



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΓΓΕΛΟΣ Μ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**“ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
IN VIVO ΚΑΙ *IN VITRO* ΜΕΤΑ ΑΠΟ STRESS”**

**ΦΩΤΕΙΝΗ Γ. ΜΑΝΕ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ MSc**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336979



Αρ. εισ:.....11022/2013





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΑΓΓΕΛΟΣ Μ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

“ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
***IN VIVO* ΚΑΙ *IN VITRO* ΜΕΤΑ ΑΠΟ STRESS”**

ΦΩΤΕΙΝΗ Γ. ΜΑΝΕ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.
(Νόμος 5343, άρθρο 202, παράγρ.2)



Ημερομηνία αίτησης της κ. Μανέ Φωτεινής: 3-11-1998

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 373^α/9-2-1999

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Καλφακάκου Βασιλική Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ευαγγέλου Άγγελος Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βεζυράκη Πατρώνα Λέκτορας Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-2-1999

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 592^α/24-10-2006

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος,	Καθηγητής Βιομηχανικής Χημείας, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Άγγελος,	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσατσούλης Αγαθοκλής,	Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική ,	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος,	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα ,	Επίκουρος Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεονάρδος Ιωάννης,	Επίκουρος Καθηγητής Ζωολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 27-3-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



Στους γονείς μου

Στο Νίκο

*Στην Άννα Μαρία και του
Αυτώνη*



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μεταξύ των επικίνδυνων ρύπων που άμεσα ή έμμεσα απειλούν την ανθρώπινη ζωή συγκαταλέγονται και τα βαρέα μέταλλα. Τα μέταλλα δεν απομακρύνονται από το φυσικό περιβάλλον (ειδικά το υδάτινο) με φυσικές διαδικασίες εν αντιθέσει με τους περισσότερους οργανικούς ρυπαντές και τείνουν να συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα προσβάλλοντας τελικά τον άνθρωπο.

Τα εσωτερικά νερά αποτελούν αποδέκτες των φυσικών και ανθρωπογενών απορροών και καθώς οι ανθρώπινες ανάγκες που βασίζονται σε αυτά όπως ύδρευση, άρδευση, αλιεία είναι ζωικές, οι συνέπειες της προσβολής των υδάτων από τοξικά μέταλλα είναι κρίσιμες για την ανθρώπινη υγεία.

Η τοξική δράση των μετάλλων ασκείται άμεσα ή έμμεσα σε κυτταρικό επίπεδο, σε επίπεδο οργάνων ή και συστημάτων και εκδηλώνεται με οξεία ή χρόνια συμπτώματα ανάλογα προς το είδος του μετάλλου, την τοξικότητα της συγκέντρωσης του και τον χρόνο έκθεσης του οργανισμού.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση στο *Consultative Forum, 18-19 December 2003 – Brussels* (COM(2003)338 final) όρισε για την επόμενη δεκαετία (έως 2013) την απαρτιωμένη έρευνα περιβάλλοντος και υγείας ως : **Μία Ευρωπαϊκή Στρατηγική για το Περιβάλλον και την Υγεία « A European Environment and Health Strategy »** εστιασμένη σε 4 άξονες:

1. Διοξίνες & Πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Dioxins & PCBs),
2. Βαρέα Μέταλλα (Heavy Metals),
3. Ενδοκρινείς Διαταράκτες (Endocrine Disrupters),
4. Βιο-καταγραφή (Bio-monitoring)

με στόχο, μετά την συγκέντρωση πληροφοριών για την κατάσταση του περιβάλλοντος και των οικοσυστημάτων, να εκτιμηθεί η κατάσταση της υγείας των ανθρώπων ως σημείο σύγκλισης των παραπάνω και συγχρόνως ως εργαλείο μιας **ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΠΟΛΙΤΙΚΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ-ΥΓΕΙΑΣ (INTEGRATED ENVIRONMENT & HEALTH POLICY)**.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι δράσεις ενός μετάλλου, του **καδμίου (Cd)**, σε κυτταρικό και οργανικό επίπεδο με εστίαση στον ρόλο του ως τοξικού βαρέος μετάλλου και ως ενδοκρινούς διαταράκτη σε ένα υδρόβιο οργανισμό, μοντέλο για μελέτες αυτού του είδους, το *Carassius auratus* (χρυσόψαρο). Επίσης μελετήθηκε ο ρόλος ενός απαραίτητου μετάλλου, του ψευδαργύρου (Zn), στην αποκατάσταση των τοξικών δράσεων του καδμίου.

Η μελέτη των βαρέων μετάλλων πέραν του ότι αποτελεί θέμα αιχμής στην Ευρωπαϊκή πολιτική περιβάλλοντος και υγείας έχει ελκύσει και το τοπικό ενδιαφέρον καθώς η λίμνη των Ιωαννίνων Παμβώτις έχει παρουσιάσει πολύ σημαντική μείωση των αλιευμάτων της. Παρατηρήθηκαν επίσης δυσκολίες στην αναπαραγωγή των ιχθύων στον Ιχθυογεννητικό Σταθμό της Δημοτικής Επιχείρησης Λίμνης Ιωαννίνων (Δ.Ε.Λ.Ι.) κατά τα τελευταία χρόνια. Συγκεκριμένα, πρώτα τα χρυσόψαρα και μετά το 2000 πλέον και ο κοινός κυπρίνος έδειξαν έλλειψη διάθεσης ή αδυναμία αναπαραγωγής ή αποτυχία της μετά 24 ώρες, κατά το στάδιο της



εκκόλαψης. Είναι προφανές ότι η λίμνη, και κατ' επέκταση το λεκανοπέδιο Ιωαννίνων, υφίσταται πολυπαραγοντικό περιβαλλοντικό stress και οι οργανισμοί που αναπτύσσονται στην λίμνη αποτελούν τον βιοτικό σύνδεσμο (biotic ligand) παρακολούθησης και ελέγχου μιας κατάστασης που αφορά ευρύτερα την υγεία των κατοίκων.

Σκοπός της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί:

1. Η δράση του καδμίου, σε υποτοξικές και τοξικές συγκεντρώσεις και διάφορους χρόνους έκθεσης, σε κύτταρα και οργανισμούς
2. Ο ρόλος του καδμίου ως ενδοκρινούς διαταράκτη της αναπαραγωγικής λειτουργίας σε ένα πειραματόζωο, μοντέλο αυτών των μελετών
3. Ο ρόλος του ψευδαργύρου στην αποκατάσταση των παραπάνω δράσεων του καδμίου.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά τα έτη 1999-2006.

Η ερευνητική δουλειά είναι για πολλούς μία μοναχική υπόθεση, μία υπέρβαση των προσωπικών ορίων, όμως πάντα υπάρχει μία σοφή καθοδήγηση και μία πολύτιμη συνεργασία ή και περισσότερες στο παρασκήνιο. Προσωπικά θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσά μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, κυρία Βίκυ Καλφακάκου, η οποία εξαρχής με περιέβαλλε με περισή εμπιστοσύνη και μου ανέθεσε το θέμα της διατριβής. Η βαθιά της γνώση πάνω στο θέμα, οι ιδέες και η διορατικότητά της καθώς και η ουσιά της καθοδήγησή της σε θέματα που ανέκυπταν στη διάρκεια της μελέτης, αλλά και κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή υπήρξαν η κινητήριος δύναμη πίσω από την ολοκλήρωση της διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά :

Τον Καθηγητή Φυσιολογίας και Διευθυντή του εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας, κύριο Άγγελο Ευαγγέλου μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για την επιστημονική καθοδήγηση σε θεωρητικά θέματα, αλλά και για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας, κυρία Πάτρα Βεζυράκη, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις πολύτιμες συμβουλές και την ακούραστη καθοδήγησή της σε θεωρητικό, αλλά και σε πειραματικό επίπεδο, για τις εύστοχες υποδείξεις της στη διάρκεια της μελέτης, στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή της εργασίας καθώς και για την ηθική στήριξη, συμπαράσταση και φιλία της.

Τους Καθηγητές Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, κύριο Αγαθοκλή Τσατσούλη και Βιομηχανικής Χημείας, κύριο Τριαντάφυλλο Αλμπάνη, μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην Επταμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής, κύριο Δημήτριο Στεφάνου, μέλος της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για τη βοήθεια στη μελέτη των ιστολογικών δειγμάτων και την αξιολόγησή τους, καθώς και για τη συμμετοχή του στην Επταμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.



Τον Επίκουρο Καθηγητή Ζωολογίας, κύριο Ιωάννη Λεονάρδο, μέλος της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής για τις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις του πάνω σε θέματα αναπαραγωγής ιχθύων, καθώς και για την αξιολόγηση των ιστολογικών δειγμάτων και τη συμμετοχή του στην Επταμελή Συμβουλευτική Επιτροπή.

Τον κύριο Λάζαρο Νάτση, εκπρόσωπο του Φορέα Διαχείρισης Λίμνης Παμβώτιδας, τέως Διευθυντή της Δημοτικής Επιχείρησης Λίμνης Ιωαννίνων (Δ.Ε.Λ.Ι.), για τις εποικοδομητικές συζητήσεις που έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη της ενδοκρινούς διαταραχής, την συμβολή του στην εξασφάλιση των πειραματοζώων και τη βοήθειά του στο χειρισμό τους, καθώς και το προσωπικό της Δ.Ε.Λ.Ι.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Πυρηνικής Ιατρικής, κύριο Ανδρέα Φωτόπουλο, για τη βοήθειά του στον προσδιορισμό της 17-β οιστραδιόλης.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Υδάτινων Οικοσυστημάτων του Τμήματος Ιχθυοκομίας-Αλιείας ΤΕΙ Ηπείρου, κυρία Ιφιγένεια Κάγκαλου, για τη βοήθεια σε θεωρητικά και πρακτικά ζητήματα.

Τον Δρ. Ιωάννη Παπαγιάννη και τον Δρ. Χριστόφορο Θωμά, φίλους και συναδέλφους για την εργαστηριακή υποστήριξη, αλλά και την προσωπική στήριξη και φιλία.

Τα μέλη ΔΕΠ του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, κύριο Ευάγγελο Κωλέττα, επίκουρο Καθηγητή, κύριο Δημήτριο Κιόρτση, αναπληρωτή Καθηγητή, κύριο Σπύρο Καρκαμπούνα, Λέκτορα και κύριο Κων/νο Χαραλαμπόπουλο αναπληρωτή Καθηγητή, για το ενδιαφέρον τους κατά την εκπόνηση της μελέτης.

Τα μέλη ΕΔΤΠ του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, κυρίους Νίκο Γκάλγκο, Παναγιώτη Γρίβα και τις κυρίες Ευτυχία Γούλα και Χριστίνα Τζίμα για την τεχνική και γραμματειακή υποστήριξη, καθώς και για την προσωπική συμπαράσταση.

Τους συναδέλφους του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, Δρ. Δήμητρα Δούμα, Δρ. Ρομάν Λιασκό, Δρ. Βαγγέλη Κονταργύρη, τους υποψήφιους διδάκτορες Αποστόλη Μέτσιο, Χρήστο Τσιρώνη, Δήμητρα Φίλιου και τους πτυχιούχους Εφαρμοσμένης Αγρο-οικολογίας Ουρανία Κατηφόρη και Σωτήρη Ξηροπόταμο για τη βοήθειά τους όποτε τους ζητήθηκε καθώς κι όλους τους φίλους που απέκτησα μέσα σ' αυτά τα χρόνια.

Την οικογένειά μου, το σύζυγό μου Δρ. Νίκο Δαρλή, για τη συνεχή και ακούραστη υποστήριξή του, αμείωτη συμπαράσταση και ενθάρρυνση σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, καθώς και για τη συμβολή του στην αξιολόγηση της μελέτης και στη συγγραφή της και τα παιδιά μου, Άννα Μαρία και Αντώνη για την κατανόηση για το χρόνο που τους στέρησα όλα αυτά τα χρόνια...Τους γονείς μου, Γιώργο και Άννα για την αμέριστη συμπαράσταση, κατανόηση, στήριξη και βοήθεια που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια και τα αδέρφια μου Μάρα και Νίκο. Επίσης τους γονείς του συζύγου μου, Αντώνη και Μαρία για τη βοήθεια που μου προσέφεραν. Αυτή η διατριβή ήταν τελικά κι ένα οικογενειακό στοίχημα, εκτός από προσωπικό...

Τέλος το παιδί που δεν έχει ακόμα γεννηθεί...



The text on this page is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a multi-paragraph document, possibly a report or a letter, but the specific content cannot be discerned.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
I. ΓΕΝΙΚΑ	2
1. Απαραίτητα και τοξικά μέταλλα.....	2
2. Μηχανισμοί δράσης των μετάλλων.....	4
3. Πηγές και οδοί εισόδου των μετάλλων στους οργανισμούς.....	8
4. Όργανα-στόχοι των μετάλλων.....	10
II. ΚΑΔΜΙΟ (Cd)	12
1. Γενικά.....	12
2. Είσοδος καδμίου στους οργανισμούς.....	13
3. Συστημική τοξικότητα του καδμίου.....	15
III. ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ Cd	23
1. Αναστολή πολλαπλασιασμού.....	23
2. Απόπτωση.....	24
3. Βιωσιμότητα.....	26
4. Διαφορές στην ευαισθησία κυτταρικών σειρών.....	27
5. Κάδμιο και οξειδωτικό στρες.....	28
6. Κάδμιο και καρκίνος.....	30
7. Κάδμιο και γονιδιακή έκφραση.....	32
8. Οξείες και χρόνιες δράσεις.....	32
9. Πρόσληψη καδμίου στα κύτταρα.....	33
IV. ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ (Zn)	35
1. Γενικά.....	35
2. Είσοδος ψευδαργύρου στους οργανισμούς.....	36
3. Δράσεις ψευδαργύρου.....	37
V. ΚΥΤΤΑΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ Zn	43
1. Αντιρρόπηση τοξικών δράσεων Cd.....	43
2. Μεταλλοθειονίνες (MTs).....	46
α. Λειτουργίες.....	48
β. Εντόπιση.....	50
γ. Γονιδιακή ρύθμιση.....	52
δ. Καρκίνος.....	53
ε. Απόπτωση.....	54
στ. Επαγωγή.....	55
ζ. Κυτταροπροστασία.....	56
VI. STRESS ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	59



1. Γενικά.....	59
2. Μεταλλοθειονίνες και υδρόβιοι οργανισμοί	63
3. Υδατική Τοξικολογία	66
4. Τοξικότητα Cd στους υδρόβιους οργανισμούς.....	68
α. Κάδμιο και εμβρυϊκή ανάπτυξη.....	71
β. Αναπνευστικό σύστημα.....	72
γ. Ήπαρ.....	74
5. Ξενοβιοτικά.....	75
VII. ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ <i>C. auratus</i>	76
1. Χρυσόψαρο <i>Carassius auratus auratus</i>	76
α. Συστηματική κατάταξη.....	76
β. Μορφολογία.....	76
γ. Γεωγραφική εξάπλωση.....	76
δ. Οικολογία-φυσιολογία.....	76
ε. Αναπαραγωγή.....	77
2. Αναπαραγωγή τελεόστεων ιχθύων.....	78
3. Στάδια γονάδων στους ιχθύς.....	81
α. Σπερματογένεση.....	81
β. Ωογένεση.....	81
γ. Εκτίμηση γονιμότητας-επιτυχίας εκκόλαψης.....	84
4. Ενδοκρινικό σύστημα και αναπαραγωγή.....	84
5. Ενδοκρινής διαταραχή.....	90
α. Κυτταρικές και μοριακές αποκρίσεις.....	91
β. Βραχυπρόθεσμες επιδράσεις σε επίπεδο ατόμου.....	91
γ. Μακροπρόθεσμες επιδράσεις σε επίπεδο πληθυσμού και βιοκοινότητας.....	93
δ. Επίδραση γνωστών ξενοβιοτικών στους ιχθύς.....	95
6. Κάδμιο και ενδοκρινής διαταραχή.....	98
7. Zn και αναπαραγωγή ιχθύων.....	102



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	105
1. MRC-5: ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες πνεύμονα.....	105
2. NIH/3T3: εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού.....	105
II. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	106
1. Κυτταρικές σειρές.....	106
2. Υλικά κυτταροκαλλιέργειας.....	106
3. Συνθήκες Κυτταροκαλλιέργειας	106
4. Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυττάρων.....	106
5. Πειραματικές συνθήκες.....	108
6. Παρασκευή των διαλυμάτων των μετάλλων.....	108
7. Μέτρηση μετάλλων.....	109
III. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ.....	109
1. Μέθοδος αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue (Trypan Blue exclusion assay).....	109
2. Μέθοδος προσδιορισμού ικανότητας σχηματισμού αποικιών (colony forming efficiency).....	110
IV. ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	111
1. Πειραματόζωα.....	111
2. Συνθήκες ιχθυοκαλλιέργειας.....	111
3. Παρασκευή των διαλυμάτων των μετάλλων.....	112
4. Μέτρηση μετάλλων στο νερό.....	112
5. Πειραματικές συνθήκες.....	112
6. Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων ορού.....	113
7. Μορφομετρικοί χαρακτήρες.....	113
8. Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων ιστών.....	114
9. Προετοιμασία δειγμάτων ιστών (όξινη πέψη) για την Ατομική Απορρόφηση.....	115
10. Μέτρηση μετάλλων στους ιστούς.....	115
V. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ.....	116
1. Μέθοδος Ατομικής Απορρόφησης.....	117
2. Ατομική απορρόφηση με φλόγα.....	117
3. Ατομική απορρόφηση με φούρνο γραφίτη.....	118
VI. ΜΕΤΡΗΣΗ 17-β ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ.....	119
VII. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ.....	122
VIII. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	122
 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
I. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ <i>In Vitro</i>.....	124
1. Επίδραση του Cd στην βιωσιμότητα των κυττάρων 3T3 και MRC-5.....	124
2. Επίδραση του Cd στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων 3T3 και MRC-5.....	129
3. Συγκέντρωση του Cd στο μέσο επώασης των κυττάρων 3T3 και MRC-5.....	133



II. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ <i>In Vivo</i>.....	138
1. Κινητική Μετάλλων Καδμίου και Ψευδαργύρου στους ιστούς του <i>Carassius auratus</i>	138
α. Βράγχια.....	138
β. Νεφροί.....	142
β ₁ . Συσσώρευση Cd στους νεφρούς ανά φύλο.....	145
β ₂ . Συσσώρευση Zn στους νεφρούς ανά φύλο.....	147
γ. Ήπαρ.....	149
γ ₁ . Συσσώρευση Cd στο ήπαρ ανά φύλο.....	152
γ ₂ . Συσσώρευση Zn στο ήπαρ ανά φύλο.....	154
γ ₃ . Μεταβολή Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI).....	157
δ. Μυϊκός ιστός.....	161
ε. Παθολογοανατομικές εξετάσεις ήπατος.....	165
2. Γονάδες.....	171
α. Συσσώρευση Cd στις γονάδες.....	171
β. Συσσώρευση Zn στις γονάδες.....	174
γ. Συγκέντρωση 17-β Οιστραδιόλης ορού.....	177
δ. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI).....	180
ε. Μεταβολή Συντελεστή Ευρωστίας (CF).....	183
στ. Παθολογοανατομικές εξετάσεις γονάδων.....	186
ζ. Μεταβολή μετάλλων στις γονάδες, 17β-οιστραδιόλης και δεικτών αύξησης μετά την έκθεση σε Cd.....	193
η. Μεταβολή μετάλλων στις γονάδες, 17β-οιστραδιόλης και δεικτών αύξησης μετά την έκθεση σε Cd- Κλάση II.....	209
3. Αποκατάσταση περιεχόμενου καδμίου στους ιστούς του <i>Carassius auratus</i> μετά από προσθήκη Ψευδαργύρου.....	217
α. Βράγχια.....	217
β. Νεφροί.....	219
β ₁ . Συσσώρευση Cd στους νεφρούς ανά φύλο.....	220
β ₂ . Συσσώρευση Zn στους νεφρούς ανά φύλο.....	222
γ. Ήπαρ.....	223
γ ₁ . Συσσώρευση Cd στο ήπαρ ανά φύλο.....	225
γ ₂ . Συσσώρευση Zn στο ήπαρ ανά φύλο.....	226
γ ₃ . Μεταβολή Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI).....	227
δ. Μυϊκός ιστός.....	228
ε. Γονάδες.....	230
ε ₁ . Συσσώρευση Cd στις γονάδες.....	230
ε ₂ . Συσσώρευση Zn στις γονάδες.....	232
ε ₃ . Συγκέντρωση 17-β Οιστραδιόλης ορού.....	233
ε ₄ . Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI).....	235
ε ₅ . Μεταβολή Συντελεστή Ευρωστίας (CF).....	236
ε ₆ . Μεταβολή μετάλλων στις γονάδες, 17β-οιστραδιόλης και δεικτών αύξησης μετά την έκθεση σε Cd.....	238
στ. Ιστολογική ωρίμανση γονάδων θηλυκών.....	246



ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
I. Τοξικότητα του Cd.....	249
1. <i>In vitro</i> σε κύτταρα 3T3 και MRC-5.....	249
α. Βιωσιμότητα των κυττάρων	249
β. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών.....	251
γ. Συγκέντρωση του Cd στο μέσο επώασης.....	253
2. <i>In vivo</i> στους ιχθύες <i>Carassius auratus</i>	256
α. Βράγχια.....	256
β. Νεφροί.....	258
γ. Ήπαρ	261
δ. Ηπατοσωματικός Δείκτης (LSI)	263
ε. Παθολογοανατομικά ευρήματα ήπατος.....	264
στ. Μυϊκός ιστός.....	265
II. Είναι το Cd ενδοκρινής διαταράκτης;.....	266
1. Θηλυκά άτομα	267
2. Αρσενικά άτομα.....	271
III. Επιτυγχάνεται αποκατάσταση των επιδράσεων του Cd στους ιχθύες <i>Carassius auratus</i> μέσω:	274
α) απομάκρυνσης από την έκθεση στο μέταλλο;	
β) προσθήκης Zn;	
1. Βράγχια.....	274
2. Νεφροί.....	275
3. Ήπαρ	277
4. Ηπατοσωματικός Δείκτης (LSI)	279
5. Μυϊκός ιστός	279
6. Γονάδες.....	280
α. Θηλυκά άτομα	280
β. Αρσενικά άτομα.....	284
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	286
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	290
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	297
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



THE GREAT GATSBY

F. SCOTT FITZGERALD

I. ΓΕΝΙΚΑ

1. Απαραίτητα και τοξικά μέταλλα

Τα μέταλλα έπαιξαν σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξη της ιστορίας της ανθρωπότητας. Η παρουσία τους στη γη είναι πολύ μεγαλύτερη από την ανθρώπινη ιστορία και καθώς η ζωή στον πλανήτη έχει εξελιχθεί παρουσία τους πολλά μέταλλα αποτελούν συστατικά βιολογικών μορίων που συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες ως απαραίτητα ιχνοστοιχεία για την ανθρώπινη διατροφή, ενώ άλλα αποτελούν ρυπαντές.

Η βασική ταξινόμηση των μετάλλων, η οποία σχετίζεται με το βιολογικό τους ρόλο τα διακρίνει σε *απαραίτητα* όπως ο χαλκός (Cu), ο σίδηρος (Fe), ο ψευδάργυρος (Zn), που είναι απαραίτητα σε μικρές ποσότητες, αλλά *τοξικά* σε μεγάλες και σε *μη απαραίτητα*, όπως το κάδμιο (Cd), ο υδράργυρος (Hg), ο μόλυβδος (Pb), το αρσενικό (As) που δε φαίνεται να έχουν βιολογικές δράσεις σημαντικές. Μέταλλα με συγκεντρώσεις <0,01% της μάζας των οργανισμών χαρακτηρίζονται ως ιχνοστοιχεία (Zn, Cu, Co, Se), ενώ εκείνα με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ως μακροστοιχεία.

Μεταξύ των απαραίτητων μετάλλων ο ψευδάργυρος (Zn) απαντά στο ενζυμικό σύστημα της καρβονικής ανυδράσης, που συμμετέχει στο μεταβολισμό του CO₂, ο χαλκός (Cu) της αιμοκυανίνης, χρωστικής του αίματος στα ασπόνδυλα (μαλάκια και αρθρόποδα) και ο σίδηρος (Fe) της αιμοσφαιρίνης στα σπονδυλωτά και τον άνθρωπο που μεταφέρει οξυγόνο, το μαγνήσιο (Mg) στη χλωροφύλλη των ανώτερων φυτών, το μαγγάνιο (Mn) στο μεταβολισμό της γλυκόζης, το κοβάλτιο (Co) στη βιταμίνη B₁₂ και ως συμπαραγοντας (ενεργοποιητής) μεταλλοενζύμων, το μολυβδαίνιο (Mo) στην κατήλωση του αζώτου και άλλα.

Όταν τα απαραίτητα μέταλλα ελλείπουν, ο οργανισμός δεν μπορεί να αυξηθεί ή να ολοκληρώσει τον βιολογικό του κύκλο, ενώ όταν βρίσκονται σε περίσσεια, όταν δηλαδή ξεπερνούν τα απαραίτητα επίπεδα για τη σωστή διατροφική απόκριση κατά 40-200 φορές, γίνονται και αυτά τοξικά. Για παράδειγμα, η υπερβολική συγκέντρωση χαλκού στο ήπαρ, τους νεφρούς και τον εγκέφαλο, που προκαλείται στη νόσο του Wilson, οδηγεί σε ηπατική και νεφρική εκφύλιση και σε νευρολογικές διαταραχές, ακόμα και στο θάνατο. Επίσης η χρόνια εναπόθεση σιδήρου σε ιστούς και όργανα χαρακτηρίζεται ως αιμοχρωμάτωση (όταν συνοδεύεται από κίρρωση του ήπατος) ή αιμοσιδήρωση (όταν δεν υφίσταται κίρρωση). Γενικά ως αποτέλεσμα έλλειψης ή περίσσειας μετάλλων μπορεί να προκληθούν διάφορες μεταβολικές διαταραχές (Πίνακας 1, Σχήμα 1). Πάντως επικρατεί η άποψη ότι η φυσική διαθεσιμότητα των μετάλλων στη διάρκεια της εξέλιξης και η αφθονία τους, είναι αυτές που καθόρισαν την πιθανότητα της απόκτησης από αυτά απαραίτητου ρόλου ή μη, στους ζωντανούς οργανισμούς (Rainbow, 1985).



Πίνακας 1: Μεταλλοεξαρτώμενες παθήσεις (από Hay, 1992).

Μέταλλο	Έλλειψη	Περίσσεια
Ασβέστιο	Σκελετικές διαταραχές, τετανία	Καταρράκτης, χολόλιθοι, αθηροσκλήρωση
Κάλιο		Νόσος του Addison
Κοβάλτιο	Αναιμία	Στεφανιαία καρδιοπάθεια, πολυκυτταραιμία
Λίθιο	Μανιοκαταθλιπτική ψύχωση	
Μαγγάνιο	Σκελετικές παραμορφώσεις, γενετικές διαταραχές	Αταξία
Μαγνήσιο	Σπασμοί	Αναισθησία
Νάτριο	Νόσος του Addison, κράμπες θερμαστών	
Σελήνιο	Νέκρωση του ήπατος, νόσος των λευκών μυών	Νέκρωση του ήπατος, νόσος των λευκών μυών
Σίδηρος	Αναιμία	Αιμοχρωμάτωση, αιμοσιδήρωση
Χαλκός	Αναιμία, σύνδρομο Menkes	Νόσος του Wilson
Χρώμιο	Ανώμαλος μεταβολισμός γλυκόζης	
Ψευδάργυρος	Νανισμός, υπογοναδισμός	Πυρετός από μεταλλικές αναθυμιάσεις
Κάδμιο		Νεφρίτιδα
Μόλυβδος		Αναιμία, εγκεφαλίτιδα, νευρίτιδα
Υδράργυρος		Εγκεφαλίτιδα, νευρίτιδα



2. Μηχανισμοί δράσης των μετάλλων

Γενικότερα τα απαραίτητα μέταλλα συμμετέχουν στη

- Δομή και λειτουργία ενζύμων όπου μπορεί να αποτελούν μέρος της προσθετικής ομάδας του ενζύμου ή συμπαράγοντα και να συμμετέχουν έτσι στο
 - μεταβολισμό πρωτεϊνών (Cu της λυσουλ-οξειδάσης για τη βιοσύνθεση κολλαγόνου και ελαστίνης),
 - μεταβολισμό νουκλεϊκών οξέων (Zn στις RNA, DNA πολυμεράσες, και σε μεταγραφικούς παράγοντες με δομή δακτύλου Zn-zinc finger)
 - μεταβολισμό υδατανθράκων (Zn της φωσφογλυκομουτάσης για τη μετατροπή 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη κατά τη γλυκονεογένεση, Mn εξωκινάσης κατά τη γλυκόλυση) και
 - μεταβολισμό λιπιδίων (Zn της φωσφολιπάσης-C για τη σύνδεση εστέρων μεταξύ γλυκερόλης και φωσφορυλ-χολίνης κατά το μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων)
- Σύνθεση και δομική σταθεροποίηση πρωτεϊνών (Zn σε κολλαγενάσες για τη σύνθεση/ή αναδόμηση κολλαγόνου των οστών) και νουκλεϊκών οξέων (Cu στη βιοσύνθεση ηπατικού DNA)
- Ρύθμιση της δράσης ορμονών και τροποποίηση περιφερικής τους λειτουργίας (Zn)
- Μεταφορά ηλεκτρονίων (Fe, Cu, Mo)

- Διαπερατότητα μεμβράνης (K, Na)

- Λειτουργίες υποκυτταρικών οργανιδίων (Mn-δισμουτάση υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια)

- Μυϊκή συστολή (Ca, Mg) και αγωγή νευρικών ώσεων (K, Na, Mg) εξασφαλίζοντας τη σωστή λειτουργία αντλιών και καναλιών ανιόντων

- Αμυντικές λειτουργίες (Zn ενεργοποιεί IL-2, Cu σχετίζεται με τη γ-ιντερφερόνη, Se ενεργοποιεί τα T λεμφοκύτταρα, αντιοξειδωτικά ένζυμα Se, Cu, Zn).

Ένας από τους κύριους μηχανισμούς τοξικότητας των μη απαραίτητων μετάλλων που εμφανίζεται όταν η συγκέντρωσή τους υπερβεί κάποια κρίσιμα όρια ανοχής των οργανισμών, είναι η αντικατάσταση άλλων απαραίτητων ιχνοστοιχείων σε κάποια μεταβολική οδό. Αυτή η υποκατάσταση έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της ενζυμικής ενεργότητας των μέταλλο-ενζύμων για παράδειγμα, των οποίων η καταλυτική δράση είναι αποτέλεσμα συγκεκριμένης τριτοταγούς δομής του ενεργού τους κέντρου.



Άλλοι μηχανισμοί τοξικότητας των μετάλλων αφορούν την επαγωγή απόπτωσης, δηλαδή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και την δημιουργία οξειδωτικών βλαβών. Οι οξειδωτικές βλάβες μπορεί να είναι άμεσες μέσω υπεροξειδωσης λιπιδίων και παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), ή έμμεσες λόγω αναστολής ορισμένων αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Κάποια μέταλλα (Cd, Cu, Fe) παρουσιάζουν καταλυτική δράση στην υπεροξειδωση των λιπιδίων, ενώ οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων προκαλούν εκτεταμένες βλάβες στις μεμβρανώδεις δομές των κυττάρων, και μπορεί να οδηγήσουν σε αρκετές ανθρώπινες ασθένειες όπως αρτηριοσκλήρυνση, έμφραγμα του μυοκαρδίου και καρκίνο. Το νευρικό σύστημα και ειδικά ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στην υπεροξειδωση των λιπιδίων, καθώς έχουν υψηλό ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και υψηλό αερόβιο μεταβολισμό. Στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) τραυματισμοί, ισχαιμία και φλεγμονώδεις ή αυτοάνοσες νόσοι μπορούν να προκαλέσουν βλάβες που επάγονται από ελεύθερες ρίζες.

Οι αμυντικοί μηχανισμοί έναντι στις ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνουν ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα όπως τη δισμουτάση του υπεροξειδίου, τις καταλάσες και τις υπεροξειδάσες και μη ενζυμικά συστήματα όπως τη βιταμίνη Ε, το ασκορβικό οξύ-βιταμίνη C και θειολικές ενώσεις του τύπου της γλουταθειόνης. Ένζυμα έναντι του οξειδωτικού στρες περιλαμβάνουν κάποια ένζυμα εξαρτώμενα από μέταλλα όπως τη *δισμουτάση του υπεροξειδίου* (SOD), η οποία είναι σημαντική για την αποτοξικοποίηση του κυττάρου από το ανιόν του υπεροξειδίου, προστατεύοντας έτσι από βλάβες την μεμβράνη και υπάρχει σε δύο μορφές, μία εξαρτώμενη από τον Zn και τον Cu (CuZnSOD) και μία εξαρτώμενη από το Mn (MnSOD). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου που προκύπτει, εν συνεχεία ανάγεται σε νερό από την *υπεροξειδάση της γλουταθειόνης*, ένα ένζυμο εξαρτώμενο από το Se. Ακόμη οι *μεταλλοθειονίνες* (MT), μεταλλοπρωτεΐνες που επάγονται από μέταλλα και άλλους παράγοντες στρες, έχουν άμεσες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου *in vitro*, μέσω μηχανισμού απομάκρυνσης των μετάλλων και οξείδωσης σουλφυδρυλίων, αλλά μπορεί επίσης να ενεργοποιήσουν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών (ROS) στα μακροφάγα (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Τα *μη απαραίτητα* μέταλλα θεωρούνται εξαιρετικά επικίνδυνα όχι μόνο λόγω της τοξικότητάς τους, αλλά και λόγω του ότι δε βιοδιασπώνται, παρουσιάζουν σημαντικό βαθμό συγκέντρωσης μέσω του τροφικού πλέγματος (φαινόμενα *βιοσυσσώρευσης* και *βιομεγέθυνσης*). Η *βιοσυσσώρευση* οφείλεται στον μικρότερο ρυθμό απέκκρισης των μετάλλων από εκείνον της πρόσληψής τους, με αποτέλεσμα να αυξάνεται συνεχώς η συγκέντρωση του μετάλλου στον υπό μέτρηση οργανισμό. Η *βιομεγέθυνση* αφορά την αύξηση της συγκέντρωσης των μετάλλων σε οργανισμούς που συγκροτούν μία τροφική αλυσίδα και βρίσκονται σε διαφορετικά τροφικά επίπεδα. Οι “μεγενθυμένες” συγκεντρώσεις εμφανίζονται στους οργανισμούς που βρίσκονται σε υψηλότερα τροφικά επίπεδα καθώς συνήθως ο

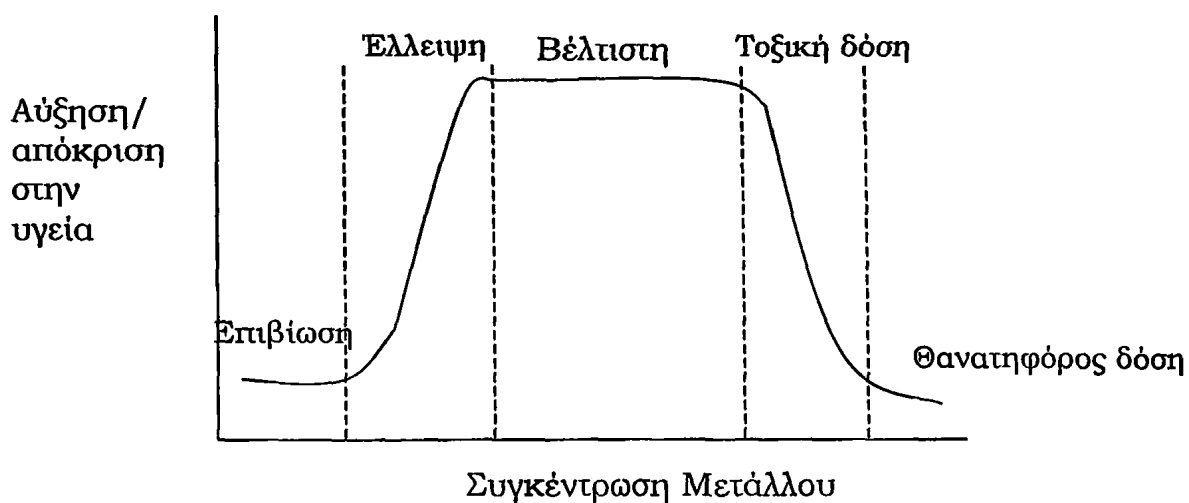


συντελεστής συσσώρευσης (ή παράγοντας μεταφοράς Ft) διατηρείται μεγαλύτερος της μονάδας στη βαθμίδα n σε σχέση με τη βαθμίδα n-1. Δηλαδή

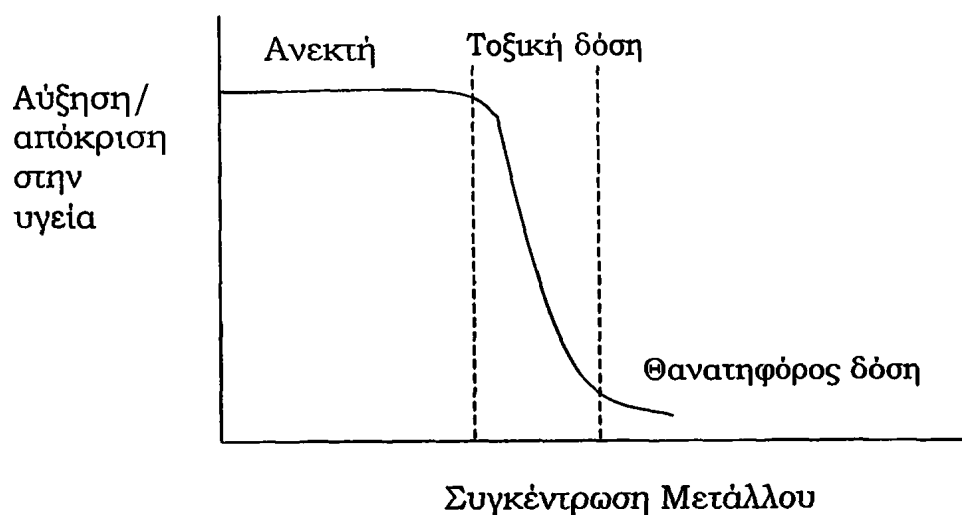
$$F_t = \frac{\text{συγκέντρωση μετάλλων σε οργανισμό τροφικού επιπέδου } n}{\text{συγκέντρωση μετάλλων σε οργανισμό τροφικού επιπέδου } n-1}$$



(A) Απαραίτητα μέταλλα



(B) Μη Απαραίτητα μέταλλα



Σχήμα 1: Σχέση μεταξύ υγείας και συγκέντρωσης (A) Απαραίτητων μετάλλων και (B) Μη Απαραίτητων Μετάλλων (από Fergusson, 1990)

3. Πηγές και οδοί εισόδου των μετάλλων στους οργανισμούς

Η παρουσία των βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον οφείλεται αφ' ενός σε φυσικές διαδικασίες και αφ' ετέρου στις ανθρώπινες δραστηριότητες. Η φυσική προέλευση των μετάλλων αφορά διεργασίες όπως η διάβρωση μεταλλοφόρων πετρωμάτων και ορυκτών, από όπου τα μέταλλα μεταφέρονται στα εδάφη και στα φυτά μέσω του ριζικού τους συστήματος, στα επιφανειακά και υπόγεια νερά μέσω εκπλύσεων του εδάφους και στην ατμόσφαιρα ως αιωρούμενα σωματίδια. Άλλες φυσικές διεργασίες περιλαμβάνουν την ηφαιστειακή δραστηριότητα, την ατμοσφαιρική κατακρήμνιση σωματιδιακού υλικού (από φυσικές ή ανθρωπογενείς πηγές), την αποσύνθεση ζωικών και φυτικών ιστών και την απορροή ποταμών. Πηγές μετάλλων ανθρωπογενούς προέλευσης αποτελούν οι ατμοσφαιρικές εκπομπές, λύματα και βιομηχανικά απόβλητα, οι κατασκευές, μεταλλεία, λιπάσματα, φυτοφάρμακα και απολυμαντικά και άλλα. Για παράδειγμα, τα μέταλλα μπορεί να προέρχονται από τη βιομηχανία χρωμάτων και πλαστικών, μπαταριών (Cd), ηλεκτρικού εξοπλισμού, βαφών anti-fouling (φυκοκτόνων και συντηρητικών ξύλου) για τις καρίνες των πλοίων (Cu), από μεταλλουργικές βιομηχανίες, βυρσοδεψεία, βαφές υφασμάτων (Cr), από θήκες μπαταριών, σωληνώσεις, καύσιμα όπου προστίθενται ως αντικροτικά (Pb) και από τα αστικά λύματα (Cu, Pb). Ένας λόγος για παράδειγμα που οι εκπομπές Cd έχουν αυξηθεί σημαντικά στον αιώνα μας, είναι ότι τα προϊόντα Cd (όπως για παράδειγμα οι μπαταρίες Ni-Cd) σπανίως ανακυκλώνονται και συνήθως απορρίπτονται μαζί με τα οικιακά απορρίμματα.

Τα μέταλλα στο περιβάλλον υπόκεινται σε αβιοτικές και βιοτικές αλληλεπιδράσεις και μπορεί να υπάρχουν ως ελεύθερα ιόντα, να σχηματίζουν σύμπλοκα (ανόργανα ή οργανικά) και κολλοειδή ή ενώσεις. Η σχετική τοξικότητα τους εμφανίζεται όταν οι απεκκριτικοί, μεταβολικοί, αποθηκευτικοί και μηχανισμοί αποτοξικοποίησης των οργανισμών δεν επαρκούν.

Στους οργανισμούς τα μέταλλα εισέρχονται με τους εξής τρόπους: α) μέσω της αναπνευστικής οδού με την εισπνοή του αέρα, β) μέσω της γαστρεντερικής οδού από τις τροφές ή το νερό, όπου είναι προσροφημένα ή παρόντα και γ) μέσω του δέρματος.

Ο αέρας που εισπνέεται από τους οργανισμούς περιέχει σωματίδια μετάλλων και η ποσότητα που θα εισέλθει τελικά στον οργανισμό εξαρτάται από τον αναπνευστικό ρυθμό κάθε οργανισμού. Επίσης ορισμένα σωματίδια αποθηκεύονται στα αναπνευστικά όργανα ανάλογα με το μέγεθος, το σχήμα ή το φορτίο τους. Τα μεγαλύτερα σωματίδια (>2μm), παγιδεύονται στο βλεννογόνο του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και απομακρύνονται προς το στόμα ή το στομάχι. Πολλά από τα μικρότερα σωματίδια (με μέγεθος <0.1μm) απομακρύνονται επίσης από τους πνεύμονες με την εκπνοή, ενώ τα ενδιάμεσου μεγέθους σωματίδια μετακινούνται βαθύτερα στο αναπνευστικό σύστημα και τις κυψελίδες και τελικά αρκετά από αυτά απορροφούνται από το αίμα.



Τελικά η ποσότητα μετάλλων που απορροφάται μέσω της αναπνευστικής οδού επηρεάζεται από την εισπνεόμενη ποσότητα, το κλάσμα αυτής που αποθηκεύεται στα αναπνευστικά όργανα και το κλάσμα του αποθηκευμένου υλικού που απορροφάται από το αίμα. Η έκθεση σε μόλυβδο (Pb) γίνεται μέσω του αέρα, από τις εκπομπές των υγρών καυσίμων, όπου προστίθεται ως αντικροτικό, οι οποίες όμως έχουν μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες.

Όσον αφορά τη γαστρεντερική οδό, τα διαφορετικά pH που επικρατούν στα επιμέρους τμήματα του γαστρεντερικού συστήματος (1-3 στο στομάχι, 7-8 στο λεπτό έντερο) επηρεάζουν τη διαλυτότητα του μετάλλου και τη φυσικοχημική μορφή του, επομένως και την ποσότητα μετάλλου που απορροφάται. Σημαντικά για την απορρόφηση του μετάλλου είναι επίσης το είδος και η ποσότητα της τροφής καθώς και ο χρόνος πέψης και η κινητικότητα στο έντερο. Οι μικροβιακές παρεμβολές και η παρουσία άλλων μετάλλων (φαινόμενα συνέργιας ή ανταγωνισμού) ή οργανικών κηλοποιητών επίσης επηρεάζουν την απορρόφηση. Τελικά η μεταφορά των μετάλλων από τη γαστρεντερική οδό στο αίμα γίνεται κυρίως παθητικά με διάχυση και ώσμωση ή δευτερευόντως ενεργητικά με κατανάλωση ενέργειας. Μπορεί να συμβεί επίσης και αντίστροφη μεταφορά από το αίμα στο έντερο, η οποία καλείται ενδογενής απέκκριση. Η απέκκριση των μετάλλων γίνεται πάντως μέσω της χολής στον γαστρεντερικό σωλήνα και από εκεί στα κόπρανα, ενώ ποσότητά τους αποβάλλεται επίσης μέσω των ούρων, του ιδρώτα και του σάλιου. Σημαντική για το μεταβολισμό των μετάλλων είναι εξάλλου και η εντεροηπατική εναλλαγή (turnover) καθώς η παρουσία των μετάλλων που επανεκκρίνονται στο έντερο μπορεί να προέρχεται από εντερική, παγκρεατική έκκριση και έκκριση μέσω της χολής.

Το δέρμα, ως οδός εισόδου των μετάλλων, αποτελεί φραγμό στην είσοδο νερού, σωματιδίων και ιονικών και μεγαλομοριακών ενώσεων, δεν μπορεί όμως να ελέγξει την είσοδο λιποδιαλυτών ουσιών. Έτσι μπορεί να απορροφήσει οργανομεταλλικές ενώσεις και ουσίες διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, παρόλα αυτά η κατάσταση δεν είναι τόσο ξεκάθαρη για τις ιονικές μορφές των μετάλλων.

Όσον αφορά την είσοδο των μετάλλων σε ένα υδάτινο οικοσύστημα, που συνήθως αποτελεί αποδέκτη πολλών δραστηριοτήτων, ανθρώπινων και φυσικών, η κατάσταση απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, λόγω της φύσης των υδρόβιων τροφικών πλεγμάτων, όπου τα μέταλλα συσσωρεύονται. Τα μέταλλα αφού εισέλθουν στο νερό γρήγορα προσροφώνται από τα σωματίδια της σιλήης του νερού (ο Cu σε ποσοστό 83%), ενώ στους υδρόβιους οργανισμούς τα μέταλλα εισέρχονται με τρεις τρόπους: Με παθητική διάχυση μέσω του δέρματος λόγω κλίσης συγκέντρωσης, μέσω της τροφής όπου είναι προσροφημένα ή παρόντα και μέσω της αναπνοής (τα βράγχια διηθούν μεγάλες ποσότητες νερού για την συγκράτηση του απαιτούμενου οξυγόνου). Επιπλέον οι θαλάσσιοι οργανισμοί καταπίνουν μεγάλες ποσότητες νερού για λόγους οσμωρύθμισης, οπότε συγκρατούν επιπλέον μέταλλα που είναι παρόντα στο νερό. Στη συνέχεια η είσοδος των μετάλλων



στον οργανισμό και η συσσώρευσή τους θα επηρεαστεί από τη φυσιολογική κατάσταση του ζώου (στάδιο ζωής, αναπαραγωγική κατάσταση, μέγεθος, φύλο κ.α.), περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως τη θερμοκρασία και την αλατότητα (που επηρεάζουν τη φυσιολογία του οργανισμού καθώς και τη μορφή του μετάλλου στο νερό), από τη φυσικοχημική μορφή του μετάλλου (ανόργανη-οργανική, διαλυτή-σωματιδιακή κλπ) καθώς και από την παρουσία άλλων μετάλλων (φαινόμενα συνέργιας ή ανταγωνισμού).

Στο υδάτινο οικοσύστημα προκειμένου να βιοσυσσωρευτούν τα μέταλλα και να εμφανιστεί η τοξική τους δράση, πρέπει αυτά να είναι σε μορφή βιολογικά διαθέσιμη. Η βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων είναι ανάλογη της διαθεσιμότητας των ελεύθερων ιόντων τους, εξαρτάται δηλαδή από τη χημεία ολόκληρου του συστήματος νερό-ίζημα-οργανικό-ανόργανο υλικό, επομένως από τους γεωχημικούς παράγοντες και τα υδροβιολογικά χαρακτηριστικά μιας περιοχής. Κατά συνέπεια οι ποσότητες μετάλλων που συγκεντρώνονται στους υδρόβιους οργανισμούς αντανακλούν τελικά την ποιότητα του νερού.

4. Όργανα-στόχοι των μετάλλων

Επιδημιολογικές μελέτες συχνά αποκαλύπτουν την πραγματική έκθεση των πληθυσμών σε μέταλλα και αξιολογούν τους κινδύνους που σχετίζονται με αυτά. Τα όργανα που κυρίως πλήττονται διαφέρουν ανάλογα με το μέταλλο. Για παράδειγμα το κάδμιο και ο υδράργυρος πλήττουν κυρίως τους νεφρούς, ο μεθυλιωμένος υδράργυρος τον εγκέφαλο, ενώ το αρσενικό φαίνεται να μην έχει ειδική δράση παρά το ότι το δέρμα προσβάλλεται σημαντικά από το μέταλλο αυτό. Πάντως αυτό δε σημαίνει ότι και άλλα όργανα ή ιστοί δεν επηρεάζονται. Γενικά τα μέταλλα μπορούν να πλήξουν τους πνεύμονες μέσω της εισπνοής, όπου μπορούν να συσσωρευτούν ως αδιάλυτα σωματίδια (Hg, Be), τους νεφρούς προσβάλλοντας τα σπειράματα (Bi, Hg, Au) ή τα νεφρικά σωληνάκια (Pb, Cd) εξαιτίας διαταραχών σε σουλφυδρυλικά ένζυμα όπως οι αφυδρογονάσες. Μπορούν ακόμη να πλήξουν το νευρικό σύστημα (Hg, Pb) όπου μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλούν σαφείς κλινικές βλάβες, ενώ μικρότερες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές συμπεριφοράς δυσδιάκριτης αιτιολογίας. Ακόμη τα μέταλλα μπορούν να προσβάλλουν το δέρμα, τα μάτια και το γαστρεντερικό σύστημα, ενώ ενοχοποιούνται επίσης για καρκινογένεση, μεταλλαξιγένεση και τερατογένεση.

Μεταξύ των πιο επικίνδυνων μετάλλων, άποψη που ενισχύεται από κάποια σοβαρά ατυχήματα όπως αυτό του κόλπου της Minamata στην Ιαπωνία τη δεκαετία του 1950, συγκαταλέγεται ο υδράργυρος (Hg), ο οποίος είναι νευροτοξικός ακόμα και σε πολύ χαμηλές δόσεις. Η έκθεση σε υδράργυρο του γενικού πληθυσμού γίνεται μέσω της τροφής. Τα ψάρια (όπως ο ξιφίας και ο τόνος) είναι η κύρια πηγή της τοξικής μεθυλιωμένης μορφής του, γι' αυτό η κατανάλωσή τους από εγκύους πρέπει να αποφεύγεται καθώς ελλοχεύει κινδύνους νευρολογικών βλαβών για το αναπτυσσόμενο έμβρυο. Άλλη πηγή υδραργύρου είναι τα αμαλλάματα των



δοντιών και αν και κατά καιρούς έχει συζητηθεί η ασφάλειά τους δεν έχει βρεθεί ακόμη άμεση συσχέτισή τους με προβλήματα υγείας (Jarup, 2003).

Η έκθεση σε μόλυβδο μπορεί να οδηγήσει σε υπέρταση, νεφρική δυσλειτουργία και νοητικές διαταραχές. Στα πειραματόζωα παρατηρείται επίσης πρωτογενής τοξική δράση του μολύβδου στην αναπαραγωγή των αρσενικών ζώων μέσω διαταραχής του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-όρχεων (Benoff, 2000). Ο μόλυβδος είναι ένα ακόμη μέταλλο το οποίο πρέπει να παραμένει σε χαμηλά επίπεδα σε εγκύους προς αποφυγή νευροαναπτυξιακών επιπτώσεων στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Επίσης έχει σχετιστεί κατά την κύηση με αυξημένο κίνδυνο αυτόματων αποβολών, ενδομήτριο θάνατο του εμβρύου και πρόωρο τοκετό (Sharara, 1998). Ο μόλυβδος συσσωρεύεται κυρίως στα οστά και αυξημένη ενδογενής έκθεση έχει παρατηρηθεί σε γυναίκες σε περιόδους αυξημένης μεταβολικής ανταλλαγής (turnover) των οστών, όπως κατά την εμμηνόπαυση. Τα παιδιά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην τοξικότητα του μολύβδου λόγω της υψηλής γαστρεντερικής πρόσληψης και του διαπερατού αιματοεγκεφαλικού φραγμού που διαθέτουν. Λόγω της νευροτοξικότητας του μολύβδου θα ήταν σκόπιμο να εγκαταλειφθούν οι βαφές που τον περιέχουν, όπως και η χρήση του σε δοχεία τροφίμων (Vahter, 2002).

Η έκθεση σε αρσενικό (As) του πληθυσμού γίνεται μέσω της τροφής και του πόσιμου νερού. Αυξημένη έκθεση σε αρσενικό έχει σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του δέρματος και αλλοιώσεις του δέρματος όπως υπερκεράτωση. Η επαγγελματική έκθεση μέσω εισπνοής έχει συσχετιστεί επίσης με καρκίνο του πνεύμονα (Jarup, 2003).

Η τοξικότητα του αργιλίου (Al) παρατηρήθηκε αρχικά ως νευροτοξικότητα, εν συνεχεία ως εγκεφαλοπάθεια, οστεομαλακία και μικροκυτταρική υπόχρωμη αναιμία, σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που υφίστανται αιμοδιάλυση, ενώ πρόσφατα η συσσώρευσή του περιγράφηκε και σε μη νεφροπαθείς, όπως σε πρόωρα βρέφη, σε ασθενείς που τρέφονται ενδοφλέβια ή παρεντερικά ή και σε άτομα που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες αντιόξινων δισκίων. Ακόμα ενδέχεται να εμπλέκεται και στη νόσο του Alzheimer (Sauvant, 1999).



II. ΚΑΔΜΙΟ (Cd)

1. Γενικά

Το κάδμιο ανακαλύφθηκε το 1817 από τον Strohmeyer και ονομάστηκε από τον μυθολογικό Κάδμο. Αρχικά θεωρήθηκε θετική ανακάλυψη λόγω της βιομηχανικής του χρήσης, ενώ οι τοξικές του δράσεις διαπιστώθηκαν πολύ αργότερα.

Το κάδμιο είναι ένα σχετικώς σπάνιο στοιχείο. Συνήθως συνοδεύει τον ψευδάργυρο σε ποσοστό μέχρι 5% σε πολλά από τα ορυκτά του (συνήθως σουλφίδια, π.χ. σφαλερίτης) και λαμβάνεται ως παραπροϊόν κατά τη μεταλλουργία του ψευδαργύρου από όπου ανακτάται εύκολα λόγω του χαμηλού σημείου τήξεως και της υψηλής πηκτικότητάς του. Η πηκτικότητά του βεβαίως συνιστά επίσης κι έναν μεγαλύτερο κίνδυνο για τη διασπορά του κατά την παραγωγή του και τις βιομηχανικές του χρήσεις. Επίσης συναντάται ευρέως και στα ορυκτά του μολύβδου.

Η χημική συμπεριφορά του καδμίου και τα φυσικά του χαρακτηριστικά μοιάζουν πολύ με του ψευδαργύρου. Και τα δύο μέταλλα σχηματίζουν δισθενή κατιόντα με συμπληρωμένη τη d στοιβάδα ηλεκτρονίων και η γεωμετρία της σύνταξής τους είναι το ίδιο προσαρμοστική. Οι ομοιότητες των δύο μετάλλων παραμένουν σε χημικό επίπεδο, όχι όμως και σε βιολογικό, όπου το κάδμιο δεν φαίνεται να μπορεί να υποκαταστήσει τον ψευδάργυρο ισομορφικά σε πρωτεΐνες ή άλλα μακρομόρια όπως κάνει στα μεταλλεύματα.

Ετήσια παράγονται 15.000-18.000 τόνοι καδμίου εκ των οποίων 80-90% δεν ανακυκλώνονται. Περίπου το 50% χρησιμοποιείται στη μεταλλουργία για την παραγωγή μεταλλικών κραμάτων και στη γαλβάνωση (επιμετάλλωση) μεταλλικών επιφανειών ως αντιδιαβρωτικό, ενώ ένα ποσοστό 20% χρησιμοποιείται ως συστατικό σταθεροποιητών στην παραγωγή πλαστικών (πολυ-βινυλοχλωρίδια). Το υπόλοιπο 30% χρησιμοποιείται στην παραγωγή χρωμάτων και στην κατασκευή μπαταριών και λυχνιών τηλεόρασης (Clark, 1992). Βέβαια τα ποσοστά αυτά μπορεί να αλλάζουν από χρόνο σε χρόνο, καθώς αλλάζει και η ευαισθητοποίηση γύρω από περιβαλλοντικά ζητήματα, για παράδειγμα μειώνεται η χρήση του στις επιμεταλλώσεις και στην παραγωγή χρωμάτων και αυξάνει στην κατασκευή μπαταριών.

Πηγές επιβάρυνσης καδμίου στο περιβάλλον αποτελούν τα απόβλητα από μεταλλεία (ψευδαργύρου και μολύβδου) και μεταλλουργικές εργασίες (από την επεξεργασία του μετάλλου στη βιομηχανική μεταλλουργία, τις επιμεταλλώσεις και γαλβανώσεις) και η εκτεταμένη χρήση προϊόντων όπως μπαταρίες νικελίου/καδμίου, χρώματα και πλαστικά. Επίσης τα φωσφορικά λιπάσματα μπορεί να περιέχουν υψηλές ποσότητες καδμίου λόγω προσμίξεων από τη χρήση μολύβδου και ψευδαργύρου. Η ικανότητα των φυτών να συσσωρεύουν το κάδμιο (αναφέρεται ότι λαχανικά και δημητριακά που παράγονται με υψηλή εφαρμογή φωσφορούχων λιπασμάτων μπορεί να περιέχουν μεταξύ 9-36ppm καδμίου) και η αποσύνθεση και διασπορά τους στο περιβάλλον, μπορεί να σημαντική οδός



είσοδου του καδμίου στα φυσικά νερά. Ακόμη επειδή το κάδμιο είναι μία κοινή πρόσμιξη στον ψευδάργυρο που χρησιμοποιείται για τη γαλβάνωση των σιδηροσωλήνων στα δίκτυα ύδρευσης, η επιβάρυνση στα φυσικά νερά μπορεί να προέρχεται από αυτήν την πηγή (Eichenberger & Chen, 1982).

Η συνολική ετήσια είσοδος του καδμίου στους ωκεανούς υπολογίζεται σε 8.000 τόνους, όπου φυσικές (ποταμοί, ατμοσφαιρική κατακρήμνιση) και ανθρωπογενείς πηγές συμβάλλουν εξίσου. Στους θαλάσσιους οργανισμούς για άγνωστους λόγους το κάδμιο προάγει τη φωτοσύνθεση και την αύξηση του φυτοπλαγκτόν σε συγκεντρώσεις έως 100 ppm. Εξαιτίας της συσχέτισης του με τα φωσφορικά ιόντα το κάδμιο ενδεχομένως προσλαμβάνεται από το φυτοπλαγκτόν, αλλά δεν φαίνεται να συσσωρεύεται στην τροφική αλυσίδα. Στα υψηλότερα επίπεδα του τροφικού πλέγματος τα ψάρια και τα θαλάσσια θηλαστικά έχουν χαμηλές συγκεντρώσεις καδμίου, κυρίως στους νεφρούς και το αποτοξικοποιούν με την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών που ονομάζονται μεταλλοθειονίνες (MT). Αντίθετα τα μαλάκια συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις του μετάλλου (Clark, 1992).

Σε υδατικά διαλύματα το κάδμιο είναι σε δισθενή μορφή και το δισθενές ιόν του σχηματίζει σύμπλοκα με τα αμμωνιακά ιόντα, καθώς και με τα χλωρίδια, δισουλφίδια και τα ιόντα υδροξυλίου. Τα προϊόντα υδρόλυσής του εμφανίζονται σε pH περίπου 8, αλλά η χαμηλή διαλυτότητα των υδροξειδίων του περιορίζει και τη διαλυτότητα του καδμίου στα φυσικά νερά. Σε ρυπασμένα περιβάλλοντα όπου και άλλα στοιχεία είναι παρόντα, μπορεί να υπάρχουν διάφορες χημικές μορφές καδμίου σε διάλυμα, όπως $CdSO_4$ και οργανικά σύμπλοκα του καδμίου (για παράδειγμα, σύμπλοκα με την κυσεΐνη ή άλλα αμινοξέα, με καρβοξυλικά οξέα και πολυσακχαρίτες, αλλά και με οργανικούς ρυπαντές) των οποίων η παρουσία εξαρτάται από τη διαθέσιμη ποσότητα οργανικής ύλης και από την παρουσία ανταγωνιστικών κατιόντων. Σε ιζήματα δε, το κάδμιο δεν φαίνεται να προσροφάται σε κολλοειδές υλικό, αλλά σε οργανικά σωματίδια όπως κουμικές ουσίες (Fergusson, 1990).

Η καύση καυσίμων πετρελαίου και άνθρακα επίσης συμβάλλουν στη ρύπανση από κάδμιο, όπως και τα αστικά απορρίμματα. Το 50% των ατμοσφαιρικών εκπομπών προκύπτει από καύση ή τήξη προϊόντων που περιέχουν κάδμιο και η ατμοσφαιρική κατακρήμνιση αυτών των σωματιδίων μπορεί επίσης να συμβάλλει στην επιβάρυνση των υδάτινων οικοσυστημάτων. Η συγκέντρωση καδμίου στον ατμοσφαιρικό αέρα κυμαίνεται σε ορισμένες πόλεις από 1-5 ng/m³, ενώ σε βιομηχανικές πόλεις μέχρι 50 ng/m³. Γενικά το σωματιδιακό κάδμιο είναι πιο διαλυτό από το σωματιδιακό μόλυβδο στα αερολύματα και η διαλυτότητά του αυξάνει καθώς το μέγεθος των σωματιδίων μειώνεται (Fergusson, 1990).

2. Είσοδος καδμίου στους οργανισμούς

Τα σωματίδια που μεταφέρουν το κάδμιο φτάνουν στις κυψελίδες και απορροφώνται στο αίμα κατά 50%. Η συνολική επιβάρυνση του οργανισμού με κάδμιο μέσω της αναπνευστικής οδού είναι μικρή, με εξαίρεση όσους υπόκεινται σε επαγγελματική έκθεση και τους καπνιστές. Ένα μόνο τσιγάρο



περιέχει 0.6-2.0 $\mu\text{g Pb}^{2+}$ και 1-4.5 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ και τουλάχιστον 10% από το περιεχόμενο του τσιγάρου σε μέταλλα εισπνέεται και ένα ποσοστό 30-40% απορροφάται στη συστηματική κυκλοφορία των καπνιστών (Benoff, 2000). Έτσι υπολογίζεται ότι επιπλέον 2-4 μg του στοιχείου εισπνέονται από το κάπνισμα 20 τσιγάρων την ημέρα. Στους πνεύμονες, το κάδμιο δεν έχει ομοιογενή κατανομή, με τις χαμηλότερες τιμές να απαντώνται στα ανώτερα τμήματα, και τα επίπεδα του μετάλλου να αυξάνονται με την ηλικία (Fergusson, 1990).

Η απορρόφηση του Cd από τους πνεύμονες είναι 10-50%, ενώ από τον γαστρεντερικό σωλήνα είναι σημαντικά μικρότερη, περίπου 2-8%. Η γαστρεντερική απορρόφηση γίνεται κατά μήκος του λεπτού εντέρου, πιθανώς με διάχυση. Αμέσως μετά την πρόσληψή του από το αίμα, το κάδμιο μεταφέρεται συνδεδεμένο με την αλβουμίνη μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας στο ήπαρ, όπου μάλλον ένας υποδοχέας αλβουμίνης βρίσκεται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων. Στο ήπαρ το κάδμιο συνδέεται με ήδη υπάρχουσες μεταλλοθειονίνες όπου υποκαθιστά τον Zn. Κατόπιν μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας μεταφέρεται στα όργανα-στόχους (νεφρούς, οστά, πάγκρεας, επινεφρίδια). Στους νεφρούς το σύμπλεγμα Cd-MT υφίσταται σπειραματική διήθηση και προσλαμβάνεται με πινοκύτωση. Η MT καταβολίζεται στα λυσοσώματα των σωληναρίων και τα ελεύθερα ιόντα καδμίου αφ' ενός επάγουν νέα σύνθεση MT, αφ' ετέρου πλήττουν ευαίσθητες θέσεις (Nordberg, 1998). Στο αίμα, το Cd αφ' ενός ανταλλάσσεται γρήγορα εντός 3 ωρών (οξεία έκθεση, ανταλλαγή 99%) μεταξύ των ερυθροκυττάρων και του πλάσματος και αφ' ετέρου αργά (χρόνια έκθεση), όπου η ανταλλαγή διευκολύνεται από τον μεταφορέα ανιόντων. Η πρόσληψη Cd από τα ερυθροκύτταρα περιορίζεται από το ποσό του μετάλλου που είναι δεσμευμένο με εξωκυττάρια πρωτεΐνες, καθώς και με ενδοκυττάρια (π.χ. αιμοσφαιρίνη), με υψηλή συγγένεια και υψηλή φέρουσα ικανότητα (Lou, 1991).

Η απορρόφηση καδμίου μέσω της γαστρεντερικής οδού επηρεάζεται από το ποσοστό ασβεστίου, σιδήρου και πρωτεϊνών της διατροφής (μπορεί να φτάσει έως 10% σε περιπτώσεις διατροφικών ελλείψεων), και τη διαλυτότητα των ενώσεων καδμίου. Άτομα με χαμηλές αποθήκες σιδήρου (όπως μεγάλο ποσοστό των γυναικών) εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα καδμίου στο αίμα και στο ήπαρ, πιθανώς λόγω αυξημένης γαστρεντερικής απορρόφησης, καθώς το κάδμιο σχετίζεται με τους μηχανισμούς απορρόφησης του ασβεστίου και του σιδήρου. Επειδή το ενδογενές κάδμιο είναι γενικά υψηλότερο στις γυναίκες, εξαιτίας της υψηλότερης γαστρεντερικής απορρόφησης που παρατηρείται σε άτομα με χαμηλές αποθήκες σιδήρου, γι' αυτό πιθανώς και η ασθένεια Itai Itai, της χρόνιας τοξίκωσης με Cd, έπληττε κυρίως γυναίκες (Vahter, 2002), αλλά και παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας και υψηλότερη ευθραυστότητα των οστών και κίνδυνος καταγμάτων στις γυναίκες (Satarug, 2004). Παρόλα αυτά οι άνδρες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα MT από τις γυναίκες. Η ανεπάρκεια σιδήρου επίσης αυξάνει τη



συγκέντρωση MT-I στο μυελό των οστών σε επίμυες που έχουν εκτεθεί σε κάδμιο, ενώ μειώνει τη συγκέντρωσή της στους νεφρούς (Nordberg, 1998).

3. Συστημική τοξικότητα του καδμίου

Το κάδμιο είναι τοξικό στον άνθρωπο σε όλες τις χημικές μορφές του, καθώς αναστέλλει τις λειτουργίες των ενζύμων που περιέχουν σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH) και εξαρτώνται από την παρουσία μετάλλων όπως ψευδαργύρου και κοβαλτίου. Τα ιόντα του καδμίου διαθέτουν υψηλή συγγένεια για τις σουλφυδρυλικές ομάδες και τα θειολικά ανιόντα. Η παρουσία μορίων που διαθέτουν τέτοιες ομάδες ενδοκυττάρια, αλλά και εξωκυττάρια είναι στόχος του καδμίου. Έτσι το κάδμιο δρα ανταγωνιστικά και υποκαθιστά τον ψευδάργυρο (και το σελήνιο) σε μία σειρά από μεταλλοένζυμα, δεσμευόμενο αμετάκλητα στα ενεργά τους κέντρα, καθιστώντας τα ένζυμα αυτά βιολογικά ανενεργά και διαταράσσοντας έτσι τις μεταβολικές διεργασίες. Το σύμπλοκο του καδμίου-γλουταθειόνης, με την οποία έχει υψηλή συγγένεια, προκαλεί έλλειψη της γλουταθειόνης και αναστέλλει τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (καταλάση, δισμουτάσες υπεροξειδίου). Η ικανότητά του να παράγει ελεύθερες ρίζες οδηγεί στην έκφραση κυτοκινών της φλεγμονής, στην οξείδωση των νουκλεϊκών οξέων και σε αλλαγή των επιδιορθωτικών μηχανισμών. Ακόμα σε κυτταρικό επίπεδο το κάδμιο συνδέεται με τα μιτοχόνδρια και αναστέλλει την κυτταρική αναπνοή (μέχρι 75%) και την οξειδωτική φωσφορυλίωση (μέχρι 100%). Επίσης με μέταλλα όπως ο χαλκός, ο σίδηρος και το ασβέστιο δρα ανταγωνιστικά και προκαλεί έλλειψή τους με επιπτώσεις στον μεταβολισμό.

Αλλά μέταλλα όπως το σελήνιο, ο ψευδάργυρος και το μαγγάνιο μπορούν να προστατεύσουν έναντι της τοξικότητας του καδμίου. Το σελήνιο *in vivo* δρα ως αντιοξειδωτικό και μειώνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων από το κάδμιο και αυξάνει την παραγωγή της S-τρανσφεράσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Ακόμη η βιταμίνη C ενισχύοντας την πρόσληψη του σιδήρου, ενδέχεται να παίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της αυξημένης απορρόφησης καδμίου (Patrick, 2003).

Η μοναδική πρωτεΐνη με την οποία σχετίζεται το κάδμιο είναι η μεταλλοθειονίνη (MT), με στοιχειομετρία 7 ατόμων καδμίου ανά μόριο πρωτεΐνης, την σύνθεση της οποίας επάγει στο ήπαρ. Η MT δεν έχει σημαντική επίδραση στην απορρόφηση και κατανομή του καδμίου στους ιστούς, αλλά επηρεάζει τη σύνδεσή του στο κύτταρο, ελαττώνοντας την απομάκρυνση από το σώμα, ειδικά στη χολή, οπότε είναι τουλάχιστον μερικώς υπεύθυνη για τη συγκράτηση του καδμίου στους ιστούς και τη μακρά βιολογική ημίσεια ζωή του μετάλλου. Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η MT παίζει σημαντικό ωφέλιμο ρόλο στο ήπαρ, όσον αφορά την ανοχή στο κάδμιο και την επαγόμενη ηπατοτοξικότητα από το μέταλλο, καθώς δεσμευοντάς το στο ηπατικό κυτταρόπλασμα το καθιστά ανενεργό. Είναι πιθανόν ότι το σύμπλεγμα MT-Cd μεταφέρεται κατόπιν στους νεφρούς όπου και διασπάται και τα ιόντα καδμίου που απελευθερώνονται, επαναπορροφώνται από τα κύτταρα των εγγύς σωληναρίων. Εκεί τα ιόντα καδμίου μπορούν να δεσμευτούν από νεοσυντιθέμενη MT, στην αντίθετη



περίπτωση θα προκαλέσουν σωληναριακές βλάβες. Επομένως η ισορροπία μεταξύ ελεύθερων και δεσμιευμένων στην MT μορφών παίζει ρόλο κλειδί στην εκκίνηση νεφρικής δυσλειτουργίας (Sato, 2002).

Έτσι στην οξεία νεφροτοξικότητα από το σύμπλεγμα MT-Cd, η MT δε φαίνεται να προσφέρει προστασία, ενώ δε σχετίζεται ούτε και με την προστασία που επάγεται από τον Zn (Klaasen, 1997). Η μελέτη της μεταφοράς καδμίου στους νεφρούς κατόπιν χρόνιας έκθεσης *in vivo* σε επίμιες και ηπατικής μεταμόσχευσης, έδειξε ότι η κύρια πηγή του καδμίου στα νεφρά προέρχεται από το ήπαρ, από όπου μεταφέρεται δεσμιευμένος σε σύμπλεγμα με την MT (Cd-MT) στο αίμα (Chan, 1993). Οι οξείες δράσεις του καδμίου μπορεί να οφείλονται σε μη δέσμιευση του μετάλλου από την MT, ενώ οι χρόνιες όταν η ικανότητα δέσμιευσης του μετάλλου από την MT κορεστεί ή τα άλλα συστήματα αποτοξικοποίησης (π.χ. γλουταθειόνη) είναι ανεπαρκή.

Το κάδμιο έχει μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, 15-30 έτη, λόγω του χαμηλού ρυθμού απέκκρισής του από το σώμα, και συσσωρεύεται στο αίμα, τους νεφρούς, το ήπαρ και τα όργανα αναπαραγωγής. Ο φλοιός των νεφρών συσσωρεύει περίπου το 1/3 του συνολικού σωματικού φορτίου σε κάδμιο, ενώ το ήπαρ 20%. Η απέκκριση του καδμίου γίνεται κυρίως μέσω των ούρων, όπου συγκεντρώσεις άνω των 10 μg συνδέονται με σωληναριακή πρωτεϊνουρία. Ο ρυθμός απέκκρισης του καδμίου είναι πολύ μικρός, μόλις το 0.001% του σωματικού καδμίου απεκκρίνεται λόγω έλλειψης ενεργού βιοχημικού μηχανισμού για την απομάκρυνση που να συνδυάζεται με τη νεφρική επαναρρόφιση (Satarug, 2004).

Η νεφροτοξικότητα του καδμίου είναι τέτοια, που σε συγκεντρώσεις καδμίου 0,5-2μg εμφανίζονται οι πρώτες ενδείξεις υποκλινικής νεφροτοξικής βλάβης, με εμφάνιση στα ούρα μικρομοριακών πρωτεϊνών (όπως οι α-, β-, και γ-σφαιρίνες και η β₂-μικροσφαιρίνη) λόγω της διαταραχής της λειτουργίας της επαναρρόφησης των εγγύς σωληναρίων. Κατόπιν εμφανίζονται στα ούρα και μεγαλομοριακές πρωτεΐνες όπως αλβουμίνη και τρανσφερίνη λόγω σπειραματικής δυσλειτουργίας του νεφρού. Ακολουθούν χρόνιες νεφρικές βλάβες με αμινοξυουρία, φωσφατουρία, γλυκοζουρία και παρουσία ασβεστίου στα ούρα. Μάλιστα η παρουσία των ιόντων ασβεστίου και των φωσφορικών ιόντων υποδεικνύει ότι συνέπεια της νεφρικής βλάβης υπάρχει διαταραχή στο μεταβολισμό των δύο αυτών ιόντων.

Τελευταία έρευνες έχουν συνδέσει τη νεφρική δυσλειτουργία από κάδμιο με μείωση στην πυκνότητα των μετάλλων στα οστά, σε πληθυσμούς που δεν είχαν επαγγελματική έκθεση σε κάδμιο ή διατροφικές ελλείψεις και των οποίων η ημερήσια πρόσληψη ήταν εντός των προτεινόμενων ορίων. Θεωρήθηκε ότι η παρατεταμένη απώλεια του ασβεστίου στα ούρα που σχετιζόταν με αυξημένη συγκέντρωση καδμίου στα ούρα και υψηλά επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό, επαρκούσε για την ανάπτυξη απομετάλλωσης του σκελετού, που οδηγεί σε ευθραυστότητα των οστών και κίνδυνο καταγμάτων (Satarug, 2004). Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Honda, 2003) δε βρέθηκε σχέση μεταξύ οστικής μάζας και νεφρικής



δυσλειτουργίας (απέκκριση β_2 -μικροσφαιρίνης), οπότε θα μπορούσε η δράση του καδμίου να είναι πρωτογενώς στα οστά ανεξάρτητα από τη δράση του στους νεφρούς. Πάντως το ανώτατο όριο ανοχής Cd προς αποφυγή νεφρικής δυσλειτουργίας είναι 50mg/g υγρού βάρους (ww) στο νεφρό (Satarug, 2000).

Μέσες τιμές καδμίου στο ολικό αίμα είναι συνήθως 0.1-0.15 $\mu\text{g}/\text{dl}$, ενώ στο φλοιό του νεφρού όπου και συσσωρεύεται είναι 10-30 $\mu\text{g}/\text{g}$ υγρού βάρους (ww). Σε άτομα που έχουν εκτεθεί σε κάδμιο, η παρουσία MT στα ούρα είναι καλός δείκτης της συγκέντρωσης καδμίου στα ούρα, όπως και του συνολικού σωματικού φορτίου. Στις γυναίκες μάλιστα εμφανίζονται υψηλότερα επίπεδα MT στα ούρα (Nordberg, 1998). Η συγκέντρωση καδμίου αυξάνει με την ηλικία (παρουσιάζοντας ελάχιστες τιμές κατά τη γέννηση) έως τα 40-50 έτη και κατόπιν μειώνεται, λόγω εκφύλισης της επαναροφητικής λειτουργίας του νεφρού. Παράλληλα μειώνονται και τα επίπεδα MT στους νεφρούς, υποστηρίζοντας την πιθανότητα η ικανότητα σύνθεσης νεφρικής MT να εξαρτάται από την ηλικία. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες οι Αυστραλοί ηλικίας 41-50 ετών παρουσιάζουν 1.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww καδμίου στο ήπαρ και 26 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww στο φλοιό των νεφρών, με αντίστοιχες τιμές στους Ιάπωνες 2 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww καδμίου στο ήπαρ και 70 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww στο φλοιό των νεφρών, και στους Καναδούς 1.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww καδμίου στο ήπαρ και 41 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww στο φλοιό των νεφρών (Satarug, 2004).

Οι καπνιστές διαθέτουν 4-5 φορές υψηλότερα επίπεδα Cd στο αίμα (1.5 $\mu\text{g}/\text{l}$) και διπλάσια έως τριπλάσια (20-30 $\mu\text{g}/\text{g}$ ww) στο φλοιό των νεφρών από τους μη καπνιστές (Jarup, 1998). Οι αρνητικές επιπτώσεις του καπνίσματος στην ανδρική όσο και στη γυναικεία γονιμότητα θεωρούνται επίσης ως αποτέλεσμα της τάσης του καδμίου που προέρχεται από τον καπνό να συσσωρεύεται στο γεννητικό σύστημα των καπνιστών. Το κάπνισμα σε πειραματόζωα αύξησε την καταστροφή των ωοθυλακίων και επιτάχυνε την απώλεια της αναπαραγωγικής λειτουργίας (Sharara, 1998). Στις γυναίκες, το κάπνισμα σχετίστηκε με ταχύτερη απώλεια ωοθυλακίων και πρόωρη είσοδο στην κλιμακτήριο, ενώ κατά την κύηση (και με υψηλότερα επίπεδα καδμίου στα ούρα) έχει σχετιστεί με πρόωρο τοκετό και χαμηλό βάρος γέννησης (πιθανώς λόγω του πρόωρου τοκετού). Περιβαλλοντική έκθεση κατά την κύηση σχετίζεται με αυτόματες αποβολές, αναιμία και τοξαιμία (Patrick, 2003). Πάντως το κάδμιο δε φαίνεται να διαπερνά το φραγμό του ανθρώπινου πλακούντα και έτσι ενδομήτρια το έμβryo προστατεύεται από την έκθεση σε κάδμιο. Αντίθετα κατά το θηλασμό, το κάδμιο στο μητρικό γάλα αντανακλά την έκθεση της μητέρας και παρουσιάζει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με το περιεχόμενο ασβέστιο στο γάλα (Satarug, 2004). Στους άνδρες εκδηλώνεται ως αλλαγή της ποιότητας του σπέρματος (μείωση στον όγκο του σπέρματος, στην πυκνότητα και κινητικότητά του, στη φυσιολογική μορφολογία και βιωσιμότητά του), ενώ μπορεί ακόμη να οδηγήσει σε βλάβες των σπερματοφόρων σωληναρίων (Benoff, 2000).

Για τους μη καπνιστές οι τροφές είναι η σημαντικότερη πηγή καδμίου. Τροφές στις οποίες απαντάται είναι τα λαχανικά και τα δημητριακά,



λιγότερο το κρέας και τα ψάρια, ενώ μαλάκια και καρκινοειδή μπορεί να συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες. Το 1961, ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO-Food and Agriculture Organization) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) καθιέρωσαν τον Κώδικα Τροφίμων (Codex Alimentarius) για να θεσπιστεί διεθνής νομοθεσία για τα τρόφιμα. Τον Οκτώβριο του 2001 στην Επιτροπή του Κώδικα Τροφίμων για τα Πρόσθετα και τους Ρυπαντές των Τροφών (CCFAC) συμφωνήθηκαν οι αρχές για την θέσπιση ανώτατων ορίων (MLs) για τους ρυπαντές στα τρόφιμα, όπως το Cd και τον Pb. Αντίστοιχα η Οδηγία ΕΕ 466/2001 της 8-3-2001, η οποία εφαρμόζεται από τον Απρίλιο του 2002, ορίζει τα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια πιο λεπτομερώς (Berg, 2002). Στη χώρα μας αντίστοιχα, η απόφαση του Ανώτατου Χημικού Συμβουλίου 77/1999 (ΦΕΚ 2108/Β/3-12-99) καθόριζε ανώτατα επιτρεπόμενα όρια καδμίου για τα μαλάκια (1.5 mg/kg), τα οποία έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν κάδμιο από το περιβάλλον τους και αποτελούν πηγή ανησυχίας για τους καταναλωτές. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έθεσε νέα αντίστοιχα όρια για τα δίθυρα μαλάκια στο 1 mg/kg, στην Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, ορίστηκαν στα 2 mg/kg το 2000, ενώ στην Αμερική (ΗΠΑ, Καναδά) δεν έχουν οριστεί ακόμη (Satarug, 2004).

Το κάδμιο μεταφέρεται με υψηλούς ρυθμούς από το έδαφος στα φυτά και υπάρχουν συγκεκριμένα είδη που συσσωρεύουν μεγάλα ποσά από έδαφος χαμηλής περιεκτικότητας (Hu, 2000). Λόγω αυτής της υψηλής μεταφοράς καδμίου από το έδαφος στα φυτά, η έκθεση σε κάδμιο από τις τροφές αναμένεται να αυξηθεί στα επόμενα 10-20 χρόνια. Μάλιστα το Τμήμα Καταγραφής Τοξικών Ουσιών και Ασθενειών (ATSDR) του Αμερικανικού Υπουργείου Υγείας κατατάσσοντας τους συνδυασμούς των χημικών που απαντώνται στο περιβάλλον και αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία τοποθέτησε το αρσενικό και το κάδμιο στην πρώτη επτάδα των 275 πιο επικίνδυνων ουσιών στο περιβάλλον (Patrick, 2003) και διαπίστωσε ότι μέσα στους συχνότερους συνδυασμούς βρισκόταν το Cr, Cd και Pb (12%) στο έδαφος (Fay, 1996). Ακόμη σύμφωνα με μελέτη στη Σουηδία η συγκέντρωση Cd στη γεωργική γη αυξάνει συνεχώς με ρυθμό 0.2% ετησίως, όπως και στους νεφρούς αγροτικών ζώων, με ρυθμό μάλιστα 2% στους χοίρους (Jarup, 1998). Βέβαια η πρόσληψη των μετάλλων από τα φυτά εξαρτάται άμεσα από τη φύση του εδάφους και ειδικά από το pH, γιατί η διαλυτότητα των μετάλλων αυξάνει σε όξινα εδάφη, επομένως και η απορρόφησή τους. Στα φυτά, συνήθεις επιπτώσεις του καδμίου είναι η μείωση παραγωγής της βιομάζας στις ρίζες των δημητριακών (βρώμη, σιτάρι), η μείωση της ικανότητας των μυκήτων του περιριζικού συστήματος αυτών των φυτών να διασπούν την κυτταρίνη, η συγκέντρωσή του στις πηκτίνες του κυτταρικού τοιχώματος στις ρίζες δημητριακών (αραβόσιτος) και η αναστολή της ανάπτυξης του φυτού προκαλώντας χλώρωση και νέκρωση (Kalfakakou, 1987).

Η έκθεση του ανθρώπου σε κάδμιο έχει σχετιστεί με νεφρικές παθήσεις, υπέρταση, οστεοπόρωση, λευχαιμία, καρκίνο του πνεύμονα, των νεφρών, της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος, του μαστού και του προστάτη (Henson, 2004). Μάλιστα το αρσενικό και το κάδμιο, μαζί με τον



υδράργυρο και τον μόλυβδο αποτελούν τα πιο πιθανά αίτια ασθενειών που σχετίζονται με μέταλλα στην πρωτοβάθμια περιθαλψη (Hu, 2000). Ακόμη το κάδμιο έχει συνδεθεί με ελαφρά αναιμία λόγω του ανταγωνισμού του με τον σίδηρο. Μετά από χρόνια τοξίκωση με κάδμιο αναφέρονται δυσλειτουργίες στα φαγοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, μεταβολές στη φαγοκυτταρική δραστηριότητα, αναστολή της μετακίνησης των μακροφάγων και μείωση της κινητικότητάς τους και αναστολή της αντι-ογκογόνου ανοσίας από μακροφάγα.

Η έκθεση σε υψηλές τιμές σωματιδίων του αέρα έχει σχετιστεί με μειωμένη ποιότητα σπέρματος, με τα ιόντα Cd^{2+} να είναι κοινά συστατικά των σωματιδίων αυτών και κατά προτίμηση να συσσωρεύονται στα όρνεα αναπαραγωγικά όργανα. Αντίθετα η επαγγελματική έκθεση σε Cd^{2+} σχετίστηκε με αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του προστάτη, καθώς σε κυτταρικές σειρές, αλλά και πειραματόζωα έχει αποδειχτεί σχέση μεταξύ καδμίου και κακοήθους εξαλλαγής των επιθηλιακών κυττάρων του προστάτη, αλλά όχι με σημαντική μείωση της ποιότητας σπέρματος (Benoff, 2000). Πάντως σε επιδημιολογικές μελέτες στον άνθρωπο δεν έχει παρατηρηθεί αναπαραγωγική τοξικότητα αν και σε χαμηλές δόσεις θεωρείται ύποπτο για ενδοκρινή διαταραχή (Satoh, 2002).

Η έκθεση σε Cd *in vivo* μπορεί να προκαλέσει οξεία θανατηφόρο ηπατοκυτταρική νέκρωση σε επίμυες και αλλοιώσεις στους πνεύμονες, νεφρούς, όρχεις και τον γαστρεντερικό σωλήνα (Sauer, 1997). Στα αναπαραγωγικά όργανα και έμβρυα επίμυων προκάλεσε εκτεταμένες βλάβες, οίδημα και νέκρωση των όρχεων, μείωση της κινητικότητας του σπέρματος, νέκρωση των σπερματογωγών, βλάβες στα κύτταρα Sertoli, μείωση της τεστοστερόνης στον ορό, αποβολή και τερατογένεση του εμβρύου. Η τοξικότητα στο έμβρυο μπορεί να οφείλεται σε βλάβη του πλακούντα ή σε συσσώρευση Cd στο έμβρυο. Επίσης σε επίμυες η πρώιμη έκθεση σε κάδμιο προκάλεσε ταχεία απόκτηση βάρους και πρώιμη εφηβεία (Johnson, 2003).

Επίσης σε χαμηλές δόσεις μακροχρόνια επάγει ασθένειες του κυκλοφορικού (υπέρταση και αρτηριοσκλήρυνση) σε πειραματόζωα, χωρίς νεφρική δυσλειτουργία, ενώ σε χαμηλές δόσεις μακροχρόνια στον άνθρωπο επάγει νεφρική δυσλειτουργία (ανεπάρκεια τελικού σταδίου), πρώιμη έναρξη νεφρικών επιπλοκών σε διαβητικούς, διαταραχή της ρύθμισης της αρτηριακής πίεσης και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου (Satarug, 2004). Αντίστοιχα, οι υπερτασικοί εκκρίνουν στα ούρα τους περισσότερο Cd, ενώ οι ασθενείς που πάσχουν από Itai Itai σπάνια πάσχουν από υπέρταση, οπότε ενδέχεται η δυσλειτουργία της επαναρρόφησης των νεφρικών σωληναρίων να σχετίζεται με τη ρύθμιση της πίεσης του αίματος (Satoh, 2002).

Η οξεία εισπνοή καδμίου προκαλεί βρογχίτιδα, πνευμονίτιδα και ηπατική τοξαιμία και μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατο. Η χρόνια εισπνοή καδμίου λόγω επαγγελματικής απασχόλησης ή λόγω του καπνίσματος σχετίζεται ακόμη με το εμφύσημα, που αποτελεί μία ασθένεια που χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη διαταραχή του συνδετικού ιστού του πνεύμονα και οδηγεί σε μείωση της χωρητικότητάς του (Yang, 1997).



Ακόμη, έκθεση σε 30-50 μg ημερησίως έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων των οστών, καρκίνου, νεφρικής δυσλειτουργίας και υπέρτασης (λόγω πιθανολογούμενης δράσης του στα λεία μυοκύτταρα των αγγείων, άμεσα ή έμμεσα). Επομένως ασφαλή όρια ημερήσιας πρόσληψης καδμίου θα έπρεπε να είναι κάτω των 30 μg (Satarug, 2003). Δεδομένου ότι υπάρχουν ατομικές διαφορές στην απορρόφηση του μετάλλου και στην ευαισθησία έναντι στην τοξικότητά του, ακόμα και αυτή η τιμή ημερήσιας πρόσληψης θα μπορούσε να οδηγήσει ένα 1% του πληθυσμού σε ελαφρά νεφρική δυσλειτουργία (Satarug, 2000). Καθώς ήδη πολλά άτομα στην Ευρώπη έχουν υπερβεί τα ασφαλή όρια έκθεσης σε κάδμιο απαιτούνται μέτρα μείωσης της έκθεσης του γενικού πληθυσμού (Jagup, 2003).

Πίνακας 2: Οι δυσμενείς δράσεις του καδμίου στους ανθρώπους (από Fergusson, 1990).

Έκθεση	Όργανο	Δράση	Σχόλια
Οξεία	Πνεύμονες	Βρογχίτιδα, πνευμονίτιδα, μπορεί να αποβεί θανατηφόρο	
	Γαστρεντερικός σωλήνας	Ναυτία, έμετος, κοιλιακοί πόνοι, γαστρεντερίτιδα, ίλιγγος μπορεί θανατηφόρο	
Χρόνια	Ήπαρ	Τοξαιμία	
	Πνεύμονες	Εμφύσημα	
	Νεφροί	Πρωτεϊνουρία, αμινοξυουρία, φωσφατουρία, γλυκοζουρία, Cd στα ούρα, πέτρες στους νεφρούς	Λόγω δυσλειτουργίας εγγύς σωληναρίων και σπειραμάτων
	Οστά	Έντονοι πόνοι, παθολογικά κατάγματα, οστεομαλακία	Ίσως απαιτούνται και ελλείψεις βιταμίνης D και διατροφικές
	Ένζυμα	Απενεργοποίηση	Υποκατάσταση Zn από Cd
	Αίμα	Υπέρταση Αναιμία	Σε ζώα το Cd ανταγωνίζεται με Fe
	Προστατικός αδένας	Καρκίνος	Επιβεβαίωση;
	Άλλα μέταλλα	Δημιουργεί έλλειψη	

Η προτεινόμενη τιμή ημερήσιας πρόσληψης καδμίου σύμφωνα με τον FAO/WHO είναι τα 70 μg ημερησίως (7 $\mu\text{g}/\text{κίλο}$ σωματικού βάρους την εβδομάδα) (Satarug, 2004). Η μέση ημερήσια πρόσληψη βέβαια κυμαίνεται, ανάλογα με την ενεργειακή πρόσληψη και τις διαιτητικές συνήθειες του ατόμου, καθώς διαίτα πλούσια σε ίνες ή σε κατανάλωση



οστράκων αυξάνει σημαντικά την πρόσληψη καδμίου, καθώς και με άλλους παράγοντες όπως οι διαφορές στις διαιτητικές συνήθειες διαφορετικών πληθυσμών και η γεωγραφική κατανομή των μετάλλων (Hu, 2000). Στη Σουηδία η μέση ημερήσια πρόσληψη είναι περίπου 15 μg (Jarup, 1998), ενώ η έκθεση του γενικού πληθυσμού της Ιαπωνίας, όπου στο παρελθόν υπήρξαν σοβαρές περιπτώσεις ρύπανσης καδμίου, μέσω της τροφής, είναι 25-30 μg ημερησίως. Οι τιμές αυτές είναι σαφώς μειωμένες σε σχέση με τα προηγούμενα 25 χρόνια, εν τούτοις εξακολουθούν να είναι υψηλότερες από τα επίπεδα άλλων πληθυσμών της Ασίας που η διαίτα τους βασίζεται επίσης στο ρύζι. Πάντως το κάδμιο που προέρχεται από την κατανάλωση ρυζιού, αποτελεί το 30-40% του συνολικού καδμίου που προσλαμβάνεται μέσω τροφής στους Ασιάτες (Ikeda, 2004).

Οι παράγοντες που ενδέχεται να συντελούν στη χρόνια τοξίκωση από Cd είναι η κακή διατροφή και η έλλειψη βιταμίνης D. Η παρέμβαση του καδμίου πιθανώς να επηρεάζει δυσμενώς το μεταβολισμό ασβεστίου, φωσφορικών ιόντων και βιταμίνης D στον οργανισμό, ενώ η χορήγηση βιταμίνης D ανακουφίζει από τα συμπτώματα της χρόνιας τοξίκωσης με κάδμιο (Hu, 2000). Οξεία δηλητηρίαση από στοματική λήψη καδμίου (10 mg μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά συμπτώματα) έχει σαν αποτέλεσμα ναυτία, σιελόρροια, εμέτους, διάρροια, ίλιγγο και κοιλιακούς πόνους, ενώ μεγαλύτερες δόσεις μπορεί να προκαλέσουν απώλεια των αισθήσεων και θάνατο (>350-500 mg). Η τοξικότητα του καδμίου που λαμβάνεται από το στόμα περιορίζεται κατά ένα ποσοστό, λόγω του εμέτου που μπορεί να προκαλέσει. Κατά την οξεία επαγγελματική έκθεση μπορεί να εμφανιστεί δυσουρία, πολυουρία, δύσπνοια, στηθάγχη, κόπωση και ζάλη.

Η πιο γνωστή περίπτωση χρόνιας δηλητηρίασης από μακρόχρονη έκθεση σε χαμηλή δόση καδμίου (που αποτελεί μία κυρίως βιομηχανική ασθένεια) εκδηλώθηκε κατά μήκος του ποταμού Jinzu (Jintsu) της Ιαπωνίας κι έγινε γνωστή ως νόσος Itai Itai. Η περιοχή ήταν κοντά σε ένα παλιό εγκαταλελειμμένο ορυχείο μη σιδηρούχων ορυκτών (ψευδαργύρου) και αρκετές εκατοντάδες ανθρώπων πέθαναν κατόπιν δηλητηρίασεως με κάδμιο. Ένα χαρακτηριστικό της δηλητηρίασεως με κάδμιο εκτός της νεφροτοξικότητάς του είναι η ευθραυστότητα των οστών (οστεομαλακία), τα παθολογικά κατάγματα και οξύς πόνος στις αρθρώσεις (Hay, 1992).

Οι υψηλότερες τιμές ημερήσιας πρόσληψης καδμίου που έχουν αναφερθεί, ήταν στα τέλη της δεκαετίας του 1960, στον τοπικό πληθυσμό του ποταμού Jinzu της Ιαπωνίας, όπου η ασθένεια Itai Itai ήταν ενδημική, και η ημερήσια πρόσληψη Cd έφτανε τα 600 μg , ενώ αντίστοιχα σε άλλες ρυπασμένες περιοχές έφτανε τα 300 μg και στις καθαρές περιοχές τα 100 μg . Όταν το ρυπασμένο έδαφος αντικαταστάθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970, οι τιμές της ημερήσιας πρόσληψης έπεσαν κάτω από τα 100 μg και σήμερα είναι κάτω των 30 μg (Ikeda, 2004). Πάντως τα επίπεδα καδμίου στις ασθενείς που έπασχαν από τη νόσο Itai Itai εμφανίζονταν υψηλότερα στο ήπαρ (πίνακας 3).



Πίνακας 3: Επίπεδα καδμίου στους ιστούς γυναικών που έπασχαν από Itai Itai (από Fergusson, 1990).

Ιστός	Συγκέντρωση $\mu\text{g/g}$ (ww)
Οστά	1.6-2.8
Εγκέφαλος	0.6
Ήπαρ	63.3-132
Πνεύμονες	2.1-8.0
Μυς	14.1
Πάγκρεας	5.2-64.7
Φλοιός νεφρού	12-41.1
Δέρμα	3.9-5.1

Στη χώρα μας ένα ανησυχητικό κρούσμα διατροφικής μόλυνσης με κάδμιο διαπιστώθηκε πρόσφατα από το Ελληνικό Ινστιτούτο Υγιεινής και Ασφάλειας της Εργασίας. Σύμφωνα με μετρήσεις το καλοκαίρι του 2004 σε δείγμα 557 μεταλλικών ψυκτών νερού, σε 6% του συνόλου το νερό είχε περιεκτικότητα σε κάδμιο υψηλότερη από τα επιτρεπόμενα όρια και οι ψύκτες τέθηκαν εκτός λειτουργίας μέχρι να διαπιστωθεί εάν είναι ασφαλείς από νέες μετρήσεις.



III. ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ Cd

Σε κυτταρικό επίπεδο οι δράσεις του καδμίου είναι ποικίλες. Μπορεί να επηρεάζει διάφορες μεταβολικές διεργασίες ειδικά τον ενεργειακό μεταβολισμό, τη μεταφορά μέσω της μεμβράνης και την πρωτεϊνοσύνθεση. Μπορεί να δρα στο DNA άμεσα ή έμμεσα, με ενεργοποίηση της ενδονουκλεάσης της εξαρτώμενης από Ca^{2+} προκαλώντας κατακερματισμό του DNA ή παρεμβαίνοντας στο γενετικό έλεγχο και τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), όπως ανιόντων οξυγόνου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και υδροξυλίου, ικανών επαγωγών της απόπτωσης, επίσης σχετίζεται με την κυτταροτοξικότητά του και σύμφωνα με κάποιες έρευνες και τα συμπλέγματα Cd-MT μπορεί να επάγουν ROS που προκαλούν βλάβες στο DNA. Οι βλάβες περιλαμβάνουν επίσης αυξημένη υπεροξειδωση λιπιδίων, διαταραχές αντιοξειδωτικών μηχανισμών και μεταβολές στην ομοιόσταση του ασβεστίου και των σουλφυδρυλομάδων. Το Cd έμμεσα προκαλεί κυτταρική δυσλειτουργία μέσω της διαταραχής σημαντικών ενζυμικών μηχανισμών, όπως της ηπατικής γλουταθειόνης και αναστολής αντιοξειδωτικών ενζύμων (Szuster-Ciesielska, 2000).

Η παραιτηρούμενη κυτταροτοξικότητα του Cd εξαρτάται από τον χρόνο έκθεσης, την συγκέντρωση και την κυτταρική σειρά. Οι μελέτες κυτταροτοξικότητας μπορούν να προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την εκτίμηση της τοξικότητας των μετάλλων. Συνοπτικά, πριν τη χρήση μιας κυτταρικής σειράς ως εργαλείο διερεύνησης της κυτταροτοξικότητας, θα πρέπει να εφαρμόζονται πιλοτικές δοκιμασίες, καθώς τα αποτελέσματα μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ακόμη και ανάμεσα σε παρόμοιες κυτταρικές σειρές.

1. Αναστολή πολλαπλασιασμού

Ο πολλαπλασιασμός των κυτάρων είναι ένα χρήσιμο σημείο ελέγχου στις μελέτες τοξικότητας *in vitro* καθώς κάθε βλάβη στο κύτταρο μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε χαμηλές δόσεις τα μέταλλα μπορούν να τροποποιήσουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση με αύξηση ή καταστολή της απόπτωσης.

Το κάδμιο σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (1μM) επάγει τη σύνθεση του DNA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διάφορες κυτταρικές σειρές, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι ανασταλτικές. Επίσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις του ενισχύει την έκφραση πολλών γονιδίων όπως των πρωτοογκογονιδίων c-fos, c-jun, c-myc, του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και των γονιδίων που κωδικοποιούν για τη σύνθεση προστατευτικών μορίων όπως MT, γλουταθειόνης και στρες πρωτεϊνών (θερμικού σοκ)(Beyersmann, 1997). Φαίνεται ότι το c-fos γονίδιο μπορεί να παίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της κυτταροτοξικότητας του Cd. Για την επαγωγή της MT, που παίζει ρόλο κλειδί στην αποτοξικοποίηση των μετάλλων και περιέχει λειτουργικές θέσεις του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 στον υποκινητή της, δεν φαίνεται να είναι ουσιώδες το c-fos γονίδιο.



Μπορεί να εμπλέκεται στη γενικότερη προστασία του κυττάρου, ειδικά έναντι σε βλάβες του DNA από περιβαλλοντικό στρες όπως από μέταλλα ή να συμβάλλει στην κυτταρική αναγέννηση (Matsuoka, 2000).

Ορισμένα πρωτοογκογονίδια, τα οποία μεταφέρουν ρυθμιστικά σήματα αύξησης από την κυτταρική επιφάνεια προς τον πυρήνα, ενεργοποιούνται κατόπιν έκθεσης των κυττάρων σε μιτωτικά σήματα, αλλά και σε μη μιτωτικές αποκρίσεις στρες. Το Cd, θα μπορούσε να ενεργοποιεί τέτοια πρωτοογκογονίδια.

2. Απόπτωση

Η απόπτωση (ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) σε αντίθεση με τη νέκρωση, τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το στρες, είναι ένα φυσιολογικό και κρίσιμο γεγονός για τις διαδικασίες ανάπτυξης που απαιτούν απομάκρυνση των κυττάρων. Η απόπτωση διαφέρει από τη νέκρωση, κυρίως λόγω της ενεργούς συμμετοχής του κυττάρου στην όλη διαδικασία, και ξεχωρίζει λόγω της ενεργοποίησης μίας οικογένειας πρωτεασών κυστεΐνης-ασπαρτικού (κασπάσες), οι οποίες κόβουν διάφορες πρωτεΐνες και οδηγούν έτσι το κύτταρο σε χαρακτηριστικές αλλαγές. Οι αλλαγές αυτές αφορούν εμφάνιση συγκεκριμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών όπως συμπύκνωση της χρωματίνης στην πυρηνική μεμβράνη, πυρηνικό και κυτταρικό κατακερματισμό και ακόμη ορισμένα βιοχημικά χαρακτηριστικά όπως το σπάσιμο του DNA σε ολιγονουκλεοσωμικά κλάσματα. Ο ενδοπυρηνικός κατακερματισμός του DNA από μία ενδογενή νουκλεάση, που είναι το σημείο κλειδί για την απόπτωση, είναι ένας πιθανός στόχος του Cd μέσω άμεσης επαγωγής αυτής της ενδονουκλεάσης (Tsangaris, 1998b).

Σύμφωνα με μελέτες τα μιτοχόνδρια παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην απόπτωση. Τα οργανίδια αυτά αποτελούν στόχο αρκετών ερεθισμάτων “θανάτου” που επάγουν την απελευθέρωση πρωτεϊνών όπως του κυτοχρώματος c. Το κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα προσδένεται στο μόριο Apaf-1, το οποίο ολιγομερίζεται και ενεργοποιεί την προ-κασπάση-9. Η κασπάση-9 ενεργοποιεί με τη σειρά της την προ-κασπάση-3 και -7 (Robertson, 2000).

Γονιδιακά προϊόντα όπως της οικογένειας γονιδίων bcl-2 και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 έχουν σημαντική ρυθμιστική επίδραση στην κυτταρική απόπτωση (Deng, 1998). Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια επηρεάζεται από την οικογένεια των bcl-2 πρωτεϊνών διαφορετικά, με την Bax να διευκολύνει τη διαδικασία, ενώ η Bcl-2 να την ανταγωνίζεται (Robertson, 2000). Ο p21 (αναστολέας κινασών εξαρτώμενων από την κυκλίνη, CDK, που είναι ένζυμα απαραίτητα για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου) επίσης έχει σχετιστεί με την απόπτωση, αν και δεν είναι γνωστό αν δρα ως αναστολέας ή επαγωγέας την απόπτωσης. Η μεταγραφική ή μετα-μεταγραφική επαγωγή του p21, εξαρτώμενη ή όχι από το p53, συμβάλλει στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης και μεσολαβεί στην παύση της κυτταρικής αύξησης (Jiang, 1998).



Το κάδμιο επάγει αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο στα κύτταρα και η τοξικότητά του διαφέρει ανάλογα με την κυτταρική σειρά και το χρόνο έκθεσης. Σε κύτταρα γλοιομάτος ο ενδοπυρηνικός κατακερματισμός του DNA συνέβη μετά από 40 ώρες δόσο-εξαρτώμενα σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1-100μM, με μείωση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις λόγω διαδικασιών νέκρωσης, η αποπτωτική συμπύκνωση της χρωματίνης και ο πυρηνικός κατακερματισμός παρατηρήθηκε στις 48 ώρες με χορήγηση 2.5μM, ενώ 1μM προκαλούσε βλάβες στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Άλλα τοξικά μέταλλα δεν προκαλούσαν απόπτωση εκτός από τον Zn σε υψηλές συγκεντρώσεις, άνω των 150μM (Watjen, 2002a). Σε 3T3 εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού η απόπτωση που επάγεται από το Cd αναστέλλεται με την υπερέκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (Watjen, 2002b).

Σε κυτταρική σειρά T λεμφοκυττάρων χαμηλές συγκεντρώσεις Cd ασκούν την τοξική τους δράση με αποπτωτικές διαδικασίες. Καθώς η απόπτωση είναι το κύριο γεγονός που ρυθμίζει τις διαδικασίες ανάπτυξης στο ανοσοποιητικό σύστημα, ο διαφορετικός ρυθμός αποπτωτικού θανάτου που επάγεται από το Cd μπορεί να διαταράσσει τη φυσιολογική διαδικασία ανάπτυξης και να προκαλεί κακοήθεια στο σύστημα αυτό (Tsangaris, 1998b). Σε καλλιέργειες από κύτταρα νεφρού χοίρου LLC-PK1 προσθήκη 10μM Cd επάγουν απόπτωση, ενώ έκθεση των κυττάρων σε 50μM Cd για 24h επάγει την παραγωγή MT (Ishido, 1999). Σε κύτταρα ηπατώματος ανθρώπου η επαγωγή της MT μειώνει το ρυθμό απόπτωσης που προέρχεται από το Cd (Shimoda, 2001).

Το κάδμιο επάγει απόπτωση μέσω οξειδωτικού στρες. Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου που παράγονται μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και εμπλοκή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 στην διαδοχή των γεγονότων που σχετίζονται με την τοξικότητα του καδμίου (Stohs, 2000). Συνθήκες που μειώνουν τα αντιοξειδωτικά συστήματα του κυττάρου αναμένεται να ευνοούν την απόπτωση, ενώ αυξημένα επίπεδα αντιοξειδωτικών αναμένεται να την αναστέλλουν (Deng, 1998). Πάντως η διατήρηση της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ επαγωγής και αναστολής της απόπτωσης είναι κρίσιμη για τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, καθώς η απόπτωση είναι ένα μέσο απομάκρυνσης των κυττάρων με βλάβες στο DNA ή με απορύθμιση της αύξησής τους, που θα μπορούσαν να γίνουν πρόδρομα κακοηθών κλώνων.

Σε πρωτογενή επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα η αποπτωτική δράση του καδμίου φαίνεται να οφείλεται σε άλλο μηχανισμό, μέσω της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (Lag, 2002). Φυσιολογικά ο p53 (ογκοκατασταλτικός παράγων μεταγραφής) προσφέρει ένα σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου δίνοντας το χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει γενετικές αλλαγές πριν από τη διενέργεια κρίσιμων φάσεων του κυττάρου όπως την αντιγραφή του DNA και την κυτταρική διαίρεση. Η έκθεση σε κάδμιο κάνει τα κύτταρα να συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ακόμα και μετά την έκθεση σε ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες που καταστρέφουν το DNA. Αυτή η παύση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και των διαδικασιών επιδιόρθωσης όπου μετέχει ο p53



αυξάνει τελικά τον αυτόματο και επαγόμενο ρυθμό των μεταλλάξεων και τον αριθμό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών (Eneman, 2000). Η διαδοχή της απόπτωσης από τη νέκρωση παρουσιάζεται ως μία όψιμη δράση του μετάλλου.

3. Βιωσιμότητα

Μία παράμετρος που συχνά μελετάται στην εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των μετάλλων είναι η βιωσιμότητα των υπό εξέταση κυττάρων.

Σε καλλιέργειες χονδροκυττάρων, το Cd επιδεικνύει άμεση τοξικότητα σε συγκεντρώσεις άνω των 5μM, ενώ ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0.25μM) προκαλεί σημαντική μείωση του DNA λόγω κατακερματισμού του. Ακόμη προκαλεί μείωση στη σύνθεση ενδοκυττάρων πρωτεϊνών και πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας και επαγωγή MT μετά από έκθεση σε 0.1μM Cd και 200μM Zn (Litchfield, 1998). Επίσης, σε μακροφάγα κύτταρα J774A.1 *in vitro* η τοξικότητα του Cd εκφράζεται άμεσα ως κατακερματισμός του DNA μέσω της παραγωγής δραστικών ριζών ανιόντος υπεροξειδίου και οξειδίου του αζώτου, δηλαδή μέσω οξειδωτικού στρες. Σε έκθεση σε 0.6μM Cd επί 48 ώρες η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε κατά 50% και η παραγωγή των ανιόντων διπλασιάστηκε (Hassoun, 1996).

Σε περιφερικά κύτταρα αίματος ανθρώπου η τοξικότητα του Cd ήταν εμφανής σε υψηλές συγκεντρώσεις, στα μονοπύρηνα σε έκθεση άνω των 50μM (με εκθετική δράση ανάλογα με τη δόση του μετάλλου), ενώ τα πολυμορφοπύρηνα ήταν ακόμη πιο ανθεκτικά, αν και σε αυτές τις υψηλές δόσεις (50-150μM) ενσωμάτωναν μεγαλύτερες ποσότητες Cd, ο οποίος δεν ήταν προσδεδεμένος σε MT. Αντίθετα στα μονοπύρηνα η επαγωγή της MT ήταν ταχύτερη, μόλις 1 ώρα μετά την έκθεση σε 50μM του μετάλλου, με μέγιστη τιμή μέσα σε 4 ώρες (Enger, 1983).

Σύμφωνα με μελέτη της νεφροτοξικότητας του Cd *in vitro* σε κύτταρα εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου ανθρώπινου νεφρού, προκύπτει ότι ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.5-1.0μg/ml Cd) η μείωση στον αριθμό των κυττάρων μερικώς αποκαθίσταται, στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (2-10μg/ml Cd) η παρατηρούμενη μείωση στον αριθμό των κυττάρων είναι αμετάκλητη. Οι μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται περιλαμβάνουν συμπύκνωση της χρωματινής στον πυρήνα (δείγμα έναρξης αποπτωτικών διαδικασιών), απώλεια της δομής των μικρονυλλίων και αποδιοργάνωση των προεκβολών της πλαγίας (lateral) μεμβράνης (Hazen-Martin, 1989).

Σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων από εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο επίμυος η κυτταροτοξικότητα του Cd εμφανίστηκε κατόπιν έκθεσης 4 ωρών στα 129μM (Liu, 1996). Επίσης σε κύτταρα βόειου νεφρού επώαση με 0.1-10μM Cd επί 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα 0-90% κυτταροτοξικότητα, με το 50% της τοξικότητας να εμφανίζεται στη συγκέντρωση των 0.8μM. Η συσσώρευση του Cd ήταν γραμμική για τις πρώτες 6 ώρες έκθεσης, ενώ μετά τις 18 ώρες έφτανε σε ένα πλατώ (Bracken, 1984).



Η ηπατοτοξικότητα του Cd εκτιμήθηκε *in vitro* σε ανθρώπινα εμβρυϊκά ηπατοκύτταρα (WRL-68) σε συγκεντρώσεις 0.5 ή 5μM Cd, επί 24 ώρες ή 7 ημέρες και οι κυτταρικές βλάβες αποδόθηκαν μέσω της δραστηριότητας της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALAT) και του ασπαρτικού (ASAT), η υψηλότερη τιμή των οποίων παρατηρήθηκε στα 5μM Cd επί 24 ώρες. Οι μορφολογικές αλλαγές που προκαλούνται στα ηπατοκύτταρα αφορούν δομικές μεταβολές στην υπερδομή των μιτοχονδρίων και του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ παρατηρείται επίσης ισχυρή επαγωγή MT (Bucio, 1995).

Μετά από έκθεση σε Cd διαπιστώθηκε λειτουργική και δομική διαταραχή του παρακυτταρικού φραγμού του εντερικού επιθηλίου *in vitro* και η επίδραση ήταν δόσο- και χρονο-εξαρτώμενη. Το Cd προκάλεσε αυξημένη παρακυτταρική διαπερατότητα μειώνοντας τη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, με διαταραχή στη δομή και λειτουργία των στενών συνδέσεων τους και τελικά αύξησε την ίδια του τη βιοδιαθεσιμότητα (Duizer, 1999).

4. Διαφορές στην ευαισθησία κυτταρικών σειρών

Σε μελέτες πρόσληψης και τοξικότητας του Cd σε παρόμοιες κυτταρικές σειρές από διαφορετικά είδη αναφέρονται διαφορετικές αποκρίσεις των κυττάρων. Κατά τη σύγκριση εμβρυϊκών ινοβλαστών επίμυος (REF) και ανθρώπινων ινοβλαστών δέρματος (HFW), η επαγωγή της MT και στις δύο κυτταρικές σειρές ακολουθούσε παρόμοιους ρυθμούς σύνθεσης (άρα η ευαισθησία δεν οφείλεται σε διαφορετικά επίπεδα MT). Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συσσώρευση κυτταροπλασματικού Cd μετά από 24ωρη έκθεση σε 1 ή 5μM Cd στα HFW κύτταρα, αλλά στα REF το Cd συσσωρευόταν στον πυρήνα προκαλώντας ενδεχομένως κυτταρικό θάνατο μέσα από βλάβες στις λειτουργίες του πυρήνα (Lin, 1995).

Η επίδραση του Cd και του Pb, γνωστών οστεοτοξινών στον άνθρωπο και σε άλλα είδη, σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος ανθρώπου και επίμυος αποκάλυψε ότι τα κύτταρα επίμυος, στα οποία δεν επαγόταν σύνθεση μεταλλοθειονίνης, ήταν πιο ευαίσθητα στο κάδμιο από του ανθρώπου, όπου το Cd και ο Zn επήγαγαν σύνθεση MT. Αντίθετα τα κύτταρα οστεοσαρκώματος επίμυος ήταν λιγότερο ευαίσθητα στην επίδραση του Pb, ο οποίος προσδενόταν λιγότερο σταθερά ενδοκυττάρια σε μιτοχόνδρια, μικροσώματα και στον πυρήνα των κυττάρων αυτών (Angle, 1993).

Επίσης τα κύτταρα γλοιώματος επίμυος C6 εμφανίζονται πιο ευαίσθητα από τα A549 αδενοκαρκινώματος ανθρώπου (Watjen, 2002a) και κύτταρα προστάτη επίμυος εμφανίζονται 200 φορές πιο ευαίσθητα από ανθρώπινα (Terracio, 1986).

Η κυτταροτοξικότητα του Cd μπορεί να διαφέρει και σε διαφορετικά κύτταρα του ίδιου είδους, όπως εξάλλου συμβαίνει και με άλλα μέταλλα. Για παράδειγμα εμφανίζεται διαφορετική ευαισθησία στην τοξικότητα του Pb ανάμεσα σε διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων *in vitro*. Μάλιστα η νευροτοξικότητα του Pb σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων από γάγγλια



της νωτιαίας (dorsal) ρίζας εμβρύων και ενηλίκων ποντικών εμφανίστηκε πιο έντονη στα μη νευρωνικά κύτταρα από ότι στα νευρωνικά κύτταρα και διέφερε σημαντικά μεταξύ εμβρυϊκών και ενηλίκων κυττάρων (Scott, 1986). Πιο ευαίσθητα μοιάζουν να είναι τα μυελινικά κύτταρα, ακολουθούν οι νευρώνες και τα αστρογλοϊκά κύτταρα, τα οποία μάλιστα προσλαμβάνουν και αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες του μετάλλου ενδοκυττάρια, γεγονός που ενδέχεται να συμβαίνει και *in vivo*. Στους μηχανισμούς εισόδου του Pb μπορεί να συμμετέχουν ένας ανταλλάκτης ανιόντων, κανάλια Ca^{2+} ή άλλες διαδικασίες μεταφοράς (Tiffany-Castiglioni, 1993).

5. Κάδμιο και οξειδωτικό στρες

Το κάδμιο είναι ένα μέταλλο, το οποίο απαντάται στην πρώτη σειρά των στοιχείων μετάπτωσης και του οποίου τα ιόντα δεν καταλύουν αντιδράσεις τύπου Fenton, διότι δε δέχεται ούτε προσφέρει ηλεκτρόνια υπό φυσιολογικές συνθήκες. Έτσι δεν προκαλεί άμεσες οξειδωτικές βλάβες στο DNA.

Το κάδμιο προκαλεί οξειδωτικό στρες μέσω έμμεσου μηχανισμού. Εξαλείφει τη γλουταθειόνη και τις σουλφυδρυλικές ομάδες που δεσμεύουν τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να εντείνεται η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ιόν υπεροξειδίου, ρίζες υδροξυλίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου). Οι ρίζες αυτές με τη σειρά τους οδηγούν σε αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων, τροποποιήσεις στην ενδοκυττάρια οξειδωτική κατάσταση, βλάβες στο DNA και τις μεμβράνες, αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων και απόπτωση (Stohs, 2000).

Τα ιόντα μετάλλων όπως ο Cu, Hg, Ag και Cd που έχουν υψηλή συγγένεια για θειολικές ομάδες διαταράσσουν πολλές μεταβολικές λειτουργίες στο κύτταρο. Σε κύτταρα HeLa κατόπιν επίδρασης αυτών των μετάλλων το ποσό της εξωκυττάριας γλουταθειόνης αυξήθηκε όπως και της ανηγμένης γλουταθειόνης (για τα μέταλλα Hg, Ag και Cd και για συγκεντρώσεις που δεν παρεμβαίνουν στην κυτταρική αύξηση). Αντίθετα η προσθήκη ακόμα και πολύ χαμηλών (1μmol/l) συγκεντρώσεων Cu, ο οποίος καταλύει το σχηματισμό τοξικών ριζών οξυγόνου μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής, μείωσε τις ανηγμένες θειόλες ενδο- και εξωκυττάρια, ένδειξη οξειδωτικού στρες (Hultberg, 1997).

Η κυτταροτοξικότητα του Cd σε κύτταρα V79 κινέζικου hamster συσχετίστηκε με τη μείωση της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης, υποδεικνύοντας ότι η γλουταθειόνη αποτελεί έναν μηχανισμό κυτταρικής άμυνας έναντι της τοξικότητας του Cd. Η επαγωγή των MT από τον Zn απαιτούσε 2 ώρες μετά την έκθεση σε 10μM για να συσσωρευτεί σε ικανοποιητικές ποσότητες προσφέροντας προστασία έναντι της κυτταροτοξικότητας του Cd. Κατά τα φαινόμενα η γλουταθειόνη και οι μεταλλοθειονίνες έχουν συνεργιστικό προστατευτικό ρόλο έναντι της κυτταροτοξικότητας του Cd, η πρώτη ως αρχική, ενδογενής (intrinsic) άμυνα, ενώ η δεύτερη λειτουργεί σε δεύτερο χρόνο, κατόπιν επαγωγής έναντι του στρες από μέταλλα (Ochi, 1988).



Ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα άμυνας στον πνεύμονα περιλαμβάνουν τις δισμουτάσες του υπεροξειδίου για το ανιόν του υπεροξειδίου, την καταλάση για το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης για το υπεροξείδιο του υδρογόνου και την ανηγμένη γλουταθειόνη. Παρουσία σιδήρου, το ανιόν υπεροξειδίου αλληλεπιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου προς σχηματισμό πολύ ενεργών ριζών υδροξυλίου. Η ρίζα του υδροξυλίου, η οποία θεωρείται η πιο ισχυρή από τις ROS, μπορεί να απενεργοποιείται από την MT (Hart, 1995).

Σε κύτταρα καρκινώματος πνεύμονα ανθρώπου A549-T27 επίσης η γλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην πρώιμη προστασία έναντι της τοξικότητας του Cd που εμφανίζεται σε τιμές άνω των 10μM (Kang, 1988). Κατά τον ίδιο τρόπο, η ηπατική γλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία έναντι της τοξικότητας του Cd πριν την έναρξη της σύνθεσης της MT σε ποντίκια (Shimizu, 1990). Η δε ηπατική MT εμφανίζεται μέγιστη σε επίμυες μετά τις 2 ημέρες έκθεσης, κατόπιν χορήγησης Cd *in vivo*, ενώ στο νεφρό αυξάνεται σε μικρότερο βαθμό, αλλά σταθερά για 14 ημέρες μετά την έκθεση (Hiratsuka, 1993).

Ακόμα σε κύτταρα LLC-PK1 νεφρού χοίρου από εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, η γλουταθειόνη μπορεί να έχει έναν προστατευτικό ρόλο έναντι των σοβαρών τοξικών δράσεων του καδμίου που προκαλούνται μετά από έκθεση για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (12-24 ώρες), που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, ενώ η πιο βραχύχρονη δράση του Cd στις διακυτταρικές συνδέσεις που προκύπτει στις 2 ώρες έκθεσης δεν φαίνεται να σχετίζεται με αλλαγές στην ενδοκυττάρια γλουταθειόνη ή στο μεταβολισμό των σουλφυδρυλικών ομάδων (Prozialeck, 1995).

Σε αστεροειδή κύτταρα ήπατος, των οποίων ο φαινότυπος ενεργοποιείται και πολλαπλασιάζονται στις ηπατικές βλάβες και παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία ίνωσης του ήπατος, κατόπιν έκθεσης σε κάδμιο παρατηρούνται οξειδωτικές βλάβες από την υπεροξείδωση των λιπιδίων και την αλλαγή σε αντιοξειδωτικά ένζυμα (υπεροξειδάση γλουταθειόνης, δισμουτάση υπεροξειδίου, καταλάση) καθώς και επαγωγή MT. Έτσι το κάδμιο σε αυτήν την περίπτωση μπορεί να δρα ως προ-οξειδωτικός παράγοντας στο ήπαρ (Carmen, 2002).

Και άλλα μέταλλα εκτός από το Cd ασκούν τη δράση τους μέσω οξειδωτικού στρες. Σε καλλιέργειες από ανθρώπινους ινοβλάστες δέρματος η κυτταροτοξικότητα του Pb είναι μεγαλύτερη από του Al και μάλιστα στα γηραιότερα απ' ότι στα πιο νεαρά κύτταρα και ο μηχανισμός φαίνεται να είναι η υπεροξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης, που αποτελεί πρώιμο δείγμα κυτταρικού τραυματισμού. Σε συγκεντρώσεις μάλιστα των 400μM τα ιόντα των μετάλλων ασκούν μία ομοιάζουσα με αντι-οξειδωτική δράση ή με προ-οξειδωτική δράση στις κυτταρικές μεμβράνες, ανάλογα με τον χρόνο επώασης. Το Al, το οποίο προσλαμβάνεται με τη βοήθεια της τρανσφερίνης ενδοκυττάρια, μπορεί να επάγει την υπεροξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης άμεσα, αλληλεπιδρώντας με ένζυμα που προστατεύουν το κύτταρο από την υπεροξείδωση, όπως την δισμουτάση του υπεροξειδίου και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ή με άμεση αλληλεπίδραση με τις



κυτταρικές μεμβράνες επηρεάζοντας τη φυσική τους κατάσταση και κάνοντάς τις πιο ευάλωτες στις ελεύθερες ρίζες (Dominguez, 1995).

Επώαση καρδιακών μυοκυττάρων σε καλλιέργεια με 100-200 μ M Ab επί 4-18 ώρες επήγαγε υπεροξειδωση των λιπιδίων που μπορούσε να αποφευχθεί με πρώιμη χορήγηση βιταμίνης E ή με ταυτόχρονη προσθήκη άλλων αντιοξειδωτικών ή ενώσεων που περιείχαν θειόλες (γλουταθειόνη, 2-μερκαπτοαιθανόλη). Μετά τις 4 ώρες έκθεσης σε 50-100 μ M Ab τα επίπεδα της γλουταθειόνης των καρδιακών μυοκυττάρων μειώνονταν (Tirmenstein, 1995).

Ακόμη και η κυτταροτοξική επίδραση υψηλών συγκεντρώσεων ψευδαργύρου έχει συνδεθεί με το μεταβολισμό της γλουταθειόνης και το κυτταρικό περιεχόμενο σε ανηγμένη γλουταθειόνη (Walther, 2002).

Η βιταμίνη C, η οποία αυξάνει το κυτταρικό περιεχόμενο σε γλουταθειόνη, μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της τοξικότητας του Cd (Ermidou-Pollet & Pollet, 2000). Άλλος τρόπος προστασίας των κυττάρων, είναι η χορήγηση χηλοποιητών, οι οποίοι μειώνουν την πρόσληψη καδμίου και έτσι καταστέλλουν την τοξικότητα του μετάλλου (Fischer, 1995). Στην περίπτωση του Al η κυτταροτοξικότητά του σε MRC-5 ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα ενισχυόταν όταν συγχορηγούνταν με φυσικούς χηλοποιητές όπως το κιτρικό οξύ, ενώ κατά τη χορήγησή του με EDTA παρατηρήθηκε επίσης κυτταροπροστατευτική δράση (Sauvant, 1999).

6. Κάδμιο και καρκίνος

Το κάδμιο επιδρά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και άλλες κυτταρικές διαδικασίες τροποποιώντας τη γονιδιακή έκφραση και τη μετάδοση του κυτταρικού σήματος ή παρεμβαίνοντας σε αντιοξειδωτικά ένζυμα και παράγοντας δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS). Η δράση του ακόμη θεωρείται υπεύθυνη για αλλαγές τόσο σε επίπεδο μεταγραφής όσο και μετάφρασης.

Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες το κάδμιο προκαλεί άμεσα ή έμμεσα γονοτοξικά γεγονότα όπως σπασίματα στις αλυσίδες του DNA, χιάσματα μεταξύ DNA και πρωτεϊνών, οξειδωτικές βλάβες του DNA, μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανωμαλίες, κυρίως σε υψηλές κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Επιπρόσθετα μπορεί να δράσει ως επαγωγέας καρκίνου και να έχει συνεργιστική γονοτοξική (μιτωγόνο) δράση με την υπεριώδη ακτινοβολία και το βενζοπυρένιο σε κύτταρα θηλαστικών, λόγω της παρεμβολής του σε επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA, αυξάνοντας έτσι τη συχνότητα των μεταλλάξεων. Σε κύτταρα ζύμης μάλιστα των οποίων ο επιδιορθωτικός μηχανισμός του DNA είχε κατασταλεί από χαμηλά επίπεδα καδμίου παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού των μεταλλάξεων κατά 2000 φορές (Jin, 2003).

Πιθανοί στόχοι του καδμίου είναι δομές δακτύλων ψευδαργύρου σε επιδιορθωτικές πρωτεΐνες DNA και μεταγραφικούς παράγοντες, όπου μπορεί να υποκαθιστά τον ψευδάργυρο και να διαταράσσει την σωστή πτύχωση του μορίου, οπότε να οδηγεί σε απώλεια και της λειτουργικότητας



των πρωτεϊνών αυτών. Οι πρωτεΐνες αυτές συνήθως σχετίζονται με τη γονιδιακή έκφραση, τη ρύθμιση της αύξησης και του πολλαπλασιασμού και τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος (Hartwig, 2002a,b, 2001). Το κάδμιο διαταράσσει επίσης την προσκόλληση κυττάρου με κύτταρο μέσω της E-καντερίνης, ενισχύοντας την ανάπτυξη όγκων (Waisberg, 2003). Όσον αφορά τη συνεργιστική του δράση, σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος κατά την έκθεση σε μη κυτταροτοξικές δόσεις καδμίου (0.01-1 μ M) παρατηρήθηκε μόνο μικρή ενίσχυση της γονοτοξικής δράσης του βενζοπυρένιου πιθανώς λόγω αναστολής από ένζυμα CYP (P450) της ενδογενούς μεταβολικής ενεργοποίησης αυτού του καρκινογόνου (Fatur, 2002).

Επίσης λόγω του γεγονότος ότι κύτταρα που υπόκεινται σε χρόνια έκθεση καδμίου αποκτούν αντιοξειδωτική άμυνα μέσω επαγωγής MTs και μία αυξημένη αντίσταση στην απόπτωση που επάγεται από οξειδωτικά, αυτές οι προσαρμογές θα μπορούσαν να αφήνουν άθικτα προκαρκινικά ή νεοπλασματικά κύτταρα, τα οποία τελικά να οδηγούν σε ανάπτυξη καρκίνου, όχι όμως λόγω άμεσης μεταλλαξιγένεσης. Ένας άλλος έμμεσος μηχανισμός θα μπορούσε να είναι η ενεργοποίηση ογκογονιδίων και καταστολή της απόπτωσης από αυτήν την οδό.

Σύμφωνα με άλλες μελέτες το Cd *in vivo* μπορεί να είναι ένας ικανοποιητικός αντικαρκινικός παράγοντας, καθώς εμφανίζει ογκοκατασταλτική δράση σε όγκους ήπατος ποντικού επαγόμενους χημικά (Waalkes 1999, 1996).

Οι ιστοί που παρουσιάζουν μειωμένη ή καμία έκφραση MT είναι πιο ευάλωτοι σε καρκινογένεση από Cd καθώς η MT με τη δέσμευση των μετάλλων προστατεύει τους ιστούς αυτούς από την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων (Shukla, 1998). Σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος έκθεση σε χαμηλές μη κυτταροτοξικές δόσεις καδμίου (0.01-1 μ M) είχε σαν αποτέλεσμα χρονο- και δοσο-εξαρτώμενες βλάβες στο DNA, που όμως μειώνονταν μετά από παρατεταμένη έκθεση λόγω αυξημένης σύνθεσης MT (Fatur, 2002).

Η εισπνοή καδμίου προκαλεί αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα στους επίμυες, σε συμφωνία με τις επιδημιολογικές μελέτες που σχετίζουν την επαγγελματική έκθεση σε κάδμιο και τον καρκίνο του πνεύμονα στον άνθρωπο. Βέβαια πιο πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν μικρότερο σχετικό κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα στις ομάδες που έχουν εκτεθεί σε κάδμιο, απουσία αρσενικού και νικελίου, ενώ δεν έχει επιβεβαιωθεί συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε κάδμιο και καρκίνου του προστάτη (Verougstraete, 2003).

Οι προσαρμογές του πνεύμονα στο κάδμιο μετά από χρόνια έκθεση, που μπορεί να συμβάλλουν στην καρκινογένεση, περιλαμβάνουν υπερπλασία και υπερτροφία τύπου II στα επιθηλιακά αρχέγονα κύτταρα των κυψελίδων, μία φλεγμονώδη απόκριση με πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και αυξημένη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση πολλών παραγόντων αντίστασης, όπως αυξημένη σύνθεση MT, αυξημένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και επαγωγή ενζύμων της σύνθεσης και



μεταβολισμού της. Παρόλα αυτά τα προσαρμοσμένα σε κάδμιο επιθηλιακά κύτταρα των κυψελίδων παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης βλαβών στο DNA, εν μέρει λόγω αναστολής δύο επιδιορθωτικών ενζύμων αποκοπής βάσεων (της 8-οξυγαουανίνη- DNA γλυκοζυλάσης και της ενδονουκλεάσης III). Η μείωση της απόπτωσης που παρατηρείται σε αυτά τα προσαρμοσμένα κύτταρα μπορεί να αφήνει άθικτα προ-νεοπλασματικά και νεοπλασματικά κύτταρα και να ευνοεί την ανάπτυξή τους (Hart, 2001).

Το 1993 το Διεθνές Πρακτορείο για την Έρευνα και τον Καρκίνο (IARC) κατέταξε το Cd στην Κατηγορία 1, δηλαδή στα καρκινογόνα για τον άνθρωπο χημικά. Βέβαια στα ποντίκια οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν μη καρκινογόνο δράση όπως και ορισμένες επιδημιολογικές μελέτες για τον άνθρωπο, οπότε ενδεχομένως αυτή η δράση θα έπρεπε να επανεκτιμηθεί και το Cd να τοποθετηθεί στην Κατηγορία 2A, δηλαδή στα πιθανώς καρκινογόνα για τον άνθρωπο χημικά (Sato, 2002).

7. Κάδμιο και γονιδιακή έκφραση

Είναι γνωστό ότι το Cd επηρεάζει τη μεταγραφή γονιδίων με προστατευτικές λειτουργίες όπως MT που χηλοποιούν τα ιόντα Cd ώστε να τα κάνουν βιολογικά αδρανή, HSP πρωτεΐνες, με ρόλο στην επαναδόμηση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την αιμη-οξυγενάση I με αντιοξειδωτικό ρόλο. Το Cd επίσης επάγει πρωτοογκογονίδια που μπορεί να σχετίζονται με την καρκινογένεση. Η επίδρασή του τέλος στα γονίδια των υποδοχέων των ορμονών του φύλου προκαλεί ενδοκρινή διαταραχή.

Έκθεση κυττάρων HeLa σε 5μM Cd επί 6 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή (upregulation) 46 γονιδίων και την καταστολή 10 γονιδίων, των οποίων τα επίπεδα έκφρασης άλλαξαν. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την προστασία του κυττάρου όπως τα γονίδια των MT, αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών (βαριές και ελαφρές αλυσίδες της φερριτίνης: πρωτεΐνης που περιορίζει τη διαθεσιμότητα του Fe προς σχηματισμό ρίζας οξυγόνου, Mn δισμουτάσης του υπεροξειδίου: ενζύμου που ανάγει το υπεροξειδίο που παράγεται στα μιτοχόνδρια και γGCS συνθετάση της γ- γλουταμυλ-κυστεΐνης: ενζύμου-κλειδί στην βιοσύνθεση της γλουταθειόνης). Επίσης με τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης, πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP): HSP70-1,6,5, HSP40, HSP90β, HSP60-1 για την επαναδόμηση κατεστραμμένων πρωτεϊνών, πρωτεΐνες του συστήματος της ουμπικιτίνης (π.χ. ουμπικιτίνη B) για την αποδόμηση πρωτεϊνών που δεν μπορούν να επαναδομηθούν, και αταξίνη-2 που σχετίζεται με την απόπτωση. Άλλα γονίδια που επάγονται, σχετίζονται με τη μετάδοση του κυτταρικού σήματος (κυτοκίνες), το μεταβολισμό και άλλα. Συνολικά ένας αριθμός γονιδίων ρυθμίζονται προς την επιβίωση από την τοξικότητα του Cd (Koizumi, 2003).

8. Οξείες και χρόνιες δράσεις

Τα μέταλλα σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν άμεσες βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη και τις μεμβράνες οργανιδίων, με συνέπεια την απώλεια του ομοιοστατικού ελέγχου, την παρεμπόδιση του ενεργειακού μεταβολισμού και τον κυτταρικό θάνατο με νέκρωση. Για παράδειγμα η



κυτταροτοξικότητα του Pb αποδόθηκε στις διάφορες βλάβες στη μεμβράνη που προκαλούνται από το μέταλλο. Σε επιθηλιοειδή κύτταρα ο Pb αλλάζει το σχήμα του κυττάρου μεταβάλλοντας τη ρευστότητα του μεμβρανικού δίστοιβου, κάνοντάς το έτσι περισσότερο ευάλωτο σε οσμωτικό σοκ (Dominguez, 1995).

Η συσσώρευση μετάλλων μετά από χρόνια έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις οδηγεί σε άμεσες επιδράσεις, αλλάζοντας τα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος. Ο Pb κατόπιν επίδρασης του σε κύτταρα ηπατώματος διαταράσσει την μεταγωγή του σήματος, την υποβοηθούμενη από γλυκορτικοειδή, στους ηπατικούς ιστούς-στόχους των ορμονών. Οι στόχοι του φαίνεται να αφορούν κυτταρικές διαδικασίες εξαρτώμενες από το ασβέστιο και την μετατροπή της ενεργότητας της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) (Tonner, 1997a).

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις με τη σειρά του το Cd δρα μέσω ενός κενού υποδοχέα Zn για την παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης και απελευθέρωσης Ca από τις ενδογενείς αποθήκες και με αυτόν τον τρόπο επάγει την πρωτεϊνική κινάση C (Tsangaris, 1998b). Σε ινοβλάστες το κάδμιο προκαλεί αύξηση στο κυτταροπλασματικό ελεύθερο Ca και στην έξοδο του Ca, που είναι ανεξάρτητη από την εξωκυττάρια συγκέντρωση του ασβεστίου. Η πρωτεϊνική κινάση C επάγεται άμεσα και από το Pb, ο οποίος όπως και το κάδμιο έχει υψηλή συγγένεια για θέσεις δέσμευσης Ca. Σε κύτταρα γλοιώματος ο Pb διαταράσσει τις διαδικασίες τις υποβοηθούμενες από γλυκορτικοειδή στους ιστούς-στόχους των ορμονών στο ΚΝΣ, πιθανώς επηρεάζοντας τις φωσφορυλιώσεις που υποβοηθούνται από την PKC στο σύστημα της μεταγωγής του σήματος γλυκορτικοειδών (Tonner, 1997b).

Επίσης στα εμπύρηννα κύτταρα του αίματος το Cd ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων της MT-II στις χαμηλές συγκεντρώσεις και της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 70 (HSP70) σε υψηλές (Tsangaris, 1998a).

9. Πρόσληψη καδμίου από τα κύτταρα

Σε μελέτη πρόσληψης μετάλλων *in vitro* παρατηρήθηκε ότι η πρόσληψη των μετάλλων είχε σχέση με το κατά πόσον ήταν απαραίτητα ή μη, και μάλιστα ο αρχικός ρυθμός πρόσληψης του Cd και η συγκέντρωσή του εμφάνιζαν μία σιγμοειδή σχέση. Το Cd απορροφάται ομοτροπικά μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και η πρόσληψή του παρεμποδίζεται από τον Cu (Meshitsuka, 1987).

Σε καλλιέργειες κινέζικου hamster B14F28 και κυττάρων HeLa η συσσώρευση μεγαλύτερης ποσότητας Cd γινόταν στην εκθετική φάση της καλλιέργειας όπως και κατά την αύξηση του pH του καλλιεργητικού μέσου, οπότε ενισχυόταν και η τοξικότητά του. Αντίθετα ο ορός και η αλβουμίνη ορού όπως και τα ιόντα Ca^{2+} έδειχναν προστατευτική δράση μειώνοντας την πρόσληψη Cd, ενώ οι δύο κυτταρικές σειρές διέφεραν στη συσσώρευση Cd κι έτσι και στην ευαισθησία τους έναντι στο μέταλλο (Fischer, 1985).

Πρωτογενείς καλλιέργειες από κύτταρα φλοιού σωληναρίου επίμυος που εκτέθηκαν σε Cd παρουσίασαν μειωμένη δραστηριότητα συμμεταφοράς Na-γλυκόζης και το μήνυμα για την παραγωγή του υψηλής συγγένειας



ισοτύπου του συµµεταφορέα Na-γλυκόζης (SGLT1) μειωνόταν καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση Cd (από 0-10 μ M), µε την αύξηση της συγκέντρωσης Zn (από 0-75 μ M) και της συγκέντρωσης Cu (από 0-150 μ M). Έτσι οι δράσεις του Cd και άλλων µετάλλων στη µεταφορά γλυκόζης στο νεφρό σχετίζονται µε µειωµένη έκφραση του συµµεταφορέα (Blumenthal, 1998).

Η αυξηµένη γαστρεντερική απορρόφηση Cd (και Pb) σε άτοµα µε χαμηλές αποθήκες σιδήρου υποδεικνύει κοινούς µοριακούς µηχανισµούς µεταφοράς αυτών των µετάλλων. Πράγµατι, σύµφωνα µε πρόσφατες µελέτες ο µεταφορέας του σιδήρου εκτός αίµης (nonheme) στο έντερο, που ονοµάζεται δισθενής µεταφορέας µετάλλων 1 (DMT1), διευκολύνει τη µεταφορά των δύο µετάλλων (Bressler, 2004). Αυξηµένη έκφραση του µεταφορέα βρέθηκε σε άτοµα µε έλλειψη σιδήρου και αιμοχρωµάτωση, γεγονός που παρέχει µεγαλύτερη δυνατότητα στα άτοµα αυτή απορρόφησης σιδήρου και πιθανότατα και καδµίου (Satarug, 2004).



IV. ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ (Zn)

1. Γενικά

Ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα συμμετέχοντας σε πολλές και ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Είναι ένα από τα πιο άφθονα από τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία που απαιτούνται από τον ανθρώπινο οργανισμό, περίπου 100 φορές πιο άφθονο από το χαλκό, αν και η αφθονία του στο φλοιό της γης είναι σημαντικά μικρότερη, είναι μόλις 27^ο. Είναι συστατικό όλων των κυττάρων, συναντάται σε πολλά μεταλλοένζυμα όπως οξειδοαναγωγάσες, τρανσφεράσες, υδρολάσες, λυάσες, ισομεράσες και λιγάσες και επίσης αποτελεί συμπράγοντα σε αρκετά ένζυμα.

Στη φύση απαντάται συνήθως ως σουλφίδιο (ZnS), γνωστό ως σφαλερίτης, και συχνά σχετίζεται με σουλφίδια άλλων μετάλλων, ιδίως του μολύβδου, του χαλκού, του καδμίου και του σιδήρου. Ο σχηματισμός διαλυτών σουλφιδίων του επιτρέπει τη γρήγορη απομάκρυνσή του με μεταφορά και αυτή η υψηλή κινητικότητα του κατά τη διάβρωση και ιζηματοποίηση προκαλεί συχνά καταστάσεις έλλειψής του. Σε περιοχές εξόρυξης του το περιβάλλον επιβαρύνεται ιδιαίτερα με μόλυβδο και κάδμιο, τα οποία είναι σαφώς πολύ τοξικότερα του ψευδαργύρου, ενώ σε φυσικά νερά κοντά σε μεταλλεία η συγκέντρωση του ψευδαργύρου φτάνει τα 50 ppb (Eichenberger & Chen, 1982).

Πολλά άλατά του χρησιμοποιούνται σε γαλβανώσεις και στην κατασκευή χρωμάτων και βαφών, φαρμακευτικών ειδών, καλλυντικών και εντομοκτόνων. Η διαλυτότητα πολλών από αυτά τα άλατα ευθύνεται για την παρουσία τους σε βιομηχανικά απόβλητα, ενώ μία άλλη σημαντική πηγή ψευδαργύρου στα φυσικά νερά είναι οι εκπλύσεις από τη γεωργική γη όπου εφαρμόζονται λιπάσματα που περιέχουν ψευδάργυρο. Στις Η.Π.Α. μάλιστα υπολογίζεται ότι περίπου 22.000 τόνοι ψευδαργύρου χρησιμοποιούνται σε λιπάσματα κάθε χρόνο.

Ο ψευδάργυρος είναι στην ουσία μη τοξικός στους ζωντανούς οργανισμούς και οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την ποσότητά του σε κύτταρα και ιστούς είναι αρκούντως αποτελεσματικοί, ώστε να μην έχουν αναφερθεί διαταραχές εξαιτίας της υπερβολικής συσσώρευσής του. Στον άνθρωπο δεν έχει δυσμενείς δράσεις, εκτός σπανίων περιπτώσεων εισπνοής αναθυμιάσεων Zn λόγω επαγγελματικής έκθεσης ή εξαιτίας τυχαίας κατάποσης εξαιρετικά μεγάλων ποσοτήτων του από χυμούς που διατηρούνται σε γαλβανισμένα δοχεία. Και οι δύο καταστάσεις και τα συμπτώματά τους είναι πλήρως αναστρέψιμα. Παρατεταμένη μείωση της πρόσληψης Zn ή υπερβολικές απώλειές του που δεν αντισταθμίζονται οδηγούν σε ανεπάρκεια του μετάλλου (Vallee, 1995).

Εδώ να σημειωθεί ότι στο νερό της βρύσης οι τιμές του μπορεί να κυμαίνονται από 3 έως 2100μg/L λόγω της ύπαρξης γαλβανισμένων σωλήνων, και τα προτεινόμενα όρια στο πόσιμο νερό τίθενται προς αποφυγή της στυφής γεύσης που μπορεί να παρουσιάζει το νερό σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ψευδαργύρου (Eichenberger & Chen, 1982).



Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του Zn ευθύνονται για την ευρεία συμμετοχή του στο μεταβολισμό πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, υδατανθράκων και λιπιδίων όπως επίσης και στον έλεγχο της μεταγραφής και γονιδιακής έκφρασης, της κυτταρικής διαίρεσης και ανάπτυξης. Ο Zn δεν υφίσταται οξείδωση ή αναγωγή υπό φυσιολογικές συνθήκες και είναι αμφοτερικός σε ουδέτερα pH. Υπάρχουν περί τα 18 μεταλλοένζυμα Zn και περί τα 14 ένζυμα με ενεργοποιητή το ιόν Zn, ενώ τα σύμπλοκά του χρησιμοποιούνται στη ρύθμιση του pH *in vivo*. Στις πρωτεΐνες και τα μεταλλοένζυμα η γεωμετρία με την οποία συντάσσεται είναι μοτίφ 4, 5 και 6 αριθμών σύνταξης, δείχνει δηλαδή ευελιξία στη σύνταξή του ώστε να προσαρμόζεται στις ανάγκες των πρωτεϊνών και των ενζύμων του που επιτελούν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. Η ευρεία χρήση του σε πολλά μεταλλοένζυμα έχει να κάνει μεταξύ άλλων και με το γεγονός ότι οι αντιδράσεις ανταλλαγής υποκαταστάτη στον Zn(II) είναι ταχείες ώστε τα υποστρώματα και τα προϊόντα τους μπορούν εύκολα να δράσουν και να απομακρυνθούν και επίσης στο ότι ο Zn δε δίνει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στα βιολογικά συστήματα, παίζοντας το ρόλο του σταθεροποιητή (Hay, 1992).

2. Είσοδος ψευδαργύρου στους οργανισμούς

Στον άνθρωπο ο ψευδάργυρος απαντάται σε σημαντική ποσότητα (2-3g σε 70 kg βάρος) με το 99% του ολικού σωματικού Zn να είναι ενδοκυττάριο, συγκεντρωμένος στα μάτια, τον προστάτη και τις εκκρίσεις του, το δέρμα, τα οστά, το πάγκρεας και το σπέρμα. Η μέση απαιτούμενη ημερήσια πρόσληψη ψευδαργύρου είναι περίπου 10-15 mg, η οποία αυξάνει σε 20-25 mg στη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο Zn απορροφάται στο δωδεκαδάκτυλο και ειλεό του εντέρου με παθητική διάχυση και εν μέρει με διευκολυνόμενη μεταφορά και η πρόσληψή του από το έντερο είναι διφασικής φύσεως, με μία ταχεία και μία βραδύτερη φάση. Από εκεί προσδεμένος στην αλβουμίνη του πλάσματος μεταφέρεται στην πυλαία κυκλοφορία, ενώ η ηπατική πρόσληψη ευθύνεται για την αρχική συσσώρευση του απορροφούμενου ψευδαργύρου και διεγείρεται από την παρουσία γλυκορτικοειδών. Η παρουσία γλυκόζης επάγει την γαστρεντερική απορρόφησή του, ενώ η παρουσία ασβεστίου την επιβραδύνει. Η απέκκριση του Zn γίνεται από την γαστρεντερική οδό, αλλά εμφανίζεται και στις εκκρίσεις του παγκρέατος, της χολής, στα ούρα και τον ιδρώτα (Cousins, 1985).

Στο αίμα μόνο 10-20% του Zn βρίσκεται στο πλάσμα, συνδεδεμένος ασθενώς κυρίως με την αλβουμίνη, αλλά και ισχυρά σε μικρότερο ποσοστό βέβαια με άλλες πρωτεΐνες όπως την α₂-μακροσφαιρίνη, ενώ το υπόλοιπο βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα, κυρίως υπό τη μορφή της καρβονικής ανυδράσης, όπου ενδέχεται να παίζει και ρόλο σταθεροποιητή στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Η συγκέντρωσή του στο πλάσμα των ανδρών είναι υψηλότερη από των γυναικών, όπως και μετά από νηστεία. Οι μύες και τα οστά αποτελούν συνολικά τις μεγαλύτερες δεξαμενές του μετάλλου, και το απόθεμα των οστών επαναποδίδεται στο πλάσμα μόνον όταν υπάρχει



κινητοποίηση στα οστά για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου. Επίσης σε σημαντική αύξηση του μεταβολισμού των μυών ευνοείται απώλεια Zn στα ούρα. Πτώση του Zn του πλάσματος, πρόσληψη από το ήπαρ και ανακατανομή του στα ηπατοκύτταρα παρατηρείται ως οξεία απόκριση στο στρες και τη λοίμωξη.

Στον εγκέφαλο των θηλαστικών ο Zn απαντάται σε υψηλά επίπεδα στον ιππόκαμπο και το φλοιό του εγκεφάλου. Ο νευροφυσιολογικός ρόλος του Zn μελετάται σε σχέση με τη δέσμευση των οπιοειδών και των υποδοχέων τους και ο ρόλος του στη λειτουργία αυτών των μορίων πιθανολογείται λόγω της παρόμοιας κατανομής του με τα οπιοειδή στον εγκέφαλο (Vallee, 1995). Ο Zn, που είναι παρών σε προσυναπτικές απολήξεις, με ρόλο νευροδιαβιβαστή, απελευθερώνεται επίσης σε ισχαιμία του εγκεφάλου και προκαλεί βλάβες στο ΚΝΣ (Sato, 2002). Στον οφθαλμό πάλι σε κάποιους από τους ιστούς του τα υψηλά επίπεδα Zn (όπου φτάνει μέχρι και 570 $\mu\text{g}/\text{mg}$ σε σχέση με 10-200 $\mu\text{g}/\text{mg}$ στους υπόλοιπους ιστούς) μπορεί να αντανakλούν την παρουσία πολλών γνωστών ψευδαργυροενζύμων, όπως της αφυδρογονάσης της ρετινόλης, της α-μαννοσιδάσης, της καρβονικής ανυδράσης, κολλαγενασών και της αμινοπεπτιδάσης της λευκίνης του φακού. Στο ενδοκρινικό σύστημα τέλος, ο Zn συνδέεται με την αυξητική ορμόνη και επάγει το διμερισμό της απελευθερώνοντάς την από τον υποδοχέα της, ενώ η περιοχική δέσμευση των υποδοχέων των στεροειδικών ορμονών περιέχει επίσης Zn.

3. Δράσεις ψευδαργύρου

Οι λειτουργίες του Zn στα βιολογικά συστήματα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες τις καταλυτικές, τις δομικές και τις ρυθμιστικές. Στην καταλυτική λειτουργία, το μέταλλο είτε συμμετέχει άμεσα στην καταλυτική διαδικασία, όπως στο μεταλλοένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης, είτε η παρουσία του αυξάνει ή μειώνει την καταλυτική λειτουργία σε συνδυασμό με άλλο μέταλλο, χωρίς όμως να είναι απαραίτητο για την ενεργότητα ή τη σταθερότητα του ενζύμου (συγκатаλυτικός ρόλος). Στη δομική λειτουργία το μέταλλο είναι απαραίτητο μόνο για τη δομική σταθεροποίηση των πρωτεϊνών, όπως στην πρωτεϊνική κινάση C. Η ρυθμιστική λειτουργία αφορά τη συμμετοχή του μετάλλου στην έκφραση γονιδίων όπως στην MT και σε μεταφορείς του μετάλλου. Οι αλκοολικές αφυδρογονάσεις των θηλαστικών είναι τα μόνα γνωστά ένζυμα που διαθέτουν καταλυτικό και δομικό άτομο Zn (Cousins, 1998).

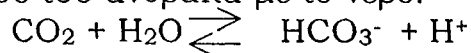
Ο ψευδάργυρος στα ψευδάργυρο-ένζυμα με καταλυτικό, δομικό ή/και συγκαταλυτικό ρόλο ακολουθεί συγκεκριμένες δομές (μοτίφ) δέσμευσης. Οι καταλυτικές θέσεις Zn γενικά αποτελούνται από τρεις πρωτεϊνικούς συνδέσμους που συντάσσονται μεταξύ τους συν ένα μόριο νερού, με τους δύο πρώτους συνδέσμους να διαχωρίζονται από ένα μικρό μεσοδιάστημα ενός έως τριών αμινοξέων και τους δεύτερο και τρίτο συνδέσμους να διαχωρίζονται από ένα μεγάλο μεσοδιάστημα 5-196 αμινοξέων. Τα διαστήματα αυτά συμβάλλουν στη σταθεροποίηση των δομών. Οι συγκαταλυτικές θέσεις του Zn είναι χαρακτηριστικές σε μεταλλοένζυμα που



περιέχουν 2 ή περισσότερα άτομα μετάλλων που λειτουργούν ως καταλυτική μονάδα. Μεταξύ τουλάχιστον 2 ή 3 ατόμων μετάλλου όπως 2 ατόμων Zn και/ή 1 ατόμου Mg υπάρχουν γέφυρες αμινοξέων (ασπαρτικού ή γλουταμινικού), που τα φέρνουν πολύ κοντά μεταξύ τους. Στις δομικές θέσεις ο Zn συντάσσεται τετραεδρικά με 4 κυστεϊνικά κατάλοιπα όπως στα ένζυμα της αλκοολικής αφυδρογονάσης στο ήπαρ και στη ρυθμιστική υπομονάδα της τρανσ-καρβαμυλάσης του ασπαρτικού. Ένας νέος τύπος δομικού ατόμου Zn βρέθηκε στην ενζυμική οικογένεια των μεταλλοπρωτεασών της θεμέλιας ουσίας, όπου ο Zn έχει και δομικό και καταλυτικό ρόλο, με τετραεδρική σύνταξη του δομικού ατόμου με 3 ιστιδίνες και 1 ασπαρτικό, ενώ στην πρωτεϊνική κινάση C ο Zn στη μη καταλυτική περιοχή του ενζύμου, συντάσσεται τετραεδρικά με 3 κυστεϊνες και 1 ιστιδίνη (Vallee 1995, 1993).

Μεταξύ των ψευδάργυρο-ενζύμων, οι καρβοξυπεπτιδάσες είναι μεταλλοένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση του καρβοξυτελικού αμινοξέος ενός πεπτιδίου ή μιας πρωτεΐνης και μάλιστα αποτελούν παράδειγμα εξωπεπτιδασών που διασπούν μόνο τελικούς πεπτιδικούς δεσμούς. Τα ένζυμα αυτά έχουν αποδεσμευτεί από τα αδρανή τους πρόδρομα (ζυμογόνα) στο παγκρεατικό υγρό των ζώων, εμφανίζουν το μέγιστο της δραστικότητάς τους σε ουδέτερο ή ελαφρώς αλκαλικό pH και δρουν εξωκυτταρικά, υποβοηθώντας την πέψη των πρωτεϊνών στο δωδεκαδάκτυλο.

Η καρβονική ανυδράση είναι επίσης μεταλλοένζυμο Zn, που απαντάται σε ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς και καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση του διοξειδίου του άνθρακα με το νερό:



Επίσης καταλύει την προσθήκη νερού σε πολλές αλδεΐδες και την υδρόλυση διαφόρων εστέρων.

Ακόμα οι αλκοολικές αφυδρογονάσες είναι μεταλλοένζυμα Zn στο μεταβολισμό της φρουκτόζης, που καταλύουν την αμφίδρομη οξείδωση των αλκοολών προς αλδεΐδες (καρβονυλικές ενώσεις) και η δράση τους εξαρτάται από ένα πυριδινονουκλεοτίδιο (NAD⁺).

