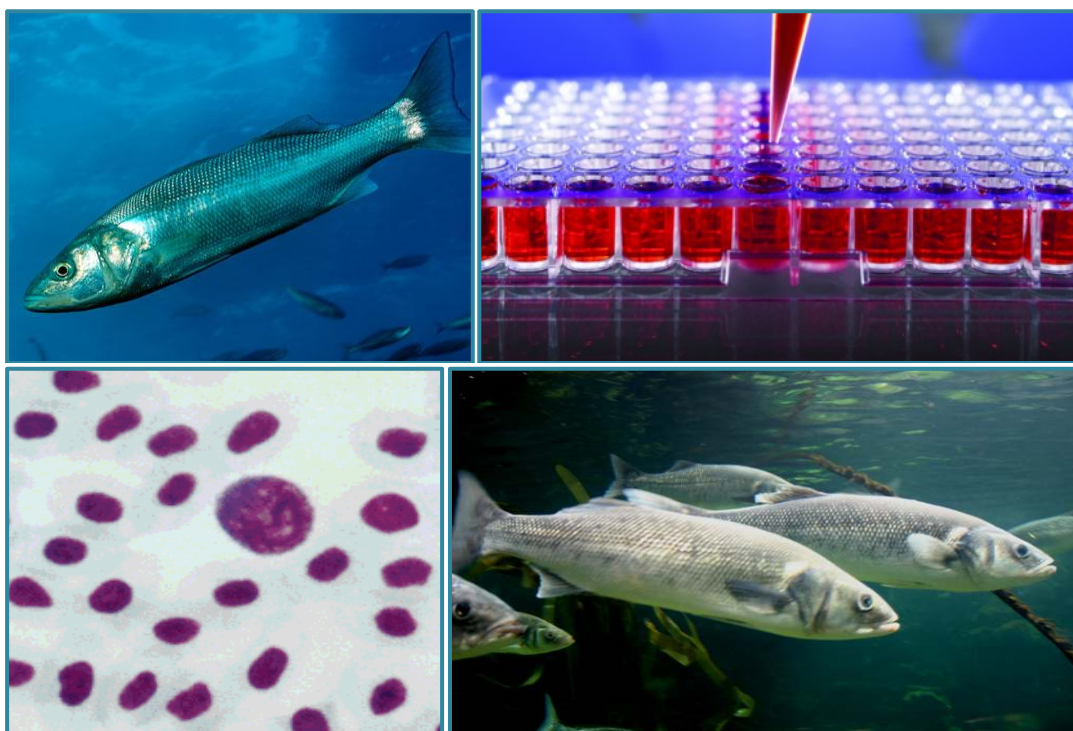




Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Σχολή Θετικών Επιστημών  
ΔΠΜΣ «Ωκεανογραφία και Διαχείριση Θαλάσσιου Περιβάλλοντος»

## Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση της χορήγησης μίγματος ιχνοστοιχείων οργανικής ή ανόργανης προέλευσης στην αύξηση και την ανοσολογική απόκριση νεαρών ατόμων λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*)



**Ιωάννης Ρούσος**

A.M. 216011

**Επιβλέπουσα:** Περσεφόνη Μεγαλοφώνου, Καθηγήτρια  
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Ζωολογίας – Θαλάσσιας Βιολογίας

**Εξωτερική υπεύθυνη:** Morgane Henry, Ερευνήτρια Γ'  
Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών

Αθήνα  
Σεπτέμβριος 2019

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Σχολή Θετικών Επιστημών  
ΔΠΜΣ «Ωκεανογραφία και Διαχείριση Θαλάσσιου Περιβάλλοντος»



## Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Επίδραση της χορήγησης μίγματος ιχνοστοιχείων οργανικής ή ανόργανης προέλευσης  
στην αύξηση και την ανοσολογική απόκριση νεαρών ατόμων λαβρακίου  
(*Dicentrarchus labrax*)

**Ιωάννης Ρούσσος**

A.M. 216011

**Επιβλέπουσα:** Περσεφόνη Μεγαλοφώνου, Καθηγήτρια  
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Ζωολογίας – Θαλάσσιας  
Βιολογίας

**Εξωτερική υπεύθυνη:** Morgane Henry, Ερευνήτρια Γ'  
Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και  
Υδατοκαλλιέργειών

