

## ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και

Βιοτεχνολογίας

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»



Νίκη Ι. Ζερβού

«Επίδραση Ιχθυοτροφών Διαφορετικής Σύστασης στην  
Αποτοξικοποίηση του Οξολινικού οξέος και της Φλουμεκίνης στην  
Τσιπούρα (*Sparus aurata*)»

Φεβρουάριος 2013

**«Επίδραση Ιχθυοτροφών Διαφορετικής Σύστασης στην Αποτοξικοποίηση του  
Οξολινικού οξέος και της Φλουμεκίνης στην Τσιπούρα (*Sparus aurata*)»**

- ◆ κα Ευθυμία Κώτου  
Βιολόγος- Οικοτοξικολόγος  
Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας & Υδατοκαλλιεργειών ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε  
(Αγ.Κοσμάς)
- ◆ κα Μούτου Αικατερίνη  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- ◆ κος Μαμούρης Ζήσης  
Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της Διπλωματικής Μεταπτυχιακής Εργασίας μου, άλλοι με την επιστημονική τους ιδιότητα και καθοδήγηση και άλλοι με τη στήριξη σε πρακτικά ζητήματα.

Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά την κα Κώτου Ευθυμία, Εντεταλμένη Ερευνήτρια, Βιολόγο- Οικοτοξικολόγο, του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Είμαι ευγνώμων που δέχθηκε να υλοποιήσω το εργαστηριακό μέρος της Διπλωματικής μου Εργασίας υπό την επίβλεψή της, διότι στάθηκε σημαντική η συμβολή της στη γνώση που μου μετέδωσε, αλλά και γιατί στο σύντομο διάστημα της συνεργασίας μας διέθεσε χρόνο πέρα από τις προσωπικές της ερευνητικές δραστηριότητες.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ την κα Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για το ενδιαφέρον, τη βοήθεια και την καθοδήγηση σε κάθε στάδιο του ΠΜΣ.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον κο Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, που δέχθηκε να παρευρεθεί στην παρουσίαση της Διατριβής μου ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής. Ευχαριστώ τη Γεωργίου Στέλλα για την πρότερη συνεργασία και βοήθειά της και το Δ.Σ του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογία του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παράταση παράδοσης της εργασίας μου.

Τελευταίους άφησα τους ανθρώπους του στενού μου κύκλου, Κουναλάκη Λενιώ, Γεωργακά Κώστα, Μπρέστα Παναγιώτα και Κωνσταντίνου Κωνσταντίνα, που αποτέλεσαν αστείρευτη πηγή ηθικής υποστήριξης στο χρονικό των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	7
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	8
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	12
ABSTRACT.....	13
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>14</b>
1.1. Καλλιέργεια τσιπούρας ( <i>Sparus aurata</i> ).....	14
1.2. Τροφές που χρησιμοποιούνται στην Ιχθυοκαλλιέργεια .....	14
1.2.1. Αντικατάσταση τροφής- μια παγκόσμια ανάγκη .....	16
1.2.2. Ιχθυέλαιο έναντι Φυτικών ελαίων .....	17
1.3. Αντιβιοτικά- Χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων στην ιχθυοκαλλιέργεια .....	18
1.3.1. Κινολόνες.....	20
1.3.2. Φλουμεκίνη ( <i>Flumequine</i> ) .....	22
1.3.2.1. Φαρμακοκινητική και μεταβολισμός της Φλουμεκίνης .....	23
1.3.3. Οξολινικό οξύ ( <i>Oxolinic acid</i> ) .....	24
1.3.3.1. Φαρμακοκινητική και μεταβολισμός του Οξολινικού οξέος .....	25
1.3.4. Κατάλοιπα αντιβιοτικών στα καλλιεργούμενα είδη.....	25
1.4. Μηχανισμοί αποτοξικοποίησης.....	26
1.4.1 Φάσεις του Βιομετασχηματισμού .....	29
1.5. Ένζυμα και ο μηχανισμός δράσης του .....	30
1.5.1. EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase)- Κυτόχρωμα P450 .....	32
1.5.2. GST (γλουταθειόνη S- τρανσφεράση) .....	35
1.5.3. CAT (Καταλάση) .....	37
1.6. Σκοπός εργασίας .....	39
<b>2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</b>	<b>40</b>
2.1. Συνθήκες Πειράματος.....	41
2.2. Σύνθεση Τροφών.....	41
2.3. Δειγματοληψία .....	42
2.4. Προετοιμασία Δειγμάτων .....	42
2.5. Προσδιορισμός Πρωτεΐνης στα Δείγματα.....	43
2.5.1. Δημιουργία Πρότυπης Καμπύλης Ριζορουφίνης .....	44
2.6. Μέτρηση Δραστηριότητας Ενζύμου EROD .....	44
2.7. Μέτρηση Δραστηριότητας Ενζύμου GST.....	45
2.8. Μέτρηση Δραστηριότητας Ενζύμου CAT .....	46
2.9. Στατιστική Ανάλυση.....	48
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>49</b>
3.1. Δραστηριότητα του Ενζύμου EROD.....	49
3.2. Δραστηριότητα του Ενζύμου GST .....	51
3.3. Δραστηριότητα του Ενζύμου CAT.....	53
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>56</b>

<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>60</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>61</b>

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

- **Γράφημα 1:** Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης, που απεικονίζει τη σχέση απορρόφησης και συγκέντρωσης πρωτεΐνης ..... **43**
- **Γράφημα 2:** Πρότυπη καμπύλη ριζορουφίνης, που απεικονίζει τη σχέση συγκέντρωσης της ουσίας και φθορισμού..... **44**
- **Γράφημα 3:** Δραστηριότητα του ενζύμου EROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Οξολινικό οξύ μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης..... **49**
- **Γράφημα 4:** Δραστηριότητα του ενζύμου EROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Φλουμεκίνη μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης..... **50**
- **Γράφημα 5:** Δραστηριότητα του ενζύμου GST (nmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Οξολινικό οξύ μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης..... **51**
- **Γράφημα 6:** Δραστηριότητα του ενζύμου GST (nmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Φλουμεκίνη μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης..... **52**
- **Γράφημα 7:** Δραστηριότητα του ενζύμου CATALASE (Units/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Οξολινικό οξύ μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης ..... **53**
- **Γράφημα 8:** Δραστηριότητα του ενζύμου CATALASE (Units/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Φλουμεκίνη μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης..... **54**

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

- **Πίνακας 1:** Κινολόγες Α' και Β' γενεάς (Μούζουρας, pp 352).....**21**
- **Πίνακας 2:** Συγκέντρωση Φλουμεκίνης στο δέρμα και τους μύες της Πέστροφας (10 Ψάρια σε κάθε χρονικό σημείο) μετά από στοματική χορήγηση 12 mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα, ανά 12 ώρες (εκτός από 5 διαδοχικές ημέρες σε 2 ομάδες) Διατήρηση σε 7,4 ° C και 16,4 ° C, αντίστοιχα (FAO Food and Nutrition Papers, 1998).....**23**
- **Πίνακας 3:** Μέθοδοι ανίχνευσης της υποοικογένειας CYP1A στα ψάρια (Goksøyr and Husøy, 1998) .....**35**
- **Πίνακας 4.** Σύνθεση των τροφών Α και Β (%). .....**42**



## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

- ▶ **Εικόνα 1:** Πιθανό μεταβολικό μονοπάτι αποτοξικοποίησης μιας ξενοβιοτικής ουσίας που εισέρχεται στο κύτταρο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (Sheehan *et al.*, 2001).....**29**
- ▶ **Εικόνα 2:** Ο καταλυτικός κύκλος του κυτοχρώματος P450 (Segall, 1997) .....**32**
- ▶ **Εικόνα 3:** Αντίδραση αποαιθυλίωσης του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνη (ethoxyresorufin) μέσω των ενζύμων P450 1A1 (UNEP, 1999) .....**33**
- ▶ **Εικόνα 4:** Κρυσταλλογραφική δομή του ενζύμου γλουταθειόνη S- τρανσφεράση (Wikipedia, 2012).....**36**
- ▶ **Εικόνα 5:** Δομή γλουταθειόνης (GSH) (Thomas, 1999).....**36**
- ▶ **Εικόνα 6:** Κρυσταλλογραφική δομή του ενζύμου καταλάση (Wikipedia, 2012) .....**37**
- ▶ **Εικόνα 7:** Επίδραση καταλάσης στην αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Alfonso- Prieto *et al.*, 2012) .....**38**

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

**ADI:** αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη  
**ADP:** διφωσφορική αδενοσίνη  
**AhR:** υποδοχέας αρωματικών υδρογονανθράκων  
**ALDH:** αλδεϋδική αφυδρογονάση  
**ARA:** αραχιδονικό οξύ  
**Asp147:** ασπαραγίνη στη θέση 147  
**ATP:** τριφωσφορική αδενοσίνη  
**CAT:** καταλάση  
**CCRVDF:** κώδικας για τα κατάλοιπα των κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα  
**CDNB:** 1-γλωρο-2,4-δινιτροβενζένιο  
**CYP:** κυτόχρωμα P450  
**DHA:** εικοσιδυα-εξα-εν-οϊκό οξύ  
**DMSO:** διμεθυλσουλφοξείδιο  
**DNA:** δε (σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ  
**DTT:** διθειοθρεϊτόλη  
**DWI:** ημερήσιος δείκτης βάρους  
**EDTA:** αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ  
**EPA:** εικοσα-πεντα-εν-οϊκό οξύ  
**EROD:** 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (διαιθυλάση της 7 αιθοξυριζορουφίνης)  
**FAO:** διεθνής οργάνωση τροφίμων και γεωργίας  
**FARAD:** βάση δεδομένων αποφυγής καταλοίπων αντιβιοτικών στις ζωοτροφές  
**FCR:** λόγος μετατροπής ζωοτροφών  
**FDA:** διαχείριση τροφίμων και φαρμάκων  
**GMOs:** γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί  
**GSH:** γλουταθειόνη  
**GST:** S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης ή γλουταθειόνη S-τρανσφεράση  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** υπεροξείδιο του υδρογόνου  
**Hist74:** ιστοιδίνη στη θέση 74  
**HPLC:** υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης  
**K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:** διβασικό φωσφορικό κάλιο  
**KCl:** χλωριούχο κάλιο  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** μονοβασικό φωσφορικό κάλιο  
**LOC:** όριο ποσοτικοποίησης  
**LOD:** όριο ανίχνευσης  
**MATC:** μέγιστη αποδεκτή τοξική συγκέντρωση  
**MIC:** ελάχιστη συγκέντρωση ανάσχεσης  
**MRL:** μέγιστο όριο καταλοίπων  
**mRNA:** αγγελιαφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ  
**MROD:** 7-methoxyresorufin-O-demethylase (διμεθυλάση της 7 μεθοξυριζορουφίνης)  
**NaCl:** χλωριούχο νάτριο  
**NADPH:** φωσφορικό νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή)  
**PAH:** πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες  
**PCBs:** πολυχλωριωμένα διφαινύλια  
**PMSF:** φαινυλο-μεθυλο- σουλφονυλο-φθορίδιο  
**PUFA:** πολυακόρεστα λιπαρά οξέα  
**SGR:** ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  
**SULT:** σουλφοτρανσφεράση  
**Tris:** (υδροξυλο-μεθυλο) αμινομεθάνιο

**UDPGT:** UDPγλυκουρονυλ-τρανσφεράση  
**VFI:** εθελοντική πρόσληψη τροφής

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη, εκτιμήθηκε η επίδραση της μερικής αντικατάστασης του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια στο βιομετασχηματισμό και την αποτοξικοποίηση του οξολινικού οξέος και της φλουμεκίνης στην τσιπούρα (*Sparus aurata*). Τα ψάρια χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες, που διέφεραν ως προς το είδος της τροφής που καταναλώναν και ως προς τον αντιμικροβιακό παράγοντα που χορηγήθηκε. Η τροφή Α περιελάμβανε ιχθυέλαιο ως μοναδική πηγή λίπους, ενώ στην τροφή Β το 66% του ιχθυελαίου αντικαταστάθηκε από μίγμα φυτικών ελαίων (κραμβέλαιο, λινέλαιο και φοινικέλαιο). Στα ψάρια κάθε ομάδας χορηγήθηκε αντιμικροβιακός παράγοντας, οξολινικό οξύ ή φλουμεκίνη, μέσω της τροφής, στη δόση των 30 mg/kg/ημέρα για το οξολινικό οξύ και 75 mg/kg/ημέρα για τη φλουμεκίνη, για 7 ημέρες. Το ήπαρ των ψαριών συλλέχθηκε δύο ημέρες πριν την έναρξη χορήγησης του οξολινικού οξέος (ημέρα -2), μετά από πέντε μέρες χορήγησης του αντιβιοτικού (ημέρα 5) και τρεις μέρες μετά το τέλος της θεραπείας (ημέρα 8). Υπολογίστηκαν οι δραστηριότητες των ενζύμων 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και καταλάση (CAT).

Στα ψάρια, που έλαβαν την τροφή Α, η δραστηριότητα του ενζύμου EROD αυξήθηκε μετά από τη χορήγηση του οξολινικού οξέος και της φλουμεκίνης, ενώ επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα μετά τη διακοπή τους. Οι δραστηριότητες των ενζύμων GST και CAT στις ίδιες ομάδες ψαριών δεν εμφάνισαν σημαντική μεταβολή κατά τη χορήγηση του οξολινικού οξέος, σε αντίθεση με τις αυξήσεις που παρουσίασαν κατά τη χορήγηση της φλουμεκίνης και τη μείωση μετά τη διακοπή του αντιβιοτικού. Όταν στην τροφή το ιχθυέλαιο αντικαταστάθηκε από φυτικά έλαια (τροφή Β), δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της δραστηριότητας των ενζύμων EROD κατά τη χορήγηση και των δύο αντιβιοτικών. Οι δραστηριότητες των ενζύμων GST και CAT κατά τη χορήγηση του οξολινικού οξέος δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές, ενώ, κατά τη χορήγηση της φλουμεκίνης, αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της χορήγησης και μειώθηκαν μετά τη διακοπή της.

Συμπερασματικά, η μερική αντικατάσταση των φυτικών ελαίων στην τροφή της τσιπούρας έδειξε να επηρεάζει το βιομετασχηματισμό του οξολινικού οξέος και της φλουμεκίνης, γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, όταν αυτά επιλέγονται ως εναλλακτικές πηγές ελαίων.

**Λέξεις-κλειδιά:** *Sparus aurata*, ιχθυέλαια, φυτικά έλαια, οξολινικό οξύ, φλουμεκίνη, ένζυμα βιομετασχηματισμού, αποτοξικοποίηση.

## ABSTRACT

The effect of partial substitution of fish oil by vegetable oils in the biotransformation and detoxification of oxolinic acid was investigated in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Fish were divided into four groups, which differed in the type of food they consumed and in the type of antibiotic. Diet A contained fish oil as the only lipid source, while in diet B fish oil was partially replaced (66%) by a mixture of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oil). Fish of each group received a dosage of 30 mg oxolinic acid/kg/day or 75 mg flumequine/kg/day, for 7 days. Livers were sampled on days -2 (two days before the administration), 5 (after five days of antibiotic administration) and 8 (three days after the administration). Biotransformation enzyme activity, including 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), glutathione S-transferase (GST) and catalase (CAT) activity, was evaluated.

EROD activity was increased after administration of oxolinic acid and flumequine and reduced to the initial baseline after the end of the treatment in fish receiving diet A. In the same groups of fish, GST and CAT activity showed no significant fluctuation during the administration of oxolinic acid, in contrast to the increase observed during the administration of flumequine and the decrease after the suspension of the antibiotic. When fish oil was replaced by plant oil (diet B), no significant changes to EROD activity were observed during drug administration (both oxolinic acid and flumequine). No significant variation was recorded on the activity of GST and CAT during the administration of oxolinic acid, whereas the activity of both GST and CAT increased during the administration of flumequine and decreased after the treatment.

The results of the present study indicate that the use of vegetable oils in the diet of sea bream can affect the biotransformation of oxolinic acid, and that should be taken into account when they are selected as an alternative lipid source.

**Keywords:** *Sparus aurata*, fish oil, vegetable oils, oxolinic acid, biotransformation enzymes, detoxification.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Καλλιέργεια τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Το είδος της τσιπούρας αποτελεί στις μέρες μας μια από τις καλύτερες επενδυτικές δραστηριότητες στο χώρο της εκτροφής ψαριών της θάλασσας λόγω της ικανότητας ταχείας προσαρμογής και ανάπτυξης της σε τεχνητό περιβάλλον. Στον ελληνικό θαλάσσιο χώρο φτάνει το εμπορικό μέγεθος των 300-400gr στους 14-16 μήνες (Τυρπένου, 2002).

Η διατροφή της περιλαμβάνει μαλάκια, οστρακόδερμα, μικρά ψάρια και φύκη. Είναι ευαίσθητη στις χαμηλές θερμοκρασίες και στις χαμηλές συγκεντρώσεις του οξυγόνου (Χώτος και Ρογδάκης, 1992; Christofilogiannis, 1993). Επιπλέον είναι ένα είδος, που σε σχέση προς τα άλλα είδη θαλασσινού και γλυκού νερού, είναι λιγότερο ευαίσθητο στην αμμωνία. Έχει διαπιστωθεί, ότι επιβιώνει σε υψηλότερη συγκέντρωση και από την Μέγιστη Αποδεκτή Τοξική Συγκέντρωση (MATC) ολικής αμμωνίας ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ), η οποία είναι 4,8 - 8,2 mg/L (Wajsbrot *et al.*, 1993; Parra και Yufera, 1999).

Αποτελεί ένα εκτρεφόμενο είδος της Μεσογείου, το οποίο χαρακτηρίζεται από ταχύτερη ανάπτυξη ειδικά κατά τις θερμές περιόδους του χρόνου, μια ιδιότητα που της προσδίδει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον για τις εκτροφές ψαριών. Μια τσιπούρα 3 ετών μπορεί να φθάσει σε μήκος 40- 45 cm και βάρος 0,600 - 0,800 kg σε υφάλμυρα νερά και 25 - 30 cm με βάρος 0,400 – 0,500 kg σε αλμυρά νερά (Χώτος και Ρογδάκης, 1992; Paspatis *et al.*, 1999).

## 1.2. Τροφές που χρησιμοποιούνται στην Ιχθυοκαλλιέργεια

Τα ψάρια της ιχθυοκαλλιέργειας τρέφονται με τεχνητές ισορροπημένες πλήρεις ιχθυοτροφές που έχουν σύσταση ανάλογη των διατροφικών συνηθειών του κάθε είδους ψαριού στη φύση. Ανήκουν στην κατηγορία των ξηρών τροφών και παράγονται σε 2 μορφές αναλόγως του μεγέθους του εκτρεφόμενου ψαριού: σύμπηκτων (pellets) για τα μεγαλύτερα μεγέθη και κόκκου (granulated meal) για τις μικρές ηλικίες. Η διαδικασία παραγωγής τους περιλαμβάνει την προκατεργασία των νωπών πρώτων υλών που είναι κυρίως ιχθυάλευρα, ιχθυέλαια (fish meal και fish oil) και δημητριακά, την προσθήκη βιταμινών και ιχθυοστοιχείων (απαραίτητων για την φυσιολογική ανάπτυξη των ψαριών) και τέλος, αμύλου (starch) για την συγκόλληση των συστατικών μεταξύ τους.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης πλήρων τεχνητών ιχθυοτροφών είναι ότι: α) παράγονται σε εξειδικευμένες βιομηχανικές εγκαταστάσεις με χρήση σταθερών συνθηκών παραγωγής και πιστοποιημένων πρώτων υλών με αποτέλεσμα να είναι υγειονομικά ασφαλείς, β) διαθέτουν ελεγχόμενα φυσικά χαρακτηριστικά (σχήμα, μέγεθος, πυκνότητα, χρώμα) και γ) η σύνθεσή τους είναι ελεγχόμενη και άρα έχουν σταθερή και γνωστή διατροφική αξία και οργανοληπτικές ιδιότητες

Τέλος, ακριβώς επειδή οι τεχνητές ιχθυοτροφές έχουν σαν κύρια πρώτη ύλη το ιχθυάλευρο, το οποίο προέρχεται πάλι από ψάρια με αντίστοιχο προφίλ θρεπτικών ουσιών, πρωτεϊνών και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, διατηρούν στο ακέραιο τις πολύτιμες ιδιότητες που έχει το ψάρι ως τρόφιμο. Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια είναι τα κυριότερα συστατικά των ιχθυοτροφών με τις οποίες τρέφονται τα ψάρια της ιχθυοκαλλιέργειας διότι οι ιχθυοτροφές πρέπει να προσδίδουν στο εκτρεφόμενο ψάρι τις απαραίτητες για την ανάπτυξή του πρωτεΐνες και λίπη.

Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια προκύπτουν από την επεξεργασία (άλεσμα) ορισμένων ειδών πελαγικών ψαριών (μη εμπορικά είδη) τα οποία αλιεύονται κυρίως στον νότιο Ειρηνικό και βόρειο Ατλαντικό και δε χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη κατανάλωση, κυρίως λόγω του μικρού τους μεγέθους και της σκληρής σάρκας τους. Τα είδη αυτά των ψαριών, σχηματίζουν τεράστιους πληθυσμούς, πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και σε μεγάλους αριθμούς, μεγαλώνουν ταχύτατα και έχουν μικρή διάρκεια ζωής. Αλιεύονται σε μεγάλες ποσότητες και αποτελούν σπουδαιότατη πηγή άριστης ποιότητας πρωτεϊνών και ιχθυελαίου όχι μόνο για τις ανάγκες της παγκόσμιας ιχθυοκαλλιέργειας αλλά και της ζωικής παραγωγής εν γένει (κτηνοτροφία, πτηνοτροφία).

Συγκεκριμένα, εκτιμάται ότι η ετήσια παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρου είναι περίπου 6,5 εκατομμύρια τόνοι, εκ των οποίων μόνο τα 2 εκατομμύρια καταναλώνονται από την ιχθυοκαλλιέργεια. Αντιστοίχως, η ετήσια παραγωγή ιχθυελαίου είναι 1,2 εκατομμύρια τόνοι, εκ των οποίων η ιχθυοκαλλιέργεια καταναλώνει περίπου 450.000 τόνους.

Γενικά, η διατροφή των ιχθύων περιλαμβάνει πέντε κύρια συστατικά: πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες, χημικά στοιχεία και βιταμίνες. Τα ψάρια προσλαμβάνουν πρωτεΐνες με σκοπό να λάβουν τα αμινοξέα, που τις αποτελούν. Μετά από την πρόσληψη, οι πρωτεΐνες διασπώνται με τη βοήθεια των πεπτικών ενζύμων σε 20 αμινοξέα, τα οποία απορροφώνται στη συνέχεια από τον εντερικό βλεννογόνο και κατανέμονται με το αίμα σε όργανα και ιστούς. Τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών (κατά την ανάπτυξη και αναπαραγωγή), αλλά και την αντικατάσταση παλιών (διατήρηση) και είναι σημαντικά στην παραγωγή των ενζύμων. Από τα 20 αμινοξέα, τα 10 θεωρούνται απαραίτητα και πρέπει να περιλαμβάνονται στην τροφή, αφού τα ψάρια δεν μπορούν να τα συνθέσουν. Ωστόσο, στην τροφή θα πρέπει να υπάρχει ισορροπία μεταξύ απαραίτητων και μη απαραίτητων αμινοξέων, ώστε να μην υπάρχει πλεόνασμα κάποιων εις βάρος κάποιων άλλων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε έλλειψη ορισμένων αμινοξέων, απαραίτητων για την ανάπτυξη και τη λήψη ενέργειας, παρά το ότι τα επίπεδα των πρωτεϊνών στην τροφή είναι μέσα στα φυσιολογικά όρια. Επιπλέον, η λήψη ανεπαρκούς ποσότητας ή/και ποιότητας πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε καταβολισμό ορισμένων ιστών, για να διατηρηθεί η λειτουργία ζωικών ιστών, με αποτέλεσμα μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και απώλεια βάρους. Τέλος, η τροφή πρέπει να περιλαμβάνει αρκετά εύπεπτες πρωτεΐνες, ώστε να μειώνεται η ποσότητα του αζώτου, που εκκρίνεται (Wilson, 2002).

Τα λιπίδια θεωρούνται η κύρια πηγή ενέργειας για τα ψάρια, καθώς διαθέτουν τη διπλάσια ενέργεια ανά μονάδα βάρους, συγκριτικά με τις πρωτεΐνες. Είναι σημαντικά για το σχηματισμό της δομής του κυττάρου, τη διατήρηση της ακεραιότητας της μεμβράνης και τη διατήρηση της βέλτιστης υγείας, ανάπτυξης και αναπαραγωγής. Παρόλα αυτά, η υπερβολική περιεκτικότητα της τροφής σε λιπίδια μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μεγάλης ποσότητας λίπους στο σκελετό και, ιδιαίτερα, στη σπλαχνική κοιλότητα. Τα λιπίδια προμηθεύουν τα ψάρια με δύο λιπαρά οξέα, το λινολεϊκό (18:2 ω-6) και το λινολενικό οξύ (18:3 ω-3), τα οποία δεν μπορούν να συνθέσουν τα ψάρια και επομένως είναι απαραίτητη η πρόσληψή τους με την τροφή. Για το λόγο αυτό σημαντική είναι όχι μόνο η εξασφάλιση της σωστής ποσότητας των λιπιδίων στην τροφή, αλλά και το είδος αυτών, ώστε να εξασφαλίζεται η πρόσληψη των απαραίτητων λιπαρών οξέων (Morrow, 2003).

Τα λιπίδια των ψαριών των αλμυρών υδάτων είναι πλούσια σε μια μεγάλη ποικιλία κορεσμένων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία προκύπτουν από *de novo* σύνθεση, κάτι που δε συμβαίνει με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία πρέπει να

χορηγηθούν μέσω της τροφής. Τρία πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου, το εικοσα-πεντα-εν-οϊκό οξύ (EPA 20:5 ω-3), το εικοσιδυα-εξα-εν-οϊκό οξύ (DHA 22:6 ω-3) και το αραχιδονικό οξύ (ARA 20:4 ω-6), παρουσιάζουν πολύ σημαντικές λειτουργίες στα διάφορα είδη ψαριών, όπως και στα περισσότερα σπονδυλωτά.

Στα νεαρά άτομα τσιπούρας το επίπεδο των απαραίτητων λιπαρών οξέων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1,5-1,8% σε τροφές με 12-15% λιπίδια, με σκοπό να επιτευχθεί η βέλτιστη ανάπτυξη και αντίσταση στο στρες. Λαμβάνοντας υπόψη όλη την περίοδο ανάπτυξης και τα υψηλά επίπεδα λιπών στις εμπορικές δίαιτες, ποσοστό μεγαλύτερο από 2,5% επί της ξηράς ουσίας είναι αυτό, που συστήνεται για τα νεαρά άτομα τσιπούρας (Izquierdo, 2005).