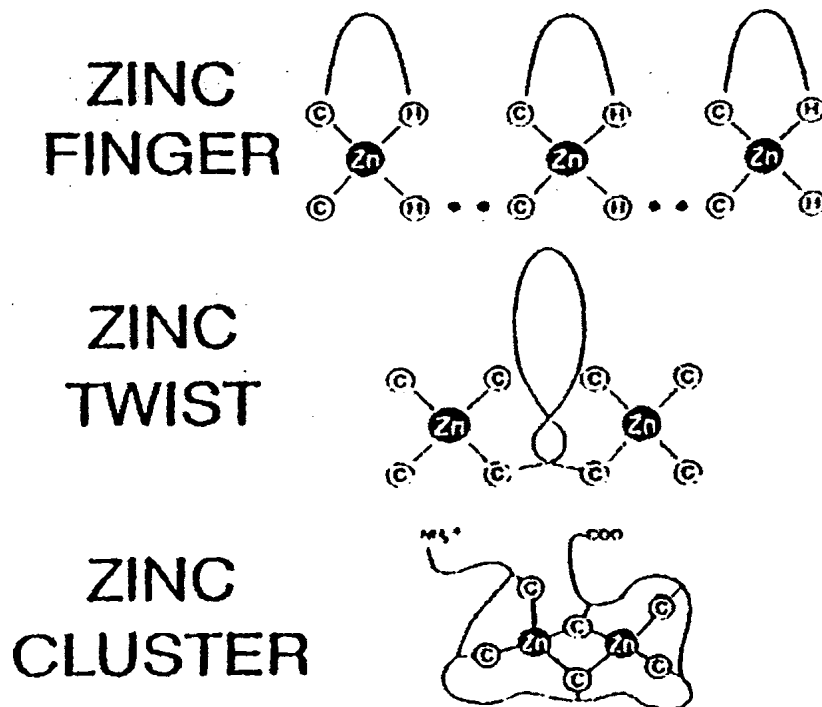
Η οικογένεια των κλάσεως I συνθετασών του tRNA είναι ένζυμα που καταλύουν την ενεργοποίηση των αμινοξέων με το ATP για το σχηματισμό αμινοακυλοαδενυλικού, που μεταφέρεται στο 3' άκρο του tRNA. Μάλιστα η μεθυλ-tRNA συνθετάση της *Escherichia coli* είναι ένα ομοδιμερές που περιέχει 1 mol Zn ανά πολυπεπίδιο και του οποίου η ενεργότητα εξαρτάται από την παρουσία Zn (Landro, 1993).

Ο μεταγραφικός παράγοντας TFIIE, ένα ετεροτετραμερές το οποίο προσδένεται σε πολλαπλούς στόχους στο σύμπλεγμα έναρξης της μεταγραφής, είναι ακόμη μία πρωτεΐνη δέσμευσης Zn. Πράγματι, η δέσμευση του Zn καθώς και η περιοχή με δομή δακτύλων Zn (zinc finger) στη μεγάλη υπομονάδα του μορίου είναι απαραίτητες για τη λειτουργικότητα του, καθώς πιθανώς συμβάλλουν στο σχηματισμό μίας ειδικής δομής απαραίτητης για το σχηματισμό του συμπλέγματος της μεταγραφής. Οι περιοχές δέσμευσης Zn γενικά συμμετέχουν σε



αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-νουκλεϊκών οξέων, μονόκλωνων και δίκλωνων (Maxam, 1994). Ο μεταγραφικός παράγοντας TFIIIA, από το *Xenopus* με τη σειρά του, ενεργοποιεί τη μεταγραφή από την RNA πολυμεράση III, με το άτομο Zn να συντάσσεται τετραεδρικά ως σύμπλεγμα με κυστεΐνες και ιστιδίνες, και τελικό σχηματισμό της πρωτεΐνης με δομή δακτύλου Zn (Vallee, 1993).

Ο ψευδάργυρος στις πρωτεΐνες δέσμησης του DNA ακολουθεί τουλάχιστον τρεις τύπους μοτίφ, που διαφέρουν από τις δομές (μοτίφ) δέσμησης στα ψευδάργυρο-ένζυμα, και διακρίνονται σε “δακτύλους” (fingers), “περιελίξεις” (twists), “σύμπλοκα” (clusters) ή συνοπτικά “fz” πρωτεΐνες. Σε όλες αυτές τις δομές 4 σύνδεσμοι βρίσκονται σχετικά κοντά μεταξύ τους στη γραμμική αλληλουχία. Το άτομο (ή άτομα) του Zn έχει συνταχθεί πλήρως και βοηθά στην οργάνωση μικρών πρωτεϊνικών περιοχών (domains) που αναγνωρίζουν ειδικές θέσεις στο DNA. Στις “περιελίξεις”, που είναι θηλιές μεταξύ δύο ατόμων Zn, που αποτελούν τη βάση τους, κάθε άτομο Zn συντάσσεται με 4 κυστεϊνικά κατάλοιπα. Αντίθετα στους “δακτύλους” 2 ιστιδίνες και 2 κυστεΐνες είναι οι σύνδεσμοι ενός ατόμου Zn στη βάση μιας αμινοξικής αλληλουχίας που σχηματίζει τους δακτύλους που αλληλεπιδρούν με το DNA. Στα “σύμπλοκα” 6 κυστεϊνικά κατάλοιπα συντάσσονται με δύο άτομα Zn μέσω 4 τελικών και 2 ενδιάμεσων (γέφυρες) συνδέσμων κυστεΐνης. Επομένως και στις τρεις δομές ο ψευδάργυρος συντάσσεται χαρακτηριστικά με κυριαρχία και αφθονία αλληλεπιδράσεων μεταξύ ψευδαργύρου και θείου (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Χαρακτηριστικές δομές ψευδάργυρο-πρωτεϊνών δέσμησης του DNA, με μοτίφ “δακτύλων” (fingers), “περιελίξεων” (twists), “συμπλόκων” (clusters) (από Vallee, 1995)

Οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των οιστρογόνων ενσωματώνουν τρεις πολυπεπτιδικές περιοχές (domains), μία που συνδέεται με την ορμόνη (π.χ. οιστρογόνο), μία δεύτερη δυαδικής συμμετρίας, που συνδέεται με ενισχυτικά τμήματα DNA και μία τρίτη που συνδέεται με την RNA πολυμεράση. Η αλληλουχία DNA που παρεμβάλλεται, αγκυροβολείται από δύο συμπλέγματα Zn, ώστε το μοτίφ δέσμησης να είναι ελικοειδές (περιέλιξη). Η MT είναι μία πρωτεΐνη που περιέχει δύο σύμπλοκα μετάλλων, όπως και ο μεταγραφικός παράγοντας GAL4 της ζύμης, ο οποίος ενεργοποιεί τα γονίδια για το μεταβολισμό της γαλακτόζης, περιέχει ένα σύμπλοκο. Τα σύμπλοκα επιδεικνύουν επιλεκτικότητα για τα άτομα των μετάλλων, συνεργασία στη δέσμηση και απελευθέρωση και αντίδραση με ηλεκτρόφιλια (Vallee, 1995).

Ο Zn επομένως έχει ουσιώδη ρόλο στη ροή της γενετικής πληροφορίας. Αποτελεί απαραίτητο συστατικό πάνω από 20 DNA και RNA πολυμερασών και μπορεί ακόμη να λειτουργεί και ο ίδιος ως μη ενζυμική πολυμεράση *in vitro*. Αποτελεί επίσης αναπόσπαστο κομμάτι σε πάνω από 300 πρωτεΐνες, αντιπροσωπεύοντας περισσότερους από 50 διαφορετικούς τύπους, πρωτεΐνες ρυθμιστικές γονιδίων που λειτουργούν κύρια ως μεταγραφικοί παράγοντες, αλλά και σε αμινοακυλο-tRNA συνθετάσες και στον παράγοντα μετάφρασης EF-1, καλύπτοντας έτσι όλα τα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Μετάλλαξη οποιασδήποτε από αυτές τις πρωτεΐνες μπορεί να έχει σημαντικότερες γενετικές επιπτώσεις, μπορεί να αλλοιώσει τη δομή και λειτουργία της χρωματίνης (ιστόνες-μη ιστόνες), ακόμα ένζυμα αντιγραφής και μεταγραφής ή και ρυθμιστικές πρωτεΐνες γονιδίων (Ermidou-Pollet & Pollet, 2000). Προφανώς υπάρχει κάποιο σύστημα ελέγχου της βιοδιαθεσιμότητάς του προς εξασφάλιση των άμεσων ζωτικών μεταβολικών λειτουργιών όπου συμμετέχει. Περίπου το 30-40% του ολικού κυτταρικού Zn είναι στον πυρήνα, ~50% στο κυτταρόπλασμα και το υπόλοιπο στην κυτταρική μεμβράνη. Εφόσον η ενδοκυττάρια συγκέντρωση ελεύθερου μετάλλου είναι χαμηλή, η σύνδεσή του με μακρομόρια υπό μορφή ψευδαργυρο-πρωτεϊνών/ενζύμων ή νουκλεοτιδίων RNA, DNA είναι σημαντική.

Η έλλειψή του οδηγεί τα κύτταρα σε αποτυχία διαίρεσης και διαφοροποίησης με συνέπεια την αναστολή της αύξησης σε μικροοργανισμούς, ζώα και φυτά. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, τα εμβρυϊκά και νεαρά κύτταρα με υψηλό μεταβολισμό, όπως στο δέρμα και τις γονάδες, είναι πιο ευαίσθητα. Έλλειψη Zn επάγει ατροφία των σπερματοφόρων σωληναρίων και αποτυχία σπερματογένεσης στους επίμυες, ενώ παρατηρούνται αναπτυξιακές ανωμαλίες σε έμβρυα από μητέρες με ανεπάρκεια Zn.

Ο Zn και ο Cu εξαιτίας της χημικής τους ομοιότητας συνδυάζονται με αρκετούς κοινούς υποκαταστάτες, ενώ Zn και Cd μπορεί να δράσουν ανταγωνιστικά ως προς την απορρόφηση του Cu, συναγωνιζόμενα την ένταξή του στα ίδια κέντρα. Τα τρία αυτά μέταλλα εξάλλου δείχνουν μεγάλη τάση πρόσληψης από μία ομάδα πρωτεϊνών, που έχουν απομονωθεί από το ήπαρ, τους νεφρούς και άλλους ιστούς, τις μεταλλοθειονίνες (MT). Οι



πρωτεΐνες αυτές έχουν μικρό μοριακό βάρος (περίπου 6000), παρουσιάζουν μία ασυνήθιστη κατανομή αμινοξέων με μεγάλη περιεκτικότητα κυστεΐνης (33%) και λίγα ή καθόλου αρωματικά αμινοξέα και δεσμεύουν 6-7 γραμμοάτομα του μεταλλικού ιόντος. Οι θειονίνες του ψευδαργύρου και του χαλκού θεωρούνται σημαντικές για την αποθήκευση και διακίνηση των μετάλλων αυτών, ενώ του καδμίου θεωρείται ότι συμβάλλει στην αποτοξικοποίησή του. Μάλιστα τα επίπεδα των MT εμφανίζονται αυξημένα σε ασθενείς με υπέρταση, στους οποίους και τα επίπεδα Zn εμφανίζονται συνεχώς υψηλά (Apostolova, 1998). Είναι γνωστό ότι πολλά ένζυμα με ρόλο-κλειδί και βιολογικά ενεργές ουσίες που ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση περιέχουν μέταλλα και σχετίζονται με την ομοιόσταση του ψευδαργύρου και του χαλκού (β-υδροξυλάση νιοπαμίνης, τυροσινάση, μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης ACE), δίνοντας έναν πιθανό ρόλο και στην MT, η οποία επηρεάζει τη συγκέντρωση των μετάλλων αυτών.

Στην περίπτωση του Zn μάλιστα καμία από τις πρωτεΐνες του δε συνδέεται με τοξικολογικές εκδηλώσεις και διαταραχές της αποθήκευσής του, που να σχετίζονται με ασθένειες, όπως του Cu στη νόσο του Wilson ή του Fe στην αιμοχρωμάτωση. Για την ακρίβεια ο ψευδάργυρος είναι το μόνο στοιχείο μετάπτωσης που δεν είναι ούτε κυτταροτοξικό ούτε τοξικό στα συστήματα, ούτε καρκινογόνο, μεταλλαξογόνο ή τερατογόνο. Η επαγωγή της θειονίνης από μέταλλα που μπορεί να δεσμεύσει έως 7 άτομα ψευδαργύρου ανά μόριο μπορεί να ρυθμίζει το μεταβολισμό του.

Ο Zn εκτός από την ενεργοποίηση διαφόρων ενζύμων, σχετίζεται και με την αποθήκευση, απελευθέρωση, σταθεροποίηση και δέσμευση του μορίου της ινσουλίνης και αυτό εξηγεί και τη συσσώρευσή του στο πάγκρεας όπου σχηματίζεται η ινσουλίνη. Επίσης αναστέλλει τη δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών (ανταγωνιστών της ινσουλίνης) στον υποδοχέα τους. Ελάττωση των επιπέδων ψευδαργύρου στο πάγκρεας προκαλεί αποσταθεροποίηση της ινσουλίνης και εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη. Ακόμα υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών οδηγούν σε μείωση του ψευδαργύρου στο πλάσμα και αύξηση της πρόσληψης του ηπατικού Zn.

Φαίνεται εξάλλου ότι μικρές συγκεντρώσεις Zn (1.5μM) ενισχύουν την καρδιακή λειτουργία (Kalfakakou, 1993). Ακόμη ο Zn παίζει κεντρικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπου έχει σχετιστεί με την γονιδιακή έκφραση, τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση πολλών πληθυσμών λευκοκυττάρων, όπως των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών (Prasad, 1995). Χρόνια έλλειψή του προκαλεί δερματίτιδες, ανωμαλίες στη διάπλαση του σκελετού και στο σχηματισμό νουκλεϊκών οξέων, υπογοναδισμό, τερατογένεση, αγευσία και ανοσμία, αναιμία, ηπατοσπληνομεγαλία, ενώ η δράση του παρεμποδίζεται από ιόντα Cu και Cd (Hay, 1992).

Χορήγηση Zn *in vivo* σε ανθρώπους ως συμπλήρωμα διατροφής είχε ως αποτέλεσμα αύξηση των επιπέδων της MT στα ερυθροκύτταρα από την όγδοη ημέρα και αύξηση των επιπέδων του mRNA της MT στα μονοκύτταρα νωρίτερα από τη δεύτερη ημέρα ως απόκριση στην αύξηση του διαιτητικού Zn, καθιστώντας την MT χρήσιμο δείκτη εκτίμησης της διαιτητικής



κατάστασης Zn στους ανθρώπους. Σε περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα αίματος, που είναι πιο άφθονα από τα μονοκύτταρα, παρατηρήθηκε παρόμοια αύξηση των επιπέδων του mRNA της MT (Cao 2000, Sullivan 1998).

Ο ανταγωνισμός μεταξύ ψευδαργύρου και καδμίου δίνει κάποιες ενδείξεις ότι ο λόγος των δύο μετάλλων μπορεί να είναι σημαντικός βιολογικά. Έχει αναφερθεί κατά το παρελθόν μία συσχέτιση μεταξύ της αρτηριοσκλήρωσης και του μειωμένου λόγου ψευδαργύρου προς κάδμιο σε ιστούς επίμυων, η οποία ενδεχομένως συνδέει και την υπέρταση στον άνθρωπο με τον λόγο των δύο μετάλλων (Eichenberger & Chen, 1982).

Επίσης η στενή σχέση μεταξύ ψευδαργύρου και καδμίου στη γεώσφαιρα και βιόσφαιρα έχει ήδη δημιουργήσει ανησυχία. Στο έδαφος ο λόγος του καδμίου κυμαίνεται μεταξύ 1:300 έως 1:2900 ανά mol, στο θαλασσινό νερό ο λόγος των μορίων είναι 1:35, στο νεφρό του ενηλίκου ανθρώπου η μοριακή αφθονία του καδμίου μπορεί να φτάσει ή και να υπερβεί τα 3/5 του ψευδαργύρου, αναλόγως των ατομικών ιδιοτεροτήτων και της γεωγραφικής κατανομής. Η αύξηση της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου στο πόσιμο νερό από τη διάβρωση των σωλήνων ύδρευσης δεν επάγει κάποια κλινικά συμπτώματα. Δοκιμασίες όμως *in vivo* παρέχουν ενδείξεις ότι ο ανθρώπινος μεταβολισμός μπορεί να επηρεαστεί, σε επίπεδο ισοζυγίου μετάλλων και ενζύμων, ειδικά σε παιδιά και ασθενείς που πάσχουν από διαταραχές του μεταβολισμού (Förstner & Wittmann, 1983).



V. ΚΥΤΤΑΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ Zn

1. Αντιρρόπηση τοξικών δράσεων Cd

Είναι γνωστό ότι πολλές από τις τοξικές δράσεις του καδμίου προκύπτουν κατόπιν αλληλεπίδρασης του με απαραίτητα μέταλλα όπως τον ψευδάργυρο, όσον αφορά τις βιολογικές τους λειτουργίες, αλλά και την απορρόφηση, κατανομή και αποβολή τους από τον οργανισμό. Ο ψευδάργυρος με τη σειρά του ασκεί σημαντική δράση στην προστασία από την τοξικότητα του καδμίου, επηρεάζοντας την απορρόφηση και τη συσσώρευση του. Γενικά ο Zn περιγράφεται ως ένας παράγοντας προστασίας έναντι του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης, κυρίως λόγω της δέσμευσής του σε γειτονικές σουλφυδρυλομάδες, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό ελευθέρων ριζών (ROS).

Ηπατοκύτταρα Chang στα οποία προχορηγήθηκε Zn, ακόμα και όταν οι εξωκυττάρια συγκεντρώσεις ήταν χαμηλές και δεν είχε επαχθεί MT από το μέταλλο, ήταν πιο ανθεκτικά στην τοξικότητα του Cd. Επίσης σε λεία μυοκύτταρα βόειας αορτής στα οποία προχορηγήθηκε Zn, η ενδοκυττάρια συσσώρευση Cd ήταν σημαντικά μειωμένη, χωρίς αλλαγές στο περιεχόμενο MT, υποδεικνύοντας ότι η ανθεκτικότητα στην κυτταροτοξικότητα του Cd μπορεί να επάγεται από τον Zn μέσω άλλων μηχανισμών εκτός μεταλλοθειονίνης, που μειώνουν το ενδοκυττάριο Cd (Mishima, 1997).

Ακόμη η προχορήγηση Zn 80-120μM σε κύτταρα πνεύμονα είχε προστατευτική δράση έναντι της κυτταροτοξικής επίδρασης υψηλών συγκεντρώσεων ψευδαργύρου. Η κυτταροπροστατευτική αυτή επίδραση δεν αποδόθηκε στην επαγωγή MT (Walther, 2002). Στις κυτταροκαλλιέργειες οι υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου μπορεί να είναι τοξικές, καθώς οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί που απαντώνται *in vivo* έχουν αποκλειστεί. Αντίθετα, σε L6 μυοβλάστες επίμυος η προχορήγηση Zn μειώνει την έκφραση των c-myc και c-jun πρωτοογκογονιδίων, που επάγονται κατόπιν έκθεσης σε Cd, ενώ αυξάνει τα επίπεδα της ενδοκυττάριας MT. Αυτή η αύξηση της MT ενδεχομένως ευθύνεται για τη μειωμένη έκφραση των παραπάνω πρωτοογκογονιδίων (Abshire, 1996).

Η χορήγηση *in vivo* Zn είχε προστατευτική δράση, καθώς επήγαγε στρες πρωτεΐνες (θερμικού σοκ), που μπορεί να δρουν μαζί με τη μεταλλοθειονίνη, ώστε να προστατεύουν τα κύτταρα από την κυτταροτοξικότητα του Cd (Liu, 1996). Επίσης η χορήγηση Zn *in vivo* μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη μεσεγχυματικών όγκων, υποδερμικά ή ενδομυϊκά, κατόπιν ένεσης Cd και όγκων στους όρχεις (Waalkes, 2000).

Ο πολλαπλασιασμός των T λεμφοκυττάρων *in vitro* είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος στην έλλειψη Zn και την προσθήκη Cd. Η ανασταλτική δράση του Cd στον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων προστατεύεται ειδικά από τον Zn, η πρόσδεση του οποίου όμως δεν επηρεάζει το κυτταρικό περιεχόμενο σε Cd ούτε την επαγωγή μεταλλοθειονινών. Φαίνεται ότι οι διαδικασίες οι εξαρτώμενες από τον Zn που εκφράζονται πριν την S φάση του κυτταρικού κύκλου είναι κρίσιμες για τον πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων (Ohsawa, 1992). Σε οργανισμούς μάλιστα με έλλειψη Zn



παρατηρείται μείωση στον αριθμό των T λεμφοκυττάρων λόγω της αύξησης των στεροειδών των επινεφριδίων που συνοδεύουν το στρες της ανεπάρκειας και αλλαγή στη λειτουργία των μακροφάγων ως αποτέλεσμα των διαδικασιών έκρηξης οξυγόνου και παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου απαραίτητων για την εξόντωση παρασίτων που θεωρούνται ψευδαργυροεξαρτώμενα (Vallee, 1993).

Σε κύτταρα γλοιώματος ποντικού, ο Zn σε μέτριες συγκεντρώσεις (10-50μM) δρούσε προστατευτικά έναντι της απόπτωσης από το Cd (Watjen, 2002a), ενώ η στέρησή του προκαλούσε κυτταρικό θάνατο με τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης (Watjen, 2002b). Σε κύτταρα ηπατώματος ανθρώπου η χορήγηση Zn μείωνε την ευαισθησία των κυττάρων στην απόπτωση από κάδμιο, μέσω επαγωγής Zn-MT (Shimoda, 2001).

Προσθήκη 6.5mg/L Zn σε καλλιέργεια ανθρώπινων ινοβλαστών δέρματος μείωσε σημαντικά τα σπασίματα του DNA που επάγονταν από ακτινοβολία των κυττάρων με υπεριώδη ακτινοβολία UVA1, όπως και την επαγόμενη απόπτωση. Παρόμοια δράση είχε και σε HaCat κερατινοκύτταρα που είχαν ακτινοβοληθεί με υπεριώδη ακτινοβολία UVB. Συγκεντρώσεις πάνω από 8.1mg/L Zn είναι τοξικές σε ινοβλάστες δέρματος *in vitro* (Leccia, 1999).

Σε καλλιέργεια διπλοειδών ανθρώπινων ινοβλαστών δέρματος η προσθήκη Zn είχε προστατευτική δράση καθώς μείωνε την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αυτή η αντιοξειδωτική του δράση δε φαίνεται να μεσολαβείται από αντιοξειδωτικά μεταλλοένζυμα, αλλά μάλλον από την ισορροπία μεταξύ του Zn και άλλων ιχνοστοιχείων εντός του κυττάρου (Richard, 1993).

Ο προστατευτικός ρόλος του Zn μάλλον σχετίζεται με την αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών. Η χορήγηση *in vitro* Zn 10μM σε κύτταρα HeLa και ενδοθηλιακά κύτταρα βόειας αορτής είχε προστατευτική δράση έναντι της απόπτωσης, που επαγόταν από 10μM Cd, προκαλώντας μείωση στη συσσώρευση του Cd, μείωση στην παραγωγή ROS και μείωση στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο από το Cd. Σε συγκεντρώσεις άνω των 10μM επήγαγε κυρίως νεκρωτικό θάνατο με δοσοεξαρτώμενο τρόπο από τα 25-100μM (Szuster-Ciesielska, 2000).

Η αντιαποπτωτική δράση του Zn μπορεί να σχετίζεται με την αναστολή της ενδονουκλεάσης της εξαρτώμενης από Ca^{2+} , που προκαλεί τον κατακερματισμό του DNA στην απόπτωση. Μπορεί ακόμη να αναστέλλει πιο πρώιμα στάδια της απόπτωσης όπως την ωρίμανση της κασπάσης 3, μίας αποπτωτικής πρωτεάσης που δρα ανάντη της ενδονουκλεάσης κατά τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Τα δύο προηγούμενα ένζυμα αναστέλλονται από τον Zn. Επίσης ο Zn αναστέλλει ένζυμα μεταβολισμού του DNA όπως τη δεοξυριβονουκλεάση II και εμπλέκεται στη σύνθεση και δραστηριότητα επιδιορθωτικών ενζύμων. Ακόμα εμπλέκεται στη σταθεροποίηση της τριτογενούς δομής σε μεταγραφικούς παράγοντες που πιθανά ενεργοποιούνται κατά την απόπτωση, όπως του p53 και του NFκB (Leccia, 1999). Ακόμα οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του Zn μπορεί να είναι σημαντικές για την αναστολή της απόπτωσης, καθώς οι ROS είναι διαμεσολαβητές της απόπτωσης. Ο Zn σχετίζεται ως γνωστόν με τη



σταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης, τη μεταγραφή της MT και τη δομή της CuZnSOD (δισμουτάσης του υπεροξειδίου), ενός κλασσικού αντιοξειδωτικού ενζύμου. Το οξειδωτικό στρες διαταράσσει την ομοιότητα του ασβεστίου, οδηγώντας σε ενεργοποίηση πολλών ενζύμων που εξαρτώνται από το Ca^{2+} και μπορεί να εμπλέκονται στις βλάβες της μεμβράνης ή στο κόψιμο του DNA.

Ακόμη ο ίδιος ο Zn μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό, αφού μέσω της αλληλεπίδρασής του με τη γλουταθειόνη και τιςθειόλες μπορεί να προστατέψει τις σουλφυδρυλομάδες από την οξείδωση, εμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό δισουλφιδίων ενδομοριακά. Άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η αναστολή παραγωγής ριζών υδροξυλίου και οξυγόνου από τα μέταλλα μεταπτώσεως λόγω ανταγωνισμού μεταξύ Zn και προοξειδωτικών μετάλλων (Cu, Fe) για τις θέσεις δέσμευσης μειώνοντας την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Richard, 1993).

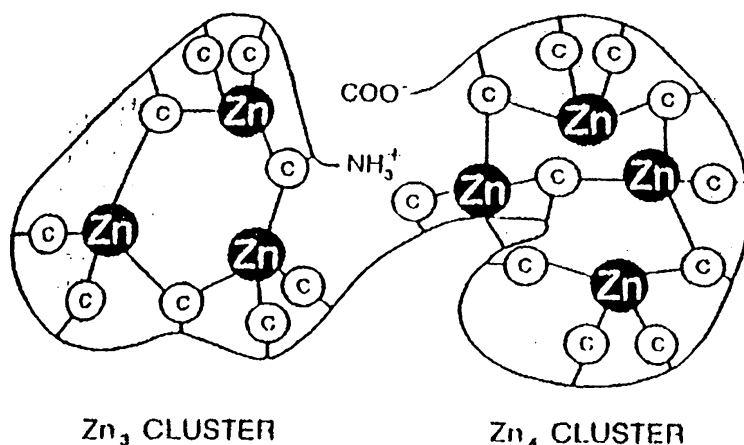
Έχει βρεθεί επίσης ότι ο Zn ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της MT σε πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών καθώς και σε ηπατοκύτταρα, ενώ φαίνεται να επάγει την MT των ερυθροκυττάρων κατά την ερυθροποίηση (Grider, 1990). Η Zn-θειονίνη αφαιρώντας το τοξικό μέταλλο και ανταλλάσσοντάς το με τον ψευδάργυρο μπορεί να αποκαταστήσει την δευτεροταγή δομή σε πρωτεΐνες με δομή δακτύλου Zn για παράδειγμα, και με αυτόν τον τρόπο και τη λειτουργικότητά τους.



2. Μεταλλοθειονίνες (MTs)

Οι μεταλλοθειονίνες (Metallothioneins-MTs) είναι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους (6000-7000Da), πλούσιες σε κυστεΐνη (30%), αλλά με πλήρη απουσία αρωματικών αμινοξέων και ιστιδίνης. Είναι θερμοσταθερές πρωτεΐνες που δεν καταστρέφονται με θέρμανση στους 85°C για 10 λεπτά. Επίσης, αν και 20 από τα 61 αμινοξέα είναι κυστεϊνικά κατάλοιπα, δεν υπάρχουν δισουλφιδικοί δεσμοί καθώς όλα εμπλέκονται στη δέσμευση των μετάλλων και είναι σε ανηγμένη μορφή (Nordberg, 1998).

Οι MT απαντώνται σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από ζύμες έως τον άνθρωπο, και δείχνουν υψηλή συγγένεια με ορισμένα μέταλλα, π.χ. $Hg(II) \gg Ag(I) \sim Cu(I) \gg Cd(II) \gg Zn(II)$, όπως και άλλες ανόργανες θειόλες, χωρίς όμως να έχουν κάποια γνωστή ενζυμική δράση. Οι MT συνδέονται με τα μέταλλα μέσω συμπλόκων (clusters) με θειόλες, που συμπεριφέρονται ως άκρα και ως γέφυρες. Από πλευράς δομής, οι MT είναι μονομερή με μορφή αλτήρα, που παρουσιάζουν δύο ξεχωριστά συμπλοκα μετάλλων-θειολών, μία περιοχή (α -), με το καρβοξυτελικό άκρο (31 κατάλοιπα), που δεσμεύει τέσσερα δισθενή μεταλλοκατιόντα και μια περιοχή (β -) με το αμινοτελικό άκρο (30 κατάλοιπα), που δεσμεύει τρία δισθενή μεταλλοκατιόντα. Κάθε μέταλλο συντάσσεται τετραεδρικά με 4 θειολικούς δεσμούς με κάποιους από τους θειολικούς συνδέσμους που μοιράζονται το ιόν του μετάλλου (Dabrio 2002, Vallee 1993). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο Zn των β -περιοχών σχετίζεται με τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής αναπνοής από την MT (Sato, 2002). Ανοσολογικές μελέτες συνάγουν ότι η αμινοτελική περιοχή είναι η πιο ανοσοαποκρινόμενη. Ένας επίτοπος μάλιστα αποτελείται από μια περιοχή με 5-7 αμινοξικά κατάλοιπα (Garvey, 1991). Ο διαχωρισμός των MT σε I και II βασίζεται στην χρωματογραφική τους συμπεριφορά.



Σχήμα 3. Τα συμπλοκα (clusters) ψευδαργύρου-θειολών της MT. Το μόριο συντίθεται από 2 συμπλοκα, την αμινοτελική ($-NH_2$) και καρβοξυτελική περιοχή ($-COOH$), οι οποίες αντίστοιχα περιέχουν 3 (Zn_3) και 4 (Zn_4) άτομα ψευδαργύρου σε κάθε συμπλοκο. Κάθε μέταλλο συντάσσεται τετραεδρικά με 4 θειολικούς δεσμούς με κάποιους από τους θειολικούς συνδέσμους που μοιράζονται το ιόν του ψευδαργύρου (από Vallee, 1993).

Τα μέταλλα που δεσμεύονται από τις MT υπό φυσιολογικές συνθήκες περιλαμβάνουν τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία χαλκό (Cu) και ψευδάργυρο (Zn), αποτελώντας έτσι πιθανές ενδοκυττάρια αποθήκες των απαραίτητων ιχνοστοιχείων, και τα πιθανώς τοξικά ιχνοστοιχεία κάδμιο (Cd) και υδράργυρο (Hg). Υψηλά επίπεδα ενδογενών MT δεσμευμένων με χαλκό (Cu) και ψευδάργυρο (Zn) έχουν ανιχνευτεί στο ήπαρ θηλασικών κατά την εμβρυϊκή και πρώιμη νεογνική περίοδο της ζωής τους σε διάφορα είδη υποδηλώνοντας κάποιο βιολογικό ρόλο στην ομοίωση των μετάλλων (Deng 1998, Fresno 1993). Βέβαια κυτταρικές σειρές που δεν συνθέτουν MT είναι πλήρως βιώσιμες με φυσιολογικό χρόνο διπλασιασμού του κυττάρου, θέτοντας έτσι υπό αμφισβήτηση τη σημασία των MT για την ενδοκυττάρια ενεργοποίηση των μεταλλοενζύμων της κυτταρικής διαίρεσης (Goulding, 1995). Σε ενήλικα άτομα γίνεται πολύ μικρή σύνθεση MT κατόπιν επαγωγής από μέταλλα ή συνθήκες στρες (Nartey, 1987), ακόμη από γλυκοκορτικοειδή και κυτοκίνες. Η ρύθμιση της βιοσύνθεσης MT γίνεται κυρίως σε επίπεδο έναρξης της μεταγραφής όπου εμπλέκονται πολλά στοιχεία με δράσεις *cis* και *trans* (Rising, 1995).

Οι ανθρώπινες μεταλλοθειονίνες (hMTs) αποτελούν μία από τις πλέον χαρακτηριστικές πολυγονιδιακές οικογένειες όπου έχουν αναγνωριστεί 14 γονίδια, από τα οποία μόνο 6 κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες. Τα γονίδια αυτά εντοπίζονται ως σύμπλεγμα (cluster) 82 kb στο χρωμόσωμα 16. Οι hMTs χωρίζονται σε δυο κύριες οικογένειες, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια της μεταλλοθειονίνης-I και μεταλλοθειονίνης-II αντίστοιχα. Επίσης έχουν αναγνωριστεί και πέντε ανθρώπινα ψευδογονίδια. Τα λειτουργικά γονίδια των ανθρώπινων μεταλλοθειονινών (hMTs) αποτελούνται από μία τριμερή δομή, στην οποία δύο εσώνια παρεμβάλλονται μεταξύ τριών εξωνίων, τα οποία περιέχουν το τυπικό πολυαδενυλικό σήμα στις αμετάφραστες περιοχές του 3' άκρου. Πολλά γονίδια της μεταλλοθειονίνης-I επάγονται σε διαφορετικό βαθμό από διάφορα μέταλλα σε διαφορετικούς ιστούς. Στην άλλη οικογένεια, μόνο το γονίδιο της μεταλλοθειονίνης-IIA είναι λειτουργικό, διατηρείται στη διάρκεια της εξέλιξης και επάγεται ισχυρά από το Cd²⁺ με δόσο-εξαρτώμενο και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Τα γονίδια των hMTs συνθέτουν την πλειοψηφία των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών θειολών, δεσμεύοντας 5 και 7 γάτομα μετάλλων της ομάδας IIβ ανά mole πρωτεΐνης και έως 12 μονοσθενή ιόντα (Tsangaris, 1998a).

Η MT-III είναι ένας ειδικός ισότυπος στον εγκέφαλο, που αναστέλλει την επιβίωση των νευρώνων σε καλλιέργεια με μη ειδική καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και είναι απύουσα σε εγκεφάλους ασθενών με Alzheimer. Η MT-IV εκφράζεται μόνο σε διαφοροποιούμενα κύτταρα στρωματοποιημένου πλακώδους επιθηλίου σε όργανα όπως η γλώσσα και το δέρμα. Τα γονίδια των MT-I, -II, -III έχουν παρόμοιο μέγεθος, πανομοιότυπη οργάνωση εξωνίων και εσωνίων, 65% ομοιότητα στις περιοχές κωδικοποίησης και ομαδοποιούνται στο ίδιο χρωμόσωμα (16 στον άνθρωπο, 8 στο ποντίκι). Ακόμη διαθέτουν αρκετά μεταθετά στοιχεία μετάλλων (MREs) στην περιοχή του υποκινητή τους αν και η θέση και ο προσανατολισμός τους ποικίλλουν. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η ανθρώπινη



MT-III ομοιάζει περισσότερο με την MT-II, ενώ του ποντικού με την MT-I (Palmiter, 1992).

Η έκφραση του γονιδίου της MT στον εγκέφαλο δεν είναι πάντοτε εμφανής ως απόκριση σε επαγωγείς (μέταλλα, ορμόνες), καθώς ο εγκέφαλος προστατεύεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και οι αποκρίσεις στους περιφερειακούς ιστούς τροποποιούν τη συσσώρευση στον εγκέφαλο. Παρόλα αυτά η ρύθμιση του γονιδίου της MT στον εγκέφαλο είναι επίσης σημαντική για τη διατήρηση των επιπέδων των ιχνοστοιχείων και για τον έλεγχο των οξειδοαναγωγικών δυναμικών (Saijoh, 1994), όπως φάνηκε και από το γεγονός ότι σε νευρώνες που αποθηκεύουν ψευδάργυρο στα τελικά τους κομβία και *in vivo* υπήρχε άφθονο mRNA της MT-III. Κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου πάντως, ο μεταβολισμός των μετάλλων (Zn, Cu) αλλάζει σημαντικά και οι MT θα μπορούσαν να έχουν έναν φυσιολογικό ρόλο σε αυτήν τη διαδικασία. Επίσης οι MT που απαντώνται στα αστροκύτταρα, σε πενταπλάσια ποσότητα απ' ό,τι στους νευρώνες, μπορεί να έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της νευροτοξικότητας των μετάλλων (Rising, 1995).

α. Λειτουργίες

Ο φυσιολογικός ρόλος των μεταλλοθειονίνων (MT) δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Από την ανακάλυψή της ως μία πρωτεΐνη που περιείχε κάδμιο και ψευδάργυρο από το φλοιό του νεφρού αλόγου το 1957 από τους Vallee & Margoshes, η MT παραμένει μία πρωτεΐνη με αναζήτηση της λειτουργίας της.

Είναι γνωστό ότι η σύνθεση των MT επηρεάζεται από το στρες και από περιβαλλοντικά ερεθίσματα και έχει υποτεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ομοιόστασης των ιχνοστοιχείων (με ρύθμιση του μεταβολισμού τους και αποθήκευση αυτών των ιόντων στο ήπαρ). Τα επιθηλιακά κύτταρα (της χρωστικής) του αμφιβληστροειδούς περιέχουν παρόμοια μία χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη με υψηλή ικανότητα δέσμευσης Zn, εξαρτώμενη από τις ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες, η οποία επάγεται από τον ψευδάργυρο, το κάδμιο ή τη δεξαμεθαζόνη μετά από 24 ώρες έκθεσης και η οποία φαίνεται να είναι η μεταλλοθειονίνη και να παίζει κρίσιμο ρόλο στην οικονομία του Zn στο συγκεκριμένο ιστό (Oliver, 1992). Στον εγκέφαλο επίσης όπου το περιεχόμενο σε ψευδάργυρο είναι υψηλότερο από άλλους ιστούς ή όργανα, θεωρείται ότι η κύρια λειτουργία των MT είναι η ομοιόσταση του Zn. Να σημειωθεί εδώ ότι οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις Zn για την επαγωγή MT είναι πολύ υψηλότερες από ότι για το Cd, δηλαδή το κάδμιο είναι ο ισχυρότερος επαγωγέας (Kikuchi, 1993). Οι MT έχουν θεωρηθεί υπεύθυνες και για τη συσσώρευση Zn στο ήπαρ κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Sato, 2002). Βέβαια το γεγονός ότι οι MT δεν εκφράζονται σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές αμφισβητεί το γεγονός ότι είναι απαραίτητες για τη σύνθεση μεταλλοενζύμων ψευδαργύρου ή χαλκού (Palmiter, 1992).

Επίσης θεωρούνται σημαντικά αντιοξειδωτικά συμμετέχοντες στον ενδοκυττάριο αμυντικό μηχανισμό έναντι στις ελεύθερες ρίζες, ως δεσμευτές



ελευθέρων ριζών. Μάλιστα η ικανότητα των MT να δεσμεύουν τις ρίζες υδροξυλίου, που είναι κυρίως υπεύθυνες για την τοξικότητα, είναι πάνω από 300 φορές μεγαλύτερη από της γλουταθειόνης (Sato, 2002). Δεσμεύοντας το Cu που συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, παρεμποδίζουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και δρουν προστατευτικά στο DNA (Nordberg, 1998). Ακόμη συζητείται ο ρόλος τους στη ρύθμιση του ενδοκυττάριου οξειδοαναγωγικού δυναμικού και στην προστασία έναντι της ιονίζουσας ακτινοβολίας (Shukla 1998, Goulding 1995). Σε μη τροποποιημένους ινοβλάστες πνεύμονα ανθρώπου (IMR-90) στους οποίους είχε προχορηγηθεί Cd εμφανίζεται αυξημένη αντίσταση σε ROS και υπερέκφραση της MT (στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα) που μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό ενδοκυττάριο μηχανισμό για τη ρύθμιση οξειδωτικών αντιδράσεων ειδικά σε καταστάσεις που αφορούν οξεία φλεγμονή (Hart, 1995). Επίσης, σε ινοβλάστες η κυτταροπλασματική έκφραση της MT ήταν αυτή που μείωσε το επίπεδο των ενδοκυττάριων ROS και προστάτεψε έναντι της κυτταροτοξικότητας του Cd (Woo, 1997).

Μπορεί επίσης να συμμετέχουν στην εμβρυϊκή ανάπτυξη (εμφανίζονται μετά τις 21 εβδομάδες κύησης στον άνθρωπο) ή σε γρήγορα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, οπότε υπάρχουν αυξημένες ανάγκες για ψευδάργυρο και χαλκό, για τη σύνθεση και το μεταβολισμό πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων σε περιόδους γρήγορης αύξησης και αυξημένης κυτταρικής και μεταβολικής δραστηριότητας. Φαίνεται ότι στις περιπτώσεις αυτές η MT λειτουργεί ως ενδοκυττάρια αποθηκευτική πρωτεΐνη ψευδαργύρου και χαλκού στο εμβρυϊκό ήπαρ, όπου απαντάται σε υψηλά επίπεδα κατά την κύηση και τη νεογνική ηλικία, παρέχοντας τις απαραίτητες ποσότητες μετάλλων για τις διάφορες λειτουργίες καθώς με την πάροδο του χρόνου έως την ενηλικίωση τα επίπεδα των μετάλλων φθίνουν (Nordberg 1998, Kontozoglou 1989, Nartey 1987).

Γενικότερα αποδίδεται στις MT ρόλος ενεργού ρυθμιστικού συστήματος μετάλλων που ελέγχει τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών που απαιτούν ψευδάργυρο και συμμετέχουν στη γονιδιακή έκφραση (π.χ. μεταγραφικοί παράγοντες με δομή δακτύλου Zn), στην κυτταρική διαφοροποίηση, κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καρκινογένεση ή ακόμα και ρόλος στην κυτταρική αλληλεπίδραση. Πάντως η εμφάνιση μέγιστων συγκεντρώσεων MT κοντά στο στάδιο μετάβασης του κυτταρικού κύκλου από τη G₁/S φάση, στην έναρξη της σύνθεσης του DNA, της αποδίδει κάποιο πιθανό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Nagel, 1995).

Βέβαια η παρουσία τους μπορεί να μην είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη, καθώς διαγονιδιακά ποντίκια με αδρανοποιημένα γονίδια MT παρήχθησαν επιτυχώς και μάλιστα με λίγες αναπτυξιακές και αναπαραγωγικές ανωμαλίες (Deng 1998, Nagel 1995), γεγονός που μπορεί να υποστηρίξει ότι οι MT είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση του μεταβολισμού του Zn υπό σρες και όχι υπό φυσιολογικές συνθήκες (Sato, 2002).

Ακόμη τα κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος περιέχουν μεταλλοπρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας που περιέχουν ψευδάργυρο, όπως



και αναστολεις τους, αλλα και ΜΤς (σε κυτταρα-β και μη), που ενδεχομενως σχετιζονται με τη συνθεση ορμονων στο παγκρεας και την εκκριση τους, επιπροσθετα με το ρολο τους στην ομοιοσταση του ψευδαργυρου και την αποτοξικοποιηση (Tomita, 2000).

Τελος η επαγωγη τους σχετιζεται με προστασια απο την τοξικότητα των βαρεων μεταλλων καθως δεσμευουν ενδοκυτταρια μεγαλες ποσοτητες τοξικων μεταλλων οπως του καδμιου, και την κυτταρική αντισταση σε ορισμενα κυτταροτοξικά φάρμακα. Η προστατευτική τους δράση έχει μελετηθεί ευρέως σε πειραματόζωα και κυτταροκαλλιέργειες, *in vivo* και *in vitro* (Saint-Jacques 1993, Leibrandt 1991, Angel 1986, Peterson 1986, Maroni 1986, Munger 1985).

Η χρήση πάντως διαγονιδιακών ζώων με αδρανοποιημένα γονίδια ΜΤ υποστηρίζει σθεναρά τον προστατευτικό ρόλο των ΜΤ έναντι της τοξικότητας του καδμίου, καθως αυτά τα ζώα εμφανίζουν νεφροτοξικότητα κατόπιν έκθεσης σε μόλις το 1/10 της δόσης που προκαλεί το ίδιο αποτέλεσμα σε φυσιολογικά ζώα. Έτσι φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης αυτός ο ρόλος των ΜΤ προκρίθηκε έναντι των άλλων λειτουργιών (Klaassen, 1999). Ακόμα με τη χρήση αυτών των διαγονιδιακών ζώων ενισχύεται η άποψη του προστατευτικού ρόλου των ΜΤ στην ηπατοτοξικότητα, αιματοτοξικότητα, ανοσοτοξικότητα και βλάβες των οστών (οστεοπόρωση, οστεομαλακία) προκαλούμενες από το κάδμιο (Dabrio, 2002). Η πρόσληψη όμως του καδμίου από το ήπαρ, νεφρούς και πάγκρεας δε φαίνεται να διαφέρει μεταξύ διαγονιδιακών και φυσιολογικών ζώων, υποδεικνύοντας ότι η ΜΤ δε σχετιζεται με την πρόσληψη του μετάλλου. Αντίθετα φαίνεται να προκαλεί την συγκράτησή του μετάλλου στους ιστούς καθως στα διαγονιδιακά ζώα με αδρανοποιημένα γονίδια ΜΤ, τα επίπεδα καδμίου αφού φτάσουν σε μία μέγιστη τιμή μειώνονται σημαντικά (Sato, 2002).

Ο αντίλογος στην τοξικολογική προσέγγιση του ρόλου της ΜΤ είναι ότι η επιχειρηματολογία σύμφωνα με την οποία η φύση σχεδίασε την πρωτεΐνη αυτή όχι ως συμπλήρωμα της χημείας του καδμίου και του ψευδαργύρου, αλλά αναμένοντας να λύσει οικολογικά προβλήματα που προκλήθηκαν πρόσφατα από τη βιομηχανική ρύπανση με μέταλλα μοιάζει ανυπόστατη. Επίσης το γεγονός ότι η φυσική παρουσία του καδμίου στο περιβάλλον και τη βιολογική ύλη είναι σπανιότατη αποδυναμώνει την πιθανότητα σχεδιασμού ειδικού βιολογικού μηχανισμού αναστολής των τοξικών δράσεων του μετάλλου (Vallee, 1995).

Συνοπτικά η λειτουργία των ΜΤ έχει σχετιστεί με μεταφορά μεταλλων, αποτοξικοποιηση από μέταλλα, προστασια απο την τοξικότητα των μεταλλων, δέσμευση ελευθέρων ριζών, αποθήκευση μεταλλων, μεταβολισμό απαραίτητων μεταλλων, ανοσολογική απόκριση και γονοτοξικότητα και καρκινογένεση.

β. Ευτόπιση

Με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ΜΤ έχει ανιχνευθεί σε διάφορους τύπους ανθρώπινων όγκων σε όργανα όπως θυρεοειδή (Nartey, 1987), όρχεις (Eid 1998, Kontozoglou 1989), ουροδόχο κύστη (Bahnsen, 1991),



προστάτη (Kondo, 1995), μαστό (Goulding 1995, Fresno 1993), κοληδόχο κύστη (Shukla, 1998), νεφρούς (Zhang, 1998) και ακόμη στον αρθρικό υμένα (Backman, 1998). Ωστόσο η παρουσία της εξαρτάται από παράγοντες όπως ο τύπος του όγκου, η κυτταρική του προέλευση, η μορφολογική ετερογένεια, η παρουσία κυτοκινών ή το ιστολογικό στάδιο (Deng 1998, Kondo 1995, Fresno 1993, Kontozoglou 1989). Έχει προταθεί ότι η παρουσία MT σε ορισμένους όγκους (π.χ. μαστό) μπορεί να θεωρηθεί ως χρήσιμος δείκτης λιγότερο διαφοροποιημένων και περισσότερο επιθετικών καρκινωμάτων, που εμφανίζουν αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα και έχουν πιθανώς υψηλότερες απαιτήσεις σε Zn και MT (Fresno, 1993).

Η MT εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα φυσιολογικών και κακοηθών κυττάρων (Shukla 1998, Zhang 1998, Fresno 1993, Kontozoglou 1989). Γενικά θεωρείται κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, γιατί δε διαθέτει πεπτιδία-σήματα ή άλλες υδροφобες περιοχές που να σχετίζονται με εκκριτικές λειτουργίες (Palmiter, 1992). Η εντόπισή της στον πυρήνα έχει αναφερθεί σε αναπτυσσόμενους ιστούς και αναπαραγωγικά όργανα, σε ηπατοκύτταρα και κύτταρα νεφρού, όπως και σε κύτταρα από ανθρώπινο αστροκύτωμα μετά από επίδραση ιντερλευκίνης, Cd και Zn και σε ηπατοκύτταρα μετά από επίδραση ινσουλίνης και επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Nagel, 1995). Η κατανομή της στον πυρήνα πιθανώς προάγεται από αυξημένα επίπεδα ενδοκυττάριας MT (Zhang 1998, Kondo 1995) και από γοργό κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή μετακίνηση στην S φάση (Kondo 1995, Nartey 1987), όπως στην όψιμη εμβρυϊκή και πρόιμη νεογνική ανάπτυξη (Nordberg, 1998). Σε πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες γαστρικού βλεννογόνου και πρωτογενή ηπατοκύτταρα επίμυος κατόπιν μερικής ηπατεκτομής, η MT απαντάται κυρίως στον πυρήνα και σχετίζεται πιθανώς με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Hogstrand, 1996). Η κυτταροπλασματική MT βρέθηκε επίσης να έχει κατασταλτική δράση σε οξειδωτικές βλάβες και την κυτταροτοξικότητα των μετάλλων (Woo, 1997), ενώ η πυρηνική MT εμφάνιζε προστατευτική δράση έναντι των βλαβών του DNA από τις υπεριώδεις ακτίνες και το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η MT εντοπίστηκε μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και θεωρήθηκε ότι ρυθμίζει την κυτταρική αναπνοή. Επειδή εξάλλου τα μιτοχόνδρια αποτελούν και θέση συνεχούς παραγωγής δραστικού οξυγόνου αναμένεται αυτή η εντόπιση της MT να σχετίζεται με τη δέσμευση ελευθέρων ριζών (Sato, 2002).

Η σημασία της έκφρασης της πυρηνικής MT μπορεί να σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών ιόντων με διάφορα συστατικά του πυρήνα σε ειδικά στάδια του κυτταρικού κύκλου. Μπορεί ακόμη να μεταφέρει ιόντα Zn στον πυρήνα σε ένζυμα ή παράγοντες που απαιτούν ψευδάργυρο κάτω από ειδικές συνθήκες (Kikuchi, 1993). Έτσι μπορεί να συνδέονται με ιστόνες, πυρηνικό RNA, πυρηνικές πρωτεΐνες και να τροποποιούν τη γονιδιακή έκφραση και φωσφορλίωση ρυθμιστικών πρωτεϊνών, προκαλώντας σπασίματα, εκτομές, χιάσματα, μεταβάσεις στο DNA που οδηγούν σε καρκινογένεση (Shukla, 1998). Μπορεί ακόμα να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του γονιδίου της MT, το προϊόν του οποίου, η



MT μπορεί να αποτοξικοποιεί τα μέταλλα με σχηματισμό χηλικών συμπλόκων. Μπορεί επίσης να μεσολαβούν στην αυξημένη έκφραση ιοικών ογκογονιδίων που επάγονται ορμονικά, μέσω της αλληλεπίδρασης τους με μεταγραφικούς υποκινητές (Kontozoglou, 1989).

γ. Γονιδιακή ρύθμιση

Η γονιδιακή έκφραση βρίσκεται υπό συνεχή έλεγχο υψηλής πιστότητας στον οποίο συμμετέχουν ανώτεροι μηχανισμοί χρήσης της γονιδιακής πληροφορίας όπως μεθυλίωση του DNA, ακετυλίωση ιστόνης και ρύθμιση της μεταγραφής. Όσον αφορά τη ρύθμιση του γονιδίου της MT στην περιοχή του υποκινητή ανάντη είναι παρόντα μεταθετά στοιχεία γλυκορτικοειδών (GREs), μεταθετά στοιχεία μετάλλων (MREs), αντιοξειδωτικό μεταθετό στοιχείο (ARE) και στοιχεία που ενεργοποιούνται από μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές μεταγραφής (signal transducers and activators of transcription) και σχετίζονται με την έκφραση της MT που επάγεται από γλυκορτικοειδή, Zn, δραστικό οξυγόνο και κυτοκίνες.

Τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν ειδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, που εντοπίζονται στις ρυθμιστικές περιοχές όλων των γονιδίων και αποκρίνονται σε ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά ερεθίσματα μέσω αντίδρασης καταρράκτη σε σήμα (signal transduction-cascade) καταλήγοντας σε ενεργοποιημένους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται με την επαναλαμβανόμενη αλληλουχία και επάγουν ή καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση (Ptashne, 1997). Τα ερεθίσματα μπορεί να είναι ενδογενείς ουσίες, αλλαγές στην ομοιόσταση, αλλά και εξωγενείς ουσίες όπως περιβαλλοντικοί ρυπαντές.

Στα θηλαστικά υπάρχουν μικρά τμήματα DNA στον υποκινητή του γονιδίου της MT, τα μεταθετά στοιχεία των μετάλλων (Metal Responsive Elements MREs) και τα μεταθετά στοιχεία των γλυκορτικοειδών (Glucocorticoid Responsive Elements GREs), απαραίτητα για τη μεταγραφή της MT κατόπιν απόκρισης στα μέταλλα και τα γλυκορτικοειδή (Karin, 1984). Τα μεταθετά στοιχεία των μετάλλων (MREs), τα οποία πρώτα ταυτοποιήθηκαν στα γονίδια της μεταλλοθειονίνης ποντικού (Mt1, Mt2) αποκρίνονται στην παρουσία κατιόντων βαρέων μετάλλων όπως υδράργυρου, χαλκού, νικελίου, κοβαλτίου, καδμίου και ψευδάργυρου κι η επαγωγή των γονιδίων μέσω αυτού του μηχανισμού γίνεται απευθείας μετά την έκθεση στα μέταλλα (Carvan, 2000).

Ο υποκινητής των MREs σχετίζεται με την επαγωγή της MT από τα μέταλλα, την επαγωγή της από τον Zn που ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη MTF-1 (μεταγραφικός παράγοντας που δεσμεύεται στον υποκινητή MREs). Στα ποντίκια ο MTF-1 είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή του γονιδίου της MT-I κατόπιν επαγωγής με Zn (και μετά από οξειδωτικό στρες). Ο MTF-1 περιέχει έξι περιοχές με δομή δακτύλου Zn και ρυθμίζει τη μεταγραφή της MT που επάγεται από τον Zn, λειτουργώντας μάλλον ως αισθητήρας της συγκέντρωσης ψευδαργύρου στο κυτταρόπλασμα. Απουσία του μετάλλου δεν μπορεί να δεσμευτεί στα MREs, ενώ παρουσία του συνδέεται στις δομές



δακτύλου Zn, προκαλώντας αλλαγές στην πρωτεΐνη και ακολούθως δεσμεύεται στο DNA. Όταν η MT φτάσει σε ικανοποιητικά επίπεδα απομακρύνει τον Zn από τον MTF-1 απενεργοποιώντας τον. Ένα εναλλακτικό μοντέλο θα μπορούσε να είναι ένας αναστολέας, ευαίσθητος σε Zn που δημιουργεί σύμπλεγμα με τον MTF-1 απενεργοποιώντας τον. Καθώς τα επίπεδα του Zn αυξάνονται, το μέταλλο συνδέεται με τον αναστολέα απελευθερώνοντας τον από τον MTF-1, ώστε ο μεταγραφικός παράγοντας να επιτρέψει τη μεταγραφή του γονιδίου της MT. Μία τρίτη υπόθεση αφορά την ενεργοποίηση καταρρακτών μεταγωγής σήματος που τελικά προκαλούν αλλαγή στη φωσφορυλίωση του MTF-1 και ακολούθως στην ικανότητά του να ενεργοποιεί τη μεταγραφή της MT. Ο MTF-1, μέσω ενεργοποίησης μιας πρωτεϊνικής κινάσης ή φωσφατάσης από μέταλλα ή άλλο επαγωγέα, τροποποιείται (φωσφορυλιώνεται;) και επάγει τη μεταγραφή της MT (Adams, 2000). Πάντως ενδέχεται στο μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης MT να συμμετέχουν πολλαπλοί μεταγραφικοί παράγοντες (Sato, 2002).

Άλλοι δύο μεταγραφικοί παράγοντες που εξαρτώνται από τον Zn και ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση της MT είναι ο Sp1, μία πρωτεΐνη δομής δακτύλου Zn και διάφοροι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς του τύπου περιέλιξης Zn (twist). Η αλληλεπίδραση του Sp1 με τον υποκινητή της MT θα μπορούσε να είναι μέσω μηχανισμού ανάδρομου ελέγχου (feedback), με τη θειονίνη, η οποία είναι γνωστό ότι μπορεί να απομακρύνει τον Zn και αναστέλλει τη δέσμευση του Sp1 με το DNA, να ρυθμίζει τη λειτουργία του ίδιου της του μεταγραφικού παράγοντα. Σε αυτήν την περίπτωση ο λόγος θειονίνης/MT θα μπορούσε να είναι σημαντικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης που εξαρτάται από τον Zn για τη διατήρηση της ομοιόστασης, ως απόκριση και στην περίσσεια, αλλά και στην απαίτηση για ψευδάργυρο (Vallee, 1995).

Η επαγωγή της MT από ορμόνες, κυτοκίνες και κυτταροτοξικούς παράγοντες δείχνουν πιθανή συμμετοχή τους στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, καθώς και στους αμυντικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Γενικά οι επαγωγείς της γονιδιακής έκφρασης της MT χρησιμοποιούν τις οδούς μετάδοσης σήματος των πρωτεϊνικών κινασών A και C και ογκογονιδίου *ras* και αυτή η χρήση πολλαπλών σημάτων υπαινίσσεται ότι η MT είναι μέρος ενός πλήρους δικτύου κυτταρικών σημάτων και μηχανισμών ελέγχου.

δ. Καρκίνος

Οι όγκοι του ανθρώπινου ήπατος περιέχουν λιγότερη MT από τα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα κι αυτή η μείωση της έκφρασης της MT υποδηλώνει ότι αυτά τα κύτταρα έχουν πιθανόν διαφορετικά χαρακτηριστικά πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης από τα φυσιολογικά και έτσι η MT μπορεί να είναι δείκτης ηπατοκυτταρικής διαφοροποίησης. Στα καρκινώματα του μαστού η υπερέκφρασή της MT τείνει να συσχετίζεται με πωχή πρόγνωση (Goulding, 1995, Fresno 1993), ενώ στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου η έκφρασή της είναι αμφιλεγόμενη (Deng, 1998). Τέλος οι όγκοι σπερματογονίων των όρχεων με



έλλειψη ή χαμηλή σύνθεση MT (όπου η πρωτεΐνη θα μπορούσε να μην είναι λειτουργική, αλλά μεταλλαγμένη ή αδρανής) έχουν χειρότερη πρόγνωση (Eid, 1998).

Κάποια βαρέα μέταλλα όπως το Cd, έχουν σχετιστεί με την καρκινογένεση, και οι ιστοί που παρουσιάζουν μειωμένη ή καμία έκφραση MT είναι πιο ευάλωτοι σε καρκινογένεση από Cd καθώς η MT με τη δέσμευση των μετάλλων προστατεύει τους ιστούς αυτούς από την τοξικότητα των βαρέων μετάλλων (Shukla, 1998). Σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος έκθεση σε χαμηλές μη κυτταροτοξικές δόσεις καδμίου (0.01-1μM) είχε σαν αποτέλεσμα χρονο- και δοσο-εξαρτώμενες βλάβες στο DNA, που όμως μειώνονταν μετά από παρατεταμένη έκθεση λόγω αυξημένης σύνθεσης MT (Fatur, 2002).

Αντιθέτως, σε κάποιες μελέτες το κάδμιο εμφανίζει ογκοκατασταλτική δράση σε όγκους ήπατος ποντικού επαγόμενους χημικά, και μια πιθανή αντικαρκινική δράση του καδμίου (Waalkes, 1996). Έτσι η παρουσία MT σε όγκους μπορεί να είναι ένας από τους μηχανισμούς αντίστασης στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που περιέχουν μέταλλα (Hart 2001, Susanto 1998).

ε. Απόπτωση

Η αναστολή της σύνθεσης των MTs έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, υποδεικνύοντας μία φυσιολογική δράση τους στην αποφυγή της απόπτωσης. Ο μηχανισμός είναι πιθανώς η δέσμευση ελευθέρων ριζών, καθώς τα γονίδια των MT αποκρίνονται στο οξυγόνο και το υπεροξειδίο αδρανοποιώντας την περίσσεια ROS, που προκαλούν απόπτωση με άμεσες οξειδωτικές βλάβες στο DNA, συμμετέχοντας έτσι στο κυτταρικό αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα (Tsangaris 1998a, Deng 1998, Backman 1998). Ο προστατευτικός ρόλος των MT έναντι στις ROS μπορεί να στηρίζεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς. Οι κυστεϊνικές ομάδες που σχηματίζουν τα θειολικά σύμπλοκα με τα μέταλλα θεωρούνται οι πρωταρχικοί στόχοι για την επίθεση των ελευθέρων ριζών, η δε οξειδωτική βλάβη μπορεί να αναστραφεί από την ανηγμένη γλουταθειόνη. Εναλλακτικά η MT μπορεί να δρα έμμεσα ως δεσμευτής ελευθέρων ριζών, εγκλωβίζοντας το σίδηρο σε σύμπλεγμα με τη θειονίνη και παρεμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό ριζών υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton. Ο εντοπισμός της MT στον πυρήνα μπορεί να σχετίζεται με προστασία έναντι των βλαβών στο DNA από ρίζες υδροξυλίου. Έτσι φαίνεται να αποτελούν έναν κυτταρικό προστατευτικό μηχανισμό απενεργοποιώντας εξωτερικά αποπτωτικά σήματα.

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται από μορφολογικές, βιολογικές και γενετικές αλλαγές και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την διαφοροποίηση κατά την εμβρυογένεση και στον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική εξαλλαγή σε πληθώρα καλοηθών και κακοηθών όγκων. Η απόπτωση είναι υπό γενετικό έλεγχο και μπορεί να ξεκινήσει ενδογενώς από ένα εσωτερικό ρολόι ή από εξωκυττάριους παράγοντες όπως ορμόνες, κυτοκίνες και από ποικιλία



φυσικοχημικών και ιοικών παραγόντων. Με την απενεργοποίηση των αποπτωτικών σημάτων οι ΜΤ βέβαια πιθανώς διαταράσσουν την φυσιολογική αναπτυξιακή διαδικασία, επάγοντας καρκινογένεση, αφού η απόπτωση είναι ένας σημαντικός μηχανισμός απομάκρυνσης σε όγκους κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες στο DNA από νεοπλασία. Όμως είναι δύσκολο να διευκρινιστεί εάν η απόπτωση μπορεί τελικά να επηρεαστεί από την ΜΤ σε κακοήθεις ιστούς (Zhang, 1998). Επίσης οι hMTs όπως και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο bcl-2 περιέχουν πολλά μόρια κυστεΐνης υποδεικνύοντας πιθανή συμμετοχή τέτοιων πρωτεϊνών στην αποφυγή της απόπτωσης. Οι πολλές ομάδες θειόλης στο μόριο της ΜΤ δεσμεύουν τόσο μέταλλα όσο και μεταβολίτες ελευθέρων ριζών (Deng, 1998).

στ. Επαγωγή

Η σύνθεση της ΜΤ (η οποία μπορεί ακόμη και να ρυθμίζεται από το ογκογονίδιο ras) επάγεται από ποικιλία ουσιών όπως μέταλλα (Cd, Zn), γλυκορτικοειδή, οιστρογόνα, κυτοκίνες (IL-1, IL-6) λιποσακχαρίτες και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), που μπορεί να επηρεάσουν την αποπτωτική διαδικασία, με αποφυγή της απόπτωσης από τον Zn και επαγωγή της από το Cd. Πάντως το Cd αποτελεί πιο ικανό και γρήγορο επαγωγέα από τον Zn. Χορήγηση Cd *in vivo*, πριν τη χορήγηση Zn επάγει επιπλέον σύνθεση ΜΤ στο ήπαρ, τους νεφρούς και το πάγκρεας με ακόλουθη δέσμευση και των δύο μετάλλων στην ενδοκυττάρια ΜΤ (Suzuki, 1990). Σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινης χοριακής τροφοβλάστης κατόπιν έκθεσης σε 0.5μM Cd ή σε 2.5μM Zn για 24 ώρες αυξήθηκαν τα επίπεδα ΜΤ, ενώ πολλαπλασιάστηκαν κατά 4 και 8 φορές αντίστοιχα σε πιο μακροχρόνια έκθεση 72 ωρών σε 2μM Cd ή σε 10μM Zn, αντανακλώντας έναν προστατευτικό μηχανισμό έναντι στην τοξικότητα των μετάλλων ή μία όψη της φυσιολογικής ομοιόστασης του Zn (Lehman, 1984).

Η επαγωγή της ΜΤ σε ηπατικά κύτταρα Chang από τρεις πρωταρχικούς παράγοντες, όπως τα βαρέα μέταλλα, τα γλυκορτικοειδή, και τις κυτοκίνες έδειξε ότι μία μετα-μεταγραφική ρύθμιση σχετίζεται με τη συνεργιστική επαγωγή της πρωτεΐνης από τους παράγοντες αυτούς, η οποία μάλλον εξαρτάται από τη συνδυασμένη δράση δύο ή περισσότερων επαγωγέων στο στρες *in vivo* (Iijima, 1990). Η επαγωγή της ΜΤ από τον Zn υπόκειται σε «απευαισθητοποίηση», ενώ στην περίπτωση της δεξαμεθαζόνης (γλυκορτικοειδή) η σύνθεση της ΜΤ αυξάνεται συνεχώς. Όμως η ΜΤ που επάγεται από τη δεξαμεθαζόνη διασπάται πολύ γρηγορότερα, με χρόνο ημίσειας ζωής 11 με 12 ώρες, από αυτήν που επάγεται από τον Zn, με χρόνο ημίσειας ζωής 36 με 38 ώρες (Karin, 1981). Επομένως φαίνεται ότι η ΜΤ είναι πιο ανθεκτική στις πρωτεάσες από τη θειονίνη και ότι η ηπατική διάσπαση της ΜΤ ρυθμίζεται κυρίως από το κυτταρικό περιεχόμενο σε Zn. Έτσι η μείωση της ΜΤ είναι ένδειξη διάσπασής της, ίσως λόγω απώλειας Zn, που χρησιμοποιείται σε πρωτεΐνες όπως μεταγραφικούς παράγοντες κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Nagel, 1995).

Έχει ακόμη παρατηρηθεί παραγωγή ΜΤ σε υψηλά επίπεδα σε απομονωμένα μονοκύτταρα και T και B λεμφοκύτταρα μετά από επαγωγή



με Cd (10 μ M), Zn (125 μ M) και δεξαμεθαζόνη για χρονικό διάστημα από 2 έως 24 ώρες, ενώ για συγκεντρώσεις κάτω των 5 μ M ψευδαργύρου και 1 μ M καδμίου δεν παρατηρήθηκε καθόλου MT (Mesna, 1995). Επίσης η έκθεση μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων σε 125 μ M Zn οδηγούσε σε επαγωγή MT με υψηλότερη συγγένεια για τον Zn απ' ότι για το Cd σε σύγκριση με την ηπατική MT ποντικού, τις MT από ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες ποντικού (Mesna, 1990).

ζ. Κυτταροπροστασία

Η παρουσία της μεταλλοθειονίνης σχετίζεται με προστατευτικές ιδιότητες έναντι της κυτταροτοξικότητας από ελεύθερες ρίζες, που σχετίζεται με τις φλεγμονώδεις διαδικασίες. Στη ρευματοειδή αρθρίτιδα οι φλεγμονώδεις βλάβες στον αρθρικό υμένα φαίνονται να σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες από υψηλή συγκέντρωση ουδετερόφιλων στο αρθρικό υγρό. Βρέθηκε ότι υπαρθρικά υπάρχει ένα στρώμα κυττάρων θεικών για MT, πιθανώς μυοβλάστες προερχόμενοι από περιαγγειακές περιοχές του αρθρικού υμένα, αντανακλώντας το ρόλο της MT ως δεσμευτή ελευθέρων ριζών δρώντας προστατευτικά έναντι των οξειδωτικών βλαβών (Winters, 1997). Οι κυτοκίνες IL-1, IL-6, IL-11, οι οποίες εμφανίζονται αυξημένες σε αρθρώσεις με φλεγμονή ως απόκριση στην κατάσταση στρες, μπορούν επίσης να επάγουν τη σύνθεση MT σε κυτταροκαλλιέργειες, ενώ τα γονίδια της MT εκφράζονται σε επίπεδο mRNA σε ανθρώπινα χονδροκύτταρα και κύτταρα αρθρικού υμένα. Η MT μέσω της ιδιότητάς της να δεσμεύει Zn θα μπορούσε να τροποποιεί τη λειτουργία των ψευδάργυρο-εξαρτώμενων μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας που εκφράζονται στις οστεοαρθρικές αρθρώσεις (Backman, 1998).

Η MT διαθέτει επίσης, σημαντικές ανοσορυθμιστικές ιδιότητες, όπως τη μείωση *in vivo* των αποκρίσεων της χυμικής ανοσίας της ειδικής σε αντιγόνα και την *in vitro* αναστολή της ικανότητας πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων ως απόκριση σε αντιγόνα. Σε λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα χορήγηση της προκαλεί κυτταροτοξικότητα αντικρούοντας τον παραδοσιακό ρόλο που της αποδίδεται, αυτόν της κυτταροπροστασίας (Borghesi, 1996). Σε μετασχηματισμένα κύτταρα ανθρώπινου νεφρού (293), επαγωγή της απόπτωσης προέκυψε όχι μόνο από το ίδιο το κάδμιο, αλλά και από την παρουσία μορίων πολυμερισμένης μεταλλοθειονίνης που απελευθερώνονταν από τα κύτταρα στο θρεπτικό μέσο (Hamada, 1996).

Η MT ως μία πηγή ευμετάβλητου Zn θα μπορούσε να συμμετέχει σε αντιδράσεις μεταφοράς Zn παρά να ευθύνεται για μακρόχρονη αποθήκευση του μετάλλου, του οποίου η απελευθέρωση ελέγχεται και περιορίζεται όταν και όπου απαιτείται. Σε συνθήκες έλλειψης του μετάλλου έχει παρατηρηθεί ταχύτατη απελευθέρωση Zn από την MT, που δε συμβαδίζει με το χρόνο πρωτεόλυσης του μορίου. Οι αντιδράσεις μεταφοράς Zn είναι δύο τύπων, στον έναν το πλήρως συνταγμένο σύμπλεγμα μετάλλου-MT χρησιμεύει ως δότης του μετάλλου και στον άλλον η θειονίνη δρα ως κηλοποιητής (Vallee, 1995). Πάντως οι οξειδοαναγωγικά ενεργές ομάδες δότες θείου της κυστεΐνης προσδίδουν οξειδοαναγωγικά χαρακτηριστικά σε σταθερές θέσεις

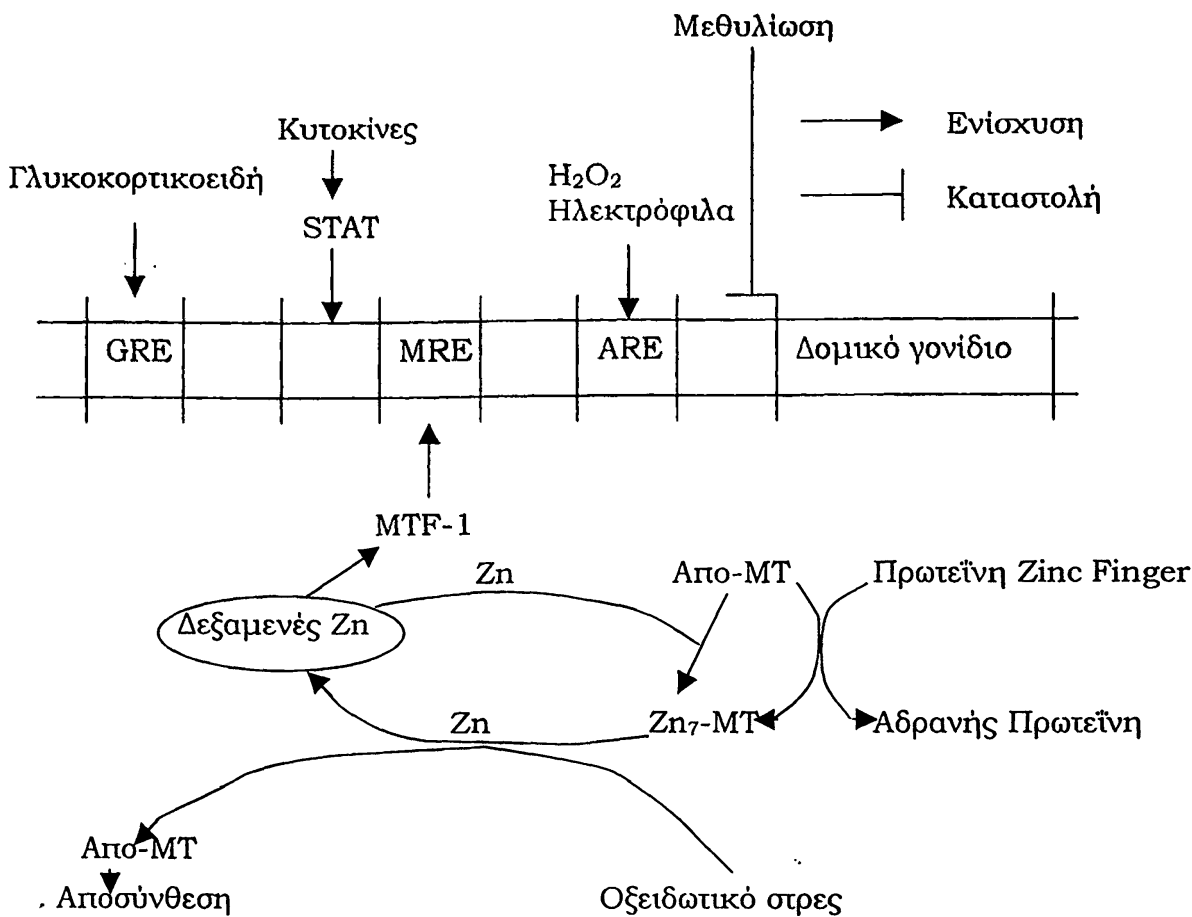


Zn σε πρωτεΐνες. Στο interactive δίκτυο όπου εμφανίζονται πολλαπλοί δεσμοί ψευδαργύρου-θείου, όπως στα σύμπλοκα της MT, σχηματίζεται μία μονάδα σύνταξης κρίσιμη για την ταυτόχρονη οξείδωση των συνδέσμων κυστεΐνης και την επακόλουθη απελευθέρωση του Zn. Οι σύνδεσμοι ψευδαργύρου και θείου στα σύμπλοκα είναι σε τοποθέτηση που ευνοεί το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Ο έλεγχος της κατανομής του κυτταρικού Zn ως λειτουργία της ενεργειακής κατάστασης του κυτάρου πρέπει να είναι ο ρόλος της MT, σύμφωνα και με τη συχνή χρήση της κυστεΐνης ως σύνδεσμος Zn στις πρωτεΐνες ως μέσο ισχυρής και ασθενούς δέσμευσης θειολών και δισουλφιδίων αντίστοιχα. Έτσι σχετίζονται οι αλλαγές της αναγωγικής δύναμης του κυτάρου με τη σταθερότητα του δικτύου ψευδαργύρου-θείου στην MT και η σχετική κινητικότητα του Zn και ο έλεγχός του (Maret, 1998).

Πίνακας 4. Ιστορία της μεταλλοθειονίνης (τροποπ. από Nordberg, 1998)

Χρονολογία	Γεγονός
1957	Απομόνωση
1960, 1961	Μεταλλοθειονίνη
1964	Επαγωγή από Cd
1971	Τροποποίηση τοξικότητας Cd
1972	Αμινοξική σύνθεση
1976	Αλληλουχία
1979	1 ^ο Διεθνές Συνέδριο, ονοματολογία RIA
1983	Διεθνές Συνέδριο MT και νεφροτοξικότητα
1985, 1992	2 ^ο και 3 ^ο Διεθνές Συνέδριο για την MT





Σχήμα 4. Ρύθμιση γονιδίου MT. Ο υποκινητής έχει πολλά μεταθετά στοιχεία που ενισχύουν τη μεταγραφή μεταξύ των οποίων: 1) Μεταθετά στοιχεία μετάλλων (MREs), που ενεργοποιούνται από τον μεταγραφικό παράγοντα (MTF-1) μετά την κατάληψη από Zn, 2) Μεταθετά στοιχεία γλυκοκορτικοειδών (GRE), 3) Στοιχεία που ενεργοποιούνται από μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές μεταγραφής (STAT) μέσω σηματοδότησης με κυτοκίνες και 4) Μεταθετά στοιχεία αντιοξειδωτικών (ή ηλεκτρόφιλα) (ARE) που ενεργοποιούνται ως απόκριση στην οξειδοαναγωγική κατάσταση. Η μεθυλίωση μπορεί να καταστέλλει την έκφραση σε κάποια κύτταρα όγκων (από Sato, 2002).

VI. STRESS ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

1. Γενικά

Είναι γνωστό ότι οξύ ή χρόνια στρες που προέρχεται από βιολογικούς και φυσικοχημικούς παράγοντες, το οποίο φτάνει ή ακόμη υπερβαίνει τα φυσιολογικά όρια ανοχής, μπορεί να εμποδίσει την αναπαραγωγική επιτυχία, την αύξηση, την ανοχή σε μολυσματικές ασθένειες και την επιβίωση των ιχθύων. Εάν το στρες είναι έντονο ή μακροχρόνιο όλο και μεγαλύτερες βαθμίδες βιολογικής οργάνωσης θα επηρεαστούν από αυτό. Η συσσωρευτική δράση υποθανατηφόρων παραγόντων στρες μπορεί να μειώσει τη στρατολόγηση νεαρών ιχθυδίων μειώνοντας τελικά και τους πληθυσμούς.

Το **στρες** αρχικά ορίστηκε ως το σύνολο των φυσιολογικών αποκρίσεων με τις οποίες ένα ζώο προσπαθεί να διατηρήσει ή να επανακτήσει έναν φυσιολογικό μεταβολισμό όταν αντιμετωπίζει μία φυσική ή χημική δύναμη (Selye, 1950). Έτσι το στρες στα ψάρια προκύπτει από βιοτικές (βιολογικές) ή αβιοτικές (περιβαλλοντικές) προκλήσεις ή δυνάμεις (παράγοντες στρες) που τελικά αναγκάζουν τις ομοιοστατικές ή σταθεροποιητικές αποκρίσεις του οργανισμού να υπερβούν την συνήθη ικανότητα ελέγχου των φυσιολογικών διαδικασιών, ώστε να μπορούν να αντεπεξέλθουν τα άτομα, οι πληθυσμοί ή ακόμα και τα οικοσυστήματα. Ο εγκλιματισμός μπορεί να επέλθει όταν οι αποκρίσεις στο στρες είναι τέτοιες που να μπορεί να επανακτηθεί μία ικανοποιητική σχέση μεταξύ του τροποποιημένου περιβάλλοντος και του οργανισμού ή του βιολογικού συστήματος ανώτερης βαθμίδας. Παρόλα αυτά, η συσσωρευτική δράση ακόμα και υποθανατηφόρων (υποτοξικών) πολλαπλών παραγόντων στρες μπορεί τελικά να οδηγήσει σε θάνατο, αν και κάθε παράγοντας ξεχωριστά μπορεί να μην υπερβαίνει τα φυσιολογικά όρια ανοχής.

Οι αποκρίσεις στο στρες των ιχθύων μπορούν να ταξινομηθούν έτσι ώστε να περιλαμβάνουν σταδιακά υψηλότερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης σε:

α) *Πρωτογενείς αποκρίσεις* (ενδοκρινικό σύστημα). Κατόπιν της αντίληψης ερεθίσματος στρες από το κεντρικό νευρικό σύστημα, ορμόνες όπως η κορτιζόλη και η αδρεναλίνη συντίθενται και απελευθερώνονται στην αιματική κυκλοφορία. Η κορτιζόλη παράγεται έμμεσα αφού ο παράγοντας απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης από τον υποθάλαμο διεγείρει την υπόφυση ώστε να απελευθερώσει την αδρενοκορτικοτροπίνη (ACTH), η οποία μεταφέρεται μέσω της αιματικής κυκλοφορίας στα επινεφρίδια, τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν την κορτιζόλη. Στους ιχθύς η κορτιζόλη συνδυάζει γλυκοκορτικοειδείς και αλατοκορτικοειδείς δράσεις, οι οποίες συμβάλλουν στην αποκατάσταση της ομοιόστασης των αλάτων. Η αδρεναλίνη απελευθερώνεται κυρίως από τα επινεφρίδια κατόπιν απευθείας διέγερσης από το συμπαθητικό νευρικό σύστημα.

β) *Δευτερογενείς αποκρίσεις* (αλλαγές στο αίμα και τους ιστούς). Οι αιματολογικές και ιστικές αλλαγές περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων ανεβασμένα επίπεδα σακχάρου του αίματος (υπεργλυκαιμία) και μειωμένο



χρόνο πήξης του αίματος. Ξεκινάει διούρηση, η οποία ακολουθείται από απώλεια ηλεκτρολυτών του αίματος και οσμωρυθμιστικές δυσλειτουργίες. Μπορεί να παρατηρηθούν επίσης αλλαγές στους ιστούς όπως στέρωση γλυκογόνου στο ήπαρ και ενδονεφρικής βιταμίνης C, κορτικοστεροειδών και λιπιδίων, καθώς και αιμορραγία στο θύμο αδένα και υπερτροφία του νεφρού (παρεγχυματική υπερτροφία), ακόμα ατροφία του γαστρικού βλεννογόνου και κυτταρικές αλλοιώσεις στο σπλήνα και το νεφρό.

γ) *Τριτογενείς αποκρίσεις* (στα άτομα και τους πληθυσμούς). Περιλαμβάνουν μείωση της αύξησης, της αντίστασης στις μολυσματικές ασθένειες, της αναπαραγωγικής επιτυχίας και της επιβίωσης. Κατόπιν αυτών μπορεί να μειωθεί και η στρατολόγηση (recruitment) σε διαδοχικά βιολογικά στάδια οπότε και ο πληθυσμός φθίνει. Σε επίπεδο βιοκοινότητας ή οικοσυστήματος, οι διαταραχές στη ροή ενέργειας μέσω των διάφορων τροφικών επιπέδων μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγή της σύνθεσης των ειδών.

Οι αποκρίσεις στο στρες αρχικά βοηθούν στην προσαρμογή των οργανισμών, μέσω της διατήρησης της ομοιόστασης. Για παράδειγμα, η αύξηση του σακχάρου του αίματος λόγω της δράσης της αδρεναλίνης προμηθεύει με την κατάλληλη ενέργεια τον οργανισμό για την αντίδραση “μάχης ή φυγής” (“fight-or-flight”) έναντι στο στρες. Πηγή του σακχάρου είναι το γλυκογόνο του ήπατος και των μυών από όπου αντίστοιχα στερείται. Τα επίπεδά του κατόπιν διατηρούνται σταθερά με τη δράση της κορτιζόλης, η οποία επάγει τη γλυκονεογένεση στο ήπαρ και μπορεί να καταστείλει την περιφερειακή πρόσληψη οξυγόνου ή να τροποποιήσει τη δράση άλλων γλυκαιμικών ορμονών. Εάν οι ενεργειακές απαιτήσεις για μυϊκή δραστηριότητα είναι μεγάλες, μπορεί να εμφανιστούν στην κυκλοφορία και αναπνευστικοί μεταβολίτες όπως το γαλακτικό οξύ. Βέβαια συχνά, δε δείχνουν όλες οι φυσιολογικές παράμετροι αυτές τις χαρακτηριστικές αλλαγές υπό όλες τις συνθήκες. Κάποιες τοξικές ουσίες για παράδειγμα, όπως το **κάδμιο**, μπορεί να μην προκαλέσουν πρωτογενείς ή δευτερογενείς αποκρίσεις στα ψάρια ακόμα και όταν καταστέλλουν ζωτικές λειτουργίες.

Σε χρόνιες καταστάσεις όμως, αυτές οι αποκρίσεις μπορεί τελικά να προκαλέσουν επιβλαβή προσαρμογή και να απειλήσουν την υγεία του οργανισμού. Στις πρωτογενείς αποκρίσεις, οι αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις των κορτικοστεροειδών ορμονών μαζί με την καταβολική δράση των ορμονών (γλυκονεογένεση) μπορεί να εκφραστούν ως μειωμένη αύξηση, λευκοπενία ή μειωμένη ανθεκτικότητα στις ασθένειες. Στις δευτερογενείς αποκρίσεις, οι σοβαρότερες αλλαγές είναι οι αιματολογικές και αυτές των ηλεκτρολυτών του αίματος. Η αδρεναλίνη που επάγεται από το στρες, εκτός από το ότι κινητοποιεί το γλυκογόνο του ήπατος στους ιχθύς για την άνοδο του σακχάρου του αίματος, αυξάνει επίσης την βραγχιακή αιματική ροή και τη διαπερατότητα των βραγχίων για τη διευκόλυνση της ανταλλαγής αερίων οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Όμως η ακόλουθη οσμωτική είσοδος νερού και η ταχεία διούρηση μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρές ανισορροπίες των ηλεκτρολυτών



που διαταράσσουν την οσμωρυθμιστική ικανότητα και γρήγορα γίνονται απειλητικές για τη ζωή.

Πίνακας 5: Προτεινόμενες φυσιολογικές δοκιμασίες για την εκτίμηση των ορίων ανοχής των ψαριών σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες στρες (από Passino 1984, Reinert & Hohreiter 1984, Wedemeyer et al 1984, Buckley et al 1985).

Φυσιολογική Δοκιμασία	Ερμηνεία αποτελεσμάτων εάν είναι	
	Χαμηλά	Υψηλά
Αιματολογικές παράμετροι		
Ερυθροκύτταρα	Αναιμίες, αιμοδιάλυση λόγω διαταραχής της οσμωρύθμισης	Πολυκυτταραιμία από στρες, αφυδάτωση, αιμοσυγκέντρωση λόγω βραγχιακής βλάβης
Λευκοκύτταρα	Λευκοπενία λόγω οξέος στρες	Λευκοκυττάρωση λόγω βακτηριακής μόλυνσης
Θρομβοκύτταρα	Μη φυσιολογικός χρόνος πήξης αίματος	Θρομβοκυττάρωση λόγω οξέος ή χρόνιου στρες
Χλωριόντα πλάσματος	Βλάβη χλωριόντων βραγχιακών κυττάρων, οσμωρύθμιση διακυβεύεται	Αιμοσυγκέντρωση, οσμωρύθμιση διακυβεύεται
Χοληστερόλη πλάσματος	Παρεμπόδιση στο μεταβολισμό των λιπιδίων	Χρόνιο στρες, διαιτητική ανισορροπία λιπιδίων
Χρόνος πήξης αίματος	Οξύ στρες, θρομβοκυτταροπενία	Σουλφοναμίδες ή θεραπείες ασθενειών με αντιβιοτικά που επηρεάζουν την εντερική μικροχλωρίδα
Κορτιζόλη πλάσματος	Φυσιολογικές συνθήκες	Χρόνιο ή οξύ στρες
Γλυκόζη πλάσματος	Νηστεία	Οξύ ή χρόνιο στρες
Αιματοκρίτης αίματος	Αναιμίες, αιμοδιάλυση	Αιμοσυγκέντρωση λόγω βραγχιακής βλάβης, αφυδάτωση, πολυκυτταραιμία από στρες
Αιμοσφαιρίνη αίματος	Αναιμίες, αιμοδιάλυση, διατροφικές ασθένειες	Αιμοσυγκέντρωση λόγω βραγχιακής βλάβης, αφυδάτωση, πολυκυτταραιμία από στρες
Αιμοσφαιρίνη βλεννογόνου	Φυσιολογικές συνθήκες	Οξύ στρες



Γαλακτικό οξύ αίματος	Φυσιολογικές συνθήκες	Οξύ ή χρόνια στρες, κολυμβητική κόπωση
Οσμωτικότητα αίματος	Εξωτερική παρασιτική μόλυνση, έκθεση σε ρυπαντές, αιμοδιάλυση	Αφυδάτωση, αύξηση αλατότητας σε περίσσεια οσμωρυθμιστικής ικανότητας, διούρηση, οξέωση
Ολική πρωτεΐνη αίματος	Μολυσματική ασθένεια, βλάβη νεφρών, διατροφική ανισορροπία, νηστεία	Αιμοσυγκέντρωση, διαταραγμένη ισορροπία νερού

Ιστικές παράμετροι

Ατροφία γαστρικού βλεννογόνου	Φυσιολογικές συνθήκες	Χρόνιο στρες
Γλυκογόνο ήπατος, μυών	Χρόνιο στρες, νηστεία	Ηπατικές βλάβες λόγω δημιουργίας εκτεταμένων κενотоπιών (vacuolation), δίαιτα υψηλή σε υδατάνθρακες
Ενδονεφρική υπερτροφία, μέγεθος κυττάρων και διάμετρος πυρήνα	Καμίας γνωστής σημασίας	Χρόνιο στρες
Λόγος RNA:DNA μυών	Διαταραχές αύξησης, χρόνια στρες	Καλή αύξηση

Πολλές τριτογενείς αποκρίσεις όπως οι αλλαγές του μεταβολικού ρυθμού, της υγείας, της συμπεριφοράς, της αύξησης, της επιβίωσης και της αναπαραγωγικής επιτυχίας μπορούν να είναι ενδείξεις υπέρβασης των ορίων ανοχής των ιχθύων λόγω δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών κι αυτές οι ολιστικές αποκρίσεις προκύπτουν από προβλήματα σε κατώτερες βαθμίδες βιολογικής οργάνωσης. Μία σοβαρή περίπτωση είναι οι *δυσμενείς δράσεις στην αναπαραγωγή* εκφρασμένη ως ωοκυτταρική ατρησία, αναστολή της ωοτοκίας και μειωμένη γονιμότητα και επιτυχία εκκόλαψης. Όταν περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία του νερού ή η αλατότητα επηρεάζουν τη γαμετογένεση, τυχόν αλλαγές σ' αυτούς τους παράγοντες θα έχουν δυσμενή δράση στη γονιμότητα. Επίσης, κάποιες ορμόνες που μετέχουν στις αποκρίσεις στο στρες, εμπλέκονται φυσιολογικά και στον αναπαραγωγικό κύκλο, οπότε αλλαγή στην αναπαραγωγική επιτυχία μπορεί να είναι ένδειξη ενδοκρινών διαταραχών λόγω χρόνιου στρες ή και ένδειξη μεταβολής των περιβαλλοντικών παραγόντων λόγω αλλαγών των ενδιαιτημάτων (habitat).

Όπως προαναφέρθηκε οι αλλαγές που προκαλούνται από έναν παράγοντα στρες μπορεί να είναι μεταβολικής φύσεως, να επηρεάζουν τα μοριακά και κυτταρικά συστατικά (π.χ. ένζυμα) ή να αναστέλλουν



λειτουργίες όπως του μεταβολισμού, της ανοσολογικής απόκρισης, της οσμορύθμισης ή της ορμονικής ρύθμισης. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις συνήθως αλληλεπιδρούν συνεργιστικά και συσσωρευτικά με τους παράγοντες στρες στα υδάτινα οικοσυστήματα και κάνουν την εξήγηση και εκτίμηση των αποκρίσεων των οργανισμών στο στρες από τους ρυπαντές ακόμη πιο περίπλοκη (Adham, 2002).

2. Μεταλλοθειονίνες και υδρόβιοι οργανισμοί

Στους υδρόβιους οργανισμούς η παρουσία των MT έχει επιβεβαιωθεί σε διαφορετικές ζωικές ομάδες, με παρόμοιο όμως ρόλο. Η επαγωγή τους σχετίζεται με προστασία των κυτταρικών δομών από μη ειδική αλληλεπίδραση των κατιόντων μετάλλων όπως Ag, Hg, Cu, Cd, Zn με βιολογικά μόρια (π.χ. μεταλλοένζυμα). Οι MT και εδώ δεσμεύουν τα μέταλλα σε μη τοξική μορφή κι έτσι αποτοξικοποιούν την περίσσεια τους, που εισέρχεται στο κύτταρο. Όταν κορεστεί η δεσμευτική ικανότητα των μεταλλοθειονινών (είτε γιατί η σύνθεση πέραν μιας ποσότητας περιορίζεται γενετικά είτε γιατί η αυξημένη συγκέντρωση μετάλλου παρεμβαίνει στη σύνθεσή τους) παρουσιάζονται τοξικά φαινόμενα.

Στους ιχθύς το κάδμιο είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της MT που ακινητοποιεί στους νεφρούς και το ήπαρ το μέταλλο σε μη τοξική μορφή. Στα χρυσόψαρα *Carassius auratus* η ενεργότητα της ηπατικής κινάσης του πυρουβικού αρχικά αναστέλλεται από το κάδμιο, μετά τη βιοσύνθεση της MT όμως, η ενζυμική δραστηριότητα εν μέρει αποκαθίσταται αποδεικνύοντας έναν αποτοξικοποιητικό ρόλο για την MT (Isani, 2001).

Στο ήπαρ της ιριδιζουσας πέστροφας μετά από χορήγηση Cd ανιχνεύτηκαν δύο ισότυποι MT παρόμοιοι με τις MT των θηλαστικών. Μάλιστα το RNA έδειχνε ομολογία με probe από MT-I cDNA ποντικού και έκθεση κυττάρων ηπατώματος ιριδιζουσας πέστροφας σε Cd και Zn επήγαγε τη σύνθεση MT και MT-mRNA. Αντίθετα έκθεση εμβρυϊκών κυττάρων σολομού Chinook δεν οδήγησε σε σύνθεση MT, θέτοντας ως πιθανότητα ότι η έκφραση του γονιδίου της MT στα ψάρια να ρυθμίζεται κατά την ανάπτυξη (Price-Hughey 1986, 1987).

Σε τελεόστεους ιχθύς (καλκάνι-*Scophthalmus maximus*) η ηπατική MT εκφραζόταν σε επίπεδο mRNA καθ' όλη την εμβρυϊκή και πρώιμη προνυμφική ανάπτυξη σε διπλάσια ποσότητα απ' ότι στα νεαρά ιχθύδια, με εξαίρεση την περίοδο περί την εκκόλαση όπου εμφανίζονταν μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Καθώς η ανοχή στο κάδμιο σχετίζεται με επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της MT από τα μέταλλα, η αυξημένη ευαισθησία στα μέταλλα των πρώιμων προνυμφικών σταδίων ίσως οφείλεται στην μειωμένη μεταγραφή MT σε αυτό το στάδιο (George, 1996).

Συχνά παρατηρείται σημαντική διακύμανση της σύνθεσης MT μεταξύ ειδών, ακόμα και σε μέλη των ίδιων ταξινομικών ομάδων κατόπιν έκθεσης σε αυξημένες συγκεντρώσεις μετάλλων. Έκθεση νεαρών ατόμων κυπρίνου και τιλάπιας σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις Zn (10, 50, 100ppb) επί 3 εβδομάδες έδειξε ότι σημαντική επαγωγή MT σε επίπεδο mRNA συνέβαινε στα βράγχια και το ήπαρ στην τιλάπια, με τα βράγχια να εμφανίζουν πιο



ξεκάθαρα την επαγωγή από το ήπαρ, όπου ενδεχομένως η συγκέντρωση Zn να ρυθμίζεται και να μη συσσωρεύεται. Αντίθετα στον κυπρίνο δεν διαπιστώθηκε καθόλου επαγωγή βραγχιακής ή ηπατικής MT στις ίδιες συνθήκες έκθεσης (Lam, 1998).

Τα επίπεδα του mRNA της ηπατικής MT αυξάνουν στο τέλος της αναπαραγωγικής ωριμότητας σε θηλυκά και αρσενικά άτομα ιριδιζουσας πέστροφας, ενώ κατά την ανάπτυξη των ωοθηκών τα επίπεδα του mRNA της MT πέφτουν όπως και του Zn που είναι προσδεμένος στην MT. Οι διακυμάνσεις αυτές κατά την ανάπτυξη φαίνονται να σχετίζονται με τη ρύθμιση των μετάλλων (Olsson, 1990). Ακόμα, οι κάβουρες φυσιολογικά χρησιμοποιούν τις MT (και τα σύμπλοκα γλουταθειόνης) για να ρυθμίσουν τα επίπεδα των μετάλλων, που ποικίλλουν στην αιμόλεμφο κατά την έκδυση ως αποτέλεσμα της διάσπασης και σύνθεσης της αιμοκυανίνης. Η περίσσεια του μετάλλου αποβάλλεται με τα κόπρανα και τα ούρα (Hook, 2001).

Η MT στα θηλαστικά είναι μία πολυρυθμιζόμενη πρωτεΐνη και η έκφρασή της μπορεί να επάγεται στους ιστούς από ποικιλία ορμονών και παράγοντες στρες. Τα επίπεδα των κορτικοστεροειδών, και ειδικά της κορτιζόλης που διαθέτει τόσο μεταλλοκορτικοειδείς όσο και γλυκοκορτικοειδείς ιδιότητες, επίσης αυξάνονται σημαντικά μετά από στρες στα σπονδυλωτά, όπως οι ιχθύς. Επομένως, τόσο η κορτιζόλη όσο και η MT μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες πρωτογενούς απόκρισης στο στρες που προέρχεται από αλλαγές στις φυσικοχημικές συνθήκες (αλατότητα, αναισθησία, χειρισμοί, υψηλή ιχθυοφόρτιση), αλλά και από την επίδραση των μετάλλων (κάδμιο, χαλκός) (Wu, 2002).

Στα ενήλικα άτομα της ιλάπια *in vivo* μάλιστα, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επάγουν τη σύνθεση MT και να συμβάλλουν με αυτή τη ρύθμιση της έκφρασης της MT στην ενίσχυση της ανθεκτικότητας του οργανισμού έναντι της τοξικότητας του καδμίου, στοιχεία που υπαινίσσονται την παρουσία μεταθετών στοιχείων MREs και GREs και στα γονίδια της MT στα ψάρια. Η προγεστερόνη μάλιστα, πρόδρομος ορμόνη στη βιογένεση της κορτικοστερόνης, οιστραδιόλης, αλδοστερόνης και κορτιζόλης μπορεί να επάγει πιο αποτελεσματικά τη σύνθεση της ηπατικής MT για την αποτοξικοποίηση από τα μέταλλα (Wu, 2002).

Το γεγονός ότι οι αλληλουχίες των MREs διατηρούνται σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, σε ανθρώπους, ποντίκια, αλλά και σε ιχθύς, αχινούς, μύγες υποστηρίζει την άποψη ότι και οι ιδιότητες των στοιχείων αυτών, μπορεί να διατηρούνται στον τρόπο δράσης τους κατά τη μεταγραφή (Zhu, 1996).

Όσον αφορά την κατανομή τους, η παρουσία MT σε διάφορους ιστούς από γατόψαρα εμφανιζόταν σχετικά πιο άφθονη στο ήπαρ, με τους νεφρούς και το πάγκρεας να ακολουθούν όπως και στα θηλαστικά. Ανοσολογικά υφίσταται αξιοσημείωτη ομολογία μεταξύ των MT στα ψάρια, ενώ μερική μεταξύ ιχθύων και αμφιβίων (φρύνος) ή ασπονδύλων (κάβουρας) στους αντιγονικούς καθοριστές (Chatterjee, 1990).

Ανοσολογική σύγκριση αντι-ορών MT από ιριδιζουσα πέστροφα και άλογο όσον αφορά την ειδικότητά τους (με την ανοσοενζυμική μέθοδο της



ELISA) έδειξε ότι του αλόγου αντιδρούσε πλήρως με MT ανθρώπου, επίμυος, κουνελιού και καθόλου με ιχθύς (πέστροφας ή γλώσσας) ή σκόληκα. Η διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ διαφορετικών MT θηλαστικών οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχουν ομοιότητες στην πρωτοταγή δομή και την αλληλουχία των επιτόπων τους. Αντίθετα ο αντι-ορός από πέστροφα αντιδρούσε πλήρως με MT από ιχθύς (γλώσσα, καλκάνι, πέρκα, σολομό), μερικώς με MT από μαλάκια (στρείδι, μύδι) και καθόλου με ανθρώπινο, μυός, επίμυος, σκόληκα ή καρκινοειδούς (κάβουρα). Επίσης η αντίδραση με τα αντισώματα αντι-MT πέστροφας δεν εξαρτάται από την παρουσία ή τη φύση των μετάλλων που είναι δεσμευμένα στην πρωτεΐνη (Norey, 1990).

Η πρόσληψη των μετάλλων στα μύδια μοιάζει να είναι κυρίως μία παθητική διαδικασία αντίθετα με την απομάκρυνσή τους, στην οποία ενεργό ρόλο παίζουν τα λυσοσώματα, τα οποία συσσωρεύουν τα μέταλλα (Cu) και τα απεκκρίνουν ως υπολειπόμενα σωμάτια. Σε αυτά τα τριτογενή λυσοσώματα, τα μέταλλα είναι δεσμευμένα είτε σε προϊόντα υπεροξειδωσής των λιπιδίων (στη λιποφουσκίνη, μια αδιάλυτη, φθορίζουσα, λιποπρωτεϊνική χρωστική που παγιδεύει τα μέταλλα) ή σε πολυμερισμένες MT. Για το κάδμιο είναι πιθανόν να υπάρχει μία αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο βιοχημικών διαδικασιών (Viarengo, 1987).

Στα μύδια, η παρουσία των MT διαπιστώθηκε κατόπιν έκθεσης σε κάδμιο σε διάφορους ιστούς όπως σε βράγχια, ηπατοπάγκρεας, νεφρούς και μανδύα, με ρόλο αποτοξικοποίησης. Η παρουσία ιχνοποσοτήτων MT και σε άτομα που δεν είχαν εκτεθεί, δείχνει πιθανό ρόλο τους στη ρύθμιση των απαραίτητων μετάλλων Zn και Cu. Τα επίπεδα της MT κατόπιν χρόνιας έκθεσης μυδιών (*Mytilus edulis*) σε κάδμιο άρχισαν να παρατηρούνται μετά τις 7 ημέρες έκθεσης και έφταναν στο μέγιστο στις 30 ημέρες έκθεσης, από εκεί και μετά ακολουθούσε ισορροπία, ίσως και ελαφρά μείωση είτε λόγω παύσης της παραγωγής MT είτε λόγω εξισορρόπησης της σύνθεσης και καταβολισμού της (Bebianno, 1991).

Βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες όπως η εποχιακή διακύμανση, το φύλο, η ηλικία, το μέγεθος του ζώου, και η διαίτα του επηρεάζουν τα επίπεδα της MT στα δίθυρα και είναι πιθανόν ότι παρεμβαίνουν στη σύνθεση των MT ως απόκριση στην παρουσία των μετάλλων στα υδάτινα οικοσυστήματα. Σε στρείδια του Ειρηνικού (*Crassostrea gigas*) που συλλέχθηκαν από ρυπασμένες από μέταλλα περιοχές, τα επίπεδα MT ήταν ανάλογα της συγκέντρωσης των μετάλλων και της διακύμανσης της αλατότητας στις εκβολικές περιοχές (Boutet, 2002).

Η ύπαρξη πρωτεϊνών πλούσιων σε θειολικές ομάδες δεν απαντάται μόνο σε θηλαστικά και υδρόβιους οργανισμούς, αλλά και σε διάφορους φυτικούς ιστούς, όπου ονομάζονται φυτοχελατίνες εάν το κατάλοιπο στο καρβοξυτελικό άκρο είναι η γλυκίνη ή ομοφυτοχελατίνες εάν είναι η β-αλανίνη, και σε μη θηλαστικά όπου ονομάζονται κάδμιο-δεσμευτικές πρωτεΐνες. Το γεγονός ότι οι MT είναι ενδογενείς πρωτεΐνες στα περισσότερα είδη τις καθιστά κατάλληλο δείκτη περιβαλλοντικής έκθεσης στα μέταλλα. Έτσι αυτές οι πρωτεΐνες έχουν προταθεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή και



άλλους διεθνείς επιστημονικούς οργανισμούς ώστε να περιληφθούν σε προγράμματα περιβαλλοντικής παρακολούθησης ως βιοδείκτες για την εκτίμηση της ρύπανσης από μέταλλα και της αξιολόγησης δυσμενών επιδράσεων σε είδη, οικοσυστήματα και τον ίδιο τον άνθρωπο (Dabrio, 2002).

3. Υδατική Τοξικολογία

Τα τελευταία χρόνια τοξικολογικές μελέτες σχετικές με διάφορους περιβαλλοντικούς ρυπαντές γίνονται σε ψάρια και ασπόνδυλα, τα οποία είναι πιο ευαίσθητα στους ρυπαντές και οι αποκρίσεις τους ποικίλλουν, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις και σε φύκη και υδρόβια φυτά. Είναι σημαντικό οι βιοκοινότητες και τα οικοσυστήματα στο σύνολό τους να προστατεύονται από τις δυσμενείς επιδράσεις των ρυπαντών και όχι μόνον κάποια ζωική ομάδα όπως οι ιχθύς. Η προσπάθεια ερμηνείας των φαινομένων στο επίπεδο του συνόλου του οργανισμού βοηθά πολλές φορές να ερμηνευθεί η σημασία των αλλαγών, εάν αυτές δηλαδή είναι επιβλαβείς ή μία συνήθης προσαρμογή του οργανισμού εντός των φυσιολογικών ορίων.

Η σκοπιμότητα των δοκιμασιών (τεστ) τοξικότητας στους υδρόβιους οργανισμούς είναι αφ' ενός ο καθορισμός των επιπέδων συγκέντρωσης όπου μία ουσία γίνεται επιβλαβής για τους οργανισμούς χωρίς να υπάρχει μία εμφανής δράση. Με βάση τα στοιχεία αυτά συντάσσονται τα Κριτήρια Ποιότητας Νερού (Water Quality Criteria) και τελικά οι οδηγίες για τα Πρότυπα Ποιότητας Νερού (Water Quality Standards or Objectives). Οι δοκιμασίες τοξικότητας μπορούν αφ' ετέρου να χρησιμοποιηθούν κατά την βιολογική παρακολούθηση (monitoring) της τοξικότητας αποβλήτων, ειδικά εάν πολλές τοξικές ουσίες είναι παρούσες σε αυτά ή δεν είναι γνωστό ακριβώς ποιες είναι οι ουσίες αυτές, ή για να γίνει εκτίμηση της ποιότητας των επιφανειακών νερών.

Οι παράμετροι που μπορεί να επηρεάζουν την τοξικότητα μιας ουσίας είναι βιολογικές και φυσικοχημικές. Στις βιολογικές περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων το είδος του οργανισμού, το βιολογικό του στάδιο (οι νεοεκκολαφθείσες προνύμφες ψαριών όπως και τα ασπόνδυλα κατά την έκδυσή τους είναι πιο ευαίσθητα) και το μέγεθος του ατόμου (τα μικρότερα άτομα έχουν πιο υψηλούς μεταβολικούς ρυθμούς), η κατάσταση της υγείας του, η διατροφική του κατάσταση (μία δίαιτα υψηλή σε πρωτεΐνες κάνει τα ψάρια πιο ανθεκτικά) και ο εγκλιματισμός. Οι φυσικοχημικές παράμετροι περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, το διαλυμένο οξυγόνο, το pH, τη σκληρότητα, την αλατότητα και την οργανική ύλη.

Η θερμοκρασία είναι εξαιρετικά σημαντική παράμετρος για ποικιλόθερμους οργανισμούς, όπως τα ψάρια, αλλά επειδή επίσης επηρεάζει τις χημικές ιδιότητες των ρυπαντών. Το διαλυμένο οξυγόνο όταν μειωθεί κάτω από τα επίπεδα κορεσμού του προκαλεί αύξηση της θνησιμότητας. Η συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων (pH) είναι σημαντική για τους ρυπαντές που ιονίζονται. Για κάποιες ουσίες οι μη ιονισμένες μορφές ευθύνονται για το μεγαλύτερο μέρος της τοξικότητάς τους, καθώς οι μορφές αυτές διαχέονται πιο εύκολα μέσω των μεμβρανών των βραγχίων



(π.χ. αμμωνία). Για τα **μέταλλα** η ιονισμένη μορφή είναι συνήθως η πιο τοξική, φαινόμενο που εμπλέκεται και με τη σκληρότητα του νερού. Η σκληρότητα (συγκέντρωση αλάτων ασβεστίου και μαγνησίου) γενικά συμμεταβάλλεται με την αλκαλικότητα και το pH. Για τα **μέταλλα** η τοξικότητά τους αυξάνει σε σκληρά νερά καθώς αυξάνει παράλληλα και το pH, αλλά σε αυτές τις συνθήκες τα βράγχια προσλαμβάνουν λιγότερα μέταλλα όπως ψευδάργυρο. Η αλατότητα επηρεάζει κυρίως τους θαλάσσιους οργανισμούς οι οποίοι γίνονται πιο ευαίσθητοι στους ρυπαντές σε χαμηλές αλατότητες. Η οργανική ύλη (διαλυτή ή σωματιδιακή ή ακόμα και οργανισμοί όπως κύτταρα φυκών) είναι επίσης σημαντικός παράγοντας, καθώς μπορεί να δεσμεύει και να προσροφά τους ρυπαντές κι έτσι να τους αποτοξικοποιεί, γεγονός σημαντικό για αρκετά μέταλλα όπως ο χαλκός.

Οι δοκιμασίες τοξικότητας μπορεί να περιλαμβάνουν δοκιμασίες ολόκληρου του βιολογικού κύκλου (νεοεκκολαφθείσες προνύμφες ψαριών που φτάνουν σε αναπαραγωγική ωριμότητα, αναπαράγονται και οι ουσίες δοκιμάζονται και στους απογόνους τους δεύτερης γενιάς), βιοενεργειακές μελέτες αύξησης (όπου μεταξύ άλλων εμπλέκονται και προβλήματα εγκλιματισμού, όρεξης και ικανότητας μετατροπής της τροφής) ή κινητικής επίδοσης (η μέγιστη κολυμβητική επίδοση επηρεάζεται από τους ρυπαντές μέσω της δράσης τους στα βράγχια και στην αναπνευστική ικανότητα). Ακόμα γίνονται μελέτες συμπεριφοράς (συγκεντρώσεων που δεν έχουν εμφανείς δράσεις στη φυσιολογία αλλά μπορεί να επηρεάσουν τη διατροφή, τη θήρευση, την αναπαραγωγή, την ικανότητα μάθησης, τις κοινωνικές αλληλεπιδράσεις και την κίνηση προσανατολισμού), μελέτες βιοχημείας και φυσιολογίας (για τον καθορισμό της υγείας του οργανισμού και του τρόπου δράσης των ρυπαντών μέσω ταχέων και ευαίσθητων μεθόδων) και ιστοπαθολογικές μελέτες για τον προσδιορισμό της ωρίμανσης των γονάδων και την εξήγηση της μειωμένης αναπαραγωγικής ικανότητας.

Η βιοσυσσώρευση (βιοσυγκέντρωση) των μετάλλων στους οργανισμούς και η τελική τους τοξικότητα εξαρτάται από παράγοντες παρόμοιους με αυτούς που μπορεί να επηρεάζουν την τοξικότητα οποιουδήποτε ρυπαντή, όπως το είδος του οργανισμού, την ικανότητά του για μεταβολισμό και απέκκριση (όπου παίζουν σημαντικό ρόλο επίσης το φύλο, η ηλικία και η φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού) και οι χημικές ιδιότητες του νερού (η συγκέντρωση ιόντων και οργανικού υλικού, που επηρεάζουν τη διαλυτότητα) και ο τύπος του μετάλλου (επειδή καθορίζει τη διαλυτότητά του στο νερό).

Παρόμοιοι ρύποι υπό σταθερές συνθήκες θα βιοσυσσωρευτούν σε παρόμοιο βαθμό για τα περισσότερα είδη ιχθύων με παράγοντες συγκέντρωσης που κυμαίνονται συχνά μεταξύ 1.000-100.000 σε σχέση με τα επίπεδά τους στο περιβάλλον. Ο υδράργυρος συγκεκριμένα, συσσωρεύεται 40.000 φορές στους μύες ψαριών σε σχέση με το περιβάλλον νερό (Carvan, 2000). Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία μπορούν επίσης να επηρεάσουν το τοξικολογικό στρες του μετάλλου καθώς επηρεάζουν τη διαλυτότητά του στο νερό.



Το σωματικό φορτίο του μετάλλου στην πραγματικότητα αντανακλά το βιοδιαθέσιμο κλάσμα του μετάλλου, και μόνο αυτό μπορεί να εξασκήσει την τοξική του δράση. Το κάδμιο, ο μόλυβδος και ο ψευδάργυρος έχουν μια μικρότερης διάρκειας δράση από τον υδράργυρο ή τον άργυρο λόγω της χαμηλότερης (ασθενέστερης) συνάφειάς τους με το θείο (κι έτσι και τις πρωτεΐνες). Ακόμη υπάρχουν μεταβολικά μονοπάτια που μπορούν να οδηγήσουν σε επανακινητοποίηση των μετάλλων από τον εξωσκελετό σε εσωτερικούς ιστούς στα κωπήποδα και άλλα καρκινοειδή όπως κατά την έκδυση, οπότε τα άλατα ασβεστίου και μετάλλων επαναρρωφώνται (Hook, 2001). Σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων στους ιχθύς γενικά θεωρείται ότι τα υδατικά (hydrate ions) ιόντα και τα σύμπλοκα υδροξειδίου (hydroxo complexes) είναι οι περισσότεροι ή οι μόνες βιοδιαθέσιμες μορφές μετάλλων για την πρόσληψη μέσω των βραγχίων (Ταο, 1999).

Γενικά οι παράγοντες στρες στους ιχθύς αυξάνουν τη διαπερατότητα των επιφανειακών επιθηλίων, όπως των βραγχίων κι έτσι επάγουν διαταραχές νερού και αλάτων. Τα ψάρια είναι πιο εκτεθειμένα στους ρυπαντές λόγω της εκτενούς και λεπτής αναπνευστικής επιφάνειας των βραγχίων και στη θάλασσα επίσης μέσω της κατάποσης, αλλά και λόγω της υψηλής βιοδιαθεσιμότητας πολλών χημικών ουσιών στο νερό (Wendelaar, 1997).

Πρόσφατα αναπτύχθηκε το Μοντέλο του Βιοτικού Συνδέσμου (Biotic Ligand Model, BLM), ένα εργαλείο ολοκληρωμένης εκτίμησης των τοξικών δράσεων των μετάλλων και πρόγνωσης της τοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς, το οποίο εισάγει τη δέσμευση των μετάλλων στα βράγχια ως το κρίσιμο ζήτημα για την τοξικότητα των μετάλλων (Paquin, 2002). Το μοντέλο αυτό είναι αρκετά ευέλικτο ώστε να περιλαμβάνει όλες τις συνιστώσες της χημείας του νερού που μπορεί να επηρεάσουν την τοξικότητα και βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων και συσχετίζει το χημικό είδος των μεταλλικών ιόντων στη στήλη του νερού και την αλληλεπίδρασή τους με θέσεις-υποδοχείς στον οργανισμό. Ακόμη εξηγεί τον ανταγωνισμό των ελεύθερων μεταλλικών ιόντων (βιοδραστική μορφή μετάλλων) με τα κατιόντα που απαντώνται στη φύση (υδρογονοκατιόντα, ιόντα ασβεστίου, νατρίου, μαγνησίου) που αντιδρούν με αβιοτικούς συνδέσμους (διαλυτή οργανική ύλη, κλωρίδια, σουλφίδια, διττανθρακικά) και με τις θέσεις του βιοτικού συνδέσμου. Τέλος, σχετίζει την τοξικότητα με το κλάσμα των θέσεων-υποδοχών στον οργανισμό που δεσμεύονται από το μέταλλο.

4. Τοξικότητα Cd στους υδρόβιους οργανισμούς

Το κάδμιο είναι ένα μέταλλο, του οποίου το όριο για την ανθρώπινη υγεία, τόσο της αμερικανικής Κρατικής Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος (US EPA) όσο και της Ευρωπαϊκής Οδηγίας (EC 1488/94) είναι 10μg/l. Μάλιστα, το όριο αυτό είναι 10 φορές αυστηρότερο από αυτό της παγκόσμιας οδηγίας (World Bank Guideline) για την παρουσία καδμίου στα νερά που επιτρέπει τιμές έως 0,1mg/l. Σχετικά χαμηλά επίπεδα (0,5μg/l) καδμίου μπορούν να είναι θανατηφόρα για νεαρά ψάρια,



επίπεδα της τάξης των 3μg/l για υδρόβια έντομα, ενώ για ενήλικα ψάρια 5μg/l στο νερό μπορούν να αποβούν μοιραία.

Το κάδμιο αυξάνει τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών και με αυτόν τον τρόπο επάγει μεταβολικές διαταραχές στα κύτταρα (USEPA 2001, Grose 1987). Η είσοδος του καδμίου στο περιβάλλον οφείλεται κυρίως στη χρήση του στη βιομηχανία με συνήθεις πηγές τα διυλιστήρια, την καύση υγρών καυσίμων, την αποσύνθεση ελαστικών, τα ορυχεία και επίσης στην παρουσία του σε φωσφορικά λιπάσματα και ζιζανιοκτόνα (Wood, 1997). Τα επιβαρημένα επιφανειακά νερά εισέρχονται στους υδάτινους αποδέκτες και το κάδμιο εισχωρεί στα τροφικά πλέγματα, όπου και βιοσυσσωρεύεται (Mane 2005, 2003, Kalfakakou 1987 a-b). Το κάδμιο βιοσυσσωρεύεται στο ήπαρ, επηρεάζει το αναπνευστικό και ουρογεννητικό σύστημα και τα τελευταία χρόνια μελετάται ως διαταράκτης του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων με πιθανώς τοξικό ρόλο στην αναπαραγωγή (Rani 2000, Sigal 1985).

Η τοξικότητα του καδμίου έχει σχετιστεί κυρίως με παρεμβολή στις ενζυμικές διαδικασίες και την οσμωρύθμιση (αφού προκαλεί ανισορροπία των απαραίτητων μεταλλικών ιόντων), όπως και με διαταραχές της αναπαραγωγής σε θηλαστικά και ψάρια. Η οξεία έκθεση προκαλεί τοξικές αλλοιώσεις στο ήπαρ, τους νεφρούς, τους πνεύμονες, το γαστρεντερικό σωλήνα, το κεντρικό νευρικό σύστημα, τις ωοθήκες, τον πλακούντα και τους όρχεις. Το κάδμιο πλήττει κυρίως νεφρούς και ήπαρ ως όργανα-στόχους, αλλά ανιχνεύεται και στο αίμα μετά από χρόνια έκθεση σχετιζόμενο με εμπύρηντα κύτταρα, κυρίως λεμφοκύτταρα.

Το κάδμιο σε ψάρια και θηλαστικά μπορεί να προκαλέσει επίσης ανοσολογική καταστολή ή επαγωγή ανάλογα με την ανοσολογική λειτουργία που μελετάται. Για παράδειγμα η δραστηριότητα των T-λεμφοκυττάρων συνήθως καταστέλλεται από το μέταλλο, ενώ η επίδρασή του στα B-λεμφοκύτταρα ποικίλλει. Στην ιριδιζουσα πέστροφα για παράδειγμα έκθεση σε 0.7 ή 3.6 μg/L καδμίου επί 12 εβδομάδες προκάλεσε καταστολή των T-λεμφοκυττάρων, ενώ η απόκριση με αντισώματα των B-λεμφοκυττάρων σε βακτηριακή πρόκληση ενισχύθηκε στα ψάρια που είχαν εκτεθεί στο μέταλλο. Σύμφωνα με άλλες έρευνες παρατηρήθηκε μία ελαφρά καταστολή στην παραγωγή αντισωμάτων όταν στο ίδιο είδος και σε συγκρίσιμες συγκεντρώσεις καδμίου ενέθηκαν ανθρώπινα κύτταρα αίματος. Έκθεση ιριδιζουσας πέστροφας σε 2μg/l Cd αλλάζει επίσης τις ανοσολογικές αποκρίσεις που εξαρτώνται από μακροφάγα, συμπεριλαμβανομένης της φαγοκυττάρωσης και της παραγωγής ελεύθερων ριζών, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Zelikoff, 1995).

Οι ανοσολογικές αποκρίσεις στα ψάρια επηρεάζονται διαφορετικά από το κάδμιο αναλόγως του είδους τους, όπως ποικίλλει και η δράση του πάνω στο λευκοκυτταρικό τύπο. Σε θαλάσσιο τελεόσπεο παρατηρήθηκε δόσοεξαρτώμενη αύξηση στα ουδετερόφιλα και αντίστοιχη μείωση στα λεμφοκύτταρα κατόπιν έκθεσης σε κάδμιο. Αντίθετα στα χρυσόψαρα η δράση του καδμίου, αν και παρόμοια, δεν ήταν τόσο έντονη ούτε δόσοεξαρτώμενη. Ίσως το γεγονός αυτό να οφείλεται σε διαφορετική



ευαισθησία των διαφόρων υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων στο κάδμιο, των οποίων η μείωση φαίνεται να οφείλεται σε μείωση του ρυθμού παραγωγής τους, όπως υπαινίσσεται και η μείωση των βλαστοκυττάρων, δηλαδή των προδρόμων μορφών τους. Η αύξηση των ουδετερόφιλων μπορεί με τη σειρά της να εξισορροπεί την έλλειψη λεμφοκυττάρων και να αποκαθιστά εν μέρει την ανοσολογική απόκριση.

Μία άλλη σημαντική παράμετρος που τροποποιεί την ανοσολογική απόκριση στα ψάρια, η κορτιζόλη, δεν επηρεάζεται από τη δράση του καδμίου. Αντίθετα στους περισσότερους ιχθύς ως απόκριση σε οποιονδήποτε παράγοντα στρες εμφανίζεται άνοδος στα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα. Τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης μπορεί να είναι ένας κύριος μηχανισμός ανοσοκαταστολής στα ψάρια και η έλλειψη επαγωγής της ορμόνης αυτής από το κάδμιο, το μοναδικό από τα μέταλλα, μπορεί να εξηγήσει διάφορα απρόσμενα αποτελέσματα της έκθεσης των ψαριών σε αυτό το μέταλλο (Heath, 1994).

Στην οξεία έκθεση το κάδμιο μπορεί να προκαλέσει επαγωγή ή αναστολή πολλών κυτταρικών ενζύμων. Σε νεαρούς κεφάλους έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου επάγει ισχυρά την αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού στην καρδιά και τα βράγχια, ενώ στο ήπαρ η αρχική επαγωγή του ενζύμου ακολουθείται από αναστολή καθώς το μέταλλο στον ιστό συσσωρεύεται. Το ίδιο σχήμα ενζυμικής επαγωγής παρατηρείται και για την αμινοτρανσφεράση της αλανίνης στους μη ηπατικούς ιστούς και αναστολής της στο ήπαρ. Σε θαλάσσιους τελεόστεους πάλι, ένζυμα όπως η ηπατική αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού μπορεί να εμφανίσουν μείωση στην ενεργότητά τους, ενώ η ενεργότητα της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης να εμφανίσει αύξηση, πιθανώς για παροχή μεταβολιτών κατά την αυξημένη βιοσύνθεση που παρατηρείται, πιθανώς για επιδιόρθωση ιστών (Heath, 1994).

Πιο ενδιαφέρουσες παρουσιάζονται οι δράσεις μικρών, χρόνιων ρεαλιστικών δόσεων μετάλλων στην ενζυμική ενεργότητα των ιχθύων. Όταν ιριδιζουσα και άγρια πέστροφα εκτίθενται σε υποθανατηφόρες δόσεις καδμίου για περίοδο 3 μηνών καμία αλλαγή δεν παρατηρείται στις ενεργότητες ενζύμων όπως η αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού και η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, πιθανώς λόγω προσαρμογής σε μοριακό επίπεδο. Το ίδιο ισχύει για την αλκαλική φωσφατάση στο θαλάσσιο σκορπιό, στον οποίον όμως η Cu-Zn δισμουτάση του υπεροξειδίου στο έντερο αναστέλλεται. Η υψηλή ευαισθησία του εντέρου μπορεί να αποδοθεί στην κατάποση νερού στα θαλάσσια είδη για αποκατάσταση των οσμωτικών τους απωλειών και της επακόλουθης εισόδου καδμίου με αυτόν τον τρόπο, γεγονός που δε συμβαίνει στα είδη του γλυκού νερού.

Ακόμα το κάδμιο επηρεάζει τις αναπνευστικές λειτουργίες και τη σύνθεση του πλάσματος προκαλώντας υπασβεστιαϊμία, υποκαλταιμία και υπεργλυκαιμία (Ricard, 1998). Στα θαλάσσια ψάρια απαιτούνται πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου από αυτές που αλλάζουν την οσμωρύθμιση στα ψάρια του γλυκού νερού, υποδεικνύοντας ότι το κάδμιο



φαίνεται να αλλάζει άλλες λειτουργίες, όπως του νεφρού παρά την οσμορυθμιστική δραστηριότητα των βραγχίων (Heath, 1994).

a. Κάδμιο και εμβρυϊκή ανάπτυξη

Το κάδμιο στα ψάρια ειδικά του γλυκού νερού, σε υποτοξικές δόσεις είναι ένα σημαντικό ξενοβιοτικό, με δυσμενείς επιδράσεις στην αύξηση και την αναπαραγωγή καθώς δεν βιοδιασπάται και συσσωρεύεται στα τροφικά πλέγματα των υδάτινων οικοσυστημάτων.

Σε ότι αφορά στο χρόνο εκκόλαψης, δηλαδή την περίοδο μεταξύ της γονιμοποίησης και της εκκόλαψης του 50% των αυγών, το κάδμιο προκαλεί μείωση στο χρόνο αυτό, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο μέχρι ένα κρίσιμο σημείο σημαντικής μείωσης της επιτυχίας εκκόλαψης. Από εκεί και μετά, μπορεί να καθυστερήσει να εκκολαφθεί το 50% των αυγών λόγω αποτυχίας εκκόλαψης πολλών εξ αυτών. Η βράχυνση του χρόνου εκκόλαψης συχνά παράγει προνύμφες μικρότερου μεγέθους από τις φυσιολογικές, χωρίς αυτό να σημαίνει απαραίτητα ταχύτερη ανάπτυξή τους. Η βιώσιμη εκκόλαψη, δηλαδή ο αριθμός των προνυμφών που πραγματικά αναδύονται, επίσης επηρεάζεται σημαντικά από την έκθεση των αυγών σε χαμηλές συγκεντρώσεις καδμίου στο γλυκό νερό, ενώ απαιτούνται υψηλές, μη ρεαλιστικές συγκεντρώσεις, για το ίδιο αποτέλεσμα στο θαλασσινό νερό.

Οι προνύμφες που εκκολάπτονται από αυγά που εκτέθηκαν σε ρυπαντές είναι όπως προαναφέρθηκε συχνά μικρότερες, λόγω αναστολής της ανάπτυξης ή πρόωρης εκκόλαψής τους. Επίσης παρατηρούνται μορφολογικές ανωμαλίες όπως: α) ανωμαλίες στο λεκιθικό σάκο με περιοχές νεκρωτικού ιστού και ατελή κυκλοφορία της λεκίθου, β) δυσμορφίες στα μάτια με μείωση του μεγέθους και αποδιοργάνωση του αμφιβληστροειδούς, γ) ελαττωματική ωτική κάψα με ελλείψεις ωτολίθων έως απουσία ωτικών καψών, δ) ανωμαλίες στις γνάθους με απουσία της κάτω γνάθου έως δυσμορφία ή καθυστέρηση στο σχηματισμό της, ε) ελαττωματικά πτερύγια, στ) δυσμορφίες στη σπονδυλική στήλη. Κάποια από αυτά τα αναπτυξιακά προβλήματα είναι αποτέλεσμα ανώμαλης διαίρεσης των χρωμοσωμάτων των εμβρύων. Οι προνύμφες με μορφολογικές ανωμαλίες επιδεικνύουν ακόμα ανώμαλη συμπεριφορά, με απώλεια συντονισμού και μείωση της κολυμβητικής τους ικανότητας, γεγονός που προκαλεί επίσης μείωση στην κατανάλωση τροφής και ακολούθως μείωση στο ρυθμό αύξησης, αλλά και έκθεση σε θηρευτές.

Η οντογένεση των συστημάτων ελέγχου στα ψάρια παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον. Η έκθεση αυγών τιλάπιας σε κάδμιο είχε ως αποτέλεσμα οι προνύμφες που προέκυπταν από αυτά τα αυγά να εμφανίζουν μειωμένο περιεχόμενο ασβεστίου στα κύτταρα της υπόφυσης που συνθέτουν προλακτίνη, μία ορμόνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση ασβεστίου. Οι προνύμφες αυτές όταν μεταφέρθηκαν σε μη ρυπασμένο νερό, έδειξαν αποκατάσταση στις 288 ώρες, όσον αφορά το περιεχόμενο ασβεστίου και αντίστοιχη αύξηση της δραστηριότητας των κυττάρων προλακτίνης, ένα φαινόμενο που παρατηρείται επίσης και στα ενήλικα ψάρια που εκτίθενται σε κάδμιο (Heath, 1994).



Η έκθεση των εμβρύων σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις μετάλλων συχνά προκαλεί μεγαλύτερη ανοχή των προνυμφών στα μέταλλα, όπως συμβαίνει για την ιριδιζουσα πέστροφα και την έκθεσή της σε κάδμιο. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην επαγωγή της μεταλλοθειονίνης, η οποία δεσμεύει το μέταλλο, αλλά και σε εγκλιματισμό στο ρυπαντή, που επηρεάζει όμως δυσμενώς την ανοχή σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως τη θερμοκρασία. Ακόμη η έκθεση σε ρυπαντές κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μπορεί να μεταβάλλει το μέγεθος του λεκιθικού σάκου εξαιτίας δύο διαδικασιών. Αφ' ενός οι αλλαγές στον όγκο της λεκίθου μπορεί να δημιουργούνται από μεταβολές στο περιεχόμενο νερό της λεκίθου λόγω οσμоруθμιστικών αλλαγών στο αυγό λίγο πριν την εκκόλαψη, αφ' ετέρου μπορεί να οφείλονται σε δράση των ρυπαντών στη βιτελλογένεση όταν δημιουργείται η λέκιθος, καθώς αυτή η διαδικασία είναι υπό ορμονικό έλεγχο και μπορεί να είναι το αποτέλεσμα δράσης του ρυπαντή στο ορμονικό προφίλ του ενήλικου ψαριού πολύ νωρίτερα.

Κατά την προνυμφική ανάπτυξη ειδών όπως του σολομού και πριν την έναρξη της εξωγενούς θρέψης, οι προνύμφες πρέπει να απορροφήσουν από το νερό περίπου 75% του ασβεστίου και 45% του καλίου, που απαιτούνται για τη φυσιολογική λειτουργία, ενώ το υπόλοιπο προέρχεται από τη λέκιθο. Καθώς το κάδμιο προκαλεί δοσοεξαρτώμενη μείωση στην πρόσληψη ασβεστίου και καλίου αναστέλλεται η ασβεστοποίηση των σκελετικών στοιχείων, πιθανώς λόγω της μείωσης του σωματικού ασβεστίου, οπότε προκύπτουν λεπτές ακτίνες πτερυγίων και μία ανώμαλη σπονδυλική στήλη. Ακόμη αυτή η παρεμβολή του καδμίου στο μεταβολισμό του ασβεστίου μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία των ψαριών καθώς δεν αναπτύσσονται φυσιολογικά οι ωτόλιθοι και οι ωτικές κάψες. Η δράση του καδμίου στην πρόσληψη ασβεστίου εξακολουθεί ακόμη και αφού οι προνύμφες μεταφερθούν σε καθαρό νερό και δεν έχουν πλέον συσσωρευμένο σωματικό κάδμιο (Heath, 1994).

β. Αναπνευστικό σύστημα

Η αναπνοή στα ψάρια όπως και στους υπόλοιπους οργανισμούς περιλαμβάνει την πρόσληψη οξυγόνου από το περιβάλλον σε θέσεις ανταλλαγής αερίων (τυπικά στα βράγχια), τη χρήση του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια μέσα στα κύτταρα και την απέκκριση των άχρηστων αερίων στο περιβάλλον. Η αναπνοή παρέχει το οξυγόνο για την αερόβια μετατροπή της ενέργειας που περιέχεται στην τροφή σε χημικούς δεσμούς υψηλής ενέργειας, όπως αυτοί που σχηματίζονται όταν η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) μετατρέπεται σε τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Η ενέργεια που αποθηκεύεται με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιείται για τη διατήρηση των ψαριών στη ζωή (επιβίωση) και για την κίνηση, πέψη, αύξηση, αναπαραγωγή και όλες τις λειτουργίες που απαιτούν ενέργεια.

Η πρόσληψη του οξυγόνου μέσω των αναπνευστικών επιφανειών είναι ένα παθητικό φαινόμενο στα ψάρια, που οδηγείται από τη διάχυση. Ο ρυθμός της διάχυσης οξυγόνου είναι άμεσα ανάλογος με την κλίση της μερικής πίεσης. Η κίνηση του νερού πάνω από τα βράγχια αντικαθιστά το



οριακό στρώμα νερού δίπλα στο επιθήλιο των ελασμάτων (όπου το οξυγόνο διαχέεται προς τα μέσα), κι έτσι διατηρείται η κλίση μερικής πίεσης οξυγόνου μεταξύ του νερού και του αίματος. Έτσι ο αερισμός των βραγχίων είναι ουσιώδης αναπνευστική διαδικασία στα περισσότερα ψάρια. Ο αερισμός των βραγχίων επιτελείται με δύο τρόπους, με ενεργή άντληση του νερού από τη συσκευή στόματος-βραγχιακού επικαλύμματος ή διαπερνά παθητικά τα βράγχια καθώς το ψάρι κολυμπά.

Τα βράγχια των τελεόστεων ιχθύων του γλυκού νερού είναι αναπνευστικά όργανα όπως σε όλους τους ιχθύς, με μία σημαντική επιφάνεια ανταλλαγής αναπνευστικών αερίων, αλλά και οι δομές που επιτελούν νεφρικές λειτουργίες μέσω ανταλλαγής ιόντων και ηλεκτρολυτών. Συγκροτούν μία δομή ομοιάζουσα με “κόσκινο” που σχηματίζεται από βραγχιακά τόξα, ελάσματα και άκανθες-lamellae με το τοίχωμά τους. Το νερό περνά διαμέσου στενών καναλιών μεταξύ αυτών των lamellae. Το μικροπεριβάλλον εντός των στενών καναλιών μεταξύ των lamellae μπορεί να διαφέρει από το περιβάλλον νερό. Λόγω της διακίνησης ιόντων όπως NH_3 , NH_4^+ , CO_2 και HCO_3^- , μέσω της μεμβράνης, το pH στο μικροπεριβάλλον των βραγχίων μπορεί να αλλάζει (να είναι ελαφρώς πιο όξινο) και να αλλάζει έτσι και το χημικό είδος των μετάλλων, η κινητικότητα και η διαθεσιμότητά τους. Επίσης η ύπαρξη της βλέννας των βραγχίων, μίας εξωκυττάριας πολυανιονικής ουσίας πλούσιας σε γλυκοπρωτεΐνες, η οποία καλύπτει το βραγχιακό επιθήλιο και ανανεώνεται συνεχώς, λειτουργώντας ως σύστημα ανταλλαγής ιόντων, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη των μετάλλων. Η βλέννα πιθανώς συγκεντρώνει με διαφορετική συγγένεια μέταλλα εντός του μικροπεριβάλλοντος των βραγχίων σε γειννίαση με θέσεις μεταφοράς στη μεμβράνη όπου μπορεί να μεταφερθούν τα μέταλλα. Επίσης μπορεί να λειτουργεί και ως οδός απόρριψης πιθανώς τοξικών ιόντων.

Για τα κατιόντα των μετάλλων όπως το κάδμιο, η “ελεύθερη” ή υδατική μορφή τους θεωρείται η πιο βιοδιαθέσιμη για τα ψάρια. Τα σωματίδια πάλι, λόγω της μεγάλης τους επιφάνειας έχουν την ικανότητα να προσροφούν και να απορροφούν ιόντα και να καταβυθίζουν τα μέταλλα στους υδάτινους αποδέκτες και σε αυτό οφείλεται κυρίως και η χαμηλή παρουσία διαλυτών μορφών των μετάλλων στα υδάτινα οικοσυστήματα. Τα ψάρια συχνά εκτίθενται και σε αιωρούμενα σωματίδια, ειδικά μετά από ραγδαίες βροχοπτώσεις. Λόγω της άμεσης επαφής τους τα βράγχια επηρεάζονται από τα σωματίδια, αν και οι περισσότερες μελέτες ασχολούνται μόνο με τους διηθηματοφάγους οργανισμούς ή την πρόσληψη των μετάλλων μέσω πέψης (ingestion). Επίσης η φαγοκυτταρική πρόσληψη ρυπασμένων σωματιδίων από τα επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να αποτελεί οδό εισόδου για τις τοξικές ουσίες.

Η οξεία τοξική δράση των μετάλλων στους οργανισμούς των εσωτερικών υδάτων προκαλεί σοβαρές μορφολογικές βλάβες στα βράγχια με αποτέλεσμα είτε τη διαταραχή στην ανταλλαγή των αερίων με συνέπεια την ασφυξία είτε αυξημένη απώλεια ιόντων ή και τα δύο (Mallatt, 1995). Η διαταραχή της εσωτερικής ιοντικής ισορροπίας οδηγεί σε αναστολή της ενεργού πρόσληψης νατρίου, αναδιανομή ιόντων και νερού στο εσωτερικό



του σώματος και μείωση των επιπέδων στο πλάσμα νατρίου, κλωρίου και άλλων ιόντων που μπορεί να οδηγήσουν τελικά σε καρδιοαγγειακή κατάρριψη (collapse) και θάνατο (Wilson 1993 a-b). Μείωση του νατρίου του πλάσματος κατά 30%, λόγω δέσμμευσης των μετάλλων, σχετίζεται με το θάνατο των ιχθύων (Grosell, 2002). Στα θαλάσσια είδη η κλίση συγκέντρωσης των ιόντων είναι αντιθέτου φοράς λόγω της υψηλής αλατότητας του εξωτερικού μέσου και η έκθεση σε μέταλλα οδηγεί στην είσοδο ιόντων με διαφορετικές επιδράσεις και αιτίες θανάτου από αυτές στους οργανισμούς των γλυκών νερών (Wood, 1999).

γ. Ήπαρ

Το ήπαρ συσσωρεύει υψηλά επίπεδα όλων των μετάλλων καθώς έχει αναφερθεί ως θέση αποτοξικοποίησης και αποβολής των μετάλλων στους ιχθύς.

Τα ψάρια αποθηκεύουν ενέργεια στο μυϊκό ιστό, αλλά συσσωρεύουν επίσης ενέργεια στο ήπαρ, κυρίως υπό μορφή γλυκογόνου σε περιόδους υψηλής ενεργειακής πρόσληψης. Έτσι το σχετικό ηπατικό μέγεθος συσχετίζεται με τη διατροφική κατάσταση του ψαριού και με το ρυθμό αύξησης, καθώς και με την αναπαραγωγική διαδικασία. Αυτή η έμμεση μέτρηση του ρυθμού αύξησης αναφέρεται ως Ηπατοσωματικός Δείκτης (HSI ή LSI) και εκφράζεται ως $LSI = (\text{Βάρος ήπατος} / \text{Βάρος σώματος}) \times 100$. Ο δείκτης αυτός συχνά χρησιμοποιείται σε εποχιακές και ετήσιες μελέτες της αύξησης σε φυσικούς πληθυσμούς ψαριών, τα οποία έχουν ενδογενείς εποχιακούς ρυθμούς στη δυναμική της αύξησής τους (με μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται την άνοιξη και το καλοκαίρι).

Η απομάκρυνση των μετάλλων στους ιστούς υδρόβιων οργανισμών εξαρτάται από το χρόνο, τη θερμοκρασία, την ηλικία, τη μεταβολική δραστηριότητα του ιχθύος, αλλά και τη βιολογική ημίσεια ζωή του μετάλλου. Για παράδειγμα στην ιριδιζουσα πέστροφα η βιολογική ημίσεια ζωή του μολύβδου στο ήπαρ είναι μικρότερη από 16 εβδομάδες ενώ του καδμίου στο ήπαρ και τους νεφρούς πάνω από 1 χρόνο (Larson, 1985). Στα δε μύδια η βιολογική ημίσεια ζωή του χαλκού στον πεπτικό τους αδένα ήταν 6-8 ημέρες ενώ του καδμίου ήταν πάνω από 6 μήνες (Viarengo 1990, 1987). Οι οδοί απομάκρυνσης μετάλλων στους ιχθύς περιλαμβάνουν τα βράγχια, τη χολή, τα ούρα, το δέρμα, και τη βλέννα (mucus). Παρά το ότι οι οδοί απομάκρυνσης είναι περισσότεροι από τις οδούς πρόσληψης των μετάλλων, η συσσώρευση των μετάλλων είναι ταχύτερη από την απομάκρυνση τους, πιθανώς λόγω της παρουσίας μεταλλοδεσμευτικών πρωτεϊνών στους ιστούς. Τα βράγχια επιδεικνύουν υψηλότερη απομάκρυνση των μετάλλων λόγω της άμεσης επαφής τους με το περιβάλλον, ενώ το ήπαρ σχετικά χαμηλή λόγω του ότι αποτελεί το όργανο αποθήκευσης μετάλλων και αποτοξικοποίησής τους.

Σε σχέση με το σελήνιο, το ήπαρ φαίνεται να παίζει ρόλο εκτός από την αποβολή του και στην αποθήκευση και μεταβολισμό του, και μάλιστα το σελήνιο από τις τροφές συσσωρεύεται στο ήπαρ από το έντερο μέσω της ηπατικής οδού, ενώ το σελήνιο από το νερό εισέρχεται στον οργανισμό μέσω



των βραγκίων και οδηγείται στους υπόλοιπους ιστούς μέσω της γενικής κυκλοφορίας. Αντίθετα, ο υδράργυρος ο οποίος συνδέεται με τις σουλφυδρυλικές ομάδες των πρωτεϊνών και συσσωρεύεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των ιχθύων και μάλιστα απαντάται σε υψηλότερα επίπεδα στα γηραιότερα άτομα ενός πληθυσμού, τείνει να συσσωρεύεται στους μύες, τα βράγχια, τον εγκέφαλο και όχι στο ήπαρ στα ψάρια του γλυκού νερού (Mauk, 2001).

5. Ξενοβιοτικά

Τα τελευταία χρόνια η παρουσία στο περιβάλλον ξενοβιοτικών ουσιών εγείρει ολοένα αυξανόμενη ανησυχία δοθέντος του γεγονότος ότι τα ξενοβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν την ενδοκρινή κατάσταση της άγριας πανίδας δρώντας ως ορμονικοί συναγωνιστές ή ανταγωνιστές διαταράσσοντας έτσι τη σύνθεση των ορμονών, τη δραστικότητα και το μεταβολισμό τους.

Τα μέταλλα όπως και άλλοι περιβαλλοντικοί ρυπαντές προκαλούν διαταραχές στο ενδοκρινικό σύστημα, μεταβάλλοντας τις συγκεντρώσεις των ορμονών στην κυκλοφορία και παρεμβαίνουν έτσι στις διαδικασίες αναπαραγωγής (ωρίμανση, παραγωγή και μεταφορά γαμετών, αναπαραγωγική συμπεριφορά και γονιμότητα) και ανάπτυξης. Η δράση των ρυπαντών συνήθως αφορά:

α) Συναγωνισμό για τους ορμονικούς υποδοχείς, καθώς αρκετοί από αυτούς μοιάζουν δομικά με ορμόνες, έτσι ώστε προσδένονται στους κυτταρικούς υποδοχείς-στόχους των φυσικών ορμονών ή ανταγωνισμό για τους ορμονικούς υποδοχείς, καθώς αρκετοί από αυτούς μπλοκάρουν τις θέσεις πρόσδεσης, έτσι ώστε οι φυσικές ορμόνες να αδυνατούν να προσδένονται. Και στις δύο περιπτώσεις παρεμποδίζεται η φυσιολογική κυτταρική δραστηριότητα.

β) επαγωγή της δημιουργίας επιπλέον θέσεων υποδοχέων στο κύτταρο, με συνέπεια ενίσχυση της επίδρασης των ορμονών στην κυτταρική δραστηριότητα.

γ) αλληλεπίδραση άμεση ή έμμεση με φυσικές ορμόνες, αλλάζοντας το ορμονικό μήνυμα και μεταβάλλοντας την κυτταρική δραστηριότητα.

δ) μεταβολή της παραγωγής ορμονών στην ενδοκρινή πηγή τους, λόγω αλλαγής του φυσιολογικού σχεδίου σύνθεσης και μεταβολισμού τους, με αποτέλεσμα την ανισορροπία στην ποσότητα των ορμονών στην κυκλοφορία.

ε) μεταβολή της έκκρισης επαγωγικών ή ανασταλτικών ορμονών από την υπόφυση ή τον υποθάλαμο και

στ) μεταβολή της ενζυμικής βιομετατροπής των ορμονών στο ήπαρ, οπότε με την αλλαγή της συγκέντρωσης των ελεύθερων ορμονών στον ορό μεταβάλλεται και η συγκέντρωση ή η λειτουργία των δεσμευτικών πρωτεϊνών του ορού (Arukwe 2001, Guillette 2001).



VII. ΕΝΔΟΚΡΙΝΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ *C. auratus*

1. *Carassius auratus auratus* (Linnaeus, 1758)

α. Συστηματική κατάταξη

Κλάση: Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)

Τάξη: Κυπρινόμορφα (Cypriniformes)

Οικογένεια: Κυπρινοειδή (Cyprinidae)

Γένος: *Carassius*

Είδος: *Carassius auratus auratus* (Linnaeus, 1758)

Κοινό όνομα: Χρυσόψαρο, κοκκινόψαρο

β. Μορφολογία

Η μορφολογία του χρυσόψαρου είναι παρόμοια με αυτήν του κοινού κυπρίνου, με τη διαφορά ότι το χρυσόψαρο δε φέρει μύστακες και ότι η αναλογία ολικού μήκους και ύψους του σώματος είναι μικρότερη, με μέγιστο μέγεθος τα 3 kg βάρος και 59 cm ολικό μήκος. Φέρει επίσης πλήρη πλευρική γραμμή και ευρέως τριγωνικό κεφάλι χωρίς λέπια.

Παρατηρούνται πολλοί διαφορετικοί φαινότυποι, οι οποίοι έχουν προκύψει από μεταλλάξεις ή από τη διαδικασία συνεχούς επιλογής και διασταυρώσεων (άτομα με τριπλή ουρά, τηλεσκοπικά μάτια, μεγάλη ποικιλία χρωματισμών κλπ). Πάντως, το καρυοτυπικό πρότυπο του χρυσόψαρου είναι παρόμοιο με του κοινού κυπρίνου με τον οποίο υβριδοποιείται και τα υβρίδια τους είναι ενδιάμεσων χαρακτηριστικών. Ο καρυότυπος του χρυσόψαρου αποτελείται από 100 χρωμοσώματα ($2n=100$), ενώ έχουν παρατηρηθεί και τριπλοειδή άτομα με $2n=156$. Ο χρωματισμός του μπορεί να ποικίλλει από καφέ, πράσινο, ασημί, γκρι, χρυσαφί έως λευκό στα “άγρια” άτομα, ενώ οι καλλιεργούμενες μορφές έχουν χρώμα από κόκκινο, ροζ, ασημί, καφέ, λευκό, μαύρο και συνδυασμό αυτών των χρωμάτων.

γ. Γεωγραφική εξάπλωση

Από την κεντρική Ασία, την Κίνα και την Ιαπωνία (όπου απειτέλεσε ιερό ψάρι και οι αναφορές σ' αυτό εντοπίζονται πολύ πριν το 1300 και πιθανά το 200-300 πΧ) διαδόθηκε σταδιακά σε όλον τον κόσμο ως διακοσμητικό ψάρι. Στην Ελλάδα εισήχθη από τους Ιταλούς τη δεκαετία του 1930 και σε αρκετά νησιά όπως η Σύρος, η Πάρος και η Σκιάθος αναπτύχθηκε υποτυπώδης εκτροφή του σε δεξαμενές άρδευσης, και τα άτομα που τοποθετούνταν εκεί αναπαράγονταν με φυσικό τρόπο. Οργανωμένη εκτροφή στη χώρα μας άρχισε μετά το 1990 στον Ιχθυογεννητικό Σταθμό της Λίμνης Ιωαννίνων (Δ.Ε.Λ.Ι.), όπου και αναπαράχθηκαν 6-7 ποικιλίες σε ελεγχόμενες συνθήκες, ενώ σε πολλές άλλες χώρες αποτελεί παραδοσιακή δραστηριότητα (Πάσχος, 2002).

δ. Οικολογία-φυσιολογία

Το χρυσόψαρο διαβιεί σε ποτάμια, λίμνες, ακόμα και μικρές υδατοσυλλογές με στάσιμο ή μικρής ροής γλυκό νερό, σε συνθήκες



παρόμοιες με αυτές που ζει ο κυπρίνος. Αντέχει σε οριακές θερμοκρασίες (θεωρητικά από 4-30°C), και αλατότητες (έως 17 ppt), αλλά όχι μακρόχρονα. Οι καλύτερες συνθήκες από πλευράς θερμοκρασίας είναι μεταξύ 9 και 25°C (προτιμά όμως το κρύο νερό), το εύρος pH που διαβίει είναι 6.0-8.0, σε μέγιστο βάθος έως 10 m.

Τρέφεται με ποικιλία τροφής, με φυτά, πράσινα φύκη, μικρά καρκινοειδή, έντομα και detritus. Αναπαράγεται κατά τους μήνες της άνοιξης, όταν η θερμοκρασία φτάσει τους 15-16°C. Τα θηλυκά απελευθερώνουν 2000-4000 αυγά, τα οποία φέρουν κολλώδη ουσία και τα αποθέτουν σε υδρόβια βλάστηση. Η επιβίωση των πελαγικών προνυμφών είναι μικρή (κάτω του 1%) εξαιτίας των πολλών θηρευτών, ενώ ο ελάχιστος χρόνος διπλασιασμού του πληθυσμού είναι 1,4-4,4 χρόνια ($K=0.17$, $t_{min}=1$, $t_{max}=30$).

Το χρυσόψαρο παρόλο που δεν έχει αλιευτικό ενδιαφέρον (αν και είναι βρώσιμο, σπάνια τρώγεται), έχει σημαντικό εμπορικό ενδιαφέρον καθώς έχει ευρεία χρήση ως πειραματόζωο, αλλά κυρίως ως διακοσμητικό είδος σε μικρές υδατοσυλλογές και ενυδρεία.

ε. Αναπαραγωγή

Τα ώριμα θηλυκά μετά το τέλος του χειμώνα παράγουν περίπου 3000 ωάρια ανά γεννήτορα, των οποίων το ποσοστό γονιμοποίησης εξαρτάται από την κινητικότητα των αρσενικών ατόμων και την ποιότητα του σπέρματος (μπορεί να φτάνει 80-90% στις καλές ποικιλίες).

Όταν η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 15-18°C και η ηλιοφάνεια δεν ξεπερνά τις 12 ώρες, τα αρσενικά κολυμπώντας παράλληλα ανά 2-4, αρχίζουν συνήθως την αυγή να κυνηγούν τα θηλυκά, που προσπαθούν να ξεφύγουν, ενώ ψάχνουν για σημεία εναπόθεσης των ωαρίων. Μετά από ένα κυνήγι διάρκειας τα θηλυκά απελευθερώνουν σταδιακά τα ωάρια τους στο κατάλληλο υπόστρωμα και συνεχίζουν ακόμα και για 2-4 ημέρες μετά την αρχική απελευθέρωση. Οι προνύμφες που προκύπτουν μοιάζουν με του κουνουπιού κι έτσι πολλές φορές τα ενήλικα άτομα κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος τυχαίνει να τρώνε τα αυγά και τις προνύμφες τους.

Συνήθως τα χρυσόψαρα αναπαράγονται τεχνητά σε ελεγχόμενες δεξαμενές με μεταβολή της θερμοκρασίας (18°C) και συνεχή ανανέωση του νερού (διαλυμένο οξυγόνο >8mg/l) ή με χορήγηση ορμονών από υπόφυση κοινού κυπρίνου. Σε περίπτωση χορήγησης 17-β οιστραδιόλης αναστέλλεται η απελευθέρωση των γεννητικών προϊόντων, ενώ σε σταθερή θερμοκρασία περί τους 24°C και ηλιοφάνεια στις 12 ώρες, μπορεί να μεταβληθεί η φυσική περίοδος αναπαραγωγής και να γίνει η αναπαραγωγή εκτός της συνηθισμένης περιόδου. Το ποσοστό εκκολαψιμότητας των αυγών είναι μεταξύ 50-70% κι η επώαση διαρκεί συνήθως 3-4 ημέρες, με επιθυμητή θερμοκρασία 17-19°C.



2. Αναπαραγωγή τελεόστεων ιχθύων

Οι τελεόστεοι ιχθύς διαθέτουν μία τεράστια ποικιλία στις στρατηγικές αναπαραγωγής που ευρύνονται από μαζικές ωτοκίες στα ελεύθερα ύδατα μέχρι ζευγάρωμα σε κλειστές περιοχές όπως επίσης και εσωτερική γονιμοποίηση.

Η ετήσια ωτοκία σε ψάρια της εύκρατης και υποτροπικής ζώνης σχετίζεται με ορισμένες εποχές του χρόνου. Τρία στάδια φαίνονται να ξεχωρίζουν σε αρσενικά και θηλυκά άτομα, α) η εποχή της αναπαραγωγής (την άνοιξη), β) η εποχή της ηρεμίας (το καλοκαίρι-φθινόπωρο με χαμηλά επίπεδα στεροειδών ορμονών) και γ) η εποχή της ωρίμανσης των γονάδων (το χειμώνα με αύξηση στις γοναδοτροπίνες και τις στεροειδείς ορμόνες που σχετίζονται με την ενδογενή βιτελλογένεση στα θηλυκά και της τεστοστερόνης για την σπερματογένεση στα αρσενικά).

Οι κυκλικές περιβαλλοντικές μεταβολές της φωτοπερίοδου και της θερμοκρασίας του νερού παίζουν σημαντικό ρόλο στον ετήσιο κύκλο της ανάπτυξης των γονάδων στους τελεόστεους, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας και της φωτοπερίοδου μετά το χειμώνα εκκινεί την εξωγενή βιτελλογένεση και την ανάπτυξη των ωοκυττάρων, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του σχετικού μεγέθους των γονάδων, δηλαδή του γοναδοσωματικού δείκτη GSI (Shein 2004, Kokokiris 2001). Υπάρχει μάλιστα τόσο στενή αλληλεπίδραση των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων με τον ενδοκρινή έλεγχο της αναπαραγωγής που ο ενδοκρινής έλεγχος δεν μπορεί να συνεχίσει χωρίς τα κατάλληλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που είναι απαραίτητα για την επαγωγή της αναπαραγωγής (Cornish, 1998). Η απουσία αυθόρμητης ωτοκίας έχει αναφερθεί σε πληθυσμούς ιχθύων σε αιχμαλωσία και αποδόθηκε στην έλλειψη επαρκών φυσικών ερεθισμάτων (κατάλληλο υπόστρωμα, συνθήκες νερού κλπ), στο στρες λόγω υψηλής ιχθυοφόρτισης ή σε συνθήκες που εμποδίζουν την έκκριση γοναδοτροπινών και στεροειδών των γονάδων, απαραίτητων για την εκκίνηση της τελικής ωρίμανσης και ωτοκίας (Kokokiris, 2001).

