



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Επιδράσεις του Ευρωπίου (Eu),
στην εμβρυοφυσιολογία του *Danio rerio***

**ΛΑΖΑΡΗΣ Χ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ - ΙΧΘΥΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Λάζαρη Δημητρίου: 7-12-2005

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 569^α/13-12-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ευαγγέλου Άγγελος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Λεονάρδος Ιωάννης Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 18-4-2006

«Επιδράσεις του Ευρωπαϊού (Eu) στην εμβρυοφυσιολογία του *Danio rerio*»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος	Καθηγητής Βιομηχανικής Χημείας, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ανωγειανάκης Γεώργιος	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κιόρτσης Δημήτριος-Νικηφόρος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεονάρδος Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καρκαμπούνας Σπυρίδων	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Περιβαλλοντολογική Φυσιολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 14-6-2012

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

“ Με τη δύναμη της θέλησης ο άνθρωπος αλλάζει τον εαυτό του. Με τη δύναμη της αγάπης αλλάζει τους άλλους. Με τη δύναμη της σκέψης αλλάζει τον κόσμο ”

Rabindranath Tagore, 1861-1941, Ινδός λογοτέχνης, Νόμπελ 1913

ΣΤΗΝ ΑΓΑΠΗΜΕΝΗ ΜΟΥ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AP	A nterior – P osterior	πρόσθιοι – οπίσθιοι
bpm	b eats p er m inutes	καρδιακοί κτύποι ανά λεπτό
CRTs	C athode R ay T ubes	σωλήνες καθοδικών ακτίνων
DEL	D eep C ell M ultilayer	πολλαπλή στιβάδα κυττάρων βάθους
DV	D orsal – V entral	ραχιαίοι – κοιλιακοί
FET	F ish E mbryo T oxicity	τοξικότητα εμβρύων ιχθυδίων
GGG	G adolinium G allium G arnet	γρανάτης γαδολινίου γαλλίου
hpf	h ours p ost f ertilization	ώρες μετά την γονιμοποίηση του αυγού
LD₅₀	L ethal D ose	Μέση θανατηφόρος δόση
MBT	M idblastoula	μεσοβλαστίδιο
MRI	M agnetic R esonance I maging	απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού
PET	P ositron E mission T omography	τομογραφία με εκπομπή ποζιτρονίων
REEs	R are E arth E lements	σπάνιες γαίες
REO	R are E arth O xide	οξειδία σπανίων γαιών
SR	S arcoplasmic R eticulum	σαρκοπλασματικό δίκτυο
StL	S tandard L ength	σταθερό μήκος
TL	T otal L ength	ολικό μήκος
USGS	U.S. G eological S urvey	Γεωλογικό Ινστιτούτο των Η.Π.Α
YAG	Y ttrium A luminium G arnet	γρανάτης ύττριου αλουμινίου
YIG	Y ttrium I ron G arnet	γρανάτης υττρίου σιδήρου
YSL	Y olk S yncytial L ayer	λεκιθική συγκυτιακή στιβάδα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	17
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
1. ΕΥΡΩΠΙΟ (Eu) ΚΑΙ ΣΠΑΝΙΕΣ ΓΑΙΕΣ (REEs)	19
1.1 Γενικά στοιχεία Eu και REEs	19
1.1.1 Ιστορική αναδρομή του ευρωπαϊού (Eu)	19
1.1.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες του ευρωπαϊού.....	20
1.2 Κατανομή των ορυκτών του Eu	20
1.2.1 Πηγές και κατανομή του Eu στον γήινο φλοιό	20
1.2.2 Πηγές του Eu στην ατμόσφαιρα.....	22
1.2.3 Παγκόσμιες απαιτήσεις για τα στοιχεία των REEs.....	23
1.2.4 Χρήσεις και εφαρμογές Eu και λανθανιδών	24
1.3 Βιοχημική συμπεριφορά Eu και REEs	27
1.3.1 Αλληλεπίδραση Eu και REEs με μόρια βιοχημικού ενδιαφέροντος	27
1.3.2 Ανταγωνιστική δράση ιόντων λανθανιδών με τα ιόντα Ca^{2+}	28
1.3.3 Επίδραση των REEs στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού και του εδάφους.....	30
1.3.4 Οικοτοξικολογία REEs και Eu.....	30
1.4. Επίδραση και κατανομή Eu και REEs στους οργανισμούς	30
1.4.1 Επιδράσεις Eu και REEs στους φυτικούς ιστούς.....	30
1.4.2 Αλληλεπιδράσεις Eu και REEs με μικροοργανισμούς	31
1.4.3 Επιδράσεις REEs στους υδρόβιους οργανισμούς	32
1.4.4 Επιδράσεις Eu και REEs στην φυσιολογία και την ανάπτυξη των θηλαστικών	32
2. ZEBΡΟΨΑΡΟ, zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	37
2.1 Προέλευση, γεωγραφική εξάπλωση και οικολογικός θώκος	37
2.2 Συστηματική κατάταξη	38
2.3 Βιολογία και αναπαραγωγή	38
2.4 Αναπτυξιακά στάδια του <i>Danio rerio</i>	40
2.5 Το <i>Danio rerio</i> ως μοντέλο ανάπτυξης και μελέτης	51

3. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	53
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
1. Διαχείριση γεννητόρων	55
2. Προετοιμασία ωοτοκίας και διαχείριση αυγών	55
3. Προετοιμασία διαλυμάτων Eu	57
4. Έλεγχος τοξικότητας.....	57
4.1 Τύποι τοξικολογικού ελέγχου	58
4.2 Μέτρηση καρδιακών παλμών.....	59
4.3 Μορφομετρική ανάλυση	59
4.4 Προσδιορισμός του Eu στα βιολογικά δείγματα των λαρβών.....	64
5. Στατιστική ανάλυση.....	65
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	67
1. Θνησιμότητα εμβρύων και LD ₅₀	67
2. Εκτιμώμενος χρόνος εκκολαψιμότητας.....	69
3. Επίδραση του Eu στην σωματική διαμόρφωση και διαφοροποίηση των εμβρύων <i>Danio rerio</i>	75
4. Επίδραση του Eu στην ανάπτυξη και λειτουργία της εμβρυικής καρδιάς του <i>Danio rerio</i>	79
5. Ανίχνευση του μετάλλου στα βιολογικά δείγματα λαρβών.....	82
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	85
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	95
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	97
SUMMARY	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	123

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της Επαγγελματικής μου πορείας· μου έδωσε την ευκαιρία, μέσα από μία επίπονη και δύσκολη πορεία ερευνητικής δουλειάς, να αποκτήσω πλούσιες γνώσεις και εμπειρία, φίλους συναδέλφους και συνεργασίες με πολύ σημαντικούς επιστήμονες του Πανεπιστημιακού χώρου. Η όλη ερευνητική μου δουλειά εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ζωολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στη Μονάδα Περιβαλλοντικής Φυσιολογίας του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Λειτουργικο-Κλινικοεργαστηριακού τομέα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Άγγελου Ευαγγέλου.

Η διατριβή μου εστίασε στην μελέτη της επίδρασης του ευρωπαϊού (Eu) στα έμβρυα *Danio rerio* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως τοξικολογικοί ερευνητικοί δείκτες. Η επιλογή του μετάλλου, για την μελέτη μου, έγινε με βάση την εξαιρετική ποικιλία των εφαρμογών του σε διαφορετικούς τομείς της σύγχρονης ανθρώπινης δραστηριότητας όπως γεωργία, βιοϊατρική, άμυνα και σε τεχνολογικά μέσα της απλής καθημερινότητας μας. Επίσης το Eu όπως και οι υπόλοιπες λανθανίδες λόγω της ευρείας γκάμας χρήσεων τους και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους αποτελούν με την ανθρωπογενή κυρίως απόδοση τους, στο χερσαίο και υδάτινο περιβάλλον, μελλοντικούς σημαντικούς ρύπους καθώς εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο. Με την συνεχή αναζήτηση διεθνούς βιβλιογραφίας και στο μέτρο που γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα σχετικά με τοξικές επιδράσεις του Eu κυρίως στους υδρόβιους οργανισμούς. Ευελπιστώ η διατριβή αυτή στο μέλλον να αποτελέσει έναν ακρογωνιαίο λίθο στο αχανές πεδίο της τοξικολογικής έρευνας και μελέτης.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω και να εκφράσω τα βαθιά μου συναισθήματα ευγνωμοσύνης στον Καθηγητή κ. Άγγελο Ευαγγέλου, που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να περατώσω την διδακτορική μου διατριβή. Καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων μου, μου συμπαραστάθηκε με πολύ σεβασμό και αγάπη, καθοδηγώντας με σε κάθε στάδιο της ερευνητικής μου πορείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Βασιλική Καλφακάκου, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και υποδείξεις της κατά την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων μου.

Επίσης την ευχαριστώ πολύ για το χρόνο που μου αφιέρωσε, όπου με πολύ ευγένεια και αγάπη με βοήθησε στην διόρθωση του κειμένου βελτιώνοντας την εικόνα της Διατριβής μου.

Οφείλω να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Λεονάρδο, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την αμέριστη ηθική και υλική συμπαράσταση κατά την εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής τις σημαντικές και ουσιώδεις υποδείξεις του για το ιχθυολογικό κομμάτι της ερευνητικής μου δουλειάς, καθώς και για την παροχή πλήρους εργαστηριακού εξοπλισμού και ενυδριακού χώρου. Θα ήθελα να προσθέσω, ότι είχα την τιμή και την χαρά να συνεργαστώ ήδη από παλαιότερα έτη μαζί του υπήρξε ακαδημαϊκός μου δάσκαλος και υπεύθυνος της διπλωματικής μου εργασίας, όταν φοιτούσα στο τμήμα Ιχθυοκομίας–Αλιείας του Α.Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου.

Θερμές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στον φίλο και συνεργάτη μου Δρ. Roman Liasko, ο οποίος, με την πλούσια επιστημονική του κατάρτιση και εμπειρία, συνέδραμε σημαντικά στην εκπαίδευσή μου πάνω στην ανάλυση μορφομετρικών τεχνικών. Ακόμη, τον ευχαριστώ, επειδή με ευγένεια και κατανόηση συνέβαλε σημαντικά στην στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της Διατριβής μου και στην συγγραφή και διόρθωση της δημοσίευσής μου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω από την καρδιά μου τους φίλους και συναδέλφους Msc Περιβαντολλόγο Όλγα Παπιγγιώτη και Βιολόγο Αντώνη Αντωνόπουλο, οι οποίοι σε ημέρες απουσίας μου από το εργαστήριο μεριμνούσαν επιμελώς και με ευγένεια για την διαχείριση και την φροντίδα των γεννητόρων και των λεκιθοφόρων ιχθυδίων μου.

Θερμές ευχαριστίες στον Δρ. Δημήτριο Μπέη, που στάθηκε πολύτιμος αρωγός για όλο το διάστημα εκπόνησης της εργασίας μου, με τις πολύτιμες γνώσεις και υποδείξεις του για την διαχείριση των ιχθυδίων, αλλά και για την παροχή ζωντανού υλικού (αυγά και λεκιθοφόρα ιχθύδια). Επίσης ευχαριστώ τον Δρ. Ευάγγελο Παλαιολόγο για την πάντα πρόθυμη και ανεκτίμητη βοήθειά του στην ανίχνευση του Eu στα βιολογικά δείγματα του πειράματός μου.

Τέλος, ένα μεγάλο, θερμό ευχαριστώ οφείλω και στους γονείς μου Χριστόφορο και Σοφία, και στην αδελφή μου Ελένη, των οποίων η υποστήριξη και η αγάπη όλα αυτά τα χρόνια ήταν ανεκτίμητες και αποτέλεσαν την κινητήριου δύναμη για να ολοκληρώσω την παρούσα Διατριβή μου. Σε αυτούς οφείλω ό,τι έχω κατορθώσει ως σήμερα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

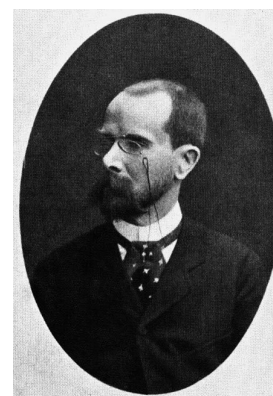
1. ΕΥΡΩΠΙΟ (Eu) ΚΑΙ ΣΠΑΝΙΕΣ ΓΑΙΕΣ (REEs)

1.1 Γενικά στοιχεία Eu και REEs

1.1.1 Ιστορική αναδρομή του ευρωπαϊού (Eu)

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα στοιχεία των σπάνιων γαιών (Rare Earth Elements, REEs) περιλαμβάνουν μια ομοιογενή ομάδα στοιχείων στον περιοδικό πίνακα. Οι σπάνιες γαίες απαρτίζονται από το σκάνδιο (*Scandium*, Sc), το ύτριο (*Yttrium*, Y), και τα 15 στοιχεία της σειράς των λανθανιδών (lanthanides): λανθάνιο (*Lanthanum*, La), δημήτριο (*Cerium*, Ce), πρασεοδύμιο (*Praseodymium*, Pr), νεοδύμιο (*Neodymium*, Nd), προμήθειο (*Promethium*, Pm), σαμάριο (*Samarium*, Sm), ευρώπιο (*Europium*, Eu), γαδολίνιο (*Gadolinium*, Gd), τέρβιο (*Terbium*, Tb), δυσπρόσιο (*Dysprosium*, Dy), όλμιο (*Holmium*, Ho), έρβιο (*Erbium*, Er), θούλιο (*Thulium*, Tm), υττέρβιο (*Ytterbium*, Yb) και λουτέτιο (*Lutetium*, Lu) (Hu *et al.*, 2004). Συνήθως οι λανθανίδες ταξινομούνται σε τρεις ομάδες: στις ελαφριές (από το La έως το Nd), στις μεσαίες (από το Sm έως το Dy) και στις βαριές (από το Ho έως το Lu) (Kirk, 1995).

Από το 1843 μέχρι σήμερα έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για να βρεθούν μέθοδοι διαχωρισμού και προσδιορισμού διαφόρων ορυκτών των REEs. Η ανάπτυξη της τεχνικής της φασματοσκοπίας (1859) βοήθησε πάρα πολύ στην μελέτη των στοιχείων των λανθανιδών (Καραγιαννίδης, 2006). Έτσι το Eu απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1901, από τον Γάλλο χημικό Eugène A. Demarçay (εικόνα 1) από τον σαμαρσκήτη $((Y,Ce,U,Fe)_3(Nb,Ta,Ti)_5O_{16})$. Το 1901, ο Demarçay καθώς μελετούσε το σαμάριο, (στοιχείο είχε ανακαλυφθεί πριν από είκοσι έτη) διαπίστωσε ότι το στοιχείο αυτό δεν ήταν ένα, αλλά δύο. Έτσι λοιπόν ο Demarçay έδωσε το αρχικό όνομα σαμάριο στο ένα ενώ στο άλλο ευρώπιο, από την ήπειρο της Ευρώπης (Holden, 2001).



Εικόνα 1. Ο Γάλλος χημικός Eugène A. Demarçay (1852-1904)

Περισσότερο από έναν αιώνα νωρίτερα, ένα νέο βαρύ μέταλλο βρέθηκε κοντά στην πόλη Bastnas, στην Σουηδία, και του έδωσαν το όνομα Ce. Οι χημικοί διαπίστωσαν ότι το Ce ήταν ένα σύμπλοκο. Εκατό έτη έρευνας αποκάλυψαν επτά νέα στοιχεία στο Ce. Το Eu ήταν το τελευταίο στοιχείο που προσδιορίστηκε (Asimov, 1964).

1.1.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες Eu

Το Eu είναι ένα μαλακό, αργυροειδές-λευκό μέταλλο (εικόνα 2). Έχει φωτεινή και λαμπρή επιφάνεια. Το σημείο τήξης του είναι στους 822,0°C (1511,6°F, 1095,15°K) και το σημείο βρασμού του περίπου στους 1597,0°C (2906,6°F, 1870,15°K). Η πυκνότητα του είναι 5,24 γραμμάρια ανά κυβικό εκατοστόμετρο.



(α)

(β)

Εικόνα 2. (α) αργυροειδές-λευκό μεταλλικό Eu, (β) κίτρινο ανθρακικό άλας Eu (II)

Το Eu έχει ατομικό αριθμό 63, ατομικό βάρος 151,96 με αριθμούς οξείδωσης +2, +3. Το στοιχείο διαθέτει 63 πρωτόνια και ηλεκτρόνια, 89 νετρόνια ενώ η κρυσταλλική του δομή είναι τετραεδρική. Η ηλεκτρονιακή του διαμόρφωση είναι $4f^7 6s^2$. Τα ιόντα Eu^{3+} απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή και είναι άχρωμα. Είναι το πιο ενεργό στοιχείο των λανθανιδών διότι αναφλέγεται (οξειδώνεται) γρήγορα. στον ατμοσφαιρικό αέρα στους 150 °C έως 180 °C και σχηματίζει ένα ασθενώς ροδόχροο οξείδιο (Eu_2O_3). Επίσης αντιδρά με όλα τα αλογόνα (όπως π.χ. με Cl δίνει EuCl_3).

1.2 Κατανομή των ορυκτών του Eu

1.2.1 Πηγές και κατανομή του Eu στον γήινο φλοιό

Οι περισσότερες REEs δεν είναι τόσο σπάνιες όσο το όνομα τους υπονοεί. Το Ce είναι αφθονότερο στο φλοιό της γης σε σχέση με το Cu ή το Pb. Πολλές REEs είναι πιο

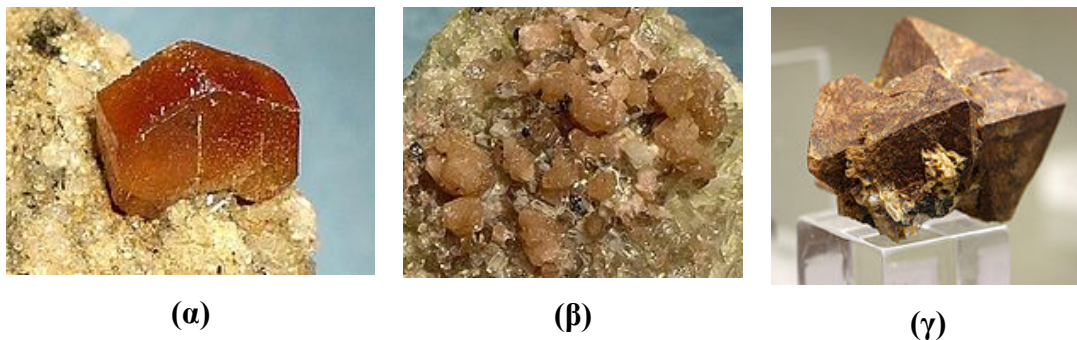
κοινές από τον Sn και το Mo και άλλα εκτός από το Pm που είναι πιο συχνά κοινό από Pt ή Hg (Taylor and McLennan, 1985).

Στον ηπειρωτικό και ωκεάνιο φλοιό της γης η συγκέντρωση του Eu ανιχνεύεται στα 1,1 ppm και 1,3 ppm αντίστοιχα (Brown *et al.*, 1990; Argonne National Laboratory, 2005). Το Eu δεν βρίσκεται ποτέ στη φύση ως ελεύθερο στοιχείο, αλλά όπως και οι άλλες REEs περιέχεται σε πολλά ορυκτά, με τις σημαντικότερες πηγές τον βασταισίτη (bastnäsite), τον ξενότιμο (xenotime) και τον μοναζίτη (monazite) (Ni *et al.*, 1993, 1995) (εικόνα 3).

Ο μπασναζίτης είναι ανθρακικό/φθοριούχο ορυκτό των σπανίων γαιών. Διακρίνεται σε βασταισίτη-(Ce): $Ce(CO_3)F$, βασταισίτη-(La): $La(CO_3)F$ και σε βασταισίτη-(Y): $Y(CO_3)F$ (Ni *et al.*, 1993). Απαντά σε πολλά σημεία της Γης. Αξιόλογα κοιτάσματά του υπάρχουν στη Σουηδία, το Εσκή Σεχίρ στην Τουρκία, το Αφγανιστάν, το Πακιστάν, τη Μαδαγασκάρη, το Μπουρουντί, την Τανζανία, τη Ζάμπια, την περιοχή Agiege στη Γαλλία, την Εσωτερική Μογγολία (Κίνα), τα Ουράλια όρη στη Ρωσία, τις ΗΠΑ (Κολοράντο, Νέο Μεξικό, Καλιφόρνια) και το Mont Saint Hilaire του Καναδά.

Ο μοναζίτης είναι φωσφορικό ορυκτό των σπανίων γαιών. Διακρίνεται σε τέσσερα είδη, τον μοναζίτη-(Ce): $(Ce, La, Nd, Th)PO_4$, τον μοναζίτη-(La): $(La, Ce, Nd)PO_4$, τον μοναζίτη-(Nd): $(Nd, Ce, La)(P, Si)PO_4$ και τον μοναζίτη-(Sm): $SmPO_4$ (Ni *et al.*, 1995). Απαντά σε πολλά σημεία του πλανήτη, σπάνια όμως σε μεγάλους κρυστάλλους. Σημαντικά κοιτάσματά του βρίσκονται στα Ουράλια όρη, τα όρη Ίλμεν (Ρωσία), στην Νορβηγία (περιοχή Arendal), σε ορισμένα σημεία των ΗΠΑ, στην Βραζιλία, στην Ινδία, στην Μαδαγασκάρη (Ινδία - Μαδαγασκάρη υπό μορφή μοναζιτούχων άμμων) και στην Σρι Λάνκα.

Ο ξενότιμος είναι από τα ελάχιστα ευρεθέντα ορυκτά του υτρίου (YPO_4) ενώ τα άλλα δύο είναι ο τσερνοβίτης (chernovite-Y) ($YAsO_4$) και ο ουεϊκφιλδίτης (wakefieldite-Y) (Ni *et al.*, 1995). Αξιοσημείωτες εμφανίσεις του υπάρχουν στις περιοχές Lindesnes, Hidra (νήσος Hitterö), Tvedestrand, Arendal, Raade της Νορβηγίας, στην περιοχή Vaxholm της Σουηδίας, τη Ρωσία, το Τατζικιστάν, το Πακιστάν, τη Μαδαγασκάρη, τη Βραζιλία (Minas Gerais, Ataleia, Ibitiara, Brumado, Novo Horizonte), στον Καναδά και στο Κολοράντο των ΗΠΑ.



Εικόνα 3. (α) μπασтнаζίτης, (β) μοναζίτης, (γ) ξενότιμος.

Το 1982, η πρώτη ωκεανογραφική μελέτη ανίχνευσης των REEs ταυτοποίησε εννέα από τις δέκα λανθανίδες στον Βόρειο Ατλαντικό. Από τότε, ένας σημαντικός αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί για την εύρεση της κατανομής των λανθανιδών σε διάφορες ωκεάνιες περιοχές. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις των βαρέων λανθανιδών, σε βάθη μικρότερα των 1500 m, εμφανίζουν μια αυξανόμενη συγκέντρωση με την σειρά Βόρειος Ατλαντικός < Ινδικός Ωκεανός < Βόρειος Ειρηνικός ενώ εκείνη των ελαφριών λανθανιδών είναι Ινδικός Ωκεανός < Βόρειος Ατλαντικός < Βόρειος Ειρηνικός (Taylor and McLennan, 1985; Sholkovitz *et al.*, 1994; Nozaki, 1997; Alibo *et al.*, 1999). Με βάση τον πίνακα 1 το Eu στον Ειρηνικό Ωκεανό έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενώ δυτικά του Ινδικού την μικρότερη.

1.2.2 Πηγές του Eu στην ατμόσφαιρα

Στην ατμόσφαιρα η συγκέντρωση του αερίου Eu είναι σχεδόν μηδενική ($\approx 0,0$ ppm) σε αντίθεση με τα αιωρούμενα σωματίδια στα οποία έχουν ανιχνευτεί οι περισσότερες λανθανίδες. Ορισμένες δημοσιεύσεις δείχνουν ότι η συγκέντρωση του Eu στην ατμόσφαιρα ποικίλει ανάλογα με την δραστηριότητα της περιοχής και εκτιμάται ότι είναι περίπου 0,062 – 0,797 $\mu\text{g/g}$. Η δραστηριότητα περιλαμβάνει την φυσική (ορυκτογενής, θαλάσσια) και την ανθρωπογενή (εγκαταστάσεις καθαρισμού πετρελαίου, προϊόντα αποτεφρωτών, πετρελαιοκίνητες εγκαταστάσεις παραγωγής ενέργειας, αυτοκίνητα) (Suzuki *et al.*, 2010).

Πίνακας 1. Συγκέντρωση των REEs (pmol/Kg) σε 3 διαφορετικές ωκεάνιες περιοχές (Taylor and McLennan, 1985; Sholkovitz *et al.*, 1994; Nozaki, 1997; Alibo *et al.*, 1999).

Στοιχείο	Συγκέντρωση REEs (pmol/Kg)			
	Βορειοδυτικός Ειρηνικός Ωκεανός	Δυτικός Ινδικός Ωκεανός	Βόρειος Ατλαντικός Ωκεανός	Μέσος όρος
Y	0,8 ± 1,6	–	–	0,80
La	2,9 ± 2,2	1,33 ± 0,67	3,68 ± 0,27	2,65
Ce	36,6 ± 7,6	17,10 ± 4,1	23,7 ± 7,6	25,8
Pr	5,5 ± 3,4	–	–	5,49
Nd	4,4 ± 2,7	2,10 ± 0,65	3,42 ± 0,66	3,31
Sm	5,1 ± 2,9	2,10 ± 0,63	2,75 ± 0,69	3,30
Eu	5,4 ± 5,6	1,50 ± 0,37	3,00 ± 0,58	3,30
Gd	4,8 ± 3,1	1,28 ± 0,33	1,70 ± 0,27	2,58
Tb	4,2 ± 3,7	1,2	1,6	2,33
Dy	2,8 ± 3,2	1,03 ± 0,35	1,55 ± 0,33	1,80
Ho	0,81 ± 3,0	0,80	1,1	0,90
Er	0,45 ± 3,3	0,57 ± 0,19	0,63 ± 0,45	0,55
Tm	–	0,50	0,62	0,56
Yb	–	0,48 ± 0,20	0,61 ± 0,33	0,55
Lu	–	0,44 ± 0,21	0,48 ± 0,34	0,46

1.2.3 Παγκόσμιες απαιτήσεις για τα στοιχεία των REEs

Οι REEs, όχι τόσο λόγω της σπανιότητάς τους αλλά κυρίως της φύσης των δραστηριοτήτων στις οποίες βρίσκουν εφαρμογές, έχουν εξελιχθεί σε κρίσιμο παράγοντα τεχνολογικής και οικονομικής ανάπτυξης. Οι παγκόσμιες απαιτήσεις για τα στοιχεία των REEs υπολογίζονται σε 134.000 tn ετησίως, με παραγωγή 124.000 tn περίπου με την διαφορά αυτή καλύπτεται από τα υπέργεια αποθέματα. Οι παγκόσμιες απαιτήσεις υπολογίζονται να ανέλθουν σε 180.000 tn ετησίως έως το 2012, ενώ φαίνεται να είναι απίθανο η δημιουργία νέων ορυχείων να καλύψει το χάσμα βραχυπρόθεσμα. Μέχρι το 2014, η παγκόσμια απαίτηση για τις REEs μπορεί να υπερβεί τους 200.000 tn ετησίως (Smith, 2010).

Η Κίνα μονοπωλεί σχεδόν στην παραγωγή και διατήρηση των αποθεμάτων (36%) των REEs την τελευταία δεκαετία (πίνακας 2). Η παραγωγή της μπορεί να φθάσει στους

160.000 tn ανά έτος το 2014 (πάνω από 130.000 tn το 2008). Οι Η.Π.Α διαθέτουν το 13% περίπου, ενώ η Νότια Αφρική και ο Καναδάς (που συμπεριλαμβάνονται στις "άλλες" κατηγορίες) έχουν σημαντική συμμετοχή στην διάθεση και αξιοποίηση των REEs σύμφωνα με την USGS (U.S. Geological Survey). Αποθέματα REEs βρίσκονται επίσης στην Αυστραλία, Βραζιλία, Ινδία, Ρωσία, Νότια Αφρική, Μαλαισία, και Μαλάουι (Humphries, 2010).

Πίνακας 2. Παγκόσμια αποθέματα και παραγωγή (Humphries, 2010).

Χώρα	Παραγωγή ορυκτών (μετρικοί tn)	% του συνόλου	Αποθέματα (εκατομμύρια μετρικοί tn)	% του συνόλου
Η.Π.Α	–		13,0	13,0
Κίνα	120.000	97	36,0	36,0
Ρωσία και λοιπές χώρες της Ε.Σ.Σ.Δ.			19,0	19,0
Αυστραλία			5,4	5
Ινδία	2.700	2	3,1	3
Βραζιλία	650			
Μαλαισία	380			
Άλλες	270		22,0	22
Σύνολο	124.000		99,0	

Οι REEs, σε ένα μεγάλο ποσοστό της τάξης του 95%, εξορύσσονται με την μορφή των ορυκτών βασταζίτη, μοναζίτη και ξενοτίμη στα οποία η περιεκτικότητα των οξειδίων των σπανίων γαιών (REO) φθάνουν το 60% (Giungato and Notarnicola, 2003). Γενικά ο μπασταζίτης εμφανίζεται ως πρωτογενές μετάλλευμα ενώ ο μοναζίτης βρίσκεται ως πρόσμιξη σε άλλα ορυκτά και λαμβάνεται ως δευτερογενές προϊόν (Humphries, 2010).

1.2.4 Χρήσεις και εφαρμογές των λανθανιδών

Τα μέταλλα και οι ενώσεις των λανθανιδών είναι ευρέως χρήσιμα σε μια εξαιρετική ποικιλία εφαρμογών στην χημεία και υψηλής τεχνολογίας, παγκοσμίως, όπως στην επιστήμη υλικών στην ιατρική και στην άμυνα (Haxel *et al.*, 2002; Dines, 2009). Οι εφαρμογές τους εξαρτώνται από τις χημικές και φυσικές ιδιότητες των μετάλλων καθώς

και από την δυνατότητά τους να σχηματίσουν ενώσεις και σύμπλοκα. Οι χρήσεις τους περιλαμβάνουν κράματα, ηλεκτρονικά, γυαλί, κεραμικά, χρωστικές ουσίες. Οι ενώσεις των λανθανιδών έχουν σημαντική συμβολή στις χρήσεις ως καταλύτες, φωσφόροι, λείζερ και υλικά που χρησιμεύουν οι μαγνητικές τους ιδιότητες (Suzuki *et al.*, 2010). Επίσης περιλαμβάνουν συσκευές της καθημερινής ζωής όπως κινητά τηλέφωνα, φορητά DVDs, και lap-top (Smith, 2010; Humphries, 2010). Πιο αναλυτικά στοιχεία δίνονται στον πίνακα 3 (Morral, 1990; Hedrick, 2004).

Η +3 οξειδωτική κατάσταση είναι χαρακτηριστική του Eu, όπως και των περισσότερων λανθανιδών, τόσο σε στερεές ενώσεις όσο και σε υδατικά ή άλλα διαλύματα (Σδούκος και Πομώνης, 2010; Καραγιαννίδης, 2006). Το στοιχείο του Eu συνδυάζεται με όλα τα γνωστά ανιόντα σχηματίζοντας μια ευρεία γκάμα ενώσεων με πολλές εφαρμογές όπως φαίνεται στον πίνακα 4 (Metall Rare Earth Limited, 2010).

Η πιο συχνή χρήση του Eu είναι ο συνδυασμός του με το Yb για την κατασκευή κόκκινων λυχνιών των έγχρωμων τηλεοράσεων (Argonne National Laboratory, 2005). Πρόσφατα, έχει υπάρξει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές του Eu στη βιοϊατρική νανοτεχνολογία. Οι χηλικές ενώσεις του Eu καθώς και άλλων συμπλόκων του με οργανικά μόρια έχουν ιδιότητες φθορισμού που χρησιμοποιούνται για μετρήσεις αποστάσεων σε διάφορα βιομόρια, έχουν εφαρμογές στην πρωτεϊνική αλληλουχία και σε μελέτες αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών και ανοσοφθορισμού. (Kallistratos *et al.*, 1985; Reynaldo *et al.*, 1996; Alptürk *et al.*, 2006).

Πίνακας 3. Χρήσεις και εφαρμογές των REEs σε διάφορους τομείς (Morral, 1990; Hedrick, 2004).

Τομέας	Εφαρμογές
Άμυνα	φορητά βλήματα Stinger, “έξυπνες” βόμβες, έλεγχος και καθοδήγηση βλημάτων, λέιζερ, αεροσκάφη (συσκευές ελέγχου πτήσης, πηδάλια, και περύγια), μόνιτορ, σόναρ, ηλεκτρονικά συστήματα μεταδόσεων μάχης, YIG συστήματα καθοδήγησης πυραύλων
Αυτοκίνητα	καταλύτες ελέγχου ρύπανσης, καταλυτικός μετατροπέας υποστρωμάτων, επαναφορτιζόμενες μπαταρίες, χρωματισμένα πλαστικά
Ηλεκτρονικά	πυκνωτές, κάθοδοι, ηλεκτρόδια, ημιαγωγοί, θερμίστορες, GGG για μνήμη υπολογιστών, YAG σε λέιζερ
Ιατρική	απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI), τομογραφία με εκπομπή ποζιτρονίων (PET), πομποί και ανιχνευτές ραδιοϊσοτόπων, νανοσωματίδια, θεραπεία αργεντιναφινώματος (καρκίνος που εξικνείται από κύτταρα APUD)
Κεραμικά	Χρωστικές για υαλώσεις, προστατευτικά γυαλιά όρασης, πυρίμαχα για υψηλές θερμοκρασίες, μηχανές εσωτερικής καύσης, υποκατάστατα μετάλλων, επιστρώματα και σταθεροποιητές
Μαγνήτες	ηλεκτρικοί κινητήρες, εναλλακτήρες, γεννήτριες, εκκινητήρες δίσκων υπολογιστών, επιταχυντές πρωτονίων, εκτυπωτές, μεγάφωνα, ακουστικά
Μεταλλουργία	μαγνήσιο, χάλυβας, μέσο κραματοποίησης στον σίδηρο, υπερκράματα, πυρφόρα κράματα, τσακμακόπετρες, καθαρά μέταλλα για έρευνα, αντοχή στη διάβρωση, πολεμικός εξοπλισμός
Πυρηνικά	ράβδοι ελέγχου πυρηνικών αντιδραστήρων, ανιχνευτές και μετρητές, επαναεπεξεργασίας καυσίμων, θωράκιση
Υαλικά	υλικά στίλβωσης, αποχρωματοποιητές, χρωστικά, διορθωτές χρώματος, για ενισχυτές διάθλασης, σταθεροποιητές ακτινοβολίας, για απορρόφηση φωτός, οπτικές ίνες
Φωσφόροι	σωλήνες καθοδικών ακτίνων (CRTs), φωτισμός φθορισμού, οθόνες έντασης ακτίνων X, αισθητήρες θερμοκρασίας
Φωτισμός	φωσφορικά (έγχρωμη τηλεόραση, οθόνες), λάμπες υδραργύρου, λαμπτήρες τόξου άνθρακα, αέριοι μανδύες, τριχρωματικές φωσφορικές λάμπες, αυτόματοι προβολείς
Χημικά	καταλύτες, φαρμακευτικά προϊόντα, επεξεργασία νερού, χημικές διεργασίες και αναλύσεις, λιπάσματα, απορρόφηση και κατακράτηση υγρασίας
Άλλες εφαρμογές	κοσμήματα, στεγνωτικά βαφών και μελανιών, υφάσματα, αποθήκευση ενέργειας υδρογόνου, φωτογραφία, θερμόμετρα, ψυκτικά, λίπανση, κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα

Πίνακας 4. Μοριακοί τύποι και εφαρμογές διαφόρων ενώσεων Eu (στοιχεία από την Metall Rare Earth Limited, 2010).

Μοριακός τύπος ενώσεων Eu	Εμφάνιση ένωσης	Εφαρμογές
$\text{Eu}(\text{O}_2\text{C}_2\text{H}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	λευκοί κρύσταλλοι	φωσφορούχα χρώματα, ύαλος, κεραμικά
$\text{Eu}_2(\text{CO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	λευκά υλικά	φωσφορούχα χρώματα, ύαλος, κεραμικά
$\text{EuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	λευκοί κρύσταλλοι	φωσφορούχα χρώματα, ύαλος, κεραμικά
EuF_3	λευκά υλικά	φωσφορούχα χρώματα, ύαλος, κεραμικά
$\text{Eu}(\text{OH})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	λευκοί κρύσταλλοι	ύαλος, νετρονιακή απορρόφηση
Eu	αργυρόφαια τεμάχια	μεταλλουργεία, βιομηχανία πυρηνικών, ειδικά κράματα
$\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	λευκοί κρύσταλλοι	καταλύτες, φωσφορούχα χρώματα, ύαλος, κεραμικά
$\text{Eu}_2(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	λευκοί κρύσταλλοι	φωσφορούχα χρώματα, ύαλος, κεραμικά
Eu_2O_3	λευκή σκόνη	ύαλοι φωσφόρου, έγχρωμες τηλεοράσεις, X-ακτίνες και άλλα φθορίζοντα υλικά, ύαλος, κρύσταλλα
$\text{Eu}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	λευκοί κρύσταλλοι	φωσφορούχα χρώματα ύαλος, κεραμικά

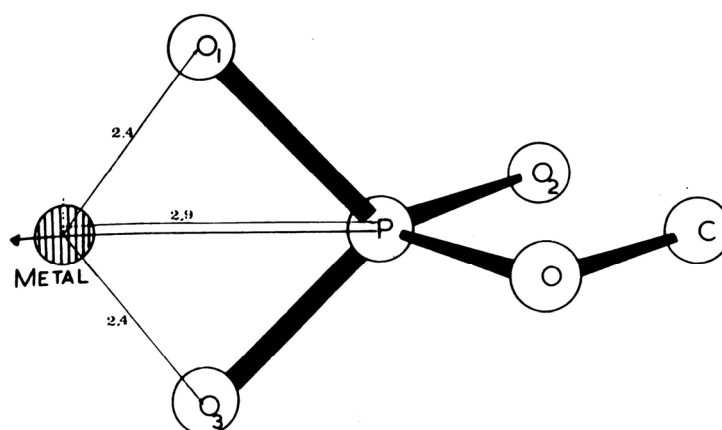
1.3 Βιοχημική συμπεριφορά Eu και REEs

1.3.1 Αλληλεπίδραση Eu και REEs με μόρια βιοχημικού ενδιαφέροντος

Η βιοχημική συμπεριφορά των REEs έχει εξετασθεί εκτενώς αλλά λίγες αναφορές για το Eu υπάρχουν (Evans, 1990; Cotton, 1991). Οι λανθανίδες είναι γενικά ηλεκτροθετικά μέταλλα με αριθμούς οξείδωσης +2 έως +4 και σχηματίζουν ενώσεις

ιοντικής φύσης. Μόνο το Ce, το Tb και το Pr με αριθμό οξειδωσης +4 και το Sm, το Eu και το Yb με αριθμούς οξειδωσης +2 μπορούν να σχηματίσουν σταθερές σύμπλοκες ενώσεις. Συμπληρωματικά οι τρισθενείς μορφές του Ce και του Eu είναι ακόμη πιο σταθερές (Evans, 1990; U. F. Fachschaft Chemie, 2005).