Η ικανότητα των ψαριών να χρησιμοποιούν τους υδατάνθρακες ποικίλλει μεταξύ των ειδών. Η απουσία τους από την τροφή αυξάνει τον καταβολισμό άλλων συστατικών, όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια για ενέργεια και άλλων βιολογικών μορίων, που προέρχονται από τους υδατάνθρακες. Επίσης, οι υδατάνθρακες συμμετέχουν στις τροφές ως συνδετικό υλικό των συστατικών τους (Morrow, 2003).

Αν και οι βιταμίνες και τα ανόργανα στοιχεία δε χρησιμεύουν ως πηγές ενέργειας, είναι απαραίτητη η παρουσία τους, με σκοπό τη φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών. Τα ανόργανα στοιχεία είναι το ασβέστιο, μαγνήσιο, νάτριο, κάλιο, σίδηρος, ψευδάργυρος, χαλκός, σελήνιο και προσλαμβάνονται από τα ψάρια μέσω της τροφής, αλλά και από το εξωτερικό περιβάλλον τους. Τα στοιχεία αυτά είναι απαραίτητα στο σχηματισμό της δομής του σκελετού, στη μεταφορά ηλεκτρονίων, στη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας και στην ωσμωρρύθμιση. Επίσης, είναι σημαντικά στοιχεία των ορμονών και των ενζύμων.

### **1.2.1. Αντικατάσταση τροφής- μια παγκόσμια ανάγκη**

Με την ανάπτυξη του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας αυξάνεται η ζήτηση για τροφές που να είναι κατάλληλες για τη σωστή ανάπτυξη των εκτρεφόμενων ειδών. Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια είναι οι τύποι τροφής που χρησιμοποιούνται περισσότερο μέχρι σήμερα, κάτι που τείνει να διαφοροποιηθεί λόγω της παγκόσμιας μείωσης των ιχθυαποθεμάτων. Συγκεκριμένα, γίνονται προσπάθειες μείωσης του ποσοστού ιχθυάλευρων στις ζωοτροφές με σκοπό την τη βιωσιμότητα του κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας. Η έρευνα έχει εστιαστεί σε άλλες πηγές πρωτεϊνών που θα αντικαταστήσουν τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια, όπως φυτικές πρώτες ύλες, επιδιώκοντας, παράλληλα, τη διατήρηση των θρεπτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των καλλιεργούμενων ειδών.

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης. Οι περισσότερες είναι λιγότερο καλά προσαρμοσμένες στις απαιτήσεις των ψαριών, δεδομένου ότι δεν έχουν την ίδια θρεπτική αξία ούτε την ίδια γευστικότητα με τα ιχθυάλευρα. Επίσης, αν και έχουν δεσμευτικές ιδιότητες που επιτρέπουν την «συγκόλληση» με ένα σφαιρίδιο τροφής (pellet), η ενσωμάτωσή τους σε σύνθετα τρόφιμα είναι εντελώς διαφορετική.

Η κατασκευή των φυτικών γευμάτων ακολουθεί κανονισμούς που αφορούν στην αποφυγή μόλυνσης από μικροβιακούς, χημικούς, τοξικούς παράγοντες και στον έλεγχο του ποσοστού των GMOs στις πρώτες ύλες.

Μια μεγάλη ποικιλία των φυτικών συστατικών έχουν ήδη εξεταστεί για να βρεθεί το κατάλληλο υποκατάστατο ιχθυάλευρου, ανάλογα με το καλλιεργούμενο είδος. Στις περισσότερες μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί το λινέλαιο, σογιέλαιο, ηλιέλαιο, λινέλαιο, κραμβέλαιο, ελαιόλαδο και παραπροϊόντα όπως η γλουτένη, είτε αποκλειστικά είτε



σε συνδυασμό στη σύνθεση της τροφής για τα είδη με επίπεδα διαιτητικών λιπιδίων μεταξύ 10 και 12% (Elham *et al.*, 2009). Εκτός από τη γλουτένη, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες των φυτικών ελαίων είναι μικρότερη από αυτή των ιχθυάλευρων (60-70%), π.χ. 60% η γλουτένη και 45% η σόγια. Επίσης, ενώ οι φυτικές πρωτεΐνες είναι πλούσιες σε βιταμίνες, ορισμένα αμινοξέα ενδέχεται να υπάρχουν σε χαμηλές ποσότητες (λυσίνη, μεθειονίνη).

Τα φυτικά έλαια είναι λιγότερο εύπεπτα, οπότε για να αυξηθεί η πεπτικότητά τους και να περιοριστούν οι επιδράσεις των ανεπαρκώς εύπεπτων συστατικών ή ενώσεων που μειώνουν τη διατροφική αξία, γίνεται χρήση της θερμότητας, της πίεσης (εξώθηση) ή αποφλοιώνονται οι σπόροι των φυτών.

Αυτές οι αρνητικές ιδιότητες μπορούν, εντούτοις, να αντισταθμιστούν δημιουργώντας ένα μίγμα διαφόρων συστατικών στη σύνθεση της τροφής, προσαρμόζοντάς το ανάλογα με τα στοχευόμενα είδη ψαριών. Για παράδειγμα, στα σαλμονοειδή τα καλύτερα αποτελέσματα για την αντικατάσταση των ιχθυαλευρών έχουν ληφθεί με τροφή από σόγια. Για την πέστροφα και την τσιπούρα, έχει σημειωθεί πρόοδος με το συνδυασμό πρωτεϊνών από διαφορετικές φυτικές πηγές. Είναι δυνατή η αντικατάσταση του 75% του ιχθυάλευρων με ένα μίγμα ελαιοκράμβης, γλουτένης και αραβοσίτου. Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται ως συνδετικά είναι το αλγινικό, η καρραγίνη και το άγαρ.

Η χρήση των φυκών ή βακτηρίων ως πηγές πρωτεΐνης εξετάζονται επίσης, αλλά έχει γνωρίσει μικρή επιτυχία μέχρι τώρα, καθώς και τα παραπροϊόντα της παραγωγής της βιοαιθανόλης που είναι πλούσια σε πρωτεΐνες. Διότι θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η διαθεσιμότητα των πρώτων υλών ως υποκατάστατα, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η βιωσιμότητα της αλιείας και της ιχθυοκαλλιέργειας.

Εκτός, όμως, από πρωτεΐνες, τα ψάρια χρειάζονται βιταμίνες, ανόργανες ουσίες και λιπαρά οξέα για την αύξηση και ανάπτυξή τους. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσού είναι τα σημαντικότερα, ιδιαίτερα της n-3 σειράς, γνωστή ως ωμέγα-3, τα οποία αποτελούν μέρος των κυτταρικών μεμβρανών. Τα ψάρια έχουν πολύ μικρή ικανότητα να συνθέσουν αυτά τα λιπαρά οξέα από άλλους προδρόμους λιπιδίων, όπως το λινολενικό οξύ. Η τροφή πρέπει, συνεπώς, να περιέχει τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, στο 1% του συνόλου της διατροφής των εκτρεφόμενων ψαριών. Η ανάγκη αυτή μπορεί να καλύπτεται είτε με προσθήκη ιχθυελαίου στην δίαιτα στο τέλος του κύκλου εκτροφής ή με την προσθήκη μιας επαρκούς ποσότητας ιχθυαλευρού στην συνολική δίαιτα.

### 1.2.2. Ιχθυέλαιο έναντι Φυτικών ελαίων

Οι έρευνες για την αντικατάσταση των ιχθυοτροφών έχουν ενταθεί την τελευταία δεκαετία. Γίνεται προσπάθεια συνδυασμού διάφορων παραγόντων, όπως αναφέρθηκε, για την εφαρμογή μίας διατροφικής πρότασης στηριζόμενη σε φυτικά έλαια (Plant oil). Εκ των προτέρων, οι επιστήμονες γνωρίζουν πως όσο μεγαλύτερη συγγένεια έχει η παρασκευαζόμενη τροφή των καλλιεργούμενων ψαριών με την τροφή που επιλέγουν τα άγρια ψάρια τόσο πιο υγιής θα είναι η παραγωγή. Σε αυτό έρχεται να συγκρουστεί ο οικονομικός παράγοντας που θα καταστήσει μία ιχθυοκαλλιέργεια βιώσιμη. Έτσι, τα ιχθυέλαια και τα ιχθυάλευρα έγιναν «καθεστώς» στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών, που τώρα τείνουν να αντικατασταθούν, κυρίως, εξαιτίας της μείωσης των φυσικών αποθεμάτων και για να μειωθεί το κόστος παραγωγής. Μέχρι σήμερα διαφαίνονται κάποια θετικά στοιχεία στη χρήση φυτικών ελαίων, ενώ υπολείπονται σε άλλα που ακόμα δεν είναι γνωστές οι επιπτώσεις.

Οι Elham *et al.* (2009), έπειτα από μελέτες, έδειξαν ότι είναι δυνατή η υποκατάσταση του 60% των διατροφικών ελαίων σε είδη όπως το φαγκρί (*Pagrus pagrus*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*), από μίγματα τριών φυτικών ελαίων (ηλιέλαιο, βαμβάκελαιο και λινέλαιο ή σογιέλαιο). Παρατηρήθηκε, δηλαδή, ότι δεν υπήρχε σημαντική επίδραση στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (SGR), στον ημερήσιο δείκτη βάρους (DWI), ή στο λόγο μετατροπής ζωοτροφών (FCR) με την αλλαγή της διατροφής (Elham *et al.*, 2009; Mourente, 2006).

Εντούτοις, σε πείραμα με αντικατάσταση της τροφής, από φυτικά έλαια, στο καλκάνι (*Psetta maxima*), προκλήθηκε αύξηση του λινελαϊκού οξέος στην περίπτωση της σόγιας ή του κραμβέλαιου και αύξηση του λινολενικού οξέος στην περίπτωση του λινελαίου. Από την άλλη πλευρά, η μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων από την πρόσληψη της ιχθυελαίων οδήγησε σε ορισμένες αλλαγές των οργανοληπτικών ιδιοτήτων της σάρκας (Regosta *et al.*, 2003).

Ενώ η αντικατάσταση των ιχθυάλευρων από τη σόγια δείχνει να είναι μια καλή πηγή πρωτεΐνης για την τσιπούρα, το άλευρο σόγιας έχει κατώτερη θρεπτική αξία που πιθανόν να οφείλεται στη χαμηλή θερμική επεξεργασία του προϊόντος (Alexis, 1997).

Η απουσία των ιχθυελαίων στη διατροφή των ψαριών αντικατοπτρίζεται στο προφίλ των λιπαρών οξέων του πληθυσμού. Τα ψάρια που τρέφονται αποκλειστικά με βάση τα φυτικά έλαια, έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ωμέγα-3 (n-3) λιπαρά οξέα μακράς αλυσού από εκείνα που τρέφονται με ιχθυέλαια (Trattner, 2009). Γι' αυτό ενδείκνυται η εκ νέου αξιολόγηση των θετικών στοιχείων της αντικατάστασης (Alexis, 1997), διότι η ελάττωση των ωμέγα-3 δεν είναι επιθυμητή ιδιότητα ούτε για τη σωστή ανάπτυξη των ψαριών ούτε για τα οφέλη από την κατανάλωσή τους.

Σε άλλα πειράματα παρατηρήθηκε ότι η υιοθέτηση φυτικών πηγών διατροφής επηρεάζει συγκεκριμένα τη σύνθεση των λιπαρών οξέων των ιστών των ψαριών. Οι φυτοστερόλες και τοκοφερόλες που βρίσκονται στα φυτικά έλαια μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω επιπτώσεις στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Μολονότι οι φυτοστερόλες δε βρέθηκαν σε σημαντικές ποσότητες στους ιστούς των ψαριών, εικάζεται ότι μπορούν να ανταγωνιστούν με τη χοληστερόλη για θέσεις δέσμευσης και γι' αυτό υπάρχει μείωση στα επίπεδα χοληστερόλης. Ένα ακόμη δείγμα προσαρμογής των ψαριών στα νέα διατροφικά δεδομένα είναι η μείωση της κολυμβητικής τους ικανότητας στους 4°C (Pettersen, 2010).

Γενικότερα, ο στόχος δεν είναι μόνο να καταστεί εφικτή η αντικατάσταση των διαιτητικών συνηθειών των καλλιεργούμενων ειδών με τα απαραίτητα λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης για τη βέλτιστη ανάπτυξη, αλλά και να διατηρηθεί η ορθή ανοσολειτουργία στα ψάρια (Elham *et al.*, 2009).

### **1.3. Αντιβιοτικά- Χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων στην ιχθυοκαλλιέργεια**

Τα φάρμακα χρησιμοποιούνται στις εκτροφές ψαριών για την πρόληψη, την εξάλειψη και τη θεραπεία των νοσημάτων των ψαριών, τα οποία έχουν σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις στο κόστος της παραγωγής. Η χρησιμοποίησή τους στις εντατικές εκτροφές υπόκειται σε κανονισμούς, οι οποίοι ποικίλλουν ανάλογα με το είδος που πρόκειται να εκτραφεί και ανάλογα με την εθνική πολιτική της κάθε χώρας (Schneider, 1994).

Οι εγκεκριμένες αντιβακτηριακές ουσίες από τον FDA για χρήση από τους κτηνιάτρους, αναφέρονται στη βάση δεδομένων FARAD. Είναι ένα σύστημα πληροφόρησης σχεδιασμένο, για να πληροφορεί τους κτηνιάτρους, στο πώς να αποφεύγουν τα προβλήματα εμφάνισης καταλοίπων από τα κτηνιατρικά φάρμακα, τα

παρασιτοκτόνα και τους περιβαλλοντικούς ρύπους (Stoffregen *et al.*, 1996). Όσον αφορά τον αριθμό των χημικών ουσιών, οι οποίες χρησιμοποιούνται διεθνώς στην εκτροφή των ψαριών, έχει υπολογισθεί ότι, αν και ανέρχονται σε 50 περίπου, μόνο λίγες από αυτές είναι επίσημα εγκεκριμένες για χρήση στα ψάρια των εντατικών εκτροφών, γιατί τα υπάρχοντα τοξικολογικά δεδομένα είναι ελάχιστα και ελλιπή, ενώ απαιτούνται πολύ περισσότερα για την έγκρισή της κυκλοφορίας τους (Ruiter *et al.*, 1996). Αυτό οφείλεται στο ότι κάθε φαρμακευτική ουσία μαζί με όλους τους μεταβολίτες της πρέπει αρχικά να μελετηθεί φαρμακολογικά, τοξικολογικά, και βακτηριολογικά. Στη συνέχεια, αφού διαπιστωθεί ποια είναι η πλέον ασφαλής, σε συνδυασμό πάντα με την ποσοστιαία συμμετοχή της στα κατάλοιπα, καθορίζεται ως η ουσία κατάλοιπο δείκτης (marker residue). Είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, στην οποία βασίζεται ο προσδιορισμός του Μέγιστου Ορίου Καταλοίπων (Gingerich *et al.*, 1998). Η διαδικασία αυτή συμπεριλαμβάνει τη μελέτη ασφάλειας (Safety File) και τη μελέτη καταλοίπων (Residue File). Στην πρώτη εμπεριέχονται όλα τα φαρμακολογικά, τοξικολογικά και λοιπά αποτελέσματα της υπό μελέτη ουσίας, μαζί με την προτεινόμενη Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη (ADI) για τον άνθρωπο. Στη δεύτερη μελέτη εμπεριέχονται όλα τα δεδομένα, τα οποία έχουν σχέση με την παρουσία και την παραμονή των καταλοίπων στους ιστούς, μαζί με όλα τα αποτελέσματα και τα προτεινόμενα για αυτούς MRL (Τυρπένου, 2002).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση οι χημικές ουσίες οι οποίες είναι εγκεκριμένες για χρήση στα ψάρια των εντατικών εκτροφών είναι συγκεκριμένες, καθώς κι εκείνες για τις οποίες δεν είναι δυνατό να καθορισθεί MRL (απαγορευμένες) και συμπεριλαμβάνονται στα παραρτήματα του Κανονισμού (ΕΟΚ) 2377/90. Σε όλα σχεδόν τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης επιτρέπεται η χρησιμοποίηση των κινολονών πρώτης γενεάς όπως είναι η φλουμεκίνη και το οξολινικό οξύ.

Η χορήγηση των φαρμάκων κατά τη θεραπευτική αγωγή στα εκτρεφόμενα ψάρια γίνεται με τρεις τρόπους: με ένεση, με φαρμακευτικά λουτρά και με φαρμακούχο ιχθυοτροφή (Τυρπένου, 2002).

• **Ένεση:** Η ένεση αποτελεί την οδό χορήγησης του αντιβακτηριακού παράγοντα και των εμβολίων για τον έλεγχο των ασθενειών των γεννητόρων και για την ανοσοποίηση των νεαρών ψαριών. Όταν τα φάρμακα χορηγούνται με ένεση, το μεγαλύτερο ποσοστό τους παραμένει στον οργανισμό του ψαριού και έτσι η πιθανότητα να εισέλθουν στο περιβάλλον μειώνεται σημαντικά. Τα ψάρια στα στάδια αυτά της ζωής τους είναι πιθανόν είτε να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα πριν τον μεταβολισμό και την πλήρη απέκκρισή τους ή να μη χρησιμοποιηθούν για ανθρώπινη κατανάλωση. Για τον λόγο αυτό η ένεση είναι η πιο κατάλληλη μέθοδος χορήγησης των φαρμάκων στα ψάρια. Όμως, η χειρονακτική εργασία που απαιτείται και η καταπόνηση (στρες) των ψαριών περιορίζουν την εφαρμογή της.

• **Φαρμακευτικά λουτρά:** χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία κυρίως των εξωτερικών παρασιτώσεων των ψαριών, των νοσημάτων που οφείλονται σε βακτήρια και σε ιούς, για την αποτροπή των επιμολύνσεων.

• **Φαρμακούχος ιχθυοτροφή:** Η φαρμακούχος ιχθυοτροφή είναι ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης φαρμάκων στα ψάρια. Πραγματοποιείται με την ενσωμάτωσή τους στην ιχθυοτροφή. Η χορήγηση των φαρμάκων στα ψάρια μέσω του στόματος γίνεται πάντοτε λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα τροφής στη βιομάζα και την ενσωμάτωση του φαρμάκου σ' αυτήν σε ανάλογο ποσοστό. Αν και το σχήμα αυτό σε γενικές γραμμές είναι το πρότυπο, το ποσοστό αυτό μπορεί να αλλάξει. Επειδή τα ψάρια είναι ψυχρόαιμα ζώα, η δραστηριότητα και η διατροφή τους εξαρτώνται άμεσα από τη θερμοκρασία του νερού. Στην πράξη η χορηγούμενη ποσότητα τροφής στη βιομάζα κυμαίνεται από 0,5% έως 1%. Γνωρίζοντας την ποσότητα της τροφής, η οποία πρέπει

να καταναλωθεί ανά ημέρα και το ολικό βάρος των ψαριών (βιομάζα), μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του φαρμάκου, η οποία πρέπει να προστεθεί ανά χιλιόγραμμο τροφής. Το φάρμακο μπορεί είτε να ενσωματωθεί στην τροφή σε ειδικές εγκαταστάσεις (feed mill) ή να επικαλύψει τα σύμπηκτα (pellets). Η χρονική διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής, αν και ποικίλλει από χώρα σε χώρα, συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 5 και 14 ημερών (Schneider, 1994). Συνήθως, επειδή κατά τη διάρκεια μιας θεραπευτικής αγωγής η όρεξη των ασθενών ψαριών είναι μειωμένη, είναι εύλογο η φαρμακούχος τροφή να μην καταναλώνεται πλήρως και ποσότητες αυτής να διαφεύγουν προς το περιβάλλον. Οι ποσότητες αυτές ποικίλλουν από εκτροφή σε εκτροφή ανάλογα με τη μέθοδο διατροφής, την τεχνική της παρασκευής της και τη θεραπευτική αγωγή. Για τον περιορισμό των απωλειών αυτών πολλές μέθοδοι εφαρμόζονται, όπως είναι η διατροφή των ασθενών ψαριών με το χέρι αντί με αυτοματισμούς, η χρησιμοποίηση συστημάτων βίντεο κάτω από το νερό για τον έλεγχο της κατανάλωσης, η χρησιμοποίηση μηχανικών μέσων συλλογής και απομάκρυνσης της τροφής, που χάνεται στο περιβάλλον και η ρύθμιση της συχνότητας χορήγησης (Stephen και Iwama, 1998).

Για να είναι ορθολογική η χρησιμοποίηση των αντιβακτηριακών παραγόντων στις εκτροφές ψαριών, γενικά πρέπει να ακολουθούνται οι παρακάτω αρχές (Vollmer *et al.*, 1997):

- να χρησιμοποιούνται μόνο όταν η μόλυνση είναι επιβεβαιωμένη
- η θεραπεία να αρχίζει όσο το δυνατόν πιο γρήγορα, έχοντας οπωσδήποτε πάρει δείγματα για βακτηριολογικό έλεγχο
- να χρησιμοποιείται αντιβακτηριακός παράγοντας, όσο το δυνατόν στενότερου αντιβακτηριακού φάσματος, για να προστατευθεί η βακτηριακή χλωρίδα
- να αποφεύγεται η προληπτική αντιβακτηριακή θεραπεία
- να χορηγείται πάντα η σωστή δόση με την ορθή διάρκεια αγωγής, ώστε να διασφαλίζονται τα επιτρεπτά όρια καταλοίπων στους ιστούς
- να υιοθετηθεί η πολιτική της περιορισμένης και εκ περιτροπής χρήσης των αντιβακτηριακών ουσιών.

Η επιλογή του κατάλληλου αντιβακτηριακού εξαρτάται και από παράγοντες, οι οποίοι αφορούν την καλύτερη πρακτική, τη χρησιμοποίηση πάντα των εγκεκριμένων φαρμακευτικών ιδιοσκευασμάτων, αλλά και των παραγόντων, οι οποίοι συμβάλλουν στην ορθή επιλογή του, όπως (Vollmer *et al.*, 1997):

- η εμπειρία για την συγκεκριμένη ασθένεια
- οι πληροφορίες για τον υπεύθυνο μικροοργανισμό
- η τυχόν προηγούμενη εμπειρία στην εκτροφή
- η τυχόν παλαιότερη χρησιμοποίηση του φαρμάκου
- η ευαισθησία
- η ανάγκη της εκ περιτροπής χρησιμοποίησης
- οι χρόνοι απομάκρυνσης, όταν τα ψάρια πρόκειται να καταναλωθούν
- το κόστος, και
- το νομικό καθεστώς της χρησιμοποίησης του φαρμάκου στα ψάρια.

### 1.3.1. Κινολόνες

Οι κινολόνες είναι συνθετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες με μικροβιοκτόνο δράση. Η πρώτη κινολόνη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1964. Πρόκειται για το ναλιδιξικό οξύ (nalidixic acid), που αποτέλεσε τη βάση σύνθεσης μιας σειράς νέων αντιμικροβιακών ουσιών με παραπλήσια χημική δομή, αλλά σημαντικά καλύτερες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες.

Σήμερα οι κινολόνες ταξινομούνται με βάση το χρόνο εμφάνισης και τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες σε δύο γενεές, σύμφωνα με τον **Πίνακα 1**:

**Πίνακας 1:** Κινολόνες Α' και Β' γενεάς (Μούζουρας, pp 352).

<b>ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ Α' ΓΕΝΕΑΣ</b>	<b>ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ Β' ΓΕΝΕΑΣ</b>
Δραστικές κυρίως έναντι των κατά Gram αρνητικών. Εξαιρέση αποτελεί το Οξολινικό οξύ που δρα επίσης κατά των σταφυλόκοκκων	Διαθέτουν ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα που συμπεριλαμβάνει κατά Gram αρνητικά και θετικά βακτηρίδια, ψευδομονάδα και μυκοπλάσματα.
Nalidixic acid (Ναλιδιξικό οξύ)	Enrofloxacin (Ενροφλοξακίνη)
	Amifloxacin (Αμιφλοξακίνη)
	Danofloxacin (Δανοφλοξακίνη)
Flumequine (Φλουμεκίνη)	Enoxacin (Ενοξακίνη)
	Ciprofloxacin (Σιπροφλοξακίνη)
	Lomefloxacin (Λομεφλοξακίνη)
Oxolinic acid (Οξολινικό οξύ)	Norfloxacin (Νορφλοξακίνη)
	Pefloxacin (Πεφλοξακίνη)
	Ofloxacin (Οφλοξακίνη)
	Sparfloxacin (Σπαφλοξακίνη)
	Temafloxacin (Τεμαφλοξακίνη)
	Tosufloxacin (Τοσουφλοξακίνη)
	Fleroxacin (Φεροφλοξακίνη)

Οι λιπόφιλες ιδιότητες εξασφαλίζουν στις κινολόνες πολύ καλό βαθμό απορρόφησης από το γαστρεντερικό σωλήνα. Ο όγκος κατανομής (Vd) των κινολονών πρώτης γενιάς θεωρείται μέτριος, σε αντίθεση με τις κινολόνες δεύτερης γενιάς, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλο όγκο κατανομής.

Οι κινολόνες δρουν ως αναστολείς της σύνθεσης του DNA. Συγκεκριμένα αναστέλλουν τη δράση του μικροβιακού ενζύμου DNA-γυράση, το οποίο είναι απαραίτητο στη διαδικασία αναδιπλασιασμού του DNA. Η δράση των κινολονών είναι μικροβιοκτόνος. Ο θάνατος των μικροβίων επέρχεται μέσα σε 20-30 λεπτά, μετά την επαφή τους με την απαιτούμενη συγκέντρωση των κινολονών. Η Ελάχιστη Συγκέντρωση Ανάσχεσης (MIC) των φθοροκινολονών (ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin και ofloxacin) είναι εξαιρετικά χαμηλή συγκρινόμενη με την αντίστοιχη των υπόλοιπων αντιμικροβιακών.

Είναι χαρακτηριστικό ότι μετά την πτώση της συγκέντρωσης των φθοροκινολονών κάτω του MIC παρατηρείται υπολειμματική μικροβιοκτόνος δράση έναντι μερικών μικροβίων όπως *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, που διαρκεί 4-8 ώρες. Αντίθετα η αύξηση της συγκέντρωσης των κινολονών (κυρίως αυτών της α' γενιάς) πάνω από τα θεραπευτικά όρια (0,1-10 μg/ml) μειώνει αισθητά τη μικροβιοκτόνο δράση τους έναντι των ευαίσθητων σ' αυτές μικροβίων.

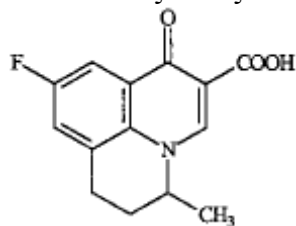
Η αλόγιστη χρήση των κινολονών στην κτηνιατρική προκαλεί την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Το φαινόμενο αυτό, που οφείλεται στην τροποποίηση του ενζύμου DNA-γυράση, είναι ιδιαίτερα συχνό στην περίπτωση των κινολονών πρώτης γενιάς. Πρέπει όμως να τονιστεί, ότι παρατηρείται διασταυρούμενη ανοχή μεταξύ των κινολονών. Αυτός είναι και ο κυριότερος λόγος για τη διστακτικότητα του FDA να εγκρίνει τη χρήση των νεότερων φθοροκινολονών στην κτηνιατρική.

