



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ



Διδρυματικό Πρόγραμμα
Μεταπτυχιακών Σπουδών



Μακροχρόνιες υποθνησιγόνες επιδράσεις του κυανοφύκου
Microcystis aeruginosa στη δομή και λειτουργία του zebrafish,
Danio rerio (Hamilton 1822)

Εμμανολία Σέργη

Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης



Μακροχρόνιες υποθνησιγόνες επιδράσεις του κυανοφύκου *Microcystis aeruginosa* στη δομή και λειτουργία του zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton 1822)



Επιβλέπων Καθηγητής

Κουμουندούρος Γεώργιος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καρακάσης Ιωάννης (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Κουμουندούρος Γεώργιος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Σωμαράκης Στυλιανός (Διευθυντής Ερευνών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

Πρόλογος

Η διατριβή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Περιβαλλοντική Βιολογία». Όλες οι πειραματικές διαδικασίες που απαιτούνταν για τη διεκπεραίωσή της πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Θαλάσσιας Βιολογίας - Βιολογίας Ιχθύων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπον καθηγητή μου Γεώργιο Κουμουνδούρο για τη συμβουλευτική και καθοδηγητική βοήθεια που μου προσέφερε αλλά και για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Ιωάννη Καρακάση και Στυλιανό Σωμαράκη, μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, για το χρόνο, τις παρατηρήσεις και τα σχόλιά τους. Ακόμη, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τους συνεργάτες και συμφοιτητές στο εργαστήριο που συνέβαλαν ο καθένας με τις δικές του γνώσεις στη διεξαγωγή των πειραμάτων και ιδιαίτερα στο Μιχάλη Ορφανάκη και την Ανθή Ζαχοπούλου που με εκπαίδευσαν με υπομονή και όρεξη.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συγγενείς και φίλους που με στηρίζουν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την Ελληνική (Οδηγία 63/2010) και Ευρωπαϊκή (Οδηγία 56/2013) νομοθεσία σχετικά με την καλή διαβίωση των ζώων. Όλα τα πρωτόκολλα εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Περιφερειακής Φροντίδας Ζώων (Αριθμός Άδειας: 115470-16/5/19).

Περίληψη

Οι ανθίσεις των κυανοφυκών εντείνονται από την κλιματική αλλαγή και τον ευτροφισμό. Το είδος *Microcystis aeruginosa* είναι ένα κοσμοπολίτικο είδος κυανοβακτηρίου που παράγει πλήθος βιοενεργών ενώσεων, μερικές από τις οποίες έχουν τοξική δράση. Η έντονη τοξικότητα του είδους οφείλεται στην ενδοτοξίνη MC-LR η οποία έχει την ικανότητα να συσσωρεύεται στους ιστούς των ιχθύων, επηρεάζοντας πληθώρα συστημάτων και λειτουργιών. Η τοξική δράση της MCLR ενισχύεται από άλλες ουσίες που παράγονται από το κυανοβακτήριο. Στην παρούσα εργασία, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, διερευνήθηκε το κατά πόσο η σύντομη (διάρκειας 2 ημερών) έκθεση του εμβρυϊκού σταδίου των ιχθύων σε υποθησιγόνα επίπεδα εκχύλισματος (200 mg/L) του *M. aeruginosa* μπορεί να έχει μακροχρόνιες (1-3 μήνες μετά την έκθεση) επιδράσεις στη δομή και λειτουργία των ιχθύων.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικές επαναλήψεις και μελετήθηκαν οι μεταβολές της κολυμβητικής ικανότητας, της εξωτερικής μορφολογίας, της σκελετικής δομής και των κόκκινων μυών των μεταμορφούμενων νυμφών και ενήλικων αρσενικών ατόμων. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν μεταβολές στο σχήμα της καρδιάς των μεταμορφούμενων νυμφών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκθεση των εμβρύων σε εκχύλισμα *M. aeruginosa* μείωσε σημαντικά την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης των ιχθυδίων κατά 1,4 μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο ($p < 0,05$, Bonferroni test), μείωσε το λόγο μήκους προς ύψος της κοιλίας της καρδιάς τους καθιστώντας την πιο κυκλική ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test) και προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στους κόκκινους μύες, με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας (activity) του ενζύμου ηλεκτρική αφυδρογονάση κατά 13% ($p < 0,01$, Mann-Whitney U test). Επιπλέον, η ανάλυση γεωμετρικής μορφομετρίας έδειξε σημαντική επίδραση της τοξίνης στο σχήμα του σώματος τόσο των μεταμορφούμενων νυμφών όσο και των ενήλικων ($p < 0,05$, discriminant analysis). Τέλος, η οστεολογική εξέταση έδειξε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης των δυσπλασιών της σπονδυλικής στήλης ($p < 0,05$, G-test) στους πληθυσμούς που είχαν εκτεθεί στο εκχύλισμα *M. aeruginosa*.

Συνολικά, τα αποτελέσματα μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση των επιπτώσεων των κυανοβακτηριακών ανθίσεων στους υδρόβιους οργανισμούς.

Abstract

Cyanobacterial blooms are intensifying in parallel with climate change and eutrophication. *Microcystis aeruginosa* comprises a species of freshwater cyanobacteria which can form a plethora of bioactive compounds, some of which have toxic effects. The toxicity of cyanobacteria is mainly due to Microcystin-LR (MCLR), an endotoxin that bioaccumulates in fish tissues and affects many systems and functions. In parallel, other substances produced by cyanobacteria have the ability to enhance MCLR toxicity. Aim of the present study was to shed light on the effect of a short (two day long) exposure of sublethal levels (200 mg/L) of *Microcystis aeruginosa* extract during the embryonic period of the zebrafish on long term effects (one to three months after exposure) in structure and function of fishes.

In order to answer this question, we performed studies on swimming performance, body shape, skeletal structure and red muscle of metamorphosing larvae and male adults. Furthermore, we investigated the alterations in the heart shape of the juveniles.

Our data strongly support that MCLR significantly decreases the relative critical swimming speed of juveniles by 1.4 total length per second ($p < 0,05$, Bonferroni test), decreases length/height heart ratio making heart more circular ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test), and finally causes significant changes in red muscles, which results in 13% decrease of the activity of succinate dehydrogenase ($p < 0,01$, Mann-Whitney U test). Moreover, geometric morphometric analysis of both metamorphosing larvae and adult fish revealed that this specific toxin has a significant effect in their body shape, while osteological examination showed increased incidence of skeletal deformities of vertebral column ($p < 0,05$, G-test). In conclusion, these results can play a key role in understanding the effects of cyanobacterial blooms on aquatic organisms.

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	3
Περίληψη.....	3
Abstract	4
1 Εισαγωγή.....	8
1.1 Τα Κυανοβακτήρια.....	8
1.2 Οι Ανθίσεις.....	9
1.3 Οι Κυανοτοξίνες.....	10
1.4 Η MCLR.....	12
1.5 Τα Εκχυλίσματα	14
1.6 Η βιολογία του zebrafish	15
1.7 Το zebrafish ως αντικείμενο μελέτης.....	15
1.8 Σκοπός της εργασίας	16
2 Υλικά και Μέθοδοι.....	17
2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	17
2.2 Παρασκευή Εκχυλισμάτων <i>Microcystis aeruginosa</i>	18
2.3 Επίδραση της MCLR στην κολυμβητική ικανότητα των νεαρών ιχθυδίων και των ενήλικων αρσενικών ατόμων.....	18
2.4 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στη μορφολογία της καρδιάς των ιχθυδίων.....	21
2.5 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στο σχηματισμό σκελετικών παραμορφώσεων.....	24
2.6 Επίδραση της έκθεσης των εμβρύων στην MCLR στο σχήμα του σώματος των μεταμορφούμενων νυμφών και των ενήλικων αρσενικών ατόμων.....	24
2.7 Επίδραση της έκθεσης των εμβρύων στην MCLR στους κόκκινους μύες των μεταμορφούμενων νυμφών και των ενήλικων αρσενικών ατόμων.....	25
3 Αποτελέσματα	28
3.1 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στην κολυμβητική ικανότητα των μεταμορφούμενων νυμφών	28
3.2 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στην κολυμβητική ικανότητα των ενήλικων αρσενικών.....	28
3.3 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στο σχήμα της καρδιάς των μεταμορφούμενων νυμφών	29
3.4 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στο σχηματισμό σκελετικών παραμορφώσεων.....	30
3.5 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στο σχήμα σώματος των μεταμορφούμενων νυμφών	33
3.6 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στο σχήμα σώματος των ενήλικων αρσενικών.....	35
3.7 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στη δομή και λειτουργία των κόκκινων μυϊκών ινών των μεταμορφούμενων νυμφών	36
3.7 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στη δομή και λειτουργία των κόκκινων μυϊκών ινών των ενήλικων αρσενικών	37

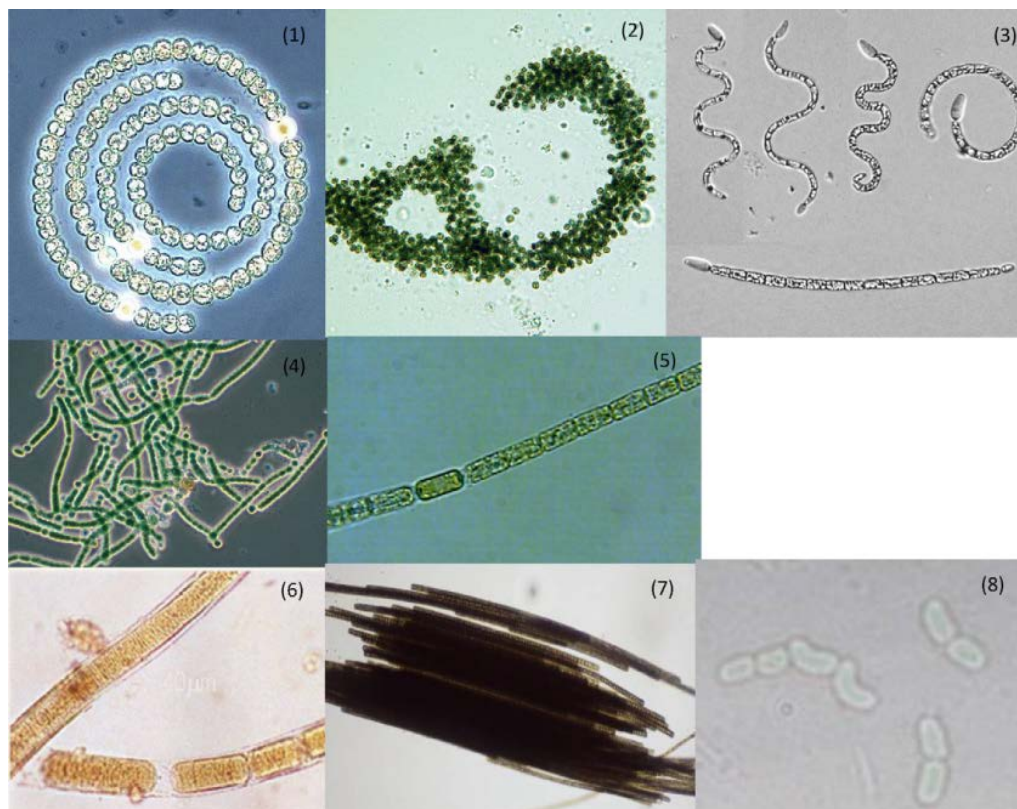
4 Συζήτηση.....	37
5 Βιβλιογραφία.....	43

1 Εισαγωγή

1.1 Τα Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα φωτοσυνθετικών προκαρυωτικών οργανισμών (Whitton 1992, Christophoridis *et al.* 2018) και χαρακτηρίζονται από την ιδιότητά τους να παράγουν χλωροφύλλη α και τουλάχιστον ένα είδος φυκοβιλιπροτεΐνης (Whitton 1992). Παρόλα αυτά, ανήκουν στο φύλο των βακτηρίων (Van Den Hoek *et al.* 1995, Boone & Castenholz 2001). Οι οργανισμοί αυτοί είναι από τους αρχαιότερους που εμφανίστηκαν στη Γη (Schopf & Walter 1982), αφού χρονολογούνται προ 2 δισεκατομμυρίων ετών (Walter *et al.* 2017) ενώ η ηλικία της γης είναι 4,5 δισεκατομμύρια έτη (Brent 2001). Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι οργανισμοί που υπήρξαν τότε και έμοιαζαν πολύ με τα σύγχρονα κυανοβακτήρια συνέβαλαν στον εμπλουτισμό της ανοξικής ατμόσφαιρας της Γης με οξυγόνο διαμέσου της φωτοσύνθεσης (Knoll 1985, Schirrmeyer *et al.* 2011). Τα σημερινά κυανοβακτήρια έχουν σημαντικό ρόλο στον εμπλουτισμό των ωκεανών σε οξυγόνο (Whitton 1992).

Με βάση τον βοτανικό σύστημα ταξινόμησης, και λόγω των κοινών χαρακτηριστικών τους με τα ευκαρυωτικά φύκη, τα κυανοβακτήρια αποκαλούνται και κυανοφύκη (Carmichael 2008, Kauff & Büdel 2010). Επικρατεί ωστόσο ένας διχασμός για το αν πρέπει ταξινομούνται με αυτό το σύστημα ή με των βακτηρίων (Whitton 1992). Το μέγεθός τους ποικίλει από 1 μm έως 100 μm (Whitton 1992). Μπορούν να είναι μονοκύτταρα και να σχηματίζουν αποικίες ή να είναι νημάτια αποτελούμενα από δύο ή περισσότερα κύτταρα (Whitton 1992) (Εικόνα 1.1). Τόσο το σχήμα όσο και το μέγεθος των κυανοβακτηρίων σχετίζεται με το περιβάλλον διαβίωσης του κάθε είδους ενώ ταυτόχρονα το ίδιο είδος έχει την ικανότητα να παράγει πάνω από έναν κυτταρικό τύπο ανάλογα με τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες και τις ανάγκες που προκύπτουν (Whitton 1992).



Εικόνα 1.1: Κυτταρικοί τύποι και αποικίες κυανοβακτηρίων: (1),(2),(3) γλυκών υδάτων, (4),(5) υφάλμυρων υδάτων, (6),(7),(8) θαλασσινών υδάτων (O'Neil *et al.* 2012)

Το φύλο των κυανοβακτηρίων απαρτίζεται από γένη με τεράστια εξάπλωση και μεγάλη αφθονία, τα οποία εποικίζουν όλα τα φωτεινά περιβάλλοντα εκτός από αυτά με πολύ όξινο pH (Whitton 1992). Ένα από τα χαρακτηριστικά του φύλου που ενισχύει την παγκόσμια εξάπλωσή του και τη μεγάλη του αφθονία είναι η ικανότητα των οργανισμών να αποθηκεύουν θρεπτικά, όπως ο φωσφόρος (Stewart 1967). Επιπλέον, είναι σε θέση να μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο σε αμμωνία (Stewart 1967) και ταυτόχρονα να χρησιμοποιούν για τη φωτοσύνθεση τα διτανθρακικά ιόντα (έναντι του διοξειδίου του άνθρακα) με αποτέλεσμα να κυριαρχούν έναντι των ευκαρυωτικών μικροφυκών σε περιβάλλοντα με αυξημένη φωτοσύνθεση και μειωμένο CO₂ (Shapiro 1997). Γενικά, διαβιώνουν σε όλα τα υδάτινα περιβάλλοντα, από γλυκά, υφάλμυρα ως αλμυρά νερά (O'Neil *et al.* 2012) (Εικόνα 1.1).

1.2 Οι ανθίσεις

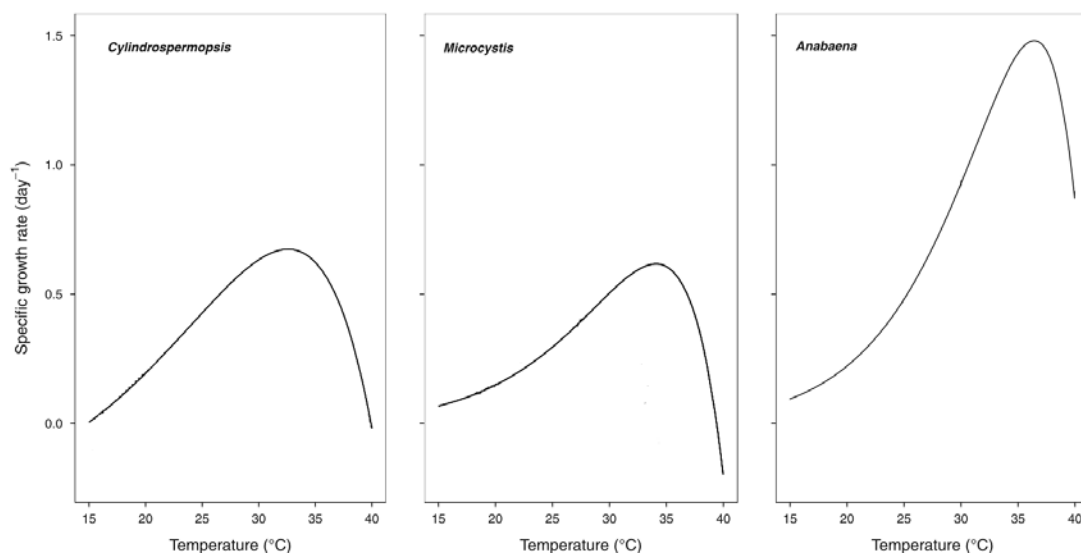
Ο όρος άνθιση (bloom) αναφέρεται στον απότομο, ταχύτατο πολλαπλασιασμό των κυττάρων συγκεκριμένων οργανισμών στα επιφανειακά ύδατα (Whitton 1992, Christophoridis *et al.* 2018). Την ικανότητα να δημιουργούν ανθίσεις σε αλμυρά και υφάλμυρα νερά, έχουν ορισμένα είδη μονοκύτταρων μικροφυκών όπως τα διάτομα και τα δινομαστιγωτά, ενώ στα γλυκά επιφανειακά ύδατα επικρατούν οι ανθίσεις των κυανοβακτηρίων (Paerl 1988, Trainer *et al.* 2010) (Εικόνα 1.2). Κάθε άνθιση μπορεί να δημιουργείται από ένα είδος ή δύο συνυπάρχοντα είδη (Paerl 1988).



Εικόνα 1.2: Ανθίσεις κυανοβακτηρίων στα υδάτινα οικοσυστήματα (Paerl *et al.* 2011)

Οι ανθίσεις των κυανοβακτηρίων στα εσωτερικά ύδατα θεωρείται η τελική φάση του ευτροφισμού (Dokulil & Teubner 2000). Η ανθρωπογενής δραστηριότητα και οι πηγές ρύπανσης που σχετίζονται με αυτήν (όπως τα λιπάσματα και τα βιομηχανικά και αστικά απόβλητα) εμπλουτίζουν τα ύδατα με άζωτο και φωσφόρο (Paerl *et al.* 2011, Minasyan *et al.* 2018). Ο εμπλουτισμός αυτός οδηγεί στη δημιουργία ευτροφικών συνθηκών στις λίμνες με αποτέλεσμα την απότομη αύξηση της βιομάζας των κυανοβακτηρίων (Codd 2000).

Παράλληλα, η άνοδος της θερμοκρασίας λόγω της κλιματικής αλλαγής αυξάνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυανοβακτηρίων, τα οποία παρουσιάζουν θερμοκρασιακό βέλτιστο στους 25°C με 35°C (Paerl & Huisman 2008, Thomas & Litchman 2016) (Εικόνα 1.3). Όμως, με την άνοδο της θερμοκρασίας αυξάνεται και το διοξείδιο του άνθρακα που περιλαμβάνεται στα αέρια του θερμοκηπίου. Το διοξείδιο του άνθρακα όμως καταναλώνεται από τα κυανοβακτήρια κατά κόρον για τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης παρεμποδίζοντας την είσοδο του στα βαθύτερα υδάτινα στρώματα. Έτσι αποκτούν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των υπολοίπων φωτοσυνθετικών οργανισμών ευνοώντας ακόμη περισσότερο η αύξησή τους (Paerl *et al.* 2011).



Εικόνα 1.3: Καμπύλη ρυθμού αύξησης κυανοβακτηρίων σε σχέση με τη θερμοκρασία (τροποποιημένη από Thomas & Litchman 2016)

Ως αποτέλεσμα των κυανοβακτηριακών ανθίσεων έρχεται η διατάραξη της τροφικής αλυσίδας (Minasyan *et al.* 2018) λόγω της μείωσης της διαφάνειας του νερού, της δημιουργίας ανοξικών συνθηκών κατά τη διάρκεια της νύχτας και αλλαγών στο pH του νερού (Klapper 1991). Επιπλέον, το τοπίο υποβαθμίζεται και αναδύεται δυσοσμία λόγω διάφορων χημικών ενώσεων που παράγονται (Paerl 1988, Whitton 1992). Το κυριότερο όμως πρόβλημα που δημιουργούν οι ανθίσεις είναι ότι παράγεται μία πληθώρα βιογενών ενώσεων με τοξική δράση, σε τεράστιες συγκεντρώσεις, τόσο για τους υπόλοιπους υδρόβιους οργανισμούς όσο και για τον άνθρωπο που εκμεταλλεύεται τα υδάτινα οικοσυστήματα (Paerl 1988, Whitton 1992, Thomas & Litchman 2016).

