

## Individuazione di biomarkers di stress ossidativo nel fegato di due specie ittiche autoctone del fiume Tevere

### *Evaluation of biomarkers of oxidative stress in liver of two autochthonous fish species from the Tiber River*

**Antonia Concetta Elia<sup>\*</sup>, Ambrosius Josef Martin Dörr,  
Maria Illuminata Taticchi**

Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Via Elce di Sotto, – 06100 Perugia

**RIASSUNTO** – La valutazione dello stress ossidativo mediante alcuni indici biochimici (biomarkers), glutazione S-transferasi (GST), glutazione perossidasi (Se-GPx), glutazione reductasi (GR), catalasi (CAT), gliossalasi (GI) e glutazione totale (GSH+2GSSG) è stata effettuata nel fegato di due specie ittiche autoctone del fiume Tevere, il barbo tiberino (*Barbus tyberinus* Bonaparte, 1839) e il cavedano (*Leuciscus cephalus* Linnaeus, 1758). Gli esemplari di ambedue le specie sono stati campionati in due siti, TEVE01 a monte e TEVE02 a valle, distanti tra di loro circa 35 km. In campo, sono stati registrati peso e lunghezza di ogni singolo individuo e prelevato il fegato. In laboratorio i tessuti epatici sono stati processati singolarmente e le analisi biochimiche sono state eseguite con metodi spettrofotometrici. Entrambe le specie ittiche hanno evidenziato livelli di Se-GPx, GST, GR e GI notevolmente più alti in TEVE01, rispetto a quelli campionati a valle. La concentrazione di GSH+2GSSG misurata nel barbo di TEVE01 era 3-4 volte più alta rispetto a quella di TEVE02, mentre la stessa nel cavedano ha evidenziato il più alto livello negli esemplari di TEVE02. L'attività enzimatica della CAT di entrambe le specie ittiche non ha mostrato nessuna differenza statisticamente significativa tra le due stazioni. I risultati di questa indagine indicano che le due specie sono esposte a fattori tossici che potrebbero provocare effetti nocivi, particolarmente nella stazione più a monte. Questi settori di fiume dovranno essere costantemente monitorati per poter intervenire precocemente e prevenire ogni possibile effetto nocivo sulle comunità ittiche.

**SUMMARY** - The evaluation of biochemical indexes like biomarkers of oxidative stress such as glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (Se-GPx), glutathione reductase (GR), catalase (CAT), glyoxalase I (GI), and total glutathione (GSH+2GSSG) was conducted in liver of two autochthonous fish species from the Tiber River. The Tiber barbell (*Barbus tyberinus* Bonaparte, 1839) and the European chub (*Leuciscus cephalus* Linnaeus, 1758) were collected from two sampling sites: one situated upstream (TEVE01) and one downstream (TEVE02). The distance from TEVE01 to TEVE02 is about 35 km. For each species were captured 10-11 specimens. In field, weight and length of each specimen were recorded and the liver removed. Each tissue was employed separately for biochemical assays. Both fish species evidenced levels of Se-GPx, GST, GR, GI markedly higher in TEVE01, compared to those from TEVE02. The concentration of GSH+2GSSG measured in *Barbus tyberinus* from TEVE01 was 3-4 times higher than that of TEVE02, while the thiol concentration of *Leuciscus cephalus* was higher in specimens of TEVE02. The enzymatic activity of CAT in both fish species was similar in all specimens from both sites. The results of this study indicate that both species are exposed to toxic factors which could induce harmful effects mainly at the sampling site TEVE01. These river sectors should be constantly monitored to allow an early intervention and to prevent any possible toxic effect on the fish community.

**Key words:** *Barbus tyberinus*, *Leuciscus cephalus*, Oxidative stress, Antioxidant enzymes, Glutathione, Tiber River, Liver, Biomonitoring.

\* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Facoltà di Scienze matematiche, fisiche e naturali, Università degli Studi di Perugia, Via Elce di Sotto, 8 - 06123 Perugia. Tel.: 075-5855717; Fax: 075-5855725; E-mail: elia@unipg.it

