



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΜΣ: Αειφορική Διαχείριση Υδατικού
Περιβάλλοντος

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΩΣ ΔΕΙΚΤΗΣ
ΥΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΕΝΤΑΤΙΚΑ
ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΙΧΘΥΩΝ

ΜΑΤΟΥΖΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΒΟΛΟΣ 2017

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Ελένη Γκολομάζου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Προστασία Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπουσα*
- 2) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*
- 3) Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης, Επίκουρος Καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας ιχθυολογίας και υδάτινου περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια μεταπτυχιακών σπουδών του τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά την περίοδο 2015-2017. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην υλοποίηση αυτής της εργασίας, ο κάθε ένας με τον τρόπο του και από τη θέση του.

Ευχαριστώ την κα. Έλενα Γκολομάζου, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία ανέλαβε την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας, υποστηρίζοντας και καθοδηγώντας με καθ' όλη τη διάρκειά της.

Ευχαριστώ, επίσης, την κα. Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια φοίτησής μου.

Ακόμη ευχαριστώ τον κ Ιωάννη Καραπαναγιωτίδη, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμβουλευτική της υποστήριξη κατά τη διάρκεια της συγγραφής της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω αυτούς που στέκονται πάντα δίπλα μου και με τη θετική τους ενέργεια μου δίνουν δύναμη να πετύχω τους στόχους μου, τη μητέρα μου Σοφία και τον φίλο μου Βαγγέλη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μερική αντικατάσταση ιχθυεαλεύρου στις ιχθυοτροφές με εναλλακτικές μορφές πρωτεΐνης θα συμβάλλει σημαντικά στην αειφορία και στην οικονομική ευρωστία του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών. Η διερεύνηση των ποσοστών αντικατάστασης είναι αναγκαία για την επίτευξη αυτού του στόχου.

Με γνώμονα τα παραπάνω, σκοπός της εργασίας ήταν η μερική αντικατάσταση ιχθυαλεύρων με πρωτεΐνες που προέρχονται από πουλερικά και η μελέτη επίδρασης της αντικατάστασης στο προφίλ των αιματολογικών παραμέτρων των ιχθύων. Η διατροφή είναι ένας από τους παράγοντες που σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα των τιμών των δεικτών του αίματος και κυρίως της γλυκόζης με τις μεταβολές της στα διάφορα στάδια της ζωής των ψαριών. Μεταβολές των δεικτών του αίματος και διαφόρων στοιχείων μεταβολισμού, κυρίως της γλυκόζης, σχετίζονται με την κατάσταση της φυσιολογίας των ψαριών.

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 2 διατροφικές ομάδες: «ομάδα ιχθυάλευρο» που διατράφηκε με την FM τροφή και «ομάδα πτηνάλευρο» που διατράφηκε με την PM50 τροφή δηλαδή αντικατάσταση του 50% της τροφής με πτηνάλευρο.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η μερική αντικατάσταση δεν επηρέασε το αιματολογικό προφίλ των πειραματικών ψαριών, γεγονός που υποδεικνύει ότι η μερική αντικατάσταση σε ποσοστό 50% μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής.

ABSTRACT

Partial replacement of fishmeal in fish feed with alternative forms of protein will greatly contribute to the sustainability and profitability of the aquaculture industry. Research on replacement rates is necessary to achieve this goal.

In view of the above, the aim of the present study was to partially replace fishmeal with poultry-derived proteins and to assess the effect of replacement on the profile of haematological parameters in gilthead seabream. Diet is one of the factors directly related to blood parameters and, especially glucose, strongly related to the physiology of fish.

In total, 2 diets were used: "fishmeal group" fed with FM feed and "poultry meal" group fed with PM50 feed, is replacing 50% of feed with poultry-by-products..

The results revealed that partial replacement did not affect the haematological profile of experimental fish, suggesting that partial replacement of 50% could be considered safe.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αιματολογικές Αναλύσεις Γενικά Στοιχεία.....	8
1.2. Συνηθισμένες Αιματολογικές Μέθοδοι.....	9
1.3. Συστατικά του αίματος των ιχθύων.....	11
1.3.1 Αίμα.....	11
1.3.2 Πλάσμα.....	11
1.3.3. Ορός	11
1.3.4 Ερυθροκύτταρα.....	12
1.3.5 Αιμοπετάλια ή Θρομβοκύττα.....	12
1.4 Γενική εξέταση αίματος.....	13
1.5 Βιοχημικές εξετάσεις	14
1.6 Σκοπός διατριβής.....	17

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....18

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός	18
2.2 Εκτροφή ιχθύων με τις πειραματικές ιχθυοτροφές	18
2.3 Τεχνικές αιμοληψίας.....	19
2.4 Βασικές αρχές για τη δειγματοληψία.....	24

2.5 Μέτρηση αιματοκρίτη.....	24
2.6 Τεχνικές βιοχημικών εξετάσεων	25
2.7 Πρωτόκολλο χρώσεων	25
2.7.1 Χρώση May Grünwald- Giemsa.....	25
2.8 Παρασκευή επιχρισμάτων αίματος.....	26
2.9 Πειραματική διαδικασία.....	27
2.10 Προσδιορισμός της γλυκόζης στο αίμα – πρωτόκολλο.....	28
2.11 Προσδιορισμός χοληστερόλης στο αίμα- πρωτόκολλο.....	29
2.12 Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων στο αίμα- πρωτόκολλο.....	29
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	30
4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	33
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	35

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αιματολογικές Αναλύσεις Γενικά Στοιχεία

Τα ευρήματα των αιματολογικών εξετάσεων δίνουν πολύτιμες διαγνωστικές πληροφορίες για την κατάσταση και την εικόνα της υγείας ενός οργανισμού. Η εξέταση αίματος είναι μία από τις συχνότερα ζητούμενες και διενεργούμενες εργαστηριακές εξετάσεις. Σε αυτήν μελετούνται τόσο ποσοτικά όσο και μορφολογικά όλα τα έμμορφα συστατικά (κύτταρα) του αίματος, τα οποία αιωρούνται μέσα σε υγρό περιβάλλον που ονομάζεται ορός. Αίμα είναι το υγρό που κυκλοφορεί στο αγγειακό σύστημα των ανθρώπων και των ζώων.

Η κυκλοφορία του διαμέσου της καρδιάς, των αρτηριών, των φλεβών και των τριχοειδών αγγείων επιτελεί διάφορες λειτουργίες όπως η μεταφορά θρεπτικών ουσιών, ορμονών, βιταμινών, θερμότητας και οξυγόνου στους ιστούς και την απομάκρυνση άχρηστων ουσιών που παράγονται κατά τον μεταβολισμό και του διοξειδίου του άνθρακα. Επιπρόσθετα, παρέχει άμυνα κατά των λοιμώξεων μέσω της δράσης των λευκών αιμοσφαιρίων και των αντισωμάτων.

Το αίμα αποτελεί έναν εξαιρετικά εξειδικευμένο κυκλοφορούντα ιστό, ο οποίος αποτελείται από διάφορους τύπους κυττάρων που συγκροτούνται μέσα σε ένα υγρό μέσο που ονομάζεται πλάσμα. Τα στοιχεία αυτά παράγονται και ωριμάζουν αρχικά στον μυελό των οστών και στη συνέχεια υπό φυσιολογικές συνθήκες απελευθερώνονται στο αίμα ανάλογα με τις ανάγκες (Rigos *et al.* 2010). Η ποσοτική μελέτη αφορά τον ολικό αριθμό ή την εκατοστιαία αναλογία των αιμοσφαιρίων, δηλαδή των κυττάρων του αίματος (Ερυθρών, Λευκών, Αιμοπεταλίων), ενώ μορφολογικά αναζητούνται μεταβολές ή αλλοιώσεις αναφορικά με το μέγεθος, το σχήμα, το είδος καθώς και άλλων φυσικών χαρακτηριστικών των αιμοσφαιρίων.