1.3 Οι Κυανοτοξίνες

Τα κυανοβακτήρια παράγουν μια πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών, δηλαδή ενώσεων που δε συμμετέχουν στο βασικό τους μεταβολισμό (Vining 1992) αλλά είναι βιοενεργές και χαρακτηρίζονται από δομική και βιοχημική ποικιλότητα (Smith *et al.* 2008). Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται κυανοτοξίνες (Codd *et al.* 2005, Christophoridis *et al.* 2018) και μπορούν να κατατάσσονται ανάλογα με τη χημική τους δομή σε κυκλικά πεπτίδια, αλκαλοειδή και

λιπολυσακχαρίτες (Carmichael 2001). Οι κυανοτοξίνες διαχωρίζονται, επίσης, ανάλογα με το αν παράγονται και εκκρίνονται στο περιβάλλον ή αν παραμένουν μέσα στο κύτταρο σε εξωτοξίνες και ενδοτοξίνες αντίστοιχα (Svrcek & Smith 2004). Οι τελευταίες απελευθερώνονται στο περιβάλλον μετά τη λύση των κυττάρων, καθιστώντας έτσι το θάνατο των ανθίσεων ακόμη πιο βλαβερό για τους οργανισμούς (Svrcek & Smith 2004, Saraf *et al.* 2018). Μαζική λύση των κυανοβακτηριακών κυττάρων μπορεί να επέλθει για παράδειγμα από ιούς (Hiskia *et al.* 2014). Ένα τελευταίο κριτήριο για την ομαδοποίηση των κυανοτοξινών είναι με βάση το όργανο το οποίο προσβάλλουν. Έτσι ταξινομούνται σε ηπατοτοξίνες, νευροτοξίνες, δερματοτοξίνες και κυτοτοξίνες (Christophoridis *et al.* 2018) (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1: Ομαδοποίηση κυανοτοξινών με βάση τη δομή τους και το όργανο στόχο τους (Svrcek & Smith 2004)

Toxin group	Toxic or irritant effect	Producer cyanobacteria genera
Cyclic peptides		
Microcystins	Hepatotoxic	<i>Anabaena, Anabaenopsis, Aphanocapsa, Hapalosiphon, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria</i>
Nodularins	Hepatotoxic	<i>Nodularia</i> (mainly brackish water)
Alkaloids		
<i>Neurotoxic alkaloids</i>		
Anatoxin-a	Neurotoxic	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria</i>
Anatoxin-a(S)	Neurotoxic	<i>Anabaena, Oscillatoria</i>
Saxitoxins	Neurotoxic	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Lyngbya</i>
<i>Cytotoxic alkaloids</i>		
Cylindrospermopsin	Cytotoxic, hepatotoxic, neurotoxic, genotoxic	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Umezakia</i>
<i>Dermatotoxic alkaloids</i>		
Aplysiatoxin	Dermatotoxic	Marine cyanobacteria <i>Lyngbya, Schizothrix, Oscillatoria</i>
Debromoaplysiatoxin	Dermatotoxic	<i>Lyngbya, Schizothrix, Oscillatoria</i>
Lyngbyatoxin-a	Dermatotoxic, oral and gastrointestinal inflammation	<i>Lyngbya</i>
Lipopolysaccharides (LPS)	Potentially irritates any exposed tissue	All

Σήμερα, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί κυρίως στις μικροκυστίνες (MCs) αφού αποτελούν την πιο διαδεδομένη κλάση κυανοτοξινών που εντοπίζεται στα γλυκά νερά (Christophoridis *et al.* 2018). Επιπλέον, είναι ενδοτοξίνες που απελευθερώνονται μετά τη λύση των κυττάρων αυξάνοντας την τοξικότητα των ανθίσεων (Saraf *et al.* 2018). Οι μικροκυστίνες παράγονται σε παγκόσμια κλίμακα από τα γένη *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria* και *Plankothrix* (Smith *et al.* 2008, Hiskia *et al.* 2014) αλλά ονομάστηκαν έτσι γιατί πρώτη φορά βρέθηκαν σε κυανοβακτήρια του είδους *Microcystis aeruginosa* (Codd 2000).

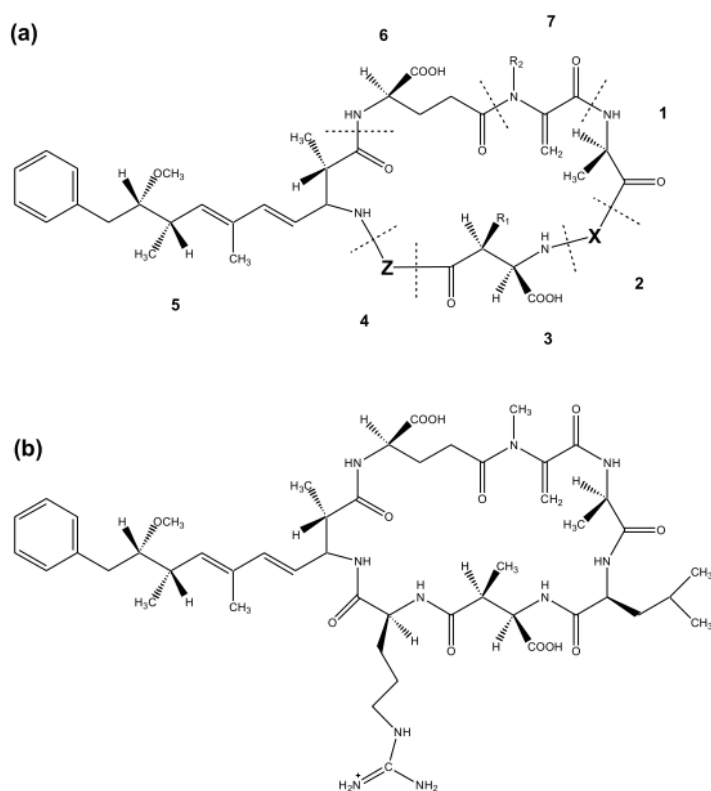
Όσον αφορά στη δομή και τη λειτουργία των μικροκυστινών, αυτές είναι μονοκυκλικά επταπεπτιδία που περιλαμβάνουν μία ασυνήθιστη β-αμινομάδα, την ADDA ((2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) (Smith *et al.* 2008, Babica *et al.* 2006), η οποία ευθύνεται για την τοξικότητά τους (Christophoridis *et al.* 2018). Οι ενώσεις αυτές είναι ευρέως γνωστές για την ηπατοτοξική δράση τους, κατά την οποία αναστέλλουν, μη αντιστρεπτά, τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες 1 και 2A οδηγώντας σε φωσφορυλίωση της σερίνης και θρεονίνης (Smith & Haney 2006, Christophoridis *et al.* 2018). Η δράση τους επηρεάζει σημαντικά τα μεταβολικά μονοπάτια, τη μεμβρανική μεταφορά και την έκκριση ουσιών από το ήπαρ, ενώ παράλληλα διαταράσσει τον

κυτταροσκελετό προκαλώντας απόπτωση και λύση των ηπατοκυττάρων (Christophoridis *et al.* 2018).

Η φυσιολογική σημασία των μικροκυστινών για τα κυανοβακτήρια είναι μάλλον πολυδιάστατη. Επηρεάζουν σημαντικές διαδικασίες όπως η μεταγωγή σήματος (Dittmann *et al.* 2001), δρουν ως χηλικοί παράγοντες μεταλλικών ιόντων (Utkilen & Gjølme 1995, Humble *et al.* 1997), προσφέρουν προστασία από θηρευτές όπως το ζωοπλαγκτόν (DeMott & Moxter 1991, Rohrlack *et al.* 1999 & 2001), ή περιορίζουν την ανάπτυξη άλλων φωτοσυνθετικών οργανισμών (αλληλοπάθεια¹) (Pflugmacher 2002). Η ανταγωνιστική τους δράση αναστέλει τη φωτοσύνθεση, ενώ παράλληλα προαγάγει το οξειδωτικό στρες (Babica *et al.* 2006) σε μακροφύκη, μικροφύκη ή άλλα κυανοβακτήρια (Gross, Legrand *et al.* 2003). Επιπλέον, όσον αφορά στις λειτουργίες τους μέσα στα κύτταρα των οργανισμών που τις παράγουν, είναι η συμμετοχή στην αφομοίωση της ηλιακής ακτινοβολίας (Hesse & Kohl 2001), στην αποθήκευση αζώτου σε περιόδους ανεπάρκειας αυτού (Kotak *et al.* 2000) και τέλος, στη δημιουργία αποικιών (Kehr *et al.* 2006).

1.4 Η MCLR

Η MCLR είναι η πιο τοξική και άφθονη μικροκυστίνη (Puddick *et al.* 2014, Saraf *et al.* 2018), δικαιολογώντας έτσι και το πλήθος των εργασιών που αναφέρονται σε αυτήν (Svrcek & Smith 2004). Έχει την τυπική δομή των μικροκυστινών (Εικόνα 1.4a), περιλαμβάνοντας μία λευκίνη (L) και μία αργινίνη (R) (Εικόνα 1.4b) (Carmichael & Falconer 1992). Η MCLR είναι γνωστή για την ηπατοτοξική και καρκινογενή δράση της (Smith *et al.* 2008).



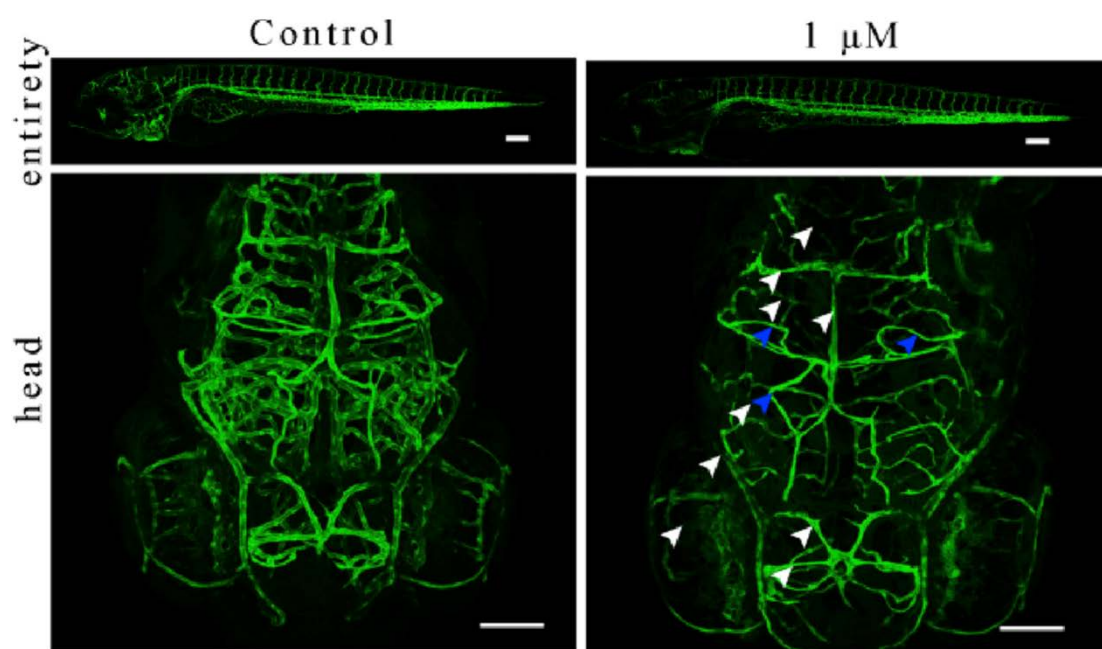
Εικόνα 1.4: (a) Γενική δομή των μικροκυστινών. (b) Χημικός τύπος MCLR (τροποποιημένη εικόνα από Svrcek & Smith 2004)

¹ Αλληλοπάθεια είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένας οργανισμός παράγει μία ή περισσότερες βιοχημικές ουσίες που μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και την επιβίωση άλλων οργανισμών (Rice 1984)

Η επίδραση της MCLR στους ιχθύες έχει περιγραφεί σε μία πληθώρα εργασιών της τελευταίας δεκαετίας, μετά από έκθεση των οργανισμών είτε σε θνησιγόνες είτε σε υποθνησιγόνες συγκεντρώσεις της MCLR. Συνήθως, το στάδιο όπου μελετάται η επίδραση της τοξίνης σε αυτές τις εργασίες είναι το ίδιο με το στάδιο έκθεσης του οργανισμού σε αυτήν ή είναι το ακριβώς επόμενο (short-term effects). Έτσι, έχει δειχθεί ότι σε υποθνησιγόνα επίπεδα, η MCLR μπορεί να επιδρά σε όργανα όπως η καρδιά, προκαλώντας μείωση του καρδιακού ρυθμού (Zeng *et al.* 2014, Qi *et al.* 2016) λόγω αύξησης των αποπτωτικών κυττάρων σε αυτήν (Qi *et al.* 2016). Σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης και συγκεντρώσεις MCLR έχει δειχθεί πως προκαλούνται ανώμαλα αναπτυξιακά πρότυπα που συνδέονται με την αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) (Zeng *et al.* 2014).

Έκθεση σε θνησιγόνα επίπεδα της MCLR κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια αναστέλει την αγγειογένεση (Wang *et al.* 2018) όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5, και έχει νευροτοξική δράση επηρεάζοντας τη συμπεριφορά των εκτεθειμένων οργανισμών μέσω της μείωσης που προκαλεί στα επίπεδα της ακετυλοχολίνης και ντοπαμίνης (Wu *et al.* 2016) (Εικόνα 1.6).

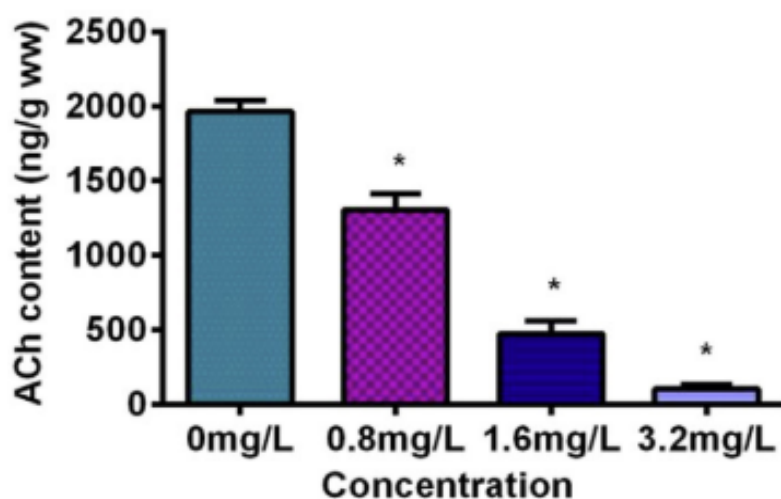
Τέλος, μακροπρόθεσμη έκθεση σε υποθνησιγόνες συγκεντρώσεις, από το στάδιο της νύμφης μέχρι την ενηλικίωση, επηρεάζει αρνητικά την αναπαραγωγική ωρίμανση των ατόμων μέσω αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων αυξητικών παραγόντων εκκρινόμενων είτε από το ήπαρ είτε από τον εγκέφαλο (Hou *et al.* 2017).



Εικόνα 1.5: Αναστολή της αγγειογένεσης στον κορμό και το κεφάλι του zebrafish. Τα λευκά βέλη υποδεικνύουν απουσία και τα μπλε παραμορφώσεις αγγείων (τροποποιημένη εικόνα από Wang *et al.* 2019)

Η έκθεση των νεαρών σταδίων ανάπτυξης των ιχθύων στην MCLR, τόσο κατά το εμβρυϊκό όσο και το νυμφικό στάδιο είναι πολύ καλά μελετημένη, πιθανώς επειδή είναι η πιο ευαίσθητη περίοδος του κύκλου ζωής τους. Η ευαισθησία των σταδίων αυτών οφείλεται εν μέρει στη μειωμένη ικανότητα μετακίνησής τους στη στήλη του νερού που καθιστά αδύνατη την αποφυγή μεγάλων συγκεντρώσεων της τοξίνης (Zeng *et al.* 2014, Saraf *et al.* 2018). Παράλληλα, η πολύ λεπτή επιδερμική στοιβάδα, η μεγαλύτερη επιφάνεια σώματος σε σχέση με τον όγκο τους (Malbrouck & Kestemont 2006) και ο μεγαλύτερος μεταβολικός ρυθμός (Westernhagen *et al.* 1988) καθιστά ευκολότερη την πρόσληψη της τοξίνης στο σώμα τους (Saraf *et al.* 2018). Τέλος, το υποανάπτυκτο ανοσοποιητικό τους σύστημα και οι ανώριμοι

μηχανισμοί αποτοξικοποίησης (Yang *et al.* 2016, Saraf *et al.* 2018, Wang *et al.* 2018) ενισχύουν περαιτέρω την ευαισθησία τους στις κυανοτοξίνες.

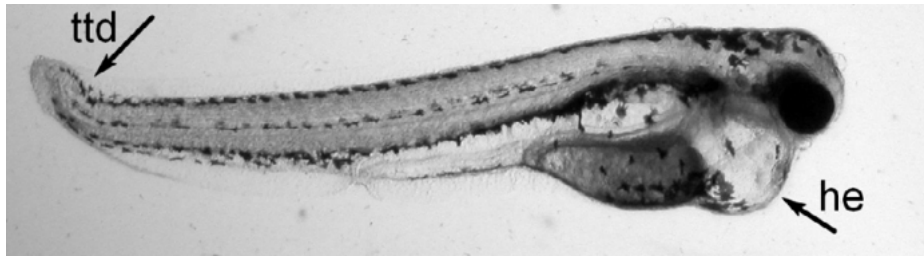


Εικόνα 1.6: Δοσοεξαρτώμενη πτώση των επιπέδων των νευροδιαβιβαστών από την MCLR (τροποποιημένη εικόνα από Wu *et al.* 2016).

1.5 Τα εκχυλίσματα των κυανοβακτηρίων

Παρόλη την έρευνα που έχει διεξαχθεί γύρω από την επίδραση της καθαρής MCLR στους οργανισμούς, έχει αποδειχθεί ότι η επίδραση εκχυλισμάτων από τα κυανοβακτήρια που την παράγουν (προσομοιάζουν τις συνθήκες των κυανοβακτηριακών ανθίσεων) είναι πολύ πιο έντονη και δυσμενής για τους οργανισμούς (Best *et al.*, Pietsch *et al.* 2001). Αυτό πρακτικά υποδηλώνει ότι ορισμένες βιοενεργές ουσίες των εκχυλισμάτων δρουν συνεργατικά με τις κυανοτοξίνες (Oberemm *et al.* 1997), αυξάνοντας μεταξύ άλλων τον ρυθμό πρόσληψης των τελευταίων (Best *et al.* 2001).

Πλέον, είναι γνωστό ότι σε αυτές τις ουσίες περιλαμβάνονται παράγωγα του ρετινοϊκού οξέος τα οποία μπορούν και εμπλέκονται σε μονοπάτια σηματοδότησης των αναπτυξιακών σταδίων των σπονδυλωτών (Jonas *et al.* 2015). Η εμπλοκή τους, δυνητικά, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία σοβαρών παραμορφώσεων στην ουρά, τη σπονδυλική στήλη, το στόμα τη λέκιθο και την καρδιά των νυμφών των ιχθύων (Εικόνα 1.7), συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της θνησιμότητας (Jonas *et al.* 2015). Αναφορές έχουν γίνει επίσης και για την παρουσία οιστρογόνων ανάμεσα στις βιοενεργές ουσίες (Jonas *et al.* 2015), αλλά και λιπαρών οξέων ή λιποπολυσακχαριτών των κυανοβακτηρίων (Rogers *et al.* 2011). Γενικά, οι βιοενεργές ουσίες είναι γνωστό πως μπορούν να επηρεάζουν την έκφραση ποικιλίας γονιδίων στα οποία δεν παρεμβάλλεται η καθαρή MCLR (Rogers *et al.* 2011).



Εικόνα 1.7: Πρόκληση περικαρδιακού οιδήματος (he) και ανώμαλης κάμψης της ουράς (ttd) μετά από έκθεση σε εκχύλισμα *M. aeruginosa* (τροποποιημένη εικόνα από Jonas *et al.* 2015)

1.6 Η βιολογία του zebrafish

Το zebrafish (*Danio rerio*) ανήκει στην οικογένεια των κυπρινοειδών (Cyprinidae) (Spence *et al.* 2008) η οποία περιλαμβάνει την πιο μεγάλη ποικιλία ειδών σε σχέση με τις άλλες ομάδες σπονδυλωτών (Nelson 1994). Είναι ένα είδος του γλυκού νερού που στη φύση συναντάται σε τροπικές περιοχές της νοτιοανατολικής Ασίας, με τη μεγαλύτερη αφθονία να εμφανίζεται στη βορειοανατολική Ινδία, στο Μπαγκλαντές και στη Μιανμάρ (Barman 1991). Χαρακτηρίζεται από το μικρό του μέγεθος, που δεν ξεπερνά τα 40 χιλιοστά τυπικό μήκος (από το ρύγχος έως την αρχή του ουραίου περυγίου), και το ατρακτοειδές σχήμα σώματος (Spence *et al.* 2008). Ο χρωματισμός του χαρακτηρίζεται από διακριτές σκούρες και ανοιχτόχρωμες οριζόντιες γραμμές που εναλλάσσονται μεταξύ τους (Spence *et al.* 2008).

Ως προς την οικολογία του, το zebrafish δείχνει να έχει μεγάλο εύρος αντοχής στη θερμοκρασία αφού εντοπίζεται, σε κοπάδια, σε περιβάλλοντα με 6°C ελάχιστη, και 38°C μέγιστη θερμοκρασία (Spence *et al.* 2008). Οι προτιμήσεις του είδους ως προς τον τύπο των εσωτερικών υδάτων φαίνεται να είναι οι λίμνες και τα στάσιμα νερά (Spence *et al.* 2008) έναντι των ποταμών λόγω, κυρίως, της απουσίας μεγάλων θηρευτών (Spence & Smith 2006). Όσον αφορά στη δομή της βλάστησης και τη θολερότητα των υδάτων, το zebrafish προτιμά τα ρηχά, διαυγή νερά με υδρόβια βλάστηση και λασπώδες υπόστρωμα (Spence 2008). Οι τροφικές του συνήθειες το καθιστούν παμφάγο είδος, αφού περιλαμβάνουν τόσο ζωικούς (όπως ζωοπλαγκτόν και έντομα, κυρίως προνύμφες από δίπτερα), όσο και φυτικούς οργανισμούς (Spence *et al.* 2008). Επίσης, η διατροφή των ενηλίκων μπορεί να περιλαμβάνει ακόμη και αυγά του ίδιου είδους (Spence *et al.* 2008).

Είναι γονοχωριστικό είδος με «ερμαφροδιτισμό ιχθυδίου» όπου η διαθεσιμότητα της τροφής και ο ρυθμός αύξησης είναι οι παράγοντες που τελικά θα καθορίσουν το φύλο των ενηλίκων. Η αναπαραγωγική ωρίμανση επέρχεται από 23 χιλιοστά και πάνω ολικό μήκος (Spence *et al.* 2008). Το είδος είναι φωτόκο με βενθική εναπόθεση αυγών που πραγματοποιείται τις πρώτες πρωινές ώρες, γεγονός που δείχνει ότι είναι φωτοεξαρτώμενη (Spence *et al.* 2008). Η εκκόλαση λαμβάνει χώρα 48 με 72 ώρες μετά την εξωτερική γονιμοποίηση και ανάλογα με τις συνθήκες (Kimmel *et al.* 1995), ενώ τόσο τα αυγά όσο και οι νύμφες δεν λαμβάνουν γονική φροντίδα (Spence *et al.* 2008).