Εκτός από τη θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο, παράγοντες όπως το υπόστρωμα εναπόθεσης των αυγών, το διαλυμένο οξυγόνο, η τροφή επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά τη διαδικασία της φυσικής αναπαραγωγής. Απουσία φυσικών ερεθισμάτων, όπως το υπόστρωμα και το φλερι με τα αρσενικά, η παραγωγή αυγών στα θηλυκά παράγεται τεχνητά με ορμόνες, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή σπέρματος από τα αρσενικά την ίδια περίοδο με τα θηλυκά (Kime, 2001).

Επειδή η αύξηση και ανάπτυξη των γονάδων γίνεται κανονικά σε ιχθύς σε αιχμαλωσία, συμπεραίνεται ότι η αναπαραγωγική αναστολή είναι αποτέλεσμα αναστολής της τελικής ωρίμανσης των γονάδων. Έτσι κρίνεται απαραίτητη η χρήση ορμονών ή άλλων ουσιών για την επαγωγή της αναπαραγωγής. Συνήθως είναι η παροχή ακατέργαστων εκχυλισμάτων υπόφυσης ιχθύων, εμπορικών σκευασμάτων μερικώς καθαρών υποφύσεων σολομού ή κυπρίνου ή γοναδοτροπινών θηλαστικών (όπως ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης). Επίσης η εκλυτική ορμόνη γοναδοτροπινών (GnRH), η ορμόνη-πεπτίδιο του υποθαλάμου, που επάγει τη σύνθεση και



έκκριση γοναδοτροπινών από την υπόφυση, και τα ανάλογά της είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για την επαγωγή της ωρίμανσης των γονάδων και της ωογένεσης. Οι ίδιες αποκρίσεις επάγονται επίσης με μείωση των επιπέδων των αναπαραγωγικών ορμονών στην κυκλοφορία, καθώς οι στεροειδείς ορμόνες και ειδικά τα οιστρογόνα αναστέλλουν την έκλυση της γοναδοτροπίνης από την υπόφυση, οπότε η χρήση ανταγωνιστών οιστρογόνων μπορεί να επάγει την ωοτοκία. Η προγεστερόνη, ειδικά σε συνδυασμό με την γοναδοτροπίνη έχει επίσης μία δράση στις γονάδες επάγοντας την τελική ωρίμανση των ωοκυττάρων.

Βέβαια, η χορήγηση ορμονών (γοναδοτροπίνες) είναι αποτελεσματική μόνον όταν τα ωάρια έχουν φτάσει στο στάδιο της βιτελλογένεσης και όλες οι άλλες συνθήκες είναι ευνοϊκές. Με άλλα λόγια, οι ενδογενείς ρυθμοί ελέγχουν επίσης την αναπαραγωγική ανάπτυξη, όπως δείχνει το γεγονός ότι η συμπεριφορά εποχιακής ωοτοκίας συνεχίζεται ακόμα και όταν τα ψάρια κρατούνται υπό σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες. Η προδιάθεση των ψαριών να ωριμάζουν σε συγκεκριμένη ηλικία και να αναπαράγονται εποχιακά μία ή δύο φορές το χρόνο είναι υπό γενετικό έλεγχο.

Πολλά ψάρια των γλυκών νερών ωριμάζουν σχετικά νωρίς, το χρυσόψαρο σε 12 μήνες κι η ηλικία της πρώτης γεννητικής ωριμότητας και η περιοδικότητά της επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία. Εάν για κάποιο λόγο οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν το επιτρέπουν, η διαδικασία της ωρίμανσης και της ωοτοκίας μπορεί να ανατραπεί και να επαναληφθεί την επόμενη περίοδο.

Οι αντίστοιχες εποχιακές αλλαγές στις συγκεντρώσεις των ορμονών στο αίμα και η σημασία τους στην αναπαραγωγή έχουν μελετηθεί ευρέως σε πολλούς τελεόστεους ιχθύς (Guerriero 2005, Cornish 1998).

Τα θηλυκά χρυσόψαρα κοντά στην ωοτοκία απελευθερώνουν τις αναπαραγωγικές ορμόνες και τους μεταβολίτες τους στο νερό, τις οποίες ανιχνεύουν τα αρσενικά οπότε οδηγούνται σε αλλαγές στη συμπεριφορά και στην ενδοκρινή τους κατάσταση και συγχρονίζονται με τα θηλυκά. Στα αρσενικά κυπρινοειδή στη φάση ηρεμίας ή στάσης των γονάδων υπάρχουν σπερματογόνια στους λοβούς των όρχεων, κατά την ωρίμανση υπάρχουν σπερματοκύτταρα και σπερματίδες, στην περίοδο αναπαραγωγής σπερματοζώαρια (όπου υψηλά επίπεδα γοναδοτροπινών σχετίζονται με τη διαδικασία δημιουργίας σπέρματος) και μετά την απελευθέρωση των γαμετών οι γονάδες χάνουν την οργάνωσή τους και εμφανίζονται μόνο σπερματογόνια. Τα επίπεδα των ανδρογόνων στις γονάδες δε και οι υποδοχείς τους παίζουν σημαντικότερο ρόλο κατά τη σπερματογένεση και δεν ακολουθούν πάντα τα επίπεδα των ανδρογόνων στο πλάσμα (Guerriero, 2005).

Τα επίπεδα της τεστοστερόνης στο πλάσμα στα ώριμα χρυσόψαρα αυξάνονται και κορυφώνονται κατά την περίοδο μόλις πριν την απελευθέρωση των γαμετών, γεγονός που λειτουργεί ως θετικό ανάδρομο ερέθισμα στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων για τη διατήρηση των υψηλών επιπέδων γοναδοτροπίνης που απαιτούνται για τη σπερμιογένεση. Εάν σε αυτό το στάδιο αυξηθεί η παραγωγή τεστοστερόνης θα μπορούσε να



ενεργοποιήσει πρόωρα τον άξονα και να υπάρχει χρονική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων στην εκκίνηση της αναπαραγωγής (Evanson, 2001).

Το ορμονικό προφίλ, δηλαδή το είδος και η ποσότητα των αναπαραγωγικών ορμονών που είναι ελεύθερες στην αιματική κυκλοφορία, μπορεί να καθορίσει το φύλο όπως και την αναπαραγωγική κατάσταση των ψαριών, καθώς αύξηση της συγκέντρωσης των ορμονών στο πλάσμα σηματοδοτούν την έναρξη της αναπαραγωγικής δραστηριότητας. Στα χρυσόψαρα, όπως προαναφέρθηκε, αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα των ορμονών της 17-β οιστραδιόλης (E_2) και της τεστοστερόνης σηματοδοτούν την ωθητική ανάπτυξη και παραμένουν υψηλές έως την ωοτοκία, ενώ αντίθετα στην ιριδίζουσα πέστροφα η τελική ωοκυτταρική ωρίμανση συνοδεύεται από μία πώση της οιστραδιόλης και αντίστοιχη αύξηση της γοναδοτροπίνης και προγεστογόνων στεροειδών ορμονών, και στα αρσενικά αντίστοιχα συνοδεύεται με εμφάνιση ανδρογόνων και προγεστερόνης.

Ο καθορισμός του φύλου βάσει εξωτερικών μορφολογικών χαρακτηριστικών είναι ιδιαίτερα δύσκολος σε νεαρά ψάρια γιατί συνήθως δε διαθέτουν εξωτερικούς χαρακτήρες που σχετίζονται με την αναπαραγωγική ωριμότητα. Ακόμη και τα ενήλικα ψάρια σε ορισμένα είδη δεν έχουν σταθερές, ανιληπτές διαφορές σε εξωτερικά σωματικά χαρακτηριστικά. Αξιόπιστος καθορισμός φύλου σε τέτοιες περιπτώσεις μπορεί να γίνει με απευθείας εξέταση των γονάδων ενδοσκοπικά ή με αιματολογικές εξετάσεις ή εξέταση στους βλεννογόνους. Στην περίπτωση αιματολογικών εξετάσεων μπορεί να γίνει ραδιοανοσομετρικός προσδιορισμός (RIA) της βιτελλογενίνης, της ειδικής πρωτεΐνης των θηλυκών ή αυξημένων επιπέδων (>10 ng/ml) των στεροειδών αναπαραγωγικών ορμονών (οιστρογόνων στα θηλυκά, 11-κετοτεστοστερόνης στα αρσενικά) κατά την περίοδο της αναπαραγωγής, ενώ με την ανοσοενζυμική μέθοδο της ELISA μπορεί να γίνει ο προσδιορισμός της βιτελλογενίνης σε δείγματα βλεννογόνου.

Η χορήγηση διαφόρων στεροειδών κατά την επώαση των αυγών ή ενσωματώνοντάς τα στη διαίτα νεαρών ατόμων επάγει αναστροφή φύλου σε αρκετά γονοχωριστικά είδη ιχθύων. Τα ανδρογόνα δρουν ως επαγωγείς αρσενικών ενώ τα οιστρογόνα ως επαγωγείς θηλυκών. Για να είναι πιο αποτελεσματικά τα ανδρογόνα πρέπει να χορηγούνται στα νεαρά ψάρια μόλις αρχίζουν να παίρνουν έτοιμη τροφή. Για τη θηλυκοποίηση στα σολωμοειδή συνήθως χρησιμοποιείται η οιστραδιόλη, ενώ στα χρυσόψαρα και την τιλάπια συνήθως χρησιμοποιείται η οιστρόνη μέσω της διαίτας τους για τις 30 πρώτες μέρες διατροφής. Οι ουσίες αυτές καταβολίζονται ταχύτατα μετά τη θεραπεία, εντός των επόμενων ημερών και η χορήγησή τους σταματά πολύ πριν την έξοδό τους στην αγορά έτσι ώστε να μη διακυβεύεται η ασφάλεια των καταναλωτών.

Ο καθορισμός της αναπαραγωγικής ωριμότητας γίνεται εύκολα επί νεκρών ιχθύων με τη χρήση του Γοναδοσωματικού Δείκτη (Gonadosomatic Index, GSI), που ανιπροσωπεύει το σχετικό βάρος των γονάδων και παρέχει μία γενική εκτίμηση φυσιολογικής ωθητικής αύξησης και αναπαραγωγικής ανάπτυξης και υπολογίζεται ως εξής: Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) = $100 \times \text{βάρος γονάδων(g)} / \text{σωματικό βάρος(g)}$. Παρέχεται έτσι



μία εκτίμηση της ωρίμανσης των γονάδων, του χρόνου της μέγιστης αναπαραγωγικής δραστηριότητας και του εύρους της αναπαραγωγικής περιόδου. Ο δείκτης αυτός όμως δεν μπορεί να διαχωρίσει τα ιδιαίτερα στάδια ωρίμανσης των γονάδων, ειδικά για ψάρια των οποίων τα μεγέθη μεταβάλλονται ευρέως. Η σχέση μεταξύ του βάρους των γονάδων και του μεγέθους των ψαριών δίνεται από τον Σχετικό Γοναδικό Δείκτη από τους Erickson et al (1985), σύμφωνα με τον οποίο: $RG_i = a_i W / S^b$ όπου W είναι το βάρος των γονάδων και a_i και b είναι παράμετροι για το i στάδιο των γονάδων.

Σε ορισμένα είδη ψαριών η εξελισσόμενη αναπαραγωγική ωριμότητα ακολουθείται από εμφανείς εξωτερικές αλλαγές στο σώμα ή στο χρωματισμό, αλλαγές στο σχήμα των σιαγόνων ή με την ανάπτυξη γονοποδίων ή άλλων δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, αλλά ακόμα και από το γεγονός ότι τα τοιχώματα της κοιλιάς μαλακώνουν ή ότι ο ουρογεννητικός πόρος εξέχει. Πλήρης αναπαραγωγική ωριμότητα ανιχνεύεται με την άμεση απελευθέρωση αυγών ή σπέρματος μετά από πίεση στην κοιλιά.

Η σταδιοποίηση των γαμετών μπορεί να καταδείξει την αναπαραγωγική κατάσταση ειδών χωρίς εξωτερικά δείγματα ωριμότητας. Το μέγεθος των αυγών αντιστοιχεί σε κάποια είδη με το στάδιο της αναπαραγωγικής τους ωριμότητας ή ακόμα η διάμετρος των αυγών μπορεί να υποδείξει εάν τα θηλυκά είναι δεκτικά σε ορμονική επαγωγή της ωοτοκίας. Επίσης η θέση του πυρήνα εντός του ωοκυττάρου δίνει μία καλή εκτίμηση αναπαραγωγικής ωριμότητας, καθώς η μετακίνησή του από το κέντρο στην περιφέρεια και η αποδιοργάνωσή του δείχνουν ότι η ωοτοκία πλησιάζει.

3. Στάδια γονάδων στους ιχθύς

Τα άτομα ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας των γονάδων διακρίνονται σε ανώριμα, όταν δεν είναι ευδιάκριτα τα ωάρια και το σπέρμα, σε ώριμα, όταν οι γονάδες είναι γεμάτες ωάρια και σπέρμα και σε πλήρους κατανάλωσης άτομα (spent), που πρόσφατα ωοτόκησαν.

α. Σπερματογένεση

Η γαμετογένεση στα αρσενικά είναι μία εποχιακή, μη συνεχής διαδικασία, όπου εμφανίζονται όλες οι κατηγορίες των γεννητικών κυττάρων (από σπερματογόνια έως σπερματοζώαρια).

Η διαδικασία της ωρίμανσης των αρσενικών γαμετών περιλαμβάνει τον μειωτικό πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων, για το σχηματισμό των σπερματοκυττάρων. Ακολουθεί η πρώτη μειωτική διαίρεση, που δίνει δύο θυγατρικά κύτταρα, τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση δημιουργεί τις σπερματίδες, που στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε λειτουργικούς γαμέτες, τα σπερματοζώαρια. Στους τελεόστεους ιχθύς, τα σπερματοζώαρια είναι σφαιρικά ή ωοειδή και στερούνται ακροσώματος.

Αναλυτικά τα μορφολογικά στάδια των όρχεων κατά τη σπερματογένεση μπορούν να διαχωριστούν σε 6 στάδια σύμφωνα με την



εμφάνιση (σχετική αφθονία) κάθε τύπου γεννητικών κυττάρων που απαντάται στους όρχεις ως εξής:

M₁ (σπερματογονιακό στάδιο): Ο κύκλος ξεκινά με τον μιτωτικό πολλαπλασιασμό των αρχέγονων κυττάρων. Κυριαρχία των σπερματογονίων και καλά διαμορφωμένο σύστημα λοβών (στ.1).

M₂ (σπερματογένεση): Η ωρίμανση των κυττάρων συνεχίζεται με κυριαρχία των σπερματοκυττάρων, παρουσία σπερματιδών στους λοβούς και μικρή εμφάνιση σπερματοζωαρίων (στ.2).

M₃ (σπερμιογένεση): Όλοι οι τύποι των γεννητικών κυττάρων είναι παρόντες, μεγενθυμένοι λοβοί, μεγάλα τμήματα των γονάδων γεμάτα σπερματίδες και σπερματοζωάρια (στ.3).

M₄₋₅ (spermiation-απελευθέρωση σπέρματος): Γίνεται αραιώση και ενυδάτωση του σπέρματος. Η επιδυδυμίδα (Vas deferens) και ο σπερματογωγός είναι γεμάτοι σπερματοζωάρια (στ.4). Όταν τα αρσενικά είναι ώριμα παρατηρούνται μεγενθυμένοι και μερικοί διερρηγμένοι λοβοί (στ.5) και με πίεση στην κοιλιά απελευθερώνεται σπέρμα.

M₆ (μετά την απελευθέρωση): Οι περισσότεροι λοβοί είναι κενοί από σπερματοζωάρια, παραμονή σπέρματος (απελευθέρωση) σε λοβούς και sinuses. Ανάπτυξη ηωσινόφιλων κοκκιοκυττάρων, φαγοκυτταρική απορρόφηση του εναπομείναντος σπέρματος και μη κυτταρικές εναποθέσεις στα όρια των λοβών (στ.6).

β. Ωογένεση

Η ωογένεση στα θηλυκά καθορίζεται σύμφωνα με την παρουσία των πλέον ώριμων τύπων ωοκυττάρων και της σχετικής αφθονίας τους (ωογόνια και προβιτελλογενικά ωοκύτταρα είναι παρόντα όλο το χρόνο).

Η διαδικασία της ωρίμανσης των θηλυκών γαμετών περιλαμβάνει τον μιτωτικό πολλαπλασιασμό των ωογονίων, για το σχηματισμό των πρωτογενών ωοκυττάρων (πρωτογενής αύξηση), τα οποία μπαίνουν αμέσως στην πρώτη μειωτική διαίρεση και κατόπιν ακολουθεί μία περίοδος αύξησης των ωοκυττάρων. Κατά τη δευτερογενή αύξηση των ωοκυττάρων εμφανίζονται τα λεκιθικά κυστιδία στην περιπυρηνική περιοχή, τα οποία περιέχουν μουκοπολυσακχαρίτες ή γλυκοπρωτεΐνες και συντίθενται εντός του ωοκυττάρου. Τα λεκιθικά κυστιδία αυξάνουν σε μέγεθος και αριθμό και μεταφέρονται περιφερικά (σχηματισμός cortical alveoli), ενώ στο τέλος της βιτελλογένεσης η λέκιθος συσσωρεύεται στο κέντρο και καταλαμβάνει τη μεγάλη μάζα του ωοκυττάρου (στην λέκιθο μάλιστα οφείλεται η τεράστια αύξηση του ωοκυττάρου κατά τη διάρκεια της βιτελλογένεσης).

Κατά τη φάση της ωρίμανσης γίνεται μία σειρά από βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές, κυρίως με επανάληψη των μειωτικών διαιρέσεων και τη χαρακτηριστική μετανάστευση του προμειωτικού πυρήνα προς τη μικροπύλη, στο τέλος της οποίας, η πυρηνική μεμβράνη σπάζει και το πυρηνικό περιεχόμενο αναμειγνύεται με το κυτταρόπλασμα.

Όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν είναι κατάλληλες δημιουργείται ατρησία του ωοκυττάρου. Μπορεί ένας ολόκληρος πληθυσμός ωοκυττάρων στο στάδιο της βιτελλογένεσης να γίνει ατρησιακός, με υπερτροφία των



κοκκιωδών κυττάρων, τα οποία εισβάλλουν στο ωοκύτταρο και επαναροφούν τα υπολείμματά του. Μετά σχηματίζεται μια ανώμαλη κυτταρική μάζα και παρατηρούνται ωχρές κηλίδες μεταξύ των κυττάρων.

Τα στάδια ωρίμανσης των ωοθηκών ιστολογικά, βάσει των κυρίαρχων γεννητικών κυττάρων ακολουθούν την εξής πορεία:

F₁ (προβιτελλογένεση): Τα ωοθηκικά lamellae είναι γεμάτα κυρίως με πρωτογενή ωοκύτταρα (ισχυρά βασεόφιλα όταν βάφονται με αιματοξυλίνη-ηωσίνη, μικρά σφαιρικά κύτταρα με κεντρικό πυρήνα και αυξανόμενο ποσό κυτταροπλάσματος (στ.1-3).

F₂ (πρώιμη βιτελλογένεση): Παλαιότερα ονομαζόταν «ενδογενής βιτελλογένεση», μία σύντομη ενεργή περίοδος σύνθεσης RNA και πρωτεϊνών που ακολουθείται από εναπόθεση πρωτογενών λεκιθικών κοκκίων μέσα στο κυτταρόπλασμα των αναπτυσσόμενων ωοκυττάρων. Κατά την ωρίμανση γίνεται η ενσωμάτωση των λεκιθικών κοκκίων από το ήπαρ, τα οποία πρώτα εναποτίθενται περιφερικά και μετά προς το κέντρο. Το κυτταρόπλασμα των ωοκυττάρων είναι λιγότερο βασεόφιλο, η ζώνη γύρω από τον πυρήνα καταλαμβάνεται από λιπιδικά κοκκία και cortical alveoli.

F₃ (εξωγενής βιτελλογένεση): Μακρά και σημαντική φάση αύξησης των ωοκυττάρων. Οι πρόδρομοι της λεκίθου (βιτελλογενίνη) παίζουν σημαντικό ρόλο. Παρουσία δευτερογενών λεκιθικών κενοτοπιών σε οξεόφιλο κυτταρόπλασμα. Αυξημένα επίπεδα οιστραδιόλης και βιτελλογενίνης στο αίμα (συνδεδεμένη με ασβέστιο). Γρήγορη αύξηση του μεγέθους των ωοκυττάρων από 1% ή και λιγότερο του σωματικού βάρους σε 20% ή περισσότερο (στ. 3-6).

F_{3 a}: Λιγότερο από 50% καταλαμβάνεται από βιτελλογενικά ωοκύτταρα, στα οποία η κεντρική-περιφερική ζώνη του ωοπλάσματος εποικίζεται από μικρά, σφαιρικά και ηωσινόφιλα λεκιθικά κοκκία. Τα ωοθυλάκια ξεχωρίζουν εύκολα και η ακτινωτή ζώνη περιβάλλει αυτά τα ωοκύτταρα.

F_{3 b}: Περισσότερο από 50% καταλαμβάνεται από προχωρημένα βιτελλογενικά ωοκύτταρα. Μεγάλα λιπιδικά και λεκιθικά κοκκία που άρχισαν να συνιέκονται καταλαμβάνουν το ωοπλάσμα. Άφθονα ατρησιακά βιτελλογενικά ωοκύτταρα παρόντα.

F₄ (τελική ωρίμανση): Ωριμα (ενυδατωμένα) μεγάλα ωοκύτταρα παρόντα γεμάτα λέκιθο, πυρήνας απών, τα λεκιθικά κοκκία ολοκλήρωσαν την σύντηξή τους, διαυγής περιλεκιθικός χώρος, μία μεγάλη σταγόνα ελαίου σχηματίζεται, η ακτινωτή ζώνη λεπταίνει (στ. 7).

Τα πλήρως ώριμα ωοκύτταρα είναι ενυδατωμένα και περιβάλλονται από μία σκληρή μεμβράνη. Σε κάποια, η παρουσία νηματίων ευνοεί την προσκόλλησή τους σε φυτά μετά την ωοτοκία.

Η ωοθήκη πλήρους κατανάλωσης μετά την ωοτοκία (στ.8) έχει κενά ωοθυλάκια και δομές που χαρακτηρίζονται ως ωχρά σωματίδια (*corpora lutea*) (από Πάσχος 2002, Kokokiris 2001, Ruby 2000, Crim & Glebe 1990).



γ. Εκτίμηση γονιμότητας-επιτυχίας εκκόλαψης

Η γονιμότητα, η εκτίμηση δηλαδή του αναπαραγωγικού δυναμικού των θηλυκών, μπορεί να υπολογιστεί με τη μέτρηση του συνόλου των αυγών, όμως η λειτουργική γονιμότητα, που δίνει την πραγματική παραγωγή βιώσιμων ωοκυττάρων μπορεί να διαφέρει σημαντικά, λόγω ατελούς ωοτοκίας ή ατρησίας (εκφυλισμού) και επαναρρόφησης των ωοκυττάρων. Η γονιμότητα μπορεί να επηρεαστεί επίσης από τη διαθεσιμότητα τροφής, καθώς η στέρηση τροφής μπορεί να μειώσει το βαθμό ωρίμανσης των γονάδων.

Η ποιότητα των γαμετών μπορεί να διαφέρει μεταξύ ατόμων και να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως την υπερωρίμανση. Για το σπέρμα, τα κριτήρια της ποιότητας περιλαμβάνουν το εκατοστιαίο ποσοστό δραστήριων σπερματοζωαρίων, την ταχύτητα της κίνησης, και την διάρκεια της δραστηριότητας που ακολουθεί την ενεργοποίηση λόγω της επαφής με το νερό, γνωστά και ως εκτίμηση της κινητικότητας. Η δραστηριότητα του σπέρματος επηρεάζεται από το pH, καθώς τόσο το σπέρμα όσο και τα ωθηκικά υγρά έχουν αλκαλικό pH και πτώση του κάτω από το 4,5 πρακτικά μηδενίζει την κινητικότητα. Η ποιότητα των αυγών σχετίζεται άμεσα με το χρόνο της ωογένεσης και η εκτίμησή της μπορεί να γίνει από το ποσοστό των γονιμοποιημένων αυγών, των αυγών που φτάνουν στο στάδιο της οφθαλμοεμφάνισης και εκκόλαψης και αυτών που δίνουν κολυμβητικές προνύμφες. Η απώλεια της ποιότητας των αυγών ειδών που βρίσκονται σε αιχμαλωσία έχει αποδοθεί σε υπερωρίμανση των αυγών και αυτή η μείωση της βιωσιμότητάς τους σχετίζεται ενδεχομένως με την αποσύνθεση της λεκίθου. Διατήρηση των αυγών και του σπέρματος για αρκετές μέρες μπορεί να γίνει σε θερμοκρασίες λίγο πάνω από τους 0°C ενώ μακρόχρονη διατήρηση του σπέρματος, αλλά όχι των αυγών μπορεί να γίνει σε θερμοκρασίες κάτω του μηδενός, κατά προτίμηση με κρυοδιατήρηση σε υγρό άζωτο στους -196°C.

4. Ενδοκρινικό σύστημα και αναπαραγωγή

Στην αναπαραγωγή των ιχθύων μία σειρά από οργανικά συστήματα και ορμόνες εμπλέκονται, επικοινωνούν και αλληλεπιδρούν με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται ότι η εποχή θα είναι η πιο κατάλληλη για την επιβίωση των απογόνων. Στις εύκρατες περιοχές υπάρχει μία εποχιακή περιοδικότητα ώστε η ωοτοκία να συμπίπτει με συμβατές περιβαλλοντικές συνθήκες και δυνατότητες διατροφής. Κατά την γενεϊκή ωρίμανση, οι εσωτερικές αποκρίσεις που συγχρονίζονται από εξωτερικά σήματα, εξαρτώνται από κάποιο γενεϊκώς καθορισμένο όριο και η διαδικασία της ωρίμανσης θα συνεχιστεί μόνον εφόσον ξεπεραστεί ορισμένο κρίσιμο σημείο κάποια στιγμή κατά την άνοιξη ή το χειμώνα. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό η ωρίμανση θα καθυστερήσει.

Ο υποθάλαμος μέσω της επίδρασης των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων της φωτοπερίόδου, της θερμοκρασίας, της διατροφής και κοινωνικών παραγόντων ελέγχει τη σύνθεση και απελευθέρωση των ορμονών και των χημικών μηνυμάτων κατόπιν επαγωγής από το ΚΝΣ. Η εκλυτική ορμόνη



των γοναδοτροπινών (GnRH) απελευθερώνεται από τον υποθάλαμο και επάγει την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών (GtH) από την υπόφυση, που είναι οι σημαντικότερες ορμόνες στη ρύθμιση της ανάπτυξης και ωρίμανσης των γονάδων και εμφανίζονται υπό δύο τύπους στα ψάρια. Η γοναδοτροπίνη I (GtH I) είναι η ανάλογη της θυλακιοτρόπου ορμόνης των θηλαστικών (FSH) και σχετίζεται με τη γαμετογένεση και τη στεροειδογένεση, ενώ η γοναδοτροπίνη II (GtH II) είναι η ανάλογη της ωχρινοτρόπου ορμόνης των θηλαστικών (LH) και σχετίζεται με τα τελικά στάδια ωρίμανσης στη γαμετογένεση. Γενικά οι γοναδοτροπίνες επάγουν τη σύνθεση των στεροειδών του φύλου στις γονάδες (ανδρογόνων, οιστρογόνων και προγεστινών), τα οποία με τη σειρά τους δρουν σε ιστούς-στόχους για τη ρύθμιση της αναπαραγωγής, του φυλετικού φαινοτύπου και των χαρακτηριστικών της συμπεριφοράς.

Στα θηλυκά η ωογένεση ελέγχεται από την γοναδοτροπίνη I, η οποία αυξάνεται κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των ωοκυττάρων και δεσμεύεται σε υποδοχείς στην κυτταρική στοιβάδα της θήκης και των κοκκιωδών κυττάρων του θυλακίου. Τα κύτταρα της θήκης συνθέτουν ιεστοστερόνη και επιτρέπουν την αρωματοποίησή της ώστε να σχηματίζεται τελικά οιστραδιόλη (17-β οιστραδιόλη E₂), στην κοκκιώδη στοιβάδα, που εκκρίνεται στο πλάσμα. Η οιστραδιόλη του πλάσματος θα δεσμευτεί στους οιστρογονικούς υποδοχείς (ER) και θα εκκινήσει μία σειρά βημάτων που θα οδηγήσουν στην παραγωγή βιτελλογενίνης (VTG) και των πρωτεϊνών της ακτινωτής ζώνης του κελύφους του αυγού (Zr proteins) στο ήπαρ.

Η βιτελλογενίνη (VTG) είναι μία ψευδάργυρο-πρωτεΐνη που παράγεται στο ήπαρ των ιχθύων κατόπιν επαγωγής από την 17-β οιστραδιόλη (E₂), η οποία όπως προαναφέρθηκε επάγεται στα θηλυκά ψάρια από τις γοναδοτροπίνες (GtH) της υπόφυσης (Shein, 2004). Η βιτελλογενίνη (VTG), αποτελεί επίσης μία γλυκολιποφωσφο-πρωτεΐνη, η οποία μετά την σύνθεσή της από τα ηπατοκύτταρα μεταφέρεται μέσω της αιματικής κυκλοφορίας στις ωοθήκες όπου ενσωματώνεται στα ωοκύτταρα και βιομετατρέπεται στην πρωτεΐνη της λεκίθου, που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του εμβρύου (Tata 1979, Wallace 1978). Με αυτόν τον τρόπο η βιτελλογένεση επιτρέπει την αύξηση των ωοκυττάρων.

Η βιτελλογενίνη (VTG) και οι πρωτεΐνες της ακτινωτής ζώνης απελευθερώνονται επομένως στην αιματική κυκλοφορία και ενσωματώνονται στο ωοκύτταρο μέσω ενδοκύτωσης που διευκολύνεται από υποδοχείς. Καθώς το ωοκύτταρο μεγαλώνει τα επίπεδα της γοναδοτροπίνης I μειώνονται και αντικαθιστώνται από αυξημένα επίπεδα γοναδοτροπίνης II. Οι γοναδοτροπίνες επηρεάζουν την τελική ωρίμανση των ωοκυττάρων μέσω της σύνθεσης των στεροειδών ωρίμανσης MIS (maturation inducing substances). Ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων-ήπατος (HPGL axis) ελέγχεται από συστήματα αρνητικής ανάδρομης ρύθμισης ώστε αλλαγές στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών να μπορούν να αναστείλουν τελικά τις διαδικασίες αναπαραγωγής.

Για παράδειγμα όταν η παραγωγή της ορμόνης κορυφώνεται, η ορμόνη δρα πλέον ως αναστολέας και «κλείνει» το μονοπάτι που την παράγει. Τα



μονοπάτια αυτά που διατηρούν την ομοιόσταση είναι πολύπλοκα και οδηγούν στη σύνθεση, απελευθέρωση και μεταφορά μορίων-σημάτων (ορμονών), που έχουν κύτταρα-στόχους και αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη ή με ενδοκυττάρους υποδοχείς, εκκινώντας έναν καταρράκτη σημάτων ή αλληλεπιδρούν άμεσα με ειδικές αλληλουχίες στο γονιδίωμα και τροποποιούν την γονιδιακή μεταγραφή και μετάφραση, αλλάζοντας τις βιοχημικές και φυσιολογικές αποκρίσεις.

Στους τελεόστεους ιχθύς, όπως και σε άλλα σπονδυλόζωα, τα στεροειδή των γονάδων είναι σημαντικοί ανάδρομοι ρυθμιστές της έκκρισης των γοναδοτροπινών, αλληλεπιδρώντας με ειδικές θέσεις δέσμησης στεροειδών στον εγκέφαλο και την υπόφυση. Κατά την εμβρυογένεση (ανάπτυξη) οι στεροειδείς ορμόνες μπορούν να παίξουν οργανωτικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, ενώ στους ενήλικες οργανισμούς μπορεί να είναι σημαντικές για την ενεργοποίηση μεταβολικών και φαινομένων μεταγραφής, που οδηγούν σε αλλαγές της αναπαραγωγικής συμπεριφοράς (Foran, 2002).

Τα στεροειδή της αναπαραγωγής ρυθμίζουν την έκκριση της γοναδοτροπίνης II (LH) σε αρκετά είδη τελεοστέων μετά από μακροχρόνια χορήγηση, για παράδειγμα η τεστοστερόνη αύξησε τα επίπεδα γοναδοτροπίνης II του πλάσματος στα χρυσόψαρα, ενώ η οιστραδιόλη στην ιριδιζουσα πέστροφα αντίστοιχα. Επίσης η εκλυτική ορμόνη γοναδοτροπινών (GnRH) επίσης επήγαγε την έκκριση γοναδοτροπίνης II σε κυτταροκαλλιέργειες υπόφυσης από πολλούς τελεόστεους μεταξύ των οποίων, το ευρωπαϊκό κέλι, η ιριδιζουσα πέστροφα και τα χρυσόψαρα. Μετά από λίγες ώρες βέβαια, στα χρυσόψαρα εμφανιζόταν φαινόμενο απευαισθητοποίησης της έκκρισης γοναδοτροπίνης II μετά από επαγωγή με GnRH. Η 17-β οιστραδιόλη ρυθμίζει την απόκριση των γοναδοτροπινών στη δράση της GnRH πιθανώς μέσω δράσης στον αριθμό των υποδοχέων της GnRH κατά τις μετα-μεταφραστικές διαδικασίες (π.χ. υπεργλυκοζυλίωση των υποδοχέων) ή σε θέσεις μετά τον υποδοχέα τροποποιώντας μονοπάτια μετάδοσης του σήματος που σχετίζονται με Ca^{2+} και την πρωτεϊνική κινάση C. Πάντως για τα χρυσόψαρα η έκκριση της γοναδοτροπίνης II κατόπιν επαγωγής από την GnRH υποβοηθούμενης από την τεστοστερόνη (T) σχετίζεται με την ενίσχυση της ευαισθησίας της έκκρισής της που εξαρτάται από την πρωτεϊνική κινάση C (Yen, 2002).

Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για την επαγωγή της ωρίμανσης των γονάδων και της ωογένεσης (ovulation) σε πολλούς τελεόστεους ιχθύς (Shein, 2004) και έχει παρατηρηθεί ότι ο αριθμός των υποδοχέων της (GnRH) στην υπόφυση σταδιακά αυξάνει κατά την φάση ωρίμανσης των γονάδων στα χρυσόψαρα (Habibi, 1989).

Η οιστραδιόλη επίσης ρυθμίζει το μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων στα χρυσόψαρα (Guerreiro, 2002). Τα χρυσόψαρα μάλιστα παρουσιάζουν εποχιακούς κύκλους στο μέγεθος των γονάδων, στα στεροειδή του αίματος και στα επίπεδα γοναδοτροπινών, τα οποία μειώνονται μετά την ωοτοκία. Στην περίοδο μετά την ωοτοκία τα θηλυκά έχουν σχετικά μεγάλες



ατρησιακές ωοθήκες και χαμηλά επίπεδα στεροειδών αναπαραγωγής (Utoh 2005, Trudeau 1991). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται κάποιες ενδεικτικές τιμές.

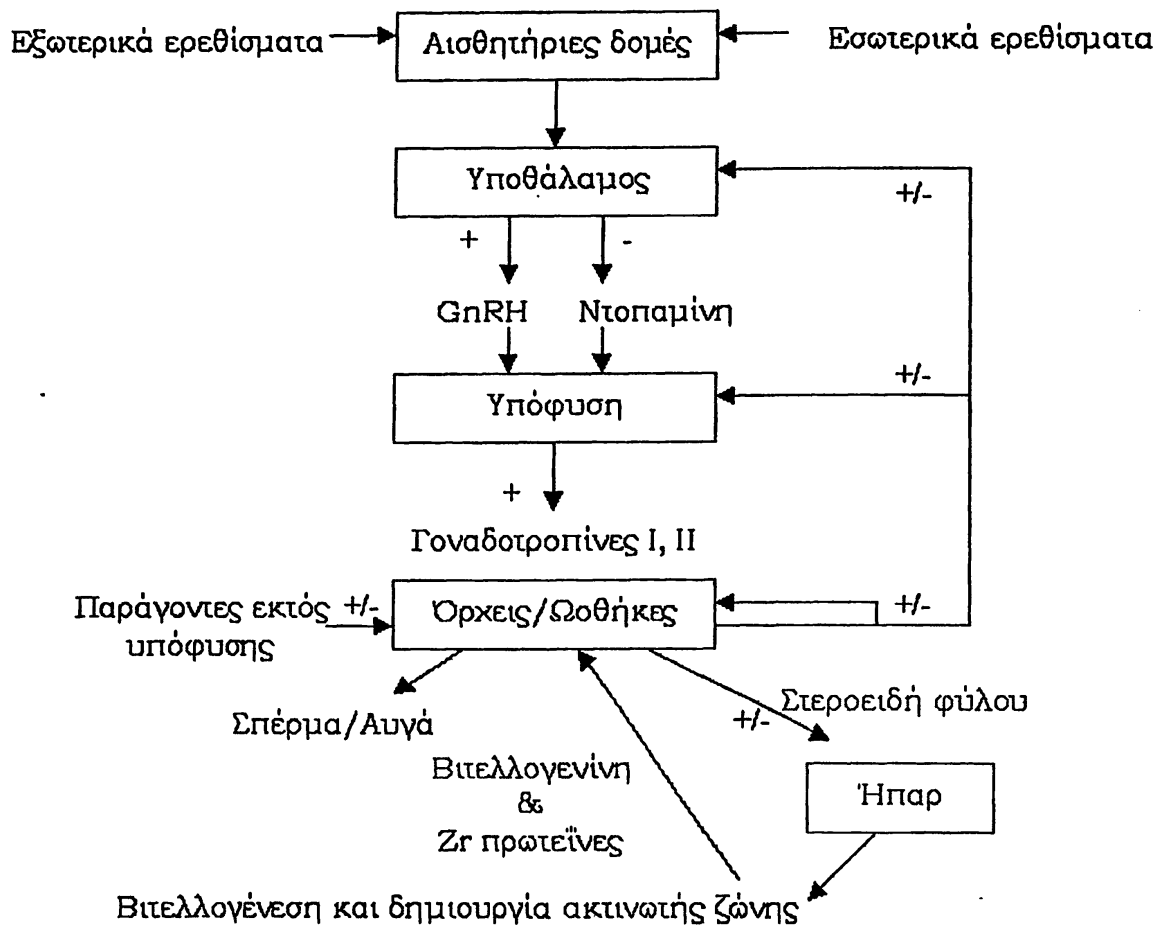
Πίνακας 6: Εποχιακές μεταβολές της οιστραδιόλης και του μεγέθους των γονάδων (GSI) στα χρυσόψαρα (από Trudeau, 1991)

E_2 (ng/ml)	GSI	Μήνας
0.6 ± 0.2	$8,8 \pm 1,3$	Μάρτιος
1.9 ± 0.2	$7,3 \pm 1,9$	Μάιος
1.2 ± 0.3	$8,1 \pm 1,3$	"
0.3 ± 0.1	1,8-3	Ιουλ-Οκτ
	$4,7 \pm 1,8$	Φεβ

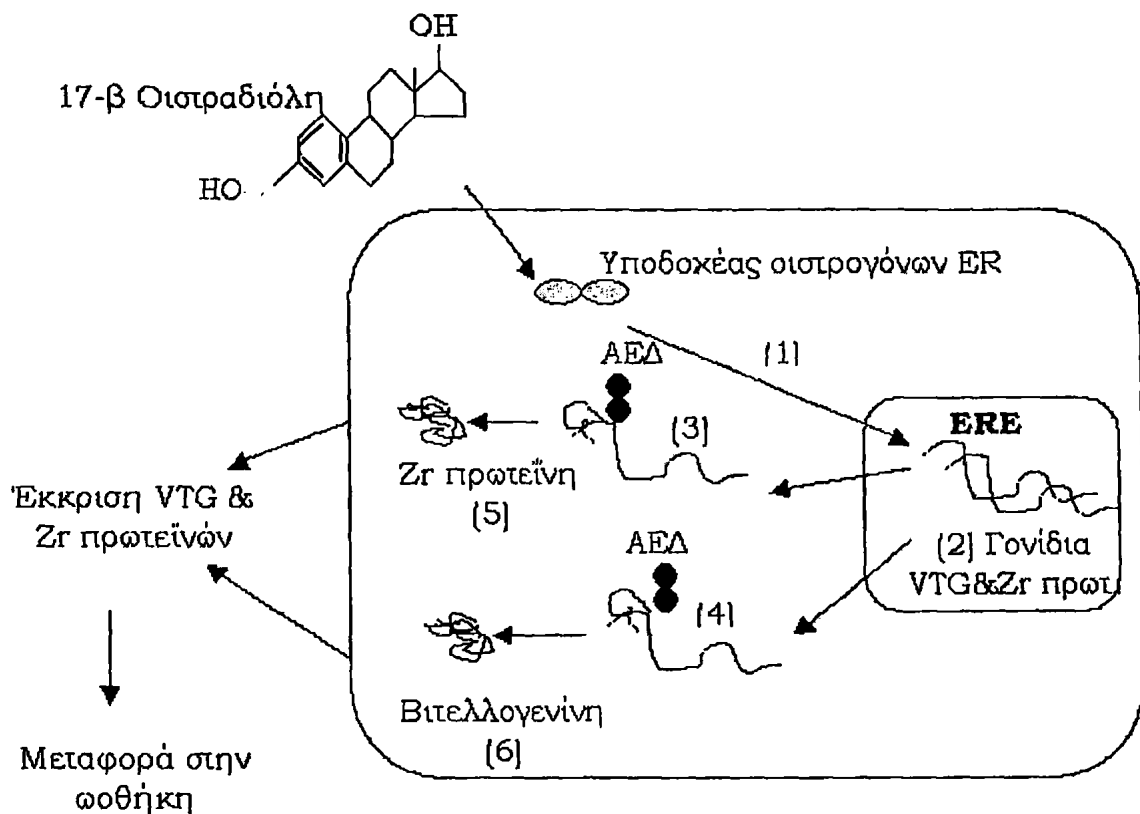
Τα χρυσόψαρα διαθέτουν επίσης την καλσιτονίνη, μία ορμόνη με υπασβαιοποιητική δράση (Sasayama, 1993). Τα ψάρια του γλυκού νερού γενικά αυξάνουν τα επίπεδα ολικού ασβεστίου και προσαρμόζουν τους μηχανισμούς μεταφοράς του μετά την αύξηση της οιστραδιόλης και της βιτελλογενίνης (VTG), κινητοποιώντας τις εσωτερικές αποθήκες του στα οστά ή τα λέπια (Guerreiro, 2002).

Στα αρσενικά η γοναδοτροπίνη I αυξάνεται κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και μειώνεται κατά την απόθεση των γαμετών, ενώ η II είναι χαμηλή σε όλη την περίοδο ανάπτυξης και αυξάνεται κατά την απελευθέρωση του σπέρματος. Οι γοναδοτροπίνες επάγουν τον πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων και τη σύνθεση των απαραίτητων ανδρογόνων για τη γαμετογένεση στα κύτταρα Leydig και την ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτήρων του φύλου. Με άλλα λόγια τα ανδρογόνα επάγουν την ανάπτυξη αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος στα αρσενικά και ενεργοποιούν την αύξηση και εκκριτική λειτουργία των σχετικών αδένων. Η σύνθεση των διαφόρων ανδρογόνων είναι ανάλογη του είδους και του αναπτυξιακού σταδίου και περιλαμβάνουν την τεστοστερόνη, την 11-κετοτεστοστερόνη και/ή ανδροστενδιόνη. Μείωση των ανδρογόνων και οξεία αύξηση των προγεστινών κατά την απόθεση των γαμετών αποδίδονται στην αύξηση της γοναδοτροπίνης II.





Σχήμα 5. Σχηματικές οδοί επαγωγής (+) και αναστολής (-) αναπαραγωγικής ωρίμανσης, αποτελούμενες από παράγοντες ή ουσίες που ρυθμίζουν δομές ή συμπεριφορές ενήλικων τελεόστεων ιχθύων. GnRH=εκλυτική ορμόνη γοναδοτροπινών, Ζr =πρωτεΐνες ακτινωτής ζώνης (από Arukwe, 2001).



Σχήμα 6. Σχηματική αναπαράσταση βιτελλογένεσης (πρωτεΐνης προδρόμου της λεκίθου) και δημιουργίας πρωτεϊνών ακτινωτής ζώνης (κελύφους αυγού) επαγόμενων από την 17-β οιστραδιόλη (E_2) σε θηλυκούς τελεόστεους ιχθύς.

- (1) Η E_2 που παράγεται από τα ωθυλακικά κύτταρα εισέρχεται με διάχυση στο κύτταρο και παραμένει στα κύτταρα-στόχους δεσμευμένη λόγω υψηλής συγγένειας με έναν ειδικό υποδοχέα στεροειδών πρωτεϊνικής φύσεως (όπως τον υποδοχέα οιστρογόνων ER).
- (2) Το σύμπλεγμα ορμόνης-υποδοχέα δεσμεύεται ισχυρά στον πυρήνα στα μεταθετά στοιχεία οιστρογόνων (ERE estrogen responsive elements) ανάντη ή εντός των αντίστοιχων γονιδίων του DNA και με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται ή ενισχύεται η μεταγραφή των γονιδίων της βιτελλογενίνης (VTG) και πιθανώς και των πρωτεϊνών της ακτινωτής ζώνης Ζr. Ακολούθως αυξάνει και σταθεροποιείται το mRNA της βιτελλογενίνης (VTG).
- (3) Εκτενής τροποποίηση προδρόμων πρωτεϊνών της ακτινωτής ζώνης Ζr στα αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ).
- (4) Εκτενής τροποποίηση προδρόμων της βιτελλογενίνης (VTG) στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΑΕΔ).
- (5) Τροποποιημένες πρωτεΐνες ακτινωτής ζώνης Ζr και
- (6) Τροποποιημένη βιτελλογενίνη (VTG) εκκρίνονται στον ορό για μεταφορά προς την ωσθήκη (από Arukwe, 2001).

5. Ενδοκρινής διαταραχή

Η διαταραχή των ορμονικών λειτουργιών στα ψάρια μπορεί να επηρεάσει την αναπαραγωγική τους ωρίμανση (ανάπτυξη των γονάδων), την παραγωγή και μεταφορά των γαμετών, την αναπαραγωγική συμπεριφορά και τη γονιμότητα. Οι μεταβολές στις γονάδες μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της γονιμότητας και της αναπαραγωγικής επιτυχίας όπως επίσης και σε ανωμαλίες στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Αντίθετα με το νευρικό σύστημα που στέλνει γρήγορα σήματα ηλεκτροχημικής διαβίβασης το ενδοκρινικό σύστημα παρέχει οδηγίες στα κύτταρα μέσω χημικών μηνυμάτων με πιο λεπτό και αργό τρόπο. Πολλές χημικές ουσίες, φυσικής προέλευσης από φυτά ή μύκητες, ή ανθρωπογενή παραπροϊόντα, που απαντώνται στο περιβάλλον έχουν οιστρογόνο ή ανδρογόνο δράση και μπορούν να αλληλεπιδρούν με στεροειδείς ορμόνες και τους υποδοχείς τους ή με άλλες ορμόνες και μεταγραφικούς παράγοντες στα βιοχημικά μονοπάτια ή στην ορμονική δραστηριότητα (*περιβαλλοντικά οιστρογόνα*). Κάποια οργανοχλωρικά ζιζανιοκτόνα, για παράδειγμα, συνδέονται στους μεμβρανικούς υποδοχείς των στεροειδών και παρεμβάλλονται έτσι στις μη γονιδιωματικές δράσεις των στεροειδών ωρίμανσης MIS ως ανταγωνιστές. Η δράση αυτή αφορά αποκλειστικά την κυτταρική επιφάνεια, με έναν μηχανισμό που δεν επάγει μεταγραφή, αλλά περιλαμβάνει ενεργοποίηση δευτερογενών αγγελιοφόρων που σχετίζονται με τη μεμβράνη, όπως το cAMP (Das, 1999). Τα ξеноβιοτικά επομένως μπορούν να δρουν παρόμοια με τις ορμόνες και περιλαμβάνουν φυτο και μυκοοιστρογόνα και συνθετικές ενώσεις όπως μεθοξυχλωρίνη, DDT, και πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), ουσίες που χρησιμοποιούνται σε φυτοφάρμακα, πλαστικά, ηλεκτρικούς συσσωρευτές, παραπροϊόντα ή προϊόντα αποικοδόμησης άλλων χημικών και ορισμένα φάρμακα (17β-αιθινυλοιστραδιόλη) (Arukwe, 2001).

Στους αρσενικούς τελεόστεους τα ξеноβιοτικά επιδρούν στη στεροειδογένεση έχοντας ως στόχο διάφορους μηχανισμούς ελέγχου. Στο επίπεδο υποθάλαμου-υπόφυσης μπορεί να επηρεάζουν την εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) και/ή την έκκριση των γοναδοτροπινών. Στο επίπεδο των γονάδων μπορεί να επηρεάζουν θέσεις μέσα στην οδό μετάδοσης του σήματος του κυκλικού AMP(cAMP)/πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), που είναι ο κύριος δρόμος που ακολουθεί η γοναδοτροπίνη I για την επαγωγή της στεροειδογένεσης στους όρχεις των τελεόστεων. Η επίδραση σ' αυτή τη μεταβολική οδό μπορεί να τροποποιεί την παραγωγή του cAMP, τη διαθεσιμότητα του πρωτογενούς υποστρώματος, δηλαδή της χοληστερόλης και/ή τη δραστηριότητα των ενζύμων της στεροειδογένεσης, καθώς θετική ρύθμιση της σύνθεσης ή ενεργοποίηση των ενζύμων παρατηρήθηκε μετά το σχηματισμό του cAMP (Evanson, 2001).

Η δράση των ξеноβιοτικών στην ενδοκρινή διαταραχή μπορεί να αναλυθεί ανάλογα με το επίπεδο οργάνωσης που μελετάται σε μοριακές και κυτταρικές αποκρίσεις, σε αποκρίσεις σε επίπεδο ατόμου και σε αποκρίσεις σε επίπεδο πληθυσμού-βιοκοινότητας.



α. Κυτταρικές και μοριακές αποκρίσεις

Η έκθεση αρσενικών προνυμφών ιχθύων σε οιστρογονικές ορμόνες κατά τα ευαίσθητα στάδια ανάπτυξης των γονάδων τους μπορούν να θηλυκοποιήσουν πλήρως το φαινότυπό τους. Έκθεση μάλιστα ιριδιζουσας πέστροφας σε αλκυλοφαινολικές ενώσεις που επάγουν τη σύνθεση βιτελλογενίνης ταυτόχρονα ανέστειλε και την αύξηση των όρχεων (Jobling, 1996), ενώ έκθεση του medaka (*Oryzias latipes*) σε β-εξαχλωροκυκλοεξάνιο οδήγησε σε ανάπτυξη ωο-όρχεων στα αρσενικά και βιτελλογένεση και στα δύο φύλα (Canton, 1986). Επίσης έκθεση νεαρών ιχθυδίων ιριδιζουσας πέστροφας σε επεξεργασμένα λύματα ή νεαρών σολομών Ατλαντικού σε επεξεργασμένα απόβλητα από διυλιστήρια πετρελαίου είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή πρωτεΐνης ακτινωτής ζώνης Zr και τη σύνθεση βιτελλογενίνης (Arukwe, 2001). Έτσι η μέτρηση της βιτελλογενίνης στους αρσενικούς ιχθύς αποτελεί έναν καλό βιοδείκτη έκθεσης σε οιστρογόνα στα υδατικά περιβάλλοντα, καθώς τα αρσενικά διαθέτουν μεν το γονίδιο της βιτελλογενίνης, αλλά φυσιολογικά δε συνθέτουν ανικνεύσιμες ποσότητες της πρωτεΐνης.

Η επίδραση των ουσιών που προκαλούν ενδοκρινή διαταραχή στην ανάπτυξη των γαμετών μπορεί να είναι σε επίπεδο οργάνωσης εάν μιλάμε για νεαρά άτομα ή σε επίπεδο ενεργοποίησης όταν πρόκειται για ενήλικα άτομα. Πάντως και τα δύο επίπεδα είναι σημαντικά για τη διευκρίνιση του ρόλου των ορμονών στον καθορισμό του φυλετικού διμορφισμού μορφολογικά, φυσιολογικά και ηθολογικά.

β. Βραχυπρόθεσμες επιδράσεις σε επίπεδο ατόμου

Οιστρογόνες και αντι-οιστρογόνες δράσεις. Κυριότερη επίπτωση των ξενοοιστρογόνων είναι η επαγωγή της σύνθεσης της πρωτεΐνης της ακτινωτής ζώνης Zr και η σύνθεση βιτελλογενίνης σε αρσενικά άτομα όπου δεν έχουν καμία λειτουργία, γεγονός διαδεδομένο σε υδατικά περιβάλλοντα που είναι αποδέκτες λυμάτων και αποβλήτων.

Οι άμεσες συνέπειες της παρουσίας αυτών των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν τη μείωση του ασβεστίου σε λέπια και οστά, την υπερπλασία-υπεριτροφία του ήπατος και νεφρικές βλάβες. Μάλιστα παρατηρείται και συσσώρευση υαλινικού υλικού στα ηπατοκύτταρα και στα νεφρικά σωληνάκια, όπως και στην αγγείωση των όρχεων, που πρόκειται μάλλον για βιτελλογενίνη, αν και αρσενικοί ιχθύς κατόπιν επαγωγής με οιστρογόνα εκφράζουν επίσης και πρωτεΐνες της ακτινωτής ζώνης. Οι πρωτεΐνες αυτές συσσωρεύονται τελικά στους ιστούς μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας λόγω απουσίας των ειδικών υποδοχέων στους όρχεις, που θα τις δέσμευαν στους ιστούς αυτούς (Folmar, 2001). Αυτή η ουσιαστική σπατάλη ενέργειας θα μειώσει επίσης την αναπαραγωγική ικανότητα των ιχθύων. Η ανάπτυξη των όρχεων καθυστερεί ή δεν είναι φυσιολογική (ατροφία), η σπερματογένεση θα διαταραχθεί λόγω των αλλαγών στη στεροειδογένεση των ανδρογόνων που επάγονται από τα οιστρογόνα (οιστραδιόλη), παρά από τη συσσώρευση της βιτελλογενίνης. Επίσης τα



δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου μπορεί να μην αναπτυχθούν σωστά ώστε να επηρεαστεί ή να απουσιάζει η ηθολογία της αναπαραγωγής.

Στα θηλυκά οι επιπτώσεις μπορεί να είναι σοβαρότερες, με πρόωμη ωρίμανση των ωοθηκών, ενώ διαταραγμένη σύνθεση πρωτεϊνών της ακτινωτής ζώνης Zr δημιουργεί ωοκύτταρα με ανωμαλίες του κελύφους και προβλήματα στην εκκόλαψη και επιβίωση.

Ανδρογόνες και αντι-ανδρογόνες δράσεις. Σε θηλυκά κουνουπόψαρα από ρέματα που δέχονται απόβλητα από χαρτοποιίες (kraft mills) τα αρρενοποιημένα χαρακτηριστικά είναι μεταξύ άλλων η ανάπτυξη τροποποιημένου εδρικού περυγίου (γονοποδίου) σε κυοφορούντα θηλυκά, που συμβαδίζει με συμπεριφορά ζευγαρώματος αρσενικού και ερμαφρόδιτη κατάσταση με ταυτόχρονη παρουσία βιτελλογενικών ωοκυττάρων και κύστεων με σπερματίδες και σπερματοζωάρια. Τα αρρενοποιημένα άτομα εμφανίζουν υψηλή θνησιμότητα στο εργαστήριο και μπορεί να αντιπροσωπεύουν στάδια ενδιάμεσου φύλου προς ερμαφροδιτισμό ή αναστροφής φύλου (Arukwe, 2001).

Επιδράσεις στη σύνθεση ορμονών και το μεταβολισμό. Οι αλλαγές στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών της αναπαραγωγής στο πλάσμα μπορεί να οφείλονται σε άμεσες επιδράσεις των ξενοβιοτικών πάνω στα ένζυμα της στεροειδογένεσης ή σε έμμεσες τροποποιήσεις κάποιου από τα στάδια του αρνητικού ανάδρομου ελέγχου. Η σύνθεση των στεροειδών ορμονών κι ο μεταβολισμός τους καταλύεται από μία σειρά ενζύμων όπως υδροξυλάσες των στεροειδών, αναγωγάσες και άλλα ένζυμα που τροποποιούν το μητρικό μόριο χοληστερόλης σε διάφορους ιστούς και κύτταρα, που αποτελούν πιθανούς στόχους για ενδοκρινείς διαταράξεις.

Στα ψάρια, στο μεταβολισμό των στεροειδών συμμετέχουν ορισμένες υποοικογένειες του κυτοχρώματος P450 ή CYP, όπως πιθανώς και στο μεταβολισμό της E₂ των θηλαστικών. Κατά την γεννητική ωρίμανση των θηλυκών και την αναπαραγωγή τους, η ενεργότητα του κυτοχρώματος P450 και της υδροξυλάσης των αρυλ-υδρογονανθράκων δείχνουν αρνητική συσχέτιση με υψηλά κυτταρικά επίπεδα 17-β οιστραδιόλης, οπότε παρατηρείται διαφορά στα επίπεδα των ενζύμων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών, γεγονός που αναστρέφεται σύντομα μετά την αναπαραγωγή όταν τα επίπεδα της οιστραδιόλης πέφτουν. Η τοξικότητα διαφόρων ρυπαντών ίσως αφορά τη λειτουργία του κυτοχρώματος P450, καθώς το σύστημα αυτό μεταβολίζει ενδογενείς και εξωγενείς ουσίες (ξενοβιοτικά) και έχει βρεθεί ότι υψηλή ενεργότητα του ενζύμου αυτού σχετίζεται με διαταραχές στην ενδοκρινή λειτουργία και ανεπιτυχή αναπαραγωγή (Thomas, 1990).

Ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών και η βιομετατροπή τους επομένως είναι σημαντικός για τη δράση τους. Εκτός από το κυτόχρωμα P450 (CYP) και η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) είναι σημαντική οικογένεια ενζύμων που σχετίζονται με τη βιομετατροπή των ξενοβιοτικών. Αρκετοί περιβαλλοντικοί ρυπαντές είναι γνωστοί επαγωγείς των επιπέδων έκφρασης των παραπάνω ενζύμων. Κάποιοι αναστέλλουν τη δραστηριότητα του κυτοχρώματος P450 (CYP) όπως το τριβουτυλο-αλουμίνιο που αναστέλλει τη δραστηριότητα της αρωματάσης (CYP19) στα νεογαστερόποδα, ενώ άλλα



οργανοκλωρικά όπως οι διοξίνες διαταράσσουν το μεταβολισμό στεροειδών όπως τα οιστρογόνα, καταλήγοντας για παράδειγμα στην εξασθένηση του κελύφους των αυγών στα πτηνά (Kawai, 2003).

γ. Μακροπρόθεσμες επιδράσεις σε επίπεδο πληθυσμού και βιοκοινότητας

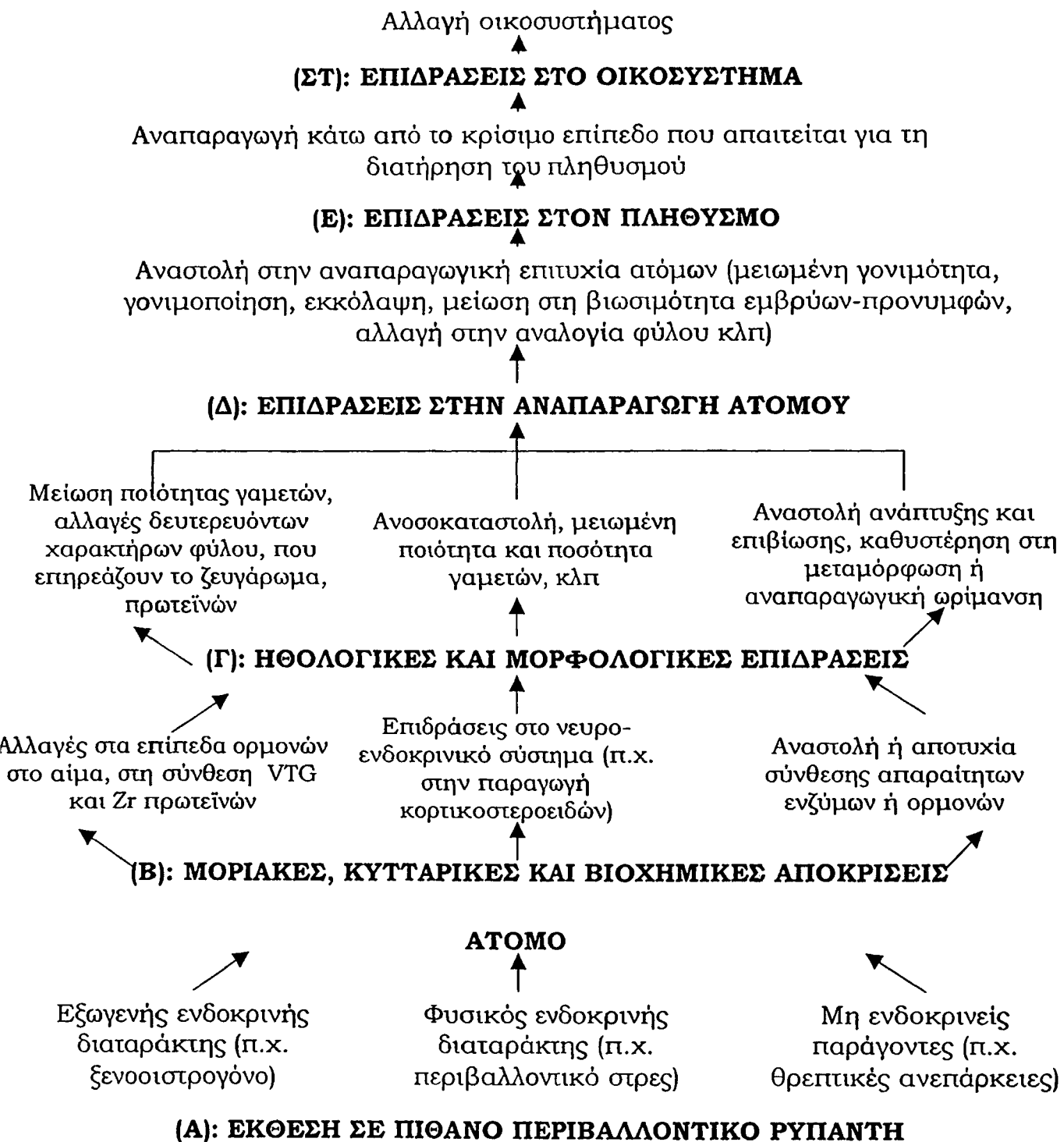
Η έκθεση σε οιστρογόνα (και πιθανώς επίσης σε ανδρογόνα) των ιχθύων κατά τα ευαίσθητα στάδια της ανάπτυξης, μπορεί να οδηγήσει αρσενικά άτομα σύμφωνα με τον γονότυπό τους στην πλήρη θηλυκοποίησή τους, με ανάπτυξη εμφανώς φυσιολογικών ωοθηκών και ωαγωγών. Αυτά τα άτομα αναπαράγονται κανονικά ως ενήλικα αλλάζοντας έτσι την αναλογία φύλου στον πληθυσμό προς τα θηλυκά. Πιο κοινή περίπτωση είναι η δημιουργία ατόμων ενδιάμεσου φύλου στα αρσενικά με ωο-όρχεις, δηλαδή η μερική θηλυκοποίησή τους, με εμφάνιση ωοκυττάρων σε κατά τα άλλα φυσιολογικούς όρχεις.

Η μείωση στην στρατολόγηση ιχθυδίων, η οφειλόμενη στη ρύπανση οδηγεί σε μείωση της αφθονίας σε έναν πληθυσμό και μάλιστα τα πιο ευαίσθητα είδη που χρησιμεύουν ως βιοδείκτες της ποικιλότητας των ειδών μπορούν να δώσουν μία εκτίμηση για την επίδραση των ρυπαντών στις ιχθυοκοινότητες. Ανάλογης βαρύτητας μείωση στη στρατολόγηση προκαλείται και από την αλιευτική πίεση σε έναν πληθυσμό.

Τα επίπεδα συγκέντρωσης των οιστρογονικών ουσιών στα ψάρια εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, τη βιοσυγκέντρωση-βιοσυσσώρευση και τη βιομετατροπή τους. Οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες είναι λιπόφιλες και υδρόφοβες, κι έτσι έχουν την τάση να συσσωρεύονται στους υδρόβιους οργανισμούς, με παράγοντες βιοσυγκέντρωσης (BCF) μεταξύ 13 και 3400 στα ψάρια, οπότε ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, πρακτικά ανενεργές *in vitro* μπορεί οι ουσίες αυτές να είναι δραστικές *in vivo* σε μεγάλο χρόνο έκθεσης. Ακόμα μπορεί να είναι φυσιολογικά ανενεργές όταν είναι αποθηκευμένες στο λιπώδη ιστό, αλλά σε περιπτώσεις κινητοποίησης των αποθεμάτων λίπους όπως κατά την φυλετική ωρίμανση μπορεί οι ενώσεις αυτές να απελευθερωθούν δημιουργώντας τοξικότητα σε άλλους ιστούς ή να μεταβολιστούν σε πιο τοξικές ενώσεις από τη μητρική. Οι δε οιστρογονικές αποκρίσεις δεν αφορούν μόνο τη σύνδεσή τους με τον υποδοχέα οιστρογόνων ER, αλλά και την ενεργοποίηση συνενεργοποιητών και συγκαταστολέων, τη μεταγραφική ενεργοποίηση μεταθετών στοιχείων (responsive) γονιδίων, μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις και έκκριση πρωτεϊνών.

Γενικά είναι εμφανές ότι οι χημικές ουσίες που δρουν ως ενδοκρινείς διαταράκτες δεν είναι τα κλασικά δηλητήρια ή τα τυπικά καρκινογόνα, έχουν διαφορετικούς κανόνες και δεν ακολουθούν τη γραμμική λογική της μεγαλύτερης βλάβης από υψηλότερες συγκεντρώσεις (Arukwe, 2001).





Σχήμα 7. Η σειρά με την οποία οι ενδοκρινείς τροποποιητές και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν στην αναπαραγωγική κατάσταση και επιβίωση των υδρόβιων άγριων πληθυσμών. Οι επιδράσεις στα ανώτερα επίπεδα συνήθως έπονται αλλαγών σε πιο πρώιμες βιολογικές διεργασίες (Τροπ. από Campbell & Hutchinson, 1998)



δ. Επίδραση γνωστών ξενοβιοτικών στους ιχθύς

Ανάμεσα στις χημικές ουσίες, οι οποίες μπορούν να δράσουν ως ενδοκρινείς τροποποιητές επηρεάζοντας δυσμενώς την αναπαραγωγή διάφορων ζωικών ομάδων μεταξύ των οποίων και των ιχθύων, είναι κάποια μέταλλα και οργανικές ενώσεις σε χαμηλότερες, υποτοξικές συγκεντρώσεις.

Ο **Pb**, μετά από χρόνια υποτοξική έκθεση (επί 30 ημέρες) σε ιχθύς του γλυκού νερού (*Anabas testudineus* Bloch) επηρέασε το μεταβολισμό των λιπιδίων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή των τελεόστεων ως πηγή ενέργειας και πρόδρομοι των στεροειδών (Tulasi, 1992). Επίσης έχει αναφερθεί ότι σε άλλους τελεόστεους (*Pimephales promelas*) ο μόλυβδος καθυστέρησε την ωοθηκική ανάπτυξη στα θηλυκά, μείωσε τον αριθμό των αυγών που αποτέθηκαν, αύξησε την περίοδο μεταξύ δύο αναπαραγωγικών κύκλων και κατέστειλε την ανάπτυξη των εμβρύων, ενώ στα αρσενικά κατέστειλε την παραγωγή σπερματοκυττάρων και μείωσε την εμφάνιση των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου. Επομένως επηρέασε συνολικά την αναπαραγωγική συμπεριφορά και επιτυχία του είδους (Weber, 1993). Επιδημιολογικές μελέτες που μπόρεσαν να ταυτοποιήσουν πολλούς διαφορετικούς ισotύπους καναλιών καλίου (K^+) στους ανθρώπινους όρχεις και στα σπερματοζώαρια, κατέληξαν ότι τα κανάλια αυτά εμπλέκονται στα πρώιμα γεγονότα των αντιδράσεων του ακροσώματος στα ώριμα σπερματοζώαρια και βρέθηκε ότι τα κανάλια K^+ είναι ευάλωτα στην έκθεση σε Pb^{2+} (Benoff, 2000).

Όσον αφορά τον **Hg**, ο οποίος στους υδρόβιους οργανισμούς αφού προσληφθεί κυρίως μέσω της τροφής, μετατρέπεται στην πιο τοξική μεθυλιωμένη μορφή του και αδιαμφισβήτητα βιομεγενθύνεται μέσω των τροφικών πλεγμάτων έως και 40.000 φορές, έχει παρατηρηθεί στην τούρνα (*Esox lucius*) μετά από έκθεση σε υψηλές τιμές του, μείωση στο σχετικό μέγεθος των γονάδων που αξιολογείται μέσω του γοναδοσωματικού δείκτη (GSI), αναπτυξιακές ανωμαλίες, καθυστέρηση στην ωρίμανση των γαμετών, ακόμα και αναστολή της ωογένεσης και σπερματογένεσης, αναστολή της ωοτοκίας και αλλαγές στα ποσοστά εκκόλαψης (Friedmann, 1996). Ο υδράργυρος ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (1μg/l το όριο της ΕΕ για την παρουσία του στο πόσιμο νερό) μπορεί να μειώσει την κινητικότητα του σπέρματος του Αφρικανικού γατόψαρου, ενώ άλλα κυπρινοειδή φαίνονται πιο ανθεκτικά με παρατηρούμενη σημαντική μείωση της κινητικότητας του σπέρματος μετά από έκθεση σε 1 mg/l (Kime, 2001). Η προσθήκη υποτοξικών συγκεντρώσεων μεθυλυδραργύρου ακόμα και της τάξης των νανογραμμαρίων στο νερό όπου αναπτύσσονται έμβρυα και προνύμφες του είδους *Stizostedion vitreum* μειώνει την επιτυχία εκκόλαψης των αυγών λόγω θνησιμότητας κατά την έναρξη της γαστριδίωσης, πρώιμης οργανογένεσης και μορφολογικών ανωμαλιών των εμβρύων. Ακόμα μειώνει τον καρδιακό ρυθμό των εμβρύων, μειώνοντας τη φυσιολογική δραστηριότητα και αυτό καθυστερεί την ανάπτυξη και την εκκόλαψή τους. Η μεταφορά του μεθυλυδραργύρου από τα θηλυκά προς τα αυγά γίνεται στη διάρκεια της ωογένεσης, ενώ τα αυγά που παραμένουν



στον πυθμένα των υδάτινων οικοσυστημάτων υπόκεινται επιπλέον και στην επίδραση των ακόμα υψηλότερων συγκεντρώσεων του μετάλλου στο ίζημα (Latif, 2001).

Το **Se**, ένα απαραίτητο μέταλλο στη διαίτα των ψαριών σε μικρές ποσότητες, αλλά τοξικό σε συγκεντρώσεις ελαφρώς υψηλότερες από τις θρεπτικές απαιτήσεις, μπορεί να προκαλέσει αποτυχία στην αναπαραγωγή στον κοινό κυπρίνο (*Cyprinus carpio*), ειδικά αλληλεπιδρώντας με τον υδράργυρο οπότε ενισχύεται η τοξική του δράση (Mauk, 2001).

Το τριβουτυλο-αλουμίνιο (**tributyltin**) σε περιβαλλοντικά ρεαλιστικές συγκεντρώσεις (0,1 μg/l) επίσης μειώνει την κινητικότητα του σπέρματος του κυπρίνου και της πέστροφας (Kime, 2001).

Οργανοχλωρικές ενώσεις (DDT και οι μεταβολίτες του, διοξίνες, PCBs, κάποια ζιζανιοκτόνα): Το **εξαχλωρο-βενζόλιο**, ένα κοινό μυκητοκτόνο που εφαρμοζόταν για απολύμανση σε γεωργικούς σπόρους, στην πεταλούδα (*Carassius auratus gibelio*) προκαλεί αλλαγές στα επίπεδα των ορμονών της αναπαραγωγής (κατάλληλος βιο-δείκτης για την εκτίμηση της ενδοκρινούς διαταραχής). Συγκεκριμένα προκαλεί σημαντική αύξηση στα επίπεδα της οιστραδιόλης και ταυτόχρονα σχετική μείωση στα επίπεδα τεστοστερόνης, των αντιπροσωπευτικότερων ορμονών της αναπαραγωγής στους τελεόστεους με υψηλή βιολογική δραστηριότητα. Μάλιστα τα θηλυκά είναι πιο ευαίσθητα στις αλλαγές αυτές, φαινόμενο που παρατηρείται και στα θηλαστικά (Zhan, 2000). Το **καρβο-φουράνιο**, ένα ζιζανιοκτόνο, επιδρά στη διαδικασία ωρίμανσης των ωοκυττάρων, μειώνει το ποσοστό γονιμοποίησης *in vitro* και επάγει αναπτυξιακές ανωμαλίες στο γατόψαρο του Ινδικού (*Heteropneustes fossilis* Bloch). Επίσης προκαλεί μείωση στα επίπεδα της οιστραδιόλης και της βιτελλογενίνης στον ορό και τις ωοθήκες του γατόψαρου και αδυναμία στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης να απελευθερώσουν γοναδοτροπίνες, δρώντας έτσι ως αντι-οιστρογόνο, πιθανά στοχεύοντας τον άξονα υπόφυσης-γονάδων (Chatterjee, 2001). Υψηλές συγκεντρώσεις **DDT** σε αυγά πτηνών προκάλεσαν θηλυκοποίηση με ανάπτυξη ωαγωγού σε αρσενικά που εκτέθηκαν στο εργαστήριο (Fry, 1981). Είναι επίσης γνωστά τα προβλήματα στην αναπαραγωγή των πτηνών από την έκθεση σε **PCBs** (πολυβινυλοχλωρίδια) και η εξασθένηση του κελύφους των αυγών υδρόβιων πτηνών εξαιτίας του DDT. Η ευθραυστότητα του κελύφους σχετίζεται με την υπολειμματική δράση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων, λόγω της μείωσης της οιστραδιόλης στο αίμα, η οποία είναι επιφορτισμένη με τη μεταφορά ασβεστίου από τα οστά στον ωαγωγό για το σχηματισμό κελύφους στα πτηνά. Τα πτηνά ως θηρευτές-καταναλωτές υψηλού τροφικού επιπέδου που τρέφονται σχεδόν αποκλειστικά με ψάρια βιομεγενθύνουν τους διάφορους περιβαλλοντικούς ρυπαντές, όπως υδράργυρο, μόλυβδο και οργανοχλωρικές ενώσεις (Clark, 2001). Η μεταφορά των PCBs μάλιστα στα δελφίνια από τη μητέρα στα νεογέννητα γίνεται μέσω θηλασμού. Άρα η ηλικία, το φύλο και η αναπαραγωγική κατάσταση παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσυσσώρευση των οργανοχλωρικών, όπως και το περιεχόμενο σε λιπίδια και η σύνθεση των λιπιδίων στους ιστούς ή τα όργανα (Kawai, 2003).



Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs): Η ενδοκρινής διαταραχή που προκαλούν συνίσταται στο ασυνήθιστο φαινόμενο της ενίσχυσης της στεροειδογένεσης στους όρχεις των αρσενικών χρυσόψαρων, ενώ αντίθετα μπορεί να μην παρατηρηθεί καμία αλλαγή στα επίπεδα τεστοστερόνης στο πλάσμα στην αμερικανική γλώσσα (*Pleuronectus americanus*), και να εμφανιστεί αύξηση στα επίπεδα τεστοστερόνης στο πλάσμα στην ιριδιζουσα πέστροφα. Επιώσεις *in vitro* όρχεων χρυσόψαρου με PAHs, αλλά και *in vivo* έκθεσή τους οδήγησε σε διαφασική ενεργοποίηση της παραγωγής τεστοστερόνης της επαγόμενης από γοναδοτροπίνες (GtH) και τα χρυσόψαρα εμφανίστηκαν να είναι πιο ευαίσθητα στην επίδραση τέτοιων ουσιών από την ιριδιζουσα πέστροφα. Η διαφασική ενεργοποίηση αφορά παραγωγή τεστοστερόνης κατόπιν έκθεσης σε χαμηλές δόσεις και καμία επίδραση (ίσως και μείωση) σε υψηλότερες δόσεις. Πιθανή αιτία του φαινομένου αυτού ο εγκλιματισμός των οργανισμών στις υψηλότερες δόσεις ρυπαντών μέσω της επαγωγής ενζύμων αποτοξικοποίησης ή η αυξημένη κυτταροτοξικότητα των ρυπαντών που μειώνουν τον αριθμό των κυττάρων που παράγουν τα στεροειδή. Εντός της μεταβολικής οδού της στεροειδογένεσης η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να διευκολύνεται από αύξηση στην παραγωγή του cAMP (το οποίο συμμετέχει στην επαγωγική δράση των γοναδοτροπινών), αλλά φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από το κυτταροπλασματικό ποσό του ασβεστίου (Evanson, 2001).

Τα **συνθετικά οιστρογόνα** προκαλούν θηλυκοποίηση άγριων αρσενικών ψαριών, με κάποια κυπρινοειδή (*Rutilus rutilus*) στα ποτάμια της Μ. Βρετανίας να εμφανίζουν ενδιάμεσου φύλου (*intersex*) γονάδες (Jobling, 2002), και τα χέλια (*Anguilla anguilla*) από τα επιφανειακά νερά της Φλάνδρας να παρουσιάζουν ανεβασμένες συγκεντρώσεις βιτελλογενίνης στο πλάσμα (Versonnen, 2004). Η διαφοροποίηση του φύλου σε γονοχωριστικά είδη ψαριών περιλαμβάνει δύο στάδια, τη γοναδογένεση (ανάπτυξη των σωματικών ιστών και αγωγών των γονάδων) και τη γαμετογένεση (διαφοροποίηση των ωογονίων ή σπερματογονίων). Και στα δύο στάδια τα οιστρογόνα παίζουν κυρίαρχο ρόλο στα θηλυκά ψάρια.

Μετά από έκθεση νεαρών αρσενικών του είδους *Rutilus rutilus* σε **επεξεργασμένα λύματα** που φέρουν οιστρογόνα έχουν παρατηρηθεί δόσο-εξαρτώμενη επαγωγή βιτελλογενίνης (που φυσιολογικά απαντάται στα θηλυκά) και μόνιμη διαταραχή στην ανάπτυξη των αναπαραγωγικών αγωγών, χωρίς όμως επιδράσεις στην ανάπτυξη των σπερματογονίων. Ο ρυθμός της αναπαραγωγικής διαφοροποίησης στα θηλυκά ήταν αυξημένος με πρόωρη ανάπτυξη των ωογονίων (Rodgers-Gray, 2001) ενώ σε φυσικούς πληθυσμούς που ζουν σε ποτάμια επιβαρημένα από λύματα, τα θηλυκά δεν φάνηκαν να επηρεάζονται ιδιαίτερα αν και παρουσίαζαν συχνότερα αιτησιακά ωοκύτταρα. Η σπερματογένεση όμως επηρεαζόταν ξεκάθαρα, ώστε λιγότερα αρσενικά απελευθέρωναν σπέρμα ενώ τα ενδιάμεσου φύλου (*intersex*) εμφάνιζαν μειωμένο όγκο και πυκνότητα σπέρματος, όπως και ανωμαλίες στον αναπαραγωγικό αδένα (Jobling, 2002). Αν και η βιτελλογενίνη θεωρείται πρωτεΐνη που είναι ειδική για τα θηλυκά και



εξαρτάται από τα οιστρογόνα, μπορεί να παραχθεί και από αρσενικά (στο ήπαρ) εάν αυτά εκτεθούν σε συγκεκριμένο ποσό ουσίας με οιστρογονική δραστικότητα (Ishibashi, 2001).

6. Κάδμιο και ενδοκρινής διαταραχή

Τα μέταλλα παρεμβαίνουν στα νευροενδοκρινή μονοπάτια που ελέγχουν την αναπαραγωγή των ιχθύων μεταβάλλοντας το ορμονικό περιβάλλον κατά τα ευαίσθητα στάδια της φυλετικής διαφοροποίησης και αναπαραγωγής. Επίσης τα μέταλλα μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγή και τη βιωσιμότητα των οργανισμών ως αποτέλεσμα της κυτταροτοξικότητάς τους καθώς τα συσσωρευμένα μέταλλα στις θηλυκές γονάδες μπορούν να μεταφερθούν στα έμβρυα μέσω της λεκίθου. Αυτή η πρώιμη έκθεση σε μέταλλα μπορεί να προκαλέσει μορφολογικές ανωμαλίες στις λάρβες (προνύμφες), γεγονός που μπορεί να αυξήσει τα ποσοστά της θνησιμότητάς τους εξαιτίας της ανικανότητάς τους να τραφούν ικανοποιητικά και να αποφύγουν τους θηρευτές τους (Ruby, 2000). Επειδή τα επίπεδα των μετάλλων μπορεί να έχουν μία πιο λεπτή επίδραση στην αναπαραγωγική φυσιολογία απαιτείται διερεύνηση πολλών συγκεντρώσεων για να διαφανούν αυτές οι επιδράσεις.

Το Cd συγκεκριμένα, σε επίπεδα συγκέντρωσης 5μg/l μείωσε σημαντικά την επιτυχία εκκόλαψης γονιμοποιημένων αυγών του είδους *Oryzias latipes* (medaka) που είχαν εκτεθεί στο μέταλλο ως λάρβες, ενώ επανέκθεση σε 1μg/l Cd ατόμων που είχαν εκτεθεί in ovo (δηλαδή μόνο οι γονείς τους, κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης, πριν τη γονιμοποίηση) έτεινε να αυξάνει τα επίπεδα οιστραδιόλης στο πλάσμα. Η in ovo έκθεση επίσης ανέβαζε τα επίπεδα βιτελλογενίνης στο ήπαρ των αρσενικών (Foran, 2002). Επίσης, μετά την έκθεση σε κάδμιο κατά τη διάρκεια της πρώιμης βιτελλογένεσης ατόμων αμερικανικής γλώσσας (*Pleuronectes americanus*), παρατηρήθηκε αναστολή της παραγωγής και πρόσληψης της βιτελλογενίνης (Pereira, 1992).

Το κάδμιο ακόμη επάγει ορμονικές μεταβολές στους όρχεις ιριδιζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) in vitro (Kime, 1984). Στην άγρια πέστροφα (*Salmo trutta*) η έκθεση σε κάδμιο προκαλεί καθυστέρηση στην ωογένεση (Brown, 1994) ενώ σε έμβρυα ιριδιζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) προάγει πρόωρη εκκόλαψη, καθυστέρηση στην αύξηση, αυξημένη θνησιμότητα και αναπτυξιακές ανωμαλίες (Le Guevel, 2000). Βέβαια μετά από χρόνια έκθεση σε 3μg/l Cd δεν παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της αύξησης στην ιριδιζουσα πέστροφα (Hollis, 2001), ενώ οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στην ηπατική βιτελλογενίνη ή στα στεροειδή του πλάσματος στον medaka *Oryzias latipes* μετά από έκθεση σε Cd δεν συσχετίστηκαν με αναπαραγωγική αναστολή (Foran, 2002).

Το κάδμιο ειδικότερα αντιπροσωπεύει ενδοκρινείς διαταράκτες με κεντρική δράση. Μπορεί να τροποποιεί ειδικά το μεταβολισμό των αμινών στο ΚΝΣ και την έκκριση των ορμονών της υπόφυσης, που σχετίζονται με την αναπαραγωγική λειτουργία, αλλά και άλλων ορμονών της υπόφυσης,



όπως τις ACTH, GH, TSH και την προλακτίνη. Η διαταραχή φαίνεται να συμβαίνει στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης (Lafuente, 1999). Μπορεί επίσης να επιδρά απευθείας στη λειτουργία της υπόφυσης προκαλώντας αλλαγές στη στεροειδογένεση (αναστολή παραγωγής στεροειδών), μέσω αναστολής της μιτοχονδριακής πρόσληψης της χοληστερόλης δηλαδή του μιτοχονδριακού μεταβολισμού της χοληστερόλης (Foran, 2002).

Η έκθεση σε Cd στον *Micropogonias undulatus* (croaker) του Ατλαντικού επάγει την έκκριση της γοναδοτροπίνης II (LH) μέσω ενός μηχανισμού που συμπεριλαμβάνει τα κανάλια ιόντων Ca^{2+} , ενώ οι υποφύσεις που εκτέθηκαν σε Cd εκκρίνουν μειωμένα επίπεδα γοναδοτροπινών (Khan, 2001).

Κατόπιν χρόνιας έκθεσης (45 μέρες) σε Cd του θηλυκού κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) μειώθηκαν τα επίπεδα της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) (Mukherjee, 1994). Επίσης αναφέρεται ότι το κάδμιο μπορεί να επηρεάσει και τους υποδοχείς της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών GnRH της υπόφυσης (Thomas, 1993). Σε νεαρές ιριδιζουσες πέστροφες το Cd μεταβάλλει τα επίπεδα κορτιζόλης του πλάσματος, αυξάνοντάς τα στη χαμηλότερη δόση του $1\mu\text{g/l}$ Cd και μειώνοντάς τα στην υψηλότερη δόση των $5\mu\text{g/l}$ Cd (Ricard, 1998). Η μείωση της έκκρισης κορτιζόλης στις υψηλότερες εκθέσεις μπορεί να οφείλεται σε επαγωγή MT ή σε καταστολή των κυττάρων των επινεφριδίων λόγω της κυτταροτοξικότητας του Cd.

Στους ιχθύς όπως και σε άλλα ωτόκα σπονδυλωτά το ήπαρ είναι ένας από τους κύριους στόχους της 17β -οιστραδιόλης (E_2), της στεροειδικής ορμόνης που όπως όλα τα οιστρογόνα, συντίθεται στην ωοθήκη και επάγει την αύξηση και διαφοροποίηση των αναπαραγωγικών οργάνων και των άλλων ιστών που σχετίζονται με την αναπαραγωγή. Η δράση της διευκολύνεται μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), με ισότυπους α και β , ένα μέλος της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, επαναλαμβανόμενης δομής, που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται με τη σύνδεση (ligand-activated). Στην ίδια οικογένεια γονιδίων εξάλλου ανήκουν οι υποδοχείς γλυκορτικοειδών, προγεστερόνης, αλατοκορτικοειδών, θυρεοειδή, ρετινοϊκού οξέος και βιταμίνης D (Kumar, 1987). Ο υποδοχέας ER χωρίζεται σε ειδικές περιοχές της πεπτιδικής αλληλουχίας, που ορίζονται από A έως F, μία εκ των οποίων η C, πλούσια σε κυστεΐνη, η οποία διατηρείται στη διάρκεια της εξέλιξης, αντιστοιχεί στην περιοχή της σύνδεσης με το DNA. Στην περιοχή C τα κατάλοιπα κυστεΐνης συντάσσονται με ιόντα ψευδαργύρου επιτρέποντας στις ενδιάμεσες αμινοξικές αλληλουχίες να σχηματίσουν δομές δακτύλων Zn (zinc finger), που αλληλεπιδρούν ειδικά με το DNA ώστε να γίνει η κατάλληλη σύνδεση, μία σύνδεση αρκετά δυνατή και ανθεκτική (Lees, 1989).

Κατά τη σύνδεσή του με την οιστραδιόλη (στην περιοχή E του υποδοχέα) ο υποδοχέας διμερίζεται ώστε να μπορεί να συνδεθεί με ειδικές αλληλουχίες DNA (τα μεταθετά στοιχεία οιστρογόνων EREs), που μπορούν να επάγουν τη μεταγραφή ειδικών γονιδίων. Ο διμερισμός του υποδοχέα



είναι υπό την ευθύνη της C περιοχής όπως και η μεταγραφική ενεργοποίηση. Δοκιμές *in vitro* έδειξαν ότι το κάδμιο έχει άμεση επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), επηρεάζοντας διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης οιστρογόνων και δεν παρεμβαίνει στο γενικό κυτταρικό μηχανισμό μεταγραφής και μετάφρασης (Le Guevel, 2000). Σε κυτταρικές σειρές που αποκρίνονται σε οιστρογόνα όπως τα κύτταρα καρκίνου του μαστού MCF-7, το κάδμιο μιμείται τη δράση της οιστραδιόλης, είναι δηλαδή ένα ικανό μη στεροειδικό οιστρογόνο. Η ανασταλτική δράση του στον υποδοχέα ER είναι σε επίπεδο μεταγραφής, με καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου του υποδοχέα οιστρογόνων. Επίσης επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων του υποδοχέα της προγεστερόνης και έχει επαγωγική δράση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών (Stoica, 2000).

Ακόμη η επίδραση του Cd^{2+} είναι ειδική στον υποκινητή του γονιδίου του κυτοχρώματος P450_{sc} (side chain cleavage). Το κυτόχρωμα P450_{sc} είναι ένα ένζυμο της στεροειδογένεσης, που ρυθμίζεται ορμονικά και καταλύει τη μετατροπή της χοληστερόλης σε προγνεσολόνη, την πρόδρομο της προγεστερόνης. Η δράση του καδμίου επηρεάζει τον υποκινητή του γονιδίου του P450_{sc} κοντά στη θέση έναρξης της μεταγραφής, με ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων όπως του AP-1 και Sp1. Μάλιστα ο Sp1 με δομή δακτύλου Zn και ουσιώδη ρόλο στην έκφραση των ευκαρυωτικών γονιδίων, τη διατήρηση της ομοιόστασης, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την τελική διαφοροποίηση και την απόπτωση απαντάται ως μοτίφ δέσμησης και σε άλλους υποκινητές γονιδίων, που ρυθμίζονται ισχυρά από το Cd^{2+} , όπως της ανθρώπινης MT IIA. Το κάδμιο μπορεί επίσης να παρεμβαίνει στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών κινασών, να αλλάζει τη δομή των νουκλεϊκών οξέων (DNA, tRNA) και ορισμένων ενζύμων, αντιδρώντας με τις σουλφυδρυλικές ομάδες τους (Henson, 2004).

Η δράση του Cd στην αναπαραγωγή έχει διερευνηθεί και σε άλλες ζωικές ομάδες αλλά και σε *in vitro* δοκιμασίες. Η έκθεση σε υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις Cd σε μύδια (*Mytilus edulis*) προκαλεί μειωμένη ανάπτυξη των γαμετών, θηλυκών και αρσενικών ατόμων και μία επαγωγική δράση στη συχνότητα της ωοτοκίας (Kluytmans, 1988). Μακροπρόθεσμα διαταράσσονται η γαμετογένεση κι η ανάπτυξη υγιών προνυμφών, που τελικά μπορεί να έχει δυσμενείς επιδράσεις στο αποτέλεσμα της αναπαραγωγής και τη διατήρηση υγιών υδρόβιων βιοκοινοτήτων.

Έκθεση ποντικών σε κάδμιο προκαλεί μείωση της σύνθεσης (down-regulation) των ορμονών της υπόφυσης μεταξύ των οποίων των γοναδοτροπινών, της προλακτίνης, της ACTH και της αυξητικής ορμόνης, όπως και μείωση στον αριθμό των ωχρών σωματίων και μείωση στην αγγειούμενή τους περιοχή. Σε καλλιέργειες κοκκιωδών κυττάρων ποντικού και ανθρώπου το κάδμιο ανέστειλε τη σύνθεση προγεστερόνης, γεγονός που διαπιστώθηκε και στο ωοθυλακικό υγρό και τον πλακούντα καπνιστριών, που υπόκεινται σε αυξημένο κίνδυνο έκθεσης από τον καπνό του τσιγάρου.



Το Cd σε κάποιους ιστούς ακόμη, έχει την ικανότητα να μιμείται τη δράση των οιστρογόνων *in vivo* και *in vitro*, όπως στα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 μειώνοντας τα επίπεδα mRNA του οιστρογονικού υποδοχέα (ER) και τη μεταγραφή του γονιδίου του και αυξάνοντας τη μεταγραφή του γονιδίου του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR). Το γεγονός αυτό όπως και ότι η δράση αυτή δεν πραγματοποιείται από τον Zn δείχνει μία ειδική δράση του Cd στη μεταγραφή (Henson, 2004).

Όμως, έχουν παρατηρηθεί και κάποιες παράδοξες δράσεις του καδμίου στην αναπαραγωγή αφήνοντας να διαφανεί ότι ο ρόλος του δεν είναι τελικά εντελώς ξεκάθαρος. Ενώ σε κύτταρα ανθρώπινης τροφοβλάστης το κάδμιο ανέστειλε τη σύνθεση προγεστερόνης από τον πλακούντα, αντίθετα σε θηλυκά ποντίκια κατά τον οίστρο και δίοιστρο, τα επίπεδα προγεστερόνης στον ορό αυξήθηκαν, όπως και σε καλλιέργειες κοκκιωδών κυττάρων χοίρου και σε κύτταρα χοριοκαρκινώματος JAr όπου επήγαγε τη σύνθεση προγεστερόνης.

Επίσης σε καλλιέργειες κοκκιωδών κυττάρων χοίρου JC-410 παρατηρήθηκε αντίθετη επίδραση χαμηλών (0.6-3 μM) και υψηλών δόσεων (5 μM) Cd σε σχέση με τη δραστηριότητα του υποκινητή του γονιδίου του κυτοχρώματος P450_{scc}. Οι χαμηλές δόσεις καδμίου λοιπόν, αύξαναν τα επίπεδα του mRNA του κυτοχρώματος P450_{scc} και της σύνθεσης της προγεστερόνης, χωρίς να επηρεάζουν τον αριθμό των κυττάρων, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο ή την κυτταρική μορφολογία. Αντίθετα, οι υψηλές δόσεις καδμίου ανέστειλαν τη δραστηριότητα του υποκινητή του γονιδίου του κυτοχρώματος P450_{scc}, και προκάλεσαν μείωση στον αριθμό των κυττάρων, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο και αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία. Οι παρατηρούμενες επιδράσεις αφορούσαν συγκεντρώσεις πολύ μικρότερες από αυτές που επάγουν ενδοκρινείς διαταραχές σε καλλιέργειες ανθρώπινης τροφοβλάστης (5-20 μM), κάνοντας εμφανές το γεγονός ότι ακόμα και χαμηλές συγκεντρώσεις είναι ικανές να επηρεάσουν το μονοπάτι της στεροειδογένεσης.

Στον άνθρωπο τώρα, η έκθεση της μητέρας σε κάδμιο σχετίζεται με χαμηλό βάρος γέννησης παιδιών και αύξηση των αυτόματων αποβολών. Αν και το μέταλλο δεν φτάνει άμεσα στο έμβρυο, σύμφωνα με φαρμακοκινητικές μελέτες, συσσωρεύεται στον πλακούντα. Εκεί παρατηρείται μείωση στην έκκριση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG), ορμόνης απαραίτητης για τη διατήρηση της πρώιμης κύησης. Επίσης η παραγωγή προγεστερόνης από τον πλακούντα, ορμόνης ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της κύησης, μειώθηκε κατά 50% σε γυναίκες καπνίστριες, οι οποίες εμφάνισαν διπλάσια ποσότητα Cd στον πλακούντα. Οι υψηλές αυτές συγκεντρώσεις στον πλακούντα επηρέασαν και τη μορφολογία του, ενώ σε ποντίκια παρατηρήθηκε αύξηση της συχνότητας των συσπάσεων της μήτρας μετά από επαγωγή με οξυτοκίνη. Η περιβαλλοντική έκθεση της μητέρας επίσης έχει οδηγήσει σε σημαντική αύξηση των πρόωρων γεννήσεων στην Ιαπωνία στην λεκάνη του ποταμού Jinzu, όπου ακόμα παρατηρούνται περιπτώσεις της νόσου Itai Itai, χρόνιας δηλαδή δηλητηρίασης από Cd.



Πιθανοί μηχανισμοί αναστολής της σύνθεσης της προγεστερόνης στον ανθρώπινο πλακούντα, μπορούν να θεωρηθούν η περιορισμένη διαθεσιμότητα της χοληστερόλης (μέσω της δηλητηριώδους επίδρασης του καδμίου στο mRNA της LDL-R) ή/και η αναστολή των στεροειδογόνων γονιδίων σε διάφορες θέσεις του μεταβολικού μονοπατιού της στεροειδογένεσης (κυτόχρωμα P450_{scc}, 3-β υδροξυστεροειδής αφυδρογονάση 3β-HSD) και όχι ο κυτταρικός θάνατος από απόπτωση ή νέκρωση.

Συμπερασματικά το Cd δείχνει διπλή δράση στη στεροειδογένεση. Σε χαμηλές δόσεις επάγει τη σύνθεση DNA, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την κακοήθη εξαλλαγή. Σε δόσεις της τάξης των mM είναι τοξικό, μειώνει τη σύνθεση DNA σχετίζεται με την απόπτωση και με χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2-5μM επάγει την απόπτωση, μερικώς μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-9 στα κύτταρα HL-60 (Henson, 2004).

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι οι διαφορετικές αποκρίσεις των οργανισμών στις ενδοκρινικά ενεργές ουσίες οφείλονται τελικά σε διαφορές μεταξύ φύλων, ατόμων, πληθυσμών και ειδών που σχετίζονται με φυσιολογικούς, βιοχημικούς και γενετικούς παράγοντες. Οι διαφορές στην ευαισθησία στις ουσίες αυτές αποδίδεται στη συγγένεια ή την ειδικότητα των υποδοχέων τους σε κυτταρικό επίπεδο. Το αναπαραγωγικό ενδοκρινικό σύστημα είναι βασικά κοινό μεταξύ των σπονδυλοζώων, αλλά οι χημικοί τύποι, ο φυσιολογικός ρόλος και τα επίπεδα των ορμονών στο αίμα διαφέρουν μεταξύ των ειδών, ειδικά τα στεροειδή της αναπαραγωγής (Kawai, 2003).

Η παρούσα μελέτη σκοπεύει να διαφωτίσει το ρόλο του καδμίου ως ικανού ενδοκρινή διαταράκτη σε σχέση με τις αναπαραγωγικές λειτουργίες του χρυσόψαρου σε συγκεντρώσεις μετάλλου και συνθήκες εκτροφής που προσομοιάζουν αρκετά στις φυσικές. Επίσης φιλοδοξεί να συνδέσει τη συνολική αναπαραγωγική αναστολή με μεταβολές στην μορφολογική ανάπτυξη. Η εκτίμηση τέλος, της ενδοκρινούς διαταραχής έγινε κατά την περίοδο της αναπαραγωγικής ωρίμανσης των ιχθύων μέσω των αλλαγών στις στεροειδείς ορμόνες, που αποτελούν καλύτερο βιοδείκτη της έκθεσης σε Cd απ' οι αλλαγές της βιτελλογενίνης.

7. Zn και αναπαραγωγή ιχθύων

Ο Zn είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως τη μεταγραφή, την ενζυμική δομή και ενεργότητα, τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, την κυτταρική σηματοδότηση, την αντιοξειδωτική άμυνα και την διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης. Βέβαια σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να γίνει τοξικός, οπότε αρκετές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων του, μεταξύ των οποίων και η MT.

Ως γνωστόν η MT μία χαμηλού βάρους πρωτεΐνη (~6 kDa), υψηλής περιεκτικότητας σε κυστεΐνη (30-35%) και με απουσία αρωματικών αμινοξέων και ιστιδίνης, παίζει ρόλο-κλειδί στον ενδοκυττάριο μεταβολισμό



Zn και Cu. Επάγεται κατόπιν μεταγραφής του γονιδίου της με τη βοήθεια μεταθετών στοιχείων μετάλλων (MREs) στον υποκινητή της, από αυξημένη ενδοκυττάρια δραστηριότητα Zn και Cu, καθώς επίσης και από άλλα μέταλλα των ομάδων I B και II B του περιοδικού πίνακα, αλλά και από καταστάσεις στρες και μόλυνσης. Μόλις παραχθεί η MT δεσμεύει τα μέταλλα που την επάγουν (με στοιχειομετρία 7 άτομα μετάλλου Zn και Cd και 10-12 άτομα Cu, Hg, Ag ανά μόριο MT), ενώ θεωρείται ότι μπορεί να σχετίζεται με την κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη σηματοδότηση, τη ρύθμιση ενζύμων, τη δέσμευση ελευθέρων ριζών και την αποθήκευση μετάλλων και την αποτοξικοποίησή τους. Οι λειτουργικές της ομάδες, τα κατάλοιπα κυστεΐνης, που δρουν ως κηλοποιητές των μετάλλων, παραμένουν ακριβώς ίδιες στις περισσότερες MT ιχθύων, όσον αφορά τον αριθμό και τις θέσεις (Thompson, 2001). Στην ιριδιζουσα πέστροφα μάλιστα, η ηπατική MT και τα επίπεδα του Zn αυξάνουν κατά την γεννητική ωρίμανση των θηλυκών και έχει βρεθεί ότι στο 5' άκρο του γονιδίου MT-A υπάρχουν πέντε λειτουργικές περιοχές του ενεργοποιητή πρωτεΐνης-1 (AP-1), αλληλουχίες μεταθετών στοιχείων γλυκορτικοειδών (GREs) και θέσεις πυρηνικού παράγοντα ιντερλευκίνης 6 (NF-IL6).

Σε πολλά από τα μέλη-είδη της οικογένειας Holocentridae των κοραλλιογενών υφάλων (squirrelfish), ανεξαρτήτως γεωγραφικής κατανομής ή περιβαλλοντικών συνθηκών, απαντώνται εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις Zn στο ήπαρ (έως 70 μmol/g), οι υψηλότερες που απαντώνται στα σπονδυλόζωα (με εξαίρεση τον αμφιβληστροειδή). Η συσσώρευση αυτή σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ηπατικής μεταλλοθειονίνης.

Η χορήγηση των θηλυκών squirrelfish με οιστραδιόλη **μείωσε** το περιεχόμενο του ηπατικού Zn κατά το ήμισυ περίπου, ενώ αύξησε τον Zn στις γονάδες κατά 1.5 φορές περίπου, υποδεικνύοντας πιθανή μετακίνηση του Zn από το ήπαρ προς τις γονάδες. Στο ήπαρ των θηλυκών ο Zn απαντάται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, ενώ στα αρσενικά κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Η ηπατική MT επίσης είχε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση στα θηλυκά απ' ό,τι στα αρσενικά και σχεδόν όλη εντοπιζόταν στον πυρήνα, αντίθετα με τη συνήθη εντόπισή της στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση αυτή η MT θα μπορούσε να εμπλέκεται στην έκφραση πρωτεϊνών ειδικών για τα θηλυκά ή να χρησιμεύει ως όχημα για τη μετακίνηση του Zn από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Η κυτταροπλασματική εντόπιση του ηπατικού Zn δείχνει ότι αυτός δεν ήταν δεσμευμένος στην MT, αλλά σε μία ειδική για τα θηλυκά πρωτεΐνη δέσμευσης Zn (FZnBP) στο κυτταρόπλασμα, διαφορετική από τη βιτελλογενίνη (Hogstrand, 1996).

Σε άλλη μελέτη η χορήγηση των θηλυκών squirrelfish με οιστραδιόλη προκάλεσε μία σημαντική αύξηση στο μέγεθος του ήπατος και τη βιτελλογενίνη του πλάσματος σύμφωνη με την αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης, αλλά και αύξηση στον Zn του πλάσματος και στην πυρηνική MT των ηπατοκυττάρων. Η εντόπιση αυτή της MT μπορεί να σχετίζεται με αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες-δακτύλους Zn για τη ρύθμιση της ηπατικής μεταγραφής του RNA για τη σύνθεση της βιτελλογενίνης, η οποία εξάγεται από τα ηπατοκύτταρα με μεγάλα σωματίδια Golgi. Ίσως μάλιστα η



MT να μην είναι παρούσα στον πυρήνα, αλλά στον πυρηνικό φάκελο ή σε άλλες δομές που κατακρημνίζονται μαζί με τον πυρήνα, όπως για παράδειγμα στα σωματίδια Golgi. Η MT έχει επίσης την ικανότητα να δίνει τον Zn σε άλλες ψευδαργυροπρωτεΐνες (ίσως και στη βιτελλογενίνη), ακόμη και χαμηλότερης συγγένειας με τον Zn (Thompson, 2001).

Η βιτελλογενίνη είναι μία γλυκοφωσφολιποπρωτεΐνη, που απαντάται σε έντομα, σκώληκες, ερπετά, αμφίβια και πτηνά. Είναι μία Zn-πρωτεΐνη, πρόδρομος της λεκίθου και των πρωτεϊνών του βιτελλινικού φακέλου (ακτινωτής ζώνης), που συντίθεται στο ήπαρ ωοτόκων ζώων ως απόκριση στο ενδοκρινές σήμα των οιστρογόνων. Κατόπιν εκκρίνεται στο πλάσμα ως διμερές, όπου φτάνει μία μέγιστη τιμή (στα αμφίβια σε 6 ημέρες) και προσλαμβάνεται από τα ωοκύτταρα, δεσμευόμενη σε έναν πρωτεϊνικό υποδοχέα της μεμβράνης τους. Το σύμπλεγμα βιτελλογενίνης – υποδοχέα μέσω ενδοκύτωσης εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα όπου ανιχνεύεται ως κυστιδία. Τα κυστιδία υφίστανται συγχώνευση με τα λυσοσώματα προς σχηματισμό πολυκυστικών σωματίων. Σε αυτά τα σωμάτια πλέον η βιτελλογενίνη διασπάται από τον υποδοχέα της και υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία από ειδικές πρωτεάσες. Τα πολυπεπίδια που προκύπτουν είναι δύο υπομονάδες, της λιποβιτελλίνης και της φωσβιτίνης που αποθηκεύονται ως μικροκρύσταλλοι στα λεκιθικά κοκκία. Στο βάτραχο *Xenopus laevis*, η βιτελλογενίνη περιέχει 2 mol Zn και 3 mol Ca ανά 440kDa διμερούς, με τον Zn να είναι παρών στη λιποβιτελλίνη και το Ca αποκλειστικά στη φωσβιτίνη. Η φωσβιτίνη επιπλέον περιέχει 3 mol Mg/mol τα οποία αποκτά κατά την πρόσληψη και αποθήκευση των πρωτεολυτικών προϊόντων της βιτελλογενίνης στα λεκιθικά κοκκία (Montorzi, 1995).

Ο Zn επομένως που είναι δεσμευμένος στη βιτελλογενίνη μεταφέρεται μέσω της αιματικής κυκλοφορίας στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα και προσλαμβάνεται από αυτά. Έτσι ως απόκριση στα οιστρογόνα ο Zn αναδιανέμεται από το ήπαρ στις ωοθήκες για τις ανάγκες του αναπτυσσόμενου εμβρύου.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



1894

THE NEW YORK PUBLIC LIBRARY

I. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

1. MRC-5: ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες πνεύμονα

Η κυτταρική σειρά προήλθε από φυσιολογικό ιστό πνεύμονα από άρρεν έμβρυο της Καυκάσιας φυλής, ηλικίας 14 εβδομάδων, από τον J.P. Jacobs το Σεπτέμβριο του 1966 (Nature 227:168-170, 1970). Για την αρχική τους καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Eagle σε ρυθμιστικό διάλυμα Earle, εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου μόσχου (FCS). Μετά την αρχική καλλιέργεια έγιναν ανακαλλιέργειες δις εβδομαδιαία σε αναλογία 1:2 και περίπου κατά τον 7^ο διπλασιασμό των κυττάρων καταψύχθηκε η πλειοψηφία των καλλιιεργειών ώστε να δημιουργηθεί ένα κυτταρικό απόθεμα.

Κατόπιν παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα είναι ικανά για 42-46 διπλασιασμούς πριν να αρχίσει η μείωση του πολλαπλασιασμού που συνήθως συμβαίνει στις σειρές ανθρώπινων ινοβλαστών (Sitte, 2000), αλλά και των υπόλοιπων φυσιολογικών κυττάρων *in vitro* οπότε και μπαίνουν σε μια αμετάκλητη μετα-μιτωτική κατάσταση που αναφέρεται ως γήρανση (MacKenzie, 2000). Τα MRC-5 σταματούν να πολλαπλασιάζονται στους 60 διπλασιασμούς περίπου. Η σειρά είναι ευαίσθητη σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ιών, είναι κατάλληλη για την παραγωγή ιοικών εμβολίων και έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες της γήρανσης (MacKenzie 2000, Sitte 2000, 1998), της απόπτωσης (Jiang, 1998), της κυτταροτοξικότητας και του οξειδωτικού stress (Lamkadem 2001, Lee 2000, Yang 1997, Yuan 1996) καθώς και του παράγοντα ανάπτυξης ηπατοκυττάρων (Harrison 2000a-b, Broten 1999).

Τα κύτταρα είναι διπλοειδή και σταθερά κι ο καρυότυπός τους είναι φυσιολογικού άρρενος ατόμου ($2n=46$). Η βιωσιμότητά τους, σύμφωνα με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής, είναι περίπου 95%, ενώ η ικανότητα πολλαπλασιασμού (plating efficiency) είναι λιγότερο από 1% στο παραπάνω θρεπτικό μέσο. Στους 37°C μία σπορά από 4×10^4 ζωντανά κύτταρα/ml πολλαπλασιάζεται 3-5 φορές σε 7 ημέρες. Στο πειραματικό μας πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 26-30.

2. NIH/3T3: εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού

Η κυτταρική σειρά δημιουργήθηκε το 1962 από τομές εμβρύων ποντικού Swiss από τους G.Todaro και H.Green (J Cell Biol 17:299-313, 1963). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Eagle τροποποιημένο κατά Dulbecco-Vogt, που περιείχε περίπου τετραπλάσια συγκέντρωση αμινοξέων (συμπεριλαμβανομένων της σερίνης και γλυκίνης) και βιταμίνες και εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS). Τα 3T3 κύτταρα εμφανίζουν μεγαλύτερη αποφυγή επαφής από τους διπλοειδείς ινοβλάστες που έχουν μόλις εναποτεθεί σε καλλιέργεια, καθώς αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες που ευνοούσαν αυτήν την ιδιότητα, γεγονός που έχει κάνει τη σειρά κατάλληλη για μελέτες μετασχηματισμού από ογκογόνους ιούς. Η κυτταρική σειρά εύκολα μετασχηματίζεται από δύο διαφορετικούς ογκογόνους ιούς, τους polyoma (κονδύλωμα) και SV40 και τα



μετασηματισθέντα κύτταρα αναγνωρίζονται από την αυξημένη τους τάση επαφής.

Τα κύτταρα είναι διπλοειδή και η συνήθης κατανομή των χρωμοσωμάτων στον καρυότυπό τους είναι 48 (όπου ο φυσιολογικός είναι $2n=40$). Η βιωσιμότητά τους, σύμφωνα με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής, είναι περίπου 90%, ενώ η ικανότητα πολλαπλασιασμού (plating efficiency) είναι περίπου 20% στο παραπάνω θρεπτικό μέσο. Στους 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO₂- 95% αέρα μία σπορά από 10⁵ ζωντανά κύτταρα/5ml πολλαπλασιάζεται 5 φορές σε 8-10 ημέρες, ενώ η πυκνότητα του μονόστοιβου ταπήτιου είναι 3,9X10⁴ ζωντανά κύτταρα/cm² μετά από μία εβδομάδα.

II. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

1. Κυτταρικές σειρές

Η ανάπτυξη των κυττάρων και των δύο κυτταρικών σειρών (MRC-5 και 3T3 εμβρυϊκοί ινοβλάστες ανθρώπου και ποντικού αντίστοιχα) έγινε σύμφωνα με τις συνθήκες που προτείνονται από την Αμερικανική Κυτταρική Συλλογή (American Type Culture Collection, ATCC) σε αποστειρωμένα τρυβλία μιας χρήσης διαμέτρου 10 cm. Τα χαρακτηριστικά των δύο κυτταρικών σειρών αναφέρονται παραπάνω.

2. Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

Τα κύτταρα, τα οποία ήταν σε εναιώρημα, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Eagle τροποποιημένο κατά Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)(Biochrom). Το υγρό θρεπτικό υλικό παρασκευάστηκε από το αντίστοιχο στερεό, κατόπιν διάλυσής του σε δις-απεσταγμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση, στο οποίο προστέθηκε επίσης όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃, Merck, Darmstadt, Germany) σε συγκέντρωση 3,7g/l και αντιβιοτικά σε συγκέντρωση 0,1 mg/ml (10000U/10000μg/ml πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης, Biochrom). Το pH του θρεπτικού υλικού κατά την παρασκευή του ήταν 7,4, ενώ κατά τη διάρκεια των πειραματικών συνθηκών κυμαινόταν μεταξύ 6,8-7,8. Κατόπιν το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε σε συσκευή Gelman με διήθηση σε προφίλτρο και φίλτρο (GelmanSciences, type A/E Glass, cat. No 66559 και GelmanSciences, Supor-200, 0,2μm, cat. No 66549 αντίστοιχα), και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένες φιάλες στους 4°C έως τη χρησιμοποίησή του.

Το ρυθμιστικό διάλυμα με το οποίο εκπλύθηκαν τα κύτταρα ήταν το PBS (Phosphate Buffer Saline), το οποίο παρασκευάστηκε από 137mM NaCl, 10,1mM Na₂HPO₄·2H₂O, 1,76mM KH₂PO₄ και 2,68mM KCl (Merck, Darmstadt, Germany) αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο (Sanyo, Electric Co) και τέλος τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένες φιάλες στους 4°C έως τη χρησιμοποίησή του.

Η θρυψινοποίηση των κυττάρων, δηλαδή η αποκόλλησή τους από το υπόστρωμα έγινε με διάλυμα θρυψίνης/EDTA 0,05% και 0,02% w/v αντίστοιχα, σε PBS χωρίς Ca²⁺ και Mg²⁺(Biochrom, Gibco BRL).



Επίσης το θρεπτικό μέσο ήταν εμπλουτισμένο με 2mM L-γλουταμίνης (Biochrom) και ορό FCS (Fetal Calf Serum, Biochrom, Gibco BRL) 10%, ο οποίος περιέχει παράγοντες ανάπτυξης απαραίτητους για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

3. Συνθήκες Κυτταροκαλλιέργειας

Η κυτταροκαλλιέργεια γινόταν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο στον οποίο επικρατούσαν κατά το δυνατόν στείρες συνθήκες. Όλοι οι χειρισμοί έγιναν κάτω από εστία κάθετης νηματικής ροής (Laminar Flow-BHA 48, Faster) για την αποφυγή μολύνσεων από μικροοργανισμούς. Η εστία όπως και όλος ο χώρος της κυτταροκαλλιέργειας μετά το πέρας της εργασίας αποστειρωνόταν με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Narco, CO₂ Water-Jacket Incubator Precision Scientific και Forma, Direct Heat CO₂ Incubator, Forma Scientific) με κατάλληλη υγρασία και ατμόσφαιρα 5%CO₂-95% αέρα, που διατηρούσε σταθερό το pH του θρεπτικού υλικού, σε σταθερή θερμοκρασία 37°C. Η παρατήρηση των κυττάρων γινόταν σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Olympus CK2), ενώ όλα τα υλικά και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν (τρυβλία, πιπέτες, φιαλίδια, φυγοκεντρικοί σωλήνες) ήταν μιας χρήσης και αποστειρωμένα. Τέλος οι φιάλες και τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο (Sanyo, Electric Co) για 20 λεπτά στους 120°C.

4. Ανάπτυξη, διατήρηση και αποθήκευση κυττάρων

Κύτταρα αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασία -192°C μέσα σε φιαλίδια ψύξης (Corning) αποψύχθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C και επαναιωρήθηκαν σε 10ml θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με ορό FCS 10%. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες, ώστε τα κύτταρα να προσκολληθούν και να σχηματίσουν μονοστοιβάδα (ταπήτιο). Μετά τις 24 ώρες αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δυο φορές με 10 ml PBS κάθε φορά, οπότε στη συνέχεια προστέθηκε εκ νέου θρεπτικό υλικό προκειμένου τα κύτταρα να αναπτυχθούν και να καταλάβουν όλη τη διαθέσιμη επιφάνεια των τρυβλίων.

Όταν συμβαίνει αυτό τα τρυβλία θεωρούνται πλήρη (confluent) και ακολουθεί ανακαλλιέργεια. Στη διαδικασία αυτή αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλένονται δυο φορές με 10 ml PBS κάθε φορά και αποκολλούνται (θρυψινοποιούνται) με τη δράση 1ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0,4% για 2-3 λεπτά προκειμένου να ανασηκωθούν από το υπόστρωμα. Κατόπιν προστίθενται 3ml θρεπτικού υλικού, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και τα κύτταρα συλλέγονται σε μονοκύτταρο εναιώρημα με τη βοήθεια συνεχών αναρροφήσεων-εκροφήσεων με αυτόματη πιπέτα (Falcon). Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε νέα τρυβλία με νέο θρεπτικό υλικό.

Όταν τα κύτταρα πρέπει να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα τοποθετούνται σε ειδικό μέσο αποθήκευσης, για να διατηρηθούν ζωντανά, στο υγρό άζωτο σε θερμοκρασία -192°C. Αρχικά, κύτταρα που



βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας ξεπλένονται δυο φορές με 10ml PBS κάθε φορά και αποκολλούνται με τη δράση διαλύματος 1ml θρυψίνης-EDTA 0,4% για 2-3 λεπτά μέχρι να ανασηκωθούν από το υπόστρωμα. Κατόπιν προστίθενται 3ml θρεπτικού υλικού, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και τα κύτταρα συλλέγονται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες, όπου και φυγοκεντρούνται στις 2000rpm για 3 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα (περίπου 2×10^6 κύτταρα) επαναιωρείται σε 1,5ml μέσου αποθήκευσης, που αποτελείται από 90% ορό FCS και 10% DMSO. Το εναιώρημα τοποθετείται σε σωλήνα ψύξης και για 15 λεπτά περίπου παραμένει σε λουτρό πάγου, ενώ στη συνέχεια μεταφέρεται στους -80°C για 24 ώρες και τέλος σε δοχείο υγρού αζώτου. Έτσι η μείωση της θερμοκρασίας γίνεται σταδιακά και όχι απότομα, γεγονός που θα προκαλούσε θάνατο μεγάλου αριθμού κυττάρων.

5. Πειραματικές συνθήκες

Καλλιέργειες εναιωρήματος 10^6 κυττάρων/τρυβλίο από κάθε κυτταρική σειρά τοποθετήθηκαν σε τρυβλία ιστοκαλλιέργειας. 24 ώρες μετά τη σπορά, το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε και τα κύτταρα, αφού ξεπλύθηκαν δυο φορές με 10ml PBS (Phosphate Buffer Saline), επώαστηκαν σε 10ml θρεπτικού μέσου DMEM, που περιείχε 0,1, 1, 5, 10, 50, 100 μM CdCl_2 σε διάλυμα. Κάθε κυτταρική σειρά επώαστηκε στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις για 6, 24 ή 120 ώρες. Κύτταρα ελέγχου επώαστηκαν μόνο με θρεπτικό μέσο DMEM και καλλιεργήθηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως τα κύτταρα που εκτέθηκαν σε CdCl_2 .

6. Παρασκευή των διαλυμάτων των μετάλλων

Το CdCl_2 , αρχικής συγκέντρωσης 1mM παρασκευαζόταν με διαδοχικές αραιώσεις από πυκνό πρότυπο Cd για την Ατομική Απορρόφηση (Atomic Spectroscopy Standard Concentrate, FLUKA Chemica, GmbH, AG, BUCKS) συγκέντρωσης 1g/l (1000ppm). Το CdCl_2 (1mM) κατόπιν διαλυόταν με διάλυμα κιτρικού νατρίου ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma Chemical Co, St Louis Mo) συγκέντρωσης 2mM και υφίστατο και περαιτέρω διάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα NaCl 150mM - NaHepes 5mM (Serva, Heidelberg/NY), ώστε το τελικό pH να ρυθμίζεται στο 7,4. Το επωαστικό αυτό μέσο αποστειρωνόταν και αραιωνόταν διαδοχικά στο θρεπτικό μέσο DMEM ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις μετάλλων που επρόκειτο να εισαχθούν στα κύτταρα (0,1, 1, 5, 10, 50, 100 μM CdCl_2).

Το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε στο τέλος του χρόνου επώασης (6, 24 και 120 ώρες), τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δυο φορές με 10 ml PBS κάθε φορά και θρυψινοποιήθηκαν με διάλυμα 1ml θρυψίνης-EDTA 0,4% προκειμένου να ανασηκωθούν από το υπόστρωμα. Κατόπιν προστέθηκαν 3ml θρεπτικού υλικού, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε μονοκύτταρο εναιώρημα με τη βοήθεια συνεχών αναρροφήσεων-εκροφήσεων με αυτόματη πιπέτα (Falcon). Στη συνέχεια τα



κύτταρα μετρήθηκαν με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer) κάτω από οπτικό μικροσκόπιο (Nikon) ή με τον κυτταρομετρητή (Coulter-Counter, Coulter Electronics LTD) και μοιράστηκαν σε άλλα τρυβλία ανάλογα με τους χειρισμούς που θα ακολουθούσαν.

Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν και περιελάμβανε τριπλά δείγματα.

7. Μέτρηση μετάλλων

Το θρεπτικό μέσο, το οποίο αφαιρέθηκε στο τέλος του χρόνου επώασης, συλλέχθηκε και αφού μετρήθηκε το pH του (περίπου 7,6-7,7) οξινίστηκε με 100 μl πυκνού HNO₃ 65% (suprapur, Merck, Darmstadt, Germany). Οι συγκεντρώσεις του Cd στο μέσο μετρήθηκαν με Φασματοφωτόμετρο Ατομικής Απορρόφησης Perkin-Elmer 560 με Φλόγα (FAAS).

III. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίστηκε ως ποσοστό (%) επί των κυττάρων ελέγχου με τη δοκιμασία αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue και με την ικανότητα σχηματισμού αποικιών μετά από 6, 24 και 120 ώρες επώασης με CdCl₂.

1. Μέθοδος αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue (Trypan Blue exclusion assay)

Στη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue μετά το πέρας του χρόνου επώασης των κυττάρων με τα διαλύματα των μετάλλων, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και συλλέγονται σε DMEM. Το κυτταρικό ελαιώδη μεταφέρεται σε φυγοκεντρικούς σωλήνες και φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο Sigma 2-4 στις 2000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση αναμιγνύεται με 0,5ml χρωστικής Trypan Blue 0,4% (Sigma) σε 0,5ml PBS ώστε η τελική συγκέντρωση της Trypan Blue να είναι 0,2% και αφήνεται για 5 λεπτά. Τελικά μετράται το πλήθος των ζώντων, αλλά και των νεκρών κυττάρων κάτω από οπτικό μικροσκόπιο (Nikon) με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer) στα τριπλά δείγματα. Η μέτρηση γίνεται στα τετράγωνα της πλάκας με πλευρά 1mm στα οποία αντιστοιχεί όγκος 0,1mm³. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν.

Η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{Βιωσιμότητα \%} = 100 \times \frac{\text{(κύτταρα που δεν βάφτηκαν)}}{\text{(βαμμένα + κύτταρα που δεν βάφτηκαν)}}$$

και εκφράστηκε τελικά ως ποσοστό (%) επί της βιωσιμότητας των κυττάρων ελέγχου. Τα κύτταρα που βάφονται επιλεκτικά με έντονο μπλε χρώμα είναι τα νεκρά κύτταρα, ενώ τα ζωντανά παραμένουν άθικτα.



2. Μέθοδος προσδιορισμού ικανότητας σχηματισμού αποικιών (*colony forming efficiency*)

Στη μέθοδο του σχηματισμού αποικιών, μετά το πέρας του χρόνου επώασης των κυττάρων με τα διαλύματα των μετάλλων, αυτά θρυψινοποιήθηκαν και τα κυτταρικά εναιωρήματα καταμετρήθηκαν σε κυτταρομετρητή (Coulter Counter, Coulter Electronics LTD) και τοποθετήθηκαν σε νέα τρυβλία διαμέτρου 5 cm σε πυκνότητα 1000, 2000 και 3000 κυττάρων/τρυβλίο. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% ορό FCS για 14 ημέρες, οπότε δημιουργήθηκαν ορατές αποικίες γύρω από κάθε κύτταρο. Εφόσον δημιουργήθηκαν αποικίες στο χρόνο αυτό, το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS δύο φορές. Μετά ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων-αποικιών με πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα μεθανόλης 75% v/v-οξέος 25% v/v για 10 λεπτά στους -20°C, αφαίρεση του διαλύματος μονιμοποίησης και παραμονή των τρυβλίων σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν. Κατόπιν έγινε η χρώση με διάλυμα χρωστικής Giemsa (Riedel-deHaën) 10% v/v σε θερμό νερό βρύσης για 30 λεπτά. Τέλος τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με δις-απεσταγμένο νερό και καταμετρήθηκαν οι αποικίες σε κάθε τρυβλίο.

Η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Ικανότητα σχηματισμού αποικιών} = \frac{(\# \text{ μεμονωμένων κυττάρων})}{(\# \text{ αποικιών κυττάρων})}$$

και εκφράστηκε τελικά ως ποσοστό (%) επί του αρχικού αριθμού κυττάρων. Τα κύτταρα που σχηματίζουν μεγαλύτερες αποικίες είναι αυτά με το μεγαλύτερο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



IV. ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

1. Πειραματόζωα

Τα χρυσόψαρα *Carassius auratus* που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική μας διάταξη ανήκαν σε δυο ηλικιακές ομάδες: 307 ιχθύς κλάσης I (0-1 έτους) και 26 ιχθύς κλάσης II (1-2 ετών). Τα ψάρια της ίδιας ηλικιακής κλάσης είχαν παρόμοιο βάρος και μέγεθος μεταξύ τους.

Τα ψάρια της κλάσης I τοποθετήθηκαν περίπου ανά 60 στα ενυδρεία I και II, ενώ στα III και IV περίπου ανά 80 υπό ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, οξυγόνωσης νερού και τροφής. Έγινε προσπάθεια να τοποθετηθούν σε κάθε ενυδρείο μισά αρσενικά και μισά θηλυκά ψάρια, αν και μορφολογικά ο φυλετικός διαχωρισμός δεν ήταν πολύ εύκολος λόγω της γενετήσιας ανωριμότητάς τους. Η ομάδα Ο (μάρτυρας) ήταν 12 ιχθύς (5♀ και 7♂) στην αρχή του πειράματος (πρώτη ημέρα) που δεν είχαν εκτεθεί σε μέταλλα.

Τα ψάρια της κλάσης II τοποθετήθηκαν ανά 12 στα ενυδρεία I και II, επίσης υπό ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, οξυγόνωσης νερού και τροφής. Κι εδώ έγινε προσπάθεια να τοποθετηθούν σε κάθε ενυδρείο μισά αρσενικά και μισά θηλυκά. Η ομάδα Ο (μάρτυρας) ήταν 2 ιχθύς (1♀ και 1♂) στην αρχή του πειράματος. Τελικά η αναλογία των ιχθύων ήταν 15♀ και 11♂ (με 8♀-4♂ στο ενυδρείο I και 6♀-6♂ στο ενυδρείο II).

Τα ψάρια της κλάσης I ήταν συνολικά 161♀-146♂ και η κατανομή τους σε κάθε ενυδρείο είχε ως εξής: στο ενυδρείο I 32♀-26♂, στο ενυδρείο II 28♀-32♂, στο ενυδρείο III 55♀-38♂ και στο ενυδρείο IV 46♀-50♂.

2. Συνθήκες ιχθυοκαλλιέργειας

Η ιχθυοκαλλιέργεια γινόταν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο στις εγκαταστάσεις του εκκολαπτηρίου ιχθυδίων της Δημοτικής Επιχείρησης Λίμνης Ιωαννίνων (ΔΕΛΙ) από τα μέσα Ιανουαρίου ως τα μέσα Μαΐου. Τα ενυδρεία στα οποία τοποθετήθηκαν τα χρυσόψαρα ήταν χωρητικότητας 150l, ενώ το νερό που τοποθετήθηκε σε αυτά (αποκλωριωμένο νερό βρύσης) είχε όγκο 115l. Στα ενυδρεία δεν γινόταν ανανέωση νερού, αλλά τοποθετήθηκε μία μικρή αντλία νερού για την ανάδευση και ικανοποιητική οξυγόνωσή του. Καθημερινά γινόταν έλεγχος και καταγραφή του pH, του διαλυμένου οξυγόνου και της θερμοκρασίας του νερού σε όλα τα ενυδρεία.

Η θερμοκρασία του νερού σε όλη τη διάρκεια του πειράματος κυμάνθηκε στο ενυδρείο I μεταξύ 4-21°C, ενώ στα ενυδρεία II, III, IV μεταξύ 7-21°C και στα IIIα-IIIβ, IVα-IVβ μεταξύ 11-21°C. Το pH αντίστοιχα κυμάνθηκε στα ενυδρεία I, II μεταξύ 7,2-8,4, ενώ στα ενυδρεία III, IV μεταξύ 7,3-8,1 και στα IIIα-IIIβ, IVα-IVβ μεταξύ 7,4-8. Τέλος το διαλυμένο οξυγόνο κυμάνθηκε στο ενυδρείο I μεταξύ 7,9-13,4, ενώ στα ενυδρεία II, III μεταξύ 7,3-11,6, στο IV μεταξύ 5-11,4 και στα IIIα-IIIβ, IVα-IVβ μεταξύ 5-8,5.

Πριν τεθεί σε εφαρμογή η πειραματική διάταξη έγινε προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των μετάλλων Cd, Cu, Ni, και Zn στο νερό της λίμνης καθώς και στο νερό της βρύσης. Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων στο νερό μετρήθηκαν με Φασματοφωτόμετρο Ατομικής Απορρόφησης Perkin-Elmer



mod.560 με Φούρνο Γραφίτη-HGA 400 (GF-AAS) και διορθωτή υποστρώματος με λάμπα δευτερίου.

3. Παρασκευή των διαλυμάτων των μετάλλων

Τα διαλύματα των μετάλλων παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις από πυκνά πρότυπα διαλύματα Cd και Zn για την Ατομική Απορρόφηση (Atomic Spectroscopy Standard Concentrate, FLUKA Chemica, GmbH, AG, BUCKS) συγκέντρωσης 1g/l (1000ppm).

Το CdCl₂ και το ZnCl₂ αραιωνόταν διαδοχικά βάσει του τελικού όγκου νερού που περιείχε κάθε ενυδρείο, ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις των μετάλλων. Πιο συγκεκριμένα, στα ενυδρεία III και IV η τελική συγκέντρωση ήταν αντίστοιχα 1μg/l (ppb) CdCl₂ και 5μg/l CdCl₂, και στα ενυδρεία IIIβ και IVβ ήταν αντίστοιχα 1μg/l CdCl₂+1μg/l ZnCl₂ και 5μg/l CdCl₂+10μg/l ZnCl₂.

4. Μέτρηση μετάλλων στο νερό

Το νερό από κάθε ενυδρείο ελεγχόταν σε εβδομαδιαία βάση και πάντοτε πριν από κάθε δειγματοληψία ώστε να εξασφαλίζεται ότι δεν έχουν αλλάξει οι συγκεντρώσεις των μετάλλων. Το νερό, το οποίο συλλεγόταν από κάθε ενυδρείο και στο οποίο μετριόταν το pH του, οξινιζόταν με 100 μl πυκνού HNO₃ 65% (suprapur, Merck, Darmstadt, Germany). Οι συγκεντρώσεις του Cd και του Zn στο νερό μετρήθηκαν με Φασματοφωτόμετρο Ατομικής Απορρόφησης Perkin-Elmer mod.560 με Φούρνο Γραφίτη-HGA 400(GF-AAS) και διορθωτή υποστρώματος με λάμπα δευτερίου.

5. Πειραματικές συνθήκες

Τα χρυσόψαρα της κλάσης I καλλιεργήθηκαν στις δεξαμενές που περιείχαν νερό με διαφορετικές συγκεντρώσεις μετάλλων:

- (I) νερό λίμνης από τη λίμνη Παμβώτιδα των Ιωαννίνων (με ~0.05μg/l Cd),
- (II) αποκλωριωμένο νερό βρύσης (με ~0.1μg/l Cd),
- (III) αποκλωριωμένο νερό βρύσης με 1μg/l (ppb) Cd και
- (IV) αποκλωριωμένο νερό βρύσης με 5μg/l (ppb) Cd.

Επίσης οι ιχθύς της κλάσης II καλλιεργήθηκαν στις συνθήκες (I) και (II), σε διαφορετικές δεξαμενές από αυτά της κλάσης I. Ο συνολικός χρόνος έκθεσης και για τις δύο κλάσεις ψαριών ήταν 120 ημέρες και το πείραμα διήρκησε από μέσα Ιανουαρίου έως μέσα Μαΐου.

Εδώ να σημειωθεί ότι οι αντίστοιχες συνθήκες που αφορούσαν την έκθεση των δύο κυτταρικών σειρών 3T3 και MRC-5 σε μέταλλα ήταν: 0,1μM=11,24 ppb, 1μM=112,4ppb, 5μM=562 ppb, 10μM=1,124 ppm, 50μM=5,62 ppm και 100μM=11,24 ppm. Δηλαδή οι συνθήκες της ιχθυοκαλλιέργειας με τις συγκεντρώσεις 1 ppb =0,009 μM και 5 ppb =0,044 μM ήταν περίπου υποδεκαπλάσιες και υποδιπλάσιες αντίστοιχα από τη μικρότερη συγκέντρωση μετάλλων στην κυτταροκαλλιέργεια.



Στις 60 ημέρες (μέσα Μαρτίου) τα ενυδρεία I και II παρέμειναν ως είχαν, ενώ από τα ενυδρεία III και IV ελήφθησαν περίπου 20 ιχθύς από το καθένα, οι οποίοι τοποθετήθηκαν ανά 10 σε 4 νέα ενυδρεία υπό τις εξής συνθήκες:

α) Οι δεξαμενές IIIα (5φ και 3δ) και IVα (4φ και 6δ) περιείχαν αποκλωριωμένο νερό βρύσης και οι ιχθύς από τα ενυδρεία III και IV αντίστοιχα αφέθηκαν εκεί για αποκατάσταση για 60 ημέρες.

β) Οι δεξαμενές IIIβ (5φ και 4δ) και IVβ (4φ και 6δ) περιείχαν 1ppb και 5ppb Cd όπως οι III και IV, αλλά προστέθηκε σε καθμία και Zn σε συγκέντρωση 1ppb και 10ppb αντίστοιχα. Και εδώ οι ιχθύς από τα ενυδρεία III και IV αντίστοιχα αφέθηκαν για αποκατάσταση για 60 ημέρες.

Σε όλες τις δεξαμενές αφέθηκαν να γονιμοποιηθούν οι ιχθύς για να ελεγχθούν τα ποσοστά εκκόλαψης και επιβίωσης σε 1,2,3,6,7 ημέρες, κάτι που δεν έγινε εφικτό, γιατί τα ψάρια δεν επέδειξαν καμία αναπαραγωγική συμπεριφορά, παρά το γεγονός ότι γινόταν επιπλέον τεχνητή αύξηση της θερμοκρασίας του νερού από τα τέλη Απριλίου έως το τέλος του πειράματος.

Η ομάδα Ο (μάρτυρας) ήταν 12 ιχθύς κλάσης I και 2 ιχθύς κλάσης II στην αρχή του πειράματος (πρώτη ημέρα) που δεν είχαν εκτεθεί σε μέταλλα.

6. Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων ορού

Κάθε δύο εβδομάδες (μετά από 15, 30, 45, 60 και 120 ημέρες έκθεσης) γινόταν τυχαία δειγματοληψία 12 ψαριών (6 ζεύγη) κλάσης I και 2 κλάσης II από κάθε δεξαμενή. Στα ψάρια κλάσης II έγινε και μια ενδιάμεση δειγματοληψία στις 90 ημέρες. Τα ψάρια κατόπιν αναισθητοποιήθηκαν και έγινε αιμοληψία από την ουραία φλέβα τους με σύριγγα ινσουλίνης 1ml. Το αίμα από δύο ψάρια κλάσης I (γινόταν συνένωση -pooling- δειγμάτων καθώς το μέγεθος των ψαριών ήταν πολύ μικρό) ή από ένα ψάρι κλάσης II (μεγαλύτερου μεγέθους) τοποθετήθηκε σε σωληνάριο erpendorff 1ml σε πάγο για να πήξει. Στη συνέχεια τα ψάρια θυσιάστηκαν και τοποθετήθηκαν σε πάγο μέχρι τη μεταφορά τους στο εργαστήριο.

Στο εργαστήριο, τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν στις 2500rpm για 10 λεπτά, για το διαχωρισμό ορού και έμμορφων συστατικών του αίματος. Στον ορό που προέκυψε ως υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρηση, προστέθηκαν δύο αναστολείς πρωτεασών, ο PMSF σε συγκέντρωση 2mM και το EDTA σε συγκέντρωση 1mM για την αποφυγή της πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών του ορού. Τέλος τα δείγματα των ορών τοποθετήθηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους για τον προσδιορισμό της 17-β οιστραδιόλης.

7. Μορφομετρικοί χαρακτήρες

Με τον όρο αυτό εννοούμε τα μεριστικά εκείνα χαρακτηριστικά, τα οποία είναι μετρήσιμα (σε χιλιοστά) στο σώμα του οργανισμού και αφορούν κυρίως μετρήσεις μήκους, εύρους και βάθους. Στα ψάρια, τα οποία υπόκεινται σε συνεχή αύξηση, αλλάζουν με το μέγεθος και την ηλικία. Η αύξηση μπορεί να οριστεί ως κάθε αλλαγή στο μέγεθος ή στην ποσότητα της



σωματικής ύλης, ανεξάρτητα από το αν η αλλαγή αυτή είναι θετική ή αρνητική, προσωρινή ή μακροχρόνια. Η ποσοτικοποίηση των αλλαγών του μεγέθους αφορά τόσο το μήκος και το βάρος όσο και άλλους χαρακτήρες, όπως τον καθορισμό των ουσιών σε ένα μίγμα π.χ. πρωτεϊνική ανάλυση, ανάλυση λιπιδίων και υδατανθράκων, αλλά επίσης και θερμοδομετρική ανάλυση του ενεργειακού περιεχομένου.

Οι μετρήσεις μήκους περιλαμβάνουν συνήθως μετρήσεις ολικού μήκους (Total Length TL), ουραίου μήκους (Fork Length FL) και σταθερού μήκους (Standard Length SL) και παρέχουν άμεση απόδειξη της αύξησης ή της έλλειψής της, που όμως σταματά με την πάροδο του χρόνου.

Η μέτρηση του βάρους είναι το χαρακτηριστικό της αύξησης που χρησιμοποιείται συχνότερα για το σύνολο του σώματος των ιχθύων και δίνει επίσης την εκτίμηση της παραγωγής, την εξέλιξη δηλαδή της βιομάζας μιας ομάδας ή ενός πληθυσμού. Συχνά μετρούνται και οι δύο χαρακτήρες μήκους-βάρους, των οποίων η σχέση γενικά εκφράζεται από την εξίσωση: $W=aL^n$, όπου W =Βάρος, L =Μήκος, a είναι μία σταθερά και n είναι ένας εκθέτης που κυμαίνεται μεταξύ 2.5 και 3.5 (συνήθως κοντά στο 3.0). Καθώς το ψάρι μεγαλώνει οι αλλαγές στο βάρος είναι σχετικά μεγαλύτερες από αυτές στο μήκος λόγω της σχεδόν κυβικής σχέσης μήκους-βάρους στα ψάρια. Για μικρές χρονικές περιόδους οι αλλαγές του βάρους είναι αρκετά ακριβείς, αλλά παράλληλα μπορεί να αντανακλούν και αλλαγές στο περιεχόμενο νερού του σώματος, αλλαγές στα λιπίδια, στην ανάπτυξη των γονάδων ή στην πληρότητα του στομάχου.

Στους ιχθύς του πειραματικού πρωτοκόλλου μετρήθηκε το σταθερό μήκος (SL) και το ολικό μήκος (TL), το οποίο περιελάμβανε και το ουραίο μήκος και κατόπιν ζυγίστηκαν και καταγράφηκε το ολικό σωματικό τους βάρος. Επίσης υπολογίστηκε ο συντελεστής ευρωστίας (CF), ο οποίος εκφράζει τη σωματική αύξηση των ιχθύων. Στη συνέχεια απομονώθηκαν οι ιστοί από τα ζώα, οι οποίοι και ξεπλύθηκαν με ισότονο διάλυμα PBS. Οι γονάδες και το ήπαρ κάθε ζώου ζυγίστηκαν και καταγράφηκαν τα βάρη τους για τον προσδιορισμό του γοναδοσωματικού (GSI) και του ηπατοσωματικού (LSI ή HSI) δείκτη αντίστοιχα, που αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα το σχετικό μέγεθος γονάδων και το σχετικό μέγεθος ήπατος των πειραματοζώων:

Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI) = Βάρος γονάδων/Βάρος σώματος X 100

Ηπατοσωματικός Δείκτης (HSI ή LSI)=Βάρος ήπατος/Βάρος σώματος X 100

Συντελεστής Ευρωστίας (CF)= Βάρος σώματος/(Μήκος)³ X 100

8. Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων ιστών

Από τις γονάδες και το ήπαρ ελήφθησαν δείγματα από ένα ζώο για ιστοπαθολογική μελέτη. Τα δείγματα των ιστών για την ιστοπαθολογική μελέτη τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10%.



Για τον προσδιορισμό των μετάλλων στους ιστούς και συγκεκριμένα του Cd και του Zn στο ήπαρ, τις γονάδες, τα βράγχια, τους νεφρούς και τους μύες λήφθηκαν δείγματα που τοποθετήθηκαν στους -20°C από 2 ψάρια κλάσης I (pooling) ή από ένα ψάρι κλάσης II. Το δείγμα του μύος αποτελούσε τμήμα από τη ραχιαία περιοχή του ζώου στο ύψος των πλευρών. Όταν επρόκειτο να αναλυθούν, οι ιστοί αποψύχθηκαν και ζυγίστηκαν.

9. Προετοιμασία δειγμάτων ιστών (όξινη πέψη) για την Ατομική Απορρόφηση

Η διαδικασία της όξινης πέψης γίνεται με προσθήκη πυκνού διαλύματος HNO_3 65%. Η προσθήκη του HNO_3 εξασφαλίζει τη δέσμευση των μετάλλων υπό τη μορφή νιτρικών ενώσεών τους. Επίσης κατά την υγρή διαδικασία (υγρή πέψη με HNO_3) αποφεύγονται οι υψηλές θερμοκρασίες της ξηρής μεταλλοποίησης κι έτσι πιθανές απώλειες των πιο πιητικών στοιχείων.

Τμήμα (περίπου 0,2g) ιστού (βράγχια, ήπαρ, νεφροί, γονάδες, μύς) τοποθετήθηκε σε οβίδες Teflon-PFA όπου προστέθηκαν 3ml πυκνού HNO_3 65% (suprapur, Merck, Darmstadt, Germany). Οι οβίδες με τα δείγματα, για την πραγματοποίηση της όξινης πέψης των ιστών, μετά την παραμονή τους σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων Panasonic, ισχύος $P=400\text{W}$ για 15 λεπτά για τον προσδιορισμό των μετάλλων. Η πέψη είχε ολοκληρωθεί όταν τα διαλύματα έγιναν διαυγή, οπότε και αραιώθηκαν με δις απεσταγμένο νερό σε σταθερό όγκο 10ml και ήταν έτοιμα προς μέτρηση.

Σε κάθε ανάλυση προετοιμάστηκαν επίσης τυφλά διαλύματα (blanks) HNO_3 (suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) και υλικά αναφοράς (references) με την ίδια διαδικασία όπως και τα δείγματα, για την ελαχιστοποίηση των σταθερών (συστηματικών) σφαλμάτων της ανάλυσης (bias). Τα υλικά αναφοράς ελέγχουν την ποιότητα των δεδομένων της ανάλυσης και την αξιοπιστία τους και είναι συνήθως βιολογικό υλικό από διεθνείς οργανισμούς που διαθέτει γνωστή κι αποδεκτή τιμή. Το υλικό αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν ιστός μυδιού *Mytilus edulis* (BCR 278R Mussel Tissue of Institute for Reference Materials and Measurements IRMM, JRC-EC).

10. Μέτρηση μετάλλων στους ιστούς

Για τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων των μετάλλων Zn και Cd χρησιμοποιήθηκε Φασματοφωτόμετρο Ατομικής Απορρόφησης (AAS) Perkin-Elmer mod.560 με φλόγα και φούρνο γραφίτη HGA-400, με διορθωτή υποστρώματος λάμπα δευτερίου (background corrector). Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τουλάχιστον εις τριπλούν.

Τα δείγματα υπό υγρή μορφή υπόκεινται σε ανάλυση (περίπου 2ml για κάθε μέτρηση στη φλόγα, ενώ 20ml δείγματος για κάθε μέτρηση στο φούρνο). Η συγκέντρωση του υπό μέτρηση μετάλλου πρέπει να δίνει 0,1-0,5 μονάδες απορρόφησης που υπολογίζονται βάσει της ευαισθησίας κάθε μετάλλου.



Τυφλά διαλύματα καθώς και πρότυπα διαλύματα μετάλλων χρησιμοποιούνται για τη βαθμονόμηση του φωτόμετρου. Τα πρότυπα συνήθως αναλύονται στην αρχή και στο τέλος μιας σειράς αναλύσεων και περιοδικά όταν υπάρχουν πολλά δείγματα, ενώ τα τυφλά ανάμεσα σε κάθε δείγμα ή πρότυπο για την επαλήθευση της σταθερότητας των μετρήσεων. Η βαθμονόμηση του οργάνου μπορεί να γίνει έτσι ώστε να δίνονται απευθείας μετρήσεις συγκέντρωσης, εάν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων και των προτύπων είναι μέσα στο γραμμικό εύρος της καμπύλης, με τη χρήση ενός τυφλού και ενός προτύπου στο ανώτερο άκρο του γραμμικού εύρους της καμπύλης.

Για τη μέτρηση του Cd με φούρνο γραφίτη χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα 2,5 και 5ppb Cd υπό νιτρική μορφή, ενώ για τη μέτρηση του Zn με φλόγα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα 0,5 και 1ppm Zn υπό νιτρική μορφή επίσης, που παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις από αντίστοιχα πυκνά πρότυπα CdNO₃ και ZnNO₃ συγκέντρωσης 1mg/ml (Spectrosol, BDH Chemicals, Ltd Poole-England). Στη συνέχεια προέκυψαν οι καμπύλες βαθμονόμησης (αναφοράς) από τις απορροφήσεις των προτύπων υδατικών διαλυμάτων του μετάλλου συναρτήσει των συγκεντρώσεών τους. Τα δείγματα καθορίζονται από τις καμπύλες βαθμονόμησης εφόσον βρίσκονται εντός του γραμμικού εύρους. Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων υπολογίζονται τελικά από τον τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)} = \frac{\text{Καθαρή Απορρόφηση δείγματος} \times \text{Συγκέντρωση προτύπου}}{\text{Καθαρή Απορρόφηση προτύπου}}$$

Ο τύπος αυτός για τα υγρά και στερεά δείγματα διαμορφώνεται αντίστοιχα ως εξής:

$$\text{Μέταλλο (}\mu\text{g/ml)} = \text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)} \times \text{Αραιώση}$$

$$\text{Μέταλλο (ppm)} = \frac{\text{Συγκέντρωση (}\mu\text{g/ml)} \times \text{Όγκος δείγματος (ml)} \times \text{Αραιώση}}{\text{Βάρος πέψης (g)}}$$

V. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Ο προσδιορισμός των μετάλλων στους ιστούς έγινε με τη μέθοδο της Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrophotometry ή AAS), όπου με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου μία περιοχική συγκεκριμένου μήκους κύματος απομονώνεται από το υπόλοιπο φάσμα και μετράται η μεταβολή της έντασης αυτής της περιοχής. Η ανάλυση των μετάλλων έγινε στη Μονάδα Περιβαλλοντικής Φυσιολογίας του εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



1. Μέθοδος Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrophotometry)

Στη μέθοδο της Ατομικής Απορρόφησης οι βασικές αρχές είναι οι ακόλουθες:

Τα προς ανάλυση μεταλλικά άλατα, που προκύπτουν μετά την όξινη πέψη των δειγμάτων, φέρονται σε ατομική κατάσταση και παρεμβάλλονται στη διαδρομή της εκπεμπόμενης φωτεινής συχνότητας του φωτόμετρου. Για κάθε μέταλλο χαρακτηριστικά φάσματα φωτεινών συχνοτήτων ενεργοποιούνται στην πηγή του φωτόμετρου με τη βοήθεια μιας κοίλης λυχνίας καθόδου (hollow cathode lamp). Τα άτομα του μετάλλου τότε απορροφούν επιλεκτικά την ακτινοβολία που εκπέμπεται.

Ως γνωστόν όταν ακτινοβολία μήκους κύματος λ περνά από νέφος ατόμων, ένα μέρος της απορροφάται λόγω της διέγερσης των ατόμων ($M^0 + h\nu \rightarrow M^*$). Επομένως η ένταση της ακτινοβολίας στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στην ενέργεια του φωτονίου $h\nu$ θα μειωθεί. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ατόμου τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η μείωση στην ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Όπως προαναφέρθηκε κάθε είδος ατόμου απαιτεί φωτόνια συγκεκριμένης ενέργειας, σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, για να παράγει διεγερμένα άτομα αυτού του στοιχείου. Τελικά η μείωση της έντασης του σήματος του ανιχνευτή του φωτόμετρου υπακούει στο νόμο των Lambert-Beer, που ορίζει πως όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από ομοιογενές υλικό, η ισχύς της ακτινοβολίας μειώνεται ανάλογα με τον αριθμό των απορροφούμενων σωματιδίων στη διαδρομή του φωτός:

$$A = \log P_0/P = a b c$$

όπου A η απορρόφηση, P_0 η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, P η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας, a η απορροφητικότητα (σταθερά), b το μήκος της διαδρομής που διανύθηκε και c η συγκέντρωση. Άρα η απορρόφηση σχετίζεται με τη συγκέντρωση του μετάλλου.

2. Ατομική απορρόφηση με φλόγα (flame)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των επιπέδων Zn στους ιστούς των χρυσόψαρων. Για την ατομοποίηση ενδιάμεσης σταθερότητας στοιχείων όπως ο Zn , χρησιμοποιείται η φλόγα αέρα-ασετιλίνης, που φτάνει σε θερμοκρασία $2300^\circ C$. Το δείγμα φέρεται προς μέτρηση σε υγρή κατάσταση και μετατρέπεται σε αερόλυμα με τη βοήθεια νεφελοποιητή, μεταφέρεται από ρεύμα αερίων στον καυστήρα και μετά τη μίξη του με τα αέρια της φλόγας καίγεται και ατομοποιείται. Ένα σταθερό σήμα, του οποίου η ένταση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του μετάλλου, καταγράφεται κατά το χρονικό διάστημα που το δείγμα εκτίθεται στη φλόγα.

Για τη μέτρηση του Zn με φλόγα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα $S_1=0,5\mu g/ml$ και $S_2=1\mu g/ml$ (ppm) Zn υπό νιτρική μορφή που παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις από πυκνό πρότυπο διάλυμα



ZnNO₃ συγκέντρωσης 1mg/ml (Spectrosol, BDH Chemicals, Ltd Poole-England). Οι ρυθμίσεις λειτουργίας του οργάνου για τον Zn ήταν:

Μήκος κύματος (λ): 213,9 nm Εύρος σχισμής (slit): 0,7 nm NORM
Ένταση ρεύματος: 15 mA Πηγή φωτός: Κοίλη λυχνία καθόδου Zn
Φλόγα: Μείγμα ασετιλίνης-αέρα, οξειδωτική
Ευαισθησία: 0,018 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zn για 1% απορρόφηση (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ έχουν απορρόφηση 0,12).

3. Ατομική απορρόφηση με φούρνο γραφίτη (*graphite furnace*)

Στην ατομοποίηση με ηλεκτροθερμική συσκευή (φούρνο γραφίτη), η οποία αυξάνει την ευαισθησία και μειώνει τα όρια ανίχνευσης, το δείγμα τοποθετείται στον ατομοποιητή, ο οποίος θερμαίνεται με τη διέλευση ελεγχόμενου ηλεκτρικού ρεύματος. Ο ατομοποιητής αποτελείται από υλικό αγωγίμο που εμφανίζει ηλεκτρική αντίσταση (εδώ γραφίτης), οπότε ελέγχοντας το ηλεκτρικό ρεύμα ελέγχεται αντίστοιχα και η θερμοκρασία του ατομοποιητή, και αυξάνει κι αυτή σταδιακά. Αρχικά το δείγμα ξηραίνεται και ο διαλύτης εξατμίζεται. Ακολουθεί το στάδιο της πυρόλυσης όπου απομακρύνονται τα πτητικά συστατικά (κυρίως οργανικά) του χημικού υποστρώματος (*matrix*) κι έτσι μειώνονται οι παρεμβολές. Τέλος, με πολύ υψηλές θερμοκρασίες το μέταλλο ατομοποιείται. Ένα σύστημα ψύξης κι ένα αδρανές αέριο (αργόν) που δεν αντιδρά με τα άτομα του μετάλλου ή το γραφίτη προστατεύουν το γραφίτη από καύση σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες.

Καθώς η ηλεκτροθερμική θυρίδα βρίσκεται στη διαδρομή του φωτός του φωτόμετρου κατά τη διάρκεια της ατομοποίησης καταγράφεται παροδικό σήμα απορρόφησης από το μεταλλικό νέφος. Η καμπύλη βαθμονόμησης παρουσιάζει τα δεδομένα και το ύψος της κορυφής ή το εύρος της περιοχής που μετρήθηκε (*peak height* ή *peak area*) τελικά είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του μετάλλου.

Τα ιδανικά όρια ανίχνευσης της μεθόδου ενδεικτικά για κάποια μέταλλα είναι για το Cd ($\lambda=228,8$ nm) 0,001 ppb, ενώ στη φλόγα είναι 0,6 ppb και για τον Zn ($\lambda=213,9$ nm) 0,0006 ppb, ενώ στη φλόγα είναι 2 ppb.

Ο φούρνος γραφίτη παρέχει το πλεονέκτημα της αύξησης της ευαισθησίας και της μείωσης των παρεμβολών, απομακρύνοντας τα ιόντα του χημικού υποστρώματος με τον προσεκτικό έλεγχο των θερμοκρασιών ξήρανσης, πυρόλυσης και ατομοποίησης. Δεν παρέχει όμως καλή ακρίβεια καθώς μπορεί να υπάρχουν παρεμβολές από το υπόστρωμα (*background*), το οποίο επίσης απορροφά. Έτσι είναι ουσιώδης η διόρθωση του υποστρώματος, η οποία γίνεται με χρήση διορθωτή (*background corrector*). Ο διορθωτής (εδώ λάμπα δευτερίου) μετρά το σήμα απορρόφησης του υποστρώματος (μη ειδική απορρόφηση) και το αφαιρεί από το τελικό σήμα. Το διορθωμένο σήμα αποτελεί την καθαρή απορρόφηση από το μέταλλο.

