

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ & ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΣΤΗΝ
ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΣΤΗΝ
ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*Sparus aurata*)**



ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ ΜΠΟΥΛΙΝΑΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ

Λέκτορας, Μοριακή Γενετική Ζωικών Οργανισμών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αισθάνομαι την υποχρέωση να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην Καθηγήτριά μου Αικατερίνη Μούτου για την ανάθεση σε εμένα του ενδιαφέροντος αυτού θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας προπτυχιακής διατριβής και την κριτική διόρθωση του κειμένου. Επίσης ένα θερμό ευχαριστώ στον Καθηγητή Ζήση Μαμούρη και στη Λέκτορα Θεολογία Σαραφίδου που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή. Ακόμη ευχαριστώ τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για το φιλικό περιβάλλον στο χώρο εργασίας και ιδιαιτέρως ευχαριστώ, τον Κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη υπεύθυνο του εργαστηρίου Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας, τους υποψήφιους Διδάκτορες Θεμιστοκλή Γιαννούλη και Ευαγγελία Κουτσογιαννούλη καθώς και τον Διδάκτορα Κωνσταντίνο Βουδούρη για τη βοήθειά τους η οποία υπήρξε σημαντική για μένα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Η τσιπούρα <i>Sparus aurata</i>	5
1.2 Φυσιολογία πέψης της τσιπούρας.....	6
1.3 Οι πρωτεάσες της σερίνης στην τσιπούρα.....	10
1.4 Επίδραση αυξητικής ορμόνης στη δραστικότητα των πεπτικών πρωτεασών στη τσιπούρα.....	11
1.5 Σκοπός της μελέτης.....	11
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	12
2.1 Χορήγηση αυξητικής ορμόνης.....	12
2.2 Δειγματοληψία και απομόνωση RNA.....	12
2.3 Σύνθεση cDNA και έλεγχος.....	13
2.4 Ανάπτυξη μεθόδου real-time PCR.....	14
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	18
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	19
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	26
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	28

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η τσιπούρα *Sparus aurata*

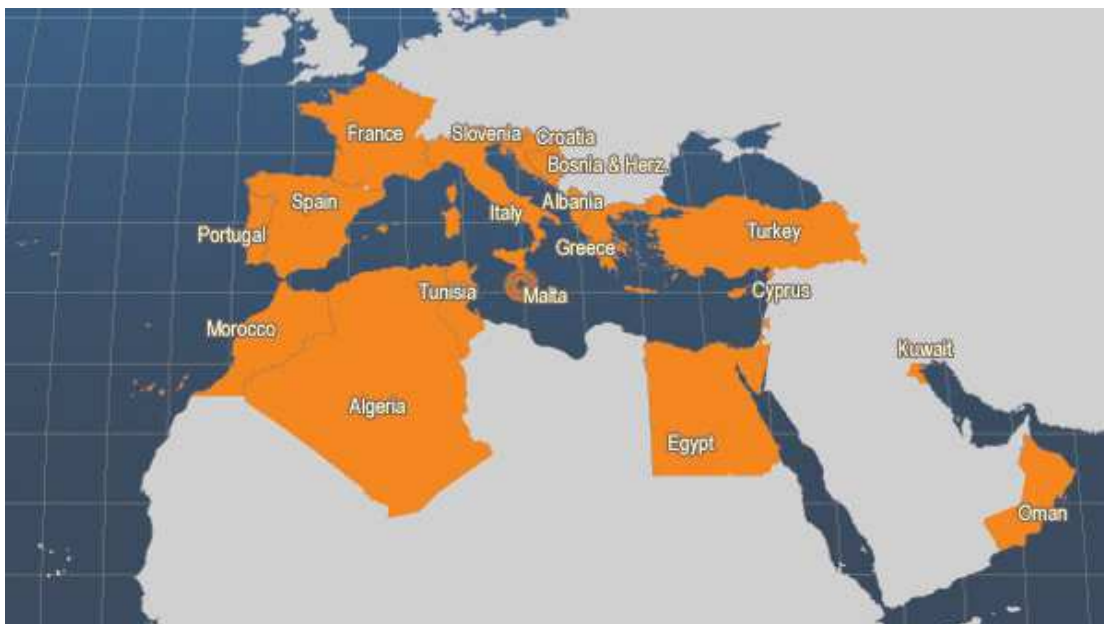
ΚΛΑΣΗ: Ακτινοπτερύγιοι

ΥΠΕΡΤΑΞΗ: Ακανθοπτερύγιοι

ΤΑΞΗ: Perciformes

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Sparidae

Η τσιπούρα *Sparus aurata* είναι ένα ευρύαλο και ευρύθερμο είδος που εμφανίζει ταχύτερους ρυθμούς αύξησης σε θερμοκρασία 25°C. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1 συναντάται σε όλη την εύκρατη ζώνη του ανατολικού Ατλαντικού, στις λιμνοθάλασσες, τα εκβολικά και παράκτια οικοσυστήματα της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας.



Σχήμα1. Η εξάπλωση της τσιπούρας *Sparus aurata*. Με πορτοκαλί χρώμα παρουσιάζονται οι περιοχές που έχει παρατηρηθεί η τσιπούρα .

Ο βιολογικός κύκλος της τσιπούρας χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός πρώτανδρου ερμαφροδιτισμού και η αλλαγή φύλου εμφανίζεται ανάμεσα στο 2^ο και 3^ο έτος της ηλικίας των ψαριών. Οι διατροφικές προτιμήσεις της τσιπούρας στο φυσικό της περιβάλλον

περιλαμβάνουν κυρίως πολύχαιτους, καρκινοειδή, μύδια, γαστερόποδα και εχινόδερμα, ενώ μεταβάλλονται με την ηλικία, καθώς τα μεγαλύτερα ψάρια καταναλώνουν μεγαλύτερη λεία με ισχυρότερα κελύφη .

Η καλλιέργεια της τσιπούρας έχει αναπτυχθεί πάρα πολύ τα τελευταία χρόνια, σε όλες σχεδόν τις χώρες της Μεσογείου, μιας και πρόκειται για ένα είδος μεγάλης οικονομικής σημασίας. Η Ελλάδα κατέχει την πρώτη θέση στην Ε.Ε. στην παραγωγή θαλασσινών ειδών εντατικής εκτροφής, στηριζόμενη τόσο στην αξιοποίηση των ευνοϊκών συνθηκών των ελληνικών θαλασσών όσο και στη διαρθρωτική πολιτική ενισχύσεων της Ε.Ε. (ΕΠΑΛ, 2007). Σύμφωνα με την πρόσφατη έκθεση της Ομοσπονδίας Ευρωπαϊκών Υδατοκαλλιεργητών (Production and price reports of the member associations of the Federation of European Aquaculture Producers, 2001-2008):

- Η Ελλάδα είναι η υπ' αριθμόν ένα παραγωγός τσιπούρας στην Ευρώπη, με ετήσια αύξηση παραγωγής 7,3%.
- Το 2008 η ελληνική ιχθυοπαραγωγή ανήλθε στους 95.000 τόνους, 60.000 από τους οποίους ήταν τσιπούρα.
- Σε ευρωπαϊκή κλίμακα, η ιχθυογέννηση τσιπούρας ανήλθε σε 500.000.000 ιχθύδια και τζίρο 112,5 εκατομμυρίων ευρώ το 2008.

1.2 Φυσιολογία πέψης της τσιπούρας

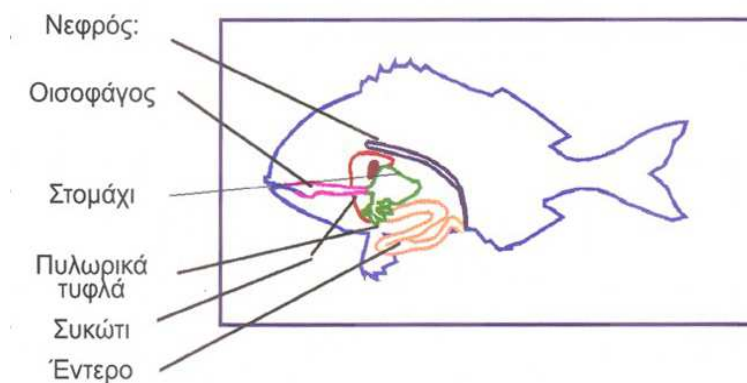
➤ Δομή του πεπτικού σωλήνα

Η τσιπούρα, όπως και όλα τα ψάρια, έχει την ικανότητα να προσαρμόζει την διαίτα της σε μια μεγάλη διατροφική ποικιλία, προσπαθώντας κάθε φορά να εκμεταλλευτεί με τον αποτελεσματικότερο τρόπο τη διαθέσιμη τροφή του περιβάλλοντος της (Moyle & Cech, 1982). Είναι δε χαρακτηριστική η παρουσία των περισσότερων πεπτικών ενζύμων σε όλα τα είδη ψαριών, ανεξάρτητα των διατροφικών τους συνηθειών (Chakrabarti et al., 1995; Hidalgo et al., 1999).