## INTRODUZIONE

Molti fattori abiotici agiscono da agenti proossidanti, in grado cioè di indurre l'aumento della concentrazione intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Quindi per valutare precocemente gli effetti negativi indotti da tali fattori è necessario anche l'applicazione di un monitoraggio, mediante biomarkers, mirato alla valutazione dello "stato di salute" delle specie bersaglio. Esse sono in grado di contrastare l'aumento dello stress ossidativo mediante induzione dei livelli di enzimi antiossidanti che possono essere in tal modo utilizzati come biomarkers di stress ossidativo (Winston & Di Giulio, 1991; Livingstone, 2001). Il glutatione ridotto (GSH) è un importante *scavenger* non enzimatico degli ossiradicali ed è coinvolto nel metabolismo di molti composti endogeni ed esogeni (Meister, 1989). Il tiolo è substrato o cofattore di diversi enzimi antiossidanti: glutatione perossidasi (GPx Se-dependent, EC 1.11.1.9), glutatione reduttasi (GR, EC 1.6.4.2); glutatione S-transferasi (GST, EC 2.5.1.18), gliossalasi I (GI, EC 4.4.1.5). L'azione detossificante della GST consiste nel catalizzare la coniugazione di differenti composti elettrofili, mutageni, carcinogeni ed altri composti chimici con il centro nucleofilo del glutatione ridotto (GSH) al fine di rendere gli xenobiotici facilmente eliminabili attraverso l'escrezione (Chatterje & Bhattacharya, 1984). Le GPx's sono enzimi antiossidanti coinvolti nella detossificazione dei metaboliti prodotti durante lo stress ossidativo (Winston & Di Giulio, 1991). Il sistema delle gliossalasi catalizza la detossificazione da  $\alpha$ -chetoaldeidi che si formano nei processi cellulari ossidativi. L' $\alpha$ -chetoaldeide più semplice, il metilgliossale (MG), si origina normalmente dal diidrossiacetone fosfato (DHAP) tramite la triosofosfato isomerasi;  $\alpha$ -chetoaldeidi più complesse si originano in condizioni di stress ossidativo, spesso in correlazione con la perossidazione dei fosfolipidi di membrana. La catalasi (CAT, EC 1.11.1.6) è un enzima biologicamente importante nella rimozione a livello cellulare dei perossidi di idrogeno, quali principali precursori dei radicali idrossilici, che sono forme molto più reattive e tossiche degli ossidiradicali (Halliwell & Aruoma, 1991).

Degli organismi acquatici i pesci sono tra i più ampiamente utilizzati negli studi di biomonitoraggio. Nel bacino umbro del fiume Tevere la zona del barbo presenta la più ampia estensione territoriale rispetto ad altre (Mearelli *et al.*, 1994). La scelta delle specie ittiche da monitorare si è quindi rivolta alle specie più rappresentative di questa zona, quali barbo tiberino (*Barbus tyberinus* Bp.) e cavedano (*Leuciscus cephalus* L). Le informazioni su distribuzione, ecologia e biologia di tali specie in Umbria sono già presenti in letteratura (Mearelli *et al.*, 1991; Mearelli *et al.*, 1994; Lorenzoni *et al.*, 1994). Quindi, gli obiettivi di questa ricerca consistono nel monitoraggio del fiume Tevere (tratto umbro) mediante l'utilizzo di biomarkers e valutarne complessivamente lo stato di conservazione. Le attività enzimatiche di glutatione S-transferasi (GST), glutatione reduttasi (GR), gliossalasi I (GI), gliossalasi II (GII), glutatione perossidasi Se-dipendente (Se-GPx), glutatione perossidasi Se-indipendente (GPx), glutatione reduttasi (GR), catalasi (CAT) e il livello di Glutatione totale (GSH+2GSSG) sono stati studiati nel fegato delle due specie.

## MATERIALI E METODI

### Campionamento

Lungo l'asse del fiume Tevere, nella provincia di Perugia, sono state scelte due stazioni: una a monte TEVE01, all'altezza del comune di San Giustino all'entrata del fiume in Umbria e TEVE02, a valle, sotto l'abitato di Umbertide nelle vicinanze della confluenza con il torrente Assino. La stazione TEVE01 si trova a 43 km di distanza dalle sorgenti, mentre quella di TEVE02 a 78 km, subito dopo la diga del lago di Montedoglio. Il campionamento è

stato condotto in luglio 2003. Per ognuna delle due specie sono stati campionati 11 esemplari nella stazione TEVE01 e 10-11 nella stazione TEVE02 (Tabella 1). Sul campo gli esemplari sono stati pesati, misurati e da tutti gli individui sono stati prelevati i fegati e processati singolarmente in laboratorio.

Stazione	Specie	N°	Lunghezza (cm) (media $\pm$ DS)	Peso (g) (media $\pm$ DS)
TEVE01	<i>Leuciscus cephalus</i>	11	28,5 $\pm$ 6,8	287,9 $\pm$ 171,4
	<i>Barbus tyberinus</i>	11	23,6 $\pm$ 2,8	140,3 $\pm$ 68,3
TEVE02	<i>Leuciscus cephalus</i>	11	23,7 $\pm$ 3,4	117,1 $\pm$ 61,4
	<i>Barbus tyberinus</i>	10	26,8 $\pm$ 4,2	169,6 $\pm$ 65,8

Tabella 1 - Media dei pesi e delle lunghezze degli esemplari campionati nel fiume Tevere.  
Table 1 - Weight and length of specimens sampled from Tiber River.

#### Analisi biochimiche

Per la determinazione del livello di glutazione 0,5 g di tessuto sono stati omogeneizzati in acido sulfosalicilico (5%) ed EDTA 4 mM. L'omogenato è stato lasciato in ghiaccio per 30 minuti e successivamente centrifugato a 30.000 g per 30 minuti a 4° C. Il supernatante è stato utilizzato per la determinazione del GSH+2GSSG, secondo il metodo enzimatico della GR (Akerboom & Sies, 1981). I valori riportati come nmol/g di tessuto sono il risultato delle medie delle concentrazioni ottenute.