Οι σημαντικότερες κινολόνες από πλευράς κλινικής εφαρμογής στην κτηνιατρική είναι η ενροφλοξακίνη, το οξολινικό οξύ και η φλουμεκίνη.

### 1.3.2. Φλουμεκίνη (Flumequine)

*Χημική ονομασία:* 9-φθορο-6,7-διδρο-5-μεθυλ-1-οξο-1H, 5H-βενζο [ij]-κινολιζινο-2-καρβοξυλικό οξύ.

*Συντακτικός τύπος:*



*Μοριακός τύπος:* C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>NFO<sub>3</sub>

*Μοριακό βάρος:* 261,26

*Καθαρό ενεργό συστατικό:* Φλουμεκίνη

*Μορφή:* Λευκή σκόνη μικροκρυσταλλική, άοσμη

*Σημείο τήξεως:* 253-255 °C

*Διαλυτότητα:* Διαλυτή σε υδατικά αλκαλικά διαλύματα και την αιθυλική αλκοόλη, αδιάλυτη στο νερό

*Οπτική περιστροφή:* Παράγεται και χρησιμοποιείται ως ένα ρακεμικό μίγμα

Η φλουμεκίνη είναι ένα φάρμακο πρώτης γενεάς της φθοροκινολόνης, ομάδας των αντιβιοτικών. Χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία των εντερικών λοιμώξεων σε κατοικίδια είδη. Η φλουμεκίνη έχει επίσης μια περιορισμένη χρήση στον άνθρωπο για τη θεραπεία των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος.

### 1.3.2.1. Φαρμακοκινητική και μεταβολισμός της Φλουμεκίνης

Σε πείραμα με 2 ομάδες αποτελούμενες από 200 πέστροφες, χορηγήθηκε φλουμεκίνη σε στοματικό μίγμα επί 5 συνεχείς ημέρες στους 7,4 ° C ή 16,4 ° C, αντίστοιχα, με ρυθμό 12 mg/ kg σωματικού βάρους/ ημέρα ανά διαστήματα 12 ωρών. Οι συγκεντρώσεις της φλουμεκίνης και της 7-hydroxyflumequine, μετρούμενη στους μύες και το δέρμα σε φυσικές αναλογίες, με τη μέθοδο HPLC (High pressure-performance- liquid chromatography), φαίνονται στον **Πίνακα 2**. Παρατηρήθηκε ότι η έλλειψη της 7-hydroxyflumequine σε κάθε δείγμα υποστήριξε την *in vivo* μελέτη η οποία κατέδειξε την απουσία μεταβολισμού της φλουμεκίνης από μικροσώματα ψαριών. Αυτή η παρατήρηση έγινε με βάση την υπόθεση ότι η φλουμεκίνη μεταβολίζεται στα ψάρια με τον ίδιο τρόπο που μεταβολίζεται στα θηλαστικά. Δεκατέσσερις ημέρες μετά τη διακοπή της φαρμακευτικής αγωγής δεν υπήρχαν κατάλοιπα φλουμεκίνης, και στις δύο θερμοκρασίες μελέτης (Caizergues *et al.*, 1995).

**Πίνακας 2:** Συγκέντρωση Φλουμεκίνης στο δέρμα και τους μύες της Πέστροφας (10 Ψάρια σε κάθε χρονικό σημείο) μετά από στοματική χορήγηση 12 mg / kg σωματικού βάρους / ημέρα, ανά 12 ώρες (εκτός από 5 διαδοχικές ημέρες σε 2 ομάδες) Διατήρηση σε 7,4 ° C και 16,4 ° C, αντίστοιχα (FAO Food and Nutrition Papers, 1998).

Χρόνος θανάτωσης μετά την τελευταία χορήγηση φλουμεκίνης (ημέρες)	Συγκεντρώσεις ιστού (mg/kg)	
	Θερμοκρασία 7.4°C	Θερμοκρασία 16.4°C
1	8.58-2.71	3.65-0.58
2	3.92-0.63	0.68-0.08
4	1.49-0.08	0.08-<LOQ
7	0.13-0.06	<LOD
14	<LOD	<LOD
21	<LOD	ΔΠ

LOQ=0.05mg/kg;

LOD = 0.018 mg/kg; ΔΠ = Δεν Προσδιορίστηκαν

Τα στοιχεία που παρουσιάζονται παραπάνω ελήφθησαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας (ανίχνευση φθορισμού) για τη φλουμεκίνη και το μεταβολίτη της, 7-hydroxyflumequine. Η χρωματογραφία διεξήχθη μετά από εκχύλιση υγρού-υγρού.

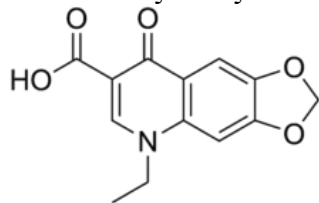
Οι μέγιστες συγκεντρώσεις καταλοίπων φλουμεκίνης στη χαμηλή θερμοκρασία βρίσκονται στο δέρμα / μύες της ομάδας ψαριών την 1<sup>η</sup> ημέρα (8,58 mg / kg) και

μειώνεται σε 1,49 mg / kg την 4<sup>η</sup> ημέρα, μετά τη διακοπή του φαρμάκου. Τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων στην ομάδα υψηλής θερμοκρασίας μετά την απόσυρση του φαρμάκου ήταν 3,65 και 0,08 mg / kg, αντίστοιχα και στους ίδιους χρόνους. Τέλος, δεν υπήρχαν κατάλοιπα φλουμεκίνης 14 ημέρες μετά τη διακοπή της φαρμακευτικής αγωγής σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες μελέτης.

### 1.3.3. Οξολινικό οξύ (Oxolinic acid)

*Χημική ονομασία:* 5-Ethyl- 8-oxo- 5,8-dihydro [1,3] dioxolo [4,5-g] quinoline- 7-carboxylic acid

*Συντακτικός τύπος:*



*Μοριακός τύπος:* C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>

Μοριακό βάρος: 261,23

Το οξολινικό οξύ ανήκει στις κινολόνες, που αποτελούν συνθετικά καρβοξυλικά οξέα. Έχει βακτηριοκτόνο δράση αναστέλλοντας το ένζυμο DNA-γυράση, που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των βακτηριακών πυρηνικών οξέων και για την αδιάσπαστη περιέλιξη των ελίκων του βακτηριακού DNA. Το οξολινικό οξύ είναι δραστικό εναντίον των λοιμώξεων που οφείλονται σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια, π.χ. *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Photobacterium* spp., *Yersinia* spp., *Pseudomonas* spp., κλπ.

Χορηγούμενο από το στόμα μετά από ανάμιξη με την ιχθυοτροφή, φθάνει γρήγορα σε υψηλά επίπεδα στο αίμα και στους ιστούς. Κυκλοφορεί σε προμίγματα (premix) 24% και 50%, τα οποία περιέχουν 240g και 500g οξολινικού νατρίου ανά 1000g σκευάσματος σε σκόνη αντιστοίχως. Συνιστάται να προηγείται της χορήγησης έλεγχος ευαισθησίας (αντιβιογράμμα) και να μη χορηγείται στα ψάρια πέραν των 10 ημερών χωρίς διακοπή. Το οξολινικό οξύ αποφεύγεται να συνδυάζεται με σκευάσματα που περιέχουν παράγωγα φουρανίων, τετρακυκλινών και σουλφοναμιδών.

Όπως αναφέρθηκε, τα προμίγματα οξολινικού οξέος χορηγούνται από το στόμα με την τροφή. Αυτό επιτυγχάνεται είτε μετά από ανάμιξή τους σε ιχθυέλαιο και στη συνέχεια με την τροφή, είτε μετά από διάλυσή τους σε λίγο νερό με το οποίο 'ποτίζεται' η τροφή, πριν την επικάλυψη με ιχθυέλαιο ως συνδετικό (top coating).

Η συνιστώμενη θεραπευτική δοσολογία στα θαλασσινά ψάρια του δραστικού συστατικού είναι 60mg/kg βιομάζας / ημέρα (ή 6g/100kg βιομάζας / ημέρα) για 7-10 ημέρες. Η αντίστοιχη δοσολογία επί 24% σκόνης premix είναι στα 25g/100kg βιομάζας / ημέρα (ή 250g/1000kg βιομάζας / ημέρα) για 7-10 ημέρες και επί 50% σκόνης premix στα 12g/100kg βιομάζας / ημέρα (ή 120g/1000kg βιομάζας / ημέρα) για 7-10 ημέρες.



### 1.3.3.1. Φαρμακοκινητική και μεταβολισμός του Οξολινικού οξέος

Το οξολινικό οξύ παρουσιάζει μια γρήγορη κατανομή και ικανοποιητική διείσδυση στους ιστούς της τσιπούρας. Προκειμένου να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου έχει πραγματοποιηθεί παρασκευή οξολινικού οξέος σε μορφή πολύ μικρών σωματιδίων, τα οποία παρουσιάζουν καλύτερη διάλυση. Αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας έχει επιτευχθεί και με χορήγηση του οξολινικού οξέος σαν εστέρας καρβιτόλης, κάτι που αυξάνει το λιπόφιλο χαρακτήρα του φαρμάκου. Ο χρόνος αναμονής του οξολινικού οξέος είναι 150 βαθμο-ημέρες (9 ημέρες από την τελευταία χορήγηση, εφόσον η θερμοκρασία του νερού δεν είναι χαμηλότερη από 17°C).

Σε έρευνα που έγινε σε ψάρια του είδους *Sparus aurata* και *Diplodus puntazzo*, εξετάστηκε η κατανομή του οξολινικού οξέος στους ιστούς, μετά από χορήγηση του φαρμάκου με την τροφή σε δόση 30mg/kg για 10 μέρες στους 19°C. Το οξολινικό οξύ παρουσίασε μία διφασική πορεία μείωσης στους ιστούς κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της ουσίας στην τσιπούρα παρατηρήθηκαν την ημέρα 4 (σε πλάσμα, μύες, δέρμα, ήπαρ και χολή), ενώ ο χρόνος ημιζωής εκτιμήθηκε στις 11-14 h στους ιστούς της τσιπούρας και 11-19 h στους ιστούς της χιόννας (Rigos *et al.*, 2003).

### 1.3.4. Κατάλοιπα αντιβιοτικών στα καλλιεργούμενα είδη

Η χρήση των αντιβακτηρικών παραγόντων στις εκτροφές ψαριών έχει ως αποτέλεσμα: α) την παρουσία καταλοίπων στα ψάρια, β) την ενδεχόμενη ανάπτυξη αντιβακτηριακής αντοχής και γ) την πρόκληση δυσμενών επιπτώσεων στο περιβάλλον (Reilly και Käferstein, 1997).

Σύμφωνα με τον Κανονισμό [ΕΟΚ] 2377/90, όπως τροποποιήθηκε, κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων είναι όλες οι φαρμακολογικά δραστικές ουσίες, έκδοχα ή προϊόντα αποδόμησης και μεταβολισμού, τα οποία ενδέχεται να παραμείνουν στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Όταν οι αντιβακτηριακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται κατά μη ορθολογικό τρόπο ή οι νομοθετημένοι χρόνοι απομάκρυνσης δε τηρούνται, τα κατάλοιπα στους εδώδιμους ιστούς αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τους καταναλωτές. Ειδικότερα ο κίνδυνος γίνεται μεγαλύτερος σε άτομα υπερευαίσθητα με αποτέλεσμα την εκδήλωση αλλεργικών αντιδράσεων και άλλων τοξικών φαινομένων. Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ο κίνδυνος, στον οποίο εκτίθενται οι καταναλωτές από τα κατάλοιπα, δεν είναι ο ίδιος με εκείνο που οφείλεται στη μητρική ουσία του φαρμάκου, επειδή η μητρική ουσία ενδέχεται να έχει υποστεί εκτενή μεταβολισμό στον οργανισμό του ζώου στο οποίο χορηγήθηκε. Έτσι, για την προστασία της Δημόσιας Υγείας, μετά την ολοκλήρωση των φαρμακολογικών, τοξικολογικών και λοιπών ελέγχων ασφάλειας του φαρμακευτικού προϊόντος, το επόμενο στάδιο που ακολουθεί είναι ο ορισμός της Αποδεκτής Ημερήσιας Πρόσληψης (ADI).

Σύμφωνα με την Επιτροπή του Κώδικα για τα Κατάλοιπα των Κτηνιατρικών Φαρμάκων στα Τρόφιμα (CCRVDF), το MRL αποτελεί τη μέγιστη εκείνη συγκέντρωση, η οποία είναι αποτέλεσμα της χρήσης ενός κτηνιατρικού φαρμάκου (σε mg/kg ή µg/kg του προϊόντος). Έτσι, προτείνεται από την Επιτροπή του Codex Alimentarius ως η νόμιμα επιτρεπόμενη ή αναγνωρισμένη συγκέντρωση ως αποδεκτή εντός ή επί του τροφίμου. Βασίζεται στην μορφή του καταλοίπου, το οποίο θεωρείται, ότι δεν ενέχει τοξικολογικούς κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου, όπως αυτό εκφράζεται από την ADI. Η ADI είναι η ποσότητα του κτηνιατρικού φαρμάκου σε σχέση με το σωματικό βάρος. Μπορεί να καταναλώνεται καθημερινά για όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου βάρους 60 kg χωρίς να προκαλεί αξιόλογους κινδύνους. Στη συνέχεια προσδιορίζονται τα MRLs. Το τελευταίο στάδιο είναι ο καθορισμός του χρόνου απομάκρυνσης (Withdrawal period), δηλαδή του χρόνου εκείνου ο οποίος παρέρχεται μεταξύ της τελευταίας χορήγησης ενός κτηνιατρικού φαρμάκου και της παραγωγής τροφίμων και με τη διαβεβαίωση ότι τα τρόφιμα αυτά δε περιέχουν κατάλοιπα σε συγκεντρώσεις οι οποίες να ξεπερνούν το MRL. Ο χρόνος απομάκρυνσης μιας φαρμακευτικής ουσίας, αφ' ενός μεν διαφέρει μεταξύ των ειδών των ψαριών και αφ' ετέρου δε, εξαρτάται από τη θερμοκρασία του νερού. Για το λόγο αυτό έχει υιοθετηθεί ο όρος βαθμοημέρα (degree day), ο οποίος υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη μέση θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια μιας ημέρας με τη διάρκεια σε ημέρες της θεραπευτικής αγωγής. Έτσι, π.χ. ένας χρόνος απομάκρυνσης 120 βαθμοημέρων σημαίνει 8 ημέρες για μια σταθερή θερμοκρασία 15°C. Γενικά, ο καθορισμός του χρόνου απομάκρυνσης απαιτεί συνεχείς μελέτες καταλοίπων κάτω από διάφορες συνθήκες με τη χρησιμοποίηση διαφόρων ειδών ψαριών, διαφόρων φαρμακευτικών προϊόντων και σε δύο θερμοκρασίες νερού, μιας υψηλής και μιας χαμηλής (Yndestad, 1993). Οι Ιωσηφίδου και Ψωμάς (1996) υποστηρίζουν πως το όλο πρόβλημα των καταλοίπων, που στην περίπτωση των ψαριών παρουσιάζεται σύνθετο, έχει ένα ενθαρρυντικό στοιχείο στον Ελλαδικό χώρο. Οι θερμοκρασίες των νερών της ελληνικής επικράτειας ευνοούν τη γρήγορη αποβολή των φαρμάκων από τα ψάρια. Ο χρόνος απομάκρυνσης των φαρμάκων πρέπει να είναι σύντομος. Θεωρητικά, δε θα πρέπει να υπάρχει πρόβλημα καταλοίπων, επειδή ένας τέτοιος σύντομος χρόνος απομάκρυνσης διευκολύνει τους εκτροφείς να τον τηρήσουν. Αυτό, βέβαια, δε μειώνει ούτε τη σπουδαιότητα του προβλήματος ούτε και την άμεση ανάγκη διερεύνησής του, καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων στις εντατικές εκτροφές στη χώρα μας.

Κάθε χρήση φαρμακευτικού προϊόντος στα ψάρια των εντατικών εκτροφών πρέπει πάντα να αναφέρεται στις αρμόδιες αρχές. Αυτό εφαρμόζεται στην Νορβηγία, όπου οι αρμόδιες αρχές, πριν τα ψάρια αλιευθούν για να διατεθούν στην αγορά, προβαίνουν σε δειγματοληψίες για να διαβεβαιώσουν την απουσία καταλοίπων στους εδάδιμους ιστούς (Brown και Gray, 1993).

#### **1.4. Μηχανισμοί αποτοξικοποίησης**

Η φαρμακοκινητική αποτελεί έναν από τους σπουδαιότερους κλάδους της φαρμακολογίας, καθώς ασχολείται με την τύχη του φαρμάκου στον οργανισμό από την στιγμή της χορήγησης μέχρι την απομάκρυνσή του από αυτόν. Κατά τη διάρκεια της διαδρομής αυτής το φάρμακο διέρχεται από τα εξής βασικά στάδια: της απορρόφησης, της κατανομής, του μεταβολισμού και της αποβολής (Holford και Benet, 1995).

Η διαδικασία, με την οποία ένα φάρμακο περνά από το σημείο χορήγησης στο κυκλοφορικό σύστημα και από εκεί στα σημεία δράσης, ονομάζεται απορρόφηση.

Πρόκειται για τη μετακίνηση του φαρμάκου δια μέσου μιας σειράς βιολογικών μεμβρανών, οι οποίες λειτουργούν ως ανατομικοί φραγμοί (τοιχώματα εντέρου, τοιχώματα αιμοφόρων αγγείων, κυτταρικές μεμβράνες). Πρέπει να τονισθεί, ότι η απορρόφηση των φαρμάκων από το γαστρεντερικό σύστημα των ψαριών δεν είναι ανάλογη με εκείνη των θηλαστικών (Schneider, 1994). Η απορρόφηση των φαρμάκων γίνεται με την παθητική διάχυση, μια διαδικασία, η οποία δεν απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, αλλά προϋποθέτει την ύπαρξη διαφοράς στη συγκέντρωση της υπό διάχυση ουσίας στις δύο πλευρές της μεμβράνης. Η ταχύτητα της διάχυσης είναι ανάλογη και με τη λιποδιαλυτότητα του φαρμάκου. Επειδή όμως η λιποδιαλυτότητα μιας οργανικής ουσίας έχει άμεση σχέση και με τον βαθμό του ιονισμού της, η παθητική διάχυση επηρεάζεται σημαντικά και από αυτόν τον παράγοντα, εφόσον η μη ιονισμένη μορφή μιας χημικής ένωσης είναι και η περισσότερο λιποδιαλυτή. Είναι γνωστό, ότι τα περισσότερα φάρμακα είναι ασθενή οξέα ή βάσεις, και συνεπώς σε ένα υδατικό διάλυμα βρίσκονται σε ιονισμένη και μη ιονισμένη μορφή. Στην κατάσταση αυτή και στις διαδικασίες απορρόφησης του φαρμάκου, υπεισέρχονται και οι έννοιες της λογαριθμικής σταθεράς ιονισμού ( $pK_a$ ) και της ενεργού οξύτητας (pH) του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται. Επειδή οι τιμές του pH που επικρατούν στα διάφορα σημεία ενός οργανισμού ποικίλλουν, ο βαθμός του ιονισμού των φαρμάκων επηρεάζεται και ποικίλει σημαντικά. Φάρμακα που είναι ασθενή οξέα παρουσιάζουν μικρό βαθμό ιονισμού σε χαμηλές τιμές pH και συνεπώς υψηλό βαθμό απορρόφησης, ενώ τα φάρμακα που είναι ασθενείς βάσεις απορροφώνται καλύτερα σε υψηλές τιμές pH. Οι μικρές διακυμάνσεις της τιμής του pH του περιβάλλοντος επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στο βαθμό ιονισμού του μορίου ενός φαρμάκου ( $pK_a$ ), ανάλογα με την εξίσωση των Henderson-Hasselbalch,  $\text{Log}(\text{protonated} / \text{unprotonated}) = pK_a - \text{pH}$  (Katzung, 1995).

Άλλοι παράγοντες, που επηρεάζουν την απορρόφηση ενός φαρμάκου, είναι ο τρόπος χορήγησης, το μέγεθος των τεμαχίων της τροφής, καθώς και τα κατιόντα μαγνησίου και ασβεστίου ( $Mg^{+2}$  και  $Ca^{+2}$ ). Οι συγκεντρώσεις τους στο θαλάσσιο νερό επιφέρουν δραματική μείωση της βιολογικής δράσης των αντιβακτηριακών παραγόντων έως και πάνω από το 90%, όπως π.χ. της οξυτετρακυκλίνης και των κινολονών. Η διαλυτότητά τους επηρεάζεται ουσιαστικά από το pH του νερού και μειώνεται με την αύξησή του. Ειδικά για το pH του θαλασσινού νερού, επειδή είναι αλκαλικό οι συγκεντρώσεις των μετάλλων σε αυτό είναι μικρές.

Σε ιδανικές συνθήκες, ένας αντιβακτηριακός παράγοντας αναμένεται να φθάσει στον στόχο του ανεμπόδιστος και άθικτος, να συνδεθεί στους ουσιαστικότερους ιστούς στόχους, με αποτέλεσμα το κύτταρο γρήγορα να χάσει την ζωτικότητά του και να υποστεί λύση. Αν και οι κινολόνες χαρακτηρίζονται από μικρό βαθμό μεταβολισμού, ο βαθμός της πρωτεϊνικής τους σύνδεσης είναι πολύ υψηλός και ανέρχεται σε 93-97% (Steffenak *et al.*, 1991).

Τα φάρμακα τα οποία εισέρχονται στον οργανισμό του ψαριού με την τροφή εξέρχονται στο περιβάλλον. Ο μεταβολισμός των φαρμάκων είναι σημαντικός παράγοντας, ο οποίος προσδιορίζει την κατανομή και την απέκκρισή τους. Το ήπαρ είναι το κυριότερο όργανο μεταβολισμού στα περισσότερα είδη ψαριών, ωστόσο μεταβολική δραστηριότητα αποδίδεται επίσης στα βράγχια, στους νεφρούς και στον εντερικό βλεννογόνο. Η αποβολή γίνεται με το μηχανισμό της παθητικής διάχυσης μέσω των βραγχίων ή με άλλους μηχανισμούς μέσω της χολής και του ούρου (Ingebrigtsen, 1991). Ο βιομετασχηματισμός μπορεί επίσης να τροποποιήσει την τοξικότητα μιας ουσίας, γεγονός που μπορεί να είναι ωφέλιμο ή επιβλαβές για τον οργανισμό (βιοενεργοποίηση). Στην πρώτη περίπτωση, η τοξικότητα της ουσίας

μειώνεται, ενώ η απέκκρισή της αυξάνεται. Στην περίπτωση της βιοενεργοποίησης, η ουσία μετατρέπεται σε ενεργό μεταβολίτη, που είναι περισσότερο τοξικός από την αρχική ουσία. Για το λόγο αυτό, ο βιομετασχηματισμός καθορίζει τη δράση κάθε ουσίας, τη διάρκεια της δράσης και το χρόνο ημιζωής της ουσίας στον οργανισμό (Van der Oost *et al.*, 2003).

Γενικά, η διάθεση των φαρμάκων στα ψάρια είναι μία πολύπλοκη διαδικασία, τα στάδια της οποίας αλληλοσχετίζονται και επηρεάζονται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Το είδος, το φύλο και η ηλικία είναι οι κυριότεροι βιοτικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη τύχη των φαρμάκων στον οργανισμό. Άλλοι παράγοντες είναι οι διαφορές οι οποίες υπάρχουν στην κατανομή των λιποφιλικών ενώσεων στα διάφορα είδη ψαριών, όπως αυτό συμβαίνει στον μπακαλιάρο και στην πέστροφα. Ακόμα, ο χρόνος της κένωσης του πεπτικού συστήματος και η κινητικότητα των εντέρων είναι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν επίσης άμεσα την απορρόφηση των φαρμάκων (Ingebrigtsen, 1991; Schwedler και Johnson, 1997). Οι αβιοτικοί παράγοντες χωρίζονται στους παράγοντες που έχουν σχέση με το φάρμακο και στους παράγοντες που έχουν σχέση με το περιβάλλον.

Ο ιονισμός, η λιποφιλικότητα και η σταθερά  $pK_a$  μιας χημικής ουσίας είναι πολύ σημαντικές παράμετροι, οι οποίες καθορίζουν την ικανότητα του φαρμάκου να διεισδύει, να παραμένει ή να αποβάλλεται από τους ιστούς και τέλος από τον οργανισμό. Επίσης η χορηγούμενη ποσότητα, η χημική δομή και η οδός χορήγησης του φαρμάκου επηρεάζουν άμεσα το μεταβολισμό και την απέκκριση. Φάρμακα τα οποία απορροφούνται από το γαστρεντερικό σωλήνα, αρχικά μεταβολίζονται στο ήπαρ, ενώ, εκείνα τα οποία απορροφούνται από τα βράγχια, φθάνουν απ' ευθείας στους νεφρούς (Schneider, 1994).

Από μελέτες σε φυτοφάγα ζώα και ψάρια έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει μια γραμμική αύξηση στην τοξικότητα και στη δράση των φαρμάκων. Η πολύ υψηλή λιποφιλικότητα πρέπει να αποφεύγεται, επειδή προκαλεί δυσμενή αποτελέσματα στην πρωτεϊνική δέσμευση, στη διαλυτότητα και στην απορρόφησή τους. Ο μεταβολισμός μπορεί να μην είναι επιθυμητός, για να περιορισθεί η βιοδιαθεσιμότητα και η παραγωγή τοξικών μεταβολιτών. Σε μια γενική αρχή, το ιδανικό φάρμακο θα πρέπει να έχει όσο το δυνατό μικρότερη λιποφιλικότητα με την προϋπόθεση, ότι δε θα έχει καθεί η συνάφειά του προς τον υποδοχέα στόχο (Testa *et al.*, 1996).

Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες η θερμοκρασία είναι η παράμετρος που επηρεάζει περισσότερο τη διάθεση των φαρμάκων στα ψάρια. Στα ψάρια που είναι ποικιλόθερμα ζώα, μία άνοδος της θερμοκρασίας κατά  $1^{\circ}\text{C}$  επιφέρει αύξηση της μεταβολικής συχνότητας κατά 10%. Το pH και η ιονική ισχύς του νερού είναι δύο ακόμα παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την απορρόφηση και την απέκκριση των φαρμάκων. Από μελέτες που έχουν γίνει, διαπιστώθηκαν διαφορές ανάμεσα σε αλμυρά και γλυκά νερά. Τέλος, η συγκέντρωση του  $\text{O}_2$  όταν είναι χαμηλή μεταβάλλεται η απορρόφηση και η απέκκριση των φαρμάκων λόγω της αύξησης της έκθεσης της επιφάνειας των βραγχίων στο νερό (Schwedler και Johnson, 1997).