Κατά τη διάρκεια των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων των ψαριών, το πεπτικό σύστημα εμφανίζεται εξαιρετικά ανώριμο (Kolkovski, 2001). Κατά την εκκόλαψη, ο πεπτικός σωλήνας αποτελεί έναν ευθύ σωλήνα, κλειστό στην περιοχή του στόματος και ιστολογικά αδιαφοροποίητο σε όλο το μήκος του. Παραμένει, δε, σχεδόν στην ίδια κατάσταση για το διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα στο άνοιγμα του στόματος και την

πλήρη απορρόφηση του λεκιθικού σάκου, οπότε και διαιρείται στον οισοφάγο, το πρόσθιο, το μέσο και το οπίσθιο έντερο. Η περίοδος του ατελούς ιχθυδίου ολοκληρώνεται με την ανάπτυξη του στομάχου, των γαστρικών αδένων και των πυλωρικών τυφλών. Το συκώτι και το πάγκρεας αναπτύσσονται κατά την εκκόλαψη και είναι πλήρως λειτουργικά την ημέρα πρώτης τροφοληψίας. Είναι χαρακτηριστικό, ότι η πέψη των πρωτεϊνών σ' αυτά πρώτα στάδια ανάπτυξης, επαφίεται αποκλειστικά στη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων που εκκρίνονται από το πάγκρεας (Sarasquete et al., 1993; Sarasquete et al., 1995; Kolkovski, 2001; Srivastava et al., 2002).

Στην τσιπούρα ο πεπτικός σωλήνας αρχίζει από το στόμα και τη στοματική κοιλότητα, συνεχίζει στο φάρυγγα και τον οισοφάγο, το στομάχι, τα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο, για να καταλήξει στην έδρα (Σχήμα 2). Το επιθήλιο του πεπτικού σωλήνα αντιπροσωπεύει μια σημαντική επιφάνεια επαφής ανάμεσα στο εξωτερικό και το εσωτερικό περιβάλλον, και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην πέψη και απορρόφηση των τροφών, την οσμωρύθμιση και τις ανοσιακές αποκρίσεις (Buddington et al., 1997; Buddington & Krogdahl, 2004).



Σχήμα 2. Ανατομία του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας.

Η ανατομία του γαστρεντερικού σωλήνα της τσιπούρας, ακολουθεί το τυπικό πρότυπο των σαρκοφάγων ψαριών. Η στοματική κοιλότητα περιλαμβάνει μια δυνατή οδοντοστοιχία για την αποτελεσματικότερη διάσπαση των τροφών και ακολουθεί ένας σχετικά μικρού μήκους οισοφάγος, του οποίου τα ιστολογικά χαρακτηριστικά συνηγορούν στον οσμωρυθμιστικό του ρόλο. Το καλά διαμορφωμένο στομάχι έχει σχήμα Y και είναι εφοδιασμένο με γαστρικούς αδένες. Η πυλωρική περιοχή χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τεσσάρων πυλωρικών τυφλών, ενώ το έντερο – το οποίο καλύπτεται από επιθηλιακά και βλεννογόνα κύτταρα – είναι κοντό με σχετικό μήκος 0,5-0,6 ως προς το συνολικό μήκος

του πεπτικού σωλήνα. Ο παγκρεατικός ιστός εμφανίζεται έντονα διαχυτός εντός του ήπατος και γύρω από την πυλωρική περιοχή (Cataldi et al., 1987; Elbal & Agulleiro, 1986).

➤ **Πεπτικά ένζυμα που έχουν ανιχνευθεί**

Στην τσιπούρα έχει ανιχνευθεί ένας μεγάλος αριθμός πεπτικών ενζύμων, κυριότερα των οποίων είναι:

- η αμυλάση (Munilla-Morán & Sabonino-Rey, 1996a; Hidalgo et al., 1999; Deguara et al., 2003),
- η πεψίνη (Alarcón et al., 1998; Deguara et al., 2003),
- η θρυψίνη (Alarcón et al., 1998; Deguara et al., 2003),
- η χυμοθρυψίνη (Alarcón et al., 1998; Deguara et al., 2003),
- η καρβοξυπεπτιδάση A (Deguara et al., 2003),
- η καρβοξυπεπτιδάση B (Deguara et al., 2003),
- η ελαστάση (Psohiou et al., 2007a)

➤ **Σημεία πέψης και απορρόφησης θρεπτικών**

Η διαδικασία της πέψης αρχίζει από το στόμα και το φάρυγγα, με τη μηχανική διάσπαση των τροφών και συνεχίζεται στον οισοφάγο με την παραγωγή βλέννας. Στα παραπάνω τμήματα του πεπτικού σωλήνα δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι σήμερα καμία έκκριση πεπτικών ενζύμων. Η ενζυμική πέψη ξεκινά από το στομάχι με τη δράση της πεψίνης σε όξινο περιβάλλον. Στους γαστρικούς αδένες της τσιπούρας, έχει εντοπισθεί μόνο ένας κυτταρικός τύπος, που παράγει υδροχλωρικό οξύ και πρωτεολυτικά ένζυμα (πεψίνη) ως αντίδραση στην παρουσία τροφής στο στομάχι. Το μεγαλύτερο μέρος της ενζυμικής πέψης πραγματοποιείται καθώς η τροφή περνά από τα πυλωρικά τυφλά και κατά μήκος του εντερικού αυλού. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σ' αυτή προέρχονται κυρίως από το πάγκρεας, τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, αλλά και από την εντερική χλωρίδα (Karoor et al., 1975). Το πάγκρεας παράγει τη μεγαλύτερη ποικιλία και ποσότητα πεπτικών ενζύμων (πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες), ενώ βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο φυσιολογικών διαδικασιών που συνδέονται με το διατροφικό καθεστώς, το εξωτερικό περιβάλλον, το φύλο και την ηλικία. Οι παγκρεατικές εκκρίσεις περιέχουν επίσης δικαρβονικά ιόντα, τα οποία σε συνεργασία με τα χολικά υγρά, δρουν προς εξουδετέρωση των οξέων που προέρχονται από το στομάχι (Karoor et al., 1975; Kurakawa

& Suzuki, 1995). Η διάσπαση της τροφής ολοκληρώνεται με τη δράση των πεπτικών ενζύμων, που εκκρίνονται από το εντερικό επιθήλιο και συγκεντρώνονται κυρίως στην περιοχή των λαχνών, δίνοντας τα τελικά προϊόντα της πέψης (δισακχαρίτες, δι- και τρι-πεπτίδια, μονοσακχαρίτες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα) που απορροφούνται και μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των εντεροκυττάρων (Karoor et al., 1975; Moyle & Cech, 1982; Halver, 1989).

Το εντερικό επιθήλιο έρχεται σε επαφή με το περιεχόμενο του εντερικού αυλού και είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση και μεταφορά των περιεχόμενων σ' αυτό θρεπτικών, ιόντων και νερού (Ferraris & Ahearn, 1984). Η απορρόφηση των θρεπτικών από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου πραγματοποιείται μέσω διαφόρων οδών όπως i) η παθητική διάχυση, ii) η ενεργητική - μη εξαρτώμενη από την παρουσία ιόντων - μεταφορά, iii) η ενεργητική - εξαρτώμενη από την ύπαρξη βαθμίδωσης ιόντων - μεταφορά, iv) η ενδοκύττωση και v) η παρακυτταρική κυκλοφορία (Bakke-McKeller et al., 2000). Όσον αφορά την πέψη των πρωτεϊνών, εξακολουθεί να υπάρχει το ερώτημα, εάν το μεγαλύτερο μέρος των απορροφούμενων θρεπτικών – όπως και στα θηλαστικά - αποτελείται από δι- και τρι- πεπτίδια (Georgopoulou et al., 1986), καθώς σύγχρονα αποτελέσματα υποστηρίζουν την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη απορρόφηση των απλών αμινοξέων (Bakke-McKeller et al., 2000). Μελέτες, ωστόσο, σε διάφορα είδη ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας, έχουν δείξει ότι διεξάγεται ιδιαίτερα σημαντική πρόσληψη από το εντερικό επιθήλιο – ιδιαίτερα από το τελικό τμήμα του εντέρου – ολόκληρων πρωτεϊνικών μορίων, μέσω πινοκύττωσης (Dabrowski & Dabrowska, 1981; Stroband & Van der Veen, 1981; Elbal & Agulleiro, 1986; Georgopoulou et al., 1986; Cataldi et al., 1987; Buddington et al., 1997; Bakke-McKeller et al., 2000).

➤ **Ανάπτυξη του πεπτικού σωλήνα**

Στην τσιπούρα, η ανάπτυξη του πεπτικού σωλήνα περιλαμβάνει πέντε επιμέρους φάσεις:

- I (ημέρα 0), ο λεκιθικός σάκος εμφανίζεται μεγάλος και ο πεπτικός σωλήνας αδιαφοροποίητος,
- II (ημέρα 2-3), ανοίγει η έδρα και διαφοροποιούνται ο οισοφάγος, το στομάχι και το έντερο, εμφανίζεται δραστηριότητα θρυψίνης, ενώ η τροφοληψία εξακολουθεί να είναι αποκλειστικά ενδογενής,
- III (ημέρα 4-7), ανοίγει το στόμα, αρχίζει η απορρόφηση του λεκιθικού σάκου και το έντερο διαιρείται σε δύο επιμέρους περιοχές,

- IV (ημέρα 8-59), ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί και η τροφοληψία είναι πλέον αποκλειστικά εξωγενής,
- V (ημέρα 60-69), διαφοροποιούνται τα πυλωρικά τυφλά και οι γαστρικοί αδένες (Sarasquete et al., 1993; Sarasquete et al., 1995; Kolkovski, 2001; Elbal et al., 2004).