Οι λανθανίδες μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με πολλά μόρια βιοχημικού ενδιαφέροντος συμπεριλαμβανομένων των νουκλεϊνικών οξέων (Sonya, 2001; Mundoma and Greenbaum, 2003), πρωτεϊνών (Amellal and Landry, 1983; Hunt and Jones, 1982, Buccigross and Nelson, 1986), υδατανθράκων (Angyal *et al.*, 1976; Gyurcsik and Nagy, 2000), φωσφολιπιδίων, ιονοφόρων (Hunt and Jones, 1982), και πορφυρινών (Zhu *et al.*, 2008). Οι σημαντικότεροι υποκαταστάτες για τις λανθανίδες είναι ομάδες δότες με αρνητικά φορτισμένα άτομα οξυγόνου, όπως π.χ. οι καρβοξυλικές ομάδες των αμινοξέων ή οι φωσφορικές ομάδες των νουκλεοτιδίων (σχήμα 1). Ιόντα λανθανιδών (π.χ. ιόντα Tb^{3+}) μπορούν επίσης να μετατοπίσουν έντονα ιόντα H^+ (Gersanovski *et al.*, 1985; Franklin, 2001).



Σχήμα 1. Το διάγραμμα δείχνει την θέση πρόσδεσης του Ln^{3+} σε φωσφορική ομάδα των AMP και TMP. Οι μεσοατομικές αποστάσεις είναι σε Å (από Barry *et al.*, 1971).

1.3.2 Ανταγωνιστική δράση ιόντων REEs με τα ιόντα Ca^{2+}

Αξιοσημείωτο είναι ότι οι λανθανίδες αντιδρούν με βιολογικά ενεργές ενώσεις, δρώντας ανταγωνιστικά και αντικαθιστώντας ιόντα ασβεστίου καθώς και άλλα είδη ιόντων όπως Zn(II), Mg(II), Mn(II), Fe(II) και Fe(III) (Burroughs *et al.*, 1992; Sigel and Sigel, 2003). Μεταξύ αυτών των μεταλλικών ιόντων μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ιόντα ασβεστίου Ca^{2+} . Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ιοντική ακτίνα του ασβεστίου (0,104 nm) είναι παρόμοιου μεγέθους με των περισσότερων λανθανιδών (από 0,0848 nm

του Lu έως 0,1034 nm του Ce) συμπεριλαμβανομένου και του Eu (1,09 nm), επηρεάζονται πολλά κυτταρικά μεταβολικά μονοπάτια και γενικότερα η κυτταρική συμπεριφορά (Dziégielewski, 1986; Brzyska, 1996). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι του μοντέλου της πρόσδεσης των λανθανιδών στην πρωτεΐνη καλμοδουλίνη (calmodulin) στην οποία υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης για τα ιόντα Ca^{2+} διαφορετικής συγγένειας, δύο υψηλής και δύο χαμηλής ενώ είναι διαφορετικές για κάθε λανθανίδα. Τα ιόντα Lu^{3+} και Er^{3+} δεσμεύονται όπως τα ιόντα Ca^{2+} , ενώ τα ιόντα Eu^{3+} και Tb^{3+} δεσμεύονται σε άλλες θέσεις απέναντι των αντίστοιχων θέσεων πρόσδεσης των ιόντων Ca^{2+} και τα ιόντα La^{3+} και Nd^{3+} δεσμεύονται σε ενδιάμεσες θέσεις (Buccigross and Nelson, 1986). Επίσης οι λανθανίδες, λόγω της ανταγωνιστικής δράσης τους για τα ιόντα του Ca^{2+} και του Mg^{2+} , εμποδίζουν επίσης την λειτουργία ορισμένων βασικών ένζυμων όπως της Ca^{2+} - ATPάσης στο σαρκοπλασματικό δίκτυο των ινών των σκελετικών μυών καθώς και τις Mg^{2+} - ATPάσες και τις εστεράσες της χολίνης και την ενεργοποίηση της γ κινάσης (Wadkins *et al.*, 1998). Τα ιόντα του Eu^{3+} είναι σε θέση να αντικαταστήσουν τα ιόντα Ca^{2+} που προσδέεται στην καλσινευρίνη (Ca^{2+} /καλμοδουλίνη - εξαρτώμενη φωσφατάση) (Burroughs *et al.*, 1994).

Τα ιόντα των λανθανιδών μπορούν να προσδεθούν στην κυτταρική επιφάνεια καταστρέφοντας την σταθερότητα των μεμβρανών και αυξάνοντας την διαπερατότητα τους (Chang, 1991). Πιο συγκεκριμένα μπορούν να επηρεάσουν την ημίρρευστη κατάσταση των φωσφολιπιδίων και να τροποποιήσουν την διαφορά δυναμικού των μεμβρανών αυξάνοντας το θετικό φορτίο, ενώ διαταράσσουν την διαμεμβρανική μεταφορά των ιόντων Ca^{2+} (μπλοκάρουν τις λειτουργίες των αντλιών Ca^{2+} - Ca^{2+} , Ca^{2+} - Na^{2+} και την παθητική μεταφορά των ιόντων) κυρίως την ενδοκυτταρική είσοδο των ιόντων Ca^{2+} και την πρόσληψη τους από τα μιτοχόνδρια. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι το εύρος της αλλαγής του δυναμικού των κυτταρικών μεμβρανών που προκαλούνται με την παρουσία των λανθανιδών μειώνεται σε συνάρτηση με τον ατομικό τους αριθμό με την εξής σειρά: $\text{Lu}^{3+} > \text{Er}^{3+} > \text{Tb}^{3+} > \text{Eu}^{3+} > \text{Nd}^{3+} > \text{Ce}^{3+} > \text{La}^{3+}$ (Ma *et al.*, 1993). Ως συνέπεια των γεγονότων αυτών είναι η παύση των νευρικών ώσεων και η συστολή των λείων, σκελετικών και καρδιακών μυών, η λειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων και σταματούν τις διάφορες ορμονικές αποκρίσεις (Barry *et al.*, 1978; Morris, 1980; Muscholl *et al.*, 1985).

1.3.3 Επίδραση των REEs στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού και του εδάφους

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού και του εδάφους, όπως το pH, η περιεχόμενη οργανική ύλη, η ανταλλαγή κατιόντων και η περιεκτικότητα του εδάφους σε άργιλο είναι οι κύριοι παράγοντες που ελέγχουν την μεταφορά, τον μετασχηματισμό και την βιολογική διαθεσιμότητα των REEs (Wytttenbach *et al.*, 1994; Nakamaru *et al.*, 2006). Επίσης στο έδαφος και στο νερό οι λανθανίδες δημιουργούν ισχυρά σύμπλοκα με σημαντικά ανιόντα όπως F^- , CO_2^{-3} , OH^- , HPO_2^{-4} με αποτέλεσμα να αυξάνει η άθροιση των REEs τοπικά στην περιοχή και να μειώνεται η διεισδυτικότητα του φωτός στο νερό (Keasler and Loveland, 1982; Goldstein and Jacobsen, 1988).

1.3.4 Οικοτοξικολογία Eu και REEs

Οι REEs λόγω της αυξανόμενης εφαρμογής τους στην σύγχρονη βιομηχανία, γεωργία και καθημερινή ζωή έχουν παρουσιάσει μια ανοδική τάση συσσώρευσης στα χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα με τελικό αποδέκτη τον άνθρωπο (Boer *et al.*, 1996). Στην φύση οι REEs διατίθενται, μέσω των υπόγειων νερών, λόγω της διήθησης τους από τα ορυκτά αποθέματα. Ορισμένες REEs είναι ανιχνεύσιμες σε χαμηλά επίπεδα σε ανώτερους οργανισμούς και ενδεχομένως, όπως έχει προταθεί, να φθάνουν σε αυτούς μέσω της τροφικής αλυσίδας. Ένας άλλος εναλλακτικός τρόπος είναι η αναπνοή. Επίσης η διάβρωση του φλοιού της γης απελευθερώνει REEs στην ατμόσφαιρα όπου οι συγκεντρώσεις των αερολυμάτων αντικατοπτρίζουν την σύνθεση των τοπικών πετρωμάτων (Evans, 1990). Δυστυχώς μέχρι σήμερα, λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τις επιπτώσεις των REEs στο περιβάλλον ενώ πολλές προσπάθειες έχουν καταβληθεί για την κατανόηση της χημικής συμπεριφοράς και της βιολογικής διαθεσιμότητας τους (Zhang and Shan, 2001; Lu *et al.*, 2003).

1.4. Επίδραση και κατανομή Eu και REEs στους οργανισμούς

1.4.1 Επιδράσεις Eu και REEs στους φυτικούς ιστούς

Γενικά οι υψηλές συγκεντρώσεις των REEs στα εδάφη έχουν ως αποτέλεσμα την πρόσληψη μεγαλύτερων ποσοτήτων REEs από τα φυτά. Μια εργασία για τον υδρόβιο υάκινθο *Eichhornia crassipes* δείχνει ότι ορισμένα φυτά αφομοιώνουν τις REEs, από εδαφικά και υδατικά διαλύματα, μέσω του ριζικού τους συστήματος, αλλά και διαμέσου

των στομάτων και της επιδερμίδας των φύλλων τους (Chua, 1998). Συνήθως, οι συγκεντρώσεις των REEs στους φυτικούς ιστούς ακολουθούν μια διαβάθμιση από την μεγαλύτερη συγκέντρωση: ρίζα > φύλλο > μίσχος > άνθος > καρποί (Ma *et al.*, 1996). Εντούτοις, η κατανομή των REEs στη φτέρη *Dichotoma Dicranopteris* ποικίλλει ανάλογα με το είδος της REE. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηριστικές είναι περιπτώσεις είναι των Ce, Nd, Dy με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα φύλλα και μικρότερες στη ρίζα και στο βλαστό ενώ τα Pr, Sm, Eu, Gd, Ho, Y παρουσίασαν μεγαλύτερη συγκέντρωση στις ρίζες ενώ ακολουθούν τα φύλλα και ο βλαστός (Hong *et al.*, 1999). Η κατανομή των REEs στους φυτικούς ιστούς επηρεάζεται από δύο βασικούς παράγοντες τον τύπο του φυτικού ιστού και την συγκέντρωση των REEs στα υποστρώματα. Οι REEs μπορούν να σχηματίσουν χηλικές ενώσεις με διάφορα βιομόρια όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, αμινοξέα κ.λ.π. (Zheng and Chu, 1987). Οι REEs μπορούν επίσης να ενωθούν με διάφορες χρωστικές (π.χ. χλωροφύλλη) και την κυτταρίνη (Xu *et al.*, 2004).

1.4.2 Αλληλεπιδράσεις Eu και REEs με μικροοργανισμούς

Τα τελευταία 15 χρόνια, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί (βακτηρίδια, ζύμες και μύκητες) μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ιόντα όπως τα βαρέα μέταλλα και REEs επηρεάζοντας αρνητικά το οικολογικό τους προφίλ. Για παράδειγμα το La σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει την νιτροποίηση (Zhu *et al.*, 2002; Chen and Zhao, 2007) και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα βαρέα μέταλλα (Liu and Wang, 2001). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι το La, Eu και το Tb συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της αύξησης, του διαστήματος μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης (περιπλασματικό διάστημα) στην *Escherichia coli* εμποδίζοντας τη μεμβρανική λειτουργία και τη μεταφορά των ιόντων Ca^{+2} (Bayer and Bayer, 1991). Ορισμένα gram θετικά βακτήρια, όπως το *Bacillus licheniformis* έχουν την δυνατότητα να συσσωρεύσουν REEs επιλεκτικά. Σε πειράματα που διεξήχθησαν έδειξαν ότι όλα τα gram θετικά βακτήρια και οι ακτινομύκητες μπορούν να συσσωρεύσουν μεγαλύτερες ποσότητες Eu παρά Gd. Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι περισσότεροι από τους ακτινομύκητες απομάκρυναν περισσότερο Eu παρά Sm (Tsuruta, 2007). Από την άλλη μεριά βέβαια, οι μικροοργανισμοί μπορούν να επηρεάσουν το περιβάλλον τους με παραγωγή ορισμένων όξινων ενώσεων όπως τα σιδηροφόρα (siderophores) ή υποπροϊόντα μεταβολισμού (οργανικά οξέα). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιόντων ενός μυκοβακτηριακού

σιδηροφόρου, της σιδηροξαμίνης β (ferrioxamine β), και των ιόντων Eu προκαλεί την μείωση της σταθερότητας του Eu στα ορυκτά βοημίτη (boehmite) και γκαιίτη (goethite) (Andrés *et al.*, 2003).

1.4.3 Επιδράσεις REEs στους υδρόβιους οργανισμούς

Οι επιπτώσεις των REEs στους οργανισμούς των υδάτινων οικοσυστημάτων ποικίλουν ανάλογα με την πολυπλοκότητάς τους. Πιο συγκεκριμένα τα άλγη εμφανίζουν μια αξιόλογη ικανότητα στο να συσσωρεύουν REEs ακόμα κι αν η συγκέντρωσή τους είναι αρκετά χαμηλή στο υδάτινο μέσο. Συγκέντρωση σπάνιων γαιών π.χ. La της τάξης μικρότερης των 57 mg/l επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη διαφόρων ζωοπλαγκτονικών οργανισμών καθυστερώντας τον κύκλο ωρίμανσης τους, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της *Daphnia carinata* (Barry and Meehan, 2000). Μελέτες που είχαν επίσης διεξαχθεί στα πρωτόζωα *Tetrahymena shanghaiensis*, προκειμένου να διερευνηθεί η υδρόβια τοξικότητα των REEs, έδειξαν ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις διεγείρονταν η ανάπτυξη ενώ σε μεγαλύτερες η τοξικότητα ήταν έντονη (Wang *et al.*, 2000c). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και από τους Kong *et al.* (1998) που επιπλέον έδειξαν την σειρά τοξικότητας σε ορισμένες REEs είναι $Gd^{3+} > Y^{3+} > Sm^{3+} > La^{3+}$.

Σε αντίθεση με τη βιοσυσσωρευτικότητα των REEs στην υδρόβια χλωρίδα, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι είναι ιδιαίτερα χαμηλή η πρόσληψη τους από τα ψάρια κάτω από εργαστηριακές συνθήκες (Tu *et al.*, 1994). Μετά από συνεχή έκθεση, των κυπρίνων *Cyprinus carpio* σε συγκεντρώσεις 0,50 mg/l La, Gd και Yb, για 45 ημέρες, αφού προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των REEs, έδειξαν ότι η σειρά βιοσυσώρευσης σε διάφορα όργανα είναι μυς < σκελετός < βράγχια < εσωτερικά όργανα. Οι βαριές λανθανίδες εμφανίστηκαν γενικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις ελαφριές.

1.4.4 Επιδράσεις Eu και REEs στην φυσιολογία και την ανάπτυξη των θηλαστικών

Επίδραση των λανθανιδών στα μάτια και το δέρμα. Στα κουνέλια, οι λανθανίδες όταν εφαρμόζονται άμεσα στα μάτια, προκαλούν επιπεφυκίτιδα και ερεθισμό του δέρματος όταν εφαρμόζονται σε αποψιλωμένη περιοχή του. Ενδοδερμική έγχυση χλωριδίων των λανθανιδών προκαλεί τριχόπτωση (epilation) και σχηματισμό επιδερμικών κονδύλων στα ινδικά χοιρίδια (Haley *et al.*, 1965, 1966). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η υποδόρια έγχυση

των λανθανιδών προκαλεί την τοπική ασβεστοποίηση (local calcification) με ήπια ίνωση και συσσώρευση μεγακυττάρων (giant cells) στα ποντίκια (Garrett and McClure, 1981).

Επίδραση των λανθανιδών στους πνεύμονες. Επίσης έχουν γίνει διάφορες μελέτες που αφορούν τα τοξικά αποτελέσματα των REEs μετά από εισπνοή και ενδοτραχειακή έγχυση τους σε πειραματόζωα (Haley, 1979; Evans, 1990). Αποδείχθηκε ότι η πνευμονική τοξικότητα των REEs συμβάλλει στην ανάπτυξη μιας προοδευτικής πνευμονικής ίνωσης, επίσης γνωστής ως πνευμοκονίωση (pneumoconiosis), η οποία μπορεί να επιταχυνθεί ή να ενισχυθεί με ραδιενεργά υλικά. Έτσι λοιπόν η παθογόνος δράση των εισπνεόμενων λανθανιδών σχετίζεται με τον τύπο και την φυσικοχημική μορφή των υλικών ως προς τη δόση και την διάρκεια της έκθεσης (Nemery, 1990; Haley, 1991). Μελέτες οξείας τοξικότητας του Eu στους αρουραίους έδειξε ότι τα κύρια συμπτώματα που παρουσίασαν ήταν αταξία (ataxia), δακρύρροια (lacrymation), έκταση των οπίσθιων άκρων στο περπάτημα και υποτονική αναπνοή (depressed respiration). Ο θάνατος προέκυψε από την καρδιαγγειακή κατάρρευση που συνδέθηκε με αναπνευστική παράλυση (Haley *et al.*, 1965).

Οι λανθανίδες ως ανταγωνιστές των ιόντων ασβεστίου σε σχέση με την συσταλτικότητα των οργάνων. Η ανασταλτική δράση των λανθανιδών στην συσταλτικότητα ορισμένων οργάνων οφείλεται στη ανταγωνιστική δράση των ιόντων Ca^{2+} με τις REEs (Triggle and Triggle, 1976) ή στην τροποποίηση της σταθερότητας των κυτταρικών μεμβρανών από τις REEs (Swamy *et al.*, 1976). Πιο συγκεκριμένα μελέτες έχουν δείξει ότι ο τόνος (tonus) και η συσταλτικότητα (contractility) του ειλεού των κουνελιών σε απάντηση προς την ακετυλοχολίνη ή τη νικοτίνη μειώνεται ανάλογα με τη δόση των χορηγηθέντων αλάτων EuCl_3 (Haley *et al.*, 1965), DyCl_3 , HoCl_3 , και ErCl_3 (Haley *et al.*, 1966) *in vitro*. Επίσης στα ινδικά χοιρίδια, τα ιόντα Tm^{3+} , La^{3+} , και Ce^{3+} εμποδίζουν τη συστολική απάντηση στα ιόντα K^+ από το διαμήκη ειλεϊκό μυ και τα ανασταλτικά αποτελέσματα αυξάνονται με το μέγεθος της επίδρασης (Triggle and Triggle, 1976). Τα ανασταλτικά αποτελέσματα των ιόντων La^{3+} και των Tm^{3+} στα ιόντα K^+ ή στην νοραδρεναλίνη επίσης αναφέρθηκαν χρησιμοποιώντας τα κύτταρα σπερματικών πόρων (vas deferens) των αρουραίων (Swamy *et al.*, 1976).

Επίδραση των λανθανιδών στους πνεύμονες στην ανάπτυξη, μακροζωία και καρκινογένεση. Σε κουνέλια που εκτέθηκαν σε αθηρογενητική διαίτα η χοληστερόλη, το κολλαγόνο, η ελαστίνη, το ασβέστιο και ουρική έκκριση υδροξυπρολινών αυξήθηκαν. Όταν όμως σε αυτά κατόπιν χορηγήθηκαν, μέσω της διατροφής τους, La (40 mg LaCl_3/kg

βάρους/ημέρα) οι παραπάνω αρτηριοσκληρυντικές παράμετροι μειώθηκαν (Kramsch *et al.*, 1980). Η ανάπτυξη στα ποντίκια ήταν περιορισμένη όταν σε αυτά δόθηκαν 5 ppm Sc^{3+} ή Y^{3+} μέσω πόσιμου νερού, και η μακροζωία αυξήθηκε στα Y^{3+} - ταϊσμένα ποντίκια (Schroeder *et al.*, 1971). Εντούτοις, καμία επίδραση στην ανάπτυξη δεν βρέθηκε στους αρουραίους όταν στην δίαιτα τους περιλαμβάνονταν 0,1 έως 1% DyCl_3 , HoCl_3 ή ErCl_3 για 12 εβδομάδες (Haley *et al.*, 1966). Καμία καρκινογενετική δράση των λανθανιδών δεν παρουσιάστηκε σε ζώα (Ji and Cui, 1988; Strubelt *et al.*, 1980; Schroeder *et al.*, 1971). Επίσης άλλες μελέτες αναφέρουν ότι σε συγκεντρώσεις 0,5 έως 50 mg/REE(NO_3)₃ (REE: μίγμα των Ce, La, Nd, Pr και Sm), οι δοκιμές μεταλλαξικότητας (Ames test) που έλαβαν χώρα στους οργανισμούς ήταν αρνητικές (Schroeder *et al.*, 1971).

Τοξικότητα λανθανιδών και θνησιμότητα (LD_{50}). Η τοξικότητα των λανθανιδών έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται πολύ από την χημική μορφή και την οδό της χορήγησής τους, δηλαδή εάν είναι ενδοφλέβια (intravenous, iv), ενδοπεριτοναϊκή (intraperitoneal, ip) ή στοματική (per os administration, po) (πίνακας 5). Για παράδειγμα διαφορετικά άλατα του Nd, εμφανίζουν την εξής αυξανόμενη σειρά τοξικότητας: χλωριούχα άλατα < προπριονικά άλατα < άλατα οξικού οξέος < 3-σουλφοισονικοτιναμιδικά άλατα < θειικά άλατα < νιτρικά άλατα (Zimakon, 1973; Haley, 1979). Όσον αφορά τα άλατα του Eu και σε συνάρτηση με τις τιμές της μέσης θανατηφόρας δόσης του μετάλλου (lethal dose 50%, LD_{50}) η σειρά αυξανόμενης τοξικότητας που εμφάνισαν τα διάφορα άλατα είναι: Eu^{3+} citrate < $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$ < EuCl_3 (Graca *et al.*, 1962; Bruce *et al.*, 1963; Graca *et al.*, 1964; Haley *et al.*, 1965; Venugopal and Luckey 1978). Έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση του $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.o. στους αρουραίους προκαλεί υπερκεράτωση (hyperkeratosis) του πρόσθιου τμήματος του στομάχου (forestomach) και διήθηση ηωσινόφιλων κυττάρων του υποβλεννογόνου (submucosa) του στομάχου (Ogawa *et al.*, 1995). Εντούτοις όμως ο τρόπος χορήγησης των λανθανιδών στα πειραματόζωα μπορεί να καθορίσει τις τιμές της μέσης θανατηφόρας δόσης του μετάλλου (lethal dose 50%, LD_{50}); Μεγαλύτερες τιμές του LD_{50} παρατηρήθηκαν σε ζώα που χορηγήθηκαν ουσίες δια μέσω της στοματικής οδού που κυμαίνονταν από 1178 mg/Kg έως 7650 mg/Kg (Haley *et al.*, 1966; Ji and Cui, 1988) ενώ ακολουθούν οι οδοί της ενδοπεριτοναϊκής και ενδοφλέβιας οδού με τιμές κατά μέσο όρο 426 mg/Kg και 66 mg/Kg αντίστοιχα (Graca *et al.*, 1964; Bruce *et al.*, 1963; Lachine, 1976; Salas *et al.*, 1976; Venugopal and Luckey, 1978). Με την ενδοπεριτοναϊκή και ενδοφλέβια οδό οι λανθανίδες συσσωρεύονται στον σπλήνα και στο ήπαρ σε ποσοστό που κυμαίνεται από 72 – 80 % (Shinohara and Chiba, 1991; Rosoff *et al.*, 1963) και σε

μικρότερα ποσά στους πνεύμονες, στο πάγκρεας και στα οστά των ζώων. Μέσω όμως της στοματικής οδού οι λανθανίδες συσσωρεύονται, εκτός των προαναφερθεισών ιστών, στα δόντια (Sakurai, 1982; Rabinowitz *et al.*, 1988), και στο γαστρεντερικό σωλήνα ο οποίος εμφανίζει μεγάλη απορροφητικότητα (Kostial *et al.*, 1987; 1989). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι τα θηλυκά άτομα των ποντικών και των αρουραίων είναι περισσότερο επιρρεπή στην θανατηφόρα δράση των λανθανιδών σε σχέση με τα αρσενικά (Bruce *et al.*, 1963) γεγονός που έχει συνδεθεί με την μεγαλύτερη τάση που εμφανίζουν τα θηλυκά άτομα για λιπώδη διήθηση (fatty infiltration) (Snyder *et al.*, 1959) ή με την μικρότερη ικανότητα τους στην ηπατική απομάκρυνση των λανθανιδών (Schmantz, 1964).

Πίνακας 5. LD₅₀ πειραματόζωων μετά από ενδοφλέβια (iv), ενδοπεριτοναϊκή (ip), και στοματική χορήγηση (po) λανθανιδών.

Χημική ένωση λανθανιδών	οδός χορήγησης	πειραματόζωο	LD ₅₀ (mg/Kg)	βιβλιογραφία
La(NO ₃) ₃	ip	ποντίκι	150	Ozeki <i>et al.</i> , 1979
CeCl ₃	iv	αρουραίος	10	Salas <i>et al.</i> , 1976
Ce(NO ₃) ₃	po	ποντίκι	1178	Ji <i>et al.</i> , 1988
EuCl ₃	ip	ποντίκι	550	Haley <i>et al.</i> , 1965
EuCl ₃	po	ποντίκι	5000	Haley <i>et al.</i> , 1965
Eu(NO ₃) ₃	po	αρουραίος ♀	> 5000	Bruce <i>et al.</i> , 1963
Eu ³⁺ citrate	ip	ποντίκι	187	Graca <i>et al.</i> , 1964
Eu ³⁺ citrate	ip	ινδικό χοιρίδιο	72	Venugopal and Luckey, 1978
EuCl ₃	ip	ποντίκι ♂	535	Haley <i>et al.</i> , 1965
EuCl ₃	ip	ποντίκι	387	Graca <i>et al.</i> , 1962
EuCl ₃	ip	ινδικό χοιρίδιο	156	Venugopal and Luckey, 1978
Eu(NO ₃) ₃	ip	ποντίκι ♀	320	Bruce <i>et al.</i> , 1963
Eu(NO ₃) ₃	ip	αρουραίος ♀	210	Bruce <i>et al.</i> , 1963
DyCl ₃	ip	ποντίκι	585	Haley <i>et al.</i> , 1966
DyCl ₃	po	ποντίκι	7650	Haley <i>et al.</i> , 1966
HoCl ₃	ip	ποντίκι	560	Haley <i>et al.</i> , 1966
HoCl ₃	po	ποντίκι	7200	Haley <i>et al.</i> , 1966
ErCl ₃	ip	ποντίκι	535	Haley <i>et al.</i> , 1966
ErCl ₃	po	ποντίκι	6200	Haley <i>et al.</i> , 1966
ScCl ₃	iv	ποντίκι	24	Lachine <i>et al.</i> , 1976
ScCl ₃	ip	ποντίκι	440	Lachine <i>et al.</i> , 1976
Sc-EDTA	iv	ποντίκι	108	Lachine <i>et al.</i> , 1976
Sc-EDTA	ip	ποντίκι	702	Lachine <i>et al.</i> , 1976
RE(NO ₃) ₃	po	ποντίκι	1876	Ji <i>et al.</i> , 1988
RE(NO ₃) ₃	po	αρουραίος	1832	Ji <i>et al.</i> , 1988
RE(NO ₃) ₃	po	ινδικό χοιρίδιο	1397	Ji <i>et al.</i> , 1988

2. ZEBΡΟΨΑΡΟ (*Danio rerio*)

Το είδος *Danio rerio* (ή *Brachydanio rerio*) ανήκει στην οικογένεια των *Cyprinidae* και είναι επίσης γνωστό με τις κοινές ονομασίες *Barilius rerio*, *Cyprinus chapalio*, *Cyprinus rerio*, *Nuria rerio*, (Hamilton, 1822) και στην Ελλάδα με την κοινή ονομασία ζέβρα ή ζεβρόψαρο (*zebrafish*).

2.1 Προέλευση, γεωγραφική εξάπλωση και οικολογικός θώκος

Το *zebrafish*, είναι ένα μικρό βενθο-πελαγικό τροπικό ψάρι. Περιγράφηκε για πρώτη φορά στον ποταμό Γάγγη. Οι φυσικοί πληθυσμοί του είδους βρίσκονται σε ποταμούς, χείμαρρους, κανάλια και τάφρους της Ινδίας, του Πακιστάν, του Μπαγκλαντές, του Νεπάλ και της Myanmar (Burma) σε γεωγραφικό μήκος 33°N - 8°N και πλάτος 66°E - 98°E. Αυτές οι γεωγραφικές περιοχές έχουν μουσωνικό κλίμα με έντονες περιόδους βροχής και ξηρασίας που επιδρούν ουσιαστικά στις παραμέτρους βιότοπων συμπεριλαμβανομένων της χημείας του ύδατος και της αφθονίας της τροφής (Talwar and Jhingran, 1991; Menon, 1999; Bhat, 2003). Στα φυσικά οικοσυστήματα, στα οποία διαβιούν τα *zebrafish*, τα υδάτινα ρεύματα έχουν ταχύτητα από 0 m/sec έως 0,1 m/sec, ενώ η θερμοκρασία σε αυτά τα κλίματα έχει μεγάλο εύρος από 6°C το χειμώνα ως 38°C το καλοκαίρι. Το pH του νερού κυμαίνεται από 7,9 – 8,2. Οι υδάτινες μάζες έχουν βάθος 1 έως 12 m, ενώ τα βάθη στα οποία ζουν είναι 16 ως 57 cm. Τα νερά είναι σχετικά καθαρά (διαφανή έως τα 35 cm) ενώ τα φυσικά υποστρώματα είναι αργιλώδη, ιλυώδη ή λιθώδη (Raymond *et al.*, 2007). Τα ενήλικα ψάρια είναι ικανά να ανεχθούν μεγάλες διακυμάνσεις θερμοκρασίας, pH και σκληρότητας. Ωστόσο για να είναι ψάρια υγιή και να παράγουν αβγά καλής ποιότητας, πρέπει να εξασφαλίζονται βέλτιστες συνθήκες.

Όσον αφορά την διατροφή τους τα *zebrafish*, από ανάλυση του περιεχομένου του στομάχου τους, χαρακτηρίζονται παμφάγα. Η φυσική διατροφή τους αποτελείται επί το πλείστον από ζωοπλαγκτόν και έντομα, καθώς επίσης φυτοπλαγκτόν, νηματοειδή άλγη, αγγειακό φυτικό ιστό, σπόρια αυγά ασπονδύλων, λέπια ψαριών, αραχνίδια, υπολείμματα από τριβή ή αποσάθρωση, άμμο και λάσπη (Dutta, 1993; McClure *et al.*, 2006; Spence *et al.*, 2007a). Υπό πειραματικές συνθήκες, σε ενυδρεία, το *zebrafish* συνήθως τρέφεται με βιομηχανική τροφή, *paramecium* και *artemia* σε θερμοκρασία 26°C-28°C (Westerfield, 2000).

2.2 Συστηματική κατάταξη

Το *Danio rerio* αποτελεί είδος ενός αρκετά διαφοροποιημένου γένους που περιλαμβάνει συνολικά 51 περίπου είδη (Fang, 1997; Eschmeyer, 1998). Η συστηματική κατάταξη του είδους που ακολουθεί είναι η εξής:

Βασίλειο: Ζώα (*Animalia*)

Φύλο: Χορδωτά (*Chordata*)

Υποφύλο: Σπονδυλωτά (*Vertebrata*)

Υπερομοταξία: Γναθοστόματα (*Gnathostomata*)

Ομοταξία: Ακτινοπτερύγιοι (*Actinopterygii*)

Υφομοταξία: Τελεόστεοι (*Teleostei*)

Τάξη: Κυπρινόμορφοι (*Cypriniformes*)

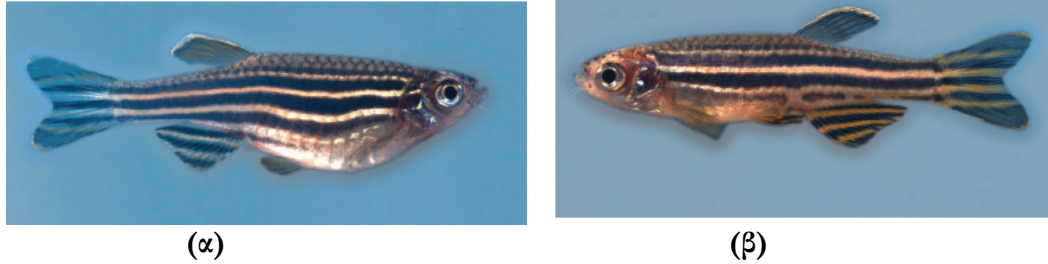
Οικογένεια: Κυπρινοειδή (*Cyprinidae*)

Γένος: *Danio*

Είδος: *Danio rerio*

2.3 Βιολογία και αναπαραγωγή.

Το βασικό μορφολογικό χαρακτηριστικό που καθιστά τα *zebrafish* εύκολα αναγνωρίσιμα, είναι ότι το σώμα τους είναι κυλινδρικό με 7 – 9 οριζόντιες σκούρες μπλε στιλπνές ραβδώσεις (εικόνα 4). Οι ραβδώσεις καταλήγουν στα πτερύγια της ουράς και της έδρας (Barman, 1991). Μεταξύ αυτών των σκούρων μπλε γραμμών, στα αρσενικά άτομα διακρίνεται έντονο χρυσαφί χρώμα, ενώ στα θηλυκά, ασημί (πιο σκουρόχρωμο ραχιαία και πιο ανοιχτόχρωμο κοιλιακά και στην περιοχή των βραγχίων). Ο χρωματισμός του σώματος είναι αποτέλεσμα συνδυασμού 3 διαφορετικών τύπων χρωματοφόρων: μελανοφόρα, ξανθοφόρα και ιριδοφόρα (Parichy, 2006a, 2006b). Τα αρσενικά είναι πιο αδύνατα με πιο λεπτό «τορπιλοειδές» σώμα σε σχέση με τα θηλυκά. Τα θηλυκά είναι πιο στιλπνά και η γαστρική χώρα είναι διασταλμένη, λόγω των αυγών, ιδίως πριν την ωοτοκία. Το μήκος του σπανίως δεν υπερβαίνει τα 45 mm. Το βάρος των θηλυκών ατόμων κυμαίνεται στα $0,65 \pm 0,13$ gr και $0,5 \pm 0,1$ gr για τα αρσενικά.



Εικόνα 4. (α) Θηλυκό άτομο του είδους *Danio rerio* με διασταλμένη την γαστρική του χώρα λόγω των αυγών, (β) αρσενικό άτομο του είδους *Danio rerio* με πιο λεπτό και «τορπιλοειδές» σώμα (Canny Sol Gomez de la Torre et al., 2009).

Τα *zebrafish* είναι αδιαφοροποίητα γονοχωριστικά. Ανήκουν στους πρωτόγυνους ιχθύες (protogynous fishes). Πιο συγκεκριμένα, όλες οι γονάδες (gonads) τους αρχικά αναπτύσσονται ως ωθήκες, οι οποίες στα αρσενικά θα αρχίζουν διαφοροποιούνται περίπου σε 5-7 εβδομάδες μετά την εκκόλαψη (10-15 mm, TL) κατά την διάρκεια ενός ερμαφροδιτικού σταδίου (intersexual stage). Περίπου τον τρίτο μήνα της ανάπτυξης τους (12-17 mm, TL) οι διαφοροποιημένες ωθήκες αναπτύσσονται σε όρχεις (Devlin and Nagahama, 2002; Maack and Segner, 2003; Siegfried and Nüsslein-Volhard, 2008).

Το *zebrafish* είναι ωοτόκο, με ασύγχρονη ωρίμανση γονάδων και εξωτερική γονιμοποίηση. Η παρουσία ενός αρσενικού είναι ουσιαστική για την ωοτοκία από τα θηλυκά. Η ωογένεση εξαρτάται από την έκθεση των θηλυκών ατόμων στις αρσενικές φερομόνες (στεροειδές γλυκουρονίδιο) που διαχέονται στο νερό και γίνονται αντιληπτές από το οσφρητικό επιθήλιο των θηλυκών (van den Hurk *et al.*, 1987; von Hofsten and Olsson, 2005). Κάθε ώριμο θηλυκό μπορεί κάθε φορά να αποθέσει μέχρι και 400 αυγά. Τα αυγά είναι βενθικά, μη κολλώδη και βύθια, με διάμετρο περίπου 0,7 mm. Απελευθερώνονται άμεσα πάνω στο υπόστρωμα, χωρίς καμιά προετοιμασία του υποστρώματος από κανένα γονέα, ενώ δεν υπάρχει καμία γονική φροντίδα. Τα αυγά ενεργοποιούνται με την επαφή τους με το ύδωρ ακόμη και ελλείψει του σπέρματος, με μια σειρά προγραμματισμένων αναπτυξιακών βημάτων. Τα αγονιμοποίητα αυγά αναπτύσσονται μόνο για ένα διάστημα κατά την διάρκεια των πρώτων αυλακώσεων (cleavages) (Lee *et al.*, 1999).

Τα αυγά του *Danio rerio* είναι τελολεκιθικά (telolecithal) και η αυλάκωση μεροβλαστική (meroblastic) και δισκοειδής (discoidal). Αμέσως μετά από τη γονιμοποίηση, το κυτταρόπλασμα του αυγού συσσωρεύεται στο ζωικό πόλο όπου περιβάλλει τον πυρήνα του ζυγωτού (zygote). Μόνο αυτό το κυτταροπλασματικό τμήμα του αυγού, που αποκαλείται βλαστοδίσκος (blastodisc), υποβάλλεται σε διαιρέσεις, όχι

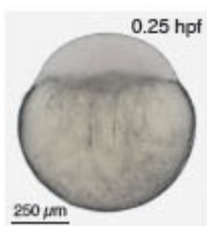
όμως το λεκιθικό τμήμα. Η εκκόλαψη πραγματοποιείται μεταξύ των 48-72 h στους 28,5 °C, ανάλογα με το πάχος του χορίου (chorion) και τη μυϊκή δραστηριότητα του εμβρύου μέσα, όπου και τα δύο μπορούν να ποικίλουν μέσα σε μια ομάδα εμβρύων (Kimmel *et al.*, 1995).

2.4 Αναπτυξιακά στάδια του *Danio rerio*

Η εμβρυική ανάπτυξη από την γονιμοποίηση του αυγού έως την εκκόλαψη εκτιμάται χρονικά σε ώρες μετά την γονιμοποίηση του αυγού (hours post fertilization, hpf), στους 28,5°C, και περιλαμβάνει τις εξής περιόδους:

Περίοδος ζυγωτού (0 – 0,75 hpf)

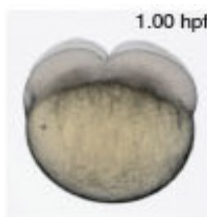
Το στάδιο του ζυγωτού περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα από την γονιμοποίηση του αυγού έως την πρώτη κυτταρική διαίρεση περίπου 40 λεπτά μετά από τη γονιμοποίηση (εικόνα 5). Αν και σε αυτό το στάδιο εμφανίζονται πολλές αλλαγές δεν είναι εύκολο να υποδιαιρεθεί σε επιμέρους φάσεις (Hisoaka and Battle, 1958).



