



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ: Γεωπονικών Επιστημών

ΤΜΗΜΑ: Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και  
Υδατοκαλλιεργειών

Π.Μ.Σ.: «Βιώσιμη Αλιεία, Υδατοκαλλιέργεια»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:

# Ανοσοτοξικολογία Ιχθύων

*Βιβλιογραφική ανασκόπηση*

**Αθηνά Σαμαρά**

Επιβλέπων: Παναγιώτης Λογοθέτης, Επίκ. Καθηγητής

**ΙΟΥΝΙΟΣ 2021 – ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ**



## **Abstract**

The fish immune system is of paramount importance to the health and well-being of the animals and the populations thereof. Fish represent a very important constituent of nearly every aquatic habitat and are particularly diverse in biological terms. Water pollution and contamination with toxic chemicals is a huge environmental challenge; this includes a vast range of potentially hazardous substances which can have adverse impacts on the organisms and disrupt their normal functions with serious ecological consequences. Given the nature of the immune system as a constant guardian of individual health against any biological threat, which is almost certain to appear sooner or later, the possible immunotoxic effects of any noxious chemical that might enter the body from its external structures into the systemic milieu, could signify an indirect health problem and come to be life-threatening, even in the absence of other pathological implications. The research on this general subject has produced an accumulating amount of data that are absolutely affirmative to the seriousness of this issue. Many types of immunodepressive impacts have been described, based on a variety of studies and experimental set-ups; these impacts are due to mechanisms of toxicity not fully clarified but, anyway, resulting in damages to the normal functioning of one or more constitutive elements of the system. The evidence, however, is not invariably conclusive owing not only to the complex nature of the immune system and of the biological variation of the animals tested vis-à-vis any suspect substance but, also, to the – perhaps inevitable – lack of standardization regarding the exposure protocols used. At any rate, with respect to the possible ramifications of this matter, a clear distinction can be drawn between immunotoxic effects on wild or reared fish populations with the former being more significant from an ecological standpoint whereas the latter are clearly more focused on economical issues as they are in a particular setting of possible threats and possibilities for control.

## Περίληψη

Με δεδομένη την αποφασιστική σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος για την υγεία του οργανισμού, η οποιαδήποτε δυσλειτουργία του μπορεί να έχει σοβαρές φυσιολογικές και οικολογικές συνέπειες. Η τεράστια βιολογική ποικιλία των Ιχθύων, που εκτείνεται σε κάθε είδους υδάτινο βιότοπο, μπορεί να δεχθεί επιδράσεις, διαφορετικής έντασης και διάρκειας, από μια επίσης εντυπωσιακή ποικιλία τοξικών παραγόντων που μπορεί να εμφανίζονται στο άμεσο περιβάλλον τους και να έρχονται σε άμεση συνάφεια με τον οργανισμό τους, εισερχόμενοι μέσω των εξωτερικών επιθηλίων δια της τροφής ή/και του νερού, και προκαλώντας διάφορες τοξικοπαθολογικές αλλοιώσεις και διαταραχές πέραν του συνδρόμου γενικής παθοφυσιολογικής καταπόνησης. Οι τοξικές αυτές επιδράσεις ερευνώνται παλαιόθεν ως έχουσες άμεση επίπτωση στην υγεία και ευεξία των ιχθύων· ειδικότερα, τέτοιες επιδράσεις στο ανοσοποιητικό μπορούν να συνεπάγονται έως και σημαντική ανοσοκαταπίεση, λόγω βλαβών που επέρχονται στους ιστούς του συστήματος, ακόμη και εν τη απουσία άλλων παθολογικών επιπτώσεων, πράγμα που μπορεί να επιτρέψει την δημιουργία σοβαρών προβλημάτων υγείας σε όλα τα βιολογικά στάδια των ιχθύων ως εκ της μόνιμης παρουσίας διαφόρων βιολογικών απειλών που το ανοσοποιητικό σύστημα αντιμετωπίζει, κατά κανόνα, επιτυχώς. Οι μελέτες που έχουν γίνει επ' αυτού, έως σήμερα έχουν δώσει αρκετά χρήσιμα στοιχεία για την τοξικότητα πολλών ρυπαντών του υδάτινου περιβάλλοντος και τα συνακόλουθα ανοσοτροποποιητικά αποτελέσματά τους αλλά δεν έχουν καταλήξει, όπως ήταν αναμενόμενο, σε οριστικά συμπεράσματα πλην της επιβεβαίωσης της σοβαρότητας του εν γένει ζητήματος. Μια σαφής διάκριση μπορεί, ίσως, να γίνει μεταξύ αγρίων και εκτρεφόμενων ιχθυοπληθυσμών ως προς την φύση και τον έλεγχο των απειλών και των αποτελεσμάτων της οποιασδήποτε τοξικής επίδρασης στο ανοσοποιητικό σύστημα· στην δεύτερη περίπτωση οι τελικές επιπτώσεις θα είναι απλώς οικονομικές, ενώ στην πρώτη κυρίως οικολογικές.

## ΠΙΝΑΞ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<u>A.A.</u>	<u>Τίτλος Κεφαλαίου</u>	<u>Σελ.</u>
<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	1
<b>2</b>	<b>ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΟΞΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ</b>	16
<b>3</b>	<b>ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ</b>	49
<b>4</b>	<b>ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	59
<b>5</b>	<b>ΤΟΞΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ / ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ</b>	65
<b>6</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	69
<b>7</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	71

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1. Βιώσιμη Αλιεία (Ιχθύων) - Υδατοκαλλιέργεια (Ιχθύων)**

Η ζωή του ανθρώπου πάνω στον πλανήτη είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το υγρό στοιχείο για μια σειρά αρκετά σπουδαίων λόγων μεταξύ των οποίων ιδιαίτερη θέση κατέχει η παραγωγική εκμετάλλευση των υδρόβιων πόρων. Από την Παλαιολιθική κιόλας εποχή ο άνθρωπος κατασκεύασε αλιευτικά εργαλεία και δεν είναι τυχαίο ότι οι πρώτοι μόνιμοι οικισμοί εντοπίζονται στις όχθες λιμνών. Με την πρόοδο της τεχνολογίας, τα αλιευτικά εργαλεία εξελίχθηκαν και, τώρα πλέον, η αλιεία δεν περιορίζεται μόνο στις παράκτιες περιοχές αλλά καλύπτει όλα τα μήκη και βάρη των ωκεανών. Αν και περιλαμβάνονται φυτικοί οργανισμοί, η αλιεία αφορά ως επί το πλείστον σε ζωικά 'αλιεύματα' ('ιχθυηρά': 'ψάρια' και 'θαλασσινά'). Η αλιεία είναι βασικό στοιχείο παράδοσης, πολιτισμού και ευημερίας, κυρίως στις παράκτιες/παρόχθιες περιοχές του πλανήτη, ενώ για πάνω από 3 δισεκατομμύρια ανθρώπους τα αλιεύματα αποτελούν βασική και συχνά μοναδική πηγή ζωικής πρωτεΐνης και βασικών αμινοξέων. Πέραν της ανθρώπινης διατροφής, τα αλιευτικά προϊόντα χρησιμοποιούνται και σε άλλες, δευτερεύουσες, δραστηριότητες σχετιζόμενες με τον σύγχρονο πολιτισμό και τις απαιτήσεις του.

Ο 20ός αιώνας είδε, αρχικά, μια ραγδαία αύξηση της αλιευτικής παραγωγής, χάρη και στην ραγδαία επιστημονική και τεχνολογική πρόοδο, αλλά και, τελευταία, μια εξίσου ραγδαία αύξηση της υδατοκαλλιεργητικής παραγωγής, κυρίως ζωικών οργανισμών, πράγμα που ήρθε να καλύψει την ολοένα αυξανόμενη ζήτηση ιχθυηρών καθώς η αλιεία έφθανε στα όριά της. Η υδατοκαλλιέργεια συνέβαλε στο να αυξηθεί η παγκόσμια κατά κεφαλήν κατανάλωση 'ψαριών' και 'θαλασσινών' και δημιούργησε μια σειρά νέων θέσεων εργασίας. Μαζί με την αλιεία συμβάλλει στην επισιτιστική ασφάλεια, την υγιεινή διατροφή, και την κοινωνικο-οικονομική ευημερία συνολικά. Ενδεικτικά, δεκάδες εκατομμυρίων άνθρωποι αναφέρονται (FAO, 2018) ως εργαζόμενοι στον πρωτογενή τομέα της αλιείας και της υδατοκαλλιέργειας, ενώ πάρα πολλοί ακόμη απασχολούνται στους τομείς της επεξεργασίας, τυποποίησης και εμπορίας των σχετικών προϊόντων καθώς και της έμμεσης υποστήριξης των σχετικών δραστηριοτήτων. Αυτά μας δημιουργούν την υποχρέωση για συνετή

και υπεύθυνη διαχείριση των υδρόβιων πόρων ώστε να υπάρχει η δυνατότητα για συνεχή απόδοση (αναφερόμενη και ως «αιφορία»).

Η ρύπανση των υδάτων από φυσικές πηγές αλλά, καινοφανώς και κυρίως, από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες (βιομηχανία, γεωργοκτηνοτροφία, αστικά λύματα, μεταφορές κ.λπ.) έχει σαν αποτέλεσμα την υποβάθμιση των υδατικών φυσικών οικοσυστημάτων με την συνακόλουθη μείωση των 'αγρίων' (ή 'ελευθέρων') ιχθυοπληθυσμών ή την ακαταλληλότητα τους για την ανθρώπινη διατροφή. Η υπεραλίευση πολλών φυσικών ιχθυοαποθεμάτων επιτείνει την φθίνουσα πορεία τους, καθώς και η υποβάθμιση των φυσικών βιοτόπων και η διατάραξη των τροφικών πλεγμάτων από ποικίλα αίτια, ενώ δεν έχουν ακόμα εκτιμηθεί οι επιπτώσεις της κλιματικής αλλαγής. Υπάρχουν περισσότερες από 100.000 «ξеноβιοτικές» ουσίες στις ομάδες των ποικίλων φαρμάκων, βιοκτόνων, βιομηχανικών χημικών, προσθέτων τροφίμων και άλλων προϊόντων ανθρώπινης κατανάλωσης οι οποίες, ως επί το πλείστον, καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον. Όλες αυτές οι ουσίες έρχονται σε επαφή με τους ζωντανούς οργανισμούς, σε όλο τον κύκλο ζωής τους, προκαλώντας τους οξείες ή χρόνιες τοξικότητες. Καθίσταται, επομένως, εμφανές ότι η βιωσιμότητα της σύγχρονης αλιείας είναι ένα μεγάλο ζήτημα που αφορά, πλέον, σε όλη την ανθρωπότητα ξεκινώντας από την τοπική και καταλήγοντας σε παγκόσμια κλίμακα. Η σύγχρονη ιχθυοκαλλιέργεια, από την άλλη μεριά, έχει πλέον εξελιχθεί σε έναν κρίσιμο κλάδο του πρωτογενούς τομέα και περιλαμβάνει τεράστια ποικιλία Ειδών και συστημάτων παραγωγής, από τα πιο 'κλασσικού τύπου' εκτατικά – που λίγο διαφέρουν από την παραδοσιακή αλιεία (π.χ. λιμνοθάλασσες) – έως τα πιο προχωρημένα υπερεντατικά. Όμως, η βιωσιμότητά της εξαρτάται κυρίως από την εισροή πρώτων υλών μεταξύ των οποίων είναι και τα (παρα)προϊόντα της ελεύθερης αλιείας (προκειμένου για την πιο παραγωγική μορφή καλλιέργειας, την εκτροφή) οξύνοντας, έτσι, το πρόβλημα βιωσιμότητας της τελευταίας μέσω του ανταγωνισμού για τους πεπερασμένους πόρους της· αυτή η κατάσταση οδηγεί είτε στην υποβάθμιση της ποιότητας των ιχθυοκαλλιεργητικών προϊόντων είτε στην αύξηση της τιμής τους, πράγματα που τα καθιστούν λιγότερο ελκυστικά στους καταναλωτές. Επιπλέον, η υποβάθμιση της ποιότητας του φυσικού νερού, ως αναγκαίου και αναντικατάστατου μέσου της ιχθυοκαλλιέργειας, συνιστά μίαν όχι ασήμαντη απειλή σε πολλές

περιπτώσεις ιχθυοκαλλιεργητικής δραστηριότητας. Σε αυτά έρχεται να προστεθεί και μια σειρά από άλλα προβλήματα, βιολογικής ή/και διαχειριστικής φύσεως, τα οποία μπορεί επίσης να συμβάλουν ώστε να οδηγηθούμε σε τεχνικο-οικονομικά αδιέξοδα. Η ιχθυοκαλλιέργεια, επίσης, μπορεί να επηρεάσει και με άλλους τρόπους την ελεύθερη αλιεία όπως: διασπορά βιοπαθογονικών συντελεστών σε εγγύς ευρισκόμενους άγριους ιχθυοπληθυσμούς (του ιδίου ή διαφορετικών με τα καλλιεργούμενα Ειδών), αλλαγή των φυσικών γονιδιακών συχνοτήτων, και διαρροή ρύπων στο εγγύς υδάτινο περιβάλλον.

## 1.2. Βιολογία και ποικιλότητα Ιχθύων

Μεταξύ των πολλών Ειδών υδρόβιων ζώων τα οποία αλιεύονται ή/και καλλιεργούνται με σκοπό την ανθρώπινη κατανάλωση, οι Ιχθείς απαρτίζουν μια ομάδα σχετικώς ομοιογενή και ευδιάκριτη η οποία παλαιόθεν κατέχει δεσπόζουσα θέση για την πρωτογενή παραγωγή των ανθρωπίνων κοινωνιών και πολιτισμών, ιδιαίτερα δε αυτών που αναπτύχθηκαν και αναπτύσσονται κοντά σε σχετικώς μεγάλες υδατικές μάζες υγρής μορφής. Παράλληλα, οι Ιχθείς (εν γένει αλλά και κατ' ιδίαν) αποτελούν έναν ζωτικό και κρίσιμο βιοτικό παράγοντα σχεδόν σε κάθε τύπο υδάτινου περιβάλλοντος και οικοσυστήματος συμμετέχοντας σε διάφορους τύπους φυσικών βιοκοινωνιών.

Ο όρος «Ιχθείς» αναφέρεται σ' έναν τύπο έμβιων οργανισμών και σε μια ταξινομική ομάδα που αφορά σε μια κατηγορία ποικιλόμορφων υδρόβιων Σπονδυλωτών που ανήκουν σε διάφορους εξελικτικούς κλάδους οι οποίοι έχουν διαμορφωθεί από την υδρόβια διαβίωση. Ορίζονται ως η ομάδα Σπονδυλωτών που δεν έχουν άκρα με δάκτυλα (δηλ., τα 'μη-Τετράποδα'). Αυτός ο αρνητικός ορισμός δείχνει ότι τα 'ψάρια' είναι μια παραφυλετική ομάδα, η οποία περιλαμβάνει τους Άγναθους, τους Οστεϊχθύες και τους Χονδριχθύες. Αποτελείται από περίπου 32.000 Είδη οργανισμών (Helfman et al., 2009).

### Συστηματική κατάταξη 'Ψαριών':

Βασίλειο	Animalia (Ζώα)
Συνομοταξία	Chordata (Χορδωτά)
Υποσυνομοταξία	Σπονδυλωτά (Vertebrata)
Κλάδοι	Άγναθα (Agnatha) και Γναθόστομα (Gnathostomata)
Υπερομοταξία	Ιχθύες (Pisces)



Ομοταξίες	Χονδριχθύες (Chondrichthyes) και Οστεϊχθύες (Osteichthyes)
-----------	--

Τα 'ψάρια' υπάρχουν στη Γη περισσότερο από 450 εκατομμύρια χρόνια, διάστημα κατά το οποίο έχουν εξελιχθεί επανειλημμένως ώστε να προσαρμοστούν σε σχεδόν κάθε υπαρκτό τύπο υδάτινου βιότοπου, από τα υψηλότερα όρη έως και τις ωκεάνιες αβύσσους, καθώς και από την Ανταρκτική έως και τις τροπικές λιμνοθάλασσες. Πρέπει, δε, να γίνει και αναφορά στις απολιθωμένες (δηλ. εξαφανισμένες) μορφές ψαριών που, όμως, 'ήκμασαν' κατά το απώτερο γεωλογικό παρελθόν του πλανήτη μας.

Είναι ζώα 'ψυχρόαιμα', δηλ. παρουσιάζουν το φαινόμενο της ποικιλοθερμίας ως μη δυνάμενα να θερμορρυθμίσουν, πράγμα το οποίο έχει σημαντικές μεταβολικές και εν γένει φυσιολογικές συνέπειες. Αναπνέουν, κατά κανόνα, με βράγχια από το οξυγόνο που είναι διαλυμένο στο νερό αλλά υπάρχουν και μερικά είδη που μπορούν να αξιοποιήσουν τον ατμοσφαιρικό αέρα με ειδικά όργανα (ως πρωτόγονους πνεύμονες).

Στην συντριπτική πλειονότητα των ειδών τους, παρουσιάζουν ένα υδροδυναμικό σχήμα (ατρακτοειδές) που τους επιτρέπει την ευχερέστερη μετακίνηση μέσα σε ένα μέσο όπως το νερό που προβάλλει σημαντική αντίσταση. Εν τούτοις, υπάρχουν και άλλες μορφές σώματος οι οποίες, αν και αρκετά διαφορετικές, συνδέονται με τον ίδιο τρόπο ζωής των 'ψαριών' σε συγκεκριμένα ξεχωριστά περιβάλλοντα. Παραλλαγές του βασικού σχήματος δείχνουν τα βενθικά είδη τα οποία σε πολλές περιπτώσεις έχουν επίπεδα σώματα. Σε κάθε περίπτωση όμως, το σώμα των ψαριών παρουσιάζει αμφίπλευρη συμμετρία και διαθέτει πτερύγια τα οποία χρησιμεύουν για τη μετακίνηση και των ισορροπία τους. Τα ψάρια διαθέτουν διάφορους τύπους πτερυγίων καθένας εκ των οποίων παίζει ένα πολύ συγκεκριμένο ρόλο.

Τα σώματα των 'ψαριών' είναι επικαλυμμένα με βλέννα που έχει διπλό ρόλο: αφ' ενός ενισχύει την υδροδυναμική λειαινώντας το σώμα και αφ' ετέρου παρέχει προστασία ενάντια σε προσκόλληση και εισβολή βιοπαθογόνων μικροοργανισμών αλλά και ενάντια σε επιδράσεις τοξικών χημικών παραγόντων. Το βλεννώδες 'περίβλημα', όπως και η βλεννογόνος επιδερμίδα, είναι παχύτερα σε είδη χωρίς λέπια. τα λέπια αποτελούν οστέινους σχηματισμούς της δερμίδας και παρατηρείται πολύ μεγάλη ποικιλία τύπων, μεγεθών και παραλλαγών

τους καθώς και σχετικά με την έκφυσή τους κατά περιοχές του δέρματος.

Μια πολύ χαρακτηριστική, όσο κι εντυπωσιακή, έκφραση της φαινοτυπικής βιοποικιλότητας των Ιχθύων είναι η εξωτερική χρωματική εμφάνιση των διαφόρων Ειδών η οποία οφείλεται στην κατά περίπτωση βιολογική προσαρμοστική διαρρύθμιση των χρωματοφόρων του δέρματος και, συχνά, μπορεί να αλλάζει ανάλογα με το άμεσο περιβάλλον όπου ευρίσκεται το κάθε άτομο αλλά και, ενίοτε, ανάλογα με εσωτερικές φυσιολογικές προσαρμογές του οργανισμού ιδίως για την αναπαραγωγή.

Όπως και η εξωτερική μορφολογία, έτσι και η εσωτερική ανατομία των ψαριών – ακόμη και αν περιοριστούμε στους Τελεόστεους (ήτοι, την μεγαλύτερη ομάδα των Οστειχθύων) – παρουσιάζει επίσης αρκετή ποικιλότητα, αν και σε γενικές γραμμές υπάγεται σε ένα βασικό σχέδιο. Τέτοιες διαφορές, φυσικά, αντανακλούν στην εξελικτική προσαρμογή και την φυλογένεσή τους και είναι αναμενόμενες και προκειμένου για τις κατώτερες βαθμίδες βιολογικής οργάνωσης (ιστολογική, κυτταρική, βιομοριακή).

### **1.3. Ανοσοποιητικό σύστημα Ιχθύων**

Το «ανοσοποιητικό σύστημα» είναι ένα σύνολο βιολογικών στοιχείων που είναι υπεύθυνα για την άμυνα του οργανισμού απέναντι σε βιολογικές απειλές εξωτερικές (δηλ. παθογονικούς μικροοργανισμούς) ή εσωτερικές (δηλ. νεοπλασίες). Δεν περιλαμβάνονται βιολογικές απειλές θηρευτικού ή κοινωνικού τύπου αλλά ούτε και απειλές και βλάβες από φυσικοχημικούς παράγοντες. Οι οποιεσδήποτε προκαλούμενες βλάβες, ωστόσο, υπόκεινται κατά κανόνα σε φλεγμονικές αντιδράσεις στις οποίες, συνήθως, συμμετέχουν και στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης, το ανοσοποιητικό σύστημα δεν περιλαμβάνει τις φυσικοχημικές άμυνες που συγκροτεί αφ' εαυτής η εν γένει δομή και λειτουργία των διαφόρων ιστών και οργάνων του σώματος (π.χ. λέπια και λοιπά στοιχεία του δέρματος) αλλά μπορεί να βρίσκεται σε συνάφεια με κάποιες εξ αυτών (π.χ. ανοσοσφαιρίνες-Α στην βλέννα). Τέλος, το ανοσοποιητικό, με την στενή έννοια, δεν περιλαμβάνει βιομόρια που μπορεί να σχετίζονται παρεμπιπτόντως με την φυσική άμυνα έναντι των μικροοργανισμών αλλά, ουσιαστικά, αποτελούν λειτουργικά στοιχεία του οργανισμού (π.χ. τρανσφερίνη) ούτε και περιλαμβάνει βιομόρια που έχουν να

κάνουν με αποκατάσταση βλαβών ή προστασία από χημικές επιδράσεις στο υποκυτταρικό επίπεδο (π.χ. heat-shock proteins ή μεταλλο-θειονεΐνες).

Το ανοσοποιητικό ως σύστημα είναι χαρακτηριστικό των Σπονδυλοζώων καθώς τα Ασπόνδυλα μπορεί να διαθέτουν μόνον υποτυπώδεις μηχανισμούς εξελιγμένης άμυνας απέναντι σε βιοπαθογονικές απειλές. Στους Ιχθείς υπάρχει, βέβαια, ποικιλότητα, αλλά και διαφορές από τα Θηλαστικά με γενικά πιο πρωτόγονα συστήματα (λόγω ποικιλοθερμίας τους) αλλά, πάντως, και με αρκετές αναλογίες και ομοιότητες.

Το ανοσοποιητικό σύστημα λειτουργεί αυτορυθμιζόμενο και βασιζόμενο σε αντίστοιχες ειδικές γενετικές προδιαγραφές· εν τούτοις, η σωστή και επωφελής λειτουργία του δεν είναι πάντοτε δεδομένη και εξαρτάται κατ' αρχήν από την γενική κατάσταση του κάθε ατόμου καθώς και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορεί να περιορίζουν ή να διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία του. Τα βασικότερα χαρακτηριστικά του ανοσοποιητικού είναι: 1) η ικανότητα να διακρίνει μεταξύ του εαυτού και του «άλλου» σε επίπεδο βιομορίων, και 2) η ικανότητα να αντιδρά με συντονισμένο τρόπο έναντι όλων των πιθανών βιοπαθογονικών απειλών με σκοπό την εξουδετέρωσή τους ώστε να διατηρείται η ομοιόσταση και η καλή υγεία του κάθε ατόμου διασφαλιζόμενης της «ανοσίας» του έναντι των βιοπαθογονικών απειλών.

Η λειτουργική οργάνωση του ανοσοποιητικού γίνεται σε δύο επίπεδα:

1) το της εγγενούς ή ανειδίκευτης ανοσοαντίδρασης, στο οποίο δεν γίνεται κάποια ουσιαστική διάκριση μεταξύ των διαφορετικών τύπων απειλής, και

2) το της επίκτητης ή εξειδικευμένης ανοσοαντίδρασης, στο οποίο γίνεται πλήρης διάκριση των απειλών και προσαρμογή της ανοσοαντίδρασης έτσι ώστε να υπάρχει η μέγιστη δυνατή αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση της κάθε απειλής· η ύπαρξη, όμως, αυτού του επιπέδου εξαρτάται από την δραστηριότητα του προηγούμενου το οποίο πάντα προηγείται χρονικώς καθώς αποτελεί την πρώτη «γραμμή άμυνας» απέναντι σε κάθε απειλή.

Επομένως, μπορούν να χαρακτηρισθούν τα δύο αυτά επίπεδα ως κατώτερο (το πρώτο) και ανώτερο (το δεύτερο) λαμβάνοντας υπόψη

την δραστικότητα της ανοσοαντίδρασης αλλά και το γεγονός ότι η αντίδραση στο δεύτερο επίπεδο δεν είναι πάντοτε δεδομένη.

Δομικώς, το ανοσοποιητικό σύστημα των Τελεοστέων συγκροτείται από πληθυσμούς κυττάρων, ιστούς και όργανα με παράλληλο αιμοποιητικό ρόλο και αποκαλούμενα «λεμφοειδή». Συγκεκριμένα:

- Ο θύμος αδής που θεωρείται ως «κεντρικό» λεμφοειδές όργανο που δεν εκφυλίζεται με την ηλικία και παράγει μόνον λεμφοκύτταρα τύπου «Τ».

- Τα περιφερειακά όργανα, ήτοι ο σπλήν και ο διανεφρικός ιστός (ενίοτε και ως ξεχωριστός «πρόνεφρος») που παράγουν όλους τους υπόλοιπους τύπους κυττάρων του αίματος (μαζί και τα ανοσοποιητικού ενδιαφέροντος λευκά αιμοσφαίρια, μαζί και τα λεμφοκύτταρα τύπου «Β» από τα οποία προέρχονται τα πλασμοκύτταρα που παράγουν τα αντισώματα)· είναι επίσης χώροι για την ανάπτυξη των «μελανομακροφάγων κέντρων» καθώς και για το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα καθαρισμού του αίματος από αδρανή σωματίδια.

- Επίσης «περιφερειακά» απαντώνται πληθυσμοί λεμφοκυττάρων στους βλεννογόνους (εντέρου, βραγχίων και δέρματος).

Βεβαίως, όλα τα *sensu stricto* λευκά αιμοσφαίρια και όλα τα λευκοκύτταρα, όπου και αν βρίσκονται σε ολόκληρο τον οργανισμό, αποτελούν οργανικό μέρος του συστήματος (Secombes & Wang, 2012).

Αν και η δομική βάση είναι οπωσδήποτε ιστο-κυτταρική, και στα δύο επίπεδα λειτουργίας του συστήματος υπάρχουν και οι «χυμικοί» παράγοντες (ήτοι, διαλυτά βιομόρια ποικίλων τύπων – βλ. παρακάτω). Η πλήρης ανάπτυξη του ανοσοποιητικού γίνεται αργά στην οντογένεση του οργανισμού ώστε τα πρώιμα στάδια να στερούνται ενός πλήρως λειτουργικού συστήματος (Zapata et al., 2006).

#### A. Ανειδίκευτη ανοσοαντίδραση

Είναι το σκέλος της 'αμέσου αντιδράσεως' και περιλαμβάνει, εν συντομία, τα ακόλουθα στοιχεία (αν και δεν εμπλέκονται όλα στην αντιμετώπιση του κάθε τύπου βιοπαθογονικής απειλής):

- Αντιμικροβιακά βιομόρια (ειδικά πεπτιδία, ένζυμα και φυσικές συγκολλητίνες/«λεκτίνες») εντός της βλέννης.

- Χυμικούς παράγοντες του ορού όπως οι ανωτέρω και, επιπλέον, «κυτοκίνες», «συμπλήρωμα» (σύστημα συνδετικών πρωτεϊνών και ενζύμων) και η Κ-αντιδρώσα πρωτεΐνη.

- Φαγοκύτταρα (ήτοι, μακροφάγα και ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα). Από την φαγοκυττάρωση ξεκινάει η ειδικευμένη ή «προσαρμοστική» ανοσοαντίδραση μέσω των μακροφάγων που «παρουσιάζουν» τα αντιγόνα προς τα λεμφοκύτταρα.

- Άλλα κοκκιοκύτταρα και φυσικώς κυτταροτοξικά «φονικά κύτταρα» (Magnadóttir, 2006).

Η αναγνώριση των απειλών σε αυτό το επίπεδο γίνεται μέσω κληρονομούμενων «υποδοχέων αναγνώρισης παθογόνων» που αντιστοιχούν σε γενικού τύπου «μοριακά σχήματα σχετιζόμενα με παθογόνα» (Boltaña et al., 2011).

#### Β. Εξειδικευμένη ανοσοαντίδραση

Είναι πιο αργή στην εκδήλωσή της αλλά διαρκεί περισσότερο από την ανειδίκευτη. Περιλαμβάνει το συστημικό μέρος που φέρεται από την κυκλοφορία του αίματος και το τοπικό μέρος που εκδηλώνεται στις εξωτερικές σωματικές επιφάνειες. Τα λεμφοκύτταρα (τύπου «Β» και τύπου «Τ» που υποδιαιρούνται σε υποτύπους), εκδηλώνουν ειδικούς υποδοχείς και παράγουν χυμικούς παράγοντες (ανοσοσφαιρίνες και ιντερλευκίνες). Τα λεμφοκύτταρα περιλαμβάνουν τόσο τα μικρής διάρκειας ζωής δραστικά κύτταρα όσο και τα μακράς διάρκειας κύτταρα μνήμης που καθιστούν την δευτεροταγή (ή, «αναμνηστική») ανοσοαντίδραση δυνατή και άκρως αποτελεσματική καθότι οργανωμένη, στοχευμένη και ταχεία (Secombes & Wang, 2012).

Σε γενικές γραμμές, το ακριβές είδος, ο χρονισμός και το μέγεθος της επίκτητης ανοσοαντίδρασης εξαρτώνται από:

- την κατάσταση του οργανισμού γενικά και του ανοσοποιητικού ειδικότερα,
- το είδος και την δοσολογία του ανοσογόνου συστατικού (ή των συστατικών),
- την οδό χορήγησης και την θέση εισόδου,
- τις εξωτερικές συνθήκες με κορυφαία την θερμοκρασία, και
- την πιθανή παρουσία ανοσοτροποποιητικών ουσιών (ενισχυτικών ή καταπιεστικών).

Οι γενικές αρχές στις οποίες βασίζεται η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών είναι:

- ✓ Ο συνδυασμός των γενικών και ειδικών αποκρίσεων.
- ✓ Ο καταμερισμός καθηκόντων μεταξύ των διαφορετικών τύπων ανοσοκυττάρων.
- ✓ Η συνεχής επικοινωνία και η ανταλλαγή σημάτων μεταξύ των διαφόρων μερών του συστήματος.
- ✓ Η ισορροπία μεταξύ των αντιδράσεων, π.χ. μεταξύ των υπέρ και κατά των φλεγμονών σημάτων, και
- ✓ Η προσαρμοστικότητα και η συνεχής καινοτομία για την αντιμετώπιση της αντιγονικής ποικιλομορφίας (Trowsdale & Parham, 2004).

Επιπλέον, το ανοσοποιητικό σύστημα πρέπει να βρίσκεται μόνιμα σε άριστη φυσιολογική κατάσταση ετοιμότητας, ακόμη και όταν δεν υπάρχει κάποια ενεργός απειλή, και γι' αυτό βρίσκεται σε στρατηγικά σημεία του οργανισμού, ώστε να μπορεί να αντιλαμβάνεται και να επικοινωνεί μεταξύ των μερών του τις πληροφορίες που λαμβάνει καθώς και να είναι ικανό να αποκριθεί άμεσα σε κάθε περίπτωση κινδύνου (του τύπου που το αφορά) καθώς και να κλιμακώσει και διατηρήσει την αντίδρασή του στο απαραίτητο επίπεδο για όσο χρόνο χρειαστεί.

