



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΩΝ
(ΦΥΤΙΚΟ ΕΛΑΙΟ ΚΑΙ ΙΧΘΥΕΛΑΙΟ)
ΣΤΟ ΒΙΟΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΟΞΙΚΟΠΟΙΗΣΗ
ΤΟΥ ΟΞΟΛΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*SPARUS AURATA*)**

ΧΡΥΣΟΥΛΑ Α. ΦΡΑΓΚΟΥΛΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Κώτου Ευθυμία

Ερευνήτρια

Ινστιτούτο Υδατοκαλλιέργειας, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε

Αθήνα, 2012



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΥΔΡΟΒΙΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΩΝ
(ΦΥΤΙΚΟ ΕΛΑΙΟ ΚΑΙ ΙΧΘΥΕΛΑΙΟ)
ΣΤΟ ΒΙΟΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΤΟΞΙΚΟΠΟΙΗΣΗ
ΤΟΥ ΟΞΟΛΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*SPARUS AURATA*)**

ΧΡΥΣΟΥΛΑ Α. ΦΡΑΓΚΟΥΛΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κώτου Ευθυμία, Ερευνήτρια ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε

Αθανασοπούλου Φωτεινή, Καθηγήτρια Τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ

Τυρπένου Αθανάσιος, Κτηνίατρος

Αθήνα, 2012

ii

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αισθάνομαι βαθύτατα την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης και ιδιαίτερα:

- Την επιβλέπουσα Ερευνήτρια κ. Κώτου Ευθυμία για την αμέριστη συμπαράσταση, την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας, για τις εύστοχες υποδείξεις της καθώς και τον ενθουσιασμό και το σεβασμό, που μου εμφύσησε για τη φύση τόσο της συγκεκριμένης μελέτης όσο και του ευρύτερου πεδίου της επιστήμης μας.
- Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Αθανασοπούλου Φωτεινή και κ. Τυρπένου Αθανάσιο για τη βοήθεια στην ολοκλήρωση της εργασίας, μέσω των παρατηρήσεων και των διορθώσεων που έκαναν στο κείμενο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.
- Τέλος, την οικογένεια μου για την ηθική συμπαράσταση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	x
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ.....	5
1.2 ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ	10
1.3 ΟΞΟΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ	13
1.3.1 Δομή.....	13
1.3.2 Διαλυτότητα	13
1.3.3 Σύμπλοκα	14
1.3.4 Τρόπος δράσης	14
1.3.5 Φαρμακοκινητική	15
1.3.6 Μορφές	16
1.4 ΒΙΟΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	18
1.5 ΦΑΣΗ I	20
1.5.1 Κυτόχρωμα P450.....	21
1.6 ΦΑΣΗ II.....	32
1.6.1 S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST).....	33

1.6.2 Σουλφοτρανσφεράση.....	40
2. ΥΛΙΚΑ-ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	46
2.1 ΥΛΙΚΑ.....	47
2.2 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	47
3. ΜΕΘΟΔΟΙ	48
3.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	49
3.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΡΟΦΩΝ	49
3.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	51
3.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	52
3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	53
3.6 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΡΙΖΟΡΟΥΦΙΝΗΣ	55
3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ EROD	57
3.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ MROD	58
3.9 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ GST	59
3.10 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ SULT	61
3.11 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	63
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	64
4.1 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΑΙΘΥΛΑΣΗ ΤΗΣ 7 ΑΙΘΟΞΥΡΙΖΟΡΟΥΦΙΝΗΣ (EROD).....	65
4.2 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΜΕΘΥΛΑΣΗ ΤΗΣ 7 ΜΕΘΟΞΥΡΙΖΟΡΟΥΦΙΝΗΣ (MROD).....	67
4.3 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ S-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GST).....	70
4.4 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΣΟΥΛΦΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ (SULT)	72

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	74
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	87
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	90

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Μέθοδοι προσδιορισμού της υποοικογένειας CYP1A στα ψάρια28

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Σύνθεση των τροφών Α και Β (%)50

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Αποτελέσματα από την επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου EROD σε τσιπούρες που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.....65

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Αποτελέσματα από την επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου MROD σε τσιπούρες που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.....67

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Αποτελέσματα από την επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου GST σε τσιπούρες που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.....70

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Αποτελέσματα από την επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου SULT σε τσιπούρες που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.....72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

ΓΡΑΦΗΜΑ 1: Ολική ποσότητα του ιχθυελαίου που χρησιμοποιείται στις υδατοκαλλιέργειες και η κατανομή στα θαλάσσια είδη.	10
ΓΡΑΦΗΜΑ 2: Παγκόσμια παραγωγή ιχθυάλευρου και ιχθυελαίου από το 1963-2009 σε χιλιάδες τόνους.	11
ΓΡΑΦΗΜΑ 3: Πρότυπη καμπύλη διαλυμάτων αλβουμίνης η οποία απεικονίζει τη σχέση συγκέντρωσης-απορρόφησης.....	53
ΓΡΑΦΗΜΑ 4: Πρότυπη καμπύλη διαλυμάτων ριζορουφίνης η οποία απεικονίζει τη σχέση συγκέντρωσης-φθορισμού.	56
ΓΡΑΦΗΜΑ 5: Επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου EROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους <i>Sparus aurata</i> που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.	65
ΓΡΑΦΗΜΑ 6: Επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου MROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους <i>Sparus aurata</i> που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.	67
ΓΡΑΦΗΜΑ 7: Επίδραση του ιχθυελαίου (τροφή Α) στην ενεργότητα του ενζύμου MROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους <i>Sparus aurata</i> που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής..	68
ΓΡΑΦΗΜΑ 8: Επίδραση των φυτικών ελαίων (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου MROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους <i>Sparus aurata</i> που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.	68
ΓΡΑΦΗΜΑ 9: Επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου GST (nmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους <i>Sparus aurata</i> που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.	70

ΓΡΑΦΗΜΑ 10: Επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου SULT (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.....72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1: Οδός σύνθεσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλύσου.....	7
ΕΙΚΟΝΑ 2: Δομή οξολινικού οξέος.....	13
ΕΙΚΟΝΑ 3: Απλοποιημένη παρουσίαση της πορείας των εξωγενών χημικών ουσιών μέσα στο ηπατικό κύτταρο.....	19
ΕΙΚΟΝΑ 4: Καταλυτικός κύκλος του κυτοχρώματος P450.....	22
ΕΙΚΟΝΑ 5: Σχέση οικογένειας CYP1 μεταξύ ψαριών, αμφίβιων, πτηνών και θηλαστικών.....	24
ΕΙΚΟΝΑ 6: Αντίδραση απαιθυλίωσης του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνη (ethoxyresorufin) μέσω των ενζύμων P450 1A1.....	29
ΕΙΚΟΝΑ 7: Αντίδραση απομεθυλίωσης του υποστρώματος 7-μεθοξυριζορουφίνη (methoxyresorufin).	29
ΕΙΚΟΝΑ 8: Κρυσταλλογραφική δομή του ενζύμου S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης	33
ΕΙΚΟΝΑ 9: Δομή γλουταθειόνης (GSH).....	34
ΕΙΚΟΝΑ 10: Αντίδραση σύνδεσης της αναχθείσας μορφής της γλουταθειόνης (GSH) με το υπόστρωμα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζένιο (CDNB).	39
ΕΙΚΟΝΑ 11: Ανθρώπινη σουλφοτρανσφεράση (ισομορφή SULT1B1).....	40
ΕΙΚΟΝΑ 12: Αντίδραση θείωσης που καταλύεται από τις σουλφοτρανσφεράσες	42

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AH	υδροξυλάση της ανιλίνης
AHH	υδροξυλάση των αρωματικών υδρογονανθράκων
AhR	υποδοχέας αρωματικών υδρογονανθράκων
ALDH	αλδεϋδική αφυδρογονάση
ARA	αραχιδονικό οξύ
ARNT	Ah υποδοχέας πυρηνικός μεταθέτης
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
AUC	περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης/χρόνου
BNF	β-ναφθοφλαβίνη
cDNA	συμπληρωματικό DNA
CDNB	1-γλωρο-2,4-δινιτροβενζένιο
CYP	κυτόχρωμα P450
Cyt P450s	ισοένζυμα κυτοχρώματος P450
DCNB	3,4-διγλωρονιτροβενζένιο
DHA	εικοσιδυα-εξα-εν-οϊκό οξύ
DMN-N demethylase	διμεθυλάση της νιτροζοδιμεθυλαμίνης
DMSO	διμεθυλσουλφοξείδιο
DREs	στοιχεία που ανταποκρίνονται στις διοξίνες
DTT	διθειοθρεϊτόλη
EA	αιθακρυνικό οξύ
EDTA	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ELISA	ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμή
EMDM	διμεθυλάση της αιθυλομορφίνης

EPA	εικοσα-πεντα-εν-οϊκό οξύ
EROD	διαθυλάση της 7-αιθοξυριζορουφίνης
GSH	γλουταθειόνη
GST	S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
HSP90	πρωτεΐνη θερμικού σοκ μοριακού βάρους 90 kDa
HUFA	πολυακόρεστα λιπαρά οξέα πολύ μακριάς αλύσου
IFFO	Διεθνής Οργάνωση Ιχθυάλευρου και Ιχθυελαίου
KCl	χλωριούχο κάλιο
MBC	ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση
MFO	ένζυμα του συστήματος βιομετασχηματισμού και αποτοξικοποίησης
MIC	ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
MROD	διμεθυλάση της 7-μεθοξυριζορουφίνης
NaCl	χλωριούχο νάτριο
NADPH	φωσφορικό νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (αναχθείσα μορφή)
NBC	νιτροβενζυλοχλωρίδιο
OA	οξολινικό οξύ
OTC	οξυτετρακυκλίνη
PAH	πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
PAP	3'-φωσφορική 5'-φωσφοαδενοσίνη
PAPS	3'-φωσφορική 5'-φωσφοθειϊκή αδενοσίνη
PCBs	πολυχλωριωμένα διφαινύλια
PMSF	φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο
PUFA	πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

RT-PCR	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - αντίστροφης τρανσκριπτάσης
SULT	σουλφοτρανσφεράση
Tris	(υδροξυλο-μεθυλο) αμινομεθάνιο
UDPGT	UDPγλυκουρονυλ-τρανσφεράση

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση της μερικής αντικατάστασης του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια στο βιομετασχηματισμό και την αποτοξικοποίηση του οξολινικού οξέος στην τσιπούρα (*Sparus aurata*). Τα ψάρια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με το είδος της τροφής που τους χορηγήθηκε. Στην ομάδα A χορηγήθηκε τροφή που περιελάμβανε ιχθυέλαιο (τροφή A) ενώ στην ομάδα B χορηγήθηκε τροφή στην οποία είχε αντικατασταθεί το 66% του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων κραμβέλαιου, λινέλαιου και φοινικέλαιου (τροφή B). Στα ψάρια κάθε ομάδας χορηγήθηκε με την ιχθυοτροφή το οξολινικό οξύ (OA) στη δόση των 30 mg/kg ψαριού/ημέρα για 7 ημέρες. Το ήπαρ των ψαριών συλλέχθηκε σε τρεις διαφορετικές στιγμές: μία ημέρα πριν την έναρξη της χορήγησης του OA (ημέρα 0), μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης (ημέρα 5) και μια ημέρα μετά το τέλος της χορήγησής του (ημέρα 8) και υπολογίστηκε η ενεργότητα των ενζύμων βιομετασχηματισμού της φάσης I [διαιθυλάση της 7-αιθοξυριζορουφίνης (EROD) και διμεθυλάση της 7-μεθοξυριζορουφίνης (MROD)] και της φάσης II [S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και σουλφοτρανσφεράση (SULT)].

Στα ψάρια που έλαβαν την τροφή A η ενεργότητα του ενζύμου EROD αυξήθηκε μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης του OA ενώ επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα μία ημέρα μετά τη διακοπή της χορήγησής του, σε αντίθεση με τα ένζυμα MROD, GST και SULT, των οποίων η ενεργότητα παρουσίασε μείωση η οποία διατηρήθηκε και μετά τη διακοπή της χορήγησης του OA. Όταν στην τροφή το ιχθυέλαιο αντικαταστάθηκε από φυτικά έλαια δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή της ενεργότητας των ενζύμων EROD και MROD μετά από τη χορήγηση του OA. Ήταν όμως σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη των ψαριών της άλλης ομάδας. Μείωση της ενεργότητας των ενζύμων GST και SULT εκδηλώθηκε στο ήπαρ των ψαριών της ομάδας B κατά τη διάρκεια της χορήγησης του OA, η οποία όμως επανήλθε στα αρχικά επίπεδα μετά τη διακοπή της χορήγησής του στο ένζυμο SULT ή τα ξεπέρασε στο ένζυμο GST. Συμπερασματικά, η χρησιμοποίηση των φυτικών ελαίων στην τροφή της τσιπούρας φάνηκε να επηρεάζει το βιομετασχηματισμό του OA, γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν αυτά επιλέγονται ως εναλλακτικές πηγές ελαίων στην εκτροφή της.

Λέξεις-κλειδιά: *Sparus aurata*, ιχθυέλαιο, φυτικά έλαια, οξολινικό οξύ, ένζυμα βιομετασχηματισμού και αποτοξικοποίησης.

ABSTRACT

The effect of fish oil partial substitution by vegetable oils on the biotransformation and detoxification of oxolinic acid (OA) was investigated in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Fish were divided into two groups according to the food type they consumed. Diet A contained fish oil while in diet B fish oil was partially replaced (66%) by a mixture of vegetable oils such as rapeseed, linseed and palm oil. Fish of each group were received a dose of 30 mg OA/kg/day for 7 days. Liver samples were taken on the day 0 (one day before OA administration), 5 (after OA administration for 4 days) and 8 (one day post treatment). Biotransformation enzyme activities, including 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), 7-methoxyresorufin-O-demethylase (MROD), glutathione S-transferase (GST) and sulfotransferase (SULT), were evaluated.

In fish receiving diet A EROD activity increased after OA administration for 4 days and returned to the natural levels after the end of the treatment. On the contrary, MROD, GST and SULT activities were decreased during and after the end of the treatment. Fish fed diet B did not exhibit a significant change on EROD and MROD activities after OA administration. However, enzyme activities were significantly lower in comparison with the other group. Hepatic GST and SULT activities were decreased in fish fed diet B after receiving OA for 4 days but came back to initial levels post treatment (SULT) or overcame these (GST). The results of the present study indicated that fish oil partial substitution (66%) by vegetable oils in the diet of gilthead sea bream can affect the biotransformation of OA and this evidence should be taken into account when vegetable oils are selected as an alternative lipid source.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ

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

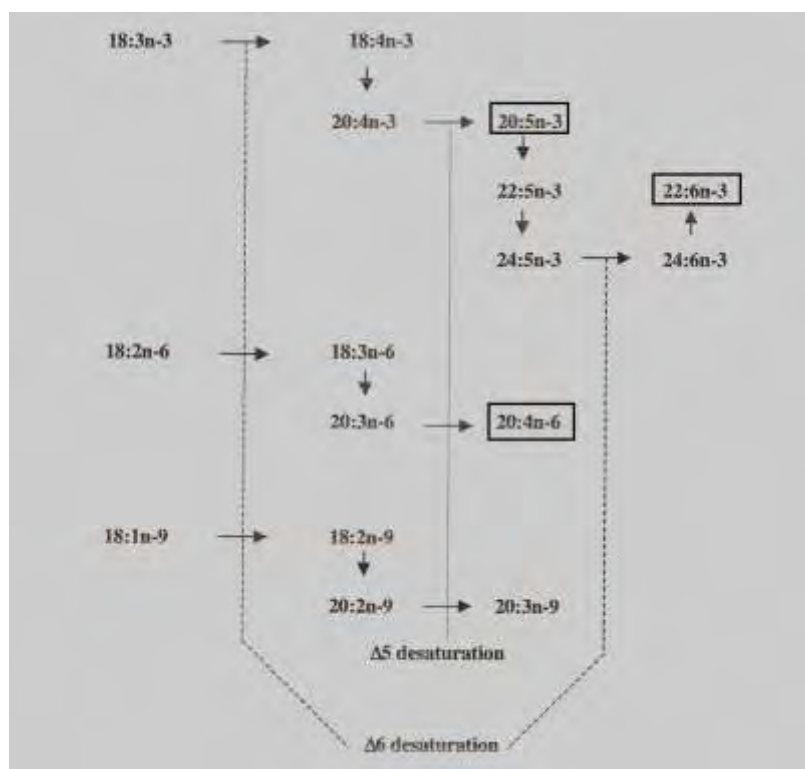
Εφόσον οι πρωτεΐνες είναι από τα σημαντικότερα συστατικά για την ανάπτυξη και τη λήψη ενέργειας, η αναλογία πρωτεϊνών που πέπτονται/ενέργεια που λαμβάνεται θα καθορίσει τη χρήση των πρωτεϊνών ως πηγή ενέργειας ή πηγή ανάπτυξης. Αν για παράδειγμα, η αναλογία αυτή είναι μικρή τότε ο βαθμός ανάπτυξης θα μειώνεται καθώς η πλειοψηφία των πρωτεϊνών θα χρησιμοποιείται για να καλύψει τις ενεργειακές απαιτήσεις και μόνο ένα μικρό μέρος θα χρησιμοποιείται για ανάπτυξη. Επειδή οι πρωτεΐνες αποτελούν το μέρος της τροφής με το μεγαλύτερο κόστος, η επιδίωξη των παραγωγών ιχθυοτροφών είναι να αυξήσουν την ανάπτυξη μειώνοντας τις πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας (Morrow, 2003).

Η παραπάνω αναλογία μπορεί να βελτιωθεί με την παροχή ενέργειας μέσω άλλων συστατικών, όπως είναι τα λιπίδια, μια από τις πιο κοινές πηγές ενέργειας. Έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνοντας τα επίπεδα των λιπιδίων καλύπτονται οι ενεργειακές απαιτήσεις ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνονται οι πρωτεΐνες οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη των ψαριών. Αν και έχουν αναφερθεί πολλές διακυμάνσεις σχετικά με την καλύτερη αναλογία τους, πιθανολογείται ότι αυτές οφείλονται στις διαφορές που υπάρχουν ανάλογα με το είδος, το γένος, την ηλικία και τις συνθήκες ανάπτυξης (Morrow, 2003).

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

Τα λιπίδια των ψαριών των αλμυρών υδάτων είναι πλούσια σε μια μεγάλη ποικιλία κορεσμένων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων τα οποία προκύπτουν από *de novo* σύνθεση, κάτι που δε συμβαίνει με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που πρέπει να χορηγηθούν μέσω της τροφής. Από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (PUFA) το εικοσα-πεντα-εν-οϊκό οξύ (EPA 20:5 ω-3), το εικοσιδυα-εξα-εν-οϊκό οξύ (DHA 22:6 ω-3) και το αραχιδονικό οξύ (ARA 20:4 ω-6) επιτελούν σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες των ψαριών, όπως και των περισσότερων σπονδυλωτών. Τα ψάρια του γλυκού νερού διαθέτουν τα ένζυμα Δ₅ και Δ₆ δεσατουράσες και μπορούν να συνθέσουν τα λιπαρά αυτά οξέα από τις πρόδρομες ουσίες (λινολεϊκό και λινολενικό οξύ), εφόσον αυτές υπάρχουν στην τροφή τους (εικ.1). Αντίθετα, στα ψάρια του θαλασσινού νερού η δραστηριότητα αυτή είναι πολύ περιορισμένη με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη

η ύπαρξη των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλύσου στην τροφή τους (Izquierdo, 2005).



Εικόνα 1: Οδός σύνθεσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλύσου. Τα λιπαρά οξέα 20:5n-3, 22:6n-3 και 20:4n-6 είναι απαραίτητα για τα ψάρια των θαλασσιών υδάτων. Δ5/Δ6 desaturation: διαδικασία αποκορεσμού μέσω των ενζύμων Δ₅/Δ₆ δεσατουράσες (Sargent *et al.*, 2002).

Οι απαιτήσεις των ψαριών των θαλασσιών υδάτων σε απαραίτητα λιπαρά οξέα εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι το είδος των ψαριών, το μέγεθος και η ηλικία τους, η θερμοκρασία, η αλατότητα και η φωτοπερίοδος (Izquierdo, 2005). Από έρευνες που έχουν γίνει σε γεννήτορες τσιπούρας (Fernández-Palacios *et al.*, 1995) βρέθηκε ότι για να εξασφαλιστεί η παραγωγή καλής ποιότητας αυγών θα πρέπει οι απαιτήσεις για τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα πολύ μακρίας αλύσου (HUFA) να είναι περίπου 1,5-1,6% σε ξηρά ουσία. Τα υψηλότερα ποσοστά μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς την ποιότητα των αυγών ενώ ένα ποσοστό μεγαλύτερο από 2,2% θα μπορούσε να έχει ευεργετικά αποτελέσματα όταν η α-τοκοφερόλη της τροφής αυξηθεί από 125 σε 190 mg/kg.

Αρκετοί συγγραφείς αναφέρουν ότι οι απαιτήσεις σε απαραίτητα λιπαρά οξέα (ω -3 HUFA) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των νυμφών της τσιπούρας είναι 1,5%, όταν οι νύμφες τρέφονται με ζωντανά θηράματα ή μικροδίαιτες και ανεξάρτητα από το επίπεδο των λιπών. Υψηλότερες είναι οι απαιτήσεις όταν το EPA είναι κατά 2-3 φορές περισσότερο από το DHA λόγω του υψηλού ποσοστού ενσωμάτωσης του πρώτου στα πολικά λιπίδια των προνυμφών και την παράλληλη μετατόπιση του δεύτερου από αυτά. Παρόλα αυτά, η αύξηση των ω -3 HUFA μέχρι το 8%, με διατήρηση της αναλογίας DHA/EPA στο 1,7, μπορεί να βελτιώσει την ανάπτυξη και την επιβίωση των προνυμφών (Izquierdo, 2005).

Στα νεαρά άτομα τσιπούρας το επίπεδο των ω -3 HUFA θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 1,5-1,8% σε τροφές με περιεκτικότητα λιπιδίων μεταξύ 12-15% με σκοπό να επιτευχθεί η βέλτιστη ανάπτυξη και αντίσταση στο στρες. Λαμβάνοντας υπόψη όλη την περίοδο ανάπτυξης και τα υψηλά επίπεδα λιπών στις εμπορικές δίαιτες, ένα ποσοστό μεγαλύτερο από 2,5% επί της ξηράς ουσίας είναι αυτό που συστήνεται για τα νεαρά άτομα τσιπούρας (Izquierdo, 2005).

Για να εξασφαλιστεί η άριστη ανάπτυξη των ψαριών ιδιαίτερη σημασία θα πρέπει να δοθεί και στη σχέση μεταξύ των απαραίτητων λιπαρών οξέων. Η βέλτιστη αναλογία DHA/EPA για την τσιπούρα θα πρέπει να είναι περίπου 1,2. Επίσης, για επίπεδα αραχιδονικού οξέος μεγαλύτερα από 0,5%, η τιμή της σχέσης (DHA+EPA+ARA)*DHA/EPA/ARA θα πρέπει να είναι περίπου 50 (Izquierdo, 2005).

Οι διατροφικές απαιτήσεις των ψαριών σε υδατάνθρακες ποικίλλουν μεταξύ των ειδών. Η ενσωμάτωσή τους στην τροφή εξασφαλίζει μέρος της απαιτούμενης ενέργειας με αποτέλεσμα να μπορούν να αξιοποιηθούν οι πρωτεΐνες για την ανάπτυξη των ψαριών. Ωστόσο, η απουσία τους από την τροφή αυξάνει τον καταβολισμό άλλων συστατικών, όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, προκειμένου να ληφθεί η απαιτούμενη ενέργεια (Morrow, 2003).

Αν και οι βιταμίνες και τα ανόργανα στοιχεία δε χρησιμεύουν ως πηγές ενέργειας, η παρουσία τους στην τροφή είναι απαραίτητη με σκοπό τη φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών. Οι βιταμίνες είναι οργανικά στοιχεία, τα οποία χρειάζεται ο οργανισμός σε πολύ μικρές ποσότητες. Χρησιμεύουν στη φυσιολογική ανάπτυξη, αναπαραγωγή και

υγεία. Οι βιταμίνες παίζουν το ρόλο συνενζύμου ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις η λειτουργία τους είναι ανεξάρτητη από τα ένζυμα, όπως στην περίπτωση του φολικού οξέος το οποίο συμμετέχει στο σχηματισμό των φυσιολογικών αιμοκυττάρων. Η έλλειψή τους προκαλεί συμπτώματα, όπως είναι μειωμένη ανάπτυξη, αιμορραγίες, βλάβες στους ιστούς, ατροφία, δυσκολία συντονισμού και ισορροπίας, οφθαλμικές βλάβες κ.α. Τα ανόργανα στοιχεία είναι το ασβέστιο, μαγνήσιο, νάτριο, κάλιο, σίδηρος, ψευδάργυρος, χαλκός, σελήνιο και προσλαμβάνονται από τα ψάρια μέσω της τροφής, αλλά και από το εξωτερικό τους περιβάλλον. Τα στοιχεία αυτά είναι απαραίτητα για τη δόμηση του σκελετού τους, τη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας, την ωσμωρρύθμιση ενώ συμμετέχουν και στη σύνθεση των ορμονών και των ενζύμων (Morrow, 2003).

1.2 ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

Το 2006, η χρήση του ιχθυάλευρου και του ιχθυελαίου στις υδατοκαλλιέργειες αντιπροσώπευε το 57% και 87% της συνολικής παραγωγής τους, αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, η χρησιμοποίησή τους στη διατροφή των ψαριών διαφέρει ανάλογα με το είδος του ψαριού. Από τα 3 εκατομμύρια τόνους ιχθυάλευρου και 800.000 τόνους ιχθυελαίου οι μεγαλύτερες ποσότητες χρησιμοποιούνται για τη διατροφή των σολομοειδών (γράφημα 1) (Aquamax, 2008).

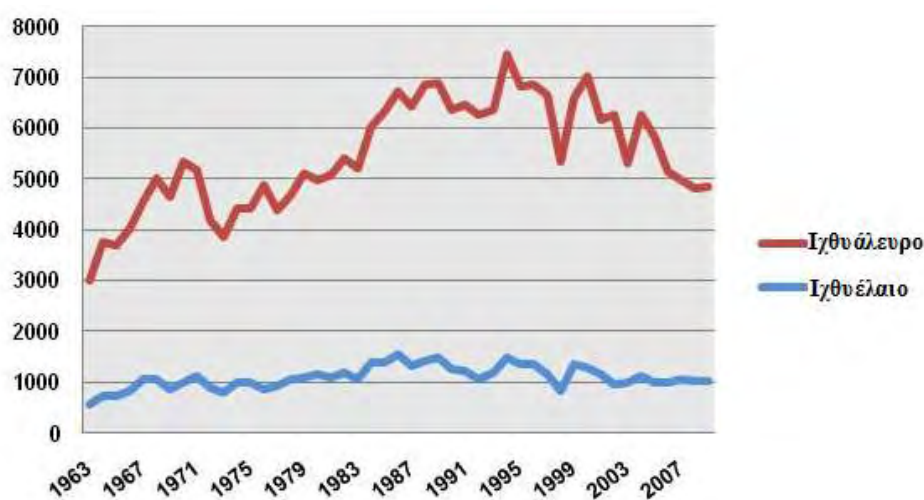


Γράφημα 1: Ολική ποσότητα του ιχθυελαίου που χρησιμοποιείται στις υδατοκαλλιέργειες και η κατανομή στα θαλάσσια είδη (Aquamax, 2008).

Σύμφωνα με στοιχεία της IFFO (Διεθνής Οργάνωση Ιχθυάλευρου και Ιχθυελαίου) εκτιμάται ότι το 2009 η παγκόσμια παραγωγή ιχθυελαίου ήταν 1,1 εκατομμύρια τόνοι και από το 81% που χρησιμοποιήθηκε στις υδατοκαλλιέργειες, το 68% χρησιμοποιήθηκε στη διατροφή των σολομοειδών (International Fishmeal and Fish Oil Organisation, 2011).