Εικόνα 5. Περίοδος του ζυγωτού. Στο ζυγωτό διακρίνεται ο ζωικός πόλος που εντοπίζεται στην κορυφή του, περίπου 10 min μετά την γονιμοποίηση. Ρεύματα κυτταροπλάσματος κατευθύνονται προς το ζωικό πόλο για να διαμορφωθεί ο βλαστοδίσκος (blastodisc) (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).

Περίοδος αυλάκωσης (0,75 – 2,25 hpf)

Μετά την πρώτη διαίρεση τα κύτταρα ή αλλιώς βλαστομερίδια (blastomeres) διαιρούνται σε διαστήματα των 15 λεπτών περίπου. Τα κυτταροπλασματικά τμήματα είναι μεροβλαστικά και περικόπτουν ημιτελώς το βλαστοδίσκο (Kimmel and Law, 1985a). Τα βλαστομερίδια παραμένουν συνδεδεμένα με κυτταροπλασματικές γέφυρες. Στο τέλος μίτωσης περίπου τα βλαστομερίδια γίνονται περισσότερο στρογγυλευμένα (εικόνα 6).



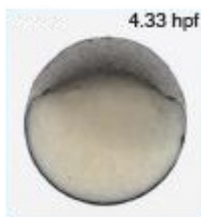
Εικόνα 6. Περίοδος της αυλάκωσης στο στάδιο των 4 κυττάρων (1,00 hpf). Το έμβρυο περιστρέφεται γύρω από τον ζωικό-φυτικό άξονα σε 45° από την πρόσοψη της φωτογραφίας. Ο βλαστοδίσκος έχει ελλειψοειδή μορφή (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).

Περίοδος βλαστιδίου (2,25 – 5,25 hpf)

Ο όρος βλαστίδιο (blastula) χρησιμοποιείται για να αναφερθούμε στην περίοδο που ο βλαστοδίσκος αρχίζει να γίνεται σφαιρικός στο στάδιο των 128 κυττάρων έως την αρχή της γαστριδίωσης, περίπου την 14^η κυτταρική διαίρεση. Σημαντικές διαδικασίες εμφανίζονται κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου: το έμβryo εισέρχεται στην φάση του μεσοβλαστιδίου (midblastula, MBT), διαμορφώνεται η λεκιθική συγκυτιακή στιβάδα (yolk syncytial layer, YSL), και αρχίζει η επιβολή (epiboly). Η επιβολή συνεχίζεται και κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης.

Στην αρχή της 10^{ης} κυτταρικής διαίρεσης (Kimmel and Law, 1985b), τα περιφερειακά κύτταρα υφίσταται αποδιοργάνωση απελευθερώνοντας το κυτταρόπλασμα μαζί με τους πυρήνες τους στο κυτταρόπλασμα του παρακείμενου λεκιθικού κυττάρου με αποτέλεσμα να προκύπτει η YSL στιβάδα.

Η **επιβολή** (epiboly) αρχίζει προς το τέλος της περιόδου του βλαστιδίου (Solnica-Krezel and Driever, 1994), ως εκλέπτυνση και επέκταση της YSL στιβάδας και του βλαστοδίσκου, καλύπτοντας το λεκιθικό κύτταρο (εικόνα 7). Τελικά, στο τέλος της περιόδου του γαστριδίου το λεκιθικό κύτταρο έχει καλυφθεί πλήρως. Κατά την διάρκεια των αρχικών σταδίων αυτής της μορφογενετικής μετακίνησης ο βλαστοδίσκος λεπταίνει αρκετά αλλάζοντας από μια ανυψωμένη μάζα κυττάρων σε μια κυπελλοειδής πολύστιβη μάζα ομοιόμορφου πάχους. Η περάτωση της διαδικασίας λαμβάνει χώρα με την μετακίνηση των βαθύτερων βλαστομεριδίων προς την επιφάνεια.



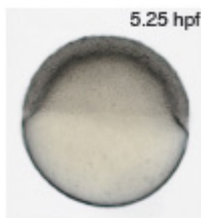
Εικόνα 7. Περίοδος του βλαστιδίου (4,33 hpf). Το λεκιθικό κύτταρο διογκώνεται προς το ζωικό πόλο ενώ η διαδικασία της επιβολής (epiboly) αρχίζει. Κατά την επιβολή η οριακή περιοχή του βλαστοδέρματος κινείται σταδιακά προς τα κάτω για να καλύψει το λεκιθικό κύτταρο (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).

Περίοδος γαστριδίου (5,25 – 10,33 hpf)

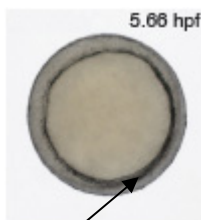
Η επιβολή συνεχίζεται και συνοδεύεται επιπλέον με μορφογενετικές μετακινήσεις των κυττάρων της αναδίπλωσης (involution), σύγκλισης (convergence) και επέκτασης (extension) δημιουργώντας τις αρχικές βλαστικές στιβάδες (primary germ layers) και τον εμβρυικό άξονα (embryonic axis).

Τα πρώτα στάδια της αναδίπλωσης καθορίζουν την αρχή της γαστριδίωσης, η οποία εμφανίζεται στο 50% της επιβολής (εικόνα 8). Κατά συνέπεια, μερικά λεπτά αργότερα μια

πυκνωμένη οριακή περιοχή καλούμενη ως βλαστικός δακτύλιος (germ ring) εμφανίζεται σχεδόν ταυτόχρονα γύρω από το χείλος του βλαστοδέρματος (εικόνα 9). Αμέσως μετά, ακολουθούν μετακινήσεις σύγκλισης παράγοντας μια τοπική συσσώρευση κυττάρων σε μια θέση κατά μήκος του βλαστικού δακτυλίου που ονομάζεται εμβρυϊκή ασπίδα (embryonic shield). Κατά τη διάρκεια των γεγονότων αυτών, η επιβολή διακόπτεται προσωρινά και συνεχίζεται μετά την διαμόρφωση της εμβρυϊκής ασπίδας (εικόνα 10) έως ότου το χείλος του βλαστοδέρματος καλύψει εντελώς το λεκιθικό κύτταρο. Επειδή κατά την διάρκεια της περιόδου του βλαστιδίου δεν δημιουργήθηκε βλαστόκοιλο (blastocoele) τότε και κατά την διάρκεια του γαστριδίου δεν θα σχηματισθεί το αρχέντερο (archenteron).



Εικόνα 8. Περίοδος γαστριδίου (5.25 hpf). Το βλαστόδερμα έχει καλύψει το 50% της απόστασης του ζωικού – φυτικού άξονα του βλαστιδίου και είναι ομοιόμορφα λεπτό (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).



Εικόνα 9. Περίοδος γαστριδίου (5.7 hpf). Ο βλαστικός δακτύλιος (germ ring), όπως φαίνεται από τον ζωικό πόλο, γύρω από το όριο του βλαστοδέρματος λαμβάνει χώρα ως μια αναδίπλωση που είναι παχύτερη από οποιοδήποτε άλλο σημείο (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).



βλαστικός
δακτύλιος
(germ ring)

εμβρυϊκή ασπίδα
(embryonic shield)

Εικόνα 10. Περίοδος γαστριδίου (6 hpf). Η επιβολή παραμένει στο 50%. Ταυτόχρονα με την αναδίπλωση του ορίου του βλαστοδέρματος, η ραχιαία περιοχή αρχίζει να επιμηκύνεται ως προς τον εμπρο-οπίσθιο άξονα μέσω σύγκλισης επέκτασης, καθοδηγώντας προς το εσωτερικό κύτταρα που εντοπίζονται σε πλευρικές περιοχές. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα να παχύνεται η ραχιαία οριακή ζώνη σε σχέση με την υπόλοιπη περιφέρεια με αποτέλεσμα να μετατραπεί στην εμβρυϊκή ασπίδα (embryonic shield) η οποία χαρακτηρίζει την μελλοντική ραχιαία πλευρά του εμβρύου ενώ τα κύτταρα του ζωικού πόλου θα αναπτυχθούν στις δομές του εγκεφάλου (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).

Στην περίοδο αυτή δεν έχει σχηματισθεί βλαστόπορος (blastopore). Κύτταρα, από ένα πολύστιβο στρώμα πάχους 4 κυττάρων (deep cell multilayer, DEL), αναδιπλώνονται στο χείλος του βλαστοδέρματος καθώς αυτό υποκαθιστά το ρόλο του βλαστοπόρου. Η αναδίπλωση θα σχηματίσει το βλαστικό δακτύλιο με την αναστροφή και κίνηση προς τα μέσα του βλαστοδέρματος. Ως εκ τούτου, μέσα στο βλαστικό δακτύλιο υπάρχουν δύο βλαστικές στιβάδες, η ανώτερη, το επίβλαστο (epiblast), που συνεχίζει να τροφοδοτεί τα

κύτταρα της χαμηλότερης, το υπόβλαστο (hypoblast), καθ' όλη την διάρκεια της γαστριδίωσης.

Η περίοδος του γαστριδίου ολοκληρώνεται όταν η επιβολή είναι πλήρης και η καταβολή της ουράς έχει διαμορφωθεί (εικόνες 11, 12). Εντούτοις, αυτό είναι καθαρά λειτουργικό επειδή οι μετακινήσεις της γαστριδίωσης φαίνεται να συνεχίζονται στη καταβολή της ουράς και μετά από αυτήν τη περίοδο.



Εικόνα 11. Περίοδος γαστριδίου. Στάδιο 90% επιβολής (9 hpf). Το λεκιθικό κύτταρο διαθέτει ένα τμήμα, το λεκιθικό πάμα (1) που δεν έχει καλυφθεί από το βλαστοδόερμα και προεκβάλει στον φυτικό πόλο του γαστριδίου. Η ραχιαία πλευρά του βλαστοδέρματος είναι ευδιακρίτως παχύτερη από τη κοιλιακή. Ραχιαία ο επιβλάστης πυκνώνεται για να διαμορφώσει την νευρική πλάκα (2) που αντιπροσωπεύει μελλοντικά την καταβολή του εγκεφάλου. Η προχορδιακή πλάκα (3) επεκτείνεται ακριβώς μετά από το ζωικό πόλο. Σε αυτό το στάδιο, η καταβολή της ουράς (4) είναι ορατή σε μερικά έμβρυα (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).



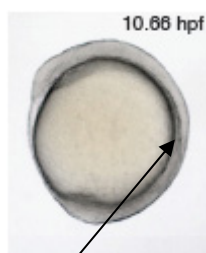
Εικόνα 12. Περίοδος γαστριδίου (10,00 hpf). Το μεγαλύτερο τμήμα της νευρικής πλάκας θα διαμορφώσει μια προεξέχουσα διόγκωση το rolster (1) που αποτελείται από προμιτωτικά αδενικά κύτταρα εκκόλαψης. Η επιβολή ολοκληρώνεται στο 100% όπου το βλαστοδόερμα έχει καλύψει πλήρως όλη την επιφάνεια της λεκίθου (2) και γενικά του εμβρύου. Η καταβολή της ουράς (3) είναι καλά ορατή σε όλα τα έμβρυα (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).

Περίοδος μεταμερισμού (σωμιτογένεση) (10,33 – 24 hpf)

Το στάδιο χαρακτηρίζεται από μια ποικιλία μορφογενετικών αλλαγών του εμβρύου όπως η ανάπτυξη των σωμιτών (somites), οι καταβολές των πρόδρομων οργάνων πλέον γίνονται ορατές, η καταβολής της ουράς είναι πιο προεξέχουσα ενώ το έμβρυο αυξάνει το μήκος του. Τα πρώτα κύτταρα διαφοροποιούνται μορφολογικά, και εμφανίζονται οι πρώτες κινήσεις του εμβρύου.

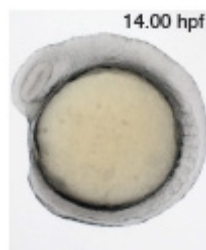
Οι σωμίτες εμφανίζονται διαδοχικά στον κορμό και την ουρά αποτελώντας έναν χρήσιμο δείκτη προσδιορισμού σταδίων μεταμερικής ανάπτυξης (εικόνα 13). Οι σωμίτες αποτελούν αδιαφοροποίητες μεσοδερμικές δομές που η επιφάνειά τους εμφανίζεται επιθηλιακή αμέσως μετά την διαμόρφωση τους. Η μεγάλη πλειοψηφία των εσωτερικών κυττάρων κάθε σωμίτη θα αναπτυχθούν ως μυοτόμια (myotome) (ή όπως αλλιώς ονομάζονται μυομερή) ή τμήμα μυών. Τα μυοτόμια εξασφαλίζουν την μεταμερική σταθερότητα των σωμιτών. Τα γειτονικά μυοτόμια διαχωρίζονται από ένα εγκάρσιο συνδετικό ιστό, το μυοδιάφραγμα (myoseptum).

Οι πρόνεφροι αναπτύσσονται αμφίπλευρα και βαθιά στο τρίτο ζεύγος σωματίων (εικόνα 14). Ο προνεφρικός αγωγός (pronephric duct) επεκτείνεται κατά μήκος του εμβρυϊκού κορμού και κάμπτεται κοιλιακά γύρω από την προέκταση της λεκίθου, εκεί όπου θα αναπτυχθεί μελλοντικά η έδρα. Ακριβώς πρόσθια και ραχιαία στο τέλος του προνεφρικού αγωγού, κοιλιακά του καταλοίπου της ουράς, συσσωρεύεται μια μεσεγγυματική μάζα, αποκαλούμενη ως ενδιάμεση μάζα μεσοδέρματος (intermediate mass of mesoderm), που θα αποτελέσει την πρόδρομη μορφή των αιμοποιητικών νησίδων (hematopoietic blood island).



2 σωματίτες

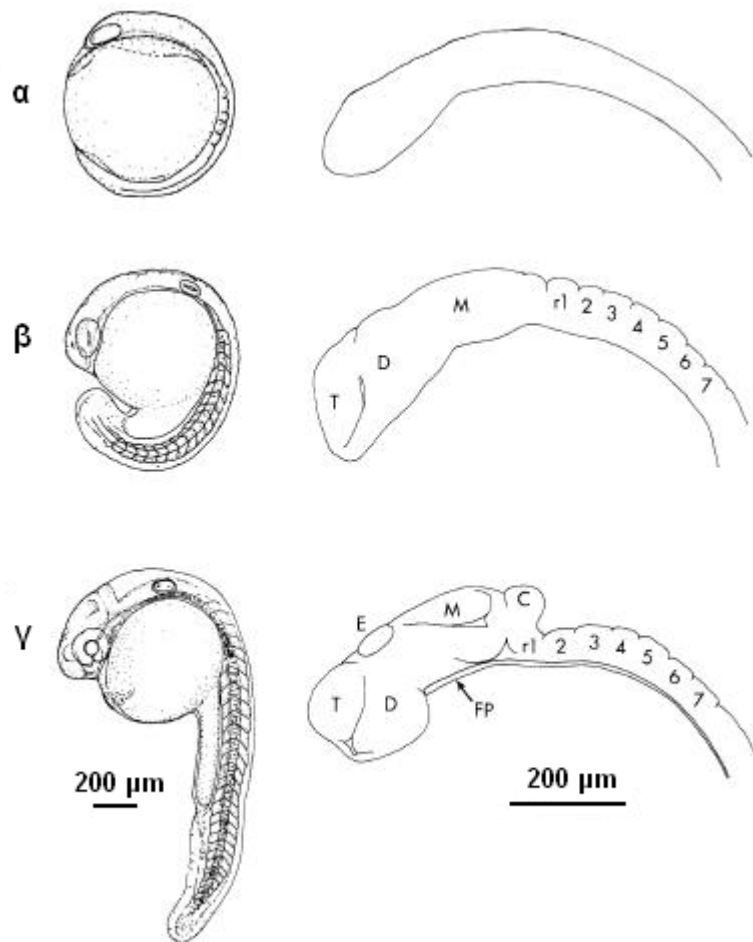
Εικόνα 13. Περίοδος μεταμερισμού (10,66 hpf). Μια διαχωριστική αύλακα χαρακτηρίζει το όριο μεταξύ του πρώτου και δεύτερου σωματίτη (Canny Sol Gomez de la Torre et al., 2009).



Εικόνα 14. Περίοδος μεταμερισμού (14,00 hpf). Το έμβρυο χαρακτηρίζεται από την παρουσία 10 σωματίων ενώ αρχίζουν να διαμορφώνονται οι πρόνεφροι (Canny Sol Gomez de la Torre et al., 2009).

Στο τέλος της γαστριδίωσης, ο πρόδρομος ιστός του κεντρικού νευρικού συστήματος, η νευρική πλάκα, αρχίζει να πτυχώνεται ήδη. Η πρόσθια περιοχή, όπου ο εγκέφαλος θα διαμορφωθεί, είναι ιδιαίτερα παχιά. Στην αρχή της σωματογένεσης η καταβολή του εγκεφάλου, αν και μεγαλύτερη από εκείνης του νωτιαίου μυελού εμφανίζεται ομοιόμορφη καθ' όλο το μήκος της. Κατόπιν, κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού της σωματογένεσης διακρίνονται δέκα περίπου διογκώσεις, τα νευρομερή (neuromeres). Τα πρώτα τρία είναι επιμήκη και πιο καλοσχηματισμένα. Το πρώτο νευρομερές είναι ο προσεγκέφαλος (forebrain) με τις δύο υποδιαίρεσεις του, τον διεγκέφαλο (diencephalon) και τον τελεγκέφαλο (telencephalon), και ο μεσεγκέφαλος (midbrain ή mesencephalon) (εικόνα 15). Επιπλέον, οι καταβολές των ματιών (rudimes of eyes), ο πρόδρομος οπτικός ιστός (optic primordia), αναπτύσσονται πολύ νωρίς από τα πλευρικά τοιχώματα του διεγκέφαλου (εικόνα 16). Στα τελευταία στάδια της σωματογένεσης ο διεγκέφαλος επεκτείνεται ως αρχέγονος ιστός του υποθαλάμου και η

πρόδρομη επίφυση (epiphysis) εμφανίζεται ως μικρή διόγκωση στο μέσο της διεγκεφαλικής οροφής. Ο πρόδρομος μεσεγκέφαλος υποδιαιρείται οριζόντια για να διαμορφώσει το ραχιαίο (οπτικό) μεσεγκέφαλο (tectum midbrain) και το κοιλιακό μεσεγκεφαλικό κάλυμα (ventral tegmentum midbrain). Τα υπόλοιπα επτά νευρομερή, που καλούνται ρομβομερή (rhombomeres r1-r7), υποδιαιρούν τον οπίσθιο εγκέφαλο (hindbrain).



Εικόνα 15. Ανάπτυξη της πρόδρομου στοιχείου του εγκεφάλου κατά τη διάρκεια της περιόδου μεταμερισμού. (α) Δεν παρατηρούνται μορφολογικές υποδιαιρέσεις του εγκεφάλου στο στάδιο των έξι σωματιών (12 hpf). (β) Στο στάδιο των 18 σωματιών (18 hpf) περίπου έχουν αναπτυχθεί δέκα νευρομερή τα οποία είναι: ο τελεγκέφαλος (T, telencephalon), ο διεγκέφαλος (D, diencephalon), ο μεσεγκέφαλος (M, mesencephalon) και επτά περίπου ρομβομερή (r1-r7, rhombomeres). (γ) Στο στάδιο prim-5 (24 hpf) η επίφυση (E, epiphysis) είναι παρούσα στο μέσον της διεγκεφαλικής οροφής ενώ ο κοιλιακός διεγκέφαλος έχει επεκταθεί ως πρόδρομο στοιχείο του υποθαλάμου. Ο ραχιαίος μεσεγκέφαλος (M, midbrain), χωρίζεται τώρα από τον κοιλιακό (ventral midbrain ή tegmentum). Η παρεγκεφαλίδα (C, cerebellum) είναι εμφανής στο όριο οπίσθιου εγκεφάλου και μεσεγκεφάλου. Η βασική πλάκα (FP, floor plate) επεκτείνεται κοιλιακά και στο μέσο χωρίς να περιλαμβάνει το προσεγκέφαλο (Kimmel, 1993).



Εικόνα 16. Περίοδος μεταμερισμού (11,66 hpf). Ο πρόδρομος εγκεφαλικός ιστός (1) πυκνώνεται και γίνεται πιο ευδιάκριτος. Από την πλάγια μικροσκοπική παρατήρηση του εμβρύου διακρίνεται ο πρόδρομος οπτικός ιστός (2) στο στάδιο των 4 ή 5 σωματιών. Επίσης στο στάδιο αυτό διαμορφώνεται η κύστη του Kupffer (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).

Λίγο μετά την μορφογένεση του νευρικού σωλήνα αρχίζει η διαφοροποίηση των πρώτων νευρώνων (neurons).

Ένας πρόδρομος ιστός, πλευροκοιλιακά του πρόδρομου εγκεφάλου, αρχίζει να διαφοροποιείται δίνοντας μια σειρά φαρυγγικών (pharyngeal arches) ή σπλαχνικών (visceral arches) τόξων.

Στην περίοδο αυτή, οι πρόσθιοι – οπίσθιοι (Anterior – Posterior, AP) και οι ραχιαίοι – κοιλιακοί (Dorsal – Ventral, DV) άξονες του εμβρυικού σώματος είναι περισσότερο σαφείς. Επίσης για πρώτη φορά τα κύτταρα διαφοροποιούνται μορφολογικά και το έμβρυο κάνει τις πρώτες αντανακλαστικές κινήσεις του. Οι συσπάσεις των μυών, που εμφανίζονται στο στάδιο των 17 σωματιών (16 hpf), συσχετίζονται με την εσωτερική ανάπτυξη των νευριτών των αναπτυσσόμενων κινητικών νευρώνων (Hanneman and Westerfield, 1989) και σταδιακά αρχίζουν να γίνονται ισχυρότερες, συντονισμένες και συχνότερες.

Φαρυγγική (pharyngula) περίοδος (24 – 48 hpf)

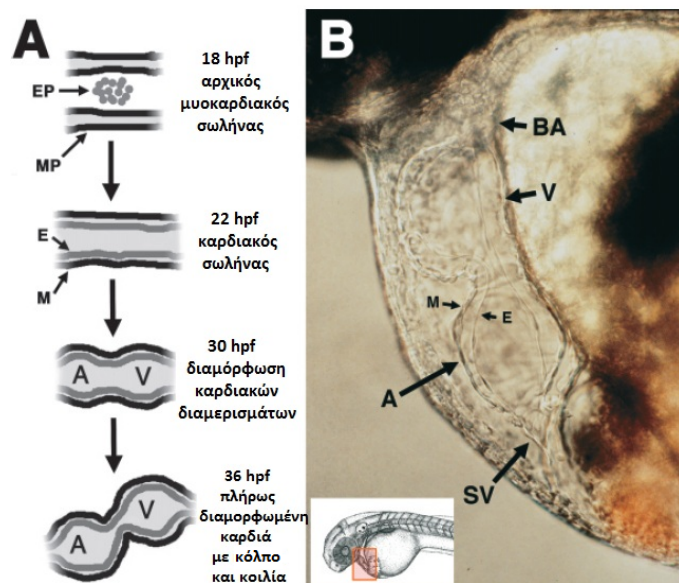
Σε αυτήν την περίοδο ανάπτυξης η νωτοχορδή είναι καλά αναπτυγμένη, έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των σωματιών στο σύνολό τους. Το νευρικό σύστημα επεκτείνεται σε όλο το σώμα. Με τη γρήγορη παρεγκεφαλιδική μορφογένεση του μετεγέφαλου, ο εγκέφαλος διαμορφώνει πέντε λοβούς.

Μελλοντικά το γναθικό τόξο (mandibular arches) και το υοειδές τόξο (hyoid arches) θα διαμορφώσουν τις γνάθους (jaws) και τα πίσω τόξα τα βράγχια (gills).

Στις 26 hpf, μεσεγχυματικά κύτταρα αθροίζονται πλευρικά και αμφοτέρα στον τρίτο σωματίτη όπου θα διαφοροποιηθούν στις καταβολές των θωρακικών πτερυγίων. Η μέση πτυχή των πτερυγίων είναι μόλις παρούσα στην αρχή της περιόδου και με την παραγωγή κολλαγόνων ενισχύονται οι ακτίνες πτερυγίων (fin rays) ή τα ακτινοτρίχια (actinotrichia). Τα θωρακικά πτερύγια (pectoral fins) ξεκινούν την μορφογένεσή τους.

Τα κύτταρα χρωστικών ουσιών αρχίζουν να διαφοροποιούνται στην αρχή της περιόδου. Στις 26 hpf περίπου τα μελανοφόρα (melanophores) εμφανίζουν μια χαρακτηριστική, καθορισμένη, διάταξη θέσης στο σώμα του εμβρύου και πιο συγκεκριμένα πλευρικά στον κορμό και στην ουρά. Επίσης είναι παρόντα στις ραχιαία και πλευρική επιφάνεια του λεκιθικού σάκου. 16 hpf αργότερα το κεφάλι θα εμφανίζει έναν χρωματισμό ανοικτό κίτρινο λόγω της πρώτης εμφάνισης των ξανθοφόρων (xanthophores). Επίσης για πρώτη φορά σε έντονο φωτισμό αποκαλύπτονται οι διασκορπισμένα, ασθενείς, ανακλώμενες κηλίδες χρωστικής των ιριδοφόρων (iridophores) στο μάτι (Milos and Dingle, 1978).

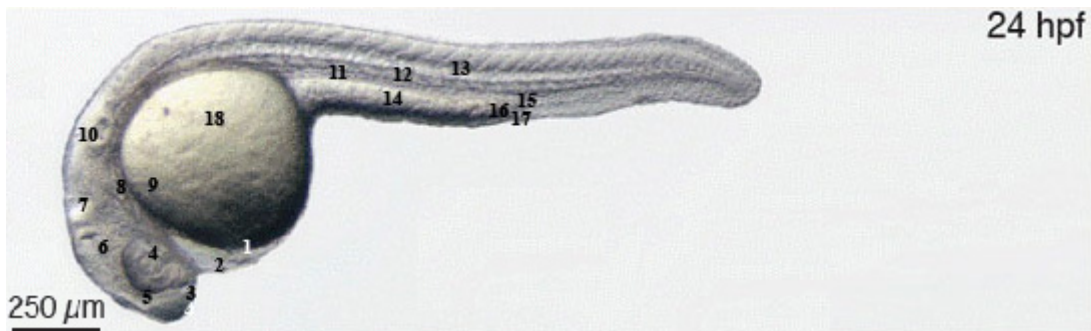
Το κυκλοφορικό σύστημα αρχίζει να διαμορφώνεται με τους καρδιακούς ρυθμούς να εμφανίζονται στην αρχή της περιόδου, με συχνότητα καρδιακών παλμών $141 \pm 14,2$ bpm (beats per minutes) περίπου, ενώ το αίμα κυκλοφορεί σε ένα κλειστό σύστημα αγγείων (Reib, 1973; Glickman and Yelon, 2002; Martin *et al.*, 2008). Στις πρώτες 24 hpf ανάπτυξης η καρδιά έχει μορφή κωνικού σωλήνα, με περικαρδιακό σάκο και βρίσκεται μπροστά από το λεκιθικό σάκο (εικόνα 17). Στο τέλος της περιόδου η καρδιά θα έχει ήδη διαμορφώσει τα διαμερίσματα του κόλπου και της κοιλίας (Vogel and Weinstein, 2000).



Εικόνα 17. Α. Διαγραμματική απεικόνιση της οντογένεσης της καρδιάς στα έμβρυα *Danio rerio*. EP: ενδοκαρδιακά πρόδρομα κύτταρα (endocardial progenitor cells), MP: αρχικός μυοκαρδιακός σωλήνας (primitive myocardial tubes), E: ενδοκαρδιακή κυτταρική στιβάδα (endocardial cell layer), M: μυοκαρδιακή κυτταρική στιβάδα (myocardial cell layer) Β. A: κόλπος καρδιάς (atrium), V: κοιλία καρδιάς (ventricle), BA: αρτηριακός βολβός (bulbus arteriosus), SV: φλεβώδης κόλπος (sinus venosus) (Vogel and Weinstein, 2000).

Τα περισσότερα κύτταρα αίματος εντοπίζονται στις αιμοποιητικές νησίδες και στις 24-25 hpf μερικά από αυτά κατευθύνονται πρόσθια και ραχιαία στην περιοχή μεταξύ της λεκίθου και της νωτοχορδής, όπου υπάρχουν τα κύρια αγγεία που επικοινωνούν με τον κορμό και την ουρά. Τα κύτταρα αίματος θα αρχίσουν να εισέρχονται στο κυκλοφορικό πολύ σύντομα. Στις 42 hpf ο πρωτογενής ιστός του συκωτιού και πιθανώς της νηκτικής κύστης (swim bladder) σχηματίζονται κατά μήκος του εντερικού σωλήνα, μετά από το φάρυγγα στην περιοχή έμπροσθεν της λεκιθικής σφαίρας.

Τα αποχοριομένα έμβρυα (dechorionated embryos) σε κατάσταση ανάπαυσης έχουν το σώμα τους πλαγιαστά τοποθετημένο με τον λεκιθικό σάκο πλάγια προς τα πάνω (εικόνα 18). Όταν τα έμβρυα ενοχληθούν με επαφή απαντούν με μια γρήγορη συστροφή του σώματός τους.



Εικόνα 18. Έμβρυο *Danio rerio* 24 hpf. 1. αδενικά κύτταρα εκκόλαψης, 2. περικαρδιακή κοιλότητα 3. τελεγκέφαλος, 4. μάτι, 5. επίφυση, 6. οπτικό πλακάδιο, 7. ραχιαίος οπτικός μεσεγκέφαλος, 8. ρομβοεγκέφαλος, 9. καταβολή καρδιάς, 10. ωτική κάψα, 11. ραχιαία αορτή, 12. νωτοχορδή, 13. βασική πλάκα, 14. προέκταση λεκιθικού σάκου, 15. αιμοποιητική νησίδα, 16. προνεφρικός αγωγός, 17. ουρογεννητική οπή (έδρα), 18. σφαίρα λεκιθικού σάκου (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).

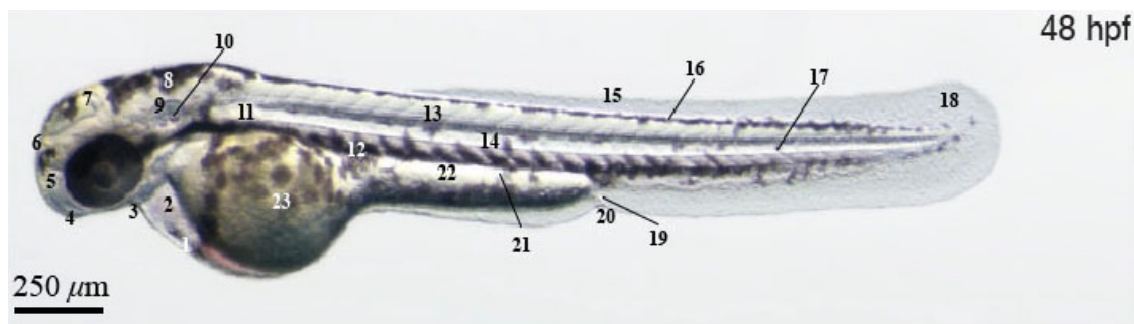
Περίοδος εκκόλαψης (48 – 72 hpf)

Κατά τη διάρκεια της περιόδου εκκόλαψης το έμβρυο συνεχίζει να αναπτύσσεται στον ίδιο ρυθμό όπως και νωρίτερα. Η μορφογένεση πολλών από τα όργανα έχει σχεδόν ολοκληρωθεί ενώ για κάποια άλλα η μορφογένεση έχει επιβραδυνθεί αρκετά συμπεριλαμβανομένου του εντέρου και εκείνων που το συνοδεύουν. Εντούτοις, αυτές οι ενδοδερμικές δομές είναι δύσκολο να διακριθούν σε ένα ζωντανό έμβρυο λόγω της θέσης τους στο εσωτερικό του σώματος του. Πιο εύκολα μπορούν να διακριθούν η ανάπτυξη των θωρακικών πτερυγίων, των σαγονιών και των βραγχίων.

Η ανάπτυξη των θωρακικών πτερυγίων συνεχίζει να είναι ένα χρήσιμο χαρακτηριστικό γνώρισμα για τον προσδιορισμό των πρώτων σταδίων της περιόδου εκκόλαψης (εικόνα 19).

Διακριτές αλλαγές εμφανίζονται στη φαρυγγική περιοχή. Κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της περιόδου της εκκόλαψης η μορφογένεση του στόματος είναι γρήγορη. Τα δύο πρόσθια φαρυγγικά τόξα (γναθιαίο και υοειδές τόξο) θα διαμορφώνουν τη σιαγόνα. Η ανάπτυξη χόνδρου των γνάθων καθυστερεί σε σχέση με την ανάπτυξη του χόνδρου στο θωρακικό πτερύγιο και των πρώτων χόνδρων του χονδροκράνιου (chondrocranium). Οι χόνδροι των γνάθων αναπτύσσονται μπροστά από τους βραγχιακούς χόνδρους (branchial cartilages).

Η διαφοροποίηση της νωτοχορδής έχει προχωρήσει έως το τελικό άκρο του εμβρυϊκού σώματος (ουραίο άκρο).



Εικόνα 19. Έμβryo *Danio rerio* 48 hpf. 1. περικάρδιο, 2. καρδιά, 3.στόμα, 4. τελεγκέφαλος, 5. οσφρητική κοιλότητα, 6.επίφυση, 7. οπτικός μεσεγκεφάλος, 8. ρομβοεγκεφάλος, 9. ωτική κάψα, 10. ωτόλιθος, 11. καταβολή θωρακικού πτερυγίου, 12. ραχιαία αορτή, 13. βασική φλέβα, 14. νωτοχορδή, 15. ραχιαίο πτερύγιο, 16.αιμοφόρα αγγεία σωμίτη, 17. οριζόντιο μυοδιάφραγμα, 18. ουραίο πτερύγιο, 19. προνεφρικός αγωγός, 20. έδρα, 21. οπίσθια βασική φλέβα, 22. προέκταση λεκιθικού σάκου, 23. λεκιθικός σάκος (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).

Η λωρίδα των μελανοφόρων τώρα είναι πολύ καλά διακριτή και πυκνή, ραχιαία, στο μέσο του κορμού και της ουράς. Στην ραχιαία πλευρά του κεφαλιού η λωρίδα σχηματίζει ένα V. Η άκρη της ουράς καλύπτεται κοιλιακά με χρωστική ουσία, εκτός από ορισμένα σημεία. Μια διπλή γραμμή μελανοφόρων ενώνεται στο μέσον της λεκιθικής σφαίρας σχηματίζοντας ένα "μπάλωμα" στο σημείο που θα αναπτυχθεί η νηκτική κύστη (swim bladder).

Η διαφοροποίηση των ξανθοφόρων (xanthophore) δίνει στο κεφάλι ένα χαρακτηριστικό εξασθενημένο κίτρινο χρωματισμό. Ραχιαία του σώματος και της ουράς το χρώμα είναι πιο αδύνατο. Τα ιριδοφόρα είναι διάσπαρτα και πέρα από τον αμφιβληστροειδή ενώ η μελάγχρωση του είναι πιο πυκνή. Πολλά από τα ιριδοφόρα εμφανίζονται να σχηματίζουν ένα ασυνεχές δαχτυλίδι μεμονωμένων κυττάρων ή μικρές αντανακλαστικές ομάδες κυττάρων γύρω από το φακό εκεί όπου η ίριδα θα αναπτυχθεί.

Η περικαρδιακή κοιλότητα (pericardial cavity) γίνεται πιο ευδιάκριτη με την μείωση του μεγέθους του λεκιθικού σάκου. Ο καρδιακός σωλήνας κάμπτεται με τέτοιο τρόπο έτσι

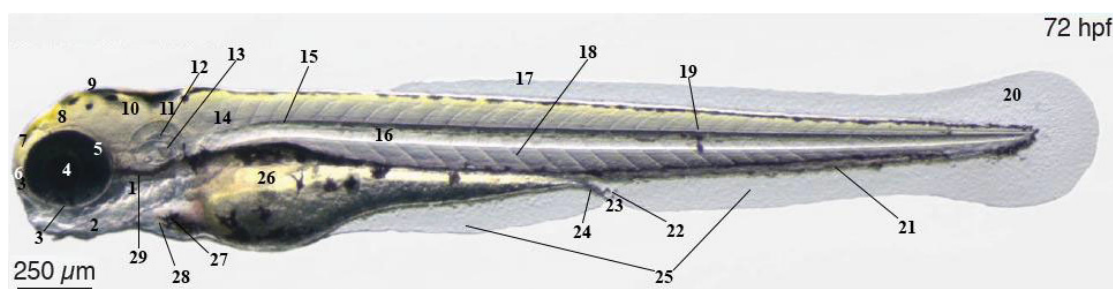
ώστε ο καρδιακός κόλπος να είναι σε ραχιαία θέση σε σχέση με την κοιλία. **Ο καρδιακός παλμός είναι πιο ισχυρός**, αυξάνει περίπου σε $147,2 \pm 20,9$ bpm, **καθώς το αίμα διατρέχει όλα τα αορτικά τόξα και τον υποκλείδιο βρόχο** (Martin *et al.*, 2008).

Στις 60 hpf περίπου το εσωτερικό του ωτικού κυστιδίου διαχωρίζεται σε δύο διαμερίσματα, ένα για κάθε ωτόλιθο, ενώ οι ημικυκλικοί σωλήνες έχουν διαφοροποιηθεί πλήρως.

Σε κατάσταση ανάπαυσης, τα αποχοριομένα έμβρυα αρχίζουν να υιοθετούν την στάση σώματος με το ραχιαίο τμήμα προς τα πάνω. Επίσης οι συσπάσεις του σώματος τους κατά την διάρκεια της αντίδρασης – διαφυγής εμφανίζονται τόσο γρήγορα που δεν είναι αντιληπτές με το μάτι.

Περίοδος λάρβας (72 hpf – 29 ημέρες)

Στην περίοδο αυτή η λάρβα δεν αποκτά πλήρως ενήλικη μορφή (εικόνα 20) διότι η ανάπτυξη των πτερυγίων και των μελανοφόρων συνεχίζεται και ολοκληρώνεται και στην επόμενη περίοδο του νεαρού ατόμου. Το ολικό μήκος σώματος του φθάνει στα τα 7,8 mm ενώ έχουν αναπτυχθεί 10 δόντια.



