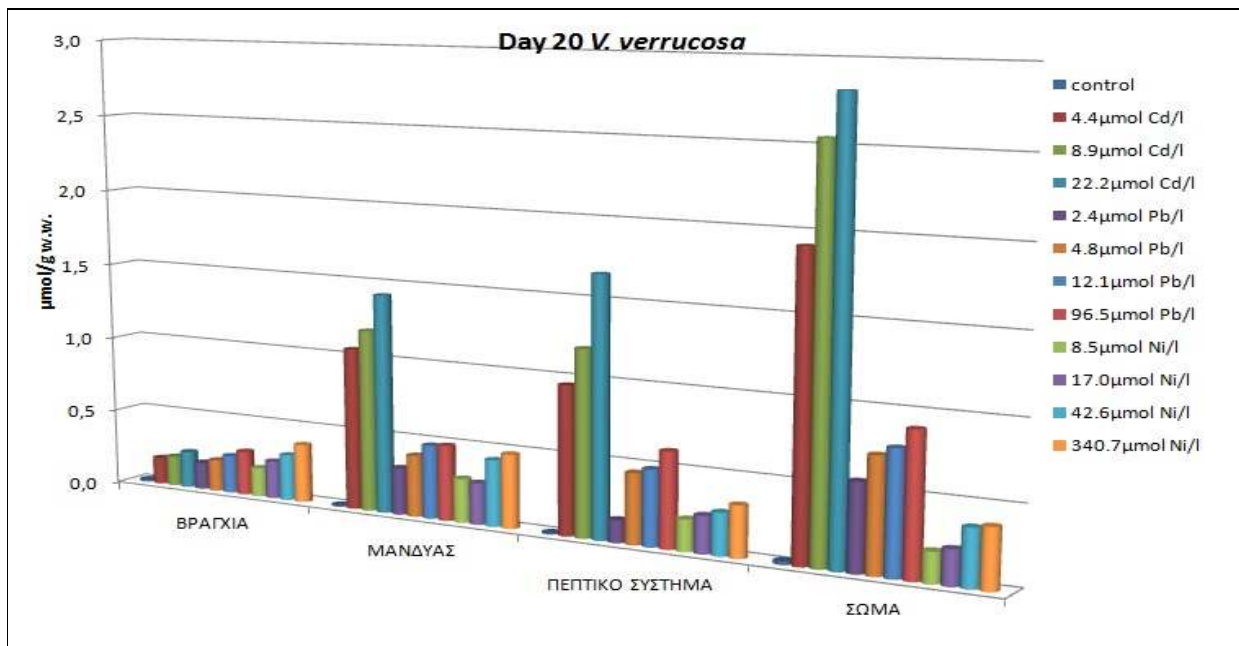
Υψηλότερες τιμές κατάλυσης στα βράγχια και το σώμα προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο. Στο πεπτικό σύστημα, παρόμοιες τιμές προσδιορίστηκαν σε στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και νικέλιο, χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο, ενώ στο μανδύα, παρόμοιες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο, υψηλότερες από τις αντίστοιχες των οργανισμών που εκτέθηκαν σε νικέλιο. Υψηλότερες τιμές μεταξύ των ιστών για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο προσδιορίστηκαν στα βράγχια, για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο στα βράγχια και το σώμα, ενώ για εκείνους που εκτέθηκαν σε νικέλιο στο σώμα.



Σχήμα 188: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων καταλάσης στους ιστούς των *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

7.3.7 Μεταλλοθειονίνες

Υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο, εκτός από τα βράγχια όπου όλες οι τιμές ήταν παρόμοιες μεταξύ τους. Οι χαμηλότερες τιμές σε κάθε ιστό προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο. Υψηλότερες τιμές μεταξύ των ιστών για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο προσδιορίστηκαν στο σώμα, ενώ για εκείνους που εκτέθηκαν σε νικέλιο στο μανδύα.



Σχήμα 189: Συγκριτική απεικόνιση των επιπέδων μεταλλοθειονινών στους ιστούς των *V. verrucosa* που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα και των τριών μετάλλων την 20^η ημέρα έκθεσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή μελετήθηκε η αντίδραση τριών θαλάσσιων οργανισμών στην έκθεσή τους σε επιλεγμένα βαρέα μέταλλα (Pb, Cd, Ni). Τα είδη που επιλέχθηκαν ήταν *Mytilus galloprovincialis* (μύδι), *Callista chione* (γυαλιστερή) και *Venus verrucosa* (κυδώνι), τα οποία είναι θαλάσσια δίθυρα και διηθητές οργανισμοί, διαφέρουν ελαφρώς ως προς τον οικότοπό τους. Και οι τρεις οργανισμοί είναι μεσογειακά είδη και καταναλώνονται και στη χώρα μας. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι γυαλιστερές (*Callista chione*) και τα κυδώνια (*Venus verrucosa*) δεν έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί σε τέτοιου είδους πειράματα έκθεσης σε βαρέα μέταλλα σε εργαστηριακές συνθήκες.

Το κάδμιο και ο μόλυβδος θεωρούνται ρύποι προτεραιότητας για τη Μεσόγειο, έχει επίσης βρεθεί ότι έχουν αυξημένη τοξικότητα και είναι μη απαραίτητα στοιχεία για τους οργανισμούς. Το νικέλιο χρησιμοποιήθηκε γιατί θεωρείται λιγότερο τοξικό στοιχείο για τους οργανισμούς (γι' αυτό και δεν έχει θεσπιστεί νομοθετικό όριο από την Ευρωπαϊκή Ένωση⁶⁸), έχει όμως βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο θαλάσσιο περιβάλλον λόγω της χρήσης του σε μεταλλουργικές δραστηριότητες.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων συνάγεται ότι η έκθεση αυτή επάγει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών αποκρίσεων, το οποίο εξαρτάται από το μέταλλο, το χρόνο έκθεσης και το επίπεδο της βιοσυσσώρευσης αυτού στους ιστούς των οργανισμών. Τα πιο σημαντικά συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή συνοψίζονται στα παρακάτω:

Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων στο θαλασσινό νερό από την περιοχή του κόλπου της Ελευσίνας, της ευρύτερης περιοχής της Αίγινας και του νερού από τις βόρειες ακτές του νομού Χανίων (Αγ. Κυριακή, Κουλούρα, Καλαθάς) που χρησιμοποιήθηκε στα ενυδρεία διατήρησης οργανισμών ήταν πολύ χαμηλότερες από τις προδιαγραφές που έχει θέσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για οξεία και χρόνια τοξικότητα⁶⁸.

Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων στα ιζήματα που χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα στα ενυδρεία με τις γυαλιστερές και τα κυδώνια, κυμαίνονταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι περιεκτικότητες ολικών μετάλλων της περιοχής μελέτης ήταν μικρότερες τόσο από το κριτήριο ERL (Effects Range-Low)³⁹⁸, κάτι που υποδηλώνει ότι σπάνια μπορεί να παρατηρηθούν αρνητικές επιπτώσεις σε οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με τέτοια ιζήματα.

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία⁶⁸, η συγκέντρωση του μολύβδου στα μύδια που συλλέχθηκαν από τον Σαρωνικό κόλπο ήταν κάτω από τα επιτρεπτά όρια για την ανθρώπινη κατανάλωση, ενώ η συγκέντρωση του καδμίου ήταν υψηλότερη. Η συγκέντρωση μολύβδου στις γυαλιστερές και τα κυδώνια ήταν πάνω από τα επιτρεπτά όρια, ενώ η συγκέντρωση καδμίου και στους δύο οργανισμούς ήταν κάτω από τα επιτρεπτά όρια.

Παρά τις πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου και νικελίου στις οποίες εκτέθηκαν και οι οποίες βιοσυγκεντρώθηκαν στους ιστούς όλων των οργανισμών, δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι. Αντίθετα η έκθεση στην υψηλότερη συγκέντρωση καδμίου προκάλεσε μεγάλη θνησιμότητα στους οργανισμούς, με τα μύδια να είναι πιο ευαίσθητοι οργανισμοί (προκλήθηκαν θάνατοι τόσο με

έκθεση στα 2,5 όσο και στα 20 ppm) και τα κυδώνια οι πιο ανθεκτικοί (άντεξαν την έκθεση σε 20 ppm Cd για 15 μέρες, ενώ έκθεση σε 2,5 ppm Cd δεν προκάλεσε θανάτους).

Κατά την αποτοξίνωση όλων των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο και νικέλιο, παρατηρήθηκε γενικά μικρή μείωση στα επίπεδα του μετάλλου στους ιστούς, χωρίς να επανέλθουν στα αρχικά τους επίπεδα. Κατά την αποτοξίνωση των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο παρατηρήθηκε γενικά μείωση της συγκέντρωσης των μετάλλων στα βράγχια και αύξηση στους υπόλοιπους ιστούς, πιθανά λόγω μεταφοράς του μετάλλου προς τους υπόλοιπους ιστούς (translocation).

Οι τιμές MDA στους ιστούς όλων των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάθε μέταλλο (όλα τα επίπεδα) ήταν πολύ υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς.

Τα ένζυμα σε όλους τους ιστούς όλων των οργανισμών και σε όλα τα πειράματα έκθεσης κατά την αποτοξίνωση μειώνονταν ή αυξάνονταν ώστε να επιστρέψουν στα αρχικά τους επίπεδα.

Μόλυβδος

Η γενική τάση που παρατηρήθηκε κατά την παραμονή των οργανισμών σε περιβάλλον αυξημένων συγκεντρώσεων μολύβδου ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης των μετάλλων στους ιστούς των οργανισμών με το χρόνο.

Για την περίπτωση του μολύβδου, για όλους τους οργανισμούς, τα βράγχια ήταν το όργανο-στόχος γιατί στον ιστό αυτό προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα μύδια προσδιορίστηκαν στο μανδύα, στις γυαλιστερές στο πεπτικό σύστημα και το σώμα και στα κυδώνια στο σώμα.

Κατά την αποτοξίνωση όλων των οργανισμών, παρατηρήθηκε γενικά μικρή μείωση στα επίπεδα του μολύβδου στους ιστούς, χωρίς να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα.

Στα βράγχια των μυδιών και των κυδωνιών προσδιορίστηκε επίσης η υψηλότερη συγκέντρωση μηλονικής διαλδεΐδη (MDA), άρα ήταν ο ιστός που έχει υποστεί την σημαντικότερη οξειδωτική βλάβη. Μεταξύ των ιστών των γυαλιστερών δεν ξεχώρισε συστηματικά κάποιος ιστός με υψηλότερες τιμές MDA. Και στους τρεις οργανισμούς βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στη λιπιδική υπεροξείδωση και τη συγκέντρωση μολύβδου σε κάθε ιστό, κάτι που ενισχύει την άποψη περί κυτταρικής βλάβης λόγω του μετάλλου.

Στα βράγχια όλων των οργανισμών που είχαν εκτεθεί στα δύο υψηλότερα επίπεδα μετάλλου και παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μολύβδου προσδιορίστηκε η χαμηλότερη ενεργότητα ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), κάτι που υποδηλώνει την νευροτοξικότητα του μετάλλου στον ιστό αυτό. Επίσης, οι τιμές ακετυλοχολινεστεράσης που μετρήθηκαν στο μανδύα και το πεπτικό σύστημα των μυδιών και των γυαλιστερών, και τα βράγχια και το σώμα των κυδωνιών, ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς. Τα παραπάνω, μαζί με την αρνητική συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ μολύβδου και AChE στους ιστούς των οργανισμών ενισχύει την άποψη περί νευροτοξικότητας του μολύβδου.

Οι τιμές καταλάσης στους ιστούς όλων των οργανισμών ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς και παρουσίαζαν αύξηση με την πάροδο του χρόνου έκθεσης και του επιπέδου έκθεσης, εκτός από το μανδύα των κυδωνιών και το σώμα των μυδιών. Η θετική

συσχέτιση που προέκυψε ανάμεσα στην ενεργότητα του ενζύμου και τη συγκέντρωση μολύβδου στους ιστούς των οργανισμών υποδηλώνει ότι ο οργανισμός ενεργοποιείται και παράγει μεγαλύτερες ποσότητες ενζύμου με σκοπό την αντιμετώπιση του stress.

Οι τιμές της S μεταφοράσης της γλουταθειόνης (glutathione S transferase- GST) που μετρήθηκαν στους ιστούς όλων των οργανισμών, εκτός από τα βράγχια των κυδωνιών, και όλα τα επίπεδα μολύβδου ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς. Η αύξηση της συγκέντρωσης μολύβδου στον ιστό ενεργοποίησε την GST καθώς προέκυψε θετική συσχέτιση μολύβδου-ενζύμου στους περισσότερους ιστούς των τριών οργανισμών, εκτός από το σώμα των μυδιών και των γυαλιστερών και τα βράγχια των κυδωνιών, όπου όσο αυξανόταν το επίπεδο και οι ημέρες έκθεσης μειώνονταν οι τιμές του ενζύμου.

Για τα μύδια, υψηλότερες τιμές αναγωγάσης της γλουταθειόνης (glutathione reductase-GR) προσδιορίστηκαν στο μανδύα και το σώμα τους, ενώ για τις γυαλιστερές και τα κυδωνία στο πεπτικό τους σύστημα. Αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας της GR σε όλους τους ιστούς των μυδιών, των κυδωνιών και των γυαλιστερών, εκτός από το σώμα των τελευταίων, όπου παρατηρήθηκε το αντίθετο.

Οι τιμές των MTs στους ιστούς όλων των οργανισμών αυξανόταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση μολύβδου στους ιστούς των οργανισμών με τις μεταλλοθειονίνες, κάτι που δείχνει την απόκριση του οργανισμού στην αυξανόμενη συγκέντρωση μετάλλου με σκοπό την προστασία του. Ενδιαφέρον είναι ότι συγκρίνοντας τους ιστούς μεταξύ τους, στον ίδιο ιστό, η χαμηλότερη συγκέντρωση μετάλλου προκάλεσε την μεγαλύτερη αύξηση μεταλλοθειονινών (στα βράγχια που προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μολύβδου προσδιορίστηκαν οι χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών).

Σύγκριση των τριών οργανισμών για τον μόλυβδο

Για το επίπεδο 0,5 ppm Pb, σε κάθε ιστό, δεν προέκυψε κάποιος οργανισμός με υψηλότερες τιμές. Στο επίπεδο 1,0 ppm Pb, η γυαλιστερή είχε υψηλότερες τιμές σε όλους τους ιστούς, ενώ οι υπόλοιποι οργανισμοί δεν διέφεραν μεταξύ τους. Για το επίπεδο 2,5 ppm Pb, το κυδωνί είχε τις υψηλότερες τιμές, ενώ οι δύο άλλοι οργανισμοί δεν διέφεραν μεταξύ τους. Για το υψηλότερο επίπεδο έκθεσης βρέθηκαν οι εξής τάσεις: για τα βράγχια: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* > *C. chione*, για το μανδύα: *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* > *C. chione* και για το σώμα *M. galloprovincialis* > *C. chione* > *V. verrucosa*.

Μεταξύ των τριών οργανισμών, το μύδι είχε υποστεί την μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη σε όλους τους ιστούς. Τα μύδια πιθανά να υπέστησαν μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη σε σχέση με τους δύο άλλους οργανισμούς, παρ' ότι δεν είχαν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου, λόγω του οικότοπου τους, ότι δηλαδή είναι άμεσα εκτεθειμένα στο επιβαρυμένο θαλασσινό νερό, σε σχέση με τους άλλους οργανισμούς οι οποίοι βρίσκονται εντός της άμμου.

Στα βράγχια των κυδωνιών προσδιορίστηκαν υψηλότερες ενεργότητες AChE και GR, ενώ στα βράγχια των μυδιών οι υψηλότερες ενεργότητες καταλάσης, GST και μεταλλοθειονινών. Στο μανδύα των μυδιών προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες ενεργότητες AChE, GST, GR, MTs και CAT (για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 2,5 και 20 ppm Pb). Στο σώμα των γυαλιστερών προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες ενεργότητες AChE και CAT (για τους οργανισμούς που εκτέθηκαν

σε 0,5 και 1,0 ppm Pb), ενώ στο σώμα των μυδιών οι υψηλότερες ενεργότητες GST, GR και μεταλλοθειονινών. Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών δεν προέκυψε στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο οργανισμών για κάποιον βιοδείκτη, εκτός από την καταλάση και τις μεταλλοθειονίνες, όπου υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στη γυαλιστερή.