Per le analisi enzimatiche, il tessuto del peso di 0,5-1 g circa è stato omogeneizzato in 100 mM di tampone TRIS pH 7,8, contenente 100  $\mu$ M di fenilmetilsulfonil-fluoride (PMSF), bacitracina e aprotinina. L'omogenato ottenuto è stato centrifugato per 15 minuti a 20.000 g e successivamente a 100.000 g per 60 minuti. Il sedimento è stato eliminato ed i supernatanti sono stati utilizzati per la determinazione delle attività enzimatiche (Elia *et al.*, 2000). L'attività enzimatica della Glutazione perossidasi (Se-GPx) è stata determinata usando l'acqua ossigenata H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come substrato, secondo il metodo di Lawrence & Burk (1976). In base a tale procedura, che consiste in un saggio enzimatico accoppiato, si determina l'ossidazione del NADPH a 340 nm in presenza di Glutazione riduttasi (GR) che catalizza la riduzione del GSSG prodotto dall'attività della Glutazione perossidasi (GPx). La reazione viene fatta iniziare con l'aggiunta di perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e il decremento del NADPH viene seguito spettrofotometricamente a 340 nm ( $\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La velocità di ossidazione non enzimatica è determinata in assenza di GPx ed è sottratta dalla velocità determinata in presenza dell'enzima. L'unità enzimatica di GPx è stata espressa come la quantità di enzima richiesto per ossidare 1  $\mu$ mole di NADPH al minuto nelle condizioni descritte. L'attività enzimatica della Glutazione S-transferasi (GST) è stata misurata secondo il metodo di Habig *et al.* (1974) usando il 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) come substrato. La miscela di reazione conteneva il tampone sodio fosfato pH 6,5 100 mM, CDNB 1 mM, GSH 1 mM e un'opportuna aliquota di campione. Una unità di enzima è definita come la quantità che produce 1  $\mu$ mol/min del tioetere dal CDNB ed è stata misurata spettrofotometricamente a 340 nm ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). L'attività della Glutazione riduttasi è stata determinata secondo il metodo di Chung *et al.* (1991) con alcune modifiche. Con tale metodica si valuta il decremento della concentrazione di NADPH dovuta alla sua

ossidazione in presenza di GSSG. La mistura di saggio contiene un volume finale di 1 ml: tampone sodio fosfato 100 mM pH 7, 1 mM GSSG, 60  $\mu$ M NADPH e campione. La reazione è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm ( $\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). L'attività enzimatica della Catalasi è determinata secondo il metodo di Greenwald (1985) usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  come substrato a 240 nm ( $\epsilon = -0,04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). L'attività della Gliossalasi I (GI) è stata determinata con il metodo di Oray & Norton (1977) modificato. In particolare è stata misurata la velocità iniziale della produzione di S-D-lactoilglutazione (LSG) dall'addotto emitioacetilico che si forma spontaneamente tra metilgliossale (MG) e GSH. La reazione è stata seguita spettrofotometricamente a 240 nm valutando la formazione del legame tioestere ( $\epsilon \text{ SLG} - \epsilon \text{ emitioacetale} = 3,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Un volume finale di 1 ml conteneva tampone 100 mM sodio fosfato pH 6,8, 1 mM GSH, 1 mM MG e campione. La determinazione delle proteine totali citosoliche è stata condotta con il metodo di Lowry *et al.* (1951).

#### Analisi statistiche

Per determinare le differenze nelle risposte epatiche dei campioni raccolti nelle diverse stazioni è stata utilizzata l'analisi della varianza a due vie (MANOVA) con il test di Tukey HSD, scegliendo come livello minimo di significatività  $P < 0,05$ .

## RISULTATI

Gli esemplari di barbo e cavedano di ambedue i sessi sono stati campionati nella fase post-riproduttiva. Poiché il campione era costituito in prevalenza da esemplari maschi (1-2 femmine per ogni stazione), esso è stato trattato senza distinzione tra sessi. Ambedue le specie delle stazioni TEVE01 e TEVE02 presentavano un buono stato sanitario. Come evidenziato nella Figura 1, gli esemplari di barbo e cavedano della stazione a monte (TEVE01) mostrano valori di GST più alti rispetto a quelli del TEVE02 (circa 100-150%).