Εικόνα 20. Λάρβα *Danio rerio* στις 72 h. 1. κερατουοειδής χόνδρος, 2. τετράγωνο, 3. επιθήλιο αμφιβληστροειδή χιτώνα, 4. φακός, 5. αμφιβληστροειδής χιτώνας, 6. οσφρητική κοιλότητα, 7. τελεγκέφαλος, 8. μεσεγκεφαλικό κάλυμμα, 9. παρεγκεφαλίδα, 10. μετεγκεφαλος, 11. ρομβοεγκεφαλος, 12. ωτική κάψα, 13. ωτόλιθος, 14. νευρόκοιλο, 15. βασική πλάκα, 16. νωτοχορδή, 17. ραχιαίο πτερύγιο, 18. οριζόντιο μυοδιάφραγμα, 19. ραχιαία αορτή, 20. ουραίο πτερύγιο, 21. ουραία φλέβα, 22. προνεφρικός αγωγός, 23. ουρογενετική οπή (έδρα), 24. έντερο, 25. κοιλιακά πτερύγια, 26. λεκιθικός σάκος, 27. κόλπος καρδιάς, 28. κοιλία καρδιάς, 29. βραγχιακά τόξα. (Canny Sol Gomez de la Torre *et al.*, 2009).

Περίοδος νεαρού ατόμου (30 ημέρες – 89 ημέρες)

Στην περίοδο του νεαρού ατόμου (juvenile) το *zebrafish* εμφανίζει τα χαρακτηριστικά ενήλικου ατόμου εφόσον έχουν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των πτερυγίων και των μελανοφόρων του στις 30 – 44 ημέρες. Το ολικό μήκος σώματος του φθάνει στα 10 mm ενώ από την 45 ημέρα περίπου το μήκος του φθάνει τα 14 mm ενώ έχουν αναπτυχθεί 12 δόντια.

Τέλος, **ενήλικο** θεωρείται το άτομο των 90 ημερών – 2 ετών ενώ εισέρχεται στην γενετική ωρίμανση αμέσως μετά την ολοκλήρωση των 90 ημερών.

2.5 Το *Danio rerio* ως μοντέλο ανάπτυξης και μελέτης

Σήμερα το *zebrafish* (*Danio rerio*) αποτελεί έναν δημοφιλή, πρότυπο πειραματικό οργανισμό, λόγω του μεγάλου αριθμού των πλεονεκτημάτων που προσφέρει για αναπτυξιακή και περιβαλλοντική έρευνα, που το καθιστούν μοντέλο τοξικολογικών μελετών. Ορισμένα από τα βασικά πλεονεκτήματά του είναι το μικρό μέγεθος ενηλίκων, η εύκολη διαχείριση γεννητόρων, το μικρό κόστος συντήρησης και διάθεσης χώρου, ο μικρός χρόνος ανάπτυξης, ο συνεχής αναπαραγωγικός κύκλος, παραγωγή πολλών αυγών σε κάθε ωοτοκία (150 – 400) και υψηλό ποσοστό γονιμοποίησης που φθάνει το 90% (Lele and Krone, 1996; Westerfield, 2000; Nagel, 2002; Maack and Segner, 2003; Carney *et al.*, 2006). Αυτό είναι βέβαια εμφανές από τον αυξανόμενο αριθμό επιστημονικών άρθρων που έχουν δημοσιευθεί στο κοντινό παρελθόν έχοντας ως βασικό πειραματικό μοντέλο το *zebrafish*. Στις αρχές της δεκαετίας του '90 υπήρχαν λιγότερες από 100 δημοσιεύσεις ετησίως ενώ σήμερα υπολογίζεται ότι ανέρχονται κατά μέσο όρο στις 3.500 ετησίως περίπου και συνεχίζουν να αυξάνουν (Hill, 2005).

Ένα πειραματικό μοντέλο προσδιορισμού τοξικότητας είναι εύκολο να εκτελεσθεί με την χρήση εμβρύων ή λαρβών *zebrafish* σε σχέση με την χρήση ενηλίκων ψαριών για τους εξής λόγους:

- τα αυγά και τα έμβρυα είναι διαφανή με αποτέλεσμα η πιο εύκολη παρατήρηση της εμβρυϊκής ανάπτυξης (καταγραφή καρδιακών παλμών, εμβρυϊκές κινήσεις, τυχόν δυσμορφίες),
- ραγδαία εμβρυϊκή ανάπτυξη έως την εκκόλαψη μέσα σε 72 h,
- πλήρως χαρακτηρισμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη (πλήρης αναγνώριση και διαχωρισμός περιόδων και σταδίων ανάπτυξης μεταξύ τους),
- το μικρό μέγεθος των εμβρύων επιτρέπει την ταυτόχρονη μελέτη και σύγκριση πολλαπλών δοκιμών τοξικότητας.

3. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν η βραχυπρόθεσμη επίδραση του Eu στην φυσιολογία καθώς και η τοξικολογική επίδραση του μετάλλου στα έμβρυα *D. rerio* κατά την αναπτυξιακή διαφοροποίηση και οργανογένεση τους. Ειδικότερα η μελέτη περιλαμβάνει τις επιπτώσεις του μετάλλου σχεδόν σε όλες τις αναπτυξιακές παραμέτρους του *D. rerio* όπως:

- ✓ τη θνησιμότητα,
- ✓ τον εκτιμώμενο χρόνο εκκολασιμότητας,
- ✓ τους σωματομετρικούς δείκτες (28 μορφομετρικές μεταβλητές και οκτώ ανατομικά διαμερίσματα σώματος κάθε λάρβας),
- ✓ την καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία, καθώς και
- ✓ την διερεύνηση της απορροφητικότητας του μετάλλου από τα έμβρυα και τα λεκιθοφόρα ιχθύδια.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Διαχείριση γεννητόρων

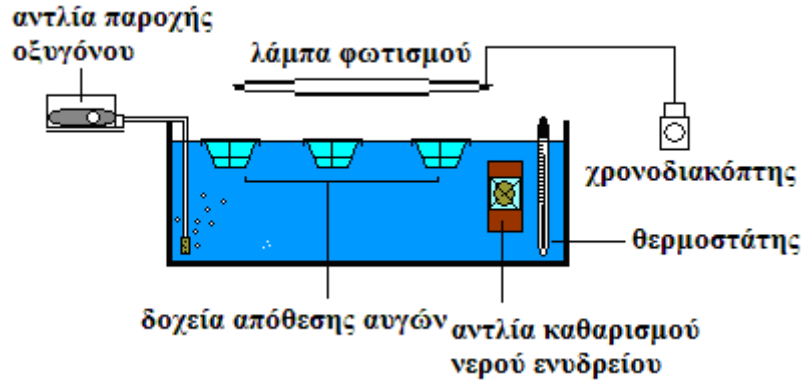
Οι γεννήτορες, διατηρήθηκαν σε δύο ενυδρεία χωρητικότητας 40 l, με πυκνότητα 2-4 άτομα/l και αναλογία φύλου ♀/♂ 2:1. Τα ενυδρεία διαχείρισης (εικόνα 1) υποστηρίζονταν με κλειστό σύστημα κυκλοφορίας και ανανέωσης νερού (μηχανικό και βιολογικό φίλτρο), όπου για κάθε ενυδρείο η ανανέωση του νερού ήταν ίση με 10-20 l/h. Ο κορεσμός του νερού σε οξυγόνο κυμαινόταν από 80 ως 95% με κατάλληλο σύστημα αερισμού (αντλίες παροχής οξυγόνου). Η συγκέντρωση των αμμωνιακών και των νιτρωδών ιόντων ήταν μικρότερη του 0,1mg/l. Το νερό των ενυδρείων προερχόταν από το αστικό δίκτυο. Πριν όμως την χρήση του, υφίστανται αποχλωρίωση για 3-4 ημέρες και ανάμειξη με απιονισμένο νερό σε αναλογία περίπου 3:1 ώστε να επιτευχθεί ολική σκληρότητα 24°dH. Το pH κυμαίνονταν $7,2 \pm 0,2$. Η θερμοκρασία ήταν 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Η φωτοπερίοδος ήταν 14h φως/10h σκοτάδι και επιτεύχθηκε με λάμπες UV (OSRAM L 15W/77) και χρονοδιακόπτη. Οι γεννήτορες σιτίζονταν 2 φορές την ημέρα με τεχνητή τροφή (ZM-400, Tetra Werke, Melle, Germany).

2. Προετοιμασία ωοτοκίας και διαχείριση αυγών

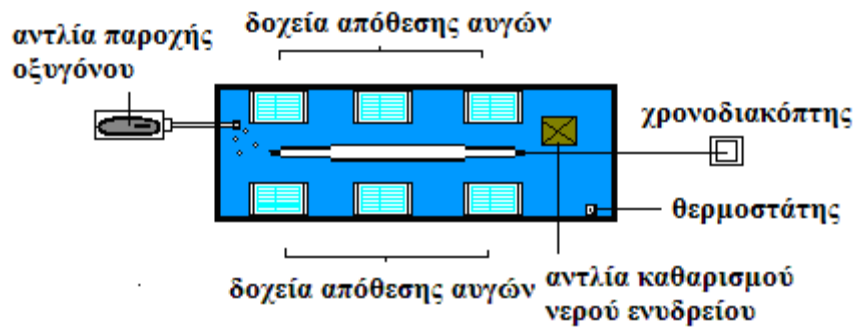
Πέντε έως δέκα θηλυκά και αρσενικά άτομα κρατούνταν χωριστά για 1-2 εβδομάδες (η γαστρική περιοχή των ♀ θα έχει διασταλεί λόγω των αυγών), πριν την ωοτοκία, μέσα σε ειδικά, πλαστικά δοχεία απόθεσης και συλλογής αυγών (εικόνα 2). Κάθε δοχείο απόθεσης αυγών διέθετε έναν ψευδοπυθμένα (σχάρα 3-4 mm) μέσα από τον οποίο περνούσαν τα αυγά και εναποθέτονταν στον πυθμένα του δοχείου χωρίς να κινδυνεύουν να φαγωθούν από τους γονείς τους.

Το βράδυ, που προηγούνταν του πρωινού της ωοτοκίας, οι δεξαμενές αφήνονταν κατά το δυνατό χωρίς οχλήσεις. Το πρωινό φως αποτελεί το έναυσμα στους γεννήτορες για ωοτοκία και γονιμοποίηση (μια περίπου ώρα μετά). Μετά από 30 min περίπου αφαιρούνταν τα ψάρια και συλλέγονταν τα αυγά. Κατόπιν, τα αυγά μεταφέρονταν σε πλαστικά δοχεία, πριν τον έλεγχο τοξικότητας, με γυάλινες πιπέτες (διαμέτρου > 4 mm) εφοδιασμένες με ελαστικές φούσκες αναρρόφησης. Μετά την καταμέτρησή τους,

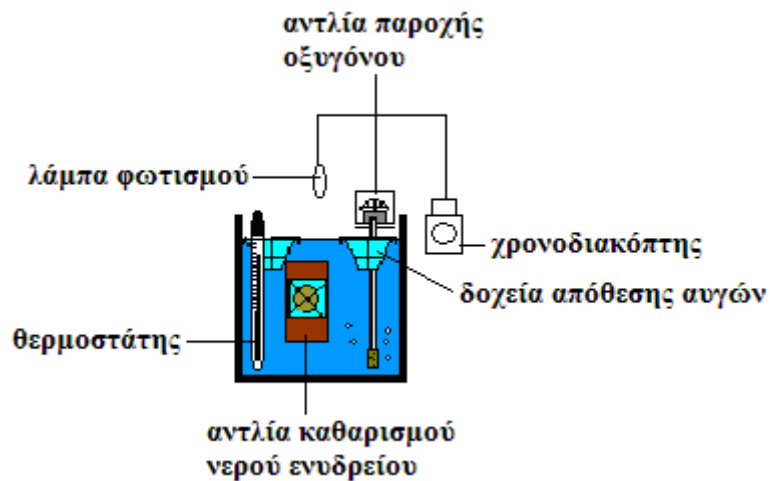
εμβαπτίζονταν για δύο λεπτά σε διάλυμα κυανού του μεθυλενίου (~0,5 ml/l) για να απαλλαγθούν από την ενδεχόμενη ύπαρξη μυκήτων ή και άλλων παρασίτων.



(α)

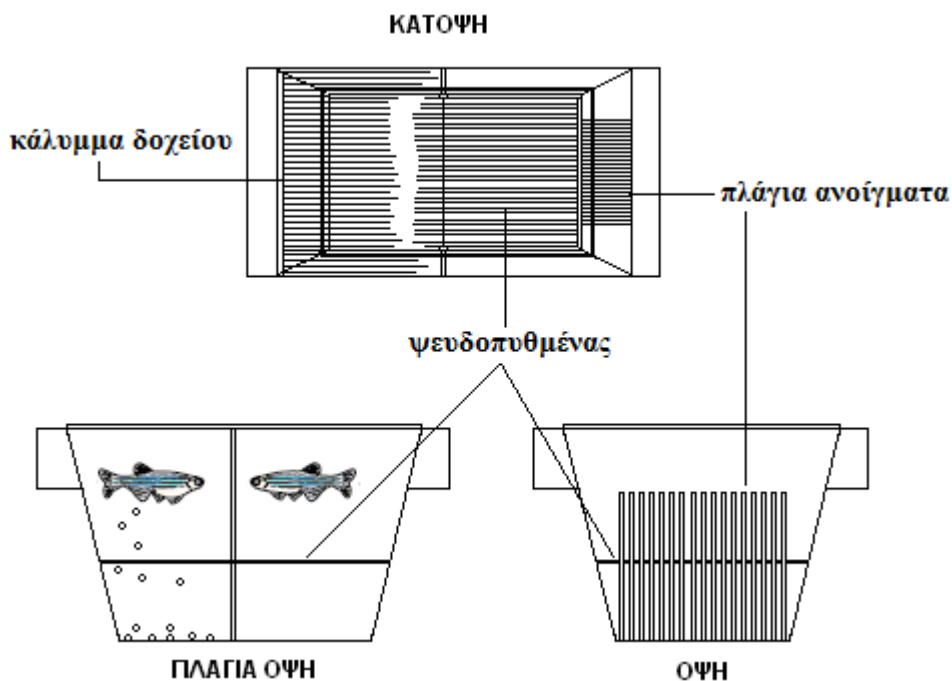


(β)



(γ)

Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση ενυδρείου με όλα τα συστήματα υποστήριξης του (αντλία καθαρισμού νερού, λάμπα φωτισμού, θερμοστάτης) σε (α) πλάγια όψη, (β) κάτοψη και (γ) όψη.



Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση δοχείου απόθεσης αυγών με τα επιμέρους τμήματά της (κάλυμμα, ψευδοπυθμένας).

3. Προετοιμασία διαλυμάτων Eu

Το άλας του Eu που επιλέχτηκε για την τοξικολογική μελέτη είναι το έξι ένυδρο άλας του χλωριούχου ευρωπαϊού (III), ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Europium III chloride hexahydrate), καθαρότητας 99.9%, σε μορφή λευκής, κρυσταλλικής σκόνης από την Aldrich Chem. Co. (εικόνα 3). Τα υδατικά διαλύματα του άλατος του Eu παρασκευάστηκαν με ανάδευση της ουσίας ελέγχου στο νερό αραιώσης (νερό δικτύου που είχε υποστεί μερική κατεργασία) με μηχανικό μέσο (μηχανική ανάδευση) για να επιτευχθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις.



Εικόνα 3. Κρυσταλλική σκόνη $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

4. Έλεγχος τοξικότητας

Η δοκιμασία τοξικότητας σε έμβρυα ψαριών γνωστή ως δοκιμασία FET (Fish Embryo Toxicity) εφαρμόζεται κυρίως σε ψάρια όπως το είδος *Danio rerio* (zebrafish) ή τον κυπρίνο *Pimephales promelas* (fathead minnow). Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των θανατηφόρων επιδράσεων χημικών ουσιών σε εμβρυικά στάδια

ανάπτυξης ψαριών και αποτελούν μια εναλλακτική δοκιμασία οξείας τοξικότητας έναντι των δοκιμασιών σε ψάρια.

4.1 Τύποι τοξικολογικού ελέγχου

Τα έμβρυα ψαριών *Danio rerio* εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του υπό εξέταση μετάλλου, αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και η δοκιμασία ολοκληρώθηκε μετά από 72h. Στη συνέχεια προσδιορίζονται η θνησιμότητα, το LD₅₀, ο εκτιμώμενος χρόνος εκκολαψιμότητας, οι σωματομετρικοί δείκτες, η καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία σε σχέση με τα δείγματα αναφοράς. Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δέκα διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου με 120 έμβρυα για κάθε έκθεση. Η δοκιμασία για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Έλαβαν χώρα δύο τύποι τοξικολογικών ελέγχων των εμβρύων *zebrafish* που βασίζονταν σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης και συγκεντρώσεις.

A' τύπος ελέγχου τοξικότητας. Περιλαμβάνει την βραχυπρόθεσμη δοκιμασία τοξικότητας των εμβρύων για τις πρώτες 72 h ώρες ανάπτυξης τους σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων Eu (0, 0,05, 0,5, 5, 50, 100, 200, 320, 400 και 500 ppm).

B' τύπος ελέγχου τοξικότητας. Περιλαμβάνει την βραχυπρόθεσμη δοκιμασία τοξικότητας των εμβρύων τις πρώτες 10 h ανάπτυξης τους (στάδιο καταβολής της ουράς) για τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu (200, 320, 400 και 500 ppm) και στην συνέχεια μεταφορά και τοποθέτηση των αυγών σε καθαρό νερό.

Κατά τον έλεγχο τοξικότητας 120 έμβρυα στο στάδιο των 4–8 βλαστομεριδίων, πριν την γαστριδίωση, μεταφέρθηκαν και εμβυθίστηκαν σε μια σειρά υδατικών διαλυμάτων Eu, διαφόρων συγκεντρώσεων, μέσα σε τρυβλία petri. Κατόπιν τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα στους 28°C ± 0,5°C. Καθ' όλη την διάρκεια της δοκιμής και καθημερινά λάμβανε χώρα η αντικατάσταση του 50% του διαλύματος δοκιμής με νέο και οξυγονωμένο καθώς και η καταγραφή των αριθμητικών δεδομένων θνησιμότητας καθώς απομακρύνονταν τα αγονιμοποίητα αυγά (λευκή, θαμπή όψη λόγω πήξης ή / και καταβύθισης των πρωτεϊνών τους) ή τα νεκρά έμβρυα (εικόνα 4). Τα νεκρά αυτά στοιχεία θα έπρεπε να απομακρύνονταν ώστε να μην χτυπηθούν ή να υποστούν φυσική ζημιά τα γειτονικά αυγά ή λάρβες (larvae) καθώς είναι εξαιρετικά ευαίσθητα και εύθραυστα. Επίσης θα αποτελούσαν και σημαντικές εστίες ανάπτυξης μικροβίων.



(α)



(β)

Εικόνα 4. Αγονιμοποιητό αυγό (α) 1,00 hpf και (β) 5,5 hpf .

4.2 Μέτρηση καρδιακών παλμών

Ο ρυθμός των καρδιακών παλμών (beats per minute, bpm) καταγράφηκε στις 48 h και 72 h ανάπτυξης του εμβρύου μετά την γονιμοποίηση. Κάθε έμβρυο τοποθετούνταν πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και εξετάζονταν στο μικροσκόπιο (Zeiss Axioscop 40) σε μεγέθυνση X 10. Η μεταφορά και η τοποθέτηση των εμβρύων / λαρβών στην πλάκα γίνονταν συνοπτικά και όσον το δυνατό με λιγότερο στρεσογόνες κινήσεις ώστε να μην αυξάνουν οι καρδιακοί παλμοί. Οι παλμοί καταγράφονταν από μια ψηφιακή κάμερα (SONY DSC-F828), που ήταν προσαρτημένη στο μικροσκόπιο και συνδέονταν με έναν υπολογιστή. Στον υπολογιστή έλαβε χώρα η καταμέτρηση και η αξιολόγηση των παλμών. Για κάθε έμβρυο οι μετρήσεις επαναλαμβάνονταν εις τριπλούν.

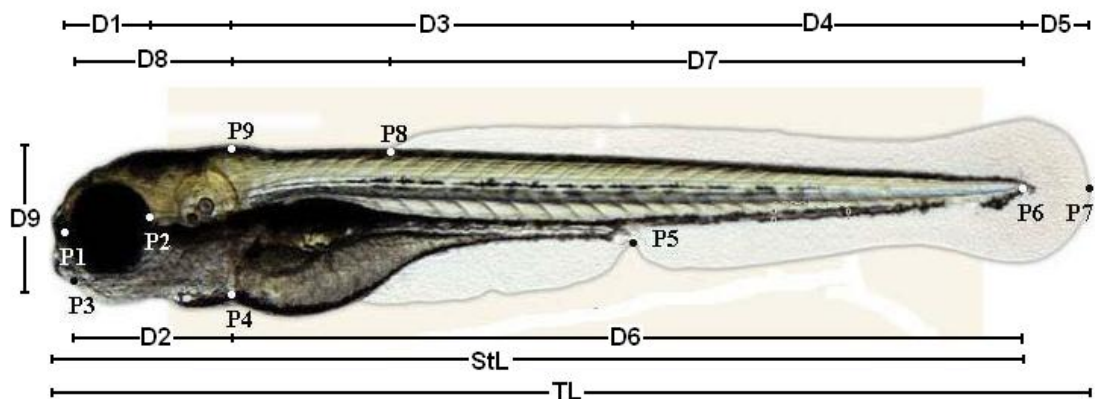
4.3 Μορφομετρική ανάλυση

Μετά την περάτωση της μέτρησης των καρδιακών παλμών οι λάρβες τοποθετούνταν σε διαβαθμισμένες πλάκες Neubauer σε πλάγια θέση ώστε να είναι διακριτή κατά την παρατήρηση και η συνολική εικόνα των υποδιαίρέσεων της πλάκας (εικόνα 5). Οι λάρβες φωτογραφίζονταν με ψηφιακή μηχανή (SONY DSC-F828) και με τα κατάλληλα λογισμικά προγράμματα επεξεργασίας εικόνων στο Photoshop 8.0 (Adobe Systems) και υπολογισμού των μορφομετρικών αποστάσεων και εμβαδών στο NIKON Digital Sight DS-L2 ακολούθησε η μορφομετρία των λαρβών.



Εικόνα 5. Φωτογραφία μικροσκοπικής παρατήρησης της λάρβας πάνω σε διαβαθμισμένη πλάκα Neubauer.

Για την ανάλυση επιλέχτηκαν 28 μορφομετρικές μεταβλητές (εικόνα 6): εννέα μορφομετρικά σημεία (landmarks, P) σε αντίστοιχες διακριτές ανατομικές περιοχές, εννέα διαφορετικοί συνδυασμοί μορφομετρικών σημείων, τις μορφομετρικές αποστάσεις (Distances), το σταθερό μήκος σώματος (Standard Length, StL), το ολικό μήκος (Total Length, TL) σώματος και οκτώ ανατομικά διαμερίσματα σώματος για την μέτρηση του εμβαδού τους για κάθε λάρβα (πίνακας 1).

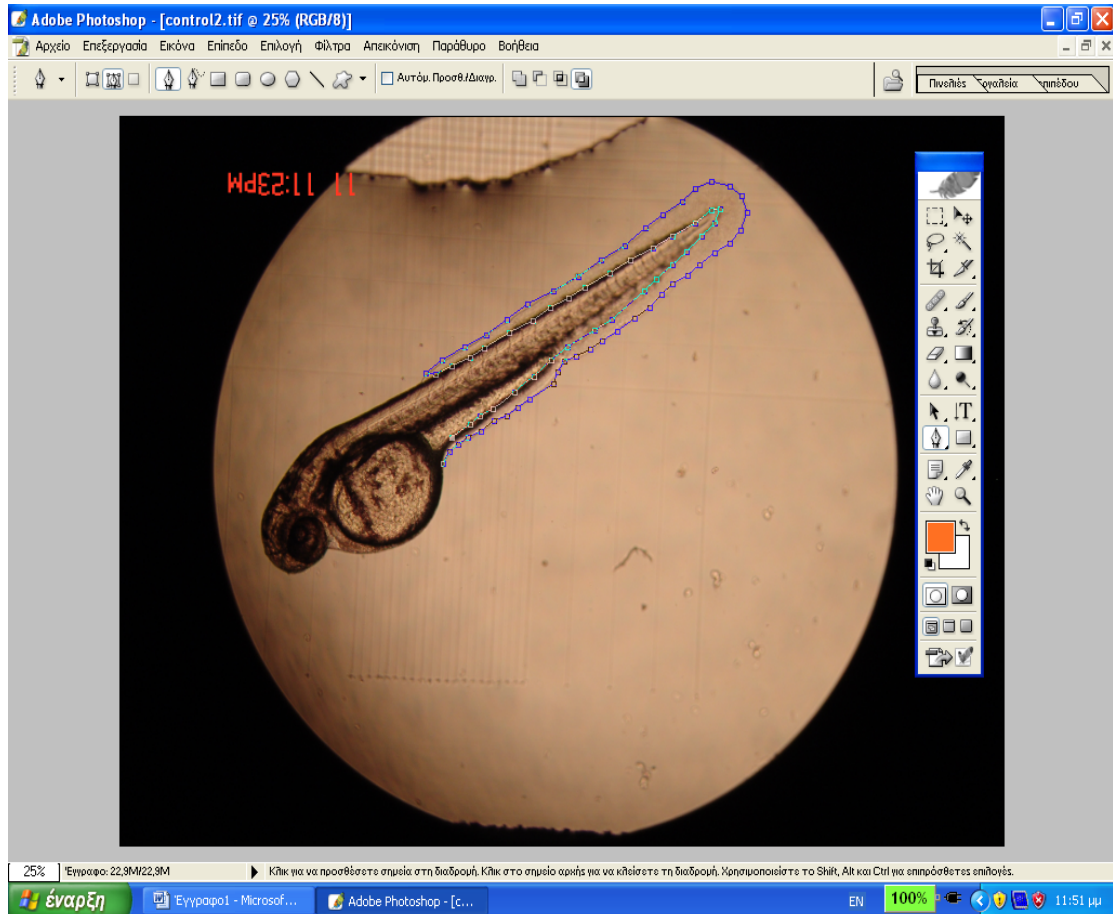


Εικόνα 6. Λάρβα με απεικόνιση των μορφομετρικών μεταβλητών που εκτιμήθηκαν.

Πίνακας 1. Πίνακας προσδιοριζόμενων μορφομετρικών μεταβλητών (μορφομετρικών σημείων, αντίστοιχων αποστάσεων και εμβαδών).

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ		
Μορφομετρικά σημεία	Συνδυασμοί μορφομετρικών σημείων (μορφομετρικές αποστάσεις)	Εμβαδά ανατομικών περιοχών σώματος
P1 και P2: αντιδιαμετρικά σημεία του ματιού ακριβώς απέναντι από την ρινική οπή	D1: P1 – P2 (μάτι)	Οφθαλμός
P3: άκρο ρύγχους	D2: P3 – P4	Λέκιθος
P4: οπίσθιο άκρο της περικαρδιακής κοιλότητας	D3: P4 – P5	Ραχιαίο -ουριαίο πτερύγιο (έως την ουρογενετική οπή)
P5: έδρα (ουρογεννητική οπή)	D4: P5 – P6	Κοιλιακό πτερύγιο (τμήμα πτερυγίου μεταξύ λεκιθικού σάκου και ουρογενετικής οπής)
P6: οπίσθιο άκρο νωτοχορδής	D5: P6 – P7	Νωτοχορδή
P7: οπίσθιο όριο σώματος	D6: P6 – P9	Ωτική κάψα
P8: πρόσθιο άκρο ραχιαίου πτερυγίου	D7: P6 – P8	Ωτόλιθος
P9: ανώτατο σημείο ραχιαία του ρομβοκεφάλου.	D8: P3 – P9	Σώμα (σώμα λάρβας χωρίς πτερύγια και λεκιθικό σάκο)
	D9: P4 – P9	
	St L	
	T L	

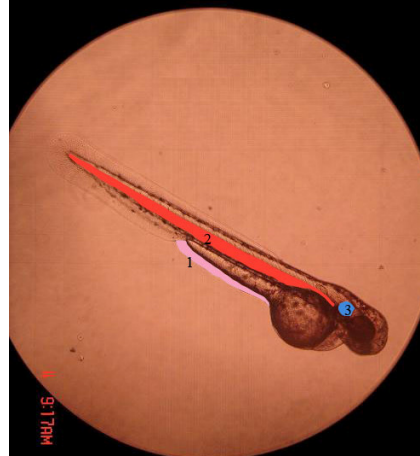
Πριν την διαδικασία εκτίμησης των εμβαδών κάθε ανατομικής περιοχής προηγήθηκε η αναγνώριση, ο καθορισμός και η προσεκτική οριοθέτηση κάθε σωματικής περιοχής σταδιακά για κάθε λάρβα μάρτυρα ή/και για εκείνες που είχαν εκτεθεί σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (εικόνες 7 και 8).



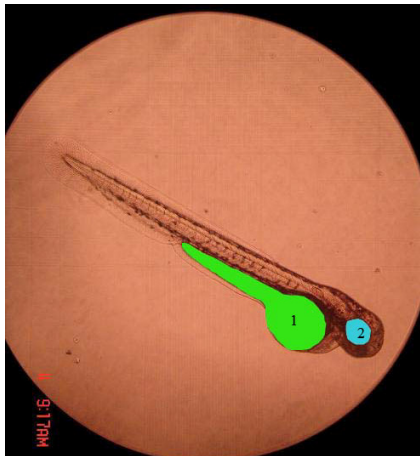
Εικόνα 7. Φωτογραφική απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε κατά την οριοθέτηση του μορφομετρικού εμβαδού του ραχιαίο-ουριαίου περυνγίου μιας λάρβας από το δείγμα ελέγχου. Στην φωτογραφία διακρίνονται οι υποδιαιρέσεις της πλάκας Neubauer με βάσει τις οποίες εκτιμήθηκαν οι μορφομετρικές αποστάσεις και τα εμβαδά κατά την μορφομετρία των λαρβών. Οι υπολογισμοί ολοκληρώθηκαν με κατάλληλα λογισμικά προγράμματα επεξεργασίας εικόνων στο Photoshop 8.0 (Adope Systems).



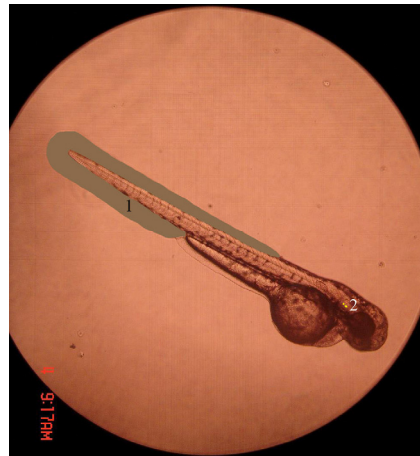
(α)



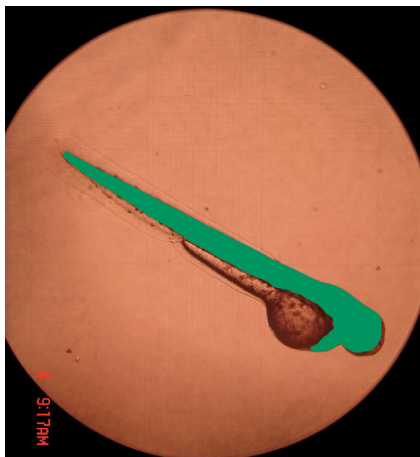
(β)



(γ)



(δ)



(ε)

Εικόνα 8. Φωτογραφίες λάρβας κατά τις οποίες εκτιμούνται τα εμβαδά κάθε ανατομικού διαμερίσματος του σώματός της. (α) η λάρβα χωρίς την οριοθέτηση των μορφομετρικών εμβαδών, (β) 1: κοιλιακό πτερύγιο, 2: νωτοχορδή, 3: ωτική κάψα, (γ) 1: λεκιθικός σάκος, 2: μάτι, (δ) 1: Ραχιαίο-ουριαίο πτερύγιο (έως την ουρογενετική οπή), 2: ωτόλιθοι, (ε) σώμα (σώμα λάρβας χωρίς πτερύγια και λεκιθικό σάκο).

4.4 Προσδιορισμός Eu στα βιολογικά δείγματα λαρβών

Για τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων του Eu στα δείγματα των λαρβών χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (AAS) Perkin – Elmer mod. με φούρνο γραφίτη 560 HGA-400 (εικόνα 8) με ιδανικό όριο ανίχνευσης της μεθόδου για το μέταλλο 3,1 μg/l.

Τα στάδια που έλαβαν χώρα κατά τον προσδιορισμό του μετάλλου ήταν τα εξής:

(α) Συλλογή και αποθήκευση του βιολογικού υλικού. Οι λάρβες αμέσως μετά την ολοκλήρωση των μετρήσεων των καρδιακών παλμών και των μορφομετρικών μεταβλητών τους ξεπλύθηκαν με δις απεσταγμένο νερό και στην συνέχεια καταψύχθηκαν στους -20°C όπου και διατηρήθηκαν έως την ανάλυση τους.

(β) Απόψυξη και ζύγιση των λαρβών. Η απόψυξη των λαρβών διήρκεσε μερικά λεπτά και κατόπιν το βάρος τους εκτιμήθηκε σε ζυγό ακριβείας (μοντέλο με ακρίβεια 4^{00} δεκαδικού).

(γ) Όξινη πέψη (χώνευση) των βιολογικών δειγμάτων. Η διαδικασία της όξινης πέψης περιλάμβανε την τοποθέτηση των δειγμάτων σε οβίδες Teflon – PFA και ακολούθως την προσθήκη 5 ml πυκνού διαλύματος HNO_3 (65% suprapure), 1 ml H_2O_2 και 4ml H_2O . Κατόπιν τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων $P=400\text{W}$ και θερμάνθηκαν για 20 min. Με την περάτωση του χρόνου θέρμανσης τα διαλύματα αραιώθηκαν με δις απεσταγμένο νερό σε σταθερό όγκο 10 ml. Ταυτόχρονα προετοιμάστηκαν τυφλά διαλύματα (blanks) ομοίως με την παραπάνω διαδικασία για την ελαχιστοποίηση των σταθερών (συστηματικών) σφαλμάτων της ανάλυσης (bias).

(δ) Μέτρηση της συγκέντρωσης του Eu στο βιολογικό δείγμα. Για την μέτρηση του Eu με φούρνο γραφίτη χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα αναφοράς συγκεντρώσεων 10, 20 και 50 μg/l τα οποία παρασκευάστηκαν με 0,2% HNO_3 κατόπιν διαδοχικών αραιώσεων από πυκνό πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1000 mg/l. Στην συνέχεια προέκυψε η καμπύλη βαθμονόμησης (αναφοράς) με τις απορροφήσεις των προτύπων υδατικών διαλυμάτων του μετάλλου συναρτήσει των συγκεντρώσεων τους με εξίσωση

$$A (\text{peak area}) = 0,0027 C(\mu\text{g/L}) + 0,0045.$$



Εικόνα 8. Φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (AAS) Perkin – Elmer mod. με φούρνο γραφίτη 560 HGA-400.

5. Στατιστική ανάλυση

Η θνησιμότητα των εμβρύων μετά από 48 hpf έκθεσης στο Eu αναλύθηκε με την μέθοδο της *probit* ανάλυσης (Finney, 1971). Η *probit* ανάλυση (ποσοστιαία στατιστική ανάλυση) είναι μια μαθηματική τεχνική ανάλυσης της δυωνιμικής απόκρισης μεταβλητών και χρησιμοποιείται στην τοξικολογία για τον προσδιορισμό της τοξικότητας χημικών ουσιών σε οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται με την καταγραφή της απόκρισης των οργανισμών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις έκθεσης σε κάποια χημική ουσία και στη συνέχεια στη συσχέτιση των συγκεντρώσεων αυτών με τις αποκρίσεις. Η απόκριση των βιολογικών οργανισμών είναι δυωνιμική (π.χ. θάνατος/ επιβίωση), με αποτέλεσμα η σχέση απόκρισης-συγκέντρωσης να είναι σιγμοειδής. Με την *probit* ανάλυση μετατρέπεται η σιγμοειδής καμπύλη σε ευθεία και στη συνέχεια μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση εκείνη της χημικής ουσίας που επιφέρει για παράδειγμα το θάνατο σε 50% του πληθυσμού των βιολογικών οργανισμών (LD_{50}). Η *probit* ανάλυση χρησιμοποιείται για να μετατρέψει τη σχέση της απόκρισης μιας εξαρτημένης μεταβλητής (Y) από μια ανεξάρτητη μεταβλητή (X) σε γραμμική.

$$Y = a + bX + e$$

όπου a: σταθερά, b: η κλίση της ευθείας, e: σφάλμα

Οι επιδράσεις του Eu στο ποσοστό της εκκόλαψης των αυγών του *zebrafish* αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Kaplan-Meier (Hosmer and Lemeshow, 1999). Στην ανάλυση περιλήφθηκαν μόνο οι επιτυχώς εκκολαπτόμενες λάρβες. Προσδιορίστηκαν η γενική στατιστική σημαντικότητα της παρουσίας του Eu (Mantel-Cox test) καθώς επίσης και οι διαφορές μεταξύ των καμπυλών εκκόλαψης (log-rank test) για κάθε συγκέντρωση και σε σύγκριση με την αντίστοιχη της ομάδας ελέγχου. Επίσης για κάθε συγκέντρωση υπολογίστηκε ο μέσος χρόνος εκκόλαψης μαζί με το διάστημα εμπιστοσύνης.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της τοξικής επίδρασης του μετάλλου στην ανάπτυξη των λαρβών αξιολογήθηκαν οι διαφορές των τιμών του σταθερού μήκους των εκκολαπτόμενων λαρβών (StL) με την μέθοδο της ανάλυσης της συνδιακύμανσης (analysis of covariance, ANCOVA) κατά την οποία λήφθηκαν ως σταθερός παράγοντας ο χρόνος έκθεσης των εμβρύων στο Eu (10 hpf και 72 hpf) και συμμεταβλητή (covariate) οι λογαριθμημένες συγκεντρώσεις του Eu σε ένα μέγεθος δείγματος σαράντα ατόμων (n=40) ανά συγκέντρωση. Οι σταθερές τιμές των μορφομετρικών μεταβλητών υποβλήθηκαν σε πολυμεταβλητή ανάλυση της συνδιακύμανσης (multivariate analysis of variance, MANOVA) καθώς επίσης και διακριτική ανάλυση (discriminant analysis) προκειμένου να εκτιμηθούν οι ενδεχόμενες μορφολογικές σωματικές διαφορές των λαρβών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων των συγκεντρώσεων του Eu.

Επίσης εκτιμήθηκαν τα διαστήματα εμπιστοσύνης για το ποσοστό των εμβρύων εκείνων που είχαν διαμορφώσει πλήρως καρδιά και γενικά το καρδιαγγειακό τους σύστημα στις 48 hpf χρησιμοποιώντας τη δυωνυμική δοκιμή (binomial test) (n=154-331 σύμφωνα με τις διάφορες συγκεντρώσεις του μετάλλου). Οι αλλαγές στους καρδιακούς παλμούς μετά την έκθεση υποβλήθηκαν σε ανάλυση με την μέθοδο της συνδιακύμανσης (analysis of covariance, ANCOVA, τύπος IV αθροίσματος των τετραγώνων) με τους χρόνους έκθεσης των 10 και των 72 hpf ως σταθεροί παράγοντες και την μετασχηματισμένη λογαριθμικά συγκέντρωση του ευρωπίου ως συμμεταβλητή (n=40).