Αθήνα  
Οκτώβριος 2019

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Περσεφόνη Μεγαλοφώνου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και συνεχίζει να μου δείχνει.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην ερευνήτρια Morgane Henry που από την πρώτη στιγμή με υποδέχτηκε στο εργαστήριο της με μεγάλη θέρμη και με «μύηση» στον κλάδο της ανοσολογίας των ψαριών με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί βέβαια χωρίς την βοήθεια του ερευνητικού και τεχνικού προσωπικού του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίου Έρευνών και συγκεκριμένα των ερευνητών Γιάννη Νέγκα, Κρίτωνα Γρηγοράκη, Γιώργου Ρήγου και των ερευνητριών Ελένη Φουντουλάκη και Έφη Κώτου, των τεχνικών Αντιγόνη Βασιλάκη και Χρύσα Νικολουδάκη και του ειδικού επιστημονικού προσωπικού, Δήμητρα Κογιανού και Μαντώ Κοτσίρη. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Γιώργο Πυρένη και την Χριστιάνα Κουννά για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη τους καθόλη την διάρκεια της παραμονής μου στο ΕΛΚΕΘΕ.

Καθώς το χρονικό διάστημα συγγραφή της εργασίας συνέπεσε με την στρατιωτική μου θητεία, θα ήθελα να αποδώσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στους πλωτάρχες Κωνσταντίνο Κωτσηδήμο και Κώστα Βυθούλκα και την υποπλοίαρχο Ελένη Παπαπέτρου, που συνέβαλαν σημαντικά με την στήριξή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου που είναι δίπλα μου σε κάθε μου βήμα.

## Περίληψη

Πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα διατροφής διάρκειας 13 εβδομάδων για την αξιολόγηση της αύξησης και της συστημικής και βλεννογονικής ανοσολογικής απόκρισης νεαρών ατόμων λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) που τράφηκαν με φυτικές δίαιτες συμπληρωμένες με μίγμα ιχνοστοιχείων (χαλκού, σιδήρου, σεληνίου, μαγγανίου και ψευδαργύρου) οργανικής (χηλικά) ή ανόργανης προέλευσης. Σχεδιάστηκαν 6 πειραματικές δίαιτες που περιείχαν 0% πρόσθετων ιχνοστοιχείων (δίαιτα αρνητικός μάρτυρας CTRL-), 100% της συγκέντρωσης που προσδιορίστηκε στο λαβράκι στο ευρωπαϊκό πρόγραμμα «ARRAINA» είτε σε ανόργανα (INORG) ή σε οργανικά (ORG) ιχνοστοιχεία, 65% (ORGlow) και 150% (ORGhigh) της προηγούμενης συγκέντρωσης σε οργανικά ιχνοστοιχεία καθώς και μια δίαιτα θετικός μάρτυρας (CTRL+) βασισμένη σε ιχθυάλευρο. Όσον αφορά την αύξηση, τα ψάρια που τράφηκαν με την δίαιτα ORG εμφάνισαν βελτιωμένο ειδικό συντελεστή αύξησης (SGR). Η συστημική ανοσία βελτιώθηκε σημαντικά από την μέση συγκέντρωση ιχνοστοιχείων, με βάση την ολική πρωτεΐνη του ορού και το μονοξειδίο του αζώτου που ήταν αυξημένα στην δίαιτα ORG. Αντίθετα η συνολική αντιβακτηριακή δράση του ορού βελτιώθηκε από την μέση συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων. Η δερματική βλεννογονική ανοσία βελτιώθηκε από την χορήγηση μέσης συγκέντρωσης οργανικών ιχνοστοιχείων (ολική πρωτεΐνη & μονοξειδίο του αζώτου), ανόργανων (ενεργότητα λυσοζύμης) ή και των δύο (ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης). Εξαίρεση αποτελεί η συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα που ήταν βέλτιστη στην μειωμένη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων όπως και στην περίπτωση του ορού. Τέλος, η εντερική βλεννογονική ανοσία ενισχύεται από την μειωμένη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων, σε αντίθεση με την δερματική και την συστημική. Συνολικά, η απουσία μίγματος ιχνοστοιχείων απέτυχε να βελτιώσει την αύξηση των ψαριών και τις περισσότερες ανοσολογικές παραμέτρους. Η παρούσα εργασία υποδεικνύει πως τα ιχνοστοιχεία οργανικής προέλευσης δρουν καλύτερα ως συμπληρώματα σε φυτικές δίαιτες του λαβρακίου αλλά το επίπεδο χρησιμοποίησής τους δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο.

