



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΑΕΙΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**ΤΙΤΛΟΣ: Σκελετική δυσμορφία σκολίωσης σε τσιπούρες. Ιστολογική εξέταση
και τεστ μηχανικής αντοχής σπονδύλων.**

ΘΕΟΧΑΡΗ ΧΑΡΙΤΙΝΗ

ΒΟΛΟΣ 2018

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC
ENVIRONMENT

POSTGRADUATE MASTERS THESIS

<<Skeletikal malformation of scoliosis in Sparus aurata fish. Histological examination and mechanical strength test of vertebrae>>

Theochari Charitini

VOLOS 2018

“Σκελετική δυσμορφία σκολίωσης σε τσιπούρες. Ιστολογική εξέταση και τεστ μηχανικής αντοχής σπονδύλων”

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Βερίλλης Παναγιώτης, Επίκουρος καθηγητής, Μικροσκοπία και Ανάλυση Εικόνας στην Ιστολογία και στους Υδρόβιους Οργανισμούς, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ), Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου περιβάλλοντος (ΤΓΙΥΠ), ***Επιβλέπων***.

Βαφείδης Δημήτρης, Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των Θαλάσσιων Βενθικών Ασπονδύλων και άμεση – έμμεση χρησιμότητά τους., Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ), Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος (τΤΓΙΥΠ), ***Μέλος***.

Στέφανος Ζαούτσος, Καθηγητής, Αντοχή Υλικών, Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών Τ.Ε, ΤΕΙ Θεσσαλίας, ***Μέλος***,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, τον Επίκουρο καθηγητή κ. Παναγιώτη Βερίλλη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής αποτελούμενη από τον κ. Στέφανο Ζαούτσο και τον κ. Βαφείδη για την άμεση και πολύτιμη βοήθεια τους. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
1.Εισαγωγή.....	2
1.1 Σκελετικές ανωμαλίες και συχνότητες εμφάνισης των εκτρεφόμενων ιχθύων	3
1.2 Είδη που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σκελετικών δυσμορφιών.....	4
1.3.Παράγοντες που προκαλούν σκελετικές δυσμορφίες στους ιχθύες	4
1.4.Σκελετικές ανωμαλίες, επιπτώσεις και αντιμετώπιση τους	10
1.5.Το εξεταζόμενο είδος.....	13
1.6.Οστίτης ιστός και σκελετική ανατομία της τσιπούρας	15
1.7.Μηχανική προσαρμογή των οστών	17
1.8.Μέτρο ελαστικότητας Young	18
2. Υλικά και Μέθοδοι	21
2.1 Συλλογή και μέτρηση δειγμάτων (μέτρο ελαστικότητας, ιστολογική μελέτη)	21
2.2.Στάδια των τεχνικώνιστολογίας.....	25
2.3. Συλλογή & επεξεργασία ιστολογικού δείγματος	26
2.4. Επεξεργασία του ιστού	26
2.5. Λήψη τομών	28
2.6. Χρώση τομών	29
2.7.Μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης	31
3.Αποτελέσματα.....	32
4.Συζήτηση	40
5.Βιβλιογραφία	50
5.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	50
5.2.Ελληνική βιβλιογραφία.....	71
5.3.Ηλεκτρονική βιβλιογραφία	72
6.ABSTRACT.....	73

Περίληψη

Οι σκελετικές δυσμορφίες στο κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας εμφανίζονται σε μεγάλα ποσοστά στους εκτρεφόμενους ιχθύες προκαλώντας σημαντικά προβλήματα στη διαβίωση τους με αποτέλεσμα οι ιχθύες να απορρίπτονται τόσο από τις ιχθυομονάδες όσο και από τους καταναλωτές. Οι παράγοντες που προκαλούν αυτού του είδους τις ανωμαλίες δεν είναι ακόμη καλά κατανοητές. Στη παρούσα εργασία μελετήθηκαν 20 άτομα τσιπούρας (*Sparus aurata*) από τα οποία 10 εξ αυτών παρουσίασαν την σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης. Μετρήθηκαν τα ολικά μήκη και βάρη των ιχθύων, τα μήκη και οι διάμετροι των σκολιωμένων καθώς και των υγιών σπονδύλων. Εκτιμήθηκε η ελαστικότητα των σπονδύλων η οποία διέφερε μεταξύ των σκολιωμένων και των μη σκελετικά δύσμορφων ιχθύων. Επιπλέον διαφορετικοί σπόνδυλοι από τους προηγούμενους συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν ιστοπαθολογικά.

1.Εισαγωγή

Στην Ευρώπη, η υδατοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει περίπου το 20% της παραγωγής και απασχολεί άμεσα περίπου 85.000 άτομα (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2017). Στην Ευρωπαϊκή ένωση ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας διακρίνεται για τα υψηλά πρότυπα ποιότητας, βιωσιμότητας και προστασίας των καταναλωτών. Το 2015, η ευρωπαϊκή παραγωγή υδατοκαλλιέργειας ανήλθε σε 2.350.278 τόνους. Το 94% αυτού του ποσού παραγωγής αντιπροσωπεύουν ο σολομός, η πέστροφα, η τσιπούρα, το λαβράκι και ο κυπρίνος. Βάσει της Ετήσιας Οικονομικής Έκθεσης του 2016, η συνολική αξία των πωλήσεων από τον τομέα της υδατοκαλλιέργειας της Ευρωπαϊκής ένωσης ανέρχεται σε 4,517 εκατομμύρια € το 2014. Αυτό αντιπροσωπεύει αύξηση κατά 3% στα 4,365 εκατομμύρια ευρώ που αναφέρθηκαν το 2012, στην παραγωγή. Ο Hough 2009, διαπίστωσε ότι η ελάχιστη εκτίμηση της ετήσιας απώλειας που οφείλεται σε παραμορφωμένα ψάρια υπερβαίνει τα 50.000.000 ευρώ ετησίως για την ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια και η μείωση του ποσοστού παραμόρφωσης των ψαριών κατά 50% θα μπορούσε να εξοικονομήσει 25.000.000 ευρώ ετησίως, και να βελτιώσουν τη φήμη της υδατοκαλλιέργειας.

1.1 Σκελετικές ανωμαλίες και συχνότητες εμφάνισης των εκτρεφόμενων ιχθύων

Ως μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις μπορούν να οριστούν οι μη αντιστρέψιμες μορφολογικές αποκλίσεις των ιχθύων από τον «άγριο» φαινότυπο τους. Αν και η ανάπτυξή τους αφορά και τους φυσικούς πληθυσμούς ιχθύων (Dethlefsen et al. 1996, Von Westemhagen and Dethlefsen 1997, Koumoundouros 2008), οι μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις είναι στενά συνδεδεμένες με την εντατική αναπαραγωγή και την εκτροφή ιχθύων και αποτελούν ένα από τα μείζοντα προβλήματα του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας διότι υποβαθμίζουν παράλληλα τόσο την εμπορική αξία των εκτρεφόμενων ιχθύων όσο και την εικόνα του προϊόντος, αυξάνοντας τελικά το κόστος παραγωγής. (Divanach et al. 1997, Koumoundouros et al. 1997a, Koumoundouros et al. 1997b, Koumoundouros et al. 2000b, Loy et al. 2000, Boglione et al. 2001, Koumoundouros et al. 2001b, Gavaia et al. 2002, Koumoundouros et al. 2002a, Beraldo et al. 2003, Cahu et al. 2003a, Sfakianakis et al. 2003, Koumoundouros et al. 2004, Sfakianakis et al. 2004, Abdel et al. 2005, Sfakianakis et al. 2006a, Sfakianakis et al. 2006b, Georgakopoulou et al. 2007a). Οι υδατοκαλλιέργειες της Μεσογείου αντιμετώπισαν σοβαρά προβλήματα μορφο-ανατομικών ανωμαλιών τις δεκαετίες 1970 και 1980, κατά τη διάρκεια των οποίων η ερευνητική δραστηριότητα επικεντρώθηκε κυρίως στην ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος και όχι στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του. Αποτέλεσμα των ανωτέρων ήταν να είναι αδύνατη η διάθεση του προϊόντος σε ποσοστό ως και 90% με συνεπακόλουθο τις μεγάλες οικονομικές απώλειες για τις μονάδες παραγωγής (Divanach et al. 1996).

Αν εξαιρέσουμε τις αποκλίσεις του χρωματισμού (Bolker and Hill 2000, Cejasetal. 2003) και της πλευρικής γραμμής (Carrillo et al. 2001), η πλειονότητα των

μορφοανατομικών παραμορφώσεων αφορά σε δυσπλασίες του σκελετού. Οι δυσπλασίες αυτές παρατηρούνται κυρίως στη σπονδυλική στήλη, στα πτερύγια, στις σιαγόνες και στο βραγχιακό επικάλυμμα, προσβάλλοντας κατά μέσο όρο το 7-20% των εκτρεφόμενων ιχθυδίων (Georgakopoulou et al. 2010).

1.2 Είδη που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σκελετικών δυσμορφιών

Οι σκελετικές ανωμαλίες έχουν εντοπιστεί σε πολλά είδη εκτρεφόμενων ιχθύων. Γενικότερα τα είδη που εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης είναι: ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*) (McKay & Gjerde, 1986), το γριβάδι (*Cyprinus carpio*) (Wunder, 1981), η πέστροφα (*Salmo trutta*) (Poynton, 1987), ιχθύες του γένους *tilapia* L. 1758 (Mair 1992), το κοινό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (Chatain, 1994), το φαγκρί (*Pagrus pagrus*) (Taniguchi et al., 1984), η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Andrades et al., 1996), η συναγρίδα (*Dentex dentex*) (Koumoundouros et al., 2001a), ο σαργός (*Diplodus sargus*) (Sfakianakis et al. 2003), το μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*) (Favaro & Mazzola 2000, Boglione et al. 2003, Sfakianakis et al. 2005) καθώς και πολλά άλλα.

1.3. Παράγοντες που προκαλούν σκελετικές δυσμορφίες στους ιχθύες

Οι γενεσιουργοί παράμετροι των μορφο-ανατομικών ανωμαλιών ποικίλουν. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε γενετικούς και επιγενετικούς.

Οι επιγενετικοί παράγοντες περιλαμβάνουν:

- 1) Τους αβιοτικούς, όπως η ένταση του φωτός, το pH, η συγκέντρωση O₂ και CO₂, η αλατότητα, η θερμοκρασία, η ταχύτητα των ρευμάτων στις δεξαμενές εκτροφής,
- 2) Τους βιοτικούς, όπου ανήκουν οι διατροφικές ανάγκες του κάθε είδους και σταδίου ανάπτυξης, η πυκνότητα των πληθυσμών, οι μολύνσεις από παράσιτα
- 3) Τα διάφορα ξеноβιοτικά-παρασιτοκτόνα, εντομοκτόνα, βιομηχανικά λύματα και βαρέα μέταλλα (Koumoundouros et al. 2001c).

Κάποιες από τις φυσικές παραμέτρους που επηρεάζουν σε μεγάλο ποσοστό τη ζωή των ψαριών είναι η θερμοκρασία, το φως, το pH κ.α.

α) Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί έναν περιβαλλοντικό παράγοντα που επηρεάζει τα ποικιλόθερμα ζώα δια μέσου της αναπνοής, της ανάπτυξης, της αναπαραγωγής και γενικά ολόκληρης της δραστηριότητάς τους. Η θερμοκρασία στην οποία αντέχουν τα ψάρια εξαρτάται από το στάδιο εξέλιξής τους, το διαλυμένο οξυγόνο, τη μόλυνση, την εποχή του χρόνου και τη μέγιστη θερμοκρασία που επιτυγχάνεται στο συγκεκριμένο περιβάλλον και επομένως στον εγκλιματισμό τους. Επίσης, η θερμοκρασία ασκεί μεγάλη επίδραση στην υγεία των ψαριών. Η επίδραση αυτή είναι μεγαλύτερη στα γλυκά παρά στα θαλασσινά νερά. Αυτό οφείλεται τόσο στη στρωμάτωση όσο και στο μεγάλο όγκο των θαλασσινών νερών. Η θερμοκρασία,

ειδικά στα πρώιμα στάδια της ζωής του ψαριού, μπορεί να είναι υπεύθυνη για μορφολογικές δυσμορφίες (Poloetal. 1991) και φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη των ιχθύων (Blaxter 1992, Koumoundourosetal. 2001b) και τη διάκριση του φύλου (Conover&Kynard 1981, Koumoundourosetal. 2002a).

β) pH

Το pH είναι απαραίτητο για την εκτίμηση της ποιότητας του υδάτινου οικοσυστήματος. Τα ψάρια ζουν σε τιμές pH από 5-9,5 ενώ όταν κρατηθούν σε τιμές pH κάτω του 5 αρχίζουν να χάνουν την ικανότητα ελέγχου του νατρίου στο πλάσμα του αίματος και τις συγκεντρώσεις του χλωρίου. Γενικά η τιμή pH εξαρτάται από την ύπαρξη ελεύθερων ιόντων υδρογόνου (Νεοφύτου, 1997). Οι φυσικές παράμετροι που προαναφέρθηκαν σπάνια προκαλούν από μόνοι τους κάποια ανωμαλία στα ψάρια. Παίζουν όμως καθοριστικό ρόλο για την εμφάνιση σκελετικών ανωμαλιών σε συνδυασμό με την έλλειψη βιταμινών. Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις που περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν ανωμαλίες στην ανάπτυξη. Για παράδειγμα, η αύξηση θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε τέτοιες ανωμαλίες όπως και σε θνησιμότητα. Η υψηλή θερμοκρασία στην εκκόλαψη αυγών σολομού (Sweetetal, 1964) μείωσε το ποσοστό εκκόλαψης που ήταν μόλις 23% σε 19°C αντί για 78% σε 13°C. Έτσι, αυξήθηκαν οι σκελετικές ανωμαλίες στο στάδιο της λάρβας. Η καλύτερη περίπτωση όπου δεν υπήρξαν θνησιμότητες και ανωμαλίες παρατηρήθηκε στη χαμηλότερη αλατότητα (25 p.p.t) και θερμοκρασία (12°C) (Lindenetal, 1979).

γ) Παθογόνοι οργανισμοί

Πολλές σκελετικές δυσμορφίες οφείλονται στην ανάπτυξη παρασίτων, όπως στην περίπτωση των μυξοσποριδίων. Μια από αυτές είναι και η μυξοσωμάτωση. Η μυξοσωμάτωση είναι μια από τις πιο σοβαρές εσωτερικές παρασιτώσεις των νεαρών ψαριών από την οικογένεια των σολομοειδών και κυρίως της εκτρεφόμενης πέστροφας. Η παρασίτωση αυτή οφείλεται στο πρωτόζωο *Myxobolus cerebralis* που ανήκει στο φύλο Myxozoa και στο γένος Myxobolus. Είναι ένα τυπικό μυξόζωο, οι σπόροι του οποίου έχουν σφαιρικό σχήμα. Παρασιτεί στο χονδρικό ιστό του κρανίου και της σπονδυλικής στήλης (Φώτης, 1999). Τα ασθενή ψάρια παρουσιάζουν ανησυχία, τινάζονται έξω από το νερό ή εμφανίζουν γρήγορες περιστροφικές κινήσεις γύρω από τον άξονα του σώματός τους. Κατέρχονται μάλιστα στο βυθό και ανεβαίνουν ξανά στην επιφάνεια, έως ότου ακινητοποιηθούν στο βυθό, προς τη μια πλευρά τους, με το κεφάλι χαρακτηριστικά λυγισμένο προς τα πλάγια. Άλλα χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου αυτής είναι ο σκούρος χρωματισμός, οι παραμορφώσεις στη σπονδυλική στήλη, τα ελαττωματικά βραγχιακά επικαλύμματα και η κακή διάπλαση των γνάθων (Φώτης, 1999). Ένα άλλο μυξόζωο, το *Myxobolus cyprini* (Molnar et al., 1898), είναι επίσης συνδεδεμένο με σκελετικές ανωμαλίες σε ψάρια και έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερα σε κυπρινοειδή. Σε άλλα ψάρια συχνή είναι και η παρασίτωση από μετακερκάρια τρηματωδών, όπως το *Aprophallus donicus*, που έχει παρατηρηθεί ότι παρασιτεί σε ουρές ιχθύων.

