

Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ ΑΛΙΕΙΑΣ

Πτυχιακή εργασία με θέμα :

ΑΙΧΜΑΙΝΟΚΑΡΚΙΝΟΜΑΤΑ ΣΥΝΔΡΟΜΗΣ

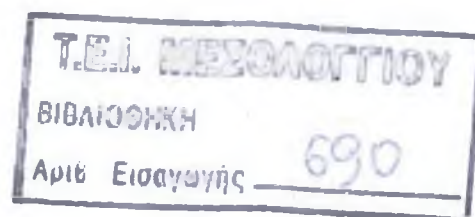
ΤΩΝ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΑΝΩΝ

ΣΥΝΕΡΓΑΣΤΗΚΑΝ ΟΙ ΣΠΟΥΔΑΣΤΕΣ

ΚΑΡΑΜΠΕΛΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΑΡΜΟΥΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

9



ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ  
Ν. Γ. ΒΛΑΧΟΣ

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 1999

Ευχαριστώ

ο Εισπληρωτής

~~Ε. Γ. ΒΛΑΧΟΣ~~

Μεσοπύργι 22/03/1999.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην ιχθυοκαλλιέργεια, ιδιαίτερα όταν αυτή παίρνει την εντατική της μορφή, η έννοια του στρες παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο. Η πλήρης κατανόηση όλων των βιοχημικών αλλαγών οι οποίες συντελούνται στους οργανισμούς κάτω από καταστάσεις στρες, αποτελεί σημαντικό μέλημα για την επιτυχία μιας καλλιέργειας.

Γι' αυτό πρόσφατα, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή σε κάποιες βιοχημικές αλλαγές, οι οποίες σχετίζονται με το στρες των ψαριών, εξαιτίας της πιθανής αξίας που έχουν στο να παρέχουν μία πρώιμη ένδειξη των περιβαλλοντικών προβλημάτων. Στη μελέτη μας, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη δράση κάποιων ορμονών και ενζύμων, αλλά και άλλων βιοενεργών μορίων των οργανισμών, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοχημικοί δείκτες του βαθμού μόλυνσης και επομένως του βαθμού στρες των ψαριών.

Οι συντάκτες αυτής της μελέτης, ευχαριστούμε θερμά τον εισηγητή μας καθηγητή του Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΣΟΛΟΓΓΙΟΥ κ. Ν.Γ. ΒΛΑΧΟ, καθώς και όλους εκείνους που συνετέλεσαν στην εκπόνησή της. \_



1000

1000



## ΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ

### I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αντίδραση στο στρες αποτελείται από ένα ολοκληρωμένο σχέδιο / μοντέλο ρυθμίσεων στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά ενός ψαριού, το οποίο ενισχύει την καλύτερη δυνατή επιβίωση σε περίπτωση επιβλαβούς ή απειλητικής κατάστασης.

Η αντίδραση χαρακτηρίζεται ως μία μεταστροφή από μία αναβολική σε μία καταβολική κατάσταση, παρέχοντας με τον τρόπο αυτό στο ψάρι τις απαραίτητες πηγές ενέργειας ώστε να αποφύγει ή να ξεπεράσει την άμεση απειλή, δηλαδή έχει αναπτυχθεί μία προσαρμοστική αντίδραση σε μικρής διάρκειας ή εντονο στρες. Αν το ψάρι έρθει αντιμέτωπο με ένα συνεχές ή χρόνια στρες, από το οποίο δεν υπάρχει διαφυγή (π.χ. καταστροφική μόλυνση, μέτριες υδατοκαλλιεργητικές εγκαταστάσεις κλπ.) η προσαρμοστική αξία της αντίδρασης τίθεται σε κίνδυνο. Το ψάρι μπορεί να εγκλιματιστεί στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες, με μειωμένη ωστόσο απόδοση, όμως η εκτεταμένη δράση της αντίδρασης στο στρες μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφικές παρενέργειες (π.χ. αναστολή της ανάπτυξης, αναπαραγωγική δυσλειτουργία, καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος) οι οποίες τελικά μπορούν να επιφέρουν την θνησιμότητα. Ο αναγνώστης παραπέμπεται στους (Adams<sup>2</sup>, Colombo και συνεργάτες<sup>45</sup>, Wedemeyer και συνεργάτες<sup>197</sup>, Barton και Iwama<sup>19</sup>) για πρόσφατες έρευνες σχετικά με την αντίδραση του στρες στα ψάρια. Η ακριβής μορφή της αντίδρασης στο στρες, τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά, ποικίλει ανάλογα με τη φύση του στρες, αλλά είναι κοινώς αποδεκτό ότι υπάρχει ένα βασικό συστατικό στις ενδοκρινολογικές και φυσιολογικές αλλαγές, το οποίο είναι κοινό στις αντιδράσεις στα περισσότερα αν όχι σε όλα είδη περιβαλλοντικού στρες. Αυτό περιλαμβάνει διέγερση στο συμπαθητικό-χρωμαφινικό (sympathetic – chromaffin) σύστημα και στον άξονα υποθαλαμικού λοβού υποφύσεως (hypothalamic pituitary – interrenal axis).

Αυτή η έρευνα καλύπτει την «κλασσική» νευροενδοκρινική αντίδραση στο στρες καθώς και μερικές από τις πιο συγκεκριμένες συνέπειες που προκύπτουν, για παράδειγμα, από την έκθεση σε τοξικές ουσίες.

Είναι σημαντικό να αναγνωρίσει κανείς ότι η αντίδραση στο στρες στο μεμονωμένο ψάρι συνεπάγεται ρυθμίσεις σε όλα τα επίπεδα οργάνωσης (μοριακό, βιοχημικό, φυσιολογικό, δομικό και συμπεριφορικό) και ότι αυτές επιφέρουν συνέπειες στο επίπεδο του πληθυσμού και του οικοσυστήματος<sup>18,167</sup>. Παραδοσιακά οι μεταβολές στην ανάπτυξη, στον δείκτη θνησιμότητας και στην αναπαραγωγική ικανότητα έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες περιβαλλοντικού στρες.

Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή χωλαίνει στο ότι θα μπορούσε να σημειωθεί αμετάβλητη καταστροφή στους πληθυσμούς των ψαριών πριν τεθεί σε εφαρμογή επανορθωτική δράση.

Επομένως, πρόσφατα έχει δοθεί προσοχή σε κάποιες βιοχημικές αλλαγές, οι οποίες σχετίζονται με το στρες των ψαριών, εξαιτίας της πιθανής αξίας που ίσως έχουν στο να παρέχουν μία ευαίσθητη πρόωμη ένδειξη των περιβαλλοντικών προβλημάτων. Για παράδειγμα οι βιοχημικές αποδείξεις της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος προειδοποιούν νωρίς για επικείμενα επιδημικά προβλήματα, τα οποία με τη σειρά τους θα επηρέαζαν τους δείκτες θνησιμότητας και επομένως και τη δυναμική των πληθυσμών.

Παρόλη όμως την αξία αυτής της βιοχημικής προσέγγισης, χωρίς να ληφθούν υπόψη οι αλλαγές στα άλλα επίπεδα οργάνωσης, θα δοθεί μόνο μία πλευρά του ζητήματος από την οποία θα προσδιορισθεί η σημασία των διαφόρων μορφών περιβαλλοντικού στρες και όπου είναι δυνατό, ο αναγνώστης θα παραπέμπεται σε συμπληρωματική βιβλιογραφία (μέρος της οποίας ανήκει στη σειρά αυτού του βιβλίου), η οποία καλύπτει ευρύτερη οπτική της βιολογίας του στρες των ψαριών.

Το κεφάλαιο αυτό περιγράφει μερικές από τις σημαντικότερες βιοχημικές μεταβολές, τις οποίες υφίστανται στρεσαρισμένα ψάρια, είτε ως αποτέλεσμα συνεπειών που επιτυγχάνεται μέσω ορμονών του στρες ή ως αποτέλεσμα συγκεκριμένων αντιδράσεων σε συγκεκριμένα είδη στρες. Έξαιτίας της ποικιλίας τέτοιων μεταβολών, οι πληροφορίες που δίνονται είναι αναγκαστικά επιλεκτικές, αλλά καλύπτουν τους σημαντικότερους τομείς αναπνοής, μεταβολισμού, ανάπτυξης, ωσμορύθμισης (osmoregulation), άμυνας (συμπεριλαμβανομένης και της απεξάρτησης) και αναπαραγωγής. Δίνεται μία αρχική περιγραφή των ορμονικών μεταβολών που υφίστανται τα στρεσαρισμένα ψάρια και κάθε τομέας τελειώνει συνοψίζοντας με μορφή πίνακα της βιοχημικής παραμέτρου που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες του στρες στα ψάρια.

## **II . ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ**

Οι άμεσες νευροενδοκρινικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα όταν τα ψάρια υπόκεινται σε κατάσταση στρες, είναι γνωστές ως πρωταρχικές αντιδράσεις στο στρες και κυριαρχούν οι μεταβολές στο συμπαθητικό – χρωμαφινικό σύστημα και στον άξονα HPI ( Hypothalamic – Pituitary – Interrenal ). Ωστόσο, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι πολλά άλλα συστατικά του ενδοκρινικού συστήματος των ψαριών είναι ευαίσθητα στο περιβαλλοντικό στρες / πίεση και καθώς η έρευνα εξελίσσεται και νέες τεχνικές αναπτύσσονται ο ρόλος των άλλων ορμονών στην αντίδραση του στρες θα γίνει φανερός. Αυτές οι πρωταρχικές νευροενδοκρινικές αντιδράσεις παράγουν δευτερεύουσες βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές στα ψάρια, οι οποίες τελικά οδηγούν σε αντιδράσεις σε επίπεδα ατομικά, κοινωνικά και πληθυσμιακά στην ανάπτυξη επιβίωση και αναπαραγωγή, οι οποίες αναφέρονται γενικά ως τριτογενείς τριτοβάθμιες αντιδράσεις.

## 1. Το Συμπαθητικό – Χρωμαφινικό Σύστημα ( Sympathetico – Chromaffin System )

Όπως με πολλές άλλες πλευρές της ενδοκρινολογίας και της φυσιολογίας, ο ρόλος των κατεχολαμίνων (ορμόνες παράγωγες της πυροκατεχόλης όπως η αδρεναλίνη) στην αντίδραση των ζώων στο στρες έχει μελετηθεί πιο εντατικά στα ανώτερα σπονδυλωτά ( βασικά στα θηλαστικά ) απ' ό τι στα ψάρια και ο αναγνώστης παραπέμπεται στον Kuchel<sup>95</sup> για μία περιεκτική ανασκόπηση του θέματος. Οι κατεχολαμίνες απεκρίνονται τόσο ως νευρομεταφορείς από το νευροσυμπαθητικό σύστημα, όσο και ως κλασσικές ορμόνες από το μυελλό επινεφριδίων. Στα ψάρια το μυελλώδες ομόλογο (το χρωμαφινικό πλέγμα) αποτελείται από διάχυτες ομάδες κυττάρων τοποθετημένες γύρω από τα μεταγενέστερα βασικά αιμοφόρα αγγεία και τα προνεφρίδια τα οποία διεγείρονται από προγαγγλιακές, χολινεργικές ίνες (νευρικά κύτταρα που ελευθερώνουν ακετυλοχολίνη). Τα χρωμαφινικά κύτταρα περιέχουν τις τρεις βασικές κατεχολαμίνες, επινεφρίνη (αδρεναλίνη), νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη) και ντοπαμίνη, αλλά η σχετική αναλογία των διαφορετικών κατεχολαμίνων διαφέρουν ανάλογα με το είδος<sup>110</sup>. Αυτές οι ορμόνες φυλάσσονται μέσα σε ενδοκυτταρικούς κόκκους και γρήγορα μπαίνουν στη ροή του αίματος των ψαριών ως αντίδραση σε «αγχωτικές» συνθήκες. Ο βαθμός κατά τον οποίο ο «υπερπληθυσμός» στο αίμα από την συναπτική απελευθέρωση στα τελικά νεύρα συνεισφέρει στις τεράστιες αλλαγές στα επίπεδα κατεχολαμίνης στα στρεσσαρισμένα ψάρια, παραμένει εντελώς αδιευκρίνιστος (αναφορά 69). Η απελευθέρωση της κατεχολαμίνης στα ψάρια συνδέεται ιδιαίτερα με το αναπνευστικό στρες – όπως ακριβώς εκείνα που έχουν σχέση με την εξαντλητική εργασία<sup>147</sup>, την υποταξία<sup>8</sup> ή την υπερκαπνία<sup>131</sup> και αποτελούν γνώρισμα της μικρής διάρκειας αξίας της αντίδρασης στο στρες, ετοιμάζοντας το ψάρι « να παλέψει ή να πετάξει », κατά το οποίο η "adrenergic" διέγερση διευκολύνει την ανταλλαγή αερίων στα βράγχια, αυξάνει την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου στο αίμα και κινητοποιεί τα αποθέματα ενέργειας ( συγκεκριμένα μέσω της γλυκογενόλυσης ) για να διατηρήσει τα απαραίτητα αποθέματα μεταβολικών καυσίμων ( γλυκόζη ) στο κεντρικό νευρικό σύστημα).



Ο σχετικός ρόλος αυτών των ορμονών κατά τη διάρκεια του στρες, ο έλεγχος της απελευθέρωσης κατεχολαμίνης από άλλες ορμόνες (π.χ. κορτικοστεροειδή) και οι συνέπειες του στρες στην μείωση της κατεχολαμίνης ( κυρίως μέσω της ηπατικής δημιουργίας θεικού άλατος ) εξακολουθούν να βρίσκονται υπό έρευνα.

Η αύξηση όμως των επιπέδων της επινεφρίνης, της νορεπινεφρίνης και της ντοπαμίνης στο πλάσμα του αίματος είναι μία σημαντική βιοχημική αντίδραση των ψαριών στο περιβαλλοντικό στρες και έχει τεράστιες συνέπειες στην αναπνοή, στον ενδιάμεσο μεταβολισμό και στην ωσμωρύθμιση. Το κοινωνικό στρες, αποτέλεσμα της δομής των κυρίαρχων ιεραρχιών, είναι μία ισχυρή μορφή στρες σε πολλές ομάδες ψαριών. Σε ακραίες περιπτώσεις τα «υπάκουα» ψάρια επιδεικνύουν μία τυπική αντίδραση χρόνιου στρες με ανεβασμένα επίπεδα πλάσματος κορτιζόλης και μειωμένα αθροίσματα λυμφοκυττάρων χωρίς καμία ένδειξη εγκλιματισμού<sup>143</sup>. Κάποιες πληροφορίες υποδηλώνουν ότι τα μονοαμινικά συστήματα μπορούν να ρυθμίζουν την επιθετική συμπεριφορά στα ψάρια, με το κυρίαρχο ψάρι να επιδεικνύει συγκέντρωση λιγότερης νορεπινεφρίνης και περισσότερης ντοπαμίνης στον εγκέφαλο<sup>114</sup>. Ο Winberg και οι συνεργάτες του<sup>202</sup> παρουσιάζουν αποδείξεις για να δείξουν ότι το κοινωνικό στρες ενώ δεν επηρέαζε τη συγκέντρωση νορεπινεφρίνης, ντοπαμίνης ή σροτονίνης (5- υδροξυτριπταμίνη) στον εγκέφαλο του υπάκουου Αρκτικού charr, *Salvelinus alpinus*, ωστόσο προκάλεσε σημαντική αύξηση σε δύο από τους μεταβολίτες του (5- υδροξυινδολεακετικό οξύ στα υπάκουα ψάρια, ομοβανιλλικό οξύ στα ισχυρά). Αυτά τα ευρήματα ερμηνεύονται ως αυξημένη σροτονινική δραστηριότητα και μειωμένη ντομανική δραστηριότητα στον εγκέφαλο του κατώτερου charr.

## 2. Ο Άξονας Υποθαλαμικού Λοβού Υποφύσεως (HPI)

Ο άξονας HPI στα ψάρια αποτελείται από ιεραρχία στις ορμονικές οδούς (παραγωγή απελευθέρωσης υποθαλαμικής κορτικοτροπίνης (CRF) → λοβός αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH) → κορτικοστεροειδή υπόφυση) με μία σειρά ρυθμιστικών αναδραστικών βρόγχων, οι οποίοι λειτουργούν σε διαφορετικά επίπεδα (αναφορές 51 και 19 για λεπτομέρειες). Η κορτιζόλη, η βασική κορτικοστεροειδής ορμόνη που παράγουν τα ψάρια δημιουργείται εκ νεού και αποκρύπτεται από τον μεσονέφριο ιστό ως αντίδραση στα περισσότερα – αν όχι όλα – είδη στρες. Ο Schreck<sup>163</sup> υποστηρίζει πειστικά ότι μία αίσθηση «αντίληψης» είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην εισαγωγή αυτής της άποψης στην αντίδραση του στρες. Όταν το στρες είναι μικρής διάρκειας ή έντονο, τα φυσιολογικά επίπεδα πλασματικής κορτιζόλης ίσως αυξηθούν για μερικές ώρες, αλλά επιστρέφουν στα βασικά επίπεδα μέσα σε περίπου 24 ώρες. Αν από την άλλη πλευρά, το στρες είναι συνεχές ή χρόνιο τα επίπεδα πλασματικής κορτιζόλης στη φύση μπορούν να αυξηθούν για μέρες ή ακόμη και για εβδομάδες<sup>34,143</sup>. Η επιστροφή στα φυσιολογικά επίπεδα πλασματικής κορτιζόλης κατά τη διάρκεια ορισμένων ειδών χρόνιου στρες μπορεί να επιτευχθεί<sup>136</sup> αν και αυτός ο εμφανής εγκλιματισμός δεν είναι το μόνιμο θέμα. Γενικά, η δυναμική της αύξησης και της μείωσης της πλασματικής κορτιζόλης είναι κάπως πιο αργή από αυτή των κατεχολαμινών. Η σχεδόν πανταχού παρούσα φύση της κορτιζόλικης αντίδρασης οδήγησε στη χρήση της ως ποσοτικός δείκτης της σοβαρότητας του στρες που βιώνουν τα ψάρια. Ωστόσο αυτή η κάπως απλοική προσέγγιση γίνεται πιο σύνθετη από την φανερή πτώση στη ρύθμιση του αριθμού των δεικτών κορτιζόλης στους στόχους – ιστούς των χρόνια στρεσαρισμένων ψαριών<sup>109,141</sup> και από την αύξηση στον μεταβολικό ρυθμό της κορτιζόλης<sup>35</sup>. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η αντίδραση της κορτιζόλης στο περιβαλλοντικό στρες είναι μεγαλύτερη στα άγρια ψάρια όταν συγκριθούν με εξημερωμένα είδη ψαριού<sup>209</sup> ή με τα ψάρια που εκτρέφονται σε εκκολαπτήρια / ιχθυοτροφεία<sup>157</sup>. Μερικές από αυτές τις διαφορές στην ευαισθησία πιθανόν να έχουν γενετική βάση<sup>58,113,144</sup>.

Η κορτιζόλη φαίνεται ότι παίζει αρκετούς ρόλους στην αντίδραση στο στρες, συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας της ενέργειας, της διέγερσης των ιοντορυθμιστικών διεργασιών και της διευκόλυνσης λήψης οξυγόνου κάτω από υποξικές συνθήκες. Ωστόσο, η παρατεταμένη αύξηση της κορτιζόλης μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ανθυγεινές συνέπειες στην αντοχή στις ασθένειες, στην ανάπτυξη και στην αναπαραγωγή. Αυτές οι πλευρές των συνεπειών της αύξησης της κορτιζόλης στα στρεσοσαρισμένα ψάρια αναφέρονται διεξοδικότερα παρακάτω.

### 3. Άλλα Ενδοκρινικά Συστήματα

Έχει ήδη τονιστεί ότι το συμπαθητικό – χρωμαφινικό σύστημα και ο άξονας HPI κυριάρχησαν σε προηγούμενες μελέτες για την ενδοκρινολογία της αντίδρασης των ψαριών στο στρες. Έχει όμως αποδειχθεί ότι άλλα ενδοκρινικά συστήματα είναι ευαίσθητα σε διάφορες μορφές έντονου και χρόνιου στρες και γι' αυτό είναι σωστό να μιλήσουμε για αυτά περιληπτικά.

Η θυροειδής έκκριση της θυροξίνης (τετρα- ιοντοθυρονίνη, το οποίο μετατρέπεται μέσω περιφερειακού απιονισμού σε ενεργή ορμόνη τρι-ιοντοθυρονίνη T3) διεγείρεται από έντονο στρες όπως η ένεση<sup>33</sup> παρόλο που τα κυκλοφοριακά επίπεδα T3 μπορούν να συγκαληφθούν<sup>38</sup>. Τα χρόνια είδη στρες γενικά απωθούν την δραστηριότητα του θυροειδή<sup>35</sup>. Αντιθέτως, έντονες μορφές στρες μπορεί να μειώσουν το επίπεδο της κυκλοφοριακής ορμόνης ανάπτυξης του λοβού (GH αναφορές 56 και 139) ενώ οι πιο παρατεταμένες μορφές στρες τείνουν να αυξήσουν τα επίπεδα GH του πλάσματος, ως αποτέλεσμα της μειωμένης λήψης φαγητού που έχει παρατηρηθεί στα χρόνια αγχωμένα ψάρια<sup>180</sup>. Η εκκρινόμενη από τον λοβό προλακτίνη (PRL) είναι επίσης ευαίσθητη στο στρες παρόλο που τα αρχικά αποτελέσματα φαίνονται αντιφατικά. Στα θηλαστικά η απελευθέρωση προλακτίνης είναι χαρακτηριστική αντίδραση στην έκθεση σε πλήθος αγχωτικών καταστάσεων και τα επίπεδα προλακτινικού πλάσματος είναι καλός δείκτης του «επιπέδου στρες» πειραματόζων και ανθρώπων<sup>189</sup>. Στον ανήλικο σολωμό *Oncorhynchus kisutch*, (Avella και συνεργάτες)<sup>11</sup>, αναφέρεται διέγερση της έκκρισης προλακτίνης η οποία

έπεται του φυσικού απτού στρες, ενώ αντίθετα ο Pottinger και οι συνεργάτες του<sup>145</sup> βρήκαν ότι τα επίπεδα κυκλοφορίας της προλακτίνης μειώνονται στην χρόνια αγχωμένη πολύχρωμη πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss*. Μία σχετική ορμόνη του λοβού, η σωματολακτίνη (SL αναφορά 148), της οποίας η λειτουργία δεν έχει ακόμα αποδοθεί, φαίνεται ότι απελευθερώνεται ως αντίδραση σε έντονο, φυσικό στρες (M. RandWeaver και T.G. Pottinger, δεν έχει εκδοθεί) παρόλο που η φυσιολογική σπουδαιότητα αυτής της αντίδρασης δεν έχει γίνει ακόμη αντιληπτή.

Η λοβιαία αδρενικορτικοτροπίνη (ACTH), ως μέρος του άξονα HPI, αποκρύπτεται γρήγορα ως αντίδραση στα περισσότερα είδη περιβαλλοντικού στρες, αλλά μπορούν επίσης να επηρεαστούν άλλες ορμόνες της προ — οπιομελανοκορτινικής οικογένειας. Έτσι ο Sumpter και οι συνεργάτες του<sup>179</sup> υπέδειξαν την έκκριση της διεγερτικής ορμόνης μελανοκίτης (α-MSH) και της β-ενδορφίνης στην πολύχρωμη πέστροφα ως αντίδραση στα θερμικά σοκ. Η υποθαλαμική πεπτίτιδα, ορμόνη γυγκέντρωσης μελανοκίτης (MCH) είναι ευαίσθητη στο στρες και έχει αναφερθεί ότι το αυξημένο επίπεδο MCH στα στρεσοαρισμένα ψάρια μπορεί να ρυθμίζει την αντίδραση στο στρες με το να μειώνει τη δράση της HPI (αναφορά 13).

Η τωρινή γνώση που αφορά την παγκρεατική ορμόνη ινσουλίνη στα ψάρια, πρόσφατα επανεξετάστηκε<sup>118</sup> και παρόλο που κάποιες πληροφορίες για το ρόλο της ινσουλίνης κατά τη διάρκεια περιόδων υπερβολικής φυσιολογικής πρόκλησης, όπως η λιμοκτονία, η άσκηση και η μετανάστευση σε αλμυρό περιβάλλον, είναι δυνατή, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα σε σχέση με τα αποτελέσματα άλλων ειδών στρες. Παρομοίως, παρόλο που ο μεταβολικός ρόλος της γλυκαγόνης γίνεται όλο και πιο κατανοητός<sup>140,181</sup>, δεν υπάρχουν πληροφορίες σε σχέση με τα αποτελέσματα του στρες στη δράση αυτής της ορμόνης. Ο Thomas και ο Neff<sup>186</sup> συμπέραναν την αναστολή της έκκρισης ινσουλίνης στο Cd-treated striped mullet, *Mugil cephalus*, ωστόσο σαφώς χρειάζονται περαιτέρω μελέτες ως προς τον ρόλο των εντερικών και παγκρεατικών ορμονών στην αντίδραση των ψαριών στο στρες.

Τέλος, όλο και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι ο άξονας pituitary-gonadal των τελεόστεων ψαριών μειώνεται σε διάφορα επίπεδα από φυσικά είδη στρες όπως εκμετάλλευση και περιορισμό. Ο Pickering και οι συνεργάτες του<sup>138</sup> απέδειξαν τη μείωση του επιπέδου της κυκλοφοριακής τεστοστερόνης και της 11-κετοτεστοστερόνης στη σεξουαλικά ώριμη καφέ πέστροφα *Salmo trutta*, μία συνέπεια που μπορεί να επιτευχθεί μέσω της κορτιζόλης<sup>42</sup>. Μία παρόμοια καταστολή των κυκλοφοριακών ανδρογόνων παρατηρήθηκε στην πιτσιλωτή θαλάσσια πέστροφα *Cynoscion nebulosus*, από τους Safford και Thomas<sup>156</sup>. Η αύξηση της κορτιζόλης προκάλεσε επίσης μείωση στην έκκριση τεστοστερόνης και οιστροδιόλης από τις ωθήκες της θηλυκής πέστροφας τόσο εν ζωή<sup>42</sup> όσο και στο εργαστήριο<sup>40</sup>. Επιπλέον στοιχεία δείχνουν ότι το περιβαλλοντικό στρες που δρα μέσω αυξημένων επιπέδων κορτιζόλης, μπορεί επίσης να επηρεάσει την αναπαραγωγική δράση μειώνοντας την σύνθεση / έκκριση γοναδοτροπίνης (GTH) από τους αδένες υπόφυσης<sup>41,42</sup>.

Στα θηλαστικά η δράση του συστήματος ρενίνης / αγγειοτενσινογενίνη / αγγειοτασίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικός δείκτης του στρες<sup>189</sup> και ο Arillo και οι συνεργάτες του<sup>9</sup> ανέφεραν αυξημένη δραστηριότητα της ρενίνης στην πολύχρωμη πέστροφα μετά από έκθεση σε αμμωνία.

Κάτω από το φως όλων αυτών των μελετών, φαίνεται πιθανό ότι τα περισσότερα συστατικά του ενδοκρινικού συστήματος των ψαριών θα ανταποκριθούν σε καταστάσεις στρες καθώς το ζώο «κλείνει» τις διεργασίες που αποσπούν την προσοχή από την άμεση ενεργειακή κινητοποίηση. Ξεκάθαρα, ολόκληρος ο τομέας της νευροενδοκρινολογίας της αντίδρασης των ψαριών στο στρες απαιτεί περισσότερη ερευνητική προσπάθεια ώστε να καταλάβουμε τις συνέπειες του στρες πάνω στην ικανότητα των ψαριών για επιβίωση, ανάπτυξη και αναπαραγωγή.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 1**  
**Βιοχημικές αλλαγές που σχετίζονται με τις νευροενδοκρινικές**  
**αντιδράσεις των ψαριών στο στρες.**

ΤΟΜΕΑΣ	ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΙΣΤΟΣ	ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ	ΜΟΡΦΗ ΣΤΡΕΣ
Π.1.	Αδρεναλίνη(Επινεφρίνη)	Πλάσμα	↑	Σωματική, Αναπνευστική, Φόβος
	Νοραδρεναλίνη	Πλάσμα	↑	Σωματική, Αναπνευστική, Φόβος
		Εγκέφαλος	↓	Κοινωνική (Κυρίαρχος)
	Ντοπαμίνη	Πλάσμα	↑	Σωματική, Αναπνευστική, Φόβος
		Εγκέφαλος	↑	Κοινωνική (Κυρίαρχος)
	5-Υδροξινδολακετικό οξύ	Εγκέφαλος	↑	Κοινωνική (Κατώτερος)
Ομοβανιλικό οξύ	Εγκέφαλος	↑	Κοινωνική (Κυρίαρχος)	
Π.2.	ACTH	Πλάσμα	↑	Σωματική, Τρόπος Συμπεριφοράς, Χημική
	Υδροκορτιζόνη	Πλάσμα	↑	Σωματική, Τρόπος Συμπεριφοράς, Χημική
	Δέκτες Υδροκορτιζόνης	Συκώτι	↓	Χρόνιο Στρες
		Βράγχια	↓	Χρόνιο Στρες
Π.3.	Θυροξίνη	Πλάσμα	↑	Οξεία Σωματική
			↓	Χρόνιο Στρες, Πείνα
	Τριωδοθυρονίνη	Πλάσμα	↓	Οξεία Σωματική
	Ορμόνες Ανάπτυξης	Πλάσμα	↓	Οξεία Σωματική
		Πλάσμα	↑	Χρόνιο Στρες, Πείνα
	Προλακτίνη	Πλάσμα	↑	Οξεία Σωματική
		Πλάσμα	↓	Οξεία Σωματική
	Σωματολακτίνη	Πλάσμα	↑	Οξεία Σωματική
	A-MSH	Πλάσμα	↑	Σωματική
	B-Ενδορφίνη	Πλάσμα	↑	Σωματική, Θερμικό σοκ
	MCH	Πλάσμα	↑	Σωματική
	Ινσουλίνη	Πλάσμα	↓	Τοξικά
	Ρενίνη (Νεφρίνη)	Πλάσμα	↑	Έκθεση σε Αμμωνία
	Τεστοστερόνη	Πλάσμα	↓	Σωματική, Τοξικά
11-Κετοτεστοστερόνη	Πλάσμα	↓	Σωματική, Τοξικά	
Οιστραδιόλη	Πλάσμα	↓	Σωματική, Τοξικά	
V.1	Ουροτενσίνη I	Ουραίο Νευροεκκριτ. Σύστημα	↑	Χαμηλό pH
	Αργινική Αγγειοτοκίνη (Arginine Vasotocin)	Εγκέφαλος, Υπόφυση	↑	Χαμηλό pH
VIII.1	Ακετυλοχοληστερίνη	Εγκέφαλος	↓	Οργανοφωσφ/κά άλατα

### III. ΑΝΑΠΝΟΗ

Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), το σημαντικότερο «ενεργειακό νόμισμα» των ιστών μπορεί να παραχθεί είτε από αερόβιες, είτε από αναερόβιες οδούς. Ο αεροβικός μεταβολισμός, κατά τον οποίο το οξυγόνο δρα ως δέκτης ηλεκτρονίων, είναι αναμφισβήτητα ο πιο αποτελεσματικός, όσον αφορά την ενέργεια, μεταβολισμός για την παραγωγή ATP και γι' αυτό είναι πλεονέκτημα των ψαριών να διατηρούν οξειδωτικά μονοπάτια όπου μπορούν. Ωστόσο τα ψάρια χρησιμοποιούν και αναερόβιες οδούς για να εφοδιάζουν απαραίτητες μεταβολικές διεργασίες όταν οι αερόβιες οδοί είναι ανεπαρκείς ή δεν μπορούν να διατηρηθούν (δες αναφορά 73). Καταστάσεις στρες, όπως επιβαλλόμενη άσκηση, περιβαλλοντική υποταξία και ζημιά στα βράγχια (που προκλήθηκε για παράδειγμα από μόλυνση ή ασθένεια) μπορούν να δημιουργήσουν συνθήκες μειωμένης ικανότητας παραγωγής οξυγόνου στους ιστούς. Στον τομέα αυτό, θα εστιάσουμε την προσοχή μας, δηλαδή στις βραγχιακές και χημικές ρυθμίσεις που χρησιμοποιούν τα ψάρια για να διατηρήσουν ή να αυξήσουν τη λήψη οξυγόνου κάτω από συνθήκες στρες και στους αναερόβιους μηχανισμούς που είναι διαθέσιμοι στα ψάρια όταν τα μονοπάτια οξείδωσης είναι ανεπαρκή. Καθόλη την έκταση του τομέα αυτού, θα δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στις βιοχημικές αλλαγές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες του στρες, με αποκορύφωμα την εκτίμηση της χρήσης του αδενυλικού φορτιστή ενέργειας (Adenylate Energy Charge), ένα μέτρο της άμεσα διαθέσιμης ενέργειας στα ψάρια, για τέτοιο σκοπό.

## 1. Βραγχιακές και Καρδιακές Ρυθμίσεις στα Στρεσαρισμένα Ψάρια

Η έκκριση κατεχολαμίνης (νευρική και / ή χημική) μπορεί να αλλάξει τη ροή αίματος, αυξάνοντας τους καρδιακούς παλμούς και την ένταση της εγκεφαλικής συμφόρησης ως κάποιο βαθμό, παρόλο που η συνέπεια αυτή στα ψάρια είναι σαφώς μικρότερης έντασης από αυτή που έχει αναφερθεί για ορισμένα θηλαστικά (αναφορά 161) και προκαλεί μικρής διάρκειας αγγειοσυστολή, την οποία ακολουθεί παρατεταμένη αγγειοδιαστολή των αγγείων των βραγχίων<sup>206</sup>. Η γενική συνέπεια είναι η αύξηση της λειτουργικής επιφανειακής περιοχής των βραγχίων που είναι διαθέσιμη για ανταλλαγή αερίων<sup>26</sup>. Αυτές οι αλλαγές στα αιμοφόρα αγγεία μπορεί να συνοδεύονται από αύξηση στον ρυθμό οξυγόνωσης του αίματος και / ή από έντονο βραγχιακό εγκεφαλικό επεισόδιο<sup>73</sup>.

## 2. Η Ικανότητα Μεταφοράς Οξυγόνου του Αίματος

Αρκετές ξεχωριστές, αλλά σχετικές, φυσιολογικές αντιδράσεις στην έκκριση κατεχολαμίνης συνεισφέρουν στη διατήρηση ή στην αύξηση της ικανότητας του αίματος των στρεσαρισμένων ψαριών να μεταφέρει οξυγόνο. Αυτές περιλαμβάνουν ταχεία διέγερση απελευθέρωσης ερυθροκυττάρων από την σπλήνα στη γενική κυκλοφορία<sup>130,203</sup>, προστασία του ερυθροκυτταρικού ενδοκυτταρικού pH διεγείροντας την απέκκριση πρωτονίου, εξουδετερώνοντας έτσι την συνέπεια-αιτία. (αναφορά 188). Ταυτόχρονα  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$  μπαίνουν στο κύτταρο και προκαλούν οσμωτική διόγκωση των ερυθροκυττάρων, τα οποία τελικά μειώνουν τη συγκέντρωση οργανικών φωσφορικών αλάτων μέσα στο κύτταρο, αυξάνοντας και πάλι την ανάγκη της αιμοσφαιρίνης για οξυγόνο<sup>122</sup>. Επιπλέον, πρόσφατα διατυπώθηκε η άποψη ότι η αδρεναλίνη μπορεί να επηρεάζει άμεσα τη σχέση του οξυγόνου με το μόριο της αιμοσφαιρίνης<sup>55</sup>. Και η κορτιζόλη παίζει ρόλο στην αύξηση της ικανότητας του αίματος να μεταφέρει οξυγόνο κάτω από υποξικές συνθήκες, αυξάνοντας την εσωτερική υποδοχή των β-δεικτών στα ερυθροκύτταρα, κάνοντας ως εκ τούτου τις ενδεχόμενες αδρενεργικές συνέπειες της υποταξίας στον έλεγχο του pH μέσα στο κύτταρο<sup>150</sup>.

Με βιοχημικούς όρους, αυτές οι προσαρμοστικές αλλαγές είναι άμεσα εμφανής ως αύξηση της συνολικής αιμοσφαιρίνης του αίματος (σε συνδιασμό με αύξηση του αιματοκρίτη), αλλά και ως μείωση στη μέση συγκέντρωση κυτταρικής αιμοσφαιρίνης (MCHC) στα στρεσαρισμένα ψάρια, αποτέλεσμα της οσμωτικής διόγκωσης / οιδήματος και εισροής ανώριμων ερυθροκυττάρων. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για ψάρια εκτεθειμένα σε σωματικό ή αναπνευστικό στρες, ωστόσο η εικόνα είναι ακόμη πιο σύνθετη όταν εμπλέκεται μόλυνση. Η έκθεση των ψαριών σε τοξικές ουσίες μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην κλίμακα καταστροφής των ερυθροκυττάρων (συχνά συνδέεται με επανορθωτικές αλλαγές στην ερυθροποίηση – παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων), της αιμόλυσης και σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. έκθεση σε νιτρίτη ή χλωραμίνη), βλάβη της ικανότητας της αιμοσφαιρίνης να μεταφέρει οξυγόνο, η οποία προκαλείται από την οξείδωση του μορίου στη μεθαιμοσφαιρίνη (ανάμειξη αιμογλοβίνης και οξυγόνου στο αίμα). Ο Μόλυβδος, το Κάδμιο, ο Υδράργυρος, η Χλωραμίνη και τα απόβλητα των εργοστασίων χαρτοπολτού μπορούν να προκαλέσουν αναιμία, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης στο αίμα ενώ το χαμηλό pH προκαλείται από ορισμένα φυτοφάρμακα, το χρώμιο και ο χαλκός και διεγείρουν την παραγωγή αιμοσφαιρίνης<sup>73</sup>. Οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται δεν είναι κατανοητοί σε κάθε περίπτωση, παρόλο που είναι γνωστό ότι ο μόλυβδος εμποδίζει την αφυδάτωση του ενζύμου delta – amino levulinic acid (ALA-D), ένα ένζυμο που συμμετέχει στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και η ηλεκτρόλυση της ALA-D δραστηριότητας, έχει χρησιμοποιηθεί ως ειδικός δείκτης δηλητηρίασης του μολύβδου στα ψάρια (αναφορά 75). Οι συνέπειες ενός ευρέως φάσματος μολυσματικών ουσιών στη λειτουργία των κοκκινόαιμων κυττάρων, καθώς και μία μελέτη της ιδιαιτερότητας της καταστολής του ALA-D, μελετήθηκαν πρόσφατα από τον Nikinmaa<sup>123</sup>.

### 3. Αναερόβια Αναπνοή

Αν οι ενεργειακές απαιτήσεις των ψαριών είναι τέτοιες που η ικανότητα οξυγόνου γίνεται περιοριστικός παράγοντας, το ATP μπορεί να παραχθεί από εναλλακτικά, αναερόβια μονοπάτια. Τα ψάρια που υφίστανται σοβαρή υποταξία ή παρατεταμένη άσκηση, συχνά παρουσιάζουν γρήγορη εξάντληση των αποθεμάτων του μυϊκού γλυκογόνου, μία πολύ σημαντική πηγή ενέργειας κάτω από αναερόβιες συνθήκες<sup>192</sup>. Η άμεση συνέπεια της αλλαγής σε αναερόβιο μεταβολισμό είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέως, το οποίο συσσωρεύεται στους ιστούς. Τα επίπεδα λακτιδίων (παράγωγα γαλακτικού οξέως) του αίματος έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέτρο του βαθμού αναεροβίωσης και ως δείκτης του στρες σε αρκετά είδη (αναφορές 70,137,165,196). Αυτό το χρέος του οξυγόνου δεν μπορεί να διατηρηθεί επ' αόριστον και τα λακτίδια τελικά ξαναοξειδώνονται και γίνονται πυροσταφιλικό άλας και είτε μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό ή ξαναγίνεται γλυκογόνο, όταν αυξάνεται η ικανότητα παραγωγής οξυγόνου.