Όλες οι αναλύσεις έγιναν μέσω του στατιστικού προγράμματος spss16.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ΗΠΑ).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία του Eu είχε σημαντικές επιπτώσεις σε όλες σχεδόν τις αναπτυξιακές παραμέτρους του *D. rerio* (θνησιμότητα, εκτιμώμενος χρόνος εκκολαψιμότητας, σωματομετρικοί δείκτες, καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία) και η συγκέντρωση του μετάλλου στις λάρβες.

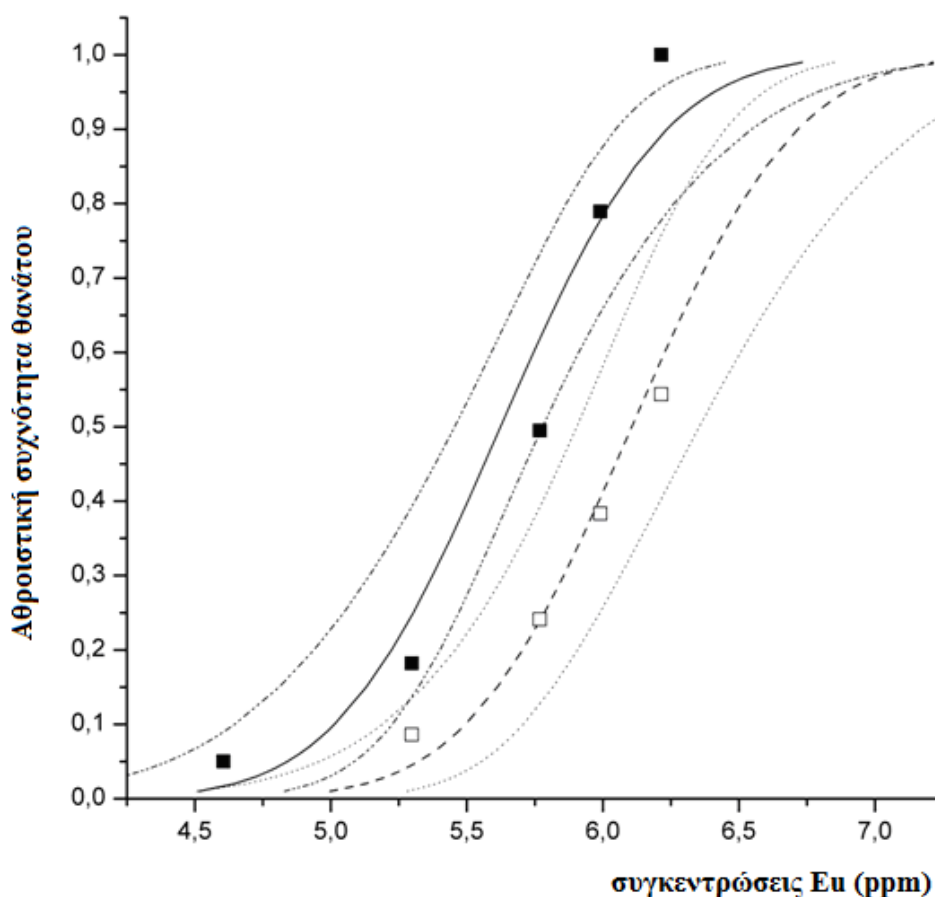
1. Θνησιμότητα εμβρύων και LD₅₀

Για 72 hpf συνεχούς έκθεσης των εμβρύων, σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις διαλυμάτων Eu (0, 0,05, 0,5, 5, 50, 100, 200, 320, 400 και 500 ppm), έδειξε ότι σε συγκεντρώσεις των 100 ppm και άνω αρχίζει να εμφανίζεται θνησιμότητα η οποία αυξάνονταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου. Η έκθεση των εμβρύων στα 500 ppm προκαλεί μια συνολική θνησιμότητα στον πληθυσμό των εμβρύων που φθάνει το 100%. Όμως συγκριτικά με τις εκθέσεις των εμβρύων στις πρώτες 10 hpf ανάπτυξης τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (200, 320, 400 και 500 ppm), η θνησιμότητα μειώνεται σημαντικά και κατά μέσο όρο 30,3% εφόσον ο τοξικός παράγοντας έχει απομακρυνθεί (πίνακας 1).

Πίνακας 1. Θνησιμότητες εμβρύων *D. rerio* μετά από 72 h και 10 h έκθεσης τους σε διάφορες συγκεντρώσεις Eu.

Συγκέντρωση Eu (ppm)	Θνησιμότητα	
	72 h έκθεσης	10 h έκθεσης
0	0/60	0/125
0,05	0/60	–
0,5	0/60	–
5	0/80	–
50	0/80	–
100	10/200 (5,0%)	–
200	36/198 (18,2%)	11/128 (8,6%)
320	99/200 (49,5%)	27/112 (24,1%)
400	150/190 (78,9%)	46/120 (38,3%)
500	200/200 (100%)	56/103 (54,4%)

Η μέση θανατηφόρα δόση του μετάλλου (lethal dose 50%, LD₅₀) με την χρήση της *probit* ανάλυσης υπολογίστηκε ότι είναι ισοδύναμο με 277,1 ppm με 95% όρια εμπιστοσύνης και μεταξύ των τιμών 233,9 – 323,0 ppm. Η θνησιμότητα όμως των εμβρύων μειώθηκε στατιστικά σημαντικά, όταν εκτέθηκαν μόνο στις πρώτες 10 hpf στο Eu και τοποθετήθηκαν αμέσως μετά σε καθαρό νερό, όπου το LD₅₀ αυξήθηκε στα 448,6 ppm με 95% όρια εμπιστοσύνης και μεταξύ των τιμών 366,4 – 574,9 ppm (διάγραμμα 1). Επίσης η αναλογία LD₅₀(72 hpf) / LD₅₀(10 hpf) έδειξε να είναι ισοδύναμη με 0,618 με 95% όρια εμπιστοσύνης και μεταξύ των τιμών 0,397 – 0,821 ppm. Η τιμή του αποτελέσματος είναι στατιστικά σημαντική και διαφορετική της μονάδας γεγονός που σημαίνει ότι απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις του μετάλλου για να εμφανιστούν μεγαλύτερες τιμές θνησιμότητας κατά την διάρκεια της 10ωρης έκθεσης των εμβρύων.



Διάγραμμα 1. Καμπύλες θνησιμότητας με λογαριθμισμένες (\ln) συγκεντρώσεις του Eu όπως προκύπτουν με την *probit analysis* (όρια εμπιστοσύνης 95%) και τις παρατηρηθείσες συχνότητες θανάτου (τετράγωνα). Οι 72 hpf έκθεσης παρουσιάζονται με συνεχή γραμμή και μαύρα τετράγωνα ενώ οι 10 hpf έκθεσης παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές και λευκά τετράγωνα

2. Εκτιμώμενος χρόνος εκκολαψιμότητας

Με βάση την σημαντικότητα της θνησιμότητας των εμβρύων που εμφανίστηκε σε συγκεντρώσεις των 100 ppm Eu και άνω, το ποσοστό εκκολαψιμότητας αναλύθηκε μόνο με ζωντανά και επιτυχώς εκκολάσιμα έμβρυα. Στην συνεχή έκθεση των 72 hpf στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μετάλλου που χρησιμοποιήθηκαν ο χρόνος εκκόλαψης επεκτάθηκε στις 53 – 57 hpf σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, δηλαδή περίπου δύο εικοσιτετράωρα περισσότερα (≈ 42 hpf) ενώ στην 10 hpf έκθεση των εμβρύων στο μέταλλο, που οι συγκεντρώσεις ήταν ακόμη μεγαλύτερες, ο χρόνος εκκόλαψης αυξάνει ακόμη περισσότερο (98 – 116 hpf) (πίνακας 2, 3). Και στις δύο περιπτώσεις των εκθέσεων των 10 και 72 hpf, ο μέσος χρόνος εκκολαψιμότητας αυξήθηκε περίπου πάνω από 83 hpf, όπου και μετά παρατηρήθηκε εκτενής εμβρυϊκή θνησιμότητα. Έτσι λοιπόν η συνεχής έκθεση των εμβρύων στο Eu αύξησε στατιστικά σημαντικά το μέσο χρόνο εκκολαψιμότητας (median hatching time) (διάγραμμα 2) όπως επίσης και την διάρκεια του συνολικού χρόνου εκκόλαψης (overall duration of hatching) (Mantel-Cox, $p < 0,001$) όπου η συνεχής έκθεση στις 72 hpf έδειξε μεγαλύτερη καθυστέρηση εκκόλαψης.

Πίνακας 2. Εκκολαψιμότητες εμβρύων *D. rerio* (ανά 1 h) μετά από 72 h συνεχούς έκθεσης τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu.

hpf	Συγκεντρώσεις Eu (ppm)							
	control	0,05	0,5	5	50	100	200	320
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0

Πίνακας 2 (συνέχεια). Εκκολασιμότητες εμβρύων *D. rerio* (ανά 1 h) μετά από 72 h συνεχούς έκθεσης τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu.

hpf	Συγκεντρώσεις Eu (ppm)							
	control	0,05	0,5	5	50	100	200	320
21	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0	0	0	0
52	2	2	0	0	0	0	0	0
53	3	2	0	0	0	0	0	0
54	2	2	2	0	0	0	0	0
55	4	3	2	0	0	0	0	0
56	19	3	3	0	0	0	0	0
57	3	16	1	1	0	0	0	0
58	2	2	2	3	0	0	0	0
59	7	6	3	2	2	0	0	0
60	9	8	2	1	1	0	0	0
61	2	2	2	2	2	1	1	0
62	1	2	3	2	2	1	1	0
63	2	2	9	8	2	1	2	1
64	1	1	2	2	1	2	1	1
65	1	2	3	1	1	1	1	1

Πίνακας 2 (συνέχεια). Εκκολαυσιμότητες εμβρύων *D. rerio* (ανά 1 h) μετά από 72 h συνεχούς έκθεσης τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu.

hpf	Συγκεντρώσεις Eu (ppm)							
	control	0,05	0,5	5	50	100	200	320
66		2	2	1	5	1	1	2
67		1	1	3	1	1	1	1
68			1	2	2	2	1	1
69			2	2	1	5	2	1
70			3	1	2	2	4	4
71			1	3	2	2	2	1
72			2	2	1	1	1	1
73			2	1	1	1	1	1
74			3	2	2	1	1	1
75			2	1	2	0	1	1
76			1	2	1	0	0	2
77			2	3	0	2	0	1
78			1	1	3	2	2	1
79			1	1	1	1	1	1
80				2	1	1	2	1
81				3	2	1	2	2
82				1	2	2	1	1
83				1	2	2	1	1
84				2	1	1	1	1
85				2	2	1	1	1
86					1	2	1	1
87					1	2	2	1
88					3	0	2	1
89					2	1	1	1
90					1	1	1	2
91					2	1	1	1
92					1	1	1	1
93					1	2	2	1
94					1	1	1	1
95						1	1	2
96						1	2	2
97						1	2	1
98						2	2	1
99						2	2	1
100						1	1	1
101						1	1	2
102						1	1	1
103						1	1	1
104							1	1
105								1
106								1
107								2
108								1

Πίνακας 3. Εκκολαπιμότητες εμβρύων *D. rerio* (ανά 1 h) μετά από τις πρώτες 10 h έκθεσης τους σε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu.

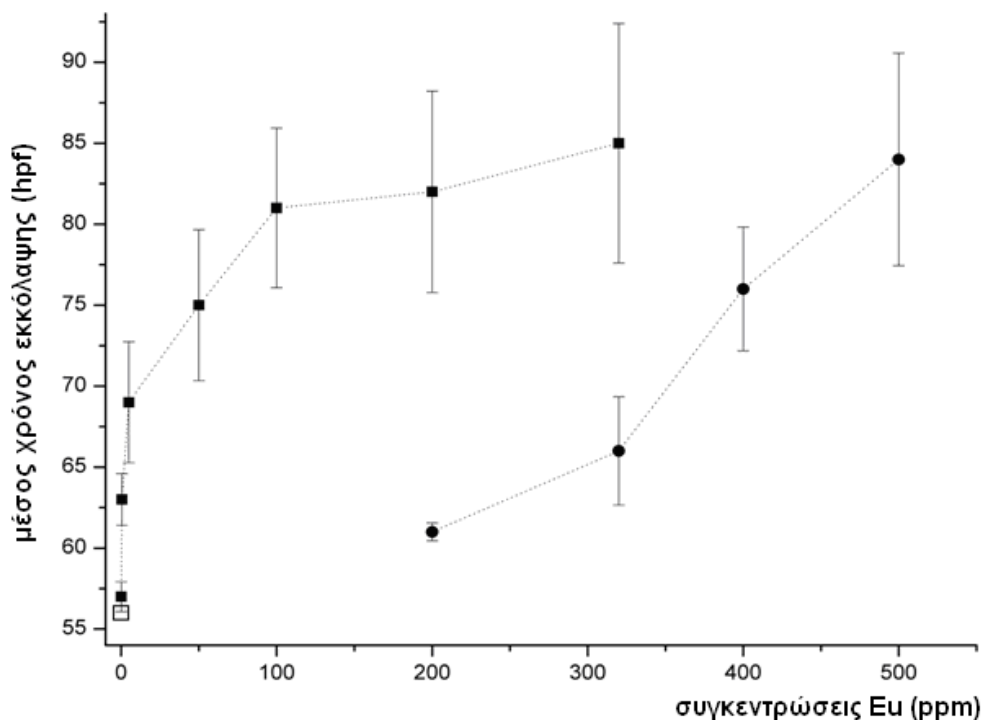
hpf	Συγκεντρώσεις Eu				
	control	200ppm	320ppm	400ppm	500ppm
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0

Πίνακας 3 (συνέχεια). Εκκολαπιμότητες εμβρύων *D. rerio* (ανά 1 h) μετά από τις πρώτες 10 h έκθεσης τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu.

hpf	Συγκεντρώσεις Eu				
	control	200ppm	320ppm	400ppm	500ppm
41	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
51	3	0	0	0	0
52	3	1	0	0	0
53	4	3	0	0	0
54	6	1	0	0	0
55	18	2	0	0	0
56	8	0	0	0	0
57	3	3	2	0	0
58	2	3	2	0	0
59	3	2	1	0	0
60	2	6	1	0	0
61	3	14	2	1	0
62	2	4	1	3	0
63	3	1	1	2	0
64		2	4	1	0
65		1	11	0	0
66		0	5	2	0
67		1	1	1	1
68		2	1	2	2
69		1	2	8	1
70		1	0	3	1
71		2	1	1	2
72		1	2	0	1
73		1	2	2	1
74		2	1	1	2
75		0	2	3	3
76		2	1	2	6
77		1	2	1	3
78		1	1	2	1
79		2	1	1	1
80		1	2	2	1

Πίνακας 3 (συνέχεια). Εκκολαψιμότητες εμβρύων *D. rerio* (ανά 1 h) μετά από τις πρώτες 10 h έκθεσης τους σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu.

hpf	Συγκεντρώσεις Eu				
	control	200ppm	320ppm	400ppm	500ppm
81		0	1	1	1
82		1	2	1	2
83			1	0	1
84			0	1	1
85			1	1	0
86			2	2	1
87			1	3	2
88			1	1	1
89			1	1	2
90				2	1
91				2	2
92				1	1
93				1	2
94				1	2
95				2	1
96				1	2
97				1	2
98				1	0
99					1
100					1
101					2
102					1
103					1
104					2
105					2
106					1



Διάγραμμα 2. Καμπύλες μέσου χρόνου εκκόλαψης (ώρες μετά την γονιμοποίηση, hpf) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του Eu με τα μέσα χρονικά σημεία (όρια εμπιστοσύνης 95%). Οι 72 hpf έκθεσης παρουσιάζονται με μαύρα τετράγωνα ενώ οι 10 hpf έκθεσης παρουσιάζονται με μαύρους κύκλους.

3. Επίδραση του Eu στην σωματική διαμόρφωση και διαφοροποίηση των εμβρύων *D. rerio*

Δυσμορφίες σώματος, ματιού και λεκιθικού σάκου δεν παρατηρήθηκαν στα νεκρά ή τα ζωντανά έμβρυα, εκτός από απλασία (aplasia) των καρδιών στα πιο πολλά νεκρά έμβρυα. Πιο συγκεκριμένα η στατιστική μελέτη των μέσων τιμών των σωματομετρικών δεικτών έδειξε μια ισομετρική επιβράνδυση της ανάπτυξης των λαρβών, για όλες τις μορφομετρικές μεταβλητές, η οποία ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του μετάλλου. Η μείωση των τιμών των μορφομετρικών μεταβλητών, για το σύνολο των υπό μελέτη συγκεντρώσεων του Eu, κυμάνθηκε μεταξύ 0,03 – 0,34% (πίνακες 4 και 5, πίνακες παραρτήματος Π1 – Π10).

Πίνακας 4. Οι μέσες τιμές μορφομετρικών αποστάσεων του σώματος (D1-D9) (mm) των εμβρύων *D. rerio* που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (ppm) του Eu για 72 h έκθεσης. (ορισμούς TL, StL, D1-D9, βλέπε πιν.1)

	TL	StL	D1 (MATI)	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
control	3,285	3,147	0,2569	0,3244	1,6513	1,2185	0,0976	2,6922	1,6806	0,7251	0,5307
5	3,284	3,146	0,2568	0,3242	1,6508	1,2180	0,0975	2,6913	1,6800	0,7249	0,5305
50	3,283	3,145	0,2568	0,3242	1,6505	1,2178	0,0975	2,6907	1,6796	0,7247	0,5304
100	3,280	3,143	0,2566	0,3240	1,6493	1,2169	0,0974	2,6888	1,6785	0,7242	0,5300
320	3,276	3,139	0,2563	0,3235	1,6472	1,2153	0,0973	2,6853	1,6763	0,7233	0,5293

Πίνακας 5. Οι μέσες τιμές εμβαδών ανατομικών περιοχών σώματος (mm²) των εμβρύων *D. rerio* που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (ppm) του Eu για 72 h έκθεσης.

	MATI	ΛΕΚΙΘΟΣ	P-ΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΝΩΤΟΧΟΡΑΗ	ΩΤΙΚΗ ΚΑΨΑ	ΩΤΟΛΙΘΟΣ	ΣΩΜΑ
control	0,04327	0,3544	0,2668	0,0255	0,1336	0,0110	0,00004108	0,7445
5	0,04326	0,3542	0,2667	0,0255	0,1336	0,0110	0,00004107	0,7443
50	0,04325	0,3542	0,2666	0,0255	0,1336	0,0110	0,00004106	0,7442
100	0,04322	0,3539	0,2664	0,0255	0,1335	0,0110	0,00004103	0,7436
320	0,04316	0,3535	0,2661	0,0254	0,1333	0,0109	0,00004097	0,7425

Με βάση τον πίνακα των αποτελεσμάτων της ανάλυσης της διακύμανσης ως προς τις μορφομετρικές μεταβλητές (πίνακας 6), οι αναλύσεις έδειξαν ότι οι τιμές των σωματικών μεταβλητών της ομάδας ελέγχου δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές με τις αντίστοιχες ακόμη και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του μετάλλου ($p > 0,005$, MANOVA). Η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε είναι ο τύπος III για το άθροισμα των τετραγώνων ενός όρου (Type III Sum of Squares), η οποία ακολούθησε την λογική της ανάλυσης της παλινδρόμησης, δηλαδή κάθε άθροισμα τετραγώνων που υπολογίζεται, διορθώνεται ως προς όλα τα υπόλοιπα αθροίσματα. Η πολύ μικρή διάκριση (32% των περιπτώσεων) επιτεύχθηκε επίσης με τη βοήθεια της διακρίνουσας ανάλυσης (discriminant analysis). Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, εξήχθη το συμπέρασμα ότι η έκθεση των εκκολαπτόμενων λαρβών στο Eu δεν έχει καμία τερατογενετική επίδραση έτσι ώστε να δικαιολογείται η άποψη ότι το μέταλλο δεν ασκεί καμία σημαντική αλλαγή στην σωματική διαμόρφωση και διαφοροποίηση των λαρβών με βάση την ανάλυση των μορφομετρικών μεταβλητών.

Πίνακας 6. Ανάλυση διακύμανσης των μορφομετρικών μεταβλητών των εμβρύων *D. rerio* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του Eu για 72 h έκθεσης. Στην πρώτη στήλη του πίνακα Source, εμφανίζεται η επίδραση της συγκέντρωσης (concentration) του μετάλλου ενώ στην δεύτερη οι μορφομετρικές μεταβλητές που αποτελούν τις εξαρτώμενες μεταβλητές (Dependent Variable) της ανάλυσης. Στην τρίτη στήλη του πίνακα εμφανίζονται τα αθροίσματα των τετραγώνων (Type III Sum of Squares) των επιδράσεων. Οι βαθμοί ελευθερίας (df) για κάθε ένα από τα αθροίσματα τετραγώνων εμφανίζονται στην τέταρτη στήλη. Στην πέμπτη στήλη Mean Square, δίνεται το μέσο τετράγωνο της επίδρασης του Eu για κάθε μορφομετρική μεταβλητή, υπολογιζόμενο ως προς το πηλίκο του αθροίσματος των τετραγώνων της επίδρασης προς τους αντίστοιχους βαθμούς ελευθερίας. Στις δύο τελευταίες στήλες εμφανίζονται οι τιμές του κριτηρίου *F* για τον έλεγχο των επιδράσεων και οι αντίστοιχες πιθανότητες (Sig., *p*).

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	<i>F</i>	Sig.(<i>p</i>)
concentrations	D1	1,999E-8	4	4,998E-9	1,716	0,148
Eu (0, 5, 50,	D2	9,299E-8	4	2,325E-8	2,983	0,082
100, 320 ppm)	D3	4,396E-7	4	1,099E-7	1,682	0,156
	D4	5,786E-7	4	1,446E-7	2,083	0,084
	D5	2,156E-9	4	5,389E-10	1,187	0,318
	D6	1,175E-6	4	2,938E-7	1,480	0,210
	D7	6,389E-7	4	1,597E-7	0,617	0,651
	D8	1,310E-7	4	3,274E-8	2,011	0,094
	D9	7,440E-8	4	1,860E-8	1,395	0,237
	MATI	1,842E-9	4	4,604E-10	0,512	0,727
	ΛΕΚΙΘΟΣ	1,071E-8	4	2,678E-9	0,451	0,771
	P-OY	7,633E-9	4	1,908E-9	0,425	0,791
	ΠΤΕΡΥΓΙΟ					
	ΚΟΙΛΙΑΚΟ	1,047E-9	4	2,617E-10	0,225	0,924
	ΠΤΕΡΥΓΙΟ					
	ΝΩΤΟΧΟΡΔΗ	3,727E-8	4	9,318E-9	1,345	0,255
	ΩΤΙΚΗ ΚΑΨΑ	1,372E-8	4	3,429E-9	0,140	0,967
	ΩΤΟΛΙΘΟΣ	0,000	4	0,000	0,000	1,000
	ΣΩΜΑ	4,772E-7	4	1,193E-7	0,494	0,740

Το σταθερό μήκος (StL, Standard Length) των εκκολαπτόμενων λαρβών έδειξε ότι επηρεάστηκε στατιστικά σε σημαντικό βαθμό σε υψηλές συγκεντρώσεις Eu ($p < 0,001$). Μετά από 72 hpf συνεχούς έκθεσης των εμβρύων παρατηρήθηκε μια μικρή αλλά και στατιστικά σημαντική μείωση της μέσης τιμής του StL στα 100 ppm Eu ($p < 0,01$) σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου και η μείωση αυτή έγινε περισσότερο έντονη σε συγκεντρώσεις των 320 ppm ($p < 0,001$). Σε αυτή την συγκέντρωση δεν ήταν δυνατό να υπολογιστούν οι διαφορές του StL λόγω της εκτενούς θνησιμότητας των εμβρύων. Μια ανάλογη μείωση του StL παρατηρήθηκε επίσης και μετά από έκθεση των εμβρύων στο Eu στις πρώτες 10 hpf ανάπτυξης τους (πίνακας 7).

Πίνακας 7. Τιμές του σταθερού μήκους (StL, Standard Length) των εμβρύων *D. rerio* του control και αυτών που έχουν εκτεθεί για 10 h σε 200, 320, 400 και 500 ppm Eu.

aa	control	200 ppm	320 ppm	400 ppm	500 ppm
1	3,148	3,15	3,134	3,141	3,133
2	3,134	3,139	3,15	3,134	3,136
3	3,136	3,15	3,15	3,146	3,135
4	3,132	3,149	3,146	3,146	3,136
5	3,133	3,15	3,146	3,146	3,139
6	3,155	3,15	3,134	3,135	3,139
7	3,158	3,15	3,148	3,135	3,135
8	3,148	3,15	3,134	3,147	3,134
9	3,146	3,149	3,148	3,133	3,135
10	3,148	3,149	3,148	3,136	3,134
11	3,148	3,148	3,147	3,141	3,134
12	3,194	3,139	3,148	3,141	3,134
13	3,139	3,15	3,147	3,141	3,134
14	3,135	3,139	3,148	3,134	3,135
15	3,147	3,146	3,146	3,146	3,139
16	3,146	3,149	3,146	3,146	3,135
17	3,146	3,134	3,146	3,139	3,141
18	3,15	3,139	3,135	3,139	3,146
19	3,149	3,15	3,146	3,136	3,135
20	3,146	3,15	3,134	3,141	3,146
21	3,148	3,15	3,139	3,133	3,133
22	3,139	3,136	3,136	3,136	3,133
23	3,194	3,135	3,141	3,135	3,135
24	3,139	3,136	3,141	3,136	3,141
25	3,194	3,146	3,146	3,139	3,146
26	3,139	3,139	3,134	3,141	3,141
27	3,135	3,134	3,139	3,139	3,135
28	3,136	3,136	3,149	3,141	3,141
29	3,147	3,15	3,149	3,141	3,141
30	3,146	3,149	3,134	3,141	3,135
31	3,147	3,141	3,134	3,135	3,135
32	3,146	3,15	3,141	3,141	3,135
33	3,146	3,149	3,141	3,141	3,135
34	3,15	3,147	3,141	3,135	3,135
35	3,149	3,15	3,134	3,141	3,135
36	3,141	3,149	3,149	3,135	3,141
37	3,15	3,15	3,134	3,141	3,135
38	3,15	3,15	3,141	3,141	3,141
39	3,148	3,141	3,141	3,134	3,141
40	3,154	3,15	3,134	3,133	3,135

Επιπλέον, υπήρξε μια στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του παράγοντα έκθεσης και της συγκέντρωσης του Eu ως συμεταβλητής ($p < 0,001$), δείχνοντας ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις έκθεσης του μετάλλου είτε στις πρώτες 10 hpf είτε στις 72 hpf, μπορούν να προκαλέσουν παρόμοιες αρνητικές επιδράσεις στην αναπτυξιακή φυσιολογία των εμβρύων.

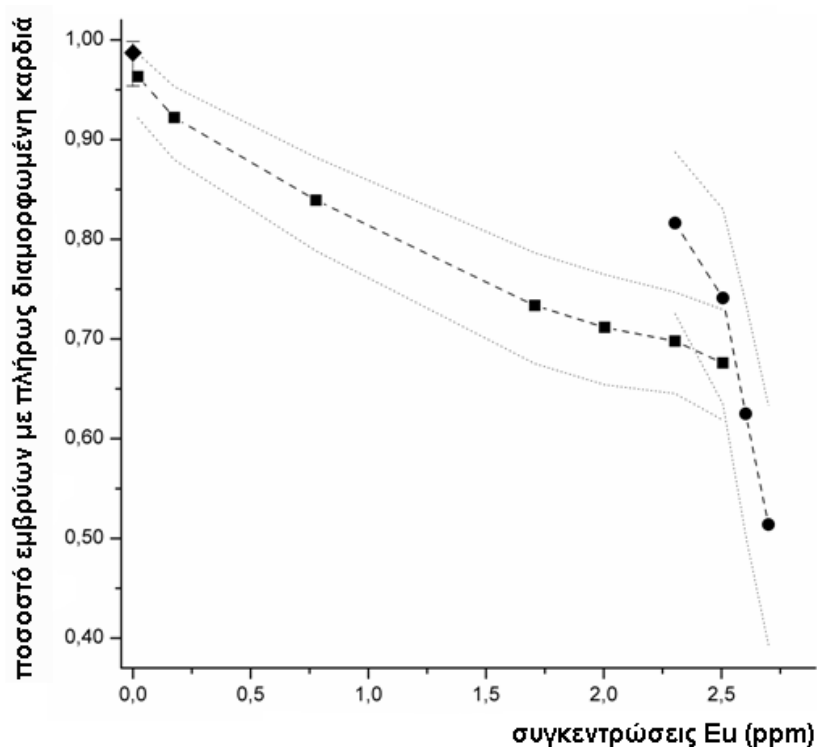
4. Επίδραση του Eu στην ανάπτυξη και στη λειτουργία της εμβρυικής καρδιάς του *D. rerio*

Η επίδραση του μετάλλου στην ανάπτυξη και στη λειτουργία της εμβρυικής καρδιάς με βάση τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι ήταν στατιστικά σημαντική (πίνακας 8). Κατά την βραχυπρόθεσμη έκθεση των λαρβών στο Eu τα αποτελέσματα που έλαβαν χώρα δείχνουν ότι η καθυστέρηση της ανάπτυξης του μυός της καρδιάς είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του μετάλλου και είναι στατιστικά σημαντική (διωνυμική δοκιμή, $p < 0,001$). Στη συγκέντρωση των 320 ppm του μετάλλου, το ποσοστό των κανονικών εμβρύων δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της έκθεσης των 10 και 72 hpf. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, τα περισσότερα έμβρυα ήταν νεκρά μετά από συνεχή έκθεση, ενώ για την 10 hpf έκθεση το ποσοστό των εμβρύων με κανονικά αναπτυγμένη καρδιά στις 48 hpf συνέχιζε να μειώνεται (διάγραμμα 3). Ο θάνατος των εμβρύων συνοδεύθηκε από την πλήρη απλασία των καρδιών στις περισσότερες των περιπτώσεων.

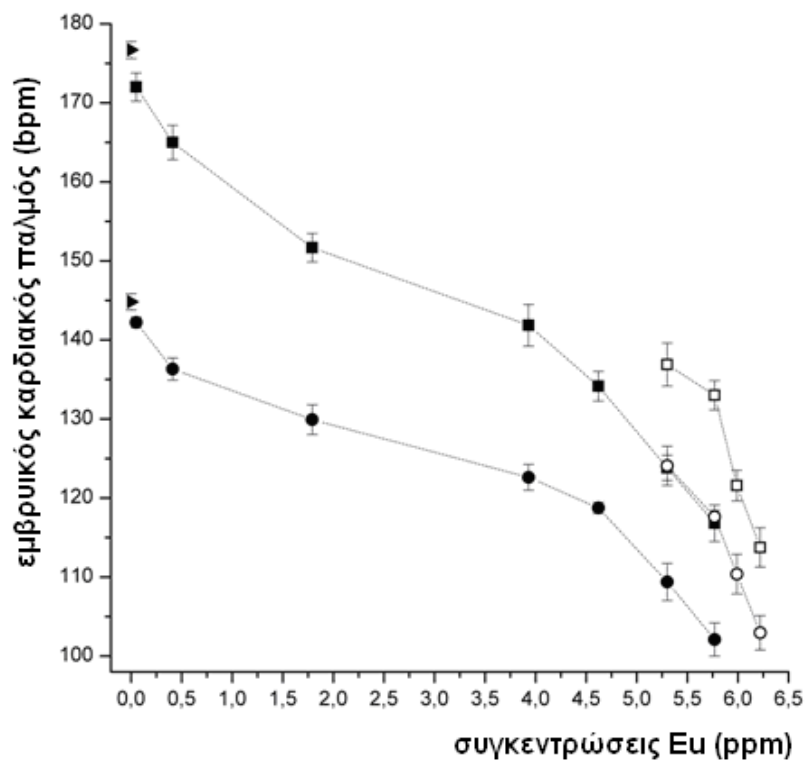
Επιπροσθέτως, ακόμη και τα έμβρυα που εμφάνισαν πλήρως διαμορφωμένη καρδιά, ο καρδιακός παλμός τους επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από την παρουσία του μετάλλου (πίνακες παραρτήματος Π11 – Π14). Το διάγραμμα 4 δείχνει ότι οι μέσες τιμές των καρδιακών παλμών ανά λεπτό (beats per minute, bpm) και με 95% όρια εμπιστοσύνης, μειώνονται σημαντικά για διαφορετικές συγκεντρώσεις του μετάλλου και για διαφορετικούς χρόνους έκθεσης. Η επίδραση του μετάλλου στους καρδιακούς παλμούς ήταν πιο σαφής όταν οι τιμές των συγκεντρώσεων του Eu μετασχηματίστηκαν σε λογαριθμική κλίμακα νεπέριου λογάριθμου όπου έδειξαν μια ισχυρή απόκλιση μεταξύ των τιμών (covariate) ($p < 0,001$, partial $\text{Eta}^2 = 0,440$), λόγω μιας σημαντικής μείωσης των καρδιακών παλμών που είναι εξαρτημένη χρονικά με το ποσοστό των αναπτυσσόμενων καρδιών. Η μείωση των καρδιακών παλμών εξαρτήθηκε επίσης και από το χρόνο έκθεσης στο μέταλλο ($p < 0,001$, partial $\text{Eta}^2 = 0,225$) καθώς επίσης και από το χρονικό σημείο της μέτρησης ($p < 0,001$, partial $\text{Eta}^2 = 0,044$).

Πίνακας 8. Ποσοστό των εμβρύων (%) *D. rerio* που δεν έχουν διαμορφώσει καρδιά στις 48 hpf μετά από 72 h και 10 h έκθεσης τους σε διάφορες συγκεντρώσεις Eu.

Ποσοστό των εμβρύων (%) <i>D. rerio</i> που δεν έχουν διαμορφώσει πλήρως καρδιά στις 48 hpf		
Συγκέντρωση Eu (ppm)	72 h έκθεσης	10 h έκθεσης
0	2/154 (1%)	1/125 (1%)
0,05	6/163 (4%)	–
0,5	18/231 (8%)	–
5	41/255 (16%)	–
50	69/259 (27%)	–
100	79/274 (29%)	–
200	100/331 (30%)	18/98 (18%)
320	94/290 (32%)	22/85 (26%)
400	–	27/72 (37%)
500	–	35/72 (49%)



Διάγραμμα 3. Καμπύλες εμφάνισης του ποσοστού των εμβρύων με πλήρως διαμορφωμένη καρδιά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του Eu (ppm) και χρόνους έκθεσης (hpf) όπως προκύπτουν με την probit analysis (όρια εμπιστοσύνης 95%). Οι συγκεντρώσεις του Eu είναι σε λογαριθμική κλίμακα του 10. Οι 72 hpf έκθεσης παρουσιάζονται με τετράγωνα ενώ οι 10 hpf έκθεσης παρουσιάζονται με κύκλους.



Διάγραμμα 4. Καμπύλες εμφάνισης των εμβρυικών καρδιακών παλμών ανά λεπτό (beats per minute, bpm) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του Eu (ppm) και χρόνους έκθεσης (hrf) όπως προκύπτουν με την probit analysis (όρια εμπιστοσύνης 95%). Οι συγκεντρώσεις του Eu έχουν μετασχηματιστεί σε νεπέρια λογαριθμική κλίμακα. Οι 48 hrf συνεχούς έκθεσης παρουσιάζονται με μαύρους κύκλους, οι 72 hrf συνεχούς έκθεσης παρουσιάζονται με μαύρα τετράγωνα ενώ οι 10 hrf εκθέσεις με λευκούς κύκλους και τετράγωνα για 48 hrf και 72 hrf αντίστοιχα.

Υπήρξαν επίσης και σημαντικές αλληλεπιδράσεις της συγκέντρωσης του Eu με τους παράγοντες της διάρκειας έκθεσης ($p < 0,001$, partial $\text{Eta}^2 = 0,184$) και το χρονικό σημείο της μέτρησης ($p < 0,05$, partial $\text{Eta}^2 = 0,006$), δείχνοντας ότι οι διαφορές μεταξύ των χρονικών σημείων έκθεσης και μέτρησης μειώθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις του μετάλλου.

5. Ανίχνευση του μετάλλου στα βιολογικά δείγματα λαρβών

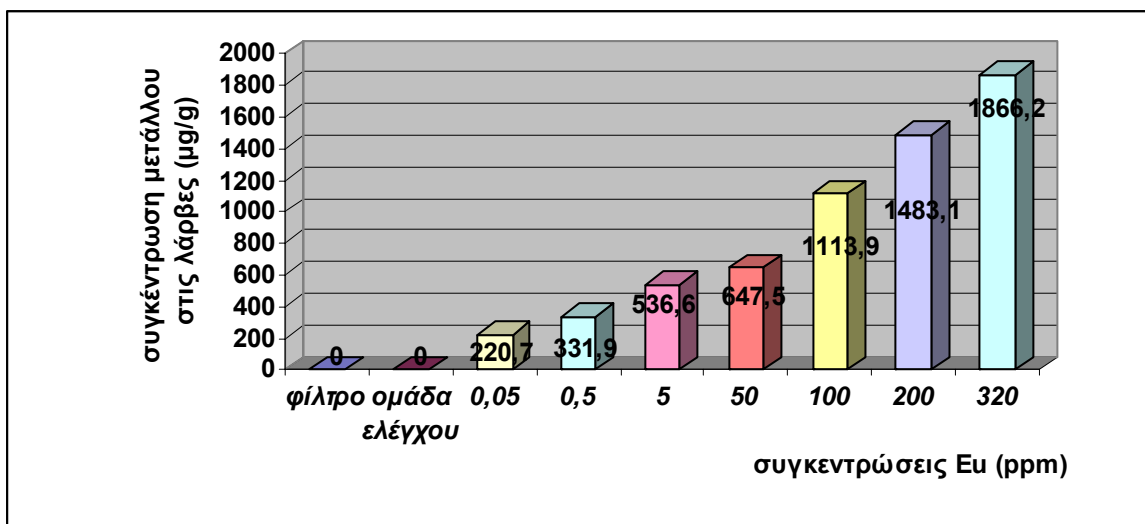
Οι συγκεντρώσεις του μετάλλου στα αναπτυσσόμενα λεκιθοφόρα ιχθύδια αξιολογήθηκαν μετά από δύο διαφορετικούς χρόνους έκθεσης (10 hpf και 72 hpf). Κάθε συγκέντρωση του μετάλλου αντιπροσωπεύονταν από ένα δείγμα πληθυσμού που κυμαίνονταν από 140 – 231 λάρβες (πίνακας 9).

Πίνακας 9. Αριθμός λαρβών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του Eu ανά συγκέντρωση διαλύματος.