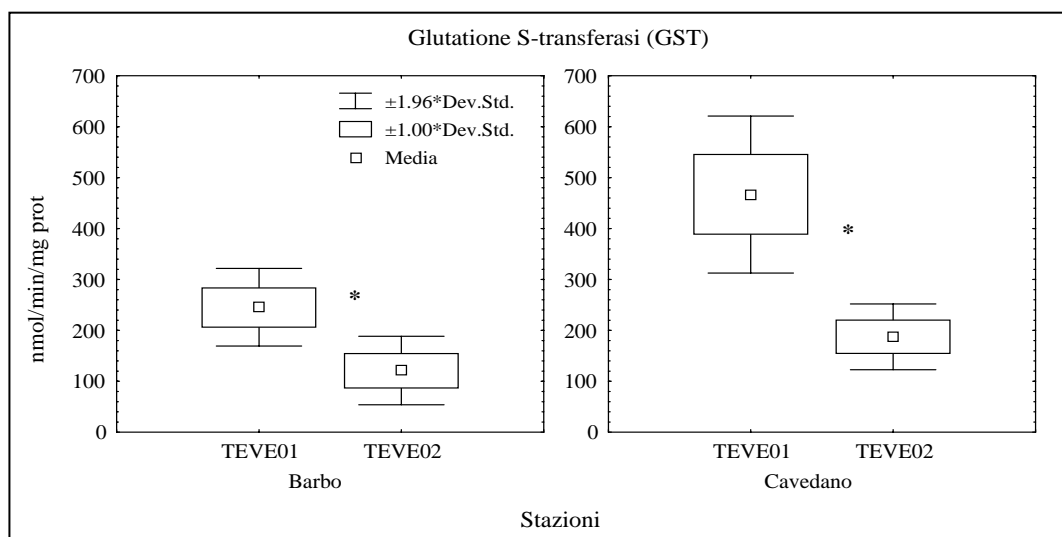


Figura 1 - Glutathione S-transferasi (GST) nel fegato di entrambe le specie ittiche campionate nelle due stazioni del fiume Tevere. L'asterisco (\*) evidenzia differenze statisticamente significative per  $P < 0,05$ .

Figure 1 - Glutathione S-transferase (GST) in liver of both fish species sampled from two sites of Tiber River. The asterisk (\*) evidences statistically significant differences.

La GI di ambedue le specie mostra valori più elevati in TEVE01 di +100%, rispetto a TEVE02 (Figura 2). La CAT (Figura 3) non mostra, differenze statisticamente significative tra gli esemplari di entrambe le specie nelle due stazioni.

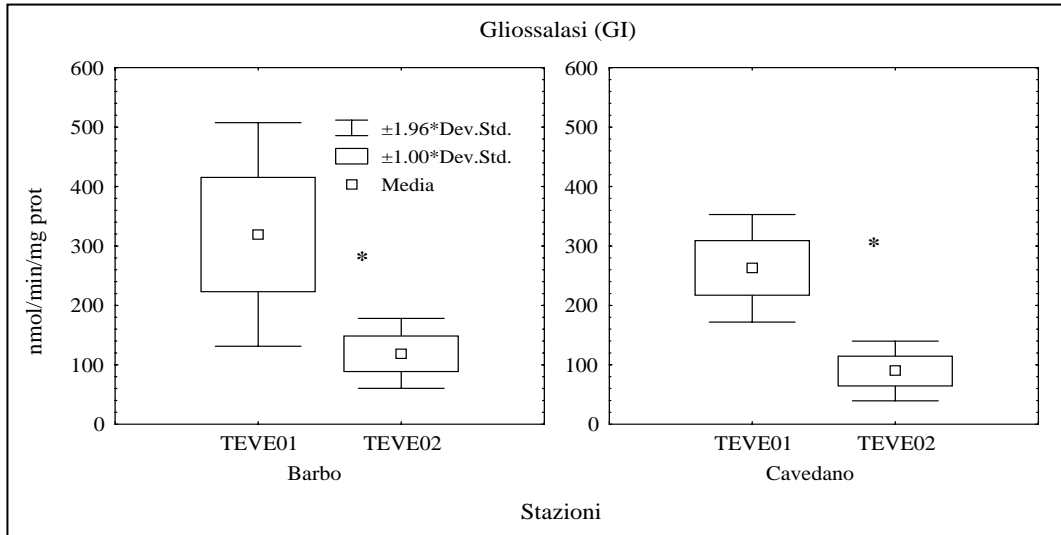


Figura 2 - Gliossalasi I (GI) nel fegato di esemplari di entrambe le specie ittiche campionate nelle due stazioni del fiume Tevere. L'asterisco (\*) evidenzia differenze statisticamente significative per  $P < 0,05$ .  
 Figure 2 - Glyoxalase I (GI) in liver of both fish species sampled from two sites of Tiber River. The asterisk (\*) evidences statistically significant differences.

