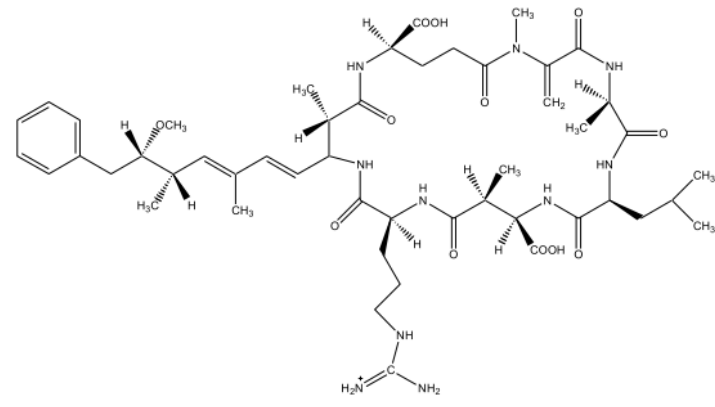


Περίληψη

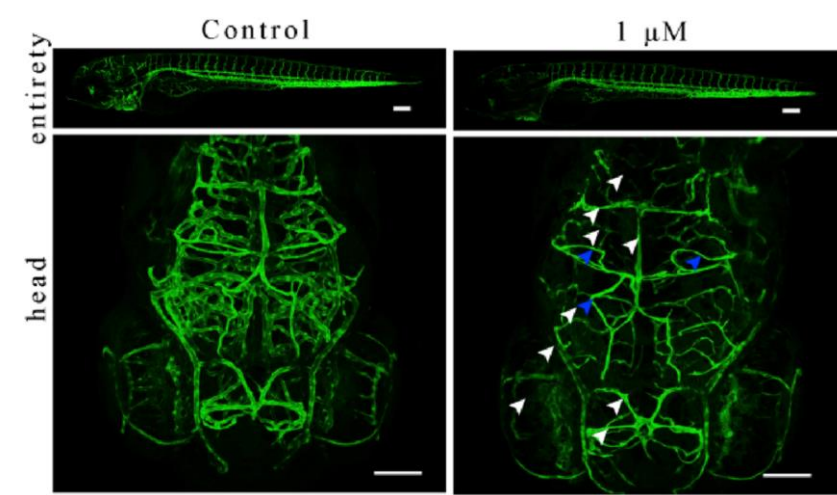
Το κυανοβακτηριακό είδος *M. aeruginosa* παράγει πλήθος ενώσεων, μερικές από τις οποίες έχουν τοξική δράση. Όμως, η έντονη τοξικότητά του οφείλεται στην ενδοτοξίνη MC-LR που συσσωρεύεται στους ιστούς των ιχθύων, επηρεάζοντας πληθώρα συστημάτων και λειτουργιών. Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε αν η σύντομη έκθεση του εμβρυϊκού σταδίου των ιχθύων σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος του *M. aeruginosa* έχει μακροχρόνιες επιδράσεις στη δομή και λειτουργία των ιχθύων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις και μελετήθηκαν οι μεταβολές της κολυμβητικής ικανότητας, της εξωτερικής μορφολογίας, της σκελετικής δομής και των κόκκινων μυών των μεταμορφούμενων νυμφών και ενήλικων αρσενικών ατόμων. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν μεταβολές στο σχήμα της καρδιάς των νυμφών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα μείωσε την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης των νυμφών ($p < 0,05$), μείωσε το λόγο μήκους προς ύψος της κοιλίας της καρδιάς τους ($p < 0,05$) και προκάλεσε μεταβολές στους κόκκινους μύες, με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση ($p < 0,1$). Η ανάλυση γεωμετρικής μορφομετρίας έδειξε επίδραση της τοξίνης στο σχήμα του σώματος τόσο των νυμφών όσο και των ενήλικων ($p < 0,05$). Τέλος, η οστεολογική εξέταση έδειξε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης δυσπλασιών στη σπονδυλική στήλη ($p < 0,05$) στους πληθυσμούς που είχαν εκτεθεί στο εκχύλισμα.