#### **1.4. Γενική τοξικολογία Ιχθύων**

Οι Ιχθύες, ως κατ' εξοχήν υδρόβια ζώα, ευρίσκονται πάντοτε σε άμεση συνάφεια με ένα περιβάλλον που μπορεί να είναι φορέας ποικίλων τοξικών χημικών παραγόντων. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του υγρού ύδατος, σε συνδυασμό με την άμεση επαφή του με τον οργανισμό των Ιχθύων, επιτρέπουν την ισχυρή επίδραση τυχόν τοξικών παραγόντων οι οποίοι φέρονται υπό διάφορες μορφές εντός αυτού. Η επαφή μεταξύ ύδατος και σώματος των Ιχθύων επέρχεται κυρίως στα βλεννογόνα επιθηλία, ήτοι: την επιδερμίδα (που περιλαμβάνει μόνον ζωντανά κύτταρα), τα βράγχια (όπου και συντελείται ευχερώς η διάχυση στο αίμα λόγω υψηλής διαπερατότητας του αναπνευστικού επιθηλίου) και τον πεπτικό σωλήνα (μόνον για τα θαλάσσια είδη). Ωστόσο, και άλλοι τρόποι επαφής υπάρχουν με κυριώτερο την πρόσληψη τοξικών ουσιών μέσω τυχόν μολυσμένης τροφής.

Πρέπει εξ αρχής να τονισθεί ότι, ενώ κατά την αρχή της γενετικής εξέλιξης των Ιχθύων οι περιβαλλοντολογικές αλλαγές ήταν αργές και βαθμιαίες και, άρα, οι οργανισμοί είχαν τη δυνατότητα της

προσαρμογής μέσω και της φυσικής επιλογής, σήμερα, λόγω της εντατικής ανθρώπινης δραστηριότητας (βιομηχανία, εντατική γεωργία και κτηνοτροφία, κ.λπ.), η ροή χημικών ουσιών στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι μεγάλη και συνεχής και, επομένως, τόσο η φυσιολογική προσαρμογή καθίσταται συχνά ανέφικτη αλλά και η εξέλιξη υφίσταται έντονες διαταράξεις στα πλαίσια του καθόλου οικοσυστήματος όπου η ρύπανση επισυμβαίνει. Είναι σημαντικό να αναφερθεί εδώ ότι στο περιβάλλον είναι αδύνατον να εκτιμηθεί η τοξικότητα μιας και μόνο ένωσης, καθότι υπάρχει μεγάλη πληθώρα ενώσεων που πιθανώς αλληλεπιδρούν και, ταυτόχρονα, επιδρούν στους έμβιους οργανισμούς συνδυαστικά οπότε αυξάνουν την τοξικότητά τους. Επιπλέον, και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού στον εκάστοτε χρόνο μπορεί να αυξάνουν (ή και να μειώνουν), ανάλογα με τις τιμές τους, τις αρνητικές επιπτώσεις των ουσιών στους οργανισμούς.

Από την άλλη μεριά, οπωσδήποτε γίνονται προσπάθειες ελέγχου και περιορισμού των ρύπων που καταλήγουν στα νερά, αλλά οι περισσότερες τοξικές ουσίες μπορούν να υφίστανται για δεκαετίες και να προκαλούν τοξικά φαινόμενα πολλά χρόνια μετά την είσοδό τους. Μέθοδοι και τεχνικές έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την καλύτερη ανίχνευση ακόμα και των ελάχιστων ποσοτήτων ουσιών διαλυμένων στο νερό καθώς και για τον καθορισμό των τοξικών επιπτώσεων τους στους υδρόβιους οργανισμούς ενώ μελετώνται και τρόποι απομάκρυνσης τους από τις υδάτινες μάζες.

Είναι σκόπιμο να γίνει μια διάκριση ανάμεσα στην γενική «ρύπανση» αφ' ενός, η οποία μπορεί να αναφέρεται και σε θέματα προσθήκης βιοαποδομήσιμου οργανικού υλικού (που συχνά καταλήγει σε υποξικές συνθήκες, βλαπτικές μεν για τα ψάρια αλλά όχι και τοξικές με την στενή έννοια), ευτροφισμού από χημικά λιπάσματα (όχι κατ' ανάγκην τοξικά για τα ψάρια) ή παρουσίας αιωρούμενων σωματιδίων (πιθανώς βλαπτικά αλλά όχι με χημικό τρόπο) και, αφ' ετέρου, στην καθ' αυτό «μόλυνση» που συνεπάγεται την, κυρίως ανθρωπογενή, είσοδο μη φυσικών υλικών στο υδάτινο περιβάλλον τα οποία επενεργούν μέσω χημικών αντιδράσεων. Περαιτέρω, είναι σημαντικό να υπάρχει σαφής οπτική των τοξικών φαινομένων στην βάση των αυξανόμενης πολυπλοκότητας επιπέδων βιολογικής οργάνωσης από την απλή χημική σύσταση έως το οικολογικό επίπεδο και περνώντας από το κυτταρικό-ιστολογικό, το οργανικό-συστημικό

και το φυσιολογικό-οργανισμικό (Heath, 1995). Ανώτερα επίπεδα δείχνουν πιο γενικευμένα αποτελέσματα των τοξικών επιδράσεων αλλά τα κατώτερα επίπεδα μπορούν να παράσχουν αιτιολογήσεις των αποτελεσμάτων με την λεπτομερέστερη κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν σε αυτά (ibid.).

Συνήθως διακρίνομε δύο βασικούς τύπους τοξικότητας σε επίπεδο ατόμου/οργανισμού, την οξεία και την χρόνια: **Οξεία τοξικότητα** παρατηρείται όταν μια χημική ουσία υπάρχει σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις στο νερό και είναι συχνά θανατηφόρα γιατί δημιουργούνται στον οργανισμό σοβαρά λειτουργικά προβλήματα τα οποία δεν επιτρέπουν την επιβίωσή του. **Χρόνια τοξικότητα** μιας ουσίας παρατηρείται όταν αυτή βρίσκεται στο περιβάλλον του οργανισμού σε χαμηλές μεν συγκεντρώσεις αλλά για σχετικά μεγάλα χρονικά διαστήματα. Οπωσδήποτε, η κάθε τοξική επίδραση πρέπει πάντοτε να αποτιμάται με όρους δοσολογικούς, ήτοι πρόσληψη/συγκέντρωση της ουσίας που ενδιαφέρει σε συνδυασμό με την χρονική διάρκεια της έκθεσης του οργανισμού (ή του ιστού, *in vitro*) σε αυτήν (Heath, 1995). Οι αντιδράσεις του υπό μελέτην οργανισμού (ή ιστού, *in vitro*) μπορούν, κατ' αρχήν, να θεωρηθούν υπό το πρίσμα της άμεσης θνησιμότητας, ήτοι ως «θανάσιμη συγκέντρωση 50%» ή ως «χρόνος θανάτου 50%» τα οποία, συνήθως, αφορούν περιπτώσεις οξείας τοξικότητας. Εν τούτοις, υπάρχει ανάγκη για ευρύτερη θεώρηση των φαινομένων τοξικότητας διότι πολλές αλλοιώσεις και διαταραχές μπορεί να επέλθουν, αντιστρεπτές ή μη, σε υποθανάσιμα, έως και υποκλινικά, δοσολογικά επίπεδα, οι οποίες, όμως, μπορεί να συνεπάγονται σοβαρές μεταβολές στην υγεία και ευεξία του ατόμου που τις υφίσταται (ibid.). Είναι, επομένως, ευνόητον ότι η χρονική παράμετρος, ακόμη και όταν η συγκέντρωση του τοξικού παράγοντα κυμαίνεται, αποκτά προτεραιότητα σε χρόνιες εκθέσεις οπότε και μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ των συστημάτων/οργάνων τα οποία κατ' εξοχήν προσβάλλονται ενώ, παράλληλα, αποκτά σημασία η κινητική του παράγοντα, ήτοι ο ρυθμός πρόσληψης, μεταβολισμού και αποβολής. Σε τέτοιες καταστάσεις προκύπτει η ανάγκη για θεώρηση της «βιοσυσσώρευσης» ή «βιοσυγκέντρωσης» καθώς και της «βιομετατροπής» του τοξικού παράγοντα από τον προσλαμβάνοντα οργανισμό. Σε κάθε περίπτωση, οι επιμέρους αντιδράσεις του οργανισμού μπορεί να είναι προς την κατεύθυνση της μείωσης ή αναστολής κάποιων εκ των φυσιολογικών



λειτουργιών του είτε προς την αντίθετη κατεύθυνση (ως «υπεραντιστάθμιση») ενώ μπορεί και να κυμαίνονται ανάμεσα σε δύο επίπεδα στην πορεία του χρόνου καθιστώντας την εκτίμηση των τοξικών επιδράσεων μάλλον αδύνατη (εκτός εάν υπάρχει αναφορά σε συγκεκριμένο χρονικό πλαίσιο έκθεσης και, αντίστοιχα, μέτρησης των φυσιολογικών μεταβλητών που εξετάζονται).

Οι εκάστοτε τοξικές επιδράσεις και οι αντιδράσεις του προσλαμβάνοντος και προσβαλλόμενου οργανισμού σε αυτές μπορούν να ποικίλουν αρκετά και, μάλιστα, να περιλαμβάνουν στοιχεία φυσιολογικής αντιστάθμισης που δεν έχουν άμεση σχέση με την καθαυτό δράση του τοξικού παράγοντα αλλά, μάλλον, να συνιστούν προσαρμογή του οργανισμού στα αποτελέσματα αυτής. Καθίσταται, επομένως, αναγκαίο να μετρώνται οι όσον το δυνατόν πιο ευθείες αλλαγές οι οποίες, όμως, δεν είναι πάντοτε εύκολο να ανιχνευθούν σε περίπλοκα βιολογικά συστήματα όπως είναι ο οργανισμός των Σπονδυλοζώων. Τέτοιες αλλαγές συχνά είναι δευτερεύουσας σημασίας εάν δεν απειλείται άμεσα η ομοιόσταση. Επιπλέον, η συσσώρευση μιας τοξικής ουσίας σε ένα όργανο ή ιστό δεν συνεπάγεται αναγκαστικά και το μέγιστο των τοξικών επιπτώσεων της σε επίπεδο οργανισμού. Περιττόν, δε, να αναφερθεί ότι ο κάθε τοξικός παράγων μπορεί να έχει σημαντικά διαφορετικές επιπτώσεις που εξαρτώνται από έναν συνδυασμό της δοσολογίας του, των περιβαλλοντικών συνθηκών υπό τις οποίες επιδρά, και του Είδους και της ηλικίας (ή βιολογικού σταδίου) των οργανισμών που προσβάλλει (Heath, 1995).

Η πρόσληψη των τοξικών ουσιών του περιβάλλοντος νερού ή της τροφής από τον οργανισμό των Ιχθύων γίνεται δια μέσου των εξωτερικών επιφανειών του σώματος (ήτοι, τα βλεννογόνα επιθήλια) και είναι σχετικά απλή διαδικασία στον βαθμό που το εκάστοτε τοξικό χημικό μπορεί να διέλθει από αυτές («βιοδιαθεσιμότητα»). Ακολουθεί η εσωτερική διακίνησή του, αιματογενώς, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει και μεταβολικές διεργασίες, κυρίως στο ήπαρ, με τελική κατάληξή του, αν δεν αποβληθεί γρήγορα, σε ένα ή περισσότερα όργανα/ιστούς πιο μακρόχρονης παραμονής όπου επέρχεται και η συσσώρευσή του εάν συνεχισθεί η πρόσληψη. Πρόκειται, επομένως, για μια απολύτως δυναμική κατάσταση που δεν μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια ούτε να προβλεφθεί η τύχη του κάθε χημικού και, άρα, οι επιδράσεις της σε κάποιο/α σημεία του

οργανισμού (Heath, 1995). Σημειωτέον ότι η βιομετατροπή δεν είναι πάντοτε προς την κατεύθυνση της αποτοξικοποίησης αλλά, ενίοτε, μπορεί να παράγει τοξικά ή τοξικότερα προϊόντα. Εκτός των πιθανών βιομετατροπών, υπάρχουν και κυτταρικοί μηχανισμοί αποτοξικοποίησης που βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα στάδια αυτής της κίνησης και μπορούν να εξουδετερώσουν ένα μέρος της προσλαμβανόμενης ποσότητας της ουσίας έως και το σύνολο αυτής· επομένως, η ακριβής διαδρομή μπορεί να είναι σημαντική για θέματα ολικής έκθεσης, ιδιαιτέρως σε πιο χρόνιες προσβολές όταν δίνεται επαρκής χρόνος στα συστήματα αποτοξικοποίησης και επισκευής βλαβών να δράσουν οπότε μπορεί να επέλθει ο λεγόμενος «εγκλιματισμός» (ibid.).

Τέλος, μια ουσιαστική πλευρά της τοξικότητας είναι η πιθανότητα να προκληθεί μια γενικότερη παθοφυσιολογική καταπόνηση του οργανισμού η οποία, σε ειδικές περιπτώσεις, μπορεί να κατατείνει στην εκδήλωση του λεγόμενου «ψυχολογικού στρές» (Schreck, 1981) και πέραν των όποιων επιμέρους τοξικολογικών επιπτώσεων· αυτό συνήθως εμφανίζεται σε καταστάσεις οξείας ή υποξείας τοξικότητας όταν εμπλέκονται πολλά οργανικά συστήματα και απειλούνται οι ζωτικές λειτουργίες. Σε τέτοιες περιπτώσεις, είναι δύσκολο να ξεχωρίσουν οι άμεσες τοξικές επιδράσεις του υπό μελέτην παράγοντα από τις δευτερογενείς που προκύπτουν στα πλαίσια του οργανισμού.

### **1.5. Ανοσοτοξικολογία Ιχθύων: ορισμός, περιεχόμενο· σκοποί της Μ. Δ. Εργασίας**

Υπάρχει επιστημονικό ενδιαφέρον από αρκετά παλαιότερα για θέματα τοξικολογίας του ανοσοποιητικού συστήματος των Ιχθύων, το οποίο συνιστά μια τομή μεταξύ της μελέτης του συστήματος αφενός και της συνολικότερης ιχθυοτοξικολογίας αφετέρου (ανασκοπήσεις από: Zeeman & Brindley, 1981· και Anderson & Zeeman, 1995). Αυτό το ενδιαφέρον προέρχεται από την αντίληψη ότι οι τοξικές επιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν σε ανοσοκαταπίεση με αποτέλεσμα να υπονομεύεται η επιβίωση των επηρεασμένων ατόμων δεδομένου του πολύ ουσιαστικού ρόλου του ανοσοποιητικού συστήματος στην διασφάλιση της υγείας των ψαριών έναντι των βιοπαθογονικών συντελεστών (Austin, 1999).

Σημειωτέον, δε, ότι οι τοξικές επιδράσεις συχνά αφορούν στο σύνολο του οργανισμού με μια πλειάδα οργάνων να υφίστανται την εκάστοτε επίδραση, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό έκαστον, με αποτέλεσμα το ανοσοποιητικό σύστημα να υφίσταται και κάποιον έμμεσο αντίκτυπο πέραν της όποιας αμέσου επιδράσεως. Ειδικότερα σε ό,τι αφορά στο ήπαρ, αυτό όχι μόνον υποστηρίζει μεταβολικά τα όργανα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού αλλά και συνθέτει κάποιους χυμικούς παράγοντες που συμμετέχουν στο τελευταίο (π.χ., συστατικά του συμπληρώματος)· επομένως, τυχόν ισχυρή τοξίκωση του ήπατος μπορεί να έχει και σοβαρές επιπτώσεις στην αναμενόμενη ανοσο-αντίδραση. Συχνά είναι δύσκολο να απομονωθεί η πρωτογενής επίδραση του οποιουδήποτε τοξικού χημικού παράγοντα σε ένα μόνο σύστημα ή όργανο ή ιστό χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψη η συνολική του επίδραση στον οργανισμό η οποία, δευτερογενώς, μπορεί επίσης να επηρεάσει την λειτουργία του υπό μελέτην συστήματος (in vivo)· σε αυτό το πλαίσιο, η πρόκληση μιας συνολικής φυσιολογικής καταπόνησης 'ψυχολογικού' τύπου (stress) είναι μόνον το τελειωτικό στάδιο μιας σειράς 'αθέατων' πλην πιθανώς σημαντικών παθοφυσιολογικών μεταβολών.

Εν κατακλείδι, οι επιδράσεις των τοξικών παραγόντων είναι είτε άμεσες είτε έμμεσες· οι μεν πρώτες έχουν ως πιθανό αποτέλεσμα την βλάβη συγκεκριμένων κυττάρων, ιστών και οργάνων (ενός ή περισσοτέρων, μεταξύ των οποίων και τα συγκροτούντα το ανοσοποιητικό σύστημα), ενώ οι δεύτερες μπορούν να προκαλέσουν διαταραχή στην λειτουργία του συστήματος μέσω της βλάβης που προκαλούν σε άλλα συστήματα ή, συνήθως, μέσω της διαδικασίας της γενικής καταπόνησης του οργανισμού η οποία ενίοτε προκαλεί σοβαρές παθοφυσιολογικές διαταραχές. Οι τελευταίες δεν μπορούν να περιληφθούν στην παρούσα Εργασία διότι οι μηχανισμοί που επιφέρουν τα αποτελέσματά τους δεν είναι οι ευθέως τοξικολογικοί αλλά άλλης κατηγορίας και, μάλιστα, το έμμεσο αποτέλεσμα μπορεί να προκληθεί ενωρίτερα και εντονότερα.

Τα άμεσα αποτελέσματα των ποικίλων τοξικών επιδράσεων στο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελούν τον βασικό σκοπό της παρούσας Εργασίας. Πολλές από αυτές συχνά είναι σε υποκλινικό επίπεδο και μπορεί να επηρεάζουν μόνο (ή, κυρίως) το ανοσοποιητικό, ενώ άλλες μπορεί να προκαλούν όχι μόνον ανοσοκαταπίεση αλλά και σοβαρές βλάβες σε άλλα μέρη του οργανισμού ώστε οι όποιες βλάβες του

ανοσοποιητικού να καθίστανται μάλλον επουσιώδεις. Το θέμα παρουσιάζει μεγάλη ευρύτητα αλλά και πολυπλοκότητα με δεδομένες την αφ' ενός ύπαρξη πολλών και ποικίλων στοιχείων του ανοσοποιητικού και την αφ' ετέρου ύπαρξη πολλών και ποικίλων τοξικών παραγόντων που έρχονται σε επαφή με πολλά και ποικίλα Είδη Ιχθύων, όπως έχει καταδειχθεί από πρόσφατη ανασκόπηση των Rehberger κ.ά. (2017). Επιπλέον, οι μελέτες που γίνονται επί του θέματος εξετάζουν ωρισμένες μόνον παραμέτρους ενώ και τα πειραματικά πρωτόκολλα δεν είναι πάντοτε καλώς προσδιορισμένα (ibid.).

Η Εργασία θα παρουσιάσει αναλυτικά τους τοξικούς παράγοντες, εστιάζοντας στους σημαντικότερους από αυτούς, έτσι όπως τους αναφέρει η πιο σύγχρονη επί του θέματος βιβλιογραφία· παράλληλα, θα παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα των τοξικών επιδράσεων. Εν συνεχεία, θα παρουσιασθούν οι μηχανισμοί τοξικής δράσης επί του ανοσοποιητικού και, κατόπιν, θα γίνει σχολιασμός των μεθόδων μελέτης. Τέλος, θα γίνει αναφορά στις δευτερογενείς επιπτώσεις των τοξικολογικών βλαβών του ανοσοποιητικού συστήματος.

## **2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΟΞΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

### **I. Ακτινοβολίες – ραδιενεργά υλικά**

Ασχέτως της πηγής τους οι διάφορες ακτινοβολίες συνιστούν την μοναδική περίπτωση τοξικών παραγόντων που είναι 'φυσικού τύπου'. ωστόσο, η επίδρασή τους γίνεται μέσω χημικών μηχανισμών καθώς είτε προκαλούν ευθέως βλάβες στα βιομόρια είτε προκαλούν τον σχηματισμό ενώσεων με τοξικές δυνατότητες (π.χ. οξειδωτικές ρίζες) μέσω του ιονισμού των ατόμων. Οι σοβαρότερες τοξικές επιδράσεις είναι στο επίπεδο των νουκλεϊκών οξέων των κυττάρων το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση του ανοσοποιητικού συστήματος με δεδομένο τον τρόπο λειτουργίας του. θεωρείται, μάλιστα, ότι τα όργανα του ανοσοποιητικού των Ιχθύων εντοπίζονται φυλογενετικώς στο βάθος του σώματος και κάτω από τον αξονικό σκελετό διότι εκεί υπάρχει η καλύτερη δυνατή προστασία τους από την κοσμική ακτινοβολία (Manning & Nakanishi, 1996). Υπάρχουν πολλοί τύποι ακτινοβολιών που έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν, μεταξύ άλλων, και το ανοσοποιητικό σύστημα, ανάλογα και με την δόση. Για παράδειγμα, η υπεριώδης Β ακτινοβολία (ΥΒΑ) έχει αναφερθεί σε κάποιες μελέτες ότι επιδρά αρνητικά σε ανοσολογικές παραμέτρους των 'ψαριών' (π.χ., στην παραγωγή αντισωμάτων καθώς και στην ικανότητα αντίστασης σε προσβολές από βιοπαθογονικούς συντελεστές: Subramani et al., 2015). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, αν αποφευχθεί η κατάποση ραδιενεργού υλικού, η κατ' αρχήν επίδραση είναι στις εξωτερικές επιφάνειες του σώματος με κύριο αποδέκτη το δέρμα. Εν τούτοις, έχουν αναφερθεί και επιδράσεις συστημικές μετά την ακτινοβολήση με υπεριώδεις ακτίνες, ακόμη και εν τη απουσία ευθείας παθολογίας του δέρματος, οι οποίες πιθανώς οφείλονται στην ενεργοποίηση εγγενών ανοσοκαταπιεστικών μηχανισμών που ξεκινούν από το δέρμα και καταλήγουν στο συστημικό μέρος (Lawrence et al., 2019). Περαιτέρω, η ραδιενέργεια είναι οπωσδήποτε βλαπτική για το ανοσοποιητικό· οι Sazykina & Kryshev (2003) αναφέρονται σε παλαιότερες Σοβιετικές έρευνες όπου βρέθηκε πως, μετά από μακρόχρονη έκθεση ατόμων κοινού κυπρίνου σε νερό με διαλυμένο ραδιενεργό Στρόντιο σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, πέφτει ο λευκοκρίτης του αίματος και αλλάζει η σύνθεση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων, μειώθηκε η

φαγοκυτταρική δραστηριότητα, ενώ και η παραγωγή αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό ήταν κατώτερη και καθυστερημένη.

## **II. Μη μεταλλικές ανόργανες και μικρές οργανικές ενώσεις**

Ακραίες τιμές του pH, διοξείδιο του άνθρακα, αμμωνία, νιτρώδη/νιτρικά, κυανιούχα, χλωρίνη, υδρόθειο, αλδεΐδες κ.ά.τ. αποτελούν πιθανούς τοξικούς κινδύνους για την υγεία και την ζωή των 'ψαριών'. Σπανίζουν εξαιρετικά, όμως, οι αναφορές για ανοσοτοξικότητα τέτοιων παραγόντων, το πιθανότερο διότι, εάν δεν πρόκειται για οριακά περιστατικά (οπότε επέρχεται ταχέως είτε ο θάνατος είτε η ανάνηψη), οι παθοφυσιολογικές μεταβολές είναι αρκετά σοβαρές ώστε να αποκτά προτεραιότητα η συνολικότερη καταπόνηση του οργανισμού και, άρα, να περιπτεύει η μελέτη των επιμέρους ανοσολογικών παραμέτρων· προς τα εκεί δείχνει η μελέτη των Carballo et al. (1995) οι οποίοι διαπίστωσαν αυξημένη πειραματική μόλυνση με *Saprolegnia parasitica* σε πέστροφες που είχαν εκτεθεί σε νιτρώδη ή κυανιούχα πράγμα που απεδόθη στην αύξηση του 'στρες' όπως έδειξαν οι μετρήσεις κορτιζόλης στο πλάσμα. Εν τούτοις, δεν μπορούν να αγνοούνται πιθανές τέτοιες επιδράσεις σε πιο χρόνιες εκθέσεις όπως, για παράδειγμα, στην μόλυνση με νιτρικά που οδηγεί, μεταξύ άλλων, σε αιμορραγική νέκρωση του θύμου αδένος (Wedemeyer, 1996) πιθανόν λόγω της εκτεθειμένης εξωτερικά θέσης του πλησίον της επιφάνειας του άνω φάρυγγος. Ανάλογο ήταν και το αποτέλεσμα της έκθεσης σε κυανιούχα για τον σπλήνα των πειραματικών κυπρίνων από τους David & Kartheek (2015) – πράγμα μάλλον αναμενόμενο με δεδομένη την εμπλοκή αυτού του οργάνου στην διακίνηση του σιδήρου. Περαιτέρω, η χλωρίνη είναι εξαιρετικά τοξική για τα ψάρια, και οι Verma et al. (2007) διαπίστωσαν ότι πολύ χαμηλή συγκέντρωση χλωρίνης είχε μάλλον καταπιεστικά αποτελέσματα σε αιματολογικούς δείκτες και σε αναπνευστική έκρηξη φαγοκυττάρων από κοινό κυπρίνο.

## **III. Μεταλλικά και μεταλλοειδή ανόργανα**

Περιλαμβανομένου του μεταλλοειδούς As, τα «βαρέα μέταλλα» χωρίζονται σε μη-βασικά (ενν., για τα βιολογικά συστήματα) και σε βασικά (ή, «ιχνοστοιχεία») αλλά και οι δύο περιπτώσεις μπορούν να είναι τοξικές στις κατάλληλες δόσεις. Τα μέταλλα απαντούν εντός του

ύδατος ή της τροφής υπό διάφορες μορφές: στοιχειακή, ιοντική, σωματιδιακή (περ. των νανοσωματιδίων), ή μορφή χημικού συμπλόκου· επίσης, τα μέταλλα μπορούν να αλλάξουν μορφή εντός του σώματος αλλά και εντός των κυττάρων.

- Άργυρος

Στην καθαρή του μορφή, το χημικό στοιχείο άργυρος (Ag) είναι βαρύ, σπάνιο, μαλακό ευγενές μέταλλο με έντονη μεταλλική λάμψη. Έχει τη μεγαλύτερη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα καθώς και τη μεγαλύτερη ανακλαστικότητα στο ορατό τμήμα του φάσματος. Χρησιμοποιείται ως προϊόν αποταμίευσης και συναλλαγών, ως υλικό κατασκευής κοσμημάτων και νομισμάτων και ως υλικό βιομηχανικών και επιστημονικών εφαρμογών. Στη βιομηχανία, χρησιμοποιείται στην κατασκευή καταλυτών, μπαταριών ως κράμα με ψευδάργυρο και κάδμιο, ηλεκτρικών επαφών, ηλεκτροσυγκολλήσεων, αγωγών και ολοκληρωμένων κυκλωμάτων εξαιτίας της μεγαλύτερης ηλεκτρικής αγωγιμότητας που παρουσιάζει έναντι όλων των μετάλλων. Λόγω της εξαιρετικής αντανακλαστικότητας του στο ορατό φάσμα χρησιμοποιείται στην επίστρωση κατόπτρων. Έτσι, ο νιτρικός άργυρος χρησιμοποιείται ευρύτατα στην ιατρική αλλά και στα φωτογραφικά υλικά, ο ιωδιούχος άργυρος χρησιμοποιείται στη δημιουργία νεφών που παράγουν τεχνητή βροχή, ο χλωριούχος άργυρος ως πρόσθετο στην υαλουργία, ενώ άλλες ενώσεις του αργύρου χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική ως αντιβακτηριδιακά και αντισηπτικά υλικά. Επίσης, τα νανοσωματίδια και τα νανوسύρματα αργύρου χρησιμοποιούνται σε πληθώρα ιατρικών και βιομηχανικών εφαρμογών όπως σε χρωστικές ουσίες, καθώς και ως αντιμικροβιακοί παράγοντες σε συσκευασίες τροφίμων, καλλυντικά, κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, ηλεκτρικές συσκευές κ.λπ.. Λόγω της ευρείας χρήσης του, ο άργυρος ανιχνεύεται ως συστατικό πολλών χημικών ενώσεων και νανοϋλικών στα αστικά και βιομηχανικά απόβλητα και οι επιπτώσεις του στην οικοτοξικολογία και στους υδρόβιους οργανισμούς δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστές.

Ειδικότερα για τα 'ψάρια', σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Kanwal et al. (2019) σε ινδικό κυπρίνο, προέκυψε ότι η έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) για διάστημα 21 ημερών δεν ήταν θανατηφόρα, ενώ τα ψάρια παρουσίαζαν κανονική συμπεριφορά ως προς την κολύμβηση, την κοινωνικότητα και την πρόσληψη τροφής. Όμως, παρατηρήθηκε σημαντική πτώση του αριθμού των

λευκοκυττάρων και των ερυθροκυττάρων καθώς και κάποια αύξηση του επιπέδου της χοληστερόλης στο ορό του αίματος, ενώ η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης μειώθηκε σημαντικά στους νεφρούς και στο ήπαρ. Η ιστολογική μελέτη των νεφρών έδειξε επιθηλιακή απολέπιση σε νεφρικά σωληνάρια, οίδημα και συρρίκνωση νεφρικών σπειραμάτων, ενώ στο ήπαρ παρατηρήθηκαν συμπυκνωμένα αιμοφόρα αγγεία. Τα παραπάνω δείχνουν την ηπιώς τοξική δράση των AgNPs η οποία, πιθανότατα, εξικνείται και στο ανοσοποιητικό σύστημα αλλά χωρίς να γίνεται κάποια απευθείας μέτρηση.

Οι Bruneau et al. (2016) εξέθεσαν ιχθύδια ιριδιζουσας πέστροφας σε διάλυμα AgNPs ή νιτρικού αργύρου ( $\text{AgNO}_3$ ) για 96 ώρες και παρατήρησαν είσοδο των νανοσωματιδίων και συσσώρευσή τους στο ήπαρ. Τα βράγχια εμφάνισαν παθολογικές αλλοιώσεις και οξειδωτικό στρές αλλά χωρίς ορατή παρουσία νανοσωματιδίων. Σημαντική κάμψη της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας παρατηρήθηκε σε προνεφρικά κύτταρα ειδικά στην περίπτωση της έκθεσης σε  $\text{AgNO}_3$  ενώ, παράλληλα, αυξήθηκαν οι ενδείξεις φλεγμονής καθώς και το επίπεδο της μεταλοθειονεΐνης από το ήπαρ.

Μετά από ενδοπεριτοναϊκή έγχυση νανοσωματιδίων αργύρου σε νεαρές τιλάπιες, οι Thummanbancha et al. (2016) διαπίστωσαν σοβαρές αιματολογικές αλλαγές – πράγμα δηλωτικό διαταραχών στην αιμοποίηση, αλλά και ανοσολογικές αλλαγές όπως: καταπίεση της φαγοκύττωσης από το αίμα, διαταραχές στην παραγωγή αντισωμάτων του ορού – πιθανόν λόγω αυξημένης έκφρασης μεταλοθειονεΐνης στον πρόνεφρο – και μειωμένη επιβιωσιμότητα μη εμβολιασμένων ψαριών μετά από τεχνητά προκαλούμενη αντίστοιχη λοίμωξη – πράγμα που μπορεί να αποδοθεί στην μειωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα.

Τα ανωτέρω συνηγορούν στην επικινδυνότητα του αργύρου τόσο για το σύνολο του οργανισμού όσο και, ειδικότερα, για το ανοσοποιητικό σύστημα.