Οι καταλληλότερες ενώσεις-βιοδείκτες ώστε να προσδιοριστεί η βλάβη που έχουν υποστεί οι ιστοί του μυδιού (*Mytilus galloprovincialis*) μετά από έκθεσή του σε μόλυβδο είναι η ακετυλοχολινεστεράση, η λιπιδική υπεροξειδωση αλλά και η GST αν χρησιμοποιηθούν τα βράγχια ως ιστός ελέγχου, τα οποία βρέθηκε πως βιοσυσσωρεύουν περισσότερο μόλυβδο από τους άλλους ιστούς. Οι βιοδείκτες αυτοί εμφανίζουν ξεκάθαρη τάση με το χρόνο έκθεσης και στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το μόλυβδο στα χαμηλότερα αλλά και στα υψηλότερα επίπεδα έκθεσης. Αν χρησιμοποιηθεί ο μανδύας ή το σώμα ιστός ελέγχου, ο κατάλληλος βιοδείκτης είναι η ακετυλενοχολινεστάση.

Αντίστοιχα για τις γυαλιστερές (*Callista chione*) είναι η λιπιδική υπεροξειδωση και η GR αν χρησιμοποιηθούν τα βράγχια ως ιστός ελέγχου, η λιπιδική υπεροξειδωση αν χρησιμοποιηθεί ο μανδύας ή το σώμα ως ιστός ελέγχου (αναμένεται αύξηση και στους δύο ιστούς) και η ακετυλοχολινεστεράση αν χρησιμοποιηθεί το πεπτικό σύστημα (αναμένεται μείωση).

Για τα κυδώνια (*Venus verrucosa*), αν χρησιμοποιηθούν τα βράγχια ως ιστός ελέγχου η λιπιδική υπεροξειδωση είναι η καταλληλότερη ένωση-βιοδείκτης αλλά ικανοποιητικές ενώσεις δείκτες είναι και η αναγωγή της γλουταθειόνης, η καταλάση και οι μεταλλοθειονίνες. Η ακετυλοχολινεστεράση δίνει καλά αποτελέσματα σε οργανισμούς που έχουν εκτεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις μετάλλου. Αν χρησιμοποιηθεί ο μανδύας των οργανισμών, τότε ως ενώσεις-βιοδείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν η ακετυλοχολινεστεράση, η λιπιδική υπεροξειδωση, η αναγωγή του γλουταθείου και οι μεταλλοθειονίνες. Αν χρησιμοποιηθεί το πεπτικό σύστημα των οργανισμών ως ιστός ελέγχου, οι καταλληλότερες ενώσεις-βιοδείκτες είναι η ακετυλενοχολινεστάση, η αναγωγή της γλουταθειόνης και η S μεταφοράση της γλουταθειόνης. Τέλος, αν χρησιμοποιηθεί το σώμα των οργανισμών ως ιστός ελέγχου, οι καταλληλότερες ενώσεις-βιοδείκτες είναι η S μεταφοράση του γλουταθείου και η καταλάση.

Επειδή και στους τρεις οργανισμούς οι υψηλότερες συγκεντρώσεις μολύβδου προσδιορίστηκαν στα βράγχιά τους, προτείνεται οι προσδιορισμοί της βιοσυσσώρευσης να γίνονται σε αυτό τον ιστό. Η καταλληλότερη ένωση-βιοδείκτης για το μύδι είναι ακετυλοχολινεστεράση, η λιπιδική υπεροξειδωση αλλά και η αναγωγή της γλουταθειόνης (κοινός βιοδείκτης για όλους τους ιστούς). Αντίστοιχα για τη γυαλιστερή είναι λιπιδική υπεροξειδωση (κοινός βιοδείκτης για όλους τους ιστούς) και για το κυδώνι η ακετυλοχολινεστεράση, η λιπιδική υπεροξειδωση, η αναγωγή της γλουταθειόνης, η καταλάση και οι μεταλλοθειονίνες (κοινή βιοδείκτης για όλους τους ιστούς).

Για λόγους απλούστευσης ελέγχων προτείνεται και για τους τρεις οργανισμούς η χρήση των βραγχίων με ένωση-βιοδείκτη την λιπιδική υπεροξειδωση (εκφρασμένη ως ποσότητα μηλονικής διαλδεΐδης ανά γραμμάριο νωπού ιστού).

Νικέλιο

Η γενική τάση που παρατηρήθηκε κατά την παραμονή των οργανισμών σε περιβάλλον αυξημένων συγκεντρώσεων **νικελίου** ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης των μετάλλων στους ιστούς των

οργανισμών με το χρόνο. Για το επίπεδο έκθεσης 20 ppm η συγκέντρωση του μετάλλου στους ιστούς αυξανόταν γραμμικά με τις μέρες έκθεσης. Και στους τρεις οργανισμούς παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της συσσωρευόμενης συγκέντρωσης σε κάθε ιστό, αλλά κάποιες μέρες υπήρχαν αυξομειώσεις, όπως στους ιστούς των γυαλιστερών και των κυδωνιών που εκτέθηκαν σε νικέλιο συγκέντρωσης 0,5, 1,0 και 2,5 mg/L.

Ανάμεσα στους τρεις ιστούς των μυδιών που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0-2,5 ppm Ni, το νικέλιο αρχικά συσσωρευόταν στο σώμα, ενώ με την πάροδο των ημερών στα βράγχια. Για τα μύδια που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni, και τα κυδώνια που εκτέθηκαν σε 0,5-2,5 και 20 ppm Ni τα βράγχια ήταν το όργανο-στόχος. Μεταξύ των ιστών των γυαλιστερών, για κάθε επίπεδο έκθεσης, το σώμα είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου, και αποτελεί το όργανο-στόχο για τον οργανισμό αυτό. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου στο μύδι και την γυαλιστερή προσδιορίστηκαν στο μανδύα τους. Για τα κυδώνια που εκτέθηκαν σε 1,0 ppm δεν ξεχώριζε κάποιος ιστός με υψηλότερες τιμές.

Κατά την αποτοξίνωση όλων των οργανισμών, παρατηρήθηκε γενικά μικρή μείωση στα επίπεδα νικελίου στους ιστούς, χωρίς να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα.

Οι τιμές μηλονικής διαλδεΐδης που προσδιορίστηκαν στους ιστούς όλων των οργανισμών που εκτέθηκαν σε νικέλιο ήταν υψηλότερες, από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς. Από τους ιστούς των μυδιών και των κυδωνιών, οι υψηλότερες τιμές MDA προσδιορίστηκαν στα βράγχια, με την τάση για τα μύδια να διαμορφώνεται ως εξής: βράγχια > σώμα ≥ μανδύας, ενώ για τα κυδώνια βράγχια > πεπτικό σύστημα > μανδύας ≈ σώμα. Στις γυαλιστερές δεν υπήρξε συγκεκριμένη χρονική τάση των ιστών και δεν ξεχώρισε συστηματικά κάποιος ιστός με υψηλότερες τιμές μηλονικής διαλδεΐδης, αλλά το σώμα είχε τις χαμηλότερες τιμές για κάθε επίπεδο. Γενικά, η λιπιδική υπεροξειδωση και στους τρεις οργανισμούς ακολουθούσε την τάση βιοσυσσώρευσης του νικελίου για κάθε επίπεδο έκθεσης. Έτσι, παρατηρήθηκε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης όταν προσδιορίστηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις μετάλλου, κάτι που υποδεικνύει ότι η οξειδωτική βλάβη που προκλήθηκε στους ιστούς των οργανισμών οφείλεται στο μέταλλο.

Για τα μύδια που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0-2,5 ppm Ni, υψηλότερες τιμές AChE προσδιορίστηκαν στο μανδύα των οργανισμών, ενώ στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε 20 ppm Ni στα βράγχια, στα οποία προσδιορίστηκαν και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου. Για τις γυαλιστερές, υψηλότερες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν στο σώμα τους. Για τα κυδώνια που εκτέθηκαν σε 0,5 και 2,5 ppm Ni οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στα βράγχια, ενώ για τους υπόλοιπους οργανισμούς στο σώμα. Αρνητική συσχέτιση, παρατηρήθηκε στο μανδύα και στο σώμα των μυδιών, στο πεπτικό σύστημα των γυαλιστερών και σε όλους τους ιστούς των κυδωνιών, κάτι που είναι ένδειξη νευροτοξικότητας. Αξιοσημείωτο είναι ότι βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στο νικέλιο και την ακετυλοχολινεστεράση στα βράγχια των μυδιών.

Οι τιμές καταλάσης στους ιστούς των μυδιών ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του πληθυσμού αναφοράς και αυξάνονταν με την πάροδο του χρόνου, αλλά και με την αύξηση του επιπέδου έκθεσης. Για τα μύδια για κάθε επίπεδο έκθεσης, η τάση της καταλάσης ήταν: βράγχια > μανδύας ≥ σώμα, για τις γυαλιστερές: πεπτικό σύστημα ≥ σώμα > μανδύας ≈ βράγχια και για τα κυδώνια που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0 και 2,5 ppm Ni ήταν σώμα > πεπτικό σύστημα > βράγχια > μανδύας, ενώ στο επίπεδο 20 ppm Ni, τα βράγχια είχαν τις υψηλότερες τιμές, ενώ οι υπόλοιποι ιστοί δεν διέφεραν μεταξύ τους.

Για τα μύδια, οι χαμηλότερες τιμές S μεταφοράς της γλουταθειόνης προσδιορίστηκαν στα βράγχια, τα οποία είχαν πολύ υψηλές τιμές Ni σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς. Για τις γυαλιστερές και τα κυδώνια και στα τέσσερα επίπεδα έκθεσης, υψηλότερες τιμές GST είχε το πεπτικό σύστημα. Γενικά, η GST παρουσίασε αυξομειώσεις σε όλους τους ιστούς των γυαλιστερών και των κυδωνιών με την πάροδο των ημερών έκθεσης. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τις ημέρες που προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες τιμές GST είχαν προσδιοριστεί οι χαμηλότερες τιμές νικελίου, κάτι που αποτελεί ένδειξη της τοξικότητας του μετάλλου.

Για τα μύδια, ο ιστός με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου ήταν αυτός που είχε την υψηλότερη ενεργότητα αναγωγής της γλουταθειόνης, ενώ για τις γυαλιστερές ήταν τα βράγχια και για τα κυδώνια το σώμα. Οι τιμές της GR στους ιστούς των μυδιών και τα βράγχια των γυαλιστερών και το σώμα των κυδωνιών αυξάνονταν με την πάροδο του χρόνου έκθεσης σε όλα τα επίπεδα νικελίου. Για τους υπόλοιπους ιστούς των γυαλιστερών και των κυδωνιών, οι τιμές παρουσίαζαν αυξομειώσεις, αλλά ήταν χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς.

Οι τιμές των MTs στους ιστούς όλων των οργανισμών που εκτέθηκαν σε νικέλιο αυξανόταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση νικελίου στους ιστούς των οργανισμών με τις μεταλλοθειονίνες, κάτι που δείχνει την απόκριση του οργανισμού στην αυξανόμενη συγκέντρωση μετάλλου με σκοπό την προστασία του. Ενδιαφέρον είναι ότι συγκρίνοντας τους ιστούς μεταξύ τους, στον ίδιο ιστό, η χαμηλότερη συγκέντρωση μετάλλου προκάλεσε την μεγαλύτερη αύξηση μεταλλοθειονινών (στα βράγχια που προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου προσδιορίστηκαν οι χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών, κάτι που παρατηρήθηκε και στον μόλυβδο).

Σύγκριση των τριών οργανισμών για το νικέλιο

Οι τιμές του νικελίου που προσδιορίστηκαν στα βράγχια και το μανδύα των μυδιών ήταν υψηλότερες από αυτές των άλλων οργανισμών, οι οποίοι δεν διέφεραν μεταξύ τους. Στο σώμα των οργανισμών παρόμοιες και υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο μύδι και τη γυαλιστερή σε σχέση με τις αντίστοιχες του κυδωνιού. Στο πεπτικό σύστημα οι τιμές που προσδιορίστηκαν στην γυαλιστερή ήταν υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές από τις αντίστοιχες του κυδωνιού.

Σε όλους τους ιστούς των οργανισμών, για κάθε επίπεδο μετάλλου, υψηλότερες τιμές λιπιδικής υπεροξειδωσης προσδιορίστηκαν στα μύδια, ενώ οι γυαλιστερές με τα κυδώνια δεν διέφεραν μεταξύ τους. Ίδια εικόνα είχε η GST και οι μεταλλοθειονίνες σε όλους τους ιστούς, η AChE στο μανδύα, η καταλάση στα βράγχια και το μανδύα αλλά και η GR σε όλους τους ιστούς εκτός από το σώμα, στο οποίο υψηλότερες τιμές είχε το κυδώνι. Στο κυδώνι προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες τιμές ακετυλοχολινεστάσης στα βράγχια και το σώμα. Στις γυαλιστερές προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες τιμές καταλάσης στο σώμα. Στο πεπτικό σύστημα, υψηλότερες τιμές όλων των ενζύμων προσδιορίστηκαν στη γυαλιστερή σε σχέση με το κυδώνι.

Για τα μύδια, όποιος ιστός και αν χρησιμοποιηθεί για έλεγχο, η ακετυλοχολινεστάση και η λιπιδική υπεροξειδωση είναι οι καταλληλότερες ενώσεις-βιοδείκτες καθώς έχουν ξεκάθαρη τάση σε κάθε ιστό σε όλα τα επίπεδα έκθεσης. Για τις γυαλιστερές, όποιος ιστός και αν χρησιμοποιηθεί ως ιστός ελέγχου, η ακετυλοχολινεστεράση και η λιπιδική υπεροξειδωση είναι οι καταλληλότερες ενώσεις-βιοδείκτες. Για τα κυδώνια, οποιοσδήποτε ιστός και αν χρησιμοποιηθεί ως ιστός ελέγχου η

ακετυλοχολινεστάση, η λιπιδική υπεροξειδωση και η καταλάση είναι οι καταλληλότερες ενώσεις-βιοδείκτες.

Για λόγους απλούστευσης των ελέγχων, καταλληλότεροι ιστοί μελέτης, σύμφωνα με την τάση του νικελίου, για τα μύδια και τα κυδώνια είναι τα βράγχια, ενώ για την γυαλιστερή το σώμα και καταλληλότερες ενώσεις-βιοδείκτες είναι η ακετυλοχολινεστάση και η λιπιδική υπεροξειδωση.

Κάδμιο

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή, και στους τρεις οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο, παρατηρήθηκε μεγάλη θνησιμότητα. Η έκθεση στην υψηλότερη συγκέντρωση καδμίου προκάλεσε μεγάλη θνησιμότητα στους οργανισμούς, με τα μύδια να είναι πιο ευαίσθητοι οργανισμοί (προκλήθηκαν θάνατοι τόσο με έκθεση στα 2,5 όσο και στα 20 ppm) και τα κυδώνια οι πιο ανθεκτικοί (άντεξαν την έκθεση σε 20 ppm Cd για 15 μέρες, ενώ έκθεση σε 2,5 ppm Cd δεν προκάλεσε θανάτους).

Η γενική τάση που παρατηρήθηκε κατά την παραμονή των οργανισμών σε περιβάλλον αυξημένων συγκεντρώσεων **καδμίου** ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης των μετάλλων στους ιστούς των οργανισμών με το χρόνο. Ανάμεσα στους ιστούς των μυδιών, τα βράγχια των μυδιών είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου, ενώ ο μανδύας είχε τις χαμηλότερες. Για τις γυαλιστερές, το σώμα είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου, ενώ για τα κυδώνια οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στα βράγχια μόνο για εκείνα που εκτέθηκαν σε 1,0 και 20 ppm Cd. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα βράγχια ήταν το όργανο-στόχος για τα μύδια και τα κυδώνια που εκτέθηκαν σε κάδμιο και το σώμα για τις γυαλιστερές.

Για τα μύδια παρατηρήθηκε ότι όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης αυξανόταν και η συγκέντρωση καδμίου στους ιστούς, ενώ για τις γυαλιστερές και τα κυδώνια, παρατηρήθηκε έντονη αύξηση μόνο στο επίπεδο 20 ppm Cd. Κατά την αποτοξίνωση σε όλους τους οργανισμούς παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του καδμίου στα βράγχια, αλλά αύξηση στους υπόλοιπους ιστούς, πιθανά λόγω μεταφοράς του μετάλλου προς τους υπόλοιπους ιστούς (translocation).