Εισαγωγή

Η ανόδος της θερμοκρασίας λόγω της κλιματικής αλλαγής ευνοεί τη δημιουργία κυανοβακτηριακών ανθίσεων στα εσωτερικά ύδατα. Το τέλος των ανθίσεων σηματοδοτείται με μαζική απελευθέρωση των ηπατοτοξικών μικροκυστινών. Η MCLR είναι ένα κυκλικό επταπεπτίδιο που ανήκει στις μικροκυστίνες, με δοσοεξαρτώμενη τοξικότητα για τους οργανισμούς και κύριο μηχανισμό την αναστολή πρωτεϊνικών φωσφατασών. Η βραχυχρόνια δράση της καθαρής MCLR σε θνησιγόνα επίπεδα είναι πολύ καλά μελετημένη τόσο στα ψάρια όσο και στα θηλαστικά. Ωστόσο, τα κυανοβακτηριακά εκχυλίσματα έχει δείχθει ότι περιέχουν και άλλες ουσίες, όπως το ρετινοϊκό οξύ, που ενισχύουν την δράση των κυανοτοξινών. Παρόλο που από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι και οι υποθνησιγόνες συγκεντρώσεις ρύπων όπως τα πετρελαιοειδή μπορεί να αποβούν μοιραίες για τους οργανισμούς, η επίδραση της MCLR στα επίπεδα αυτά δεν είναι μελετημένη. Έτσι, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των μακροχρόνιων επιδράσεων της έκθεσης εμβρύων zebrafish σε εκχύλισμα του κυανοβακτηρίου *M. aeruginosa*. Η έκθεση πραγματοποιήθηκε σε υποθνησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος προκειμένου να προσομοιαστούν οι συνθήκες των ανθίσεων του κυανοβακτηρίου στο φυσικό περιβάλλον. Για την εκτίμηση των μακροχρόνιων επιδράσεων επιλέχθηκαν χαρακτηριστές της δομής (σχήμα σώματος, μορφολογία καρδιάς, δομή κόκκινων μυών, σκελετικό σύστημα) και λειτουργίας (αερόβια κολυμβητική ικανότητα), οι οποίοι εξετάστηκαν σε νύμφες κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης και σε ενήλικα αρσενικά άτομα.