#### - Αρσενικό

Μεταλλοειδές που βρίσκεται σε πολλές αλλοτροπικές μορφές, από τις οποίες η πιο συνηθισμένη είναι γκρίζα μεταλλική α-μορφή. Η μορφή αυτή είναι εύθρυπτη, οξειδώνεται επιφανειακά και καίγεται στον αέρα. Αν και οι ενώσεις του αρσενικού ήταν γνωστές από την αρχαιότητα, η απομόνωσή του ως στοιχείο αποδίδεται στον αλχημιστή



Albertus Magnus κατά το 1250. Το οξειδίο ( $As_2O_3$ ), παλαιότερα γνωστό κι ως ποντικοφάρμακο, όπως και τα άλατά του, αποτελούν ιστορικά δηλητήρια. Παγκοσμίως παράγονται περίπου 59.000 τόνοι αρσενικού το χρόνο, που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή κραμάτων, εντομοκτόνων, μυοκτόνων, συντηρητικών ξυλείας, ημιαγωγών και ηλεκτρονικών εξαρτημάτων (λάμπες LED), καθώς και στην υαλουργία, στην κεραμική και στη φαρμακευτική. Το αρσενικό περιέχεται σε όλα τα πετρώματα και ειδικότερα στα θειούχα ορυκτά χαλκού, μολύβδου και ψευδαργύρου και συνοδεύει τα μέταλλα αυτά στις διαδικασίες εξόρυξης. Οι φυσικές πηγές αρσενικού στο περιβάλλον είναι κυρίως οι ηφαιστειογενείς δράσεις, από τις οποίες εκπέμπεται με μορφή θειούχων αλάτων ή οξειδίων και η σήψη της φυτικής ύλης. Η εκτεταμένη χρήση του στην παραγωγή παρασιτοκτόνων, σε βιομηχανικές εφαρμογές και στις διαδικασίες εξόρυξης και επεξεργασίας μεταλλικών κραμάτων οδήγησε στην παγκόσμια αύξηση της εμφάνισης διαλυτού αρσενικού με τη μορφή οργανικών και ανόργανων ενώσεων σ' όλους τους τύπους υδάτινων συστημάτων. Η τοξικότητα του αρσενικού είναι πολύ μεγάλη με τις ανόργανες μορφές του να είναι γενικά τοξικότερες των οργανικών (Lage et al., 2006).

Οι υψηλές συγκεντρώσεις των ενώσεων του αρσενικού στα υδάτινα οικοσυστήματα, άρα και στην τροφή, επηρεάζουν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες των ψαριών όπως την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, τη ρύθμιση ιόντων, την ανοσοποίηση, τις ενζυματικές δραστηριότητες, και προκαλούν τοξικά φαινόμενα σε πολλά όργανα του σώματος των ψαριών όπως το δέρμα, οι νεφροί και το ήπαρ (Kumari et al., 2016). Επίσης, το αρσενικό μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από μοριακά συμβάντα που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες, την ομοιόσταση του σιδήρου, τη διαταραχή του μεταβολισμού των λιπιδίων και την καρκινογένεση (ibid.). Η συσσώρευση του στους ιστούς είναι η συνάρτηση των ποσοστών πρόσληψης και η κάθαρση του από μεμονωμένα όργανα. Άλλες παθολογικές επιπτώσεις όπως αναιμία, φλεγμονή της χοληδόχου κύστης και εκφυλισμός του ήπατος παρατηρήθηκαν μετά από έκθεση ψαριών σε υδατικές συγκεντρώσεις αρσενικού ή σε συγκεντρώσεις του στην τροφή τους (ibid.). Το μεγαλύτερο μέρος της βιομετατροπής του ανόργανου κυρίως As εντοπίζεται στο ήπαρ και έτσι συσσωρεύεται εκεί όπως έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη Τελεοστέων όπως η ιριδιζουσα πέστροφα,

η Japanese medaka, η τιλάπια και το γατόψαρο στα οποία έχουν παρατηρηθεί εκτεταμένες ηπατοπαθολογικές αλλοιώσεις ιδιαιτέρως μετά από οξείες εκθέσεις (ibid.). Οι νεφροί είναι η κύρια οδός απέκκρισης του αρσενικού καθώς και το όργανο στο οποίο γίνεται η μετατροπή του πεντασθενούς αρσενικού – το οποίον θεωρείται ως λιγότερον τοξικόν του τρισθενούς. Νεφρικές ιστοπαθολογικές αλλαγές σε Τελεοστέους του γλυκού νερού έχουν επίσης παρατηρηθεί στην ιριδίζουσα πέστροφα, στον κορέγγο και στη λιμναία πέστροφα, καθώς και μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης σε ψάρια (*Channa punctatus*) που είχαν υποστεί μακροχρόνια έκθεση στο αρσενικό (ibid.). Παρατεταμένη έκθεση σε υδατοδιαλυτό αρσενικό (Kumar & Banerjee, 2016) προκάλεσε προοδευτική μείωση των αιματολογικών δεικτών σε ινδικό γατόψαρο αλλά, αντιθέτως, αύξηση των λευκοκυττάρων του αίματος ενώ, ταυτόχρονα, μειώθηκε η συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών του ορού και αυξήθηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα – όλα αυτά υποδεικνύουν μια πολύ σοβαρή συστηματική τοξίκωση. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Han et al. (2019), με γλώσσα του Β. Ειρηνικού, αν και μόνο στην ανώτερη συγκέντρωση αρσενικού.

Η συσσώρευση του αρσενικού στο ήπαρ και στους νεφρούς των ψαριών έχει βρεθεί ότι προκαλεί μακροπρόθεσμη μείωση της παραγωγής αντισωμάτων και κυτοκινών. Επιπλέον, καθώς τα μακροφάγα του πρόσθιου νεφρού είναι σημαντικά για την έναρξη λειτουργίας του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος, όμως η έκθεση των ψαριών σε αρσενικό προκαλεί τον θάνατό τους επηρεάζοντας έτσι την ανοσοαντίδραση (Ghosh et al., 2007). Παρομοίως, οι Banerjee et al. (2015) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η έκθεση των ψαριών σε υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού προκαλεί ανοσοκαταπίεση και ευπάθεια σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι Hermann & Kim (2005) μελέτησαν την επίδραση του αρσενικού στο εγγενές σύστημα των λαρβών του zebra fish και κατέληξαν στο ότι μειώνεται η δραστηριότητα της αναπνευστικής έκρηξης των φαγοκυττάρων με συνοδές διαταραχές στην έκφραση κυτοκινών.

Από τα ανωτέρω συνάγεται ότι και το αρσενικό συνιστά σοβαρό πιθανό πρόβλημα για την ανοσοποιητική λειτουργία διότι μπορεί να προσβάλλει ισχυρά τα όργανα/κύτταρα που την συγκροτούν και την υποστηρίζουν.

- Κάδμιο

Είναι σχετικά νέο μέταλλο, ανακαλύφθηκε το 1818 από τον Γερμανό χημικό F. Stromeyer. Υπάρχει σε διάφορες ποσότητες στο έδαφος (κυρίως σε ηφαιστειογενή), τα φυτά, τον αέρα, το νερό, ακόμα και στις τροφές. Η παραγωγή του στις ΗΠΑ άρχισε το 1907 και από τότε αυξάνει σταθερά. Οι ΗΠΑ προμηθεύουν και καταναλώνουν περίπου το 50% της παγκόσμιας παραγωγής. Χρησιμοποιείται στις ηλεκτροεπιμεταλλώσεις, ως σταθεροποιητικό στα πλαστικά, ως συστατικό στις μπαταρίες νικελίου-καδμίου καθώς και στην παρασκευή χρωμάτων και χρωστικών. Λαμβάνεται και ως υποπροϊόν κατά την τήξη ή άλλη επεξεργασία του ψευδαργύρου και του μολύβδου ή από φωσφορικά λιπάσματα. Το 1979 η ετήσια ποσότητα καδμίου που εισερχόταν στο περιβάλλον υπολογίστηκε ότι ήταν περίπου 2.000 - 5.000 τόνοι. Το κάδμιο χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πιο τοξικά βαρέα μέταλλα. Δεν αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για κανέναν ζωντανό οργανισμό. Ποταμοί και λίμνες είναι οι αρχικές περιοχές που μολύνονται με το διαλυμένο κάδμιο, απόβλητο των βιομηχανικών και μεταλλευτικών δραστηριοτήτων. Η μόλυνση των υδρόβιων οργανισμών από κάδμιο παρουσίασε μεγάλη αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες, όπως προκύπτει από τα αποθέματά του στους ιστούς των υδρόβιων οργανισμών σ' όλες τις τροφικές αλυσίδες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι το κάδμιο είναι στοιχείο υψηλής τοξικότητας για όλα τα θηλαστικά και τα ψάρια.

Η βιοσυσσώρευση του καδμίου στους ζωντανούς οργανισμούς είναι μεγάλο οικολογικό ζήτημα λόγω της ιδιότητας του να συσσωρεύεται πολύ γρήγορα και να αποβάλλεται με αργούς ρυθμούς. Υπάρχουν πολλοί τρόποι πρόσληψης του καδμίου από τους υδρόβιους οργανισμούς, με πιο άμεσο την απευθείας απορρόφηση του από το νερό όταν αυτό βρίσκεται στην ιοντική του μορφή. Τα ιόντα των μετάλλων συνήθως απορροφώνται μέσω παθητικής διάχυσης ή μεταφέρονται μέσω διαβιβαστή από τα βράγχια, όπου ενώνονται με άλλα οργανικά υλικά, καταπίνονται και απορροφούνται μέσω της ενδοκυττάρωσης από το πεπτικό σύστημα (Perera et al., 2015). Μόλις το ιόν εισέλθει στα κύτταρα αντιδρά με τα κυτταροπλασματικά συστατικά, όπως ένζυμα (προκαλώντας τοξικά αποτελέσματα) και τη μεταλλοθειονεΐνη (για αποτοξίνωση). Αν και η μεταλλοθειονεΐνη ενεργοποιείται στα βράγχια, δεν είναι ικανή να δεσμεύσει την πλειονότητα του καδμίου, καθώς αυτό ανιχνεύεται συσσωρευμένο στο ήπαρ. Ο λόγος που γίνεται αυτό πιστεύεται ότι είναι η υψηλή

συνάφεια του καδμίου με το ασβέστιο, τα οποία δεσμεύονται στις ίδιες θέσεις των βραγχίων (*ibid.*). Φαίνεται λοιπόν ότι το κάδμιο εισέρχεται στα βράγχια μέσω του διαύλου του ασβεστίου και μετατοπίζεται στην κυκλοφορία μέσω της  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPάσης της βασικής πλευράς του επιθηλίου (Okocha & Adedeji, 2011). Είναι πολύ σπάνιο το να απελευθερωθεί μόνο ένα τοξικό στοιχείο στο υδάτινο περιβάλλον, ενώ συνήθως είναι πολλά τα οποία αντιδρούν μεταξύ τους, με αποτέλεσμα την αύξηση ή τη μείωση της τοξικότητας του καδμίου. Ειδικά για την περίπτωση του ασβεστίου, έχει παρατηρηθεί ότι σε νερά πλούσια σ' αυτό η τοξικότητα του καδμίου μειώνεται πολύ λόγω της έντονης ανταγωνιστικότητας που παρουσιάζουν αυτά τα δύο στοιχεία μεταξύ τους για την κατάληψη θέσεων στα σημεία πρόσληψης (*ibid.*). Τα κάδμιο συσσωρεύεται σε πολλά όργανα, αμέσως μετά την πρόσληψή του από τα βράγχια και το πεπτικό σύστημα, με τους νεφρούς και το ήπαρ να προηγούνται (Perera et al., 2015) αλλά και το έντερο να συμμετέχει (Wu et al., 2007). Στα ψάρια, το κάδμιο προκαλεί ποικίλες παθομορφολογικές αλλαγές σε πληθώρα οργάνων. Για παράδειγμα, στα βράγχια προκαλεί υπερπλασία αλλά και βλάβες στα χλωριοκύτταρα με αποτέλεσμα υπασβεσταιμία και επακόλουθες σκελετικές δυσμορφίες (Wong & Wong, 2000).

Η ανοσοκαταπιεστική δράση του είναι παλαιόθεν γνωστή. Μεταξύ άλλων, οι Sovenyi & Szokolczal (1993) αναφέρουν σημαντικά ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα εξαιτίας της έκθεσης κυπρίνου σε κάδμιο: μειωμένη αντισωματική απόκριση, μείωση των επιπέδων λυσοζύμης και μειωμένη ικανότητα ενδοκυτταρικής θανάτωσης των φαγοκυττωμένων μικροβίων. Από την άλλη, οι Wu et al. (2007) αναφέρουν άνοδο της λυσοζύμης του ορού με μακροχρόνια έκθεση τιλάπιας σε κάδμιο αλλά και καταπίεση της δραστηρότητας του εναλλακτικού συμπληρώματος ενώ, παράλληλα, τα επίπεδα κορτιζόλης επανήλθαν σε φυσιολογικές τιμές. Μια ισχυρή έκφραση του αντιοξειδωτικού ενζύμου τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης παρατηρήθηκε στον πρόνεφρο και το ήπαρ ευρωπαϊκού λάβρακος από τους Mosbaha et al. (2017), μετά από ενδοπεριτοναϊκή έγχυση διαλύματος καδμίου, συνοδευόμενη από μεγάλη άνοδο στην έκφραση μιας αποπτωτικής πρωτεΐνης, αλλαγές οι οποίες, αντίστοιχα, είτε ενισχύθηκαν είτε ελαττώθηκαν με την ενσωμάτωση σκόνης σκόρδου στην τροφή· ίδια εικόνα παρατηρήθηκε στην έκφραση γονιδίων

σχετιζόμενων με την ανοσοαπόκριση (ανοσοσφαιρίνη, ειδικός υποδοχέας T-λυμφοκυττάρων και διαλευκίνη) από τον πρόνεφρο.

- Μόλυβδος

Ο μόλυβδος είναι ένα πολύ βαρύ μέταλλο αρχαιόθεν γνωστό· χρησιμοποιήθηκε στη Μεσοποταμία και την Αίγυπτο για την κατασκευή νομισμάτων, αγαλμάτων και αντικειμένων οικιακής χρήσης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε από τους Ρωμαίους για την κατασκευή οικιακών σκευών καθώς και στους αγωγούς ύδρευσης. Ο μόλυβδος είναι ισχυρά τοξικό μέταλλο όταν εισέρχεται στο ανθρώπινο σώμα. Εισαγωγή στον οργανισμό συγκεντρώσεως μεγαλύτερης του 1mg/ημέρα προκαλεί μολυβδίαση που συνοδεύεται από εντερικές διαταραχές. Έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις μολύβδου μπορεί να προκαλέσει εγκεφαλοπάθεια, βλάβη στα τύμπανα, διαταραχές συμπεριφοράς, βλάβη στα νεφρά, αναιμία (γιατί παρεμποδίζει τον σχηματισμό της αιμοσφαιρίνης) και προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα (για επίπεδα μολύβδου στο αίμα 25-40μg/L), στα παιδιά δε μπορεί να προκαλέσει νοητική υστέρηση (Mushak, 2011). Στην ιατρική βιβλιογραφία, έχει ακόμη αναφερθεί συσχετισμός του μολύβδου με καρδιαγγειακές παθήσεις όπως αρτηριοσκλήρωση και έμφραγμα του μυοκαρδίου. Γενικά, θάνατοι από τοξίκωση με μόλυβδο δεν παρατηρούνται πια. Εξαίρεση αποτελεί η Ταϊβάν όπου η δηλητηρίαση από μόλυβδο αποτελεί την τρίτη πιο συχνά απαντώμενη αιτία θανάτου (Huang et al., 2012).

Οι ανθρωπογενείς προσθήκες στις υδατοσυλλογές πιστεύεται ότι είναι δεκαπλάσιες αυτών που προέρχονται από τη φυσική διάβρωση και φτάνουν στους 390.000 τόνους το χρόνο, δηλαδή πάνω από το 1/10 του συνολικά εξορυσσόμενου μολύβδου σε ολόκληρο τον πλανήτη καταλήγει κάθε χρόνο στο υδάτινο περιβάλλον. Η τοξικότητα του μολύβδου εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του στην τροφή και το νερό και επηρεάζεται από το pH και τη σκληρότητα του νερού, την παρουσία άλλων μετάλλων και τις χημικές μορφές στις οποίες βρίσκεται. Οι περισσότερες ανθρωπογενείς εκπομπές του μολύβδου είναι αποτέλεσμα της εξόρυξης και κατεργασίας των μεταλλευμάτων του.

Ευρεία χρήση του μολύβδου γίνεται σε ποικίλες βιομηχανικές δραστηριότητες όπως στην παραγωγή ηλεκτρικών στοιχείων (μπαταριών), στα διυλιστήρια πετρελαίου, στα χυτήρια, στη χρωματουργία κ.α.. Τα απόβλητα των εργοστασίων και τα αστικά

απορρίμματα επίσης συνεισφέρουν στην ρύπανση των υδάτων με μόλυβδο. Η χρήση του μολύβδου αυξήθηκε γύρω στο 1940, εξαιτίας της χρήσης των αλκυλιωμένων παραγώγων του σαν αντικροτικά πρόσθετα στη βενζίνη των αυτοκινήτων, με αποτέλεσμα την απότομη αύξηση της συγκέντρωσής του στην ατμόσφαιρα. Η εκπομπή του από τα καυσαέρια των οχημάτων, η οποία αποτελεί σημαντική πηγή ρύπανσης της ατμόσφαιρας, μειώθηκε σημαντικά τα τελευταία χρόνια με τη χρήση της αμόλυβδης βενζίνης. Στις ΗΠΑ η μείωση ήταν της τάξης του 80% τη δεκαετία 1975-1985. Οι φυσικές εκπομπές του μολύβδου στην ατμόσφαιρα από ηφαίστεια, πυρκαγιές δασών, σκόνη εδάφους, σταγονίδια κυμάτων θαλάσσης κ.λπ. είναι αρκετά μικρότερες σε μέγεθος από τις ανθρωπογενείς (Hutchinson & Meema, 1987). Η ατμοσφαιρική οδός είναι η σημαντικότερη στον κύκλο μεταφοράς του μολύβδου. Σε παγκόσμια κλίμακα, δηλαδή για το σύνολο των θαλάσσιων υδάτων, το 98% του μολύβδου που τελικά διαλύεται σε αυτά εισέρχεται από την ατμόσφαιρα (ibid.). Οι ατμοσφαιρικές κατακρημνίσεις αυξάνουν τη συγκέντρωση του μολύβδου στις παραλιακές περιοχές κυρίως το χειμώνα (υγρές κατακρημνίσεις), ενώ στην ανοιχτή θάλασσα κυρίως το καλοκαίρι (ξηρές κατακρημνίσεις). Παρά τις σημαντικές μειώσεις των επιπέδων μολύβδου λόγω του περιορισμού της χρήσης του στα καύσιμα, συνεχίζει να είναι ένας από τους κύριους ρύπους για τα οικοσυστήματα (Schuhmacher et al., 1996). Στα υδάτινα οικοσυστήματα, η ύπαρξη μολύβδου σε συγκεντρώσεις πέραν του φυσικού θεωρείται τοξική. Τα ψάρια τα οποία συνήθως βρίσκονται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας σ' αυτά τα συστήματα είναι και τα πιο ευάλωτα στην τοξικότητά του. Επίσης, τα ψάρια ως ανθρώπινη τροφή επηρεάζουν άμεσα τη Δημόσια Υγεία.

Το μόριο του Pb σχηματίζει έναν εύκαμπτο δεσμό με άτομα οξυγόνου και θείου στις πρωτεΐνες και η ικανότητά του να σχηματίζει σταθερό σύμπλεγμα με αυτά τα στοιχεία αυξάνει την συγγένειά του με ορισμένες πρωτεΐνες. Έτσι, η έκθεση σε μόλυβδο προκαλεί μια μεγάλη γκάμα τοξικών αποτελεσμάτων στις φυσιολογικές, ηθολογικές και βιοχημικές λειτουργίες των Σπονδυλοζώων, όπως καταστροφές στο κεντρικό και περιφερειακό νευρικό σύστημα, στο αιμοποιητικό, στο καρδιαγγειακό και σε όργανα όπως το ήπαρ και τα νεφρά (Lee et al, 2019). Επίσης, αυτό το μέταλλο ενισχύει την προ-οξειδωτική κατάσταση (pro-oxidant status) καθώς δρα αναστέλλοντας ή

καταστρέφοντας τη λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών προκαλώντας την παραγωγή ROS (Reactive Oxygen Species, ήτοι ελεύθερων ριζών με βάση το οξυγόνο) (ibid.).

Ειδικά στα ψάρια, έχει παρατηρηθεί μειωμένη αιμοποιητική δραστηριότητα στο σπλήνα, φαγοκυτταρική δραστηριότητα και μειωμένη παραγωγή αντισωμάτων. Για παράδειγμα, η παρατεταμένη έκθεση τιλάπιας σε μόλυβδο απέληξε σε αρκετά μειωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα (Aboud, 2010)· ο μόλυβδος, μάλιστα, προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση από τον υδράργυρο και το κάδμιο, η οποία επίσης αντανάκλασε και στην αυξημένη θνητότητα μετά από μια τεχνητώς προκληθείσα μόλυνση με παθογόνο βακτήριο. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η μακροχρόνια έκθεση προκαλεί την μείωση των λεμφοκυττάρων καθώς και των λευκών αιμοσφαιρίων εξαιτίας των βλαβών του ανοσοποιητικού συστήματος πράγμα που αποδίδεται στην έκκριση κορτιζόλης που προκαλείται από την αντίδραση στο στρες μειώνοντας τη ζωή των λεμφοκυττάρων ή απευθείας προωθώντας την απόπτωσή τους (Lee et al., 2019). Μείωση σε τίτλους αντισωμάτων μετά από έγχυση μολύβδου έχει επίσης αναφερθεί (ibid.). Περαιτέρω, οι Kim & Kang (2016) αναφέρουν ότι η έκθεση σε μόλυβδο επηρέασε τις ανοσοαποκρίσεις για παράγοντες όπως η ανοσοσφαιρίνη πλάσματος M (IgM) και η λυσοζύμη στο *Sebastes schlegelii*. Επιπλέον, ο μόλυβδος παρεμβαίνει στην έκφραση των κυτοκινών. Οι κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκινών, είναι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κυττάρων που παράγουν την ανοσοαπόκριση και, άρα, παίζουν σημαντικό ρόλο στη κινητοποίηση ενός ανοσοποιητικού μηχανισμού (Savan & Sakai, 2006). Κάποιες κυτοκίνες έδειξαν άνοδο μετά από έκθεση κυπρίνων σε μόλυβδο (Dai et al., 2018).

#### - Υδράργυρος

Ο υδράργυρος απαντάται φυσικά στο περιβάλλον, συνήθως δε σε ασφαλείς περιεκτικότητες σε ορυκτά υλικά, χωρίς να εγκυμονεί κάποιο σοβαρό κίνδυνο. Το πρόβλημα προκύπτει λόγω των ανθρώπινων δραστηριοτήτων που έχουν ως συνέπεια την έκλυση μεγάλων ποσοτήτων υδραργύρου στο περιβάλλον, οι οποίες μπορούν να κυκλοφορούν ελεύθερα για χιλιάδες χρόνια. Κύρια ανησυχία αποτελεί ο υδράργυρος που περιέχεται στο νερό και τα προσχρωματικά υλικά, καθώς απαντάται σε αυτά σε ιδιαίτερα τοξική μορφή και είναι εύκολη η πρόσληψή του από τα ζώα μέσω των οποίων εισέρχεται στην

ανθρώπινη τροφική αλυσίδα. Η σημαντικότερη οδός έκθεσης των ανθρώπων στον υδράργυρο είναι η κατανάλωση ψαριών και θαλασσινών. Ο υδράργυρος που προσλαμβάνουν τα ζώα της θάλασσας έχει την τάση να παραμένει στον οργανισμό τους και να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου. Τα μεγαλύτερα ψάρια-θηρευτές τείνουν να έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υδραργύρου, καθώς τρέφονται με μικρότερα ζώα των οποίων οι οργανισμοί περιέχουν ήδη κάποιες ποσότητες υδραργύρου. Συνεπώς, η κατανάλωση μεγαλύτερων ψαριών-θηρευτών, όπως ο τόνος ή ο ξιφίας, συνεπάγεται κατά κανόνα μεγαλύτερη πρόσληψη υδραργύρου σε σύγκριση με την κατανάλωση μικρότερων ψαριών, τα οποία βρίσκονται χαμηλότερα στην τροφική αλυσίδα (φαινόμενο «βιομεγέθυνσης»). Τον Οκτώβριο του 2013, υπογράφηκε μια πρώτη παγκόσμια διεθνής συμφωνία, η σύμβαση της Μιναμάτα, για την αντιμετώπιση του προβλήματος του υδραργύρου, η οποία κυρώθηκε από 98 συμβαλλόμενα μέρη και τέθηκε σε ισχύ το 2017. Αν και είναι ακόμη πολύ νωρίς για να αξιολογηθεί ο αντίκτυπός της, η σύμβαση αυτή αποτελεί ένα εξαιρετικά σημαντικό βήμα προς την κατεύθυνση της ανάληψης συντονισμένης παγκόσμιας δράσης για τη μείωση της ρύπανσης από τον υδράργυρο.

Ο υδράργυρος (Hg) είναι το μοναδικό μέταλλο που σε θερμοκρασία περιβάλλοντος βρίσκεται σε υγρή μορφή και είναι ιδιαίτερα πτητικός. Είναι καλός αγωγός της θερμότητας και αρκετά καλός αγωγός του ηλεκτρισμού. Η συγκέντρωση του υδραργύρου στο περιβάλλον είναι αυξημένη κυρίως λόγω των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων που παράγουν περίπου 2600 τόνους υδραργύρου το χρόνο, αλλά και λόγω φυσικών αιτιών. Ο στοιχειώδης υδράργυρος ( $Hg^0$ ), που περιλαμβάνει το 95–99% του υδραργύρου στην ατμόσφαιρα, μπορεί να κυκλοφορήσει στον αέρα μέχρι και ένα έτος πριν από την απόθεση του στο έδαφος ή στο νερό και να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις από την πηγή εκπομπής του. Στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας οξειδώνεται προς τα κατιόντα  $Hg^+$  ή  $Hg^{2+}$  και αποτίθεται στο έδαφος με τη βροχή (Rice et al., 2014). Οι φυσικές πηγές απελευθέρωσης υδραργύρου στην ατμόσφαιρα είναι τα ηφαίστεια, οι δασικές πυρκαγιές και η διάβρωση των ορυκτών. Σημαντικότερες ανθρωπογενείς πηγές απελευθέρωσης Hg είναι η κινητοποίηση των προσμίξεων υδραργύρου κατά την καύση του άνθρακα, την παραγωγή τσιμέντου και τις εξορύξεις μετάλλων, οι εκπομπές από την άμεση



εξόρυξη υδραργύρου και η χρήση του σε προϊόντα ευρέως χρησιμοποιούμενα, όπως τα οδοντικά αμαλγάματα και οι απελευθερώσεις από την επεξεργασία αποβλήτων (Pirrone et al., 2010).

Οι μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες του Hg τον καθιστούν εύκολα ανταλλάξιμο μεταξύ των περιβαλλοντικών μέσων. Μετά την απελευθέρωση του στο περιβάλλον, ο υδράργυρος εισέρχεται σε ένα βιογεωχημικό κύκλο και παραμένει χημικά, βιολογικά και περιβαλλοντικά ενεργός για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι τρεις φάσεις του κύκλου αυτού είναι: 1) η απελευθέρωση του υδραργύρου στην ατμόσφαιρα, 2) η μεταφορά και η απόθεσή του στο έδαφος και το νερό και 3) η βιολογική μετατροπή και απορρόφηση του από διάφορους οργανισμούς και η προσρόφηση του στα ιζήματα, που θεωρούνται ο τελικός του αποδέκτης (Selin, 2009). Ο  $Hg^{2+}$  έχει την τάση να δημιουργεί ανόργανες ενώσεις, τα άλατα υδραργύρου, με στοιχεία όπως το χλώριο, το θείο και το οξυγόνο. Οι ενώσεις αυτές είναι γενικά πιο τοξικές από τον στοιχειακό υδράργυρο και έχουν χρόνο ημιζωής περίπου 40 ημέρες (Randall & Chattopadhyay, 2013). Οι οργανικές ενώσεις του υδραργύρου είναι δυνητικά πιο τοξικές από τις ανόργανες, με τον MeHg να καταλαμβάνει περίπου το 90% των οργανικών ενώσεων στα ιζήματα· αυτή η μορφή του υδραργύρου μπορεί να εισαχθεί στην τροφική αλυσίδα και να προκαλέσει βλάβες σε ανώτερους οργανισμούς. Η ένωση αυτή είναι λιποδιαλυτή και έχει την ικανότητα να διαπερνά τις βιολογικές μεμβράνες και να συσσωρεύεται στα κύτταρα συμπλεκόμενη με πρωτεΐνες, ένζυμα και νουκλεϊκά οξέα.

Αναφορικά με τις επιδράσεις του στα κύτταρα, η έκθεση σε Hg συνδέεται με αλλοιώσεις της διαπερατότητας και της μακρομοριακής δομής των μεμβρανών και με βλάβες στο DNA. Επιπλέον, ο Hg προκαλεί οξειδωτικό στρες στα κύτταρα και διαταραχές της μιτοχονδριακής λειτουργίας που οδηγούν σε μεταβολές της ομοιόστασης του Ca. Τέλος, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα οξυγόνου καθώς δρα ως καταλύτης στις αντιδράσεις Fenton (Rice et al., 2014). Η ικανότητα του Hg να επηρεάζει πολλαπλά κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, ο κυτταροσκελετός και το ενδοπλασματικό δίκτυο και μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης.

Ειδικά για τα 'ψάρια', οι Roales & Perlmutter (1977), απέδειξαν ότι 9ppb μεθυλικού υδραργύρου που χορηγήθηκαν για τέσσερις εβδομάδες στο μπλε γκουράμι, μείωσαν τις ανοσοαποκρίσεις του κατά ιικών (IPN) και βακτηριακών (*Proteus vulgaris*) αντιγόνων εξαιτίας της καταστροφής που υπέστη ο λευκός πολτός του σπλήνα. Περαιτέρω, οι Voccia et al. (1994) μελέτησαν τις λειτουργικές βλάβες που προκλήθηκαν στα ανοσο-κύτταρα της ιριδίζουσας πέστροφας από τη χορήγηση μεθυλ-υδραργύρου και χλωριούχου υδραργύρου in vitro. Το κυτταρικό δυναμικό του μεθυλικού υδραργύρου εμφανίστηκε τουλάχιστον δέκα φορές υψηλότερο από αυτό του χλωριούχου υδραργύρου, ενώ παρατηρήθηκε αυξημένη καταστολή σε λειτουργικές δραστηριότητες όπως στον πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων με μιτογόνα, στην αντίδραση των λεμφοκυττάρων στη φαγοκυτταρική και αναπνευστική δραστηριότητα του αίματος και στη λειτουργία του πρόσθιου νεφρού. Γενικά, παρατηρείται μια μη ειδικευμένη καταστολή των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος, λόγω δηλητηρίασης από τις in vitro κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις ενώσεων υδραργύρου (Dunier, 1996). Σε νεώτερες μελέτες, έχουν παρατηρηθεί διαταραχές στην έκφραση διαφόρων κυτοκινών μετά από έκθεση in vivo ή in vitro αλλά αυτές οι αλλαγές δεν είχαν μια σταθερή τάση σε όλα τα πειράματα που έγιναν με διάφορα είδη ψαριών (Morcillo et al., 2017)· παρομοίως ακανόνιστες ήταν και οι αντιδράσεις ως προς άλλους χυμικούς παράγοντες, ήτοι ανοσοσφαιρίνη, λυσοζύμη και συμπλήρωμα. Ωστόσο, οι μελέτες που εστίασαν σε φαγοκύτταρα έδειξαν μια σαφή τάση για αρνητικές επιδράσεις σε μια σειρά παραμέτρων περί την επιβίωση και την λειτουργία τους (Morcillo et al., 2017).