Για τη μέτρηση του Cd με φούρνο γραφίτη χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα $S_1=2,5\mu\text{g}/\text{l}$ και $S_2=5\mu\text{g}/\text{l}$ (ppb) Cd υπό νιτρική μορφή, που παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις από πυκνό πρότυπο



διάλυμα CdNO₃ συγκέντρωσης 1mg/ml (Spectrosol, BDH Chemicals, Ltd Poole-England). Οι ρυθμίσεις λειτουργίας του οργάνου για το Cd ήταν:

Μήκος κύματος (λ): 228,8 nm Εύρος σχισμής (slit): 0,7 nm ALT
Ένταση ρεύματος: 4mA Πηγή φωτός: Κοίλη λυχνία καθόδου Cd
Γραφίτης: UNCOATED
Ευαισθησία: 4,2 µg/l Cd για 1% απορρόφηση (CM=1,39-2,31µg/l έχουν απορρόφηση 0,2).
Χρήση διορθωτή υποστρώματος: Λάμπα δευτερίου (BG)

Στον παρακάτω πίνακα δίνεται τέλος ένα ενδεικτικό πρόγραμμα χρόνου-θερμοκρασίας του φούρνου γραφίτη για το Cd.

Πίνακας 8. Ενδεικτικό Πρόγραμμα χρόνου-θερμοκρασίας φούρνου γραφίτη AAS

Μέταλλο	Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Έναρξη (sec)	Στάση (sec)
Cd	1-2 (ξήρανση)	110-150	10	50
	3 (πυρόλυση)	250	10	20
	4 (ατομοποίηση)	800	0	5
	5 (καθαρισμός)	2500	1	5

VI. ΜΕΤΡΗΣΗ 17-Β ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ

Ο προσδιορισμός της 17-β οιστραδιόλης έγινε με τη μέθοδο της Ραδιοανοσομετρίας (Radio-immunoassay, RIA) στο εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Στη μέθοδο αυτή ένα αντίσωμα με υψηλή εξειδίκευση προς την ορμόνη που πρόκειται να μετρηθεί αναμιγνύεται αφ' ενός με σωματικό υγρό του ζώου που περιέχει την υπό μέτρηση ορμόνη και αφ' ετέρου με καθαρή πρότυπη ορμόνη που έχει σημασθεί με ραδιενεργό ισότοπο. Κατ' αυτόν τον τρόπο η φυσική ορμόνη μέσα στο δείγμα και η επισημασμένη πρότυπη ανταγωνίζονται για τις θέσεις δέσμευσης στο αντίσωμα και τελικά συνδέονται με το αντίσωμα σύμφωνα με τη συγκέντρωση της καθεμίας στο διάλυμα. Τέλος μετράται η ποσότητα της επισημασμένης ορμόνης που είναι συνδεδεμένη με το αντίσωμα, όπως και προτύπων διαλυμάτων μη σημασθείσας ορμόνης σε διάφορες συγκεντρώσεις, οπότε προκύπτει η πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης από όπου μπορεί να υπολογιστεί και η ποσότητα της φυσικής ορμόνης, που συνήθως είναι σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες (pg/ml).



Για τον προσδιορισμό της 17-β οιστραδιόλης χρησιμοποιήθηκε τυποποιημένη συσκευασία Coat-A-Count οιστραδιόλης (DPC, Los Angeles, USA) στερεάς φάσης με ραδιοανοσοσήμανση με ^{125}I , η οποία προορίζεται για την ποσοτική μέτρηση της οιστραδιόλης στον ορό σε *in vitro* διάγνωση.

Η μέθοδος βασίζεται σε σωλήνες που είναι επενδυμένοι με αντίσωμα. Τα δείγματα ορού αφέθηκαν να αποψυχθούν, σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύτηκαν ελαφρώς. Κατόπιν προστέθηκε 1ml επισημασμένης ^{125}I οιστραδιόλης μέσα στο υπό εξέταση δείγμα ορού όγκου 100μl. Η επισημασμένη οιστραδιόλη με ^{125}I (ικνηθέτης) και η οιστραδιόλη του δείγματος ανταγωνίζονται για τις θέσεις δέσμευσης πάνω στο αντίσωμα. Μετά την επώαση διάρκειας 3 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, ο διαχωρισμός της ελεύθερης από την συνδεδεμένη ορμόνη επιτυγχάνεται με προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου υγρού από τους σωλήνες με αναστροφή τους σε ειδικό δοχείο ραδιενεργών καταλοίπων. Ο σωλήνας κατόπιν μετράται για 1 λεπτό σε μετρητή γ-ακτινοβολίας (γ-counter, Packard Crystal II, Multidetector RIA System), κατάλληλο για ^{125}I . Οι κρούσεις που τελικά καταγράφονται από τον μετρητή της ραδιενέργειας είναι αντιστρόφως ανάλογες με την ποσότητα της οιστραδιόλης στο δείγμα. Κάθε μέτρηση επαναλαμβάνεται εις διπλούν. Τέλος η ποσότητα της οιστραδιόλης στο δείγμα καθορίζεται από τη σύγκριση των κρούσεων με την καμπύλη βαθμονόμησης. Η αναλυτική ευαισθησία της παραπάνω μεθόδου είναι 8pg/ml.

Ο προσδιορισμός της οιστραδιόλης έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμος καθώς μπορεί να αξιολογήσει τη σωστή λειτουργία του αναπαραγωγικού κύκλου εφόσον η ορμόνη αυτή εμπλέκεται στα κυκλικά φαινόμενα της παραγωγής ωαρίων και του αντίστοιχου αναπαραγωγικού κύκλου.

Γενικά η οιστραδιόλη είναι μια στεροειδής ορμόνη με μοριακό βάρος 272,3 dalton, η οποία κυκλοφορεί κυρίως συνδεδεμένη με πρωτεΐνες. Άλλα φυσικά στεροειδή οιστρογόνα είναι επίσης η οιστρόνη, η οιστριόλη και τα σύμπλοκά τους. Τα φυσικά οιστρογόνα είναι ορμόνες που εκκρίνονται κυρίως από τα ωοθυλάκια καθώς επίσης από τα επινεφρίδια, το ωχρό σωματίο, τον πλακούντα και στους άρρενες από τους όρχεις. Τα εξωγενή οιστρογόνα, φυσικά ή συνθετικά, εκλύουν σε διαφορετικό βαθμό όλες τις φαρμακολογικές αποκρίσεις που συνήθως παράγονται από τα ενδογενή οιστρογόνα.

Οι οιστρογονικές ορμόνες εκκρίνονται σε διαφορετικά επίπεδα κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο καθ' όλη την περίοδο της ωοθηκικής δραστηριότητας. Οι γοναδοτροπίνες του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης ρυθμίζουν την έκκριση των ωοθηκικών ορμονών οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Ο υποθαλαμικός έλεγχος της παραγωγής γοναδοτροπινών από την υπόφυση ρυθμίζεται με τη σειρά του από τις συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και προγεστερόνης στο πλάσμα. Αυτό το σύνθετο σύστημα ανάδρασης οδηγεί τελικά στο κυκλικό φαινόμενο της παραγωγής ωαρίων και του αντίστοιχου αναπαραγωγικού κύκλου.

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τέλος ενδεικτικές τιμές αναφοράς της οιστραδιόλης για ενήλικες.



Πίνακας 9. Ενδεικτικές τιμές αναφοράς της οιστραδιόλης για ενήλικες

Ομάδα	90% Εύρος (pg/ml)	n
Ενήλικοι άρρενες	ND-44	57
Θήλυς με ωορρηξία ημέρες του κύκλου σε σχέση με τη μέγιστη τιμή της LH		30
Ωοθυλακική φάση		
-12	10-50	
-4	60-200	
Ωορρηξία		
-1	120-375	
Ωχρινοποιητική φάση		
+2	50-155	
+6	60-260	
+12	15-115	



VII. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Δείγματα από γονάδες και ήπαρ από όλες τις ομάδες των πειραματοζώων σε κάθε δειγματοληψία μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% για λίγες ημέρες. Τα δείγματα αυτά κατόπιν αφυδατώθηκαν (με εμφύσησή τους σε σειρά ανιουσών αλκοολών) και εγκλείστηκαν σε κύβους παραφίνης (ισοκινέτα). Στα μπλοκ αυτά έγιναν με τη βοήθεια μικροτόμου τομές 5μm, οι οποίες στη συνέχεια χρωματίστηκαν με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H+E) για τη μορφολογική παρατήρηση των ιστών.

Αρχικά οι τομές των ιστών τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και αποπαραφινώθηκαν με εμφύσησή τους πρώτα σε ξυλόλη για 10 λεπτά (2 φορές) και στη συνέχεια σε αιθανόλη 100 βαθμών (2 φορές) και σε αιθανόλη 96 βαθμών (2 φορές). Τελικά τα πλακίδια ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης και απεσταγμένο νερό.

Στην περίπτωση της χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H+E), προστέθηκε το διάλυμα της χρωστικής αιματοξυλίνης στα πλακίδια για 10 λεπτά. Κατόπιν τα πλακίδια ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης και με οξινομένη αιθανόλη, ώστε να αποχρωματιστούν ελαφρώς και μετά με απεσταγμένο νερό. Ακολούθησε προσθήκη του διαλύματος της χρωστικής ηωσίνης στα πλακίδια για 1 λεπτό και ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό. Τέλος τα πλακίδια εμφύσησαν διαδοχικά σε αιθανόλη 96 βαθμών, σε αιθανόλη 100 βαθμών και σε ξυλόλη και καλύφθηκαν με καλυπτρίδα. Αφού τα παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν (μετά δύο ώρες) έγινε η μικροσκοπική τους εξέταση με οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX 50-F4.

Η επεξεργασία των δειγμάτων των ιστών έγινε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και η μικροσκοπική τους εξέταση στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

VIII. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων όταν οι επιμέρους ομάδες του δείγματος είναι πολυάριθμες και μικρότερου μεγέθους είναι ιδιαίτερα δυσχερής, καθώς οι στατιστικές διαφορές είναι δύσκολο να αναδειχθούν. Ως εργαλεία πρώτου ελέγχου (screening) χρησιμοποιήσαμε παραμετρικές μεθόδους (ανάλυση διακύμανσης ANOVA), γιατί οι μέθοδοι αυτοί είναι δυνατόν να αναδείξουν μικρότερες διαφορές οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να ελεγχθούν με μη παραμετρικές μεθόδους (δοκιμασία Mann-Whitney). Αναλυτικότερα στοιχεία για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας βρίσκονται στα αποτελέσματα.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

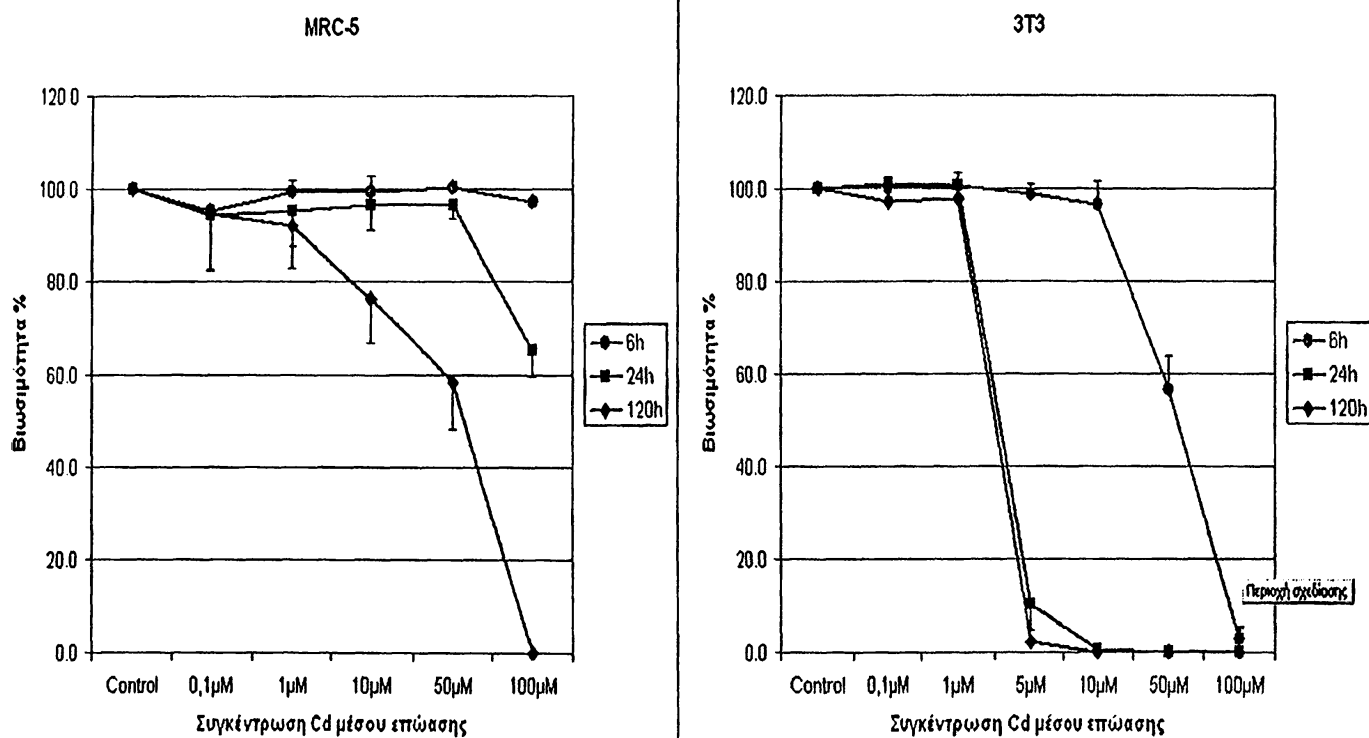
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



I. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ *In Vitro*

1. Επίδραση του Cd στην βιωσιμότητα των κυττάρων 3T3 και MRC-5

Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας των μετάλλων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue. Σύμφωνα με αυτήν, μετά το πέρας του χρόνου επώασης (6, 24 και 120 ώρες) των κυττάρων με τα διαλύματα των μετάλλων, τα κύτταρα συλλέγονται και το κυτταρικό εναιώρημα βάφεται με την χρωστική Trypan Blue. Τελικά μετράται το πλήθος των ζώντων, αλλά και των νεκρών κυττάρων και η κυτταρική βιωσιμότητα υπολογίζεται ως ποσοστό (%) επί της βιωσιμότητας των κυττάρων ελέγχου. Τα κύτταρα που βάφονται επιλεκτικά με έντονο μπλε χρώμα είναι τα νεκρά κύτταρα, ενώ τα ζωντανά παραμένουν άθικτα.



Γράφημα 1. Βιωσιμότητα των κυττάρων MRC-5 και 3T3 μετά από επώασή τους σε CdCl₂ επί 6h, 24h και 120h.

Στα κύτταρα MRC-5 η βιωσιμότητα παραμένει σχεδόν ανεπηρέαστη κατόπιν επώασης σε χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0,1 και 1μM), στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου, ακόμα και μετά από 120 ώρες επώασης. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις όμως, των 10, 50 και 100μM Cd γίνονται κυτταροτοξικές μετά τις 120 ώρες επώασης, ενώ η υψηλότερη των 100μM λειτουργεί κυτταροτοξικά ήδη από τις 24 ώρες επώασης. Η βιωσιμότητα των MRC-5 μετά από χρόνια έκθεση (120 ώρες) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 10, 50 και 100μM CdCl₂ είναι σημαντικά μειωμένη ($p=0,000$) σε σχέση με αυτήν της πιο βραχείας έκθεσης σε Cd (επί 6 και 24 ώρες αντίστοιχα).

Επίσης η βιωσιμότητα των MRC-5 που επώαστηκαν στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,1 και 1μM) CdCl₂ δεν διαφέρει ανάλογα με το χρόνο επώασης, εάν πρόκειται δηλαδή για βραχεία ή χρόνια έκθεση αντίστοιχα.

Στα κύτταρα 3T3 η βιωσιμότητα εξακολουθεί να παραμένει ανεπηρέαστη για τις χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0,1 και 1μM) ακόμα και μετά από 120 ώρες επώασης, όπως και για τα κύτταρα MRC-5, ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των 5, 10, 50 και 100μM Cd είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικές ήδη από τις 24 ώρες επώασης. Η βιωσιμότητα μάλιστα κατόπιν βραχείας έκθεσης (6 ώρες) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 5, 10 και 50μM CdCl₂ είναι σημαντικά αυξημένη (p=0,000) σε σχέση με αυτήν της πιο μακρόχρονης έκθεσης (24 και 120 ώρες αντίστοιχα) στις ίδιες συγκεντρώσεις Cd. Επίσης η βιωσιμότητα μετά από χρόνια έκθεση (120 ώρες) στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,1 και 1μM) CdCl₂ είναι σημαντικά χαμηλότερη (p=0,000) από αυτήν της πιο βραχείας έκθεσης (24 ώρες).

Πίνακας 10. Βιωσιμότητα των κυττάρων MRC-5 και 3T3 μετά από επώασή τους σε CdCl₂.

MRC-5	Control	0,1μM	1μM	10μM	50μM	100μM
6h	96,1±2,1	95,4±0,5	99,3±2,7	99,5±3,4	100,4±1,3	97,3±0,6
24h	92,1±2,7	94,3±11,8	95,3±7,7	96,5±5,2	96,6±3,0	65,3±5,8
120h	82,8±5,9	94,6±12,3	92,2±9,3	76,3±9,5	58,1±10,0	0,0±0,0

3T3	Control	0,1μM	1μM	5μM	10μM	50μM	100μM
6h	93,6±3,3	99,9±2,0	100,6±2,9	98,7±2,3	96,7±5,0	56,4±7,3	2,8±2,6
24h	95,6±2,6	100,8±2,6	100,6±2,2	10,3±5,5	0,6±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0
120h	95,8±2,6	97,0±5,3	97,7±3,1	2,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Πίνακας 11. Στατιστικές διαφορές (p) της βιωσιμότητας των κυττάρων MRC-5 και 3T3 (ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα).

Κύτταρα	CONTROL	0.1 μM	1μM	5μM	10 μM	50μM	100 μM
3T3	0,219	0,043	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000
MRC-5	0,000	0,928	0,441	0,000	0,000	0,000	0,000

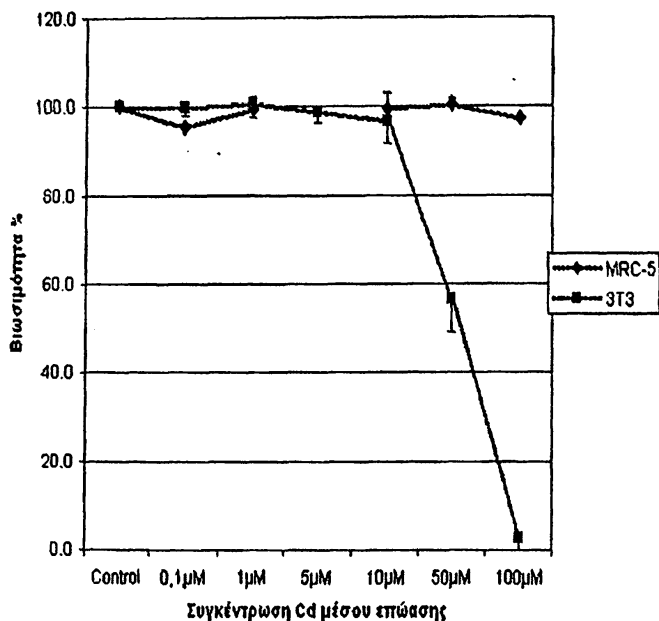
Πίνακας 12. Στατιστικές διαφορές (p) της βιωσιμότητας των κυττάρων MRC-5 και 3T3 (εκ των υστέρων έλεγχοι).

Κύτταρα	Επώαση	6h-24h	24h-120h	6h-120h
3T3	CONTROL			
	0.1 μM	0,571	0,016	0,390
	1μM	0,997	0,001	0,152
	10μM	0,000	0,007	0,000
	50μM	0,000		0,000

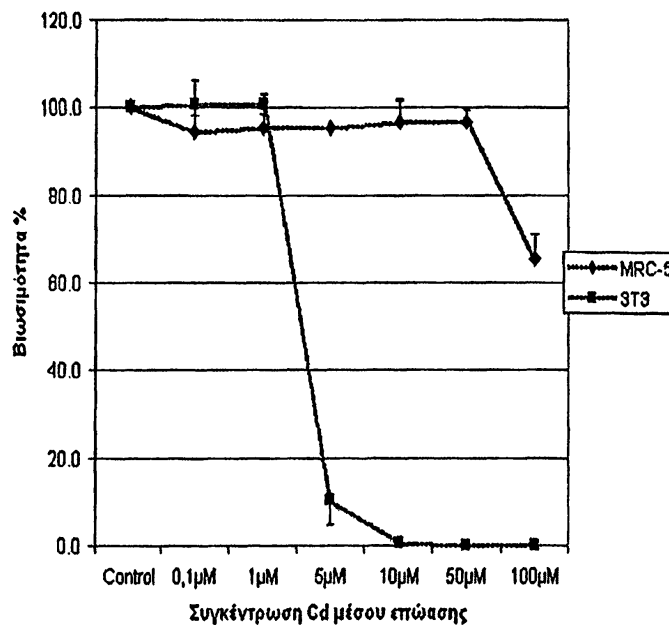


	100 μ M	0,142		0,000
MRC-5	CONTROL	0,027	0,002	0,006
	10 μ M	0,818	0,000	0,006
	50 μ M	0,052	0,000	0,000
	100 μ M	0,000	0,000	0,000

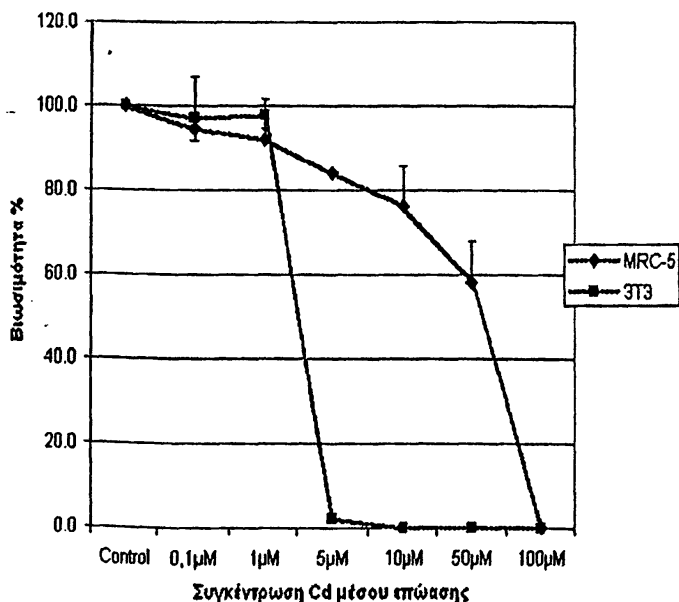
Βιωσιμότητα % μετά από 6h επώασης



Βιωσιμότητα % μετά από 24h επώασης



Βιωσιμότητα % μετά από 120h επώασης



Γράφημα 2. Βιωσιμότητα των κυττάρων 3T3 και MRC-5 μετά από επώασή τους σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις CdCl₂ επί 6h, 24h και 120h.



Συγκρίνοντας τις δύο κυτταρικές σειρές μεταξύ τους, παρατηρείται ότι η βιωσιμότητα στα κύτταρα 3T3 μετά από βραχεία έκθεση (6 ώρες) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (50 και 100μM) CdCl₂ είναι σημαντικά χαμηλότερη (p=0,000) από των κυττάρων MRC-5, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στη χαμηλή συγκέντρωση των 0,1μM, όπου η βιωσιμότητα στα κύτταρα 3T3 μετά από βραχεία έκθεση (6 ώρες) σε 0,1μM CdCl₂ είναι σημαντικά αυξημένη (p=0,020) σε σχέση με των κυττάρων MRC-5. Στις 24 ώρες επώασης με CdCl₂ η βιωσιμότητα των κυττάρων 3T3 στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 10, 50 και 100μM CdCl₂ εξακολουθεί να είναι σημαντικά χαμηλότερη από των κυττάρων MRC-5 (p=0,000), ενώ το αντίθετο συμβαίνει στη χαμηλή συγκέντρωση των 1μM και στα κύτταρα ελέγχου, με τη βιωσιμότητα των 3T3 να υπερέχει σημαντικά (p=0,002 και p=0,001 αντίστοιχα). Στις 120 ώρες επώασης με CdCl₂ η βιωσιμότητα των κυττάρων 3T3 στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 10 και 50μM CdCl₂ εξακολουθεί να είναι σημαντικά χαμηλότερη από των κυττάρων MRC-5 (p=0,000), ενώ το αντίθετο συμβαίνει στα κύτταρα ελέγχου, με τη βιωσιμότητα των 3T3 να είναι σημαντικά αυξημένη (p=0,000).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα κύτταρα MRC-5 είναι πιο ανθεκτικά από τα 3T3 στην επίδραση του Cd, πιθανόν λόγω προστατευτικών μηχανισμών που οφείλονται στη διαφορετική καταγωγή των κυττάρων αυτών. Βέβαια η μακρόχρονη έκθεση (120 ώρες) σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd (100μM) είναι τελικά ιδιαίτερα τοξική ακόμη και για αυτά τα ανθεκτικά κύτταρα. Η δε βραχεία έκθεση (6 και 24 ώρες) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις Cd (0,1 και 1μM) για τα κύτταρα 3T3 φαίνεται να είναι *ευεργετική* καθώς παρατηρείται μια επαγόμενη από τα μέταλλα αύξηση της βιωσιμότητάς τους.

Πίνακας 13. Βιωσιμότητα των κυττάρων 3T3 και MRC-5 μετά από επώαση τους σε CdCl₂ επί 6, 24 και 120h.

6h	Control	0,1μM	1μM	5μM	10μM	50μM	100μM
3T3	93,6±3,3	99,9±2,0	100,6±2,9	98,7±2,3	96,7±5,0	56,4±7,3	2,8±2,6
MRC-5	96,1±2,1	95,4±0,5	99,3±2,7		99,5±3,4	100,4±1,3	97,3±0,6
24h	Control	0,1μM	1μM	5μM	10μM	50μM	100μM
3T3	95,6±2,6	100,8±2,6	100,6±2,2	10,3±5,5	0,6±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0
MRC-5	92,1±2,7	94,3±11,8	95,3±7,7		96,5±5,2	96,6±3,0	65,3±5,8
120h	Control	0,1μM	1μM	5μM	10μM	50μM	100μM
3T3	95,8±2,6	97,0±5,3	97,7±3,1	2,3±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
MRC-5	82,8±5,9	94,6±12,3	92,2±9,3		76,3±9,5	58,1±10,0	0,0±0,0



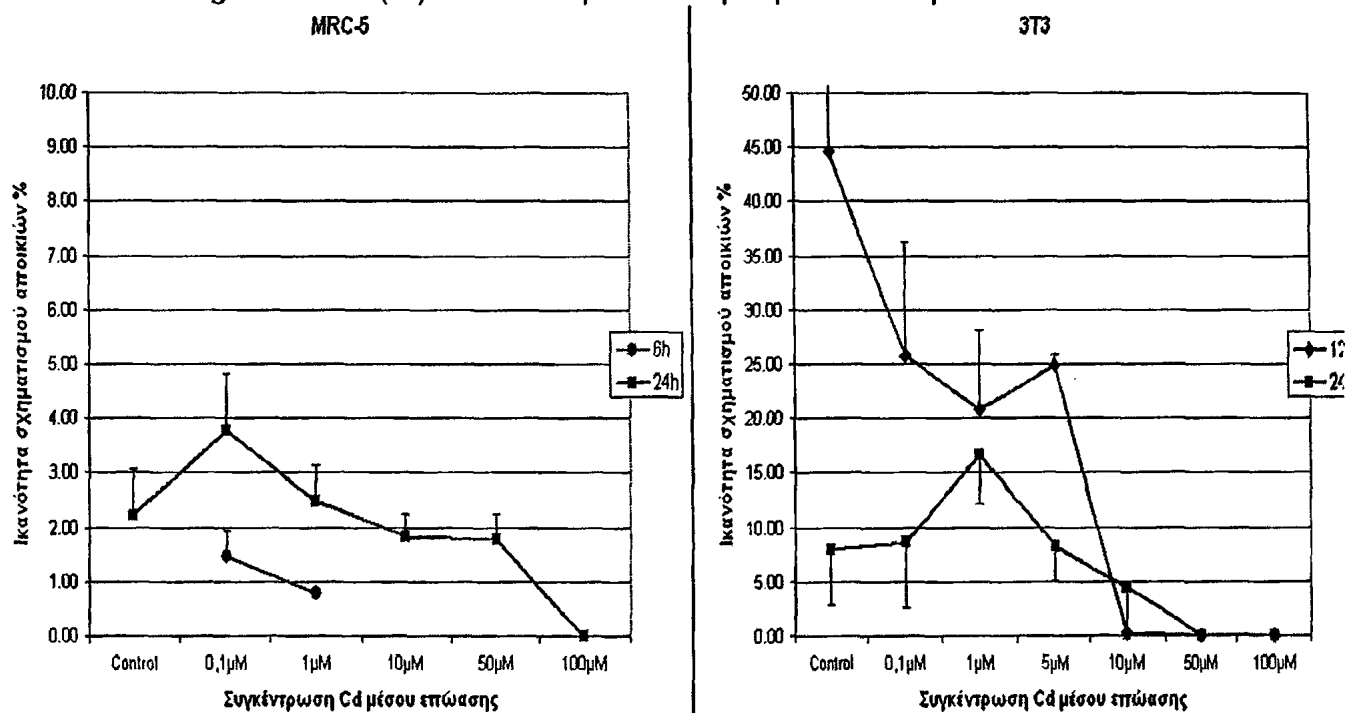
Πίνακας 14. Στατιστικές διαφορές(p) της βιωσιμότητας μεταξύ των κυττάρων MRC-5 και 3T3.

Κύτταρα	Επώαση	6h	24h	120h
3T3- MRC-5	CONTROL	0,238	0,001	0,000
	0.1 μ M	0,020	0,259	0,547
	1 μ M	0,606	0,002	0,047
	10 μ M	0,462	0,000	0,000
	50 μ M	0,000	0,000	0,000
	100 μ M	0,000	0,000	



2. Επίδραση του Cd στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων 3T3 και MRC-5

Για τη μελέτη της ικανότητας των μετάλλων να αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος σχηματισμού αποικιών. Σύμφωνα με αυτήν, μετά το πέρας του χρόνου επώασης (6, 24 και 120 ώρες) των κυττάρων με τα διαλύματα των μετάλλων, αυτά καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 1000, 2000 και 3000 κυττάρων/τρυβλίο για 14 ημέρες, οπότε δημιουργήθηκαν ορατές αποικίες γύρω από κάθε κύτταρο. Μετά ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων-αποικιών, χρώση με διάλυμα χρωστικής Giemsa 10% και καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε τρυβλίο. Η ικανότητα των κυττάρων να δημιουργούν αποικίες εκφράστηκε τελικά ως ποσοστό (%) επί του αρχικού αριθμού κυττάρων.



Γράφημα 3. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων MRC-5 και 3T3 μετά από επώασή τους σε CdCl₂.

Στα κύτταρα MRC-5 η ικανότητα σχηματισμού αποικιών αυξάνεται μετά από 24 ώρες επώασης στη χαμηλή συγκέντρωση του 0,1µM CdCl₂. Το γεγονός αυτό παρατηρείται επίσης, κατόπιν βραχείας έκθεσης 6 ωρών των κυττάρων αυτών στην ίδια συγκέντρωση (0,1µM) CdCl₂. Από εκεί και πέρα, η ικανότητα σχηματισμού αποικιών αρχίζει να φθίνει, φτάνει στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου κατόπιν επώασης στη συγκέντρωση του 1µM, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από 50 µM μηδενίζεται. Πάντως η ικανότητα σχηματισμού αποικιών στα κύτταρα MRC-5 μετά από 24 ώρες επώασης σε χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0,1µM-1µM) είναι σημαντικά αυξημένη



($p=0,015$ και $p=0,006$ αντίστοιχα) σε σχέση με αυτήν της πιο βραχείας επώασης (6 ώρες).

Στα κύτταρα 3T3 η ικανότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται επίσης να αυξάνεται μετά από 24 ώρες επώασης σε χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl_2 ($1\mu\text{M}$), γεγονός που συνδυάζεται και με την επαγόμενη από μέταλλα υψηλή βιωσιμότητα, και από εκεί και μετά φθίνει ώσπου μηδενίζεται κατόπιν έκθεσης σε $50\mu\text{M}$ Cd. Μετά από χρόνια έκθεση (120 ώρες) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (5 και $10\mu\text{M}$) CdCl_2 η ικανότητα σχηματισμού αποικιών διαφέρει σημαντικά ($p=0,000$ και $p=0,033$ αντίστοιχα) από αυτήν της πιο βραχείας έκθεσης (24 ώρες). Άρα τα κύτταρα αυτά μετά από έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl_2 όχι μόνο επιβιώνουν περισσότερο, αλλά επίσης πολλαπλασιάζονται.

Πίνακας 15. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων MRC-5 και 3T3 μετά από επώασή τους σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις CdCl_2 .

MRC-5	Control	0,1 μM	1 μM	10 μM	50 μM	100 μM
6h		1,48 \pm 0,46	0,78 \pm 0,04			
24h	2,22 \pm 0,85	3,78 \pm 1,03	2,49 \pm 0,65	1,83 \pm 0,42	1,78 \pm 0,47	0,00 \pm 0,00

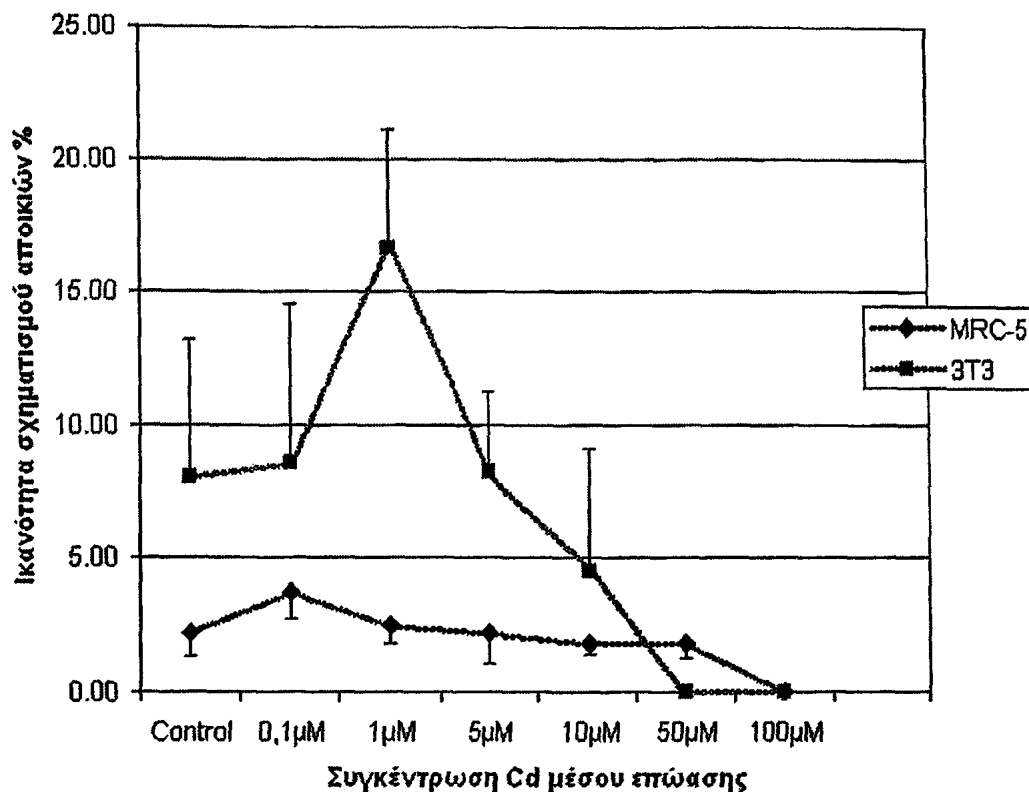
3T3	Control	0,1 μM	1 μM	5 μM	10 μM	50 μM	100 μM
24h	8,01 \pm 5,17	8,60 \pm 5,97	16,63 \pm 4,48	8,22 \pm 3,05	4,46 \pm 4,66	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
120h	44,69 \pm 30,72	25,80 \pm 20,49	20,79 \pm 12,36	24,85 \pm 1,11	0,25 \pm 0,22	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Πίνακας 16. Στατιστικές διαφορές (p) της ικανότητας σχηματισμού αποικιών των κυττάρων MRC-5 και 3T3.

Κύτταρα	Επώαση	6h-24h	24h-120h	6h-120h
3T3	CONTROL		0,003	
	0.1 μM		0,074	
	1 μM		0,539	
	5 μM		0,000	
	10 μM		0,033	
MRC-5	0.1 μM	0,015		
	1 μM	0,006		



Ικανότητα σχηματισμού αποικιών %
μετά από 24h επώασης με Cd



Γράφημα 4. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων 3T3 και MRC-5 μετά από επώασή τους επί 24h σε CdCl₂.

Συγκρίνοντας τις δύο κυτταρικές σειρές μεταξύ τους, παρατηρείται ότι η ικανότητα σχηματισμού αποικιών στα κύτταρα 3T3 μετά από έκθεση 24 ωρών στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (50µM) CdCl₂ είναι σημαντικά χαμηλότερη από των κυττάρων MRC-5 ($p=0,000$), ενώ το αντίθετο συμβαίνει στις χαμηλές συγκεντρώσεις των 0,1 και 1µM και στα κύτταρα ελέγχου, όπου τα κύτταρα 3T3 εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού αποικιών από τα MRC-5 ($p=0,031$, $p=0,000$ και $p=0,004$ αντίστοιχα).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι τα κύτταρα MRC-5 αυξάνονται καλύτερα παρουσία 0,1µM Cd, ενώ τα 3T3 καλύτερα παρουσία 1µM Cd πιθανόν λόγω της διαφορετικής καταγωγής των κυττάρων αυτών. Βέβαια η έκθεση ακόμη και για 24 ώρες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd (100µM) αναστέλλει πλήρως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Πίνακας 17. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων 3T3 και MRC-5 μετά από επώαση τους σε CdCl₂.

24h	Control	0,1μM	1μM	5μM	10μM	50μM	100μM
3T3	8,01±5,17	8,60±5,97	16,63±4,48	8,22±3,05	4,46±4,66	0,00±0,00	0,00±0,00
MRC-5	2,22±0,85	3,78±1,03	2,49±0,65		1,83±0,42	1,78±0,47	0,00±0,00

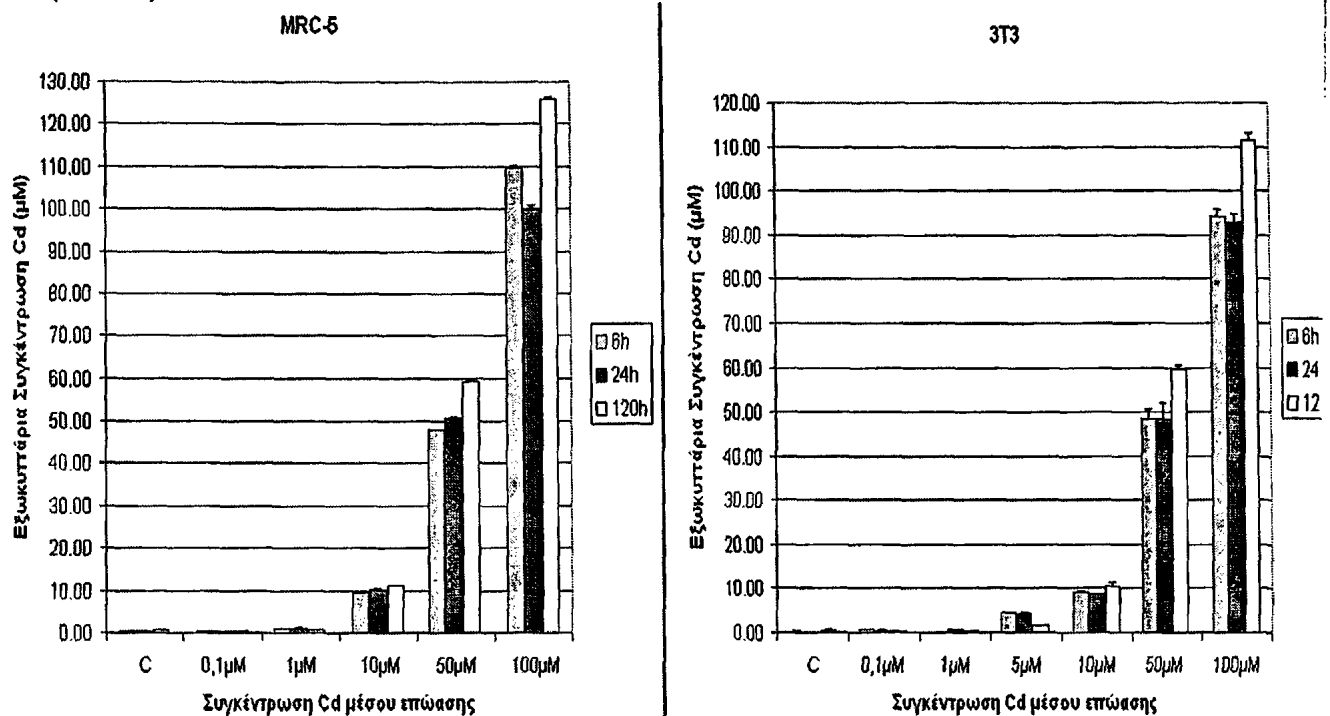
Πίνακας 18. Στατιστικές διαφορές (p) της ικανότητας σχηματισμού αποικιών μεταξύ των κυττάρων MRC-5 και 3T3.

Χρόνος επώασης	Επώαση	3T3- MRC-5
24h	CONTROL	0,004
	0.1 μM	0,031
	1μM	0,000
	10μM	0,111
	50 μM	0,000



3. Συγκέντρωση του Cd στο μέσο επώασης των κυττάρων 3T3 και MRC-5

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης (6, 24 και 120 ώρες) των κυττάρων με τα διαλύματα των μετάλλων, το θρεπτικό μέσο συλλέχθηκε και οξινίστηκε. Οι συγκεντρώσεις του Cd στο μέσο επώασης μετρήθηκαν με Φασματοφωτόμετρο Ατομικής Απορρόφησης Perkin-Elmer 560 με Φλόγα (FAAS).



Γράφημα 5. Συγκέντρωση εξωκυττάριου Cd στο μέσο επώασης των κυττάρων MRC-5 και 3T3 μετά από επώασή τους σε CdCl₂.

Στα κύτταρα MRC-5 η εξωκυττάρια συγκέντρωση του Cd στο μέσο επώασης για τις χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0,1μM) παραμένει ίδια σε όλους τους χρόνους επώασης, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 10, 50 και 100μM Cd παρατηρείται σημαντική αύξηση ($p=0,000$) του μετάλλου στο μέσο επώασης προϊόντος του χρόνου έκθεσης. Η εξωκυττάρια συγκέντρωση του Cd μετά από βραχεία έκθεση (6 ώρες) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (10, 50 και 100 μM) CdCl₂ είναι σημαντικά χαμηλότερη ($p=0,000$) από αυτήν της πιο μακρόχρονης έκθεσης (24 και 120 ώρες). Μπορούμε επομένως να υποθέσουμε ότι σε αυτά τα κύτταρα για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd, μετά τις 24 ώρες επώασης, αρχίζει παθητική έξοδος της ενδοκυττάριας ποσότητας του μετάλλου, αποτελέσματα που ενισχύονται και από την παρατηρηθείσα βιωσιμότητα.

Στα κύτταρα 3T3 η εξωκυττάρια συγκέντρωση του Cd στο μέσο επώασης για τις χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0,1 και 1μM) μειώνεται σημαντικά προϊόντος του χρόνου επώασης, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 10, 50 και 100μM Cd παρατηρείται σημαντική αύξηση



του μετάλλου στο μέσο επώασης για τις 120 ώρες έκθεσης ($p=0,000$). Η εξωκυτάρια συγκέντρωση του Cd μετά από βραχεία έκθεση (6 ώρες) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 10, 50 και 100 μ M CdCl₂ δε διαφέρει σημαντικά από αυτήν της πιο μακρόχρονης έκθεσης (24 ώρες). Μπορούμε επομένως να υποθέσουμε ότι για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd μετά τις 24 ώρες επώασης αρχίζει παθητική έξοδος της ενδοκυττάριας ποσότητας του μετάλλου. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται και από την παρατηρηθείσα βιωσιμότητα.

Πίνακας 19. Συγκέντρωση εξωκυττάριας Cd στο μέσο επώασης των κυττάρων MRC-5 και 3T3 μετά από επώασή τους σε CdCl₂.

MRC-5	Control	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M
6h	0,27 \pm 0,09	0,27 \pm 0,09	0,86 \pm 0,10	9,64 \pm 0,14	47,85 \pm 0,19	109,53 \pm 0,82
24h	0,24 \pm 0,06	0,26 \pm 0,08	1,17 \pm 0,08	10,12 \pm 0,52	50,81 \pm 0,19	99,74 \pm 0,93
120h	0,52 \pm 0,13	0,30 \pm 0,05	0,56 \pm 0,05	11,13 \pm 0,09	59,30 \pm 0,37	125,91 \pm 0,42

3T3	Control	0,1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M
6h	0,15 \pm 0,17	0,59 \pm 0,05		4,54 \pm 0,09	9,32 \pm 0,10	48,46 \pm 2,08	94,18 \pm 1,71
24h	0,02 \pm 0,04	0,36 \pm 0,21	0,73 \pm 0,07	4,22 \pm 0,20	8,76 \pm 0,13	48,37 \pm 3,48	93,00 \pm 1,82
120h	0,36 \pm 0,24	0,20 \pm 0,08	0,36 \pm 0,10	1,55 \pm 0,11	10,45 \pm 1,15	59,53 \pm 0,84	111,35 \pm 1,90

Πίνακας 20. Στατιστικές διαφορές (p) της συγκέντρωσης εξωκυττάριας Cd στο μέσο επώασης των κυττάρων MRC-5 και 3T3 (ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα).

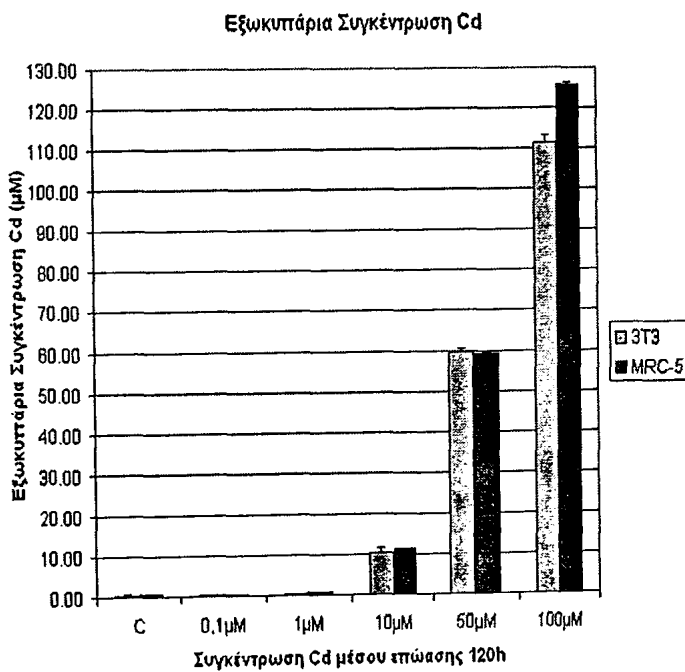
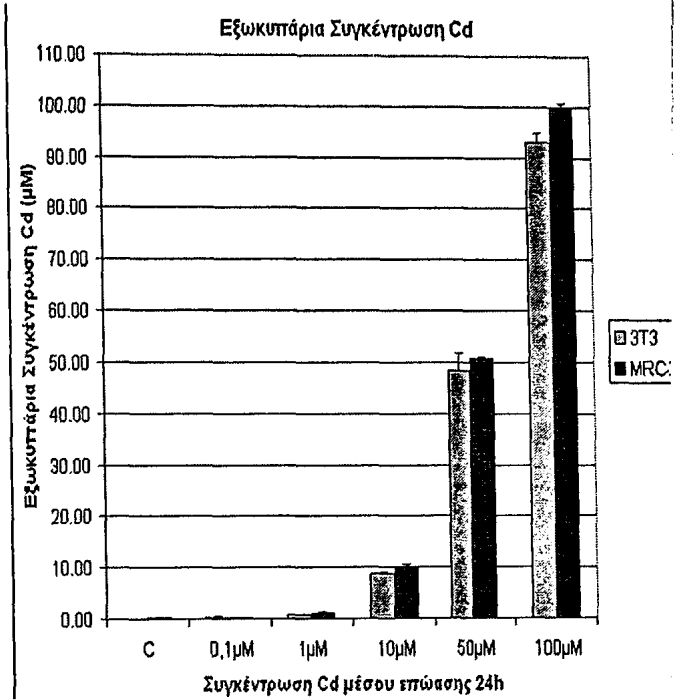
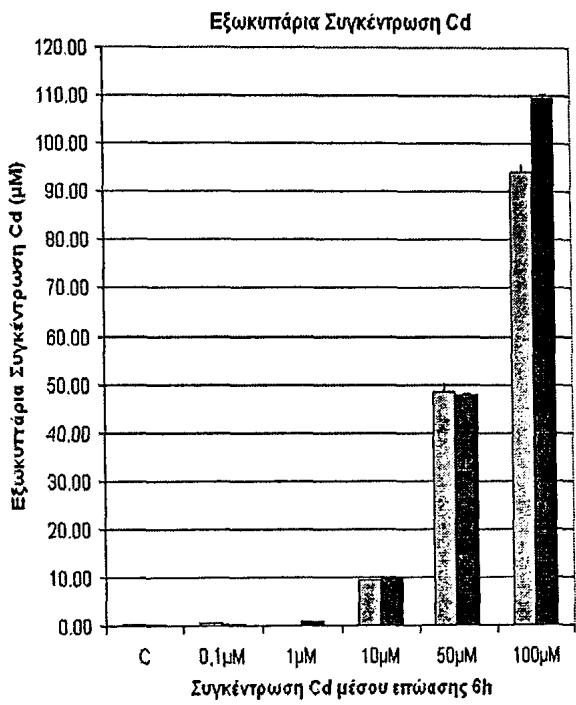
Κύτταρα	CONTROL	0.1 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M
3T3	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
MRC-5	0,000	0,767	0,000		0,003	0,000	0,000

Πίνακας 21. Στατιστικές διαφορές (p) της συγκέντρωσης εξωκυττάριας Cd στο μέσο επώασης των κυττάρων MRC-5 και 3T3 (εκ των υστέρων έλεγχοι).

Κύτταρα	Επώαση	6h-24h	24h-120h	6h-120h
3T3	CONTROL	0,037	0,000	0,066
	0.10 μ M	0,088	0,013	0,000
	1 μ M			
	5 μ M	0,018	0,000	0,000
	10 μ M	0,000	0,000	0,114
	50 μ M	0,954	0,000	0,000
	100 μ M	0,230	0,000	0,000



MRC-5	CONTROL	0,484	0,000	0,015
	1 μ M	0,000	0,000	0,011
	10 μ M	0,149	0,006	0,000
	50 μ M	0,000	0,000	0,000
	100 μ M	0,000	0,000	0,000



Γράφημα 6. Συγκέντρωση εξωκυτάριου Cd στο μέσο επώασης κυττάρων 3T3 και MRC-5 μετά από επώασή τους σε CdCl₂ επί 6h, 24h και 120h.

Συγκρίνοντας τις δύο κυτταρικές σειρές μεταξύ τους, παρατηρείται ότι η εξωκυτάρια συγκέντρωση Cd στα κύτταρα 3T3 μετά από βραχεία έκθεση (6 ώρες) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 10 και 100μM Cd είναι σημαντικά χαμηλότερη από των κυττάρων MRC-5 ($p=0,029$ και $p=0,000$ αντίστοιχα), ενώ το αντίθετο συμβαίνει στη χαμηλή συγκέντρωση των 0,1μM με την εξωκυτάρια συγκέντρωση Cd στα 3T3 να υπερέχει σημαντικά ($p=0,005$) έναντι των MRC-5. Στις 24 ώρες επώασης με Cd η εξωκυτάρια συγκέντρωση Cd των κυττάρων 3T3 σε όλες σχεδόν τις συγκεντρώσεις (1, 10, 50 και 100μM) Cd, αλλά και στα κύτταρα ελέγχου εξακολουθεί να είναι σημαντικά χαμηλότερη από των κυττάρων MRC-5 ($p=0,000$), ενώ στη χαμηλή συγκέντρωση των 0,1μM δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά. Στις 120 ώρες επώασης με Cd η εξωκυτάρια συγκέντρωση Cd των κυττάρων 3T3 στην υψηλή συγκέντρωση των 100μM Cd εξακολουθεί να είναι σημαντικά χαμηλότερη από των κυττάρων MRC-5 ($p=0,000$), όπως και στις χαμηλές συγκεντρώσεις των 0,1 και 1μM ($p=0,047$ και $p=0,002$ αντίστοιχα). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι στα κύτταρα MRC-5 παρατηρείται υψηλότερη εξωκυτάρια συγκέντρωση Cd από αυτήν των κυττάρων 3T3, γεγονός το οποίο υποδηλώνει πιθανή έξοδο του μετάλλου και το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με την αυξημένη βιωσιμότητα των MRC-5

Πίνακας 22. Συγκέντρωση εξωκυτάριου Cd στο μέσο επώασης κυττάρων 3T3 και MRC-5 μετά από επώασή τους σε CdCl₂ επί 6h, 24h και 120h.

6h	Control	0,1μM	1μM	5μM	10μM	50μM	100μM
3T3	0,15±0,17	0,59±0,05		4,54±0,09	9,32±0,10	48,46±2,08	94,18±1,71
MRC-5	0,27±0,09	0,27±0,09	0,86±0,10		9,64±0,14	47,85±0,19	109,53±0,82
24h	Control	0,1μM	1μM	5μM	10μM	50μM	100μM
3T3	0,02±0,04	0,36±0,21	0,73±0,07	4,22±0,20	8,76±0,13	48,37±3,48	93,00±1,82
MRC-5	0,24±0,06	0,26±0,08	1,17±0,08		10,12±0,52	50,81±0,19	99,74±0,93
120h	Control	0,1μM	1μM	5μM	10μM	50μM	100μM
3T3	0,36±0,24	0,20±0,08	0,36±0,10	1,55±0,11	10,45±1,15	59,53±0,84	111,35±1,90
MRC-5	0,52±0,13	0,30±0,05	0,56±0,05		11,13±0,09	59,30±0,37	125,91±0,42

Πίνακας 23. Στατιστικές διαφορές (p) της συγκέντρωσης εξωκυτάριου Cd στο μέσο επώασης μεταξύ των κυττάρων MRC-5 και 3T3.

Κύτταρα	Επώαση	6h	24h	120h
3T3- MRC-5	CONTROL	0,294	0,000	0,154
	0.1 μM	0,005	0,157	0,047
	1μM		0,000	0,002
	10μM	0,029	0,000	0,340
	50 μM	0,640	0,050	0,682
	100μM	0,000	0,000	0,000



Πίνακας 24. Συσχέτιση συγκεντρώσεων -βιωσιμότητας.

Κύτταρα	Επώαση	6h	24h	120h
MRC-5	CONTROL	-0,89	0,007	0,47
	0.1 μM	-0,11	0,36	0,10
	1 μM	-0,99	0,17	0,92
	10 μM	0,23	0,70	-0,69
	50 μM	-0,78	-0,49	0,51
	100 μM	0,89	0,07	
3T3	CONTROL	0,11	0,11	-0,41
	0.1 μM	0,97	-0,45	0,044
	1 μM		0,27	-0,68
	10 μM	0,99	0,44	
	50 μM	-0,43	-0,29	
	100 μM	0,99		



II. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ *In Vivo*

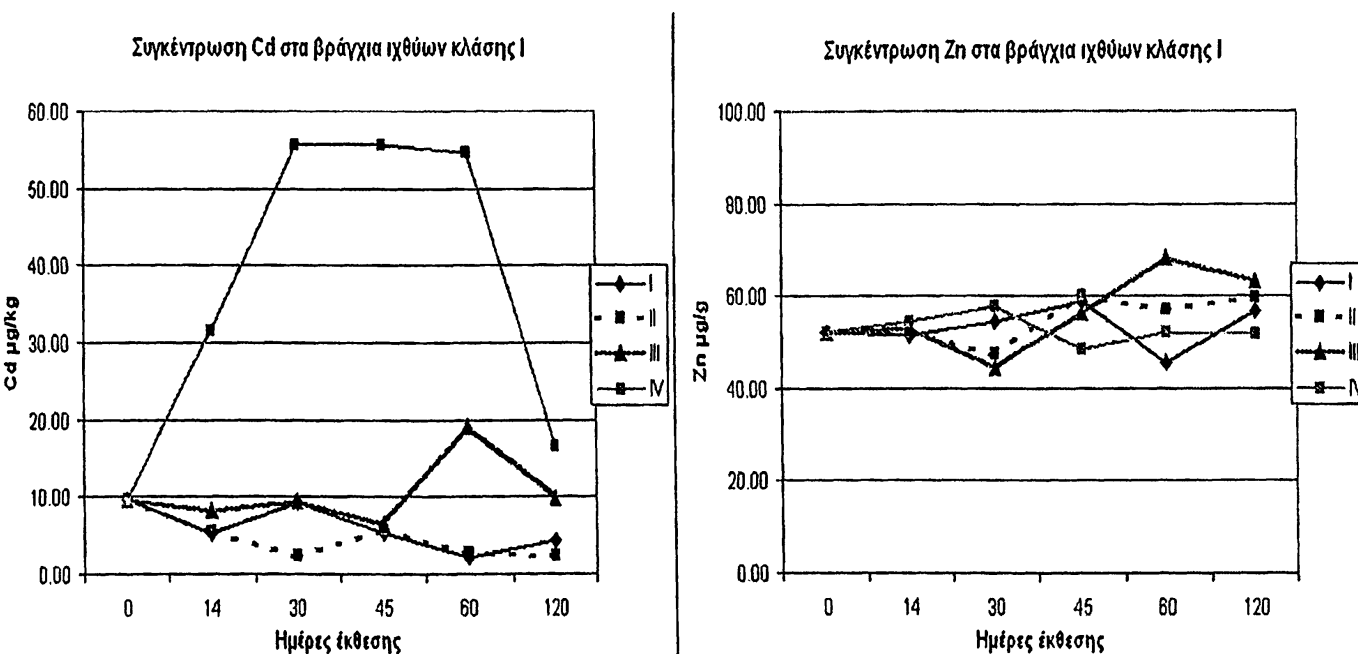
1. Κινητική Μετάλλων Καδμίου και Ψευδαργύρου στους ιστούς του *Carassius auratus*

Για τη μελέτη της κινητικής των μετάλλων στους ιστούς προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των μετάλλων στους ιστούς σε δεδομένες χρονικές στιγμές στη διάρκεια του πειράματος με τη μέθοδο της Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Απορρόφησης. Σύμφωνα με αυτήν, μετά το πέρας του χρόνου έκθεσης (0, 14, 30, 45, 60 και 120 ημέρες) των ιχθύων στα διαλύματα των μετάλλων, λήφθηκαν δείγματα ιστών από ιχθύς όλων των ενυδρείων, τα οποία προετοιμάστηκαν κατάλληλα μέσω όξινης πέψης με π.ΗΝΟ₃ και μετρήθηκε το περιεχόμενό τους σε μέταλλα. Οι ιστοί οι οποίοι αναλύθηκαν ήταν τα βράγχια, το ήπαρ, οι νεφροί, ο μυϊκός ιστός και οι γονάδες.

α. Βράγχια

Για τη μελέτη της συσσώρευσης των μετάλλων στα βράγχια των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των μετάλλων στα βράγχια σε όλες τις πειραματικές συνθήκες και στις δύο ηλικιακές κλάσεις.

Κλάση I



Γράφημα 7. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στα βράγχια των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Στα νεαρότερα ψάρια (κλάση I), η συγκέντρωση Cd στα βράγχια των ιχθύων των ενυδρείων I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) εμφανίζεται σταθερά χαμηλή καθ' όλη τη



διάρκεια του πειράματος έως τις 120 ημέρες, με μία μικρή διαφοροποίηση στις 30 ημέρες, όπου στο ενυδρείο I εμφανίζεται η σημαντικά υψηλότερη τιμή Cd ($p=0,00$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Πάντως τα επίπεδα Cd στα βράγχια των ιχθύων των ενυδρείων I και II είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τις τιμές κατά την έναρξη του πειράματος (0 ημέρες), ειδικά μετά τις 45 ημέρες ($p=0,03$ και $p=0,01$), πιθανώς επειδή τα ψάρια ομοιοστατούν.

Στα βράγχια των ιχθύων του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd) η συσσώρευση Cd είναι σχεδόν σταθερή έως τις 45 ημέρες έκθεσης, σε χαμηλά παρόμοια επίπεδα με των ομάδων I και II, διπλασιάζεται στις 60 ημέρες έκθεσης, ενώ μειώνεται εκ νέου στα αρχικά επίπεδα στις 120 ημέρες έκθεσης. Πάντως μετά τις 45 ημέρες η συγκέντρωση Cd διαφοροποιείται σημαντικά από τις χαμηλότερες τιμές των ομάδων I και II ($p=0,00$ και $p=0,02$).

Η συσσώρευση Cd στα βράγχια των ιχθύων του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd) διαφοροποιείται από των υπόλοιπων ομάδων ήδη από τις 14 ημέρες έκθεσης (οπότε τριπλασιάζεται), με σημαντικά υψηλότερες τιμές από των ενυδρείων I, II και III, αλλά και σε σχέση με τις αρχικές τιμές (0 ημέρες) ($p=0,00$ σε όλες τις περιπτώσεις). Από τις 30 έως τις 60 ημέρες έκθεσης τα επίπεδα του Cd στα βράγχια των ιχθύων της ομάδας IV παραμένουν σταθερά υψηλά, σε πενταπλάσιες τιμές από των ενυδρείων I, II και III ($p=0,00$ σε όλες τις περιπτώσεις), ενώ από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, η συσσώρευση Cd στα βράγχια μειώνεται επίσης, σε σημαντικά υψηλότερες τιμές όμως από των ομάδων I και II ($p=0,00$), πιθανώς επειδή τα βράγχια ομοιοστατούν όσον αφορά τις συγκεντρώσεις Cd. Πάντως η συσσώρευση Cd στα βράγχια των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (ενυδρείο IV) είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με αυτήν που παρατηρείται στους ιχθύς που εκτέθηκαν στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (ενυδρείο III) σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ($p=0,00$), καθώς τα βράγχια αποτελούν τον πρώτο ιστό-στόχο, τον οποίο πλήττουν τα μέταλλα στους υδρόβιους οργανισμούς.

Πίνακας 25. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Cd στα βράγχια ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	0-I	0-II	0-III	0-IV	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
14	0.24	0.26	0.81	0.01	0.96	0.45	0.00	0.51	0.00	0.00
30	0.84	0.01	0.97	0.00	0.00	0.95	0.00	0.07	0.00	0.00
45	0.03	0.06	0.07	0.00	0.11	0.00	0.00	0.45	0.00	0.00
60	0.01	0.03	0.20	0.00	0.77	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
120	0.06	0.01	0.48	0.51	0.28	0.11	0.00	0.02	0.00	0.12

Στα νεαρότερα ψάρια (κλάση I), η συγκέντρωση Zn στα βράγχια των ιχθύων των ενυδρείων I (νερό λίμνης, $\sim 0,05\text{ppb}$ Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, $\sim 0,10\text{ppb}$ Cd) δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος έως τις 120 ημέρες, με μία μικρή



διαφοροποίηση στις 30 και στις 60 ημέρες σε σχέση με την ομάδα III ($p=0,05$ και $p=0,01$). Πάντως τα επίπεδα Zn στα βράγχια των ιχθύων των ενυδρείων I και II εμφανίζουν μία μικρή αύξηση σε σχέση με τις τιμές κατά την έναρξη του πειράματος (0 ημέρες), έως τις 45 ημέρες, οπότε και μειώνονται εκ νέου στις αρχικές τιμές τους.

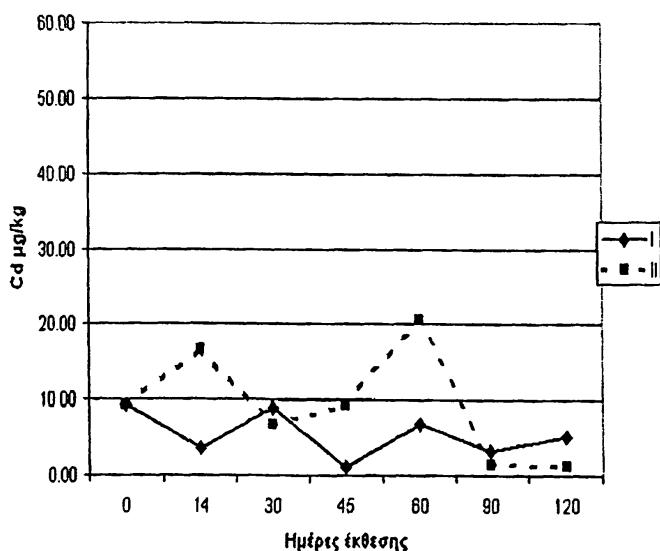
Στους ιχθύς του ενυδρείου III η συγκέντρωση Zn στα βράγχια αυξάνεται προοδευτικά από τις 30 έως τις 60 ημέρες έκθεσης με 1ppb Cd, ενώ στη συνέχεια παρατηρείται μία μικρή μείωση στη συγκέντρωσή του στις 120 ημέρες. Στους ιχθύς του ενυδρείου IV ο Zn στα βράγχια παρουσιάζει μία μικρή αύξηση έως τις 30 ημέρες έκθεσης, αντίθετα με το ενυδρείο III όπου εμφανίζεται σημαντική μείωση ($p=0,01$), ενώ κατόπιν παραμένει σταθερός έως τις 120 ημέρες έκθεσης και μάλιστα σε χαμηλότερα επίπεδα από του ενυδρείου III, ειδικά στις 120 ημέρες έκθεσης σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ($p=0,02$), δείχνοντας ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd επηρεάζουν λιγότερο τη συγκέντρωση Zn στα βράγχια.

Πίνακας 26. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Zn στα βράγχια ιχθύων κλάσης I.

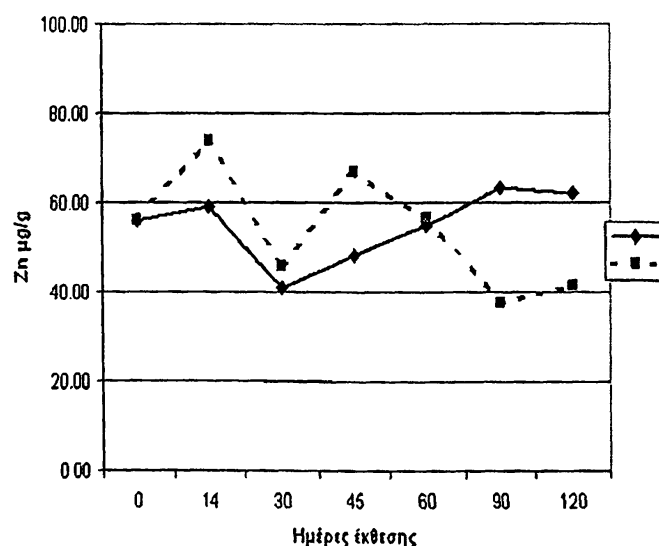
Ημέρες	0-I	0-II	0-III	0-IV	I -II	I -III	I -IV	II -III	II -IV	III-IV
14	0.87	0.99	0.90	0.74	0.89	0.79	0.65	0.90	0.76	0.87
30	0.65	0.39	0.13	0.26	0.21	0.05	0.51	0.59	0.06	0.01
45	0.53	0.20	0.49	0.40	0.85	0.79	0.18	0.57	0.04	0.16
60	0.21	0.60	0.05	0.99	0.22	0.01	0.30	0.30	0.62	0.07
120	0.61	0.31	0.01	0.96	0.77	0.13	0.62	0.12	0.33	0.02

Κλάση II

Συγκέντρωση Cd στα βράγχια ιχθύων κλάσης II



Συγκέντρωση Zn στα βράγχια ιχθύων κλάσης II



Γράφημα 8. Συσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στα βράγχια των ιχθύων κλάσης II.



Στα μεγαλύτερα ψάρια (κλάση II), η συγκέντρωση Cd στα βράγχια των ιχθύων του ενυδρείου I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) εμφανίζεται χαμηλή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος έως τις 120 ημέρες, με μία διαφοροποίηση στις 45 και στις 120 ημέρες, όπου στο ενυδρείο I εμφανίζονται συγκεντρώσεις Cd που διαφέρουν σημαντικά ($p=0,02$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (ενυδρείο II). Κατά τα άλλα στα βράγχια των ιχθύων του ενυδρείου II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) τα επίπεδα Cd παρουσιάζονται υψηλότερα σε σχέση με του ενυδρείου I, χωρίς όμως σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ή με τα νεαρότερα ψάρια (κλάση I) στις ίδιες συνθήκες.

Πίνακας 27. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Cd στα βράγχια ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	0-I	0-II	I-II
14	0.29	0.26	0.14
30	0.86	0.56	0.60
45	0.07	0.99	0.02
60	0.55	0.41	0.34
90	0.19	0.09	0.36
120	0.19	0.06	0.02

Στα μεγαλύτερα ψάρια (κλάση II), η συγκέντρωση Zn στα βράγχια των ιχθύων των ενυδρείων I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) παρουσιάζει κάποιες διακυμάνσεις καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, όχι όμως σημαντικές μεταβολές έως τις 120 ημέρες. Επιπλέον τα επίπεδα Zn στα βράγχια των ιχθύων των ενυδρείων I και II δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ τους ή με τα νεαρότερα ψάρια (κλάση I) στις ίδιες συνθήκες. Επομένως συγκρίνοντας τις δύο ηλικιακές κλάσεις μεταξύ τους, στα βράγχια δεν παρατηρείται καμία διαφορά στη συγκέντρωση των μετάλλων ανάλογα με την ηλικία.

Πίνακας 28. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Zn στα βράγχια ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	0-I	0-II	I-II
14	0.90	0.71	0.71
30	0.55	0.69	0.60
45	0.79	0.68	0.38
60	0.95	0.98	0.88
90	0.97	0.49	0.35
120	0.86	0.75	0.66

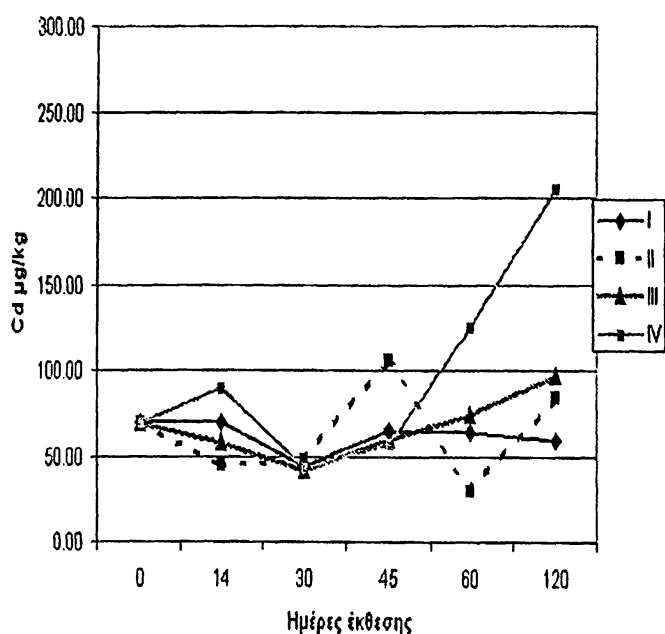


β. Νεφροί

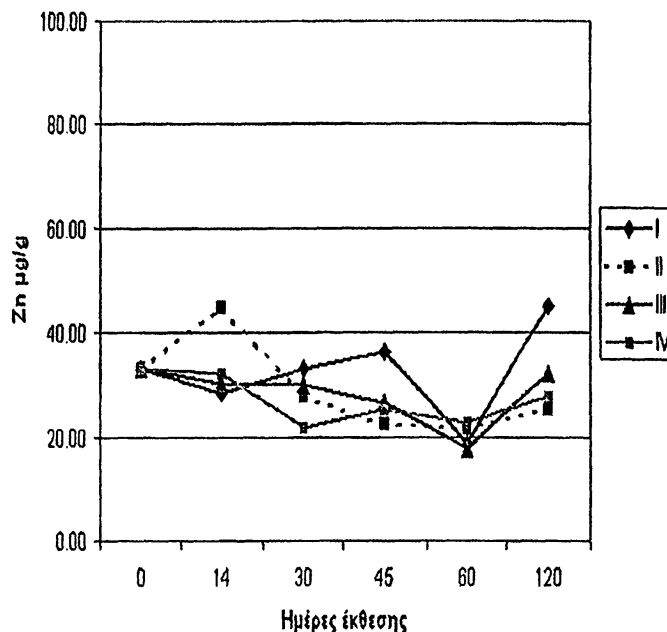
Για τη μελέτη της συσσώρευσης των μετάλλων στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των μετάλλων στους νεφρούς σε όλες τις πειραματικές συνθήκες και στις δύο ηλικιακές κλάσεις και στα δύο φύλα.

Κλάση I

Συγκέντρωση Cd στους νεφρούς ιχθύων κλάσης I



Συγκέντρωση Zn στους νεφρούς ιχθύων κλάσης I



Γράφημα 9. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στους νεφρούς των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Εξετάζοντας τη συσσώρευση των μετάλλων στους νεφρούς των νεαρότερων ιχθύων (κλάση I), η συγκέντρωση Cd στους νεφρούς στα ενυδρεία I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) φαίνεται να μειώνεται σημαντικά τις πρώτες 30 ημέρες σε σχέση με τις αρχικές τιμές ($p=0,04$ για την ομάδα ελέγχου). Η ίδια τάση ισχύει και για τους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε Cd, για το ενυδρείο III (έκθεση σε 1ppb Cd, $p=0,00$) και για το ενυδρείο IV (έκθεση σε 5ppb Cd, $p=0,02$), των οποίων οι συγκεντρώσεις είναι σημαντικά μειωμένες στις 30 ημέρες σε σχέση με τις τιμές κατά την έναρξη του πειράματος.

Από τις 30 ημέρες και μετά όμως, όλες οι ομάδες εμφανίζουν αύξηση της συγκέντρωσης Cd στους νεφρούς και μετά τις 45 ημέρες δε, διαφοροποιούνται σαφώς τα επίπεδα Cd στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε Cd από τις ομάδες I και II. Έτσι η συσσώρευση Cd στους νεφρούς των ιχθύων του ενυδρείου IV είναι σημαντικά υψηλότερη από των ενυδρείων I ($p=0,01$ και $p=0,00$ στις 60 και 120 ημέρες αντίστοιχα) και II



($p=0,00$ και $p=0,01$ στις 60 και 120 ημέρες αντίστοιχα). Επίσης οι τιμές του ενυδρείου IV είναι σημαντικά υψηλότερες από τις αρχικές συγκεντρώσεις, αλλά και από του ενυδρείου III ($p=0,02$ και $p=0,00$ στις 60 και 120 ημέρες αντίστοιχα). Τέλος η συσσώρευση Cd στους νεφρούς του ενυδρείου III είναι σημαντικά υψηλότερη από της ομάδας ελέγχου στις 60 ημέρες έκθεσης ($p=0,02$).

Πίνακας 29. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Cd στους νεφρούς ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	0-I	0-II	0-III	0-IV	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
14	1.00	0.09	0.06	0.30	0.22	0.41	0.32	0.22	0.06	0.06
30	0.06	0.04	0.00	0.02	0.73	0.90	0.98	0.52	0.66	0.90
45	0.65	0.29	0.40	0.57	0.25	0.72	0.73	0.15	0.15	0.87
60	0.63	0.01	0.77	0.02	0.03	0.54	0.01	0.02	0.00	0.02
120	0.45	0.61	0.08	0.00	0.42	0.07	0.00	0.61	0.01	0.00

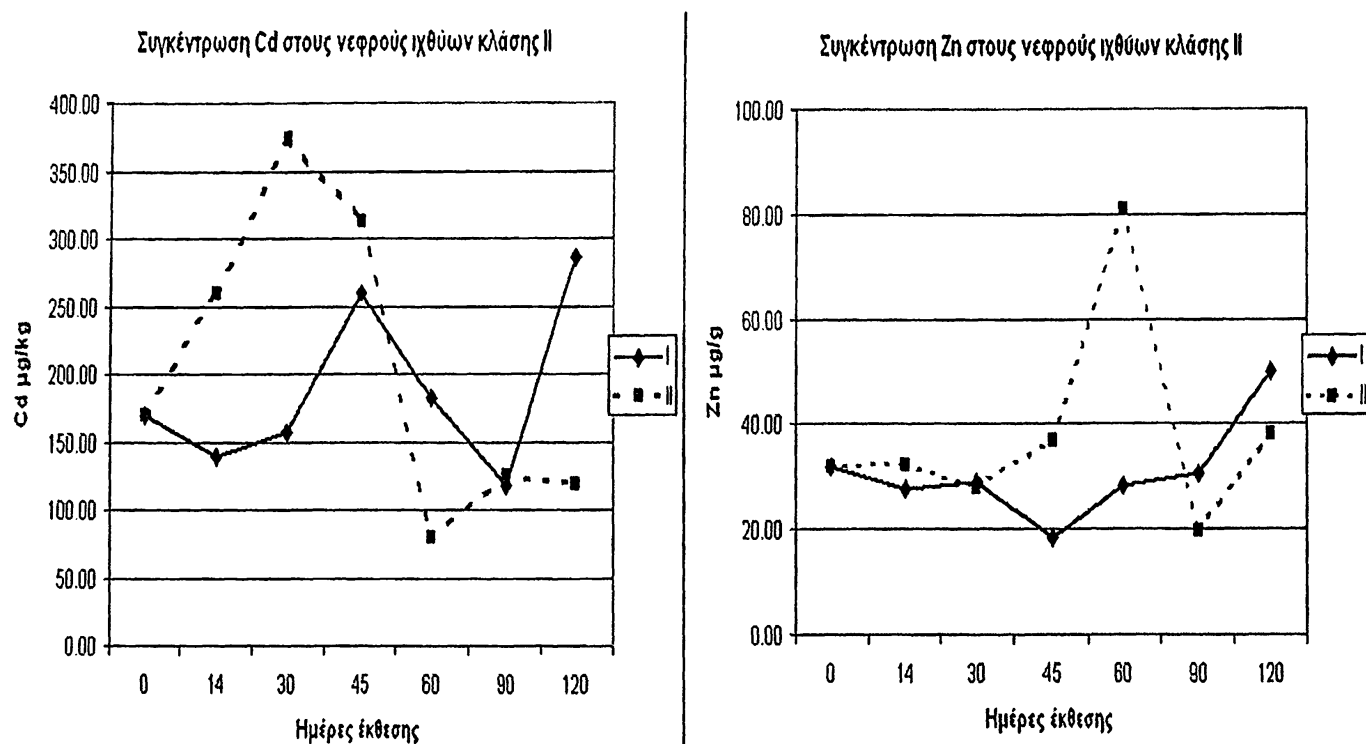
Όσον αφορά τη συγκέντρωση Zn στους νεφρούς των ιχθύων της κλάσης I στο ενυδρείο I (νερό λίμνης, $\sim 0,05 \mu\text{g/g}$ Cd) εμφανίζεται σχετικά σταθερή μέχρι τις 45 ημέρες, μειώνεται στην ελάχιστη τιμή της στις 60 ημέρες και αυξάνεται εκ νέου στις 120 ημέρες. Στο ενυδρείο II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, $\sim 0,10 \mu\text{g/g}$ Cd), μετά τις 14 ημέρες ο Zn στους νεφρούς μειώνεται προοδευτικά έως τις 60 ημέρες, οπότε αυξάνεται εκ νέου έως τις 120 ημέρες. Η ίδια τάση ακολουθείται και για τη συγκέντρωση Zn στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε 1 και $5 \mu\text{g/g}$ Cd αντίστοιχα (ενυδρεία III και IV). Πάντως καμία από τις διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντική, πλην της σημαντικά υψηλότερης τιμής Zn στο ενυδρείο I στις 120 ημέρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0,00$).

Πίνακας 30. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Zn στους νεφρούς ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	0-I	0-II	0-III	0-IV	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
14	0.58	0.38	0.71	0.91	0.10	0.62	0.52	0.13	0.23	0.58
30	1.00	0.50	0.70	0.21	0.25	0.53	0.06	0.39	0.14	1.00
45	0.86	0.27	0.41	0.39	0.36	0.45	0.42	0.25	0.59	0.86
60	0.11	0.19	0.12	0.27	0.52	0.83	0.40	0.51	0.79	0.11
120	0.23	0.39	0.74	0.69	0.00	0.18	0.13	0.45	0.79	0.23



Κλάση II



Γράφημα 10. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στους νεφρούς των ιχθύων κλάσης II.

Στα ιχθύς της κλάσης II, η συγκέντρωση Cd στους νεφρούς των ιχθύων του ενυδρείου I (νερό λίμνης, $\sim 0,05 \text{ppb Cd}$) αρχικά μειώνεται έως τις 30 ημέρες σε σχέση με την έναρξη του πειράματος, κατόπιν αυξάνεται έως τις 45 ημέρες, οπότε μειώνεται εκ νέου έως τις 90 ημέρες στην ελάχιστη τιμή της. Ακολουθεί σημαντική αύξηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις 120 ημέρες ($p=0,02$). Πάντως τα επίπεδα Cd στο ενυδρείο I μέχρι τις 45 ημέρες είναι χαμηλότερα από του ενυδρείου II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, $\sim 0,10 \text{ppb Cd}$), από εκεί και πέρα όμως γίνονται υψηλότερα. Συγκρίνοντας τις δύο ηλικιακές κλάσεις μεταξύ τους, στους νεφρούς των μεγαλύτερων ατόμων (κλάση II) παρατηρούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου στις ίδιες συνθήκες σε σχέση με τα νεαρότερα άτομα, λόγω μεγαλύτερης διάρκειας έκθεσης σε μέταλλα.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση Zn στους νεφρούς των ιχθύων του ενυδρείου I (νερό λίμνης, $\sim 0,05 \text{ppb Cd}$) οι τιμές του κυμαίνονται σχετικά σταθερές έως τις 90 ημέρες, οπότε παρατηρείται ιδιαίτερη αύξηση. Στο ενυδρείο II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, $\sim 0,10 \text{ppb Cd}$), εκτός μίας ασυνήθιστα υψηλής τιμής Zn στις 60 ημέρες, που διαφέρει σημαντικά από του ενυδρείου I ($p=0,01$), και από της έναρξης του πειράματος ($p=0,04$) δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση Zn σε σχέση με του ενυδρείου I ή με τα νεαρότερα ψάρια (κλάση I) στις ίδιες συνθήκες.

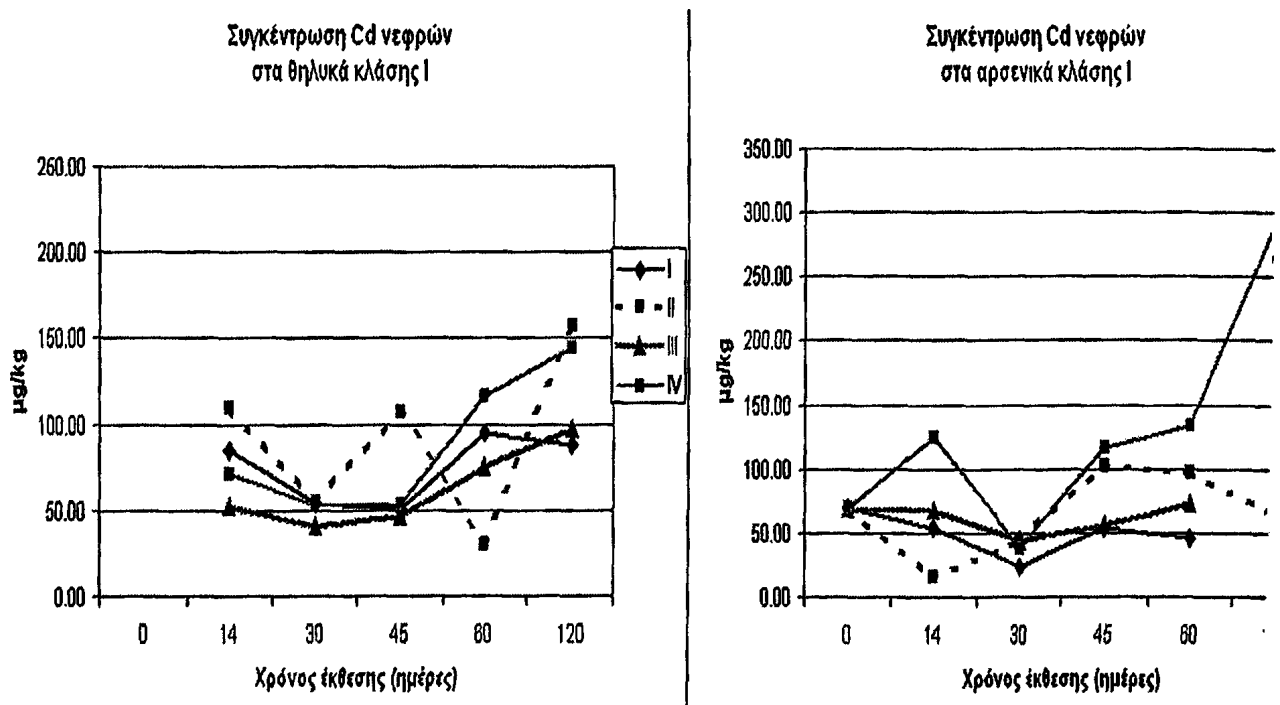
Πίνακας 31. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Cd στους νεφρούς ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	0-I	0-II	I -II
14	0.77	0.51	0.27
30	0.93		
45	0.42	0.30	0.47
60	0.92	0.42	0.34
90	0.60	0.78	0.93
120	0.31	0.64	0.02

Πίνακας 32. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Zn στους νεφρούς ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	0-I	0-II	I -II
14	0.68	0.98	0.65
30	0.80	0.72	0.86
45	0.26	0.67	0.06
60	0.72	0.04	0.01
90	0.93	0.44	0.49
120		0.82	

β1. Συσσώρευση Cd στους νεφρούς ανά φύλο



Γράφημα 11. Συσσώρευση καδμίου στους νεφρούς θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.



Στα θηλυκά η συγκέντρωση Cd στους νεφρούς στα ενυδρεία I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) φαίνεται να μειώνεται τις πρώτες 30 ημέρες, όπως και στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε 1 και 5ppb Cd (ενυδρεία III, IV αντίστοιχα). Από τις 45 ημέρες και μετά όμως, όλες οι ομάδες εμφανίζουν αύξηση της συγκέντρωσης Cd στους νεφρούς (εκτός της ομάδας ελέγχου) και στις 60 ημέρες δε, διαφοροποιούνται σαφώς τα επίπεδα Cd στους νεφρούς των ιχθύων της ομάδας ελέγχου (ενυδρείο II), και είναι σημαντικά χαμηλότερα από των ομάδων I (νερό λίμνης $p=0,04$) και IV (έκθεση σε 5ppb Cd, $p=0,01$). Η συσσώρευση Cd στους νεφρούς των θηλυκών του ενυδρείου IV κορυφώνεται στις 120 ημέρες έκθεσης σε Cd.

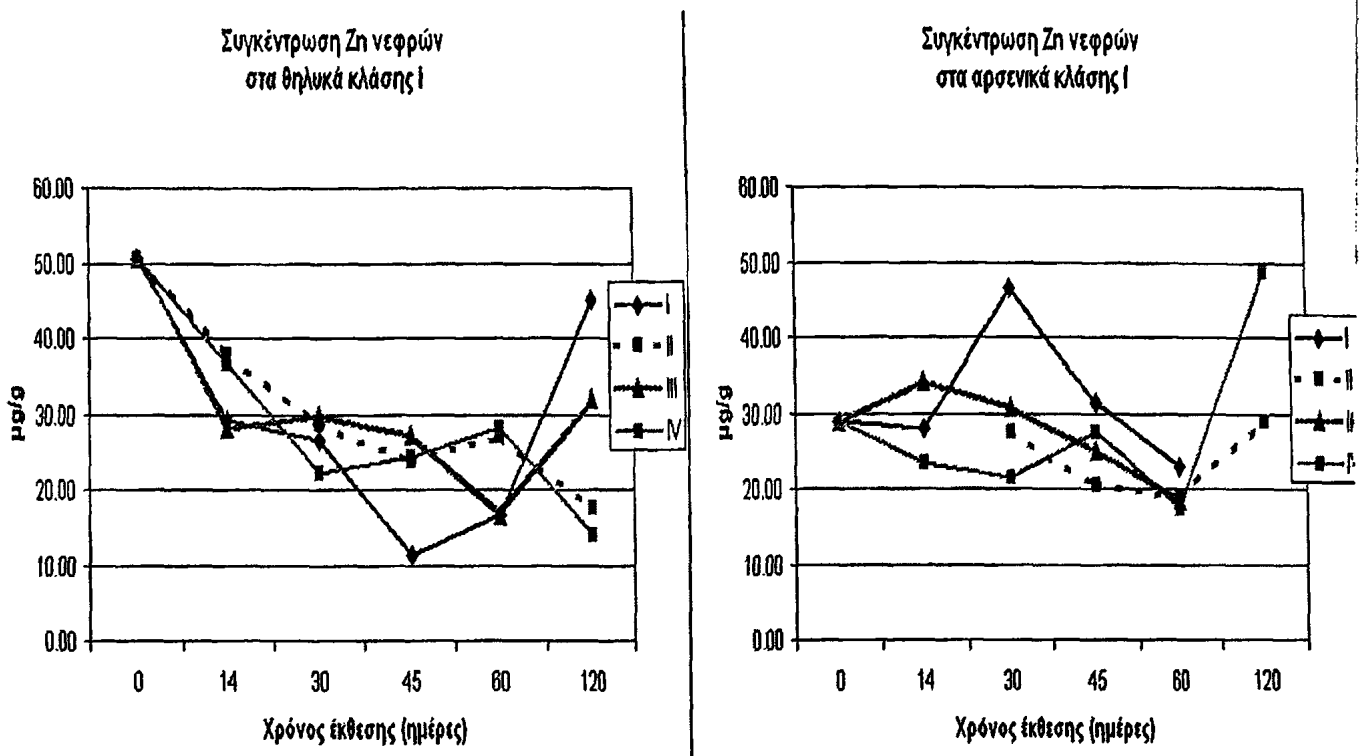
Στα αρσενικά όλων των ενυδρείων I, II, III και IV η συσσώρευση του Cd μειώνεται επίσης τις πρώτες 30 ημέρες, με την ομάδα I να έχει τότε σημαντικά χαμηλότερη τιμή από των ενυδρείων II και IV ($p=0,05$). Από εκεί και πέρα όμως, παρουσιάζεται αύξηση των επιπέδων Cd στους νεφρούς, στις 120 ημέρες έκθεσης μάλιστα στα αρσενικά του ενυδρείου IV, παρατηρείται η σημαντικά υψηλότερη τιμή Cd στους νεφρούς (σε σχέση με την ομάδα ελέγχου $p=0,00$), που είναι ταυτόχρονα διπλάσια από την αντίστοιχη στα θηλυκά. Γενικά πάντως, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων των μετάλλων στους νεφρούς ανάμεσα στα δύο φύλα.

Πίνακας 33. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd στους νεφρούς θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
Θ	14	0.73	0.05	0.53	0.35	0.53	0.22
	30	0.97	0.35	0.98	0.49	0.97	0.53
	45	0.31	0.50	0.87	0.29	0.18	0.69
	60	0.04	0.52	0.47	0.09	0.01	0.20
	120		0.79	0.30			0.36
Α	14		0.58	0.06			0.01
	30	0.05	0.14	0.05	0.99	0.18	0.09
	45	0.45	0.94		0.55		
	60	0.39	0.44	0.08	0.62	0.55	0.13
	120					0.00	



β2.Συσσώρευση Zn στους νεφρούς ανά φύλο



Γράφημα 12. Συσσώρευση Zn στους νεφρούς θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Στα θηλυκά η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς στα ενυδρεία I (νερό λίμνης, $\sim 0,05 \mu\text{ppb Cd}$) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, $\sim 0,10 \mu\text{ppb Cd}$) μειώνεται τις πρώτες 30 ημέρες, όπως και στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε 1 και $5 \mu\text{ppb Cd}$ (ενυδρεία III, IV αντίστοιχα). Από τις 45 ημέρες και μετά όμως, οι μεν ομάδες I και III εμφανίζουν αύξηση της συγκέντρωσης Zn στους νεφρούς έως τις 120 ημέρες, οι δε ομάδες II και IV αύξηση έως τις 60 ημέρες, και εκ νέου μείωση στις 120 ημέρες σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα από της ομάδας I ($p=0,00$ και στις δύο περιπτώσεις).

Στα αρσενικά των ενυδρείων I, II, III και IV η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς παραμένει σχετικά σταθερή, τις πρώτες 30 ημέρες, με μόνη εξαίρεση την ομάδα I η οποία έχει τότε σημαντικά υψηλότερη τιμή από των ενυδρείων II, III και IV ($p=0,00$, $p=0,04$ και $p=0,01$ αντίστοιχα). Από εκεί και πέρα παρουσιάζεται σχετική μείωση των επιπέδων Zn στους νεφρούς. Αντίθετα, στις 120 ημέρες έκθεσης των αρσενικών του ενυδρείου IV, παρατηρείται η υψηλότερη τιμή Zn στους νεφρούς, τετραπλάσια από την αντίστοιχη στα θηλυκά. Πάντως και στα δύο φύλα η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς εμφανίζεται μάλλον υψηλότερη στους ιχθύς που εκτέθηκαν στη χαμηλότερη συγκέντρωση Cd ($1 \mu\text{ppb}$).

Πίνακας 34. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Zn στους νεφρούς θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
Θ	14	0.40	0.75	0.18	0.28	0.88	0.10
	30	0.40	0.36	0.51	0.83	0.59	0.37
	45	0.14	0.01	0.16	0.51	0.97	0.59
	60	0.18	1.00	0.14	0.46	0.59	0.33
	120	0.00	0.18	0.00	0.34	0.54	0.11
Α	14		0.47	0.70			0.47
	30	0.00	0.04	0.01	0.38	0.22	0.22
	45	0.71	0.76	0.90	0.46	0.54	0.80
	60	0.67	0.63	0.26	0.96	0.56	0.87
	120					0.15	

Πίνακας 35. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ των δύο φύλων σε σχέση με τις συγκεντρώσεις Cd και Zn στους νεφρούς αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

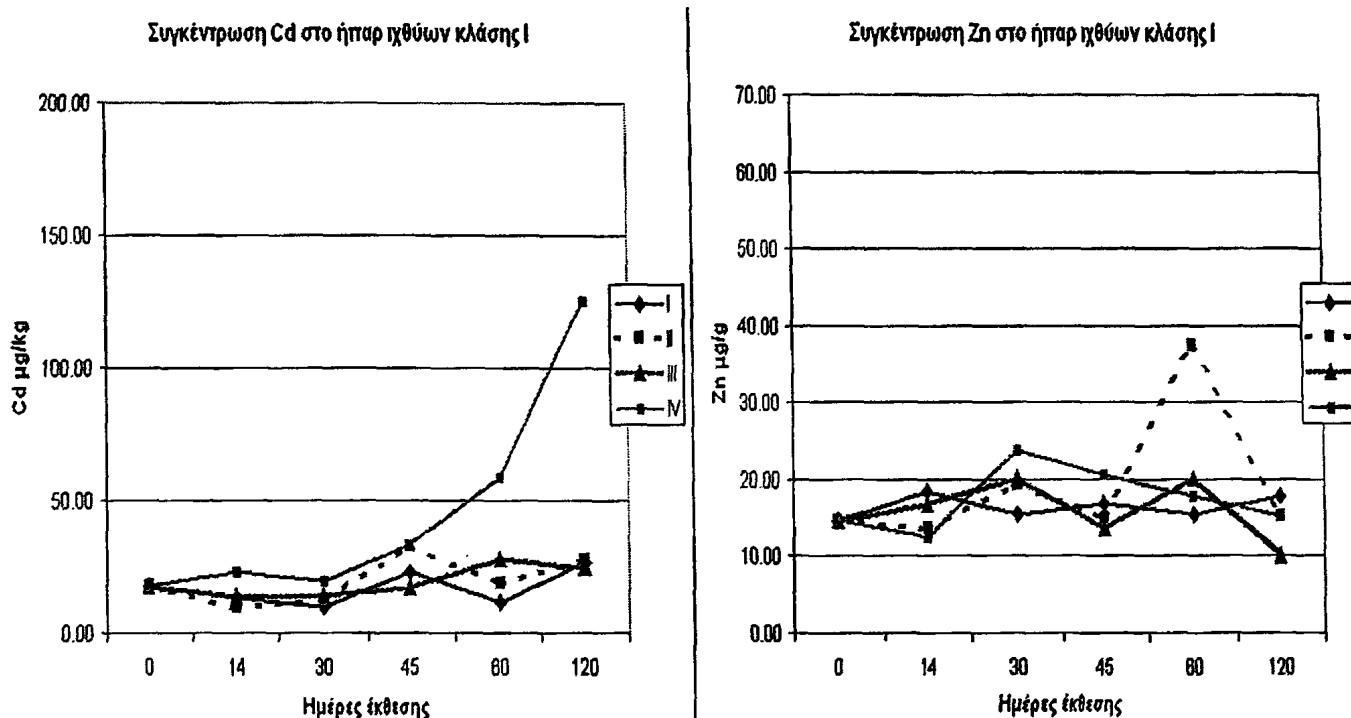
Μέταλλο	Ημέρες	I	II	III	IV
Cd	14	0.24	0.39	0.01	0.06
	30	0.13		0.79	0.35
	45	0.94	0.64	0.78	
	60	0.19	0.95	0.94	0.61
	120		0.14		0.06
Zn	14	0.85	0.91	0.21	0.22
	30	0.00		0.86	0.93
	45	0.51	0.95	0.56	0.73
	60	0.27	0.64	0.85	0.20
	120		0.53		0.06



γ. Ήπαρ

Για τη μελέτη της συσσώρευσης των μετάλλων στο ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, προσδιορίστηκε αφ' ενός το περιεχόμενο των μετάλλων στο ήπαρ σε όλες τις πειραματικές συνθήκες και στις δύο ηλικιακές κλάσεις και στα δύο φύλα και αφ' ετέρου ο ηπατοσωματικός δείκτης.

Κλάση I



Γράφημα 13. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στο ήπαρ των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Η συγκέντρωση Cd στο ήπαρ των νεαρότερων ιχθύων (κλάση I) που εκτράφηκαν στα ενυδρεία I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) φαίνεται να κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, με μία μικρή αύξηση σε σχέση με τις αρχικές τιμές στις 45 ημέρες. Η ίδια τάση ισχύει λίγο πολύ και για το ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε 1ppb Cd (ενυδρείο III) και για τους ιχθύς του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd), όπου όμως οι συγκεντρώσεις είναι σημαντικά αυξημένες στις 30 ημέρες σε σχέση με της ομάδας I (με $p=0,02$). Από τις 45 ημέρες και μετά όμως, η συσσώρευση Cd στο ήπαρ των ιχθύων του ενυδρείου IV αυξάνει, ώστε στις 60 ημέρες να είναι ήδη σημαντικά υψηλότερη από των υπόλοιπων ενυδρείων I, II και III (με $p=0,01$ και $p=0,00$ στις 60 και 120 ημέρες αντίστοιχα) και από τις αρχικές τιμές ($p=0,00$).



Πίνακας 36. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Cd στο ήπαρ ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	0-I	0-II	0-III	0-IV	I -II	I -III	I -IV	II -III	II -IV	III-IV
14	0.53	0.15	0.16	0.80	0.37	0.56	0.44	0.49	0.19	0.20
30	0.02	0.15	0.23	0.77	0.40	0.13	0.02	0.67	0.17	0.27
45	0.72	0.16	0.57	0.21	0.18	0.44	0.26	0.07	0.77	0.09
60	0.07	0.72	0.35	0.00	0.08	0.02	0.00	0.59	0.01	0.01
120	0.53	0.42	0.56	0.00	0.92	0.84	0.00	0.73	0.00	0.00

Όσον αφορά τη συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των ιχθύων της κλάσης I στο ενυδρείο I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd), αυτή εμφανίζεται σταθερή, χωρίς ιδιαίτερες διακυμάνσεις μέχρι τις 120 ημέρες και σε παρόμοια επίπεδα με της ομάδας ελέγχου (ενυδρείο II). Η μόνη εξαίρεση είναι η σημαντικά υψηλότερη τιμή Zn στο ήπαρ στην ομάδα ελέγχου στις 60 ημέρες, τόσο από της ομάδας I ($p=0,00$) όσο και από της ομάδας που εκτέθηκε σε 1ppb Cd (ενυδρείο III, $p=0,02$) και από τις αρχικές τιμές ($p=0,01$). Η συγκέντρωση αυτή δε, σαφώς είναι υψηλότερη και από τη σταθερά χαμηλή συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε 5ppb Cd (ενυδρείο IV), όχι όμως στατιστικώς σημαντική, και επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα στις 120 ημέρες. Στις 120 ημέρες επίσης, στους ιχθύς του ενυδρείου III η συσσώρευση Zn στο ήπαρ μειώνεται σημαντικά σε σχέση με των ομάδων I ($p=0,02$), II ($p=0,01$) και IV ($p=0,02$).

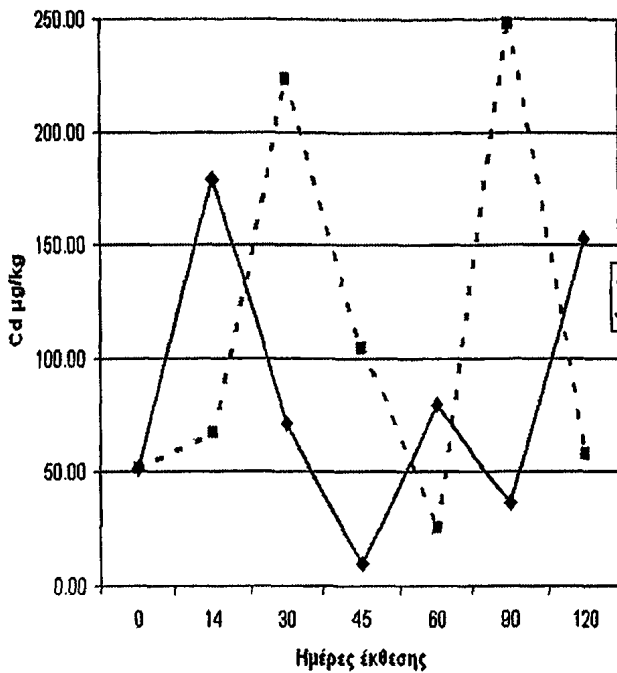
Πίνακας 37. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Zn στο ήπαρ ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	0-I	0-II	0-III	0-IV	I -II	I -III	I -IV	II -III	II -IV	III-IV
14	0.68	0.53	0.98	0.18	0.64	0.67	0.08	0.52	0.26	0.19
30	0.45	0.43	0.49	0.15	0.61	0.69	0.97	0.85	0.29	0.51
45	0.72	0.66	0.74	0.43	0.68	0.75	0.49	0.94	0.93	0.86
60	0.66	0.01	0.44	0.32	0.00	0.25	0.27	0.02	0.54	0.47
120	0.80	0.53	0.06	0.60	0.27	0.02	0.33	0.01	0.92	0.02

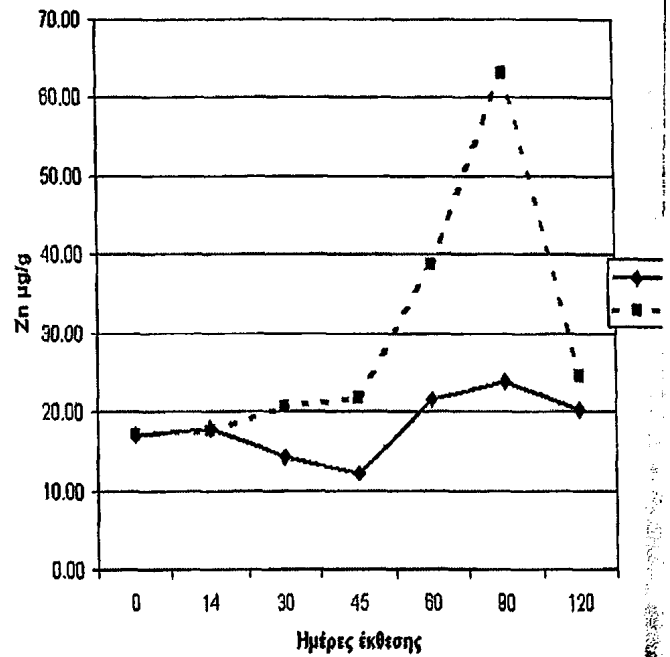


Κλάση II

Συγκέντρωση Cd στο ήπαρ ιχθύων κλάσης II



Συγκέντρωση Zn στο ήπαρ ιχθύων κλάσης II



Γράφημα 14. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στο ήπαρ των ιχθύων κλάσης II.

Η συσσώρευση Cd στο ήπαρ των μεγαλύτερων ιχθύων (κλάση II) των ενυδρείων I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) φαίνεται να κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα, με μεγάλες διακυμάνσεις καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η μόνη εξαίρεση που παρατηρείται, είναι η σημαντικά μειωμένη τιμή του ενυδρείου I στις 45 ημέρες ($p=0,02$). Συνολικά πάντως στα μεγαλύτερα ψάρια (κλάση II) παρατηρούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου στο ήπαρ σε σχέση με τα νεαρότερα, λόγω της μεγαλύτερης διάρκειας έκθεσης στα μέταλλα, με το ήπαρ όπως και τους νεφρούς να αποτελούν ιστό-στόχο και συνάμα θέση αποτοξικοποίησης από μέταλλα.

Πίνακας 38. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Cd στο ήπαρ ιχθύων κλάσης II

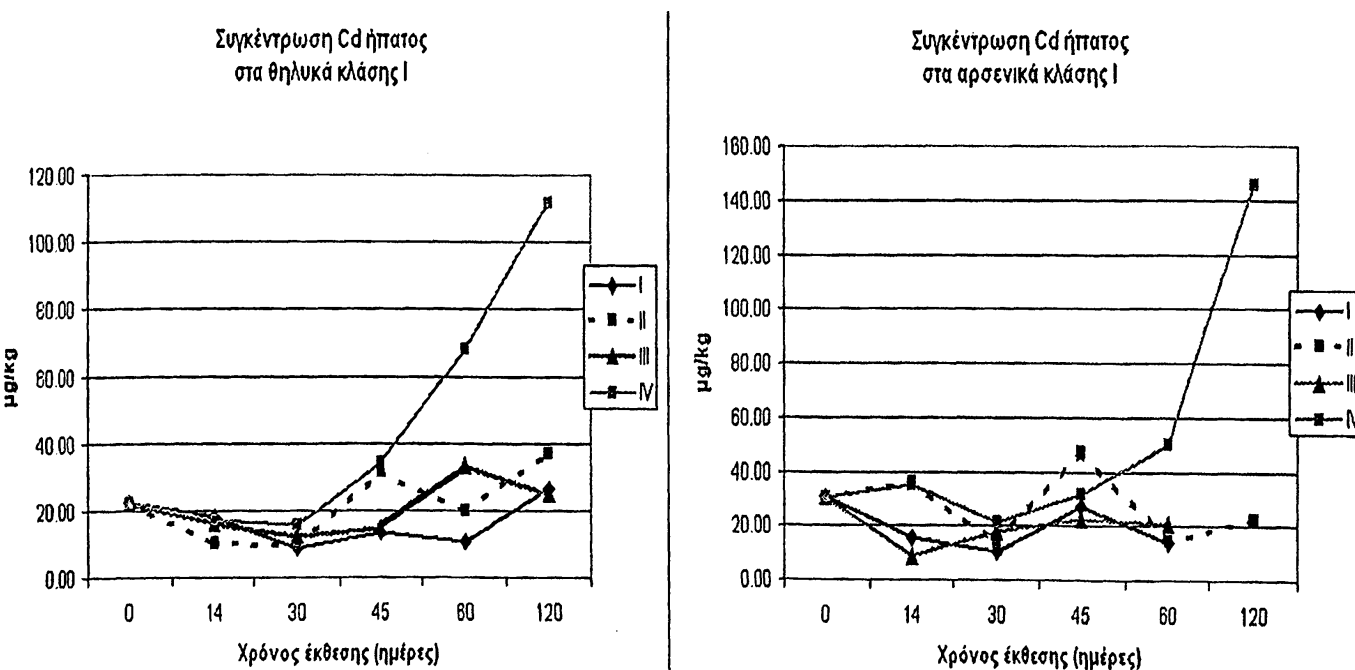
Ημέρες	0-I	0-II	I -II
14	0.18	0.68	0.22
30	0.81	0.29	0.38
45	0.20	0.17	0.02
60	0.74	0.34	0.52
90	0.66		
120	0.38	0.82	0.39

Όσον αφορά τη συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των ιχθύων της κλάσης II στο ενυδρείο I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd), αυτή εμφανίζεται με μικρές διακυμάνσεις, μία αύξηση από τις 45 μέχρι τις 120 ημέρες, η οποία γίνεται σημαντική σε σχέση με τις αρχικές τιμές στις 60 ημέρες ($p=0,04$). Στην ομάδα ελέγχου (ενυδρείο II), ενώ έως τις 45 ημέρες η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ είναι σταθερή, στις 60 ημέρες εμφανίζει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα Zn στο ήπαρ, τόσο σε σχέση με της ομάδας I ($p=0,02$) όσο και με τις αρχικές τιμές ($p=0,01$). Η συγκέντρωση αυτή δε, επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα στις 120 ημέρες. Πάντως στους ιχθύς του ενυδρείου I η συσσώρευση Zn στο ήπαρ είναι καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με της ομάδας ελέγχου (ενυδρείο II), ενώ δεν φαίνονται διαφορές με τα νεαρότερα ψάρια (κλάση I).

Πίνακας 39. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Zn στο ήπαρ ιχθύων κλάσης II

Ημέρες	0-I	0-II	I -II
14	0.60	0.75	0.98
30	0.63	0.12	0.33
45	0.32	0.24	0.17
60	0.04	0.01	0.02
90	0.07	0.22	0.28
120	0.14	0.52	0.70

γ1. Συσσώρευση Cd στο ήπαρ ανά φύλο



Γράφημα 15. Συσσώρευση καδμίου στο ήπαρ θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.



Στα θηλυκά η συγκέντρωση Cd στο ήπαρ (κλάση I) στα ενυδρεία I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) φαίνεται να κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα αρχικά, με την ομάδα II να υπερέχει από τις 45 ημέρες και μετά. Η συσσώρευση Cd στο ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε 1ppb Cd (ενυδρείο III) είναι επίσης σε χαμηλά έως τις 45 ημέρες, αλλά στις 60 ημέρες σχεδόν διπλασιάζεται. Στους θηλυκούς ιχθύς του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd), οι συγκεντρώσεις Cd στο ήπαρ είναι χαμηλές έως τις 30 ημέρες έκθεσης, μετά αρχίζει η προοδευτική τους αύξηση ως τη μέγιστη τιμή τους στις 120 ημέρες. Μάλιστα τότε είναι σημαντικά αυξημένες σε σχέση με της ομάδας I (με $p=0,00$), II (με $p=0,05$) και III (με $p=0,00$).

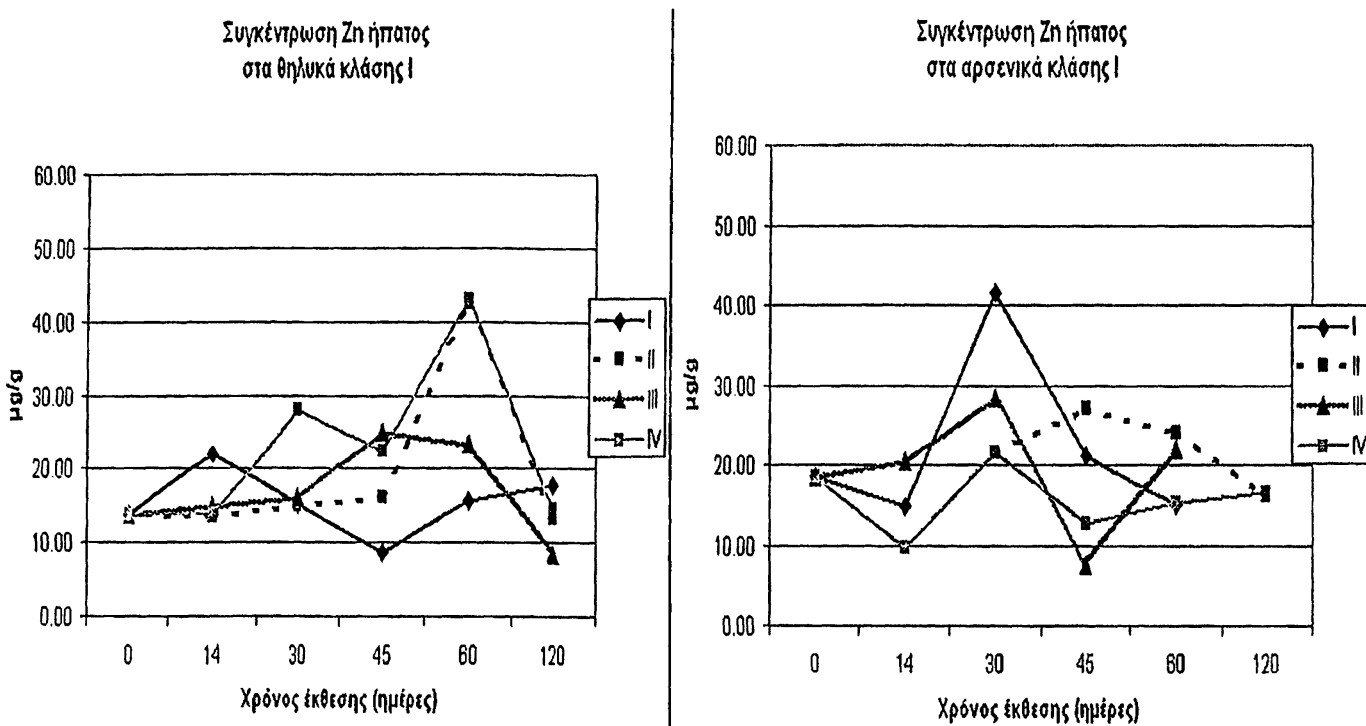
Στα αρσενικά των ενυδρείων I, II, III και IV η συσσώρευση του Cd στο ήπαρ παρουσιάζει παρόμοιες διακυμάνσεις έως τις 45 ημέρες. Μετά από αυτό το χρονικό σημείο όμως, στα αρσενικά του ενυδρείου IV παρουσιάζεται σημαντική αύξηση των επιπέδων Cd στο ήπαρ, ήδη από τις 60 ημέρες έκθεσης, σε σχέση με την ομάδα I ($p=0,01$), II ($p=0,04$) και III ($p=0,01$). Στις 120 ημέρες έκθεσης μάλιστα στα αρσενικά του ενυδρείου IV, παρατηρείται η σημαντικά υψηλότερη τιμή Cd στο ήπαρ (σε σχέση με την ομάδα ελέγχου $p=0,00$). Γενικά πάντως, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων του καδμίου στο ήπαρ ανάμεσα στα δύο φύλα.

Πίνακας 40. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd στο ήπαρ θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
Θ	14	0.32	0.75	0.96	0.32	0.47	0.90
	30	0.84	0.27	0.07	0.63	0.46	0.53
	45	0.37	0.90	0.27	0.25	0.87	0.16
	60	0.10	0.07	0.01	0.80	0.10	0.14
	120	0.58	0.84	0.00	0.26	0.05	0.00
Α	14		0.60	0.25			0.08
	30	0.65	0.44	0.19	0.64	0.29	0.71
	45	0.14	0.63	0.73	0.15	0.43	0.56
	60	0.96	0.25	0.01	0.52	0.04	0.01
	120					0.00	



γ2. Συσσώρευση Zn στο ήπαρ ανά φύλο



Γράφημα 16. Συσσώρευση Zn στο ήπαρ θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Στα θηλυκά του ενυδρείου I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd), η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των ιχθύων της κλάσης I εμφανίζει μικρή μείωση στις 45 ημέρες, κατόπιν όμως επανασταθεροποιείται. Στην ομάδα ελέγχου (ενυδρείο II) η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ είναι σταθερά χαμηλή, εκτός από τη σημαντικά υψηλότερη τιμή Zn στις 60 ημέρες, σε σχέση με της ομάδας I ($p=0,02$). Η συγκέντρωση αυτή δε, συμπίπτει με τη συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε 5ppb Cd (ενυδρείο IV), την ίδια χρονική στιγμή, και επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα στις 120 ημέρες και για τις δύο ομάδες. Στις 120 ημέρες επίσης, στους ιχθύς του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd) η συσσώρευση Zn στο ήπαρ μειώνεται σημαντικά σε σχέση με των ομάδων I ($p=0,02$) και IV ($p=0,05$), ενώ είχε προηγηθεί αύξησή της σε σχέση με τις αρχικές τιμές από τις 45 έως τις 60 ημέρες. Γενικά η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των θηλυκών εμφανίζεται μάλλον χαμηλότερη στους ιχθύς που εκτέθηκαν στη χαμηλότερη συγκέντρωση Cd (1ppb).

Στα αρσενικά, μεγαλύτερες διακυμάνσεις σε σχέση με τη συγκέντρωση Zn στο ήπαρ εμφανίζονται στην ομάδα I, και ακολουθούν ανάλογα και οι ομάδες III και IV. Μάλιστα στις 45 ημέρες ο Zn ήπατος είναι σημαντικά μεγαλύτερος στην ομάδα I από την III ($p=0,02$). Πάντως όσον αφορά τη συγκέντρωση Zn στο ήπαρ, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα, για τις ομάδες που εκτέθηκαν σε Cd (III, IV).

Πίνακας 41. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Zn στο ήπαρ θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
Θ	14	0.08	0.24	0.08	0.73	0.90	0.77
	30	0.90	0.73	0.15	0.68	0.37	0.18
	45	0.38	0.22	0.04	0.37	0.37	0.78
	60	0.02	0.22	0.19	0.11	0.95	0.46
	120	0.17	0.02	0.33	0.24	0.62	0.05
Α	14		0.10	0.27			0.18
	30	0.27	0.68	0.28	0.33	0.97	0.37
	45	0.63	0.02				
	60	0.50	0.29	0.95	0.84	0.43	0.22
	120					0.65	

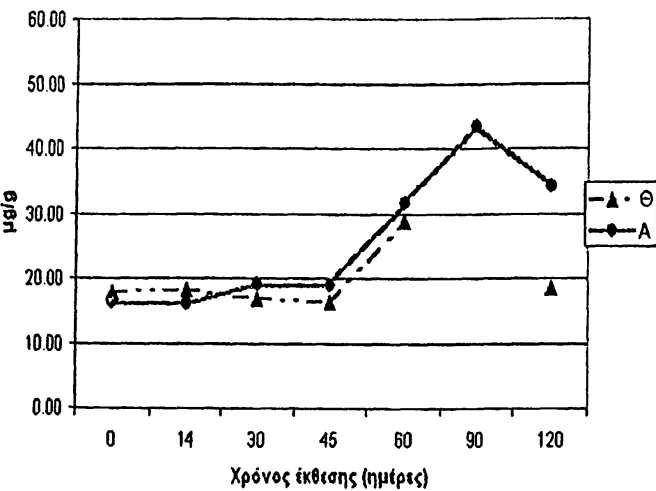
Πίνακας 42. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ των δύο φύλων σε σχέση με τις συγκεντρώσεις Cd και Zn στο ήπαρ αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Μέταλλο	Ημέρες	I	II	III	IV
Cd	14	0.85		0.13	0.24
	30	0.52	1.00	0.43	0.47
	45	0.23	0.45	0.49	0.90
	60	0.55	0.32	0.35	0.31
	120		0.28		0.27
Zn	14	0.16		0.37	0.31
	30	0.17	0.02	0.13	0.43
	45	0.03	0.44	0.19	
	60	0.90	0.17	0.83	0.27
	120		0.10		0.30

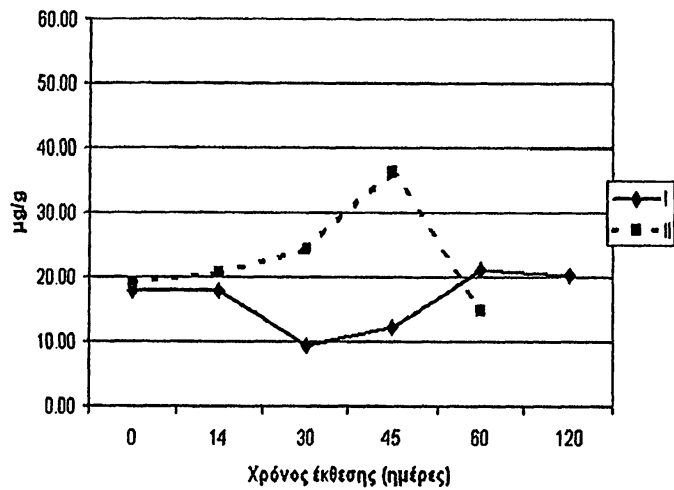


Κλάση II

Συγκέντρωση Zn ήπατος
στους ιχθύες κλάσης II



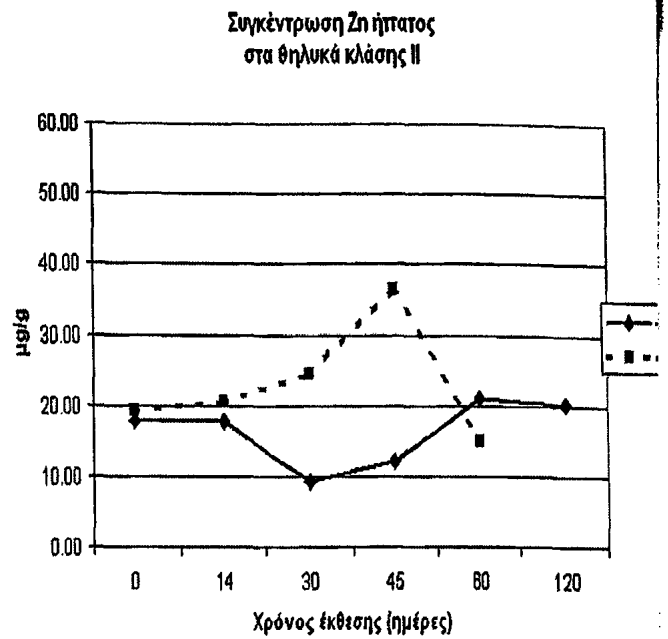
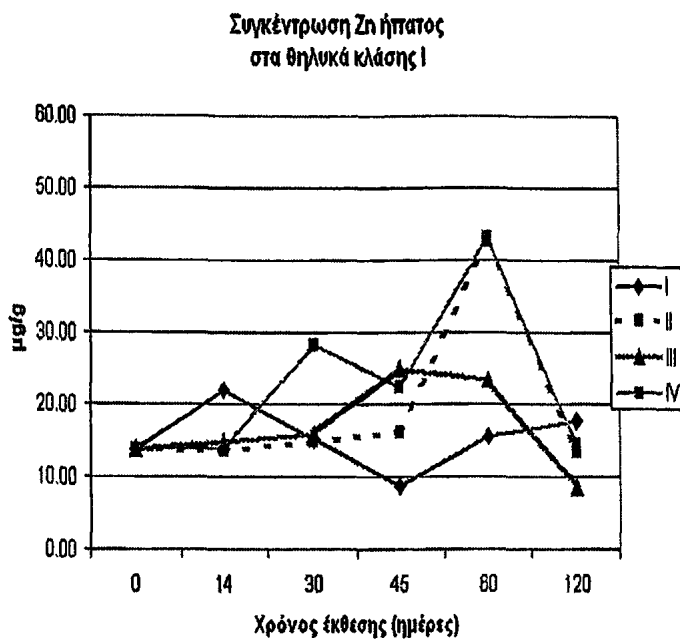
Συγκέντρωση Zn ήπατος
στα θηλυκά κλάσης II



Γράφημα 17. Συσσώρευση Zn στο ήπαρ θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.

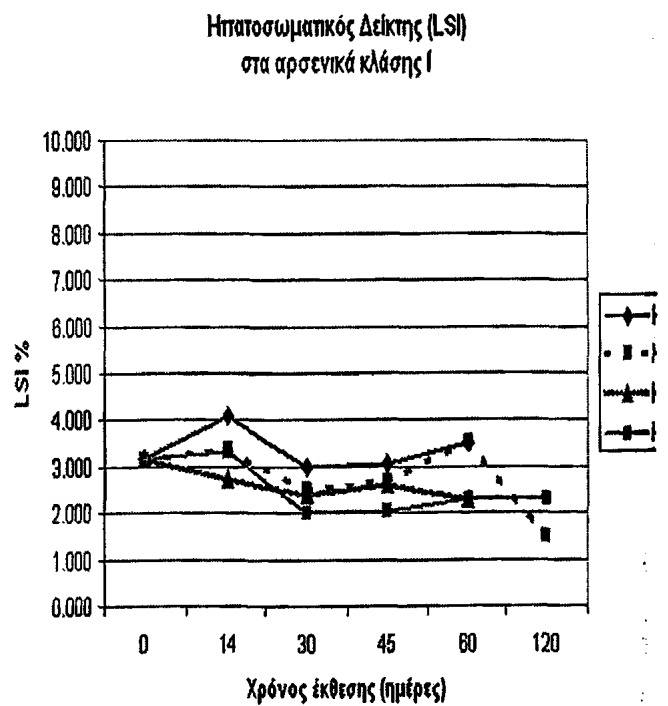
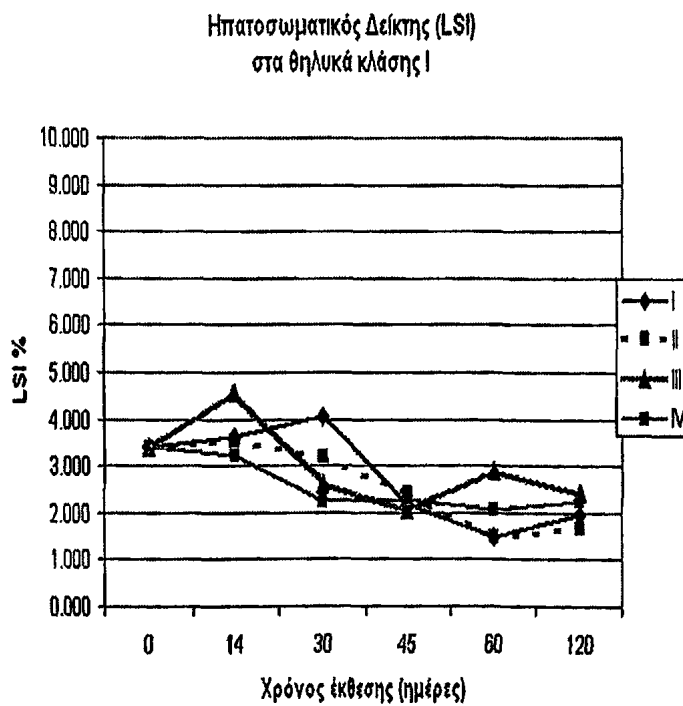
Η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των θηλυκών (κλάση II) στα ενυδρεία I (νερό λίμνης, $\sim 0,05 \mu\text{g/l}$ Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, $\sim 0,10 \mu\text{g/l}$ Cd) φαίνεται να κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με των αρσενικών μέχρι τις 60 ημέρες, ενώ στις 120 ημέρες μειώνεται σε σχέση με των αρσενικών. Γενικά πάντως, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων του Zn στο ήπαρ ανάμεσα στα δύο φύλα. Μεταξύ των δύο ομάδων των θηλυκών, αρχικά η συγκέντρωση Zn κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με την ομάδα II να υπερέχει της I από τις 30 ημέρες και μετά, έως τις 60 ημέρες, οπότε και παρουσιάζει μείωση στα αρχικά επίπεδα.

Στα θηλυκά των ενυδρείων I, II, των δύο ηλικιακών κλάσεων η συσσώρευση του Zn στο ήπαρ παρουσιάζει παρόμοιες διακυμάνσεις στις αντίστοιχες συνθήκες, με την ομάδα II να υπερέχει της I και στις δύο ηλικίες. Συνολικά πάντως στα μεγαλύτερα ψάρια (κλάση II) δεν παρατηρούνται υψηλότερες τιμές στη συγκέντρωση Zn σε σχέση με τα νεαρότερα.



Γράφημα 18. Συσσώρευση Zn στο ήπαρ των ιχθύων κλάσης I και II.

**γ3. Μεταβολή Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI)
Κλάση I**



Γράφημα 19. Μεταβολή Ηπατοσωματικού (LSI) Δείκτη των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.



Ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, που εκφράζει το σχετικό μέγεθος του ήπατος, στα θηλυκά των ενυδρείων I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου) δείχνει να συμμεταβάλλεται στις δύο ομάδες και να μειώνεται προοδευτικά ως τις 120 ημέρες. Η τιμή του δείκτη στα θηλυκά του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd) μειώνεται επίσης προοδευτικά, όμως σε υψηλότερα επίπεδα από των άλλων ομάδων (στις 60 ημέρες σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου $p=0,02$), ενώ στα θηλυκά του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd) ο LSI εμφανίζει μία αρχική μείωση ως τις 30 ημέρες και από εκεί και μετά μία σχετική σταθερότητα συνεχώς, σε χαμηλότερα επίπεδα από της ομάδας III.

Όσον αφορά τα αρσενικά των ενυδρείων I και II η προοδευτική μείωση στο δείκτη είναι λιγότερο εμφανής, ενώ για τα ενυδρεία III και IV οι τιμές του δείκτη εμφανίζονται σταθερές, με τα αρσενικά του ενυδρείου IV να παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα του ηπατικού δείκτη αύξησης από της ομάδας III. Παρόλα αυτά δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στον δείκτη LSI σε καμία από τις ομάδες στα αρσενικά ψάρια. Πάντως η τιμή του δείκτη αύξησης του ήπατος δε διαφέρει ούτε μεταξύ των δύο φύλων σε καμία από τις συνθήκες.

Πίνακας 43. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ Ηπατοσωματικού (LSI) Δείκτη θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

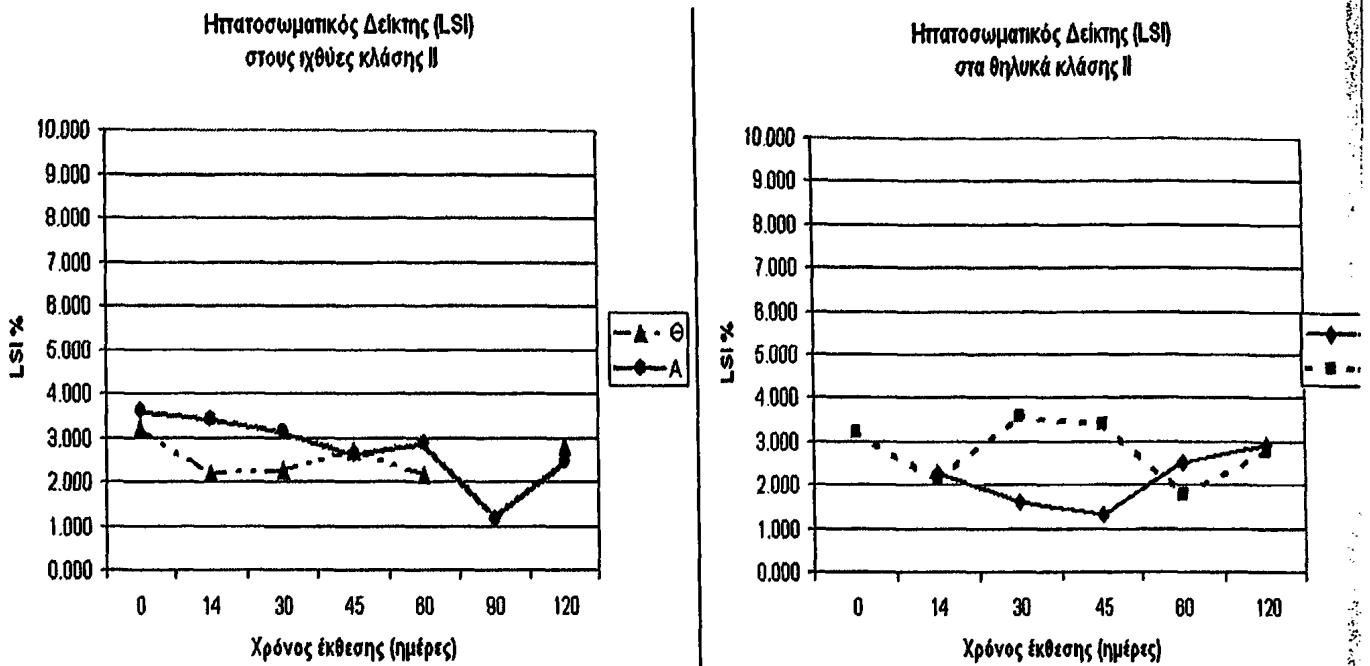
Φύλο	Ημέρες	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
Θ	14	0.88	0.47	0.48	0.33	0.43	0.21
	30	0.32	0.07	0.08	0.42	0.07	0.56
	45	0.75	0.83	0.88	0.54	0.84	0.68
	60	0.85	0.07	0.38	0.02	0.17	0.10
	120	0.43	0.17	0.30	0.16	0.09	0.59
Α	14	0.56	0.98	0.64	0.62	0.98	0.77
	30	0.58	0.29	0.24	0.88	0.29	0.52
	45	0.70	0.32	0.31	0.92	0.32	0.57
	60	0.98	0.26	0.38	0.26	0.32	0.99
	120					0.16	

Πίνακας 44. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ των δύο φύλων σε σχέση με τον Ηπατοσωματικό Δείκτη (LSI) αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

LSI	Ημέρες	I	II	III	IV
	14	0.61	0.82	0.28	0.93
	30	0.34	0.15	0.81	0.62
	45	0.37	0.69	0.47	0.73
	60	0.17	0.12	0.11	0.45
	120		0.50		0.92



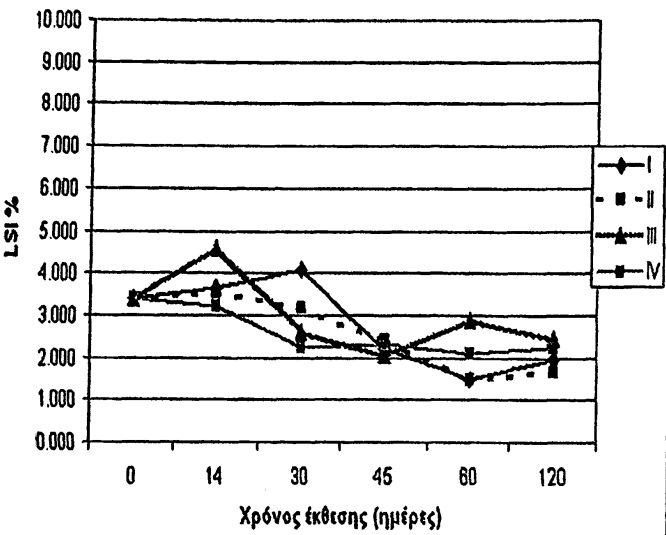
Κλάση II



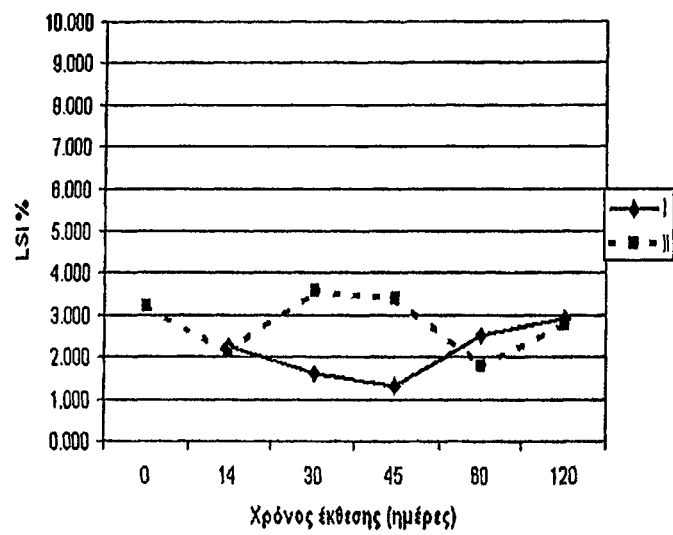
Γράφημα 20. Μεταβολή Ηπατοσωματικού (LSI) Δείκτη των ιχθύων κλάσης II.

Ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, που εκφράζει το σχετικό μέγεθος του ήπατος, στα αρσενικά της κλάσης II, των ομάδων I και II κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα από των θηλυκών έως τις 60 ημέρες και μειώνεται προοδευτικά στη διάρκεια του χρόνου. Όσον αφορά τα θηλυκά της κλάσης II, στο ενυδρείο I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) ο δείκτης αύξησης του ήπατος δείχνει να μειώνεται προοδευτικά ως τις 45 ημέρες και να αυξάνει στα αρχικά επίπεδα μέχρι τις 120 ημέρες, ενώ στην ομάδα II (ομάδα ελέγχου) παρουσιάζει μία παροδική αύξηση μεταξύ 30 και 45 ημερών, κατόπιν όμως μειώνεται. Συνολικά πάντως στα μεγαλύτερα ψάρια (κλάση II) παρατηρούνται νωρίτερα (30-45 ημέρες) οι χαμηλότερες τιμές του ηπατικού δείκτη αύξησης σε σχέση με τα νεαρότερα ψάρια, ενώ επίσης νωρίτερα παρατηρούνται και οι υψηλότερες τιμές του.

Ηπατοσωματικός Δείκτης (LSI)
στα θηλυκά κλάσης I



Ηπατοσωματικός Δείκτης (LSI)
στα θηλυκά κλάσης II



Γράφημα 21. Μεταβολή Ηπατοσωματικού (LSI) Δείκτη των ιχθύων κλάσης I και II.

Πίνακας 45. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ παραμέτρων θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.

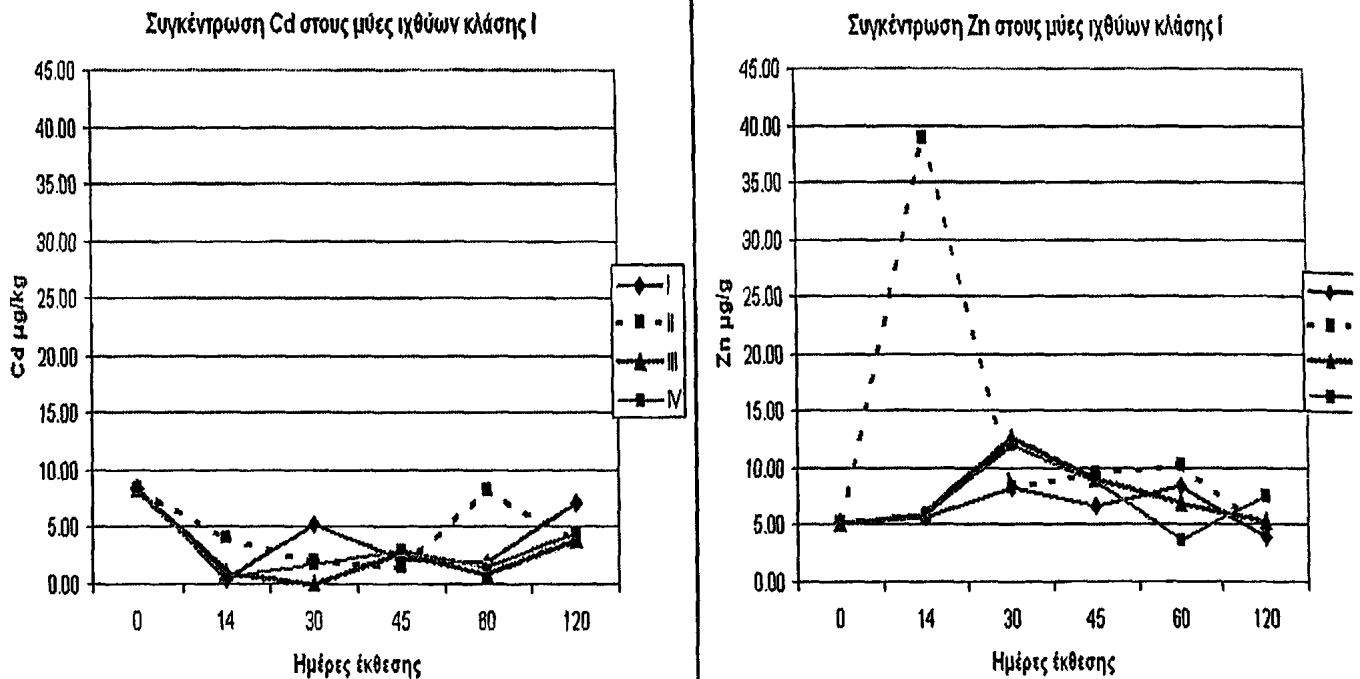
Ιστός	Μέταλλο	I	II
Ήπαρ	Cd	0.51	0.38
	Zn	0.05	0.17
	LSI	0.57	0.91
Νεφροί	Cd	0.21	0.92
	Zn	0.65	0.78



δ. Μυϊκός ιστός

Για τη μελέτη της συσσώρευσης των μετάλλων στο μυϊκό ιστό των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των μετάλλων στους μύες της ραχιαίας πλευράς σε όλες τις πειραματικές συνθήκες και στις δύο ηλικιακές κλάσεις.

Κλάση I



Γράφημα 22. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στους μύες των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Στα νεαρότερα ψάρια (κλάση I), η συγκέντρωση Cd στους μύες των ιχθύων των ενυδρείων I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τις τιμές κατά την έναρξη του πειράματος (0 ημέρες), μέχρι τις 45 ημέρες ($p=0,02$ για το ενυδρείο I ήδη από τις 14 ημέρες και $p=0,04$ για το ενυδρείο II στις 45 ημέρες). Μάλιστα στις 14 ημέρες το Cd στους μύες των ιχθύων του ενυδρείου II είναι σημαντικά μεγαλύτερο από του ενυδρείου I ($p=0,05$). Από τις 45 ημέρες και μετά, παρατηρείται μία σταδιακή αύξηση των τιμών έως τις 120 ημέρες.

Στους μύες των ιχθύων του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd), όπως και του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd) η συσσώρευση Cd αρχικά μειώνεται σημαντικά σε σχέση με τις τιμές κατά την έναρξη του πειράματος (0 ημέρες), μέχρι τις 45 ημέρες ($p=0,03$ στις 14 ημέρες και $p=0,02$ στις 30 ημέρες για το ενυδρείο III, και $p=0,02$ στις 14 ημέρες και $p=0,05$ στις 30 ημέρες για το ενυδρείο IV). Από τις 60 ημέρες έκθεσης, τα επίπεδα Cd στις

ομάδες III και IV αυξάνονται παρόμοια με της ομάδας I έως το τέλος του πειράματος (120 ημέρες). Πάντως η συγκέντρωση Cd στους μύες της ομάδας III (χαμηλή δόση Cd) είναι σημαντικά χαμηλότερη από τις τιμές των ομάδων I και II στις 30 ημέρες έκθεσης ($p=0,02$ και $p=0,03$ αντίστοιχα) και από της ομάδας II στις 60 ημέρες έκθεσης ($p=0,03$) υποδεικνύοντας ότι στο μυϊκό ιστό δεν υπάρχει ιδιαίτερη επιβάρυνση από μέταλλα.

Πίνακας 46. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Cd στους μύες ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	0-I	0-II	0-III	0-IV	I -II	I -III	I -IV	II -III	II -IV	III-IV
14	0.02	0.27	0.03	0.02	0.05	0.31	0.68	0.11	0.14	0.47
30	0.38	0.06	0.02	0.05	0.14	0.02	0.13	0.03	0.82	0.12
45	0.13	0.04	0.10	0.12	0.56	0.77	0.72	0.34	0.36	0.93
60	0.06	0.97	0.03	0.06	0.06	0.41	0.80	0.03	0.06	0.74
120	0.70	0.17	0.39	0.28	0.09	0.16	0.21	0.97	0.70	0.78

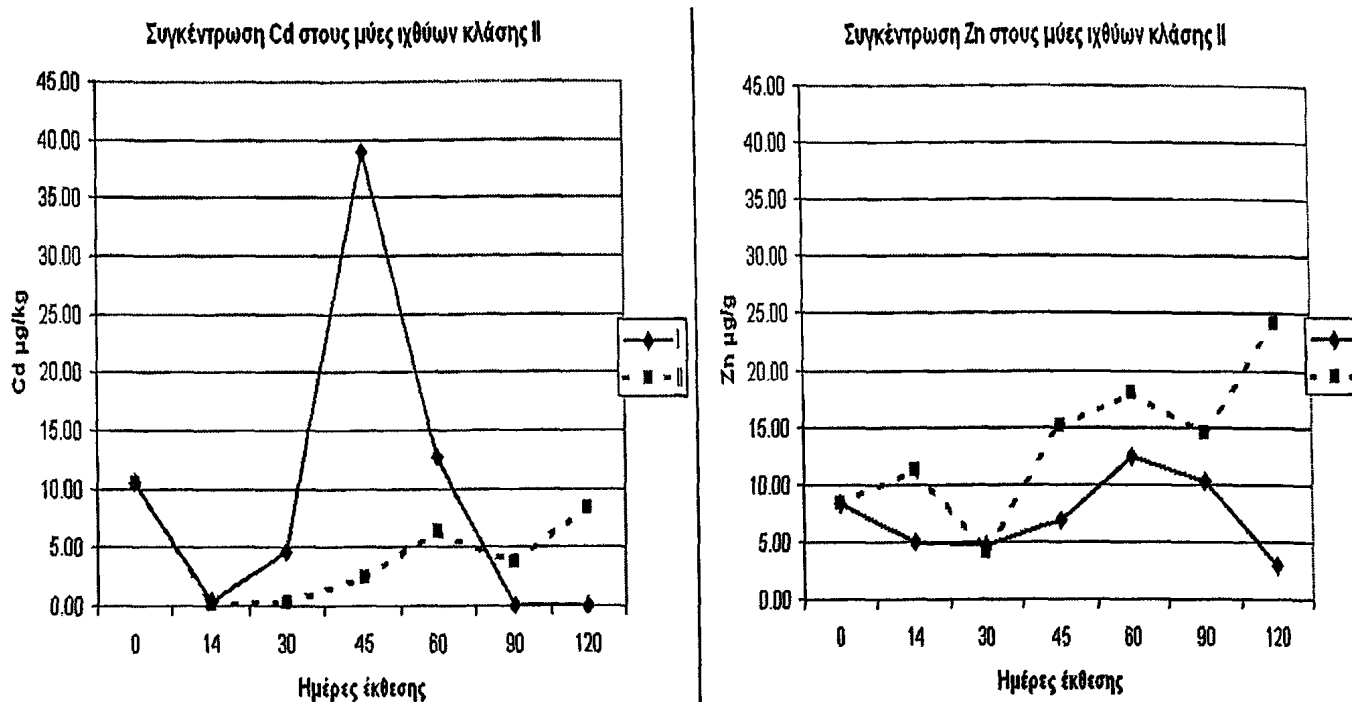
Στους μύες των ιχθύων των ενυδρείων I (νερό λίμνης, $\sim 0,05\text{ppb}$ Cd), III (έκθεση σε 1ppb Cd) και IV (έκθεση σε 5ppb Cd) η συγκέντρωση Zn αρχικά αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με τις τιμές κατά την έναρξη του πειράματος (0 ημέρες), μέχρι τις 30 ημέρες ($p=0,04$ για το ενυδρείο I, $p=0,03$ για το ενυδρείο III και $p=0,00$ για το ενυδρείο IV στις 30 ημέρες). Από εκεί και πέρα παρατηρείται μία σταδιακή μείωση μέχρι τις 120 ημέρες. Όσον αφορά την ομάδα II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, $\sim 0,10\text{ppb}$ Cd), διαφοροποιείται σημαντικά από τις υπόλοιπες αρχικά στις 14 ημέρες (με $p=0,01$ για το ενυδρείο I και το ενυδρείο III και $p=0,02$ για το ενυδρείο IV), λόγω μίας ασυνήθιστα υψηλής τιμής, ενώ στη συνέχεια κυμαίνεται σε παρόμοια χαμηλά επίπεδα με τις υπόλοιπες ομάδες.

Πίνακας 47. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Zn στους μύες ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	0-I	0-II	0-III	0-IV	I -II	I -III	I -IV	II -III	II -IV	III-IV
14	0.78	0.02	0.70	0.70	0.01	0.89	0.85	0.01	0.02	0.94
30	0.04	0.08	0.03	0.00	1.00	0.17	0.03	0.15	0.06	0.80
45	0.72	0.24	0.10	0.03	0.47	0.43	0.42	0.89	0.81	0.88
60	0.03	0.08	0.45	0.32	0.45	0.50	0.01	0.29	0.03	0.17
120	0.46	0.84	0.50	0.23	0.65	0.52	0.14	0.82	0.24	0.36



Κλάση II



Γράφημα 23. Συσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στους μύες των ιχθύων κλάσης II.

Στα μεγαλύτερα ψάρια (κλάση II), η συγκέντρωση Cd στους μύες των ιχθύων του ενυδρείου I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) αρχικά εμφανίζεται σημαντικά χαμηλότερη ($p=0,03$) σε σχέση με την έναρξη του πειράματος, κατόπιν αυξάνεται έως τις 45 ημέρες, οπότε μειώνεται εκ νέου σταδιακά έως τις 120 ημέρες στην ελάχιστη τιμή, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0,04$). Στο ενυδρείο II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) τα επίπεδα Cd στους μύες παρουσιάζονται σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τις αρχικές τιμές τους έως τις 45 ημέρες ($p=0,03$ και $p=0,05$), μετά όμως αυξάνονται διαδοχικά έως τις 120 ημέρες. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές με τα νεαρότερα ψάρια (κλάση I) στις ίδιες συνθήκες.

Πίνακας 48. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Cd στους μύες ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	0-I	0-II	I-II
14	0.03	0.03	0.67
30	0.37	0.03	0.45
45	0.50	0.05	0.41
60	0.88	0.20	0.67
90	0.18	0.22	0.90
120	0.02	0.46	0.04

Στα μεγαλύτερα ψάρια (κλάση II), η συγκέντρωση Zn στους μύες των ιχθύων των ενυδρείων I (νερό λίμνης, ~0,05ppb Cd) και II (ομάδα ελέγχου, νερό βρύσης, ~0,10ppb Cd) παρουσιάζει μία σχετική αύξηση έως τις 60 ημέρες, οπότε αρχίζει και φθίνει, με τα επίπεδα Zn στους μύες της ομάδας II να είναι συνεχώς υψηλότερα από της ομάδας I καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, χωρίς όμως σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επιπλέον τα επίπεδα Zn στους μύες των ιχθύων της κλάσης II δεν εμφανίζουν ιδιαίτερες διαφορές με τα νεαρότερα ψάρια (κλάση I) στις ίδιες συνθήκες. Επομένως συγκρίνοντας τις δύο ηλικιακές κλάσεις μεταξύ τους, ούτε στους μύες παρατηρείται διαφορά στη συγκέντρωση των μετάλλων ανάλογα με την ηλικία.

Πίνακας 49. Στατιστικές διαφορές (p) στις συγκεντρώσεις Zn στους μύες ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	0-I	0-II	I-II
14	0.70	0.78	0.34
30	0.68	0.65	0.89
45	0.87	0.53	0.26
60	0.65	0.32	0.11
90	0.54	0.50	0.36
120	0.84	0.54	0.46

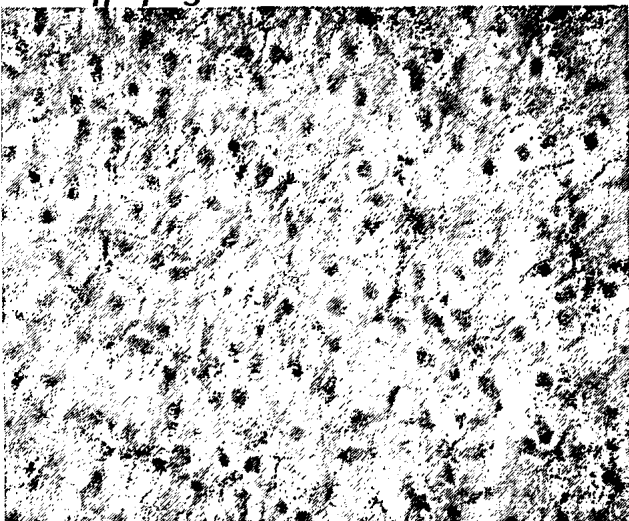


ε. Παθολογοανατομικές εξετάσεις ήπατος

Για την εκτίμηση της λειτουργικής κατάστασης του ήπατος, μετά το πέρας του χρόνου έκθεσης (0, 14, 30, 45, 60 και 120 ημέρες) των ιχθύων, λήφθηκαν δείγματα ήπατος από ιχθύς όλων των ενυδρείων, τα οποία προετοιμάστηκαν κατάλληλα (μονιμοποίηση σε διάλυμα φορμόλης 10%, αφυδάτωση με εμβάπτισή τους σε σειρά ανιουσών αλκοολών και εγκλεισμός σε κύβους παραφίνης), τους έγιναν τομές 5μm, χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H+E) και μορφολογική παρατήρηση των ιστών.

Κλάση I

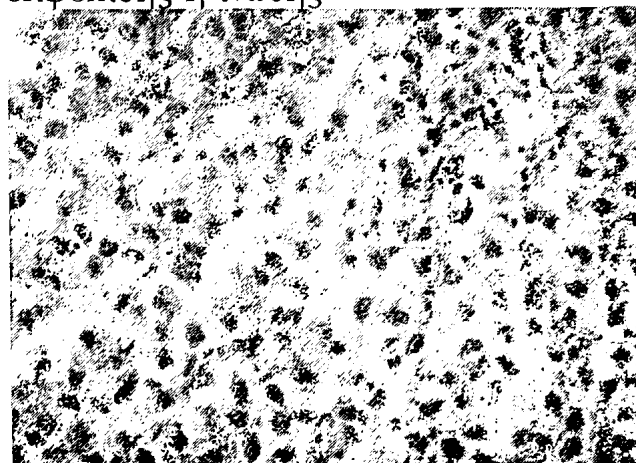
14 ημέρες



Εικόνα 1. Ομάδα I (40X).

Εμφάνιση ήπιων αλλοιώσεων (++) ηπατοκυττάρων (κενοί χώροι).

Οριακή εικόνα λιπώδους εκφύλισης ή ίνωσης



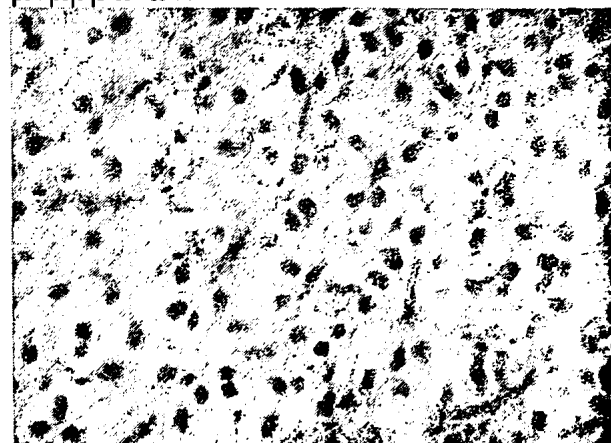
Εικόνα 2. Ομάδα II (40X). Χωρίς

ουσιαστικές αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων.



Εικόνα 3. Ομάδα III (40X).

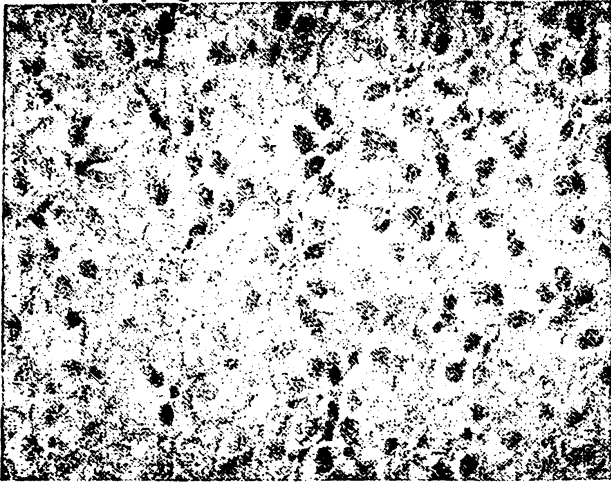
Εμφάνιση εκτεταμένων αλλοιώσεων (++++), ηπατοκυττάρων (κενοί χώροι) και κυτταρικών μεμβρανών.



