



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

«Η επίδραση της διατροφικής σόγιας στο σωματοτρόπο άξονα της
τσιπούρας (*Sparus aurata*)»

«The effect of dietary Soybean on the somatotropic axis of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) »



Μαρία-Μαλεβή Μανδραβέλη
Λάρισα 2024

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Βιολογίας Σπονδυλωτών, Μούτου Αικατερίνης

Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή :

➤ Μούτου Αικατερίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

➤ Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

➤ Σταμάτης Κωνσταντίνος

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της κ. Κατερίνας Μούτου την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου, την βοήθεια και την συνεχή καθοδήγηση. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αλεξία Φυτσίλη και τον διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο για την πολύτιμη βοήθεια τους, καθώς είχα την χαρά και τύχη να συνεργαστώ καθ' όλη την διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα υπόλοιπα μέλη που απαρτίζουν το εργαστήριο για τις συμβουλές τους, για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο και τον κ. Μαμούρη Ζήση

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει ενταθεί το ενδιαφέρον και η προσοχή για την ανακάλυψη νέων, εναλλακτικών και πιο βιώσιμων μεθόδων υδατοκαλλιέργειας, λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας των αλιευτικών πόρων. Μια διαδεδομένη μέθοδος αύξησης της βιωσιμότητας των υδατοκαλλιεργειών είναι η υποκατάσταση των συμβατικών ιχθυάλευρων (FM) με φυτικής προέλευσης άλευρα. Στην τσιπούρα, έναν από τους πρωταγωνιστές των Μεσογειακών εκτροφών, η διατροφική σόγια (SBM) και η διατροφική συμπυκνωμένη πρωτεΐνη σόγιας (SPC), έχουν το πλεονέκτημα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη και προτιμώνται συχνά στην εκτροφή της. Ωστόσο, ορισμένοι παράγοντες που εμπεριέχονται στις φυτικές τροφές, παρεμποδίζουν την φυσιολογική ανάπτυξη και υγεία των εκτρεφόμενων ιχθύων. Τα ποσοστά υποκατάστασης των ιχθυοτροφών με φυτικές τροφές ποικίλουν, όπως και τα αποτελέσματα στην ανάπτυξή τους. Ένας από τους σημαντικότερους ενδοκρινικούς δείκτες φυσιολογικής ανάπτυξης και μεταβολισμού των ιχθύων είναι η αξιολόγηση του σωματοτρόπου άξονά τους και συγκεκριμένα των γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτόν. Με την αξιολόγηση της έκφρασης των ηπατικών *ghri*, *ghrii*, *igfi* και *igfii* στην τσιπούρα, φάνηκε να μην υπάρχει καμία σημαντική αλλαγή στα φυσιολογικά μοτίβα έκφρασής τους σε ιχθύδια τσιπούρας με υποκατάσταση ιχθυάλευρου με 20% SBM διατροφή και 20% SPC διατροφή. Αυτά τα ποσοστά, βοηθούν τις καλλιέργειες τόσο στο κομμάτι της αύξησης και υγείας των ιχθύων αλλά όσο και σε οικονομικό επίπεδο.

ABSTRACT

Over the last decades, there has been a wide interest and attention in finding novel, alternative and more viable methods in aquaculture, due to the reducing availability of aquatic resources. A widespread means of augmenting the viability of aquaculture is the substitution of the conventional Fish meals with plant-based diets. In Gilthead Seabream, one of the starring fish of the Mediterranean cultures, SoyBean Meal and SoyProtein Concentrate meal, have the advantage of high protein content and are frequently used in aquacultures. However, they contain certain factors which can prevent the normal growth and welfare of cultured fish. The percentages of substitution of conventional fish meals by plant-based meals are varying, as well as their effects in the growth of fish. One prominent endocrine marker of normal growth and metabolism in fish is the evaluation of their somatotrophic axis, and more precisely of the genes that are involved in this pathway. After the assessment of the expression of the hepatic *ghri*, *ghrii*, *igfi* and *igfii* genes in seabream juveniles, there was not an evident change in the physiological expression pattern, under the substitution of fish meal with 20%SBM diet and 20%SPC diet. The percentages above, are not only found to be beneficial on terms of growth and welfare of the cultured fish, but also on a financial level.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Η Τσιπούρα.....	8
1.1.1 Χαρακτηριστικά και Συστηματική κατάταξη	8
1.1.2 Εκτροφή Τσιπούρας.....	8
1.1.3 Οικονομική σημασία εκτροφών.....	9
1.2 Αναπτυξιακά στάδια στους τελεόστεους.....	11
1.2.1 Αναπτυξιακά στάδια έως την ενηλικίωση.....	11
1.2.2 Από την ενηλικίωση στην αναπαραγωγική ωριμότητα.....	12
1.3 Διατροφή εκτρεφόμενης τσιπούρας.....	13
1.3.1 Διατροφικές απαιτήσεις τσιπούρας.....	13
1.3.2 Διατροφικό πρωτόκολλο εκτροφής τσιπούρας.....	13
1.4 Το γονιδίωμα των τελεοστέων.....	14
1.4.1 Πρώτος και δεύτερος διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά.....	14
1.4.2 Τρίτος διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος ή Τελεοστο-ειδικός διπλασιασμός.....	15
1.4.3 Η “μοίρα” των διπλασιασμένων γονιδίων- των παραλόγων.....	16
1.5 Ο σωματοτρόπος άξονας της τσιπούρας.....	18
1.5.1 Αυξητική ορμόνη (GH) και οι υποδοχείς της (GHRs).....	19
1.5.1.1 Έκφραση και λειτουργία.....	19
1.5.1.2 Η εξελικτική πορεία των GHRs.....	21
1.5.1.3 Χαρακτηρισμός και γονιδιακή δομή των GHRs.....	21
1.5.1.4 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος.....	22
1.5.2 IGFs στον σωματοτρόπο άξονα της τσιπούρας.....	23
1.5.2.1 Η εξελικτική πορεία των IGFs.....	23
1.5.2.2 Γονιδιακή δομή των IGFs.....	24
1.5.2.3 IGF1.....	25
1.5.2.3.1 Έκφραση και λειτουργία.....	25

1.5.2.3.2 Εναλλακτικά μετάγραφα.....	26
1.5.2.3.3 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος.....	27
1.5.2.4 IGF2.....	39
1.5.3 Επιρροή του σωματοτρόπου άξονα από το διατροφικό προφίλ.....	31
1.6 Σκοπός	34
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1 Επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων.....	35
2.2 Προσδιορισμός των δειγμάτων.....	35
2.3 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA.....	36
2.4 Γονίδια αναφοράς.....	36
2.5 Γονίδια στόχοι	37
2.6 Σχεδιασμός εκκινητών.....	37
2.7 Ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης: Real-time PCR.....	37
2.7.1 Αρχή της μεθόδου.....	37
2.7.2 Πρωτόκολλο της Real-time PCR.....	38
2.7.3 Πρότυπη καμπύλη και υπολογισμός απόδοσης αντίδρασης.....	38
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	40
2.8.1 Κανονικοποίηση δεδομένων.....	40
2.8.2 Στατιστική ανάλυση με την χρήση γλώσσας προγραμματισμού R.....	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
3.1 Έκφραση γονιδίου <i>ghri</i>	41
3.2 Έκφραση γονιδίου <i>ghrii</i>	42
3.3 Σχετική έκφραση <i>ghr-i/ghrii</i>	43
3.4 Έκφραση γονιδίου <i>igfi</i>	44
3.5 Έκφραση γονιδίου <i>igfii</i>	45
3.6 Σχετική έκφραση <i>igfii/igfi</i>	46
3.8 Διάγραμμα συσχέτισης Spearman.....	47
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	50
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	55

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.1 Η τσιπούρα

1.1.1 Χαρακτηριστικά και Συστηματική κατάταξη

Η τσιπούρα είναι ένα ψάρι της οικογένειας των Σπαρίδων και ένα από τα δύο κυριότερα εκτρεφόμενα είδη στις μεσογειακές και ελληνικές θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες (Πίνακας 1). Φυσιολογικά, εντοπίζεται στη Μεσόγειο Θάλασσα, κατά μήκος των ανατολικών ακτών του Ατλαντικού, από τη Μεγάλη Βρετανία έως τη Σενεγάλη, και πιο σπάνια στη Μαύρη Θάλασσα. Λόγω των ευρυαλκαλικών και ευρυθερμικών συνηθειών του, το είδος απαντάται τόσο σε θαλασσινά όσο και σε υφάλμυρα περιβάλλοντα και σε θερμοκρασίες από 4 έως 32 βαθμούς Κελσίου, όπως σε παράκτιες λιμνοθάλασσες και περιοχές εκβολών (FAO). Στην ανοιχτή θάλασσα οι τσιπούρες συνήθως βρίσκονται σε βραχώδεις περιοχές και λιβάδια ποσειδωνίας (*Posidonia oceanica*), αλλά συχνά αλιεύονται και σε αμμώδεις βυθούς. Στη φύση, είναι γνωστό ότι τα θηλυκά μπορούν να φτάσουν σε μήκος πάνω από 70 εκ. και τα αρσενικά μέγιστο μήκος περίπου 55 εκ., με μέγιστο σωματικό βάρος περίπου 4 έως 5 κιλά (Campillo, 1992).

Πίνακας 1. Συστηματική κατάταξη τσιπούρας

-	Συνομοταξία	Ομοταξία	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος
Ζώα	Χορδωτά	Ακτινοπτερύγια	Περκόμορφα	Σπαρίδων	<i>Sparus</i>	<i>Sparus aurata</i>

1.1.2 Εκτροφή τσιπούρας

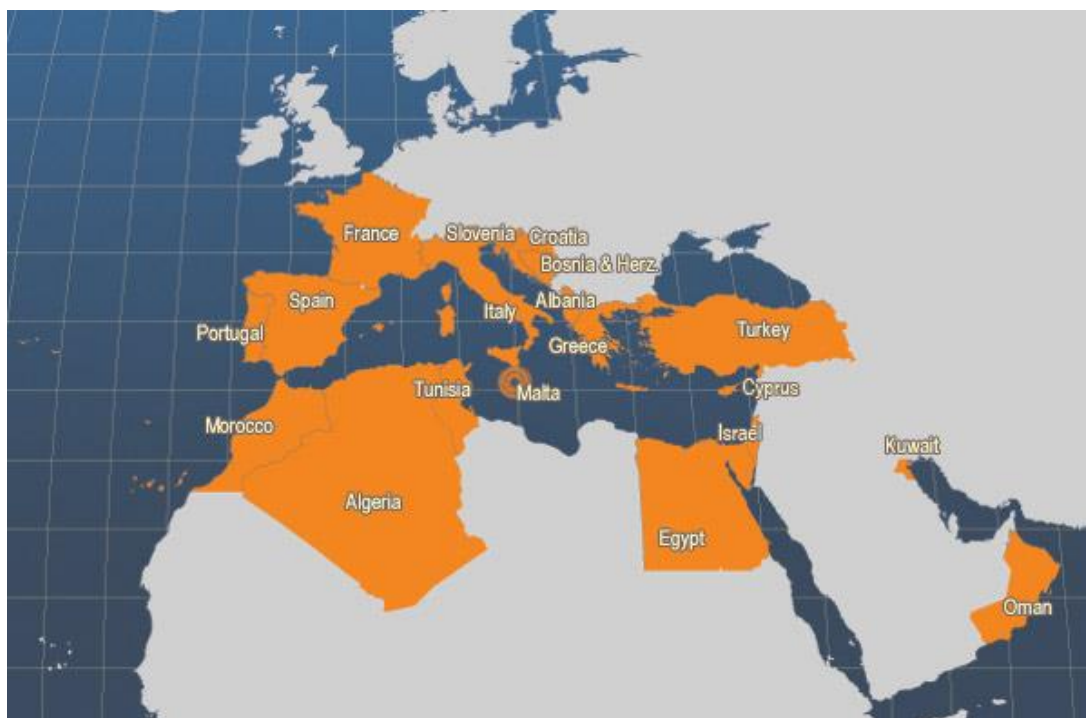
Οι τσιπούρες είναι κατάλληλα είδη για εκτεταμένη εκτροφή στη Μεσόγειο (Εικόνα 1), λόγω της καλής τιμής στην αγορά, του υψηλού ποσοστού επιβίωσης (αυξημένη προσαρμοστικότητα), των διατροφικών συνηθειών τους, της γρήγορης ανάπτυξής τους και της εξαιρετικής ποιότητας φιλέτου τους. Γι' αυτούς τους λόγους, η ετήσια παραγωγή τους είναι μεγάλη και συνεχώς αυξανόμενη με την παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας του 2019 να ανέρχεται στους 258.754 τόνους, ενώ μέσα σε δύο χρόνια σημειώθηκε αύξηση 100.000 τόνων, με το 2021 να φθάνει η παραγωγή στους 319.214 τόνους (Εικόνα 2). Εκτρέφονταν εκτενώς σε παράκτιες λιμνοθάλασσες και αλμυρά έλη, έως ότου αναπτύχθηκαν εντατικά συστήματα εκτροφής κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980. Η τεχνητή αναπαραγωγή επιτεύχθηκε επιτυχώς στην Ιταλία το 1981-82 και η μεγάλης κλίμακας παραγωγή νεαρών

ιχθυδίων τσιπούρας επιτεύχθηκε οριστικά το 1988-1989 στην Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα (FAO). Με βάση δεδομένα του FAO για το 2019, υπάρχουν δέκα κύριες χώρες που εκτρέφουν τσιπούρα. Τα ποσοστά παραγωγής καθώς και οι χώρες φαίνονται στον Πίνακα 2.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η Ελλάδα κρατούσε για αρκετά χρόνια την πρωτιά στην παραγωγή τσιπούρας αλλά από το 2015 και μετά η Τουρκία έχει αυξήσει σημαντικά το ποσό παραγωγής της, ανακάμπτοντας με διαφορά στην πρώτη θέση. Αντίστοιχα, η Αίγυπτος πήρε την θέση της Ισπανίας, που είχε σημαντική παραγωγή, από το 2015 και μετά (FAO).



Εικόνα 1. εγκαταστάσεις ιχθυοκαλλιεργειών

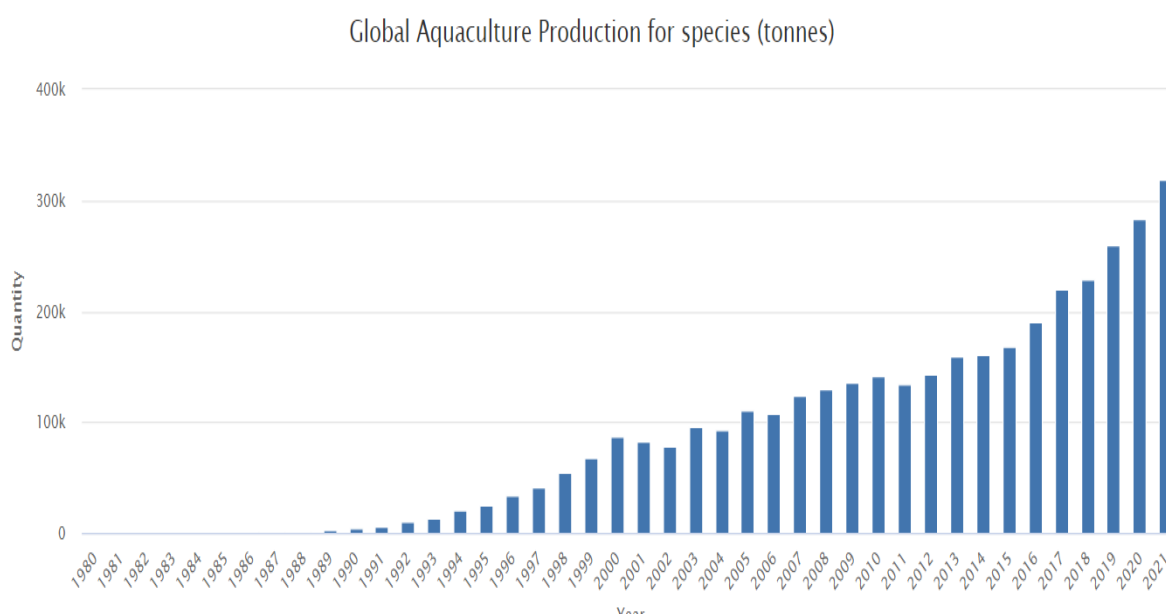


Εικόνα 2. Περιοχές εκτροφής τσιπούρας. FAO, 2019

Πίνακας 2. Ποσοστά χωρών εκτροφής τσιπούρας (FAO, 2019)

Χώρες εκτροφής	Ποσοστά εκτροφής παγκοσμίως %
Τουρκία	38.54%
Ελλάδα	21.43%
Αίγυπτος	13.87%
Τυνισία	6.96%
Ισπανία	4.82%
Ιταλία	2.84%
Κροατία	2.61%
Κύπρος	2%
Ισραήλ	1.14%
Αλβανία	0.95%

1.1.3 Οικονομική σημασία εκτροφών



Εικόνα 3. Ποσότητα εκτροφής τσιπούρας σε τόνους ανά έτος. FAO, "Fishery and Aquaculture Statistics. 1976-2021," 2024

Εάν υπολογισθούν τα έσοδα για περίπου 200.000 τόνους παραγωγής τσιπούρας τον χρόνο με την τσιπούρα να κοστίζει κατά μέσο όρο 12 ευρώ/κιλό (Mercamadrid, “Mercamadrid - Estadísticas.”) στην αγορά τότε προκύπτουν έσοδα για την παγκόσμια αγορά:

$200.000 * 1000 * 23 = 4.600.000.000$ ευρώ παγκοσμίως/χρόνο

Είναι κατανοητό από τα παραπάνω, ότι ο κλάδος της ιχθυοκαλλιέργειας είναι ένας κερδοφόρος και συνεχώς αναπτυσσόμενος κλάδος (Εικόνα 3) για την παγκόσμια οικονομία καθιστώντας απαραίτητη την μέριμνα για την διασφάλιση της ποιότητας αλλά και την βελτίωση της παραγωγής. Ένας μεγάλος παράγοντας που συμβάλλει στην σωστή ανάπτυξη της τσιπούρας είναι η τροφή της, η οποία με βάση τα παραπάνω δεδομένα είναι απαραίτητη σε τεράστιες ποσότητες ετησίως. Με σκοπό μια πιο βιώσιμη παραγωγή τόσο για το περιβάλλον όσο και για την παγκόσμια οικονομία, χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια διατροφές φυτικής προέλευσης.

1.2 Αναπτυξιακά στάδια στους τελεόστεους

1.2.1 Αναπτυξιακά στάδια έως την ενηλικίωση

Οι τελεόστεοι είναι η πιο ποικιλόμορφη ταξινομική ομάδα των σπονδυλωτών. Σε αυτό υπάρχουν πάνω από 30.000 διαφορετικά είδη σε σύγκριση με τα τετράποδα με μόλις 25.000 (Weitzman, 2024). Επιπλέον, σε σχέση με το σύνολο των σύγχρονων ιχθύων οι τελεόστεοι καταλαμβάνουν το 96% , γεγονός που αναδεικνύει την τρομερή επιτυχία επικράτησής τους κατά την Κρητιδική Περίοδο (Moore Richard, 2007). Η αρχή της ζωής μιας τσιπούρας ξεκινάει με την γονιμοποίηση, την σύντηξη δηλαδή ενός αρσενικού γαμέτη με έναν θηλυκό για την δημιουργία του ζυγωτού. Από εκεί και πέρα ξεκινάει η εμβρυακή ανάπτυξη, οποία είναι αναμνιωτική, δηλαδή δεν λαμβάνει χώρα σε αμνιακό σάκο όπως συμβαίνει σε αρκετά σπονδυλωτά, αλλά σε αυγό. Αυτό το στάδιο ονομάζεται και αλλιώς **στάδιο του αυγού** (egg stage). Στην 1.15 ώρα μετά γίνεται η πρώτη αυλάκωση, ενώ με το πέρας 1.45 h, 2 h, 2.30 h, 3 h και 4.15 h συμβαίνουν η πρώτη κυτταρική διαίρεση, το στάδιο των 4-, 8-, 16- και 32- κυττάρων αντίστοιχα, όπου το έμβρυο έχει την μορφή μοριδίου. Στις δέκα ώρες μετά την γονιμοποίηση ξεκινά ένα από τα πιο σημαντικά στάδια της ανάπτυξης ενός οργανισμού η γαστριδίωση. Δύο μέρες μετά την γονιμοποίηση γίνεται η εκκόλαψη των αυγών στην ανοιχτή θάλασσα της Μεσογείου στις περιόδους του Οκτωβρίου και Δεκεμβρίου. Από αυτήν τη στιγμή και μετά ξεκινά το δεύτερο **στάδιο της προνύμφης** (larvae stage). Η προνύμφη μετά την εκκόλαψη έχει μήκος 3mm. Στις προνύμφες ηλικίας 15-18 ημερών το περιεχόμενο της λεκίθου έχει απορροφηθεί πλήρως και αναπτύσσονται αποτελεσματικά κάποιες βασικές λειτουργίες όπως είναι το άνοιγμα του στόματος, η έναρξη της εξωγενούς σίτισης και η εντερική πεπτική δραστηριότητα. Σε αυτό το στάδιο, οι προνύμφες πραγματοποιούν άτακτες κινήσεις με βάση τις κυματιστές κινήσεις του σώματος, αναζητώντας τροφή. Αυτή η ενδιαμέση φάση από την εκκόλαψη μέχρι την εξάντληση του λεκιθικού σάκου είναι το στάδιο προνύμφης λεκιθικού σάκου (Aral et al., 2011; Mhalhel et al., 2023).