#### - Χαλκός

Ο χαλκός είναι πολύ γνωστό μέταλλο από την αρχαιότητα. Ήδη από το 3000π.Χ. πραγματοποιείται συστηματική εξόρυξη ορυκτών χαλκού και αναφέρεται ως βάση του πολιτισμού κατά την ομώνυμη ιστορική εποχή, μετά την νεολιθική και πριν από αυτήν του σιδήρου. Το σύμβολό του, Cu, προέρχεται από τη λατινική ονομασία "cuprus" που παραπέμπει στο νησί της Κύπρου που υπήρξε σημαντική πηγή ορυκτών χαλκού μέχρι και την ρωμαϊκή εποχή. Τα κυριότερα ορυκτά του χαλκού είναι ο χαλκοπυρίτης, ο κυπρίτης, ο χαλκοσίτης, ο μαλαχίτης, ο αζουρίτης. Ο χαλκός χρησιμοποιείται ως υλικό κατασκευών (σωληνώσεις), ως στοιχείο κραμάτων με μεγάλη ποικιλία

χρήσεων, όπως τα νομίσματα, και στη κατασκευή ηλεκτρικών αγωγών και ηλεκτρονικών εξαρτημάτων. Λόγω της βιοστατικής του ιδιότητας χρησιμοποιείται για την κατασκευή βιοστατικών ινών, για πόμολα θυρών και φίλτρων σε κλιματιστικά, ιδιαίτερα σε νοσοκομειακές εγκαταστάσεις.

Ο χαλκός είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τους οργανισμούς και έχει σημαντικό ρόλο στις οξειδο-αναγωγικές αντιδράσεις, στη δέσμευση ελευθέρων ριζών και σαν συνένζυμο στη διαδικασία του μεταβολισμού. Επίσης συμμετέχει και στην μεταφορά ηλεκτρονίων στις διαδικασίες της φωτοσύνθεσης και της αναπνοής (Perales-Vela et al., 2007).

Η τοξικότητα του χαλκού εμφανίζεται όταν το στοιχείο αυτό συσσωρεύεται στο σώμα ενός οργανισμού σε μεγάλες ποσότητες ή η συγκέντρωσή του υπερβεί τα όρια της ανοχής του. Η μέση συγκέντρωση του χαλκού στα ψάρια ποικίλει ανάλογα με το είδος και τον τύπο του οργάνου. Σύμφωνα με τους Yilmaz et al. (2007), οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται στο ήπαρ και στα βράγχια. Η συσσώρευση του μετάλλου στο ήπαρ μπορεί να συνδέεται με το ρόλο του στη διαδικασία του μεταβολισμού (Zhao et al., 2012). Συχνά συνδέεται με τη δεσμευτική πρωτεΐνη μεταλλοθειονεΐνη η οποία δρα σαν αποθήκη μετάλλων για να καλυφθούν οι ενζυματικές και άλλες ανάγκες του μεταβολισμού (Gorur et al., 2012). Περαιτέρω, οι Wang et al. (2020), μετά από πείραμα διατροφής με Zn και Cu που πραγματοποίησαν στην τιλάπια, κατέληξαν ότι το ήπαρ και κατόπιν το έντερο παρουσίασαν τη μεγαλύτερη συσσώρευση χαλκού. Το πιο σημαντικό όμως εύρημά τους ήταν ότι ο χαλκός και ο ψευδάργυρος προκάλεσαν οξειδωτικό στρες και καταστροφή της ανοσολογικής λειτουργίας του συκωτιού της τιλάπιας διαταράσσοντας τις δραστηριότητες των CAT, SOD, Gpx, τα αποθέματα των MDA, GSH και GSSG και τις εκφράσεις των γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσία. Η συνδυασμένη διατροφή με Cu και Zn οδήγησε σε εντονότερο οξειδωτικό στρες απ' ό,τι η μεμονωμένη κατανάλωσή τους, δηλ. ο χαλκός και ο ψευδάργυρος είχαν συνεργιστικά αποτελέσματα στο αντιοξειδωτικό σύστημα, ενώ η τοξικότητα του ψευδαργύρου ήταν ισχυρότερη από του χαλκού. Ωστόσο, η τοξικότητα του χαλκού στο ανοσοποιητικό σύστημα ήταν ισχυρότερη από του ψευδαργύρου και ο ψευδάργυρος δεν μπόρεσε να αποδυναμώσει την τοξικότητα του

χαλκού, ενώ ο χαλκός εξασθένησε την τοξικότητα του ψευδαργύρου σ' ορισμένα επίπεδα.

- Χρώμιο

Το χρώμιο (Cr), είναι ένα μεταλλικό στοιχείο που ανακαλύφθηκε το 1797 από το Γάλλο Louis-Nicolas Vauquelin. Το όνομά του προέρχεται από την ελληνική λέξη 'χρώμα', επειδή όλες οι γνωστές του ενώσεις έχουν έντονο χρώμα. Οι τρεις κύριες μορφές του χρωμίου είναι:

- *Μεταλλικό χρώμιο*, χρησιμοποιείται κυρίως σε κράματα (όπως ανοξείδωτος χάλυβας)
- *Τρισθενές χρώμιο ή χρώμιο(III)*, σχηματίζεται φυσικά στο περιβάλλον και είναι ένα βασικό διατροφικό ιχνοστοιχείο.
- *Εξασθενές χρώμιο ή χρώμιο(VI)*, δεν υπάρχει ελεύθερο στη φύση παρά μόνο σε κάποια σπάνια ορυκτά, παράγεται από βιομηχανικές διεργασίες (αποτέφρωση αποβλήτων, κατασκευή χάλυβα). Το Cr(6) (εξασθενές χρώμιο), ως διχρωμικό ιόν, είναι σχετικά ισχυρό οξειδωτικό σε όξινα διαλύματα και παρέχει αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με ανόργανες αναγωγικές ουσίες. Όλες οι ενώσεις του εξασθενούς χρωμίου που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία είναι εξαιρετικά τοξικές. Έχει χαρακτηριστεί ως αποδεδειγμένα καρκινογόνος ουσία. Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα ότι ενώσεις του Cr(6) καταστρέφουν το DNA και προκαλούν μεταλλάξεις.

Η συσσώρευση του χρωμίου στους οργανισμούς εμφανίζεται διαφορετική στους διάφορους ιστούς. Έτσι, η συγκέντρωσή του έχει βρεθεί ότι είναι μεγαλύτερη στα βράγχια, στους νεφρούς και στο συκώτι των ψαριών, ενώ είναι ανύπαρκτη στο μυϊκό σύστημα. Σε κάθε περίπτωση πάντως, φαίνεται ότι τόσο οι φυσικές όσο και οι χημικές ιδιότητες του νερού, καθώς και οι εποχιακές μεταβολές ευθύνονται για το ρυθμό βιοσυσσώρευσης των βαρέων μετάλλων στους διάφορους ιστούς των ψαριών (Sadiq, 1992). Εκτός από το ρόλο του τρισθενούς χρωμίου Cr(III) στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στα λίπη και τις πρωτεΐνες στα ζώα και στον άνθρωπο, παρουσιάζει διακριτά τοξικολογικά αποτελέσματα. Μεταξύ άλλων, σε ψάρια που εκτέθηκαν σε χρώμιο, έχουν αναφερθεί σοβαρές αιματολογικές διαταραχές καθώς και ανοσοκαταπίεση με αυξημένη ευπάθεια σε μολύνσεις (Aslam & Yusafzai, 2017). Επίσης, οι Arunkumar et al. (2000) αφού χορήγησαν χαμηλές δόσεις χρωμίου ενδοπεριτοναϊκώς σε τιλάπια

Μοζαμβίκης και, εν συνεχεία, την ανοσοποίησαν με λευκωματίνη βοείου ορού, διαπίστωσαν ότι οι τίτλοι αντισωμάτων ήσαν σαφώς χαμηλότεροι απ' όσο στους μάρτυρες, πράγμα που συνοδεύονταν με μείωση βάρους και κυτταρικότητας στον σπλήνα καθώς και μείωση στα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα· το εξασθενές αποδείχθηκε σαφώς πιο δραστικό ανοσοκαταπιεστικό από το τρισθενές χρώμιο ενώ σημειώθηκε και κάποια ένδειξη για δοσοεξάρτηση. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι Bakshi & Panigrahi (2018) από άλλες μελέτες που περιλαμβάνουν και άλλους χυμικούς και λευκοκυτταρικούς παράγοντες.

- Ψευδάργυρος

Ο ψευδάργυρος είναι από τα αρκετά μελετημένα μέταλλα στη φύση γιατί μετέχει σε ενζυμικές αντιδράσεις, έχει την τάση να συσσωρεύεται στους ιστούς διαφόρων οργανισμών και το ραδιενεργό του ισότοπο Zn-65 θεωρείται ρύπος. Το μέταλλο αυτό έχει μεγάλη τάση σχηματισμού συμπλόκων (π.χ. με χλωριόντα, θειούχα και φωσφορικά). Επίσης αξιοσημείωτο είναι ότι συσσωρεύεται σε ορισμένα θαλάσσια ορυκτά, όπως οι κόνδυλοι μαγγανίου-σιδήρου και οι φωσφορίτες και ότι συσσωρεύεται σε πολλούς θαλάσσιους οργανισμούς. Μερικοί συγγραφείς υποστηρίζουν ότι ο ρυθμός βιομεγέθυνσης στα ανώτερα στάδια της τροφικής αλυσίδας είναι πολύ μικρός ή και αρνητικός. Οι σημαντικότερες πηγές ρύπανσης από ψευδάργυρο είναι διάφορες ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως χημικές βιομηχανίες, οι βιομηχανίες μετάλλων, αυτοκινήτων και άλλων μηχανών, βαφεία, τυπογραφεία, ηλεκτροαποθέσεις και ηλεκτρολύσεις κάθε μορφής. Υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται επίσης σε ναυπηγεία καθώς και σε χώρους καθαρισμού και ελλιμενισμού πλοίων. Γενικά, οι συγκεντρώσεις στις ανοιχτές θάλασσες δε δείχνουν μια συστηματική αύξηση των επιπέδων του ψευδαργύρου. Σε κλειστές όμως λεκάνες και κόλπους έχει παρατηρηθεί αύξηση της συγκέντρωσής του τόσο στο υδάτινο περιβάλλον (σε διαλυτή και σωματιδιακή μορφή) όσο και σε ιζήματα και στους ιστούς διαφόρων, βενθικών κυρίως, οργανισμών.

Ο ψευδάργυρος, είναι βασικό στοιχείο για τη δομική και καταλυτική λειτουργία περισσότερων από 300 πρωτεϊνών των ψαριών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού τους συστήματος (Kim et al., 2017). Ο υδατοδιαλυτός ψευδάργυρος

προκαλεί ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στα βράγχια των ψαριών, όπως διήθηση λεμφοκυττάρων, πολλαπλασιασμό επιθηλιακών κυττάρων, νέκρωση, υπερτροφία και υπερέκκριση βλέννας (Wood 2001). Επιπλέον, η έκθεση σε Zn είναι ιδιαίτερα τοξική για τα ψάρια καθώς αναστέλλει την πρόσληψη ασβεστίου, η οποία δημιουργεί εσωτερική ανισορροπία και οδηγεί σε υπασβεσταιμία ενώ προκαλεί και διαταραχές στην οξεοβασική ισορροπία (Santore et al., 2002).

Αρκετοί ερευνητές μελέτησαν τη λειτουργία της φαγοκύτωσης μετά την επίδραση Zn, αφού αυτή αποτελεί θεμελιώδη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος· έτσι, οι Kim et al. (2017) σε μελέτη που πραγματοποίησαν σε γόνιο *Acanthopagrus schlegelii* κατέληξαν ότι η δραστηριότητα της αυξάνεται, καθώς επίσης αυξάνεται και η δραστηριότητα της λυσοζύμης. Οι Sanchez-Dardon et al. (1999) επίσης αναφέρουν αξιοσημείωτες μεταβολές στην λυσοζύμη του ορού στην ιριδίζουσα πέστροφα. Ομοίως και οι Çelik et al. (2012), κατέγραψαν αύξηση στη φαγοκυτταρική και λυσοζυμική δραστηριότητα στην τιλάπια. Οι Min et al. (2019) μελέτησαν τα ανοσολογικά και αιματολογικά αποτελέσματα της έκθεσης του *Paralichthys olivaceus* σε πυριθειονικό ψευδάργυρο και κατέληξαν ότι προκλήθηκε ανοσοτοξικότητα η οποία εκδηλώθηκε με αλλαγές στην αιματολογική ομοιόσταση και την επαγωγή οξειδωτικού στρες.

#### **IV. Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες**

Τα πολυαρένια, γνωστότερα ως πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) είναι μια ειδική κατηγορία οργανικών ενώσεων οι οποίες αποτελούνται από τρεις ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, ενωμένους μεταξύ τους, έτσι ώστε ορισμένα άτομα άνθρακα ανήκουν σε δύο ή τρεις δακτυλίους. Μια τέτοια δομή αναφέρεται επίσης ως σύστημα συγκολλημένων (fused) δακτυλίων. Οι δακτύλιοι μπορεί να είναι τοποθετημένοι σε ευθεία γραμμή ή να σχηματίζουν γωνίες ή να δημιουργούν μια συστάδα (cluster). Τα PAHs, μπορούν επίσης να περιλαμβάνουν αλκυλιο-ομάδες όπως μεθυλίου και αιθυλίου, οι οποίες αντικαθιστούν ένα ή περισσότερα από τα άτομα υδρογόνου τους, ή ετεροκυκλικές αρωματικές ενώσεις όπου το θείο, το οξυγόνο ή το άζωτο αντικαθιστούν ένα ή περισσότερα άτομα άνθρακα στους δακτυλίους τους. Τα PAHs, συνθέτουν ένα σημαντικό μέρος πολλών ορυκτών καυσίμων, όπως το αργό πετρέλαιο, ο σχιστόλιθος και η

πίσσα. Τα PAHs, είναι ημιπτητικές οργανικές ενώσεις που σχηματίζονται κατά την ατελή καύση και την πυρόλυση της οργανικής ύλης. Παρά το γεγονός ότι εκλύονται στην ατμόσφαιρα από φυσικές πηγές (π.χ. πυρκαγιές δασών και λιβαδιών), η παρουσία τους στο περιβάλλον είναι σε μεγάλο βαθμό αποτέλεσμα ανθρωπογενών δραστηριοτήτων (εγκαταστάσεις καύσης κάρβουνου, πετρελαίου και φυσικού αερίου, μηχανοκίνητα οχήματα και βιομηχανικές δραστηριότητες, κ.λπ.). Τα PAHs, κατατάσσονται στους επίμονους χημικούς ρυπαντές, οι οποίοι βρίσκονται στο έδαφος, στα ιζήματα, στο νερό και στον αέρα.

Οι μηχανισμοί τοξικότητας των PAHs στο ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών έχει μελετηθεί εκτενώς, αλλά σχετικά λίγες μελέτες αφορούν στα ψάρια αλλά είναι βέβαιοι ότι διαταράσσουν το εγγενές και το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών. Τα PAHs προκαλούν τοξικότητα κυρίως με δύο μηχανισμούς: α) την διέγερση του βιομετασχηματισμού (P450-mediated biotransformation), και β) τη διατάραξη των ενδοκυτταρικών επιπέδων του ασβεστίου (Reynaud et al., 2001; 2003). Οι περισσότερες μελέτες εξετάζουν την επίδραση των PAHs στο εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα εστιάζοντας στις χυμικές και στις κυτταρικές ανειδίκευτες ανοσοάμυνες.

Μετά από *in vitro* έκθεση του ευρωλαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) σε πληθώρα μεμονωμένων PAHs προκλήθηκε τόσο διέγερση όσο και καταστολή της δραστηριότητας του συμπληρώματος και της συγκέντρωσης της λυσοζύμης ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση του κάθε φορά εξεταζόμενου PAH (Bado-Nilles et al., 2009). Αντίθετα στην περίπτωση του πλατύψαρου *Limanda limanda* που εκτέθηκε σε υπόστρωμα μολυσμένο με PAHs δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στη συγκέντρωση λυσοζύμης (Hutchinson et al., 2003). Είναι, άρα, πιθανό ότι τα αποτελέσματα της έκθεσης σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες στο χυμικό ανοσοποιητικό σύστημα εξαρτώνται όχι μόνο από το είδος του μολυντή αλλά και από τη μέθοδο έκθεσης. Οι μελέτες που εξετάζουν τις επιδράσεις των PAHs στα κύτταρα του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος εστιάζουν κυρίως στη φαγοκύτωση (Reynaud et al., 2001; Carlson et al., 2002). Η νεφρική φαγοκύτωση του *Oryzias latipes* το οποίο μολύνθηκε με ενέσιμο BaP, παρουσίασε μειωμένες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) (Carlson et al., 2002). Τα ίδια αποτελέσματα είχε και η έκθεση της *Limanda limanda* σε μολυσμένα με PAHs

υποστρώματα (Hutchinson et al., 2003). Αντίθετα, στην περίπτωση του κοινού κυπρίνου που εκτέθηκε σε 3-μεθυλ-χολανθρένιο, η νεφρική φαγοκύτωση παρουσίασε αύξηση της παραγωγής ROS (Reynaud et al., 2001). Ομοίως, φαγοκυτταρική αύξηση του ROS παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του πλατύψαρου *Parophrys vetulus*, το οποίο εκτέθηκε σε μίγμα PAHs (Clemons et al., 1999).

Μελέτες που εξετάζουν την ανοσοτοξικολογική επίδραση των PAHs στον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων πραγματοποιήθηκαν είτε μέσω της διατροφής τους (Connolly & Means, 2010), είτε μέσω της καλλιέργειας κυττάρων (Reynaud et al., 2003), ή με ενέσιμη έκθεση (Reynaud & Deschaux, 2005). Ανάλογα με το είδος του PAH που χρησιμοποιήθηκε και την οδό της έκθεσης, παρατηρήθηκε ανοσοκαταστολή και ανοσοδιέγερση ανάλογα με την αντίδραση των μιτωγόνων. Ειδικότερα, το *Lepomis macrochirus* που εκτέθηκε ξεχωριστά σε δύο (2-διμεθυλ-ναφθαλίνη) και σε τριών δακτυλίων (2-αμινο-ανθρακένιο και 9,10-διμεθυλ-ανθρακένιο) PAHs, μέσω της τροφής του, παρουσίασε αυξημένη ή μειωμένη μιτωγένεση ανάλογα με την ουσία της έκθεσης. Όταν όμως το ίδιο είδος ψαριού εκτέθηκε σε μίγμα των παραπάνω ουσιών παρουσίασε ανοσοκαταπίεση (Connolly & Means, 2010). Καταπίεση της επίδρασης των Β- και Τ-μιτωγόνων παρατηρήθηκε επίσης σε κυπρίνο που εκτέθηκε σε 3-μεθυλ-χολανθρένιο μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης ή σε καλλιέργεια κυττάρων που απομονώθηκαν (Reynaud et al., 2003; Reynaud & Deschaux, 2005). Το *Oryzias latipes*, επίσης εμφάνισε μειωμένη απόκριση των Β- και Τ-μιτωγόνων όταν μολύνθηκε με ενέσιμο BaP (Carlson et al., 2002). Λίγες μελέτες εξετάζουν την επίδραση των PAHs στα χυμικά συστατικά του επίκτητου ανοσολογικού συστήματος. Ιριδίζουσες πέστροφες που μολύνθηκαν ενδοπεριτοναϊκώς με ενέσιμη ρητίνη, ένα αλκυλικό PAH, εμφάνισαν αυξημένο τίτλο αντισωμάτων κατά της *Aeromonas salmonicida*, όμοιο με αυτό που εμφάνισαν και τα άτομα που δεν είχαν μολυνθεί (Hogan et al., 2010).

Η PFC (plaque-forming cell) είναι μια τεχνική που βασίζεται στην αιμόλυση και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση Β-λεμφοκυττάρων που παράγουν αντισώματα. Ιχθύδια σολομού Chinook, που εκτέθηκαν σε 7,12-διμεθυλ-βενζο(α)ανθρακένιο (DMBA), εμφάνισαν καταπιεσμένες αρχικές και δευτερεύουσες αποκρίσεις μετρούμενες με τη μέθοδο PFC (Arkoosh et al., 1994). Τα ίδια αποτελέσματα έδωσε και το *Oryzias*



*latipes* όταν εκτέθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε ενέσιμο BaP (Carlson et al., 2002).

Οι κυτταρικές μελέτες εξετάζουν πληθώρα συστατικών του εγγενούς και του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος και είναι σημαντικές για τον έλεγχο της ανοσοτοξικότητας των PAHs όμως δεν εξετάζουν την ολική τοξικότητα που προκύπτει σ' ένα ψάρι μετά την έκθεση του (Segner et al., 2012a). Μια πιο ολιστική μέθοδος της μελέτης της ανοσοτοξικότητας είναι ο έλεγχος της ικανότητας του οργανισμού να αντιμετωπίσει επιτυχώς κάποιο παθογόνο παράγοντα (Arkoosh & Collier, 2002; Arkoosh et al., 2005). Ιχθύδια ιριδιζουσας πέστροφας, τα οποία τράφηκαν με τροφή που περιείχε μίγματα από 10 υψηλού μοριακού βάρους PAHs, παρουσίασαν ευαισθησία στο παθογόνο *Aeromonas salmonicida* (Bravo et al., 2011). Τα *Oryzias latipes* καθώς και ιχθύδια σολομού Chinook που εκτέθηκαν σε ενέσιμο μίγμα PAHs ή σε DMBA εμφάνισαν επίσης ευαισθησία στα παθογόνα *Yersinia ruckeri* (Carlson et al., 2002) και *Listonella anguillarum* (Arkoosh et al., 2001), αντίστοιχα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του zebrafish, όταν μια ομάδα άτομων εκτέθηκε ταυτόχρονα σε φαιναθρένιο και σε *Mycobacterium marinum* και εμφάνισε μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με μια δεύτερη ομάδα που εκτέθηκε μόνο σε φαιναθρένιο (Prosser et al., 2011). Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι τα βακτήρια προκάλεσαν μια φλεγμονώδη απόκριση η οποία παρενέβει στο μεταβολισμό του φαιναθρένιου σε πιο τοξικές ενώσεις, και έτσι υποθέτουν μια ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των παθογονικών παραγόντων. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται και από παλαιότερες μελέτες, οι οποίες καταδεικνύουν ότι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες αναστέλλουν τον βιομετασχηματισμό (μέσω CYP1A) της αρχικής PAH ένωσης σε ενδεχομένως πιο τοξικούς μεταβολίτες (Morgan, 2001). Ωστόσο, οι μηχανισμοί με τους οποίους επιτυγχάνεται αυτή η καταστολή δεν είναι ακόμη γνωστοί (Prosser et al., 2011). Μελέτες για την επίδραση των παραπροϊόντων πετρελαίου όπως το πισσέλαιο, το υδατοδιαλυτό κλάσμα πετρελαίου, το νερό που προκύπτει από την εξόρυξη πετρελαίου ή φυσικού αερίου κ.λπ. στο ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών, καταλήγουν ότι τα αποτελέσματα αυτών των προϊόντων είναι παρόμοια με αυτά των PAHs που συνθέτουν τα πετρελαιοειδή (Reynaud & Deschaux, 2006). Λειτουργικά ανοσολογικά σημεία και γονιδιακές εκφράσεις βρέθηκε ότι είναι ευαίσθητα σε αυτά τα προϊόντα αλλά οι επιπτώσεις τους

εξαρτιούνται από το είδος του ψαριού και το είδος του χημικού (Barron, 2012).

## **V. Πολυχλωριωμένα διφαινύλια**

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PolyChlorinated Biphenyls) είναι παντού στον κόσμο ένας σημαντικός ρυπαντής των νερών και της υδρόβιας ζωής. Λόγω της μεγάλης τους λιποδιαλυτότητας, τα PCBs δεν υποβαθμίζονται και έτσι βιοσυσσωρεύονται στο περιβάλλον και στην τροφική αλυσίδα. Χωρίζονται σε τρεις υποομάδες ανάλογα με τον προσανατολισμό των μορίων χλωρίου (Duffy et al., 2002): η υποομάδα των ομοιοεπίπεδων είναι και η πιο τοξική εξαιτίας της μεγάλης δεσμευτικής της συγγένειας με τον υποδοχέα Ah (Silkworth et al., 1984). Είναι μια κατηγορία 209 χημικών ουσιών, που φέρονται ως παράγωγες μορφές συγγενούς δομής (congeners) του χλωροδιφαινυλίου και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό και τη θέση των ατόμων του χλωρίου που περιέχουν. Οι 150-160 από αυτές βρίσκονται στο περιβάλλον, ενώ οι 40-70 βρέθηκαν σε βιομηχανικά μείγματα που παρασκευάζονταν για περισσότερο από 40 χρόνια και είχαν πολλαπλή χρήση. Εμπορικά προϊόντα με χρήση PCBs κατασκευάστηκαν σε πολλές βιομηχανικά ανεπτυγμένες χώρες, φέροντας διάφορες ονομασίες, όπως Aroclor, Clophen, Phenoclor κ.ά.. Οι ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών αυτών, όπως η υψηλή θερμική και χημική σταθερότητα τους και η υψηλή ηλεκτρική αντίσταση, επέβαλαν την ευρεία χρήση τους σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές, όπως υδραυλικά ρευστά, ψυκτικά υγρά σε μετασχηματιστές και διηλεκτρικά υγρά σε πυκνωτές. Επίσης, βρήκαν εφαρμογή σε πλαστικοποιητές, λιπαντικά, μελάνια και χρώματα. Εξαιτίας της ανθεκτικότητάς τους στο περιβάλλον και της αποδεδειγμένης τοξικότητάς τους στη χλωρίδα και πανίδα, η παραγωγή των PCBs απαγορεύτηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1970. Από το 1929 είχαν παραχθεί τουλάχιστον ένα εκατομμύριο τόνοι (Birkett & Lester, 2003). Τα επίπεδα των PCBs στο περιβάλλον βρίσκονται σε πολύ χαμηλότερες τιμές τώρα σε σχέση με τα μέσα της δεκαετίας του '70, αλλά παραμένουν ευρέως διαδεδομένες ουσίες που ρυπαίνουν το περιβάλλον.

Οι επιπτώσεις που έχουν παρατηρηθεί στην πανίδα αναφέρονται κυρίως στο αναπαραγωγικό και το ανοσοποιητικό σύστημα. Όσον αφορά στους Τελεοστέους, οι επιπτώσεις των PCBs στο ανοσοποιητικό

τους σύστημα είναι μεγάλες. Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Duffy et al. (2002) στο Japanese medaka (*Oryzias latipes*) χορηγώντας PCB-126, κατέληξαν ότι το ψάρι παρουσίασε αλλαγές όσον αφορά τόσο στην επίκτητη ανοσοαπόκριση (παραγόμενα αντισώματα) όσο και στην εγγενή (επίπεδα ενδοκυτταρικού υπεροξειδίου στα φαγοκύτταρα). Συγκεκριμένα, έκθεση στο PCB (1.0 µg/g σωματικού βάρους) δεν είχε επιπτώσεις στον αριθμό των κυττάρων των νεφρών ή στην επιβίωση του ψαριού. Αντίθετα, παρουσιάστηκαν μεγάλες αλλαγές στην παραγωγή πλασματοκυττάρων και υπεροξειδίου, ανάλογα με την ηλικία του ψαριού, όσο πιο νεαρό τόσο καλύτερα αντιστέκεται στις αλλαγές που προκαλεί η έκθεση σε PCB στο ανοσοποιητικό. Στο ίδιο είδος ψαριού, οι Duffy et al. (2003) παρατήρησαν διαφοροποίηση της παραγωγής ROS, ανάλογα με το χρόνο εξέτασης μετά την έκθεση στο PCB-126. Το 2006, οι Duffy & Zelikoff κατέληξαν ότι η χορήγηση PCB-126 και PCB-153 στο Bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) δεν είχε επιπτώσεις στην επιβίωση, στον αριθμό ή στη ζωτικότητα των κυττάρων του σπλήνα των ψαριών. Η παραγωγή υπεροξειδίου επηρεάστηκε μόνο στην περίπτωση της έκθεσης στο PCB-153, ενώ η παραγωγή του στους νεφρούς ήταν αυξημένη. Ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων από τον σπλήνα άλλαξε κατά την έκθεση και στους δύο τύπους PCB. Η αντίδραση στη μιτωγόνο λεκτίνη Concanavalin-A (η οποία διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων) ήταν σημαντικά μειωμένη σε ψάρια στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο PCB-153 σε δόση 50µg/gZ.B. μόνο για τρεις μέρες μετά τη χορήγηση του. Από την άλλη, οι Iwanowicz et al. (2005) βρήκαν ότι η μακρά κολυμβητική έκθεση νεαρών σολομών σε Aroclor-1254 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της πολλαπλασιαστικής αντίδρασης των T-λεμφοκυττάρων του πρόσθιου νεφρού σε κοινά μιτωγόνα ενώ, παράλληλα, τέτοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και 15 μήνες μετά την έκθεση λαρβών ατλαντικού σολομού. Η ίδια ομάδα είχε παρόμοια ευρήματα μετά από ενδοπεριτοναϊκή έγχυση Aroclor-1248 σε γατόψαρα *Ameiurus nebulosus* (Iwanowicz et al., 2009))· πλην όμως, τα μολυσμένα ψάρια έδειξαν μειωμένη βακτηριοκτόνα δραστηριότητα νεφρικών λευκοκυττάρων, μείωση σε κυκλοφορούντα ειδικά αντισώματα, αλλά και ελαττωμένη επιβιωσιμότητα σε τεχνητή λοίμωξη με *Edwardsiella ictaluri*. Σε άλλη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στην ιριδιζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) για τη διερεύνηση των επιπτώσεων

του PCB-126 στο στρες και στις ανοσοποιητικές λειτουργίες του ψαριού χρησιμοποιώντας καλλιέργειες κυττάρων του προσθίου νεφρού, στις οποίες μετρήθηκαν σε πραγματικό χρόνο τα επίπεδα έκφρασης του κυτοχρώματος P4501A (CYP1A), της ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) και του υποδοχέως γλυκοκορτικοειδών, με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, ευρέθη ότι η επώαση με PCB προκάλεσε μάλλον παροδική διέγερση παρά μόνιμη βλάβη του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς η διέγερσή του με LPS είχε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση της IL-1β μετά την επώαση με PCB (Quabius et al., 2005). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ιχθύδια του γατόψαρου *Ictalurus punctatus*, που ταϊστήκαν με δύο δόσεις PCB-126, 1 ή 100 ppb στην τροφή, παρατηρήθηκε καταστολή των επιπέδων της κυκλοφορούσας στο πλάσμα λυσοζύμης κατά τη διατροφή με τη μικρή δόση, ενώ αντίθετα αυτά αυξήθηκαν με τη χορήγηση της μεγαλύτερης δόσης PCB (Burton et al., 2002). Οι Regala et al. (2001) χορήγησαν ενέσιμο PCB-126 (0.01 ή 1.0 μg) για 16 ημέρες σε ιχθύδια του ίδιου είδους γατόψαρου και παρατήρησαν ότι η υψηλή δόση του PCB-126 είχε σαν αποτέλεσμα την καταπίεση της απόκρισης των αντισωμάτων κατά του *Listonella anguillarum* και την μείωση της οξειδωτικής έκκρισης των φαγοκυττάρων.

## **VI. Εντομοκτόνα**

Τα εντομοκτόνα, είναι η μοναδική ομάδα οργανικών ρυπαντών που έχει σχεδιαστεί για να προκαλεί τοξικότητα σε πλήθος οργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες και έτσι έχουν την δυναμική να προκαλούν τοξικότητα και σ' άλλους μη στοχευμένους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών. Σήμερα, στον πόλεμο εναντίων των εντόμων χρησιμοποιείται πληθώρα συνθετικών οργανικών ενώσεων που ανήκουν στις εξής κλάσεις:

- Οργανοχλωρίνες (OCs)
- Οργανοφωσφορικά (OPs)
- Συνθετικά πυρεθροειδή
- Καρβαμικά
- Νεονικοτινοειδή
- Φαινυλοπυραζόλες

Οι τρεις πρώτες από αυτές έχουν βρεθεί ως παράγοντα ανοσοτοξικότητα στα ψάρια.