Ένα σημαντικό πρόβλημα που επηρεάζει τις υδατοκαλλιέργειες είναι η διαθεσιμότητα της τροφής. Κάτω από τις εντατικές συνθήκες εκτροφής, που επικρατούν στην Ευρώπη, το ιχθυάλευρο και το ιχθυέλαιο είναι τα πιο συνηθισμένα συστατικά των τροφών τα οποία προμηθεύουν τον οργανισμό με απαραίτητες ουσίες (αμινοξέα, λιπαρά οξέα, μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία) για την ανάπτυξη, υγεία, αναπαραγωγή και τις φυσιολογικές λειτουργίες των εκτρεφόμενων ψαριών. Η γρήγορη όμως ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει οδηγήσει σε αύξηση των απαιτήσεων σε ιχθυέλαιο και σε άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται στις τροφές (Aquamax, 2008).

Ωστόσο, η παραγωγή του ιχθυελαίου παραμένει σταθερή, όπως φαίνεται και στο γράφημα 2.



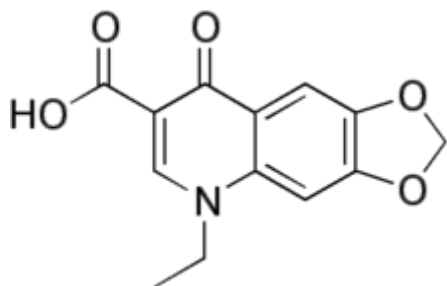
Γράφημα 2: Παγκόσμια παραγωγή ιχθυάλευρου και ιχθυελαίου από το 1963-2009 σε χιλιάδες τόνους (International Fishmeal and Fish Oil Organisation, 2011).

Έτσι, δημιουργήθηκε η ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών πηγών ελαίων για τη διατροφή των ψαριών. Μεγαλύτερη όμως καθίσταται η ανάγκη για τα θαλασσινά ψάρια, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να συνθέσουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου-PUFA (C20 και C22), με αποτέλεσμα να πρέπει να τα λαμβάνουν με την τροφή τους μέσω του ιχθυελαίου. Κατά κύριο λόγο, τα ψάρια του θαλασσινού νερού τρέφονται με δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε λίπη που περιέχουν λιπαρά οξέα τα οποία είναι απαραίτητα για αυτά τα είδη, όπως είναι το εικοσα-πεντα-εν-οϊκό οξύ, το εικοσιδω-εξα-εν-οϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ. Τα μόνα έλαια που μπορούν να αντικαταστήσουν τα ιχθυέλαια στις τροφές των ψαριών του θαλασσινού νερού είναι τα φυτικά έλαια, τα οποία είναι μεν πλούσια σε C18 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αλλά δεν περιέχουν τα παραπάνω απαραίτητα λιπαρά οξέα. Έρευνες σε ψάρια, όπως του είδους *Seriola* sp., *Psetta maxima*, *Dicentrarchus labrax*, *Diplodus puntazzo*, *Pagrus auratus* και *Sparus aurata*, έχουν δείξει ότι είναι δυνατή η μερική αντικατάσταση των ιχθυελαίων από τα φυτικά έλαια χωρίς να υπάρξουν δυσμενείς συνέπειες στην ανάπτυξη των ψαριών (Montero *et al.*, 2008).

Φυτικά έλαια, όπως είναι το λινέλαιο και το κραμβέλαιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εναλλακτικές πηγές ελαίων στη διατροφή των σαρκοφάγων ψαριών

του γλυκού και του αλμυρού νερού, επειδή είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ιδιαίτερα σε λινολενικό και ελαϊκό οξύ (Izquierdo *et al.*, 2005, Montero *et al.*, 2005, Mourente και Bell, 2006). Για το φοινικέλαιο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό, οι Ng *et al.* (2003) παρατήρησαν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη διατροφή του αφρικανικού γατόψαρου χωρίς να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξη των ψαριών ή την αξιοποίηση της τροφής. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η αντικατάσταση του 69% του ιχθυελαίου από κραμβέλαιο δεν προκάλεσε μεταβολή στην ανάπτυξη ή την αξιοποίηση της τροφής σε τσιπούρες. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι, όταν χρησιμοποιήθηκε μίγμα φυτικών ελαίων, τα κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διατηρήθηκαν σε παρόμοια επίπεδα σε σχέση με τα ψάρια που έλαβαν τροφή με ιχθυέλαιο (Fountoulaki *et al.*, 2009).

1.3 ΟΞΟΛΙΝΙΚΟ ΟΞΥ



Εικόνα 2: Δομή οξολινικού οξέος (Wikipedia, 2011).

1.3.1 Δομή

Οι 4-κινολόνες αποτελούν μια ομάδα συνθετικών αντιβακτηριακών παραγόντων και είναι καρβοξυλικά οξέα. Παρά το όνομά τους δεν έχουν όλες κυκλική μοριακή δομή. Πολλές κινολόνες είναι εμπορικά διαθέσιμες αλλά μόνο ένας περιορισμένος αριθμός τους έχει μελετηθεί στις γχθυοκαλλιέργειες. Μεταξύ αυτών, το οξολινικό οξύ (5-ethyl- 8-oxo-5,8-dihydro [1,3] dioxolo [4,5-g] quinoline-7-carboxylic acid) (εικ.2) είναι αυτό που παρουσιάζει ενδιαφέρον, αφού αναπτύχθηκε στην Ιαπωνία ειδικά για τα ψάρια (Treves-Brown, 2000).

Έχει βρεθεί ότι η ύπαρξη ενός ατόμου φθορίου στη θέση 6 στο μόριο των κινολονών αυξάνει την αντιβακτηριακή τους ικανότητα και αυτό οδήγησε στη δημιουργία μια υποομάδας, των φθοριοκινολονών. Οι αντικαταστάσεις στη θέση 7 του μορίου βελτιώνουν τη φαρμακοκινητική διείσδυσή τους. Το οξυγόνο στη θέση 8 βελτιώνει τη δραστηριότητα εναντίον των gram+ βακτηρίων (Treves-Brown, 2000).

1.3.2 Διαλυτότητα

Οι κινολόνες έχουν αμφολυτικό χαρακτήρα και οι περισσότερες είναι ελαφρώς διαλυτές σε ουδέτερο pH. Επειδή τα άλατά τους με νάτριο είναι διαλυτά στο νερό μπορούν να απορροφηθούν μέσω των βραγχίων των ψαριών και να χορηγηθούν σε αυτά με εμβάπτιση (Treves-Brown, 2000).

1.3.3 Σύμπλοκα

Ιδιαίτερο γεγονός για τα θαλάσσια είδη, συγκριτικά με τα είδη του γλυκού νερού, είναι η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα πολλών αντιβιοτικών. Ιδιαίτερα οι κινολόνες και οι τετρακυκλίνες παρουσιάζουν την ιδιότητα να συνδέονται με δισθενή κατιόντα, που υπάρχουν στο θαλασσινό νερό, όπως Mg^{+2} και Ca^{+2} . Αυτά τα σύμπλοκα είναι βακτηριολογικά ανενεργά, γι' αυτό και η δραστηριότητα των κινολονών επηρεάζεται από την παρουσία αυτών των ιόντων (Daniel, 2009). Τα ιόντα Mg^{+2} φαίνεται ότι έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (MBC - την ελάχιστη συγκέντρωση που θανατώνει το 99,9% των βακτηρίων) παρά στην ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC - την ελάχιστη συγκέντρωση που αναστέλλει τον τετραπλασιασμό της μονάδας αναπτυσσόμενων αποικιών). Για επίπεδα 0,3-14,5 mmol Mg^{+2} υπάρχει μια γραμμική σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση των ιόντων και την MBC. Το θαλασσινό νερό περιέχει 54 mmol Mg^{+2} και αφού τα θαλασσινά ψάρια πίνουν συνεχώς νερό για οσμωρρυθμιστικούς λόγους σχηματίζονται στο έντερό τους σύμπλοκα με κινολόνες όταν αυτές χορηγούνται με την τροφή (Treves-Brown, 2000). Οι Barnes *et al.* (1995) διαπίστωσαν ότι η MIC του οξολινικού οξέος ενάντια στο βακτήριο *Aeromonas salmonicida* μπορεί να αυξηθεί μέχρι 40-60 φορές λόγω των ιόντων Mg^{+2} .

1.3.4 Τρόπος δράσης

Το οξολινικό οξύ είναι ένας βακτηριοκτόνος και ευρέως φάσματος αντιμικροβιακός παράγοντας που δρα κυρίως εναντίον gram- βακτηρίων. Διέρχεται το βακτηριακό τοίχωμα με παθητική διάχυση και αναστέλλει τη βακτηριακή ανάπτυξη, παρεμποδίζοντας τη δράση της DNA γυράσης. Επειδή το ένζυμο αυτό είναι απαραίτητο στη διαδικασία διπλασιασμού του DNA η δράση των κινολονών έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο του βακτηρίου (Samuelsen, 2006).

Το οξολινικό οξύ και γενικότερα οι κινολόνες έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό στη θεραπεία ασθενειών στα ψάρια, λόγω της χαμηλής MIC για τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια και της ικανοποιητικής τους κατανομής στους ιστούς των ψαριών. Είναι αποτελεσματικά εναντίον πολλών κοινών βακτηριακών ασθενειών, όπως είναι η δοθιήνωση (*Aeromonas salmonicida*), η άτυπη δοθιήνωση (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*), η δονακίωση (*Listonella (Vibrio) anguillarum*) και η ερυθροστοματίτιδα

(*Yersinia ruckeri*). Δυστυχώς, η ανάπτυξη αντιβακτηριακής αντοχής έχει γίνει σοβαρό πρόβλημα ιδιαίτερα στις περιοχές όπου γίνεται συστηματική χρήση τους, αν και δεν υπάρχουν ενδείξεις για ανάπτυξη μεταδιδόμενης αντίστασης μέσω πλασμιδίων (Samuelsen, 2006). Η αντιβακτηριακή αντοχή στο οξολινικό οξύ προκαλεί διασταυρούμενη αντίδραση με το ναλιδιξικό οξύ αλλά όχι και με τις φθοριοκινολόνες (Treves-Brown, 2000).

Σύμφωνα με έρευνα των Shojaee AliAbadi και Lees (2000) για να επιτευχθεί αποτελεσματικός έλεγχος των παθογόνων από αντιβακτηριακούς παράγοντες θα πρέπει η τιμή AUC (AUC=MIC, AUC: η περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης/χρόνου, MIC: ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) να είναι τουλάχιστον 100 και η αναλογία C_{max}/MIC (C_{max} : η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα) να είναι τουλάχιστον 8.

1.3.5 Φαρμακοκινητική

Το οξολινικό οξύ παρουσιάζει γρήγορη κατανομή και ικανοποιητική διείσδυση στους ιστούς της τσιπούρας. Σε έρευνα των Rigos *et al.* (2002) παρατηρήθηκε ότι η βιοδιαθεσιμότητα (F%) του οξολινικού οξέος στην τσιπούρα ήταν 14%, όταν αυτό χορηγήθηκε με την ιχθυοτροφή και σε δόση 30 mg/kg ψαριού. Η μειωμένη απορρόφηση του οξολινικού οξέος μπορεί να οφείλονται στις μη ευνοϊκές τιμές pH στο έντερο των θαλασσινών ψαριών (pH>8). Σε αλκαλικό pH το οξολινικό οξύ βρίσκεται κυρίως στην ιονισμένη του μορφή, επειδή είναι ασθενές οξύ. Δεδομένου ότι τα περισσότερα φάρμακα απορροφώνται με παθητική διάχυση της μη ιονισμένης τους μορφής μπορεί να εξηγηθεί γιατί το μεγαλύτερο μέρος του οξολινικού οξέος δεν απορροφήθηκε. Σε έρευνες των Endo *et al.* (1987) χρησιμοποιήθηκε οξολινικό οξύ σε μορφή υπέρλεπτων μικροσωματιδίων, το οποίο παρουσίαζε καλύτερη διάλυση λόγω της μορφής του, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη βιοδιαθεσιμότητά του. Αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας έχει επιτευχθεί και με χορήγηση του οξολινικού οξέος σαν εστέρας καρβιτόλης, κάτι που αυξάνει το λιπόφιλο χαρακτήρα του φαρμάκου (Samuelsen και Ervik, 1999).

Οι Rigos *et al.* (2002) επίσης διαπίστωσαν ότι η μέγιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στους μύες ήταν μόνο 1,7 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στο πλάσμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπήρχε ουσιαστική κατανομή του αντιβιοτικού χωρίς να

παρατηρηθεί 'προτίμηση' για το μυϊκό ιστό. Η απορρόφηση του φαρμάκου από το πλάσμα ήταν αργή τις πρώτες 16 ώρες ενώ ακολούθησε γρηγορότερη απορρόφηση από τις 16-24 ώρες, πιθανότατα λόγω της χρήσης του αμύλου ως αυξητικού παράγοντα.

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

1.3.6 Μορφές

- Κοινή μορφή οξολινικού οξέος

Η δόση του οξολινικού οξέος, όταν χορηγείται από το στόμα, είναι 10 mg/kg/ημέρα σε ψάρια του γλυκού νερού. Σε ψάρια του θαλασσινού νερού απαιτούνται υψηλότερες δόσεις λόγω της δημιουργίας συμπλόκων του φαρμάκου με τα δισθενή κατιόντα. Οι αρχές των διαφόρων χωρών καθορίζουν διαφορετική δοσολογία. Συνήθως, η δόση κυμαίνεται από 25-50 mg/kg/ημέρα (Christofilogiannis, 2002).

Στο Ηνωμένο Βασίλειο σε ιριδιζουσες πέστροφες προσβεβλημένες από δοθεινώση χορηγήθηκε οξολινικό οξύ με την τροφή σε δόση 5 mg/kg/ημέρα καθ' όλη την περίοδο υψηλού κινδύνου (θερμοκρασία ύδατος >18°C) και παρατηρήθηκε επιβίωση του 99% του πληθυσμού, σε αντίθεση με τα ψάρια που δεν έγινε θεραπεία όπου παρατηρήθηκε επιβίωση μόνο του 69%. Επίσης, σε άλλη εκτροφή με ψάρια του είδους *Salmo trutta* χορηγήθηκε με την τροφή οξολινικό οξύ σε δόση 5 mg/kg/ημέρα για 10 ημέρες με αποτέλεσμα να μην παρατηρηθεί θνησιμότητα τις πρώτες 24 ώρες μετά την έναρξη της θεραπείας (Treves-Brown, 2000).

- Μορφή οξολινικού οξέος σε υπέρλεπτα μικροσωματίδια

Στα τέλη της δεκαετίας του 80 άρχισε να χρησιμοποιείται οξολινικό οξύ με τη μορφή υπέρλεπτων μικροσωματιδίων. Η μέση διάμετρος κάθε σωματιδίου ήταν 1 μm, σε αντίθεση με την προηγούμενη μορφή που ήταν 6,4 μm. Η χρήση αυτής της μορφής μελετήθηκε σε θαλασσινά είδη (yellowtail και red sea bream) και παρατηρήθηκε αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα. Σε κλινική έρευνα που έγινε σε yellowtail τεχνητά μολυσμένο με *Pasteurella piscicida* παρατηρήθηκε ότι η χρήση οξολινικού οξέος αυτής της μορφής σε δόση 10 mg/kg/ημέρα ήταν το ίδιο αποτελεσματική με την κανονική μορφή στη δόση 30 mg/kg/ημέρα. Η δόση των 20 mg/kg/ημέρα της μορφής αυτής ήταν κλινικά καλύτερη από τη δόση 10 mg/kg/ημέρα ενώ δεν παρατηρήθηκε μεγαλύτερη βελτίωση όταν χρησιμοποιήθηκε στη δόση των 30 mg/kg/ημέρα. Τα συμπεράσματα, που βγήκαν από αυτή την έρευνα, έδειξαν ότι τα 10 mg/kg/ημέρα κατάφεραν να απορροφήσουν όλα τα διαθέσιμα δισθενή κατιόντα αφήνοντας δραστική αρκετή ποσότητα φαρμάκου ώστε να είναι το ίδιο αποτελεσματικό με δόση 30 mg/kg/ημέρα της κανονικής του μορφής (Treves-Brown, 2000).

1.4 ΒΙΟΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ

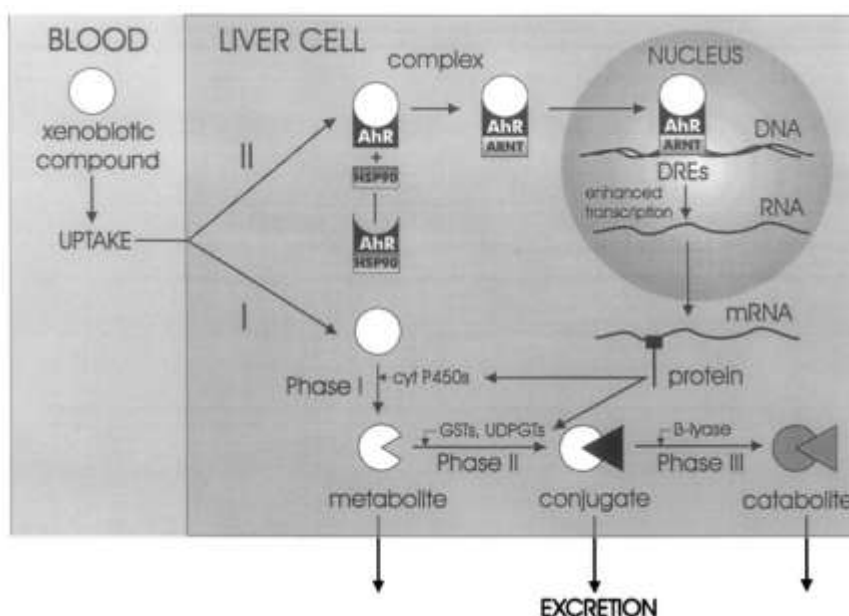
Κάθε ουσία (ενδογενής ή εξωγενής) που εισέρχεται σ' έναν οργανισμό ακολουθεί δύο οδούς: είτε αποβάλλεται με την αρχική της μορφή είτε βιομετασχηματίζεται από τον οργανισμό. Ο βιομετασχηματισμός οδηγεί στην παραγωγή μιας περισσότερο υδρόφιλης μορφής, η οποία μπορεί να απεκκριθεί ευκολότερα από τη μητρική ουσία. Το όργανο που εμπλέκεται περισσότερο στο βιομετασχηματισμό είναι το ήπαρ λόγω της λειτουργίας του, της θέσης του και της αιμάτωσής του. Ο βιομετασχηματισμός μπορεί να τροποποιήσει την τοξικότητα μιας ουσίας και να την καταστήσει ωφέλιμη (αποτοξικοποίηση) ή επιβλαβή (βιοενεργοποίηση) για τον οργανισμό. Στην πρώτη περίπτωση, η τοξικότητα της ουσίας μειώνεται και η απέκκρισή της αυξάνεται. Στην περίπτωση της βιοενεργοποίησης, η ουσία μετατρέπεται σε ενεργό μεταβολίτη ο οποίος είναι περισσότερο τοξικός από την αρχική ουσία. Για το λόγο αυτό, ο βιομετασχηματισμός καθορίζει τη δραστικότητα, τη διάρκεια δράσης και το χρόνο ημίσειας ζωής κάθε ουσίας (Van der Oost *et al.*, 2003).

Καταστάσεις που μπορούν να επηρεάσουν την ενεργότητα των ενζύμων βιομετασχηματισμού είναι η ηλικία, η φωτοκία, η διατροφική κατάσταση καθώς και οι συνθήκες και η διάρκεια έκθεσης στην ουσία. Επίσης, σημαντικός παράγοντας είναι και η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ή περισσότερων ουσιών στην περίπτωση που ένας οργανισμός εκτίθεται ταυτόχρονα σε αυτές (Van der Oost *et al.*, 2003).

Παρά το γεγονός ότι η όλη διαδικασία του βιομετασχηματισμού των χημικών ουσιών στα ψάρια είναι παρόμοια με αυτή των θηλαστικών υπάρχουν αρκετές διαφορές στη μεταβολική τους τύχη. Τέτοιες διαφορές αφορούν στο ρυθμό αντίδρασης, στις οδούς που ακολουθούν καθώς και στα προϊόντα τα οποία παράγονται. Ποικίλες έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των διαφόρων ειδών ψαριών. Για παράδειγμα, ο βιομετασχηματισμός του βενζο-α-πυρενίου στα ψάρια διαφέρει μεταξύ των ειδών ανάλογα με την έκταση του μεταβολισμού στις διάφορες θέσεις του μορίου. Γενικότερα, στα τελεόστεα παράγονται *in vitro* περισσότερες κυκλικές διόλες συγκριτικά με είδη, όπως το σαλάχι, στο οποίο σχηματίζονται περισσότεροι φαινολικοί μεταβολίτες. Τέλος, μεγάλες διαφορές έχουν παρατηρηθεί ανάμεσα σε ψάρια του ίδιου είδους όσον αφορά το βιομετασχηματισμό των χημικών ουσιών. Τα αποτελέσματα ορισμένων ερευνών σε άγρια είδη τσιπούρας έδειξαν αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ που αφορούσαν την ενεργότητα

του ενζύμου υδρολάση του υποξειδίου και που οφείλονταν σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Kleinow *et al.*, 1987).

Οι εξωγενείς χημικές ουσίες μπορούν να βιομετασχηματιστούν στο ήπαρ ακολουθώντας τη διαδρομή I, όπως φαίνεται στην εικόνα 3. Η διαδρομή αυτή περιλαμβάνει τις φάσεις I, II και III. Στη φάση I πραγματοποιείται οξείδωση, αναγωγή ή υδρόλυση της αρχικής ουσίας, προκαλώντας το σχηματισμό μεταβολιτών οι οποίοι συνδέονται με ενδογενείς ουσίες κατά τη φάση II και καταβολίζονται στη φάση III (μέσω της δράσης ενζύμων, όπως οι πεπτιδάσες, οι υδρολάσες και οι β λυάσες) (Van der Oost *et al.*, 2003).



Εικόνα 3: Απλοποιημένη παρουσίαση της πορείας των εξωγενών χημικών ουσιών μέσα στο ηπατικό κύτταρο. Η διαδρομή I απεικονίζει ένα πιθανό μηχανισμό της αποτοξικοποίησης ή βιοενεργοποίησης και η διαδρομή II απεικονίζει ένα πιθανό μηχανισμό της επαγωγής των ενζύμων. AhR: υποδοχέας αρωματικών υδρογονανθράκων, HSP90: πρωτεΐνη θερμικού σοκ μοριακού βάρους 90 kDa, ARNT: Ah υποδοχέας πυρηνικός μεταθέτης, DREs: στοιχεία που ανταποκρίνονται στις διοξίνες, cytP450s: ισοένζυμα κυτοχρώματος P450, GSTs: S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, UDPGTs: UDP γλυκουρονυλ-τρανσφεράσες (Van der Oost *et al.*, 2003).

1.5 ΦΑΣΗ I

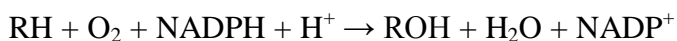
Η φάση I του μεταβολισμού περιλαμβάνει αντιδράσεις οξείδωσης, αναγωγής ή υδρόλυσης. Για την πλειοψηφία των ξενοβιοτικών, οι αντιδράσεις της πρώτης φάσης καταλύονται από ένζυμα του κυτοχρώματος P450, τις μονοξυγενάσες που περιέχουν φλαβίνη, τις εστεράσες και τις υδρολάσες των υποξειδίων. Οι δύο πρώτες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

1.5.1 Κυτόχρωμα P450

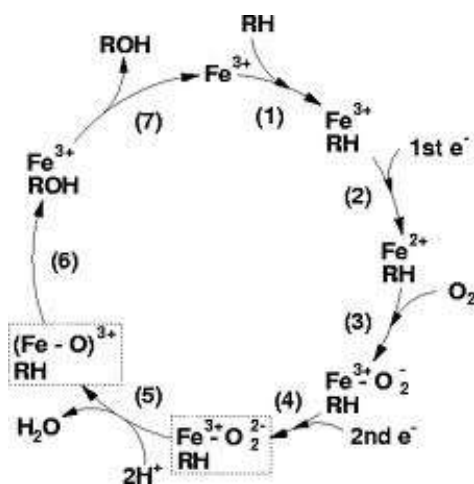
1.5.1.1 Γενικές αρχές και μοριακές ιδιότητες

Το σύστημα του κυτοχρώματος P450 είναι μια ομάδα ενζύμων που περιέχουν αίμη και εμφανίζονται σε μεγάλη ποικιλία φυτών και ζώων μέχρι και μικροοργανισμών. Εμπλέκονται σε πολλές διαδικασίες, όπως είναι η σύνθεση χρωστικών, η άμυνα κατά των χημικών ουσιών καθώς και η σύνθεση των στεροειδών, των προσταγλανδινών και του ρετινοϊκού οξέος. Η βιοχημεία του κυτοχρώματος P450 και ειδικότερα της ισομορφής CYP1A έχει ευρέως μελετηθεί στα θηλαστικά και σε άλλους οργανισμούς (Jones, 2010).

Το σύστημα του κυτοχρώματος P450 είναι ένας κεντρικός καταλύτης οξειδωτικών αντιδράσεων, όπως της υδροξυλίωσης, της εποξειδωσης, της απαλκυλίωσης και άλλων. Οι ουσίες που μεταβολίζονται από τα ένζυμα του συστήματος αυτού είναι τόσο ενδογενείς (λιπαρά οξέα, στεροειδή, προσταγλανδίνες, κετόνες) όσο και εξωγενείς (πρόσθετα τροφίμων, φάρμακα, πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, διοξίνες). Αν και η πλειοψηφία των ισομορφών του συστήματος παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, ο βασικός μηχανισμός οξυγόνωσης του υποστρώματος είναι ο ίδιος για όλα τα ισοένζυμα. Η αντίδραση που καταλύεται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 είναι η εξής:



Το λιπόφιλο υπόστρωμα (RH) μετατρέπεται σε ένα περισσότερο πολικό και υδατοδιαλυτό προϊόν (ROH) μετά την ενσωμάτωση ενός ατόμου οξυγόνου από το μόριο του οξυγόνου ενώ το άλλο άτομο χρησιμοποιείται στην παραγωγή νερού (Goksøyr και Husøy, 1998). Ο καταλυτικός κύκλος του κυτοχρώματος P450 φαίνεται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4: Καταλυτικός κύκλος του κυτοχρώματος P450 (Segall, 1997)

1.5.1.2 Ονοματολογία

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 έχουν βρεθεί σε κάθε τομέα της ζωής. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί περισσότερες από 8.128 ακολουθίες. Αυτό δημιούργησε την ανάγκη για εφαρμογή μιας ονοματολογίας για το μεγάλο αυτό αριθμό των ακολουθιών. Η ονοματολογία, που χρησιμοποιείται, βασίζεται στην ομοιότητα των αμινοξέων και όχι στη λειτουργία των ενζύμων. Σύμφωνα με αυτή, τα ένζυμα κατατάσσονται σε οικογένειες και υποοικογένειες και απεικονίζονται με τη συντομογραφία CYP ακολουθούμενη από έναν αραβικό αριθμό που υποδηλώνει την οικογένεια των ενζύμων, ένα γράμμα που υποδηλώνει την υποοικογένεια και έναν ακόμη αραβικό αριθμό που αντιπροσωπεύει το γονίδιο (π.χ. *CYP1A1*). Η κατάταξη σε οικογένεια ή υποοικογένεια γίνεται με βάση την ομοιότητα στην ακολουθία των αμινοξέων. Τα ένζυμα που παρουσιάζουν περισσότερο από 40% ομοιότητα τοποθετούνται στην ίδια οικογένεια ενώ αυτά που παρουσιάζουν περισσότερο από 55% ομοιότητα τοποθετούνται στην ίδια υποοικογένεια. Ωστόσο, φυλογενετικές αναλύσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για να εντάξουν τα ένζυμα σε οικογένειες και υποοικογένειες όταν η ομοιότητα των ακολουθιών βρίσκεται κοντά στα παραπάνω όρια, όπως μπορεί να συμβεί μεταξύ πιο απομακρυσμένων ειδών (Scornaienchi, 2009).