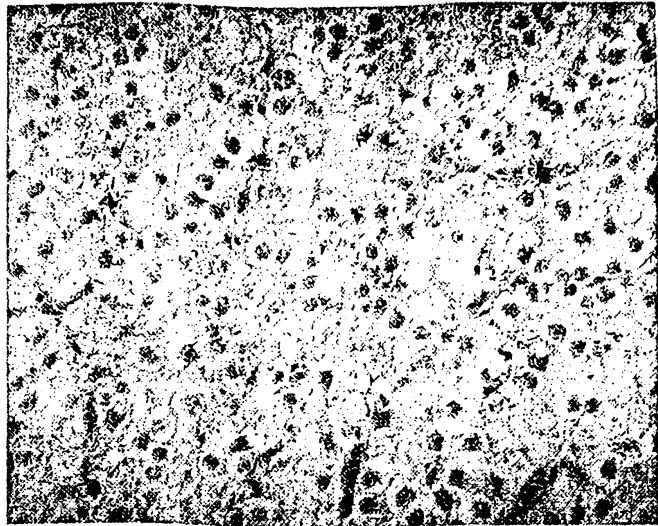
Εικόνα 4. Ομάδα IV (40X).

Εμφάνιση ήπιων αλλοιώσεων (++) ηπατοκυττάρων (κενοί χώροι). Οριακή εικόνα λιπώδους εκφύλισης.

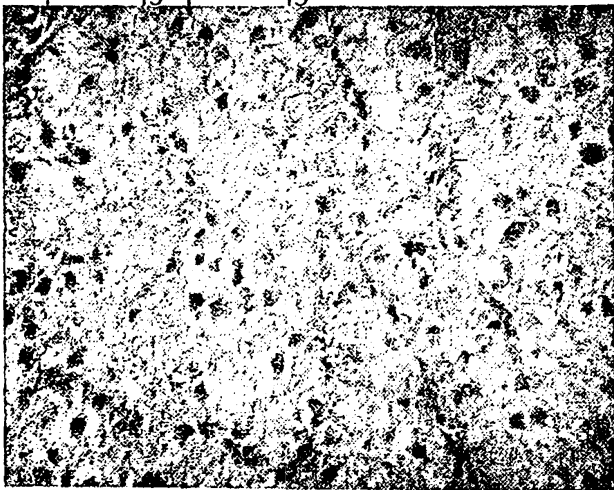
30 ημέρες



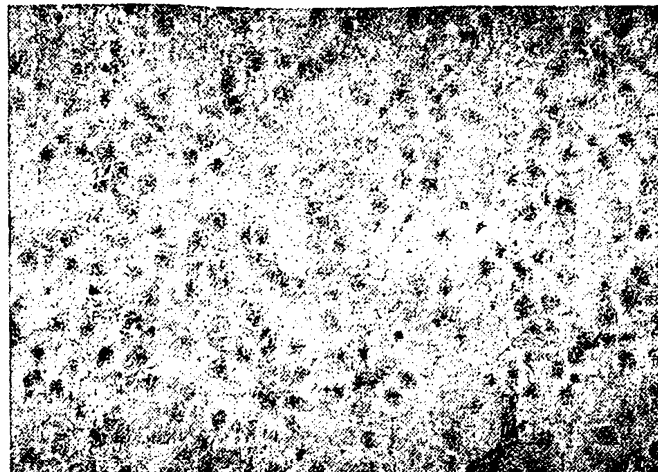
Εικόνα 5. Ομάδα II (40X).
Εμφάνιση ήπιων αλλοιώσεων (++)
ηπατοκυττάρων (κενοί χώροι).
Οριακή εικόνα λιπώδους
εκφύλισης ή ίνωσης



Εικόνα 7. Ομάδα III (40X).

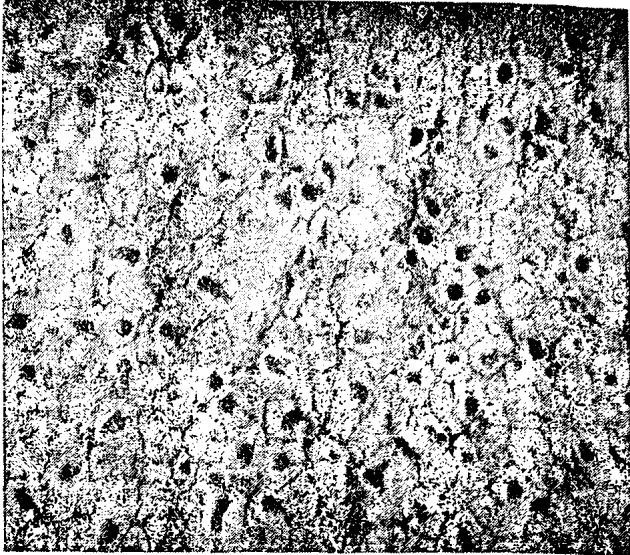


Εικόνα 6. Ομάδα IV (40X).
Εμφάνιση εκτεταμένων
αλλοιώσεων (++++)
ηπατοκυττάρων. Λιπώδης
εκφύλιση.

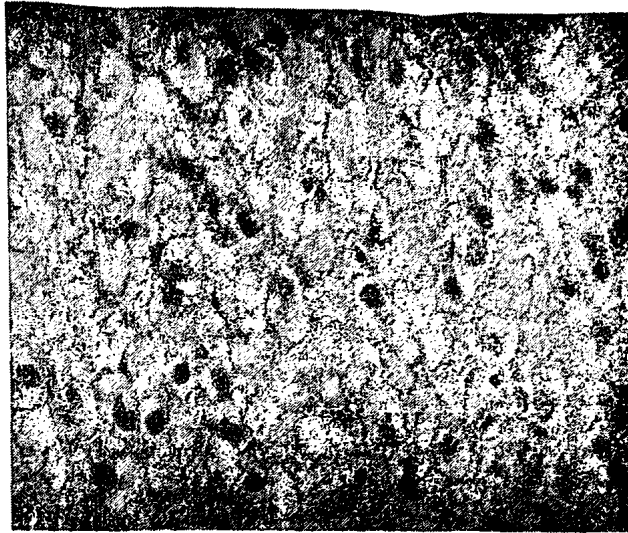


Εικόνα 8. Ομάδα III (40X).
Εμφάνιση μέτριων αλλοιώσεων
(+++) ηπατοκυττάρων. Λιπώδης
εκφύλιση.

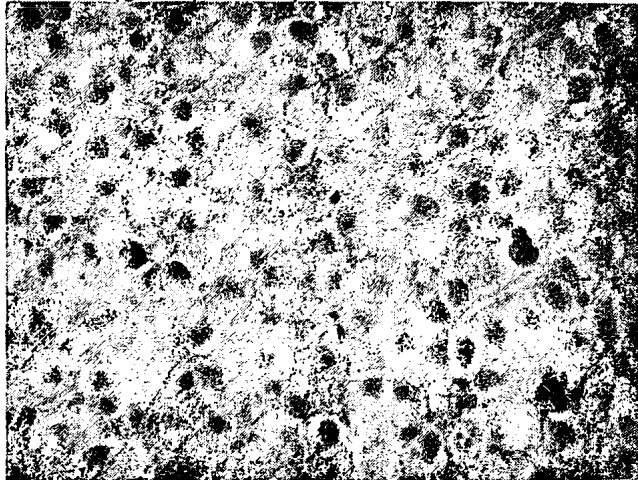
45 ημέρες



Εικόνα 9. Ομάδα I (40X). Εκτεταμένη εκφύλιση (++++) και νέκρωση ηπατοκυττάρων. Πλήρης λιπώδης εκφύλιση.



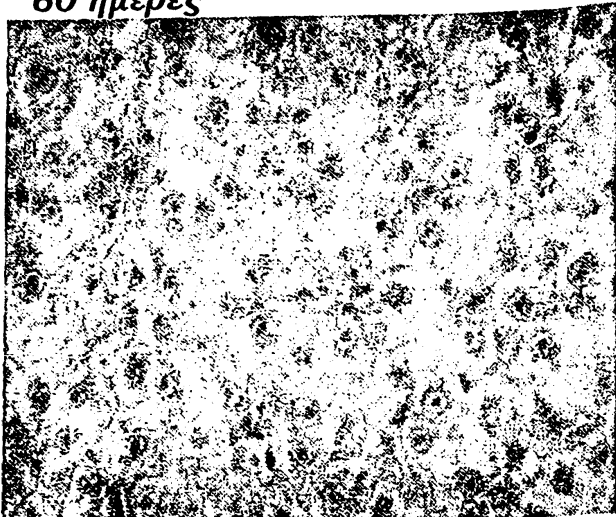
Εικόνα 11. Ομάδα III (40X). Εκτεταμένη εκφύλιση (++++) και νέκρωση ηπατοκυττάρων. Λιπώδης εκφύλιση.



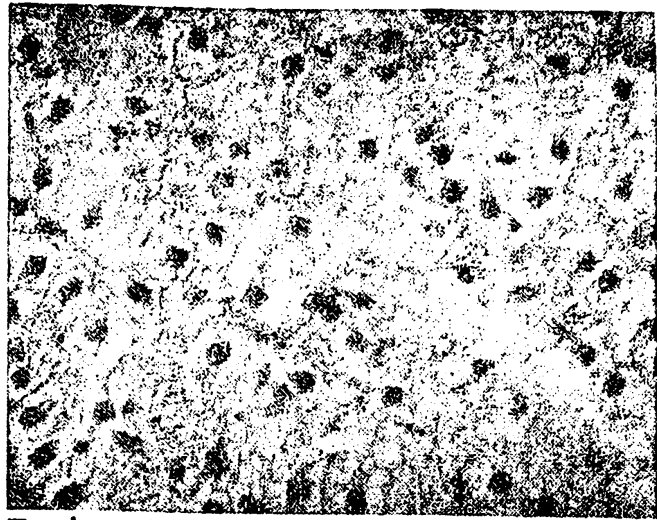
Εικόνα 10. Ομάδα II (40X). Χωρίς ουσιαστικές αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων. Εμφάνιση κοκκίων, πιθανώς αιμοσιδηρίνης λόγω αποδόμησης αιμορραγικών ερυθροκυττάρων (χολόσταση;).



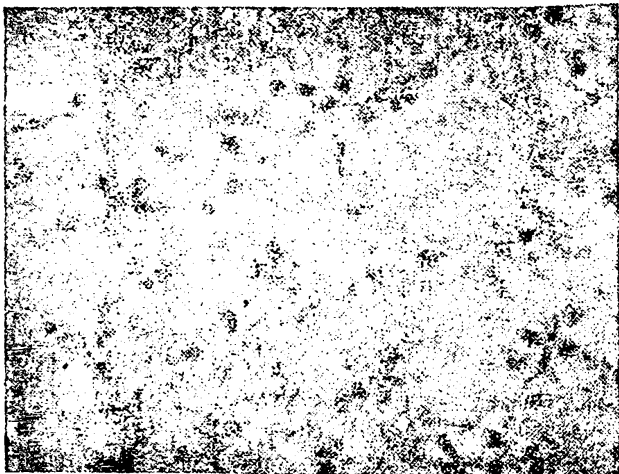
60 ημέρες



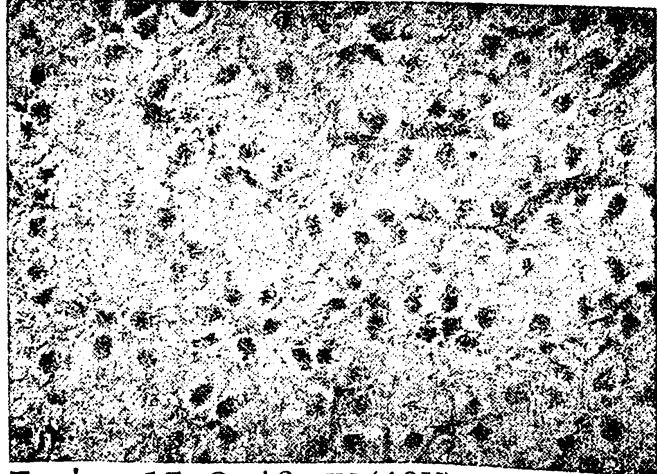
Εικόνα 12. Ομάδα I (40X). Χωρίς ουσιαστικές αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων.



Εικόνα 14. Ομάδα III (40X). Μέτριες αλλοιώσεις (+++) ηπατοκυττάρων. Λιπώδης εκφύλιση.

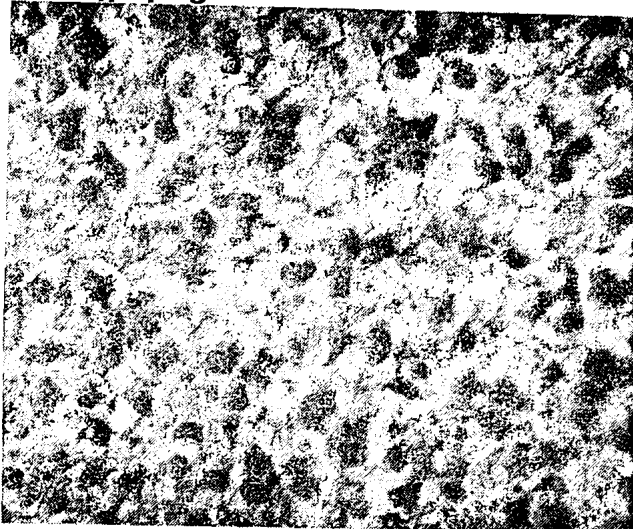


Εικόνα 13. Ομάδα II (40X). Μέτριες αλλοιώσεις (+++) ηπατοκυττάρων. Λιπώδης εκφύλιση.



Εικόνα 15. Ομάδα IV (40X). Μέτριες αλλοιώσεις (+++) ηπατοκυττάρων. Λιπώδης εκφύλιση.

Κλάση II
30 ημέρες

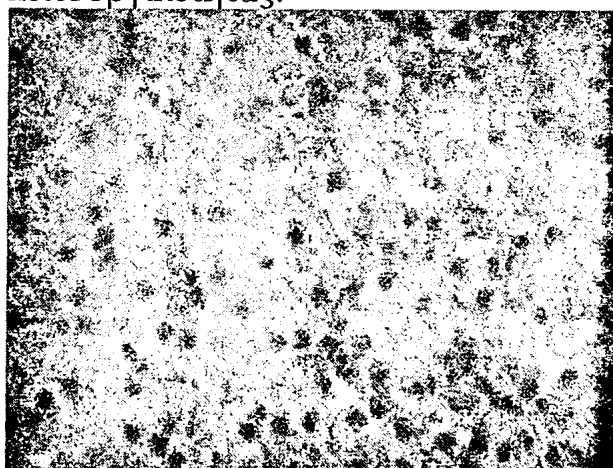


Εικόνα 16. Ομάδα I (40X).
Μέτριες αλλοιώσεις (+++) ηπατοκυττάρων. Μερική λιπώδης εκφύλιση.

60 ημέρες

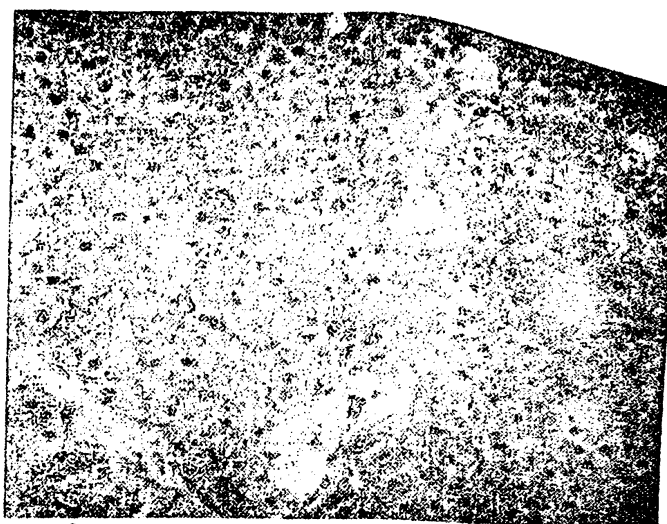


Εικόνα 17. Ομάδα I (40X).
Εκτεταμένες αλλοιώσεις (++++)
ηπατοκυττάρων. Πλήρης λιπώδης
εκφύλιση και απουσία
λειτουργικότητας.



Εικόνα 18. Ομάδα II (40X).
Μέτριες αλλοιώσεις (+++) ηπατοκυττάρων. Λιπώδης εκφύλιση.

120 ημέρες



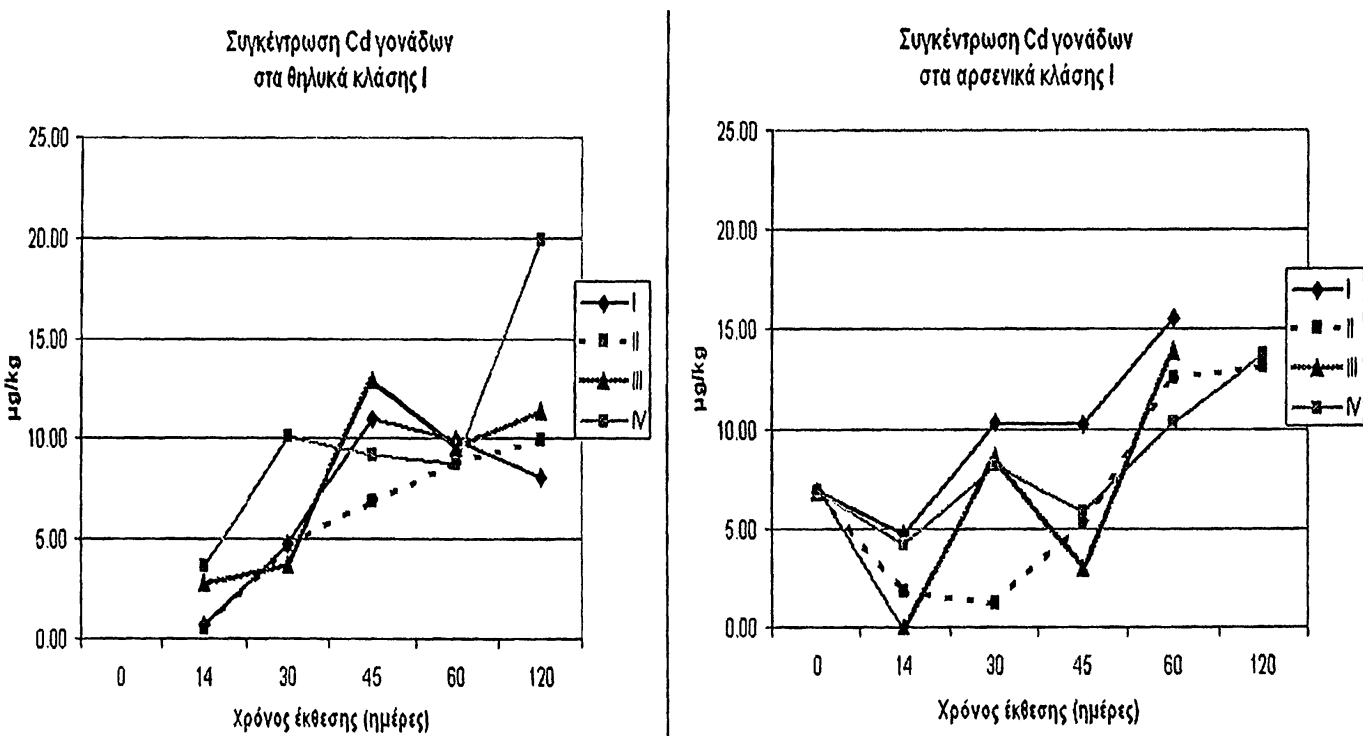
Εικόνα 21. Ομάδα II (40X).
Μέτριες αλλοιώσεις (+++) ηπατοκυττάρων. Εμφάνιση λιποκυττάρων (;) Λιπώδης εκφύλιση.

Εικόνα 19-20. Ομάδα II (2.5X, 10X). Εκτεταμένες εναποθέσεις μελανών σωματιδίων (μετάλλων;) εντός εκφυλισμένων ηπατοκυττάρων.

2. Γονάδες

Για τη μελέτη της συσσώρευσης των μετάλλων στις γονάδες προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των μετάλλων στις γονάδες σε δεδομένες χρονικές στιγμές (0, 14, 30, 45, 60 και 120 ημέρες) στη διάρκεια του πειράματος με τη μέθοδο της Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Απορρόφησης. Επίσης προσδιορίστηκε το ορμονικό προφίλ των ιχθύων μέσω της 17-β οιστραδιόλης ορού με τη μέθοδο της Ραδιοανοσομετρίας. Τέλος υπολογίστηκε η αύξηση των γονάδων μέσω του σχετικού μεγέθους τους (Γοναδοσωματικός δείκτης GSI) και εκτιμήθηκε η ωρίμανση των γονάδων ιστολογικά.

α. Συσσώρευση Cd στις γονάδες



Γράφημα 24. Συσσώρευση καδμίου στις γονάδες των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Η συγκέντρωση του Cd στις γονάδες είναι γενικά χαμηλή τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά ψάρια. Στα θηλυκά του ενυδρείου I (νερό λίμνης), II (ομάδα ελέγχου) και III (έκθεση σε 1ppb Cd) η συσσώρευση Cd στις γονάδες, είναι σε παρόμοια επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης, με την ομάδα II (ελέγχου) να παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα Cd στις 45 ημέρες από της ομάδας I ($p=0,01$). Στα θηλυκά του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb), η συσσώρευση Cd στις γονάδες, αυξάνεται σημαντικά στις 120 ημέρες έκθεσης, σε σχέση με την ομάδα I (νερό λίμνης) και III (έκθεση σε 1ppb Cd) ($p=0,05$). Έτσι φαίνεται τελικά ότι η έκθεση σε υψηλές

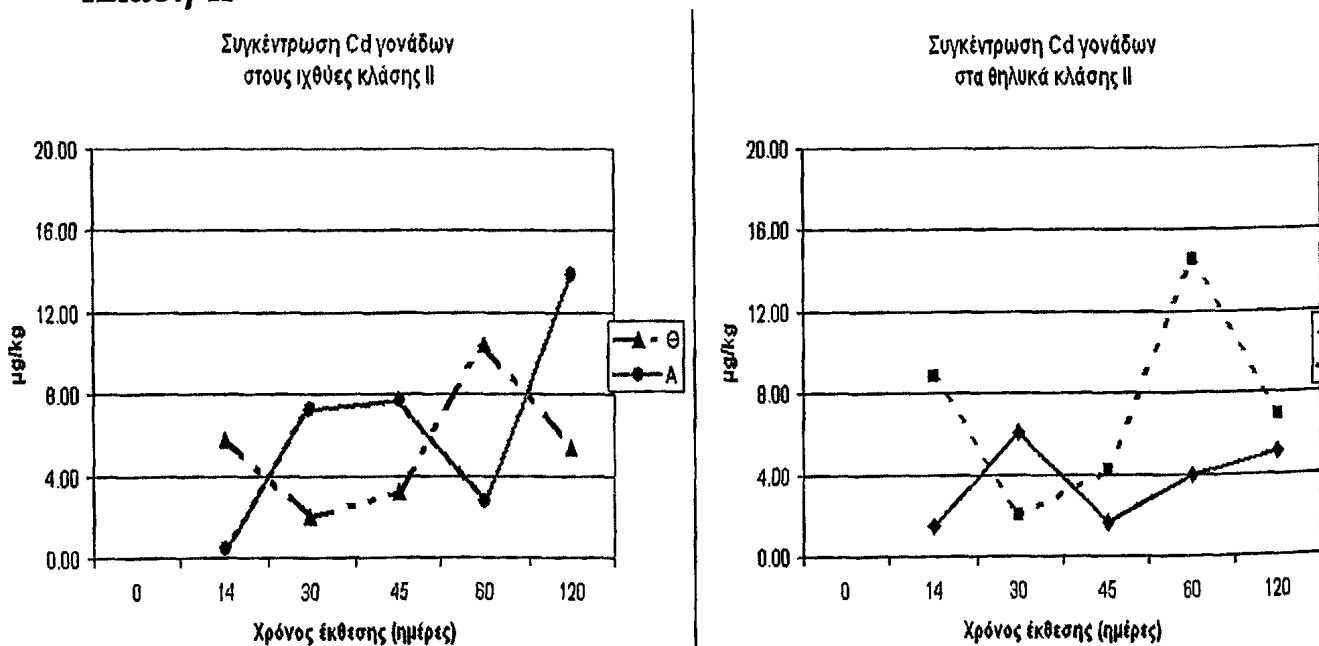
συγκεντρώσεις Cd επηρεάζει περισσότερο τη συσσώρευση Cd στις γονάδες των θηλυκών.

Στις γονάδες των αρσενικών του ενυδρείου I η συγκέντρωση Cd που παρατηρείται είναι γενικά υψηλότερη από των υπόλοιπων ομάδων και μάλιστα σημαντικά υψηλότερη από της ομάδας II (ελέγχου) στις 30 και 45 ημέρες (με $p=0,02$ και $p=0,05$ αντίστοιχα). Στις γονάδες των αρσενικών του ενυδρείου III και IV (έκθεση σε Cd) η συσσώρευση του Cd εμφανίζεται σε παρόμοια χαμηλά επίπεδα. Έτσι φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συσσώρευση του καδμίου στις γονάδες των αρσενικών, εκτός από τη σημαντικά υψηλότερη τιμή στις γονάδες της ομάδας IV σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στις 30 ημέρες ($p=0,03$).

Πίνακας 50. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd στις γονάδες θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
Θ	14	0.79	0.28	0.29	0.24	0.27	0.75
	30	0.98	0.82	0.18	0.88	0.24	0.33
	45	0.01	0.79	0.57	0.23	0.29	0.53
	60	0.68	0.45	0.58	0.83	0.88	0.75
	120	0.76	0.45	0.05	0.82	0.25	0.05
Α	14		0.26	0.89			0.09
	30	0.02	0.85	0.59	0.20	0.03	0.94
	45	0.18	0.05		0.54		
	60	0.76	0.83	0.54	0.79	0.70	0.23
	120						

Κλάση II

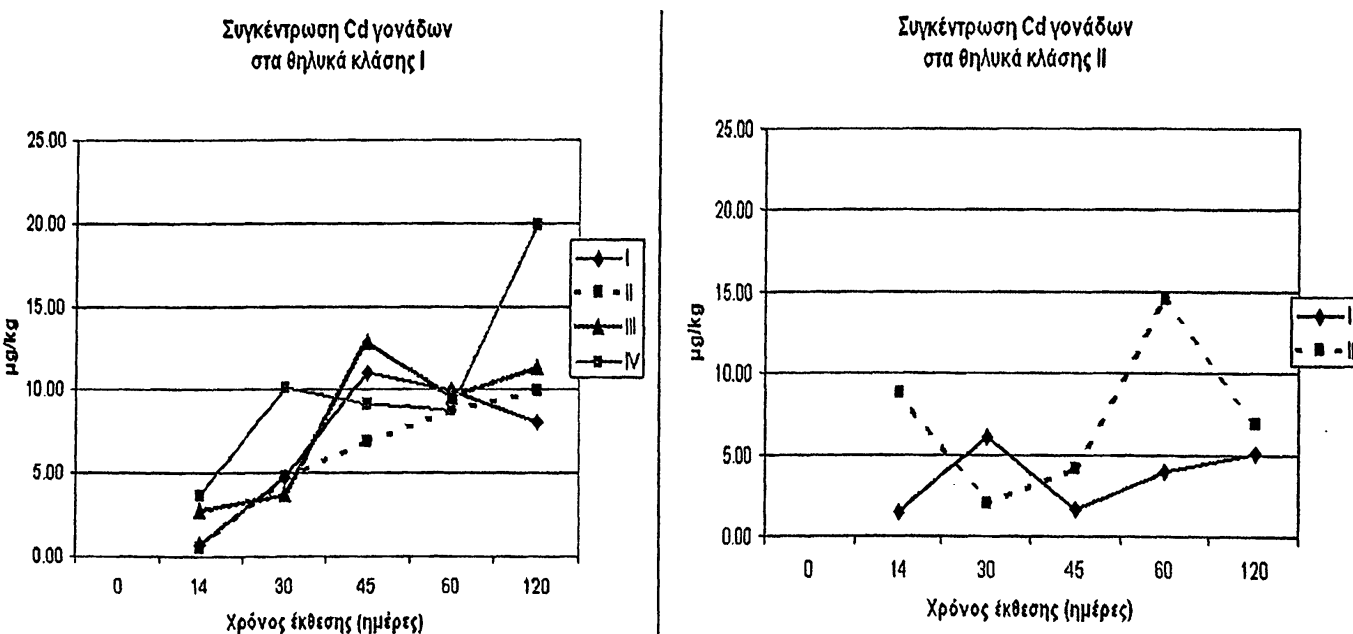


Γράφημα 25. Συσσώρευση καδμίου στις γονάδες των ιχθύων κλάσης II.



Η συγκέντρωση του Cd στις γονάδες της κλάσης II είναι επίσης χαμηλή τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά ψάρια, με αντίθετη τάση μεταβολής στα δύο φύλα. Στα θηλυκά του ενυδρείου I (νερό λίμνης), η συσσώρευση Cd στις γονάδες, είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από της ομάδας ελέγχου, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, με την ομάδα II (ελέγχου) να παρουσιάζει τα υψηλότερα επίπεδα Cd στις 60 ημέρες. Στα αρσενικά και των δύο ενυδρείων (I, II), η συσσώρευση Cd στις γονάδες, αυξάνεται στις 120 ημέρες του πειράματος, σε σχέση με τα θηλυκά.

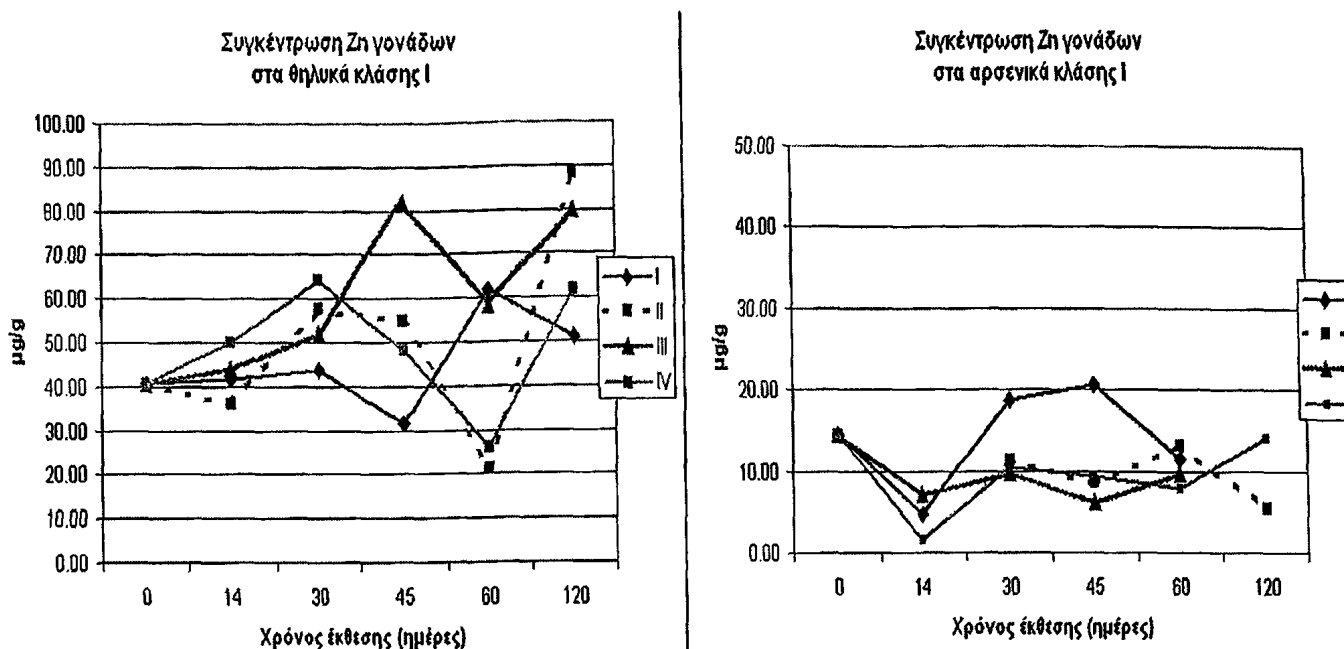
Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση Cd στις γονάδες των θηλυκών των δύο κλάσεων, η συσσώρευση που παρατηρείται στα νεαρότερα άτομα είναι γενικά υψηλότερη από των μεγαλύτερων, χωρίς να υπάρχουν όμως σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.



Γράφημα 26. Συσσώρευση καδμίου στις γονάδες των θηλυκών ιχθύων κλάσης I-II.



β. Συσσώρευση Zn στις γονάδες



Γράφημα 27. Συσσώρευση ψευδαργύρου στις γονάδες των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Η συγκέντρωση του Zn στις γονάδες είναι γενικά υψηλή στα θηλυκά ψάρια και μάλιστα σημαντικά υψηλότερη από των αρσενικών σχεδόν σε όλες τις συνθήκες (πίνακας 52). Στα θηλυκά του ενυδρείου I (νερό λίμνης), παρατηρούνται οι χαμηλότερες τιμές από όλες τις ομάδες και μάλιστα στις 30 και στις 120 ημέρες η συγκέντρωση Zn στις γονάδες της ομάδας I είναι σημαντικά χαμηλότερη από της II ($p=0,05$ και $p=0,03$ αντίστοιχα), III ($p=0,05$ και $p=0,04$ αντίστοιχα), και IV ($p=0,01$). Παράλληλα στις 45 ημέρες εμφανίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση και στις 60 ημέρες η υψηλότερη συγκέντρωση Zn στην ίδια ομάδα. Στα θηλυκά της ομάδας II (ελέγχου) και IV (έκθεση σε 5ppb Cd) η συσσώρευση Zn στις γονάδες, είναι σε παρόμοια επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και φαίνεται να συμμεταβάλλεται, με τα χαμηλότερα επίπεδα Zn στις 60 ημέρες και τα υψηλότερα στις 120 ημέρες και για τις δύο ομάδες. Στα θηλυκά του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb), η συσσώρευση Zn στις γονάδες, αυξάνεται ιδιαίτερος και υπερβαίνει όλων των ομάδων στις 45 ημέρες έκθεσης, ενώ μειώνεται εκ νέου στις 60 ημέρες. Έτσι φαίνεται τελικά ότι η έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις Cd επηρεάζει περισσότερο τη συσσώρευση Zn στις γονάδες των θηλυκών.

Στις γονάδες των αρσενικών του ενυδρείου I η συγκέντρωση Zn που παρατηρείται είναι γενικά υψηλότερη από των υπόλοιπων ομάδων και μάλιστα στις 30 και 45 ημέρες φτάνει σε διπλάσια επίπεδα. Στις γονάδες των αρσενικών των ενυδρείων III και IV (έκθεση σε Cd) η συσσώρευση του Zn εμφανίζεται σε παρόμοια χαμηλά επίπεδα με της ομάδας ελέγχου, χωρίς



σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Έτσι φαίνεται ότι τα αρσενικά δεν κάνουν ειδική συγκέντρωση Zn στις γονάδες, με πιθανές επιπτώσεις στη σπερματογένεση.

Πίνακας 51. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Zn στις γονάδες θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

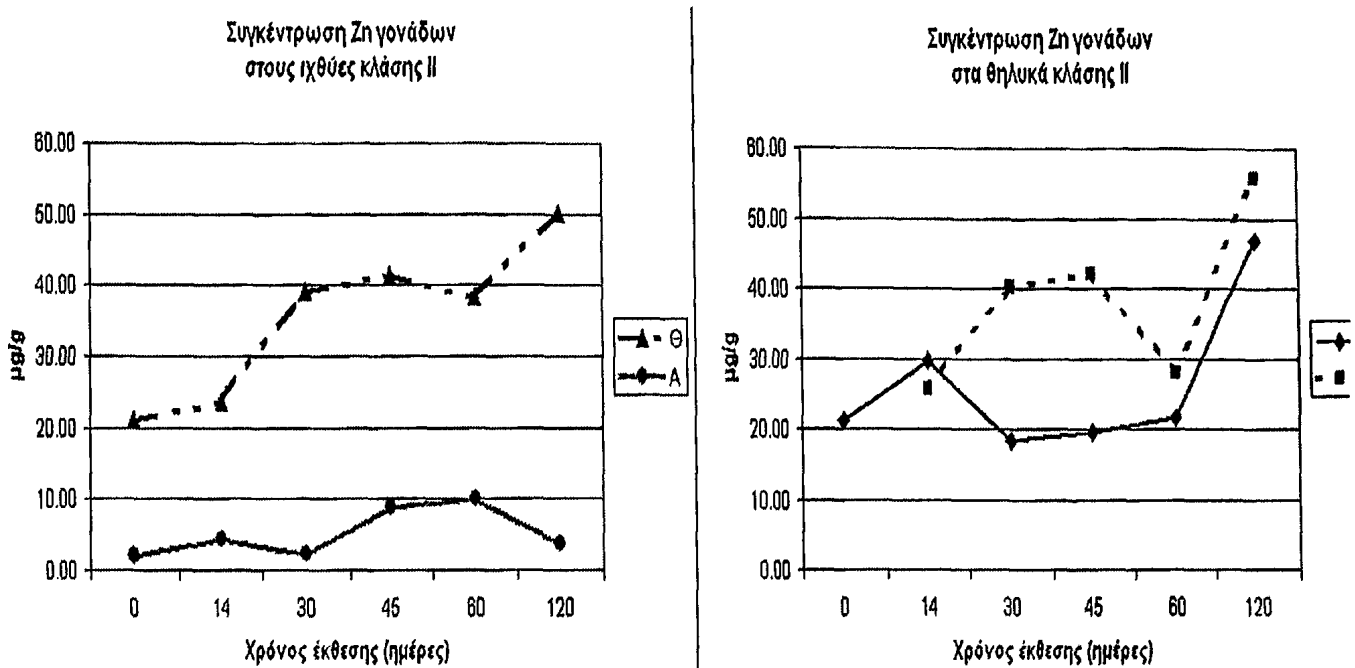
Φύλο	Ημέρες	I-II	I-III	I-IV	II-III	II-IV	III-IV
Θ	14	0.60	0.58	0.19	0.36	0.16	0.27
	30	0.05	0.05	0.01	0.24	0.28	0.02
	45	0.27	0.13	0.50	0.13	0.52	0.12
	60	0.20	0.77	0.05	0.20	0.60	0.09
	120	0.03	0.04	0.51	0.66	0.35	0.36
Α	14		0.51	0.43			0.09
	30	0.32	0.41	0.20	0.71	0.78	0.58
	45	0.41	0.33	0.44	0.35	0.76	0.16
	60	0.80	0.67	0.38	0.56	0.39	0.43
	120					0.11	

Πίνακας 52. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ των δύο φύλων σε σχέση με τις συγκεντρώσεις Cd και Zn στις γονάδες αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Μέταλλο	Ημέρες	I	II	III	IV
Cd	14	0.21	0.53	0.97	0.69
	30	0.18		0.27	0.88
	45	0.77	0.31	0.54	0.61
	60	0.41	0.47	0.21	
	120		0.59		0.56
Zn	14	0.00	0.00	0.00	0.00
	30	0.02		0.00	0.00
	45	0.62	0.00	0.00	0.00
	60	0.02	0.01	0.02	0.03
	120		0.18		0.30



Κλάση II



Γράφημα 28. Συσσώρευση ψευδαργύρου στις γονάδες των ιχθύων κλάσης II.

Η συγκέντρωση του Zn στις γονάδες της κλάσης II είναι επίσης χαμηλή στα αρσενικά και σημαντικά υψηλότερη στα θηλυκά ψάρια, σε όλες τις συνθήκες ($p=0,00$). Στα θηλυκά του ενυδρείου I (νερό λίμνης), η συσσώρευση Zn στις γονάδες, είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από της ομάδας ελέγχου, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, με την ομάδα II (ελέγχου) να παρουσιάζει τα χαμηλότερα επίπεδα στις 60 ημέρες και τα υψηλότερα στις 120 ημέρες όπως και η I. Στα αρσενικά και των δύο ενυδρείων (I, II), η συσσώρευση Zn στις γονάδες, μειώνεται στις 120 ημέρες του πειράματος.

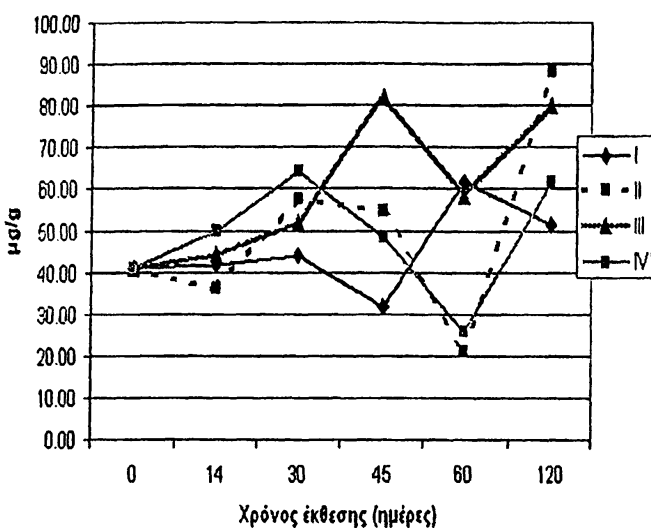
Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες των θηλυκών των δύο κλάσεων, η συσσώρευση που παρατηρείται στα νεαρότερα άτομα είναι γενικά υψηλότερη από των μεγαλύτερων, χωρίς να υπάρχουν όμως σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Πίνακας 53. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ των δύο φύλων σε σχέση με παραμέτρους των γονάδων αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης II.

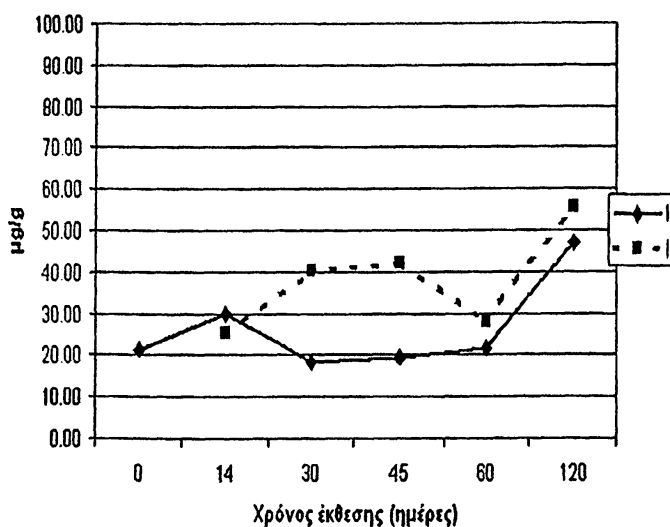
Ιστός	Μέταλλο	I	II
Γονάδες	Cd	0.10	0.93
	Zn	0.00	0.00
	Οιστραδιόλη	0.32	0.27
	GSI	0.26	0.05



Συγκέντρωση Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I



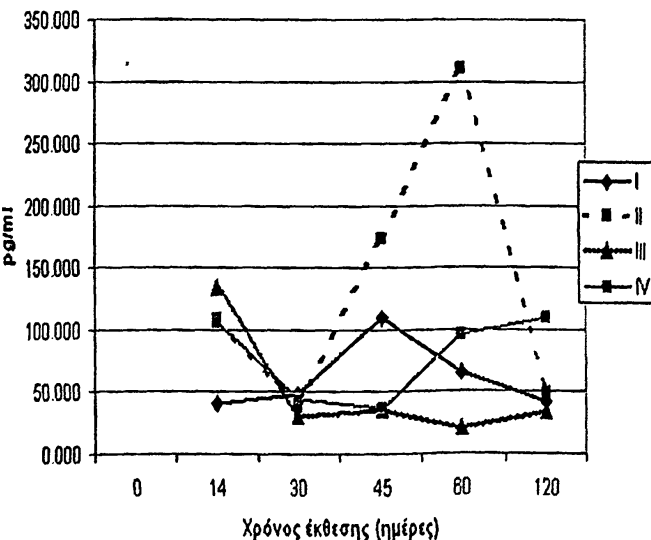
Συγκέντρωση Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης II



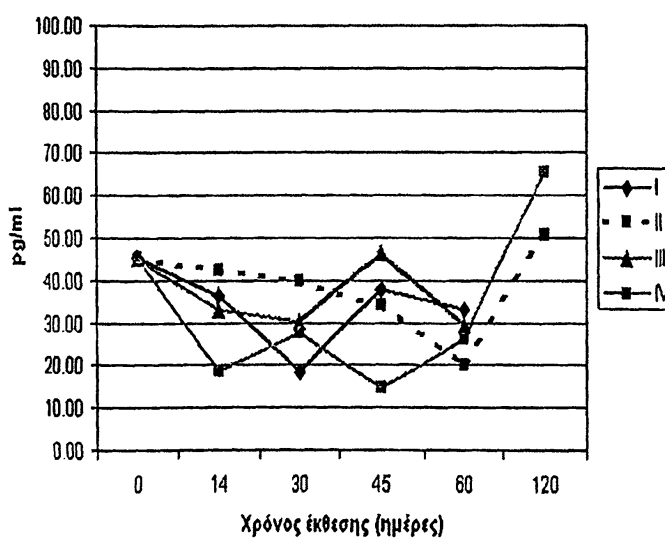
Γράφημα 29. Συσσώρευση Zn στις γονάδες των θηλυκών ιχθύων κλάσης I-II.

γ. Συγκέντρωση 17-β Οιστραδιόλης ορού

Οιστραδιόλη ορού
στα θηλυκά κλάσης I



Οιστραδιόλη ορού
στα αρσενικά κλάσης I



Γράφημα 30. Μεταβολή 17-β οιστραδιόλης ορού (pg/ml) των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Η συγκέντρωση της 17-β οιστραδιόλης ορού στα θηλυκά του ενυδρείου I (νερό λίμνης) εμφανίζει τη μέγιστη τιμή της στις 45 ημέρες, ενώ από εκεί



και πέρα μειώνεται στα αρχικά χαμηλά επίπεδα. Στην ομάδα ελέγχου (II) αρχικά παρατηρείται μείωση της οιστραδιόλης έως τις 30 ημέρες, ενώ ακολουθεί έντονη αύξηση μέχρι την κορύφωσή της στις 60 ημέρες και τέλος στις 120 ημέρες επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα. Στα θηλυκά του ενυδρείου III (τα οποία εκτέθηκαν σε 1ppb Cd), η υψηλότερη τιμή οιστραδιόλης εμφανίζεται στις 14 ημέρες (με σημαντική διαφορά από την ομάδα I, με $p=0,04$), ενώ στη συνέχεια παραμένει σταθερά χαμηλή μέχρι του τέλους της έκθεσης. Αντίθετα, στα θηλυκά του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd), ενώ μέχρι τις 45 ημέρες η συγκέντρωση της οιστραδιόλης ακολουθεί το πρότυπο του ενυδρείου III, μετά αρχίζει και αυξάνεται μέχρι τη μέγιστη τιμή της στις 120 ημέρες, η οποία είναι παρόμοια με τη μέγιστη του ενυδρείου I.

Στα αρσενικά όλων των ενυδρείων παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές οιστραδιόλης από ότι στα θηλυκά του αντίστοιχου ενυδρείου, με σημαντικά χαμηλότερες τιμές στις 14 ημέρες ανάμεσα στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα της ομάδας ελέγχου ($p=0,03$) και της ομάδας IV ($p=0,02$).

Πίνακας 54. Ανάλυση συσχέτισης μεταξύ παραμέτρων θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

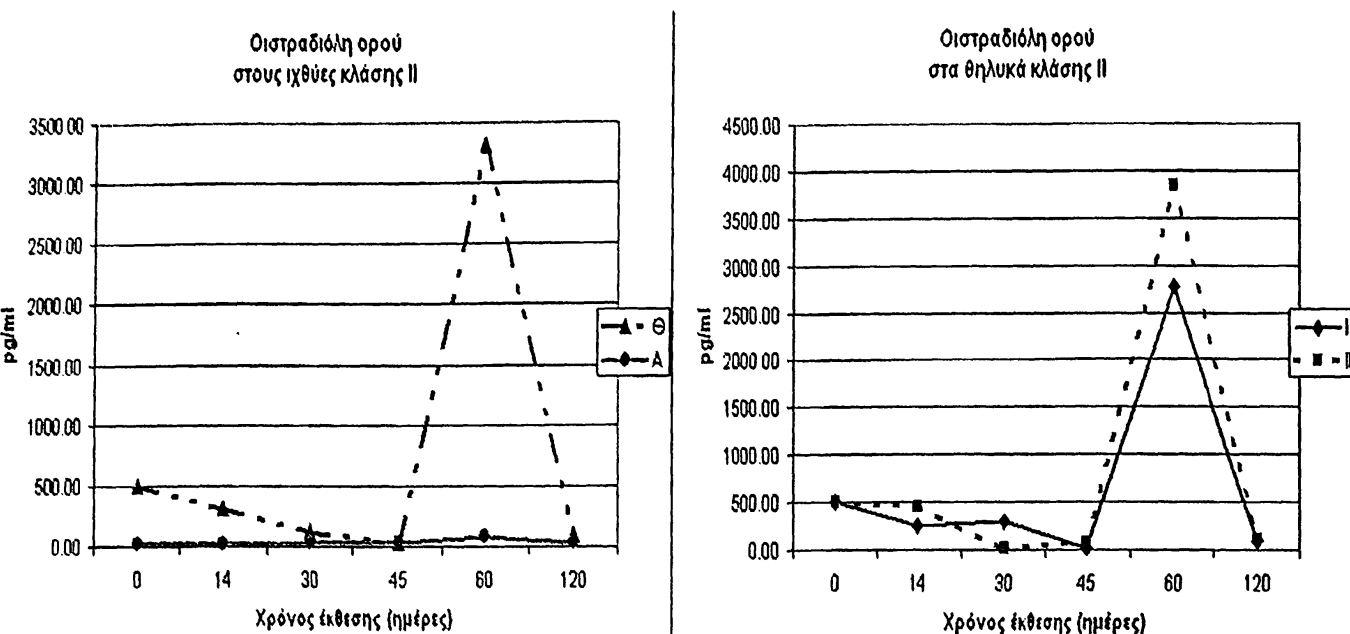
Ομάδα	Ημέρες	Cd				E ₂		
		Cd γον-E ₂	Cdήπ-E ₂	Cd γον-GSI	Cdήπ-LSI	E ₂ -GSI	E ₂ -LSI	GSI-LSI
II	30		-0.63					-0.90
	60	0.69		0.68	-0.73	0.95		
	120	1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00	1.00	-1.00
III	30							
	60							
	120	-0.77	0.85	0.80				
IV	30	-0.78	-0.78				0.69	
	60			-0.69	1.00	0.69		-0.71
	120			-1.00	1.00	0.99		0.67

Πίνακας 55. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων 17-β οιστραδιόλης ορού αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Παράμετρος	Ημέρες	I	II	III	IV
Οιστραδιόλη	14	0.75	0.03	0.69	0.02
	30	0.29	0.47	0.88	0.18
	45	0.24	0.39	0.61	0.56
	60	0.50			
	120		0.09		0.15



Κλάση II



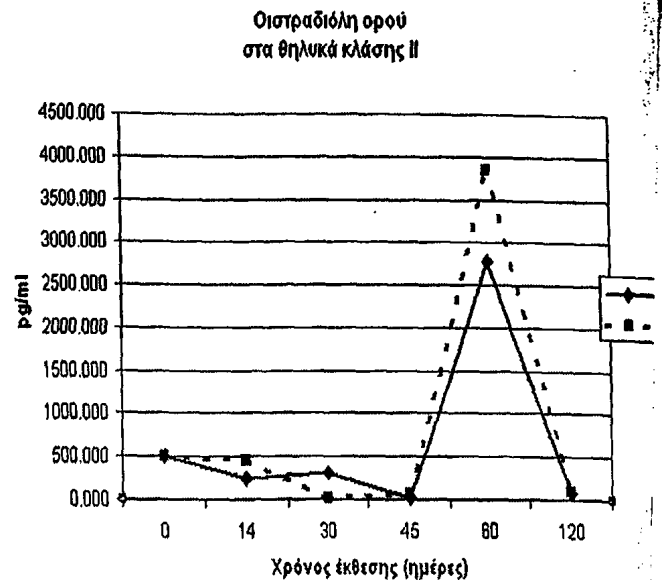
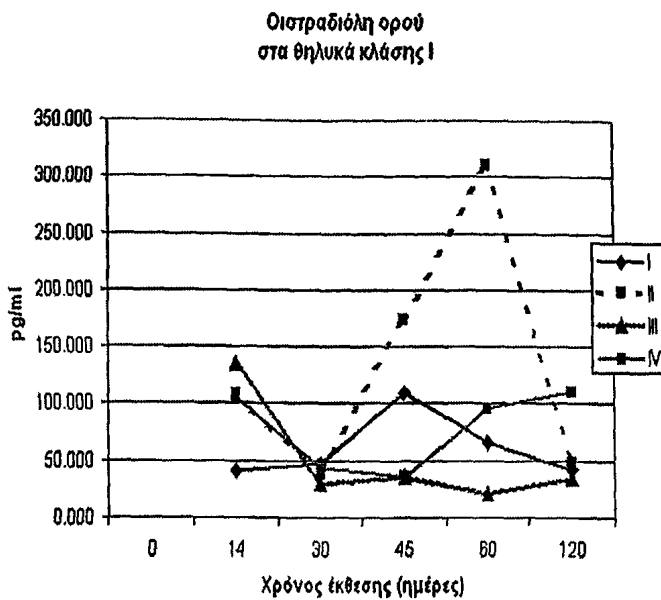
Γράφημα 31. Μεταβολή 17-β οιστραδιόλης ορού των ιχθύων κλάσης II.

Η συγκέντρωση της 17-β οιστραδιόλης ορού στα μεγαλύτερα ψάρια, κλάσης II, είναι ιδιαίτερα χαμηλή στα αρσενικά και κατά πολύ υψηλότερη στα θηλυκά ψάρια, σε όλες τις συνθήκες. Στα θηλυκά της κλάσης II του ενυδρείου I (νερό λίμνης), όπως και του ενυδρείου II (ομάδα ελέγχου), αρχικά παρατηρείται μείωση της οιστραδιόλης έως τις 45 ημέρες, ενώ ακολουθεί έντονη αύξηση μέχρι την κορυφή της στις 60 ημέρες και τέλος στις 120 ημέρες επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα. Στα αρσενικά όλων των ενυδρείων παρατηρούνται κατά πολύ χαμηλότερες τιμές οιστραδιόλης από ότι στα θηλυκά του αντίστοιχου ενυδρείου.

Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση 17-β οιστραδιόλης ορού των θηλυκών των δύο κλάσεων, οι τιμές που παρατηρούνται στα νεαρότερα άτομα είναι πολύ χαμηλότερες από των μεγαλύτερων, σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

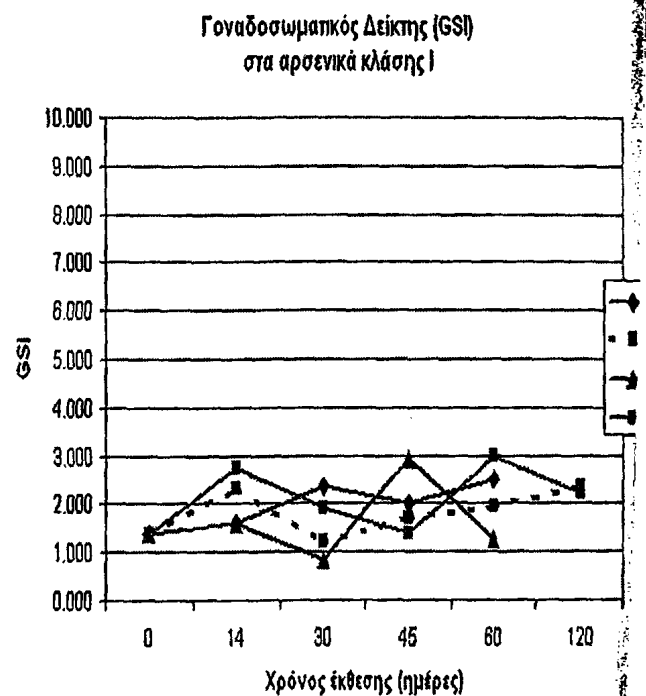
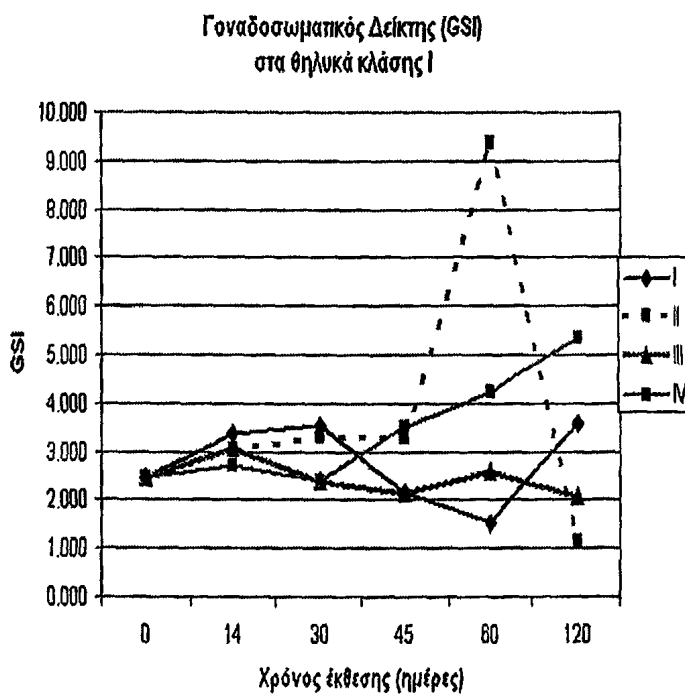
Πίνακας 56. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ των δύο φύλων σε σχέση με παραμέτρους των γονάδων αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης II.

Ιστός	Μέταλλο	I	II
Γονάδες	Cd	0.10	0.93
	Zn	0.00	0.00
	Οιστραδιόλη	0.32	0.27
	GSI	0.26	0.05



Γράφημα 32. Μεταβολή 17-β οιστραδιόλης ορού των θηλυκών ιχθύων κλάσης I-II.

δ. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI)



Γράφημα 33. Μεταβολή Γοναδοσωματικού (GSI) Δείκτη των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.

Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης GSI, στα θηλυκά του ενυδρείου I (νερό λίμνης) φαίνεται να είναι σταθερά χαμηλός, μειώνεται μάλιστα επιπλέον



στις 45 και 60 ημέρες. Η τιμή μάλιστα του GSI στα θηλυκά του ενυδρείου I στις 60 ημέρες είναι σημαντικά χαμηλότερη από ότι της ομάδας ελέγχου (II) ($p=0,04$). Στην ομάδα ελέγχου εμφανίζεται κορύφωση του δείκτη αύξησης των γονάδων στις 60 ημέρες, ενώ μειώνεται στο ελάχιστο στις 120 ημέρες. Στα θηλυκά του ενυδρείου III (1ppb Cd) οι τιμές του δείκτη είναι σταθερά χαμηλές σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ στα θηλυκά του ενυδρείου IV (5ppb Cd) παρατηρείται αύξηση του Γοναδοσωματικού δείκτη σε σχέση με τα άτομα του ενυδρείου III σχεδόν σε όλες τις συνθήκες μετά τις 30 ημέρες, και φτάνει στη μέγιστη τιμή του στις 120 ημέρες.

Στα αρσενικά όλων των ομάδων οι τιμές του GSI είναι σταθερά χαμηλές, ενώ στα αρσενικά του ενυδρείου IV η σημαντικά μεγαλύτερη τιμή του γοναδοσωματικού δείκτη σε σχέση με το ενυδρείο III εμφανίζεται στις 60 ημέρες έκθεσης σε Cd ($p=0,00$). Παρόμοιες τιμές παρατηρούνται στους ιχθύς στις υπόλοιπες συνθήκες.

Συγκρίνοντας την αύξηση των γονάδων θηλυκών και αρσενικών, οι τιμές που παρατηρούνται στα θηλυκά άτομα είναι σημαντικά υψηλότερες από των αρσενικών, έως τις 45 ημέρες (πίνακας 58).

Πίνακας 57. Συγκέντρωση Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$) στο ήπαρ και Γοναδοσωματικός (GSI) και Ηπατοσωματικός Δείκτης θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	Cd liv			GSI %			LSI %		
	II	III	IV	II	III	IV	II	III	IV
30	3.32±2.95 <i>n</i> =12	5.00±1.84 <i>n</i> =16	6.71±5.34 <i>n</i> =12	3.2±0.8	2.8±1.0	2.7±1.3	3.5±0.5	3.8±1.9	3.0±0.7
60	11.28±7.98† <i>n</i> =14	12.52±7.48* <i>n</i> =14	21.27±7.60* † <i>n</i> =14	4.4±2.9	2.4±0.9	4.0±1.3	2.4±0.9	2.5±0.8	2.3±0.7
120	18.64±9.78 <i>n</i> =4	9.44±2.69** <i>n</i> =4	37.22±10.07** <i>n</i> =6	1.1±0.0	2.1±1.0	6.0±7.4	1.7±0.4	2.5±0.6	2.3±0.2

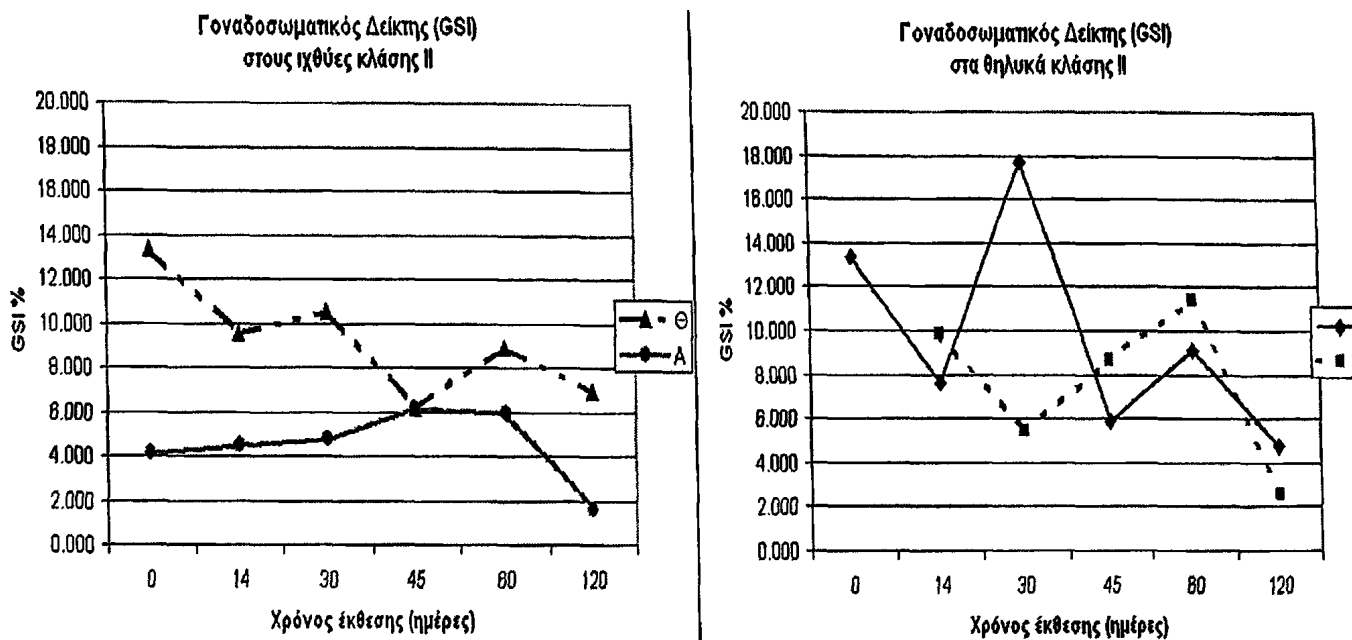
*, **, †: Σημαντική διαφορά μεταξύ ομάδας ελέγχου και ομάδων που εκτέθηκαν σε Cd ($p < 0.05$)

Πίνακας 58. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ GSI στις γονάδες αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Παράμετρος	Ημέρες	I	II	III	IV
GSI	14	0.04	0.02	0.23	0.99
	30	0.22	0.45	0.04	0.58
	45	0.88	0.03	0.03	0.12
	60	0.49	0.27	0.18	0.44
	120		0.11		0.55



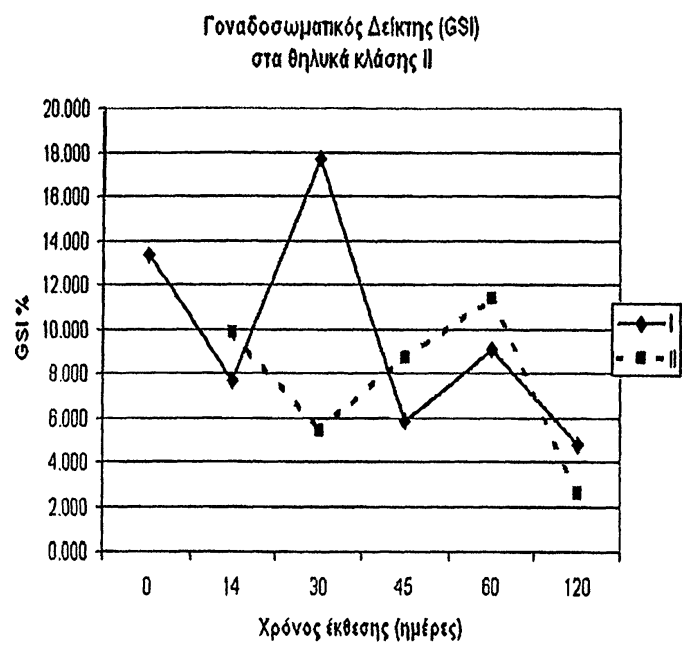
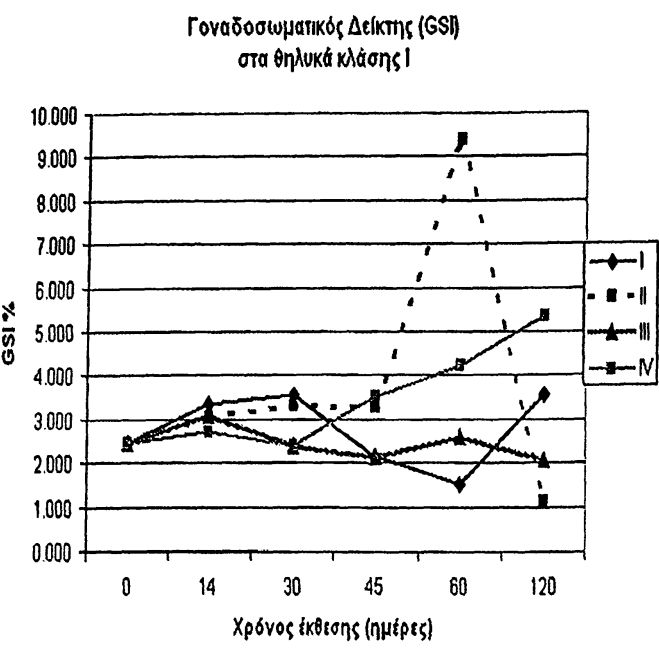
Κλάση II



Γράφημα 34. Μεταβολή Γοναδοσωματικού (GSI) Δείκτη των ιχθύων κλάσης II.

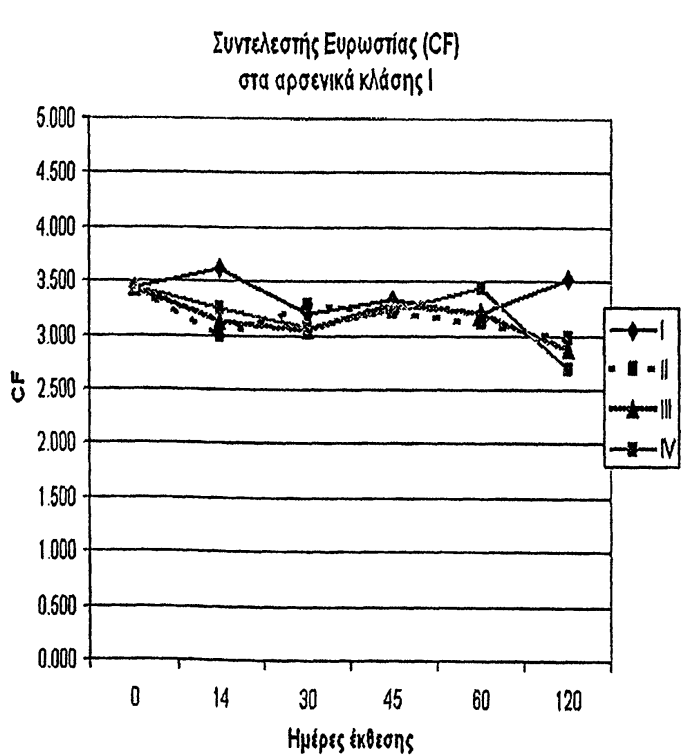
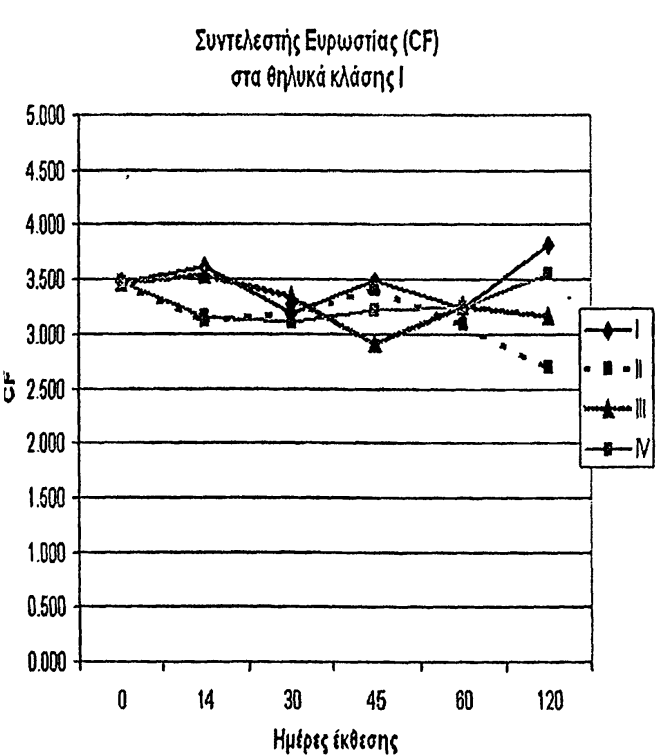
Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης GSI, στα θηλυκά της κλάσης II μειώνεται προοδευτικά και μάλιστα στις 45 ημέρες φτάνει στην ελάχιστη τιμή του, ενώ στα αρσενικά είναι γενικά χαμηλότερος από τα θηλυκά, και φτάνει στη μέγιστη τιμή του στις 45 και 60 ημέρες. Ο GSI στα θηλυκά του ενυδρείου I γενικά κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα από ότι της ομάδας ελέγχου (II) έως τις 30 ημέρες, κατόπιν μειώνεται σε παρόμοια επίπεδα. Στην ομάδα ελέγχου εμφανίζεται μέγιστη τιμή του δείκτη αύξησης των γονάδων στις 60 ημέρες, και ελάχιστη στις 120 ημέρες.

Συγκρίνοντας την αύξηση των γονάδων των θηλυκών των δύο κλάσεων, οι τιμές που παρατηρούνται στα νεαρότερα άτομα είναι γενικά χαμηλότερες από των μεγαλύτερων, σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, με εξαίρεση τις τιμές στις 60 ημέρες για την ομάδα ελέγχου, που είναι σε παρόμοια επίπεδα.



Γράφημα 35. Μεταβολή Γοναδοσωματικού (GSI) Δείκτη των θηλυκών ιχθύων κλάσης I-II.

ε. Μεταβολή Συντελεστή Ευρωστίας (CF)

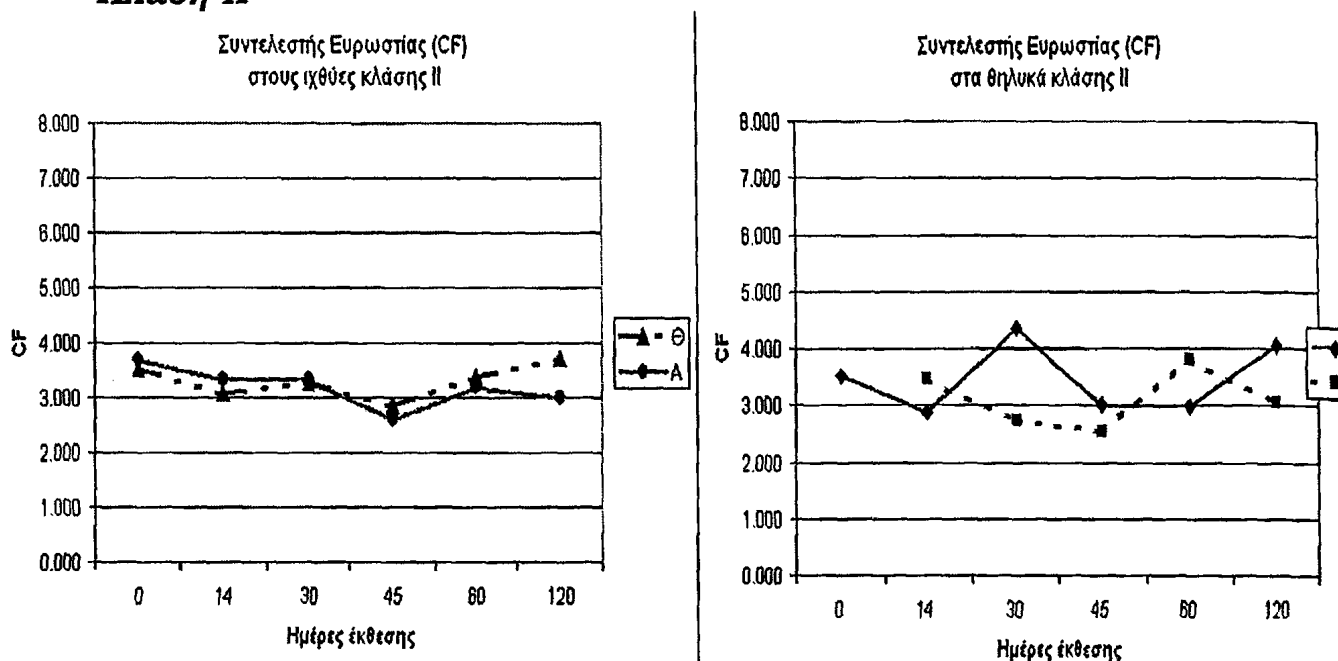


Γράφημα 36. Μεταβολή Συντελεστή Ευρωστίας (CF) των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd.



Ο Συντελεστής Ευρωστίας (CF), που εκφράζει τη σωματική αύξηση των ιχθύων, στα θηλυκά όλων των ενυδρείων φαίνεται να παραμένει σταθερός, με την ομάδα I να εμφανίζει ελαφρώς αυξητικές τάσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Στα αρσενικά όλων των ομάδων ο συντελεστής κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα όπως και στα θηλυκά, ενώ παρατηρείται και μία ελαφρά μείωση του συντελεστή στις 120 ημέρες έκθεσης με Cd σε σχέση με τις 60 ημέρες έκθεσης, σε όλες τις ομάδες πλην της ομάδας I. Γενικά οι τιμές του συντελεστή ευρωστίας που παρατηρούνται στα θηλυκά και των ενυδρείων, είναι κατά τι υψηλότερες από ότι στα αρσενικά, υποδεικνύοντας ότι η έκθεση με Cd πιθανόν να επηρεάζει περισσότερο την σωματική αύξηση των αρσενικών.

Κλάση II



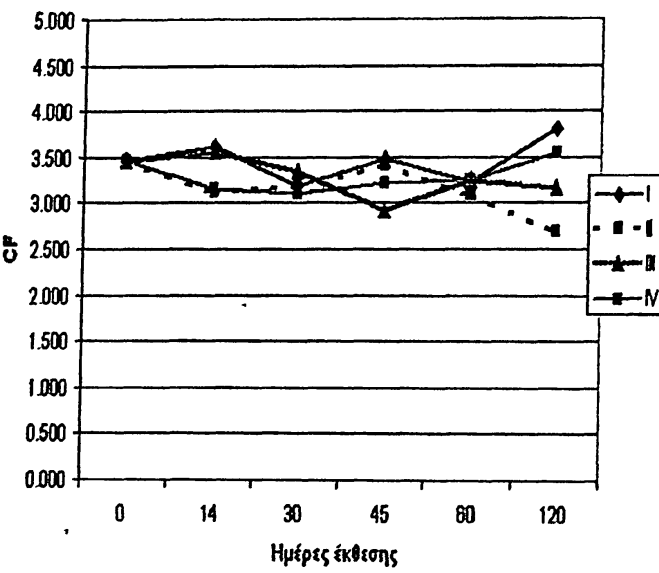
Γράφημα 37. Μεταβολή Συντελεστή Ευρωστίας (CF) των ιχθύων κλάσης II.

Ο Συντελεστής Ευρωστίας (CF), στα θηλυκά της κλάσης II φαίνεται να παραμένει σταθερός, ενώ στα αρσενικά είναι κατά τι χαμηλότερος από τα θηλυκά. Ο Συντελεστής στα θηλυκά του ενυδρείου I γενικά κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα από ότι της ομάδας ελέγχου (II). Στην ομάδα ελέγχου για τα θηλυκά εμφανίζεται μέγιστη τιμή του συντελεστή στις 60 ημέρες.

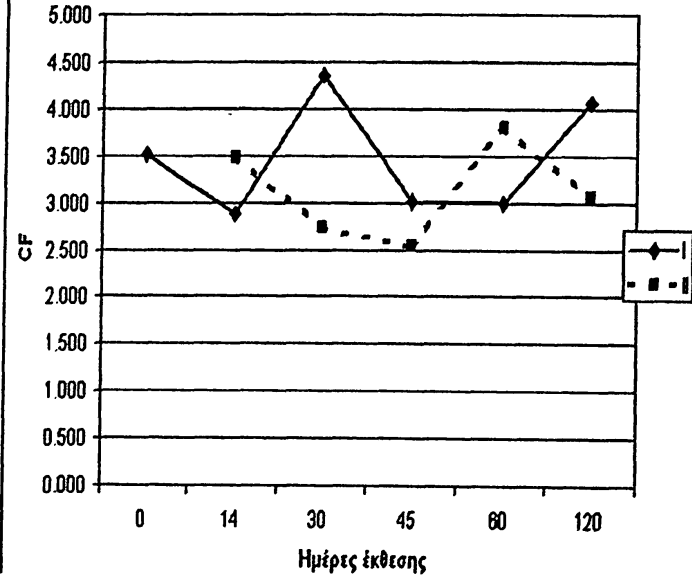
Συγκρίνοντας την σωματική αύξηση των θηλυκών των δύο κλάσεων, οι τιμές που παρατηρούνται στα νεαρότερα άτομα είναι μάλλον χαμηλότερες από των μεγαλύτερων ατόμων. Γενικά επειδή οι τιμές του συντελεστή ευρωστίας που παρατηρούνται στα θηλυκά, είναι κατά τι υψηλότερες από ότι στα αρσενικά, είναι πιθανόν η έκθεση με Cd να επηρεάζει περισσότερο την σωματική αύξηση των αρσενικών.



Συντελεστής Ευρωστίας (CF)
στα θηλυκά κλάσης I



Συντελεστής Ευρωστίας (CF)
στα θηλυκά κλάσης II



Γράφημα 38. Μεταβολή Συντελεστή Ευρωστίας (CF) των θηλυκών ιχθύων κλάσης I-II.



στ. Παθολογοανατομικές εξετάσεις γονάδων

Για την εκτίμηση του σταδίου ωρίμανσης των γονάδων, μετά το πέρας του χρόνου έκθεσης (0, 14, 30, 45, 60 και 120 ημέρες) των ιχθύων στα διαλύματα των μετάλλων, λήφθηκαν δείγματα γονάδων από ιχθύς όλων των ενυδρείων, τα οποία προετοιμάστηκαν κατάλληλα (μονιμοποίηση σε διάλυμα φορμόλης 10%, αφυδάτωση με εμβάπτισή τους σε σειρά ανιουσών αλκοολών και εγκλεισμός σε κύβους παραφίνης). Κατόπιν έγιναν τομές 5μm, οι οποίες χρωματίστηκαν με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H+E) για τη μορφολογική παρατήρηση των ιστών.

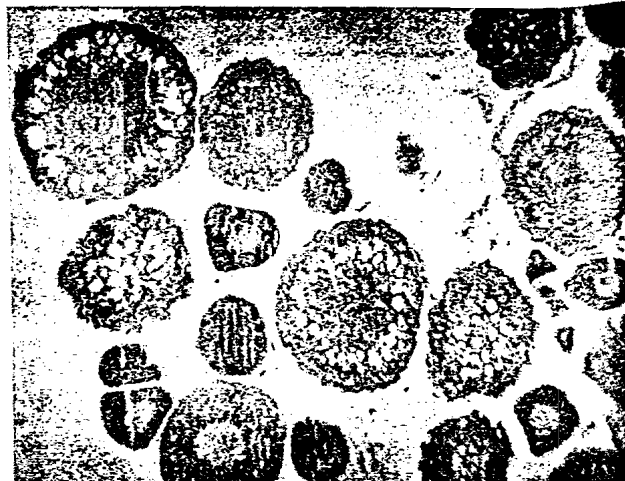
Κλάση I

14 ημέρες-Θηλυκά



Εικόνα 22. Ομάδα I (10X).

Εμφάνιση πρώιμων βιτελλογενικών ωοκυττάρων σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (F₂)



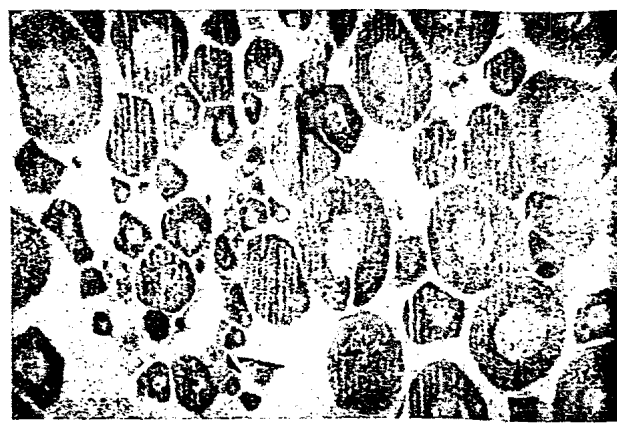
Εικόνα 24. Ομάδα III (10X).

Εμφάνιση πρώιμων βιτελλογενικών ωοκυττάρων σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (F₂)



Εικόνα 23. Ομάδα II (10X).

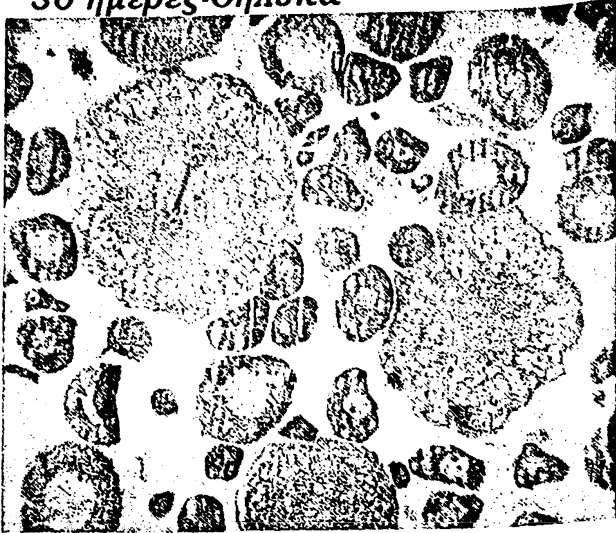
Εμφάνιση δευτερογενών βιτελλογενικών ωοκυττάρων (F_{3a}) σε διάφορα στάδια ωρίμανσης



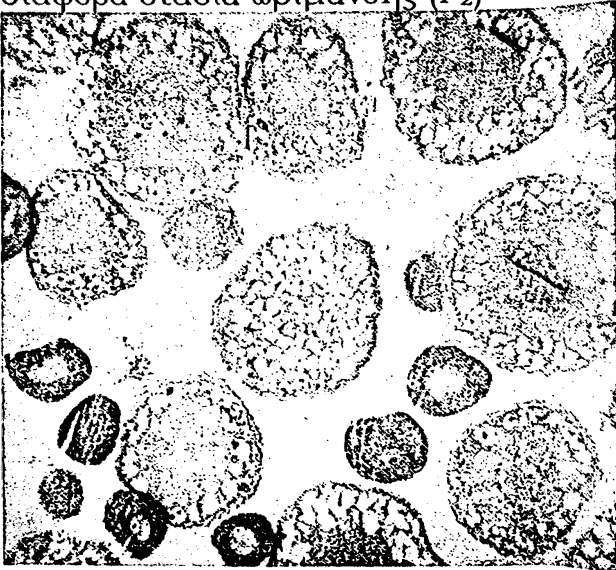
Εικόνα 25. Ομάδα IV (10X).

Εμφάνιση ανώριμων ωοκυττάρων (F₁)

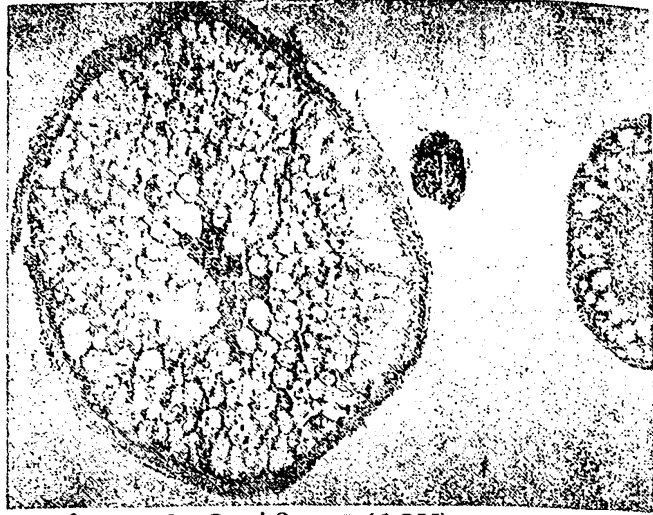
30 ημέρες-Θηλυκά



Εικόνα 26. Ομάδα I (10X).
Εμφάνιση πρώιμων
βιτελλογενικών ωοκυττάρων σε
διάφορα στάδια ωρίμανσης (F₂)



Εικόνα 27. Ομάδα II (10X).
Εμφάνιση πρώιμων
βιτελλογενικών ωοκυττάρων σε
διάφορα στάδια ωρίμανσης (F₂)
και προχωρημένων δευτερογενών
(F_{3b}) ωοκυττάρων, αραιός ιστός

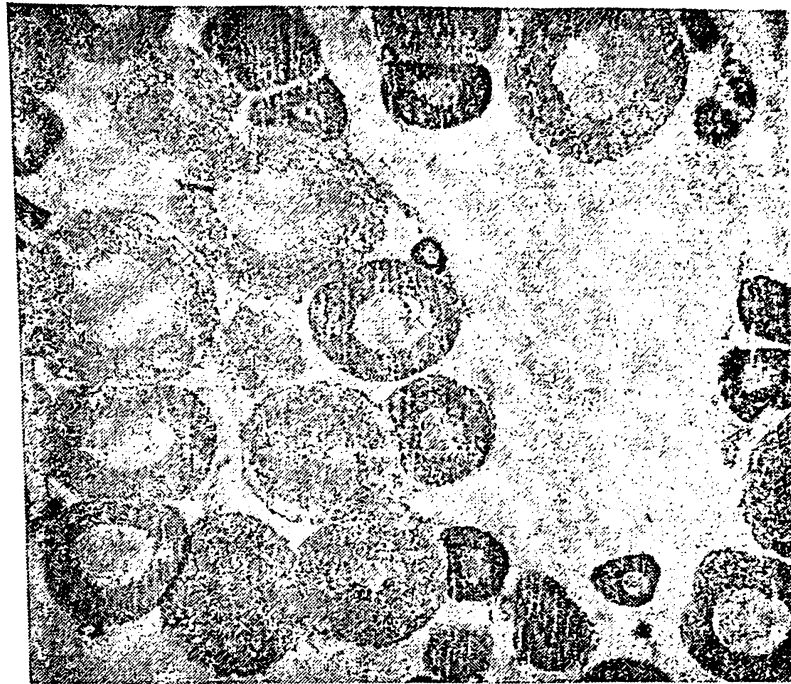
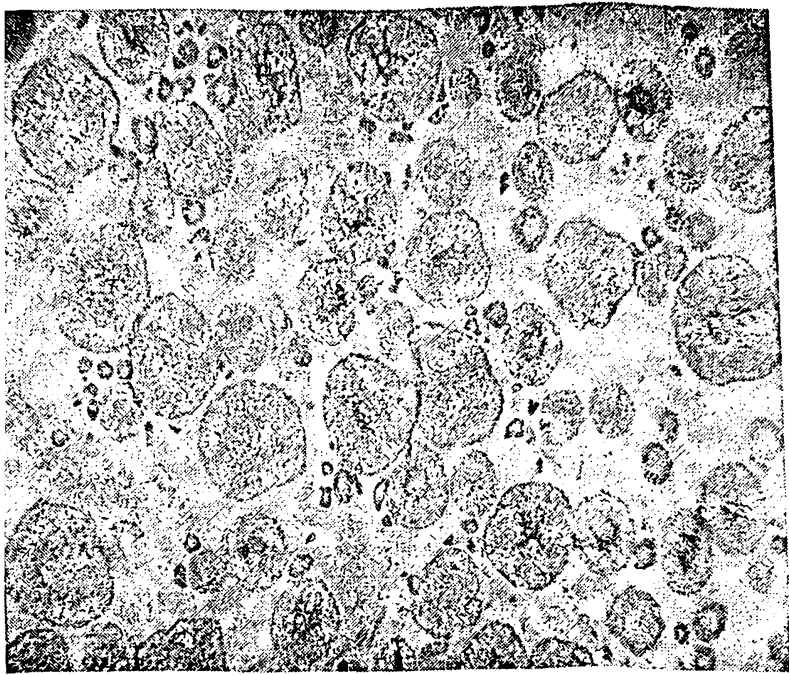


Εικόνα 28. Ομάδα III (10X).
Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών βιτελλογενικών (F_{3b})
ωοκυττάρων, διακριτός πυρήνας,
αραιός ιστός



Εικόνα 29. Ομάδα IV (10X).
Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών (F_{3b}) βιτελλογενικών
ωοκυττάρων, διακριτός πυρήνας,
αραιός ιστός

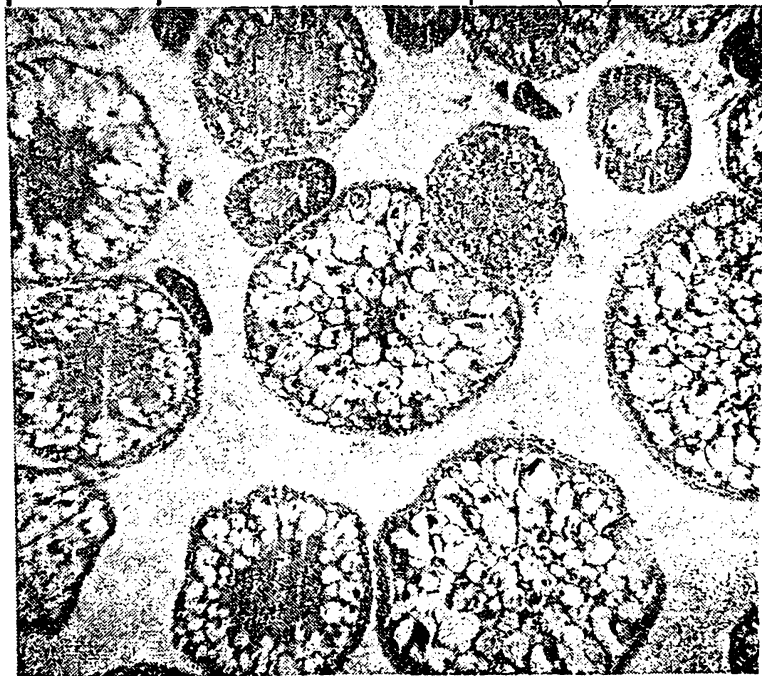
45 ημέρες-Θηλυκά



Εικόνα 32. Ομάδα III (10X, 40X).
Εμφάνιση πρώιμων
βιτελλογενικών ωοκυττάρων (F_2)



Εικόνα 30-31. Ομάδα II (2.5X,
10X). Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών βιτελλογενικών (F_{3b})
ωοκυττάρων, διακριτός πυρήνας



Εικόνα 33. Ομάδα IV (10X).
Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών (F_{3b}) και τριτογενών
βιτελλογενικών ωοκυττάρων,

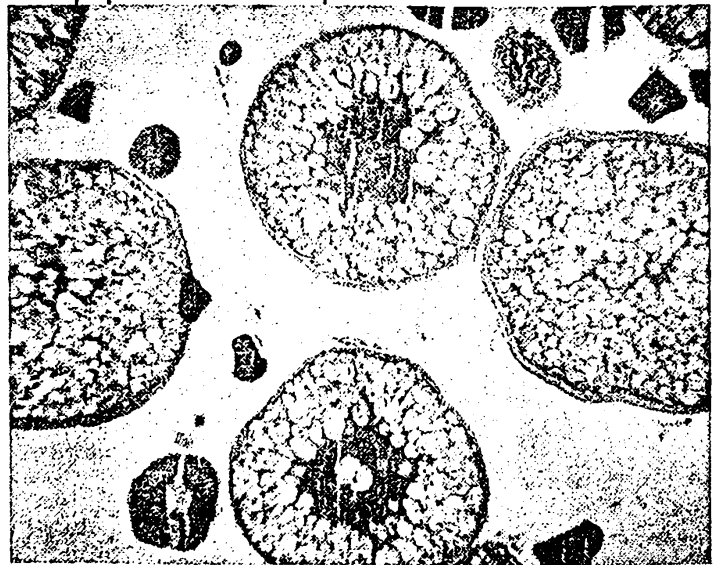
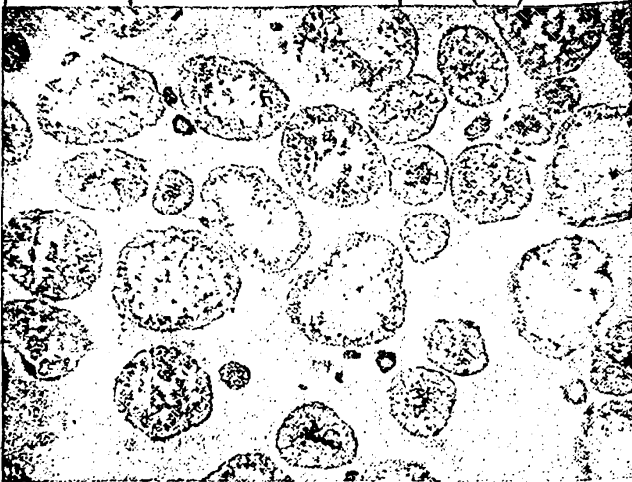




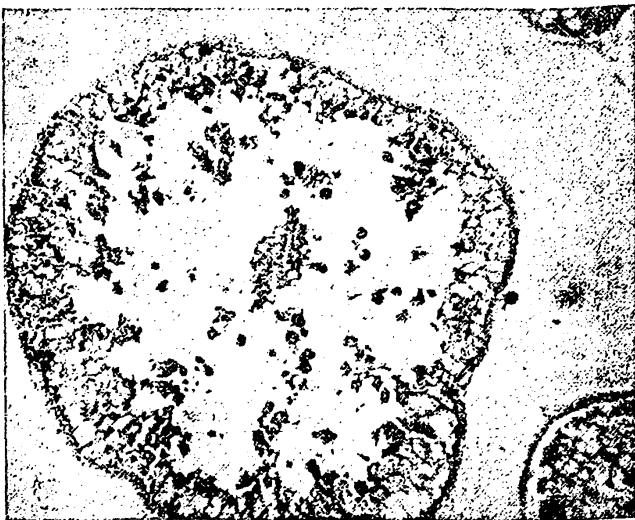
Εικόνα 34. Ομάδα I (10X).
Εμφάνιση πρώτων
βιτελλογενικών ωοκυττάρων (F₂)



Εικόνα 37. Ομάδα III (10X).
Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών (F_{3b}) και τριτογενών
βιτελλογενικών ωοκυττάρων,
μετακίνηση πυρήνα, αλλά και
ανώριμων ωοκυττάρων



Εικόνα 38. Ομάδα IV (10X).
Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών (F_{3b}) και τριτογενών
βιτελλογενικών ωοκυττάρων,
μετακίνηση πυρήνα



Εικόνα 35-36. Ομάδα II (2.5X,
10X). Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών (F_{3b}) και τριτογενών
ωοκυττάρων, μετακίνηση πυρήνα

Κλάση II
0 ημέρες-Θηλυκά



Εικόνα 39-40. Ομάδα I (2.5X, 10X). Εμφάνιση ώριμων ωοκυττάρων πλήρων λεκίθου (F4)

14 ημέρες-Θηλυκά



Εικόνα 41. Ομάδα I (10X). Εμφάνιση προχωρημένων δευτερογενών (F3b) και τριτογενών βιτελλογενικών ωοκυττάρων, μετακίνηση πυρήνα



Εικόνα 42. Ομάδα II (10X). Εμφάνιση ατρησιακών ωοκυττάρων (F3b)



30 ημέρες-Θηλυκά

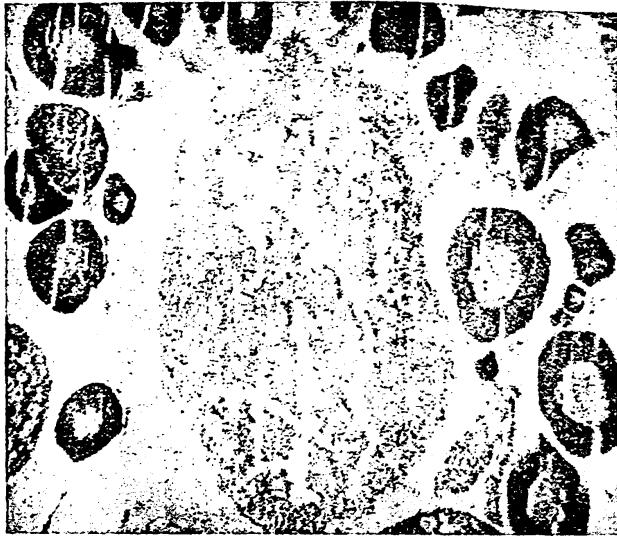


Εικόνα 43. Ομάδα I (10X).
Εμφάνιση προχωρημένων
τριτογενών ωοκυττάρων (F3b),
μετακίνηση πυρήνα

45 ημέρες-Θηλυκά



Εικόνα 45. Ομάδα I (10X).
Εμφάνιση πρώιμων
βιτελλογενικών ωοκυττάρων (F2),
παρουσία μελανών σωματιδίων στο
υπόστρωμα και σε εκφυλισμένα
κύτταρα

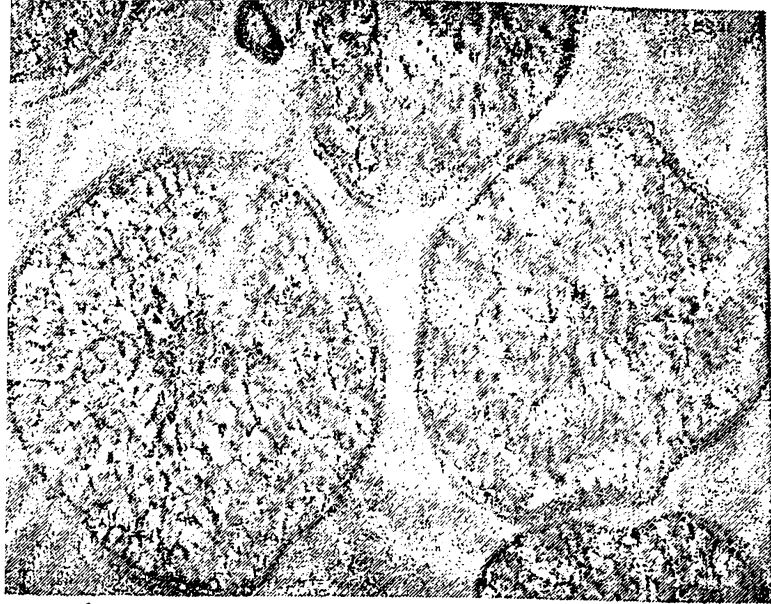


Εικόνα 44. Ομάδα II (10X).
Εμφάνιση τριτογενών
βιτελλογενικών ωοκυττάρων (F3b),
παρουσία και ανώριμων
ωοκυττάρων



Εικόνα 46. Ομάδα II (10X).
Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών βιτελλογενικών (F3b)
ωοκυττάρων, διακριτός πυρήνας

60 ημέρες-Θηλυκά

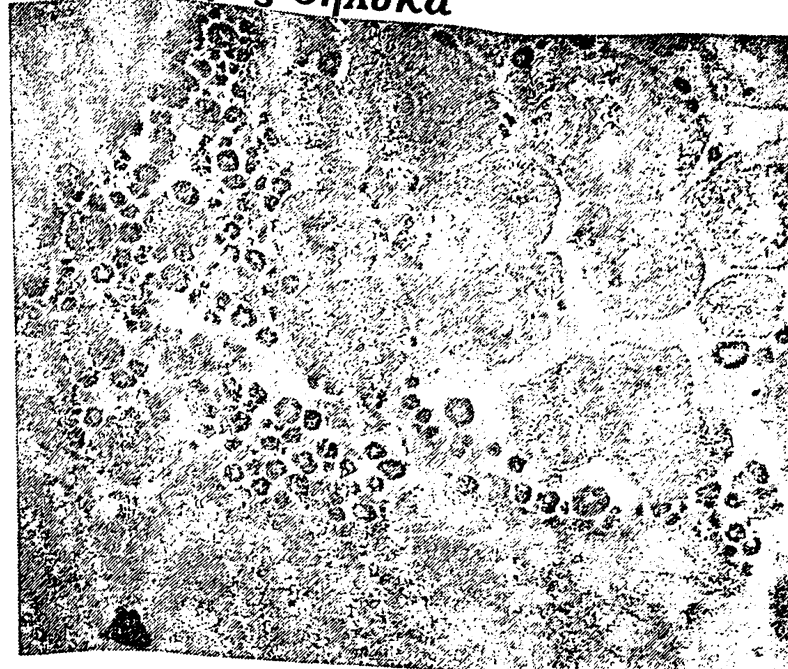


Εικόνα 47. Ομάδα II (10X).
Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών βιτελλογενικών (F_{3b})
ωοκυττάρων, διακριτός πυρήνας



Εικόνα 48. Ομάδα II (10X).
Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών (F_{3b}) και τριτογενών
βιτελλογενικών ωοκυττάρων,
μετακίνηση πυρήνα

120 ημέρες-Θηλυκά

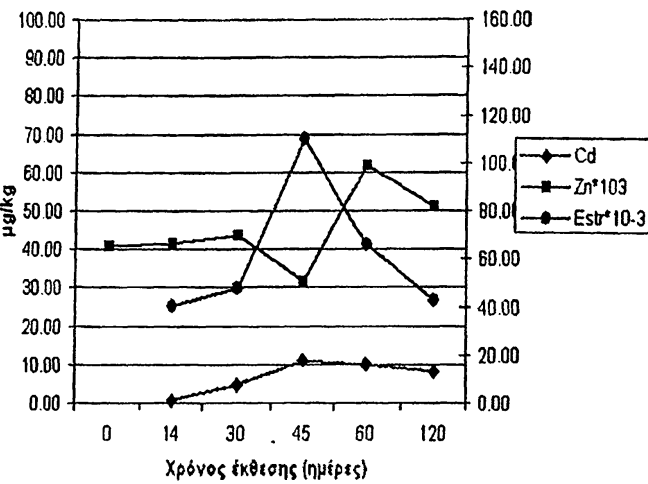


Εικόνα 49-50. Ομάδα I (2.5X,
10X). Εμφάνιση προχωρημένων
δευτερογενών (F_{3b}) και τριτογενών
βιτελλογενικών ωοκυττάρων

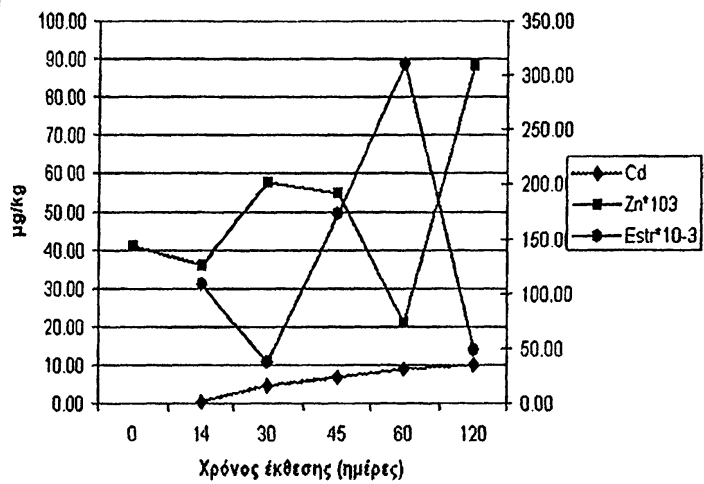


ζ. Μεταβολή μετάλλων στις γονάδες, 17β-οιστραδιόλης και δεικτών αύξησης μετά την έκθεση σε Cd.

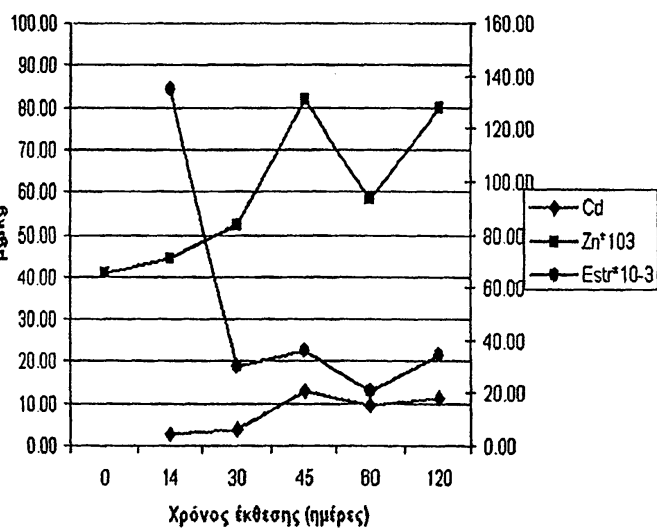
Μεταβολή Μετάλλων γονάδων και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου I



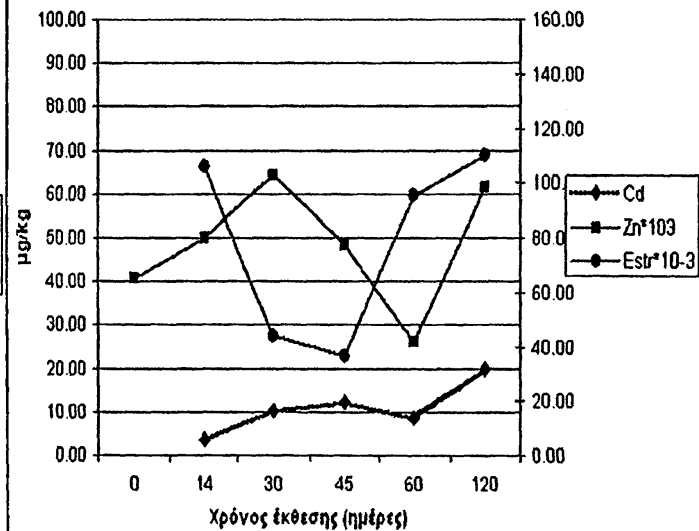
Μεταβολή Μετάλλων γονάδων και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου II



Μεταβολή Μετάλλων γονάδων και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου III



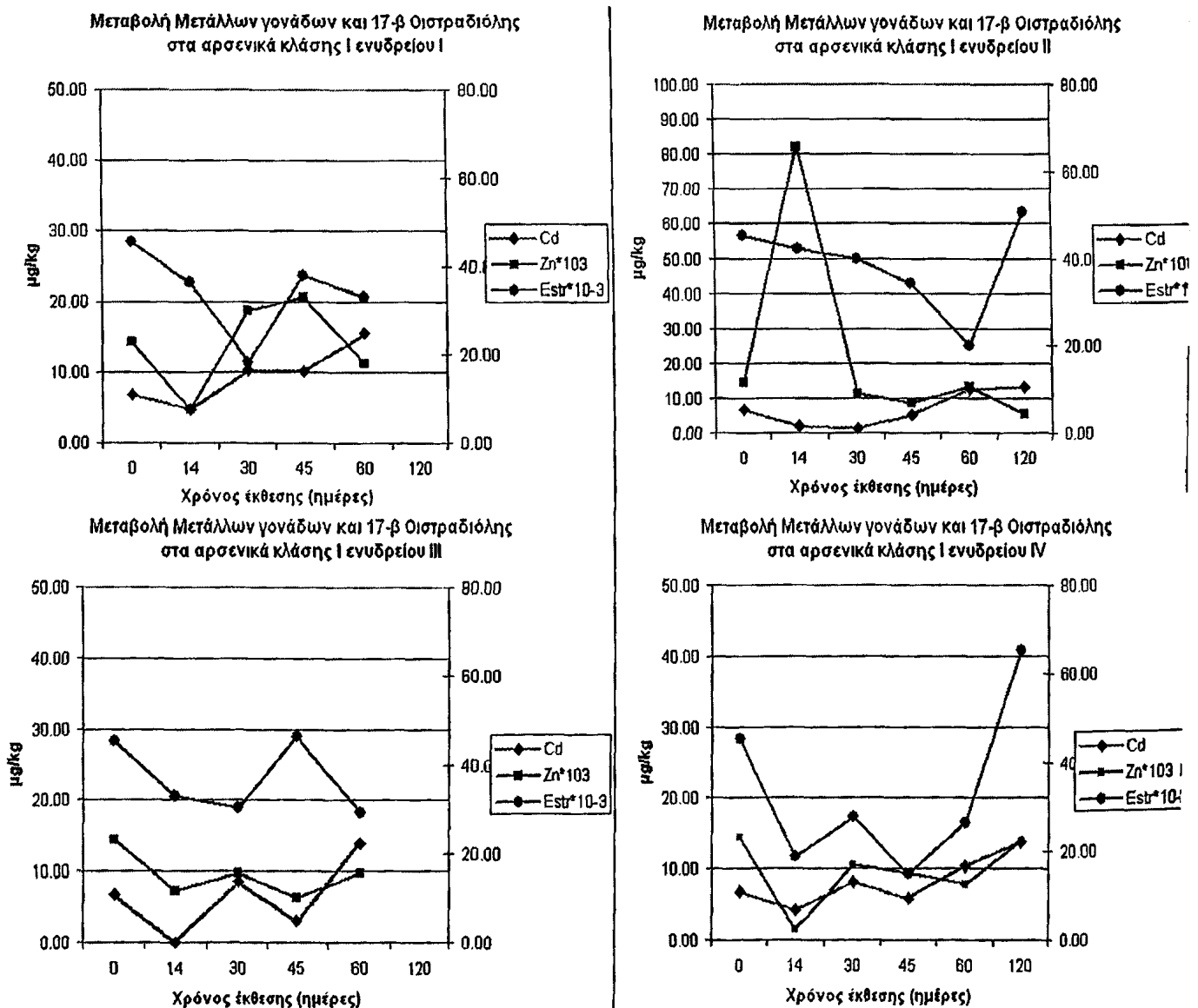
Μεταβολή Μετάλλων γονάδων και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου IV



Γράφημα 39. Μεταβολή μετάλλων γονάδων και 17-β οιστραδιόλης ορού των θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Στα θηλυκά των ενυδρείων I (νερό λίμνης), III (1ppb Cd) και IV (5ppb Cd) η συγκέντρωση Zn μεταβάλλεται παρόμοια με τη συγκέντρωση του Cd, υποδεικνύοντας πιθανή συνεργιστική δράση των δύο μετάλλων. Η τάση αυτή δεν ακολουθείται στο ενυδρείο II (νερό βρύσης). Η συσσώρευση πάντως του Cd στις γονάδες δείχνει χρονο-εξαρτώμενη μεταβολή της επιβάρυνσης σε όλες τις συνθήκες.

Η οιστραδιόλη ορού στα θηλυκά των ενυδρείων I (νερό λίμνης), II (νερό βρύσης) και IV (5ppb Cd) στο κρίσιμο χρονικό διάστημα των 30-60 ημερών, οπότε κορυφώνεται, μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες, ενώ στο ενυδρείο IV παρατηρείται επιπλέον αντίστροφη μεταβολή οιστραδιόλης και συσσώρευσης Cd. Πάντως η κορύφωση της οιστραδιόλης καθυστερεί από το ενυδρείο I στο II και κατόπιν στο IV, ενώ σε αυτά τα χρονικά διαστήματα μειώνεται και η συγκέντρωση του Zn, ο οποίος πιθανώς χρησιμοποιείται στη βιογένεση των ορμονών. Στο ενυδρείο III (1ppb Cd), η 17-β οιστραδιόλη ορού συμμεταβάλλεται με τα μέταλλα, ειδικά με τον Zn, από τις 30 ημέρες και μετά, οπότε και ελαχιστοποιείται. Γενικά στο ενυδρείο III παρατηρούνται πιο σοβαρές επιδράσεις. Μειώνονται δραματικά τα επίπεδα της οιστραδιόλης, ενώ ο Zn στις γονάδες ο οποίος κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα, ίσως δεν διατίθεται για παραγωγή ορμονών.



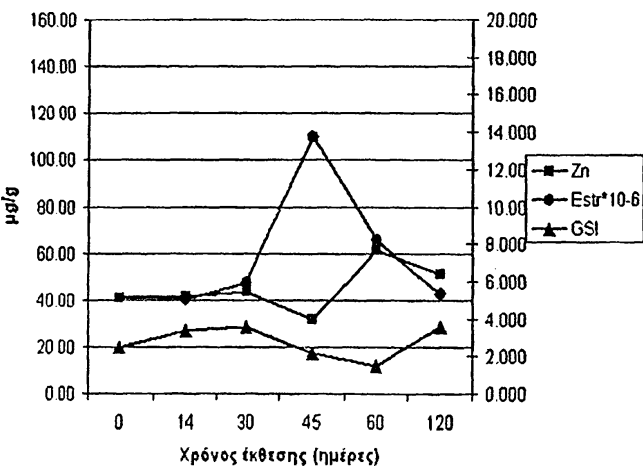
Γράφημα 40. Μεταβολή μετάλλων γονάδων και 17-β οιστραδιόλης ορού των αρσενικών ιχθύων κλάσης I.



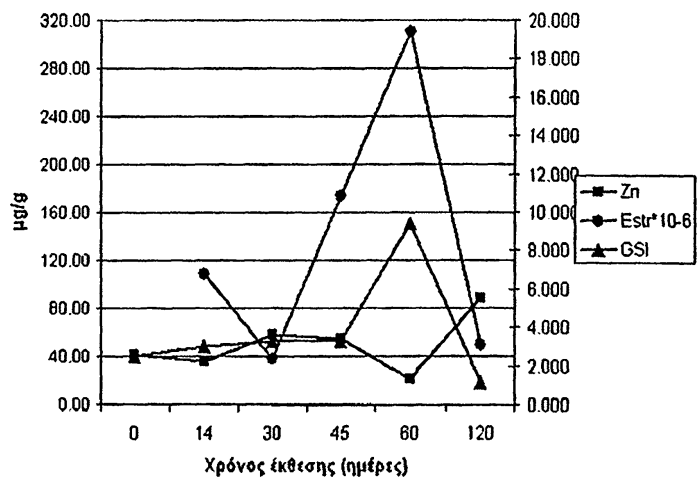
Στα αρσενικά των ενυδρείων I, III (1ppb Cd) και IV (5ppb Cd) παρατηρείται συμμεταβολή των συγκεντρώσεων Cd και Zn, υποδεικνύοντας πιθανή συνεργιστική δράση των δύο μετάλλων και στα αρσενικά. Η τάση αυτή δεν ακολουθείται στο ενυδρείο II (ομάδα ελέγχου), όπου η μεταβολή είναι αντίστροφη. Η συσσώρευση πάντως του Cd στις γονάδες των αρσενικών δείχνει επίσης χρονο-εξαρτώμενη μεταβολή σε όλες τις συνθήκες.

Η οιστραδιόλη ορού στα αρσενικά των ενυδρείων I, II και III στο χρονικό διάστημα των 30-60 ημερών, μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση των μετάλλων στις γονάδες, ενώ στο ενυδρείο IV παρατηρείται συμμεταβολή οιστραδιόλης και μετάλλων, αντίθετα από ότι στα θηλυκά, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Έτσι φαίνεται ότι το κάδμιο δεν επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο το ορμονικό προφίλ στα δύο φύλα. Γενικά η οιστραδιόλη ορού κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα στα αρσενικά και δε φαίνεται να συσχετίζεται με τα μέταλλα, οπότε δεν υπάρχουν ενδείξεις θηλεοποίησής τους.

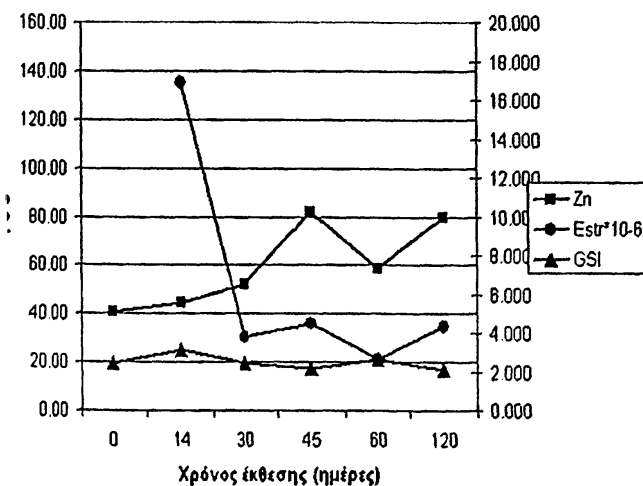
Μεταβολή Zn γονάδων, GSI και και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου I



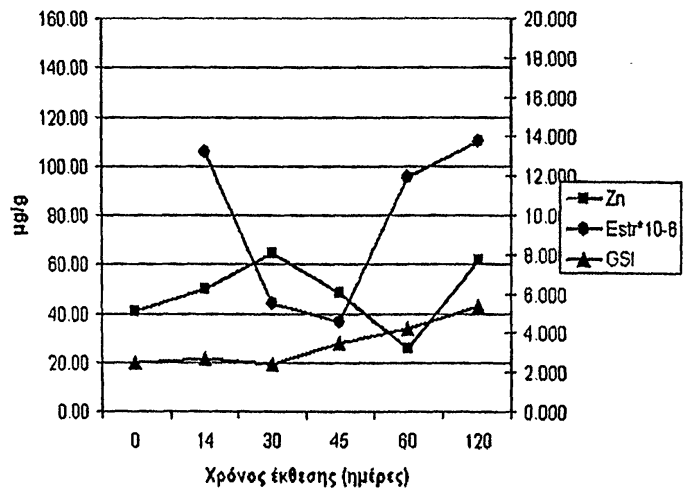
Μεταβολή Zn γονάδων, GSI και και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου II



Μεταβολή Zn γονάδων, GSI και και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου III



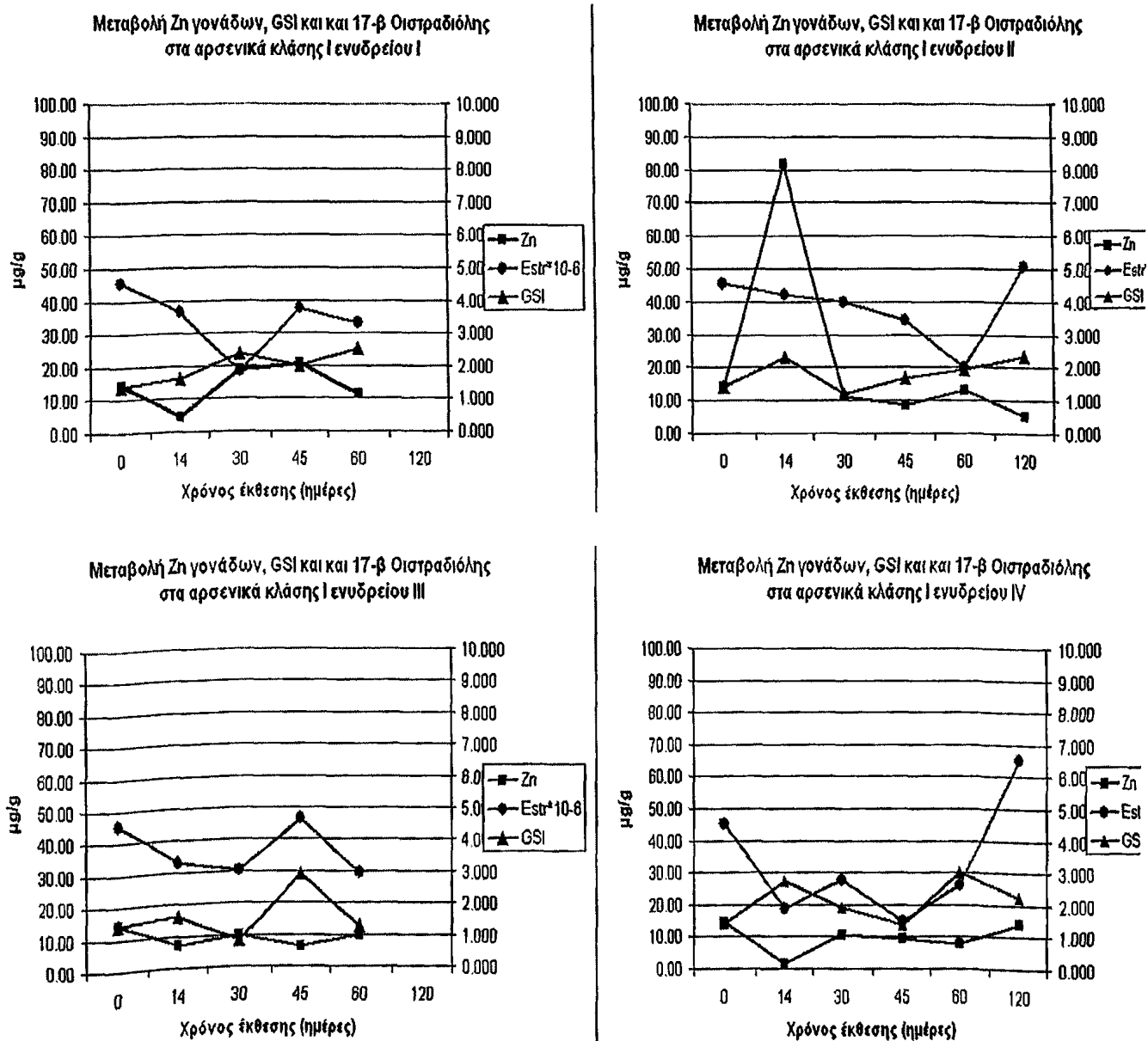
Μεταβολή Zn γονάδων, GSI και και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου IV



Γράφημα 41. Μεταβολή Zn γονάδων, Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και 17-β οιστραδιόλης ορού των θηλυκών ιχθύων κλάσης I.



Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης, GSI, στα θηλυκά του ενυδρείου I εμφανίζει ίδιο προφίλ μεταβολής με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες έως τις 45 ημέρες, ενώ οι δυο παράμετροι μεταβάλλονται αντίστροφα από εκεί και πέρα, όπως και ο GSI με τη 17-β οιστραδιόλη ορού. Στα θηλυκά του ενυδρείου II ο δείκτης αύξησης των γονάδων μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες ενώ συμμεταβάλλεται με τη 17-β οιστραδιόλη ορού από τις 45 ημέρες και μετά. Η ίδια τάση εμφανίζεται και στα θηλυκά του ενυδρείου IV, ενώ στα θηλυκά του ενυδρείου III ο GSI μεταβάλλεται αντίστροφα τόσο με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες, όσο και με τη 17-β οιστραδιόλη ορού. Έτσι φαίνεται ότι η παρουσία 1ppb καδμίου έχει διαταράξει τη σχέση οιστραδιόλης-Zn όπως και την αύξηση του GSI.

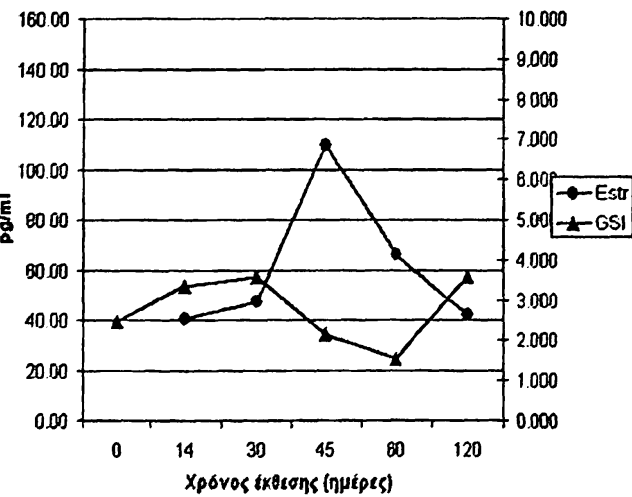


Γράφημα 42. Μεταβολή Zn γονάδων, Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και 17-β οιστραδιόλης ορού των αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

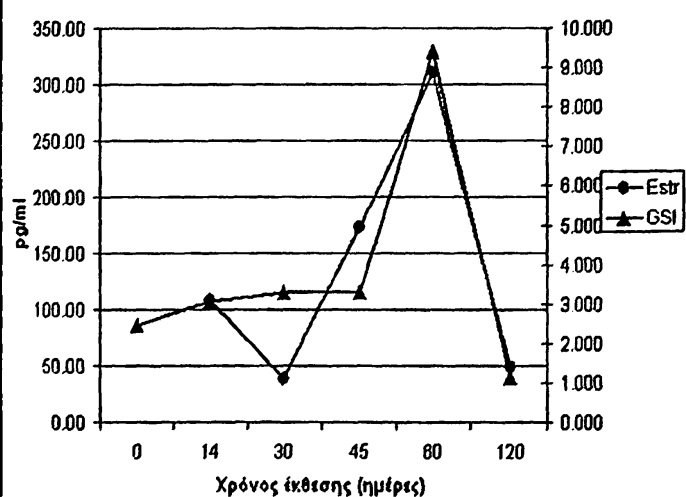


Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης, GSI, στα αρσενικά των ενυδρείων I και II εμφανίζει ίδιο προφίλ μεταβολής με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες έως τις 30 ημέρες, ενώ οι δυο παράμετροι μεταβάλλονται αντίστροφα από εκεί και πέρα, όπως και ο GSI με τη 17-β οιστραδιόλη ορού σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στα αρσενικά του ενυδρείου III ο δείκτης αύξησης των γονάδων μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες ενώ συμμεταβάλλεται με τη 17-β οιστραδιόλη ορού, όπως και στα θηλυκά του ίδιου ενυδρείου. Η ίδια τάση εμφανίζεται και στα αρσενικά του ενυδρείου IV, ο GSI μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες, ενώ μεταβάλλεται ανάλογα με τη 17-β οιστραδιόλη ορού από τις 30 έως τις 60 ημέρες έκθεσης.

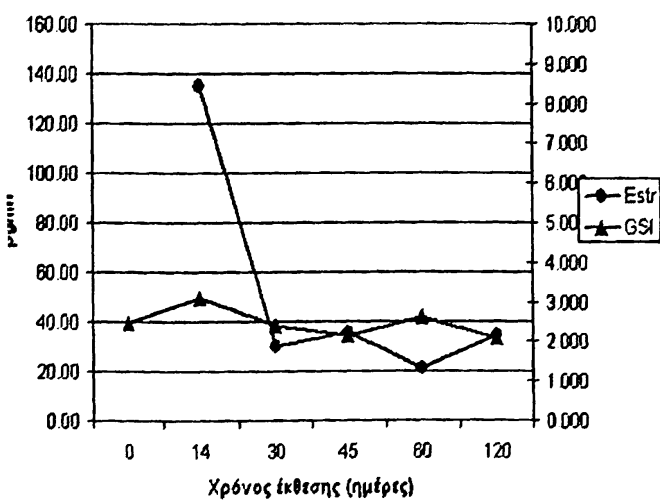
GSI και οιστραδιόλη στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου I



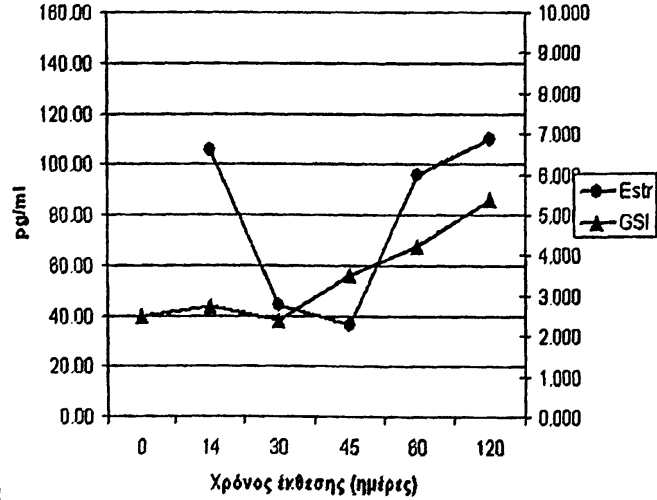
GSI και οιστραδιόλη στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου II



GSI και οιστραδιόλη στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου III

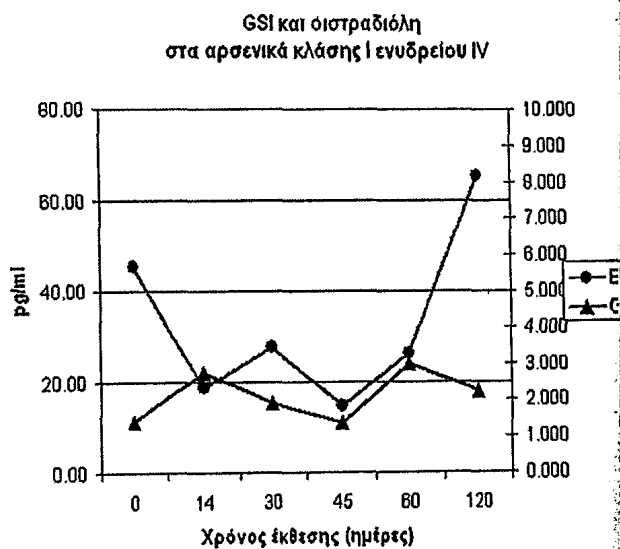
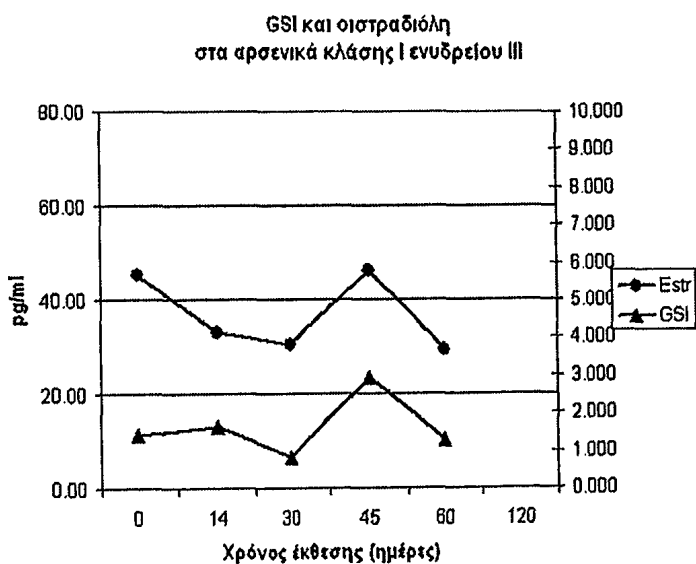
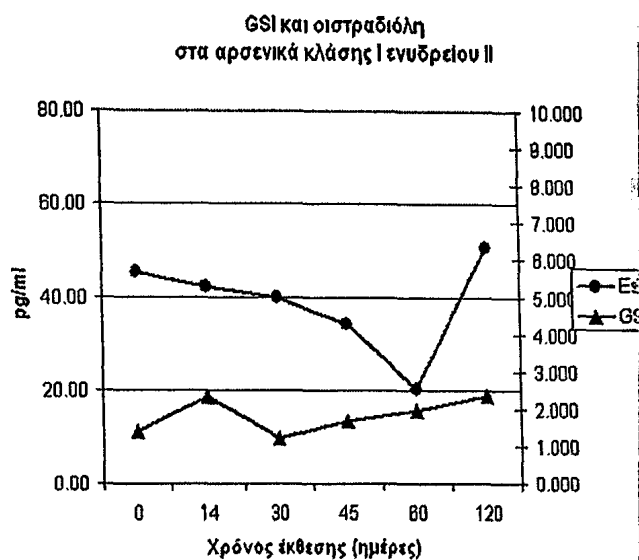
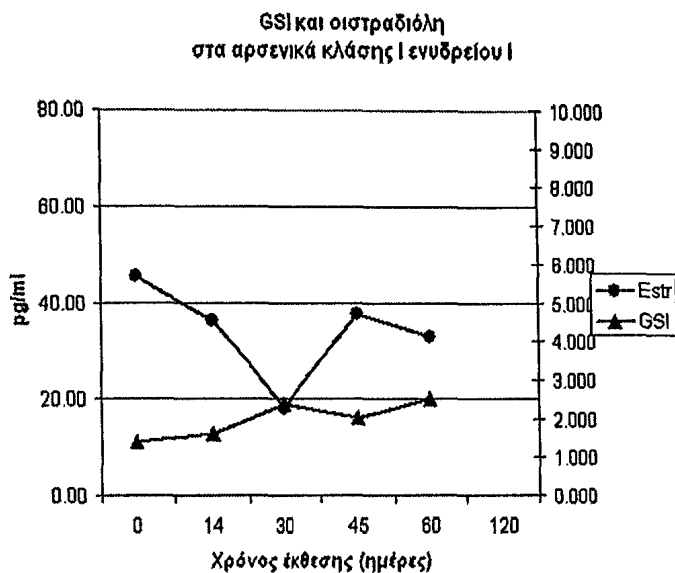


GSI και οιστραδιόλη στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου IV



Γράφημα 43. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και 17-β οιστραδιόλης ορού των θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

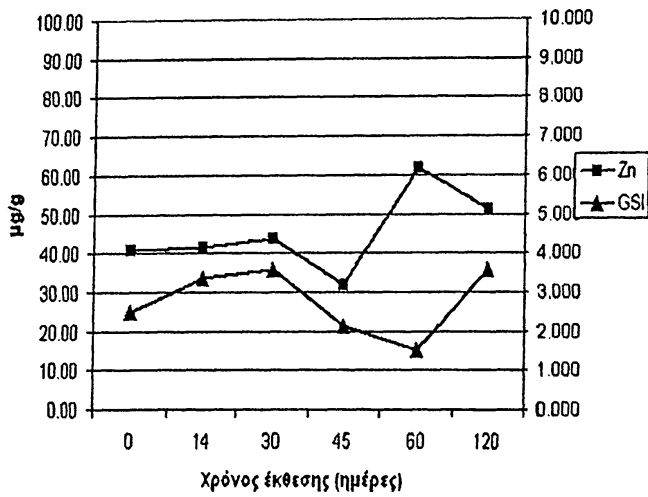




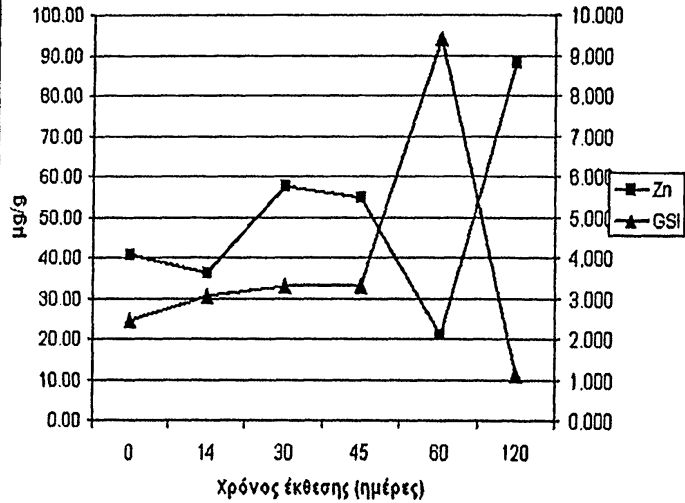
Γράφημα 44. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και 17-β οιστραδιόλης ορού των αρσενικών ιχθύων κλάσης I.



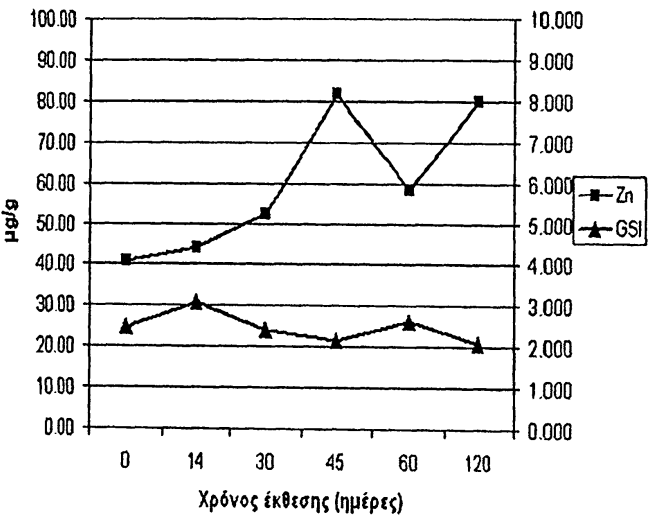
GSI και Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου I



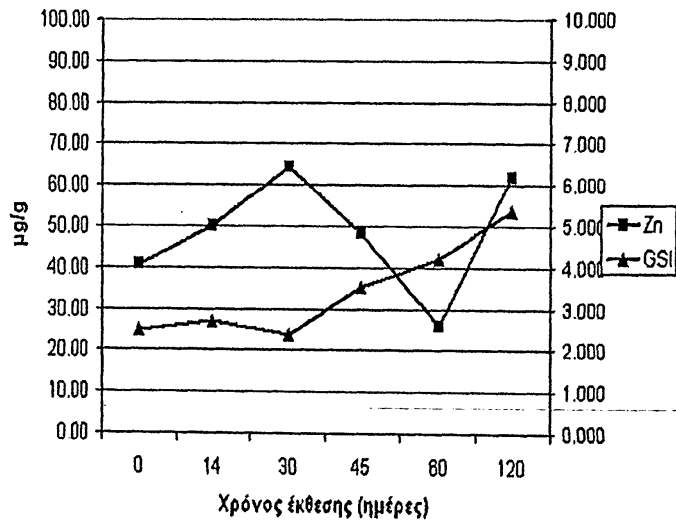
GSI και Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου II



GSI και Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου III

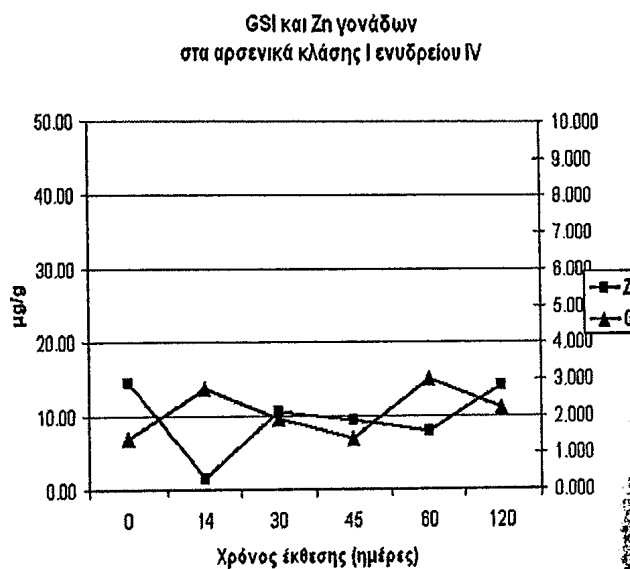
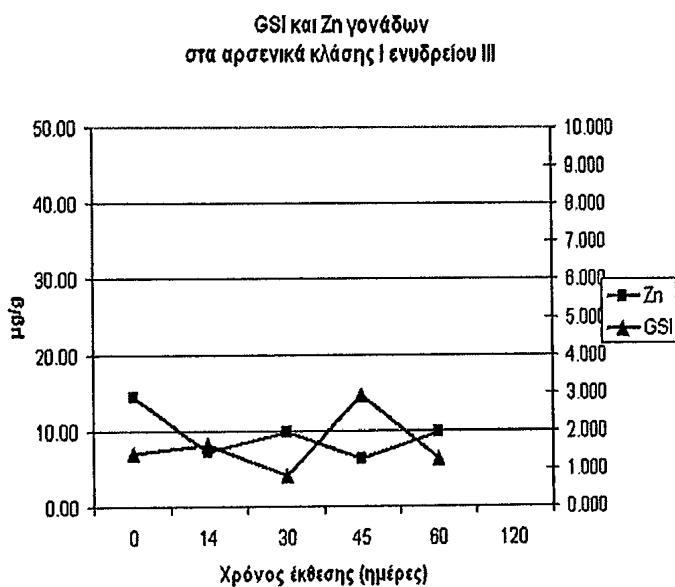
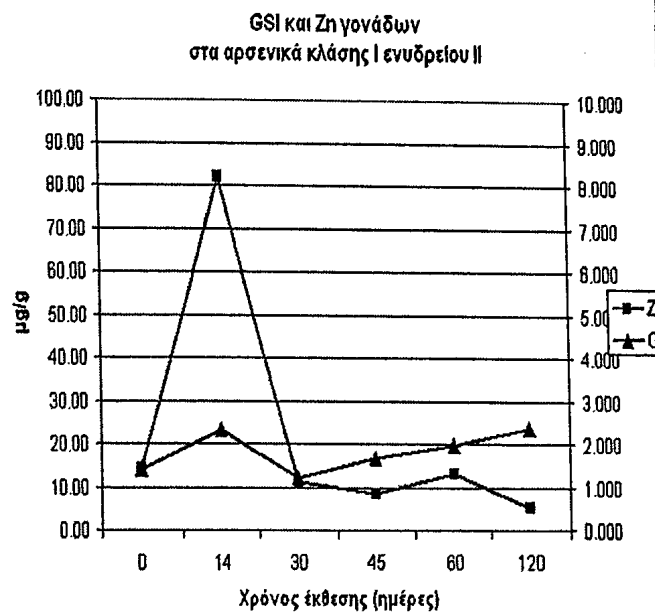
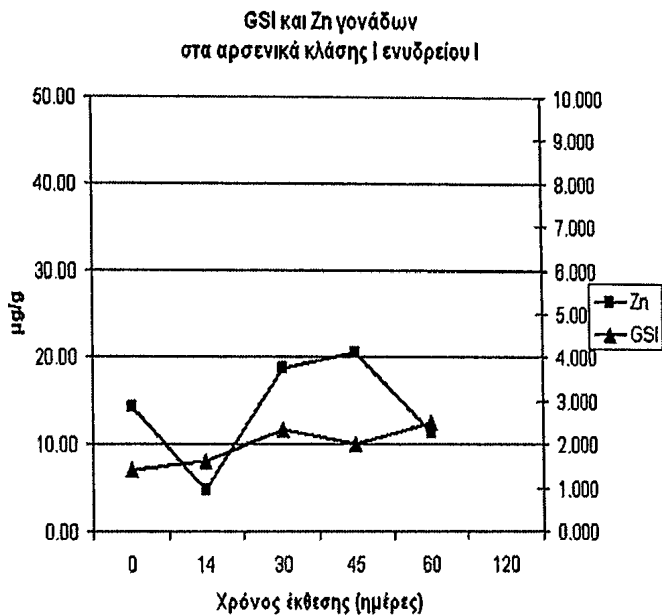


GSI και Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου IV



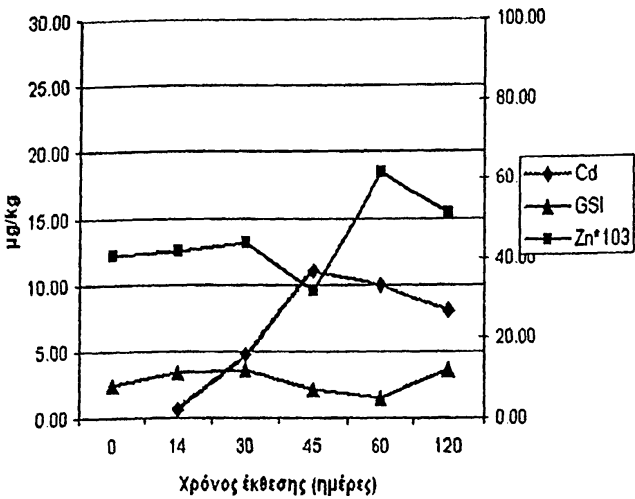
Γράφημα 45. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και Zn γονάδων των θηλυκών ιχθύων κλάσης I.



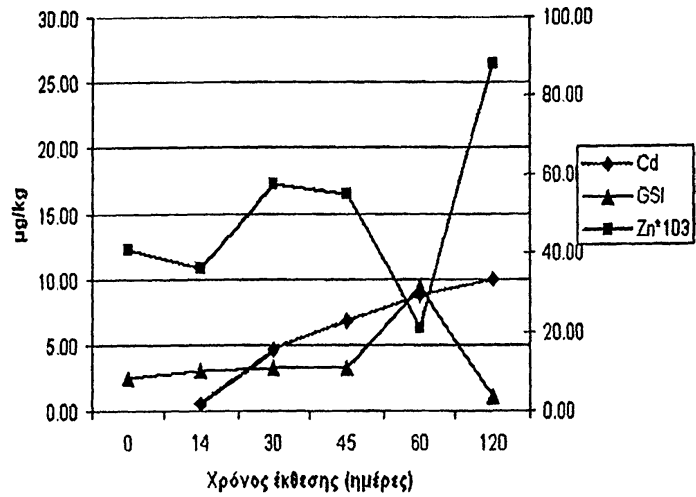


Γράφημα 46. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και Zn γονάδων των αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

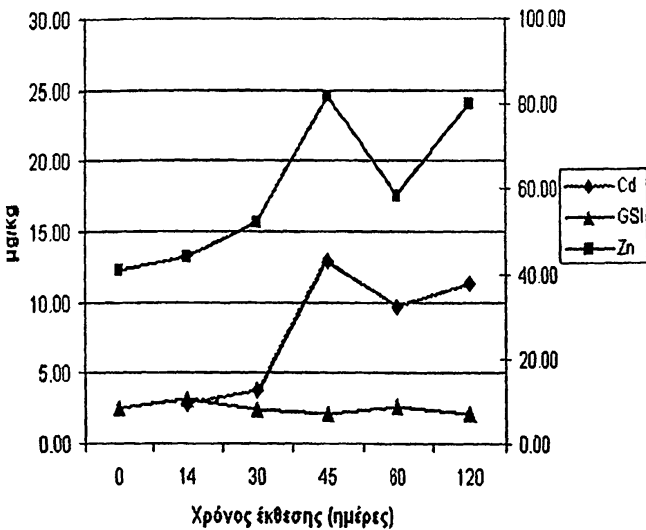
GSI και μέταλλα γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου I



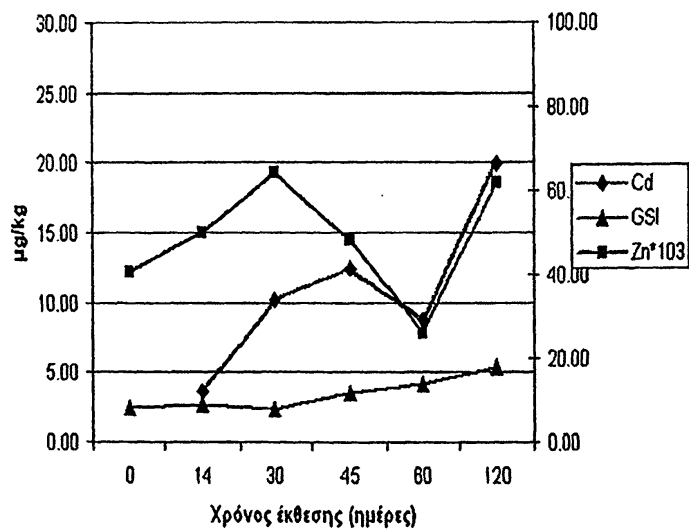
GSI και μέταλλα γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου II



GSI και μέταλλα γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου III



GSI και μέταλλα γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου IV



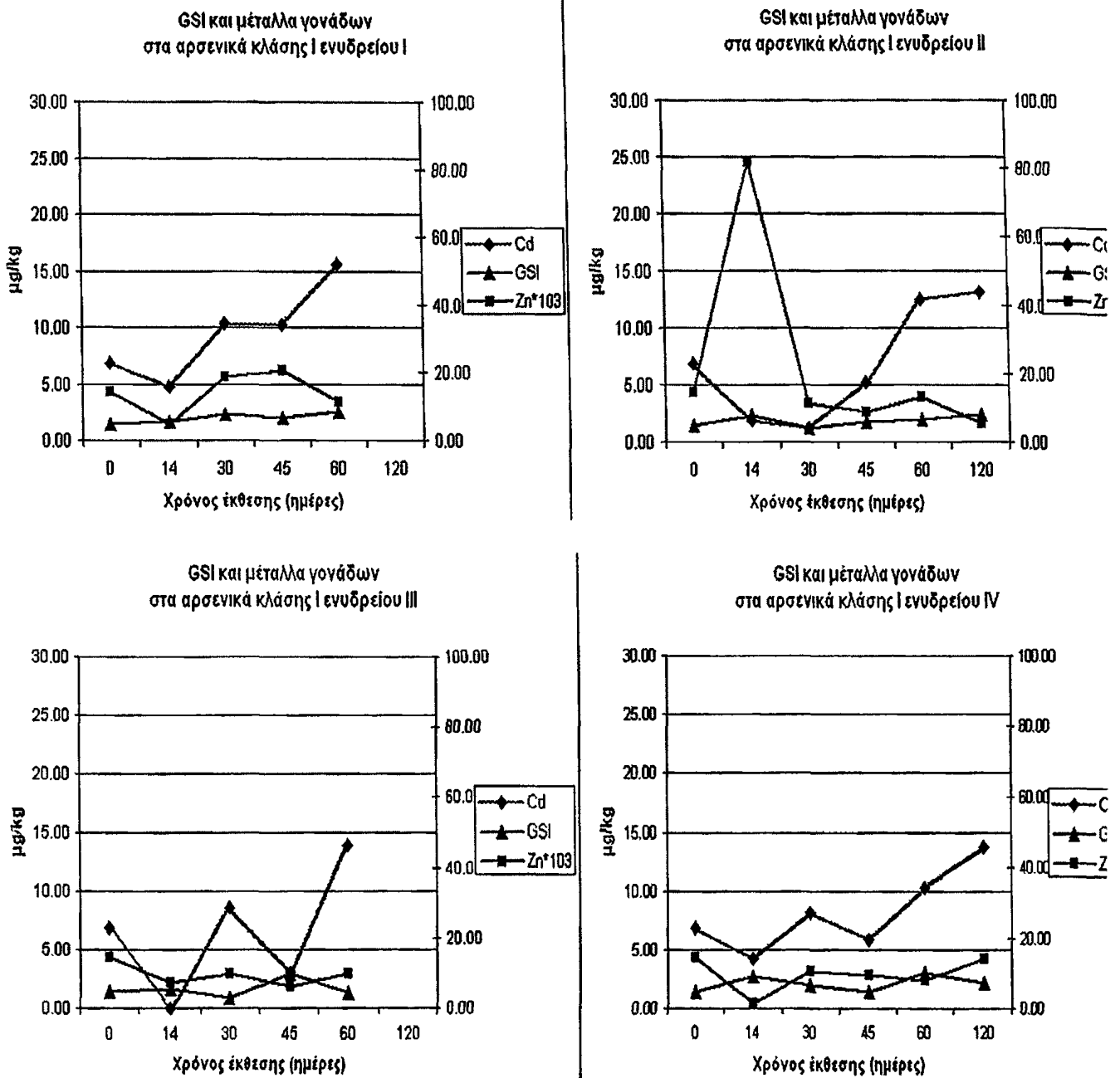
Γράφημα 47. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και μετάλλων γονάδων των θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Όσον αφορά τη σχέση του Γοναδοσωματικού Δείκτη, GSI, με τη συγκέντρωση Cd στις γονάδες, στα θηλυκά του ενυδρείου I εμφανίζει αντίστροφο προφίλ μεταβολής, ενώ και στα ενυδρεία II, III και IV οι δυο παράμετροι μεταβάλλονται μάλλον αντίστροφα, όπως αντίστοιχα ο GSI με τη 17-β οιστραδιόλη ορού. Πάντως η παρουσία καδμίου ειδικά μικρών συγκεντρώσεων (1ppb) επάγει διαταραχές στην αύξηση του GSI.

Στα αρσενικά των ενυδρείων III και IV ο δείκτης αύξησης των γονάδων μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση Cd στις γονάδες, ενώ στα

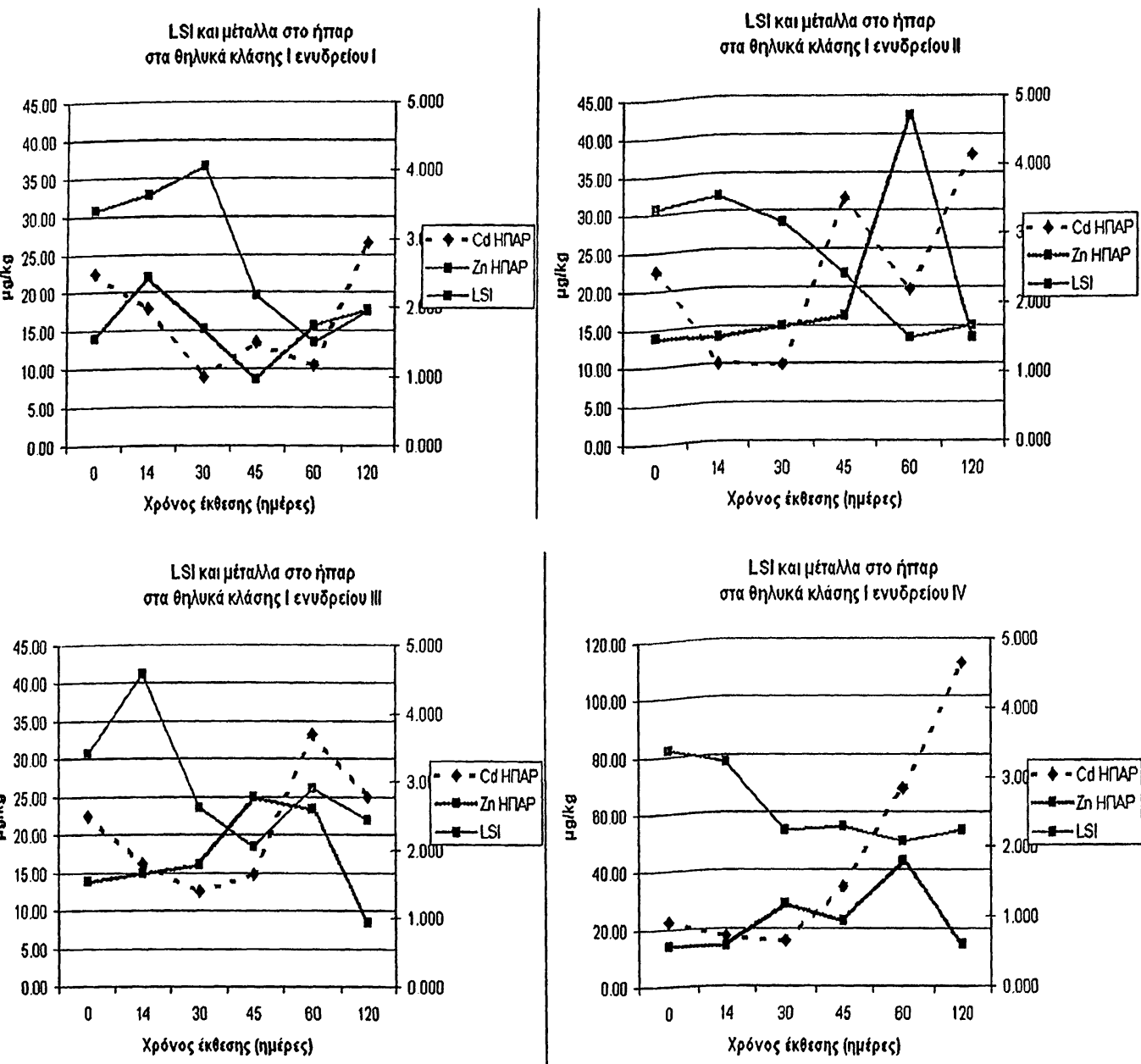


αρσενικά του ενυδρείου I και II, δε φαίνεται καμία ξεκάθαρη τάση στη μεταβολή του GSI και της συγκέντρωσης Cd στις γονάδες.