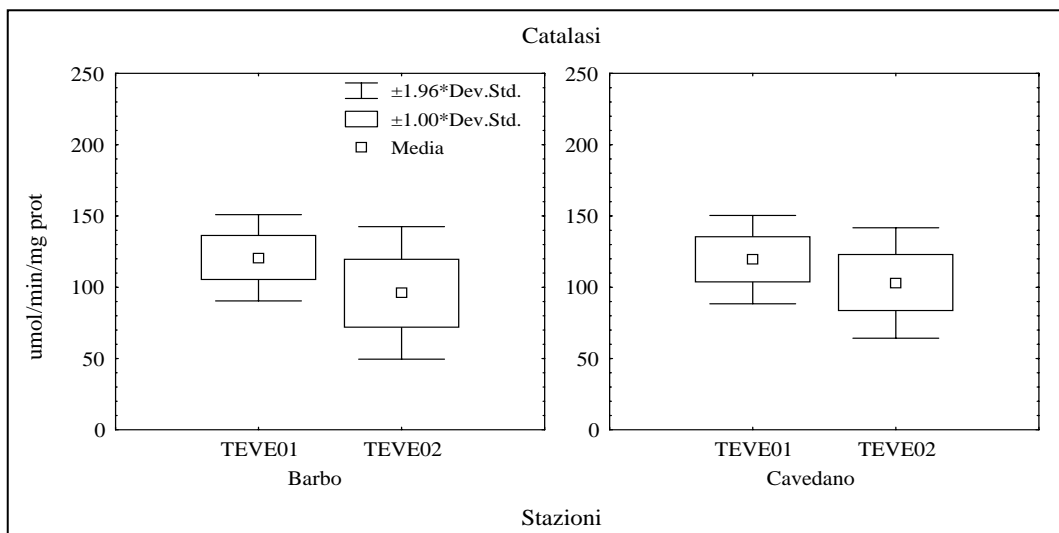


Figura 3 - Catalasi (CAT) nel fegato di esemplari di entrambe le specie ittiche campionate nelle due stazioni del fiume Tevere.  
 Figure 3 - Catalase (CAT) in liver of both fish species sampled from two sites of Tiber River.

La Se-GPx (Figura 4) è notevolmente più alta (6 volte) negli esemplari di barbo e cavedano di TEVE01 rispetto a quelli della stazione più a valle. Anche la GR mostra valori più alti di circa il doppio in entrambe le specie di TEVE01 (Figura 5).

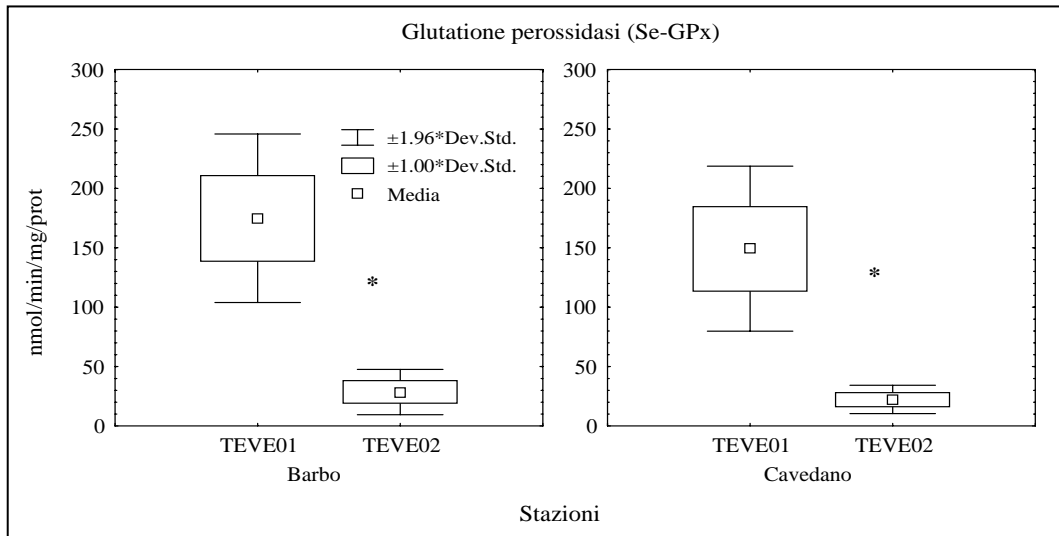


Figura 4 – Glutazione perossidasi (Se-GPx) nel fegato di entrambe le specie ittiche campionate nelle due stazioni del fiume Tevere. L’asterisco (\*) evidenzia differenze statisticamente significative per  $P < 0,05$ .

Figure 4 – Glutathione peroxidase (Se-GPx) in liver of both fish species sampled from two sites of Tiber River. The asterisk (\*) evidences statistically significant differences.