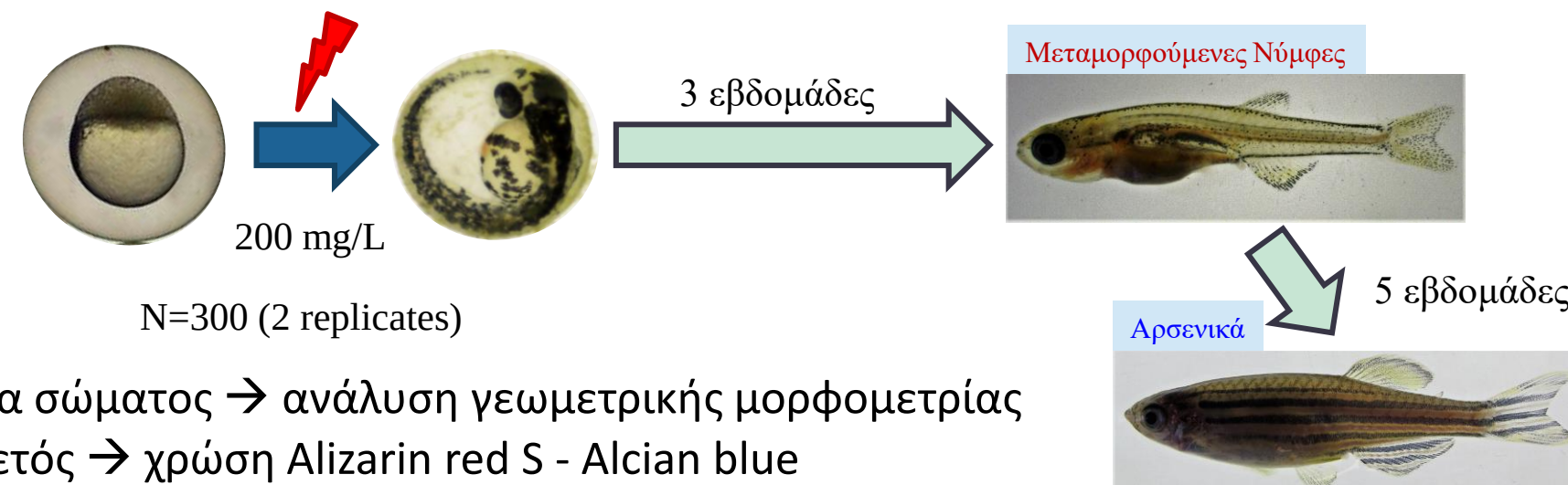


Εικόνα 1. Χημική δομή της μυκροκυστίνης MCLR



Εικόνα 2. Πρόκληση αγγειοδυσπλασιών από έκθεση σε θνησιγόνο συγκέντρωση MCLR

Υλικά και Μέθοδοι



Σχήμα σώματος → ανάλυση γεωμετρικής μορφομετρίας

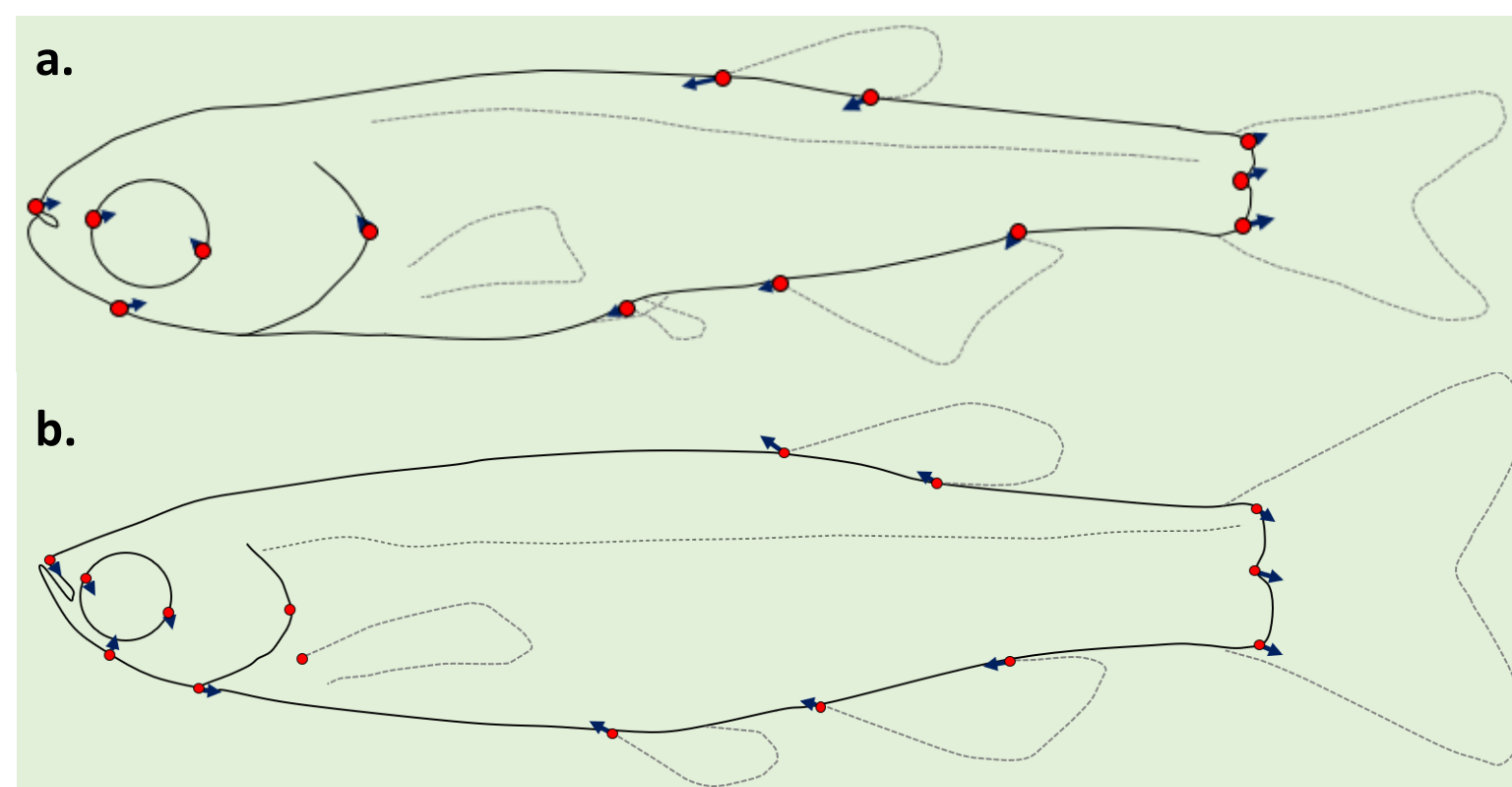
Σκελετός → χρώση Alizarin red S - Alcian blue