δ) Βιταμίνες

Οι βιταμίνες ρυθμίζουν τις διάφορες αντιδράσεις του μεταβολισμού ενώ άλλοι μεταβολίτες όπως τα λίπη, οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται σαν πρώτη ύλη αυτών των αντιδράσεων. Μία έλλειψη βιταμίνης σταματάει τις ειδικές

μεταβολικές εργασίες και μπορεί να αλλάξει τη μεταβολική ισορροπία στον οργανισμό. Οι βιταμίνες, η έλλειψη των οποίων είναι σε θέση να προκαλέσει σκελετικές δυσμορφίες στους ιχθύες είναι:

i) Βιταμίνη C

Οι διατροφικοί παράγοντες και ορισμένα θρεπτικά συστατικά διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των σκελετικών ανωμαλιών. Οι δυσμορφίες της κύφωσης, της σκολίωσης και της λόρδωσης συνδέονται άμεσα με τα επίπεδα βιταμίνης C. Σύμφωνα με τους Madsen και Dalsgaard (1999), η εκτρεφόμενη ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) μπορεί να αναπτύξει πιο σοβαρές σκελετικές ανωμαλίες στο κρανίο, στο μεσαίο και στο ουραίο τμήμα της σπονδυλικής στήλης όταν εκτρέφεται με δίαιτα χαμηλής συγκέντρωσης βιταμίνης C. Μια σημαντική χρονική περίοδος, 15 ή 20 εβδομάδες, είναι ο περισσότερος χρόνος που απαιτείται για να εμφανιστούν τα σημάδια της ανεπάρκειας της βιταμίνης C (Sato et al., 1982). Σύμφωνα με μια μελέτη των Lim and Lowell (1978) σχετικά με την αποτελεσματικότητα της βιταμίνης C στην ιχθυοκαλλιέργεια (*Ictalurus punctatus*), αποδείχθηκε ότι οι νευρώσεις περιλάμβαναν νωτιαία κύφωση, σκολίωση και λόρδωση.

ii) Βιταμίνη A

Η διατροφική ανισορροπία βιταμίνης A συνεπάγεται της εμφάνισης σπονδυλικών παραμορφώσεων. Η υπερβολική δόση βιταμίνης A μπορεί να προκαλέσει σπονδυλικές παραμορφώσεις στη σπονδυλική στήλη νεαρών ατόμων τσιπούρας, μέσω της αύξησης της εναπόθεσης ασβεστίου στα οστά, με άμεση συνέπεια τον αυξημένο μηχανικό φόρτο στις ακραίες πλάκες των σπονδύλων (αυτές που

έρχονται σε άμεση επαφή με τους μεσοσπονδύλιους δίσκους) (Fernández et al., 2012). Σύμφωνα με τον Fernández et al (2008), οι προνύμφες τσιπούρας είναι πολύ ευαίσθητες στα χορηγούμενα επίπεδα διατροφής της βιταμίνης Α. Υψηλότερα επίπεδα διατροφικής βιταμίνης Α από αυτά που περιλαμβάνονται σε ένα εμπορικό συσκευάσμα οδήγησαν σε διαφορετικούς τύπους σκελετικών παραμορφώσεων.

iii) Βιταμίνη Κ

Η βιταμίνη Κ ρυθμίζει τον σχηματισμό του οστού μέσω της σύνθεσης οστεοκαλσίνης από τους οστεοβλάστες, η οποία είναι σημαντική για την ανοργανοποίηση και τη δομή των οστών. Σύμφωνα με τον Roy and Lall (2007), η επίδραση της βιταμίνης Κ σε μπακαλιάρους (*Melanogrammus aeglefinus*), αποδείχθηκε ότι είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη οστεοποίηση καθώς και τη μειωμένη οστική μάζα και μπορεί να ενισχύσει τις οστικές παραμορφώσεις. Ο Udagawa (2001) ανέφερε ότι οι ανωμαλίες που εμφανίστηκαν σε κουνουποφάγους ιχθύες (*Fundulus heteroclitus*), όπως η σπονδυλική σύντηξη, η σπονδυλική παραμόρφωση και η παραμόρφωση των σπονδυλικών σειρών, ήταν σημαντικά υψηλότερες σε μια δίαιτα η οποία δε περιείχε βιταμίνη Κ.

1.4.Σκελετικές ανωμαλίες, επιπτώσεις και αντιμετώπιση τους

Η εμφάνιση των σκελετικών δυσπλασιών στους εκτρεφόμενους ιχθύες δημιουργεί ένα τεράστιο οικονομικό πρόβλημα στις ιχθυομονάδες. Οι σκελετικές δυσπλασίες επιδρούν αρνητικά τόσο στην εξωτερική μορφολογία του ψαριού όσο και στην ανάπτυξη και την επιβίωσή των ιχθύων (Bolla & Holmfjord 1988, Wiegand et al. 1989, Polo et al. 1991). Επιπλέον, οι σκελετικά δύσμορφοι ιχθύες τείνουν να χάνουν την εμπορική τους αξία αφού πωλούνται σε χαμηλότερες τιμές (Andrades et al. 1996).

Ωστόσο θετικό γεγονός αποτελεί πως τα τελευταία χρόνια έχει καταγραφεί μια σημαντική πρόοδος στις συνθήκες εκτροφής των ιχθύων, στη διατροφή και στον έλεγχο πιθανών ασθενειών τους επιλύοντας αρκετά από τα μέχρι πρότινος εμφανιζόμενα προβλήματα (Sfakianakis et al. 2006a). Για παράδειγμα, στην περίπτωση εμφάνισης προ αιματικής λόρδωσης εξαιτίας της μη λειτουργικής νηκτικής κύστης, το πρόβλημα κατάφερε να περιοριστεί με τη χρήση μηχανισμών απομάκρυνσης του ελαιώδους φιλμ από την επιφάνεια των δεξαμενών οπότε οι νύμφες ήταν σε θέση να προσλαμβάνουν έγκαιρα την απαραίτητη φυσαλίδα αέρα για την πλήρωση της νηκτικής τους κύστης (Chatain 1989).

Οι σκελετικές παραμορφώσεις αποτελούν τον συχνότερο τύπο μορφο-ανατομικών δυσμορφιών που εμφανίζουν τα εκτρεφόμενα είδη ιχθύων, και για αυτό το λόγο αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας ως προς την διερεύνηση των γενεσιουργών παραγόντων και κατ' επέκταση του περιορισμού τους. Πλήτουν όλες τις ανατομικές περιοχές, από το κεφάλι μέχρι τη σπονδυλική στήλη και τα πτερύγια. Περιλαμβάνουν πολλαπλασιασμό ή απουσία σκελετικών στοιχείων καθώς και αλλαγές στη θέση ή

τον προσανατολισμό ή και το σχήμα των οστών, επιδρώντας άμεσα στη μορφολογία της περιοχής ανάπτυξής τους ή και σε ολόκληρο το σώμα του ιχθύος.

Οι κυριότερες παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης διακρίνονται στη λόρδωση, την κύφωση και τη σκολίωση. Απαντώνται πολύ συχνά στο λαβράκι και στην τσιπούρα. Παρουσιάζονται είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό εμφανίζοντας διαφορετικό βαθμό έντασης (Barahona & Fernades 1982, Boglione et al. 1995, Andrades et al. 1996, Divanach et al. 1997, Koumoundouros et al. 2002b).

Η λόρδωση (L) εμφανίζεται τόσο στην προ-αιματική περιοχή όσο και στην αιματική περιοχή της σπονδυλικής στήλης εξαιτίας διαφορετικών παραγόντων (Chatain 1989,1994, Andrades et al. 1996, Divanach et al. 1997, Sfakianakis et al. 2006a). Τα λόρδα άτομα τείνουν να παρουσιάζουν νωτοκοιλιακή κάμψη της σπονδυλικής στήλης σχήματος V (Barahona & Femades 1982, Andrades et al. 1996). Στην προ-αιματική λόρδωση συνήθως εμπλέκονται 2-3 σπόνδυλοι στο σημείο της φυσικής κάμψης της σπονδυλικής στήλης (Chatain, 1989). Οι σπόνδυλοι στο σημείο σχηματισμού της λόρδωσης έχουν τραπεζοειδές σχήμα και παρουσιάζουν υπερβολική εναπόθεση αλάτων από του συνηθισμένου. Οι αλλαγές αυτές αποτελούν την απόκριση στο αυξημένο μηχανικό φορτίο που δέχονται οι ιχθύες. Η σκελετική ανωμαλία της λόρδωσης θα μπορούσε να περιγράψει ως ο συνδυασμός μιας γενικής παραμόρφωσης της σπονδυλικής στήλης με τον επανασχεδιασμό των σπονδύλων (Kranenbarg et al. 2005).

Όσον αφορά στην κύφωση (K), τα προσβεβλημένα άτομα εμφανίζουν νωτοκοιλιακή κάμψη της σπονδυλικής τους στήλης σχήματος Λ. Η κύφωση παρατηρείται τόσο στην προ-αιματική περιοχή (Boglione et al. 1995, Koumoundouros et al. 2002b), ραχιαία στη νηκτική κύστη και συχνά στους σπονδύλους 5 και 6 (Koumoundouros et

al. 2002b), όσο και στην αιματική περιοχή. Οι Koumoundouros et al. (2002b) διαπίστωσαν πως τα κυφωτικά άτομα εμφανίζουν ληθαργικές συμπεριφορές και πως τα ποσοστά εμφάνισης της παραμόρφωσης σε άτομα μεγαλύτερα των 17mm ολικού μήκους μειώνονται δραματικά εξαιτίας των υψηλών ποσοστών θνησιμότητάς τους.

Η σκολίωση (S) παρουσιάζεται στην πλευρική κάμψη της σπονδυλικής στήλης και εμφανίζεται μόνη της σπάνια στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς.

Οι παραμορφώσεις σκελετικών στοιχείων της σπονδυλικής στήλης αναφέρονται σε:

- 1) Σύντηξη, μικρότερο μέγεθος, παραμόρφωση ή απουσία των κέντρων,
- 2) Συμπίεση, παραμόρφωση, σπάσιμο, απουσία ή σχηματισμό επιπλέον αιματικών και νευρικών αποφύξεων και τόξων
- 3) Βράχυνση, παραμόρφωση, απουσία ή διαχωρισμό των πλευρών (Boglioneetal. 1995, Divanach et al. 1996, Fraser et al. 2004).

Η σοβαρότερη περίπτωση της συγκεκριμένης ομάδας παραμορφώσεων είναι η εκτεταμένη σύμπτυξη σπονδύλων η οποία επιδρά σημαντικά στο σχήμα του σώματος των ατόμων (Divanach et al. 1996).

Κρίνεται σκόπιμο να επισημανθεί ότι η έλλειψη γνώσεων μπορεί να προκαλέσει δυσλειτουργίες σε έναν ιχθυογεννητικό σταθμό. Προκειμένου να αντιμετωπιστεί μια τέτοια κατάσταση, οι παραγωγοί θα πρέπει να στοχεύουν σε συνεχείς γνώσεις που αφορούν όλες τις διατροφικές ανάγκες των εκτρεφόμενων ιχθύων, κατά τη διάρκεια των βιολογικών τους σταδίων, σε συνδυασμό πάντα με τις γνώσεις εκείνες που αφορούν στις περιβαλλοντικές τους απαιτήσεις και γενικότερα στην ηθολογία της

διαβίωσής τους (Παπουτσόγλου, 2008). Ο συνεχής έλεγχος της διαβίωσης των ιχθύων καθώς και η εφαρμογή της βέλτιστης διατροφής, οι εταιρείες παραγωγής ψαριών θα βοηθήσουν σημαντικά τις μονάδες ώστε να μετριάσουν τα ποσοστά εμφάνισης των σκελετικών δυσμορφιών.

1.5. Το εξεταζόμενο είδος

Το σημερινό επιστημονικό όνομα *Sparus aurata* Linnaeus 1758, αναφέρεται στην Ευρωπαϊκή τσιπούρα, με διεθνές κοινό όνομα *European seabream*. Η σημερινή αποδεκτή συστηματική κατάταξη του είδους δίδεται στον Πίνακα 1. (Κασπίρη, 2000).

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του είδους *Sparus aurata*.

ΚΛΑΣΗ	Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)
ΥΠΟΚΛΑΣΗ	Περκόφορμα (Perciforms)
ΤΑΞΗ	Σπαροειδή (Perciformes)
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Σπαροειδή (Sparidae)
ΓΕΝΟΣ	<i>Sparus</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Sparus aurata</i>

Η τσιπούρα απαντάται στις ακτές της Μεσογείου και του Ανατολικού Ατλαντικού ωκεανού, από τα Βρετανικά νησιά ως το Cape Verde (Εικόνα 1). Ζει ως επί το

πλείστον κοντά στις ακτές και σε βάθη που κυμαίνονται από 5-30 μέτρα για τα ιχθύδια και μέχρι 150 μέτρα για τα ενήλικα άτομα. Την άνοιξη εισχωρεί στις εκβολές των ποταμών και στις λιμνοθάλασσες. Είναι κατεξοχήν ευρύθερμο και ευρύαλο είδος, αλλά προτιμά νερά με υψηλή αλατότητα 25-42‰. Το μέγιστο μήκος που μπορεί να φτάσει είναι τα 70 cm και το βάρος τα 5 Kg (Fischer et al, 1987).

Είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος, με την αναστροφή του φύλου να πραγματοποιείται μετά την πρώτη αναπαραγωγική ωρίμανση, στην ηλικία των δύο ετών (D'Ancona, 1941, 1949, 1950, Lissia, 1968, Zohar et al. 1978, Divanach, 1985, ανασκόπηση από Κουμουνδούρο 1993). Στη Μεσόγειο, η αναπαραγωγή της τσιπούρας πραγματοποιείται κατά τους μήνες Οκτώβριο έως Δεκέμβριο όταν οι θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 13 και 19 °C. Είναι μοναχικό ψάρι και μερικές φορές σχηματίζει σμήνη. Η διατροφή της στηρίζεται σε δίθυρα μαλάκια και καρκινοειδή (Fischer et al. 1987).



Εικόνα 1: Γεωγραφική εξάπλωση του είδους Sparusaurata. Η γεωγραφική εξάπλωση υποδηλώνεται με κόκκινα και κίτρινα βέλη στις περιοχές εξάπλωσης. (fishbase.org)

Η τσιπούρα είναι ένα από τα κυρίαρχα είδη της θαλάσσιας Ευρωπαϊκής ιχθυοκαλλιέργειας και ένα από τα δύο πιο σημαντικά της Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας.

1.6.Οστίτης ιστός και σκελετική ανατομία της τσιπούρας

Ο οστίτης ιστός αποτελεί εξειδικευμένο τύπο συνδετικού ιστού, του οποίου η εξωκυττάρια ουσία είναι εφραλατωμένη και έχει εγκλωβίσει τα κύτταρα που την παρήγαγαν.

Ιστολογικά, τα οστά στους ιχθύες είναι παρόμοια με εκείνα των ανώτερων σπονδυλωτών. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, δεν υπάρχουν αιμοποιητικά στοιχεία εντός του οστού (Berillis et al., 2015). Το κολλαγόνο αντιπροσωπεύει το 90% του οργανικού μέρους των οστών (Berillis et al., 2015). Τα οστά των ιχθύων αποτελούνται από άλατα υδροαξιαπατίτη ασβέστιου- φωσφόρου (όπου το 65% του ανόργανουμέρουςείναι η ξηρή μάζας) τα οποία ενσωματώνονται στις χασματικές περιοχές του κολλαγόνου (κυρίως τύπου I).

Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν δύο τύποι οστών στους ιχθύες. Ο κυτταρικός τύπος και ο ακυτταρικός (Berillis et al., 2015). Ο οστίτης ιστός των σπονδυλωτών και των υπόλοιπων ιχθύων, περιλαμβάνει έγκλειστα οστεοκύτταρα, αλλά η συγκέντρωσή τους είναι αναμφισβήτητα χαμηλότερη από εκείνη στα θηλαστικά.

Η εξωτερική επιφάνεια των οστών καλύπτεται από το περίοστεο, το οποίο

παρουσιάζει μια εξωτερική στοιβάδα στην οποία περιέχονται οστεοπρογονικά κύτταρα. Το οστεογόνο στρώμα περιέχει οστεοβλάστες που εκκρίνουν την κολλαγόνο θεμέλια ουσία των ακυτταρικών οστών. Όταν οι οστεοβλάστες περιβληθούν από θεμέλια ουσία, καθίστανται αδρανή κύτταρα και ονομάζονται οστεοκύτταρα. Η απορρόφηση και η αναδιάταξη του οστίτη ιστού επιτελείται από τους οστεοκλάστες (Berillis et al., 2015).

Το αμφίκυκλο κέντρο των σπονδύλων στους περισσότερους τελεόστεους ιχθύες, αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από ακυτταρικό οστό. Το οστό που περιέχει χόνδρινα σκελετικά στοιχεία ή στοιχεία συνδετικού ιστού, ονομάζεται μικτό οστό σχηματίζεται από τη συγχώνευση δερματικών και χόνδρινων οστέινων στοιχείων και μπορεί να περιέχει υαλοειδή χόνδρο, ακυτταρικό οστό και αραιό ή πυκνό συνδετικό ιστό (Berillis, 2015). Υποκατηγορία μικτού οστού αποτελεί το σπογγώδες οστό, το οποίο αποτελείται από πετάλια και περιέχει χώρους που του δίνουν μια σπογγώδη εμφάνιση (Berillis, 2015).

Ο συνολικός αριθμός των σπονδύλων της σπονδυλικής στήλης της τσιπούρας είναι 24. Ο χόνδρος αποτελεί το πρώτο στοιχείο του σκελετού που κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης των σπονδυλωτών διαμορφώνεται και εν συνεχεία μετατρέπεται σε οστίτη ιστό (Faustino & Power, 1998). Συνεπώς, η πρώτη δομή των οστών των προνυμφών των εκτρεφόμενων ιχθύων προσδιορίζεται περίπου στα 1- 4,1 χιλιοστά του μήκους της νωτιαίας χορδής. Η οστεοποίηση συμβαίνει στα 5,7-6 χιλιοστά του προτύπου μήκος όταν και ολοκληρώνεται η χόνδρινη οντογένεση της σπονδυλικής στήλης (Faustino & Power, 1998).

Η οστεοποίηση πραγματοποιείται με ένα διαδοχικό τρόπο και συμπίπτει με την ραχιαία κάμψη στο οπίσθιο άκρο της νωτιαίας χορδής (Faustino & Power, 1998).

Κατά το στάδιο της προνύμφης στην διαδικασία της οντογένεσης σημαντικός είναι ο ρόλος της οστεονεκτίνης, μιας γλυκοπρωτεϊνης η οποία εμπλέκεται στην ανάπτυξη, τον σχηματισμό των οστών καθώς και των ανόργανων ουσιών (Estevao et al., 2005).

Η ανάπτυξη εντοπίζεται σε τρεις περιοχές της σπονδυλικής στήλης της τσιπούρας: 1) στην αυχενική, 2) στην κοιλιακή (μεσαία) και 3) στην ουραία περιοχή (Faustino & Power, 1998). Η σπονδυλική στήλη της τσιπούρας χωρίζεται σε 3 μέρη: στο αυχενικό το οποίο αποτελείται από 4 σπονδύλους, στο κοιλιακό (μεσαίο) που αποτελείται από 12 σπονδύλους και στο ουραίο που αποτελείται από 8 σπονδύλους (Berillis & Panagiotopoulos, 2015).