Οι τιμές μηλονικής διαλδεΐδης που μετρήθηκαν στους ιστούς όλων των οργανισμών ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού αναφοράς. Γενικά για τα μύδια και τα κυδώνια, οι πιο υψηλές τιμές μηλονικής διαλδεΐδης προσδιορίστηκαν στα βράγχια, και οι πιο χαμηλές στο μανδύα. Για τις γυαλιστερές οι υψηλότερες τιμές MDA προσδιορίστηκαν στο σώμα. Παρατηρείται λοιπόν ότι και στους τρεις οργανισμούς, ο ιστός που είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου είχε υποστεί και την μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη. Γενικά, και για τους τρεις οργανισμούς, όσο αυξάνονταν οι μέρες έκθεσης αυξανόταν και η λιπιδική υπεροξειδωση σε κάθε ιστό.

Οι τιμές ακετυλενοχολινεστεράσης στους ιστούς των μυδιών και των γυαλιστερών ήταν χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς. Στο μανδύα και στο σώμα φαίνεται ότι η ενεργότητα του ενζύμου μειωνόταν όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης. Για όλους τους οργανισμούς, για κάθε επίπεδο έκθεσης, οι χαμηλότερες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν στα βράγχια, ενώ οι υψηλότερες κυρίως στο σώμα. Η ενεργότητα της AChE συσχετίστηκε αρνητικά με την συγκέντρωση καδμίου σε κάθε έναν από τους ιστούς των μυδιών και των γυαλιστερών, κάτι που υποδεικνύει την τοξικότητα του μετάλλου. Στο κυδώνι, η συσχέτιση καδμίου-ακετυλοχολινεστεράσης ήταν θετική για τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν στα τρία χαμηλότερα επίπεδα καδμίου, ενώ ήταν αρνητική

στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd, και οι οποίοι δεν άντεξαν ως το τέλος του πειράματος. Πιθανά, μείωση της AChE και αρνητική συσχέτισή της με τη συγκέντρωση του μετάλλου να είναι μια ένδειξη κατάρρευσης του οργανισμού, ενώ στα κυδώνια, όπου η συσχέτιση ήταν θετική, οι οργανισμοί ήταν πιο ανθεκτικοί.

Για τα μύδια, για κάθε επίπεδο έκθεσης, οι τιμές της καταλάσης που προσδιορίστηκαν στα βράγχια ήταν οι υψηλότερες, ενώ στο σώμα η καταλάση βρισκόταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Οι τιμές στο μανδύα των μυδιών και το σώμα των γυαλιστερών ήταν χαμηλές και ανεξάρτητες από το επίπεδο έκθεσης. Για τις γυαλιστερές, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στα βράγχια και σε όλους τους ιστούς, εκτός από το σώμα παρατηρήθηκε αύξηση με τις μέρες έκθεσης. Στα κυδώνια, οι υψηλότερες τιμές του ενζύμου προσδιορίστηκαν στα βράγχια και αύξηση του επιπέδου έκθεσης προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου.

Στα μύδια, οι υψηλότερες τιμές GST προσδιορίστηκαν στο μανδύα και στο σώμα, ενώ για τις γυαλιστερές και τα κυδώνια προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα. Οι τιμές του ενζύμου στα βράγχια των μυδιών και σε όλους τους ιστούς των γυαλιστερών, ήταν υψηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς, οι οποίες στα δύο χαμηλότερα επίπεδα έκθεσης αυξάνονταν με το επίπεδο έκθεσης. Για το μανδύα και το σώμα των μυδιών όσο αυξανόταν το επίπεδο έκθεσης, η GST μειωνόταν, φτάνοντας σε τιμές χαμηλότερες από του πληθυσμού αναφοράς. Η ενεργότητα του ενζύμου στους ιστούς των κυδωνιών που εκτέθηκαν στα τρία χαμηλότερα επίπεδα μετάλλου δεν είχε ξεκάθαρη τάση με τις μέρες έκθεσης, αλλά στο επίπεδο 20 ppm, οι τιμές μειώνονταν.

Μεταξύ των ιστών των μυδιών υψηλότερη ενεργότητα GR προσδιορίστηκε στο μανδύα των οργανισμών, ενώ στις γυαλιστερές και τα κυδώνια δεν ξεχώρισε κάποιος ιστός με υψηλότερες τιμές. Αύξηση της GR και μείωση της GST που παρατηρήθηκε κυρίως στους ιστούς των μυδιών δείχνει τον κύκλο της οξειδωσης και αναγωγής της γλουταθειόνης όπου τα δύο παραπάνω ένζυμα συμμετέχουν.

Για τα μύδια, σε όλα τα επίπεδα έκθεσης, εκτός από το υψηλότερο, παρατηρήθηκε πως τα βράγχια είχαν τις χαμηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών, ενώ το σώμα τις υψηλότερες. Υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών, για τα μύδια που εκτέθηκαν σε 20 ppm καδμίου προσδιορίστηκαν στο μανδύα και χαμηλότερες στα βράγχια. Για τις γυαλιστερές και τα κυδώνια, υψηλότερες τιμές MTs προσδιορίστηκαν στο πεπτικό σύστημα, ενώ οι χαμηλότερες στα βράγχια.

Σύγκριση των τριών οργανισμών για το κάδμιο

Η τάση βιοσυσσώρευσης του καδμίου στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των τριών οργανισμών που εκτέθηκαν στα τρία χαμηλότερα επίπεδα ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* ≈ *C. chione*. Στο πεπτικό σύστημα υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο κυδώνι από ότι στην γυαλιστερή. Για το υψηλότερο επίπεδο έκθεσης, βρέθηκε ότι στα βράγχια και στο μανδύα, οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο κυδώνι, το οποίο άντεξε και τις περισσότερες μέρες, ενώ στο σώμα στην γυαλιστερή. Και στους δύο ιστούς το μύδι είχε τις χαμηλότερες τιμές. Στο πεπτικό σύστημα οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στη γυαλιστερή σε σχέση με το κυδώνι.

Στα βράγχια, το μανδύα και το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάθε επίπεδο καδμίου, η τάση αύξησης της λιπιδικής υπεροξειδωσης ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* ≈ *V. verrucosa*. Το μύδι είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου και είχε υποστεί την μεγαλύτερη οξειδωτική

βλάβη, κάτι που υποδεικνύει ότι είναι πιο ευαίσθητος οργανισμός από τους άλλους δύο και ίσως γι' αυτό να είχε μεγαλύτερη θνησιμότητα. Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε 0,5 και 1,0 ppm Cd υψηλότερη οξειδωτική βλάβη είχε υποστεί η γυαλιστερή, ενώ για τα δύο υψηλότερα επίπεδα η τάση ήταν η αντίστροφη.

Η τάση της ακετυλοχολινεστεράσης στα βράγχια και το μανδύα ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* ≥ *V. verrucosa*, ενώ στο σώμα ήταν: *V. verrucosa* > *M. galloprovincialis* ≈ *C. chione*. Στο πεπτικό σύστημα των κυδωνιών προσδιορίστηκαν υψηλότερες τιμές από των γυαλιστερών.

Το κυδώνι με την γυαλιστερή είχαν παρόμοιες τιμές καταλάσης στα βράγχια, υψηλότερες από τις αντίστοιχες του μυδιού, ενώ στους υπόλοιπους ιστούς το κυδώνι είχε τις υψηλότερες και το μύδι τις χαμηλότερες. Η υψηλή ενεργότητα της καταλάσης πιθανά προστατεύει το κυδώνι από το οξειδωτικό stress και έτσι ανταπεξέρχεται στις υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου καταλήγοντας να είναι ο οργανισμός ο οποίος αντέχει τις περισσότερες ημέρες σε κάδμιο.

Η τάση της ενεργότητας της S μεταφοράς της γλουταθειόνης στα βράγχια των οργανισμών ήταν: *V. verrucosa* > *C. chione* ≥ *M. galloprovincialis*, ενώ στο σώμα: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* > *C. chione*. Στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών, υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στο κυδώνι από ότι στη γυαλιστερή. Στο μανδύα η τάση ανάμεσα στους οργανισμούς διέφερε ανάλογα με το επίπεδο έκθεσης.

Στα βράγχια των οργανισμών που εκτέθηκαν σε 0,5-1,0 και 2,5 ppm Cd η τάση της αναγωγής της γλουταθειόνης ήταν παρόμοια με της GST, ενώ η τάση για εκείνους που εκτέθηκαν σε 20 ppm Cd ήταν: *M. galloprovincialis* > *C. chione* ≥ *V. verrucosa*. Στο μανδύα και στο σώμα η τάση, ανεξάρτητα από το επίπεδο έκθεσης, ήταν: *M. galloprovincialis* > *V. verrucosa* ≥ *C. chione*. Οι τιμές της GR στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών δεν παρουσίασαν στατιστική διαφορά για κανένα επίπεδο έκθεσης.

Οι τιμές των μεταλλοθειονινών στα βράγχια των γυαλιστερών ήταν παρόμοιες με των μυδιών, αλλά υψηλότερες από του κυδωνιού. Στο μανδύα δεν προέκυψαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των οργανισμών. Στο σώμα, οι γυαλιστερές είχαν υψηλότερες τιμές, ενώ οι δύο άλλοι οργανισμοί είχαν παρόμοιες τιμές. Το κυδώνι είχε τις υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών στο πεπτικό σύστημα για κάθε επίπεδο.

Για τα μύδια, όποιος ιστός και να χρησιμοποιηθεί για έλεγχο, η ακετυλοχολινεστεράση και η λιπιδική υπεροξειδωση είναι οι καταλληλότερες ενώσεις-βιοδείκτες, ενώ για τις γυαλιστερές και τα κυδώνια είναι η λιπιδική υπεροξειδωση καθώς αυτές οι ενώσεις-βιοδείκτες έχουν ξεκάθαρη τάση με το χρόνο έκθεσης και με την συγκέντρωση του μετάλλου σε κάθε ιστό.

Για λόγους απλούστευσης των ελέγχων, καταλληλότερος ιστός μελέτης, σύμφωνα με την τάση του καδμίου, για όλους τους οργανισμούς είναι τα βράγχια και καταλληλότερη ένωση-βιοδείκτης είναι η λιπιδική υπεροξειδωση.

Σύγκριση των τριών μετάλλων σε κάθε οργανισμό

Για να είναι ορθότερη η σύγκριση μεταξύ των συγκεντρώσεων διαφορετικών μετάλλων, οι συγκεντρώσεις εκφράστηκαν σε μmol μέταλλου/g d.w.

Για τα **μύδια**, όταν αυτά συλλέγονταν, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις όλων των μετάλλων (μπολι μετάλλου/g d.w.) προσδιορίστηκαν στα βράγχια τους. Κατά την έκθεση, από τα τρία μέταλλα, υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο.

Στα βράγχια, υψηλότερες τιμές ακετυλοχολινεστεράσης και μεταλλοθειονινών προσδιορίστηκαν στα μύδια που είχαν εκτεθεί σε νικέλιο. Στο μανδύα και στο σώμα οι υψηλότερες τιμές AChE προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο, ενώ μεταλλοθειονινών σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο.

Στους τρεις ιστούς των μυδιών μεγαλύτερη οξειδωτική βλάβη είχαν υποστεί οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε κάδμιο και την μικρότερη οι οργανισμοί που εκτέθηκαν σε νικέλιο. Για όλους τους οργανισμούς, ο ιστός που είχε υποστεί την μεγαλύτερη βλάβη ήταν τα βράγχια. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το πιο τοξικό μέταλλο είναι το κάδμιο και ας έχει μικρότερη συγκέντρωση στο θαλασσινό νερό από ότι ο Pb ή το Ni.

Στους τρεις ιστούς των μυδιών μεγαλύτερη ενεργότητα GST, GR, CAT προσδιορίστηκε στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο από ότι στα άλλα δύο μέταλλα.

Για τις **γαυαλιστερές**, όταν συλλέγονταν (day 0), υψηλότερες συγκεντρώσεις σε όλους τους ιστούς προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο. Κατά την έκθεση, από τα τρία μέταλλα, υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο, εκτός από το σώμα των οργανισμών που εκτέθηκαν στο υψηλότερο επίπεδο νικελίου, όπου η τιμή ήταν υψηλότερη από όλες.

Η ενεργότητα της ακετυλοχολινεστεράσης στα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα των γαυαλιστερών, ήταν παρόμοια για όλους τους οργανισμούς ανεξάρτητα από το μέταλλο στο οποίο εκτέθηκαν. Στο σώμα, υψηλότερες τιμές ενζύμου μετρήθηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.

Τα επίπεδα μηλονικής διαλδεΰδης γενικά, δεν ήταν πολύ διαφορετικά ανάμεσα στα τρία μέταλλα, εκτός από το υψηλότερο επίπεδο νικελίου το οποίο σε όλους τους ιστούς εκτός από το σώμα είχε τις υψηλότερες τιμές.

Υψηλότερες τιμές S μεταφοράς της γλουταθειόνης στα βράγχια, το μανδύα και το πεπτικό σύστημα των γαυαλιστερών προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μολύβδου. Στο σώμα, οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο.

Υψηλότερες τιμές αναγωγής της γλουταθειόνης στο μανδύα, το πεπτικό σύστημα και το σώμα των γαυαλιστερών προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε όλα τα επίπεδα μολύβδου. Στα βράγχια οι υψηλότερες τιμές προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο.

Στα βράγχια των γαυαλιστερών, υψηλότερες τιμές καταλάσης προσδιορίστηκαν σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο, στο μανδύα σε εκείνους που εκτέθηκαν σε μόλυβδο, στο πεπτικό σύστημα σε εκείνους που εκτέθηκαν σε νικέλιο, ενώ στο σώμα παρόμοιες τιμές βρέθηκαν σε εκείνους που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και νικέλιο.

Υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών προσδιορίστηκαν σε όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.

Για τα **κυδώνια**, όπως και στις γυαλιστερές, όταν συλλέγονταν, υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα μέταλλα (μπολ μέταλλου/g d.w.) προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε νικέλιο. Κατά την έκθεση, από τα τρία μέταλλα, υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που είχαν εκτεθεί σε μόλυβδο.

Σε όλους τους ιστούς, εκτός από το σώμα, υψηλότερες τιμές AChE προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και νικέλιο. Στο σώμα προσδιορίστηκαν οι υψηλότερες τιμές στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο.

Υψηλότερες τιμές μηλονικής διαλδεΐδης στα βράγχια και το πεπτικό σύστημα προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο, ενώ στο μανδύα στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο, ενώ στο σώμα σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο.

Υψηλότερες τιμές GST σε όλους τους ιστούς προσδιορίστηκαν στα κυδώνια που εκτέθηκαν σε κάδμιο, εκτός από το πεπτικό σύστημα όπου εξίσου υψηλές τιμές προσδιορίστηκαν και στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο.

Υψηλότερες τιμές GR στο πεπτικό σύστημα προσδιορίστηκαν στα κυδώνια που εκτέθηκαν σε μόλυβδο. Στο σώμα, παρόμοιες τιμές προσδιορίστηκαν σε όλους τους οργανισμούς, ενώ στα βράγχια και το μανδύα, παρόμοιες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο.

Υψηλότερες τιμές καταλάσης στα βράγχια και το σώμα προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε μόλυβδο. Στο πεπτικό σύστημα, υψηλότερες σε εκείνους που εκτέθηκαν σε κάδμιο, ενώ στο μανδύα, παρόμοιες τιμές ενζύμου προσδιορίστηκαν στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο και μόλυβδο, υψηλότερες από τις αντίστοιχες των οργανισμών που εκτέθηκαν σε νικέλιο.

Υψηλότερες τιμές μεταλλοθειονινών προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε κάδμιο, εκτός από τα βράγχια όπου όλες οι τιμές ήταν παρόμοιες μεταξύ τους. Οι χαμηλότερες τιμές σε κάθε ιστό προσδιορίστηκαν στους οργανισμούς που εκτέθηκαν σε νικέλιο.

Παρατηρείται ενεργοποίηση των ενζύμων στους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν σε μόλυβδο και κάδμιο και ίσως σε αυτό οφείλεται η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των οργανισμών αυτών ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων.

Συνοψίζοντας

- Πιο ευαίσθητοι οργανισμοί, με βάση τους θανάτους αλλά και την οξειδωτική βλάβη που υπέστησαν οι ιστοί τους, αποδείχτηκαν τα μύδια κάτι που προφανώς οφείλεται στην πιο άμεση επαφή τους με το θαλασσινό νερό.
- Επειδή παρατηρήθηκε σημαντική θνησιμότητα και στα τρία είδη οργανισμών που εκτέθηκαν σε κάδμιο, το μέταλλο αυτό αποδεικνύεται το πιο τοξικό από τα μέταλλα που εξετάστηκαν.