Τα εντομοκτόνα εισέρχονται στα υδάτινα οικοσυστήματα μέσω της έκπλυσης του εδάφους από τις βροχές, της απορροής των αρδευτικών καναλιών, ή μέσω σκοπούμενης ή εσφαλμένης εφαρμογής. Τα ψάρια, όπως και οι υπόλοιποι υδρόβιοι οργανισμοί, δύναται να εκτεθούν σε πληθώρα εντομοκτόνων στη διάρκεια της ζωής τους. Η απορρόφησή τους γίνεται δια μέσου των βράγχιων, του δέρματος ή του διατροφικού αγωγού (Banaee, 2013). Αν οι συγκεντρώσεις τους είναι υψηλές, πιθανόν τα ψάρια να οδηγηθούν στο θάνατο. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις, τα ψάρια παρουσιάζουν προβλήματα σε διάφορα ζωτικά τους συστήματα, ίδια με αυτά των εντόμων στόχων, ενώ, σε ελάχιστες συγκεντρώσεις, ο πληθυσμός των ασπόνδυλων επηρεάζεται με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθέσιμη τροφή (Pimental, 2005). Τα εντομοκτόνα επηρεάζουν την ανάπτυξη, τη συμπεριφορά, την αναπαραγωγή και τις ανοσοποιητικές λειτουργίες των ψαριών (Banaee et al., 2011).

- Οργανοχλωρίνες (OCs)

Οι οργανοχλωρίνες περιλαμβάνουν ενώσεις όπως Dichloro Diphenyl Trichloroethane (DDT), Endosulfan, Benzene hexachloride (BHC), Aldrin, Chlordane, Heptachlor, Atrazine, Endrin και Lindane οι οποίες, λόγω της ιδιότητας τους να μην υποβαθμίζονται χημικά και να βιοσυσσωρεύονται, κατατάσσονται στους επίμονους οργανικούς ρυπαντές (POPs). Τα OCs, χωρίζονται σε τρεις διακριτές κατηγορίες με βάση τη χημική τους δομή: διχλωροδιφαινυλαιθάνια, χλωριωμένα κυκλοδιένια και χλωριωμένα βενζόλια/κυκλοεξάνια (Ecobichon, 2001). Τα διχλωροδιφαινυλαιθάνια, περιλαμβάνουν το DDT και τουλάχιστον άλλες 10 ανάλογες ενώσεις. Αυτή η ομάδα έχει πολύ διαφορετικές ιδιότητες που κυμαίνονται από τη γνωστή περιβαλλοντική επιμονή και τη βιοσυγκέντρωση του DDT ως τον ταχύ μεταβολισμό και την αμελητέα επιμονή του methoxychlor (ibid.). Τα χλωριωμένα κυκλοδιένια, περιλαμβάνουν συγγενικές ενώσεις όπως aldrin, dieldrin, isodrin, endrin, chlordane, heptachlor και endosulfan. Σ' όλες αυτές υπάρχει ο δακτύλιος του εξαχλωροκυκλοπενταδιενίου, ο οποίος συμβάλει στην τοξικότητά τους, η οποία ποικίλει ανάλογα με τις διαφορετικές χημικές ουσίες που είναι προσκολλημένα στον δακτύλιο και τις διαφορετικές στερεοχημικές θέσεις τους. Τα εντομοκτόνα αυτής της κατηγορίας είναι και τα πιο τοξικά απ' όλα τα OCs (Kaushik & Kaushik, 2007). Τα χλωριωμένα βενζόλια/κυκλοεξάνια, αποτελούνται από

εξαχλωροκυκλοεξάνιο (HCH) και τα οκτώ στερεοϊσομερή του που εμφανίζουν τόσο διαφορετικές ιδιότητες όσο και τα διχλωροδιφαινυλαιθάνια. Το πιο γνωστό HCH είναι το  $\gamma$  ισομερές, το lindane (Escobichon, 2001), το οποίο είναι το μόνο ισομερές αυτής της ομάδας με έντονη εντομοκτόνο δράση (Kaushik & Kaushik, 2007). Όλα τα OCs εμφανίζουν χαρακτηριστική διαλυτότητα στα λίπη και χαμηλή στο νερό, ενώ η παρουσία τους στο περιβάλλον διαρκεί από μήνες ως χρόνια. Τα Heptachlor και aldrin γρήγορα μεταβολίζονται από τους οργανισμούς, αλλά οι μεταβολίτες τους heptachlor epoxide και dieldrin, αντιστοίχως, είναι το ίδιο τοξικοί και δεν υποβαθμίζονται εύκολα. Το Endrin εμφανίζει σχετικά μικρή ημίσεια ζωή στους οργανισμούς, αλλά ο μεταβολίτης του 12-ketoendrin, είναι υψηλά τοξικός (Coats, 1990).

Μετά από χορήγηση του Toxaphene, μέσω της διατροφής στο *Salvelinus alpinus* για 104 μέρες, οι μελετητές παρατήρησαν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, μείωση των μυϊκών λιπιδίων και της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, αλλά δεν παρατηρήθηκε αύξηση στις μολύνσεις μέσω παρασίτων (Blanar et al., 2005). Οι ανοσοποιητικές λειτουργίες της ιριδιζουσας πέστροφας, μελετήθηκαν μετά από έκθεσή της σε δύο συγκεντρώσεις lindane και σε υψηλές και χαμηλές δόσεις βιταμίνης C (Dunier et al., 1995). Ένα μήνα μετά από την έκθεση σε 10 mg/kg, ο πολλαπλασιασμός των B-λεμφοκυττάρων των ψαριών μειώθηκε, αλλά δεν παρατηρήθηκαν αποτελέσματα μετά από έκθεση σε δόση 50 mg/kg, γιατί η χορήγηση της βιταμίνης C προκάλεσε πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων (ibid.). Όταν κυπρίνοι εκτέθηκαν σε 0.038 mg/L της ίδιας ουσίας για 25 μέρες, εμφάνισαν μειωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια και αυξημένα λευκά (Saravanan et al., 2011). Οι τιμές της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη, επίσης μειώθηκαν, αλλά μετά τη δέκατη μέρα ανέκαμψαν σημαντικά. Τα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος αυξήθηκαν, ενώ μειώθηκαν τα επίπεδα πρωτεΐνης (ibid.). Από τα ανωτέρω ευρήματα δεν συνάγεται κάποιος ισχυρός τοξικός κίνδυνος για το ανοσοποιητικό των ψαριών από τα οργανοχλωρικά (ή, οργανοχλωρίνες) αλλά το πλήθος αυτών των ενώσεων απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

#### - Οργανοφωσφωρικά

Τα OPs χαρακτηρίζονται ως ηπιότεροι ρυπαντές σε σχέση με τα OCs και για αυτό η παραγωγή και η χρήση τους αυξήθηκε, σε

συνδυασμό και με την απόσυρση από την αγορά των OCs. Ευρέως χρησιμοποιούμενα OPs, είναι: parathion, malathion, chlorpyrifos, azinphosmethyl, acephate, και diazinon. Στο τέλος του 20ου αιώνα, άρχισαν να εντοπίζονται αρκετά προβλήματα που προκαλούσαν στην ανθρώπινη υγεία, ιδιαίτερα στα παιδιά, και έτσι απαγορεύτηκε η χρήση αρκετών OPs (U.S. EPA, 2011).

Τα OPs είναι εστέρες, αμιδία ή παράγωγα θειόλης είτε φωσφορικού είτε θειοφωσφορικού οξέος (Storm, 2012). Χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες:

- τους φωσφοροθειονικούς εστέρες (diazinon και parathion)
- τους φωσφοροδιθειονικούς εστέρες (azinphosmethyl, chlorpyrifos, και malathion )
- τους φωσφορικούς εστέρες που είναι και η πιο τοξική κατηγορία των OPs (paraoxon [μεταβολίτης του parathion], mevinphos, και dichlorvos ).

Το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών είναι πολύ ευαίσθητο σε ομοιοστατικές προσαρμογές μέσω των ενδοκρινικών ρυθμίσεων και επηρεάζεται από την βιοχημική κατάσταση του νευρικού συστήματος. Έτσι, κάθε βλάβη του νευρικού συστήματος και κάθε διαταραχή της βιοχημικής ομοιόστασης προκαλούν εξασθένιση του ανοσολογικού συστήματος των ψαριών. Διαφορετικά εντομοκτόνα σε υποθανατηφόρες ποσότητες έχει αποδειχθεί ότι στρεσάρουν τα ψάρια και καταβάλλουν το ανοσοποιητικό σύστημά τους (Werner & Oram, 2008). Επιπλέον, μερικά εντομοκτόνα, προκαλούν ευθεία ανοσοτοξικότητα διαταράσσοντας τη μεταγραφή σημαντικών διαμεσολαβητών του ανοσοποιητικού συστήματος (Eder et al., 2009). Εντομοκτόνα όπως τα P,P'-DDE, lindane, cypermethrin, chlorpyrifos, diazinon, επηρεάζουν τις λειτουργίες των παραμέτρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), ο υποδοχέας της IL-1β (IL-1R1), η ιντερφερόνη γ (IFN-γ2b), ο TNFα, τα MHCIIa, MHCIIa, Mx, TLR9, η IγML και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), το TCRα στα λεμφοκύτταρα του πρόσθιου νεφρού, τη δραστηριότητα της λυσοζύμης, την απόκριση χημειοφωταύγειας (CL), τα επίπεδα ανοσφαιρίνης IgM, τις τιμές των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) και της οξειδωτικής έκρηξης, και τα φαγοκύτταρα του πρόσθιου νεφρού (Betouille et al., 2000; Khoshbavar-Rostami et al., 2006; Banaee et al., 2008; Girón-Pérez et al., 2009; Shelley et al., 2009; Ahmadi et al., 2014; Wang et al., 2011).

Οι λυσοζύμες είναι οικογένεια ενζύμων με σημαντική αντιβακτηριακή δραστηριότητα και συχνά διαταράσσονται από την έκθεση των ψαριών σε οργανοφωσφωρικά. Έχει αναφερθεί ότι η δραστηριότητα της λυσοζύμης αυξήθηκε σημαντικά στο ήπαρ και στο σπλήνα του οξύρυγχου (*Huso huso*) που εκτέθηκε απότομα σε diazinon (1.5 mg/L). Ενώ, όταν το ίδιο είδος ψαριού υπέστη υποξεία και υποχρόνια έκθεση σε αυτό το εντομοκτόνο παρουσίασε μείωση της δραστηριότητας της λυσοζύμης στο πλάσμα, στο ήπαρ, στους νεφρούς και στο σπλήνα (Khoshbavar-Rostami et. al., 2006). Οι Soltani και Pourgholam (2007), όταν εξέθεσαν τον χορτοφάγο κυπρίνο (*Ctenopharyngodon idella*) σε diazon (2,0 και 4,0mg/L), παρατήρησαν σημαντική αύξηση της παρουσίας λυσοζύμης στους νεφρούς και στο σπλήνα, ενώ η δραστηριότητα του ενζύμου μειώθηκε σημαντικά στο πλάσμα των ψαριών δείχνοντας, μάλλον, αδυναμία έκκρισης. Παρόμοιες μελέτες που έγιναν στη ιριδίζουσα πέστροφα και στον κοινό κυπρίνο, με χρήση diazinon (0.1 και 0.2 mg/L) και phosalone (0.15, 0.30, και 0.60 mg/L), αντιστοίχως, έδειξαν μείωση της λυσοζύμης (Kaya et al., 2014; Ahmadi et al., 2014; Banaee, 2013). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το chlorpyrifos προκάλεσε μείωση της παρουσίας του ενζύμου στο πλάσμα και στο σπλήνα του κοινού κυπρίνου, που εκτέθηκε σε 75 μg/L του εντομοκτόνου (Li et al., 2013). Όταν, όμως, η τιλάπια του Νείλου εκτέθηκε σε chlorpyrifos (0.102 ή 0.255 mg/L), προκλήθηκε αύξηση της δραστηριότητας της λυσοζύμης στο πλάσμα των ψαριών, αλλά δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές όταν αυτά εκτέθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0.051 mg/mL) του εντομοκτόνου (Díaz-Resendiz & Girón-Pérez, 2014).

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών, είναι η πρωτεΐνη C3 του συμπληρώματος, η οποία επίσης διαταράσσεται στην έκθεση στα OPs. Μια απορρύθμιση στη συγκέντρωσή της και αλλαγές στην mRNA έκφρασή της έχουν αναφερθεί στο πρόσθιο νεφρό, στη σπλήνα και στο πλάσμα του κοινού κυπρίνου (Li et al., 2013).

Η C-ενεργή πρωτεΐνη (CRP), είναι ένα ακόμη στοιχείο του εγγενούς ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών που διαταράσσεται κατά την έκθεσή τους σε αυτού του τύπου τα εντομοκτόνα. Μελέτες που έχουν γίνει στην ιριδίζουσα πέστροφα, έδειξαν σημαντική αύξηση αυτής της πρωτεΐνης στο πλάσμα των οργανισμών μετά από οξεία έκθεσή τους σε metrifonate (0.4 ppm) για τρεις ημέρες, αλλά και



σημαντική μείωση της δραστηριότητας της πρωτεΐνης 10-18 μέρες μετά την έκθεση (Kodama et al., 2004).

Οι Ahmadi et al. (2012) παρατήρησαν μείωση των επιπέδων της σφαιρίνης στο πλάσμα του αίματος των ψαριών που εκτέθηκαν σε diazinon, ενώ οι Banaee et al. (2011) εξήγησαν ότι το diazinon προκάλεσε καταστροφή ιστών και ηπατοκυτταρική απόπτωση που είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της σύνθεσης ολικών πρωτεϊνών, λευκωματίνης και σφαιρίνης από το ήπαρ.

Σχετικά με την επίδραση των OPs στις κυτοκίνες, έχει αναφερθεί ότι η έκθεση σε chlorpyrifos (1.16, 11.6 and 116 µg/L) για 24 ώρες προκαλεί αύξηση της έκφρασης του mRNA των IL-1β, IL-1R, και IFN-γ στο σπλήνα του κυπρίνου (Wang et. al., 2011).

#### - Συνθετικά πυρεθροειδή

Τα πυρεθροειδή εμφανίζουν γενικά χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, υψηλή έλξη για τα ιζήματα και τον οργανικό άνθρακα και χαρακτηρίζονται ως μέτρια επίμονοι ρυπαντές. Έχουν ημίσειες ζωές υδρόλυσης μερικές μέρες ως μερικές βδομάδες στα υδάτινα οικοσυστήματα (Oros & Werner, 2005). Αυτές οι ενώσεις, υφίστανται φωτοχημικό μετασχηματισμό και απορροφούνται από τα ιζήματα. Η υποβάθμισή τους προκύπτει κυρίως μέσω της μικροβιακής δράσης και της φωτόλυσης (Cox, 1998).

Τα συνθετικά πυρεθροειδή εμφανίζουν διάφορους μηχανισμούς τοξικότητας, αλλά κυρίως δρουν νευροτοξικά ή επιφέρουν κατάσταση μέθης στο νευρικό σύστημα των ψαριών. Πυρεθροειδή όπως το cypermethrin ή cyanohydrin, τα οποία διασπώνται σε αλδεΐδες και κυανίδια, καταλήγουν σε δραστικές μορφές οξυγόνου (Ullah et. al., 2018) που προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων, αυξάνουν το οξειδωτικό στρες καταλήγοντας σε οξειδωτική καταστροφή, και αυξάνουν τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο κυτταρόλυμα η οποία οδηγεί σε κυτταροτοξικότητα και γονοτοξικότητα στα ψάρια.

Οι Ullah et al. (2015) ανέφεραν ότι η έκθεση του κυπρινοειδούς *Tor putitora* σε οξεία συγκέντρωση cypermethrin οδήγησε σε αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων και μείωση των ερυθρών. Πολλές μελέτες, δείχνουν διαφορετικούς τύπους τοξικολογικών αποτελεσμάτων στο αιματολογικό προφίλ των ψαριών, συμπεριλαμβανομένων των λευκών αιμοσφαιρίων όπως τα λεμφοκύτταρα, τα θρομβοκύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, των ερυθρών όπως η αιμοσφαιρίνη, ο αιματοκρίτης, το μέσο μέγεθος τους (MCV), η μέση

συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης (MCHC), η μέση συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης σ' ένα ερυθρό αιμοσφαίριο (MCH), όταν αυτά εκτίθενται σε διαφορετικά πυρεθροειδή. Μερικά από τα είδη ψαριών που έχουν μελετηθεί είναι ο κοινός κυπρίνος, *Cyprinus carpio*, (Velisek et al., 2009), ο ασιατικός κυπρίνος, *Catla catla*, (Vani et al., 2012), το γατόψαρο, *Rhamdia quelen*, (Montanha et al., 2014), και ο κέφαλος, *Alburnus tarichi*, (Özok et al., 2018) μετά από έκθεση σε cypermethrin, *Catla catla* (Vani et al., 2011) και η πέστροφα *Salmo trutta fario* (Karataş, 2016) μετά από έκθεση σε deltamethrin, και το *Prochilodus lineatus* μετά από έκθεση σε λ-cyhalothrin (Vieira & dos Reis Martinez, 2018).

## **VII. Ενδοκρινικοί διαταράκτες (άλλως, «ξενο-οιστρο/ανδρογόνα»)**

Πρόκειται για ειδική κατηγορία οργανικών ουσιών (μερικές εκ των οποίων ανήκουν χημικά σε κάποιες από τις παραπάνω κατηγορίες) οι οποίες επιδρούν κυρίως στο αναπαραγωγικό σύστημα αλλά, μεταξύ άλλων, και στο ανοσοποιητικό, με δεδομένη την διασύνδεση των δύο. Φυσικά ή τεχνητά οιστρογόνα έχουν βρεθεί να επηρεάζουν την έκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την ανειδίκευτη ανοσία, ιδίως σε ό,τι αφορά το ήπαρ και την σύνθεση στοιχείων του συμπληρώματος (Casanova-Nakayama et al., 2011). Αυτό έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη ψαριών ενώ και άλλοι ανοσολογικοί δείκτες παρατηρήθηκε ότι καταπίεστηκαν από χορηγηθέντα οιστρογόνα και, μάλιστα, ανάλογα με την χορήγηση κορτιζόλης· τέτοιοι δείκτες ήσαν οι φαγοκυτταρικές δραστηριότητες, η λυσοζύμη του πλάσματος και το επίπεδο της ανοσοσφαιρίνης (ibid.). Πέραν αυτού, έχει παρατηρηθεί ότι τα ξενοοιστρογόνα μπορούν να προκαλέσουν ανοσοκαταπίεση ακόμη και σε δόσεις που δεν επηρεάζουν το αναπαραγωγικό σύστημα. Επίσης, η ευπάθεια σε παθογονικούς μικροοργανισμούς αυξάνεται όταν τα ψάρια λαμβάνουν οιστρογόνα, πράγμα που υποδεικνύει ελαττωμένη εγγενή ανοσοάμυνα (ibid.). Εν τούτοις, τα ξενοοιστρογόνα μερικές φορές έχουν αναφερθεί ως διεγερτικοί παράγοντες ενώ τα (ξενο)ανδρογόνα είναι πάντοτε ανοσοκαταπιεστικά, ιδίως σε ό,τι αφορά τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα (Milla et al., 2011).

## **VIII. Βιοτοξίνες**

Στις τοξίνες αυτές δεν μπορούν να περιληφθούν οι εκκρινόμενες από παθογονικούς μικρο-οργανισμούς διότι αυτές, ακόμη και όταν επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα (π.χ. «λευκοκτονίνες»), συνιστούν μέρος της καθόλου διαδικασίας της παθογένεσης και, άρα, το πρόβλημα που προκύπτει για τον οργανισμό είναι σαφώς διαφορετικής τάξεως. Αντιθέτως, βιοτοξίνες προερχόμενες από «σαπρόφυτα», ήτοι μικροφύκη και μύκητες που ίσως πολλαπλασιάζονται και αποσυντίθενται στο φυσικό περιβάλλον των 'ψαριών', μπορούν να επιδράσουν στον οργανισμό εν γένει και στο ανοσοποιητικό σύστημα ειδικότερα.

Ένα ευρύ φάσμα μικροφυκών, κυρίως Κυανοβακτήρια και Δινομαστιγωτά, παράγουν τοξίνες που διαλύονται στα νερά και, σε περιπτώσεις άνθησης του φυτοπλαγκτού, μπορεί να φθάσουν σε υψηλές συγκεντρώσεις ώστε να απειλείται η υγεία, ακόμη και η ζωή, των Ιχθύων. Ειδικά για επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα, πολύ λίγες είναι οι σχετικές μελέτες διότι προηγούνται βλάβες σε άλλα ζωτικά όργανα (π.χ. στο ήπαρ και τους νεφρούς ή, ακόμη περισσότερο, στα νευρικά κύτταρα). Ένα παράδειγμα δίνει η μελέτη των Lin et al. (2018) που εξέτασαν τους σπλήνες από zebrafish, τα οποία είχαν εκθέσει για 30 μέρες σε συνδυασμούς νιτρωδών και μικροκυστίνης, και βρήκαν αυξημένο σπληνικό δείκτη σε εντόνως εκτεθέντα ψάρια καθώς και αύξηση της υπεροξειδωσης λιπιδίων με αντίστοιχη μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας· επιπλέον, ισχυρή ελάττωση του C3 στον ορό του αίματος καθώς και μειωμένη έκφραση σε μια σειρά γονιδίων που σχετίζονται με την λειτουργία του ανοσοποιητικού· τέλος, παθολογικές αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν στην υπέρλεπτη δομή των σπληνοκυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν την ευπάθεια του αιμοποιητικού/ανοσοποιητικού όχι μόνο στην βιοτοξίνη αλλά και στον ανόργανο παράγοντα, πολλώ δε μάλλον στον συνδυασμό τους που μπορεί εύκολα να προκύψει από κάποια σημαντική άνθηση του φυτοπλαγκτού σε ευτροφικές λίμνες. Επίσης για μικροκυστίνη, οι Rymuszka & Adaszek (2013) διαπίστωσαν σοβαρές λειτουργικές διαταραχές σε λευκοκύτταρα του αίματος και του προνέφρου από κοινό κυπρίνο, μετά από έκθεση σε εκχύλισμα φυτοπλαγκτού ενώ, σε ανώτερες τοξικές συγκεντρώσεις, παρατήρησαν και μειωμένη βιωσιμότητα των λευκοκυττάρων η οποία ήταν μάλλον αποπτωτικής παρά νεκρωτικής φύσεως· επίσης, οι κυτοκίνες που εξετάστηκαν από

φαγοκύτταρα έδειξαν σημαντικές αυξήσεις στην έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων μετά από πειραματική έκθεση στο τοξικό εκχύλισμα. Τα ως άνω ευρήματα συνηγορούν στην προσοχή που πρέπει να αποδίδεται ακόμη και σε τέτοιες περιβαλλοντικές καταστάσεις.

Σε ό,τι αφορά τις αφλατοξίνες, οι Sahoo & Mukherjee (2001) πραγματοποίησαν δοκιμή με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση σε ινδικό κυπρίνο και διαπίστωσαν ότι προκαλείται ισχυρότατη μείωση του επιπέδου ειδικών αντισωμάτων, μετά από πειραματικό εμβολιασμό, ακόμα και για την χαμηλότερη δόση χορήγησης της τοξίνης. Οι αφλατοξίνες και, γενικότερα, όλες οι μυκοτοξίνες πρέπει να λαμβάνουν σοβαρή εκτίμηση λόγω πιθανής συγκέντρωσής τους σε ιχθυοτροφές αν και η βιβλιογραφία είναι αρκετά περιορισμένη για τα ανοσολογικά ζητήματα που μπορεί να εγείρονται ως προς την παρουσία τους.

## **ΙΧ. Φαρμακευτικές ουσίες**

Παρόλο που τέτοιες ουσίες συχνά μπορούν να καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον ως απόβλητα νοσοκομείων, φαρμακευτικών βιομηχανιών και κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων, η ουσιαστική τοξικολογική επίδρασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων ενδιαφέρει ιδιαίτερα στην περίπτωση της ιχθυοκαλλιέργειας καθώς εκεί μπορεί να γίνεται σημαντική χρήση τους στα ίδια άτομα που πιθανώς επηρεάζονται ανοσοτοξικολογικώς από αυτές. Οι ουσίες αυτές αποτελούν, έτσι, μια ειδική κατηγορία τοξικών χημικών από την οποία, όμως, πρέπει να εξαιρεθούν εκείνα τα χημικά που προκαλούν και σημαντική παθοφυσιολογική καταπόνηση (π.χ. απολυμαντικά). Τα αντιμικροβιακά, βεβαίως, χρησιμοποιούνται συνήθως για την καταπολέμηση λοιμωδών και παρασιτικών νοσημάτων και, άρα, η τυχόν ανοσοκαταπίεση που μπορεί να προκαλέσει η χρήση τους ίσως να θεωρηθεί αποδεκτή και αδιάφορη· εν τούτοις, τέτοιες ουσίες έχουν πεπερασμένο φάσμα αποτελεσματικής δράσης οπότε τίθεται ζήτημα ως προς την πιθανή παρουσία βιοπαθογόνων εκτός αυτού του φάσματος ενώ, από μια άλλη σκοπιά, μπορεί να υπονομευθεί η αποτελεσματικότητα κάποιου εμβολιασμού.

Είναι παλαιόθεν γνωστόν ότι η οξυτετρακυκλίνη, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό, μπορεί να καταπιέσει/καθυστερήσει την παραγωγή αντισωμάτων σε κοινό κυπρίνο (Rijkers et al., 1980;

Grondel et al., 1987) πράγμα το οποίο, αν δεν ληφθεί σοβαρώς υπ' όψιν, θα μπορούσε να οδηγήσει κάποιο εμβολιαστικό πρόγραμμα σε κατώτερα του αναμενομένου αποτελέσματα. Επιπλέον, σε *in vitro* μελέτη, οι Grondel et al. (1985) παρατήρησαν παρόμοιο αποτέλεσμα στην μιτογονική αντίδραση λευκοκυττάρων κυπρίνου που καλλιεργήθηκαν παρουσία οξυτετρακυκλίνης και, ακόμη περισσότερο, δοξυκυκλίνης. Περαιτέρω, οι Guardiola et al. (2012) παρατήρησαν αρνητικές αλλά και θετικές διαταραχές στις εγγενείς ανοσοαντιδράσεις της τσιπούρας μετά από χορήγηση του ίδιου βακτηριοστατικού· συγκεκριμένα, τα μεν κυτταρικά στοιχεία έδειξαν κάποιες αυξήσεις ενώ τα χυμικά στοιχεία έδειξαν μειώσεις. Στο μεταξύ, δουλεύοντας με ιριδίζουσα πέστροφα, οι Lundén & Bylund (2000) διαπίστωσαν ότι το οξολινικό οξύ, η οξυτετρακυκλίνη και η φλορφενικόλη μείωσαν την μιτογονική αντίδραση των λεμφοκυττάρων του νεφρού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, με τα κύτταρα τύπου «T» να είναι πιο ευαίσθητα από αυτά του τύπου «B», ενώ ο συνδυασμός τριμεθοπρίμης και σουλφαδιαζίνης (1:5) δεν προκάλεσε ουσιαστική μεταβολή· το τελευταίο επιβεβαιώθηκε από τους ίδιους (2002) με μελέτη εμβολιαμού όταν δεν διαπιστώθηκε κάποια σημαντική επίδραση στους τίτλους αντισωμάτων ή στο ποσοστό επιβίωσης μετά από τεχνητή μόλυνση.

Ωστόσο, αν και η οποιαδήποτε ανοσοκαταπίεση από αντιμικροβιακά χημειοθεραπευτικά μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανώς επικίνδυνη για την υγεία των λαμβανόντων την αγωγή – ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με άλλους πιθανά ανοσοκαταπιεστικούς παράγοντες, η ίδια η παρουσία του εκάστοτε αντιμικροβιακού μπορεί να καλύπτει την διακινδύνευση αυτή, πάντοτε με την επιφύλαξη της δραστηριότητας του χορηγούμενου χημικού απέναντι σε όλες τις υπάρχουσες μικροβιακές απειλές – ενώ, ως γνωστόν, η δράση των αντιμικροβιακών δεν εκτείνεται στις περιπτώσεις των ιογενών νοσημάτων.

### 3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Το πρωταρχικό ζήτημα σχετικά με την τοξική δραστηριότητα του οποιουδήποτε χημειοπαθογονικού παράγοντα στον οργανισμό των Ιχθύων είναι αυτό της βιοδιαθεσιμότητας· ακολουθούν η (τοξικο)κινητική με την βιοσυσσώρευση και την βιομεταμόρφωση, πριν την αποβολή του ίδιου ή/και των προϊόντων που προέρχονται από την βιομεταμόρφωσή του. Σε επίπεδο ιστού και κυττάρου, εξετάζονται οι μηχανισμοί μοριακής δράσης με τα πιθανά αποτελέσματά τους στην λειτουργία και την ομοίωση των κυτταρικών τύπων που υφίστανται την επίδραση του τοξικού παράγοντα. Στην τοξικοκινητική, η φυσικοχημική φύση των χημικών παραγόντων και το βιολογικό προφίλ του οργανισμού αποδέκτη καθορίζουν το πως ο κάθε παράγοντας θα καταλήξει στον οργανισμό και συνεπώς και τον τρόπο απορρόφησής του, διασποράς/συσσώρευσης και μεταβολισμού του, συγκέντρωσής του σε συγκεκριμένους ιστούς και, τέλος, απέκκρισής του.

1) ΠΡΟΣΛΗΨΗ: Οι τυπικές οδοί πρόσληψης ενός τοξικού παράγοντα από τα 'ψάρια' είναι μέσω της αναπνοής, της διατροφής (περιλ. της πόσεως) καθώς και μέσω της δερματικής επαφής με την ουσία. Επομένως, η πρόσληψη θα γίνει μέσω των επιθηλίων που έρχονται σε επαφή με το νερό και την τροφή, αλλά είναι μεγαλύτερη στα επιθήλια του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος, μιας και τα συγκεκριμένα είναι σχεδιασμένα για γρήγορη και αποδοτική πρόσληψη· η μεγάλη επιφάνεια και η μικρή απόσταση διάχυσης είναι τα χαρακτηριστικά των επιθηλιακών ιστών που ενισχύουν την απορρόφηση. Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί με τους οποίους τα τοξικά μπαίνουν ή διασχίζουν τα επιθήλια όπως η παθητική διάχυση, η διευκολυνόμενη διάχυση, η διήθηση μέσω μεμβρανών, η ενεργή μεταφορά και η ενδοκύτωση. Ουσίες όπως οι διοξίνες και τα PCBs είναι λιπόφιλες και έχουν μεγάλο λογαριθμικό συντελεστή οκτανόλης ( $\log K_{ow}$ ) και έτσι εισχωρούν στις μεμβράνες με απλή παθητική διάχυση. Οι κυτταρικές μεμβράνες δρουν ως φράγμα για τα περισσότερα ιόντα και μη ιονισμένα υδρόφιλα μόρια μεγαλύτερα των 100Da, τα οποία όμως μπορούν να εισέρχονται στους οργανισμούς μέσω υδατικών καναλιών προσαρμοσμένων να προσλαμβάνουν μικρά διαλυμένα πολικά μόρια και ιόντα (Kleinow et al., 2008). Άλλος τρόπος εισόδου είναι μέσω των πρωτεϊνικών μεταφορέων, κατά τον

οποίο η ουσία εμφανίζει μηδενική κινητική όμως εισέρχεται στον οργανισμό αυτούσια – κορεσμένη – κάτι που δε συμβαίνει κατά τη διαδικασία της διάχυσης. Η διαδικασία της ενδοκύτωσης περιλαμβάνει βασικά την πινοκύτωση και τη φαγοκύτωση και αποτελεί την κύρια διαδικασία εισόδου κυρίως φυσικών τοξινών και όχι συνθετικών χημικών ουσιών (ibid.). Η πρόσληψη ξενοβιοτικών μέσω του δέρματος στα ενήλικα ψάρια είναι περιορισμένη λόγω του πάχους του, της μικρής επιφάνειάς του και της χαμηλής του αιμάτωσης. Αντιθέτως, τα ιχθύδια εμφανίζουν αναλογικώς μεγαλύτερη επιφάνεια δέρματος και βραγχίων και το δέρμα μπορεί να είναι και η μόνη είσοδος οξυγόνου στις λάρβες μέχρι να αναπτυχθούν τα βράγχια (ibid.). Το γαστροεντερικό επιθήλιο αποτελεί σημαντική δίοδο για τα ξενοβιοτικά, αφού συνδέεται με τη λήψη τροφής και νερού, και ιδιαίτερα για τις λιπόφιλες ουσίες που βρίσκονται διαλυμένες στο διαιτολόγιό τους. Αυτές προσλαμβάνονται μέσω διάχυσης, με μηχανισμούς παρόμοιους με αυτούς που λαμβάνουν χώρα στα βράγχια, καθώς επίσης μπορούν να παρακάμψουν υδατικά εμπόδια στο έντερο με το σχηματισμό σταγονιδίων λίπους ή μικκυλίων λιπαρών οξέων (ibid.).