Σε ορισμένα είδη *Carassius*, η αναερόβια γλυκόλυση μπορεί να λάβει χώρα ξέχωρα από την παραγωγή λακτιδίων, τα οποία λακτίδια μετατρέπονται ακόμη περισσότερο μέσω πυροσταφυλικού άλατος και ακεταλδεύδης σε αιθανόλη, αυξάνοντας έτσι την ικανότητα παραγωγής αναερόβιου ATP (αναφορές 120,123a,190). Πόσο εξαιρετικά είναι αυτά τα Κυπρινοειδή σε σχέση με αυτό το βιοχημικό χαρακτηριστικό πρέπει να εξακριβωθεί.



## ΠΙΝΑΚΑΣ 2

### Βιοχημικές αλλαγές που σχετίζονται με την αναπνευστική αντίδραση των ψαριών στο στρες

ΤΟΜΕΑΣ	ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΙΣΤΟΣ	ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ	ΜΟΡΦΗ ΣΤΡΕΣ
ΠΙ.2	Αιμοσφαιρίνη	Αίμα	↑	Σωματική, Αναπνευστική, Φόβος, Χαμηλό pH, Cr, Cu Εντομοκτόνα Pb, Cd, Hg, Χλωραμίνες, Εκροές Εργοστ. Χαρτοπολιτού
			↑	
			↓	
	MCHC	Ερυθρά Αιμοσφαίρια	↓	Σωματική, Αναπνευστική, Φόβος
ALA-D	Ερυθρά Αιμοσφαίρια	↓	Pb	
	Ανάμιξη Οξυγόνου και Αιμοσφαιρίνης στο Αίμα	Αίμα	↑	Νιτρώδη άλατα, Χλωραμίνες
ΠΙ.3	Λακτίδιο	Αίμα	↑	Σωματική, Αναπνευστική, Φόβος
ΠΙ.4	AEC	Μύες, Όλο το Σώμα	↓	Χρόνιο Στρες, Πείνα

MCHC (Mean Cell Haemoglobin Concentration) = Μέσος όρος Συγκέντρωσης Κυτταρικής Αιμοσφαιρίνης

ALA-D (δ-Aminolevulinic Acid Dehydratase)

AEC (Adenylate Energy Charge)

= Αδενυλική Ενέργεια Φόρτισης

#### 4. Αδενυλική Φόρτιση Ενέργειας

Τόσο ο αερόβιος, όσο και ο αναερόβιος μεταβολισμός φτάνουν στην αποκορύφωσή τους στην παραγωγή φωσφορικών δεσμών υψηλής ενέργειας, συνήθως (αλλά όχι αποκλειστικά) με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Αυτό οδήγησε τους ερευνητές στη σκέψη να χρησιμοποιήσουν την φόρτιση αδενυλικής ενέργειας :

$$\text{AEC} = \frac{[\text{ATP}] + 0.5 [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + \text{AMP}}$$

ως μέτρο ενεργειακής κατάστασης και επομένως ως δείκτη στρες<sup>151</sup>. Το AEC μετριέται σε κλίμακα από το 0 έως το 1, με τις χαμηλές τιμές να δείχνουν την κατάσταση του στρες. Όσο γοητευτικός δείχνει αυτός ο δείκτης, ξεπροβάλλουν μπερδέματα εξαιτίας διαφορών στην ανταπόκριση των ιστών, λόγω εποχιακών συνεπειών (αναφορά 23,79) και λόγω δυσκολίας αποτίμησης της πραγματικής συγκέντρωσης ελεύθερου, παρά ολόκληρου ADP.

### **IV. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ**

Η αλλαγή από αναβολικές σε καταβολικές διεργασίες στα αγχωμένα ψάρια εμπεριέχουν σημαντικές αλλαγές στον ενδιάμεσο μεταβολισμό και έχει σημαντικές συνέπειες στη σωματική ανάπτυξη. Ιδιαίτερη ερευνητική προσπάθεια έχει εστιαστεί στο σχετικό ρόλο των κατεχολαμινών και των κορτικοστεροειδών σε τέτοιες αλλαγές ως κύρια συστατικά της αντίδρασης στο στρες. Ο Van der Boon και οι συνεργάτες του<sup>191</sup>, πρόσφατα μελέτησαν τα αποτελέσματα της κορτιζόλης στον ενδιάμεσο μεταβολισμό των ψαριών. Ο σκοπός αυτού του τομέα του κεφαλαίου είναι να τονιστούν αυτά τα σημεία της μεταβολικής δραστηριότητας, τα οποία είναι γνωστό ότι είναι ευαίσθητα σε διάφορες μορφές στρες αλλά ο συγγραφέας αναφέρεται σε σχετικά κεφάλαια μέσα σε αυτούς τους τόμους για πιο λεπτομερείς περιγραφές των υπογραμμισμένων μεταβολικών διεργασιών.

## 1. Μεταβολισμός Υδατανθράκων

Η πιο πολυμελετημένη από τις δευτερεύουσες αντιδράσεις στο στρες είναι η αύξηση του επιπέδου γλυκόζης του αίματος (υπεργλυκαιμία). Η υπεργλυκαιμία που προκαλείται από το στρες συμβαίνει στα περισσότερα από τα ψάρια που έχουν μέχρι στιγμής μελετηθεί και ως αντίδραση σε μία μεγάλη ποικιλία καταστάσεων στρες συμπεριλαμβανομένης της αιχμαλωσίας<sup>70,96,198</sup>, της εκμετάλλευσης ή της παρενόχλησης<sup>54,137,165</sup>, και της εμφάνισης ή έκθεσης σε μολυσματικές ουσίες<sup>105</sup>.

Η πανταχού παρούσα φύση αυτής της αντίδρασης στο στρες είναι αναμφίβολη αλλά δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τους μηχανισμούς που εμπλέκονται. Τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μπορούν να προέλθουν από μειωμένη χρήση γλυκόζης, διέγερση γλυκονογένεσης και / ή διέγερση γλυκογονόλυσης. Η αναφερθείσα μείωση γλυκογόνου του συκωτιού στην πέρκα, *Perca fluviatilis*, η οποία οφείλεται σε στρες από αιχμαλωσία<sup>70</sup> και στην πολύχρωμη πέστροφα που οφείλεται στην εκμετάλλευση και την ένεση<sup>119</sup>, δείχνει ότι η γλυκογονόλυση είναι ένα σημαντικό συστατικό αυτής της αντίδρασης.

Στα ψάρια, οι κατεχολαμίνες προωθούν τόσο τη γλυκογονόλυση<sup>24,125</sup> όσο και τη γλυκονογένεση<sup>71</sup>. Ο ρόλος της κορτιζόλης στον έλεγχο αυτών των διεργασιών είναι περισσότερο αμφιλεγόμενος. Την αύξηση της πλασματικής γλυκόζης ως αντίδραση στη χορήγηση κορτιζόλης την έχουν εξηγήσει οι Butler<sup>37</sup>, Inui και Yokote<sup>82</sup>, Lidman και συνεργάτες<sup>102</sup>, Leach και Taylor<sup>99</sup>, de la Higuera και Cardenas<sup>48</sup> και οι Ignatius και Oomen<sup>81</sup>, παρόλο που άλλες έρευνες απέτυχαν να εξηγήσουν τέτοια αντίδραση<sup>3,62,171,194</sup>. Ωστόσο η άμεση σύγκριση διαφορετικών μελετών γίνεται περίπλοκη από το γεγονός ότι οι διαδικασίες χορήγησης, όπως η ένεση μπορούν από μόνες τους να προκαλέσουν αντίδραση στο στρες τόσο στα ελεγχόμενα όσο και στα πειραματικά ψάρια. Επιπλέον η ίδια η κορτιζόλη μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα κατεχολαμίνης<sup>88</sup>, οδηγώντας στη πιθανότητα ότι τα αποτελέσματα της κορτιζόλης μπορεί να είναι έμμεσα ενεργώντας μέσω απελευθέρωσης κατεχολαμίνης.

Οι σχετικοί ρόλοι κορτιζόλης και κατεχολαμινών στον έλεγχο του επιπέδου πλασματικής γλυκόζης έχουν μελετηθεί κριτικά από τους Suarez και Mommsen<sup>178</sup>, οι οποίοι παρατήρησαν ότι η μόνη άμεση απόδειξη της γλυκονεογέννεσης που παράγεται από την κορτιζόλη<sup>152</sup> δεν ήταν επαναλαμβανόμενη<sup>62</sup>.

Οι αναφορές των συνεπειών της κορτιζόλης στα αποθέματα γλυκογόνου στο συκώτι των ψαριών είναι εξίσου μπερδεμένες. Έτσι οι Butler<sup>37</sup>, Swallow και Fleming<sup>182</sup>, Inui και Yokote<sup>82</sup>, Chan και Woo<sup>43</sup>, Lidman και άλλοι<sup>102</sup> και οι de la Higuera και Cardenas<sup>48</sup> όλοι ανέφεραν, αύξηση των επιπέδων γλυκογόνου στο συκώτι των ψαριών που κάνουν θεραπεία κορτιζόλης, ενώ ο Storer<sup>177</sup> δεν μπορούσε να βρει καμία επίδραση και οι Ball και Hawkins<sup>14</sup>, Foster και Moon<sup>62</sup>, Barton και συνεργάτες<sup>20</sup>, Andersen και συνεργάτες<sup>3</sup> και ο Soengas με άλλους<sup>171</sup>, ανέφεραν μείωση στα επίπεδα ηπατικού γλυκογόνου.

Ένας περιορισμένος αριθμός μελετών διερεύνησε τη δράση διαφόρων ενζύμων «κλειδιών» στα γλυκονεογεννικά και γλυκογεννολυτικά μονοπάτια στα στρεσαρισμένα ψάρια και σε αυτά που κάνουν θεραπεία κορτιζόλης. Η σωματική παρενόχληση έχει διεγερτικές συνέπειες σε πολλά ένζυμα του συκωτιού στην πολύχρωμη πέστροφα, πράγμα το οποίο ο Morales και οι συνεργάτες του<sup>119</sup> ερμήνευσαν ως απόδειξη αυξημένης γλυκονεογέννεσης από τα αμινοξέα. Έχει βρεθεί ότι η κορτιζόλη έχει διεγερτικές συνέπειες στις γλυκονεογεννητικές οδούς αυξάνοντας την ηπατική (aspartate) αμινομεταφορά (AspAT – αναφορές 43,62,83) και αυξάνοντας την δραστηριότητα αμινομεταφοράς τυροσίνης (TAT)<sup>47,200</sup>, παρόλο που ο Andersen και οι συνεργάτες του<sup>3</sup> δεν κατάφεραν να παρατηρήσουν τέτοιου είδους συνέπειες στην θεραπεία κορτιζόλης στο AspAT και σε ηπατικά ένζυμα «κλειδιά» στην πολύχρωμη πέστροφα.

Γενικά οι μέχρι τώρα αποδείξεις, επιβεβαιώνουν τον γλυκογονολυτικό ρόλο των κατεχολαμινών στα στρεσαρισμένα ψάρια, αλλά η σπουδαιότητα της κορτιζόλης στη μεταβολή του υδρογονανθρακικού μεταβολισμού δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως.

Παρομοίως η συνεισφορά των εντερικών και παγκρεατικών ορμονών στις μεταβολικές ρυθμίσεις που έχουν παρατηρηθεί στα στρεσαρισμένα ψάρια χρειάζονται εν καιρώ διευκρίνηση.

## 2. Μεταβολισμός Πρωτεϊνών

Ο ρόλος των αμινοξέων ως πηγή ενέργειας για τα γλυκονεογεννητικά μονοπάτια έχει συζητηθεί μερικώς στην προηγούμενη ενότητα. Οι πληροφορίες σχετικά με τα πλασματικά αμινοξέα και τα επίπεδα πρωτεΐνης στα στρεσαρισμένα ψάρια είναι περιορισμένες. Οι Leach και Taylor<sup>99</sup> δεν μπόρεσαν να εντοπίσουν καμία αλλαγή στο επίπεδο κυκλοφοριακών αμινοξέων στο ποταμίσιο ψάρι, *Fundulus heteroclitus*, το οποίο εκτίθεται σε περιορισμένο στρες, ενώ ο Morales και οι συνεργάτες του<sup>119</sup> ανέφεραν σημαντική αύξηση των πλασματικών αμινοξέων στην πολύχρωμη πέστροφα, η οποία εκτίθεται σε διάφορες διαδικασίες στρες. Παρομοίως οι Laidley και Leatherland<sup>96</sup> δεν μπόρεσαν να βρουν αλλαγές στα επίπεδα πλασματικής πρωτεΐνης στη στρεσαρισμένη πολύχρωμη πέστροφα ενώ ο Wells και οι συνεργάτες του<sup>198</sup> παρατήρησαν ότι το στρες από αιχμαλωσία, προκάλεσε σημαντική αύξηση του επιπέδου της πλασματικής πρωτεΐνης σε διάφορα είδη καρχαριών και marlin (είδος τροπικού ψαριού του γένους *Makaira*, *Istiomprax*).

Η ανάμειξη της κορτιζόλης σε αυτές τις αλλαγές δεν είναι ξεκάθαρη με στοιχεία τόσο υπέρ όσο και κατά. Από την άλλη πλευρά η θεραπεία με κορτιζόλη παρατηρήθηκε ότι αυξάνει ταυτόχρονα το επίπεδο του πλάσματος αμινοξέων<sup>3</sup> και πρωτεϊνών<sup>62</sup>, ωστόσο άλλοι ερευνητές δεν κατάφεραν να εντοπίσουν οποιαδήποτε επιρροή της κορτιζόλης στα επίπεδα του πλάσματος αμινοξέων και πρωτεϊνών<sup>82,99,102,193</sup>.

Το κολλαγόνο είναι μία από τις συνηθέστερες πρωτεΐνες στα πολυκυτταρικά ζώα και δρα ως σημαντικό δομικό στοιχείο σε όλους τους βοηθητικούς ιστούς. Για παράδειγμα περιλαμβάνει πάνω από 90 % της φαιάς ουσίας των ιστών. Σήμερα αρκετές αποδείξεις που δείχνουν ότι το απόθεμα κολλαγόνου στους ιστούς των σκελετών των ψαριών μειώνεται σημαντικά στα ψάρια που εκτίθενται σε πλήθος



μολυσματικών ουσιών (οργανοχλωρινικά και οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα, PCBs, μέταλλα), προκαλώντας αλλαγές στις μηχανικές ιδιότητες του σκελετού (ερευνήθηκε από τον Ρανίον και τους συνεργάτες του<sup>128</sup>). Τέτοιες βιοχημικές αλλαγές μπορούν να προκαλέσουν το σύνδρομο «Σπασμένης Πλάτης» στο οποίο η μυϊκή συστολή προκαλεί κατάγματα στα αδύναμα σκελετικά συστήματα<sup>115</sup>. Αν και τα αποτελέσματα τέτοιου φάσματος διαφορετικών μολυσματικών ουσιών στο μεταβολισμό του κολλαγόνου είναι γενικά και συμπεριλαμβάνουν όλους τους ιστούς που περιέχουν κολλαγόνο, η ικανότητα των ψαριών να επουλώνουν πληγές (σε αυτές τις περιπτώσεις τα αποθέματα κολλαγόνου είναι απαραίτητα) μπορεί επίσης να τεθεί υπό συμβιβασμό. Σε αυτό το συσχετισμό οι Roubal και Bullock<sup>155</sup> ανέφεραν ότι η κορτιζόλη αναστέλει την ινωμάτωση του δέρματος κατά τη διάρκεια της επούλωσης τραύματος στο σολωμό του Ατλαντικού *Salmo salar*. Περισσότερες έρευνες χρειάζονται για τον πιθανό ρόλο της κορτιζόλης στην καταστολή του αποθέματος κολλαγόνου στα ψάρια εξαιτίας της μόλυνσης.

### 3. Μεταβολισμός Λιπιδίων

Τα λιπίδια αποτελούν ένα σημαντικό ενεργειακό απόθεμα στα ψάρια, αλλά τα δεδομένα που αφορούν τις συνέπειες του στρες στο μεταβολισμό των λιπιδίων είναι περιορισμένα και αντιφατικά. Τόσο το αυξημένο, όσο και το μειωμένο επίπεδο ελεύθερου λιπαρού οξέως (FFA) του πλάσματος έχουν αναφερθεί στο στρεσαρισμένο χρυσόψαρο *Carassius auratus*<sup>116,201</sup>. Ωστόσο σαφής αύξηση του πλάσματος FFA παρατηρήθηκε τόσο στη γλώσσα, *Pleuronectes platessa*, όσο και στον σολωμό του Ατλαντικού *Salmo salar*, που εκτείνονται σε στρες εκμετάλλευσης (handling stress)<sup>196</sup>. Η θεραπεία με κορτιζόλη του Ευρωπαϊκού χελιού *Anguilla anguilla*, διέγειρε την καταστολή των τριγλυκεριδίων του αίματος και προώθησε τον μεταβολισμό του πλάσματος FFA<sup>102</sup>. Αυτή η καταβολική δράση της κορτιζόλης στο μεταβολισμό των λιπιδίων υποστηρίζεται από την έρευνα του Sheridan<sup>166</sup> στην οποία η εμφύτευση κορτιζόλης προκάλεσε κινητοποίηση λιπιδίων, μείωση στο συνολικό περιεχόμενο λιπιδίων και τριασιγλυκερόλης (triacylglycerol) του συκωτιού

και των σκοτεινών μυών και αύξηση στη δραστηριότητα λίπασης (lipase) των ιστών στον ανήλικο coho salmon.

Η έκθεση των ψαριών σε συγκεκριμένες μολυσματικές ουσίες μπορεί να προκαλέσει υπεροξείδωση των λιπιδίων, μία χημική διεργασία που έχει ως αποτέλεσμα την οξειδωτική αποσύνθεση των πολυακόρεστων λιπιδίων στις βιολογικές μεμβράνες και τελικά την κυτταρική καταστροφή (αναφορά 185). Η Μηλοναλδεύδη είναι ένα καταστροφικό προϊόν που έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης υπεροξείδωσης λιπιδίων. Έτσι οι Wofford και Thomas<sup>205</sup> έδειξαν ότι η έκθεση του ριγωτού λιθρινιού και Ατλαντικού κράχτη (Atlantic croaker), *Micropogonias undulatus*, είτε σε κάδμιο, είτε σε μείγμα PCB Aroclor 1254, αύξησε την παραγωγή μηλοναλδεύδης στο δοκιμαστικό σωλήνα από ηπατικές μικροσωματικές προετοιμασίες.

#### 4. Ανάπτυξη

Η λογική που υπογραμμίζει την προσαρμοστική φύση της αντίδρασης στο στρες (ενεργειακή κινητοποίηση) υπαγορεύει ότι το στρες θα έχει κρυφές συνέπειες στον ενδιάμεσο μεταβολισμό. Η σύντομη περίληψη της βιβλιογραφίας, φανερώνει ότι σε πολλούς σημαντικούς τομείς δεν υπάρχει ακόμη κοινή άποψη είτε επειδή οι μελέτες δεν έχουν ακόμα ολοκληρωθεί, είτε επειδή τα αποτελέσματα από τις διάφορες έρευνες είναι αντιφατικά και συγκρουόμενα. Ωστόσο δεν υπάρχουν πολλές αμφιβολίες ότι η κύρια συνέπεια όλων των παραπάνω αλλαγών στον ενδιάμεσο μεταβολισμό των στρεσαρισμένων ψαριών είναι η μείωση της σωματικής ανάπτυξης.

Από βιοχημική άποψη, το πηλίκιο RNA / DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα καλό μέτρο σωματικής ανάπτυξης (αναφορά 36). Η συνολική ποσότητα του DNA ανά κύτταρο είναι αμετάβλητη σε φυσιολογικούς σωματικούς ιστούς και δεν αλλάζει από τη λιμοκτονία ή άλλες μορφές στρες. Ωστόσο, η ποσότητα του RNA ανά κύτταρο είναι μεταβλητή και αντικατοπτρίζει τη δράση της σύνθεσης των πρωτεϊνών.

Μία υψηλή αναλογία RNA / DNA αντιπροσωπεύει τη γρήγορη σύνθεση πρωτεΐνης και αφού η ανακύκλωση της πρωτεΐνης στα ψάρια γίνεται έτσι ώστε πάνω από το 50 % της διαμορφωμένης πρωτεΐνης να αποθηκεύεται στους μυς<sup>79</sup>, η ανάπτυξη του σωματικού βάρους και η ικανότητα σύνθεσης πρωτεΐνης στους μυς συνδέονται στενά. Πρόσφατα ο Bastrop και οι συνεργάτες του<sup>22</sup>, απέδειξαν έναν πολύ σημαντικό συσχετισμό ανάμεσα στη συγκεκριμένη κλίμακα ανάπτυξης της πολύχρωμης πέστροφας και της αναλογίας RNA / DNA των καθαρών μυών. Έτσι οι μυικές αναλογίες RNA / DNA θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στον εντοπισμό της καταστολής της ανάπτυξης στα ψάρια, παρόλο που παράγοντες όπως η περιβαλλοντική θερμοκρασία και η σεξουαλική ωριμότητα πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη<sup>36</sup>.

Αρκετές αποδείξεις δείχνουν ότι η αναλογία RNA / DNA είναι ευαίσθητη σε διάφορες μορφές στρες. Οι Kearns και Atchison<sup>90</sup> έδειξαν ότι η κίτρινη πέρκα *Perca flavescens*, που συγκεντρώνεται σε ιχθυότοπους και παρουσιάζει διαφορετικά ποσοστά ανάπτυξης (όπως μετρήθηκαν από αλλαγές σε βάρος και μήκος) και παράλληλες αλλαγές στην αναλογία RNA / DNA. Σε αυτή τη μελέτη η έκθεση σε υποθανατηφόρα επίπεδα καδμίου και ψευδάργυρου από ηλεκτρομαγνητική εμφύτευση ήταν ένας κύριος παράγοντας επιρροής των ποσοστών ανάπτυξης. Οι Barton και Adelman<sup>16,17</sup> χρησιμοποιώντας μία πιο πειραματική προσέγγιση, απέδειξαν την καταστολή της αναλογίας RNA / DNA στον χοντροκέφαλο μικρό κυπρίνο, *Pimephales promelas*, που εκτίθεται σε διάφορες τοξικές ουσίες. Πρόσφατα η μικρή αναλογία RNA / DNA χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό νυμφών αφρόψαρων (*Coregonus* spp.) τα οποία υποφέρουν από μία εντερική ασθένεια που σχετίζεται με τη διατροφή<sup>176</sup>.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 3

#### Βιοχημικές αλλαγές που συσχετίζονται με τον ενδιάμεσο μεταβολισμό και την ανάπτυξη των στρεσαρισμένων ψαριών

ΤΟΜΕΑΣ	ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΙΣΤΟΣ	ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ	ΜΟΡΦΗ ΣΤΡΕΣ
IV.1	Γλυκόζη	Πλάσμα	↑	Όλοι οι τύποι στρες
	Γλυκογόνο, Ζωικό Άμυλο	Συκώτι, Μύες	↓	Σωματική, Αναπνευστική, Φόβος
			↓	Τοξικά, Πείνα
	FBPase	Συκώτι	↑	Σωματική
	G6PDH	Συκώτι	↑	Σωματική
	AspAT	Συκώτι	↑	Σωματική
GDH	Συκώτι	↑	Σωματική	
IV.2	Αμινοξέα	Πλάσμα	↑	Σωματική
			→	Στρες Περιορισμού
	Πρωτείνες	Πλάσμα	↑	Στρες Αιχμαλωσίας
			→	Σωματική
	LAN	Πλάσμα	↑	Εξάντληση από Παθολογική Διαταραχή
Κολλαγόνο	Σκελετός	↓	Τοξικά	
IV.3	FFA	Πλάσμα	↑	Σωματική
			↓	Σωματική
	Παραγωγή Μηλοναλδεύδης (Production Malondialdehyde)	Συκώτι	↑	Τοξικά
IV.4	Αναλογία RNA / DNA	Μύες, Όλο το Σώμα	↓	Χρόνιο Στρες, Μόλυνση, Πείνα

**FBPase** (Fructose 1,6-Bisphosphatase) = Φρουκτόζη 1,6 - Δισφωφατάση

**G6PDH** (Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase) = Γλυκόζη 6-Φωσφατική Αφυδρογονάση

**AspAT** (Aspartate Aminotransferase) = (Καταλυτικό Ένζυμο)

**GDH** (Glutamate Dehydrogenase) = Γλουταμάτη (Άλας του γλουταμινικού οξέος) Αφυδρογονάση

**LAN** (Leucine Aminonaphthylamidase) = Λευκίνη (Αμινοξύ) Αμινοναφθυλαμιδάση

**FFA** (Free Fatty Acids) = Αδέσμευτα Λιπαρά Οξέα

## V. ΩΣΜΟΡΥΘΜΙΣΗ

Τόσο τα θαλασσινά ψάρια, όσο και αυτά του γλυκού νερού βρίσκονται σε στενή επαφή με το νερό που είναι απόλυτα διαφορετικό στη σύνθεση και συγκέντρωση διαλύματος από τις εκκρίσεις του σώματός τους. Συμπερασματικά η διαρκής ιοντομεταφορά (με συνακόλουθη οσμωτική ροή νερού) απαιτείται για τη διατήρηση της εσωτερικής οσμωτικής και ιοντικής ισορροπίας. Εξαιτίας του ρόλου των βραγχίων τόσο στην αναπνοή, όσο και στην ανταλλαγή ιόντων, οι βραγχιακές και καρδιακές ρυθμίσεις με τη μεσολάβηση κατεχολαμίνης στα στρεσαρισμένα ψάρια (αναφέρθηκε στο III.1) οδηγούν σε έναν «οσμωρυθμιστικό συμβιβασμό»<sup>65</sup> κατά τον οποίο χάνονται ιόντα από το ψάρι που στρεσάρεται σε γλυκό νερό και ανακτώνται όταν στρεσάρεται σε θαλασσινό νερό (αναφορά 11). Έτσι κάθε μορφή στρες που προκαλεί απελευθέρωση κατεχολαμίνης είναι πιθανό να προκαλέσει αλλαγές στη συγκέντρωση σημαντικών ιόντων στα υγρά του σώματος. Η αύξηση της πλασματικής κορτιζόλης στα στρεσαρισμένα ψάρια μπορεί να βελτιώσει τέτοιες αλλαγές διεγείροντας τις μεταφορές ιόντων τόσο στο γλυκό νερό<sup>98</sup> όσο και στο θαλασσινό νερό<sup>106,107,112</sup>. Ο Eddy<sup>53</sup> κάνει μία περίληψη των συνεπειών του στρες στην οσμωρύθμιση και στην ισορροπία των ιόντων στους τελεόστεους ιχθύες.

### 1. Το Όξινο Στρες

Το πρόβλημα της «όξινης βροχής» σε μερικά μέρη του ανεπτυγμένου κόσμου, εστίασε την προσοχή στον αντίκτυπο του χαμηλού pH στα ψάρια, σε συγκεκριμένα σαλμονοειδή, στο γλυκό νερό. Μία απότομη μείωση του περιβαλλοντικού pH που μοιάζει με «επεισόδιο οξέως», μπορεί να προκαλέσει καταστροφικές απώλειες ιόντων που έχουν σαν αποτέλεσμα την κυκλοφοριακή ανεπάρκεια και το θάνατο<sup>207</sup>. Πολλά από τα βιβλία που έχουν εκδοθεί, δείχνουν ότι η έκθεση σε χαμηλό pH (4 – 5) προκαλεί χρόνια δραστηριοποίηση του άξονα HPI (αναφορές 34,35), παρόλο που ορισμένες έρευνες υποδεικνύουν μόνο προσωρινή αύξηση της πλασματικής κορτιζόλης<sup>21,66</sup> ή καθόλου αύξηση<sup>101</sup>.



Ωστόσο είναι ξεκάθαρο ότι σε πολλές περιπτώσεις είναι ο *συνδιασμός* του χαμηλού pH μαζί με τα αυξημένα επίπεδα μετάλλων στο διάλυμα (που προκύπτει από διεργασίες φιλτραρίσματος), που προκαλούν περισσότερη καταστροφή στους πληθυσμούς ψαριών που ζουν ελεύθερα στη φύση<sup>149</sup>. Συγκεκριμένα το αργίλιο εμπλέκεται σε αυτή τη συνέπεια παρόλο που η σχέση ανάμεσα στο pH και στην αργλική τοξικότητα είναι πολύπλοκη<sup>146</sup> και ο ακριβής μηχανισμός δράσης δεν είναι πλήρως κατανοητός. Έτσι η έκθεση της πολύχρωμης πέστροφας σε pH 5,0 δεν απέσπασε αλλαγές στο πλάσμα  $\text{Na}^+$ , στην κορτιζόλη ή στις κατεχολαμίνες, ενώ η παρουσία Al ( $60 \mu\text{g l}^{-1}$ ) στο ίδιο pH προκάλεσε αξιοσημείωτη διέγερση του HPI και της συμπαθητικο – χρωμαφινικής δραστηριότητας καθώς και σημαντική μείωση στα επίπεδα πλάσματος  $\text{Na}^+$ . Σύμφωνα με τον Lauren<sup>97</sup> τα μεταλλικά κατιόντα προκαλούν ιοντορυθμιστική ανεπάρκεια μέσω τουλάχιστον δύο αξιοπρόσεκτων διεργασιών :

- (α) Σύνδεση των μεταλλικών ιόντων στις ομάδες των θεικών αλάτων των μεταφερόμενων πρωτεϊνών (ATPases) και
- (β) Αντικατάσταση του ασβεστίου από τους ενδοκυτταρικούς στενούς δεσμούς, των επιθήλιων κυττάρων (αναφορά 208).

Εκτός από τις συνέπειες στη δράση του HPI και στην έκκριση κατεχολαμίνης, το όξινο στρες φαίνεται να επηρεάζει το ουραίο νευροεκκριτικό σύστημα. Σχετικά με αυτό ο Hontela και άλλοι<sup>77</sup> ανέφεραν μία αύξηση στην urotensin I του ουραίου νευροεκκριτικού συστήματος της brook πέστροφας *Salvelinus fontinalis* που στρεσάρεται από οξύ. Επιπλέον το χαμηλό pH επίσης προωθεί υψηλότερα επίπεδα προσθεγκεφάλου (forebrain) και λοβού (pituitary) της αργινίνης βασοτοξίνης (arginine vasotocin) στα ίδια είδη<sup>78</sup> παρόλο που οι συγγραφείς το ερμηνεύουν ως συγκεκριμένη προστατευτική αντίδραση παρά ως μη-συγκεκριμένη αντίδραση του στρες. Περισσότερες λεπτομέρειες των συνεπειών της έκθεσης στο οξύ στο ενδοκρινικό σύστημα των ψαριών μπορούν να βρεθούν στο Wendelaar Bonga and Balm<sup>199</sup>.

## 2. Οσμωτική Πρόκληση και η μετανάστευση των νεαρών σολωμών σε αλμυρά νερά

Η οσμωτική πρόκληση σαν αυτή που ζουν οι σολωμοί που εκτρέφονται σε υδατοκαλλιέργειες και μεταφέρονται αμέσως από συστήματα εκτροφής γλυκού νερού σε θαλασσινά κλουβιά, είναι σοβαρή μορφή στρες που προκαλεί κλασική αντίδραση στρες στα ψάρια, τα οποία πρέπει επίσης να αντιμετωπίσουν μία καινούργια οσμωρυθμιστική πρόκληση. Η «μετανάστευση» (smoltification) είναι η διαδικασία προδιάθεσης κατά την οποία τα σαλμονοειδή του γλυκού νερού προετοιμάζονται για την ύπαρξή τους σε θαλασσινό νερό (αναφορά 74) και από βιοχημικής άποψης η δραστηριότητα του  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$  στα βράγχια συχνά αξιοποιείται ως αξιόπιστος δείκτης της προσαρμοστικότητας στο θαλασσινό νερό. Η έκθεση των σολωμών σε χρόνιες μορφές στρες, όπως χαμηλό  $\text{pH}^{57,162}$  ή αυξημένη αποθηκευόμενη πυκνότητα<sup>172</sup>, μειώνει τα επίπεδα  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$  στα βράγχια και μειώνει την πιθανότητα επιβίωσης στη θάλασσα. Επιπλέον ο Jarvi<sup>85</sup> απέδειξε ότι το στρες αντιπαράθεσης με αρπακτικά, συνεργεί με το στρες της οσμωτικής πρόκλησης στα νεαρά άτομα του Ατλαντικού Σολωμού μειώνει επίσης την πιθανότητα επιβίωσης στη θάλασσα.

Πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν τόσο την ορμόνη ανάπτυξης όσο και την κορτιζόλη στη διαδικασία προσαρμογής στο θαλασσινό νερό (αναφορές 25,210) και την προλακτίνη στην προσαρμογή στο γλυκό νερό<sup>10</sup>. Έτσι ξεκάθαρα κάθε μορφή περιβαλλοντικού στρες που έχει να κάνει με την έκκριση ορμονών ανάπτυξης προλακτίνης και κορτιζόλης, έχει τη δυνατότητα να καταστρέφει την ικανότητα των ψαριών να αντέξουν την οσμωτική πρόκληση (τόμος 2 για περίληψη των συνεπειών του στρες στα επίπεδα πλάσματος αυτών των ορμονών).

### ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Βιοχημικές αλλαγές που σχετίζονται με τα οσμωρυθμιστικά συστήματα των  
στρεσαρισμένων ψαριών

ΤΟΜΕΑΣ	ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΙΣΤΟΣ	ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ	ΜΟΡΦΗ ΣΤΡΕΣ
V.	Ανώτερα Ιόντα	Πλάσμα	↓	Όλα τα στρες (γλυκού νερού)
		Πλάσμα	↑	Όλα τα στρες (αλμυρού νερού)
	Όσμωση	Πλάσμα	↓	Όλα τα στρες (γλυκού νερού)
		Πλάσμα	↑	Όλα τα στρες (αλμυρού νερού)
V.1, V.2	ΑΤΡάση(ες)	Βράγχια	↓	Τοξικά, χαμηλό pH, υπερπληθυσμός

### VI. ΑΜΥΝΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Για τους σκοπούς αυτής της έρευνας στον όρο «αμυντικό σύστημα» δίνεται ευρεία ερμηνεία και περιλαμβάνει όχι μόνο τα συγκεκριμένα και μη-συγκεκριμένα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, αλλά και μερικούς από τους προστατευτικούς αποτοξινωτικούς μηχανισμούς που διαθέτουν τα ψάρια όταν στρεσάρονται από έκθεση σε μολυσματικές ουσίες. Θα δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις βιοχημικές πλευρές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες του στρες, αλλά και πάλι ο αναγνώστης παραπέμπεται σε άλλες πιο πρόσφατες μελέτες για περαιτέρω πληροφορίες.

## 1. Παθογόνος πρόκληση

Θεωρείται ότι τα ψάρια είναι κάτω από διαρκή πρόκληση από πιθανές παθογόνες ουσίες στο υγρό στοιχείο (ιοί, βακτήρια, πρωτόζωα, μύκητες και μεταζωικά παράσιτα) και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι ικανά να προστατέψουν τον εαυτό τους από την λοίμωξη / παρουσία πολλών παρασίτων. Πολλά στοιχεία σήμερα, δείχνουν ότι όλες οι μορφές περιβαλλοντικού στρες μπορούν να καταστήλουν τα αμυντικά συστήματα των ψαριών σε τέτοιο βαθμό, που να αυξάνεται η ευαισθησία στις ασθένειες<sup>4,170</sup>. Επιπλέον πολλά στοιχεία αποδεικνύουν ότι η κορτιζόλη είναι ένας σημαντικός παράγοντας υπεύθυνος για αυτή την προδιάθεση<sup>133</sup>. Οι προστατευτικοί μηχανισμοί των ψαριών για την αντοχή σε παθογόνες προκλήσεις μπορούν να χωριστούν χονδρικά σε μη συγκεκριμένα αμυντικά εμπόδια και σε συγκεκριμένες αμυντικές λειτουργίες (αναφορά 4 για ξεκάθαρη σύναψη).

### 1.1 Μη – Συγκεκριμένοι Μηχανισμοί

Το μη συγκεκριμένο αμυντικό σύστημα αποτελείται από φυσικά και χημικά εμπόδια ενάντια στις εισβάλουσες παθογόνες αιτίες. Η επιδερμίδα και το σχετικό της βλεννώδες στρώμα, αποτελούν έναν άμεσο φραγμό και ενώ οι ποσοτικές αλλαγές στον αριθμό των επιφανειακών εκκρίσεων της βλέννας στα καλλυκοειδή κύτταρα παρατηρείται ότι ακολουθούν σωματικά τραύματα<sup>135</sup> στα σαλμονοειδή. Λίγα πράγματα γνωρίζουμε για την αναλογία της βλεννώδους έκκρισης, παρόλο που η βιβλιογραφία είναι γεμάτη από δηλώσεις που αναφέρονται στην « έκκριση άφθονων ποσοτήτων βλέννας κατά την διάρκεια καταστάσεων στρες ». Ποσοτικές τεχνικές μέτρησης της αναλογίας έκκρισης, πρέπει να γίνουν πριν από οποιοδήποτε συγγραφικό σχόλιο πάνω σε αυτό το θέμα. Το εξωτερικό στρώμα της βλέννας περιέχει μεγάλη ποικιλία βιοενεργών μορίων (ανοσοσφαιρίνες<sup>29,84</sup>, λυσοζύμη και χιτινάση<sup>103</sup>, πρωτεάση<sup>30</sup>, αιμοσυγγολλητίνες<sup>89</sup>), αλλά δεν ξέρουμε πολλά σχετικά με τις συνέπειες του στρες στην βιοχημεία της βλέννας.

Ωστόσο η λυσοζύμη παρατηρείται και στο αίμα των ψαριών και οι Mock και Peters<sup>117</sup> ανέφεραν μείωση στη δράση του πλασματικού λυσοζύμου στην πολύχρωμη πέστροφα που εκτείθεται σε στρες παγίδευσης / μεταφοράς ή σε υψηλά επίπεδα αμμωνίας. Το σωματικό στρες που σχετίζεται με την έκθεση στον αέρα έχει σχετιστεί με την εμφάνιση κρυφής αιμοσφαιρίνης στη βλέννα των τελεόστων ψαριών<sup>169</sup>.

Αν παθογόνες ουσίες είναι ικανές να διαπερνούν το βλεννοειδές / επιδερμικό φράγμα, τότε ξεκινά μία φλεγμονώδης αντίδραση κατά την οποία φαγοκύτταρα (κυρίως μονοκύτταρα και πολύμορφα λευκοκύτταρα) μεταναστεύουν στην πλευρά της εισβολής για να διώξουν κάθε ξένη ουσία. Η δραστηριότητα εκδίωξης μπορεί να μετρηθεί με το βαθμό του χημειοφωτισμού που απορρέει από την απελευθέρωση υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) από διεγερμένα φαγοκύτταρα. Επιπλέον αυτός ο δείκτης εκδίωξης είχε κατασταλεί στην πολύχρωμη πέστροφα που είχε στρεσαριστεί από παγίδευση και ανοξία<sup>7</sup> και επίσης φαίνεται ότι είχε κατασταλεί εξαιτίας στεροειδών ορμονών<sup>174</sup> και αδρεναλίνης<sup>61</sup>.