- Ⓜ Υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των οργάνων-στόχων ανά μέταλλο και ανά είδος. Γενικά αυξημένη επιβάρυνση και στα τρία μέταλλα εμφάνισαν τα βράγχια, εκτός από την γυαλιστερή όπου το νικέλιο βιοσυσσωρευόταν στο σώμα.
- Ⓜ Και για τους τρεις οργανισμούς, μεταξύ των τριών μετάλλων, ο μόλυβδος είχε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (μmol/g d.w.) σε όλους τους ιστούς.
- Ⓜ Η ύπαρξη αυξημένων συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον των οργανισμών προκαλεί αυξημένη συσσώρευσή τους στους ιστούς. Έτσι, οργανισμοί που προέρχονται από ρυπασμένες περιοχές ή ακόμα και από μέτριας ρύπανσης περιοχές, καταλήγουν να είναι ακατάλληλοι για άμεση κατανάλωση λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στους ιστούς τους.
- Ⓜ Η αποτοξίνωση χρειάζεται αρκετό χρόνο για να ολοκληρωθεί. Οι 10 ημέρες ή ακόμα και 30, δεν ήταν αρκετές ώστε να επιστρέψουν οι συγκεντρώσεις των μετάλλων στις τιμές προ έκθεσης.
- Ⓜ Τα επίπεδα μολύβδου δεν διαφοροποιήθηκαν ιδιαίτερα μεταξύ των τριών οργανισμών, εκτός από το πείραμα που οι οργανισμοί εκτέθηκαν σε 20 ppm Pb και τότε οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στα μύδια.
- Ⓜ Μεταξύ των τριών οργανισμών, υψηλότερα επίπεδα καδμίου αλλά και νικελίου προσδιορίστηκαν στους ιστούς των μυδιών.
- Ⓜ Η έκθεση των οργανισμών σε βαρέα μέταλλα αποδείχτηκε πως επηρεάζει τις βιολογικές λειτουργίες των οργανισμών μέσω των διακυμάνσεων ενώσεις-βιοδείκτες, οι οποίες μεταβάλλονται ακόμα και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (sublethal).
- Ⓜ Υπάρχουν αναλύσεις ενώσεων-βιοδεικτών, που μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα περιβαλλοντικού ελέγχου.
- Ⓜ Από τις ενώσεις-βιοδείκτες που μελετήθηκαν, η ακετυλοχολινεστεράση, η λιπιδική υπεροξειδωση και η καταλάση θεωρούνται οι πλέον κατάλληλοι για ένταξη σε προγράμματα παρακολούθησης του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Δεν είναι όμως όλες οι ενώσεις-βιοδείκτες κατάλληλες για όλους τους οργανισμούς. Γενικά όμως προέκυψε ότι η λιπιδική υπεροξειδωση είναι ο καταλληλότερος βιοδείκτης για όλους τους ιστούς των οργανισμών που εκτέθηκαν και στα τρία μέταλλα.

Μελλοντικές Ερευνητικές Προτάσεις

Τα βασικά συμπεράσματα που εξήχθησαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής θα μπορούσαν να φανούν ιδιαίτερος χρήσιμα και να αξιοποιηθούν σε μελλοντική εργασία.

Θα πρέπει να μελετηθεί η απόκριση και η βλάβη που προκαλείται στους οργανισμούς όταν αυτοί εκτίθενται και σε άλλα στοιχεία τα οποία είτε είναι ρύποι προτεραιότητας για την Μεσόγειο (όπως ο υδράργυρος), είτε υπάρχουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ιζήματα στη χώρα μας (όπως το χρώμιο), είτε γιατί είναι πολύ διαδεδομένα στη χρήση τους (όπως είναι ο ψευδάργυρος και ο χαλκός). Επίσης θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να εξεταστεί η συνεργική δράση των μετάλλων

μεταξύ τους αλλά και με άλλους παράγοντες, όπως οι οργανικοί ρύποι, ο ευτροφισμός και η υποξία ώστε να βρεθούν οι επιδράσεις τους στους οργανισμούς.

Κρίνεται σκόπιμο να δοκιμαστούν χαμηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων κατά την έκθεση, με επίπεδα πλησιέστερα σε συγκεντρώσεις που έχουν μετρηθεί σε πραγματικές συνθήκες, σε λιγότερο ρυπασμένες περιοχές. Χρησιμοποιώντας βέβαια χαμηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων υπάρχει κίνδυνος να μην υπάρχει σαφής απόκριση των οργανισμών, κυρίως των ενώσεων-βιοδεικτών.

Θα μπορούσαν, τέλος, να μελετηθούν και άλλοι μεσογειακοί οργανισμοί στους οποίους έχουν ξαναπροσδιοριστεί συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, όπως τα ασκίδια, όπου και αυτοί είναι διηθητές, είτε σαλιγκάρια και πεταλίδες οι οποίοι είναι βοσκητές.

Από τα ευρήματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής προκύπτει ότι χρειάζεται συνεργασία με άλλους επιστημονικούς κλάδους, όπως Βιολόγους-Βιοχημικούς-Οικολόγους ώστε να γίνει σε βάθος μια έρευνα των επιπτώσεων σε όλα τα επίπεδα (μοριακό-οργανισμοί-οικοσύστημα). Μια τέτοια έρευνα είναι πολύ χρήσιμη, ώστε να δοθεί σωστή διαχειριστική κατεύθυνση, με σκοπό την αειφόρο ανάπτυξη.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 68: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	1 χλωρο-2,4 δινιτροβενζόλιο
acetonitrile	ακετονιτρίλιο
acetylcholinesterase	ακετυλοχολινεστεράση
acetylthiocholine	ακετυλοθειοχολίνη
acetylthiocholine iodide	ιωδιούχος ακετυλοθειοχολίνη
bioindicator	οργανισμός-βιοδείκτης
biomarker	ένωση-βιοδείκτης
box-plot	θηκόγραμμα
bromophenol blue	μπλε βρωμοφαινόλης
butylated hydroxytoluene	βουτυλοϋδροξυ τολουόλιο
carbonic anhydrase	καρβονική ανυδράση
destain solution	διάλυμα αποχρωματισμού
detoxifying agents	αποτοξινωτές
dithiothreitol	διθειοθρεϊτόλη
ethylenediamine tetracetic acid	Αιθυλονοδιάμινο τετραοξικό οξύ
fixing solution	διάλυμα σταθεροποίησης
flavoprotein	φλαβοπρωτεΐνη
glutathione	ανηγμένη γλουταθειόνη
gonadal follicle	γεννητικός αδένας
hemolymph	αιμολέμφος
inhalant siphon	σίφωνας εισόδου
isoelectric point	ισοηλεκτρικό σημείο
oxidized glutathione	οξειδωμένη γλουταθειόνη
protein ladder	πρωτεϊνική κλίμακα
separating gel	πηκτική διαχωρισμού
silver stain	χρώση αργύρου
stacking gel	πηκτική πάκτωσης ή πακεταρίσματος
trichloroacetic acid	Τριχλωροοξικό οξύ
β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	Φωσφοροκό Β- νικοτινάμιδο αδενίνο δινουκλεοτίδιο

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

AChE	Acetylcholinesterase
APS	Ammonium Peroxodisulfate
BChE	butyrylcholinesterase
BHT	Butylated Hydroxytoluene
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>C. chione</i>	<i>Callista chione</i>
CAT	Catalase
CbE	carboxylesterase
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
Cys	cystein
Da	Dalton
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid
DTT	dithiothreitol
d.w.	dry weight
EC	Enzyme Commission
EDTA	ethylenediamine tetracetic acid
EPA	Environmental Protection Agency
GR	Glutathione Reductase
GSH	Reduced Glutathione
GSSG	Oxidized Glutathione
GST	Glutathione S Tranferase
LC ₅₀	Lethal Concentration
LPO	Lipid Peroxidation
<i>M. galloprovincialis</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
MDA	Malondialdahyde
MRP	Multidrug Resistance Associated Proteins
MTs	Metallothioneins
NADPH	β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
P.I.	isoelectric point
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

PCBs	Polychlorinated biphenyls
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl Fluoride
PUFAs	Polyunsaturated Fatty Acids
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SOD	Superoxide Dismutase
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TBA	Thiobarbituric acid
TBARs	Thiobarbituric Reactive Substances
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
<i>V. verrucosa</i>	<i>Venus verrucosa</i>
w.w.	wet weight

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. USEPA, Office of Water, Office of Science and Technology. National Recommended Water Quality Criteria, 2009. [Internet] [cited 2012 Aug 18]. Available from: <http://www.epa.gov/ost/pc/revcom.pdf>.
2. Hellenic Republic, Official Government Gazette (2010) Environmental Quality Standards for Pollutants and Priority Substances in surface waters, No 1909
3. D. Naimo, P. Adamo, M. Imperato, D. Stanzione, Mineralogy and geochemistry of a marine sequence, Gulf of Salerno, Italy, *Quaternary International*, vol. 140-141, 2005, pp. 53-63.
4. U. Förstner, G.T.W. Wittmann, Metal accumulations in acidic waters from gold mines in South Africa, *Geoforum*, vol. 7, 1976, pp. 41-49.
5. C.F. Mason, *Biology of fresh water pollution*, 2nd edition, J. Wiley and Sons, New York, 1991.
6. J.P. Riley, R. Chester, *Introduction to Marine Chemistry*, Academic Press, London, 1971.
7. P.G. Brewer, J.P. Riley, R. Chester, *Minor elements in seawater*, chapter 7 in *Chemical Oceanography*, vol 1, 2nd Ed., J.P. Riley and G. Skinner Eds, Academic Press, New York, 1975.
8. K.W. Bruland, *Trace elements in Seawater*, Chemical Oceanography, London, vol. 8, 1983, pp. 157-220.
9. Β. Παρασκευοπούλου, *Διακίνηση και χημική συμπεριφορά βαρέων μετάλλων σε θαλάσσια περιοχή επηρεαζόμενη από βιομηχανική ρύπανση (ΒΔ Σαρωνικός)*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2009.
10. S.J Hawkins, P.E Gibbs, N.D Pope, G.R Burt, B.S Chesman, S Bray, S.V Proud, S.K. Spence, A.J Southward, W.J. Langston, Recovery of polluted ecosystems: the case for long-term studies, *Marine Environmental Research*, vol. 54, 2002, pp. 215-222.
11. A.J. Simkiss, M.G.Taylor, *Transport of Metals Across Membranes. In: Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, IUPAC, 1995.
12. F.A. Cotton, G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, 4th edition, J. Wiley and Sons, New York, 1980.
13. A.Z. Mason, K.D. Jenkins, *Metal detoxification in aquatic organisms, in metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, Eds Tesier A., Turner D.R., IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, John Wiley and Sons, vol 3, 1995, pp. 482-491.
14. J.G Lee, S.B. Roberts, Cadmium: A nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*, *Limnology and Oceanography*, vol. 40, 1995, pp. 1056-1063.
15. T.W. Lane, F.M.M. Morel, A biological function for cadmium in marine diatoms, *PNAS*, vol. 97, 2000, pp. 4627-4631.
16. V. Yilmaz, Z. Arslan, LaK. Rose, M. D. Little, Cyanovanadate(III) complexes as novel additives for efficient generation of volatile cadmium species in complex samples prior to determinations by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)." *Talanta*, vol. 115, 2013, pp. 681-687.
17. J Harte, C Holdren, R Schneider, C Shirley, *Toxics A to Z: A guide to everyday pollution hazards*, University of California Press Berkeley and Los Angeles, California University of California Press, England, 1991.
18. C.K. Yap, A. Ismail, S.G. Tan, Heavy metal (Cd, Cu, Pb and Zn) concentrations in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) collected from some wild and aquacultural sites in the west coast of Peninsular Malaysia, *Food Chemistry*, vol. 84, 2004, pp. 569-575.

19. L. Campanella, M.E. Conti, F. Cubadda, C. Sucapane, Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean, *Environmental Pollution*, vol. 111, 2001, pp.117-126.
20. B.L. McGee, D.A. Wright, D.J. Fisher, Biotic factors modifying acute toxicity of aqueous cadmium to estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*, *Archives of environmental contamination toxicology*, vol.34, 1998, pp. 34-40.
21. R. Eisler, G. E. Zarogian, R. J. Hennekey, Cadmium Uptake by Marine Organisms, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 29, 1972, pp. 1367-1369.
22. M. Zuykov, E. Pelletier, D. A.T. Harper, Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring, *Chemosphere*, Vol. 93, 2013, pp. 201-208.
23. Q. Zhou, J. Zhang, J. Fu, J. Shi, G. Jiang, Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem, *Analytica Chimica Acta*, vol. 606, 2008, pp. 135-150.
24. S. Koutsogiannaki, S. Franzellitti, S. Kalogiannis, E. Fabbri, V. K. Dimitriadis, M. Kaloyianni, Effects of cadmium and 17 β -estradiol on *Mytilus galloprovincialis* redox status. Prooxidant-antioxidant balance (PAB) as a novel approach in biomonitoring of marine environments, *Marine Environmental Research*, vol. 103, 2015, pp. 80-88.
25. M. Martin, B. J. Richardson, Long term contaminant biomonitoring: Views from southern and northern Hemisphere perspectives, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 22, 1991, pp 533-537.
26. European Commission, REACH legislation, http://ec.europa.eu/smart-regulation/impact/ia_carried_out/docs/ia_2011/sec_2011_0633_en.pdf.
27. L. Friberg, M. Vahter, Assessment of exposure to lead and cadmium through biological monitoring: Results of a UNEP/WHO global study, *Environmental Research*, vol. 30, 1983, pp. 95-128.
28. K. Nogawa, Y. Suwazono, In *Encyclopedia of Environmental Health*, Nriagu J. O. Ed. Elsevier, Burlington, 2011, pp. 308-314.
29. T. Inaba, E. Kobayashi, Y. Suwazono, M. Uetani, M. Oishi, H. Nakagawa, K. Nogawa, Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease, *Toxicology Letters*, vol. 159, 2005, pp. 192-201.
30. Μ. Σκούλλος, *Χημική Ωκεανογραφία: Μια εισαγωγή στη χημεία του θαλάσσιου περιβάλλοντος*, Εκδ. Συμμετρία, Αθήνα, 2008.
31. P. Mushak, Chapter 16 - Hematological Effects of Lead in Human Populations, In *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, Eds Elsevier Vol. 10, 2011, pp. 597-633.
32. P. C. Huang, P. H. Su, H. Y. Chen, H. B. Huang, J. L. Tsai, H. I. Huang, S. L. Wang, Childhood blood lead levels and intellectual development after ban of leaded gasoline in Taiwan: A 9-year prospective study, *Environment International*, vol. 40, 2012, pp. 88-96.
33. S. J. S. Flora, V. K. Jain, J. R. Behari, S. K. Tandon, Protective role of trace metals in lead intoxication, *Toxicology Letters*, vol 13, 1982, pp. 51-56.
34. M. J. Scoullos, Lead in coastal sediments: The case of the elefsis gulf, Greece, *Science of The Total Environment*, vol 49, 1986, pp. 199-219.
35. M. J.Scoullos, Trace metals in the sea water of a polluted bay near Athens, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, vol. 85, 1981, 85, pp. 247.
36. Αθ. Βαλαβανίδης, *Οικοτοξικολογία και Περιβαλλοντική Τοξικολογία: Ερευνητική Μεθοδολογία και Εκτίμηση Οικολογικού Κινδύνου από Επικίνδυνες Χημικές Ουσίες*, Εκδ. Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2007.