2) ΔΙΑΣΠΟΡΑ: Η διασπορά των ξενοβιοτικών στον οργανισμό των ψαριών γίνεται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Το υδατικό συστατικό του αίματος είναι το πλάσμα, και πολλές υδρόφιλες ουσίες διαλύονται και μεταφέρονται μέσω αυτού. Οι υδρόφοβες ενώσεις δε διαλύονται στο πλάσμα και έτσι συνδέονται με άλλα συστατικά του αίματος των ψαριών όπως οι χοληστερόλες και τα τριγλυκερίδια, με τα μακροκυτταρικά συστατικά, όπως οι κυτταρικές μεμβράνες, αλλά πιο συχνά με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Οι πρωτεΐνες του πλάσματος περιλαμβάνουν λευκωματίνες, σφαιρίνες και άλλα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, ινωδογόνα, ρυθμιστικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες μεταφοράς, πηκτικούς παράγοντες κ.ά.. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τοξικού παράγοντα καθορίζουν τον τρόπο σύνδεσης του με την κάθε πρωτεΐνη, αλλά συνήθως συνδέονται με υδρόφοβες διαδικασίες. Η λευκωματίνη είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη του πλάσματος του αίματος των ψαριών και έχει έναν τομέα που προσελκύει λιπόφιλες ουσίες και γι' αυτό οι περισσότερες τοξικές ουσίες συνδέονται μ' αυτήν ή παρόμοιες πρωτεΐνες (Kleinow et al., 2008). Το μεγάλο μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που συνδέονται με τις τοξικές ουσίες, αποκλείει τη εύκολη έξοδό τους από τα τριχοειδή

αγγεία, θέτοντας έτσι τις τοξικές ουσίες μη άμεσα διαθέσιμες για διασπορά στους ιστούς. Όμως οι υδρόφοβες αντιδράσεις είναι γρήγορα αναστρέψιμες και η απελευθέρωση του τοξικού παράγοντα συμβαίνει όταν η χημική συγγένεια με ένα άλλο βιομόριο ή συστατικό των ιστών είναι μεγαλύτερη απ' αυτήν με της πρωτεΐνης του πλάσματος. Όταν οι χημικοί δεσμοί σπάσουν, το τοξικό μπορεί εύκολα να διαχέεται ανάμεσα στα τριχοειδή αγγεία και τα ενδοθήλια των κυττάρων μέχρι να επέλθει μια ισορροπία ανάμεσα στις πρωτεΐνες των ιστών και του πλάσματος. Γενικά, η διασπορά στους ιστούς εξαρτάται κυρίως από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της χημικής ουσίας, τη ροή του αίματος που τη μεταφέρει σε κάποιον ιστό και τη συγγένεια της ουσίας με τα συστατικά του ιστού (ibid.). Οι φορτισμένες υδατοδιαλυτές χημικές ενώσεις δεν μπορούν να περάσουν παθητικά τις μεμβράνες των κυττάρων παρά μόνο αν συνδεθούν με κάποια πρωτεΐνη-μεταφορέα. Για να περιγραφούν και να προβλεφθούν οι κινήσεις των χημικών ουσιών από το περιβάλλον προς τον οργανισμό, αλλά και ανάμεσα στους ιστούς και τα συστατικά τους έχουν αναπτυχθεί τοξικοκινητικά μοντέλα που βασίζονται στις φυσιολογικές παραμέτρους του οργανισμού (ibid.).

3) ΒΙΟΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗ: Η βιομετατροπή ή βιομετασχηματισμός, ήτοι η ενζυματική μετατροπή ενός χημικού από την αρχική του μορφή σε κάποιον μεταβολίτη, που συνίσταται από πολλές ενδιάμεσες φυσικές και χημικές διαδικασίες όπως η φωτόλυση. Ο βιομετασχηματισμός αναφέρεται σε συνδυασμένες μεταμορφώσεις-μετατροπές και αναδεικνύει το γεγονός ότι τα χημικά υφίστανται πλήθος μεταμορφώσεων με διαφορετικούς ρυθμούς σε διαφορετικές κυτταρικές θέσεις και καταλήγουν σε ποικίλους μεταβολίτες. Ο βιομετασχηματισμός καθορίζει την τελική συσσώρευση και τους ρυθμούς απέκκρισης των χημικών που επηρεάζονται τις βιολογικές ημίσειες ζωές, την επιμονή των χημικών και τη σωματική επιβάρυνση, χαρακτηριστικά που με τη σειρά τους καθορίζουν την σοβαρότητα και τη διάρκεια της τοξικότητας (Schlenk et al., 2008). Η απέκκριση των τοξικών από τα βράγχια, το γαστροεντερικό σωλήνα και τους νεφρούς εξαρτάται από την ικανότητα του χημικού να διαλύεται στο νερό. Επομένως, ένας ακόμη σκοπός του βιομετασχηματισμού είναι να συνθέσει πολικούς μεταβολίτες, για να χρησιμοποιηθούν από τους απεκκριτικούς μηχανισμούς. Έτσι, προστίθεται ένα υδρόφιλο τμήμα στο μόριο μέσω αντιδράσεων αποσύνθεσης (Φάση I) ή σύνθεσης



(Φάση II). Ειδικότερα, οι αντιδράσεις της Φάσης I εισάγουν ή απορρίπτουν μια ενεργή πολική ομάδα, όπως  $\text{OH}^-$ ,  $\text{SH}^-$ ,  $\text{NH}_2^-$ ,  $\text{COOH}^-$ , από το αρχικό μόριο, ενώ κατά τις αντιδράσεις της Φάσης II προστίθεται ένα ενδογενές μόριο όπως γλυκουρονικό οξύ, γλουταθειόνη,θειικό άλας και ταυρίνη στο αρχικό μόριο ή στον μεταβολίτη του που προέκυψε από τη Φάση II. Ειδικότερα, η βιοχημεία του βιομετασχηματισμού των ξενοβιοτικών στα ψάρια περιλαμβάνει τις αντιδράσεις της «Φάσης I» (δηλ. οξειδο/αναγωγικές), της «Φάσης II» (βιοσυνθετικές/βιοδιασπαστικές-ενζυματικές, ήτοι αντιδράσεις υδρόλυσης, γλυκουρονιδίωσης, θείωσης, μεθυλίωσης, και σύζευξης με αμινοξέα ή με γλουταθειόνη) (ibid.). Θεωρείται ως δεδομένο ότι, ενώ οι ιστοί του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να μεταβολίζουν χημικούς παράγοντες το ίδιο όπως και άλλοι ιστοί του σώματος, τα προϊόντα αυτής της δραστηριότητας μπορούν να είναι ακόμη τοξικότερα για το ανοσοποιητικό σύστημα· για παράδειγμα, αναφέρεται ότι η επαγωγή του κυτοχρώματος P450 από βενζο(α)πυρένιο μέσω του υποδοχέα αρυλικών υδρογονανθράκων, εμφανίζεται σε όλα τα κύτταρα των λεμφοειδών οργάνων και, άρα, μπορεί να επηρεάζει είτε απευθείας είτε μέσω των γειτονικών ιστών και, μάλιστα, οι μεταβολίτες σε μεγαλύτερο βαθμό από το αρχικό χημικό (Reynaud et al., 2008). Παρεμπιπτόντως, οι πολυκυκλικοί και οι πολυαλογονωμένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες μπορεί να επενεργούν ανοσοτοξικώς μέσω του κυτταρικού υποδοχέα αρυλικών υδρογονανθράκων αλλά υπάρχουν και άλλοι πιθανοί μηχανισμοί όπως, π.χ., η διαταραχή των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου, παράλληλα με την αναστολή του πολλαπλασιασμού, που παρατήρησαν οι Reynaud et al. (2003) σε λεμφοκύτταρα κυπρίνου που είχαν εκτεθεί σε έναν πολυκυκλικό αρωματικό υδρογονάνθρακα (3-μεθυλοχολανθρένιο).

4) ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ: Τα κύρια συστήματα απέκκρισης των ψαριών είναι το ηπατοχολικό, οι νεφροί και τα βράγχια. Άλλες δευτερεύουσες απεκκριτικές οδοί είναι μέσω των γονάδων (όταν ωριμάζουν) καθώς και μέσω εκκρίσεων βλέννας. Επομένως, αφού τα σημεία πρόσληψης και αποβολής των χημικών ουσιών είναι κοινά, οι μηχανισμοί βιομετασχηματισμού των τοξικών παραγόντων σε ενώσεις υψηλής υδατοδιαλυτότας είναι μεγάλης σημασίας για την αποτοξίνωση του οργανισμού των ψαριών.

### Βαρέα μέταλλα και οργανομεταλλικά.

Το προκαταρκτικό ζητούμενο για την δράση της κάθε τοξικής ουσίας είναι η βιοδιαθεσιμότητά της η οποία ορίζεται ως το κλάσμα της συνολικής συγκέντρωσης της τοξικής ουσίας στο βιοτικό και αβιοτικό περιβάλλον το οποίο προσλαμβάνεται από τον οργανισμό που εκάστοτε επηρεάζει. Επομένως, η βιοδιαθεσιμότητα καθορίζεται από την ολική συγκέντρωση της ουσίας στο περιβάλλον του κάθε οργανισμού αφ' ενός και από τις εσωτερικές βιοχημικές διεργασίες του οργανισμού αφ' ετέρου. Ειδικότερα, σε ό,τι αφορά τα προσλαμβανόμενα μέταλλα, αυτά συναντώνται σε διάφορες αρχικές μορφές: διαλύματα ιόντων, οργανικών ή ανόργανων ενώσεων, οργανικά ή ανόργανα σύμπλοκα που συμμετέχουν σε αντιδράσεις ιοντο-ανταλλαγής, χημικά σύμπλοκα με διάφορες οργανικές ουσίες, αδιάλυτες ενώσεις που έχουν προσροφηθεί σε βιολογικά υλικά ή έχουν εγκλωβιστεί στις κρυσταλλικές δομές των ορυκτών (Hawkins et al., 2002). Τα μέταλλα μπορούν να προσληφθούν από τους οργανισμούς με διάφορους μηχανισμούς, οι κυριότεροι από τους οποίους αφορούν σε σύνδεση με πρωτεΐνες, υδατάνθρακες ή/και λιπίδια της κυτοπλασματικής μεμβράνης, η ενδοκύτωση, καθώς και η διείσδυση από διάφορες διόδους (ibid.).

Τα μέταλλα, παρά τις ιδιαίτερα χαμηλές τους συγκεντρώσεις, επιδρούν στη ζωή των οργανισμών θετικά ή αρνητικά, παρεμβαίνοντας στις βιοχημικές τους λειτουργίες, συμμετέχοντας έτσι στις μεταβολικές διαδικασίες και επηρεάζοντας τη φυσιολογία των οργανισμών. Ανάλογα με τη σημασία τους για την ζωή του κάθε οργανισμού, τα μέταλλα διακρίνονται σε απαραίτητα και μη απαραίτητα. Απαραίτητα θεωρούνται τα βαρέα μέταλλα όταν ανιχνεύονται σε σταθερές συγκεντρώσεις στους υγιείς ιστούς και η έλλειψή τους εμποδίζει έναν οργανισμό να αναπτυχθεί πλήρως ή να συμπληρώσει τον κύκλο ζωής του. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τα 30 απαραίτητα για τη ζωή στοιχεία, 17 είναι μέταλλα και 4 μεταλλοειδή. (Simkiss & Taylor, 1995).

Τα μέταλλα κατατάσσονται σε 3 ομάδες, Α, Β και ενδιάμεσα με κριτήριο τις προτιμήσεις στην σύνδεση με υποκαταστάτες. Κάποια από τα μέταλλα της Ομάδας Α δίνουν κατιόντα στα διαλύματα. Αυτά είναι τα:  $K^+$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  και  $Al^{3+}$  που είναι σταθερά και γενικά σχηματίζουν ασθενή σύμπλοκα με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Τα στοιχεία  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  είναι

«μακροθρεπτικά» και έχουν σημαντικούς βιολογικούς ρόλους γι' αυτό και βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και σε ποικιλία μορφών στα σωματικά υγρά ενώ, επιπλέον, τα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  αποτελούν σημαντικά συστατικά των οστικών στοιχείων. Τα μέταλλα στην Ομάδα Β σχηματίζουν κυρίως ομοιοπολικούς δεσμούς και η σειρά προτίμησης είναι αντίθετη από των μετάλλων Α ( $\text{S} > \text{N} > \text{P} > \text{O}$ ). Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται τα  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{B}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^{3+}$ . Γενικά, είναι μη απαραίτητα και τοξικά ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις. Τα «ενδιάμεσα» μέταλλα παρουσιάζουν ιδιότητες που είναι ενδιάμεσες ανάμεσα στις άλλες δύο κατηγορίες. Τα μέταλλα που περιλαμβάνονται εδώ είναι  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ . Ο Cu και το Cd είναι πιο κοντά στη συμπεριφορά στα μέταλλα της Ομάδας Β. Τα ενδιάμεσα μέταλλα συμμετέχουν σε πολλά σημαντικά βιολογικά μακρομόρια και άρα είναι «απαραίτητα». Μολοντούτο, τα ενδιάμεσα μέταλλα μπορεί να εμφανίσουν τοξικότητα και συγκεκριμένα, το νικέλιο, το βανάδιο και το σελήνιο σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ το κοβάλτιο, ο σίδηρος, ο χαλκός και ο ψευδάργυρος σε υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Η απορρόφηση των μετάλλων από τις κυτταρικές μεμβράνες γίνεται με διάφορους τρόπους· στα κύτταρα μπορούν να διεισδύσουν ελεύθερα μεταλλικά ιόντα ( $\text{M}^{2+}$ ), ενυδατωμένα ιόντα [ $\text{M}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ ], φορτισμένα σύμπλοκα [ $\text{MCl}(\text{H}_2\text{O})^+$ ], μη φορτισμένα ανόργανα σύμπλοκα ( $\text{MCl}_2$ ) και οργανομεταλλικά σύμπλοκα ( $\text{RM}^+$ ). Τα βιολογικά σημαντικά στοιχεία ( $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες με εξειδικευμένους φορείς και διόδους. Ο  $\text{Fe}^{3+}$  μεταφέρεται επίσης με εξειδικευμένο ενζυμικό σύστημα, ενώ το Mn μπορεί να εισέρχεται από διόδους για το Ca. Μέταλλα που είναι απαραίτητα όπως ο Cu και ο Zn εισέρχονται στα κύτταρα είτε με παθητική διάχυση είτε μέσω εξειδικευμένων μηχανισμών που δεν έχουν διευκρινιστεί απόλυτα. Το Cd εισέρχεται με απλή διάχυση ή από διόδους του Mn και το ίδιο ισχύει και για ανόργανες μορφές του Pb. Οργανομεταλλικές ενώσεις του Hg, Sn και Pb αντιδρούν με τα λιπίδια των μεμβρανών και εισέρχονται με αυτό τον τρόπο. Τα μέταλλα που σχηματίζουν ανιονικά σύμπλοκα (π.χ. το Cr) εισέρχονται στα κύτταρα από διόδους ανιόντων ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ).

Η απορρόφηση των μετάλλων από τον οργανισμό των ψαριών συμβαίνει είτε με διάχυση είτε μέσω μεταφορέων. Συνήθως, ουδέτερα φορτισμένες ουσίες όπως ο μεθυλυδράργυρος εισβάλλουν στον

οργανισμό μέσω της διάχυσης, ενώ φορτισμένα σωματίδια όπως ο δισθενής μόλυβδος ( $Pb^{2+}$ ) μέσω μεταφορέων (Wu et al., 2016). Η απορρόφηση του MeHg από τα βράγχια γίνεται μέσω παθητικής μεταφοράς και είναι μικρή (<10%) (Rodgers & Beamish, 1981), αν και πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι μπορεί να είναι και μεγαλύτερη του 10% (Hrenchuk et al., 2012). Η πρόσληψη του MeHg γίνεται κυρίως μέσω της διατροφής. Με τη χρήση βιοενεργητικών μοντέλων, έχει εκτιμηθεί ότι το 65% ως 90% του MeHg που υπάρχει στην τροφή των ψαριών αφομοιώνεται από το έντερο και οδηγείται στο κυκλοφορικό σύστημα (Pickhardt et al., 2006). Το κάδμιο εισέρχεται στον οργανισμό μέσω των βράγχιων και του δέρματος με παθητική διάχυση αλλά απορροφάται από το έντερο (Wu et al., 2016).

Ο MeHg από το έντερο μεταφέρεται στο αίμα κι από κει μέσα σε λίγες μέρες διανέμεται σε όλο το σώμα (Leaner & Mason, 2004). Το 90% του MeHg που υπάρχει στο αίμα των ψαριών δεσμεύεται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και κυρίως από την αιμοσφαιρίνη (Oliveira Ribeiro et al., 1999). Γενικά, τα υψηλότερα επίπεδα υδραργύρου ανιχνεύονται στο αίμα, στο ήπαρ, στους νεφρούς και στον σπλήνα. Όσον αφορά στο κάδμιο, αυτό ενώνεται με τη μεταλλοθειονίνη και η Cd-μεταλλοθειονίνη αποθηκεύεται στους νεφρούς, στο ήπαρ και στο πάγκρεας (Wu et al., 2016).

Η μετατροπή του μεθυλϋδραργύρου (MeHg) σε ανόργανο υδράργυρο (Hg) είναι σημαντικό στάδιο κατά τη διαδικασία της βιομεταμόρφωσης (ή, βιομετασχηματισμού)· η απομεθυλίωση μάλλον πραγματοποιείται στα μελανομακροφάγα κέντρα των ψαριών στο σπλήνα, στους νεφρούς και στο ήπαρ (Chumchal et al., 2011). Ο MeHg ενώνεται με τη γλουταθειόνη κι έτσι μπαίνει στον εντεροηπατικό κύκλο και τελικά αποβάλλεται μέσω της χολής. Γενικά, η αποβολή του υδραργύρου γίνεται σε δύο φάσεις: αρχικά αποβάλλεται σχετικά γρήγορα (1-2 μήνες) από το ήπαρ και τους νεφρούς (Van Wallenghem et al., 2007) και με την πάροδο των χρόνων από τους μυς (Amlund et al., 2007).

### **Γενικό και τοξικό στρες στα ψάρια**

Το στρες, κατ' αρχήν, θεωρείται ως μια γενική και όχι ειδικευμένη αντίδραση σε κάθε παράγοντα που διαταράσσει την ομοιόσταση. Νευρικές και ορμονικές αντιδράσεις ελέγχου του στρες περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού

συστήματος και του διανεφρικού ιστού τα οποία ελευθερώνουν επινεφρίνη και κορτιζόλη, τις ορμόνες του στρες. Σε περιπτώσεις ελαφρού στρες η εσωτερική ισορροπία συνήθως αποκαθίσταται σύντομα, αλλά κάτω από έντονο στρες ο οργανισμός εξαντλείται προσπαθώντας να ισορροπήσει και αυτό οδηγεί σε φυσιολογικές διαταραχές ή ακόμα και το θάνατο. Το στρες στα ψάρια μπορεί να προκληθεί από ποικίλους αβιοτικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως οι διακυμάνσεις στη θερμοκρασία, στο pH, στη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου, στη μόλυνση κ.λπ.. αλλά και από βιοτικούς όπως η πίεση από θηρευτές, επιθέσεις παρασίτων ή ισχυρός ανταγωνισμός κ.λπ., αλλά και από ανθρώπινες δραστηριότητες που εμπλέκονται στις διαδικασίες της ιχθυοκαλλιέργειας όπως μεταφορές, διαλογές κ.λπ..

Το στρες μπορεί να προκαλέσει ποικίλες φυσιολογικές αλλαγές, περιλαμβανομένων των αιματολογικών και των ανοσολογικών. Αυτές οι αλλαγές σε περιπτώσεις τοξικών στρες από βαρέα μέταλλα αφορούν σε ένζυμα όπως η γλουταθειονική τρανσφεράση καθώς και σε αύξηση στα επίπεδα των πρωτεϊνών οξείας φάσεως και της μεταλλοθειονεΐνης και, βέβαια, σε μείωση των χυμικών ανοσοποιητικών παραγόντων (π.χ., λυσοζύμη και αντισώματα). Το στρες προκαλεί επίσης αλλαγές στον αριθμό των αιμοκυττάρων και στις δραστηριότητες τους. Στο σύστημα των ερυθροκυττάρων, έχουμε αύξηση του αιματοκρίτη, του αριθμού των κυττάρων και της πυκνότητάς τους καθώς και των επιπέδων αιμοσφαιρίνης. Τα ερυθροκύτταρα διογκώνονται σαν αποτέλεσμα ωσμωτικής διαταραχής και προσλαμβάνουν ηλεκτρολύτες και νερό και έτσι καταλήγουμε σε οξίνιση του πλάσματος και σε αλκαλοποίηση του κυτταροπλάσματος των ερυθροκυττάρων. Απότομη αύξηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων, η οποία προκαλεί ακόμα και 25% αύξηση του αιματοκρίτη, είναι αποτέλεσμα της σύσπασης (συστολής) του σπλήνα και 90% νέων κυττάρων μπορούν να ελευθερωθούν μέσα σε λίγα λεπτά. Μερικές φορές μπορεί να παρατηρηθεί διαίρεση των κυκλοφορούντων κυττάρων, ειδικά στην περίπτωση υποξικού στρες. Αυτές οι προσαρμοστικές αλλαγές οδηγούν σε υψηλότερη ενεργειακή παραγωγή του οργανισμού. Πολλές μελέτες έχουν δείξει, ότι η δηλητηρίαση των ψαριών από βαρέα μέταλλα παρουσιάζει συμπτώματα παρόμοια με αυτά του στρες. Συνήθως το σύστημα των ερυθρών αιμοσφαιρίων αντιδρά με αναιμία αλλά σε μερικές περιπτώσεις, ιδιαίτερα μετά από σύντομες εκθέσεις

σε βαρέα μέταλλα, οι παράμετροι του αίματος Ht, RBC, MCV και Hb αυξάνονται (Witeska, 2005). Στο σύστημα των λευκών κυττάρων παρατηρείται πτώση (μείωση) των κυττάρων, ειδικά των λεμφοκυττάρων, σε ψάρια που υφίστανται στρες. Η δηλητηρίαση από βαρέα μέταλλα σχεδόν πάντα έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των λευκοκυττάρων και ειδικότερα των λεμφοκυττάρων, λόγω της αύξησης των επιπέδων της κορτιζόλης, η οποία συνοδεύεται και από ελάττωση της δραστηριότητας τους. Από την άλλη μεριά, συχνά παρατηρείται ουδετεροφιλία. Γενικά, η βραχυχρόνια έκθεση σε υψηλά επίπεδα βαρέων μετάλλων προκαλεί αντίδραση στρες στα ψάρια. Οι μεταβολές στο σύστημα των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι σημαντικές και αντανακλούν μια παροδική ωσμωτική ανισορροπία όμοια με αυτή που προκαλεί το στρες. Ωστόσο, οι βαθιές αλλαγές που παρατηρούνται στο σύστημα των λευκών αιμοσφαιρίων, δείχνουν ότι το στρες μειώνει το ανοσοποιητικό δυναμικό των ψαριών. Επομένως, ακόμη και ένα παροδικό τοξικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της ευαισθησίας των ψαριών σε μολύνσεις (ibid.).

### **Οξειδωτικό στρες και αντιοξειδωτικές άμυνες**

Το οξειδωτικό στρες είναι μια αναπόφευκτη πτυχή της αερόβιας ζωής. Αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να αποκαθιστά τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των νουκλεϊκών οξέων. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες:

- Ελεύθερες ρίζες όπως του  $-OH^-$
- Ιόντα όπως το υποχλωριώδες ανιόν ( $ClO^-$ ) που προκύπτουν από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέος ( $HClO^-$ )
- Συνδυασμός ελεύθερων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) και
- Μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )

Οι ελεύθερες ρίζες, που χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα, είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια

παίρνοντας απ' αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να το ζευγαρώσουν με το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται, έτσι, τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και μ' αυτό τον τρόπο μεταβάλλεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μια αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη. Τα ROS προκαλούνται από ουσίες όπως τα ιόντα μεταβατικών μετάλλων, τα παρασιτοκτόνα και οι ρύποι πετρελαίου (Sevcicova et al., 2011). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης παράγονται από ενδογενείς κυτταρικές πηγές κατά τη διάρκεια του κανονικού μεταβολισμού του κυττάρου. Η μιτοχονδριακή αναπνοή είναι η κύρια πηγή παραγωγής ROS. Η αυξημένη παραγωγή ROS, προκαλεί οξείδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων και αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου.

Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας των ψαριών, περιλαμβάνουν το ενζυμικό σύστημα και τα αντιοξειδωτικά χαμηλού μοριακού βάρους, παρόμοια μ' αυτά των θηλαστικών (Sevcicova et al., 2011). Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και η γλουτοθειονική τρανσφεράση (GST) είναι τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα και αποτελούν σημαντικούς δείκτες οξειδωτικού στρες. Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και η οξειδωμένη γλουταθειόνη δισουλφιδίου (GSSG) έχουν βασικό ρόλο στη μη ενζυματική αντιοξειδωτική άμυνα. Οι μεταλλοδεσμευτικές πρωτεΐνες όπως η φερριτίνη, η κερουλοπλασμίνη και οι μεταλλοθειονεΐνες (MTs) βοηθούν στην απομάκρυνση των τοξικών μετάλλων, ενώ συνάμα μετέχουν στο μεταβολισμό και στην ομοιόσταση των ζωτικών για τον οργανισμό μετάλλων. Οι μεταλλοθειονεΐνες είναι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, πλούσιες σε κυστίνη, η οποία μπορεί να δεσμεύσει διάφορα μέταλλα, συμπεριλαμβανομένων του υδραργύρου, του αργύρου, του χαλκού, του καδμίου, του μολύβδου, του ψευδαργύρου και του κοβαλτίου με ποικίλες χημικές αντιδράσεις. Έχει διαπιστωθεί ότι διαφορετικά είδη ψαριών διαθέτουν διαφορετικά ισόμορφα των MTs. Οι μεταλλοθειονεΐνες εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων των βασικών μετάλλων, χαλκού και ψευδαργύρου, καθώς και στην αποτοξίκωση από τα μη βασικά (ibid.).

#### **4. ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Ανεξαρτήτως της οδού πρόσληψης, είτε μέσω των επιθηλίων των βραγχίων και του δέρματος, είτε μέσω του εντέρου, τα διάφορα μέρη του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν να εκτεθούν σε τοξικές ουσίες οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν την δυσλειτουργία του. Επιπροσθέτως, το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να επηρεαστεί έμμεσα από τοξικούς παράγοντες μέσω του νευρο-ενδοκρινικού συστήματος (Rice, 2001; Burnett, 2005; Casanova-Nakayama et al., 2011). Οι διαταραχές στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλούνται από χημικούς παράγοντες σε συγκεντρώσεις έως και πολύ χαμηλότερες από τις κλινικώς σημαντικές και τις θανατηφόρες (Luster, 2014), και αυτό σημαίνει ότι τα τοξικά αποτελέσματα δεν οφείλονται μόνο στη δράση της ουσίας αλλά και στην αντίδραση του οργανισμού (π.χ. αλλεργίες, οξειδοαναγωγικό στρες). Έτσι, το ερώτημα που πρέπει να τεθεί δεν είναι αν οι τοξικές ουσίες επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών αλλά: ποιες μπορεί να είναι οι επιπτώσεις τους στην αποτελεσματικότητα του συστήματος και στην ως εκ τούτου γενικότερη υγεία του οργανισμού;

Η καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού είναι, ως γνωστόν, καθοριστική για την επιβίωση του ατόμου και την διατήρηση και αναπαραγωγή του πληθυσμού. Όταν το άτομο εκτίθεται σε κάποιο ρυπαντή, είτε αποκλειστικά είτε σε συνδυασμό με κάποιον άλλον στρεσογόνο παράγοντα, ο οργανισμός δε μπορεί να αντιμετωπίσει επιτυχώς τις ασθένειες με αποτέλεσμα την εξασθένηση και ίσως το θάνατο του ψαριού με τα ανάλογα αποτελέσματα και στον πληθυσμό (Segner et al., 2012b). Για παράδειγμα, η τοξικότητα που προκαλείται από τα POPs στο ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών έχει αξιολογηθεί από τη λειτουργικότητα των επιμέρους στοιχείων του ή από την συνολική ικανότητα του οργανισμού να αντιμετωπίσει κάποιο βιοπαθολογικό παράγοντα με την τελευταία να αποτελεί, προφανώς, μια ολιστική προσέγγιση με άμεσες πιθανές επιπτώσεις. Ανοσοτοξικολογικές μελέτες έχουν εξετάσει τη λειτουργία των μακροφάγων, την έκφραση των χυμικών παραγόντων του εγγενούς ανοσοποιητικού όπως οι κυτοκίνες (ιντερφερόνες, ιντερλευκίνες, χημειοκίνες), την απόκριση των λεμφοκυττάρων στα Β- και Τ-μιτογόνα, καθώς και την παραγωγή αντισωμάτων σε συγκεκριμένο



αντιγόνο (Segner et al., 2012a). Μια πιο ολοκληρωμένη και ολιστική προσέγγιση για τη μελέτη της τοξικότητας ενός χημικού παράγοντα σε έναν οργανισμό είναι να εξεταστεί η ικανότητά του να αντιμετωπίζει επιτυχώς ένα παθογόνο. Μ' αυτόν τον τρόπο, η ανοσοτοξικολογία μελετάται απέναντι σε ένα ενεργοποιημένο ανοσοποιητικό σύστημα, πράγμα σαφώς πιο αποτελεσματικό από τη μελέτη ενός μη ενεργοποιημένου συστήματος (Köllner et al., 2002). Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί κυτταρικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των τρόπων με τους οποίους οι ρυπαντές αλλάζουν την έκφραση των ανοσο-σχετιζόμενων γονιδίων κατά τη διάρκεια μια ενεργούς μόλυνσης (Jin et al., 2010). Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο γίνεται η αλλαγή της έκφρασης των γονιδίων οδηγεί σε μια πιο μηχανική προσέγγιση του πως οι ρυπαντές ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Πρόσφατες μελέτες, έχουν δείξει ότι πολλά POPs, τα οποία έχουν μελετηθεί σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες, μπορούν να αλλάξουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, την απόκρισή του κατά κάποιου παθογόνου παράγοντα και την έκφραση των ανοσο-γονιδίων. Για παράδειγμα, οι Wenger et al. (2011) εξέθεσαν ιριδίζουσες πέστροφες σε υψηλές δοσολογίες 17β-οιστραδιόλης ώστε να παρατηρήσουν οιστρογονική αντίδραση αλλά όχι και ανοσοτροποποίηση, μετρώντας την δραστηριότητα του συμπληρώματος· όταν, όμως, οι επηρεασμένες πέστροφες μολύνθηκαν με *Yersinia ruckeri*, τότε φάνηκε μια σαφής ανοσοανεπάρκεια διότι και υψηλότερη θνητότητα είχαν, σε σύγκριση με τους μάρτυρες, αλλά και απέτυχαν να ανεβάσουν την έκφραση γονιδίων από βασικά στοιχεία του συμπληρώματος οπότε η ανοσοαντίδρασή τους ήταν πλημμελής σε συνθήκες πραγματικής αμυντικής κινητοποίησης.