Από εδώ και στο εξής συνεχίζεται η ανάπτυξη στο προνυμφικό στάδιο το οποίο διαχωρίζεται σε 3 κύριες υποκατηγορίες με βάση την κάμψη της νωτοχορδής:

1) Προνύμφη προ-κάμψης (pre-flexion): συμβαίνει η κάμψη της νωτοχορδής

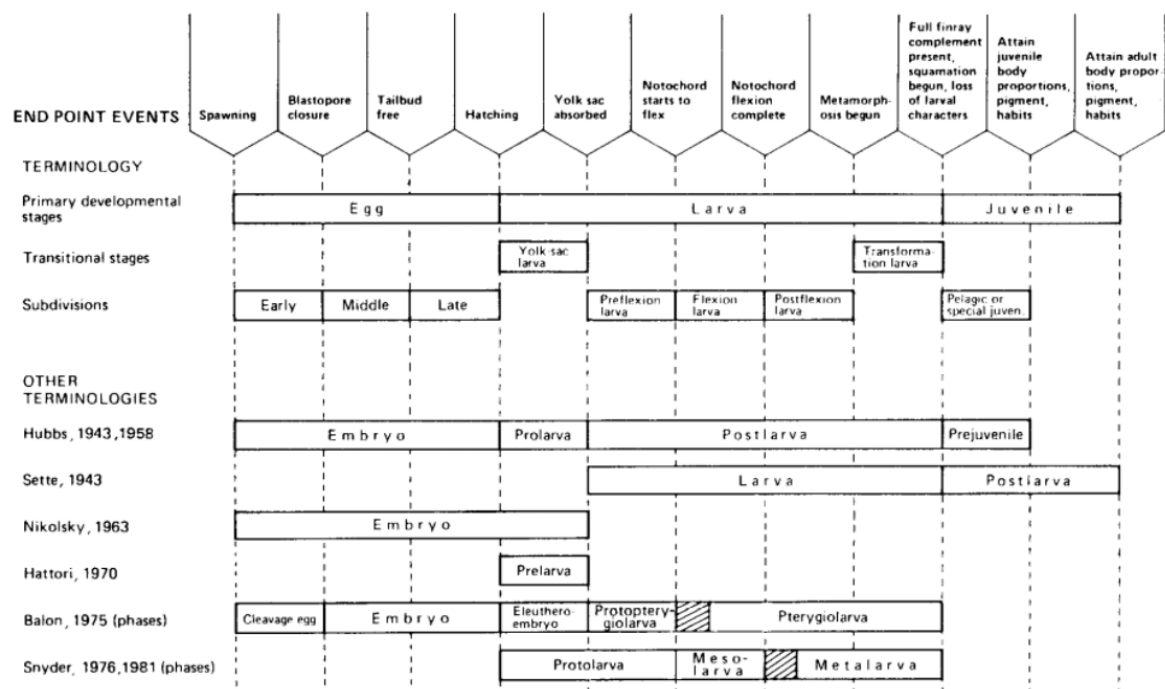
2) Προνύμφη κάμψης (flexion): ολοκλήρωση της κάμψης της νωτοχορδής

3) Προνύμφη μετά-κάμψης (post-flexion): σχηματισμός του ουριάιου πτερυγίου (Kendall et al., 1984).

Στο παραπάνω στάδιο η προνύμφη ξεκινά να διαμορφώνει τα ενήλικα χαρακτηριστικά της σταδιακά, και αναπτύσσει στοιχεία όπως η διαμόρφωση των σπλάχνων και ο σχηματισμός των πτερυγίων με σκοπό να μπορέσει να ξεκινήσει την ενεργητική εύρεση και την κατανάλωση εξωγενούς τροφής. Στο τέλος της μετά-κάμψης ή προ- μεταμορφωτικής φάσης 30-45 μέρες μετά την εκκόλαψη, η προνύμφη έχει φτάσει στα 5.5-8 mm μήκος.

Σε αυτό το σημείο υπάρχει ένα μεταβατικό στάδιο, το στάδιο της μεταμόρφωσης, που τοποθετείται ενδιάμεσα απο το στάδιο μετά-κάμψης και την φάση του νεαρού ιχθυδίου. Αυτό το στάδιο μπορεί να είναι ταχύ ή εκτεταμένο ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το ψάρι και το είδος του. Εδώ το ψάρι χάνει τα προνυμφικά χαρακτηριστικά του και στο τέλος της μεταμόρφωσης φθάνει να έχει την μια πολυ κοντινή μορφή με την νεανική-ενήλικη μορφή του, με κάποιες εξαιρέσεις χαρακτηριστικών, όπως το χρώμα του. Το ψάρι φθάνει στην φάση του ιχθυδίου-νεανική (juvenile) κατά την 60η έως την 90η ημέρα της ζωής του μετά την εκκόλαψη και φθάνει έως 16-20mm μήκος (Εικόνα 4).

Τέλος, στην 150η μέρα μετά την εκκόλαψη οι ιχθύες έχουν λάβει την ανατομική μορφή και συμπεριφορά ενός **ενήλικου** ιχθύ (Mhalhel et al., 2023).



Εικόνα 4. Η ορολογία των πρώιμων σταδίων ανάπτυξης των τελεόστεων (Kendall et al., 1984)

1.2.2 Από την ενηλικίωση στην αναπαραγωγική ωριμότητα

Η τσιπούρα είναι ένας ερμαφρόδιτος ιχθύς, που αναπτύσσεται ως αρσενικό τα πρώτα 2-3 έτη ζωής και στα 4-6 έτη διαμορφώνει θηλυκά χαρακτηριστικά. Κατά αυτόν τον τρόπο στις αντίστοιχες ηλικίες οι τσιπούρες είναι αναπαραγωγικά ώριμες για γονιμοποίηση. Η

εναλλαγή των φύλων, που προκύπτει από ιχθείς γεννήτορες (broodstock), υπο ελεγχόμενες συνθήκες καθορίζεται από την τεχνητή έκκριση ορμονών και από άλλους κοινωνικούς παράγοντες του τεχνητού μικροπεριβάλλοντος. Η αναλογία των φύλων πρέπει να είναι 2:1, αρσενικά:θηλυκά. Τα θηλυκά φθάνουν σε μεγαλύτερο μέγεθος από τα αρσενικά, έως και πάνω από 33-40 cm σε σχέση με τα αρσενικά που φθάνουν στα 20-30 cm. (FAO 2024, Mhalhel et al., 2023)

1.3 Διατροφή εκτρεφόμενης τσιπούρας

1.3.1 Διατροφικές απαιτήσεις τσιπούρας

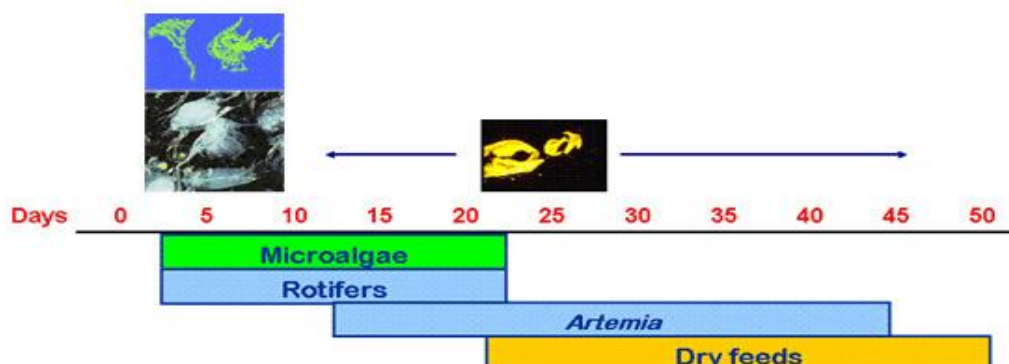
Για να μπορέσει να γίνει η σωστή ανάλυση των τροφών που καταναλώνει η τσιπούρα στις καλλιέργειες είναι σημαντικό να γίνει αναφορά στις διατροφικές απαιτήσεις τις τσιπούρας στα απαραίτητα μακρομόρια και ιχνοστοιχεία που απαρτίζουν την τροφή της.

Το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στις ιχθυοτροφές είναι η πρωτεΐνη. Πρώιμες μελέτες πρότειναν ότι οι ανάγκες σε πρωτεΐνη των νεαρών (2.5 g) τσιπούρων ήταν περίπου 40% για μέγιστη χρήση πρωτεΐνης και ενέργειας (Sabaut και Luquet, 1973), αν και η καλύτερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε ψάρια που τρέφονταν με δίαιτα που περιείχε 60 % ακατέργαστη πρωτεΐνη. Τα τρέχοντα δεδομένα προτείνουν ότι τα επίπεδα ακατέργαστης πρωτεΐνης μπορούν να μειωθούν σε περίπου 45-50 % για τα ιχθύδια και σε 40-42% για τα ενήλικα ψάρια. Στην πράξη, οι αναλογίες πρωτεΐνης που μεταβολίζεται (DP) προς ενέργεια που μεταβολίζεται (DE) μειώνονται με την αύξηση του μεγέθους των ψαριών.

Έπειτα, θεωρείται πολύ σημαντική η συμπερίληψη λιπιδίων και λιπαρών οξέων, καθώς είναι γνωστό ότι τα λίπη βοηθούν στην αύξηση του μεταβολισμού των πρωτεϊνών. Το προτεινόμενο ποσοστό λιπιδίων στις ιχθυοτροφές είναι από 12-25%.

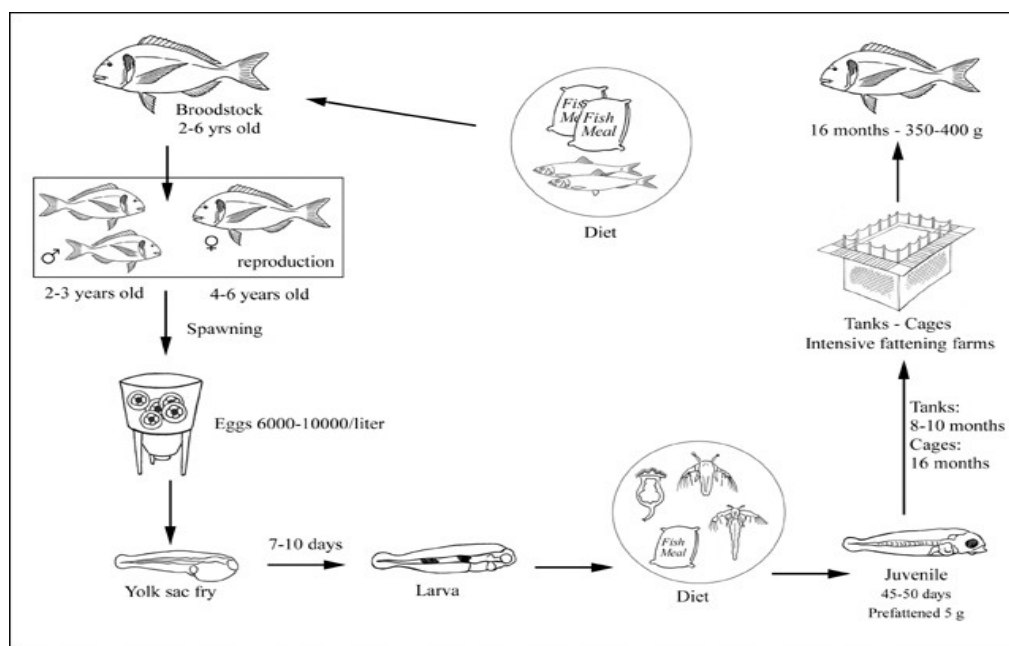
Στην συνέχεια, είναι απαραίτητη η συμπερίληψη αμινοξέων σε ποσοστό πάλι από 12-25%, υδατανθράκων σε 15-20% και τέλος πολύ μικρότερα ποσοστά σε βιταμίνες και μέταλλα, κυρίως σε Φωσφόρο (FAO,2024).

1.3.2 Διατροφικό πρωτόκολλο εκτροφής τσιπούρας



Εικόνα 5. Διατροφή της εκτρεφόμενης τσιπούρας τις πρώτες μέρες μετά την εκκόλαψη της, FAO

Υπό συνθήκες καλλιέργειας, έπειτα από το άνοιγμα του στόματος που ξεκινάει σταδιακά στις 3-5 μέρες μετά την εκκόλαψη, ξεκινάει η χορήγηση της πρώτης μικροσκοπικής τροφής, των τροχόζων (rotifers) (π.χ. *Brachionus plicatilis*) με μέγεθος 0.15 με 0.25 mm, τα οποία επιλέγονται και λόγω της εύκολης μαζικής παραγωγής τους. Στις 10-11 ημέρες προσφέρεται μαζί με τα τροχοφόρα και ένα είδος δεκάποδου η Αρτέμια (*Artemia salina nauplii*), η οποία εμπλουτίζεται με λιπαρά οξέα. Κοντά στην 20η μέρα μετά την εκκόλαψη, όταν τα ψάρια φθάσουν κοντά στα 10 mg βάρους, ξεκινάει η διαδικασία απογαλακτισμού (weaning) των ιχθύων, οι οποίοι βρίσκονται σε προνυμφικό στάδιο. Σε αυτό το στάδιο ξεκινάει η σταδιακά αυξανόμενη χορήγηση της ξηράς τροφής, σε συνδιασμό ακόμα με την σταδιακά φθίνουσα χορήγηση της Αρτέμια. Μέχρι τις 45-50 ημέρες μετά την εκκόλαψή του τα ιχθύδια πλέον, έχουν φθάσει στα 5 γραμ. Και μεταφέρονται σε δεξαμενές ειδικά διαμορφωμένων συνθηκών όπου τρέφονται αποκλειστικά με ξηρά τροφή (Εικόνα 5). Σε ένα με δύο χρόνια, οι τσιπούρες φθάνουν στα 300-400 γραμ. Σε αυτό το σημείο της εκτροφής έχουν φτάσει στο εμπορικό μέγεθος και είναι έτοιμα για την διανομή τους στην παγκόσμια αγορά ή την επανακαλλιέργειά τους ως γεννήτορες (FAO,2024). Αυτή η διαδικασία φαίνεται παρακάτω σχηματικά (Εικόνα 6).



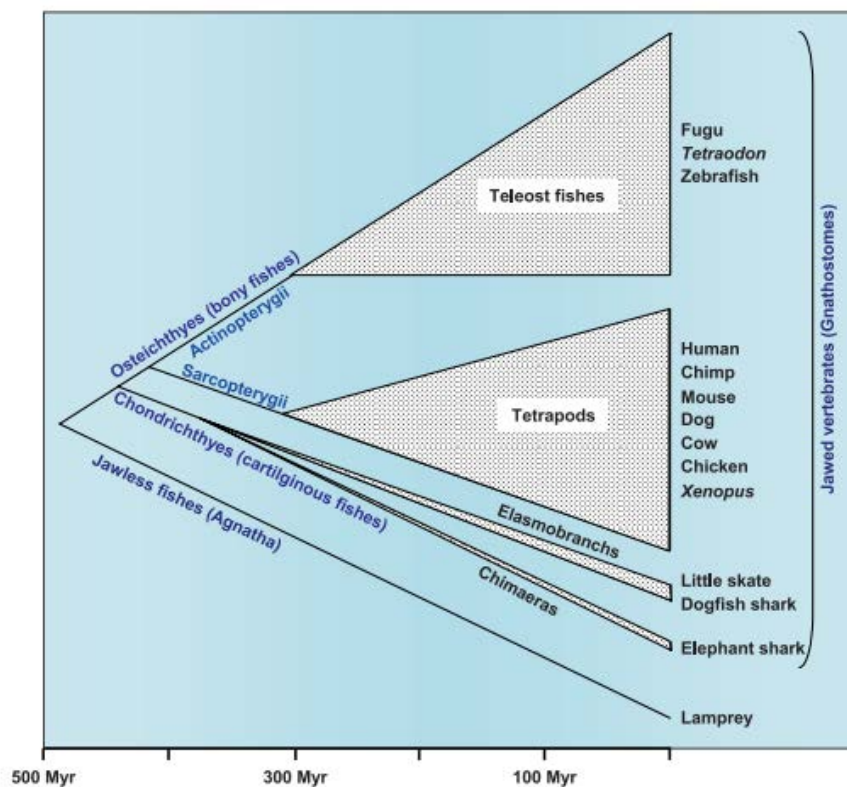
Εικόνα 6. Κύκλος εκτροφής τσιπούρας, FAO

1.4 Γονιδίωμα των τελεόστεων

Όπως έχει αναφερθεί, οι τελεόστεοι αποτελούν ένα μεγάλο μέρος των σπονδυλωτών και χαρακτηρίζονται από την ανάπτυξη ποικίλων προσαρμογών σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Η εξέλιξη και η διαφοροποίηση, λοιπόν, του γονιδιώματός τους αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την κατανόηση της εξέλιξης των σπονδυλωτών.

1.4.1 Πρώτος και δεύτερος διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά (2R hypothesis)

Ο διπλασιασμός ενός γονιδίου, δημιουργεί δύο θυγατρικά γονίδια, τα οποία ονομάζονται παράλογα. Την πρώτη στιγμή μετά τον διπλασιασμό αυτά τα γονίδια είναι πανομοιότυπα δομικά και λειτουργικά. Απο το 1970 προτάθηκε ότι αυτά τα θυγατρικά γονίδια δίνουν την δυνατότητα στους οργανισμούς να αποκτήσουν νέες ιδιότητες. Είναι κατανοητό, πως οι διπλασιασμοί ολόκληρου του γονιδιώματος (WGDs) αποτελούν αφετηρίες ανάπτυξης νέων γονιδίων και λειτουργιών. Στο ίδιο χρονικό πλαίσιο διαμορφώθηκε και η υπόθεση 2R (2R hypothesis), με βάση την οποία προτίνεται ότι τα γναθόστομα σπονδυλωτά έχουν προκύψει από διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος. Πιο συγκεκριμένα, η 2R hypothesis, δείχνει πως έγιναν δύο διπλασιασμοί ολόκληρου του γονιδιώματος, μετά την εμφάνιση των Ουροχορδωτών και πριν αυτήν των γναθόστομων σπονδυλωτών. Ο πρώτος διπλασιασμός συνέβη ανάμεσα στους Άγναθους ιχθύες και την εξέλιξη των Γναθόστομων σπονδυλωτών 530 MYA, ενώ ο δεύτερος μεταξύ των Χονδριχθύων και των Οστεϊχθύων 500 MYA (Εικόνα 7)

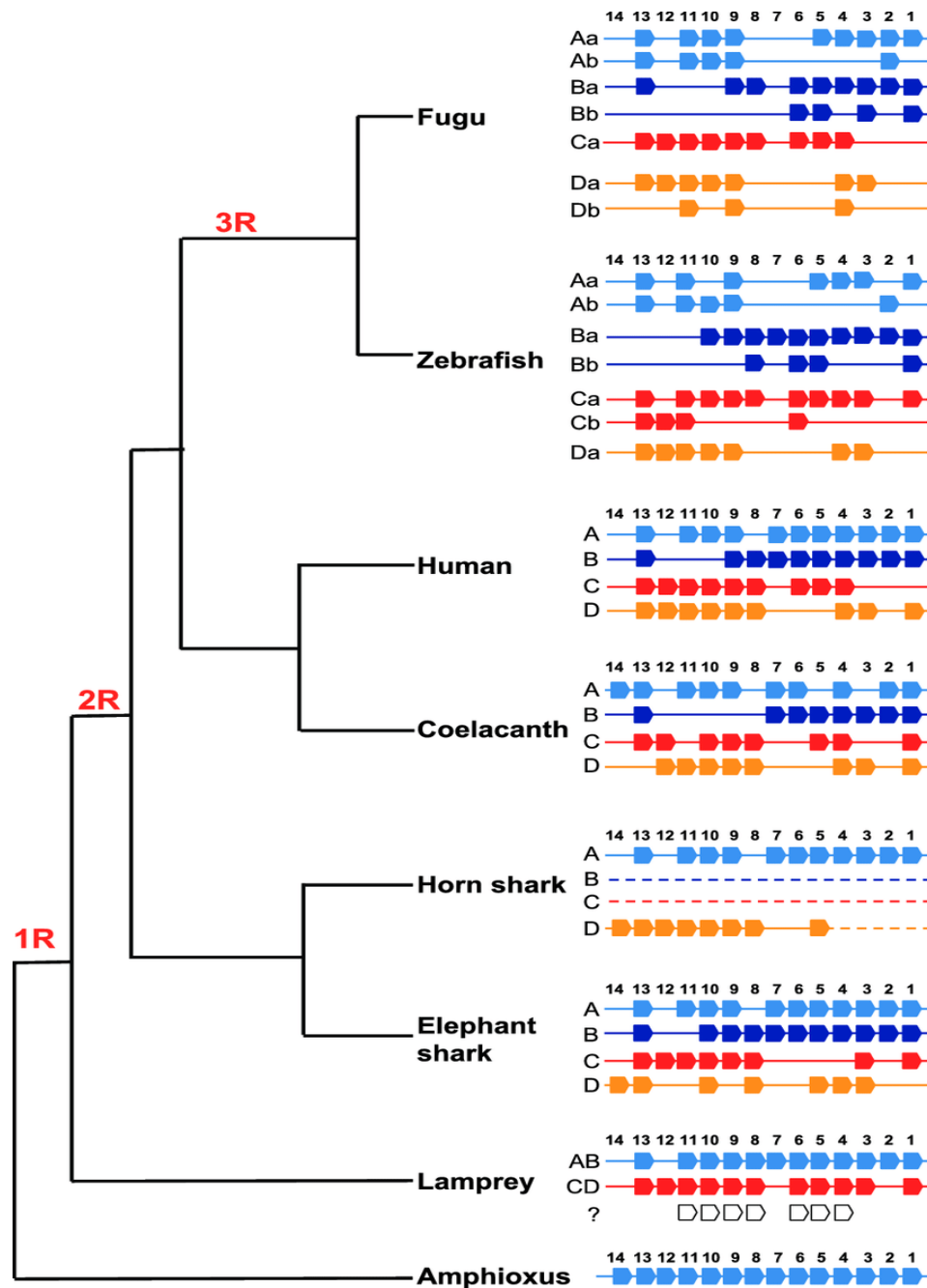


Εικόνα 7. Εξελικτική πορεία των τελεόστεων ιχθύων, Venkatesh 2007

1.4.2 Τρίτος διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος ή Τελεοστο-ειδικός διπλασιασμός

Ο τρίτος διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος συνέβη 350 MYA, σε έναν κοινό πρόγονο των τελεόστεων και γι' αυτό λέγεται και από πολλούς ως Τελεοστο-ειδικός διπλασιασμός (Teleost Specific, TS). Οι πρώτες ενδείξεις για την επιβεβαίωση του φάνηκαν από το γονιδίωμα του είδους zebrafish που ανήκει στους τελεόστεους και τον αριθμό των αντιγράφων μιας συστάδας HOX γονιδίων (Hox clusters). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν 7 αντίγραφα μιας συστάδας Hox γονιδίων σε σύγκριση με τέσσερα που βρέθηκαν στα

τετράποδα, σχεδόν τα διπλάσια. Αυτό το μοτίβο ακολουθούταν και από άλλους τελεόστεους οργανισμούς, έως ότου επιβεβαιώθηκε η ύπαρξή του και στα Ελοπόμορφα που αποτελούν την παλιότερη γνωστή ομάδα τελεόστεων



Εικόνα 8. Η εξέλιξη των Hox γονιδίων στα σπονδυλωτά και οι διπλασιασμοί ολόκληρου του γονιδιώματος, (Glasauer & Neuhauss, 2014)

1.4.3 Η “μοίρα” των διπλασιασμένων γονιδίων- των παραλόγων

Όπως αναφέρθηκε, μετά από κάθε γεγονός διπλασιασμού προκύπτουν δύο πανομοιότυπα γονίδια που καλούνται ως παράλογα. Στιγμιαία, αυτά τα γονίδια είναι ίδια δομικά και

λειτουργικά. Ωστόσο αυτό, δεν παραμένει το ίδιο με το πέρασμα του χρόνου και αρκετές φορές η “μοίρα” κάποιων γονιδίων αλλάζει πορεία, δηλαδή η αλληλουχία του υπόκεινται σε μεταλλάξεις λόγω της εξελικτικής πίεσης. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν προκαλέσουν ποικίλα αποτελέσματα στην τελική δομή και λειτουργία του γονιδίου, που είναι τα παρακάτω:

α) Απώλεια λειτουργίας

Μελέτες έδειξαν πως η απώλεια λειτουργίας είναι το πιο συχνό ενδεχόμενο εξέλιξης των διπλασιασμένων γονιδίων. Η πιθανότητα διατήρησης και των δύο θυγατρικών γονιδίων είναι χαμηλή, λόγω του ότι οι επιβλαβείς μεταλλάξεις είναι πολύ πιο πιθανές και συχνές να εμφανιστούν σε σύγκριση με τις ωφέλιμες (Glasauer & Neuhauss, 2014).