Κολυμβητική ικανότητα $\rightarrow$ μέτρηση RU_{crit}

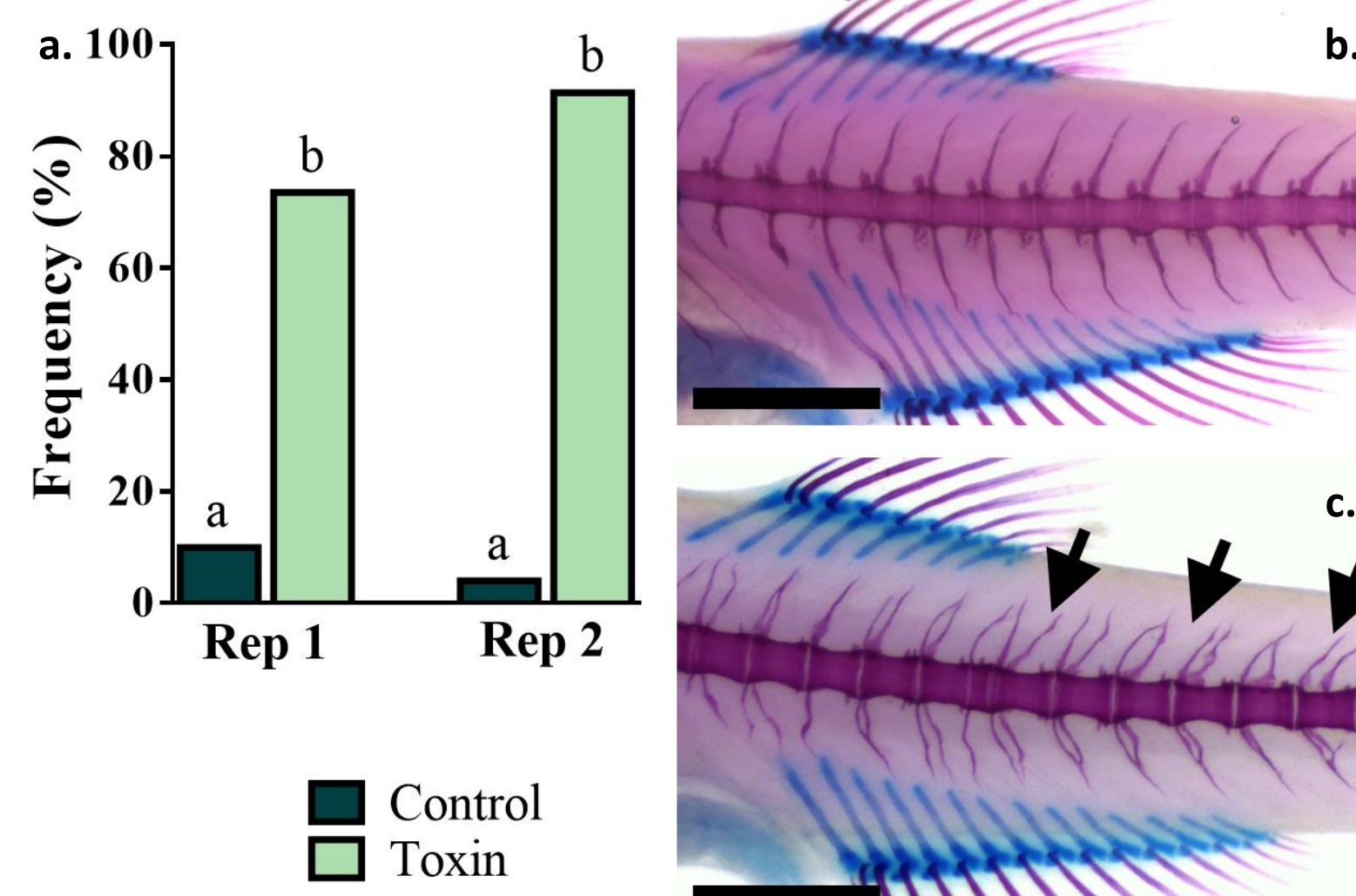
Ανατομία καρδιάς → σάρωση μικροτομογραφίας, υπολογισμός λόγου μήκους προς πλάτος κοιλίας