**Λέξεις κλειδιά:** Λαβράκι, φυτική δίαιτα, ανόργανα, οργανικά, ιχνοστοιχεία, μίγμα, αύξηση, ανοσολογία, συστημική, βλεννογονική ανοσία

## Abstract

A 13-week feeding trial was conducted to assess the growth performance as well as the systemic and mucosal immunity of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed plant based diets supplemented with trace mineral premix (Cu, Fe, Se, Mn, Zn) from organic (chelated) or inorganic sources. Six experimental diets were formulated that contained 0% of added minerals (control negative diets CTRL-), 100% of the concentration that was established for sea bass by the European research project “ARRAINA” either with inorganic (INORG) or organic (ORG) minerals, 65% (ORGLow) and 150% (ORGhigh) of the previous dose in organic minerals and a fish-meal based control positive diet (CTRL+). Concerning growth, fish fed the ORG diet showed elevated specific growth rate (SGR). Systemic immunity was significantly enhanced by the medium dose of organic minerals, based on total serum protein and nitric oxide that were increased in the ORG diet. On the other hand, serum total antibacterial activity was improved by the lower dose of organic minerals. Skin mucosal immunity was improved by the addition of medium dose of organic minerals (total protein and nitric oxide concentration), inorganic minerals (lysozyme activity) or both of them (alkaline phosphatase activity), whereas total antibacterial activity was highest in fish fed the ORGLow diet, as in the case with serum. Finally, intestinal mucosal immunity was strengthened in the ORGLow diet, in contrast with what was found in the systemic and skin mucosal immune response. Overall, without supplementation of diets with a mineral premix, growth and the majority of immune parameters were not improved. The present study suggests that organic trace minerals act better as supplements in plant-based diets of sea bass, but the level at which they should be used is not totally clear.

**Keywords:** Sea bass, plant-based, inorganic, organic, minerals, premix, growth, immunology, systemic, mucosal immunity

# Πίνακας περιεχομένων

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΙ ΑΜΥΝΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. ΦΥΣΙΚΟΙ ΦΡΑΓΜΟΙ .....	3
1.1.2. ΕΜΦΥΤΗ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ .....	7
1.1.3. ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	10
1.1.4. ΕΜΦΥΤΗ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ.....	13
1.1.5. ΕΜΦΥΤΗ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ .....	15
<b>1.2. ΦΛΕΓΜΟΝΗ</b> .....	<b>17</b>
1.2.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ .....	18
<b>1.3. ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ</b> .....	<b>19</b>
1.3.1. ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ .....	19
1.3.2. ΛΕΜΦΙΚΑ ΟΡΓΑΝΑ .....	19
1.3.3. ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ .....	21
1.3.4. ΜΕΙΖΟΝ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ.....	23
1.3.5. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΗ ΑΝΟΣΙΑ (CELL-MEDIATED IMMUNITY, CMI) .....	24
1.3.6. ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΕΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ .....	24
1.3.7. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΜΝΗΜΗ.....	25
<b>1.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ</b> .....	<b>25</b>
<b>1.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ</b> .....	<b>26</b>
1.5.1. ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	<b>ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.</b>
<b>1.6. ΛΑΒΡΑΚΙ (<i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>)</b> .....	<b>29</b>
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>29</b>
<b>3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΕΣ 384 ΒΟΘΡΙΩΝ</b> .....	<b>30</b>
3.1.1. ΛΥΣΟΖΥΜΗ.....	30
3.1.2. ΣΕΡΟΥΛΟΠΛΑΣΜΙΝΗ .....	33
3.1.3. ΜΥΕΛΟΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ (ΜΡΟ).....	34
3.1.4. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ .....	35
3.1.5. ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (NO) .....	36
<b>3.2. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ – ΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ</b> .....	<b>37</b>
3.2.1. ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ – ΧΗΛΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ .....	51
<b>4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΔΙΑΙΤΩΝ</b> .....	<b>56</b>
<b>4.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗ</b> .....	<b>57</b>
<b>4.3. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ</b> .....	<b>58</b>
4.3.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΛΕΝΝΑΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ .....	59
4.3.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΙΜΑΤΟΣ .....	59
4.3.3. ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΛΕΝΝΑΣ ΕΝΤΕΡΟΥ.....	60
<b>4.4. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ</b> .....	<b>60</b>
4.4.1. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	60