1.3 Οι πρωτεάσες της σερίνης στην τσιπούρα

Οι πρωτεάσες της σερίνης βρίσκονται μεταξύ των πρώτων καλά μελετημένων ενζύμων και αποτελούν ενδοπρωτεάσες που φέρουν το αμινοξύ της σερίνης στο ενεργό κέντρο τους. Ανήκουν σε μία ομάδα ενζύμων που συντίθενται ως ανενεργά πρόδρομα τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούνται με διάσπαση ενός ή μερικών ειδικών πεπτιδικών δεσμών. Το ανενεργό ένζυμο ονομάζεται ζυμογόνο και για την ενεργοποίησή του (δηλ. την διάσπαση ενός ή μερικών ειδικών πεπτιδικών δεσμών) δεν απαιτείται πηγή ενέργειας. Οι κύριες πρωτεάσες σερίνης στην τσιπούρα είναι η χυμοθρυψίνη I και II καθώς και η θρυψίνη II, ενώ τα αντίστοιχα ζυμογόνα τους είναι το χυμοθρυψινογόνο I και II (CHTRI, CHTRII) και το θρυψινογόνο II (TRPII - Psohiou et al. 2007b).

Οι αμινοξικές αλληλουχίες του CHTRI και CHTRII είναι 261 και 257 αμινοξέα αντίστοιχα και εμφανίζουν μόνο 61% ομολογία. Το CHTRII της τσιπούρας είναι η μεγαλύτερη μορφή απ' όλα τα γνωστά χυμοθρυψινογόνα των τελεόστεων και περιέχει ένα μεγάλο αριθμό κατάλοιπων μεθειονίνης. Σε σύγκριση με το CHTRI, το CHTRII είναι πιο υδροφοβικό και έχει χαμηλότερο ισοηλεκτρικό σημείο. Από την άλλη, η αμινοξική αλληλουχία του TRPII έχει μήκος 241 αμινοξέα και έχει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο που αποτελείται από 13 αμινοξικά κατάλοιπα και ένα πεπτίδιο ενεργοποίησης που αποτελείται από 7. Σε αντίθεση με το CHTRI και CHTRII, το TRPII έχει χαμηλότερο ισοηλεκτρικό σημείο το οποίο το μετατρέπει σε ανιόν σε ουδέτερο pH. Ανάλυση κατά Northern έδειξε ότι το κύριο σημείο μεταγραφής των ζυμογόνων είναι το ήπαρ. Όλα τα μετάγραφα των ζυμογόνων έχουν ανιχνευθεί και σε περιοχές κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα (στομάχι, πυλωρικά τυφλά, πρόσθιο και οπίσθιο έντερο) με τα πυλωρικά τυφλά να παρουσιάζουν την πιο έντονη έκφραση (Psohiou et al., 2007b).

1.4 Επίδραση αυξητικής ορμόνης στη δραστικότητα των πεπτικών πρωτεασών στη τσιπούρα

Η εξωγενής χορήγηση αυξητικής ορμόνης (oGH) είχε σημαντική επίδραση στη δραστικότητα των πεπτικών πρωτεασών στην τσιπούρα (Ψόχιου, 2006). Οι διαφορετικές δόσεις χορηγούμενης oGH επηρέασαν σημαντικά τη δραστικότητα των ολικών όξινων πρωτεασών στο στομάχι, όπως επίσης και τη δραστικότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών και του οπίσθιου εντέρου. Επιπλέον, στο τμήμα του οπίσθιου εντέρου οι διαφορετικές δόσεις oGH είχαν σημαντική επίδραση στη δραστικότητα της χυμοθρυψίνης. Στην ίδια περιοχή του εντέρου παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στις δραστικότητες ολικών αλκαλικών πρωτεασών και χυμοθρυψίνης ($R = 0,29$, $P < 0,05$), υποδηλώνοντας έτσι – σε συνδυασμό με τα παραπάνω – πιθανή επίδραση της αυξητικής ορμόνης στην πέψη των πρωτεϊνών στο αλκαλικό τμήμα του πεπτικού σωλήνα μέσω επίδρασης της στη δράση της χυμοθρυψίνης, η οποία αποτελεί και την κυρίαρχη πεπτική πρωτεάση για την τσιπούρα.

Τα παρόντα αποτελέσματα υποδεικνύουν την ύπαρξη σχέσεων μεταξύ της πέψης των πρωτεϊνών και της κεντρικής ορμονικής ρύθμισης, ενώ, από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, αυτή αποτελεί και την πρώτη αναφορά επίδρασης της αυξητικής ορμόνης στη δραστικότητα και την έκφραση οποιουδήποτε πεπτικού ενζύμου.

1.5 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας προπτυχιακής διατριβής είναι:

- Η μελέτη της επίδρασης της αυξητικής ορμόνης στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα ζυμογόνα πεψινογόνο, χυμοθρυψινογόνο I και II και θρυψινογόνο II στο ήπαρ, το στομάχι, τα πυλωρικά τυφλά και το οπίσθιο έντερο της τσιπούρας με τη μέθοδο της real-time RT-PCR.
- Η σύγκριση και η ανάδειξη των καταλληλότερων γονιδίων αναφοράς μεταξύ των β -actin, TubA, RPS18 και GAPDH για τη μελέτη των παραπάνω ζυμογόνων και ιστών.
- Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με της επίδρασης της αυξητικής ορμόνης στη δραστικότητα των αντίστοιχων πεπτικών πρωτεασών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χορήγηση αυξητικής ορμόνης

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών στην Αθήνα, τον Ιούλιο του 2005. Εξήντα νεαρά άτομα *S. aurata* ($57,3 \pm 1,1$ g) διαιρέθηκαν σε τέσσερις πειραματικές ομάδες των 15 ατόμων, τα οποία τοποθετήθηκαν σε 60-lt PVC δεξαμενές και εγκλιματίστηκαν στις πειραματικές συνθήκες για 10 μέρες. Κατά την έναρξη του πειράματος τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν με MS-222 (~ 35 mg/l), έλαβαν ενδοπεριτονιακά διαφορετικές δόσεις από πρόβεια αυξητική ορμόνη (ovineGH, NIADDK-oGH-15, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) διαλυμένη σε 0,9% NaCl και επανατοποθετήθηκαν στις πειραματικές δεξαμενές. Η ομάδα «Α» έλαβε 0,1 μg oGH/g σωματικού βάρους, η ομάδα «Β» 1 μg oGH/g σωματικού βάρους και η ομάδα «Γ» 10 μg oGH/g σωματικού βάρους αντίστοιχα, ενώ ο μάρτυρας (ομάδα «Ο») έλαβε διάλυμα 0,9% NaCl. Οι ενέσιμοι χορηγούμενοι όγκοι ήταν ανάλογοι του σωματικού βάρους κάθε ψαριού. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, τα ψάρια τρέφονταν στο 2% του σωματικού τους βάρους με τη χρήση εμπορικών συμπληκτων (BioMar AE) αναγραφόμενης σύστασης: 44% πρωτεΐνη, 20% λιπίδια, 15,8% ENEO και 8,2% τέφρα, μια φορά ημερησίως (14.00). Κάθε ενυδρείο ήταν εξοπλισμένο με αυτόνομο αερισμό, σύστημα φιλτραρίσματος και ανακύκλωσης νερού. Η φωτοπερίοδος στη διάρκεια του πειράματος ήταν 14D:10L. Τα επίπεδα οξυγόνου, θερμοκρασίας και αλατότητας μετρούνταν καθημερινά. Η διακύμανση της θερμοκρασίας ($27,4 \pm 0,1$ °C) και της αλατότητας ($37,5 \pm 0,1$ ppt) ήταν η ίδια μεταξύ των μεταχειρίσεων, ενώ το διαλυμένο οξυγόνο κυμάνθηκε σε επίπεδα κορεσμού. Θνησιμότητες δεν καταγράφηκαν.