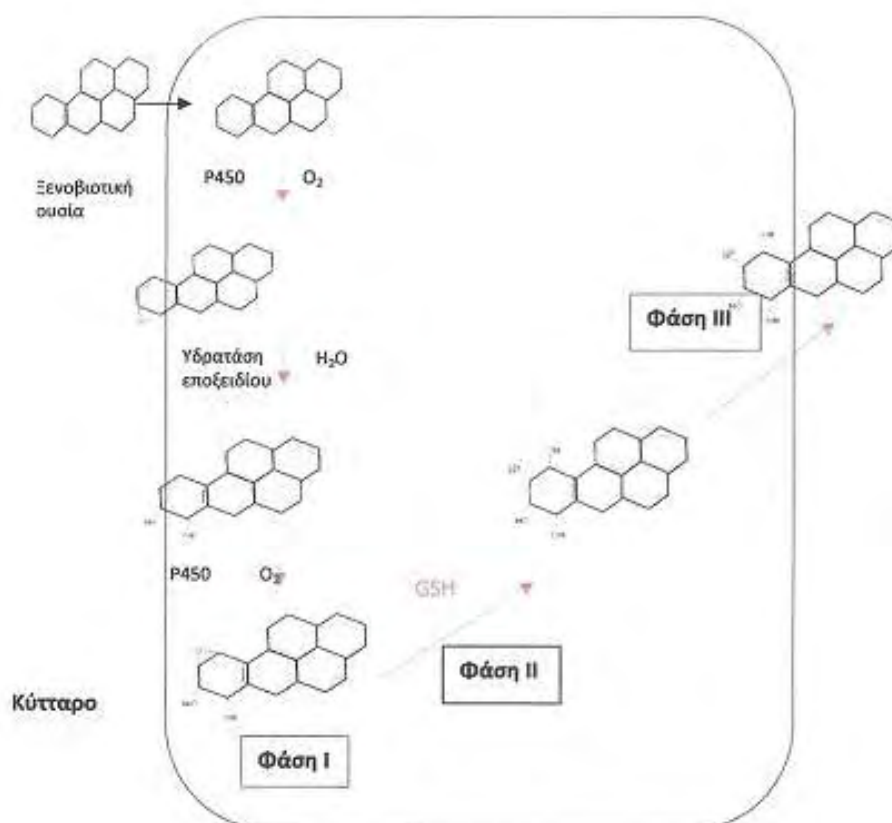
Το φάρμακο, μετά την είσοδο στον οργανισμό του ψαριού, κατανέμεται στο σώμα του με το μηχανισμό της παθητικής διάχυσης. Εστιάζεται σε κάποιους αρχικούς ιστούς από τους οποίους στη συνέχεια ανακατανέμεται σε άλλους ιστούς με μεγαλύτερη συγγένεια-συνάφεια προς το φάρμακο. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της κατανομής είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου στους συγκεκριμένους ιστούς, οι οποίοι δεν είναι τα όργανα – στόχοι, αλλά οι ονομαζόμενες «αποθήκες του φαρμάκου». Στη ρύθμιση της κατανομής του φαρμάκου στους ιστούς παρεμβαίνει και η πρωτεϊνική σύνδεση. Σε όσο μεγαλύτερο ποσοστό συμβαίνει αυτή, τόσο μεγαλύτερες είναι και οι τοξικές συνέπειες από την αποδέσμευσή του. Πολλά

παραδείγματα έχουν αναφερθεί για αρκετές ουσίες, οι οποίες παρουσίασαν μακρά παραμονή η οποία επηρέασε ουσιαστικά τον καθορισμό του χρόνου απομάκρυνσης (Schneider, 1994).

Ο χρόνος απομάκρυνσης είναι η τελική φάση της διαδικασίας αποβολής ενός φαρμάκου από τον οργανισμό μετά τη βιομετατροπή του. Η αποβολή γίνεται με τον μηχανισμό της παθητικής διάχυσης δια μέσου των βραγχίων ή με άλλους μηχανισμούς δια μέσου της χολής και του ούρου. Η απομάκρυνση του φαρμάκου από τον οργανισμό του ψαριού συχνά είναι προβληματική, επειδή τα ποικιλόθερμα ζώα αποβάλλουν τις ουσίες βραδύτερα από τα θερμοίαιμα. Εξωγενείς παράμετροι όπως π.χ. η θερμοκρασία του νερού, επηρεάζουν ουσιαστικά τον μεταβολισμό και την αποβολή. Έχει δε αποδειχθεί ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής ενός φαρμάκου είναι μεγαλύτερη στις χαμηλές θερμοκρασίες (Schneider, 1994).

### 1.4.1 Φάσεις του Βιομετασχηματισμού

Οι εξωγενείς χημικές ουσίες βιομετασχηματίζονται στο ήπαρ ακολουθώντας τρεις φάσεις (I, II, III) (Εικόνα 1). Στη φάση I, πραγματοποιείται οξείδωση, αναγωγή ή υδρόλυση της αρχικής ουσίας, προκαλώντας το σχηματισμό μεταβολιτών, οι οποίοι συνδέονται με ενδογενείς ουσίες κατά τη φάση II και καταβολίζονται κατά τη φάση III (μέσω της δράσης ενζύμων, όπως οι πεπτιδάσες, οι υδρολάσες και οι β λυάσες) (Van der Oost *et al.*, 2003).



**Εικόνα 1:** Πιθανό μεταβολικό μονοπάτι αποτοξικοποίησης μιας ξενοβιοτικής ουσίας που εισέρχεται στο κύτταρο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (Sheehan *et al.*, 2001)

## **Φάση I του Βιομετασχηματισμού**

Η φάση I του μεταβολισμού περιλαμβάνει αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής ή υδρόλυσης. Για την πλειοψηφία των ξενοβιοτικών ουσιών, οι αντιδράσεις της πρώτης φάσης καταλύονται από ένζυμα, όπως είναι το κυτόχρωμα P450, οι μονοξυγέναςες, που περιέχουν φλαβίνη, οι εστεράσες και οι υδρολάσες των εποξειδίων. Οι δύο πρώτες οικογένειες είναι από τις πιο σημαντικές, γιατί μπορούν να καταλύουν ένα μεγάλο εύρος αντιδράσεων με μεγάλη ειδικότητα στα υποστρώματα. Αυτά τα ένζυμα εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου και έχουν μελετηθεί σε πολλά όργανα και ιστούς. Οι αντιδράσεις της φάσης I οδηγούν στη δημιουργία προϊόντων περισσότερο υδατοδιαλυτών και με αυξημένη πολικότητα (Tang *et al.*, 2006).

## **Φάση II του Βιομετασχηματισμού**

Η δεύτερη φάση του βιομετασχηματισμού περιλαμβάνει τη σύνδεση εξωγενών χημικών ουσιών ή των μεταβολιτών τους με μία ενδογενή ουσία (Γλυκουρονιδίωση, Ακετυλίωση, Σύζευξη με γλουταθειόνη, Μεθυλίωση). Κατά τις αντιδράσεις αυτές, μεγάλες και πολικές ουσίες ή τμήματά τους, όπως σάκχαρα και αμινοξέα, προστίθενται ομοιοπολικά σε ξενοβιοτικές χημικές ουσίες (π.χ φάρμακα). Τα περισσότερα ένζυμα της φάσης αυτής καταλύουν αυτές τις αντιδράσεις, διευκολύνοντας έτσι την απέκκριση αυτών των ουσιών, μέσω της σύνδεσης περισσότερο πολικών ομάδων (γλουταθειόνη και γλυκουρονικό οξύ) στο μόριο. Στα ψάρια, τα προϊόντα σύζευξης απεκκρίνονται εύκολα μέσω της χολής, των ούρων ή των βραγχίων. Ορισμένες ουσίες διαθέτουν ομάδες (όπως  $-COOH$ ,  $-OH$ ,  $-NH_2$ ), που τους επιτρέπουν τον απευθείας μεταβολισμό από τα ένζυμα της φάσης II, ενώ κατά το μεταβολισμό άλλων ουσιών προηγείται της φάσης II μία άλλη διαδικασία μεταβολισμού. Η κύρια οδός μεταβολισμού ηλεκτρόφιλων ουσιών και μεταβολιτών τους περιλαμβάνει τη σύνδεση με τη γλουταθειόνη, ενώ οι πυρηνόφιλες ουσίες συνδέονται με το γλυκουρονικό οξύ. Άλλες οδοί παίζουν πολύ μικρό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών και προτιμώνται σε ορισμένες μόνο ουσίες (Van der Oost *et al.*, 2003).

Στα ένζυμα της φάσης II περιλαμβάνονται η NADPH οξειδοαναγωγή της μενανδιόνης, η αλδεϋδική αφυδρογονάση (ALDH), η UDPγλυκουρονυλ-τρανσφεράση (UDPGT), η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και η σουλφοτρανσφεράση (SULT). Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των περισσότερων μορφών των ενζύμων της φάσης II σχετίζεται με τον υποδοχέα Ah. Συγκριτικά με τη φάση I, οι διαδικασίες ενεργοποίησης των ενζύμων της φάσης II είναι λιγότερο έντονες και επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως το φύλο, η σεξουαλική ωριμότητα, η διατροφή, η θερμοκρασία, η εποχή και άλλα (Van der Oost *et al.*, 2003).

### **1.5. Ένζυμα και ο μηχανισμός δράσης του**

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες και δρουν ως καταλύτες αντιδράσεων οι οποίες πραγματοποιούνται στο εσωτερικό του κυττάρου. Χωρίς αυτά πολλές αντιδράσεις δε θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθούν. Ως ενέργεια ενεργοποίησης ορίζεται η ενέργεια που πρέπει να προσφερθεί στα αντιδρώντα μόρια για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στο περιβάλλον η ενέργεια ενεργοποίησης μπορεί να εξασφαλιστεί με προσφορά θερμότητας, πράγμα το οποίο δεν είναι εφικτό στα κύτταρα διότι θα τα κατέστρεφε. Επίσης ο χρόνος πραγματοποίησης των αντιδράσεων είναι πολύ μεγάλος

και το κύτταρο δεν μπορεί να ‘περιμένει’ γιατί οι ανάγκες του είναι άμεσες. Τα κύτταρα για να αντιμετωπίσουν τα προβλήματα αυτά διαθέτουν μηχανισμό μείωσης της ενέργειας ενεργοποίησης, που δεν είναι άλλος από τα ένζυμα.. Η ταχύτητα μιας αντίδρασης μπορεί να αυξηθεί μέχρι 100 εκατομμύρια φορές. Αυτό επιτυγχάνεται με τον κατάλληλο προσανατολισμό των αντιδρώντων μορίων τα οποία λέγονται και μόρια υποστρώματα. Κάθε ένζυμο έχει μια ειδική περιοχή το ενεργό κέντρο στο οποίο ενώνεται το υπόστρωμα. Ενεργό κέντρο και υπόστρωμα ταιριάζουν δομικά. Μερικές φορές αυτό γίνεται μετά την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Όταν το υπόστρωμα συνδεθεί με το ενεργό κέντρο οι δεσμοί μεταξύ των μορίων του εξασθενούν, σπάνε εύκολα και μπορούν να δημιουργηθούν νέοι οπότε να προκύπτουν τα προϊόντα της αντίδρασης.

Οι ιδιότητες των ενζύμων συγκεντρώνονται παρακάτω:

- Είναι πρωτεΐνη
- Η καταλυτική δράση του ενζύμου καθορίζεται από την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης και χάνεται αν αυτή αλλάξει
- Μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης μιας αντίδρασης
- Μείωση του χρόνου πραγματοποίησης της αντίδρασης, δηλαδή αύξηση της ταχύτητας μιας αντίδρασης
- Ένα ένζυμο είναι ειδικό για μία αντίδραση ή το πολύ κάποιες συγγενικές αντιδράσεις και όχι για οποιαδήποτε, παρουσιάζει δηλαδή εξειδίκευση
- Ένα ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί περισσότερες από μία φορές γιατί παραμένει αναλλοίωτο ποσοτικά και ποιοτικά
- Η δραστηριότητα των ενζύμων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες με σημαντικότερο το pH

Τα ένζυμα δρουν ενδοκυτταρικά μέσα στο κύτταρο και είναι είτε ελεύθερα είτε δεσμευμένα σε πρωτεΐνες. Εξωκυτταρικά εκκρίνονται από τα κύτταρα και δρουν στο εξωτερικό των κυττάρων όπως πχ στο στομάχι και άλλες κοιλότητες.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση των ενζύμων είναι η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση του υποστρώματος και του ενζύμου.

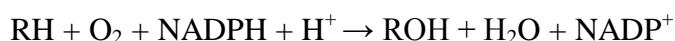
- **Θερμοκρασία:** η ταχύτητα μιας αντίδρασης η οποία καταλύεται από ένζυμα μεταβάλλεται ανάλογα με τη θερμοκρασία. Κάθε ένζυμο έχει μια άριστη θερμοκρασία δράσης στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης γίνεται μέγιστη. Στα ένζυμα του ανθρώπου η άριστη θερμοκρασία είναι 36-38 βαθμοί. Με αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται η δραστηριότητα του ενζύμου. Αν η θερμοκρασία φτάσει στους 50 βαθμούς τότε το ένζυμο χάνει μόνιμα τη δραστηριότητά του γιατί χάνει την τριτοταγή του δομή
- **pH:** τα ένζυμα επηρεάζονται από τις μεταβολές του pH. Για καθένα υπάρχει μία τιμή στην οποία παρουσιάζει τη μέγιστη δραστηριότητά του, η οποία για την πλειοψηφία κυμαίνεται μεταξύ 5 και 9. Σε ακραίες τιμές τα ένζυμα μπορεί να καταστραφούν. Υπάρχουν βέβαια εξαιρέσεις όπως η πεψίνη η οποία δρα στο στομάχι σε pH=2 ή η θρυψίνη που δρα στο λεπτό έντερο σε pH=8,5.
- **Συγκέντρωση υποστρώματος:** Αύξηση συγκέντρωσης υποστρώματος οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης, μέχρι όμως ενός σημείου. Από εκεί και πέρα η ταχύτητα δεν αλλάζει γιατί όλα τα μόρια ενζύμων είναι ενωμένα με υπόστρωμα και συνεπώς τα επιπλέον μόρια υποστρώματος δε βρίσκουν ελεύθερα μόρια ενζύμων για να ενωθούν.
- **Συγκέντρωση ενζύμου:** αν η θερμοκρασία, το pH είναι σταθερά και η συγκέντρωση του υποστρώματος δεδομένη, αύξηση του ενζύμου οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης.

Επίσης, τη δράση των ενζύμων επηρεάζει η ύπαρξη αναστολέων. Οι αναστολείς ενζύμων είναι οι ουσίες οι οποίες αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων και διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη αντιστρεπτούς. Οι πρώτοι εμποδίζουν παροδικά τη δράση των ενζύμων και όταν πάψουν να υπάρχουν το ένζυμο επανέρχεται στην κανονική του λειτουργία, ενώ οι δεύτεροι συνδέονται μόνιμα με το ένζυμο και δεν το αφήνουν πια να δράσει. Επιπλέον, υπάρχουν και μερικά ένζυμα που είναι δραστικά μόνο με την παρουσία άλλων πρωτεϊνών, τους συμπαραγόντες. Αυτοί μπορεί να είναι ανόργανα ιόντα, όπως  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ή οργανικές ουσίες όπου ανήκουν και τα συνένζυμα (Ένζυμο + Συνένζυμο = Ολοένζυμο). Πολλά από τα συνένζυμα είναι βιταμίνες ή περιέχουν βιταμίνες.

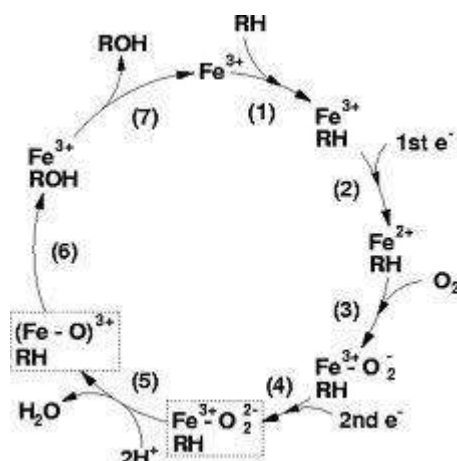
### 1.5.1. EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase)- Κυτόχρωμα P450

Τα κυτοχρώματα είναι πρωτεΐνες (συνένζυμα) που περιέχουν αίμη. Μπορούν να μεταφέρουν ηλεκτρόνια με ταυτόχρονη μετατροπή του  $Fe^{+2}$  σε  $Fe^{+3}$  κι έχουν μεγάλη σημασία για την αναπνοή και την παραγωγή ενέργειας. Σήμερα είναι γνωστά πάνω από 30 κυτοχρώματα. Τα κυτοχρώματα a, b, c είναι απαραίτητα για την παραγωγή κυτταρικής ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Με το να μεταφέρουν ηλεκτρόνια συμβάλλουν στη μετατροπή του ADP σε ATP, το ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου.

Πιο συγκεκριμένα, το σύστημα του κυτοχρώματος P450 είναι ένας κεντρικός καταλύτης οξειδωτικών αντιδράσεων, όπως υδροξυλίωσης, εποξειδίωσης, απαλκυλίωσης και άλλων. Οι ενώσεις, που μεταβολίζονται από τα ισόένζυμα του κυτοχρώματος P450, είναι τόσο ενδογενείς (λιπαρά οξέα, στεροειδή, προσταγλανδίνες, κετόνες) όσο και εξωγενείς (πρόσθετα τροφίμων, φάρμακα, πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, διοξίνες). Η αντίδραση, που καταλύεται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, είναι η εξής:



Το λιπόφιλο υπόστρωμα (RH) μετατρέπεται σε ένα περισσότερο πολικό και υδατοδιαλυτό προϊόν (ROH), μετά την ενσωμάτωση ενός ατόμου οξυγόνου από το μόριο του οξυγόνου. Το άλλο άτομο οξυγόνου χρησιμοποιείται στην παραγωγή νερού (Goksøyr και Husøy, 1998). Ο καταλυτικός κύκλος του κυτοχρώματος P450 φαίνεται στην **Εικόνα 2**.



**Εικόνα 2:** Ο καταλυτικός κύκλος του κυτοχρώματος P450 (Segall, 1997).



Το κυτόχρωμα P450 εντοπίζεται σε μεμβράνες κυττάρων του ήπατος, καθώς και σε κύτταρα της βλεννώδους μεμβράνης του εντέρου. Ο χημικός τους ρόλος είναι να ενεργοποιεί το O<sub>2</sub> και τα υπεροξειδία. Η κύρια λειτουργία του αναφέρεται στη σύνθεση στεροειδών ορμονών, την οξυγόνωση των εικοσανοειδών και τη οξειδωτική καταστροφή διαφόρων χημικών και τοξινών.

Στα θηλαστικά έχουν εντοπιστεί δύο διαφορετικά γονίδια, CYP1A1 και CYP1A2 τα οποία πιστεύεται ότι προέρχονται από διπλασιασμό γονιδίου κατά την πρώιμη μοριακή εξέλιξη των σπονδυλωτών (Nebert και Gonzalez, 1987). Στα ψάρια, αρχικά είχε ανιχνευθεί μόνο ένα γονίδιο CYP1A (Nebert και Gonzalez, 1987), αλλά πρόσφατες μελέτες έδειξαν την ύπαρξη περισσότερων γονιδίων CYP1A, μολονότι η λειτουργική σημασία αυτού του ευρήματος παραμένει ακόμη άγνωστη (Delgado *et al.*, 2008).

Το ένζυμο 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) είναι μία ένωση που χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα στη μέτρηση της επαγωγής του κυτοχρώματος P450 (CYP1A1). Το ένζυμο αυτό καταλύει την O-αποαιθυλίωση του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνης με παραγόμενο προϊόν την ουσία ριζορουφίνη (**Εικόνα 3**), η οποία ανιχνεύεται μέσω του φθορισμού που παρουσιάζει. Η αντίδραση επαγωγής είναι μια διαδικασία, κατά την οποία οι διάφορες χημικές ουσίες διεγείρουν τη μεταγραφή των γονιδίων, καταλήγοντας σε αυξημένα επίπεδα mRNA και στη σύνθεση των πρωτεϊνών του συστήματος P450 (Φραγκούλη, 2011). Το υπόστρωμα 7-ethoxyresorufin-O-deethylase μεταβολίζεται προς φθορίζουσα ρεζορουφίνη και τα ένζυμα CYP εκφράζονται κυρίως στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Γενικά, οι καταλυτικές δραστηριότητες προσδιορίζονται σε μικροσώματα που σχηματίζονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο μετά την ομογενοποίηση του ιστού.



**Εικόνα 3:** Αντίδραση αποαιθυλίωσης του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνης (ethoxyresorufin) μέσω των ενζύμων P450 1A1 (UNEP, 1999).

Μία χαρακτηριστική ιδιότητα των γονιδίων CYP1A είναι η επαγωγιμότητα από τα ξενοβιοτικά. Ρύποι όπως PAHs και PHAHs οδηγούν σε ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου CYP1A μέσω της σύνδεσης σε έναν κυτοσολικό υποδοχέα, τον AhR (aryl hydrocarbon receptor). Λόγω της επαγωγιμότητάς του από τις ξενοβιοτικές ουσίες, το CYP1A χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης στην έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους που δεσμεύουν το AhR, και στους ανθρώπους και στα ζώα. Οι μελέτες για την επαγωγή των CYP1A στα ψάρια έχουν επικεντρωθεί κυρίως στο ήπαρ. Ο σχετικός ρόλος των διαφόρων οργάνων στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών και την απόκριση στην επαγωγή των CYP1A στους εξωπατικούς ιστούς είναι λιγότερο γνωστός (Delgado *et al.*, 2008).

Στα ψάρια, το μεγαλύτερο μέρος της οξειδωτικής φάσης I της βιομετατροπής καταλύεται από το κυτόχρωμα P450 (Teles, 2005). Η δραστηριότητα της 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) φαίνεται να είναι ο πιο ευαίσθητος ανιχνευτής

για τον *in vitro* προσδιορισμό της επαγωγικής απόκρισης του κυτοχρώματος P4501A1.

Το κυτόχρωμα P4501A (CYP1A) μεταβολίζει ένα ευρύ φάσμα των λιπόφιλων ξενοβιοτικών. Στο ήπαρ των ψαριών, το CYP1A εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα, εντούτοις τα ξενοβιοτικά μπορούν να επάγουν σε σημαντικό βαθμό την έκφραση του CYP1A, με τη μεσολάβηση υποδοχέων. Ενώ η επαγωγή του ηπατικού CYP1A από ξενοβιοτικά έχει διερευνηθεί επαρκώς στα τελεόστεα, πολύ λίγα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της έκφρασης κι επαγωγής του από άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα, στη μελέτη των Segner *et al.*, (2000) παρατηρήθηκε ότι στην κυτταρική γραμμή RTL-W1 του ήπατος της ιριδίτσουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*), η δραστηριότητα του CYP1A και 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) μπορεί να επαχθεί από την αλλαγή του μέσου καλλιέργειας, απουσία ξενοβιοτικών. Πειράματα έδειξαν ότι η τρυπτοφάνη είναι ο παράγων που προκαλεί την αύξηση της δραστηριότητας του EROD μετά την αλλαγή μέσου. Η δραστηριότητα του EROD μπορεί να επηρεαστεί από ένα μεγάλο αριθμό βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, όπως το είδος, το γένος, το φύλο, το αναπαραγωγικό στάδιο (Hoydal, 2004), η θερμοκρασία του νερού, το pH, η ηλικία και η αναπαραγωγική φάση (Whyte και Tillitt, 1997).

Εργαστηριακά πειράματα και μελέτες πεδίου έχουν γίνει σε περισσότερα από 150 είδη ψαριών. Μία μεγάλη ποικιλία χημικών, είναι γνωστό, ότι μπορούν να αναστείλουν την επαγωγή της EROD. Τέτοιες ενώσεις είναι οι οργανικές, οι οργανομεταλλικές και οι μεταλλικές (πολυχλωριωμένα διφαινύλια- PCBs) (Whyte και Tillitt, 1997). Ανάμεσά τους υπάρχουν αναφορές και για τη συσχέτιση της επαγωγής του EROD από ρύπους με την εμφάνιση κάποιων δυσμενών συμπτωμάτων στα ψάρια, π.χ. καρκινογένεση, εμβρυοτοξικότητα, μορφολογικές και ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, ανοσοτοξικότητα.

Οι Goksøyr και Husøy (1998) επισημαίνουν πως η σωστή διατροφή είναι απαραίτητη για την άμυνα του οργανισμού απέναντι στα διάφορα αίτια τοξικότητας διότι έχει παρατηρηθεί η συσχέτιση μεταξύ των διαιτητικών παραγόντων και της δραστηριότητας του συστήματος P450.

Ο μεταβολισμός των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες από το σύστημα κυτοχρώματος P450, θα μπορούσε να επηρεάσει τη δραστηριότητά τους, την κατανομή στους ιστούς και τα ποσοστά αποβολής, και να καθορίσει την ύπαρξη υπολειμμάτων, όπως ακριβώς γίνεται την περίοδο της απόσυρσης, πριν το ψάρι διατεθεί για ανθρώπινη κατανάλωση (Moutou *et al.*, 1998).

#### Υπολογισμός της ειδικής ενζυμικής ενεργότητας EROD

$$\text{activity}_{\text{EROD}} = \frac{IF_c \cdot c \cdot VF}{IFV_c \cdot t \cdot P}$$

**IFc** = *sample fluorescence* (δείγμα φθορισμού)

**γ** = *resorufin concentration* (συγκέντρωση ρεζορουφίνης)

**VF** = *final volume of reaction* (τελικός όγκος αντίδρασης)

**AN** = *resorufin fluorescence* (φθορισμός ρεζορουφίνης)

**Vc** = *volume of liver supernatant* (όγκος του υπερκειμένου ήπατος)

**T** = *reaction time* (χρόνος της αντίδρασης)

**P** = *protein content* (περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες)

(UNEP, 1999)

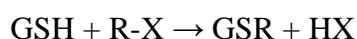
Η ιδέα να χρησιμοποιηθεί η επαγωγή των CYP1A ως μέσο για την παρακολούθηση της έκθεσης των ψαριών στους ρύπους προτάθηκε ήδη στα μέσα της δεκαετίας του 1970 από τους Payne και Penrose (1975) και Payne (1976). Αργότερα ακολούθησαν πολυάριθμες εργαστηριακές μελέτες και μελέτες πεδίου, με σκοπό την εξέταση των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A σε ψάρια, που έχουν εκτεθεί σε διάφορες ουσίες (Πίνακας 3). Η μελέτη της καταλυτικής δραστηριότητας των ενζύμων είναι η τεχνική, που χρησιμοποιείται πιο συχνά (Goksøyr and Husøy, 1998).

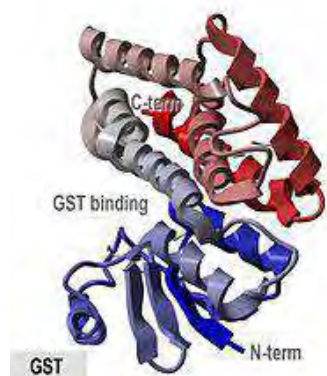
**Πίνακας 3:** Μέθοδοι ανίχνευσης της υποοικογένειας CYP1A στα ψάρια (Goksøyr and Husøy, 1998).