Κόκκινοι μύες → κρυστόμος, χρώση με Nitro Blue Tetrazolium, μέτρηση απορρόφησης SDH
κόκκινων μυών, υπολογισμός του λόγου εμβαδόν λευκών προς κόκκινων μυϊκών
ινών

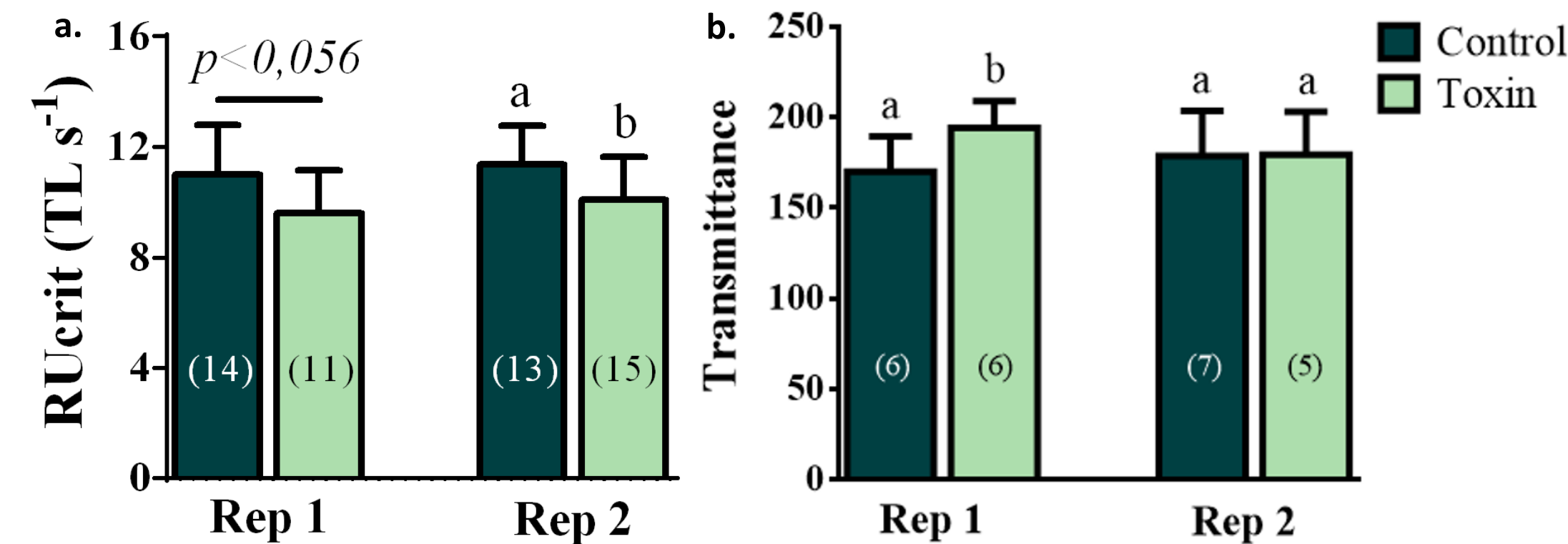
Αποτελέσματα



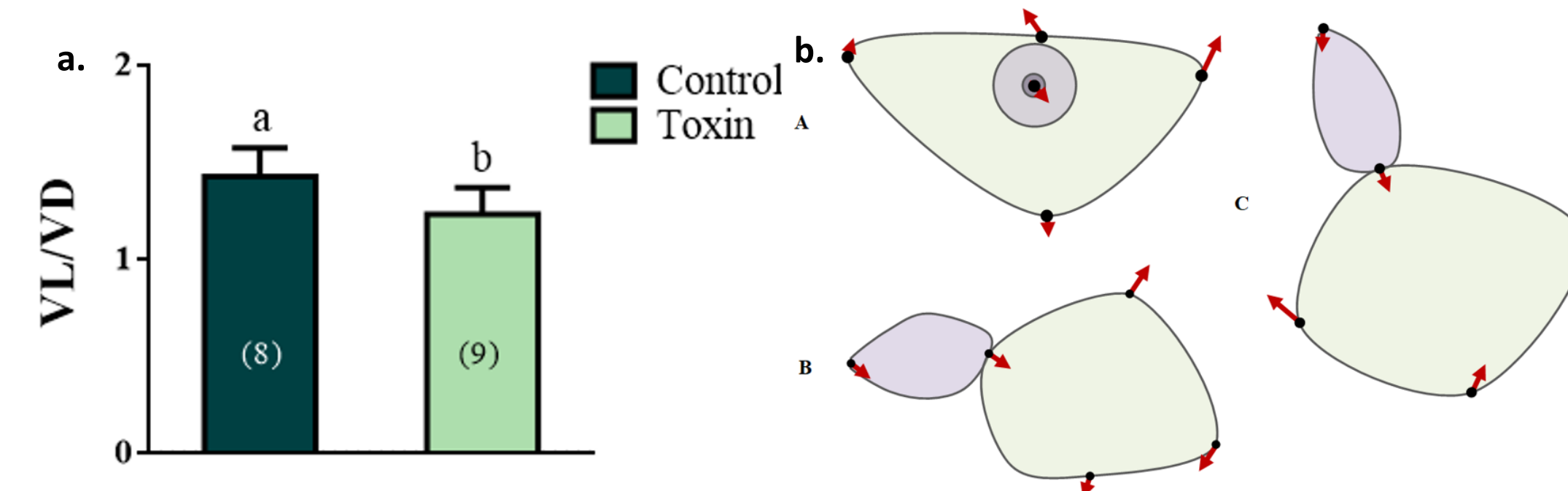
Εικόνα 3. Επιμήκυνση ουραίου μίσχου ($p<0,05$, discriminant analysis) α)στις εκτεθειμένες μεταμορφούμενες νύμφες β)στα εκτεθειμένα ενήλικα αρσενικά άτομα



Εικόνα 4. α)Αύξηση συχνότητας εμφάνισης δυσπλασιών που αφορούν τη σπονδυλική στήλη στα άτομα που εκτέθηκαν στην MCLR ($p<0,05$, Gtest) **β)**Φυσιολογική σπονδυλική στήλη **γ)**Ανώμαλη σπονδυλική στήλη



Εικόνα 5. α) Σημαντική μείωση της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης των νυμφών που εκτέθηκαν στην τοξίνη ($p < 0,05$, Bonferroni test) β) Μείωση της δραστηριότητας της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης στους κόκκινους μύες των νυμφών που εκτέθηκαν ($p < 0,1$, Mann-Whitney test)



Εικόνα 6. α) Κυκλοποίηση της ουιλίας της καρδιάς των εκτεθειμένων που εκτέθηκαν ($p < 0,05$, Mann-Whitney test)
 β) Μετατόπιση των διανυσμάτων των οροσφήμων, που τοποθετήθηκαν στην καρδιά των νυμφών, λόγω της έκθεσης στην MCLR Α. πρόσοψη καρδιάς Β. πλάγια όψη Κ. κάτοψη

- Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης των ενήλικων αρσενικών ατόμων που εκτέθηκαν ως έμβρυα δεν διαφέρει σημαντικά από εκείνα που δεν εκτέθηκαν στην τοξίνη
- Η απορρόφηση της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης δεν επηρεάζεται σημαντικά στο ενήλικο στάδιο από την έκθεση στην MCLR
- Ο λόγος του εμβαδού W/R δεν επηρεάζεται σημαντικά σε κανένα από τα δύο στάδια ανάπτυξης από τη σύντομη έκθεση του εμβρυϊκού σταδίου στην τοξίνη

Συζήτηση

Για πρώτη φορά αποδεικνύεται ότι ακόμη και μία πολύ σύντομη έκθεση, όπως αυτή στο εμβρυϊκό στάδιο, σε υποθησιγόνους συγκεντρώσεις της MCLR μπορεί να αποβεί μοιραία για τους ιχθύες αφού επηρεάζει σημαντικές λειτουργίες όπως αυτή της καρδιάς αλλά και την κολύμβηση. Επιπλέον, μεταβάλλει το σχήμα του σώματος, τον σκελετό και τους κολυμβητικούς μύες με τρόπους που συμβάλλουν στη μεταβολή της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης επηρεάζοντας τη στρατολόγηση και κατ' επέκταση τη δομή των ιχθυοπληθυσμών.

Η ΜCLR συσσωρεύεται στους ιστούς και τα όργανα των οργανισμών και έχει την ικανότητα να μεταφέρεται από τα θηλυκά (μαλακίων, ιχθύων και θηλαστικών) στους απογόνους τους αν και οι τελευταίοι δεν έχουν εκτεθεί ποτέ στην τοξίνη. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δημιουργούν προβληματισμούς για τη διαχείριση και την εκμετάλλευση των εσωτερικών υδάτων.

Αναφορές

- Chen J., Xie P. (2009) Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins LR- and RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponense*, from a large shallow, eutrophic lake at the subtropical China's, *Toxicology*, 45(8), pp. 615–625.
- Christodoridou C., Zervou S.K., Manolidis K., Katsapi M., Moustaka-Gouni M., Kaloudis T., Triantis T.M., Hiskia A. (2018) Occurrence and diversity of cyanotoxins in Greek lakes, *Scientific Reports*, 8(1), p. 1–22.
- Hicks E.E., Linbo T.B., Felder D.H., Willis M.L., Myers M.S., Holland L., Larsen M., Stoklov M., Rice S.D., Collier T.X., Scholz N.J., Incardona J.P. (2011) Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphogenesis and reduces aerobic capacity in adult fish, *Molecular Biology and Evolution*. Sciences of the United States of America, 159(7), pp. 7088–7098.
- Jensen A., Scholtz S., Baidar F., Syrovča V., Novakova K., Örtengren U., Benisek M., Adasman O., Giesy J.P., Hilsciger-Kühn R. (2015) Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular and vitreous body morphology embryos assays, *The Cyanobacterium. Elsevier Ltd*, In press, pp. 321–327.
- Koundouroulou, Skafianakis D.G., Divanach P., Kentouri M. (2002) Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles, *Journal of Fish Biology*, 60(4), pp. 923–932.
- O'Neill I.A., Chen Y.-L., Smith W.R. (2006) Microcystin-LR leads to growth retardation and reproductive dysfunction in zebrafish offspring, an oral transmission effect of toxicant Aquatic Toxicology, 155C, pp. 360–367.
- O'Neill M.O., Davis T.W., Burford MA., Gobler CJ. (2012) The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change, *Harmful Algae*, 14, pp. 313–334.
- Svrcek S., Smith D.W. (2004) Cyanobacterial toxins and the current state of knowledge on water treatment options: A review, *Journal of Environmental Engineering Research*, 3(2), pp. 155–185.
- Tang Q., Guo J., Wang Y., Xu J., Gao X., Liang Y., Zhang W., Wang S. (2018) Mitochondrial cytochrome c oxidase II induces apoptosis through procytisin-I-induced activation of caspases in HepG2 cells, *Cytoskeleton*, 15, pp. 338–348.
- Zhang H.Z., Liu Chong-Chun (2015) Atmospheric ammonia gas promotes proliferation and increases intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in hepatic, *Journal of Proteome Research*, 14, pp. 397–407.