2.2 Δειγματοληψία και απομόνωση RNA

Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 1, 2, 4, και 7 του πειράματος. Κάθε ημέρα δειγματοληψίας, τρία άτομα από κάθε μεταχείριση αναισθητοποιούνταν με MS 222 και ζυγίζονταν ατομικά πριν τη λήψη δειγμάτων. Με τους κατάλληλους χειρισμούς, από κάθε ψάρι αφαιρούνταν περίπου 100 mg από το ήπαρ, το στομάχι, τα πλωρικά τυφλά και το οπίσθιο έντερο, τα οποία εμβαπτίζονταν σε RNAlater (Sigma), που εξασφαλίζει για 24 h

τουλάχιστον τη μη αποικοδόμηση του ευαίσθητου RNA σε θερμοκρασία δωματίου και διατηρούνταν στους -20°C μέχρι την εξαγωγή ολικού RNA. Τα δείγματα λαμβάνονταν πάντα την ίδια ώρα (24 h μετά τη χορήγηση τροφής) και η ώρα δειγματοληψίας καταγράφονταν. Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε μηχανικά (ομογενοποιητής ULTRA TURAX, IKA-WERKE) από τα δείγματα ιστών σύμφωνα με τις οδηγίες του εμπορικού προϊόντος TRI Reagent (Sigma), ενός φαινολικού διαλύματος για την απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση χλωροφορμίου και ισοπροπανόλης. Τα δείγματα RNA που προέκυψαν κατακρημνήστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 75% και διατηρήθηκαν στους -80°C . Για την εξασφάλιση της καλύτερης δυνατής ποιότητας RNA, όλη η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διπλά αποστειρωμένων υλικών και DEPC ddH₂O για την καταστροφή των υπαρχόντων νουκλεασών.

2.3 Σύνθεση cDNA και έλεγχος

Τα δείγματα RNA φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 x g για 15 λεπτά και στους 4°C . Η υπερκείμενη αιθανόλη απομακρύνθηκε και τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν μέσα σε πάγο. Ακολούθησε επαναδιαλυτοποίηση των δειγμάτων σε DEPC νερό (Diethyl Pyrocarbonate –Research Organics). Κατόπιν τα δείγματα φωτομετρήθηκαν για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητας του RNA σε κάθε δείγμα. Από αυτά δημιουργήθηκαν διαλύματα RNA 5μg/mL με DEPC.

Το συμπληρωματικό DNA (cDNA) συντέθηκε στους 42°C για 50 λεπτά, από τα 5μg ολικού RNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής. Ως εκκινητές της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν για κάθε δείγμα, σε χωριστές αντιδράσεις oligo dT₍₁₈₎ (Sigma Co, USA) και random hexamers). Το μίγμα της αντίδρασης που προστέθηκε σε κάθε δείγμα περιείχε: 6μL 5x RT buffer, 3μL dNTP's, 3μL DTT (0,1 M), 0,2μL αναστολέα RNAase (RNAase inhibitor), και 0,2μL αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, 200U/μL; GIBCO). Μετά το πέρας της διαδικασίας, ενωποιούνται οι αντιδράσεις κάθε δείγματος στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί εκκινητές, δηλαδή είτε oligo-dT είτε random hexamers και φυλάσσονταν στους -20°C .

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της σύνθεσης του cDNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της PCR με εκκινητές για την ενίσχυση της β-ακτίνης. Από κάθε ενωποιημένο πλέον δείγμα χρησιμοποιούνταν 1 μl ως υπόστρωμα. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε:

5 μl 10x PCR buffer

3 μl MgCl₂ (25mM)

1 μl dNTPs (10mM)

1 μl forward primer b-actin BAF 5' GAGGAGCACCCNGTCSTG 3' (100pmol/ μl)

1 μl reverse primer b-actin BAR 5' GGTGGTWCCWCCRGACARYAC 3' (100pmol/ μl)

0,2 μl Taq

37,8 μl dH₂O

Η αντίδραση ενίσχυσης περιελάμβανε 3 min στους 94°C και 30 επαναλήψεις με 45 sec στους 94°C, 1 min στους 48°C και 1 min στους 72°C.

Με το πέρας της αντίδρασης, τα δείγματα ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%.

2.4 Ανάπτυξη μεθόδου Real-Time PCR

- Διαδικασία *real-time PCR*

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (*real-time PCR*) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα 3 μl της αντίδρασης RT. Κάθε αντίδραση, εκτός από το δείγμα, περιείχε :

- 21,7 μl SYBER GREEN
- 1 μl forward primer (10 pmol/ μl)
- 1 μl reverse primer (10 pmol/ μl)
- 16.6 μl dH₂O

έτσι ώστε ο όγκος κάθε δείγματος να ρυθμιστεί στα 43,3 μl. Από αυτό χρησιμοποιούνταν 20 μl για την αντίδραση, η οποία επαναλαμβάνονταν εις διπλούν. Τα δείγματα φυγοκεντρώνταν στιγμιαία, πριν τοποθετηθούν στο μηχάνημα της *real-time PCR*. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κοινές για όλα τα ζεύγη εκκινητών και περιλάμβαναν τα εξής βήματα:

1 min στους 95°C και 40 επαναλήψεις με 1 min στους 95°C, 30 sec στους 60°C και 1min στους 72°C. Ακολουθούσε η αντίδραση αποδιάταξης (dissociation) με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55 °C στους 95 °C.

- *Πρότυπες καμπύλες-υπολογισμός απόδοσης αντίδρασης*

Για κάθε ιστό δημιουργήθηκε ένα συλλεκτικό δείγμα ενώνοντας 1μl από τις 48 διαφορετικές μεταχειρίσεις του κάθε ιστού. Στη συνέχεια για κάθε συλλεκτικό δείγμα έγιναν οι εξής διαδοχικές αραιώσεις: 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 και 1:1000. Στις αραιώσεις αυτές εφαρμόστηκε η real-time PCR με σκοπό την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών του κάθε ιστού. Μέσω της κλίσης της κάθε καμπύλης υπολογίστηκε ο βαθμός απόδοσης (efficiency) κάθε αντίδρασης χρησιμοποιώντας τον εξής τύπο :

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

όπου slope η κλίση της πρότυπης καμπύλης.

Πίνακας 2.1. Τα γονίδια που μελετήθηκαν, οι αριθμοί πρόσβασης στην GenBank, οι εκκινητές και το μέγεθος του ενισχυμένου προϊόντος

Γονίδιο	Εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος
β-actin X89920	FW 5' CGACATCCGTAAGGACCTGT 3'	206 bp
	RV 5' ACATCTGCTGGAAGGTGGAC 3'	
EF1α AF184170	FW 5' TCAAGGCATGGAAGGTTGAG 3'	152 bp
	RV 5' AGTTCCAATACCGCCGAT 3'	
RPS18 AM490061	FW 5' AGGGTGTGTCAGACGTTAC 3'	197 bp
	RV 5' CAGGACCTGGCTGTATTTGC 3'	
TubA AY326430	FW 5' AGGTGGGCATCAACTACCAG 3'	195 bp
	RV 5' CACCCTCTTCCATACCCTCA 3'	
GAPDH DQ641630	FW 5' ATCACTGCCACCCAGAAGAC 3'	192 bp
	RV 5' GTCAACCACTGACACGTTGG 3'	
Pepsin EU163284	FW 5' CGTCGTGCCTGTCTTCTACA 3'	194 bp
	RV 5' CGCTGTCCATGCTAATCTGA 3'	
CHTRI	FW 5' CTAAGTCAATGTGCGAGCC 3'	105 bp

DQ443541	RV 5' GAAGTGTGGGGCAAAGCACA 3'	
CHTRII	FW 5' GAACCTGCACTCCCACCATG 3'	111 bp
DQ443542	RV 5' CTGGAAGCTGTCCTGTCTCGGA 3'	
TRPII	FW 5' ACGGATGTGCTGAGAGGGAC 3'	129 bp
DQ443543	RV 5' GATGACGTGCTGCTTACATGG 3'	

Πίνακας 2.2 Αναλυτική παρουσίαση της απόδοσης της αντίδρασης ανά ιστό και ζεύγος εκκινητών

	EF1a	b-actin	TubA	GAPDH	RPS18	CHTRI	CHTRII	TRPII	Pepsinogen
S	93,95	104,92	112,71	115,90	98,12	133,32	147,70	152,71	101,62
PC	109,64	106,01	103,40	103,27	98,33	100,69	101,65	93,82	-
PI	115,01	111,98	123,97	129,57	111,02	93,87	106,27	98,49	-
L	106,44	100,43	111,43	112,16	98,06	97,69	98,02	101,23	-

Δεδομένης της απόδοσης της αντίδρασης για κάθε ιστό και γονίδιο, χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος (comparative ct method) για τον προσδιορισμό της ποσότητας του mRNA-στόχου (Čikoš et al. 2007), στην οποία το ct προσδιοριζόταν στο ίδιο επίπεδο φθορισμού για όλα τα δείγματα στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Η αρχική ποσότητα του mRNA-στόχου είναι ανάλογη του φθορισμού στην αρχή της αντίδρασης και προσδιορίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$R_0 = 1/(E+1)^{ct}$$

όπου

R_0 , τα επίπεδα φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης, ανάλογα με την αρχική ποσότητα του mRNA-στόχου,

E , η απόδοση της αντίδρασης, και

Ct , ο αριθμός κύκλων αντίδρασης για ένα συγκεκριμένο επίπεδο φθορισμού στην εκθετική φάση της αντίδρασης.