1.2 Συνηθισμένες Αιματολογικές Μέθοδοι

Σχεδόν όλες οι αιματολογικές και αναλυτικές μέθοδοι αναπτύχθηκαν για χρήση της ανθρώπινης ιατρικής και μπορούν να προσαρμοστούν για εξετάσεις του αίματος στους ιχθύες. Όπως με την ιατρική πρακτική στον άνθρωπο και στα σπονδυλωτά κατά ανάλογο τρόπο πολλοί ερευνητές αποπειράθηκαν να οριοθετήσουν τις φυσιολογικές αιματολογικές τιμές σε ποικίλα είδη ιχθύων. Εκτροπές από τέτοιες τιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εκτίμηση των συνθηκών των εκτρεφόμενων ατόμων, για διάγνωση μολύνσεων και παθογόνων περιπτώσεων καθώς και για τον εντοπισμό άλλων παραμέτρων που επιφέρουν καταπόνηση του οργανισμού.

Ως υδρόβιοι ποικιλόθερμοι οργανισμοί, οι ιχθύες ανταποκρίνονται αμέσως στις αλλαγές του περιβάλλοντος τους. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να λάβουν χώρα ωριαία, ημερήσια ή και εποχιακά. Οι υδρόβιοι οργανισμοί πιθανώς να είναι συχνά σε κατάσταση διαδικασίας προσαρμογής στις νέες συνθήκες ή να έχουν ήδη προσαρμοστεί. Το ερώτημα είναι αν ο όρος «φυσιολογικό» μπορεί να εφαρμοστεί στα υδρόβια ποικιλόθερμα για την μέθοδο που χρησιμοποιείται στα θηλαστικά, αφού «φυσιολογική» αιματολογική κατάσταση στους ιχθύες μπορεί να παρουσιαστεί με τιμή εύρους τόσο μεγάλη ώστε να είναι άνευ σημασίας. Παρόλα αυτά, μια προσεχτική ερμηνεία των αιματολογικών στοιχείων μπορεί να μας εξασφαλίσει σημαντικές πληροφορίες για πολυσήμαντες λειτουργίες.

Για αυτό τον λόγο, περισσότερη έμφαση δόθηκε στην ανάπτυξη, την εφαρμογή και τη διάθεση μεθοδολογιών (Hesser 1960, Blaxhall & Daisley 1973, Casillas & Smith 1977, Christopher et al. 1978). Αυτές θεωρούνται κατάλληλες στους ορούς των ερυθροκυττάρων (κατά συνέπεια της αναπνευστικής μεταφορά αερίων) και των λευκοκυττάρων (κατά συνέπεια της πήξης του αίματος και της ανταπόκρισης στην παθογένεια). Αυτές οι τεχνικές αναφέρονται σε

μια σειρά από προσπάθειες να υπολογισθούν διάφοροι βιοχημικοί παράμετροι του αίματος των ιχθύων συλλέγοντας έγκυρες τιμές.

Οι δείκτες του αίματος χρησιμοποιούνται συνήθως ως άμεσοι ή συμπερασματικοί δείκτες της λειτουργικής κατάστασης του οργανισμού. Ωστόσο η επίδραση του στρες (stress) σε αυτούς τους δείκτες είναι διαρκής και εκτενής, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα σύνδεσης των τιμών των αιματολογικών αναλύσεων με πορίσματα που σχετίζονται με την φυσιολογική ή όχι συμπεριφορά του ψαριού (Iwama. G.K. et al. 1995).

Οι κυριότερες από αυτές τις αναλύσεις σχετίζονται με :

- Την καταμέτρηση των ερυθροκυττάρων.
- Τον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη .
- Τον υπολογισμό όγκων αίματος.
- Την κατανομή μεγεθών των ερυθρών κυττάρων.
- Την ηλεκτροφόριση της αιμοσφαιρίνης.
- Την εξίσωση καμπύλης του οξυγόνου.
- Την δραστηριότητα των ενζύμων των ερυθρών κυττάρων.
- Τον προσδιορισμό και υπολογισμό των λευκοκυττάρων , μονοκυττάρων θρομβοκυττάρων, λεμφοκυττάρων, μακροφάγων, ετερόφιλων, βασόφιλων και εοσινόφιλων.
- Τον υπολογισμό επιπέδων ορμονών και βιοχημικών ουσιών.

1.3 Συστατικά του αίματος των ιχθύων.

1.3.1. Αίμα

Το αίμα είναι ο ιστός, ο οποίος αποτελείται από κύτταρα που κυκλοφορούν σε ένα υγρό μέσο, το πλάσμα, ή στην περίπτωση ορισμένων σπονδυλόζων στην αιμολέμφο. Ο ρόλος του αίματος είναι η μεταφορά των τροφικών προϊόντων, απεκκρίσεων μέσα στο σώμα σε διαφορετικά όργανα και ιστούς. Συνήθως περιέχει αναπνευστικές χρωστικές. Το αίμα κυκλοφορεί με μυϊκές συσπάσεις αγγείων ή εξειδικευμένων οργάνων (καρδιά) (Basic techniques in fish haematology). Το αίμα του ψαριού πήζει σε 20-30' ενώ το αίμα του ανθρώπου σε 7-8' (Κουφός Σ. - Βορεινάκης Φ. 1994)

1.3.2 Πλάσμα

Το πλάσμα αποτελείται από 90% νερό και 10% διαλυμένες οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Οι οργανικές ουσίες συμπεριλαμβάνουν τις πρωτεΐνες, όπως σφαιρίνες, αλβουμίνες, ινωδογόνο και αντισώματα. Το πλάσμα περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων νατρίου και χλωρίου που παραμένουν σε σταθερή αναλογία με τα ιόντα καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου. Όταν αυτή η ιοντική ισορροπία διαταραχθεί μπαίνει άμεσα σε κίνδυνο η ζωή του οργανισμού (Καββαδίας Σπ. 1994).

1.3.3. Ορός

Ο Ορός είναι υγρό κιτρινωπού χρώματος, το οποίο απομένει μετά την πήξη του αίματος. Η σύνθεση είναι η ίδια με του πλάσματος, μόνο που ο ορός δεν περιέχει ινωδογόνο (Basic techniques in fish haematology).

1.3.4. Κύτταρα

Τα αιμοκύτταρα διακρίνονται σε 2 κύριες κατηγορίες: ερυθροκύτταρα (ερυθρά αιμοσφαίρια) και λευκοκύτταρα (λευκά αιμοσφαίρια)

1.3.5. Ερυθροκύτταρα

Ο όρος ερυθροκύτταρο αναφέρεται στα εμπύρρινα αιμοκύτταρα τα οποία φέρουν την κόκκινη χρωσμένη πρωτεΐνη, αιμοσφαιρίνη. Τα ερυθροκύτταρα διαφέρουν από τα λευκοκύτταρα και η πρωταρχική λειτουργία τους είναι η μεταφορά αερίων σε ολόκληρο το σώμα. Η αύξηση του αριθμού τους σε συνδυασμό με τη μείωση του μεγέθους τους αποτελεί τον καλύτερο εφοδιασμό του οργανισμού με οξυγόνο (Κουφός Σ. - Βορεινάκης Φ. 1994).

Τα ερυθροκύτταρα είναι τα κυρίαρχα αιμοκύτταρα στα ψάρια. Υπάρχει σημαντική διαφορά στον αριθμό τους από είδος σε είδος. Μπορεί επίσης να υπάρχει διαφορά μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, εξαρτώμενη άμεσα από την κατάσταση της υγείας του ψαριού.