1.7.Μηχανική προσαρμογή των οστών

Ο Wolff (1892) δημοσίευσε τον «νόμο μετασχηματισμού των οστών» σύμφωνα με τον οποίο ο σκελετός των σπονδυλωτών παρουσιάζει υψηλό βαθμό φαινοτυπικής πλαστικότητας και κάτι τέτοιο τον καθιστά ικανό να προσαρμόζει τη δομή του στο μεταβαλλόμενο μηχανικό φορτίο (Bertram et al., 1997, Kostenuik et al., 1999, Currey, 2003). Ο σκελετός των τελεόστεων ιχθύων μπορεί να εμφανίσει φαινοτυπική πλαστικότητα σε αρκετά μεγάλο βαθμό. Προσαρμόζεται στις μεταβαλλόμενες δυνάμεις που δέχεται από το εξωτερικό του περιβάλλον και ο βαθμός της μορφολογικής πλαστικότητας που εμφανίζουν γενικά οι τελεόστεοι ιχθύες θεωρείται ότι είναι αρκετά υψηλός σε σχέση με άλλες ομάδες οργανισμών (Greenwood, 1965, Meyer, 1987b).

1.8.Μέτρο ελαστικότητας Young

Τα διάφορα υλικά ανάλογα με τη σύστασή τους και την κατεργασία που έχουν υποστεί έχουν διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες. Τα υλικά υφίστανται διάφορες δοκιμασίες και καταγράφονται οι διάφοροι παράμετροι τις μηχανικής τους συμπεριφοράς, ώστε αυτά τα αποτελέσματα να χρησιμοποιηθούν για ποιοτικό έλεγχο, για την επιλογή υλικού για κάποια εφαρμογή καθώς και για την καταγραφή της συμπεριφοράς του υλικού κάτω από διάφορες καταπονήσεις (Young, 1990).

Ελαστικότητα είναι η ιδιότητα που έχει ένα σώμα να επιστρέφει στο αρχικό του μέγεθος και σχήμα όταν οι δυνάμεις που το παραμορφώνουν σταματούν να ασκούνται πάνω του. Για να περιγραφούν οι ελαστικές ιδιότητες γραμμικών αντικειμένων όταν τεντώνονται ή συμπιέζονται (συμπίεση ή θλίψη), χρησιμοποιείται το μέτρο Young (Young, 1990)

Όταν σε ένα σώμα ασκείται μια τάση, το σώμα παραμορφώνεται. Για μικρές τιμές της τάσης και της παραμόρφωσης, συνήθως το ένα μέγεθος είναι ευθέως ανάλογο του άλλου, ο δε συντελεστής αναλογίας ορίζεται ως μέτρο ελαστικότητας.

Το μέτρο ελαστικότητας Young εκφράζει την παραμόρφωση ενός μονοδιάστατου σώματος, πρακτικά ενός σώματος με μεγάλο μήκος και μικρή διατομή, όπως μία μακριά ράβδος. Το μέτρο ελαστικότητας Young ισούται με την τάση που εφαρμόζεται στο σώμα και το παραμορφώνει κατά μήκος προς την μεταβολή του μήκους του, δηλαδή:

$$Y = [F/A_0] / [\Delta L/L_0]$$

Το μέτρο ελαστικότητας του Young αποτελεί ένα βασικό μέγεθος της μηχανικής συμπεριφοράς των υλικών και εξαρτάται μόνο από το υλικό του αντικειμένου.

Συγκεκριμένα εξαρτάται από τις δυνάμεις που ασκούνται μεταξύ των ατόμων του υλικού ώστε να κρατάνε τα άτομα στις θέσεις ισορροπίας τους, Όταν σε ένα σώμα ασκηθούν εξωτερικές δυνάμεις, τα άτομα μετατοπίζονται από τις αρχικές τους θέσεις σε νέες και οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων αυξάνονται. Αυτό προκαλεί την ανάπτυξη εσωτερικών δυνάμεων που αντιτίθενται στις εξωτερικές και τείνουν να επαναφέρουν τα άτομα στις αρχικές θέσεις ισορροπίας (<https://el.wikipedia.org/wiki/Ελαστικότητα>).

Το μέτρο ελαστικότητας του Young) είναι μια ιδιότητα υλικού που περιγράφει την ακαμψία του και συνεπώς είναι μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των στερεών υλικών. Η μηχανική παραμόρφωση προσδίδει ενέργεια σε ένα υλικό. Η ενέργεια αποθηκεύεται ελαστικά ή διαχέεται πλαστικά. Ο τρόπος με τον οποίο ένα υλικό δέχεται αυτή την ενέργεια εμφανίζεται στις καμπύλες τάσης-παραμόρφωσης. Η τάση είναι αυτή που ορίζεται ως η δύναμη ανά μονάδα επιφάνειας και η παραμόρφωση ως επιμήκυνση ή συστολή ανά μονάδα μήκους.

Όταν ένα υλικό παραμορφώνεται ελαστικά, το μέγεθος της παραμόρφωσης εξαρτάται από το μέγεθος του. Η παραμόρφωση για μια συγκεκριμένη τάση είναι πάντα η ίδια και οι δύο σχετίζονται με το νόμο του Hooke (η τάση είναι άμεσα ανάλογη με την παραμόρφωση του υλικού). Η τάση δεν είναι άμεσα μετρήσιμη. Μπορούμε να την υπολογίσουμε από διαφορετικούς τύπους για διαφορετικούς τύπους παραμόρφωσης. Η παραμόρφωση ορίζεται ως η μεταβολή του μήκους που διαιρείται με το μήκος που είχε το υλικό πριν την παραμόρφωση. Γραφικά μπορούμε να ορίσουμε το μέτρο ελαστικότητας του Young ως την κλίση του γραμμικού τμήματος του διαγράμματος τάσης-παραμόρφωσης.

Ένα υλικό με μεγάλο μέτρο Young είναι δύσκαμπτο διότι απαιτείται μεγάλη τάση για να επιτευχθεί δεδομένη ειδική επιμήκυνση. Για μικρές τάσεις έχουμε γραμμική σχέση μεταξύ τάσης και παραμόρφωσης. Η περιοχή αυτή ονομάζεται ελαστική περιοχή και περιορίζεται μέχρι την πλαστική περιοχή. Εάν η τάση αυξηθεί πέραν του ορίου αυτού, ονομάζεται πλαστική περιοχή όπου μετά την άρση της τάσης το σώμα δεν επανέρχεται στις αρχικές του διαστάσεις αλλά υφίσταται μόνιμη παραμόρφωση. Τέλος εάν η τάση ξεπεράσει το όριο θραύσης, τότε το σώμα υφίσταται θραύση (www.ikaros.teipir.gr).

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Συλλογή και μέτρηση δειγμάτων (μέτρο ελαστικότητας, ιστολογική μελέτη)

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν συνολικά 20 ενήλικα άτομα τσιπούρας *Sparus aurata* από την μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας ΑΦΟΙ Δ ΜΑΝΤΕ και ΣΙΑ ΟΕ, στην περιοχή Πελασγία Φθιώτιδας. Οι λάρβες προέρχονται από την ίδια παρτίδα εκκόλαψης. Τα ψάρια εκτράφηκαν σε θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς σε πυκνότητα 8 kg/m³ και η χορηγηθείσα εμπορική τροφή περιείχε 46% ολική πρωτεΐνη και 17% λίπος. Οι φυσικές και χημικές παράμετροι του νερού, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας και του διαλυμένου οξυγόνου, κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας, κυμαίνονταν από 21,5 °C έως 23,7 °C η θερμοκρασία και το διαλυμένο οξυγόνο από 8,1 έως 9,0 mg/l. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ένας φορητός ηλεκτρονικός μετρητής οξυγόνου και θερμοκρασίας. Οι εξεταζόμενοι ιχθύες συλλέχθηκαν από τον ίδιο κλωβό και εν συνεχεία συντηρήθηκαν σε πάγο στους 0⁰ C. Από τα 20 συνολικά άτομα, τα 10 παρουσίαζαν την σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης, ενώ τα υπόλοιπα 10 δε παρουσίαζαν σκελετική δυσμορφία. Αρχικά, μετρήθηκε το ολικό μήκος και το βάρος των μη σκελετικών δύσμορφων ατόμων με μέσο ολικό μήκος 27,39± 3,04 cm και μέσο βάρος 352,64 ± 123,89gr. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα σκελετικά δύσμορφα άτομα με μέσο ολικό μήκος 25,11 ±2,88 cm και μέσο βάρος 336,69 ±83,73gr.

Ο συνολικός αριθμός των σπονδύλων της τσιπούρας είναι 24 και τα μεσοσπονδύλια διαστήματα είναι 23 (n-1 όπου n ο συνολικός αριθμός των σπονδύλων του ψαριού). Οι σπόνδυλοι χωρίζονται σε 3 κύριες κατηγορίες: τους αυχενικούς όπου περιλαμβάνονται οι 4 πρώτοι σπόνδυλοι ξεκινώντας από το τέλος

των βραγχιοκαλυμμάτων, τους ραχιαίους όπου περιλαμβάνονται οι 12 επόμενοι σπόνδυλοι από το τέλος των αυχενικών και τέλος οι ουραίοι στους οποίους περιλαμβάνονται οι 8 τελευταίοι σπόνδυλοι από το τέλος των ραχιαίων έως το ουραίο πτερύγιο.

Από τους ιχθύες οι οποίοι εμφάνισαν σκολίωση πάρθηκαν 3 διαδοχικοί σπόνδυλοι από την ουραία περιοχή όπου και εμφανίστηκε η δυσμορφία της σκολίωσης σε όλα τα σκελετικά δύσμορφα ψάρια και σημάνθηκαν από το 1 έως το 3. Ο σπόνδυλος 2 σημάνθηκε ως ο σπόνδυλος που εμφάνιζε τη μεγαλύτερη «γωνία» της σκολίωσης. Ο σπόνδυλος 1 ήταν ο σπόνδυλος από τα αριστερά του 2 (προς την περιοχή του κεφαλιού) ενώ ο σπόνδυλος 3 ήταν ο σπόνδυλος από τα δεξιά του 2 (προς την περιοχή του ουραίου πτερυγίου). Εν συνεχεία, από τους σπονδύλους με τη μεγαλύτερη γωνία σκολίωσης (σπόνδυλοι 2) λήφθηκαν 2-3 τιμές της διαμέτρου του κάθε σπονδύλου. Επίσης 3 διαδοχικοί σπόνδυλοι από την ουραία περιοχή πάρθηκαν και από τους μη σκελετικά δύσμορφους ιχθύες.

Έπειτα, τόσο οι σπόνδυλοι που δεν παρουσίασαν ενδείξεις σκολίωσης όσο και οι σπόνδυλοι από τους σκελετικά δύσμορφους ιχθύες μεταφέρθηκαν σε μηχανήμα θλίψης (Instron 3382) ώστε να διεξαχθούν δοκιμασίες συμπίεσης για να μπορέσει να προσδιορισθεί η τιμή της ελαστικότητας του κάθε σπονδύλου (μέτρο του Young) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Σπόνδυλος από τσιπούρα με σκολίωση του πειράματός μας, τοποθετημένος στο μηχάνημα θλίψης και έτοιμος για να ξεκινήσει η διαδικασία θλίψης.

Ο ρυθμός θλίψης του μηχανήματος θλίψης ρυθμίστηκε στα 2mm/min. Κάθε σπόνδυλος, σκολιωμένος ή μη, τοποθετήθηκε στο μηχάνημα θλίψης με τη διαδικασία να ξεκινά και να διαρκεί έως ότου ο σπόνδυλος να περάσει από την ελαστική του φάση, δηλαδή μέχρι να μην μπορεί να επανέλθει πλήρως στην αρχική του κατάσταση.

Η διαδικασία θλίψης είχε ως σκοπό να παρθεί η γραφική παράσταση θλίψης και κατά συνέπεια, από την κλίση της γραφικής παράστασης, το μέτρο ελαστικότητας τόσο των σκολιωμένων όσο και των υγιών σπονδύλων του πειράματος.

Για τον υπολογισμό του μέτρου ελαστικότητας (μέτρο Young), αρχικά μετρήθηκαν οι διαμέτροι και τα μήκη του κάθε σπονδύλου πριν αυτοί τοποθετηθούν στο μηχάνημα θλίψης. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα bluehill 2 κατά τη διαδικασία θλίψης ώστε

να ληφθούν οι γραφικές παραστάσεις που απεικονίζουν το ρυθμό θλίψης των σπονδύλων. Στη συνέχεια οι τιμές των δεδομένων της παραμόρφωσης (compressive strain) των σπονδύλων, καθώς και της τάσης (compressive stress) που πάρθηκαν από τις γραφικές παραστάσεις εισάχθηκαν στο πρόγραμμα origin pro8 και αποτέλεσαν τους άξονες των γραφικών παραστάσεων που δημιουργήθηκαν. Στον άξονα x η παραμόρφωση (compressive strain %) και στον y η τάση (compressive stress MPa) των σπονδύλων. Η κλίση των τελικών γραφικών παραστάσεων μας έδωσε το μέτρο ελαστικότητας του Young.

Εν συνεχεία, οι σπόνδυλοι (σπόνδυλοι 3) από την περιοχή προς το ουραίο περύγιο τοποθετήθηκαν σε διάλυμα EDTA + tris για αφαλάτωση για συνολικά 10 ημέρες με συνεχείς αναδεύσεις και αλλαγές των υγρών. Κάθε μέρα το διάλυμα αντικαθιστόταν από διάλυμα ίδιας σύστασης για να επιτευχθεί η αφαλάτωση. Μόλις διαπιστώθηκε ότι οι σπόνδυλοι είχαν μαλακώσει στον επιθυμητό βαθμό, διεξήγαμε όλα τα απαραίτητα στάδια ώστε να μπορέσουν να εξεταστούν ιστοπαθολογικά με τη χρήση μικροσκοπίου (Εικόνα 3).



Εικόνα 3:Μπουκαλάκια με διάλυμα αφαλάτωσης στα οποία τοποθετήθηκαν οι σπόνδυλοι κατά τη διαδικασία αφαλάτωσης. Με C σημάνθηκαν οι σπόνδυλοι από μη σκελετικά δύσμορφα άτομα και με SC οι σπόνδυλοι από τα άτομα με σκολίωση.

2.2.Στάδια των τεχνικών ιστολογίας

Προκειμένου μελετηθούν ιστοπαθολογικά οι σπόνδυλοι των ιχθύων του πειράματός, ακολουθήθηκαν οι παρακάτω διαδικασίες:

- i. Συλλογή και επεξεργασία ιστολογικού δείγματος
 - Συλλογή 20 σπονδύλων, τοποθέτηση και σήμανση του καθενός χωριστά
- ii. Αφαλάτωση των σπονδύλων
 - Τοποθετήθηκαν τόσο οι σκολιωμένοι όσο και οι κανονικοί σπόνδυλοι για αφαλάτωση σε υγρό διάλυμα EDTA με tris, με συνεχείς αλλαγές των υγρών. Η αφαλάτωση διήρκησε 10 ημέρες και οι σπόνδυλοι ήταν έτοιμοι για την περαιτέρω επεξεργασία.
- iii. Επεξεργασία του ιστού (Αφυδάτωση, Διαύγαση, Σκλήνωση)
- iv. Λήψη τομών
- v. Χρώση
- vi. Παρατήρηση

2.3. Συλλογή & επεξεργασία ιστολογικού δείγματος

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε συλλογή, καταγραφή, ταξινόμηση και μακροσκοπική εξέταση του υλικού. Χαράχθηκε η απαιτούμενη τομή ώστε να γίνει σωστή λήψη των σπονδύλων από τις 20 τσιπούρες του πειράματός (10 σκολιωμένες, 10 υγιείς) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Τσιπούρα του πειράματος με εμφανή σκολιωμένη σπονδυλική στήλη στο τμήμα της ουραίας περιοχής.

2.4. Επεξεργασία του ιστού

Προκειμένου να παρθεί μια λεπτή τομή με τη χρήση μικροτόμου, οι ιστοί πρέπει να εγκλεισθούν με μια ουσία που θα δώσει σταθερή συνοχή, απαραίτητη για το κόψιμο. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με την έγκλειση του ιστού σε παραφίνη, αλλά και σε

άλλες ουσίες όπως η ρητίνη.

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε παραφίνη. Στην επεξεργασία του ιστού πριν την σκλήνωση (εμποτισμό) προηγήθηκαν 2 κύριες φάσεις: η αφυδάτωση και η διαύγαση.

Ο υγρός μονιμοποιημένος ιστός δεν μπορεί να επεξεργαστεί κατευθείαν με παραφίνη αν δεν αφαιρεθεί πρώτα το νερό. Αυτό επιτεύχθηκε με διαδοχικά εμβαπτίσματα σε σειρές από μίγματα αιθανόλης με νερό (συνήθως από 70% μέχρι 100%). Στη συνέχεια η αιθανόλη αντικαταστάθηκε από ουσίες με τις οποίες είναι δυνατόν να αναμιχθεί η παραφίνη. Καθώς οι ιστοί εμποτίστηκαν με το διαλυτικό έγιναν διαφανείς και για το λόγο αυτό η συγκεκριμένη φάση καλείται διαύγαση. Το σύνηθες διαλυτικό που χρησιμοποιείται είναι η ξυλόλη (xylene).

Ο ιστός εμποτίστηκε με διαλυτικό και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε λιωμένη παραφίνη (58- 60 °C). Η θερμότητα έχει σαν αποτέλεσμα να εξατμισθεί το διαλυτικό και οι χώροι που αδειάζουν να γεμίσουν με παραφίνη. Αυτή είναι η διεργασία του εμποτισμού ή σκλήνωση. Οι διαποτισμένοι με παραφίνη ιστοί τοποθετήθηκαν σε ειδικές κασέτες έγκλησης.