72 hpf έκθεσης	
Συγκέντρωση Eu (ppm)	Αριθμός λαρβών ανά συγκέντρωση
<i>ομάδα ελέγχου</i>	140
0,05	157
0,5	213
5,0	214
50	190
100	195
200	143
320	196

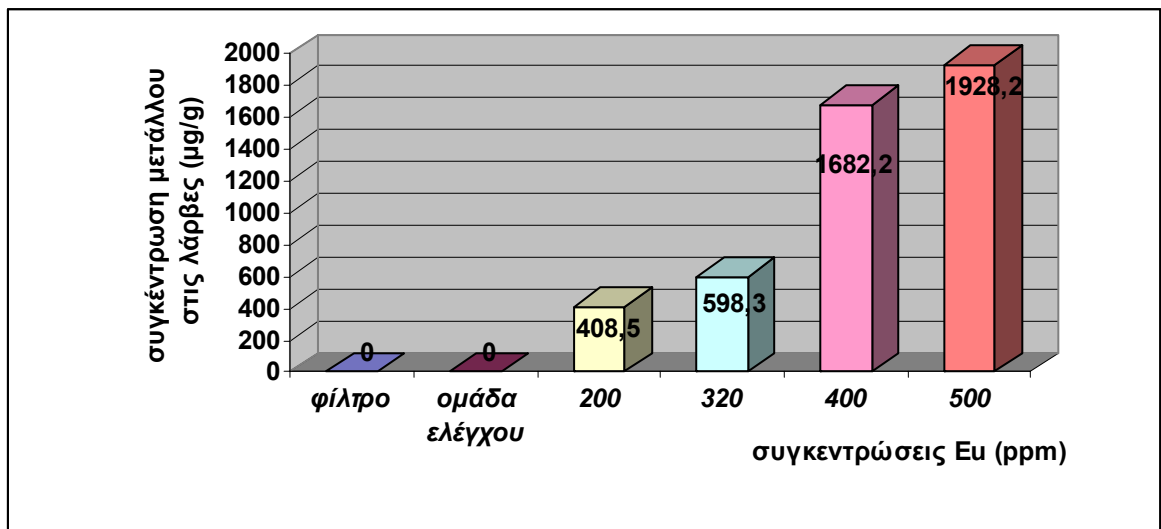
10 hpf έκθεσης	
<i>ομάδα ελέγχου</i>	152
200	231
320	196
400	149
500	142

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα έρευνα, κατά τον προσδιορισμό του Eu στα βιολογικά δείγματα των λεκιθοφόρων ιχθυδίων, έδειξαν ότι καθίσταται δυνατή η ανίχνευση του μετάλλου. Η απορρόφηση του Eu από τους εμβρυϊκούς ιστούς μελετήθηκε διεξοδικά για επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις του μετάλλου (σε σύνολο 1.448 λεκιθοφόρων ιχθυδίων) και διαπιστώθηκε θετική αύξηση συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του διαλύματος του μετάλλου καθ' όλη την διάρκεια της έκθεσης των 72 hpf (διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5. Συγκέντρωση του Eu ($\mu\text{g/g}$) στις λάρβες, συναρτήσεως της συγκέντρωσης του μετάλλου στο διάλυμα έκθεσης των λαρβών, για 72hrf.

Η ανίχνευση του Eu ήταν δυνατή επίσης και στα δείγματα των λεκιθοφόρων ιχθυδίων όταν αυτά είχαν εκτεθεί στο μέταλλο για τις πρώτες 10 hrf ανάπτυξης τους και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε περιβάλλον καθαρού νερού. Η απορρόφηση του μετάλλου κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μελετήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις του Eu (σε σύνολο 870 λεκιθοφόρων ιχθυδίων). Η συγκέντρωση του μετάλλου ($\mu\text{g/g}$) στις λάρβες έδειξε επίσης μια θετική αύξηση εξαρτώμενη από την αύξηση της δυναμικότητας της συγκέντρωσης του διαλύματος (διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6. Συγκέντρωση του Eu ($\mu\text{g/g}$) στις λάρβες, συναρτήσει της συγκέντρωσης του μετάλλου στο διάλυμα έκθεσης των λαρβών, για 10 hpf.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες REEs εισέρχονται στα φυσικά οικοσυστήματα, δια μέσου διαφορετικών οδών, εξαιτίας των ολοένα αυξανόμενων απαιτήσεων τους για εμπορικές και βιομηχανικές εφαρμογές. Η παραγωγή των REEs έχει αυξηθεί από αρκετές χιλιάδες tn από το 1950 μέχρι σχεδόν 100.000 tn το 2000 ενώ μέχρι το 2014 η παγκόσμια απαίτηση για τις REEs μπορεί να υπερβεί τους 200.000 tn ετησίως (Sneller *et al.*, 2000; Kučera *et al.*, 2007; Smith, 2010). Αυτό ενδεχομένως να συνεπάγεται μελλοντικά ότι οι εκπομπές REEs στο περιβάλλον να αυξηθούν κατά παρόμοιο τρόπο. Η διασπορά των REEs, με την μορφή υπολειμμάτων, σε υδάτινα οικοσυστήματα και ατμοσφαιρικά περιβάλλοντα επιτυγχάνεται είτε κατά την διαδικασία εξόρυξης ορυκτών είτε με την αερομεταφορά ατμοσφαιρικών σταγονιδίων και μορίων ύδατος που περιέχουν REEs από σύγχρονες βιομηχανικές εγκαταστάσεις που χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη τις REEs (Ichihashi *et al.*, 1992). Επομένως η ρύπανση του περιβάλλοντος με REEs έχει κυρίως ανθρωπογενή χαρακτήρα (Yusof *et al.*, 2001).

Το ευρώπιο (Eu) αποτελεί ένα από τα πιο δραστικά στοιχεία των REEs καθώς σε τρισθενή μορφή σχηματίζει πολύ σταθερές ενώσεις. Το στοιχείο χρησιμοποιείται σε μια ευρεία γκάμα ενώσεων με πολλές εμπορικές εφαρμογές λόγω των μαγνητικών, καταλυτικών και οπτικών ιδιοτήτων του που το καθιστούν ευρέως χρησιμοποιούμενο υλικό στη βιομηχανία και στην βιοϊατρική τεχνολογία. Οι βιομηχανικές πηγές του Eu καθώς και των άλλων λανθανιδών περικλείουν ενδεχομένως κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και την βιωσιμότητα των οικοσυστημάτων. Η τοξική επίδραση των λανθανιδών μπορεί να εμφανίζεται με οξεία ή χρόνια συμπτώματα. Οξεία τοξικότητα μπορεί να προκαλείται από υψηλές συγκεντρώσεις και να εμφανίζει αιφνίδια συμπτώματα, συχνά οφειλόμενα σε μη αντιστρεπτή βλάβη. Σωρευτική επίδραση ή χρόνια δηλητηρίαση μπορεί να προκύψει από μακροχρόνια έκθεση στο στοιχείο, σε χαμηλότερες όμως συγκεντρώσεις, και είναι δυνατόν να αντιστραφεί ενδεχομένως με διακοπή της έκθεσης. Έτσι καθίσταται επιτακτική ανάγκη να ερευνηθούν περισσότερο οι τοξικές δράσεις του Eu στους ιστούς και στην φυσιολογία των οργανισμών. Τα

τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότερες πειραματικές μέθοδοι αναπτύσσονται ικανοποιητικά για την λήψη σημαντικών πληροφοριών όσον αφορά τον ρόλο των λανθανιδών σε διάφορες κυτταρικές και βιοχημικές λειτουργίες (Palasz and Czekaj, 2000).

Οι ιχθύες, ως η κύρια υδρόβια τάξη σπονδυλοζώων, αποτελούν την κύρια επιλογή για ολοκληρωμένες δοκιμές ελέγχου τοξικότητας. Στην πραγματικότητα, οι ιχθύες μπορούν να διαφέρουν από τα υπόλοιπα σπονδυλωτά αλλά και από τα περισσότερα ασπόνδυλα όσον αφορά τη μεταβολική τους ικανότητα στην απορρόφηση, βιομεταφορά και βιοδιαθεσιμότητα ορισμένων χημικών στοιχείων. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τη ρύπανση υψηλού επιπέδου που συμβαίνει κατά καιρούς σε διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα του πλανήτη και τις συχνότητες των χημικών διαρροών, τα ψάρια γίνονται συχνά στόχοι μιας συστηματικής χημικής ρύπανσης από ανθρωπογενείς πηγές όπως εγκαταστάσεις και πλοία. Δεδομένης της σημασίας των ψαριών στο υδάτινο περιβάλλον και της επιτακτικής ανάγκης παρακολούθησης και αξιολόγησης της ρύπανσης, τόσο σε εθνικό όσο και σε διεθνές επίπεδο, τα ψάρια αποτέλεσαν ταυτόχρονα σημαντικούς δείκτες για την ποιότητα των υδάτων και ένα απλό εργαλείο για δοκιμές οικοτοξικότητας.

Η επιλογή των εμβρύων και των λεκιθοφόρων ιχθυδίων *D. rerio* στις τοξικολογικές μας έρευνες σε σχέση με την φυσιολογία του οργανισμού βασίστηκε στον μεγάλο αριθμό πειραματικών πλεονεκτημάτων που προσφέρει ως μοντέλο τοξικολογικών δοκιμών αλλά και στις πρακτικές εφαρμογές που προσφέρει το μοντέλο αυτό. Πιο συγκεκριμένα:

(α) Λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των εμβρύων και των λεκιθοφόρων ιχθυδίων, αυτά μπορούν να διατηρηθούν σε πολύ μικρούς όγκους διαλυμάτων μελέτης τοξικότητας (μεγέθους της τάξης περίπου των 100 μl) για μια εβδομάδα.

(β) Τα έβρυα είναι εξαιρετικά διαπερατά σε πολλές ουσίες λόγω της διευκολυνόμενης διάχυσης του σώματός τους.

(γ) Η τοξικολογική αξιολόγηση μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε λίγες ημέρες λόγω της σύντομης διάρκειας της διαφοροποίησης και ανάπτυξής τους.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι τοξικές επιδράσεις του Eu σε όλες σχεδόν τις αναπτυξιακές παραμέτρους των εμβρύων *D. rerio* (θνησιμότητα, εκτιμώμενος χρόνος εκκολαψιμότητας, διάφοροι σωματομετρικοί δείκτες, καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία) καθώς και η βιοδιαθεσιμότητα του μετάλλου

στα έμβρυα. Η ανάλυση της τοξικής επίδρασης του Eu βασίστηκε στην στατιστική σημαντικότητα των επιδράσεων της παρουσίας του μετάλλου συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου, στα αρχικά στάδια ανάπτυξης και διαφοροποίησης των εμβρύων και των λεκιθοφόρων ιχθυδίων *D. rerio*.

Η πρώτη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του ελέγχου της τοξικότητας του Eu έδειξε ότι η έκθεση των αυγών στο μέταλλο είχε σημαντικά αρνητικές επιδράσεις στην εμβρυϊκή βιωσιμότητα. Το πρώτο εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της τοξικότητας στην μελέτη μας είναι η μέση θανατηφόρα δόση (LD_{50}). Γενικά, η επιλογή της ως δείκτη έχει δύο πλεονεκτήματα: (α) αποτρέπει το ενδεχόμενο ασάφειας για μετρήσεις σε ακραίες τιμές δόσης και (β) μειώνει την ποσότητα των δοκιμών που απαιτούνται για τον έλεγχο της τοξικότητας. Η θνησιμότητα μελετήθηκε σε 1.791 έμβρυα, για εννέα διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu και για δύο διαφορετικούς χρόνους έκθεσης (10 hpf και 72 hpf). Μετά την εκτίμηση των δεδομένων της θνησιμότητας η μέση θανατηφόρα δόση του μετάλλου για 72 hpf έκθεσης ($LD_{50(72\ hpf)}$) υπολογίστηκε στα 277,1 ppm ενώ η αντίστοιχη για 10 hpf έκθεσης ($LD_{50(10\ hpf)}$) παρουσίασε αύξηση στα 448,6 ppm. Η αύξηση της τιμής της $LD_{50(10\ hpf)}$ υποδηλώνει ότι απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις του μετάλλου για να εμφανιστεί θνησιμότητα ανάλογη αυτής των 72 hpf, λόγω της απομάκρυνσης του παράγοντα που προκαλεί την τοξικότητα στα έμβρυα, δηλαδή του μετάλλου.

Ακολούθως, η συνεχής έκθεση των αυγών στο Eu είχε σημαντικές τοξικές επιδράσεις σε άλλες δύο αναπτυξιακές παραμέτρους, στην εκκολασιμότητα και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη λόγω της απορρόφησης του μετάλλου ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του (0,05 ppm). Η απορρόφηση του μετάλλου από το έμβρυο πραγματοποιήθηκε από τα πρώτα κιόλας στάδια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του. Επιπροσθέτως, ακολούθησε μια αυξητική τάση απορρόφησης του μετάλλου ανάλογη όχι μόνο της συγκέντρωσης του Eu αλλά και του χρόνου έκθεσης των αυγών στο μέταλλο. Το γεγονός της ενσωμάτωσης του Eu στον εμβρυϊκό ιστό επιβεβαιώνεται από τις συγκεντρώσεις του Eu που ανιχνεύθηκαν στο σώμα των λεκιθοφόρων ιχθυδίων μετά από τις πρώτες 10 hpf έκθεσης των αυγών και κατόπιν της μεταφοράς και ανάπτυξης τους σε περιβάλλον ελεύθερο του μετάλλου (καθαρό νερό). Έτσι λοιπόν το αυγό ως ο πρώτος εμβρυϊκός μηχανισμός προστασίας, στα πρώτα στάδια μετά την γονιμοποίηση, δεν φαίνεται να περιορίζει την είσοδο του μετάλλου σε αυτό ανεξάρτητα από τον

χρόνο της έκθεσης. Κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της εμβρυϊκής ανάπτυξης, αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, παρατηρείται διόγκωση του αυγού λόγω της απορρόφησης του νερού από το εξωτερικό υδάτινο περιβάλλον. Στην φάση αυτή εάν το περιβάλλον είναι επιβαρυνμένο με ιόντα βαρέων μετάλλων τότε το αυγό λόγω της εισόδου του μετάλλου δέχεται ισχυρή επίδραση από τα ιόντα τα οποία δύνανται να αλλάξουν όχι μόνο την διαπερατότητα του κελύφους του αυγού αλλά και την δομή του χορίου. Κοινή παράμετρος των δύο αυτών συνεπειών είναι η ανταγωνιστική δράση των βαρέων μετάλλων και απαραίτητων μετάλλων των βιομορίων του αυγού, όπως τα ιόντα Ca^{2+} (Jezierska *et al.*, 2009). Ενδεχομένως οι βασικές βιολογικές αιτίες που φαίνεται να συνέβαλαν στην είσοδο και ενσωμάτωση του Eu στα αυγά κατά την τοξική επίδραση του μετάλλου, στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, είναι το χόριο (chorion) και τα ιόντα Ca^{2+} .

Γενικά το χόριο (chorion) αποτελεί την εξωτερική μεμβράνη των αυγών στους τελεόστεους ιχθύες (teleosts) και είναι διαπερατό στο νερό, στα ιόντα και τα άλατα όχι όμως σε μόρια μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Ο λειτουργικός του ρόλος δεν είναι μόνο να αποτελεί ένα φυσικό, προστατευτικό μηχανισμό για τα αναπτυσσόμενα έμβρυα από το εξωτερικό περιβάλλον τους (έως ένα όμως βαθμό εκτός αν το περιβάλλον είναι ιδιαίτερα τοξικό) αλλά και να διατηρείται μια διαφορά ιοντικού δυναμικού μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού περιβάλλοντος (Eddy, 1982; 1990). Μελέτες έχουν δείξει ότι διάφορα μέταλλα όπως τα Cu, Cd, Pb μπορούν να επηρεάσουν την δομή και την διαπερατότητα του χορίου καθώς επίσης και τις φυσικές ιδιότητες της επιφάνειας των αυγών. Τα ιόντα Cd^{2+} μπορούν να συνδεθούν με το θείο των σουλφιδικών ομάδων των πρωτεϊνών (-SH), και συγκεκριμένα με τις ομάδες των αμινοξέων κυστεΐνης και γλουταθειόνης, αναστέλλοντας τη λειτουργία αυτών των βιομορίων. Τα ιόντα Cd^{2+} έτσι μπορούν να μιμηθούν μερικώς τα ιόντα Ca^{2+} (Baldisserotto *et al.*, 2004). Έχει προταθεί, επίσης, ότι ο Pb δεσμεύεται στους βλεννοπολυσακχαρίτες (mucopolysaccharides) της μεμβράνης επηρεάζοντας σημαντικά την ανταλλαγή των ιόντων μεταξύ του εξωτερικού και εσωτερικού περιβάλλοντος του αυγού (Stouthart *et al.*, 1994). Ακόμη, και όταν τα αυγά του είδους *Pimephales promelas* εκτέθηκαν σε περιβάλλοντα Zn έγιναν περισσότερο κολλώδη και πιο εύθραυστα (Benoit and Holcombe, 1978). Ενδεχομένως τα στοιχεία των λανθανιδών, όπως και τα ιόντα Eu^{3+} , επειδή παρουσιάζουν ισχυρές θέσεις πρόσδεσης με τις υδροξυλομάδες της ανθρακικής αλυσίδας των υδατανθρακικών μακρομορίων, να επηρεάζουν σημαντικά την λειτουργία τους και

κατά συνέπεια την διαπερατότητα του χορίου. Έτσι λοιπόν κατά την έκθεση των αυγών του *D. rerio* σε διαλύματα Eu, διαφορετικής δυναμικότητας συγκεντρώσεων, επειδή το χόριο δεν αποτελεί σημαντικό περιοριστικό παράγοντα εισόδου του μετάλλου στο εσωτερικό του αυγού, τα ιόντα Eu^{3+} , στην πλειονότητά τους, εισέρχονται στο εσωτερικό του. Ο τελικός προορισμός τους είναι η ενσωμάτωσή τους στο εμβρυικό ιστό, δρώντας ανταγωνιστικά και αντικαθιστώντας τα ιόντα Ca^{2+} , καθώς και άλλα σημαντικά ιόντα όπως εκείνα του Mg^{2+} , σε ειδικές θέσεις πρόσδεσης. Τα ιόντα Ca^{2+} έχουν πολύ μεγάλη σπουδαιότητα γιατί παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εκκόλαψη, εμβρυϊκή ανάπτυξη και οργανογένεση. Οι τελεόστειοι των γλυκέων υδάτων τόσο στην ενήλικη όσο και στην λαρβική τους ηλικία διαβιούν σε περιβάλλοντα τα οποία είναι φτωχότερα σε ιόντα Ca^{2+} σε σχέση με την ενδοκυτταρική συγκέντρωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει μια συνεχής τάση εισόδου των ιόντων στον οργανισμό. Πειραματικά στοιχεία που προέκυψαν μετά από επώαση αυγών της πέστροφας *Salmo trutta* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Na^+ και Ca^{2+} έδειξαν ότι τα ιόντα Ca^{2+} είναι πρωταρχικής σημασίας για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Επίσης, μελέτες καταδεικνύουν ότι η ανάπτυξη εμβρύων, σε φτωχά περιβάλλοντα ιόντων Ca^{2+} , συνοδεύτηκε από μια επιταχυνόμενη είσοδο των ιόντων για εξισορρόπηση της ομαλής ανάπτυξης για τον σχηματισμό των οστών και την διεκπεραίωση άλλων βασικών μεταβολικών διαδικασιών (Chou *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι ελαφρότερες λανθανίδες, όπως το Eu (μαζί με τις Ce, Pr, Nd, Pm, Ln και Gd), έχουν αυξημένο ανταγωνιστικό χαρακτήρα με τα ιόντα Ca^{2+} , εξαιτίας του μεγαλύτερου ατομικού αριθμού τους και επομένως την τάση τους να εμφανίζουν σχετικά υψηλότερο αριθμό συντονισμού (coordination number) (Sturza *et al.*, 2008). Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί ότι το Eu καθώς και ορισμένα άλλα στοιχεία των λανθανιδών αποτελούν σημαντικούς παρεμποδιστές (blockers) της ενδοκυτταρικής μεταφοράς των ιόντων Ca^{2+} , εφόσον τα αντικαθιστούν σε ειδικές θέσεις, και κατά συνέπεια περιορίζονται σημαντικές βιολογικές διαδικασίες. Επίσης το μαγνήσιο είναι απαραίτητο δισθενές ιόν (Mg^{2+}) του μεταβολισμού των σκελετικών ιστών και της νευρομυϊκής ώσης καθώς αποτελεί και βασικό συστατικό της λεκίθου των εμβρύων και λεκιθοφόρων ιχθυδίων. Η ανταγωνιστική συμπεριφορά του Eu απέναντι στα ιόντα Mg^{2+} δεν είναι τόσο ισχυρή όσο με εκείνη των ιόντων Ca^{2+} , αλλά όμως εφικτή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι βαριές λανθανίδες λόγω του ιοντικού μεγέθους τους προσομοιάζουν

περισσότερο με εκείνο των ιόντων Mg^{2+} (Sudhindra *et al.*, 2004) με αποτέλεσμα να παρεμποδίζονται μεταβολικοί οδοί θρέψης και ανάπτυξης κατά την διαφοροποίηση των εμβρύων (Metin and Sener, 2001).

Επίσης τοξικολογικές μελέτες με έμβρυα και λάρβες *D. rerio*, που αναπτύχθηκαν σε περιβάλλοντα με βαρέα μέταλλα, δείχνουν ότι η απορρόφηση τους επιτυγχάνεται κυρίως με την διαδικασία της διευκολυνόμενης διάχυσης (facilitated diffusion) μέσω του δέρματός τους (Han-Li *et al.*, 2004). Ταυτόχρονα όμως μπορούν να εμφανίζουν ωσμωρυθμιστική ικανότητα (ικανότητα να διατηρήσουν την σταθερότητα των ιοντικών συγκεντρώσεων του σώματός τους) που σε αυτά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης τα βράγχια και τα νεφρά τους δεν έχουν διαφοροποιηθεί πλήρως (Alderdice, 1988). Έτσι λοιπόν η συνεχής και αυξανόμενη τάση των εμβρύων για την ολοκλήρωση της οργανογένεσης και της αναπτυξιακής φυσιολογίας τους συνοδεύεται με την ολοένα αυξανόμενη τάση για πρόσληψη ιόντων Ca^{2+} , μέσω της διευκολυνόμενης διάχυσης, τα οποία πολλά από αυτά όμως λόγω της ανταγωνιστικής συμπεριφοράς των ιόντων Eu^{3+} έχουν αντικατασταθεί.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα έρευνα δείχνουν επίσης ότι η εκκολαψιμότητα και ο καρδιακός ρυθμός είναι οι πιο ευαίσθητες βιολογικές παράμετροι στην παρουσία του μετάλλου. Η εκκολαψιμότητα με βάση τον αριθμό των ζωντανών και των επιτυχώς εκκολάσιμων εμβρύων επηρεάστηκε σημαντικά από την τοξική επίδραση του Eu επεκτείνοντας στατιστικά σημαντικά το χρόνο εκκόλαψης σχεδόν δύο 24ωρα μετά από συνεχή έκθεση. Ερευνητικά στοιχεία έχουν δείξει ότι έμβρυα ιχθύων που αναπτύχθηκαν σε τοξικά περιβάλλοντα βαρέων μετάλλων όπως τα Cu, Cd, Pb εμφάνισαν πολύ χαμηλή εκκολαψιμότητα η οποία ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης, λόγω της αναστολής της λειτουργίας εξειδικευμένων αδένων εκκόλαψης από τα μέταλλα με ταυτόχρονο περιορισμό των μυϊκών κινήσεων των εμβρύων που είναι απαραίτητες για να σπάσει το κέλυφος των αυγών και να ελευθερωθούν οι λάρβες. Γενικά τα έμβρυα των ιχθύων πριν το στάδιο της εκκόλαψης αναπτύσσουν ειδικούς αδένες εκκόλαψης (hatching glands) που εδράζονται στο κεφάλι τους και σχετίζονται με την εκκόλαψη. Οι αδένες αυτοί παράγουν την χοριονάση (chorionase) ένα πρωτεϊνικό ένζυμο απαραίτητο για την διάσπαση του κελύφους του αυγού κατά την διαδικασία της εκκόλαψης. Πολλά μέταλλα όμως μπορούν να έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην ανάπτυξη και τη λειτουργία αυτών των αδένων τα οποία μπορούν να προκαλέσουν

διαταραχές στις διαδικασίες της μεταγραφής και της μετάφρασης με συνέπεια τη μειωμένη σύνθεση των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου και της χοριονάσης. Η επιφάνεια των αδένων λόγω της παρουσίας των μετάλλων συρρικνώνεται όποτε οι αδένες καθίστανται μη λειτουργικοί (Jezierska *et al.*, 2009). Σε μοριακό επίπεδο οι λανθανίδες μπορούν να προσδεθούν στις πουρίνες, πυριμιδίνες και στις φωσφορικές ομάδες των δεοξυριβονουκλεοτιδίων και ριβονουκλεοτιδίων δημιουργώντας ισχυρά σύμπλοκα σε pH 6 – 7 με αποτέλεσμα την ισχυρές μετατοπίσεις πρωτονίων (H^+). Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να προκληθούν μορφολογικές αλλαγές στο DNA, όπως π.χ. Z – διαμόρφωση και πτώση του σημείου τήξης του μακρομορίου. Επίσης οι λανθανίδες, και κυρίως τα ιόντα Eu^{3+} , μπορούν να προσδεθούν στον βρόχο των αντικωδικονίων των μορίων tRNA λόγω της παρουσίας μιας ποικιλίας ομάδων (ιμινικές, αμινο και καρβονυλικές ομάδες) που διαθέτουν και αποτελούν ισχυρές θέσεις πρόσδεσης (Mundoma and Greenbaum, 2003). Τα ιόντα Eu^{3+} σταθεροποιούν το σύμπλοκο με ταυτόχρονη αλλαγή της τρισδιάστατης δομής των tRNA και την τελική απενεργοποίησή τους, οπότε η μεταφραστική διαδικασία περιορίζεται.

Οι πρώτες εμφανείς επιδράσεις της τοξικότητας του μετάλλου όσον αφορά το καρδιαγγειακό σύστημα παρατηρήθηκαν στην χαμηλότερη συγκέντρωση του Eu που χρησιμοποιήθηκε (0,05 ppm). Το καρδιαγγειακό σύστημα είναι το πρώτο λειτουργικό όργανο που αναπτύσσεται στα έμβρυα *D. rerio* (διαφοροποιείται στις πρώτες 24 hpf) και σε αυτό στηρίζονται όλες οι λειτουργίες της φυσιολογίας του κατά την διάρκεια της οντογένεσης και διαφοροποίησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να είναι ένα από τα πρώτα συστήματα φυσιολογίας που υφίσταται την τοξική επίδραση του μετάλλου και φαίνεται να είναι πολύ σημαντική κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η τοξική αυτή επίδραση περιλαμβάνει την εμφανή καθυστέρηση διαφοροποίησης της καρδιάς και μείωση των καρδιακών παλμών από την συγκέντρωση των 0,5 ppm. Σε συγκεντρώσεις άνω των 100 ppm παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης ενώ το ποσοστό των εμβρύων που δεν έχουν διαμορφώσει πλήρως το καρδιαγγειακό σύστημα κυμαίνονταν στο 30 – 32%. Επίσης στις πιο υψηλές συγκεντρώσεις του μετάλλου (200 ppm, 320 ppm), οι περισσότερες θνησιμότητες συνέβησαν την δεύτερη ημέρα μετά την γονιμοποίηση και συνοδεύτηκαν από την απουσία ή την παρουσία μερικώς αναπτυγμένου καρδιακού μυϊκού ιστού. Η βραδυκαρδία παρατηρήθηκε

ακόμη και όταν τα έμβρυα αφού παρέμειναν τις πρώτες 10 hpf ανάπτυξης τους στα υδατικά διαλύματα του μετάλλου (200 ppm, 320 ppm, 400 ppm, 500 ppm) στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε περιβάλλοντα ελεύθερα των ιόντων Eu^{3+} . Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί την μη αναστρέψιμη ευαισθησία των εμβρύων, λόγω της μερικής ή ολικής απλασίας της καρδιάς, κατά την διάρκεια της ανάπτυξης τους στην παρουσία του μετάλλου ακόμη και αν αυτό έχει απομακρυνθεί. Επομένως ο χρόνος έκθεσης στο μέταλλο είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στον εμβρυϊκό καρδιακό παλμό λαμβάνοντας υπόψη μας βέβαια και το χρονικό σημείο της μέτρησης.

Από τα ερευνητικά δεδομένα που έλαβαν χώρα κατά την τοξική δράση του Eu υποθέτουμε ότι το μέταλλο έχει αρχικό στόχο την καρδιακή συσταλτικότητα, ένα ευαίσθητο δείκτη της δράσης του μετάλλου, γεγονός που υποδηλώνεται από την βραδυκαρδία που εμφάνισαν τα έμβρυα. Οι πολύ μικρές συγκεντρώσεις του μετάλλου (0,05 ppm) μπορούν να προκαλέσουν μικρή πτώση του καρδιακού ρυθμού. Σε μεγαλύτερες όμως μπορούν να προκαλέσουν μείωση των καρδιακών παλμών σε ένα μέγεθος που κυμαίνεται από 31,34 - 50,42 % με επακόλουθα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Είναι γνωστό ότι η ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{+2} αποτελεί το βασικό κλειδί για την συστολή και διαστολή του καρδιακού μυός. Το σαρκοπλασματικό δίκτυο (sarcoplasmic reticulum, SR) διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{+2} . Για την ATP – εξαρτώμενη μεταφορά των ιόντων Ca^{+2} κατά μήκος του SR διαμεσολαβεί ένα πολυπεπτίδιο, η τριφωσφατάση της αδενοσίνης ($[\text{Ca}^{+2} + \text{Mg}^{+2}]$ -ATPάση). Έχει προταθεί ότι η ανταγωνιστική δράση των ιόντων Eu^{3+} για τα ιόντα Ca^{+2} , όπως και των άλλων λανθανιδών (Dy^{3+} , La^{3+} , Tb^{3+}), μπορεί να οδηγήσει στην εκτόπιση του επιφανειακά συνδεδεμένου ασβεστίου ή στη πρόσδεση των ιόντων Eu^{3+} σε συγκεκριμένες ειδικές θέσεις της $[\text{Ca}^{+2} + \text{Mg}^{+2}]$ – ATPάσης και κατά συνέπεια στην παρεμπόδιση της συστολής των καρδιακών μυών (Joshi and Shamo, 1987). Τα ιόντα Eu^{3+} δεσμεύονται σε δύο περιοχές υψηλής συγγένειας στο καρδιακό SR. Η σταθερότητα σύνδεσης των λανθανιδών στις θέσεις πρόσδεσης των ιόντων Ca^{2+} είναι συνήθως υψηλότερη από την αντίστοιχη του ίδιου του ασβεστίου λόγω του υψηλότερου φορτίου μέσα στην ίδια ιοντική ακτίνα. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν έτσι την άποψη ότι πιθανά η αναστολή της ασβέστο - εξαρτώμενης

αγωγιμότητας από τα ιόντα Eu^{3+} στα πρώτα εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης προκαλεί σοβαρές συνέπειες στην καρδιακή μορφογένεση και την διαφοροποίηση του *zebrafish* (Glickman and Yelon, 2002).

Στα ψάρια κατά την εμβρυϊκή τους ηλικία, συμπεριλαμβανομένου και του *zebrafish*, η καρδιακή λειτουργία δεν έχει ως πρωταρχικό σκοπό μόνο την εξασφάλιση παροχής και διανομής του οξυγόνου αλλά των διαφόρων θρεπτικών ουσιών και ηλεκτρολυτών δια μέσω των εμβρυϊκών ιστών (Pelster and Burggren, 1996). Πιο συγκεκριμένα στα πρώτα στάδια ανάπτυξης, κυρίως κατά τη διάρκεια των πρώτων 10 ημερών, οι απαιτήσεις σε οξυγόνο είναι αυξημένες λόγω της αύξησης του μεταβολικού ρυθμού και είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την οργανογένεση και τη μετατροπή της λεκίθου ως μια νέα μεταβολιζόμενη βιομάζα. Ο κυρίαρχος τρόπος όμως του ανεφοδιασμού οξυγόνου στους ιστούς κατά την εμβρυϊκή ηλικία είναι η διάχυση μέσω του δέρματος το οποίο σταδιακά αρχίζει και πυκνώνεται ενώ ταυτόχρονα ο λειτουργικός του ρόλος για την ανταλλαγή αερίων και διαφόρων ιόντων αρχίζει να υποβαθμίζεται και να αντικαθίσταται από το σύστημα του κυκλοφορικού και των βραγχίων κατά την πορεία της διαφοροποίησης του. Ενδεχομένως στις πρώτες hpf οι διάφορες συγκεντρώσεις του μετάλλου να μην επηρεάζουν την ανάπτυξη του εμβρύου, με παράμετρο την πρόσληψή του οξυγόνου, μέχρι την έναρξη της διαφοροποίησης του κυκλοφορικού συστήματος και του καρδιακού ιστού και κατά συνέπεια να μην επηρεάζονται οι μεταβολικές διεργασίες σε σημαντικό βαθμό ούτε οι άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες.

Ο καρδιακός ρυθμός αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη του μεταβολισμού που επηρεάζεται σαφώς πολύ από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι περισσότεροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι με την αύξηση του μεταβολικού ρυθμού επιταχύνονται οι διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες ενώ στην αντίθετη περίπτωση καθυστερούν. Η μείωση του μεταβολικού ρυθμού μειώνει την αξιοποίηση του μεταβολικά ενεργού λεκιθικού αποθέματος των εμβρύων και των λεκιθοφόρων λαρβών (επιβράδυνσης της θρεπτικής απορρόφησης). Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διαθέσιμη ενέργεια που αναλογεί να μην επαρκεί πλήρως για την διαφοροποίηση και την οργανογένεση με ταυτόχρονο περιορισμό της αύξησης του συνολικού μεγέθους του εμβρυϊκού σώματος. Άλλωστε η κατανομή της ενέργειας στα έμβρυα και στις λάρβες ακολουθεί μια στρατηγική

μετατροπής γνωστής στην διεθνή βιβλιογραφία ως “switching strategy”, σύμφωνα με την οποία τα μεγαλύτερα ποσά διαθέσιμης ενέργειας δαπανούνται για τις μεταβολικές ανάγκες της ανάπτυξης και της κολυμβητικής δραστηριότητας των εκκολαπτόμενων λαρβών (Wieser *et al.*, 1988).

Με βάση τα παραπάνω ερευνητικά στοιχεία και τα δεδομένα που προέκυψαν από την μελέτη της τοξικής επίδρασης του μετάλλου στα έμβρυα και στα λεκιθοφόρα ιχθύδια η μείωση του καρδιακού παλμού προκάλεσε μια επιβράδυνση της ανάπτυξης σώματος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα δεν παρατηρήθηκαν τερατογενετικές δυσμορφίες στα λεκιθοφόρα ιχθύδια αλλά μια ισομετρική μείωση, όλων μορφομετρικών μεταβλητών, που ήταν σημαντικά ανάλογη της συγκέντρωσης του μετάλλου. Η πιο χαρακτηριστική μορφομετρική μεταβλητή που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό επίδρασης στους σωματομετρικούς δείκτες κατά την δοκιμασία της βραχυπρόθεσμης τοξικότητας ήταν το StL των εκκολαπτόμενων λαρβών όπου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, στο σύνολο των συγκεντρώσεων του μετάλλου, παρατηρήθηκε μια μείωση της τάξης κατά 0,03 – 0,34%. Δηλαδή η μείωση του μήκους τους έφθασε σχεδόν τον ¼ του συνολικού μήκους τους (TL).

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία που έλαβαν χώρα το Eu λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του, μπορεί να επηρεάσει ένα πλήθος κυτταρικών μεταβολικών μονοπατιών με αποτέλεσμα να παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στην βιοφυσιολογία και στα φαινοτυπικά γνωρίσματα του οργανισμού. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ανταγωνιστική του «διάθεση» απέναντι σε άλλα στοιχεία του οργανισμού (Ca^{2+} , Mg^{2+}) που είναι βασικά για την διεκπεραίωση οργανικών βασικών λειτουργιών αλλά και στην ευκολία κυτταρικής εισόδου του (λόγω της μικρής ιοντικής του ακτίνας). Όπως παρατηρήθηκε από την βραχυπρόθεσμη τοξική επίδραση στα έμβρυα *D. rerio* οι μεταβολές στην βιοφυσιολογία είναι μη αντιστρεπτές λόγω της ενσωμάτωσης του μετάλλου μέσα στους ιστούς του οργανισμού. Κυρίως επιδρά στον κυκλοφορικό σύστημα προκαλώντας βραδυκαρδία με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το σύνολο του μεταβολικού συστήματος και να μειώνονται οι διάφοροι σωματομετρικοί δείκτες χωρίς να αποκλείονται και άλλες βασικές διαταραχές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που έλαβαν χώρα από τα ερευνητικά δεδομένα της ανά χειράς διατριβής είναι τα εξής:

1. Η παρουσία του Eu επηρέασε σημαντικά σχεδόν όλες τις αναπτυξιακές παραμέτρους των εμβρύων *Danio rerio* σε συγκεντρώσεις κυρίως άνω των 100 ppm. Φαίνεται ότι τα ιόντα Eu^{3+} έχουν μια συνεχή τάση να εισέρχονται και να ενσωματώνονται σε ειδικές θέσεις πρόσδεσης μέσα στο εμβρυικό ιστό, δρώντας ανταγωνιστικά και αντικαθιστώντας ιόντα Ca^{2+} (ιόντα που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εκκόλαψη, εμβρυϊκή ανάπτυξη και οργανογένεση).
2. Οι 10 hpf εκθέσεις των εμβρύων στο Eu έδειξαν ότι το μέταλλο εισέρχεται στον οργανισμό από τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης του και προκαλεί μη αναστρέψιμη ευαισθησία στο μέταλλο για τις περισσότερες αναπτυξιακές του παραμέτρους εφόσον τα ιόντα Eu^{3+} δρουν ανταγωνιστικά με άλλα σημαντικά ιόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και οργανογένεσης.
3. Η μέση θανατηφόρα δόση του μετάλλου (LD_{50}) για 72 hpf έκθεσης είναι ισοδύναμη με 277,1 ppm ενώ η αντίστοιχη για 10 hpf έκθεσης στο Eu αυξήθηκε στα 448,6 ppm. Η αναλογία $\text{LD}_{50(72 \text{ hpf})} / \text{LD}_{50(10 \text{ hpf})}$ έδειξε να είναι ισοδύναμη με 0,618 και μεταξύ των τιμών 0,397 – 0,821 ppm. Η τιμή του αποτελέσματος είναι στατιστικά σημαντική και διαφορετική της μονάδας και υποδηλώνει ότι απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις του μετάλλου για να εμφανιστούν μεγαλύτερες τιμές θνησιμότητας κατά την διάρκεια της 10 hpf έκθεσης των εμβρύων.
4. Δυσμορφίες σώματος, ματιού και λεκιθικού σάκου δεν παρατηρήθηκαν στα νεκρά ή τα ζωντανά έμβρυα, εκτός από απλασία (aplasia) των καρδιών στα πιο πολλά νεκρά έμβρυα. Επομένως εξήχθη το συμπέρασμα ότι η έκθεση στο Eu δεν έχει καμία τερατογενετική επίδραση και δεν ασκεί καμία σημαντική αλλαγή στην σωματική διαμόρφωση και διαφοροποίηση.