- *Γονίδια αναφοράς- υπολογισμός παράγοντα κανονικοποίησης*

Στην παρούσα εργασία με την μέθοδο της Real-time PCR μελετήθηκαν τα εξής πέντε γονίδια αναφοράς:

- EF1a
- b-actin
- TubA
- RPS18
- GAPDH

Η σταθερότητα έκφρασης των γονιδίων-αναφοράς (M) υπολογίστηκε με το geNorm, και τα γονίδια κατατάχθηκαν κατά σειρά αυξανόμενης σταθερότητας. Το geNorm προσδιορίζει τη σταθερότητα στην έκφραση κάθε γονιδίου και υπολογίζει τελικά τη σταθερότητα όλων των γονιδίων βασιζόμενο στην ομοιότητα που παρουσιάζουν τα πρότυπα έκφρασής τους σε κατά ζεύγη συγκρίσεις, χρησιμοποιώντας το γεωμετρικό μέσο ως παράγοντα κανονικοποίησης. Σε κάθε βήμα της ανάλυσης επιλέγεται και εξαιρείται το γονίδιο με τη μεγαλύτερη τιμή M και άρα το πιο ασταθές, μέχρι να προσδιορισθούν τα δύο πιο σταθερά γονίδια αναφοράς (Vandesompele et al. 2002). Για τον υπολογισμό των επιπέδων R_0 των γονιδίων αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος (comparative ct method)

Ο παράγοντας κανονικοποίησης για κάθε δείγμα, υπολογίστηκε με την χρήση του geNorm ως ο γεωμετρικός μέσος των δύο καλύτερων γονιδίων αναφοράς. Η έκφραση όλων των γονιδίων στόχων κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με αυτόν το παράγοντα κανονικοποίησης:

Κανονικοποιημένη έκφραση= έκφραση του γονιδίου/ παράγοντα κανονικοποίησης.

- *Γονίδια στόχοι*

Τα γονίδια –στόχοι που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και οι ιστοί στους οποίους μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.3.

Ιστός	Γονίδια-στόχοι που μελετήθηκαν
Ήπαρ	Χυμοθρυψινογόνο I (CHTRI)και II(CHTRII) , θρυψινογόνο II(TRPII)
Πυλωρικά τυφλά	Χυμοθρυψινογόνο I (CHTRI)και II(CHTRII) , θρυψινογόνο II(TRPII)
Οπίσθιο έντερο	Χυμοθρυψινογόνο I (CHTRI)και II(CHTRII) , θρυψινογόνο II(TRPII)
Στομάχι	πεψινογόνο

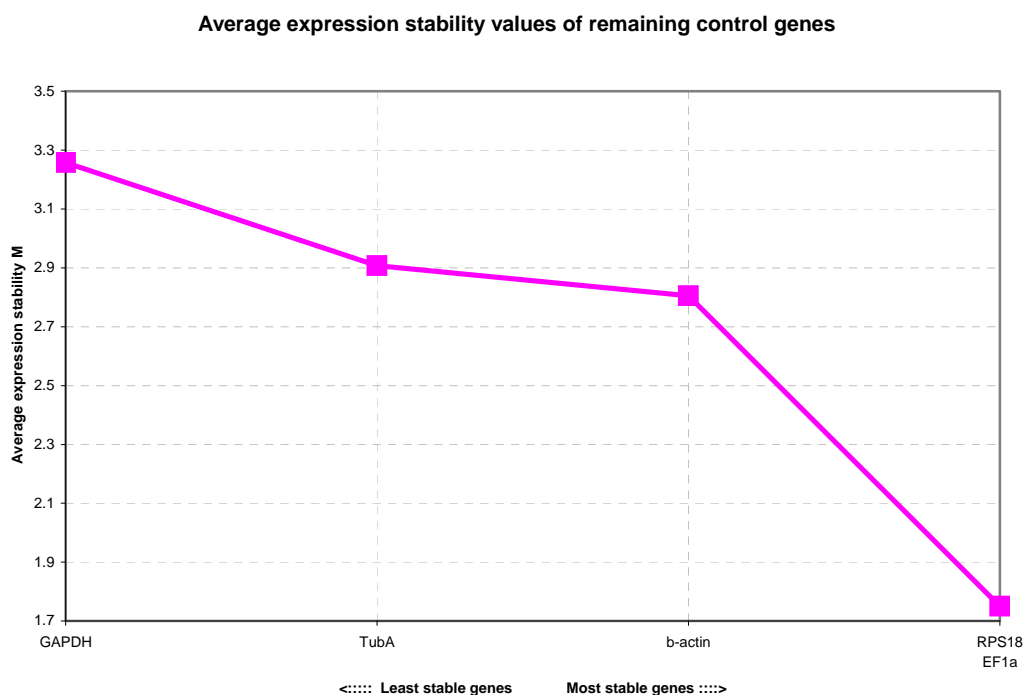
2.5 Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές της κανονικοποιημένης έκφρασης υποβλήθηκαν σε arcsine transformation και στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου και της δόσης της αυξητικής ορμόνης με two-way ANOVA

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γονίδια αναφοράς

Με τις μεθόδους που περιγράφηκαν στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» συγκρίθηκαν τα πέντε γονίδια αναφοράς (EF1a,b-actin, TubA , RPS18,GAPDH) και επιλέχθηκαν τα δύο καλύτερα : ο EF1a και το RPS18 (Σχήμα 3.1).



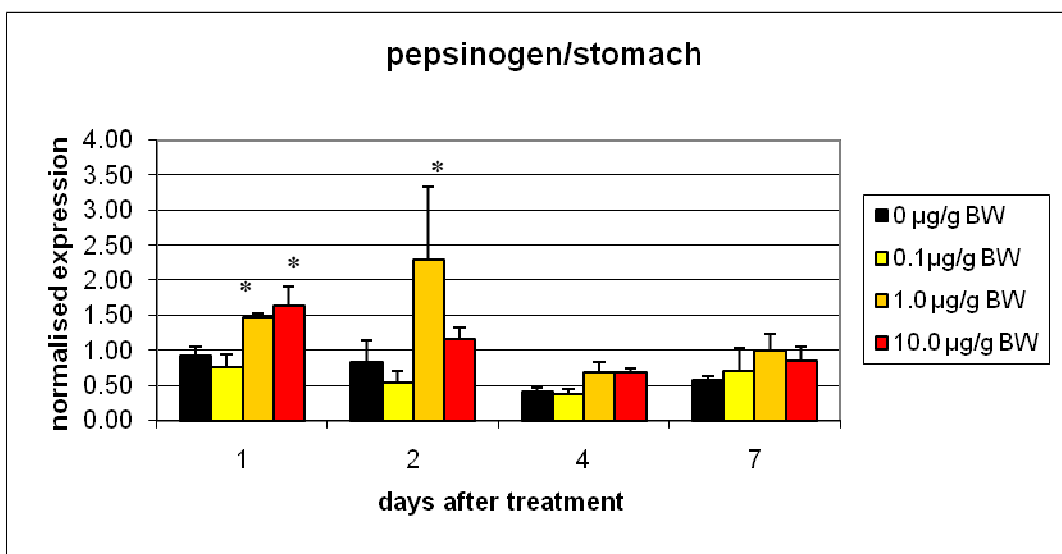
Σχήμα 3.1. Μέσες τιμές σταθερότητας (M) των γονιδίων αναφοράς που μελετήθηκαν

- *Έκφραση του πεψινογόνου στο στομάχι*

Η χορήγηση οGH είχε σημαντική επίδραση ($P=0,005$) στην έκφραση του πεψινογόνου στο στομάχι (Σχήμα 3.2). Τις ημέρες 1 και 2 μετά τη χορήγηση της ορμόνης, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντικά αυξημένη έκφραση στις ομάδες Β και Γ, στις οποίες χορηγήθηκε 1,0 και 10,0 μg οGH/g σωματικού βάρους. Καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα Α. Η έκφραση του πεψινογόνου δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά στην ομάδα Ο στις ημέρες δειγματοληψίας.

- Έκφραση των πρωτεασών στο ήπαρ

Η χορήγηση οGH είχε σημαντική επίδραση ($P<0,005$) στην έκφραση του χυμοθρυψινογόνου II (CHTRII) στο ήπαρ σε αντίθεση με την επίδραση στην έκφραση του χυμοθρυψινογόνου I (CHTRI) και του θρυψινογόνου II (TRPII). Τις ημέρες 2, 4 και 7 μετά τη χορήγηση της ορμόνης, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντικά αυξημένη έκφραση στις ομάδες A (0,1μg/g BW) και B (1.0μg/g BW) και τις ημέρες 1 και 7 στην ομάδα Γ (10.0μg/g BW) (Σχήμα 3.3). Η έκφραση του χυμοθρυψινογόνου II δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά στην ομάδα Ο στις ημέρες δειγματοληψίας.