Η όλη προετοιμασία των δειγμάτων έγινε αυτοματοποιημένα με την χρήση ιστοκινέτας, το πρωτόκολλο της οποίας παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Πρωτόκολλο ιστοκινέτας

ΧΗΜΙΚΑ	ΧΡΟΝΟΣ
Αιθανόλη 70%	1ώρα
Αιθανόλη 80%	1 ώρα
Αιθανόλη 95%	1 ώρα
Αιθανόλη 95%	2 ώρες
Αιθανόλη 100%	1 ώρα
Αιθανόλη 100%	1 ώρα
Αιθανόλη 100%	2 ώρες
Ξυλόλη	2 ώρες
Ξυλόλη	2 ώρες
Παραφίνη	2 ώρες
Παραφίνη	4 ώρες

Στην ιστοκινέτα του εργαστηρίου , το πρόγραμμα που επιλέχθηκε ήταν το Νο 5 και διήρκησε 19 ώρες.

Αφού ο ιστός διαποτίσθηκε πλήρως από το διαλύτη, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε το βήμα της σκίνωσης, όπου ο ιστός τοποθετήθηκε μέσα σε λιωμένη παραφίνη με τη βοήθεια ειδικών μεταλλικών καλουπιών. Εν συνεχεία το μπλοκ παραφίνης αφέθηκε να κρυώσει και να στερεοποιηθεί.

2.5. Λήψη τομών

Τέλος, οι σκληροί κύβοι παραφίνης στους οποίους περιέχονταν οι ιστοί, κόπηκαν με την ατσάλινη λεπίδα του μικροτόμου σε πάχος από 5-6 μm . Πάρθηκαν οι τομές και τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο (40°C) έτσι ώστε να ανοίξουν. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν προσεκτικά με γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι αντικειμενοφόρες

τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα.

2.6. Χρώση τομών

Με λίγες εξαιρέσεις οι περισσότεροι ιστοί είναι άχρωμοι, γεγονός που δυσκολεύει τη μικροσκοπική τους παρατήρηση. Γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για τη χρώση των ιστών, που επιτρέπουν τόσο τη παρατήρηση των επιμέρους συστατικών του ιστού, αλλά και τη διάκριση ανάμεσα τους. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιγμάτων χρωστικών που έχουν τη τάση να χρωματίζουν τα στοιχεία του ιστού περισσότερο ή λιγότερο εκλεκτικά. Οι περισσότερες χρωστικές συμπεριφέρονται σαν βασικές ή όξινες ενώσεις, και έχουν τη τάση να σχηματίζουν άλατα με τις ιονίζουσες ρίζες των ιστών. Από όλες τις χρωστικές, ο συνδυασμός της αιματοξυλίνης και ηωσίνης είναι αυτός που χρησιμοποιείται πιο συχνά.

Προκειμένου οι τομές παραφίνης να παρατηρηθούν μικροσκοπικά ως προς πιθανές αλλοιώσεις στη δομή του οστίτη ιστού, πραγματοποιήθηκε χρώση τους με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Η χρώση αιματοξυλίνης εντοπίζεται πυρηνικά, ενώ η ηωσίνη παράγει κυτταροπλασματική χρώση. Παρακάτω παρατίθεται το πρωτόκολλο της Αιματοξυλίνης –Ηωσίνης (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης.

ΧΗΜΙΚΑ	ΧΡΟΝΟΣ
Ευλόλη	15 λεπτά
Ευλόλη	15 λεπτά
Αλκοόλη 100%	2λεπτά
Αλκοόλη 100%	2 λεπτά
Αλκοόλη 96%	2 λεπτά
Αλκοόλη 80%	1 λεπτό
Αλκοόλη 70%	1λεπτό
Τρεχούμενο νερό βρύσης	2 λεπτά
Αιματοξυλίνη	8 λεπτά
Τρεχούμενο νερό βρύσης	2 λεπτά
Acid alcohol 1%	1-3 εμβαπτίσεις σε νερό βρύσης
Ηωσίνη	3 λεπτά
Νερό βρύσης	30 δευτερόλεπτα
Αλκοόλη 70%	30 δευτερόλεπτα
Αλκοόλη 80%	30 δευτερόλεπτα
Αλκοόλη 96%	30 δευτερόλεπτα x2
Αλκοόλη 100%	2 λεπτά
Αλκοόλη 100%	2 λεπτά
Ευλόλη	2 λεπτά
Ευλόλη	2 λεπτά

Αρχικά, έγινε αποπαραφίνωση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης, ενώ ακολούθησε ενυδάτωση των ιστών σε κατιούσα σειρά αλκοολών. Αυτό ήταν απαραίτητο αφού οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν με μορφή υδατικών διαλυμάτων. Κατόπιν, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης και αφού εκπλύθηκαν σε νερό και οξυνισμένη αλκοόλη, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ηωσίνης. Ακολούθως, οι τομές αφυδατώθηκαν σε ανιούσα αλκοολών και, αφού απομακρύνθηκε και η αλκοόλη με εμβάπτιση σε διάλυμα ξυλόλης, πραγματοποιήθηκε επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες. Τέλος, οι τομές παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά σε μικροσκόπιο (Bresser) με προσαρμοσμένη ψηφιακή κάμερα.

2.7.Μέθοδοι στατιστικής ανάλυσης

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Origin Pro 8. Η στατιστική ανάλυση των μηκών των σπονδύλων για τα τρία ζεύγη δειγμάτων ανά περιοχή ενδιαφέροντος (δηλαδή αυχενική, ραχιαία, ουραία), έγινε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο εξετάστηκε εάν οι παρατηρήσεις του καθενός από τα δείγματα ξεχωριστά ακολουθούν την κανονική κατανομή ή όχι με την χρήση του Kolmogorov-Smirnov test του λειτουργικού προγράμματος και την κατασκευή των αντίστοιχων ιστογραμμάτων των δειγμάτων. Για την εξαγωγή του μέτρου ελαστικότητας του Young πραγματοποιήθηκε το t-test γιατί τα δεδομένα του πειράματος ακολουθούσαν την κανονική κατανομή συνεπώς οι τιμές των δειγμάτων οι οποίες παρουσίαζαν κανονική κατανομή εμφανίζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα.

3.Αποτελέσματα

Πίνακας 4: Ολικό μήκος και βάρος των φυσιολογικών και των σκελετικά δύσμορφων ατόμων. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα.

Οι μέσοι όροι που έχουν το ίδιο εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά ($P>0,05$)

Σκολιωμένα άτομα		Μη σκελετικά δύσμορφα άτομα		
A/A	Ολικό μήκος (cm)	Ολικό βάρος (gr)	Ολικό μήκος (cm)	Ολικό βάρος (gr)
1	22,8	275,52	28,6	402,84
2	29,9	497,42	29,1	395,44
3	24,3	299,02	28,6	446,86
4	27	368,91	28,6	407,61
5	24,2	314,92	30,4	475,94
6	19,2	171	30	433,66
7	26	356,1	23,3	181,29
8	26,9	372,29	24,4	222,28
9	24,3	336,41	29,1	427,36
10	26,5	375,28	21,8	133,15
Μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα	25,11 \pm 0,91 ^a	336,69 \pm 26,48 ^b	27,39 \pm 0,96 ^a	352,64 \pm 39,18 ^b

Οι τιμές των δειγμάτων που ακολουθούν την κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπικό σφάλμα.

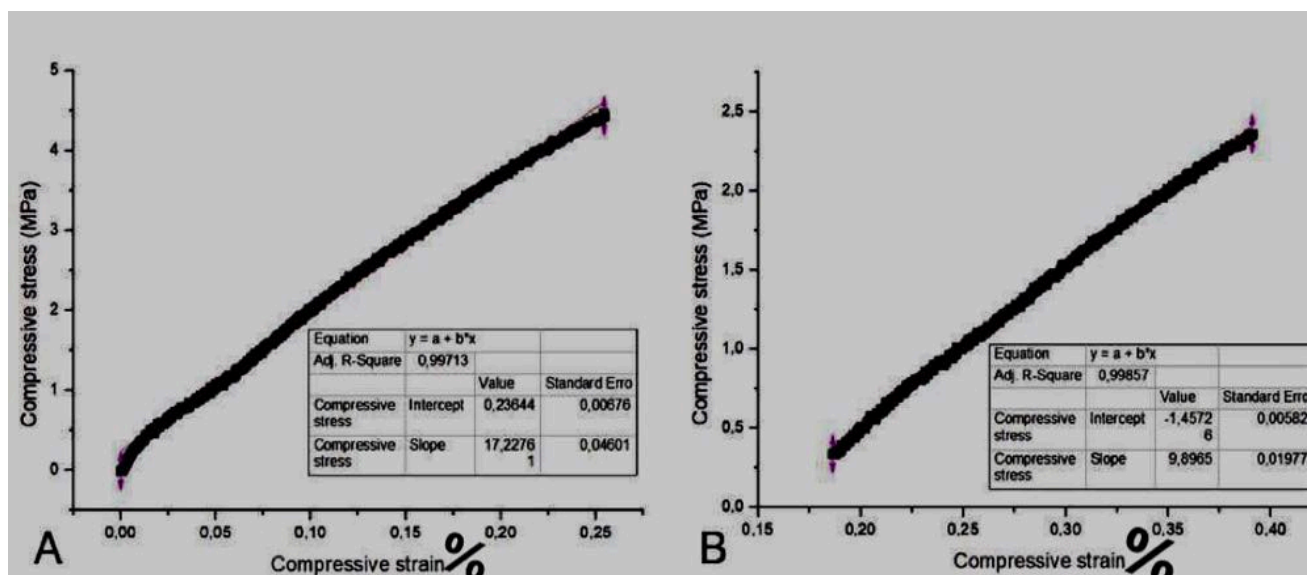
Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα ολικά μήκη και βάρη των σκολιωμένων ιχθύων όσο και των ιχθύων που δεν εμφάνισαν σκελετική παραμόρφωση. Το μέσο ολικό μήκος των σκολιωμένων ιχθύων είναι $25,11 \pm 0,91$ και των μη σκελετικά δύσμορφων ιχθύων είναι $27,39 \pm 0,96$. Το μέσο ολικό βάρος των σκολιωμένων ιχθύων είναι $336,69 \pm 26,48$ και των μη σκελετικά δύσμορφων ιχθύων είναι $352,64 \pm 39,18$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικά σφάλματα διότι τα δεδομένα ακολουθούσαν την κανονική κατανομή και δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Πίνακας 5: Μέτρο ελαστικότητας του Young. Τα μέτρα ελαστικότητας με διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.

Μέτρο ελαστικότητας Young (MPa)	
Τσιπούρες χωρίς εμφανή σκελετική δυσμορφία	$20,79 \pm 2,32^b$ (10)
Σκολιωμένες τσιπούρες	$6,81 \pm 1,52^c$ (10)

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα μέτρα ελαστικότητας Young για τις τσιπούρες που παρουσίασαν τη σκελετική δυσμορφία της σκολίωσης καθώς και για εκείνες που δεν είχαν κάποια εμφανή παραμόρφωση. Το μέτρο ελαστικότητας για τις σκολιωμένες τσιπούρες υπολογίστηκε ότι είναι $6,81 \pm 1,52$ MPa ενώ το μέτρο ελαστικότητας για τις μη σκελετικά δύσμορφες τσιπούρες υπολογίστηκε $20,79 \pm 2,32$ MPa. Τα δύο αυτά μέτρα ελαστικότητας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι σπόνδυλοι των σκολιωμένων ιχθύων ήταν περισσότερο εύκαμπτοι

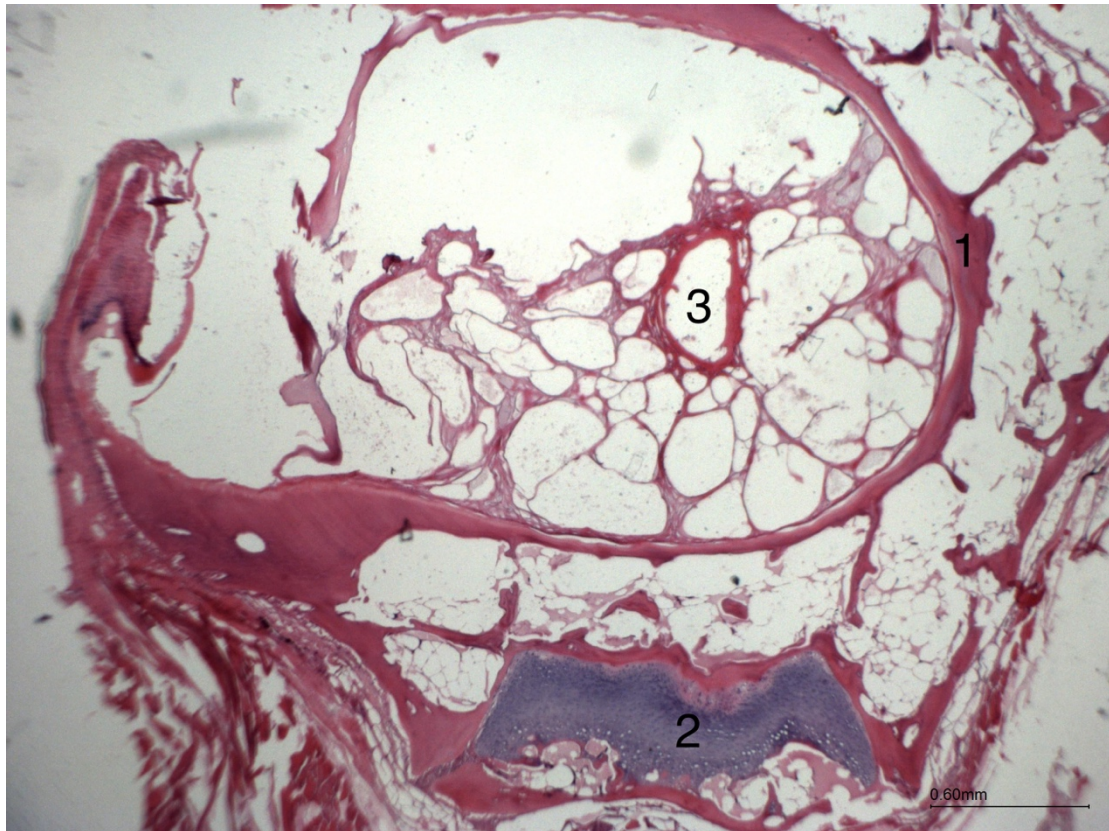
σε σχέση με τις υγιείς τσιπούρες. Παρακάτω παρατίθενται δύο γραφικές παραστάσεις υπολογισμού του μέτρου ελαστικότητας του Young τόσο μη σκελετικά δύσμορφο σπόνδυλο όσο και σε σκολιωμένο σπόνδυλο τσιπούρας. Οι τιμές των μέτρων ελαστικότητας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Εικόνα 5).



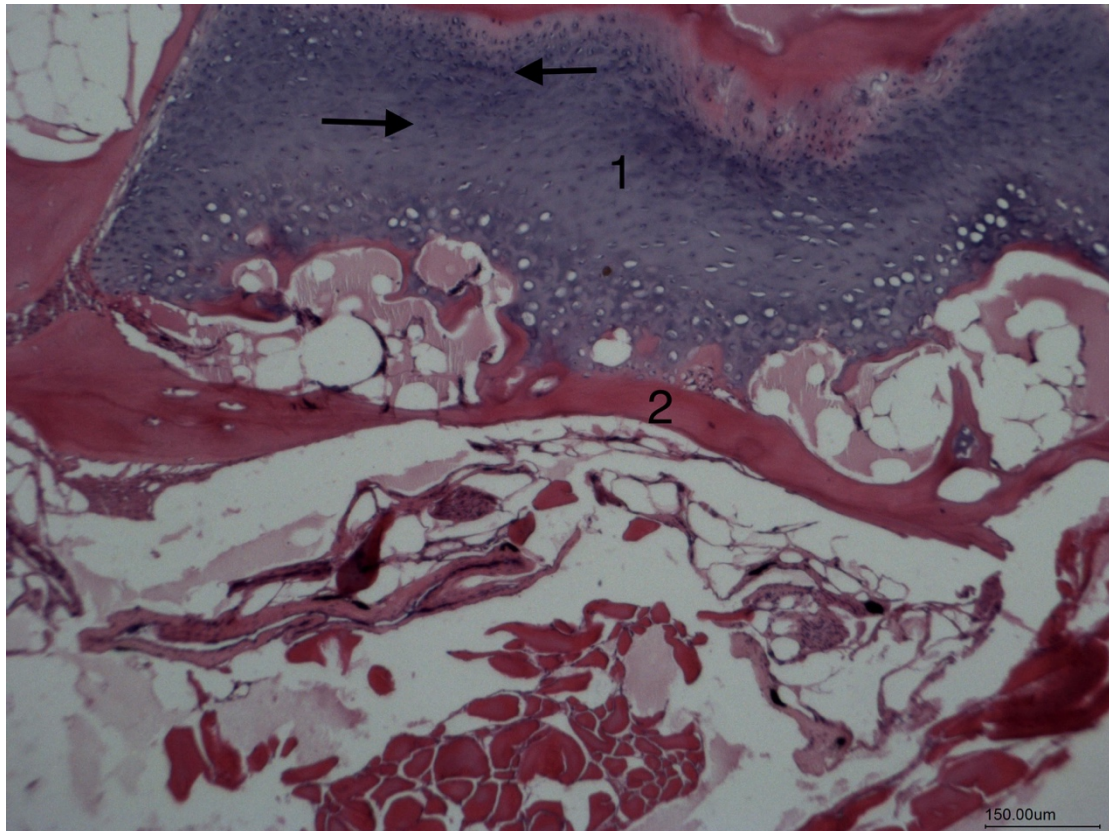
Εικόνα 5: Γραφική παράσταση απεικόνισης υπολογισμού του μέτρου ελαστικότητας ενός υγιούς σπονδύλου τσιπούρας (A) και ενός σκολιωμένου σπονδύλου τσιπούρας του πειράματός μας (B).