1.3.6. Αιμοπετάλια ή Θρομβοκύτταρα

Στα θηλαστικά τα θρομβοκύτταρα είναι οι πρόδρομοι των κυττάρων που καλούνται αιμοπετάλια, τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα και είναι υπεύθυνα για την θρόμβωση. Τα θρομβοκύτταρα των θηλαστικών σπάνια βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Στα ψάρια ωστόσο, σε αντίθεση με τα θηλαστικά τα θρομβοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα. Υπάρχει διαφωνία σχετικά με τους αριθμούς

των θρομβοκυττάρων που βρίσκονται στο περιφερειακό αίμα των ψαριών, η οποία προκύπτει από την ευκολία με την οποία μπορούν να θεωρηθούν εσφαλμένα λεμφοκύτταρα. Στα νεαρά άτομα της ιριδίζουσας πέστροφας για παράδειγμα τα θρομβοκύτταρα αντιστοιχούν στο 1-6% των συνολικών λευκοκυττάρων.

Η αναλογία των λεμφοκυττάρων ως προς τα θρομβοκύτταρα στην ιριδίζουσα πέστροφα έχει βρεθεί πως είναι 25:1, ωστόσο για το ίδιο είδος έχει μετρηθεί μια αναλογία 2:1. Αντιστρόφως, στη γλώσσα (*Pleuronectes platessa*) έχει καταγραφεί μια αναλογία λεμφοκυττάρων προς θρομβοκύτταρα 1:3. (Κουφός Σ. - Βορεινάκης Φ. 1994).

1.4 Γενική Εξέταση Αίματος

Στη Γενική Εξέταση Αίματος προσδιορίζονται η Αιμοσφαιρίνη, ο Αιματοκρίτης, ο αριθμός των Ερυθροκυττάρων, των Λευκοκυττάρων (με τον Λευκοκυτταρικό τους τύπο), των Αιμοπεταλίων καθώς επίσης και σειρά άλλων αιματολογικών παραμέτρων με ιδιαίτερη σημασία ο καθένας τους. Με την εισαγωγή σύγχρονων αιματολογικών αναλυτών υψηλής τεχνολογίας και την αυτοματοποίηση των μετρήσεων, οι προσδιορισμοί αυτοί έγιναν όχι μόνο ταχύτεροι αλλά και ακριβέστεροι.

Ο προσδιορισμός όλων αυτών των αιματολογικών παραμέτρων είναι πάρα πολύ σημαντικός και χρήσιμος για τη διάγνωση πολλών νοσημάτων όπως, μικροβιακών και ιογενών λοιμώξεων), αιμοσφαιρινοπαθειών και αναιμιών (κληρονομικών, αιμολυτικών, σιδηροπενικών), αιμορραγιών ή θρομβώσεων και λευχαιμιών. Εξίσου σημαντικός και χρήσιμος είναι επίσης ο προσδιορισμός των αιματολογικών παραμέτρων και για την παρακολούθηση της πορείας πολλών παθήσεων και νοσημάτων καθώς και για την αποτελεσματικότητα της ακολουθούμενης θεραπείας.

Η διαταραχή οποιουδήποτε τμήματος του ανθρώπινου οργανισμού μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη σύσταση του αίματος. Τα διάφορα συστατικά που αποτελούν το αίμα αντικατοπτρίζουν τις περισσότερες από τις λειτουργίες του οργανισμού. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα συστατικά αυτά βρίσκονται σε σταθερά και φυσιολογικά επίπεδα. Οι όποιες αλλαγές όμως στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, συχνά συνοδεύονται και από αλλαγές τόσο στα ποσοτικά όσο και στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των συστατικών του αίματος, επιτρέποντας έτσι τη συγκέντρωση χρήσιμων στοιχείων απαραίτητων για τη σωστή και έγκαιρη διάγνωση. (Dal'Βό *et al.* 2015)

1.5 Βιοχημικές εξετάσεις

Οι βιοχημικές αναλύσεις είναι οι από τις συχνότερες αναλύσεις που γίνονται στα ιατρικά εργαστήρια. Στην κατηγορία «βιοχημικές αναλύσεις» ανήκει ένας πολύ μεγάλος αριθμός ποσοτικών προσδιορισμών. Όλες οι αναλύσεις που αναφέρονται ανήκουν στην κατηγορία που είναι γνωστές ως «χρωματομετρικές» ή «φωτομετρικές» αναλύσεις.

Παλαιότερα εκτελούνταν με ένα μόνο με το φωτόμετρο, σήμερα όμως εκτελούνται πλέον σε αυτόματους βιοχημικούς αναλυτές. Παρόλα αυτά η γνώση των μεθοδολογιών με την βοήθεια του φωτομέτρου είναι ακόμα και σήμερα χρήσιμη για να κατανοήσει κανείς τον τρόπο λειτουργίας αυτών των αυτόματων μηχανημάτων. Έτσι, ο χρήστης γνωρίζοντας τον τρόπο λειτουργίας των αυτόματων αναλυτών μπορεί να παρέμβει αποτελεσματικά όταν υπάρχουν τεχνικά προβλήματα και να βοηθήσει στην γρήγορη εξουδετέρωσή τους.

Οι πιο συνηθεις βιοχημικες εξετάσεις φαίνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1 Βιοχημικές αναλύσεις αίματος

Γλυκόζη	Σίδηρος	Ουρικό οξύ	χοληστερόλη	Κρεατινίνη
Ασβέστιο	Ουρία	Αλβουμίνη	Χολερυθρίνη	Αμυλάση
GOT/AST ALP	GPT/ALT	Μαγνήσιο	Ολική χολερυθρίνη	LDL- χοληστερόλη
Ολική πρωτεΐνη	Τριγλυκερίδια	Ασβέστιο	Φώσφορος	Νάτριο

Γλυκόζη (GLU)

Στην ελεύθερή της μορφή υπάρχει στους ιστούς των φυτών, στα φρούτα, το μέλι και το αίμα. Γλυκόζη ονομάζεται ένας απλός μονοσακχαρίτης που απορροφάται άμεσα στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της πέψης. Τα κύτταρα την χρησιμοποιούν ως πρωταρχική πηγή ενέργειας και ως μέσο μεταβολισμού. Η αντίδραση της ινσουλίνης ρυθμίζει τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα. Αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο. Η δοκιμασία της γλυκόζης είναι μια συνηθισμένη αιματολογική εξέταση με σκοπό τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο αίμα. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο τυχόν προδιαβήτη ή διαβήτη στον άνθρωπο και στα θηλαστικά (Σμοκοβίτης 2007)

Η γλυκόζη αποτελεί το κύριο προϊόν του μεταβολισμού των πιο σύνθετων υδατανθράκων. Οξειδώνεται στα κύτταρα για να δώσει ενέργεια, αποθηκεύεται στο ήπαρ και στον μυϊκό ιστό με μορφή

γλυκογόνου. Η γλυκόζη είναι το μόνο θρεπτικό συστατικό που χρησιμοποιείται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες από τα εγκεφαλικά κύτταρα και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Όταν το σάκχαρο του αίματος παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλά επίπεδα μπορεί να εκδηλωθούν επιληπτικές κρίσεις και απώλεια συνείδησης. Αντιθέτως μακροχρόνια υπεργλυκαιμία έχει σαν αποτέλεσμα την εκδήλωση επιπλοκών από τους νεφρούς, τα νεύρα η τα μεγάλα αγγεία.