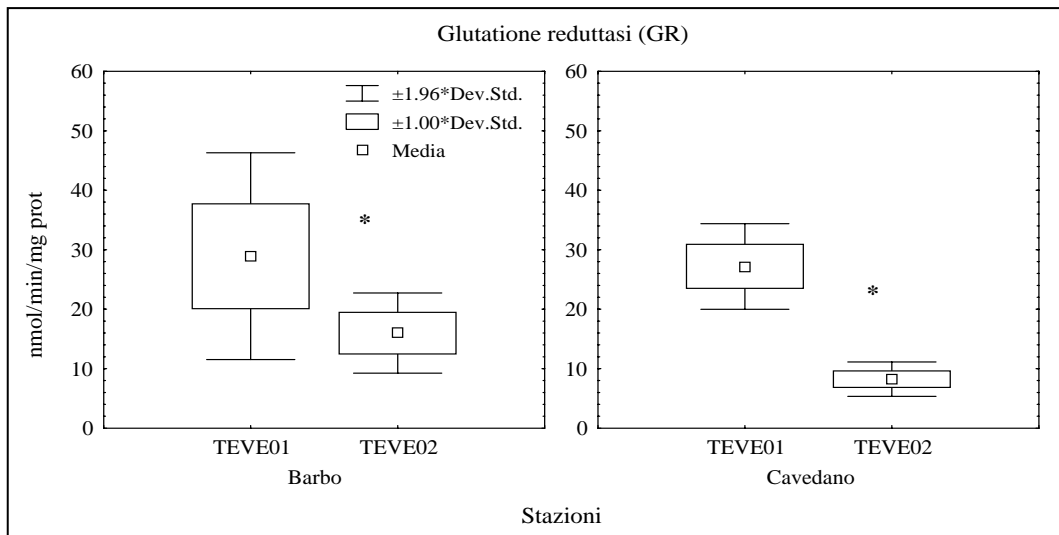


Figura 5 - Glutazione riduttasi (GR) nel fegato di entrambe le specie ittiche campionate nelle due stazioni del fiume Tevere. L’asterisco (\*) evidenzia differenze statisticamente significative per  $P < 0,05$ .

Figure 5 - Glutathione reductase (GR) in liver of both fish species sampled from two sites of Tiber River. The asterisk (\*) evidences statistically significant differences.

E' interessante notare che il livello di GSH + 2GSSG (Figura 6) nei barbi di TEVE01 è decisamente più alto rispetto a quello degli esemplari delle stazioni più a valle (3,7 volte), mentre un trend opposto è evidenziato dal cavedano di TEVE02.

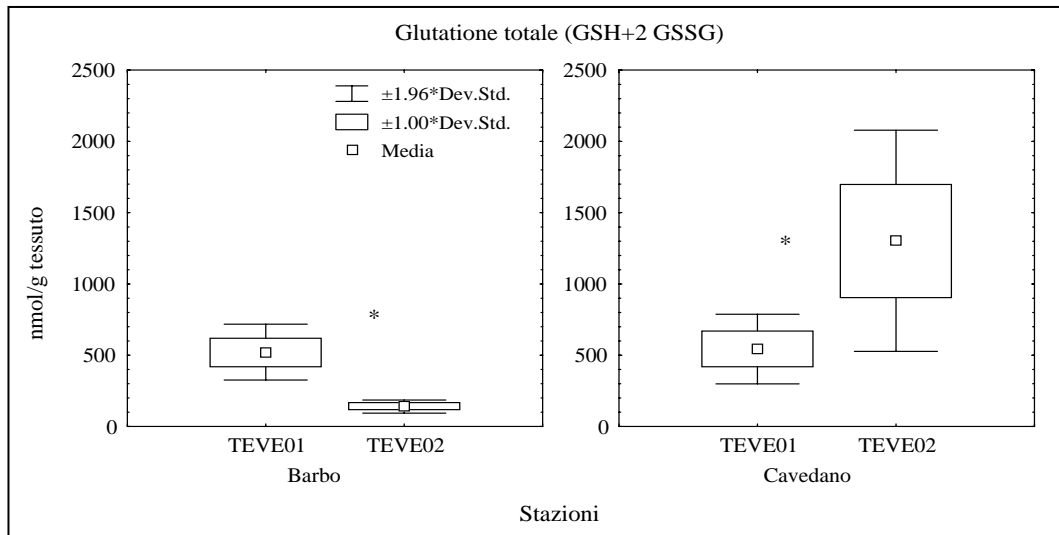


Figura 6 - Glutazione totale (GSH+2GSSG) nel fegato di entrambe le specie ittiche campionate nelle due stazioni del fiume Tevere. L'asterisco (\*) evidenzia differenze statisticamente significative per  $P < 0,05$ .

Figure 6 – Total glutathione (GSH+2GSSG) in liver of both fish species sampled from two sites of Tiber River. The asterisk (\*) evidences statistically significant differences.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La GST valutata nel tessuto epatico mostra un'attività enzimatica più alta in *Leuciscus cephalus* che in *Barbus tyberinus*, come indice di una più valida capacità di detossificazione della prima specie. Infatti, il cavedano è una specie ad ampia valenza ecologica dotata di notevole adattabilità ed è una delle specie maggiormente resistenti al degrado degli ambienti lotici. Ambedue le specie mostrano valori dell'enzima più bassi negli esemplari della stazione a valle (TEVE02), rispetto a quelli della stazione situata a monte dell'asta fluviale del Tevere (TEVE01). E' noto che l'enzima interviene nella detossificazione di inquinanti elettrofili e pertanto una più alta attività enzimatica, come evidenziata negli esemplari di TEVE01, riflette una condizione di stress ossidativo indotta da agenti proossidanti ai quali gli esemplari sono esposti. I nostri dati sembrano essere in accordo con quelli riportati da altri autori che, in studi di campo, hanno indicato per gli esemplari di *Leuciscus cephalus* esposti a metalli pesanti (Lenártová *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 2001) e per quelli di *Barbus plebejus* esposti a PCBs e PAHs (Vigano *et al.*, 1995) un'induzione della GST, rispetto agli esemplari dei siti di controllo. Le differenze di attività enzimatica nei due siti, potrebbero essere causate sia dalle diverse concentrazioni di inquinanti ai quali le specie erano esposte,