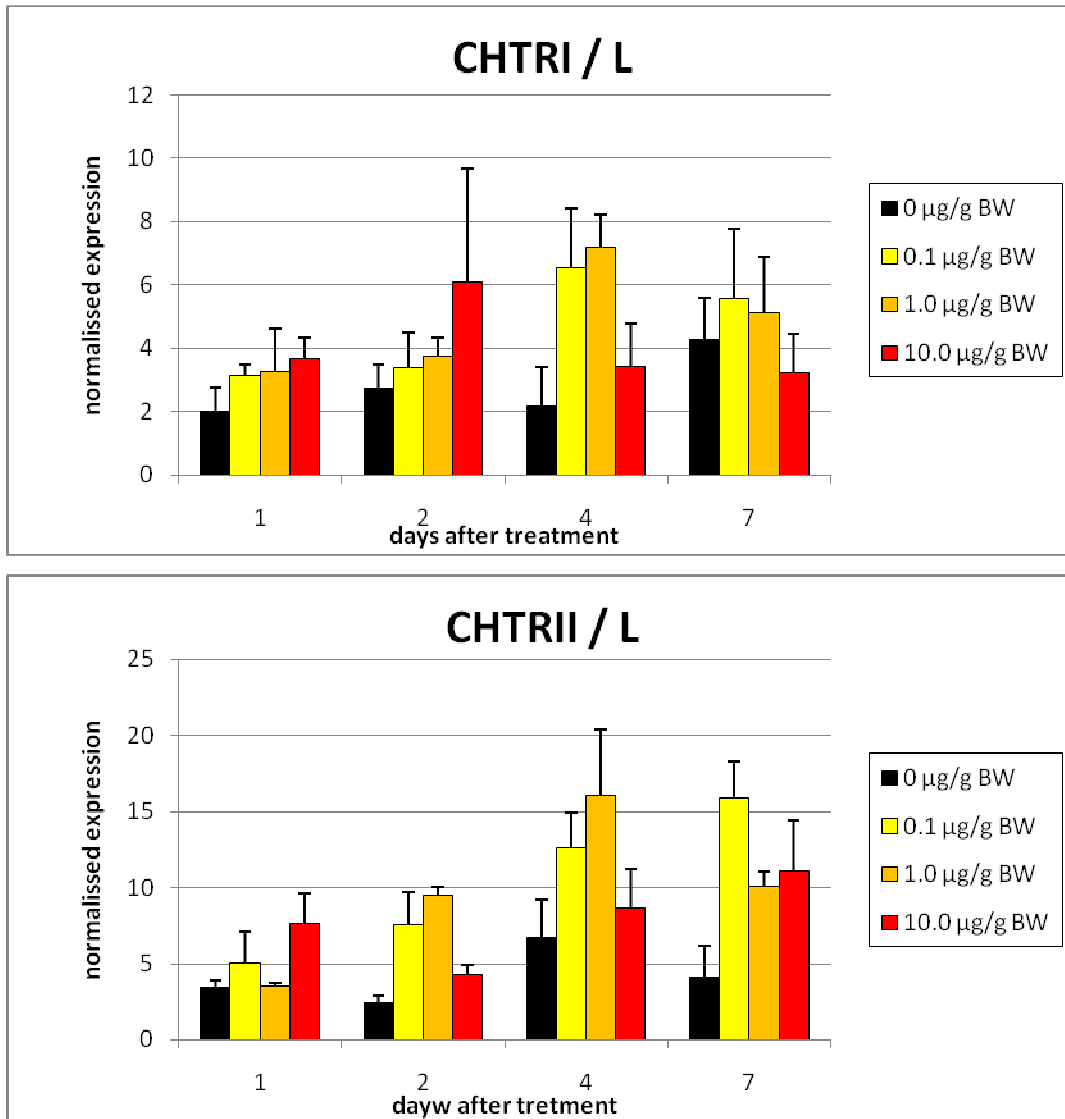
Σχήμα 3.2 Επίπεδα έκφρασης του πεψινογόνου στο στομάχι ατόμων τσιπούρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH. Η αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τη συγκεκριμένη ημέρα πειράματος σε σχέση με την ομάδα Ο ($P<0,05$).

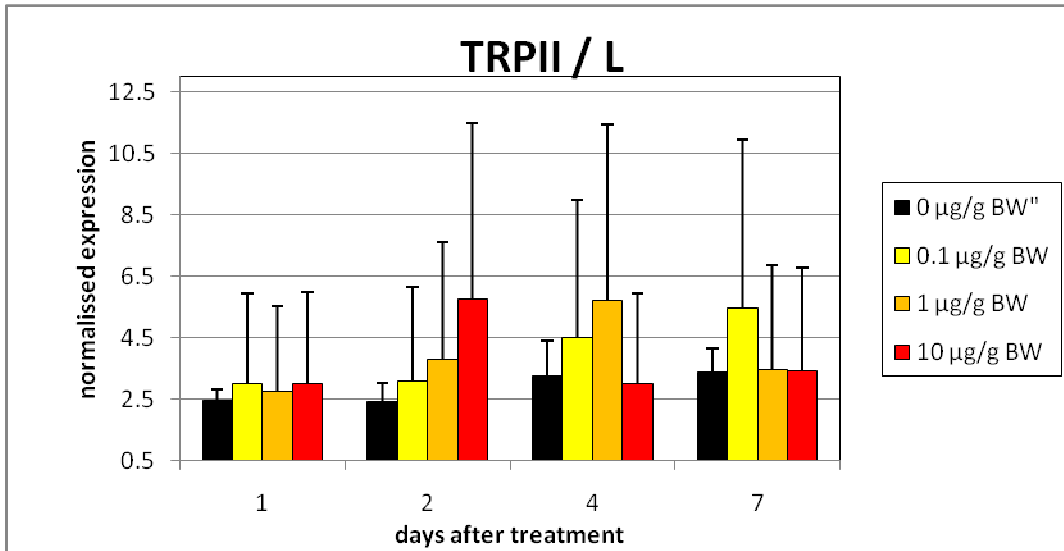
- Έκφραση των πρωτεασών στα πλωρικά τυφλά

Η χορήγηση οGH δεν είχε σημαντική επίδραση ($P>0,005$) στην έκφραση του χυμοθρυψινογόνου I (CHTRI), του χυμοθρυψινογόνου II (CHTRII) και του θρυψινογόνου II (TRPII) στα πλωρικά τυφλά (Σχήμα 3.4).

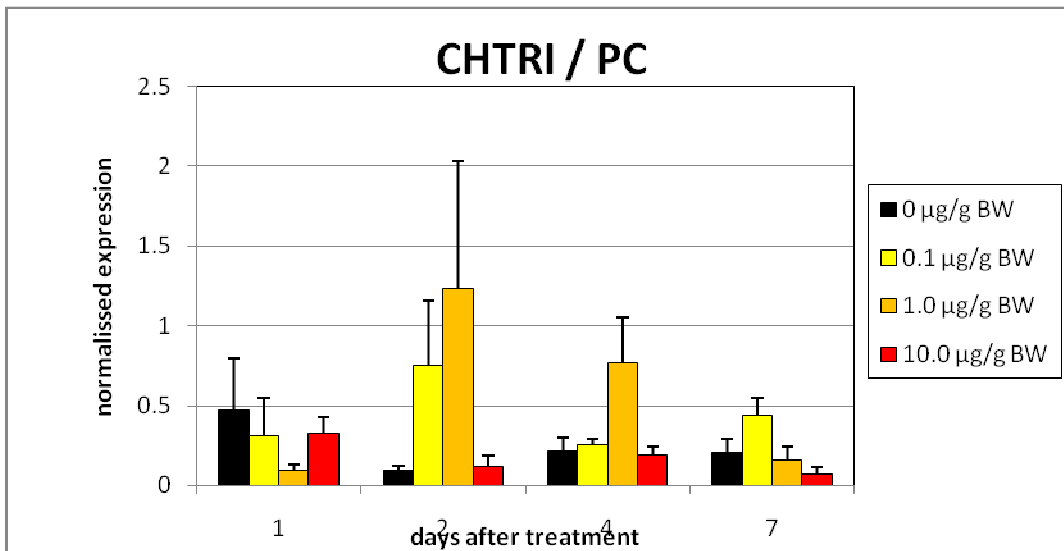
- Έκφραση των πρωτεασών στο οπίσθιο έντερο