5. Το StL των εκκολαπτόμενων λαρβών έδειξε ότι επηρεάστηκε στατιστικά σε σημαντικό βαθμό σε υψηλές συγκεντρώσεις Eu ($p < 0,001$). Η μείωση του καρδιακού παλμού αποτελεί σημαντικό δείκτη του μεταβολισμού που επηρεάζεται σαφώς πολύ από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ενδεχομένως η μείωση του μεταβολικού ρυθμού επιδρά αρνητικά στην αξιοποίηση του μεταβολικά ενεργού λεκιθικού αποθέματος που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των εμβρύων και των λεκιθοφόρων λαρβών.
6. Η τοξική επίδραση του Eu έδειξε μια στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του παράγοντα έκθεσης και της συγκέντρωσης του Eu ως συμεταβλητής ($p < 0,001$). Οι υψηλές συγκεντρώσεις έκθεσης του μετάλλου είτε στις πρώτες 10 hpf είτε στις 72 hpf, μπορούν να προκαλέσουν παρόμοιες αρνητικές επιδράσεις στην αναπτυξιακή φυσιολογία των εμβρύων λόγω της μη αναστρέψιμης ευαισθησίας των εμβρύων στο μέταλλο.
7. Στα έμβρυα που εμφάνισαν πλήρως διαμορφωμένη καρδιά, ο καρδιακός παλμός τους επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά από την παρουσία του μετάλλου) ($p < 0,001$, partial $\eta^2 = 0,440$) και πιο συγκεκριμένα οι τιμές των καρδιακών παλμών ανά λεπτό (beats per minute, bpm) μειώθηκαν σημαντικά ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης του μετάλλου και για διαφορετικούς χρόνους έκθεσης. Ενδεχομένως η ανταγωνιστική συμπεριφορά των ιόντων Eu^{3+} για τα ιόντα Ca^{+2} , οδηγεί στην εκτόπιση του επιφανειακά συνδεδεμένου ασβεστίου ή τη πρόσδεση των ιόντων Eu^{3+} σε συγκεκριμένες ειδικές θέσεις της $[\text{Ca}^{+2} + \text{Mg}^{+2}] - \text{ATPάσης}$, σημαντικού ενζύμου της καρδιακής λειτουργίας, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της συστολής των καρδιακών μυών.

Περίληψη

Κατά τη διάρκεια των προηγούμενων τριών δεκαετιών, η απελευθέρωση των σπάνιων μετάλλων στο περιβάλλον έχει αυξηθεί σημαντικά λόγω της χρήσης τους στη βιομηχανία και στην γεωργία. Το ευρώπιο (Eu) είναι ένα στοιχείο των σπάνιων γαιών, της σειράς των λανθανιδών. Το μέταλλο χρησιμοποιείται σε σημαντικό βαθμό στις ράβδους ελέγχου πυρηνικών αντιδραστήρων λόγω της αποτελεσματικότητάς του να απορροφά τα νετρόνια. Έχει χρησιμοποιηθεί ως υλικό για λέιζερ, και το οξείδιο του Eu χρησιμεύει ως φωσφορικός ενεργοποιητής, όπως παραδείγματος χάριν οι κόκκινοι φωσφόροι των έγχρωμων σωλήνων της τηλεόρασης. Πρόσφατα, έχει υπάρξει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις διαγνωστικές και θεραπευτικές εφαρμογές στην βιοϊατρική νανοτεχνολογία λόγω των ιδιοτήτων του φθορισμού του.

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η τοξικότητα του ευρωπαϊού ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) για τα έμβρυα του *zebrafish* (*Brachydanio rerio*) κάτω από τους στανταρισμένες εργαστηριακές συνθήκες. Τα έμβρυα εκτέθηκαν σε μια σειρά συγκεντρώσεων του Eu (0,05-500 ppm) για 10 και 72 ώρες. Η εμβρυική ανάπτυξη αξιολογήθηκε για διάφορες βιολογικές και φυσιολογικές παραμέτρους (θνησιμότητα, ποσοστό εκκόλαψης, σταθερό μήκος κατά την εκκόλαψη, ανάπτυξη του ματιού και της συσταλτικότητας της καρδιάς καθώς επίσης και ποσοστό καρδιών).

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η συνεχής έκθεση των αυγών του *zebrafish* στο Eu είχε σημαντικές τοξικές επιδράσεις στην εκκολαψιμότητα και την εμβρυική ανάπτυξη λόγω της απορρόφησης του μετάλλου ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0,05 ppm). Η απορροφητικότητα του μετάλλου από το έμβρυο πραγματοποιήθηκε από τα πρώτα κιόλας στάδια της ανάπτυξης του. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τις συγκεντρώσεις του Eu που ανιχνεύθηκαν στο σώμα των λαρβών μετά από τις πρώτες 10 hpf εκθέσεις των αυγών και κατόπιν της μεταφοράς και ανάπτυξης τους σε περιβάλλοντα ελεύθερα του μετάλλου (καθαρό νερό).

Ο καρδιακός ρυθμός και ο χρόνος εκκόλαψης των εμβρύων μπορούν να αναφέρονται ως οι πιο ευαίσθητοι παράμετροι στην παρουσία του Eu. Σημαντικές μεταβολές των παραμέτρων αυτών παρατηρήθηκαν στη χαμηλότερη συγκέντρωση του Eu που χρησιμοποιήθηκε (0,05 ppm) μετά από 72 ώρες έκθεσης. Η έκθεση στο Eu, επίσης, ως αποτέλεσμα τη σημαντική καθυστέρηση του σχηματισμού της καρδιάς ξεκινώντας από τη συγκέντρωση της τάξης του 0,5 ppm. Από τα 100 ppm και πάνω, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στην ανάπτυξη και εμφάνιση της θνησιμότητας. Η έκθεση στο Eu για τις πρώτες 10 ώρες μετά την γονιμοποίηση, δείχνει μικρότερη θνησιμότητα αλλά με ισχυρές αρνητικές λειτουργικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη της καρδιάς και των εμβρύων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με αυτά της συνεχούς έκθεσης 72 hpf.

Για τις 72 h συνεχούς έκθεσης το LD₅₀ υπολογίστηκε με τη χρήση της probit ανάλυσης και ήταν ισοδύναμο με 277,1 ppm με 95% όρια εμπιστοσύνης από 233,9 έως 323,0 ppm. Ο θάνατος των εμβρύων ήταν σημαντικά μειωμένος (LD₅₀ = 448,6 με 95% όρια εμπιστοσύνης από 366,4 έως 574,9 ppm) όταν αυτά εκτέθηκαν για 10 hpf. Επίσης η αναλογία LD₅₀(72 hpf) / LD₅₀(10 hpf) έδειξε να είναι ισοδύναμη με 0,618 με 95% όρια εμπιστοσύνης και μεταξύ των τιμών 0,397 – 0,821 ppm. Η τιμή του αποτελέσματος είναι στατιστικά σημαντική και διαφορετική της μονάδας γεγονός που σημαίνει ότι απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις του μετάλλου για να εμφανιστούν μεγαλύτερες τιμές θνησιμότητας κατά την διάρκεια της 10ωρης έκθεσης των εμβρύων.

Λόγω της σημαντικής θνησιμότητας που αρχίζει από τα 100 ppm, το ποσοστό εκκόλαψης εξετάστηκε μόνο για τους ζωντανά και επιτυχώς εκκολάψιμα έμβρυα. Η έκθεση στο Eu αύξησε σημαντικά τον μέσο χρόνο εκκόλαψης καθώς και την συνολική διάρκεια της εκκόλαψης (Mantel-Cox, $p < 0,001$). Σε συνθήκες των 10 και 72 hpf έκθεσης, ο μέσος χρόνος εκκόλαψης αυξήθηκε περίπου μέχρι και 83 hpf, όπου μετά παρατηρήθηκε εκτεταμένη θνησιμότητα των εμβρύων.

Δεν παρατηρήθηκαν δυσπλασίες σώματος, ματιών και λεκιθικού σάκου σε νεκρά ή ζωντανά έμβρυα, εκτός από την απλασία της καρδιάς στα περισσότερα νεκρά έμβρυα. Όταν συσχετίστηκαν τα μεγέθη του σώματος, οι μορφομετρικές μετρήσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές, ακόμη και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις του Eu που χρησιμοποιήθηκαν. Η πολύ μικρή διάκριση (32% των

περιπτώσεων) επιτεύχθηκε επίσης με τη βοήθεια της διακρίνουσας ανάλυσης. Η έκθεση στο Eu δεν έχει τερατογόνο δράση και δεν επιδρά σημαντικά στην μεταβολή του σχηματισμού του σώματος. Το StL των πρόσφατα εκκολαπτόμενων λαρβών επηρεάστηκε σημαντικά σε υψηλές συγκεντρώσεις του Eu ($p < 0,001$). Μετά από συνεχή έκθεση 72 hpf, παρατηρήθηκε μια μικρή αλλά σημαντική μείωση της μέσης τιμής του StL σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε 100 ppm Eu ($p < 0,01$) και έγινε πιο έντονη στα 320 ppm ($p < 0,001$). Πάνω απ' αυτή τη συγκέντρωση, οι διαφορές στο StL δεν εκτιμήθηκαν λόγω της εκτεταμένης θνησιμότητας των εμβρύων. Μια δοσοεξαρτώμενη μείωση του StL παρατηρήθηκε επίσης μετά από 10 hpf έκθεσης. Επιπλέον, δεν υπήρχε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του παράγοντα έκθεσης και της συγκέντρωσης του Eu ως συμμεταβλητής ($p < 0,001$), υποδεικνύοντας ότι η υψηλή συγκέντρωση του μετάλλου, είτε για 10 είτε για 72 hpf έκθεσης, έχει την τάση να παράγει περισσότερη παρόμοια αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των εμβρύων.

Η συσταλτικότητα της καρδιάς αποτελεί τον πρωταρχικό στόχο της τοξικής επίδρασης του Eu λαμβάνοντας υπόψη ότι ο καρδιακός ρυθμός ήταν η πιο ευαίσθητη παράμετρος της έκθεσης του Eu. Σε υψηλές συγκεντρώσεις Eu, οι περισσότερες περιπτώσεις του θανάτου των εμβρύων κατά τη δεύτερη ημέρα μετά την γονιμοποίηση συνοδεύονταν από απλαστικούς ή υποπλαστικούς καρδιακούς μυς. Ο λογαριθμικός μετασχηματισμός (ln) της συγκέντρωσης του Eu ήταν η ισχυρότερη συμμεταβλητή ($p < 0,001$, partial $\text{Eta}^2 = 0,044$), προκαλώντας κάθε φορά την εξαρτώμενη (από την συγκέντρωση του μετάλλου) την μείωση του καρδιακού παλμού. Ο τελευταίος επίσης εξαρτάται από το χρόνο έκθεσης ($p < 0,001$, partial $\text{Eta}^2 = 0,225$), καθώς και για το χρονικό σημείο της μέτρησης ($p < 0,001$, partial $\text{Eta}^2 = 0,044$). Υπήρξαν επίσης σημαντικές αλληλεπιδράσεις της συγκέντρωσης του Eu με τους παράγοντες της διάρκειας της έκθεσης ($p < 0,001$, partial $\text{Eta}^2 = 0,184$) και το χρονικό σημείο της μέτρησης ($p < 0,05$, partial $\text{Eta}^2 = 0,006$), δείχνοντας ότι οι διαφορές μεταξύ των σημείων της έκθεσης και του χρόνου μέτρησης ήταν μειωμένες σε υψηλές συγκεντρώσεις του μετάλλου. Η βραδυκαρδία παρατηρήθηκε ακόμη και όταν τα έμβρυα παρέμειναν τις πρώτες 10 hpf ανάπτυξης τους στα υδατικά διαλύματα του μετάλλου (200 ppm, 320 ppm, 400 ppm, 500 ppm) και κατόπιν μεταφέρθηκαν σε περιβάλλοντα ελεύθερα των ιόντων Eu^{3+} . Το γεγονός αυτό σηματοδοτεί την μη αναστρέψιμη ευαισθησία των εμβρύων, λόγω της

μερικής ή ολικής απλασίας της καρδιάς, κατά την διάρκεια της ανάπτυξη τους στην παρουσία του μετάλλου ακόμη και αν αυτό έχει απομακρυνθεί. Λόγω της παρόμοιας χημείας τους και ιοντικής ακτίνας, οι λανθανίδες όπως και το Eu, είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της μεταφοράς του ασβεστίου και αναστολείς των φυσιολογικών διεργασιών, που εξαρτώνται από την μεταφορά των Ca^{2+} . Η αναστολή της καρδιακής συστολής των μυών από τις λανθανίδες μπορεί να αποδοθεί είτε στην εκτόπιση του Ca ή της δέσμευσης του Eu σε ειδικές θέσεις του Ca της Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPάσης.

Στα ψάρια κατά την εμβρυϊκή τους ηλικία, συμπεριλαμβανομένου και του *zebrafish*, η καρδιακή λειτουργία δεν έχει ως πρωταρχικό σκοπό μόνο την εξασφάλιση παροχής και διανομής του οξυγόνου αλλά των διαφόρων θρεπτικών ουσιών και ηλεκτρολυτών δια μέσω των εμβρυϊκών ιστών. Ο καρδιακός ρυθμός αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη του μεταβολισμού που επηρεάζεται σαφώς πολύ από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η μείωση του μεταβολικού ρυθμού μειώνει την αξιοποίηση του μεταβολικά ενεργού λεκιθικού αποθέματος των εμβρύων και των λεκιθοφόρων λαρβών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διαθέσιμη ενέργεια να μην επαρκεί πλήρως και τον περιορισμό της αύξησης του συνολικού μεγέθους του εμβρυϊκού σώματος.

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία που προέκυψαν από την μελέτη μας, το Eu λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του, μπορεί να επηρεάσει ένα πλήθος μεταβολικών αντιδράσεων στο σύνολό τους, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στην βιοφυσιολογία και στα φαινοτυπικά γνωρίσματα του οργανισμού. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ανταγωνιστική δράση του μετάλλου με άλλα βασικά μέταλλα του οργανισμού όπως τα Ca^{2+} , Mg^{2+} που είναι βασικά για την διεκπεραίωση οργανικών σημαντικών λειτουργιών αλλά και στην ευκολία της κυτταρικής εισόδου του (λόγω της μικρής ιοντικής του ακτίνας).

Summary

Over the past three decades, the release of rare metals into the environment has been increased significantly due to their use in industry and agriculture. Europium (Eu) is a rare earth element, of the lanthanide series. It is primarily used in nuclear reactor control rods because of its effectiveness in absorbing neutrons. Eu-doped plastics have been used as laser materials, and Eu oxide serves as a phosphor activator, for example in the red phosphors of color television tubes. Recently, there has been an increasing interest in diagnostic and therapeutic applications of Eu in biomedical nanotechnology due to its fluorescent properties

The aim of the present study was to assess toxicity of Europium ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) for embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*) under standardised laboratory conditions. Embryos were exposed to a range of Eu concentrations (0.05-500 ppm) for 10 and 72 hours. The embryonic development was assessed by several biological and physiological endpoints (mortality, hatching rate, standard length at hatch, development of eye and contractile heart as well as heart rate).

The assessment of the results showed that continuous exposure of zebrafish eggs to Eu had significant toxic effects on hatching and embryonic development due to absorption of the metal even at very low concentrations (0.05 ppm). The absorption of the metal from the embryo was in the earliest stages of development. This is confirmed by the Eu concentrations which detected in the larvae body after the first 10 hpf exposure of eggs and then transfer and growth in the environments free of the metal (pure water).

The heart rate and hatching time of embryos can be indicated as the most sensitive to the presence of Eu. Significant changes in these parameters were observed at the lowest Eu concentration used (0.05 ppm) after 72 hpf exposure. Exposure to Eu also resulted in a significant delay of heart formation starting from the concentration of 0.5 ppm. At 100 ppm and above, a significant decrease in growth and onset of mortality was observed. Exposure to Eu for the first 10 hpf, resulted in a lesser mortality but exerted strong negative functional effects on the developing heart and growth of embryos. At high concentrations, these effects were comparable to those of continuous 72 hpf exposure.

LD₅₀ of continuous 72 hpf exposure estimated by probit analysis was equal to 277.1 ppm with 95% CI within 233.9 – 323.0 ppm. Death of embryos was significantly attenuated (LD₅₀ = 448.6; 95% CI 366.4 – 574.9 ppm), when they were exposed for 10 hpf. Also, the ratio of LD₅₀ (72 hpf) / LD₅₀ (10 hpf) was shown to be equivalent to 0.618 to 95% CI between the values 0.397 – 0.821 ppm. The value effect is statistically significant and distinct unit of meaning that require higher concentrations of the metal to show greater mortality rates during the 10 hpf of exposure of embryos.

Because of significant mortality starting at 100 ppm, the hatching rate was analyzed only for alive and successfully hatched embryos. Exposure to Eu significantly increased the median hatching time as well as the overall duration of hatching (Mantel-Cox, $p < 0.001$). In conditions of both 10 and 72 hpf exposure, the median hatching time increased approximately up to 83 hpf, after which extensive mortality of embryos was observed.

Malformations of body shape, eye and yolk sac were not seen in dead or alive embryos, except for heart aplasia in most dead embryos. When corrected for body size, the morphometric measurements were not significantly different even at highest Eu concentrations used. Very poor discrimination (32% of cases) was also achieved by means of discriminant analysis. The exposure to Eu has no teratogenic effect and exerts no significant alterations to the body formation. The StL of newly hatched larvae was significantly affected at high Eu concentrations ($p < 0.001$). After continuous 72 hpf exposure, a slight but significant decrease of mean StL in comparison to the control group was observed at 100 ppm of Eu ($p < 0.01$) and became more pronounced at 320 ppm ($p < 0.001$). Above this concentration, the differences in StL were not estimated due to the extensive mortality of embryos. A dose-dependent decrease in StL was also observed after 10 hpf exposure. Moreover, there was significant interaction between exposure factor and Eu concentration covariate ($p < 0.001$), indicating that the high concentrations of the metal, whether for 10 or 72 hpf exposure, tend to produce more similar negative effects on the growth of embryos.

The heart contractility constitutes the primary target of Eu toxic effects, taking into account that the heart rate was the most sensitive parameter to Eu exposure. At high Eu concentrations, most embryos death events occurred at the

second day post fertilization and they were accompanied by aplastic or hypoplastic heart muscle. Ln-transformed Eu concentration was the strongest covariate ($p < 0.001$; partial $\text{Eta}^2 = 0.440$), causing a time-dependent decrease in the heart rate. The latter was also dependent on the exposure time ($p < 0.001$; partial $\text{Eta}^2 = 0.225$) as well as on the time point of measurement ($p < 0.001$; partial $\text{Eta}^2 = 0.044$). There were also significant interactions of Eu concentration with the factors of exposure duration ($p < 0.001$; partial $\text{Eta}^2 = 0.184$) and the time point of measurement ($p < 0.05$; partial $\text{Eta}^2 = 0.006$), indicating that the differences between exposure and measurement time points were attenuated at high concentrations of the metal. Bradycardia was observed even when the embryos remained the first 10 hpf of their development in the aqueous solutions of metal (200 ppm, 320 ppm, 400 ppm, 500 ppm) and then transferred into environments free of Eu^{3+} ions. This marks the irreversible susceptibility of embryos due to the partial or total aplasia of the heart during development in the presence of metal even if metal has removed. Due to their similar chemistry and ionic radius, lanthanides like Eu, are effective blockers of calcium movement and inhibitors of physiological processes depending on Ca^{2+} transport. The inhibition of cardiac muscle contraction by lanthanides may be attributed either to Ca displacement or to Eu binding in calcium specific sites of Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP-ase.

Fish during their embryonic age, including the zebrafish, the heart function has not been primary aim only to ensure the provision and distribution of oxygen but of different nutrients and electrolytes through embryonic tissues. The heart rate is an important indicator of metabolic indeed very influenced by environmental conditions. The decrease in metabolic rate reduces the use of metabolically active stock of yolk of embryo and sac larvae. As a result, the available energy is not completely sufficient to limit the growth of the overall size of an embryonic body.

Based on the above which data which were obtained from our study, the Eu, because of its physico-chemical characteristics, can affect a multitude of metabolic reactions in their entirety, resulting in significant changes in bio physiology and phenotypic characteristics of the organism. This is due mainly to the competitive action of the metal with other essential metals of the organism,

like Ca^{2+} , Mg^{2+} , which are essential for processing organic basic functions and ease of cellular entry (due to its small ionic radius).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διεθνής βιβλιογραφία

Alderdice D.F. 1988. *Osmotic and ionic regulation in teleost eggs and larvae. In Fish Physiology*. Vol. XI, part A, pp. 163-251. Edited by W.S. Hoar and D.J. Randall. Academic Press, San Diego.

Alibo D.S, Nozaki Y., Amakawa H., Gamo T., Hasumoto H. 1999. *Dissolved rare earth elements and hydrography in the Sulu Sea*. *Geochemica et Cosmochemica Acta* 63:2171–2181.

Alptürk O., Rusin O., Fakayode S., Wang W., Escobedo J., Warner I., Crowe W., Král V., Pruet J., Strongin R. 2006. *Lanthanide complexes as fluorescent indicators for neutral sugars and cancer biomarkers*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103:9756–9760.

Amellal M., Landry Y. 1983. *Lanthanides are transported by ionophore A23187 and mimic calcium in the histamine secretion process*. *Br. J. Pharmac.*, 80, 365-370.

Andrés Y.A., Texier C., Le Cloire P. 2003. *Rare earth elements removal by microbial biosorption: A review*. *Environmental Technology*, Vol. 24:1367-1375.

Angyal S.J., Greeves D., Littlemore L., Pickles A.V. 1976. *Complexes of Carbohydrates with Metal Cations. VIII Lanthanide-Induced Shifts in the P.M.R. Spectra of Some Methyl Glycosides and 1,6-Anhydrohexoses*. *Aust. J. Chem.*, 29, 1231-7.

Argonne National Laboratory. *Europium*. EVS Human Health Fact Sheet, August 2005.

Asimov I. 1964. *Asimov's Biographical Encyclopedia of Science and Technology*. Editor: Doubleday, USA.

Baldisserotto B., Kamunde C., Matsuo A., Wood C.M. 2004. *A protective effect of dietary calcium against acute waterborne cadmium uptake in rainbow trout*. *Aquat. Toxicol.* 67:57–73.

Barman R.P. 1991. *A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of Danio rerio*. *Record of the Zoological Survey of India Occasional Papers* 137:1-91.

Barry H.W., Goldminz D., Kimball T., Fitzgerald W.J. 1978. *Influence of cell dissociation and culture of chick embryo ventricle on inotropic responses to calcium and lanthanum*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* Volume 10, Issue 10, p.967-979.

Barry M.J., Meehan B.J. 2000. *The acute and chronic toxicity of lanthanum to Daphnia carinata*. *Chemosphere*, 41(10):1669-1674.

Bayer M.E., Bayer M.H. 1991. *Lanthanide accumulation in the periplasmic space of Escherichia coli*. *B. J. Bacteriology*, Vol. 173:141-149.

Benoit D.A., Holcombe G.W. 1978. *Toxic effects of zinc on fathead minnows Pimephales promelas in soft water*. *J Fish Biol.* 13:701-708.

Bhat A. 2003. *Diversity and composition of freshwater fishes in streams of Central Western Ghats, India*. *Environ. Biol. Fishes* 68:25-38.

Boer J.L.M., Verweij T.W., van der Velde-K., Mennes W. 1996. *Levels of rare earth elements in Dutch drinking water and its sources. Determination by inductively coupled plasma mass spectrometry and toxicological implications. A pilot study*. *Water Research*, 30(1):190-198.

Brown P., Rathjen A., Graham R., Tribe D. 1990. *In: Gschneidner & Eyring (eds.). Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Forths*. Vol. 13, North-Holland, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, p. 423.

Bruce D.W., Hietbrink, B.E., DuBois K.P. 1963. *The acute mammalian toxicity of rare earth nitrates and oxides*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 5:750-759.

Brzyska W. 1996. *Lantanowce i aktynowce*. pp. 40-41, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa (in Polish).

Buccigross J.M, Nelson D.J. 1986. *EPR studies show that all lanthanides do not have the same order of binding to calmodulin*. Biochem Biophys Res Commun. Aug 14;138(3):1243-9.

Burroughs S., Eisenman G., Horrocks W. Jr. 1992. *Characterization of the five-fold Ca^{2+} binding site of satellite tobacco necrosis virus using Eu^{3+} luminescence spectroscopy: a marked size-selectivity among rare earth ions*. Biophys Chem. Apr;42(3):249-256.

Burroughs S., Horrocks W. Jr., Ren H., Klee C. 1994. *Characterization of the lanthanide ion-binding properties of calcineurin-B using laser-induced luminescence spectroscopy*. Biochemistry 33, 10428-10436. MEDLINE.

Carney A.S., Prasch L.A., Heideman W., Peterson E.R. 2006. *Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model*. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology, Volume 76, Issue 1, pages 7-18.

Chang J. 1991. *Effects of lanthanum on the permeability of root plasmalemma and the absorption and accumulation of nutrients in rice and wheat*. Plant Physiol Commun Vol. 27:17-21 (in Chinese).

Chen X.H., Zhao B. 2007. *Arbuscular mycorrhizal fungi mediated uptake of lanthanum in Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus* L.)*. Chemosphere, Vol. 68 (8):1548-1555.

Chen Y.Y., Lu F.I., Hwang P.P. 2003. *Comparisons of calcium regulation in fish larvae*. J. Exp. Zool. 295A:127-135.

Chou M.Y., Yang C.H., Lu F.I., Lin H.C., Hwang P.P. 2002. *Modulation of calcium balance in tilapia larvae (Oreochromis mossambicus) acclimated to low-calcium environments*. J. Comp. Physiol. [B] 172:109-114.

Chua H. 1998. *Bio-accumulation of environmental residues of rare earth elements in aquatic flora Eichhornia crassipes (Mart.) Solms in Guangdong Province of China*. The Science of the Total Environment, 214:79-85.

Cotton S. A. 1991. *Lanthanides and Actinides*. Oxford Univ. Press, New York, p.26.

Denvir A.M., Tucker S.C., Mullins J.J. 2008. *Systolic and diastolic ventricular function in zebrafish embryos: Influence of norepinephrine, MS-222 and temperature*. BMC Biotechnology, 8:21.

Devlin R.H., Nagahama Y. 2002. *Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences*. Aquaculture, 208:191-364.

Dines J. 2009. *Rare Earth Stocks In Classic Uptrends*. The Bull & Bear Financial Report 32791:1-11.

Dutta S.P.S. 1993. *Food and feeding habits of Danio rerio (Ham. Buch.) inhabiting Gadigarh stream, Jammu*. Journal of Freshwater Biology 5:165-168.

Dziêgielewski J. 1986. *Chemia nieorganiczna, tom III; Chemia metali grup pobocznych*. pp. 238-239, Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego, Katowice (in Polish).

Eddy F.B. 1982. *Osmotic and ionic regulation in captive fish with particular reference to salmonids*. Comp. Biochem. Physiol. 73B: 125-141.

Eddy F.B., Ward M.R., Talbot C., Primmitt D. 1990. *Ionic movement across the chorion in newly shed salmon eggs (Salmo salar L.)*. J. Comp. Physiol. 159B: 771-776.

Eschmeyer W.N. 1998. *The Catalog of Fishes*. San Francisco: California Academy of Sciences.

Evans C.H. 1990. *Biochemistry of the lanthanides*. Biochemistry of the Elements Series, Vol. 8. Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-4317-9.

Fang F. 1997. *Redescription of Danio kakhensis, a poorly known cyprinid fish from the Irrawaddy basin*. Ichthyological Explorations of Freshwaters 7 (4):289-298.

Finney D.J. 1971. *Probitanalysis*. Cambridge: The University Press.

Franklin J.S. 2001. *Lanthanide-mediated DNA hydrolysis*. Bio-inorganic chemistry, Elsevier Science Ltd, 5:201-208.

Garrett J.R., McClure J. 1981. Lanthanide-induced calcergy. J Pathol 135:267-275.

Gersanovski D.P., Colson C.H., Fredericq E. 1985. *Terbium (3+) as a probe of nucleic acids structure. Does it alter the DNA conformation in solution?* Biochim. Biophys. Acta. 824:313-323.

Goldstein S.J., Jacobsen S.B. 1988. *Rare earth elements in river waters*. Earth and Planetary Science Letters, 89:35-47.

Graca J.G., Davison, F.C., Feavel J.B. 1962. *Comparative toxicity of stable rare earth compounds. II. Effect of citrate and edate complexing on acute toxicity in mice and guinea pigs*. Arch. Environ. Health 5:437-444.

Graca J.G., Davison F.C., Feavel J.B. 1964. *Comparative toxicity of stable rare earth compounds. III. Acute toxicity of intravenous injections of chlorides and chelates in dogs*. Arch. Environ. Health 8:555-564.

Giungato P. and Notarnicola B. 2003. *Rare earth elements: Technologies and environmental burdens*. J. Elementol., Vol. 8 (3):199-206.

Glickman S.N., Yelon D. 2002. *Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function*. CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Vol. 13: pp. 507-513.

Gyurcsik B., Nagy L. 2000. *Carbohydrates as ligands: Coordination equilibria and structure of the metal complexes*. Coordination Chemistry Reviews, 203, 81-149.

Haley P.J. 1991. *Pulmonary toxicity of stable and radioactive lanthanides*. Health Physics, 61(6):809-820.

Haley T.J., Komesu N., Colvin G., Koste L., Upham HC. 1965. *Pharmacology and toxicity of europium chloride*. J. Pharmacol. Sci. 54:643-645.

Haley T.J., Koste L., Komesu N., Efros M., Upham H.C. 1966. *Pharmacology and toxicity of dysprosium, holmium, and erbium chlorides*. Toxicol. Appl. Pharmacol 8:37-43.

Haley T.J. 1979. *Toxicity*. In: Schneider KA. Jr, Eyring K.A. (eds). *Handbook on the physics and chemistry of rare earths*. North- Holland, Amsterdam, pp 553-585.

Hamilton F. 1822. *An account of the fishes found in the river Ganges and its branches*. Edinburgh and London: Constable.

Han-Li W., Chan C.Y.P., Chan M.K. 2004. *Metal uptake in zebrafish embryo-larvae exposed to metal-contaminated sediments*. Marine Environmental Research 58:829-832.

Hanneman E., Westerfield M. 1989. *Early expression of acetylcholine-sterase activity in functionally distinct neurons of the zebrafish*. J. Comp. Neurol. 284:350-361.

Haxel B.G., Hedrick B.J., Orris J.G. 2002. *Rare Earth Elements - Critical Resources for High Technology*. USGS Fact Sheet 087-02.

Hedrick B.J. 2004. *RARE EARTHS IN SELECTED U.S. DEFENSE APPLICATIONS*. 40th Forum on the Geology of Industrial Minerals, Bloomington, Indiana.

Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.E. 2005. *Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity*. Toxicol. Sci. 86:6-19.

Hisoaka K.K., Battle H.I. 1958. *The normal developmental stages of the zebrafish, Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan)*. J. Morphol. 102:311-323.

Holden E.N. 2001. *History of the Origin of the Chemical Elements and Their Discoverers*. Brookhaven National Laboratory Upton, New York 11973-5000 USA.

Hong F.S., Wei Z.G., Tao Y., Wang S.K., Yang Y.T., Cao X.D., Zhao G.W. 1999. *Distribution of rare earth elements and structure characterization of chlorophyllanthnaum in a natural plant fern*. Acta Bot. Sinica, Vol. 41(8):851-854.

Hosmer D.W., Lemeshow S. 1999. *Applied Survival Analysis: Regression Modelling of Time to Event Data*. New York: Wiley.

Humphries M. 2010. *Rare Earth Elements: The Global Supply Chain*. CRS Report for Congress, pages 1-14.

Hunt G.R.A., Jones I.C. 1982. *Lanthanide-ion transport across phospholipid vesicular membranes: a comparison of alamethicin 30 and A23187 using ¹H-NMR spectroscopy*. Sci. Rep. 2:921-928.

Ichihashi H., Morita H., Tatsukawa R. 1992. *Rare earth elements (REEs) in naturally grown plants in relation to their variation in soils*. Environmental Pollution, 76:157-162.

Jeziarska B., Ługowska K., Witeska M. 2009. *The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review)*. Fish Physiol. Biochem. 35:625-640.

Ji Y.J., Cui M.Z. 1988. *Toxicological studies on safety of rare earths used in agriculture*. Biomed Environ. Sci. 1:270-276.

- Joshi B.N., Shamoo E.A. 1987. *Binding of Eu^{3+} to cardiac sarcoplasmic reticulum ($Ca^{2+}+Mg^{2+}$)-atpase-laser excited Eu^{3+} spectroscopic studies*. BIOPHYS. J. © Biophysical Society, Volume 51 February, 185-191.
- Kallistratos G., Vezyraki P., Seferiadis K., Evangelou A., Kalfakakou V. 1985. *Fluorescent determination of steroids possessing a semi-quinonoid structure*. FEBS Proc., C, 377-382.
- Keasler K.M., Loveland W.D. 1982. *Rare earth elemental concentrations in some Pacific northwest rivers*. Earth and Planetary Science Letters, 61:68 – 72.
- Kimmel C.B., Law R.D. 1985a. *Cell lineage of zebrafish blastomeres. I. Cleavage pattern and cytoplasmic bridges between cells*. Dev. Biol. 108:78-85.
- Kimmel C.B., Law, R.D. 1985b. *Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk syncytial layer*. Devel. Biol. 108:86-93.
- Kimmel C.B. 1993. *Patterning the brain of the zebrafish embryo*. Ann. Rev. Neurosci. 16:707-732.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel R.S., Ullmann B., Schilling F.T. 1995. *Stages of Embryonic Development of the Zebrafish*. DEVELOPMENTAL DYNAMICS, 203:255-310.
- Kirk O. 1995. *Encyclopedia of Chemical Technology, "Lanthanides"*, Vol.14, 4rth edition 1091, Editor: Mary Howe-Grant.
- Kong Z., Wang Y., Zhang M., Wang X. 1998. *Toxic effects of rare earth element ions on the growth of Tetrahymena pyriformis*. Nanjing Daxue Xuebao, Ziran Kexue, 34(6):752-755.
- Kostial K., Kargacin B., Lendeka M. 1987. *Reduction of ^{141}Ce absorption in suckling rats*. Int. J Radiat Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 51:139-145.

Kostial K., Kargacin B., Landeka M. 1989. *Gut retention of metals in rats*. Biol. Trace Elem. Res. 21:213-218.

Kramsch D.M., Apsen A.J., Apstein C.S. 1980. *Suppression of experimental atherosclerosis by the Ca⁺⁺-antagonist lanthanum*. J. Clin. Invest. 65:967-981.

Kučera J., Mizera J., Řanda Z., Vávrová M. 2007. *Pollution of agricultural crops with lanthanides, thorium and uranium studied by instrumental and radiochemical neutron activation analysis*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Vol. 271(3): 581-587.

Lachine E.E., Noujaim A.A., Ediss C., Wiebe L.I. 1976. *Toxicity, tissue distribution and excretion of ⁴⁶ScCl₃ and ⁴⁶Sc-EDTA in mice*. Int. J. Appl. Radiat Isotopes 27:373-377.

Lee K.W., Webb S.E., Miller A.L. 1999. *A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation*. Dev. Biol. 214:168-180.

Lele Z., Krone P.H. 1996 *The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research*. Biotech. Adv. 14:57-72.

Liu D., Wang Z. 2001. *Influence of rare earth elements on chemical transformation of References 157 nitrogen in agricultural soil*. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, 12(4):545-548.

Lu A., Zhang S., Shan X., Wang S., Wang Z. 2003. *Application of microwave extraction for the evaluation of bioavailability of rare earth elements in soils*. Chemosphere, 53:1067-1075.

Ma J., Narahashi T. 1993. *Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated chloride channel currents by lanthanides in rat dorsal root ganglion neurons*. J. Neurosci. 13, 4872-4879.

Ma Y.Z., Lao X.R., Liu C.S. 1996. *Study of distribution of REEs in peanut treated by seed soaking with REE solution*. Chinese Rare Earths (in Chinese), Vol. 15(5):62-65.

Maack G., Segner H. 2003. *Morphological development of the gonads in zebrafish*. J. Fish Biol. 62:895-906.

McClure M.M., McIntyre P.B., McCune A.R. 2006. *Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish, Danio rerio*. Journal of Fish Biology 69: 553-570.

Metin Ç., Şener M. 2001. *The Effects of Ambient magnesium concentration on the embryonic and prelarval development of Mirror Carp (Cyprinus Carpio L., 1758)*. Archives of Polish Fisheries Vol. 9 Fasc., 1:97-104

Menon A.G.K. 1999. *Check list-fresh water fishes of India*. Rec. Zool. Surv. India. Misc. Publ., Occas. Pap. 175 (366):234-259.

METALL RARE EARTH LIMITED, 2010. (<http://www.metall.com.cn/eu.htm>).

Milos N., Dingle A.D. 1978. *Dynamics of pigment formation in the zebrafish, Brachydanio rerio. I. Establishment and regulation of the lateral line melanophore stripe during the first eight days of development*. J. Exp. Zool. 205:205-216.

Morris E.G. 1980. *The use of lanthanum and cytochalasin B to study calcium effects on skeletal muscle differentiation in vitro*. Journal of Cellular Physiology, v.105, Issue 3, p.431-43.

Morrall F.R. 1990. "A history of the rare earth elements". Canadian Institute of Mining, Metallurgy and Petroleum Engineering BULLETIN, 83: pp. 97-101.

Mundoma C., Greenbaum L.N. 2003. *Binding of Europium (III) Ions to RNA Stem Loops: Role of the Primary Hydration Sphere in Complex Formation*. Biopolymers, Vol. 69, 100-109.

Muscholl E., Racke K., Traut A. 1985. *Gadolinium ions inhibit exocytotic vasopressin release from the rat neurohypophysis*. J. Physiol., 365, 419-434.

Nagel R. 2002. *DarT: The embryo test with the zebrafish Danio rerio - a general model in ecotoxicology and toxicology*. Altex. (Suppl. 1) 19:38-48.

Nakamaru Y., Tagami K., Uchida S. 2006. *Effect of nutrient uptake by plant roots on the fate of REEs in soil*. Journal of Alloys and Compounds, Vol. 408-412 (9):413- 416.

Nemery B. 1990. *Metal toxicity and the respiratory tract*. The European Respiratory Journal, 3(2):202-219.

Ni Y., Hughes M.J., Antony N.M. 1993. *The atomic arrangement of bastnasite-(Ce), Ce(CO₃)F, and structural elements of synchysite-(Ce), rontgenite-(Ce), and parasite-(Ce)*. American Mineralogist, Volume 78, pages 415-418.

Ni Y., Hughes M.J., Antony N.M. 1995. *Crystal chemistry of the monazite and xenotime structures*. American Mineralogist, Volume 80, pages 21-26.

Nozaki Y. 1997. *A fresh look at elemental distribution in the North Pacific Ocean*. EOS Transactions 78:221.