## 1.2 Η Άνοση Αντίδραση

Όπως με όλα τα σπονδυλωτά, η αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών προκαλείται ως αντίδραση στις παθογόνες ουσίες ή τα αντιγόνα και εμπλέκει πολύπλοκη βιοχημική επικοινωνία ανάμεσα σε πλήθος διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Το κεντρομόλο συστατικό του συστήματος δέχεται και επεξεργάζεται υλικά που εισβάλλουν και παρέχει πληροφορίες στο απαγωγό σύστημα. Εδώ οι πληροφορίες μεταφέρονται για να προκαλέσουν την παραγωγή συγκεκριμένων αντισωμάτων και τη δράση συγκεκριμένων λευκών αιμοσφαιρίων για την προστασία των ψαριών από ορισμένες παθογόνες ουσίες. Ο Anderson<sup>4</sup> ανέφερε 18 προσδιορισμούς που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν το βαθμό ανοσοκαταστολής εξαιτίας του στρες στα ψάρια. Οι περισσότεροι από αυτούς τους προσδιορισμούς είναι αιματολογικοί, μορφολογικοί ή φυσιολογικοί, παρά βιοχημικοί, και δεν αφορούν αυτή τη μελέτη.

Ωστόσο, είναι ξεκάθαρο από έρευνες στα θηλαστικά, ότι οι κυττοκίνες ( με άλλους όρους λεμφοκίνες – πρωτεΐνες που παράγουν τα λεμφοκύτταρα - , μονοκίνες, ιντερλευκίνες και ιντεφερόνες) από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι σημαντικοί παράγοντες που μεσολαβούν σε πολλές από τις αλλαγές που οφείλονται στο στρες στα σπονδυλωτά<sup>1,153</sup>. Λίγα πράγματα είναι γνωστά σχετικά με τη βιοχημεία της κυττοκίνης στους τελεόστεους ιχθύες, παρόλο που η χορήγηση διαχείριση ανασυνδιασμένων κυττοκινών των θηλαστικών είχαν σαφείς συνέπειες στο ενδοκρινικό σύστημα (απελευθέρωση α-MSH), στην επιθηλιακή λειτουργία και στον ηπατικό μεταβολισμό στην τιλάπια, *Oreochromis mossambicus*<sup>15</sup>. Αυτή η προεισαγωγική μελέτη, δείχνει ότι η βιοχημεία και η φυσιολογία της κυττοκίνης θα αποτελέσει σημαντική θέση στις μελλοντικές μελέτες για την αντίδραση στο στρες των τελεόστεων ιχθύων.

## 2. Μηχανισμοί Αποτοξίνωσης

### 2.1 Βιομετασχηματισμός

Πολλά ξеноβιοτικά σύμπλοκα είναι λιπόφιλα (π.χ. αρωματικοί υδρογονάνθρακες, PCB's, ορισμένα εντομοκτόνα) και επομένως εύκολα μπαίνουν στα κύτταρα διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης και τείνουν να συσσωρεύονται στα πλούσια από λιπίδια όργανα όπως το συκώτι. Ο Βιομετασχηματισμός των λιπόφιλων χημικών ουσιών σε πιο υδατοδιαλυτά μείγματα είναι επιβεβλημένος για την αποτοξίνωση και την απέκκριση. Τα ψάρια, όπως και τα άλλα σπονδυλωτά, κατέχουν ένα σύμπλεγμα ενζύμων ικανών να διασπάσουν τέτοιες αντιδράσεις. Ωστόσο, ένας κύριος ρόλος των εμπλεκόμενων συστημάτων ενζύμων μπορεί να σχετίζεται σε κρίσιμες φυσιολογικές λειτουργίες όπως βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών και αδρανοποίηση του μεταβολισμού λιπαρού οξέως (αναφορά 59). Το πρώτο βήμα στη διαδικασία του βιομετασχηματισμού περιλαμβάνει την οξείδωση του μείγματος (φάση I), για την οποία οι βασικοί καταλύτες είναι τα ισοένζυμα κυτοχρώμες P-450.

Ίσως έπρεπε να σημειωθεί ότι ορισμένες κλάσεις οργανικών μειγμάτων μπορούν να καταχωρηθούν ως πιο τοξικές (ή καρκινογενείς) αν εκτεθούν σε κάποια ένζυμα<sup>175</sup>. Η οξείδωση του μείγματος ακολουθείται από τη σύζευξη (φάση II) μεθειικό άλας, γλουτοθειονικό<sup>124</sup> ή γλουκουρονικό οξύ (αναφορά 44) και ως εκ τούτου αυξάνεται η πολικότητα και έτσι και η διαλυτότητα του νερού του μείγματος, και διευκολύνεται η απέκκριση του μέσω του νεφρού ή της χοληδόχου κύστης.

### 2.1.1. Τα Ισοένζυμα Κυτοχρώμης P-450

Αυτό το σύστημα ενζύμων (αλλιώς γνωστό ως σύμμεικτη λειτουργία οξειδάσης, μονοοξυγενάσης, κυτοχρώμη P-450, P-450) είναι στην πραγματικότητα ένα ενωμένο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων που αποτελείται από μερικά συμπληρωματικά ένζυμα που βρίσκονται στο ενδοπλασματικό δικτύωμα μαζί με τα ισοένζυμα P-450. Οι ενζυμικές δραστηριότητες περιλαμβάνουν αιθέρα (resorufin O-deethylation) (EROD), aryl υδρογονάνθρακα υδροξυλάση (AHH), τεστοστερόνη ββ υδροξυλάση και λιπαρό οξύ α-υδροξυλάση (FAH) (αναφορά 64 για λεπτομέρειες). Τα συστατικά αυτών των ενζύμων βρέθηκαν σε μεγάλο αριθμό ειδών ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της πολύχρωμης πέστροφας<sup>132</sup>, του Ευρωπαϊκού χελιού<sup>31</sup>, του ριγωτού λιθρινιού, του *Mullus barbatus*<sup>108</sup>, της πέρκας<sup>6</sup>, της γλώσσας *Platichthys flesus*<sup>173</sup> και του οξύρυγχου, *Acipenser baeri*<sup>129</sup>. Σε πολλές περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι η έκθεση ψαριών σε ξενόβια, προκαλεί δραστηριότητα των ενζύμων και συνεπώς η αποτοξίνωση των ενζύμων (ειδικά εκείνων που βρίσκονται στο συκώτι) έχει προταθεί ως ο ιδανικός βιοχημικός δείκτης της μόλυνσης<sup>86</sup>. Πράγματι, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως εργαλεία βιοπαρακολούθησης (αναφορά 195).

### 2.1.2. Φάση II, Συζευτικά Ένζυμα

Όπως και τα ισοένζυμα κυτοχρώμη P-450, τα ένζυμα της 2ης φάσης είναι μία οικογένεια με πολλά γονίδια της οποίας η έκθεση ισοτύπων είναι διαφορετική, αλλά συχνά συμπίπτουν σε ιδιαίτερα υποστρώματα για μείγματα, τόσο ενδογενούς όσο και εξωγενούς προέλευσης. Παρόλο που δεν χρησιμοποιούνται τόσο συχνά ως δείκτες μολυσματικού στρες, όπως τα ένζυμα της 1ης φάσης, τα ένζυμα της 2ης φάσης στα ψάρια μπορεί επίσης να προκληθούν επιλεκτικά από έκθεση σε μολυσματικές ουσίες (αναφορά 100).

Τόσο τα συστήματα της 1ης όσο και αυτά της 2ης φάσης μπορούν να επηρεαστούν και από άλλους παράγοντες πλην της έκθεσης στα ξενόβια. Σημειωμένες διαφορές σε σχέση με το φύλο στην αναλογία κυτοχρώμης P-450 και στη δραστηριότητα συγκεκριμένων ενζύμων στο κεφάλι και στον μακρύ σωλήνα του νεφρού γίνονται στη σεξουαλικά ώριμη πολύχρωμη πέστροφα<sup>5</sup>. Διαφορές σχετικά με το φύλο σε αποτοξινωτικές δραστηριότητες ενζύμων συμβαίνουν επίσης σε πολλά είδη, συμπεριλαμβανομένης της χειμερινής γλώσσας, *Pseudopleuronectes americanus* και της τσιπούρας *Stenotomus chrysops*<sup>67</sup>, στα οποία η οιστροδιόλη εμπλέκεται ως παράγοντας ελέγχου. Έχουν επίσης παρατηρηθεί εποχιακές διαφορές στο λιθρίνι<sup>108</sup>, στον κορέγονο (είδος λιμναίου ψαριού), *Coregonus albula*<sup>104</sup> και στο τσιρόνι, *Leuciscus (Rutilus) rutilus*<sup>50</sup>. Οι Jimenez και Stegeman<sup>86</sup> εξέτασαν άλλους παράγοντες (θερμοκρασία, ηλικία, φύλο, κατάσταση ωριμότητας και ηπατικοτοξικότητα) ικανούς να διαμορφώσουν την μεταβολή του βιομετασχηματισμού ενζύμων των ψαριών στα ξενοβιοτικά.

Παρόλες τις αποδείξεις ότι πολλοί παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν τα συστήματα βιομετασχηματισμού, λίγα ξέρουμε για το μη – μολυσματικό περιβαλλοντικό στρες, παρόλο που πολλά από τα ξενοβιοτικά που είναι ικανά να προκαλέσουν δράση του P-450, μπορούν επίσης να διεγείρουν τον άξονα HPI των ψαριών (π.χ. βενζόλιο<sup>105</sup>, ζιζανιοκτόνα<sup>111</sup>, υγρά καύσιμα<sup>187</sup>) και επομένως είναι ενδιαφέρον ότι μελέτες του Hansson και Lidman<sup>68</sup> και Devaux<sup>49</sup>, δείχνουν



ότι η κορτιζόλη μπορεί να κάνει δυνατή την πρόκληση δραστηριότητας διαφόρων ενζύμων που σχετίζονται με το σύστημα ενζύμων κυτοχρώμη P-450. Έτσι η βασική αντίδραση στο στρες μπορεί να προωθήσει τις διεργασίες βιομετασχηματισμού.

## 2.2 Μεταλλικές Ρίζες

Οι Μεταλλικές ρίζες βρίσκονται παντού στον ζωντανό κόσμο και πιστεύεται ότι η βασική τους λειτουργία είναι ως ρυθμιστές του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού του χαλκού (Cu) και του ψευδάργυρου (Zn). Είναι πρωτείνες χαμηλού μοριακού βάρους, πλούσιες σε κυστεΐνη και με ικανότητα να δεσμεύουν τα μέταλλα των ομάδων IB και IIB (Cu, Zn, Cd, Hg). Αυτή η ιδιότητα εξυπηρετεί την προστατευτική λειτουργία κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε βαριά μέταλλα, απομονώνοντας τα περισσότερα από τα ελεύθερα μεταλλικά ιόντα μέσα στο κύτταρο και αποτρέποντάς τα με αυτό τον τρόπο να ενωθούν με τις ομάδες των θεικών αλάτων και άλλων σημαντικών λειτουργικά πρωτεϊνών.

Στα ψάρια, η έκθεση σε βαριά μέταλλα προωθεί την μεταγραφή των γονιδίων<sup>91</sup> μεταλλικών ριζών και την αύξηση του επιπέδου των ιστών μεταλλικών ριζών που είναι ανάλογη με το βαθμό έκθεσης<sup>76</sup> των μετάλλων. Έτσι το επίπεδο των μεταλλικών ριζών στα ψάρια προτάθηκε ως συγκεκριμένος βιοχημικός δείκτης της μόλυνσης από βαριά μέταλλα (αναφορές 93,154). Οι συνέπειες άλλων μορφών στρες στην εισαγωγή μεταλλικών ριζών ίσα που έχουν αναφερθεί παρόλο που ο Overnell και οι συνεργάτες του<sup>126</sup>, δεν κατάφεραν να αποδείξουν ότι υπάρχουν συνέπειες από το στρες της αιχμαλωσίας, της κορτιζόλης ή της Διοξυμεθασόνης στα ηπατικά επίπεδα των μεταλλικών ριζών στις γλώσσες. Αντίθετα, ο συνδιασμός στρες θερμοκρασίας, αλατότητας, αιχμαλωσίας και ένεσης, αύξησαν τα επίπεδα μεταλλικών ριζών στον βούβαλο σκορπιό, *Euphras bison*<sup>158</sup> και στο ριγωτό λιθρίνι<sup>12</sup>. Επιπλέον η εισαγωγή της σύνθεσης metallothionein που διεγείρεται από την κορτιζόλη έχει αποδειχθεί

εργαστηριακά στα (hepatocytes)<sup>80</sup> της πολύχρωμης πέστροφας. Σαφώς, χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να λυθούν αυτές οι εμφανείς ασυμφωνίες.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 5

#### Βιοχημικές αλλαγές στο αμυντικό / αποτοξινωτικό σύστημα των στρεσαρισμένων ψαριών

ΤΟΜΕΑΣ	ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΙΣΤΟΣ	ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ	ΜΟΡΦΗ ΣΤΡΕΣ
VI.1.1.	Λυσοζύμη	Αίμα	↓	Σωματική, αύξηση αμμωνίας
	Αιμοσφαιρίνη	Βλέννα	↑	Αποκάλυψη Στρες
	Χημειοφωτισμός	Φαγοκύτταρα	↓	Σωματική, Ανοξία
VI.2.1.1.	Κυτοχρώμη P-450	Συκώτι	↑	Ξενοβιοτικά
	Ισοένζυμα (EROD, AHH, T6H, FAH, κ.λ.π.)	Συκώτι	↑	Ξενοβιοτικά
VI.2.1.1	Συζυγή ένζυμα	Συκώτι	↑	Ξενοβιοτικά
VI.2.2.	Μεταλλοθειονείνη	Συκώτι, άλλοι ιστοί	↑	Cu, Zn, Cd, Hg

**EROD** = Ethoxyresorufin O-deethylase

**AHH** = Aryl Hydrocarbon (υδρογονάνθρακας) Hydroxylase (υδροξυλάση)

**T6H** = Testosterone (Τεστοστερόνη) 6β- Hydroxylase

**FAH** = Fatty (Λιπαρό) Acid (Οξύ) α-Hydroxylase

### 2.3. Πρωτείνες Θερμικού Στρες

Η σύνθεση των πρωτεϊνών θερμικού στρες ως αντίδραση στις περιβαλλοντικές διαταραχές, πιστεύεται ότι αυξάνει την ανθεκτικότητα του κυττάρου σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Τόσο τα κωδικοποιημένα γονίδια όσο και οι ίδιες οι πρωτείνες του στρες, διατηρούνται πολύ και έχουν βρεθεί σε προκαρυωτικά, κατώτερα ευκαρυωτικά, ανώτερα φυτά, ασπόνδυλα και σπονδυλωτά ζώα (συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών : αναφορά 94). Δεν ξέρουμε πολλά σχετικά με το μηχανισμό δράσης με τον οποίο αυτές οι πρωτείνες ασκούν τις προστατευτικές τους συνέπειες και το θερμικό στρες είναι μόνο μία

μορφή στρες ικανής να προκαλέσει αυτή την κυτταρική αντίδραση (αναφορά 185). Πριν γίνουν άλλες έρευνες, η σπουδαιότητα της αντίδρασης στα στρεσαρισμένα ψάρια δεν μπορεί να εκτιμηθεί.

## VII. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Οι κατασταλτικές συνέπειες των σωματικών μορφών στρες στην αναπαραγωγική ενδοκρινολογία σημειώθηκαν στο κεφάλαιο Π.3. και μία πιο πλήρης μελέτη του στρες και της αναπαραγωγής στα ψάρια παρουσιάζεται από τον Donaldson<sup>52</sup>. Κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής ωρίμανσης, τα στρεσαρισμένα ψάρια παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα των κυκλοφοριακών ανδρογόνων, τεστοστερόνης και 11-κετοτεστοστερόνης<sup>138,156</sup>. Αυτή η συνέπεια μπορεί να παρομοιαστεί με τη θεραπεία με κορτιζόλη σε κατά τα άλλα μη στρεσαρισμένα ψάρια, κι επομένως εμπλέκεται ο άξονας HPI σε αυτή την αντίδραση<sup>42</sup>. Παρομοίως, στο ώριμο θηλυκό ψάρι, η αύξηση της κορτιζόλης προκαλεί μείωση στα επίπεδα πλάσματος των σεξουαλικών στεροειδών οιστροδιόλης και τεστοστερόνης<sup>42</sup> καθώς και μείωση στην πλασματική κροκογενίνη (vitellogenin) (πρωτείνες κρόκου αυγού στη μεταφορά από το συκώτι στις ωοθήκες). Ο Tam και οι συνεργάτες του<sup>183</sup> απέδειξαν ότι η έκθεση σε οξύ προκαλεί μείωση στη δραστηριότητα των επιπέδων της λοβιαίας γοναδοτροπίνης, οιστρογόνου και κροκογενίνης στη ποταμίσια πέστροφα. Από βιοχημικής άποψης, οι αλλαγές στη κροκογενίνη στα ώριμα θηλυκά ψάρια μπορούν να μετρηθούν ως αλλαγές στο ασβέστιο του δεσμού των πρωτεϊνών ή ως αλκαλική αλλοίωση φωσφόρου (αναφορά 127). Η καταστολή των σεξουαλικών στεροειδών στα θηλυκά με τη μεσολάβηση της κορτιζόλης μπορεί να αποδειχθεί εργαστηριακά<sup>40</sup> και η θεραπεία με κορτιζόλη προκαλεί μείωση στο πλήθος των δεικτών οιστροδιόλης στο συκώτι της πολύχρωμης πέστροφας<sup>142</sup>. Επιπλέον το περιεχόμενο της λοβιαίας γοναδοτροπίνης στα ψάρια που δέχονται θεραπεία κορτιζόλης μειώθηκε σημαντικά<sup>42</sup>.

Τελικά αυτή η καταστολή της δραστηριότητας υπόφυσης-γονάδων στα στρεσαρισμένα ψάρια προκαλεί μείωση στην ποιότητα των γαμετών, με αποκορύφωμα την περιορισμένη επιβίωση των μελλοντικών απογόνων<sup>39</sup>.

Η έκθεση των σεξουαλικά ώριμων ψαριών σε μολυσματικές ουσίες μπορεί επίσης να επηρεάσει σημαντικά τις διεργασίες αναπαραγωγής είτε μέσω των συνεπειών εξαιτίας της κορτιζόλης που αναφέρθηκαν παραπάνω, είτε μέσω των άμεσων συνεπειών των τοξικών ουσιών στον αναπαραγωγικό μεταβολισμό των ορμονών. Οι Singh και Singh<sup>168</sup> βρήκαν μειωμένα επίπεδα οιστροδιόλης και τεστοστερόνης στο γατόψαρο *Clarias batrachus*, που βρέθηκε εκτεθειμένο σε οργανοχλωρινικό εντομοκτόνο BHC και ο Thomas<sup>184</sup> απέδειξε παρόμοια συνέπεια στους Ατλαντικούς κράχτες που θεραπεύτηκαν με μόλυβδο και βενζοπυρίνη (benzo[a]pyrene). Ωστόσο οι Sangalang και Freeman<sup>159</sup> ανέφεραν *αυξημένα* επίπεδα 11-κετοτεστοστερόνης στην ποταμίσια πέστροφα που είχε χρόνια εκτεθεί σε χαμηλά επίπεδα καδμίου, παρόλο που η έντονη έκθεση σε υψηλότερα επίπεδα κατέστρεψε τη σύνθεση της 11-κετοτεστοστερόνης από τεστοστερόνη<sup>160</sup>. Οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης των τοξικών ουσιών στην αναπαραγωγική βιοχημεία δεν έχουν διευκρινιστεί εντελώς, αλλά γνωρίζουμε ότι προκαλούν άμεσες συνέπειες στη στεροειδογένεση<sup>63</sup>, ίσως ως τμήμα γενικότερων συνεπειών στον μεταβολισμό των λιπιδίων στις γονάδες<sup>92</sup>, αυξημένη μεταβολική καθαρότητα των σεξουαλικών στεροειδών σαν αποτέλεσμα της εισαγωγής βιομετασχηματισμένων ενζύμων και ίσως της ανταγωνιστικής αναστολής των ορμονών υποδοχής (π.χ. οι αντι-οιστρογονικές συνέπειες της (clomiphene) : αναφορά 185).

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6****Βιοχημικές αλλαγές που συσχετίζονται με το αναπαραγωγικό σύστημα των στρεσαρισμένων ψαριών**

ΤΟΜΕΑΣ	ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	ΙΣΤΟΣ	ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΑΛΛΑΓΗΣ	ΜΟΡΦΗ ΣΤΡΕΣ
II.3, VIII	Τεστοστερόνη	Πλάσμα	↓	Σωματική, Τοξικά
	11-Κετοτεστοστερόνη	Πλάσμα	↓	Σωματική, Τοξικά
			↑	Χρόνια Καδμιακή (Cd) αποκάλυψη
	Οιστροδιόλη	Πλάσμα	↓	Σωματική, Τοξικά
	Δέκτες Οιστροδιόλης	Συκώτι	↓	Μεταμόσχευση Υδροκορτιζόνης
			↓	Σωματικό στρες
	Κροκογενίνη	Πλάσμα	↓	Σωματική, τοξικά
	Συνολικό Ασβέστιο	Πλάσμα	↓	Χαμηλό pH
	Αλκαλι-Ευμετάβλητος Φώσφορος	Πλάσμα	↓	Χαμηλό pH
Γοναδοτροπίνη	Υπόφυση	↓	Μεταμόσχευση Υδροκορτιζόνης	

**VIII. ΑΛΛΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΣΤΡΕΣΑΡΙΣΜΕΝΑ ΨΑΡΙΑ**

Αυτός ο τομέας περιλαμβάνει μέρη της βιοχημείας των ψαριών που δεν μπορούν εύκολα να μπουν κάτω από τους προηγούμενους υπότιτλους, αλλά αξίζει να συμπεριληφθούν όχι μόνο λόγω πληρότητας της εργασίας, αλλά γιατί τα καθοριστικά αυτά μέρη έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες συγκεκριμένων ειδών περιβαλλοντικού στρες.

**1. Ένζυμα Ιστών**

Οι αλλαγές που προκαλούνται από το στρες σε διάφορα συστήματα ενζύμων έχουν είδη περιγραφεί και περιληφθεί : Δ αμινοπεβουλινικό οξύ (ALA-D) (Τομέας III.2), γλυκονεογενικά και γλυκογενολυτικά ένζυμα (Τομέας IV.1), δραστηριότητα λιπάσης (Τομέας IV.3), ΑΤΡάσεις (Τομείς V.1,V.2), λυσοζύμη (Τομέας VI.1.1),

ισοένζυμα κυτοχρώμης P-450 (Τομέας VI.2.1.1) και ένζυμα σύζευξης (Τομέας VI.2.1.2).

Η αμινοναφθυλαμιδάση λευκίνη(αμινοξύ) (Leucine AminoNaphthylamidase - LAN) είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που βρίσκεται κυρίως στα λυσοσώματα των κυττάρων και δραστηριοποιείται από τις αυτολυτικές διαδικασίες του θανάτου του κυττάρου, αλλά και βοηθάει αυτές. Επειδή το στρες μπορεί να προκαλέσει ανωμαλίες απώλειας, με βλάβη του επακόλουθου ιστού, ο Bouck<sup>27</sup> χρησιμοποίησε τη δραστηριότητα LAN του αίματος ως δείκτη του θανάτου των ψαριών. Σε ένα υγιές ψάρι το επίπεδο LAN του αίματος είναι χαμηλό, και έτσι η βλάβη σε οποιονδήποτε ιστό θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας LAN στο πλάσμα. Επιπλέον η δραστηριότητα LAN του πλάσματος στα ψάρια, δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στο στρες από αιχμαλωσία<sup>28</sup>. Και άλλα ένζυμα απελευθερώνονται από τους ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη και ο ορός γλουταμινικής οξαλοακετικής τρανσαμινάσης (AspAT) (Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase), η αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase) και το λακτίδιο αφυδρογονάσης (Lactate Dehydrogenase) έχουν προταθεί πολλές φορές ως δείκτες καταστροφής των ιστών παρόλο που τα αποτελέσματα γενικά είναι αντιφατικά (αναφορά 121).

Η Ακετυλοχολινεστεράλη (Acetylcholinesterase) είναι ένα ένζυμο που διαμορφώνει την ποιότητα του νευρομεταδότη ακετυλοχολίνης στο νευρικό σύστημα και είναι ευαίσθητη σε συγκεκριμένες μορφές στρες από μόλυνση. Το μαλάθιο, το παράθιο και άλλα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα απορροφούν αυτό το ένζυμο και η δραστηριότητα της εγκεφαλικής ακετυλοχολινεστεράλης έχει χρησιμοποιηθεί σε αυτόν τον τομέα<sup>46</sup> για να ανιχνεύσει την οργανοφωσφορική δηλητηρίαση στα ψάρια (κεφάλαιο 16 αυτού του τομέα).

## 2. Η Βλάβη του DNA

Η αύξηση των βιολογικά ενεργών χημικών στο υγρό στοιχείο ως αποτέλεσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας, αποτελεί ιδιαίτερη απειλή για τα ψάρια προκαλώντας αλλοίωση του DNA, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ανωμαλία ταυτόχρονα στα σωματικά κύτταρα και στο σπέρμα. Παρόλο που αυτός είναι ένας τομέας αυξημένης σπουδαιότητας, είναι πέρα από την άμεση σκοπιά αυτής της έρευνας. Ωστόσο, από την πλευρά της φύσης των μοριακών και βιοχημικών διεργασιών που εμπλέκονται, ο αναγνώστης παραπέμπεται στον Thomas<sup>185</sup> για μία γενική θεώρηση και στους Jones και Parry<sup>87</sup> για μία συνολική θεώρηση των βιοχημικών τεχνικών που είναι διαθέσιμες για την αποσαφήνιση των βασικών αλλαγών του DNA και των χρωμοσωματικών βλαβών.

## **IX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Αποδείχτηκε ότι οι περισσότερες μορφές του στρες, ενεργοποιούν μία πρωταρχική νευροενδοκρινική αντίδραση που περιλαμβάνει τη διέγερση του συμπαθητικού-χρωμαφινικού συστήματος και συγκεκριμένα του άξονα HPI, όπως επίσης και πολλά άλλα συστατικά του ενδοκρινικού συστήματος. Αυτή η αντίδραση έχει εκτεταμένες και δευτερεύουσες συνέπειες σε όλες τις πλευρές της βιολογίας των ψαριών καθώς αλλάζει από κυρίαρχες αναβολικές σε καταβολικές οδούς. Εν συντομία, τέτοιες αλλαγές έχουν προσαρμοστική αξία καθώς ενεργοποιούν τα αποθέματα και να παρέχουν στα ψάρια την απαραίτητη ενέργεια για να αποφύγουν ή να ξεπεράσουν την άμεση απειλή. Ωστόσο, κάτω από συνθήκες συνεχούς ή χρόνιου στρες, αυτές οι προσαρμοστικές διεργασίες μπορεί να έχουν δυσκολοπροσαρμοστικές παρενέργειες με τη μορφή καταστολής της ανάπτυξης, αύξηση της ευαισθησίας στις αρρώστιες και επίσης καταστολή της αναπαραγωγικής δραστηριότητας.

Εκτός από τη διέγερση των νευροενδοκρινικών συστατικών ως αντίδραση στο στρες, ορισμένες μορφές στρες (π.χ. έκθεση σε τοξικές ουσίες) μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα συστήματα αποτοξίνωσης ή να προκαλέσουν άμεση κυτταρική βλάβη.

Όλες οι παραπάνω διεργασίες μπορούν να θεωρηθούν σε ορισμένα στάδια ως βιοχημικές αλλαγές μέσα σε διάφορους ιστούς, και η χρήση της βιοχημικής προσέγγισης να έχει συνηγορήσει στη δημιουργία σύντομης προειδοποίησης των πιθανών επιβλαβών αλλαγών στα στρεσαρισμένα ψάρια. Οι βιοχημικές αλλαγές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τέτοιους σκοπούς ταξινομούνται σε πίνακα στο τέλος κάθε βασικού τμήματος του κεφαλαίου και περιλαμβάνουν : νευροενδοκρινικές αντιδράσεις, αναπνευστικές αλλαγές, μεταβολικές ρυθμίσεις, οσμωρυθμιστικές αλλαγές, διέγερση και καταστολή του αμυντικού συστήματος και βλάβη στη φυσιολογία της αναπαραγωγής.

Από αυτή την πληθώρα βιοχημικών πληροφοριών, θα ήταν ανάρμοστο αν όχι αδύνατο, να βάλουμε σε προτεραιότητα κάποιες παραμέτρους με βάση την αξία τους ως δείκτες του στρες στα ψάρια επειδή το ταίριασμα και ο ορισμός ενός καθοριστικού στοιχείου θα διαφέρει ανάλογα με μία σειρά από περιστάσεις. Φυσικά, καμία παράμετρος μόνη της (η «ιερή αναζήτηση» των φυσιολόγων του στρες) δεν θα είναι ποτέ αρκετή και οι παράγοντες που καθορίζουν την επιλογή θα έπρεπε να περιλαμβάνουν την ευαισθησία, την ιδιαιτερότητα, την σταθερότητα και πρακτικά θέματα όπως η ευκολία (και το κόστος) του μέτρου. Η βασική κατεύθυνση για τα περισσότερα, αν όχι όλα, τα καθοριστικά στοιχεία των οποίων περίληψη γίνεται στους πίνακες 1 και 6 θα διαφέρει ανάλογα με το χρόνο (ηλικία, εποχή, diel) όπως επίσης τη θερμοκρασία, τη διατροφική κατάσταση, το είδος, την οικογένεια και το φύλο και θα αλλάζουν την αντίδραση στο στρες κάτω από εκμετάλλευση και αιχμαλωσία. Γι' αυτό είναι σημαντικό να δοθεί προσοχή στον σχεδιασμό οποιουδήποτε πειραματικού προγράμματος ή προγράμματος επίβλεψης το οποίο θα περιλαμβάνει τη χρήση βιοχημικών ενδείξεων του στρες στα ψάρια.



Σημαντική πηγή αναφοράς αποτελούν οι Schreck και Moyle<sup>164</sup> όχι μόνο για κάποια από τη βασική μεθοδολογία που χρειάζεται για την προετοιμασία δείγματος αλλά και για τη θεώρηση των πρακτικών θεμάτων που σχετίζονται με τον σχεδιασμό ελεγχόμενων πειραμάτων και προγραμμάτων επίβλεψης. Πάνω από όλα πρέπει να θυμόμαστε ότι μία βιοχημική προσέγγιση για την ανίχνευση και τη μέτρηση των αντιδράσεων στο στρες είναι ένα πολύ στενό παράθυρο μέσα από το οποίο θα γίνουν αντιληπτά τα ευρύτερα θέματα της βιολογίας του στρες στα ψάρια.



# ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ, ΠΙΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΛΙΑ ΝΑΤΡΙΟΥ : Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΜΟΡΦΙΚΗΣ (HOMEOVISCIOUS) ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι διεργασίες της κυτταρικής μεμβράνης είναι υπερβολικά ευαίσθητες στις περιβαλλοντικές ταραχές. Έτσι η λειτουργία της μεμβράνης παίζει αποφασιστικό ρόλο στον καθορισμό των ορίων αντοχής των ψαριών και των άλλων ζώων<sup>26,63</sup> στη θερμοκρασία και την πίεση. Οι προσαρμοστικές και εγκλιματιστικές αλλαγές στα λιπίδια και τα ένζυμα της κυτταρικής μεμβράνης έχουν προσεχθεί πολύ από περιβαλλοντικούς φυσιολόγους. Μία από τις πιο εντατικά ερευνημένες μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι η αντλία νατρίου (sodium pump), τριφωσφορική αδενοσίνη Νατρίου-Καλίου ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάση). Οι άμεσες συνέπειες της θερμοκρασίας και της πίεσης στη δραστηριότητα  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάση είναι σχετικά μεγάλες αν συγκριθούν με άλλα ένζυμα, κάνοντάς τη έτσι σαφώς υποψήφια για έρευνες βιοχημικής προσαρμογής. Ο σκοπός αυτής της σύντομης έρευνας είναι να περιγράψει τους βιοχημικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται από τα ψάρια για να διατηρήσουν τη λειτουργία της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάση σε διαφορετικούς τύπους φυσικού περιβάλλοντος και ιδιαίτερα το ρόλο των αλλαγών στο περιβάλλον των μεμβρανικών λιπιδίων (ομοιομορφική (homeoviscous) προσαρμογή).

Η δραστηριότητα της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάση εξαρτάται αρκετά από τα περιβάλλοντα λιπίδια και πλήθος ερευνών έχουν χρησιμοποιήσει αυτό το ένζυμο για να αναφέρουν τις λειτουργικές συνέπειες της ομοιομορφικής προσαρμογής. Οι έρευνες για τις συνέπειες της θερμοκρασίας αρχικά εστιάστηκαν στις αντιδράσεις εγκλιματισμού, ενώ οι έρευνες για την πίεση ασχολήθηκαν περισσότερο με συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Η ΑΤΡάση του Νατρίου-Καλίου παίζει σημαντικό ρόλο στην οσμωρύθμιση των ψαριών του αλμυρού και του γλυκού νερού<sup>18,46</sup> και έτσι οι αλλαγές που σχετίζονται με την αλατότητα στις ενζυμικές δραστηριότητες έχουν επίσης μελετηθεί<sup>39</sup>. Ωστόσο στα όργανα που συμμετέχουν στη ρύθμιση των ιόντων (π.χ. τα βράγχια στους τελεόστεους θαλάσσιους οργανισμούς, τα έντερα και τα νεφρά στους τελεόστεους οργανισμούς γλυκού νερού, ο πρωκτικός αδένας στα ελασματοβράγχια), οι μεμβράνες τους που περιέχουν  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase συνήθως δεν βρίσκονται σε άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Η αντλία νατρίου είναι ένα ουσιώδες ένζυμο στη διατήρηση της ομοιόστασης ενάντια στις διακυμάνσεις αλατότητας, αλλά το ίδιο δεν εκτείθεται άμεσα σε τέτοιες αλλαγές. Αντίθετα, οι συνέπειες της περιβαλλοντικής αλατότητας πάνω στη  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase μετριάζονται έμμεσα μέσω αλλαγών στο ενδοκυτταρικό  $\text{Na}^+$  και από ορμονικούς μηχανισμούς<sup>38</sup>. Οι μηχανισμοί ανεκτικότητας των ψαριών στην αλατότητα έχουν μελετηθεί αλλού<sup>40</sup> και δεν θα συζητηθούν εδώ.

Η αντλία νατρίου είναι μία ζωτική μεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη σχεδόν όλων των ζωικών κυττάρων. Είναι καταλυτική για την ανταλλαγή ηλεκτρογενούς μεταφοράς μεμβράνης τριών ιόντων νατρίου που φεύγουν για δύο ιόντα καλίου που μπαίνουν και έτσι καθορίζουν την ιοντική και ηλεκτρολογική κλίση που είναι απαραίτητη για πολλές κυτταρικές διεργασίες ανάμεσα στις οποίες είναι η αναπαραγωγή ενεργών δυναμικών,  $\text{Na}^+$ -ζεύγους ζαχάρου και αμινοξέος μεταφοράς και την ένταση λειτουργείας των κυττάρων<sup>31,49</sup>. Η συνεισφορά της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase στον γενικό μεταβολισμό είναι σημαντική. Μπορεί να ξοδεύει μέχρι και μισό από το ATP που παράγεται από μερικούς ιστούς<sup>1</sup>. Στα ψάρια το ενεργειακό κόστος της ιοντορύθμισης μπορεί να εξηγήσει περισσότερο από το 25% των τελεόστεων οργανισμών<sup>17,37</sup> που έχουν εγκλιματιστεί στο θαλασσινό νερό και πολύ από αυτό δείχνει την κατανάλωση ATP από τη  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase.

Η πιο λεπτομερής γνώση αυτής της δομής, λειτουργίας και ρύθμισης της αντλίας νατρίου προέρχεται από θηλαστικά ομόλογα<sup>49</sup>. Το Νάτριο-Κάλιο ATPάση είναι ένα ετεροδιμερικό (heterodimeric) ένζυμο, με απόλυτη ανάγκη φωσφολιπιδίων. Η πιο μεγάλη A υποομάδα (MW ~ 112.000 Da) είναι η καταλυτική υποομάδα. Περιέχει δεσμούς για το νάτριο, κάλιο, ATP και την συγκεκριμένη επιβραδυντική ουσία, ouabain. Η λειτουργία της B υποομάδας δεν είναι ξεκάθαρη παρόλο που είναι απαραίτητη για δράση. Η B υποομάδα έχει βαριά σύνθεση γλυκοπρωτεΐνης από υδατάνθρακες και πρωτεΐνη, με υδατάνθρακες που αποτελούν μέχρι και το ¼ της συνολικής μάζας (40,000 – 60,000 Da). Τα γονίδια και για τις δύο υποομάδες έχουν παραγωγή κλώνων και ακολουθία από πολλά θηλαστικά είδη, όπως και τα γονίδια για τα ισοένζυμα συγκεκριμένων ιστών.

Ο κινητικός σχεδιασμός της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάση είναι μάλλον πολύπλοκος<sup>31</sup>. Σε υψηλό επίπεδο υπάρχουν δύο κύριες δομές, καθορισμένες  $E_1$  και  $E_2$ , οι οποίες «αντιμετωπίζουν» διαφορετικές πλευρές της μεμβράνης και έχουν εντελώς διαφορετική συγγένεια με τα υποστρώματα. Οι αλλαγές ανάμεσα σε αυτές τις δύο δομές περιλαμβάνουν ουσιώδεις μεταβολές στη γεωμετρία των πρωτεϊνών και φαίνεται ότι αποτελούν τα αργά βήματα για την κατάλυση και τη μεταφορά. Ο επαναπροσδιορισμός των υποομάδων επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση των γειτονικών μορίων μεμβρανικών λιπιδίων, και διάφορες έρευνες, χρησιμοποιώντας πλήθος βιοφυσικών τεχνικών<sup>8,22,23,29,57</sup>, έχουν αναφέρει ότι η ενζυματική δραστηριότητα εξαρτάται πολύ από τις φυσικές ιδιότητες των μεμβρανικών λιπιδίων. Έτσι, αυτές οι αλλαγές εγκλιματισμού στις μεμβρανικές φυσικές ιδιότητες είναι πιθανό να επηρεάσουν τη δράση της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάση, με συνακόλουθες συνέπειες στην ιοντική ισορροπία των οργανισμών. Η αντλία νατρίου έχει για αυτό το λόγο χρησιμοποιηθεί ευρέως ως σύστημα μοντέλο για τη λειτουργική σπουδαιότητα της ομοιομορφικής (homeoviscous) προσαρμογής. Στην πραγματικότητα, στα ψάρια έχει δοθεί περισσότερη προσοχή στην επιρροή των διαφορών στα μεμβρανικά λιπίδια απ' ό,τι στην προσαρμογή της ίδιας της πρωτεΐνης.