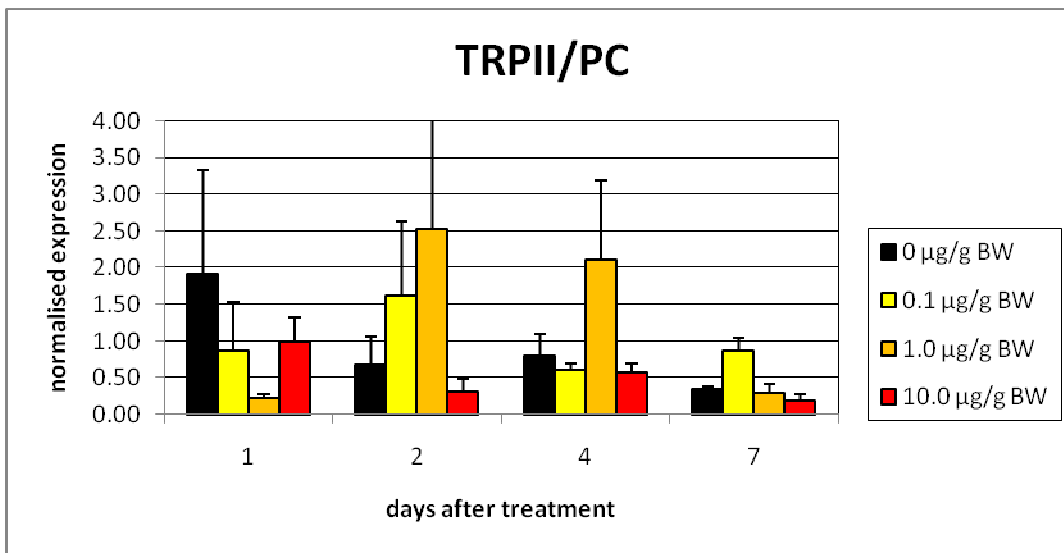
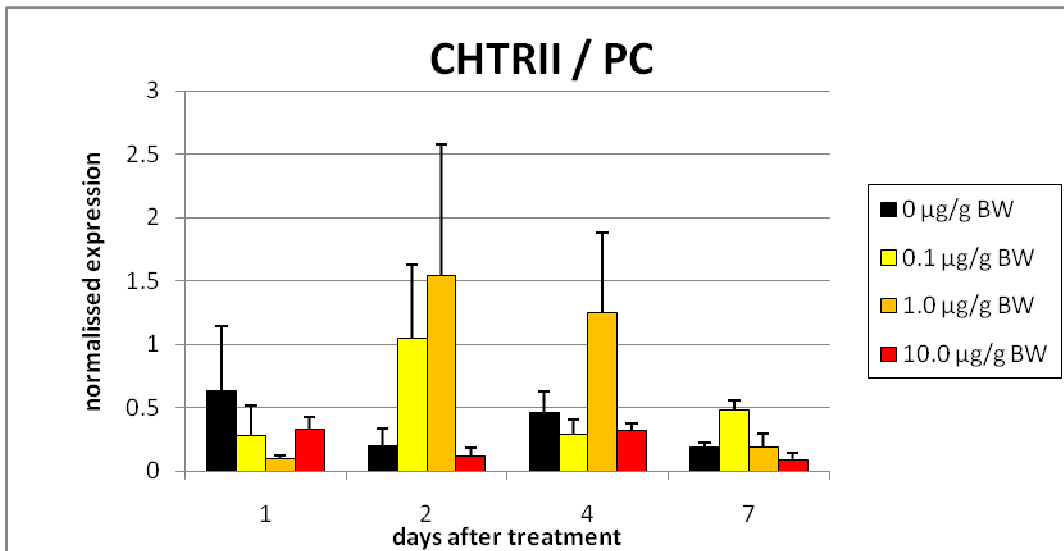
Η χορήγηση οGH δεν είχε σημαντική επίδραση ($P>0,005$) στην έκφραση του χυμοθρυψινογόνου I (CHTRI), του χυμοθρυψινογόνου II (CHTRII) και του θρυψινογόνου II (TRPII) στο οπίσθιο έντερο (Σχήμα 3.5).



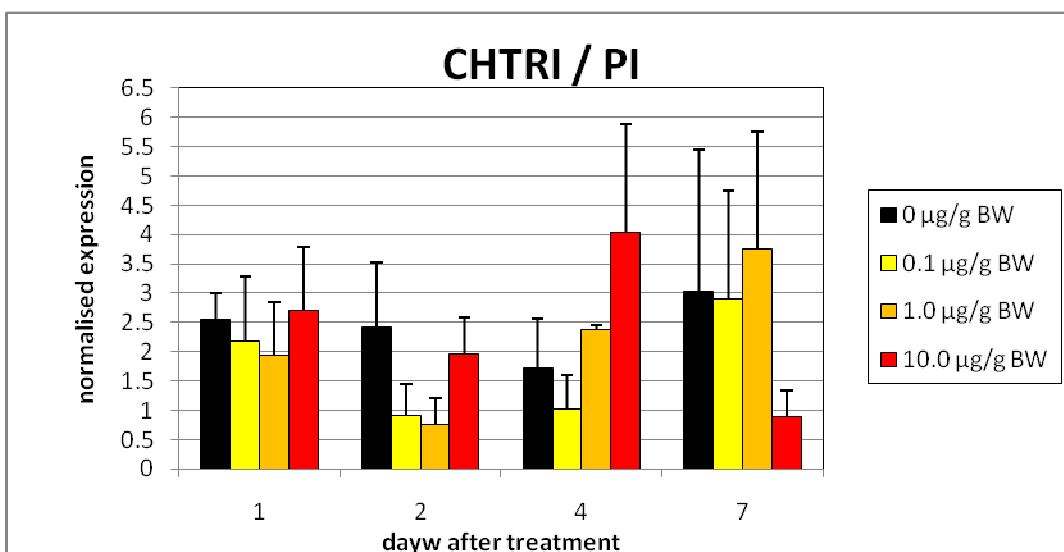


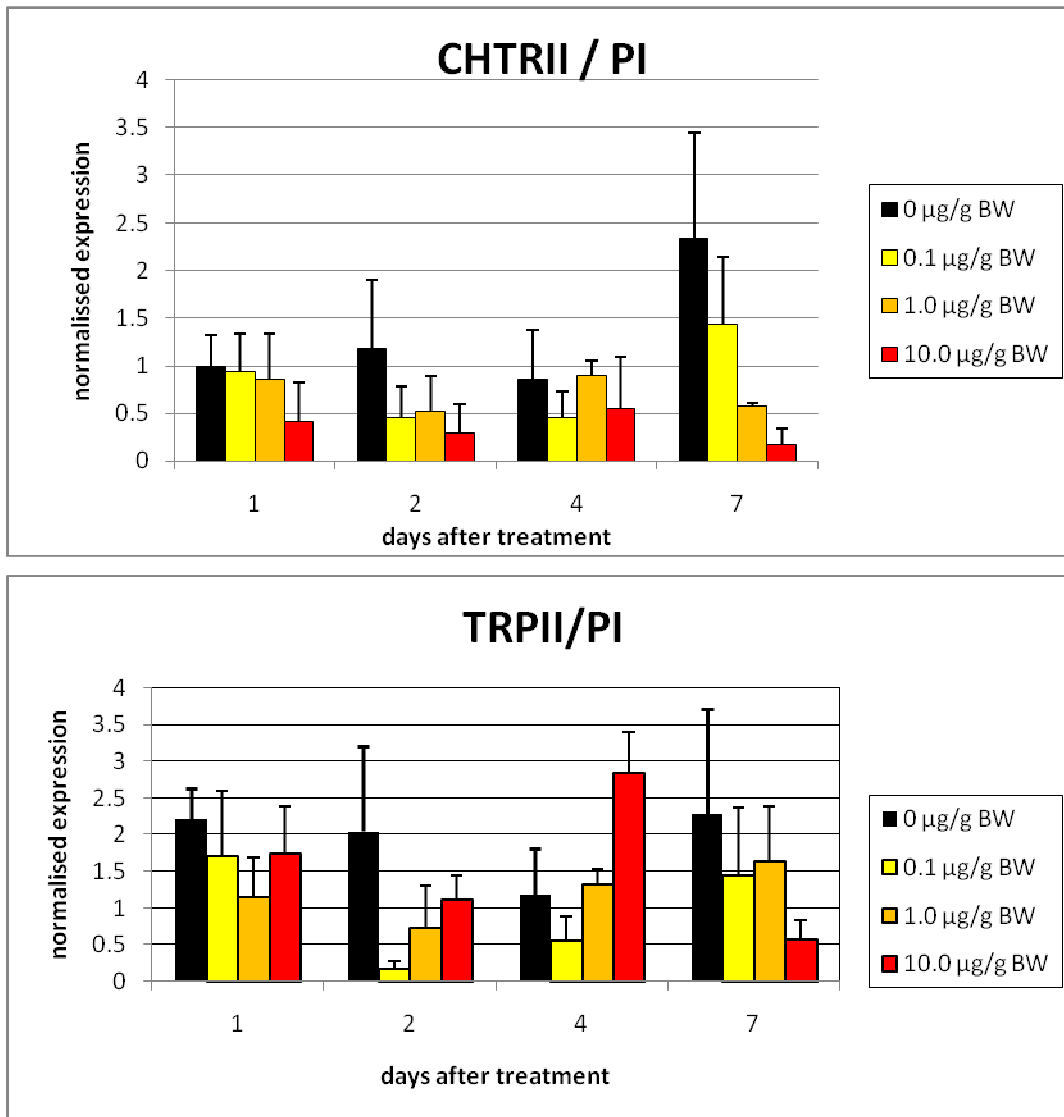
Σχήμα 3.3. Επίπεδα έκφρασης του χυμοθρυψινογόνου I (CHTRI) και II (CHTRII) και του θρυψινογόνου II (TRPII) στο ήπαρ ατόμων τσιπούρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH. Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τη συγκεκριμένη ημέρα πειράματος ($P < 0,05$).





Σχήμα 3.4. Επίπεδα έκφρασης του χυμοθρυψινογόνου I (CHTRI) και II (CHTRII) και του θρυψινογόνου II (TRPII) στα πλωρικά τυφλά άτομα τσιπούρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH.





Σχήμα 3.5. Επίπεδα έκφρασης του χυμοθρυψινογόνου I (CHTRI) και II (CHTRII) και του θρυψινογόνου II (TRPII) στο οπίσθιο έντερο ατόμων τσιπούρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH.