Επίπεδο ανίχνευσης	Διερεύνηση	Δοκιμή
CYP1A ένζυμο	Καταλυτική δραστηριότητα	EROD, AHH
CYP1A πρωτεΐνη	Αντισώματα	Western blot, ELISA, ανοσοϊστοχημεία
CYP1A mRNA	cDNA, ολιγονουκλεοτίδια	Northern blot, RT-PCR, <i>in situ</i> υβριδισμός

### 1.5.2. GST (γλουταθειόνη S- τρανσφεράση)

Οι γλουταθειόνες S- τρανσφεράσες (**Εικόνα 4**) ανήκουν στην οικογένεια των ενζύμων που αποτελούνται από κυτοσολικές, μιτοχονδρικές και μικροσωμικές πρωτεΐνες. Βρίσκονται στους περισσότερους ιστούς, αλλά κυρίως εντοπίζονται στο ήπαρ, τους νεφρούς και το έντερο. Οι GSTs είναι παρούσες σε ευκαρυωτικά και προκαρυωτικά κύτταρα όπου καταλύουν ποικίλες αντιδράσεις και δέχονται ενδογενή και ξενοβιοτικά υποστρώματα. Μέλη της υπεροικογένειας είναι εξαιρετικά ανομοιογενή στην αμινοξική αλληλουχία, ως εκ τούτου ένα μεγάλο κλάσμα των αλληλουχιών εισάγονται στις δημόσιες βάσεις δεδομένων άγνωστης λειτουργίας. Οι GSTs μπορεί να αποτελούν έως και το 10% της κυτοσολικής πρωτεΐνης σε κάποια όργανα θηλαστικών και καταλύουν τη σύζευξη της μειωμένης γλουταθειόνης (GSH) (**Εικόνα 5**) σε ηλεκτρονιόφιλα κέντρα, μέσω μιας ομάδας σουλφυδρυλίου, σε μια ευρεία ποικιλία υποστρωμάτων. Αυτή η δράση αποτοξινώνει ενδογενείς ενώσεις, όπως υπεροξειδωμένα λιπίδια, καθώς συμβάλλει και στη φάση II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη σύνδεση του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) με το ηλεκτρονιόφιλο κέντρο του κατάλληλου υποστρώματος (R-X). Η αντίδραση που παρατηρείται είναι η εξής:

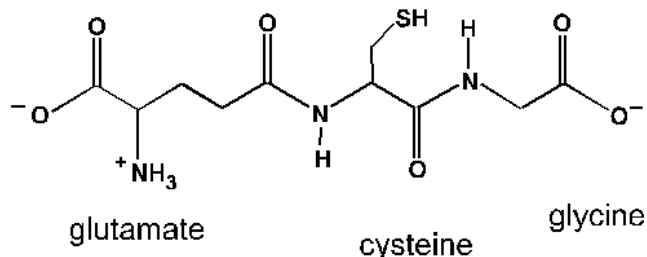




**Εικόνα 4:** Κρυσταλλογραφική δομή του ενζύμου γλουταθειόνη S- τρανσφεράση (Wikipedia, 2012).

Η γλουταθειόνη είναι σημαντικό αντιοξειδωτικό των κυττάρων. Λειτουργεί ως υπόστρωμα σε αντιοξειδωτικά ένζυμα και προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες μέσω της σάρωσης των ελεύθερων ριζών. Το ένζυμο GST δρα δεσμεύοντας τη γλουταθειόνη στο ενεργό G τμήμα του και το ηλεκτρόφιλο υπόστρωμα στο ενεργό H τμήμα του, με αποτέλεσμα να μεταφέρεται το υπόστρωμα κοντά στη γλουταθειόνη. Ταυτόχρονα, το τμήμα SH της γλουταθειόνης ενεργοποιείται.

glutathione (GSH)



**Εικόνα 5:** Δομή γλουταθειόνης (GSH) (Thomas, 1999).

Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αυτής, που πραγματοποιείται στο ήπαρ, σχηματίζεται ένας θειοαιθέρας ανάμεσα στην κυστεΐνη της γλουταθειόνης και το υπόστρωμα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός λιγότερο ενεργού και περισσότερο διαλυτού προϊόντος (Slatinská *et al.*, 2008). Το προϊόν αυτό, στη συνέχεια, εξέρχεται από τα ηπατικά κύτταρα, μέσω μιας αντλίας της μεμβράνης και απεκκρίνεται αυτούσιο στη χολή ή καταλήγει στο σχηματισμό των μερκαπτουρικών οξέων στους νεφρούς και την αποβολή από τον οργανισμό με το ούρο (Blanchette *et al.*, 2007). Η αντίδραση αυτή θεωρείται ότι είναι το πρώτο στάδιο σχηματισμού των μερκαπτουρικών οξέων, τα οποία συμμετέχουν στη μείωση των εξωγενών χημικών ουσιών. Οι GSTs μπορούν επίσης να δεσμεύουν τοξίνες και να λειτουργούν ως πρωτεΐνες μεταφοράς.

Τα περισσότερα ισοένζυμα θηλαστικών έχουν συγγένεια με το υπόστρωμα 1-χλωρο-2, 4-δινιτροβενζόλιο (CDNB). Οι φασματοφωτομετρικές αναλύσεις που χρησιμοποιούν αυτό το υπόστρωμα συνήθως κάνουν έλεγχο της GST ενεργότητας. Ωστόσο, ορισμένες ενδογενείς ενώσεις, π.χ. η χολερυθρίνη, μπορούν να αναστείλουν τη δραστηριότητα των GSTs.

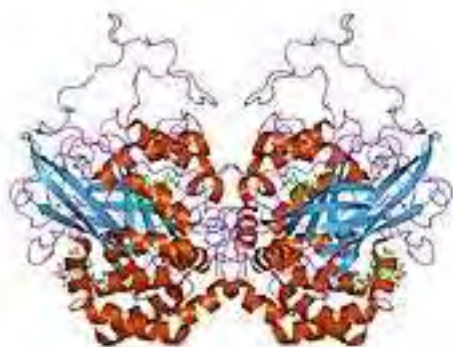
Μεταξύ των ειδών οι γλουταθειόνες S- τρανσφεράσες (GSTs) υποδιαιρούνται σε κλάσεις με βάση τη σειρά αμινοξέων, το ισοηλεκτρικό σημείο, την ειδικότητα στο υπόστρωμα, την ανοσοαντιδραστικότητα και τη χρωμοσωματική τους εντόπιση. Οι κλάσεις είναι: GSTA (Alpha), GSTD (Delta), GSTK (Kappa), GSTM (Mu), GSTP (Pi), GSTT (Theta), GSTZ (Zeta), GSTO (Omega) και MGST (Microsomal).

Η μέτρηση της δραστηριότητας της GST έχει αποδειχθεί ότι είναι χρήσιμη για την ανίχνευση ποικίλων διαταραχών στα ψάρια (Borvinskaya, 2010) και θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των ειδών στο στρες των χημικών. Συχνά χρησιμοποιείται ως Μοριακός Βιοδείκτης για την εκτίμηση της ρύπανσης και των δυσμενών επιπτώσεων του περιβάλλοντος στους οργανισμούς.

### 1.5.3. CAT (Καταλάση)

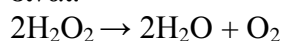
Η καταλάση (**Εικόνα 6**) είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς που εκτίθενται σε οξυγόνο. Καταλύει την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο. Είναι ένα πολύ σημαντικό ένζυμο για πολλές αντιδράσεις, καθώς έχει έναν από τους υψηλότερους αριθμούς κύκλου εργασιών ( $k_{cat}$ - μέγιστος αριθμός μορίων υποστρώματος που ένα ένζυμο μπορεί να μετατρέψει σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου) από όλα τα ένζυμα. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει εκατομμύρια μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο ανά δευτερόλεπτο.

Η καταλάση είναι ένα τετραμερές με τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που κάθε μία αποτελείται πάνω από 500 μακριά αμινοξέα. Περιέχει τέσσερις αλυσίδες πορφυρίνης, ομάδες που επιτρέπουν στο ένζυμο να αντιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το βέλτιστο pH για την ανθρώπινη καταλάση είναι περίπου 7 και έχει ένα αρκετά ευρύ φάσμα μεγίστου (η ταχύτητα της αντίδρασης δεν αλλάζει αισθητά σε pH μεταξύ 6.8 και 7.5). Για τις υπόλοιπες καταλάσες ο βέλτιστο pH κυμαίνεται μεταξύ 4 και 11, ανάλογα με το είδος. Η ιδανική θερμοκρασία λειτουργίας της καταλάσης, επίσης, διαφοροποιείται ανά τα είδη.



**Εικόνα 6:** Κρυσταλλογραφική δομή του ενζύμου καταλάση (Wikipedia, 2012).

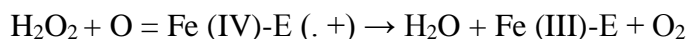
Η αντίδραση της καταλάσης στην αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι:



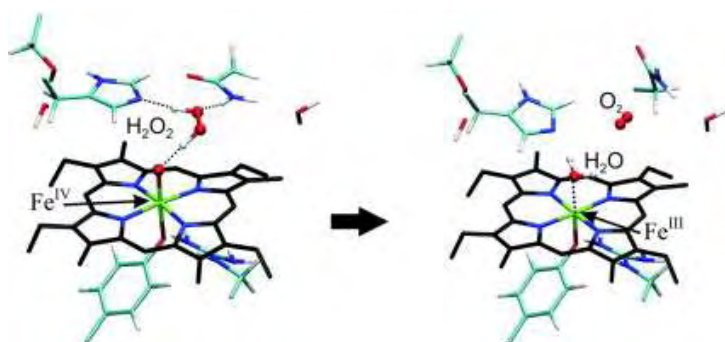
Η παρουσία της καταλάσης σε ένα δείγμα ιστού μπορεί να ελεγχθεί με την προσθήκη ενός όγκου του υπεροξειδίου του υδρογόνου και παρατηρώντας την

αντίδραση (**Εικόνα 7**). Ο σχηματισμός των φουσαλίδων, δηλαδή η απελευθέρωση του οξυγόνου, δείχνει ότι η καταλάση έχει μία πολύ υψηλή ειδική δραστηριότητα, η οποία παράγει μια ανιχνεύσιμη απόκριση.

Όσον αφορά στο μοριακό μηχανισμό της καταλάσης, μέχρι σήμερα φαίνεται να μην έχει διασαφηνιστεί πλήρως. Η αντίδραση πιστεύεται ότι συμβαίνει σε δύο στάδια:



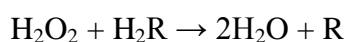
Εδώ ο Fe (III)-E και Fe (IV)-E αντιπροσωπεύει κέντρο σιδήρου της αίμης, ομάδα συνδεδεμένη στο ένζυμο. Ο Fe (IV)-E (. +) είναι μία μεσομερική μορφή του Fe (V)-E, δηλαδή ο σίδηρος δεν οξειδώνεται πλήρως στο + V, αλλά λαμβάνει κάποια "υποστήριξη ηλεκτρονίων" από την αίμη. Στη συνέχεια, η αίμη μετατρέπεται σε κατιόν (. +).



**Εικόνα 7:** Επίδραση καταλάσης στην αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Alfonso- Prieto *et al.*, 2012).

Καθώς το υπεροξείδιο του υδρογόνου εισέρχεται στην ενεργό θέση, αυτό αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα Asn147 (ασπαραγίνη στη θέση 147) και His74 (χιστιδίνη στη θέση 74), δημιουργώντας ένα πρωτόνιο (υδρογόνιο) για τη μεταφορά μεταξύ των ατόμων του οξυγόνου. Το ελεύθερο άτομο οξυγόνου ελευθερώνει το νεοσχηματισμένο μόριο νερού και το Fe (IV) = O. Ο Fe (IV) = O αντιδρά με ένα δεύτερο μόριο υπεροξειδίου του υδρογόνου για να μετατραπεί σε Fe (III)-E παράγοντας νερό και οξυγόνο. Η αποδοτικότητα της αντίδρασης μπορεί να βελτιωθεί με τις αλληλεπιδράσεις των His74 και Asn147 με τα ενδιάμεσα παράγωγα της αντίδρασης. Σε γενικές γραμμές, ο ρυθμός της αντίδρασης μπορεί να προσδιορίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten.

Η καταλάση μπορεί επίσης να καταλύσει την οξείδωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, παρουσία διαφόρων μεταβολιτών και τοξινών, όπως φορμαλδεΰδη, μυρμηκικό οξύ, φαινόλες, ακεταλδεΰδη και αλκοόλες.



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένα επιβλαβές υποπροϊόν πολλών φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών. Για να αποφευχθεί βλάβη στα κύτταρα και τους ιστούς, πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλα, λιγότερο επικίνδυνα προϊόντα. Για το σκοπό αυτό, η καταλάση χρησιμοποιείται συχνά από τα κύτταρα για να καταλύουν ταχέως την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα, όχι τόσο δραστικά, αέρια οξυγόνο και μόρια νερού. Από τα παραπάνω, προκύπτει ότι η

καταλάση είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο συχνά χρησιμοποιείται και ως βιοχημικός δείκτης για τη ρύπανση υδατικών περιοχών (Velkova- Jordanoska *et al.*, 2008).

Η πραγματική βιολογική σημασία της καταλάσης δεν είναι πάντα εύκολο να εκτιμηθεί. Μερικοί άνθρωποι έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα της καταλάσης (acatalasia), πράγμα το οποίο έχει αρνητικές συνέπειες στην υγεία τους. Για παράδειγμα, μια ανεπάρκεια της καταλάσης μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη τύπου 2. Όλοι οι ζωικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν το ένζυμο καταλάση σε κάθε όργανο, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να βρίσκονται στο ήπαρ. Στον ανθρώπινο οργανισμό η καταλάση λειτουργεί σε μία βέλτιστη θερμοκρασία 37°C, περίπου στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος. Αντίθετα, η καταλάση που απομονώνεται από το υπερθερμόφιλο αρχαιοβακτήριο *Pyrobaculum calidifontis* έχει βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας τους 90°C.

Η καταλάση χρησιμοποιείται και στη βιομηχανία τροφίμων για την απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από το γάλα πριν από την παραγωγή τυροκομικών προϊόντων. Άλλες χρήσεις της είναι στις συσκευασίες τροφίμων όπου εμποδίζει την οξείδωσή τους και στους φακούς επαφής για να αποσυνθέσει το διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (απολυμαντικό) πριν την επαφή με τα μάτια. Πρόσφατα, η καταλάση έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται και στη βιομηχανία αισθητικής, αφού η αντίδρασή της με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ενισχύει την κυτταρική οξυγόνωση στα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας.

Η εξέταση καταλάσης είναι επίσης ένα από τα τρία κύρια τεστ που χρησιμοποιούνται από μικροβιολόγους για αναγνώριση ειδών βακτηρίων. Η παρουσία του ενζύμου καταλάση στην δοκιμή απομόνωσης ανιχνεύεται χρησιμοποιώντας υπεροξείδιο του υδρογόνου. Εάν τα βακτηρίδια έχουν καταλάση (δηλ., είναι καταλάση-θετικά), όταν μία μικρή ποσότητα της βακτηριακής απομόνωσης προστίθεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, παρατηρούνται φυσαλίδες του οξυγόνου. Τέτοια βακτήρια είναι: *Staphylococci*, *Listeria*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Shigella*, *Burkholderia cepacia*, *Nocardia*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* και *E.coli*. Αντιθέτως, οι *Streptococcus* και *Enterococcus* είναι «καταλάσες- αρνητικά».

Ενώ η εξέταση καταλάσης από μόνη της δεν μπορεί να προσδιορίσει ένα συγκεκριμένο οργανισμό, σε συνδυασμό με άλλες εξετάσεις, όπως αντίσταση σε αντιβιοτικά, μπορεί να βοηθήσει την ταυτοποίηση.

## 1.6. Σκοπός εργασίας

Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η σύγκριση της δραστηριότητας των αποτοξικοποιητικών και αντιοξειδωτικών ηπατικών ενζύμων της τσιπούρας κατά τη χορήγηση ιχθυοτροφών που περιέχουν ιχθυέλαιο και φυτικά έλαια.

Από τα επίπεδα και τη δραστηριότητα των αποτοξικοποιητικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase), GST (γλουταθειόνη S-τρανσφεράση) και CAT μπορεί να εκτιμηθεί το κατά πόσο τα φυτικά έλαια είναι μπορούν να αντικαταστήσουν το ιχθυέλαιο στις ιχθυοτροφές.

## 2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων, την ομογενοποίηση των δειγμάτων, τη μέτρηση πρωτεϊνών, τη μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase), GST (γλουταθειόνη S- τρανσφεράση) και CAT (καταλάση) χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά:

- διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $K_2HPO_4$ )
- μονοβασικό φωσφορικό κάλιο ( $KH_2PO_4$ )
- χλωριούχο κάλιο (KCl)
- αιθανόλη ( $C_2H_6O$ )
- διθειοθρεϊτόλη (DTT)
- αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA)
- φαινυλο-μεθυλο-σουλφοφοθορίδιο (PMSF)
- αντιδραστήριο Bradford
- αλβουμίνη από ορό μόσχου
- ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης (GSH)
- 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζόλιο (CDNB)
- διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO)
- ριζορουφίνη
- (υδροξυλο-μεθυλο)αμινομεθάνιο (Tris)
- χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- αιθυλαιθέρας ριζορουφίνης
- φωσφορικό νικοτιναμινο-αδενο-δινουκλεοτίδιο (ανηγμένη μορφή) (NADPH)
- θειικό οξύ ( $H_2SO_4$ )
- θειικός σίδηρος ( $FeSO_4$ )
- υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )
- θειοκυανούχο (KSCN)
- φλουμεκίνη και οξολινικό οξύ

Τα αντιβακτηριακά Οξολινικό οξύ και Φλουμεκίνη προμηθεύτηκαν σε μορφή σκόνης με εμπορική ονομασία Aquinox (VETHELLAS A.E., Ελλάδα) και Vitaquin (Pharmaqua A.E., Ελλάδα), αντίστοιχα. Το 2-φαινοξυαιθανόλη αγοράστηκε από την Pharmaqua. Όλα τα άλλα χημικά, τα αντιδραστήρια, ένζυμα και υποστρώματα ήταν αναλυτικής καθαρότητας από την Sigma (Ελλάδα).

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- Φασματοφωτόμετρο του οίκου TECAN (μοντέλο Genios Pro 96/384) για μέτρηση απορρόφησης φωτός και φθορισμού με τη χρήση μικροπλακών
- Φασματοφωτόμετρο του οίκου Beckman (μοντέλο DU 64) για μέτρηση απορρόφησης φωτός με τη χρήση κυψελίδων
- Ομογενοποιητής του οίκου Heidolph (μοντέλο RZR 2020) από Sigma-Aldrich
- Φυγόκεντρος του οίκου Sorvall (μοντέλο RC 2-B)
- pHμετρο του οίκου MeterLab (μοντέλο PHM 210)
- Αναλυτικοί ζυγοί του οίκου Mettler Toledo (μοντέλο XS 105) διακριτικής ικανότητας 10-5 g, του οίκου Sartorius (μοντέλο ) διακριτικής ικανότητας 10-4 g διακριτικής ικανότητας 1 g
- Αναδευτήρας Vortex



## 2.1. Συνθήκες Πειράματος

Τα ψάρια του είδους *Sparus aurata* ( $240 \pm 60$  g) αγοράστηκαν από τον όμιλο ΣΕΛΟΝΤΑ (Ελλάδα) και διατηρήθηκαν στις εγκαταστάσεις του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε) για 3 μήνες πριν την έναρξη του πειράματος. Τα ψάρια διατηρήθηκαν και χωρίστηκαν σε δώδεκα κυλινδρικές δεξαμενές χωρητικότητας 800 λίτρων. Η μέση θερμοκρασία του νερού ήταν  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  και η αλατότητα 38‰. Κατά τη διάρκεια του πειράματος τα ψάρια χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες (3 δεξαμενές ανά ομάδα), που διέφεραν ως προς την τροφή που καταλάωναν (fish oil, plant oil) και τη χορήγηση του αντιμικροβιακού παράγοντα (φλουμεκίνη, οξολινικό οξύ).

Οι φαρμακευτικός δίαιτες δόθηκαν με το χέρι μία φορά την ημέρα σε ποσοστό 1,5-2% του βάρους σώματος του ψαριού στις 13:00 ώρα για 5 ημέρες. Η δοσολογία για το Οξολινικό οξύ και τη Φλουμεκίνη ήταν 75 mg / kg ψαριών και 30 mg / kg ψαριών, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των αντιμικροβιακών παραγόντων στις δίαιτες των ψαριών, ελέγχθηκε πριν από την έναρξη της σίτισης.

## 2.2. Σύνθεση Τροφών

Χρησιμοποιήθηκαν δύο πειραματικές δίαιτες στο είδος *Sparus aurata* με βάση τα ιχθυέλαια (Α) και τα φυτικά έλαια (Β). Η σύνθεση της κάθε τροφής φαίνεται στον **Πίνακα 4**. Και στις δύο τροφές έχει εισαχθεί σογιάλευρο, το οποίο έχει αντικαταστήσει σχεδόν το 50% του ιχθυάλευρου. Η τροφή Α περιλαμβάνει ιχθυέλαιο σε ποσοστό 15%. Στην τροφή Β, το 66% του ιχθυελαίου (10% της τροφής) αντικαταστάθηκε από φυτικά έλαια (κραμβέλαιο, λινέλαιο και φοινικέλαιο σε ποσοστά 1,7, 5,8 και 2,5% αντίστοιχα). Οι δίαιτες με το Οξολινικό οξύ και τη Φλουμεκίνη (θεραπευτικές τροφές) παρασκευάστηκαν με ενσωμάτωση των αντιβακτηριακών στις τροφές Α και Β και χορηγήθηκαν μέσω της τροφής σε δόση 30 mg/kg/ημέρα για το οξολινικό οξύ και 75 mg/kg/ημέρα για τη φλουμεκίνη για 7 ημέρες.

**Πίνακας 4:** Σύνθεση των τροφών Α και Β (%).

Συστατικά (%)	Τροφή Α	Τροφή Β
Ιχθυάλευρο (Ακατέργαστη πρωτεΐνη: CP 70%)	15	15
Συγκέντρωση πρωτεΐνης (CPSP 902)	5	5
Γλουτένη καλαμποκιού	40	40
Σογιάλευρο	14	14
Εξωθημένο σιτάρι	4	4
Ιχθυέλαιο	15	5
Κραμβέλαιο	0	1,7
Λινέλαιο	0	5,8
Φοινικέλαιο	0	2,5
Λεκιθίνη σόγιας	1	1
Συγκολλητική ουσία	1	1
Πρόμιγμα μετάλλων	1	1
Πρόμιγμα βιταμινών	1	1
CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (18%P)	2	2
L-λυσίνη	0,55	0,55

### 2.3. Δειγματοληψία

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν μετά από αναισθητοποίηση των ψαριών με χρήση του αναισθητικού 2-φαινοξυαιθανόλη (2 ml/l). Οι δεξαμενές 1Α, 1Β, 1Γ αντιστοιχούσαν στην τροφή Β και χορήγηση Φλουμεκίνης και οι δεξαμενές 2Α, 2Β, 2Γ αντιστοιχούσαν στην τροφή Α και χορήγηση του ίδιου αντιβιοτικού. Επίσης, οι 3Α, 3Β, 3Γ αντιστοιχούσαν στην τροφή Β και χορήγηση Οξολινικού οξέος και οι 4Α, 4Β, 4Γ αντιστοιχούσαν στην τροφή Α και χορήγηση του ίδιου αντιμικροβιακού παράγοντα.

Συνολικά, δεκαπέντε ψάρια της ομάδας με τροφή Α και Β με χορήγηση Φλουμεκίνης και δώδεκα ψάρια της ομάδας με τροφή Α και Β με χορήγηση Οξολινικού οξέος υποβλήθηκαν σε δειγματοληψία τις επόμενες ημέρες: δύο ημέρες (ημέρα -2) πριν από τη χορήγηση των αντιβιοτικών, την έκτη ημέρα (ημέρα 5) κατά τη διάρκεια της χορήγησης και τρεις ημέρες (ημέρα 8) μετά τη διακοπή των αντιβιοτικών. Μετά από τη ζύγιση ακολούθησε θανάτωση και νεκροτομή των ψαριών και απομάκρυνση των ηπάτων. Τα ήπατα υπέστησαν επεξεργασία σε υγρό άζωτο και τοποθετήθηκαν σε βαθειά κατάψυξη (-80°C) μέχρι τις ενζυμικές και χημικές αναλύσεις.

### 2.4. Προετοιμασία Δειγμάτων

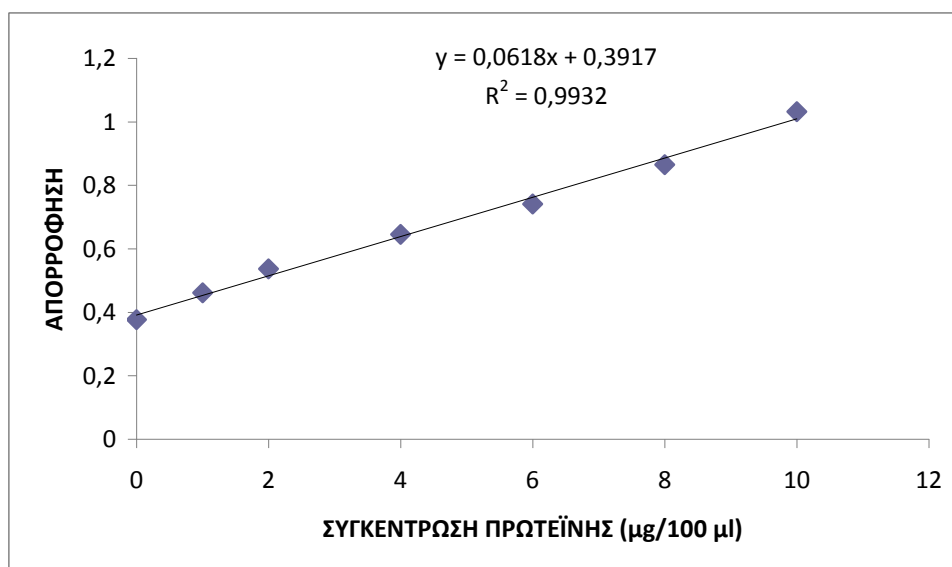
Τα δείγματα απομακρύνθηκαν από τους -80°C και τοποθετήθηκαν σε πάγο, όπου διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ζύγιση και χρησιμοποιήθηκε περίπου 1g ιστού, το οποίο τοποθετήθηκε σε σωλήνα ομογενοποίησης (Potter-Elvehjem Tissue Grinder with Teflon® Pestle). Στο σωλήνα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (το οποίο περιείχε 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 7,4, 0,15 M χλωριούχο κάλιο KCl, 1 mM διθειοθρεϊτόλη DTT, 1 mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ EDTA

και 0,1 M φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο PMSF) σε αναλογία 1:4, ιστός : ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολούθησε ομογενοποίηση σε ομογενοποιητή του οίκου Heidolph. Το ομογενοποιημένο διάλυμα φυγοκεντρήθηκε ακολούθως στις 10.000 g (στροφές) για 20 min στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά με πιπέτα, ώστε να αποφευχθεί η ανάδευση του φυγοκεντρισμένου διαλύματος, καθώς και η λήψη ουσιών από τη στιβάδα των λιπιδίων. Το υπερκείμενο περιελάμβανε στοιχεία του κυττάρου, που απέμειναν μετά την απομάκρυνση μιτοχονδρίων, πυρήνα και άθικτων κυττάρων. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε σε φιαλίδια πολυαιθυλενίου και τοποθετήθηκε σε βαθειά κατάψυξη στους -80°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η βιοχημική ανάλυση.