Χοληστερόλη

Χοληστερόλη ονομάζεται μια κηρώδης στερόλη που βρίσκεται στη μεμβράνη των κυττάρων όλων των ιστών και στο πλάσμα του αίματος όλων των ζώων. Διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των νευρικών συνδέσμων του εγκεφάλου και προστατεύει τους νευρώνες. Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμεύει ως πρώτη ύλη για την παρασκευή της προβιταμίνης D και το σχηματισμό ορμονών. Βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο συκώτι, τη σπονδυλική στήλη και τον εγκέφαλο. Η χοληστερόλη δεν διαλύεται στο αίμα.. Όταν μάλιστα βρίσκεται σε αυτό σε υπερβολικές τιμές τότε αποτελεί κύριο δείκτη κίνδυνου καρδιαγγειακών παθήσεων. Σχετίζεται με την κακή διατροφή και την αυξημένη γλυκόζη στο αίμα (Κατινάκης 2004)

Τριγλυκερίδια (TRI)

Τριγλυκερίδια ονομάζονται οι εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα. Βασική λειτουργία των τριγλυκεριδίων του πλάσματος είναι η μεταφορά των λιπιδίων μεταξύ του ήπατος και των περιφερειακών ιστών. Η αύξηση τους αποτελεί συχνό παθολογικό πρόβλημα. Όπως και η χοληστερόλη σχετίζονται επίσης με την κακή διατροφή και την αυξημένη γλυκόζη στο αίμα (Κατινάκης 2004, Σμοκοβίτης 2007) Τα τριγλυκερίδια αποτελούν μορφή λιπιδίων που χρησιμεύει για την μεταφορά των λιπαρών οξέων στο αίμα. Τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή και της αποθήκευση ενέργειας.

Συναντώνται στο αίμα για 2-3 ώρες μετά από τη λήψη ενός λιπαρού γεύματος. Τις υπόλοιπες ώρες συναντώνται με τη μορφή των πολύ χαμηλής έως χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών που παράγονται από το ήπαρ και τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου. Όταν οι τιμές των τους είναι αυξημένες, ακόμα κι αν υπάρχουν χαμηλές τιμές LDL και υψηλές HDL, συνιστούν κίνδυνο για την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσεως. Υψηλές τιμές τριγλυκεριδίων συναντώνται στην κίρρωση του ήπατος, το νεφρωτικό σύνδρομο, την παγκρεατίτιδα, την οικογενή υπερλιποπρωτεϊναιμία και στη διατροφή με πολλούς υδατάνθρακες και λίγες πρωτεΐνες. Χαμηλές τιμές συναντώνται στον υποσιτισμό, τη δίαιτα που είναι χαμηλή σε λιπαρά και σε προβλήματα απορρόφησης των λιπών. Λιπαρά που λαμβάνονται από τις τροφές και παράγονται στο σώμα από την υπερβολική λήψη τροφής. Ο οργανισμός αποθηκεύει το λίπος υπό μορφή τριγλυκεριδίων (Esteban et al 2015)

1.6 Σκοπός διατριβής

Η μερική αντικατάσταση ιχθυαλεύρου στις ιχθυοτροφές με εναλλακτικές πηγές πρωτεΐνης θα συμβάλλει σημαντικά στην αειφορία και στην οικονομική ευρωστία του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών. Η διερεύνηση των ποσοστών αντικατάστασης είναι αναγκαία για την επίτευξη αυτού του στόχου.

Με γνώμονα τα παραπάνω, σκοπός της εργασίας ήταν η μερική αντικατάσταση ιχθυαλεύρου με άλευρα που προέρχονται από πουλερικά και η μελέτη της επίδρασής τους. Ο σκοπός της διατριβής είναι οι αιματολογικές αναλύσεις σε βιοχημικό επίπεδο στη μεταβολή των αιματολογικών παραμέτρων των πειραματικών ψαριών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Το πείραμα έλαβε χώρα στον εργαστηριακό χώρο των εγκαταστάσεων του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

2.2 Εκτροφή ιχθύων με τις πειραματικές ιχθυοτροφές

Για τις ανάγκες του πειράματος απαιτούνταν ψάρια μεγάλου μεγέθους ώστε να υπάρξει ικανή ποσότητα αίματος κατά την αιμοληψία τους και τις απαιτούμενες εργαστηριακές αναλύσεις.

Για το σκοπό αυτό, τσιπούρες μέσου βάρους 200 g μεταφέρθηκαν από την μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας «ΑΦΟΙ ΜΑΝΤΕ» (Πελασγία, Φθιώτιδος) στον Πειραματικό Σταθμό του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος.

Τα ψάρια αφέθηκαν να εγκλιματιστούν στα πειραματικά ενυδρεία για 7 ημέρες παρέχοντας τους εμπορική τροφή. Πριν την έναρξη της διατροφής τους με τις πειραματικές ιχθυοτροφές (τροφές FM, PM50), τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν σε 10/1 αλατόνευρο 33‰ και θερμοκρασίας 20°C με 1,2 ml φαινοξυθανόλης, ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό, ανένησαν από την αναισθησία σε καθαρό οξυγονωμένο νερό ίδιων φυσικών παραμέτρων και τοποθετήθηκαν στα ενυδρεία.

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 2 διατροφικές ομάδες: «ομάδα ιχθυάλευρο» που διατράφηκε με την FM τροφή και «ομάδα πτηνάλευρο» που διατράφηκε με την PM50 τροφή. Χρησιμοποιήθηκαν 2 ενυδρεία για κάθε διατροφική ομάδα ιχθύων (2 ομάδες X 2 ενυδρεία κάθε μια). Η σίτιση πραγματοποιούνταν καθημερινά, 2 φορές την ημέρα (πρωί – μεσημέρι) με ποσοστό 1% του σωματικού τους βάρους. Η διάρκεια αυτής της πειραματικής

εκτροφής ήταν συνολικά 42 ημέρες. Στο τέλος του πειράματος, ακολούθησε η αιμοληψία των ψαριών.

2.3 Τεχνικές αιμοληψίας

Η λήψη του αίματος από τους ιχθύες πραγματοποιείται από την ουριαία φλέβα με κοιλιακή προσέγγιση. Η βελόνη τοποθετείται με γωνία 45°. Στη συνέχεια γίνεται προώθηση της διαμέσου της σπονδυλικής στήλης μέχρις ότου υπάρξει αίσθηση αντίστασης λόγω επαφής με σπόνδυλο. Τέλος γίνεται η αναρρόφηση της επιθυμητής ποσότητας αίματος με τη σύριγγα και ακολουθεί η επίστρωση του αίματος στις αντικειμενοφόρους πλάκες.

Συνήθως συλλέγονται με διάτρηση της ουριαίας φλέβας, η οποία βρίσκεται ακριβώς κοιλιακά στο νωτιαίο μυελό, είτε με κοιλιακή ή πλευρική προσέγγιση. Κατά την πλευρική προσέγγιση, η βελόνη εισέρχεται με γωνία 45° κάτω από την πλευρική γραμμή κοντά στη βάση του μίσχου της ουράς. Στη συνέχεια, προωθείται διαμέσου των μυών προς την σπονδυλική στήλη.

Στην αίσθηση της αντίστασης λόγω επαφής με το σπόνδυλο, η βελόνη οδηγείται κοιλιακά και πλευρικά προς την σπονδυλική στήλη (1-3mm) κάνοντας ταυτόχρονα αναρρόφηση με τη σύριγγα (Collinw, 1993) Η αναρρόφηση πρέπει να γίνεται αργά για την αποφυγή ρήξης αγγείων, καθώς τα ψάρια έχουν χαμηλή πίεση αίματος. Στην κοιλιακή προσέγγιση, η βελόνη εισέρχεται διαμέσου μυϊκών μαζών των κάτω κοιλιακών τοιχωμάτων, κάθετα με τον οριζόντιο άξονα του σώματος και 1cm οπισθίως του εδρικού πτερυγίου και ακολουθεί η ίδια διαδικασία με την πλευρική προσέγγιση.