1.7 Το zebrafish ως αντικείμενο μελέτης

Το zebrafish έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε μελέτες που αφορούν την αναπτυξιακή και μοριακή βιολογία (Spence *et al.* 2008), κυρίως λόγω μίας πληθώρας χαρακτηριστικών όπως είναι οι ταυτοποιημένες μεταλλάξεις, η ευκολία στους γενετικούς χειρισμούς, η ταχεία ανάπτυξη, τα διάφανα έμβρυα, το μικρό μέγεθος και ο μικρός χρόνος μέχρι την επόμενη γενιά (Bird & Mabee 2003). Παράλληλα, όμως, είναι και ένας οργανισμός που χρησιμοποιείται στην εκτίμηση των περιβαλλοντικών κινδύνων αφού τα διάφορα αναπτυξιακά του στάδια (έμβρυο, νύμφη, ενήλικο) χρησιμοποιούνται για μελέτες της επίδρασης των ρύπων τόσο στη μορφολογία όσο και στη συμπεριφορά του (Qian *et al.* 2019).

Στην τελευταία περίπτωση έχει συμβάλει και το γεγονός ότι οι τοξικές επιπτώσεις διαφόρων παραγόντων του περιβάλλοντος είναι σχεδόν ίδιες στα έμβρυα του zebrafish και του ανθρώπου (Yao *et al.* 2018).

1.8 Σκοπός της εργασίας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο ευτροφισμός σε συνδυασμό με την κλιματική αλλαγή οξύνουν το πρόβλημα των κυανοβακτηριακών ανθίσεων (Codd 2000, Paerl & Huisman 2008) με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται τεράστιες ποσότητες μικροκυστινών στο υδρόβιο περιβάλλον (Paerl 1988). Για το λόγο αυτό, έχει διεξαχθεί μία πληθώρα εργασιών που αφορά τις επιπτώσεις της MCLR στα νεαρά στάδια ή στο ενήλικο στάδιο του zebrafish αλλά και σε θηλαστικά ή αμφίβια. Καμία, όμως, από αυτές τις εργασίες δεν αφορά σε μακροχρόνιες επιδράσεις της τοξίνης σε διαφορετικά στάδια έκθεσης και μελέτης των επιπτώσεων. Επιπλέον, οι περισσότερες εργασίες αφορούν στην έκθεση σε καθαρή MCLR και όχι σε εκχυλίσματα κυανοφυκών αν και υπάρχουν εργασίες όπως των Rogers *et al.* (2011), Jonas *et al.* (2015) και των Saraf *et al.* (2018) που αποδεικνύουν ότι η επίδραση των εκχυλισμάτων έχει πιο σοβαρές επιπτώσεις από την MCLR αυτή καθαυτή.

Οι Hicken *et al.* (2011) έδειξε πως η έκθεση εμβρύων ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις πετρελαιοειδών, έχει σημαντικές επιδράσεις στο σχήμα της καρδιάς και στην κολυμβητική ικανότητα των ενηλίκων. Αυτή η πρωτότυπη μελέτη για τις μακροχρόνιες επιδράσεις ρύπων σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα νεαρά στάδια των ιχθύων είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στις κυανοτοξίνες (Saraf *et al.* 2018) έθεσαν τα θεμέλια των ερωτημάτων της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

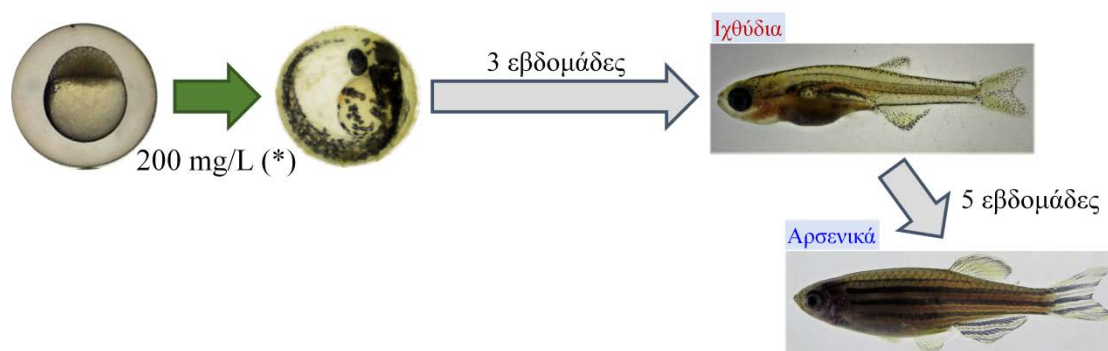
Έτσι, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των μακροχρόνιων επιδράσεων της έκθεσης εμβρύων zebrafish σε εκχύλισμα του κυανοβακτηρίου *M. aeruginosa*. Η έκθεση πραγματοποιήθηκε σε επίπεδα εκχυλίσματος, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία χαρακτηρίζονται ως υποθησιγόνα (Ορφανάκης 2019), προκειμένου να προσομοιαστούν οι συνθήκες των ανθίσεων του κυανοβακτηρίου στο φυσικό περιβάλλον. Για την εκτίμηση των μακροχρόνιων επιδράσεων επιλέχθηκαν χαρακτηριστές της δομής (σχήμα σώματος, μορφολογία καρδιάς, δομή κόκκινων μυών, σκελετικό σύστημα) και λειτουργίας (αερόβια κολυμβητική ικανότητα), οι οποίοι εξετάστηκαν σε νύμφες κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης και σε ενήλικα αρσενικά άτομα.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Γονιμοποιημένα αυγά *D. rerio* συλλέχθηκαν από κοινό απόθεμα γεννητόρων άγριου τύπου (ZF WT2 F13, Wageningen Agricultural University, The Netherlands) δύο ώρες μετά τη γονιμοποίηση, στο στάδιο του βλαστιδίου. Τα επιλεγμένα αυγά διαμοιράστηκαν ομοιόμορφα σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν η 0 mg/L που αποτέλεσε την ομάδα ελέγχου και η 200 mg/L που αποτέλεσε την ομάδα έκθεσης. Σε κάθε συνθήκη υπήρχαν τρεις επαναλήψεις 100 έως 150 αυγών, ενώ το πείραμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές για τη μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Όλα τα πειράματα έγιναν σε θερμοκρασία 28°C, αγωγιμότητα 450-550 $\mu\text{S cm}^{-1}$, συνθήκες κατάλληλες για την ανάπτυξη του zebrafish (Tsang *et al.* 2017), και συνεχή παροχή φυσαλίδων αέρα έτσι ώστε ο κορεσμός του οξυγόνου στο νερό να είναι συνέχεια πάνω από 90%.

Κάθε 12 ώρες, τα αυγά μεταφέρονταν σε καινούρια διαλύματα των δύο συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος και μετρούνταν οι αβιοτικοί παράγοντες όπως το οξυγόνο, η θερμοκρασία και το pH. Επιπλέον, καταγράφονταν και οι βιοτικοί παράγοντες όπως η βιωσιμότητα και η εκκολασιμότητα. Τα αυγά παρέμειναν στις συνθήκες αυτές μέχρι πριν την εκκόλαψη, δηλαδή για 48 ώρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν όλα σε κοινό περιβάλλον ανάπτυξης με συγκέντρωση εκχυλίσματος 0 mg/L. Στις κοινές συνθήκες τα άτομα που εκκολάφθηκαν παρέμειναν για διάστημα τριών (μεταμορφούμενες νύμφες) ως πέντε εβδομάδων (ενήλικα αρσενικά), οπότε και εξετάστηκε η δομή και λειτουργία του οργανισμού (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Απεικόνιση της βασικής πειραματικής διαδικασίας. Έκθεση των εμβρύων στην επιθυμητή συγκέντρωση του εκχυλίσματος μέχρι την εκκόλαψη και μεταφορά σε κοινές συνθήκες χωρίς τοξίνη. Μελέτη των επιδράσεων του εκχυλίσματος στο στάδιο του ιχθυδίου και των ενήλικων αρσενικών ατόμων. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές.

Αναφορικά με το κοινό απόθεμα των γεννητόρων, ενήλικα, αναπαραγωγικά ώριμα άτομα zebrafish, σε αναλογία 2 θηλυκά προς 1 αρσενικό, συντηρούνται στο εργαστήριο σε θερμοκρασία 28°C. Η φωτοπερίοδος διατηρείται σταθερή στις 14 ώρες φως και 10 ώρες σκοτάδι με αυτόματο διακόπτη. Δύο φορές την ημέρα, στις 8.30 το πρωί και στις 18.30 το απόγευμα, οι γεννήτορες ταΐζονται με το χέρι, με βιομηχανική τροφή κατάλληλη για zebrafish και διάμετρο 400-600 μm . Πριν την αναπαραγωγική διαδικασία, στους γεννήτορες παρέχεται ζωντανή τροφή του είδους *Artemia salina* με σκοπό την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας σπερματοζωαρίων και αυγών καθώς και το μεγαλύτερο δυνατό ποσοστό εκκόλαψης αυτών (Kaushik *et al.* 2011).

2.2 Παρασκευή Εκχυλισμάτων *Microcystis aeruginosa*

Για την παρασκευή των εκχυλισμάτων του κυανοφύκου χρησιμοποιήθηκαν 240 mg ξηρής μάζας αυτού, σε κάθε επανάληψη, διαλυμένης σε 48 mL nanopure νερό. Η τελική συγκέντρωση του κυανοφύκου όπου επώαστηκαν τα αυγά ήταν 200 mg/L ενώ της MCLR 5253 μg/g ξηρής μάζας. Η συγκέντρωση της MCLR ταυτοποιήθηκε από το Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Αναλύσεων του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης & Νανοτεχνολογίας του Δημόκριτου, ενώ έχει δειχθεί από προηγούμενη προπτυχιακή διπλωματική εργασία ότι η συγκεκριμένη συγκέντρωση του εκχυλίσματος είναι υποθησιγόνος (Ορφανάκης 2019).

Όσον αφορά στη διαδικασία παρασκευής του εκχυλίσματος, ακολουθήθηκε η μέθοδος των Ács et al. (2013). Έτσι, η ξηρή μάζα των κυττάρων ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας και διαλύθηκε σε nanopure νερό με σκοπό τη διάρρηξη των κυττάρων με ώσμωση. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν στο διάλυμα 8 κύκλοι υπερήχων των 20 δευτερολέπτων ώστε να διαρρηχθούν τα κύτταρα των κυανοβακτηρίων με μηχανική πίεση. Το τελικό διάλυμα με τα διαρρηγμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκε 20 λεπτά στα 12.000g σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C και το υποκείμενο απομακρύνθηκε. Το υπερκείμενο από τη φυγοκέντρωση ήταν το επιθυμητό προϊόν αφού περιείχε την τοξίνη MCLR και άλλες βιοενεργές ενδοκυτταρικές ουσίες. Τελικά, το διάλυμα χωρίστηκε σε δόσεις για τις δωδεκάωρες ανανεώσεις των διαλυμάτων και καταψύχθηκε στους -20°C.

2.3 Επίδραση της MCLR στην κολυμβητική ικανότητα των μεταμορφούμενων νυμφών και των ενήλικων αρσενικών ατόμων

Τα πειράματα που αφορούσαν στον έλεγχο της αερόβιας κολυμβητικής ικανότητας εφαρμόστηκαν σε μεταμορφούμενες νύμφες μεγέθους 12,1±0,9 mm ολικό μήκος (TL, 22 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, dpf) και σε ενήλικα αρσενικά άτομα μεγέθους 21,1±1,4 mm TL (44 dpf) (Πίνακας 2.1). Τα άτομα αυτά προήλθαν από τις δύο πειραματικές επαναλήψεις που αναφέρονται στην ενότητα 2.1 και αφορούσαν τόσο στην ομάδα ελέγχου (0 mg/L) όσο και την εκτεθειμένη στο κυανοβακτηριακό εκχύλισμα ομάδα (200 mg/L).

Για τη μελέτη της επίδρασης των υποθησιγόνων συγκεντρώσεων της MCLR στην αερόβια κολυμβητική ικανότητα εκτιμήθηκε η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (U_{crit}), ατομικά για 12 έως 13 μεταμορφούμενες νύμφες ανά πειραματική συνθήκη και για 11 έως 15 ενήλικα αρσενικά άτομα ανά πειραματική συνθήκη.

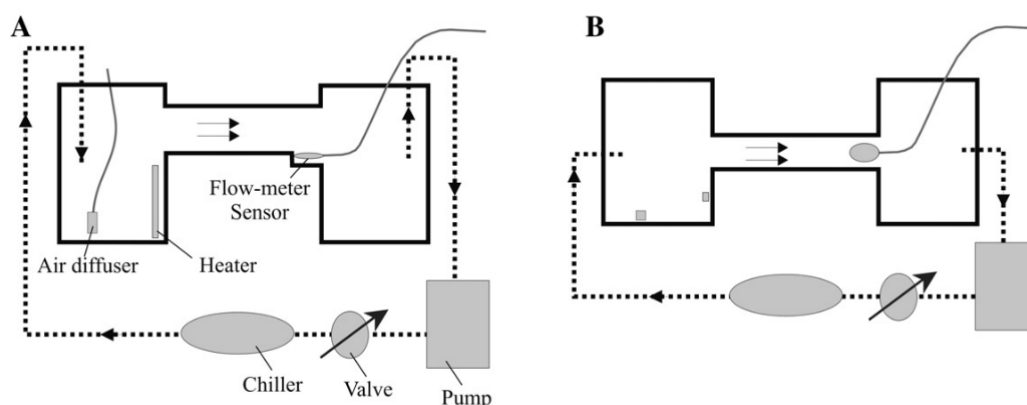
Πίνακας 2.1: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση ολικού μήκους των μεταμορφούμενων νυμφών και ενήλικων αρσενικών ατόμων που εξετάστηκαν

Πειραματική Επανάληψη	Συνθήκη (mg/L)	Αριθμός Ατόμων Νυμφών	Αριθμός Ατόμων Ενηλίκων	Ολικό Μήκος Νυμφών (mm)	Ολικό Μήκος Ενηλίκων (mm)
1	0	13	14	12.0±0.6	21.0±1.0
	200	12	11	12.2±0.8	20.3±1.8
2	0	12	13	11.6±0.6	21.5±0.9
	200	13	15	12.3±1.1	21.6±1.0

Ο υπολογισμός αυτός πραγματοποιήθηκε σε ειδικά σχεδιασμένη κολυμβητική συσκευή (Dimitriadi et al. 2018) (Εικόνα 2.2), η οποία αποτελείται από το κανάλι κολύμβησης με διαστάσεις μήκους-πλάτους-ύψους 70 X 5 X 10 cm. Το κανάλι αυτό συνδέεται με δύο δεξαμενές κλειστού τύπου 30 λίτρων. Με τη χρήση αντλιών ρυθμιζόμενης ροής (EHEIM, Model 2217) το νερό μεταφέρεται από τη μία δεξαμενή στην άλλη διαμέσου του καναλιού. Η

ταχύτητα της ροής του νερού μέσα στο κανάλι κολύμβησης καταγράφεται από έναν ηλεκτρομαγνητικό ρευματογράφο (Valeport, Model 801).

Ενα ψυκτικό μηχάνημα (SFILIGOI, 200W) και δύο αντιστάσεις (FLUVAL tronic, 300 W) διατηρούσαν τη θερμοκρασία σταθερή στους 28°C, ενώ υπήρχε συνεχής παροχή οξυγόνου με χρήση αεραγωγού. Για τη διατήρηση της ελασματικής ροής τοποθετήθηκαν πλαστικά καλαμάκια, ενώ ταυτόχρονα το ύψος του νερού στο κανάλι διατηρούνταν στα 5 cm στα πειράματα που αφορούσαν στις νύμφες και στα 4 cm για τα ενήλικα αρσενικά. Επιπλέον, τα καλαμάκια χρησίμευαν και στην πρόληψη της διαφυγής των ατόμων από το κανάλι αφού ήταν τοποθετημένα στη δεξιά πλευρά του καναλιού, δηλαδή προς αυτήν που κολυμπούσαν τα ψάρια αντίθετα με τη ροή του νερού.



Εικόνα 2.2: Ειδικά σχεδιασμένη κολυμβητική συσκευή A) πλάγια όψη, B) κάτοψη (Koumoundouros *et al.* 2009)

Οι οργανισμοί που επρόκειτο να ασκηθούν μετρήθηκαν σε mm χαρτί για να προσδιοριστεί το ολικό τους μήκος ούτως ώστε να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης. Επίσης, ελέγχθηκαν οπτικά για τυχόν ανωμαλίες στο σχήμα του σώματος. Κατόπιν, υποβλήθηκαν σε εικοσιτετράωρη περίοδο νηστείας. Τα άτομα τοποθετούνταν ανά ζεύγη στη συσκευή αλλά ο υπολογισμός της U_{crit} γινόταν ατομικά. Η σειρά με την οποία τα ζεύγη τοποθετούνταν στο κανάλι ήταν εναλλασσόμενη για τις δύο συνθήκες των 0 mg/L και των 200 mg/L.

Αρχικά, παρέμεναν για 5 λεπτά στο κανάλι σε μηδενική ταχύτητα ροής νερού με σκοπό τον εγκλιματισμό στο καινούριο περιβάλλον και την εξερεύνηση του καναλιού. Η ταχύτητα σταδιακά αυξανόταν κατά 2 μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο κάθε 15 λεπτά, μέχρις ότου τα άτομα να φτάσουν την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης. Η ταχύτητα αυτή έχει προσεγγιστεί όταν τα άτομα έχουν φτάσει σε τέτοιο σημείο κόπωσης που δεν μπορούν να κολυπήσουν άλλο. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως έχουν παρασυρθεί τρεις φορές εκτός καναλιού, εγκαταλείποντάς το εξουθενωμένα και μη ανταποκρινόμενα στα οπτικοακουστικά ερεθίσματα (Koumoundouros *et al.* 2002, 2009).

Τελικά, η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης υπολογίστηκε από τον τύπο $U_{crit} = U_i + (U_{ii} * t_i / t_{ii})$ (Brett 1964). Στον τύπο αυτό το U_i είναι η μεγαλύτερη ταχύτητα κολύμβησης σε χιλιοστά, που το κάθε άτομο κατάφερε να διατηρήσει για ολόκληρο το διάστημα των 15 λεπτών, U_{ii} το βήμα αύξησης της ταχύτητας (2 μήκη σώματος) σε χιλιοστά, σταθμισμένο με το ολικό μήκος του οργανισμού, t_i ο χρόνος σε λεπτά που ο οργανισμός παρέμεινε μέσα στο κανάλι στην ταχύτητα που εξαντλήθηκε και t_{ii} το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ δύο βημάτων (15 λεπτά, σταθερό).

Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας που αφορούσε στην κολυμβητική ικανότητα, τόσο οι μεταμορφούμενες νύμφες όσο και τα ενήλικα αρσενικά άτομα συλλαμβάνονταν και αναισθητοποιούνταν με 2% MS222 (tricaine methanesulfonate). Στη

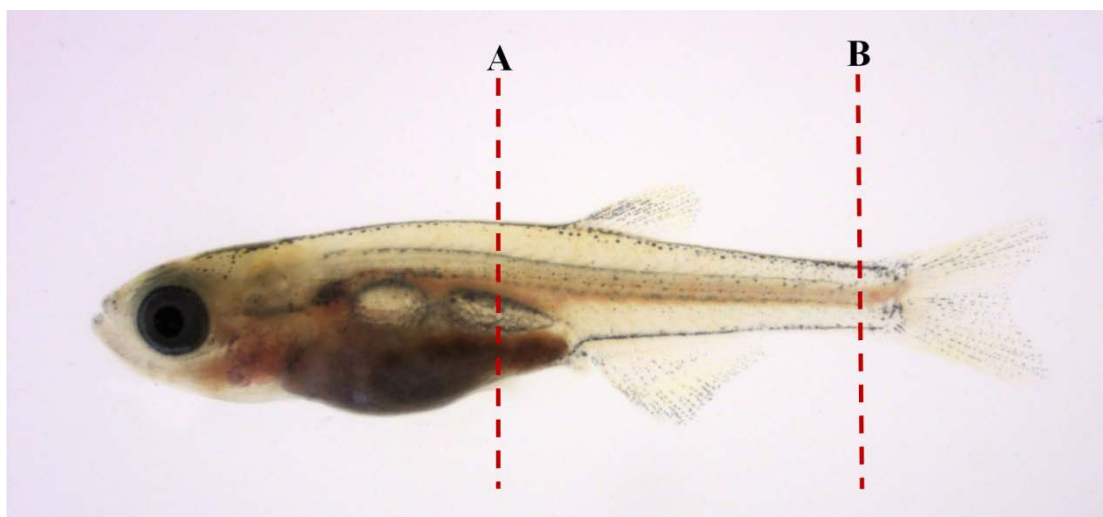
συνέχεια, τα νεαρά ιχθύδια φωτογραφήθηκαν με κάμερα ενσωματωμένη σε στερεοσκόπιο (OLYMPUS SZ61) ενώ τα ενήλικα αρσενικά με ψηφιακή μηχανή (Canon PowerShot G9) και χρήση φωτεινής τράπεζας. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από την αριστερή πλευρά των ατόμων (Koumoundouros *et al.* 2009) και χρησιμοποιήθηκαν για τον ακριβές υπολογισμό του ολικού τους μήκους (Εικόνα 2.3) με το πρόγραμμα tpsDig 1.37 (Dimitriadi *et al.* 2018) αλλά και την ανάλυση του σχήματός τους με γεωμετρική μορφομετρία. Μετά τη φωτογράφιση τα άτομα που βρέθηκε ότι απέκλιναν από το φυσιολογικό σχήμα δεν συμπεριλήφθηκαν στα αποτελέσματα. Αφότου βρέθηκε το ολικό μήκος υπολογίστηκε η σχετική κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (RU_{crit}) από τον τύπο $RU_{crit} = U_{crit} * TL^{-1}$ (Beamish 1978), η οποία ουσιαστικά αποτελεί κανονικοποίηση της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης ως προς το ολικό μήκος των οργανισμών με ακρίβεια 0,1 χιλιοστού.



Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση των σημείων που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του ολικού μήκους των ατόμων. Η απόσταση AB αποτελεί το ολικό μήκος (total length) για κάθε άτομο

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση Bonferromi αφού προηγουμένως ελέγχθηκαν οι προϋποθέσεις της ομοιογένειας των διακυμάνσεων (Levene test) και η κανονική κατανομή των δεδομένων (Kolmogorov-Smirnov & Lilliefors test).

Μετά τις δοκιμές κολύμβησης, τα άτομα θυσιάστηκαν με υπερβολική δόση αναισθητικού (4% MS222) και υποβλήθηκαν σε τομή δύο σημείων. Η πρώτη τομή έγινε εκεί όπου τελειώνει το στομάχι, (σημείο A, Εικόνα 2.4) με σκοπό την αποθήκευση της κεφαλής σε φορμαλίνη 5% και τη μελέτη της επίδρασης της MCLR στο σχήμα της καρδιάς. Η δεύτερη τομή έγινε πριν από τον ουραίο μίσχο (σημείο B, Εικόνα 2.4) με σκοπό τον εγκλεισμό του δείγματος σε OCT (Optimal Cutting Temperature compound), την ψύξη σε μεθυλοβουτάνιο στους -80°C , την αποθήκευση στους -80°C και τη μελέτη της επίδρασης της MCLR στους κόκκινους μύες.



Εικόνα 2.4: Φωτογραφία στερεοσκοπίου από μεταμορφούμενη νύμφη. Τα σημεία A και B αντιπροσωπεύουν τα μέρη του σώματος που πραγματοποιήθηκαν οι τομές με σκοπό την αποθήκευση της κεφαλής και του κορμού για τη μελέτη της καρδιάς και των μυών αντίστοιχα.

2.4 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στη μορφολογία της καρδιάς των νυμφών

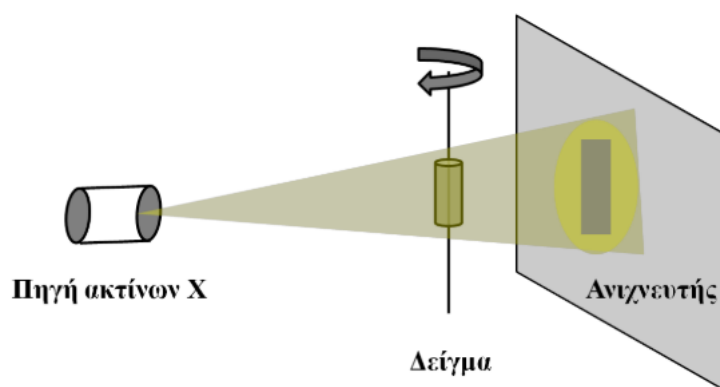
Για τη μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος των κυανοβακτηρίων στην καρδιά των μεταμορφούμενων νυμφών πραγματοποιήθηκε υπολογιστική μικροτομογραφία ακτίνων X (micro-computed tomography, micro-CT) στα κεφάλια που είχαν κοπεί και αποθηκευτεί σε φορμαλίνη για αυτό το σκοπό. Ο μικροτομογράφος SkyScan 1172 (Εικόνα 2.5) που χρησιμοποιήθηκε εδράζεται στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών Κρήτης. Οι ιστοί είχαν προηγουμένως υποστεί χρώση για 6 μέρες σε ειδικό διάλυμα 2.5% φωσφομολυβδαινικού οξέος, που καθιστά πιο ευδιάκριτη την καρδιά στο μικροτομογράφο (Descamps *et al.* 2014), και σταδιακή αφυδάτωση σε αυξανόμενη συγκέντρωση αιθανόλης 70%.



Εικόνα 2.5: Φωτογραφία του μικροτομογράφου SkyScan 1172.

Τα δείγματα τοποθετούνταν μέσα σε δοχείο σάρωσης στο μικροτομογράφο που περιείχε 70% αιθανόλη και ήταν σφραγισμένο με πλαστελίνη, ώστε να αποφευχθεί πιθανή συρρίκνωση του ιστού λόγω εξάτμισης. Η σάρωση έγινε ατομικά και εναλλάξ ανά συνθήκη, πρώτα των ατόμων που προέρχονταν από την πρώτη επανάληψη και έπειτα αυτών από τη δεύτερη. Συνολικά, σαρώθηκαν 8 δείγματα από τη συνθήκη 0 mg/L και 9 δείγματα από τη συνθήκη 200 mg/L του εκχυλίσματος. Τα δείγματα αυτά βρισκόντουσαν εντός του μέσου όρου της RU_{crit} για κάθε συνθήκη. Οι παράμετροι σάρωσης που επιλέχθηκαν (1,45-3,11 μm μέγεθος ογκοστοιχείου, 180° περιστροφή, 650 ms χρόνος έκθεσης, 49-50 kV τάση, 198-200 μΑ ένταση) παρέμεναν σταθεροί για όλα τα δείγματα που σαρώθηκαν.

Η σάρωση και η απεικόνιση των υπό μελέτη δομών σε τρεις διαστάσεις πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ακτίνων X. Κατά τη σάρωση, το δείγμα τοποθετείται και περιστρέφεται μεταξύ μιας σειράς ανιχνευτών και μιας πηγής ακτίνων X υψηλής ενέργειας. Καθώς περιστρέφεται, αποκτάται μια εικόνα προβολής (projection image) από κάθε δυνατή γωνία (Εικόνα 2.6). Οι εικόνες προβολής είναι εικόνες διαβαθμίσεων του γκρι, στις οποίες απεικονίζεται η απορρόφηση των ακτίνων X από το αντικείμενο. Πυκνές περιοχές (μικρή διέλευση των ακτίνων X) αντιστοιχούν στο λευκό χρώμα, ενώ λιγότερο πυκνές περιοχές (μεγάλη διέλευση των ακτίνων X) αντιστοιχούν στο μαύρο.



Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση της λήψης των εικόνων στο μικροτομογράφο (από Δημητριάδη 2018)

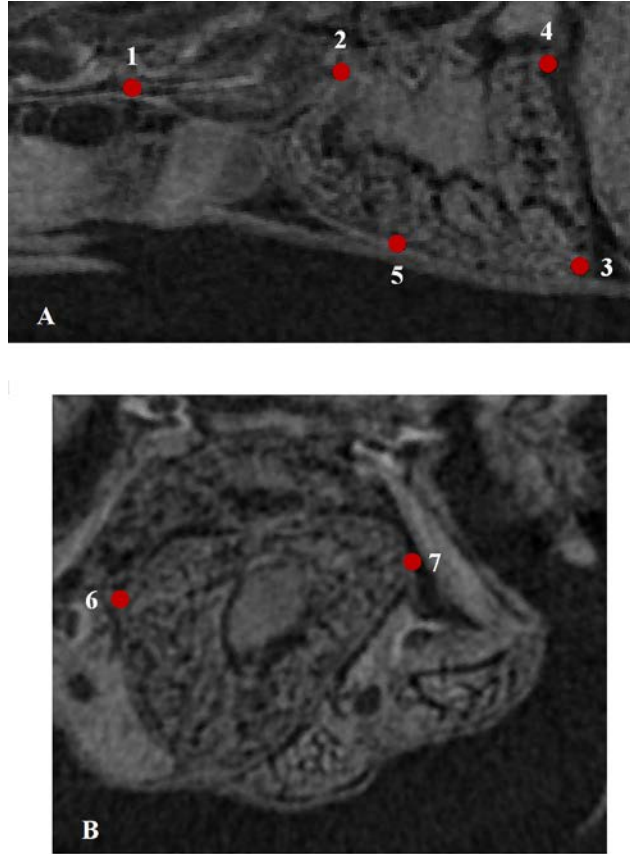
Συνοπτικά, αφού ολοκληρώθηκαν οι μικροτομογραφίες, έγινε ανακατασκευή των εικόνων προβολής που προέκυψαν από τη σάρωση, με χρήση του λογισμικού NRecon, SKYSCAN με σκοπό τη δημιουργία εύκολα αναλύσιμων, εγκάρσιων, ψηφιακών τομών TIFF μορφής (Dimitriadi *et al.* 2018). Οι εικόνες αυτές εισήχθησαν στο πρόγραμμα Amira v.5.2 (VSG, Burlington USA) για την περαιτέρω δισδιάστατη και τρισδιάστατη επεξεργασία τους.

Η διαδικασία αυτή έγινε ώστε να υπολογιστούν οι διάφορες παράμετροι που ορίζουν το σχήμα της καρδιάς. Έτσι, για κάθε δείγμα, ορίστηκε στο Amira ένα επίπεδο τομής (Oblique slice) το οποίο διερχόταν από το κλείθρο, το οπίσθιο άκρο του αυλού του αρτηριακού βολβού και το κέντρο του πρώτου σπονδύλου. Οι συγκεκριμένες θέσεις διέλευσης καθιστούν ευδιάκριτο τον αρτηριακό βολβό και την κοιλία της καρδιάς, δομές που έχουν επιλεγεί ως οι καταλληλότερες για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν το σχήμα της καρδιάς (Hicken *et al.* 2011, Dimitriadi *et al.* 2018).

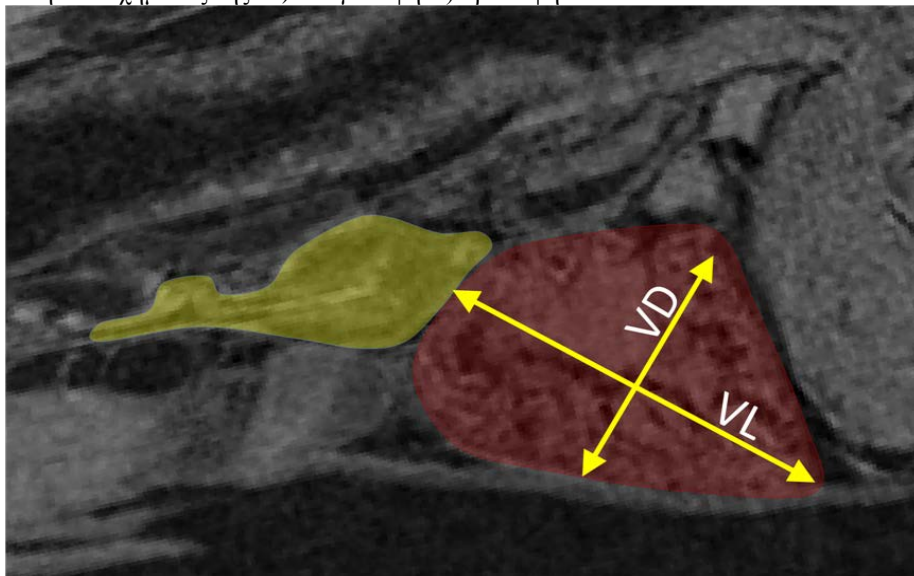
Για τη μορφομετρική ανάλυση, τοποθετήθηκαν επτά ορόσημα στις θέσεις που απεικονίζονται στην Εικόνα 2.7. Η απόσταση 1-2 ορίστηκε ως το μήκος του αρτηριακού βολβού, ενώ ως μήκος κοιλίας η απόσταση 2-3 και ως ύψος η 4-5. Τα σημεία 6 (αριστερά) και 7 (δεξιά) οριοθετούν το πλάτος της κοιλίας. Για τη μεταβολή του σχήματος της καρδιάς και συγκεκριμένα της κυκλικότητας της κοιλίας εκτιμήθηκε ο λόγος μήκους προς ύψους της κοιλίας (VL/VD, Εικόνα 2.8) ο οποίος δείχνει την κυκλικότητα της και είναι κατάλληλος δείκτης της καρδιακής παροχής στο zebrafish (Hicken *et al.* 2011),(Εικόνα 2.8). Παράλληλα, έγινε κανονικοποίηση των εκτιμώμενων αποστάσεων ως προς το ολικό μήκος κάθε δείγματος.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαχωρισμού (discriminant analysis) για τις συντεταγμένες των οροσήμων στο τρισδιάστατο επίπεδο με χρήση του προγράμματος MorphoJ. Η ανάλυση αυτή επέτρεψε την εξαγωγή των τετραγώνων των αποστάσεων Mahalanobis, καθώς και των διανυσμάτων για τις τριπλασιασμένες ακραίες τιμές (0 mg/L–200 mg/L) του σχήματος της καρδιάς.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε με μη παραμετρικό Mann-Whitney δοκιμή. Παράλληλα, για την εύρεση κάποιας πιθανής συσχέτισης μεταξύ των ορόσημων και των αποστάσεων που αυτά ορίζουν βρέθηκε ο μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης Spearman.



Εικόνα 2.7: Απεικόνιση των θέσεων των μορφομετρικών οροσήμων που τοποθετήθηκαν στην καρδιά για τη μελέτη του σχήματός της. Α) πλάγια όψη Β) πρόσοψη.



Εικόνα 2.8: Απεικόνιση πλάγιας όψης του αρτηριακού βολβού με κίτρινο χρώμα και της κοιλίας με κόκκινο χρώμα. VL: ventricle length (μήκος κοιλίας), VD: ventricle depth (ύψος κοιλίας)

2.5 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στην ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων

Όταν τα ψάρια της πρώτης και της δεύτερης πειραματικής επανάληψης έφθασαν τις 31 και 26 dpf αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 30 έως 50 ατόμων ανά συνθήκη και ανά επανάληψη με σκοπό τη μελέτη των σκελετικών τους στοιχείων. Μετά τη δειγματοληψία, οι νύμφες φωτογραφήθηκαν στο στερεοσκόπιο (OLYMPUS SZ61) με ενσωματωμένη κάμερα (Luminera INFINITY 1), ενώ τα ενήλικα και με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Canon PowerShot G9) σε φωτεινή τράπεζα. Από τις φωτογραφίες μετρήθηκε το ολικό μήκος των ιχθύων στο λογισμικό ImageJ.

Τα άτομα της πρώτης επανάληψης είχαν μέσο όρο ολικού μήκους $16,4 \pm 2,4$ mm από τη συνθήκη των 0 mg/L ενώ αυτά που προέρχονταν από τα 200 mg/L είχαν ολικό μήκος $13,9 \pm 1,8$ mm. Για τη δεύτερη επανάληψη τα άτομα από την ομάδα ελέγχου είχαν ολικό μήκος $10,7 \pm 1,6$ χιλιοστά ενώ αυτά από την εκτεθειμένη ομάδα ήταν $9,9 \pm 1,6$ χιλιοστά ολικό μήκος.

Τα δείγματα συντηρήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 10% και στη συνέχεια έγινε χρώση με κυανό της Αλσατίας και ερυθρό της Αλιζαρίνης. Συνοπτικά, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της συγκεκριμένης μεθόδου χρώσης, τα δείγματα ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό και επωάστηκαν για μία ώρα σε 50% αιθανόλη, υπό ανάδευση, με σκοπό να απομακρυνθεί το συντηρητικό. Κατόπιν, επωάστηκαν, υπό ανάδευση, όλη νύχτα στο διάλυμα των χρώσεων Alcian Blue-Alizarin Red. Την επόμενη ημέρα έγινε πλύση με απιονισμένο νερό και προσθήκη σε υπεροξειδίου του υδρογόνου για 3 λεπτά ώστε να διαρρηχτούν τα μελανοφόρα κύτταρα των οργανισμών. Ακολούθησαν διαδοχικές αλλαγές διαλύματος γλυκερόλης-υδροξειδίου του καλίου, το οποίο καθιστά διάφανους τους μύες, και παρέμειναν υπό ανάδευση για όλη νύχτα. Την τρίτη και τελευταία ημέρα τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 50% γλυκερόλης στο οποίο και συντηρήθηκαν μέχρι τη μελέτη τους.

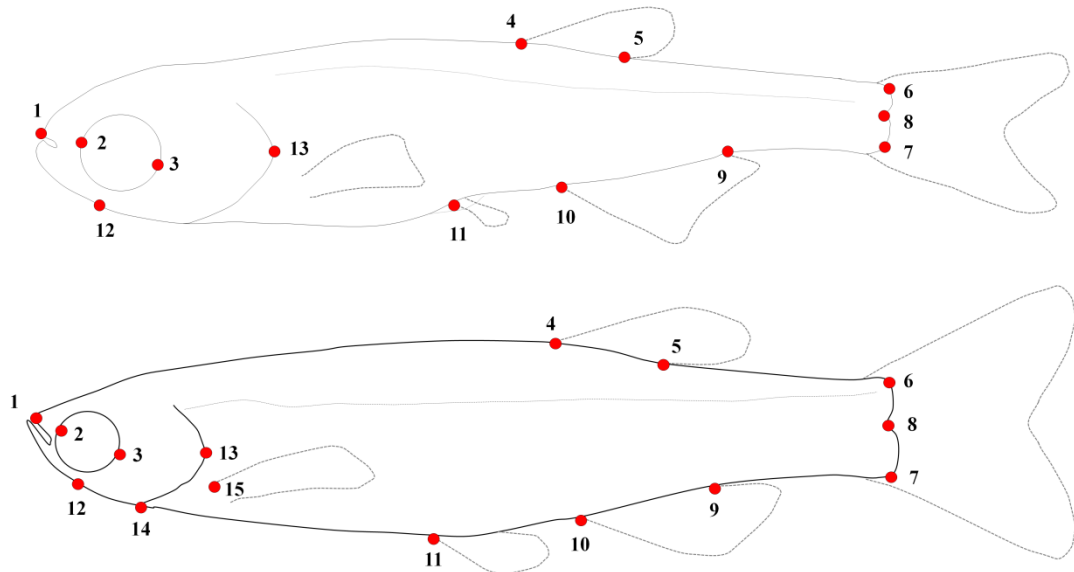
Η μελέτη του σκελετού των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε στερεοσκόπιο Carl Zeiss stemi DV4, με χαμηλό φωτισμό, αφού προηγουμένως είχαν αφαιρεθεί όλα τα λέπια από τους οργανισμούς. Το σύνολο του σκελετού εξετάστηκε για την παρουσία ανωμαλιών

Για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών στη συχνότητα εμφάνισης των παραμορφώσεων μεταξύ των ατόμων της ομάδας ελέγχου (0 mg/L συγκέντρωση εκχυλίσματος) και αυτών της ομάδας που είχε εκτεθεί στην τοξίνη (200 mg/L συγκέντρωση εκχυλίσματος) πραγματοποιήθηκε G-test.

2.6 Επίδραση της έκθεσης των εμβρύων στην MCLR στο σχήμα του σώματος των μεταμορφούμενων νυμφών και των ενήλικων αρσενικών ατόμων

Η επίδραση της τοξίνης MCLR στην εξωτερική μορφολογία των νυμφών και των ενήλικων αρσενικών ατόμων εξετάστηκε για 54 και 53 άτομα αντίστοιχα τα οποία προέρχονταν από το σύνολο των πειραματικών επαναλήψεων. Από τα άτομα αυτά 30 νύμφες προέρχονταν από την ομάδα ελέγχου (0 mg/L) και 24 από την εκτεθειμένη στην τοξίνη (200 mg/L) ενώ για τα ενήλικα αρσενικά το πλήθος των ατόμων ανά συνθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης ήταν 27 και 26.

Αρχικά, εφαρμόστηκε η μέθοδος της γεωμετρικής μορφομετρίας όπου τοποθετήθηκαν 13 ομόλογα μορφομετρικά ορόσημα (landmarks) στις νύμφες και 15 στα ενήλικα αρσενικά άτομα (Εικόνα 2.9). Η τοποθέτηση έγινε σε ευδιάκριτες ανατομικές περιοχές των οργανισμών, σε φωτογραφίες που προέρχονταν από τα άτομα που είχαν υποβληθεί σε κολυμβητική άσκηση εξαιρουμένων αυτών με εμφανής εξωτερικές παραμορφώσεις.



Εικόνα 2.9: Θέσεις των μορφομετρικών οροσήμων που τοποθετήθηκαν στις μεταμορφούμενες νύμφες (επάνω) και στα ενήλικα (κάτω).

Για τη διεξαγωγή της παραπάνω διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό tpsUtil και tpsDig 2.17 (Rohlf 2015) ενώ σε επόμενο βήμα οι διαστάσεις (x,y) των σημείων κάθε δείγματος, που προέκυψαν από αυτά τα λογισμικά εισήχθησαν στο πρόγραμμα MorphoJ. Το συγκεκριμένο λογισμικό κατέστησε δυνατή την εύρεση του κεντροειδούς μεγέθους² και της μέσης διαμόρφωσης σχήματος με τη μέθοδο "Thin Plate Spline" έτσι ώστε να γίνει εξάλειψη των επιπτώσεων του μεγέθους, της θέσης, και του προσανατολισμού του κάθε ατόμου στο σχήμα του σώματος.

Για την εξέταση της στατιστικής σημαντικότητας της επίδρασης της MCLR στο σχήμα του σώματος εφαρμόστηκε ανάλυση διαχωρισμού (discriminant analysis) στο MorphoJ μεταξύ των δύο συνθηκών, τόσο για τα ενήλικα άτομα όσο και για τις νύμφες. Παράλληλα, η ανάλυση αυτή επέτρεψε την εξαγωγή των τετραγώνων των αποστάσεων Mahalanobis, καθώς και των διανυσμάτων για τις τριπλασιασμένες ακραίες τιμές του σχήματος.

Τέλος, εξετάστηκε αν ο τρόπος με τον οποίο αλλάζει το σχήμα του σώματος των νυμφών, υπό την επίδραση των εκχυλισμάτων του κυανοβακτηρίου, επηρεάζει την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησής τους. Για τη συγκεκριμένη μελέτη έγινε χρήση του προγράμματος tpsRelW (Rohlf 2010) αφού προηγουμένως τα μορφομετρικά σημεία των δειγμάτων είχαν επεξεργαστεί με το λογισμικό πρόγραμμα IMP (CoorGen6D).