1.5.1.3 Υποοικογένεια CYP1A

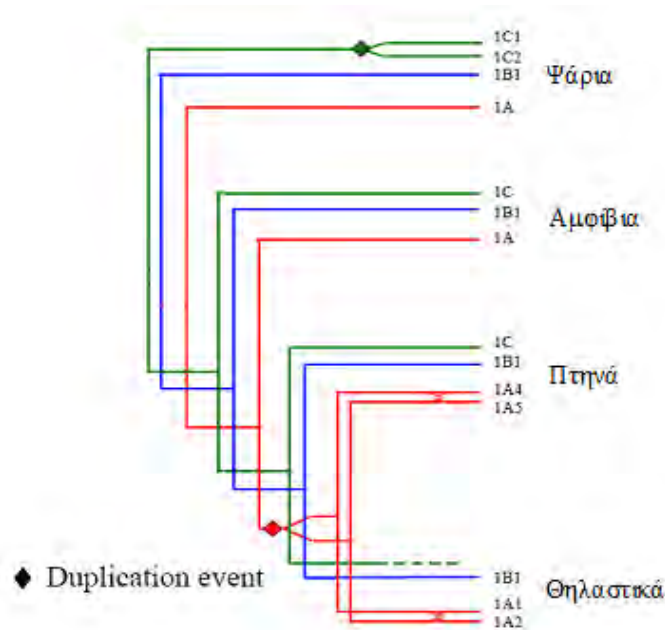
Ο μεταβολισμός της πλειοψηφίας των εξωγενών χημικών ουσιών καταλύεται από τα ένζυμα που ανήκουν στις οικογένειες CYP1, CYP2 και CYP3. Αν και υπάρχει σημαντική επικάλυψη της ειδικότητας ως προς τα υποστρώματα μεταξύ διαφορετικών ισομορφών, κάθε οικογένεια παρουσιάζει ειδικότητα απέναντι σε υποστρώματα με συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες (Jones, 2010). Η οικογένεια CYP1 και ιδιαίτερα η υποοικογένεια CYP1A είναι οι περισσότερο μελετημένες στα σπονδυλωτά. Η υποοικογένεια αυτή είναι η πιο σημαντική στην αποτοξικοποίηση ή τη βιοενεργοποίηση των ξеноβιοτικών. Επίσης, η υποοικογένεια CYP1A μπορεί να είναι δείκτης πιθανής χημικής καρκινογένεσης ενώ έχει χρησιμοποιηθεί συστηματικά στα ψάρια ως βιοδείκτης της ρύπανσης του υδάτινου περιβάλλοντος, λόγω της επαγωγής της ενζυμικής ενεργότητας που προκαλείται από ποικίλες ουσίες που είναι παρούσες σ' αυτό. Για το λόγο αυτό είναι η περισσότερο μελετημένη υποοικογένεια του συστήματος P450 (González, 2006).

1.5.1.4 Φυλογενετική σχέση με άλλους οργανισμούς

Όλα τα σπονδυλωτά διαθέτουν δύο υποοικογένειες, τις CYP1A και CYP1B ενώ τα μη θηλαστικά σπονδυλωτά (όπως και τα ψάρια) διαθέτουν ακόμη τις CYP1C και CYP1D. Φυλογενετικά, θεωρείται ότι ένα αρχικό γονίδιο υπέστη αναπαραγωγή με διπλασιασμό και ακολούθησε νέος πολλαπλασιασμός απ' όπου προέκυψαν οι 4 υποοικογένειες (Scornaienchi, 2009).

Τα θηλαστικά έχουν δύο CYP1A γονίδια (CYP1A1 και CYP1A2) ενώ τα περισσότερα ψάρια έχουν ένα (CYP1A) με εξαίρεση ορισμένες πολυπλοειδείς καταγωγές. Στην ιριδίζουσα πέστροφα έχουν ανακαλυφθεί δύο γονίδια CYP1A με 96% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων. Αυτά έχουν οριστεί ως CYP1A1 και CYP1A3 για να διαφοροποιηθούν από το γονίδιο CYP1A2 των θηλαστικών (Goksøyr και Husøy, 1998). Όλα τα σπονδυλωτά έχουν ένα γονίδιο CYP1B, το CYP1B1. Στα ψάρια έχει πρόσφατα ανακαλυφθεί η υποοικογένεια CYP1C, η οποία περιλαμβάνει δύο γονίδια, τα CYP1C1 και CYP1C2. Τα υπόλοιπα σπονδυλωτά εκτός των θηλαστικών έχουν ένα μόνο γονίδιο, το CYP1C1. Τέλος, από τις πιο πρόσφατες υποοικογένειες των σπονδυλωτών είναι η CYP1D. Τα σπονδυλωτά εκτός των θηλαστικών έχουν ένα μόνο γονίδιο, το CYP1D1 ενώ τα θηλαστικά έχουν ένα μη λειτουργικό CYP1D ψευδογονίδιο, που είναι γνωστό ως

CYP1D1P (Scornaienchi, 2009). Η φυλογενετική σχέση μεταξύ της οικογένειας CYP1 ψαριών, αμφιβίων, πτηνών και θηλαστικών φαίνεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Σχέση οικογένειας CYP1 μεταξύ ψαριών, αμφιβίων, πτηνών και θηλαστικών. Η υποοικογένεια CYP1D των ψαριών δεν εμφανίζεται καθώς δεν έχει ακόμα καταγραφεί η σχέση της με υποοικογένειες άλλων ζώων (Hirsch, 2007).

◆ Duplication event: φαινόμενο επικάλυψης

1.5.1.5 Εντόπιση της ενεργότητας των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A

Η εντόπιση της ενζυμικής ενεργότητας έχει περιγραφεί σε πολλά όργανα διαφόρων τελεόστων ειδών. Υψηλή ενεργότητα των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A έχει ανιχνευθεί στο ήπαρ αλλά και σε εξωηπατικά όργανα, όπως στο έντερο, στη χοληδόχο κύστη, στο νεφρό, στα βράγχια, στις γονάδες, στο νευρικό ιστό, στα ενδοκρινή κύτταρα κ.α. Ωστόσο, τα επίπεδα των ενζύμων αυτής της υποοικογένειας που ανιχνεύονται με βιοχημικές μεθόδους στα εξωηπατικά όργανα είναι συνήθως χαμηλότερα από αυτά στο ήπαρ (Ray και Ghosh, 2006). Ένα κοινό σημείο εντόπισης της ενεργότητας των ενζύμων αυτών σε όλους τους ιστούς είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων (Sarasquete και Segner, 2000).

Η κύρια έκφραση και επαγωγή των ενζύμων στο ήπαρ των ψαριών οφείλεται στο ρόλο του οργάνου αυτού στο μεταβολισμό και την απέκκριση των ξενοβιοτικών. Το ήπαρ των ιχθύων αποτελείται κυρίως από ηπατοκύτταρα σε ποσοστό μέχρι 80% του ολικού όγκου. Πολλές έρευνες ανοσοϊστοχημείας δείχνουν σημαντική έκφραση των ενζύμων στα ηπατοκύτταρα. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, τα ένζυμα αυτά κατανέμονται ετερογενώς στο ηπατικό παρέγχυμα χωρίς να παρατηρείται σαφής ζώνη εμφάνισής τους. Μέσα στο ηπατοκύτταρο τα ένζυμα αυτά εντοπίζονται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και στην πυρηνική μεμβράνη (Ray και Ghosh, 2006). Εκτός από τα ηπατοκύτταρα, ενζυμική ενεργότητα εντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα κατά μήκος των χοληφόρων οδών και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολπωδών τριχοειδών. Ωστόσο, η επαγωγική ανταπόκριση των ενζύμων λόγω της δράσης των ξενοβιοτικών διαφέρει στα διάφορα είδη ηπατικών κυττάρων. Η διαφορά αυτή εξαρτάται από το είδος του επαγωγέα (αν μεταβολίζεται αργά ή γρήγορα), τη δόση του, την οδό έκθεσης και/ή το είδος του ψαριού (Sarasquete και Segner, 2000).

Ένα δεύτερο όργανο σημαντικό στο μεταβολισμό και την απέκκριση των ξενοβιοτικών είναι ο νεφρός. Τα ένζυμα εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων καθώς και στο ενδοθήλιο των νεφρικών αγγείων. Έρευνες έδειξαν ότι τα ένζυμα αυτά εντοπίζονται και στα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου. Ο βαθμός έκφρασης στα εντερικά κύτταρα εξαρτάται κυρίως από την οδό έκθεσης στα ξενοβιοτικά. Όταν η έκθεση στις ουσίες γίνεται μέσω της τροφής παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα των ενζύμων στον εντερικό βλεννογόνο και ήπια έκφραση σε άλλα όργανα (Sarasquete και Segner, 2000).

Επαγωγή των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A έχει παρατηρηθεί στα επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού, στα στυλοειδή κύτταρα των δευτερογενών βραγχιακών ελασμάτων και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων των βραγχιακών νηματίων και τόξων μετά από έκθεση ψαριών σε ουσίες προερχόμενες από το υδάτινο περιβάλλον. Ανοσοϊστοχημικές έρευνες έδειξαν ενζυμική ενεργότητα στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αρτηριακού κώνου, του κόλπου, της κοιλίας και των στεφανιαίων αγγείων της καρδιάς. Τέλος, ενεργότητα των ενζύμων έχει παρατηρηθεί στα ενδοκρινή κύτταρα κυρίως της υπόφυσης και του μεσονεφρικού ιστού καθώς και στο δέρμα των ψαριών (Sarasquete και Segner, 2000).

1.5.1.6 Ρύθμιση του συστήματος του κυτοχρώματος P450 στα ψάρια

Η επαγωγή των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 από ενδογενείς και εξωγενείς ουσίες είναι μια διαδικασία κατά την οποία οι διάφορες χημικές ουσίες διεγείρουν τη μεταγραφή των γονιδίων, καταλήγοντας σε αυξημένα επίπεδα mRNA και στη σύνθεση των πρωτεϊνών του συστήματος P450. Η διέγερση του κυτοχρώματος P450 στα ψάρια επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, όπως το είδος, το φύλο, η ηλικία, το αναπαραγωγικό στάδιο, η θερμοκρασία, η διατροφή και κάποιοι διεγερτικοί ή ανασταλτικοί παράγοντες (Hoydal, 2004).

Αρκετές παραλλαγές στη διαδικασία αυτή μπορεί να παρατηρηθούν ακόμα και μεταξύ συγγενικών ειδών. Η μέτρηση της ενεργότητας του συστήματος (μέσω μέτρησης της ενεργότητας του ενζύμου διαιθυλάση της 7-αιθοξυριζορουφίνης-EROD) σε ψάρια του είδους *Limanda limanda* και *Plathichthys flesus*, που βρίσκονταν στην ίδια τοποθεσία και κάτω από τις ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος, έδειξε ότι η ενεργότητα ήταν 3-4 φορές υψηλότερη στο είδος *L. limanda* από το είδος *P. flesus* (Krüner και Westernhagen, 1999).

Ενεργότητα των ενζύμων έχει παρατηρηθεί ακόμα και σε αρχικά στάδια ανάπτυξης. Σχετικά με την επίδραση της ηλικίας και του φύλου, διαπιστώθηκε υψηλότερη ενεργότητα στα ενήλικα αρσενικά από τα ενήλικα θηλυκά και τα νεαρά άτομα στο είδος *Pleuronectes americanus* (Goksøyr και Husøy, 1998).

Η σεξουαλική ωριμότητα είναι ακόμη ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει το σύστημα αυτό. Κατά τη διάρκεια της σεξουαλικής ωρίμανσης έχουν παρατηρηθεί διαφορές στο περιεχόμενο του συστήματος μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων καθώς τα ώριμα αρσενικά παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές από τα ώριμα θηλυκά (Goksøyr και Husøy, 1998). Ο εποχικός αναπαραγωγικός κύκλος των σολομοειδών οφείλεται σε αλλαγές στα επίπεδα των ορμονών στο πλάσμα και ενδέχεται αυτές να είναι υπεύθυνες για τις διαφορές στην ενζυμική ενεργότητα μεταξύ των δύο φύλων ή μεταξύ ψαριών σε διαφορετικό αναπαραγωγικό στάδιο. Έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει μία αντίστροφη σχέση μεταξύ της επαγωγής των ενζύμων και της σύνθεσης της οιστραδιόλης (Arinç *et al.*, 2000).

Στην έρευνα των Carrera *et al.* (2007) παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας των ενζύμων διαιθυλάση της 7-αιθοξυριζορουφίνης (EROD) και S-τρανσφεράση της

γλουταθειόνης (GST) μετά από χορήγηση 17-β οιστραδιόλης σε σεξουαλικά ανώριμα ψάρια του είδους *Sparus aurata*. Σε μια άλλη έρευνα (Teles *et al.*, 2005) όπου ανώριμα ψάρια του ίδιου είδους εκτέθηκαν σε 17-β οιστραδιόλη ή σε συνδυασμό 17-β οιστραδιόλης με 4-εννεύλοφαινόλη διαπιστώθηκε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου EROD καθ' όλη τη διάρκεια και των δύο πειραμάτων.

Η θερμοκρασία επηρεάζει το βαθμό ενεργότητας των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A. Έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα των ενζύμων αυτών σε ψάρια που έχουν προσαρμοστεί σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική ενεργότητα έχει παρατηρηθεί τους καλοκαιρινούς μήνες σε ψάρια του είδους *Limanda limanda* στη Βόρεια θάλασσα (Sleiderink *et al.*, 1995).

Η διατροφή είναι ακόμα ένας παράγοντας που επηρεάζει το μεταβολισμό των ξενοβιοτικών στα ψάρια. Έχει μελετηθεί η επίδραση των λιπιδίων, των βιταμινών, των αντιοξειδωτικών, του σιδήρου και των υδατανθράκων, που περιέχονται στην τροφή, στην ενεργότητα των ενζύμων του συστήματος P450 (Goksøyr και Husøy, 1998).

Πολλά συστατικά της τροφής ή ξενοβιοτικά μπορούν να ενωθούν με το ενεργό τμήμα των ενζύμων του κυτοχρώματος, παίζοντας το ρόλο υποστρώματος ή αναστολέα. Τα φλαβονοειδή, όπως είναι η α και η β ναφθοφλαβόνη, αναστέλλουν την ενεργότητα του ενζύμου AHH (υδροξυλάση των αρωματικών υδρογονανθράκων) ή του EROD στα θηλαστικά και στα ψάρια όταν απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επίσης, οι αυξημένες συγκεντρώσεις των χημικών ρυπαντών στο περιβάλλον (π.χ. βενζοπυρένια, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) προκαλούν μείωση της ενεργότητας των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A στο ήπαρ. Τα βαρέα μέταλλα είναι ακόμη μία κατηγορία ουσιών που μπορεί να επηρεάσει την ενεργότητα των ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Έκθεση σε κάδμιο και άλλα μέταλλα προκαλεί αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου που καταλύει το μεταβολισμό της αίμης. Μειωμένη ενζυμική ενεργότητα παρατηρήθηκε σε ιριδίζουσα πέστροφα μετά από έκθεση στο ίδιο μέταλλο. Τέλος, οι οργανομεταλλικές ουσίες, όπως είναι η τριβουτυλίνη, μπορούν να δράσουν ως αναστολείς των ενζύμων αυτών (Goksøyr και Husøy, 1998).

1.5.1.7 Μέθοδοι μελέτης της έκφρασης της υποοικογένειας CYP1A στα ψάρια

Πολλές εργαστηριακές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό τον προσδιορισμό της υποοικογένειας CYP1A σε ψάρια που έχουν εκτεθεί σε διάφορες ουσίες (πίνακας 1). Η μελέτη της καταλυτικής ενεργότητας των ενζύμων είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται πιο συχνά (Goksøyr και Husøy, 1998).

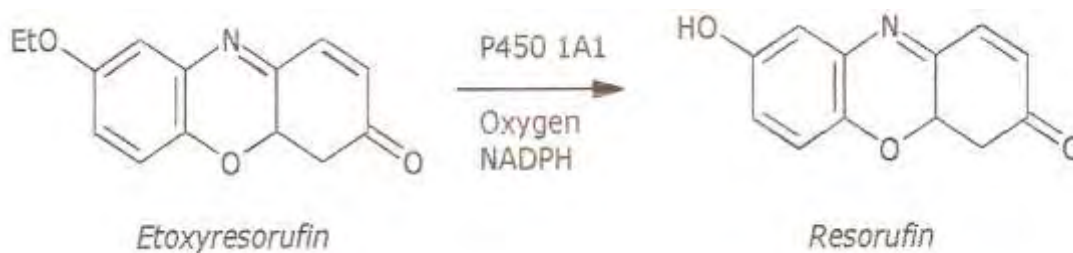
Πίνακας 1: Μέθοδοι προσδιορισμού της υποοικογένειας CYP1A στα ψάρια (Goksøyr και Husøy, 1998)

Επίπεδο προσδιορισμού	Μέσο προσδιορισμού	Αναλυτική μέθοδος
CYP1A ένζυμο	Καταλυτική ενεργότητα	EROD, AHH
CYP1A πρωτεΐνη	Αντισώματα	Western blot, ELISA, ανοσοϊστοχημεία
CYP1A mRNA	cDNA, ολιγονουκλεοτίδια	Northern blot, RT-PCR, <i>in situ</i> υβριδισμός

- Καταλυτική ενεργότητα

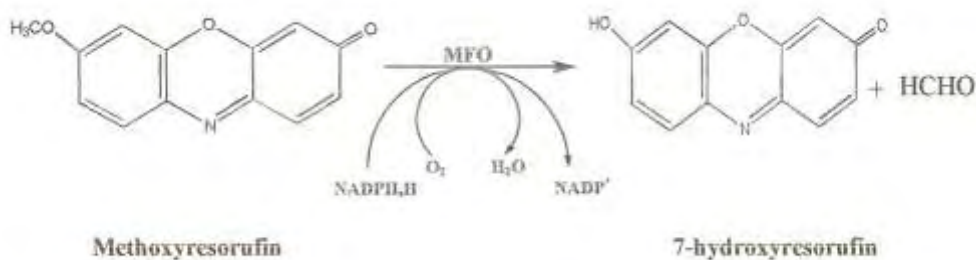
Η καταλυτική ενεργότητα των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση διαφόρων υποστρωμάτων. Οι ουσίες 7-αιθοξυριζορουφίνη, 7-μεθοξυριζορουφίνη και βενζο-α-πυρένιο είναι γνωστά και πολύ ειδικά υποστρώματα για τα ένζυμα της υποοικογένειας αυτής και καταλύονται από τα ένζυμα διαιθυλάση της 7-αιθοξυριζορουφίνης (EROD), διμεθυλάση της 7-μεθοξυριζορουφίνης (MROD) και υδροξυλάση των αρωματικών υδρογονανθράκων (AHH), αντίστοιχα (Goksøyr και Husøy, 1998).

Οι Burke και Mayer (1974) περιέγραψαν την πρώτη τεχνική μέτρησης της ενεργότητας του ενζύμου EROD, η οποία στηριζόταν στο φθορισμό. Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση απαιθυλίωσης του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνη με παραγόμενο προϊόν την ουσία ριζορουφίνη (εικ.6), η οποία ανιχνεύτηκε μέσω του φθορισμού που παρουσίαζε. Αργότερα περιγράφηκαν πολλές παραλλαγές αυτής της τεχνικής.



Εικόνα 6: Αντίδραση απαιθυλίωσης του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνη (ethoxyresorufin) μέσω των ενζύμων P450 1A1 (UNEP, 1999).

Για τη μελέτη της ενεργότητας των ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A χρησιμοποιείται και το ένζυμο MROD. Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση απομεθυλίωσης του υποστρώματος 7-μεθοξυριζορουφίνη (εικ.7). Τα υποστρώματα 7-αιθοξυριζορουφίνη και 7-μεθοξυριζορουφίνη παρουσίασαν τον υψηλότερο ρυθμό μεταβολισμού στα μικροσώματα της πέστροφας συγκριτικά με τα άλλα υποστρώματα. Τα υποστρώματα αυτά μεταβολίζονται στα ποντίκια από τα ένζυμα CYP1A1, CYP1A2 (7-αιθοξυριζορουφίνη) και CYP1A1 (7-μεθοξυριζορουφίνη), αντίστοιχα. Τα ψάρια όμως έχουν ένα μόνο CYP1A ένζυμο. Η ενεργότητα των ενζύμων EROD και MROD στα ψάρια έχει συνδεθεί, γεγονός που αποδεικνύει ότι μόνο ένα CYP1A ένζυμο συμμετέχει στο μεταβολισμό των δύο υποστρωμάτων, σε αντίθεση με τα ποντίκια (Hirsch, 2007).



Εικόνα 7: Αντίδραση απομεθυλίωσης του υποστρώματος 7-μεθοξυριζορουφίνη (methoxyresorufin) (Boyunegmez, 2004).

Για τη μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου AHH χρησιμοποιούνται οι ουσίες βενζο-α-πυρένιο ή διφαινυλοξαζόλη σαν αρχικά υποστρώματα. Έχουν επίσης περιγραφεί και μέθοδοι που χρησιμοποιούν ραδιοσημασμένο βενζο-α-πυρένιο. Το κυριότερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι το βενζο-α-πυρένιο είναι ισχυρά καρκινογόνο (Goksøyr και Husøy, 1998).

Οι τεχνικές μέτρησης της ενεργότητας των παραπάνω ενζύμων φαίνεται να είναι οι περισσότερο ευαίσθητες για τον καθορισμό της διέγερσης του συστήματος στα ψάρια, παρουσιάζοντας μειωμένα ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε ψάρια που δεν έχουν εκτεθεί σε συγκεκριμένες εξωγενείς ουσίες ενώ παρουσιάζουν πολύ υψηλά επίπεδα σε αυτά που έχουν εκτεθεί σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) ή παρόμοιους παράγοντες. Όταν οι τεχνικές πραγματοποιούνται ταυτόχρονα τα αποτελέσματα συσχετίζονται. Παρόλα αυτά, η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου EROD είναι η πιο ευαίσθητη και εύκολη στην πραγματοποίηση μέθοδος, με αποτέλεσμα να προτιμάται από τους ερευνητές (Hoydal, 2004).

Στα μειονεκτήματα των παραπάνω δοκιμών περιλαμβάνεται το γεγονός ότι η καταλυτική ενεργότητα είναι ευαίσθητη στη μετουσίωση ή την απενεργοποίηση κατά τη διαδικασία λήψης του δείγματος, συντήρησης και προετοιμασίας των κλασμάτων του ενζύμου. Επιπλέον, η ενεργότητα μπορεί να ανασταλεί από ενδογενείς (π.χ. οιστραδιόλη) ή εξωγενείς (π.χ. PAHs ή PCBs) ουσίες που βρίσκονται στο δείγμα (Goksøyr και Husøy, 1998).

- CYP1A πρωτεΐνη

Τα επίπεδα των πρωτεϊνών ανιχνεύονται συνήθως ποιοτικά και ποσοτικά με τη μέθοδο Western Blot ή ημιποσοτικά με τη μέθοδο ELISA. Οι ανοσολογικές τεχνικές δεν εξαρτώνται από τα βιολογικά ενεργά δείγματα. Επίσης, οι τεχνικές αυτές ενδείκνυται σε καταστάσεις που η καταλυτική ενεργότητα έχει ανασταλεί ή υποβαθμιστεί (Goksøyr και Husøy, 1998). Έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε προγράμματα ελέγχου του περιβάλλοντος χωρίς να απαιτείται προστασία της ενζυμικής ενεργότητας στα δείγματα. Επίσης, δεν είναι ευαίσθητες σε πιθανή ανασταλτική δράση των ξενοβιοτικών, σε αντίθεση με τις προηγούμενες τεχνικές. Τα μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι ότι παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία συγκριτικά με τη μέθοδο EROD και

παρουσιάζουν προβλήματα στην ποσοτικοποίηση (Sarasquete και Segner, 2000). Για τη μέτρηση των CYP1A πρωτεϊνών έχει χρησιμοποιηθεί και η ανοσοϊστοχημεία.

- CYP1A mRNA

Η ανάλυση του mRNA είναι άλλη μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της έκφρασης της υποοικογένειας CYP1A. Ο χειρισμός των δειγμάτων είναι ιδιαίτερης σημασίας κατά την ανάλυση του mRNA. Η τεχνική αυτή θεωρείται χρήσιμη όταν έχουμε ενεργοποίηση των γονιδίων αλλά το ένζυμο έχει ανασταλεί ή διασπαστεί (Goksøyr και Husøy, 1998).

Πολλοί ανιχνευτές cDNA έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση του CYP1A mRNA στα τελεόστεα ψάρια. Το mRNA έχει αναγνωριστεί σε ηπατικούς και εξωηπατικούς ιστούς σε πολλά είδη ψαριών (Goksøyr και Husøy, 1998). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η Northern Blot και ο *in situ* υβριδισμός. Για την ποιοτική ανίχνευση του mRNA σε ιστούς σολομού του Ατλαντικού έχει χρησιμοποιηθεί και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - αντίστροφης τρανσκριπτάσης (RT-PCR) (Sarasquete και Segner, 2000).

1.6 ΦΑΣΗ II

Η δεύτερη φάση του βιομετασχηματισμού περιλαμβάνει τη σύνδεση εξωγενών χημικών ουσιών ή των μεταβολιτών τους με μία ενδογενή ουσία. Κατά τις αντιδράσεις αυτές μεγάλες και πολικές ουσίες ή τμήματά τους, όπως σάκχαρα και αμινοξέα, προστίθενται ομοιοπολικά σε εξωγενείς χημικές ουσίες (π.χ. φάρμακα). Τα περισσότερα ένζυμα της φάσης αυτής καταλύουν τις αντιδράσεις διευκολύνοντας έτσι την απέκκριση αυτών των ουσιών μέσω της σύνδεσης περισσότερο πολικών ομάδων (γλουταθειόνη και γλυκουρονικό οξύ) στο μόριό τους. Τα προϊόντα σύζευξης απεκκρίνονται εύκολα μέσω της χολής, των ούρων ή των βραγχίων. Ορισμένες ουσίες διαθέτουν ομάδες (όπως -COOH, -OH, -NH₂) που τους επιτρέπουν τον απευθείας μεταβολισμό από τα ένζυμα της φάσης II ενώ κατά το μεταβολισμό άλλων ουσιών προηγείται της φάσης II μία άλλη διαδικασία. Η κύρια οδός μεταβολισμού ηλεκτρόφιλων ουσιών και μεταβολιτών τους περιλαμβάνει τη σύνδεση με τη γλουταθειόνη ενώ οι πυρηνόφιλες ουσίες συνδέονται με το γλυκουρονικό οξύ. Άλλες οδοί παίζουν πολύ μικρό ρόλο στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών (Van der Oost *et al.*, 2003).

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

1.6.1 S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)



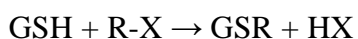
Εικόνα 8: Κρυσταλλογραφική δομή του ενζύμου S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Wikipedia, 2011).

1.6.1.1 Γενικά

Το ένζυμο S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (εικ.8) ανήκει σε μια οικογένεια ενζύμων τα οποία παρουσιάζουν ποικίλους καταλυτικούς ρόλους. Για πρώτη φορά απομονώθηκαν από καλαμπόκι πριν από 40 περίπου χρόνια. Στη συνέχεια όμως βρέθηκαν και σε άλλα φυτά και ανώτερους οργανισμούς (χερσαίους και υδρόβιους). Ανήκουν στα ένζυμα της φάσης II του βιομετασχηματισμού των ξενοβιοτικών και αντιπροσωπεύουν περίπου το 1% του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά και μερικά προκαρυωτικά κύτταρα (Blanchette *et al.*, 2007).