Γράφημα 48. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και μετάλλων γονάδων των αρσενικών ιχθύων κλάσης I.





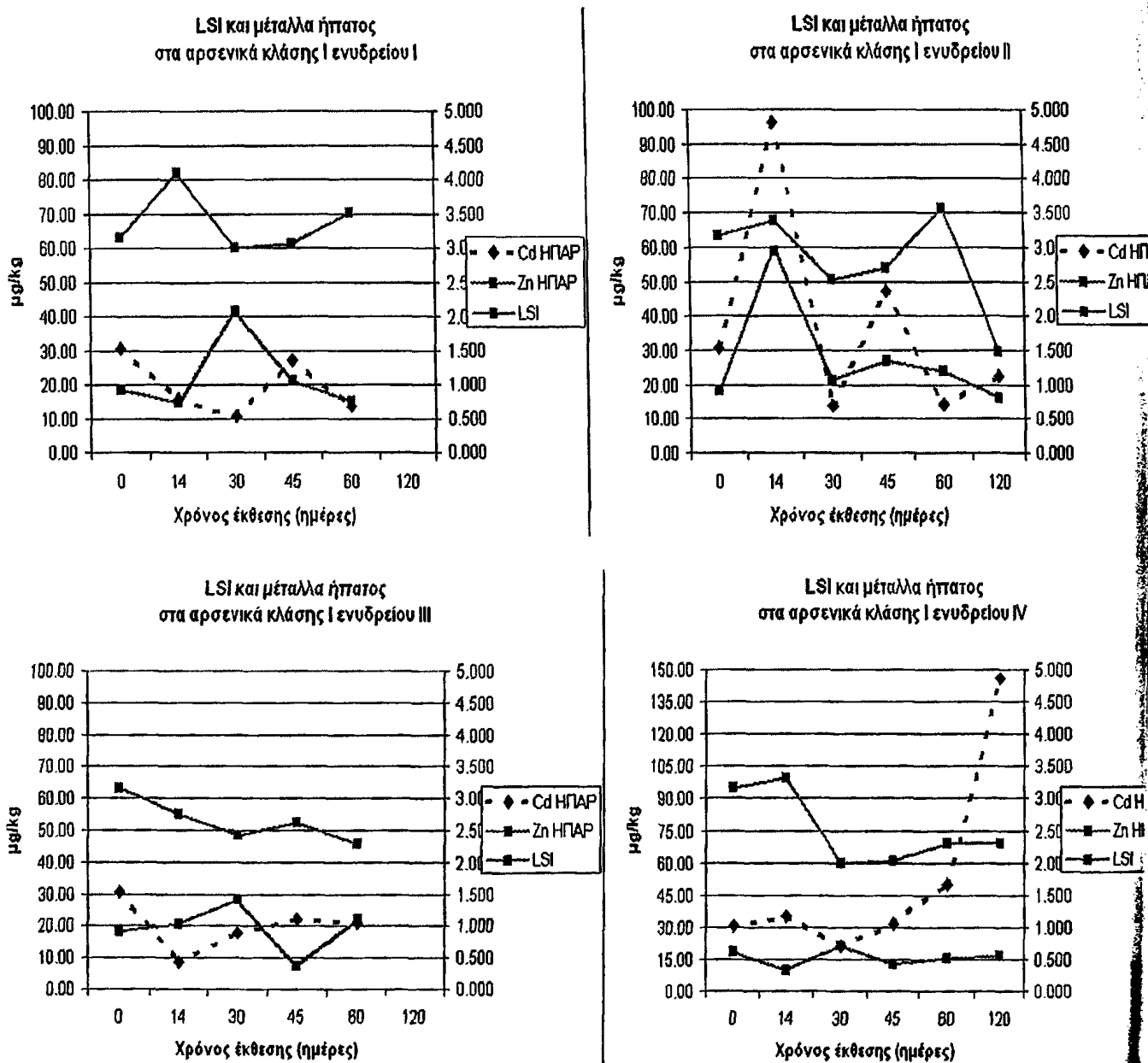
Γράφημα 49. Μεταβολή Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI) και μετάλλων ήπατος των θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, στα θηλυκά του ενυδρείου I και II προοδευτικά μειώνεται, ενώ η συγκέντρωση του Cd του ήπατος παρουσιάζει παρόμοιες διακυμάνσεις και αντίστροφο προφίλ μεταβολής με το δείκτη αύξησης ήπατος έως τις 45 ημέρες, ενώ από εκεί και μετά δείχνουν συμμεταβολή. Αντίθετα η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των θηλυκών αυτών των ενυδρείων μεταβάλλεται αντιστρόφως με τον LSI από τις 45 ημέρες και μετά. Στα θηλυκά του ενυδρείου III ο δείκτης αύξησης του ήπατος και τα επίπεδα Cd στο ήπαρ φαίνονται μάλλον να συμμεταβάλλονται, ενώ εμφανίζεται αντίστροφη σχέση του Zn ήπατος και του LSI από τις 30 έως τις



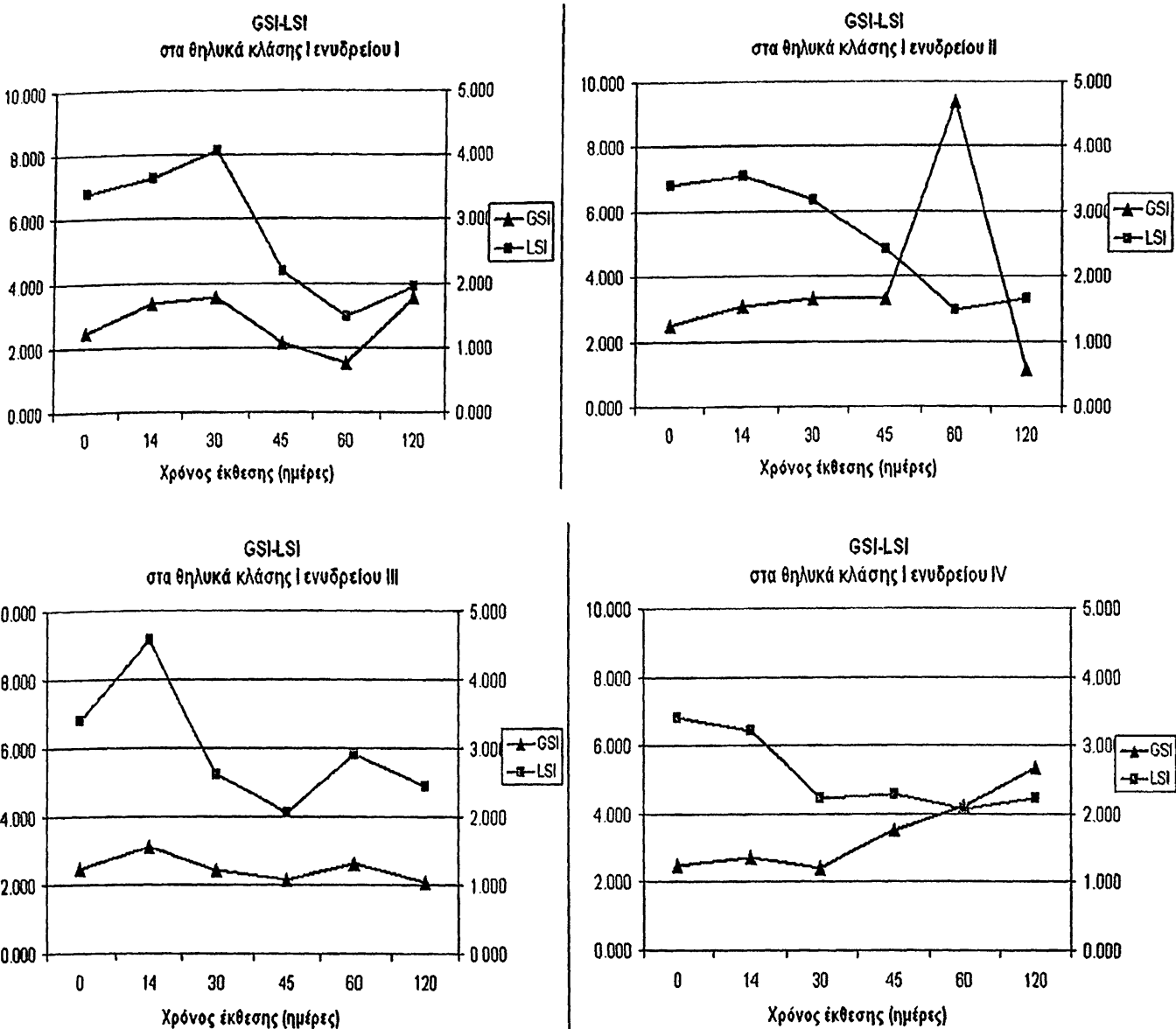
60 ημέρες έκθεσης. Τέλος, στα θηλυκά του ενυδρείου IV τα επίπεδα των μετάλλων στο ήπαρ φαίνονται μάλλον να συµµεταβάλλονται, ενώ εμφανίζεται αντίστροφη σχέση των μετάλλων ήπατος και του LSI.

Στα αρσενικά του ενυδρείου I παρουσιάζεται συνεχώς αντιστρόφως ανάλογη µεταβολή του δείκτη αύξησης ήπατος και των επιπέδων µετάλλων στο ήπαρ, ενώ στο ενυδρείο II οι παράµετροι εμφανίζουν ανάλογη σχέση. Στα αρσενικά του ενυδρείου III και IV εμφανίζεται συνεχώς ανάλογη µεταβολή του δείκτη αύξησης ήπατος και των επιπέδων Cd στο ήπαρ, ενώ για τα επίπεδα Zn στο ήπαρ η µεταβολή είναι αντίστροφη.



Γράφημα 50. Μεταβολή Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI) και μετάλλων ήπατος των αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

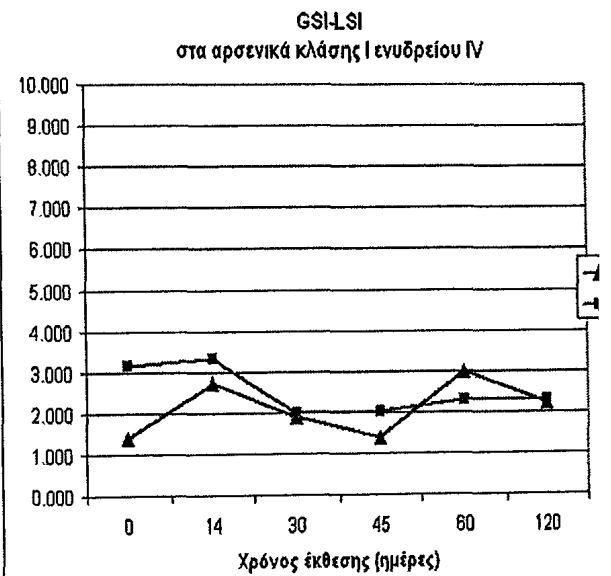
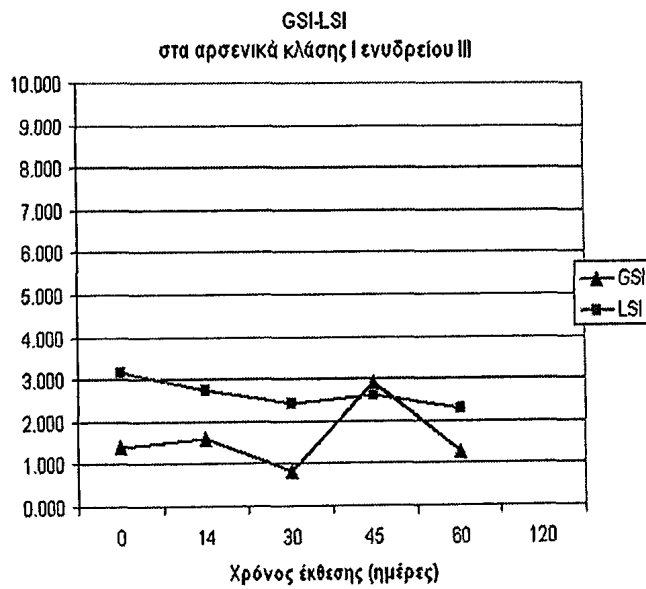
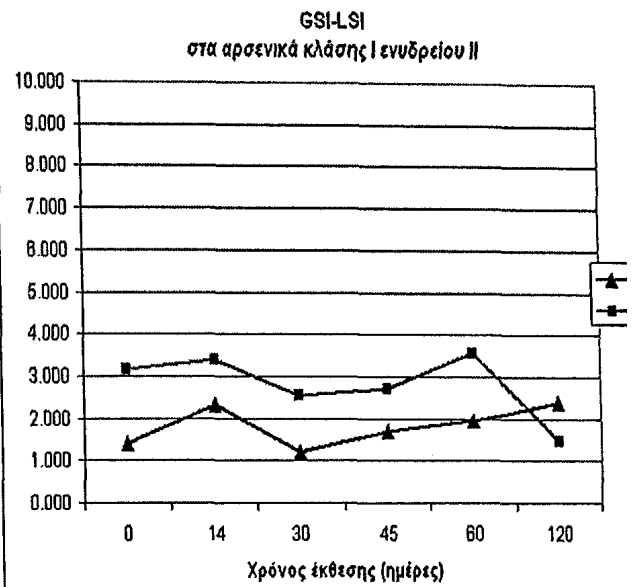
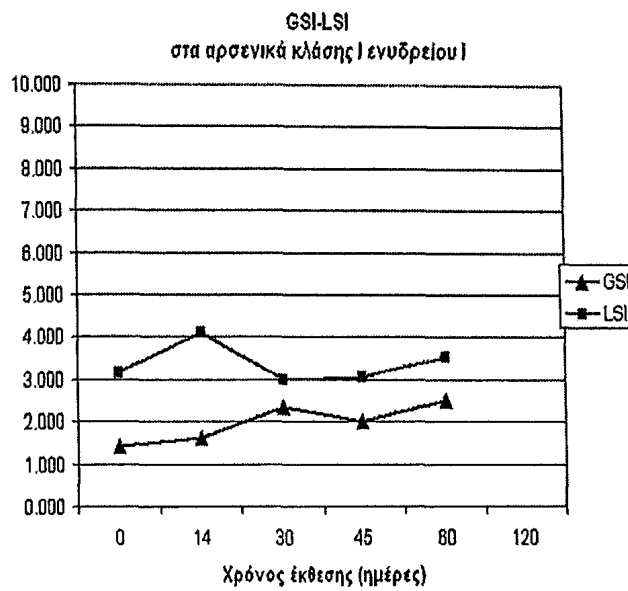




Γράφημα 51. Μεταβολή Γοναδοσωματικού (GSI) και Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI) των θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης GSI, όπως και ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, στα θηλυκά του ενυδρείου I και III προοδευτικά μειώνονται, εμφανίζοντας ίδιο προφίλ μεταβολής. Στα θηλυκά του ενυδρείου II και IV ο δείκτης αύξησης των γονάδων μεταβάλλεται αντίστροφα με του ήπατος. Πάντως στο ενυδρείο IV προηγείται μάλλον η ηπατική ανάπτυξη αυτής των γονάδων. Στα αρσενικά όλων των ενυδρείων I, II, III και IV σε όλες τις συνθήκες ο δείκτης αύξησης των γονάδων και ο δείκτης αύξησης του ήπατος φαίνονται να συµμεταβάλλονται, με το δείκτη αύξησης ήπατος (LSI) να εμφανίζει πολύ μικρές αυξομειώσεις. Πάντως στο ενυδρείο I προηγείται μάλλον η ηπατική ανάπτυξη αυτής των γονάδων.

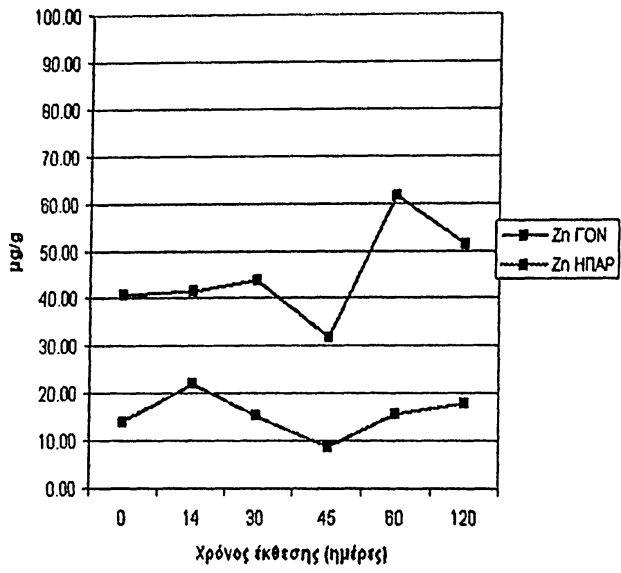




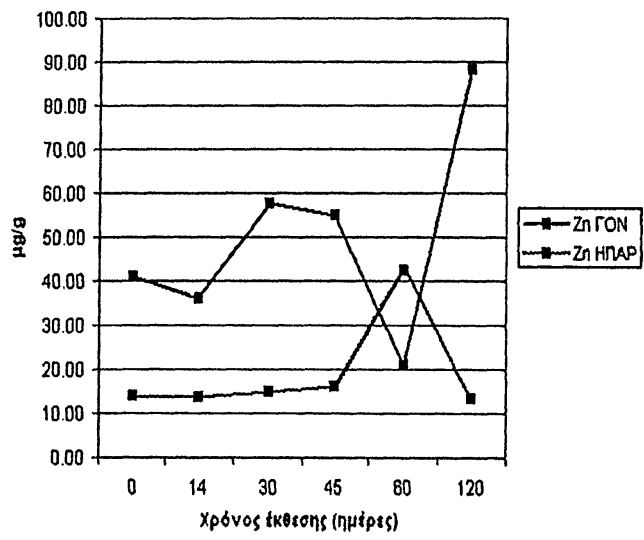
Γράφημα 52. Μεταβολή Γοναδοσωματικού (GSI) και Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI) των αρσενικών ιχθύων κλάσης I.



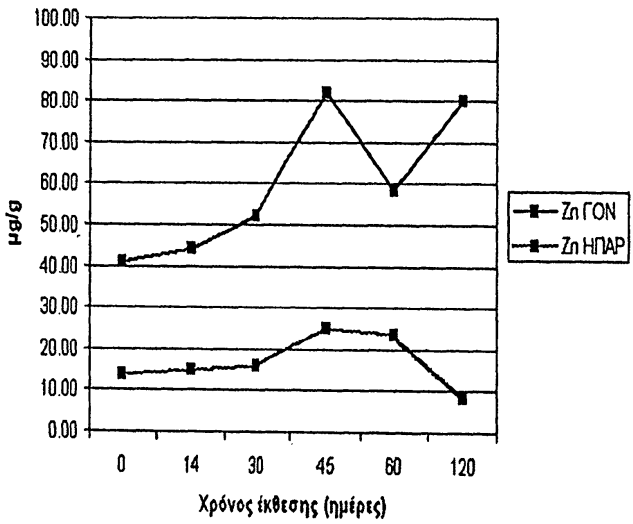
Ζη ήπατος και γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου I



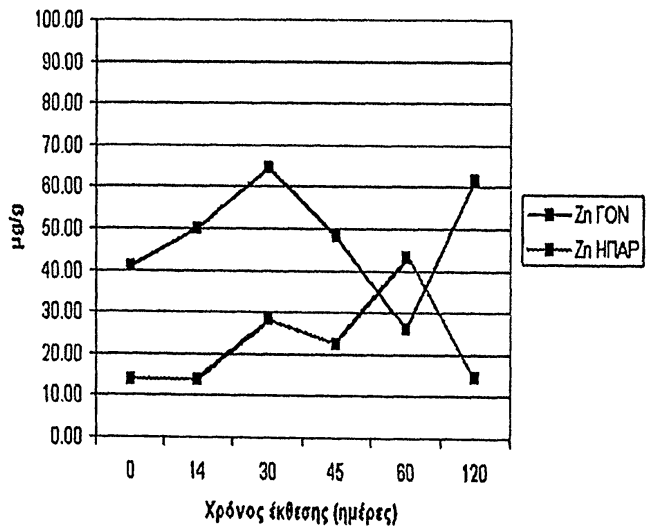
Ζη ήπατος και γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου II

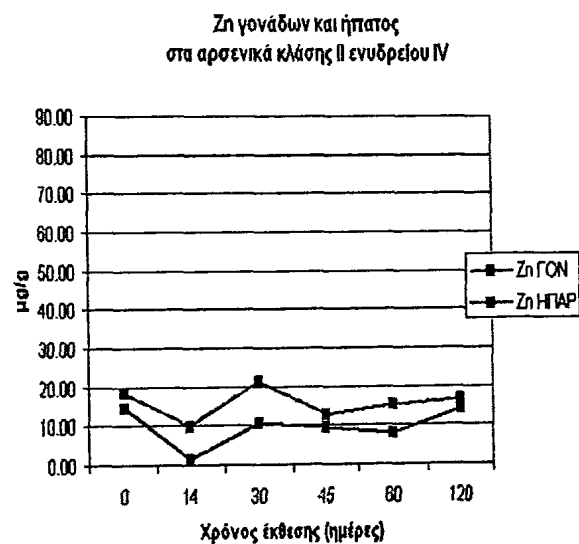
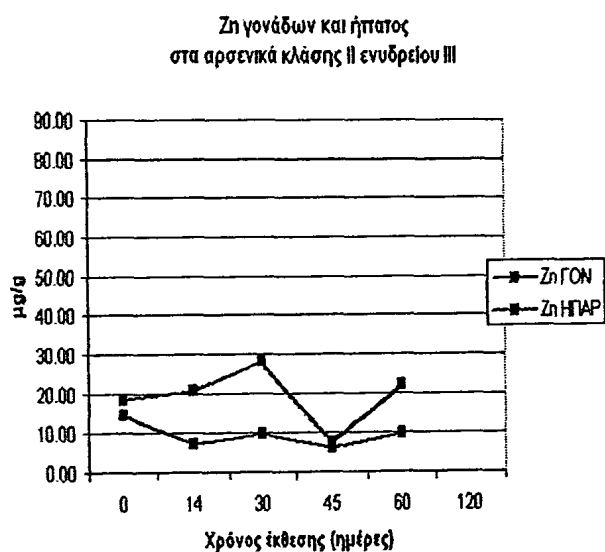
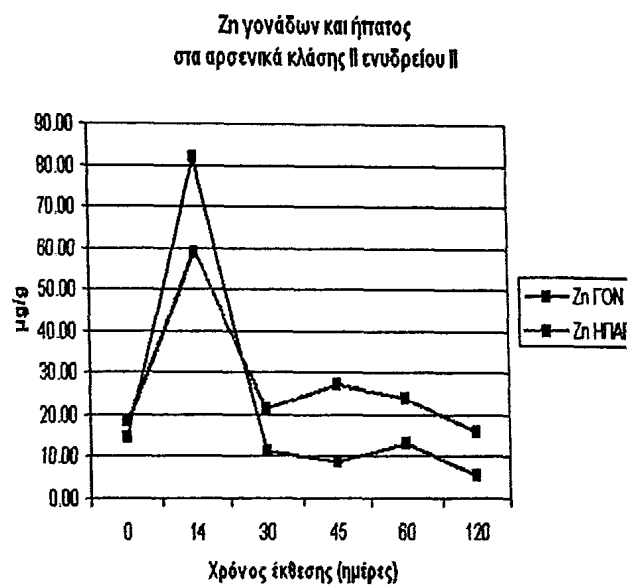
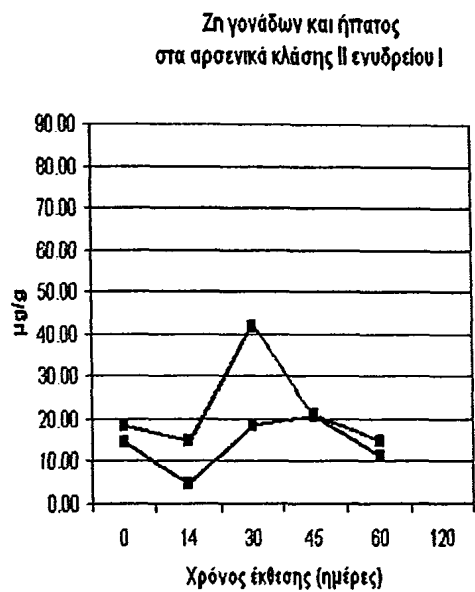


Ζη ήπατος και γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου III



Ζη ήπατος και γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου IV



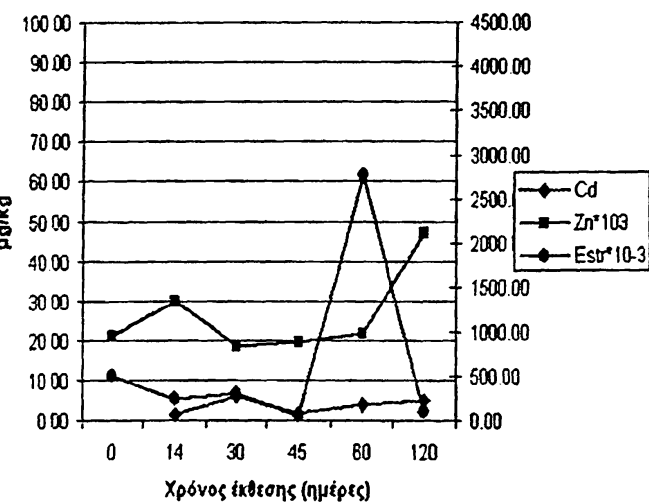


Γράφημα 52 α-β. Μεταβολή Zn ήπατος και γονάδων των θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

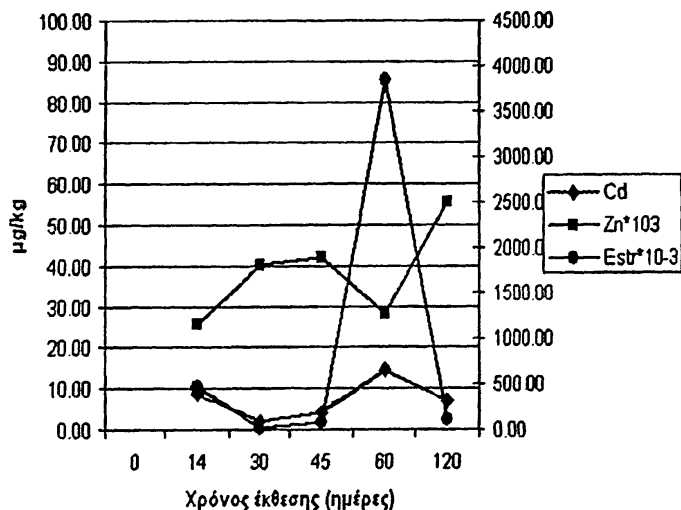


η. Μεταβολή μετάλλων στις γονάδες, 17β-οιστραδιόλης και δεικτών αύξησης- Κλάση II

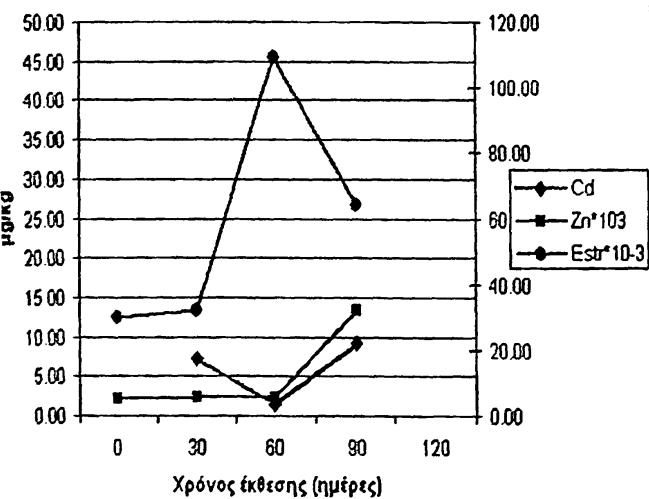
Μεταβολή Μετάλλων γονάδων και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης II ενυδρείου I



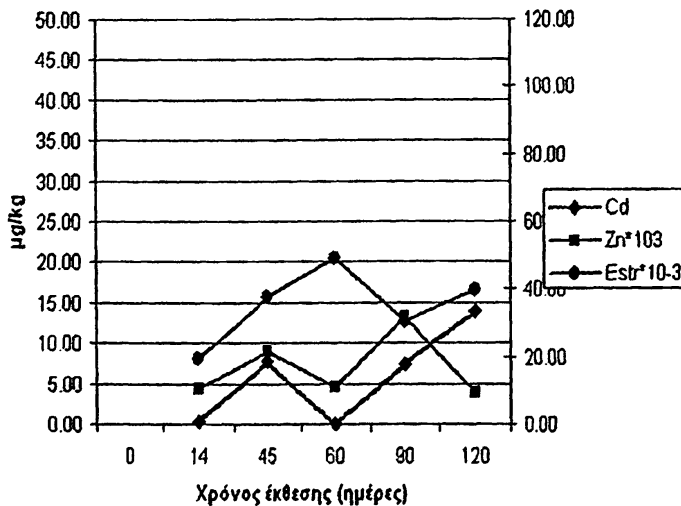
Μεταβολή Μετάλλων γονάδων και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης II ενυδρείου II



Μεταβολή Μετάλλων γονάδων και 17-β Οιστραδιόλης στα αρσενικά κλάσης II ενυδρείου I



Μεταβολή Μετάλλων γονάδων και 17-β Οιστραδιόλης στα αρσενικά κλάσης II ενυδρείου II

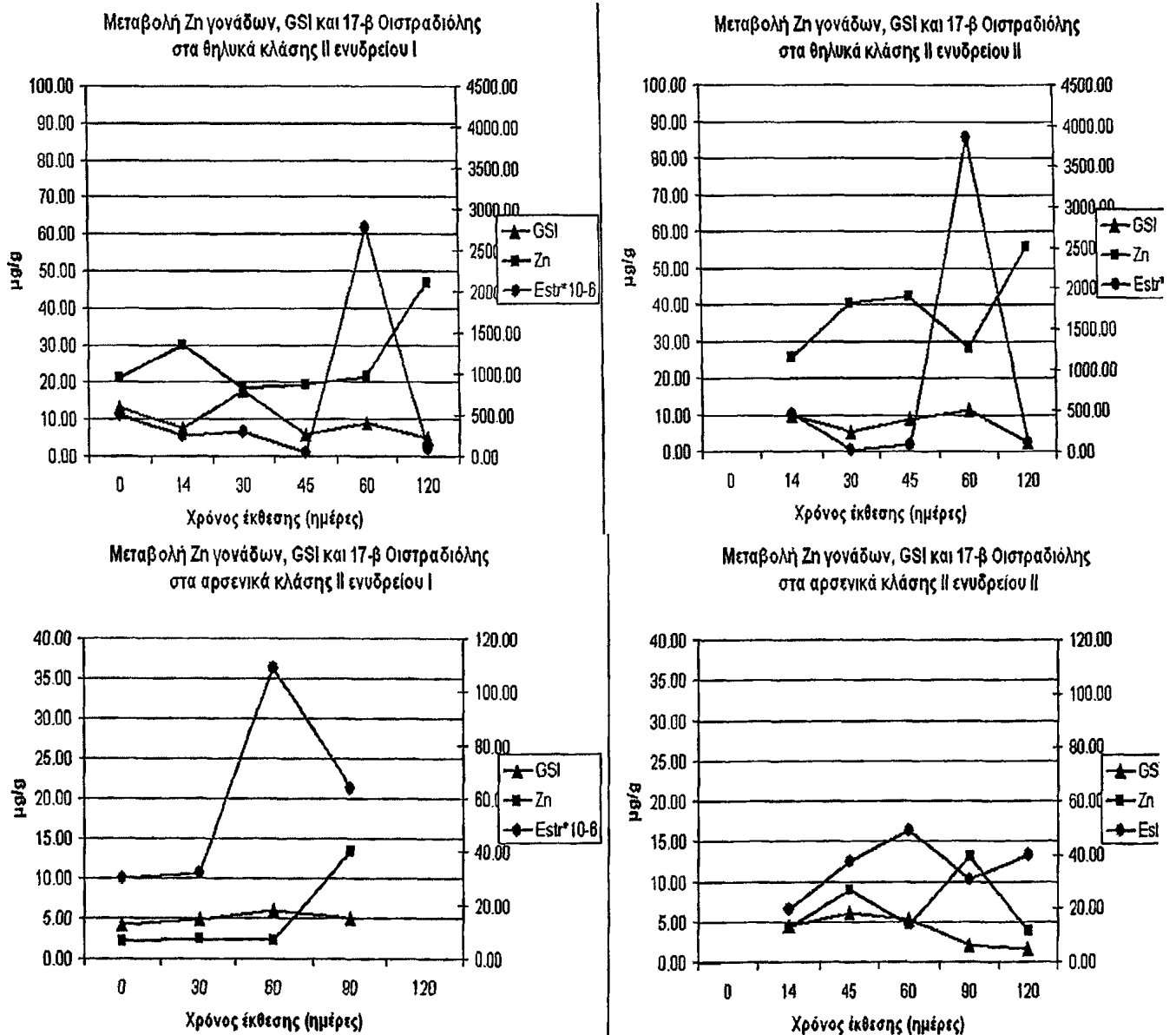


Γράφημα 53. Μεταβολή μετάλλων γονάδων και 17-β οιστραδιόλης ορού θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.

Στα θηλυκά της κλάσης II, των ενυδρείων I (νερό λίμνης), II (νερό βρύσης) η συγκέντρωση Zn δείχνει να μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση του Cd, υποδεικνύοντας πιθανή ανταγωνιστική δράση των δύο μετάλλων. Η τάση αυτή δεν ακολουθείται στα αρσενικά και των δύο ενυδρείων, όπου παρατηρείται συμμεταβολή των μετάλλων, τουλάχιστον

μέχρι τις 90 ημέρες. Η συσσώρευση πάντως του Cd στις γονάδες είναι χαμηλή σε όλες τις συνθήκες.

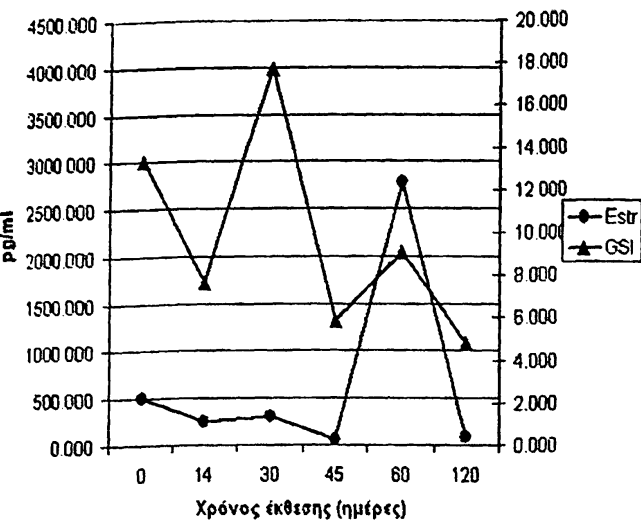
Η οιστραδιόλη ορού στα θηλυκά των ενυδρείων I (νερό λίμνης) και II (νερό βρύσης), ειδικά στο κρίσιμο χρονικό διάστημα των 60 ημερών, οπότε κορυφώνεται, μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες. Επιπλέον παρατηρείται ανάλογη μεταβολή οιστραδιόλης και συσσώρευσης Cd. Πάντως κατά την κορύφωση της οιστραδιόλης ειδικά στο ενυδρείο II, μειώνεται και η συγκέντρωση του Zn στο ελάχιστο, ο οποίος πιθανώς χρησιμοποιείται στη βιογένεση των ορμονών. Στα αρσενικά η 17-β οιστραδιόλη ορού μεταβάλλεται αντίστροφα με τα μέταλλα, ειδικά στο κρίσιμο χρονικό διάστημα των 60 ημερών, οπότε κορυφώνεται.



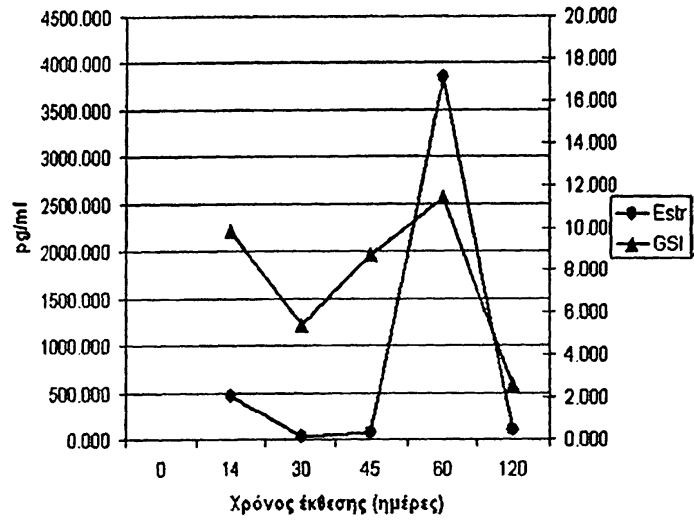
Γράφημα 54. Μεταβολή Zn γονάδων, Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και 17-β οιστραδιόλης ορού θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.



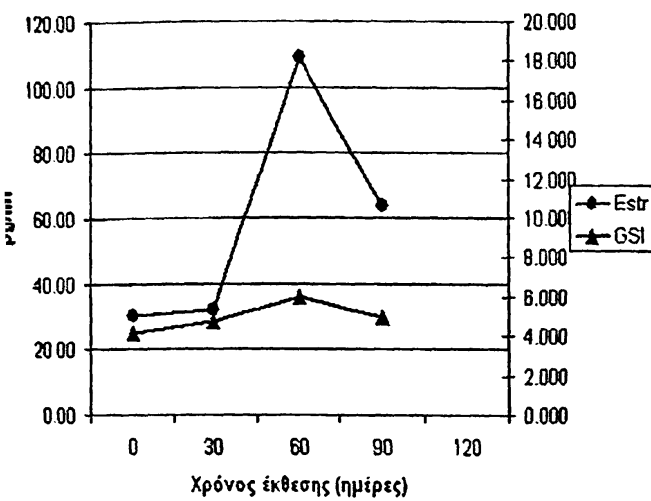
GSI και οιστραδιόλη
στα θηλυκά κλάσης II ενυδρείου I



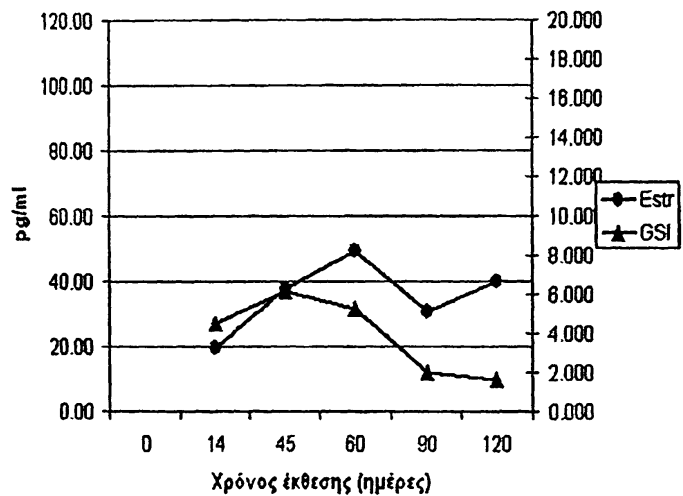
GSI και οιστραδιόλη
στα θηλυκά κλάσης II ενυδρείου II



GSI και οιστραδιόλη
στα αρσενικά κλάσης II ενυδρείου I



GSI και οιστραδιόλη
στα αρσενικά κλάσης II ενυδρείου II

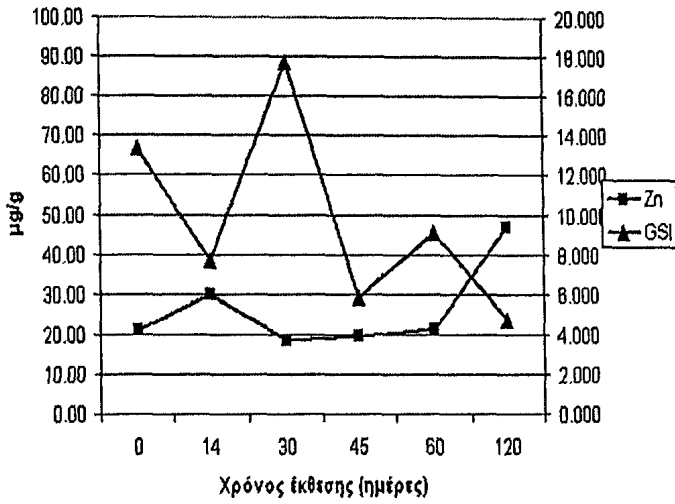


Γράφημα 55. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και 17-β οιστραδιόλης ορού θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.

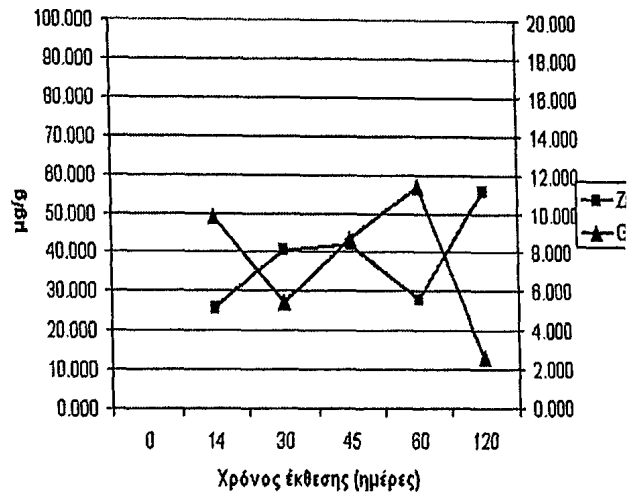
Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης, GSI, στα θηλυκά της κλάσης II, των ενυδρείων I και II εμφανίζει ίδιο προφίλ μεταβολής με τη 17-β οιστραδιόλη ορού και η ίδια τάση εμφανίζεται και στα αρσενικά των ίδιων ενυδρείων. Όσον αφορά τη σχέση της συγκέντρωσης Zn στις γονάδες και του δείκτη αύξησης των γονάδων στα θηλυκά της κλάσης II, οι δυο παράμετροι μεταβάλλονται αντίστροφα συνεχώς. Στα αρσενικά των ενυδρείων I και II ο δείκτης αύξησης των γονάδων μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες από τις 60 ημέρες και μετά.



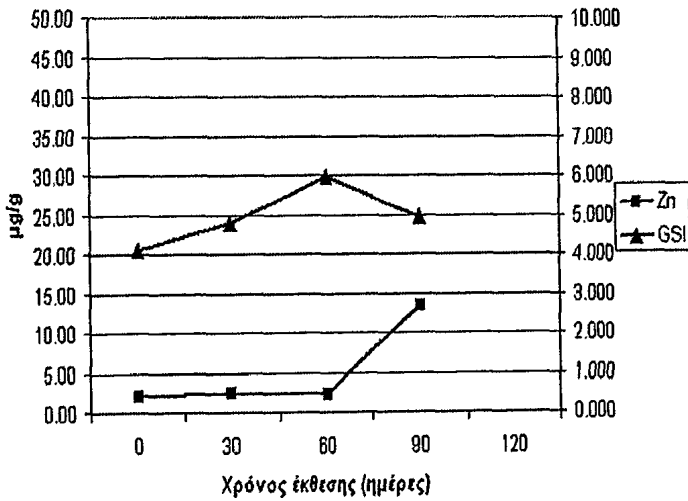
GSI και Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης II ενυδρείου I



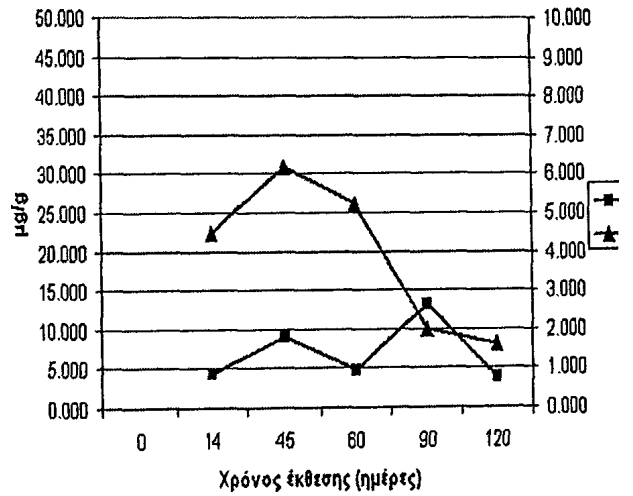
GSI και Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης II ενυδρείου II



GSI και Zn γονάδων
στα αρσενικά κλάσης II ενυδρείου I



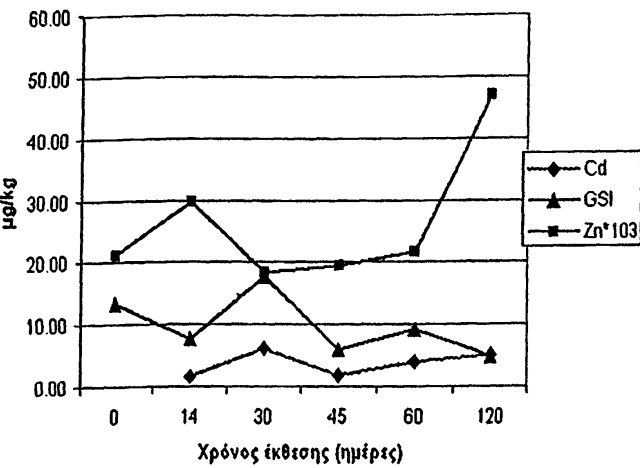
GSI και Zn γονάδων
στα αρσενικά κλάσης II ενυδρείου II



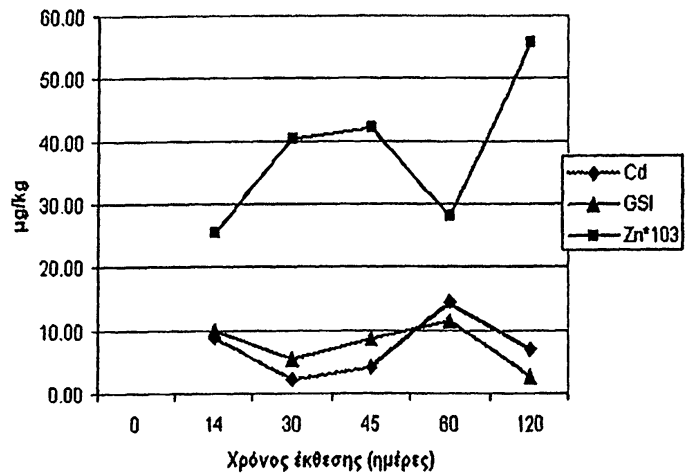
Γράφημα 56. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και Zn γονάδων θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.



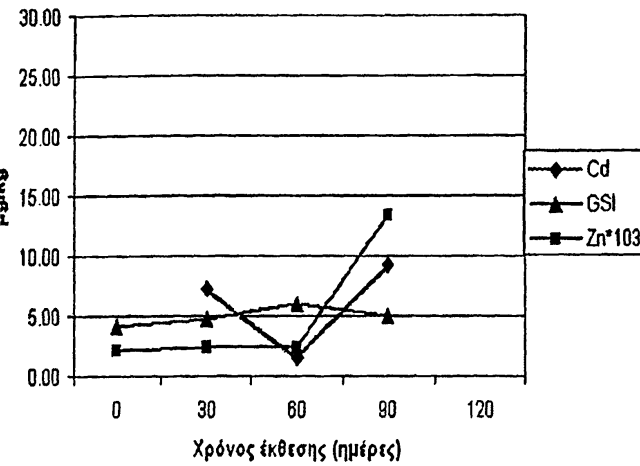
GSI και μέταλλα γονάδων
στα θηλυκά κλάσης II ενυδρείου I



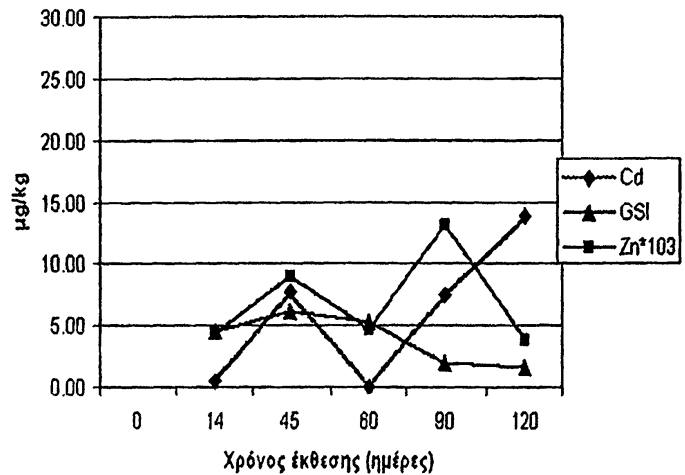
GSI και μέταλλα γονάδων
στα θηλυκά κλάσης II ενυδρείου II



GSI και μέταλλα γονάδων
στα αρσενικά κλάσης II ενυδρείου I



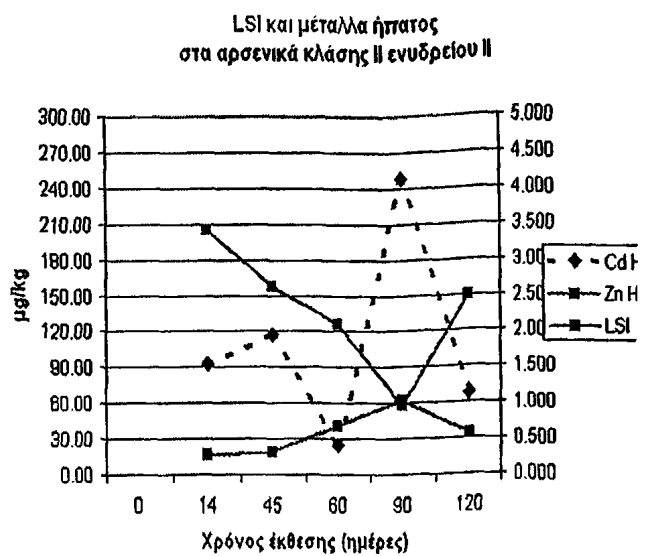
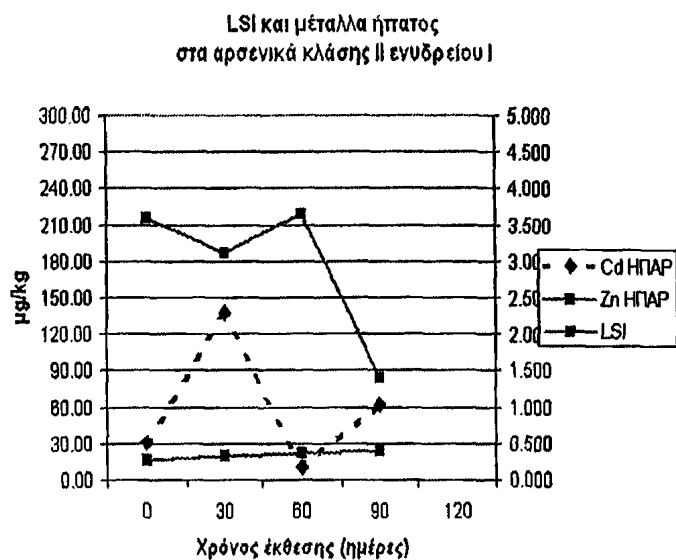
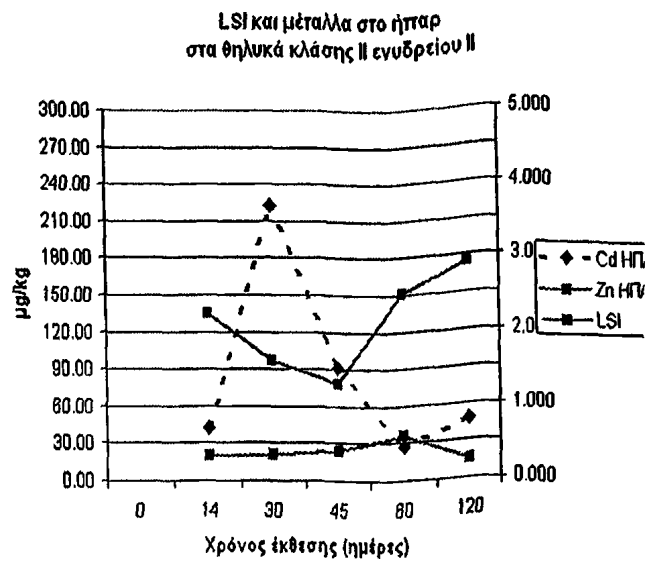
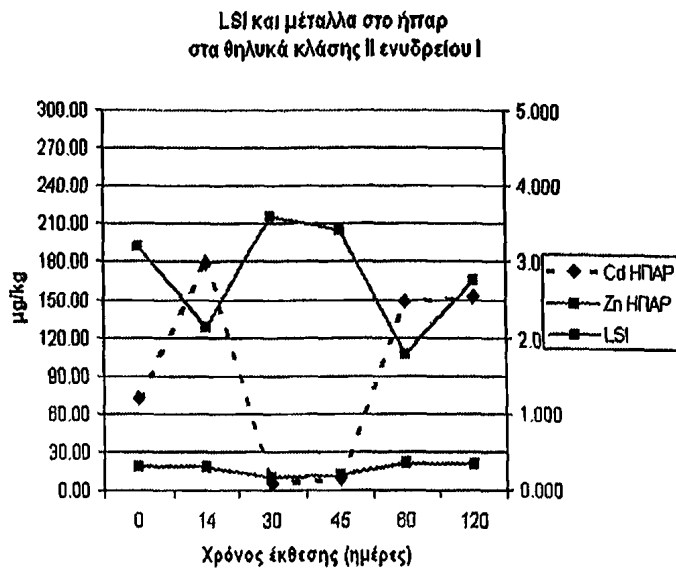
GSI και μέταλλα γονάδων
στα αρσενικά κλάσης II ενυδρείου II



Γράφημα 57. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και μετάλλων γονάδων θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.

Όσον αφορά τη σχέση του Γοναδοσωματικού Δείκτη, GSI, με τη συγκέντρωση Cd στις γονάδες των ιχθύων της κλάσης II, στα θηλυκά των ενυδρείων I και II, οι δυο παράμετροι μεταβάλλονται ανάλογα συνεχώς. Αντίθετα στα αρσενικά των ενυδρείων I και II ο δείκτης αύξησης των γονάδων μεταβάλλεται αντίστροφα με τη συγκέντρωση Cd στις γονάδες, ενώ τα δύο μέταλλα μεταξύ τους δείχνουν ανάλογη μεταβολή υποδεικνύοντας συνεργιστική δράση.



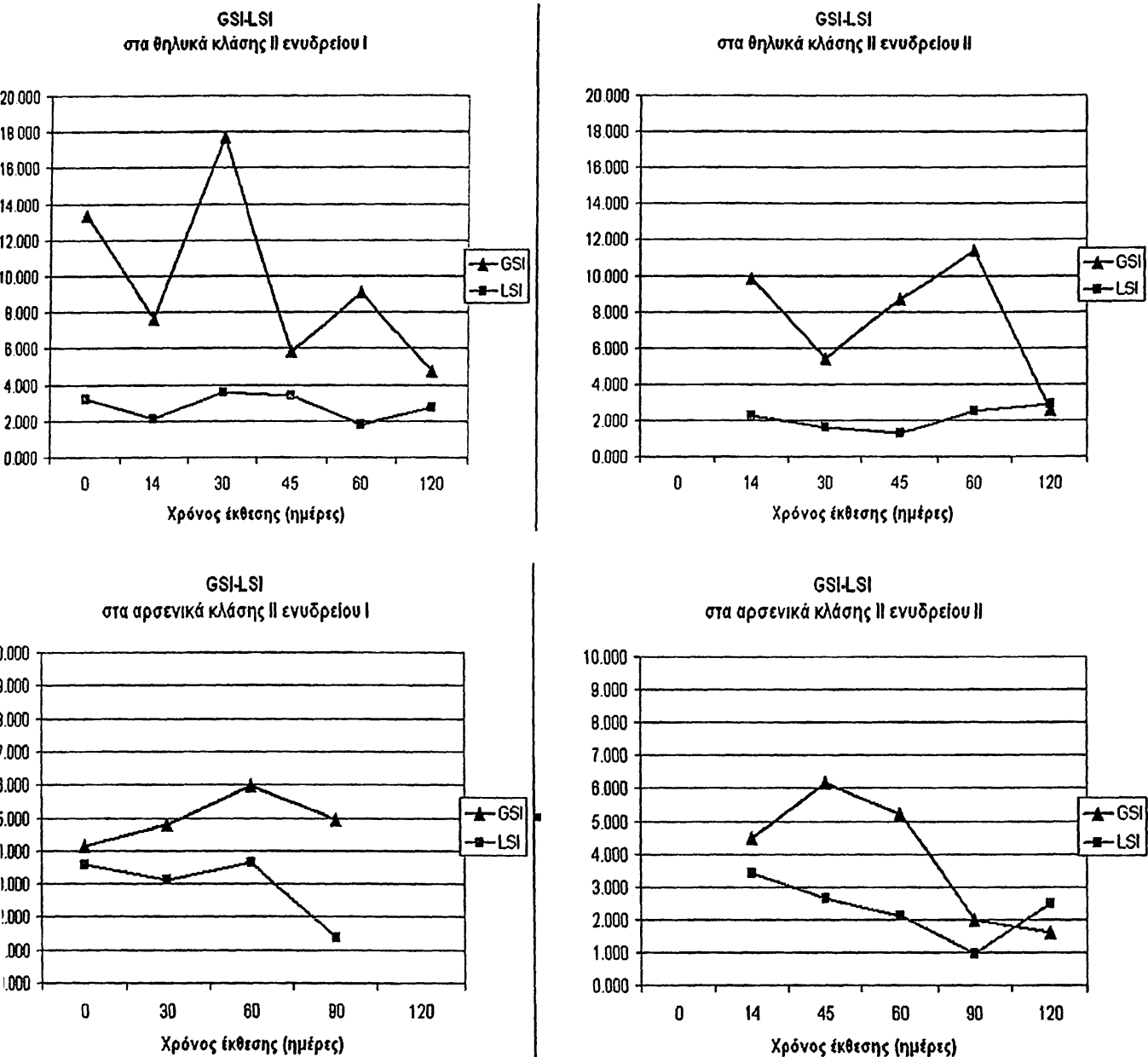


Γράφημα 58. Μεταβολή Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI) και μετάλλων ήπατος θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.

Ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, στα θηλυκά της κλάσης II του ενυδρείου I δείχνει μεγάλες διακυμάνσεις, ενώ η συγκέντρωση του Cd του ήπατος παρουσιάζει παρόμοιες διακυμάνσεις και αντίστροφο προφίλ μεταβολής με το δείκτη αύξησης ήπατος. Στα θηλυκά της κλάσης II του ενυδρείου II οι διακυμάνσεις των δύο παραμέτρων είναι μικρότερες, πάντως η τάση είναι και σε αυτά αντίστροφης μεταβολής. Επιπλέον η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των θηλυκών και των δύο ενυδρείων φαίνεται μάλλον να μεταβάλλεται αντιστρόφως με τον LSI συνεχώς. Στα αρσενικά της κλάσης II των ενυδρείων I και II ο δείκτης αύξησης του ήπατος και τα επίπεδα Cd στο ήπαρ φαίνονται μάλλον να μεταβάλλονται αντίστροφα όπως και στα



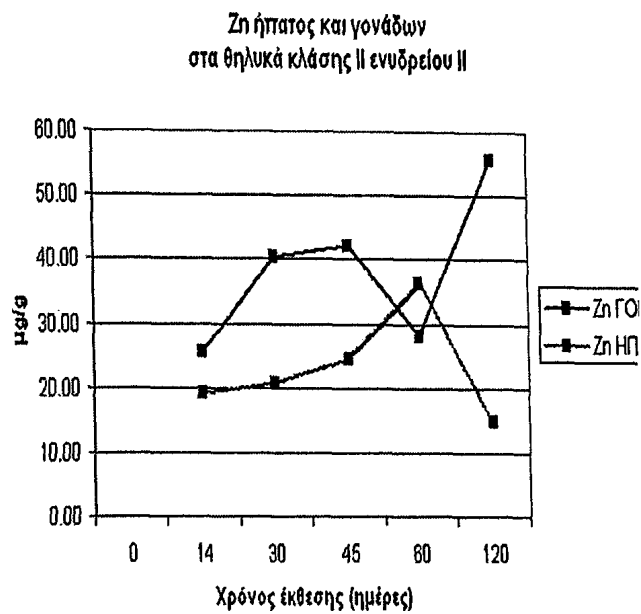
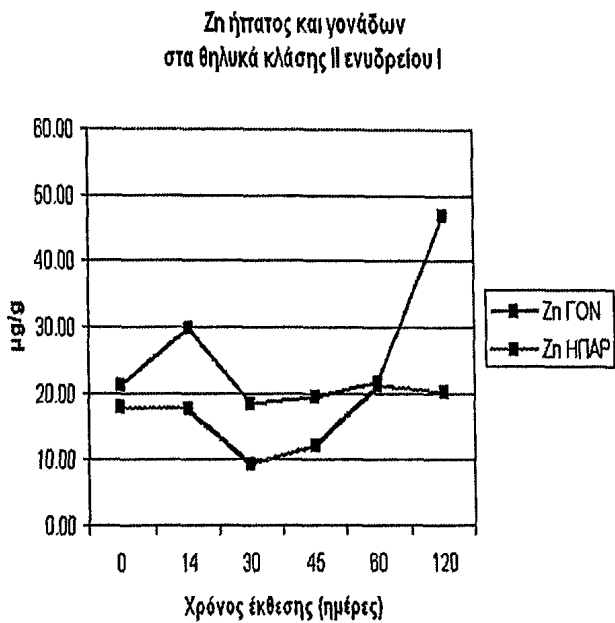
θηλυκά, ενώ επίσης εμφανίζεται αντίστροφη σχέση του Zn ήπατος και του LSI.



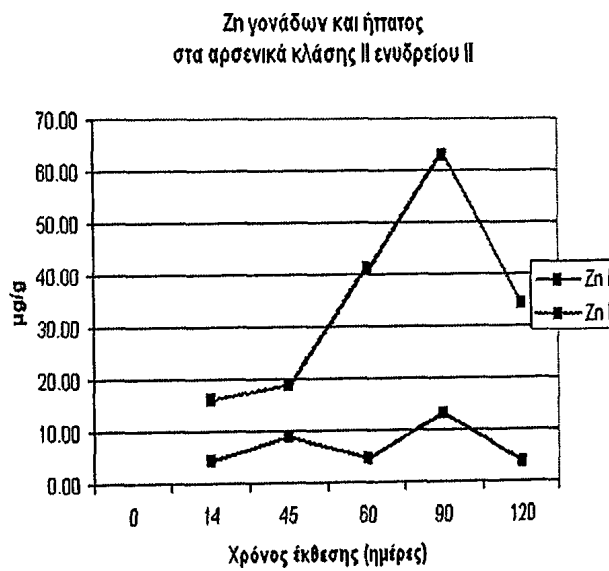
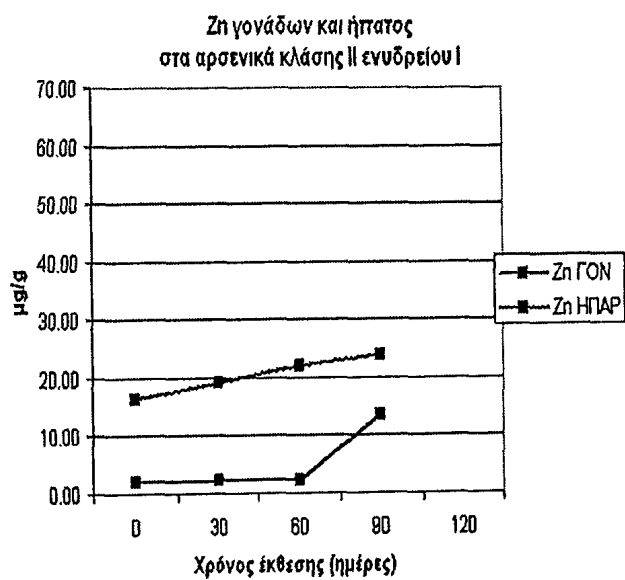
Γράφημα 59. Μεταβολή Γοναδοσωματικού (GSI) και Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI) θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.

Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης GSI, όπως και ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, στα θηλυκά της κλάσης II, του ενυδρείου I και II προοδευτικά μειώνονται, εμφανίζοντας ίδιο προφίλ μεταβολής έως τις 45 και 60 ημέρες αντίστοιχα. Από εκεί και πέρα η μεταβολή είναι αντιστρόφως ανάλογη λόγω πιθανώς της χρήσης των ενεργειακών αποθεμάτων του ήπατος για την αναπαραγωγή. Στα αρσενικά του ενυδρείου I και II ο δείκτης αύξησης των γονάδων μεταβάλλεται αντιστρόφως με του ήπατος έως τις 30 και 45 ημέρες αντίστοιχα, ενώ κατόπιν φαίνονται να συµμεταβάλλονται.





Γράφημα 59α-β. Μεταβολή Zn ήπατος και γονάδων των θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης II.

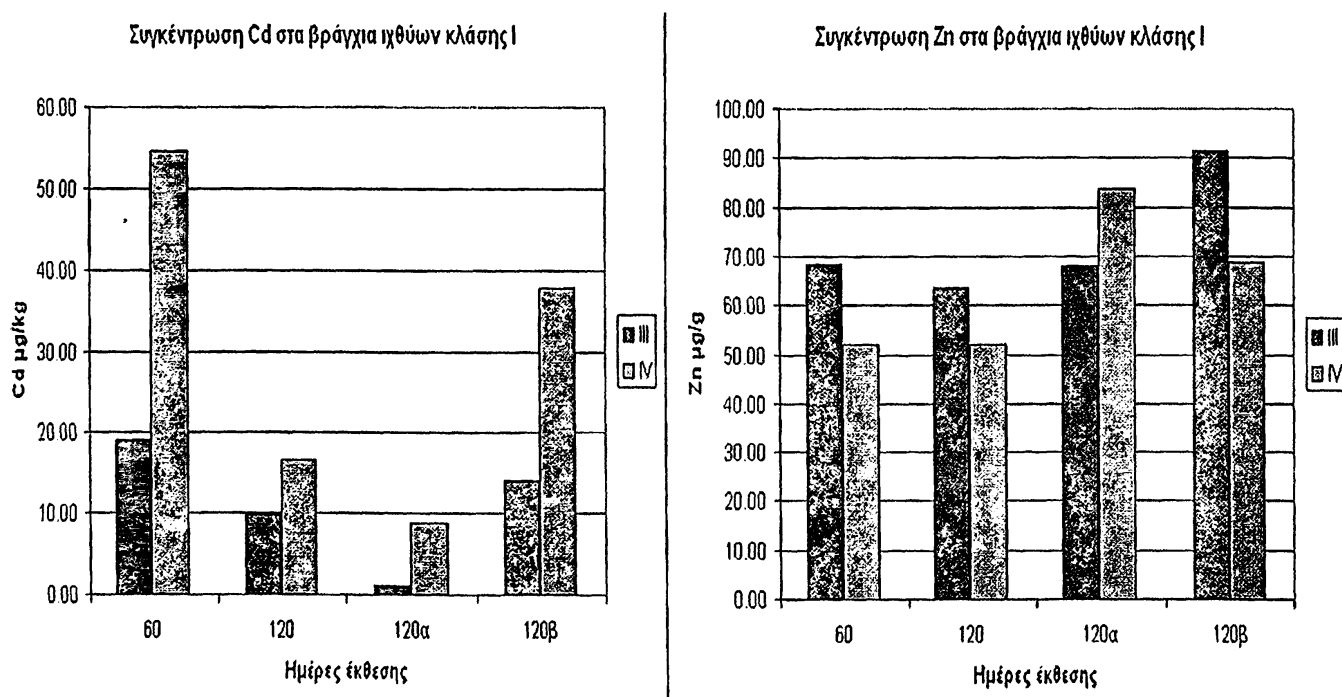


3. Αποκατάσταση περιεχόμενου καδμίου στους ιστούς του *Carassius auratus* μετά από προσθήκη Ψευδαργύρου

Για τη μελέτη της αποκατάστασης των ιστών των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, ιχθύς από τα ενυδρεία III και IV απομακρύνθηκαν μετά τις 60 ημέρες έκθεσης σε κάδμιο 1ppb και 5ppb αντίστοιχα και τοποθετήθηκαν στις εξής συνθήκες: α)ενυδρεία με αποχλωρωμένο νερό βρύσης και β)ενυδρεία με νερό με την αρχική συγκέντρωση καδμίου, όπου είχε προστεθεί και ψευδάργυρος σε αναλογία 1:1 για το ενυδρείο III και αναλογία 1:2 για το ενυδρείο IV. Στις 120 ημέρες από την αρχή του πειράματος προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των μετάλλων στους ιστούς των ιχθύων με τη μέθοδο της Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Απορρόφησης και οι ιστοί οι οποίοι αναλύθηκαν ήταν τα βράγχια, το ήπαρ, οι νεφροί, ο μυϊκός ιστός και οι γονάδες.

α. Βράγχια

Για τη μελέτη της αποκατάστασης των βραγχίων των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των μετάλλων στα βράγχια κατόπιν μεταφοράς τους σε αποχλωρωμένο νερό βρύσης (συνθήκη 120α) ή σε νερό με την αρχική συγκέντρωση καδμίου, όπου είχε προστεθεί και 1ppb Zn για το ενυδρείο III και 10ppb για το ενυδρείο IV (συνθήκη 120β).



Γράφημα 60. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στα βράγχια των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Η συγκέντρωση Cd στα βράγχια των ιχθύων του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd) μειώνεται από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, πιθανώς



επειδή τα ψάρια ομοιοστατούν, όπως και κατά την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α), όπου παρατηρείται σημαντική μείωση της συσσώρευσης Cd σε σχέση με την συσσώρευση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,01$). Η συσσώρευση Cd στα βράγχια των ιχθύων κατόπιν της αποκατάστασης με 1ppb Zn (120β) αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α) ($p=0,03$).

Στους ιχθύς του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd) η συσσώρευση Cd στα βράγχια μειώνεται επίσης, από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, πιθανώς επειδή τα ψάρια ομοιοστατούν, όπως και κατά την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α), όπου παρατηρείται σημαντική μείωση της συσσώρευσης Cd σε σχέση με την συσσώρευση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,04$). Η συσσώρευση Cd στα βράγχια των ιχθύων κατόπιν της αποκατάστασης με 10ppb Zn (120β) αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α) ($p=0,00$), όπως και σε σχέση με την συσσώρευση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,01$), υποδεικνύοντας πιθανή συνέργια του Zn στην είσοδο του Cd στα βράγχια κατόπιν έκθεσης σε μικρές (ενυδρείο III) και σε μεγάλες συγκεντρώσεις (ενυδρείο IV). Έτσι φαίνεται ότι ο Zn δεν ασκεί προστατευτική δράση έναντι της συσσώρευσης Cd στα βράγχια σε καμία από τις ομάδες ιχθύων που αποκαταστάθηκαν. Πάντως η συσσώρευση Cd στα βράγχια είναι σημαντικά υψηλότερη στους ιχθύς που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (ενυδρείο IV) σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (ενυδρείο III) ήδη από τις 60 ημέρες ($p=0,00$), καθώς τα βράγχια αποτελούν τον πρώτο ιστόστοχο, τον οποίο πλήττουν τα μέταλλα στους υδρόβιους οργανισμούς.

Στους ιχθύς του ενυδρείου III η συσσώρευση Zn στα βράγχια εμφανίζεται σχεδόν σταθερή από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, όπως και στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α). Κατόπιν προσθήκης 1ppb Zn (120β) παρατηρείται μία μικρή αύξηση στη συγκέντρωσή του στα βράγχια. Πάντως καμία από τις διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Στους ιχθύς του ενυδρείου IV ο Zn στα βράγχια παραμένει σταθερός από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, ενώ αυξάνεται σημαντικά στην αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α) σε σχέση με την συγκέντρωσή του κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,00$). Τέλος μειώνεται εκ νέου κατόπιν προσθήκης 10ppb Zn (120β), σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα όμως, σε σχέση με την συγκέντρωσή του κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,05$). Πάντως σε όλες τις συνθήκες ο Zn στα βράγχια των ιχθύων του ενυδρείου IV είναι σε χαμηλότερα επίπεδα από του ενυδρείου III (εκτός στη συνθήκη 120α), και μάλιστα στις 120 ημέρες έκθεσης σε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ($p=0,02$), δείχνοντας ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd επηρεάζουν λιγότερο τη συγκέντρωση Zn στα βράγχια.

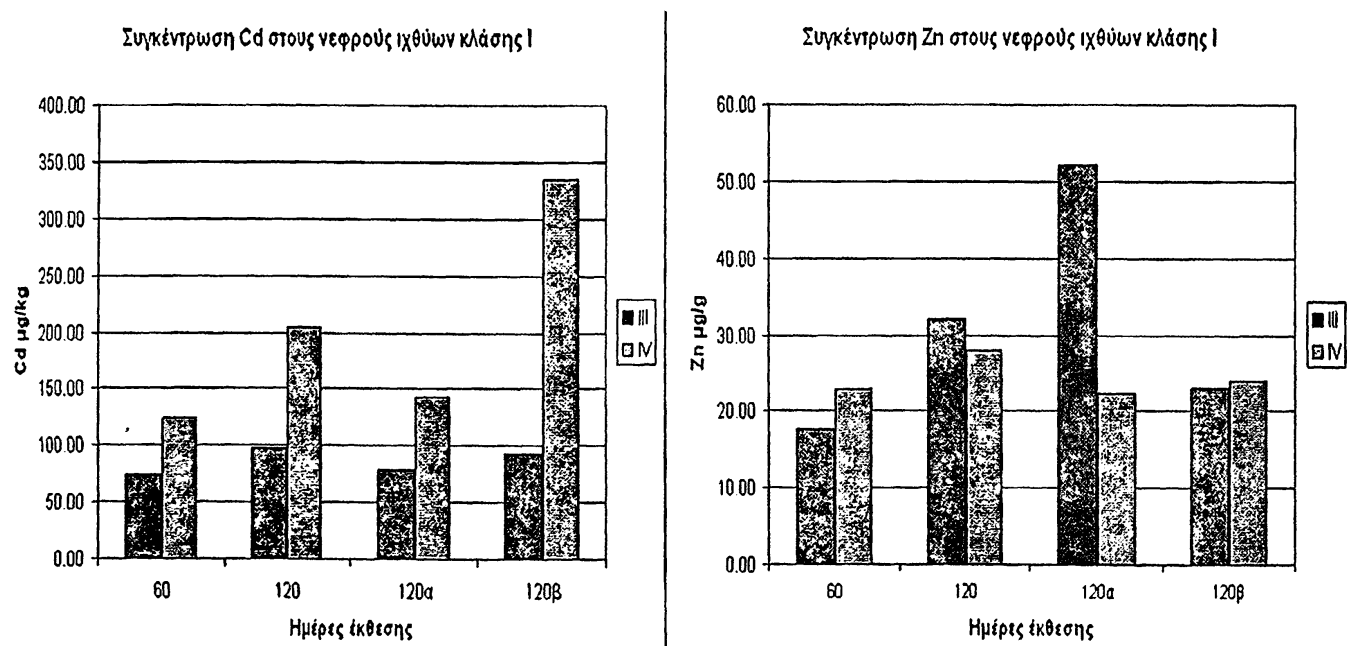


Πίνακας 59. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd και Zn στα βράγχια ιχθύων κλάσης I.

Μέταλλο	Ημέρες	III-IV	III -IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Cd	60	0.00								
	120	0.12	0.01	0.47	0.03	0.00	0.04	0.01	0.00	0.01
Zn	60	0.07								
	120	0.02	0.60	0.34	0.63	0.99	0.00	0.05	0.12	0.10

β. Νεφροί

Για τη μελέτη της αποκατάστασης των νεφρών των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των μετάλλων στους νεφρούς κατόπιν μεταφοράς τους σε αποχλωριωμένο νερό βρύσης (συνθήκη 120α) ή σε νερό με την αρχική συγκέντρωση καδμίου, όπου είχε προστεθεί και 1ppb Zn για το ενυδρείο III και 10ppb για το ενυδρείο IV (συνθήκη 120β).



Γράφημα 61. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στους νεφρούς των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Εξετάζοντας τη συσσώρευση των μετάλλων και για τα δύο φύλα στους νεφρούς, η συγκέντρωση Cd για τους ιχθύς του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd) εμφανίζεται σχεδόν σταθερή σε όλες τις συνθήκες και κατόπιν της αποκατάστασης σε νερό βρύσης ή με Zn (IIIa-IIIβ). Στους ιχθύς του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd) η συσσώρευση Cd στους νεφρούς αυξάνει από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, ενώ κατά την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α) παρατηρείται σημαντική μείωσή της σε σχέση με αυτήν κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,03$), αλλά και σε σχέση με την αποκατάσταση με 10ppb Zn (120β) ($p=0,01$). Στην



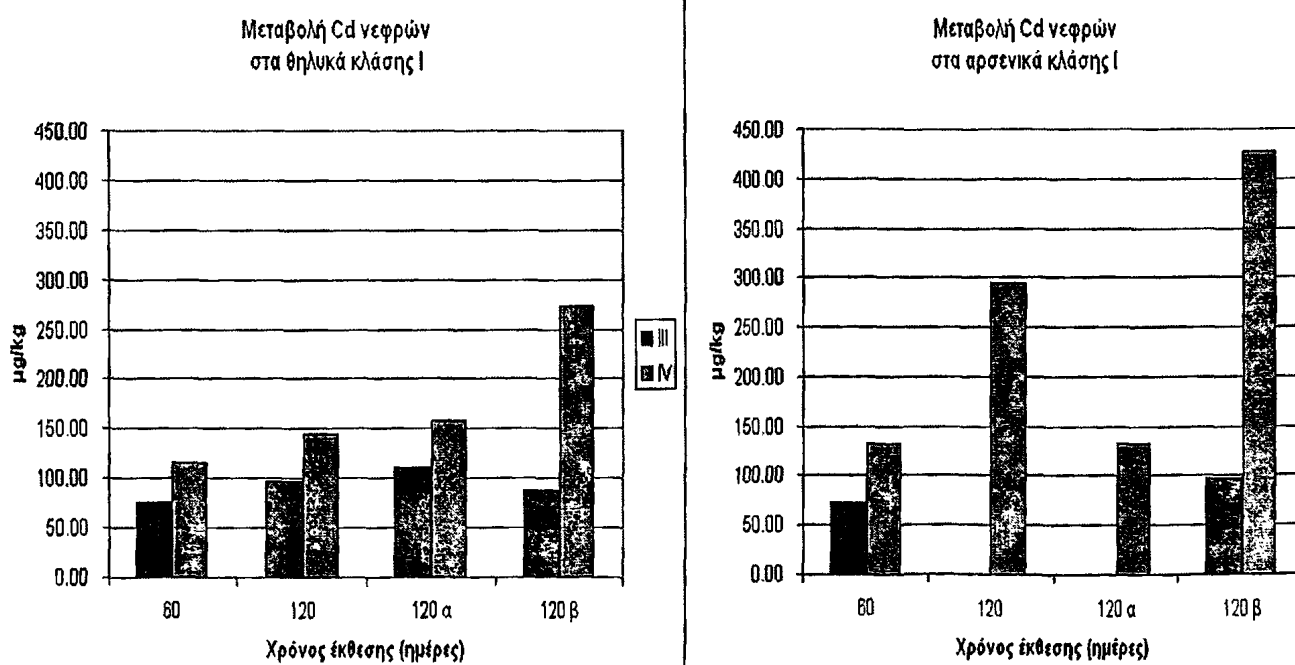
περίπτωση αποκατάστασης με 10ppb Zn (120β) το Cd στους νεφρούς αυξάνεται μέχρι τη μέγιστη τιμή του, παρέχοντας σοβαρές ενδείξεις ότι ο Zn ευνοεί την είσοδο Cd στους νεφρούς. Πάντως η συσσώρευση Cd στους νεφρούς των ιχθύων του ενυδρείου IV είναι σημαντικά υψηλότερη από του ενυδρείου III τόσο κατόπιν της έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,00$), καθώς και κατόπιν αποκατάστασης με Zn (120β) ($p=0,01$).

Στους ιχθύς του ενυδρείου III η συσσώρευση Zn στους νεφρούς αυξάνεται από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, ενώ στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) ο Zn στο ήπαρ αυξάνεται στη μέγιστη τιμή του, και μειώνεται εκ νέου σε σχέση με τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, κατόπιν προσθήκης 1ppb Zn (120β). Πάντως καμία από τις διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Στους ιχθύς του ενυδρείου IV ο Zn στους νεφρούς αρχικά αυξάνεται ελαφρώς από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, ενώ στις συνθήκες αποκατάστασης (120α-120β) παραμένει σχεδόν σταθερός.

Πίνακας 60. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd και Zn στους νεφρούς ιχθύων κλάσης I.

Μέταλλο	Ημέρες	III-IV	III -IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVt
Cd	60	0.02								
	120	0.00	0.75	0.87	0.71	0.07	0.03	0.23	0.01	0.01
Zn	60	0.40								
	120	0.75	0.57	0.41	0.32	0.12	0.66	0.51	0.78	0.92

β1. Συσσώρευση Cd στους νεφρούς ανά φύλο



Γράφημα 62. Συσσώρευση καδμίου στους νεφρούς θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.



Στα θηλυκά του ενυδρείου III η συσσώρευση Cd στους νεφρούς αυξάνεται σχεδόν προοδευτικά σε όλες τις συνθήκες εκτός κατόπιν της αποκατάστασης με 1ppb Zn (120β) όπου μειώνεται ελαφρά, ενώ στα θηλυκά του ενυδρείου IV η συσσώρευση Cd στους νεφρούς αυξάνει προοδευτικά από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, όπως και κατόπιν αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α). Στην περίπτωση αποκατάστασης με 10ppb Zn (120β) το Cd στους νεφρούς αυξάνεται μέχρι τη μέγιστη τιμή του, σχεδόν διπλασιάζεται, παρέχοντας σοβαρές ενδείξεις ότι ο Zn ευνοεί την είσοδο Cd στους νεφρούς των θηλυκών. Πάντως η συσσώρευση Cd στα θηλυκά του ενυδρείου IV είναι σημαντικά υψηλότερη από του ενυδρείου III κατόπιν της αποκατάστασης με 10ppb Zn (120β) ($p=0,04$).

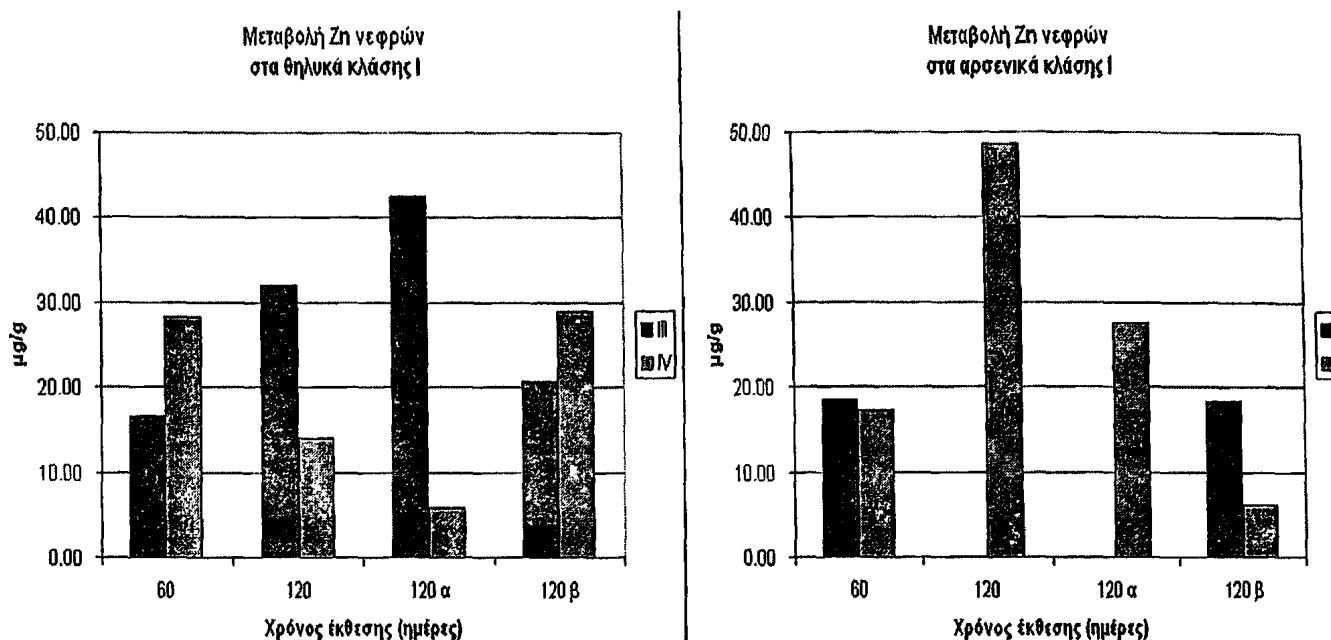
Στα αρσενικά του ενυδρείου III η συσσώρευση του Cd εμφανίζεται σχετικά σταθερή, ενώ στα αρσενικά του ενυδρείου IV παρουσιάζεται αύξηση των επιπέδων Cd στους νεφρούς, από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης. Επίσης, στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) παρατηρείται σημαντική μείωση της συσσώρευσης Cd στους νεφρούς σε σχέση με αυτήν κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,00$). Κατόπιν αποκατάστασης δε, με 10ppb Zn (120β) το Cd στους νεφρούς αυξάνεται μέχρι τη μέγιστη τιμή του, ενισχύοντας την πιθανότητα ο Zn να ευνοεί την είσοδο Cd στους νεφρούς και στα δύο φύλα.

Πίνακας 61. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd στους νεφρούς θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	III-IV	III-IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Θ	60	0.20								
	120	0.36	0.75	0.82	0.73	0.51	0.83	0.09	0.13	0.04
Α	60	0.13								
	120						0.02			0.11



β2. Συσσώρευση Zn στους νεφρούς ανά φύλο



Γράφημα 63. Συσσώρευση Zn στους νεφρούς θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Στα θηλυκά του ενυδρείου III η συσσώρευση Zn στους νεφρούς αυξάνεται προοδευτικά από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, όπως και στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α). Κατόπιν αποκατάστασης με προσθήκη 1ppb Zn (120β) τα επίπεδα Zn στους νεφρούς μειώνονται στα επίπεδα που είχαν στις 60 ημέρες έκθεσης με Cd. Στα θηλυκά του ενυδρείου IV ο Zn στους νεφρούς αρχικά μειώνεται από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, ενώ μειώνεται ακόμα περισσότερο στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α). Κατόπιν αποκατάστασης με προσθήκη 10ppb Zn (120β) τα επίπεδα Zn στους νεφρούς αυξάνονται εκ νέου στα επίπεδα που είχαν στις 60 ημέρες έκθεσης με Cd.

Στα αρσενικά του ενυδρείου III η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς παραμένει συνεχώς σταθερή, ενώ στα αρσενικά του ενυδρείου IV η συγκέντρωση του Zn αυξάνει στις 120 ημέρες έκθεσης με Cd και μειώνεται σημαντικά σε όλες τις συνθήκες αποκατάστασης (120α-120β) ($p=0,01$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση Zn μεταξύ των δύο φύλων παρατηρούνται στη συνθήκη IVα, με τα αρσενικά να έχουν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση Zn ($p=0,00$), και στη συνθήκη IVβ με τα θηλυκά να έχουν σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση Zn ($p=0,05$).

Πίνακας 62. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Zn στους νεφρούς θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

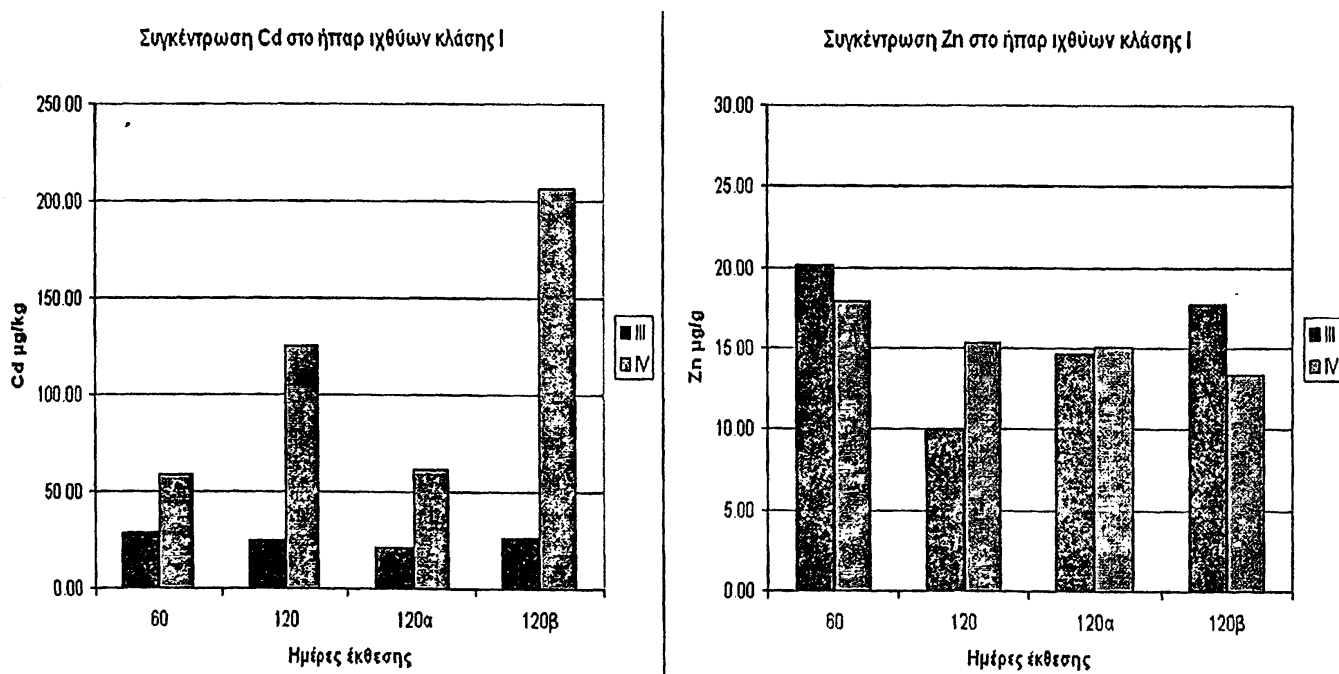
Φύλο	Ημέρες	III-IV	III-IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
♂	60	0.33								
	120	0.11	0.57	0.41	0.27	0.22	0.27	0.12	0.06	0.49
Α	60	0.87								
	120						0.13	0.09	0.01	0.12

Πίνακας 63. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd και Zn στους νεφρούς αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	Μέταλλο	IIIβ	IVα	IVβ
120	Cd	0.88	0.44	0.24
	Zn	0.85	0.00	0.05

γ. Ήπαρ

Για τη μελέτη της αποκατάστασης του ήπατος των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, κατόπιν μεταφοράς τους σε αποχλωριωμένο νερό βρύσης (συνθήκη 120α) ή σε νερό με την αρχική συγκέντρωση καδμίου, όπου είχε προστεθεί και 1ppb Zn για το ενυδρείο III και 10ppb για το ενυδρείο IV (συνθήκη 120β), προσδιορίστηκε αφ' ενός το περιεχόμενο των μετάλλων στο ήπαρ, αφ' ετέρου η αύξηση του ήπατος μέσω του σχετικού μεγέθους του (Ηπατοσωματικός δείκτης LSI).



Γράφημα 64. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στο ήπαρ των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.



Εξετάζοντας τη συσσώρευση των μετάλλων συνολικά και για τα δύο φύλα στο ήπαρ, η συγκέντρωση Cd για τους ιχθύς του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd) εμφανίζεται σταθερή σε όλες τις συνθήκες και κατόπιν της αποκατάστασης σε νερό βρύσης ή με Zn (120α-β). Παράλληλα στους ιχθύς του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd) η συσσώρευση Cd στο ήπαρ αυξάνει από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, ενώ κατά την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α) παρατηρείται σημαντική μείωση της συσσώρευσης Cd σε σχέση με την συσσώρευση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,02$), αλλά και σε σχέση με την αποκατάσταση με 10ppb Zn (120β) ($p=0,01$). Στην περίπτωση αποκατάστασης με 10ppb Zn (120β) το Cd στο ήπαρ αυξάνεται μέχρι τη μέγιστη τιμή του, παρέχοντας σοβαρές ενδείξεις ότι ο Zn ευνοεί την είσοδο Cd στο ήπαρ. Πάντως η συσσώρευση Cd στο ήπαρ των ιχθύων του ενυδρείου IV είναι σημαντικά υψηλότερη από του ενυδρείου III τόσο κατόπιν της έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,00$), καθώς και σε όλες τις συνθήκες αποκατάστασης (120α-β) ($p=0,03$ και $p=0,00$ αντίστοιχα).

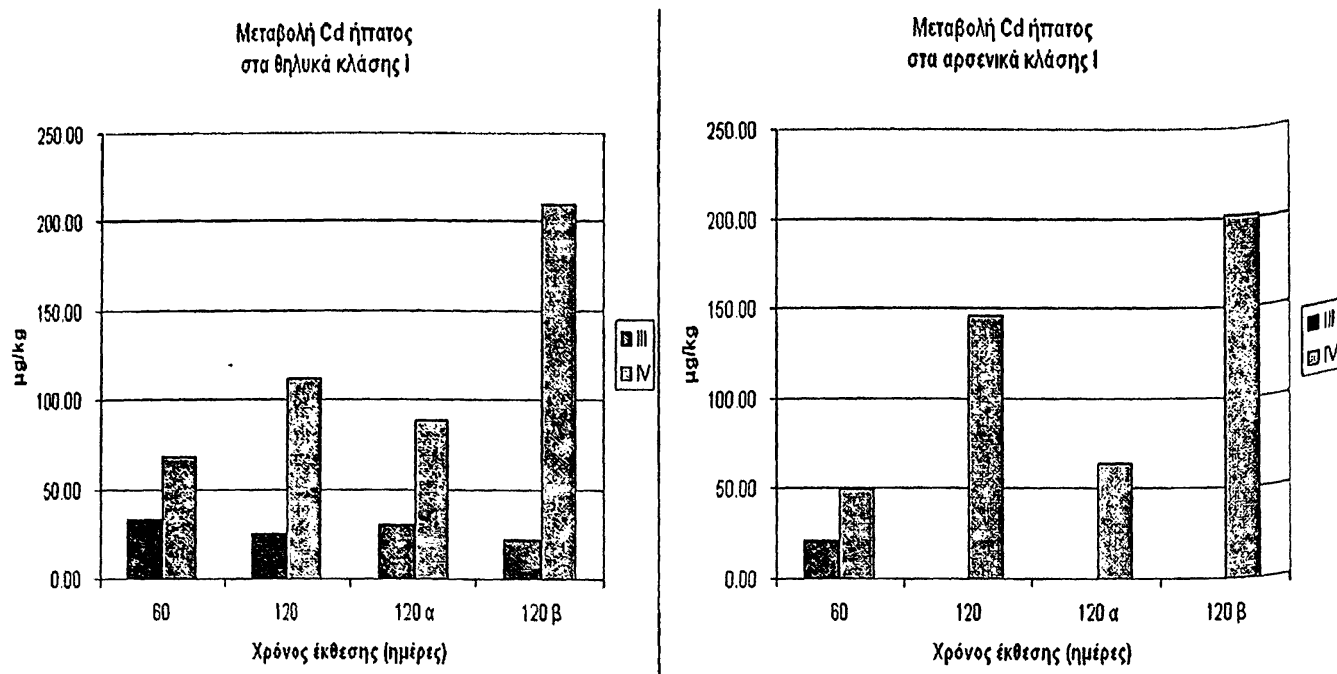
Στους ιχθύς του ενυδρείου III η συσσώρευση Zn στο ήπαρ μειώνεται από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, ενώ στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) ή με προσθήκη 1ppb Zn (120β) ο Zn στο ήπαρ αυξάνεται προοδευτικά σε σχέση με τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd. Στους ιχθύς του ενυδρείου IV ο Zn ήπατος αρχικά μειώνεται από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, ενώ στις συνθήκες αποκατάστασης (120α-β) παραμένει σχεδόν σταθερός. Πάντως η μόνη σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι μεταξύ ιχθύων του ενυδρείου III και ενυδρείου IV στις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, με τα επίπεδα Zn στο ήπαρ ιχθύων του ενυδρείου IV να είναι σημαντικά χαμηλότερα από του ενυδρείου III ($p=0,02$).

Πίνακας 64. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd και Zn στο ήπαρ ιχθύων κλάσης I.

Μέταλλο	Ημέρες	III-IV	III -IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IV
Cd	60	0.01								
	120	0.00	0.62	0.81	0.72	0.03	0.02	0.08	0.01	0.00
Zn	60	0.47								
	120	0.02	0.10	0.09	0.99	0.90	0.87	0.10	0.13	0.23



γ1. Συσσώρευση Cd στο ήπαρ ανά φύλο



Γράφημα 65. Συσσώρευση καδμίου στο ήπαρ θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

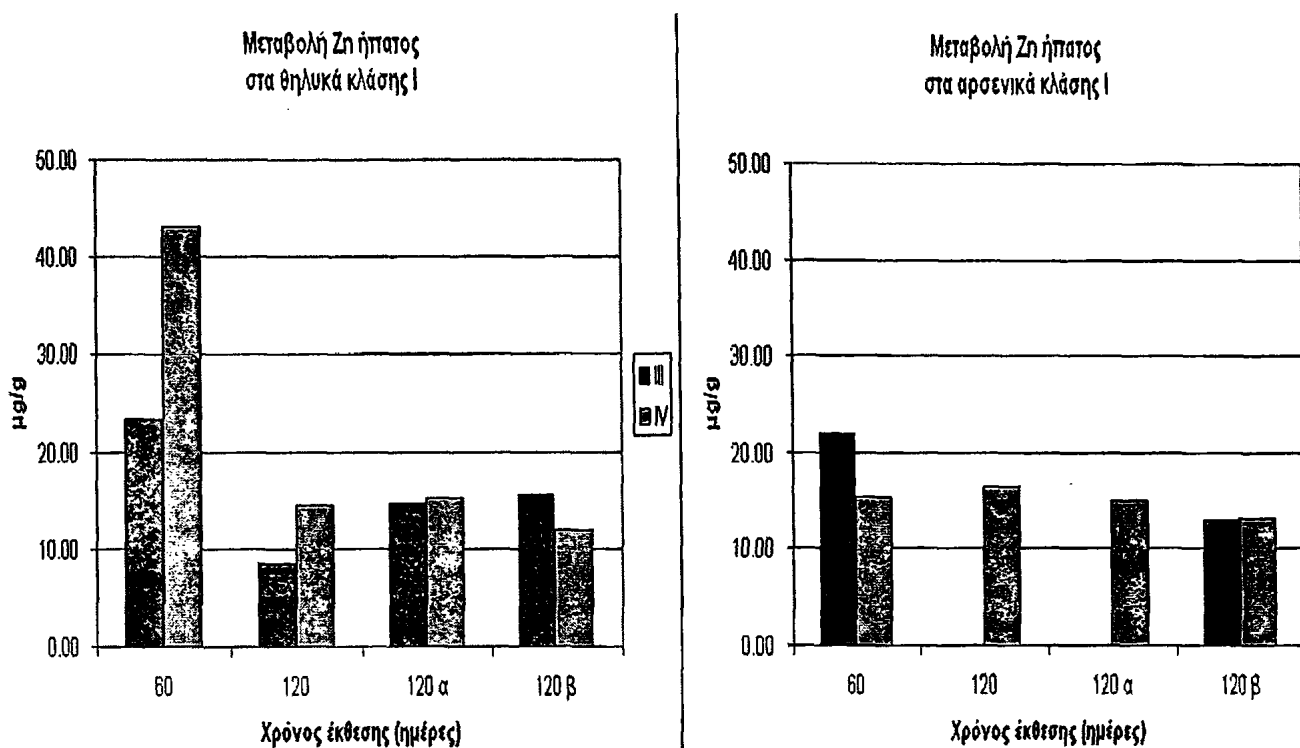
Στα θηλυκά του ενυδρείου III η συσσώρευση Cd στο ήπαρ εμφανίζεται σταθερή σε όλες τις συνθήκες και κατόπιν της αποκατάστασης (120α-β), ενώ στα θηλυκά του ενυδρείου IV η συσσώρευση Cd στο ήπαρ αυξάνει από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης. Επίσης στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) παρατηρείται σχετική μείωση της συσσώρευσης Cd, αλλά στην περίπτωση αποκατάστασης με 10ppb Zn (120β) το Cd στο ήπαρ αυξάνεται μέχρι τη μέγιστη τιμή του, παρέχοντας σοβαρές ενδείξεις ότι ο Zn ευνοεί την είσοδο Cd στο ήπαρ. Πάντως η συσσώρευση Cd στο ήπαρ στα θηλυκά του ενυδρείου IV είναι σημαντικά υψηλότερη από του ενυδρείου III τόσο κατόπιν της έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,00$), καθώς και σε όλες τις συνθήκες αποκατάστασης (120α-β) ($p=0,05$).

Στα αρσενικά του ενυδρείου IV παρουσιάζεται αύξηση των επιπέδων Cd στο ήπαρ, από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης. Επίσης, όπως και στα θηλυκά του ίδιου ενυδρείου, στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) παρατηρείται σημαντική μείωση της συσσώρευσης Cd στο ήπαρ σε σχέση με την συσσώρευση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,01$), αλλά και σε σχέση με την αποκατάσταση με 10ppb Zn (120β) ($p=0,00$). Μάλιστα κατόπιν αποκατάστασης με 10ppb Zn (120β) το Cd στο ήπαρ αυξάνεται σημαντικά μέχρι τη μέγιστη τιμή του, σε σχέση με την συσσώρευση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,00$), ενισχύοντας την πιθανότητα ο Zn να ευνοεί την είσοδο Cd στο ήπαρ και στα δύο φύλα.

Πίνακας 65. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd στο ήπαρ θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	III-IV	III -IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Θ	60	0.14								
	120	0.00	0.62	0.68	0.48	0.05	0.52	0.24	0.28	0.05
Α	60	0.01								
	120						0.01	0.08	0.00	0.00

γ2. Συσσώρευση Zn στο ήπαρ ανά φύλο



Γράφημα 66. Συσσώρευση Zn στο ήπαρ θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Στα θηλυκά του ενυδρείου III η συσσώρευση Zn στο ήπαρ μειώνεται, ιδιαίτερα από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, ενώ στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) ή με προσθήκη 1ppb Zn (120β) ο Zn στο ήπαρ είναι ελαφρά αυξημένος σε σχέση με τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd. Στα θηλυκά του ενυδρείου IV ο Zn ήπατος αρχικά μειώνεται έντονα από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, ενώ στις συνθήκες αποκατάστασης (120α-β) παραμένει σχεδόν σταθερός. Πάντως η μόνη σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι μεταξύ θηλυκών ενυδρείου III και ενυδρείου IV στις 60 ημέρες έκθεσης, με τα επίπεδα Zn στο ήπαρ θηλυκών του ενυδρείου IV να είναι σημαντικά υψηλότερα από του ενυδρείου III ($p=0,05$).

Στα αρσενικά του ενυδρείου III η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ μειώνεται μετά τις 60 ημέρες έκθεσης με Cd, ενώ στα αρσενικά του ενυδρείου IV η

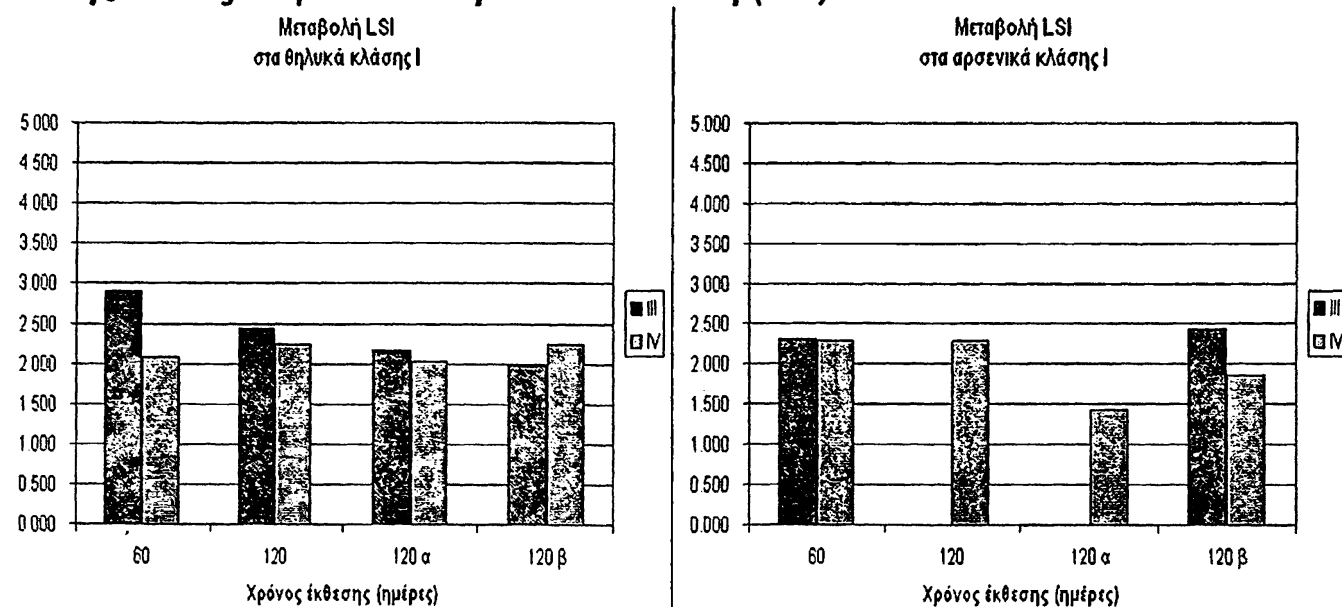


συγκέντρωση του Zn στο ήπαρ παραμένει συνεχώς σταθερή. Πάντως η συσσώρευση τόσο του Cd όσο και του Zn στο ήπαρ δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο φύλων σε καμία από τις συνθήκες.

Πίνακας 66. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Zn στο ήπαρ θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	III-IV	III-IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Θ	60	0.46								
	120	0.05	0.10	0.14	0.86	0.92	0.82	0.42	0.47	0.50
Α	60	0.22								
	120						0.52			

γ3. Μεταβολή Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI)



Γράφημα 67. Μεταβολή Ηπατοσωματικού (LSI) Δείκτη των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, στα θηλυκά του ενυδρείου III δείχνει προοδευτική μείωση σε όλες τις συνθήκες, ενώ η τιμή του στα θηλυκά του ενυδρείου IV εμφανίζει μία σχετική σταθερότητα συνεχώς. Πάντως η τιμή του δείκτη αύξησης του ήπατος δε διαφέρει μεταξύ των δύο φύλων σε καμία από τις συνθήκες.

Όσον αφορά τα αρσενικά του ενυδρείου III οι τιμές του δείκτη εμφανίζονται σταθερές, ενώ τα αρσενικά του ενυδρείου IV παρουσιάζουν εμφανή μείωση του ηπατικού δείκτη αύξησης κατόπιν της αποκατάστασής τους σε νερό βρύσης (120α). Πάντως μετά από αποκατάσταση των ιχθύων με 10ppb Zn το σχετικό μέγεθος του ήπατος αυξάνει, σε χαμηλότερα επίπεδα όμως από αυτό της έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες. Παρόλα αυτά



δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στον δείκτη LSI σε καμία από τις ομάδες στα αρσενικά ή τα θηλυκά ψάρια.

Πίνακας 67. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ Ηπατοσωματικού (LSI) Δείκτη θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

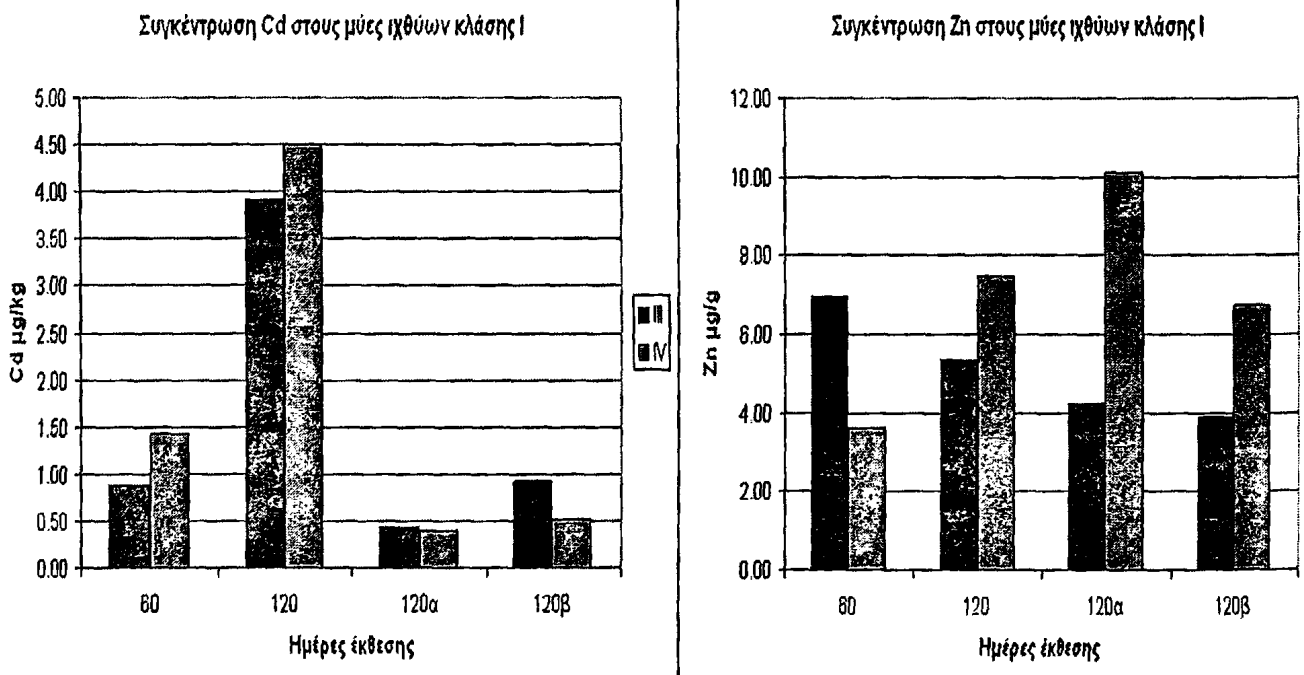
Φύλο	Ημέρες	III-IV	III -IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Θ	60	0.10								
	120	0.59	0.54	0.31	0.68	0.82	0.59	0.99	0.71	0.57
Α	60	0.99								
	120						0.36	0.67	0.60	0.41

Πίνακας 68. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd και Zn στο ήπαρ και LSI αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	LSI			
	IIIβ	IVα	IVβ	
120	Cd	0.34	0.42	0.93
	Zn	0.67	0.97	
	LSI	0.33	0.44	0.55

δ. Μυϊκός ιστός

Για τη μελέτη της αποκατάστασης του μυϊκού ιστού των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, προσδιορίστηκε το περιεχόμενο των μετάλλων στους μύες της ραχιαίας πλευράς κατόπιν μεταφοράς τους σε αποχλωριωμένο νερό βρύσης (συνθήκη 120α) ή σε νερό με την αρχική συγκέντρωση καδμίου, όπου είχε προστεθεί 1ppb Zn για το ενυδρείο III και 10ppb για το ενυδρείο IV (συνθήκη 120β).



Γράφημα 68. Συσσώρευση καδμίου και ψευδαργύρου στους μύες των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.



Η συγκέντρωση Cd στους μύες των ιχθύων του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd) αυξάνεται από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, ενώ κατά την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α) παρατηρείται σημαντική μείωση της συσσώρευσης Cd σε σχέση με την συσσώρευση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,05$), όπως και κατά την αποκατάσταση με 10ppb Zn (120β). Στους ιχθύς του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb Cd) η συσσώρευση Cd στους μύες αυξάνει επίσης από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, ενώ κατά την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α) μειώνεται σημαντικά σε σχέση με την συσσώρευση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες ($p=0,02$), όπως και κατά την αποκατάσταση με 1ppb Zn (120β) ($p=0,02$). Πάντως είναι εμφανές το γεγονός ότι η συσσώρευση Cd στους μύες μειώνεται κατόπιν των συνθηκών αποκατάστασης και για το ενυδρείο III και για το IV.

Στους ιχθύς του ενυδρείου III η συσσώρευση Zn στους μύες μειώνεται από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, όπως και στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) σε σχέση με τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd, και κατόπιν προσθήκης 1 ppb Zn (120β). Πάντως καμία από τις διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Στους ιχθύς του ενυδρείου IV ο Zn στους μύες αρχικά αυξάνεται από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης, όπως και στην αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α), ενώ μειώνεται εκ νέου κατόπιν προσθήκης 10ppb Zn (120β). Πάντως σε όλες τις συνθήκες στις 120 ημέρες ο Zn στους μύες των ιχθύων του ενυδρείου IV είναι σε υψηλότερα επίπεδα από του ενυδρείου III (στην περίπτωση 120α σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα $p=0,05$), δείχνοντας ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd επηρεάζουν περισσότερο τη συγκέντρωση Zn στους μύες.

Πίνακας 69. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd και Zn στους μύες ιχθύων κλάσης I.

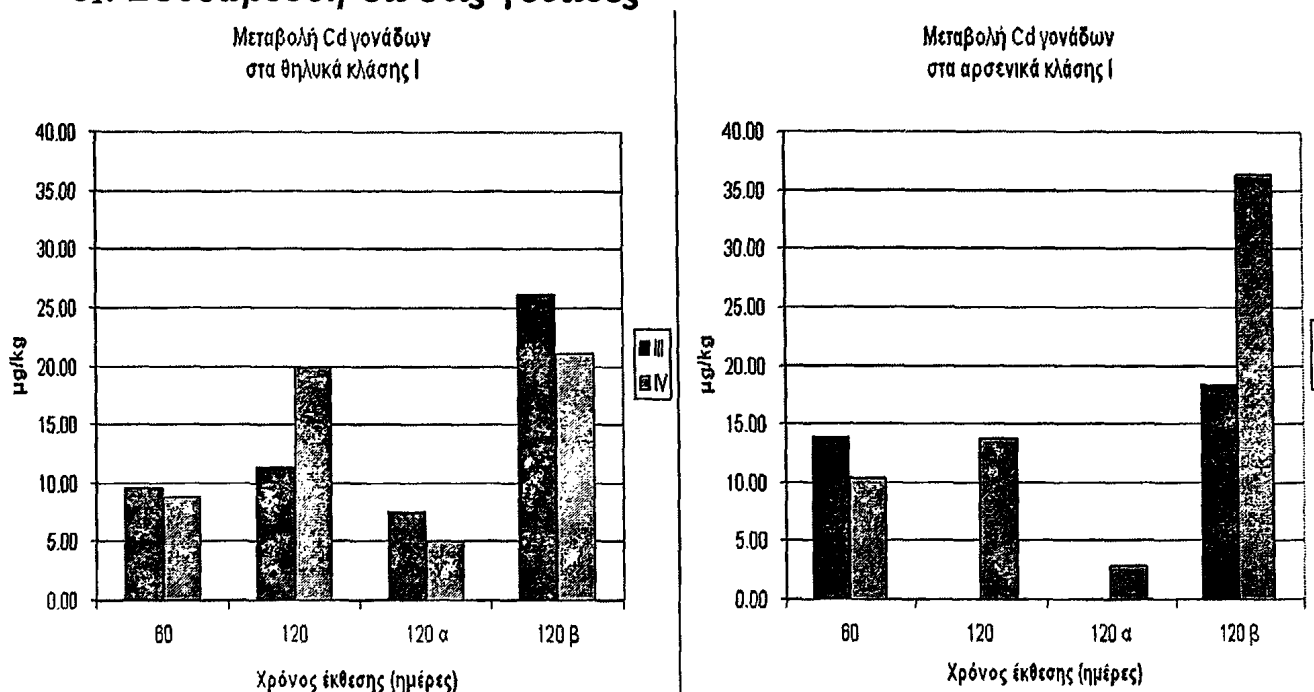
Μέταλλο	Ημέρες	III-IV	III -IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Cd	60	0.74								
	120	0.78	0.05	0.11	0.48	0.95	0.02	0.02	0.81	0.58
Zn	60	0.17								
	120	0.36	0.54	0.59	0.89	0.05	0.38	0.85	0.43	0.48



ε. Γονάδες

Για τη μελέτη της αποκατάστασης των γονάδων των ιχθύων που εκτέθηκαν σε κάδμιο, κατόπιν μεταφοράς τους σε αποκλωριωμένο νερό βρύσης (συνθήκη 120α) ή σε νερό με την αρχική συγκέντρωση καδμίου, όπου είχε προστεθεί και 1ppb Zn για το ενυδρείο III και 10ppb για το ενυδρείο IV (συνθήκη 120β), προσδιορίστηκε αφ' ενός το περιεχόμενο των μετάλλων στις γονάδες, αφ' ετέρου το ορμονικό προφίλ μέσω της 17-β οιστραδιόλης ορού, όπως επίσης και η αύξηση των γονάδων μέσω του σχετικού μεγέθους τους (Γοναδοσωματικός δείκτης GSI).

ε1. Συσσώρευση Cd στις γονάδες



Γράφημα 69. Συσσώρευση καδμίου στις γονάδες των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Η συγκέντρωση του Cd στις γονάδες είναι γενικά χαμηλή τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά, με εξαίρεση τη συνθήκη αποκατάστασης των ιχθύων με προσθήκη 1ppb Zn και 10ppb Zn (120β) για τα ενυδρεία III και IV αντίστοιχα.

Στα θηλυκά του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd) η συσσώρευση Cd στις γονάδες, είναι σε παρόμοια επίπεδα στις 60 και 120 ημέρες έκθεσης με Cd, φαίνεται να μειώνεται ελαφρά κατόπιν της αποκατάστασης σε νερό βρύσης, ενώ στην περίπτωση της αποκατάστασης με προσθήκη 1ppb Zn (120β) η εικόνα αλλάζει. Εκεί η συσσώρευση είναι σημαντικά υψηλότερη τόσο από τη συσσώρευση που παρατηρείται στις 120 ημέρες έκθεσης με Cd ($p=0,03$), όσο και μετά από την αποκατάσταση των ιχθύων σε νερό βρύσης (120α) ($p=0,00$), και μάλιστα κορυφώνεται, υποδεικνύοντας πιθανή

συνεργιστική δράση των δύο μετάλλων, με τον Zn να ευνοεί την είσοδο Cd στις γονάδες των θηλυκών.

Στα θηλυκά του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb), η συσσώρευση Cd στις γονάδες, αυξάνεται στα ίδια επίπεδα στις 120 ημέρες έκθεσης, όπως και κατόπιν αποκατάστασης με προσθήκη 10ppb Zn (120β), ενισχύοντας την πιθανότητα συνέργιας των δύο μετάλλων. Φαίνεται επίσης ότι η συγκέντρωση Cd στις γονάδες μειώνεται σημαντικά κατόπιν της αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) σε σχέση με τις τιμές στις 120 ημέρες έκθεσης με Cd ($p=0,02$), όσο και σε σχέση με την αποκατάσταση των ιχθύων με προσθήκη Zn (120β) ($p=0,02$). Πάντως η συσσώρευση Cd είναι υψηλότερη στις γονάδες των θηλυκών της ομάδας IIIβ από ότι στα θηλυκά της ομάδας IVβ, παρά το γεγονός ότι η συσσώρευση που παρατηρείται στις 120 ημέρες έκθεσης με 5ppb Cd (ενυδρείο IV) είναι σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη συσσώρευση στις 120 ημέρες έκθεσης με 1ppb Cd (ενυδρείο III) ($p=0,05$). Έτσι φαίνεται τελικά ότι η έκθεση σε μικρές συγκεντρώσεις Cd επηρεάζει περισσότερο τη συσσώρευση Cd στις γονάδες των θηλυκών, με την είσοδο Cd να ευνοείται σε αυτά περισσότερο παρουσία Zn.

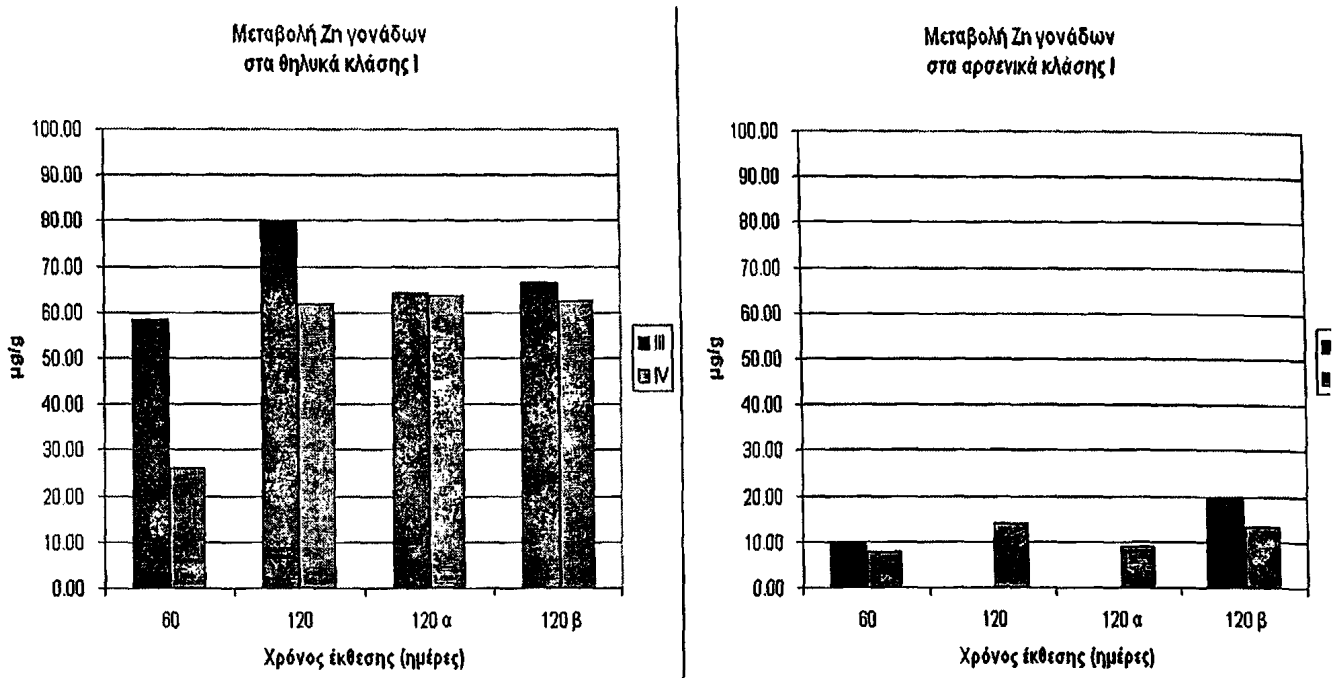
Στις γονάδες των αρσενικών του ενυδρείου III η υψηλότερη τιμή συγκέντρωσης Cd παρατηρείται κατόπιν της αποκατάστασης με 1ppb Zn (120β), υποδεικνύοντας ότι η προσθήκη Zn ευνοεί την είσοδό του στις γονάδες και των δύο φύλων. Στις γονάδες των αρσενικών του ενυδρείου IV η συσσώρευση του Cd εμφανίζεται σημαντικά υψηλότερη ($p=0,00$) μετά από την αποκατάσταση των ιχθύων με Zn (120β), σε σχέση με την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α), ενισχύοντας την άποψη της συνεργιστικής δράσης των δύο μετάλλων και στα αρσενικά. Μάλιστα η συσσώρευση του Cd φτάνει σε επίπεδα πολύ υψηλότερα από των θηλυκών ή από του ενυδρείου IIIβ. Έτσι φαίνεται ότι ισχυρότερη επίδραση ασκούν οι μεγάλες συγκεντρώσεις καδμίου στη συσσώρευσή του στις γονάδες των αρσενικών, αντίθετα από ότι στα θηλυκά. Πάντως αυτές οι διαφορές δεν είναι σημαντικές.

Πίνακας 70. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd στις γονάδες θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	III-IV	III-IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Θ	60	0.75								
	120	0.05	0.32	0.03	0.00	0.50	0.02	0.67	0.02	0.44
Α	60	0.23								
	120								0.00	0.13



ε2. Συσσώρευση Zn στις γονάδες



Γράφημα 70. Συσσώρευση ψευδαργύρου στις γονάδες των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Στα θηλυκά του ενυδρείου III (έκθεση σε 1ppb Cd) η συγκέντρωση Zn στις γονάδες είναι σταθερά υψηλή στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης ή με προσθήκη 1ppb Zn (120α-120β), αλλά η υψηλότερη τιμή παρατηρείται στην περίπτωση της έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες. Στα θηλυκά του ενυδρείου IV (έκθεση σε 5ppb) μετά τις 60 ημέρες έκθεσης σε Cd, η συγκέντρωση Zn στις γονάδες, υπερδιπλασιάζεται σε όλες τις συνθήκες και φτάνει στο ίδιο επίπεδο και για τα ενυδρεία της αποκατάστασης των ιχθύων σε νερό βρύσης (120α) ή κατόπιν προσθήκης 10ppb Zn (120β), χωρίς όμως σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Στις γονάδες των αρσενικών του ενυδρείου III η συγκέντρωση Zn είναι πολύ μικρότερη (από υποτριπλάσια έως υποεξαπλάσια) από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα θηλυκά, ενώ η υψηλότερη τιμή παρουσιάζεται κατόπιν της αποκατάστασης με Zn. Στις γονάδες των αρσενικών του ενυδρείου IV η συγκέντρωση του Zn εμφανίζεται σε σταθερά χαμηλά επίπεδα σε όλες τις συνθήκες, είναι μάλιστα υποεξαπλάσια των αντίστοιχων τιμών των γονάδων των θηλυκών του ενυδρείου IV. Στις συνθήκες δε, IIIβ και IVα, η συγκέντρωση του Zn στις γονάδες των αρσενικών είναι σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη των θηλυκών ($p=0,01$ και $p=0,00$ αντίστοιχα).

Το γεγονός ότι η είσοδος του Zn δε μεταβάλλεται στη συνθήκη 120β υποδεικνύει ότι η προσθήκη Zn δεν ευνοεί την είσοδό του στις γονάδες και των δύο φύλων.

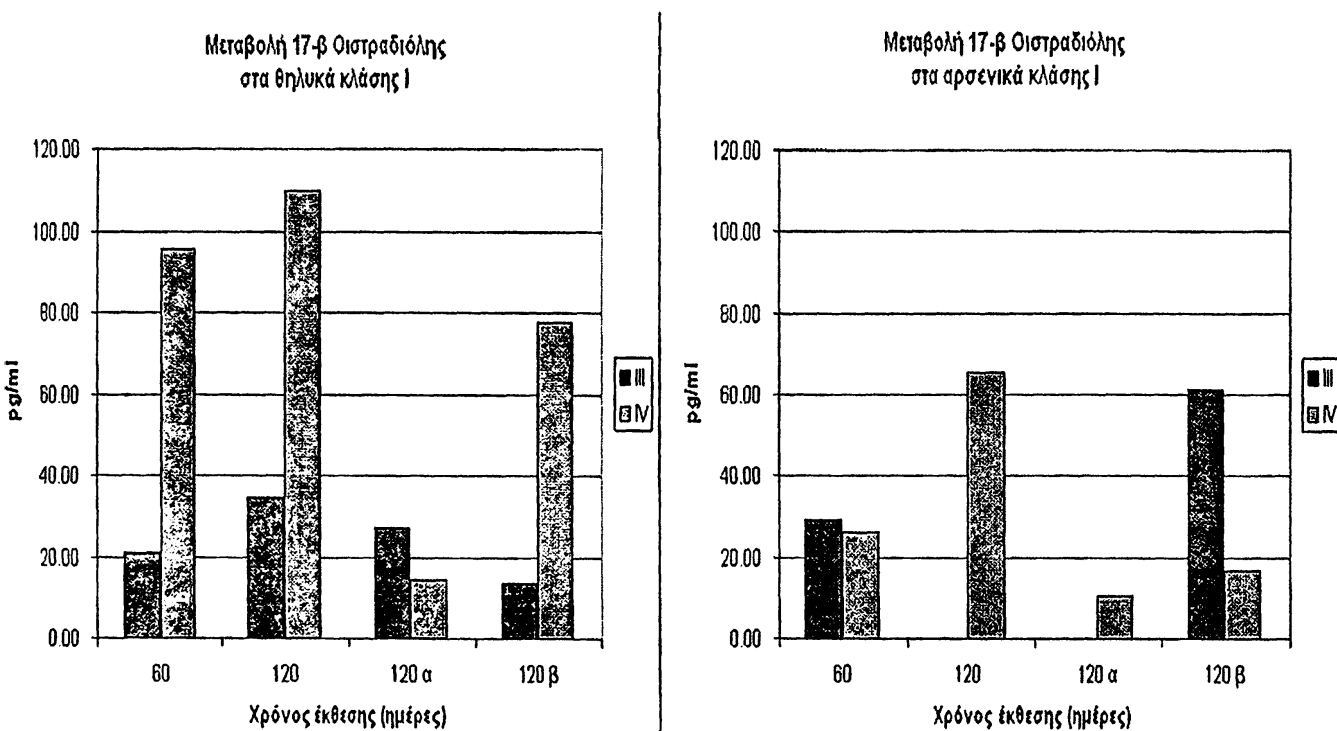
Πίνακας 71. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Zn στις γονάδες θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	III-IV	III -IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Θ	60	0.09								
	120	0.36	0.31	0.36	0.88	0.97	0.94	0.98	0.96	0.84
Α	60	0.43								
	120						0.21	0.94	0.52	0.64

Πίνακας 72. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων Cd και Zn στις γονάδες αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I

Ημέρες	Μέταλλο	IIIβ	IVα	IVβ
		Cd	0.15	0.23
120	Zn	0.01	0.00	0.14

ε3. Συγκέντρωση 17-β Οιστραδιόλης ορού



Γράφημα 71. Μεταβολή 17-β οιστραδιόλης ορού (pg/ml) των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Η συγκέντρωση της 17-β οιστραδιόλης ορού στα θηλυκά του ενυδρείου III (τα οποία εκτέθηκαν σε 1ppb Cd) φαίνεται να είναι σταθερά χαμηλή, ακόμα και μετά την αποκατάσταση των ιχθύων σε νερό βρύσης (120α) ή κατόπιν προσθήκης 1ppb Zn (120β). Στα θηλυκά του ενυδρείου IV εμφανίζεται η μέγιστη τιμή οιστραδιόλης στις 120 ημέρες έκθεσης σε 5ppb



Cd, ενώ μειώνεται στο ελάχιστο μετά την αποκατάσταση των ψαριών σε νερό βρύσης (120α). Επίσης κατόπιν προσθήκης 10ppb Zn (120β) η τιμή της οιστραδιόλης αυξάνει σε σχέση με του ενυδρείου IVa, αλλά είναι σαφώς χαμηλότερη σε σχέση με του ενυδρείου IV.

Στα αρσενικά του ενυδρείου III παρατηρούνται υψηλότερες τιμές οιστραδιόλης από ότι στα θηλυκά του ίδιου ενυδρείου, και μάλιστα κατόπιν της αποκατάστασης με Zn (120β). Στα αρσενικά του ενυδρείου IV η μέγιστη τιμή οιστραδιόλης εμφανίζεται επίσης στις 120 ημέρες έκθεσης σε Cd, ενώ ιδιαίτερα χαμηλές τιμές παρατηρούνται στους ιχθύς κατόπιν της αποκατάστασης (120α-β), χωρίς όμως να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές σε καμία από τις ομάδες στα αρσενικά ή τα θηλυκά ψάρια.

Πίνακας 73. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων 17-β οιστραδιόλης ορού θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

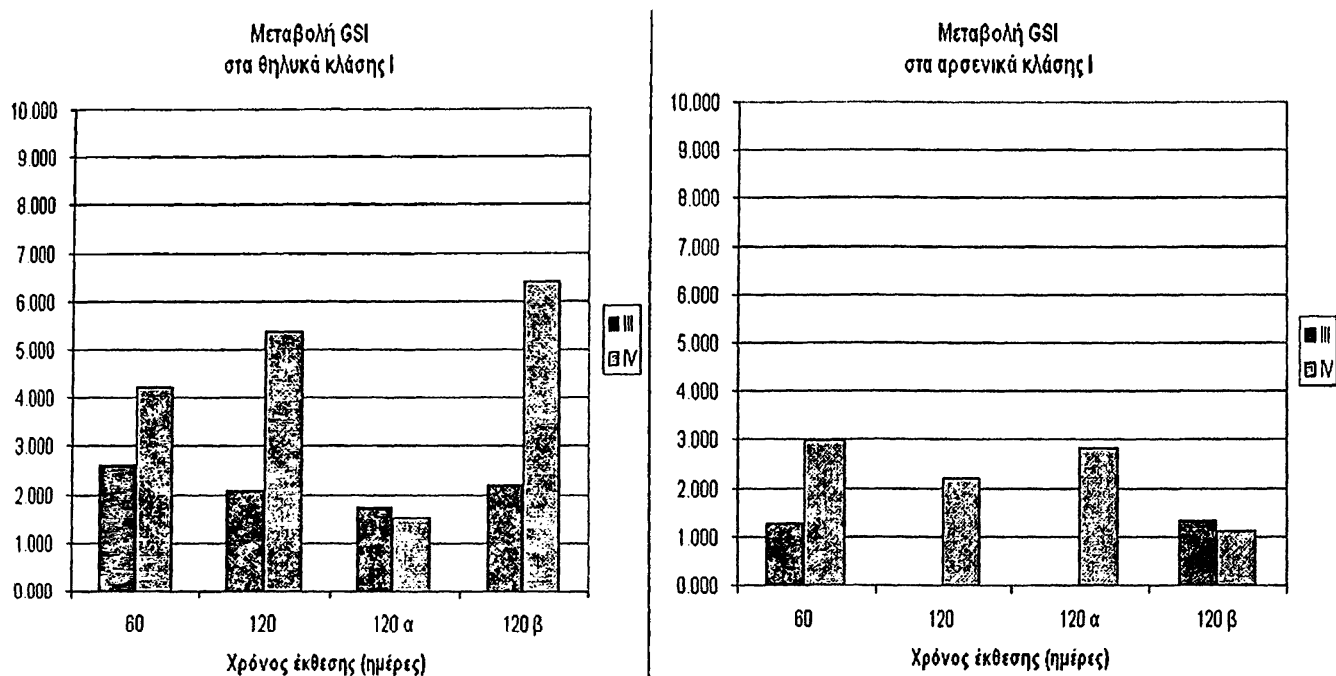
Φύλο	Ημέρες	III-IV	III-IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Θ	60	0.19								
	120	0.15	0.61	0.25	0.16	0.27	0.33	0.65	0.17	0.08
Α	60	0.80								
	120	0.19						0.07		0.40

Πίνακας 74. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ συγκεντρώσεων 17-β οιστραδιόλης ορού, GSI και Zn στις γονάδες αρσενικών και θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες		IIIβ	IVa	IVβ
120	Estr	0.23		0.18
	GSI	0.02	0.12	0.34
	Zn	0.01	0.00	0.14



ε4. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI)



Γράφημα 72. Μεταβολή Γοναδοσωματικού (GSI) Δείκτη των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης GSI, στα θηλυκά του ενυδρείου III φαίνεται να είναι σταθερά χαμηλός, ακόμα και στις συνθήκες αποκατάστασης των ιχθύων σε νερό βρύσης (120α) ή με προσθήκη Zn (120β). Πάντως η τιμή του δείκτη αύξησης των γονάδων είναι σημαντικά μεγαλύτερη στην περίπτωση της αποκατάστασης με Zn (120β) από ότι στην αποκατάσταση σε νερό βρύσης (120α) για τα θηλυκά του ενυδρείου III ($p=0,04$). Η τιμή μάλιστα του GSI στα θηλυκά του ενυδρείου 120β είναι σημαντικά υψηλότερη στα θηλυκά από ότι στα αρσενικά ($p=0,02$), υποδεικνύοντας ότι η προσθήκη Zn ευνοεί την αύξηση των γονάδων στα θηλυκά.

Στα θηλυκά του ενυδρείου IV εμφανίζονται αυξημένες τιμές του Γοναδοσωματικού δείκτη σε σχέση με τα άτομα του ενυδρείου III σχεδόν σε όλες τις συνθήκες, ενώ ο GSI μειώνεται στο ελάχιστο μετά την αποκατάσταση των ψαριών σε νερό βρύσης (120α). Επίσης κατόπιν προσθήκης 10ppb Zn (120β) η τιμή του δείκτη GSI κορυφώνεται, ακόμη και σε σχέση με την υψηλή τιμή του ενυδρείου IV, επιβεβαιώνοντας ότι η προσθήκη Zn ευνοεί την αύξηση των γονάδων.

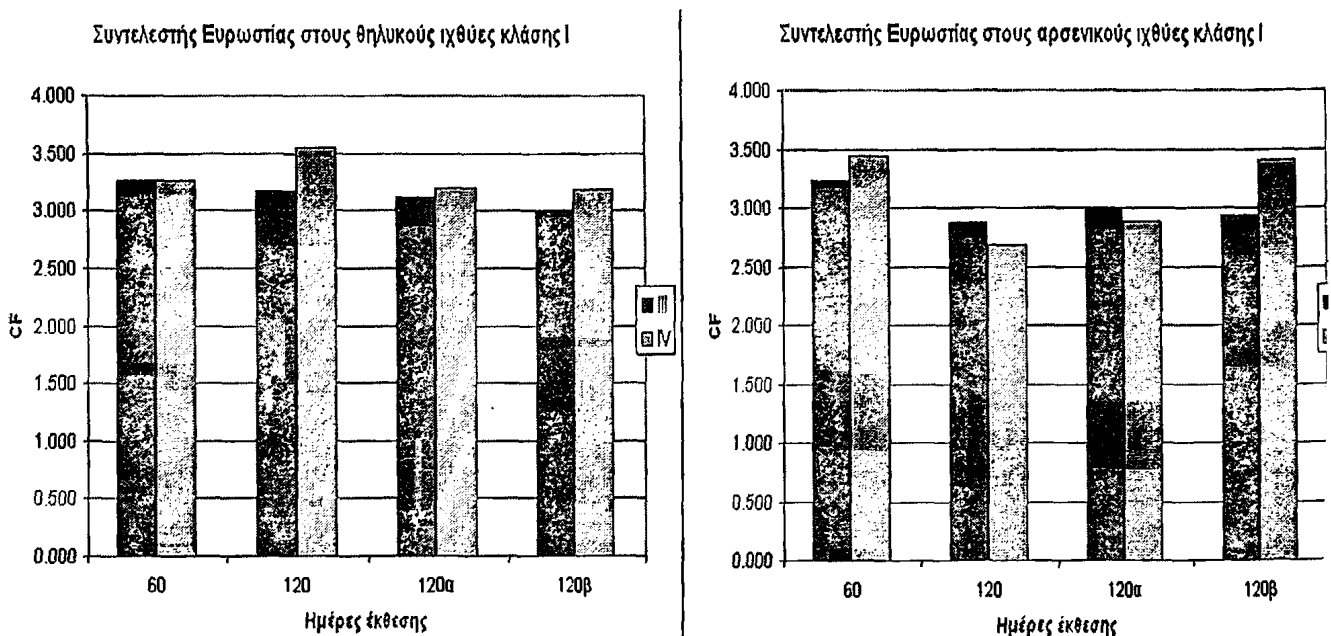
Στα αρσενικά του ενυδρείου III οι τιμές του GSI είναι σταθερά χαμηλές, ενώ στα αρσενικά του ενυδρείου IV η σημαντικά μεγαλύτερη τιμή του γοναδοσωματικού δείκτη σε σχέση με το ενυδρείο III εμφανίζεται στις 60 ημέρες έκθεσης σε Cd ($p=0,00$). Παρόμοιες τιμές παρατηρούνται στους

ιχθύς στις υπόλοιπες συνθήκες, με εξαίρεση κατόπιν αποκατάστασης με Zn (120β), οπότε παρατηρείται σαφώς η χαμηλότερη τιμή του δείκτη.

Πίνακας 75. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ Γοναδοσωματικού (GSI) Δείκτη θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	III-IV	III-IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Θ	60	0.39								
	120	0.28	0.47	0.88	0.04	0.52	0.48	0.85	0.37	0.31
Α	60	0.00								
	120						0.35	0.18	0.08	0.72

ε5. Μεταβολή Συντελεστή Ευρωστίας (CF)



Γράφημα 73. Μεταβολή Συντελεστή Ευρωστίας (CF) των ιχθύων κλάσης I μετά από έκθεσή τους σε Cd και αποκατάσταση με Zn.

Ο Συντελεστής Ευρωστίας (CF), στα θηλυκά του ενυδρείου III φαίνεται να παραμένει σταθερός, ακόμα και στις συνθήκες αποκατάστασης των ιχθύων σε νερό βρύσης (120α) ή με προσθήκη Zn (120β). Στα θηλυκά του ενυδρείου IV εμφανίζονται ελαφρά αυξημένες τιμές του συντελεστή σε σχέση με τα άτομα του ενυδρείου III, σχεδόν σε όλες τις συνθήκες.

Στα αρσενικά του ενυδρείου III παρατηρείται μία ελαφρά μείωση του συντελεστή στις 120 ημέρες έκθεσης με Cd σε όλες τις συνθήκες σε σχέση με τις 60 ημέρες έκθεσης, τάση που επαναλαμβάνεται και με τα αρσενικά του ενυδρείου IV. Πάντως η τιμή του συντελεστή φαίνεται να αυξάνεται στην περίπτωση της αποκατάστασης με 10ppb Zn (120β) για τα αρσενικά του ενυδρείου IV στα επίπεδα των 60 ημερών έκθεσης. Γενικά οι τιμές του συντελεστή ευρωστίας που παρατηρούνται στα θηλυκά και των δύο



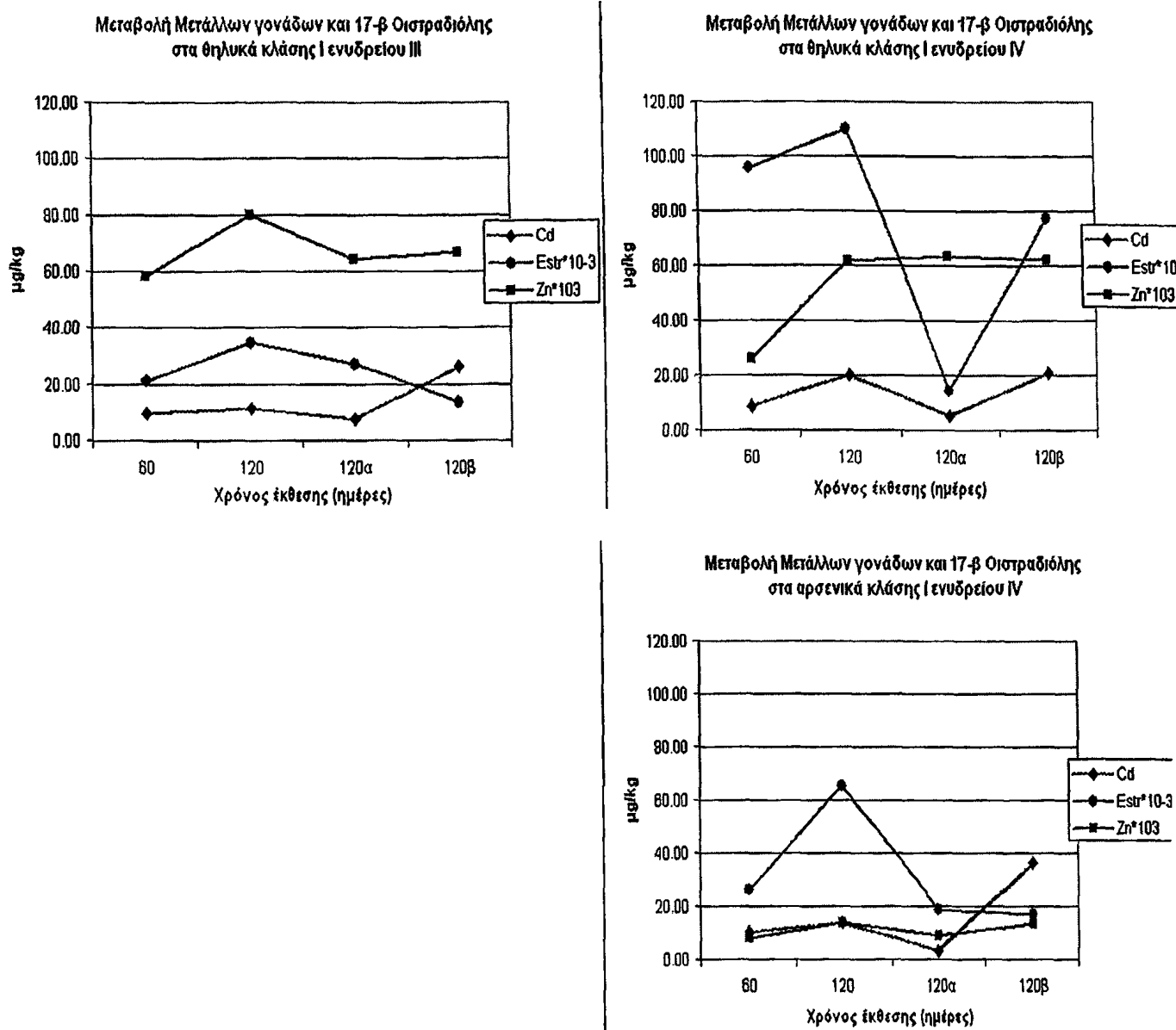
ενυδρείων III-IV, είναι υψηλότερες από ότι στα αρσενικά, υποδεικνύοντας ότι η έκθεση με Cd επηρεάζει περισσότερο την σωματική αύξηση των αρσενικών.

Πίνακας 76. Στατιστικές διαφορές (p) μεταξύ Συντελεστή Ευρωστίας (CF) θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Φύλο	Ημέρες	III-IV	III -IIIa	III-IIIb	IIIa-IIIb	IIIa-IVa	IV-IVa	IV-IVb	IVa-IVb	IIIb-IVb
Θ	60	0.63								
	120	0.31	0.72	0.40	0.51	0.91	0.33	0.26	0.92	0.83
Α	60	0.12								
	120						0.96	0.36	0.29	0.46



ε6. Μεταβολή μετάλλων στις γονάδες, 17β-οιστραδιόλης και δεικτών αύξησης στις συνθήκες αποκατάστασης από την έκθεση σε Cd.



Γράφημα 74. Μεταβολή μετάλλων γονάδων και 17-β οιστραδιόλης ορού θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης Ι.

Στα θηλυκά του ενυδρείου ΙΙΙ (1ppb Cd) η συγκέντρωση Zn μεταβάλλεται παρόμοια με τη συγκέντρωση του Cd, υποδεικνύοντας πιθανή συνεργιστική δράση των δύο μετάλλων, ειδικά στην περίπτωση της αποκατάστασης με προσθήκη 1ppb Zn (120β). Η οιστραδιόλη ορού επίσης συμμεταβάλλεται με τα μέταλλα, ειδικά με τον Zn, εκτός από την περίπτωση του ενυδρείου ΙΙΙβ.

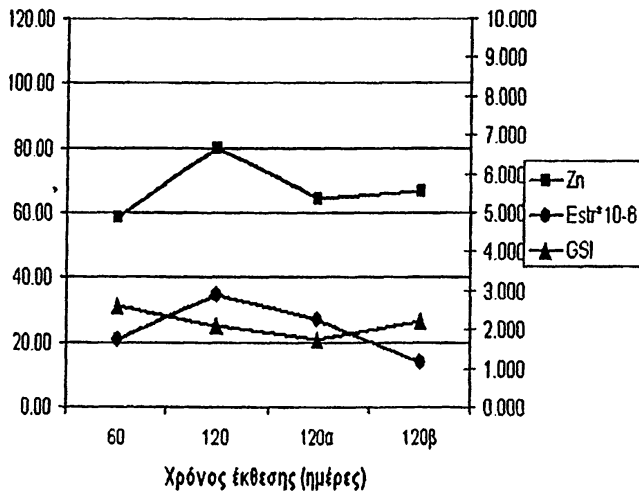
Η μεταβολή της 17-β οιστραδιόλης ορού στα θηλυκά του ενυδρείου ΙV μετά τις 60 ημέρες έκθεσης σε Cd, φαίνεται να ακολουθεί τη μεταβολή της



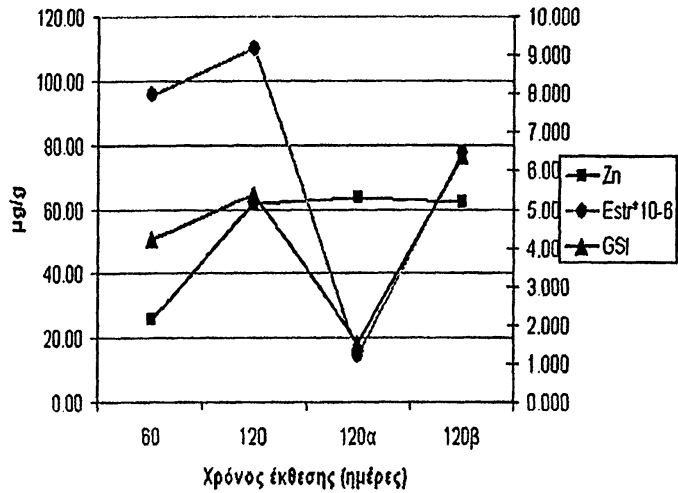
συσσώρευσης του καδμίου στις γονάδες, και για τα ενυδρεία της αποκατάστασης των ιχθύων σε νερό βρύσης (120α) ή κατόπιν προσθήκης 10ppb Zn (120β). Αντίθετα η συγκέντρωση του Zn αυξάνεται μεν μετά τις 60 ημέρες έκθεσης, αλλά σε σταθερά επίπεδα σε όλες τις συνθήκες.

Στα αρσενικά του ενυδρείου IV φαίνεται ότι οι παράμετροι μέταλλα γονάδων και οιστραδιόλη συµμεταβάλλονται, με την υψηλότερη τιμή συσσώρευσης Cd να παρατηρείται στο ενυδρείο IVβ κατόπιν προσθήκης 10ppb Zn (120β), όπως και στα θηλυκά.

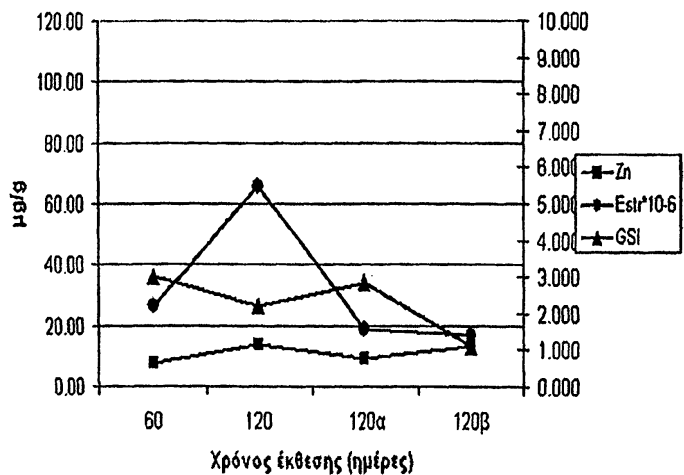
Μεταβολή Zn γονάδων, GSI και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου III



Μεταβολή Zn γονάδων, GSI και 17-β Οιστραδιόλης στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου IV

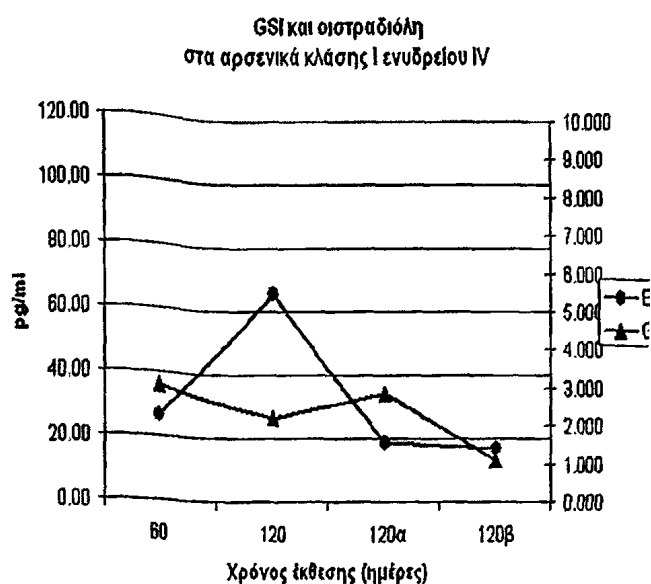
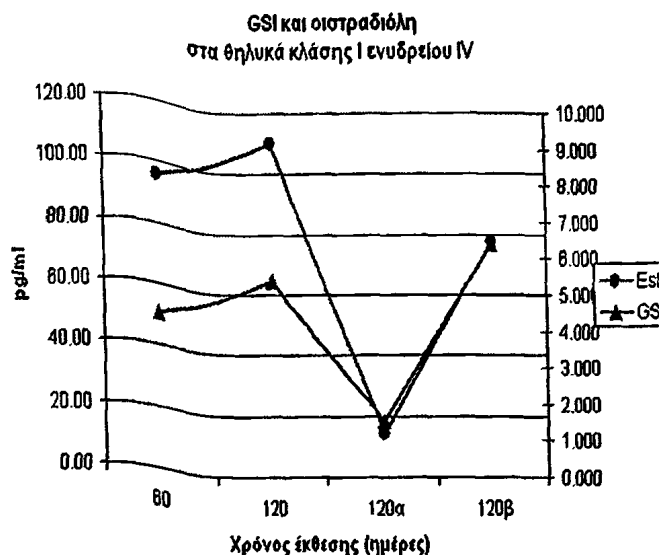
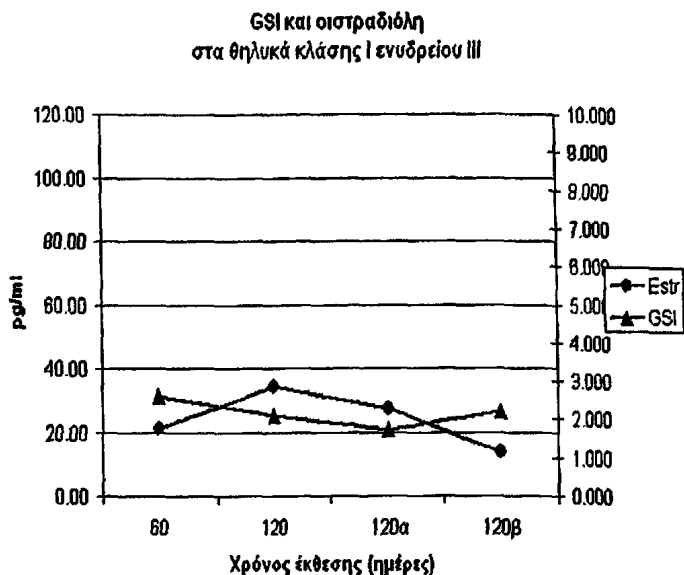


Μεταβολή Zn γονάδων, GSI και 17-β Οιστραδιόλης στα αρσενικά κλάσης I ενυδρείου IV



Γράφημα 75. Μεταβολή Zn γονάδων, Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και 17-β οιστραδιόλης ορού θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

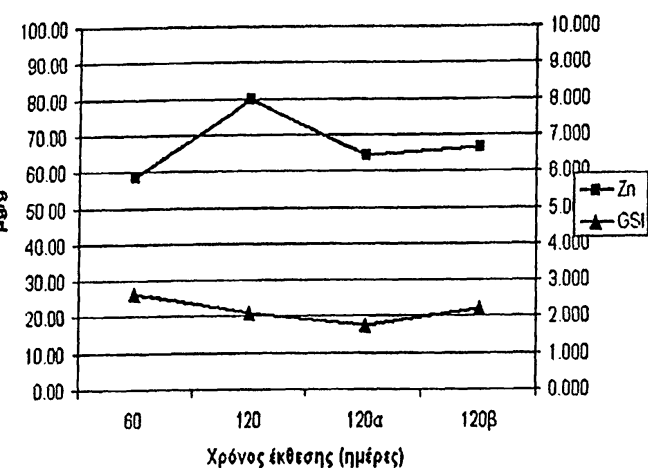




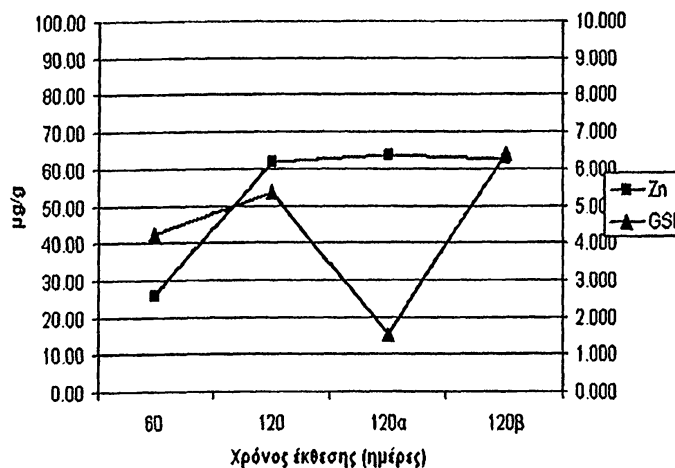
Γράφημα 76. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και 17-β οιστραδιόλης ορού θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης, GSI, στα θηλυκά του ενυδρείου IV εμφανίζει ίδιο προφίλ μεταβολής με τη 17-β οιστραδιόλη ορού, με την υψηλότερη τιμή του να παρατηρείται στη συνθήκη αποκατάστασης με Zn (120β). Αντίθετα στα αρσενικά του ενυδρείου IV παρουσιάζεται αντιστρόφως ανάλογη μεταβολή του δείκτη αύξησης των γονάδων και της οιστραδιόλης σε όλες τις συνθήκες, με την χαμηλότερη τιμή του δείκτη να παρατηρείται στη συνθήκη αποκατάστασης με Zn (120β). Στα θηλυκά του ενυδρείου III και οι δύο παράμετροι έχουν χαμηλές τιμές και σχέση μάλλον αντιστροφή.