2.7 Επίδραση της έκθεσης των εμβρύων στην MCLR στους κόκκινους μύες των μεταμορφούμενων νυμφών και των ενήλικων αρσενικών ατόμων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 1.4 το σύνολο των ατόμων που υποβλήθηκαν σε κολυμβητική άσκηση θυσιάστηκαν και ο κορμός τους απομονώθηκε, εγκλείστηκε σε OCT και φυλάχθηκε στην κατάψυξη στους -80°C . Από το σύνολο αυτών των δειγμάτων επιλέχθηκαν 5 έως 6 δείγματα ανά συνθήκη από κάθε πειραματική επανάληψη τόσο για τις

² Το κεντροειδές μέγεθος ορίζεται ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των ελάχιστων αποστάσεων όλων των μορφομετρικών οροσήμων από ένα σημείο που ονομάζεται κεντροειδές (Rohlf 1993)

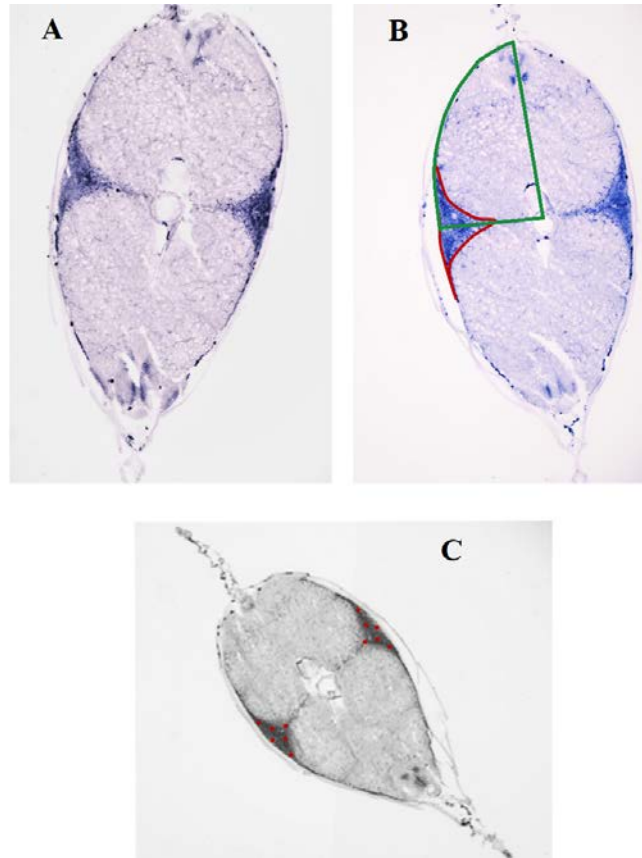
νύμφες όσο και για τα ενήλικα αρσενικά άτομα. Η επιλογή των δειγμάτων έγινε με βάση το μέσο όρο της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης. Κατόπιν, φτιάχτηκαν εκμαγεία από OCT στα οποία τοποθετήθηκαν τα δείγματα που είχαν καταψυχθεί. Τα εκμαγεία πάγωσαν σε μεθυλοβουτάνιο, στους -80°C ώστε να γίνουν εγκάρσιες κρυτομές για τη μελέτη των κόκκινων μυών.

Τα εκμαγεία παρέμεναν για μία ώρα στους -20°C , στο εσωτερικό της κρυτόμου ώστε να μπορέσουν να ξεπαγώσουν και να ληφθούν οι κρυτομές. Οι τομές ήταν πάχους $20\mu\text{m}$ και τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες "superfrost plus" (Thermo Scientific). Στη συνέχεια, κάθε αντικειμενοφόρος ξεχωριστά υποβλήθηκε σε χρώση νιτροκυανού του τετραζολίου (Nachlas *et al.* 1957) (Εικόνα 2.10-A). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη χρώση, το υδρογόνο που απελευθερώνεται από την ενζυμική δραστηριότητα της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης προσδένεται στο τετραζόλιο μετατρέποντάς το στην κυανή φορμαζάνη η οποία τελικά θα υποδηλώσει την παρουσία της SDH. Η ηλεκτρική αφυδρογονάση είναι ένζυμο των μιτοχονδρίων που συμμετέχει στην αερόβια διαδικασία του κύκλου του κιτρικού οξέος, ο οποίος παράγει την ενέργεια για την τροφοδότηση των αερόβιων κόκκινων μυών (Pool *et al.* 1979).

Κατά τη δοκιμασία αυτή οι αντικειμενοφόροι πλάκες επωάζονταν σε υδατόλουτρο στους 37°C στο διάλυμα της χρώσης για διάστημα 20 λεπτών. Στη συνέχεια, ξεπλένονταν δύο φορές με απιονισμένο νερό και παρέμεναν στον αέρα για 30 λεπτά με σκοπό να φύγουν οι φυσαλίδες. Τέλος, επωάζονταν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα 10% φορμαλίνης ώστε να μονιμοποιηθούν, ξεπλένονταν με νερό βρύσης και γινόταν προσθήκη γλυκερίνης.

Κάθε τομή φωτογραφήθηκε σε στερεοσκόπιο OLYMPUS SZX16 με ενσωματωμένη κάμερα QImaging (Retiga R6). Οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα ImagePro-Plus v6.0.0.260, στο οποίο, αφού ενσωματώθηκε η μεγέθυνση στην οποία λήφθηκαν μετατράπηκαν από έγχρωμες στην κλίμακα του γκρι. Σε επόμενο βήμα, αφαιρέθηκε η ένταση του υπόβαθρου από τον ιστό, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της αντίστροφης οπτικής πυκνότητας των κόκκινων μυών με τοποθέτηση 12 σημείων (Εικόνα 2.10-C) και υπολογίστηκε ο μέσος όρος αυτών για κάθε τομή. Επιπλέον, έγινε μέτρηση του εμβαδού των κόκκινων αλλά και των λευκών μυών του ενός τεταρτημόριου της τομής (Εικόνα 2.10-B). Μετά τη μέτρηση υπολογίστηκε ο λόγος του εμβαδού λευκών προς κόκκινων μυϊκών ινών. Οι μετρήσεις έγιναν για δύο κοντινές τομές από κάθε δείγμα στις οποίες υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Όλες οι τομές πάρθηκαν από την αιματική περιοχή της σπονδυλικής στήλης, αμέσως μετά την έδρα.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων τόσο για την αντίστροφη οπτική πυκνότητα όσο και για το λόγο του εμβαδού -λευκές προς κόκκινες μυϊκές ίνες- πραγματοποιήθηκε για κάθε πειραματική επανάληψη ξεχωριστά για τις νύμφες και τα ενήλικα αρσενικά άτομα. Χρησιμοποιήθηκε το Mann Whitney U test.

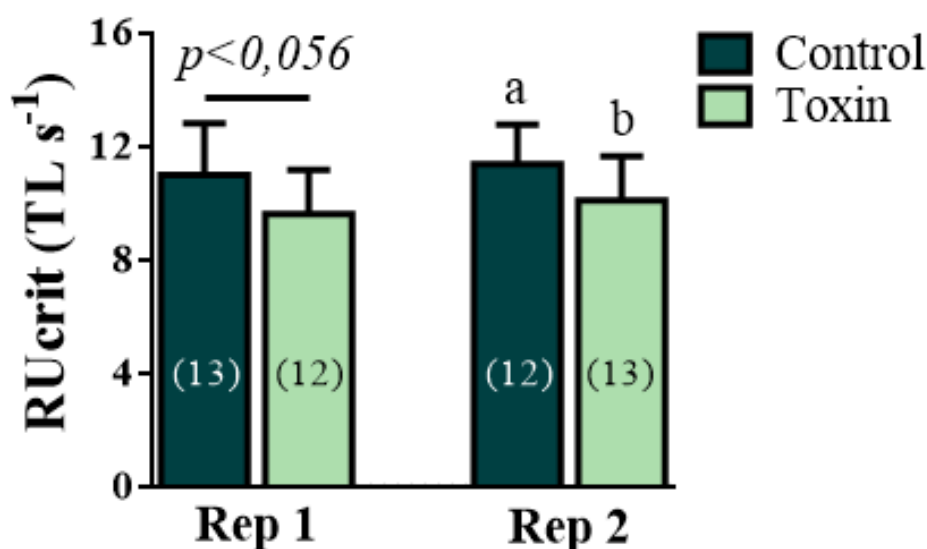


Εικόνα 2.10: Κρυτομές πάχους 20 μ m. Α) τομή έπειτα από χρώση με νιτροκυανό του τετραζολίου. Β) υπολογισμός του εμβαδού των κόκκινων μυών που απεικονίζεται με κόκκινο περίγραμμα και λευκών μυών που απεικονίζεται με πράσινο περίγραμμα. Γ) υπολογισμός της δραστηριότητας της SDH των κόκκινων μυών σε 12 σημεία.

3 Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στην κολυμβητική ικανότητα των νυμφών

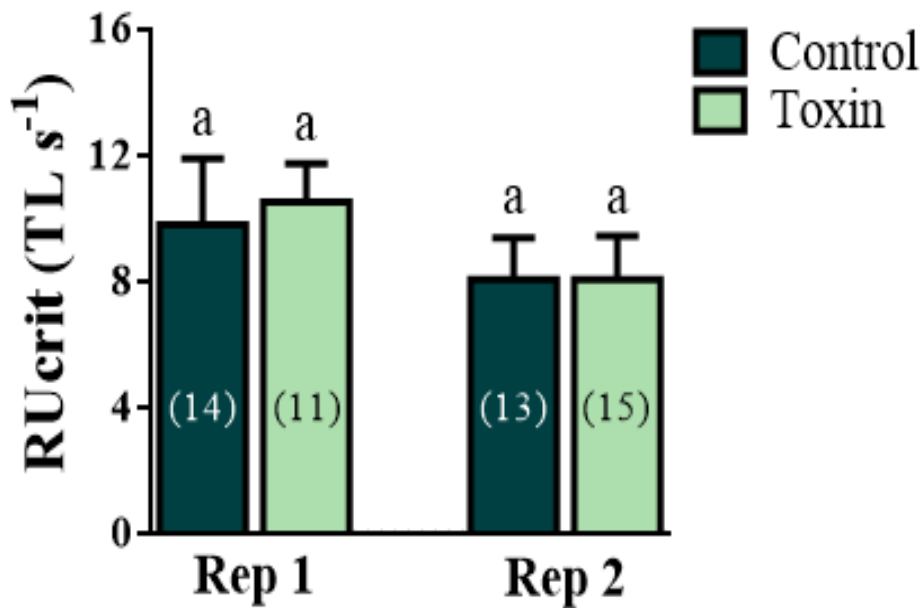
Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι η έκθεση των εμβρύων στην τοξίνη είχε σημαντική επίδραση στην αερόβια άσκηση των μεταμορφούμενων νυμφών, μειώνοντας σημαντικά την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (RU_{crit} , Εικόνα 3.1). Συγκεκριμένα, η ανάλυση Bonferroni για την πρώτη επανάληψη έδειξε πως η μείωση της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης κατά 1,4 μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο είναι σημαντική στο επίπεδο $p < 0,056$. Στη δεύτερη επανάληψη η ίδια ανάλυση έδειξε πως η μείωση κατά 1,4 μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο είναι σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,050$. Όταν τα άτομα από τις δύο επαναλήψεις ενώθηκαν σε μία κοινή ανάλυση, η μείωση που καταγράφηκε ήταν 1,3 μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο, και στατιστικά σημαντική σε $p < 0,05$.



Εικόνα 3.1: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης των δύο πειραματικών επαναλήψεων για την ομάδα των νυμφών. Αριστερά παρουσιάζεται η μεταβολή στην πρώτη επανάληψη και δεξιά η μεταβολή στη δεύτερη. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με παρουσία διαφορετικών γραμμμάτων ($p < 0,05$), ενώ το μέγεθος του δείγματος που εξετάστηκε σε κάθε συνθήκη σημειώνεται στις κολώνες. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD.

3.2 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στην κολυμβητική ικανότητα των ενήλικων αρσενικών

Σε αντίθεση με την επίδραση της τοξίνης στην κολυμβητική ικανότητα των νυμφών, τα ενήλικα αρσενικά άτομα δεν φάνηκε να επηρεάζονται σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ως προς τη συγκεκριμένη λειτουργία (Εικόνα 3.2). Η ανάλυση Bonferroni δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων που προέρχονταν από την ομάδα ελέγχου και αυτών από την ομάδα που είχε εκτεθεί στα υποθησιγόνα επίπεδα της τοξίνης κατά το εμβρυϊκό στάδιο. Το αποτέλεσμα αυτό είναι το ίδιο τόσο για κάθε επανάληψη ξεχωριστά όσο και για τα ενοποιημένα αποτελέσματα.



Εικόνα 3.2: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης των δύο πειραματικών επαναλήψεων για την ομάδα των ενήλικων αρσενικών ατόμων. Αριστερά παρουσιάζεται η μεταβολή στην πρώτη επανάληψη και δεξιά η μεταβολή στη δεύτερη. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με παρουσία διαφορετικών γραμμάτων ($p < 0,05$) ενώ το μέγεθος του δείγματος που εξετάστηκε σε κάθε συνθήκη σημειώνεται στις κολώνες. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD.

3.3 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στο σχήμα της καρδιάς των μεταμορφούμενων νυμφών

Η μη παραμετρική ανάλυση Mann-Whitney που πραγματοποιήθηκε δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στο μήκος του αρτηριακού βολβού μεταξύ των νεαρών ιχθυδίων που είχαν εκτεθεί στην MCLR και αυτών που δεν είχαν εκτεθεί. Επιπλέον, δε φάνηκε να διαφοροποιείται σημαντικά καμία άλλη απόσταση (1-2, 2-3, 4-5, 6-7, Πίνακας 3.1) μεταξύ των δύο συνθηκών.

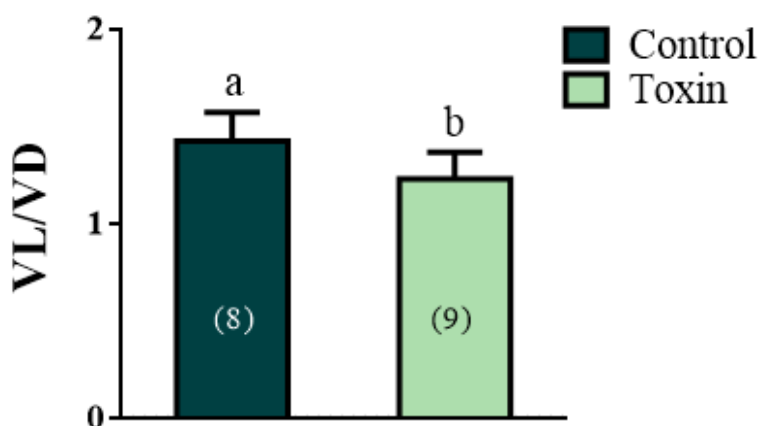
Πίνακας 3.1: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των αποστάσεων της καρδιάς που υπολογίστηκαν για τις μεταμορφούμενες νύμφες

Συνθήκη (mg/L)	Αριθμός Ατόμων Νυμφών	Απόσταση	Μέσος Όρος (mm)
0	8	1-2	0.28±0.04
		2-3	0.45±0.05
		4-5	0.32±0.04
		6-7	0.42±0.07
200	9	1-2	0.28±0.04
		2-3	0.43±0.05
		4-5	0.36±0.06
		6-7	0.44±0.06

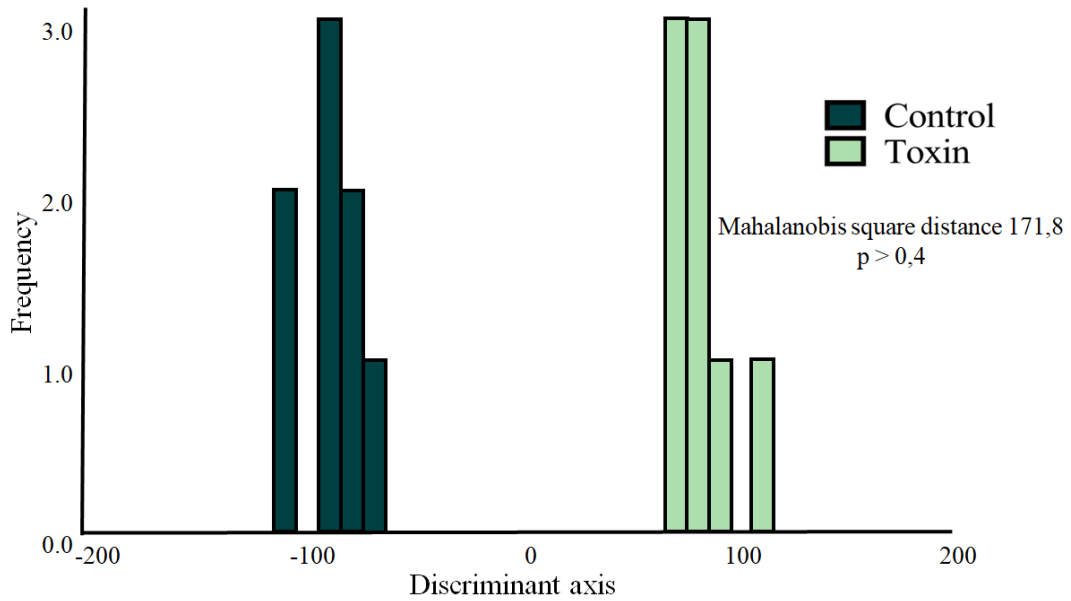
Σημαντική φάνηκε να είναι η επίδραση της αρχικής έκθεσης των εμβρύων στο λόγο VL/VD, ο οποίος μειώθηκε σημαντικά στα εκτεθειμένα άτομα ($p<0,05$, Εικόνα 3.3).

Ο συντελεστής συσχέτισης Spearman έδειξε πως το μήκος της κοιλίας σχετίζεται θετικά σε βαθμό στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p<0,05$) με το μήκος του αορτικού βολβού και το ύψος της κοιλίας. Αυτό έχει ως επακόλουθο όταν το μήκος του αορτικού βολβού ή το ύψος της κοιλίας μεγαλώνει να αυξάνεται και το μήκος αυτής μέχρι ένα βαθμό ($r=0,55$). Επιπλέον, βρέθηκε το πλάτος της κοιλίας σχετίζεται θετικά ($r=0,6$) με το ύψος της κοιλίας με αποτέλεσμα να αυξάνεται όσο αυξάνεται και αυτό σε βαθμό στατιστικά σημαντικό ($p<0,05$).

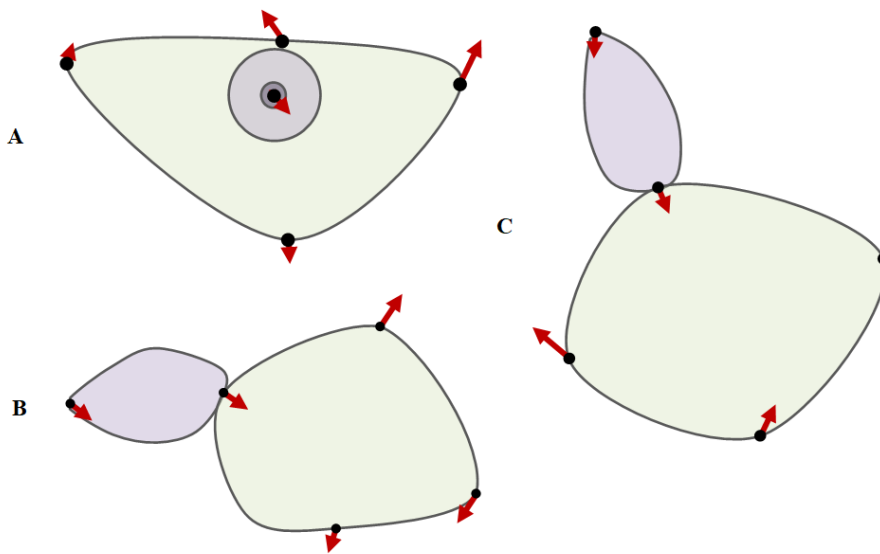
Τέλος, η ανάλυση διαχωρισμού που πραγματοποιήθηκε, έδειξε ότι αν και οι συντεταγμένες των οροσήμεων, στο τρισδιάστατο επίπεδο φάνηκε να διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο συνθηκών, αυτή η μεταβολή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.4 και Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.3: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής του λόγου του μήκους προς το ύψος της κοιλίας (VL/VD) στις νύμφες μεταξύ των δύο συνθηκών. Η παρουσία διαφορετικών γραμμμάτων υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνθηκών ($p<0,05$) ενώ το μέγεθος του δείγματος που εξετάστηκε σε κάθε συνθήκη σημειώνεται στις κολώνες. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD.



Εικόνα 3.4: Το σχήμα της καρδιάς των ιχθυδίων που εκτέθηκαν στην τοξίνη φαίνεται να διαφοροποιείται κατά μήκος του άξονα διαχωρισμού. Ωστόσο ο διαχωρισμός από τα ιχθυδία που δεν εκτέθηκαν δεν αποδείχθηκε στατιστικά σημαντικός



Εικόνα 3.5: Μεταβολή των τριπλασιασμένων διανυσμάτων των οροσίων της καρδιάς των ιχθυδίων που εκτέθηκαν στην τοξίνη. Α) πρόσοψη της καρδιάς. Β) πλάγια όψη. C) κάτοψη. Με ιώδες χρώμα δίνεται ο αορτικός βολβός και με πράσινο η κοιλία.

3.4 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στην ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων

Από τις σκελετικές παραμορφώσεις που ελέγχθηκαν (Πίνακας 3.2), τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είχαν οι δυσπλασίες που αφορούν στη σπονδυλική στήλη και συγκεκριμένα την αδυναμία ευθυγράμμισης των σπονδύλων, δηλαδή τη μετατόπισή τους από τον κεντρικό άξονα που ορίζει την αμφίπλευρη συμμετρία (Εικόνα 3.6). Οι πληθυσμοί που εκτέθηκαν ως έμβρυα στην τοξίνη, εμφάνισαν υψηλά ποσοστά αυτής της παραμόρφωσης (74-91%), ενώ αντίθετα, οι πληθυσμοί ελέγχου είχαν πολύ χαμηλότερες συχνότητες εμφάνισης της συγκεκριμένης παραμόρφωσης (4-10%). Και στις δύο πειραματικές

επανάληψης η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντική διαφοροποίηση της συχνότητας αυτής της παραμόρφωσης μεταξύ των δύο πειραματικών συνθηκών (Εικόνα 3.7).