Οι ιστοί/κύτταρα και τα όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι στενά συνδεδεμένοι με το κυκλοφορικό σύστημα όπου και έχουν ρόλο διήθησης από ξένα σωματίδια (ως δικτυοενδοθηλιακό σύστημα)· ως εκ τούτου, είναι άμεσα προσβάσιμοι σε τοξικές ουσίες που εισέρχονται στην κυκλοφορία αλλά και σε μεταβολίτες τους που προέρχονται, κατά κανόνα, από το ήπαρ, ενώ, προκειμένου γι' αυτές που δεν εισέρχονται, αναμφίβολα τα στοιχεία του ανοσοποιητικού που ευρίσκονται στα βλεννογόνα μπορούν να έχουν σχεδόν άμεση επαφή με αυτές από το νερό ή/και την τροφή (Segner et al., 2012a). Οι δομικές αλλαγές σε αυτούς τους ιστούς και τα όργανα θα μπορούσαν

να έχουν κάποια αξία ως προς τις εκτιμήσεις τοξικότητας και αυτό μπορεί να περιλαμβάνει και γενικότερες ενδείξεις προερχόμενες από τις αιματολογικές παραμέτρους καθότι αυτές αντανακλούν στους αιμοποιητικούς ιστούς οι οποίοι συνιστούν και την βάση του ανοσοποιητικού συστήματος (με την εξαίρεση του θύμου). Παρόλα αυτά, και μολονότι έχει πολλάκις παρατηρηθεί αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα από μεταδοτικά νοσήματα εντός πληθυσμών σε μολυσμένα ενδιαιτήματα, δεν έχει μέχρι πρόσφατα αναπτυχθεί μια αξιόπιστη μέθοδος τοξικολογικής βιοπαρακολούθησης ιχθύων σε φυσικά οικοσυστήματα που να περιλαμβάνει ανοσολογικούς βιοδείκτες πιθανότατα λόγω της μεγάλης ποικιλίας των Ειδών που εμπλέκονται (Rehberger et al., 2017).

Όσον αφορά στην ανοσοτοξικότητα σε εμβρυϊκά και πρώιμα στάδια προνυμφών, αυτή θα μπορούσε να καταλήξει σε εφ' όρου ζωής αλλοιώσεις του συστήματος (Ottinger & Kaatari, 2000). Για παράδειγμα, οι Seemann et al. (2015a; 2015b) διαπίστωσαν ότι αναστέλλεται η ανάπτυξη του θύμου στο ευρωμεσογειακό λαβράκι όταν αυτό εκτεθεί, ως έμβρυο, σε 17β-οιστραδιόλη. Φαίνεται ότι οι δομές του εξειδικευμένου μέρους του συστήματος είναι οι πλέον ευαίσθητες.

Η ανοσοτοξικότητα μπορεί, επίσης, να διαφέρει, αναλόγως με το φύλο, σε περιόδους αναπαραγωγικής ωρίμανσης των ενηλίκων ατόμων. Για παράδειγμα, οι Hoeger et al. (2005) παρατήρησαν ότι η έκθεση της ιριδίζουσας πέστροφας σε επεξεργασμένα αστικά λύματα απέληξε σε μειωμένους τίτλους αντισωμάτων και χαμηλότερους αριθμούς λεμφοκυττάρων αλλά μόνον στα θηλυκά και όχι στα αρσενικά ώριμα άτομα. Παρομοίως, οι Ye et al. (2012) βρήκαν φυλετικές διαφορές ως προς την ευπάθεια του συμπληρώματος στο θαλασσινό medaka που εκτέθηκε σε πολυβρωμιωμένο πυροεπιβραδυντικό.

Οι μέθοδοι μελέτης και αξιολόγησης των ανοσοτοξικολογικών φαινομένων χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες :

α) **Μελέτη δομικών και λειτουργικών παραμέτρων**, του συστήματος και της ανοσοαπόκρισης, με αλλαγές στους τίτλους αντισωμάτων, μέτρηση πολλαπλασιασμού ανοσοκυττάρων, μελέτη φαγοκύτωσης, έκφραση ανοσοδιαβιβαστών όπως, λ.χ., κυτοκινών, μέτρηση οξειδωτικής λειτουργίας, κ.λπ.. Το πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι ότι δίνουν άμεση απάντηση για το αν κάποια λειτουργία

του ανοσοποιητικού συστήματος επηρεάζεται από την έκθεση του σε κάποιο χημικό παράγοντα, αλλά δεν δίνουν καμιά πληροφορία για το αν αυτές οι επιδράσεις προκαλούν αλλοίωση στην ανοσοεπάρκεια του οργανισμού (Segner et al., 2012a). Η απλή χημική έκθεση, είναι μια γρήγορη μέθοδος μελέτης και χρησιμοποιείται στο πεδίο, όπου οι οργανισμοί θεωρείται ότι έχουν εκτεθεί σε κάποιο μίγμα χημικών ουσιών το οποίο προέκυψε από κάποια ανθρωπογενή ή όχι δραστηριότητα στο περιβάλλον, ή σε εργαστηριακά ενυδρεία όπου τα ψάρια εκτίθενται σε συγκεκριμένο χημικό με ορισμένη δοσολογία, τρόπο χορήγησης και χρόνο παρατήρησης και, κατόπιν, μετρώνται προεπιλεγμένες ανοσολογικές μεταβλητές που θεωρείται ότι μπορεί να αντανακλούν στις αντιδράσεις που μπορεί να προκύψουν από τις διάφορες συνιστώσες του συστήματος· σε αυτή την περίπτωση η ύπαρξη μαρτύρων είναι περισσότερο αξιόπιστη αλλά οι φυσικές συνθήκες απλώς προσομοιώνονται. Ακόμη περισσότερο, χρήσιμα συμπεράσματα και ακριβέστερη διερεύνηση των μηχανισμών ανοσοτοξικότητας μπορούν να προκύψουν μέσα από προσεκτικά σχεδιασμένες *in vitro* μελέτες κυττάρων και ιστών του συστήματος (Rehberger et al., 2017) στις οποίες απουσιάζουν πιθανοί συστημικοί παράγοντες σύγχισης όπως, λ.χ., οι ορμόνες του στρες.

β) **Παράλληλη έκθεση σε τοξικό και παθογόνο παράγοντα**, ώστε να διερευνηθεί αν η παθογένεια του ψαριού αυξάνεται ως εκ της επίδρασης του ανοσοτοξικού παράγοντα (Segner et al., 2012a). Για τη μελέτη των επιπτώσεων των χημικών ουσιών στα ψάρια η πιο συχνή πειραματική μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι τα τεστ θνησιμότητας. Σ' αυτά τα τεστ τα ψάρια εκτίθενται: α) στην ύποπτη τοξική ουσία σε συγκεντρώσεις οι οποίες δεν προκαλούν θνησιμότητα, β) σε έναν οξύ βιοπαθογονικό παράγοντα που προκαλεί χαμηλά ως μέτρια επίπεδα θνησιμότητας, και γ) στον ίδιο βιοπαθογονικό παράγοντα και στην τοξική ουσία ταυτόχρονα. Οι θνησιμότητες που προκύπτουν από την έκθεση μόνο στον βιοπαθογονικό παράγοντα συγκρίνονται με αυτές που προκύπτουν από τη συνδυαστική έκθεση (βιοπαθογόνο + τοξική ουσία) κι έτσι αποδεικνύεται αν μια ουσία δρα ανοσοτοξικά κρινόμενη εκ του τελικού αποτελέσματος της ανοσοεπάρκειας υπό το πρίσμα μιας ρεαλιστικής διακινδύνευσης (Rehberger et. al., 2017). Εν τούτοις, θεωρητικά, δεν έπεται ότι η αύξηση της θνητότητας, εν όλω ή εν μέρει, προέρχεται μέσω κάποιας μορφής ανοσοκαταπίεση, αφού η θνητότητα συνιστά την πιο ακραία

παθολογική εκδοχή, καθιστώντας την ανοσοτοξικότητα απλά μια συνιστώσα μιας γενικότερης τοξικής προσβολής εκ παραλλήλου με την βιολογική· για να επιτευχθεί κάποια διάκριση, επομένως, θα πρέπει να μελετώνται οι ανοσοτοξικές επιδράσεις σε αρκετά χαμηλά επίπεδα έκθεσης στον τοξικό παράγοντα και αρκετά κάτω από το LD<sub>50</sub> (Segner et al., 2012a). Επί παραδείγματι, η έκθεση νεαρών σολομών chinook στο πυρεθροειδές esfenvalerate ή στον ιό της Λοιμώδους Αιμοποιητικής Νεκρώσεως δεν απέληξε σε θνησιμότητες αλλά η ίδια έκθεση στον συνδυασμό των δύο παραγόντων έδωσε 24,1% θνητότητα (Clifford et al., 2005)· η δράση του εντομοκτόνου είναι κυρίως νευροτοξική αλλά οι Eder et al. (2008) και οι Clifford et al. (2014) διαπίστωσαν ότι μειώνει και την έκφραση δύο ανειδίκευτων αντι-ιικών ανοσογονιδίων της πρώιμης αντίδρασης (Mx-1 και Vig-8).

Η ερμηνεία των ανοσολογικών ευρημάτων αντιμετωπίζει αρκετές προκλήσεις. Χρειάζεται, κατ' αρχήν, να γίνει διαχωρισμός μεταξύ των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την απ' ευθείας επίδραση των χημικών στα στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών και των έμμεσων αποτελεσμάτων που μπορεί να προκύπτουν λόγω στρες που προκαλείται απευθείας από την έκθεση στον τοξικό παράγοντα και έμμεσα από την ανοσορρυθμιστική δράση των ορμονών που εκκρίνονται σε τέτοιες περιπτώσεις (Bennett & Wolke, 1987). Περαιτέρω, η έκθεση σε ποικίλα χημικά μπορεί να μην έχει εμφανή αποτελέσματα σε ένα μη διεγερμένο, 'εν ηρεμία' ευρισκόμενο, ανοσοποιητικό σύστημα (Segner et al., 2012b). Η ερμηνεία της ανοσοαπόκρισης είναι ένα ακόμη ζήτημα διότι, ενίοτε, η έκθεση σε κάποιο τοξικό μπορεί να οδηγήσει είτε σε ανοσοκαταπίεση είτε σε ανοσοδιέγερση (Kimber & Dearman, 2002). Τέλος, το πλήθος και η ποικιλία των πιθανών στόχων του τοξικού παράγοντα όσο και οι πιθανές επιπτώσεις πάνω σε αυτούς τους στόχους μπορεί να δημιουργήσουν μια περισσότερο ή λιγότερο σύνθετη εικόνα. Πράγματι, οι αλληλεπιδράσεις των τοξικών ουσιών με το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να συμβούν σε πληθώρα σημείων του και να προκαλέσουν διάφορες αλλαγές ως προς τον πολλαπλασιασμό των ανοσοκυττάρων, την διαφοροποίηση και την επιβίωσή τους ή αλλαγές στη λειτουργία των οργάνων εν γένει οι οποίες, τελικά, μπορούν να οδηγήσουν σε ανοσοτοξικά αποτελέσματα τα οποία μπορεί να είναι ανοσοκαταπιεστικά, αυξάνοντας τον κίνδυνο μολυσματικών και νεοπλαστικών ασθενειών, ή μπορεί να είναι

ανοσοδιεργετικά φθάνοντας στο σημείο να προκαλέσουν αυτοάνοσα ή αλλεργικού τύπου νοσήματα εφ' όσον έχει επέλθει διατάραξη της ομαλής λειτουργίας του συστήματος (Rehberger et al., 2017).

## **5. ΤΟΞΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ / ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ**

Παρόλο που, απ' την σκοπιά του οργανισμού, αυτό που, σε τελική ανάλυση, ενδιαφέρει είναι η συνολική απόδοση του ανοσοποιητικού συστήματος και όχι οι επιμέρους λειτουργίες του, θα πρέπει, ίσως, να εκτιμηθεί η απόδοση των επιμέρους στοιχείων του με δεδομένο ότι υπάρχει κάποια λειτουργική εξειδίκευση ως προς την φύση των απειλών που υπάρχουν και των αντίστοιχων αποκρίσεων που θα μπορούσαν να διασφαλίσουν την ανοσία του οργανισμού απέναντι σε καθεμία από αυτές. Με αυτή την έννοια, σε πολλές περιπτώσεις η ανοσοεπάρκεια δεν χρειάζεται να είναι ολική αλλά απλώς να είναι στοχευμένη σε ρεαλιστικά σενάρια απειλών διαφόρων τύπων· για παράδειγμα, η λυσοζύμη του ορού δεν έχει αποτέλεσμα απέναντι σε ιούς ενώ οι ιντερφερόνες δεν δρουν απέναντι στα βακτήρια. Από την άλλη πλευρά, όμως, ας μην λησμονείται το γεγονός ότι τα περισσότερα από τα ανοσοτοξικά χημικά μπορούν να επηρεάζουν περισσότερες, έως και πολύ περισσότερες, από μία ή δύο ανοσολογικές παραμέτρους αλλά το επίπεδο των τοξικών επιδράσεων μπορεί να διαφέρει ως προς το κάθε στοιχείο του συστήματος (Segner et al., 2012a). Επίσης, δεν πρέπει να παραγνωρίζεται το γεγονός ότι το 'ανειδίκευτο' σκέλος του συστήματος, δηλ. οι μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας, συμμετέχει στις ειδικευμένες ανοσοαντιδράσεις, π.χ. κατόπιν εμβολιασμών. Μια ακόμη σταθερά της κάθε ανοσοαντίδρασης είναι το γεγονός ότι τα χυμικά στοιχεία του συστήματος απορρέουν από τα κυτταρικά έστω και, ένα εξ αυτών, από τα ηπατοκύτταρα και, άρα, τυχόν απευθείας τοξικές χημικές επιδράσεις στα χυμικά στοιχεία είναι μάλλον δευτερεύουσας σημασίας μπροστά στις πιθανές αλλαγές που θα προκαλέσουν οι τοξικοί παράγοντες στην λειτουργία και την ίδια την επιβιωσιμότητα των ανοσοκυττάρων.

### **I. Χυμικοί παράγοντες**

Εξαρτώνται, ως προς την παραγωγή τους, από κυτταρικούς και ευρύτερους οργανικούς αλλά υπάρχουν και δρουν αυτοδύναμα ενώ, μεταξύ αυτών, οι κυτοκίνες και συναφή βιομόρια δρουν ως παράγοντες 'ενδοσυνεννόησης' μεταξύ κυττάρων. Δεν έχουν μελετηθεί όλες οι κατηγορίες χυμικών ανοσοποιητικών στοιχείων εξ ίσου.

- Λυσοζύμη

Αντιβακτηριακό ένζυμο που ευρίσκεται σχεδόν παντού στον οργανισμό. Η έκθεση σε βαρέα μέταλλα τείνει να μειώνει τα επίπεδα της στον ορό ή/και στον νεφρό αλλά, ενίοτε, τα ανεβάζει· ο συνδυασμός της τοξικής δοσολογίας με το Είδος που εκτίθεται καθώς και με τον τόπο και χρόνο μέτρησης δημιουργεί σημαντική ποικιλία για το κάθε μέταλλο που ερευνάται και, πόσο μάλλον, για συνδυασμούς μετάλλων (Bols et al., 2001). Αστικά απόβλητα, εντομοκτόνα και σύνθετοι υδρογονάνθρακες φαίνεται να έχουν αρνητική επίδραση στα επίπεδα της λυσοζύμης (ibid.).

- Ιντερφερόνες

Είναι μια ομάδα βιομορίων με σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση των ιογενών λοιμώξεων. Οι έρευνες που έχουν γίνει δεν είναι ιδιαίτερα καταληκτικές και μια μάλλον αρνητική εικόνα προκύπτει για τις πιθανές επιδράσεις διαφόρων οργανικών τοξικών σε κυτταροκαλλιέργειες ή σε ζωντανά ψάρια (Bols et al., 2001). Ο χρόνος και ο τρόπος έκθεσης, μαζί με την δοσολογία της κάθε ουσίας ως προς κάθε Είδος, ίσως να είναι ένα ζήτημα αλλά, πολύ περισσότερο, πιθανόν το αποτέλεσμα να εξαρτάται από τον χρονισμό της ιικής προσβολής διότι από αυτήν εξαρτάται η παραγωγή ιντερφερονών.

## **II. Κυτταρικοί παράγοντες**

Υπάρχει ποικιλία κυτταρικών τύπων και λειτουργιών στα πλαίσια του ανοσοποιητικού συστήματος των 'ψαριών'.

- Φαγοκύτταρα

Αν και είναι διαφόρων τύπων, συχνά εξετάζονται συνολικώς. Τα μακροφάγα έχουν δείξει θετική χημειόταξη σε βαρέα μέταλλα (Bols et al., 2001) αλλά αυτό μάλλον δεν συμβάλλει στην άμυνα του οργανισμού.

Όσον αφορά στην ενδοκύτωση σωματιδιακού υλικού, βασικό στοιχείο της φαγοκυτταρικής λειτουργίας, τα μακροφάγα έχουν δείξει ότι την μειώνουν μετά από έκθεση σε χρώμιο και σε υψηλές δόσεις καδμίου αλλά, σε χαμηλές δόσεις καδμίου, μπορεί να την αυξάνουν· ο υδράργυρος είναι κυτταροτοξικός σε μακροφάγα και μειώνει την ενδοκύτωση (Bols et al., 2001). Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες δείχνουν μια γενική τάση να μειώνουν την φαγοκυττάρωση αλλά αυτό εξαρτάται από την ουσία που

χρησιμοποιείται, το Είδος που δοκιμάζεται και το καθεστώς χορήγησης (ibid.). Επίσης, η φαγοκύτωση μάλλον μειώνεται με την έκθεση σε απόβλητα βιομηχανιών χαρτοπολυτού ή σε αλογονωμένους αρωματικούς υδρογονάνθρακες (ibid.).

Η αναπνευστική έκρηξη, που χρησιμεύει στην ενδοκυτταρική καταστροφή των φαγοκυτωμένων μικροβίων, έχει αποδειχθεί, σε γενικές γραμμές, αρκετά ευαίσθητη στον τριβουτυλικό κασσίτερο ο οποίος δρά αυξάνοντας το ενδοκυτταρικό ασβέστιο και προξενώντας βλάβη στα μιτοχόνδρια (Bols et al., 2001). Ο υδράργυρος είναι, επίσης, βλαπτικός σε σχετικά πιο χρόνιες εκθέσεις και σε υψηλότερες δόσεις· το κάδμιο, εξ εναντίας, έχει δώσει μάλλον συγκρουόμενα αποτελέσματα τα οποία μπορεί να οφείλονται στο Είδος του πειραματόζωου ή/και στον κυτταρικό τύπο που εξετάζεται (ibid.). Διάφορα εντομοκτόνα έχουν δείξει καθαρά καταπιεστικές επιδράσεις σε αυτήν τη λειτουργία ενώ, η έκθεση σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες δεν έχει δώσει αρκετά σαφή αποτελέσματα, πιθανώς λόγω της εκτεταμένης ποικιλίας στα πειραματικά πρωτόκολλα, αν και με μια γενικότερη μειωτική τάση (ibid.). Τα επεξεργασμένα αστικά λύματα και οι αλογονωμένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες έχουν δώσει σαφή βλαπτικά αποτελέσματα και, μάλιστα, έως την μείωση της ενδοκυτταρικής καταστροφής βακτηριακών παθογόνων (ibid.).

Η αναπνευστική έκρηξη, που χρησιμεύει στην ενδοκυτταρική καταστροφή των φαγοκυτωμένων μικροβίων, έχει αποδειχθεί, σε γενικές γραμμές, αρκετά ευαίσθητη στον τριβουτυλικό κασσίτερο ο οποίος δρά αυξάνοντας το ενδοκυτταρικό ασβέστιο και προξενώντας βλάβη στα μιτοχόνδρια (Bols et al., 2001). Ο υδράργυρος είναι, επίσης, βλαπτικός σε σχετικά πιο χρόνιες εκθέσεις και σε υψηλότερες δόσεις· το κάδμιο, εξ εναντίας, έχει δώσει μάλλον συγκρουόμενα αποτελέσματα τα οποία μπορεί να οφείλονται στο Είδος του πειραματόζωου ή/και στον κυτταρικό τύπο που εξετάζεται (ibid.). Διάφορα εντομοκτόνα έχουν δείξει καθαρά καταπιεστικές επιδράσεις σε αυτήν τη λειτουργία ενώ, η έκθεση σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες δεν έχει δώσει αρκετά σαφή αποτελέσματα, πιθανώς λόγω της εκτεταμένης ποικιλίας στα πειραματικά πρωτόκολλα, αν και με μια γενικότερη μειωτική τάση (ibid.). Τα επεξεργασμένα αστικά λύματα και οι αλογονωμένοι αρωματικοί υδρογονάνθρακες έχουν δώσει σαφή βλαπτικά αποτελέσματα και,



μάλιστα, έως την μείωση της ενδοκυτταρικής καταστροφής βακτηριακών παθογόνων (ibid.). Το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα έχει δειχθεί ευαίσθητο στην επίδραση ουσιών 'τύπου διοξίνης' και σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες κατά το ενδοθηλιακό του μέρος και αυτό μπορεί να έχει σημασία στην εκκαθαριστική λειτουργία των φαγοκυτταρικών του στοιχείων (Bols et al., 2001).

Τέλος, τα φλεγμονικά φαινόμενα, αν και δύσκολα στην προσέγγισή τους, μπορεί να υφίστανται κάποια σημαντικής εκτάσεως καταπίεση όπως έχουν δείξει οι αυξημένες εξωτερικές πληγές σε ψάρια από περιοχές μολυσμένες με τοξικά χημικά όπως, για παράδειγμα, τα απόβλητα χαρτοβιομηχανιών πράγμα που υποδεικνύει ότι, απουσία μικροβιακής επιπλοκής, η επούλωση των μηχανικών τραυμάτων καθίσταται προβληματική (Bols et al., 2001) – αν και αυτό δεν αφορά, κατ' ανάγκην, μόνον στα φαγοκύτταρα.

– Ανειδίκευτα κυτταροτοξικά κύτταρα

Σημαντικά για την αντι-ιική και την αντιπαρασιτική άμυνα, αποκαλούνται και «φυσικά φονικά κύτταρα». Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια και τα εντομοκτόνα δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματικά για την καταπίεση αυτού του κυτταρικού τύπου (Bols et al., 2001). Από την άλλη, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, φαίνεται να δίνουν ένα σαφώς βλαπτικό αποτέλεσμα (ibid.). Περαιτέρω, ο χαλκός και ο ψευδάργυρος, πιθανόν και ο οργανικός κασσίτερος, είχαν βλαπτική επίδραση στην λειτουργία τους ενώ, εξ εναντίας, το μαγγάνιο προκάλεσε αύξηση της δραστηριότητάς τους (ibid.).

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στο υδάτινο περιβάλλον συχνά απαντάται, σε διάφορες συγκεντρώσεις και μορφές, μεγάλη ποικιλία τοξικών χημικών που μπορούν να επιδράσουν στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων με αρνητικό, κατά κανόνα, τρόπο.
- Οι επιδράσεις αυτές εξαρτώνται από τον εκάστοτε συνδυασμό που δημιουργούν η ουσία (ή, οι ουσίες), τα ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά του ψαριού, καθώς και οι άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορεί να έχουν κάποιο ρόλο για τις τοξικές επιδράσεις στον οργανισμό και στα επιμέρους τμήματά του συνιστώντας, έτσι, μια αρκετά σύνθετη και δυναμική κατάσταση.
- Η βιοδιαθεσιμότητα του τοξικού παράγοντα, η πρόσληψή και η εντός του οργανισμού διασπορά του, η συσσώρευσή του σε κρίσιμα για το ανοσοποιητικό σύστημα όργανα και ιστούς καθώς και η περαιτέρω, τελειωτική, ιστολογική και κυτταρική επίδρασή του συγκροτούν την εκάστοτε πορεία των γεγονότων που οφείλουν να αναλύονται και να λαμβάνονται υπόψιν. Οι πιθανές φυσιολογικές αντιδράσεις του οργανισμού από το υποκυτταρικό έως το οργανισμικό επίπεδο είναι, επίσης, μια παράμετρος που δεν πρέπει να παραγνωρίζεται.
- Αν και έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα εγκλιματισμού, υπεραντίδρασης ή υπεραντιστάθμισης, η μεγάλη πλειονότητα των περιπτώσεων είναι σαφώς βλαπτική ως προς την ανοσοεπάρκεια· τέτοιες καταστάσεις, όμως, καθώς και το ζήτημα της διάρκειας και της έκτασης της ανοσοκαταπίεσης δεν έχουν ερευνηθεί αρκετά αλλά ούτε και σενάρια πολλαπλών επιδράσεων που είναι και πιο πιθανά στις πραγματικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Segner et al., 2012a; 2012b).
- Οι μεμονωμένες εργαστηριακές μελέτες παραμένουν το κυρίαρχο εργαλείο στην διερεύνηση των ανοσοτοξικολογικών καταστάσεων και είναι αρκετά χρήσιμες αν και, ενίοτε, ο πειραματικός σχεδιασμός δεν είναι σε πολύ καλό επίπεδο, πράγμα που μπορεί να καταλήξει σε αμφίβολης αξίας αποτελέσματα (Rehberger et al., 2017).
- Παρόλο που έχουν αναφερθεί οι ευεργετικές δυνατότητες των διατροφικών συμπληρωμάτων και των ανοσοενισχυτικών

σκευασμάτων για την αποκατάσταση των ανοσοποιητικών λειτουργιών, αυτή η δυνατότητα δεν έχει ερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό κυρίως λόγω της έμφασης που έχει έως τώρα δοθεί σε μελέτες με οικολογικό προσανατολισμό που αφορούν σε άγριους πληθυσμούς.

- Στον χώρο της ιχθυοκαλλιέργειας φαίνεται ότι δεν έχει υπάρξει σημαντική ερευνητική ενασχόληση έως σήμερα για την σημασία που μπορεί να έχουν τα ανοσοτοξικά χημικά, ως ένας ακόμη πιθανός παράγων φαινομένων ανοσοκαταπίεσης, ακόμη και όταν αυτά προέρχονται από τις ίδιες τις ιχθυοκαλλιεργητικές δραστηριότητες (Cuesta et al., 2011).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aboud O.A.S.A. (2010). Impact of pollution with lead, mercury and cadmium on the immune response of *Oreochromis niloticus*. New York Science Journal 3(9), 12-6.
- Ahmadi K., Banaee M., Vosoghei A. R., Mirvaghefei A. R., & Ataeimehr B. (2012). Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae). Acta Ichthyol. Piscat. 42(2), 113-120.
- Ahmadi K., Mirvaghefei A. R., Banaee M. and Vosoghei A. R. (2014). Effects of long-term diazinon exposure on some immunological and haematological parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Toxicology and Environmental Health Sciences 6, 1-7.
- Amlund H., Lundebye A.K., Berntssen M.H. (2007). Accumulation and elimination of methylmercury in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) following dietary exposure. Aquat. Toxicol. 83, 323-30.
- Anderson D. P. and Zeeman M. G. (1995). Immunotoxicology in fish. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental fate and Risk Assessment. Edited by Gary M. Rand. Chapter 12, pp. 371-404.
- Arkoosh M.R., Clemons E., Myers M. & Casillas E. (1994). Suppression of B-cell mediated immunity in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) after exposure to either a polycyclic aromatic hydrocarbon or to polychlorinated biphenyls. Immunopharmacology and Immunotoxicology 16, 293-314.
- Arkoosh M.R., Clemons E., Huffman P., Kagle A.N., Casillas E., Adams N., Sanborn H.R., Collier T.K. & Stein J.E. (2001). Increased susceptibility of juvenile Chinook salmon to vibriosis after exposure to chlorinated and aromatic compounds found in contaminated urban estuaries. Journal of Aquatic Animal Health 13, 257-268.
- Arkoosh M.R. & Collier T.K. (2002). Ecological risk assessment paradigm for salmon: analyzing immune function to evaluate risk. Human and Ecological Risk Assessment 8, 265-276.

- Arkoosh M. R., Boylen D., Stafford C.L., Johnson L.L. & Collier T.K. (2005). Use of disease challenge assay to assess immunotoxicity of xenobiotics. *In*: Ostrander, G.K. (ed.). *Techniques in Aquatic Toxicology*. Taylor and Francis, New York, N.Y., U.S.A.. pp. 19-38.
- Arunkumar R.I., Rajasekaran P. & Michael R.D. (2000). Differential effect of chromium compounds on the immune response of the African mouth breeder *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Fish Shellfish Immunol.* 10, 667-76.
- Aslam S. & Yusafzai A. M. (2017). Chromium toxicity in fish: A review article. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 5(3), 1483-88.
- Austin B. (1999). The effects of pollution on fish health. *J. Appl. Microbiol.* 85, 234S-42S.
- Bado-Nilles A., Quentel C., Thomas-Guyon H., Le Floch S. (2009). Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.. *Toxicology in Vitro* 23, 235-241.
- Bakshi A. & Panigrahi A.K. (2018). A comprehensive review on chromium induced alterations in fresh water fishes. *Toxicol. Reports* 5, 440-7.
- Banaee M., Mirvagefei A.R., Rafei G.R., Majazi Amiri B. (2008). Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *International Journal Environmental Research* 2, 189-198.
- Banaee M., Sureda A., Mirvaghefi A.R. & Ahmadi K. (2011). Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99, 1-6.
- Banaee M. (2013). Physiological Dysfunction in Fish After Insecticides Exposure. <http://dx.doi.org/10.5772/54742>
- Banerjee S., Mitra T., Purohit G.K., Mohanty S., Mohanty B.P. (2015). Immunomodulatory effect of arsenic on cytokine and HSP gene expression in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish Shellfish Immunol.* 44, 43-9.

- Barron M.G. (2012). Ecological impacts of the deepwater horizon oil spill: implications for immunotoxicity. *Toxicologic Pathology* 40, 315-20.
- Bennett R.O. & Wolke R.E. (1987). The effect of sublethal endrin exposure on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. I. Evaluation of serum cortisol concentrations and immune responsiveness. *J. Fish Biol.* 31, 375-85.
- Betoulle S., Duchiron C. & Deschaux P. (2000). Lindane differently modulates intracellular calcium levels in two populations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune cells: head kidney phagocytes and peripheral blood leucocytes. *Toxicology* 145, 203-215.
- Birkett J.W. & Lester J.N. (2003) (Eds.). Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes. CRC Press, Boca Raton, Fla., U.S.A.. 295pp..
- Blanar C.A., Curtis M.A., Chan H.M. (2005). Growth, nutritional composition, and hematology of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) exposed to toxaphene and tapeworm (*Diphyllbothrium dendriticum*) larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 397-404.
- Bols N.C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.E.J. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 853-73.
- Boltaña S., Roher N., Goetz F.W., McKenzie S.A. (2011). PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1195-203.
- Bravo C.F., Curtis L.R., Myers M., Meador J.P., Johnson L.L., Buzitis J., Collier T.K., Morrow J.D., Laetz C.A., Loge F.J. & Arkoosh M.R. (2011). Biomarker response and disease susceptibility in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed a high molecular weight PAH mixture. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 1-11.
- Bruneau A., Turcotte P., Pilote M., Gagné F., Gagnon C. (2016). Fate of silver nanoparticles in wastewater and immunotoxic effects on rainbow trout. *Aquat.Toxicol.* 174, 70-81.
- Burnett K.G. (2005). Impact of environmental toxicants and natural variables on the immune system of fishes. In: Mommsen T.P. & Moon T.W. (Eds.). *Environmental Toxicology (Biochemistry and*

Molecular Biology of Fishes, Vol. VI). Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp. 231-53.