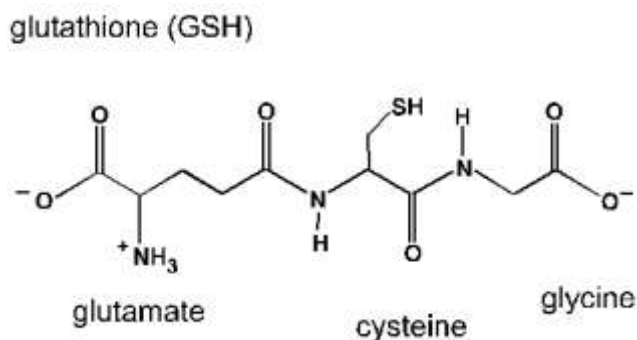
1.6.1.2 Λειτουργία

Το ένζυμο αυτό καταλύει τη σύνδεση του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης (GSH) με το ηλεκτρόφιλο κέντρο του κατάλληλου υποστρώματος (R-X). Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο (γλουταμυλ-κυστεϊνυλ-γλυκίνη) (εικ.9) που συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η μεταφορά ουσιών, η προστασία των κυττάρων και ο μεταβολισμός πολλών ξενοβιοτικών (Pecore, 2001).

Αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό των κυττάρων, λειτουργώντας ως υπόστρωμα σε αντιοξειδωτικά ένζυμα και προστατεύοντας τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, δεσμεύει τα μέταλλα αποτρέποντας τη σύνθεση των μεταλλοθειονινών (Haluzoná *et al.*, 2011).



Εικόνα 9: Δομή γλουταθειόνης (GSH) (Thomas, 1999).

Το ένζυμο GST δρα δεσμεύοντας τη γλουταθειόνη στο ενεργό G τμήμα του και το ηλεκτρόφιλο υπόστρωμα στο ενεργό H τμήμα του με αποτέλεσμα να μεταφέρεται το υπόστρωμα κοντά στη γλουταθειόνη. Ακολουθεί ενεργοποίηση του τμήματος SH της γλουταθειόνης. Από την αντίδραση αυτή, που πραγματοποιείται στο ήπαρ, σχηματίζεται ένας θειοαιθέρας (Slatinská *et al.*, 2008). Το προϊόν αυτό στη συνέχεια εξέρχεται από τα ηπατικά κύτταρα και συμμετέχει στο σχηματισμό των μερκαπτουρικών οξέων στους νεφρούς και την αποβολή από τον οργανισμό με τα ούρα (Blanchette *et al.*, 2007). Η αντίδραση αυτή θεωρείται ότι είναι το πρώτο στάδιο βιοσύνθεσης των μερκαπτουρικών οξέων, τα οποία συμμετέχουν στην αποβολή των εξωγενών χημικών ουσιών. Αν και το ένζυμο αυτό συμμετέχει στη διαδικασία αποτοξικοποίησης, σε ορισμένες περιπτώσεις καταλύει αντιδράσεις που οδηγούν σε ενεργοποίηση τοξικών και καρκινογενών ουσιών (Slatinská *et al.*, 2008).

Επιπλέον, το ένζυμο GST έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει λιπόφιλες ουσίες και να διευκολύνει τη μεταφορά τους. Άλλη λειτουργία του είναι η δέσμευση της χολερυθρίνης και η αποτροπή της παλινδρόμησής της από το κυτταρόπλασμα στο αίμα. Τα ένζυμα της θ κλάσης έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν την αίμη και να συμμετέχουν στη μεταφορά της από τα μιτοχόνδρια στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου ενσωματώνεται στην αποπρωτεΐνη του κυτοχρώματος b5. Άλλες ισομορφές συμμετέχουν στη δέσμευση πολλών ενδογενών

ουσιών, όπως είναι τα χολικά οξέα και οι στεροειδείς ορμόνες (Slatinská *et al.*, 2008). Η πιο σημαντική από τις λειτουργίες μεταφοράς του ενζύμου αυτού είναι η συμμετοχή του στη σύνθεση των τοπικών ορμονών (προσταγλανδίνες και λευκοτριένια). Η σύνδεση των ουσιών που μεταφέρει γίνεται σε διαφορετικά τμήματα του ενζύμου από το ενεργό τμήμα με αποτέλεσμα να χάνει το ένζυμο την καταλυτική του ενεργότητα λόγω αλλαγής στη διαμόρφωσή του (Blanchette *et al.*, 2007).

1.6.1.3 Μηχανισμός ενεργοποίησης

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του ενζύμου GST στα θηλαστικά γίνεται μέσω του υποδοχέα Ah, όπως συμβαίνει και στα ένζυμα της υποοικογένειας CYP1A. Ωστόσο, έχει αναφερθεί και ένας τρόπος ενεργοποίησης του ενζύμου που λειτουργεί ανεξάρτητα από τον παραπάνω υποδοχέα και κατά τον οποίο ο μεταβολισμός της ουσίας γίνεται πριν τη μεταγραφή του γονιδίου (Van der Oost *et al.*, 2003).

1.6.1.4 Κατάταξη-ονοματολογία

Η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης διαιρείται σε μεγάλο αριθμό κλάσεων με βάση ποικίλα κριτήρια, όπως είναι η ακολουθία των αμινοξέων και των νουκλεοτιδίων, ανοσολογικά, κινητικά και δομικά χαρακτηριστικά. Η πλειοψηφία των κλάσεων παρουσιάζει μια τυπική κρυσταλλική δομή. Οι διαφορές στη δομή εντοπίζονται κυρίως γύρω από το ενεργό τμήμα του ενζύμου και κατά μήκος της γραμμής μεταξύ των υπομονάδων. Γενικότερα, σε μία κλάση κατατάσσονται ισομορφές που παρουσιάζουν ομοιότητα στην ακολουθία των αμινοξέων μεγαλύτερη από 60% ενώ όταν η ομοιότητα είναι μικρότερη από 30% τότε εντάσσονται σε διαφορετικές κλάσεις (Slatinská *et al.*, 2008). Τα μέλη κάθε κλάσης παρουσιάζουν παρόμοια μεγέθη μονομερών (περίπου 24-28 kDa), υψηλή ομοιότητα στην ακολουθία των αμινοξέων (συνήθως 60-80%) και έχουν ευδιάκριτη αλλά επικαλυπτόμενη ειδικότητα υποστρωμάτων (Gadagbui και James, 2000).

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πέντε κλάσεις στα θηλαστικά: α κλάση GST (A1-A4), μ κλάση GST (M1-M5), π κλάση GST (P1), θ κλάση GST (T1-T2) και ζ κλάση GST (Z1). Η μία κλάση (ζ) περιλαμβάνει ένζυμα τριμερούς μορφής συνδεδεμένα στη μεμβράνη ενώ οι υπόλοιπες κλάσεις (α, μ, π και θ) περιλαμβάνουν διαλυτές διμερείς πρωτεΐνες (Martínez - Lara *et al.*, 1996). Επίσης, στα ασπόνδυλα έχει βρεθεί και η σ κλάση GST. Στα

ψάρια έχουν περιγραφεί οι α, π και θ κλάσεις. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν κατανομή η οποία είναι ειδική των ιστών. Για παράδειγμα, η ισομορφή GST M3 έχει βρεθεί στους όρχεις, η ισομορφή GST M2 στον εγκέφαλο ενώ ένζυμα αυτής της κατηγορίας έχουν βρεθεί στο φακό των οφθαλμών. Στο ήπαρ έχουν ανιχνευθεί μεγάλες ποσότητες των α και θ ισομορφών ενώ στο έντερο η π ισομορφή. Η τελευταία ισομορφή εντοπίζεται κυρίως σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού παρά σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα (Slatinská *et al.*, 2008).

Οι ισομορφές του ενζύμου GST παρουσιάζουν ειδικότητα για συγκεκριμένα υποστρώματα, γεγονός που έχει χρησιμοποιηθεί στην κατηγοριοποίησή τους. Για παράδειγμα, τα ένζυμα της κλάσης α παρουσιάζουν προτίμηση για την ουσία υδροπεροξειδίου κυμενίου, της κλάσης μ για τα εποξειδία, της κλάσης π για τις ουσίες αιθακρυνικό οξύ (EA) και (+)anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-oxide (BPDE) και της κλάσης θ για την ουσία 4-βρωμιούχο νιτροφαιαιθύλιο (4-nitrophenethyl bromide) (Gadagbui και James, 2000).

1.6.1.5 Εντόπιση

Το ένζυμο GST είναι από τα κυριότερα ένζυμα της δεύτερης φάσης του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Βρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς, όπως βακτήρια, φυτά και ζώα. Το ένζυμο αυτό μπορεί να εντοπιστεί στο ενδοκυτταρικό υγρό και στα μικροσώματα. Τα ένζυμα που βρίσκονται στο ενδοκυτταρικό υγρό είναι διμερείς πρωτεΐνες, που αποτελούνται από δύο ίδιες ή διαφορετικές υπομονάδες (ομοδιμερή ή ετεροδιμερή) και έχουν μοριακό βάρος περίπου 25kDa. Κάθε υπομονάδα έχει ένα ενεργό μέρος το οποίο αποτελείται από δύο τμήματα με διαφορετική λειτουργία, το υδρόφιλο G τμήμα που δεσμεύει τη γλουταθειόνη και το γειτονικό υδρόφοβο H τμήμα που δεσμεύει διάφορες ηλεκτροφιλικές ουσίες. Το G τμήμα είναι ίδιο σε όλες τις κλάσεις του ενζύμου σαν αποτέλεσμα της υψηλής ειδικότητάς του για σύνδεση με τη γλουταθειόνη ενώ το H τμήμα διαφέρει λόγω της ευρέως φάσματος ειδικότητας σύνδεσης με χημικές ουσίες (Slatinská *et al.*, 2008).

Τα ένζυμα που εντοπίζονται στα μικροσώματα αποτελούν μια ομάδα από πρωτεΐνες συνδεδεμένες με τη μεμβράνη και έχουν μοριακό βάρος 16-18 kDa. Πρόκειται για τριμερείς πρωτεΐνες που παρουσιάζουν παρόμοιες υπομονάδες. Τα ένζυμα αυτά είναι

συνδεδεμένα στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου εκεί όπου παράγονται υποστρώματα με τη βοήθεια του συστήματος του κυτοχρώματος P450. Η εξουδετέρωση των εξωγενών χημικών ουσιών από τα ένζυμα αυτά είναι περισσότερο αποτελεσματική συγκριτικά με τα ένζυμα του ενδοκυτταρικού υγρού. Το ένζυμο GST που είναι συνδεδεμένο με τη μεμβράνη αποτελείται από έξι πρωτεΐνες: τις MGST 1, MGST 2, MGST 3, τη συνθάση C4 λευκοτριενίου, την πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την 5-λιποξυγενάση και τη συνθάση της προσταγλανδίνης E (Slatinská *et al.*, 2008).

1.6.1.6 Επαγωγή-αναστολή του ενζύμου

Η επαγωγή ή η αναστολή του ενζύμου ποικίλει ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στην οποία εκτίθεται ο οργανισμός, τη διάρκεια έκθεσης καθώς και το είδος του ψαριού. Όταν έγινε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση της ουσίας β-ναφθοφλαβόνη (BNF) σε ιριδίζουσα πέστροφα προκλήθηκε διπλάσια αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου (Anderson *et al.*, 1985). Σε άλλη έρευνα στο ίδιο είδος ψαριού (Goksoyr *et al.*, 1987) παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου επί 2,5 φορές μετά από έκθεση στην ίδια ουσία. Τέλος, οι Davies *et al.* (1994) διαπίστωσαν μείωση της ενζυμικής ενεργότητας όταν ψάρια του είδους *Oncorhynchus mykiss* εκτέθηκαν επί 10 ημέρες στην ουσία fenitrothion (οργανοφωσφορικό) σε δόση 45-220 µg/l.

Σε έρευνα των Teles *et al.* (2005) ανώριμα ψάρια του είδους *Sparus aurata* εκτέθηκαν στην ουσία 17-β οιστραδιόλη (4000 ng/l) και στο συνδυασμό της προηγούμενης ουσίας με την 4-εννεύλοφαινόλη (4000 ng/l + 50000 ng/l) για 4, 8, 12 και 16 ώρες και μελετήθηκε η επίδραση στα ηπατικά ένζυμα. Η ενεργότητα του GST παρουσίασε αύξηση μετά από έκθεση για 8 και 12 ώρες σε 17-β οιστραδιόλη ή 17-β οιστραδιόλη και 4-εννεύλοφαινόλη. Η αύξηση αυτή πιθανότατα ήταν αποτέλεσμα του αυξημένου καταβολισμού των στεροειδών στο ήπαρ των ψαριών.

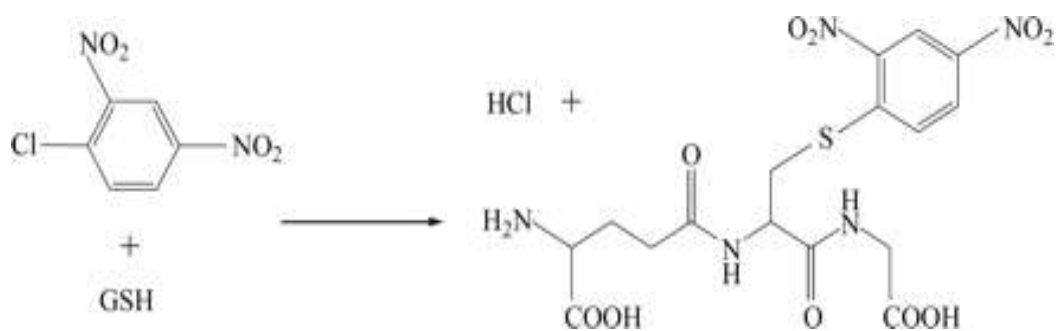
Παρόμοιο πείραμα πραγματοποιήθηκε από τους Carrera *et al.* (2007) οι οποίοι χορήγησαν ενδοπεριτοναϊκά 17-β οιστραδιόλη (10 µg/g ψαριού) ή 4-εννεύλοφαινόλη (100 και 200 µg/g ψαριού) σε σεξουαλικά ανώριμα ψάρια του είδους *Sparus aurata* και εκτίμησαν την επίδραση στα ηπατικά ένζυμα μετά από 10 ημέρες. Η ενεργότητα του ενζύμου GST ανεστάλη μετά από τη χορήγηση 17-β οιστραδιόλης ενώ αντίθετα ενισχύθηκε όταν η ουσία 4-εννεύλοφαινόλη χορηγήθηκε σε αυξημένη δόση.

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί λίγοι αναστολείς του ενζύμου. Οι αναστολείς είναι κυρίως λιποδιαλυτές ουσίες που διαπερνούν τη μεμβράνη του κυττάρου και μεταβολίζονται αργά. Η δράση τους επιτυγχάνεται με την προσκόλλησή τους στο ενεργό G τμήμα ή στο ενεργό H τμήμα του ενζύμου και σε άλλα τμήματά του. Παραδείγματα τέτοιων αναστολέων είναι οι ουσίες S-(4-βρωμο-2,3-διοξυβουτυλο) γλουταθειόνη και S-(φαινυλοσουλφονυλο) γλουταθειόνη (Slatinská *et al.*, 2008).

1.6.1.7 Μέθοδος μέτρησης

Οι ουσίες που μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματα για το ένζυμο GST είναι ποικίλες. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα για όλες τις ισομορφές (εκτός από την T1) είναι το 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζένιο (CDNB). Η αυξημένη ενεργότητα προς το υπόστρωμα αυτό αντιπροσωπεύει την ενεργότητα πολλών ισομορφών του ενζύμου GST με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διαφοροποιηθεί η επίδραση των ουσιών σε συγκεκριμένες ισομορφές. Άλλα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της ενεργότητας του ενζύμου είναι το 3,4-διχλωρονιτροβενζένιο (DCNB) που είναι ειδικό υπόστρωμα για την κλάση μ, το αιθακρυνικό οξύ (EA) που είναι ειδικό υπόστρωμα για την κλάση π και το 4-νιτροβενζυλοχλωρίδιο (NBC) που είναι ειδικό υπόστρωμα για την κλάση θ (Slatinská *et al.*, 2008).

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ολικής ενεργότητας του ενζύμου (όλων των ισομορφών εκτός από την T1) είναι η ανίχνευση της απορρόφησης του φωτός του προϊόντος που προκύπτει από την αντίδραση της αναχθείσας μορφής της γλουταθειόνης με το υπόστρωμα CDNB (Slatinská *et al.*, 2008). Είναι το καταλληλότερο υπόστρωμα κάνοντας τη δοκιμή ευκολότερη στη χρήση και περισσότερο ευαίσθητη. Από την αντίδραση της γλουταθειόνης με το υπόστρωμα αυτό προκύπτει η ουσία S-(2,4-δινιτροφαινυλο) γλουταθειόνη (Pecore, 2001) (εικ.10).



Εικόνα 10: Αντίδραση σύνδεσης της αναχθείσας μορφής της γλουταθειόνης (GSH) με το υπόστρωμα 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζένιο (CDNB) (Zhang *et al.*, 2006).

1.6.2 Σουλφοτρανσφεράση



Εικόνα 11: Ανθρώπινη σουλφοτρανσφεράση (ισομορφή SULT1B1) (Structural Genomics Consortium, 2012).

1.6.2.1 Γενικά

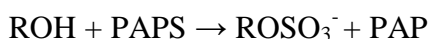
Οι σουλφοτρανσφεράσες (εικ.11) καταλύουν την αντίδραση θείωσης κατά το μεταβολισμό πολλών εξωγενών (συμπεριλαμβανομένων και των φαρμάκων) και ενδογενών χημικών ουσιών, όπως είναι οι ορμόνες, οι νευροδιαβιβαστές, τα πεπτίδια και τα λιπίδια (Bhuyan, 2010) Η αντίδραση της θείωσης περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Baumann το 1876. Πρόκειται για αντίδραση της φάσης II του μεταβολισμού που οδηγεί στη δημιουργία περισσότερο υδατοδιαλυτών προϊόντων, τα οποία μπορούν να απεκκριθούν από τον οργανισμό ευκολότερα.

Σε έρευνα των Finnsen και Eales (1998) μελετήθηκε η αντίδραση θείωσης των θυρεοειδών ορμονών μέσω των παραπάνω ενζύμων σε ψάρια του είδους *Oncorhynchus mykiss*. Στα ψάρια αυτά διαπιστώθηκε μεγαλύτερη ικανότητα σύνδεσης των ενζύμων με την ανενεργή μορφή της τριωδοθυρονίνης (rT_3), σε αντίθεση με τα ποντίκια στα οποία παρατηρήθηκε προτίμηση για την ενεργή μορφή (T_3) ακολουθούμενη από την ανενεργή τριωδοθυρονίνη (rT_3) και τη θυροξίνη (T_4).

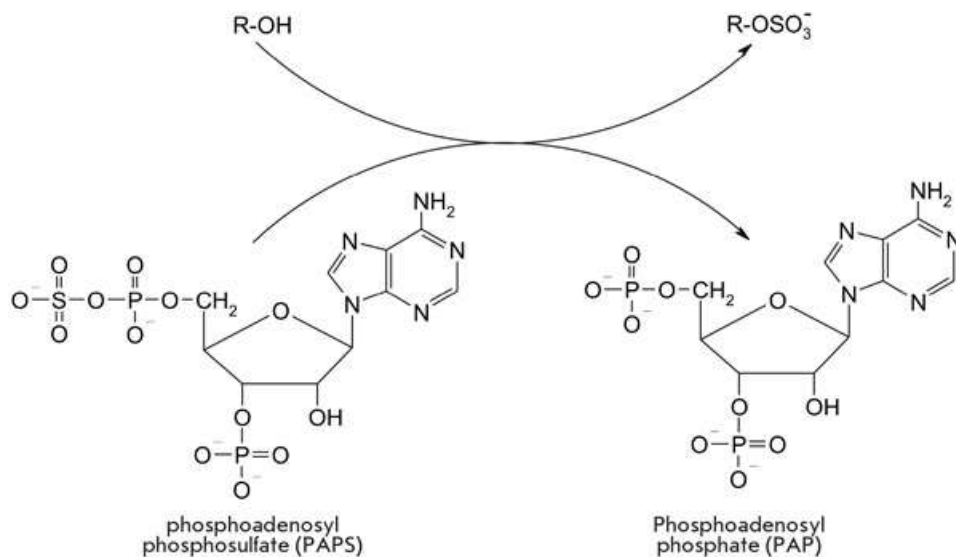
Υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον στο να καθοριστεί ο ρόλος των ενζύμων αυτών στη βιοενεργοποίηση των ξενοβιοτικών. Όπως έχει παρατηρηθεί οι σουλφοτρανσφεράσες εμπλέκονται σε μη επιθυμητές αντιδράσεις που καθορίζουν την ενεργοποίηση μεταλλαξιογόνων ουσιών, όπως οι βενζυλικές αλκοόλες, οι αρωματικές υδροξυλαμίνες και τα δευτερογενή νιτροαλκάνια. Οι παρατηρήσεις αυτές προέρχονται από έρευνες στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ανθρώπινες σουλφοτρανσφεράσες και όχι ψαριών (González, 2006).

1.6.2.2 Λειτουργία

Οι σουλφοτρανσφεράσες καταλύουν τη σύζευξη υδροξυλικών ομάδων, αλειφατικών αλκοολών, αρωματικών αμινών και υδροξυλαμινών. Αυτό που θα καθορίσει το είδος της σύζευξης που θα λάβει χώρα στη φάση II του μεταβολισμού είναι η συγκέντρωση του μεταβολίτη που προέρχεται από τη φάση I και θα εισέλθει στη συνέχεια στη δεύτερη φάση. Συνήθως, όταν ο μεταβολίτης απαντά σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπερισχύει η θείωση ενώ όσο η συγκέντρωση αυξάνει παρατηρείται προτίμηση για σύζευξη με άλλο ένζυμο (π.χ. UDPGT) (González, 2006). Η αντίδραση που καταλύουν οι σουλφοτρανσφεράσες είναι η εξής:



Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτείται η ουσία 3'-φωσφορική 5'-φωσφοθειϊκή αδενοσίνη (PAPS) της οποίας ο ρόλος είναι στην παροχή θειωδών ιόντων SO_3^- στο υπόστρωμα (εικ.12). Η ουσία PAPS σχηματίζεται από τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και ανόργανη θειική ρίζα μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων που καταλύονται από τα ένζυμα ATP σουλφορυλάση ($\text{SO}_4^{2-} + \text{ATP} \rightarrow \text{APS} + \text{PP}_i$) και APS κινάση ($\text{APS} + \text{ATP} \rightarrow \text{PAPS} + \text{ADP}$). Κύρια πηγή των θειικών ιόντων που απαιτούνται για τη σύνθεση της ουσίας PAPS αποτελεί η κυστεΐνη, η οποία απαντάται στο ενδοκυτταρικό υγρό σε περιορισμένη συγκέντρωση. Για τη σύνθεση ενός μορίου PAPS απαιτούνται δύο μόρια ATP. Γι' αυτό το λόγο η θείωση είναι μία αντίδραση με υψηλό ενεργειακό κόστος (González, 2006).



Εικόνα 12: Αντίδραση θείωσης που καταλύεται από τις σουλφοτρανσφεράσες (Knorre *et al.*, 2012)

Η ενεργότητα των σουλφοτρανσφερασών έχει μελετηθεί σε ορισμένα είδη ψαριών που χρησιμοποιούν φαινολικά υποστρώματα προερχόμενα από το υδάτινο περιβάλλον. Τέτοια είδη είναι τα *Carassius auratus*, *Poecilia reticulata*, *Phoxinus phoxinus*, *Rutilus rutilus*, *Cyprinus carpio* και *Tinca tinca*. Ωστόσο, τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στα θηλαστικά για να εκτιμηθεί η ενεργότητα των ενζύμων αυτών (π.χ. ακεταμινοφαίνη, 7-αιθοξικουμαρίνη, πενταχλωροφαινόλη) μεταβολίζονται στα ψάρια σε μικρό μόνο ποσοστό (González, 2006).

1.6.2.3 Κατάταξη-ονοματολογία

Ο χαρακτηρισμός των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τις σουλφοτρανσφεράσες στα διάφορα είδη ζώων βασίζεται σε έρευνες που έχουν γίνει στον άνθρωπο. Πέντε τύποι αυτών των ενζύμων κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (HAST1 έως HAST5). Οι σουλφοτρανσφεράσες του ανθρώπου παρουσιάζουν περισσότερο από 90% ομοιότητα στην ακολουθία των αμινοξέων αλλά ποικίλουν ως προς την ειδικότητα των υποστρωμάτων. Για το λόγο αυτό είχε προταθεί ότι όλες οι σουλφοτρανσφεράσες του ενδοκυτταρικού υγρού των σπονδυλωτών ανήκουν σε μια υπεροικογένεια, η οποία περιλαμβάνει 3 οικογένειες: φαινολικές (SULT1), υδροξυστεροειδείς (SULT2) και φλαβονοειδείς (SULT4) σουλφοτρανσφεράσες (González, 2006). Τα ένζυμα που ανήκουν

στην ίδια οικογένεια παρουσιάζουν τουλάχιστον 45% ομοιότητα στην ακολουθία των αμινοξέων ενώ αυτά που ανήκουν στην ίδια υποοικογένεια περισσότερο από 60% (Bhuyan, 2010). Κάθε οικογένεια παρουσιάζει διαφορετική ειδικότητα ως προς τα υποστρώματα. Τα ένζυμα που ανήκουν στην πρώτη οικογένεια και είναι γνωστά ως φαινολικές σουλφοτρανσφεράσες μεταβολίζουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, όπως οι εξωγενείς (π.χ. ακεταμινοφαίνη, 1-ναφθόλη, 4-νιτροφαινόλη, 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνη κ.α) και οι ενδογενείς ουσίες (π.χ. δοπαμίνη) (Jones, 2010). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τουλάχιστον 5 υποοικογένειες: SULT1A (φαινόλες), SULT1B (θυρεοειδείς ορμόνες), SULT1C (υδροξυαρυλαμίνες), SULT1D (εστέρες τυροσίνης) και SULT1E (οιστρογόνα) (Yasuda *et al.*, 2009). Τα ένζυμα της δεύτερης οικογένειας ονομάζονται υδροξυστεροειδείς σουλφοτρανσφεράσες και μεταβολίζουν υποστρώματα, όπως η τεστοστερόνη, η διϋδροεπιανδροστερόνη, η 17-αιθινυλ-οιστραδιόλη και τα χολικά οξέα. Ωστόσο, τα ένζυμα της οικογένειας αυτής μπορούν να συμμετέχουν στο μεταβολισμό και κάποιων φαρμακευτικών ουσιών, όπως είναι η 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνη (Jones, 2010). Η δεύτερη οικογένεια περιλαμβάνει 2 υποοικογένειες: SULT2A (DHEA-διϋδροεπιανδροστερόνη) και SULT2B (χολοστερόλη/πρεγνενολόνη SULT) (Bhuyan, 2010). Μέχρι σήμερα δεν έχουν αναγνωριστεί κάποια υποστρώματα για τα ένζυμα της τρίτης οικογένειας (SULT4) (Jones, 2010). Παρόλα αυτά τα στοιχεία που είναι γνωστά για τις ισομορφές των παραπάνω ενζύμων στα ψάρια είναι ελάχιστα. Ορισμένες έρευνες (Finnsen και Eales, 1998) έχουν δείξει ότι οι σουλφοτρανσφεράσες στην ιριδιζούσα πέστροφα ανήκουν σε ένα μόνο τύπο (φαινολικές), σε αντίθεση με τα θηλαστικά. Σε πρόσφατη έρευνα των Yasuda *et al.* (2009) σε ψάρια του είδους *Danio rerio* περιγράφηκε και η οικογένεια SULT3 (ισομορφές ST1 και ST2).

1.6.2.4 Εντόπιση

Έχουν διαπιστωθεί δύο κατηγορίες ενζύμων: (1) οι συνδεδεμένες με τη μεμβράνη σουλφοτρανσφεράσες που εντοπίζονται στη συσκευή του Golgi και είναι υπεύθυνες για τη θείωση πεπτιδίων, λιπιδίων και άλλων μακρομορίων και (2) οι σουλφοτρανσφεράσες που εντοπίζονται στο ενδοκυτταρικό υγρό και είναι υπεύθυνες για το μεταβολισμό ξενοβιοτικών και μικρών ενδογενών ουσιών, όπως είναι τα στεροειδή, οι ορμόνες και άλλα μικρότερα μόρια. Τα ένζυμα της δεύτερης κατηγορίας εμπλέκονται στη φάση II του μεταβολισμού (Bhuyan, 2010).