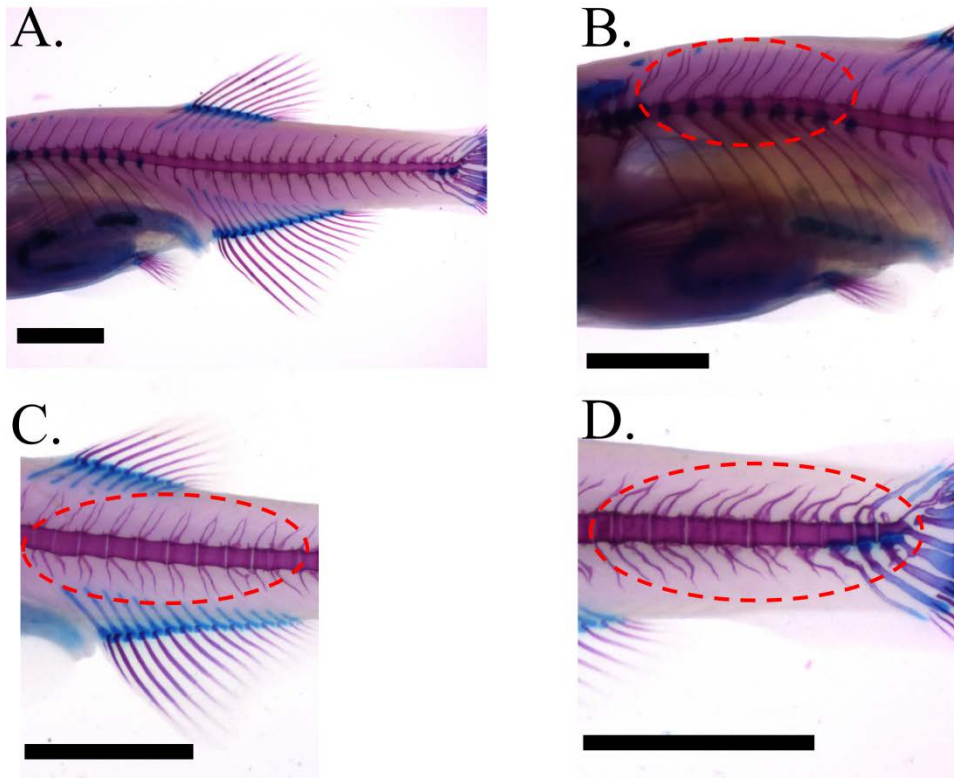
Εκτός, όμως, από τις παραμορφώσεις που αφορούν μετατοπίσεις των σπονδύλων ελέγχθηκε και η εμφάνιση άλλων ειδών σκελετικών αποκλίσεων από το φυσιολογικό που αφορούν τόσο τη σπονδυλική στήλη όσο την ουρά και το κεφάλι (Εικόνα 3.8). Οι δυσπλασίες αυτές, περιελάμβαναν την κύφωση, τη λόρδωση, συντήξεις σπονδύλων ή κεκαμμένες αιματικές και νευρικές αποφύσεις. Επιπλέον, στο κεφάλι παρατηρήθηκε η ανάπτυξη του συνδρόμου διασταυρούμενου δαγκώματος (cross-bite) (Koumoundouros *et al.* 2010), ενώ στην ουρά έγινε προσπάθεια εύρεσης της αναλογίας των λεπιδοτριχίων του άνω και κάτω λοβού καθώς και τυχόν ανωμαλιών που αφορούν το ουρόστυλο και άλλες σκληρές δομές της ουράς όπως τα επουραία.

Από τις παραμορφώσεις αυτές το σύνδρομο διασταυρούμενου δαγκώματος φαίνεται να αναπτύσσεται μόνο στους πληθυσμούς που εκτέθηκαν ως έμβρυα στο εκχύλισμα του κυανοβακτηρίου. Ωστόσο, η συχνότητα εμφάνισης του είναι χαμηλή (2-6%) και λόγω απουσίας του από την ομάδα ελέγχου δεν είναι δυνατός ο στατιστικός έλεγχος για το αν η εμφάνιση του συνδέεται με την έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα ή όχι. Από τα αποτελέσματα του G-test για τις υπόλοιπες σκελετικές ανωμαλίες που εμφανίστηκαν, δείχθηκε ότι δεν σχετίζονται με την έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα ($p>0,05$) αν και η συχνότητα των παραμορφώσεων του ουραίου πτερυγίου διέφερε στα εκτεθειμένα άτομα της δεύτερης επανάληψης από τα μη εκτεθειμένα ($p<0,1$).

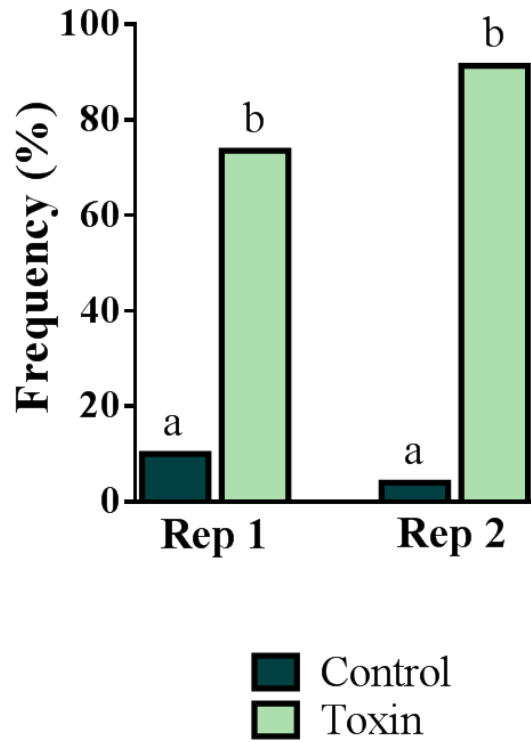
Συνολικά, παρατηρείται ότι οι διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης παραμορφώσεων των εκτεθειμένων και μη εκτεθειμένων στο εκχύλισμα πληθυσμών αφορούν σοβαρές σκελετικές ανωμαλίες όπως οι μετατοπίσεις των σπονδύλων και το σύνδρομο cross-bite. Οι υπόλοιπες παραμορφώσεις που ελέγχθηκαν και δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών θεωρούνται μικρής έντασης με εξαίρεση τη σκολίωση του ουραίου μίσχου που όμως αναπτύχθηκε σε χαμηλά ποσοστά (3-12%).

Πίνακας 3.2: Ποσοστά εμφάνισης των παραμορφώσεων που ελέγχθηκαν ανά συνθήκη για κάθε πειραματική επανάληψη ξεχωριστά. R: πειραματική επανάληψη. n: αριθμός ατόμων. UCFR: λεπιδοτρίχια άνω λοβού ουραίου πτερυγίου. LCFR: λεπιδοτρίχια κάτω λοβού ουραίου πτερυγίου.

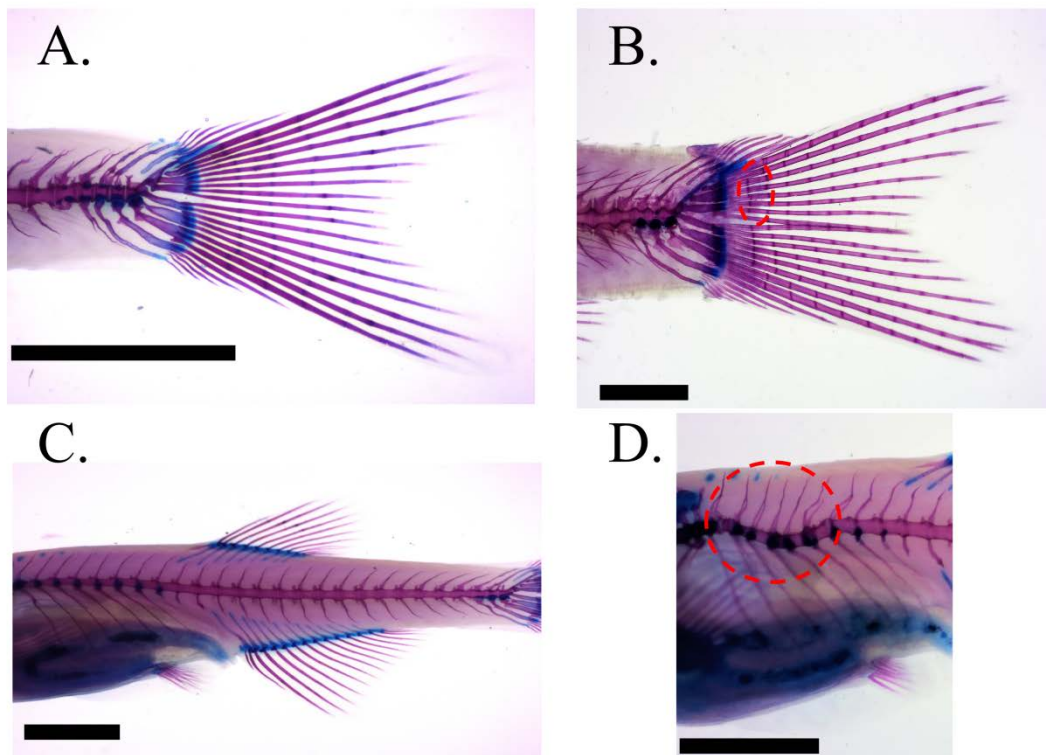
Deformities	R1	R1	R2	R2
	0 mg/L	200 mg/L	0 mg/L	200 mg/L
Vertebral displacement	10	74	4	91
Crossbite	0	6	0	2
Caudal fin Scoliosis	3	3	12	9
Abnormal Caudal fin	40	53	8	24
UCFR/LCFR	77	85	88	93
Other vertebral deformities	53	56	48	72
n	30	34	50	46



Εικόνα 3.6: Παρουσίαση της σκελετικής παραμόρφωσης που αφορά στην αδυναμία ευθυγράμμισης των σπονδύλων. Α) κορμός νύμφης από την ομάδα ελέγχου. Β) προ-αιματική περιοχή με εμφανή μετατόπιση σπονδύλων. Γ) αιματική περιοχή με την παραμόρφωση. Δ) αιματική περιοχή ακριβώς πριν το ουραίο πτερύγιο με την παραμόρφωση. Η κλίμακα είναι 1 mm, οι εικόνες Β, Γ, Δ αφορούν σε δείγματα από τη συνθήκη 200 mg/L.



Εικόνα 3.7: Διαγραμματική απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης μετατοπισμένων σπονδύλων ανά συνθήκη για κάθε πειραματική επανάληψη. Συχνότητες με διαφορετικό γράμμα ήταν σημαντικά διαφορετικές μεταξύ τους ($p < 0.05$, G-test).

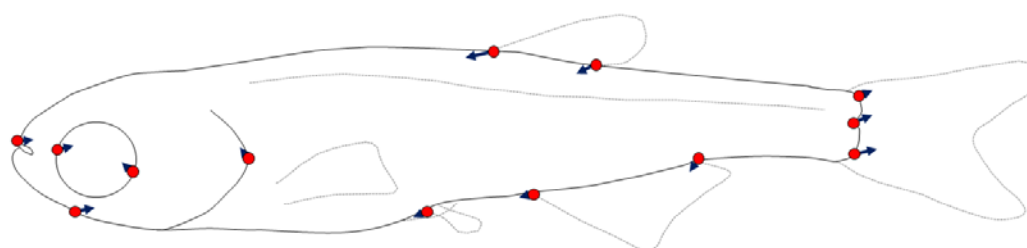
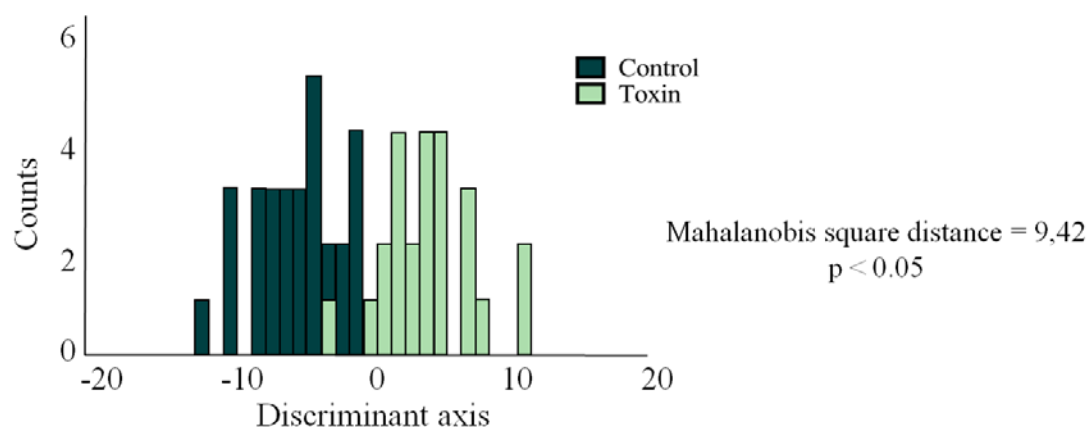


Εικόνα 3.8: Παρουσίαση άλλων σκελετικών αποκλίσεων από το φυσιολογικό που σχηματίστηκαν. A) φυσιολογικό ουραίο πτερύγιο. B) ουραίο πτερύγιο με λιγότερα λεπιδοτρίχια από το φυσιολογικό. C) φυσιολογικός κορμός. D) κορμός με λόρδωση στην προ-αιματική περιοχή. Η κλίμακα είναι 1 mm.

3.5 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στο σχήμα σώματος των νυμφών

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης διαχωρισμού κάθε πειραματικής επανάληψηςδείχθηκε ότι η έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα κυανοβακτηρίων δεν επέδρασε σημαντικά στο σχήμα του σώματος των μεταμορφούμενων νυμφών ($p > 0,05$).

Όταν όμως η ανάλυση έγινε κατά πειραματική συνθήκη (με ενοποιημένα τα δείγματα των δύο επαναλήψεων) το σχήμα του σώματος της ομάδας που είχε εκτεθεί στην τοξίνηδείχθηκε ότι διέφερε σημαντικά από αυτό της ομάδας ελέγχου. Συγκρινόμενες με την ομάδα ελέγχου, οι νύμφες των εκτεθειμένων πληθυσμών παρουσίασαν σημαντικά πιο επιμήκη ουραίο μίσχο ($p < 0,05$, Εικόνα 3.9).

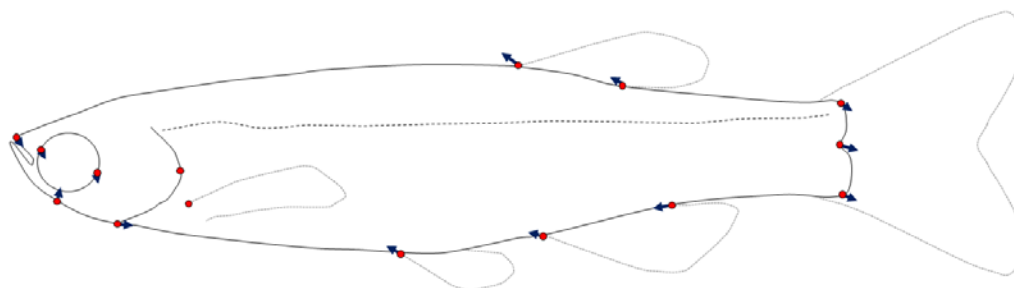
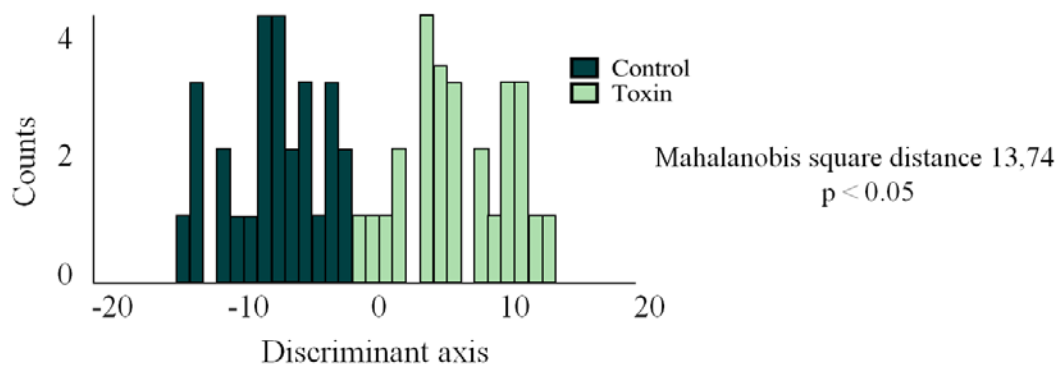


Εικόνα 3.4: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στο σχήμα του σώματος των ιχθυδίων κατά μήκος του άξονα διαχωρισμού (επάνω) και απεικόνιση των διανυσμάτων των οροσήμων στα άτομα που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση εκχυλίσματος 200 mg/L.

3.6 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στο σχήμα σώματος των ενήλικων αρσενικών

Ομοίως με τα αποτελέσματα της ενότητας 3.5, από την ανάλυση διαχωρισμού για κάθε πειραματική επανάληψηδείχθηκε ότι η έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα κυανοβακτηρίων δεν επέδρασε σημαντικά στο σχήμα του σώματος των ενήλικων αρσενικών ατόμων ($p > 0,05$).

Όταν, όμως, η ανάλυση έγινε κατά πειραματική συνθήκη (με ενοποιημένα τα δείγματα των δύο επαναλήψεων) το σχήμα του σώματος της ομάδας που είχε εκτεθεί στην τοξίνηδείχθηκε ότι διέφερε σημαντικά από αυτό της ομάδας ελέγχου. Συγκρινόμενες με την ομάδα ελέγχου, τα ενήλικα αρσενικά άτομα των εκτεθειμένων πληθυσμών παρουσίασαν σημαντικά πιο επιμήκη ουραίο μίσχο ($p < 0,05$, Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.5: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής στο σχήμα του σώματος των ενήλικων αρσενικών κατά μήκος του άξονα διαχωρισμού (επάνω και απεικόνιση των διανυσμάτων των οροσήμενων στα ενήλικα αρσενικά άτομα που εκτέθηκαν στη συγκέντρωση εκχυλίσματος 200 mg/L.

3.7 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στη δομή και λειτουργία των κόκκινων μυϊκών ινών των νυμφών

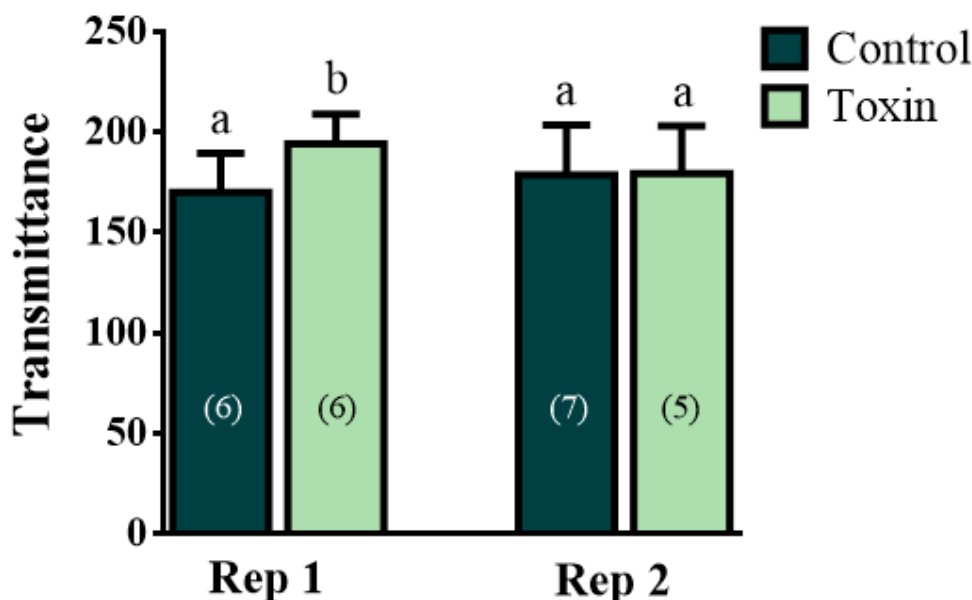
Από τη μη παραμετρική ανάλυση Mann Whitneyδείχθηκε ότι η έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα της τοξίνης δεν επέδρασε στο λόγο του εμβαδού -λευκές προς κόκκινες μυϊκές ίνες- των μεταμορφούμενων νυμφών ($p > 0,05$, Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του λόγου του εμβαδού των λευκών προς κόκκινων μυϊκών ινών των μεταμορφούμενων νυμφών που εξετάστηκαν

Πειραματική Επανάληψη	Συνθήκη (mg/L)	Αριθμός Ατόμων	Λόγος Εμβαδού
1	0	6	7.6±0.9
	200	6	8.3±0.4
2	0	7	7.8±1.2
	200	5	8.2±1.1

Αντίθετα, από τα αποτελέσματα της ανάλυσης Mann Whitney για την πρώτη επανάληψηδείχθηκε ότι η έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα του *M. aeruginosa* έχει σημαντική επίδραση ($p < 0,1$) στην αντίστροφη οπτική πυκνότητα των κόκκινων μυϊκών ινών, αυξάνοντάς την (κατά 13%). Κάτι τέτοιο δε φάνηκε να ισχύει για την δεύτερη πειραματική επανάληψη αφού η ίδια στατιστική ανάλυση δεν έδειξε σημαντική επίδραση ($p > 0,1$) της

εμβρυϊκής έκθεσης στο εκχύλισμα του κυανοβακτηρίου στην αντίστροφη οπτική πυκνότητα των κόκκινων μυϊκών ινών των μεταμορφούμενων νυμφών (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.6: Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής της οπτικής πυκνότητας των κόκκινων μυών ανά συνθήκη για κάθε πειραματική επανάληψη. Η παρουσία διαφορετικών γραμμμάτων υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,1$) ενώ το μέγεθος του δείγματος ανά συνθήκη σημειώνεται στις κολώνες.