β) Μερική απώλεια λειτουργίας

Αυτή η περίπτωση μπορεί να επέλθει μέσω της δράσης του μηχανισμού

διπλασιασμός → εκφυλισμός → συμπλήρωση

σε γονίδια τα οποία έχουν πάνω από μία διακριτές λειτουργίες και διακριτές επικράτειες.

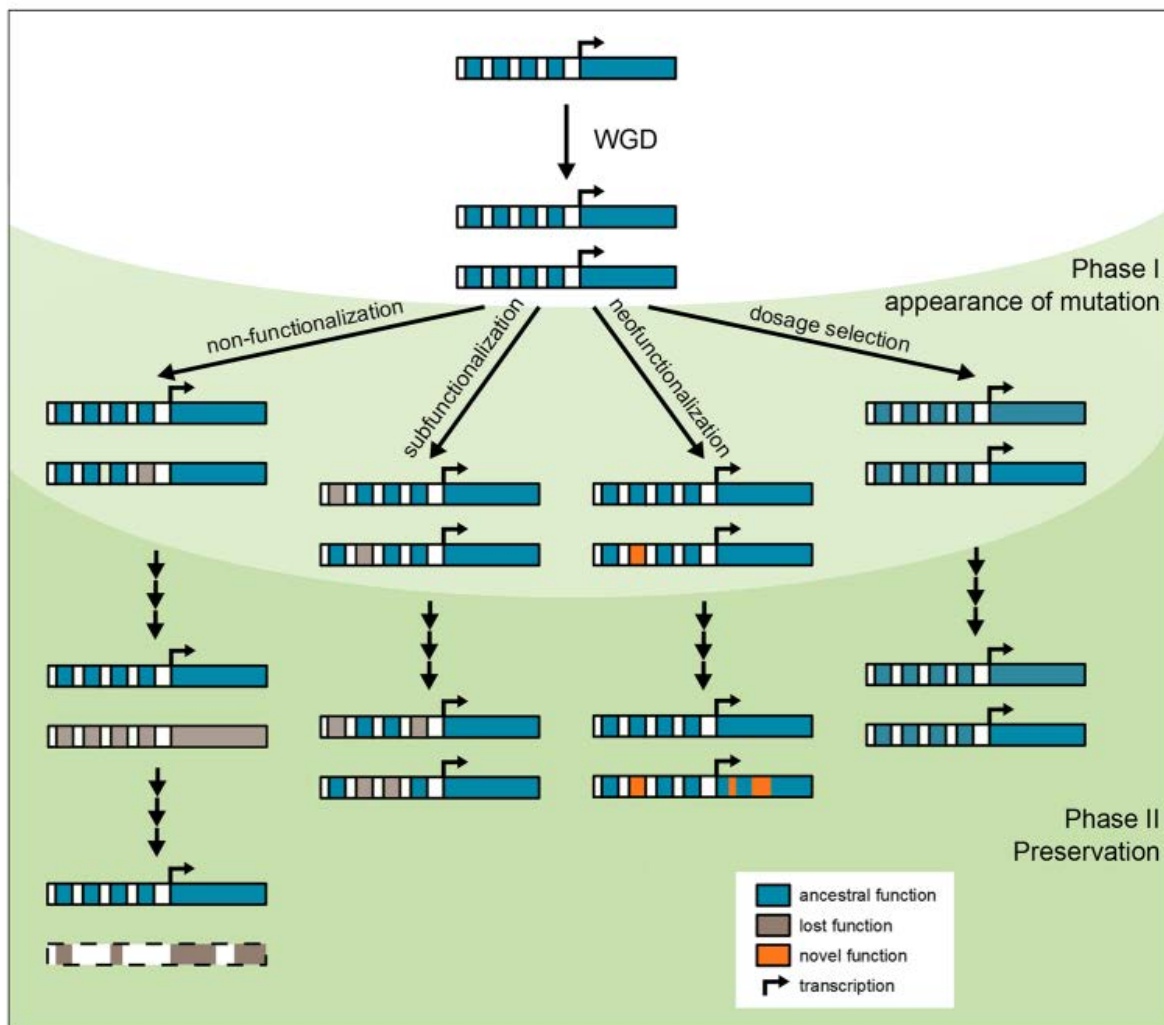
Σε αυτή τη περίπτωση γίνεται διατήρηση των δύο αντιγράφων ενός γονιδίου μέσω μετάλλαξης και εκφυλισμού ενός αντιγράφου. Το μεταλλαγμένο αντίγραφο δρα συμπληρωματικά στο δεύτερο αντίγραφο, διατηρώντας μια (συνήθως παλαιότερη) λειτουργία του (Force et al., 1999; Glasauer & Neuhauss, 2014).

γ) Εμφάνιση νέας λειτουργίας

Ένα κλασσικό μοντέλο αλλαγής μοίρας των διπλασιασμένων γονιδίων είναι η απόκτηση νέας λειτουργίας, η οποία σε σύγκριση με αυτήν της απώλειας λειτουργίας συμβαίνει σε πολύ χαμηλότερο βαθμό. Αυτό, όπως προαναφέρθηκε συμβαίνει γιατί οι μεταλλάξεις απόκτησης λειτουργίας δεν συμβαίνουν αρκετά συχνά (Glasauer & Neuhauss, 2014).

δ) Επιλογή δόσης – υπόθεση ισορροπίας γονιδίου

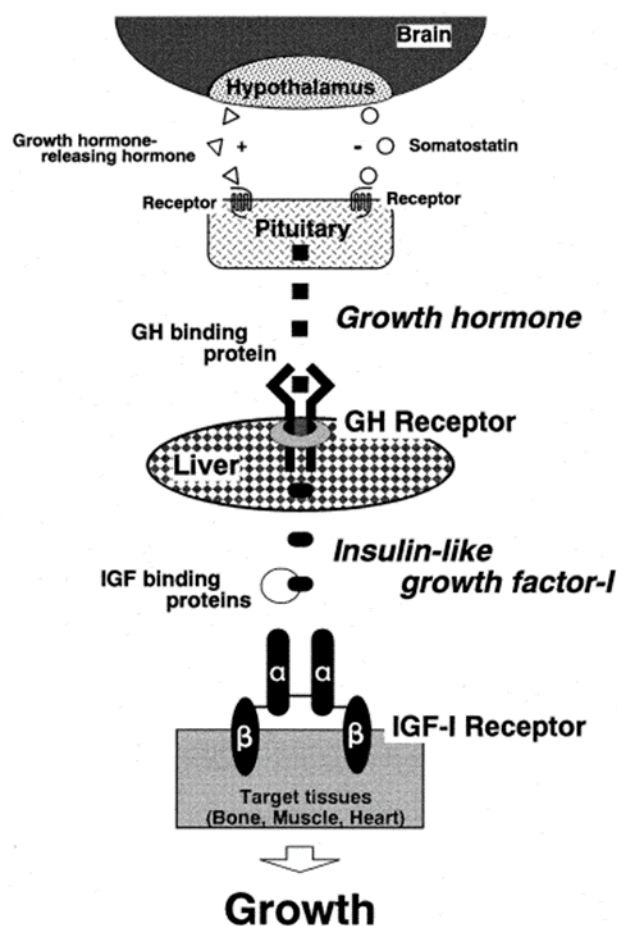
Με βάση την υπόθεση ισορροπίας δόσης του γονιδίου υπάρχουν κάποια γονίδια τα οποία χρειάζονται περισσότερο να διατηρήσουν την διπλασιασμένη μορφή τους για την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, όπως τα γονίδια ριβοσωμικών υπομονάδων. Συγκεκριμένα, μεταλλάξεις απώλειας νουκλεοτιδίων σε τέτοια γονίδια μπορεί να έχουν επιζήμια αποτελέσματα για τον εκάστοτε οργανισμό (Glasauer & Neuhauss, 2014).



Εικόνα 9. Τα πιθανά αποτελέσματα εμφάνισης μεταλλάξεων (Glasauer & Neuhauss, 2014)

1.5 Ο σωματοτρόπος άξονας της τσιπούρας

Για να κατανοήσουμε την ανάπτυξη και τους βιολογικούς μηχανισμούς υπό τους οποίους οι ιχθύες μεγαλώνουν, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τους ενδοκρινικούς μηχανισμούς ρύθμισης της ανάπτυξης της τσιπούρας. Το ενδοκρινικό σύστημα των τελεόστεων είναι πολύ ευαίσθητο στις εξωτερικές αλλαγές συνθηκών και γι' αυτό είναι σημαντικό να μελετηθεί υπό συνθήκες μη συμβατικής διατροφής της τσιπούρας. Η σωματική ανάπτυξη στα ψάρια εξαρτάται από το διατροφικό προφίλ και όπως και στα περισσότερα σπονδυλωτά ρυθμίζεται από το ενδοκρινές μονοπάτι του σωματοτρόπου άξονά τους, growth hormone (GH)/insulin-like growth factor (IGF) (Dourots et al., 2017). Σε αυτό το μονοπάτι σημαντικά μόρια σηματοδότησης είναι οι GH, GHRs, IGFs, IGFbPs και IGFrs. Με βάση την σύγχρονη βιβλιογραφία οι ηπατικοί GHRs και IGFs όσο και η IGF1 του πλάσματος αποτελούν ιδανικούς δείκτες για την αξιολόγηση των διατροφικών προφίλ που καταναλώνονται από τους καλλιεργούμενους ιχθείς (Moriyama et al., 2000).



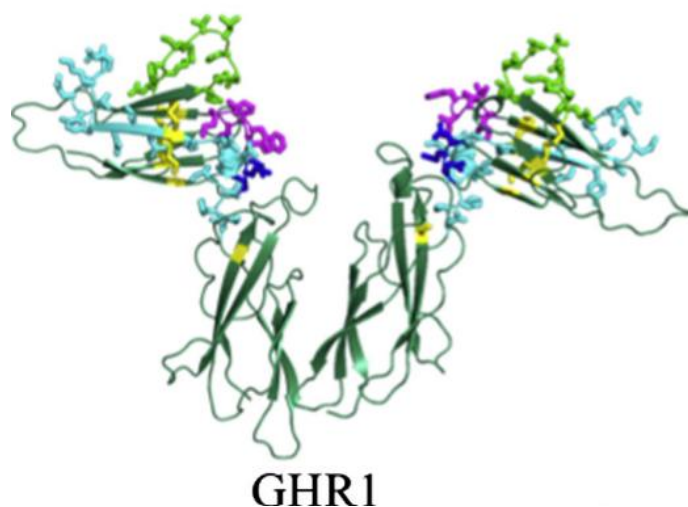
Εικόνα 10. Επαγωγή ανάπτυξης από την Αυξητική ορμόνη, σωματοτρόπος άξονας (Moriyama et al., 2000)

1.5.1 Αυξητική ορμόνη (GH) και οι υποδοχείς της (GHRs)

Ένας από τους παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης είναι η αυξητική ορμόνη (Growth Hormone, **GH**), η οποία έχει πολλαπλούς στόχους και όργανα δράσης στους τελεόστεους. Βασικές λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει είναι ο μεταβολισμός πρωτεϊνών και λιπιδίων, η ωσμωρική ρύθμιση, η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και η σωματική αύξηση (Bone & Moore, 2007). Πέραν από το κύριο εμπορικό προϊόν των ιχθυοκαλλιεργειών που είναι ο λευκός μυς, η διασφάλιση της σωστής λειτουργίας του μεταβολισμού, του ανοσοποιητικού και του ενδοκρινικού συστήματος που αναφέρθηκαν προηγουμένως, είναι εξίσου σημαντικά ως δείκτες απόδοσης των εκτρεφόμενων ιχθύων (Pérez-Sánchez & Le Bail, 1999). Η GH εκφράζεται στην υπόφυση των ιχθύων και στην συνέχεια ελευθερώνεται στην κυκλοφορία μέσω της οποίας βρίσκει πολλούς στόχους-όργανα, ρυθμίζοντας έτσι πλειοτροπικά διάφορες λειτουργίες των τελεόστεων. Η αυξητική ορμόνη φαίνεται να μην συμβάλλει σημαντικά στην εμβρυική ανάπτυξη, αλλά επιδρά κυρίως στα στάδια μετά την εκκόλαψη (Butler & Roith, 2001).

1.5.1.1 Έκφραση και λειτουργία

Με στόχο την εξειδικευμένη δράση της σε κάθε όργανο που δρά, υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς της αυξητικής ορμόνης (Εικόνα 11), οι Growth Hormone Receptors (**GHRs**).



Εικόνα 11: Κρυσταλλογραφική δομή ομοδιμερισμένου υποδοχέα GHR1 (Ellens et al., 2013)

Έχει βρεθεί επιπλέον ότι οι GHRs δεν είναι ειδικοί μόνο για την αυξητική ορμόνη αλλά και για την σωματολακτίνη (SL) σε ορισμένα είδη τελεόστεων (Pierce et al., 2012), γεγονός που έχει προκαλέσει αρκετή σύγχυση στην επιστημονική κοινότητα, όσον αφορά την εξειδίκευση και λειτουργία τους. Οι **GHR1** και **GHR2** του ήπατος, είναι οι δύο βασικές παράλογες μορφές αυτής της οικογένειας υποδοχέων στους τελεόστεους ιχθείς. Η έκφρασή τους επάγεται σε μεγαλύτερο βαθμό στο ήπαρ και στους μύες των ιχθύων, αλλά εμφανίζονται και σε άλλους ιστούς όπως η σπλήν, η καρδιά, ο εγκέφαλος κ.ά. Ωστόσο, δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρο ακόμα κατά πόσο αυτές οι δύο παράλογες μορφές έχουν όμοιες ή διαφορετικές λειτουργίες. Έχει προταθεί από αρκετές μελέτες πως είναι πιθανό η λειτουργία και δράση του κάθε υποδοχέα να διαφέρει από είδος σε είδος ανάμεσα στους τελεόστεους ιχθείς. Παράδειγμα της πιθανής διαφοροποιημένης έκφρασής τους από είδος είδος είναι το γεγονός ότι στο είδος *Spondyliosoma cantharus* σε σχέση με την τσιπούρα, φαίνεται να υπάρχει διαφοροποίηση του προφίλ έκφρασής τους καθώς στο πρώτο παρατηρείται υψηλότερη έκφραση του **GHR2** σε σχέση με τον **GHR1**, ενώ στο δεύτερο το αντίστροφο (Jiao et al., 2006; Saera-Vila et al., 2005). Επιπλέον, στο *Spondyliosoma cantharus* παρατηρήθηκε και λειτουργική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο υποδοχέων, με τον GHR1 να επάγει την ενεργοποίηση του υποκινητή *cfos* που χρησιμοποιείται ως δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού, σε αντίθεση με τον GHR2 που δεν τον ενεργοποιούσε (Jiao et al., 2006). Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι και οι δύο υποδοχείς επηρεάζουν την ενεργοποίηση της αύξησης και ανάπτυξης των ιχθύων αλλά μέσω της ενεργοποίησης της έκφρασης διαφορετικών γονιδίων. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως άλλες ορμόνες πέραν της αυξητικής, επίσης επηρεάζουν την διαφορική έκφραση των υποδοχέων όπως η κορτιζόλη, η ινσουλίνη, η σωματοστατίνη, οι θυροειδείς ορμόνες, φυλετικές ορμόνες αλλά και άλλοι εξωτερικοί παράγοντες όπως η επιβολή νηστείας και η αλατότητα του νερού. Ωστόσο, η έκφραση παραμένει υψηλή και για τους δύο υποδοχείς στο ήπαρ, αλλά δεν έχει εξακριβωθεί

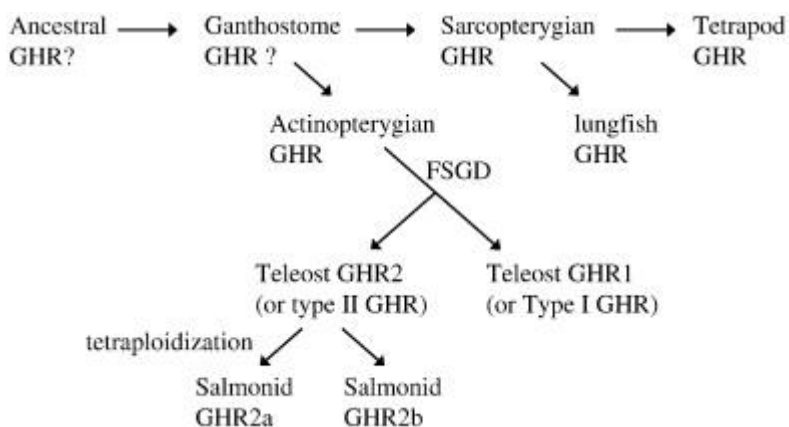
το πλήρες προφίλ της πιθανής διαφορικής λειτουργίας των δύο υποδοχέων (Reindl & Sheridan, 2012).

Έχει προταθεί η διαφορική λειτουργία των δύο τύπων GHR. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται ότι ένας τύπος σχετίζεται με τα αυξητικά μονοπάτια και ο άλλος με τα μεταβολικά μονοπάτια. Στα ηπατικά κύτταρα της τιλάπια βρέθηκε ότι ο GHR2 ενεργοποιείται από την επίδραση της GH και δρά αυξητικά, ενώ ο GHR1 δεν ενεργοποιείται από την GH αλλά από την ινσουλίνη, κορτιζόλη και γλυκαγόνο, υποδεικνύοντας ότι η δράση του επηρεάζεται από το μεταβολικό προφίλ του ιχθύ. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για την εξακρίβωση των μεταβολικών και σωματοτρόπων δράσεων των παραλόγων των GHRs στην τσιπούρα (Pierce et al., 2012).

Επιπλέον, έχει δειχθεί πως ο GHR1 κατέχει περισσότερο κυρίαρχο ρόλο στο ήπαρ από τον GHR2 στην συστηματικά επαγόμενη ανάπτυξη από την GH, ενώ ο GHR2 να εμφανίζει σημαντικότερη έκφραση στους σκελετικούς μύες (Pérez-Sánchez et al., 2018).

1.5.1.2 Εξελικτική πορεία των GHRs

Η GHR2 αναφέρεται και ως τελεοστο-ειδικός υποδοχέας καθώς φαίνεται να προέκυψε αργότερα στην εξέλιξη των τελεόστεων ιχθύων κατά τον τρίτο διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος, ενώ ο GHR1 έχει διατηρηθεί κατά μεγάλο ποσοστό από την ίδια προγονική μορφή που προκύπτει και ο GHR1 των θηλαστικών. Ωστόσο έχουν προκύψει και περαιτέρω παραλλαγές των υποδοχέων λόγω εξελικτικής πίεσης κατά τον τέταρτο διπλασιασμό του γονιδιώματος με την εμφάνιση δύο νέων ισομορφών τόσο για τους GHR1s (GHR1a, GHR1b) όσο και για τους GHR2s (GHR2a, GHR2b). Παρακάτω μπορούμε να δούμε και την απεικόνιση της προτεινόμενης φυλογένεσης της οικογένειας των GHRs (Εικόνα 12, Reindl & Sheridan, 2012).