Η ιστολογική εξέταση των σπονδύλων δεν κατέδειξε καμία ιστολογική διαφορά ανάμεσα στους σκελετικά δύσμορφους σπονδύλους και στους μη παραμορφωμένους σπονδύλους.

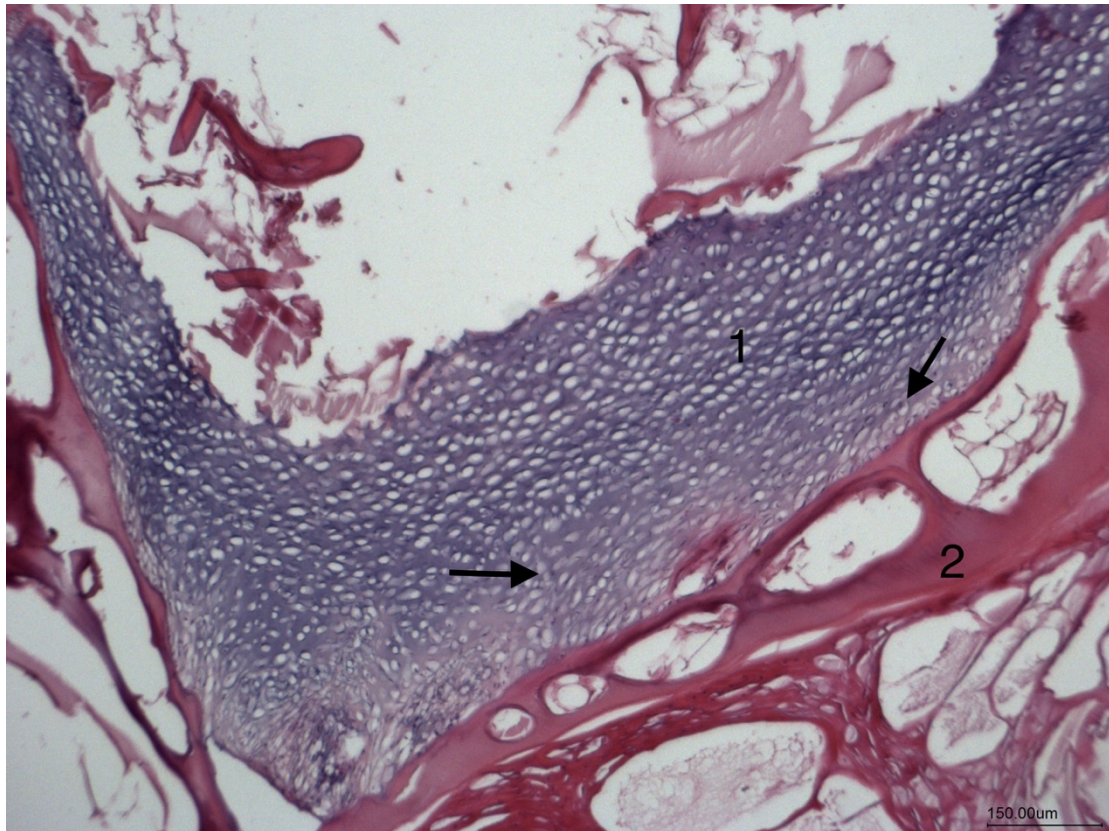
Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά ιστολογικές εικόνες τόσο των σκολιωμένων σπονδύλων όσο και των μη παραμορφωμένων σπονδύλων που εξετάστηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.



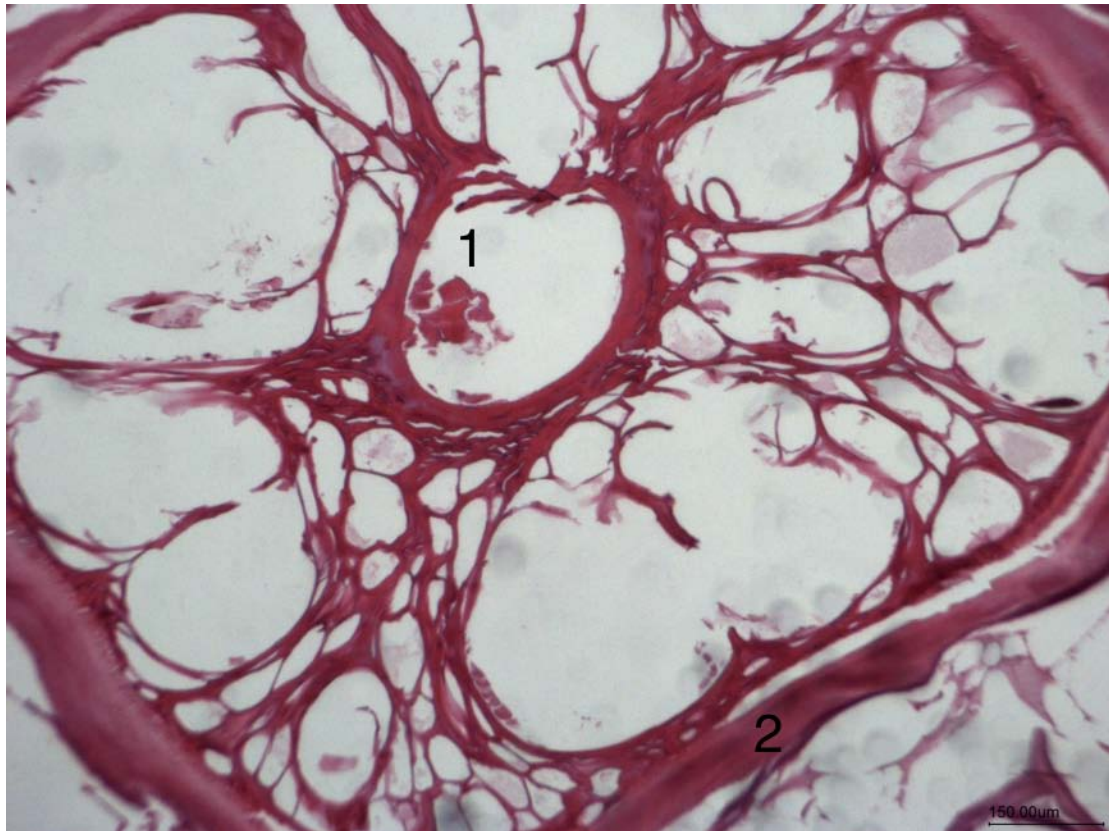
Εικόνα 6: Τομή μη σκελετικά δύσμορφου σπονδύλου *Sparus aurata*. Η περιοχή 1 απαρτίζεται από ακυτταρικό οστό, η περιοχή 2 από χόνδρο και η περιοχή 3 περιέχει τη νωτιαία χορδή. Μέγεθος μπάρας: 0,6mm



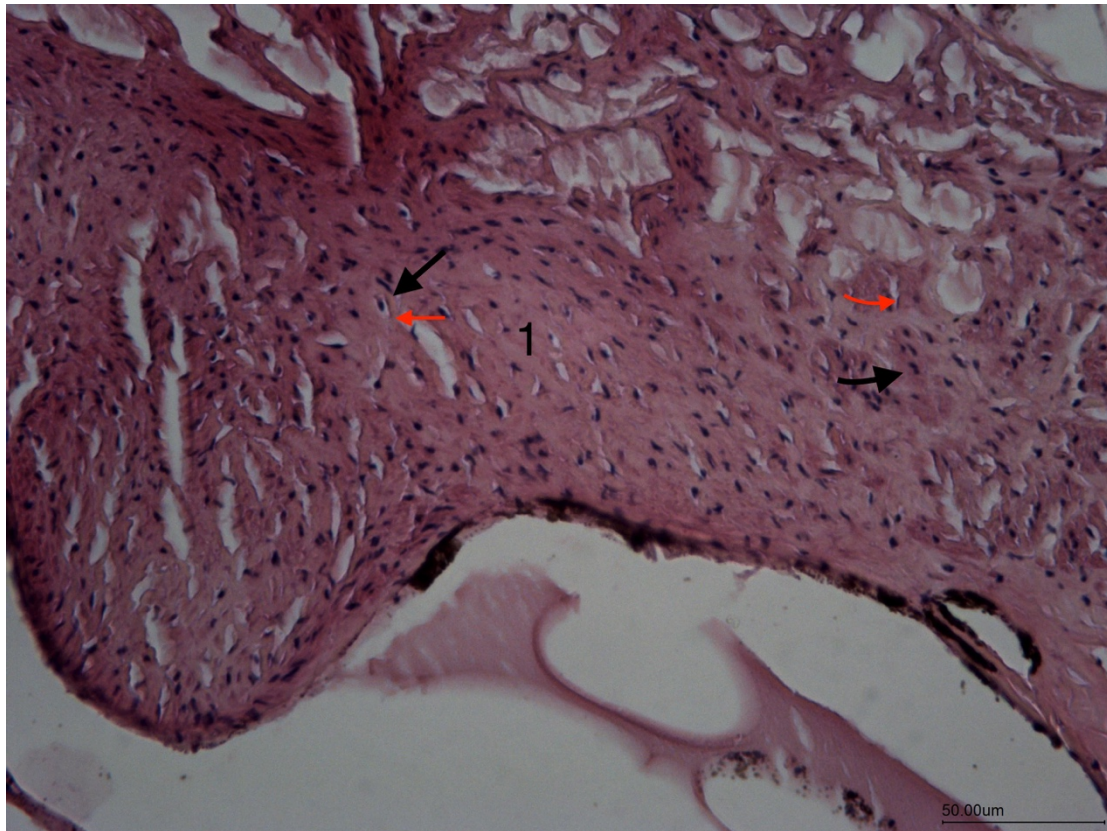
Εικόνα 7: Τομή μη σκελετικά δύσμορφου σπονδύλου *Sparus aurata*. Η περιοχή 1 απαρτίζεται από χόνδρο, η περιοχή 2 από το ακυτταρικό οστό. Διακρίνονται τα χονδροκύτταρα (βέλη). Μέγεθος μπάρας: 150um



Εικόνα 8: Τομή μη σκελετικά δύσμορφου σπονδύλου *Sparus aurata*. Η περιοχή 1
απαρτίζεται από χόνδρο, η περιοχή 2 από το ακυτταρικό οστό που το περιβάλλει. Διακρίνονται
τα χονδροκύτταρα (βέλη). Μέγεθος μπάρας: 150um



Εικόνα 9: Τομή σκολιωμένου σπονδύλου *Sparus aurata*. Διακρίνεται η κεντρική περιοχή του σπονδύλου και στο εσωτερικό της (1) διακρίνεται η νωτιαία χορδή. Η περιοχή 2 απαρτίζεται από ακυτταρικό οστό. Μέγεθος μπάρας: 150 μm



Εικόνα 10: Τομή σκολιωμένου σπονδύλου *Sparus aurata*. Η περιοχή 1 απαρτίζεται το σπογγώδες οστό. Η πορώδης και πεταλιώδης υφή του είναι εμφανής. Διακρίνονται οι πυρήνες (μαύρα βέλη) των χονδροκυττάρων και τα χονδροκύτταρα (κόκκινα βέλη). Μέγεθος μπάρας: 50um

4.Συζήτηση

Η τσιπούρα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα είδη ιχθύων στη Μεσόγειο. Τα εκτρεφόμενα άτομα τσιπούρας παρουσιάζουν σκελετικές δυσμορφίες ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξής τους καθώς και τη μέθοδο εκτροφής τους (Boglione and Costa, 2011). Τα σκελετικά δύσμορφα άτομα είναι αναγκαίο να απομακρύνονται από την αγορά ή να πωλούνται σε αρκετά χαμηλότερες τιμές. Οι καταναλωτές φαίνεται ότι δεν προτιμούν τα σκελετικά δύσμορφα ψάρια απορρίπτοντας τα λόγω της μορφολογίας τους.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων δεν είναι καλά κατανοητή και μπορεί να σχετίζεται με θρεπτικούς, περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες (Fernandez et al., 2008). Τα ταχέως αναπτυσσόμενα ζώα είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν παθολογικές αλλοιώσεις στον σκελετό τους. Για το λόγο αυτό μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου εμφάνισης σκελετικών παραμορφώσεων στους ιχθύες (Halver et al., 1969, Weisbrode and Doige 2001).

Οι Boglione et al. (2013a, b), εξετάζοντας την εμφάνιση σκελετικών δυσπλασιών στις εκτρεφόμενες θαλάσσιες προνύμφες και στους νεαρούς ιχθύες, δεδομένου ότι αποτελούν επί του παρόντος μείζον πρόβλημα στην ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια, που συνεπάγεται οικονομικά, βιολογικά και ηθικά ζητήματα, υπογράμμισαν την ανάγκη βελτίωσης των γνώσεών μας σχετικά με τις βασικές διαδικασίες που ρυθμίζουν τη σκελετογένεση και τον σκελετικό ιστό, για μια αποτελεσματική λύση για την αποφυγή εμφάνισης σκελετικών ανωμαλιών στους εκτρεφόμενους ιχθύς ή ακόμη και για την εξόντωση των προσβεβλημένων ατόμων. Η εμφάνιση των σκελετικών ανωμαλιών δεν μπορεί να κατανοηθεί πλήρως και μπορεί να σχετίζεται

με θρεπτικούς, περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες (Fernández et al., 2008). Στο πείραμά μας, δε μπορούμε να γνωρίζουμε αν η σκολίωση που εμφάνισαν οι ιχθύες προερχόταν από διατροφικούς παράγοντες, διότι τα άτομα που εξετάστηκαν ακολούθησαν μια διατροφή άγνωστης σύστασης προς εμάς.

Η έρευνα της Boglione το 2013 αναφέρει ότι οι πρώτες δημοσιεύσεις σχετικά με τις σκελετικές δυσμορφίες στους εκτρεφόμενους ιχθύες έκαναν την εμφάνισή τους στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Τα είδη που έχουν μελετηθεί και οι μεταγενέστερες δημοσιεύσεις αντικατοπτρίζουν την εξέλιξη της σύγχρονης υδατοκαλλιέργειας. Το πρώτο είδος που αναφέρθηκε ότι παρουσίαζε ανωμαλίες υπό συνθήκες εκτροφής ήταν η πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* (Aulstad & Kittelsen, 1971). Έπειτα αναφέρθηκαν σκελετικές δυσμορφίες στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Paperna et al., 1977), καθώς και στο ευρωπαϊκό λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*) (Barahona, 1978).

Η σχετικά απλή δομή της νοτοχορδής η οποία, κατά τα αρχικά στάδια ζωής των ιχθύων, αντικαθίσταται από την σπονδυλική στήλη είναι πιο εύκαμπτη σε σχέση με τη νοτοχορδή. Η συγκεκριμένη μεταβατική φάση αποτελεί μια εύθραυστη φάση στην οποία τα φορτία στον αξονικό σκελετό αυξάνονται λόγω της ανάπτυξης του ζώου. Σύμφωνα με τον Santamarí et al., 1994, η εντατικά αυξανόμενη κολυμβητική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάπτυξης των ιχθύων τσιπούρας είναι πολύ πιθανό να προκαλέσει υπερφόρτωση της σπονδυλικής στήλης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σκελετικών δυσμορφιών.

Εκτός από την παραμόρφωση της σπονδυλικής στήλης των ιχθύων, ακόμη ένα αποτέλεσμα της αυξημένης μυϊκής δραστηριότητας είναι η ανομοιόμορφη εναπόθεση ασβεστίου στον αξονικό σκελετό (Dacke, 1979). Η αυξημένη συχνότητα της

κολυμβητικής δραστηριότητας του ιχθύος σε συνδυασμό με την αυξημένη κίνηση του ουραίου πτερυγίου, εντείνει πιθανώς αντίστοιχα και την ταχύτητα παραμόρφωσης και καταπόνησης των σπονδύλων.

Συγκεκριμένα, οι Kihara et al., 2002, Kranenbarg et al., 2005, Witten et al., 2005a σε έρευνα τους, διατύπωσαν ότι ο χόνδρος στις εκτρεφόμενες τσιπούρες που είχαν μεγαλύτερη κολυμβητική δραστηριότητα, αναπτύσσεται ετεροτοπικά δηλαδή αναπτύσσεται νέος υγιής χόνδρος ελάχιστα μετατοπισμένος από την κανονική του θέση εξαιτίας του υπερβολικά μεγάλου μηχανικού φορτίου που δέχονται οι ιχθύες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μη κυτταρικό οστό των τελεόστεων ιχθύων ανταποκρίνεται τόσο σε μεταβαλλόμενα σχήματα φόρτωσης όσο και σε μεταβολές στο μηχανικό φορτίο (Meyer, 1987a, b; Huysseune et al., 1994; Hegrenes, 2001; Kranenbarg et al, 2005).

Σύμφωνα με την έρευνα του Berillis (2015), η σπονδυλική στήλη εμφανίζει δυσμορφίες σε σημεία που επηρεάζονται περισσότερο από την πίεση των μυών και ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της ενεργούς κολύμβησης. Στην πραγματικότητα, οι παραμορφώσεις στο σκελετό της τσιπούρας εμφανίζονται κυρίως στην περιοχή της σπονδυλικής στήλης (σπόνδυλοι 14-15), όπου βρίσκεται η διασταύρωση της νεφρικής ουροδόχου κύστης και όπου μειώνονται περισσότερο οι νευρώσεις. Η συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να αποτελέσει μια ζώνη αδυναμίας της τσιπούρας. Εν αντιθέσει με τα προαναφερόμενα, στην παρούσα εργασία η δυσμορφία της σκολίωσης εμφανίστηκε σε σπονδύλους κοντά στο ουραίο τμήμα (18-20) πράγμα που υποδηλώνει την έντονη κολυμβητική δραστηριότητα των σκολιωμένων ιχθύων.