3.7 Επίδραση της έκθεσης στην MCLR στη δομή και λειτουργία των κόκκινων μυϊκών ινών των ενήλικων αρσενικών

Η ανάλυση Mann Whitney έδειξε ότι η έκθεση κατά το εμβρυϊκό στάδιο στο εκχύλισμα του κυανοβακτηρίου δεν είχε σημαντική επίδραση ούτε στο λόγο του εμβαδού λευκών προς κόκκινων μυϊκών ινών ούτε στην αντίστροφη οπτική πυκνότητα των κόκκινων μυϊκών ινών των ενήλικων αρσενικών ατόμων ($p > 0,1$, Πίνακας 3.4).

Πίνακας 2.4: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του λόγου του εμβαδού των λευκών προς κόκκινων μυϊκών ινών και της αντίστροφης οπτικής πυκνότητας των ενήλικων αρσενικών που εξετάστηκαν

Πειραματική Επανάληψη	Συνθήκη (mg/L)	Αριθμός Ενήλικων για Εμβαδόν	Λόγος Εμβαδού W/R	Αριθμός Ατόμων για Αντίστροφη Οπτική Πυκνότητα	Αντίστροφη Οπτική Πυκνότητα
1	0	6	6.2±1.6	6	186.9±15.4
	200	6	6.0±1.5	6	167.34±8.1
2	0	6	5.4±1.0	5	151.5±34.7
	200	5	6.5±0.7	5	140.2±36.8

4 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία αποδεικνύεται για πρώτη φορά ότι ακόμη και η μικρής διάρκειας έκθεση (48 ωρών) των εμβρύων των ψαριών σε υποθνησιγόνα επίπεδα εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου *M. aeruginosa*, μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις για τη δομή και λειτουργία των νυμφών και ενήλικων ατόμων. Συνοπτικά, η έκθεση των εμβρύων στο τοξικό εκχύλισμα, μείωσε την αερόβια κολυμβητική ικανότητα των μεταμορφούμενων νυμφών, αλλά όχι και των ενήλικων αρσενικών, και αύξησε τη συχνότητα ανάπτυξης σκελετικών δυσπλασιών στη σπονδυλική στήλη και στις γνάθους. Η μείωση της κολυμβητικής ικανότητας των νυμφών συνοδεύτηκε από αύξηση της κυκλικότητας της κοιλίας της καρδιάς των νυμφών, μείωση της δραστηριότητας της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης των κόκκινων μυϊκών ινών και αύξηση του μήκους του ουραίου μίσχου. Οι αλλαγές του σχήματος του σώματος των νυμφών διατηρήθηκαν μέχρι και το στάδιο των ενήλικων.

Πλήθος εργασιών έχουν αποδείξει ότι η δομή και η λειτουργία της καρδιάς είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την αερόβια κολυμβητική δραστηριότητα. Ένας μεγάλος λόγος VL/VD (μήκος προς πλάτος) της κοιλίας σε σχέση με ένα μικρότερο έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με καλύτερη κολυμβητική ικανότητα, δηλαδή με μεγαλύτερη κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (Hicken *et al.* 2011, Dimitriadi *et al.* 2018) Επιπλέον, οι Claireaux *et al.* (2005) έδειξαν ότι αυτή η δομή της πιο επιμηκυμένης κοιλίας σχετίζεται με μεγαλύτερη χωρητικότητα άντλησης της καρδιάς προσδίδοντας το πλεονέκτημα των καλύτερων κολυμβητών στους ιχθύες έναντι αυτών με πιο κυκλική καρδιά. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ένας τόσο σημαντικός για τη ζωή των ιχθύων χαρακτήρας όπως η κολυμβητική ικανότητα μπορεί να επηρεάζεται από πλήθος περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία (Dimitriadi *et al.* 2018) αλλά και διάφορους ρυπαντές όπως τα πετρελαιοειδή (Hicken *et al.* 2011, Hansen *et al.* 2019) και τα βαρέα μέταλλα (Hammer 1995).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η επίδραση της MCLR στο σχήμα της καρδιακής κοιλίας και κατ' επέκταση στην κολυμβητική ικανότητα των ιχθυδίων αποτελεί μια βιβλιογραφική συνέχεια για τις επιδράσεις της τοξίνης στην καρδιά. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι είτε η έκθεση σε εκχύλισμα του *M. aeruginosa* (Saraf *et al.* 2018) είτε η καθαρή χορήγηση της MCLR (Liu *et al.* 2001, Qi *et al.* 2016) είναι ικανή να προκαλέσει βραδυκαρδία στους ιχθύες. Η βραδυκαρδία προκαλείται από υποθνησιγόνες συγκεντρώσεις σε όλες τις περιπτώσεις έκθεσης και έχει σχετιστεί με αύξηση της απόπτωσης στην καρδιά (Zeng *et al.* 2014, Qi *et al.* 2016). Επιπλέον, οι Saraf *et al.* (2018) θεώρησαν ότι εξαιτίας της βραδυκαρδίας που παρατηρείται αμέσως μετά το σχηματισμό της καρδιάς προκαλείται μείωση της ροής του αίματος με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η μεταφορά θρεπτικών και οξυγόνου στα υπόλοιπα αναπτυσσόμενα όργανα. Το τελευταίο, όμως, αποτέλεσμα σήμερα είναι γνωστό ότι μπορεί να σχετίζεται με την χωρητικότητα της καρδιάς που τροποποιείται λόγω μεταβολής του σχήματος της κοιλίας. Άλλες επιπτώσεις της MCLR σχετικά με την τοξικότητα που προκαλεί στην καρδιά και το κυκλοφορικό σύστημα είναι η δημιουργία περικαρδιακού οιδήματος (Liu *et al.* 2001, Fernandes *et al.* 2019) και μείωση της αγγειογένεσης με δυσμενής επιπτώσεις στην κυκλοφορία (Wang *et al.* 2018).

Όσον αφορά στην επίδραση του εκχυλίσματος στο μυϊκό σύστημα των ιχθύων θα περίμενε κανείς, τουλάχιστον για τις μεταμορφούμενες νύμφες, να έχουν μειωμένη επιφάνεια κόκκινων μυών σε σχέση με των λευκών αφού έχει βρεθεί ότι οι καλύτεροι κολυμβητές έχουν τόσο μεγαλύτερο λόγο κόκκινων προς λευκών μυϊκών ινών όσο και μεγαλύτερο λόγο κόκκινων μυών προς τη συνολική επιφάνεια διατομής (Koumoundouros *et al.* 2009). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι οι κόκκινοι μύες σχετίζονται με την αργή κολύμβηση αφού

απαρτίζονται από βραδείας σύσπασης, οξυγονωμένες και ανθεκτικές στην κόπωση μυϊκές ίνες. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δε φάνηκε να ισχύει στην προκειμένη περίπτωση, όπου όμως δεν ελέγχθηκε ο λόγος της επιφάνειας των κόκκινων μυών προς τη συνολική διατομή και θα μπορούσε να τεθεί ως ένας μελλοντικός στόχος.

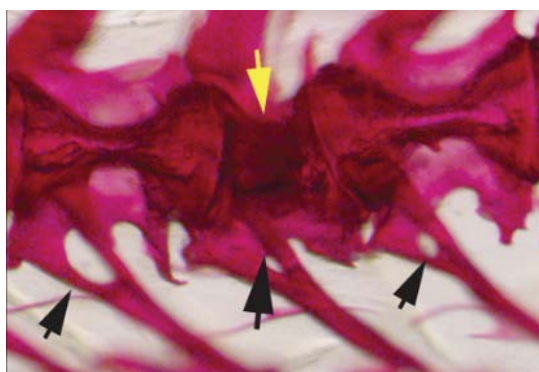
Η ηλεκτρική αφυδρογονάση (SDH) είναι ένζυμο της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων που συμμετέχει τόσο στον κύκλο του κιτρικού οξέος όσο και στην αναπνευστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Yao *et al.* 2018). Η συμμετοχή της στο μεταβολισμό της γλυκόζης μέσω της οξειδωσης του ηλεκτρικού σε φουμαρικό οξύ την καθιστούν ένζυμο απαραίτητο για την παροχή ενέργειας στον οργανισμό (Yang *et al.* 2017) και συγκεκριμένα για την παροχή ATP στους κόκκινους μύες (Pool *et al.* 1979). Έτσι, μεταβολές στη δραστηριότητα της SDH προκαλούν διατάραξη στο μεταβολισμό της γλυκόζης με αποτέλεσμα την πρόκληση τοξικού στρες (Yang *et al.* 2017). Στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι η ποσότητα του ενζύμου μειώνεται, αφού μειώνεται η οπτική πυκνότητα, στους κόκκινους μύες των ατόμων που είχαν εκτεθεί στο τοξικό εκχύλισμα. Το αποτέλεσμα αυτό αν και χρειάζεται ενίσχυση συμφωνεί εν μέρη με την εργασία των Wang *et al.* (2018) που έδειξε ότι η MCLR είναι ικανή να αλλάζει τη μορφολογία των μιτοχονδρίων προκαλώντας διαταράξεις στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και αυξάνοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Όμως, η αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου λόγω της MCLR προκαλούν οξειδωτικό στρες στον οργανισμό (Zeng *et al.* 2014) το οποίο έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη δραστηριότητα της SDH (Jaspers *et al.* 2014), δεδομένο που δεν συμβαδίζει με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Στη συγκεκριμένη εργασία λόγω έκθεσης στο εμβρυϊκό στάδιο η μείωση της δραστηριότητας του SDH μάλλον οφείλεται σε μείωση ή βλάβες των μιτοχονδρίων και όχι σε ρυθμίσεις και μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων της. Εκτός από την MCLR, η δραστηριότητα της SDH επηρεάζεται και από άλλες ουσίες που απελευθερώνονται στο περιβάλλον όπως είναι τα μυκητοκτόνα (Yao *et al.* 2018, Qian *et al.* 2019), αλλά και βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο (Jeziarska *et al.* 2009). Ωστόσο, μελλοντικά θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί αν σε υποθησιγόνα επίπεδα η MCLR επιδρά στον αριθμό και τη διάμετρο των μυϊκών ινιδίων, αφού είναι γνωστό ότι αυξάνει το διακυτταρικό χώρο στα μυοϊνίδια και όσο αυξάνεται η διάρκεια της έκθεσης τα μυοϊνίδια κατακεραματίζονται (Nince Ferreira *et al.* 2010).

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.1 η έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα ξεκίνησε στο στάδιο του βλαστιδίου. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι σε όλη τη διάρκεια της γαστριδίωσης τα έμβρυα ήταν εκτεθειμένα στην τοξίνη. Κατά την κρίσιμη φάση της γαστριδίωσης δημιουργείται η νωτοχορδή (Kimmel *et al.* 1995), κατά την ανάπτυξη της οποίας εκφράζονται τα γονίδια Hox B. Στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών στην αρχή της ανάπτυξης συμβάλει ως σηματοδότης το ρετινοϊκό οξύ, το οποίο όταν είναι σε αυξημένες συγκεντρώσεις λόγω εξωγενούς χορήγησης δημιουργεί ανωμαλίες στην έκφραση των γονιδίων και οδηγεί στο σχηματισμό παραμορφώσεων (Ross *et al.* 2000). Η νωτοχορδή είναι αυτή που θα καθορίσει τη διάταξη των σωματιών οι οποίοι σε επόμενο στάδιο θα διακριθούν σε μυοτόμους και σκληροτόμους (Chow & Cheng 2003). Τα μυομερή θα δώσουν τους σκελετικούς μύες η κατανομή των οποίων μπορεί να επηρεαστεί από παραμορφώσεις της νωτοχορδής που μπορεί να προκαλούνται από βαρέα μέταλλα όπως η έκθεση σε κάδμιο (Chow & Cheng 2003).

Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι η έκθεση των εμβρύων στο εκχύλισμα του κυανοφύκου μπορεί να αποβεί μοιραία, παρόλο που η συγκέντρωση είναι χαμηλή, και να οδηγήσει στην ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων, λόγω τόσο της παρουσίας της MCLR όσο και της παρουσίας των παραγώγων ρετινοϊκού οξέος που αυτό περιέχει (βλ. ενότητα 1.5). Οι παραμορφώσεις που βρέθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία πιθανόν να οφείλονται σε ασύμμετρη κατανομή των μυομερών κατά τη γαστριδίωση με αποτέλεσμα να γίνονται

ασύμμετρες συσπάσεις των προκυπτόντων σκελετικών μυών στο στάδιο του εμβρύου και να οδηγούν στην ασύμμετρη ανάπτυξη των σπονδύλων. Έτσι τα εκτεθειμένα έμβρυα οδηγήθηκαν στο φαινότυπο των μετατοπισμένων σπονδύλων σε όλη την έκταση της σπονδυλικής στήλης, με μη παράλληλες νευρικές και αιματικές αποφύσεις.

Παρόμοιες επιπτώσεις στη σπονδυλική στήλη φαίνεται να έχει τόσο η έκθεση σε πετρελαιοειδή (Hansen *et al.* 2019) όσο και η έκθεση σε βαρέα μέταλλα (Weis & Weis 1977, Kessabi *et al.* 2013) ή σε διοξίνη (TCDD) (Baker *et al.* 2013). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι Kessabi *et al.* και Baker *et al.* (2013) ανέφεραν ξεχωριστά στις εργασίες τους παραμορφώσεις που αφορούσαν διχοτομήσεις των σπονδυλικών αποφύσεων και οπτικά μοιάζουν πολύ στην παραμόρφωση που βρέθηκε στην παρούσα εργασία (Εικόνα 4.1), παρόλο που η επίδραση είχε γίνει σε άλλο στάδιο (ενήλικο). Επιπρόσθετα, αν και η έκθεση στο εμβρυϊκό στάδιο δεν προκάλεσε μεγάλου βαθμού τερατογενέσεις, αφού οι παραμορφώσεις είναι σοβαρές αλλά δεν επηρεάζουν την εξωτερική μορφολογία τουλάχιστον άμεσα, επίδραση της τοξίνης σε άλλα στάδια ανάπτυξης έχει προκαλέσει σοβαρότερες σκελετικές ανωμαλίες όπως κάμψεις στον κορμό και την ουρά των ιχθύων (Liu *et al.* 2001).



Εικόνα 4.1: Διχοτόμηση σπονδυλικών αποφύσεων υποδεικνύονται με τα μαύρα βέλη (τροποποιημένη εικόνα από Baker *et al.* 2013).

Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης επηρεάζεται τόσο από την ανατομία των κόκκινων μυών όσο και από το σχήμα του σώματος το οποίο τείνει να είναι πιο επίμηκες και υδροδυναμικό, κατάλληλο για γρήγορη κολύμβηση όσο βελτιώνεται η κολυμβητική ικανότητα (Koumoundouros *et al.* 2009) προσδίδοντας πλεονέκτημα στα πελαγικά ψάρια για περιγητική κολύμβηση και αναζήτηση τροφής (Pakkasma & Piironen 2001). Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε αντιδιαστολή με τον επιμηκυμένο ουραίο μίσχο των νυμφών που είχαν εκτεθεί ως έμβρυα στην MCLR, αφού εμφανίζουν μειωμένη κολυμβητική ικανότητα και δραστηριότητα ηλεκτρικής αφυδρογόνωσης σε σχέση με τις νύμφες που δεν είχαν εκτεθεί στην τοξίνη. Παρόλα αυτά ο συγκεκριμένος χαρακτήρας που αφορά στο σχήμα σώματος διατηρείται και στο στάδιο των ενήλικων ατόμων. Από το γεγονός αυτό και σε συνδυασμό με την παρουσία των ασύμμετρα διατεταγμένων σπονδύλων σε όλη τη ζωή των οργανισμών μπορεί κανείς ασφαλώς να συμπεράνει ότι η επιμήκυνση του ουραίου μίσχου έχει προκύψει από την ύπαρξη της συγκεκριμένης σκελετικής δυσπλασίας. Επιπλέον, η επίδραση της τοξίνης στην κολυμβητική ικανότητα και στους μύες φαίνεται να εξαφανίζεται στο ενήλικο στάδιο. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι έχουν τη δυνατότητα να επανακάμπτουν αφού προηγούμενη εργασία έχει δείξει ανάκαμψη στο σκώτι και τους μύες (Nince Ferreira *et al.* 2010).

Όλες οι αλλαγές που αναφέρονται στην εργασία αυτή και αφορούν στη δομή και λειτουργία του zebrafish είναι προϊόν της επίδρασης της τοξίνης στο εμβρυϊκό στάδιο του οργανισμού. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.1 οι φυσικοχημικές ιδιότητες του νερού διατηρούνταν συνέχεια σταθερές, εντός των βέλτιστων για τον υπό μελέτη οργανισμό ορίων, ούτως ώστε

να μην υπάρξει καμία συνεργιστική δράση με τις ουσίες του εκχυλίσματος του κυανοβακτηρίου. Για παράδειγμα, στο φυσικό περιβάλλον των λιμνών κατά το πέρας των ανθίσεων το οξυγόνο πέφτει σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Όμως, έχει αποδειχθεί ότι η υποξία μπορεί να επηρεάζει διάφορες δομές όπως το σχήμα της καρδιάς και κατ' επέκταση την κολυμβητική ικανότητα των οργανισμών (Webster & Abela 2007). Για το λόγο αυτό και επειδή η έκθεση των εμβρύων έγινε με σκοπό τη μελέτη των επιδράσεων καθαρά και μόνο από το εκχύλισμα η θερμοκρασία, το οξυγόνο και το pH διατηρούνταν σταθερά.

Οι επιδράσεις αυτές πιθανόν να μην αφορούν μόνο τους οργανισμούς που διαβιώνουν στα εσωτερικά γλυκά νερά, όπως αυτά των λιμνών, αφού όπως έχει ήδη αναφερθεί ανθίσεις δημιουργούνται και στα θαλάσσια οικοσυστήματα. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία της MCLR έχει καταγραφεί σε αλμυρά θαλασσινά νερά (Hawser *et al.* 1991, Chen *et al.* 1993) και έχει προσδιοριστεί η συσχέτισή της με ανθίσεις του τροπικού κυανοβακτηρίου *Trichodesmium thiebautii* (Hawser *et al.* 1991). Η ύπαρξη μίας τόσο ισχυρής τοξίνης, που ακόμη και σε πολύ μικρές δόσεις μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στα σπονδυλόζωα, σε όλα τα υδάτινα οικοσυστήματα γεννάει υψίστης σημασίας ερωτήματα σχετικά με την εκμετάλλευση και τη διαχείριση τους από τον άνθρωπο. Οι άνθρωποι εκτίθενται στην τοξίνη είτε άμεσα από την εκμετάλλευση των εσωτερικών υδάτων για πόσιμο νερό είτε έμμεσα μέσω της κατανάλωσης επιβεβαρυσμένης τροφής ή της κολύμβησης (Christophoridis *et al.* 2018). Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί επίσης το γεγονός ότι η MCLR και γενικότερα οι μικροκυστίνες έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται στους ιστούς υδρόβιων και χερσαίων οργανισμών (Chorus 2001, Carmichael 2001, Mohamed *et al.* 2003, Papadimitriou *et al.* 2012) αλλά και να μεταφέρονται από το ένα τροφικό επίπεδο στο άλλο (Smith *et al.* 2008). Ωστόσο, είναι άτοπο να μιλήσει κανείς για βιομεγένθυση³ της τοξίνης (Papadimitriou *et al.* 2012) αφού ναι μεν η τοξίνη συσσωρεύεται στους ιστούς και μεταφέρεται στα διάφορα τροφικά επίπεδα αλλά ένα μέρος της μεταβολίζεται από τα συστήματα αποτοξικοποίησης που διαθέτουν οι διάφοροι οργανισμοί.

Η βιοσυσσώρευση⁴ της MCLR έχει αναφερθεί και σε αναπαραγωγικά όργανα όπως είναι οι γονάδες διαφόρων καρκινοειδών και συγκεκριμένα για το είδος *Astacus astacus* (Papadimitriou *et al.* 2012) και τα *Palaemon modestus* και *Macrobrachium nipponensis* (Chen & Xie 2005). Μάλιστα στην τελευταία εργασία βρήκαν ότι η τοξίνη μπορεί να μεταφέρεται στα αυγά των δεκαπόδων. Ακόμη πιο ανησυχητική είναι η εργασία των Liu (2014) που έδειξε ότι ενήλικα άτομα zebrafish που εκτέθηκαν σε υποθησιγόνα επίπεδα της τοξίνης έδωσαν απογόνους οι οποίοι αν και αναπτύχθηκαν σε περιβάλλον χωρίς τοξίνη, παρουσίασαν στο ενήλικο στάδιο μειωμένο μήκος και βάρος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, τα άτομα αυτά παρόλο που δεν εκτέθηκαν ποτέ στην MCLR παρουσίαζαν αλλαγές στη διάταξη των ηπατοκυττάρων και διαταραχές στα συστήματα αποτοξικοποίησης. Η διατάραξη της ομαλής διεξαγωγής της αποτοξίνωσης έχει βρεθεί ότι οφείλεται στην αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου από την MCLR (Babica *et al.* 2006). Αυτό υποδεικνύει ότι η τοξίνη μπορεί να αποβεί μοιραία για τη δυναμική των ιχθυοπληθυσμών. Τέλος, η τοξίνη μπορεί να μεταφέρεται σε απογόνους θηλαστικών και συγκεκριμένα αρουραίων προκαλώντας αναπτυξιακή νευροτοξικότητα (Zhao *et al.* 2015).