37. T.C. Hutchinson, K.M. Meemia, *Lead, Mercury, Cadmium, and Arsenic in the Environment*, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1987.
38. E. Remoudaki, G. Bergametti, R. Losno, On the dynamic of the atmospheric input of copper and manganese into the Western mediterranean sea, *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, vol. 25, 1991, pp. 733-744.
39. M. J. Scoullou, F. Oldfield, Trace metal and magnetic studies of sediments in greek estuaries and enclosed gulfs, *Marine Chemistry*, vol. 18, 1986, pp. 249-268.
40. M. Schuhmacher, M. Bellés, A. Rico, J. L. Domingo, J. Corbella, Impact of reduction of lead in gasoline on the blood and hair lead levels in the population of Tarragona Province, Spain, 1990–1995, *Science of The Total Environment*, vol. 184, 1996, pp. 203-209.
41. J. Molas, S. Baran, Relationship between the chemical form of nickel applied to the soil and its uptake and toxicity to barley plants (*Hordeum vulgare* L.), *Geoderma*, vol. 122, 2004, pp. 247-255.
42. D. G. Gundermann, T. C. Hutchinson, Changes in soil chemistry 20 years after the closure of a nickel-copper smelter near Sudbury, Ontario, Canada, *Journal of Geochemical Exploration*, vol. 52, 1995, pp. 231-236.
43. A. Shtiza, R. Swennen, A. Tashko, Chromium and nickel distribution in soils, active river, overbank sediments and dust around the Burrel chromium smelter (Albania), *Journal of Geochemical Exploration*, vol. 87, 2005, pp. 92-108.
44. J. A. Nott, A. Nicolaidou, Metals in gastropods—metabolism and bioreduction, *Marine Environmental Research*, vol. 28, 1989, pp. 201-205.
45. T.C. Hutchinson, L.M. Whitby, Heavy-metal pollution in the Sudbury mining and smelting region of Canada, I. Soil and vegetation contamination by nickel, copper, and other metals, *Environmental Conservation*, Cambridge Univ Press, 1974.
46. R. L. Blakeley, B. Zerner, Jack bean urease: the first nickel enzyme, *Journal of Molecular Catalysis*, vol. 23, 1984, pp. 263-292.
47. L. M. Gloss, R. P. Hausinger, Reduction potential characterization of methanogen factor 390, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 48, 1987, pp. 143-145.
48. E. P. Day, J. Peterson, M. J. Todd, R. P. Hausinger, Saturation magnetization of the nickel centers in urease, *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 36, 1989, pp. 305.
49. R. K. Thauer, Nickel Tetrapyrroles in Methanogenic Bacteria: Structure, Function and Biosynthesis, *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, vol. 3, 1982, pp. 265-270.
50. E. Denkhaus, K. Salnikow, Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 42, 2002, pp. 35-56.
51. A. Trupschuh, M. Anke, M. Muller, M. Illing-Gunther, Reproduction toxicology of nickel, 1st communication: Effect of excessive nickel amounts on magnesium content of organs and tissues, *Mengen*, vol. 3, 1997, pp. 23-24
52. H. Chen, T. Davidson, S. Singleton, M.D. Garrick, M. Costa, Nickel decreases cellular iron level and converts cytosolic aconitase to iron-regulatory protein 1 in A549 cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 206, 2005, pp. 275-287.
53. P. A. Cox, *Elements on the Earth*, Oxford University Press, 1995, pp.105-280.

54. R.E. Rodriguez, M. Misra, S.L. North, K.S. Kasprzak, Nickel-induced lipid peroxidation in the liver of different strains of mice and its relation to nickel effects on antioxidant systems, *Toxicology Letters*, vol. 57, 1991, pp. 269-281.
55. H. Attig, N. Kamel, S. Sforzini, A. Dagnino, J. Jamel, H. Boussetta, A. Viarengo, M. Banni, Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam), *Marine Environmental Research*, vol. 94, 2014, pp. 65-71.
56. E.F.D. Silva, A. Mlayah, C. Gomes, F. Noronha, A. Charef, C. Sequeira, V. Esteves, A.R.F. Marques, Heavy elements in the phosphorite from Kalaat Khasba mine (North-western Tunisia): Potential implications on the environment and human health, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 182, 2010, pp. 232-245.
57. J. Pempkowiak, A. Sikora, E. Biernacka, Speciation of heavy metals in marine sediments vs their bioaccumulation by mussels, *Chemosphere*, vol. 39, 1999, pp. 313-321.
58. J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, B. Berthet, C. Metayer, Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 106, 1987, pp. 73-89.
59. E. Abkhoshk, E. Jorjani, M.S. Al-Harashsheh, F. Rashchi, M. Naazeri, Review of the hydrometallurgical processing of non-sulfide zinc ores, *Hydrometallurgy*, vol. 149, 2014, pp. 153-167.
60. P. Ayris, P. Delmelle, Volcanic and atmospheric controls on ash iron solubility: A review, *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, vol. 45-46, 2012, pp. 103-112.
61. P. R. Henry, E.R. Miller, 9. Iron bioavailability. In *Bioavailability of Nutrients for Animals*; Lewis, C. B. A. H. B. J., Ed.; Academic Press: San Diego, 1995; pp 169-199.
62. S.B. Pandeya, Ligand competition method for determining stability constants of fulvic acid iron complexes, *Geoderma*, vol. 58, **1993**, pp. 219-231.
63. Y. Sugimura, Y. Suzuki, Y. Miyake, The dissolved organic iron in seawater, *Deep Sea Research*, vol. 25, 1978, pp. 309-314.
64. F. Scholz, S. Severmann, J. McManus, A. Noffke, U. Lomnitz, C. Hensen, On the isotope composition of reactive iron in marine sediments: Redox shuttle versus early diagenesis, *Chemical Geology* vol. 389, 2014, pp. 48-59.
65. D.E. Canfield, Reactive iron in marine sediments, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 53, 1989, pp. 619-632.
66. Οδηγία 98/83/ ΕΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ (ΕΥ) της 3ης Νοεμβρίου 1998 σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης
67. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, 2009. "National Recommended Water Quality Criteria", <http://www.epa.gov/ost/pc/revcom.pdf>, τελευταία πρόσβαση 14/05/2015.
68. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
69. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1881/2006, ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 19ης Δεκεμβρίου 2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα.

70. Legal Authority: Section 311(j)(1)(C) of the Clean Water Act as amended by the Oil Pollution Act of 1990, spill Prevention, Control, and Countermeasure (SPCC) Regulation, 40 CFR 112, <http://www2.epa.gov/oil-spills-prevention-and-preparedness-regulations/overview-spill-prevention-control-and>, τελευταία πρόσβαση 14/05/2015.
71. C.M. Ramakritinan, R. Chandurvelan, A.K. Kumaraguru, *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, vol. 4, 2012, pp. 141-145.
72. A.A. Otitolaju, K.N. Don-Pedro, Integrated laboratory and field assessments of heavy metals accumulation in edible periwinkle, *Tympanotonus fuscatus var radula* (L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 57, 2004, pp. 354-362.
73. P.R. Bhamre, S.P. Thorat, A.E. Desai, B.M. Deoray, Evaluation of acute toxicity of mercury, cadmium and zinc to a freshwater mussel *Lamellidens consobrinus*, *Our Nature*, vol. 8, 2010, pp. 34-43.
74. S. Belabed, N. Soltani, Acute toxicity of cadmium on *Donax trunculus*: acetylcholinesterase, glutathione S-transferase activities and pattern of recovery, *European Journal of Experimental Biology*, vol. 3, 2013, pp. 54-61.
75. R. Beiras, M. Albentosa, Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria, *Aquaculture*, vol. 230, 2004, pp. 205-213.
76. W.H. Tan, L.H. Lim, The tolerance to and uptake of lead in the green mussel, *Perna viridis* (L.), *Aquaculture*, vol. 42, 1984, pp. 317-332.
77. L. Bat, F. Ustun, O.G. Baki, F. Sahin, Effects of some heavy metals on the sizes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 22, 2013, pp. 243-249.
78. A. Calabrese, J.R. MacInnes, D.W. Nelson, J.E. Miller, Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress, *Marine Biology*, vol. 41, 1977, pp. 179-184.
79. M. Martin, K.E. Osborn, P. Billig, N. Glickstein, Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 12, 1981, pp. 305-308.
80. D. Taylor, B.G. Maddock, G. Mance, The acute toxicity of nine 'grey list' metals (arsenic, boron, chromium, copper, lead, nickel, tin, vanadium and zinc) to two marine fish species: Dab (*Limanda limanda*) and grey mullet (*Chelon labrosus*), *Aquatic Toxicology*, vol. 7, 1985, pp. 135-144.
81. L. Hédouin, O. Pringault, M. Metian, P. Bustamante, M. Warnau, Nickel bioaccumulation in bivalves from the New Caledonia lagoon: Seawater and food exposure, *Chemosphere*, vol. 66, 2007, pp. 1449-1457.
82. W.-X. Wang, P.S. Rainbow, Significance of metallothioneins in metal accumulation kinetics in marine animals, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 152, 2010, pp. 1-8.
83. P.L. Klerks, J.S. Weis, Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review, *Environmental Pollution*, vol. 45, 1987, pp. 173-205.
84. J. Liu, H. Wu, J. Feng, Z. Li, G. Lin, Heavy metal contamination and ecological risk assessments in the sediments and zoobenthos of selected mangrove ecosystems, South China, *CATENA*, vol. 119, 2014, pp. 136-142.

85. T.M. Florence, Development of physico-chemical speciation procedures to investigate the toxicity of copper, lead, cadmium and zinc towards aquatic biota, *Analytica Chimica Acta*, vol. 141, 1982, pp. 73-94.
86. G. Barrera, S. Pizzimenti, M.U. Dianzani, Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death, *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 29, 2008, pp. 1-8.
87. J.M. Matés, J.A. Segura, F.J. Alonso, J. Márquez, Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 49, 2010, pp 1328–1341.
88. M. Repetto, J. Semprine, A. Boveris, *Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination, Chapter 1*, INTEC, 2012, pp.3-22.
89. J.E. Coleman, Mechanism of action of carbonic anhydrase substrate, sulfonamide, and anion binding, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 242, 1967, pp. 5212-5219.
90. B. Alloway, D.C. Ayres, *Chemical principles of environmental pollution*, Blackie Academic and Professional, 2nd Edition, 1997, pp. 395-399
91. K. Shah, R.G. Kumar, S. Verma, R.S. Dubey, Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, *Plant Science*, vol. 161, 2001, pp. 1135-1144.
92. G. Bertin, D. Averbeck, Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (A Review), *Biochimie*, vol. 88, 2006, pp. 1549-1559.
93. F. Thévenod, Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 238, 2009, pp. 221-239.
94. E. Banakou, S. Dailianis, Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger and respiratory burst enzymes NADPH oxidase and NO synthase, in Cd-induced lipid peroxidation and DNA damage in haemocytes of mussels, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 152, 2010, pp. 346-352.
95. D.R. Lloyd, D.H. Phillips, Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 424, 1999, pp. 23-36.
96. J. Torrelles, M.-C. Guérin, Nickel (II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation, *FEBS Letters*, vol. 272, 1990, pp. 58-60.
97. M. Costa, Z. Zhuang, X. Huang, S. Cosentino, C.B. Klein, K. Salnikow, Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis, *Science of The Total Environment*, vol. 148, 1994, pp. 191-199.
98. J. Cartaña, A. Romeu, L. Arola, Effects of copper, cadmium and nickel on liver and kidney glutathione redox cycle of rats (*Rattus sp.*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, vol. 101, 1992, pp. 209-213.
99. M. Misra, R.E. Rodriguez, K.S. Kasprzak, Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems, *Toxicology*, vol. 64, 1990, pp. 1-17.

100. J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell, Comments on review of free radicals in biology and medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M.C. Gutteridge. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 12, **1992**, pp. 93-94.
101. O. Blokhina, K.V. Fagerstedt, Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation, *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 48, 2010, pp. 359-373.
102. L. Donaghy, H.-K. Hong, C. Jauzein, K.-S. Choi, The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs, *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 42, 2015, pp. 91-97.
103. B.R. Zelickson, S.W. Ballinger, L.J. Dell'Italia, J. Zhang, V.M. Darley-USmar, Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Interactions with Mitochondria and Pathophysiology. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*; W. J. L. D.Lane, Ed.; Academic Press: Waltham, 2013, pp 17-22.
104. I. Fridovich, An Overview of Oxyradicals in Medical Biology, In *Advances in Molecular and Cell Biology*; E. E Bittar, M.M. Joe, Eds.; Elsevier, vol. 25, 1998, pp 1-14.
105. T. Inoue, Y. Suzuki, T. Yoshimaru, C. Ra, Reactive oxygen species produced up- or downstream of calcium influx regulate proinflammatory mediator release from mast cells: Role of NADPH oxidase and mitochondria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research*, vol. 1783, 2008, pp. 789-802.
106. U. Weyemi, C. Dupuy, The emerging role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage responses, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 751, **2012**, pp. 77-81.
107. T. Finkel, Oxygen radicals and signaling, *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 10, 1998, pp. 248-253.
108. W. Klinger, A. Lupp, A. Barth, E. Karge, L. Knels, U.Kuhn, D. Müller, F. Schiller, U. Demme, P. Lindström-Seppä, O. Hänninen, Cytochrome P450 (P450) isoforms expression, P450 concentration, monooxygenase activities, reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and glutathione content in wild catch carp and tench liver - influence of a two weeks exposure to phenobarbital, *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 52, 2001, pp. 513-522.
109. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 39, 2007, pp. 44-84.
110. I. Juránek, D. Nikitovic, D. Kouretas, A.W. Hayes, A.M. Tsatsakis, Biological importance of reactive oxygen species in relation to difficulties of treating pathologies involving oxidative stress by exogenous antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 61, 2013, pp. 240-247.
111. R. Schmidt, J.H.M. Schippers, ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. In Press, Corrected Proof, doi:10.1016/j.bbagen.2014.12.020
112. K. Irani, S. Sollott, L. Rosolowski, T. Finkei, M. Sundaresan, P.J. Goldschmidt-Clemont, Reactive oxygen species act as mediators in endothelial cell signalling pathways, *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 27, 1996, pp. 385.
113. D. Hernández-García, C.D. Wood, S. Castro-Obregón, L. Covarrubias, Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 49, 2010, pp. 130-143.

114. D. Malinska, A.P. Kudin, M. Bejtka, W.S. Kunz, Changes in mitochondrial reactive oxygen species synthesis during differentiation of skeletal muscle cells, *Mitochondrion*, vol. 12, 2012, pp. 144-148.
115. J.E. Kaplan, R.D. Chrenek, J.G. Morash, C.M. Ruksznis, L.G. Hannum, Rhythmic patterns in phagocytosis and the production of reactive oxygen species by zebrafish leukocytes, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 151, 2008, pp. 726-730.
116. A. Valavanidis, T. Vlahogianni, M. Dassenakis, M. Scoullas, Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 64, 2006, pp. 178-189.
117. E. Södergren, B. Vessby, S. Basu, Radioimmunological measurement of F2-isoprostanes after hydrolysis of lipids in tissues, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 63, 2000, pp. 149-152.
118. B. Halliwell, Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, vol. 344, 1994, pp. 721-724.
119. R.P. Rastogi, S.P.; Singh, A. Incharoensakdi, D.P. Häder, R.P. Sinha, Ultraviolet radiation-induced generation of reactive oxygen species, DNA damage and induction of UV-absorbing compounds in the cyanobacterium *Rivularia* sp. HKAR-4, *South African Journal of Botany*, vol. 90, 2014, pp. 163-169.
120. K.L. Cooper, K.J. Liu, L.G. Hudson, Enhanced ROS production and redox signaling with combined arsenite and UVA exposure: Contribution of NADPH oxidase, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, 2009, pp. 381-388.
121. M. Pedrosa Gomes, É. Smedbol, M. Mércia Lima Carvalho Carneiro, Q. Souza Garcia, P. Juneau, Chapter 2 - Reactive Oxygen Species and Plant Hormones. In *Oxidative Damage to Plants*; Ahmad, P., Ed. Academic Press: San Diego, 2014, pp 65-88.
122. J.M. McCord: Chapter 6 Mechanisms of cell injury by free radicals. In *Principles of Medical Biology*; Bittar, E. E., Neville, B., Eds. Elsevier, vol. 3, 1998, pp 197-211.
123. M. Jozefczak, T. Remans, J. Vangronsveld, A. Cuypers, Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses, Review, *International journal of Molecular Science*, vol. 13, 2012, pp. 3145-3175.
124. H.C. Sutton, C.C. Winterbourn, On the participation of higher oxidation states of iron and copper in fenton reactions, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 6, 1989, pp. 53-60.
125. X. Shi, N.S. Dalal, On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 277, 1990, pp. 342-350.
126. E. López, C. Arce, M.J. Oset-Gasque, S. Cañadas, M.P. González, Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 40, 2006, pp. 940-951.
127. B.-M. Kim, J.-S. Rhee, C.-B. Jeong, J.S. Seo, G.S. Park, Y.-M. Lee, J.-S. Lee, Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (hsp) modulation in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 166, 2014, pp. 65-74.