Από μελέτες που έχουν γίνει στον άνθρωπο παρατηρήθηκε ότι η ισομορφή SULT1A απαντάται σε πολλούς ιστούς, όπως στο ήπαρ, στον εγκέφαλο, στο μαστό, στο έντερο (υψηλά επίπεδα SULT1A3), στο ενδομήτριο, στα επινεφρίδια, στα αιμοπετάλια και στους πνεύμονες (SULT1A1 και SULT1A3). Οι ισομορφές SULT1B, SULT1C και SULT1E έχουν εντοπιστεί σε ιστούς, όπως στο έντερο, στο κόλον, στο στομάχι, στο νεφρό, στους θυρεοειδείς αδένες και στο ήπαρ και αυτά τα ένζυμα εμπλέκονται στο μεταβολισμό των θυρεοειδών ορμονών (SULT1B1), των οιστρογόνων (SULT1E1) ή παρουσιάζουν άγνωστο ρόλο. Τα ένζυμα που ανήκουν στη δεύτερη οικογένεια εντοπίζονται σε ορμονοεξαρτώμενους ιστούς αφού είναι αυτά που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των υδροξυστεροειδών (Jones, 2010).

1.6.2.5 Επαγωγή-αναστολή ενζύμου

Λίγες είναι οι έρευνες που έχουν γίνει στα ψάρια σχετικά με την επίδραση διαφόρων παραγόντων στην ενεργότητα των παραπάνω ενζύμων. Οι Ohkimoto *et al.* (2003) διαπίστωσαν ότι ουσίες με οιστρογόνο δράση που απαντώνται στο περιβάλλον προκαλούν αναστολή της θείωσης της 17β-οιστραδιόλης σε ψάρια του είδους *Danio rerio*. Αναστολή της θείωσης της ίδιας ουσίας παρατηρήθηκε και στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) σε έρευνα των Wang και James (2007), οι οποίοι διαπίστωσαν την ανασταλτική επίδραση ουσιών που ανήκουν στα πολυχλωριωμένα διφαινύλια και φαρμακευτικών ουσιών (σελεξοκίβη) στην ενεργότητα των σουλφοτρανσφερασών.

ΣΚΟΠΟΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση της επίδρασης της σύστασης των ιχθυοτροφών στο βιομετασχηματισμό και την αποτοξικοποίηση του οξολινικού οξέος στην τσιπούρα (*Sparus aurata*). Ο έλεγχος αφορά την επίδραση της αντικατάστασης του ιχθυελαίου των τροφών από φυτικά έλαια στα ένζυμα βιομετασχηματισμού. Τα ένζυμα που μελετώνται είναι τόσο της φάσης I [διαθυλάση της 7-αιθοξυριζορουφίνης (EROD) και διμεθυλάση της 7-μεθοξυριζορουφίνης (MROD)] όσο και της φάσης II [S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) και σουλφοτρανσφεράση (SULT)]. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε ψάρια του είδους *Sparus aurata* που αποτελεί το πλέον εκτρεφόμενο είδος στη Μεσόγειο Θάλασσα με μεγάλη εμπορική σημασία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2
ΥΛΙΚΑ-ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

2.1 ΥΛΙΚΑ

Όλα τα ένζυμα, τα ενζυμικά υποστρώματα, τα αντιδραστήρια, οι πρωτεΐνες και οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των ενζύμων ήταν από τον οίκο Sigma-Aldrich (Ελλάδα). Όλες οι χημικές ουσίες (στερεάς ή υγρής μορφής) ήταν αναλυτικής καθαρότητας ($\geq 99\%$). Το οξολινικό οξύ αγοράστηκε από την Aquinox (VetHellas, A.E.B.E) (Ελλάδα).

2.2 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Φασματοφωτόμετρο του οίκου TECAN (μοντέλο Genios Pro 96/384) για τη μέτρηση της απορρόφησης του φωτός και του φθορισμού με τη χρήση μικροπλακών.

Φασματοφωτόμετρο του οίκου Beckman (μοντέλο DU 64) για τη μέτρηση της απορρόφησης του φωτός με τη χρήση κυψελίδων.

Μηχανικό τμήμα ομογενοποιητή του οίκου Heidolph (μοντέλο RZR 2020).

Ομογενοποιητής τύπου Potter-Elvehjem με Teflon® έμβολο.

Φυγόκεντρος του οίκου Sorvall (μοντέλο RC 2-B).

pHμετρο του οίκου MeterLab (μοντέλο PHM 210).

Υδατόλουτρο του οίκου Memmert (μοντέλο WB 14).

Αναλυτικοί ζυγοί με ικανότητα ακρίβειας 10^{-5} g, 10^{-4} g και 10^{-2} g.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Τα ψάρια του είδους *Sparus aurata* ($110\pm 13\text{g}$) αγοράστηκαν από τον όμιλο ΣΕΛΟΝΤΑ (Ελλάδα) και διατηρήθηκαν στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Διατροφής και Παθολογίας υδρόβιων οργανισμών στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε) στον Άγιο Κοσμά Ελληνικού για 3 μήνες πριν την έναρξη του πειράματος. Τα ψάρια διατηρήθηκαν σε δεξαμενές χωρητικότητας 850 λίτρων με ιχθυοπυκνότητα 56 ψάρια ανά δεξαμενή. Η μέση θερμοκρασία του νερού ήταν $25\pm 1^\circ\text{C}$ και η αλατότητα 35‰. Κατά τη διάρκεια του πειράματος τα ψάρια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες που διέφεραν ως προς την τροφή που καταλάωναν (3 δεξαμενές ανά ομάδα). Στα ψάρια κάθε ομάδας χορηγήθηκε το οξολινικό οξύ με την τροφή στη δόση των 30 mg/kg ψαριού/ημέρα για 7 ημέρες.

3.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΡΟΦΩΝ

Οι ιχθυοτροφές παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο. Η σύνθεση της κάθε ιχθυοτροφής φαίνεται στον πίνακα 2. Και στις δύο τροφές έχει εισαχθεί σογιάλευρο το οποίο έχει αντικαταστήσει το 50% περίπου του ιχθυάλευρου. Η τροφή Α περιλαμβάνει ιχθυέλαιο σε ποσοστό 15%. Στην τροφή Β το 66% του ιχθυελαίου (10% της τροφής) αντικαταστάθηκε από φυτικά έλαια (κραμβέλαιο, λινέλαιο και φοινικέλαιο σε ποσοστά 1,7, 5,8 και 2,5%, αντίστοιχα). Οι φαρμακούχες ιχθυοτροφές παρασκευάστηκαν με ανάμιξη του οξολινικού οξέος με την καθεμία από τις ιχθυοτροφές (Α και Β) και χορηγήθηκαν στα ψάρια με το χέρι μία φορά την ημέρα (στις 13:00) για 7 ημέρες. Η ημερήσια δόση του οξολινικού οξέος που χορηγήθηκε μέσω της τροφής ήταν 30 mg/kg ψαριού/ημέρα για 7 ημέρες.

Πίνακας 2: Σύνθεση των τροφών Α και Β (%)

Συστατικά (%)	Τροφή Α	Τροφή Β
Ιχθυάλευρο (Ακατέργαστη πρωτεΐνη: CP 70%)	15	15
Συγκέντρωση πρωτεΐνης (CPSP 902)	5	5
Γλουτένη καλαμποκιού	40	40
Σογιάλευρο	14	14
Εξωθημένο σιτάρι	4	4
Ιχθυέλαιο	15	5
Κραμβέλαιο	0	1,7
Λινέλαιο	0	5,8
Φοινικέλαιο	0	2,5
Λεκιθίνη σόγιας	1	1
Συγκολλητική ουσία	1	1
Πρόμιγμα μετάλλων	1	1
Πρόμιγμα βιταμινών	1	1
CaHPO₄ · 2H₂O (18%P)	2	2
L-λυσίνη	0,55	0,55

3.3 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Έγινε δειγματοληψία 3 ψαριών από κάθε δεξαμενή (δεξαμενές 2Α, 1Γ και 4Β) στην οποία χρησιμοποιήθηκε η τροφή Α και 3 ψαριών από κάθε δεξαμενή (δεξαμενές 2Γ, 4Γ και 1Α) στην οποία χρησιμοποιήθηκε η τροφή Β (μέσο βάρος ψαριών 127 ± 18 g). Η δειγματοληψία έγινε μία ημέρα πριν την έναρξη χορήγησης του οξολινικού οξέος (ημέρα 0), μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης (ημέρα 5) και μία ημέρα μετά το τέλος της χορήγησής του (ημέρα 8). Όλες οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στις 9.00 το πρωί κάθε ημέρα δειγματοληψίας και μετά από αναισθητοποίηση των ψαριών με χρήση του αναισθητικού 2-φαινοξυαιθανόλη (2 ml/l). Μετά από τη ζύγιση ακολούθησε θανάτωση των ψαριών και απομάκρυνση του ήπατος. Τα δείγματα ήπατος τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια σε βαθειά κατάψυξη (-85°C).

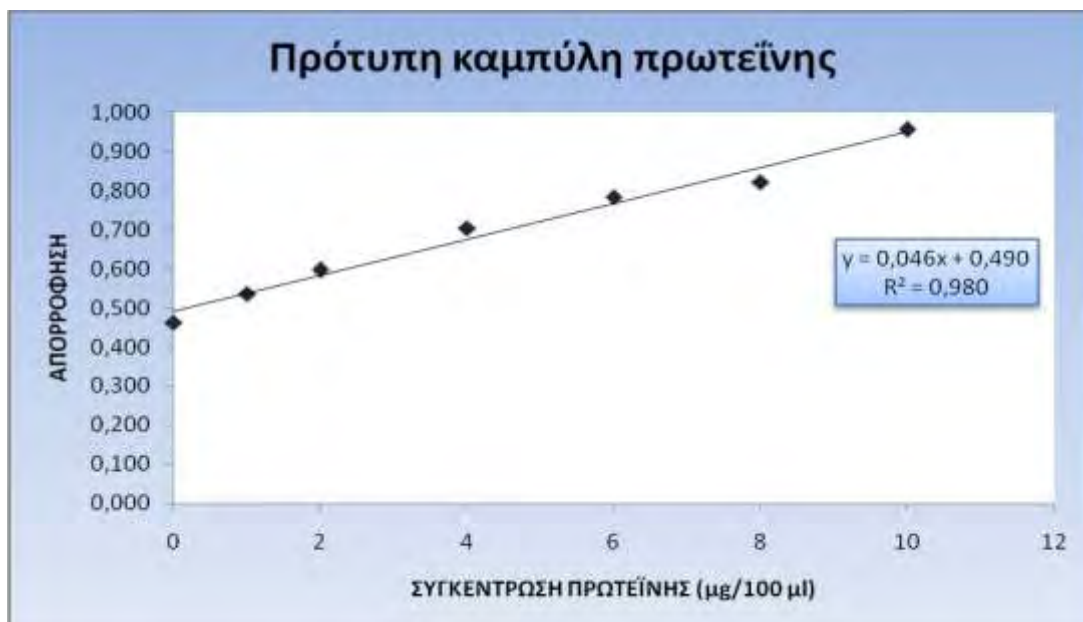
3.4 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν από τους -85°C σε πάγο όπου διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της προετοιμασίας για την εργαστηριακή εξέταση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ζύγιση δείγματος ιστού περίπου 1g που τοποθετήθηκε σε σωλήνα ομογενοποίησης (ομογενοποιητής τύπου Potter-Elvehjem με Teflon® έμβολο). Στο σωλήνα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 0,1 M και $\text{pH}=7,4$ το οποίο περιείχε 0,15 M χλωριούχο κάλιο KCl, 1 mM διθειοθρεϊτόλη DTT, 1 mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ EDTA και 0,1 M φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο-φθορίδιο PMSF) σε αναλογία 1:4 (ιστός:ρυθμιστικό διάλυμα). Ακολούθησε ομογενοποίηση και φυγοκέντρωση στα 10.000 g για 20 min στους 4°C . Το υπερκείμενο συλλέχθηκε με πιπέτα και με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η ανάδευση του φυγοκεντρισμένου διαλύματος καθώς και η λήψη με την πιπέτα δείγματος από τη στιβάδα των λιπιδίων. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε σε φιαλίδια πολυαιθυλενίου και τοποθετήθηκε σε βαθειά κατάψυξη στους -85°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η βιοχημική ανάλυση.

3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

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

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης δημιουργήθηκε μία πρότυπη καμπύλη που απεικονίζει την απορρόφηση φωτός που παρουσιάζουν διαλύματα πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης στα 600 nm και επομένως δείχνει τη σχέση συγκέντρωσης-απορρόφησης. Παρασκευάστηκε αρχικά ένα πρότυπο διάλυμα με αραιώση αλβουμίνης από ορό μόσχου (0,1 mg/ml) σε απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια αραιώθηκε το διάλυμα αυτό με απεσταγμένο νερό παρασκευάζοντας νέα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 - 10 μg/100 μl). Σε μικροπλάκα πολλαπλών θέσεων προστέθηκαν διάφοροι όγκοι των παραπάνω διαλυμάτων και του αντιδραστηρίου Bradford, μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 600 nm και προέκυψε η καμπύλη που απεικονίζεται στο γράφημα 3.

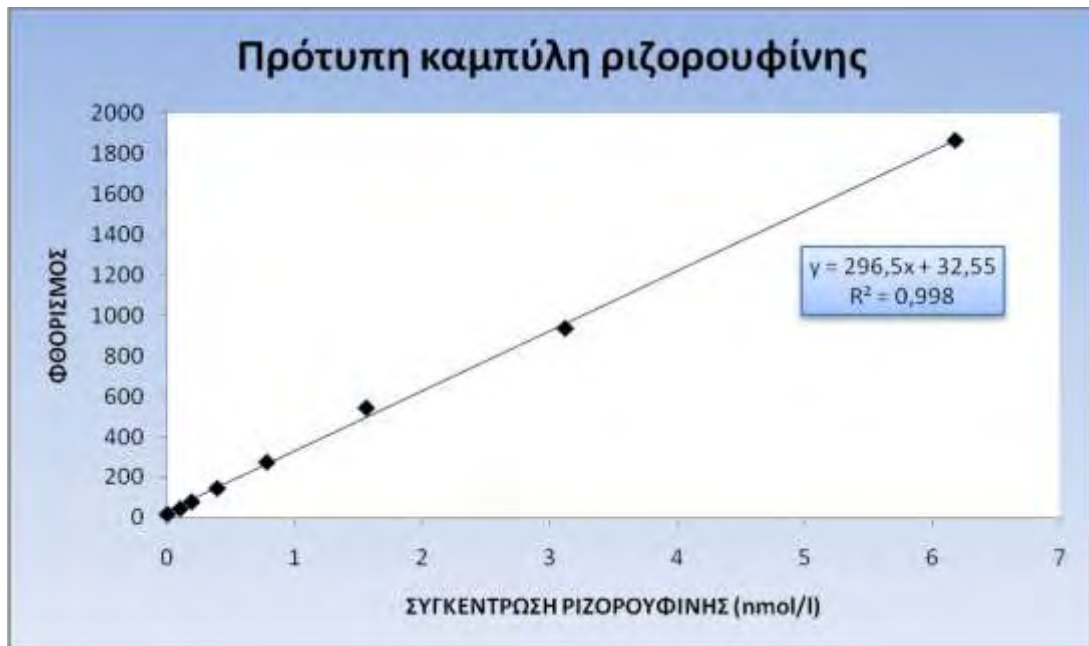


Γράφημα 3: Πρότυπη καμπύλη διαλυμάτων αλβουμίνης η οποία απεικονίζει τη σχέση συγκέντρωσης-απορρόφησης.

Ακολούθησε προετοιμασία των δειγμάτων τα οποία από τους -85°C μεταφέρθηκαν σε πάγο όπου διατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Στη συνέχεια, κάθε δείγμα αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:500 και το αραιωμένο δείγμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδια πολυαιθυλενίου. Όγκος 100 μl από το αραιωμένο δείγμα και 200 μl από το αντιδραστήριο Bradford προστέθηκαν σε μικροπλάκα πολλαπλών θέσεων και υπολογίστηκε η απορρόφηση στα 600 nm. Με βάση την πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης και τις μετρήσεις που προέκυψαν από την απορρόφηση των δειγμάτων υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματα.

3.6 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΡΙΖΟΡΟΥΦΙΝΗΣ

Η καμπύλη αυτή απεικονίζει το φθορισμό που παρουσιάζουν τα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων ριζορουφίνης και επομένως δείχνει τη σχέση συγκέντρωσης-φθορισμού. Για τη δημιουργία της παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα διαλύοντας 1 mg ριζορουφίνης σε 50 ml διμεθυλσουλφοξειδίου (DMSO). Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και μακριά από το φως. Στη συνέχεια έγινε αραιώση του σταθερού αυτού διαλύματος με ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M Tris/0,1 M NaCl pH=8) σε αναλογία 1:2. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης φωτός του αραιωμένου αυτού διαλύματος σε φασματοφωτόμετρο (Beckman) σε μήκος κύματος 572 nm. Η απορρόφηση του συγκεκριμένου διαλύματος ήταν 1,7666. Εφαρμόζοντας το νόμο Beer-Lambert, που συσχετίζει την απορρόφηση του φωτός από μια ουσία με τη συγκέντρωσή της [$A=C \cdot e \cdot l$], όπου A: η απορρόφηση στο μήκος κύματος που έχουμε ορίσει, C: η συγκέντρωση της ουσίας (ριζορουφίνη), e: ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης $73,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και l: η διατομή της κυψελίδας (1 cm)], προέκυψε ότι η συγκέντρωση του παραπάνω διαλύματος ήταν 24 μM . Στη συνέχεια, αραιώθηκε το προηγούμενο διάλυμα (το ήδη αραιωμένο με ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1:2) με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1:1000. Η συγκέντρωση του διαλύματος έγινε 24 nM (ή nmol/l). Ακολούθησε παρασκευή διαλυμάτων ριζορουφίνης σε συγκεντρώσεις 0 - 0,1 - 0,19 - 0,39 - 0,78 - 1,56 - 3,12 - 6,18 nM με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα. Τέλος, μετρήθηκε η ένταση φθορισμού των παραπάνω διαλυμάτων ριζορουφίνης σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (TECAN, Genios) σε φάσμα διέγερσης 535 nm και φάσμα εκπομπής 590 nm. Από τις μετρήσεις προέκυψε η καμπύλη που απεικονίζεται στο γράφημα 4.



Γράφημα 4: Πρότυπη καμπύλη διαλυμάτων ριζορουφίνης η οποία απεικονίζει τη σχέση συγκέντρωσης-φθορισμού.

3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ EROD

Η ενεργότητα του ενζύμου EROD μετρήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο των Burke και Mayer (1974), προσαρμοσμένη από τους Galgani και Payne (1991), Burgeot (2001) και του εργαστηρίου Διατροφής & Παθολογίας υδρόβιων οργανισμών (Άγιος Κοσμάς, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε) για μετρήσεις σε κλάσματα S9 (10.000 g) και σε μικροπλάκα πολλαπλών μετρήσεων. Η ενεργότητα του ενζύμου EROD αντιπροσωπεύει το βαθμό απαιθυλίωσης του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνης, παρουσία των πρωτεϊνών της υποοικογένειας CYP1A, με τελικό προϊόν την ουσία ριζορουφίνη. Η καταλυτική ενεργότητα ως προς αυτό το υπόστρωμα είναι μία ένδειξη της ενεργότητας του ενζύμου που υπάρχει στο δείγμα και εκφράζεται ως η συγκέντρωση της ριζορουφίνης που παράγεται ανά λεπτό (pmol/min/μl).

Για τη μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου έγινε μεταφορά των δειγμάτων από τους -85°C σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και ακολούθησε η παρασκευή των παρακάτω διαλυμάτων. Παρασκευάστηκε διάλυμα 7-αιθοξυριζορουφίνης στη συγκέντρωση των 0,4 mM διαλύοντας 1 mg του αιθυλαιθέρα της ριζορουφίνης σε 10 ml DMSO. Για τη μέτρηση των άγνωστων δειγμάτων παρασκευάστηκε διάλυμα 7-αιθοξυριζορουφίνης συγκέντρωσης 70 μM μετά από αραιώση με ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M Tris/0,1 M NaCl pH=8) και το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και μακριά από το φως.

Ακολούθησε η παρασκευή διαλύματος NADPH συγκέντρωσης 10 mM με τη διάλυση της ουσίας β-nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH) σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M Tris/0,1 M NaCl pH=8). Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε μικροπλάκα πολλαπλών θέσεων προστέθηκε σε κάθε κελί όγκος 10 μl από κάθε δείγμα (χωρίς να προηγηθεί αραιώση), 10 μl διαλύματος 7-αιθοξυριζορουφίνης συγκέντρωσης 70 μM, 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος συγκέντρωσης 0,1 M και 10 μl διαλύματος NADPH συγκέντρωσης 10 mM. Το διάλυμα NADPH προστέθηκε τελευταίο για να ξεκινήσει η αντίδραση. Ακολούθησε μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (TECAN, Genios) σε φάσμα διέγερσης 535 nm και φάσμα εκπομπής 590 nm στους 20°C . Οι μετρήσεις αντιπροσώπευαν το φθορισμό της ουσίας ριζορουφίνης που προέκυπτε από την αντίδραση της απαιθυλίωσης του υποστρώματος 7-αιθοξυριζορουφίνης μέσω των

ενζύμων της υποοικογένειας CYP1A ανά λεπτό. Με βάση την πρότυπη καμπύλη της ριζορουφίνης και τις παραπάνω μετρήσεις υπολογίστηκε η συγκέντρωσή της στα δείγματα ανά λεπτό. Η ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε από τον τύπο: Ενεργότητα EROD = $(R \times V_R)/(P \times V_S)$ όπου:

R (pmol/min/μl): η συγκέντρωση της ριζορουφίνης,

V_R (μl): ο ολικός όγκος σε κάθε κελί,

P (mg/μl): η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος,

V_S (μl): ο όγκος του δείγματος σε κάθε κελί

και εκφράστηκε σε pmol/min/mg πρωτεΐνης.

3.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ MROD

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου MROD ήταν ίδια με αυτή που περιγράφηκε για το ένζυμο EROD, με τη διαφορά ότι παρασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε άλλο υπόστρωμα (διάλυμα 7-μεθοξυριζορουφίνης συγκέντρωσης 0,4 mM). Η 7-μεθοξυριζορουφίνη διαλύθηκε πρώτα σε DMSO.

3.9 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ GST

Η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου GST βασίστηκε στη μέθοδο των Habig *et al.* (1974). Μετά τη μεταφορά των δειγμάτων από τους -85°C στους 4°C ακολούθησε αραιώση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ($0,1\text{ M pH}=6,5$) σε αναλογία 1:200. Τα αραιωμένα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια πολυαιθυλενίου και διατηρήθηκαν στον πάγο (4°C).

Στη συνέχεια και λίγο πριν τη μέτρηση παρασκευάστηκε διάλυμα γλουταθειόνης (GSH) συγκέντρωσης 10 mM μετά από διάλυση της αναχθείσας μορφής της L-γλουταθειόνης στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα της γλουταθειόνης διατηρήθηκε στους 4°C μέχρι τη χρήση του.

Ακολούθησε παρασκευή, λίγο πριν τη μέτρηση, διαλύματος 1-χλωρο-2,4-δινιτροβενζένιο (CDNB) συγκέντρωσης 60 mM μετά από τη διάλυση της ουσίας σε αιθανόλη. Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και μακριά από το φως μέχρι τη χρήση του.

Τέλος, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα που περιελάμβανε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, διάλυμα GSH και διάλυμα CDNB σε αναλογία $4,950\text{ μl}: 900\text{ μl}: 150\text{ μl}$. Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε στους 4°C και μακριά από το φως μέχρι τη χρήση του.

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

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

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας του ενζύμου GST χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

Ενεργότητα GST (nmol/min/ml) = $[\Delta A_{340}/\text{min} \times V(\text{ml}) \times \text{dil}] / [\varepsilon(\text{mM}) \times V_{\text{enz}}(\text{ml})]$ όπου:

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

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

dil: η αραίωση του δείγματος,

ε (mM): ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του προϊόντος της αντίδρασης στα 340 nm,

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

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

3.10 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ENZYMOY SULT

Η μέτρηση της ενεργότητας της σουλφοτρανσφεράσης στηρίχθηκε σε τροποποίηση των μεθόδων που περιγράφονται από τους Beckman (1991) και González *et al.* (2009). Περιληπτικά, για τη μέτρηση του ενζύμου αυτού παρασκευάστηκε αρχικά ένα πρότυπο διάλυμα διαλύοντας 1 mg ριζορουφίνης σε 50 ml DMSO. Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και μακριά από το φως. Στη συνέχεια έγινε αραίωση του σταθερού αυτού διαλύματος με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0,1 M pH=7,4) σε αναλογία 1:2. Ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης φωτός σε φασματοφωτόμετρο (Beckman) και σε μήκος κύματος 572 nm. Η απορρόφηση του συγκεκριμένου διαλύματος ήταν 1,545. Εφαρμόζοντας το νόμο Beer-Lambert, που συσχετίζει την απορρόφηση φωτός από μια ουσία με τη συγκέντρωσή της, προέκυψε ότι η συγκέντρωση του παραπάνω διαλύματος ήταν 21,1 μM. Ακολούθησε η παρασκευή διαλύματος 3'-φωσφορικής 5'-φωσφοθειϊκής αδενοσίνης (PAPS) συγκέντρωσης 40 μM μετά από διάλυση της PAPS σε δις απεσταγμένο νερό.

Σε μικροπλάκα πολλαπλών θέσεων τοποθετήθηκε σε κάθε κελί όγκος 25 μl από το κάθε δείγμα (χωρίς να προηγηθεί αραίωση), 10 μl διαλύματος ριζορουφίνης συγκέντρωσης 20 μM και 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος (διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH=7,4). Στο τέλος, προστέθηκε όγκος 25 μl διαλύματος PAPS συγκέντρωσης 40 μM για να ξεκινήσει η αντίδραση. Ακολούθησε μέτρηση του φθορισμού σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (TECAN, Genios) σε φάσμα διέγερσης 535 nm και φάσμα εκπομπής 590 nm στους 20°C. Με βάση την πρότυπη καμπύλη της ριζορουφίνης και τις παραπάνω μετρήσεις υπολογίστηκε η συγκέντρωση της ουσίας ριζορουφίνη που μειώθηκε στο λεπτό. Η ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε από τον τύπο:

Ενεργότητα SULT = $(R \times V_R)/(P \times V_S)$ όπου:

R (pmol/min/μl): η συγκέντρωση της ριζορουφίνης,

V_R (μl): ο ολικός όγκος σε κάθε κελί,

P (mg/μl): η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος,

V_S (μl): ο όγκος του δείγματος σε κάθε κελί

και εκφράστηκε σε $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ πρωτεΐνης.