## 2.5. Προσδιορισμός Πρωτεΐνης στα Δείγματα

Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης στα δείγματα έγινε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα, όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό, ενώ το σύμπλοκο χρωστική-πρωτεΐνη γαλάζιο. Η αξιοπιστία της μεθόδου περιορίζεται σε πρωτεϊνικά δείγματα, που η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 0,04 και 0,20 mg/ml.

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης δημιουργήθηκε αρχικά μία πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης. Η καμπύλη αυτή απεικονίζει την απορρόφηση φωτός, που παρουσιάζουν διαλύματα πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης, στα 750 nm και επομένως δείχνει τη σχέση απορρόφησης-συγκέντρωσης. Για τη δημιουργία της, παρασκευάστηκε αρχικά ένα πρότυπο διάλυμα με αραιώση αλβουμίνης από ορό μόσχου (0,1 mg/ml) σε απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια, αραιώθηκε το διάλυμα αυτό με απεσταγμένο νερό, σχηματίζοντας νέα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 μg/100 μl). Σε μικροπλάκα πολλαπλών θέσεων προστέθηκαν διάφοροι όγκοι των παραπάνω διαλυμάτων και του αντιδραστηρίου Bradford και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 750 nm. Προέκυψε, λοιπόν, η καμπύλη, που απεικονίζεται στο **Γράφημα 1**.

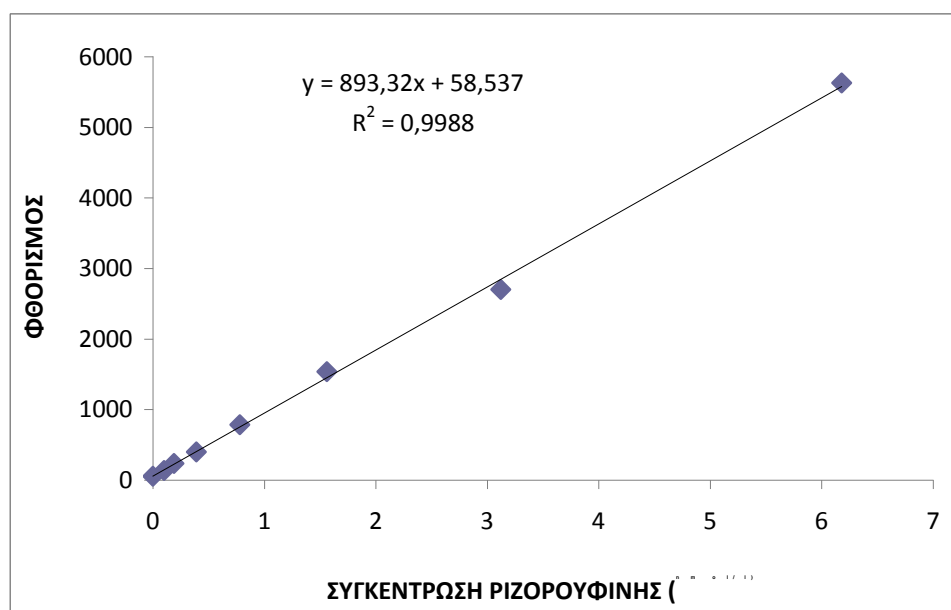


**Γράφημα 1:** Πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης, που απεικονίζει τη σχέση απορρόφησης και συγκέντρωσης πρωτεΐνης.

Ακολούθησε η απομάκρυνση των δειγμάτων από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  και η τοποθέτησή τους σε πάγο, όπου διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Κάθε δείγμα αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:800. Το αραιωμένο δείγμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδια πολυαιθυλενίου. Στη συνέχεια, 100 μl από το αραιωμένο δείγμα και 200 μl από το αντιδραστήριο Bradford προστέθηκαν σε μικροπλάκα πολλαπλών θέσεων και υπολογίστηκε η απορρόφηση στα 750 nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης και την απορρόφηση των δειγμάτων, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

### 2.5.1. Δημιουργία Πρότυπης Καμπύλης Ριζορουφίνης

Η καμπύλη αυτή απεικονίζει το φθορισμό, που παρουσιάζουν διαλύματα ριζορουφίνης γνωστών συγκεντρώσεων και επομένως δείχνει τη σχέση συγκέντρωσης-φθορισμού. Για τη δημιουργία της, αρχικά παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα, διαλύοντας 1 mg της ουσίας ριζορουφίνη σε 50 ml διμεθυσουλφοξειδίου (DMSO) (διάλυμα 15-20 μM). Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένο από το φως. Στη συνέχεια, έγινε αραιώση του σταθερού αυτού διαλύματος με ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M Tris/0,1 M NaCl pH=8) σε διάφορες συγκεντρώσεις για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης για τη ριζορουφίνη. Τέλος, μετρήθηκε η ένταση φθορισμού των παραπάνω διαλυμάτων ριζορουφίνης σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (TECAN, Genios) σε φάσμα διέγερσης 535 nm και φάσμα εκπομπής 590 nm. Προέκυψε λοιπόν η καμπύλη, που απεικονίζεται στο **Γράφημα 2**.



**Γράφημα 2:** Πρότυπη καμπύλη ριζορουφίνης, που απεικονίζει τη σχέση συγκέντρωσης της ουσίας και φθορισμού.

### 2.6. Μέτρηση Δραστηριότητας Ενζύμου EROD

Η δραστηριότητα του ενζύμου EROD μετρήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο των Burke και Mayer (1974), προσαρμοσμένη από τους Galgani και Payne (1994), Burgeot (2001) και του εργαστηρίου Διατροφής & Παθολογίας υδρόβιων οργανισμών (Άγιος Κοσμάς, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε) για μετρήσεις σε κλάσματα S9 (10.000 g) και σε

μικροπλάκα πολλαπλών μετρήσεων. Η δραστηριότητα του ενζύμου EROD περιγράφει το βαθμό αποαιθυλίωσης του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνης μέσω των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A, με τελικό προϊόν την ουσία ριζορουφίνης. Η καταλυτική δραστηριότητα ως προς αυτό το υπόστρωμα είναι μία ένδειξη της ποσότητας του ενζύμου, που υπάρχει στο δείγμα και μετριέται σαν τη συγκέντρωση της ριζορουφίνης, που παράγεται ανά λεπτό ανά mg πρωτεΐνης (mol/min/mg).

Η διαδικασία ξεκίνησε με απομάκρυνση των δειγμάτων από τους -80°C και τοποθέτησή τους σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Ακολούθησε η παρασκευή ορισμένων διαλυμάτων, που απαιτούνται για τη διαδικασία.

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα 7-αιθοξυριζορουφίνης συγκέντρωσης 0,4 mM, διαλύοντας 1 mg του αιθυλαιθέρα της ριζορουφίνης σε 10 ml διμεθυλσουλφοξειδίου (DMSO). Για τη μέτρηση των άγνωστων δειγμάτων, παρασκευάστηκε διάλυμα 7-αιθοξυριζορουφίνης συγκέντρωσης 70 μM, μετά από αραιώση με ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M Tris/0,1 M NaCl pH=8). Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και προστατευμένο από το φως. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε διάλυμα NADPH συγκέντρωσης 10 mM, που προέκυψε από τη διάλυση της ουσίας β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M Tris/0,1 M NaCl pH=8). Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε μικροπλάκα πολλαπλών θέσεων προστέθηκαν σε κάθε κελί 10 μl από το κάθε δείγμα (χωρίς να προηγηθεί αραιώση), 10 μl διαλύματος 7-αιθοξυριζορουφίνης συγκέντρωσης 70 μM, 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος συγκέντρωσης 0,1 M και 10 μl διαλύματος NADPH συγκέντρωσης 10 mM. Το διάλυμα NADPH προστέθηκε τελευταίο και κοντά στο μηχανήμα. Ακολούθησε μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (TECAN, Genios) σε φάσμα διέγερσης 535 nm και φάσμα εκπομπής 590 nm στους 20°C. Οι μετρήσεις παρίσταναν το φθορισμό της ουσίας ριζορουφίνης, που προέκυπε από την αντίδραση της αποαιθυλίωσης του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνης μέσω των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A ανά λεπτό. Με βάση την πρότυπη καμπύλη της ριζορουφίνης και τις παραπάνω μετρήσεις, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της ριζορουφίνης, που παρήχθη από την αντίδραση αποαιθυλίωσης μέσω του ενζύμου που περιέχεται στα δείγματα, ανά λεπτό. Η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα EROD} = (R \times VR) / (P \times VS)$$

όπου:

R: συγκέντρωση της ριζορουφίνης, που παρήχθη,

VR: ο ολικός όγκος σε κάθε κελί,

P: η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος,

VS: ο όγκος του δείγματος σε κάθε κελί.

## 2.7. Μέτρηση Δραστηριότητας Ενζύμου GST

Η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου GST βασίστηκε στη μέθοδο Habig *et al.* (1974). Αρχικά, απομακρύνθηκαν τα δείγματα από τους -80°C και τοποθετήθηκαν στον πάγο (4°C). Έγινε αραιώση των δειγμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0,1 M pH=6,5) σε αναλογία 1:500. Τα αραιωμένα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια πολυαιθυλενίου και διατηρήθηκαν στον πάγο.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε παρασκευή ορισμένων διαλυμάτων, που απαιτήθηκαν για τη διαδικασία. Παρασκευάστηκε, λίγο πριν τη μέτρηση, διάλυμα

γλουταθειόνης (GSH) συγκέντρωσης 10 mM, μετά από διάλυση της ανηγμένης μορφής της L-γλουταθειόνης στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε στον πάγο μέχρι τη χρήση του.

Ακολούθησε παρασκευή, λίγο πριν τη μέτρηση, διαλύματος 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζένιο (CDNB) συγκέντρωσης 60 mM, μετά από διάλυση της ουσίας σε αιθανόλη. Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου προστατευμένο από το φως μέχρι τη χρήση του. Τέλος, παρασκευάστηκε διάλυμα, που περιελάμβανε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, διάλυμα GSH και διάλυμα CDNB σε αναλογία 4.950 μl: 900 μl: 150 μl. Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε στον πάγο προστατευμένο από το φως μέχρι τη χρήση του.

Σε μικροπλάκα πολλαπλών θέσεων τοποθετήθηκαν, σε κάθε κελί, 200 μl από το παραπάνω μίγμα και 100 μl από κάθε αραιωμένο δείγμα. Ακολούθησε μέτρηση απορρόφησης φωτός σε φασματοφωτόμετρο (TECAN, Genios) στα 340 nm στους 25°C αμέσως και κάθε 20 δευτερόλεπτα στα πρώτα 5 λεπτά.

Η αύξηση της απορρόφησης του δείγματος είναι ανάλογη με τη δραστηριότητα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα, που ελήφθησαν από το μηχάνημα, δηλώνουν την απορρόφηση του προϊόντος της αντίδρασης στα 340 nm σε συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ) και προκύπτουν από την εξίσωση:

$$\Delta A_{340}/\text{min} = [A_{340}(\text{τελική}) - A_{340}(\text{αρχική})] / \text{χρόνος αντίδρασης (min)}$$

Για τον υπολογισμό της δραστηριότητας του ενζύμου GST, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\text{Δραστηριότητα GST (nmol/min/ml)} = \Delta A_{340}/\text{min} \times V(\text{ml}) \times \text{dil} / \varepsilon(\text{mM}) \times V_{\text{enz}}(\text{ml})$$

όπου:

$\Delta A_{340}/\text{min}$ : απορρόφηση του προϊόντος της αντίδρασης στα 340 nm σε συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης

V (ml): ο όγκος του διαλύματος, που έγινε η αντίδραση

dil: η αραιώση του δείγματος

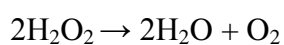
$\varepsilon$  (mM): ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του προϊόντος της αντίδρασης στα 340 nm

$V_{\text{enz}}$  (ml): ο όγκος του δείγματος, που προστέθηκε σε κάθε κελί.

Εφαρμόζοντας τον παραπάνω τύπο για όλα τα δείγματα και με βάση την περιεχόμενη σε κάθε δείγμα συγκέντρωση πρωτεΐνης, υπολογίστηκε η δραστηριότητα του ενζύμου GST σε nmol/min/mg πρωτεΐνης.

## 2.8. Μέτρηση Δραστηριότητας Ενζύμου CAT

Ο προσδιορισμός της καταλάσης έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο (Cohen *et al.*, 1996). Η καταλάση καταλύει την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



Με την προσθήκη του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο δείγμα, το  $\text{H}_2\text{O}_2$  καταναλώνεται και μειώνεται η συγκέντρωσή του. Η συγκέντρωσή του μετρήθηκε

χρωματομετρικά με την προσθήκη ιόντων σιδήρου ( $\text{Fe}^{+2}$ ) και ιόντων θειοκυανούχου ( $\text{SCN}^-$ ).



$\text{Fe}^{+2} + \text{SCN} \rightarrow$  κόκκινο χρώμα

Αρχικά, απομακρύνθηκαν τα δείγματα από τους  $-80^\circ\text{C}$  και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία  $4^\circ\text{C}$ . Παρασκευάστηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών που ήταν απαραίτητα για τη διαδικασία ( $0,1 \text{ M pH}=7,4$  και  $0,01 \text{ M pH}=7$ ).

Πραγματοποιήθηκε πρώτη αραιώση 1/10 των δειγμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα  $0,1 \text{ M pH}=7,4$ , σε αναλογία  $50 \mu\text{l}$  δείγματος:  $450 \mu\text{l}$  διαλύματος και περαιτέρω αραιώση 1:40, σε αναλογία  $100 \mu\text{l}$  δείγματος:  $300 \mu\text{l}$  διαλύματος (δηλαδή, αραιώση δείγματος 1:400). Για κάθε δείγμα η αντίδραση μετρήθηκε στους χρόνους 1min και 10min. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τρεις σειρές δοκιμαστικών σωλήνων. Η πρώτη σειρά διατηρήθηκε σε πάγο, ενώ η δεύτερη και η τρίτη σε θερμοκρασία δωματίου  $25^\circ\text{C}$ .

Στο δεύτερο και τρίτο σωλήνα (Tube II, III) κάθε δείγματος προστέθηκαν  $4 \text{ ml}$  θεικού οξέος  $0,6 \text{ N}$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) και  $1 \text{ ml}$  θεικού σιδήρου  $10 \text{ mM}$  ( $\text{FeSO}_4$ ) και αναδεύτηκαν στο Vortex. Στη συνέχεια έγινε παρασκευή υπεροξειδίου του υδρογόνου  $60 \text{ mM}$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), διαλύοντας  $680 \mu\text{l}$   $30\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$  σε  $100 \mu\text{l}$  απιονισμένου νερού. Τοποθετήθηκε σε πάγο προστατευμένο από το φως.

Στον πρώτο σωλήνα (Tube I) κάθε δείγματος παρασκευάστηκε η αντίδραση. Προστέθηκαν  $50 \mu\text{l}$  δείγματος και  $850 \mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών  $0,01 \text{ M pH}=7$  και αναδεύτηκαν ελαφρώς στο Vortex. Έπειτα, προστέθηκαν  $100 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  και επαναλήφθηκε ελαφριά ανάδευση. Έγινε εκκίνηση στο χρονόμετρο.

Στο 1min έγινε λήψη  $100 \mu\text{l}$  από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα της πρώτης σειράς (Tube I) και τοποθετήθηκαν στους αντίστοιχους σωλήνες κάθε δείγματος της δεύτερης σειράς (Tube II), αναδεύοντας στο Vortex. Στα 10min ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τους δοκιμαστικούς σωλήνες της τρίτης σειράς (Tube III). Μετά τη λήξη των 10min προστέθηκαν  $400 \mu\text{l}$  θειοκυανιούχου καλίου  $2,5 \text{ M}$  ( $\text{KSCN}$ ) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. ανά σειρά (II και III) και αναδεύτηκαν στο Vortex.

Σε μικροπλάκα πολλαπλών θέσεων τοποθετήθηκαν, σε κάθε κελί,  $200 \mu\text{l}$  από το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων II και III κάθε δείγματος. Ακολούθησε μέτρηση απορρόφησης φωτός σε φασματοφωτόμετρο (TECAN, Genios) στα  $490 \text{ nm}$  στους  $25^\circ\text{C}$ .

Για τον υπολογισμό της δραστηριότητας του ενζύμου CAT, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\text{Μονάδες ενζύμου (units)} = k / \text{πρωτεΐνη} = [\ln (A_1/A_2) / t] / \text{πρωτεΐνη}$$

όπου:

$A_1$ : ο μέσος όρος της απορρόφησης στο χρονικό σημείο 1min

$A_2$ : ο μέσος όρος της απορρόφησης στο χρονικό σημείο 10min

t: η διαφορά μεταξύ των δύο χρονικών σημείων (9min στη συγκεκριμένη μέτρηση)

Η δραστηριότητα του ενζύμου καταλάση υπολογίστηκε σε Units/mg πρωτεΐνης.

## 2.9. Στατιστική Ανάλυση

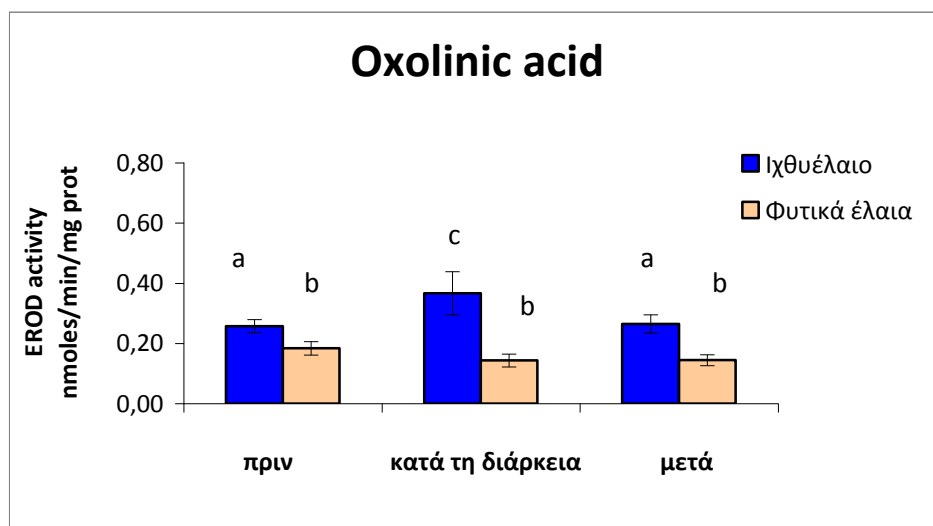
Τα αποτελέσματα όλων των μετρήσεων και υπολογισμών υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση με το πρόγραμμα SPSS 11.0. Οι μέσοι συγκρίθηκαν με μονοπαραγοντική ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA). Για τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντιβιοτικών, τροφών και ημερών ( $P \leq 0,05$ ), πραγματοποιήθηκε περαιτέρω στατιστική ανάλυση με δοκιμή του Tukey όπου ίσχυαν οι προϋποθέσεις της κανονικότητας και της ομοιότητας των διασπορών των μέσων.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Δραστηριότητα του Ενζύμου EROD

Η δραστηριότητα του ενζύμου EROD στα ψάρια που τους χορηγήθηκε η τροφή Α (ιχθυέλαιο) και Β (φυτικά έλαια), απεικονίζεται στα παρακάτω γραφήματα ξεχωριστά για κάθε αντιβιοτικό.



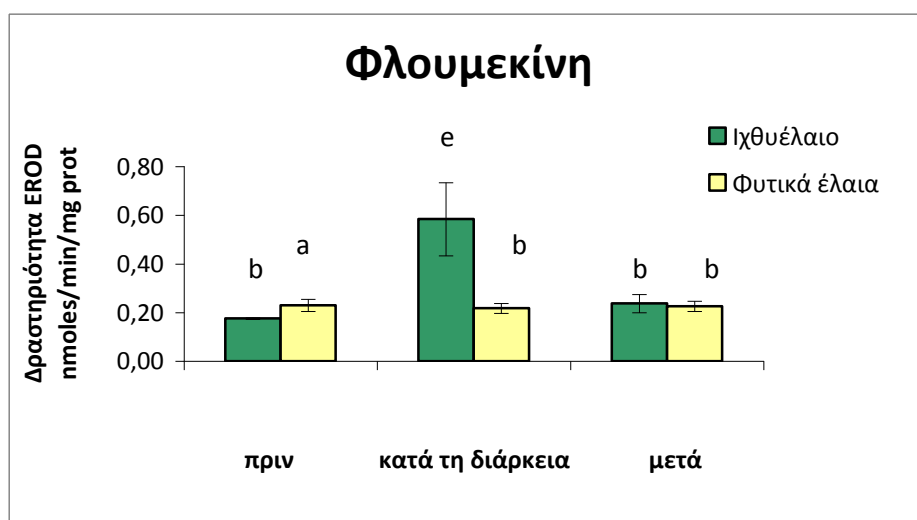
**Γράφημα 3:** Δραστηριότητα του ενζύμου EROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Οξολινικό οξύ μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 4 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ( $P \leq 0,05$ ).

Όταν στα ψάρια χορηγήθηκε τροφή με μοναδική πηγή λίπους το ιχθυέλαιο, η δραστηριότητα του ενζύμου EROD επηρεάστηκε κατά τη χορήγηση του οξολινικού οξέος (ημέρα 5). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση που κρίθηκε στατιστικά σημαντική. Ακολούθως, μετά τη χορήγηση του αντιβιοτικού (ημέρα 8), εκδηλώθηκε μία μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας με στατιστικά σημαντική διαφορά, με τιμές μέσων όμοιες με εκείνες πριν την έναρξη της χορήγησης του αντιβιοτικού (ημέρα -2).

Η πορεία της ενζυμικής δραστηριότητας στο ήπαρ των ψαριών που κατανάλωσαν τροφή με φυτικά έλαια, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις με την πάροδο του χρόνου. Οι μέσες τιμές κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα και τις τρεις ημέρες της δειγματοληψίας, με μία ήπια μείωση την ημέρα 5 και 8, η οποία όμως ήταν ασήμαντου βαθμού.

Συγκρίνοντας τη δραστηριότητα του EROD στο ήπαρ των ψαριών των δύο ομάδων (που έλαβαν διαφορετικές τροφές), διαπιστώθηκε ότι, πριν ξεκινήσει η χορήγηση του οξολινικού οξέος, η δραστηριότητα ήταν σημαντικά μικρότερη στα ψάρια που έλαβαν την τροφή με τα φυτικά έλαια. Ομοίως, στατιστικά σημαντική ήταν και η διαφορά που παρουσιάστηκε κατά τη χορήγηση του αντιβιοτικού μεταξύ των ομάδων με διαφορετικές τροφές. Στην ομάδα που τράφηκε με ιχθυέλαιο αυξήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου και αντίθετα στην ομάδα που τράφηκε με φυτικά έλαια φάνηκε μία μείωση της δραστηριότητας, αν και στατιστικά μη σημαντική. Τέλος, την ημέρα 8, μετά τη διακοπή της θεραπευτικής τροφής με ιχθυέλαιο, το EROD μειώθηκε

σημαντικά, ενώ παράλληλα, παραμένει με υψηλότερες μέσες τιμές σε σχέση με τα ψάρια που δέχθηκαν θεραπευτική τροφή με φυτικά έλαια.



**Γράφημα 4:** Δραστηριότητα του ενζύμου EROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Φλουμεκίνη μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ( $P \leq 0,05$ ).

Στην ομάδα των ψαριών που ακολουθήθηκε διαίτα αποκλειστικά με ιχθυέλαια, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του EROD κατά τη διάρκεια της χορήγησης του αντιβιοτικού φλουμεκίνη (ημέρα 5), από την ημέρα πριν την εκκίνηση (ημέρα -2), και σημαντική μείωση μετά τη διακοπή αυτού (ημέρα 8). Επίσης, στατιστικά σημαντική διαφορά φάνηκε να υπάρχει την ημέρα πριν τη χορήγηση του αντιβιοτικού και την ημέρα μετά τη διακοπή του, με αύξηση της δραστηριότητάς του.

Για την ομάδα των ψαριών που ακολουθήθηκε διαίτα με φυτικά έλαια, δεν έγινε αντιληπτή κάποια μεταβολή στην ενζυμική δραστηριότητα στο ήπαρ, καθώς οι μέσες τιμές κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα σε όλες τις ημέρες της δειγματοληψίας, με μία τάση μείωσης την ημέρα 5, ασήμαντου βαθμού.

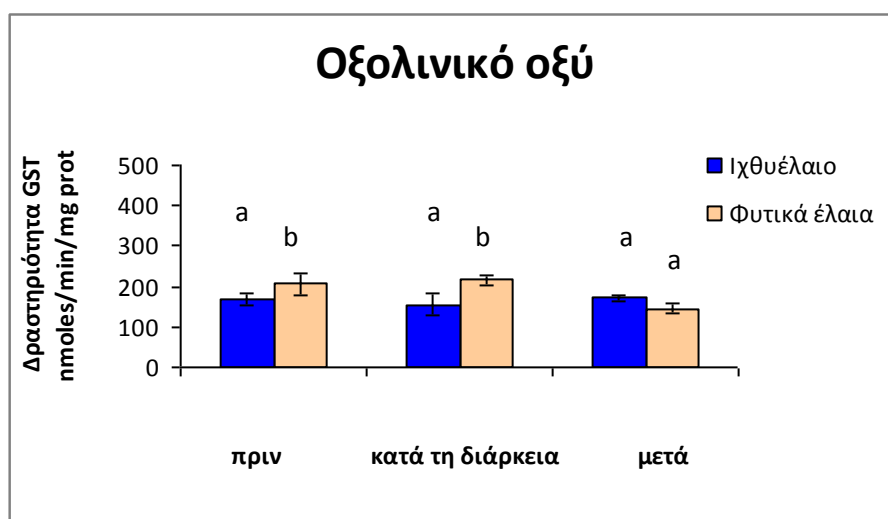
Κάνοντας μία σύγκριση μεταξύ των ομάδων με διαφορετικές τροφές, προκύπτει ότι, παρόλο που η δραστηριότητα του EROD στο ήπαρ των ψαριών που τράφηκαν με ιχθυέλαια ήταν μειωμένη σε σχέση με τα ψάρια που δέχθηκαν τροφή φυτικής προέλευσης, κατά τη διάρκεια της χορήγησης της φλουμεκίνης αυξήθηκε σημαντικά. Αντιθέτως, οι μέσες τιμές της δεύτερης ομάδας, έδειξαν μία ήπια μείωση, ασήμαντου βαθμού σε σχέση με την ημέρα πριν την εκκίνηση του αντιβιοτικού, αλλά στατιστικά σημαντική σε σχέση με την πρώτη ομάδα. Μετά τη διακοπή της φλουμεκίνης, η ενζυμική δραστηριότητα στο ήπαρ των ψαριών της πρώτης και της δεύτερης ομάδας δε διέφερε στατιστικά.