128. X. Zirong, B. Shijun, Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 67, 2007, pp. 89-94.
129. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage, *The Lancet*, vol. 324, 1984, pp. 1095.
130. E.C. Borsonelo, J.C.F. Galduróz, The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: Review and propositions, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 78, 2008, pp. 237-245.
131. L.J. Marnett, Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 424, 1999, pp. 83-95.
132. L. Yang, G.-Y. Tan, Y.-Q. Fu, J.-H. Feng, M.-H.; Zhang, Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 151, 2010, pp. 204-208.
133. S.S. Davies, L. Guo, Lipid peroxidation generates biologically active phospholipids including oxidatively N-modified phospholipids, *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 181, 2014, pp. 1-33.
134. A.W. Girotti, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *Journal of lipid research*, vol. 39, 1998, pp. 1529-1542.
135. E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito, N. Noguchi, Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 338, 2005, pp. 668-676.
136. H. Esterbauer, G. Waeg, H. Puhl, F. Tatzber, Chemistry of oxidation of low density lipoproteins. In *Oxidative Damage & Repair*, Davies, K. J. A., Ed. Pergamon: Amsterdam, 1991, pp 273-280.
137. D.R. Janero, Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 9, 1990, pp. 515-540.
138. K.J. Davies, M.E. Delsignore, S.W. Lin, Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of amino acids, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, 1987, pp. 9902-9907.
139. M. Roméo, M. Gnassia-Barelli, Effect of Heavy Metals on Lipid Peroxidation in the Mediterranean Clam *Ruditapes decussatus*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 118, 1997, pp. 33-37.
140. F. Regoli, M.E. Giuliani, Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms, *Marine Environmental Research*, vol. 93, 2014, pp. 106-117.
141. K. Irani, Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling, *Circulation research*, vol. 87, 2000, pp. 179-183.
142. G. Powis, M. Briehl, J. Oblong, Redox signalling and the control of cell growth and death, *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 68, 1995, pp. 149-173.
143. M.D. Jacobson, Reactive oxygen species and programmed cell death, *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 21, 1996, pp. 83-86.

144. V. Nimet İzgüt-Uysal, R. Tan, M. Bülbül, N. Derin, Effect of stress-induced lipid peroxidation on functions of rat peritoneal macrophages, *Cell Biology International*, vol. 28, 2004, pp. 517-521.
145. M. Hermes-Lima, J.M. Storey, K.B. Storey, Chapter 20 Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress, In *Cell and Molecular Response to Stress*, Storey, K. B., Storey, J. M., Eds. Elsevier, vol. 2, 2001; pp 263-287.
146. M. Sato, M. Kondoh, Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals, *The Tohoku journal of experimental medicine*, vol. 196, 2002, pp. 9-22.
147. S.N.Luoma, Bioavailability of Trace Metals to Aquatic Organisms: A Review, *Science of the Total Environment*, vol. 28, 1983, pp. 1-22.
148. A. Tessier, P.G.C. Campbell, Partitioning of trace metals in sediments: relationships with bioavailability, *Hydrobiologia*, vol. 149, 1987, pp. 43-52.
149. P.S. Rainbow, Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 31, 1995, pp. 183-192.
150. J.I. Saiz-Salinas, J.M. Ruiz, G. Frances-Zubillaga, Heavy metal levels in intertidal sediments and biota from the bidasoa estuary, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 32, 1996, pp. 69-71.
151. D.J. Phillips, P.S. Rainbow, Strategies of Trace Metal Sequestration in Aquatic Organisms, *Marine Environmental Research*, vol. 28, 1989, pp. 207-210.
152. S.N. Luoma, G.W. Bryan, A statistical study of environmental factors controlling concentrations of heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* and the polychaete *Nereis diversicolor*, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol.15, 1982, pp. 95-108.
153. A. Chovanec, R. Hofer, F. Schiemer, Chapter 18: Fish as bioindicators. In *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*; B.A. Markert, A. M. B., Zechmeister, H. G., Eds. Elsevier, vol. 6, 2003, pp. 639-676.
154. P. Miramand, P. Bustamante, D. Bentley, N. Kouéta, Variation of heavy metal concentrations (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V, and Zn) during the life cycle of the common cuttlefish *Sepia officinalis*, *Science of The Total Environment*, vol. 361, 2006, pp. 132-143.
155. S.N. Luoma, G.W. Bryan, A statistical study of environmental factors controlling concentrations of heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* and the polychaete *Nereis diversicolor*, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 15, 1982, pp. 95-108.
156. Y. Nasu, M. Kugimoto, O. Tanaka, A. Takimoto, Comparative studies on the absorption of cadmium and copper in *Lemna paucicostata*, *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, vol. 32, 1983, pp. 201-209.
157. R. Martoja, C. Ballandufraçais, A.Y. Jeantet, P. Gouzerh, J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, B. Berthet, J.P. Baud, Chemical and cytological effects of experimental silver contamination of oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) via seawater and food, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 45, 1988, pp. 1827–1841.
158. J.F. Edler, J.J. Collins, Freshwater molluscs as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface–water systems, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 122, 1991, pp. 37–79.

159. B. Beliaff, T.P. O' Conner, D.K. Daskalakis, P.J. Smith, U.S. mussels watch data from 1986 to 1994: Temporal trend detection at large spatial scales, *Environmental Science and Technology*, vol. 31, 1997, pp. 1411-1415.
160. P. Kakkar, F.N. Jaffery, Biological markers for metal toxicity, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 19, 2005, pp. 335-349.
161. A. Viarengo, E. Ponzano, F. Dondero, R.A. Fabbri, A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs, *Marine Environmental Research*, vol. 44, 1997, pp. 69-84.
162. F. Regoli, G.W. Winston, Application of a new method for measuring the total oxyradical scavenging capacity in marine invertebrates, *Marine Environmental Research*, vol. 46, 1998, pp. 439-442.
163. F. Regoli, E. Orlando, Accumulation and subcellular distribution of metals (Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* during a field transplant experiment, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 28, 1994, pp. 592-600.
164. Q. Zhou, J. Zhang, J. Fu, J. Shi, G. Jiang, Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem, *Analytica Chimica Acta*, vol. 606, 2008, pp. 135-150.
165. J.L. Sericano, The Mussel Watch approach and its applicability to global chemical contamination monitoring programmes, Eds. M.E. Conti, F. Botrè, The control of marine pollution: current status and future trends, *International Journal of Environmental Pollution*, vol. 13, 2000, pp. 340-350.
166. C. Ciacci, C. Barmo, G. Gallo, M. Maisano, T. Cappello, A. D'Agata, C. Leonzio, A. Mauceri, S. Fasulo, L. Canesi, Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, *Aquatic Toxicology*, vol. 120-121, 2012, pp. 109-118.
167. B. Fernández, J.A. Campillo, C. Martínez-Gómez, J. Benedicto, Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites, *Chemosphere*, vol. 87, 2012, pp. 1235-1245.
168. A. Sureda, A. Box, S. Tejada, A. Blanco, J. Caixach, S. Deudero, Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain), *Aquatic Toxicology*, vol. 101, 2011, pp. 540-549.
169. M.J. Bebianno, B. Lopes, L. Guerra, P. Hoarau, A.M. Ferreira, Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors, *Environment International*, vol. 33, 2007, pp. 550-558.
170. H. Manduzio, T. Monsinjon, C. Galap, F. Le Boulenger, B. Rocher, Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase, *Aquatic Toxicology*, vol. 2004, pp. 83-93.
171. M.L. Lares, K.J. Orians, Differences in Cd elimination from *Mytilus californianus* and *Mytilus trossulus* soft tissues, *Environmental Pollution*, vol. 112, 2001, pp. 201-207.
172. A. Sakellari, S. Karavoltsos, D. Theodorou, M. Dassenakis, M. Scoullou, Bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn) by the marine bivalves *M. galloprovincialis*, *P. radiata*, *V. verrucosa* and *C.*

- chione* in Mediterranean coastal microenvironments: association with metal bioavailability, *Environmental Monitoring Assessment*, 2013, doi 10.1007/s10661-012-2799-2.
173. C.A.R. Silva, P.S. Rainbow, B.D. Smith, Z.L. Santos, Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source, *Water Research*, vol. 35, 2001, pp. 4072-4078.
 174. A. Geffard, J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, Kinetics of metal elimination in oysters from a contaminated estuary, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 131, 2002, pp. 281-293.
 175. W. Khati, K. Ouali, C. Mouneyrac, A. Banaoui, Metallothioneins in Aquatic Invertebrates: Their Role in Metal Detoxification and their Use in Biomonitoring, *Energy Procedia*, vol. 18, 2012, pp. 18, 784-794.
 176. J.A. Burger, framework and methods for incorporating gender-related issues in wildlife risk assessment: Gender-related differences in metal levels and other contaminants as a case study, *Environmental Research*, vol. 104, 2007, pp. 153-162.
 177. R. Manly, W.O. George, The occurrence of some heavy metals in populations of the freshwater mussel *Anodonta anatina* (L.) from the river thames, *Environmental Pollution*, vol. 14, 1977, pp. 139-154.
 178. S. Rajeshkumar, J. Mini, N. Munuswamy, Effects of heavy metals on antioxidants and expression of HSP70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, Chennai, India, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 98, 2013, pp. 8-18.
 179. C. Gundacker, Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha pallas*, *Chemosphere*, vol. 38, 1999, pp. 3339-3356.
 180. C.K. Yap, A. Ismail, W.H. Cheng, S.G. Tan, Crystalline style and tissue redistribution in *Perna viridis* as indicators of Cu and Pb bioavailabilities and contamination in coastal waters, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 63, 2006, pp. 413-423.
 181. T. Lakshmanan, P.N.K. Nambisan, Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus), *Environmental Contamination Toxicology Bulletin*, vol. 43, 1989, pp. 131-138.
 182. S. Deudero, M. Cabanellas, A. Blanco, S. Tejada, Stable isotope fractionation in the digestive gland, muscle and gills tissues of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 368, 2009, pp. 181-188.
 183. P. Szefer, M. Malinga, W. Czarnowski, K. Skóra, Toxic, essential and non-essential metals in harbour porpoises of the Polish Baltic Sea, *Developments in Marine Biology*; Arnoldus Schytte Blix, L. W., Øyvind, U., Eds. Elsevier Science, vol. 4, 1995; pp 617-622.
 184. B.L. Bayne, Towards effective application of ecotoxicology research data, *Marine Environmental Research*, vol. 28, 1989, pp. 533.
 185. P.K.S. Lam, J.S. Gray, The use of biomarkers in environmental monitoring programmes, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 46, 2003, pp. 182-186.
 186. L.K. Lowry, Role of biomarkers of exposure in the assessment of health risks, *Toxicology Letters*, vol. 77, 1995, pp. 31-38.

187. N. Bodin, T. Burgeot, J.Y. Stanisière, G. Bocquené, D. Menard, C. Minier, I. Boutet, A. Amat, Y. Cherel, H. Budzinski, Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 138, 2004, pp. 411-427.
188. S.M. Adams, K.L. Shepard, M.S. Greeley Jr, B.D. Jimenez, M. G. Ryon, L.R. Shugart, J.F. McCarthy, D.E. Hinton, The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish, *Marine Environmental Research*, vol. 28, 1989, pp. 459-464.
189. A. Yawetz, L. Fishelson, V. Bresler, R. Manelis, Comparison of the effects of pollution on the marine bivalve *Donax trunculus* in the vicinity of polluted sites with specimens from a clean reference site (Mediterranean Sea), *Marine Pollution Bulletin*, vol. 60, 2010, pp. 225-229.
190. L. Fishelson, V. Bresler, R. Manelis, Z. Zuk-Rimon, A. Dotan, H. Hornung, A. Yawetz, Toxicological aspects associated with the ecology of *Donax trunculus* (Bivalvia, Mollusca) in a polluted environment, *Science of The Total Environment*, vol. 226, 1999, pp. 121-131.
191. A. Sarkar, D. Ray, A.N. Shrivastava, S. Sarker, Molecular biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring, *Ecotoxicology*, vol. 15, 2006, pp. 333-340.
192. M. Capdevila, R. Bofill, Ò. Palacios, S. Atrian, State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century, *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 256, 2012, pp. 46-62.
193. B. Ye, W. Maret, B. L. Vallee, Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration, *PNAS*, vol. 98, 2001, pp. 2317-2322.
194. P.A. Binz, J.H.R. Kägi, Metallothionein: molecular evolution and classification, *Metallothionein IV, Advances in Life Sciences*, 1999, pp. 7-13
195. M. Sato, I. Bremner, Oxygen free radicals and metallothionein, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 14, 1993, pp. 325-337.
196. D.H. Hamer, Metallothionein—an overview, *Marine Environmental Research*, vol. 24, 1998, pp. 171.
197. E. Carpené, O. Cattani, G. Hakim, G.P. Serrazanetti, Metallothionein from foot and posterior adductor muscle of *Mytilus galloprovincialis*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, vol. 74, 1983, pp. 331-336.
198. E. Nieboer, D.H.S. Richardson, The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions, *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, vol. 1, 1980, pp. 3-26.
199. H. Mao, D.-H. Wang, W.-X. Yang, The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate, *Aquatic Toxicology*, vol. 110-111, 2012, pp. 208-213.
200. J. Raimundo, P.M. Costa, C. Vale, M.H. Costa, I. Moura, Metallothioneins and trace elements in digestive gland, gills, kidney and gonads of *Octopus vulgaris*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 152, 2010, pp. 139-146.
201. M. Vašák, Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins, *Methods in Enzymology*; James F. Riordan, B. L. V., Ed. Academic Press, vol. 205, 1991; pp 452-458.

202. A. Viarengo, L. Canesi, Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, vol. 94, 1991, pp. 225-243.
203. G. Roesijadi, Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals, *Aquatic Toxicology*, vol. 22, 1992, pp. 81-113.
204. A. Viarengo, J.A. Nott, Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, vol. 104, 1993, pp. 355-372.
205. G. Zaroogian, E. Jackim, In vivo metallothionein and glutathione status in an acute response to cadmium in *Mercenaria mercenaria* brown cells, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 127, 2000, pp. 251-261.
206. M. Brouwer, R. Syring, T. Hoexum Brouwer, Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin, *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 88, 2002, pp. 228-239.
207. M. Achard-Joris, J.-L. Moreau, M. Lucas, M. Baudrimont, N. Mesmer-Dudons, P. Gonzalez, A. Boudou, J.-P. Bourdineaud, Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling: Defining the fundamental function of metallothioneins, *Biochimie*, vol. 89, 2007, pp. 1474-1488.
208. J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin, P.S. Rainbow, Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers, *Aquatic Toxicology*, vol. 76, 2006, pp. 160-202.
209. A. Cheung Pok Lap, V. Kwok Lim Lam, K.M. Chan, Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, vol. 1731, 2005, pp. 191-201.
210. L. Pan, H. Zhang, Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 144, 2006, pp. 67-75.
211. C.A. Blindauer, O.I. Leszczyszyn, Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more, *Natural product reports*, vol. 27, 2010, pp. 720-741.
212. A.L. Meistertzheim, M. Lejart, N. Le Goïc, M.T. Thébault, Sex-, gametogenesis, and tidal height-related differences in levels of HSP70 and metallothioneins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 152, 2009, pp. 234-239.
213. I. Zorita, E. Bilbao, A. Schad, I. Cancio, M. Soto, M.P. Cajaraville, Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 20, 2007, pp. 186-196.
214. O. Geffard, H. Budzinski, S. Augagneur, M.N.L. Seaman, E. His, Assessment of sediment contamination by spermioxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, 2001, pp. 1605-1611.

215. E. Cotou, C. Vagias, T. Rapti, V. Roussis, Metallothionein levels in the bivalves *Callista chione* and *Venus verrucosa* from two Mediterranean sites, *Z. Naturforsch*, vol. 56, 2001, pp. 848-852.
216. P.-E. Isson, Å. Larsson, C. Haux, Metallothionein and heavy metal levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during exposure to cadmium in the water, *Marine Environmental Research*, vol. 24, 1988, pp. 151-153.
217. M.J. Bebianno, W.J. Langston, Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*, *Talanta*, vol. 46, 1998, pp. 301-313.
218. M.J. Bebianno, M.A. Serafim, Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*, *Science of The Total Environment*, vol. 214, 1998, pp. 123-131.
219. J. Pellerin, J.-C. Amiard, Comparison of bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 150, 2009, pp. 186-195.
220. J. Alhama, A. Romero-Ruiz, J. López-Barea, Metallothionein quantification in clams by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization, *Journal of Chromatography A*, vol. 1107, 2006, pp. 52-58.
221. T.T. Ngu, M.J. Stillman, Metalation of metallothioneins, *IUBMB Life*, vol. 61, 2009, pp. 438-446.
222. G. Bocquené, A. Roig, D. Fournier, Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*): Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors, *FEBS Letters*, vol. 407, 1997, pp. 261-266.
223. P. Valbonesi, G. Sartor, E. Fabbri, Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes, *Science of The Total Environment*, vol. 312, 2003, pp. 79-88.
224. E. Escartín, C. Porte, Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 34, 1996, pp. 160-164.
225. H. Bockendahl, R. Ammon, Cholinesterases, *Methods of Enzymatic Analysis (Second Printing, Revised)*, Bergmeyer, H.-U., Ed. Academic Press, 1965; pp 771-775.
226. R. Voigtmann, G. Uhlenbruck, Purification of a pseudocholinesterase from the haemolymph of *Helix pomatia*, *Z. Naturforsch*, vol. 26b, 1971, pp. 1374-1375.
227. V. Kumar, W.B. Elliott, The acetylcholinesterase of *Bungarus fasciatus* venom, *European Journal of Biochemistry*, vol. 34, 1973, pp. 586-592.
228. J. Zhu, C.-F. Wu, X. Li, G.-S. Wu, S. Xie, Q.-N. Hu, Z. Deng, M.X. Zhu, H.-R. Luo, X. Hong, Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of substituted 2-aminobenzimidazoles as novel inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol.21, 2013, pp. 4218-4224.
229. S. Chang, C.H. Opperman, Characterization of acetylcholinesterase molecular forms of the root-knot nematode, Meloidogyne, *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 49, 1991, pp. 205-214.
230. J. Massoulié, L. Pezzementi, S. Bon, E. Krejci, F.-M. Vallette, Molecular and cellular biology of cholinesterases, *Progress in Neurobiology*, vol. 41, 1993, pp 31-91.