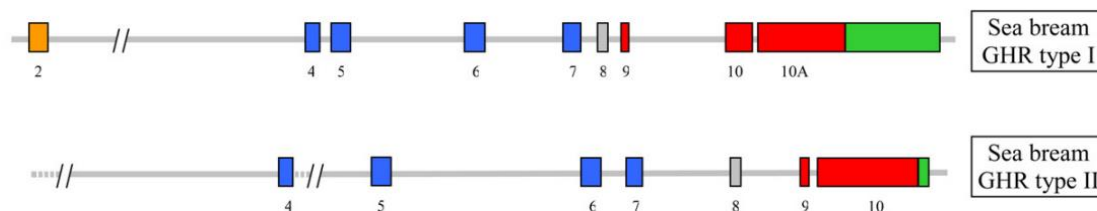


Εικόνα 12. Φυλογενετική ανάλυση οικογένειας GHRs (Reindl & Sheridan, 2012)

1.5.1.3 Χαρακτηρισμός και γονιδιακή δομή των GHRs

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό τους, οι GHRs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μονής διέλευσης, οι οποίοι ανήκουν στην πρώτη τάξη της υπεροικογένειας των υποδοχέων κυτοκίνης. Δρούν μετά τον ομοδιμερισμό τους και έπειτα από την αντίδρασή τους με την ορμόνη. Οι δομικές διαφορές μεταξύ των δύο παραλόγων σχετίζονται με διαφορές στον αριθμό των εξω-μεμβρανικών κυστεϊνών και των ενδο-μεμβρανικών τυροσινών. Είναι

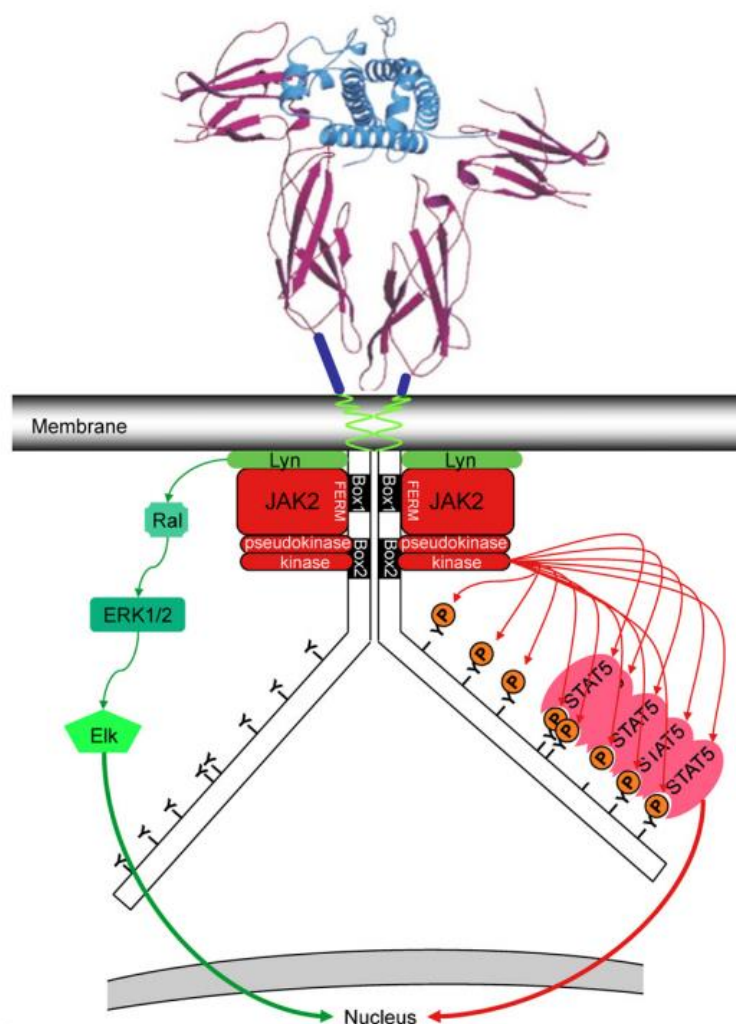
σημαντικό να σημειωθεί πως η ενδομεμβρανική επικράτεια του υποδοχέα *GHR* υπολείπεται δύο κατάλοιπα τυροσίνης τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στο μοτίβο φωσφορυλίωσης για την μεταγωγή σήματος. Όσον αφορά τις γονιδιωματικές διαφορές των *ghr1- ghr2*, εμφανίζουν μεγάλη συντήρηση μεταξύ τους εκτός από το 10/10A εξώνιο στην καρβοξυτελική περιοχή (Εικόνα 13). Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η *GHRII* μορφή είναι πιο κοντά σε αυτήν του GHR των θηλαστικών, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει σε μελέτες της λειτουργίας του (Saera-Vila et al., 2005).



Εικόνα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της γονιδιακής οργάνωσης των *ghrI* και *ghrII* στην τσιπούρα (Saera-Vila et al., 2005)

1.5.1.4 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος

Έπειτα από την αλληλεπίδραση τη αυξητικής ορμόνης με τον υποδοχέα της, γίνεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού της κινάσης Janus 2 (JAK2) και ξεκινάει η μεταγωγή σήματος για την ενεργοποίηση της έκφρασης του μονοπατιού STAT, αλλά και του μονοπατιού src/ERK (Brooks et al., 2008). Ενδομεμβρανικά υπάρχουν δύο συντηρημένες περιοχές Box1 και Box2, οι οποίες είναι σημαντικές για την μεταγωγή σήματος. Η πλούσια σε προλίνη περιοχή του Box1 είναι απαραίτητη για την σύνδεση με την κινάση JAK2 που επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα GHR (Jiao et al., 2006). Με την ενεργοποίηση τους φωσφορυλιώνουν τα STATs τα οποία συμπλοκοποιούνται και μεταφέρονται ενδοκυτταρικά για να δράσουν ως μεταγραφικοί παράγοντες στα γονίδια στόχους με ένα από αυτά να είναι τα γονίδια των IGFs. Επιπλέον, ενεργοποιείται και το μονοπάτι ERK χωρίς όμως την φωσφορυλίωση των τυροσινών (Εικόνα 14, Brooks et al., 2008).



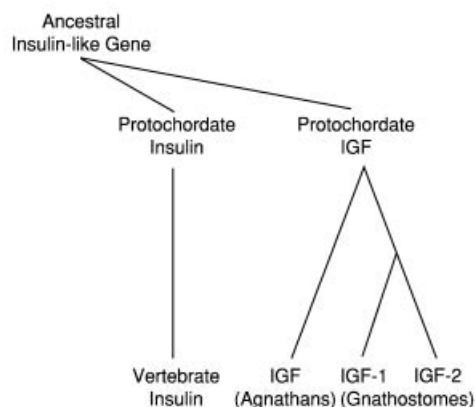
Εικόνα 14. Μονοπάτι μεταγωγής σήματος του υποδοχέα αυξητικής ορμόνης GHR (Brooks et al., 2008)

1.5.2 IGFs στον σωματοτρόπο άξονα της τσιπούρας

Ανάλογα με το όργανο-στόχο της GH ενεργοποιούνται και οι ανάλογοι καταρράκτες έκφρασης γονιδίων. Το ήπαρ είναι ένας από τους στόχους της και αυτό που απασχόλησε αυτήν την διπλωματική εργασία. Στο ήπαρ κάποια από τα γονίδια που εκφράζονται έπειτα από την επίδραση της σηματοδότησης από την αυξητική ορμόνη είναι και τα γονίδια της οικογένειας **IGF** και πιο συγκεκριμένα τα δύο παράλογα μεταξύ τους *IGF1*, *IGF2*, ενώ την τελευταία δεκαετία έχει ανακαλυφθεί και η ύπαρξη μιας ομόλογης μορφής του *IGF3*. Δρούν με παρόμοιο τρόπο με την ινσουλίνη και ρυθμίζουν σε κυτταρικό επίπεδο τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την κυτταρική μετανάστευση, τον μεταβολισμό και την αναστολή της απόπτωσης (Ndandala et al., 2022).

1.5.2.1 Η εξελικτική πορεία των IGFs

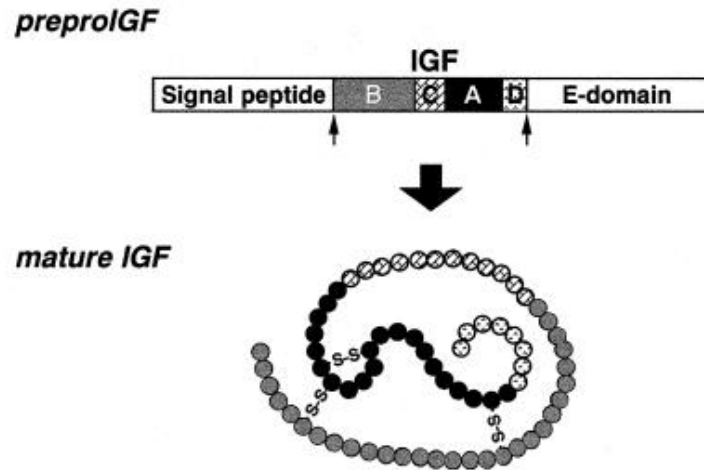
Ξεκινώντας με την νεότερη μορφή των IGF, την IGF3 φαίνεται να μην μοιράζεται την ίδια προγονική μορφή με τις άλλες δύο, διατηρώντας κάποιες δομικές ομοιότητες, όπως τις ίδιες επικράτειες (B, C, A, D, E) και την τεταρτοταγή δομή τους. Με βάση την φυλογενετική ανάλυση η IGF3 διαμορφώνει ξεχωριστό κλάδο από τις άλλες δύο και θεωρείται τελεοστοειδική μορφή καθώς δεν έχει εντοπισθεί σε άλλα σπονδυλωτά όπως ο άνθρωπος, τα ποντίκια, το κοτόπουλο, σε αντίθεση με τις IGF1 και IGF2. Η διαφοροποίησή του φαίνεται επίσης λειτουργικά καθώς επηρεάζει την λειτουργία των γονάδων, ενώ οι άλλες δύο μορφές συμμετέχουν κυρίως στην σωματική ανάπτυξη (Wang et al., 2008). Σε αυτήν τη πτυχιακή θα ασχοληθούμε περισσότερο με την επιρροή της ανάπτυξης στους ιχθύες, άρα θα προσεγγίσουμε καλύτερα μόνο τις δύο IGF1 και IGF2 μορφές. Οι IGF1 και IGF2 αποτελούν μέρος μια οικογένειας πεπτιδίων στην οποία συμπεριλαμβάνεται και η ινσουλίνη (INS) με το οποίο μοιράζονται την προγονική μορφή τους. Τα IGF πεπτίδια δεν έχουν εντοπισθεί μέχρι στιγμής στα ασπόνδυλα, ενώ διακριτές μορφές ινσουλίνης και IGF-like γονιδίων έχουν εντοπισθεί στα ουροχορδωτά, προτείνοντας ότι το «IGF-like» γονίδιο προέκυψε από μια προγονική μορφή όμοια με την ινσουλίνη, μετά την διαφοροποίηση των πρωτοχορδωτών από τους ασπόνδυλους προγόνους τους και πριν την εμφάνιση των σπονδυλωτών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15 (Wood et al., 2005). Οι INS, IGF1, και IGF2 εμφανίζουν ομοιότητες στις περιοχές των A- και B- αλυσίδων τους ενώ η πιο σημαντική διαφορά τους εμφανίζεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, στο οποίο οι IGFs έχουν διατηρήσει δύο επιπλέον επικράτειες τις D και E (Ndandala et al., 2022).



Εικόνα 15. Εξελικτική πορεία των IGF γονιδίων (Wood et al., 2005)

1.5.2.2. Γονιδιακή δομή των IGFs

Όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλα σπονδυλωτά, οι cDNA αλληλουχίες των IGF των τελεόστεων κωδικοποιούν pre-pro ορμόνες μήκους 159-193 αμινοξέων. Όλες διατηρούν ένα πεπτίδιο οδηγό, το οποίο απομακρύνεται κατά την διάρκεια της έκκρισης για την παραγωγή της προ-ορμόνης, η οποία αποτελείται από πέντε διακριτές επικράτειες (B-C-A-D-E). Έπειτα από μια δεύτερη πεπτιδική λύση αφαιρείται και η E επικράτεια, προς την παραγωγή του τελικού ώριμου IGF πεπτιδίου (B-C-A-D) το οποίο αποτελείται πλέον από 68-70 αμινοξέα για το IGF1 (ανάλογα το είδος του τελεόστεου ιχθύ), και 70 για το IGF2 (Εικόνα 16, Moriyama et al., 2000).

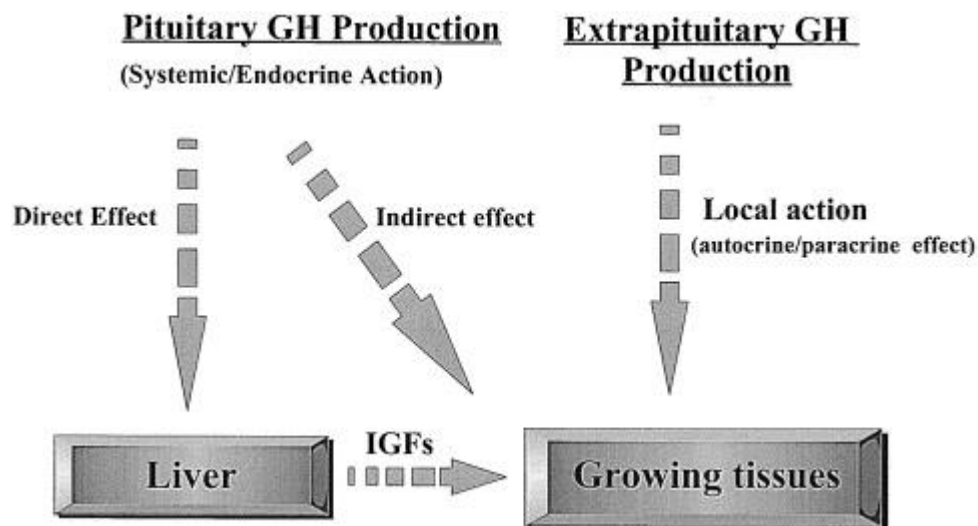


Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της *preproIGF* και της ώριμης μορφής της *IGF* (Moriyama et al., 2000)

1.5.2.3 IGF1

1.5.2.3.1 Έκφραση και λειτουργία

Η δράση της *IGF1* περιορίζεται μετά την εκκόλαψη επηρεάζοντας την σωματική αύξηση των ιχθυδίων. Η *IGF1* εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και δρα με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή τρόπο, ωστόσο το μεγαλύτερο ποσοστό έκφρασής της λαμβάνει χώρα στο ήπαρ. Η έκφρασή της εξαρτάται από την παρουσία της GH στο ήπαρ, η οποία επάγει την έκφραση των IGF, ωστόσο έχει βρεθεί ότι οι IGFs και οι GHs μπορούν να δράσουν και ανεξάρτητα (Ndandala et al., 2022; Wood et al., 2005). Έχει βρεθεί, επίσης, πως η IGF1 του πλάσματος πέραν του ποσού έκφρασής της στο ήπαρ είναι επίσης ένας πολύ καλός δείκτης αξιολόγησης της σωματικής ανάπτυξης. Η IGF1 από την στιγμή που εκφράζεται στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς έχει την ικανότητα να μεταφέρεται διασυστημικά για την ρύθμιση της αύξησης, ενώ από την στιγμή που αυξάνεται στην κυκλοφορία αναστέλλει την έκφραση της GH από τον υποθάλαμο, ενώ συμμετέχει και συνεργικά με την GH στην ανάπτυξη. Υπάρχουν επίσης δεδομένα ότι η IGF1 έχει σημαντικό ρόλο και εκτός του ήπατος και πιθανό ρόλο στην πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη, πριν ακόμα την διαμόρφωση του άξονα GH/IGF (Εικόνα 17, Duguay et al., 1996; Pérez-Sánchez & Le Bail, 1999) .



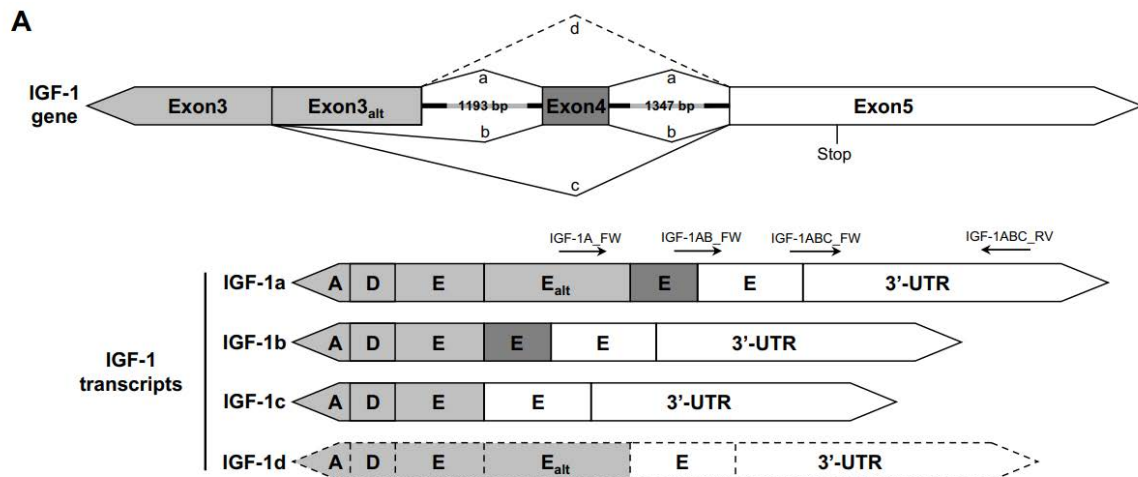
Εικόνα 17. Συνεργική δράση GH και IGF στην ανάπτυξη (Pérez-Sánchez & Le Bail, 1999)

Όσον αφορά την εξειδικευμένη και αυξημένη έκφραση της στο ήπαρ έχει διαμορφωθεί μια υπόθεση, ότι μπορεί να πρόκειται για την ύπαρξη ενός ηπατοειδικού μεταγραφικού παράγοντα του IGF1. Για την υποστήριξη αυτής της υπόθεσης, έχει βρεθεί ένας πυρηνικός ηπατοκυτταρικός παράγοντας, ο HNF1 (hepatocyte nuclear factor 1) που δεσμεύεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου, η οποία είναι επίσης συντηρημένη σε όλα τα σπονδυλωτά, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει τον λόγο της αυξημένης έκφρασης του IGF1 στους ηπατικούς ιστούς.

1.5.2.3.2. Εναλλακτικά μετάγραφα

Πέρα από την βασική ισομορφή IGF1 που εκφράζεται στο ήπαρ των ιχθύων, έχουν βρεθεί και άλλες ισομορφές αυτού του γονιδίου που προκύπτουν απο εναλλακτικό μάτισμα. Το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου παράγει διάφορα προ-IGF1 μετάγραφα που διαφοροποιούνται ως προς το μήκος της επικράτειας E. Οι ισομορφές που προκύπτουν είναι οι IGF1a, IGF1b, IGF1c και την IGFd. Οι φυσιολογικές λειτουργίες των ποικίλων μεταγράφων δεν έχουν εξακριβωθεί ακόμα εκτενώς, αλλά υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν την πιθανή ύπαρξη ιστοειδικότητας για κάθε μετάγραφο. Στην αναπτυσσόμενη προνύμφη κάθε ισομορφή έχει συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης. Οι IGF1a και IGF1b θεωρούνται να παίζουν ρόλο σε πρώιμα στάδια μετά την εκόλλαψη των ιχθύων όπως του σχηματισμού των οστών και των μυών, ενώ η IGF-1c φαίνεται να λαμβάνει χώρα περισσότερο στην πρώιμη διαμόρφωση της προνύμφης αλλά και με την βοήθεια των άλλων ισομορφών σε μεταγενέστερα στάδια. Επίσης, οι IGF1a και IGF1b δρουν τοπικά, ενώ η -c συστηματικά, όπως στα θηλαστικά. Αυτή η συντηρημένη έκφραση του -c ανάμεσα στα είδη μπορεί να

υποδεικνύει την συμμετοχή των άλλων μορφών στην ανάπτυξη του συστήματος οσμωρύθμισης στα ψάρια, ως μηχανισμός προσαρμογής (Tiago et al., 2008). Στην Εικόνα 18 απεικονίζεται πώς απο το αρχικό IGF1 γονίδιο προκύπτουν μέσω του εναλλακτικού ματίσματος τα υπόλοιπα μετάγραφα.



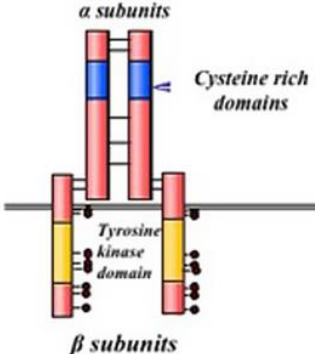
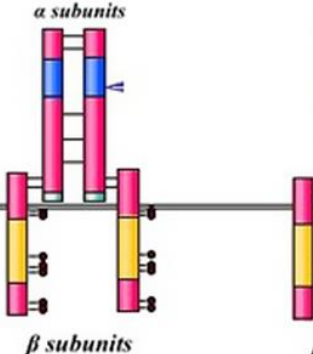
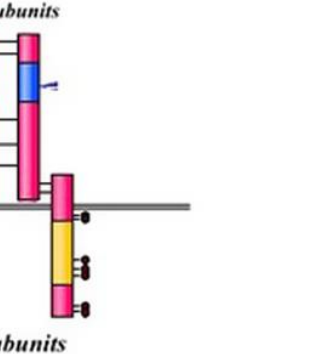
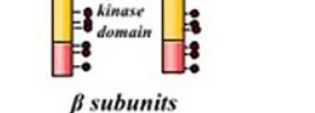
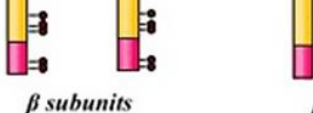
Εικόνα 18. Εναλλακτικά μετάγραφα του *igf1* της τσιπούρας, *Sparus Aurata* (Tiago et al., 2008).

1.5.2.3.3. Μονοπάτι μεταγωγής σήματος

Μια σειρά μελετών έχει αποδείξει την συντήρηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος των IGF μέσω του IGF1R, μεταξύ των ιχθύων. Πιο συγκεκριμένα έχει δειχθεί πως τα βιολογικά αποτελέσματα των IGF1Rs μεταδίδονται μέσω των μονοπατιών IRS-1, Shc/MAPK, 14-3-3/Raf και PI3K/Akt όπως συμβαίνει και στα θηλαστικά (Peruzzi et al., 1999, Pozios et al., 2001, Wood et al., 2005). IGF-1 που συνδέεται με τον IGFR1 ενεργοποιεί μια σειρά φωσφορυλιώσεων που οδηγούν σε αναβολικά αποτελέσματα, όπως η αυξημένη πρωτεϊνική και νουκλεοτιδική σύνθεση, η αναστολή της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης, αυξημένο πολλαπλασιασμό, κυτταρική επιβίωση και διαφοροποίηση. Η εξάρτηση των οργανισμών από την έκφραση των IGF1Rs με σκοπό την ανάπτυξη και την επιβίωση έχει φανεί από μελέτες που αξιολογήθηκαν ποντίκια τα οποία είχαν διπλή σίγηση των γονιδίων των IGF1Rs. Αυτά τα ποντίκια εμφάνισαν αξιοσημείωτη μείωση ανάπτυξης έως και 45% σε σχέση με το φυσιολογικό τους μέγεθος, και μειωμένη επιβίωση μετά την γέννηση (Liu et al., 1993).