essere causate sia dalle diverse concentrazioni di inquinanti ai quali le specie erano esposte, che alla diversa portata delle due stazioni. L'invaso artificiale di Montedoglio, situato immediatamente a monte della stazione TEVE01, regola in modo uniforme durante l'anno la portata del Tevere, e quindi stabilizza, di conseguenza, anche i livelli di contaminazione in questa stazione. L'acqua in uscita dall'invaso, essendo prelevata in prossimità del fondo, probabilmente non solo ha valori di temperatura più bassi di quelli del Tevere a valle della diga, ma presenta anche alte concentrazioni di metalli pesanti. Infatti, le concentrazioni di arsenico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg) e piombo (Pb) misurati nel muscolo delle due specie ittiche di ambedue le stazioni, hanno indicato concentrazioni più alte di Cr e Hg negli esemplari di TEVE01. In particolare il barbo evidenzia livelli di bioaccumulo maggiore rispetto al cavedano (dati non pubblicati).

L'attività enzimatica di GI è stata utilizzata da altri autori come biomarker di stress ossidativo indotto da contaminanti ambientali in organismi acquatici (Regoli, 1998; Elia *et al.*, 2000; Elia *et al.*, 2001; Elia *et al.*, 2002, Elia *et al.*, 2003; Antognelli *et al.*, 2003; Elia *et al.*, 2006a; Elia *et al.*, 2006b) e non vi sono dati relativi alle due specie sopraccitate. Le differenti caratteristiche ambientali delle due stazioni sembrano influire notevolmente sull'attività specifica dell'enzima e la sua più alta attività negli esemplari di San Giustino, rappresenta, anche in questo caso, una risposta nei confronti dei metaboliti prodotti nei processi di perossidazione lipidica indotta da vari xenobiotici.

La Se-GPx, che evidenzia un'attività enzimatica simile a quella osservata per la GST in ambedue le specie ittiche, è notevolmente più alta in TEVE01 (circa 6 volte) rispetto a quella della stazione TEVE02 e ciò sembra essere il risultato di una differente concentrazione di fattori proossidanti nei due diversi settori.

Nelle due specie e nelle due stazioni si evidenziano valori simili di attività enzimatica di CAT e poiché tra gli esemplari di entrambe le stazioni nessuna differenza è stata riscontrata, l'enzima non è un marker sensibile per entrambe le specie.

Similmente alla Se-GPx, anche la GR è influenzata dalla diversa qualità ambientale riscontrata nelle due stazioni. Infatti, i più alti valori di questa attività enzimatica, di ambedue le specie in TEVE01, indicano una maggiore capacità dell'enzima di rigenerare la forma ridotta del glutatione (GSH) dalla forma ossidata (GSSG) e, di conseguenza, i maggiori livelli di tiolo, in questa stazione, indicano una maggiore necessità di detossificazione.

Generalmente, il livello di tiolo offre una prima linea di difesa nei confronti dello stress ossidativo; mentre un leggero stress ossidativo può indurre l'aumento della sintesi del GSH e delle attività enzimatiche detossificanti, quello più severo può causare l'ossidazione del GSH in GSSG e la conseguente deplezione delle attività enzimatiche glutatione-dipendenti con compromissione della stessa difesa antiossidante. Infatti, i risultati di alcuni studi di campo hanno riportato sia un'induzione che una deplezione di livello di glutatione nelle specie ittiche esposte a vari contaminanti ambientali, quali PAHs, PCBs e metalli pesanti, rispetto agli esemplari campionati da siti di controllo (van der Oost *et al.*, 2003).

La valutazione di biomarkers di stress ossidativo nelle due specie ittiche autoctone del fiume Tevere, barbo tiberino (*Barbus tyberinus*) e cavedano (*Leuciscus cephalus*) delle due stazioni, indica che nella stazione a monte entrambe le specie sono esposte maggiormente a fattori proossidanti che potrebbero provocare danni irreparabili. Questo settore di fiume dovrà quindi essere costantemente monitorato per poter intervenire precocemente nel risanamento ambientale, prevenendo ogni possibile effetto nocivo sulla comunità ittica. L'individuazione di *markers* biochimici in *Leuciscus cephalus* e *Barbus tyberinus* ha permesso di conoscere in maniera chiara lo stato di salute di questi esemplari e nell'insieme

può fornire indicazioni utili per la gestione e per l'eventuale recupero delle acque del fiume Tevere nel tratto indagato.

## RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è stato condotto in parte con il finanziamento della Provincia di Perugia, (2003) ed in parte con finanziamento MIUR (2003).

## BIBLIOGRAFIA

- Akerboom T.P.M. & Sies H. (1981). Assay of glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfide in biological samples. *Meth. Enzymol.*, 71: 373-382.
- Antognelli C., Romani R., Baldacchini F., De Santis A., Andreani G. & Talesa V. (2003). Different activity of glyoxalase system enzymes in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chem-Biol. Interact.*, 142: 297-305.
- Chatterje S. & Bhattacharya S. (1984). Detoxification of industrial pollutants by the glutathione-S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (Bloch.). *Toxicol. Lett.*, 22: 187-198.
- Chung P.M., Cappel R.E. & Gilbert H.F. (1991). Inhibition of glutathione disulfide reductase by glutathione. *Arch. Biochem. Biophysic*, 288: 48-53.
- Elia A.C., Anastasi V., Dörr A.J.M. (2006b). Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid, for superficial water potabilization. *Chemosphere*, in stampa.
- Elia A.C., Dörr A.J.M., Mantilacci L., Taticchi M.I. & Galarini R. (2000). Effects of mercury on glutathione-dependent enzymes in catfish (*Ictalurus melas* R.). In: Market B., Friese K., ed., "Trace metal in the environment", Elsevier Science Holland Biomedical Press, Amsterdam: 411-421.
- Elia A.C., Ludovisi A. & Taticchi M.I. (2001). Study of seasonal variations of Glutathione and detoxificant enzymes in *Lophopus crystallinus* Pallas (Bryozoa) from Piediluco lake (Umbria, Italy). *Ital. J. Zool.*, 68: 291-297.
- Elia A.C., Galarini R., Dörr A.J.M. & Taticchi M.I. (2006a). Bioaccumulation of heavy metals, organochlorine pesticides and detoxificant biochemical indexes in tissues of *Ictalurus melas* of Lake Trasimeno. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76: 132-139.
- Elia A.C., Galarini R., Taticchi M.I., Dörr A.J.M. & Mantilacci L. (2003). Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 55: 162-167.
- Elia, A.C., Waller, W.T. & Norton, S.J. (2002). Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 68: 809-816.
- Greenwald R.A. (1985). Handbook of methods for oxygen radical research. *CRC Press, Boca Raton, FL*.
- Habig W.H., Pabst M.J. & Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.

- Halliwell B. & Aruoma O.I. (1991). DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian system. *FEBS Lett.*, 281: 9-19.
- Lawrence R.A. & Burk R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophysical Res. Com.*, 71: 592-598.
- Lenàrtovà V., Holovska K., Pedrajas J.R., Martinez-Lara E., Peinado J., Lopez-Barea J., Rosival I. & Kosuth P. (1997). Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution. *Biomarkers*, 2: 247-252.
- Livingstone D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organism. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 656-666.
- Lopez P.A. Pinheiro T., Santos M.C., da Luz M.M., Collares-Pereira M.J. & Viegas-Crespo A.M. (2001). Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Sci. Tot. Environ.* 280: 153-163.
- Lorenzoni M., Mearrelli M., Carosi A., Giovinazzo G., Petesse M.L., Santucci A. & Bazzurro F. (1994). Indagini sulla rete idrica dell'alto bacino del F. Tevere (Italia centrale): Comunità ittiche. *Riv. Idrobiol.*, 33: 228-275.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Mearrelli M., Giovinazzo G., Lorenzoni M. & Costantini L. (1991). Contributo alla Carta Ittica della Regione Umbria: caratterizzazione ambientale e comunità ittiche di alcuni bacini del Tevere umbro. *Atti IV Convegno AIIAD, Riva del Garda (TN): 259-270.*
- Mearrelli M., Lorenzoni M., Giovinazzo G. & Petesse M.L. (1994). Carta ittica della regione Umbria: metodologie adottate e risultati. *Riv. Idrobiol.*, 33: 129-149.
- Meister A. (1989). On the biochemistry of glutathione. In: N. Taniguchi, T. Higashi, Y. Sakamoto and A. Meister (Eds), "Glutathione Centennial: Molecular perspectives and Clinical Implications" Academic Press, Inc., San Diego, California: 3-22.
- Oray B. & Norton S.J. (1977). Two step purification of mouse liver glyoxalase I and evidence of its dimeric constitution. *Biochem. Biophysical Acta*, 483: 203-208.
- Regoli F. (1998). Trace metal and antioxidant mechanisms seasonal variations in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 48-63.
- van der Oost R., Beyer J. & Vermeulen N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57-149.
- Vigano L., Arillo A., Melodia F., Bagnasco M., Bennicelli C. & De Flora S. (1995). Hepatic and biliary biomarkers in rainbow trout injected with sediment extracts from the river Po (Italy). *Chemosphere*, 30, 11: 2117-2128.
- Winston G.W. & Di Giulio R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19: 137-161.