## II. ΟΜΟΙΟΜΟΡΦΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ (HOMEOVISCOUS ADAPTATION)

Οι χαμηλές θερμοκρασίες και οι υψηλές πιέσεις προκαλούν στη λιπαρή ακυλοαλυσίδα (\* ακυλοαλυσίδα : αλυσίδα καρβοξύλιου) των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων την στενή συμπίεση μεταξύ τους. Αυτή η στενή συμπίεση έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη πυκνότητα (μικρότερη «ροή») μέσα στη ενδότερο υδροφοβικό τμήμα της μεμβράνης. Συμπερασματικά, η αύξηση της πυκνότητας παρεμβάλλεται στις διαμορφωτικές αλλαγές που σχετίζονται με τη λειτουργία των μεμβρανικών πρωτεϊνών όπως η  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάση. Από την άλλη μεριά, μία πολύ υγρή μεμβράνη μπορεί να είναι πιο διαπερατή σε ιόντα, νερό ή άλλα μικρά μόρια. Έτσι, κάποιος θα περίμενε ότι η διατήρηση της κατάλληλης ρευστότητας της ενδιάμεσης μεμβράνης θα είχε προσαρμοστική αξία<sup>9,13,24</sup>. Ο Sinensky<sup>56</sup> δημιούργησε τον όρο «ομοιομορφική προσαρμογή» (homeoviscous adaptation) για να περιγράψει τέτοιες αλλαγές στις φυσικές μεμβρανικές ιδιότητες που έχουν σχέση με τον θερμικό εγκλιματισμό, παρόλο που η αντίληψη υπήρχε πολλά χρόνια πριν την ονομασία της<sup>7</sup>. Ο μηχανισμός που έχει δοθεί με τα καλύτερα δεδομένα σχετικά με τις ρυθμίσεις ροής είναι μέσω των αυξήσεων στην ακόρεστη λιπαρή ακυλοαλυσίδα κατά τη διάρκεια του ψυχρού εγκλιματισμού. Η παρουσία των διπλών δεσμών *cis* (\* *cis* : δείχνει ότι δύο ομάδες ατόμων σε μία μη κεκορεσμένη ένωση βρίσκονται στην ίδια πλευρά ενός διπλού δεσμού) διαλύουν τον δεσμό των λιπιδίων στον πυρήνα της υδροφοβικής μεμβράνης, και έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ρευστότητα της μεμβράνης. Η φωσφολιπιδιακή σύνθεση της κύριας ομάδας επίσης αλλάζει, παρόλο που δεν έχει αναγκαία σχέση με την επακόλουθη διαφορά στη ρευστότητα<sup>24</sup>.



Ο όρος «ομοιομορφική προσαρμογή» βασίζεται στην παραδοχή ότι η διατήρηση της κανονικής ρευστότητας της μεμβράνης έχει προσαρμοστική αξία. Πολλοί συγγραφείς έχουν διαφωνήσει γι' αυτήν την ιδέα, δίνοντας έμφαση στη σπουδαιότητα άλλων μεμβρανικών ιδιοτήτων στον έλεγχο της λειτουργίας της μεμβρανικής πρωτεΐνης όπως : συμπεριφορά στο στάδιο μείωσης ή μίτωσης, πυκνότητα, σύνθεση της κύριας ομάδας ή ακόρεστη ακυλαλυσίδα<sup>6,23b,32</sup>. Ωστόσο, οι διάφορες φυσικές ιδιότητες των μεμβρανών συνδέονται στενά. Για παράδειγμα, μία μεμβράνη της οποίας τα φωσφολιπίδια είναι σχετικά ακόρεστα θα τείνει να έχει χαμηλότερη θερμοκρασία μεταφοράς, να είναι λιγότερο πυκνή και πιο ρευστή σε οποιαδήποτε δεδομένη θερμοκρασία. Σαφώς, αυτό που πραγματικά μετράει για τον οργανισμό είναι η διατήρηση της γενικής μεμβρανικής λειτουργίας. Η ρευστότητα της μεμβράνης μετριέται εύκολα και έχει κατακόρον χρησιμοποιηθεί ως δείκτης των μεμβρανικών ιδιοτήτων, είτε είναι η ίδια η ρευστότητα η φυσιολογικά σημαντική φυσική παράμετρος, είτε όχι. Για τους σκοπούς αυτής της εργασίας η ρευστότητα θα χρησιμοποιηθεί ως όρος αναπλήρωσης για τις γενικές συνέπειες των διαφορών στη σύνθεση των μεμβρανικών λιπιδίων στη δραστηριότητα της αντλίας νατρίου. Διάφορες λεπτομερείς και κριτικές συζητήσεις της ομοιομορφικής προσαρμογής δημοσιεύτηκαν πρόσφατα<sup>23b,24,32,35</sup>.

Στα ψάρια οι μεμβράνες που περιέχουν  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάση τείνουν να εκθέσουν αρκετά μεγάλες αλλαγές ρευστότητας σε σύγκριση με άλλα μεμβρανικά κλάσματα, ακόμα και από αυτά των ίδιων ιστών<sup>33,52</sup>. Η διαφοροποίηση των λιπιδίων έχει συνδεθεί με διαφορές στις ενζυματικές ιδιότητες της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάση σε πολυάριθμες περιπτώσεις<sup>10,20,48,52,62</sup>. Έτσι η  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάση είναι ένα ένζυμο που επηρεάζεται σημαντικά από περιβαλλοντικές διακυμάνσεις και έχει κρίσιμο φυσιολογικό ρόλο ενώ συμβαίνει σε μεμβράνες που υπόκεινται σε εκτενείς αλλαγές ρευστότητας. Ως τέτοιο έπαιξε σημαντικό ρόλο στην υποβολή της ερώτησης κλειδί της ομοιομορφικής (homeoviscous) θεωρίας : Επηρεάζουν σημαντικά οι αλλαγές της σύνθεσης των μεμβρανικών λιπιδίων και οι φυσικές ιδιότητες την μεμβρανική λειτουργία ; Πολλές βιοχημικές προσεγγίσεις έχουν γίνει.

Οι αλλαγές στη δραστηριότητα της αντλίας νατρίου έχουν συσχετιστεί με : (1) αλλαγές εγκλιματισμού στη ρευστότητα της μεμβράνης<sup>10,48,52</sup>, (2) προκαλούμενες θερμοδυναμικές αλλαγές στη ρευστότητα (που επηρεάζεται από τη διαφορετική θερμοκρασία και πίεση<sup>20</sup>), και (3) αλλαγές στη ρευστότητα της μεμβράνης που σχετίζεται με τον μέσω εργαστηρίου χειρισμό της σύνθεσης ή ρευστότητας των μεμβρανικών λιπιδίων<sup>10,20,48</sup>.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Περίληψη μελετών των συνδυαστικών αλλαγών στις ιδιότητες της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσης με το θερμικό εγκλιματισμό. Ενισχυτικές αποδείξεις για το ρόλο της ομοιομορφικής (homeoviscous) προσαρμογής παρουσιάζεται αν είναι εφικτό.

ΕΙΔΟΣ	ΙΣΤΟΣ	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΛΙΑΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ	ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ
<i>Anguilla anguilla</i> (eel)	Βράγχια <sup>62</sup>	Θερμοκρασία τομής στο διάγραμμα Arrhenius	Σύσταση
<i>Carassius auratus</i> (χρυσόψαρο)	Έντερα <sup>58</sup>	Θερμοκρασία τομής στο διάγραμμα Arrhenius	
	Έντερα <sup>59</sup>	Ρυθμός αντικατάστασης	
	Εγκέφαλος <sup>10</sup>	Θερμική σταθερότητα	Ρευστότητα, n- εξανολική θεραπεία
<i>Cyprinodon salinus</i> (σκυλόψαρο)	Βράγχια <sup>61</sup>	Ειδική δραστικότητα	
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (πέστροφα)	Ερυθρά αιμοσφαίρια <sup>48</sup>	Ειδική δραστικότητα, ρυθμός αντικατάστασης	Ρευστότητα, πρόσθετη χοληστερίνη
<i>Rutilus rutilus</i> (τσιρόνι, λευκίσκος)	Νεφρά <sup>53</sup>	Ειδική δραστικότητα, πυκνότητα αντλίας	
	Βράγχια <sup>53</sup>	Ειδική δραστικότητα, πυκνότητα αντλίας, ρυθμός αντικατάστασης	
	Ηπατοκύτταρα <sup>51</sup>	Ειδική δραστικότητα, πυκνότητα αντλίας	
	Νεφρά <sup>52</sup>	Θερμική σταθερότητα	Ρευστότητα
<i>Salvelinus alpinus</i>	Βράγχια <sup>53</sup>	Ειδική δραστικότητα, ρυθμός αντικατάστασης	



### III. ΘΕΡΜΙΚΟΣ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ΑΤΡάση

Τα περισσότερα ψάρια είναι ισοθεμικά με σεβασμό στο περιβάλλον. Η Νάτριο – Κάλιο ΑΤΡάση είναι ένα σχετικά ευαίσθητο στη θερμοκρασία ένζυμο με τυπικές  $Q_{10}$  αξίες 2,5-4. Άλλες διεργασίες που σχετίζονται με την ιοντική ισορροπία (ιοντικά κανάλια, παθητική διαπερατότητα κλπ.) παρουσιάζουν διαφορετικές θερμικές σχέσεις<sup>25</sup>, κι έτσι κάποιος θα περίμενε ότι τα ψάρια θα κανόνιζαν αυτές τις ενέργειες, ως αντίδραση στις αλλαγές της θερμοκρασίας. Μία εξαντλητική λίστα ερευνών θερμικού εγκλιματισμού της δραστηριότητας της αντλίας νατρίου δίνεται στον πίνακα 1. Μία από τις πιο κοινές διαπιστώσεις είναι ότι ο εγκλιματισμός στο κρύο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας της αντλίας νατρίου (σε επίπεδο ιστών) ούτως ώστε να καταστέλλονται μερικώς οι άμεσες ανασταλτικές επιδράσεις της θερμοκρασίας στη  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάση. Ένας τρόπος για να γίνει αυτό είναι να αυξηθεί ο αριθμός των μορίων της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσης<sup>51,53</sup>. Άλλοι δυνατοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη σύνθεση πιο ενεργών ισοενζύμων ή την αλλαγή στη συγκεκριμένη δραστηριότητα (τελικό νούμερο – turnover number) κάθε μορίου αντλίας νατρίου. Αλλαγές στο τελικό νούμερο μπορεί να οφείλονται στις μετα-μεταφραστικές αλλαγές του ενζύμου (π.χ. ένζυμο φωσφορυλίωσης ή μεταβολή στα κατάλοιπα σύνθεσης γλυκοπρωτεΐνης), ή στις μη-δεσμευτικές αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον του ενζύμου : άλλες πρωτεΐνες, αλλοστερικές ρυθμιστές δράσης, το εσωτερικό και εξωτερικό σταθερό περιβάλλον και τα μεμβρανικά λιπίδια. Το περιβάλλον των μεμβρανικών λιπιδίων έχει κερδίσει τη μεγαλύτερη προσοχή.

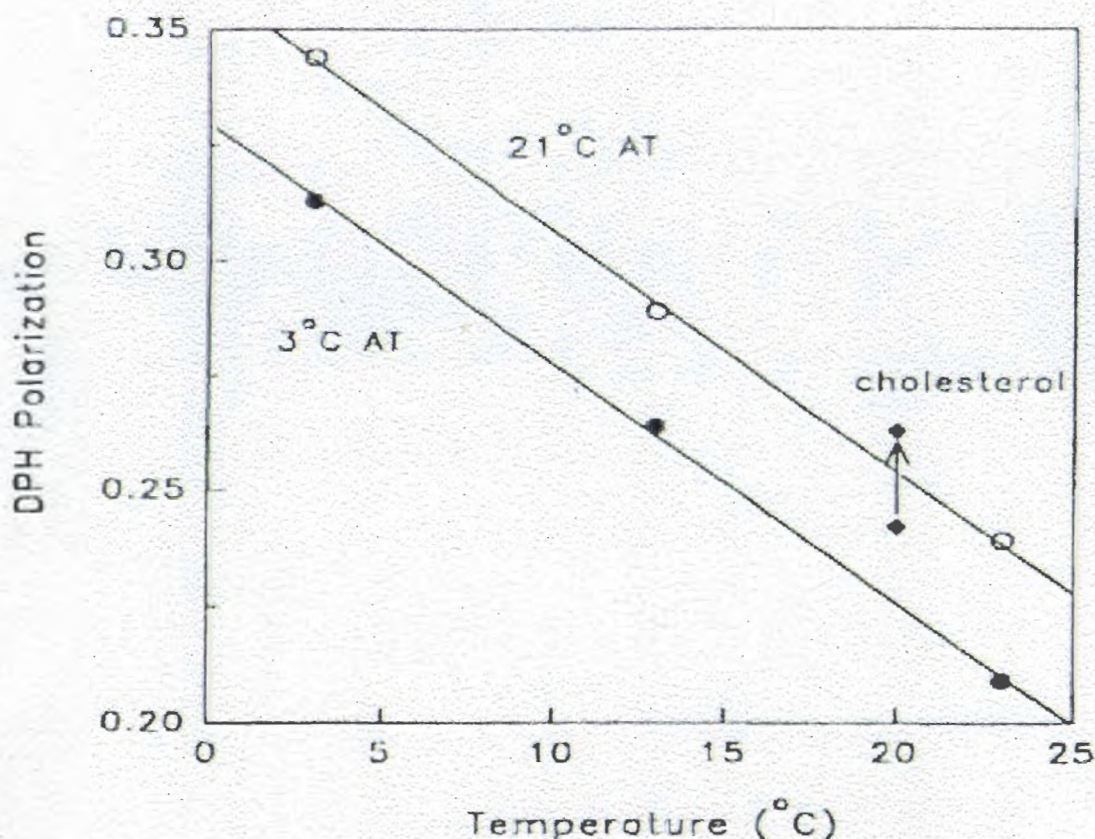
Μία συνηθισμένη προσέγγιση περιλάμβανε τη χρήση του διαγράμματος Arrhenius για τη σύγκριση της δραστηριότητας  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσης στα άτομα που έχουν εγκλιματιστεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η ενζυματική δραστηριότητα (σε λογαριθμική κλίμακα) χρησιμοποιείται ενάντια στην αντιστροφή της θερμοκρασίας (σε βαθμούς Kelvin). Η κλίση ενός τέτοιου σχεδίου εξίσωσης -  $E_a / R$ , όπου  $E_a$  είναι η φανερή ενέργεια δραστηριοποίησης για την κατάλυση και  $R$  η σταθερή αερίων.

Στην περίπτωση της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσης η γραφική παράσταση Arrhenius είναι συνήθως μη-ευθύγραμμη και γίνεται απότομη (πιο εμφανείς ενεργειακές δραστηριότητες) σε χαμηλότερες θερμοκρασίες<sup>5,22,28,29,58,62</sup>. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει για άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες και διεργασίες. Τα δεδομένα προσαρμόζονται συχνά σε δύο ευθείες γραμμές, και η θερμοκρασία στην οποία οι γραμμές τέμνονται (θερμοκρασία τομής) μπορεί να αλλάζει ανάλογα με τη θερμοκρασία εγκλιματισμού<sup>58,62</sup>. Ο ισχυρισμός που έγινε είναι ότι το σημείο τομής δείχνει την αλλαγή φάσης (μορφής) των μεμβρανικών λιπιδίων που βρίσκονται γύρω από την  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάση. Σύμφωνα με αυτή την ιδέα, σε θερμοκρασίες κάτω από την αλλαγή φάσης (μορφής), το μεμβρανικό περιβάλλον θα υπήρχε σε μία κατάσταση κολλώδης, γλοιώδης μάζας. Έτσι, το ένζυμο θα χρειαζόταν να επιτύχει υψηλότερη ενέργεια για να προχωρήσει μέσα από διαμορφωτικές αλλαγές που είναι απαραίτητες για την ιοντομεταφορά και την υδρόλυση ΑΤΡ, όπως καταγράφεται από μία μεγαλύτερη κλίση (υψηλότερη εμφανής δραστηριότητα ενέργειας) σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Με αυτή τη λογική μία αλλαγή στο σημείο τομής, εκφράζει αλλαγή στις φυσικές ιδιότητες της μεμβράνης λόγω της ομοιομορφικής (homeoviscous) προσαρμογής.

Δυστυχώς, η ερμηνεία των σημείων τομής στη γραφική παράσταση Arrhenius δεν είναι τόσο απλή. Ένας σημαντικός περιορισμός αυτής της έρευνας είναι ότι το σημείο τομής του διαγράμματος μπορεί να μη συμφωνεί με την αλλαγή φάσης (μορφής). Στην πραγματικότητα, τα σημεία τομής μπορεί να εμφανιστούν ακόμα και όταν δεν υπάρχουν αλλαγές<sup>30,55</sup>. Ο Klein<sup>30</sup> παρέχει μία ιδιαίτερα καλή απόδειξη ότι το μη ευθύγραμμο διάγραμμα Arrhenius μπορεί να προέρχεται από μεγάλο αριθμό καταστάσεων διαφορετικών από την αλλαγή φάσης (μορφής). Αυτές οι αλλαγές περιλαμβάνουν μία αλλαγή στο οριακό βήμα κλίμακας της αντίδρασης, μία ικανότητα θερμοχωρητικότητας μη μηδενική, μία διαμορφωτική αλλαγή στα ένζυμα ή συμμετοχή του ενζύμου σε μία αναλογία της μεμβράνης. Ακόμα και όταν συμβαίνει αλλαγή φάσης (μορφής) των λιπιδίων, η μεταβαλλόμενη θερμοκρασία δεν χρειάζεται να ανταποκρίνεται στο σημείο τομής για ενζυματική δραστηριότητα.

Έτσι, οι γραφικές παραστάσεις Arrhenius από μόνες τους δεν μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για ότι αφορά τις βιοφυσικές δραστηριότητες του περιβάλλοντος του μεμβρανικού λιπιδίου. Πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPάσης, έχουν επιτευχθεί σε διάφορες περιπτώσεις ανεξάρτητες βιοφυσικές αποδείξεις που ενώνουν τις αλλαγές φάσης (μορφής) με τα σημεία τομής<sup>22,23,29,57</sup>. Ωστόσο, ο γενικός χαρακτηρισμός ότι οι αλλαγές εγκλιματισμού στα σημεία τομής των διαγραμμάτων Arrhenius είναι ενδεικτικά για το ότι η ομοιομορφική (homeoviscous) προσαρμογή δεν μπορεί να υποστηριχτεί με αυστηρότητα.

Όταν δεν παρερμηνεύονται οι γραφικές παραστάσεις Arrhenius, τότε παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες. Μία αλλαγή στην εξάρτηση από τη θερμοκρασία της ενζυματικής δραστηριότητας, μας υποδεικνύει ότι κάτι έχει αλλάξει. Οι μεμβρανικές πρωτείνες και τα περιβάλλοντα λιπίδιά τους δρουν ως θερμοδυναμικές μονάδες και έτσι προκύπτει το ερώτημα : οι παρατηρημένες αλλαγές είναι αποτέλεσμα του εγκλιματισμού των λιπιδίων, των πρωτεϊνικών διαφορών, ή και των δύο ; Ένας τρόπος επίλυσης αυτού του ερωτήματος είναι με εργαστηριακούς χειρισμούς του περιβάλλοντος των μεμβρανικών λιπιδίων. Τέτοιες μελέτες έχουν γίνει αρχικά με θηλαστικά ομόλογα της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPάσης. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν συμπληρώματα χοληστερίνης από προετοιμασία των κυττάρων<sup>57</sup>, αλλαγή της φωσφολιπιδιακής βασικής ομάδας<sup>23</sup>, και ανακατασκευή της εκλιποειδούς (de-lipidated)  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPάσης στα καθορισμένα μεμβρανικά περιβάλλοντα<sup>28,29</sup>. Σε κάθε περίπτωση, η αυξημένη μεμβρανική ρευστότητα έχει συνδεθεί με την αυξημένη δραστηριότητα της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPάσης. Αυτά τα αποτελέσματα προσφέρουν πρόσθετη υποστήριξη για το ρόλο του λιπιδιακού περιβάλλοντος στον έλεγχο της δραστηριότητας της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPάσης.



**ΕΙΚΟΝΑ 1.** Αποτελέσματα θερμικού εγκλιματισμού σε μεμβράνη ρευστότητας από ερυθροκύτταρα πέστροφας. Η ρευστότητα ήταν σταθερή από DPH τεχνικής πόλωσης<sup>48</sup>. Οι υψηλές τιμές πόλωσης υποδηλώνουν μία χαμηλή ρευστή μεμβράνη. Το βέλος υποδηλώνει την διεύθυνση των επιδράσεων της χοληστερίνης επιπρόσθετα πάνω στη ρευστότητα. AT = Θερμοκρασία Εγκλιματισμού. (Acclimation Temperature)

Οι πειραματικές αλλαγές του λιπιδιακού περιβάλλοντος της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης από τα ψάρια, επηρεάζει επίσης και τις ενζυματικές ιδιότητες. Ένα ενδιαφέρον πρόσφατο παράδειγμα δίνεται από τους Raynard και Cossins<sup>48</sup>. Αυτοί κάνουν θεραπεία με χοληστερίνη στα ερυθρά αιμοσφαίρια της πέστροφας, μία διαδικασία που μειώνει τη μεμβρανική ρευστότητα. Οι παρατηρημένες αλλαγές στη ρευστότητα ήταν κατά προσέγγιση οι ίδιες με αυτές που συσχετίζεται τη διαφορά στους 18 βαθμούς Κελσίου στη θερμοκρασία εγκλιματισμού (εικόνα 1). Ο εγκλιματισμός στη ζέστη και η πρόσθετη χοληστερίνη σχετίστηκαν με τη μειωμένη καταλυτική αποδοτικότητα (τελική τιμή) της αντλίας νατρίου. Οι μειώσεις στις τελικές τιμές ήταν 22% (εγκλιματισμός στη ζέστη) και 14% (χοληστερίνη).

Έτσι, οι αλλαγές στην μεμβρανική ρευστότητα παρόμοιου μεγέθους, που προκλήθηκε με διαφορετικούς τρόπους, είχε παρόμοιες συνέπειες στη δραστηριότητα της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης. Δυστυχώς, η θερμοκρασία εγκλιματισμού της ομάδας που δέχτηκε θεραπεία χοληστερίνης δεν δόθηκε, παρόλο που οι μετρημένες ρευστότητες μας υποδεικνύουν ότι το ψάρι είχε εκτεθεί σε ενδιάμεσες θερμοκρασίες (εικόνα 1).

Ο εγκλιματισμός στο κρύο έχει συνδεθεί με τις υψηλότερες τελικές τιμές της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης σε άλλες μελέτες<sup>51,59</sup>. Αυτές οι συνέπειες έχουν αποδοθεί σε αλλαγές στο μεμβρανικό λιπιδιακό περιβάλλον. Οι αλλαγές εγκλιματισμού στη μεμβρανική ρευστότητα έχουν επίσης συνδεθεί με τις αλλαγές στη θερμική σταθερότητα της αντλίας νατρίου<sup>10,51</sup>. Η θεραπεία με n-εξανόλη (n-hexanol), ένας μεμβρανικός συντελεστής ρευστοποίησης, μειώνει τη θερμική σταθερότητα της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης, όπως συμβαίνει και με τα ένζυμα από άτομα που είχαν εγκλιματιστεί στο κρύο τα οποία επίσης παρουσιάζουν μειωμένη σταθερότητα<sup>10</sup>. Αυτές οι έρευνες συμφωνούν με τις προβλέψεις της ομοιομορφικής (homeoviscous) θεωρίας, αλλά δεν έχει σταθεί δυνατόν να αποκλειστούν εναλλακτικοί παράγοντες όπως σύνθεση των νέων ισοενζύμων σε διαφορετικές θερμοκρασίες ή την ενεργοποίηση της αντλίας με μη λιπιδιακούς μηχανισμούς.

Μία εκτεταμένη ποικιλία αποδείξεων συμφωνεί με την ιδέα ότι η ομοιομορφική προσαρμογή παίζει ρόλο στην ομαλή λειτουργία της αντλίας νατρίου κατά τη διάρκεια θερμικού εγκλιματισμού των ψαριών. Οι μεμβράνες που περιέχουν  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάση παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές στη σύνθεση και τη ρευστότητα με τη θερμοκρασία και οι δραστηριότητες των (θηλαστικών)  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡακών, εξαρτώνται ισχυρά από τις βιοφυσικές ιδιότητες των λιπιδίων. Ωστόσο, αυτά τα στοιχεία είναι σχετικά, και κάποιος θα ήθελε ακόμα πιο άμεσες αποδείξεις για το ότι οι αλλαγές εγκλιματισμού στη μεμβρανική ρευστότητα (ή άλλες μεμβρανικές ιδιότητες) έχουν σπουδαιότητα εν ζώη. Σε αντίθεση με τα ευρήματα που περιγράφονται παραπάνω, ο Schwarzbbaum και οι συνεργάτες του<sup>53</sup> δε βρήκαν αλλαγές στα επίπεδα της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης, στην πυκνότητα της αντλίας και στις

τελικές τιμές ή στη θερμική σταθερότητα στο νεφρό της πέστροφας *Salvelinus fontinalis*, που έχει εγκλιματιστεί στο κρύο, παρόλο τη μεγάλη αύξηση στη μεμβρανική ρευστότητα<sup>52</sup>. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι οι αλλαγές στη ρευστότητα δεν έχουν απαραίτητα ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της ενζυματικής δραστηριότητας. Υπάρχουν βέβαια και άλλοι παράγοντες που αναμειγνύονται στη λειτουργία της αντλίας νατρίου. Μία επιπλέον θεωρία που δεν έχει προσεχθεί αρκετά στα συμφραζόμενα των συνεπειών της θερμοκρασίας είναι η εποχιακή διακύμανση στις αντιδράσεις εγκλιματισμού<sup>40,48</sup>.

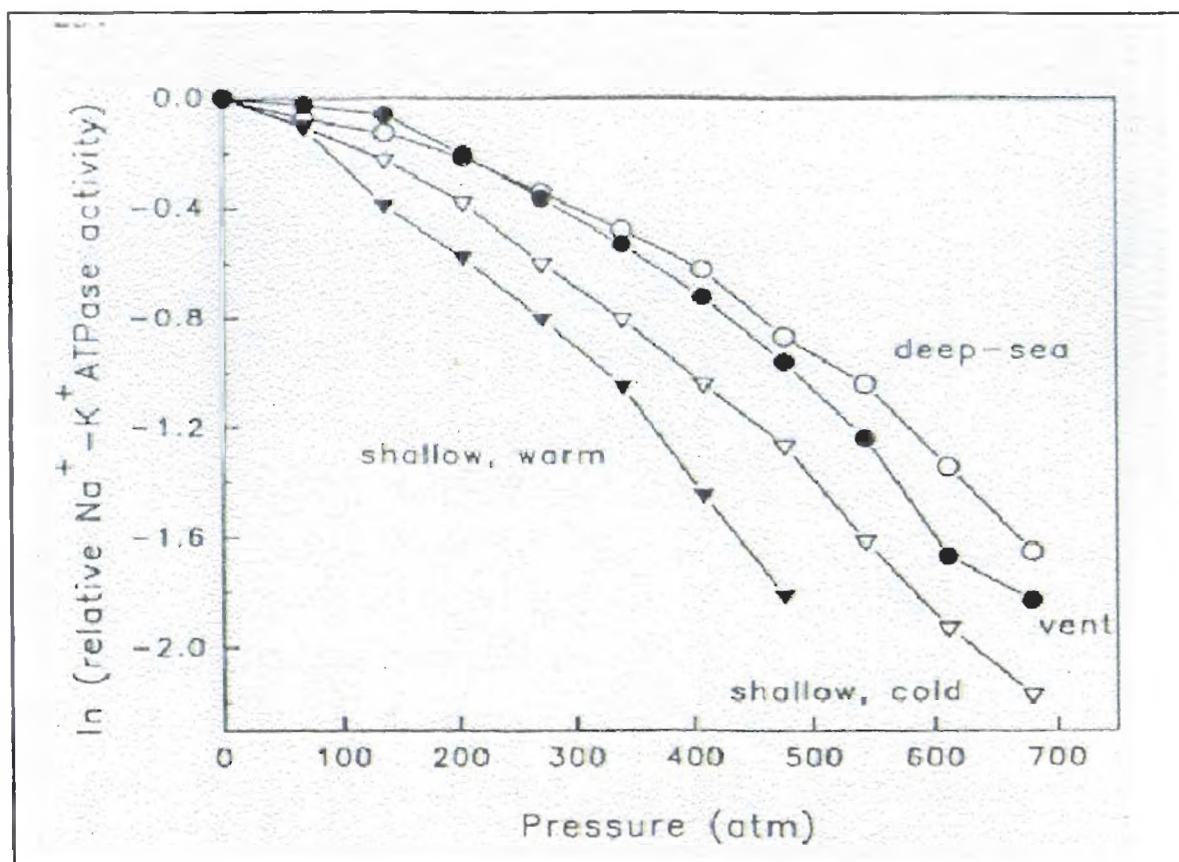
Η παραπάνω συζήτηση εστιάστηκε ολοκληρωτικά στη διαμόρφωση της δραστηριότητας της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPάσης μέσω των αλλαγών εγκλιματισμού των μεμβρανικών λιπιδίων. Τα στενοθερμικά ψάρια που ζουν σε κρύο νερό οσμωρυθμίζονται τόσο καλά όσο και τα είδη που ζουν σε ζεστό νερό<sup>43</sup>, αλλά οι εξελικτικές προσαρμογές της αντλίας νατρίου στη θερμοκρασία δεν έχουν προσεχθεί ιδιαίτερα. Πρόσφατες συγκριτικές μελέτες από τους Schwarzbaum και τους συνεργάτες του<sup>51-53</sup> είναι ένα βήμα προς αυτή την κατεύθυνση. Αντιθέτως, οι συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών ειδών ήταν το μοναδικό θέμα των μελετών για την πίεση.

#### IV. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΠΙΕΣΗΣ ΤΗΣ $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ΑΤΡάσης

Υπάρχει μια πληθώρα στοιχείων συμπεριφοράς και φυσιολογίας που δείχνουν ότι τα όρια αντοχής πίεσης των οργανισμών καθορίζονται από την εξέλιξη της μεμβράνης τους<sup>34,36</sup>. Η πίεση στο θαλάσσιο περιβάλλον αυξάνεται κατά 1 atm κάθε αύξηση 10m βάθους. Έτσι, τα ψάρια που ζουν σε μέσο βάθος ωκεανού (3843 m) δέχονται πίεση 385 atm. Αυτή η πίεση θα δημιουργούσε σοβαρό πρόβλημα στη λειτουργία των μεμβρανών των οργανισμών που ζουν στη γη ή στην επιφάνεια της θάλασσας. Αυτό το γεγονός αποδεικνύει ότι οι μεμβράνες αυτών των ζώων που ζουν στα βάθη της θάλασσας έχουν με κάποιο τρόπο προσαρμοστεί στις υψηλές πιέσεις. Οι  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ΑΤΡάσες αποτελούν ένα πολύ καλό σύστημα μελέτης της προσαρμογής των πρωτεϊνών των μεμβρανών στις πιέσεις εξαιτίας των απαιτήσεων τους για φωσφολιπίδια, της μεγάλης ευαισθησίας τους στην πίεση<sup>8,16</sup> και του γεγονότος ότι τα ψάρια που ζουν σε μεγάλα βάθη είναι πολύ καλοί ρυθμιστές της οσμωτικής πίεσης<sup>4,54</sup>.

Οι  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ΑΤΡάσες από τα βράγχια των θαλάσσιων τελεόστεων αναστέλλονται από τις υψηλές πιέσεις<sup>19,20,41,44,45</sup>, αλλά τα είδη που ζουν σε μεγάλα βάθη τείνουν να είναι σχετικά απρόσβλητα από τις πιέσεις (Εικόνα 2). Αυτό έχει δύο πιθανά πλεονεκτήματα : Λιγότερα μόρια που δρουν σαν αντλίες χρειάζονται για να παρέχουν ειδικές ενζυματικές δραστηριότητες στους ιστούς (τα οποία είναι έτσι κι αλλιώς μειωμένα<sup>21</sup>) και οι διαφορές στις πιέσεις του φυσικού περιβάλλοντος που σχετίζονται με κάθετες μεταναστεύσεις στη στήλη του νερού δεν επηρεάζουν τόσο πολύ την ικανότητα μεταφοράς ιόντων. Καθώς οι  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ΑΤΡάσες είναι ένα λιποπρωτεϊνικό σύστημα, οι διαφορές στις ενζυματικές δραστηριότητες θα μπορούσαν να καταλήξουν από εξελικτικές αλλαγές στην πρωταρχική συνοχή κάθε υπομονάδας ή από την ομοιομορφική προσαρμογή των λιπιδίων των μεμβρανών. Βασική θεωρία είναι ότι κάθε μετα-υλοποιημένη μετατροπή θα μπορούσε να παίζει ένα ρόλο.





**ΕΙΚΟΝΑ 2.** Αποτελέσματα της πίεσης στις  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσες ψαριών που ζουν σε διαφορετικές περιβαλλοντικές καταστάσεις.

Τα βαθύβια είδη (Deep-sea) περιλαμβάνουν αυτά που ζουν στους 2-4 βαθμούς Κελσίου και σε βάθη που υπερβαίνουν τα 2000 μέτρα.

Τα ψάρια του βένθους (vent fishes) είναι από κατοίκους πολύ μεγάλου βάρους σε ανοιχτό πέλαγος που αντιμετωπίζουν θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους 20 βαθμούς Κελσίου.

Τα ρηχά και θερμά είδη (shallow, warm) είναι από επιφανειακά νερά της Χαβάης με θερμοκρασία 24 βαθμούς Κελσίου.

Τα ρηχά και ψυχρά είδη (shallow, cold) υποδηλώνουν ψάρια που ζουν σε παγωμένο νερό από την επιφάνεια μέχρι τα 2000 μέτρα. Χημικές αναλύσεις εκτελέστηκαν στους 10 βαθμούς Κελσίου.

Τα δεδομένα είναι από τους Gibbs και Somero<sup>19</sup>.

Η άσκηση της πίεσης φαίνεται μέσω των αλλαγών της πυκνότητας. Σύμφωνα με την αρχή του Le Chatelier, καθώς αυξάνεται η πίεση, η πυκνότητα του συστήματος θα μειώνεται. Στις φωσφολιπιδιακές μεμβράνες η αυξημένη υδροστατική πίεση προκαλεί τις καρβοξυλιακές αλυσίδες να συσσωρεύονται. Το πάχος της μεμβράνης γίνεται πραγματικά πιο παχύ<sup>34</sup>, αλλά η συνολική πυκνότητα μειώνεται εξαιτίας πλευρικών συμπίεσεων. Η ρευστότητα της μεμβράνης μειώνεται και σε αρκετά υψηλές πιέσεις η μεμβράνη μετατρέπεται σε μία υγρή κρυστάλλινη-κολλώδη μάζα.



Αυτές οι επιδράσεις καθρεπτίζουν εκείνες των χαμηλών θερμοκρασιών. Όσον αφορά τις ιδιότητες των μεμβρανών μια αύξηση πίεσης 1000 atm έχει το ίδιο αποτέλεσμα με μείωση της θερμοκρασίας της τάξης των 15-30 °C<sup>13,34</sup>. Αυτή η ισοδυναμία πίεσης-θερμοκρασίας ισχύει και για τις δραστηριότητες της Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ΑΤΡάσης<sup>8,16,20</sup> και άλλων ενζύμων των μεμβρανών. Στην πραγματικότητα, αυτή η σχέση άλλωστε θεωρείται επαρκής ένδειξη ότι οι φυσικές ιδιότητες των λιπιδίων καθορίζουν τις ενζυματικές δραστηριότητες.

Αφού οι χαμηλές θερμοκρασίες και οι υψηλές πιέσεις έχουν σχεδόν τις ίδιες επιδράσεις στις φυσικές ιδιότητες των μεμβρανών, κάποιος θα μπορούσε να περιμένει ότι και οι αντιδράσεις εγκλιματισμού των λιπιδίων των μεμβρανών στις υψηλές πιέσεις θα συσχετίζονται με τις αντιδράσεις εγκλιματισμού στις χαμηλές θερμοκρασίες. Αυτές οι μελέτες έχουν εκτελεστεί μόνο με βακτήρια. Όπως αναμενόταν τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε υψηλότερες πιέσεις περιέχουν σχετικά περισσότερα ακόρεστα λιπίδια στις μεμβράνες<sup>14,15,64</sup>. Στα ψάρια, τα είδη που ζουν σε μεγαλύτερα βάθη τείνουν να παρουσιάζουν περισσότερα ακόρεστα λιπίδια στις μεμβράνες τους<sup>2,12,47</sup>. Όπως προβλέφτηκε, αυτές οι μεμβράνες είναι πιο ρευστές σε ατμοσφαιρικές πιέσεις<sup>3,11</sup>. Η ρευστότητα της μεμβράνης μπορεί να επηρεάζεται λιγότερο από την πίεση στα ψάρια που ζουν σε μεγαλύτερα βάθη από ότι στα είδη που ζουν σε ρηχά νερά<sup>3</sup>. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει επιπλέον μηχανισμός που μειώνει τις άμεσες επιδράσεις της αλλαγής πίεσεως στις λειτουργίες της μεμβράνης των ζώων που μπορούν να υφίστανται εκτεταμένη κάθετη μετανάστευση<sup>60</sup>.

Η υψηλή αναλογία πίεσης μιας γραφικής παράστασης Arrhenius είναι ένα διάγραμμα του ln (δραστηριότητας Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> ΑΤΡάσης) έναντι της πίεσης. Αυτά τα διαγράμματα είναι συνήθως μη-ευθύγραμμα και μπορεί καμιά φορά να προκύψουν δύο ίσιες γραμμές. Το σημείο τομής είναι εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία, και βρίσκεται στις υψηλές πιέσεις όταν η θερμοκρασία αυξάνεται. Για τα ένζυμα των θηλαστικών, μία αύξηση θερμοκρασίας 27 βαθμών Κελσίου, αυξάνει την επαπτόμενη πίεση περίπου 1000 Atm<sup>16</sup>.

Αυτό είναι ανάλογο στην ισοδυναμία πίεσης-θερμοκρασίας για πολλές ιδιότητες των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων της αλλαγής φάσης (μορφής), ρευστότητας, πυκνότητας της μεμβράνης και της επιφανειακής μοριακής περιοχής<sup>13,36</sup>. Αυτή η ανάλυση είναι παρόμοια με αυτή που χρησιμοποιείται για τις γραφικές παραστάσεις Arrhenius και ισχύουν οι ίδιοι περιορισμοί (ότι και παραπάνω και αναφορά 30). Μία αλλαγή στην κλίση μπορεί να υπάρξει και οφείλεται στην αλλαγή της δομής της πρωτεΐνης, στις διαφορετικές συμπίεστοότητες των μεταλλαγών και το καθεστώς της χημικής αντίδρασης, ή στην αλλαγή μιας περιοριστικής κλίμακας της αντίδρασης κατά την απουσία της μεταβολής φάσης (μορφής).

Η πίεση που εξαρτάται από την  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάση μπορεί να είναι καμπυλώδης και γίνεται πιο απότομη όσο αυξάνει η πίεση (εικόνα 2, αναφορές 8,19 και 20). Για κάθε αντίδραση, η κλίση μιας τέτοιας γραφικής παράστασης ισοδυναμεί με τον τύπο  $\Delta V^{++} / RT$ , όπου R η σταθερά των αερίων και T η απόλυτη θερμοκρασία. Το  $\Delta V^{++}$  εκφράζει την φαινομενική δραστηκότητα όγκου για την αντίδραση, η οποία είναι η φαινομενική διαφορά όγκου ανάμεσα στην μεταβαλλόμενη και τη φυσιολογική κατάσταση των αντιδραστηρίων. Η αυξημένη κλίση υποδεικνύει την αυξημένη φαινομενική δραστηκότητα του όγκου στις υψηλές πιέσεις. Η λέξη κλειδί σε αυτό το σημείο είναι «φαινομενική». Ούτε η δομή, ούτε οι μηχανισμοί της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάσης είναι αρκετά καλά κατανοητοί για να αποδώσουν μία καθορισμένη βιοχημική βάση στη μέτρηση του  $\Delta V^{++}$ . Παρόλα αυτά, είναι ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι, στις φυσιολογικές πιέσεις, οι  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPάσεις από όλα τα είδη των τελεόστων που μελετήθηκαν εκδηλώνουν παρόμοιες φαινομενικές δραστηκότητες όγκων ( $30-60 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ). Αυτή είναι μία σχετικά μεγάλη  $\Delta V^{++}$  για μία ενζυματική αντίδραση<sup>42</sup>, για παράδειγμα η αντλία νατρίου είναι ένα σχετικά ευαίσθητο στην πίεση ένζυμο και συνεπώς θα περίμενε κανείς να εκδηλωθούν προσαρμοστικές διαφορές.