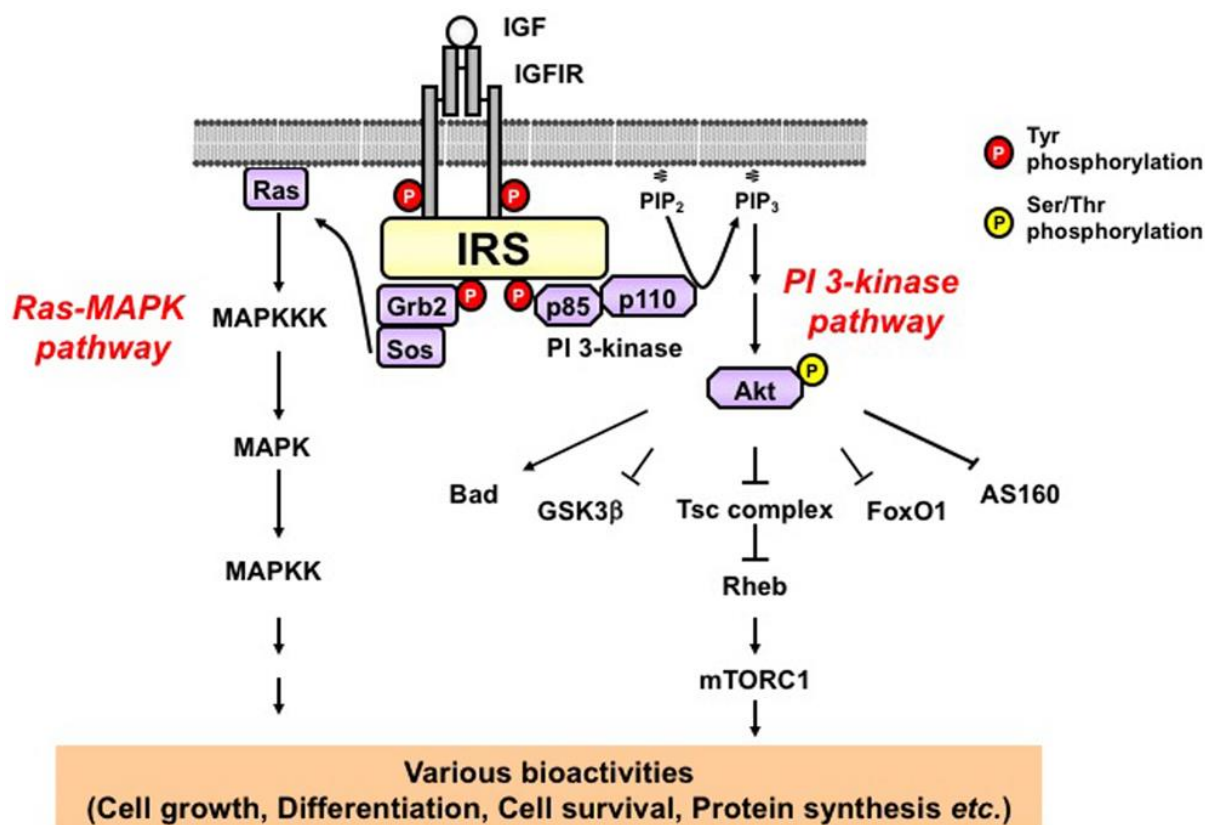
Για την κατανόηση των ενδοκυτταρικών αποτελεσμάτων των IGFs θα πρέπει πρώτα να πούμε δυο λόγια για την βασική δομή και λειτουργία των υποδοχέων τους. Η δομή των IGF1Rs εμφανίζει υψηλή ομολογία με αυτόν της ινσουλίνης. Ο IGF1R είναι ένα τετραμερές συνδεδεμένο με δισουλφιδικούς δεσμούς, το οποίο αποτελείται από δύο α υπομονάδες που είναι εξωκυττάρειες πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη και συνδεόνται με τα ειδικά υποστρώματα, και από δύο β διαμεμβρανικές υπομονάδες με δράση κινάσης-τυροσίνης. Όταν ένας IGF1R εκφράζεται στα ίδια κύτταρα με έναν υποδοχέα ινσουλίνης, κάποιοι από αυτούς διαμορφώνουν έναν υβριδικό υποδοχέα αποτελούμενο από ένα α-β ινσουλινικό ημι-υποδοχέα και έναν α-β IGF1 ημι-υποδοχέα. Στην Εικόνα 19 βλέπουμε την δομή των

υποδοχέων IGF1 και των υποδοχέων ινσουλίνης IR-A και IR-B. Κάτω από τις δομές του βλέπουμε και την συγγένεια που έχουν οι IGF1 και IGF2 και η ινσουλίνη με τους παρακάτω υποδοχείς, με φθίνουσα διάταξη (Hakuno & Takahashi, 2018).

	IGF1 Receptor	Insulin Receptor A (IR-A)	Insulin Receptor B (IR-B)
Structure	Two α -subunit (135kDa) and two β -subunit (95kDa)	Two α -subunit (135kDa) and two β -subunit (95kDa)	Two α -subunit (135kDa) and two β -subunit (95kDa)
<i>Extracellular Ligand Binding Domain</i>			
<i>Transmembrane Domain</i>			
<i>Cytoplasmic Domain</i>			
	— Disulfide bonds	• Tyrosine residues which are possibly phosphorylated	
Affinity to ligand	IGF1>IGF2 >>Insulin	Insulin>IGF2 >>IGF1	Insulin>>IGF2 >IGF1

Εικόνα 19. Μοριακή δομή των IGF1 και IR (Hakuno & Takahashi, 2018)

Σε ένα γενικότερο πλαίσιο η δέσμευση της IGF1 ή της ινσουλίνης στους ειδικούς υποδοχείς τους σε μία μεμβράνη στόχο, ακολουθείται από την ενεργοποίηση της κινάσης τυροσίνης στην β -υπομονάδα του υποδοχέα. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας φωσφορυλιώνει διαδοχικά, ειδικά υποστρώματα, συγκεκριμένα τα υποστρώματα του υποδοχέα ινσουλίνης (insulin receptor substrate) IRS1, IRS2 και Shc. Έχει βρεθεί πως φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης των IRS-1, IRS-2 και Shc αναγνωρίζονται από διάφορα σηματοδοτικά μόρια τα οποία διαθέτουν μια Src homology 2 (SH2) επικράτεια. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι Grb2 και μια ρυθμιστική υπομονάδα της φωσφατιδυλοϊνositόλης της 3-κινάσης PI3-K, υποδεικνύοντας ότι η δέσμευση των φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων τυροσίνης με πρωτεΐνες με SH2 επικράτειες ρυθμίζουν ενέργειες όμοιες με την ινσουλίνη. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις φαίνεται να ρυθμίζουν τα μονοπάτια MAPK και PI3K, γνωστά μονοπάτια αυξητικών παραγόντων (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Σηματοδοτικά μονοπάτια του IGF1R, (Hakuno & Takahashi, 2018)

- **PI3K μονοπάτι**

Η IRS-1 στρατολογεί την p85 ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K, η οποία μέσω της καταλυτικής δράσης της p110 υπομονάδας της, στρατολογείται η Akt κινάση στην κυτταρική μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη Akt έχει πολλά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου του Bcl2 ανταγωνιστή του κυτταρικού θανάτου (Bad), την 3b κινάση του γλυκογόνου GSK3b, μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας Fox, και το υπόστρωμα της Akt με 160kDa AS160. Αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν σημαντικά στην ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού μεταβολισμού. Η Akt επίσης ρυθμίζει την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω φωσφορυλίωσης της TSC2 πρωτεΐνης (tuberous sclerosis protein), η οποία αναστέλλει την δράση της Rheb για την ενεργοποίηση του TORC1 (target of rapamycin) (Hakuno & Takahashi, 2018).

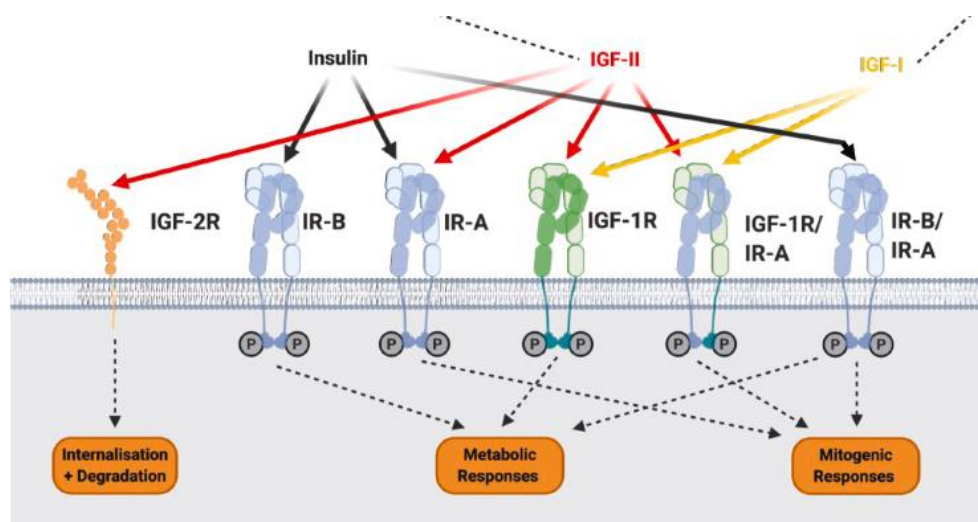
- **MAPK μονοπάτι**

Η φωσφορυλίωση των IRS-1 και Shc μπορεί επίσης να οδηγήσει στην στρατολόγηση της πρωτεΐνης Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), του SOS (Son of Sevenless) και του Ras, με επακόλουθη ενεργοποίηση μέσω μιας σειράς φωσφορυλίωσης των μονοπατιών της ενεργοποιημένης με μιτογόνα σήματα πρωτεϊνικής κινάσης (MAPKKK, MAPKK και MAPK), οδηγώντας σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και επιβίωση (Hakuno & Takahashi, 2018).

1.5.2.2 IGF2

Η αρχική υπόθεση για την ανάπτυξη μετά την εκκόλαψη των ιχθύων ήταν ότι αυτή ρυθμιζόνταν αποκλειστικά από την IGF1, η οποία εκφραζόταν από την επιρροή της GH, ενώ η εμβρυική ανάπτυξη ρυθμιζόταν από την IGF2, η οποία θεωρούνταν ανεξάρτητη από την GH. Πλέον είναι γνωστή η επίδραση της IGF2 και στην φάση του ιχθυδίου αλλά και στη ενήλικη ζωή. Επίσης, έχει φανεί και η εξαρτώμενη από την GH έκφραση της IGF2 και μάλιστα στα είδη τιλάπια και ιριδίζουσα πέστροφα επάγεται από την GH σε μεγαλύτερο βαθμό από την IGF1, υποστηρίζοντας την συμμετοχή της στην ανάπτυξη των ιχθύων μετά την εκκόλαψη (Bergan-Roller & Sheridan, 2018). Ωστόσο, αντίστοιχες μελέτες στην τσιπούρα δεν είχαν τα ίδια αποτελέσματα, γεγονός που δείχνει την πιθανή διαφοροποίηση της δράσης της μεταξύ των τελεόστεων (Ndandala et al., 2022). Επιπλέον, σε σύγκριση με την IGF1, η IGF2 η δράση της μελετάται κυρίως τοπικά, αλλά υπάρχουν έρευνες σε εξέλιξη για την κατανόηση της διασυστημικής της λειτουργίας. Η ηπατική της έκφραση είναι χαμηλότερη τις πρώτες μέρες μετά την εκκόλαψη, αλλά η δράση της φαίνεται να παραμένει σημαντική. Πιο αυξημένη, είναι η έκφραση και η δράση σε νεαρά ιχθύδια τσιπούρας στους ιστούς των σκελετικών μυών (Pérez-Sánchez et al 2018).

Ενδοκυτταρικά, η IGF2 φαίνεται να έχει όμοιες δράσεις με την IGF1, γεγονός που υποδεικνύεται και από το όμοιο μοτίβο ενεργοποίησης των υποδοχέων IGF1R και IR. Με βάση τα παραπάνω η IGF2 επιδρά στον πολλαπλασιασμό, στα μιτογόνα σήματα και τα μεταβολικά μονοπάτια (Duguay et al., 1996). Η ορμονική ρύθμιση της IGF-2 είναι λιγότερο μελετημένη και γνωστή σε σύγκριση με την εκτενή έρευνα που έχει επενεργηθεί για την IGF1, τόσο για τους ιχθύες όσο και για γενικά για όλους τους οργανισμούς. Το πεπτίδιο της IGF2 φαίνεται να έχει αυξητικές δράσεις μέσω της σύνδεσής του με τους υποδοχείς της IGF1, όπως φάνηκε στην προηγούμενη εικόνα. Οι εξειδικευμένοι υποδοχείς της IGF2, IGF-2Rs ελέγχουν την ενδοκύτωση και την ανακύκλωσή της, αλλά δεν συμμετέχουν σε μονοπάτια επαγωγής ανάπτυξης. Η IGF2 δεσμεύεται όμως και σε υποδοχείς ινσουλίνης επάγοντας μιτογόνα και μεταβολικά μονοπάτια. Αυτό συμβαίνει και λόγω της μεγάλης ομολογίας της ορμόνης με την ινσουλίνη καθώς είναι η προγονική μορφή της (Ndandala et al., 2022). Οι μεταβολικές και μιτογενετικές ιδιότητες της IGF2 συνδέονται με δύο βασικά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ακολουθούν την ενεργοποίηση των IGF1Rs υποδοχέων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.



Εικόνα 21. Τα πεπτίδια IGF-I, IGF-II, Insulin, οι υποδοχείς τους και τα ενδοκυτταρικά αποτελέσματα ενεργοποίησής τους (LeRoith et al., 2021).

1.5.3. Επίδραση της διατροφικής σόγιας στο σωματοτρόπο άξονα



Εικόνα 22. Φυτό και σπόροι σόγιας

Η σημασία της εκμετάλλευσης της φυτικής διατροφής στην ιχθυοκαλλιέργεια είναι εμπεριστατωμένη και αναγνωρισμένη λόγω της αυξανόμενης ανάγκης εύρεσης υποκατάστατων των συμβατικών ιχθυαλεύρων FM (Fish Meal). Μεταξύ διάφορων συστατικών, η διατροφική σόγια SBM (Soybean Meal) είναι μια από τις πιο ενδιαφέρουσες εναλλακτικές πρώτες ύλες ιχθυοτροφής λόγω των πλεονεκτημάτων της διαθεσιμότητάς της, του χαμηλού κόστους της και της περιεκτικότητάς της σε πρωτεΐνες και αμινοξέα (Εικόνα 22). Ωστόσο, η χρήση προϊόντων σόγιας μπορεί να προκαλέσουν επιπλοκές που μπορεί να επηρεάσουν την γευστικότητα των τροφών, τον πρωτεϊνικό καταβολισμό, την βιοδιαθεσιμότητα φωσφόρου, να μειώσουν τον ρυθμό απορρόφησης των θρεπτικών στοιχείων των τροφών, αλλά και σε ορισμένα ποσοστά να προκαλέσουν ασθένειες όπως η εντερίτιδα. Αυτές οι επιπλοκές μπορεί να προκληθούν από την ύπαρξη αντι-θρεπτικών παραγόντων. Διαφορετικά είδη ιχθύων εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία σε αυτούς τους

παράγοντες (Bonaldo et al., 2008). Κάποιοι από αυτούς τους αντι-θρεπτικούς παράγοντες είναι οι αναστολείς πρωτεασών, σαπωνίνες, ταννίνες, φυτοοιστρογόνα, αλκαλοειδή, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες εκτός του αμύλου (Florini et al., 1996).

Αποτελέσματα ερευνών σε τσιπούρες που εκτρέφονταν με κατανάλωση διατροφικής σόγιας είναι αμφιλεγόμενα. Τα μέγιστα ποσοστά ενσωμάτωσης της σόγιας στην διατροφή των ιχθύων ποικίλουν σε διαφορετικές έρευνες. Αυτό το γεγονός μπορεί να έγκειται στην ποιότητα των συστατικών, στις μεθόδους επεξεργασίας της σόγιας, ποικιλομορφία στην σύσταση της διατροφής και διαφορές στο μέγεθος των ψαριών και του συστήματος καλλιέργειας που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Δεδομένα μελετών δείχνουν πως η υποκατάσταση τροφής με SBM σε ιχθύδια, μπορεί να είναι επιτυχής σε υψηλά ποσοστά, που μπορεί να φτάσουν το 30 – 50 % χωρίς να επηρεάζουν την ανάπτυξή τους. Ωστόσο από οικονομικής πλευράς τα αυξημένα ποσοστά περιεκτικότητας σε SBM δεν αποτελούν μια κερδοφόρα επιλογή σε σύγκριση με την τιμή της συμβατικής ιχθυοτροφής και γι' αυτό το επιθυμητό συχνά ποσοστό που χρησιμοποιείται στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι 22% περιεκτικότητα ιχθυοτροφής σε SBM (Martínez-Llorens et al., 2007).

Πέραν από την χρήση των SBM υποκατάστατων, είναι επίσης γνωστή και η διατροφική συμπυκνωμένη πρωτεΐνης σόγιας SPC (Soy Protein Concentrate). Η διαφορά των δύο πρώτων υλών έγκειται κατά κύριο λόγο στο ποσοστό της πρωτεΐνης που περιέχεται σε αυτές και το ποσοστό αντι-θρεπτικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, η SBM μπορεί να προκαλέσει εντερίτιδα σε ποσοστά πάνω από 30 %, δημιουργώντας έναν λόγο παραπάνω στην μείωση του ποσοστού υποκατάστασης. Η SPC, επειδή εμπεριέχει μικρότερα ποσα αντι-θρεπτικών παραγόντων, ενέχει μικρότερο κίνδυνο για εμφάνιση εντερίτιδας στους εκτρεφόμενους ιχθύες. Έπειτα το ποσοστό σε περιεκτικότητα πρωτεΐνης της SBM ανέρχεται στα 48% σε σύγκριση με τα ~75% που εμπεριέχονται στην SPC, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει εμπόδιο σε δίαιτες υψηλής διατροφικής απαίτησης σε πρωτεΐνη. Τέλος, το ιδανικό ποσοστό υποκατάστασης των συμβατικών ιχθυοτροφών με SPC που δεν προκαλεί σημαντική αναστολή ανάπτυξης είναι το 30% (Kissil et al., 2000).

Έχει βρεθεί επίσης ότι για την σωστή ανάπτυξη των ιχθύων είναι σημαντική η αναλογία των απαραίτητων αμινοξέων προς τα μη απαραίτητα IAA/DAA (Indispensable Amino Acids/Dispensable Amino Acids) που περιέχονται σε κάθε διατροφική φόρμουλα. Αυτή η αναλογία έχει βρεθεί ότι πρέπει να είναι υψηλή ώστε να ικανοποιείται η σωστότερη ανάπτυξη των ιχθύων (Gómez-Requeni et al., 2004).

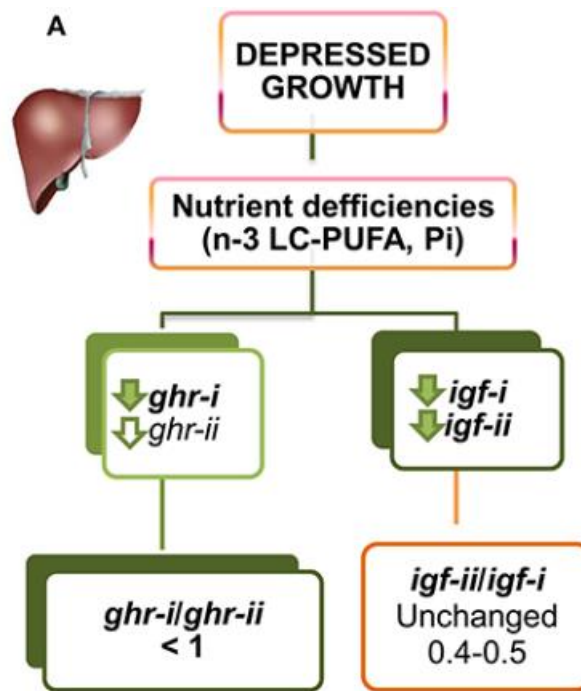
Μελέτες έχουν δείξει πως ο άξονας GH/IGF των τελεόστεων είναι ένας από τους ιδανικότερους δείκτες αξιολόγησης της ανάπτυξης ιχθύων. Προσδιορίζονται συχνά, σε περιπτώσεις που μελετούνται οι επιδράσεις της μεταβολής συνθηκών για την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης των ιχθύων. Το προφίλ που έχει βρεθεί ότι ακολουθείται κατά την αναστολή της φυσιολογικής ανάπτυξης των ιχθύων, σχετίζεται με τις μειωμένες τιμές των IGF οι οποίες εκφράζονται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό τους στο ήπαρ, καθώς και μειωμένες τιμές στους GHR του ήπατος (Εικόνα 22). Η ηπατική απευαισθητοποίηση λόγω κατανάλωσης εναλλακτικών ιχθυοτροφών εμφανίζεται από την μειωμένη έκφραση του GHRI και IGF1 σε συνδιασμό με την μειωμένη έκφραση των IGF-1 πλάσματος (Gómez-Requeni et al., 2004).