Η αιμοληψία από τα αγγεία της ουράς συστήνεται ως καλύτερη μέθοδος για τη λήψη μεγάλης ποσότητας αίματος (Lawbart, 2001, Meyers, 2004, White 2000) Η λήψη του αίματος μπορεί να γίνει εναλλακτικά και από την καρδιά



Εικόνες 1 & 2, Αιμοληψία από ουριαία φλέβα ιχθύων

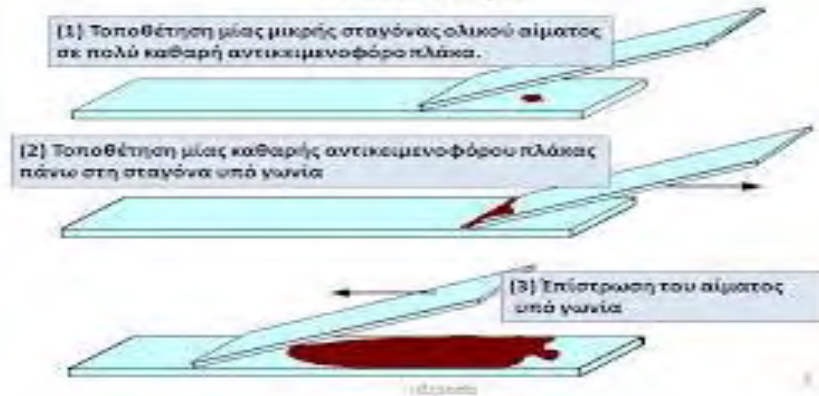
Το αίμα στη συνέχεια μεταφέρεται αμέσως είτε σε σωλήνα διαχωρισμού ορού ή σε σωλήναριο επικαλυμμένο με ηπαρίνη. Ο ορός ή το πλάσμα προσδιορίζουν το σύνηθες προφίλ στη χημεία του αίματος. Χρησιμοποιώντας σωλήνες ηπαρίνης επιτρέπεται ο διαχωρισμός του πλάσματος από τα ερυθροκύτταρα χωρίς καθυστέρηση. Τα υποδείγματα σταθερότητας για είδη ψαριών είναι συγκρίσιμα με εκείνα άλλων σπονδυλωτών. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές διακυμάνσεις των τιμών στα δείγματα αίματος που θα ληφθούν, η τεχνική τυποποιείται ως εξής. Τα ψάρια πιάνονται απαλά με μια μικρή καθαρή απόχη, αποφεύγοντας το στρες όσο το δυνατόν περισσότερο, και αμέσως αναισθητοποιούνται σε MS222.

Ο χρόνος που χρειάζεται για την αναισθητοποίηση των ψάρια είναι συνήθως 2-3 λεπτά. Η αναισθητοποίησή τους μπορεί να διακριθεί από την απώλεια της ισορροπίας και την ακινησία όταν αυτά αγγίζονται. Η χρήση αποστειρωμένων συριγγών είναι ένα απαραίτητο μέτρο προφύλαξης λόγω του ότι αν το αίμα έρθει σε επαφή με γυαλί οδηγείται σε μειωμένους χρόνους πήξης (Smith, Lewis & Kaplan, 1952). Για να αποφευχθεί η μόλυνση με βλέννα και νερό η περιοχή πρέπει να σκουπιστεί με ένα απορροφητικό χαρτί. Η βελόνα εισάγεται σε ορθή γωνία προς την επιφάνεια του ψαριού και γίνεται ελαφρά αναρρόφηση κατά τη διάρκεια της διείσδυσης. Στη συνέχεια η βελόνα σπρώχνεται απαλά προς τα κάτω μέχρι το αίμα να αρχίσει να εισέρχεται στο σώμα της σύριγγας. Όταν ληφθεί η κατάλληλη ποσότητα υπό ήπια αναρρόφηση ($0-5 \text{ cm}^3$), τότε η βελόνη

αποσύρεται. Μετά γίνεται αποσύνδεση της βελόνας από τη σύριγγα και το αίμα αναμιγνύεται καλά σε ένα φιαλίδιο που περιέχει αντιπηκτικό (EDTA) Αυτό το αντιπηκτικό χρησιμοποιείται συνήθως στις αιματολογικές εξετάσεις στην ιατρική διότι δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα με διατηρημένο αίμα . Στη συνέχεια το ψάρι τοποθετείται σε νερό για να ανακτήσει συνείδηση , η οποία επέρχεται κανονικά σε περίπου 5-10 λεπτά . Οι Klontz & Smith (1968) έχουν ασχοληθεί με διάφορες πτυχές της αναισθησίας και ανάκαμψη στα ψάρια . Η καταμέτρηση και η ταυτοποίηση των κυττάρων του αίματος είναι ανεκτίμητες στην υποβοήθηση της διάγνωσης από ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, θεωρείται σκόπιμο να συμπεριλαμβάνονται κατά την εξέταση του αίματος των ψαριών. Αρχικά είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν οι φυσιολογικές τιμές πριν από οποιαδήποτε σύγκριση. Για τη γενική κυτταρολογική χρώση, το δείγμα αφότου αφεθεί για να στεγνώσει, σταθεροποιείται σε μεθανόλη και στη συνέχεια χρωματίζονται με τη χρώση May Grunwald-Giemsa (Hayhoe, Quaglino & Doll, 19fA). Αυτές οι χρώσεις θεωρείται πως δίνουν αποτελέσματα ανώτερα από άλλες τύπου Romanowsky. Η ταυτοποίηση και η καταμέτρηση των κυττάρων απαιτεί εμπειρία σε αναγνώριση και ταξινόμηση των κυττάρων. Hayhoe et al. (1964).

Η αιμοληψία ψαριών στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 5 ψάρια από κάθε μία από τις δύο πειραματικές ομάδες (FM, PM,). Αρχικά τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν με τη χρήση του αναισθητικού φαινοξυαιθανόλης. Η αιμοληψία έγινε από την ουραία φλέβα με τη χρήση σύριγγας 2,5ml και βελόνας 23G. Η είσοδος της βελόνας έγινε στη βάση του ουραίου μίσχου υπό γωνία 45°. Μετά την ολοκλήρωση της αιμοληψίας το αίμα τοποθετήθηκε σε ειδικά σωληνάκια επιστρωμένα με αντιπηκτική ουσία EDTA, προκειμένου να αποφευχθεί η πήξη του.

Τεχνική Επίστρωσης σε Αντικειμενοφόρο Πλάκα 2/3



Εικόνα 3. Επίστρωση αίματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Πίνακας 2. Διατροφικές ομάδες και σωματικά βάρη (g) ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

ΙΧΘΥΕΣ	FM	PM50
1	145	125
2	162	148
3	179	173
4	181	175
5	182	186
6	185	190
7	187	191
8	195	206
9	199	210
10	206	219
11	213	225
12	217	226
13	221	229
14	222	234
15	223	238
16	231	253
17	270	258
18	290	265
Μέσο βάρος (g)	206	208
Συνολική βιομάζα(g)	3708	3751

2.4 Βασικές αρχές για τη δειγματοληψία

Οποιαδήποτε περιοχή δειγματοληψίας κι αν επιλεγθεί, πρέπει να λαμβάνονται κάποιες προφυλάξεις. Η πηκτικότητα πιθανώς μειώνεται όταν χρησιμοποιηθούν σύριγγες με πλαστικό αντί γυαλί. Γενικά μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη βελόνα , πρέπει να συνδυάζεται με τη μικρότερη σύριγγα. Το έμβολο της σύριγγας σύρεται αργά προς τα έξω για να κάνει χώρο στην είσοδο του αίματος, και όχι για να δημιουργήσει αρνητική πίεση.