Οι Gibbs και Somero<sup>19</sup> πρότειναν ένα απλό μοντέλο για να εξηγήσουν τις διαφορές των ιδιοτήτων των  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσεων σε σχέση με το βάθος, αποκλειστικά για τους όρους των προσαρμοστικών αλλαγών στα λιπίδια των μεμβρανών. Η βασική ιδέα αυτού του μοντέλου ήταν για την περιοριστική κλίμακα προόδου για την κατάλυση, ότι το καθεστώς στη γη ήταν σχετικά πιο συμπιεσμένο από το καθεστώς μεταβολών για την χημική αντίδραση (ως εκ τούτου, υπολογίζεται για την αύξηση στην κλίση στις υψηλές πιέσεις), και γι' αυτό η μοριακή βάση για αυτή τη διαφορετική εξάπλωση στη σύσταση των μεμβρανικών λιπιδίων από την αντλία νατρίου. Κάποιος μπορεί να προβλέψει ότι η ομοιομορφική προσαρμογή καταλήγει σε μία παρόμοια κατάσταση φυσικής μεμβράνης σε πιέσεις του φυσικού περιβάλλοντος κάτι που θα έχει επίσης σαν αποτέλεσμα παρόμοιες αλλαγές στις ποσότητες των λιπιδίων σε αυτές τις πιέσεις, αλλά μπορεί να φαίνεται έκπληξη ότι τα λιπίδια των μεμβρανών έχουν ένα τόσο ισχυρό αποτέλεσμα στο ολικό λιπο-πρωτεϊνικό σύστημα. Το συμπέρασμα είναι ότι όσο αυξάνει η πίεση τόσο αυξάνει η συγκέντρωση λιπιδίων επηρεάζοντας το ολικό λιπο-πρωτεϊνικό σύστημα. Τα 50 με 60 φωσφολιπιδικά μόρια που σχηματίζουν ένα πρώτο στρώμα γύρω από το ένζυμο έχουν ολική μοριακή μάζα περίπου 45000 Da, ενώ το γλυκο-πρωτεϊνικό συστατικό του λιπο-πρωτεϊνικού συμπλέγματος  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσης έχει ολική μοριακή μάζα μεγαλύτερη από 160000. Ακόμα και μόρια νερού θα συνεισφέρουν ασήμαντα βέβαια στην ολική συγκέντρωση. Ωστόσο, τα λιπίδια είναι πιο εύκολο να συμπιεστούν από ότι οι πρωτεΐνες. Έτσι οι αλλαγές στη συγκέντρωση της μεμβράνης προκαλούν κατά ένα μεγάλο μέρος αλλαγές στη συγκέντρωση του λιπο-πρωτεϊνικού συστήματος, και επομένως η ομοιομορφική προσαρμογή στην πίεση θα είχε σαν αποτέλεσμα μία εμφανή ενεργοποίηση αυτών των συγκεντρώσεων στις φυσιολογικές πιέσεις.

Η ανάλυση παραπάνω παρουσιάζει πως οι αλλαγές που συμβαίνουν στα λιπίδια των μεμβρανών θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες για τις διαφορετικές απαιτήσεις πίεσης της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης μεταξύ διαφορετικών ειδών, για την αυξημένη ευαισθησία (στην πίεση) όλων των χημικών ενώσεων στις υψηλές πιέσεις και για την προστασία των δραστικών όγκων στις φυσιολογικές πιέσεις. Το μοντέλο των Gibbs και Somero μπορούμε επίσης να επικαλεστούμε για να γίνουν προβλέψεις σχετικά με τη θερμοκρασία – εξάρτησης της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης. Αυτές οι προβλέψεις περιλαμβάνουν : μειωμένους δραστικούς όγκους (π.χ. μειωμένη ευαισθησία στις πιέσεις) στις υψηλές θερμοκρασίες, μειωμένη θερμοκρασία – εξάρτησης των βαθυ-θαλάσσιων ομολόγων και σημαντική θερμοευαισθησία (αυξημένη φαινομενική δραστική ενέργεια) σε υψηλότερες εκτιμώμενες πιέσεις. Κάθε μία από τις παραπάνω προβλέψεις έχει και πειραματική υποστήριξη<sup>19</sup>. Αυτό το μοντέλο μας παρέχει επίσης μία επεξήγηση για την σχετικά μεγαλύτερη ευαισθησία στην πίεση της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης από θερμο-προσαρμοστικά είδη που ζουν σε ανάλογες πιέσεις φυσικού περιβάλλοντος (εικόνα 2) ; μειωμένη ρευστότητα μεμβράνης σχετίζεται με υψηλότερη θερμοκρασία φυσικού περιβάλλοντος η οποία θα είχε σαν αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην πίεση των ενζύμων των θερμο-προσαρμοστικών ειδών. Έτσι εξηγούνται οι διαφορές στις μεμβράνες των ζώων που ζουν σε ψυχρά νερά και αυτών που ζουν σε θερμά νερά.

Ένα ισοδύναμο λογικό μοντέλο θα μπορούσε επίσης να προταθεί για να εξηγήσει αυτές τις παρατηρήσεις αποκλειστικά με όρους των πρωτεϊνικών διαφορών. Αυτό που χρειάζεται είναι μια πιο ολοκληρωμένη απόδειξη για το ρόλο της ομοιομορφικής προσαρμογής στην προσαρμογή της πίεσης της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης. Μια μεθοδολογία έχει γίνει για τις αλλαγές στη ρευστότητα των μεμβρανών και ψάχνει τις διαφορές που σχετίζονται με τη δραστηριότητα της  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης. Μια αύξηση 15-25<sup>0</sup>C στη θερμοκρασία μπορεί να αντισταθμίσει τις επιδράσεις πίεσης 1000 atm στη δραστηριότητα των  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ΑΤΡάσης<sup>8,16,20</sup>. Παρόμοιες είναι και οι επιδράσεις στη ρευστότητα της μεμβράνης από αλλαγές πίεσης και θερμοκρασίας.

Στην πραγματικότητα ταυτόχρονες αλλαγές στη θερμοκρασία και την πίεση η οποία προφυλάσσει την αδιάκοπη ρευστότητα της μεμβράνης επίσης έχει να κάνει με τη συνεχή δραστηριότητα της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσης<sup>16,20</sup>. Αυτή η συσχέτιση ανάμεσα στη ρευστότητα και τη δραστηριότητα της αντλίας νατρίου υποστηρίζει την άποψη ότι οι ενζυματικές λειτουργίες εξαρτώνται από το περιβάλλον της μεμβράνης αλλά κάποιος θα μπορούσε να υποστηρίξει ότι η ρευστότητα και η ενζυματική δραστηριότητα είναι συμπτωματική σε παρόμοιες σχέσεις πίεσης-θερμοκρασίας.

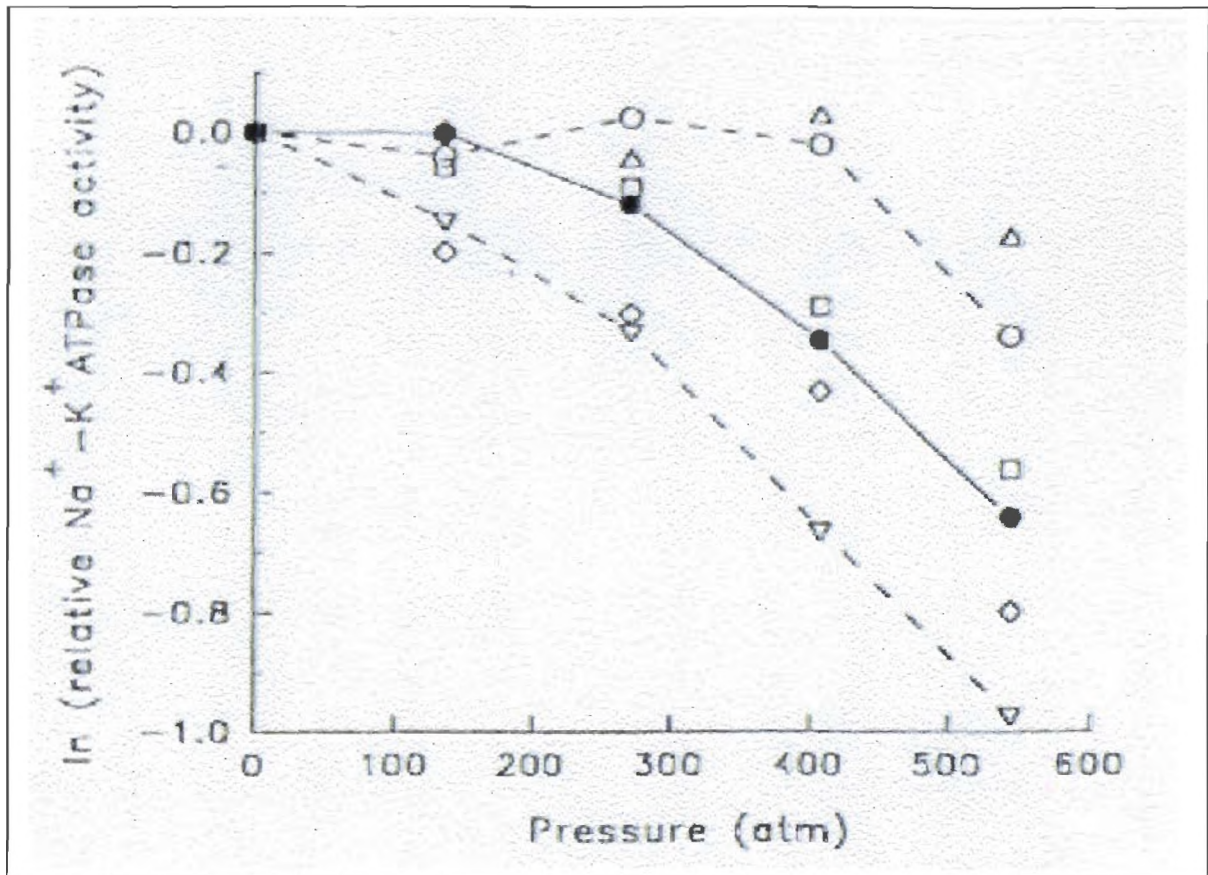
Οι χειρισμοί στο περιβάλλον της μεμβράνης παρέχουν καλύτερο τρόπο εκτίμησης των επιδράσεων εξαιτίας λειτουργιών των ενζύμων. Οι Gibbs και Somero το κάνανε αυτό αποσπώντας μεμβράνες από τα ψάρια με καθαρισμό και διαλυτοποίηση των περισσότερο ενδογενών λιπιδίων και αντικαθιστώντας τα με φωσφολιπίδια διαφορετικής σύνθεσης<sup>20</sup>. Τα αντικατεστημένα φωσφολιπίδια απομονώθηκαν από διάφορα είδη, που διέφεραν στη θερμοκρασία σώματος και στην αντοχή της πίεσης που επικρατεί στο περιβάλλον που κατοικούν (Πίνακας 2). Η προβλεπόμενη σειρά ως προς τη ρευστότητα για αυτά τα λιπίδια είναι : λεκιθίνη αυγού κοτόπουλου < barracuda (σφύραινα) < sablefish < rattail. Η εικόνα 3 απεικονίζει τις επιδράσεις της παραπάνω αντικατάστασης (λιπιδίων) πάνω στη  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάση από το βαθυ-θαλάσσιο είδος *Coryphaenoides armatus*, το οποίο εμφανίζεται σε βάθη 1800 – 4800 μέτρα. Οι αλλαγές στην εξαρτώμενη πίεση ήταν γενικά οι αναμενόμενες. Το ένζυμο επηρεαζόταν λιγότερο από την πίεση σε πιο ρευστά λιπιδικά περιβάλλοντα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας τη σφύραινα *Sphyræna barracuda*, που ζει στα ρηχά και θερμά νερά, ως μία πηγή για τη  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάση<sup>20</sup>. Δύο είναι τα συμπεράσματα που ξαφνιάζουν και χρειάζεται να καταγραφούν. Πρώτον, η αντικατάσταση λιπιδίων με φωσφολιπίδια του ίδιου είδους έκαναν το ένζυμο λιγότερο ευαίσθητα στις πιέσεις. Η αντικατάσταση με μείγμα φωσφολιπιδίου και χοληστερίνης μείωσαν αυτή τη διαφορά (εικόνα 3). Αυτό οφείλεται στην ιδιότητα της χοληστερίνης να μειώνει τη ρευστότητα της μεμβράνης<sup>24</sup>, αλλά ο ρόλος της χοληστερίνης για την ομοιομορφική προσαρμογή στην πίεση δεν έχει ακόμα πλήρως επιβεβαιωθεί.

Δεύτερον, τα φωσφολιπίδια από είδη που ζουν σε ψυχρά νερά διαφορετικών πιέσεων είχαν παρόμοιες επιδράσεις στη  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάση. Τα συλλεγόμενα βάρη των ειδών που μελετήθηκαν (*Anoploma fimbria*, *Coryphaenoides armatus*) διαφέρουν μόνο κατά 1500 μέτρα, όσο ισοδύναμα επηρεάζονται οι ιδιότητες των μεμβρανών σε μεταβολή θερμοκρασίας κατά λιγότερο από 5 βαθμούς Κελσίου. Οι διαφορές στη σύσταση των λιπιδίων που σχετίζονται με τη θερμοκρασία είχαν μεγάλη επίδραση στις απαιτήσεις πίεσης της αντλίας νατρίου. Γενικά, αυτά τα πειράματα δεν αποδεικνύουν ότι η ομοιομορφική προσαρμογή είναι υπεύθυνη για την προσαρμογή πίεσης της  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσης, αλλά δείχνουν ότι το περιβάλλον των λιπιδίων της μεμβράνης επηρεάζει σημαντικά την αντοχή των ενζύμων στην πίεση.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Πηγές φωσφολιπιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα μετατροπής λιπιδίων όπως δείχνονται στις εικόνες 3 και 4

<u>ΕΙΔΟΣ</u>	<u>ΖΩΝΗ ΒΑΘΟΥΣ</u>	<u>ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΦΥΣΙΚΗΣ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ (°C)</u>
<i>Coryphaenoides armatus</i> (rattail)	1800 – 4800	2 – 4
<i>Anoploma fimbria</i> (sablefish)	0 – 1600	4 – 10
<i>Sphyraena barracuda</i> (barracuda)	0 – 30	24
Λεκιθίνη αυγού κοτόπουλου	0	38

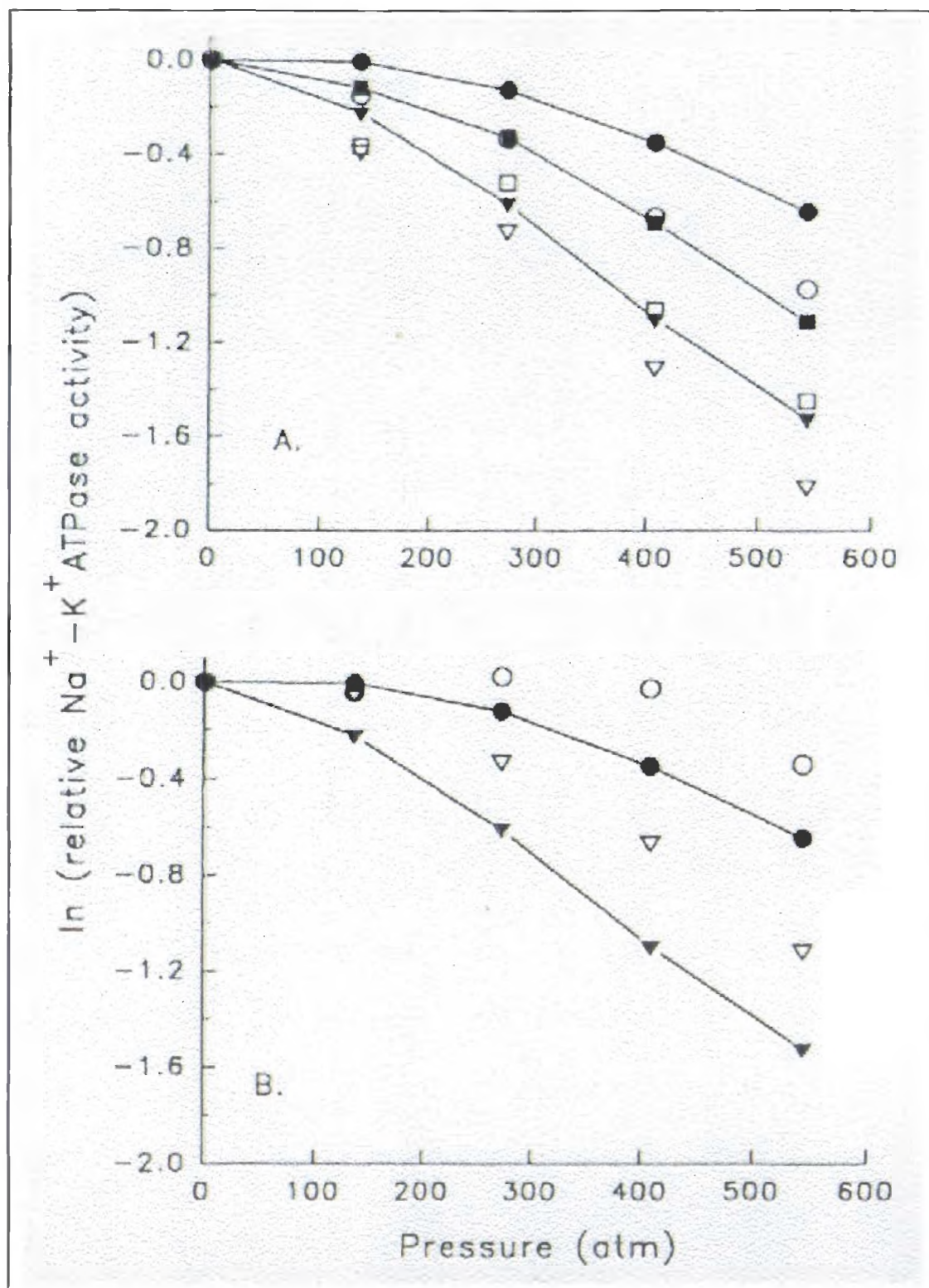


**ΕΙΚΟΝΑ 3.** Αποτελέσματα της αντικατάστασης λιπιδίων στη  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάση από βαθύβιο γρεναδιέρο *Coryphaenoides armatus*. Η πίεση εξαρτάται από την δραστικότητα της αντλίας νατρίου στο φυσικό λιποειδές περιβάλλον που δείχνεται από τους πλήρη κύκλους. Πηγές για την αντικατάσταση λιπιδίων ήταν :

(○) *C. armatus* (△) *Anoploporoma fimbria* (◇) *Sphyræna barracuda* (▽) Λεκιθίνη αυγού κοτόπουλου (□) 1 : 1 μείγμα χοληστερίνης και φωσφολιπιδίων *A. fimbria*.

Η διακεκομμένη γραμμή δίνεται για περισσότερη καθαρότητα. Χημικές αναλύσεις εκτελέστηκαν στους 17,5 βαθμούς Κελσίου. Τα δεδομένα προέρχονται από τους Gibbs και Somero<sup>20</sup> (και από αδημοσίευτα δεδομένα).





**ΕΙΚΟΝΑ 4.** Αποτελέσματα αντικατάστασης λιπιδίων πάνω στις  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσες από διαφορετικά είδη ψαριών. Τα γεμάτα σύμβολα υποδηλώνουν αντιδράσεις πίεσης από φυσική πρωτεΐνη, τα άδεια σύμβολα υποδηλώνουν αντιδράσεις πίεσης από αντικατάσταση των ακολουθούμενων λιπιδίων.

(Α) Λεκιθίνη αλγού κοτόπουλου ανταλλάχθηκαν πάνω στις  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσες από (●, ○) *Coryphaenoides armatus*, (■, □) *Anoploma fimbria*, και (▼, ▽) *Sphryaena barracuda*. (Β) Φωσφολιπίδια από βράγχια *C. armatus* ανταλλάχθηκαν πάνω στις  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ΑΤΡάσες από *C. armatus* και *S. barracuda*. Η διακεκομμένη γραμμή δίνεται για περισσότερη καθαρότητα. Χημικές αναλύσεις εκτελέστηκαν στους 17,5 βαθμούς Κελσίου. Τα δεδομένα προέρχονται από τους Gibbs και Somero<sup>20</sup>.



Τι γίνεται όμως όταν τα ίδια λιπίδια αντικατασταθούν στην αντλία νατρίου από διαφορετικές πηγές ; Οι αντικαταστάσεις των ατόφιων λιπιδίων τις μεμβράνης με λεκιθίνη από αυγό κοτόπουλου, η οποία διαποτίζεται περισσότερο και είναι λιγότερο ρευστή (είναι περισσότερο κορεσμένη), αυξάνει την ευαισθησία της πίεσης της  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ΑΤΡάσης ψάρια που ζουν και στα βαθιά και στα ρηχά νερά (Εικόνα 4Α). Οι αντικαταστάσεις με φωσφολιπίδια από τα βαθυ-θαλάσσια είδη *C. armatus* που απομονώθηκαν, είχαν σαν αποτέλεσμα την υποβαθμισμένη ευαισθησία στην πίεση για κάθε ένα από το ομόλογα της αντλίας νατρίου (Εικόνα 4Β), όπως προβλέπεται από την ομοιομορφική ερμηνεία της προσαρμογής στην πίεση. Όλα τα ομόλογα των ενζύμων παρουσιάζουν αλλαγές, προς την προβλεπόμενη πορεία, αλλά επισημαίνονται διαφορές στην ευαισθησία στην πίεση μεταξύ διαφορετικών ειδών. Από αυτά τα ευρήματα υποδεικνύεται μία διαφορά στην δομή της  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ΑΤΡάσης. Χωρίς να αποτελεί έκπληξη, η προσαρμογή της αντλίας νατρίου σε υψηλές πιέσεις φαίνεται να αφορά αλλαγές στα ένζυμα όπως και στο λιπιδιακό τους περιβάλλον.

## V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ομοιομορφική (homeoviscous) θεωρία υποστηρίζει ότι οι αλλαγές στη ρευστότητα της μεμβράνης αποτελούν το πιο σημαντικό στοιχείο στην προσαρμοστικότητα των οργανισμών και στον εγκλιματισμό στη θερμοκρασία και την πίεση. Η αντλία νατρίου είναι ένα ιδανικό ένζυμο για να εξεταστεί αυτή η θεωρία. Αυτή είναι μία ουσιώδης πρωτεϊνική μεμβράνη με μία κριτικά σημαντική φυσιολογική λειτουργία. Ένα μεγάλο μέρος των αποδείξεων υποστηρίζεται από την ομοιομορφική (homeoviscous) ερμηνεία για την περίπτωση του θερμικού εγκλιματισμού, παρόλο που πολλές από τις αποδείξεις είναι σχετικές με τη φύση. Οι αλλαγές στα σύστατικά των λιπιδίων επηρεάζουν τις ιδιότητες των ενζύμων εργαστηριακά και η δραστηριότητα της  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ΑΤΡάσης εν ζωή σχετίζεται με τη ρευστότητα της μεμβράνης.

Το θέμα για τους ομοιομορφικούς (homeoviscous) μηχανισμούς της προσαρμογής της πίεσης της  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPάσης επίσης στηρίζονται ισχυρά στις συσχετίσεις ανάμεσα στην ενζυματική δραστηριότητα και τη ρευστότητα της μεμβράνης. Πιθανόν η καλύτερη απόδειξη για το ρόλο της μεμβράνης στη προσαρμογή στην πίεση και τη θερμοκρασία προέρχεται από πειράματα στα οποία η ρευστότητα έχει εργαστηριακά χειριστεί, με επακόλουθες επιδράσεις στην ενζυματική δραστηριότητα παρόμοιες με αυτές που σχετίζονται με τις εν ζώή διαφορές ρευστότητας. Τουλάχιστον, σε βιοχημικό επίπεδο η παραπάνω θεωρία λειτουργεί σωστά για αυτά τα ένζυμα. Αυτό που ακόμα απαιτείται είναι απόδειξη σε επίπεδο οργανισμών, για παράδειγμα μία ευθεία απόδειξη ότι οι αλλαγές στη ρευστότητα της μεμβράνης παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της αντλίας νατρίου εν ζώή.

Πολλά άλλα ενδιαφέροντα ερωτήματα απομένουν να απαντηθούν όσον αφορά τη  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPάση και το περιβάλλον. Τα ψάρια που ζουν σε πολύ μεγάλα βάθη (χιλιάδες μέτρα) μπορούν να εγκλιματιστούν στην πίεση ; Ποια είναι η φύση των διαφορών που σχετίζονται με το βάθος στη δομή των ενζύμων ; Υπάρχουν παρόμοιες θερμο-προστατευτικές διαφορές στη δομή της  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPάσης ; Ποιες είναι με τον καιρό οι αντιδράσεις εγκλιματισμού ; Πως μπορούν οι αντιδράσεις εγκλιματισμού να διαφέρουν ανάμεσα στα είδη και ιστούς, τι είναι οι φυσιολογικές συνέπειες, και πως και γιατί αυτές οι διαφορές εξελίσσονται ; Το θέμα είναι ότι δεν πρέπει να περιορισθούμε στους μηχανισμούς των  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPάσεων και πρέπει να προσπαθήσουμε να εξηγήσουμε πολλές άλλες ομοιοστατικές διαδικασίες.



1871

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

# ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΟΞΙΝΟΥ ΝΕΡΟΥ ΣΤΑ ΒΡΑΧΙΑ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε μία πρόσφατη μελέτη, ο Kelso και οι συνεργάτες του<sup>24</sup>, αναφέρουν λεπτομερώς την επίδραση της ατμοσφαιρικής όξινης απόθεσης στα ψάρια και στα αποθέματα αλιείας του Καναδά. Οι μαρτυρίες που παρουσίαζαν την άποψη ότι η όξινηση του υδάτινου συστήματος καταλήγει στην απώλεια ειδών ψαριών, αναπτύχθηκαν στις αρχές του 1950 και κορυφώθηκαν στις αρχές του 1970. Η μελέτη επιπλέον υποδεικνύει ότι το 38 % όλων των Καναδικών λιμνών είναι περιοχές ευπαθείς στην όξινη ατμοσφαιρική εναπόθεση. Ενώ η απώλεια διαφόρων ειδών ψαριών ήταν υπό την ανησυχία της κυβέρνησης και της επιστημονικής κοινότητας, η διερεύνηση κάτω από την βιολογική ανάμειξη και το ενδεχόμενο αποκατάστασης του αποθέματος των ψαριών επιβαρύνονταν οικονομικά σημαντικά - Κατά προσέγγιση 5 δις δολάρια (1987) ή αυστηρά το 1% του ακαθάριστου εθνικού προϊόντος του Καναδά<sup>50</sup>. Συνεπώς δεν ήταν έκπληξη ότι η περιβαλλοντική οξίνιση ή « όξινη βροχή » έγινε θέμα σπουδαιότερης έρευνας από ερευνητές ψαριών κατά τη διάρκεια του τέλους του 1970 και αρχές του 1980.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης δεν ήταν να εξαντλήσει λεπτομερώς τη φυσιολογική επίδραση του περιβαλλοντικού όξινου στρες πάνω στα ψάρια καθώς υπάρχουν πρόσφατες πολυάριθμες άριστες εκδόσεις, οι οποίες αναγράφουν αυτό το θέμα<sup>7,16,17,19,20,28,31,33,44,54,60-63</sup>. Παρόλ' αυτά οι βελτιώσεις των πρόσφατων ετών έχουν συμβάλει στην κατανόηση αυτού του προβλήματος, ενώ ταυτόχρονα είναι αξιόλογες συζήτησης. Δηλαδή συγκεκριμένα : (i) τους μηχανισμούς από τους οποίους η περιβαλλοντική οξίνιση εξασθενεί την ομοιόσταση των ηλεκτρολυτών, (ii) τις μορφολογικές επιδράσεις της χρόνιας θανάσιμης έκθεσης σε χαμηλό pH και (iii) την ικανότητα / ανικανότητα των ψαριών να αναπτύξουν αυξημένη αντοχή σε μία τέτοια έκθεση.



Επομένως, αυτή η μελέτη θα θίξει αυτά τα αποτελέσματα, ενώ θα γίνει μία συνολική εστίαση στα βράγχια, αφού αυτά τα όργανα έχουν ξεκάθαρα επιβεβαιωθεί σαν η κύρια περιοχή δράσης της περιβαλλοντικής οξίνισης<sup>31,36,51</sup>.

## II. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι απώλειες βραγχιακών ιόντων είναι το επίκεντρο του όξινου τοξικού συνδρόμου στα ψάρια και είναι τυπικά η πρώτη ενόχληση πάνω στην έκθεση σε όξινο νερό (αναφορά McDonald<sup>31</sup>). Ο McDonald και οι συνεργάτες του<sup>33</sup> ανέφεραν μεγάλης έκτασης απώλειες στο προστατευτικό δίχτυ από νάτριο και χλωριούχα άλατα στα βράγχια ενήλικων ατόμων πέστροφας σε έκθεση με pH 4.0 – 4.1 οι οποίες πηγάζουν ταυτόχρονα από την επιβράδυνση της ενεργητικής μεταφοράς και της διέγερσης εκκρινόμενης διάχυσης. (Τα αποτελέσματα έμειναν αμετάβλητα σύμφωνα και με άλλες μελέτες<sup>5,35,40,46</sup>). Το αποτέλεσμα της εξασθενημένης βραγχιακής ηλεκτρολυτικής ομοιόστασης είναι μία ξεκάθαρη ταπείνωση στις πλασματικές ηλεκτρολυτικές συγκεντρώσεις, κυρίως Na<sup>+</sup> και Cl<sup>-</sup>. Πράγματι, έχει προταθεί ότι η θνησιμότητα από χαμηλό pH στην πολύχρωμη πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) προκύπτει όταν καθένα ή μαζί πλάσμα Na<sup>+</sup> και Cl<sup>-</sup> πέφτουν περισσότερο από 30 % χαμηλότερα από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις<sup>60</sup>, και αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το αίτιο θανάτου είναι η κυκλοφοριακή ανεπάρκεια<sup>41,61</sup>.

Δυστυχώς, λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την επίδραση της περιβαλλοντικής οξίνισης στη βραγχιακή βιοχημεία (δηλαδή ένζυμα και μεταβολικά μονοπάτια δεν συσχετίζονται με μεταφορά ιόντων ή όξινη – βασική ομοιόσταση). Ο Mommsen<sup>42</sup> χαρακτήρισε κάποιες πλευρές της βιοχημείας των βραγχιών της πολύχρωμης πέστροφας. Αυτά τα δεδομένα συμπληρώθηκαν με στοιχεία που αποκομήθηκαν από τους Perry και Walsh<sup>47</sup> που χρησιμοποίησαν αιωρηματα κύτταρα βραγχιών που απομονώθηκαν από την τιλάπια που προσαρμόζεται και σε γλυκό και σε θαλασσινό νερό (*Oreochromis mossambicus*) και τον λαγοκέφαλο (*Ospanus beta*).

Και οι δύο έρευνες έδωσαν βασικές πληροφορίες για τον μεταβολισμό των βραγχίων των τελεόστεων, αλλά μέχρι τώρα δεν υπάρχουν ενθαρρυντικές έρευνες για το χαμηλό προκαλούμενο – pH από διαφοροποιήσεις στον μεταβολισμό των βραγχίων. Επομένως, οι Bolis και οι συνεργάτες του<sup>4</sup> έκαναν έρευνες στα μεμβρανικά συστατικά των ιστών των βραγχίων πριν και μετά την έκθεση σε χαμηλό pH. Έτσι, ήταν σε θέση να αποδείξουν ότι η φωσφολιπιδική σύνθεση των ιστών των βραγχίων της πολύχρωμης πέστροφας που εκτέθηκαν σε pH 4,0 και 4.5 για 4 με 5 ημέρες άλλαξε σημαντικά και συνοδεύτηκε από αξιοσημείωτη αύξηση στην επί τοις εκατό σύνθεση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Υποπτεύθηκαν, λοιπόν ότι τέτοιες αλλαγές θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη δομή και τη ρευστότητα των βραγχιακών επιθηλιακών κυττάρων της μεμβράνης και σαν επακόλουθο να τροποποιήσουν τη λειτουργία των βραγχίων. Δυστυχώς, αυτά τα ερωτήματα δεν έχουν ακόμη επιχειρηθεί να απαντηθούν.

### III. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι δύο πιο κοινές αναφερόμενες επιδράσεις της περιβαλλοντικής οξίνισης στη μορφολογία των βραγχίων φαίνεται να είναι, πρώτον, η αυξημένη παραγωγή βλέννας και ο πολλαπλασιασμός των βλεννοκυττάρων και δεύτερον, ο πολλαπλασιασμός και η εμφάνιση μετατροπής των χλωριδιακών κυττάρων. Σε σύγκριση με τη ζημιά που συσχετίζεται από την έκθεση σε μέταλλα (επιθηλιακός αποκλεισμός, σύντηξη ελασμάτων (μεμβράνες από τις οποίες αποτελούνται τα οστά), νέκρωση, επιθηλιακό πρήξιμο και ρήξη ; αναφορά Mallat<sup>30</sup>) οι μεταβολές από τα χαμηλό προκαλούμενο-pH στη μορφολογία των βραγχίων είναι ελάχιστες, εάν όχι ασήμαντες. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές για τη σημαντική βραγχιακή επιθηλιακή ζημιά που σχετίζεται με την έκθεση σε όξινα περιβάλλοντα. Για παράδειγμα οι Daye και Garside<sup>11</sup> κατέγραψαν ότι η ποταμίσια πέστροφα (*Salvelinus fontinalis*), που υποβλήθηκε σε οξύ στρες του pH (pH = 5,2) έδειξε δευτερογενή ελάσματα (μεμβράνες από τις οποίες αποτελούνται τα οστά) των οποίων τα επιθηλιακά κύτταρα χωρίζονταν από μεγάλα μη – ιστώδη κενά.

Επιπλέον, ο Chevalier και οι συνεργάτες του<sup>8</sup> μελέτησαν τους βραγχιακούς ιστούς άγριων πληθυσμών ποταμίσιας πέστροφας που ζούσαν σε όξινα περιβάλλοντα ( $\text{pH} = 5,5$ ) και μη όξινες λίμνες. Τα βράγχια της πέστροφας που ζούσε σε όξινες λίμνες έδειξαν εκτεταμένη επιθηλιακή ζημιά κυρίως διαχωρισμό της επιθηλιακής στοιβάδας από τον ιστό που βρίσκεται κάτω από αυτή, παραμόρφωση δευτερογενών ελασμάτων, και εκφύλιση (αλλοίωση) των χλωριδιακών κυττάρων, τα οποία συνοδεύονται από έντονη υπερπλασία των μη διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων στα πρωταρχικά ελάσματα. Παρόλο που η παρατηρούμενη επιθηλιακή ζημιά είναι όμοια στη φύση και αυστηρά ακριβής με αυτήν που παρατηρείται από την έκθεση σε οξύ  $\text{pH} 5.2$  (αναφορά 11), με εξαίρεση την υπερπλασία των βλενωδών κυττάρων, η συμπτωματική ανύψωση της αργιλώδους συγκέντρωσης στον ιστό περιπλέκει κάθε προσπάθεια για να αποδώθούν οι μορφολογικές αντιδράσεις αποκλειστικά σε υποθανάτια όξινη έκθεση. Τελικά, οι Leino και McCormick<sup>26</sup> έκθεσαν χοντροκέφαλους μικρούς κυπρίνους του γένους *Phoxinus phoxinus* σε  $\text{pH} 5,0$  και για 129 μέρες. Τα βράγχια βρέθηκαν να έχουν υποστεί πολλαπλασιασμό των χλωριδιακών κυττάρων, ειδικά στα δευτερογενή ελάσματα σε πολλά από τα οποία ήταν κάτοχοι κορυφαίων κοιλωμάτων (τροποποίηση μορφολογίας). Από την άλλη μεριά, μία μεταγενέστερη μελέτη του Leino και των συνεργατών του<sup>27</sup> ανέφερε έναν άμεσο συσχετισμό ανάμεσα στον αριθμό των χλωριδιακών κυττάρων, είτε εντοπίζονται στα πρωταρχικά είτε στα δευτερογενή ελάσματα και στο  $\text{pH}$  του ήπιου νερού. Οι χοντροκέφαλοι μικροί κυπρίνοι που εκτέθηκαν σε νερά λίμνης με  $\text{pH} 5.0$  είχαν σαν αποτέλεσμα μία μείωση του αριθμού χλωριδιακών κυττάρων, ενώ τα εναπομείναντα χλωριδιακά κύτταρα εμφανίστηκαν κατεστραμένα.

Τυπικά, όμως, μικρή ή καθόλου ζημιά των βραγχίων είχε αναφερθεί παρόλες τις μετατροπές στον αριθμό των χλωριδιακών κυττάρων και στις κατανομές που παρατηρήθηκαν, όπως απεικονίζονται στις παρακάτω μελέτες. Ο Laurent και ο Perry<sup>25</sup> έκθεσαν την πολύχρωμη πέστροφα σε οξίνιση (pH 5.5 για μία εβδομάδα). Σε πόσιμα νερά του Στρασβούργου παρατηρήθηκαν αφύσικα μεγάλοι αριθμοί βλενωδών κυττάρων που παρουσιάστηκαν μαζί στην άκρη και στα χείλη του νηματοειδούς επιθηλίου, μία αντίδραση που είχε προηγούμενα παρατηρηθεί στην πολύχρωμη πέστροφα αλλά σε χαμηλότερο pH (αναφορά 11). Ωστόσο, οι Laurent και Perry με έμφαση στα βραγχιακά χλωριδιακά κύτταρα, εισηγήθηκαν ότι η οξύτητα από μόνη της ήταν ανεπαρκής για να προκαλέσει πολλαπλασιασμό των χλωριδιακών κυττάρων, αν και ερεθισμός των προ-υπάρχοντων χλωριδιακών κυττάρων ήταν πιθανός. Αυτοί οι ερευνητές εξέθεσαν την πολύχρωμη πέστροφα σε pH 5,5 και σε νερό φτωχό σε ιόντα (10% πόσιμο νερό, 90% απόσταξη) επιπροσθέτως με αυτές που εκτέθηκαν σε όξινο πόσιμο νερό του Στρασβούργου<sup>25</sup>. Περιέργως, η κορυφαία επιφανειακή περιοχή των ατόμων χλωριδιακών κυττάρων και η κλασματική επιφανειακή περιοχή των ίδιων κυττάρων αυξήθηκαν σημαντικά και οι δύο. Επομένως, ο αριθμός των χλωριδιακών κυττάρων ανά μονάδα περιοχής του νηματοειδούς επιθηλίου αυξήθηκε μόνο σε οξινισμένα νερά φτωχά σε ιόντα. Οι μικρογραφίες μετάδοσης ηλεκτρονίων αυτών των ιστών, φανερώουν «διαρροές» ζεύξεων ανάμεσα σε χλωριδιακά και συμπληρωματικά κύτταρα, εφάμιλλων με αυτά που εμφανίζονται σε ψάρια θαλασσινού νερού, τα οποία μπορούν να διευκολύνουν την παρακυτταρική διάχυση σαν μία αντίδραση στην περιβαλλοντική οξίνιση.