Εικόνα 23. Μοντέλο απόκρισης του άξονα της αυξητικής ορμόνης στην βελτίωση της αύξησης Pérez-Sánchez et al., 1999

Σε πρόσφατη μελέτη του Pérez-Sánchez καταδείχθηκε ότι η αναλογία γονιδιακής έκφρασης ρυθμίζεται επίσης σε μεγάλο βαθμό από το διατροφικό επίπεδο και τα ψάρια που τρέφονται με μη ισορροπημένες φυτικές δίαιτες ή ημικαθαρισμένες δίαιτες σχεδιασμένες για συγκεκριμένες ελλείψεις θρεπτικών συστατικών να μειώνουν την ηπατική *ghr-i*, μειώνοντας την αναλογία *ghr-i* / *ghr-ii* από 1,8 σε 2 σε < 1.

Αντίθετα, η ηπατική αναλογία *igf-ii* / *igf-i* παραμένει σχεδόν αμετάβλητη και κοντά στο 0,5 σε ιχθύδια τσιπούρας, τόσο στα υγιή όσο και στα υποσιτισμένα ψάρια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα δύο μετάγραφα ηπατικού *igf* ρυθμίζονται με όμοιο τρόπο όταν αντιμετωπίζουν διαφορετικά περιβαλλοντικά και διατροφικά ερεθίσματα. Οι μεταβολές στις παραπάνω αναλογίες φαίνονται στην Εικόνα 24 (Pérez-Sánchez et al., 2018).



Εικόνα 24. Μοντέλο απόκρισης του άξονα της αυξητικής ορμόνης στην βελτίωση της αύξησης (Pérez-Sánchez et al 2018)

1.6 Σκοπός

Η τσιπούρα ανήκει σε ένα από τα πιο μαζικά εκτρεφόμενα είδη ιχθύων στη Μεσόγειο, με τεράστιο οικονομικό αλλά και διατροφικό ενδιαφέρον. Ανήκει στην τάξη των τελεόστων ιχθύων, οι οποίοι έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς προσαρμογής στο περιβάλλον τους έπειτα από τον τελεόστο-ειδικό ή τρίτο διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματός τους, γεγονός που κάνει την έρευνα των φυσιολογικών λειτουργιών τους εξαιρετικά ενδιαφέροντα.

Η ανάπτυξη της τσιπούρας στα συστήματα των ιχθυοκαλλιεργιών βασίζεται σε ξηρά τροφή που χορηγείται από την αρχή των καλλιεργειών στην προνυμφική φάση έως την φάση του νεαρού ιχθυδίου.

Οι συνεχώς αυξανόμενες απαιτήσεις της ιχθυοκαλλιέργειας έχουν δημιουργήσει εδώ και χρόνια την ανάγκη αντικατάστασης της συμβατικής ιχθυοτροφής που προέρχεται από άλλους ιχθύες με εναλλακτικές και οικονομικές ιχθυοτροφές με στόχο έναν πιο βιώσιμο τρόπο καλλιέργειας και την αντιμετώπιση της έλλειψης μακροπρόθεσμης διαθεσιμότητας των πρώτων υλών της συμβατικής διατροφής.

Η αξιοποίηση της διατροφικής σόγιας στην ανάπτυξη της τσιπούρας είναι ευρέως διαδεδομένη, αλλά τα δεδομένα για την επίδραση που έχουν στην ανάπτυξή της δεν έχουν εδραιωθεί στην επιστημονική κοινότητα.

Σκοπός αυτής της πτυχιακής είναι η αξιολόγηση της επιρροής της διατροφικής σόγιας στην ανάπτυξη της τσιπούρας και πιο συγκεκριμένα υπο το πρίσμα του σωματοτρόπου άξονά της. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η έκφραση ορισμένων γονιδίων δεικτών της σωματικής

ανάπτυξής της στο ήπαρ, το κύριο μεταβολικό όργανο των οργανισμών αλλά και κύριο όργανο έκφρασης σημαντικών γονιδίων του σωματοτρόπου άξονα. Οι δείκτες του σωματοτρόπου άξονα που μελετήθηκαν είναι οι IGF1, IGF2 , GHRI και GHRII. Οι διατροφές υπό τις οποίες ελέγχθηκαν οι εκφράσεις των γονιδίων είναι οι διατροφές με υποκατάσταση ιχθυαλεύρου με 20% SBM και 20% SPC ξεχωριστά.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Επιλογή των υπό μελέτη δειγμάτων

Για τους σκοπούς του πειράματος λήφθηκαν 32 δείγματα ήπατος από διαφορετικές τσιπούρες οι οποίες καλλιεργούνταν υπο αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, σε ειδικά διαμορφωμένες δεξαμενές του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) της Κρήτης.

2.2 Προσδιορισμός των δειγμάτων

Τρεις δίαιτες διαμορφώθηκαν (Πίνακας 4)- μια δίαιτα χωρίς σόγια (control), μια δίαιτα με 20% σόγιαλευρο (SBM) και μια δίαιτα με 20% συμπυκνωμένη πρωτεΐνη σόγιας (SPC) - και τροφοδοτήθηκαν σε τρεις ομάδες τσιπούρας, 27 g κατά μέσο όρο, για δύο μήνες. Πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες, η πρώτη κατά την έναρξη του πειράματος όπου οι τσιπούρες λάμβαναν την εμπορική τροφή (control) και η δεύτερη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε δυο μήνες μετά από την αλλαγή στην διατροφή. Τα δείγματα ήπατος που λήφθηκαν αποθηκεύτηκαν σε RNA later στους -20oC μέχρι την εκχύλιση RNA. Ο πειραματικός σχεδιασμός των συνθηκών φαίνεται στον πίνακα παρακάτω:

Πίνακας 3. Συνθήκες λήψης δειγμάτων. Παρατηρούνται τρεις διαφορετικές συνθήκες διατροφής των ιχθύων (diet1, diet2, diet3)

1η συνθήκη	control τροφή την στιγμή μηδέν (Diet 1)
2η συνθήκη	control τροφή μετά από δύο μήνες χορήγησης της τροφής (Diet 1)
3η συνθήκη	τροφή εμπλουτισμένη με σόγια μετά από δύο μήνες χορήγησης της τροφής (DIET 2)
4η συνθήκη	τροφή εμπλουτισμένη με συμπυκνωμένη πρωτεΐνη σόγιας μετά από δύο μήνες χορήγησης της τροφής (DIET 3)

Πίνακας 4. Συστατικά των τριών διατροφικών συνθηκών που χορηγήθηκαν στα ψάρια, σε μορφή ποσοστών. Βλέπουμε με κόκκινο χρώμα τις μεταβαλλόμενες συνθήκες του πειράματος με παρουσία ή απουσία σόγιας και σόγιας με συμπυκνωμένη πρωτεΐνη

	Control (Diet 1) %	Soy (DIET 2) %	SPC (DIET 3) %
Fish meal 68	25	25	25

Wheat meal	20.2	10.900	15.10
Wheat Gluten	24.2	14.6	12.2
Corn gluten	14.3	13	10
Soybean meal	0	20	0
Soy Protein Concentrate (SPC)	0	0	20
Fish Oil	13.1	13.3	13.4
Premix (Vit.-Minerals)	0.5	0.5	0.5
Vit C	0.06	0.06	0.06
Monocalcium Phosphate	1.4	1.4	2.5
Lysine	0.8	0.8	0.8
Methionine	0.3	0.3	0.3
Choline Chloride	0.15	0.15	0.15
	100.0	100.0	100.0

2.3 Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA

Η απομόνωση του ολικού RNA των δειγμάτων κυττάρων ήπατος, ήταν ένα από τα βήματα τα οποία είχαν προηγηθεί από το εργαστήριο, χάριν μελετών που είχαν προηγηθεί.

2.4 Γονίδια αναφοράς-ιδιοσυστατικά

Στα πειράματα real-time Q-PCR δημιουργούνται σφάλματα στα αποτελέσματά μας ,λόγω μικρών διαφορών:

- Στην αρχική ποσότητα του RNA
- Στην ποιότητα του RNA
- Στην αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA
- Στην αποτελεσματικότητα της διαδικασίας ενίσχυσης της PCR

Λόγω των παραπάνω διαφορών που μπορούν να διαφοροποιήσουν τα αποτελέσματα, εκτελείται σε κάθε πείραμα PCR η ενίσχυση ενός μορίου RNA (που εμπεριέχει ο οργανισμός στόχος), ομοίως με την ενίσχυση των δειγμάτων, με απώτερο σκοπό η έκφρασή του να χρησιμοποιηθεί ως αναφορά για την σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων στόχων για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Αυτό το μόριο RNA προκύπτει από γονίδια που ονομάζονται **ιδιοσυστατικά** και έχουν την ιδιότητα να εκφράζονται σταθερά ,σε όλους τους ιστούς του οργανισμού, υπό όλες τις συνθήκες.

Ιδανικά για τα πειράματά μας, και αυτά που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν τα παρακάτω:

- **ef1a** (elongation factor 1a): Προάγει την εξαρτώμενη από GTP δέσμευση του αμινοάκυλο-tRNA στην θέση A των ριβοσωμάτων κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης της πρωτεΐνης
- **actb** (Actin Beta): Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη βητα-ακτίνη, βασικό συστατικό των μικροϊνιδίων ακτίνης, που διασφαλίζουν την κυτταρική δομή και κινητικότητα του κυττάρου.

2.5 Γονίδια στόχοι

Τα γονίδια στόχοι που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία ήταν τα :

- *ghri* (Growth Hormone Receptor I)
- *ghrii* (Growth Hormone Receptor II)
- *igfi* (Insulin-like Growth Factor I)
- *igfii* (Insulin-like Growth Factor II)

2.6 Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών των παραπάνω γονιδίων είχε ήδη προηγηθεί απο προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι κύριοι ισότοποι που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχεδιασμό ήταν η Ensenbl με βάση την οποία ανακτάται η κωδική αλληλουχία του γονιδίου που επιθυμούμε να υπολογίσουμε το ποσό έκφρασης. Με βάση αυτήν την αλληλουχία συμβουλευόμαστε τα αποτελέσματα της NCBI και του Primer3 . Τέλος, αξιοποιείται και το BeaconDesigner στο οποίο εισάγεται και η παράμετρος της φθορίζουσας χρωστικής, για περαιτέρω έλεγχο της αντίδρασης των εκκινητών.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής :

Πίνακας 5: Αλληλουχίες DNA των forward και reverse εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων

Γονίδια-στόχοι	Αλληλουχίες εκκινητών
<i>igfi</i>	Forward: 5'-AGGACAGCACAGCAGCCAGAC-3' Reverse: 5'-TCCCTTCTTCTTCCGAAGTC-3'
<i>igfii</i>	Forward: 5'-ACTCACGTGCAATCTCTCCAA-3' Reverse: 5'-TGGACGAGGACATCTTCTTGA-3'
<i>ghri</i>	Forward: 5'-TTGGGCATCCTCATACTCATC-3' Reverse: 5'-TGGTAGAAATCTGGC...-3'
<i>ghrii</i>	Forward: 5'-GACAAGCTCACAGACCTGGAC-3' Reverse: 5'-TTGATTTGGGATGAGAGGATG-3'

2.7 Ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης: Real-time PCR

2.7.1 Αρχή της μεθόδου

Η αξιοποίηση της τεχνολογίας PCR χρησιμοποιείται ευρέως για την ποσοτικοποίηση του DNA των γονιδίων στόχων, με εξαιρετική ευαισθησία. Η τεχνική της ποσοτικής PCR βασίζεται στην μέτρηση των προϊόντων του DNA στόχου έπειτα απο το πέρας κάθε κύκλου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) με την βοήθεια της χρήσης ειδικών

θερμοκυκλοποιητών. Έπειτα απο κάθε κύκλο η αρχική ποσότητα του δείγματος θα πρέπει να διπλασιάζεται. Η μέτρηση του ενισχυμένου προϊόντος επιτυγχάνεται με την δράση φθοριζόντων μορίων και η ποσότητα του προϊόντος είναι ανάλογη με τον φθορισμό που προκαλείται απο το φθορίζον μόριο. Η φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα ήταν η SYBR Green. Αυτός ο τύπος φθορίζουσας, συνδέεται μη ειδικά με το δίκλωνο DNA αυξάνοντας τον φθορισμό του έως και 1000 φορές ,ενώ ως ελεύθερο μόριο προκαλεί ελάχιστο φθορισμό. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του DNA τόσο μεγαλύτερος και ο φθορισμός. Στην περίπτωση της real time-PCR που επενεργήθηκε και στο πείραμα αυτό ,ο φθορισμός μετράται σε κάθε κύκλο όσο προχωράει η αντίδραση της ενίσχυσης. Αυτό μας επιτρέπει την μετρηση του DNA με βάση τον φθορισμό της εκθετικής φάσης που είναι πιο έμπιστη καθώς σε αυτό το σημείο υπάρχει ακόμα αφθονία στα συστατικά της αντίδρασης και καλύτερη λειτουργικότητα της πολυμεράσης.(Introduction to Quantitative PCR, 2007; Čikoš et al., 2007)

2.7.2 Πρωτόκολλο της Real-time PCR

Όλες οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή πραγματικού χρόνου ABI ONEPLUS.

Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης που θα εισέλθει στο μηχανήμα (σε κάθε πηγάδι των PCR plates)ήταν 10μl. Σε αυτά τα 10μl εμπεριέχονται 8μl απο το Mastermix που δημιουργήσαμε το οποίο περιέχει :

α) SYBR Green I απο 5μl .Στομείγμα της SYBR συμπεριλαμβάνονται επίσης όλα τα υπόλοιπα συστατικά για την ενίσχυση του γονιδίου στόχου όπως την RNAPolymerase, dNTPs κ.ο.κ

β) Ειδικοί εκκινητές (10pmol/μl) απο 0,35μlή0,2μl ανάλογα το γονίδιο (και τα efficiencies που θα προκύψουν που θα αναλύσουμε στην συνέχεια)

γ) H₂O μέχρι η τελική ποσότητα να συμπληρώσει τα 8μl

Έπειτα προστίθενται στο Mastermix ,ακόμα 2μl cDNA του δείγματός μας, σε αραιώση 1/10για την ενίσχυσή του.

Οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν απο τον θερμοκυκλοποιητή για την Q-PCR:

- Αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95,0°C για 10:00 min,
- 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού (κάθε κύκλος αποτελείται από 15 sec στους 95,0 °C και 1 min στους 60°C)
- Στάδιο της καμπύλης διαχωρισμού (15 sec στους 95,0°C και 1 min στους 50,0 °C), ώστε να επαληθευτεί η ενίσχυση ενός μόνο προϊόντος.

2.7.3 Πρότυπη καμπύλη και υπολογισμός απόδοσης αντίδρασης

Ο σχεδιασμός της πρότυπης καμπύλης για τον υπολογισμό της απόδοσης της αντίδρασης (efficiency) είναι ένα στάδιο που προηγείται της PCR πραγματικού χρόνου, στηρίζεται στο πρωτόκολλο της PCR που αναφέρθηκε προηγουμένως. Έπειτα απο την σύνθεση του cDNA για κάθε ένα απο τα 8 δείγματα, δημιουργήθηκε προηγουμένως απο το εργαστήριο ένα pool

δειγμάτων. Το pool του cDNA αποτελείται από πολλές μικροποσότητες του cDNA καθενός από τα 8 δείγματα. Σε αυτό το pool γίνονται διαδοχικές αραιώσεις 1:5 , 1:10 , 1:20 , 1:40 , 1:50 , 1:100 ,1:200, τις οποίες χρησιμοποιούμε ως δείγματα για ενίσχυση με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις εκκινητών ώστε να εξακριβώσουμε ποία είναι η ιδανική συγκέντρωση του κάθε ζεύγους εκκινητών για την αποτελεσματική ενίσχυση των γονιδίων στόχων μας. Η αποτελεσματικότητα των εκκινητών ή αλλιώς ο βαθμός απόδοσης της αντίδρασης , είναι το Efficiency που ορίζεται από τον τύπο :

$$\text{Efficiency} = 10^{*}(-1/\text{slope}) - 1$$

Το slope αντιστοιχεί στην κλίση της πρότυπης καμπύλης που δημιουργείται μετά την λήψη των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων PCR που ακολουθήθηκαν και από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης. Η εξίσωση είναι μορφής $y=ax+b$, όπου $a=\text{slope}$, κλίση. Η κλίση πρέπει να κυμαίνεται από -3.10 έως -3.59 , η οποία θα αντιστοιχεί σε εύρος απόδοσης 90–110%. Η τιμή R^2 για την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης πρέπει να είναι 0,985 ή μεγαλύτερη. Το R^2 δείχνει πόσο καλά ταιριάζουν τα σημεία δεδομένων σε μια ευθεία γραμμή, υποδηλώνοντας τη συμφωνία μεταξύ των αντιγράφων και το γραμμικό εύρος της ανάλυσης (Introduction to Quantitative PCR, 2007).

Για κάθε αντίδραση PCR προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι του pcr-plate:

- 2μl από κάθε αραιώση του cDNA pool διαλύματος
- 8μl από κάθε Mastermix που δημιουργήθηκε ξεχωριστά για κάθε ζεύγος εκκινητών (με βάση το πρωτόκολλο της PCR όπως αναφέρθηκε προηγουμένως)

Έπειτα ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα με το πρωτόκολλο της PCR .

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι αποδόσεις των αντιδράσεων για κάθε ζεύγος εκκινητών και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν τελικά και αντιστοιχούσαν στα efficiencies των αντιδράσεων.

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα και τα efficiencies που βρέθηκαν για τα αντίστοιχα γονίδια-στόχους τους.

Γονίδια-στόχοι	Efficiency (%)	Συγκεντρώσεις εκκινητών(nM)
<i>igfi</i>	100,19	150nM
<i>igfii</i>	103,38	fr: 200nM rv: 300nM
<i>ghri</i>	102,25	350nM
<i>ghrii</i>	102,86	200nM

2.8 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων της Real-time PCR

2.8.1 Κανονικοποίηση δεδομένων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, στη συνέχεια αναλύθηκαν και επεξεργάστηκαν στατιστικά μέσω του υπολογιστικού φύλλου Microsoft excel 365. Πιο συγκεκριμένα, καταγράφηκαν οι μέσες τιμές των Ct (mean Ct) που προέκυψαν σε κάθε συνθήκη για το κάθε γονίδιο, τα Efficiencies που βρέθηκαν για κάθε αντίδραση και το Threshold που ορίστηκε κάθε φορά. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα γονίδια αναφοράς, δεδομένα που θα αξιοποιηθούν για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τα παραπάνω δεδομένα αξιοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της τελικής ποσότητας cDNA με βάση την συγκριτική μέθοδο Comparative Ct Method. Η εξίσωση που βασίζεται σε αυτήν την μέθοδο είναι η παρακάτω :

$$R0 = \text{Threshold}/(1+\text{efficiency})^{Ct}$$

Όπου :

- ➔ **R0**: το επίπεδο φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου cDNA
- ➔ **Efficiency**: η απόδοση της κάθε αντίδρασης δια 100
- ➔ **Ct**: ο αριθμός κύκλων ενίσχυσης με τεχνική PCR στην εκθετική φάση της αντίδρασης

Αρχικά, υπολογίσθηκαν όλα τα R0 τόσο για τα γονίδια ενδιαφέροντος όσο και για τα ιδιοσυστατα γονίδια. Ωστόσο η έκφραση που δεχόμαστε σαν τιμή επιδέχεται και άλλη τροποποίηση ώστε να ελαχιστοποιήσουμε τις αποκλίσεις μεταξύ των τιμών απο δείγμα σε δείγμα, που προκύπτουν λόγω πειραματικού σφάλματος. Για να είναι τα τελικά μας αποτελέσματα συγκρίσιμα υπολογίζουμε στην συνέχεια τον γεωμετρικό μέσο της έκφρασης των ιδιοσυστατικών γονιδίων και τον χρησιμοποιούμε στην συνέχεια ως παράγοντα κανονικοποίησης (Normalization Factor, NF) (Vandesompele et al., 2002). Ο γεωμετρικός μέσος για δύο τιμές (τα δύο γονίδια αναφοράς) ορίζεται απο τον τύπο:

$$\text{Geometric mean} = (R0_{\text{REF.GENE1}} \times R0_{\text{REF.GENE2}})^{\frac{1}{2}}$$

Τέλος η κανονικοποιημένη έκφραση για κάθε γονίδιο υπολογίζεται απο τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Κανονικοποιημένη έκφραση} = R0_{\text{γον.στόχου}} / \text{Γεωμετρικός μέσος}$$

2.8.2 Στατιστική ανάλυση με την χρήση γλώσσας προγραμματισμού R

Στην στατιστική ανάλυση με την χρήση της γλώσσας R αξιοποιήθηκαν τα κανονικοποιημένα αποτελέσματα έκφρασης των γονιδίων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα βήματα της στατιστικής ανάλυσης που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Χρήση Shapiro test για τον έλεγχο της κατανομής των δεδομένων. Τα δεδομένα μας είχαν $p\text{-value} < 0.05$, γεγονός που δείχνει ότι δεν ακολουθούν κανονική κατανομή και θα πρέπει να ακολουθηθούν μη παραμετρικά tests για το υπόλοιπο της ανάλυσης.
- Χρήση μη παραμετρικών test Kruskal-Wallis και Dunn test, για τον προσδιορισμό των διαφορών και των στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών διατροφής, στην έκφραση των γονιδίων.
- Υπολογισμός περιγραφικών στατιστικών (μέση τιμή, διάμεσος, τυπική απόκλιση, κλπ.) και απεικόνισή τους σε θηκογράμματα- box-plots.
- Ανάλυση συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων ανά διατροφική συνθήκη με τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης Spearman

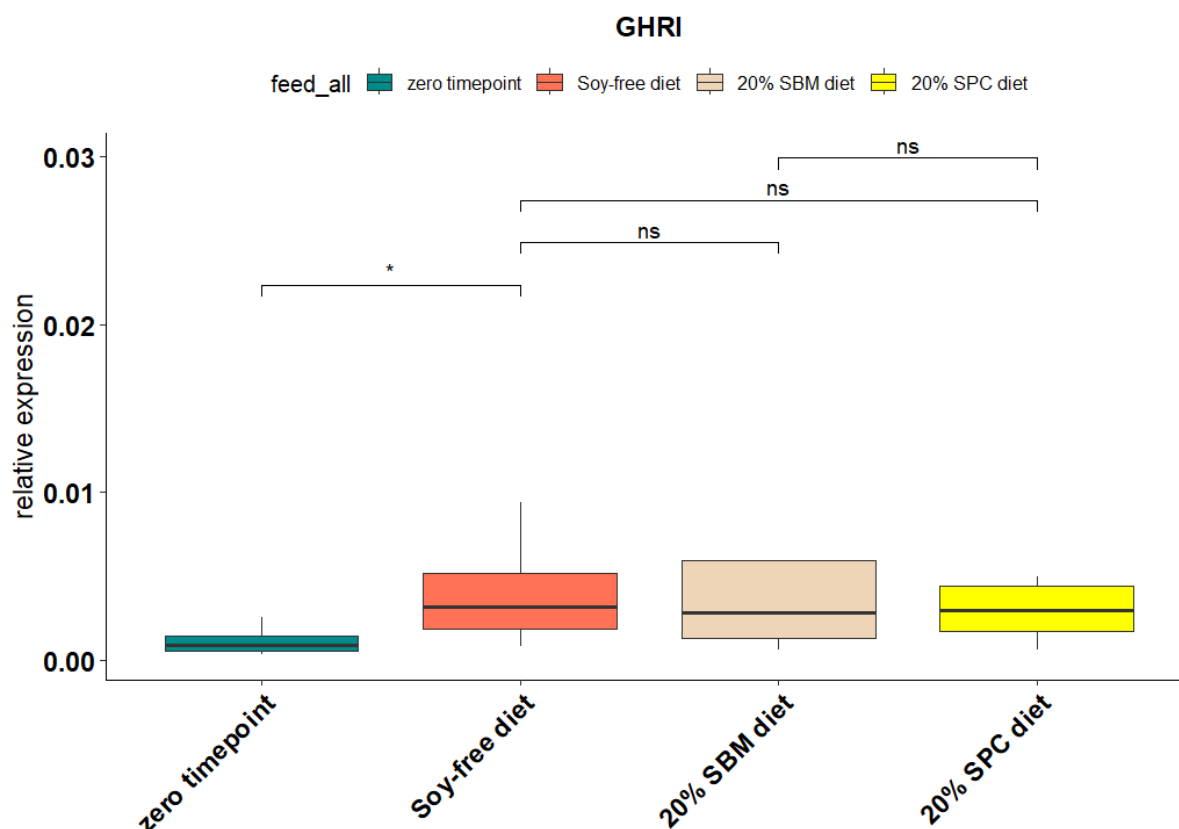
3. Αποτελέσματα

3.1. Έκφραση γονιδίου ghri

Η έκφραση του γονιδίου *ghri* αυξήθηκε σημαντικά από την αρχή μέχρι το τέλος του διατροφικού πειράματος σε όλες τις τροφές και η αύξηση ήταν στατιστικώς σημαντική σε όλες τις διατροφικές συνθήκες (Πίνακας 7, Εικόνα 25, παράρτημα Πίνακας 3). Στο τέλος του πειράματος, δεν διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των τριών τροφών.