2.5 Μέτρηση αιματοκρίτη

Προκειμένου να μετρηθεί ο αιματοκρίτης χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδή σωληνάκια μήκους 75mm τα οποία δεν περιείχαν αντιπηκτική ουσία. Η πλήρωση των τριχοειδών σωληναρίων έγινε από τα σωληνάκια που είχε αποθηκευτεί το αίμα μετά την αιμοληψία. Το τριχοειδές σωληνάριο τοποθετήθηκε οριζόντια μέχρι να γεμίσει με αίμα στο 60-70% του μήκους του αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων αέρα και στη συνέχεια σφραγίστηκε με πλαστελίνη έτσι ώστε να αποφευχθεί η διαρροή του αίματος. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο μικροαιματοκρίτη και ακολούθησε φυγοκέντριση για 5'. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρισης έγινε υπολογισμός του αιματοκρίτη για το κάθε δείγμα με την βοήθεια του ειδικού χάρακα υπολογισμού αιματοκρίτη. Η φυγοκέντριση των δειγμάτων έγινε αμέσως μετά την αιμοληψία. Από κάθε δείγμα αίματος πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις αιματοκρίτη.

2.6 Τεχνικές βιοχημικών εξετάσεων

Οι εξετάσεις διενεργούνται σήμερα σε αυτόματους βιοχημικούς αναλυτές, μπορούν όμως και να γίνουν και σε απλά φωτόμετρα. Οι χρωματομετρικές αναλύσεις είναι οι προσδιορισμοί που βασίζονται στην μέτρηση της έντασης του χρώματος που προκαλείται από μία χημική αντίδραση στην οποία συμμετέχει η προς προσδιορισμό ουσία. Η ονομασία «χρωματομετρικές» οφείλεται σε αυτή ακριβώς την δημιουργία χρώματος. Η μεγάλη όμως πλειοψηφία των χρωματομετρικών αναλύσεων χρησιμοποιούν ένζυμα για να επιταχυνθούν οι χημικές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται ενζυμικές.

2.7 Πρωτόκολλο χρώσεων

Οι σύνθετες χρώσεις περιέχουν: μία κύρια χρωστική, σταθεροποιητή, αποχρωματιστική ουσία (αιθανόλη, ακετόνη) και μία χρώση με αντιθέτου χρώματος χρωστική. Στο πείραμα εφαρμόστηκαν δύο χρώσεις, η χρώση May-Grünwald και η χρώση Giemsa.

2.7.1 Χρώση May Grünwald- Giemsa

Χρησιμοποιείται κυρίως για τα επιχρίσματα αίματος και μυελού των οστών καθώς αλλά και για τα στείρα βιολογικά υλικά (πλευριτικό υγρό, περικαρδιακό υγρό, ασκίτικό, υγρό, αρθρικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό) για το χαρακτηρισμού του τύπου των λευκών. Χαρακτηρίζεται ως πανοπτική χρώση, επειδή βάφει όλα τα κυτταρικά συστατικά. Έτσι έχουμε μπλε το RNA, το κυτταρόπλασμα και τους πυρινίσκους, κόκκινα και μωβ το DNA και τα πρωτογενή κοκκία, πορτοκαλί και κόκκινα την αιμογλοβίνη και τα ηωσινοφιλικά κοκκία. (Pages *et al* 1995)



Εικόνα 4 , Εφαρμογή χρώσεων στις αντικειμενοφόρους

2.8 Παρασκευή επιχρισμάτων αίματος

Υλικά:

Επίχρισμα κυττάρων αίματος, δοχεία και στατώ για χρώση, χρωστική May-Grünwald, χρωστική Giemsa, απεσταγμένο νερό

Μέθοδος:

Αρχικά δημιουργούμε δύο διαλύματα αραιώνοντας με απιονισμένο νερό

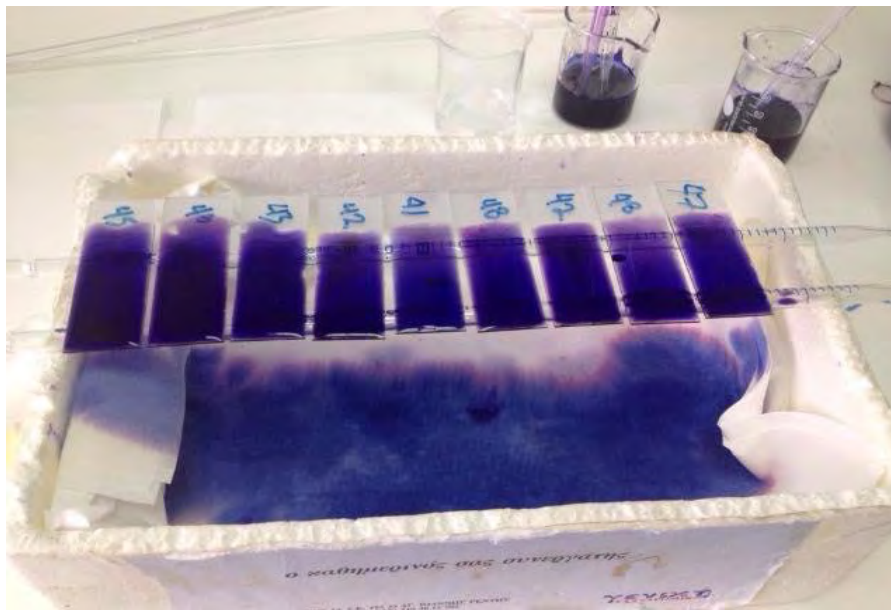
Προετοιμασία διαλύματος May-Grünwald: σε δοχείο χρώσης αραιώνουμε 25ml χρώσης May-Grünwald με 25ml απιονισμένο νερό.

Προετοιμασία διαλύματος Giemsa: σε δοχείο χρώσης με 45ml απιονισμένο νερό αραιώνουμε 5ml χρώση Giemsa (1/9)

Εφαρμογή:

- Τοποθέτηση αντικειμενοφόρων πλακών με το επίχρισμα αίματος σε στατώ αραιά μεταξύ τους
- Κάλυψη του παρασκευάσματος με το διάλυμα της May Grünwald (εφαρμογή με πιπέτα 5ml)
- Παραμονή 5 min σε θερμοκρασία δωματίου

- Κάλυψη του παρασκευάσματος με το διάλυμα της Giemsa χωρίς πρωτίστως να έχει ξεπλυθεί (εφαρμογή με πιπέτα 5ml)
- Παραμονή 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Καλό ξέπλυμα με απιονισμένο νερό βύθιση και ανακίνηση μέσα στο δοχείο νερού
- Στέγνωμα των πλακών στον αέρα σε όρθια τοποθέτηση
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό (100x) κάτω από σταγόνα ελαίου (Dahlin *et al* 2015)



Εικόνα 5: Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, εφαρμογή χρώσεων σε επιχρίσματα

2.9 Πειραματική διαδικασία

Δείγματα αίματος ελήφθησαν από την ουριαία φλέβα χρησιμοποιώντας ηπαρινοποιημένη σύριγγα εφοδιασμένη με βελόνες 23G. Το επεξεργασμένο με ηπαρίνη αίμα φυγοκεντρήθηκε στα 5000g για 10 λεπτά. Ο συνολικός αριθμός ερυθροκυττάρων (RBC) και λευκοκυττάρων (WBC) μετρήθηκε με το χέρι χρησιμοποιώντας αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Ο αιματοκρίτης (HCT) προσδιορίστηκε

από τα τριχοειδή μικρο-αιματοκρίτη χρησιμοποιώντας φυγοκεντρική μικροαιματοκρίτη (600 rpm για 10 λεπτά).