Σε μια μελέτη από τον Mueller και τους συνεργάτες του<sup>43</sup>, εκτέθηκαν νεαρά άτομα πέστροφας γλυκού νερού (*Salvelinus fontinalis*) σε χρόνια (13 μέρες) υποθανάτια οξίνιση (pH 5,2) σε μαλακό νερό και παρατηρήθηκε μικρή ζημιά στη δομή των βραγχίων. Στις 4, 7 και 13 ημέρες της έκθεσης, τα βράγγια είχαν πρωτοπαθή νημάτια με μόνο ελαφριά υπερπλασία των μη διαφοροποιημένων κυττάρων και μερικό πολλαπλασιασμό και υπερτροφία των χλωριδιακών κυττάρων.



Το περισσότερο ξεχωριστό χαρακτηριστικό του δευτερογενούς ελάσματος ήταν μία ανύψωση του επιθηλίου μακριά από το θεμελιώδες έλασμα συνοδευόμενο από μία εισροή λευκοκυττάρων στα λεμφικά διαστήματα. Το στρώμα των επιθηλιακών κυττάρων ήταν κενोटόπιο και εκφυλισμένο.

Οι Karlsson – Norrgren και οι συνεργάτες τους<sup>21</sup> εξέτασαν βράγχια από καφέ πέστροφες (*Salmo trutta*) μετά από πειραματική έκθεση σε pH 5,5 για περισσότερο από 6 εβδομάδες. Η μορφολογία των βραγγίων αυτών των ψαριών πριν και μετά από 3 και 6 εβδομάδες έκθεσης, έδειξαν φυσιολογικά χαρακτηριστικά, για παράδειγμα ενδοελασματικά χλωριδιακά κύτταρα, όμοια διαστήματα στα δευτερογενή ελάσματα με ακέραια κυτταρικά στρώματα και κανένα σημάδι συγχώνευσης ανάμεσα στα συνοριακά ελάσματα. Σε εμφανή σύγκρουση με τα ευρήματα της εργαστηριακής τους μελέτης, αυτή η ομάδα επίσης ανέφερε σημαντικές υπερδομικές ζημιές στα βράγχια των καφέ πεστροφών που πάρθηκαν από περιοχές όξινου – στρες της Σουηδίας. Σε μία βοηθητική μελέτη, οι Karlsson – Norrgren και οι συνεργάτες τους<sup>22</sup>, χρησιμοποίησαν φωτεινή και ηλεκτρονική μικροσκοπική ανάλυση για να διακρίνουν δύο σημαντικούς τύπους ζημιάς των βραγγίων, που χαρακτηρίζονται από υπερπλασία των χλωριδιακών κυττάρων στο δευτερογενές έλασμα του επιθηλίου και μεγένθυση των ενδοκυτταρικών διαστημάτων επίσης στο δευτερογενές έλασμα του επιθηλίου. Παρόλ' αυτά, σε αντίθεση με τα πειράματα του εργαστηρίου αυτά τα ψάρια δειγματολήφθηκαν από καλλιέργειες πέστροφας, το νερό των οποίων περιείχε σημαντικές συγκεντρώσεις αργιλίου (συνολικά 394-516  $\mu\text{g l}^{-1}$ ; ευμετάβλητο, που υπόκειται σε χημική αλλαγή 12-297  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Συνεπώς, η χειροτέρευση της μορφολογίας είναι απίθανο να έχει προκληθεί μόνο από χαμηλό pH και περισσότερο είναι πιθανό να είναι ένα άμεσο λογικό επακόλουθο των αυξημένων συγκεντρώσεων αργιλίου οι οποίες συχνά είναι συνέπειες της οξίνισης στα μαλακά νερά των λιμνών και των ποταμιών (αναφορές 23,53 και 64).

Οι Audet και Wood<sup>3</sup> προσδιόρησαν ποσοτικά τη βραγχιακή μορφολογία καθ' όλη την έκθεση των 81 ημερών της πολύχρωμης πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) σε pH 4,8 μαλακού νερού και ανέφεραν μόνο μικρής σημασίας αλλαγές στη δομή των βραγχίων της. Ο αριθμός των βλεννογόνων κυττάρων που εντοπίστηκε ειδικότερα στα ινίδια των βραγχίων ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν που συγκρατήθηκε μόνο ακολουθώντας την αρχική μείωση του pH του νερού από 6,5 σε 4,0. Σε αντίθεση, ο αριθμός των ελασματικών βλεννογόνων κυττάρων έτεινε να μειωθεί από την ακολουθούμενη έκθεση σε μαλακό νερό με pH 4,0, αν και αυτή η μείωση στη μέτρηση των βλεννογόνων κυττάρων ήταν σημαντική μόνο σε δύο από τις πέντε δειγματοληψίες. Ο αριθμός των χλωριδιακών κυττάρων και η ελασματική υδατο-αιματική απόσταση διάχυσης δεν επηρεάστηκαν από την έκθεση σε χρόνια υποθανάτια όξινη.

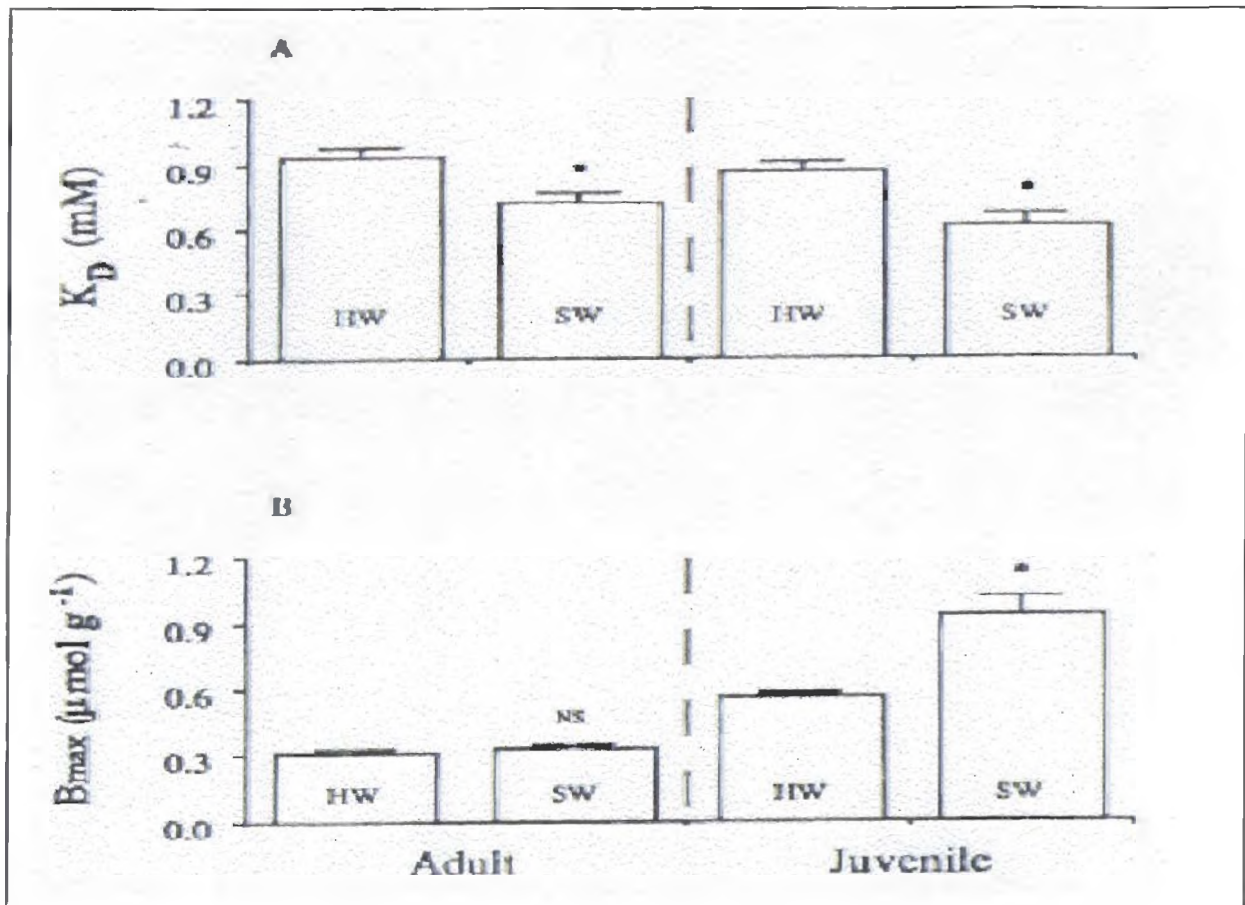
Μαζί, αυτά τα δεδομένα προτείνουν ισχυρά ότι οι μεταβολές στη δομή των βραγχίων είναι αποτέλεσμα της οξείας και/ή τοξικής έκθεσης σε συνθήκες χαμηλού pH και αυτό αλλάζει λίγο ή καθόλου τη μορφολογία που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια χρόνιας, μη προσωρινής υποθανάτιας έκθεσης σε οξύ.

#### IV. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Ο μηχανισμός της δράσης του  $H^+$  στα βράγγια πιστεύεται ότι ενέχεται σε ένα συναγωνισμό ανάμεσα στα  $H^+$  και στα  $Ca^{2+}$  σε περιοχές υπεύθυνες για την προστασία της επιθηλιακής ακεραιότητας. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι οι υποβιβασμοί στο περιβαλλοντικό ασβέστιο επιδεινώνουν την επίδραση του χαμηλού εξωτερικού pH (αναφορές 6,7,16,31-33,61) και αυτά τα διαλύματα χαμηλού pH αυξάνουν σημαντικά το ρυθμό εκροής του δεσμευμένου  $Ca^{+2}$  από (καφέ πέστροφα, *Salmo trutta*<sup>39</sup>), και την δέσμευση  $Ca^{+2}$  μέσω, διαχωρισμού, ακέραιων βραγχίων (πολύχρωμη πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss*<sup>51</sup>). Η αντικατάσταση του ασβεστίου είναι σταθερά βλαβερή για τη σωστή λειτουργία των βραγχίων, καθώς το  $Ca^{+2}$  έχει την ικανότητα για σύζευξη πολυμερών μορίων με

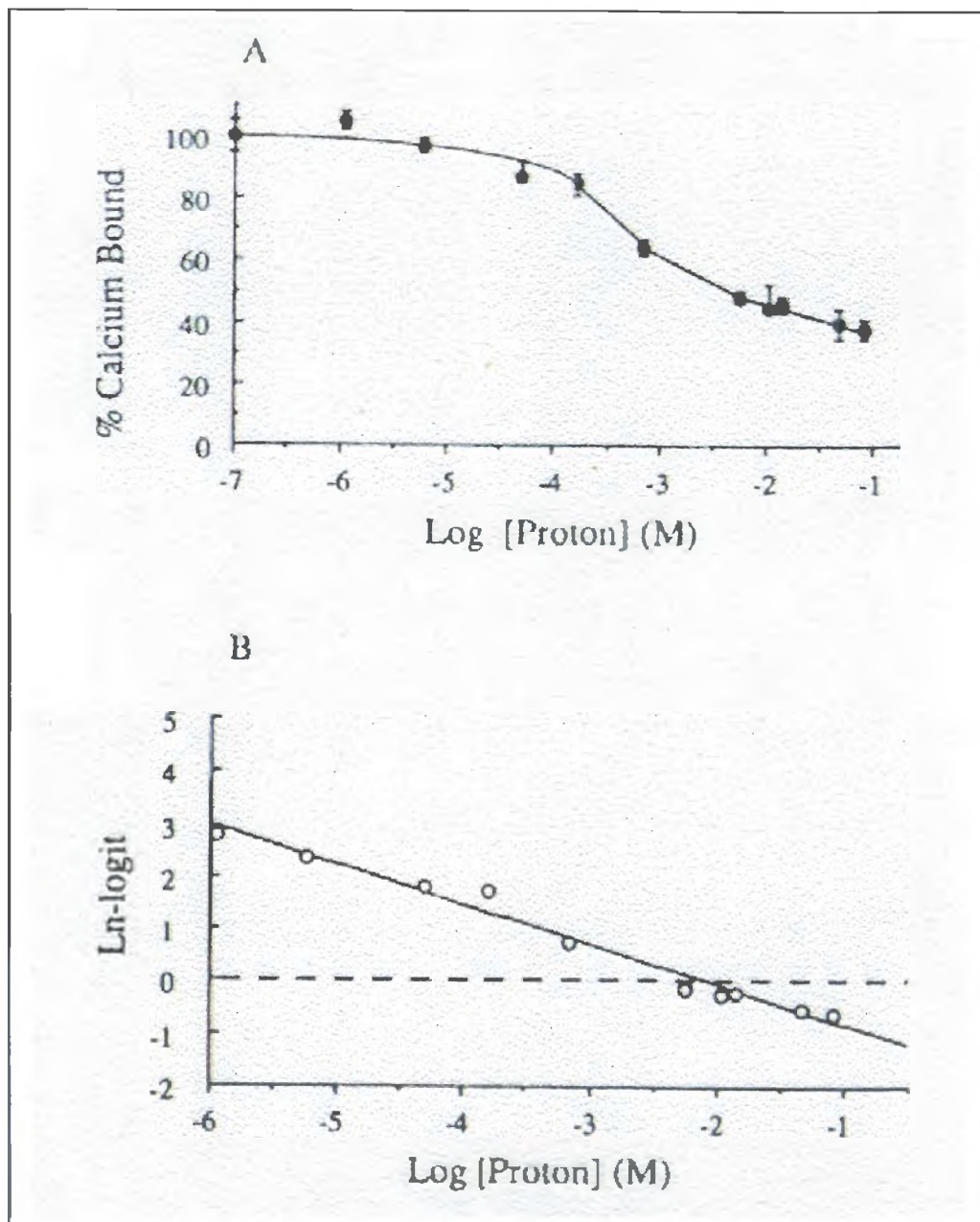
δεσμούς σθένους<sup>57</sup>, το οποίο σταθεροποιεί τη μεμβράνη των βραγχίων και μειώνει την ηλεκτρολυτική διαπερατότητα των βραγχίων<sup>9,34,45,49,55</sup>.

Η εντός του δοκιμαστικού σωλήνα ανάλυση της δραστηριότητας δέσμευσης  $\text{Ca}^{+2}$  (Εικόνα 1Α) προτείνει ότι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (παράδειγμα μία πέστροφα που ζει σε σκληρά νερά να ζει σε σκληρά νερά), περίπου 50 % των βραγχιακών δεσμευτικών περιοχών  $\text{Ca}^{+2}$  ( $\text{Ca}^{+2}$  – «υποδοχείς») ήταν κανονικά κατοικημένοι από  $\text{Ca}^{+2}$ . Ο αριθμός των ελεύθερων «υποδοχέων» αυξανόταν σημαντικά σε περιβάλλοντα χαμηλού  $\text{Ca}^{+2}$  (Εικόνα 1Β), παρόλες τις μεταβολές στον αριθμό των «υποδοχέων» και στη συγγένεια της αντίδρασης σε αυτού του είδους το περιβαλλοντικό στρες. Η επιθηλιακή μεμβράνη, που είχε αρχικά σύνθεση φωσφολιπιδίων (λεικθίνη, κεφαλένη, φωσφορολιπίδια)<sup>4</sup>, είναι καλυμμένη με ένα στρώμα βλέννας, ένα υγρό μίγμα γλυκοζαμινογλυκερίνης (υαλουρονικό οξύ, χονδρο-θειικά άλατα)<sup>14,56,59</sup>. Η δέσμευση του  $\text{Ca}^{+2}$  στην επιφάνεια των βραγχίων πιθανότατα οφείλεται, κατά μεγάλο μέρος, στα θειικά άλατα και στις ομάδες αλάτων καρβοξυλιακού οξέως αυτών των όξινων σακχάρων της βλέννας<sup>56,59</sup> τα οποία έχουν εύρος  $\text{pK}'\text{s}$  από 2,6 έως 4,0 (αναφορά 10). Έτσι, κάτω από κανονικές συνθήκες η εξωτερική επιφάνεια των βραγχίων διακατέχεται από ένα πλέγμα αρνητικής φόρτωσης το οποίο προσελκύει κατιόντα, ειδικά πολλαπλασιαζόμενα φορτισμένα κατιόντα, όπως  $\text{Ca}^{+2}$ . Επι προσθέτως, το βλεννογόνο στρώμα είναι σταθερά ανανεωμένο, με ένα ποσοστό παραγωγής στην αρχική θέση που κυμαίνεται από το μεγαλύτερο  $8.23 \text{ mg h}^{-1} \text{ g σωματικού βάρους}^{-1}$  (αναφορά 11) έως το χαμηλότερο  $0.54 \text{ mg h}^{-1} \text{ g σωματικού βάρους}^{-1}$  (αναφορά 29 ; υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας κατά προσέγγιση  $0.184 \text{ } \mu\text{M NANA}$  ανά γραμμάριο βλέννας<sup>12</sup>), και επομένως η επιφάνεια των βραγχίων υποδηλώνεται φυσιολογικά ως μία πολύ δυναμική περιοχή.



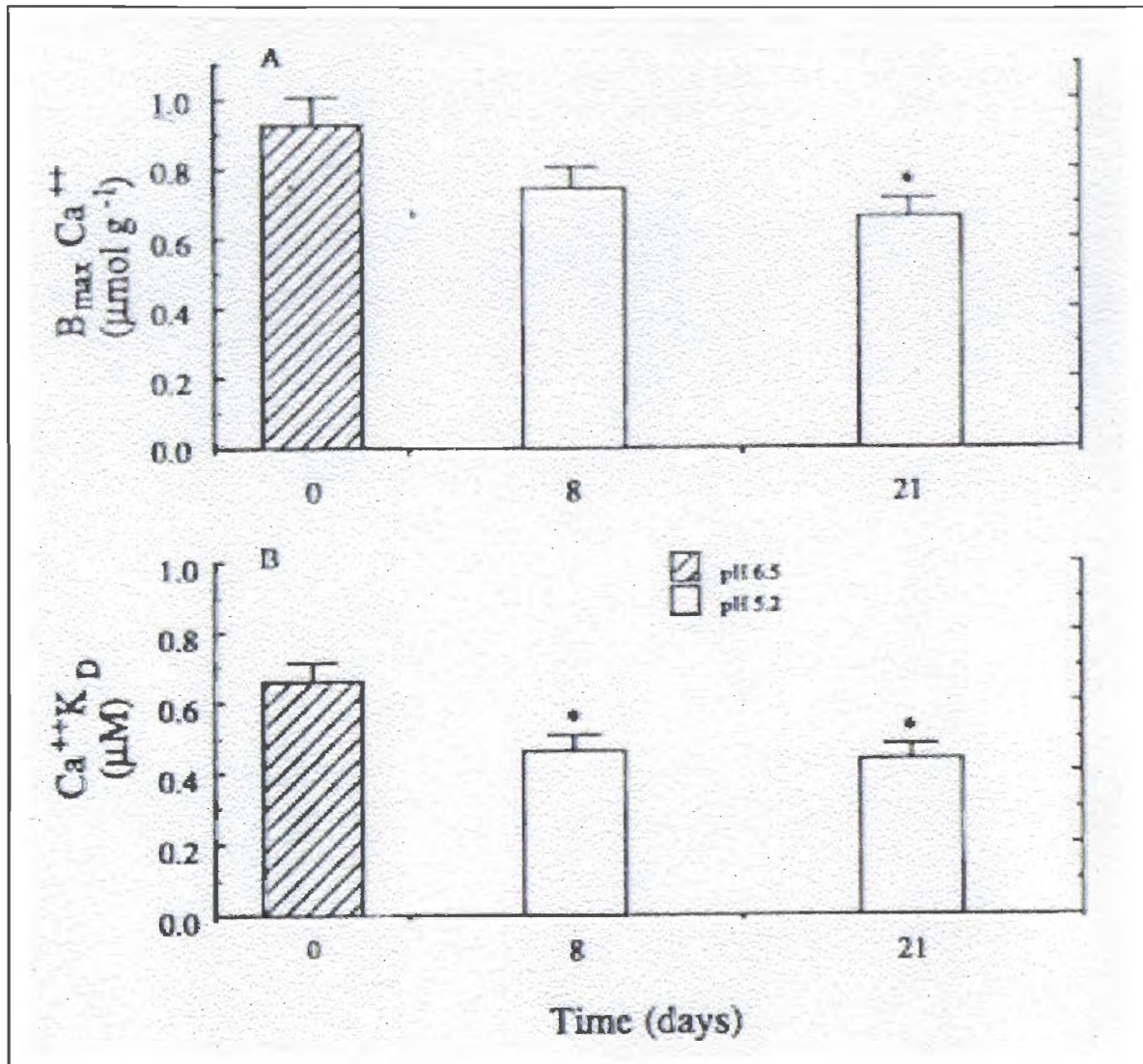
**ΕΙΚΟΝΑ 1.** Μεταβολές στην  $Ca^{2+}$  δεσμευτική δραστηριότητα των βραγχιών που σχετίζονται με τον εγκλιματισμό της πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) σε ήπια νερά. Αυτό το ιστόγραμμα αποικονίζει μία σύγκριση της (A) εμφανής σταθεράς διάστασης ( $K_D$ ), και (B)  $Ca^{2+}$  δεσμευτική χωρητικότητα ( $B_{max}$ ) για τα βράγχια ενήλικης και νεανικής πέστροφας πρώτιστα σε συμπαγή νερά (HW – HardWater) και έπειτα από 4 μήνες σε ήπια νερά (SW – SoftWater). Αυτά τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος  $\pm 1$  SEM από τρεις απαντήσεις κορεσμένων πειραμάτων ( $N = 3$ ). Διαφορές στην  $Ca^{2+}$  δεσμευτική δραστηριότητα, μέσα σε ομάδες ηλικιών, δοκιμάστηκαν χρησιμοποιώντας δύο σειρές εξετάσεων με όριο εμπιστοσύνης 95 %. Η εικόνα σχεδιάστηκε από τον Reid<sup>51</sup>.

Ο Reid<sup>51</sup>, στην πρώτη μελέτη δείχνει μία άμεση ανταγωνιστική παρεμπόδιση των δεσμευμένων κατιόντων ασβεστίου ( $\text{Ca}^{+2}$ ) των βραγχίων από  $\text{H}^+$  και ίχνη μετάλλων, που χαρακτηρίζουν το βαθμό ανταγωνισμού ανάμεσα στα  $\text{H}^+$  και στα  $\text{Ca}^{+2}$  στην εξωτερική επιφάνεια των βραγχίων της πολύχρωμης πέστροφας, χρησιμοποιώντας την τεχνική του δοκιμαστικού σωλήνα. Ήταν παρατηρημένο ότι η αύξηση στη συγκέντρωση  $\text{H}^+$  προκύπτει μέσα από μία προοδευτική επιβράδυνση συσσώρευσης  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  από συγκεκριμένα βράγχια που απομονώθηκαν από πέστροφες εγκλιματισμένες και σε μαλακά και σε σκληρά νερά (Εικόνα 2). Σε pH περίπου 2,1, η ικανότητα της επιφάνειας των βραγχίων να δεσμεύσουν  $\text{Ca}^{+2}$  μειώθηκε κατά 50 % (Εικόνα 3). Σε pH 4,0, η 96 h  $\text{LC}_{50}$ , δέσμευση  $\text{Ca}^{+2}$  περιορίστηκε από ανάμεσα 10 και 20 %. Αυτά τα δεδομένα ξεκάθαρα αποδεικνύουν ότι τέτοιες συνθήκες θα συναντώνται σε οξιτισμένες λίμνες και ποτάμια. Επομένως, δεν είναι δύσκολο να προβλέψουμε ότι η αλληλεπίδραση του  $\text{H}^+$  και του  $\text{Ca}^{+2}$  στην επιφάνεια των βραγχίων, αν και είναι δυνατό να παρατηρηθεί μία μερική υποτίμηση της ακεραιότητας του βραγχιακού επιθηλίου, δεν μπορεί να θεωρηθεί ξεκάθαρα σαν μία σημαντική ζημιά στα βράγχια.



**ΕΙΚΟΝΑ 2.** Ανταγωνιστική επιβράδυνση της δέσμευσης  $\text{Ca}^{+2}$  των βραγχίων. Η ανταγωνιστική επιβράδυνση της καμπύλης (A) κατασκευάστηκε από αποκαλυπτόμενα βράγχια που απομονώθηκαν από ενήλικη πέστροφα που είχε εγκλιματιστεί σε συμπαγή ύδατα (*Oncorhynchus mykiss*), για ακριβώς 300 sec, σε μία από διάφορες συγκεντρώσεις υδρογονοκατιόντων ( $\text{H}^+$ ) σε μία σταθερή συγκέντρωση  $\text{Ca}^{+2}$  (1,33 mM) για να προσδιοριστεί η ικανότητα των ιόντων του υδρογόνου να ανταγωνιστούν με τα  $\text{Ca}^{+2}$  για την επιφάνεια των βραγχίων  $\text{Ca}^{+2}$ -δεσμευτική μεριά. Η καμπύλη ανταγωνιστικής επιβράδυνσης εφάρμοσε τα δεδομένα με το μάτι. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σαν ο μέσος όρος  $\pm 1$  SEM τεσσάρων προσπαθειών (N=4). Η καμπύλη ανταγωνιστικής επιβράδυνσης (B) ευθυγραμμίστηκε για να υπολογίσει την επιβραδυντική συγκέντρωση που καταλήγει σε μία μείωση 50% της μέγιστης δέσμευσης  $\text{Ca}^{+2}$  ( $\text{IC}_{50}$ ). Οι γραμμές εφάρμοσαν τα δεδομένα χρησιμοποιώντας την αρχή των ελαχίστων τετραγώνων και την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Η  $\text{IC}_{50}$  ( $8,17 \pm 0,39$  mM), υπολογίστηκε από την προμηθευόμενη γραμμική παλινδρόμηση, και παριστάνει την διχοτόμηση της γραμμικής παλινδρόμησης με  $\text{ln-logit} = 0$  (διακεκομμένη γραμμή).





**ΕΙΚΟΝΑ 3.** Αλλαγές των δεσμευτικών γνωρισμάτων  $\text{Ca}^{2+}$  που απομονώθηκαν από ένα σύνολο βραγχίων που συγκρίθηκε αρχικά σε  $\text{pH} = 6,5$  και κατά τη διάρκεια εγκλιματισμού περιόδου 21 ημερών σε χαμηλό  $\text{pH}$  ( $\text{pH} = 5,2$ ).  $B_{\max}$  (A) και  $K_D$  (B), προέρχονται από τις καμπύλες συγκέντρωσης κορεσμού κατά την ημέρα 0 (ελέγχου), την ημέρα 8 και την ημέρα 21 της έκθεσης και παρουσιάζονται σαν ο μέσος όρος  $\pm 1$  SEM δύο προσπαθειών ( $N=2$ ). Σημαντικά διαφορετικά δεδομένα, διαμορφώνονται χρησιμοποιώντας ένα διπλής κατεύθυνσης t-test μελετητών με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% που υποδηλώνεται από έναν αστερίσκο για σύγκριση με τον έλεγχο ( $\text{pH} = 6,5$ ).

## V. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΟΞΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Η προσαρμογή σε όξινο νερό είναι μια λειτουργία των ψαριών, «ή ειδικότερα των βραγχίων», που έχει την ικανότητα να αναπτύσσει μία αντίσταση στις βλάβες στην ομοίωση των ηλεκτρολυτών που προκαλεί το οξύ<sup>5,15</sup>. Λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για την ανάπτυξη της αντοχής ή για τον εγκλιματισμό της βραγχιακής λειτουργίας στην έκθεση σε διαρκές χαμηλό pH. Παρόλ'αυτά, φαίνεται ότι ορισμένα είδη ψαριών είναι ανεκτικά στο οξύ, εξαιτίας των ειδικών χαρακτηριστικών των βραγχίων, ενώ για παρόμοιους λόγους κάποια άλλα είδη δεν έχουν αυτήν την αντοχή. Επιπλέον, γίνεται ολοένα και περισσότερο εμφανές, ότι αυτά τα είδη ψαριών που είναι ευαίσθητα στην έκθεση σε οξύ ή μη ανεκτικά στο οξύ, στερούνται την ικανότητα να αναπτύξουν κάποιες αντοχές σε χρόνια έκθεση σε χαμηλό pH.

### 1. Είδη ανθεκτικά στα οξέα.

Είναι προφανές από μία ποικιλία μελετών ότι υπάρχουν τέτοια είδη-ειδικά στο πεδίο αντοχής στο οξύ. Για παράδειγμα, ο Leino και οι συνεργάτες του<sup>27</sup>, παρατήρησαν αξιοσημείωτη ζημιά των χλωριδιακών κυττάρων στους χοντροκέφαλους μικρούς κυπρίνους του γένους *Phoxinus phoxinus* (*Pimephales* sp.) που ήταν εκτεθειμένα σε μαλακά νερά με pH 5.0 και ακόμα καθόλου ανώμαλη μορφολογία των χλωριδιακών κυττάρων δεν ήταν προφανής στην κίτρινη πέρκα (*Perca flavescens*) που ήταν εκτεθειμένη επίσης σε μαλακά νερά τόσο οξινισμένα όσο αντιστοιχεί σε pH 4.1. Ο Peterson και οι συνεργάτες του<sup>48</sup> εκτίμησαν κατά προσέγγιση τα όρια αποφυγής χαμηλού pH για μία ποικιλία ειδών ψαριών (4.1 : κίτρινη πέρκα (yellow perch), 4.5 : λευκή βδέλα (*Catostomus commersoni*), 4.7 : ποταμίσια είδη του γένους *Salvelinus*, 5.1 : ραβδωτά ψάρια του ρεύματος (*Fundulus diaphanus*), 5.2 : αρκτικά είδη του γένους *Salvelinus* (*Salvelinus alpinus*), 5.4 : κοινό σκουμπρί (*Notemigonus crysoleucas*) και ο λευκίσκος (*Rhinichthys atratulus*), 5.5 : ο γαστερόστεος (*Gasterosteus aculeatus*), 5.7 : ο λευκίσκος του ρυακιού



(*Semotilus atromaculatus*), 5.9 : πολύχρωμη πέστροφα) και ανέφεραν ότι αυτά τα όρια ήταν σε γενικές γραμμές παρόμοια με τα επίπεδα pH που οριοθετούνται κατά τη φυσική κατανομή αυτών των ειδών. Ο McDonald και άλλοι<sup>36</sup> ταξινόμησαν την αντοχή στο οξύ ορισμένων ειδών ψαριών βασιζόμενοι στην καταμέτρηση απώλειας ιόντων σε pH 3.25 και 4.0. Τα είδη, με ελλατούμενη σειρά στην αντοχή στο οξύ συγκροτήθηκαν ως εξής : αστερίας (sunfish), κίτρινη πέρκα (yellow perch), η μικρόστομη θαλάσσια πέρκα (smallmouth bass, *Micropterus salmoides*), πολύχρωμη πέστροφα (rainbow trout) και το κοινό σκουμπρί (common shiner). Αυτοί οι συγγραφείς<sup>36</sup> παρατήρησαν ότι οι μετρήσεις που έκαναν για την αντοχή στο οξύ δεν συσχετιζόνταν η κάθε μία με τις φυσικές διαστάσεις των βραγχίων (περιοχή επιφάνειας, ελασματική πυκνότητα, απόσταση διάχυσης) ή με το βαθμό βλέννας της επιφάνειας. Ωστόσο, ήταν σε θέση να αποδείξουν μία αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στην πυκνότητα των γλωριδιακών κυττάρων και στην αντοχή στο χαμηλό pH και έτσι, συμφώνησαν ότι η πυκνότητα των γλωριδιακών κυττάρων είναι ενδεικτική της διαπερατότητας των βραγχιικών ιόντων. Περισσότερο σημαντικό είναι ότι αυτά τα δεδομένα έμμεσα υποδεικνύουν ότι η αντοχή στο οξύ είναι άμεσα εξαρτώμενη πάνω στη «διαρροή» του βραγχιικού επιθηλίου και έτσι φτάνουμε στο αποκορύφωμα που είναι η σημασία της βραγχιικής στενής σύζευξης στη διαφύλαξη της ηλεκτρολυτικής ομοιόστασης κάτω από φυσιολογικές και οριακές περιβαλλοντικές συνθήκες.

## 2. Είδη ευαισθητα στα οξέα

Ο εγκλιματισμός των σαλμονοειδών σε οξιτισμένο περιβάλλον έχει γίνει αντικείμενο σημαντικού ενδιαφέροντος εξαιτίας της οικονομικής τους σημασίας και της ευπάθειάς τους στα πρωτόνια. Μελέτες έχουν δείξει ότι η καφέ πέστροφα που προέρχεται από φυσικό όξινο μαλακό νερό είναι φυσιολογικά πιο ανθεκτική σε έκθεση οξέων σε σχέση με ψάρια από περιβάλλον μεγαλύτερου pH<sup>6,37,38</sup>. Ωστόσο, πρέπει να γίνει ακόμα αποδεκτό κατά πόσο αυτές οι πέστροφες ήταν μη ανεκτικές στο οξύ και «εγκλιματίστηκαν» στο περιβάλλον τους κάτω από πιέσεις (φυσική επιλογή) ή ήταν γενετικά πιο ανθεκτικές στο οξύ από άλλες γενιές της καφέ πέστροφας.

Οι πιο λεπτομερείς έρευνες σε αυτό το συγκεκριμένο ερώτημα δείχνουν ότι οι πέστροφες είναι πράγματι ανίκανες να «εγκλιματιστούν» σε όξινο περιβάλλον και αυτή η προηγούμενη έκθεση σε χαμηλό pH δεν συνεπάγεται αυξημένη αντοχή σε μεταγενέστερη όξινη έκθεση. Ο Audet και οι συνεργάτες του<sup>1</sup> διεξήγαγαν χρόνια υποθανάτια έκθεση σε οξύ για να χαρακτηρίσουν τη φύση της φυσιολογικής σύγχυσης ή ανησυχίας που προκύπτει και τις σύγκριναν με τις φυσιολογικές συνέπειες της βραχυπρόθεσμης θανάτιας έκθεσης. Ενήλικες πολύχρωμες πέστροφες, που είχαν εγκλιματιστεί σε μαλακό νερό, εκτέθηκαν σε μαλακό νερό με pH 4.8 για τρεις μήνες ( $Ca^{+2} = 50, Na^{+} = 50, Cl^{-} = 100$  mequiv  $l^{-1}$ ). Η φύση της προκαλούμενης φυσιολογικής ενόχλησης ήταν παρόμοια με αυτή της έντονης έκθεσης σε χαμηλό pH, δηλαδή αυξημένη απώλεια ηλεκτρολυτών εξαιτίας της ενεργής στήλης και της διέγερσης των αδρανών ζημιών, επακόλουθη μείωση στο πλάσμα  $Na^{+}$ ,  $Cl^{-}$ , αύξηση της πρωτεΐνης του πλάσματος και της συγκέντρωσης γλυκόζης. Παρόλα αυτά, αν και επέστρεψαν στα επίπεδα ελέγχου οι παράμετροι του πλάσματος μετά από την 30η έως τη 52η ημέρα της έκθεσης, εκείνη την ώρα καθιερώθηκε νέο ακλόνητο καθεστώς συγκεντρώσεων, σημαντικά διαφορετικό από αυτό του επιπέδου ελέγχου.

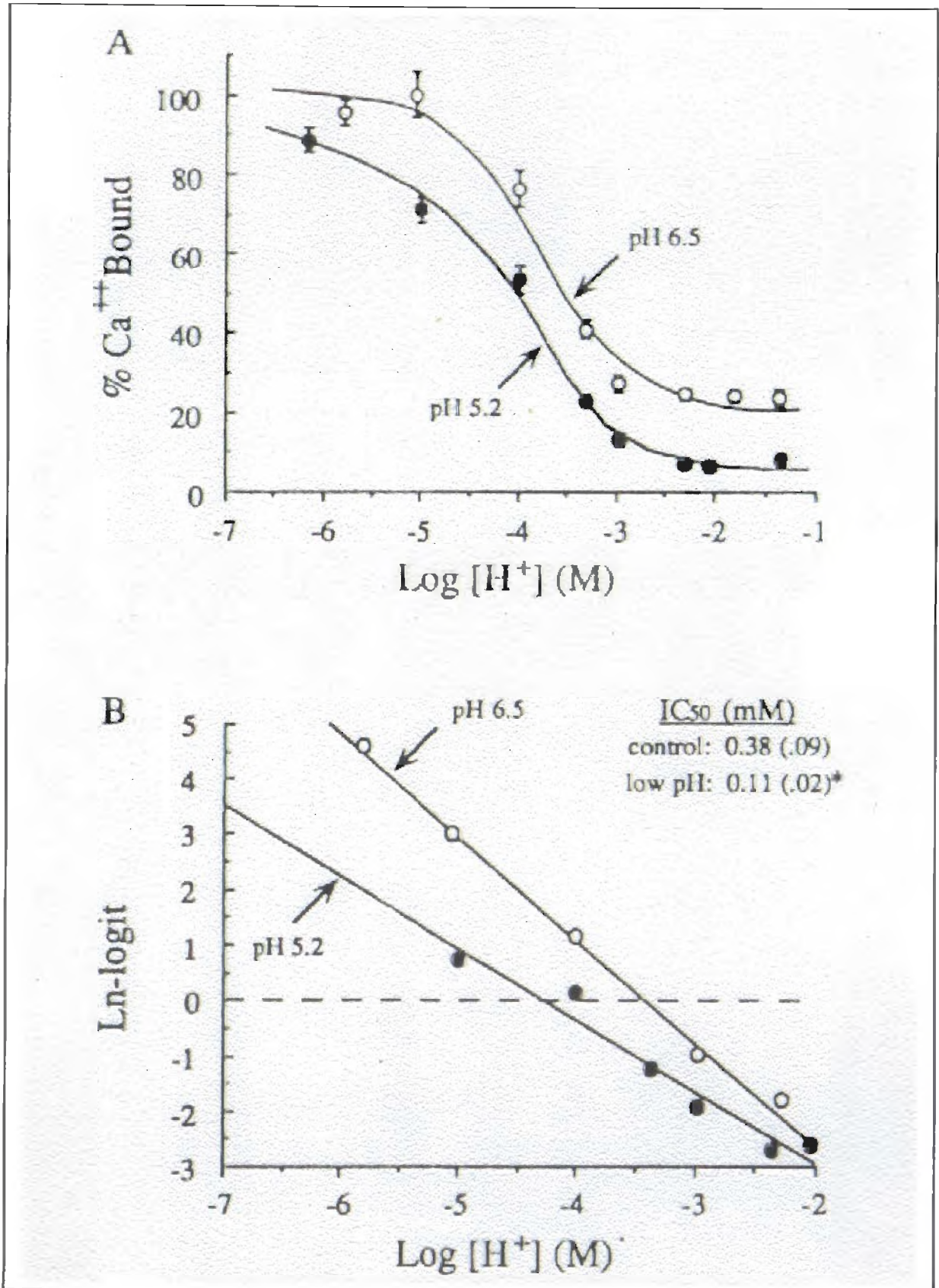
Παρόλη την εμφανή ικανότητά τους να σταθεροποιούν το εσωτερικό τους περιβάλλον κατά τη διάρκεια της χρόνιας υποθανάτιας έκθεσης σε χαμηλό pH, το καθεστώς της φυσιολογίας αυτών των πέστροφών παρέμεινε εκτεθειμένο.