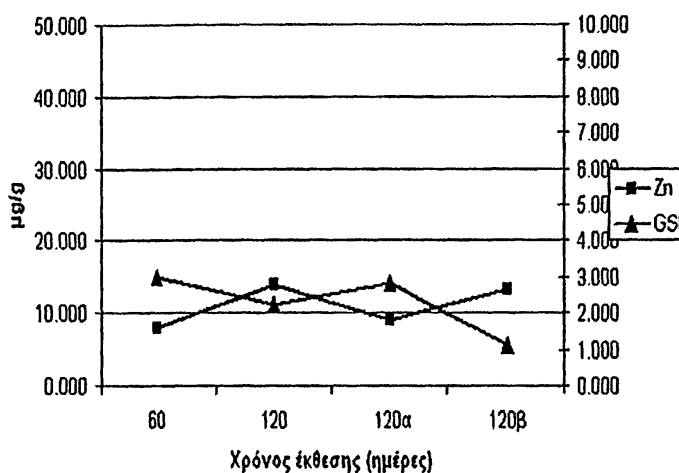
GSI και Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου III



GSI και Zn γονάδων
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου IV



GSI και Zn γονάδων
στα αρσενικά κλάσης I ενυδρείου IV



Γράφημα 77. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και Zn γονάδων θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

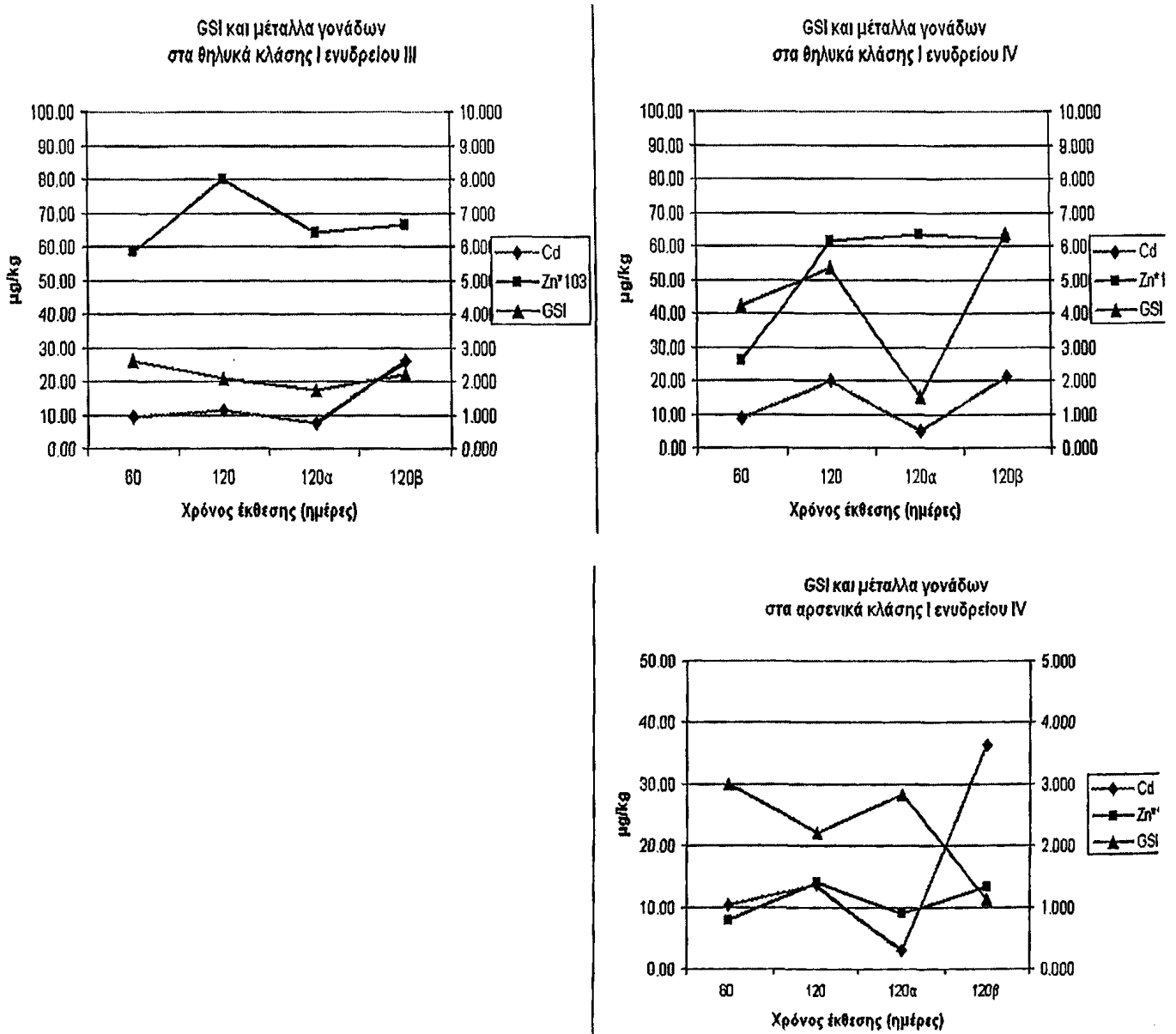
Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης GSI, στα θηλυκά του ενυδρείου III εμφανίζει ίδιο προφίλ μεταβολής με τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) ή με Zn (120β). Στα θηλυκά του ενυδρείου III από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd και οι δύο παράμετροι έχουν σχέση μάλλον αντίστροφη. Στα θηλυκά του ενυδρείου IV από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης με Cd ο δείκτης αύξησης των γονάδων και ο Zn των γονάδων συμμεταβάλλονται, ενώ στις συνθήκες αποκατάστασης ο Zn παραμένει σταθερός και ο δείκτης αύξησης μεταβάλλεται.

Αντίθετα στα αρσενικά του ενυδρείου IV παρουσιάζεται συνεχώς αντιστρόφως ανάλογη μεταβολή του δείκτη αύξησης των γονάδων και των



επιπέδων Zn στις γονάδες, με την χαμηλότερη τιμή του δείκτη να παρατηρείται στη συνθήκη αποκατάστασης με Zn (120β).

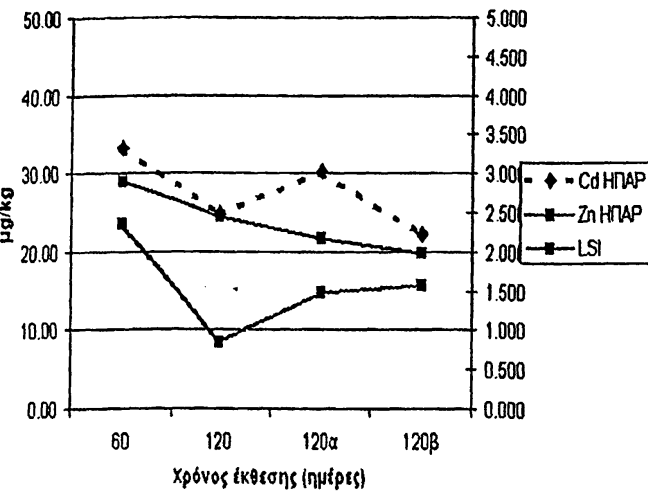
Στα θηλυκά του ενυδρείου III (1ppb Cd) η μεταβολή της συσσώρευσης Cd ακολουθεί το προφίλ μεταβολής της συγκέντρωσης του Zn, οπότε παρουσιάζει και ανάλογη σχέση με το δείκτη αύξησης γονάδων. Η μεταβολή Cd γονάδων και GSI είναι ανάλογη σε όλες τις συνθήκες (αποκατάστασης ή μη) στα θηλυκά του ενυδρείου IV, ενώ στα αρσενικά του ενυδρείου IV φαίνεται ότι οι παράμετροι μέταλλα γονάδων και Γοναδοσωματικός Δείκτης έχουν εμφανώς αντίστροφη σχέση, με την υψηλότερη τιμή συσσώρευσης Cd να παρατηρείται στο ενυδρείο IVβ κατόπιν προσθήκης 10ppb Zn (120β), όπου παρατηρείται ταυτόχρονα η χαμηλότερη τιμή GSI.



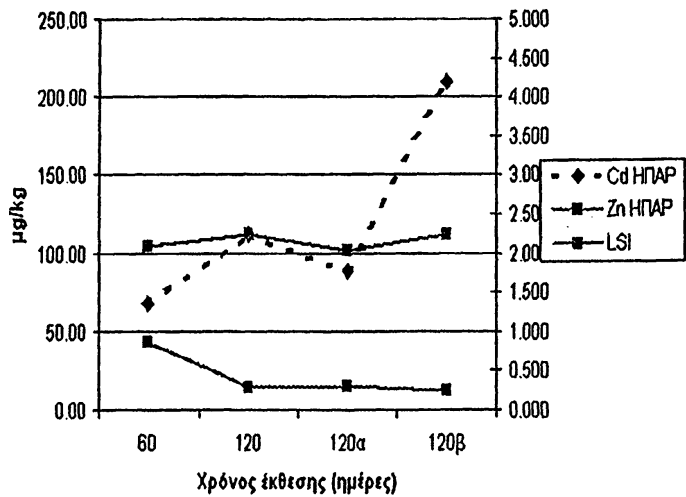
Γράφημα 78. Μεταβολή Γοναδοσωματικού Δείκτη (GSI) και μετάλλων γονάδων θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.



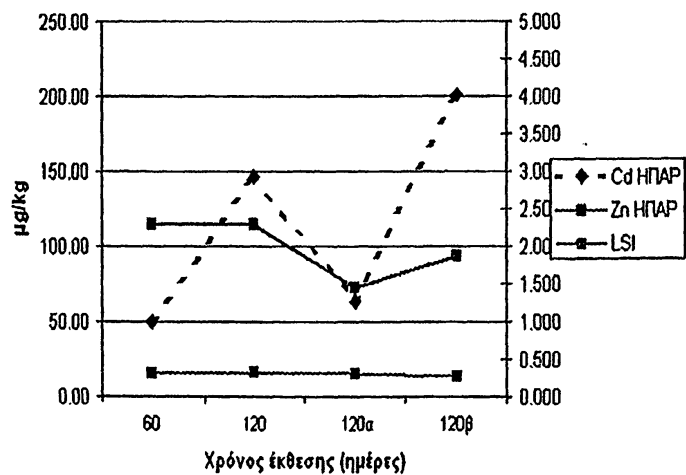
LSI και μέταλλα ήπατος
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου III



LSI και μέταλλα ήπατος
στα θηλυκά κλάσης I ενυδρείου IV



LSI και μέταλλα ήπατος
στα αρσενικά κλάσης I ενυδρείου IV



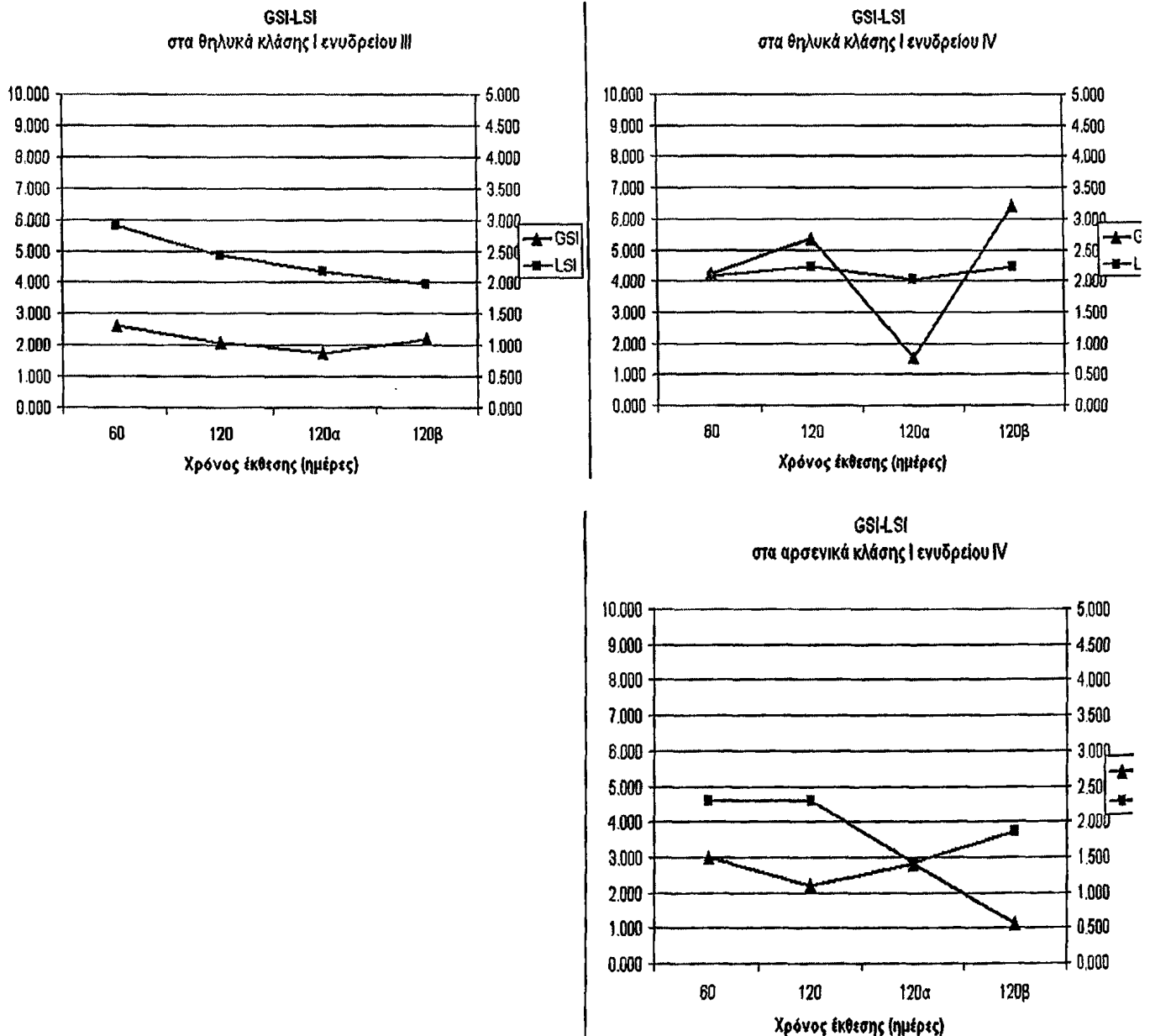
Γράφημα 79. Μεταβολή Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI) και μετάλλων ήπατος θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, στα θηλυκά του ενυδρείου III προοδευτικά μειώνεται σε όλες τις συνθήκες αποκατάστασης, ενώ η μεταβολή των μετάλλων του ήπατος ποικίλλει. Από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης εμφανίζουν ίδιο προφίλ μεταβολής με το δείκτη αύξησης ήπατος, ενώ στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) τα μέταλλα συµμεταβάλλονται µεν µεταξύ τους, αντιστρόφως δε µε τον LSI. Στην περίπτωση αποκατάστασης µε 1ppb Zn (120β) το Cd στο ήπαρ µειώνεται, ενώ ο Zn είναι ελαφρά αυξηµένος.



Στα θηλυκά του ενυδρείου IV ο δείκτης αύξησης των ήπατος και τα υψηλά επίπεδα Cd στο ήπαρ φαίνονται μάλλον να συμμεταβάλλονται, σε όλες τις συνθήκες αποκατάστασης, ενώ ο Zn ήπατος από τις 60 έως τις 120 ημέρες έκθεσης αρχικά μειώνεται και στις συνθήκες αποκατάστασης παραμένει σταθερός, δείχνοντας μάλλον αντίστροφη σχέση με τον δείκτη αύξησης ήπατος.

Στα αρσενικά του ενυδρείου IV παρουσιάζεται συνεχώς ανάλογη μεταβολή του δείκτη αύξησης ήπατος και των επιπέδων Cd στο ήπαρ, όπως και στα θηλυκά του ίδιου ενυδρείου, ενώ η συγκέντρωση του Zn στο ήπαρ παραμένει συνεχώς σταθερή.



Γράφημα 80. Μεταβολή Γοναδοσωματικού (GSI) και Ηπατοσωματικού Δείκτη (LSI) θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.



Ο Γοναδοσωματικός Δείκτης GSI, όπως και ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, στα θηλυκά του ενυδρείου III προοδευτικά μειώνονται σε όλες τις συνθήκες, εμφανίζοντας ίδιο προφίλ μεταβολής στις συνθήκες έκθεσης σε Cd και αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α). Στην περίπτωση αποκατάστασης με Zn (120β) ο δείκτης αύξησης των γονάδων διαφοροποιείται ελαφρά, με μία μικρή αύξηση της τιμής του. Στα θηλυκά του ενυδρείου IV σε όλες τις συνθήκες ο δείκτης αύξησης των γονάδων και ο δείκτης αύξησης του ήπατος φαίνονται να συμμεταβάλλονται, με το δείκτη αύξησης ήπατος (LSI) να εμφανίζει μικρές αυξομειώσεις.

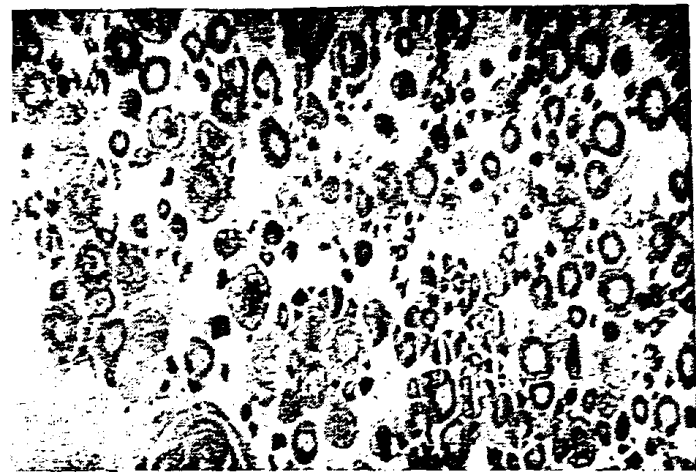
Αντίθετα στα αρσενικά του ενυδρείου IV παρουσιάζεται συνεχώς αντιστρόφως ανάλογη μεταβολή του δείκτη αύξησης των γονάδων (GSI) και του δείκτη αύξησης ήπατος (LSI), ειδικά στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (120α) ή με Zn (120β).

Πίνακας 77. Συσχέτιση παραμέτρων θηλυκών και αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

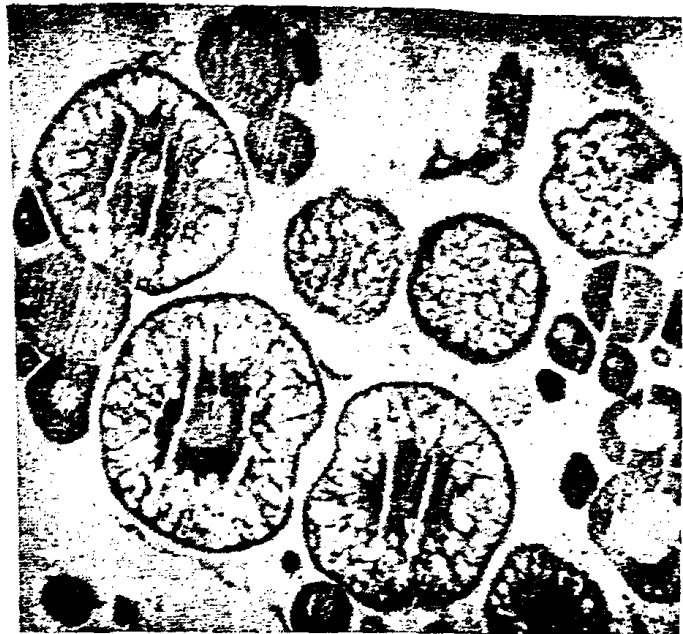
	Cd Γον- Estr	Zn Γον- Estr	Cd Γ- ZnΓ	Cd Γ- GSI	Zn Γ- GSI	GSI- Estr	Cd Ήπ- LSI	Zn Ήπ- LSI	Cd Γ- Cd Ήπ	Zn Γ- Zn Ήπ	GSI-LSI
IIIβ	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	1.00	1.00	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	1.00
IV α			0.58	0.87	0.10		0.41	0.89	-0.08	0.57	-0.39
IV β	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		1.00		1.00
IIIβ	-0.65	-0.61	0.95	-0.09	-0.02	-0.38	-0.05	-0.07	0.73	0.19	-0.71
IV α	-0.82	-0.65	0.97	-0.70	-0.86	0.18	0.94	0.58	-0.82	-0.10	0.50
IV β	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	-1.00



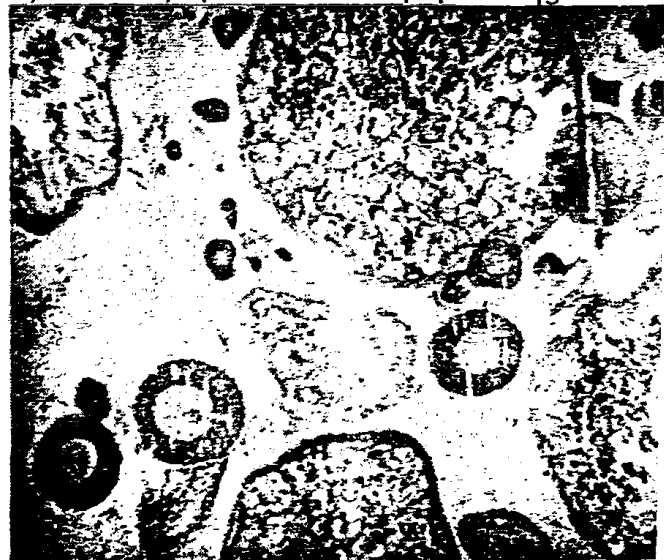
Κλάση I
120 ημέρες



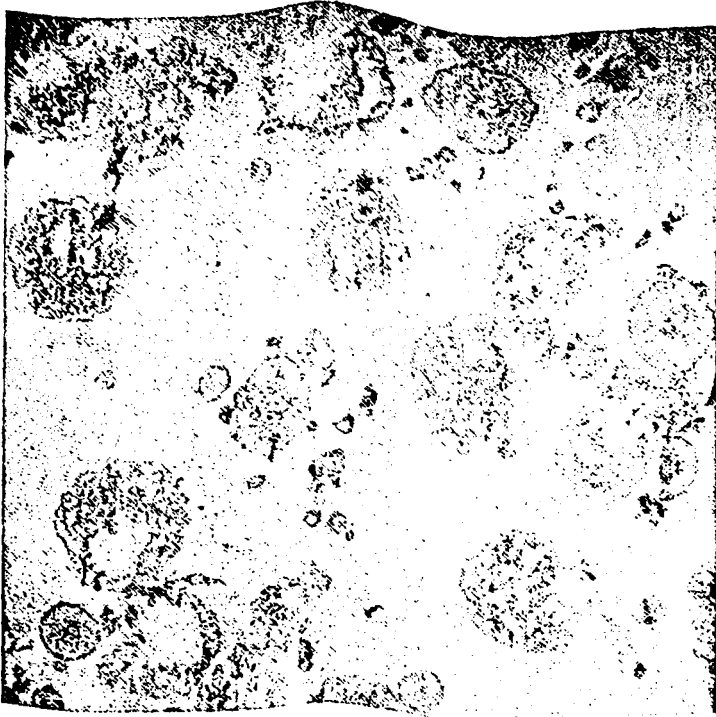
Εικόνα 52-53. Ομάδα III (2.5X, 10X). Εμφάνιση πρώιμων βιτελλογενικών και ανώριμων ωοκυττάρων (F₂)



Εικόνα 54. Ομάδα IIIα (10X). Εμφάνιση δευτερογενών βιτελλογενικών ωοκυττάρων (F_{3a-b}) σε διάφορα στάδια ωρίμανσης



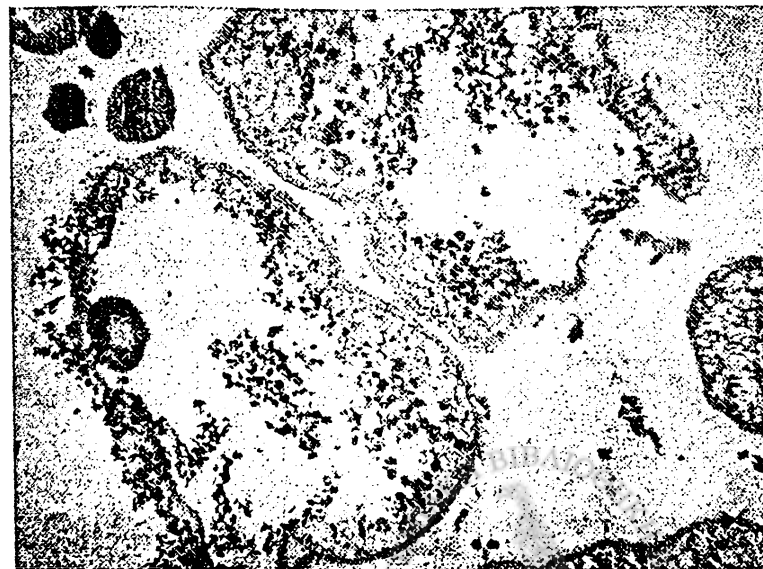
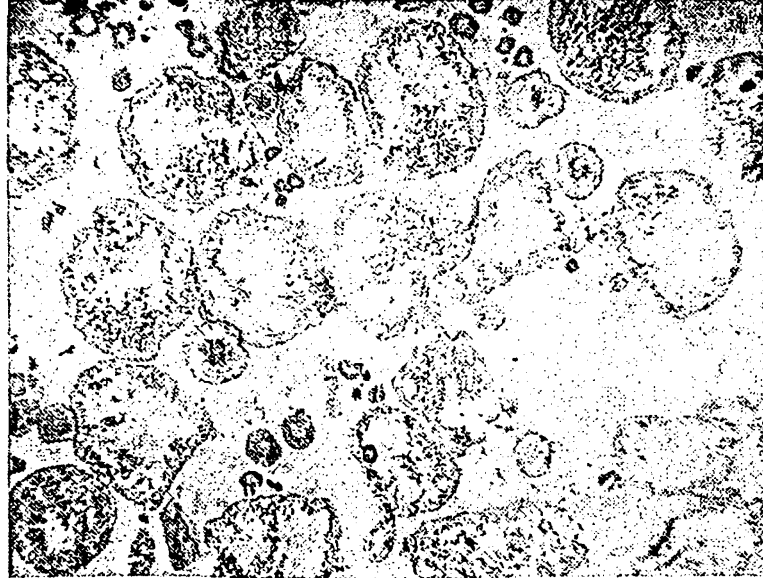
Εικόνα 55. Ομάδα IIIβ (10X). Εμφάνιση ώριμων (F₄) ωοκυττάρων και αιρησιακών ωοκυττάρων



Εικόνα 56-57. Ομάδα IV (2.5X, 10X). Εμφάνιση ώριμων (F₄) ωοκυττάρων και ατρησιακών ωοκυττάρων



Εικόνα 58. Ομάδα IVα (10X). Εμφάνιση προχωρημένων δευτερογενών βιτελλογενικών (F_{3b}) ωοκυττάρων, μετακίνηση πυρήνα



Εικόνα 59-60. Ομάδα IVβ (2.5X, 10X). Εμφάνιση ώριμων (F₄) και ατρησιακών ωοκυττάρων

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

I. Τοξικότητα του Cd

A. In vitro σε κύτταρα 3T3 και MRC-5

a. Βιωσιμότητα των κυττάρων

Στα κύτταρα **3T3** η βιωσιμότητα παραμένει υψηλή για τις συγκεντρώσεις CdCl₂ 0,1 και 1μM έως και τις 120 ώρες επώασης, μάλιστα σε αυτές τις συγκεντρώσεις η βιωσιμότητα παρατηρείται σημαντικά υψηλότερη από των κυττάρων ελέγχου (Πιν.11). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις 5-100μM είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικές ήδη από τις 24 ώρες επώασης ($p<0,000$). Η βιωσιμότητα επίσης σε συγκεντρώσεις CdCl₂ 5-100μM μεταξύ 6 και 120 ωρών έκθεσης διαφέρει στατιστικά σημαντικά ($p<0,000$) καταδεικνύοντας ότι η παρατεταμένη έκθεση στο Cd μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων (Πιν.11-12).

Το Cd μπορεί να δρα στο DNA άμεσα ή έμμεσα, με ενεργοποίηση της Ca²⁺-εξαρτώμενης ενδονουκλεάσης προκαλώντας κατακερματισμό του DNA ή παρεμβαίνοντας στο γενετικό έλεγχο και τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Επίσης το Cd προκαλεί έμμεσα οξειδωτικό στρες και κυτταρική δυσλειτουργία μέσω της διαταραχής σημαντικών ενζυμικών μηχανισμών. Για παράδειγμα, μειώνει την ηπατική γλουταθειόνη και αναστέλλει την ενεργότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), της υπεροξειδάσης και της καταλάσης, κύριων δεσμευτών του ενδοκυττάρου υπεροξειδίου (Szuster-Ciesielska, 2000). Σχεδόν σε όλα τα αερόβια κύτταρα η κύρια ελεύθερη ρίζα είναι του υπεροξειδίου, η οποία πηγάζει κατά μείζονα λόγο από διαρροή ηλεκτρονίων στο O₂ από διάφορα στοιχεία των αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων του κυττάρου, όπως μιτοχόνδρια και ενδοπλασματικό δίκτυο. Τα βιολογικά συστήματα μετατρέπουν τη ρίζα οξυγόνου σε πιο δραστικές μορφές όπως υπεροξειδίου του υδρογόνου, υδροξυλίου κλπ. Τα κύτταρα έχουν δύο γραμμές άμυνας έναντι στο οξειδωτικό στρες, μία πρώτη που άμεσα εμποδίζει τις οξειδωτικές βλάβες και αφορά τα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως δισμουτάσες του υπεροξειδίου (SOD), υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPx) και καταλάση (CAT) και άλλα μικρομοριακά μόρια όπως τη γλουταθειόνη και το ασκορβικό. Η δεύτερη γραμμή άμυνας αποτελείται από επιδιορθωτικά ένζυμα τα οποία απομακρύνουν ή επιδιορθώνουν μακρομόρια με οξειδωτικές βλάβες (DNA νουκλεάσες και γλυκοζυλάσες).

Το Cd μειώνει όχι μόνο την γλουταθειόνη αλλά και τις σουλφυδρυλικές ομάδες που δεσμεύουν τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να εντείνεται η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (όπως ιόν υπεροξειδίου, ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου). Οι ρίζες αυτές με τη σειρά τους οδηγούν σε αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων, τροποποιήσεις στην



ενδοκυττάρια οξειδωτική κατάσταση, βλάβες στο DNA και τις μεμβράνες, αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων και απόπτωση (Stohs, 2000).

Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και σε **MRC-5** ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα, όπου η αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες των γηραιότερων κυττάρων μπορεί να οφείλεται στη μείωση της ανηγμένης ενδοκυττάριας γλουταθειόνης ή σε μείωση της ενεργότητας της καταλάσης, καθώς φαίνεται ότι η πρωταρχική τους άμυνα ενάντια στο οξειδωτικό στρες είναι η ανηγμένη γλουταθειόνη (Yuan, 1996). Σύμφωνα με άλλη μελέτη στους ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα (MRC-5) η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να είναι ένας από τους μηχανισμούς κυτταροτοξικότητας του καδμίου. Οι κυτταρικές βλάβες που οφείλονται στο κάδμιο (όπως στα μιτοχόνδρια) και η υπεροξειδωση των λιπιδίων αναστέλλονται από αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως την καταλάση και τη δισμουτάση του υπεροξειδίου υποδεικνύοντας ότι η τοξικότητα του καδμίου στους πνεύμονες μπορεί να σχετίζεται με οξειδωτικές βλάβες (Yang, 1997).

Στα κύτταρα **MRC-5** η βιωσιμότητα παραμένει ανεπηρέαστη στις χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0,1 και 1μM) ακόμα και μετά από 120 ώρες επώασης, ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις 50 και 100μM γίνονται σημαντικά κυτταροτοξικές μόνο μετά από 120 ώρες έκθεση. Το κάδμιο και οι ενώσεις του βάσει των τυπικών εξετάσεων μεταλλαξογένεσης σε βακτηριακά συστήματα *Salmonella* και *E.coli*, δεν είναι μεταλλαξογόνο, ενώ σε κύτταρα θηλαστικών είναι ασθενώς μεταλλαξογόνο άμεσα, επάγοντας μεταλλάξεις, διαταραχή στις αλυσίδες του DNA (σπασίματα), χρωμοσωμικές ανωμαλίες (aberrations) και ανταλλαγές μεταξύ των αδελφών χρωματίδων και έμμεσα με αναστολή των επιδιορθωτικών μηχανισμών (Sato, 2002). Επίσης επάγει ανευπλοειδία σε κύτταρα MRC-5 (ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα) και βλάβες στη δυναμική των μικροσωληνίσκων εμποδίζοντας την συναρμολόγησή τους (Guerci, 2000).

Σε ανθρώπινους ινοβλάστες πνεύμονα *in vitro* παρατηρείται αναστολή πρωτεογλυκανών και παραγωγής προκολλαγόνου επαγόμενη από το Cd στη μη κυτταροτοξική δόση των 30μM, πιθανότατα μέσω αναστολής της λυσοξείδωσης και της κολλαγενάσης. Έτσι το κάδμιο μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του εμφυσήματος, που αποτελεί μία ασθένεια με εκτεταμένη διαταραχή του συνδετικού ιστού του πνεύμονα, αναστέλλοντας την παραγωγή των πρωτεϊνών του συνδετικού ιστού (Chambers, 1998). Ο πνεύμονας υπόκειται συνεχώς σε δραστικές ρίζες οξυγόνου που σχηματίζονται ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και τα οποία μπορούν να προκαλέσουν εκφυλιστικές αλλαγές λόγω οξείδωσης πρωτεϊνών, υπεροξειδωσης λιπιδίων και βλαβών στα νουκλεϊκά οξέα. Επανελημμένη έκθεση *in vivo* σε αερολύματα Cd αυξάνει την ενζυμική ενεργότητα πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της καταλάσης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης της εξαρτώμενης από Se, της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και της Mn-δισμουτάσης του υπεροξειδίου καθώς και τα επίπεδα της MT στον πνεύμονα είναι 400 φορές μεγαλύτερα (Hart, 1995). Η ανάπτυξη αυξημένης οξειδωτικής αντίστασης ενώ προσφέρει προστασία στον πνεύμονα ως όργανο μπορεί να δίνει την ευκαιρία σε



γενετικώς διαταραγμένα κύτταρα να ξεφεύγουν από την απόπτωση και να αναπτύσσονται ως κακοήθεις κλώνοι (Eneman, 2000).

Συγκρίνοντας τις δύο κυτταρικές σειρές μεταξύ τους, παρατηρείται ότι η βιωσιμότητα στα κύτταρα 3T3 μετά από βραχεία έκθεση στις υψηλότερες συγκεντρώσεις CdCl₂ είναι χαμηλότερη από των κυττάρων MRC-5, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στις χαμηλές συγκεντρώσεις 0,1 και 1μM Cd (Γραφ.2) Κατά τη σύγκριση εμβρυϊκών ινοβλαστών επίμυος (REF) και ανθρώπινων ινοβλαστών δέρματος (HFW), οι ινοβλάστες του επίμυος εμφανίζονται 13 φορές πιο ευαίσθητοι σύμφωνα με τη θανατηφόρο δόση του 50% (1.5 έναντι 25μM) (Lin, 1995). Επίσης κατά τη σύγκριση εμβρυϊκών ινοβλαστών μύος (Balb/c 3T3) και ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστών πνεύμονα (WI-38), οι ανθρώπινοι ινοβλάστες εμφανίζονται ως οι λιγότερο ευαίσθητοι (Wataha, 1994). Η κυτταροτοξικότητα του Cd μπορεί να διαφέρει και σε διαφορετικά κύτταρα του ίδιου είδους, για παράδειγμα εμφανίζεται ισχυρότερη στους ινοβλάστες από ότι σε επιθηλιακά κύτταρα του ίδιου είδους (Terracio, 1986).

Πρόσφατες μελέτες και άλλων ερευνητών αποκαλύπτουν έναν πιθανό ρόλο του Cd ως απαραίτητου ικνοστοιχείου σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Abshire 1996a, Hay 1992). Επίσης σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών η σύνθεση του DNA και η κυτταρική αύξηση επαγόταν με πολύ χαμηλή δόση καδμίου (Nordberg 1998, Zglinicki 1992). Ακόμη αναφέρονται διαφορετικές αποκρίσεις στην πρόσληψη και την τοξικότητα του Cd αναλόγως της κυτταρικής σειράς ή των συνθηκών καλλιέργειας.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η βραχεία έκθεση (6 και 24 ώρες) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις Cd (0,1 και 1μM) πιθανά να καθιστά τα κύτταρα 3T3 ζωτικότερα καθώς παρατηρείται μια επαγόμενη από το μέταλλο αύξηση της βιωσιμότητάς τους, ενώ η κυτταρική σειρά MRC-5 είναι γενικά ανθεκτικότερη στην έκθεση σε Cd (Πιν.13,14).

β. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών

Στα κύτταρα 3T3 η ικανότητα σχηματισμού αποικιών φαίνεται να αυξάνεται μετά από 24 ώρες επώασης σε χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (1μM), γεγονός που συνδυάζεται και με την επαγόμενη από το Cd υψηλή βιωσιμότητα.

Στα κύτταρα MRC-5 η ικανότητα σχηματισμού αποικιών αυξάνεται μετά από 24 ώρες επώασης σε χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0,1μM). Το γεγονός αυτό παρατηρείται επίσης και μετά από βραχεία έκθεση (6 ώρες) στην ίδια συγκέντρωση (0,1μM) CdCl₂. Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών σε χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ μετά από 24 ώρες επώασης διαφέρει σημαντικά από αυτήν της πιο βραχείας έκθεσης (6 ώρες)(Γραφ.3, Πιν.15,16).



Συγκρίνοντας τις δύο κυτταρικές σειρές μεταξύ τους, παρατηρείται ότι η ικανότητα σχηματισμού αποικιών στα κύτταρα 3T3 μετά από έκθεση 24 ωρών στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (50 μ M) CdCl₂ είναι σημαντικά χαμηλότερη από των κυττάρων MRC-5, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στις χαμηλές συγκεντρώσεις των 0,1 και 1 μ M (Γραφ.4, Πιν.17,18) Κατά την επώαση κυττάρων 3T3 με 20 μ M Cd ο ρυθμός αύξησης μειωνόταν, αντιπροσωπεύοντας πιθανά τη χαμηλότερη κυτταρική διαίρεση και μειωμένη βιωσιμότητα (Matsuoka, 2000).

Το κάδμιο σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (1 μ M) επάγει τη σύνθεση του DNA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διάφορες κυτταρικές σειρές, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι ανασταλτικές. Επίσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις του ενισχύει την έκφραση πολλών γονιδίων όπως των πρωτοογκογονιδίων c-fos, c-jun, c-myc, του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 και των γονιδίων που κωδικοποιούν για τη σύνθεση προστατευτικών μορίων όπως MT, γλουταθειόνης και στρες πρωτεϊνών (θερμικού σοκ). Οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν παρεμβολή του μετάλλου στη μετάδοση του κυτταρικού σήματος σε επίπεδο μεμβρανικών υποδοχέων, στην ομοιόσταση ασβεστίου και ψευδαργύρου στο κύτταρο, στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών και στην αλλαγή μεταγραφικών παραγόντων (Beyersmann, 1997).

Το κάδμιο, με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής (άνω των 20 ετών) και τοξικές δράσεις όπως νεφροτοξικότητα, καρκινογένεση και τερατογένεση επάγει την έκφραση του c-fos γονιδίου σε διάφορα κύτταρα όπως τους ινοβλάστες 3T3 ποντικού. Το c-fos πρωτοογκογονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο DNA και λειτουργεί ως συστατικό του μεταγραφικού παράγοντα AP-1, που ετεροδιμερίζεται με πρωτεΐνες της οικογένειας jun. Η έκφραση του c-fos τροποποιεί την μεταγραφή γονιδίων-στόχων όπως της ανθρώπινης κολλαγενάσης, της μεταλλοθειονίνης ΙΙΑ, της ιντερλευκίνης 2 και έχει σχετιστεί με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, καθώς και η επαγωγή του με την απόπτωση (Matsuoka, 2000). Ορισμένα πρωτοογκογονίδια, τα οποία μεταφέρουν ρυθμιστικά σήματα αύξησης από την κυτταρική επιφάνεια προς τον πυρήνα, ενεργοποιούνται κατόπιν έκθεσης των κυττάρων σε μιτωτικά σήματα, αλλά και σε μη μιτωτικές αποκρίσεις στρες. Το Cd, θα μπορούσε να ενεργοποιεί τέτοια πρωτοογκογονίδια. Σε L6 μυοβλάστες επίμυος επάγει την έκφραση των c-myc (μετά από μόλις 2 ώρες) και c-jun γονιδίων κατόπιν έκθεσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις (5 μ M) (Abshire, 1996b).

Το κάδμιο, το οποίο θεωρείται ένα καρκινογόνο μέταλλο, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να έχει αντικαρκινική δράση. Σε διάφορες κυτταρικές σειρές αυξάνει την έκφραση πρωτο-ογκογονιδίων, ενώ σε μυοβλάστες επίμυος L6 μετά από 2 εβδομάδες έκθεσης σε χαμηλή δόση (0.5 μ M) Cd εμφανίστηκε αύξηση στην έκφραση των c-myc, c-jun γονιδίων και στις 8 εβδομάδες έκθεσης ισχυρή καταστολή τους σχετιζόμενη με την εξάλλαξη των κυττάρων από το Cd. Αντιθέτως, σε κύτταρα που εκτέθηκαν σε υψηλότερη δόση (1 μ M) Cd η αύξηση των όγκων ελαττώθηκε *in vivo*. Άρα μικρές συγκεντρώσεις Cd *in vitro* προκάλεσαν μία ταχύτατη κακοήθη



πρόοδο *in vivo*, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd *in vitro* κατέστειλαν την αύξηση των όγκων *in vivo*, ενισχύοντας την άποψη ότι το Cd μπορεί να έχει και καρκινογόνο και αντι-καρκινική δράση (Abshire, 1996a).

Στον ηπατικό μηχανισμό μετάφρασης, η επίδραση του καδμίου εξαρτάται από τη διάρκεια της έκθεσης *in vivo*. Η πρωτεϊνοσύνθεση αναστέλλεται αρχικά στις πρώτες 2-4 ώρες, κατόπιν επάγεται μέχρι μέγιστα επίπεδα στις 8 ώρες και ακολουθεί μείωσή της στις 24 ώρες. Σε ηπατοκύτταρα *in vitro* η επίδρασή του είναι διφασική, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (40 μM) το κάδμιο ενεργοποιεί το ρυθμό και το επίπεδο της μετάφρασης, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (60 μM) αναστέλλει αυτές τις παραμέτρους. Η ενεργοποίηση της πρωτεϊνοσύνθεσης μπορεί να οφείλεται στην επαγωγή της σύνθεσης MT για την αποτοξικοποίηση από τα μέταλλα και πρωτεϊνών στρες (π.χ. θερμικού σοκ) που σταθεροποιούν τη δομή των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών και μερικώς αποκαθιστούν την διαταραγμένη πρωτεϊνοσύνθεση (Ivanoviene, 2003). Πάντως η δοσοεξαρτώμενη αύξηση της ηπατικής MT σε επίμυες λόγω χορήγησης Cd *in vivo*, υποδεικνύει μία διφασική απόκριση, με τις χαμηλές δόσεις να παράγουν περισσότερη ηπατική MT σε σχέση με τις υψηλότερες δόσεις (McKim, 1992). Ακόμα, οι MT ενδέχεται να έχουν ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση.

Εκτός από το κάδμιο, το οποίο σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις επάγει τη σύνθεση του DNA και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε διάφορες κυτταρικές σειρές, το Al φαίνεται να έχει διαφορετική επίδραση ανάλογα με την κυτταρική σειρά και τη συγκέντρωση. Σε μία σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων βοός σε επίπεδα άνω των 100 μM μειώνει τη σύνθεση DNA και τη μίτωση, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις επάγει τη σύνθεση DNA και δεν έχει καμία δράση στην κυτταρική διαίρεση. Επίσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες επίμυος επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ σε ανθρώπινους ινοβλάστες επάγει επίσης τη σύνθεση DNA (Dominguez, 1995).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα κύτταρα MRC-5 αυξάνονται καλύτερα παρουσία 0,1 μM Cd, ενώ τα 3T3 καλύτερα παρουσία 1 μM Cd πιθανόν λόγω της διαφορετικής καταγωγής των κυττάρων αυτών. Βέβαια η έκθεση ακόμη και για 24 ώρες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd (100 μM) αναστέλλει πλήρως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις δύο κυτταρικές σειρές (Πιν.17).

γ. Συγκέντρωση του Cd στο μέσο επώασης

Στα κύτταρα 3T3 η εξωκυττάρια συγκέντρωση του Cd στο μέσο επώασης για τις χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0,1 και 1 μM) μειώνεται σημαντικά προϊόντος του χρόνου επώασης, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρείται σημαντική αύξηση του μετάλλου στο μέσο επώασης για τις 120 ώρες έκθεσης (p=0,000). Η εξωκυττάρια συγκέντρωση



του Cd μετά από βραχεία έκθεση (6 ώρες) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις CdCl₂ δε διαφέρει σημαντικά από αυτήν της πιο μακρόχρονης έκθεσης (24 ώρες). Επομένως είναι δυνατόν να υποιεθεί ότι για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd μετά τις 24 ώρες επώασης αρχίζει παθητική έξοδος της ενδοκυττάριας ποσότητας του μετάλλου, υπόθεση που ενισχύεται και από την παρατηρηθείσα βιωσιμότητα και ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων. Σε επιθηλιακά κύτταρα νεφρού κοίρου από εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, LLC-PK1, η πρόσληψη του Cd μέσω των basolateral και apical μεμβρανών γίνεται με παθητική διάχυση για κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις άνω των 10μM. Σε μη τοξικές συνθήκες (1μM) περίπου 20% του Cd προσλαμβάνεται από την μεμβράνη apical και αντιπροσωπεύει διευκολυνόμενη μεταφορά με μεταφορείς μέσω ανιόντων Na⁺ και διαδικασιών ενεργειακού κόστους (Kimura, 1996).

Η επίδραση του Cd στα ίδια κύτταρα νεφρού κοίρου LLC-PK1 ήταν ιδιαίτερα επιβλαβής στις διακυτταρικές συνδέσεις. Το προφίλ που ακολουθούσε η συσσώρευση του μετάλλου από το basolateral διαμέρισμα (που συγκεντρώνει 3-4 φορές περισσότερο Cd σε σχέση με το apical διαμέρισμα) ήταν σε δύο φάσεις, μία ταχεία εκθετική φάση εντός 1-2 ωρών και μία πιο βραδεία, γραμμική που συνεχίστηκε για 6-8 ώρες και οδηγούσε σε πρόσληψη του μετάλλου. Το Cd που συσσωρεύτηκε κατά την ταχεία φάση απομακρύνθηκε εύκολα, υποδεικνύοντας σύνδεσή του με την κυτταρική μεμβράνη. Επιπλέον η παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων Ca²⁺ (0.1mM) ενίσχυε την συσσώρευση κατά την ταχεία φάση, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις Ca²⁺ (10mM) την μείωναν σημαντικά (Prozialeck, 1993). Η πρόσληψη του Cd στα ανθρώπινα ερυθροκύτταρα φαίνεται να γίνεται μέσω καναλιών ανταλλαγής ανιόντων χλωρίου και διττανθρακικών και μάλιστα τα διττανθρακικά ιόντα φαίνεται να έχουν διφασική δράση στην πρόσληψη Cd, με τις χαμηλές συγκεντρώσεις να επιδεικνύουν επαγωγική δράση, ενώ οι μεγαλύτερες κατασταλτική. Παρόμοια σημαντικό ρόλο ενδέχεται να παίζει ο μεταφορέας ανιόντων στην πρόσληψη Zn, αλλά και άλλων ιχνοστοιχείων ικανών να δημιουργούν σύμπλοκα με τα διττανθρακικά, ανθρακικά και χλωριούχα ιόντα. Ο μεταφορέας ανιόντων υπάρχει και στους νεφρούς αλλά δεν είναι γνωστό εάν συμμετέχει στην πρόσληψη ασβεστίου από τους νεφρούς (Lou 1991, Kalfakakou 1986, 1990).

Στα κύτταρα MRC-5 η εξωκυττάρια συγκέντρωση του Cd στο μέσο επώασης για τις χαμηλές συγκεντρώσεις CdCl₂ (0,1μM) παραμένει ίδια σε όλους τους χρόνους επώασης, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρείται σημαντική αύξηση (p<0,000) του μετάλλου στο μέσο επώασης προϊόντος του χρόνου έκθεσης. Η εξωκυττάρια συγκέντρωση του Cd μετά από βραχεία έκθεση (6 ώρες) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις CdCl₂ διαφέρει σημαντικά από αυτήν της πιο μακρόχρονης έκθεσης (24 και 120 ώρες). Επομένως πιθανά και σε αυτά τα κύτταρα για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd μετά τις 24 ώρες επώασης αρχίζει παθητική έξοδος της ενδοκυττάριας ποσότητας του μετάλλου.

Η αυξημένη γαστρεντερική απορρόφηση Cd (και Pb) σε άτομα με χαμηλές αποθήκες σιδήρου υποδεικνύει κοινούς μοριακούς μηχανισμούς



μεταφοράς αυτών των μετάλλων. Πράγματι, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες ο μεταφορέας του σιδήρου εκτός αίμης (nonheme) στο έντερο, που ονομάζεται δισθενής μεταφορέας μετάλλων 1 (DMT1), διευκολύνει τη μεταφορά των δύο μετάλλων. Ο μεταφορέας DMT1 ρυθμίζεται εν μέρει από το διαιτητικό σίδηρο και τα τοξικά μέταλλα που μεταφέρονται από αυτόν, γίνονται διαθέσιμα μέσω της πέψης και βρίσκονται επίσης στο πλάσμα (Bressler, 2004). Αυξημένη έκφραση του μεταφορέα βρέθηκε σε άτομα με έλλειψη σιδήρου και αιμοχρωμάτωση, γεγονός που παρέχει μεγαλύτερη δυνατότητα στα άτομα αυτή απορρόφησης σιδήρου και πιθανότατα και καδμίου και δίνει μία εξήγηση για τα υψηλότερα σωματικά επίπεδα καδμίου στις γυναίκες με χαμηλές αποθήκες σιδήρου (Satarug, 2004).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι στα κύτταρα MRC-5 παρατηρείται υψηλότερη εξωκυττάρια συγκέντρωση Cd από αυτήν των κυττάρων 3T3, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή έξοδο του μετάλλου και το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με την αυξημένη βιωσιμότητα των MRC-5 (Γραφ.5,6 Πιν. 19-24).



2. In vivo στους ιχθύες *Carassius auratus*

a. Βράγχια

Τα βράγχια των τελεόστεων ιχθύων του γλυκού νερού είναι τα όργανα αναπνοής, με μία σημαντική επιφάνεια ανταλλαγής αναπνευστικών αερίων, αλλά και οι δομές που επιτελούν νεφρικές λειτουργίες μέσω ανταλλαγής ιόντων και ηλεκτρολυτών. Αποτελούν τον πρώτο και πιο σημαντικό στόχο των τοξικών δράσεων ρυπαντών που περιέχονται στο νερό καθώς είναι συνεχώς σε επαφή μαζί τους. Για παράδειγμα στην ενήλικη ιριδιζουσα πέστροφα των 250g, τα βράγχια αποτελούν το 60% της συνολικής εξωτερικής επιφάνειας και έρχονται σε επαφή μέσω αερισμού με περισσότερα από 48 λίτρου νερού την ώρα.

Το Μοντέλο του Βιοτικού Συνδέσμου είναι μία προσέγγιση, που βελτιώνει σημαντικά την ικανότητα δημιουργίας ειδικών κριτηρίων ποιότητας νερού για τα μέταλλα στο φυσικό περιβάλλον. Σε σχέση με τα βράγχια των ιχθύων οι βιοτικοί σύνδεσμοι φαίνεται να είναι οδοί ενεργού πρόσληψης ιόντων (μεταφορείς νατρίου για τον χαλκό και τον άργυρο, μεταφορείς ασβεστίου για τον ψευδάργυρο και το κάδμιο, το μόλυβδο και το κοβάλτιο), των οποίων τα γεωχημικά χαρακτηριστικά (συγγένεια= $\log K$, φέρουσα ικανότητα= B_{max}) μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με βραχυπρόθεσμες (3-24 ώρες) δοκιμασίες δέσμευσης στα βράγχια *in vivo* και να προβλέψουν την οξεία τοξικότητα (LC50 για τα ψάρια στις 96 ώρες). Γενικά όσο πιο τοξικό είναι ένα μέταλλο τόσο υψηλότερος ο λογάριθμος της σταθεράς κορεσμού K (Niyogi, 2004).

Στους ιχθύες του πειράματος μας κλάσης I (ηλικίας <1 έτους), η συγκέντρωση Cd στα βράγχια των ομάδων I (Cd=0.05ppb) και II (Cd=0.1ppb) εμφανίζεται σταθερά χαμηλή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (Γραφ.7), και είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τα επίπεδα κατά την έναρξη του πειράματος, ειδικά μετά τις 45 ημέρες ($p=0,03$ και $p=0,01$), πιθανώς επειδή οι οργανισμοί ομοιοστατούν (Πιν.25).

Στην ομάδα III (έκθεση σε Cd=1ppb) η συγκέντρωση Cd στα βράγχια είναι σχεδόν σταθερή έως τις 45 ημέρες έκθεσης, σε παρόμοια χαμηλά επίπεδα, στις 60 ημέρες έκθεσης όμως διαφοροποιείται σημαντικά ($p=0,00$ και $p=0,02$) (Πιν.25), ενώ μειώνεται εκ νέου στα αρχικά επίπεδα στις 120 ημέρες έκθεσης.

Οι ιχθύες μπορεί να προσλαμβάνουν τους ρυπαντές και να τους αποθηκεύουν στο σώμα τους (φαινόμενα βιοσυσσώρευσης και βιομεγέθυνσης), αλλά και να τους απεκκρίνουν. Για παράδειγμα, ψάρια που εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις **καδμίου** συσσωρεύουν το μέταλλο αλλά το απεκκρίνουν παράλληλα σε μικρές συγκεντρώσεις και μπορεί να έχουν τελικά από τα χαμηλότερα σωματικά φορτία στη βιοκοινότητα. Ακόμα ουσίες όπως τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία, ο ψευδάργυρος και ο χαλκός, δε συσσωρεύονται στα ψάρια και δεν είναι ιδιαίτερα τοξικά στους καταναλωτές (Carvan, 2000).



Στα βράγχια της ομάδας IV που εκτέθηκε στην υψηλή συγκέντρωση Cd (5ppb) η συγκέντρωση Cd διαφοροποιείται, ήδη από τις 14 ημέρες έκθεσης, με σημαντικά υψηλότερες τιμές από αυτές των υπόλοιπων ομάδων ($p=0,00$ σε όλες τις περιπτώσεις) (Πιν.25). Από τις 30 έως τις 60 ημέρες έκθεσης τα επίπεδα του Cd παραμένουν σταθερά υψηλά ($p=0,00$ σε όλες τις περιπτώσεις), ενώ από τις 60 ημέρες έκθεσης και μετά, η συγκέντρωση Cd στα βράγχια μειώνεται, σε σημαντικά υψηλότερες τιμές όμως από των άλλων ομάδων ($p=0,00$). Επομένως μετά 60 ημέρες έκθεσης σε Cd ενεργοποιούνται εμφανώς οι προστατευτικοί μηχανισμοί που επιτρέπουν στα άτομα να ομοιοστατήσουν.

Στους ιχθύες ηλικιακής κλάσης II (ηλικία >1 έτους), η συγκέντρωση Cd στα βράγχια δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές ως προς τα νεαρότερα ηλικίας <1 έτους (Γραφ.8)(Πιν.27).

Έκθεση χρυσόψαρων *Carassius auratus* σε ελεύθερο και σωματιδιακό κάδμιο ή μόλυβδο έδειξε ότι η συσσώρευση των μετάλλων στα βράγχια αυξανόταν με την αύξηση της σωματιδιακής μορφής, όταν η συγκέντρωση της ελεύθερης μορφής παρέμενε σταθερή υποδεικνύοντας ότι το σωματιδιακό μέταλλο ήταν διαθέσιμο στα ψάρια μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας. Για το κάδμιο δε, ο ρυθμός πρόσληψης της σωματιδιακής μορφής του από τα βράγχια ήταν διπλάσιος της διαλυτής μορφής του. Η πρόσληψη του σωματιδιακού καδμίου από τα βράγχια γινόταν σταδιακά, πρώτα τα σωματίδια-μεταφορείς προσκολλούνταν στην επιφάνεια των βραγχίων, η οποία επικαλύπτεται από ένα στρώμα βλέννας και μετά γινόταν η προσρόφηση (desorption) του μετάλλου από τα σωματίδια κάτω από ευνοϊκές συνθήκες στο μικροπεριβάλλον των βραγχίων. Κατόπιν ακολουθούσε η μεταφορά του μετάλλου στο επιθήλιο των βραγχίων και η απόρριψη των σωματιδίων μαζί με τη βλέννα (Tao 1999, 2000).

Τα υδρογονοκατιόντα και τα μέταλλα όπως το Cd, Cu, Ag και Zn τείνουν να δεσμεύονται στα βράγχια σε πολύ ειδικές θέσεις παρεμποδίζοντας τη διακίνηση των ιόντων μέσω της μεμβράνης των βραγχίων (Wood, 1999). Τα δισθενή ιόντα μάλιστα, όπως το Cd^{2+} , διαταράσσουν το μεταβολισμό του ασβεστίου, τα μονοθενή όπως ο Cu^+ επηρεάζουν τη διακίνηση νατρίου ενώ άλλα διαπερνούν τα βράγχια και δρουν κεντρικά όπως ο μόλυβδος και ο υδράργυρος (Paquin, 2002).

Όσον αφορά τα νεαρότερα ψάρια των ομάδων I, II, η συγκέντρωση Zn δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές, εκτός από μία μικρή αύξηση σε σχέση με τις αρχικές τιμές, έως τις 45 ημέρες ($p=0,05$ και $p=0,01$) (Πιν.26). Στα βράγχια της ομάδας που εκτέθηκε σε Cd (1ppb) η συγκέντρωση Zn στα βράγχια αυξάνεται προοδευτικά από τις 30 ημέρες και μετά έως το τέλος της έκθεσης. Στα βράγχια της ομάδας που εκτέθηκε σε Cd (5ppb) η συγκέντρωση Zn δείχνει μικρή αύξηση έως τις 30 ημέρες ($p=0,01$), ενώ κατόπιν παραμένει σταθερή έως το τέλος της έκθεσης και μάλιστα σε χαμηλότερα επίπεδα από της ομάδας Cd (1ppb) ($p=0,02$) (Πιν.26).

Η συγκέντρωση του Zn στα βράγχια δεν εμφανίζει σημαντική διαφορά μεταξύ νεαρότερων (κλάση I) και μεγαλύτερων (κλάση II) ατόμων (Πιν.28).



Ο Ζη συμμετέχει σε ένα από τα ισχυρότερα ενζυμικά συστήματα μεταβολισμού και διαχείρισης του CO₂ στους οργανισμούς, το σύστημα της καρβονικής ανυδράσης, κρίσιμο για την λειτουργία του αναπνευστικού, του νεφρικού επιθηλίου και των ερυθροκυττάρων.

Το κάδμιο σε υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις (όπως και ο μόλυβδος και ο υδράργυρος) προκαλεί αναιμία στα ψάρια όπως και στα θηλαστικά, επίσης το κάδμιο έχει αναφερθεί να προκαλεί ανωμαλίες στη μορφολογία των ερυθροκυττάρων, λόγω πιθανής βλάβης στο μηχανισμό σχηματισμού τους (Heath, 1994). Στην τιλάπια μάλιστα, μετά από έκθεση σε κάδμιο εμφανίζεται υψηλό ποσοστό εκφυλισμένων ερυθροκυττάρων, που ενώ διαθέτουν κυτταρική μεμβράνη και πυρήνα, είναι κενά από κυτταρόπλασμα (Paroutsoglou, 1988). Τα κύτταρα του αίματος ανάλογα με τη βιολογική τους λειτουργία διαθέτουν χαρακτηριστικές μεταλλοπρωτεΐνες. Τα κοκκιοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος διαθέτουν την αλκαλική φωσφατάση (Zn), την καταλάση (Fe), και ψευδαργυρο-πρωτεάσες. Τα ερυθροκύτταρα διαθέτουν μεγάλα ποσά αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως Cu/Zn δισμουτάση του υπεροξειδίου, καταλάση (Fe) και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Se).

Είναι γνωστό ότι υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου οδηγούν σε ενζυμική αναστολή. Η δράση του καδμίου μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον ιστό που εκτίθεται και εάν η έκθεση συμβαίνει *in vitro* ή *in vivo*. Στη γλώσσα παρατηρείται αύξηση στην ενεργότητα της καρβονικής ανυδράσης *in vivo*, ενός ενζύμου που σχετίζεται με τα ερυθροκύτταρα, ενώ *in vitro* αυτό το ψευδαργυροένζυμο έχει βρεθεί να αναστέλλεται ισχυρά από το κάδμιο. Φαίνεται ότι η επαγωγή μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου σε χρόνια εκτεθειμένους ιχθύς είναι μία προσαρμογή σε μοριακό επίπεδο της μερικής ενζυμικής αναστολής που προκαλείται από το μέταλλο (Heath, 1994).

Συμπεραίνεται ότι έκθεση του *C. auratus* σε συγκεντρώσεις Cd 1-5 ppb προκαλεί σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου στα βράγχια μέχρι την 60^η ημέρα έκθεσης και πιθανότατα η παρουσία του ανταγωνίζεται την πρόσληψη του Zn από τον ιστό.

β. Νεφροί

Στα χρυσόψαρα το κάδμιο προκαλεί οξειδωτικό στρες και βλάβες στους ιστούς (Zikic, 2001). Έκθεση του κοινού κυπρίνου σε κάδμιο προκαλεί αύξηση της απόπτωσης σε προνεφρικά κύτταρα γεγονός που πιθανά σχετίζεται με την ανοσοκαταστολή που προκαλείται από το Cd (Hoole, 1997). Η επίδραση του καδμίου στους υδρόβιους οργανισμούς δεν μπορεί εύκολα να προβλεφθεί λόγω των διαφορετικών χημικών μορφών του μετάλλου στα γλυκά νερά, όπως ελεύθερο ιόν καδμίου, οργανικά και ανόργανα σύμπλοκα και αδιάλυτα σύμπλοκα με ιόντα υδροξειδίου και σουλφίδια (US EPA 1980). Το κάδμιο είναι γενικά πιο βιοδιαθέσιμο σε νερά



χαμηλής σκληρότητας, αλκαλικότητας και διαλυτής οργανικής ύλης (DOC) (Suedel, 1997).

Στους νεφρούς όλων των ομάδων της κλάσης I η συγκέντρωση Cd αρχικά μειώνεται σημαντικά τις πρώτες 30 ημέρες ($p=0,00-0,04$)(Πιν.29), στη συνέχεια όμως, όλες οι ομάδες εμφανίζουν αύξηση της συγκέντρωσης Cd (Γραφ.9). Κατά το κρίσιμο χρονικό διάστημα των 45 ημερών αρχίζουν να διαφοροποιούνται οι συγκεντρώσεις του Cd μεταξύ των ομάδων και από τις 60 ημέρες είναι σημαντικά αυξημένα τα επίπεδα Cd στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του μετάλλου ($p=0,00-0,01$) (Πιν.29). Οι παρατηρήσεις αφορούν και τα δύο φύλα χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Γραφ. 11) (Πιν.33).

Στα μεγαλύτερα άτομα της κλάσης II, η συγκέντρωση Cd στους νεφρούς δείχνει τις ίδιες τάσεις με τα νεαρότερα άτομα, δηλαδή αρχικά μειώνεται έως τις 30 ημέρες, ενώ κατόπιν αυξάνεται, αλλά τα επίπεδα Cd στους νεφρούς ιχθύων της κλάσης II είναι σημαντικά υψηλότερα των κλάσης I (Γραφ.10)(Πιν.31). Για το κάδμιο εξάλλου έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της συσσώρευσής του (εμπλουτισμού) και της ηλικίας ορισμένων ειδών όπως το *Rutilus rutilus*, αλλά μόνο για το νεφρό και το ήπαρ και όχι για το μυϊκό ιστό και πιθανώς αυτό ισχύει και για άλλα είδη ιχθύων (Förstner & Wittmann, 1983).

Τα χρυσόψαρα μετά από έκθεση σε κάδμιο εμφανίζουν ελαφρά μείωση στο νάτριο του πλάσματος και μία μετακίνηση νατρίου, καλίου, και νερού στους μύες. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να οφείλονται σε αύξηση της πρόσληψης νερού από το περιβάλλον και μεταφορά του στα εξωκυττάρια υγρά διαμερίσματα. Στην ιριδιζούσα πέστροφα, χρόνια έκθεση (178 ημέρες) σε 3.6 $\mu\text{g/L}$ Cd δεν είχε καμία επίδραση στους ηλεκτρολύτες του αίματος, ενώ έκθεση σε 6.4 $\mu\text{g/L}$ Cd προκάλεσε ελαφρά μείωση στο νάτριο, κάλιο, ασβέστιο και χλώριο του πλάσματος και άνοδο του μαγνησίου λόγω αναδιανομής των ηλεκτρολυτών. Η υπασβεσταιμία μάλιστα είναι ένα χαρακτηριστικό σύμπτωμα της τοξικότητας του Cd καθώς ανταγωνίζεται τα ιόντα ασβεστίου στις οδούς πρόσληψής τους (Chang, 1998). Με τον ίδιο τρόπο το κάδμιο διαταράσσει την ομοιοστάση των ιόντων ασβεστίου κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, επηρεάζοντας τις μορφογενετικές αλληλεπιδράσεις όπου το Ca είναι απαραίτητο, δρώντας έτσι ως μορφογενετικός αναστολέας (Gommot, 1998).

Οι ιχθύες του γλυκού νερού εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία στην παρουσία του Cd που φαίνεται να διαταράσσει το μεταβολισμό του ασβεστίου, αλλά και άλλων δισθενών απαραίτητων μετάλλων όπως ο Zn, σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στα θαλάσσια είδη (Heath, 1994).

Η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς των ατόμων της κλάσης I σε όλες τις ομάδες μετά τις 14 ημέρες μειώνεται προοδευτικά έως τις 60 ημέρες, οπότε παρουσιάζει μικρή μη σημαντική αύξηση (Γραφ.9)(Πιν.30). Η ίδια τάση ακολουθείται και από τα μεγαλύτερα άτομα της κλάσης II, τα οποία δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα νεαρότερα (Γραφ. 10)(Πιν.32).



Πολλές από τις τοξικές δράσεις του καδμίου προκύπτουν κατόπιν αλληλεπίδρασής του με απαραίτητα μέταλλα, όπως ο ψευδάργυρος, όσον αφορά τις βιολογικές λειτουργίες, αλλά και την απορρόφηση, κατανομή και αποβολή τους από τον οργανισμό. Είναι επίσης γνωστό ότι ο ψευδάργυρος ασκεί σημαντική προστασία απέναντι στην τοξικότητα του καδμίου, επηρεάζοντας την απορρόφηση και τη συσσώρευσή του. Γενικά ο Zn περιγράφεται ως ένας παράγοντας προστασίας έναντι του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης, λόγω επαγωγής μεταλλοθειονινών (MT) και λόγω της δέσμευσής του σε γειτονικές σουλφυδρυλομάδες, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό ελευθέρων ριζών (ROS). Ακόμα, η πρωτεΐνουρία, που επάγεται από το σύμπλοκο Cd-MT μειώνεται αποτελεσματικά κατόπιν προχορήγησης Zn *in vivo*. Επειδή το κάδμιο προσδένεται σταθερά στην MT, αποθηκεύεται ενδοκυττάρια σε ήπαρ και νεφρούς και οι συνήθεις χηλοποιητές δεν λειτουργούν ενδοκυττάρια, ο Zn φαίνεται να βελτιώνει την ικανότητα των χηλοποιητών απομακρύνοντας το Cd από τις ενδοκυττάρια αποθήκες (Patrick, 2003).

Στην πειραματική μας διάταξη στην ομάδα IV των αρσενικών που εκτέθηκε στην υψηλή δόση Cd (5ppb), στις 120 ημέρες παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση Zn στους νεφρούς, τετραπλάσια από την αντίστοιχη των θηλυκών, γενικότερα όμως η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς εμφανίζεται μάλλον υψηλότερη στους ιχθύς που εκτέθηκαν σε 1ppb Cd (Γραφ.9,12).

Σε καλλιέργειες από κύτταρα νεφρού χοίρου LLC-PK1 προσθήκη 10μM Cd επάγει απόπτωση, ενώ έκθεση των κυττάρων σε 50μM Cd για 24h επάγει την παραγωγή MT (Ishido, 1999). Στα ίδια κύτταρα όταν προχορηγήθηκε Zn, η ενδοκυττάρια συσσώρευση Cd ήταν σημαντικά μειωμένη, χωρίς αλλαγές των περιεχομένων MTs. Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν ότι η ανθεκτικότητα στην κυτταροτοξικότητα του Cd μπορεί να επάγεται από τον Zn μέσω και άλλων μηχανισμών, εκτός MT, που μειώνουν το ενδοκυττάρια Cd. Οι μηχανισμοί εκτός MT είναι ιδιαίτερα σημαντικοί όταν η εξωκυττάρια συγκέντρωση του Zn είναι χαμηλότερη από το όριο για την επαγωγή MT (Mishima, 1997). Ο Liu, 1996 έδειξε ότι η χορήγηση *in vivo* Zn άσκησε προστατευτική δράση επειδή προκάλεσε επαγωγή στρες- πρωτεϊνών (θερμικού σοκ) των οικογενειών 90-, 70-, και 38-kDa, που μπορεί να δρουν συνεργικά με την MT, στην προστασία των κυττάρων από την κυτταροτοξικότητα του Cd (Liu, 1996).

Συμπερασματικά τα επίπεδα Cd στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd αυξάνουν σημαντικά συναρτήσει του χρόνου έκθεσης ιδιαίτερα μετά τις 45 ημέρες ($p=0,00-0,01$) (Πιν.29) ενώ η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς όλων των ομάδων μετά τις 14 ημέρες μειώνεται προοδευτικά έως τις 60 ημέρες, οπότε εμφανίζεται αύξηση, στατιστικά μη σημαντική (Γραφ.9)(Πιν.30).



γ. Ήπαρ

Το ήπαρ συσσωρεύει υψηλά επίπεδα όλων των μετάλλων καθώς αποτελεί θέση αποτοξικοποίησης και αποβολής των μετάλλων στους ιχθύς. Το άθροισμα του περιεχόμενου σε κάδμιο ήπατος και νεφρών αντιπροσωπεύει καλύτερα το συνολικό σωματικό φορτίο καθώς οι νεφροί επίσης συσσωρεύουν κάδμιο. Τα επίπεδα καδμίου στο ήπαρ νεαρών ατόμων ιριδιζουσας πέστροφας που υπέστησαν χρόνια έκθεση σε 1 ή 5μg/1 Cd αυξήθηκαν σημαντικά παρουσιάζοντας συγκέντρωση σε σχέση με το νερό μεγαλύτερη κατά 73 και 32 φορές αντίστοιχα (Ricard, 1998).

Οι διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων των μετάλλων στα διάφορα είδη αντανακλούν τόσο τις ανάγκες και τα όρια ανοχής των ειδών όσο και το ενδιαίτημά τους (habitat), τις εποχιακές διακυμάνσεις και την ικανότητα πρόσληψής τους. Επίσης σχετίζονται με τη φυσική ιστορία των ειδών (όπως τη γεωγραφική κατανομή των βιολογικών τους σταδίων, το τροφικό επίπεδο, την ηλικία, που σχετίζεται με διαφορετικούς ρυθμούς αύξησης και μεταβολισμού), αλλά και με τις διαιτητικές τους συνήθειες που επηρεάζουν την τελική τους έκθεση σε μέταλλα. Μάλιστα έχει διαπιστωθεί μία θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων Zn στο ζωοπλαγκτόν και τα ψάρια, οπότε πλαγκτονοφάγα και διηθηματοφάγα ψάρια αναμένεται να εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις Zn από παμφάγα και σαρκοφάγα είδη. Πάντως η συσσώρευση των μετάλλων σε κάθε είδος οποιουδήποτε τροφικού επιπέδου προκύπτει όταν διαταράσσεται η ισορροπία των διεργασιών πρόσληψης/απέκκρισης των μετάλλων (Papagiannis, 2004).

Η συσσώρευση μετάλλων μετά από χρόνια έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις οδηγεί σε άμεσες επιδράσεις, αλλάζοντας τα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος. Η δράση του Cd στην κυτταρική λειτουργία αφορά διαταραχή της μετάδοσης του κυτταρικού σήματος από τις οδούς της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και του κυκλικού AMP (Sato, 2002). Η τροποποίηση γίνεται με ενίσχυση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών και με ενεργοποίηση μεταγραφικών και μεταφραστικών παραγόντων (Waisberg, 2003).

Ήδη από τις 30 ημέρες στα νεαρότερα άτομα (κλάση I) η συγκέντρωση του Cd στο ήπαρ των ατόμων της ομάδας που εκτέθηκε στην υψηλή δόση Cd (5ppb), είναι σημαντικά υψηλότερη από των υπολοίπων ($p=0,01$ και $p=0,00$ στις 60 και 120 ημέρες αντίστοιχα) (Πιν.36)(Γραφ.13,15).

Η συγκέντρωση Cd στο ήπαρ των θηλυκών ιχθύων που εκτέθηκαν σε 1ppb Cd στις 60 ημέρες σχεδόν διπλασιάζεται, ενώ στους θηλυκούς ιχθύς της ομάδας που εκτέθηκε στην υψηλή δόση Cd (5ppb), οι συγκεντρώσεις Cd στο ήπαρ αυξάνονται προοδευτικά από τις 30 ημέρες ως τη σημαντικά υψηλότερη τιμή τους στις 120 ημέρες από των υπολοίπων ομάδων ($p=0,00$, $p=0,05$ και $p=0,00$)(Πιν.40)(Γραφ.15). Η συγκέντρωση Cd στο ήπαρ των αρσενικών που εκτέθηκαν σε 5ppb Cd ήδη στις 60 ημέρες παρουσιάζει σημαντική αύξηση, σε σχέση με των υπολοίπων ομάδων ($p=0,01$, $p=0,04$ και $p=0,01$) (Πιν.40)(Γραφ.15). Γενικά πάντως, δεν παρατηρούνται



σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων του καδμίου στο ήπαρ ανάμεσα στα δύο φύλα.

Η επίδραση του φύλου στη συγκέντρωση καδμίου έχει ερευνηθεί *in vivo* σε zebrafish, με τα θηλυκά να συσσωρεύουν τουλάχιστον διπλάσια ποσότητα καδμίου κι αυτή η διαφορά πιθανότατα αποδίδεται σε φυσιολογικές διαφορές των δύο φύλων, όπως κατά την αναπαραγωγή (Förstner & Wittmann, 1983).

Στα μεγαλύτερα άτομα κλάσης II η συγκέντρωση του Cd στο ήπαρ κινείται σε υψηλά επίπεδα, παρουσιάζοντας όμως μεγάλες διακυμάνσεις (Γραφ.14)(Πιν.38).

Σε κύτταρα ηπατώματος οι υποθανατηφόρες συγκεντρώσεις Cd μπορούν να αναστείλουν την πρωτεϊνοσύνθεση και ταυτόχρονα να αυξήσουν τη σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών θερμικού σοκ όπως αυτήν που επάγεται ισχυρότερα (HSP68) κάτω από συνθήκες που αναστέλλουν τη γενική πρωτεϊνοσύνθεση. Πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υψηλή θερμοκρασία, ορισμένα μέταλλα, τοξίνες και το οξειδωτικό στρες (ανοξία ή μεταβολίτες ενεργού οξυγόνου) προκαλούν αλλαγές στην έκφραση των λεγόμενων πρωτεϊνών του θερμικού σοκ (HSP), οι οποίες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς από βακτήρια έως τον άνθρωπο και επιτρέπουν την ανοχή διαφόρων τύπων στρες και την επιβίωση. Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ οι οποίες έχουν προταθεί ως δείκτες για την τοξικότητα συμμετέχουν επίσης σε φυσιολογικές λειτουργίες όπως η πύκωση, συναρμολόγηση και μεταφορά των πρωτεϊνών μεταξύ των ενδοκυττάρων διαμερισμάτων (Oveigonne, 1995).

Ακόμη σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC επαγωγή της HSP70 πρωτεΐνης γινόταν κατόπιν έκθεσής τους σε 1mM Zn και 100μM Cd, ενώ το Ni και Co την επήγαγαν μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Επομένως κάθε μέταλλο επάγει την παραγωγή στρες πρωτεϊνών με διαφορετικό τρόπο και ένταση. Μάλιστα επειδή κάποιες από τις πρωτεΐνες στρες ενεργοποιούνται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων, όπως για το Cd, δεν αποτελούν μόνο δείκτη αμετάκλητης κυτταροτοξικότητας, αλλά και της τοξικότητας των χαμηλότερων δόσεων (Wagner, 1999).

Η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των ατόμων της κλάσης I σε όλες τις ομάδες εμφανίζεται σταθερά χαμηλή, με μόνη εξαίρεση τη σημαντικά υψηλότερη τιμή Zn στο ήπαρ των ατόμων της ομάδας ελέγχου στις 60 ημέρες ($p=0,00-0,02$) (Πιν.37). Στα θηλυκά η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ είναι σταθερά χαμηλή, εκτός από τη σημαντικά υψηλότερη τιμή Zn στις 60 ημέρες στην ομάδα ελέγχου (II) ($p=0,02$)(Πιν.41), και στην ομάδα που εκτέθηκε στην υψηλή δόση Cd (5ppb). Η χρονική αυτή στιγμή συμπίπτει με την αναμενόμενη περίοδο ωτοκίας, οπότε ο ηπατικός Zn συμμετέχει στη βιτελλογένεση και στην ωρίμανση των γονάδων. Γενικά η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των θηλυκών εμφανίζεται μάλλον χαμηλότερη στους ιχθύς που εκτέθηκαν στη χαμηλότερη συγκέντρωση Cd. Στα αρσενικά, οι μεγαλύτερες διακυμάνσεις σε σχέση με τη συγκέντρωση Zn στο ήπαρ εμφανίζονται στην ομάδα που εκτράφηκε σε νερό λίμνης (I)(Γραφ.16).



Συμπερασματικά α) η συγκέντρωση του Cd στο ήπαρ αυξάνει σημαντικά στην ομάδα IV (5ppb) μετά την 45^η ημέρα έκθεσης ($p=0.00-0.01$) (Γραφ.13, Πιν.36) β) η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ παρατηρείται σημαντικά υψηλότερη στις 60 ημέρες, περίοδο αναμενόμενης ωτοκίας, στα θηλυκά άτομα της ομάδας ελέγχου (II-0.1 ppb Cd) ($p=0,02$) (Πιν.41, Γραφ.16), και της ομάδας που εκτέθηκε στην υψηλή συγκέντρωση Cd (IV-5ppb).

δ. Ηπατοσωματικός Δείκτης (LSI)

Τα ψάρια αποθηκεύουν ενέργεια στο μυϊκό ιστό, αλλά συσσωρεύουν επίσης ενέργεια στο ήπαρ, κυρίως υπό μορφή γλυκογόνου σε περιόδους υψηλής ενεργειακής πρόσληψης. Έτσι το σχετικό ηπατικό μέγεθος εκφραζόμενο ως Ηπατοσωματικός Δείκτης (LSI) σχετίζεται με τη διατροφική κατάσταση του ψαριού και με το ρυθμό αύξησης, καθώς και με την αναπαραγωγική διαδικασία. Ο δείκτης αυτός συχνά χρησιμοποιείται σε εποχιακές και ετήσιες μελέτες της αύξησης σε φυσικούς πληθυσμούς ψαριών, τα οποία έχουν ενδογενείς εποχιακούς ρυθμούς στη δυναμική της αύξησής τους.

Ο ηπατοσωματικός δείκτης είναι μεγαλύτερος στα θηλυκά από ότι στα αρσενικά και μικρότερος σε ιχθύς από επιβαρυμένα περιβάλλοντα. Για παράδειγμα η έκθεση σε σελήνιο προκαλεί νέκρωση στο παρέγχυμα των ηπατοκυττάρων των ιχθύων οπότε παρατηρείται αντίστροφη σχέση μεταξύ του LSI και της συγκέντρωσης του μετάλλου στο ήπαρ (Mauk, 2001). Ακόμη ηπατικές βλάβες οδηγούν σε αύξηση του ηπατοσωματικού δείκτη, ενώ ο γοναδοσωματικός δείκτης, δηλαδή το σχετικό μέγεθος των γονάδων, με τη σειρά του αυξάνει και κορυφώνεται πριν την ωτοκία. Όταν αυξηθούν ο LSI και η οιστραδιόλη ξεκινάει η εξωγενής βιτελλογένεση (Banks, 1999).

Ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, στα νεαρά θηλυκά κλάσης I μειώνεται προοδευτικά έως τις 45 ημέρες, ενώ μετά εμφανίζει σχετική σταθερότητα (Γραφ.19). Η μείωση του μεγέθους του ήπατος οφείλεται στο γεγονός ότι κινητοποιούνται τα ενεργειακά αποθέματα του ήπατος για την αύξηση των γονάδων κατά την περίοδο της αναπαραγωγικής ωρίμανσης των ατόμων. Η ομάδα III-1ppb Cd, στις 60 ημέρες εμφάνισε σημαντικά υψηλότερο LSI από την ομάδα ελέγχου ($p=0.02$, Πιν.43). Η ίδια ομάδα στον παθολογοανατομικό έλεγχο εμφανίζει πολύ νωρίς εκτεταμένες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων (εικ.7, 8, 14).

Στα μεγαλύτερα άτομα κλάσης II, στα θηλυκά το ηπατικό μέγεθος μειώνεται προοδευτικά ως τις 120 ημέρες, ενώ στα αρσενικά ο ηπατοσωματικός δείκτης κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα από των θηλυκών έως τις 60 ημέρες και κατόπιν μειώνεται προοδευτικά (Γραφ.20), χωρίς συνολικά να παρατηρούνται υψηλότερες τιμές του δείκτη σε σχέση με τα νεαρότερα άτομα.



Η ομάδα που εκτέθηκε σε Cd 1ppb εμφανίζει αύξηση του LSI περί την 60η ημέρα γεγονός που υποσημαίνει καθυστέρηση ή/και διαταραχή της ανάπτυξης και ειδικότερα της αναπαραγωγικής ωρίμανσης.

ε. Παθολογοανατομικά ευρήματα ήπατος

Οι ιστολογικές τομές έδειξαν ότι: η ομάδα ελέγχου (II, 0.1ppb Cd) εμφανίζεται χωρίς ουσιαστικές αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων στις 14 ημέρες και 45 ημέρες (εικ.2, εικ.10 αντίστοιχα), με ήπιες στις 30 ημέρες (εικ.5) και μέτριες αλλοιώσεις στις 60 ημέρες (εικ.13). Η ομάδα (I- 0.05ppb Cd) που αναπτύχθηκε σε νερό Λίμνης εμφανίζει γενικά πιο επιβαρημένη εικόνα, αρχικά με ήπιες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων και οριακή εικόνα λιπώδους εκφύλισης ή ίνωσης (εικ.1), και στη συνέχεια με εκτεταμένη εκφύλιση (πλήρης λιπώδης εκφύλιση) και νέκρωση ηπατοκυττάρων (εικ.9), πιθανότατα λόγω παρουσίας στο νερό της λίμνης και άλλων ηπατοτοξικών παραγόντων, εκτός των μετάλλων, όπως φυτοφαρμάκων, λιπασμάτων και μεταβολιτών τους.

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις το Cd δρα μέσω ενός κενού υποδοχέα Zn για την παραγωγή τριφωσφορικής ινσοιτόλης και απελευθέρωσης Ca από τις ενδογενείς αποθήκες και με αυτόν τον τρόπο επάγει την πρωτεϊνική κινάση C (Tsangaris, 1998b). Η αύξηση του ενδοκυττάρου Ca σε αστεροειδή κύτταρα ήπατος μετά την έκθεση σε Cd, μπορεί να οφείλεται ακριβώς στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C από το μέταλλο (Carmen, 2002). Ένας άλλος τρόπος δράσης των μετάλλων αφορά τα ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα και έμμεσες δράσεις όπως το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, υπεροξειδίων ή κυτοκινών. Εκδήλωση της κυτταροτοξικότητας του Cd αποτελεί η εμφάνιση απόπτωσης σε διάφορους ιστούς όπως ήπαρ και νεφρούς κατόπιν έκθεσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ νέκρωσης κατόπιν έκθεσης σε υψηλές συγκεντρώσεις (Sato, 2002).

Η ομάδα III (1ppb Cd) εμφανίζει πολύ νωρίς εκτεταμένες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων (με κενούς χώρους) και κυτταρικών μεμβρανών (εικ.3), έως μέτριες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων και λιπώδη εκφύλιση στις 30 ημέρες (εικ.7-8), αργότερα στις 45 ημέρες εκτεταμένη εκφύλιση, νέκρωση ηπατοκυττάρων και λιπώδη εκφύλιση (εικ.11) και στις 60 ημέρες μέτριες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων και λιπώδη εκφύλιση (εικ.14). Η ομάδα IV (5 ppb Cd) που εκτέθηκε στην υψηλή δόση Cd εμφανίζει αρχικά στις 14 ημέρες ήπιες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων (με κενούς χώρους) και οριακή εικόνα λιπώδους εκφύλισης (εικ.4), στις 30 ημέρες εκτεταμένες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων και λιπώδη εκφύλιση (εικ.6) και τέλος μέτριες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων και λιπώδη εκφύλιση (εικ.15).

Τα μεγαλύτερα ψάρια κλάσης II που εκτράφηκαν σε νερό Λίμνης εμφανίζουν από μέτριες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων και μερική λιπώδη εκφύλιση (εικ.16) έως εκτεταμένες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων και πλήρη λιπώδη εκφύλιση (εικ.17). Η ομάδα ελέγχου των μεγαλύτερων σε ηλικία



ιχθύων παρουσιάζει με τη σειρά της μέτριες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων και λιπώδη εκφύλιση (εικ.18, εικ.21) και σε μία περίπτωση στις 120 ημέρες εκτεταμένες εναποθέσεις μελανών σωματιδίων (μετάλλων;) εντός εκφυλισμένων ηπατοκυττάρων (εικ.19-20).

Σε μελέτες χημικής και βιολογικής παρακολούθησης της λίμνης Παμβώτιδας Ιωαννίνων από τη δεκαετία του 1980 τα ψάρια της Λίμνης (ο κ. κυπρίνος *Cyprinus carpio*, το γλήνι *Tinca tinca*, η ενδημική τσίμα *Paraphoxinus epiroticus*, η δρομίτσα *Rutilus rutilus rubilio*), επέδειξαν έντονη βιοσυσσώρευση μετάλλων σε σχέση με τα προηγούμενα τροφικά επίπεδα και ειδικότερα για τα μέταλλα Zn και Cu ήταν εμφανής και η βιομεγέθυνσή τους (Kalfakakou, 1987). Σε μετέπειτα μελέτες χημικής και βιολογικής παρακολούθησης της Λίμνης προέκυψε ότι ενώ στα δείγματα νερού τα επίπεδα των μετάλλων Zn, Cu και Pb, ανθρωπογενούς κυρίως προελεύσεως, ήταν χαμηλά, στα ιζήματα της Λίμνης οι συγκεντρώσεις των μετάλλων εμφανίζονταν υψηλές, υποδεικνύοντας χρόνια ρύπανση που εγκυμονεί κινδύνους για την υδρόβια ζωή, κατατάσσοντας έτσι την Παμβώτιδα μεταξύ των ρυπασμένων οικοσυστημάτων. Παράλληλα σε κ. κυπρίνους, γλήνια, δρομίτσες και επιπλέον σε γλανίδια (*Silurus aristotelis*), χρυσόψαρα (*Carassius auratus*) και πεταλούδες (*Carassius auratus gibelio*) βρέθηκε σημαντική βιοσυσσώρευση των μετάλλων Zn και Cu, ενώ βιοσυσσώρευση Pb διαπιστώθηκε μόνο στο γλήνι (φυτοφάγο που τρέφεται με μικρά υδρόβια φυτά του πυθμένα), τη δρομίτσα και στο ήπαρ του χρυσόψαρου (με παράγοντα συγκέντρωσης σε σχέση με το νερό 12,12), υποδεικνύοντας ότι η ρύπανση των ιζημάτων έχει αρχίσει να μεταφέρεται και στα φυτά του πυθμένα της Λίμνης (Paragiannis, 2002).

Συμπερασματικά η βαρύτητα των ηπατοκυτταρικών βλαβών κατά τις διάφορες χρονικές περιόδους έκθεσης των πειραματοζώων σε Cd ακολουθεί σε γενικές γραμμές την παρακάτω σειρά: III-1ppb Cd > IV-5 ppb Cd > I-νερό λίμνης-0.05 ppb Cd > II-0.1 ppb Cd.

στ. Μυϊκός ιστός

Η δραστηριότητα των μεταβολικών ενζύμων στο ήπαρ, τους νεφρούς και τους μύες διαταράσσεται μετά την έκθεση σε Cd επειδή το μέταλλο συνδέεται στις σουλφυδρυλικές ομάδες των καταλυτικών πρωτεϊνών και αναστέλλει τις φυσιολογικές βιοχημικές λειτουργίες (Ricard, 1998). Είναι γνωστό επίσης ότι έκθεση σε Cd και Zn επιδρά στην καρδιακή λειτουργία παρεμποδίζοντας τα κανάλια ασβεστίου στο μυοκάρδιο (Wu, 2002).

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ωστόσο ότι η επιβάρυνση με Cd του μυϊκού ιστού των ιχθύων της πειραματικής μας διάταξης δεν είναι σημαντική, ιδιαίτερα δε αν συγκριθεί με τα επίπεδα του μετάλλου στους άλλους ιστούς των πειραματοζώων διαπιστώνεται ότι ο μυϊκός ιστός φέρει τα μικρότερα φορτία Cd αλλά και Zn (Γραφ.22, Πιν.46, 47).



Συμπέρασμα: ο μυϊκός ιστός, συγκριτικά με τους άλλους ιστούς, εμφανίζει τις μικρότερες συγκεντρώσεις Cd και Zn, δηλ. δεν φαίνεται να αποτελεί ιστό- στόχο του μετάλλου.

II. Είναι το Cd ενδοκρινής διαταράκτης;

Τα χρυσόψαρα εμφανίζουν ετήσιους αναπαραγωγικούς κύκλους με μέγιστη εποχιακή σεξουαλική ωριμότητα κατά την άνοιξη. Η ωρίμανση αυτή συνδέεται με αύξηση των κυκλοφορούντων στεροειδών, που παράγονται στις γονάδες, των γοναδοτροπινών και της αυξητικής ορμόνης καθώς και με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ορμονών. Στα θηλυκά ειδικότερα φαίνεται ότι η οιστραδιόλη διεγείρει την έκκριση αυξητικής ορμόνης καθ' όλη τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου (Huggard, 1996). Η **17-β οιστραδιόλη (E₂)**, που επάγεται από την γοναδοτροπίνη (GtH) και συντίθεται στην υπόφυση, διεγείρει την σύνθεση της Zn-πρωτεΐνης βιτελλογενίνης (VTG) από τα ηπατικά κύτταρα. Η βιτελλογενίνη μεταφέρεται στις ωοθήκες και αποτελεί την πρόδρομο ουσία της λεκίθου του ωοκυττάρου. Η βιτελλογένεση και η ωοκυτταρική ανάπτυξη έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση του **γοναδοσωματικού δείκτη (GSI)** που αποτελεί μέσο και μέτρο εκτίμησης της φυσιολογικής αύξησης των γονάδων και της αναπαραγωγικής ωρίμανσης. Οι παραπάνω δείκτες και ειδικότερα η συνεχής καταγραφή (monitoring) των στεροειδών του φύλου, όπως η E₂, παρέχουν ένα περιεκτικό μοντέλο εκτίμησης των βιολογικών επιδράσεων των διαταρακτών της ενδοκρινούς λειτουργίας (Ishibashi, 2001).

Η έκθεση σε ενδοκρινείς διαταράκτες οδηγεί σε μειωμένη γονιμότητα, ανώμαλη αναπαραγωγική ανάπτυξη ή ερμαφροδιτισμό σε ασπόνδυλα, ψάρια, ερπετά και θηλαστικά. Οι ουσίες αυτές μπορούν να προσβάλλουν την αναπαραγωγή άμεσα μέσω ορμονικής διαταραχής όταν ομοιάζουν με ένα ενδογενές μόριο και εισέρχονται έτσι στα όργανα αναπαραγωγής. Εκεί μπορεί να μεταβάλλουν τις κυτταρικές διαδικασίες, όπως τη διαφοροποίηση, μίτωση, μείωση, απόπτωση, διακυτταρική επικοινωνία, την επιδιόρθωση του DNA (όπου διαταράσσεται η φυσιολογική αύξηση και διαφοροποίηση με επαγωγή ανώμαλης κυτταρικής αύξησης και σχηματισμό όγκων) ή τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (απαραίτητη πηγή ενέργειας κατά την αύξηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό).

Έμμεσες δράσεις παρατηρούνται όταν η χημική ουσία παρεμβαίνει στη δράση των φυσικών ορμονών (μιμούμενη ή μπλοκάροντας τη δράση τους) που είναι κρίσιμες για τη φυσιολογική ανάπτυξη, συμπεριφορά, εμμηναρχή, αναπαραγωγική λειτουργία και γαμετογένεση, π.χ. όταν οι ρυπαντές δεσμεύονται με τον υποδοχέα οιστρογόνων και φτάνουν ως σύμπλεγμα στον πυρήνα όπου επάγουν ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων και την ακόλουθη βιολογική απόκριση. Πάντως οι συγκεντρώσεις που απαιτούνται για αντίστοιχη οιστρογονική δραστηριότητα αυτών των χημικών υπολογίζονται σε 100.000 φορές αυτών της E₂. Άλλες έμμεσες δράσεις είναι



η παρέμβαση σε μη αναπαραγωγικά συστήματα ή η μεταβολή των δεσμευτικών πρωτεϊνών του ορού, σύνθεσης και μεταβολισμού ορμονών (π.χ. θυροξίνης). Ακόμα οι ανοσολογικοί ρυπαντές που διαταράσσουν την έκκριση κυτοκινών από μακροφάγα και ενεργοποιημένα T- λεμφοκύτταρα μπορούν να παρεμποδίσουν τη φυσιολογική ενεργοποίηση άλλων T και B κυττάρων, την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων του ανοσοποιητικού μέσω κυτοκινών και να αναστείλουν ανοσολογικές αποκρίσεις απαραίτητες για την αναπαραγωγή (Sharara, 1998).

Η μελέτη του χρυσόψαρου ως οργανισμού-στόχου ενδοκρινούς διαταραχής, πέρα από τη συνήθη χρήση του σε μελέτες τοξικότητας λόγω της ευαισθησίας του προάγεται από τα βιολογικά πλεονεκτήματα που αυτό διαθέτει (μικρό μέγεθος, ετήσιος αναπαραγωγικός κύκλος, αναπαραγωγική ωρίμανση ήδη από το πρώτο έτος ζωής). Η επιλογή των νεαρών ατόμων είναι επίσης πολύ σημαντική γιατί σε αυτήν την ηλικία συμβαίνει η γοναδοωρίμανση, οπότε δρουν και οι εν δυνάμει διαταράκτες, ενώ επίσης οι μεταβολικοί ρυθμοί είναι υψηλοί και η συσσώρευση των μετάλλων είναι εντονότερη σε σχέση με το σωματικό τους βάρος.

1. Θηλυκά άτομα

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι στην **ομάδα ελέγχου των θηλυκών** ιχθύων κλάσης I (ηλικία <1 έτους) αλλά και κλάσης II (ηλικία >1 έτους) η **E₂** αρχίζει να αυξάνεται γρήγορα μετά τις 30 ημέρες εκτροφής και στις 60 ημέρες (μέσα Μαρτίου) εμφανίζει υψηλά επίπεδα, χαρακτηριστικά της ωοθηκικής ωρίμανσης για την έναρξη της ωοτοκίας ενώ στη συνέχεια αρχίζει και μειώνεται για να επανέλθει στις 120 ημέρες στα αρχικά χαμηλά επίπεδα (Γραφ.30,31,32). Ο **GSI**, ο οποίος παρέχει μία γενική εκτίμηση φυσιολογικής ωοθηκικής αύξησης και αναπαραγωγικής ανάπτυξης, εμφανίζει ανάλογη μεταβολή λαμβάνοντας μέγιστη τιμή την 60^η ημέρα της πειραματικής εκτροφής ($r=0.95$, Πιν. 54) ενώ μειώνεται στο ελάχιστο στις 120 ημέρες (Γραφ 33). Οι μεταβολές αυτές της **E₂** και του **GSI** δεν εμφανίζονται σε καμία από τις άλλες πειραματικές ομάδες.

Ιχθύς που εκτέθηκαν σε Cd εμφάνισαν μειωμένη έκκριση του παράγοντα απελευθέρωσης γοναδοτροπινών (GnRH), πιθανώς λόγω δράσης του μετάλλου πάνω στους υποδοχείς του στην υπόφυση (Khan 2001, Thomas 1993). Το Cd διαταράσσει επίσης τον έλεγχο της ωοθηκικής ωρίμανσης και της στεροειδογένεσης από τις γοναδοτροπίνες της υπόφυσης στα θηλυκά άτομα του κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) (Mukherjee, 1994). Οι Thomas 1990 και Foran 2002, ανέφεραν ότι τα επίπεδα στο πλάσμα και οι ρυθμοί έκκρισης των ορμονών του αναπαραγωγικού άξονα αυξήθηκαν μετά από έκθεση σε Cd με αποτέλεσμα *πρώιμη* (ασυντόνιστη) ωοθηκική αύξηση.

Στην **ομάδα III:1ppb Cd** φαίνεται ότι η έκκριση της **E₂** αναστέλλεται μετά την 14^η ημέρα έκθεσης καθώς και η αύξηση του **GSI**, ενώ στην **ομάδα IV :5ppb Cd** παρατηρείται παράλληλη σταθερή αύξηση της **E₂** και του **GSI**



από τις 45 έως τις 120 ημέρες ($r = 1.00$, Πιν 54) σε χαμηλότερα επίπεδα όμως από αυτά της ομάδας ελέγχου και χωρίς τη χαρακτηριστική αιχμή των τιμών τους στις 60 ημέρες, που υποδηλώνει την ωθητική ωρίμανση (Γραφ. 32,33).

Οι Guillette & Gunderson, 2001, έδειξαν ότι οι ρυπαντές δρουν σαν αγωνιστές ή ανταγωνιστές των ορμονικών υποδοχέων, μεταβάλλουν την παραγωγή των ορμονών στην ενδοκρινική τους πηγή, την απελευθέρωση διεγερτικών ή ανασταλτικών ορμονών από την υπόφυση ή τον υποθάλαμο, καθώς και την ενζυμική βιομετατροπή των ορμονών στο ήπαρ και την συγκέντρωση ή την δραστικότητα των δεσμευτικών πρωτεϊνών τους και επομένως το ελεύθερο κλάσμα των ορμονών στο πλάσμα. Το ήπαρ ειδικότερα συσσωρεύει υψηλά επίπεδα μετάλλων καθώς αποτελεί όργανο αποτοξικοποίησης και αποβολής τους τόσο στα ψάρια όσο και στα υπόλοιπα ωτόκα σπονδυλόζωα και είναι ένας από τους κύριους στόχους της E_2 της οποίας η δράση μεσολαβείται από οιστρογονικούς υποδοχείς. Η E_2 διεγείρει τα ηπατικά κύτταρα για την παραγωγή βιτελλογενίνης (VTG) (Shein, 2004). Η VTG με την κυκλοφορία μεταφέρεται στις ωθήκες και συμβάλλει στην αύξηση του ωοκυττάρου και στη συνέχεια στη διατροφή του εμβρύου. Η έκθεση σε Cd κατά τα πρώιμα στάδια της βιτελλογένεσης έχει αποδειχθεί ότι διαταράσσει στα ψάρια την παραγωγή και πρόσληψη της βιτελλογενίνης (Le Guevel, 2000).

Ανάλυση των δειγμάτων ήπατος που συλλέχθηκαν κατά την πειραματική περίοδο αποκάλυψαν μία δόσοεξαρτώμενη αύξηση του Cd στα ψάρια που εκτέθηκαν στο μέταλλο. Σημαντικές διαφορές στα **ηπατικά επίπεδα Cd** εμφανίστηκαν μεταξύ ομάδας ελέγχου και ομάδων εκτεθέντων σε 1ppb και 5ppb Cd καθώς και ενδεικτικές διακυμάνσεις του γοναδοσωματικού-GSI και ηπατοσωματικού-LSI δείκτη (Πιν 57). Οι **μεταβολές των LSI και GSI** δηλαδή το αρχικά μεγάλο μέγεθος του ήπατος και των τιμών του LSI, λόγω της αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητας προς σύνθεση VTG και η σταδιακή μείωση του μέχρι την 120^η ημέρα, καθώς και η αύξηση των ωθηκών ως την 60^η ημέρα, με αιχμή των τιμών του GSI αντίστοιχη προς αυτή της E_2 , λόγω της μετακίνησης και άθροισης της VTG σε αυτές καθώς και η ακολουθούσα σημαντική μείωση τους ως την 120^η ημέρα, που κλείνει ο αναπαραγωγικός κύκλος, είναι φυσιολογικά αναμενόμενες και εμφανίζονται στην ομάδα ελέγχου (Πιν.57). Στην ομάδα που εκτέθηκε σε 1ppb Cd ο LSI μειώνεται ως την 60^η ημέρα και μετά παραμένει σταθερός ως την 120^η, ενώ ο GSI αντίστοιχα εμφανίζει μικρή σταθερή μείωση. Στην ομάδα που εκτέθηκε σε 5ppb Cd, ο LSI εμφανίζει τιμές και μεταβολές ανάλογες της προηγούμενης ομάδας, ο GSI όμως αυξάνεται σημαντικά και σταθερά κατά τις αντίστοιχες δειγματοληψίες (Γραφ.33,43,51).

Τόσο στα πειραματόζωα μικρότερης ηλικίας-κλάση I, όσο και στα μεγαλύτερης ηλικίας-κλάση II, στα οποία άλλωστε τα επίπεδα E_2 είναι 10πλάσια, παρατηρείται ότι η εκτροπή στο νερό της λίμνης προκαλεί αποσυντονισμό στην αιχμή των τιμών E_2 και GSI που εμφανίζεται φυσιολογικά στις 60 ημέρες και υποδηλώνει συγχρονισμένη ανάπτυξη,



πιθανότητα λόγω ύπαρξης στο νερό της λίμνης και άλλων παραγόντων πέραν των μετάλλων που προκαλούν ενδοκρινή διαταραχή (Γραφ.43,55).

Συμπεραίνεται ότι το Cd φαίνεται να μεταβάλλει την σχέση E₂, LSI και GSI προκαλώντας απορύθμιση στην ανάπτυξη των γονάδων στα θηλυκά άτομα.

Η συγκέντρωση **Cd στις γονάδες των θηλυκών** ιχθύων κλάσης I αυξάνεται σε όλες τις ομάδες συναρτήσει του χρόνου έκθεσης. Η ομάδα που εκτέθηκε σε Cd:5ppb εμφανίζει στις 120 ημέρες σημαντική αύξηση ($p=0,05$)(Γραφ 24, Πιν.50). Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση Cd στις γονάδες των θηλυκών κλάσεων I και II, φαίνεται ότι η συγκέντρωση στα νεαρότερα άτομα είναι γενικά υψηλότερη (Γραφ.26).

Έκθεση κυττάρων HeLa σε 5μM Cd επί 6 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή (upregulation) 46 γονιδίων και την καταστολή 10 γονιδίων, των οποίων τα επίπεδα έκφρασης άλλαξαν. Τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την προστασία του κυττάρου. Στην υψηλότερη συγκέντρωση των 50μM οι επιδράσεις είναι πιο έντονες, 82 γονίδια επάγονται και 75 καταστέλλονται, με περαιτέρω ενεργοποίηση των προστατευτικών γονιδίων και κατεύθυνση της γονιδιακής έκφρασης προς την αναστολή της αύξησης, την αποδόμηση των πρωτεϊνών και την απόπτωση (Koizumi, 2003). Η επίδρασή του Cd στα γονίδια των υποδοχέων των ορμονών του φύλου είναι πιθανόν να προκαλεί ενδοκρινή διαταραχή. Ο υποδοχέας των οιστρογόνων (ER) είναι μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ενεργοποιούμενος από την E₂ και σχετίζεται με ειδικές περιοχές της πεπτιδικής ακολουθίας. Μία από τις περιοχές φέρει την λειτουργία σύνδεσης των πυρηνικών υποδοχέων με το DNA και αυτή η περιοχή συντάσσει δύο ιόντα Zn σε σχηματισμούς «δακτύλων ψευδαργύρου» για την κατάλληλη σύνδεση με το DNA (Kumar 1987, Lees 1989). Κατά συνέπεια η παρεμβολή του Cd μπορεί να αφορά ανταγωνισμό μετάλλου προς μέταλλο σε περιοχές του υποδοχέα της E₂ ή σε άλλες μεταβολικές οδούς που συμμετέχουν ψευδαργυροπρωτεΐνες.

Η συγκέντρωση του **Zn στις γονάδες** των νεαρών ατόμων κλάσης I είναι γενικά υψηλή στα θηλυκά, σημαντικά υψηλότερη από των αρσενικών σχεδόν σε όλες τις συνθήκες, γεγονός που πιθανά σχετίζεται με τη βιτελλογενίνη κυρίως, αλλά και τους υποδοχείς των οιστρογόνων και τον ρόλο του Zn στην ανάπτυξη των γονάδων (Πιν.52). Η ομάδα ελέγχου-II εμφανίζει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Zn την 30^η, 45^η και 120^η ημέρα ενώ την 60^η την μικρότερη όλων των ομάδων. Τα θηλυκά που εκτέθηκαν σε Cd 1ppb, εμφάνισαν στις 45 ημέρες σημαντικά υψηλότερη, όλων των ομάδων, συγκέντρωση Zn στις γονάδες (Γραφ. 27). Οι διακυμάνσεις, συναρτήσει του χρόνου, των **επιπέδων των μετάλλων στις γονάδες και της E₂** στον ορό, δείχνουν ότι στην ομάδα ελέγχου-II το Cd εμφανίζει σταθερή αύξηση ενώ η E₂ εμφανίζει απότομη άνοδο σε υψηλά επίπεδα την 60^η ημέρα συγκρόνως με απότομη πτώση του Zn. Τα ευρήματα είναι ανάλογα στην ομάδα I που αναπτύχθηκε σε νερό λίμνης με την διαφορά ότι



οι απότομες μεταβολές Zn και E₂ εμφανίζονται την 45^η ημέρα. Στην ομάδα III-1ppb Cd, το Cd εμφανίζει σταθερή αύξηση, ενώ η E₂ εμφανίζει υψηλά επίπεδα την 14^η ημέρα, απότομη πτώση την 30^η και παραμένει σε αυτά τα επίπεδα, αντίστοιχα ο Zn ανέρχεται και διατηρείται λίγο-πολύ σε υψηλά επίπεδα ως την 120^η ημέρα. Στην ομάδα IV-5 ppb Cd, το Cd εμφανίζει σταθερή αύξηση, ενώ η E₂ εμφανίζει υψηλά επίπεδα την 14^η ημέρα, απότομη πτώση μεταξύ 30^{ης} και 45^{ης} και απότομη άνοδο ως την 120^η, η διακύμανση του Zn, είναι σχεδόν αντίθετη της E₂, αλλά προσομοιάζει την αντίστοιχη διακύμανση του μετάλλου στην ομάδα ελέγχου (Γραφ.39).

Συμπεραίνεται ότι το Cd, σε συγκεντρώσεις 1ppb και 5ppb, προκαλεί μεταβολές στο χρονοδιάγραμμα έκκρισης και τα επίπεδα των E₂ και Zn στις γονάδες των θηλυκών ατόμων *Carassius*, διαταράσσοντας τον κύκλο της αναπαραγωγικής ωρίμανσης. Η διαταραχή που προκαλείται από το 1ppb Cd φαίνεται να είναι σοβαρότερη των 5ppb.

Τα ιστολογικά ευρήματα από τις γονάδες ενισχύουν και επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα ευρήματα στα θηλυκά πειραματόζωα.

Στα **νεαρότερα πειραματόζωα κλάσης I**, η **ομάδα ελέγχου-II** αρχικά παρουσιάζει πρώιμα βιτελλογενικά ωκύτταρα (F₂) και δευτερογενή βιτελλογενικά ωκύτταρα (F_{3a}) σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (εικ.23), κατόπιν στις 30 ημέρες πρώιμα βιτελλογενικά ωκύτταρα σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (F₂) και προχωρημένα δευτερογενή (F_{3b}) (εικ.27), στις 45 ημέρες πιο προχωρημένα δευτερογενή βιτελλογενικά (F_{3b}) ωκύτταρα, με διακριτό πυρήνα (εικ.30-31) και τέλος στις 60 ημέρες εμφανίζονται προχωρημένα δευτερογενή (F_{3b}) και τριτογενή ωκύτταρα με μετακίνηση πυρήνα, καθώς και ατρησιακά ωκύτταρα (εικ.35-36).

Η ομάδα που εκτράφηκε σε **νερό Λίμνης-I** εμφανίζει καθ' όλη την πειραματική διάρκεια πρώιμα βιτελλογενικά ωκύτταρα σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (F₂) (εικ.22, 26, 34).

Η **ομάδα III** που εκτέθηκε σε Cd 1ppb εμφανίζει πολύ νωρίς πρώιμα βιτελλογενικά ωκύτταρα σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (F₂) (εικ.24), αργότερα στις 30 ημέρες προχωρημένα δευτερογενή βιτελλογενικά (F_{3b}) ωκύτταρα με διακριτό πυρήνα (εικ.28), στις 45 ημέρες πρώιμα βιτελλογενικά ωκύτταρα (F₂) (εικ.32) και τέλος προχωρημένα δευτερογενή (F_{3b}) και τριτογενή ωκύτταρα με μετακίνηση πυρήνα, καθώς και ανώριμα ωκύτταρα (εικ.37). Στις 120 ημέρες δε, μαζί με πρώιμα βιτελλογενικά ωκύτταρα (F₂) εμφανίζονται και ανώριμα ωκύτταρα (εικ.52-53).

Η **ομάδα IV** που εκτέθηκε σε Cd-5ppb εμφανίζει αρχικά ανώριμα ωκύτταρα (F₁) (εικ.25), στις 30 ημέρες προχωρημένα δευτερογενή βιτελλογενικά (F_{3b}) ωκύτταρα με διακριτό πυρήνα (εικ.29), αργότερα στις 45 και 60 ημέρες προχωρημένα δευτερογενή (F_{3b}) και τριτογενή ωκύτταρα με μετακίνηση πυρήνα (εικ.33, εικ.38). Στις 120 ημέρες τέλος, μαζί με ώριμα ωκύτταρα (F₄) εμφανίζονται και ατρησιακά ωκύτταρα (εικ.56-57).



Τα μεγαλύτερα ψάρια κλάσης II που εκτράφηκαν σε νερό Λίμνης εμφανίζουν από ώριμα ωοκύτταρα, πλήρη λεκίθου (F₄) (εικ.40) έως προχωρημένα δευτερογενή (F_{3b}) και τριτογενή ωοκύτταρα με μετακίνηση πυρήνα (εικ.41, 43, 50). Σε μία περίπτωση μάλιστα στις 45 ημέρες μαζί με πρώιμα βιτελλογενικά ωοκύτταρα (F₂), υπάρχει παρουσία μελανών σωματιδίων στο υπόστρωμα και σε εκφυλισμένα κύτταρα (εικ.45). Η ομάδα ελέγχου των μεγαλύτερων σε ηλικία ιχθύων παρουσιάζει με τη σειρά της ατρησιακά ωοκύτταρα (εικ.42), τριτογενή ωοκύτταρα και ανώριμα ωοκύτταρα (εικ.44) και προχωρημένα δευτερογενή βιτελλογενικά (F_{3b}) και τριτογενή ωοκύτταρα με διακριτό πυρήνα (εικ.46, εικ.48) και ανώριμα ωοκύτταρα (εικ.51).

Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνουν τα προηγηθέντα συμπεράσματα σχετικά με τους δείκτες ανάπτυξης, την E₂ και τα επίπεδα Cd και Zn στις γονάδες των θηλυκών ατόμων *Carassius*.

Συμπεραίνεται ότι

α) θηλυκά άτομα *Carassius* που εκτίθενται σε συγκεντρώσεις Cd: 1ppb είναι δυνατόν να εμφανίσουν πρώιμη ωοθηκική ωρίμανση, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Cd: 5ppb δυνατόν να προκαλέσουν καθυστέρηση και όψιμη ωρίμανση.

β) η ανάπτυξη στο νερό της λίμνης φαίνεται να προκαλεί καθήλωση σε πρώιμα στάδια των περισσότερων ωοκυττάρων με αποτέλεσμα να διατηρείται ο ρυθμός εξέλιξης του αναπαραγωγικού κύκλου αλλά σε χαμηλά επίπεδα, πιθανότατα λόγω της παρουσίας στο νερό και άλλων ουσιών με δράση ενδοκρινικού διαταράκτη.

2. Αρσενικά άτομα

Οι ορμονικές επιδράσεις πολλών ρυπαντών είτε οιστρογονικών είτε αντι-οιστρογονικών μπορεί να αφορούν άμεσο ανταγωνισμό για τις θέσεις των υποδοχέων που είναι υπεύθυνοι για την έκφραση της τελευταίας απόκρισης (Gerstenberger, 2000). Η επίδραση επίσης στα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου είναι ένας πιθανός στόχος, καθώς η πρόσληψη ασβεστίου από τα κύτταρα που παράγουν στεροειδή είναι απαραίτητη για τη μέγιστη παραγωγή ανδρογόνων (επαγόμενη από τις GtH) στους τελεόστεους (Evanson, 2001).

Στους ιχθύς το κύριο ανδρογόνο είναι η 11-κετοτεστοστερόνη με κύριες δράσεις: α) τον έλεγχο του ρυθμού έκκρισης της GnRH β) τη σπερματογένεση γ) την έκφραση της φυσιολογικής συμπεριφοράς του αρσενικού δ) τη φυσιολογική λειτουργία των αρσενικών δευτερευόντων γεννητικών αδένων ε) άλλες δράσεις που δε σχετίζονται με την αναπαραγωγή όπως την ανοσολογική λειτουργία, το μεταβολισμό των οστών και τη μυϊκή ανάπτυξη, ιδιαίτερα στα θηλαστικά.

Ο ρόλος της 17-β οιστραδιόλης στα αρσενικά δεν είναι πλήρως κατανοητός. Σχηματίζεται με αρωματοποίηση της τεστοστερόνης σε ειδικά



όργανα-στόχους όπως τους όρχεις και τον εγκέφαλο και πιθανά αυτό το στάδιο της αρωματοποίησης να είναι στόχος ενδεχόμενης ενδοκρινούς διαταραχής (McMaster, 1995).

Στα **αρσενικά όλων των ομάδων** παρατηρούνται σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα E_2 από ότι στα θηλυκά των αντίστοιχων ομάδων ($p=0,02-0,03$)(Πιν.55) καθώς και GSI (Πιν. 58) ενώ και οι δύο παράμετροι δεν εμφανίζουν σημαντική διακύμανση (Γραφ. 30,33).

Η E_2 στα **νεαρά αρσενικά-κλάση I, της ομάδας ελέγχου-II** εμφανίζει σταθερή πτώση ως την 60^η ημέρα και μετά επαναφορά στα αρχικά επίπεδα ως την 120^η. Η **ομάδα I-νερό λίμνης** εμφανίζει ανάλογη πτώση της E_2 , πρωιμότερα, την 30^η ημέρα, η **ομάδα III-Cd (1ppb), άνοδο** την 45^η και η **ομάδα IV-Cd (5ppb) άνοδο** μετά την 60^η (Γραφ.40,42).

Στα **αρσενικά μεγαλύτερης ηλικιακής κλάσης-II** και συνεπώς μακρότερης έκθεσης σε ξеноβιοτικά, η E_2 ειδικά στο κρίσιμο χρονικό διάστημα των 60 ημερών, **αυξάνεται**, και μάλιστα πολύ εντονότερα στην ομάδα-I που αναπτύχθηκε σε νερό λίμνης, ενδεχόμενα λόγω ύπαρξης παράλληλου κύκλου ανδρογόνων-οιστρογόνων ή λόγω μερικής θηλεοποίησης των αρρένων.

Σε αρσενικές πέστροφες (brook trout) μετά από μακρόχρονη έκθεση σε κάδμιο οι ορμόνες της αναπαραγωγής συνέχισαν να αυξάνουν μετά την σπερματογένεση όταν κανονικά θα έπρεπε να μειώνονται. Παρά το υψηλό επίπεδο των στεροειδών στο αίμα, οι όρχεις επεδείκνυαν ιστοπαθολογικές βλάβες από το κάδμιο. Η αφύσικη αύξηση των ορμονών μπορεί να αποδοθεί σε αναστολή του ενζυμικού συστήματος του κυτοχρώματος P450 των μικροσωμάτων στο ήπαρ, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη φυσιολογική μεταβολική αποδόμηση των στεροειδών μεταξύ άλλων, και το οποίο στα θηλαστικά, ενδεχομένως και τα ψάρια, αναστέλλεται από το κάδμιο.

Η δράση του καδμίου μπορεί ακόμη να αφορά απευθείας στη γονάδα. Στους όρχεις ιριδιζουσας πέστροφας παρατηρήθηκε επαγωγή σύνθεσης τεστοστερόνης και 2β-υδροξυτεστοστερόνης από το κάδμιο, ένδειξη άμεσης δράσης του μετάλλου στην παραγωγή τεστοστερόνης, αλλά και αναστολής της φυσιολογικής απομάκρυνσης της ορμόνης από το ήπαρ. Επειδή η παραγωγή των γοναδοτροπινών από την υπόφυση είναι υπό τον ανάδρομο έλεγχο των στεροειδών του φύλου το γεγονός αυτό θα μπορούσε να έχει και άλλες επιπτώσεις στην αναπαραγωγή. Το Cd έχει βρεθεί επίσης να υποκαθιστά τον Zn στους δακτύλους Zn του α-υποδοχέα οιστρογόνων, με υψηλή συγγένεια με την περιοχική σύνδεσης της ορμόνης με τον υποδοχέα (Predki, 1992).

Κύτταρα Sertoli και Leydig από νεαρά αρσενικά ποντίκια επώαστηκαν με Cd και διαπιστώθηκε ότι τα Sertoli επηρεάστηκαν δυσμενώς από το μέταλλο με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ τα Leydig επηρεάστηκαν λιγότερο. Επομένως διαφορετικά κύτταρα ακόμα και εντός του ίδιου ιστού μπορεί να διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους στα μέταλλα. Τα κύτταρα Sertoli είναι αυτά που παρέχουν λειτουργική στήριξη για το σπερματοφόρο επιθήλιο και όντας πιο ευαίσθητα εξηγούν την



επαγόμενη από το Cd δυσλειτουργία των όρχεων ιδιαίτερα σε δόσεις που αφήνουν ακέραιο το αγγειακό επιθήλιο (Clough, 1990).

Στις γονάδες των αρσενικών κλάσης I που εκτράφηκαν σε νερό λίμνης η συγκέντρωση **Zn** είναι υψηλότερη από των υπόλοιπων ομάδων (Γραφ.27), ωστόσο γενικά τα αρσενικά φαίνεται να μην κάνουν ειδική συγκέντρωση Zn στις γονάδες, με πιθανές επιπτώσεις στη σπερματογένεση και την εξέλιξη των γονάδων. Η συγκέντρωση του Zn στις γονάδες των ατόμων κλάσης I & II είναι χαμηλή στα αρσενικά και σημαντικά υψηλότερη στα θηλυκά ψάρια, σε όλες τις συνθήκες ($p=0,00$) (Πιν.52,53).

Όσον αφορά τη σχέση **GSI** και συγκέντρωσης **Cd στις γονάδες**, στα νεαρά αρσενικά-κλάσης I και ενήλικα αρσενικά-κλάσης II, μια γενική παρατήρηση είναι ότι ο GSI παραμένει σχεδόν σταθερός καθ' όλη την πειραματική περίοδο σε όλες τις ομάδες, ενώ το Cd αυξάνει (Γραφ.53,54).

Μείωση των πληθυσμών της άγριας πανίδας εξαιτίας θανατηφόρων δράσεων ή μακροχρόνιων υποτοξικών δράσεων των ρυπαντών στα έμβρυα όπου προκαλούνται αναπτυξιακές ανωμαλίες (Guillette, 2000) και διαταραχές στο ενδοκρινές σύστημα έχουν παρατηρηθεί σε νεαρά και ενήλικα άτομα (Shelby, 2001). Προβλήματα όπως θηλεοποίηση των αρσενικών και αρρενοποίηση των θηλυκών, μειωμένη γονιμότητα και υψηλή θνησιμότητα των απογόνων έχουν σχετιστεί με την παρουσία ξενοβιοτικών στο περιβάλλον. Στα κωπήποδα (ζωοπλαγκτόν) οι υποτοξικές δράσεις στην αναπαραγωγή παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις μετάλλων 2-3 τάξεις μεγέθους κάτω από τις θανατηφόρες συγκεντρώσεις (Hook, 2001). Ακόμη επιδημιολογικές μελέτες στους ανθρώπους έχουν αποκαλύψει μείωση στην ποιότητα του σπέρματος τα τελευταία χρόνια, όπως και αύξηση του καρκίνου των όρχεων σε πολλές χώρες, γεγονότα που μπορεί να προκλήθηκαν από κάποιους κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (Arukwe, 2001).

Η καρκινογόνος δράση του Cd έχει δείχθει σε διάφορους ιστούς πειραματόζων, όπως στον προστάτη, τους όρχεις, τα επινεφρίδια, το ήπαρ, το πάγκρεας, την υπόφυση, το αιμοποιητικό σύστημα και τους πνεύμονες επίμυων μέσω διαφορετικών οδών έκθεσης, δηλαδή μέσω εισπνοής, μέσω ένεσης και τροφικά. Στην καρκινογένεση του προστάτη *in vivo*, οι δόσεις που χρησιμοποιούνται είναι κάτω από αυτές που επάγουν χρόνια εκφύλιση και δυσλειτουργία στους όρχεις, επιβεβαιώνοντας έτσι την εξάρτηση των προστατικών όγκων από τα ανδρογόνα. Σε σχετικά υψηλότερες δόσεις το Cd επάγει καλοήθεις όγκους στους όρχεις επίμυων, οι οποίοι όμως φαίνονται να οφείλονται σε πρώιμες τοξικές αλλοιώσεις και απώλεια της λειτουργικότητας του οργάνου παρά σε καθεαυτό καρκινογόνο δράση του καδμίου (Waalkes 2003, 2000). Πιθανός ρόλος του καδμίου στον καρκίνο του μαστού υποστηρίζεται από ευρήματα σύμφωνα με τα οποία σε επίμυες η έκθεση σε κάδμιο προκάλεσε μίμηση οιστρογονικών δράσεων στο μαστό (Johnson, 2003). Έκθεση των νεογνών θηλαστικών στα μέταλλα μπορεί να αλλάξει τη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής, προκαλώντας μακροπρόθεσμες και ακόμη επιγενετικές αλλαγές ως απόκριση σε περίσσεια ορμονικών σημάτων (McLachlan, 2001). Αυτές οι αλλαγές στη



γονιδιακή ρύθμιση, έχουν ενοχοποιηθεί σε περιπτώσεις ευαισθησίας σε περιβαλλοντικά σχετιζόμενες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Jirtle, 2000).

Συμπεραίνεται ότι

α) αρσενικά άτομα *Carassius* που εκτίθενται σε συγκεντρώσεις Cd: 1ppb και 5ppb, εμφανίζουν άνοδο της 17β-οιστραδιόλης την περίοδο ωρίμανσης των σπερμογονίων με πιθανή επίπτωση ατελή ή/και θηλεοποιητική εξέλιξη τους και

β) ο GSI, σε όλες τις ομάδες και κλάσεις, παραμένει σχεδόν σταθερός, ενώ στις γονάδες το μεν Cd αυξάνει, ο δε Zn δεν εμφανίζει ειδική συγκέντρωση, με πιθανές επιπτώσεις στη σπερματογένεση και την εξέλιξή τους.

III. Επιτυγχάνεται αποκατάσταση των επιδράσεων του Cd στους ιχθύες *Carassius auratus* μέσω:

α) απομάκρυνσης από την έκθεση στο μέταλλο;

β) προσθήκης Zn;

1. Βράγχια

Η συγκέντρωση Cd στα βράγχια των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση Cd (1ppb) επί 60 ημέρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες, (Γραφ.60), παρουσιάζει σημαντική μείωση ($p=0,01$)(Πιν.59) σε σχέση με τα εκτεθειμένα σε Cd συνεχώς επί 120 ημέρες. Όταν όμως ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με προσθήκη 1ppb Zn, η συγκέντρωση Cd στα βράγχια των ιχθύων αυξάνεται σημαντικά ($p=0,03$)(Πιν.59).

Η συγκέντρωση Cd στα βράγχια των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση Cd (5ppb) επί 60 ημέρες και μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για ακόμη 60 ημέρες, παρουσιάζει σημαντική μείωση ($p=0,04$)(Πιν.59) σε σχέση με την συγκέντρωση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες. Η συγκέντρωση Cd στα βράγχια των ιχθύων όταν μεταφέρθηκαν σε νερό συγκέντρωσης 10ppb Zn, αυξάνεται σημαντικά ($p=0,00$)(Πιν.59)

Πάντως η συγκέντρωση Cd στα βράγχια είναι σημαντικά υψηλότερη ($p=0,00$)(Πιν.59) στους ιχθύς που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις ήδη από τις 60 ημέρες, καθώς τα βράγχια αποτελούν τον πρώτο ιστό-στόχο, των μετάλλων στους υδρόβιους οργανισμούς.

Το κάδμιο και ο ψευδάργυρος συνυπάρχουν συχνά σε ρυπασμένα από μέταλλα υδατικά περιβάλλοντα, όπως και άλλες ουσίες εξάλλου, γιατί σπάνια η ρύπανση περιορίζεται σε μία μόνο ουσία. Ο Zn θεωρείται ότι ασκεί ανταγωνιστική και προστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας του καδμίου στους υδρόβιους οργανισμούς, είτε με αναστολή της πρόσληψης



του καδμίου από τα βράγχια ή με επιτάχυνση της μεταφοράς του μετάλλου στα εσωτερικά όργανα. Τα δύο μέταλλα ανταγωνίζονται για θέσεις δέσμεισης στις πρωτεΐνες-μεταφορείς όπως η MT ή για τις θέσεις πρόσληψης στα βράγχια (Kargin, 1999).

Η συγκέντρωση Zn στα βράγχια των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.60), εμφανίζεται σχεδόν σταθερή ενώ κατόπιν μεταφοράς ιχθύων της ίδιας ομάδας σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn**, παρατηρείται μία μικρή αύξηση στη συγκέντρωσή του στα βράγχια.

Η συγκέντρωση Zn στα βράγχια των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για ακόμη 60 ημέρες, **αυξάνεται σημαντικά** ($p=0,00$)(Πιν.59) σε σχέση με την συγκέντρωση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες. Η συγκέντρωση Zn στα βράγχια των ιχθύων όταν μεταφέρθηκαν σε νερό συγκέντρωσης **10ppb Zn**, **μειώνεται σημαντικά** ($p=0,05$)(Πιν.59)

Πάντως σε όλες τις συνθήκες ο Zn στα βράγχια των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση Cd (5ppb) είναι σε χαμηλότερα επίπεδα ($p=0,02$)(Πιν.59) από των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση Cd (1ppb).

Στα βράγχια των *Carassius* η απομάκρυνση των πειραματοζώων από το επιβαρυνμένο με Cd νερό επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο, ενώ η προσθήκη Zn αντίθετα προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση του ιστού από το Cd.

2. Νεφροί

Η συγκέντρωση Cd στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.61) εμφανίζεται σχεδόν σταθερή όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn**. Στα νεαρά θηλυκά της ομάδας αυτής όπως και στα αρσενικά της ίδιας ομάδας η συγκέντρωση του Cd στους νεφρούς εμφανίζεται επίσης σχετικά σταθερή (Γραφ.62).

Η συγκέντρωση Cd στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για ακόμη 60 ημέρες, παρουσιάζει **σημαντική μείωση** ($p=0,03$)(Πιν.60), σε σχέση με την συγκέντρωση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες, αλλά και σε σχέση με την αποκατάσταση με 10ppb Zn ($p=0,01$)(Πιν.60). Η συγκέντρωση Cd στους νεφρούς των ιχθύων όταν μεταφέρθηκαν σε νερό συγκέντρωσης **10ppb Zn**, **αυξάνεται** μέχρι τη μέγιστη τιμή του, παρέχοντας σοβαρές ενδείξεις ότι ο Zn ευνοεί την είσοδο Cd στους νεφρούς. Στα θηλυκά της ομάδας αυτής η συγκέντρωση Cd στους νεφρούς είναι σχεδόν σταθερή κατόπιν μεταφοράς των ιχθύων σε νερό βρύσης, ενώ στην περίπτωση αποκατάστασης με 10ppb Zn το Cd στους νεφρούς αυξάνεται



μέχρι τη μέγιστη τιμή του (Γραφ.62, Πιν.61). Στα αρσενικά της ομάδας αυτής στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης παρατηρείται σημαντική μείωση της συγκέντρωσης Cd στους νεφρούς ($p=0,00$), ενώ κατόπιν αποκατάστασης με 10ppb Zn το Cd στους νεφρούς αυξάνεται μέχρι τη μέγιστη τιμή του (Γραφ.62, Πιν.61).

Πάντως η συγκέντρωση Cd στους νεφρούς είναι σημαντικά υψηλότερη ($p=0,00$)(Πιν.60) στους ιχθύς που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, καθώς οι νεφροί αποτελούν σημαντική θέση αποτοξικοποίησης των μετάλλων.

Κατά την οξεία έκθεση το κάδμιο μπορεί να προκαλέσει επαγωγή ή αναστολή πολλών κυτταρικών ενζύμων. Σε τελεόστεους του γλυκού νερού (μπριάνα) η αλκαλική φωσφατάση, μία χαρακτηριστική ψευδαργυροπρωτεΐνη δεν επηρεάστηκε στο ήπαρ και τα βράγχια, αυξήθηκε όμως στους νεφρούς και τις ωοθήκες και ανεστάλη στο έντερο, παρουσιάζοντας μία ειδική δράση του καδμίου στους παραπάνω ιστούς (Heath, 1994).

Η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.61), **αυξάνεται** στη μέγιστη τιμή του ενώ κατόπιν μεταφοράς ιχθύων της ίδιας ομάδας σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn**, μειώνεται η συγκέντρωσή του στους νεφρούς.

Στα θηλυκά της ομάδας αυτής η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς αυξάνεται κατόπιν μεταφοράς τους σε νερό βρύσης, ενώ κατόπιν μεταφοράς τους σε νερό με 1ppb Zn τα επίπεδα Zn στους νεφρούς μειώνονται. Στα αρσενικά της ομάδας αυτής η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς παραμένει σταθερή (Γραφ.63, Πιν.62).

Η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.61), εμφανίζεται σχεδόν σταθερή όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 10ppb Zn**. Στα θηλυκά ο Zn στους νεφρούς μειώνεται στις συνθήκες αποκατάστασης σε νερό βρύσης (Γραφ.63, Πιν.62) και κατόπιν αποκατάστασης με προσθήκη 10ppb Zn τα επίπεδα Zn στους νεφρούς αυξάνονται, σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ($p=0,00-0,05$)(Πιν.63) από των αρσενικών, ενώ στα αρσενικά της ομάδας αυτής η συγκέντρωση του Zn μειώνεται σημαντικά ($p=0,01$)(Πιν.62) σε όλες τις συνθήκες αποκατάστασης.

Η είσοδος και η ενδοκυττάρια κατανομή Zn και Cd αλληλοεπηρεάζεται από την κοινή τους παρουσία. Για παράδειγμα, προ-έκθεση κυττάρων σε Cd αυξάνει την πρόσληψη Zn, ενώ προχορήγηση Zn *in vitro* μειώνει τη συσσώρευση ενδοκυττάρια Cd (Szuster-Ciesielska, 2000). Εξάλλου σε μελέτες πρόσληψης και τοξικότητας του Cd σε κυτταρικές σειρές εμβρυϊκών ινοβλαστών επίμυος (REF) και ανθρώπινων ινοβλαστών δέρματος (HFW), η προσαρμογή με Zn μείωνε την τοξικότητα του Cd χωρίς να αλλάζει όμως τη σχετική τους ευαισθησία στο μέταλλο (Lin, 1995).

Στους νεφρούς των Carassius η απομάκρυνση των πειραματοζώων από το επιβαρυνμένο με την υψηλότερη



συγκέντρωση Cd:5ppb νερό επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στα δύο φύλα, ενώ η προσθήκη Zn αντίθετα προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση του ιστού από το Cd.

3. Ήπαρ

Η συγκέντρωση Cd στο ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.64), εμφανίζεται σχετικά σταθερή όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn**. Στα νεαρά θηλυκά της ομάδας αυτής η συγκέντρωση του Cd στο ήπαρ εμφανίζεται επίσης σχετικά σταθερή (Γραφ.65).

Η συγκέντρωση Cd στο ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για ακόμη 60 ημέρες, παρουσιάζει **σημαντική μείωση** ($p=0,02$)(Πιν.64), σε σχέση με την συγκέντρωση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες, αλλά και σε σχέση με την αποκατάσταση με 10ppb Zn ($p=0,01$)(Πιν.64) και για τα δύο φύλα. Η συγκέντρωση Cd στο ήπαρ των ιχθύων όταν μεταφέρθηκαν σε νερό συγκέντρωσης **10ppb Zn, αυξάνεται** μέχρι τη μέγιστη τιμή του, ενισχύοντας την πιθανότητα ο Zn να ευνοεί την είσοδο Cd στο ήπαρ και στα δύο φύλα (Γραφ.65).

Πάντως η συγκέντρωση Cd στο ήπαρ είναι σημαντικά υψηλότερη ($p=0,00-0,05$)(Πιν.64,65) στους ιχθύς που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, καθώς και το ήπαρ αποτελεί σημαντική θέση αποτοξικοποίησης των μετάλλων.

Κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των δύο μετάλλων καδμίου και ψευδαργύρου στο ήπαρ, τα βράγχια και τους μύες στην τιλάπια (*Tilapia nilotica*) παρατηρήθηκε ότι η συσσώρευση του καδμίου σε όλους τους ιστούς μειώθηκε κατόπιν συνδυασμένης έκθεσης και στα δύο μέταλλα (με αναλογία μετάλλων 1:10), συγκριτικά με την έκθεση μόνο σε κάδμιο (0,1-1 ppm), με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου να εμφανίζονται στο ήπαρ, μετά στα βράγχια και τους μύες. Αντίθετα η συσσώρευση Zn αυξήθηκε κατόπιν συνδυασμένης έκθεσης και στα δύο μέταλλα, με αναλογία μετάλλων 1:10, συγκριτικά με την έκθεση μόνο σε Zn (1-10 ppm), με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου να εμφανίζονται στα βράγχια και τις χαμηλότερες στους μύες. Σημαντική απομάκρυνση του καδμίου όπως και του ψευδαργύρου γινόταν στα βράγχια, ενώ η απομάκρυνση στο ήπαρ γινόταν μόνον κατόπιν της συνδυασμένης έκθεσης και στα δύο μέταλλα (Kargin, 1999).

Η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.64) **αυξάνεται** προοδευτικά, ενώ κατόπιν μεταφοράς ιχθύων της ίδιας ομάδας σε νερό με **προσθήκη 1ppb**



Zn, αυξάνεται στη μέγιστη τιμή του, γεγονός που ισχύει και για τα νεαρά θηλυκά της ομάδας αυτής (Γραφ.66, Πιν.66).

Η συγκέντρωση ηπατικού Zn των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.64), εμφανίζεται σχεδόν σταθερή, με τάση μείωσης όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 10ppb Zn**, γεγονός που ισχύει και στα δύο φύλα (Γραφ.66, Πιν.66). Πάντως σε όλες τις συνθήκες η συγκέντρωση Zn στο ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση Cd (5ppb) είναι σε χαμηλότερα επίπεδα ($p=0,02$)(Πιν.64) από των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση Cd (1ppb), ενώ η συγκέντρωση των δύο μετάλλων στο ήπαρ δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο φύλων σε καμία από τις συνθήκες αποκατάστασης (Πιν.68).

Στα θηλυκά της οικογένειας *Holocentridae* η συσσώρευση του Zn στο ήπαρ και στις γονάδες βρέθηκε υψηλότερη απ' ό τι στα αρσενικά και η διατήρηση αυτών των υψηλών συγκεντρώσεων δε φάνηκε να εξαρτάται από τη διατροφή τους, αλλά από μεγαλύτερη ικανότητα μεταφοράς Zn μέσα από τις μεμβράνες των ηπατοκυττάρων των θηλυκών. Μάλιστα η ταχεία είσοδος του μετάλλου, μέσω παθητικής διάχυσης πιθανώς διαμέσου ενός καναλιού ιόντων, φάνηκε ότι δεν υπόκειται σε κορεσμό. Επειδή το πλάσμα των ιχθύων διαθέτει περίπου δεκαπλάσιο Zn από των θηλαστικών, ο μηχανισμός εισόδου του μετάλλου στα ηπατοκύτταρα πρέπει να είναι οδός χαμηλής συγγένειας-υψηλής φέρουσας ικανότητας, ενώ στα ηπατοκύτταρα ποικίλου είδους είναι υψηλής συγγένειας. Αντίθετα η έξοδος του μετάλλου φάνηκε να εξαρτάται από μία κλίση συγκέντρωσης και ότι υπόκειται σε κορεσμό, ενώ μπορεί να υποβοηθάται από κάποια πρωτεΐνη-μεταφορέα (Hogstrand, 1996).

Σε πρόσφατες μελέτες χημικής και βιολογικής παρακολούθησης της λίμνης Παμβώτιδας Ιωαννίνων παρατηρήθηκε ότι η συσσώρευση των μετάλλων σε όλα τα είδη ιχθύων υπό μελέτη (κ. κυπρίνο *Cyprinus carpio*, γλήνι *Tinca tinca*, δρομίτσα *Rutilus rutilus rubilio* και επιπλέον σε γλανιδία *Silurus aristotelis*, χρυσόψαρα *Carassius auratus* και πεταλούδες *Carassius auratus gibelio*) ακολουθούσε το σχήμα ήπαρ>γονάδες>μυς με το ήπαρ να αποτελεί το κύριο όργανο αποτοξικοποίησης από ξеноβιοτικές ουσίες, αλλά και βιομετατροπής ή σύνθεσης μεταλλοπρωτεϊνών, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των μετάλλων και στην προστασία έναντι της τοξικότητάς τους, όπως οι μεταλλοθειονίνες MT (Papagiannis, 2004).

Στο ήπαρ των *Carassius* η απομάκρυνση των πειραματοζών από το επιβαρημένο με υψηλότερη συγκέντρωση Cd νερό επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στα δύο φύλα, ενώ η προσθήκη Zn αντίθετα προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση του ιστού από το Cd.



4. Ηπατοσωματικός Δείκτης

Ο Ηπατοσωματικός Δείκτης LSI, στα νεαρά θηλυκά που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.67), όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn** δείχνει προοδευτική μείωση.

Στα θηλυκά που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.67), το μέγεθος του ήπατος εμφανίζει μία σχετική σταθερότητα συνεχώς, όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 10ppb Zn**. Τα αρσενικά της ίδιας ομάδας παρουσιάζουν εμφανή μείωση του ηπατικού δείκτη αύξησης όταν **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης, ενώ** όταν **μεταφέρθηκαν σε νερό με προσθήκη 10ppb Zn** το σχετικό μέγεθος του ήπατος αυξάνει. Παρόλα αυτά δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στον δείκτη LSI σε καμία από τις ομάδες στα αρσενικά ή τα θηλυκά ψάρια (Πιν.67-68).

Συχνά τα ψάρια μειώνουν σημαντικά την κατανάλωση τροφής όταν βρίσκονται σε στρες από ρύπανση, έτσι η μείωση του ηπατοσωματικού δείκτη που παρατηρείται σε ιχθύς από επιβαρημένα περιβάλλοντα (Banks, 1999) μπορεί να οφείλεται σε αυτό το γεγονός και όχι σε άμεση δράση του ρυπαντή. Επίσης, υπό φυσιολογικές συνθήκες η μείωση του μεγέθους του ήπατος προέρχεται από την κινητοποίηση των ενεργειακών αποθεμάτων του για την αύξηση των γονάδων κατά την περίοδο της αναπαραγωγικής ωρίμανσης.

Τα θηλυκά της ομάδας που εκτέθηκε σε **Cd 1ppb** εμφανίζουν προοδευτική μείωση του LSI στις συνθήκες αποκατάστασης γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει αποκατάσταση της αναπαραγωγικής ωρίμανσης.

5. Μυϊκός ιστός

Η συγκέντρωση Cd στους μύες των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.68), παρουσιάζει σημαντική μείωση ($p=0,05$)(Πιν.69) όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn**.

Η συγκέντρωση Cd στους μύες των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για ακόμη 60 ημέρες, παρουσιάζει **σημαντική μείωση** ($p=0,02$)(Πιν.69), σε σχέση με την συγκέντρωση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες, όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 10ppb Zn**. ($p=0,02$)(Πιν.69). Πάντως είναι εμφανές το γεγονός ότι η



συγκέντρωση Cd στους μύες μειώνεται κατόπιν των συνθηκών αποκατάστασης και για τις δύο ομάδες που εκτέθηκαν σε Cd.

Η συγκέντρωση Zn στους μύες των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.68) **μειώνεται** προοδευτικά και κατόπιν μεταφοράς ιχθύων της ίδιας ομάδας σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn**.

Η συγκέντρωση Zn στους μύες των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.68) αυξάνεται, με τάση μείωσης όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 10ppb Zn**. Πάντως σε όλες τις συνθήκες στις 120 ημέρες ο Zn στους μύες των ιχθύων της ομάδας υψηλής δόσης Cd είναι σε υψηλότερα επίπεδα από της ομάδας χαμηλής δόσης Cd.

Στον μυϊκό ιστό των *Carassius* η απομάκρυνση των πειραματοζώων από το επιβαρημένο με Cd νερό καθώς και η προσθήκη Zn επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο.

6. Γονάδες

α. Θηλυκά άτομα

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι στην ομάδα των ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn** η αναστολή της έκκρισης της E_2 που παρατηρείται στην ομάδα αυτή μετά την 14^η ημέρα έκθεσης καθώς και η αναστολή της αύξησης του GSI, δεν αποκαθίστανται σε καμία από τις παραπάνω συνθήκες (Γραφ.71,72). Επομένως οι λειτουργικές επιπτώσεις της έκθεσης σε μικρές συγκεντρώσεις Cd στην ομάδα αυτή είναι τόσο σοβαρές, ώστε ακόμα και στις συνθήκες αποκατάστασης δεν μπορεί να ανατραπεί η ενδοκρινής διαταραχή τους. Πάντως ο δείκτης αύξησης των γονάδων είναι σημαντικά αυξημένος ($p=0,04$)(Πιν.75) κατά τη μεταφορά σε νερό με Zn σε σχέση με τη μεταφορά σε νερό βρύσης.

Στην ομάδα των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** παρατηρείται παράλληλη μείωση της E_2 και του GSI σε σχέση με τη χαρακτηριστική αιχμή των τιμών της E_2 στις 120 ημέρες που υποδηλώνει την ωοθηκική ωρίμανση (Γραφ. 71,72). Όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 10ppb Zn** παρατηρείται παράλληλη αύξηση της E_2 και του GSI και μάλιστα κορύφωση της αύξησης των γονάδων στα θηλυκά, υποδηλώνοντας τη μέγιστη ωοθηκική αύξηση και ωρίμανση (Γραφ.72).



Ο ψευδάργυρος είναι ένα στοιχείο απαραίτητο για τη λειτουργία των ορμονών της αναπαραγωγής. Κατόπιν χρόνιας χορήγησης Zn σε γυναίκες, τα επίπεδα προλακτίνης και οιστραδιόλης στον ορό μειώθηκαν σημαντικά, ενώ οι συγκεντρώσεις LH και FSH αυξήθηκαν. Παράλληλα τα επίπεδα τεστοστερόνης στους άνδρες μειώθηκαν ενώ η LH αυξήθηκε πιθανώς λόγω της μείωσης της προλακτίνης. Η μείωση της οιστραδιόλης θα μπορούσε να προκαλεί την αύξηση της FSH και πιθανώς οφείλεται σε μείωση της σύνθεσής της ή σε αναστολή των ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση των στεροειδών (Rezvanipour, 2003).

Το Cd μπλοκάρει τη δέσμευση της οιστραδιόλης στον υποδοχέα της ER-α και ενεργοποιεί τον υποδοχέα μέσω αλληλεπίδρασης με τη θέση δέσμευσης της ορμόνης, στην οποία δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια (Henson, 2004). Κατά τον ίδιο τρόπο δρα το ασβέστιο, ενώ έχει βρεθεί επίσης αλληλεπίδραση του καδμίου με τις κυστεΐνες στη θέση σύνδεσης με την ορμόνη του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, που παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποδοχέα με τη δεξαμεθαζόνη (Stoica, 2000). Η παρέμβαση του Cd μπορεί να αφορά απευθείας επίδραση στη μεταγραφή του γονιδίου, καθώς το Cd μπορεί να υποκαταστήσει τον Zn στις δομές δακτύλου Zn του υποδοχέα ER-α παρεμβαίνοντας στη δέσμευση της περιοχής C (δέσμευσης με το DNA) με ένα μεταθετό στοιχείο οιστρογόνων (ERE) (Predki, 1992). Δηλαδή, να αφορά ανταγωνισμό των δύο μετάλλων για θέσεις στον υποδοχέα. Ενδέχεται επίσης να γίνεται και μετα-μεταγραφική ρύθμιση με τη μεσολάβηση του ορμονικού υποδοχέα ER ή να υφίσταται άλλη δυσλειτουργία πάνω σε ψευδάργυρο-πρωτεΐνες όπως ένζυμα που καταλύουν κρίσιμα μεταβολικά μονοπάτια.

Η αναστολή της δραστηριότητας του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) μπορεί να μην οφείλεται απαραίτητα σε αναστολή σύνδεσης της οιστραδιόλης στον υποδοχέα ή στον ανταγωνισμό με άλλα δισθενή μέταλλα, όπως Ca, Mg, Zn, και διαταραχή γενικών κυτταρικών μηχανισμών που σχετίζονται έμμεσα με την απόκριση της οιστραδιόλης και στους οποίους παρεμβάλλονται ιόντα. Ενδέχεται να σχετίζεται ακόμη με αλλαγή των ιδιοτήτων σύνδεσης του υποδοχέα με το DNA, αναστέλλοντας έτσι τη σύνδεσή του με ειδικές αλληλουχίες στο DNA. Στην περίπτωση αυτή τα ιόντα Zn ενισχύουν τη σύνδεση (Le Guevel, 2000).

Οι **μεταβολές των LSI και GSI** στην ομάδα που εκτέθηκε σε **1ppb Cd** επί 60 ημέρες και κατόπιν στις συνθήκες αποκατάστασης για 60 ημέρες ακόμη, εμφανίζονται παράλληλες με μία μικρή σταθερή μείωση του LSI, ενώ ο GSI αντίστοιχα εμφανίζει μικρή αύξηση σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn** (Γραφ.80). Στην ομάδα που εκτέθηκε σε **5ppb Cd**, ο LSI στις συνθήκες αποκατάστασης εμφανίζει τιμές και μεταβολές ανάλογες της προηγούμενης ομάδας, ο GSI όμως αυξάνεται σημαντικά και σταθερά σε νερό με **προσθήκη 10ppb Zn** (Γραφ.67,72,80). Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στο μέγεθος του ήπατος (LSI) και των γονάδων (GSI), σχετίζονται με την μεταβολική δραστηριότητα προς σύνθεση VTG και την ακόλουθη αύξηση των ωοθηκών, που παρατηρείται στον αναπαραγωγικό κύκλο. Στα θηλυκά γατόψαρα, για παράδειγμα, το σύνολο του ηπατικού



ψευδαργύρου μειώνεται κατά την ταχεία βιτελλογενική αύξηση των ωοκύτταρων, αλλά αυξάνεται ξανά μετά την ωοτοκία. Το σύνολο του ψευδαργύρου στις ωοθήκες αυξάνεται με την αύξηση του GSI, αλλά μειώνεται μετά την ωοτοκία. Επομένως γίνεται ομοιοστατική ρύθμιση του ηπατικού ψευδαργύρου από τη μεταλλοθειονίνη κατά την εξωγενή βιτελλογένεση και μία παρόμοια λειτουργία από την ωοθηκική πρωτεΐνη (την ομοιάζουσα με την MT) κατά την ανάπτυξη των ωοκυττάρων στα θηλυκά γατόψαρα (Banks, 1999).

Συμπεραίνεται ότι οι μικρές συγκεντρώσεις Cd φαίνεται να μεταβάλλουν την σχέση E_2 , LSI και GSI προκαλώντας τέτοια απορύθμιση στην ανάπτυξη των γονάδων στα θηλυκά άτομα ώστε ακόμα και στις συνθήκες αποκατάστασης δεν μπορεί να ανατραπεί η ενδοκρινής διαταραχή.

Η συγκέντρωση **Cd στις γονάδες των θηλυκών** ιχθύων που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.69), παρουσιάζει μείωση, ενώ όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn** η συγκέντρωση είναι σημαντικά υψηλότερη τόσο από αυτήν στις 120 ημέρες έκθεσης με Cd ($p=0,03$)(Πιν.70), όσο και μετά από την μεταφορά των ιχθύων σε νερό βρύσης ($p=0,00$)(Πιν.70).

Η συγκέντρωση **Cd στις γονάδες των θηλυκών** που εκτέθηκαν σε **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για ακόμη 60 ημέρες, παρουσιάζει **σημαντική μείωση** ($p=0,02$)(Πιν.70), σε σχέση με την συγκέντρωση κατόπιν έκθεσης σε Cd επί 120 ημέρες, όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 10ppb Zn** ($p=0,02$)(Πιν.70). Πάντως η συγκέντρωση Cd στις συνθήκες αποκατάστασης είναι υψηλότερη στις γονάδες των θηλυκών της ομάδας χαμηλής δόσης από ότι στα θηλυκά της ομάδας υψηλής δόσης, υποδηλώνοντας ότι η έκθεση σε μικρές συγκεντρώσεις Cd επηρεάζει περισσότερο τη συγκέντρωση Cd στις γονάδες των θηλυκών.

Και σε άλλες περιπτώσεις, η παρουσία Zn *in vitro* δεν φαίνεται να επηρεάζει την πρόσληψη του Cd, μειώνει όμως την τοξικότητά του, η οποία δεν εξαρτάται από την ποσότητα που απορροφάται στα κύτταρα, αλλά καθορίζεται από άλλους συμπαράγοντες όπως τον Cu (Meshitsuka, 1987).

Η συγκέντρωση **Zn στις γονάδες των νεαρών θηλυκών** που εκτέθηκαν σε χαμηλή δόση **Cd (1ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες** (Γραφ.70), παρουσιάζει μείωση, όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 1ppb Zn**. Παράλληλα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση Zn στις γονάδες στις συνθήκες αποκατάστασης εμφανίστηκε και αντίστοιχη μείωση του μεγέθους των γονάδων (Γραφ.75). Η συγκέντρωση **Zn στις γονάδες των θηλυκών** που εκτέθηκαν σε **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για ακόμη 60 ημέρες, κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα (Πιν.71) όπως στην περίπτωση που ψάρια της



ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με προσθήκη **10ppb Zn**. Πάντως σχεδόν σε όλες τις συνθήκες, η συγκέντρωση του **Zn στις γονάδες** στα θηλυκά, είναι σημαντικά υψηλότερη από των αρσενικών γεγονός που πιθανά σχετίζεται με τη βιτελλογενίνη κυρίως, αλλά και τους υποδοχείς των οιστρογόνων και τον ρόλο του Zn στην ανάπτυξη των γονάδων (Πιν.72).

Εξάλλου και το σελήνιο, ένα απαραίτητο μέταλλο στη διαίτα των ψαριών σε μικρές ποσότητες και τοξικό σε συγκεντρώσεις ελαφρώς υψηλότερες από τις θεραπευτικές απαιτήσεις, απαντάται σε υψηλότερα επίπεδα στις ωοθήκες απ' ότι στους όρχεις και η διαφορά αυτή μεταξύ των φύλων προκύπτει, καθώς η βιτελλογένεση λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, όπου γίνεται και η απορρόφηση του σεληνίου και ακολουθεί μετέπειτα η ενσωμάτωσή του με τα λεκιθικά κοκκία των αναπτυσσόμενων ωοκυττάρων κατά τη γαμετογένεση (Mauk, 2001).