3.11 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του προγράμματος SPSS[®] (IBM[®] SPSS[®] STATISTICS, version 20). Έγινε αρχικά έλεγχος της κανονικότητας των κατανομών με τα Shapiro-Wilk και Kolmogorov-Smirnov τεστ. Στην περίπτωση της κανονικότητας των κατανομών η σύγκριση της ενζυμικής ενεργότητας μεταξύ των διατροφικών ομάδων κάθε ημέρα μέτρησης έγινε με χρήση t τεστ ενώ όταν οι κατανομές δεν ακολουθούσαν την κανονικότητα χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Mann-Whitney U τεστ. Για τη σύγκριση της ενζυμικής ενεργότητας κάθε διατροφικής ομάδας στις διάφορες χρονικές περιόδους χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Friedman τεστ. Όταν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές ακολούθησε το Wilcoxon τεστ για τη σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ των ημερών. Σε κάθε περίπτωση οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές όταν $P < 0,05$. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές \pm SD.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

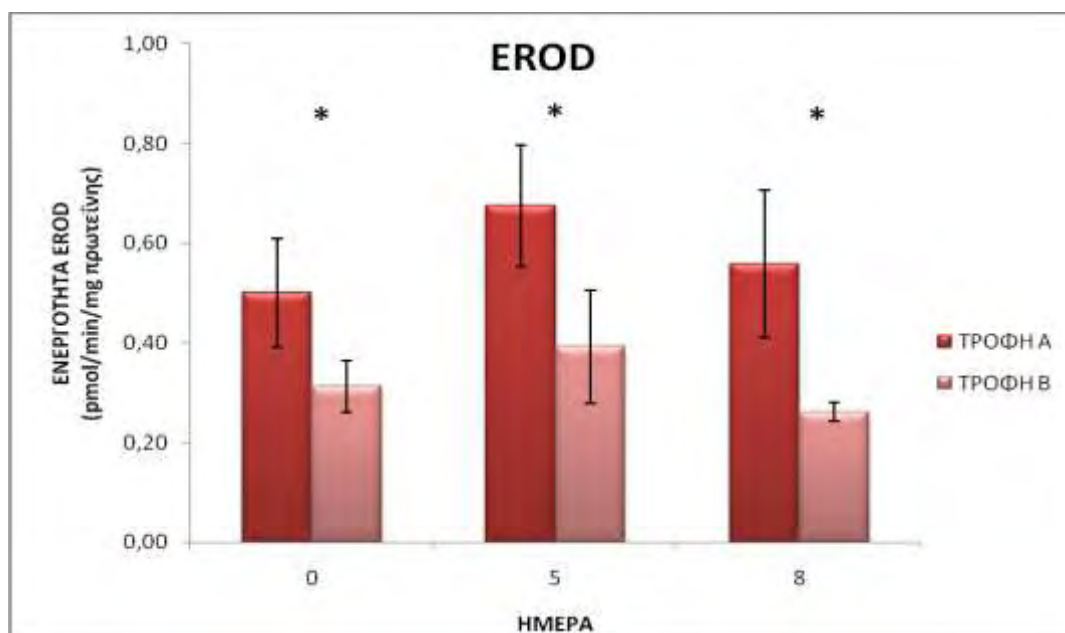
4.1 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΑΙΘΥΛΑΣΗ ΤΗΣ ΑΙΘΟΞΥΡΙΖΟΡΟΥΦΙΝΗΣ (EROD)

Η ενεργότητα του ενζύμου EROD στα ψάρια των δύο ομάδων (τροφή Α και τροφή Β) απεικονίζεται στον πίνακα 3 και στο γράφημα 5:

Πίνακας 3: Αποτελέσματα από την επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου EROD σε τσιπούρες που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.

Ενεργότητα EROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης)			
	Ημέρα 0	Ημέρα 5	Ημέρα 8
Τροφή Α	0,50±0,11 ^a	0,67±0,12 ^b	0,56±0,15 ^{a,b}
Τροφή Β	0,31±0,05 ^c	0,39±0,11 ^c	0,26±0,02 ^c

Οι αριθμοί 0-5-8 αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές ± SD. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές. Οι στατιστικές διαφορές καθορίστηκαν με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$ ($P<0.05$) και $n=9$.



Γράφημα 5: Επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου EROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής. Οι αριθμοί 0-5-8 στον άξονα χ αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P<0,05$). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές ± SD, $n=9$.

Όταν στα ψάρια χορηγήθηκε τροφή που είχε ως πηγή λίπους το ιχθυέλαιο, η ενεργότητα του ενζύμου EROD επηρεάστηκε μετά από τη χορήγηση του οξολινικού οξέος (πίνακας 3, γράφημα 5). Συγκεκριμένα, η ενζυμική ενεργότητα μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης του ΟΑ ήταν κατά 35% περίπου υψηλότερη από εκείνη πριν την έναρξη της χορήγησης. Ωστόσο, η αύξηση αυτή αν και μικρή ήταν στατιστικά σημαντική. Ακολούθως, εκδηλώθηκε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας η οποία ήταν ασήμαντου βαθμού. Η μέση τιμή της ενεργότητας του ενζύμου μία ημέρα μετά τη διακοπή της χορήγησης του ΟΑ κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα σε σχέση με την ημέρα 0.

Η πορεία της ενζυμικής ενεργότητας στο ήπαρ των ψαριών που κατανάλωσαν τροφή με φυτικά έλαια δεν παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις με την πάροδο του χρόνου. Οι μέσες τιμές κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα τις ημέρες 0, 5 και 8 (πίνακας 3, γράφημα 5) με μία ήπια αύξηση την ημέρα 5 η οποία όμως ήταν ασήμαντου βαθμού. Την ημέρα 8 διαπιστώθηκε μειωμένη ενεργότητα συγκριτικά με τις προηγούμενες ημέρες μέτρησης χωρίς όμως η μείωση αυτή να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική ($P>0,05$).

Συγκρίνοντας την ενεργότητα του EROD μεταξύ των ψαριών των δύο ομάδων κάθε ημέρα μέτρησης διαπιστώθηκε ότι πριν ξεκινήσει η χορήγηση του ΟΑ η ενεργότητα ήταν σημαντικά μικρότερη στα ψάρια που έλαβαν την τροφή Β (το 60% της αντίστοιχης των ψαριών της πρώτης ομάδας). Ακόμα και μετά από τέσσερις ημέρες λήψης του ΟΑ καθώς και μία ημέρα μετά τη διακοπή της χορήγησής του τα ψάρια που κατανάλωσαν την τροφή Β εξακολουθούσαν να παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερη ενζυμική ενεργότητα συγκριτικά με τα ψάρια που έλαβαν την τροφή Α (πίνακας 3, γράφημα 5).

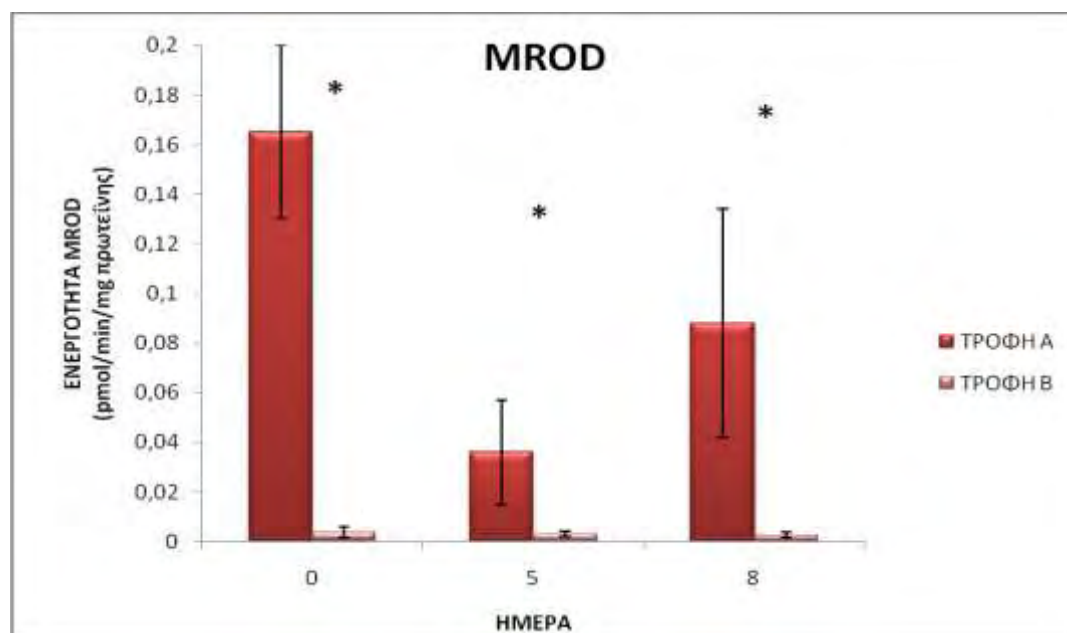
4.2 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΜΕΘΥΛΑΣΗ ΤΗΣ 7 ΜΕΘΟΞΥΡΙΖΟΡΟΥΦΙΝΗΣ (MROD)

Η ενεργότητα του ενζύμου MROD στα ψάρια των δύο ομάδων (τροφή Α και τροφή Β) απεικονίζεται στον πίνακα 4 και στα γραφήματα 6-8:

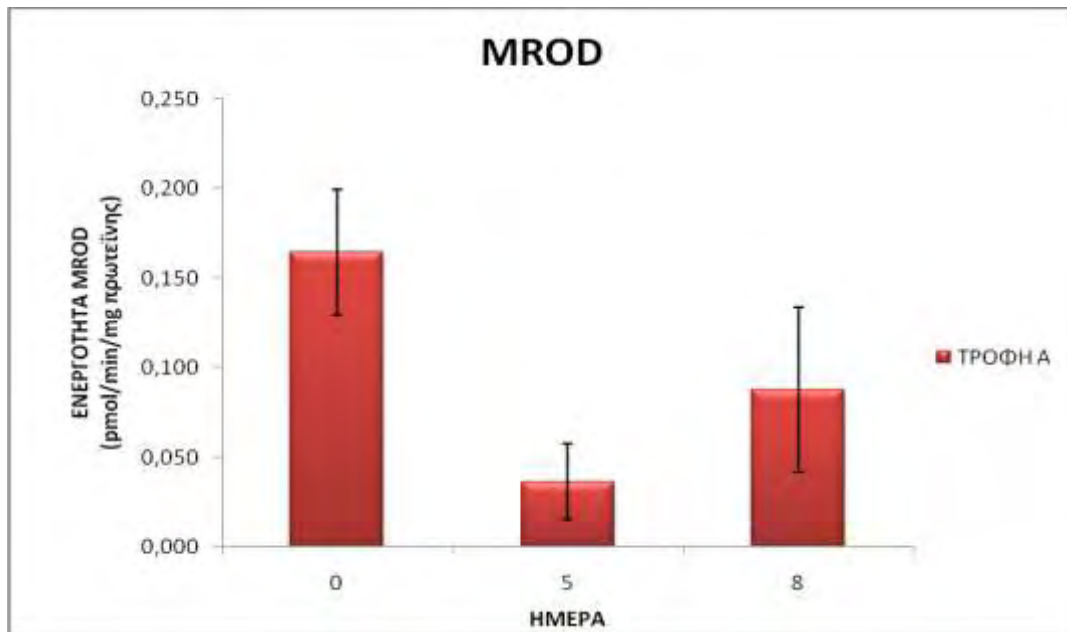
Πίνακας 4: Αποτελέσματα από την επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου MROD σε τσιπούρες που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.

Ενεργότητα MROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης)			
	Ημέρα 0	Ημέρα 5	Ημέρα 8
Τροφή Α	0,165±0,035 ^a	0,036±0,021 ^b	0,088±0,046 ^c
Τροφή Β	0,0037±0,0023 ^d	0,0031±0,0010 ^d	0,0025±0,0011 ^d

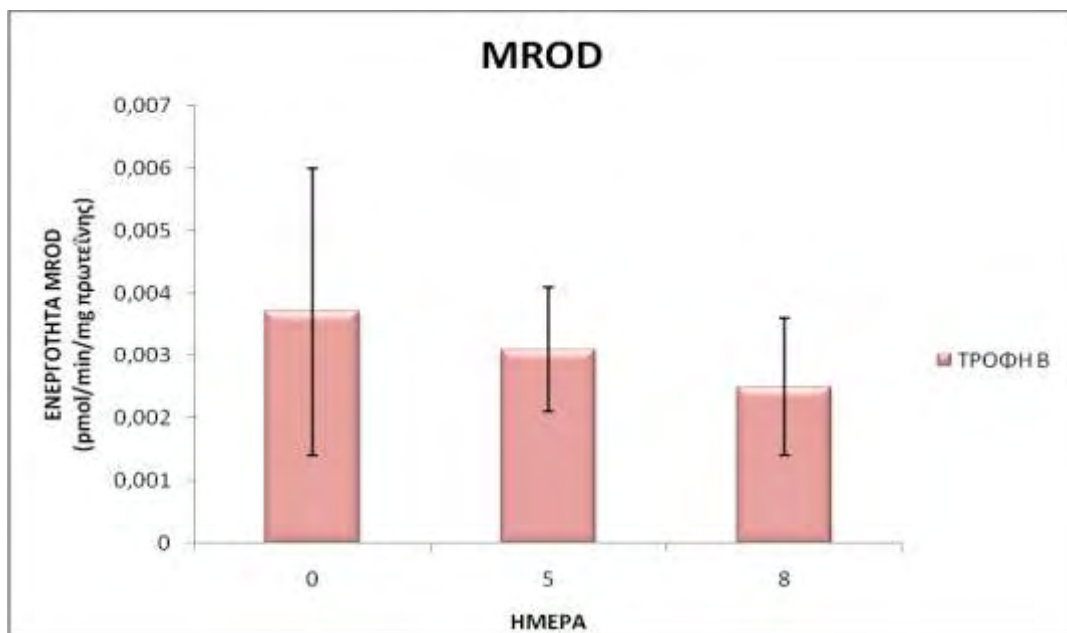
Οι αριθμοί 0-5-8 αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές ± SD. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές. Οι στατιστικές διαφορές καθορίστηκαν με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$ ($P<0,05$) και $n=9$.



Γράφημα 6: Επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου MROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής. Οι αριθμοί 0-5-8 στον άξονα χ αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P<0,05$). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές ± SD, $n=9$.



Γράφημα 7: Επίδραση του ιχθυελαίου (τροφή Α) στην ενεργότητα του ενζύμου MROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής. Οι αριθμοί 0-5-8 στον άξονα χ αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές \pm SD, n=9.



Γράφημα 8: Επίδραση των φυτικών ελαίων (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου MROD (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής. Οι αριθμοί 0-5-8 στον άξονα χ αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές \pm SD, n=9.

Στα ψάρια που κατανάλωσαν τροφή με ιχθυέλαιο παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου MROD μετά από τη χορήγηση του OA (πίνακας 4, γράφημα 7). Την ημέρα 5 η ενζυμική ενεργότητα ήταν κατά 78% μικρότερη από εκείνη την ημέρα 0 ($P < 0,05$). Η ενζυμική ενεργότητα άρχισε να αυξάνεται μετά την ημέρα 5 έτσι ώστε μία ημέρα μετά τη διακοπή της χορήγησης του OA να είναι σημαντικά υψηλότερη από την ημέρα 5. Ωστόσο, η τελευταία μέτρηση έδειξε ότι την ημέρα 8 η ενεργότητα εξακολουθούσε να είναι σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με την ημέρα 0.

Στα ψάρια που έλαβαν τροφή με φυτικά έλαια η ενεργότητα του ενζύμου MROD κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα και τις τρεις ημέρες μέτρησης (πίνακας 4, γράφημα 8). Τις ημέρες 5 και 8 οι μέσες τιμές της ενζυμικής ενεργότητας ήταν ελαφρά μικρότερες συγκριτικά με την ημέρα 0 αλλά όχι σε σημαντικό βαθμό.

Η σύγκριση των μέσων τιμών της ενζυμικής ενεργότητας έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ψαριών των δύο ομάδων σε κάθε ημέρα μέτρησης. Οι διαφορές αυτές παρατηρήθηκαν από την ημέρα 0 όπου η ενζυμική ενεργότητα των ψαριών που κατανάλωσαν τροφή με ιχθυέλαιο ήταν σημαντικά υψηλότερη από την αντίστοιχη των ψαριών των οποίων η τροφή περιείχε φυτικά έλαια (πίνακας 4, γράφημα 6). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη μέτρηση που έγινε τέσσερις ημέρες μετά την έναρξη χορήγησης του OA αλλά και μία ημέρα μετά τη διακοπή του. Συγκεκριμένα, η ενζυμική ενεργότητα των ψαριών της ομάδας B κυμαινόταν στο 2,24%, 8,61% και 2,84% της ενεργότητας των ψαριών της ομάδας A στις ημέρες 0, 5 και 8, αντίστοιχα.

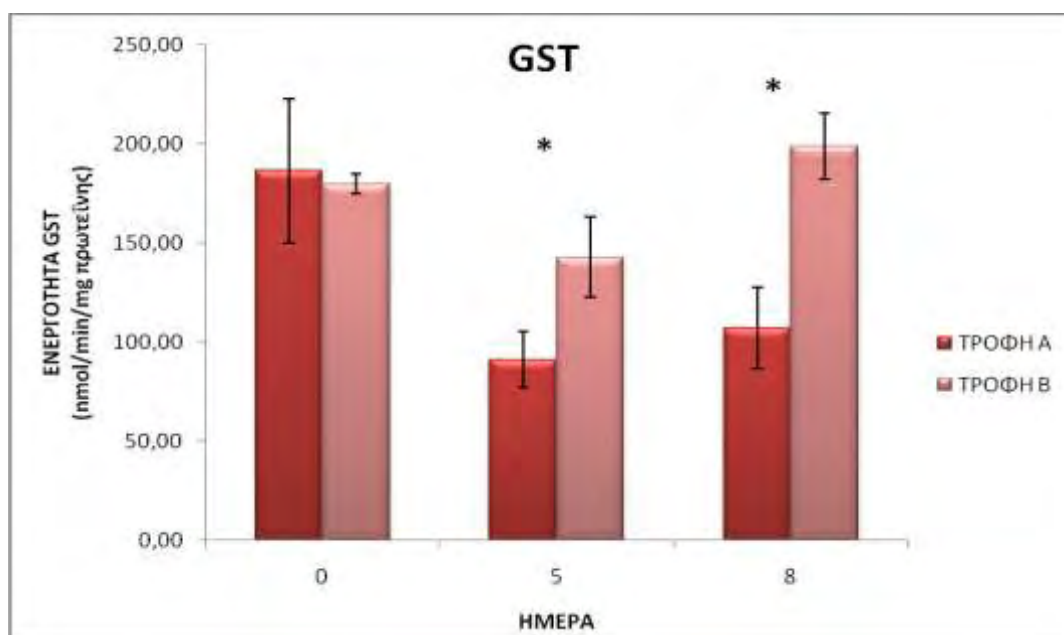
4.3 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ S-ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GST)

Η ενεργότητα του ενζύμου GST ως προς το υπόστρωμα CDNB στα ψάρια των δύο ομάδων (τροφή Α και τροφή Β) απεικονίζεται στον πίνακα 5 και στο γράφημα 9.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα από την επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου GST σε τσιπούρες που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.

Ενεργότητα GST (nmol/min/mg πρωτεΐνης)			
	Ημέρα 0	Ημέρα 5	Ημέρα 8
Τροφή Α	186,32±36,47 ^a	91,24±14,22 ^b	106,92±20,51 ^b
Τροφή Β	179,90±5,04 ^a	142,82±20,28 ^c	198,70±16,54 ^d

Οι αριθμοί 0-5-8 αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές ± SD. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές. Οι στατιστικές διαφορές καθορίστηκαν με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$ ($P<0.05$) και $n=9$.



Γράφημα 9: Επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου GST (nmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής. Οι αριθμοί 0-5-8 στον άξονα χ αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P<0,05$). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές ± SD, $n=9$.

Στα ψάρια που έλαβαν την τροφή Α (με ιχθυέλαιο) παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου μετά από τη χορήγηση του ΟΑ (πίνακας 5, γράφημα 9). Συγκεκριμένα, η ενζυμική ενεργότητα την ημέρα 5 ήταν κατά 51% περίπου μικρότερη από εκείνη μία ημέρα πριν την έναρξη χορήγησής του (ημέρα 0). Η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική. Όταν μετρήθηκε η ενεργότητα μία ημέρα μετά το τέλος της χορήγησης του ΟΑ (ημέρα 8) διαπιστώθηκε ότι ήταν κατά 43% μικρότερη συγκριτικά με την ημέρα 0 αλλά δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντικές διαφορές από την ημέρα 5.

Μείωση της ενεργότητας του GST μετά από τη χορήγηση του ΟΑ παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των ψαριών που κατανάλωσαν την τροφή Β (με φυτικά έλαια) (πίνακας 5, γράφημα 9). Οι τιμές που παρατηρήθηκαν την ημέρα 5 ήταν σημαντικά μικρότερες συγκριτικά με εκείνες πριν και μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Συγκεκριμένα, μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησής του παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας κατά 20%. Ακολούθως, όμως διαπιστώθηκε ουσιαστική αύξηση της ενεργότητας έτσι ώστε μία ημέρα μετά τη διακοπή της χορήγησης του ΟΑ η ενεργότητα του ενζύμου να έχει ξεπεράσει σε σημαντικό βαθμό την τιμή που είχε την ημέρα 0.

Συγκρίνοντας την ενζυμική ενεργότητα μεταξύ των ψαριών των δύο διατροφικών ομάδων την κάθε ημέρα μέτρησης παρατηρήθηκαν ορισμένες διαφορές (πίνακας 5, γράφημα 9). Πριν ξεκινήσει η χορήγηση του ΟΑ τα ψάρια που έλαβαν διαφορετική τροφή παρουσίασαν την ίδια περίπου ενζυμική ενεργότητα. Μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησής του (ημέρα 5) καθώς και μία ημέρα μετά τη διακοπή του (ημέρα 8) η ενεργότητα του ενζύμου GST στην ομάδα που έλαβε την τροφή Α ήταν σημαντικά μικρότερη από εκείνη της άλλης ομάδας κατά 36% και 46%, αντίστοιχα.

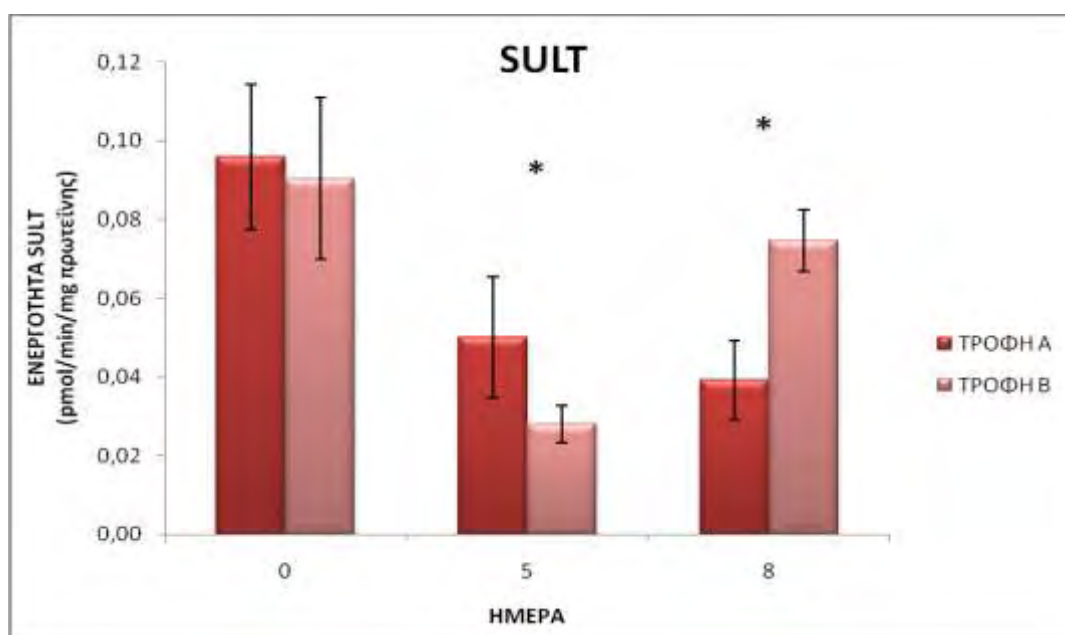
4.4 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΣΟΥΛΦΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ (SULT)

Η ενεργότητα του ενζύμου SULT στα ψάρια των δύο ομάδων (τροφή Α και τροφή Β) απεικονίζεται στον πίνακα 6 και στο γράφημα 10.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα από την επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου SULT σε τσιπούρες που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής.

Ενεργότητα SULT (pmol/min/mg πρωτεΐνης)			
	Ημέρα 0	Ημέρα 5	Ημέρα 8
Τροφή Α	0,10±0,02 ^a	0,05±0,02 ^b	0,04±0,01 ^b
Τροφή Β	0,09±0,02 ^{a,d}	0,03±0,00 ^c	0,07±0,01 ^{a,d}

Οι αριθμοί 0-5-8 αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές ± SD. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές. Οι στατιστικές διαφορές καθορίστηκαν με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$ ($P<0,05$) και $n=9$.



Γράφημα 10: Επίδραση της υποκατάστασης του ιχθυελαίου (τροφή Α) από φυτικά έλαια (τροφή Β) στην ενεργότητα του ενζύμου SULT (pmol/min/mg πρωτεΐνης) στο ήπαρ ψαριών του είδους *Sparus aurata* που έλαβαν ΟΑ μέσω της τροφής. Οι αριθμοί 0-5-8 στον άξονα χ αντιπροσωπεύουν την ημέρα πριν, κατά τη διάρκεια & μετά τη χορήγηση του ΟΑ. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P<0,05$). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές ± SD, $n=9$.

Στα ψάρια που έλαβαν τροφή που περιείχε ιχθυέλαιο εκδηλώθηκε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου μετά από τη χορήγηση του OA, η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0,05$) (πίνακας 6, γράφημα 10). Η ενεργότητα της σουλφοτρανσφεράσης μειώθηκε κατά 50% περίπου στα δείγματα που λήφθηκαν μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησής του και κατά 60% περίπου σε αυτά που λήφθηκαν μία ημέρα μετά τη διακοπή του. Ωστόσο, η μείωση κατά 10% που εμφανίστηκε την ημέρα 8 συγκριτικά με την ημέρα 5 ήταν ασήμαντου βαθμού.

Οι μετρήσεις που έγιναν στα ψάρια που έλαβαν τροφή με φυτικά έλαια έδειξαν μία αρχική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας η οποία ακολουθήθηκε από αύξηση. Συγκεκριμένα, την ημέρα 5 η ενεργότητα εμφανίστηκε μειωμένη κατά 66% συγκριτικά με την ημέρα 0, μία μείωση που ήταν στατιστικά σημαντική. Την ημέρα 8 το ένζυμο παρουσίασε σημαντική αύξηση της ενεργότητάς του σε σχέση με την ημέρα 5 (πίνακας 6, γράφημα 10). Η μέση τιμή στην τελευταία μέτρηση συνέχιζε να είναι μικρότερη από αυτή που μετρήθηκε πριν χορηγηθεί το αντιβιοτικό αλλά σε ασήμαντο βαθμό.

Παρατηρώντας την ενεργότητα του ενζύμου στο ήπαρ των ψαριών που κατανάλωσαν τις διαφορετικές τροφές διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στα δείγματα που λήφθηκαν κατά τη διάρκεια της χορήγησης του OA (ημέρα 5) και μία ημέρα μετά το τέλος της (ημέρα 8) (πίνακας 6, γράφημα 10). Την ημέρα 5 διαπιστώθηκε ότι η ενζυμική ενεργότητα στα ψάρια που έλαβαν τροφή με ιχθυέλαιο ήταν κατά 67% μεγαλύτερη από αυτή των ψαριών που έλαβαν τροφή με φυτικά έλαια. Την ημέρα 8 τα ψάρια της πρώτης ομάδας (τροφή A) παρουσίασαν σημαντικά μικρότερη ενζυμική ενεργότητα από τα ψάρια της άλλης ομάδας. Αντίθετα, η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου SULT στο ήπαρ των ψαριών μία ημέρα πριν την έναρξη της χορήγησης του OA δεν έδειξε κάποια ουσιαστική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια στη διατροφή των ψαριών έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια λόγω της μεγάλης ανάγκης για χρήση εναλλακτικών πηγών ελαίων. Πολλές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σε ψάρια του είδους *Sparus aurata* με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της μερικής ή ολικής αντικατάστασης του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια στην ανάπτυξη, στο ανοσοποιητικό σύστημα και την ανταπόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες. Η ανάπτυξη της τσιπούρας φάνηκε να μειώνεται μετά από ολική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια (σογιέλαιο, λινέλαιο ή μίγμα αυτών). Ωστόσο, η μειωμένη ανάπτυξη αντισταθμίστηκε από την επαναφορά του ιχθυελαίου στην τροφή (Montero *et al.*, 2008). Αντίθετα, όταν οι τσιπούρες κατανάλωσαν τροφή στην οποία είχε αντικατασταθεί το 33% ή το 66% του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια (μίγμα λινέλαιου, κραμβέλαιου και φοινικέλαιου) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ανάπτυξή τους. Όταν όμως το ιχθυέλαιο αντικαταστάθηκε πλήρως από φυτικά έλαια το σωματικό βάρος των ψαριών στο τέλος του πειράματος ήταν μειωμένο κατά 10% (Benedito-Palos *et al.*, 2008). Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Saera-Vila *et al.* (2009) όταν αντικατέστησαν το ιχθυέλαιο μερικώς ή ολικώς με μίγμα κραμβέλαιου, λινέλαιου και φοινικέλαιου. Οι Fountoulaki *et al.* (2009) παρατήρησαν μείωση του σωματικού βάρους της τσιπούρας όταν αντικαταστάθηκε το 69% του ιχθυελαίου της τροφής από φοινικέλαιο ενώ οι Izquierdo *et al.* (2005) διαπίστωσαν τέτοια μείωση όταν το ποσοστό του ιχθυελαίου που είχε αντικατασταθεί από φυτικά έλαια ξεπερνούσε το 80%.