Σε αυτό το τελευταίο σημείο δόθηκε έμφαση σε μία μεταγενέστερη μελέτη στην οποία οι Audet και Wood<sup>2</sup> απέδειξαν πως η μακροπρόθεσμη υποθανάτια έκθεση σε οξύ δεν βελτίωσε, αλλά στην πραγματικότητα, μειώθηκε σημαντικά η ικανότητα της πολύχρωμης πέστροφας να ανταποκριθεί σε περισσότερο κρίσιμους (έντονους) υποβιβασμούς του περιβαλλοντικού pH. Η πέστροφα που εκτέθηκε χρόνια σε χαμηλό pH (για 3 μήνες σε pH 4.8) και μία άλλη πέστροφα χωρίς προηγούμενη έκθεση σε χαμηλό περιβαλλοντικό pH «ανταγωνίστηκαν» σε μία κρίσιμη όξινη έκθεση (pH 4.0 για 4-5 ώρες). Οι προκαλούμενες από το οξύ φυσιολογικές ενοχλήσεις που παρατηρήθηκαν στην πέστροφα με την πρώτιστη έκθεση σε χαμηλό pH ήταν ισοδύναμες ή σημαντικά πιο αξιοπρόσεκτες από τις αντίστοιχες άπειρες σε έκθεση σε χαμηλό pH.

Αυτή η απάντηση δεν είναι συγκεκριμένη στην πολύχρωμη πέστροφα. Για παράδειγμα, οι Falk και Dunson<sup>13</sup> βρήκαν ότι η προηγούμενη σχεδόν θανατηφόρα όξινη έκθεση (pH = 5.0 ή 5.8 για 24 ώρες ή λιγότερο) δεν άλλαξαν τον χρόνο επιβίωσης της πέστροφας (*Salvelinus fontinalis*) σε pH 3.1 ή 3.5. Αντίστοιχα, ο Wood και οι συνεργάτες του<sup>62,63</sup>, σε μία μελέτη κατά την οποία οι πέστροφες είχαν προηγουμένως εκτεθεί για δέκα εβδομάδες σε pH 5.2 και έπειτα δοκιμάστηκαν σε μία πιο έντονη όξινη έκθεση δεν ανέφεραν καμία αύξηση της όξινης ανεκτικότητας όταν συγκρίθηκαν με πέστροφες χωρίς προηγούμενη χαμηλή έκθεση pH. Επί προσθέτως, οι McDonald και Milligan<sup>35</sup> περιγράφουν παρόμοιες μεταβολές των κατιόντων του Νατρίου στην μεταφορική δραστηριότητα που συμβαίνουν σαν απάντηση στο χαμηλό pH (pH 5.2 για δέκα εβδομάδες) και πρότειναν ότι οι πέστροφες είναι ανίκανες να εγκλιματιστούν σε χαμηλό pH καθώς η μεταφορική δραστηριότητα παρεμποδίζεται. Όταν η μεταφορική δραστηριότητα του νατρίου από προυπάρχουσα όξινη χαρακτηρίστηκε κάτω από κυκλικές καταστάσεις (pH 6.5), δεν παρατηρήθηκε καμία βελτίωση στην μεταφορική δραστηριότητα.

Δίνοντας αυτήν την αύξηση της ανεκτικότητας, ή του εγκλιματισμού, θα μπορούσε να περιείχε την μείωση της επίδρασης των πρωτεϊνών στη φυσιολογική λειτουργία των βραγχίων, και ότι η επίδραση που επικρατεί είναι η στοιχειομετρική ανάλυση των παρακυτταρικών  $\text{Ca}^{+2}$ , μετά μία μείωση της όξινης ευαισθησίας θα απαιτούσε μία αλλαγή στη σχέση της δέσμευσης των  $\text{H}^+$  ή  $\text{Ca}^{+2}$  που φυσιολογικά κατέχονται από  $\text{Ca}^{+2}$ . Ο Reid και οι συνεργάτες του<sup>52</sup>, έδειξαν ότι ο βαθμός του συναγωνισμού στην επιφάνεια των βραγχίων ανάμεσα στα  $\text{Ca}^{+2}$  και στα  $\text{H}^+$  δεν άλλαξε από χρόνια έκθεση σε όξινο περιβάλλον. Τα *in vitro*  $\text{Ca}^{+2}$  δομικά χαρακτηριστικά στα βράγχια από νεαρές πέστροφες εγκλιματισμένες στο μαλακό νερό ήταν προκαθορισμένες σε (pH = 6.5) και τις ημέρες 8 και 21 σε χαμηλό pH (pH = 5.2). Ο αριθμός των δεσμευμένων σημείων  $\text{Ca}^{+2}$  των βραγχίων στην όξινη έκθεση των ψαριών εξασθένησε με το χρόνο (Εικόνα 4A), και βρέθηκε ότι ήταν σημαντικά μειωμένη από ότι στον έλεγχο της ημέρας 21 ενώ η ομοιότητα αυτών των θέσεων ήταν σημαντικά μειωμένη μετά από έκθεση 8 ημερών (Εικόνα 4B). Καμιά απόδειξη ανάκτησης της τάσης των βραγχίων για δέσμευση  $\text{Ca}^{+2}$  δεν ήταν προφανής καθώς η σχέση των  $\text{Ca}^{+2}$  παρέμενε σημαντικά μειωμένη μετά από μία επιπρόσθετη έκθεση σε όξινο περιβάλλον για 12 ημέρες. Στην πραγματικότητα, ο Reid και οι συνεργάτες του<sup>52</sup> ανέφεραν ότι η χρόνια έκθεση σε χαμηλό pH καταλήγει σε μία αύξηση της σχέσης των βραγχίων σε  $\text{H}^+$  σε σχέση με τα  $\text{Ca}^{+2}$  και επιπλέον αυξάνει την ευαισθησία στην οξίνιση. Τις επόμενες 21 ημέρες της έκθεσης σε pH 5.2, η συγκέντρωση των  $\text{H}^+$  η οποία μειώνει τη μέγιστη δέσμευση  $\text{Ca}^{+2}$  κατά 50% ( $\text{H}^+$  IC<sub>50</sub>) για την *in vitro* δέσμευση  $\text{Ca}^{+2}$  από τα βράγχια, ήταν μικρότερη κατά 3,4 φορές σε σχέση με τα βράγχια ανήλικων ψαριών που επισημάνθηκαν σε μαλακά ύδατα με pH 6.5 (Εικόνα 4). Με άλλα λόγια, η ικανότητα των  $\text{H}^+$  να καθορίσουν την πυκνότητα των δεσμευμένων στα βράγχια  $\text{Ca}^{+2}$  ήταν 3 φορές μεγαλύτερη στα ψάρια με χρόνια έκθεση σε σχεδόν θανατηφόρο όξινο περιβάλλον απ' ότι σε ψάρια σε φυσικό όξινο περιβάλλον.

## EIKONA 4.



**ΕΙΚΟΝΑ 4.** Ανταγωνιστική επιβράδυνση δέσμευσης  $\text{Ca}^{+2}$  από υδρογονοκατιόντα (A) σε ψάρια με 21 ημέρες έκθεσης σε χαμηλό pH (pH = 5,2) και εκείνων χωρίς προηγούμενη έκθεση σε χαμηλό pH (pH = 6,5). Οι καμπύλες μέσω των δεδομένων εφαρμόστηκαν με το μάτι και τα δεδομένα παρουσιάζονται σαν ο μέσος όρος  $\pm 1$  SEM τεσσάρων προσπαθειών N=4. Οι καμπύλες ανταγωνιστικής επιβράδυνσης ευθυγραμμίστηκαν για τον υπολογισμό των  $\text{H}^+$  (B)  $\text{IC}_{50}$  για την δέσμευση  $\text{Ca}^{+2}$ . Οι γραμμές που εφαρμόστηκαν στις ευθύγραμμες καμπύλες επιβράδυνσης κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας την αρχή των ελαχίστων τετραγώνων γραμμικής παλινδρόμησης. Η  $\text{IC}_{50}$  υπολογίστηκε από την προμηθευόμενη γραμμική παλινδρόμηση που παρουσιάζεται σαν ο μέσος όρος  $\pm 1$  SEM από επιβραδυντικά πειράματα που έγινες πανομοιότυπα 2 φορές (N = 2). Σημαντικά διαφορετικά δεδομένα, διαμορφώνονται χρησιμοποιώντας ένα διπλής κατεύθυνσης t-test μελετητών με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% που υποδηλώνεται από έναν αστερίσκο.

Επιπλέον, έχει ξανά αποδειχτεί ότι οι πέστροφες είναι ανίκανες να εγκλιματιστούν όταν εκτεθούν σε χαμηλό pH και ότι μία προηγούμενη σχεδόν θανατηφόρα όξινη έκθεση μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα βράγχια ώστε τα ψάρια να είναι λιγότερο ικανά να αντισταθμίσουν την επίδραση της διαδοχικής έκθεσης σε οξύ απ' ότι τα βράγχια φυσικών ψαριών σε  $\text{H}^+$ .

Η προηγούμενη συζήτηση δεν εμποδίζει την πιθανότητα ότι τα μετριοπαθώς ευαίσθητα στα οξύ ψάρια, αν και ανίκανα να εγκλιματισθούν σε χρόνια υποθανάτια έκθεση σε χαμηλό pH, μπορεί να καταφέρουν να αντισταθμίσουν μερικώς την επίδραση της όξινης έκθεσης. Μερικές προτάσεις για αυτή τη στρατηγική στο βιοχημικό επίπεδο, δόθηκαν από τον Zukelchowski και τους συνεργάτες του<sup>65</sup> σε μία μελέτη στην οποία εξέτασαν τις γλυκοπρωτείνες στη βλέννα των δερματικών κυττάρων στα καφέ σκορπιοειδή (*Ictalurus nebulosus*) που εκτέθηκαν σε pH 6.8, pH 5.8, pH 4.8 και pH 4.0 για 5 ημέρες. Τα βλεννώδη κύτταρα των ψαριών σε pH 6.8 και pH 5.8 περιείχαν ένα μίγμα από ουδέτερα και όξινα συστατικά βλέννας (σιαλο- και σουλφοβλεννίνη). Παρόλ'αυτά, μία φαινομενική αλλαγή από σιαλοβλεννίνες σε επικρατούσες σουλφοβλεννίνες παρατηρήθηκε στο δέρμα από ψάρια που εκτέθηκαν σε pH 4.8 και pH 4.0. Οι συγγραφείς δεν ήταν σε θέση να προσδιορίσουν μία λειτουργική σπουδαιότητα που να ήταν συνδεδεμένη με την αύξηση παραγωγής σουλφοβλεννίνης στα ψάρια που στρεσοαρίστηκαν από οξύ, αλλά πρότειναν ότι η αλλαγή αντανάκλούσε σε απαραίτητες ρυθμίσεις για την διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας.

Ο Reid<sup>51</sup> είπε βασιζόμενος στην ικανότητα του μικροπεριβάλλοντος των βραγχίων να συσσωρεύει  $\text{Ca}^{+2}$ , ότι εάν τέτοιες αλλαγές στα συστατικά της βλέννας που βρίσκονται στα βράγχια, αυξάνουν την αναλογία της σουλφοβλεννίνης θα μπορούσε πιθανότατα να αυξηθεί στα βράγχια η επιφάνεια δέσμευσης  $\text{Ca}^{+2}$ . Το αποτέλεσμα από τα παραπάνω θα μπορούσε να μειώσει τη "διαρροή" του βραγχιακού επιθηλίου.

Πρόσφατα, οι McDonald και Wood<sup>36a</sup> πρότειναν ότι οι βραγχιακοί μηχανισμοί του εγκλιματισμού είναι μία λειτουργία του βαθμού της καταστροφής των κυττάρων. Επιπλέον για ένα τοξικό που μπορεί να επηρεάσει μηχανισμούς συνδεδεμένους από μία αύξηση της αντοχής ή του εγκλιματισμού, πρέπει πρώτα να προκληθεί σημαντική δομική καταστροφή του επιθηλίου των βραγχίων. Από εκεί και πέρα η εξήγηση της ανικανότητας της πέστροφας να εγκλιματιστεί ή να αναπτύξει αυξημένη αντοχή στην έκθεση σε χαμηλό pH, βρίσκεται απλά στο γεγονός ότι η χρόνια έκθεση σε σχεδόν θανατηφόρο όξινο περιβάλλον προκαλεί μία δομική καταστροφή στα βράγχια που είναι ανεπαρκής για να προκληθεί μία αντίδραση του επιθηλίου. Παρόλ' αυτά, η χρόνια έκθεση προφανώς ευαισθητοποιεί την πέστροφα σε επιπρόσθετη έκθεση σε όξινο περιβάλλον. Παρότι η προκαλούμενη από το οξύ καταστροφή δεν είναι επαρκής να διεγείρει μία φάση επισκευής, η επιθηλιακή ακεραιότητα και η δυνατότητα μεταφοράς ιόντων των βραγχίων παραμένουν δεσμευμένες. Με αυτόν τον τρόπο, η ικανότητα των βραγχίων να εξισορροπήσουν σε κάθε επιπρόσθετο στρες είναι μειωμένη και θα μπορούσε πιθανότατα να είναι μία ένδειξη της μείωσης της ανεκτικότητας σε αυτό το επιπρόσθετο στρες.

Μία ερώτηση η οποία έχει πρόσφατα γίνει, και η οποία χρειάζεται μεγαλύτερη προσοχή, είναι αυτή η οποία ονομάζει το ποσό της ενέργειας που πρέπει να χρησιμοποιείται από ευαίσθητα σε οξέα ψάρια για να διατηρήσουν την ομοιοστασή τους κάτω από οριακές περιβαλλοντικές καταστάσεις. Καθώς αυτά τα είδη είναι ανέκανα να αναπτύξουν αυξημένη ανεκτικότητα στα οξέα, δεν είναι σωστό να συζητάμε για το "κόστος" του εγκλιματισμού, αλλά αντιθέτως για τις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις να αντισταθμίσεις μερικώς τα επιβλαβή αποτελέσματα της

υπερυψωμένης συγκέντρωσης  $H^+$ . Η μόνη εκτίμηση του κόστους της επανόρθωσης του pH προέρχεται από μία μελέτη για το αλουμίνιο (αργίλιο) από τους Wilson και Wood<sup>58</sup> στην οποία οι συγγραφείς ανέφεραν μία μείωση 5% στην κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης ( $U_{crit}$  - Critical Swimming Speed) από ανώριμες πέστροφες που είχαν εκτεθεί σε σχεδόν θανατηφόρο pH ( $pH = 5.2$ ) για 22 ημέρες. Παρόλ' αυτά, αυτή η έκθεση δεν φάνηκε να επηρεάζει την ανάπτυξη, όταν τα ψάρια τράφηκαν με περιορισμένη διαίτα (1% σωματικού βάρους την ημέρα<sup>-1</sup>). Υπήρξε συμφωνία ότι η μείωση της κριτικής ταχύτητας κολύμβησης ( $U_{crit}$ ) θα μπορούσε να ακτινοβολεί, το κόστος που συνδέεται με την ίδρυση μιας καινούργιας σταθερής θέσης κατά τη διάρκεια χρόνιας, σχεδόν θανατηφόρας, έκθεσης στο οξύ, μία από την οποία επιτρέπει την αποκατάσταση του δικτύου ιοντορυθμιστικής ισορροπίας, παρόλη την μείωση του πλάσματος και ολόκληρου του ηλεκτρολυτικού επιπέδου του σώματος. Όπως φαίνεται, καθώς η ανάπτυξη ήταν ανεπηρέαστη, αυτή η αύξηση του κόστους ήταν αρκετά μικρή για να εξάγει κάποια επίδραση στο ρυθμό της ανάπτυξης. Ακόμα, αυτά τα δεδομένα προτείνουν ότι μία τέτοια έκθεση στο οξύ, δεν είναι τόσο καταστροφική στο βραγχιακό επιθήλιο για να ενεργοποιήσουν τους κατάλληλους μηχανισμούς αποκατάστασης. Σε αντίθεση με το κόστος της επανόρθωσης, το κόστος του εγκλιματισμού, καθώς αποδεικνύεται από τη μείωση της κριτικής ταχύτητας κολύμβησης ( $U_{crit}$ ) κατά τη διάρκεια χρόνιας υποθανάτιας έκθεσης στο αλουμίνιο (αργίλιο) ( $30 \mu g l^{-1}$ ,  $pH 5.2$ ), βρέθηκε να είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερο, στο 17 % και μείωνε την ανάπτυξη κατά 50 %, έχει δειχτεί κάτω από σημαντική βραγχιακή επιδιόρθωση (cf. Mueller και συνεργάτες<sup>43</sup>).



## VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Υπάρχει μία αντίληψη ότι τα ψάρια έχουν την ικανότητα να εγκλιματιστούν σε καταστάσεις περιβαλλοντικού στρες. Αυτό είναι φανερό στις χρόνιες, σχεδόν θανατηφόρες εκθέσεις σε μία ποικιλία από μέταλλα. Για παράδειγμα ο Opi<sup>44a</sup> απέδειξε ότι η έκθεση 1 ή 2 εβδομάδων σε σχεδόν υποθανάτιο αλουμίνιο, παρέχει στις ανήλικες πέστροφες αυξημένη αντίσταση στο αλουμίνιο, που βασίζεται σε ένα σύντομο διπλασιασμό των 120 ωρών LC<sub>50</sub>. Αυξημένη αντοχή ψαριών σε άλλα μέταλλα (Cu<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>) που ακολούθησαν την έκθεση σε σχεδόν θανατηφόρες συγκεντρώσεις έχουν αναφερθεί καθώς και τυπικά αποτελέσματα από 1,5 έως 2,7 αύξηση στην παρατηρούμενη LC<sub>50</sub> (επανάληψη από Hodson<sup>18</sup>). Ωστόσο, τώρα φαίνεται ότι ψάρια όπως η πέστροφα, τα οποία είναι ευαίσθητα σε όξινα περιβάλλοντα δεν έχουν την ικανότητα να εγκλιματίζονται σε χρόνιες εκθέσεις σε οξέα. Αν υπάρχει ένα κόστος που συνδέεται με τη ζωή σε ένα όξινο περιβάλλον, όπως προτάθηκε από τα δεδομένα του Wilson και άλλων<sup>58a,b</sup>, τότε σίγουρα τέτοια ψάρια θα βρίσκονται σε κίνδυνο μέχρι να σταματήσει η επικάλυψη των οξέων στο περιβάλλον και ολοκληρωθεί η ανάρρωση (επαναφορά) του οικοσυστήματος. \_

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΟΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ

<u>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u> .....	1
<u>II. ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ</u> .....	3
1. Το Συμπαθητικό - Χρωμαφινικό Σύστημα.....	4
2. Ο Άξονας Υποθαλαμικού Λοβού Υποφύσεως.....	6
3. Άλλα Ενδοκρινικά Συστήματα.....	7
<u>III. ΑΝΑΠΝΟΗ</u> .....	11
1. Βραγχιακές Και Καρδιακές Ρυθμίσεις στα Στρεσαρισμένα Ψάρια.....	12
2. Η Ικανότητα Μεταφοράς Οξυγόνου του Αίματος.....	12
3. Αναερόβια Αναπνοή.....	14
4. Αδενυλική Φόρτιση Ενέργειας.....	16
<u>IV. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ</u> .....	16
1. Μεταβολισμός Υδατανθράκων.....	17
2. Μεταβολισμός Πρωτεϊνών.....	19
3. Μεταβολισμός Λιπιδίων.....	20
4. Ανάπτυξη.....	21
<u>V. ΩΣΜΟΡΥΘΜΙΣΗ</u> .....	24
1. Το Όξινο Στρες.....	24
2. Ωσμωτική Πρόκληση και η Μετανάστευση των νεαρών σολομών σε αλμυρά νερά.....	26
<u>VI. ΑΜΥΝΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ</u> .....	27
1. Παθογόνος Πρόκληση.....	28
1.1 Μη Συγκεκριμένοι Μηχανισμοί.....	28
1.2 Η Άνοση Αντίδραση.....	29
2. Μηχανισμοί Αποτοξίνωσης.....	30
2.1 Βιομετασχηματισμός.....	30
2.1.1 Τα Ισοένζυμα Κυτοχρώμης P-450.....	31
2.1.2 Φάση II, Συζευκτικά Ένζυμα.....	32
2.2 Μεταλλικές ρίζες.....	33
2.3 Πρωτείνες Θερμικού Στρες.....	34
<u>VII. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ</u> .....	35
<u>VIII. ΑΛΛΕΣ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΣΤΡΕΣΑΡΙΣΜΕΝΑ ΨΑΡΙΑ</u> .....	37
1. Ένζυμα Ιστών.....	37
2. Η Βλάβη του DNA.....	39
<u>IX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u> .....	39

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2· ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ, ΠΙΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΛΙΑ ΝΑΤΡΙΟΥ· Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΟΜΟΙΟΜΟΡΦΙΚΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ

<u>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u> .....	42
<u>II. ΟΜΟΙΟΜΟΡΦΙΚΗ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ (HOMEOVISCUS ADAPTATION)</u> ..	45
<u>III. ΘΕΡΜΙΚΟΣ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ΑΤΡάση</u> .....	48
<u>IV. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΠΙΕΣΗΣ ΤΗΣ Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ΑΤΡάσης</u> .....	54
<u>V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u> .....	64

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3· ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΟΞΙΝΟΥ ΝΕΡΟΥ ΣΤΑ ΒΡΑΙΧΙΑ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

<u>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u> .....	66
<u>II. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ</u> .....	67
<u>III. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ</u> .....	68
<u>IV. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ</u> .....	72
<u>V. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΟΞΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ</u> .....	78
1. Είδη Ανθεκτικά στα Οξέα.....	78
2. Είδη Ευαίσθητα στα Οξέα.....	80
<u>VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ</u> .....	87

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 1

1. Abraham, E. Effects of stress on cytokine production. In: *Stress Revisited, I. Neuroendocrinology of Stress. Methods Achieve. Exp. Pathol., Vol. 14*, edited by G. Jasmin and M. Cantin, Basel, Karger, pp. 45-62, 1991.
2. Adams, S.M. (Editor) *Biological Indicators of Stress in Fish. Am. Fish. Soc. Symp.* 8, 191 pp., 1990.
3. Andersen, D.E., S.D. Reid, T.W. Moon and S.F. Perry. Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 48: 1811-1817, 1991.
4. Anderson, D.P. Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8: 38-50, 1990.
5. Andersson, T. Sex differences in cytochrome P-450-dependent xenobiotic and steroid metabolism in the mature rainbow trout kidney. *J. Endocrinol.* 126: 9-16, 1990.
6. Andersson, T., L. Förlin, J. Hårdig and Å. Larsson. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 45: 1525-1536, 1988.
7. Angelidis, P., F. Baudin-Laurencin and D.P. Youinou. Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish. Biol.* 31 (Suppl. A): 113-122, 1987.
8. Aota, S., K.D. Holmgren, P. Gallagher and D.J. Randall. A possible role for catecholamines in the ventilatory responses associated with internal acidosis or external hypoxia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 151: 57-70, 1990.
9. Arillo, A., U. Biancamaria and M. Vallarino. Renin activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) and effects of environmental ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 68A: 307-311, 1981.
10. Avella, M., G. Young, P. Prunet and C.B. Schreck. Plasma prolactin and cortisol concentrations during salinity challenges of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at smolt and post-smolt stages. *Aquaculture* 91: 359-372, 1990.
11. Avella, M., C.B. Schreck and P. Prunet. Plasma prolactin and cortisol concentrations of stressed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in freshwater or saltwater. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81: 21-27, 1991.
12. Baer, K.N. and P. Thomas. Influence of capture stress, salinity and reproductive status on zinc associated with metallothionein-like proteins in the livers of three marine teleost species. *Mar. Environ. Res.* 29: 277-287, 1990.
13. Baker, B.I. Melanin-concentrating hormone: a general vertebrate neuropeptide. *Int. Rev. Cytol.* 126: 1-47, 1991.
14. Ball, J.N. and E.F. Hawkins. Adrenocortical (interrenal) responses to hypophysectomy and adeno-hypophysial hormones in the teleost *Poecilia latipinna*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 28: 59-70, 1976.
15. Balm, P.H.M., P. Peepels, E. Van Lieshout and S.E. Wendelaar Bonga. Neuroimmunological regulations in fish: paracrine mechanisms regulating cortisol release in tilapia. (Abstract) In: *Second International Symposium on Fish Endocrinology, Saint-Malo, France*, p. L39, 1992.

16. Barron, M.G. and I.R. Adelman. Nucleic acid, protein content, and growth of larval fish sublethally exposed to various toxicants. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 41: 141-150, 1984.
17. Barron, M.G. and I.R. Adelman. Temporal characterization of growth of fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae during sublethal hydrogen cyanide exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 81C: 341-344, 1985.
18. Bartell, S.M. Ecosystem context for estimating stress-induced reductions in fish populations. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8: 167-182, 1990.
19. Barton, B.A. and G.K. Iwama. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3-26, 1991.
20. Barton, B.A., C.B. Schreck and L.D. Barton. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquatic Org.* 2: 173-185, 1987.
21. Barton, B.A., G.S. Weiner and C.B. Schreck. Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute handling stress. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 42: 710-717, 1985.
22. Bastrop, R., K. Jürss and R. Wacke. Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 102A: 151-161, 1992.
23. Bilik, T.I. Effect of ecological factors on adenine nucleotide metabolism in fish muscle and liver: a survey. *Hydrobiol. J.* 25: 58-65, 1990.
24. Birnbaum, M.J., J. Schultz and J.N. Fain. Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 231: 191-197, 1976.
25. Boeuf, G., P. Prunet and P.-Y. Le Bail. Is growth hormone treatment able to stimulate the smoltification in the Atlantic salmon? *C. R. Acad. Sci. Sér. III* 310: 75-83, 1990.
26. Booth, J.H. The effects of oxygen supply, epinephrine, and acetylcholine on the distribution of blood flow in trout gills. *J. Exp. Biol.* 83: 31-39, 1979.
27. Bouck, G.R. Concentrations of leucine aminonaphthylamidase (LAN) and soluble proteins in the tissues of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 37: 116-120, 1980.
28. Bouck, G.R. Physiological responses of fish: problems and progress toward using environmental monitoring. In: *Contaminant Effects on Fisheries*, edited by V.W. Cairns, P.V. Hodson and J.O. Nriagu, New York, NY, John Wiley and Sons, pp. 61-85, 1984.
29. Bradshaw, C.M., A.S. Richard and M.M. Sigel. IgM antibodies in fish mucus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136: 1122-1124, 1971.
30. Braun, R., J.A. Arnesen, A. Rinne and K. Hjelmeland. Immunohistochemical localization of trypsin in mucus-secreting cell layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 13: 233-238, 1990.
31. Braunbeck, T. and A. Völkl. Induction of biotransformation in the liver of eel (*Anguilla anguilla* L.) by sublethal exposure to dinitro-*o*-cresol: an ultrastructural and biochemical study. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 21: 109-127, 1991.
32. Brown, J.A., D. Edwards and C. Whitehead. Cortisol and thyroid hormone responses to acid stress in the brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.* 35: 73-84, 1989.
33. Brown, S., K. Fedoruk and J.G. Eales. Physical injury due to injection or blood removal causes transitory elevations of plasma thyroxine in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.* 56: 1998-2003, 1978.
34. Brown, S.B., J.G. Eales, R.E. Evans and T.J. Hara. Interrenal, thyroidal, and carbohydrate responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental acidification. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 41: 36-45, 1984.
35. Brown, S.B., D.L. Maclatchy, T.J. Hara and J.G. Eales. Effects of low ambient pH and aluminium on plasma kinetics of cortisol, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Zool.* 68: 1537-1543, 1990.
36. Bulow, F.J. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish. In: *The Age and Growth of Fish*, edited by R.C. Summerfelt and G.E. Hall, Iowa, IA, Iowa State University Press, pp. 45-64, 1987.
37. Butler, D.G. Hormonal control of gluconeogenesis in the North American eel (*Anguilla rostrata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 10: 85-91, 1968.
38. Byamungu, N., S. Corneillie, K. Mol, V. Darras and E.R. Kuhn. Stimulation of thyroid function by several pituitary hormones results in an increase in plasma thyroxine and reverse triiodothyronine in tilapia (*Tilapia nilotica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 80: 33-40, 1990.
39. Campbell, P.M., T.G. Pottinger and J.P. Sumpter. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. *Biol. Reprod.* 47: 1140-1150, 1992.

40. Carragher, J.F. and J.P. Sumpter. The effect of cortisol on the secretion of sex steroids from cultured ovarian follicles of rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77: 403-407, 1990.
41. Carragher, J.F. and J.P. Sumpter. Corticosteroid physiology in fish. In: *Progress in Comparative Endocrinology*, edited by A. Eppler, C.G. Scanes and M.H. Stetson, New York, NY, Wiley-Liss, pp. 487-492, 1990.
42. Carragher, J.F., J.P. Sumpter, T.G. Pottinger and A.D. Pickering. The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 310-321, 1989.
43. Chan, D.K.O. and N.Y.S. Woo. Effect of cortisol on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 35: 205-215, 1978.
44. Clarke, D.J., S.G. George and B. Burchell. Glucuronidation in fish. *Aquatic Toxicol.* 20: 35-56, 1991.
45. Colombo, L., A.D. Pickering, P. Belvedere and C.B. Schreck. Stress inducing factors and stress reaction in aquaculture. In: *Aquaculture Europe '89 - Business Joins Science*, edited by N. De Pauw and R. Billard. *Eur. Aquacult. Spec. Publ.* 12: 93-121, 1990.
46. Coppage, D.L., E. Matthews, G.H. Cook and J. Knight. Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion, *O,O*-dimethyl S-(1,2-dicarboxyethyl) phosphorodithionate. *Pestic. Biochem. Physiol.* 5: 536-542, 1975.
47. Davis, K.B., P. Torrance, N.C. Parker and M.A. Suttle. Growth, body composition and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Biol.* 27: 177-184, 1985.
48. De la Higuera, M. and P. Cardenas. Hormonal effects on gluconeogenesis from (U-<sup>14</sup>C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 517-521, 1986.
49. Devaux, A., M. Pesonen, G. Monod and T. Andersson. Glucocorticoid-mediated potentiation of P450 induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 43: 898-901, 1992.
50. Dewaide, J.H. and P.Th. Henderson. Seasonal variation of hepatic drug metabolism in the roach *Leuciscus rutilus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 32: 489-497, 1970.
51. Donaldson, E.M. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: *Stress and Fish*, edited by A.D. Pickering, London, Academic Press, pp. 11-48, 1981.
52. Donaldson, E.M. Reproductive indices as measures of the effects of environmental stressors in fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8: 109-122, 1990.
53. Eddy, F.B. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: *Stress and Fish*, edited by A.D. Pickering, London, Academic Press, pp. 77-102, 1981.
54. Ellsaesser, C.F. and L.W. Clem. Blood serum chemistry measurement of normal and acutely stressed channel catfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A: 589-594, 1987.
55. Falcioni, G., F. Grelloni, R. Gabbianelli, A.R. Bonfigli and A. Colosimo. Adrenaline effects on the oxygen binding to trout haemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol.* 98C: 451-455, 1991.
56. Farbridge, K.J. and J.F. Leatherland. Plasma growth hormone levels in fed and fasted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are decreased following handling stress. *Fish Physiol. Biochem.* 10: 67-73, 1992.
57. Farmer, G.J., R.L. Saunders, T.R. Goff, C.E. Johnston and E.B. Henderson. Some physiological responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to soft, acidic water during smoltification. *Aquaculture* 82: 229-244, 1989.
58. Fevolden, S.E., T. Refstie and K.H. Røed. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 95: 53-65, 1991.
59. Fitzpatrick, F.A. and R.C. Murphy. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological actions of 'epoxygenase'-derived eicosanoids. *Pharmacol. Rev.* 40: 229-241, 1989.
60. Fletcher, D.J. Plasma glucose and plasma fatty acid levels of *Limanda limanda* (L.) in relation to season, stress, glucose loads and nutritional state. *J. Fish Biol.* 25: 629-648, 1984.
61. Flory, C.M. and C.J. Bayne. The influence of adrenergic and cholinergic agents on the chemiluminescent and mitogenic responses of leukocytes from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 135-142, 1991.
62. Foster, G.D. and T.W. Moon. Cortisol and liver metabolism of immature American eels, *Anguilla rostrata* (Le Sueur). *Fish Physiol. Biochem.* 1: 113-124, 1986.
63. Freeman, H.C., G.B. Sangalang and J.F. Uthe. The effect of pollutants and contaminants on steroidogenesis in fish and marine mammals. In: *Contaminant Effects on Fisheries*, edited by V.W. Cairns, P.V. Hodson and J.O. Nriagu, New York, NY, John Wiley and Sons, pp. 197-212, 1984.

64. Goksøyr, A. and L. Förlin. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicol.* 22: 287-312, 1992.
65. Gonzalez, R.J. and D.G. McDonald. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. *J. Exp. Biol.* 163: 317-322, 1992.
66. Goss, G.G. and C.M. Wood. The effects of acid and acid/aluminium exposure on circulating plasma cortisol levels and other blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol.* 32: 63-76, 1988.
67. Gray, E.S., B.R. Woodin and J.J. Stegeman. Sex differences in hepatic monooxygenases in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and scup (*Stenotomus chrysops*) and regulation of P-450 forms by estradiol. *J. Exp. Zool.* 259: 330-342, 1991.
68. Hansson, T. and U. Lidman. Effects of cortisol administration on components of the hepatic microsomal mixed function oxidase system (MFO) of immature rainbow trout (*Salmo gairdneri* L.). *Acta Pharmacol. Toxicol.* 43: 6-12, 1978.
69. Hathaway, C.B. and A. Eppler. The sources of plasma catecholamines in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74: 418-430, 1989.
70. Haux, C., M.-L. Sjöbeck and Å. Larsson. Physiological stress responses in a wild fish population of perch (*Perca fluviatilis*) after capture and during subsequent recovery. *Mar. Environ. Res.* 15: 77-95, 1985.
71. Hayashi, S. and Z. Ooshiro. Gluconeogenesis in perfused eel liver - effect of starvation, amino-oxycetate, D-malate, and hormones. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 26: 89-95, 1977.
72. Heath, A.G. Changes in tissue adenylates and water content of bluegill, *Lepomis macrochirus*, exposed to copper. *J. Fish Biol.* 24: 299-309, 1984.
73. Heath, A.G. *Water Pollution and Fish Physiology*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1987.
74. Hoar, W.S. The physiology of smolting salmonids. In: *Fish Physiology, Vol XI. The Physiology of Developing Fish. Part B. Viviparity and Posthatching Juveniles*, edited by W.S. Hoar and D.J. Randall, New York, NY, Academic Press, pp. 275-343, 1988.
75. Hodson, P.V., B.R. Blunt and D.M. Whittle. Monitoring lead exposure of fish. In: *Contaminant Effects on Fisheries*, edited by V.W. Cairns, P.V. Hodson and J.O. Nriagu, New York, NY, John Wiley and Sons, pp. 87-98, 1984.
76. Hogstrand, C., G. Lithner and C. Haux. The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. *Pharmacol. Toxicol.* 68: 492-501, 1991.
77. Hontela, A., Y. Roy, R. Van Coillie, K. Lederis and G. Chevalier. Differential effects of low pH and aluminium on the caudal neurosecretory system of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J. Fish Biol.* 35: 265-273, 1989.
78. Hontela, A., J.B. Rasmussen, D. Ko, K. Lederis and G. Chevalier. Arginine vasotocin, an osmoregulatory hormone, as a potential indicator of acid stress in fish. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 48: 238-242, 1991.
79. Houlihan, D.F., D.N. McMillan and P. Laurent. Growth rates, protein synthesis and protein degradation rates in rainbow trout: effects of body size. *Physiol. Zool.* 59: 482-493, 1986.
80. Hyllner, S.J., T. Andersson, C. Haux and P.-E. Olsson. Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 139: 24-28, 1989.
81. Ignatius, J. and O.V. Oommen. Effects of corticosteroids and protein synthesis inhibitors on activities of oxidative enzymes in a bony fish, *Anabas testudineus* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 303-310, 1990.
82. Inui, Y. and M. Yokote. Gluconeogenesis in the eel. IV. Gluconeogenesis in the hydrocortisone administered eel. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 41: 973-981, 1975.
83. Inui, Y. and M. Yokote. Effects of glucagon on amino acid metabolism in Japanese eels, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33: 167-173, 1977.
84. Itami, T., T. Takahashi, T. Okamoto and K. Kobono. Purification and characterization of immunoglobulin in skin mucus and serum of ayu. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 54: 1611-1619, 1988.
85. Jarvi, T. Synergistic effect on mortality in Atlantic salmon, *Salmo salar*, smolt caused by osmotic stress and presence of predators. *Environ. Biol. Fish.* 26: 149-152, 1989.
86. Jimenez, B.D. and J.J. Stegeman. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8: 67-79, 1990.
87. Jones, N.J. and J.M. Parry. The detection of DNA adducts, DNA base changes and chromosome damage for the assessment of exposure to genotoxic pollutants. *Aquatic Toxicol.* 22: 323-344, 1992.
88. Jönsson, M.C., I. Walquist and T. Hanson. Effects of hypophysectomy and cortisol on the catecholamine biosynthesis and catecholamine content in chromaffin tissue from rainbow trout, *Salmo*

- gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 51: 278-285, 1983.
89. Kamiya, H., K. Muramoto and R. Goto. Purification and properties of agglutinins from conger eel *Conger myriaster* (Brevoort), skin mucus. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 309-318, 1988.
  90. Kearns, P.K. and G.J. Atchison. Effects of trace metals on growth of the yellow perch (*Perca flavescens*) as measured by RNA-DNA ratios. *Environ. Biol. Fish.* 4: 383-387, 1979.
  91. Kille, P., J. Kay, M. Leaver and S. George. Induction of piscine metallothionein as a primary response to heavy metal pollutants: applicability of new sensitive molecular probes. *Aquatic Toxicol.* 22: 279-286, 1992.
  92. Kirubagarin, R. and K.P. Joy. Toxic effects of mercury on testicular activity in the freshwater teleost, *Clarias batrachus* (L.). *J. Fish Biol.* 41: 305-315, 1992.
  93. Klaverkamp, J.F., W.A. Macdonald, D.A. Duncan and R. Wageman. Metallothionein and acclimation to heavy metals in fish: a review. In: *Contaminant Effects on Fisheries*, edited by V.W. Cairns, P.V. Hodson and J.O. Nriagu, New York, NY, John Wiley and Sons, pp. 99-113, 1984.
  94. Kothay, R.K. and E.P.M. Candido. Induction of a novel set of polypeptides by heat shock or sodium arsenite in cultured cells of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Biochem.* 60: 347-355, 1982.
  95. Kuchel, O. Stress and catecholamines. In: *Stress Revisited, I. Neuroendocrinology of Stress. Methods Achieve. Exp. Pathol., Vol. 14*, edited by G. Jasmin and M. Cantin, Basel, Karger, pp. 80-103, 1991.
  96. Laidley, C.W. and J.F. Leatherland. Cohort sampling, anaesthesia and stocking-density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 33: 73-88, 1988.
  97. Laurén, D.J. The fish gill: a sensitive target for waterborne pollutants. In: *Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Fourteenth Volume*, ASTM STP 1124, edited by M.A. Mayes and M.G. Barron, Philadelphia, PA, ASTM, pp. 223-244, 1991.
  98. Laurent, P. and S.F. Perry. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.* 259: 429-442, 1990.
  99. Leach, G.J. and M.H. Taylor. The effects of cortisol treatment on carbohydrate and protein metabolism in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 48: 76-83, 1982.
  100. Leaver, M.J., D.J. Clarke and S.G. George. Molecular studies of the phase II xenobiotic conjugative enzymes of marine Pleuronectid flatfish. *Aquatic Toxicol.* 22: 265-278, 1992.
  101. Lee, R.M., S.D. Gerking and B. Jezierska. Electrolyte balance and energy mobilization in acid-stressed rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and their relation to reproductive success. *Environ. Biol. Fish.* 8: 115-123, 1983.
  102. Lidman, U., G. Dave, M. Johansson-Sjoberg, Å. Larsson and K. Lewander. Metabolic effects of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 63A: 339-344, 1979.
  103. Lindsay, G.J.H. The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence. *Aquaculture* 51: 169-173, 1986.
  104. Lindström-Seppä, P. Seasonal variation of the xenobiotic metabolising enzyme activities in the liver of male and female vendace (*Coregonus albula* L.). *Aquatic Toxicol.* 6: 323-331, 1985.
  105. Macfarlane, R.B. and P.E. Benville. Primary and secondary stress responses of striped bass (*Morone saxatilis*) exposed to benzene. *Mar. Biol.* 92: 245-254, 1986.
  106. Madsen, S.S. Cortisol treatment improves the development of hypoosmoregulatory mechanisms in the euryhaline rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol. Biochem.* 8: 45-52, 1990.
  107. Madsen, S.S. The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 1-11, 1990.
  108. Mathieu, A., P. Lemaire, S. Carriere, P. Draï, J. Guidicelli and M. Lafaurie. Seasonal and sex-linked variations in hepatic and extrahepatic biotransformation activities in striped mullet (*Mullus barbatus*). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 22: 45-57, 1991.
  109. Maule, A.G. and C.B. Schreck. Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84: 83-93, 1991.
  110. Mazeaud, M.M. and F. Mazeaud. Adrenergic responses to stress in fish. In: *Stress and Fish*, edited by A.D. Pickering, London, Academic Press, pp. 49-76, 1981.
  111. McBride, J.R., H.M. Dye and E.M. Donaldson. Stress response of juvenile sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) to the butoxyethanol ester of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 877-884, 1981.
  112. McCormick, S.D., W.W. Dickhoff, J. Duston, R.S. Nishioka and H.A. Bern. Developmental differences in the responsiveness of gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase to cortisol in salmonids. *Gen. Comp.*



*Endocrinol.* 84: 308–317, 1991.