Μελέτες σε εκτρεφόμενα ψάρια δείχνουν ότι η έλλειψη φωσφόρου προκαλεί επαναρρόφηση οστού (Roy et al., 2002, Lall & Lewis, 2007). Το διαθέσιμο φωσφορικό άλας στο γλυκό νερό και το θαλασσινό νερό είναι χαμηλό και για την σωστή ενίσχυση του σκελετού οι ιχθύες πρέπει να βασίζονται στη διατροφική πρόσληψη φωσφόρου (Halstead Tarlo, 1964 ; Simmons, 1971 ; Fenwick, 1974 ; Lall & Bishop, 1977 ; Dacke, 1979 ; Vielma & Lall, 1998a, b; Vielma et al., 1999; Avila et al., 2000; Lall, 2002; Guerreiro et al., 2007). Κατά συνέπεια, η έλλειψη διατροφικών πηγών φωσφόρου μπορεί να προκαλέσει ανεπαρκή ανοργανοποίηση των οστών και μπορεί να προκαλέσει επαναρρόφηση οστού, συμβάλλοντας στην παραμόρφωση του αξονικού και κεφαλικού σκελετού (Roberts, Hardy & Sugiura, 2001; Yamada et al., 2002; Lall, 2002; Roy et al., 2002; Roy & Lall, 2003)..

Η απουσία ή η ανεπαρκής λήψη βιταμίνης C στη διατροφή των ιχθύων, μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό τον μεταβολισμό του κολλαγόνου στα οστά προκαλώντας έτσι σοβαρά προβλήματα λόρδωσης και σκολίωσης (Wilson and Poe, 1973; Agrawal et al., 1978; Lim and Lovell, 1978; Mahajan and Agrawal, 1978). Στα οστά, το κολλαγόνο αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90% της οργανικής οστικής μάζας. Προσδίδει αντίσταση στη δομή και καθιερώνει τις βιο-μηχανικές ιδιότητες του ιστού (Moro et al., 2000). Οι Lim and Lower (1978) έδειξαν ότι η ανεπάρκεια βιταμίνης C στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) οδήγησε σε παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης (κύφωση, σκολίωση, λόρδωση) και σε μείωση της περιεκτικότητας σε κολλαγόνο των οστών. Σύμφωνα με τους Santamaria κ.ά. (1994), η λόρδωση των ατόμων τσιπούρας που δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης τους χαρακτηριζόταν από αποδιοργανωμένο συνδετικό ιστό και μυϊκές δέσμες. Η λόρδωση και η σκολίωση μπορούν επίσης να συσχετιστούν με διαταραχές του μεταβολισμού του κολλαγόνου που προέρχονται από ορισμένα

φυτοφάρμακα, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν έντονες μυϊκές συσπάσεις με αποτέλεσμα να επιδεινώσουν τις σκελετικές παραμορφώσεις (Mehrle et al., 1981).

Το ασβέστιο και ο φώσφορος σχετίζονται με την ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος και η σταθερότητα των σπονδύλων διατηρείται από μια στερεή φάση φωσφορικού ασβεστίου (Tzaphlidou et al., 2005). Τα ψάρια έχουν τη δυνατότητα να προσλαμβάνουν τις απαιτούμενες ποσότητες ασβεστίου και φωσφόρου από το νερό. Η απαίτηση σε ασβέστιο ικανοποιείται από την ικανότητά τους να απορροφούν αυτό το στοιχείο απευθείας από το νερό, ενώ η διατροφή είναι η κύρια πηγή του φωσφόρου (Lall, 2002 · Lewis-McCrea, 2007). Η ανεπάρκεια ασβεστίου δεν είναι συνηθισμένη στα ψάρια, αλλά η ανεπάρκεια φωσφόρου οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη, μειωμένη ανοργανοποίηση των οστών και σκελετικές ανωμαλίες (Lall, 2002).

Οι μηχανικές ιδιότητες των οστών είναι ανάλογες με την ηλικία των ιχθύων, και παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ειδών τους. Τα μέτρα ελαστικότητας που υπολογίσθηκαν σε σπονδύλους της πέστροφας των γλυκών νερών (*Salmo trutta*) (κυτταρικό οστό), του γατόψαρου (*Ictalurus punctatus*) (κυτταρικό οστό) και του γαλαζολιόψαρου (*Lepomis macrochirus*) (ακυτταρικό οστό) έδειξαν τα εξείς αποτελέσματα ανάλογα με την ηλικία του κάθε είδους, 49-68 Mpa, 79-158 Mpa και 59-112 Mpa αντίστοιχα (Pang, 1971, Hamilton et al., 1981, Nishimoto et al., 1992, Kranenbarg et al., 2005). Στον γκρίζο καρχαρία μούστελο (*Mustelus californicus*) ο συντελεστής ελαστικότητας των σπονδύλων ήταν μεταξύ 100-150Mpa (Porter and Long, 2010), ενώ στο σαλάχι του ειρηνικού ωκεανού (*Torpedo californica*) ήταν 25,5Mpa (Porter et al., 2006).

Οι ιχθύες με άκαμπτα σώματα μπορούν να αντισταθούν αποτελεσματικότερα στις δυνάμεις που δέχονται κατά τη διάρκεια της κολύμβησης με αποτέλεσμα να μειώνονται οι πιθανότητες εμφάνισης σκελετικών δυσμορφιών (Porter et al., 2006).

Στην παρούσα εργασία, οι σκολιωμένοι σπόνδυλοι τσιπούρας παρουσίασαν μικρότερο μέτρο ελαστικότητας σε σχέση με τους υγιείς σπονδύλους. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί εάν υποθέσουμε ότι οι σκολιωμένοι σπόνδυλοι έχουν λιγότερα ή μικρότερα ινίδια κολλαγόνου από τους μη σκελετικά δύσμορφους σπονδύλους (Berillis et al., 2015).

Ωστόσο, οι Ortiz-Delgado et al. (2014) διαπίστωσαν ότι οι σκολιωμένοι σπόνδυλοι των ιχθύων του γένους *Sparus aurata* έδειξαν έναν ασυνήθιστο παθολογικό σχηματισμό πλούσιου ινώδη χόνδρου ο οποίος αντικατατέστησε το σπογγώδες οστό καθώς και το ακυτταρικό οστό στις αιματικές ή νευρικές πλευρές. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να αποτελέσει μια άλλη εξήγηση στο γιατί οι σκολιωμένοι σπόνδυλοι των ιχθύων του πειράματός μας παρουσίασαν ένα σημαντικό μικρότερο μέτρο ελαστικότητας σε σχέση με τους υγιείς σπονδύλους. Σύμφωνα με τους Porter and Long (2010), οι χόνδρινοι σκελετοί έχουν μικρότερο μέτρο ελαστικότητας σε σχέση με τους οστέινους σκελετούς όσον αφορά ζώα του ίδιου μεγέθους.

Ο περινωτοχορδικός συνδετικός ιστός ουσιαστικά αποτελεί την εξωκυττάρια ύλη που περιβάλλει τη νωτοχορδή. Αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης, διαφοροποίησης, μετανάστευσης, απόπτωσης (Hynes, 2009), ενώ η δομική ακεραιότητα των περιβαλλόμενων ιστών θεωρείται ότι ελέγχεται από αυτήν (Tsang et al., 2009). Το κυριότερο συστατικό της εξωκυττάριας ύλης είναι το κολλαγόνο (28 τύποι) και είναι πολύ σημαντικά για τη διατήρηση της δομής των ιστών (Pace et al., 2003; Canty & Kadler, 2005). Μεγάλες συγκεντρώσεις

κολλαγόνου μπορούν να βρεθούν ειδικότερα στον περινωτοχοδρικό συνδετικό ιστό όπου παρέχουν ελαστικότητα και στήριξη σε άλλα μόρια της εξωκυττάριας ύλης (όπως σε πρωτεογλυκάνες), ενώ ταυτόχρονα δημιουργούν το υπόστρωμα για την απόθεση ασβεστίου (Christiansen et al. 2009). Οι πρωτεογλυκάνες με την σειρά τους, λόγω της ιδιότητας τους να ενυδατώνονται παρέχουν μηχανική αντοχή σε δυνάμεις συμπίεσης (Fenq et al., 2006). Τα ιστολογικά αποτελέσματα της εργασίας μας, δε κατέδειξαν καμία εμφανή διαφορά ανάμεσα στους σκολιωμένους και τους μη σκελετικά δύσμορφους ιχθύες. Δε μπορούμε όμως να γνωρίζουμε εάν τα επίπεδα κολλαγόνου στους σκελετικά δύσμορφους σπονδύλους διέφεραν σημαντικά σε σχέση με το κολλαγόνο στους μη παραμορφωμένους ιχθύες. Το μέτρο ελαστικότητας της παρούσας εργασίας στις σκολιωμένες τσιπούρες διέφερε σημαντικά από το μέτρο ελαστικότητας των σκελετικά υγιών ιχθύων. Οι σπόνδυλοι των σκελετικά δύσμορφων ιχθύων είχαν μικρότερο μέτρο ελαστικότητας δηλαδή ήταν περισσότερο εύκαμπτοι σε σχέση με τους σπονδύλους χωρίς ενδείξεις παραμόρφωσης. Αυτό μπορεί να ωφείλεται είτε στη διαφορετική σύσταση κολλαγόνου των σπονδύλων των σκελετικά δύσμορφων ατόμων σε σχέση με τα υγιή άτομα είτε στα διαφορετικά ποσοστά ασβεστίου και φωσφόρου από τα οποία αποτελούνται οι σπόνδυλοι και υφίστανται κυρίως με τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη.

Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας των Theochari et al. (2016), οι οποίοι υπολόγισαν τα μέτρα ελαστικότητας καθώς και τα επίπεδα φωσφόρου και ασβεστίου τόσο σε σκολιωμένους σπονδύλους τσιπούρας, όσο και σε υγιείς σπονδύλους δε κατέδειξαν διαφορές στα ποσοστά ασβεστίου και φωσφόρου μεταξύ των σκολιωμένων σπονδύλων και των μη υγιών σπονδύλων, ενώ διαφορά παρουσίασαν οι τιμές των μέτρων ελαστικότητας μεταξύ των σκολιωμένων σπονδύλων και των υγιών σπονδύλων όπως και στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Συγκεκριμένα διαπίστωσαν ότι η δυσμορφία της σκολίωσης στις ενήλικες τσιπούρες δεν φαίνεται να σχετίζεται με διαφορές των επιπέδων ασβεστίου και φωσφόρου στην σπονδυλική στήλη.

Επιπροσθέτως, παραμόρφωση σκολίωσης, όμοιας με αυτή της παρούσας εργασίας, παρατηρήθηκε σε νύμφες τσιπούρας από τους Santamaria et al. (1994) και βρέθηκε να συσχετίζεται με «δυσμορφίες» του κολλαγόνου (τύπου II). Στα φυσιολογικά άτομα η νωτοχορδή παρουσίαζε καθορισμένα πλαίσια και κλιμάκωση της διαμέτρου της προς τα πίσω, ενώ τα ινίδια κολλαγόνου ήταν καλά τακτοποιημένα γύρω από αυτήν. Αντίθετα στα παραμορφωμένα άτομα η νωτοχορδή είχε ακανόνιστη διάμετρο, ο περινωτοχορδικός συνδετικός ιστός δεν ήταν καλά καθορισμένος και τακτοποιημένος, ενώ οι δέσμες μυϊκών ινών παρουσίαζαν παρόμοια αλλοιωμένη διάταξη.

Βάσει των αποτελεσμάτων των Santamaria et al. (1994), τα οποία συμφωνούν και με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, δημιουργούνται δύο αντίθετες υποθέσεις για την αιτία (σε φυσιολογικό επίπεδο) που προκαλεί την συγκεκριμένη παραμόρφωση: (α) η αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου οδηγεί σε αυξημένη μηχανική δράση που έχει ως αποτέλεσμα τη συμπίεση των περιβαλλόμενων ιστών, ή (β) η μειωμένη παραγωγή κολλαγόνου έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της μηχανικής υποστήριξης της νωτοχορδής με επακόλουθο την ανώμαλη κάμψη της.

Η απάντηση σε αυτό το ερώτημα δίνεται από τους Christiansen et al. (2009), οι οποίοι χρησιμοποίησαν στέλεχος *Danio rerio* στο οποίο κατεστάλη η έκφραση δύο γονιδίων (col27a1a και col27a1b) που εμπλέκονται στην παραγωγή του κολλαγόνου (τύπου XXVII). Η καταστολή είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη σκολίωσης από το στάδιο της νωτοχορδής, την επακόλουθη ανώμαλη οστεοποίηση των εμπλεκόμενων

σπονδύλων και την ακανόνιστη συσσώρευση διάφορων πρωτεϊνών στον περινωτοχοδρικό συνδετικό ιστό. Φαίνεται λοιπόν ότι η μειωμένη παραγωγή κολλαγόνου έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της μηχανικής υποστήριξης της νωτοχορδής με επακόλουθο την ανώμαλη κάμψη της που προκαλείται από την κολυμβητική δραστηριότητα.

Ακόμη, ο Chatain (1992) σε έρευνά του, αναφέρει ότι σε περιπτώσεις κάμψης της σπονδυλικής στήλης, οι οστικές δυσμορφίες δεν είναι ίδιες σε όλα τα είδη. Συγκεκριμένα, στο λαβράκι η δυσμορφία την σκολίωσης είναι αντιστρέψιμη και διαπιστώνεται μείωση του ποσοστού αυτού του τύπου των ανωμαλιών μετά τα 3g. Αυτή η θετική εξέλιξη γίνεται με υψηλό ρυθμό μετά το βάρος των 10g και αφορά άτομα, τα οποία παρουσιάζουν γωνία παραμόρφωσης σε σχέση με τον άξονα της σπονδυλικής στήλης μικρότερης από 35° (Chatain, 1992). Οι παραμορφώσεις αυτού του τύπου δεν έχουν επίδραση στην ατομική του αύξηση, ούτε στην εμπορευσιμότητα του τελικού προϊόντος. Αντίθετα αν η παραμόρφωση σχηματίζει γωνία μεγαλύτερη των 35°, η ανωμαλία δεν είναι αναστρέψιμη, είναι ορατή από την εν γένει εμφάνιση του ψαριού και ο ρυθμός αύξησης είναι χαμηλός, επηρεάζοντας αρνητικά την εμπορευσιμότητα των ψαριών (Κλαδάς, 2006).

Αντιθέτως στην τσιπούρα δεν συμβαίνει η ίδια εξέλιξη. Η επαναφορά του σκολιωμένου ψαριού (πλήρης ή μερική) στη φυσιολογική του μορφολογία, σχετίζεται μάλλον με το βαθμό οστεοποίησης του μέχρι τότε χόνδρινου και πολύ εύκαμπτου σκελετού του ψαριού. Ίσως εκεί να βρίσκεται και ο λόγος, για τον οποίο δεν υπάρχει ανάλογη βελτίωση στην περίπτωση της τσιπούρας ο σκελετός της οποίας, λόγω της βιολογίας της, οστεοποιείται πολύ γρήγορα. Μ' αυτόν τον τρόπο τα ποσοστά των δυσμορφιών δεν φαίνεται να διαφοροποιούνται με την αύξηση του μεγέθους, ενώ οι

σκελετικές δυσμορφίες επηρεάζουν σαφώς την ανάπτυξη του ψαριού (Κλαδάς, 2006).

Ο Sander et al., 2005 σε έρευνα του παρατήρησε πως το μέτρο ελαστικότητας λόρδων σπονδύλων λαβρακιού διέφερε σημαντικά από το μέτρο ελαστικότητας σε μη σκελετικά δύσμορφους ιχθύες, έχοντας ως αποτέλεσμα οι λόρδοι σπόνδυλοι να είναι πιο εύκαμπτοι σε σχέση με τους μη σκελετικά παραμορφωμένους σπονδύλους. Ωστόσο παρά τις όποιες διαφορές στα μέτρα ελαστικότητας, καμία ιστολογική διαφορά δε παρατηρήθηκε στους συγκεκριμένους ιχθύες. Οι ιχθύες τις έρευνας του Sander εμφάνισαν την σκελετική δυσμορφία της λόρδωσης στην κοιλιακή περιοχή της σπονδυλικής στήλης.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα με την προαναφερθείσα έρευνα του Sander. Τόσο οι σπόνδυλοι των σκολιωμένων τσιπούρων, όσο και οι υγιείς σπόνδυλοι του πειράματός μας, δε κατέδειξαν καμία ιστολογική διαφορά. Επιπλέον, τα μέτρα ελαστικότητας των σκολιωμένων σπονδύλων διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τους υγιείς σπονδύλους, διαπίστωση που ήταν παρόμοια και στην παραπάνω έρευνα του Sander. Η διαφορά στα μέτρα ελαστικότητας μπορεί να οφείλεται είτε στη διαφορετική σύσταση κολλαγόνου των σπονδύλων των σκελετικά δύσμορφων ατόμων σε σχέση με τα υγιή άτομα είτε στα διαφορετικά ποσοστά ασβεστίου και φωσφόρου από τα οποία αποτελούνται οι σπόνδυλοι και υφίστανται κυρίως με τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη.

Εν κατακλείδι, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω επιστημονική έρευνα για το ποια είναι τα αίτια εμφάνισης των σκελετικών δυσμορφιών στους ιχθύες καθώς επίσης και στους τρόπους αντιμετώπισης τους εάν εκείνοι είναι εφικτοί.