Όσον αφορά την επίδραση των φυτικών ελαίων στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανταπόκριση στους στρεσογόνους παράγοντες, οι Montero *et al.* (2003) παρατήρησαν ότι δεν εκδηλώθηκε καμία αλλαγή στις ανοσολογικές παραμέτρους και στην ανταπόκριση της τσιπούρας στο στρες όταν καταναλώθηκε για μικρό χρονικό διάστημα (101 ημέρες) τροφή όπου είχε γίνει μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια. Αντίθετα, όταν τα ψάρια διατράφηκαν με την παραπάνω δίαιτα για μακρά χρονική περίοδο (204 ημέρες), επηρεάστηκαν οι παράμετροι αλλά μόνο όταν το ιχθυέλαιο είχε αντικατασταθεί από μεμονωμένα φυτικά έλαια. Η ενσωμάτωση αποκλειστικά σογιέλαιου επηρέασε αρνητικά την ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος και τη φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων του νεφρού. Το κραμβέλαιο μείωσε επίσης τη φαγοκυτταρική ικανότητα ενώ το λινέλαιο επηρέασε την αντίδρασή τους στους στρεσογόνους παράγοντες. Ωστόσο, η αντικατάσταση του 60% του ιχθυελαίου από μίγμα

διαφορετικών φυτικών ελαίων δεν προκάλεσε προβλήματα στην υγεία των ψαριών. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και σε άλλη έρευνα όπου ψάρια του ίδιου είδους έλαβαν για 7 μήνες τροφές στις οποίες είχε αντικατασταθεί το ιχθυέλαιο από φυτικά έλαια (σογιέλαιο, κραμβέλαιο, λινέλαιο ή μίγμα αυτών) σε ποσοστό 60 ή 80% (Montero *et al.*, 2005).

Ωστόσο, λίγες έρευνες έχουν γίνει για τη μελέτη της επίδρασης της αντικατάστασης του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια στο μεταβολισμό των αντιβακτηριακών ουσιών. Οι Rigos *et al.* (2009) μελέτησαν την επίδραση της μερικής αντικατάστασης του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων (λινέλαιο, κραμβέλαιο και φοινικέλαιο) στη διαθεσιμότητα του ΟΑ σε ψάρια του είδους *Sparus aurata*. Παρατηρήθηκε ότι η αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια δεν είχε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση του ΟΑ στο πλάσμα των ψαριών όταν αυτό χορηγήθηκε στη δόση των 30 mg/kg ψαριού για 7 ημέρες. Στο πείραμα αυτό διαπιστώθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις του ΟΑ αλλά όχι στατιστικά σημαντικές στα ψάρια που κατανάλωσαν τροφή με ιχθυέλαιο σε σχέση με εκείνα των οποίων η τροφή περιείχε μίγμα φυτικών ελαίων.

Επίσης, σε ανάλογο πείραμα με οξυτετρακυκλίνη (OTC) δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο πλάσμα ψαριών του ίδιου είδους μετά από αντικατάσταση του ιχθυελαίου με φυτικά έλαια (Rigos *et al.*, 2011). Η αντικατάσταση του 66% του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων στην έρευνα αυτή δεν είχε σημαντική επίδραση στη συγκέντρωση της OTC στο πλάσμα της τσιπούρας. Τα ψάρια που έλαβαν τροφή με φυτικά έλαια παρουσίασαν ελαφρά υψηλότερες συγκεντρώσεις της OTC στο πλάσμα σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Οι Lunestad *et al.* (2010) διερεύνησαν τις αλλαγές στη βιοδιαθεσιμότητα του ΟΑ σε σολομό του Ατλαντικού (*Salmon salar*) μετά από αντικατάσταση των ιχθυαλεύρων και των ιχθυελαίων από φυτικές πηγές. Το ΟΑ χορηγήθηκε σε δόση 15 mg/kg ψαριού για 5 ημέρες σε ψάρια που διατηρούνταν στους 12,6°C και σε 28,6‰ αλατότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν παρόμοια κινητική του αντιβιοτικού στους μύες και στο ήπαρ των ψαριών που έλαβαν διαφορετικές τροφές. Ωστόσο, τα ψάρια που τρέφονταν με τις συμβατικές δίαιτες (μη αντικατάσταση ιχθυάλευρου-ιχθυελαίου) παρουσίασαν ελάχιστα

υψηλότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού στους παραπάνω ιστούς, γεγονός που πιθανόν να οφείλονταν στη μειωμένη όρεξη των ψαριών της άλλης ομάδας.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της αντικατάστασης του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων (λινέλαιο, κραμβέλαιο και φοινικέλαιο) στο μεταβολισμό του ΟΑ στην τσιπούρα. Ο έλεγχος της επίδρασης έγινε με την παρακολούθηση της ενεργότητας των ενζύμων που συμμετέχουν στη φάση I και στη φάση II του βιομετασχηματισμού του ΟΑ.

Στο ήπαρ των ψαριών που έλαβαν την τροφή Α (ιχθυέλαιο) παρατηρήθηκε επαγωγή της ενεργότητας του ενζύμου EROD μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης του ΟΑ. Την επαγωγή ακολούθησε μία ασήμαντου βαθμού πτώση της ενεργότητας έτσι ώστε στη μέτρηση που έγινε μία ημέρα μετά τη διακοπή της χορήγησης, η ενεργότητα του ενζύμου κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα με αυτά κατά τη διάρκεια χορήγησης του αντιβιοτικού. Διαφορετική ήταν η πορεία της ενζυμικής ενεργότητας στα ψάρια που κατανάλωσαν τροφή στην οποία είχε γίνει μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια. Στα ψάρια αυτά η ενεργότητα του ενζύμου EROD διατηρήθηκε στα ίδια περίπου επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι τα ψάρια που έλαβαν τροφή με ιχθυέλαιο παρουσίασαν υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου EROD στο ήπαρ σε όλες τις ημέρες μέτρησης σε σχέση με τα ψάρια που έλαβαν τροφή που περιείχε φυτικά έλαια.

Η επίδραση της τροφής στα ένζυμα του βιομετασχηματισμού εξετάστηκε και σε ψάρια του είδους *Ictalurus punctatus* (Ankley *et al.*, 1989). Τα ψάρια έλαβαν για 116 ημέρες τροφές που περιείχαν ιχθυέλαιο ή σογιέλαιο ή λίπος μοσχαριού σαν πηγές λιπών. Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε η επίδραση αυτών των τροφών στο σύστημα του κυτοχρώματος P450 και από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα του P450 ήταν σταθερά υψηλότερη στα ψάρια που έλαβαν ιχθυέλαιο σε σχέση με αυτά που έλαβαν σογιέλαιο ή λίπος μοσχαριού.

Παρόμοιες διαπιστώσεις έκαναν και οι Lemaire *et al.* (1992) οι οποίοι χορήγησαν για 5 μήνες σε λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) δύο διαφορετικές τροφές (με ή χωρίς ιχθυέλαιο). Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα έγινε στα ψάρια ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση της ουσίας βενζο-α-πυρένιο και 14 ώρες αργότερα καθορίστηκαν οι ενεργότητες

ορισμένων ηπατικών ενζύμων. Αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου EROD παρατηρήθηκε στα ψάρια που τους χορηγήθηκε η ουσία σε σχέση με τα ψάρια που δεν εκτέθηκαν στην ουσία και στις δύο διατροφικές ομάδες. Συγκρίνοντας την επαγωγή μετά από τη χορήγηση της ουσίας μεταξύ των ψαριών που έλαβαν διαφορετική τροφή διαπιστώθηκε ότι αυτή ήταν μεγαλύτερη σε εκείνα που έλαβαν τροφή με ιχθυέλαιο.

Μικρή απόκλιση παρουσίασαν τα αποτελέσματα στα οποία κατέληξαν οι George και Henderson (1992) οι οποίοι μέτρησαν ορισμένα ένζυμα βιομετασχηματισμού σε σολομό του Ατλαντικού μετά από χορήγηση για 4 μήνες τροφής με διαφορετικά επίπεδα ω-3 και ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η μία τροφή περιείχε υψηλά επίπεδα ω-6 λιπαρών οξέων (45% 18:2 (ω-6)-λινολεϊκό οξύ με αναλογία ω-3/ω-6=0,2) ενώ η δεύτερη τροφή περιείχε υψηλής ποιότητας ιχθυέλαιο (αναλογία ω-3/ω-6=6). Η ενεργότητα του ενζύμου EROD στα ψάρια που έλαβαν την πρώτη τροφή ήταν διπλάσια συγκριτικά με τα ψάρια που έλαβαν τροφή με ιχθυέλαιο.

Η μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων ήταν η αιτία που επηρέασε την ενεργότητα του ενζύμου MROD της φάσης I του μεταβολισμού. Στα ψάρια που διατράφηκαν με την τροφή A παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης του OA. Στη συνέχεια, η ενζυμική ενεργότητα παρουσίασε μία τάση αύξησης μέχρι μία ημέρα μετά το τέλος της χορήγησης. Ωστόσο, κατά την τελευταία μέτρηση η ενεργότητα εξακολουθούσε να είναι μειωμένη συγκρινόμενη με αυτή πριν την έναρξη χορήγησης της παραπάνω ουσίας. Αντίθετα, όταν η τροφή περιείχε φυτικά έλαια η ενεργότητα του ενζύμου MROD δεν παρουσίασε διακυμάνσεις, παραμένοντας στα ίδια επίπεδα και τις τρεις ημέρες της μέτρησης.

Σημαντική ήταν η διαφορά που παρουσίασε όλες τις ημέρες η ενεργότητα αυτού του ενζύμου στα ψάρια των δύο διατροφικών ομάδων. Η χορήγηση τροφής με ιχθυέλαιο συνδυάστηκε με σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου πριν, κατά τη διάρκεια αλλά και μετά τη διακοπή της χορήγησης του OA.

Στηριζόμενοι στα αποτελέσματα των μετρήσεων των ενζύμων της φάσης I, διαπιστώθηκε ότι τα ψάρια που έλαβαν τροφή που περιείχε ιχθυέλαιο παρουσίασαν υψηλότερη ενεργότητα και των δύο ενζύμων. Επίσης, διαφορετική ήταν η πορεία της

ενζυμικής ενεργότητας μεταξύ των ψαριών των δύο ομάδων καθώς δεν εκδηλώθηκε καμία διακύμανση της ενεργότητας κατά τη διάρκεια του πειράματος στα ψάρια που έλαβαν την τροφή Β, σε αντίθεση με εκείνα που κατανάλωσαν την τροφή Α. Τη στενή συσχέτιση των δύο ενζύμων παρατήρησε η Boyunęmez (2004) σε έρευνα που έκανε σε ψάρια του είδους *Diplodus annularis*. Σε πείραμα των Parente *et al.* (2004) διαπιστώθηκε μία γραμμική σχέση μεταξύ των ενζύμων αυτών της φάσης Ι σε ψάρια του είδους *Oreochromis niloticus* ενώ στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Smeets *et al.* (2002) οι οποίοι παρακολούθησαν την ενεργότητα των ενζύμων EROD και MROD σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων από τέσσερα είδη ψαριών (*Oncorhynchus mykiss*, *Platyichthis flesus*, *Limanda limanda* και *Microstomus kitt*). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σε συμφωνία με την υπόθεση ότι και τα δύο υποστρώματα (αιθοξυριζορουφίνη και μεθοξυριζορουφίνη) μεταβολίζονται από την ίδια ισομορφή της οικογένειας CYP1 του κυτοχρώματος P450.

Η επίδραση της αντικατάστασης του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια στο μεταβολισμό του ΟΑ φάνηκε και από τα αποτελέσματα της μέτρησης της ενεργότητας του ενζύμου GST. Στο ήπαρ των ψαριών που έλαβαν τροφή με ιχθυέλαιο παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης του ΟΑ συγκριτικά με την ημέρα 0 (μείωση κατά 51%). Η μείωση αυτή διατηρήθηκε και μετά τη διακοπή της χορήγησης του αντιβιοτικού. Την ημέρα 8 η ενζυμική ενεργότητα ήταν ελαφρά αυξημένη συγκριτικά με την ημέρα 5 αλλά όχι σε σημαντικό βαθμό. Στα ψάρια που έλαβαν τροφή με φυτικά έλαια εκδηλώθηκε επίσης σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης του ΟΑ αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα ψάρια της άλλης ομάδας (μείωση κατά 20%). Ακολούθησε αύξηση της ενεργότητας με αποτέλεσμα μία ημέρα μετά τη διακοπή της χορήγησης του ΟΑ η ενεργότητα του ενζύμου να ξεπερνάει σε σημαντικό βαθμό την αντίστοιχη πριν τη χορήγηση του αντιβιοτικού. Την ημέρα 8 υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την ημέρα 5.

Συγκρίνοντας τις μέσες τιμές της ενεργότητας του ενζύμου διαπιστώθηκε ότι τα ψάρια που κατανάλωσαν τροφή με ιχθυέλαιο εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά μικρότερες τιμές ως προς τα ψάρια που έλαβαν τροφή με φυτικά έλαια κατά τη διάρκεια αλλά και μετά τη διακοπή της χορήγησης του ΟΑ. Αντίθετα, η ενζυμική ενεργότητα δεν επηρεάστηκε από την τροφή πριν τη χορήγηση του παραπάνω παράγοντα.

Οι Lemaire *et al.* (1992) παρατήρησαν ότι η ενεργότητα του ενζύμου GST παρουσίασε μικρή και στατιστικά σημαντική μείωση (30%) σε λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) που έλαβαν τροφή με ιχθυέλαιο μετά από έκθεσή τους στο βενζο-α-πυρένιο συγκριτικά με τα ψάρια μάρτυρες (μη έκθεση στην παραπάνω ουσία). Αντίθετα, δε διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στην ενζυμική ενεργότητα μετά τη χορήγηση της παραπάνω ουσίας στα ψάρια που είχαν λάβει τροφή χωρίς ιχθυέλαιο.

Οι Ankley *et al.* (1989) διαπίστωσαν διαφορές στην ενζυμική ενεργότητα μεταξύ ψαριών του είδους *Ictalurus punctatus* που έλαβαν τροφές με διαφορετικά είδη ελαίου. Τα ψάρια αυτά κατανάλωσαν για 116 ημέρες τροφές που περιείχαν ιχθυέλαιο ή σογιέλαιο ή λίπος μοσχαριού σαν πηγές λιπών. Η ενεργότητα του GST του ενδοκυτταρικού υγρού ήταν συνεχώς υψηλότερη στα ψάρια που έλαβαν ιχθυέλαιο από αυτά που έλαβαν σογιέλαιο ή λίπος μοσχαριού. Γενικότερα, η ενζυμική ενεργότητα του GST ήταν παρόμοια στα ψάρια των δύο τελευταίων ομάδων. Ωστόσο, οι τροφές περιείχαν ένα από τα τρία είδη ελαίων σε αντίθεση με την παρούσα έρευνα όπου είχε γίνει μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες έρευνες, οι George και Henderson (1992) δεν παρατήρησαν διαφορές στην ενεργότητα του ενζύμου GST μεταξύ των ψαριών (σολομός του Ατλαντικού) που κατανάλωσαν τροφές που περιείχαν διαφορετικά επίπεδα ω-3 και ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Μελετώντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ενεργότητας του ενζύμου SULT παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ψαριών των δύο διατροφικών ομάδων. Οι μετρήσεις που έγιναν πριν τη χορήγηση του ΟΑ έδειξαν ότι η ενεργότητα του ενζύμου SULT δεν επηρεάστηκε αρχικά από την τροφή που κατανάλωναν τα ψάρια. Σημαντική μείωση εκδηλώθηκε και στις δύο ομάδες αλλά μετά από τέσσερις ημέρες λήψης του αντιβιοτικού και σε διαφορετικό βαθμό (μείωση κατά 50% και 66% στα ψάρια της ομάδας Α και Β, αντίστοιχα). Όμως μετά την πέμπτη ημέρα χορήγησης διαπιστώθηκαν ουσιαστικές διαφορές καθώς στα ψάρια της πρώτης ομάδας (τροφή με ιχθυέλαιο) παρουσιάστηκε περαιτέρω μείωση της ενεργότητας του ενζύμου ασήμαντου βαθμού, σε αντίθεση με τα ψάρια της άλλης ομάδας στα οποία διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση. Έτσι μία ημέρα μετά τη διακοπή της χορήγησης του ΟΑ η ενζυμική ενεργότητα ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με την ημέρα 0 στα ψάρια της ομάδας Α ενώ κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα με την ημέρα 0 στα ψάρια της ομάδας Β.

Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν και όταν μελετήθηκε η ενεργότητα του ενζύμου SULT στις δύο ομάδες κάθε ημέρα μέτρησης. Μπορεί πριν τη χορήγηση του ΟΑ η ενεργότητα του ενζύμου να κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα στο ήπαρ των ψαριών των δύο ομάδων, όμως την ημέρα 5 τα ψάρια που κατανάλωσαν τροφή με ιχθυέλαιο εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη ενεργότητα συγκριτικά με τα ψάρια της άλλης ομάδας. Αντίστροφα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν μετά τη διακοπή της χορήγησης του ΟΑ όπου τα ψάρια που έλαβαν την τροφή Β εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερες τιμές από τα ψάρια που έλαβαν την τροφή Α.

Όπως παρατηρήθηκε, η μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια είχε κάποια επίδραση στα ένζυμα του βιομετασχηματισμού και επομένως στο μεταβολισμό του ΟΑ. Σε όλα τα ένζυμα που μελετήθηκαν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στην ενεργότητα μεταξύ των δύο ομάδων στις διάφορες ημέρες μέτρησης. Οι διαφορές αυτές ενδέχεται να σχετίζονται με την αλλαγή στο προφίλ των λιπαρών οξέων των διαφόρων τμημάτων του οργανισμού η οποία προκαλείται από τη μεταβολή στο προφίλ των λιπιδίων της τροφής. Τα λιπίδια της τροφής μπορεί να επηρεάσουν τη σύνθεση σε λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών. Το γεγονός αυτό προκαλεί αλλαγές στη ρευστότητα και τη διαπερατότητα των μεμβρανών και αυτό με τη σειρά του μπορεί να επηρεάσει την απορρόφηση των αντιβακτηριακών ουσιών. Σε έρευνα των Rigos *et al.* (2011) διαπιστώθηκε ότι ψάρια που έλαβαν διαφορετικές τροφές (μία με ιχθυέλαιο και μία με αντικατάσταση του 66% του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων) παρουσίασαν διαφορετική συγκέντρωση λιπαρών οξέων στο έντερο και στο ήπαρ, γεγονός που επηρέασε την κατανομή της OTC στους ιστούς αλλά όχι σε σημαντικό βαθμό.

Αλλά ανεξάρτητα από τη μεταβολή του προφίλ των λιπαρών οξέων, η οποία προκαλείται από την παρουσία των φυτικών ελαίων, η ιστολογική εικόνα του ήπατος και του εντέρου (όργανα ουσιαστικά για το μεταβολισμό των φαρμάκων) δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων. Σε έρευνα των Caballero *et al.* (2004) παρατηρήθηκε ότι το ήπαρ ψαριών (είδους *Sparus aurata*) που έλαβαν τροφή στην οποία είχε αντικατασταθεί το 60% του ιχθυελαίου από λινέλαιο ή μίγμα σογιέλαιου, κραμβέλαιου και λινέλαιου παρουσίασε παρόμοια μορφολογία σε σύγκριση με τα ψάρια που έλαβαν τροφή που περιείχε αποκλειστικά ιχθυέλαιο. Όμως οι τσιπούρες στην τροφή των οποίων το 60% του ιχθυελαίου είχε

αντικατασταθεί από σογιέλαιο παρουσίασαν έντονη στεάτωση με εστίες διογκωμένων ηπατοκυττάρων τα οποία περιείχαν πολυάριθμα κενοτόπια λιπιδίων. Παρόλα αυτά, οι αλλαγές που διαπιστώθηκαν στο ήπαρ κατά τη διατροφή με φυτικά έλαια αναστράφηκαν όταν τα ψάρια επανήλθαν σε τροφή που περιείχε μόνο ιχθυέλαιο, υποδηλώνοντας τον αναστρέψιμο χαρακτήρα αυτών των ιστολογικών αλλαγών. Σε άλλη έρευνα (Fountoulaki *et al.*, 2009) στην οποία αντικαταστάθηκε το 69% του ιχθυελαίου από σογιέλαιο ή κραμβέλαιο ή φοινικέλαιο στη διατροφή της τσιπούρας παρατηρήθηκε έντονη συσσώρευση λιπιδίων στο ήπαρ μόνο των ψαριών εκείνων που έλαβαν φοινικέλαιο. Οι Benedito-Palos *et al.* (2008) διαπίστωσαν μία επερχόμενη και εντοπισμένη λιπιδίωση του ήπατος μόνο στα ψάρια (τσιπούρες) που διατράφηκαν με τροφές που είχε γίνει ολική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από φυτικά έλαια. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλαγές στο έντερο των ψαριών, όποια τροφή και αν κατανάλωσαν.

Όμως εκτός από το είδος του ελαίου που περιέχεται στην τροφή έρευνες έχουν δείξει ότι και η ποσότητα των λιπών και γενικότερα οι αλλαγές στη σύνθεση της τροφής μπορούν να επηρεάσουν τα ένζυμα βιομετασχηματισμού και επομένως το μεταβολισμό των αντιβιοτικών και άλλων ουσιών.

Σε μια άλλη έρευνα, ψάρια του είδους *Oncorhynchus mykiss* έλαβαν τρεις διαφορετικές τροφές για χρονικό διάστημα 15 ημερών. Οι τροφές αυτές διέφεραν ως προς τα επίπεδα υγρασίας, πρωτεϊνών, λιπιδίων, ινών και τέφρας. Σε μία τέταρτη ομάδα δε χορηγήθηκε καθόλου τροφή. Ακολούθησε ενδοπεριτοναϊκή έγχυση της ουσίας β-ναφθοφλαβόνη (BNF) και μετά από μία εβδομάδα υπολογίστηκαν οι δραστηριότητες πολλών ενζύμων βιομετασχηματισμού. Μεταξύ των ψαριών που κατανάλωσαν τις παραπάνω τροφές παρατηρήθηκε διαφορά στην ενεργότητα του ενζύμου EROD. Αντίθετα, η ενεργότητα του ενζύμου GST δεν επηρεάστηκε από τις διαφορετικές τροφές. Όσον αφορά την επίδραση της έλλειψης τροφής στο ήπαρ, παρατηρήθηκε ότι μετά από 15 ημέρες χωρίς τροφή η ενεργότητα του ενζύμου GST δεν επηρεάστηκε, σε αντίθεση με αυτή του EROD. Μετά από τη χορήγηση της ουσίας BNF παρατηρήθηκε επαγωγή της ενεργότητας των ενζύμων EROD και GST στα ψάρια ανεξάρτητα από την τροφή που τους χορηγήθηκε καθώς επίσης και σε αυτά που δεν έλαβαν τροφή. Μέγιστη ενεργότητα του ενζύμου EROD εκδηλώθηκε στα ψάρια που δεν έλαβαν τροφή ενώ του ενζύμου GST στα ψάρια που κατανάλωσαν μία από τις τρεις τροφές (Viganò *et al.*, 1993).

Η επίδραση της σύνθεσης της τροφής στα ένζυμα του βιομετασχηματισμού μελετήθηκε σε ψάρια του ίδιου είδους και από τους Morrow *et al.* (2004). Τα ψάρια έλαβαν για έξι εβδομάδες τρεις τροφές που διέφεραν ως προς τα επίπεδα πρωτεϊνών και λιπών ενώ στη συνέχεια τους χορηγήθηκε η ουσία BNF ενδοπεριτοναϊκά. Η ενεργότητα των ενζύμων GST και EROD δεν επηρεάστηκε από την τροφή που χορηγήθηκε. Μετά από την έγχυση της παραπάνω ουσίας η ενεργότητα του ενζύμου GST δε μεταβλήθηκε. Αντίθετα, η ενεργότητα του ενζύμου EROD αυξήθηκε σημαντικά (22-88 φορές) σε όλες τις διατροφικές ομάδες.

Σε αντίθεση με την προηγούμενη έρευνα όπου η σύνθεση της τροφής δεν επηρέασε την επαγωγή της ενεργότητας του ενζύμου EROD, σε μια άλλη έρευνα (Ankley και Blazer, 1988) σε ψάρια του είδους *Ictalurus punctatus* που έλαβαν δύο εμπορικές και μία εργαστηριακή τροφή παρατηρήθηκαν διαφορές στην επαγωγή των ενζύμων EROD και GST μετά από χορήγηση της ουσίας Aroclor 1254. Στα ψάρια στα οποία δε χορηγήθηκε η παραπάνω ουσία διαπιστώθηκε μικρότερη ενεργότητα του EROD όταν καταναλώθηκε η μία από τις τρεις δίαιτες. Τα ψάρια που έλαβαν τη συγκεκριμένη τροφή παρουσίασαν και μικρότερου βαθμού αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας μετά από χορήγηση της ουσίας Aroclor 1254. Η ενεργότητα του ενζύμου GST (του ενδοκυτταρικού υγρού) αυξήθηκε μετά από τη χορήγηση της παραπάνω ουσίας στον ίδιο βαθμό και στις τρεις ομάδες. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα της ενζυμικής ενεργότητας ήταν υψηλότερα στα ψάρια που διατράφηκαν με τις εμπορικές δίαιτες συγκριτικά με αυτά που έλαβαν την εργαστηριακή.