231. H. Soreq, S. Seidman, Acetylcholinesterase—new roles for an old actor, *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 2, 2001, pp. 294-302.
232. M.G. Lionetto, R. Caricato, M.E. Giordano, M.F. Pascariello, L. Marinosci, T. Schettino, Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 46, 2003, pp. 324-330.
233. M.H. Fulton, P.B. Key, Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, 2001, pp. 37-45.
234. C. Tsangaris, K. Kormas, E. Stroglyoudi, I. Hatzianestis, C. Neofitou, B. Andral, F. Galgani, Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 151, 2010, pp 369-378.
235. L. Guilhermino, A.M.V.M. Soares, A.P. Carvalho, M.C. Lopes, Correlation between whole blood cholinesterase activity and cerebral cortex cholinesterase activity in rats treated with parathion, *Chemosphere*, vol.37, 1998, pp.1385-1393.
236. G. Bocquené, F. Galgani, P. Truquet, Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring, *Marine Environmental Research*, vol. 30, 1990, pp. 75-89.
237. K.E. Day, I.M. Scott, Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides, *Aquatic Toxicology*, vol. 18, 1990, pp 101-113.
238. A. Sturm, H.C. da Silva de Assis, P.D. Hansen, Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination, *Marine Environmental Research*, vol. 47, 1997, pp 389-398.
239. K.K. Lehtonen, H. Kankaanpää, S. Leiniö, V.O. Sipiä, S. Pflugmacher, E. Sandberg-Kilpi, Accumulation of nodularin-like compounds from the cyanobacterium *Nodularia spumigena* and changes in acetylcholinesterase activity in the clam *Macoma balthica* during short-term laboratory exposure, *Aquatic Toxicology*, vol. 64, 2003, pp. 461-476.
240. J.F. Payne, A. Mathieu, W. Melvin, L.L. Fancey, Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 32, 1996, pp. 225-231.
241. S. Najimi, A. Bouhaimi, M. Daubeze, A. Zekhnini, Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco), *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, vol. 58, 1997, pp. 901-908.
242. A. Hamza-Chaffai, M. Roméo, M. Gnassia-Barelli, A. El Abed, Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussates*, *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, vol. 61, 1998, pp. 397-404.
243. I. Benali, Z. Boutiba, A. Merabet, N. Chèvre, Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 95, 2015, pp. 385-394.

244. L. Vidal-Liñán, J. Bellas, Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *Mytilus galloprovincialis* — Implications for marine pollution monitoring, *Science of The Total Environment*, vol. 461–462, 2013, pp. 56–64.
245. J.F. Narbonne, M. Daubèze, P. Baumard, H. Budzinski, C. Clérandeau, F. Akcha, P. Mora, P. Garrigues, Chapter 8—Biochemical Markers in Mussel, *Mytilus Sp.*, and Pollution Monitoring in European Coasts: Data Analysis, *Biomarkers in Marine Organisms-A Practical Approach*, 2001, Pages 215–236.
246. D. Scibior, H. Czeczot, Catalase: structure, properties, functions, *Postepy Hig. Med. Dosw.* (Online), vol. 60, 2006, pp. 170–180.
247. A.Khessiba, M. Roméo, P. Aïssa, Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane, *Environmental Pollution*, vol. 133, 2005, pp. 275-281.
248. M. Shamsipur, M. Asgari, M.G. Maragheh, A.A. Moosavi-Movahedi, A novel impedimetric nanobiosensor for low level determination of hydrogen peroxide based on biocatalysis of catalase, *Bioelectrochemistry*, vol. 83, 2012, pp. 31-37.
249. C. Oppenheimer, K.G. Stern, Biological oxidation, 1939, <http://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/2048170>
250. O. Warburg, Heavy metal Prosthetic Groups and Enzyme Action, Oxford Univ. Press (Clarendon), London and New York ,1949, Chapter IX
251. D. Keilin, The History of Cell Respiration and Cytochrome, Cambridge University Press, Cambridge, 1966, pp. 1887-1963.
252. B. Chance, Enzyme-Substrate Compounds, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, vol. 12, 1951, DOI: 10.1002/9780470122570.ch3.
253. J. Switala, P.C. Loewen, Diversity of properties among catalases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 401, 2002, pp. 145-154.
254. S. Mueller, H.-D. Riedel, W. Stremmel, Determination of Catalase Activity at Physiological Hydrogen Peroxide Concentrations, *Analytical Biochemistry*, vol. 245, 1997, pp. 55-60.
255. J.B. Sumner, A.L. Dounce, A. L. Liver catalase, *Methods in Enzymology*, Academic Press, vol. 2, 1955, pp 775-781.
256. D.Crane, R. Holmes, C. Masters, On the synthesis and incorporation of catalase and urate oxidase into the peroxisomes of mouse liver, *International Journal of Biochemistry*, vol. 15, 1983, pp. 1429-1437.
257. L. Goth, J.W. Eaton, Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes, *The Lancet*, vol. 356, 2000, pp. 1820-1821.
258. J.P. Greenstein, W.V. Jenrette, J. White, The liver catalase activity of tumor-bearing rats and the effect of extirpation of the tumors, *Journal of the National Cancer Institute*, 1941, pp. 234-241.
259. A. Vioque-Fernández, E. Alves de Almeida, J. López-Barea, Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*, Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches, *Science of The Total Environment*, vol. 407, 2009, pp. 1784-1797.

260. R. Talon, D. Walter, S. Chartier, C. Barrière, M. C. Montel, Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 52, 1999, pp. 47-56.
261. R.E. Altomare, P.F. Greenfield, J.R. Kittrell, Inactivation of immobilized fungal catalase by hydrogen peroxide, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 12, 1974, pp. 1675-1680.
262. R. Talon, D. Walter, S. Chartier, C. Barrière, M.C. Montel, Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 52, 1999, pp. 47-56.
263. T. Cappello, M. Maisano, A. D'Agata, A. Natalotto, A. Mauceri, S. Fasulo, Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*), *Marine Environmental Research*, vol. 91, 2013, pp. 52-60.
264. R. van der Oost, J. Beyer, N.P.E. Vermeulen, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 13, 2003, pp. 57-149.
265. D. Mendoza-Cózatl, H. Loza-Tavera, A. Hernández-Navarro, R. Moreno-Sánchez, Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants, *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 29, 2005, pp. 653-671.
266. A. Meister, On the biochemistry of glutathione, In *Glutathione Centennial*; Higashi, N. T., Meister, Y. S., Eds. Academic Press, 1989, pp 3-21.
267. T.D. Boyer, Special article the glutathione S-transferases, An update, *Hepatology*, vol. 9, 1989, pp. 486-496.
268. A. Oakley, Glutathione transferases: a structural perspective, *Drug metabolism reviews*, vol. 43, 2011, pp. 138-151.
269. P.D. Josephy, Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology, *Human Genomics and Proteomics*, vol. 2, 2010, doi: 10.4061/2010/876940.
270. D Sheehan, G Meade, V Foley, C Dowd, Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *Biochemistry Journal*, vol. 360, 2001, pp. 1-16.
271. R.N. Armstrong, Glutathione Transferases, *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*; McQueen, C. A., Ed.; Elsevier: Oxford, 2010, pp 295-321.
272. J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey, Glutathione transferases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 45, 2004, pp. 51-88.
273. B.T.G. Gowland, C.F. Moffat, R.M. Stagg, D.F. Houlihan, I.M. Davies, Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*, *Marine Environmental Research*, vol. 54, 2002, pp. 169-177.
274. S.M. Moreira, L. Guilhermino, The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest, *Environmental monitoring and Assessment*, vol. 105, 2005, pp. 309-325.

275. C. Lyons, V. Dowling, M. Tedengren, J. Gardeström, M.G.J. Hartl, N. O'Brien, F.N.A.M. van Pelt, J. O'Halloran, D. Sheehan, Variability of heat shock proteins and glutathione S-transferase in gill and digestive gland of blue mussel, *Mytilus edulis*, *Marine Environmental Research*, vol. 56, 2003, pp. 585-597.
276. H. Sies, Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, 1999, pp. 916-921.
277. N.T. Christie, M. Costa, In vitro assessment of the toxicity of metal compounds, *Biological trace element research*, vol. 6, 1984, pp. 139-158.
278. D.L. Rabenstein, R. Guevremont, C.A. Evans, Glutathione and its metal-complexes, H. Siegal (Ed.), *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Dekker, New York, 1985, pp. 104-141.
279. A. Corazza, I. Harvey, P.J. Sadler, ¹H, ¹³C-NMR and X-ray absorption studies of copper(I) glutathione complexes, *European Journal Biochemistry*, vol. 236, 1996, pp. 697-705.
280. L. Milne, P. Nicotera, S. Orrenius, M.J. Burkitt, Effects of Glutathione and Chelating Agents on Copper-Mediated DNA Oxidation: Pro-oxidant and Antioxidant Properties of Glutathione, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 304, 1993, pp. 102-109.
281. A. Naganuma, M.E. Anderson, A. Meister, Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercury chloride toxicity: prevention of toxicity by giving glutathione monoester, *Biochemical Pharmacology*, vol. 40, 1990, pp. 693-697.
282. L.H. Lash, R.K. Zalups, Activities of Enzymes Involved in Renal Cellular Glutathione Metabolism after Uninephrectomy in the Rat, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 309, 1994, pp. 129-138.
283. P. Thomas, M.J. Juedes, Influence of lead on the glutathione status of Atlantic croaker tissues, *Aquatic Toxicology*, vol. 23, 1992, pp. 11-29.
284. G.W. Winston, R.T. Di Giulio, Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, *Aquatic Toxicology*, vol. 19, 1991, pp. 137-161.
285. J.I. Ramos-Martinez, A.M.R. Torres, Glutathione reductase of mantle tissue from sea mussel *Mytilus edulis* L.—II. kinetic mechanism and regulation of two seasonal forms, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, vol. 80, 1985, pp. 917-921.
286. F. Regoli, G. Principato, Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers, *Aquatic Toxicology*, vol. 31, 1995, pp. 143-164.
287. S. Borković-Mitić, S. Pavlović, B. Perendija, S. Despotović, J. Gavrić, Z. Gačić, Z. Saičić, Influence of some metal concentrations on the activity of antioxidant enzymes and concentrations of vitamin E and SH-groups in the digestive gland and gills of the freshwater bivalve *Unio tumidus* from the Serbian part of Sava River, *Ecological Indicators*, vol. 32, 2013, pp. 212-221.
288. A. Box, A. Sureda, F. Galgani, A. Pons, S. Deudero, Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 146, 2007, pp. 531-539.

289. I. Leier, G. Jedlitschky, U. Buchholz, M. Center, S. Cole, R.G. Deeley, ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump, *Biochemical Journal*, vol. 314, 1996, pp. 433-437.
290. L.R. Shugart, Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay, *Aquatic Toxicology*, vol. 13, 1988, pp. 43–52.
291. X. Stien, P. Percic, M. Gnassia-Barelli, M. Roméo, M. Lafaurie, Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea, *Environmental Pollution*, vol. 99, 1998, pp. 339-345.
292. M.P. Cajaraville, Y. Robledo, M. Etxeberria, I. Marigómez, Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes, M.P. Cajaraville (Ed.), *Cell Biology in Environmental Toxicology*, University of the Basque Country Press Service, Bilbo, 1995, pp. 29–55.
293. A. Viarengo, B. Burlando, N. Ceratto, I. Panfoli, Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview, *Cellular Molecular Biology*, vol. 46, 2000, pp. 407–417.
294. P.K. Krishnakumar, E. Casillas, U. Varanasi, Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis, *Marine Ecology Progress Series*, vol. 106, 1994, pp. 249-261.
295. Y. de Lafontaine, F. Gagné, C. Blaise, G. Costan, P. Gagnon, H.M. Chan, Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada), *Aquatic Toxicology*, vol. 50, 2000, pp. 51-71.
296. S. Dailianis, G.P. Domouhtsidou, E. Raftopoulou, M. Kaloyianni, V.K. Dimitriadis, Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring, *Marine Environmental Research*, vol. 56, 2003, pp. 443-470.
297. D. Danellakis, I. Ntaikou, M. Kornaros, S. Dailianis, Olive oil mill wastewater toxicity in the marine environment: Alterations of stress indices in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Aquatic Toxicology*, vol. 101, 2011, pp. 358-366.
298. E.D. Goldberg, The mussel watch concept, *Environmental Monitoring Assessment*, vol. 7, 1986, pp. 91–103.
299. M. Soto, M.P. Ireland, I. Marigómez, Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in ‘Mussel-Watch’ programmes, *Science of The Total Environment*, vol. 247, 2000, pp. 175-187.
300. T.P. O'Connor, National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA, *Marine Environmental Research*, vol. 53, 2002, pp. 117-143.
301. Clam Fisheries aquaculture, Nova Publishers New York, edit. Fiz da Costa Gonzalez, Chapter 1, 2012
302. A.F. Eble, Chapter 4 Anatomy and histology of *Mercenaria mercenaria*, *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*; John, N. K., Michael, C., Eds. Elsevier, vol. 31, 2001, pp 117-220.

303. G.M. Branch, C. Nina Steffani, Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 300, 2004, pp. 189-215.
304. A.S. Anderson, A.L. Bilodeau, M.R. Gilg, T.J. Hilbish, Routes of introduction of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) to Puget Sound and Hood Canal, *Journal of Shellfish Research*, 2002, pp. 213-240.
305. E. Gosling, *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*, Edition E. Gosling, Elsevier, Amsterdam, 1992, p. 589.
306. Ö. Özden, Ş. Ulusoy, Study on the behavior of the trace metal and macro minerals in *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator species: the case of Marmara Sea, Turkey, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittel*, vol. 5, 2010, pp. 407-412.
307. S. Karayücel, M.Y. Çelik, I. Karayücel, G. Erik, Growth and production of raft cultivated Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) in Sinop, Black sea, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 10, 2010, p. 09-17.
308. EUROPA- Eurostat. 2008; Available at: <http://ec.europa.eu/eurostat>
309. C.E. Braby, G.N. Somero, Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*), *Journal of Experimental Biology*, vol. 209, 2006, pp. 2554-2566.
310. J. Richir, S. Gobert, The effect of size, weight, body compartment, sex and reproductive status on the bioaccumulation of 19 trace elements in rope-grown *Mytilus galloprovincialis*, *Ecological Indicators*, vol. 36, 2014, pp. 33-47.
311. J. Richir, S. Gobert, A reassessment of the use of *Posidonia oceanica* and *Mytilus galloprovincialis* to biomonitor the coastal pollution of trace elements: New tools and tips, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 89, 2014, pp. 390-406.
312. J.M. Zaldívar, D. Marinov, S. Dueri, J. Castro-Jiménez, C. Micheletti, A.P. Worth, An integrated approach for bioaccumulation assessment in mussels: Towards the development of Environmental Quality Standards for biota, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2011, 74, 244-252.
313. S. Stankovic, M. Jovic, Health risks of heavy metals in the Mediterranean mussels as seafood, *Environmental Chemistry Letters*, vol. 10, 2012, pp. 119-130.
314. S. Galinou-Mitsoudi, A.I. Sinis, D. Petridis, Reproduction of *Venus verrucosa* in the Thessaloniki and Thermaikos gulfs. *Proc. 5th Symposium Oceanography and Fisheries*, vol. 2, 1997, pp. 107-110.
315. V.U. Ceccherelli, R. Rossi, Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Marine Ecology Progress Series*, vol. 16, 1984, pp. 173-184.
316. Νομαρχιακή αυτοδιοίκηση Ημαθίας, Στρατηγική μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων Π.Ο.Α.Υ. Ν. Ημαθίας στο Θερμαϊκό κόλπο, 2010, σελίδες 1-125.
317. E. Voultsiadou, Therapeutic properties and uses of marine invertebrates in the ancient Greek world and early Byzantium, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 130, 2010, pp. 237-247.