Παρόλη τη σημαντικότητα των παραπάνω αποτελεσμάτων δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη διερεύνηση για το ακριβές φάσμα της έμμεσης επίδρασης της κυανοτοξίνης MCLR στους

³ Βιομεγένθυση είναι η αύξηση της συγκέντρωσης ενός βιοενεργού, βλαβερού μορίου στα υψηλότερα τροφικά επίπεδα κατά μήκος μίας τροφικής αλυσίδας (Cox *et al.* 2003)

⁴ Ως βιοσυσσώρευση ορίζεται η προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε έναν οργανισμό, η οποία προκαλείται όταν ο ρυθμός πρόσληψής της ουσίας ξεπερνά τον ρυθμό αποβολής της από τον οργανισμό (Duffus 1993)

απογόνους των θηλαστικών μέσω της συσσώρευσης στα αναπαραγωγικά όργανα και χωρίς τα μικρά να έχουν ποτέ εκτεθεί. Αυτό θα μπορούσε να τεθεί ως ένας μελλοντικός στόχος αφού έγινε σαφές ότι χαμηλές συγκεντρώσεις της τοξίνης προκαλούν διαταραχές σε βασικά όργανα όπως η καρδιά και το μυοσκελετικό σύστημα και κατ' επέκταση η κολυμβητική ικανότητα. Με τρόπο ανάλογο θα μπορούσε να προκαλεί βλάβες και στον άνθρωπο μέσα από την εκμετάλλευση των υδάτων για ιχθυοκαλλιέργειες δηλαδή με έμμεση μεταφορά διαμέσου της τροφής ή για πόσιμο νερό. Αυτό καθιστά αναγκαίο να διαλευκανθεί αν τα ανθρώπινα έμβρυα μπορούν να προσβληθούν ή όχι και σε ποιο βαθμό μπορούν να επηρεαστούν ενώ παράλληλα πρέπει να αναπτυχθούν μέθοδοι διαχείρισης τουλάχιστον για τα εσωτερικά ύδατα που χρησιμοποιούνται για πόσιμο νερό.

5 Βιβλιογραφία

- Ács, A., Kovács, A.W., Csepregi, J.Z., Törő, N., Kiss, G., Győri, J., Vehovszky, A., Kováts, N., Farkas, A. (2013) 'The ecotoxicological evaluation of *Cylindrospermopsis raciborskii* from Lake Balaton (Hungary) employing a battery of bioassays and chemical screening', *Toxicon*, 70, pp.98–106
- Babica, P., Bláha, L., Maršálek, B. (2006) 'Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms', *Journal of Phycology*, 42(1), pp. 9–20.
- Baker, T. R., Peterson, R. E., Heideman, W. (2013) 'Early Dioxin Exposure Causes Toxic Effects in Adult Zebrafish', 135(1), pp. 241–250.
- 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, pp. 1–91.
- Beamish F. W. H. (1978) 'Swimming capacity', *In Fish Physiology*, Academic Press, pp. 101-187.
- Best, J. H., Eddy, F. B., Codd, G. A. (2001) 'Effects of purified microcystin-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) alevins', *Fish Physiology and Biochemistry*, 24 (3), 171–178.
- Bird NC, Mabee PM. (2003) 'Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae)', *Dev Dyn*, 228, pp. 337–357.
- Boone, D.R., Castenholz, R.W. (2001) 'E The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria', *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer-Verlag, pp. [i]-xxi, 1-721
- Brent, D., G. (2001), 'The age of the Earth in the twentieth century: a problem (mostly) solved', *Geological Society of London, Special Publications*, 190, pp. 205-221.
- Brett, J. R. (1964) 'The Respiratory Metabolism and Swimmin Performance of Young Sockeye Salmon', *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 21(5), pp. 1183-1226.
- Carmichael, W.W., Falconer, R. (1992) 'Disease related to freshwater algal blooms', *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, Academic Press
- Carmichael, W.W. (2001) 'Health Effects of Toxin Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABS"', *Human and Ecological Risk Assessment*, 7(5), pp. 1393-1407.
- Carmichael, W. W. (2008) ' A world overview-One-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria-Where do we go from here?', *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*, Springer, pp. 105-125.
- Chen, D. Z. X., Boland, M.P., Smillie, M.A., Klix, H., Ptak, C., Andersen, R.J., Holmes, C.F. (1993) 'Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment', *Toxicon*, 31(11), pp. 1407–1414.
- Chen, J., Xie, P. (2005) 'Tissue distributions and seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins-LR and -RR in two freshwater shrimps, *Palaemon modestus* and *Macrobrachium nipponensis*, from a large shallow, eutrophic lake of the subtropical China', *Toxicon*, 45(5), pp. 615–625.

Chirrneister, B. E., Anisimova, M., Antonelli, A., Bagheri, H. C. (2011) 'Evolution of cyanobacterial morphotypes: taxa required for improved phylogenomic approaches' *Commun. Integr. Biol.*, 4, pp. 424–427.

Chorus, I. (2001) *Cyanotoxins, occurrence, causes, consequences*, Springer.

Christophoridis, C., Zervou, S.K., Manolidi, K., Katsiapi, M., Moustaka-Gouni, M., Kaloudis, T., Triantis, T.M., Hiskia, A. (2018) 'Occurrence and diversity of cyanotoxins in Greek lakes', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–22.

Claireaux, G., Mckenzie, D.J., Genge, A.G., Chatelier, A., Aubin, J., & Farrell, A.P. (2005) 'Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout', *The Journal of experimental biology*, 208(10), pp. 1775-1784 .

Codd, G.A. (2000) 'Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control', *Ecological Engineering*, 16(1), pp. 51–60.

Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, Metcalf, J.S. (2005) 'Harmful Cyanobacteria: from mass mortalities to management measure', *Harmful Cyanobacteria*, Springer, pp. 1–23.

Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J. (2003) 'Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), pp. 13380–13383.

Descamps, E., Sochacka, A., De Kegel, B., Van Loo, D., Van Hoorebeke, L., Adriaens, D. (2014) 'Soft tissue discrimination with contrast agents using micro-CT scanning', *Belgian Journal of Zoology*, 144(1), pp. 20–40.

DeMott, W. R., Moxter, F. (1991) 'Foraging on cyanobacteria by copepods: responses to chemical defenses and resource abundance', *Ecology*, 72, pp. 1820–34.

Dimitriadi, A., Beis, D., Arvanitidis, C., Adriaens, D., Koumoundouros, G. (2018) 'Developmental temperature has persistent, sexually dimorphic effects on zebrafish cardiac anatomy', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–10.

Dittmann, E., Erhard, M., Kaebernick, M., Scheler, C., Neilan, B.A., von Dørhen, H., Børner, T., (2001) 'Altered expressions of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806', *Microbiology*, 147, pp. 3113- 3119

Dokulil, M.T, Teubner, K. (2000) 'Cyanobacterial dominance in Lakes', *Hydrobiologia*, 438, pp. 1-12.

Duffus, J.F., (1993) 'Glossary for Chemists of Terms used in Toxicology', *Pure and Applied Chemistry*, 65 (9), pp. 2003–2122.

Fernandes K, Gomes A, Calado L, Yasui G, Assis D, Henry T, Fonseca A, Pinto E. (2019) 'Toxicity of Cyanopeptides from Two *Microcystis* Strains on Larval Development of *Astyanax altiparanae*', *Toxins (Basel)*, 11(4), pp. 220.

Gross, E. M. (2003) 'Allelopathy of aquatic autotrophs', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(3-4), pp. 313–39.

Hammer, C. (1995) 'Fatigue and exercise tests with fish', *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 112(1), pp. 1-20.

Hansen B.H., Salaberria I., Read K. E., Wold P. A. , Hammer K.M., Olsen A.J., Altin D., Øverjordet I. B., Nordtug T., Bardal T., Kjørsvik E. (2019) 'Developmental effects in fish

- embryos exposed to oil dispersions - The impact of crude oil micro-droplets', *Marine Environmental Research*, 150(104753).
- Hawser, S.P., Codd, G.A., Capone, D.G., Carpenter, E.J., (1991) 'A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium *Trichodesmium*', *Toxicon*, 29, pp. 227–278.
- Hen Chow, E. S., Cheng, S. H. (2003) 'Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis', *Toxicological Sciences*, 73(1), pp. 149–159.
- Hesse, K., Kohl, J.G., (2001) 'Effects of light and nutrient supply on growth and microcystin content of different strains of *Microcystis aeruginosa*', *Cyanotoxins: Occurrence, Causes, Consequences*, Springer Verlag, pp. 104–115.
- Hicken, C. E., Linbo, T.L., Baldwin, D.H., Willis, M.L., Myers, M.S., Holland, L., Larsen, M., Stekoll, M.S., Rice, S.D., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P. (2011) 'Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17), pp. 7086–7090.
- Hiskia, A. Triantis, T.M., Antoniou, M.G., de la Cruz, A.A., O'Shea, K., Song, W., Fotiou, T., Kaloudis, T., He, X., Andersen, J., Dionysiou, D.D. (2014) 'Transformation Products of Hazardous Cyanobacterial Metabolites in Water', *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks*, John Wiley & Sons, pp. 675-708.
- Hou, J., Su, Y., Lin, W., Guo, H., Xie, P., Chen, J., Gu, Z., Li, L. (2017) 'Microcystin-LR retards gonadal maturation through disrupting the growth hormone/insulin-like growth factors system in zebrafish', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139(1), pp. 27–35.
- Humble, A. V., Gadd, G. M., Codd, G. A. (1997) 'Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography', *Water Res.*, 31, pp. 1679–86.
- Jaspers, R. T. (2014) 'Increased oxidative metabolism and myoglobin expression in zebrafish muscle during chronic hypoxia', *Biology Open*, 3(8), pp. 718–727.
- Jeziarska, B., Ługowska, K. and Witeska, M. (2009) 'The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review)', *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4), pp. 625–640.
- Jonas, A., Scholz, S., Fetter, E., Sychrova, E., Novakova, K., Ortmann, J., Benisek, M., Adamovsky, O., Giesy, J.P., Hilscherova, K. (2015) 'Endocrine, teratogenic and neurotoxic effects of cyanobacteria detected by cellular in vitro and zebrafish embryos assays', *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 120, pp. 321–327.
- Kauff, F. and Büdel, B. (2011) 'Phylogeny of Cyanobacteria: An Overview', *Progress in Botany*, 72, pp. 209-224.
- Kaushik, S., Georga, I. and Koumoundouros, G. (2011) 'Growth and Body Composition of Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae Fed a Compound Feed from First Feeding Onward ', 8(2), *zebrafish*, pp. 87-97.
- Kehr, J. C., Y. Zilliges, A. Springer, M. D. Disney, D. D. Ratner, C. Bouchier, P. H. Seeberger, N. Tandeau de Marsac, E. Dittmann (2006) 'A mannan binding lectin is involved in cell–cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*', *Molecular Microbiology*, 59, pp. 893–906.
- Kessabi, K., Annabi, A., Hassine, A.I., Bazin, I., Mnif, W., Said, K., Messaoudi, I. (2013)

'Possible chemical causes of skeletal deformities in natural populations of *Aphanius fasciatus* collected from the Tunisian coast', *Chemosphere*, 90(11), pp. 2683–2689.

Kimmel, C. B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995) 'Stages of embryonic development of the zebrafish', *Developmental Dynamics*, 203(3), pp. 253–310.

Klapper, H. (1991), *Control of eutrophication in inland waters*, New York: Ellis Horwood

Knoll, A. H., (1985) 'The distribution and evolution of microbial life in the late Proterozoic era', *Annual Review of Microbiology*, 39, pp. 391-417.

Kotak, B.G., A.K-Y. Lam, E.E. Prepas and S.E. Hrudey (2000) 'Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.*, 57, pp.1584-1593

Koumoundouros, Sfakianakis, D.G., Divanach, P., Kentouri, M. (2002) 'Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles', *Journal of Fish Biology*, 60(4), pp. 923–932.

Koumoundouros, G., Ashton, C., Xenikoudakis, G. (2009) 'Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Ontogenetic differentiation of swimming performance in Gilthead seabream (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) during metamorphosis', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 370(1–2), pp. 75–81.

Koumoundouros, G. (2010) '5 . Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture', *Recent Advances in Aquaculture Research*, 661(2), pp. 125–148.

Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O., Graneli, E. (2003) 'Allelopathy in phytoplankton—biochemical, ecological and evolutionary aspects', *Phycologia*, 42, pp. 406–419.

Liu, Y., Song, L., Li, X., Liu, T. (2001) 'The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, *Misgurnus mizolepis* Gunthe', *Toxicon*, 40(4), pp. 395–399.

Malbrouck, C., Kestemont, P., (2006) 'Effects of microcystins on fish', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, pp. 72–86

Minasyan, A., Christophoridis, C., Wilson, A.E., Zervou, S.K., Kaloudis, T., Hiskia, A. (2018) 'Diversity of cyanobacteria and the presence of cyanotoxins in the epilimnion of Lake Yerevan (Armenia)', *Toxicon*, 150, pp. 28–38.

Mohamed, Z.A., Carmichael, W.W., Hussein, A.A. (2003) 'Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom', *Environmental Toxicology*, 18, pp. 137-141.

Nachlas, M. M., Tsou, K.-C., Souza, E. D., Cheng, C.-S., Seligman, M. A. (1957) 'Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-Nitrophenyl substituted ditetrazole', *Journal Histochem Cytochem*, 5(4), pp. 420-436.

Nelson, J. S. (1994) *Fishes of the world*, Wiley, 3

Nince Ferreira, M. F., Oliveira, V.M., Oliveira, R.D., Cunha, P.V., Grisolia, C.K., & Pires, O.R. (2010) 'Histopathological effects of [D-Leu1]Microcystin-LR variants on liver, skeletal muscle and intestinal tract of *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844)', *Toxicon*, 55(7), pp. 1255–1262.

Oberemm, A.; Fastner, J.; Steinberg, C. E. W. (1997) 'Effects of microcystin-LR and cyanobacterial crude extracts on embryo-larval development of zebrafish (*Danio rerio*)', *Water Research*, 31 (11), pp. 2918–2921

- O'Neil, J. M. O., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J. (2012) 'The rise of harmful cyanobacteria blooms : The potential roles of eutrophication and climate change', *Harmful Algae*, 14, pp. 313–334.
- Paerl, H. W. (1988) 'Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters', *Limnology and Oceanography*, 33(2), pp. 823–843.
- Paerl, H. W., Huisman, J. (2008) 'Blooms like it hot', *Science*, 320, pp. 57–58.
- Paerl, H. W., Hall, N. S., Calandrino, E. S. (2011) 'Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change', *Science of the Total Environment*, 409(10), pp. 1739–1745.
- Pakkasmaa, S., Piironen, J. (2001) 'Water velocity shapes juvenile salmonids', *Evolutionary Ecology*, 14, pp. 721–730.
- Papadimitriou, T., Kagalou, I., Stalikas, C., Pilidis, G., Leonardos, I.D. (2012) 'Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health', *Ecotoxicology*, 21(4), pp. 1155–1166.
- Pietsch, C., Wiegand, C., Ame, M. V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., Pflugmacher, S. (2001) 'The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors', *Environmental Toxicology*, 16, pp. 535–42
- Pflugmacher, S. (2002) 'Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems', *Environmental Toxicology*, 17, pp. 407–413.
- Pool, C. W., Moll, H. and Diegenbach, P. C. (1979) 'Quantitative succinate-dehydrogenase histochemistry', *Histochemistry*, 64, pp. 273–278.
- Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Kaufononga, S.A., Cary, S.C., Hamilton, D.P. (2014) 'High levels of structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners', *Marine Drugs*, 12, pp. 5372-5395.
- Qi, M., Dang, Y., Xu, Q., Yu, L., Liu, C., Yuan, Y., Wang, J. (2016) 'Chemosphere Microcystin-LR induced developmental toxicity and apoptosis in zebra fish (*Danio rerio*) larvae by activation of ER stress response', *Chemosphere*, 157, pp. 166–173.
- Qian, H., Zhang, M., Liu, G., Lu, T., Sun, L., Pan, X. (2019) 'Effects of different concentrations of *Microcystis aeruginosa* on the intestinal microbiota and immunity of zebrafish (*Danio rerio*)', *Chemosphere*, 214, pp. 579–586.
- Rice, E.L. (1984) *Allelopathy*, Academic Press
- Rogers, E. D., Henry, T.B., Twiner, M.J., Gouffon, J.S., McPherson, J.T., Boyer, G.L., Sayler, G.S., Wilhelm, S.W. (2011) 'Global gene expression profiling in larval zebrafish exposed to microcystin-LR and microcystin reveals endocrine disrupting effects of cyanobacteria', *Environmental Science and Technology*, 45(5), pp. 1962–1969.
- Rohlf, F. J. (1993) 'Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings', *Contributions to morphometrics*, 8, pp. 131–159.
- Rohlf, F.J. (2010) 'TpsRelw, Relative Warps Analysis, version 1.49', *Stony Brook*.
- Rohlf, F. J. (2015) 'The tps series of software', *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 26(1), pp. 9-12.
- Rohrlack, T., Dittmann, E., Henning, M., Borner, T. & Kohl, J. G. (1999) 'Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*', *Applied and Environmental Microbiology*, 65, pp.

737–739.

- Rohrlack, T., Dittmann, E., Borner, T., Christoffersen, K. (2001) 'Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* spp.', *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3523–2529.
- Ross, S. A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M. (2000) 'Retinoids in embryonal development', *Physiological Reviews*, 80(3), pp. 1021–1054.
- Saraf, S. R., Frenkel, A., Harke, M.J., Jankowiak, J.G., Gobler, C.J., McElroy, A.E. (2018) 'Effects of Microcystis on development of early life stage Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Comparative toxicity of natural blooms, cultured Microcystis and microcystin-LR', *Aquatic Toxicology*, 194, pp. 18–26.
- Schirrmeister, B. E., Anisimova, M., Antonelli, A., and Bagheri, H. C. (2011) 'Evolution of cyanobacterial morphotypes: taxa required for improved phylogenomic approaches', *Communicative & Integrative Biology* 4, 424–427.
- Schopf, J.W. Walter, M.R (1982) 'Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence', *Algae*, 19, pp. 543-564.
- Shapiro, J. (1997) 'The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes', *Freshwater Biology*, 37, pp. 307-323.
- Stewart, W.D.P. (1967) 'Transfer of biologically fixed nitrogen in a sand dune slack region', *Nature*, 214, pp. 603–604.
- Smith, J. L., Haney J., F. (2006) 'Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*)', *Toxicon*, 48(5), pp. 580-589.
- Smith, J. L., Boyer, G. L., Zimba, P. V. (2008) 'A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture', *Aquaculture*, 280(1–4), pp. 5–20.
- Spence R, Smith C. (2006) 'Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance', *Behavioral Ecology*, 17, pp. 779–783.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008) 'The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*', *Biological Reviews*, 83(1), pp. 13–34.
- Svrcek, C., Smith, D. W. (2004) 'Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: A review', *Journal of Environmental Engineering and Science*, 3(3), pp. 155–185.
- Thomas, M. K. and Litchman, E. (2016) 'Effects of temperature and nitrogen availability on the growth of invasive and native cyanobacteria', *Hydrobiologia*. Springer International Publishing, 763(1), pp. 357–369.
- Trainer, V. L., Pitcher, G.C. Reguera, B. (Beatriz) Smayda, T.J. (2010) 'The distribution and impacts of harmful algal bloom species in eastern boundary upwelling systems', *Progress in Oceanography*, 85(1–2), pp. 33–52.
- Tsang B., Zahid H., Ansari R., Lee R. C., Partap A., Gerlai R. (2017) 'Breeding Zebrafish: A Review of Different Methods and a Discussion on Standardization', *Zebrafish*, 14(6), pp. 561-573.
- Utkilen, H., Gjolme, N. (1995) 'Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*', *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, pp.797–800.
- Van, C., Hoek, D., Mann, D. G., Jahns, H. M. (1995) 'An Introduction to Phycology', *Algae*,

Cambridge University Press, pp. xiv+623. I

Vining, L.C. (1992) 'Secondary metabolites-inventive evolution or biochemical diversity - a review', *Gene*, 115, pp. 135–140.

Walter, J. M., Coutinho, F.H., Dutilh, B.E., Swings, J., Thompson, F.L., Thompson, C.C. (2017) 'Ecogenomics and taxonomy of Cyanobacteria phylum', *Frontiers in Microbiology*, 8: 2132 .

Wang, Q., Liu, Y., Guo, J., Lin, S., Wang, Y., Yin, T., Gregersen, H., Hu, T., Wang, G. (2018) 'Microcystin-LR induces angiodysplasia and vascular dysfunction through promoting cell apoptosis by the mitochondrial signaling pathway', *Chemosphere*, 218, pp. 438–448.

Webster, W. S., Abela, D. (2007) 'The effect of hypoxia in development', *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 81(3), pp. 215–228.

Weis, J.S., Weis, P. (1977), 'Effects of heavy metals on development of the killifish, *Fundulus heteroclitus*', *Journal of Fish Biology*, 11, pp. 49-54.

Westernhagen, H.v., Dethlefsen, V., Cameron, P., Berg, J., Fürstenberg, G. (1988) 'Developmental defects in pelagic fish embryos from the western Baltic', *Helgol. Meeresunters*, 42, pp. 13–36.

Whitton, B. A. (1992) 'Diversity, Ecology, and Taxonomy of the Cyanobacteria', *Photosynthetic Prokaryotes*, pp. 1–51.

Wu, Q., Yan, W., Liu, C., Li, L., Yu, L., Zhao, S., Li, G. (2016) 'Microcystin-LR exposure induces developmental neurotoxicity in zebrafish embryo', *Environmental Pollution*, 213, pp. 793–800.

Yang, Y., Liu, W., Mu, X., Qi, S., Fu, B., Wang, C. (2016) 'Biological response of zebrafish embryos after short-term exposure to thifluzamide', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(August), pp. 1–11.

Yang, Y., Liu, W., Li, D., Qian, L., Fu, B., Wang, C. (2017) 'Altered glycometabolism in zebrafish exposed to thifluzamide', *Chemosphere*, 183, pp. 89–96.

Yao, H. Xu, X., Zhou, Y., Xu, C. (2018) 'Impacts of isopyrazam exposure on the development of early-life zebrafish (*Danio rerio*)', *Environmental Science and Pollution Research*. Environmental Science and Pollution Research, 25(24), pp. 23799–23808.

Zeng, C., Sun, H., Xie, P., Wang, J., Zhang, G., Chen, N., Yan, W., Li, G. (2014) 'The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos', *Aquatic Toxicology*, 149, pp. 25–32.

Zhao, S.J., Li, G.Y., Chen, J. (2015) 'A proteomic analysis of prenatal transfer of microcystin-LR induced neurotoxicity in rat offspring', *Journal of Proteome Research*, 14, pp. 197–213.

Δημητριάδη, Α. (2018) ' Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην καρδιά, στην κολυμβητική ικανότητα και στη γονιμότητα του zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822)'

Ορφανάκης, Μ., Ζαχοπούλου, Α., Χρίστου, Μ., Χισκιά, Α., Κουμουνδούρος, Γ. (2019) 'Μακροχρόνιες επιδράσεις των υποθησιγόνων συγκεντρώσεων της κυανοτοξίνης MCLR σε βασικές λειτουργίες του zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822)', *17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιχθυολόγων*.