5.Βιβλιογραφία

5.1. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Abdel, I., Abelian, E., Lopez-Albors, O., Valdes, P., Nortes, M. J. & Garcia-Alcazar, A. (2005). Abnormalities in the juvenile stage of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) reared at different temperatures: types, prevalence and affect on growth. *Aquaculture International* 12, 523-538.
- Adams, E., 1978. Invertebrate collagens, marked differences from vertebrate collagens appear in only a few invertebrate groups. *Science* 202, 591–598.
- Afonso J. M., Montero D., Robaina L., Astorga N., Izquierdo M. S. and Gines R. (2000). Association of a lordosis-scoliosis-kyphosis deformity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with family structure. *Journal of Sea Research*, 22: 159-163
- Agrawal, N.K., Juneja, C.J. and Mahajan, C.L., 1978. Protective role of ascorbic acid in fishes exposed to organochlorine pollution. *Toxicology*, 11: 369-375.
- Andrades, J., Beccera, J., Fernandez- Llenrez, P. (1996). Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 141: 1-11.
- Andrades, J.A., Becerra, J., Fernandez-Llebrez, P., 1996. Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 14, 1–11.
- Aulstad D, Kittelsen A (1971) Abnormal body curvatures of rainbow trout *Salmo gairdneri* inbred fry. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 28: 1918–1920.
- Avila, E. M., Tu, H., Basantes, S. & Ferraris, R. P. (2000). Dietary phosphorus regulates intestinal transport and plasma concentrations of phosphate in

rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 170, 201–209.

- Azevedo TP, Witten PE, Huysseune A, Bensimon-Brito A, Winkler C, To TT et al. (2012) Interrelationship and modularity of notochord and somites: a comparative view on zebrafish and chicken vertebral body development. *Journal of Applied Ichthyology* 28: 316–319.
- Baek, G.H., Carlin, G.J., Vogrin, T.M., Woo, S.L., Harner, C.D., 1998. Quantitative analysis of collagen fibrils of human cruciate and menisofemoral ligaments. *Clin. Orthop.* 357, 205–211.
- Baeverfjord, G., Asgard, T., Shearer, K.D., (1998). Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr and post-smolts, *Aquaculture Nutrition*, 4: 1–11.
- Bailey, A., 1968. The nature of collagen. *Compr. Biochem.* 26B, 297–424.
- Barahona-Fernandes MH (1978) L' élevage intensif des larves et des juveniles du bar (*Dicentrarchus labrax* (L)): Données biologiques, zootechniques et pathologiques (Thèse d'état), Université d'Aix Marseille II, Marseille.
- Bengtsson, B.E., (1974). Vertebral damage to minnow *Phoxinus phoxinus* exposed to zinc, *Oikos*, 25: 134-9.
- Bengtsson, B.E., Bengtsson, Å., Himberg, M., (1985). Fish deformities and pollution in some Swedish waters, *Ambio*, 32-35.
- Beraldo, P., Pinosa, M., Tibaldi, E. & Canavese, B. (2003). Abnormalities of the operculum in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Morphological description. *Aquaculture* 220, 89-99.
- Berillis, P., 2004. Effect of Lithium to Collagen of Various Tissues. Use of Electron Microscopy and Image Analysis. University of Ioannina, Ph.D. thesis. Birk, D.E., Fitch, J.M., Babiartz, J.P., Doane, K.J., Linsenmayer, T.F.,

1990. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter.

- Berillis, P. Factors that can lead to the development of skeletal deformities in fishes. A review. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 2015, 9 (3): 17-23.
- Berillis, P., Panagiotopoulos, N., Boursiaki, V., Karapanagiotidis, I.T., Mente, E. Vertebrae length and ultra-structure measurements of collagen fibrils and mineral content in the vertebrae of lordotic gilthead seabreams (*Sparus aurata*). *Micron*, 2015, 75: 27-33.
- Blanc, M. (1953). Contribution à l'étude de l'ostéogénèse chez les poissons téléostéens. Mémoires du Musée national d'Histoire naturelle, Série A7, 1–146.
- Boglione, C., Costa, C., 2011. Skeletal deformities and juvenile quality. In: Pavlidis, M., Mylonas, C. (Eds.), *Sparidae: Biology, Aquaculture of Gilthead Sea Bream, Other Species*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 233–294.
- Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M. & Cataudella, S. (2001). Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture* 192, 1-22.
- Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., Witten, P.E., 2013b. A review on skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. *Rev. Aquac.* 5, 99–120.
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, E., Moren, P., Fontagné, M., Koumoundouros, S.G., 2013a. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Rev. Aquac.* 5, 121–167.
- Boglione, C., Marino, G., Fusari, A., Ferreri, A., Finoia M.G. & Cataudella, S. (1995) Skeletal anomalies in *Dicentrarchus labrax* juveniles selected for

- functional swimbladder. ICES marine Science Symposium 201, 163-169.
- Brodsky, B., Eikenberry, E.F., 1982. Characterization of fibrous forms of collagen. *Methods Enzymol.* 82 (C), 127–174.
 - Bruno D.W. (1990). Miscellaneous external abnormalities of farmed salmonids. *Aquaculture*, 11: 2-5.
 - Bucke, D., Andrews, C., (1985). Vertebral abnormalities in chub, *Leuciscus (Squalius) cephalus* L, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 5(1), 3-5.
 - Burwell, R., Dangerfield, P., (2006). Pathogenesis of progressive adolescent idiopathic scoliosis Platelet activation and vascular biology in immature vertebrae: an alternative molecular hypothesis. *Acta Orthop. Belg* 247-260
 - Cahu, C., Infante, J. Z. & Takeuchi, T. (2003a). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245-258.
 - Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245–258.
 - Chapman, J.A., 1984. Molecular organisation in the collagen fibril. In: Hukins, D.WL. (Ed.), *Connective Tissue Matrix*. Macmillan, London, pp. 89–132.
 - Chatain B., 1994a. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture* 119, 371- 379.
 - Chatain, B. (1986). La vessie natatoire chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus auratus*. Aspects morphologiques du développement. *Aquaculture* 53, 303-311.
 - Chatain, B. (1987). La vessie natatoire chez *Dicentrarchus labrax* et *Sparus auratus*. 2. Influence des anomalies de développement sur la croissance de la larve. *Aquaculture* 65, 175-181.
 - Chatain, B. & Ounais-Guschemann, N. (1990). Improved rate of initial swimbladder inflation in intensively reared *Sparus aurata*. *Aquaculture* 84,

345-353.

- Chatain, B., (1982). Contribution a l'étude de l'élevage larvaire de la dorade japonaise (*Chrysophrys major*), PhD Thesis, Université d'Aix-Marseille II.
- Chatain, B., (1994). Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture*, 119(4), 371-379
- Chatain, B., 1994. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture* 119, 371–379.
- Chatain, B. & Corrao, D. (1992). A sorting method for eliminating fish larvae without functional swimbladders. *Aquaculture* 107, 81-88.
- CIHEAM (Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes) (2008). *Agriculture, Fishery, Food and Sustainable rural*. <http://icesjms.oxfordjournals.org>.
- Cobcroft, J.M., Battaglione, S.C., 2009. Jaw malformation in striped trumpeter *Latris lineata* larvae linked to walling behaviour and tank colour. *Aquaculture* 289, 274–282.
- Dacke, C. G. (1979). *Calcium Regulation in Sub-Mammalian Vertebrates*. Academic Press, London and New York.
- Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Glynatsi, N., Christodouloupoulou, S., Huelvan, C., Desbruyeres, E., Le Gall, M.M., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino- Infante, J.L., 2010. Dietary vitamin D3 affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*. Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 298, 300–307.
- Day, T., McPhail, J.D., 1996. The effect of behavioural and morphological plasticity on foraging efficiency in the three-spine stickleback (*Gasterosteus* sp.). *Oecologia* 108, 380-388.
- Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T., Watanabe, T. and Hosoya, K. (1997).

Hypervitaminosis A during vertebral morphogenesis in larval Japanese flounder. *Journal of Sea Research*, 63: 466-473.

- Dethlefsen, V., Von Westemhagen, H. & Cameron, P. (1996). Malformations in North Sea pelagic fish embryos during the period 1984-1995. *ICES Journal of Marine Science* 53, 1024-1035.
- Divanach, P., Boglione, C., Menu, B., Koumoundouros, G., Kentouri, M., Cataudella, S., 1996. Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions. In: *Handbook of Contributions and Short Communications, International Workshop on Sea Bass and Sea Bream Culture: Problems and Prospects*, organized by European Aquaculture Society (EAS), Verona, Italy, 16–18 October, pp. 45–66.
- Divanach, P., Boglione, C., Menu, B., Koumoundouros, G., Kentouri, M. and Cataudella, S. (1996). Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem causes and solutions in sea bass and sea bream culture: Problems and Prospects. *European Aquaculture Society*, 3: 45-66.
- Divanach, P., Papandroulakis, N., Anastasiadis, P., Koumoundouros, G. & Kentouri, M. (1997). Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture* 156, 145-155.
- Duance, V.C., Crean, J.K., Sims, T.J., Avery, N., Smith, S., Menage, J., Eisestein, S.M., Roberts, S., 1998. Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis. *Spine* 23 (23), 2545–2551.
- FAO, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Cultured Aquatic Species Information Program, *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en (accessed 14.05.14).
- Fenwick, J. C. (1974). The comparative in vitro release of calcium from dried and defatted eel and rat bone fragments and its possible significance to

- calcium homeostasis in teleosts. *Canadian Journal of Zoology* 52, 755–764.
- Fernández, I., Hontoria, F., Ortiz-Delgado, J.B., Kotzamanis, Y., Estévez, A., Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 283, 102–115.
 - Fernandez, I., Ortiz-Delgado, Sarasquete. 2012) Vitamin A effects on vertebral bone tissue homeostasis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. 419–426
 - Fischer, W., M. - L. Bauchot et M. Schneider (redacteurs), 1987. Fishes F.A.O. d'identification des especes pour les besoins de la peche. Mediterranee et mer Noire. Zone de peche 37, Volume II. Vertebres. Publication prepare par la FAO, resultat d'un accord entre la FAO et la Commission des Communautes Europeennes (Projet GCP/INT/422/EEC) financee conjointement par ces deux organization. Rome, FAO, Vol. 2, 1374-1375
 - Fournier, V., Gouillou-Coustans, M.F., Kaushik, S.J., 2000. Hepatic ascorbic acid saturation is the most stringent response criterion for determining the vitamin C requirement of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Nutr.* 130 (3), 617–620.
 - Gallop, P.M., Paz, M.A., 1975. Posttranslational protein modifications, with special attention to collagen and elastin. *Physiol. Rev.* 55 (3), 418–487.
 - Gapasin, R.S.J., Duray, M.N., 2001. Effects of DHA-enriched live food on growth, survival and incidence of opercular deformities in milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture* 193, 49–63.
 - Gavaia, P. J., Dinis, M. T. & Cancela, M. L. (2002). Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and

- juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 211, 305-323.
- Georgakopoulou, E., Angelopoulou, A., Kaspiris, P., Divanach, P. & Koumoundouros, G. (2007a). Temperature effects on cranial deformities in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Applied Ichthyology* 23, 99-103.
 - Georgakopoulou, E., Katharios, P., Divanach, P., Koumoundouros, G., 2010. Effect of temperature on the development of skeletal deformities in gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 308, 13–19.
 - Guerreiro, P. M., Renfro, J. L., Power, D. M. & Canario, A. V. M. (2007). The parathyroid hormone family of peptides: structure, tissue distribution, regulation, and potential functional roles in calcium and phosphate balance in fish. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 292, R679–R696.
 - Haga, Y., Suzuki, T., Kagechika, H., Takeuchi, T., 2003. A retinoic acid receptor- selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 221, 381–392.
 - Halalstead Tarlo, B. H. (1964). The origin of bone. In *Bone and Tooth. Proceedings of the First European Bone and Tooth Symposium* (ed. H. J. J. Blackwood), pp. 3–15. Pergamon Press, Oxford.
 - Halver, J.E., Ashley, L.M., Smith, R.R., 1969. Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. *Trans. Am. Fish Soc.* 98, 762–771.
 - Hamilton, S. J., Mehrle, P. M., Mayer, F. L., & Jones, J. R. (1981). Method to evaluate mechanical properties of bone in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 110(6), 708-717.
 - Harrison, D.E., Harrison, D.D., Janik, T.J., Jones, E.W., Cailliet, R., Normand, M., 2001. Comparison of axial and flexural stresses in lordosis and three

buckled configurations of the cervical spine. *Clinical Biomechanics* 16, 276–284.

- Hegrenes, S. (2001). Diet-induced phenotypic plasticity of feeding morphology in the orangespotted sunfish, *Lepomis humilis*. *Ecology of Freshwater Fish* 10, 35–42.
- Hough, C., 2009. Improving the sustainability of European fish aquaculture by the control of malformations. In: FINEFISH Final Workshop, 5th Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Ghent University, Belgium.
- Huysseune, A. (2000). Skeletal system. In *The laboratory fish*. (ed. G. Ostrander), pp. 307–317. Academic Press, London.
- Huysseune, A. & Verraes, W. (1986). Chondroid bone on the upper pharyngeal jaws and neurocranial base in the adult fish *Astatotilapia elegans*. *American Journal of Anatomy* 177, 527–535.
- Huysseune, A. & Verraes, W. (1990). Carbohydrate histochemistry of mature chondroid bone in *Astatotilapia elegans* (Teleostei: Cichlidae) with a comparison to acellular bone and cartilage. *Annales des Sciences naturelles* 11, 29–43.
- Huysseune, A. & Witten, P. E. (2006). Patterning of development in continuously replacing osteichthyan dentitions. *Journal of Experimental Zoology Part B – Molecular and Developmental Evolution* 306B, 204–215.
- Huysseune, A., Sire, J.-Y. & Meunier, F. J. (1994). Comparative study of lower pharyngeal jaw structure in two phenotypes of *Astatoreochromis alluaudi* (Teleostei: Cichlidae). *Journal of Morphology* 221, 25–43.
- Huysseune, A., Van Der Heyden, C. & Sire, J.-Y. (1998). Early development of the zebrafish (*Danio rerio*) pharyngeal dentition (Teleostei, Cyprinidae).

Anatomy and Embryology 198, 289–305.

- Izquierdo, M.S., Scolamacchia, M., Betancor, M., Roo, J., Caballero, M.J., Terova, G., Witten, P.E., 2013. Effects of dietary DHA and -tocopherol on bone development, early mineralisation and oxidative stress in *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) larvae. *Br. J. Nutr.* 109, 1796–1805.
- Kadler, K.E., Holmes, D.F., Trotter, J.A., Chapman, J.A., 1996. Collagen fibril formation. *Biochem. J.* 316, 1–11.
- Keene, D.R., Oxford, J.T., Morris, N.P., 1995. Ultrastructural localization of collagen types II, IX, and XI in the growth plate of human rib and fetal bovine epiphyseal cartilage: type XI collagen is restricted to thin fibrils. *J. Histochem. Cytochem.* 43, 967–979.
- Keene, D.R., Sakai, L.Y., Burgeson, R.E., 1991. Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 59–69.
- Kihara, M., Ogata, S., Kawano, N., Kubota I. & Yamaguchi, R. (2002) Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture*, 212, 149-158.
- Koumoundouros G., Divanach P. and Kentouri M. (2001b). The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). *Aquaculture* 200, 285-304.
- Koumoundouros G., Divanach P., Anezaki L., & Kentouri M., (2001a). Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology* 139, 817-830.
- Koumoundouros G., Gagliardi F., Divanach P., Boglione C., Cataudella S., & Kentouri M. (1997a). Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture* 149, 215-226.
- Koumoundouros, G. (2008). First record of saddleback syndrome in wild

parrotfish *Sparisoma cretense* (L.,1758) (Perciformes, Scaridae) *Journal of Biology* 72, 1- 5

- Koumoundouros, G., 2010. Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. In: Koumoundouros, G. (Ed.), *Recent Advances in Aquaculture Research*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 125–148.
- Koumoundouros, G., Maingot, E., Divanach, P. & Kentouri, M. (2002a). Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture* 209, 49-58.
- Koumoundouros, G., Oran, G., Divanach, P., Stefanakis, S. & Kentouri, M. (1997b). The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture* 156, 165-177.
- Kranenbarg, S., Van Cleynenbreugel, T., Schipper, H. & Van Leeuwen, J. (2005). Adaptive bone formation in acellular vertebrae of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Experimental Biology* 208, 3493–3502.
- Kranenbarg, S., Van Cleynenbreugel, T., Schipper, H. & Van Leeuwen, J. (2005). Adaptive bone formation in acellular vertebrae of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Experimental Biology* 208, 3493–3502.
- Kranenbarg, S., Van Cleynenbreugel, T., Schipper, H. & Van Leeuwen, J. (2005). Adaptive bone formation in acellular vertebrae of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Experimental Biology* 208, 3493–3502.
- Lall, S. P. (2002). The minerals. In *Fish Nutrition*, 3rd edition. (eds. J. E. Halver and R. W. Hardy), pp. 259–308. Academic Press Inc., San Diego.
- Lall, S. P. & Bishop, F. J. (1977). Studies on mineral and protein utilization by Atlantic salmon grown in sea water. Environment Canada, Fisheries and Marine Service, Technical Report 688, 1–17.