Συγκρίνοντας τα παραπάνω γραφήματα, δηλαδή την επίδραση των δύο ειδών τροφής, ιχθυέλαια και φυτικά έλαια, στη δραστηριότητα του EROD για το βιομετασχηματισμό του οξολινικού οξέος και της φλουμεκίνης, προκύπτει ότι στα ψάρια της πρώτης ομάδας (ιχθυέλαια) παρατηρείται το ίδιο πρότυπο ανεξαρτήτως αντιβιοτικού. Συγκεκριμένα, διαπιστώνεται μία σημαντική αύξηση των μέσων κατά

τη χορήγηση και των δύο αντιβιοτικών και μία σημαντική μείωση την ημέρα μετά τη διακοπή τους. Αυτό δε συμβαίνει και με τις μέσες τιμές της δεύτερης ομάδας (φυτικά έλαια). Εκεί, και στα δύο αντιβιοτικά, φαίνεται μία σχετική μείωση των μέσων κατά τη χορήγηση των αντιβιοτικών σε σχέση με τις υπόλοιπες ημέρες, ενώ στατιστικά δε διαφέρουν σημαντικά, ούτε μεταξύ των ημερών ούτε μεταξύ των αντιβιοτικών. Η υψηλότερη τιμή της δραστηριότητας του EROD παρουσιάστηκε στα ψάρια που τράφηκαν αποκλειστικά με ιχθυέλαια κατά τη διάρκεια της χορήγησης φλουμεκίνης και η χαμηλότερη τιμή παρατηρήθηκε στα ψάρια που τράφηκαν με φυτικά έλαια κατά τη διάρκεια της χορήγησης οξολινικού οξέος.

### 3.2. Δραστηριότητα του Ενζύμου GST

Η δραστηριότητα του ενζύμου GST στα ψάρια που τους χορηγήθηκε η τροφή Α (ιχθυέλαιο) και Β (φυτικά έλαια), απεικονίζεται στα παρακάτω γραφήματα ξεχωριστά για κάθε αντιβιοτικό.



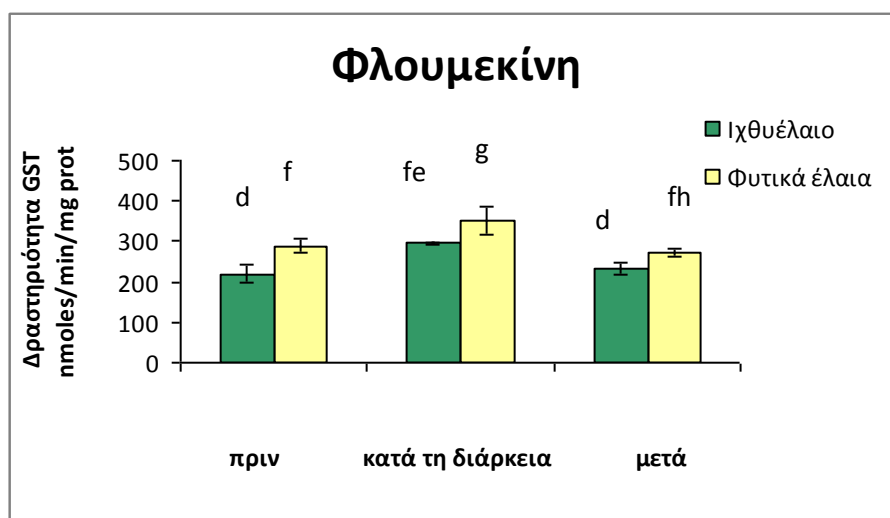
**Γράφημα 5:** Δραστηριότητα του ενζύμου GST (nmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Οξολινικό οξύ μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 4 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ( $P \leq 0,05$ ).

Τα ψάρια που τράφηκαν με ιχθυέλαια, παρουσίασαν σχετική μείωση των μέσων τιμών της δραστηριότητας του ενζύμου GST κατά τη διάρκεια της χορήγησης του οξολινικού οξέος (ημέρα 5), με στατιστικά μη σημαντική διαφορά, και μία σχετική αύξηση την ημέρα μετά τη διακοπή του αντιβιοτικού (ημέρα 8).

Όταν στα ψάρια χορηγήθηκε τροφή με φυτική πηγή λίπους, η δραστηριότητα του ενζύμου GST δεν επηρεάστηκε σημαντικά κατά τη χορήγηση του οξολινικού οξέος από την ημέρα -2 στην ημέρα 5. Οι τιμές κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα με μία τάση αύξησης την ημέρα 5, ενώ δε συνέβη το ίδιο την ημέρα 8 μετά τη διακοπή του αντιβιοτικού. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση που κρίθηκε στατιστικά σημαντική.

Από τη σύγκριση των δύο ομάδων με διαφορετικές τροφές, προέκυψε ότι η ομάδα που τράφηκε μόνο με ιχθυέλαια έφερε μειωμένες τιμές σε σχέση με τις μέσες τιμές της ομάδας που τράφηκε με φυτικά έλαια, τις ημέρες -2 και 5. Αυτό άλλαξε την ημέρα 8, μετά τη διακοπή του οξολινικού οξέος, που παρατηρήθηκε σχετική αύξηση

στη δραστηριότητα του ενζύμου GST της πρώτης ομάδας σε σχέση με τη δεύτερη, παρόλο που δεν κρίθηκε στατιστικά σημαντική.



**Γράφημα 6:** Δραστηριότητα του ενζύμου GST (nmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Φλουμεκίνη μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων  $\pm$  τυπικό σφάλμα του μέσου. Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ( $P \leq 0,05$ ).

Η πορεία της ενζυμικής δραστηριότητας στο ήπαρ των ψαριών που κατανάλωσαν τροφή με ιχθυέλαια, παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις με την πάροδο του χρόνου όταν χορηγήθηκε το αντιβιοτικό φλουμεκίνη. Δηλαδή, κατά τη χορήγηση του αντιβιοτικού (ημέρα 5), εκδηλώθηκε μία αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας με στατιστικά σημαντική διαφορά και στη συνέχεια (ημέρα 8) μία στατιστικά σημαντική μείωση, με τιμές μέσων όμοιες με εκείνες πριν την έναρξη της χορήγησης του αντιβιοτικού (ημέρα -2).

Όμοιο πρότυπο ακολούθησε και η δραστηριότητα του ενζύμου GST στην ομάδα των ψαριών που τράφηκαν με έλαια φυτικής προέλευσης. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση από την ημέρα -2 στην ημέρα 5 και στατιστικά σημαντική μείωση από την ημέρα 5 στην ημέρα 8.

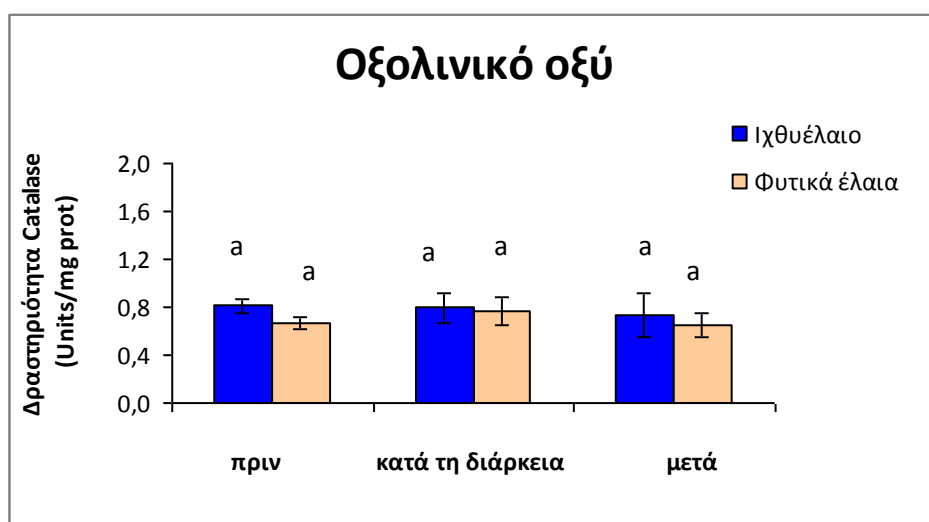
Η επίδραση των δύο ειδών τροφών στο βιομετασχηματισμό της φλουμεκίνης φάνηκε να εκδηλώνεται με το ίδιο πρότυπο στα ψάρια. Παρόλο που, οι τιμές της ομάδας που ακολούθησε δίαιτα με φυτικά έλαια, είναι αυξημένες σε σχέση με τις τιμές της άλλης ομάδας (δίαιτα με ιχθυέλαια) σε όλες τις ημέρες της δειγματοληψίας, η αρχική αύξηση με τη χορήγηση του αντιβιοτικού και η μετέπειτα μείωση μετά από τη διακοπή διακρίνεται και στις δύο περιπτώσεις.

Συγκρίνοντας τα γραφήματα των δύο αντιβιοτικών, η ενζυμική δραστηριότητα στις ομάδες των ψαριών που δέχθηκαν θεραπευτική τροφή με φυτικά έλαια, φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο πρότυπο, αύξηση την ημέρα 5 και μείωση την ημέρα 8, και στο οξολινικό οξύ, με χαμηλότερη ένταση, και στη φλουμεκίνη. Κάτι που δεν παρατηρείται στις ομάδες ψαριών που τράφηκαν με ιχθυέλαια, αφού με τη χορήγηση της φλουμεκίνης η δραστηριότητα του ενζύμου GST μοιάζει με αυτήν που αναφέρθηκε και για την προηγούμενη ομάδα (φυτικά έλαια), ενώ με τη χορήγηση του οξολινικού οξέος διαπιστώθηκε τάση μείωσης την ημέρα 5 και τάση αύξησης την

ημέρα 8. Με τη χρήση της φλουμεκίνης σαν αντιμικροβιακό παράγοντα, οι μέσες τιμές και των δύο ομάδων διαφορετικής τροφής αυξήθηκαν σημαντικά. Η υψηλότερη τιμή της δραστηριότητας του ενζύμου GST παρουσιάστηκε στα ψάρια που τράφηκαν με έλαια φυτικής προέλευσης κατά τη διάρκεια χορήγησης της φλουμεκίνης και η χαμηλότερη τιμή παρατηρήθηκε στα ψάρια που τράφηκαν με φυτικά έλαια μετά τη διακοπή του οξολινικού οξέος.

### 3.3. Δραστηριότητα του ενζύμου CAT

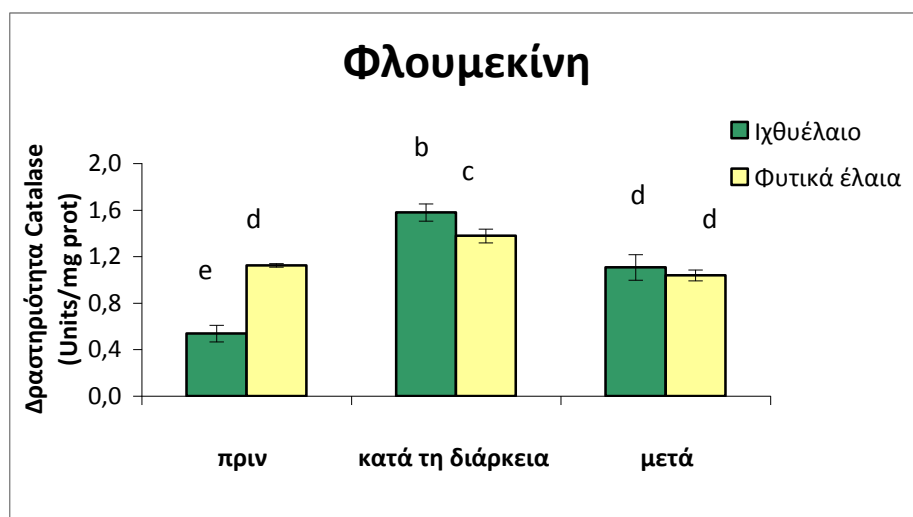
Η δραστηριότητα του ενζύμου CAT στα ψάρια που τους χορηγήθηκε η τροφή Α (ιχθυέλαιο) και Β (φυτικά έλαια), απεικονίζεται στα παρακάτω γραφήματα ξεχωριστά για κάθε αντιβιοτικό.



**Γράφημα 7:** Δραστηριότητα του ενζύμου CAT (Units/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Οξολινικό οξύ μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 4 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ( $P \leq 0,05$ ).

Η δραστηριότητα της καταλάσης υπό την επίδραση του οξολινικού οξέος δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών (-2, 5, 8) τόσο για την ομάδα που τράφηκε με ιχθυέλαια όσο και για την ομάδα που τράφηκε με φυτικά έλαια. Στην πρώτη περίπτωση εκδηλώθηκε μία ήπια τάση μείωσης την ημέρα 8 μετά τη διακοπή του αντιβιοτικού. Στη δεύτερη περίπτωση, μπορεί να αναφερθεί ότι σημειώθηκε μία ήπια τάση αύξησης την ημέρα 5 και μία τάση μείωσης της δραστηριότητας της καταλάσης την ημέρα 8.

Επίσης, κατά τον ίδιο τρόπο, οι διαφορές μεταξύ των θεραπευτικών τροφών δεν κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές. Παρότι σημειώθηκαν μικρότερες τιμές στους μέσους της ομάδας που έλαβε τροφή με φυτικά έλαια, δεν αποτελούν στατιστικά σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 8:** Δραστηριότητα του ενζύμου CAT (Units/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν το αντιβιοτικό Φλουμεκίνη μέσω τροφών διαφορετικής σύστασης. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 5 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Μέσοι όροι με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους ( $P \leq 0,05$ ).

Στην ομάδα των ψαριών που δόθηκε θεραπευτική τροφή με ιχθυέλαια, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στο ήπαρ των ψαριών κατά τη χορήγηση της φλουμεκίνης. Ακολούθως, φάνηκε να μειώνεται σημαντικά μετά τη διακοπή αυτού.

Ομοίως, στην ομάδα που δόθηκε θεραπευτική τροφή με αντικατάσταση ενός μέρους ιχθυελαίων από φυτικά έλαια, εμφανίζεται σημαντική αύξηση των μέσων τιμών της καταλάσης κατά τη χορήγηση του αντιβιοτικού (ημέρα 5) και σημαντική μείωση μετά τη διακοπή (ημέρα 8).

Η μεταβολή της δραστηριότητα της καταλάσης υπό την επίδραση του αντιβιοτικού φλουμεκίνη ακολουθεί το ίδιο πρότυπο ανεξαρτήτως είδους τροφής (ιχθυέλαια, φυτικά έλαια). Ειδικότερα, πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού οι μέσοι της καταλάσης στην ομάδα ψαριών που τράφηκαν με ιχθυέλαια ήταν σημαντικά μικρότεροι από τους μέσους της ομάδας που τράφηκαν με φυτικής προέλευσης έλαια. Παράλληλα, η αύξηση των μέσων τιμών της πρώτης ομάδας (ιχθυέλαια) μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού είναι μεγαλύτερης έντασης από την αύξηση των μέσων τιμών της δεύτερης (φυτικά έλαια). Τέλος, τα επίπεδα που κυμαίνονται οι μέσοι μετά τη διακοπή της φλουμεκίνης είναι τα ίδια, δε διαφέρουν σημαντικά, και στις δύο ομάδες.

Συγκρίνοντας τα παραπάνω γραφήματα του οξολινικού οξέος και της φλουμεκίνης, διαπιστώνεται ότι η δραστηριότητα της καταλάσης στο πρώτο αντιβιοτικό, και στα δύο είδη τροφής, παραμένει στα ίδια επίπεδα τόσο στο χρόνο (διαφορετικές ημέρες δειγματοληψίας), όσο και μεταξύ των ομάδων με διαφορετικό είδος τροφής. Αντιθέτως, στο πείραμα της φλουμεκίνης, διακρίνεται μία ένονη αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης κατά τη διάρκεια που χορηγείται το αντιβιοτικό και μία σημαντική μείωση των τιμών αφού διακοπεί. Την ημέρα 8 φαίνεται ότι και στις δύο ομάδες ψαριών (τροφή με ιχθυέλαια και φυτικά έλαια) η καταλάση εμφανίζεται με ίδιες τιμές μέσων, κάτι που ισχύει και στο οξολινικό οξύ. Η υψηλότερη τιμή της δραστηριότητας του ενζύμου καταλάση παρουσιάστηκε στα ψάρια που τράφηκαν με ιχθυέλαια κατά τη διάρκεια χορήγησης της φλουμεκίνης και η χαμηλότερη τιμή

παρατηρήθηκε στα ψάρια που τράφηκαν με ιχθυέλαια πριν την προσθήκη της φλουμεκίνης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένα σημαντικό πρόβλημα, που επηρεάζει τις υδατοκαλλιέργειες είναι η διαθεσιμότητα της τροφής. Κάτω από τις εντατικές συνθήκες εκτροφής, που επικρατούν στην Ευρώπη, το ιχθυάλευρο και το ιχθυέλαιο είναι τα πιο συνηθισμένα συστατικά των τροφών, που προμηθεύουν τον οργανισμό με απαραίτητα συστατικά (αμινοξέα, λιπαρά οξέα, μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία) για την ανάπτυξη, υγεία, αναπαραγωγή και τις φυσιολογικές λειτουργίες των εκτρεφόμενων ψαριών. Η γρήγορη, όμως, ανάπτυξη του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας σε συνδυασμό με τη μείωση των ιχθυαποθεμάτων, τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει οδηγήσει σε αύξηση των απαιτήσεων σε ιχθυέλαιο και σε άλλα συστατικά, που χρησιμοποιούνται στις τροφές. Έτσι, δημιουργήθηκε η ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών πηγών ελαίων, που θα συμπεριλαμβάνονται στις δίαιτες των ψαριών.

Η ενσωμάτωση των φυτικών ελαίων στη διατροφή των ψαριών έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια, λόγω της μεγάλης ανάγκης για αντικατάσταση του ιχθυελαίου (Φραγκούλη, 2011). Πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της μερικής ή ολικής αντικατάστασης του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια στην ανάπτυξη, στο ανοσοποιητικό σύστημα και την ανταπόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες σε ψάρια του είδους *Sparus aurata*. Η ανάπτυξη της τσιπούρας φαίνεται να μειώνεται μετά από ολική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια (σογιέλαιο, λινέλαιο ή μίγμα αυτών). Ωστόσο, η μειωμένη ανάπτυξη αυτών των ψαριών μπορεί να αντισταθμιστεί από την επαναφορά στην τροφή, που περιέχει ιχθυέλαιο σε μοναδική πηγή λίπους (Montero *et al.*, 2008). Από την άλλη πλευρά, όταν τσιπούρες έλαβαν τροφή, στην οποία είχε αντικατασταθεί το 33% ή το 66% του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια (μίγμα λινέλαιου, κραμβέλαιου και φοινικέλαιου), δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ανάπτυξή τους. Οι Regost *et al.* (2003) δοκίμασαν τρεις ισαζωτούχες και ισολιπιδικές δίαιτες με ιχθυέλαιο, σογιέλαιο ή λινέλαιο σε πληθυσμούς καλκανιών (*Psetta maxima*) για τρεις μήνες. Μετά το πέρας, δόθηκε για δύο μήνες τροφή με μοναδική πηγή λίπους το ιχθυέλαιο σε όλες τις ομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αρχική διαίτα με τα φυτικά έλαια επηρέασε σημαντικά την οργανοληπτική ποιότητα της σάρκας ιδιαίτερα την οσμή, το χρώμα και την υφή.

Όσον αφορά στην επίδραση των φυτικών ελαίων στο ανοσοποιητικό σύστημα και την ανταπόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες, οι Montero *et al.* (2003) παρατήρησαν, ότι δεν εκδηλώθηκε καμία αλλαγή στις ανοσολογικές παραμέτρους και στην ανταπόκριση στο στρες σε τσιπούρες, που έλαβαν, για μικρό χρονικό διάστημα (101 μέρες), τροφές, όπου είχε γίνει μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια. Αντίθετα, όταν τα ψάρια διατράφηκαν με τις παραπάνω δίαιτες για μακρά χρονική περίοδο (204 μέρες), επηρεάστηκαν οι παραπάνω παράμετροι, αλλά μόνο όταν το ιχθυέλαιο αντικαταστάθηκε από μεμονωμένα φυτικά έλαια.

Οι Bell *et al.* (2001), μελέτησαν την επίδραση πέντε διαφορετικών τροφών στο σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*), με μερική ή ολική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από το κραμβέλαιο. Η σύσταση της τροφής στην πρώτη ομάδα ήταν 100% ιχθυέλαιο και 0% κραμβέλαιο, στη δεύτερη 90% ιχθυέλαιο και 10% κραμβέλαιο, στην τρίτη 75% ιχθυέλαιο και 25% κραμβέλαιο, στην τέταρτη 50% ιχθυέλαιο και 50% κραμβέλαιο και στην πέμπτη 0% ιχθυέλαιο και 100% κραμβέλαιο. Η έρευνα έδειξε ότι το κραμβέλαιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως υποκατάστατο των ιχθυελαίων στην καλλιέργεια του σολομού του Ατλαντικού, σε ποσοστό <50%. Παρόλο που δεν υπήρξαν επιδράσεις της διατροφής στο ρυθμό ανάπτυξης ή αλλοιώσεις στο ήπαρ, την καρδιά και τους νεφρούς, σε μεγαλύτερα



ποσοστά αντικατάστασης του ιχθυελαίου, διαπιστώθηκαν σημαντικές μειώσεις στα 20:5(n-3), 22:6(n-3) και (n-3)/(n-6) πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) στους μύες, αναλογία η οποία πιθανώς να οδηγήσει σε μειωμένη διαθεσιμότητα των (n-3) πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία είναι ευεργετικά για την ανθρώπινη υγεία .

Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν και για τη μερική αντικατάσταση των ιχθυάλευρων από φυτικά άλευρα. Οι Webster *et al.* (1992), μετά από μελέτη στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*), κατέληξαν στο συμπέρασμα της επιτυχούς αντικατάστασης έως και 33% των ιχθυάλευρων από σογιάλευρα και άλευρα σιτηρών, χωρίς να παρουσιάζουν επιπτώσεις στο βάρος, μήκος, ρυθμό ανάπτυξης και επιβίωση των ψαριών. Τα ίδια αποτελέσματα έδειξαν και μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*) από τους Carter και Haule (2000) και στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), καθώς, επίσης, η εθελοντική πρόσληψη τροφής (VFI) φάνηκε να μην επηρεάζεται από την αλλαγή σύστασης της τροφής (Kaushik *et al.*, 2004).

Λίγες, ωστόσο, έρευνες έχουν γίνει σχετικά με την επίδραση της αντικατάστασης του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια στο μεταβολισμό των φαρμάκων. Οι Rigos *et al.* (2009) μελέτησαν την επίδραση της μερικής αντικατάστασης του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων (λινέλαιο, κραμβέλαιο και φοινικέλαιο) στη διαθεσιμότητα του οξολινικού οξέος σε ψάρια του είδους *Sparus aurata*. Παρατηρήθηκε, ότι η αντικατάσταση δεν είχε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση του φαρμάκου στους ιστούς και ότι η διαθεσιμότητα του οξολινικού οξέος ήταν παρόμοια μεταξύ των ψαριών, που έλαβαν διαφορετικές τροφές.

Η έλλειψη επίδρασης της αντικατάστασης του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια στη συγκέντρωση φαρμάκων στους ιστούς ψαριών του ίδιου είδους παρατηρήθηκε και σε ανάλογο πείραμα, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε μια άλλη αντιβακτηριακή ουσία (οξυτετρακυκλίνη) (Rigos *et al.*, 2011). Η αντικατάσταση του 66% του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων, στην έρευνα αυτή, δεν είχε σημαντική επίδραση στη διαθεσιμότητα της οξυτετρακυκλίνης στην τσιπούρα. Τα ψάρια, που έλαβαν τροφή με φυτικά έλαια, παρουσίασαν ελαφρά, αλλά όχι σημαντικά, υψηλότερες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο πλάσμα σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Οι επιδράσεις του οξολινικού οξέος και της φλουμεκίνης στα ηπατικά ένζυμα του κυτοχρώματος P450, μελετήθηκαν από τους Moutou *et al.* (1998) στην ιριδίζουσα πέστροφα. Η επίδραση της φλουμεκίνης στη δραστηριότητα του EROD εμφανίστηκε από την πρώτη μέρα μετά τη θεραπεία και ήταν 4,2 φορές μεγαλύτερη από τη δραστηριότητα στα ψάρια μάρτυρες, ενώ το οξολινικό οξύ προκάλεσε σταδιακή αύξηση των δραστηριοτήτων του ενζύμου EROD μεταξύ των ημερών 5 και 10 μετά το τέλος της θεραπείας.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της μερικής αντικατάστασης του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων (λινέλαιο, κραμβέλαιο και φοινικέλαιο) στο βιομετασχηματισμό του οξολινικού οξέος και της φλουμεκίνης στην τσιπούρα (*Sparus aurata*). Ο έλεγχος της επίδρασης έγινε με την παρακολούθηση της δραστηριότητας των ενζύμων, που συμμετέχουν στη φάση I και στη φάση II του μεταβολισμού των αντιμικροβιακών παραγόντων και του αντιοξειδωτικού ενζύμου καταλάση (EROD, GST, CAT).

Κατά τη χορήγηση του οξολινικού οξέος, στο ήπαρ των ψαριών που έλαβαν την τροφή Α (ιχθυέλαιο), παρατηρήθηκε σημαντική επαγωγή της δραστηριότητας του ενζύμου EROD. Την επαγωγή ακολούθησε μία, σημαντικού βαθμού, πτώση της δραστηριότητας. Στη μέτρηση, που έγινε μετά τη διακοπή της χορήγησης του οξολινικού οξέος, η δραστηριότητα κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα με αυτά πριν την έναρξη χορήγησής του. Διαφορετική ήταν η πορεία της δραστηριότητας του ενζύμου

στα ψάρια που κατανάλωσαν την τροφή Β (φυτικά έλαια). Στα ψάρια αυτά η χορήγηση του οξολινικού οξέος δεν επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου EROD. Αντίστοιχα, το ίδιο πρότυπο ενζυμικής δραστηριότητας, παρατηρήθηκε και στις ομάδες των ψαριών με τροφή Α και τροφή Β, όταν χορηγήθηκε φλουμεκίνη, ως αντιβιοτικό. Από τα αποτελέσματα, μπορεί να ειπωθεί ότι, κατά τη φάση Ι του μεταβολισμού, τα ηπατικά ένζυμα αποτοξικοποίησης των ομάδων με τροφή Α, αυξάνουν τη δραστηριότητά τους κατά την προσθήκη ενός αντιβιοτικού για να το βιομετασχηματίσουν επιτυχώς. Κάτι που δε φάνηκε να συμβαίνει και στις ομάδες ψαριών με τροφή Β. Εκεί σημειώθηκαν μεταβολές μη σημαντικού βαθμού, είτε στις τιμές της δραστηριότητας του EROD μεταξύ των ημερών της δειγματοληψίας είτε μεταξύ των δύο αντιβιοτικών.