Πίνακας 7: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ghri*

	Zero_timepoint – Soy free	Soy-free diet	20% SBM diet	20% SPC diet
Μέγιστη τιμή	0.00256	0.01374	0.02129	0.00496
Ελάχιστη τιμή	0.00030	0.00080	0.00059	0.00060
Διάμεσος	0.00092	0.00314	0.00282	0.00298
Μέση τιμή	0.00116	0.00465	0.00581	0.00289
Τυπική απόκλιση	0.00087	0.00454	0.00739	0.001678



Εικόνα 25. Θηκόγραμμα σχετικής έκφρασης του γονιδίου *ghri* στις διαφορετικές διατροφικές συνθήκες

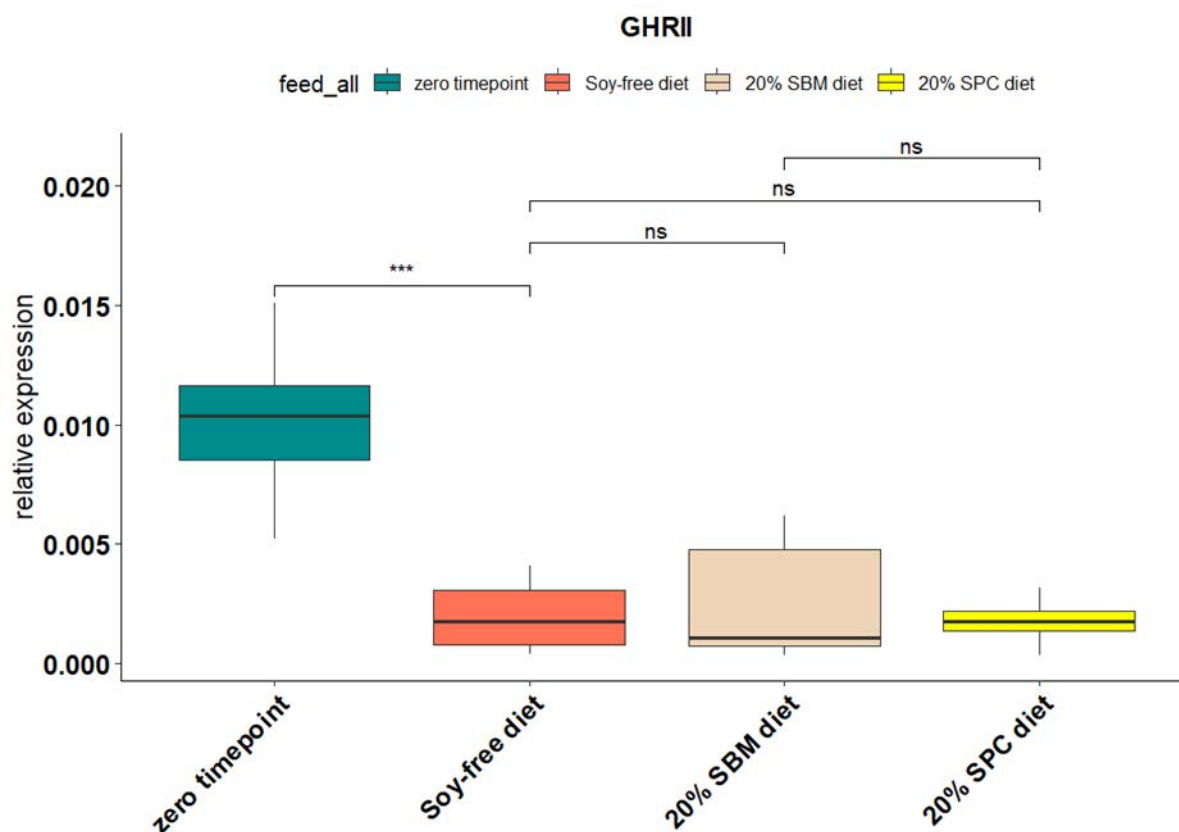
3.2. Έκφραση γονιδίου *ghrii*

Η έκφραση του γονιδίου *ghrii* μειώθηκε σημαντικά από την αρχή μέχρι το τέλος του διατροφικού πειράματος σε όλες τις τροφές και η αύξηση ήταν στατιστικώς σημαντική σε όλες τις διατροφικές συνθήκες (Πίνακας 8, Εικόνα 26, Παράρτημα Πίνακας 4). Στο τέλος του πειράματος, δεν διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των τριών τροφών.

Πίνακας 8: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ghrii*

	Zero_timepoint- Soy free	Soy-free diet	20% SBM diet	20% SPC diet
Μέγιστη τιμή	0.01510	0.00409	0.00616	0.00508
Ελάχιστη τιμή	0.00522	0.00041	0.00032	0.00036
Διάμεσος	0.01037	0.00176	0.00108	0.00175
Μέση τιμή	0.01025	0.00202	0.00247	0.00208

Τυπική απόκλιση	0.00308	0.00149	0.00239	0.00144
-----------------	---------	---------	---------	---------



Εικόνα 26. Θηκόγραμμα σχετικής έκφρασης του γονιδίου *ghrII* στις διαφορετικές διατροφικές συνθήκες

3.3 Σχετική έκφραση *ghr-i/ghr-ii*

Η αναλογία έκφρασης *ghr-i/ghr-ii* αυξήθηκε σε όλες τις τροφές ανεξαιρέτως μέχρι το τέλος του πειράματος, καταδεικνύοντας μια αλλαγή στη σχετική έκφραση των δύο παραλόγων κατά την ανάπτυξη και την αύξηση της έκφρασης του *ghr-i* έναντι του *ghr-ii* με την ηλικία (Πίνακας 9). Η μεγαλύτερη αναλογία παρατηρήθηκε στα ψάρια που σιτίστηκαν με τροφή που περιείχε 20% SBM, ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι τα ψάρια που σιτίστηκαν με την control τροφή και με την τροφή που περιείχε 20% SPC εμφάνισαν όμοια αναλογία έκφρασης των παραλόγων υποδοχέων της GH.

Πίνακας 9: Σχετική έκφραση των *ghr-i* και *ghr-ii* γονιδίων ανά διατροφική συνθήκη

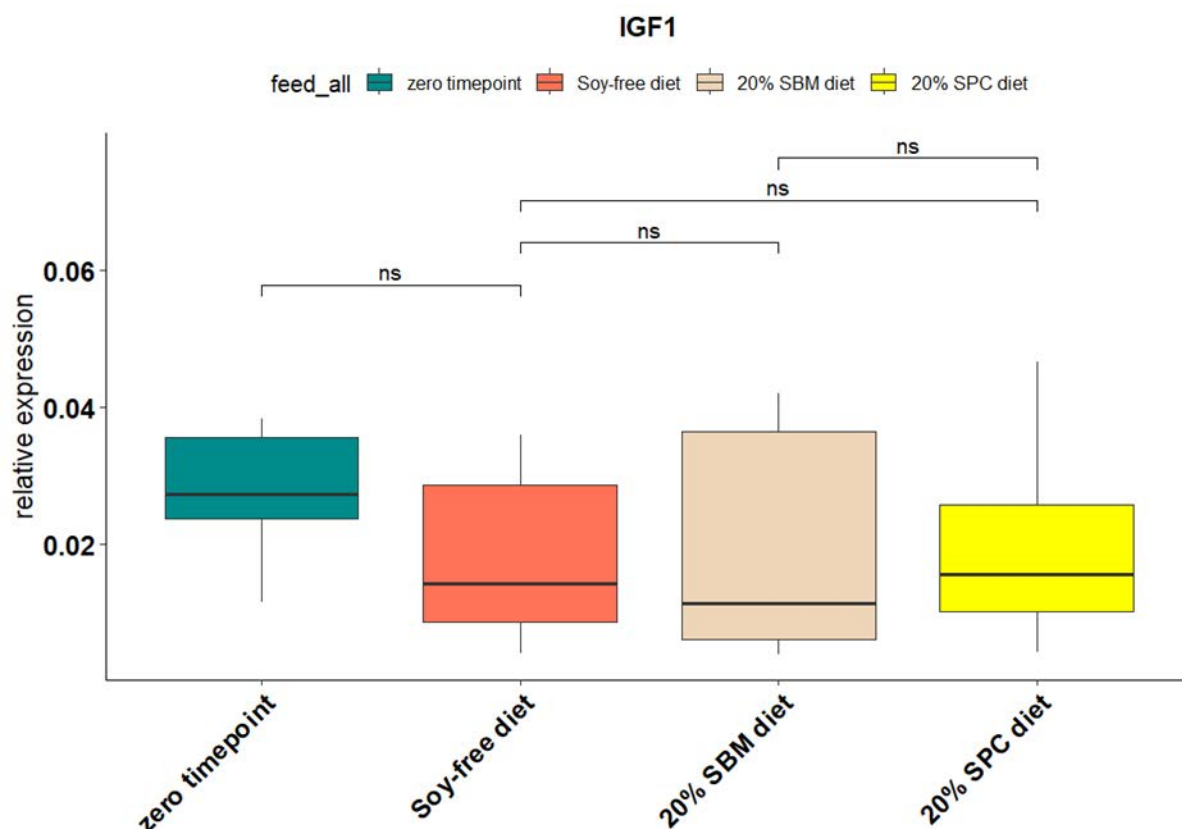
	Zero_timepoint- Soy free	Soy-free diet	20% SBM diet	20% SPC diet
<i>ghr-i/ghr-ii</i>	0,08881	1,7816	2,6140	1,7006

3.4. Έκφραση γονιδίου *igfi*

Η έκφραση του γονιδίου *igfi* δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά σε καμία συνθήκη από την αρχή μέχρι το τέλος του διατροφικού πειράματος (Πίνακας 10, Εικόνα 27, Παράρτημα Πίνακας 5). Παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση της έκφρασης του γονιδίου στο τέλος του πειράματος, σε όλες τις διατροφικές συνθήκες, χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα. Στο τέλος του πειράματος, δεν διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των τριών τροφών.

Πίνακας 10: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *igfi*

	Zero_timepoint- Soy free	Soy-free diet	20% SBM diet	20% SPC diet
Μέγιστη τιμή	0.05522	0.03595	0.04199	0.04654
Ελάχιστη τιμή	0.01165	0.00415	0.00391	0.00435
Διάμεσος	0.02736	0.01427	0.01135	0.01571
Μέση τιμή	0.02968	0.01794	0.01945	0.01919
Τυπική απόκλιση	0.01350	0.01222	0.01644	0.01364



Εικόνα 27. Θηκόγραμμα σχετικής έκφρασης του γονιδίου *igf1* στις διαφορετικές διατροφικές συνθήκες

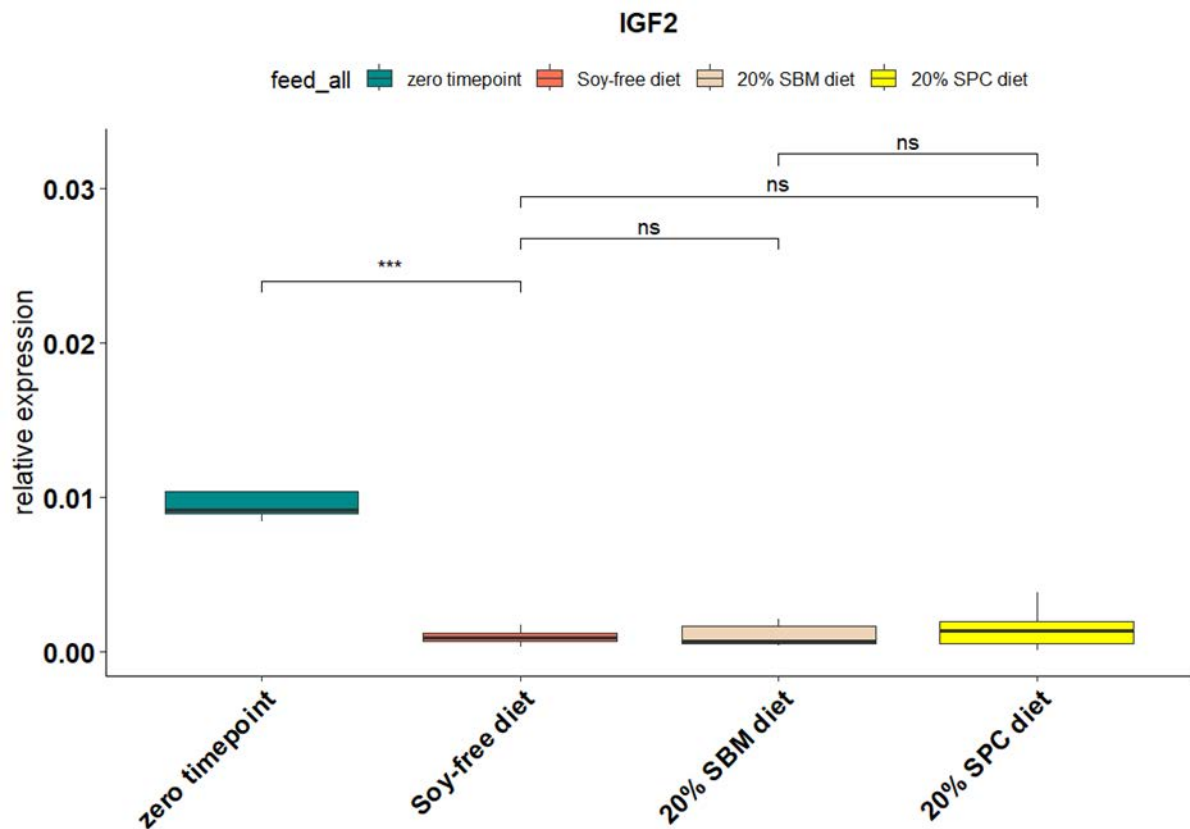
3.5. Έκφραση γονιδίου *igfii*

Η έκφραση του γονιδίου *igfii* μειώθηκε σημαντικά από την αρχή μέχρι το τέλος του διατροφικού πειράματος σε όλες τις τροφές και η μείωση ήταν στατιστικώς σημαντική σε όλες τις διατροφικές συνθήκες (Πίνακας 11, Εικόνα 28, Παράρτημα Πίνακας 5). Στο τέλος του πειράματος, δεν διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των τριών τροφών.

Πίνακας 11: περιγραφικά στατιστικά για τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *igfii*

	Zero_timepoint-Soy free	Soy-free diet	20% SBM diet	20% SPC diet
Μέγιστη τιμή	0.02284	0.00167	0.00210	3.784e-03
Ελάχιστη τιμή	0.00839	0.00028	0.00033	1.251e-05
Διάμεσος	0.00914	0.00087	0.00062	0.00129
Μέση τιμή	0.01128	0.00091	0.00100	1.445e-03

Τυπική απόκλιση	0.00621	0.00045	0.00072	0.00129
-----------------	---------	---------	---------	---------



Εικόνα 28. Θηκόγραμμα σχετικής έκφρασης του γονιδίου *igfii* στις διαφορετικές διατροφικές συνθήκες

3.6 Σχετική έκφραση *igfii/igfi*

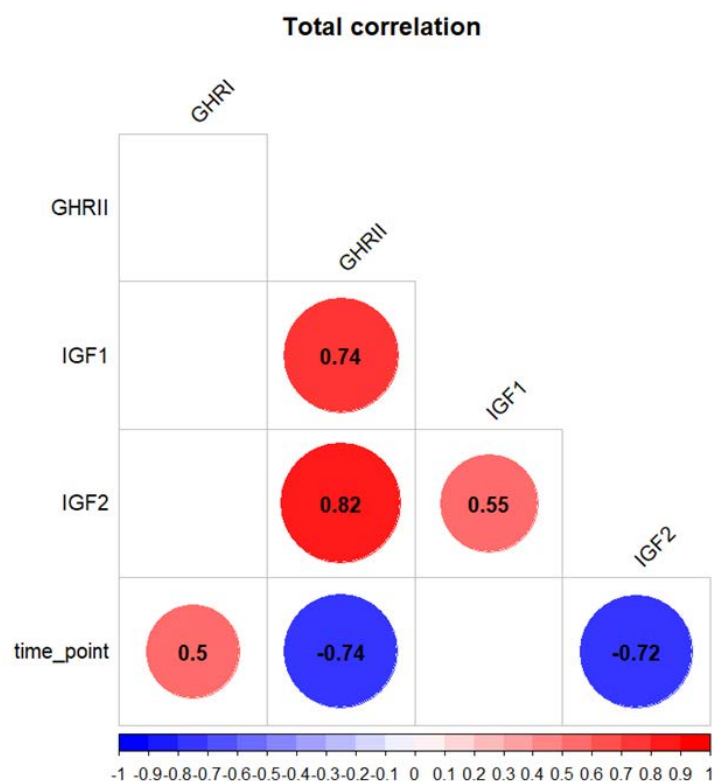
Η αναλογία έκφρασης *igfii/igfi* μειώθηκε σε όλες τις τροφές ανεξαιρέτως μέχρι το τέλος του πειράματος, καταδεικνύοντας μια αλλαγή στη σχετική έκφραση των δύο παραλόγων κατά την ανάπτυξη και την μείωση της έκφρασης του *igfii* (Πίνακας 12). Η μεγαλύτερη αναλογία παρατηρήθηκε στα ψάρια που σιτίστηκαν με τροφή FM, χωρίς σογιάλευρο την στιγμή μηδέν.

Πίνακας 12: Σχετική έκφρασης των *igfi* και *igfii* γονιδίων ανά διατροφική συνθήκη

	Zero_timepoint- Soy free	Soy-free diet	20% SBM diet	20% SPC diet
<i>igfii/igfi</i>	0,3343	0,061	0,05469	0,0824

3.7 Συσχέτιση έκφρασης γονιδίων

Το διάγραμμα συσχέτισης Spearman απεικονίζει τον βαθμό συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ τους, και υπο όλες τις συνθήκες. Σε αυτό το πείραμα παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων *ghrii* και *igfi*: 0,74, *ghrii* και *igfii*: 0,82 και *igfi* και *igfii*: 0,55. Παρατηρήθηκε επίσης θετική συσχέτιση του *GHRI* και του πειραματικού χρόνου, δηλαδή ότι αυξάνεται η έκφρασή του με το πέρασμα του χρόνου. Ωστόσο το *ghri* φαίνεται να μην έχει καμία άλλη συσχέτιση με κανένα άλλο γονίδιο. Φαίνεται, επιπλέον να υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων *ghrii* σε σχέση με το πέρασμα του χρόνου : -0,74 και του *igfii* με τον χρόνο : -0,72. Τέλος, είναι αξιοσημείωτη και η μηδενική συσχέτιση του *igfi* με το πέρασμα του χρόνου (Εικόνα 31).