- Lall, S. P. & Lewis-McCrea, L. M. (2007). Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish – An overview. *Aquaculture* 267, 3–19.
- Lall, S.P., 2002. The minerals. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. , 3rd edition. Academic Press Inc., San Diego, pp. 259–308.
- Lim, C. and Lovell, R.T., 1978. Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, 108: 1137-1 146.
- Linden, O., Sharp, J.R., Laughlin, R.B. and Neff, J.M. (1979). The interactive effects of salinity, temperature and chronic exposure to oil on the survival and development rates of embryos of estuarine killifish *Fundulus heteroclitus* Walbaum. *Marine Biology*, 51: 101-109.
- Loizides, M., Georgiou, A.N., Somarakis, S., Witten, P.E., Koumoundouros, G., 2014. A new type of lordosis and vertebral body compression in gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus. 1758): aetiology, anatomy and consequences for survival. *J. Fish Dis.* 37, 949–957.
- Lopez-Albors O., Gil F., Ramirez-Zarzosa G., Latorre R., Garcia-Alcazar A., Abelian E. , Blanco A., Vazquez J.M., & Moreno F., 1995. Early muscle injuries in a standard reared stock of sea bass *Dicentrarchus labrax*, (L.). *Aquaculture* 138, 69-76
- Loy, A., Boglione, C., Gagliardi, F., Ferrucci, L. & Cataudella, S. (2000). Geometric morphometrics and internal anatomy in sea bass shape analysis {*Dicentrarchus labrax* L., Moronidae}. *Aquaculture* 186, 33-44.
- Loy, A., Cataudella S., Corti M. (1996b). Changes in shape during the growth of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Teleostea: Perciformes), in relation to different rearing conditions: an application of the Thin-Plate Splines regression analysis. In: Marcus, L.F, Corti, M., Loy, A., Naylor, G.J.P., Slice, D.E. (Eds.), *Advances in Morphometrics*, NATO ASI series A, N0 284. Plenum Press, New York, pp. 399-406.
- Mahajan, C.L. and Agrawal, N.K., 1978. Role of vitamin C in the first year of

the life of Indian major carp, *Cirrhina mrigdu*(Pisces, Cypriniformes). Proc. All India Symp. Exp. Zool. Jaipur, India, Abstr. 14.

- Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L., Weiner, S., 2008. Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: indications for an amorphous precursor phase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 12748–12753.
- Matsuoka, M. (1987). Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in red sea bream. Bulletin of the Seikai Regional Fisheries Research Laboratory 65, 1- 114.
- Matsusato, T. (1986). Studies on the skeletal anomaly of fishes. Aquaculture, 10: 57- 179.
- Mazurais, D., Glynatsi, N., Darias, M.J., Christodouloupoulou, S., Cahu, C.L., Zambonino- Infante, J.L., Koumoundouros, G., 2009. Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. Aquaculture 294, 262–270.
- McHenry, M. J., Pell, C. A. and Long, J. H. J. (1995). Mechanical control of swimming speed: stiffness and axial wave form in undulating fish models. J. Exp. Biol. 198, 2293-2305.
- Meakin, J.R., Hukins, D.W.L., Aspden, R.M., 1996. Euler buckling as a model for the curvature end flexion of the human lumbar spine. Proceedings of the Royal Society of London B 263, 1383–1387.
- Mehrle, P.M., Mayer, F.L. and Buckler, D.R., 1981. Keptone and Mirex: Effects on bone development and swimbladder composition in fathead minnows. Trans. Am. Fish. Soc., 110: 638- 643.
- Meunier, F. J. (1983). Les tissus osseux des Ostéichthyens. Structure, genèse,

croissance et evolution. Archives et Documents, Micro-Edition, Inst. Ethnol., S.N 82-600. 238, 1–200.

- Meunier, F. J. (2002). Skeleton. In Manual of fish sclerochronology. (eds. J. Panfili, H. de Pontual, H. Troadec and P. J. Wright), pp. 65–88. Ifremer-IRD Coedition, Brest.
- Meunier, F. J. & Huysseune, A. (1992). The concept of bone tissue in Osteichthyes. Netherlands Journal of Zoology 42, 445–458.
- Meyer, A. (1987a). Morphologic measurements from specimens and their X-rays: Test of a method for the study of allometry and phenotypic plasticity in fishes. Netherlands Journal of Zoology 37, 315–321.
- Meyer, A. (1987b). Phenotypic plasticity and heterochrony in *Cichlasoma managuense* (Pisces, Cichlidae) and their implications for speciation in cichlid fishes. Evolution 41, 1357–1369.
- Miller, A., 1976. Molecular packing in collagen fibrils. In: Ramachandran, G.N., Reddi, A.H. (Eds.), Biochemistry of Collagen. Plenum Press, New York, pp. 85–136. Moro, L., Romanello, M., Favia, A., Lamanna, M.P., Lozupone, E., 2000. Posttranslational modifications of bone collagen type I are related to the function of rat femoral regions. Calcif. Tissue Int. 66, 151–156.
- Molnar, K. (1898). The pathogenicity and development within the host fish of *Myxobolus cyprini* Doflein, 549-555
- Moss, M. L. (1961a). Osteogenesis of acellular teleost fish bone. American Journal of Anatomy 108, 99–110.
- Moss, M.L., 1963. The biology of acellular teleost bone. Ann. N.Y. Acad. Sci. 109, 337–350. NRC, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.

National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.

- Nishimoto, S. K., Araki, N., Robinson, F. D., & Waite, J. H. (1992). Discovery of bone gamma-carboxyglutamic acid protein in mineralized scales. The abundance and structure of *Lepomis macrochirus* bone gamma-carboxyglutamic acid protein. *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 11600-11605.
- Nordvik, K., Kryvi, H., Totland, G.K., Grotmol, S., 2005. The salmon vertebral body develops through mineralization of two preformed tissues that are encompassed by two layers of bone. *J. Anat.* 206, 103–114.
- Ortiz-Delgado, J. B., Fernández, I., Sarasquete, C., & Gisbert, E. (2014). Normal and histopathological organization of the opercular bone and vertebrae in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Aquatic Biology*, 21(1), 67-84.
- Ottani, V., Franchi, M., De Pasquale, V., Leonardi, L., Morocutti, M., Ruggeri, A., 1998. Collagen fibril arrangement and size distribution in monkey oral mucosa. *J. Anat.* 192, 321–328.
- Ozawa, M., Suzuki, S., 2002. Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment. *J. Am. Ceram. Soc.* 85, 1315–1317.
- Pang, P. K. (1971). Calcitonin and ultimobranchial glands in fishes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 178(1), 89-99.
- Panjabi, M.M., Cholewicki, J., Nibu, K., Grauer, J., Babat, L.B., Dvorak, J., 1998. Critical load of the human cervical spine: an in vitro experimental study. *Clinical Biomechanics* 13 (1), 11–17.
- Paperna I, Colorini A, Gordin H, Kissil G (1977) Disease of *S. aurata* in

marine culture at Elat. *Aquaculture* 10: 195–213.

- Parry, D.A., Barnes, G.R., Craig, A.S., 1978. A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 203, 305–321.
- Pavlon, D.A. and Moksness, E. (1996). Sensitive stages during embryonic development of wolfish, *Anarhichas lupus* L. determining the final numbers of rays in unpaired fins and skeletal abnormalities. *Journal of Marine Science*, 32: 132-145.
- Porter, M. E., & Long, J. H. (2010). Vertebrae in compression: Mechanical behavior of arches and centra in the gray smooth-hound shark (*Mustelus californicus*). *Journal of morphology*, 271(3), 366-375.
- Porter, M. E., Beltrán, J. L., Koob, T. J., & Summers, A. P. (2006). Material properties and biochemical composition of mineralized vertebral cartilage in seven elasmobranch species (Chondrichthyes). *Journal of Experimental Biology*, 209(15), 2920-2928.
- Prestinicola, L., Boglione, C., Makridis, P., Spano, A., Rimatori, V., Palamara, E., Scardi, M., Cataudella, S., 2013. Environmental conditioning of skeletal anomalies typology and frequency in gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) juveniles. *PLOS ONE* 8 (2), e55736.
- Prockop, D.J., Berg, R.A., Kivirikko, K.I., Vitto, J., 1976. Intracellular steps in the biosynthesis of collagen. In: Ramachandran, G.N., Reddi, A.H. (Eds.), *Biochemistry of Collagen*. Plenum, New York, pp. 163–273.
- Prockop, D.J., Kivirikko, K.I., 1995. Collagen: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 403–434.

- Roberts, R. J., Hardy, R. E. & Sugiura, S. H. (2001). Screamer disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in Chile. *Journal of Fish Diseases* 24, 543–549.
- Roy, P. K. (2003). Phosphorus in Haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). Nutrition and bone metabolism. PhD Thesis, Dalhousie University, Halifax.
- Roy, P. K. & Lall, S. P. (2003). Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture* 221, 451–468.
- Roy, P. K., Witten, P. E., Hall, B. K. & Lall, S. P. (2002). Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralisation of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 35–48.
- Roy, P. K., Witten, P. E., Hall, B. K. & Lall, S. P. (2002). Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralisation of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 35–48.
- Santamaria, J.A., Andrades, J.A., Herra´ez, P., Ferna´ndes-Llebrez, P., Becerra, J., 1994. Perinotochordal connective sheet of gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata* L.) affected by axial malformations: an histochemical and immunocytochemical study. *The Anatomical Record* 240, 248–254.
- Sato, K., Yoshinaka, R., Itoh, Y., Sato, M., 1989. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue of fish. *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.* 92 (1), 87–91.
- Sato, M., Yoshinaka, R., Ikeda, S., 1977. Lathyrinic changes in carp caused by beta- amino-propionitrile. *Bull. Jpn. Sco. Sci. Fish.* 43, 349–355.
- Sfakianakis, D. G., Georgakopoulou, E., Kentouri, M. & Koumoundouros, G.

- (2006a). Geometric quantification of lordosis effects on body shape in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 256, 27-33.
- Sfakianakis, D. G., Georgakopoulou, E., Papadakis, I. E., Divanach, P., Kentouri, M. & Koumoundouros, G. (2006b). Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 254, 54-64.
 - Sfakianakis, D. G., Koumoundouros, G., Anezaki, L., Divanach, P. & Kentouri, M. (2003). Development of a saddleback-like syndrome in reared white seabream *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 217, 673-676.
 - Sfakianakis, D. G., Koumoundouros, G., Divanach, P. & Kentouri, M. (2004). Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture* 232, 407-424.
 - Sfakianakis, D.G., Georgakopoulou, E., Papadakis, I.E., Divanach, P., Kentouri, M., Koumoundouros, G., 2006. Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 254, 54–64.
 - Shin Y.J., Rochet M.J. (1998). A model for the phenotypic plasticity of North sea herring growth in relation to trophic conditions. *Aquat. Living. Resour.* 11, 315- 324.
 - Simmons, D. J. (1971). Calcium and skeletal tissue physiology in teleost fishes. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 76, 244–280.
 - Soliman, A.K., Jauncey, K. and Roberts, R.J. (1986). The effects of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 52:1-10.
 - Stephan, P. (1900). Recherches histologiques sur la structure du tissu osseux des poissons. *Bulletin des Sciences de France et de la Belgique* 33, 281–429
 - Sweet, J.G. and Kinne, O. (1964). The effects of various temperature-salinity

- combinations on the body form of newly hatched Cyprinid *macularis* (Teleostei). *Aquaculture*, 34: 1149-64.
- Takeuchi, T., Dedi, J., Haga, Y., Seikai, T., Watanabe, T., 1998. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 169, 155–165.
 - Tandler, A., Anav, F.A., Choshniak, I., 1995. The effect of salinity on growth rate, survival and swimbladder inflation in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquaculture* 135, 343–353.
 - Theochari, C., Boursiaki, V., Berillis, P., Zaoutsos S.P., Mente E., Vafidis, D., 2016. Stoichiometric analysis and compressive strength of vertebrae from gilthead seabream (*Sparus aurata*) with scoliosis.
 - Trotter, A.J., Battaglione, S.C., Pankhurst, P.M., 2003. Effects of photoperiod and light intensity on initial swim bladder inflation, growth and post-inflation viability in cultured striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae. *Aquaculture* 224, 141–158.
 - Tzaphlidou, M., 2001. Diameter distributions of collagenous tissues in relation to sex. A quantitative ultrastructural study. *Micron* 32, 333–336.
 - Tzaphlidou, M., 2005. The role of collagen in bone structure: an image processing approach. *Micron* 36, 593–601.
 - Tzaphlidou, M., 2008. Bone architecture: collagen structure and calcium/phosphorus maps. *J. Biol. Phys.* 34, 39–49.
 - Tzaphlidou, M., Berillis, P., 2002. Structural alterations caused by lithium in skin and liver collagen using an image processing method. *J. Trace Microprobe Tech.* 20, 493–504.
 - Tzaphlidou, M., Berillis, P., Matthopoulos, D., 2005. Bone calcium,

phosphorus detection by Auger electron spectroscopy. *Micron* 36, 706–709.

- Vielma, J. & Lall, S. P. (1998a). Control of phosphorus homeostasis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in fresh water. *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 83–93.
- Vielma, J. & Lall, S. P. (1998b). Phosphorus utilization by Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in freshwater is not influenced by higher dietary calcium intake. *Aquaculture* 160, 117–128.
- Vielma, J., Lall, S. P., Koskela, J. & Mattila, P. (1999). Influence of low dietary cholecalciferol intake on phosphorus and trace element metabolism by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122A, 117–125.
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P., Delmas, P.D., 2006. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos. Int.* 17, 319–336.
- Von Westemhagen, H. & Dethlefsen, V. (1997). The use of malformations in pelagic fish embryos for pollution assessment. *Hydrobiologia* 352, 241–250.
- Weisbrode, S.E., Doige, C.E., 2001. Bones and joints. In: McGavin, M.D., Carlton, W.W., Zachary, J.F. (Eds.), *Thompson's Specialized Veterinary Pathology*. Mosby, St. Louis, Missouri, pp. 499–536.
- Weiss, R.E., Watabe, N., 1979. Studies on the biology of fish bone. III. Ultrastructure of osteogenesis and resorption in osteocytic (cellular) and anosteocytic (acellular) bones. *Calcif. Tissue Int.* 28, 43–56.
- Williams, B.R., Gelman, R.A., Poppke, D.C., Piez, K.A., 1978. Collagen fibril formation. *J. Biol. Chem.* 253, 6578–6585.
- Wilson, R.P. and Poe, W.E., 1973. Impaired collagen formation in the scorbutic channel cattish. *J. Nutr.*, 103: 1359–1364.

- Wimberger, P.H., 1993. Effects of vitamin C on body shape and skull osteology in *Geophagus brasiliensis*. implications for interpretations of morphological plasticity. *Copeia* 4, 890-898
- Witten, P. E., Gil-Martens, L., Hall, B. K., Huysseune, A. & Obach, A. (2005a). Compressed vertebrae in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Evidence for metaplastic chondrogenesis as a skeletogenic response late in ontogeny. *Diseases of Aquatic Organisms* 64, 237–246.
- Witten, P. E., Hall, B. K. & Huysseune, A. (2005b). Are breeding teeth in Atlantic salmon a component of the drastic alterations of the oral facial skeleton? *Archives of oral Biology* 50, 213–217.
- Yamada, Y., Okamura, A., Tanaka, S., Utoh, T., Horie, N., Mikawa, N. & Oka, P. (2002). The roles of bone and muscle as phosphorous reservoirs during the sexual maturation of female japanese eels, *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel (*Anguilliformes*). *Fish Physiology and Biochemistry* 24, 327–334.
- Yoshinaka, R., Sato, K., Anbe, H., Sato, M., Shimizu, Y., 1988. Distribution of collagen in body muscle of fishes with different swimming modes. *Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem.* 89 (1), 147–151.
- Young, W.C., 1989. *Roark's Formulas for Stress and Strain*, sixth ed. McGraw-Hill, New York.
- Ytteborg, E., Baevefjord, G., Takle, H., Torgersen, J., 2012. *The Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Vertebra and Cellular Pathways to Vertebral Deformities*. INTECH Open Access Publisher.
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, London.

5.2.Ελληνική βιβλιογραφία

- Κασπίρης Π., 2000. Τα ψάρια τη Ελλάδα (κλείδες προσδιορισμού). Πάτρα.
- Κλαδάς Γ. (2006). Παραγωγή ιχθυδίων θαλασσινών ειδών - προπάχυνση. Ηγουμενίτσα. 16-17.
- Κουμουνδούρος , Γ. (1998). Οντογένεση της λειτουργικής μορφολογίας και κριτήρια ποιότητας των νυμφών και ιχθυδίων της συναγρίδας *Dentex dentex* (L. 1758), σε συνθήκες εκτροφής. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.
- Κουμουνδούρος, Γ. (2003). Μέθοδοι εκτροφής νυμφών και ιχθυδίων στη Μεσογειακή θάλασσα ιχθυοκαλλιέργεια. Συμπληρωματικές σημειώσεις του μαθήματος «Υδατοκαλλιέργειες ». Τμήμα Βιολογίας. Παν/μιο Πατρών.
- Κουμουνδούρος, Γ. (1993). Βιολογία ανάπτυξη της τσιπούρας, *Sparusaurata* (Linnaeus,1758) (Percoidae, Sparidae), υπό εκτατικές συνθήκες καλλιέργειας. Μεταπτυχιακή διατριβή. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης , Ηράκλειο.
- Σφακιανάκης., 2003. Επίδραση της θερμοκρασίας και των ρευματικών συνθηκών του μέσου διαβίωσης στην ανάπτυξη λόρδωσης στο λαβράκι, (*Dicentrarchus labrax*). Διατριβή μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης. Τμήμα Βιολογίας. Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Φώτης Γ. (1999). Εκτροφή και παθολογία ιχθύων. Θεσσαλονίκη. 4: 95-97

5.3. Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

http://www.europarl.europa.eu/ftu/pdf/el/FTU_3.3.7.pdf

<https://el.wikipedia.org/wiki/Ελαστικότητα>

fishbase.org

www.ikaros.teipir.gr

6.ABSTRACT

Skeletal malformations in the aquaculture industry appear to a large extent in farmed fish, causing significant problems in their living, with the result that fish are discarded both by fishmongers and by consumers. The factors that cause such anomalies are not yet well understood. In the present study, 20 individuals of sea bream (*Sparus aurata*) were studied, of which 10 had skeletal deformity of scoliosis. The total lengths and weights of the individuals were measured. In addition, the lengths and the diameters of all the studied vertebrae were estimated. The elasticity of the vertebrae was assessed, which varied between the fish with scoliosis and the non deformed ones. Furthermore, different vertebrates from the previous ones were collected and desalted, stained with hematoxylin-eosin staining to examine histopathologically for any differences in vertebral composition.