Διαφοροποίηση της έκφρασης των CHTRI, CHTRII και TRPII ανάμεσα στους ιστούς

Βάση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας και των παραπάνω σχεδιαγραμμάτων μπορούμε να παρατηρήσουμε την διαφορετική έκφραση των γονιδίων στόχων (CHTRI, CHTRII, TRPII) στους διαφορετικούς ιστούς. Το χυμοθρυψινογόνο I παρουσιάζει την μεγαλύτερη έκφραση στο ήπαρ, στη συνέχεια στο οπίσθιο έντερο, ενώ στα πλωρικά

τυφλα της τσιπούρας η έκφραση του είναι πολύ μικρή. Όσον αφορά το χυμοθρυψινογόνο II και σε αυτό η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται στο ήπαρ, ενώ η έκφραση του στο οπίσθιο έντερο και τα πυλωρικά τυφλά είναι σχεδόν ίδια, σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτή του ήπατος. Τέλος, η έκφραση του θρυψινογόνου II βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με αυτή του χυμοθρυψινογόνου II στους ιστούς που εξετάσαμε.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι διαφορετικές δόσεις χορηγούμενης οGH επηρέασαν σημαντικά την έκφραση των γονιδίων στόχων στο ήπαρ, κυρίως του χυμοθρυψινογόνου II καθώς και του πεψινογόνου στο στομάχι. Αντίθετα δεν επηρέασαν σημαντικά την έκφραση των γονιδίων στόχων στους υπόλοιπους ιστούς που μελετήσαμε. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την παρατήρηση των Muñoz-Cueto et al. (1996) ότι η ενδογενής αυξητική ορμόνη δεν προσδέεται στα ενδοηπατικά κύτταρα του εξωκρινούς παγκρέατος της τσιπούρας, όπου και παράγονται τα ζυμογόνα των πεπτικών πρωτεασών, υποδηλώνουν μια έμμεση επίδραση της οGH στην έκφραση των ζυμογόνων. Δεδομένου ότι το πάγκρεας στην τσιπούρα αποτελεί ένα έντονα διάχυτο όργανο (Cataldi et al., 1987; Muñoz-Cueto et al., 1996), η παρατηρούμενη επίδραση της αυξητικής ορμόνης στην παραγωγή των ζυμογόνων, αποκλειστικά στην ηπατική περιοχή, μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφορετικών ρυθμών μεταγωγής του σήματος για την έναρξη της μεταγραφής τους, μετά την εξάντληση των εκκρινόμενων ζυμογόνων από τα παγκρεατικά κύτταρα στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών (Kurokawa & Suzuki, 1995).

Ο χρόνος είχε σημαντική επίδραση μόνο στην έκφραση του πεψινογόνου στο στομάχι και του χυμοθρυψινογόνου II στο ήπαρ. Στην περίπτωση του πεψινογόνου η επίδραση εντοπίζεται τις ημέρες 1 και 2 μετά τη χορήγηση της οGH ενώ η έκφραση του χυμοθρυψινογόνου II στο ήπαρ εμφάνισε υψηλές τιμές ακόμα και 7 ημέρες μετά τη χορήγηση. Οι Sun & Farmanfarmaian (1992) υποστηρίζουν την ύπαρξη βραχυχρόνιων φυσιολογικών αντιδράσεων των οργανισμών στη χορήγηση εξωγενούς αυξητικής ορμόνης, ενώ οι Leedom et al. (2002) αναφέρουν ότι η χορήγηση αυξητικής ορμόνης σε διάλυμα NaCl δρα άπαξ και η επίδραση της εξαλείφεται εντός μερικών ωρών. Ακόμη, υποστηρίζουν ότι η εξάρτηση των αποτελεσμάτων από το χρόνο είναι σημαντικότερη της εξάρτησης από τη χορηγούμενη δόση αυξητικής ορμόνης, η οποία, παρόλα αυτά, δε φαίνεται να ενισχύει τα αυξητικά φαινόμενα σε δόσεις μεγαλύτερες των 5 μg/g σωματικού βάρους.

Τα επίπεδα έκφρασης των τριών ζυμογόνων που μελετήθηκαν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα επιμέρους εντερικά τμήματα.

Τα παρόντα αποτελέσματα υποδεικνύουν την ύπαρξη σχέσεων μεταξύ της πέψης των πρωτεϊνών και της κεντρικής ορμονικής ρύθμισης, ενώ, από όσο είμαστε σε θέση να

γνωρίζουμε, αυτή αποτελεί και την πρώτη αναφορά επίδρασης της αυξητικής ορμόνης στην έκφραση οποιουδήποτε πεπτικού ενζύμου. Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων θρυψίνης και χυμοθρυψίνης φαίνεται ότι πραγματοποιείται με διαφορετικό τρόπο και η έλλειψη άμεσης συσχέτισης της έκφρασης του χυμοθρυψινογόνου I με τις αντίστοιχες ενζυμικές δραστηριότητες κατά μήκος του εντέρου, ίσως μπορεί να αποδοθεί στα ενδιάμεσα στάδια μετα-μεταγραφικής, μεταφραστικής και αποθηκευτικής ρύθμισης στην έκκριση των ζυμογόνων, καθώς επίσης και στην έλλειψη υψηλής εξειδίκευσης των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των επιπέδων δραστηριότητας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J., Abellan, E., 1998.** Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiol. Biochem.* 19, 257-267.
2. **Bakke-McKellep, A.M., Nordrum, S., Krogdahl, A., Buddington, R.K., 2000.** Absorption of glucose, amino acids and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 22, 33-44.
3. **Buddington, R.K., Krogdahl, A., Bakke-McKellep, A.M., 1997.** The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiol. Scand.* 161, 67-80.
4. **Buddington, R.K., Krogdahl, A., 2004.** Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139, 261-271.
5. **Cataldi, E., Cataudella, S., Monaco, G., Rossi, A., Tancioni, L., 1987.** A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. *J. Fish Biol.* 30, 135-145.
6. **Chakrabarti, I., Gani, Md. A., Chaki, K.K., Sur, R., Misra, K.K., 1995.** Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 112, 167-177.
7. **Dabrowski, K., Dabrowska, H., 1981.** Digestion of protein by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) and absorption of amino acids within the alimentary tract. *Comp. Biochem. Physiol. A* 69, 99-111.
8. **Deguara, S., Jauncey, K., Agius, C., 2003.** Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *J. Fish Biol.* 62, 1033-1043.
9. **Elbal, M.T., Agulleiro, B., 1986.** A histochemical and ultrastructural study of the gut of *Sparus aurata* (Teleostei). *J. Submicrosc. Cytol.* 18, 335-347.
10. **Elbal, M.T., García Hernández, M.P., Lozano, M.T., Agulleiro, B., 2004.** Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* 234, 215-238.

11. **Ferraris, R.P., Ahearn, G.A., 1984.** Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol. A* 77, 397-413.
12. **Georgopoulou, U., Sire, M.F., Vernier, J.M., 1986.** Immunological demonstration of intestinal absorption and digestion of protein macromolecules in the trout, *Salmo gairdneri*. *Cell. Tissue Res.* 245, 387-395.
13. **Halver, J.E., 1989.** Fish nutrition. Academic Press Inc., San Diego, USA.
14. **Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A., 1999.** Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267-283.
15. **Kapoor, B.G., Smit, H., Verighina, I.A., 1975.** The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.* 13, 109-239.
16. **Kolkovski, S., 2001.** Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181-201.
17. **Kurokawa, T., Suzuki, T., 1995.** Structure of the exocrine pancreas of flounder (*Paralichthys olivaceus*): immunological localization of zymogen granules in the digestive tract using anti-trypsinogen antibody. *J. Fish Biol.* 46, 292-301.
18. **Leedom, T.A., Uchida, K., Yada, T., Richman, N.H.III, Byatt, J.C., Collier, R.J., Hirano, T., Grau, E.G., 2002.** Recombinant bovine growth hormone treatment of tilapia: growth response, metabolic clearance, receptor binding and immunoglobulin production. *Aquaculture* 207, 359-380.
19. **Moyle, P.B., Cech, J.J., 1982.** Fishes. An introduction to ichthyology. 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
20. **Munilla-Morán, R., Saborino-Rey, F.F., 1996a.** Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 113, 827-834.
21. **Munilla-Morán, R., Saborino-Rey, F.F., 1996b.** Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 113, 395-402.

22. **Muñoz-Cueto, J.A., Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Rodríguez, R.B., Sarasquete, C., 1996.** Autoradiographic localization of growth hormone binding sites in *Sparus aurata* tissues using a recombinant gilthead sea bream growth hormone. *Comp. Biochem. Physiol. C* 114, 17-22.
23. **Sarasquete, M.C., Polo, A., Gonzales de Canales, M.L., 1993.** A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L.. *Histochem. J.* 25, 430-437.
24. **Sarasquete, M.C., Polo, A., Yufera, M., 1995.** Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.. *Aquaculture* 130, 79-92.
25. **Srivastava, A.S., Kurokawa, T., Suzuki, T., 2002.** mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132A, 629-635.
26. **Stroband, H.W.J., Van der Veen, F.H., 1981.** Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *J. Exp. Zool.* 218, 149-156.
27. **Sun, L.Z., Farmanfarmanian, A., 1992.** Biphasic action of growth hormone on intestinal amino acid absorption in striped bass hybrids. *Comp. Biochem. Physiol.* 103A, 381-390.