Όταν μετρήθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου GST στο ήπαρ των ψαριών που τράφηκαν με την τροφή Α (ιχθυέλαιο) κατά τη χορήγηση του οξολινικού οξέος, παρουσιάστηκε μία τάση μείωσης, στατιστικά μη σημαντική. Αυτήν την τάση ακολούθησε μία ήπια αύξηση των μέσων τιμών μετά τη διακοπή του αντιβιοτικού. Το αντίθετο διαπιστώθηκε για την ομάδα ψαριών με τροφή Β (φυτικά έλαια), με μία τάση αύξησης της ενζυμικής δραστηριότητας και μία σημαντική ελάττωση μετά τη διακοπή του αντιβιοτικού. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι τιμές πριν την προσθήκη και κατά τη διάρκεια της χορήγησης στην ομάδα με την τροφή Β ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από την ομάδα με την τροφή Α. Οι μη σημαντικές μεταβολές στην δραστηριότητα του ενζύμου GST της φάσης ΙΙ του μεταβολισμού, πιθανώς να σηματοδοτούν την αναστολή του ενζύμου και τον ανεπιτυχή βιομετασχηματισμό του αντιμικροβιακού παράγοντα. Από την άλλη πλευρά, κατά τη χορήγηση της φλουμεκίνης, και στις δύο ομάδες με διαφορετική διαίτα, παρατηρήθηκε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της χορήγησης του αντιβιοτικού και μείωση μετά το πέρας. Οι τιμές της ομάδας με την τροφή Β, ήταν σημαντικά αυξημένες σε σύγκριση με την ομάδα με την τροφή Α. Επίσης, οι τιμές που μετρήθηκαν στη φλουμεκίνη ήταν υψηλότερες από αυτές που υπολογίστηκαν στο οξολινικό οξύ. Γίνεται αντιληπτό ότι, στην περίπτωση της φλουμεκίνης, και στις δύο ομάδες με διαφορετική τροφή, τα ηπατικά ένζυμα της τσιπούρας λειτούργησαν με το ίδιο πρότυπο κατά τη φάση ΙΙ του μεταβολισμού. Η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου GST κατά τη διάρκεια της χορήγησης του αντιμικροβιακού παράγοντα, είναι αναμενόμενη κι επιθυμητή, στην προσπάθεια του ψαριού να αποτοξικοποιηθεί.

Η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου CAT, δεν παρουσίασε μεταβολές κατά τη χορήγηση του οξολινικού οξέος σε καμία ομάδα ψαριών (τροφή Α και τροφή Β), τόσο στις ημέρες της δειγματοληψίας όσο και μεταξύ των ομάδων. Όταν, όμως, χορηγήθηκε φλουμεκίνη ως αντιβιοτικό, υπήρξαν σημαντικές αυξήσεις στη διάρκεια χορήγησης της. Τις αυξήσεις αυτές ακολούθησαν σημαντικές μειώσεις της δραστηριότητας στο ήπαρ των ψαριών μετά τη διακοπή της φλουμεκίνης. Οι τιμές της καταλάσης ήταν σημαντικά αυξημένες στην ομάδα με την τροφή Β σε σχέση με την ομάδα με την τροφή Α, πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού. Κατά τη διάρκεια της χορήγησης του αντιβιοτικού και μετά τη διακοπή, οι τιμές στην ομάδα με την τροφή Β ήταν μικρότερες από την ομάδα με την τροφή Α.

Συγκρίνοντας τις δραστηριότητες των ηπατικών ενζύμων της τσιπούρας, για το βιομετασχηματισμό των αντιβιοτικών οξολινικό οξύ και φλουμεκίνη, διακρίνεται ένα παρόμοιο πρότυπο δραστηριότητας (επαγωγή ή αναστολή) των ενζύμων όσον αφορά στο μεταβολισμό της φλουμεκίνης, και από τις δύο ομάδες ψαριών (τροφή Α και τροφή Β). Συγκεκριμένα, φαίνεται να αυξάνουν τη δραστηριότητά τους όταν το αντιβιοτικό προστίθεται, για να επιτύχουν την βιομετασχηματισμό του, και μετά, οι τιμές επανέρχονται στα ίδια επίπεδα με τη στιγμή πριν από την προσθήκη. Στο

πείραμα με το οξολινικό οξύ δεν είναι τόσο σαφής ο τρόπος ηπατικής δραστηριότητας. Οι μεταβολές κρίθηκαν σημαντικές, ανάμεσα στις δύο ομάδες με διαφορετικές τροφές, στη μέτρηση των ενζύμων EROD και GST, χωρίς να λειτουργούν όμως με τον ίδιο τρόπο. Στην ομάδα με την τροφή A, παρατηρείται επαγωγή του ενζύμου EROD κατά τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στη φλουμεκίνη. Αντιθέτως, η ενζυμική δραστηριότητα στην ομάδα με την τροφή B φαίνεται αμετάβλητη μετά την προσθήκη του οξολινικού οξέος, σημειώνοντας και σημαντικά μικρότερες τιμές από την πρώτη ομάδα.

Σύμφωνα και με τα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού ενζύμου CAT, που παρουσίασαν ίδιες τιμές σε όλη τη διάρκεια του πειράματος και στις δύο ομάδες κατά τη χορήγηση του οξολινικού οξέος, φαίνεται να μην επηρεάζεται η δραστηριότητα του ενζύμου από τη διαφορετική σύσταση της τροφής (τροφή A και B). Στην περίπτωση της φλουμεκίνης, όμως, πιθανώς η διαφορετική σύσταση της τροφής να επιδρά στη δραστηριότητα της CAT, αφού είναι εντονότερη, κατά τη χορήγηση του αντιβιοτικού και μετά τη διακοπή του στην ομάδα, με τροφή A.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σύγχρονη τάση αντικατάστασης των ιχθυοτροφών γεννά πολλά ερωτήματα, ηθικά και οικονομικά. Τα τεχνητά περιβάλλοντα ανάπτυξης των ψαριών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκα όσον αφορά στους παράγοντες που πρέπει να συνυπολογισθούν. Μία ιχθυοκαλλιέργεια οφείλει να παράγει κατάλληλα προς βρώση ψάρια, τηρώντας τις βασικές αρχές της βιολογίας των ειδών και των υγειονομικών κανονισμών. Η μειωμένη διαθεσιμότητα των φυσικών πόρων δίνει ώθηση για αναζήτηση νέων πηγών που θα πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις. Κάθε προσπάθεια για την ανάπτυξη και την εξέλιξη στους περισσότερους τομείς είναι συνυφασμένη με τη μείωση του κόστους παραγωγής, διατήρησης και διάθεσης. Στην περίπτωση που τα αντικείμενα-προϊόντα είναι έμβιοι οργανισμοί, το ρίσκο για την εφαρμογή νέων μεθόδων είναι ακόμα μεγαλύτερο. Όμως, ποιο είναι τα όρια της παρέμβασης στη βιολογία των ειδών;

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων του πειράματος διαπιστώθηκε ότι η σύνθεση της τροφής αποτέλεσε παράγοντα, που επηρέασε τη διαδικασία του βιομετασχηματισμού στα ψάρια του είδους *Sparus aurata*, με διαφορετικό τρόπο σε κάθε περίπτωση. Παρά το γεγονός, ότι η μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων δε φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη των ψαριών αυτών, σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει, διακρίνεται η επίδραση στα ένζυμα τόσο της φάσης I όσο και της φάσης II του μεταβολισμού.

Η χρησιμοποίηση των φυτικών ελαίων στην τροφή της τσιπούρας ως εναλλακτικές πηγές ελαίων επηρέασε το βιομετασχηματισμό του οξολινικού οξέος και της φλουμεκίνης στα ψάρια αυτά. Επομένως, η χορήγηση των αντιμικροβιακών αυτών παραγόντων συνιστάται να γίνεται με έλεγχο, λαμβάνοντας υπόψη τη διατροφή των ψαριών. Παρόλα αυτά είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση και άλλων ερευνών για να καθοριστεί ο ρόλος των διαφορετικών διατροφικών παραγόντων στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### *Ελληνική Βιβλιογραφία*

- Αποστολόπουλος, Ι.Σ., Τσουκνίδης, Α.Δ. και Χριστόπουλος, Χ.Ι. (1994). Η εκτροφή τσιπούρας - λαβρακιού στην Ελλάδα. Σημερινή κατάσταση- Προβλήματα- Προοπτικές. Αγροτική Τράπεζα της Ελλάδος Α.Ε., Τμήμα Εκδόσεων & Εντύπων, Αθήνα.
- Ιωσιφίδου, Ε.Γ. και Ψωμάς, Ι.Ε. (1996). Προσέγγιση στο πρόβλημα των καταλοίπων των κτηνιατρικών φαρμάκων στους ιχθείς των εκτροφών. Ελληνική πραγματικότητα. *Δελτίον της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, **47** (1): 19-25.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ [ΕΟΚ] 2377/90 του Συμβουλίου της 26ης Ιουνίου 1990 για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, **L 224**: 1-8.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ [ΕΟΚ] 1568/98 του Συμβουλίου της 17ης Ιουλίου 1998 για την τροποποίηση των Παραρτημάτων I, II, III και IV του Κανονισμού [ΕΟΚ] 2377/90 για τον καθορισμό των κοινοτικών διαδικασιών καθορισμού των μέγιστων ορίων καταλοίπων των κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, **L 205**: 1-6.
- Μούζουρας, Σ.Γ. (1996). Κτηνιατρική Φαρμακολογία. σελ.351-352, 355-356.
- ΣΕΘ (2000). Θαλάσσιες Ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα. Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών.
- Στεργίου, Α. (2011). Μελέτη Κλωβού Ιχθυοκαλλιέργειας Ανοιχτής Θαλάσσης, Κρήτη.
- Τυρπένου, Α.Ε (2002). Υδροχρωματογραφικός προσδιορισμός των καταλοίπων της υδροχλωρικής σαραφλοξακίνης μετά από χορήγηση αυτής με την τροφή σε εκτρεφόμενες τσιπούρες, Θεσσαλονίκη.
- Φραγκούλη, Χ.Α. (2011). Επίδραση της σύστασης (Φυτικό Έλαιο και Ιχθυέλαιο) των Ιχθυοτροφών στο Βιομετασχηματισμό και την Αποτοξικοποίηση του Οξολινικού Οξέος στην Τσιπούρα (*Sparus aurata*), Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αθήνα.
- Φώτης, Γ. (1999). Υδάτινο περιβάλλον, Στοιχεία ιχθυολογίας, Ιχθυοτροφία και Ιχθυολογία. Τόμος Α'. Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων. Εκδόσεις «Σύγχρονη Παιδεία», Θεσσαλονίκη.
- Χώτος, Γ.Ν. και Ρογδάκης, Ι.Γ. (1992). Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών. Λαβράκι & Τσιπούρα. Τεχνικές της αναπαραγωγής και Πάχυνσης. Εκδόσεις «ΙΩΝ» Στέλλα Παρίκου & ΣΙΑ Ο.Ε., Αθήνα.

### ***Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία***

- Abrahamson, A. (2007). Gill EROD Activity in Fish. A Biomarker for Waterborne Ah-receptor Agonists. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology, pp. 311.
- Akdogan, H.A. and Sen, A. (2010). Characterization of drug metabolizing enzymes and assessment of aging in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver. *Veterinari Medicina*, **55** (9): 463–47.
- Alexis, M.N. (1997). Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. CIHEAM - Options Mediterraneeennes, National Center for Marine Research, Agiow Kosmas, Helliniko, Greece.
- Alfonso- Prieto, M., Vidossich, P. and Rovira, C. (2012). The reaction mechanisms of heme catalases: An atomistic view by *ab initio* molecular dynamics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **525**(2): 121–130.
- Arnold, D. (1990). Importance of pharmacokinetics in the determination of withdrawal times. *Ann Resh Vet.*, **21**: 1,93-105.
- Beliaeff, B. and Burgeot, T. (1997). Sampling design optimization for EROD measurements in fish. *Marine Ecology Progress Series*, **153**: 239-246.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J. and Sargent, G.R. (2001). Replacement of Fish Oil with Rapeseed Oil in Diets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Affects Tissue Lipid Compositions and Hepatocyte Fatty Acid Metabolism1. *J. Nutr. May 1*, **131** (5): 1535-1543.
- Blanchette, B., Feng, X. and Singh, B.R. (2007). Marine Glutathione S-Transferases. *Marine Biotechnology*, **9**: 513-542.
- Borvinskaya, E.V., Smirnov, L.P and Nemova, N.N. (2009). A comparative study of the glutathione S-transferase activity in whitefish (*Coregonus lavaretus*) from basins with different pollution levels. Institute of biology of Karelian Research Center of Russian Academy of Sciences Petrozavodsk, Russian Federation.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Brown, A.W., Hoppe, H.G. and Rosenthal, H. (2000). Changes in bacterial abundance and community structure in cage fish-culture caused by water turbulence during feeding. *Journal of Applied Ichthyology*, **16**: 27-31.
- Brown, K.T., and Gray, A. (1993). Legislation Affecting Farmed Fish, pp.173-177.
- Burgeot, T. (2001). Standard operation procedures for EROD determination. The BEEP Workshop, Report, IFREMER Nantes, France.

- Burgeot, T., Bocquene, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R.M., Garcia De La Parra, L.M., Pfhollaszkwicz, A., Raoux, C. and Galgani, F. (1996). Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean sea. *Mar Ecol Prog Ser.*, **131**: 125-141.
- Caizergues, Ph. and Guyonnet, J. (1995a). Flumequine residue depletion study after repeated intramuscular doses in ruminant calves. Sanofi Santé Nutrition Animale.
- Carter, C.G. and Haule, R.C. (2000). Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, **185** (3–4): Pages 299–311.
- Cheevaporn, V and Beamish, F.W.H. (2007). Cytochrome P450 1A activity in liver and fixed wavelength fluorescence detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of tongue-fish (*Cynoglossus acrolepidotus*, Bleeker) in relation to petroleum hydrocarbons in the eastern Gulf of Thailand. *Journal of Environmental Biology*, **28** (4): 701-705 .
- Christofilogiannis, P. (1993). The veterinary approach to seabass and sea-bream. In: Brown, L. (ed). *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine*. Pergamon Press, Oxford, pp. 379–393.
- Cohen, M., Kim, M. and Ogwu, V. (1996). A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, **67**: 53-56.
- Committee for Veterinary Medicinal Products (1998). Oxolinic acid, Summary Report (1). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, *Veterinary Medicines and Information Technology*.
- Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G. and Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.*, **27**: 1110–1121.
- Elham, W.A., Norhan, S.E., Heyam, A. (2009). Vegetable oil blend as alternative lipid resources in diets for gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquacult Int*, **17**: 421–435.
- FAO (2006). FAO Fisheries Department State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 500. Rome, FAO, 134p.
- FAO (1998). <http://www.fao.org/docrep/W8338E/w8338e0a.htm> (accessed 20 December 2012).
- Francis, P.C. and Wells, R.J. (1998). FAO Food and Nutrition Papers. Residues of some veterinary drugs in animal and foods.
- Gingerich, W.H., Stehly, G.R., Clark, K.J. and Hayton, W.L. (1998). Crop grouping: a proposal for public aquaculture. *Veterinary and Human Toxicology*, **40** (2): 24-31.

- Goksøyr, A. and Husøy, A. (1998). Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (eds). *Fish ecotoxicology*, pp. 165-202, Birkhauser Publishing Company, Switzerland.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-Transferases (The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation). *Journal of Biological Chemistry*, **249** (22): 7130-7139.
- Haluzová, I., Modrá, H., Blahová, J., Havelková, M., Šíroká, Z. and Svobodová, Z. (2011). Biochemical markers of contamination in fish toxicity tests, *Interdisciplinary Toxicology*, **4** (2): 85-89.
- Holford, N.H.G. and Benet, L.Z. (1995). Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: Rational Dose Selection & the Time Course of Drug Action. In: Katzung, B.G. (ed) *Basic and Clinical Pharmacology*. Prentice-Hall International; Inc., USA, 1995, pp.33-47.
- Hoydal, K. (2004). Coastal baseline - Exposure and effects of PAH in the coastal zone around The Faroe Islands, Report, Food Veterinary and Environmental Agency, 41 pages.
- Ingebrigtsen, K. (1991). Factors affecting drug disposition in fish. *Acta Vet Scand*, **87**: 44–56.
- Izquierdo, M. (2005). Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cahiers Options Méditerranéennes*, **63**: 91-102.
- Jacobsen, P. and Berglind, L. (1988). Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture*, **70**: 365-370.
- Jones *et al.* (1995). The Induction of EROD Activity in New Zealand Fresh Water Fish Species as an Indicator of Environmental Contamination, *Australasian Journal of Ecotoxicology*, **1**: 95-105.
- Katzung, B.G. (1995). *Basic and Clinical Pharmacology*, 6th ed. San Francisco: University of California.
- Kaushik, S.J., Covès, D., Dutto, G. and Blanc, D. (2004). Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **230** (1–4): 391–404.
- Lennquist, A., Celander, M.C. and Förlin, L. (2008). Effects of medetomidine on hepatic EROD activity in three species of fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **69**: 74–79.
- Martínez- Gómez, C., Campillo, J.A., Benedicto, J, Fernández, B., Valdés, J., García, I. and Sánchez, F. (2006). Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boschii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, **53**: 305–314.



- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M.J. and Izquierdo, M.S. (2003). Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture*, **225** (1-4): 353-370.
- Morales-Caselles, C., Jiménez-Tenorio, N., Riba, I., Sarasquete, C. and Ángel DelValls, T. (2007). Kinetic of Biomarker Responses in Juveniles of the Fish *Sparus aurata* Exposed to Contaminated Sediments. *Environ Monit Assess*, **131**:211–220.
- Morrow, M.D. (2003). The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Master of environmental toxicology, Simon Fraser University, 87 pages.
- Mourente, G. and Bell, J.G. (2006). Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Com. Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, **145**(3-4): 389-99.
- Moutou, K.A., Burke, M.D. and Houlihan, D.F. (1998). Hepatic P450 monooxygenase response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) administered aquaculture antibiotics. *Fish Physiology and Biochemistry*, **18**: 97-106.
- Nebert, D.W and Gonzales, F.J (1987). P450 genes. Structure, evolution and Regulation. *Annu. Rev. Biochem*, **56** (in press).
- Ortiz-Delgadoa, J.B., Behrens, A., Segner, H. and Sarasquete, C. (2008). Tissue-specific induction of EROD activity and CYP1A protein in *Sparus aurata* exposed to B(a)P and TCDD. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **69**: 80–88.
- Parra, G. and Yúfera, M. (2001). Comparative Energetics During Early Development of Two Marine Fish Species, *Solea senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L.). *The Journal of Experimental Biology* **204**: 2175–2183 .
- Paspatis, M., Markakis, G., Koumoundouros, G., and Kendouri, M. (1999). Preliminary results on rearing of *Sparus aurata* x *Pargus pargus* hybrids. Performance comparison with the parental species. *Aquaculture International*, **7**: 295-306.
- Payne, J.F. (1975). Field evaluation of benopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science*, **191**: 945-946.
- Penrose, W.R. (1975). Induction of aryl hydrocarbon benzo (a) pyrene hydroxylase in fish by petroleum. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, **14**: 112-116.
- Pettersson, A. (2010). Effects of Replacing Fish Oil with Vegetable Oils in Feed for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Food Science, Uppsala.

- Radenac, G. *et al.* (2004). Measurement of EROD Activity: Caution on Spectral Properties of Standards Used. *Mar Biotechnol.*, **6**: 307–311.
- Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Rosenlun, G. and Kaushik, S.J. (2003). Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in Turbot (*Psetta maxima*) 2. Flesh quality properties. *Aquaculture*, **220**(1-4): 737-747.
- Reilly, A. and Käferstein, F. (1997). Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. *Aquaculture Research*, **28**: 735-752.
- Rigos, G., Nengas, I., Alexis, M., Tyrpenou, A.E., Piper, I. and Troisi, G. M. (2003). Tissue distribution and residue depletion of oxolinic acid in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) following multiple in-feed dosing, *Aquaculture*, **224**: 245-256.
- Ruitter, A, Scherpenisse, P. and Hajee C.A.J. (1996). Analysis of Drug Residues in Fish. In: Haagsma, N., Ruitter, A., Czedik-Eysenberg, P.B. (eds). Proceedings of the EuroResidue III Conference, Veldhoven, The Netherlands, pp 87-98.
- Samuelson, O.B., Lunestad, B.T., Thorsen, B., Eriksen, V., Ervik, A., Solheim, E. (1993). Residues and effect of oxolinic acid in wild fauna following medication in fish farms. In: Haagsma, N., Ruitter, A., Czedik-Eysenberg, P.B. (Eds.), Proceedings of Euroresidue II. Residues of Veterinary Drugs in Food II. ADDIX, Wijk bij Duurstede, The Netherlands, pp. 606–610.
- Schneider, J. (1994). Problems related to the usage of veterinary drugs in aquaculture-a review. *Quimica Analytica*, **1** : S34-S42.
- Schwedler, T.E. and Johnson, S.K. (1997). Animal Welfare Issues: Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture. In: Reynnells, R.D. and Eastwood, B.R. (eds). Animal Welfare Issues Compendium. A Collection of 14 Discussion Papers. Cooperative State Research, US Department of Agriculture, 1997.
- Segall, M. (1997). <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node49.html#cycle> (accessed 18 January 2012).
- Segner, H., Behrens, A., Joyce, E.M., Schirmer, K. and Bols, N.C. (2000). Transient induction of 7-ethoxyresorufin- O-deethylase (EROD) activity by medium change in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1. *Marine Environmental Research*, **50** (1): 489-493.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. and Dowd C.A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem.*, **360**: 1-16.
- Slatinská, I., Smutná, M., Havelková, M. and Svobodová, Z. (2008). Review article: Biochemical markers of aquatic pollution in fish – Glutathione S-Transferase, *Folia Veterinaria*, **52** (3-4): 129-134.

- Smith, P., Hiney, M. and Samuelsen, O.B. (1994). Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual review of fish diseases*, **4** : 273-313.
- Steffenak, I., Hormazabal, V. and Yndestad, M. (1991). Reservoir of quinolone residues in fish. *Food Addit. And Contam.*, **8** (6): 777-780.
- Stephen, C. and Iwama, G. (1998). Salmon Aquaculture Review. Fish Health Discussion Paper. Part C. Environmental Assessment Office (EAO). University of British Columbia, Canada.
- Stoffregen, D.A., Backman, S.C., Perham, R.E., Bowser, P.R. and Babish, J.G. (1996). Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (sunshine) bass and successful therapeutic intervention with the fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin. *J. World. Aquacult. Soc.*, **27**: 420-434.
- Tacon, A.G.J., Hasan, M.R. and Subasinghe, R.P. (2006). Use of fishery resources as feed inputs for aquaculture development: trends and policy implications. FAO Fisheries Circular. No.1018. Rome, FAO. 99p.
- Tang, J., Rose, R.L. and Ghambers, J.E. (2006). Metabolism of organophosphorus and carbamate pesticides, Gupta R. (ed.), Toxicology of organophosphate and carbamate compounds, pp. 127-144, Academic Press, Burlington.
- Teles, M., Pacheco, M. and Santos, M.A. (2005). Sparus aurata L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 $\beta$ -estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol. *Science of the Total Environment*, **336**: 57– 69.
- Testa, B., Carrupt, P.A., Gaillard, P., Tsai, R.S., 1996. Intramolecular interactions encoded in lipophilicity: their nature and significance. In: Pliska, V., Testa, B., Van de Waterbeems, H. (eds.), Lipophilicity in Drug Action and Toxicology. VCH Publishers, Weinheim, pp. 49–71.
- Thomas, J.A. (1999). <http://www.bb.iastate.edu/~jat/glutchp.html> (accessed 17 December 2012).
- Trattner, S. (2009). Quality of Lipids in Fish Fed Vegetable Oils Effects of Bioactive Compounds on Fatty Acid Metabolism. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences.
- UNEP, (1999). United Nations Environment Programme, Mediterranean Action Plan, Manual on the Biomarkers, Recommended for the Med. Pol. Biomonitoring Programme, pp.26-27.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**: 57-149.

- Velando, A., Munilla, I., López-Alonso, M., Freired, J. and Pérez, C. (2010). EROD activity and stable isotopes in seabirds to disentangle marine food web contamination after the Prestige oil spill. *Environmental Pollution*, **158**: 1275–1280.
- Velkova- Jordanoska, L. (2002). Histopathological and molecular-diagnosical study of the hepatic capillarity in black barbel (*Barbus meridionalis petenyi* Heck.) in Lake Ohrid. MSc Thesis, Univ. St.Kiril and Methodius, Skopje, R. Macedonia (Mc).
- Velkova- Jordanoska, L., Kostoski, G. and Jordanoska, B. (2008). Antioxidative Enzymes in Fish as Biochemical Indicators of Aquatic Pollution. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **14** (No 2): 235-237.
- Vollmer, D.A., Mansoori, B. and Locke, S.J. (1997). Study of 4-Quinolone Antibiotics in Biological Samples by Short-Column Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **69**: 4143-4155.
- Wajbrot, N., Gasith, A., Diamant, A. and Popper, D.M. (1993). Chronic toxicity of ammonia to juvenile gilthead seabream *Sparus aurata* and its related histopathological effects. *Journal of Fish Biology*, **42**: 321-328.
- Webster, C.D., Tidwell, J.H, Goodgame, L.S., Yancey, D.H. and Mackey, L. (1992). Use of soybean meal and distillers grains with solubles as partial or total replacement of fish meal in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, **106** (3–4): 301–309.
- Whyte J.J., Jung R.E., Schmitt C.J. and Tillitt D.E. (2000). Ethoxyresorufin-Odeethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, **30**(4): 347-570.
- Whyte, J.J. and Tillitt, D.E. (1997). Erod Activity
- Wikipedia, (2011). [http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione\\_S-transferase](http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_S-transferase) (accessed 18 December 2012).
- Wikipedia, (2011). <http://en.wikipedia.org/wiki/Catalase>(accessed 18 December 2012).
- Wilson, R.P. (2002). Amino Acids and Proteins. In: Halver, J.E. and Hardy, R.W. (eds). *Fish Nutrition*, pp. 143-180, Academic Press, New York.
- Yanong, R.P.E. (2003). *Fish Health Management Considerations in Recirculating Aquaculture Systems – Part 2: Pathogens 1*. University of Florida, IFAS Extension.
- Yndestad, M. (1993). Problems with drug residues in farmed fish. In: Haagsma, N., Ruiter, A., Czedik-Eysenberg, P.B. (eds). *Proceedings of the EuroResidue II Conference*, Veldhoven, The Netherlands, pp 115-124.