Εκτός από τα ψάρια, έρευνες για την επίδραση της τροφής στα ένζυμα βιομετασχηματισμού έχουν γίνει και σε άλλα είδη ζώων. Σε έρευνα των Wade *et al.* (1985) ποντίκια στερήθηκαν τροφή για 0-48 ώρες και στη συνέχεια ταΐστηκαν για 1-4 ημέρες με τροφές που περιείχαν 0% έως 20% καλαμποκέλαιο ή 20% κοκοφοινικέλαιο. Ορισμένα έλαβαν και νατριούχο φαινοβαρβιτάλη (80 mg/kg/ημέρα, ενδοπεριτοναϊκά) για 1-3 ημέρες πριν τη θανάτωση. Στη συνέχεια, για να εκτιμηθεί η επίδραση της διατροφής μετρήθηκαν τέσσερα ένζυμα που εξαρτώνται από το σύστημα του κυτοχρώματος P450 [(διμεθυλάση της αιθυλομορφίνης (ethylmorphine N-demethylase (EMDM), διμεθυλάση της νιτροζοδιμεθυλαμίνης (N-nitrosodimethylamine (DMN)-N demethylase), υδροξυλάση της ανιλίνης (AH), υδροξυλάση των αρωματικών υδρογονανθράκων (AHH)]. Αυξάνοντας το ποσοστό του περιεχόμενου καλαμποκέλαιου (0, 0,5, 10, 20%) παρατηρήθηκε προοδευτική

αύξηση της ενεργότητας των παραπάνω ενζύμων. Το περιεχόμενο λίπος επηρέασε την επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας που προκλήθηκε από τη χορήγηση της φαινοβαρβιτάλης σε όλα τα ένζυμα, εκτός από το ΑΗΗ. Η φαινοβαρβιτάλη προκάλεσε επαγωγή κατά 11-22% στα υπόλοιπα ένζυμα στα ζώα που έλαβαν τροφή χωρίς λίπος και κατά 119-246% σε αυτά που έλαβαν τροφή με καλαμποκέλαιο ή κοκοφοινικέλαιο. Τα ποντίκια που ταΐστηκαν με τροφή χωρίς έλαιο για 21 ημέρες και χωρίς να προηγηθεί έλλειψη τροφής και τους χορηγήθηκε φαινοβαρβιτάλη παρουσίασαν αύξηση κατά 79% στην ενεργότητα του ενζύμου EMDM και κατά 34% στο ΑΗ συγκριτικά με τους μάρτυρες (δε χορηγήθηκε η παραπάνω ουσία). Αντίθετα, η αύξηση των ίδιων ενζύμων σε ποντίκια των οποίων η τροφή περιείχε 20% καλαμποκέλαιο ήταν 227% και 143%, αντίστοιχα. Από αυτά τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε πόσο απαραίτητη είναι η ύπαρξη λίπους στην τροφή προκειμένου να εκδηλωθεί επαγωγή των ενζύμων του συστήματος βιομετασχηματισμού και αποτοξικοποίησης (MFO) από τη φαινοβαρβιτάλη.

Ωστόσο, σημαντικό ρόλο στο MFO παίζει και το είδος του ελαίου που υπάρχει στην τροφή. Σε έρευνα του Century (1973) εξετάστηκε η ικανότητα της φαινοβαρβιτάλης να διεγείρει το μεταβολισμό των φαρμάκων στο ήπαρ των ποντικών που διατράφηκαν με ημισυνθετικές τροφές που περιείχαν λιπίδια με διαφορετική σύνθεση λιπαρών οξέων. Υψηλότερη διέγερση του μεταβολισμού των φαρμάκων (υψηλότερη ενεργότητα ενζύμων μονοξυγενάσης και GST) παρατηρήθηκε στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε φαινοβαρβιτάλη και έλαβαν τροφή με λινέλαιο ή ιχθυέλαιο με υψηλά επίπεδα ω-3 μη απαραίτητων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η μικρότερη επαγωγή παρατηρήθηκε στα ζώα που έλαβαν τροφή με βόειο λίπος ή με μειωμένα επίπεδα καλαμποκέλαιου, τα οποία παρέχουν χαμηλά επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Οι Norred και Marzuki (1984) υπολόγισαν την ενεργότητα του ενζύμου GST (μικροσωμικού και κυτοσολικού) στο ήπαρ των ποντικών που έλαβαν για τρεις εβδομάδες τροφές που περιείχαν 20% κοκοφοινικέλαιο ή 20% καλαμποκέλαιο ή μίγμα από 18% κοκοφοινικέλαιο με 2% καλαμποκέλαιο σαν τη μοναδική πηγή λιπαρών οξέων στην τροφή. Η ενεργότητα του ενζύμου GST του μικροσώματος δεν επηρεάστηκε από το είδος του ελαίου. Παρόλα αυτά, όταν η τροφή περιείχε 20% κοκοφοινικέλαιο (κορεσμένο φυτικό έλαιο) η ενεργότητα του ενζύμου GST του ενδοκυτταρικού υγρού ήταν μειωμένη κατά 25-40% συγκριτικά με τα ποντίκια που έλαβαν τροφή με καλαμποκέλαιο (ακόρεστο

φυτικό έλαιο). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το είδος του ελαίου που περιέχεται στην τροφή μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα αποτοξικοποίησης καρκινογενών και άλλων τοξινών.

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της τροφής ενισχύουν την ενεργοποίηση των διαφόρων μορφών ενζύμων του ενδοπλασματικού δικτύου που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό των φαρμάκων και των καρκινογενών ουσιών. Η έρευνα των Wade *et al.* (1986) έδειξε ότι οι τροφές που περιέχουν 10-20% ιχθυέλαιο με υψηλές συγκεντρώσεις ω-3 λιπαρών οξέων υποστηρίζουν αυτά τα ένζυμα με τρόπο παρόμοιο με αυτό των ελαίων που έχουν υψηλές συγκεντρώσεις του ω-6 λιπαρού οξέος λινολεϊκού. Η ενεργότητα του ενζύμου GST δεν επηρεάστηκε από το ιχθυέλαιο. Παρόλα αυτά, η πρόσληψη αυξημένων συγκεντρώσεων αυτού του ελαίου (του ιχθυελαίου) προκάλεσαν αύξηση του περιεχομένου του κυτοχρώματος P450. Η φαινοβαρβιτάλη προκάλεσε επαγωγή της ενεργότητας του ενζύμου GST μόνο στα ποντίκια που έλαβαν ιχθυέλαιο σε ποσοστό 10 ή 20%. Το ένζυμο EMDM παρουσίασε επαγωγή κατά 25% μετά από χορήγηση φαινοβαρβιτάλης στα ποντίκια που έλαβαν τροφή χωρίς ιχθυέλαιο και κατά 128% σε αυτά που έλαβαν τροφή με ιχθυέλαιο σε ποσοστό 20%. Αντίθετα, το ένζυμο διμεθυλάση της νιτροζοδιμεθυλαμίνης (DMN N-demethylase) παρουσίασε επαγωγή μόνο στα ποντίκια που έλαβαν τροφή χωρίς ιχθυέλαιο. Το ένζυμο AHH παρουσίασε επαγωγή σε όλα τα ποντίκια ανεξάρτητα από τα επίπεδα του λίπους στην τροφή.

Τέλος, η επίδραση των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων της τροφής στην ενεργότητα των ενζύμων διαπιστώθηκε και στην έρευνα των Saito και Yamaguchi (1994) στην οποία εξετάστηκε η ενεργότητα των ενζύμων του συστήματος βιομετασχηματισμού και αποτοξικοποίησης του ήπατος μετά από χορήγηση φαινοβαρβιτάλης και σε ανταπόκριση με τα επίπεδα των ω-3 λιπαρών οξέων στην τροφή. Στα ποντίκια χορηγήθηκαν για 16 ημέρες τροφές που περιείχαν είτε λινολεϊκό οξύ (C18:2, ω-6, LA) (2,0 ενέργεια % σαν LA) είτε ω-3 λιπαρά οξέα (0,3, 1, 1,9 ή 4,8 ενέργεια % σαν ω-3 λιπαρά οξέα). Η ενεργότητα των ενζύμων του συστήματος (εκτός από το ένζυμο NADPH-αναγωγή του κυτοχρώματος c) αυξήθηκε καθώς αυξάνονταν τα επίπεδα των ω-3 λιπαρών οξέων στην τροφή και μειώνονταν των ω-6 λιπαρών οξέων. Όταν καταναλώθηκε η τροφή με το λινολεϊκό οξύ σε επίπεδα ενέργειας από 1,8 μέχρι 13,8%, δεν προκλήθηκε αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων μετά από χορήγηση της φαινοβαρβιτάλης. Συμπερασματικά, η

παρουσία των ω -3 λιπαρών οξέων στην τροφή προκάλεσε περαιτέρω αύξηση, της επαγωγίμης από τη φαινοβαρβιτάλη, ενζυμικής ενεργότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων του πειράματος διαπιστώθηκε ότι η σύνθεση της τροφής αποτέλεσε παράγοντα που επηρέασε το σύστημα βιομετασχηματισμού στα ψάρια του είδους *Sparus aurata*. Αν και σύμφωνα με έρευνες η μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου από μίγμα φυτικών ελαίων δε φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη των ψαριών αυτών, η επίδραση στα ένζυμα τόσο της φάσης I όσο και της φάσης II του βιομετασχηματισμού ήταν έκδηλη στην παρούσα έρευνα.

Στο ήπαρ των ψαριών που έλαβαν τροφή με ιχθυέλαιο παρατηρήθηκε επαγωγή της ενεργότητας του ενζύμου EROD μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης του OA ενώ η ενεργότητα επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα μετά τη διακοπή της χορήγησής του. Η ενεργότητα του ενζύμου MROD μειώθηκε μέχρι την τέταρτη ημέρα από τη χορήγηση του αντιβιοτικού μετά από την οποία παρουσίασε μια ανοδική πορεία παραμένοντας όμως ακόμα και μετά τη διακοπή της χορήγησης σε χαμηλότερα επίπεδα από εκείνα πριν την έναρξή της. Αντιθέτως, στα ψάρια που έλαβαν τροφή με φυτικά έλαια η ενεργότητα των παραπάνω ενζύμων παρέμεινε σε παρόμοια επίπεδα, όπως έδειξαν οι μετρήσεις που έγιναν τις ημέρες 0, 5 και 8. Ωστόσο, οι τιμές της ενζυμικής ενεργότητας σε αυτά τα ψάρια ήταν σημαντικά μικρότερες από τα ψάρια που κατανάλωσαν τροφή με ιχθυέλαιο σε όλες τις ημέρες μέτρησης.

Διαφορές μεταξύ των διατροφικών ομάδων διαπιστώθηκαν και στην ενεργότητα των ενζύμων της φάσης II. Η ενεργότητα του ενζύμου GST μειώθηκε σημαντικά μετά από τέσσερις ημέρες χορήγησης του OA και στις δύο ομάδες αλλά στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή στην ομάδα A ενώ αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα B ξεπερνώντας τα αρχικά επίπεδα. Παρόμοια πορεία ακολούθησε και το ένζυμο SULT η ενεργότητα του οποίου όμως επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα μετά τη διακοπή της χορήγησης του αντιβιοτικού στα ψάρια που έλαβαν την τροφή B. Στην περίπτωση των ενζύμων αυτών οι μέσες τιμές ήταν υψηλότερες στα ψάρια που έλαβαν τροφή με φυτικά έλαια κατά τη διάρκεια και μετά τη διακοπή της χορήγησης του αντιβιοτικού με εξαίρεση την ημέρα 5 στο ένζυμο SULT.

Συμπερασματικά, η χρησιμοποίηση των φυτικών ελαίων στην τροφή της τσιπούρας ως εναλλακτική πηγή ελαίων φάνηκε να επηρεάζει το βιομετασχηματισμό του OA. Επομένως, η χορήγηση του OA θα πρέπει να γίνεται με προσοχή και να λαμβάνεται πάντοτε υπόψη η σύνθεση της τροφής των ψαριών. Παρόλα αυτά, είναι απαραίτητη η

πραγματοποίηση και άλλων ερευνών για να καθοριστεί ο ρόλος και η επίδραση των διαφορετικών διατροφικών παραγόντων στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andersson T., Pesonen M., Johansson C. (1985) Differential Induction of Cytochrome P-450-Dependent Monooxygenase, Epoxide Hydrolase, Glutathione Transferase and UDP Glucuronosyl Transferase Activities in the Liver of the Rainbow Trout by 3-Naphthoflavone or Clophen A50, *Biochemical Pharmacology*, 34, pp. 3309-3314.
- Ankley G. T., Blazer V. S., Plakas S. M., Reinert R. E. (1989) Dietary lipid as a factor modulating xenobiotic metabolism in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46, pp. 1141-1146.
- Ankley G. T., Blazer V. S. (1988) Effects of Diet on PCB-Induced Changes in Xenobiotic Metabolism in the Liver of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*), *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45, pp. 132-137.
- Aquamax (2008) http://www.aquamaxip.eu/files/News_Aquamax_Issue_03.pdf [accessed 15 December 2011].
- Arinç E., Sen A., Bozcaarmutlu A. (2000) Cytochrome P4501A and associated mixed-function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment, *Pure And Applied Chemistry*, 72 (6), pp. 985-994.
- Barnes A. C., Hastings T. S., Amyes S. G. B. (1995) Aquaculture antibacterials are antagonized by sea-water, *Journal of Fish Diseases*, 18, pp. 463-465.
- Beckman J. D. (1991) Continuous fluorometric assay of phenol sulfotransferase, *Analytical Biochemistry*, 197, pp. 408-411.
- Benedito-Palos L., Navarro J. C., Sitjà-Bobadilla A., Bell J. G., Kaushik S., Pérez-Sánchez J. (2008) High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues, *British Journal of Nutrition*, 100 (5), pp. 992-1003.
- Bhuyan P. (2010) The Role of the Cytosolic Sulfotransferase SULT2 ST2 in Zebrafish Development, Master of Science degree in Pharmaceutical Sciences, University of Toledo, 57 pages.

- Blanchette B., Feng X., Singh B. R. (2007) Marine Glutathione S-Transferases, *Marine Biotechnology*, 9, pp. 513-542.
- Boyuneğmez T. (2004) Biochemical monitoring of toxic and carcinogenic organic pollutants along the Izmir Bay after the great canal project and possible health effects, Master of Science in Biochemistry, the Middle East Technical University, 151 pages.
- Bradford M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.
- Burgeot T. (2001) Standard operation procedures for EROD determination. The BEEP Workshop, Report, IFREMER Nantes, France.
- Burke M. D., Mayer R. T. (1974) Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene, *Drug Metabolism and Disposition*, 2, pp. 583-588.
- Caballero M. J., Izquierdo M. S., Kjørsvik E., Fernández A. J., Rosenlund G. (2004) Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source, *Journal of Fish Diseases*, 27, pp. 531-541.
- Carrera E. P., García-López A., Martín del Río M. del P., Martínez-Rodríguez G., Solé M., Mancera J. M. (2007) Effects of 17 β -estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145, pp. 210-217.
- Century B. (1973) A role of the dietary lipid in the ability of phenobarbital to stimulate drug detoxification, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 185, pp. 185-194.
- Christofilogiannis P. (2002) Use of Antibiotics in Greek Mariculture, Phd Thesis, University of Stirling - Institute of Aquaculture, 413 pages.

- Daniel P. (2009) Drugs and chemicals in aquafeeds: The problems and solutions, *Options Méditerranéennes*, 86, pp. 85-94.
- Davies P. E., Cook L. S. J., Goenarso D. (1994) Sublethal Responses to Pesticides of Several Species of Australian Freshwater Fish and Crustaceans and Rainbow Trout, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (8), pp. 1341-1354.
- Endo T., Onozawa M., Hmaguchi M., Kusuda R. (1987) Bioavailability of ultra-fine preparation of oxolinic acid in red sea breams, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, pp. 1493.
- Endo T., Onozawa M., Hmaguchi M., Kusuda R. (1987) Enhanced bioavailability of oxolinic acid by ultra-fine size reduction in yellowtail, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, pp. 1711-1716.
- Fernández-Palacios H., Izquierdo M. S., Robaina L., Valencia A., Salhi M., Vergara J. M. (1995) Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Aquaculture*, 132 (3-4), pp. 325-337.
- Finsson K. W., Eales J. G. (1998) Sulfation of thyroid hormones by liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 120 (3), pp. 415-420.
- Fountoulaki E., Vasilaki A., Hurtado R., Grigorakis K., Karacostas I., Nengas I., Rigos G., Kotzamanis Y., Venou B., Alexis M. N. (2009) Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile: recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuating water temperatures, *Aquaculture*, 289 (3-4), pp. 317-326.
- Gadagbui B. K. M., James M. O. (2000) Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine, *Aquatic Toxicology*, 49, pp. 27-37.

- Galgani F., Payne J. F. (1991) Biological effects of contaminants: Microplate method for measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in fish, *Techniques in Marine Environmental Science* No 13, ICES, Palegade 2-4. DK-1267 Copenhagen K. Denmark, 11 pages.
- George S., Henderson J. (1992) Influence of dietary PUFA content on cytochrome P450 and transferase activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Marine Environmental Research*, 34 (1-4), pp. 127-131.
- Goksøyr A., Husøy A. (1998) Immunochemical approaches to studies of CYP1A localization and induction by xenobiotics in fish, Braunbeck T., Hinton D. E., Streit B. (eds), *Fish ecotoxicology*, pp. 165-202, Birkhauser Publishing Company, Switzerland.
- Goksøyr A., Andersson T., Hansson T., Klungsoyr J., Zhang Y., Förlin L. (1987) Species Characteristics of the Hepatic Xenobiotic and Steroid Biotransformation Systems of Two Teleost Fish, Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and Rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Toxicology and Applied Pharmacology*, 89, pp. 347-360.
- González J. F., Reimschuessel R., Shaikh B., Kane A. S. (2009) Kinetics of hepatic phase I and II biotransformation reactions in eight finfish species, *Marine Environmental Research*, 67, pp. 183-188.
- González J. F. (2006) Hepatic phase I and II biotransformation kinetics in fishes: a comparative study, PhD Thesis, University of Maryland, 228 pages.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. (1974) Glutathione S-Transferases (The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation), *Journal of Biological Chemistry*, 249 (22), pp. 7130-7139.
- Haluzová I., Modrá H., Blahová J., Havelková M., Šířoká Z., Svobodová Z. (2011) Biochemical markers of contamination in fish toxicity tests, *Interdisciplinary Toxicology*, 4 (2), pp. 85-89.

- Hirsch E. (2007) The function of the Cytochrome P450 family in zebrafish, Bachelor's degree, McMaster University, 31 pages.
- Hoydal K. (2004) Coastal baseline - Exposure and effects of PAH in the coastal zone around The Faroe Islands, Report, Food Veterinary and Environmental Agency, 41 pages.
- International Fishmeal and Fish Oil Organisation (IFFO) (2011) <http://www.iffo.net/default.asp?contentID=718> [accessed 15 December 2011].
- Izquierdo M. S. (2005) Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species, *Cahiers Options Méditerranéennes*, 63, pp. 91-102.
- Izquierdo M. S., Montero D., Robaina L., Caballero M. J., Rosenlund G., Ginés R. (2005) Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding, *Aquaculture*, 250 (1-2), pp. 431-444.
- Jones H. S. (2010) Xenobiotic metabolism and zebrafish (*Danio rerio*) larvae, Phd Thesis, University of Birmingham, 168 pages.
- Kleinow K. M., Melancon M. J., Lech J. J. (1987) Biotransformation and Induction: Implications for Toxicity, Bioaccumulation and Monitoring of Environmental Xenobiotics in Fish, *Environmental Health Perspectives*, 71, pp. 105-119.
- Knorre D. G., Kudryashova N. V., Godovikova T. S. (2012) <http://actanaturae.ru/article.aspx?id=175> [accessed 19 January 2012].
- Krüner G., Westernhagen H. (1999) Sources of measurements error in assays of EROD activity of fish for biological effects monitoring, *Helgoland Marine Research*, 53 (3-4), pp. 250-256.

- Lemaire P., Mathieu A., Giudicelli J., Lafaurie M. (1992) Effect of diet on the responses of hepatic biotransformation enzymes to benzo(a)pyrene in the European sea bass (*Dicentrarchus Labrax*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 102 C (3), pp. 413-420.
- Lunestad B. T., Behzadzadeh M., Samuelsen O., Espe M., Berntssen M. H. G. (2010) The Effect of the Feed Oil and Protein Source on the Deposition and Depletion of Oxolinic Acid in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.), *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 2 (1), pp. 6-10.
- Martínez - Lara E., Toribio F., López - Barea J., Bárcena J. A. (1996) Glutathione-S-Transferase Isoenzyme Patterns in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Exposed to Environmental Contaminants, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113 C (2), pp. 215-220.
- Montero D., Grasso V., Izquierdo M. S., Ganga R., Real F., Tort L., Caballero M. J., Acosta F. (2008) Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters, *Fish and Shellfish Immunology*, 24, pp. 147-155.
- Montero D., Kalinowski T., Caballero M. J., Obach A., Tort L., Robaina L., Izquierdo M. S. (2005) Effect of dietary vegetable lipid sources in gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune status and stress resistance, *Cahiers Options Méditerranéennes*, 63, pp. 103-112.
- Montero D., Robaina L., Caballero M. J., Gines R., Izquierdo M. S. (2005) Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet, *Aquaculture*, 248, pp. 121-134.
- Montero D., Kalinowski T., Obach A., Robaina L., Tort L., Caballero M. J., Izquierdo M. S. (2003) Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health, *Aquaculture*, 225 (1-4), pp. 353-370.

- Morrow M. D., Higgs D., Kennedy C. J. (2004) The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137, pp. 143-154.
- Morrow M. D. (2003) The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Master of environmental toxicology, Simon Fraser University, 87 pages.
- Mourente G., Bell J. G. (2006) Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet, *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 145 (3-4), pp. 389-399.
- Ng W. K., Lim P. K., Boey P. L. (2003) Dietary lipid and palm oil source affects growth, fatty acid composition and muscle a-tocopherol concentration of African catfish, *Clarias gariepinus*, *Aquaculture*, 215 (1-4), 229-243.
- Norred W. P., Marzuki A. (1984) Effects of dietary saturated or polyunsaturated fat on hepatic glutathione S-transferase activity, *Drug Nutrient Interactions*, 3 (1), pp. 11-20.
- Ohkimoto K., Sugahara T., Sakakibara Y., Suiko M., Liu M.-Y., Carter G., Liu M.-C. (2003) Sulfonation of environmental estrogens by zebrafish cytosolic sulfotransferases, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309 (1), pp. 7-11.
- Parente T. E. M., De-Oliveira A. C. A. X., Silva I. B., Araujo F. G., Paumgarten F. J. R. (2004) Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil, *Chemosphere*, 54, pp. 1613-1618.

- Pecore R. (2001) Whole System Perspective: Steelhead, *Onchorhynchus mykiss*, Glutathione S-Transferase as a Biomarker of Chlorpyrifos Exposure, Bachelor's degree, Oregon State University, 56 pages.
- Ray A. K., Ghosh M. C. (2006) Aquatic toxicity of carbamates and organophosphates, Gupta R. (ed.), Toxicology of organophosphate and carbamate compounds, pp. 657-678, Academic Press, Burlington.
- Rigos G., Zonaras V., Nikolopoulou D., Henry M., Nikoloudaki X., Alexis M. (2011) The effect of diet composition (plant vs fish oil-based diets) on the availability of oxytetracycline in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at two water temperatures, *Aquaculture*, 311 (1-4), pp. 31-35.
- Rigos G., Morgan H., Cotou E., Papoutsis E., Zonaras V., Nikoloudaki X., Nikolopoulou D., Nengas I., Alexis M. (2009) The effect of diet composition (plant vs fish oil-based diets) on plasma concentration of various antibacterials in gilthead sea bream, 14th EAAP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Prague, pp. 408.
- Rigos G., Nengas I., Alexis M., Tyrpenou A. E., Piper I., Troisi G. M. (2003) Tissue distribution and residue depletion of oxolinic acid in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) following multiple in-feed dosing, *Aquaculture*, 224, pp. 245-256.
- Rigos G., Alexis M., Tyrpenou A. E., Nengas I., Piper I., Troisi G. (2002) Pharmacokinetics of oxolinic acid in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., *Journal of Fish Diseases*, 25, pp. 401-408.
- Saera-Vila A., Benedito-Palos L., Sitjà-Bobadilla A., Nàcher-Mestre J., Serrano R., Kaushik S., Pérez-Sánchez J. (2009) Assessment of the health and antioxidant trade-off in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed alternative diets with low levels of contaminants, *Aquaculture*, 296, pp. 87-95.

- Saito M., Yamaguchi M. (1994) Liver microsomal mixed-function oxidases in response to dietary n-3 fatty acid levels in rats, *Annals of Nutrition and Metabolism*, 38 (4), pp. 212-220.
- Samuelsen O. B. (2006) Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review, *Aquaculture*, 255, pp. 55-75.
- Samuelsen O. B., Ervik A. (1999) A single-dose of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in Atlantic halibut (*Hippoglossus hipoglossus* L.) held in sea water at 9°C, *Journal of Fish Diseases*, 22, pp. 13-23.
- Sarasquete C., Segner H. (2000) Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies, *The Science of the Total Environment*, 247, pp. 313-332.
- Sargent J. R., Tocher D. R., Bell J. G. (2002) The Lipids, Halver J. E., Hardy R. W. (eds), *Fish Nutrition*, pp. 181-257, Academic Press, New York.
- Scornaienchi M. L. (2009) Functional characterization of zebrafish cytochrome P450 1 and 3A genes using heterologously expressed proteins, Master of science, McMaster University, 117 pages.
- Segall M. (1997) <http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node49.html#cycle> [accessed 15 December 2011].
- Shojaee AliAbadi F., Lees P. (2000) Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dose regime optimization, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, pp. 307-313.
- Slatinská I., Smutná M., Havelková M., Svobodová Z. (2008) Review article: Biochemical markers of aquatic pollution in fish – Glutathione S-Transferase, *Folia Veterinaria*, 52 (3-4), pp. 129-134.

- Sleiderink H. M., Oostingh I., Goksøyr A., Boon J. P. (1995) Sensitivity of cytochrome P450 1A induction in dab (*Limanda limanda*) of different age and sex as a biomarker for environmental contaminants in the southern North Sea, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28 (4), pp. 423-430.
- Smeets J. M. W., Wamsteker J., Roth B., Everaarts J., van den Berg M. (2002) Cytochrome P4501A induction and testosterone hydroxylation in cultured hepatocytes of four fish species, *Chemosphere*, 46, pp. 163-172.
- Structural Genomics Consortium (SGC) (2012) <http://www.thesgc.org/structures/details?pdbid=3CKL/> [accessed 19 January 2012].
- Tang J., Rose R. L., Ghambars J. E. (2006) Metabolism of organophosphorus and carbamate pesticides, Gupta R. (ed.), *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*, pp. 127-144, Academic Press, Burlington.
- Teles M., Pacheco M., Santos M. A. (2005) *Sparus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 β -estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol, *Science of the Total Environment*, 336, pp. 57-69.
- Thomas J. A. (1999) <http://www.bb.iastate.edu/~jat/glutchp.html> [accessed 15 December 2011].
- Treves-Brown K. M. (2000) *Applied Fish Pharmacology*, Kluwer Academic Publishers, London, pp. 310.
- UNEP (United Nations Environment Programme) (1999) <http://195.97.36.231/acrobatfiles/MAPDocAcrobatfiles/Ramoge/Ramoge.pdf> [accessed 15 December 2011].
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N. P. E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, pp. 57-149.

- Viganò L., Arillo A., Bagnasco M., Bennicelli C., Melodia F. (1993) Xenobiotic Metabolizing Enzymes In Uninduced And Induced Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects Of Diets And Food Deprivation, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104 C (1), pp. 51-55.
- Wade A. E., Bellows J., Dharwadkar S. (1986) Influence of dietary menhaden oil on the enzymes metabolizing drugs and carcinogens, *Drug Nutrient Interactions*, 4 (4), pp. 339-347.
- Wade A. E., White R. A., Walton L. C., Bellows J. T. (1985) Dietary fat-a requirement for induction of mixed-function oxidase activities in starved-refed rats, *Biochemical Pharmacology*, 34 (20), pp. 3747-3754.
- Wang L.-Q., James M. O. (2007) Sulfonation of 17 β -estradiol and inhibition of sulfotransferase activity by polychlorobiphenyls and celecoxib in Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, *Aquatic Toxicology*, 81 (3), pp. 286-292.
- Wikipedia (2011) http://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione_S-transferase [accessed 15 December 2011].
- Wikipedia (2011) http://en.wikipedia.org/wiki/Oxolinic_acid [accessed 15 December 2011].
- Wilson R. P. (2002) Amino Acids and Proteins, Halver J. E., Hardy R. W. (eds), Fish Nutrition, pp. 143-180, Academic Press, New York.
- Yasuda S., Burgess M., Yasuda T., Liu M.-Y., Bhuiyan S., Williams F. E., Kurogi K., Sakakibara Y., Suiko M., Liu M.-C. (2009) A Novel Hydroxysteroid-Sulfating Cytosolic Sulfotransferase, SULT3 ST3, from Zebrafish: Identification, Characterization, and Ontogenic Study, *Drug Metabolism Letters*, 3, pp. 217-227.
- Zhang K., Zang T.-Z., Yang W., Sun Y., Mu Y., Liu J.-Q., Shen J.-C., Luo G.-M. (2006) Single Chain Antibody Displays Glutathione S-Transferase Activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (18), pp. 12516-12520.