Η διαφοροποιημένη μέτρηση των λευκοκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε επιχρίσματα αίματος βαμμένα με May-Grünwald-Giemsa, μετρώντας 100 κύτταρα. Το πλάσμα υποβλήθηκε σε δειγματοληψία και καταψύχθηκε στους -20°C για τον προσδιορισμό των βιοχημικών παραμέτρων. Τα επίπεδα γλυκόζης, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας εμπορικά κιτ που παρέχονται από την Biosis. Όλα τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση \pm τυπική απόκλιση (S.D.).

Οι μέσες τιμές συγκρίθηκαν μεταξύ θεραπειών χρησιμοποιώντας ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) και οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές σε $p < 0,05$.

2.10 Προσδιορισμός της γλυκόζης στο αίμα/ πρωτόκολλο

Αρχή Μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι η παρουσία του ενζύμου γλυκόζο-οξειδάση (GOD) η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδρασή του με φαινολικό παράγωγο και 4-αμυνοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα. Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος εφαρμόστηκε το εμπορικό κίτ της εταιρείας BIOSIS. Στη μέθοδο η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 510nm.

2.11 Προσδιορισμός της χοληστερόλης στο αίμα /

Πρωτόκολλο

Αρχή Μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι η παρουσία του ενζύμου χοληστερολο-εστεράση (CE) οι εστέρες της χοληστερόλης υδρολύονται προς χοληστερόλη (CH) και η ολική CH με την βοήθεια του ενζύμου χοληστερολο-οξειδάση (CO) οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδρασή του με φαινολικό παράγωγο και αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο δείγμα. Για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος εφαρμόστηκε το εμπορικό κίτ της εταιρείας BIOSIS.

2.12. Προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων στο αίμα/

Πρωτόκολλο

Αρχή Μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι η παρουσία του ενζύμου λιποπρωτεΐνο-λιπάση καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και η παραγόμενη γλυκερόλη με την βοήθεια του ενζύμου γλυκερόλο κινάση (GK) φωσφορυλιώνεται. Η 3-φωσφορική οξειδάση (GPO) οξειδώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή H_2O_2 η αντίδραση του οποίου με φαινολικό παράγωγο και αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο δείγμα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ– ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα συστατικά του πλάσματος και τα αιματολογικά χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Οι μετρήσεις των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) και των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) των ψαριών και άλλων παραμέτρων του αίματος, συμπεριλαμβανομένου του αιματοκρίτη, της γλυκόζης και των τριγλυκεριδίων, δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με το γεύμα πουλερικών.

Τα επίπεδα του πλάσματος της χοληστερόλης μειώθηκαν μετά την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου από πηγές πρωτεϊνών από πουλερικά, ωστόσο δεν αναφέρθηκαν σημαντικές διαφορές στα αιματολογικά αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων ψαριών ($P > 0,05$).

Από την επεξεργασία των δειγμάτων και την ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ο παρακάτω πίνακας στον οποίο περιγράφονται οι αιματολογικές παράμετροι που εκτιμήθηκαν.

Πίνακας 3. Αιματολογικές παράμετροι FM & PM (50%)

	FM	PM (50%)
Ερυθρά αιμοσφαίρια (10^6 ml^{-1})	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2
Λευκά αιμοσφαίρια (10^3 ml^{-1})	3.1 ± 0.7	2.8 ± 1.1
Αιματοκρίτης (%)	26.1 ± 4.1	25.1 ± 3.7
Λεμφοκύτταρα (%)	59.4 ± 1.2	61.8 ± 2.4
Κοκκιοκύτταρα (%)	39.6 ± 1.5	37.4 ± 2.5
Μονοκύτταρα (%)	1.0 ± 0.5	0.8 ± 0.3
Γλυκόζη(mg dl^{-1})	51.21±18.34	48.22±15.55
Χοληστερόλη(mg dl^{-1})	101.91±42.13	79.65±22.82
Τριγλυκερίδια (mg l^{-1})	123.59±50.89	126.34±39.24

Είναι γνωστό ότι οι παράμετροι του αίματος θεωρούνται οι δείκτες καλής υγείας για την αξιολόγηση της φυσιολογικής κατάστασης και της μη ειδικής ανοσολογικής απόκρισης των ψαριών (Zhou et al., 2005, De Pedro et al., 2005). Μέχρι στιγμής, οι βιβλιογραφίες που συζητούν την επίδραση της αντικατάστασης πηγών πρωτεϊνούχων ιχθυαλεύρων από ζωικές πρωτεΐνες στην αιματολογία των ψαριών είναι περιορισμένες.

Οι μελέτες επικεντρώνονται κυρίως στη χρήση φυτικών πρωτεϊνικών πηγών ως εναλλακτικές λύσεις για το ιχθυάλευρο (Sitja-Bobadilla et al., 2005, Hu et al., 2014), ενώ δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για τα γεύματα πουλερικών σε περίπτωση πουλιού. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η πρωτεΐνη των ψαριών μπορεί να αντικατασταθεί με πρωτεΐνη πουλερικών 50% στη διατροφή του ιχθύος, χωρίς δυσμενείς επιδράσεις στο γενικό προφίλ των ψαριών.

Η πειραματική δίαιτα δεν επηρέασε τον αιματοκρίτη, τον αριθμό των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων, τη γλυκόζη και τα τριγλυκερίδια λαμβάνοντας υπόψη την κατάσταση της υγείας των ψαριών ως κανονική. Σύμφωνα με τους Zhou et al (2011) και Hernandez et al. (2014), η αντικατάσταση πρωτεΐνης ψαριών από πηγή πρωτεΐνης πουλερικών, δεν επηρέασε επίσης το αιματολογικό προφίλ στην περίπτωση του *Rachycentron canadum* και του *Lutjanus guttatus*.

Ωστόσο, στην περίπτωση του *Micropterus salmoides*, το επίπεδο του αιματοκρίτη μειώθηκε σε σύγκριση με την εμπορική τροφή ψαριών σε περιπτώσεις αντικατάστασης του πετρελαίου από το πετρέλαιο πουλερικών (Subhadra et al., 2006). Στην παρούσα μελέτη, η αντικατάσταση της πρωτεΐνης ψαριών με πηγή πρωτεΐνης πουλερικών μείωσε τη χοληστερόλη πλάσματος σε σύγκριση με τα ψάρια που τράφηκαν με τη δίαιτα αναφοράς, αλλά όχι σημαντικά.

Στην περίπτωση των πηγών πρωτεΐνης πουλερικών έχει επίσης καταγραφεί μη σημαντική μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στην περίπτωση των κοβίων (Zhou et al., 2011), ενώ αναμένεται υποχοληστερολαιμική επίδραση σε περίπτωση πηγών φυτικής πρωτεΐνης ως εναλλακτικές λύσεις στα ιχθυάλευρα (Lim & Lee 2009, Kaushik et al 1995, Regost et al, 1999, Robaina et al, 1999).

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αιματολογία θεωρείται ως ένα από τα πιο βασικά εργαλεία για την αξιολόγηση της κατάστασης της υγείας διαφόρων ειδών διότι παρέχει μια αξιόπιστη αξιολόγηση χωρίς να χρησιμοποιούνται θανατηφόρα μέσα (Satheeshkumar et al, 2012). Παρά τη σημασία της, εκεί είναι λίγες οι αναφορές σχετικά με την επίδραση της κατάστασης της υγείας των ψαριών με τη χρήση τέτοιων μεθοδολογιών.