Οι διακυμάνσεις, συναρτήσει του χρόνου, των **επιπέδων των μετάλλων στις γονάδες και της E₂** στον ορό, δείχνουν ότι στην ομάδα που εκτέθηκε σε **1 ppb Cd**, το Cd στις συνθήκες αποκατάστασης κατόπιν προσθήκης 1ppb Zn εμφανίζει αύξηση, ενώ η E₂ εμφανίζει ακόμη μεγαλύτερη μείωση, όπως και η συγκέντρωση Zn και το μέγεθος των γονάδων. Στην ομάδα που εκτέθηκε σε **5 ppb Cd**, το Cd εμφανίζει απότομη πτώση κατόπιν μεταφοράς των ιχθύων σε νερό βρύσης όπως και η E₂, και απότομη άνοδο κατόπιν προσθήκης 10ppb Zn, ανάλογα μεταβάλλεται και το μέγεθος των γονάδων, ενώ δεν παρουσιάζεται διακύμανση του Zn, στις συνθήκες αποκατάστασης (Γραφ.75,78).

Το Cd, σε συγκεντρώσεις 1ppb και 5ppb, προκαλεί τέτοιες μεταβολές στα επίπεδα των E₂ και Zn στις γονάδες των θηλυκών *Carassius*, ώστε η απομάκρυνση των ατόμων από το επιβαρυνόμενο με Cd νερό ενώ επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο, δεν αποκαθιστά τη διαταραχή του κύκλου της αναπαραγωγικής ωρίμανσης. Η προσθήκη Zn αντίθετα, ενώ προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση του ιστού από Cd αποκαθιστά εν μέρει τα επίπεδα των E₂ και GSI.

Τα ιστολογικά ευρήματα από τις γονάδες ενισχύουν και επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα ευρήματα στα θηλυκά πειραματόζωα.

Η ομάδα III που εκτέθηκε σε **Cd 1ppb** εμφανίζει στις 120 ημέρες, μαζί με πρώιμα βιτελλογενικά ωοκύτταρα (F₂) και ανώριμα ωοκύτταρα (εικ.52-53). Κατά την μεταφορά των θηλυκών σε νερό βρύσης, η ίδια ομάδα εμφανίζει δευτερογενή βιτελλογενικά ωοκύτταρα σε διάφορα στάδια ωρίμανσης (F_{3a-b}) (εικ.54), ενώ κατά τη μεταφορά των θηλυκών σε νερό με **1ppb Zn** μαζί με ώριμα ωοκύτταρα (F₄) εμφανίζονται και ατρησιακά ωοκύτταρα (εικ.55).

Η ομάδα IV που εκτέθηκε σε **Cd 5ppb** εμφανίζει στις 120 ημέρες μαζί με ώριμα ωοκύτταρα (F₄) και ατρησιακά ωοκύτταρα (εικ.56-57). Κατά την μεταφορά των θηλυκών σε νερό βρύσης, η ίδια ομάδα εμφανίζει προχωρημένα δευτερογενή βιτελλογενικά ωοκύτταρα (F_{3b}) με μετακίνηση



πυρήνα (εικ.58), ενώ κατά τη μεταφορά των θηλυκών **σε νερό με 10ppb Zn** μαζί με ώριμα ωοκύτταρα (F4) εμφανίζονται και ατρησιακά ωοκύτταρα (εικ.59-60).

Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνουν τα προηγηθέντα συμπεράσματα σχετικά με τους δείκτες ανάπτυξης, την E_2 και τα επίπεδα Cd και Zn στις γονάδες των θηλυκών ατόμων *Carassius*.

Συμπεραίνεται ότι

α) Θηλυκά άτομα *Carassius* που απομακρύνονται από το επιβαρυνόμενο με Cd νερό είναι δυνατόν να εμφανίσουν καθήλωση σε πρώιμα στάδια των περισσότερων ωοκυττάρων με αποτέλεσμα χαμηλό ρυθμό εξέλιξης του αναπαραγωγικού κύκλου

β) Θηλυκά άτομα *Carassius* που μεταφέρονται σε νερό κατόπιν προσθήκης Zn είναι δυνατόν να εμφανίσουν καθυστέρηση και όψιμη ωρίμανση των περισσότερων ωοκυττάρων.

2. Αρσενικά άτομα

Στη σύγχρονη οικοτοξικολογία τα ψάρια έχουν γίνει το κύριο μοντέλο σπονδυλοζώων. Όταν τα υδατικά οικοσυστήματα επιβαρύνονται με οργανικούς ή ανόργανους ρυπαντές, τα ψάρια επίσης θα επιβαρυνθούν σε σημαντικό βαθμό. Πάντως η αναπαραγωγή έχει τόσα πολλά στάδια που υπάρχουν πάρα πολλά σημεία όπου ένας ρυπαντής θα μπορούσε να έχει επίδραση, ώστε η αναγνώριση κάποιου μηχανισμού να είναι πράγματι επίπονη διαδικασία.

Στα **αρσενικά** που εκτέθηκαν σε **Cd (5ppb)** επί 60 ημέρες και στη συνέχεια **μεταφέρθηκαν σε νερό βρύσης για άλλες 60 ημέρες**, όπως και όταν ψάρια της ίδιας ομάδας μεταφέρθηκαν σε νερό με **προσθήκη 10ppb Zn**, παρατηρούνται ιδιαίτερα χαμηλές τιμές E_2 (Γραφ.71) καθώς και GSI (Γραφ.72). Η E_2 μάλιστα στις συνθήκες αποκατάστασης εμφανίζει σταθερή πτώση σε σχέση με τα επίπεδα της 120^{ης} ημέρας, ενώ ο **GSI** αυξάνεται ελαφρά κατά την αποκατάσταση σε νερό βρύσης (Γραφ. 76).

Στις γονάδες των αρσενικών η συγκέντρωση του **Cd** είναι γενικά χαμηλή, με εξαίρεση τη συνθήκη αποκατάστασης των ιχθύων με προσθήκη Zn (Γραφ.69), οπότε στα νεαρά αρσενικά που εκτέθηκαν σε Cd (5ppb) εμφανίζεται σημαντικά υψηλότερη τιμή ($p=0,00$)(Πιν.70) και μάλιστα σε επίπεδα πολύ υψηλότερα από των θηλυκών της αντίστοιχης ομάδας. Πάντως αυτές οι διαφορές δεν είναι σημαντικές (Πιν.72). Στην ίδια συνθήκη παρατηρείται ταυτόχρονα η χαμηλότερη τιμή GSI (Γραφ.75), ενώ όσον αφορά τη σχέση **GSI** και συγκέντρωσης **Cd** στις γονάδες των αρσενικών, μια γενική παρατήρηση είναι ότι ο GSI μειώνεται, ενώ το Cd αυξάνει (Γραφ.78), και η οιστραδιόλη ορού παραμένει σταθερά χαμηλή (Γραφ.75).

Στα αρσενικά που εκτέθηκαν σε υψηλή δόση Cd (5ppb) το μέγεθος του ήπατος μειώνεται σε όλες τις συνθήκες αποκατάστασης, ενώ η μεταβολή του είναι συνεχώς αντιστρόφως ανάλογη με την αύξηση των γονάδων (Γραφ.80).



Εξάλλου κατόπιν έκθεσης σε σελήνιο, παρατηρήθηκε αντίστροφη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του μετάλλου στις γονάδες και του GSI στα αρσενικά, ενώ και στα δύο φύλα η συγκέντρωση του μετάλλου στο ήπαρ και ο LSI συσχετιζονταν αντίστροφα (Mauk, 2001).

Στις γονάδες των αρσενικών η συγκέντρωση **Zn** είναι σε σταθερά χαμηλά επίπεδα σε όλες τις συνθήκες αποκατάστασης, μάλιστα σημαντικά μικρότερη από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα θηλυκά της ίδιας ομάδας ($p=0,00-0,01$) (Γραφ.70, Πιν. 72), ώστε γενικά τα αρσενικά φαίνεται να μην κάνουν ειδική συγκέντρωση Zn στις γονάδες, με πιθανές επιπτώσεις στη σπερματογένεση και την εξέλιξη των γονάδων.

Επιδημιολογικές μελέτες των τελευταίων ετών έχουν ταυτοποιήσει πολλούς διαφορετικούς ισότυπους καναλιών ασβεστίου (Ca^{2+}) στους ανθρώπινους όρχεις και στα σπερματοζώαρια, όπου τα κανάλια αυτά συμμετέχουν στα πρώιμα γεγονότα των αντιδράσεων του ακροσώματος, προσφέροντας επίσης ένα μονοπάτι εισόδου για τοξικά μέταλλα στα ώριμα σπερματοζώαρια. Πιο συγκεκριμένα τα κανάλια Ca^{2+} εμφανίζονται ευάλωτα στην έκθεση σε Cd^{2+} (Benoff, 2000). Το Cd^{2+} εισέρχεται εύκολα στα κύτταρα μέσω των L-τύπου καναλιών Ca^{2+} και των υποδοχέων που μεσολαβούν, επειδή και τα δύο κατιόνια έχουν παρόμοιο μέγεθος ακτίνας και φορτίο ($Ca^{2+}=0,97 \text{ \AA}$ $Cd^{2+}=0,99 \text{ \AA}$). Το Cd^{2+} υποκαθιστά το Ca^{2+} στην κανονική του δέσμευση στην καλμοδουλίνη (που ενεργοποιεί αρκετά ένζυμα των μονοπατιών του δευτερογενούς μηνύματος) και την πρωτεϊνική κινάση-C (PKC, μία οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης, που ενεργοποιείται από το Ca^{2+} και τα φωσφολιπίδια). Συγκεντρώσεις μεταξύ 0,1-5 μ M Cd^{2+} παρεμβαίνουν στις αντλίες Ca^{2+} -ATPάσης, οπότε αυξάνεται άμεσα το ενδοκυττάριο Ca^{2+} , σχηματίζεται τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP), που εκκινεί τον καταρράκτη του σήματος των κινασών PKC. Έτσι οι χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να μιμούνται τις δράσεις του Ca^{2+} , επάγοντας το μονοπάτι της στεροειδογένεσης και σύνθεσης προγεστερόνης (Henson, 2004). Ακόμη η έκθεση σε κάδμιο προκαλεί αποπολυμερισμό των ινιδίων ακτίνης και μία καθαρή μείωση της μονομερούς πρωτεΐνης της ακτίνης. Στα σωματικά κύτταρα η απώλεια της ακτίνης αυξάνει την απόπτωση, γεγονός που παρατηρήθηκε και στους ιστούς όρχεων πειραματοζώων μετά από χορήγηση καδμίου (Benoff, 2000).

Συμπεραίνεται ότι

α) αρσενικά άτομα *Carassius* που εκτίθενται σε συγκεντρώσεις Cd: 1ppb και 5ppb, εμφανίζουν πτώση της 17 β -οιστραδιόλης κατόπιν απομάκρυνσης από το επιβαρυνμένο με Cd νερό ή προσθήκης Zn κατά την περίοδο ωρίμανσης των σπερμογονίων με πιθανή επίπτωση στην εξέλιξη τους και

β) στις γονάδες των αρσενικών η προσθήκη Zn προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση των γονάδων από το Cd, μείωση του μεγέθους τους (GSI), ο δε Zn δεν εμφανίζει ειδική συγκέντρωση, με πιθανές επιπτώσεις στη σπερματογένεση και την εξέλιξή τους.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τοξικότητα Cd ;

In vitro

1. Η βραχεία έκθεση (6 και 24 ώρες) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις Cd (0,1 και 1 μ M) πιθανά να καθιστά τα κύτταρα 3T3 ζωτικότερα καθώς παρατηρείται μια επαγόμενη από το μέταλλο αύξηση της βιωσιμότητάς τους, ενώ η κυτταρική σειρά MRC-5 είναι γενικά ανθεκτικότερη στην έκθεση σε Cd, πιθανόν λόγω προστατευτικών μηχανισμών που οφείλονται στη διαφορετική καταγωγή των κυττάρων αυτών.

2. Τα κύτταρα MRC-5 αυξάνονται καλύτερα παρουσία 0,1 μ M Cd, ενώ τα 3T3 καλύτερα παρουσία 1 μ M Cd πιθανόν λόγω της διαφορετικής καταγωγής των κυττάρων αυτών. Η έκθεση ακόμη και για 24 ώρες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd (100 μ M) αναστέλλει πλήρως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις δύο κυτταρικές σειρές.

3. Στα κύτταρα MRC-5 παρατηρείται υψηλότερη εξωκυττάρια συγκέντρωση Cd από αυτήν των κυττάρων 3T3, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή έξοδο του μετάλλου και το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με την αυξημένη βιωσιμότητα των MRC-5.

In vivo

4. Έκθεση του *C. auratus* σε συγκεντρώσεις Cd 1-5 ppb προκαλεί σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου στα βράγχια μέχρι την 60^η ημέρα έκθεσης και πιθανότατα η παρουσία του ανταγωνίζεται την πρόσληψη του Zn από τον ιστό.

5. Τα επίπεδα Cd στους νεφρούς και το ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd αυξάνουν σημαντικά συναρτήσει του χρόνου έκθεσης ιδιαίτερα μετά τις 45 ημέρες. Στα ώριμα άτομα δε, τα επίπεδα Cd στο ήπαρ και τους νεφρούς είναι σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με των νεαρότερων, λόγω της μεγαλύτερης διάρκειας έκθεσης των ατόμων στα μέταλλα.

6. Η συγκέντρωση Zn στους νεφρούς όλων των ομάδων μετά τις 60 ημέρες εμφανίζει αύξηση, στατιστικά μη σημαντική, ενώ στο ήπαρ εμφανίζεται σημαντικά υψηλότερη στις 60 ημέρες, περίοδο αναμενόμενης ωοτοκίας, οπότε ο ηπατικός Zn συμμετέχει στη βιτελλογένεση και την ωρίμανση των γονάδων, στα θηλυκά άτομα της ομάδας ελέγχου και της ομάδας που εκτέθηκε στην υψηλή συγκέντρωση Cd.



7. Η ομάδα που εκτέθηκε σε Cd 1ppb εμφανίζει αύξηση του σχετικού μεγέθους του ήπατος (LSI) περί την 60η ημέρα, γεγονός που υποσημαίνει καθυστέρηση ή/και διαταραχή της ανάπτυξης και ειδικότερα της αναπαραγωγικής ωρίμανσης.

8. Η βαρύτητα των ηπατοκυτταρικών βλαβών κατά τις διάφορες χρονικές περιόδους έκθεσης των πειραματοζώων σε Cd ακολουθεί σε γενικές γραμμές την παρακάτω σειρά: Ομάδα-1ppb Cd > Ομάδα-5 ppb Cd > Ομάδα λίμνης-0.05 ppb Cd > Ομάδα ελέγχου-0.1 ppb Cd.

9. Ο μυϊκός ιστός, συγκριτικά με τους άλλους ιστούς, εμφανίζει τις μικρότερες συγκεντρώσεις Cd και Zn, δηλ. δεν φαίνεται να αποτελεί ιστό-στόχο του μετάλλου.

Ευδοκρινής διαταράκτης το Cd ;

10. Το Cd φαίνεται να μεταβάλλει την σχέση οιστραδιόλης (E_2), ηπατικής αύξησης (LSI) και αύξησης των γονάδων (GSI) προκαλώντας απορύθμιση στην ανάπτυξη των γονάδων στα θηλυκά άτομα *Carassius*. Σε συγκεντρώσεις 1ppb και 5ppb, το Cd προκαλεί μεταβολές στο χρονοδιάγραμμα έκκρισης και τα επίπεδα των E_2 και Zn στις γονάδες των θηλυκών ατόμων, διαταράσσοντας τον κύκλο της αναπαραγωγικής ωρίμανσης. Η διαταραχή που προκαλείται από το 1ppb Cd, οπότε τα θηλυκά είναι δυνατόν να εμφανίσουν πρώιμη ωοθηκική ωρίμανση φαίνεται να είναι σοβαρότερη των 5ppb οπότε τα θηλυκά είναι δυνατόν να εμφανίσουν καθυστέρηση και όψιμη ωρίμανση.

11. Η ανάπτυξη στο νερό της λίμνης φαίνεται να προκαλεί καθήλωση σε πρώιμα στάδια των περισσότερων ωοκυττάρων με αποτέλεσμα να διατηρείται ο ρυθμός εξέλιξης του αναπαραγωγικού κύκλου αλλά σε χαμηλά επίπεδα, πιθανότατα λόγω της παρουσίας στο νερό και άλλων ουσιών με δράση ενδοκρινικού διαταράκτη.

12. Αρσενικά άτομα *Carassius* που εκτίθενται σε συγκεντρώσεις Cd 1ppb και 5ppb, εμφανίζουν άνοδο της 17β-οιστραδιόλης την περίοδο ωρίμανσης των σπερμογονίων με πιθανή επίπτωση ατελή ή/και θηλεοποιητική εξέλιξή τους. Παράλληλα ο GSI, σε όλες τις ομάδες και κλάσεις, παραμένει σχεδόν σταθερός, ενώ στις γονάδες το μεν Cd αυξάνει, ο δε Zn δεν εμφανίζει ειδική συγκέντρωση, με πιθανές επιπτώσεις στη σπερματογένεση και την εξέλιξή τους.



Αποκατάσταση των επιπτώσεων του Cd ;

Ιστοί

13. Στα βράγχια των *Carassius* η απομάκρυνση των πειραματοζώων από το επιβαρυμένο με Cd νερό επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο, ενώ η προσθήκη Zn αντίθετα προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση του ιστού από το Cd.

14. Στους νεφρούς και το ήπαρ των *Carassius* η απομάκρυνση των πειραματοζώων από το επιβαρυμένο με 5ppb Cd νερό επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στα δύο φύλα, ενώ η προσθήκη Zn αντίθετα προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση του ιστού από το Cd.

15. Στον μυϊκό ιστό των *Carassius* η απομάκρυνση των πειραματοζώων από το επιβαρυμένο με Cd νερό καθώς και η προσθήκη Zn επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο.

Ενδοκρινής διαταραχή

16. Τα θηλυκά της ομάδας που εκτέθηκε σε Cd 1ppb εμφανίζουν προοδευτική μείωση της ηπατικής αύξησης (LSI) στις συνθήκες αποκατάστασης γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει αποκατάσταση της αναπαραγωγικής ωρίμανσης. Βέβαια οι μικρές συγκεντρώσεις Cd φαίνεται να μεταβάλλουν την σχέση E_2 , LSI και GSI προκαλώντας τέτοια απορρύθμιση στην ανάπτυξη των γονάδων στα θηλυκά άτομα ώστε ακόμα και στις συνθήκες αποκατάστασης δεν φαίνεται να μπορεί να ανατραπεί η ενδοκρινής διαταραχή.

17. Το Cd, σε συγκεντρώσεις 1ppb και 5ppb, προκαλεί τέτοιες μεταβολές στα επίπεδα των E_2 και Zn στις γονάδες των θηλυκών *Carassius*, ώστε η απομάκρυνση των ατόμων από το επιβαρυμένο με Cd νερό ενώ επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο, δεν αποκαθιστά τη διαταραχή του κύκλου της αναπαραγωγικής ωρίμανσης. Η προσθήκη Zn αντίθετα, ενώ προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση του ιστού από Cd αποκαθιστά εν μέρει τα επίπεδα των E_2 και GSI.

18. Θηλυκά άτομα *Carassius* που απομακρύνονται από το επιβαρυμένο με Cd νερό είναι δυνατόν να εμφανίσουν καθήλωση σε πρώιμα στάδια των περισσότερων ωοκυττάρων με αποτέλεσμα χαμηλό ρυθμό εξέλιξης του αναπαραγωγικού κύκλου, ενώ θηλυκά που μεταφέρονται σε νερό κατόπιν προσθήκης Zn είναι δυνατόν να εμφανίσουν καθυστέρηση και όψιμη ωρίμανση των περισσότερων ωοκυττάρων.



19. Αρσενικά άτομα *Carassius* που εκτίθενται σε συγκεντρώσεις Cd 1ppb και 5ppb, εμφανίζουν πτώση της 17β-οιστραδιόλης κατόπιν απομάκρυνσης από το επιβαρυμένο με Cd νερό ή προσθήκης Zn κατά την περίοδο ωρίμανσης των σπερμογονίων με πιθανή επίπτωση στην εξέλιξη τους, ενώ η προσθήκη Zn προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση των γονάδων από το Cd, μείωση του μεγέθους τους (GSI), ο δε Zn δεν εμφανίζει ειδική συγκέντρωση, με πιθανές επιπτώσεις στη σπερματογένεση και την εξέλιξή τους.

Τελικά συμπεράσματα

1. Η τοξικότητα του Cd

α. *in vitro*, σε κυτταρικές σειρές 3T3 και MRC-5, φαίνεται να είναι σημαντική για επίπεδα έκθεσης στο μέταλλο μεγαλύτερα του 1μM. Οι συγκεντρώσεις ωστόσο 0.1-1μM φαίνεται να προκαλούν αύξηση της βιωσιμότητας και του πολλαπλασιασμού των κυτάρων

β. *in vivo*, σε πληθυσμούς *Carassius*, η έκθεση σε 1-5 ppb του μετάλλου προκαλεί χρόνο- και δόσο- εξαρτώμενη αύξηση των συγκεντρώσεων του σε όλους τους ιστούς πλην του μυϊκού. Η συγκέντρωση Cd 1ppb φαίνεται να είναι λειτουργικά και ιστολογικά η πλέον ηπατοτοξική.

2. Το Cd φαίνεται να έχει δράσεις ενδοκρινούς διαταράκτη.

Κατόπιν έκθεσης σε Cd 5ppb θηλυκών *Carassius*, η αναπαραγωγική ωρίμανση καθυστερεί, αλλά όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μετάλλου χρονικά φαίνεται ότι επάγονται προστατευτικοί μηχανισμοί, που αποκαθιστούν μερικά τις προκύπτουσες διαταραχές από τα μέταλλα.

Η ομάδα που εκτέθηκε σε Cd 1ppb φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά λειτουργικά, με αποτέλεσμα, υπό ορισμένες συνθήκες, οι μικρές συγκεντρώσεις να είναι αφ'ενός αρκετά βιοδραστικές και αφ'ετέρου ελάχιστα επαγωγικές προστατευτικών μηχανισμών.

3. Η αποκατάσταση των τοξικών ή ενδοκρινικών επιπτώσεων του Cd

σε επιβαρυμένους από το μέταλλο πληθυσμούς *Carassius* με έκθεση σε Zn δεν είναι αποτελεσματική, ενώ η μεταφορά τους σε περιβάλλον ελεύθερο Cd είναι αποτελεσματικότερη.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τοξική δράση των μετάλλων ασκείται άμεσα ή έμμεσα σε κυτταρικό επίπεδο, σε επίπεδο οργάνων ή και συστημάτων και εκδηλώνεται με οξεία ή χρόνια συμπτώματα ανάλογα με το είδος του μετάλλου, την τοξικότητα της συγκέντρωσης του και τον χρόνο έκθεσης του οργανισμού.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των δράσεων ενός μετάλλου, του καδμίου (Cd), σε υποτοξικές και τοξικές συγκεντρώσεις και διάφορους χρόνους έκθεσης, σε κυτταρικό και οργανικό επίπεδο με εστίαση στον ρόλο του ως τοξικού βαρέος μετάλλου και ως ενδοκρινούς διαταράκτη της αναπαραγωγικής λειτουργίας σε έναν υδρόβιο οργανισμό, μοντέλο για μελέτες τοξικότητας, το *Carassius auratus* (χρυσόψαρο). Επίσης μελετήθηκε ο ρόλος ενός απαραίτητου μετάλλου, του ψευδαργύρου (Zn), στην αποκατάσταση των τοξικών δράσεων του καδμίου. Τέλος, επιχειρήθηκε να διευκρινιστεί η πιθανολογούμενη σχέση του καδμίου με την αδυναμία αναπαραγωγής που παρατηρείται σε γεννήτορες ιχθύων στο περιβάλλον της Λίμνης Παμβώτιδας.

In vitro συνθήκες: Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εμβρυϊκοί ινοβλάστες ανθρώπινου πνεύμονα MRC-5 και εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού NIH/3T3, οι οποίοι επώαστηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM με 0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM CdCl₂ επί 6, 24 και 120 ώρες, σε συνθήκες δηλαδή, βραχείας και χρόνιας έκθεσης σε μέταλλα.

Υπολογίστηκε η κυτταροτοξικότητα του Cd μέσω της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής Trypan Blue (Trypan Blue exclusion assay), ενώ η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων εκτιμήθηκε με προσδιορισμό της ικανότητας σχηματισμού αποικιών. Τέλος μετρήθηκε η εξωκυτάρια συγκέντρωση του Cd στο μέσο επώασης με τη μέθοδο της Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Απορρόφησης (AAS).

Όσον αφορά την κυτταρική βιωσιμότητα η βραχεία έκθεση (6 και 24 ώρες) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις Cd (0,1 και 1 μM) πιθανώς να καθιστά τα κύτταρα 3T3 ζωτικότερα καθώς παρατηρείται μια επαγόμενη από το μέταλλο αύξηση της βιωσιμότητάς τους, ενώ η κυτταρική σειρά MRC-5 είναι γενικά ανθεκτικότερη στην έκθεση σε Cd πιθανόν λόγω προστατευτικών μηχανισμών που οφείλονται στη διαφορετική καταγωγή των κυττάρων αυτών.

Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων έδειξε ότι τα κύτταρα MRC-5 αυξάνονται καλύτερα παρουσία 0,1 μM Cd, ενώ τα 3T3 καλύτερα παρουσία 1 μM Cd πιθανόν λόγω της διαφορετικής ιστολογικής προέλευσης των κυττάρων αυτών. Βέβαια η έκθεση ακόμη και για 24 ώρες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd (100 μM) αναστέλλει πλήρως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η εξωκυτάρια συγκέντρωση του Cd που παρατηρείται στα κύτταρα MRC-5 είναι υψηλότερη από αυτήν των κυττάρων 3T3, κατόπιν της έκθεσής τους σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή έξοδο του μετάλλου μετά τις 24 ώρες και το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με την αυξημένη βιωσιμότητα των MRC-5.



In vivo συνθήκες: Στην πειραματική μας διάταξη χρησιμοποιήθηκαν 286 (168♀ και 118♂) νεαρά χρυσόψαρα *Carassius auratus*, τα οποία τοποθετήθηκαν σε ενυδρεία από τα μέσα Ιανουαρίου έως τα μέσα Μαΐου υπό ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, φωτοπεριόδου, οξυγόνωσης νερού και τροφής ως εξής:

Ομάδα I : Νερό Λίμνης Παμβώτιδας (~0.05ppb Cd)

Ομάδα II : Αποχλωριωμένο νερό βρύσης (~0.1ppb Cd) (Ομάδα ελέγχου)

Ομάδα III: Αποχλωριωμένο νερό βρύσης με 1ppb Cd (Ομάδα χαμηλής δόσης Cd)

Ομάδα IV: Αποχλωριωμένο νερό βρύσης με 5ppb Cd (Ομάδα υψηλής δόσης Cd).

Καθημερινά γινόταν έλεγχος και καταγραφή του pH, του διαλυμένου οξυγόνου και της θερμοκρασίας του νερού σε όλα τα ενυδρεία και εβδομαδιαία έλεγχος των συγκεντρώσεων των μετάλλων στο νερό. Επίσης 26 (15♀ και 11♂) ώριμα άτομα τοποθετήθηκαν στις συνθήκες (I) και (II), σε διαφορετικές δεξαμενές από της κλάσης I. Στις 60 ημέρες (μέσα Μαρτίου) ελήφθησαν ιχθύς από τις ομάδες που εκτέθηκαν σε Cd, οι οποίοι τοποθετήθηκαν για αποκατάσταση σε νέα ενυδρεία υπό τις εξής συνθήκες:

α) Σε δεξαμενές με αποχλωριωμένο νερό βρύσης και αφέθηκαν για αποκατάσταση επί 60 ημέρες.

β) Σε δεξαμενές με 1ppb Cd+1ppb Zn για την ομάδα χαμηλής δόσης Cd και με 5ppb Cd+10ppb Zn για την ομάδα υψηλής δόσης Cd αντίστοιχα, όπου αφέθηκαν για αποκατάσταση επί 60 ημέρες.

Η δειγματοληψία περιελάμβανε 12 ιχθύς (6 ζεύγη)/δεξαμενή/χρόνο έκθεσης κάθε φορά, ανά 0, 15, 30, 45, 60 και 120 ημέρες έκθεσης και καταγράφηκαν οι μορφομετρικοί χαρακτήρες των ατόμων (Σωματικό βάρος BW, Σταθερό μήκος SL, Ολικό μήκος TL, Βάρος γονάδων GW, Βάρος ήπατος LW), από όπου υπολογίστηκαν οι δείκτες σωματικής αύξησης (Ηπατοσωματικός Δείκτης (LSI)) και γοναδικής αύξησης (Γοναδοσωματικός Δείκτης (GSI)). Επίσης για την εκτίμηση της αναπαραγωγικής ανάπτυξης των ιχθύων μετρήθηκε η 17-β οιστραδιόλη ορού με τη μέθοδο της ραδιοανοσομετρίας (RIA) και έγινε ιστολογική εξέταση στις γονάδες και το ήπαρ. Ακόμα έγινε προσδιορισμός των μετάλλων Cd και Zn στα βράγχια, νεφρούς, ήπαρ, γονάδες, μύες με τη μέθοδο της Φασματοφωτομετρίας Ατομικής Απορρόφησης με φούρνο γραφίτη (GF-AAS).

Η κινητική των μετάλλων στους διάφορους ιστούς έδειξε ότι έκθεση του *C. auratus* σε συγκεντρώσεις Cd 1-5ppb προκαλεί σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου στα βράγχια μέχρι την 60^η ημέρα έκθεσης και πιθανότατα η παρουσία του ανταγωνίζεται την πρόσληψη του Zn από τον ιστό, οπότε τα βράγχια αποτελούν τον πρώτο ιστό-στόχο τον οποίο πλήττουν τα μέταλλα στους υδρόβιους οργανισμούς. Φαίνεται ότι οι 60 ημέρες έκθεσης οπότε η συγκέντρωση του Cd μειώνεται, είναι ένα κομβικό σημείο για τη συσσώρευση του στα βράγχια, όταν πιθανότατα αναπτύσσονται εκείνοι οι προστατευτικοί μηχανισμοί που επιτρέπουν στα άτομα να ομοιοστατήσουν.



Οι νεφροί και το ήπαρ αποτελούν τους επόμενους ιστούς-στόχους και θέσεις σημαντικής απομάκρυνσης μετάλλων, οπότε τα επίπεδα Cd στους νεφρούς και το ήπαρ των ιχθύων που εκτέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Cd αυξάνουν σημαντικά συναρτήσει του χρόνου έκθεσης, ιδιαίτερα μετά τις 45 ημέρες. Στα ώριμα άτομα δε, τα επίπεδα Cd στο ήπαρ και τους νεφρούς είναι σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με των νεαρότερων, λόγω της μεγαλύτερης διάρκειας έκθεσης των ατόμων στα μέταλλα.

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του Zn στο ήπαρ και τις γονάδες, στα θηλυκά της ομάδας ελέγχου και της ομάδας υψηλής δόσης Cd, ο Zn εμφανίζει ίδιο προφίλ μεταβολής, με σημαντικά υψηλότερη τιμή στο ήπαρ στις 60 ημέρες. Η χρονική αυτή στιγμή συμπίπτει με την αναμενόμενη περίοδο ωοτοκίας, οπότε ο ηπατικός Zn συμμετέχει στη βιτελλογένεση και την ωρίμανση των γονάδων.

Η εκτίμηση της λειτουργικής κατάστασης του ήπατος μέσω ιστολογικών τομών αποκαλύπτει στις ομάδες που εκτέθηκαν σε μέταλλα και στην ομάδα που αναπτύχθηκε σε νερό Λίμνης, ήπιες αλλοιώσεις ηπατοκυττάρων και αργότερα εκτεταμένες αλλοιώσεις, νέκρωση ηπατοκυττάρων και λιπώδη εκφύλιση.

Στα νεαρά θηλυκά άτομα η συγκέντρωση της 17-β οιστραδιόλης ορού αποτελεί την πιο χαρακτηριστική ορμόνη-βιοδείκτη της αναπαραγωγικής ωρίμανσης των ιχθύων. Τα νεαρά θηλυκά εμφανίζουν ασυγχρονότητα όσον αφορά την κορύφωση της οιστραδιόλης και την αύξηση και ωρίμανση των γονάδων. Το Cd φαίνεται να μεταβάλλει την σχέση οιστραδιόλης (E_2), ηπατικής αύξησης (LSI) και αύξησης των γονάδων (GSI) προκαλώντας απορύθμιση στην ανάπτυξη των γονάδων στα θηλυκά άτομα *Carassius*. Σε συγκεντρώσεις 1ppb και 5ppb, το Cd προκαλεί μεταβολές στο χρονοδιάγραμμα έκκρισης και τα επίπεδα των E_2 και Zn στις γονάδες των θηλυκών ατόμων, διαταράσσοντας τον κύκλο της αναπαραγωγικής ωρίμανσης. Η διαταραχή που προκαλείται από το 1ppb Cd στα θηλυκά τα οποία είναι δυνατόν να εμφανίσουν πρόωμη ωοθηκική ωρίμανση φαίνεται να είναι σοβαρότερη των 5ppb οπότε τα θηλυκά είναι δυνατόν να εμφανίσουν καθυστέρηση και όψιμη ωρίμανση. Επίσης η ομάδα που εκτέθηκε σε 1ppb Cd εμφανίζει αύξηση του ήπατος (LSI) περί την 60η ημέρα, γεγονός που υποδηλώνει διαταραχή της ανάπτυξης και της αναπαραγωγικής ωρίμανσης, η έκθεση δε, σε χαμηλές συγκεντρώσεις Cd επηρεάζει περισσότερο τη συγκέντρωση Zn στις γονάδες των θηλυκών, όπως και στο ήπαρ.

Η ανάπτυξη στο νερό της λίμνης φαίνεται να προκαλεί καθήλωση σε πρώιμα στάδια των περισσότερων ωοκυττάρων με αποτέλεσμα να διατηρείται ο ρυθμός εξέλιξης του αναπαραγωγικού κύκλου αλλά σε χαμηλά επίπεδα, και να παρατηρούνται οι χαμηλότερες τιμές Zn στις γονάδες, πιθανότατα λόγω της παρουσίας στο νερό και άλλων ουσιών με δράση ενδοκρινικού διαταράκτη. Στα ώριμα θηλυκά άτομα η οιστραδιόλη κορυφώνεται στις 60 ημέρες, με τιμές κατά πολύ υψηλότερες από των νεαρότερων ατόμων, υποδεικνύοντας ότι τα άτομα αυτά είναι πιο ώριμα αναπαραγωγικά, γεγονός



που επιβεβαιώνεται και από τη μεγαλύτερη αύξηση των γονάδων και από την ιστολογική τους εικόνα.

Αρσενικά άτομα *Carassius* που εκτίθενται σε συγκεντρώσεις Cd 1ppb και 5ppb, εμφανίζουν άνοδο της 17β-οιστραδιόλης την περίοδο ωρίμανσης των σπερμογονίων με πιθανή επίπτωση ατελή ή/και θηλεοποιητική εξέλιξή τους. Παράλληλα ο GSI, σε όλες τις ομάδες και κλάσεις, παραμένει σχεδόν σταθερός, ενώ στις γονάδες το μεν Cd αυξάνει, ο δε Zn δεν εμφανίζει ειδική συγκέντρωση, με πιθανές επιπτώσεις στη σπερματογένεση και την εξέλιξή τους.

Στα νεαρά άτομα, η συγκέντρωση του Cd και Zn στους μύες εμφανίζει τις μικρότερες τιμές, οπότε δεν φαίνεται να αποτελούν ιστό-στόχο των μετάλλων. Σε γενικές γραμμές η κινητική της συσσώρευσης του καδμίου ακολουθεί χρονικά τη σειρά βράγχια, νεφροί, ήπαρ, γονάδες, μύες.

Στα βράγχια, τους νεφρούς, το ήπαρ, τις γονάδες και το μυϊκό ιστό των *Carassius* που εκτέθηκαν σε Cd επί 60 ημέρες και μετά τοποθετήθηκαν σε νερό βρύσης για ακόμη 60 ημέρες η απομάκρυνση των πειραματοζώων από το επιβαρημένο με Cd νερό επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο. Αντίθετα η αποκατάσταση των πειραματοζώων με προσθήκη Zn προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση σε Cd σε όλους τους ιστούς εκτός από τον μυϊκό ιστό. Έτσι φαίνεται ότι ο Zn δεν ασκεί προστατευτική δράση έναντι της συσσώρευσης Cd σε καμία από τις ομάδες που αποκαταστάθηκαν.

Το Cd, σε συγκεντρώσεις 1ppb και 5ppb, προκαλεί τέτοιες μεταβολές στα επίπεδα E₂ και Zn στις γονάδες των θηλυκών *Carassius* και στη σχέση E₂, LSI και GSI, ώστε η απομάκρυνση των ατόμων από το επιβαρημένο με Cd νερό ενώ επιφέρει αποκατάσταση από το μέταλλο, δεν αποκαθιστά τη διαταραχή του κύκλου της αναπαραγωγικής ωρίμανσης, με αποτέλεσμα την καθήλωση σε πρώιμα στάδια των περισσότερων ωοκυττάρων. Η προσθήκη Zn αντίθετα, ενώ προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση του ιστού από το Cd αποκαθιστά εν μέρει τα επίπεδα των E₂ και GSI, ώστε τα άτομα δυνατόν να εμφανίσουν καθυστέρηση και όψιμη ωρίμανση των περισσότερων ωοκυττάρων.

Αρσενικά άτομα *Carassius* που εκτίθενται σε συγκεντρώσεις Cd 1ppb και 5ppb, εμφανίζουν πτώση της 17β-οιστραδιόλης κατόπιν απομάκρυνσης από το επιβαρημένο με Cd νερό ή προσθήκης Zn, ενώ η προσθήκη Zn προκαλεί μεγαλύτερη επιβάρυνση των γονάδων από το Cd, μείωση του μεγέθους τους (GSI), ο δε Zn δεν εμφανίζει ειδική συγκέντρωση, με πιθανές επιπτώσεις στη σπερματογένεση και την εξέλιξή των γονάδων.

Φαίνεται επομένως ότι η έκθεση σε Cd 5ppb στα θηλυκά, παρότι η αναπαραγωγική ωρίμανση καθυστερεί, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του μετάλλου χρονικά, επάγονται αυτοί οι προστατευτικοί μηχανισμοί, που αποκαθιστούν τυχόν διαταραχές από τα μέταλλα, ενώ οι μικρότερες συγκεντρώσεις Cd επειδή δεν επάγουν επαρκώς τους προστατευτικούς μηχανισμούς είναι δυνατόν να καταστούν περισσότερο επιβλαβείς.



METAL AND METAL-PROTEINS INTERACTIONS IN VIVO AND IN VITRO AFTER STRESS

DOCTORATE THESIS
Fotini G. Mane

SUMMARY

Metals' toxic actions affecting, directly or indirectly, cells, organs or organic systems are manifested by acute or chronic symptoms, depending on metal species, their toxicity and exposure time.

The **aim** of the present work was the study of cadmium (Cd) effects, at sub toxic and toxic concentrations, for various exposure times, *in vitro* and *in vivo*, focusing at its role as a toxic agent and as an endocrine disrupter of the aquatic species, *Carassius auratus* (goldfish), an organism widely used in toxicity studies. The possible role of the essential metal zinc (Zn) as a recovering agent towards cadmium's toxic actions was also studied. Finally, cadmium's possible relation to reproductive disorders observed in Lake Pamvotis fish was investigated.

Materials-Methods

In vitro conditions: The cell lines used were human fetal lung fibroblasts MRC-5 and mouse fetal fibroblasts NIH/3T3, that were incubated in DMEM with 0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM CdCl₂ for 6, 24 and 120 hours (acute and chronic metal exposure).

Cadmium's cytotoxicity was estimated through Trypan Blue exclusion assay, whereas cell proliferating ability was assessed through colony forming efficiency. Finally the extracellular concentration of Cd in the incubation medium was measured through Atomic Absorbance Spectrophotometry (AAS).

In vivo conditions: 286 (168♀ and 118♂) juvenile goldfish *Carassius auratus* were put in tanks from mid-January till mid-May under the same conditions of temperature, photoperiod, and water oxygen and food regime as follows:

Group I: Lake Pamvotis water (~0.05ppb Cd)

Group II: Dechlorinated tap water (~0.1ppb Cd) (Control group)

Group III: Dechlorinated tap water with 1ppb Cd (Low Cd group)

Group IV: Dechlorinated tap water with 5ppb Cd (High Cd group)

Water pH, dissolved oxygen, and temperature were recorded daily in all tanks and water metal concentration weekly. Another 26 (15♀ and 11♂) mature individuals were put in conditions (I) and (II), in different tanks from juvenile fish. After 60 days (mid-March) some fish from the Cd-exposed groups were put in new tanks for recovery as follows:

a) In tanks with dechlorinated tap water for another 60 days.



b) In tanks with dechlorinated tap water with 1ppb Cd+1ppb Zn for the low-Cd group and with 5ppb Cd+10ppb Zn for the high-Cd group, for another 60 days.

12 fish (6 pairs/tank/exposure times) were randomly sampled every 0, 15, 30, 45, 60 and 120 exposure days. Their morphometric characters were recorded (Body weight BW, Standard length SL, Total length TL, Gonad weight GW, Liver weight LW), and the indices of body development (Hepatosomatic Index (HSI or LSI), and gonad development (Gonadosomatic Index (GSI)) were estimated. In order to assess fish reproductive development, serum 17- β estradiol was measured by Radioimmunoassay (RIA) and gonad and liver histological study was performed. Cd και Zn concentrations were also measured in gills, kidneys, liver, gonads and muscle through Atomic Absorbance Spectrophotometry with graphite furnace (GF-AAS).

Results-Conclusions

In vitro conditions: Acute exposure (6 and 24 hours) to lower Cd concentrations (0,1 and 1 μ M) potentially increases 3T3 cell viability while MRC-5 cells have proved in general more resistant to Cd exposure, probably due to original tissue related protective mechanisms.

Cell proliferating ability of MRC-5 cells was better expressed in presence of 0,1 μ M Cd, whereas 3T3 cells in 1 μ M Cd. However, the 24-hour exposure to higher Cd concentrations (100 μ M) fully inhibits cell proliferation in both cell lines. Cadmium extracellular concentration of MRC-5 cells is higher than 3T3's, after exposure to higher Cd concentrations, insinuating a higher metal efflux after 24 hours of exposure, correlated to MRC-5's increased viability.

In vivo conditions: *C. auratus*' exposure to 1-5ppb Cd causes significant increase of Cd concentration in gills until the 60th day of exposure and its presence probably antagonizes Zn's uptake, while gills are the first target organs that metals affect in aquatic organisms. It seems that after 60 days of exposure Cd concentration decreases and this is a crucial end-point for metal accumulation in gills, since protective mechanisms may develop by that time allowing individuals to reach equilibrium.

Kidneys and liver are the next target organs and sites of metal elimination and detoxification, so that Cd levels in kidney and liver of the high-Cd exposed group increase significantly after 45 days of exposure in a time-dependent way. Older individuals, present significantly higher Cd levels in kidneys and liver than younger, probably due to long-term metal exposure.

Zn concentration in liver and gonads, in female control group and in Cd 5ppb exposed group, shows similar changes, while liver zinc is significantly higher at 60 days. This time period coincides with the expected spawning period, since liver Zn participates in vitellogenesis and gonad maturation.



The histological study of liver reveals moderate to extensive hepatocyte lesions and fatty infiltration in cadmium and in lake water exposed groups.

Serum 17β estradiol is the most characteristic hormone-biomarker of female fish reproductive maturity. Cd seems to disturb coordination between estradiol (E_2), liver growth (LSI) and gonad growth (GSI) causing derangement in gonad development in female *Carassius*. 1ppb and 5ppb of Cd cause changes in the timeline of E_2 secretion and Zn levels in female gonads disrupting the cycle of reproductive maturity. The disruption caused by 1ppb of Cd (females may present early gonad maturity), seems to be more severe than that of Cd 5ppb (females may develop delayed gonad maturity). Fish group exposed to 1ppb of Cd shows increase in liver growth (LSI) at the 60th day, implementing growth and reproductive maturity disruption, whereas low Cd exposure affects more severely female gonad and liver Zn concentration.

Female *Carassius* cultured in lake water seems to produce, in the majority of oocytes, arrest in early stages of maturity and the lowest gonad Zn levels, resulting in low evolution rate of the reproductive cycle, probably due to the presence of various endocrine disrupters, in the lake water. Mature female fish though, present estradiol peaks at 60 days much higher than juvenile fish as well as higher gonad development indicating reproductive maturity.

Male *Carassius* exposed to 1ppb and 5ppb of Cd, present an increase in 17β -estuarial serum levels during gonad maturation resulting probably to incomplete and/or feminizing evolution. In addition GSI, in all groups remains almost stable, whereas in male gonads Cd levels increase and Zn levels remain low with possible impact on spermatogenesis and gonad development.

Muscles present the lowest Cd and Zn tissue levels, being not a target-organ for metal accumulation. In general, the time line of Cd accumulation follows the pattern: gills, kidneys, liver, gonads, and muscle.

Carassius exposed to Cd for 60 days and then cultured in tap water for another 60 days for recovery, present Cd concentration significantly decreased in gills, kidneys, liver, gonads and muscle. On the contrary, zinc addition in the fish incubation tanks causes higher accumulation for the Cd-exposed groups in all tissues except muscle, revealing that Zn has neither recovering nor protective effect against Cd accumulation in any experimental group.

Cd exposure to 1ppb and 5ppb causes irreversible alterations in E_2 secretion and Zn levels in female gonads and in the relation between estradiol (E_2), liver growth (LSI) and gonad growth (GSI). Consequently *Carassius* removal from the metal polluted tanks although decreases metal accumulation in gonads offers no recovery in the reproductive cycle disruption, resulting in arrest to early stages of maturation for the



majority of oocytes. On the contrary, zinc addition in the tanks although causes higher Cd accumulation in the tissue of experimental groups, partly recovers E_2 and GSI levels resulting in delayed gonad maturation.

Male *Carassius* exposed to 1ppb and 5ppb of Cd, present a decrease in 17β -estradiol after removal from the metal polluted tanks or zinc addition, whereas gonad Cd levels increase after zinc addition, gonad growth (GSI) decreases and gonad Zn levels remain low with possible impact on spermatogenesis.

It seems that in female high-Cd exposed group, when metal begins to accumulate, protective mechanisms are induced and compensate disruptions caused by the metal, resulting in delayed reproductive maturation while the low-Cd exposed group develops less compensated disruptions. Under certain circumstances low Cd concentrations are bioactive but inadequate to induce protective mechanisms and therefore maybe more harmful.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



Βιβλιογραφία

- Abshire MK, Devor DE, Diwan BA, Shaughnessy JD Jr, Waalkes MP. 1996a. In vitro exposure to cadmium in rat L6 myoblasts can result in both enhancement and suppression of malignant progression in vivo. *Carcinogenesis*, 17(6), 1349-1356.
- Abshire MK, Buzard GS, Shiraishi N, Waalkes MP. 1996b. Induction of c-myc and c-jun protooncogene expression in rat L6 myoblasts by cadmium is inhibited by zinc preinduction of the metallothionein gene. *J Toxicol Environ Health*, 48(4), 359-377.
- Adams, 2000. Phosphorylation of the metal-activated transcription factor in response to metals. In: *Metal Ions in Biology and Medicine*; volume 6. Eds. J.A. Centeno, Ph. Collery, G. Vernet, R.B. Finkelman, H. Gibb, J.C. Etienne. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 694-697.
- Adham KG, Ibrahim HM, Hamed SS, Saleh RA. 2002. Blood chemistry of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) under the impact of water pollution. *Aquatic Ecology*, 36, 549-557.
- Angel P, Potting A, Mallick U, Rahmsdorf HJ, Schorpp M, Herrlich P. 1986. Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 6(5), 1760-1766.
- Angle CR, Thomas DJ, Swanson SA. 1993. Osteotoxicity of cadmium and lead in HOS TE 85 and ROS 17/2.8 cells: relation to metallothionein induction and mitochondrial binding. *Biometals*, 6(3), 179-184.
- Apostolova M, Nachev C, Koleva M, Bontchev PR, Kehaiov I. 1998. New competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of metallothionein in tissue and sera. *Talanta*, 46, 325-333.
- Arukwe A. 2001. Cellular and molecular responses to endocrine modulators and the impact on fish reproduction. *Mar Pol Bul*, 42, 8, 643-655.
- Backman JT, Siegle I, Fritz P. 1998. Immunohistochemical localization of metallothionein in synovial tissue of patients with chronic inflammatory and degenerative joint disease. *Virchows Arch*, 433, 153-160.
- Bahnson RR, Banner BF, Ernstoff MS, Lazo JS, Cherian MG, Banerjee D, Chin JL. 1991. Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*, 146, 1518-1520.
- Banks SD, Thomas P, Baer KN. 1999. Seasonal variations in hepatic and ovarian zinc concentrations during the annual reproductive cycle in female channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 124(1), 65-72.
- Bebiano MJ, Langston WJ. 1991. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Marine Biology*, 108, 91-96.
- Βεζυράκη-Αγγελίδη Π. 1990. Πειραματικές μελέτες της θερμορύθμισης. Ορμονικές μεταβολές και διακύμανση βασικών μετάλλων κατά την προσαρμογή επίμυων στο θερμό και ψυχρό περιβάλλον. Διδακτορική Διατριβή. Ιατρικό Τμήμα. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.



- Benoff S, Jacob A, Hurley IR. 2000. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Human Repr Update*, 6(2), 107-121.
- Berg T, Licht D. 2002. International legislation on trace elements as contaminants in food: a review. *Food Addit Contam*, 19 (10), 916-927.
- Beyersmann D, Hechtenberg S. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 144(2), 247-261.
- Blumenthal SS, Ren L, Lewand DL, Krezoski SK, Petering DH. 1998. Cadmium decreases SGLT1 messenger RNA in mouse kidney cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 149(1), 49-54.
- Borghesi LA, Lynes MA. 1996. Nonprotective effects of extracellular metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol*, 139(1), 6-14.
- Boutet I, Tanguy A, Auffret M, Riso R, Moraga D. 2002. Immunochemical quantification of metallothioneins in marine mollusks: characterization of a metal exposure bioindicator. *Environ Toxicol Chem*, 21(5), 1009-1014.
- Bracken WM, Sharma RP, Kleinschuster SJ. 1984. Cadmium accumulation and subcellular distribution in relation to cadmium chloride induced cytotoxicity in vitro. *Toxicology*, 33(2), 93-102.
- Bressler JP, Olivi L, Cheong JH, Kim Y, Bannona D. 2004. Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Ann NY Acad Sci*, 1012, 142-152.
- Brotten J, Michalopoulos G, Peterson B, Cruise J. 1999. Adrenergic stimulation of Hepatocyte Growth Factor expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 76-79.
- Brown V, Shurben D, Miller W, Crane M. 1994. Cadmium toxicity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum and brown trout *Salmo trutta* L. over extended exposure periods. *Ecotoxicol Environ Saf*, 29, 38-46.
- Bucio L, Souza V, Albores A, Sierra A, Chavez E, Carabez A, Gutierrez-Ruiz MC. 1995. Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*, 102(3), 285-299.
- Busacker GP, Adelman IR, Goolish EM. 1990. Growth. In: *Methods for fish biology*. CB Schrech and PB Moyle eds, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp.364-387.
- Cao J, Cousins RJ. 2000. Metallothionein mRNA in monocytes and peripheral blood mononuclear cells and in cells from dried blood spots increases after zinc supplementation of men. *Nutrient-Gene expression*, 0022-3166/0, 2180-2187.
- Campbell PM, Hutchinson TH. 1998. Wildlife and endocrine disruptors: Requirements for hazard identification. *Environ Toxicol Chem*, 17, 127-135.
- Carmen EM, Souza V, Bucio L, Hernandez E, Damian-Matsumura P, Zaga V, Gutierrez MC. 2002. Cadmium induces α_1 collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology*, 170, 63-73.



- Carvan MJ, III, Dalton TP, Stuart GW, Nebert DW. 2000. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Ann NY Acad Sci*, 919, 133-147.
- Chambers RC, Laurent GJ, Westergren-Thorsson G. 1998. Cadmium inhibits proteoglycan and procollagen production by cultured human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19(3), 498-506.
- Chan HM, Zhu LF, Zhong R, Grant D, Goyer RA, Cherian MG. 1993. Nephrotoxicity in rats following liver transplantation from cadmium-exposed rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 123(1), 89-96.
- Chang MH, Lin HC, Hwang PP. 1998. Ca²⁺ uptake and Cd²⁺ accumulation in larval tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to waterborne Cd²⁺. *Am J Physiol*, 274, 1570-1577.
- Chatterjee S, Maiti IB. 1990. Comparison of the immunological properties of mammalian (rodent), bird, fish, amphibian (toad), and invertebrate (crab) metallothioneins. *Mol Cell Biochem*, 94(2), 175-181.
- Chatterjee S, Dasmahapatra AK, Ghosh R. 2001. Disruption of pituitary-ovarian axis by carbofuran in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Comp Biochem Physiol C*, 129, 265-273.
- Clark KE, Stansley W, Niles LJ. 2001. Changes in contaminant levels in New Jersey osprey eggs and prey, 1989-1998. *Arch Environ Contam Toxicol*, 40, 277-284.
- Clark, R.B. 1992. *Marine pollution* 3rd ed. Clarendon Press, Oxford.
- Clough SR, Welsh MJ, Payne AH, Brown CD, Brabec MJ. 1990. Primary rat Sertoli and interstitial cells exhibit a differential response to cadmium. *Cell Biol Toxicol*, 6(1), 63-79.
- Cornish D. 1998. Seasonal steroid hormone profiles in plasma and gonads of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Water SA*, 24(3), 257-263.
- Cousins RJ. 1985. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev*, 65, 238-309.
- Cousins RJ. 1998. A role of zinc in the regulation of gene expression. *Proc Nutr Soc*, 57, 307-311.
- Crim LW, Glebe BD. 1990. Reproduction. In: *Methods for fish biology*. Schrech CB and Moyle PB eds, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp. 529-553.
- Dabrio M, Rodriguez AR, Bordin G, Bebianno MJ, De Ley M, Sestakova I, Vasak M, Nordberg M. 2002. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J Inorg Biochem*, 88, 123-134.
- Das S, Thomas P. 1999. Pesticides interfere with the nongenomic action of a progestogen on meiotic maturation by binding to its plasma membrane receptor on fish oocytes. *Endocrinology*, 140(4), 1953-1956.
- Deng DX, Chakrabarti S, Waalkes MP, Cherian MG. 1998. Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular



- carcinoma and metastatic adenocarcinoma. *Histopathology*, 32, 340-347.
- Dinischiotu A, Munteanu C, Ionica E, Staicu C, Costache M. 2003. Oxidative stress in goldfish *Carassius auratus gibelio* following chronic exposure to manganese. In: *Proceedings of 4th International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives*, S. Ermidou-Pollet & S. Pollet eds, Athens, pp. 760-770.
- Dominguez MC, Sole E, Goni C, Ballabriga A. 1995. Effect of aluminum and lead salts on lipid peroxidation and cell survival in human skin fibroblasts. *Biol Trace Elem Res*, 47, 57-67.
- Duizer E, Gilde AJ, Versantvoort CH, Groten JP. 1999. Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol*, 155(2), 117-126.
- Eichenberger, B.A. & Chen, K.Y. 1982. Origin and nature of selected inorganic constituents in natural waters. In *Water analysis, vol I: Inorganic species, part 1* (ed. R.A. Minear & L.H. Keith), pp. 1-44. Academic Press, Inc.
- Eid H, Geczi L, Magori A, Bodrogi I, Institoris E, Bak M. 1998. Drug resistance and sensitivity of germ cell testicular tumors: evaluation of clinical relevance of MDR1/Pgp, p53, and metallothionein (MT) proteins. *Anticancer Res*, 18, 3059-3064.
- Eneman JD, Potts RJ, Osier M, Shukla GS, Lee CH, Chiu JF, Hart BA. 2000. Suppressed oxidant-induced apoptosis in cadmium adapted alveolar epithelial cells and its potential involvement in cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 147, 215-228.
- Enger MD, Hildebrand CE, Stewart CC. 1983. Cd²⁺ responses of cultured human blood cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 69(2), 214-224.
- Ermidou-Pollet S & Pollet S. 2000. Trace elements: their importance in human physiology. A brief review. *Proceedings of 2nd International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives*, S. Ermidou-Pollet & S. Pollet eds, Athens, pp. 609-635.
- European Commission. 1996. European Commission Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Substance and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances, Part II, Office for Official Publication of the European Communities, Luxembourg.
- Evanson M, Van Der Kraak GJ. 2001. Stimulatory effects of selected PAHs on testosterone production in goldfish and rainbow trout and possible mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol Part C*, 130, 249-258.
- Fatur T, Tucek M, Falnoga I, Scancar J, Lah TT, Filipic M. 2002. DNA damage and metallothionein synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposed to cadmium. *Food Chem Toxicol*, 40(8), 1069-1076.
- Fay RM, Mumtaz MM. 1996. Development of a priority list of chemical mixtures occurring at 1188 hazardous waste sites, using the HazDat database. *Food Chem Toxicol*, 34 (11-12), 1163-1165.



- Fergusson JE. 1990. *The heavy elements. Chemistry, environmental impact and health effects*. Pergamon Press.
- Fischer AB. 1985. Factors influencing cadmium uptake and cytotoxicity in cultured cells. *Xenobiotica*, 15(8-9), 751-757.
- Fischer AB. 1995. Studies of cadmium chelator efficacy using mammalian cell cultures. *Analyst*, 120(3), 975-978.
- Folmar LC, Gardner GR, Schreiber MP et al. 2001. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquatic Toxicology*, 51, 431-441.
- Foran CM, Peterson BM, Benson WH. 2002. Influence of parental and developmental cadmium exposure on endocrine and reproductive function in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol Part C*, 133, 345-354.
- Förstner, V. & Wittmann, G.T.W. 1983. *Metal pollution in the aquatic environment*. 2nd ed. Springer Verlag eds.
- Fresno M, Wu W, Rodriguez JM, Nadji M. 1993. Localization of metallothionein in breast carcinomas. An immunohistochemical study. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 423, 215-219.
- Friedmann AS, Watzin MC, Leiter JC, Brinck-Johnsen T. 1996. Effects of environmental mercury on gonadal function in lake Champlain northern pike (*Esox lucius*). *Bull Environ Contam Toxicol*, 56, 486-492.
- Garvey JS. 1984. Metallothionein: structure/antigenicity and detection/quantitation in normal physiological fluids. *Environ Health Perspect*, 54, 117-127.
- Garvey JS. 1991. Antibodies to metallothionein. In: *Methods of enzymology, Metallobiochemistry, Part B*. JF Riordan and BL Vallee eds, Academic Press, New York, p. 174.
- Gerstenberger SL, Heimler I, Smies R et al. 2000. Minimal endocrine alterations in rodents after consumption of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 38, 371-376.
- George SG, Hodgson PA, Tytler P, Todd K. 1996. Inducibility of metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in larvae of a marine teleost, the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fundam Appl Toxicol*, 33(1), 91-99.
- Gohda E, Nagao T, Yamamoto I. 2000. Stimulation of Hepatocyte Growth Factor production in human fibroblasts by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Biochem Pharmacol*, 60, 1531-1537.
- Gomot A. 2001. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxic Environ Saf*, 41, 288-297.
- Goulding H, Jasani B, Pereira H, Reid A, Galea M et al. 1995. Metallothionein expression in human breast cancer. *Brit J Canc*, 72, 968-972.
- Grider A, Bailey LB, Cousins RJ. 1990. Erythrocyte metallothionein as an index of zinc status in humans. *Proc Natl Acad Sci*, 87, 1259-1262.



- Grose EC, Richards JH, Jaskot RH, Menache MG, Graham JA, Dauterman WC. 1987. A comparative study of the effects of cadmium chloride and cadmium oxide: pulmonary response. *J Toxicol Environ Health*, 21, 219-232.
- Grosell M, Nielsen C, Bianchini A. 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp Biochem Physiol C*, 133, 287-303.
- Guerci A, Seoane A, Dulout FN. 2000. Aneugenic effects of some metal compounds assessed by chromosome counting in MRC-5 human cells. *Mutation Res*, 469, 35-40.
- Guerreiro PM, Fuentes J, Canario AVM, Power DM. 2002. Calcium balance in sea bream (*Sparus aurata*): the effect of oestradiol-17 β . *J Endocrinol*, 173, 377-385.
- Guerriero G, Ferro R, Ciarcia G. 2005. Correlations between plasma levels of sex steroids and spermatogenesis during the sexual cycle of the chub, *Leuciscus cephalus* L. (Pisces: Cyprinidae). *Zoological Studies*, 44(2), 228-233.
- Guillette LJ Jr. 2000. Contaminant-induced endocrine disruption in wildlife. *Growth Horm IGF Res*, 10 Suppl B, S45-50.
- Guillette LJ Jr, Gunderson MP. 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction*, 122, 6, 857-864.
- Habibi HR, De Leeuw R, Nahorniac CS, Goos HJT, Peter RE. 1989. Pituitary-gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects. *Fish Physiol Biochem*, 7, 109-118.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. 1998. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford Science Publications.
- Hamada T, Sasaguri T, Tanimoto A, Arima N, Shimajiri S, Abe T, Sasaguri Y. 1996. Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by polymerized cadmium-metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun*, 219(3), 829-834.
- Harrison PM, Bradley L, Bomford A. 2000a. Mechanism of regulation of HGF/SF gene expression in fibroblasts by TGF- β 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 271, 203-211.
- Harrison PM, Farzaneh F. 2000b. Regulation of HGF/SF gene expression in MRC-5 cells by N-acetyl cysteine. *Biochem Biophys Res Commun*, 279, 108-115.
- Hart BA, Prabhu RM, Eneman JD, Durieux-Lu CC, Janssen AM, Borm PJ. 1995. Oxidant resistance of cadmium adapted human lung fibroblasts. *Toxicology*, 98(1-3), 1-13.
- Hart BA, Potts RJ, Watkin RD. 2001. Cadmium adaptation in the lung—a double-edged sword? *Toxicology*, 160(1-3), 65-70.
- Hartwig A. 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid Redox Signal*, 3(4), 625-634.



- Hartwig A, Schwerdtle T. 2002a. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett*, 127(1-3), 47-54.
- Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer U, Kostelac D, Pelzer A, Schwerdtle T, Bürkle A. 2002b. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ Health Persp*, 110(Suppl5), 797-799.
- Hassoun EA, Stohs SJ. 1996. Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Toxicology*, 112(3), 219-226.
- Hazen-Martin DJ, Sens DA, Blackburn JG, Sens MA. 1989. Cadmium nephrotoxicity in human proximal tubule cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol*, 25(9), 784-790.
- Hay RW. 1992. *Βιο-Ανόργανη Χημεία*. Εκδόσεις Παπαζήση. Αθήνα.
- Heath AG. 1994. *Water pollution and fish physiology*. 2nd ed. CRC Press eds. Florida, USA
- Henson MC, Chedrese PJ. 2004. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229(5), 383-392.
- Hiratsuka H, Katsuta O, Iwata H, Matsumoto J, Umemara T. 1993. Acute toxicity of cadmium in rats with or without cadmium pretreatment. *J Toxicol Sci*, 18(3), 197-201.
- Hogstrand C, Gassman NJ, Popova B, Wood CM, Walsh PJ. 1996. The physiology of massive zinc accumulation in the liver of female squirrelfish and its relationship to reproduction. *J Exp Biol*, 199, 2543-2554.
- Hollis L, Hogstrand C, Wood CM. 2001. Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. *Arch Environ Contam Toxicol*, 41, 468-474.
- Honda R, Tawara K, Nishijo M, Nakagawa H, Tanabe K, Saito S. 2003. Cadmium exposure and trace elements in human breast milk. *Toxicology*, 186, 255-259.
- Hook SE, Fisher NS. 2001. Reproductive toxicity of metals in calanoid copepods. *Mar Biol*, 138, 1131-1140.
- Hoole D. 1997. The effects of pollutants on the immune response of fish: implications for helminth parasites. *Parassitologia*, 39(3), 219-225.
- Hu H. 2000. Exposure to metals. *Prim Care*, 27(4), 983-996.
- Huggard D, Khakoo Z, Kassam G, Habibi HR. 1996. Effect of testosterone on growth hormone gene expression in the goldfish pituitary. *Can J Physiol Pharmacol*, 74, 1039-1046.
- Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. 1997. Copper ions differ from other thiol reactive metal ions in their effects on the concentration and redox status of thiols in HeLa cell cultures. *Toxicology*, 117(2-3), 89-97.



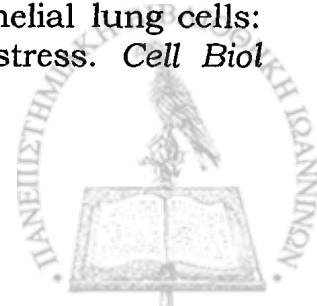
- Hussein T, Shulka GS, Chandra SF. 1987. Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharmacol Toxicol*, 60, 355-358.
- Iijima Y, Fukushima T, Bhuiyan LA, Yamada T, Kosaka F, Sato JD. 1990. Synergistic and additive induction of metallothionein in Chang liver cells. A possible mechanism of marked induction of metallothionein by stress. *FEBS Lett*, 269(1), 218-220.
- Ikeda M, Ezaki T, Tsukahara T, Moriguchi J. 2004. Dietary cadmium intake in polluted and non-polluted areas in Japan in the past and in the present. *Int Arch Occup Environ Health*, 77(4), 227-234.
- Isani G, Andreani G, Monari M, Kindt M, Carpena E. 2001. Cadmium in the aquatic ecosystem. In: *Proceedings of 1st International FESTEM Congress on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology*, FESTEM eds, Venice, pp. 70.
- Ishibashi H, Tachibana K, Tsuchimoto M, Soyano K, Ishibashi Y, Nagae M, Kohra S, Takao Y, Tominaga N, Arizono K. 2001. In vivo testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*). *J Health Sci*, 47(2), 213-218.
- Ishido M, Tohyama C, Suzuki T. 1999. Cadmium-bound metallothionein induces apoptosis in rat kidneys, but not in cultured kidney LLC-PK1 cells. *Life Sci*, 64(9), 797-804.
- Ivanoviene L, Staneviciene I, Lesauskaite V, Sadauskiene I, Ivanov L. 2003. Cadmium chloride changes the activities of liver translation machinery components and induces apoptosis. In: *Proceedings of 4th International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives*, S. Ermidou-Pollet & S. Pollet eds, Athens, pp. 549-558.
- Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. 1998. Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health*, 24 Suppl 1, 1-51.
- Jarup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*, 68, 167-182.
- Jiang Y, Porter AG. 1998. Prevention of tumor necrosis factor (TNF)-mediated induction of p21WAF1/CIP1 sensitizes MCF-7 carcinoma cells to TNF-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(3), 691-697.
- Jin YH, Clark AB, Slebos RJC, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA et al. 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet*, 34, 326-329.
- Jirtle RL, Sander M, Barrett JC. 2000. Genomic imprinting and environmental susceptibility. *Environmental Health Perspectives*, 108(3), 271-278.
- Jobling S, Beresford N, Nolan M, Rodgers-Gray T, Brighty GC, Sumpter JP, Tyler CR. 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Repr*, 66(2), 272-281.



- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L et al. 2003. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nat Med*, 9, 1081-1084.
- Kalfakakou V, & Simmons TJB. 1986. The mechanism of zinc uptake into human red blood cells. *J Physiol*, 381, 75-.
- Kalfakakou V, Akrida-Demertzi K. 1987a. Transfer factors of heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels. *Int Conf in Biopol and Bioenviron*, 218-227.
- Kalfakakou V, Kallistratos G. 1987b. Accumulation of toxic metals in the trophic chain of Ioannina Lake in N.W. Greece. *Int Conf on Heavy Metals in the Environ*, 137-139.
- Kalfakakou V, & Simmons TJB. 1990. Anionic mechanisms of zinc uptake across the human red cell membrane. *J Physiol*, 421, 485-498.
- Kalfakakou VP, Evangelou AM, Benveniste J, Arnoux B. 1993. The effects of Zn(2+) on guinea pig isolated heart preparations. *Biol Trace Elem Res*, 38(3), 289-299.
- Καλφακάκου Β. 1983. Επίπεδα συγκεντρώσεων τοξικών μετάλλων στον άνθρωπο σε σχέση με την οικολογία της Λίμνης Ιωαννίνων. Διδακτορική Διατριβή. Ιατρικό Τμήμα. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Kang YJ, Enger MD. 1988. Glutathione is involved in the early cadmium cytotoxic response in human lung carcinoma cells. *Toxicology*, 48(1), 93-101.
- Kargin F, Cogun HY. 1999. Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the freshwater fish *Tilapia nilotica*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 63, 511-519.
- Karin M, Slater EP, Herschman HR. 1981. Regulation of metallothionein synthesis in HeLa cells by heavy metals and glucocorticoids. *J Cell Physiol*, 106(1), 63-74.
- Karin M, Haslinger A, Holtgreve H, Richards RI, Krauter P, Westphal HM, Beato M. 1984. Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce the human metallothionein-II_A gene. *Nature*, 308, 513-519.
- Kawai S, Kobayashi M, Kaneko H. 2003. Effects of endocrine active substances in wildlife species: genetic, biochemical, and physiological factors in variable susceptibility to endocrine disruptors. *Pure Appl Chem*, 75, 2335-2341.
- Khan IA, Mathews S, Okuzawa K, Kagawa H, Thomas P. 2001. Alterations in the GnRH-LH system in relation to gonadal stage and Aroclor 1254 exposure in Atlantic croaker. *Comp Biochem Physiol Part B*, 129, 251-259.
- Kikuchi Y, Irie M, Kasahara T, Sawada JI, Terao T. 1993. Induction of metallothionein in a human astrocytoma cell line by interleucin-1 and heavy metals. *FEBS Lett*, 317(1-2), 22-26.
- Kime DE. 1984. The effect of cadmium on steroidogenesis by testes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Toxicol Lett*, 22, 83-88.
- Kime DE. 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Sci Total Environ*, 12, 225(1-2), 3-11.



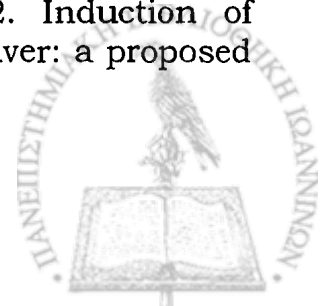
- Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp Biochem Physiol Part C*, 130, 425-433.
- Kimura O, Endo T, Sakata M. 1996. Comparison of cadmium uptakes from apical and basolateral membranes of LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 137(2), 301-306.
- Kirby J, Maher W, Krikowa F. 2001. Selenium, Cadmium, Copper, and Zinc concentrations in sediments and mullet (*Mugil cephalus*) from the Southern basin of Lake Macquarie, NSW, Australia. *Arch Environ Contam Toxicol*, 40, 246-256.
- Klaassen CD, Liu J. 1997. Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Drug Metab Rev*, 29(1-2), 79-102.
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 267-294.
- Kluytmans JH, Brands F, Zandee DI. 1988. Interactions of cadmium with the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. *Mar Environ Res*, 24, 189-192.
- Koizumi S, Yamada H. 2003. DNA microarray analysis of altered gene expression in cadmium-exposed human cells. *J Occup Health*, 45, 331-334.
- Kokokiris L, Le Menn F, Kentouri M, Kagara M, Fostier A. 2001. Seasonal cycle of gonadal development and serum levels of vitellogenin of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). *Mar Biol*, 139, 549-559.
- Kondo Y, Kuo SM, Watkins SC, Lazo JS. 1995. Metallothionein localization and cisplatin resistance in human hormone-independent prostatic tumor cell lines. *Cancer Res*, 55, 474-477.
- Kontozoglou TE, Banerjee D, Cherian MG. 1989. Immunohistochemical localization of metallothionein in human testicular embryonal carcinoma cells. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 415, 545-549.
- Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*, 51, 941-951.
- Κωλέπας Σ. 2000. *Οι Λίμνες Ιωαννίνων και Λαψίστας*. Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση-Τ.Ε.Δ.Κ. Ιωαννίνων.
- Lafuente A, Esquifino AI. 1999. Cadmium effects on hypothalamic activity and pituitary hormone secretion in the male. *Toxicol Lett*, 110(3), 209-218.
- Lafuente A, Lorenzo MP, Cano P, Esquifino AI. 2001. Does cadmium affects pituitary hormone secretion in a dose response way? In: *Proceedings of 1st International FESTEM Congress on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology*, FESTEM eds, Venice, pp. 170.
- Lag M, Westly S, Lerstad T, Bjornsrud C, Refsnes M, Schwarze PE. 2002. Cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells: Involvement of Bax and p53, but not oxidative stress. *Cell Biol Toxicol*, 18, 29-42.



- Lam KL, Ko PW, Wong JKY, Chan KM. 1998. Metal toxicity and metallothionein gene expression studies in common carp and tilapia. *Mar Environ Res*, 46(1-5), 563-566.
- Lamkadem M, Melhaoui A, Mimouni J, Fontonge R. 2001. Cytotoxic effect and electrophysiologic activity of (R)-bguagaine, an alkylpyrrolidine alkaloid against MRC-5 fibroblasts. *Toxicol*, 39, 485-490.
- Landro JA, Schimmel P. 1993. Metal-binding site in a class I tRNA synthetase localized to a cluster inserted into nucleotide-binding fold. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 2261-2265.
- Larson A, Haux C, Sjobeck M. 1985. Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicol Environ Saf*, 9, 250-281.
- Latif MA, Bodaly RA, Johnston TA, Fudge RJP. 2001. Effects of environmental and maternally derived methylmercury on the embryonic and larval stages of walleye (*Stizostedion vitreum*). *Environ Poll*, 111, 139-148.
- Leccia MT, Richard MJ, Favier A, Beani JC. 1993. Zinc protects against ultraviolet A1-induced DNA damage in cultured human fibroblasts. *Biol Trace Elem Res*, 69, 177-190.
- Le Guevel R, Petit FG, Le Goff P, Metivier R, Valotaire Y, Pakdel F. 2000. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biol Repr*, 63, 1, 259-266.
- Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH. 2000. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J*, 348, 425-432.
- Lees JA, Fawell SE, Parker MG. 1989. Identification of two transactivation domains in the mouse estrogen receptor. *Nucleic Acid Res*, 17, 5477-5488.
- Lehman LD, Poisner AM. 1984. Induction of metallothionein synthesis in cultured human trophoblasts by cadmium and zinc. *J Toxicol Environ Health*, 14(2-3), 419-432.
- Leibrandt ME, Koropatnick J, Harris JF, Cherian MG. 1991. Radioimmunoassay of metallothionein in rabbit, rat, mouse, Chinese hamster, and human cells. *Biol Trace Elem Res*, 30, 245-256.
- Lin CJ, Wu KH, Yew FH, Lee TC. 1995. Differential cytotoxicity of cadmium to rat embryonic fibroblasts and human skin fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*, 133(1), 20-26.
- Litchfield TM, Ishikawa Y, Wu LNY, Wuthier RE, Sauer GR. 1998. Effect of metal ions on calcifying growth plate cartilage chondrocytes. *Calcif Tissue Int*, 62(4), 341-349.
- Liu X, Jin GF, Nordberg GF, Sjöström M, Zhou Y. 1994. Influence of zinc and copper administration on metal disposition in rats with cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 126(1), 84-90.
- Liu J, Squibb KS, Akkerman M, Nordberg GF, Lipsky M, Fowler BA. 1996. Cytotoxicity, zinc protection, and stress protein induction in



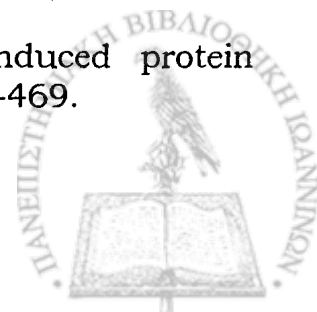
- rat proximal tubule cells exposed to cadmium chloride in primary cell culture. *Ren Fail*, 18(6), 867-882.
- Lou M, Garay R, Alda JO. 1991. Cadmium uptake through the anion exchanger in human red blood cells. *J Physiol*, 443, 123-136.
- MacKenzie K, Franco S, May C, Sadelain M, Moore MAS. 2000. Mass cultured human fibroblasts overexpressing hTERT encounter a growth crisis following an extended period of proliferation. *Experim Cell Res*, 259, 336-350.
- Mallatt J. 1995. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can J Fish Aquat Sci*, 42, 630-648.
- Mane F, Kagalou I, Katifori O, Natsis L, Kalfakakou V. 2003. Metal accumulation on the gills of goldfish (*Carassius auratus*) in lake Pamvotis, NW Greece. In: *Proceedings of 4th International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives*, S. Ermidou-Pollet & S. Pollet eds, Athens, pp. 1110-1119.
- Mane F, Kagalou I, Vezyraki P, Natsis L, Leonardos I, Kalfakakou V. 2005a. Cadmium levels' changes in *Carassius auratus* (goldfish) gills after exposure to subtoxic metal concentrations. In: *Proceedings of 27th Conf of Hellenic Soc Biol Sci*, pp. 223-224.
- Mane F, Stefanou D, Fotopoulos A, Vezyraki P, Leonardos I, Kagalou I, Natsis L, Xiropotamos S, Albanis T, Mila S, Kalfakakou V. 2005b. Is Cadmium a hormone disruptor? Evidences from an animal model. In: *Proceedings of 5th International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives*, S. Ermidou-Pollet & S. Pollet eds, Athens, pp. 522-532.
- Μανέ Φ. 1996. Συμβολή στη μελέτη του Λιμένα Ηρακλείου. Ανίχνευση βαρέων μετάλλων στο νερό και στο είδος *Mytilus galloprovincialis*. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Maret W, Vallee BL. 1998. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci*, 95(7), 3478-3482.
- Margoshes M, Vallee BL. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc*, 79, 4813-4814.
- Maroni G, Otto E, Lastowski-Perry D. 1986. Molecular and cytogenic characterization of a metallothionein gene of *Drosophila*. *Genetics*, 112(3), 493-504.
- Matsuoka M, Wispriyono B, Igisu H. 2000. Increased cytotoxicity of cadmium in fibroblasts lacking c-fos. *Biochem Pharmacol*, 59, 1573-1576.
- Mauk RJ, Brown ML. 2001. Selenium and mercury concentrations in brood-stock walleye collected from three sites on lake Oahe. *Arch Environ Contam Toxicol*, 40, 257-263.
- Maxon ME, Tjian R. 1994. Transcriptional activity of transcription factor IIE is dependent on zinc binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 9529-9533.
- McKim JM Jr, Liu J, Liu YP, Klaassen CD. 1992. Induction of metallothionein by cadmium-metallothionein in rat liver: a proposed mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol*, 112(2), 318-323.



- McLachlan JA, Burow M, Chaing TC, Li SF. 2001. Gene imprinting in developmental toxicology: a possible interface between physiology and pathology. *Toxicology Letters*, 120, 161-164.
- McMaster ME, Van Der Kraak GJ, Munkittrick KR. 1995. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comp Biochem Physiol Part C*, 112, 169-178.
- Meshitsuka S, Ishizawa M, Nose T. 1987. Uptake and toxic effects of heavy metal ions: interactions among cadmium, copper and zinc in cultured cells. *Experientia*, 43(2), 151-156.
- Mesna OJ, Steffensen IL, Melhuus A, Hjertholm H, Heier HE, Andersen RA. 1990. Induction of metallothionein production by zinc in human mononuclear cells. *Gen Pharmacol*, 21(6), 909-917.
- Mesna OJ, Steffensen IL, Hjertholm H, Andersen RA. 1995. Accumulation of metallothionein and its multiple forms by zinc, cadmium and dexamethasone in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes. *Chem Biol Interact*, 94(3), 225-242.
- Mishima A, Yamamoto C, Fujiwara Y, Kaji T. 1997. Tolerance to cadmium toxicity is induced by zinc through non-metallothionein mechanisms as well as metallothionein induction in cultured cells. *Toxicology*, 118(2-3), 85-92.
- Montorzi M, Falchuk KH, Vallee BL. 1995. Vitellogenin and lipovitellin: Zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry*, 34, 10851-10858.
- Mukherjee D, Kumar V, Chakraborti KP. 1994. Effect of mercuric chloride and cadmium chloride on gonadal function and its regulation in sexually mature common carp *Cyprinus carpio*. *Biomed Environ Sci*, 7(1), 13-24.
- Munger K, Germann UA, Lerch K. 1985. Isolation and structural organization of the *Neurospora crassa* copper metallothionein gene. *EMBO*, 4(10), 2665-2668.
- Nagel WW, Vallee BL. 1995. Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 579-583.
- Nartey N, Cherian MG, Banerjee D. 1987. Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. *Amer J Pathol*, 129(1), 177-182.
- Niyogi S, Wood CM. 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ Sci Technol*, 38(23), 6177-6192.
- Nordberg M. 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, 46, 243-254.
- Norey CG, Lees WE, Darke BM, Stark JM, Baker TS, Cryer A, Kay J. 1990. Immunological distinction between piscine and mammalian metallothioneins. *Comp Biochem Physiol B*, 95(3), 597-601.
- Ochi T, Otsuka F, Takahashi K, Ohsawa M. 1988. Glutathione and metallothioneins as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese hamster cells. *Chem Biol Interact*, 65(1), 1-14.



- Ohsawa M, Otsuka F, Sugizaki S. 1992. Zinc status in proliferative response of T lymphocytes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, Spec No: 518-521.
- Oliver PD, Tate DJ Jr, Newsome DA. 1992. Metallothionein in human retinal pigment epithelial cells: expression, induction and zinc uptake. *Curr Eye Res*, 11(2), 183-188.
- Olsson PE, Zafarullah M, Foster R, Hamor T, Gedamu L. 1990. Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Eur J Biochem*, 193(1), 229-235.
- Ovelgonne JH, Souren JE, Wiegant FA, Van Wijk R. 1995. Relationship between cadmium-induced expression of heatshock genes, inhibition of protein synthesis and cell death. *Toxicology*, 99(1-2), 19-30.
- Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM. 1992. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci*, 89, 6333-6337.
- Papagiannis I, Kagalou I, Paleologos E, Karayannis M, Kalfakakou V. 2002. Heavy metals in Lake Pamvotis (N.W. Greece) ecosystem. *Environ Intern*, 30, 357-362.
- Papagiannis I, Kagalou I, Leonardos J, Petridis D, Kalfakakou V. 2004. Copper and zinc in four freshwater species from Lake Pamvotis (Greece). *Presenius Environmental Bulletin*, 11(9b), 659-664.
- Papoutsoglou SE, Abel PD. 1988. Sublethal toxicity and accumulation of cadmium in *Tilapia aurea*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 41, 404-411.
- Παπουτσόγλου ΣΕ. 1998. *Ενδοκρινολογία ιχθύων*. Εκδόσεις Α. Σταμούλης. Αθήνα.
- Paquin PR et al. 2002. The Biotic Ligand Model: a historical overview. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 133, 1-2, 3-35.
- Πάσχος Γ. 2002. *Ιχθυοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων*. Ιωάννινα.
- Patrick L. 2003. Toxic Metals and Antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Altern Med Rev*, 8(2), 106-128.
- Pereira JJ, Mercaldo-Allen R, Kuropat C, Luedke D, Sennefelder G. 1993. Effect of cadmium accumulation on serum vitellogenin levels and hepatosomatic and gonadosomatic indices of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 24, 427-431.
- Peterson MG, Mercer JF. 1986. Structure and regulation of the sheep metallothionein-Ia gene. *Eur J Biochem*, 160(3), 579-585.
- Prasad AS. 1995. Zinc: An overview. *Nutr*, 11, 93-99.
- Predki PF, Sarkar B. 1992. Effect of replacement of "Zinc Fingers" Zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J Biol Chem*, 267, 5842-5846.
- Price-Hughey J, Bonham K, Gedamu L. 1986. Heavy metal-induced gene expression in fish and fish cell lines. *Environ Health Perspect*, 65, 141-147.
- Price-Hughey J, Gedamu L. 1987. Heavy metal induced protein synthesis in fish cell lines. *Experientia Suppl*, 52, 465-469.



- Prozialeck WC, Lamar PC. 1993. Surface binding and uptake of cadmium (Cd^{2+}) by LLC-PK1 cells on permeable membrane supports. *Arch Toxicol*, 67(2), 113-119.
- Prozialeck WC, Lamar PC. 1995. Effects of glutathione depletion on the cytotoxic effects of cadmium in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 134(2), 285-295.
- Ptashne M, Gann A. 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature*, 386(6625), 569-577.
- Rainbow PS. 1985. The biology of heavy metals in the sea. *Intern J Environmental Studies*, 25, 195-211.
- Rani AU. 2000. Cadmium-induced bioaccumulation in the selected tissues of freshwater teleost, *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ann N Y Acad Sci*, 919, 318-320.
- Rezvanipour M, Sepehri GH, Mimandi S. 2003. The effect of chronic Zinc administration and exposure to copper on gonadotropins, prolactin and testosterone level in human. *Proceedings of 4th International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives*, S. Ermidou-Pollet & S. Pollet eds, Athens, pp. 870-875.
- Ricard AC, Daniel C, Anderson P, Hontela H. 1998. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 34, 377-381.
- Richard MJ, Guiraud P, Leccia MT, Beani JC, Favier A. 1993. Effect of zinc supplementation on resistance of cultured human skin fibroblasts toward oxidant stress. *Biol Trace Elem Res*, 37, 187-199.
- Rising L, Vitarella D, Kimelberg HK, Aschner M. 1995. Cadmium chloride ($CdCl_2$)-induced metallothionein (MT) expression in neonatal rat primary astrocyte cultures. *Brain Research*, 678, 91-98.
- Robertson JD, Orrenius S. 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol*, 30(5), 609-627.
- Rodgers-Gray TP, Jobling S, Kelly C, Morris S, Brighty G, Waldock MJ, Sumpter JP, Tyler CR. 2001. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environ Sci Technol*, 35, 462-470.
- Ruby SM, Hull R, Anderson P. 2000. Sublethal lead affects pituitary function of rainbow trout during exogenous vitellogenesis. *Arch Environ Contam Toxicol*, 38, 46-51.
- Saijoh K, Katsuyama H, Sumino K. 1994. Brain metallothionein gene expression and regulation. *Biol Signals*, 1994, 3(3), 150-156.
- Saint-Jacques E, Seguin C. 1993. Cloning and nucleotide sequence of a complementary DNA encoding *Xenopus laevis* metallothionein: mRNA accumulation in response to heavy metals. *DNA Cell Biol*, 12(4), 329-340.
- Sasayama Y, Ukawa K, Kai-Ya H, Oguro C, Takei Y, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S. 1993. Goldfish calcitonin: purification, characterization, and hypocalcemic potency. *Gen Comp Endocrinology*, 89, 189-194.



- Satarug S, Haswell-Elkins MR, Moore MR. 2000. Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *Br J Nutr*, 84(6), 791-802.
- Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-Elkins MR, Reilly PE, Williams DJ, Moore MR. 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett*, 137(1-2), 65-83.
- Satarug S, Moore MR. 2004. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium pollution in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect*, 112(10), 1099-1103.
- Sato M, Kondoh M. 2002. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med*, 196, 9-22.
- Satoh M, Koyama H, Kaji T, Kito H, Toyama C. 2002. Perspectives on cadmium toxicity research. *Tohoku J Exp Med*, 196, 23-32.
- Sauer JM, Waalkes MP, Hooser SB, Baines AT, Kuester RK, Sipes IG. 1997. Tolerance induced by all-trans-retinol to the hepatotoxic effects of cadmium in rats: role of metallothionein expression. *Toxicol Appl Pharmacol*, 143(1), 110-119.
- Sauvant MP, Pepin D, Guillot J. 1999. Effects of humic substances and phenolic compounds on the in vitro toxicity of Aluminum. *Ecotoxic Environ Saf*, 44, 47-55.
- Schrech CB and Moyle Pb eds. 1990. *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Scott B, Lew J. 1986. Lead neurotoxicity: neuronal and non-neuronal cell survival in fetal and adult DRG cell cultures. *Neurotoxicology*, 7(1), 57-67.
- Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA. 1998. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertility and Sterility*, 70(4), 613-622.
- Shein NL, Chuda H, Arakawa T, Mizuno K, Soyano K. 2004. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fisheries Science*, 7, 360-365.
- Shelby JA, Mendonca MT. 2001. Comparison of reproductive parameters in male yellow-blotched map turtles (*Graptemys flavimaculata*) from a historically contaminated site and a reference site. *Comp Biochem Physiol C*, 129, 233-242.
- Shimizu M, Morita S. 1990. Effects of fasting on cadmium toxicity, glutathione metabolism, and metallothionein synthesis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 103(1), 28-39.
- Shimoda R, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP. 2001. Induction of apoptosis in cells by cadmium: quantitative negative correlation between basal or induced metallothionein concentration and apoptotic rate. *Toxicol Sci*, 64(2), 208-215.
- Shukla VK, Aryya NC, Pitale A, Pandey M, Dixit VK, Reddy CD, Gautam A. 1998. Metallothionein expression in carcinoma of the gallbladder. *Histopathology*, 33, 154-157.



- Sigal RL, Vijayvangiya R, Shukla GS. 1985. Toxic effects of cadmium and lead on reproductive function. *Endocrine toxicology*, Raven Press New York, pp. 149-179.
- Sitte N, Saretzki G, von Zglinicki T. 1998. Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of confluency. *Free Radic Biol Med*, 24(6), 885-893.
- Sitte N, Merker K, von Zglinicki T, Grune T. 2000. Protein oxidation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, 28(5), 701-708.
- Sprague JB. 1990. Aquatic Toxicology. In: *Methods for fish biology*. CB Schrech and PB Moyle eds. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp. 491-528.
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun EA, Bagchi M. 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 19(3), 201-213.
- Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. 2000. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. In: *Metal Ions in Biology and Medicine*; volume 6. Eds. J.A. Centeno, Ph. Collery, G. Vernet, R.B. Finkelman, H. Gibb, J.C. Etienne. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 698-700.
- Strauss RE, Bond CE. 1990. Taxonomic methods: Morphology. In: *Methods for fish biology*. CB Schrech and PB Moyle eds. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp. 109-140.
- Suedel BC, Rodgers JH-Jr, Deaver E. 1997. Environmental factors that may affect toxicity of cadmium to freshwater organisms. *Arch Environ Contam Toxicol*, 33, 188-193.
- Sullivan VK, Burnett FR, Cousins RJ. 1998. Metallothionein expression is increased in monocytes and erythrocytes of young men during zinc supplementation. *J Nutr*, 128(4), 707-713.
- Susanto I, Wright SE, Lawson RS, Williams CE, Deneke SM. 1998. Metallothionein, glutathione, and cystine transport in pulmonary artery endothelial cells and NIH/3T3. *Am J Physiol*, 274(2), L296-300.
- Suzuki CA, Ohta H, Albores A, Koropatnick J, Cherin MG. 1990. Induction of metallothionein synthesis by zinc in cadmium pretreated rats. *Toxicology*, 63(3), 273-284.
- Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, Kaminska T, Sniezko R, Paduch R, Abramczyk D, Filar J, Kandfer-Szerszen M. 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology*, 145, 159-171.
- Tao S, Liu C, Dawson R, Long A, Xu F. 2000. Uptake of cadmium adsorbed on particulates by gills of goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf*, 47, 306-313.
- Tao S, Liu C, Dawson R, Cao J, Li B. 1999. Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius auratus*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 37, 352-357.



- Tata JR, Smith DF. 1979. Vitellogenesis: a versatile model for hormonal regulation of gene expression. *Recent Prog Horm Res*, 35, 47-95.
- Terracio L, Nachtigal M. 1986. Transformation of prostatic epithelial cells and fibroblasts with cadmium chloride in vitro. *Arch Toxicol*, 58(3), 141-151.
- Thomas P. 1990. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. *J Exp Suppl*, 4, 126-128.
- Thomas P. 1993. Effects of cadmium on gonadotropin secretion from Atlantic croaker pituitaries incubated in vitro. *Mar Environ Res*, 35, 147-151.
- Thompson ED, Olsson PE, Mayer GD, Haux C, Walsh PJ, Burge E, Hogstrand C. 2001. Effects of 17- β estradiol on levels and distribution of metallothionein and zinc in squirreelfish. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 280, R527-535.
- Tiffany-Castiglioni E. 1993. Cell culture models for lead toxicity in neuronal and glial cells. *Neurotoxicology*, 1993, 14(4), 513-536.
- Tirmenstein MA, Plews PI, Walker CV, Woolery MD, Wey HE, Toraason MA. 1995. Antimony induced oxidative stress and toxicity in cultured cardiac myocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 130(1), 41-47.
- Tomita T, Matsubara O. 2000. Immunocytochemical localization of metallothionein in human pancreatic islets. *Pancreas*, 20(1), 21-24.
- Tonner LE, Heiman AS. 1997a. Lead may effect glucocorticoid signal transduction in cultured hepatoma cells through inhibition of protein kinase C. *Toxicology*, 119(2), 155-166.
- Tonner LE, Katz DI, Heiman AS. 1997b. The acute effect of lead acetate on glucocorticoid receptor binding in C6 glioma cells. *Toxicology*, 116(1-3), 109-122.
- Trudeau VL, Peter RE, Sloley BD. 1991. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin-releasing hormone in goldfish. *Biol Repr*, 44, 951-960.
- Tsangaris G and Tzortzatou-Stathopoulou F. 1998a. Metallothionein expression prevents apoptosis: a study with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides in a human T cell line. *Anticancer Res*, 18, 2423-2434.
- Tsangaris G, Tzortzatou-Stathopoulou F. 1998b. Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology*, 128, 143-150.
- Tulasi SJ, Reddy PU, Rao JV. 1992. Accumulation of lead and effects on total lipids and lipid derivatives on the freshwater fish *Anabas testudineus* (Bloch). *Ecotoxicol Environ Saf*, 23(1), 33-38.
- US EPA. 1980. Ambient Water Quality Criteria for Cadmium, US Environmental Protection Agency, Washington DC, EPA-440/5-80-025.
- US EPA. 2001. Streamlined Water-Effect ratios for Metals, US Environmental Protection Agency, Washington DC, EPA-822-R001-005.



- Utoh T, Horie N, Mikawa N, Okamura A et al. 2005. Annual changes in ovarian development and plasma estradiol-17 β in reared common Japanese conger, *Conger myriaster*. *Fisheries Science*, 71, 38-47.
- Vahter M, Berglund M, Akesson A, Liden C. 2002. Metals and women's health. *Environ Res*, 88(3), 145-155.
- Vallee BL, Falchuk KH. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*, 73(1), 79-118.
- Vallee BL. 1995. The function of metallothionein. *Neurochem Int*, 27(1), 23-33.
- Versonnen BJ, Goemans G, Belpaire C, Janssen CR. 2004. Vitellogenin content in European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. *Environ Poll*, 128, 363-371.
- Verougstraete V, Lison D, Hotz P. 2003. Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 6(3), 227-255.
- Viarengo A, Moore MN, Mancinelli G, Mazzucotelli A, Pipe RK, Farrar SV. 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Marine Biology*, 94, 251-257.
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp Biochem Physiol*, 97C(1), 37-42.
- Waalkes MP, Diwan BA, Weghorst CM, Ward JM, Rice JM, Cherian MG, Goyer RA. 1993. Further evidence of the tumor-suppressive effects of cadmium in the B6C3F1 mouse liver and lung: late stage vulnerability of tumors to cadmium and the role of metallothionein. *J Pharmacol Exp Ther*, 266, 1656-1663.
- Waalkes MP, Diwan BA, Rehm S et al. 1996. Down-regulation of metallothionein expression in human and murine hepatocellular tumors: association with the tumour-necrotizing and antineoplastic effects of cadmium in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 277, 1026-1033.
- Waalkes MP, Diwan BA. 1999. Cadmium-induced inhibition of the growth and metastasis of human lung carcinoma xenografts: role of apoptosis. *Carcinogenesis*, 20, 65-70.
- Waalkes MP. 2000. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem*, 79(1-4), 241-244.
- Waalkes MP. 2003. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res*, 533(1-2), 107-120.
- Wagner M, Hermanns I, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. 1999. Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 1), L1026-1033.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192(2-3), 95-117.
- Wallace RA. 1978. Oocyte growth in non-mammalian vertebrates. Int Jones RE (ed). *The Vertebrate Ovary*. New York: Plenum Press, pp. 469-502.



- Walther UI, Muckter H, Wallner B, Bergen U, Duggen S, Unsinn G, Walther SC, Fichtl B. 2002. Effect of low level zinc pretreatment on zinc-mediated toxicity in different lung cell lines. *Biol Trace Elem Res*, 88(1), 45-57.
- Wataha JC, Hanks CT, Sun Z. 1994. Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. *Dent Mater*, 10(3), 156-161.
- Watjen W, Cox M, Biagioli M, Beyersmann D. 2002a. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: mediation by caspase 9-activation. *Biometals*, 15(1), 15-25.
- Watjen W, Haase H, Biagioli M, Beyersmann D. 2002b. Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc. *Environ Health Perspect*, 110 (Suppl 5), 865-867.
- Weber DN. 1993. Exposure to sublethal levels of waterborne lead alters reproductive behavior patterns in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicology*, 14(2-3), 347-358.
- Wedemeyer GA, Barton BA, McLeay DJ. 1990. Stress and acclimation. In: *Methods for fish biology*. CB Schrech and PB Moyle eds, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp.451-489.
- Wendelaar Bonga SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev*, 77(3), 591-625.
- Wilson RW, Taylor EW 1993a. The physiological responses of freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during acutely lethal copper exposure. *J Comp Physiol B*, 1993a, 163, 38-47.
- Wilson RW, Taylor EW. 1993b. Differential responses to copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to sea and brackish water. *J Comp Physiol B*, 163, 239- 246.
- Winters C, Jasani B, Marchant S, Morgan AJ. 1997. Immunocytochemical identification of metallothionein-positive cells in rheumatoid synovium and analysis of their cell lineage. *Histochem J*, 29(4), 301-307.
- Woo ES, Lazo JS. 1997. Nucleocytoplasmic functionality of metallothionein. *Cancer Res*, 57(19), 4236-4241.
- Wood CM, Adams WJ, Ankley GT et al. 1997. Environmental toxicology of metals. In: *Reassessment of metals criteria for aquatic life protection: priorities for research and implementation*, H.L. Bergaman and E.J. Dorward-King eds, SETAC Press, Pensacola, 31-35.
- Wood CM, Playle RC, Hogstrand C. 1999. Physiology and modeling of the mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environ Toxicol Chem*, 1999, 18 1, 71-83.
- World Bank Mining Guidelines, 1995.
- Wu SM, Chou YY, Deng AN. 2002. Effects of exogenous cortisol and progesterone on metallothionein expression and tolerance to waterborne cadmium in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Zoological Studies*, 41(1), 111-118.
- Yang CF, Shen HM, Shen Y, Zhuang ZX, Ong CN. 1997. Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environ Health Perspect*, 105(7), 712-716.



- Yen FP, Lee YH, Huang JD, Sun LT, Dufour S, Chang CF. 2002. Estradiol-17 β triggers luteneizing hormone release in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegeli* Bleeker) through multiple interactions with gonadotropin-releasing hormone control. *Biol Repr*, 66, 251-257.
- Yuan H, Kaneko T, Matsuo M. 1996. Increased susceptibility of late passage human diploid fibroblasts to oxidative stress. *Exp Gerontol*, 31(4), 465-474.
- Zelikoff JT, Bowser D, Squibb KS, Frenkel K. 1995. Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies. *J Toxicol Environ Health*, 45(3), 235-248.
- Zhan W, Xu Y, Li AH, Zhang J, Schramm KW, Kettrup A. 2000. Endocrine disruption by hexachlorobenzene in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Bull Environ Contam Toxicol*, 65, 560-566.
- Zhang X-H, Takenaka I. 1998. Incidence of apoptosis and metallothionein expression in renal cell carcinoma. *Brit J Urol*, 1998, 81, 9-13.
- Zhu Z, Thiele DJ. 1996. Toxic metal-responsive gene transcription. In: *Stress-inducible cellular responses*. U. Feige, RI. Morimoto, I Yahara and B. Polla eds. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- Zikic RV, Stajn AS, Pavlovic SZ, Ognjanovic BI, Saicic ZS. 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch) exposed to cadmium. *Physiol Res*, 50, 1, 105-111.
- Ζιώγας Γ, Σταμουλάκης Γ, Κωνσταντής Κ, Καλφακάκου Β. 1986. Η ρύπανση στο Λεκανοπέδιο των Ιωαννίνων και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Τεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδας, Τμήμα Ηπείρου.
- Zglinicki von T, Edwall C, Östlund E, Lind B, Nordberg M, Ringertz NR, Wroblewski J. 1992. Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. *J Cell Sci*, 103 (Pt4), 1073-1081.



ΕΡΕΥΝΑ

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Φυσικοχημικές παράμετροι νερού ενυδρείων

Πίνακας. Μεταβολή pH νερού ενυδρείων.

Ημέρες	I	II	III	IV
14	7.81±0.12	7.79±0.11	7.80±0.09	7.82±0.10
30	8.05±0.58	7.97±0.41	7.82±0.40	7.82±0.41
45	7.33±0.05	7.38±0.04	7.38±0.04	7.36±0.03
60	7.39±0.02	7.45±0.03	7.43±0.02	7.41±0.02
90	7.40±0.04	7.46±0.05	7.44±0.02	7.42±0.03
120	7.46±0.13	7.45±0.03	7.47±0.08	7.49±0.12

Πίνακας. Μεταβολή θερμοκρασίας νερού ενυδρείων.

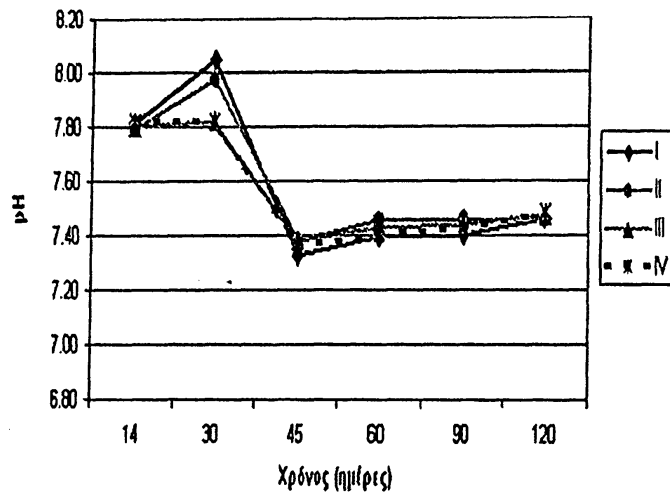
Ημέρες	I	II	III	IV
14	7.91±1.02	8.91±1.45	8.91±1.45	9.08±1.45
30	5.83±0.66	9.79±1.02	9.36±0.94	9.36±0.94
45	5.31±0.87	9.67±0.71	9.89±0.78	9.89±0.78
60	7.15±1.05	11.23±0.73	11.31±0.85	11.31±0.85
90	9.77±1.76	12.63±1.58	13.09±1.62	13.06±1.64
120	14.95±3.12	16.40±2.38	16.86±2.63	16.86±2.63

Πίνακας. Μεταβολή διαλυμένου οξυγόνου νερού ενυδρείων.

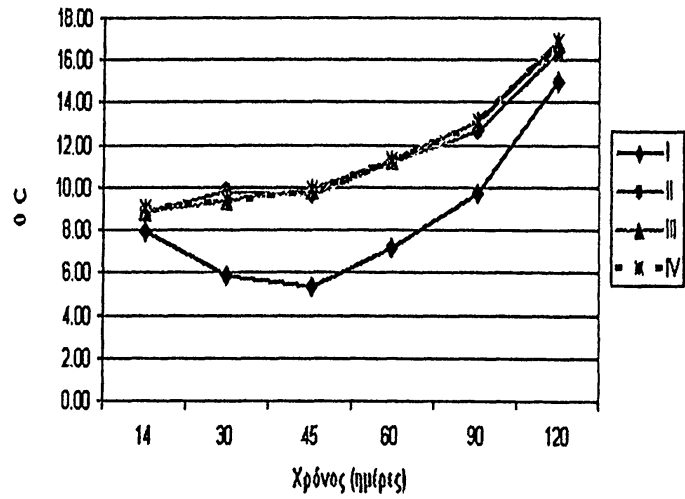
Ημέρες	I	II	III	IV
14	10.82±0.40	10.77±0.43	10.65±0.26	10.71±0.36
30	11.25±0.59	10.47±0.41	10.47±0.28	10.54±0.24
45	12.28±0.68	10.69±0.21	10.57±0.13	10.48±0.11
60	12.12±0.49	10.18±0.38	10.25±0.39	10.15±0.30
90	11.02±0.82	9.54±0.51	9.73±0.45	9.23±1.30
120	9.23±0.82	8.50±0.51	8.61±0.43	8.74±0.47



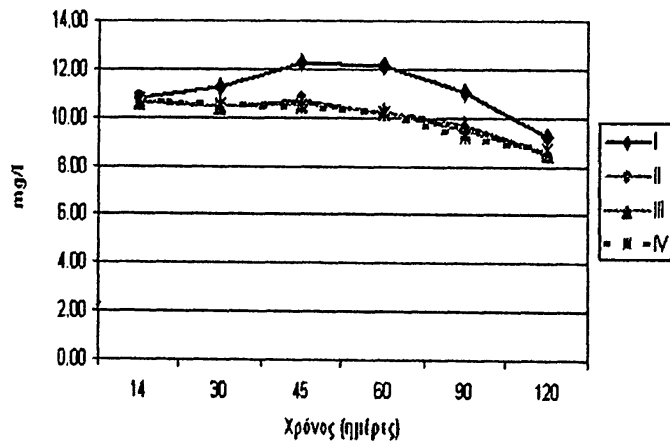
Μεταβολή pH νερού



Μεταβολή Θερμοκρασίας νερού



Μεταβολή Διαλυμένου Οξυγόνου νερού



Γράφημα. Μεταβολή των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού στα ενυδρεία I, II, III και IV.



Α. Κινητική Μετάλλων

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$) στα βράγχια ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	9.59 \pm 3.77	9.59 \pm 3.77	9.59 \pm 3.77	9.59 \pm 3.77
14	5.32 \pm 4.99	5.49 \pm 4.81	8.33 \pm 8.07	31.65 \pm 9.46
30	9.18 \pm 1.86	2.42 \pm 2.08	9.41 \pm 8.28	55.72 \pm 17.69
45	5.30 \pm 4.21	5.64 \pm 2.49	6.59 \pm 1.56	55.68 \pm 18.68
60	2.24 \pm 2.41	2.69 \pm 2.50	19.18 \pm 5.26	54.63 \pm 16.22
120	4.38 \pm 3.17	2.28 \pm 2.95	9.83 \pm 6.06	16.59 \pm 6.07
120α			1.11 \pm 1.54	8.90 \pm 3.41
120β			14.14 \pm 11.31	37.87 \pm 20.21

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn ($\mu\text{g}/\text{g}$) στα βράγχια ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	52.21 \pm 8.81	52.21 \pm 8.81	52.21 \pm 8.81	52.21 \pm 8.81
14	51.33 \pm 4.99	52.16 \pm 7.36	53.06 \pm 11.87	54.31 \pm 12.33
30	54.56 \pm 8.47	47.36 \pm 9.88	44.64 \pm 6.83	57.67 \pm 7.06
45	58.58 \pm 16.35	60.17 \pm 11.08	56.41 \pm 11.38	48.48 \pm 5.50
60	45.71 \pm 7.93	57.10 \pm 19.95	68.29 \pm 12.28	52.16 \pm 12.28
120	56.70 \pm 18.47	59.75 \pm 14.75	63.52 \pm 33.30	51.94 \pm 9.19
120α			68.15 \pm 38.91	83.77 \pm 13.58
120β			91.36 \pm 24.10	68.68 \pm 13.43

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$) στα βράγχια ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	I	II
0	9.40 \pm 2.87	9.40 \pm 2.87
14	3.55 \pm 5.02	16.64 \pm 5.86
30	8.93 \pm 1.84	6.82 \pm 4.50
45	1.14 \pm 1.61	9.38 \pm 0.88
60	6.81 \pm 4.23	20.63 \pm 15.03
90	3.16 \pm 2.47	1.50 \pm 2.12
120	5.26 \pm 0.87	1.27 \pm 0.03



Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn (μg/g) στα βράγχια ιχθύων κλάσης II.

Zn	I	II
0	56.20±30.31	56.20±30.31
14	59.13±3.21	73.94±49.23
30	40.82±4.63	45.80±10.35
45	48.07±21.16	66.93±10.82
60	54.71±5.82	56.79±15.73
90	63.37±18.21	37.61±8.81
120	62.14±31.31	41.58±46.79

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd (μg/kg) στους μύες ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	8.38±7.02	8.38±7.02	8.38±7.02	8.38±7.02
14	0.47±0.56	4.09±3.96	1.06±1.23	0.63±0.70
30	5.14±4.54	1.96±1.85	0.06±0.15	1.67±2.29
45	2.20±2.82	1.45±1.17	2.69±2.81	2.86±3.35
60	1.86±2.14	8.20±7.03	0.88±1.81	1.43±3.50
120	7.02±2.95	3.85±2.61	3.92±3.42	4.50±2.84
120α			0.43±0.50	0.40±0.89
120β			0.93±1.51	0.52±3.83

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn (μg/g) στους μύες ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	5.20±1.69	5.20±1.69	5.20±1.69	5.20±1.69
14	5.59±2.47	38.99±24.95	5.80±3.03	5.97±3.96
30	8.22±2.14	8.22±3.10	12.80±6.49	12.01±2.49
45	6.69±5.57	9.61±7.69	9.10±4.48	8.78±2.57
60	8.40±2.30	10.34±5.49	6.93±4.59	3.62±2.96
120	3.86±3.54	4.84±3.44	5.32±2.87	7.48±3.51
120α			4.22±2.29	10.11±5.30
120β			3.90±4.39	6.75±7.36



Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$) στους μύες ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	I	II
0	10.46 \pm 2.33	10.46 \pm 2.33
14	0.42 \pm 0.59	0.19 \pm 0.27
30	4.69 \pm 6.63	0.34 \pm 0.16
45	38.97 \pm 49.71	2.46 \pm 1.24
60	12.63 \pm 17.85	6.38 \pm 1.94
90	0.00 \pm 0.00	3.79 \pm 4.74
120	0.00 \pm 0.00	8.33 \pm 2.36

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn ($\mu\text{g}/\text{g}$) στους μύες ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	I	II
0	8.37 \pm 10.49	8.37 \pm 10.49
14	5.00 \pm 2.36	11.24 \pm 6.77
30	4.69 \pm 2.40	4.17 \pm 4.18
45	6.96 \pm 1.25	15.09 \pm 7.20
60	12.43 \pm 2.45	18.09 \pm 1.52
90	10.21 \pm 3.80	14.52 \pm 5.49
120	2.94 \pm 0.85	24.18 \pm 25.29

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$) στους νεφρούς ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	69.39 \pm 7.27	69.39 \pm 7.27	69.39 \pm 7.27	69.39 \pm 7.27
14	69.30 \pm 31.14	44.81 \pm 22.78	57.91 \pm 8.31	89.24 \pm 34.56
30	43.36 \pm 23.00	47.45 \pm 16.47	42.04 \pm 11.29	43.06 \pm 16.59
45	64.85 \pm 17.76	105.42 \pm 61.37	60.12 \pm 19.36	56.68 \pm 42.10
60	63.56 \pm 21.66	29.44 \pm 20.54	74.16 \pm 31.00	124.72 \pm 34.75
120	59.34 \pm 23.90	83.41 \pm 51.47	97.31 \pm 28.29	204.97 \pm 97.90
120α			79.20 \pm 60.61	143.08 \pm 28.59
120β			92.60 \pm 63.36	334.96 \pm 196.53



Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd($\mu\text{g}/\text{kg}$) στους νεφρούς θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0				
14	85.30 \pm 25.17	109.59 \pm 110.73	52.89 \pm 2.89	71.72 \pm 27.45
30	53.57 \pm 20.45	54.33 \pm 32.38	40.99 \pm 14.23	53.00 \pm 32.53
45	50.99 \pm 11.62	107.10 \pm 61.01	46.90 \pm 34.77	54.02 \pm 30.32
60	94.30 \pm 38.33	29.81 \pm 10.95	75.35 \pm 32.11	116.25 \pm 33.33
120	88.22 \pm 67.82	157.50 \pm 51.47	97.31 \pm 28.29	144.94 \pm 69.81
120α			110.70 \pm 78.56	157.50 \pm 14.14
120β			88.78 \pm 76.32	273.15 \pm 73.42

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd($\mu\text{g}/\text{kg}$) στους νεφρούς αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	69.39 \pm 7.27	69.39 \pm 7.27	69.39 \pm 7.27	69.39 \pm 7.27
14	53.30 \pm 31.98	15.63 \pm 7.43	67.95 \pm 4.18	124.27 \pm 5.40
30	22.95 \pm 11.81	44.01 \pm 87.18	44.13 \pm 4.07	38.08 \pm 2.67
45	53.72 \pm 43.53	102.90 \pm 60.84	56.50 \pm 27.58	16.88 \pm 42.10
60	5.66 \pm 25.42	96.35 \pm 35.29	72.98 \pm 36.98	133.19 \pm 41.14
120		64.89 \pm 51.47		295.00 \pm 39.60
120α			98.33 \pm 18.86	133.47 \pm 34.47
120β				427.67 \pm 170.65

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$) στους νεφρούς ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	I	II
0	169.24 \pm 122.37	169.24 \pm 122.37
14	138.93 \pm 30.86	259.51 \pm 107.15
30	156.40 \pm 128.48	373.18 \pm 24.50
45	259.73 \pm 29.67	312.55 \pm 79.03
60	182.46 \pm 114.37	79.42 \pm 27.47
90	117.30 \pm 25.62	125.95 \pm 151.01
120	285.71 \pm 13.13	119.58 \pm 33.00



Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn ($\mu\text{g/g}$) στους νεφρούς ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	33.22 \pm 18.90	33.22 \pm 18.90	33.22 \pm 18.90	33.22 \pm 18.90
14	28.50 \pm 6.19	44.87 \pm 20.95	30.19 \pm 5.38	32.10 \pm 11.61
30	33.21 \pm 10.41	27.81 \pm 3.35	30.09 \pm 5.31	21.71 \pm 8.70
45	36.30 \pm 30.79	22.52 \pm 6.75	26.47 \pm 3.74	25.31 \pm 9.20
60	18.67 \pm 5.98	21.35 \pm 7.96	17.56 \pm 10.93	22.78 \pm 9.81
120	45.12 \pm 7.32	25.14 \pm 10.03	32.05 \pm 18.29	27.88 \pm 21.96
120α			52.25 \pm 31.37	22.33 \pm 10.87
120β			23.09 \pm 10.48	23.93 \pm 15.84

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn($\mu\text{g/g}$) στους νεφρούς θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	50.53 \pm 18.90	50.53 \pm 18.90	50.53 \pm 18.90	50.53 \pm 18.90
14	29.06 \pm 3.19	37.91 \pm 16.19	28.13 \pm 3.87	36.51 \pm 7.70
30	26.55 \pm 1.70	28.60 \pm 4.08	29.76 \pm 6.22	22.26 \pm 13.57
45	11.43 \pm 4.26	23.95 \pm 7.88	27.20 \pm 4.30	24.24 \pm 9.46
60	16.60 \pm 5.84	26.88 \pm 6.11	16.59 \pm 13.80	28.19 \pm 11.73
120	45.12 \pm 7.32	17.67 \pm 3.30	32.05 \pm 18.29	14.02 \pm 8.15
120α			42.46 \pm 31.20	5.83 \pm 1.18
120β			20.79 \pm 15.30	28.95 \pm 10.29

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn($\mu\text{g/g}$) στους νεφρούς αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	28.90 \pm 18.74	28.90 \pm 18.74	28.90 \pm 18.74	28.90 \pm 18.74
14	27.94 \pm 9.20		34.33 \pm 6.98	23.29 \pm 16.22
30	46.54 \pm 0.58	27.42 \pm 3.54	30.75 \pm 4.83	21.43 \pm 8.03
45	31.22 \pm 36.24	20.38 \pm 10.21	25.00 \pm 2.83	7.44 \pm 11.87
60	22.80 \pm 5.04	19.00 \pm 10.39	18.53 \pm 10.26	17.37 \pm 3.92
120		28.88 \pm 10.03		48.67 \pm 18.86
120α				27.56 \pm 3.67
120β			18.33 \pm 5.50	6.11 \pm 3.93



Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn (μg/g) στους νεφρούς ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	I	II
0	31.85±12.41	31.85±12.41
14	27.70±0.28	32.18±12.11
30	29.08±6.01	27.91±5.73
45	18.35±0.32	36.91±7.02
60	28.22±2.20	80.90±7.07
90	30.67±13.20	19.65±13.13
120	50.00±0.85	38.13±31.53

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd (μg/kg) στο ήπαρ ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	17.76±8.05	17.76±8.05	17.76±8.05	17.76±8.05
14	13.26±8.18	10.01±10.48	13.69±5.75	23.19±16.01
30	9.50±2.30	12.51±8.04	14.40±6.94	19.43±7.99
45	22.72±12.33	32.71±20.43	17.31±10.76	33.43±18.38
60	11.52±5.20	18.99±9.02	28.32±13.55	58.91±19.75
120	26.53±15.52	27.52±14.36	24.89±8.54	125.32±30.53
120α			21.41±9.44	61.76±11.90
120β			26.38±7.66	206.51±137.21

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd (μg/kg) στο ήπαρ θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	22.43±16.69	22.43±16.69	22.43±16.69	22.43±16.69
14	17.84 ±7.29	10.01±10.48	16.26 ±5.05	17.36±15.81
30	9.00 ±2.66	9.88 ±7.86	12.62 ±5.25	15.63±4.42
45	10.47 ±8.02	31.64±23.66	14.84±12.20	34.26±21.26
60	11.52±6.34	19.70±17.52	33.18±19.19	67.99±26.14
120	26.53±15.52	37.29±19.55	24.89 ±8.54	111.65±30.20
120α			30.31±19.24	88.02±45.23
120β			22.22 ±8.42	209.91±119.26



Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd (μg/kg) στο ήπαρ αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	30.62±21.93	30.62±21.93	8.54 ±21.93	30.62±21.93
14	15.74±16.26	36.39 ±8.95	17.97 ±3.04	34.85 ±11.11
30	10.49 ±1.54	13.82±13.30	22.25±10.96	21.33 ±9.24
45	27.31±12.14	47.26±15.00	17.31±7.65	31.77 ±18.06
60	13.62 ±1.07	14.22 ±9.02	20.82 ±6.69	49.82 ±6.64
120		22.63±11.00		145.83±22.39
120α				63.67±13.81
120β			32.62±13.04	201.42±7.90

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd (μg/kg) στο ήπαρ ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	I	II
0	51.62±29.99	51.62±29.99
14	178.88±83.26	67.36±35.37
30	71.05±93.41	223.12±0.16
45	9.84±10.39	104.58±18.27
60	79.38±98.11	25.38±2.23
90	36.56±1.03	248.00±4.74
120	152.89±123.19	57.87±14.94

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn (μg/g) στο ήπαρ ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	14.54±2.50	14.54±2.50	14.54±2.50	14.54±2.50
14	18.38±6.01	13.58±2.93	16.80±6.35	12.46±4.23
30	15.39±2.56	19.32±3.82	20.13±9.21	23.65±8.70
45	16.90±8.28	14.96±9.23	13.61±6.15	20.48±8.33
60	15.40±5.13	37.35±13.19	20.18±7.99	17.88±6.15
120	17.77±5.00	15.19±1.94	10.06±3.70	15.31±1.92
120α			14.68±5.65	15.06±2.83
120β			17.73±7.92	13.35±5.08



Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn (μg/g) στο ήπαρ θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	13.88±1.14	13.88±1.14	13.88±1.14	13.88±1.14
14	21.98 ±6.96	13.58±2.93	14.96 ±6.99	13.84±2.81
30	15.24 ±2.93	14.95 ±0.79	16.03 ±3.23	28.13±16.20
45	8.66 ±0.55	16.14±10.21	24.93±14.76	22.44±8.19
60	15.61 ±5.46	42.40±15.34	23.43 ±9.51	43.07±37.25
120	17.77±5.00	13.36 ±2.14	8.43 ±4.85	14.48±2.20
120α			14.68 ±5.06	15.14±3.93
120β			15.64 ±7.30	11.97±4.31

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn (μg/g) στο ήπαρ αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	18.40±7.35	18.40±7.35	18.40±7.35	18.40±7.35
14	14.79 ±1.77		20.48 ±3.82	9.72 ±4.23
30	41.60±36.20	21.50 ±2.25	28.32±13.82	21.41 ±6.58
45	21.02 ±6.80	27.06±23.79	7.50 ±1.80	12.67 ±4.31
60	14.97 ±6.44	23.99±15.06	21.95 ±5.69	15.31 ±6.15
120		16.10 ±1.20		16.55 ±5.47
120α				15.00 ±2.89
120β			13.08±1.34	13.11 ±8.88

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn (μg/g) στο ήπαρ ιχθύων κλάσης II.

Ημέρες	I	II
0	17.04±1.11	17.04±1.11
14	17.72±1.10	17.68±2.17
30	14.23±6.92	20.64±1.58
45	12.19±5.16	21.70±3.88
60	21.61±0.70	38.72±3.32
90	23.73±2.32	63.00±37.24
120	20.17±0.85	24.52±13.64



Β. Μέταλλα και Γονάδες**Πίνακας.** Συγκεντρώσεις Cd(μg/kg) στις γονάδες θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
14	0.68 ±0.81	0.52 ±0.57	2.79 ±2.88	3.64±4.20
30	4.78 ±4.01	4.71 ±3.33	3.75 ±7.50	10.14±3.34
45	10.99 ±1.07	6.87 ±1.15	12.90 ±8.90	9.17±7.19
60	9.92 ±2.92	8.82 ±0.19	9.61 ±3.80	8.76±1.99
120	8.10 ±6.08	9.93 ±8.74	11.37 ±6.98	19.93±1.87
120α			7.48±3.89	5.04±1.83
120β			26.14±7.47	21.09±2.78

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd(μg/kg) στις γονάδες αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	6.85±2.96	6.85±2.96	6.85±2.96	6.85±2.96
14	4.72 ±4.59	1.80±0.89		4.18 ±1.87
30	10.32 ±3.87	1.20 ±2.25	8.63 ±10.43	8.17 ±4.32
45	10.19 ±3.30	5.24 ±4.20	3.01 ±0.89	5.87 ±4.31
60	15.57±13.34	12.54 ±8.09	13.89 ±1.92	10.31 ±3.68
120		13.19±13.60		13.75 ±5.47
120α				2.91±1.38
120β			9.48±12.52	36.35±8.19

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Cd(μg/kg) στις γονάδες ιχθύων κλάσης II.

Φύλο	Ημέρες	I	II
Θ	14	0.50±0.47	2.94
	30	2.02	0.69±0.74
	45	0.56±0.10	1.39
	60	1.32	4.85
	120	1.69±0.56	2.30
	Α	0	14.17
14			0.14
30		2.42	
45			5.15
60		0.51	
90		3.09±1.74	2.49±0.74
120			4.62



Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn (μg/g) στις γονάδες θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	40.79±4.01	40.79±4.01	40.79±4.01	40.79±4.01
14	41.54 ±6.72	6.04 ±15.47	44.23 ±5.50	49.88±7.42
30	43.73 ±5.69	57.55 ±5.96	52.18 ±3.84	64.35±2.75
45	31.63±37.20	54.76±11.49	81.83±28.32	48.28±12.97
60	61.64±17.01	21.05±22.61	58.39 ±7.57	26.00±19.27
120	51.17±13.58	88.19±16.70	79.92±22.44	61.70±30.23
			64.32±20.37	63.58±7.90
			66.56±4.09	62.37±32.42

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn(μg/g) στις γονάδες αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	14.35±10.90	14.35±10.90	14.35±10.90	14.35±10.90
14	4.69 ±4.47		7.21 ±1.36	1.50 ±2.12
30	18.67±12.10	11.31 ±5.09	9.75 ±2.47	10.54 ±1.04
45	20.63±17.25	8.56 ±2.68	6.26 ±0.36	9.40 ±2.02
60	11.33 ±4.24	13.17 ±8.51	9.79 ±3.29	7.83 ±1.33
120		5.37 ±4.76		13.98 ±5.23
120α				8.94±2.15
120β			19.71±12.79	13.25±10.89

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Zn (μg/g) στις γονάδες ιχθύων κλάσης II.

Φύλο	Ημέρες	I	II
Θ	0	7.06	7.06
	14	9.91±1.12	8.52
	30	6.14	13.45±6.87
	45	16.31±5.59	14.01
	60	7.19	9.35
	120	15.64±0.99	18.57
	Α	0	0.72
14			1.45
30		0.81	
45			5.96
60		0.77	1.54
90		4.48±1.06	4.38±0.81
120			1.28



Πίνακας. Συγκεντρώσεις 17-β οιστραδιόλης (pg/ml) στις γονάδες θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
14	40.52 ±18.17	108.32±111.69	134.87±57.59	105.80±70.88
30	47.50 ±31.59	37.95 ±3.58	30.21 ±10.40	43.85±53.71
45	109.81±118.33	173.64±205.59	35.78 ±7.10	36.47±21.84
60	65.72 ±57.65	310.38±302.21	21.00 ±0.77	95.54±66.70
120	42.33 ±33.28	48.97 ± 62.28	34.50 ±27.41	110.00±104.40
120α			27.15±12.04	14.43±5.76
120β			13.49±6.22	77.51±46.99

Πίνακας. Συγκεντρώσεις 17-β οιστραδιόλης (pg/ml) στις γονάδες αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	45.36±10.90	45.36±10.90	45.36±10.90	45.36±10.90
14	36.33±11.85	42.27±4.17	32.94 ±8.84	18.67±12.11
30	18.25 ±4.06	39.94 ±8.19	30.29 ±5.77	27.71±13.47
45	37.75±10.48	34.16 ±2.68	46.30 ±0.36	14.76±2.02
60	32.99±20.84	20.17 ±2.63	29.33±11.28	26.29±15.24
120		50.79±28.95		65.35±18.34
120α				18.59±1.38
120β			61.21±59.72	16.88±2.55

Πίνακας. Συγκεντρώσεις 17-β οιστραδιόλης (pg/ml) στις γονάδες ιχθύων κλάσης II.

Φύλο	Ημέρες	I	II
Θ	0	498.63	498.63
	14	246.30±339.17	462.43
	30	303.17	22.05±3.27
	45	19.52±3.63	73.036
	60	2777.46	3848.53
	120	88.51±69.11	104.09
	Α	0	30.04
14			19.52
30		31.97	
45			37.43
60		109.02	49.16
90		64.02±16.51	30.53±16.25
120			39.90



Πίνακας. Μεταβολή Γοναδοσωματικού (GSI) Δείκτη (%) θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	2.47±0.02	2.47±0.02	2.47±0.02	2.47±0.02
14	3.36 ±0.93	3.06 ±0.89	3.10±1.23	2.71±1.58
30	3.56 ±0.99	3.30 ±0.82	2.41 ±0.63	2.39±0.40
45	2.15 ±0.08	3.29 ±1.55	2.14 ±0.14	3.51±1.43
60	1.51 ±0.83	9.39 ±3.74	2.61 ±1.39	4.22±2.45
120	3.57 ±1.49	1.13 ± 0.04	2.09 ±0.99	5.36±6.32
120α			1.73±0.29	1.52±0.49
120β			2.19±0.16	6.39±6.26

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Γοναδοσωματικού (GSI) Δείκτη (%) αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	1.40±0.45	1.40±0.45	1.40±0.45	1.40±0.45
14	1.61 ± 0.39	2.32 ±1.31	1.61 ±1.25	2.73 ±0.50
30	2.35 ±0.88	1.20 ±0.63	0.82 ±0.54	1.91 ±1.03
45	2.01 ±1.09	1.69 ±0.98	2.91 ±0.45	1.38 ±0.45
60	2.51 ±2.68	1.95 ±1.10	1.27 ±0.29	3.00 ±0.15
120		2.36 ±1.80		2.21 ±0.23
120α				2.83±0.72
120β			1.34±0.26	1.12±0.72

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Γοναδοσωματικού (GSI) Δείκτη ιχθύων κλάσης II.

Φύλο	Ημέρες	I	II
Θ	0	13.34	13.34
	14	7.65±0.25	9.84±2.12
	30	17.71	5.42
	45	5.85±2.10	8.68
	60	9.09	11.40
	120	4.76±2.59	2.59
	Α	0	4.13
14			4.48
30		4.78	
45			6.15
60		5.96	5.22
90		4.94±1.25	2.01±0.62
120			1.62



Πίνακας. Μεταβολή Ηπατοσωματικού (LSI) Δείκτη (%) Θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	3.41±1.01	3.41±1.01	3.41±1.01	3.41±1.01
14	3.64 ±0.91	3.55 ±0.56	4.57 ±1.86	3.22±0.54
30	4.06 ±1.04	3.17 ±0.36	2.62 ±0.81	2.23±0.05
45	2.18 ±0.54	2.42 ±0.86	2.05 ±0.72	2.29±0.86
60	1.49 ±0.97	1.48 ±0.27	2.90 ±0.51	2.08±0.40
120	1.96 ±0.39	1.66 ±0.36	2.44 ±0.61	2.23±0.17
120α			2.17±0.65	2.03±0.61
120β			1.98±0.51	2.24±0.53

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Ηπατοσωματικού (LSI) Δείκτη (%) αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	3.16±1.51	3.16±1.51	3.16±1.51	3.16±1.51
14	4.10 ± 1.15	3.38 ±1.30	2.76 ±0.85	3.32 ±2.30
30	3.00 ±1.34	2.53 ±0.70	2.42 ±0.96	1.99 ±0.60
45	3.06 ±1.11	2.70 ±0.32	2.61±1.03	2.03 ±0.66
60	3.51 ±2.22	3.55 ±1.66	2.29±0.08	2.29 ±0.18
120		1.48 ±0.24		2.29 ±1.00
120α				1.43±0.79
120β			2.43±0.17	1.86±0.77

Πίνακας. Συγκεντρώσεις Ηπατοσωματικού (LSI) Δείκτη ιχθύων κλάσης II.

Φύλο	Ημέρες	I	II
Θ	0	3.21	3.21
	14	2.13±0.70	2.25
	30	3.59	1.61±0.31
	45	3.41±1.22	1.30
	60	1.78	2.52
	120	2.76±0.24	2.92
	Α	0	3.58
14			3.41
30		3.12	
45			2.63
60		3.64	2.09
90		1.38±0.76	0.97±0.18
120			2.48



Πίνακας. Συντελεστής Ευρωστίας (CF) θηλυκών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	3.47±0.39	3.47±0.39	3.47±0.39	3.47±0.39
14	3.61 ±0.61	3.12 ±0.51	3.56 ±0.44	3.15±0.26
30	3.19 ±0.34	3.18 ±0.16	3.35 ±0.21	3.11±0.34
45	3.49 ±0.49	3.41 ±0.34	2.92 ±0.38	3.21±0.26
60	7.43 ±11.66	3.09 ±0.18	3.26 ±0.20	3.26±0.25
120	3.81 ±0.49	2.69 ±0.26	3.17 ±0.30	3.54±0.51
120α			3.12±0.29	3.20±0.11
120β			2.99±0.20	3.18±0.35

Πίνακας. Συντελεστής Ευρωστίας (CF) αρσενικών ιχθύων κλάσης I.

Ημέρες	I	II	III	IV
0	3.44±0.41	3.44±0.41	3.44±0.41	3.44±0.41
14	3.61 ± 0.24	2.98 ±0.35	3.14 ±0.47	3.26 ±0.34
30	3.20 ±0.27	3.28 ±0.35	3.06 ±0.23	3.07 ±0.37
45	3.32 ±0.22	3.21 ±0.27	3.30±0.17	3.23 ±0.11
60	3.21 ±0.66	3.13 ±0.28	3.22±0.18	3.44 ±0.17
120	3.53 ±0.26	2.98 ±0.28	2.88 ±0.20	2.69 ±0.30
120α			2.99±0.12	2.89±0.22
120β			2.94±0.39	3.40±0.44

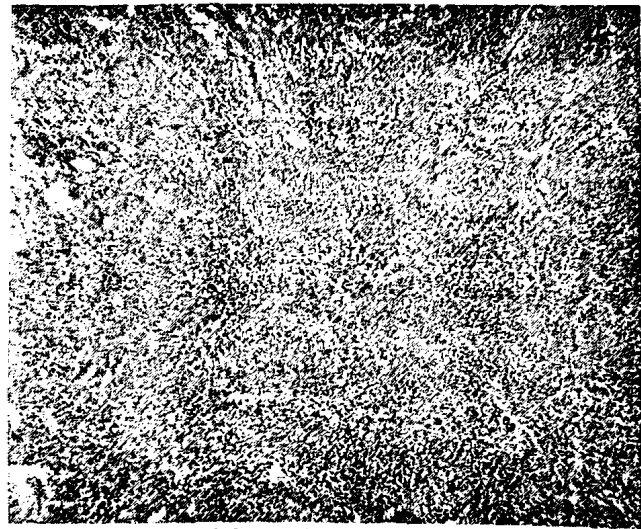
Πίνακας. Συντελεστής Ευρωστίας (CF) ιχθύων κλάσης II.

Φύλο	Ημέρες	I	II
Θ	0	3.52	3.52
	14	2.87±0.31	3.47
	30	4.35	2.73±0.25
	45	3.01±0.25	2.54
	60	2.99	3.81
	120	4.06±0.23	3.05
	Α	0	3.68
14			3.33
30		3.34	
45			2.60
60		3.24	3.15
90		3.00±0.27	2.92±0.25
120			2.99

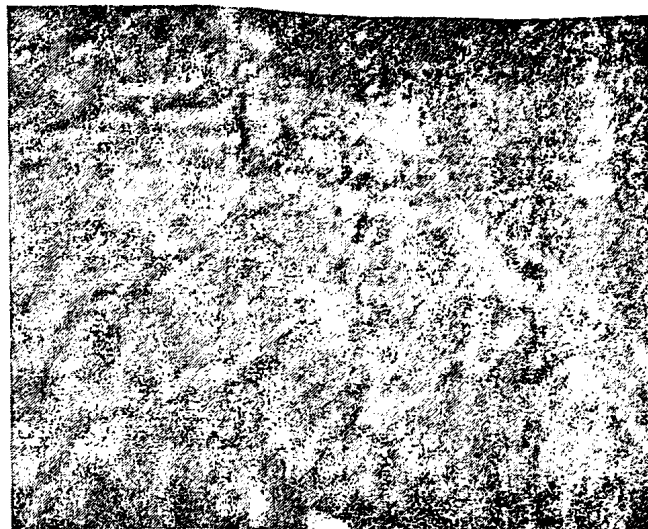


Ιστολογική ωρίμανση γονάδων αρσενικών

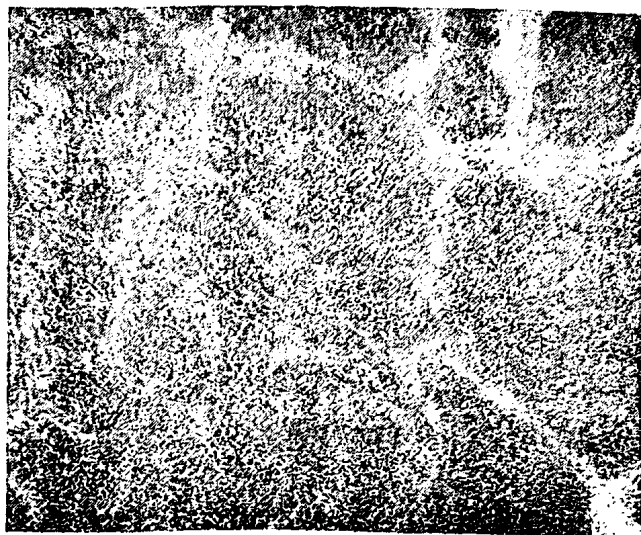
Κλάση I
14 ημέρες



Εικόνα. Ομάδα I (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια (M_1)



Εικόνα. Ομάδα III (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια (M_1)



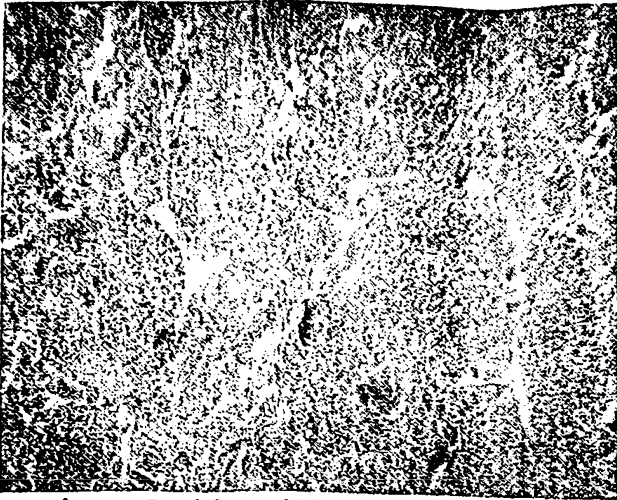
Εικόνα. Ομάδα II (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια (M_1)



Εικόνα. Ομάδα IV (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια (M_1)



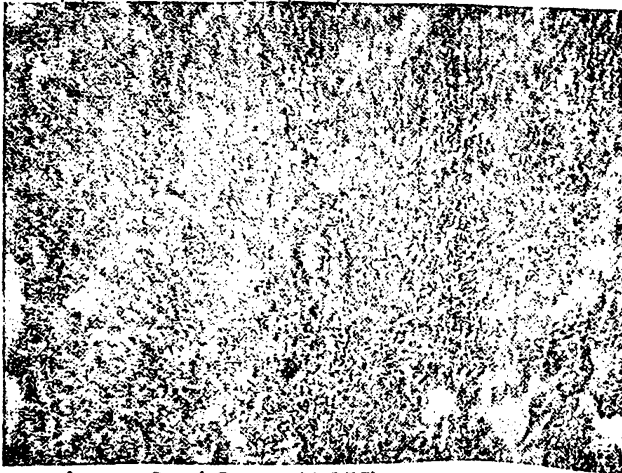
30 ημέρες



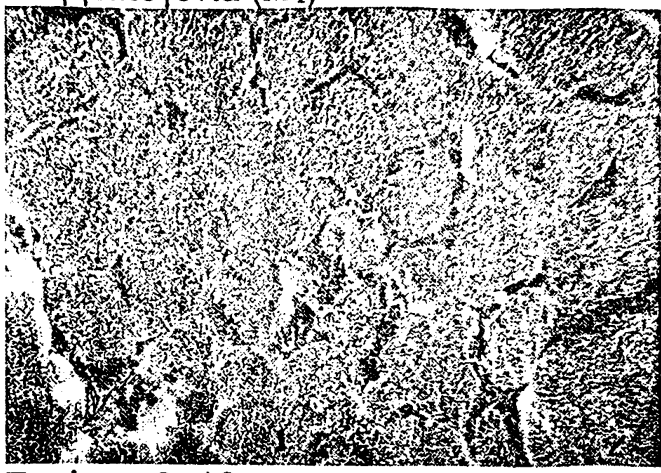
Εικόνα. Ομάδα I (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα (M₂)



Εικόνα. Ομάδα III (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια (M₁)

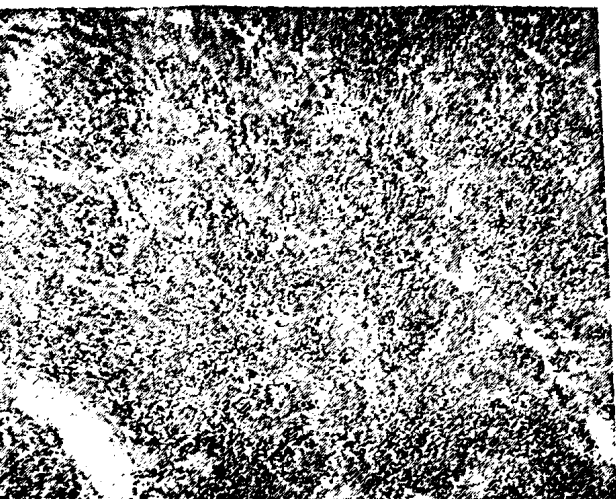


Εικόνα. Ομάδα II (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια (M₁)

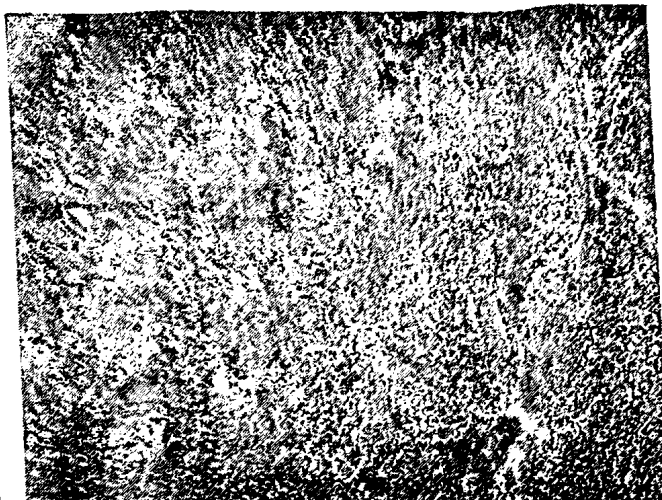


Εικόνα. Ομάδα IV (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα (M₂)

5 ημέρες



Εικόνα. Ομάδα I (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα (M₂)



Εικόνα. Ομάδα III (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα (M₂)



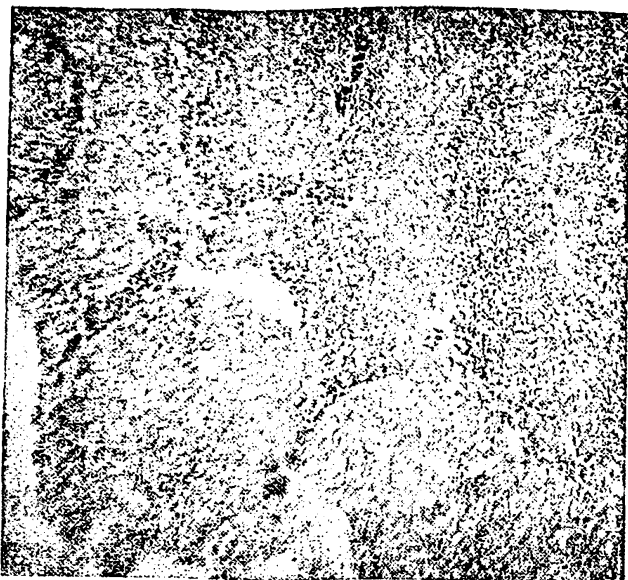
Εικόνα. Ομάδα II (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα (M₂)



Εικόνα. Ομάδα IV (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα (M₂)



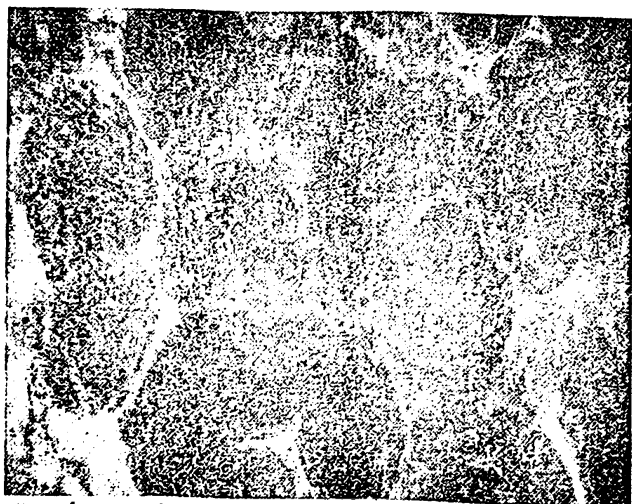
60 ημέρες



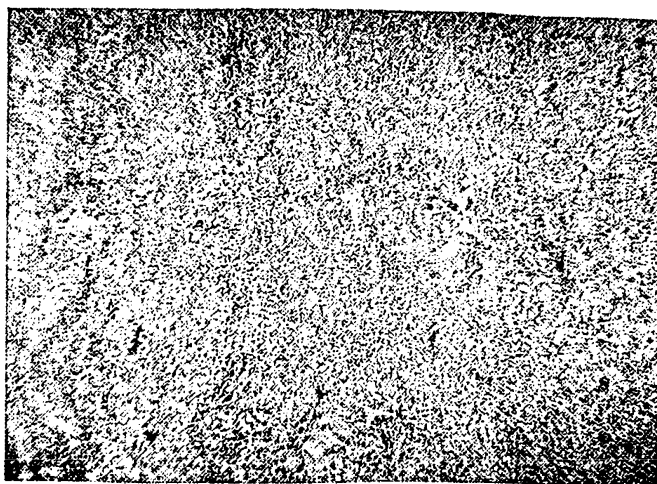
Εικόνα. Ομάδα II (10X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα
(M₂)



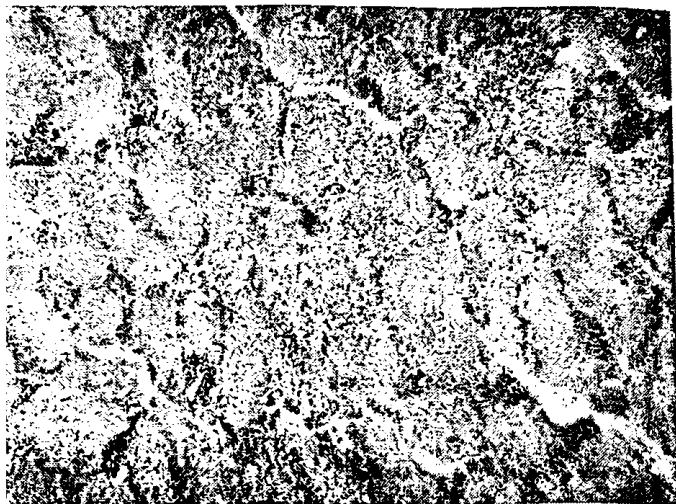
Εικόνα. Ομάδα III (40X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματοκύτταρα,
σπερματίδες(M₂)



Εικόνα. Ομάδα III (10X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα
(M₂)



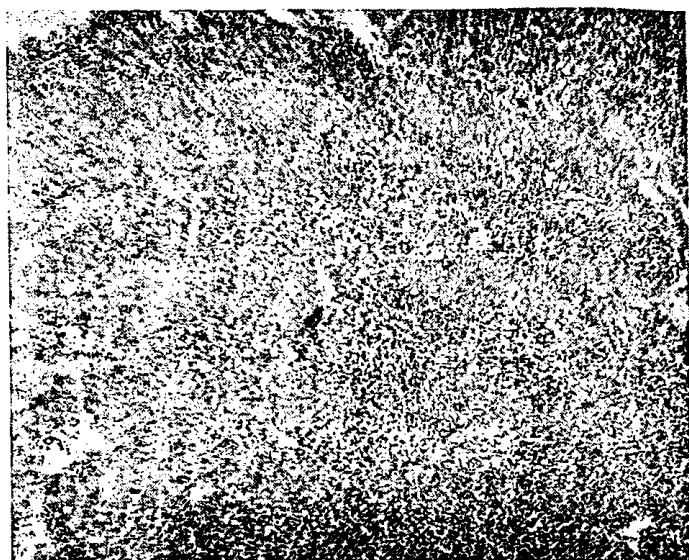
Εικόνα. Ομάδα IV (10X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα
(M₂)



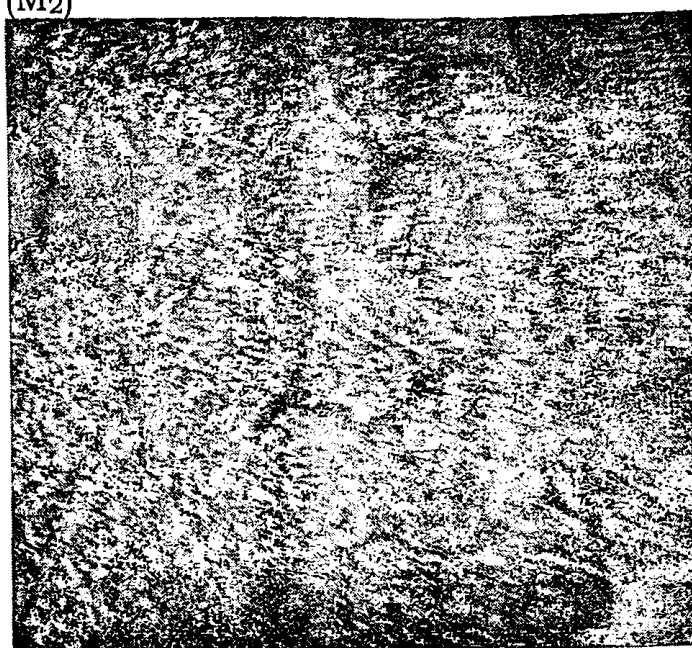
Εικόνα. Ομάδα I (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματοκύτταρα (M₂)



Εικόνα. Ομάδα III (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα (M₂)



Εικόνα. Ομάδα II (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα (M₂)



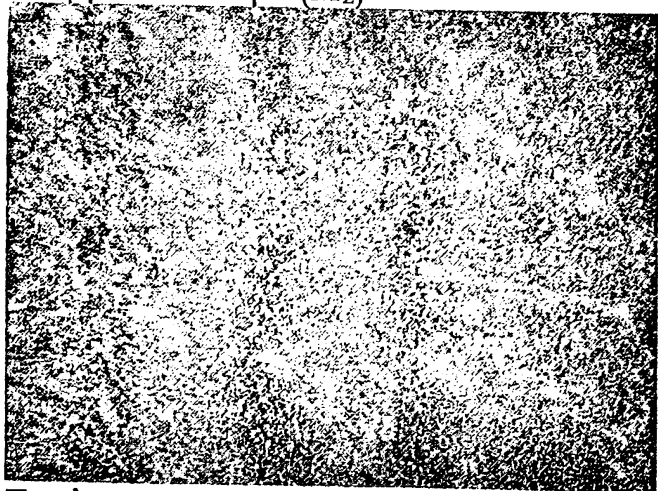
Εικόνα. Ομάδα IIIb (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα (M₂)



Εικόνα. Ομάδα IV (10X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματοκύτταρα (M₂)



Εικόνα. Ομάδα IVa (10X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματοκύτταρα (M₂)



Εικόνα. Ομάδα IVb (10X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματοκύτταρα (M₂)



Κλάση II
0 ημέρες

30 ημέρες

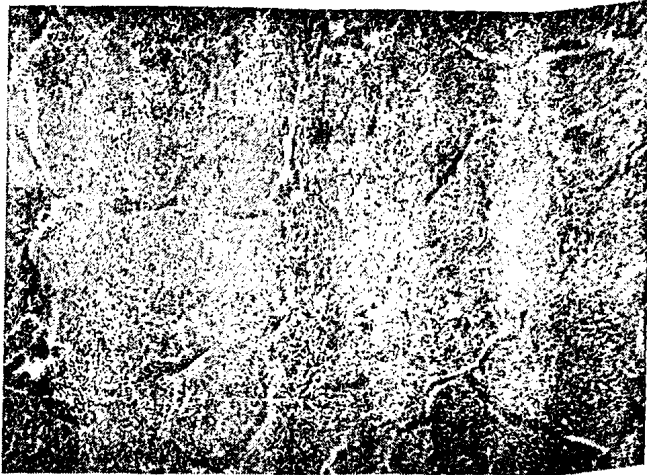


Εικόνα. Ομάδα I (10X). Εμφάνιση
λοβών με σπερματοζώαρια (M₃)

Εικόνα. Ομάδα I (10X). Εμφάνιση
λοβών με σπερματίδες και
σπερματοκύτταρα (M₂)

14 ημέρες

45 ημέρες

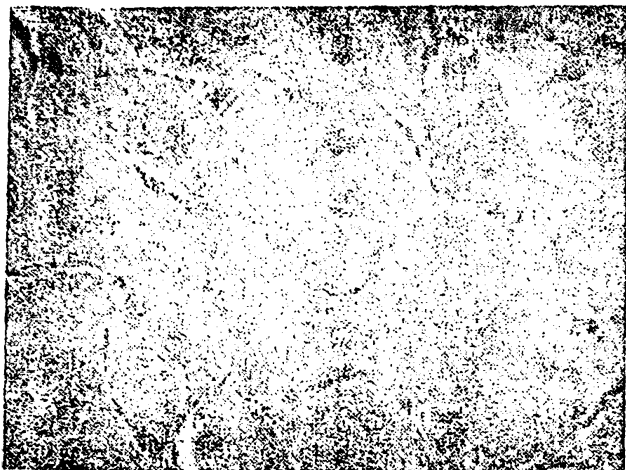


Εικόνα. Ομάδα II (10X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματοζώαρια και
σπερματοκύτταρα (M₃)

Εικόνα. Ομάδα II (10X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματοζώαρια και
σπερματοκύτταρα (M₃)



60 ημέρες

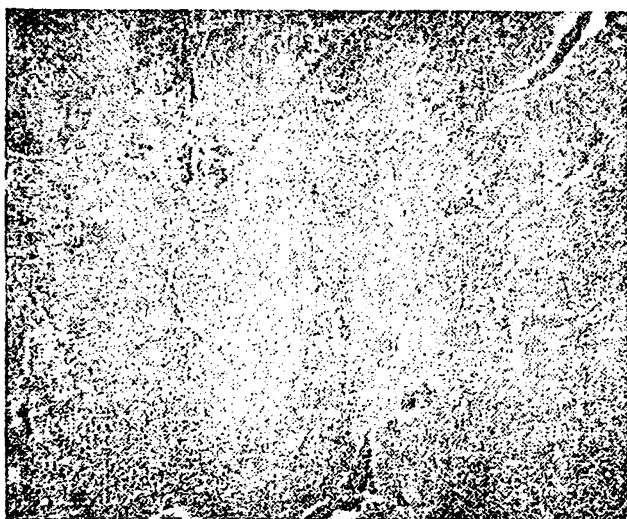


Εικόνα. Ομάδα I (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματοζώαρια και σπερματοκύτταρα (M₃)

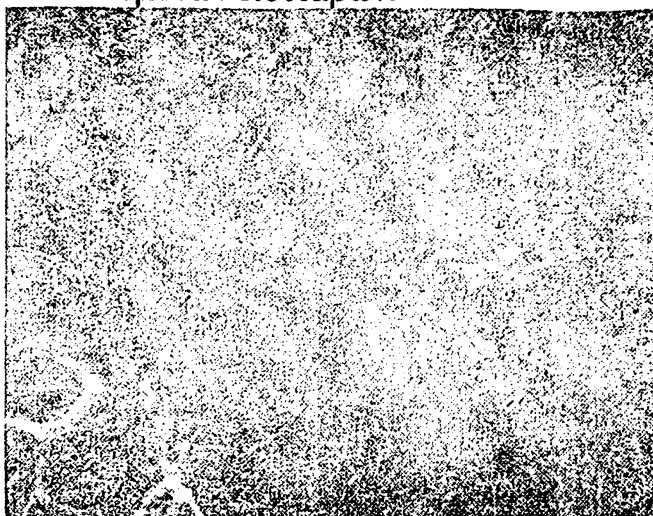
90 ημέρες



Εικόνα. Ομάδα I (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματοζώαρια και σπερματοκύτταρα (M₃)
Εμφάνιση συσσωματωμάτων ενυδατωμένων κυττάρων.



Εικόνα. Ομάδα II (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματοζώαρια και σπερματοκύτταρα (M₃)



Εικόνα. Ομάδα II (10X). Εμφάνιση λοβών με σπερματοζώαρια και σπερματοκύτταρα (M₃)

120 ημέρες



Εικόνα. Ομάδα II (10X).
Εμφάνιση λοβών με
σπερματοζώαρια και
σπερματοκύτταρα (M3)



7 12 1954

THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN LIBRARY
ANN ARBOR, MICHIGAN