318. N.J. Beaumont, M.C. Austen, J.P. Atkins, D. Burdon, S. Degraer, T.P. Dentinho, S. Deros, P. Holm, T. Horton, E. van Ierland, A.H. Marboe, D.J. Starkey, M. Townsend, T. Zarzycki, Identification, definition and quantification of goods and services provided by marine biodiversity: Implications for the ecosystem approach, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 54, 2007, pp. 253-265.
319. R.J. Thompson, Production, reproductive effort, reproductive value and reproductive cost in a population of the blue mussel *Mytilus edulis* from a subarctic environment, *Marine Ecology Progress Series*, vol. 16, 1984, pp. 249-257.
320. D. Cossa, A review of the use of *Mytilus* spp as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters, *Oceanologica acta*, vol. 12, 1989, pp. 417-432.
321. E. Ferrán, M. Treviño, M.J. Mancebo, C. Crespo, J. Espinosa, Estudio del ciclo gonadal anual en *Mytilus galloprovincialis*: cinética de poblaciones celulares en el manto y reservas bionergéticas, *Congreso Nac. Acuicultura*, Actas III, 1990, pp. 467-472.
322. A. Villalba, Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain), *Aquaculture*, vol. 130, 1995, pp. 269-277.
323. M. Mackie, Bivalves, A.S. Tompa, N.H. Verdonck, J.A.M. van den Biggelaar Edition *The Mollusca*, Academic Press, New York, vol. 7, 1984, pp. 284-316.
324. J.B. Richards, G. A. Trevelyan, Culture of mussels, In *California's living marine resources: a status report*, edition W.S. Leet, C.M. Dewees, R. Klingbeil, E.J. Larson, Sacramento, 2001, pp. 496-499.
325. N. Tebble, *British Bivalve Seashells*, Trustees of the British Museum, Natural History, London, 1966, pp. 212.
326. A. Metaxatos, Population dynamics of the venerid bivalve *Callista chione* (L.) in a coastal area of the eastern Mediterranean, *Journal of Sea Research*, vol. 52, 2004, pp. 293-305.
327. Π.Δ. 86/98, (ΦΕΚ 78/A/10-04-98) για την αλιεία οστράκων, όπως τροποποιήθηκε και ισχύει από το Π.Δ. 227/03 (ΦΕΚ 198/A/11-08-03), http://www.hcg.gr/alieia/fishes/fish_cat.pdf, τελευταία πρόσβαση 20/6/2015.
328. C. Tirado, C. Salas, Reproduction and fecundity of *Donax trunculus* L., 1758 (Bivalvia:Donacidae) in the littoral of Malaga (S. Spain), *Journal Shellfish Research*, vol. 17, 1998, pp. 169-176.
329. G.R. Forster, The age and growth of *Callista chione*, *Marine Biological Assessment*, vol. 61, 1981, pp. 881-883.
330. N. Keller, D. Del Piero, A. Longinelli, Isotopic composition, growth rates and biological behaviour of *Chamelea gallina* and *Callista chione* from the Gulf of Trieste (Italy), *Marine Biology*, vol. 140, 2002, pp. 9-15.
331. G.T. Poppe, Y. Goto, *European Seashells (Scaphopoda, Bivalvia, Cephalopoda)*, Verlag Christa Hemmen, Wiesbaden, vol. 2, 1993, pp. 222.
332. E. Arneri, G. Giannetti, B. Antolini, Age determination and growth of *Venus verrucosa* L. (Bivalvia: Veneridae) in the southern Adriatic and the Aegean Sea, *Fisheries Research*, vol. 38, 1998, pp. 193-198.

333. G. Marano, N. Casavola, C. Saracino, E. Rizzi, Riproduzione e crescita di *Chamelea gallina* (L.) e *Venus verrucosa* (L.) (Bivalvia: Veneridae) nel Basso Adriatico, Mem. *Revista de biología marina y oceanografía*, vol. 12, 1982, pp. 97–110.
334. Y. Le Gall, Exploitation des populations de praires *Venus verrucosa* (Mollusque Lamellibranche Veneridae) sur les côtes de Bretagne, Series Oceanographiques, *Biologie*, vol. 2, 1969, pp. 3–51.
335. P. Berthou, J.Y. Le Gall, F. Djabali, M. Yahiaoui, Biologie et pêche de la praire *Venus verrucosa* (mollusque veneridae) en Manche Occidentale (Bretagne et Normandie), *Croissance*, vol. 36, 1980, pp. 147-149.
336. G. Valli, P. Cester, Riproduzione e biometria di *Venus verrucosa* L. Nota preliminare, *Nova Thalassia*, vol. 4, 1980, pp. 193–194.
337. G. Marano, N. Casavola, C. Saracino, Indagine comparativa sulla riproduzione di *Chamelea gallina* (L.), *Venus verrucosa* (L.), *Rudicardium tuberculatum* (L.) nel basso Adriatico, *Revista de biología marina y oceanografía*, vol. 10, 1980, pp. 229–234.
338. C. Tirado, C. Salas, I. Márquez, Reproduction of *Venus verrucosa* L., 1758 (Bivalvia: Veneridae) in the littoral of Málaga (southern Spain), *Fisheries Research*, vol. 63, pp. 437-445.
339. G. Valli, P. Nodari, D. Castenetto, Reproduction, biometrie et indices de condition chez *Venus verrucosa* (Mollusca: Bivalvia) du Golfe du Trieste, *Rapp. Comm. Int. Mer Mediterranee*, vol. 31, 1988, pp. 15.
340. M.J. Orren, G.A. Eagle, H.F.K.O. Hennig, A. Green, Variations in trace metal content of the mussel *Choromytilus meridionalis* (Kr.) with season and sex, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 11, 1980, pp. 253-257.
341. T.M. Florence, J.L. Stauber, M. Ahsanullah, Toxicity of nickel ores to marine organisms, *Science of The Total Environment*, vol. 148, 1994, pp. 139-155.
342. J.R. Eiser, T.J. Podpadec, S.D. Reicher, S.V. Stevenage, Muddy waters and heavy metal. Yime and attitudes guide judgements of pollution, *Journal of Environmental Psychology*, vol. 18, 1998, pp. 199-208.
343. C.-W. Chen, C.-M. Kao, C.-F. Chen, C.-D. Dong, Distribution and accumulation of heavy metals in the sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan, *Chemosphere*, vol. 66, 2007, pp. 1431-1440.
344. J.M. Guerra-García, J.C. García-Gómez, Assessing pollution levels in sediments of a harbour with two opposing entrances: Environmental implications, *Journal of Environmental Management*, vol. 77, 2005, pp. 1–11.
345. M. Paetzel, G. Nes, L.O. Leifsen, H. Schrader, Sediment pollution in the Vågen, Bergen harbour, Norway, *Environmental Geology*, vol. 43, 2003, pp. 476–483.
346. S. McCready, G.F. Birch, E.R. Long, Metallic and organic contaminants in sediments of Sydney Harbour, Australia and vicinity – A chemical dataset for evaluating sediment quality guidelines, *Environment International*, vol. 32, 2006, pp. 455–465.
347. D.J. Poulton, W.A. Morris, J.P. Coakley, Zonation of contaminated bottom sediments in Hamilton Harbour as defined by statistical classification techniques, *Water Quality Research Journal Canada*, vol. 31, 1996, pp. 505–528.

348. H.C. Trannum, F. Olsgard, J.M. Skei, J. Indrehus, S. Øverås, J. Eriksen, Effects of copper, cadmium and contaminated harbour sediments on recolonisation of soft-bottom communities, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 310, 2004, pp. 87-114.
349. J.A. Smith, G.E. Millward, N.H. Babbedge, Monitoring and management of water and sediment quality changes caused by a Harbour impoundment scheme, *Environment International*, vol. 21, 1995, pp. 197-204.
350. E. Süren, S. Yilmaz, M. Türkoglu, S. Kaya, Concentrations of cadmium and lead heavy metals in Dardanelles seawater, *Environmental monitoring and Assessment*, vol. 125, 2007, pp. 91-98.
351. R. Serra, E. Carpené, A.C. Marcantonio, G. Isani, Cadmium accumulation and Cd-binding proteins in the bivalve *Scapharca inaequalis*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 111, 1995, pp. 165-174.
352. M. Roméo, M. Gnassia-Barelli, Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper, or zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 111, 1995, pp. 457-463.
353. R. Chandurvelan, I.D. Marsden, S. Gaw, C.N. Glover, Impairment of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) physiology by waterborne cadmium: Relationship to tissue bioaccumulation and effect of exposure duration, *Aquatic Toxicology*, vol. 124-125, 2012, pp. 114-124.
354. F. Geret, F. Rainglet, R.P. Cosson, Comparison between isolation protocols commonly used for the purification of mollusc metallothioneins, *Marine Environmental Research*, vol.46, 1998, pp. 545-550.
355. F. Geret, A. Serafim, M.J. Bebianno, Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*?, *Ecotoxicology*, vol. 12, 2003, pp. 417-426.
356. A. Geffard, J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, Kinetics of metal elimination in feral oysters from a contaminated estuary; implication in food hygiene, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, vol. 126, 2000, Supplement 1, pp. 57.
357. C. Mouneyrac, J.C. Amiard, C. Amiard-Triquet, A. Cottier, P.S. Rainbow, B.D. Smith, Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers, *Aquatic Toxicology*, vol. 57, 2002, pp. 225-242.
358. V.I. Lushchak, T.V. Bagnyukova, Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. Antioxidant and associated enzymes, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 143, 2006, pp. 36-41.
359. N. Kamel, J. Jebali, M. Banni, S. Ben Khedher, L. Chouba, H. Boussetta, Biochemical responses and metals levels in *Ruditapes decussatus* after exposure to treated municipal effluents, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 83, 2012, pp. 40-46.
360. T. Vlahogianni, M. Dassenakis, M.J. Scoullou, A. Valavanidis, Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 54, 2007, pp. 1361-1371.
361. H. Aebi, Catalase, Edition H.U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, vol. 2, 1974, pp. 673-678.

362. Enzymatic Assay of Catalase (EC 1.11.1.6) by Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-catalase.html>, τελευταία πρόσβαση 15/3/2015.
363. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres jr, R.M.A. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, 1961, pp 88-95.
364. G. Bocquené, F. Galgani, T. Burgeot, L. Le Dean, P. Truquet, Acetylcholinesterase levels in marine organisms along French coasts, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 26, 1993, pp. 101-106.
365. C. Tsangaris, E. Papathanasiou, E. Cotou, Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 66, 2007, pp. 232-243.
366. N. Saydam, A. Kirb, Ö. Demir, E. Hazan, Ö. OtoSaydam, G. Güner, Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues, *Cancer Letters*, vol. 119, 1997, pp. 13-19.
367. A.E. Cribb, J.S. Leeder, S.P. Spielberg, Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), *Analytical Biochemistry*, vol. 183, 1989, pp. 195-196.
368. W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, 1974, pp. 7130-7139.
369. W.H. Habig, W.B. Jakoby, Assays for differentiation of glutathione S-transferases, *Methods in Enzymology*, vol. 77, 1981, pp. 398-405.
370. L. Vidal-Liñán, J. Bellas, N. Etxebarria, O. Nieto, R. Beiras, Glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and acetylcholinesterase activities in mussels transplanted to harbour areas, *Science of The Total Environment*, vol. 470-471, 2014, pp. 107-116.
371. B. Mannervik, U.H. Danielson, Glutathione transferases: structure and catalytic activity, *Critical Reviews in Biochemistry*, vol. 23, 1988, pp. 283-337.
372. W.B. Jakoby, Glutathione transferases: An overview, *Methods in Enzymology*, vol. 113, 1985, pp 495-499.
373. E. Giarratano, C.A. Duarte, O.A. Amin, Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 73, 2010, pp. 270-279.
374. C.A.R. Evans, E.S.R. Newman, J.J.O. Turner, M.J. Davies, Free radicals, myocytes and perfusion injury, *Oxidative Damage & Repair*, K.J.A Davies, Pergamon Edition, Amsterdam, 1991, pp 438-443.
375. B. Tavazzi, D. Di Pierro, A.M. Amorini, G. Fazzina, M. Tuttobene, B. Gisrdina, G. Lazzarino, Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress, *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, 2000, pp. 684-689.
376. J.A. Buege, S.D. Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, vol. 52, 1978, pp 302-310.
377. R.P. Bird, H.H. Draper, Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination, *Methods in enzymology*, vol. 105, 1984, pp. 299-305.

378. G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Archives in Biochemistry Biophysiology*, vol. 82, 1959, pp. 70–77.
379. R.J. Simpson, *Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 2003, pp 915-929.
380. L.S. Ramagli, L.V. Rodriguez, Quantitation of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer, *Electrophoresis*, vol. 6, 1985, pp 559-563.
381. S.A. Rosenberg, G. Guidotti, The protein of human erythrocyte membranes I. Preparation, solubilization, and partial characterization, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 243, 1968, pp. 1985-1992.
382. V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, W. Ehrhardt, Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, *Electrophoresis*, vol. 9, 1988, pp. 255-262.
383. N. Mohandas, P.G. Gallagher, Red cell membrane: past, present, and future, *Blood*, 2008, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>, τελευταία πρόσβαση 3/2/2015.
384. M. Chevallet, H. Diemer, A. Van Dorssealer, Toward a better analysis of secreted proteins: the example of the myeloid cells secretome, *Proteomics*, vol. 7, 2007, pp. 1757-1770.
385. R.C. Fahey, G.L. Newton, R. Dorian, E.M. Kosower, Analysis of biological thiols: Quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography, *Analytical Biochemistry*, vol. 111, 1981, pp. 357-365.
386. OH Lowry, NJ Rosebrough, AL Farr, RJ Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 1951, pp. 265-275.
387. E Barbarino, SO Lourenço, An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae, *Journal of Applied Phycology*, 2005.
388. J.A. Berges, A.E. Fisher, P.J. Harrison, A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Marine Biology*, 1993.
389. A.C. Lucarini, B.V. Kilikian, Comparative study of Lowry and Bradford methods: Interfering substances, *Biotechnology Techniques*, 13 (1999), pp. 149–154.
390. S.N. Goodman, P values, hypothesis tests, and likelihood: implications for epidemiology of a neglected historical debate, *American Journal of Epidemiology*, vol. 137, 1993, pp. 485-496.
391. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Analytical Biochemistry*, vol. 72, 1976, pp. 248–254.
392. Κ. Γιαννοπούλου, Βαρέα μέταλλα σε ιζήματα και νερά στο Σαρωνικό Κόλπο για το έτος 2004, Μεταπτυχιακή Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης Χημείας και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος, ΕΚΠΑ, 2005.
393. Δ.Ε.Π.Π.Ε.Θ. (Δίκτυο Εργαστηρίων Παρακολούθησης Ποιότητας Περιβάλλοντος Ελληνικών Θαλασσών), 2006. “Τελική Τεχνική Έκθεση του Προγράμματος Παρακολούθησης Ποιότητας Περιβάλλοντος Ελληνικών Θαλασσών 2004-2005”.

394. Α. Σακελλάρη, *Βιογεωχημική μελέτη μετάλλων: Μελέτη κύκλου ιχνοστοιχείων σε θαλάσσιο νερό και ίζημα και διερεύνηση των επιπτώσεών τους στην τροφική αλυσίδα*, Διδακτορική Διατριβή, Π.Μ.Σ. Ωκεανογραφίας, ΕΚΠΑ, 2006.
395. M. Scoullou, M. Plavšić, S. Karavoltzos, A. Sakellari, A. Partitioning and distribution of dissolved copper, cadmium and organic matter in Mediterranean marine coastal areas: The case of a mucilage event. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 67, 2006, pp. 484-490.
396. A.M. Gavriil, M.O. Angelidis, Metal and organic carbon distribution in water column of a shallow enclosed Bay at the Aegean Sea Archipelago: Kalloni Bay, island of Lesbos, Greece, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 64, 2005, pp. 200-210.
397. Θ. Δήμα, *Περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά του Βορειοδυτικού Σαρωνικού Κόλπου*, Μεταπτυχιακή Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης Χημείας και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος, ΕΚΠΑ, 2000.
398. E.R. Long, C.J. Wilson, On the Identification of Toxic Hot Spots using Measures of the Sediment Quality Triad, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 34, 1997, pp.373-374.