- Burton J.E., Dorociak I.R., Schwedler T.E. & Rice C.D. (2002). Circulating lysozyme and hepatic CYP1A activities during a chronic dietary exposure to tributyltin (TBT) and 3,3', 4,4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB-126) mixtures in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 65, 589-602.
- Carballo M., Muñoz M.J., Cuellar M., Tarazona J.V. (1995). Effects of waterborne copper, cyanide, ammonia and nitrite on stress parameters and changes in susceptibility to saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Appl. Environ. Microbiol. 61, 2108-12.
- Carlson E., Li Y., Zelikoff J. (2002). Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. Aquatic Toxicology 56, 289-301.
- Casanova-Nakayama A., Wenger M., Burki R., Eppler E., Krasnov A., Segner H. (2011). Endocrine disrupting compounds: Can they target the immune system of fish? Mar. Poll. Bull. 63, 412-6.
- Çelik E. S., Kaya H., Yilmaz S., Akbulut M., Tulgar A. (2012). Effects of zinc exposure on the accumulation, haematology and immunology of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Afr. J. Biotechnol. 12, 744-53.
- Chumchal M.M., Rainwater T.R., Osborn S.C., Roberts A.P., Abel M.T., Cobb G.P., Smith P.N., Bailey F.C. (2011). Mercury speciation and biomagnification in the food web of Caddo lake, Texas and Louisiana, USA, a subtropical fresh water ecosystem. Environ. Toxicol. Chem. 30, 1153-62.
- Clemons E., Arkoosh M.R., Caillas E. (1999). Enhanced superoxide anion production in activated peritoneal macrophages from English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to polycyclic aromatic compounds. Marine Environmental Research 47, 71-87.
- Clifford M.A., Bowen L., Stott J.L., Werner I., Hedrick R.P. (2014). Potential mechanisms in the early mortality of juvenile Chinook

- salmon exposed concurrently to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and esfenvalerate. Calif. Fish Game 100, 616-29.
- Clifford M.A., Eder K.J., Werner I., Hedrick R.P. (2005). Synergistic effects of esfenvalerate and infectious hematopoietic necrosis virus on juvenile chinook salmon mortality. Environ. Toxicol. Chem. 24, 1766-72.
- Coats J.R. (1990). Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroids insecticides. Environ. Health Perspect. 87, 255-262.
- Connelly H. & Means J.C. (2010). Immunomodulatory effects of dietary exposure to selected polycyclic aromatic hydrocarbons in bluegill (*Lepomis macrochirus*). International Journal of Toxicology 29, 532-45.
- Cox C. (1998). Permethrin insecticide fact sheet. J. Pest. Reform 18, 1-20.
- Cuesta A., Meseguer J., Esteban M.A. (2011). Immunotoxicological effects of environmental contaminants in teleost fish reared for aquaculture. In: Stoytcheva M. (Ed.). Pesticides in the modern world – Risks and benefits. IntechOpen, London, England, U.K.. pp. 241-66.
- Dai J., Zhang L., Du X., Zhang P., Li W., Guo X., Li Y. (2018). Effect of lead on antioxidant ability and immune responses of crucian carp. Biol. Trace Elem. Res. 186, 546-53.
- David M. & Kartheek R.M. (2015). Histopathological alterations in spleen of freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to sublethal concentration of sodium cyanide. Open Vet. J. 5, 1-5.
- Díaz-Resendiz K. J. G. and Girón-Pérez M. I. (2014). Effect of chlorpyrifos on the immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Revista Biociencias, vol. 3, no. 1, pp. 59-64.
- Duffy J. E., Carlson E., Li Y., Prophete C. & Zelikoff J.T. (2002). Impact of polychlorinated biphenyls (PCBs) on the immune function of fish: age as a variable in determining adverse outcome. Marine Environmental Research 54, 559-563.



- Duffy J.E. & Zelikoff J.T. (2006). The relationship between noncoplanar PCB-induced immunotoxicity and hepatic CYP1A induction in a fish model. *Journal of Immunotoxicology* 3, 39-47.
- Duffy J.E., Carlson E., Li Y., Prophete C. & Zelikoff J.T. (2003). Age-related differences in the sensitivity of the fish immune response to a coplanar PCB. *Ecotoxicology* 12, 251-259.
- Dunier M., Vergnet C., Siwicki A.K., Verlhac V. (1995). Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity: IV. Prevention of nonspecific immunosuppression by dietary vitamin C (ascorbate-2-polyphosphate). *Ecotox. Environ. Saf.* 30, 259-268.
- Dunier M. (1996). Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. *Ital. J. Zool.* 63, 303-9.
- Ecobichon D.J. (2001). Toxic effects of pesticides. In: Klaassen C.D. (Ed.). *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (6th edn.), Ch.22. McGraw-Hill, New York, N.Y., U.S.A.. pp.763-810.
- Eder K.J., Clifford M.A., Hedrick R.P., Köhler H.R., Werner I. (2008). Expression of immune-regulatory genes in juvenile Chinook salmon following exposure to pesticides and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol.* 25, 508-16.
- Eder K.J., Leutenegger C.M., Köhler H.R., Werner I. (2009). Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 182-190.
- F.A.O. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the sustainable development goals*. Rome, Italy. 227pp.. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Ghosh D., Datta S., Bhattacharaya S., Mazumder S. (2007). Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses in *Clarias batrachus*. *Aquat. Toxicol.* 81, 79-89.
- Girón-Pérez M.I., Velázquez-Fernández J., Díaz-Resendiz K., Díaz-Salas F., Cantomonte C., Medina-Díaz I., Robledo-Marengo M., Rojas-García A. & Zaitseva G. (2009). Immunologic parameters evaluations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to

- sublethal concentrations of diazinon. *Fish & Shellfish Immunology* 27, 383-5.
- Gorur F.K., Keser, R, Akcay N., Dizman S. (2012). Radioactivity and heavy metal concentrations of some commercial fish species consumed in the Black Sea Region of Turkey. *Chemosphere*, 87: 356.
- Grondel J.L., Gloudemans A.G.M., VanMuiswinkel W.B. (1985). The influence of antibiotics on the immune system. II. Modulation of fish leucocyte responses in culture. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 9, 251-60.
- Grondel J.L., Nouws J.F.M., VanMuiswinkel W.B. (1987). The influence of antibiotics on the immune system: immuno-pharmokinetic investigations on the primary anti-SRBC in carp, *Cyprinus carpio* L., after oxytetracycline injection. *J. Fish Dis.* 10, 35-43.
- Guardiola F.A., Cerezuela R., Meseguer J., Esteban M.A. (2012). Modulation of the immune parameters and expression of genes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by dietary administration of oxytetracycline. *Aquaculture* 334-7, 51-7.
- Han J.M., Park H.J., Kim J.H., Jeong D.S., Kang J.C. (2019). Toxic effects of arsenic on growth, hematological parameters and plasma components of starry flounder, *Platichthys stellatus*, at two water temperature conditions. *Fisheries and Aquatic Sciences* 22:3, 8pp..
- Hawkins S. J., Gibbs P. E., Pope N. D., Burt G. R., Chesman B. S., Bray S., Proud S. V., Spence S.K., Southward A. J., Langston W. J. (2002). Recovery of polluted ecosystems: the case for long-term studies. *Marine Environmental Research* 54, 215-22.
- Heath A.G. (1995). *Water pollution and fish physiology* (2<sup>nd</sup> Edn.). CRC Press, Boca Raton, Fla., U.S.A.. 359pp..
- Helfman G.S., Collette B.B., Facey D.E., Bowen B.W. (2009). *The diversity of fishes* (2<sup>nd</sup> Edn.). J. Wiley & Sons, Chichester, England, U.K.. 720pp..
- Hermann A.C. & Kim C.H. (2005). Effects of arsenic on zebra fish innate immune system. *Mar. Biotechnol.* 7, 494-505.

- Hoeger B., Hitzfeld B., Köllner B., Dietrich D.R., van den Heuvel M.R. (2005). Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. *Aquat. Toxicol.* 73, 79-90.
- Hogan N.S., Lee K.S., Köllner B. & van den Heuvel M.R. (2010). The effects of the alkyl polycyclic hydrocarbon retene on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response. *Aquatic Toxicology* 100, 246-254.
- Hrenchuk L.E., Blanchfield P.J. Paterson M.J. & Hintelmann H.H. (2012). Dietary and waterborne mercury accumulation by yellow perch: a field experiment. *Environ. Sci. Technol.* 46, 509-16.
- Huang P.C., Su P.H., Chen H.Y., Huang H.B., Tsai J.L., Huang H.I., S.L.Wang (2012). Childhood blood lead levels and intellectual development after ban of leaded gasoline in Taiwan: A 9-year prospective study. *Environment International* 40, 88-96.
- Hutchinson T.C. & Meema K.M. (Eds.) (1987). *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*. John Wiley & Sons, Chichester, England, U.K.. 360pp..
- Hutchinson T.H., Field M.D.R., Manning M.J. (2003). Evaluation of non-specific immune functions in dab, *Limanda limanda* L., following short-term exposure to sediments contaminated with polyaromatic hydrocarbons and/or polychlorinated biphenyls. *Marine Environmental Research* 55, 193-202.
- Iwanowicz L.R., Lerner D.T., Blazer V.S., McCormick S.D. (2005). Aqueous exposure to Aroclor 1254 modulates the mitogenic response of Atlantic salmon anterior kidney T-cells: Indications of short- and long-term immunomodulation. *Aquat. Toxicol.* 72, 305-14.
- Iwanowicz L.R., Blazer V.S., McCormick S.D., VanVeld P.A., Ottinger C.A. (2009). Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Aquat. Toxicol.* 93, 70-82.
- Jin Y., Chen R., Liu W. & Fu Z. (2010). Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebra fish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 28, 854-61.

- Kanwal Z., Raza M.A., Manzoor F., Riaz S., Jabeen G., Fatima S., Naseem S. (2019). A comparative assessment of nanotoxicity induced by metal (silver, nickel) and metal oxide (Cobalt, Chromium) nanoparticles in *Labeo rohita*. *Nanomaterials* 9,309-29.
- Karataş T. (2016). Effects of deltamethrin on some haematological parameters of brown trout (*Salmo trutta fario*). *Ind. J. Anim. Res.* 50, 89-92.
- Kaushik P. & Kaushik G. (2007). An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides. *J. Hazard. Mat.* 143, 102-111.
- Kaya H., Celik E. S., Yılmaz S., Tulgar A., Akbulut M., and Demir N., (2015). Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone. *Comp. Clin. Pathol.* 24, 497-507.
- Khoshbavar-Rostami H.A., Soltani M. & Hassan H.M.D. (2006). Immune response of great sturgeon (*Huso huso*) subjected to long-term exposure to sublethal concentration of the organophosphate, diazinon. *Aquaculture* 256, 88-94.
- Kim J.H. & Kang J.C. (2016). The immune responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii* for the stress by the exposure to the dietary lead (II). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 46, 211-6.
- Kim J. H., Park H. J., Kim K. W. and Kang J. C. (2017). Oxidative stress and non-specific immune responses in juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, exposed to waterborne zinc. *Fisheries and Aquatic Sciences.* 20, 11 (8pp.).
- Kimber I. & Dearman R.J. (2002). Immune responses: adverse versus non-adverse effects. *Toxicol. Pathol.* 30, 54-8.
- Kleinow K.M., Nichols J.W., Hayton W.L., McKim J.M., Barron M.G. (2008). Toxicokinetics in fishes. In: DiGiulio R.T. & Hinton D.E. (Eds.). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, Fla., U.S.A.. pp.55-152.
- Kodama H., Matsuoka Y., Tanaka Y., Liu Y., Iwasaki T., Watarai S. (2004). Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after exposure to anti-ectoparasitic

- chemicals used in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 589-97.
- Köllner B., Wasserrab B., Kotterba G. & Fisher U. (2002). Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – how can environmental influences be detected? *Toxicology Letters* 131, 83-95.
- Kumar R. & Banerjee T.K. (2016). Arsenic induced hematological and biochemical responses in nutritionally important catfish *Clarias batrachus* (L.). *Toxicol. Rep.* 3, 148-52.
- Lage C.R., Nayak A., Kim C.H. (2006). Arsenic ecotoxicology and innate immunity. *Integrative and Comparative Biology* 46, 1040-54.
- Lawrence K.P., Young A.R., Diffey B.L., Norval M. (2019). The impact of solar ultraviolet radiation on fish: Immunomodulation and photoprotective strategies. *Fish and Fisheries* 21, 104-19.
- Leaner J.J. & Manson R.P. (2004). Methylmercury uptake and kinetics in sheepshead minnows, *Cyprinodon variegatus*, after exposure to CH<sub>3</sub>Hg<sup>-</sup> spiked food. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2138-46.
- Lee J.W., Choi H., Hwang U.K., Kang J.C., Kang Y.J., Kim K.I., Kim J.H. (2019). Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review. *Environ. Toxicol Pharmacol.* 68, 101-8.
- Li X., Liu L., Zhang Y., Fang Q., Li Y. (2013). Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Chemosphere* 93, 428-33.
- Lin W., Guo H., Wang L., Zhang D., Wu X., Li L., Li D., Tang R. (2018). Nitrite enhances MC-LR-induced changes on splenic oxidation resistance and innate immunity in male zebrafish. *Toxins* 10, 512 (16pp.).
- Lundén T. & Bylund G. (2000). The influence of *in vitro* and *in vivo* exposure to antibiotics on mitogen-induced proliferation of lymphoid cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 10, 395-404.

- Lundén T. & Bylund G. (2002). Effect of sulphadiazine and trimethoprim on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85, 99-108.
- Luster M.I. (2014). A historical perspective of immunotoxicology. *J. Immunotoxicol.* 11, 197-202.
- Magnadóttir B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish shellfish Immunol.* 20, 137-51.
- Manning M.J. & Nakanishi T. (1996). The specific immune system: cellular defences. In: Iwama G. & Nakanishi T. (Eds.). *The fish immune system: organism, pathogen and environment*, pp.160-206. Academic Press, London, England, U.K..
- Milla S., Depiereux S., Kestemont P. (2011). The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review. *Ecotoxicology* 20, 305-19.
- Min B.H., Saravanan M., Nam S.E., Jin H.E., Rhee J.S. (2019). Waterborne zinc pyrithione modulates immunity, biochemical, and antioxidant parameters in the blood of olive flounder. *Fish & Shellfish Immunology* 92, 469-79.
- Montanha F.P., Fredianelli A.C., Wagner R., Sacco S.R., Rocha D.C.C., Pimpão C.T. (2014). Clinical, biochemical and haemathological effects in *Rhamdia quelen* exposed to cypermethrin. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 66, 697-704.
- Morcillo P., Esteban M.A., Cuesta A. (2017). Mercury and its toxic effects on fish. *AIMS Environ. Sci.* 4, 386-402.
- Morgan E. (2001). Regulation of cytochrome P450 by inflammation mediators: why and how? *Drug Metabolism and Disposition* 29, 207-212.
- Mosbaha A., Guerbe H., Boussett H., Banni M. (2017). Effects of dietary garlic against cadmium induced immunotoxicity in sea bass head, kidney and liver tissues: A transcriptomic approach. *J. Environ. Chem. Toxicol.* 1, 9-14.
- Mushak P. (2011). *Lead and Public Health (Trace metals and other contaminants in the environment, Vol.10)*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 990pp..

- Okocha R.C. & Adedeji O.B. (2011). Overview of Cadmium toxicity in fish. *J. Appl. Sciences Res.* 7, 1195-1207.
- Oliveira Ribeiro C.A., Rouleau C., Pelletier E., Audet C., Tjalve G. (1999). Distribution kinetics of dietary methylmercury in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Sci. Technol.* 33, 902-7.
- Oros D.R. & Werner I. (2005). Pyrethroid Insecticides: An Analysis of Use Patterns, Distributions, Potential Toxicity and Fate in the Sacramento-San Joaquin Delta and Central Valley. White Paper for the Interagency Ecological Program. SFEI Contribution 415. San Francisco Estuary Institute, Oakland, CA.
- Ottinger C.A. & Kaattari S.L. (2000). Long-term immune dysfunction in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed as embryos to aflatoxin B1. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 101-6.
- Özok N., Oğuz A.R., Kankaya E., Yeltekin A.C. (2018). Hemato-biochemical responses of Van fish (*Alburnus tarichi* Guldenstadt, 1814) during sublethal exposure to cypermethrin. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 24, 2240-6.
- Perales-Vela H.V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C. & Cañizares-Villanueva R.O. (2007). Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (*Chlorophyceae*). *Chemosphere*, 67(11): 2274-81.
- Perera P.A.C.T., Kodithuwakku S.P., Sundarabarathy T.V., Edirisinghe U. (2015). Bioaccumulation of Cadmium in freshwater fish: an environmental perspective. *Insight Ecology* 4, 1-12.
- Pickhardt P.C., Stepanova M. & Fisher N.S. (2006). Contrasting uptake routes and tissue distributions of inorganic and methylmercury in mosquitofish (*Gambusia affinis*) and redear sunfish (*Lepomis microlophus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2132-42.
- Pimental D. (2005). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environ. Develop. Sustain.* 7, 229-52.
- Pirrone N., Cinnirella S., Feng X., Finkelman R.B., Friedli H.R., Leaner J., Mason R., Mukherjee A.B., Stracher G.B., Streets D.G. & Telmer K. (2010). Global mercury emissions to the atmosphere

- from anthropogenic and natural sources. *Atmos. Chem. Phys.* 10, 5951-64.
- Prosser M.P., Unger M.A. & Vogelbein W.K. (2011). Multistressor interactions in the zebrafish (*Danio rerio*): concurrent phenanthrene exposure and *Mycobacterium marinum* infection. *Aquatic Toxicology* 102, 177-185.
- Quabius E.S., Krupp G. & Secombes C.J. (2005). Polychlorinated biphenyl 126 affects expression of genes involved in stress-immune interaction in primary cultures of rainbow trout anterior kidney cells. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 3053-3060.
- Randall P.M. & Chattopadhyay S. (2013). Mercury contaminated sediment sites – An evaluation of remedial options. *Environ. Res.* 125, 131-49.
- Regala R.P., Rice C.D., Schwedler T.E. & Dorociak I.R. (2001). The effects of tributyltin (TBT) and 3,3', 4,4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB-126) mixtures on antibody responses and phagocyte oxidative burst activity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40, 386-391.
- Rehberger K., Werner I., Hitzfeld B., Segner H., Baumann L. (2017). 20 Years of fish immunotoxicology – what we know and where we are. *Crit. Rev. Toxicol.* 47, 516-42.
- Reynaud S., Duchiron C., Deschaux P. (2001). 3-Methylcholanthrene increases phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity and intracellular calcium levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.) macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 175, 1-9.
- Reynaud S., Duchiron C., Deschaux P. (2003). 3-Methylcholanthrene inhibits lymphocyte proliferation and increases intracellular calcium levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquat. Toxicol.* 63, 319-331.
- Reynaud S. & Deschaux P. (2005). The effects of 3-Methylcholanthrene on lymphocyte proliferation in common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Toxicology* 211, 156-164.



- Reynaud S. & Deschaux P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* 77, 229-238.
- Reynaud S., Raveton M., Ravanel P. (2008). Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review. *Aquat. Toxicol.* 87, 139-45.
- Rice C.D. (2001). Fish immunotoxicology: understanding mechanisms of action. In: Schlenk D. & Benson W.H. (Eds.). *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*, Vol. 2. Taylor & Francis, London, England, U.K.. pp. 96-138.
- Rice K.M., Walker J.E.M., Wu M., Gillette C., Blough E.R. (2014). Environmental mercury and its toxic effects. *J. Prev. Med. Public Health* 47, 74-83.
- Rijkers G.T., Teunissen A.G., VanOosterom R., VanMuiswinkel W.B. (1980). The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 19, 177-189.
- Roales R.R. & Perlmutter A. (1977). The effects of sub-lethal doses of methylmercury and copper, applied singly and jointly on the immune response of the blue gourami to viral and bacterial antigens. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 5, 325-32.
- Rodgers D. W. & Beamish F. W. H. (1981). Uptake of waterborne methylmercury by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to oxygen consumption and methylmercury concentration. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 1309-15.
- Rymuszka A. & Adaszek Ł.(2013). Cytotoxic effects and changes in cytokine gene expression induced by microcystin-containing extract in fish immune cells – An *in vitro* and *in vivo* study. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1524-32.
- Sadiq M. (1992). *Toxic Metal Chemistry in Marine Environments*. Ch.6: Chromium in the Marine Environment. Marcel Dekker Inc., New York N.Y., U.S.A.. pp.154-197.
- Sahoo P.K. & Mukherjee S.C. (2001). Immunosuppressive effects of aflatoxin B<sub>1</sub> in Indian major carp (*Labeo rohita*). *Comp. Immunol., Microbiol. & Infectious Diseases* 24, 143-9.

- Sanchez-Dardon J., Voccia I., Hontela A., Chilmonczyk S., Dunier M., Boermans H., Blakley B., Fournier M. (1999). Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1492-7.
- Santore R. C., Mathew R., Paquin P. R., DiToro D. (2002). Application of the biotic ligand model to predicting zinc toxicity to rainbow trout, fathead minnow, and *Daphnia magna*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 133, 271-85.
- Saravanan M., Prablu Kumar K., Ramesh M. (2011). Haematological and biochemical responses of fresh teleost fish *Cyprinus caprio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. *Pest. Biochem. Physiol.* 100, 206-11.
- Savan R. & Sakai M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comp. Biochem. Physiol. D: Genomics Proteomics* 1, 89-101.
- Sazykina T.G. & Kryshev A.I. (2003). EPIC database on the effects of chronic radiation in fish: Russian/FSU data. *J. Environmental Radioactivity* 68, 65-87.
- Schlenk D., Celander M., Gallagher E.P., George S., James M., Kullman S.W., van der Hurk P., Willett K. (2008). Biotransformation in fishes. In: DiGiulio R.T. & Hinton D.E. (Eds.). *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, Fla., U.S.A.. pp.153-234.
- Schreck C.B. (1981). Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: Pickering A.D. (Ed.). *Stress and Fish*. Academic Press, New York, N.Y., U.S.A.. pp.295-321.
- Schuhmacher M., Bellés M., Rico A., Domingo J. L., Corbella J. (1996). Impact of reduction of lead in gasoline on the blood and hair lead levels in the population of Tarragona Province, Spain, 1990-1995. *Science of the Total Environment* 184, 203-9.
- Secombes C.J. & Wang T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. In: Austin B. (Ed.). *Infectious Disease in Aquaculture: Prevention and Control*. Woodhead Publishing, Cambridge, England, U.K.. pp. 3-68.

- Seemann F., Knigge T., Duflot A., Marie S., Olivier S., Minier C., Monsinjon T. (2015). Sensitive periods for 17 $\beta$ -estradiol exposure during immune system development in sea bass head kidney. *J. Appl. Toxicol.* 36, 815-26.
- Seemann F., Knigge T., Olivier S., Monsinjon T. (2015). Exogenous 17  $\beta$ -oestradiol (E2) modifies thymus growth and regionalization in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J. Fish Biol.* 86, 1186-98.
- Segner H., Wenger M., Möller A.M., Köllner B. & Casanova-Nakayama A. (2012a). Immunotoxic effects of environmental toxicants in fish – how to assess them? *Environmental Science and Pollution Research* 19, 2465-76.
- Segner H., Möller A.M., Wenger M., Casanova-Nakayama A. (2012b). Fish Immunotoxicology: Research at the crossroads of immunology, ecology and toxicology. In: *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry – Environmental Pollution and Ecotoxicology* (eds. M. Kawaguchi, K. Misaki, H. Sato, T. Yokokawa, T. Itai, T.M. Nguyen, J. Ono, S.Tanabe), pp. 1-12. Tokyo: TERRAPUB.
- Sevcicova M., Modra H., Slaninova A., Svobodova Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinarni Medicina* 56, 537-46.
- Shelley L.K., Balfry S.K., Ross P.S., Kennedy C.J. (2009). Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 92, 95-103.
- Silkworth J.B., Antrim L.A. & Kaminsky L.S. (1984). Correlations between polychlorinated biphenyl immunotoxicity, the aromatic hydrocarbon locus, and liver microsomal enzyme induction in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 75, 156-65.
- Simkiss K. & Taylor M.G. (1995). Transport of Metals Across Membranes. In: Tessier A. & Turner D.R. (Eds.). *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. IUPAC-Wiley. pp.1-44.
- Soltani M. & Pourgholam R. (2007). Lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharingodon idella*) following exposure to sublethal

- concentrations of organophosphate, diazinon. *Veterinary Research* 62, 50-2.
- Sovenyl J. & Szacolczal J. (1993). Studies on the toxic and immunosuppressive effects of cadmium on the common carp. *Acta Vet. Hung.* 41, 415-26.
- Storm J. E. (2012). Organophosphorus Pesticides. *In:* Bingham E. & Cohrssen B. (Eds.). *Patty's Toxicology, 6<sup>th</sup> Edn., 4<sup>th</sup> Vol.*. John Wiley & Sons. pp.1077-234.
- Subramani P.A., Hameed B., Michael R.D. (2015). Effect of UV-B radiation on the antibody response of fish – Implication on high altitude fish culture. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 143, 1-4.
- Thummabancha K., Onparn N., Srisapoome P. (2016). Analysis of hematologic alterations, immune responses and metallothionein gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to silver nanoparticles. *J. Immunotoxicol.* 13, 909-17.
- Trowsdale J. & Parham P. (2004). Defense strategies and immunity-related genes. *Eur. J. Immunol.* 34, 7-17.
- Ullah R., Zuberi A., Muhammad N., Ullah S. (2015). Toxicity to haematology and morphology of liver, Brains and gills during acute exposure of mahseer (*Tor putitora*) to cypermethrin. *Int. J. Agricult. Biol.* 17, 199-204.
- Ullah S., Zuberi A., Alagawany M., Farag M.R., Dadar M., Karthik K., Tiwari R., Dhama K., Iqbal H.M. (2018). Cypermethrin induced toxicities in fish and adverse health outcomes: its prevention and control measure adaptation. *J. Environ. Manag.* 206, 863-71.
- U.S. E.P.A. (2011). Pesticides Industry sales and Usage. 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.. 41pp..
- Vani T., Saharan N., Mukherjee S.C., Ranjan R., Kumar R., Brahmchari R.K. (2011). Deltamethrin induced alterations of hematological and biochemical parameters in fingerlings of *Catla catla* (Ham.) and their amelioration by dietary supplement of vitamin C. *Pest. Biochem. Physiol.* 101, 16-20.

- Vani T., Saharan N., Roy S.D., Ranjan R., Pal A.K., Siddaiah G.M., Kumar R. (2012). Alteration in haematological and biochemical parameters of *Catla catla* exposed to sub-lethal concentration of cypermethrin. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1577-84.
- Van Wallegghem J.L., Blanchfield P.J., Hintelmann H. (2007). Elimination of mercury by yellow perch in the wild. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5895-901.
- Velisek J., Svobodova Z., Machova J. (2009). Effects of bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 35, 583-90.
- Verma A.K., Pal A.K., Manush S.M., Das T., Dalvi R.S., Chandrachootan P.P., Ravi P.M., Apte S.K. (2007). Persistent sub-lethal chlorine exposure augments temperature induced immunosuppression in *Cyprinus carpio* advanced fingerlings. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 547-55.
- Vieira C.E.D. & dos Reis Martinez C.B. (2018). The pyrethroid  $\lambda$ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 210, 958-67.
- Voccia I., Krzystyniak K., Dunier M., Flipo D., Fournier M. (1994). In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicol.*, 29: 37-48.
- Wang J., Xiao J., Zhang J., Chen H., Li D., Liuqing Li, Cao J., Xi L., Luo Y. (2020). Effects of dietary Cu and Zn on the accumulation, oxidative stress and the expressions of immune-related genes in the livers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 100, 198-207.
- Wang X., Xing H., Li X., Xu S. & Wang X. (2011). Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$ 2b in immune organs of common carp. *Fish & Shellfish Immunology* 31, 126-133.
- Wedemeyer G.A. (1996). *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman & Hall, New York, N.Y., U.S.A.. 232pp..

- Wenger M., Sattler U., Goldschmidt-Clermont E., Segner H. (2011). 17beta-estradiol affects complement components and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) challenged by bacterial (*Yersinia ruckeri*) infection. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 90-7.
- Werner I. & Oram J. (2008). Pyrethroid insecticides conceptual model. Sacramento (CA) Delta Regional Ecosystem Restoration Implementation Plan., 1-43.
- Witeska M. (2005). Stress in fish – hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic J. Ichthyology* 1, 35-41.
- Wong C.K.C. & Wong M.H. (2000). Morphological and biochemical changes in the gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.* 48, 517-27.
- Wood C.M. (2001). Toxic responses of the gill. In: Schlenk D. & Benson W.H. (Eds.). *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*, Vol. 1. Taylor and Francis, London, England, U.K.. pp. 1-89.
- Wu S.M., Shih M.J., Ho Y.C. (2007). Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 145, 218-26.
- Wu X., Cobbina S. J., Mao G., Xu H., Zhang Z. and Yang L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 8244-59.
- Ye R.R., Lei E.N.Y., Lam M.H.W., Chan A.K.Y., Bo J., van de Merwe J.P., Fong A.C.C., Yang M.M.S., Lee J.S., Segner H.E., Wong C.K.C., Wu R.S.S., Au D.W.T. (2012). Gender-specific modulation of immune system complement gene expression in marine medaka *Oryzias melastigma* following dietary exposure of BDE-47. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 2477-87.
- Yılmaz F., Özdemir N., Demirak A., Tuna A. L. (2007). Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry* 100, 830-35.
- Zapata A., Diez B., Cejalvo T., Gutierrez-DeFrias C., Cortes A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 126-36.

Zeeman M.G. & Brindley W.A. (1981). Effects of toxic agents upon fish immune systems: a review. In: Sharma R.P. (Ed.). Immunologic considerations in toxicology, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Fla., U.S.A.. pp.1-60.

Zhao S., Feng, C., Quan, W., Chen, X., Niu, J. and Shen, Z. (2012). Role of living environments in the accumulation characteristics of heavy metals in fishes and crabs in the Yangtze River Estuary, China. Mar. Poll. Bull. 64, 1163-71.

## ΠΡΟΣΘΕΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Καραγκιοζίδου Ό. (2014). Μελέτη της κατανομής των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στα εισπνεύσιμα και αναπνεύσιμα αιωρούμενα σωματίδια αστικών περιοχών. Διπλωματική εργασία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Χημείας.
- Κουϊμτζή Θ., Φυτιάνου Κ., Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ. (1998). Χημεία Περιβάλλοντος. Εκδόσεις Επιστημονικών βιβλίων και περιοδικών University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Παρασκευοπούλου Β. (2009). Διακίνηση και χημική συμπεριφορά βαρέων μετάλλων σε θαλάσσια περιοχή επηρεαζόμενη από βιομηχανική ρύπανση (ΒΔ Σαρωνικός). Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Σκούλλος Μ. (2008). Χημική Ωκεανογραφία: Μια εισαγωγή στη χημεία του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Εκδ. Συμμετρία.
- Χαλκιαδάκη Ό. (2015). Αλληλεπίδραση Βαρέων Μετάλλων και Πρωτεϊνών σε Θαλάσσιους Βενθικούς Οργανισμούς. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας.

-----

[http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_benzopyrene.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_benzopyrene.htm)

<https://www.iatronet.gr/ygeia/iatriki-ergasias/article/345/kadmio.html> (τελευταία πρόσβαση 8/8/2020, 10:20)

The silver institute. Silver in nanotechnology  
[www.silverinstitute.org](http://www.silverinstitute.org) (τελευταία πρόσβαση 20:32, 19/7/2020).

Ετήσια έκθεση ΣΕΘ 2019.  
<https://www.fgm.com.gr/article.php?id=76> (τελευταία πρόσβαση 26/4/2020, 22:00)