Η μελέτη και ανάλυση του αίματος χρησιμεύει ως ένας πολύτιμος δείκτης για την αξιολόγηση της υγείας των υδρόβιων οργανισμών. Όμως πολλές φορές μπορεί να είναι αρκετά δύσκολη λόγω πολλών εσωτερικών και εξωτερικών παραγόντων. Σύμφωνα με τους Fernandes (2003), οι αιματολογικές παράμετροι των ψαριών είναι στενά συνδεδεμένες με περιβαλλοντικούς και βιολογικούς παράγοντες.

Φυσιολογικές αλλαγές μπορεί να είναι συνέπεια του στρες, και για αυτό υφίσταται μια σειρά από αιματολογικούς δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αυτών των όρων. Σύμφωνα με τον Adams et al.(1996), η μέτρηση των παραμέτρων του αίματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την παρακολούθηση της βιολογικής κατάστασης των ψαριών ανάλογα με τις μεταβολές της διατροφής τους, την ποιότητα του νερού στο οποίο βρίσκονται και την ασθένεια την οποία πιθανό να πάσχουν.

Επιπροσθέτως άλλοι παράγοντες όπως η συμπεριφορά, ο τόπος και το κλίμα που μεγαλώνουν μπορεί επίσης να επηρεάσει σημαντικά τις αιματολογικές τιμές. Οι Tavares - Dias & Moraes (2006) ανέφεραν ως κάτι αναγκαίο την δημιουργία αξιόπιστων βάσεων δεδομένων για οικονομικά σημαντικά είδη. Οι Thrall et al (2007), έκρινε ότι η δημιουργία αυτών των βάσεων της αιματολογικής κατάστασης με βάση τα δεδομένα που λαμβάνονται από υγιή ζώα είναι θεμελιώδους σημασίας για το χαρακτηρισμό ενός φυσιολογικού εύρους διακύμανσης.

Ενώ σύμφωνα με τον Leatherland et al .(1998) πριν από τη χρήση αιματολογικών παραμέτρων για την αξιολόγηση της φυσιολογικής κατάστασης των διαφόρων ειδών ψαριών είναι αναγκαίο να θεσπιστεί ένας δείκτη αναφοράς. Η γενική αίματος αποτελεί σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο συμπεριλαμβανομένων των εργαστηριακών πρωτοκόλλων και μία σειρά επιστημονικών πηγών που αφορούν ιατρική και στην κτηνιατρική γενικά των ζώων και των ιχθύων.

Θεωρείται πολύτιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της υγείας των ψαριών, την απλή τυπική εξέταση τους καθώς και για τα κλινικά άρρωστα ψάρια. Με εξαίρεση ορισμένες διαφορές που υφίστανται, τα όργανα κλινικής χημείας που χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη και την κτηνιατρική νοσηλεία χρησιμοποιούνται εύκολα και για δείγματα ψαριών.

Ωστόσο, καθώς συνεχίζεται η έρευνα που μελετά τα αιματολογικά στοιχεία των ιχθύων και αναπτύσσονται οι μέθοδοι για αιματολογικές αναλύσεις για είδη ψαριών, αντιμετωπίζονται προκλήσεις παρόμοιες με αυτές που αντιμετωπίζονται με τις πρώτες εφαρμογές των τεχνικών για τα πουλιά και τα ερπετά.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, S. M., K. D. Ham, M. S. Greeley, R. F. LeHew, D. E. Hinton & C. F. Saylor. (1996). Downstream gradients in bioindicator responses: point source contaminant effects on fish health. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 2177-2187.
- Benedito L. & Ballester-Lozano G (2016) Lasting effects of butyrate and low FM/FO diets on growth performance, blood haematology/biochemistry and molecular growth-related markers in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) *Aquaculture* 454 8–18
- Blaxhall P. C. & Daisley K. W. (1973) Routine haematological methods for use with fish blood, *J. Fish Bid.* 5, 771-781
- Dahlin J. Ding J. (2015) Distinguishing Mast Cell Progenitors from Mature Mast Cells in Mice, Volume 24, Number 14,
- De Pedro N., Guijarro A.I., Lopez-Patino M.A., Martinez-Alvarez R., Delgado M.J. (2005) Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench. *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquaculture Research*, 36, 1185–1196.
- Esteban M. A., Meseguer J. (2015) Blood Cells of the Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.): Light and Electron Microscopic Studies, *The Anatomical Record* 234:161-171
- Fernandes, M. N. & A. F. Mazon. 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. Pp. 203-231. In: Val, A. L. & B. G. Kapoor (Eds.). *Fish adaptations*. Enfield, Sciences Publishers.
- Han Y., Jiang Z., (2015) Effect of dietary fish oil replacement with palm oil on growth performance, hematology and liver anti-oxidative enzymes of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846)
- Hernández C., Sanchez-Gutierrez Y., Hardy R. W, Benitez-Hernández A., Domínguez-Jimenez P., González-Rodríguez B., Osuna-Osuna L., Tortoledo O. (2014) The potential of pet-grade poultry by-product meal to replace fish meal in the diet of the juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) *Aquaculture Nutrition*, 20(6), 623–631
- Hu Y., Yun Huang Y., Feng F., Zhong L., Ai Q., Xiao T. & Wen H. (2014) Effect of soybean meal replacement by

cottonseed meal on growth, feed utilization and some blood physiological/biochemical indices of juvenile black carp, *Mylopharyngodon piceus*. *Aquaculture Research*, 1–11.

Kaushik S.J., Cravedi J.P., Lalles J.P., Sumpter J., Fauconneau B., Laroche M. (1995) Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133, 257 – 274.

Kaya H & Şanver Çelik E (2015) Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone, *Comp Clin Pathol* 24:497–507

Lim S.J. & Lee K.J. (2009) Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture* 290, 283–289.

Rigos G., Samartzis A. (2010) Effects of additive iron on growth, tissue distribution, haematology and immunology of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, *Aquacult Int* 18:1093–1104

Regost C.J., Arzel J., Kaushik S.J., 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 180, 99 – 117.

Robaina L., Corraze G., Aguirre P., Blanc D., Melcion J.P., Kaushik S. (1999) Digestibility, postprandial ammonia excretion and selected plasma metabolites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed pelleted or extruded diets with or without wheat gluten. *Aquaculture*, 179, 45 – 56.

Satheeshkumar, P., G. Ananthan, D. Senthilkumar, A. B. Khan & K. Jeevanantham. 2012. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. *Comparative Clinical Pathology*, 21: 275-281.

Sitja-Bobadilla A., Pena-Llopis S., Gomez-Requeni S., Medale F., Kaushik S., Perez-Sanchez, J. (2005) Effect of fishmeal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387–400.

Subhadra B, Rebecca Lochmann R, Steven Rawles S, Ruguang Chen R 2006 Effect of fish-meal replacement with poultry by-product meal on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed diets containing different lipids *Aquaculture* 260 221–231.

Tavares-Dias, M. & F. R. Moraes. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto, Villimpress Complexo Gráfico. 144p.

Tavares-Dias, M. & F. R. Moraes. 2006. Hematological

parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. *Hidrobiológica*, 16: 271-274

Tzironi E. (2010) Study on the morphology of peripheral blood cells of sea bream (*Sparus aurata*), postgraduate studies program

Yin F. & Sun P. (2015) Immunological, ionic and biochemical responses in blood serum of the marine fish *Trachinotus ovatus* to poly-infection by *Cryptocaryon irritans*, *Experimental Parasitology* 154 113–117

Zhou Q.C., Mai K.-S., Tan B.P., Liu Y.H. (2005) Partial replacement of fishmeal by soybean meal in diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquacult. Nutr.*, 11, 175–182.

Zhou Q.C., Zhao J., Li P., Wang H.L., Wang, L.G. (2011) Evaluation of poultry by-product meal in commercial diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 322, 322–323.