Εικόνα 29. Διάγραμμα συσχέτισης της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ τους και σε σχέση με το time point.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι μόνες στατιστικά σημαντικές διαφορές που διαπιστώθηκαν ήταν μεταξύ της έναρξης και της λήξης του πειράματος και όχι μεταξύ των τροφών. Το μόνο γονίδιο που δεν ακολούθησε αυτό το μοτίβο ήταν το *igfi*. Όσον αφορά την έκφραση του *ghri* (Εικόνα 25), αυτό ήταν το μόνο γονίδιο που εμφάνισε upregulation, δηλαδή αύξηση της έκφρασης, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα που εμφάνισαν downregulation. Η αιτιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων που αφορούν τις μεταβολές της έκφρασης των γονιδίων στη διάρκεια του πειραματικού χρόνου, σχετίζονται με την βιολογία της φυσιολογικής ανάπτυξης των ιχθύων καθώς τα δείγματα τρέφονταν με την συμβατική ιχθυοτροφή. Η αύξηση της έκφρασης του *ghri* είναι αναμενόμενη καθώς η σηματοδότηση από την GH στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, πριν την εκκόλαψη, είναι πολύ χαμηλή και δεν συμμετέχει σημαντικά στην ανάπτυξη (Butler & Roith, 2001). Στο στάδιο μετά την εκκόλαψη ξεκινά να ενεργοποιείται με αυξανόμενο ρυθμό το μονοπάτι της έκφρασης της GH και κατ' επέκταση των υποδοχέων της. Ο *GHRH* έχει μεγαλύτερη συμμετοχή στην έκφραση του ήπατος, με την έκφραση του *GHRH* (Εικόνα 26) να είναι σημαντική αλλά μικρότερη, όπως αναμένεται. Ο λόγος των δύο υποδοχέων *ghri/ghrii* στην έναρξη του πειράματος (0,08881) δεν έχει φθάσει στον αναμενόμενο (1,8-2) (Perez-Sanchez et al, 2018), καθώς δεν έχει ενεργοποιηθεί σε αυτό το στάδιο πλήρως το αντίστοιχο μονοπάτι, ενώ στο επόμενο χρονικό σημείο φθάνει το 1,7816. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του *igfi* (Εικόνα 27) παραμένει σχεδόν σταθερή καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος κάτι που συμβαδίζει με το δεδομένο ότι μπορεί να εκφραστεί ανεξάρτητα από την σηματοδότηση της GH. Η έκφραση του *igfii* (Εικόνα 28) πέφτει σημαντικά από την έναρξη έως τη λήξη του πειράματος, κάτι που συμβαδίζει με την βιβλιογραφία καθώς δρά πιο κυρίαρχα στην αρχή του νεαρού ιχθυοδίου. Μεταξύ των δύο εκφράσεων, και εδώ ήταν αναμενόμενη η υψηλότερη έκφραση του *igfi* σε σχέση με το *igfii* στα ηπατικά κύτταρα (Benedito-Palos et al., 2007). Ο λόγος των δύο ορμονών *igfii/igfi* είναι την στιγμή μηδέν 0,3343 που συμβαδίζει με το αναμενόμενο λόγο κοντά στο 0,4, ενώ την επόμενη χρονική στιγμή μειώνεται στο 0,061. Αυτή η μείωση οφείλεται στην μείωση της έκφρασης του *igfii* αλλά δεν μπορεί να υποστηρίξει την διατήρηση του λόγου καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης των νεαρών ιχθυοδίων με βάση την βιβλιογραφία (Perez-Sanchez et al, 2018). Μια πιθανή αιτιολόγηση για αυτήν την κατάσταση, είναι ότι αυτός ο λόγος αναμένεται να μείνει σταθερός όσο αυτά τα γονίδια παίζουν ενεργό ρόλο στην αύξηση κάτι που δεν φαίνεται να ισχύει σε μεγάλο βαθμό για το *igfii* στο ήπαρ. Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο πως αυτή η μεταβολή δεν σχετίζεται με κάποια μορφή κακής διατροφής. Βέβαια, είναι απαραίτητη περαιτέρω έρευνα για την έκφραση και δράση της *igfii* τόσο στην τσιπούρα όσο και στους τελεόστεους ιχθείς γενικότερα.

Στην συνέχεια λαμβάνοντας υπ' όψιν τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων των μεταβαλλόμενων συνθηκών με τις εναλλακτικές ιχθυοτροφές και τα αποτελέσματα του Dunnett's test (παράρτημα), υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές της έκφρασης μεταξύ της έναρξης του πειράματος και των 20% SBM, 20% SPC, όμως αυτές οι διαφορές δεν είναι συγκρίσιμες καθώς έχει χρησιμοποιηθεί διαφορετικό διατροφικό προφίλ με το πέρασμα του χρόνου. Αυτό που πρέπει να συγκριθεί και αποτελεί πρωταρχικό στόχο αυτής της διπλωματικής είναι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων υπό τις συνθήκες φυτικής διατροφής σόγιας με αυτήν της συμβατικής ιχθυοτροφής μετά από δύο μήνες κατανάλωσης της τροφής.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι δεν εμφανίζεται καμία σημαντική διαφορά στην σχετική έκφραση όλων των γονιδίων, *igfi*, *igfii*, *ghri*, *ghrii* μεταξύ όλων των διαφορετικών συνθηκών Soyfree diet, 20% SBM και 20% SPC. Αυτά τα αποτελέσματα, αποδεικνύουν πως η υποκατάσταση της συμβατικής ιχθυοτροφής με 20% διατροφική σόγια (SBM ή SPC) δεν έχουν καμία μεταβολή στην φυσιολογική έκφραση των βασικών γονιδίων του σωματοτρόπου άξονα και κατ' επέκταση στη φυσιολογική λειτουργία του. Μπορεί επίσης να σχολιασθεί το γεγονός ότι η 20% SBM διατροφή σε σύγκριση με την 20% SPC έχουν επίσης τα ίδια αποτελέσματα, παρ' όλη την περισσότερη επεξεργασία που επιδέχεται η δεύτερη για μεγαλύτερα ποσοστά σε πρωτεΐνη και μείωση των αντι-θρεπτικών παραγόντων. Επομένως, λόγω της αυξημένου κόστους της SPC διατροφής αυτή θα μπορούσε να αποφευχθεί και να αντικατασταθεί με την πιο φθηνή εκδοχή της, την SBM διατροφή.

Τέλος, στο διάγραμμα συσχέτισης Spearman (Εικόνα 29) αναδεικνύονται οι θετικές ή αρνητικές σχέσεις των εκφράσεων μεταξύ των γονιδίων. Αρχικά στην κάτω γραμμή του διαγράμματος φαίνεται η αυξημένη με κόκκινο, ή μειωμένη με μπλέ, έκφραση των γονιδίων σε βάθος χρόνου (time-point). Όμοια με την παρατήρηση των θηκογραμμάτων βλέπουμε την αύξηση της έκφρασης του *GHRH*, την μείωση των *GHRH* και *IGFII* και την σταθερότητα της έκφρασης της *IGFI* σε βάθος χρόνου, τα οποία έχουν σχολιαστεί προηγουμένως. Να υπογραμμισθεί σε αυτό το σημείο ότι η πτώση της έκφρασης των *igfii* και *ghrii* εμφανίζουν σχεδόν ταυτόσημη συσχέτιση με τον χρόνο, με -0,72 και -0,74 αντίστοιχα, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση της διαδοχικής και αλληλεξαρτώμενης δράσης τους.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι συσχετίσεις της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ τους και όχι τόσο όσον αφορά το χρονικό πλαίσιο. Αρχικά παρατηρείται ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση της έκφρασης του *GHRH* με κανένα από τα *igf* γονίδια, γεγονός που μπορεί να ενισχύσει την υπόθεση της λειτουργίας του υποδοχέα κυρίως σε μεταβολικά μονοπάτια (Pierce et al., 2012). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η *igfi* εκφράζεται ήδη ανεξάρτητα πριν την ενεργοποίηση του *ghri* σε σχεδόν σταθερά επίπεδα (Duguay et al., 1996) και γι' αυτόν τον λόγο δεν εμφανίζονται μεταβολές στο διάγραμμα. Σ' αυτό το σημείο είναι πιθανό να υπάρχει μια συσχέτιση της έκφρασης της *igfi* και του *ghri*, η οποία δεν μπορεί να εντοπισθεί στο διάγραμμα λόγω της διατήρησης της έκφρασης του *igfi* σε σταθερά επίπεδα. Η μη συσχέτιση του *ghri* με την *igfii* μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι η έκφραση του *igfii* σε αυτό το στάδιο είναι πολύ χαμηλή και σε αντίθεση με τον *GHRH* που είναι ο κύριος υποδοχέας δράσης στο ήπαρ, η ορμόνη *IGFII* εμφανίζεται πιο δραστικά στους μύες (Perez-Sanchez et al, 2018). Σ' αυτό το σημείο φαίνεται ξανά η πιθανή ύπαρξη του *GHRH* ως <<μεταβολικού>> υποδοχέα, αφού δεν υπάρχει συσχέτιση με κανέναν από τα δύο πεπτίδια *IGF*. Στην επόμενη στήλη βλέπουμε την συσχέτιση της έκφρασης του *ghrii* με τα υπόλοιπα γονίδια. Παρατηρείται θετική συσχέτιση με την έκφραση του *igfi* και του *igfii* που ενισχύουν όχι μόνο την ενεργοποίηση του *igfii*, όπως αναφέραμε νωρίτερα αλλά και αυτήν της *igfi*. Η συσχέτιση με την *IGFII* είναι αναμενόμενη γιατί και οι δύο στο στάδιο του νεαρού ιχθυδίου εκφράζονται χαμηλότερα στο ήπαρ σε σχέση με τις *ghri* και *igfi* (Perez-Sanchez et al, 2018), ωστόσο η αυξημένη συσχέτιση με την *igfii* μπορεί να εμφανίζεται από την σύγχρονη έκφραση τους στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης της στιγμής μηδέν. Η θετική συσχέτιση του *GHRH* και με τα δύο πεπτίδια, μπορεί να υποστηρίξει την υπόθεση της <<αυξητικής εξειδίκευσης>> του *GHRH*. Έπειτα, η θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο *igfs* η οποία δεν εμφανίζεται σε σημαντικά υψηλό επίπεδο μπορεί να σχετίζεται με την εμφάνιση μιας μικρής πτώσης της έκφρασης της

igfi με όμοιο τρόπο με αυτόν της *igfii* σε διαφορετικά βέβαια μεταξύ τους επίπεδα. Αυτό το δεδομένο μπορεί να υποστηρίξει την συγχρονισμένη έκφρασή τους μεν, αλλά δείχνει και το γεγονός ότι υπάρχει και διαφορεική έκφραση μεταξύ τους, για παράδειγμα από άλλους υποδοχείς (*ghri* ή και ανεξάρτητη από τη GH έκφραση).

Τέλος, είναι σημαντικό να προστεθεί, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, πιθανή διαφορεική και κατηγοριοποιημένη λειτουργία των GHRs, δηλαδή ένας τύπος να ενεργοποιείται από μεταβολικά σήματα και ένας τύπος να σχετίζεται με την αυξητική δράση των GHR(Pierce et al., 2012). Αυτό ακόμη, δεν έχει επιβεβαιωθεί στην τσιπούρα και επιδέχεται περαιτέρω έρευνα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Από τα αποτελέσματα αυτής της διπλωματικής εργασίας μπορούμε να κατανοήσουμε ότι η υποκατάσταση των συμβατικών ιχθυάλευρων με 20% σογιάλευρο (SBM) και με 20% συμπυκνωμένη πρωτεΐνη σόγιας (SPC) μπορούν να αντικαταστήσουν εξαιρετικά ικανοποιητικά τις συμβατικές ιχθυοτροφές. Αυτό φάνηκε από την διατήρηση της έκφρασης των γονιδίων δεικτών *ghri*, *ghrii*, *igfi* και *igfii* του σωματοτρόπου άξονα της τσιπούρας, σε σταθερά επίπεδα συγκρινόμενα με την διατροφή ιχθυάλευρου (Fish Meal). Επιπλέον, καταδείχθηκε η ομοιότητα των επιδράσεων των δύο ιχθυοτροφών SBM και SPC στην έκφραση των σωματοτρόπων γονιδίων, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στην αποφυγή της κατανάλωσης της ακριβότερης SPC διατροφής. Τέλος, σε αυτή τη πτυχιακή αναδείχθηκε η περιορισμένη γνώση που υπάρχει για τα μοτίβα έκφρασης και την εξειδικευμένη λειτουργία των γονιδίων *ghrii* και *igfii*, αυξάνοντας την ανάγκη για την διασαφήνισή τους.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aragão, C., Gonçalves, A. T., Costas, B., Azeredo, R., Xavier, M. J., & Engrola, S. (2022). Alternative Proteins for Fish Diets: Implications beyond Growth. *Animals*, 12(9), 1211. <https://doi.org/10.3390/ani12091211>
2. Aral, F., Sahnoz, E., & Dogu, Z. (2011). Embryonic and Larval Development of Freshwater Fish. In F. Aral (Ed.), *Recent Advances in Fish Farms*. InTech. <https://doi.org/10.5772/17687>
3. Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Caldach-Giner, J.-A., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2007). Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture*, 267(1–4), 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.011>
4. Bergan-Roller, H. E., & Sheridan, M. A. (2018). The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 258, 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.028>

5. Bonaldo, A., Roem, A. J., Fagioli, P., Pecchini, A., Cipollini, I., & Gatta, P. P. (2008). Influence of dietary levels of soybean meal on the performance and gut histology of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Soybean meal in bass and bream. *Aquaculture Research*, 39(9), 970–978. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01958.x>
6. Bone Quentin, & Moore Richard. (2007). *Biology of Fishes*.
7. Brooks, A. J., Wooh, J. W., Tunny, K. A., & Waters, M. J. (2008). Growth hormone receptor; mechanism of action. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(10), 1984–1989. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.008>
8. Butler, A. A., & Roith, D. L. (2001). Control of Growth by the Somatotropic Axis: Growth Hormone and the Insulin-Like Growth Factors Have Related and Independent Roles. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 141–164. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.141>
9. Čikoš, Š., Bukovská, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: Comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, 8(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-113>
10. Douros, J. D., Baltzegar, D. A., Mankiewicz, J., Taylor, J., Yamaguchi, Y., Lerner, D. T., Seale, A. P., Grau, E. G., Breves, J. P., & Borski, R. J. (2017). Control of leptin by metabolic state and its regulatory interactions with pituitary growth hormone and hepatic growth hormone receptors and insulin like growth factors in the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology*, 240, 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.07.017>
11. Duguay, S. J., Lai-Zhang, J., Steiner, D. F., Funkenstein, B., & Chan, S. J. (1996). Developmental and tissue-regulated expression of IGF-I and IGF-II mRNAs in *Sparus aurata*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 16(2), 123–132. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0160123>
12. Ellens, E. R., Kittilson, J. D., Hall, J. A., Sower, S. A., & Sheridan, M. A. (2013). Evolutionary origin and divergence of the growth hormone receptor family: Insight from studies on sea lamprey. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 222–236. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.008>
13. Florini, J. R., Ewton, D. Z., & Coolican, S. A. (1996). Growth Hormone and the Insulin-Like Growth Factor System in Myogenesis*. *Endocrine Reviews*, 17(5), 481–517. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-5-481>
14. Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y., & Postlethwait, J. (1999). Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations. *Genetics*, 151(4), 1531–1545. <https://doi.org/10.1093/genetics/151.4.1531>
15. Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>
16. Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Caldach-Giner, J. A., Médale, F., Martin, S. A. M., Houlihan, D. F., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2004). Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement

- by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 232(1–4), 493–510. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00532-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00532-5)
17. Hakuno, F., & Takahashi, S.-I. (2018). 40 YEARS OF IGF1: IGF1 receptor signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology*, 61(1), T69–T86. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0311>
 18. Hardy, R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41(5), 770–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>
 19. Jiao, B., Huang, X., Chan, C. B., Zhang, L., Wang, D., & Cheng, C. H. K. (2006). The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(1), 23–40. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01945>
 20. Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., ... Kohara, Y. (2007). The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447(7145), 714–719. <https://doi.org/10.1038/nature05846>
 21. Kendall A.W., Ahlstroman E.H., & Moser D.H.G. (1984). Early Life History Stages of Fishes and Their Characters. *In: Cohen: Ontogeny, Systematics Phylogeny*.
 22. Kissil, G. W., Lupatsch, I., Higgs, D. A., & Hardy, R. W. (2000). Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L.: SPC and RPC in gilthead seabream diets G Wm Kissil et al. *Aquaculture Research*, 31(7), 595–601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00477.x>
 23. LeRoith, D., Holly, J. M. P., & Forbes, B. E. (2021). Insulin-like growth factors: Ligands, binding proteins, and receptors. *Molecular Metabolism*, 52, 101245. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101245>
 24. Martínez-Llorens, S., Moñino, A. V., Tomás Vidal, A., Salvador, V. J. M., Pla Torres, M., & Jover Cerdá, M. (2007). Soybean meal as a protein source in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) diets: Effects on growth and nutrient utilization. *Aquaculture Research*, 38(1), 82–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01637.x>
 25. Mhalhel, K., Levanti, M., Abbate, F., Laurà, R., Guerrera, M. C., Aragona, M., Porcino, C., Briglia, M., Germanà, A., & Montalbano, G. (2023). Review on Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Aquaculture: Life Cycle, Growth, Aquaculture Practices and Challenges. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(10), 2008. <https://doi.org/10.3390/jmse11102008>
 26. Mommsen, T. P. (2001). Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2–3), 207–219. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00312-8)
 27. Moriyama, S., Ayson, F. G., & Kawauchi, H. (2000). Growth Regulation by Insulin-like Growth Factor-I in Fish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64(8), 1553–1562. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1553>

28. Ndandala, C. B., Dai, M., Mustapha, U. F., Li, X., Liu, J., Huang, H., Li, G., & Chen, H. (2022). Current research and future perspectives of GH and IGFs family genes in somatic growth and reproduction of teleost fish. *Aquaculture Reports*, 26, 101289. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101289>
29. Pereira, T. G., & Oliva-Teles, A. (2002). Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Pea seed meal in diets for sea bream. *Aquaculture Research*, 33(14), 1183–1189. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00782.x>
30. Pérez-Sánchez, J., & Le Bail, P.-Y. (1999). Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture*, 177(1–4), 117–128. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00073-3)
31. Pérez-Sánchez, J., Simó-Mirabet, P., Naya-Català, F., Martos-Sitcha, J. A., Perera, E., Bermejo-Nogales, A., Benedito-Palos, L., & Caldúch-Giner, J. A. (2018). Somatotrophic Axis Regulation Unravels the Differential Effects of Nutritional and Environmental Factors in Growth Performance of Marine Farmed Fishes. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 687. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00687>
32. Pierce, A. L., Breves, J. P., Moriyama, S., Uchida, K., & Grau, E. G. (2012). Regulation of growth hormone (GH) receptor (GHR1 and GHR2) mRNA level by GH and metabolic hormones in primary cultured tilapia hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 179(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.07.010>
33. Reindl, K. M., & Sheridan, M. A. (2012). Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163(3–4), 231–245. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.08.003>
34. Saera-Vila, A., Caldúch-Giner, J.-A., & Pérez-Sánchez, J. (2005). Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: Gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology*, 142(1–2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.005>
35. Tiago, D. M., Laizé, V., & Cancela, M. L. (2008). Alternatively spliced transcripts of *Sparus aurata* insulin-like growth factor 1 are differentially expressed in adult tissues and during early development. *General and Comparative Endocrinology*, 157(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.04.006>
36. Venkatesh, B., Kirkness, E. F., Loh, Y.-H., Halpern, A. L., Lee, A. P., Johnson, J., Dandona, N., Viswanathan, L. D., Tay, A., Venter, J. C., Strausberg, R. L., & Brenner, S. (2007). Survey Sequencing and Comparative Analysis of the Elephant Shark (*Callorhynchus milii*) Genome. *PLoS Biology*, 5(4), e101. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050101>
37. Wang, D.-S., Jiao, B., Hu, C., Huang, X., Liu, Z., & Cheng, C. H. K. (2008). Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(2), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.136>
38. Weitzman, S. H. (2024, September 17). *teleost*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/animal/teleost>

39. Wood, A. W., Duan, C., & Bern, H. A. (2005). Insulin-Like Growth Factor Signaling in Fish. In *International Review of Cytology* (Vol. 243, pp. 215–285). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)43004-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)43004-1)

7. Παράρτημα

Πίνακας 1: Αποτελέσματα Shapiro test

Gene names	P-values
<i>ghri</i>	2.303e-07
<i>ghrii</i>	0.0002543
<i>igfi</i>	0.03149
<i>igfii</i>	2.897e-07

Πίνακας 2: Αποτελέσματα Kruskal Wallis

Gene names	P-values
<i>ghri</i>	0.04678
<i>ghrii</i>	0.00066
<i>igfi</i>	0.3197
<i>igfii</i>	0.001094

Αποτελέσματα Dunn test για GHRI:

Πίνακας 3: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις Dunn's. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με κόκκινο. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $\alpha=0.05$

Ζεύγη διατροφών	P-values
20% SBM diet – 20% SPC diet	0.4681
20% SBM diet – Soy-free diet	0.3645
20% SPC diet – Soy-free diet	0.3349
20% SBM diet – zero timepoint	0.0144
20% SPC diet – zero timepoint	0.0176
Soy-free diet – zero timepoint	0.0057

Αποτελέσματα Dunn test για GHRII:

Πίνακας 4: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με κόκκινο. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $\alpha=0.05$

Ζεύγη διατροφών	P-values
20% SBM diet – 20% SPC diet	0.4156

20% SBM diet – Soy-free diet	0.4787
20% SPC diet – Soy-free diet	0.4365
20% SBM diet – zero timepoint	0.0003
20% SPC diet – zero timepoint	0.0006
Soy-free diet – zero timepoint	0.0003

Αποτελέσματα Dunn test για IGF1:

Πίνακας 5: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με κόκκινο. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $\alpha=0.05$

Ζεύγη διατροφών	P-values
20% SBM diet – 20% SPC diet	0.4834
20% SBM diet – Soy-free diet	0.4787
20% SPC diet – Soy-free diet	0.4681
20% SBM diet – zero timepoint	0.0644
20% SPC diet – zero timepoint	0.0678
Soy-free diet – zero timepoint	0.0579

Αποτελέσματα Dunn test για IGFII:

Πίνακας 5: Στατιστικά σημαντικές διαφορές στις κατά ζεύγη συγκρίσεις. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με κόκκινο. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $\alpha=0.05$

Ζεύγη διατροφών	P-values
20% SBM diet – 20% SPC diet	0.3103
20% SBM diet – Soy-free diet	0.5
20% SPC diet – Soy-free diet	0.3103
20% SBM diet – zero timepoint	0.0003
20% SPC diet – zero timepoint	0.0015
Soy-free diet – zero timepoint	0.0003