113. McGeer, J.C., L. Baranyi and G.K. Iwama. Physiological responses to challenge tests in six stocks of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 48: 1761–1771, 1991.
114. McIntyre, D.C., L.M. Healy and M. Saari. Intraspecies aggression and monoamine levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings. *Behav. Neural Biol.* 25: 90–98, 1979.
115. Mehrle, P.M. and F.L. Mayer. Toxaphene effects on growth and bone composition of fathead minnows, *Pimephales promelas*. *J. Fish. Res. Board Can.* 32: 593–598, 1975.
116. Minick, M.C. and W. Chavin. Effects of vertebrate insulins upon serum free fatty acids and phospholipid levels in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 41A: 791–804, 1972.
117. Möck, A. and G. Peters. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *J. Fish Biol.* 37: 873–885, 1990.
118. Mommsen, T.P. and E.M. Plisetskaya. Insulin in fishes and agnathans: history, structure and metabolic regulation. *Rev. Aquatic Sci.* 4: 225–229, 1991.
119. Morales, A.E., L. García-Rejón and M. De La Higuera. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 95A: 87–93, 1990.
120. Mourik, J., P. Raeven, K. Steur and A.D.F. Addink. Anaerobic metabolism of red skeletal muscle of goldfish (*Carassius auratus* L.): mitochondrial produced acetaldehyde as anaerobic electron acceptor. *FEBS Lett.* 137: 111–114, 1982.
121. Niimi, A.J. Review of biochemical methods and other indicators to assess fish health in aquatic ecosystems containing toxic chemicals. *J. Great Lakes Res.* 16: 529–541, 1990.
122. Nikinmaa, M. Adrenergic regulation of haemoglobin oxygen affinity in rainbow trout red cells. *J. Comp. Physiol. B* 152: 67–72, 1983.
123. Nikinmaa, M. How does environmental pollution affect red cell function in fish? *Aquatic Toxicol.* 22: 227–238, 1992.
- 123a. Nilsson, G.E. Oxygen availability: Brain defence mechanisms. In: *Environmental and Ecological Biochemistry, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 5, edited by P.W. Hochachka and T.P. Mommsen, Elsevier Science, Amsterdam, Chapter 2, 1995, this volume.
124. Nimmo, I.A. The glutathione S-transferases of fish. *Fish Physiol. Biochem.* 3: 163–172, 1987.
125. Ottolenghi, C., A.C. Puviani, M.E. Gavioli and L. Brighenti. Epinephrine effect on glycogen phosphorylase activity in catfish liver and muscles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 61: 469–475, 1986.
126. Overnell, J., R. McIntosh and T.C. Fletcher. The enhanced induction of metallothionein by zinc, its half-life in the marine fish *Pleuronectes platessa*, and the influence of stress factors on metallothionein levels. *Experientia* 43: 178–181, 1987.
127. Parker, D.B. and B.A. McKeown. Effects of pH and/or calcium enriched freshwater on plasma levels of vitellogenin and Ca<sup>2+</sup> and on bone calcium content during exogenous vitellogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 87A: 267–273, 1987.
128. Pavlov, D.F., V.I. Kozlovskaya and B.A. Flerov. The use of collagen for assessing the toxicity of pollutants to fish. *Trudy Inst. Biol. Vnutr. Vod.* 57: 85–94, 1990.
129. Perdu-Durand, E.F. and J.P. Cravedi. Characterization of xenobiotic metabolizing enzymes in sturgeon (*Acipenser baeri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 921–928, 1989.
130. Perry, S.F. and R. Kinkead. The role of catecholamines in regulating arterial oxygen content during acute hypercapnic acidosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Resp. Physiol.* 77: 365–378, 1989.
131. Perry, S.F., R. Kinkead, P. Gallagher and D.J. Randall. Evidence that hypoxemia promotes catecholamine release during hypercapnic acidosis in rainbow trout. *Resp. Physiol.* 77: 351–364, 1989.
132. Pesonen, M. and T. Andersson. Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzymes in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Xenobiotica* 21: 461–471, 1991.
133. Pickering, A.D. Environmental stress and the survival of brown trout, *Salmo trutta*. *Freshwater Biol.* 21: 47–55, 1989.
134. Pickering, A.D. Endocrine-induced pathology in stressed salmonid fish. *Fish. Res.* 17: 35–50, 1993.
135. Pickering, A.D. and D.J. Macey. Structure, histochemistry and the effect of handling on the mucous cells of the epidermis of the char *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Fish Biol.* 10: 505–512, 1977.
136. Pickering, A.D. and A. Stewart. Acclimation of the interrenal tissue of the brown trout, *Salmo trutta* L., to chronic crowding stress. *J. Fish Biol.* 21: 731–740, 1984.
137. Pickering, A.D., T.G. Pottinger and P. Christie. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *J. Fish Biol.* 20: 229–244, 1982.
138. Pickering, A.D., T.G. Pottinger, J. Carragher and J.P. Sumpter. The effects of acute and chronic

- stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68: 249-259, 1987.
139. Pickering, A.D., T.G. Pottinger, J.P. Sumpter, J.F. Carragher and P.-Y. Le Bail. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 86-93, 1991.
  140. Plisetskaya, E.M., C. Ottolenghi, M.A. Sheridan, T.P. Mommsen and A. Gorbman. Metabolic effects of salmon glucagon and glucagon-like peptide in coho and chinook salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 205-216, 1989.
  141. Pottinger, T.G. The effect of stress and exogenous cortisol on receptor-like binding of cortisol in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 194-203, 1990.
  142. Pottinger, T.G. and A.D. Pickering. The effect of cortisol administration on hepatic and plasma estradiol-binding capacity in immature female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 80: 264-273, 1990.
  143. Pottinger, T.G. and A.D. Pickering. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *J. Fish Biol.* 41: 435-447, 1992.
  144. Pottinger, T.G., A.D. Pickering and M.A. Hurley. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 103: 275-289, 1992.
  145. Pottinger, T.G., P. Prunet and A.D. Pickering. The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 454-460, 1992.
  146. Potts, W.T.W. and P.G. McWilliams. The effects of hydrogen and aluminium ions on fish gills. In: *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, edited by R. Morris, E.W. Taylor, D.J.A. Brown and J.A. Brown, Cambridge, Cambridge University Press, pp. 201-220, 1989.
  147. Primmatt, D.R.N., D.J. Randall, M. Mazeaud and R.G. Boutilier. The role of catecholamines in erythrocyte pH regulation and oxygen transport in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during exercise. *J. Exp. Biol.* 122: 139-148, 1986.
  148. Rand-Weaver, M., P. Swanson, H. Kawauchi and W.W. Dickhoff. Somatolactin, a novel pituitary protein: purification and plasma levels during reproductive maturation of coho salmon. *J. Endocrinol.* 133: 393-403, 1992.
  149. Reader, J.P. and C.H. Dempsey. Episodic changes in water quality and their effects on fish. In: *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, edited by R. Morris, E.W. Taylor, D.J.A. Brown and J.A. Brown, Cambridge, Cambridge University Press, pp. 67-83, 1989.
  150. Reid S.D. and S.F. Perry. The effects and physiological consequences of raised levels of cortisol on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte  $\beta$ -adrenoreceptors. *J. Exp. Biol.* 158: 217-240, 1991.
  151. Reinert, R.E. and D.W. Hohreiter. Adenylate energy charge as a measure of stress in fish. In: *Contaminant Effects on Fisheries*, edited by V.W. Cairns, P.V. Hodson and J.O. Nriagu, New York, NY, John Wiley and Sons, pp. 151-161, 1984.
  152. Renaud, J.M. and T.W. Moon. Characterization of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from the American eel, *Anguilla rostrata* Le Sueur. *J. Comp. Physiol.* 135: 115-125, 1980.
  153. Rivier, C. Role of interleukins in the stress response. In: *Stress Revisited, 1. Neuroendocrinology of Stress. Methods Achieve. Exp. Pathol., Vol. 14*, edited by G. Jasmin and M. Cantin, Basel, Karger, pp. 63-79, 1991.
  154. Roesijadi, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicol.* 81-114, 1992.
  155. Roubal, F.R. and A.M. Bullock. The mechanism of wound repair in the skin of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L., following hydrocortisone implantation. *J. Fish Biol.* 32: 545-555, 1988.
  156. Safford, S.E. and P. Thomas. Effects of capture and handling on circulating levels of gonadal steroids and cortisol in the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. (Abstract) In: *Reproductive Biology of Fish, 1987*, edited by D.R. Idler, L.W. Crim and J.M. Walsh, St. John's, Memorial University of Newfoundland, p. 312, 1987.
  157. Salonius, K. and G.K. Iwama. The effect of stress on the immune function of wild and hatchery coho salmon juveniles. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* 91: 47-49, 1991.
  158. Sabourin, T.D., D.B. Gant and L.J. Weber. The influence of metal and non-metal stressors on hepatic metal-binding protein production in buffalo sculpin, *Enophrys bison*. In: *Marine Pollution and Physiology: Recent Advances*, edited by F.P. Thurberg, A. Calabrese, F.J. Vernberg and W.B. Vernberg, Columbia, University of South California, pp. 247-266, 1985.
  159. Sangalang, G.B. and H.C. Freeman. Effects of sublethal cadmium on maturation and testosterone and 11-ketotestosterone production *in vivo* in brook trout. *Biol. Reprod.* 11: 429-435, 1974.

160. Sangalang, G.B. and M.J. O'Halloran. Adverse effects of cadmium on brook trout testis and on *in vitro* testicular androgen biosynthesis. *Biol. Reprod.* 9: 394-403, 1973.
161. Satchell, G.H. *Physiology and Form of Fish Circulation*. Cambridge, Cambridge University Press, 1991.
162. Saunders, R.L., E.B. Henderson, P.R. Harmon, C.E. Johnston and J.G. Eales. Effects of low environmental pH on smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 40: 1203-1211, 1983.
163. Schreck, C.B. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: *Stress and Fish*, edited by A.D. Pickering, London, Academic Press, pp. 295-322, 1981.
164. Schreck, C.B. and P.B. Moyle (Editors). *Methods for Fish Biology*. Bethesda, MD, American Fisheries Society, 1990.
165. Schwalm, K. and W.C. Mackay. The influence of exercise-handling stress on blood lactate, acid-base and plasma glucose status of northern pike (*Esox lucius* L.). *Can. J. Zool.* 63: 1125-1129, 1985.
166. Sheridan, M.A. Effects of thyroxine, cortisol, growth hormone, and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 220-238, 1986.
167. Shuter, B.J. Population-level indicators of stress. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8: 145-166, 1990.
168. Singh, S. and T.P. Singh. Evaluation of toxicity limit and sex hormone production in response to cythion and BHC in the vitellogenic catfish *Clarias batrachus*. *Environ. Res.* 42: 482-488, 1987.
169. Smith, A.C. and F. Ramos. Occult haemoglobin in fish skin mucus as an indicator of early stress. *J. Fish Biol.* 9: 537-541, 1976.
170. Snieszko, S.F. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.* 6: 197-208, 1974.
171. Soengas, J.L., P. Rey, G. Rozas, M.D. Andrés and M. Aldegunde. Effects of cortisol and thyroid hormone treatment on the glycogen metabolism of selected tissues of domesticated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 101: 317-328, 1992.
172. Sower, S.A. and R.S. Fawcett. Changes in gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, thyroxine and triiodothyronine of coho salmon held in two different rearing densities during smoltification. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A: 85-89, 1991.
173. Spies, R.B., D.W. Rice and J. Felton. Effects of organic contaminants on reproduction of the starry flounder *Platichthys stellatus* in San Francisco Bay. *Mar. Biol.* 98: 181-189, 1988.
174. Stave, J.W. and B.S. Roberson. Hydrocortisone suppresses the chemiluminescent response of striped bass phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 9: 77-84, 1985.
175. Stegeman, J.J. and P.J. Kloepper-Sams. Cytochrome P-450 isozymes and monooxygenase activity in aquatic animals. *Environ. Health Persp.* 71: 87-95, 1987.
176. Steinhart, M. and R. Eckmann. Evaluating the nutritional condition of individual whitefish (*Coregonus* spp.) larvae by the RNA/DNA ratio. *J. Fish Biol.* 40: 791-799, 1992.
177. Storer, J.H. Starvation and the effects of cortisol in the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 20: 939-948, 1967.
178. Suarez, R.K. and T.P. Mommsen. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can. J. Zool.* 65: 1869-1882, 1987.
179. Sumpter, J.P., A.D. Pickering and T.G. Pottinger. Stress-induced elevation of plasma  $\alpha$ -MSH and endorphin in brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 257-265, 1985.
180. Sumpter, J.P., P.-Y. Le Bail, A.D. Pickering, T.G. Pottinger and J.F. Carragher. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 94-102, 1991.
181. Sundby, A., K.A. Eliassen, A.K. Blom and T. Åsgard. Plasma insulin, glucagon, glucagon-like peptide and glucose levels in response to feeding, starvation and life-long restricted feed ration in salmonids. *Fish Physiol. Biochem.* 9: 253-259, 1991.
182. Swallow, R.L. and W.R. Fleming. The effect of oxaloacetate, ACTH, and cortisol on the liver glycogen levels of *Tilapia mossambica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 36: 93-98, 1970.
183. Tam, W.H., J.N. Fryer, B. Valentine and R.J.J. Roy. Reduction in oocyte production and gonadotrope activity, and plasma levels of estrogens and vitellogenin, in brook trout exposed to low environmental pH. *Can. J. Zool.* 68: 2468-2476, 1990.
184. Thomas, P. Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants. *Mar. Environ. Res.* 24: 179-183, 1988.
185. Thomas, P. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8: 9-28, 1990.

186. Thomas, P. and J.M. Neff. Plasma corticosteroid and glucose responses to pollutants in striped mullet: different effects of naphthalene, benzo[a]pyrene and cadmium exposure. In: *Marine Pollution and Physiology: Recent Advances. Belle W. Baruch Libr. Mar. Sci., 13*, edited by F.J. Vernberg, F.P. Thurberg, A. Calabrese and W.B. Vernberg, South Carolina, University of South Carolina Press, pp. 63–82, 1985.
187. Thomas, P., B.R. Woodin and J.M. Neff. Biochemical responses of the striped mullet *Mugil cephalus* to oil exposure. 1. Acute responses – interrenal activations and secondary stress responses. *Mar. Biol.* 59: 141–149, 1980.
188. Tufts, B.L. and D.J. Randall. The functional significance of adrenergic pH regulation in fish erythrocytes. *Can. J. Zool.* 67: 235–238, 1989.
189. Van De Kar, L.D., K.D. Richardson-Morton and P.A. Rittenhouse. Stress: neuroendocrine and pharmacological mechanisms. In: *Stress Revisited, 1. Neuroendocrinology of Stress. Methods Achieve. Exp. Pathol., Vol. 14*, edited by G. Jasmin and M. Cantin, Basel, Karger, pp. 133–173, 1991.
190. Van den Thillart, G. Adaptations of fish energy metabolism to hypoxia and anoxia. *Mol. Physiol.* 2: 49–61, 1982.
191. Van der Boon, J.G.E.E.J.M., G. Van den Thillart and A.D.F. Addink. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A: 47–53, 1991.
192. Van Waarde, A., G. Van den Thillart and F. Kesbeke. Anaerobic metabolism of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Comp. Physiol.* 149: 469–475, 1983.
193. Vijayan, M.M. and J.F. Leatherland. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Can. J. Zool.* 67: 2746–2750, 1989.
194. Vijayan, M.M., J.S. Ballantyne and J.F. Leatherland. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82: 476–486, 1991.
195. Vindimian, E., P. Namour, B. Migeon and J. Garric. *In situ* pollution induced cytochrome P-450 activity of freshwater fish: barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquatic Toxicol.* 21: 255–266, 1991.
196. Waring, C.P., R.M. Stagg and M.G. Poxton. The effect of handling on flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Fish Biol.* 41: 131–144, 1992.
197. Wedemeyer, G.A., B.A. Barton and D.J. Mcleay. Stress and acclimation. In: *Methods for Fish Biology*, edited by C.B. Schreck and P.B. Moyle, Bethesda, MD, American Fisheries Society, pp. 451–490, 1990.
198. Wells, R.M.G., R.H. McIntyre, A.K. Morgan and P.S. Davie. Physiological stress responses in big gamefish after capture: observations on plasma chemistry and blood factors. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A: 565–571, 1986.
199. Wendelaar Bonga, S.E. and P.H.M. Balm. Endocrine responses to acid stress in fish. In: *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, edited by R. Morris, E.W. Taylor, D.J.A. Brown and J.A. Brown, Cambridge, Cambridge University Press, pp. 243–263, 1989.
200. Whiting, S.J. and A.J. Wiggs. Effect of nutritional factors and cortisol on tyrosine aminotransferase activity in liver of brook trout, *Salvelinus fontinalis* Mitchill. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B: 189–193, 1977.
201. Wiegand, M.D. and R.E. Peter. Effect of testosterone, oestradiol-17 $\beta$  and fasting on plasma free fatty acids in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 66A: 323–326, 1980.
202. Winberg, S., G.E. Nilsson and K.H. Olsen. Social rank and brain levels of monoamines and monoamine metabolites in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *J. Comp. Physiol. A* 168: 241–246, 1991.
203. Witters, H.E., S. Van Puymbroeck, I. Van Den Sande and O.L.J. Vanderborcht. Haematological disturbances and osmotic shifts in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under acid and aluminium exposure. *J. Comp. Physiol. B* 160: 563–571, 1990.
204. Witters, H.E., S. Van Puymbroeck and O.L.J. Vanderborcht. Adrenergic response to physiological disturbances in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to aluminium at acid pH. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 48: 414–420, 1991.
205. Wofford, H.W. and P. Thomas. Effect of xenobiotics on peroxidation of hepatic microsomal lipids from striped mullet (*Mugil cephalus*) and Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Mar. Environ. Res.* 24: 285–289, 1988.
206. Wood, C.M. A pharmacological analysis of the adrenergic and cholinergic mechanisms regulating branchial vascular resistance in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Zool.* 53: 1569–1577, 1975.

207. Wood, C.M. The physiological problems of fish in acid waters. In: *Acid Toxicity and Aquatic Animals*, edited by R. Morris, E.W. Taylor, D.J.A. Brown and J.A. Brown, Cambridge, Cambridge University Press, pp. 125-152, 1989.
208. Wood, C.M. Flux measurements as indices of H<sup>+</sup> and metal effects on freshwater fish. *Aquatic Toxicol.* 22: 239-264, 1992.
209. Woodward, C.C. and R.J. Strange. Physiological stress responses in wild and hatchery-reared rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 116: 574-579, 1987.
210. Young, G., B.Th. Björnsson, P. Prunet, R.J. Lin and H.A. Bern. Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74: 335-345, 1989.

Handwritten text, possibly a signature or a name, located in the center of the page. The text is faint and difficult to read.

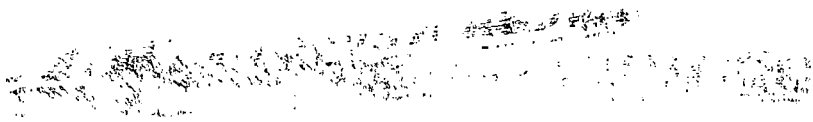
**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 2**

1. Amman, H., J. Noël, Y. Boulanger and P. Vinay. Relationship between intracellular ATP and the sodium pump activity in dog renal tubules. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 57-67, 1990.
2. Avrova, N.F. The effect of natural adaptations of fishes to environmental temperature on brain ganglioside fatty acid and long chain base composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B: 903-909, 1984.
3. Behan, M.K., A.G. Macdonald, G.R. Jones and A.R. Cossins. Homeoviscous adaptation under pressure: the pressure dependence of membrane order in brain myelin membranes of deep-sea fish. *Biochim. Biophys. Acta* 1103: 317-323, 1992.
4. Blaxter, J.H.S., C.S. Wardle and B.L. Roberts. Aspects of the circulatory physiology and muscle systems of deep-sea fish. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 51: 991-1006, 1971.
5. Busacker, G.P. and W. Chavin. Characterization of  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -ATPases and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPases from the gill and the kidney of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 249-256, 1981.
6. Carruthers, A. and D.L. Melchior. How bilayer lipids affect membrane protein activity. *Trends Biochem. Sci.* 11: 331-335, 1986.
7. Chapman, D. Biomembrane fluidity: the concept and its development. In: *Membrane Fluidity in Biology*, Vol. 2, edited by R.C. Aloia, Academic Press, New York, pp. 5-42, 1983.
8. Chong, P.L.-G., P.A.G. Fortes and D.M. Jameson. Mechanisms of inhibition of (Na,K)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* 260: 14484-14490, 1985.
9. Cossins, A.R. The adaptation of membrane structure and function to changes in temperature. In: *Cellular Acclimatisation to Environmental Change*, edited by A.R. Cossins and P. Shterline, Cambridge, Cambridge University Press, pp. 3-32, 1983.
10. Cossins, A.R., K. Bowler and C.L. Prosser. Homeoviscous adaptation and its effect upon membrane-bound proteins. *J. Therm. Biol.* 6: 183-187, 1981.
11. Cossins, A.R. and A.G. Macdonald. Homeoviscous theory under pressure. II. The molecular order of membranes from deep-sea fish. *Biochim. Biophys. Acta* 776: 144-150, 1984.
12. Cossins, A.R. and A.G. Macdonald. Homeoviscous adaptation under pressure. III. The fatty acid composition of liver mitochondrial phospholipids of deep-sea fish. *Biochim. Biophys. Acta* 860: 325-335, 1986.
13. Cossins, A.R. and A.G. Macdonald. The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: fish from the deep and cold. *J. Bioenerg. Biomembranes* 21: 115-135, 1989.
14. DeLong, E.F. and A.A. Yayanos. Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science* 228: 1101-1103, 1985.
15. DeLong, E.F. and A.A. Yayanos. Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea procaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 730-737, 1986.
16. de Smedt, H., R. Borchgraef, F. Ceuterick and K. Heremans. Pressure effects on lipid-protein interactions in  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 556: 479-489, 1979.
17. Febry, R. and P. Lutz. Energy partitioning in fish: the activity-related cost of osmoregulation in a euryhaline cichlid. *J. Exp. Biol.* 128: 63-85, 1987.
18. Frizzell, R.A., D.R. Halm, M.W. Musch, C.P. Stewart and M. Field. Potassium transport by flounder intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.* 246: F946-F951, 1984.
19. Gibbs, A. and G.N. Somero. Pressure adaptation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in gills of marine teleosts. *J. Exp. Biol.* 143: 475-492, 1989.
20. Gibbs, A. and G.N. Somero. Pressure adaptation of teleost gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -adenosine triphosphatase: role of the lipid and protein moieties. *J. Comp. Physiol.* 160B: 431-439, 1990.
21. Gibbs, A. and G.N. Somero.  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -adenosine triphosphatase activities in gills of marine teleost fishes: changes with depth, size and locomotory activity level. *Mar. Biol.* 106: 315-321, 1990.
22. Grisham, C.M. and R.E. Barnett. The role of lipid-phase transitions in the regulation of the (sodium + potassium) adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 12: 2635-2637, 1973.
23. Harris, W.E. Modulation of  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase activity by the lipid bilayer examined with dansylated phosphatidylserine. *Biochemistry* 24: 2873-2883, 1985.
- 23b. Hazel, J.R. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Ann. Rev. Physiol.* 57: 19-42, 1995.
24. Hazel, J.R. and E.E. Williams. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29: 167-227, 1990.
25. Hochachka, P.W. Channels and pumps - determinants of metabolic cold adaptation strategies. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 515-519, 1988.
26. Hochachka, P.W. and G.N. Somero. *Biochemical Adaptations*. Princeton, NJ, Princeton University Press, 1984.
27. Kawakami, K., S. Noguchi, M. Noda, H. Takahashi, T. Ohta, H. Nojima, M. Kawamura, K. Nagano, T. Hirose, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata and S. Numa. Primary structure of the  $\alpha$ -subunit of *Torpedo californica*  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$  ATPase deduced from cDNA sequence. *Nature* 316: 733-736, 1985.
28. Kimelberg, H.K. Alterations in phospholipid-dependent  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity due to membrane fluidity. *Biochim. Biophys. Acta* 413: 143-156, 1975.



29. Kimelberg, H.K. and D. Papahadjopoulos. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 249: 1071-1080, 1974.
30. Klein, R.A. Thermodynamics and membrane processes. *Q. Rev. Biophys.* 15: 667-757, 1982.
31. Läuger, P. *Electrogenic Ion Pumps*. Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc., 1991.
32. Lee, A.G. Lipids and their effects on membrane proteins: evidence against a role for fluidity. *Prog. Lipid Res.* 30: 323-348, 1991.
33. Lee, J.A.C. and A.R. Cossins. Temperature adaptation of biological membranes: differential homeoviscous responses in brush-border and basolateral membranes of carp intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 1026: 195-203, 1990.
34. Macdonald, A.G. The effects of pressure on the molecular structures and physiological functions of cell membranes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 304B: 47-68, 1984.
35. Macdonald, A.G. The homeoviscous theory of adaptation applied to excitable membranes: a critical evaluation. *Biochim. Biophys. Acta* 1031: 291-310, 1990.
36. Macdonald, A.G. and A.R. Cossins. The theory of homeoviscous adaptation of membranes applied to deep-sea animals. In: *Physiological Adaptations of Marine Animals*, edited by M.S. Laverack, Company of Biologists, Cambridge, pp. 301-322, 1985.
37. Madan Mohan Rao, G. Oxygen consumption of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to activity and salinity. *Can. J. Zool.* 46: 781-786, 1968.
38. McCormick, S.D. and H.A. Bern. *In vitro* stimulation of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity and ouabain binding by cortisol in coho salmon gill. *Am. J. Physiol.* 256: R707-R715, 1989.
39. McCormick, S.D., C.D. Moyes and J.S. Ballantyne. Influence of salinity on the energetics of gill and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.* 6: 243-254, 1989.
40. McCormick, S.D. and R.L. Saunders. Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: osmoregulation, growth, and metabolism. *Am. Fish. Soc. Symp.* 1: 211-229, 1987.
41. Moon, T.W. Effects of hydrostatic pressure on gill  $\text{Na}-\text{K}-\text{ATPase}$  in an abyssal and a surface-dwelling teleost. *Comp. Biochem. Physiol.* 52B: 59-65, 1975.
42. Morild, E. The theory of pressure effects on enzymes. *Adv. Protein Chem.* 34: 93-166, 1981.
43. O'Grady, S.M. and A.L. DeVries. Osmotic and ionic regulation in polar fishes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 57: 219-228, 1982.
44. Péqueux, A. and R. Gilles. Effects of high hydrostatic pressures on the activity of the membrane ATPases of some organs implicated in hydromineral regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 59B: 207-212, 1978.
45. Pfeiler, E. Effects of hydrostatic pressure on  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in gills of marine teleost fish. *J. Exp. Zool.* 205: 393-402, 1978.
46. Philpott, C.W. Tubular system membranes of teleost chloride cells: osmotic response and transport sites. *Am. J. Physiol.* 238: R171-R184, 1980.
47. Phleger, C.F. and R.J. Laub. Skeletal fatty acids in fish from different depths off Jamaica. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B: 329-334, 1989.
48. Raynard, R.S. and A.R. Cossins. Homeoviscous adaptation and thermal compensation of sodium pump of trout erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 260: R916-R924, 1991.
49. Rossier, B.C., K. Geering and J.P. Kraehenbuhl. Regulation of the sodium pump: how and why? *Trends Biochem. Sci.* 12: 483-487, 1987.
50. Schönrock, C., S.D. Morley, Y. Okawara, K. Lederis and D. Richter. Sodium and potassium ATPase of the teleost fish *Catostomus commersoni*. *Z. Physiol. Chem.* 372: 279-286, 1991.
51. Schwarzbaum, P.J., H. Niederstätter and W. Wieser. Effects of temperature on the  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase and oxygen consumption in hepatocytes of two species of freshwater fish, roach (*Rutilus rutilus*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Physiol. Zool.* 65: 699-711, 1992.
52. Schwarzbaum, P.J., W. Wieser and A.R. Cossins. Species-specific responses of membranes and the  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$  pump to temperature changes in the kidney of two species of freshwater fish, roach (*Rutilus rutilus*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Physiol. Zool.* 65: 17-34, 1992.
53. Schwarzbaum, P.J., W. Wieser and H. Niederstätter. Contrasting effects of temperature acclimation on mechanisms of ionic regulation in a eurythermic and a stenothermic species of freshwater fish (*Rutilus rutilus* and *Salvelinus alpinus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 98A: 483-489, 1991.
54. Shelton, C., A.G. Macdonald, A. Péqueux and I. Gilchrist. The ionic composition of the plasma and erythrocytes of deep sea fish. *J. Comp. Physiol.* 155B: 629-633, 1985.
55. Silvius, J.R. and R.N. McElhaney. Non-linear Arrhenius plots and the analysis of reaction and motional rates in biological membranes. *J. Theor. Biol.* 88: 135-152, 1981.
56. Sinensky, M. Homeoviscous adaptation - a homeostatic process that regulates the viscosity of

- membrane lipids in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 522-525, 1974.
57. Sinensky, M., F. Pinkerton, E. Sutherland and F.R. Simon. Rate limitation of  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -stimulated adenosine triphosphatase by membrane acyl chain ordering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4893-4897, 1979.
  58. Smith, M.W. Influence of temperature acclimatization on the temperature-dependence and ouabain-sensitivity of goldfish intestinal adenosine triphosphatase. *Biochem. J.* 105: 65-71, 1967.
  59. Smith, M.W. and J.C. Ellory. Temperature-induced changes in sodium transport and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -adenosine triphosphatase activity in the intestine of goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 39A: 209-218, 1971.
  60. Stein, D.L. Towing large nets by single warp at abyssal depths: methods and biological results. *Deep-Sea Res.* 32: 183-200, 1985.
  61. Stuenkel, E.L. and S.D. Hillyard. Effects of temperature and salinity on gill  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase activity in the pupfish, *Cyprinodon salinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 67A: 179-182, 1980.
  62. Thomson, A.J., J.R. Sargent and J.M. Owen. Influence of acclimatization temperature and salinity on  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent adenosine triphosphatase and fatty acid composition in the gills of the eel, (*Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol.* 56B: 223-228, 1977.
  63. White, F.N. and G.N. Somero. Acid-base regulation and phospholipid adaptations to temperature: time courses and physiological significance of modifying the milieu for protein function. *Physiol. Rev.* 62: 40-90, 1982.
  64. Wirsen, C.O., H.W. Jannasch, S.G. Wakeham and E.A. Canuel. Membrane lipids of a psychrophilic and barophilic deep-sea bacterium. *Curr. Microbiol.* 14: 319-322, 1987.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 3**

1. Audet, C., R.S. Munger and C.M. Wood. Long-term sublethal acid exposure in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in soft water : effects of ion exchanges and blood chemistry. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 45: 1387-1398, 1988.
2. Audet, C. and C.M. Wood. Do rainbow trout (*Salmo gairdneri*) acclimate to low pH ? *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 45: 1399-1405, 1988.
3. Audet, C. and C.M. Wood. Branchial morphological and endocrine responses of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) to a long-term sublethal acid exposure in which acclimation did not occur. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 50: 198-209, 1993.
4. Bolis C.L., A.Cambria and M.Fama. Effects of acid stress on fish gills. In: *Toxins, Drugs and Pollutants in Marine Animals*, edited by L. Bolis, J. Zadunaisky and R. Gilles, Berlin, Springer-Verlag, pp.122-129, 1984.
5. Booth, C.E., D.G. McDonald, B.P.Simons and C.M. Wood. Effects of aluminum and low pH on net ion fluxes and ion balance in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 45: 1563-1574, 1988.
6. Brown, D.J.A. The effects of various cations on the survival of brown trout *Salmo trutta*, at low pHs. *J. Fish Biol.* 18: 31-40, 1981.
7. Brown, D.J.A. The effects of pH and calcium on fish and fisheries. *Water air Soil Pollut.* 18: 343-351, 1982.
8. Chevalier , G., L. Gauthier and G. Moreau. Histopathological and electron microscopic studies of gills of brook trout, *Salvelinus fontinalis*, from acidified lakes. *Can. J. Zool.* 63: 2062-2070, 1985.
9. Cuthbert, A.W. and J. Maetz. The effects of calcium and magnesium on sodium fluxes through the gills of *Carassius auratus*, L. *J. Physiol.* 221: 633-643, 1972.
10. Dawson, R.M.C., D.C. Elliot, W.H. Elliot and K.M. Jones. *Data for biological Research*. New York, N.Y., Oxford University Press, 580 pp., 1986.
11. Daye, P.G. and E.T. Garside. Histopathologic changes in superficial tissues of brook trout *Salvelinus fontinalis* exposed to acute and chronic levels of pH. *Can. J. Zool.* 54: 2140-2155, 1976.
12. Eddy, F.B. and J.E. Fraser. Sialic acid and mucus production in rainbow trout *Salmo gairdneri* in response to zinc and seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* 73C: 357-399, 1982.
13. Falk, D.L. and W.A. dunson. The effects of season and acute sublethal exposure on survival time of brook trout at low pH. *Water Res.* 11: 13-15, 1976.
14. Fletcher, T.C., R. Jones and L. Reid. Identification of glycoprotein in goblet cells of epidermis and gill of plaice (*Pleuronectes platessa* L.), flounder (*Platichthys flesus* L.) and rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Histochem. J.* 8: 597-608, 1976.
15. Freda J. and D.G. McDonald. Physiological correlates of interspecific variation in acid tolerance in fish. *J. Exp. Biol.* 136: 243-258, 1988.
16. Fromm, P.O. A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid stress. *Environ. Biol. Fish.* 5: 79-93, 1980.
17. Haines T.A. Acidic precipitation and its consequences for aquatic ecosystems : a review. *Trans. Am. Fish. Soc.* 110: 669-707, 1981.

18. Hodson, P.V. The effect of metal metabolism on uptake, disposition and toxicity in fish. *Aquatic Toxicol.* 11: 3-8, 1988.
19. Howells, G.D., D.J.A. Brown and K. Sadler. Effects of acidity, calcium and aluminium on fish survival and productivity - a review. *J.Sci. Food. Agric.* 34: 559-570, 1983.
20. Howells, G.D. Fisher decline: mechanisms and predictions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 305B: 529-547, 1984.
21. Karlsson-Norrgrén, L., I. Björklund, O. Ljungberg and P. Runn. Acid water and aluminium exposure: experimentally induced gill lesions in brown trout *Salmo trutta* L. *J. Fish Dis.* 9: 11-25, 1986.
22. Karlsson-Norrgrén, L., W. Dickson, O. Ljungberg and P. Runn. Acid water and aluminium exposure: gill lesions and aluminium accumulation in farmed brown trout *Salmo trutta* L. *J. Fish Dis.* 9: 1-9, 1986.
23. Kelso, J.R.M., C.K. Minns, J.E. Grey and M.L. Jones. Acidification of surface waters in eastern Canada and its relationship to aquatic biota. *Can. Spec. Publ. Fish Aquatic Sci.* 87: 42 pp., 1986.
24. Kelso, J.R.M., M.A. Shaw, C.K. Minns and K.H. Mills. An evaluation of the effects of atmospheric acidic deposition on fish and the fishery resources of Canada. *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* 47: 644-655, 1990.
25. Laurent, P. and S.F. Perry. Environmental effects on fish gill morphology. *Physiol. Zool.* 64: 4-25, 1991.
26. Leino, R.L. and J.H. McCormick. Morphological and morphometrical changes in chloride cells of the gills of *Pimephales promelas* after chronic exposure to acid water. *Cell tissue Res.* 236: 121-128, 1984.
27. Leino, R.L., J.H. McCormick and K.M. Jensen. Changes in gill histology of fathead minnows and yellow perch transferred to soft water or acidified soft water with particular reference to chloride cells. *Cell tissue Res.* 250: 389-399, 1987.
28. Leivestad, H. Physiological effects of acid stress on fish. In: *Acid Rain / Fisheries*, edited by R.E. Johnson, Bethesda, MD, American Fisheries Society, pp. 157-164, 1982.
29. Lock, R.A.C. and A.P. Van Overbeeke. Effects of mercuric chloride and methylmercuric chloride on mucus secretion in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp. Biochem. Physiol.* 69C: 67-73, 1981.
30. Mallat, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish Aquatic Sci.* 24: 630-648, 1985.
31. McDonald, D.G. The effects of H<sup>+</sup> upon the gills of freshwater fish. *Can. J. Zool.* 61: 691-703, 1983.
32. McDonald, D.G., H. Hobe and C.M. Wood. The influence of calcium on the physiological response of the rainbow trout *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. *J. Exp. Biol.* 88: 109-131, 1980.
33. McDonald, D.G., R.L. Walker and P.R.H. Wilkes. The interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the rainbow trout, *Salmo*

- gairdneri. II. Branchial ionoregulatory mechanisms. *J. Exp. Biol.* 102: 141-155, 1983.
34. McDonald, D.G. and M.S. Rogano. Ion regulation by rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in ion poor water. *Physiol. Zool.* 59: 318-331, 1986.
35. McDonald, D.G. and C.L. Milligan. Sodium transport in the brook trout, *Salvelinus fontinalis*: Effects of prolonged low pH exposure in the presence and absence of aluminum. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 45: 1606-1613, 1987.
36. McDonald, D.G. and D.G. Freda, V. Cavdek, R. Gonzalez and S. Zia. Interspecific differences in gill morphology of freshwater fish in relation to tolerance to low-pH environments. *Physiol. Zool.* 64: 124-144, 1991.