Ogawa Y., Suzuki S., Naito K., Saito M., Kamata E., Hirose A., Ono A., Kaneko T., Chiba M., Inaba Y. 1995. *Toxicity study of europium chloride in rats*. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.14(1):1-9

Ozeki M., Kobayashi Y., Takei M., Shimano Y. 1979. *Inhibition of dental caries by lanthanum [in Japanese]*. Koku Eisei Gakka Zasshi 28:448-454.

Palasz A., Czekaj P. 2000. *Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action*. Acta Biochimica Polonica, Vol. 47 No. 4/2000.

Parichy D.M. 2006a. *Evolution of danio pigment pattern development*. Heredity 97, 200-210.

Parichy D.M. 2006b. *Homology and the evolution of novelty during Danio adult pigment pattern development*. Journal of Experimental Zoology 306B, 1-13.

Pelster B., Burggren W. 1996. *Disruption of hemoglobin oxygen transport does not impact oxygen-dependent physiological processes in developing embryos of Zebrafish (Danio rerio)*. Circulation Research, 79:358-362.

Rabinowitz J.L., Gavarron F.F., Brand J. 1988. *Tissue uptake and intracellular distribution of 140-lanthanum after oral intake by the rat*. J. Toxicol. Environ. Health 24:229-235.

Raymond E.E., Patterson B.L., Rao A.A., Parichy M.D. 2007. *Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field*. ZEBRAFISH 4 (1), 21-40.

Reib J.P. 1973. *La circulation sanguine chez l'embryon de Bruchydanio rerio*. Ann. Embryol. Morphol. 6:43-54.

Reynaldo L., Villafranca J., Horrocks W. 1996. *Investigating the effects of posttranslational adenylation on the metal binding sites of Escherichia coli glutamine synthetase using lanthanide luminescence spectroscopy*. Protein Sci., 5:2532-2544.

Rosoff B., Siegel E., Williams G.L., Spencer H. 1963. *Distribution and excretion of radioactive rare-earth compounds in mice*. Int. J. Appl. Radiat Isotopes 14:129-135.

Sakurai Y. 1982. *Distribution and fate of lanthanum in the tissues of rats administered lanthanum salt solutions by means of swabbing the solution on the teeth and through stomach tube [in Japanese]*. Aichi Gakuin Daigaku Shigakkai Shi 20:1-17.

Salas M., Tuchweber B. 1976. *Prevention by steroids of cerium hepatotoxicity*. Arch. Toxicol. 36:115-125.

Schmantz E. 1964. *Geschlechtsabhängigkeit der Verteilung von Radiocer bei der Ratte*. Strahlentherapie, 123:267-278.

Schroeder H.A., Mitchener M. 1971. *Scandium, chromium (VI), gallium, yttrium, rhodium, palladium, indium in mice: effects on growth and life span*. J. Nutr. 101:1431-1438.

Shinohara A., Chiba M. 1991. *Distribution of terbium and increase in calcium concentrations in organs of mice administered with terbium chloride*. Toxicology 66:93-103.

Sholkovitz E.R., Landing W.M., Lewis B.L. 1994. *Ocean particle chemistry: the fractionation of rare earth elements between suspended particles and seawater*. Geochemica et Cosmochemica Acta 58:1567–1579.

Siegfried R.K., Nüsslein-Volhard C. 2008. *Germ line control of female sex determination in zebrafish*. Developmental Biology 324:277-287.

Sigel A., Sigel H. 2003. *The lanthanides and their interrelations with biosystems*. USA: CRC Press. pp. v. ISBN 0824742451.

Smith A.M. 2010. *Rare Earth Minerals: The Indispensable Resource for Clean Energy Technologies*, presented at Minerals for a Green Society Conference, Washington, DC, by CEO, Molycorp Minerals.

Sneller F.E.C., Kalf D.F., Weltje L., van Wezel A.P. 2000. *Maximum permissible concentrations for negligible concentrations for rare earth elements (REEs)*. RIVM (National Institute of Public Health and the environment) report 601501011.

Snyder F., Cress E.A., Kyker G.C. 1959. *Liver lipid response to intravenous rare earths in rats*. J. LipidRes. 1:125-131.

Solnica-Krezel L., Driever W. 1994. *Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly*. Development 120:2443-2455.

Spence R., Fatema M.K., Reichard M., Huq K.A., Wahab M.A., Ahmed Z.F., Smith C. 2007a. *The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh*. Journal of Fish Biology 69, 1435-1448.

Stouthart A., Spanings F., Lock R. 1994. *Effects of low water pH on lead toxicity to early life stages the common carp (Cyprinus carpio)*. Aquat. Toxicol. 30:137-151.

Strubelt O., Siegers C.P., Younes M. 1980. *The influence of silybin on the hepatotoxic and hypoglycemic effects of praseodymium and other lanthanides*. Arzneim-Forsch 30(II):1690-1694.

Sturza C.M., Boscencu R., Nacea V. 2008. *The lanthanides: physico-chemical properties relevant for their biomedical applications*. FARMACIA, Vol. LVI, 3.

Sudhindra N.M, Gagnani M.A, Devi I.M., Shukla R.S. 2004. *Biological and Clinical Aspects of Lanthanide Coordination Compounds*. Bioinorganic Chemistry and Application, 3-4:155-192.

Suzuki Y., Suzuki T., Furuta N. 2010. *Determination of Rare Earth Elements (REEs) in Airborne Particulate Matter (APM) Collected in Tokyo, Japan, and a Positive Anomaly of Europium and Terbium*. ANALYTICAL SCIENCES VOL. 26:929-935.

Swamy V.C., Triggle C.R., Triggle D.J. 1976. *The effects of lanthanum and thulium on the mechanical responses of vas deferens*. J. Physiol. 254:55-62.

Talwar P.K., Jhingran, A.G. 1991. *Inland Fishes of India and Adjacent Countries*. A.A. Balkema, Rotterdam. 1158 pp.

Taylor S.R. and McLennan S.M. 1985. *The Continental Crust: Its Composition and Evolution*. Oxford: Blackwell.

Triggle C.R., Triggle D.J. 1976. *An analysis of the action of cations of the lanthanide series on the mechanical responses of guinea pig ileal longitudinal muscle*. J. Physiol 254:39-54.

Tsuruta T. 2007. *Accumulation of rare earth elements in various microorganisms*. Journal of Rare Earths, Vol. 25 (5):526-532.

Tu Q., Wang X.R. 1994. *Bioaccumulation of the rare earth elements lanthanum, gadolinium and yttrium in carp*. Environmental Pollution, Vol. 85:345-350.

U. F. Fachschaft Chemie. 2005. *Lanthanoide*. World Wide Web, http://www.fschemie.uni-freiburg.de/files/acII_kersting_kap07.pdf.

van den Hurk R., Schoonen W.G., van Zoelen G.A., Lambert J.G. 1987. *The biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish, Brachydanio rerio, and their pheromonal function as ovulation inducers*. Gen. Comp. Endocrinol. 68:179–188.

Venugopal B., Luckey T.D. 1978. *Metal toxicity in mammals. Vol. 2. Chemical toxicity of metals and metalloids*. New York,; Plenum Press, p.101.

Vogel M.A., Weinstein M.B. 2000. *Studying Vascular Development in the Zebrafish*. Trends Cardiovasc. Med., V10:352–360.

von Hofsten J., Olsson P.E. 2005. *Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes*. Reproductive Biology and Endocrinology, 3:63.

Wadkins T., Benz J., Briner W. 1998. *The effect of lanthanum administration during neural tube formation on the emergence of swimming behavior*. Metal Ions Biol. Med. 5, 168-171.

Wang Y., Zhang M., Wang X. 2000c. *Population growth responses of Tetrahymena shanghaiensis in exposure of REE*. Biological Trace Element Research, 75(1-3):265-275.

Westerfield M. 2000. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 4th edn. Eugene: University of Oregon Press.

Wieser W., Forstner H., Medgyesy N., Hinterleitner S. 1988. *To Switch or Not to Switch: Partitioning of Energy between Growth and Activity in Larval Cyprinids (Cyprinidae: Teleostei)*. *Functional Ecology*, Vol. 2, No. 4, pp. 499-507.

Wytttenbach A., Schleppe P., Bucher J., Furrer V., Tobler L. 1994. *The accumulation of the Rare Earth Elements and of Scandium in successive Needle Age classes of Norway Spruce*. *Biological Trace Element Research*, 41:13-29, 1994.

Xu D., Guangshen L., Jie X., Weiping L. 2004. *Effects of lanthanum and cerium on acid phosphatase activities in two soils*. *Journal of Rare Earths*, Vol. 22(5):725 – 728.

Yusof A.M., Gill S.K., Salleh S., Akyil S., Hamzah S., Rahman S.A., Wood A.K.H. 2001. *The Use of Neutron Activation Analysis in Environmental Pollution Studies*. In *JAERI-Conf. 2001-017; Proceedings of the 2000 Workshop on the Utilization of Research Reactors*, 20. - 24. November 2001, Taejon, Korea.

Zhang S., Shan X. 2001. *Speciation of rare earth elements in soil and accumulation by wheat with rare earth fertilizer application*. *Environmental Pollution*, Vol. 112:395-405.

Zheng Y.Z., Chu B.J. 1987. *Distribution and state of Ce in seedling of rubber*. In: *application of Isotope Technologies in Agriculture (in Chinese)*. Zhengjiang Agricultural University, (Eds.) Zhengjiang Agricultural University Press: Zhengjiang:57-60.

Zhu J.G., Chu H.Y., Xie Z.B., Yagi K. 2002. *Effects of lanthanum on nitrification and ammonification in three Chinese soils*. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, Vol. 63:309-314.

Zhu X.J., Jiang F.L., Poon C.T., Wong W.K., Wong W.Y. 2008. *Synthesis, Structure and Spectroscopic Properties of Lanthanide Complexes of N-Confused Porphyrins*. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2008, 3151–3162.

Zhu J.G., Chu H.Y., Xie Z.B., Yagi K. 2002. *Effects of lanthanum on nitrification and ammonification in three Chinese soils*. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, Vol. 63: 309-314.

Zimakov Y.A. 1973. *Mater Povolzh Konf Fisol Uachstiem Biokhim Farmakol Morfol*, 2(6):28.

Ελληνική βιβλιογραφία

Καραγιαννίδης Π. 2006. *Ειδική Ανόργανη Χημεία: Τα χημικά στοιχεία και ενώσεις*. Γ' ΕΚΔΟΣΗ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ

Σδούκος Α.Θ., Πομώνης Φ.Ι. 2010. *Χημικές διεργασίες της χημικής τεχνολογίας*. 1η έκδοση, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΤΖΙΟΛΑ.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π1. Μορφομετρικές αποστάσεις σώματος εμβρύων *D. rerio* σε δείγματα ελέγχου.

control											
aa	TL	StL	D1 (EYE)	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
2	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
3	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
4	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
5	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
6	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
7	3,388	3,246	0,270	0,344	1,752	1,293	0,104	2,840	1,783	0,766	0,563
8	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
9	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
10	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
11	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
12	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
13	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,097	2,590	1,663	0,692	0,525
14	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
15	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
16	3,277	3,139	0,261	0,333	1,694	1,250	0,100	2,747	1,724	0,741	0,545
17	3,401	3,258	0,271	0,345	1,759	1,297	0,104	2,850	1,790	0,769	0,565
18	3,300	3,161	0,263	0,335	1,706	1,259	0,101	2,766	1,737	0,746	0,548
19	3,286	3,148	0,262	0,334	1,699	1,254	0,100	2,754	1,729	0,743	0,546
20	3,388	3,246	0,270	0,344	1,752	1,293	0,104	2,840	1,783	0,766	0,563
21	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
22	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
23	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526
24	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
25	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
26	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
27	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
28	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
29	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
30	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
31	3,284	3,146	0,256	0,324	1,651	1,218	0,098	2,692	1,680	0,725	0,531
32	3,286	3,148	0,257	0,324	1,652	1,219	0,098	2,693	1,681	0,725	0,531
33	3,198	3,064	0,255	0,325	1,654	1,220	0,098	2,680	1,683	0,723	0,531
34	3,334	3,194	0,266	0,339	1,724	1,272	0,102	2,794	1,754	0,754	0,554
35	3,277	3,139	0,261	0,333	1,694	1,250	0,100	2,747	1,724	0,741	0,545
36	3,401	3,258	0,271	0,345	1,759	1,297	0,104	2,850	1,790	0,769	0,565
37	3,300	3,161	0,263	0,335	1,706	1,259	0,101	2,766	1,737	0,746	0,548
38	3,286	3,148	0,262	0,334	1,699	1,254	0,100	2,754	1,729	0,743	0,546
39	3,388	3,246	0,270	0,344	1,752	1,293	0,104	2,840	1,783	0,766	0,563
40	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531

Πίνακας Π2. Μορφομετρικές αποστάσεις σώματος εμβρύων *D. rerio* που έχουν εκτεθεί για 72 h σε 5 ppm Eu.

5 ppm											
aa	TL	StL	D1 (EYE)	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	3,388	3,247	0,270	0,331	1,752	1,293	0,103	2,840	1,783	0,766	0,563
2	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
3	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
4	3,300	3,161	0,256	0,326	1,661	1,224	0,098	2,689	1,730	0,725	0,533
5	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
6	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,093	2,652	1,664	0,715	0,526
7	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
8	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
9	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,097	2,590	1,663	0,692	0,525
10	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
11	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
12	3,289	3,151	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,680	1,683	0,723	0,531
13	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
14	3,388	3,246	0,270	0,344	1,752	1,293	0,104	2,840	1,783	0,766	0,563
15	3,401	3,258	0,271	0,345	1,759	1,297	0,104	2,850	1,790	0,769	0,565
16	3,300	3,161	0,263	0,335	1,706	1,259	0,101	2,766	1,737	0,746	0,548
17	3,286	3,148	0,262	0,334	1,699	1,254	0,100	2,754	1,729	0,743	0,546
18	3,388	3,246	0,270	0,344	1,752	1,293	0,104	2,840	1,783	0,766	0,563
19	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
20	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
21	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526
22	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
23	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
24	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
25	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
26	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
27	3,300	3,161	0,256	0,326	1,661	1,224	0,098	2,689	1,730	0,725	0,533
28	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
29	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,093	2,652	1,664	0,715	0,526
30	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
31	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
32	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
33	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
34	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
35	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
36	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526
37	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
38	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
39	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
40	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531

Πίνακας Π3. Μορφομετρικές αποστάσεις σώματος εμβρύων *D. rerio* που έχουν εκτεθεί για 72 h σε 50 ppm Eu.

50 ppm											
aa	TL	StL	D1 (EYE)	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	3,252	3,115	0,252	0,321	1,634	1,206	0,097	2,648	1,663	0,714	0,525
2	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526
3	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
4	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
5	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
6	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
7	3,300	3,161	0,256	0,326	1,661	1,224	0,098	2,689	1,730	0,725	0,533
8	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
9	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,093	2,652	1,664	0,715	0,526
10	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
11	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
12	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
13	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,097	2,590	1,663	0,692	0,525
14	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
15	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
16	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
17	3,300	3,161	0,256	0,326	1,661	1,224	0,098	2,689	1,730	0,725	0,533
18	3,277	3,139	0,261	0,333	1,694	1,250	0,100	2,747	1,724	0,7407	0,545
19	3,401	3,258	0,271	0,345	1,759	1,297	0,104	2,850	1,790	0,7687	0,565
20	3,300	3,161	0,263	0,335	1,706	1,259	0,101	2,766	1,737	0,7459	0,548
21	3,286	3,148	0,262	0,334	1,699	1,254	0,100	2,754	1,729	0,7428	0,546
22	3,388	3,246	0,270	0,344	1,752	1,293	0,104	2,840	1,783	0,7658	0,563
23	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
24	3,288	3,150	0,257	0,325	1,666	1,231	0,099	2,702	1,700	0,729	0,536
25	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,097	2,590	1,663	0,692	0,525
26	3,401	3,258	0,271	0,345	1,759	1,297	0,104	2,850	1,790	0,769	0,565
27	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
28	3,286	3,148	0,256	0,324	1,661	1,227	0,098	2,693	1,696	0,726	0,534
29	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,093	2,590	1,663	0,692	0,525
30	3,401	3,258	0,271	0,345	1,759	1,297	0,104	2,850	1,790	0,769	0,565
31	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
32	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
33	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
34	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
35	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
36	3,198	3,064	0,255	0,325	1,654	1,220	0,098	2,680	1,683	0,723	0,531
37	3,334	3,194	0,266	0,339	1,724	1,272	0,102	2,794	1,754	0,754	0,554
38	3,277	3,139	0,261	0,333	1,694	1,250	0,100	2,747	1,724	0,741	0,545
39	3,401	3,258	0,271	0,345	1,759	1,297	0,104	2,850	1,790	0,769	0,565
40	3,300	3,161	0,263	0,335	1,706	1,259	0,101	2,766	1,737	0,746	0,548

Πίνακας Π4. Μορφομετρικές αποστάσεις σώματος εμβρύων *D. rerio* που έχουν εκτεθεί για 72 h σε 100 ppm Eu.

100 ppm											
aa	TL	StL	D1 (EYE)	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
2	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
3	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
4	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
5	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
6	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
7	3,388	3,246	0,270	0,344	1,752	1,293	0,104	2,840	1,783	0,766	0,563
8	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
9	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
10	3,256	3,119	0,252	0,319	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
11	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
12	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
13	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,097	2,590	1,663	0,692	0,525
14	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
15	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
16	3,277	3,139	0,261	0,330	1,694	1,250	0,100	2,747	1,724	0,741	0,545
17	3,401	3,258	0,271	0,345	1,759	1,297	0,104	2,850	1,790	0,769	0,565
18	3,300	3,161	0,263	0,335	1,706	1,259	0,101	2,766	1,737	0,746	0,548
19	3,286	3,148	0,262	0,334	1,699	1,254	0,100	2,754	1,729	0,743	0,546
20	3,388	3,246	0,270	0,344	1,752	1,293	0,104	2,840	1,783	0,766	0,563
21	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
22	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
23	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526
24	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
25	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
26	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
27	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
28	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
29	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
30	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
31	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
32	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
33	3,198	3,064	0,255	0,325	1,654	1,220	0,098	2,680	1,683	0,723	0,531
34	3,334	3,194	0,266	0,339	1,724	1,272	0,102	2,794	1,754	0,754	0,554
35	3,277	3,139	0,261	0,333	1,694	1,250	0,100	2,747	1,724	0,741	0,545
36	3,401	3,258	0,271	0,345	1,759	1,297	0,104	2,850	1,790	0,769	0,565
37	3,300	3,161	0,263	0,335	1,706	1,259	0,101	2,766	1,737	0,746	0,548
38	3,286	3,148	0,262	0,328	1,699	1,254	0,100	2,754	1,729	0,743	0,546
39	3,252	3,115	0,252	0,319	1,634	1,206	0,097	2,648	1,663	0,714	0,525
40	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526

Πίνακας Π5. Μορφομετρικές αποστάσεις σώματος εμβρύων *D. rerio* που έχουν εκτεθεί για 72 h σε 320 ppm Eu.

320 ppm											
aa	TL	StL	D1 (EYE)	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
1	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526
2	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
3	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
4	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
5	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
6	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
7	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,097	2,590	1,663	0,692	0,525
8	3,288	3,150	0,258	0,321	1,666	1,233	0,099	2,703	1,705	0,728	0,537
9	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,093	2,590	1,663	0,692	0,525
10	3,345	3,204	0,266	0,340	1,730	1,276	0,102	2,804	1,760	0,756	0,556
11	3,286	3,148	0,254	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,681	0,722	0,531
12	3,252	3,115	0,252	0,321	1,634	1,206	0,097	2,648	1,663	0,714	0,525
13	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526
14	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
15	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
16	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
17	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
18	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,097	2,590	1,663	0,692	0,525
19	3,288	3,150	0,258	0,321	1,666	1,233	0,099	2,703	1,705	0,728	0,537
20	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,093	2,590	1,663	0,692	0,525
21	3,300	3,161	0,263	0,335	1,706	1,259	0,101	2,766	1,737	0,746	0,548
22	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,093	2,590	1,663	0,692	0,525
23	3,345	3,204	0,266	0,340	1,730	1,276	0,102	2,804	1,760	0,756	0,556
24	3,252	3,115	0,252	0,321	1,634	1,206	0,097	2,648	1,663	0,714	0,525
25	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526
26	3,277	3,139	0,254	0,323	1,647	1,215	0,097	2,669	1,676	0,720	0,529
27	3,256	3,119	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,652	1,665	0,715	0,526
28	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
29	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
30	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,097	2,590	1,663	0,692	0,525
31	3,288	3,150	0,255	0,325	1,653	1,220	0,098	2,679	1,682	0,723	0,531
32	3,287	3,149	0,255	0,325	1,652	1,219	0,098	2,678	1,682	0,722	0,531
33	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526
34	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,097	2,590	1,663	0,692	0,525
35	3,198	3,064	0,252	0,235	1,567	1,206	0,093	2,590	1,663	0,692	0,525
36	3,345	3,204	0,266	0,340	1,730	1,276	0,102	2,804	1,760	0,756	0,556
37	3,286	3,148	0,254	0,324	1,651	1,218	0,098	2,676	1,680	0,722	0,531
38	3,284	3,146	0,257	0,321	1,660	1,229	0,101	2,692	1,718	0,725	0,535
39	3,286	3,148	0,258	0,325	1,652	1,219	0,097	2,678	1,681	0,722	0,531
40	3,255	3,118	0,252	0,321	1,636	1,207	0,097	2,651	1,664	0,715	0,526

Πίνακας Π6. Εμβαδά ανατομικών περιοχών σώματος εμβρύων *D. rerio* σε δείγματα ελέγχου.

control								
aa	ΜΑΤΙ	ΛΕΚΙΘΟΣ	P-ΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΝΩΤΟΧΟΡΑΗ	ΩΤΙΚΗ ΚΑΨΑ	ΩΤΟΛΙΘΟΣ	ΣΩΜΑ
1	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
2	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
3	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
4	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
5	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
6	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
7	0,0459	0,3760	0,283	0,027	0,142	0,0117	0,000436	0,713
8	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
9	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
10	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
11	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
12	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
13	0,0428	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
14	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
15	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
16	0,0444	0,3636	0,274	0,026	0,137	0,0113	0,000421	0,689
17	0,0461	0,3774	0,284	0,027	0,142	0,0118	0,000437	0,715
18	0,0447	0,3662	0,276	0,026	0,138	0,0114	0,000424	0,694
19	0,0445	0,3647	0,275	0,026	0,138	0,0114	0,000423	0,691
20	0,0459	0,3760	0,283	0,027	0,142	0,0117	0,000436	0,713
21	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
22	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
23	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
24	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
25	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
26	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
27	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
28	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
29	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
30	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
31	0,0433	0,354	0,267	0,025	0,1337	0,0110	0,0000411	0,744
32	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,1337	0,0110	0,0000411	0,745
33	0,0433	0,3549	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,673
34	0,0452	0,3700	0,279	0,027	0,140	0,0115	0,000429	0,701
35	0,0444	0,3636	0,274	0,026	0,137	0,0113	0,000421	0,689
36	0,0461	0,3774	0,284	0,027	0,142	0,0118	0,000437	0,715
37	0,0447	0,3662	0,276	0,026	0,138	0,0114	0,000424	0,694
38	0,0445	0,3647	0,275	0,026	0,138	0,0114	0,000423	0,691
39	0,0459	0,3760	0,283	0,027	0,142	0,0117	0,000436	0,713
40	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672

Πίνακας Π7. Εμβαδά ανατομικών περιοχών σώματος εμβρύων *D. rerio* που έχουν εκτεθεί για 72 h σε 5 ppm Eu.

5 ppm								
aa	ΜΑΤΙ	ΔΕΚΙΘΟΣ	Ρ-ΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΝΩΤΟΧΟΡΔΗ	ΩΤΙΚΗ ΚΑΨΑ	ΩΤΟΛΙΘΟΣ	ΣΩΜΑ
1	0,0459	0,3760	0,283	0,027	0,142	0,0117	0,000436	0,713
2	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
3	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
4	0,0435	0,3560	0,268	0,026	0,135	0,0111	0,000413	0,678
5	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
6	0,0428	0,3511	0,262	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
7	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
8	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
9	0,0428	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
10	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
11	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
12	0,0433	0,3548	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,673
13	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
14	0,0459	0,3760	0,283	0,027	0,142	0,0117	0,000436	0,713
15	0,0461	0,3774	0,284	0,027	0,142	0,0118	0,000437	0,715
16	0,0447	0,3662	0,276	0,026	0,138	0,0114	0,000424	0,694
17	0,0445	0,3647	0,275	0,026	0,138	0,0114	0,000423	0,691
18	0,0459	0,3760	0,283	0,027	0,142	0,0117	0,000436	0,713
19	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
20	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
21	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
22	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
23	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
24	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
25	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
26	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
27	0,0435	0,3560	0,268	0,026	0,135	0,0111	0,000413	0,678
28	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
29	0,0428	0,3511	0,262	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
30	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
31	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
32	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
33	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
34	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
35	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
36	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
37	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
38	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
39	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
40	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672

Πίνακας Π8. Εμβαδά ανατομικών περιοχών σώματος εμβρύων *D. rerio* που έχουν εκτεθεί για 72 h σε 50 ppm Eu.

50 ppm								
aa	ΜΑΤΙ	ΛΕΚΙΘΟΣ	Ρ-ΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΝΩΤΟΧΟΡΔΗ	ΩΤΙΚΗ ΚΑΨΑ	ΩΤΟΛΙΘΟΣ	ΣΩΜΑ
1	0,0428	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000406	0,665
2	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
3	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
4	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
5	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
6	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
7	0,0435	0,3560	0,268	0,026	0,135	0,0111	0,000413	0,678
8	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
9	0,0428	0,3511	0,262	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
10	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
11	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
12	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
13	0,0428	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
14	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
15	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
16	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
17	0,0435	0,3560	0,268	0,026	0,135	0,0111	0,000413	0,678
18	0,0440	0,364	0,274	0,026	0,137	0,0111	0,000421	0,689
19	0,0460	0,377	0,284	0,027	0,142	0,0120	0,000437	0,715
20	0,0450	0,366	0,276	0,026	0,138	0,0110	0,000424	0,694
21	0,0450	0,365	0,275	0,026	0,138	0,0110	0,000422	0,691
22	0,0460	0,376	0,283	0,027	0,142	0,0120	0,000435	0,713
23	0,0430	0,355	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
24	0,0440	0,358	0,270	0,026	0,135	0,0110	0,000411	0,677
25	0,0430	0,351	0,264	0,025	0,132	0,0110	0,000273	0,616
26	0,0460	0,377	0,284	0,027	0,142	0,0140	0,000437	0,715
27	0,0430	0,355	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000410	0,672
28	0,0440	0,357	0,269	0,026	0,135	0,0110	0,000409	0,675
29	0,0430	0,351	0,262	0,025	0,132	0,0110	0,000273	0,616
30	0,0460	0,377	0,284	0,027	0,142	0,0140	0,000437	0,715
31	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
32	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
33	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
34	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
35	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
36	0,0433	0,3549	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,673
37	0,0452	0,3700	0,279	0,027	0,140	0,0115	0,000429	0,701
38	0,0444	0,3636	0,274	0,026	0,137	0,0113	0,000421	0,689
39	0,0461	0,3774	0,284	0,027	0,142	0,0118	0,000437	0,715
40	0,0447	0,3662	0,276	0,026	0,138	0,0114	0,000424	0,694

Πίνακας Π9. Εμβαδά ανατομικών περιοχών σώματος εμβρύων *D. rerio* που έχουν εκτεθεί για 72 h σε 100 ppm Eu.

100 ppm								
aa	ΜΑΤΙ	ΔΕΚΙΘΟΣ	Ρ-ΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΝΩΤΟΧΟΡΔΗ	ΩΤΙΚΗ ΚΑΨΑ	ΩΤΟΛΙΘΟΣ	ΣΩΜΑ
1	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
2	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
3	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
4	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
5	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
6	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
7	0,0459	0,3760	0,283	0,027	0,142	0,0117	0,000436	0,713
8	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
9	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
10	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
11	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
12	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
13	0,0428	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
14	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
15	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
16	0,0444	0,3636	0,274	0,026	0,137	0,0113	0,000421	0,689
17	0,0461	0,3774	0,284	0,027	0,142	0,0118	0,000437	0,715
18	0,0447	0,3662	0,276	0,026	0,138	0,0114	0,000424	0,694
19	0,0445	0,3647	0,275	0,026	0,138	0,0114	0,000423	0,691
20	0,0459	0,3760	0,283	0,027	0,142	0,0117	0,000436	0,713
21	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
22	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
23	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
24	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
25	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
26	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
27	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
28	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
29	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
30	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
31	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
32	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
33	0,0433	0,3549	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,673
34	0,0452	0,3700	0,279	0,027	0,140	0,0115	0,000429	0,701
35	0,0444	0,3636	0,274	0,026	0,137	0,0113	0,000421	0,689
36	0,0461	0,3774	0,284	0,027	0,142	0,0118	0,000437	0,715
37	0,0447	0,3662	0,276	0,026	0,138	0,0114	0,000424	0,694
38	0,0445	0,3647	0,275	0,026	0,138	0,0114	0,000423	0,691
39	0,0428	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000406	0,665
40	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665

Πίνακας Π10. Εμβαδά ανατομικών περιοχών σώματος εμβρύων *D. rerio* που έχουν εκτεθεί για 72 h σε 320 ppm Eu.

320 ppm								
aa	ΜΑΤΙ	ΛΕΚΙΘΟΣ	Ρ-ΟΥ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΚΟΙΛΙΑΚΟ ΠΤΕΡΥΓΙΟ	ΝΩΤΟΧΟΡΑΗ	ΩΤΙΚΗ ΚΑΨΑ	ΩΤΟΛΙΘΟΣ	ΣΩΜΑ
1	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
2	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
3	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
4	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
5	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
6	0,0440	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
7	0,0430	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
8	0,0440	0,3586	0,270	0,026	0,135	0,0115	0,000405	0,676
9	0,0430	0,3507	0,262	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
10	0,0450	0,3712	0,280	0,027	0,140	0,0116	0,000430	0,704
11	0,0430	0,3545	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
12	0,0430	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000406	0,665
13	0,0431	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
14	0,0432	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
15	0,0434	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
16	0,0444	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
17	0,0447	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
18	0,0435	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
19	0,0446	0,3586	0,270	0,026	0,135	0,0115	0,000405	0,676
20	0,0428	0,3507	0,262	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
21	0,0447	0,3662	0,276	0,026	0,138	0,0114	0,000424	0,694
22	0,0428	0,3507	0,262	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
23	0,0453	0,3712	0,280	0,027	0,140	0,0116	0,000430	0,704
24	0,0428	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000406	0,665
25	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
26	0,0431	0,3534	0,266	0,025	0,133	0,0110	0,000409	0,670
27	0,0429	0,3511	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
28	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
29	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
30	0,0428	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
31	0,0433	0,3547	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
32	0,0433	0,3546	0,267	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
33	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665
34	0,0428	0,3507	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
35	0,0428	0,3507	0,262	0,025	0,132	0,0109	0,000273	0,616
36	0,0453	0,3712	0,280	0,027	0,140	0,0116	0,000430	0,704
37	0,0433	0,3543	0,267	0,025	0,134	0,0110	0,000411	0,672
38	0,0436	0,3568	0,269	0,026	0,136	0,0136	0,000409	0,674
39	0,0432	0,3545	0,266	0,026	0,134	0,0110	0,000411	0,672
40	0,0429	0,3510	0,264	0,025	0,132	0,0109	0,000407	0,665

Πίνακας Π11. Καρδιακοί παλμοί (bpm) στις 48hpf των εμβρύων *D. rerio* της ομάδας ελέγχου (control) και εκείνων που έχουν εκτεθεί για 72 h σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu (ppm).

aa	control	0,05 ppm	0,5 ppm	5,0 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	320 ppm
1	150	144	130	120	120	120	100	80
2	150	144	130	120	120	120	100	110
3	140	144	130	120	120	120	115	96
4	140	140	140	137	120	120	115	96
5	150	144	130	137	120	120	115	100
6	150	144	130	137	120	120	115	100
7	150	144	130	137	120	120	115	100
8	140	144	140	137	120	115	115	100
9	140	137	130	137	120	120	115	100
10	140	140	130	137	120	120	100	90
11	144	140	130	130	120	120	100	110
12	144	144	130	130	115	115	100	110
13	144	144	137	137	130	120	100	110
14	150	144	137	130	130	120	100	110
15	150	144	137	130	130	120	100	110
16	150	144	137	130	130	120	100	110
17	140	140	140	130	130	120	100	110
18	150	140	140	130	130	120	100	100
19	150	140	140	130	120	115	100	100
20	140	144	140	130	120	115	115	100
21	140	144	140	130	115	115	115	100
22	140	144	137	137	120	120	115	100
23	140	144	137	137	120	120	115	110
24	140	144	137	137	120	115	115	100
25	150	140	137	130	120	120	115	100
26	144	140	137	130	120	120	115	100
27	144	140	140	130	120	115	115	100
28	140	140	130	130	120	120	115	110
29	150	140	130	120	120	120	115	100
30	140	140	140	120	120	120	115	100
31	150	140	140	120	120	120	115	100
32	140	144	140	120	130	115	115	96
33	140	144	140	130	130	120	100	96
34	140	144	140	130	130	120	115	100
35	150	144	140	130	130	120	100	100
36	140	144	140	130	120	120	100	100
37	140	144	140	130	115	115	115	100
38	140	140	140	130	120	115	115	110
39	140	140	140	130	130	120	115	110
40	140	140	140	120	130	120	115	110

Πίνακας Π12. Καρδιακοί παλμοί (bpm) στις 72 hpf των εμβρύων *D. rerio* της ομάδας ελέγχου (control) και εκείνων που έχουν εκτεθεί για 72 h σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu (ppm).

aa	control	0,05 ppm	0,5 ppm	5,0 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	320 ppm
1	180	170	160	150	150	137	129	120
2	170	170	160	150	150	137	129	103
3	180	170	160	150	150	137	129	120
4	180	170	160	150	150	137	120	120
5	180	160	160	150	150	137	120	111
6	180	160	160	160	150	140	120	120
7	170	170	160	150	150	140	129	103
8	170	170	170	150	150	137	120	120
9	180	170	170	160	150	137	120	120
10	180	170	170	160	150	137	120	120
11	180	180	170	150	150	137	120	120
12	180	170	170	150	150	140	120	120
13	180	170	170	150	129	140	120	120
14	170	170	160	150	129	120	120	120
15	180	180	170	150	129	130	120	120
16	170	180	150	150	129	140	129	103
17	180	160	150	140	137	140	129	120
18	170	170	170	150	137	120	129	120
19	170	170	170	150	137	140	120	120
20	180	170	170	150	137	129	120	120
21	170	170	170	150	140	129	111	111
22	180	170	170	150	140	129	129	103
23	168	170	170	150	140	129	129	103
24	180	170	160	137	129	129	129	111
25	180	180	160	140	129	129	120	103
26	170	170	150	150	140	140	120	120
27	180	170	170	150	140	140	120	120
28	170	170	170	150	150	140	120	120
29	180	170	170	160	150	140	120	120
30	170	170	170	160	150	140	129	120
31	180	170	170	150	150	140	129	120
32	170	180	170	150	129	129	129	120
33	180	180	170	150	129	137	129	120
34	170	180	170	160	150	129	120	120
35	180	180	170	160	150	129	120	120
36	168	180	160	160	137	129	120	129
37	180	170	160	160	137	129	129	129
38	180	180	170	160	140	129	129	120
39	180	180	170	150	140	129	129	120
40	170	170	150	150	140	129	129	103

Πίνακας Π13. Καρδιακοί παλμοί (bpm) στις 48 hpf των εμβρύων *D. rerio* της ομάδας ελέγχου (control) και εκείνων που έχουν εκτεθεί για 10 h σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu (ppm).

aa	control	200 ppm	320 ppm	400 ppm	500 ppm
1	150	115	120	115	100
2	144	120	115	115	100
3	150	137	115	100	100
4	150	130	120	115	110
5	140	130	120	100	80
6	140	137	120	115	100
7	150	120	120	120	100
8	140	120	115	115	100
9	140	137	120	115	110
10	150	120	115	115	100
11	150	137	120	115	100
12	144	137	115	120	100
13	144	120	120	120	110
14	150	120	120	115	110
15	150	137	115	115	110
16	150	120	115	100	110
17	140	120	115	115	110
18	150	120	120	100	100
19	150	120	120	100	100
20	150	120	115	115	110
21	150	115	115	115	90
22	140	120	120	100	96
23	140	120	115	100	96
24	140	120	120	115	100
25	150	137	120	115	100
26	144	120	115	115	100
27	144	115	115	115	100
28	140	120	115	115	110
29	150	120	115	115	110
30	144	130	120	115	110
31	144	115	120	100	110
32	140	120	120	100	110
33	140	120	115	100	96
34	140	120	115	100	100
35	150	120	115	120	100
36	144	120	120	100	100
37	144	137	120	100	100
38	150	137	120	100	110
39	150	120	115	115	110
40	150	120	120	120	110

Πίνακας Π14. Καρδιακοί παλμοί (bpm) στις 72 hpf των εμβρύων *D. rerio* της ομάδας ελέγχου (control) και εκείνων που έχουν εκτεθεί για 10 h σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Eu (ppm).

aa	control	200 ppm	320 ppm	400 ppm	500 ppm
<i>1</i>	170	129	129	120	103
<i>2</i>	180	137	137	120	111
<i>3</i>	180	129	129	120	111
<i>4</i>	170	140	137	120	103
<i>5</i>	180	140	140	120	120
<i>6</i>	170	140	129	120	103
<i>7</i>	180	129	137	111	120
<i>8</i>	180	129	137	120	111
<i>9</i>	180	140	137	129	120
<i>10</i>	180	140	129	120	111
<i>11</i>	180	129	140	120	120
<i>12</i>	180	129	140	120	120
<i>13</i>	180	150	120	129	103
<i>14</i>	170	150	130	111	111
<i>15</i>	180	140	140	120	111
<i>16</i>	170	129	140	129	120
<i>17</i>	180	137	129	129	111
<i>18</i>	170	129	129	111	103
<i>19</i>	170	150	129	120	103
<i>20</i>	180	129	129	120	103
<i>21</i>	170	150	137	111	120
<i>22</i>	180	129	129	129	103
<i>23</i>	180	129	129	129	120
<i>24</i>	180	129	129	129	120
<i>25</i>	180	150	129	120	103
<i>26</i>	180	150	129	129	120
<i>27</i>	180	150	140	120	111
<i>28</i>	180	129	129	120	120
<i>29</i>	170	150	140	129	120
<i>30</i>	180	129	140	120	120
<i>31</i>	180	129	140	129	120
<i>32</i>	180	129	140	120	120
<i>33</i>	180	129	129	129	120
<i>34</i>	180	150	137	120	103
<i>35</i>	180	129	129	129	120
<i>36</i>	170	140	129	120	120
<i>37</i>	180	140	129	129	103
<i>38</i>	180	140	120	120	120
<i>39</i>	180	129	140	111	120
<i>40</i>	180	140	129	111	129