4.4.2.	ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ – ΕΚΡΗΞΗ ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ .....	61
<b>4.5.</b>	<b>ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ .....</b>	<b>62</b>
<b>4.6.</b>	<b>ΧΥΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ .....</b>	<b>63</b>
4.6.1.	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ .....	63
4.6.2.	ΛΥΣΟΖΥΜΗ.....	63
4.6.3.	ΣΕΡΟΥΛΟΠΛΑΣΜΙΝΗ .....	63
4.6.4.	ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ (ΜΡΟ) .....	64
4.6.5.	ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΑΖΩΤΟΥ (ΝΟ).....	64
4.6.6.	ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (ALP).....	65
4.6.7.	ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ.....	65
4.6.8.	ΑΝΤΙΠΡΩΤΕΑΣΕΣ.....	67
4.6.9.	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ (ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ) .....	67
<b>4.7.</b>	<b>ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ .....</b>	<b>68</b>
<b>5.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1.</b>	<b>ΑΥΞΗΣΗ .....</b>	<b>69</b>
<b>5.2.</b>	<b>ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ .....</b>	<b>70</b>
5.2.1.	ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ .....	70
5.2.2.	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	70
5.2.3.	ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ .....	71
5.2.4.	ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ .....	72
5.2.5.	ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ.....	73
5.2.6.	ΛΥΣΟΖΥΜΗ.....	74
5.2.7.	ΣΕΡΟΥΛΟΠΛΑΣΜΙΝΗ .....	74
5.2.8.	ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ .....	75
5.2.9.	ΠΡΩΤΕΪΝΗ.....	75
5.2.10.	ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ - ΑΝΤΙΠΡΩΤΕΑΣΕΣ .....	76
5.2.11.	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ – ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ .....	77
<b>6.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>79</b>
<b>6.1.</b>	<b>ΑΥΞΗΣΗ .....</b>	<b>79</b>
<b>6.2.</b>	<b>ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ .....</b>	<b>80</b>
<b>6.3.</b>	<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....</b>	<b>80</b>
<b>6.4.</b>	<b>ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑ – ΕΚΡΗΞΗ ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ .....</b>	<b>81</b>
<b>6.5.</b>	<b>ΜΥΕΛΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ (ΜΡΟ) .....</b>	<b>82</b>
<b>6.6.</b>	<b>ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ (ΝΟ).....</b>	<b>82</b>
<b>6.7.</b>	<b>ΛΥΣΟΖΥΜΗ.....</b>	<b>83</b>
<b>6.8.</b>	<b>ΣΕΡΟΥΛΟΠΛΑΣΜΙΝΗ.....</b>	<b>83</b>
<b>6.9.</b>	<b>ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ (ALP).....</b>	<b>84</b>
<b>6.10.</b>	<b>ΠΡΩΤΕΪΝΗ.....</b>	<b>84</b>
<b>6.11.</b>	<b>ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ-ΑΝΤΙΠΡΩΤΕΑΣΕΣ .....</b>	<b>85</b>
<b>6.12.</b>	<b>ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ – ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ .....</b>	<b>85</b>
<b>6.13.</b>	<b>ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ .....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>88</b>
<b>8.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>89</b>

## 1. Εισαγωγή

Το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών, όπως και όλων των σπονδυλωτών, διακρίνεται σε δύο κύριους άξονες: στην μη ειδική-έμφυτη ανοσία και στην ειδική-επίκτητη ανοσία. Η διάκριση αυτή ωστόσο είναι τεχνική, καθώς στην πραγματικότητα οι ειδικοί και μη ειδικοί μηχανισμοί ενεργούν από κοινού και είναι άρρηκτα συνδεδεμένοι (Rauta *et al.*, 2012). Το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών στηρίζεται περισσότερο στην μη ειδική άμυνα, σε σύγκριση με τα θηλαστικά τα οποία βασίζονται περισσότερο στην ειδική ανοσία (Magnadottir, 2006).

Η πρώτη γραμμή άμυνας αμυντικών μηχανισμών περιλαμβάνει όλους τους μη ειδικούς μηχανισμούς, που αποτελούνται από τους φυσικούς φραγμούς και όσους ενεργούν μετά την είσοδο ενός παθογόνου, ενώ οι ειδικοί μηχανισμοί αποτελούν την δεύτερη γραμμή άμυνας (Lieschke & Trede, 2009).

### 1.1. Μη ειδικοί αμυντικοί μηχανισμοί

#### 1.1.1. Φυσικοί φραγμοί

##### 1.1.1.1 Δέρμα

Η επιφάνεια του δέρματος των ψαριών διαφέρει από τα ανώτερα σπονδυλόζωα στο ότι η επιδερμίδα αποτελείται από μη-κερατινοποιημένα ζωντανά κύτταρα (**Εικόνα 1**). Η απόκριση για την επούλωση του δέρματος στα ψάρια είναι εξαιρετικά γρήγορη και περιλαμβάνει την μετανάστευση μαλπιγγιανών κυττάρων από την περιφέρεια του τραύματος (Roberts, 2012a). Ακόμη, η επιδερμίδα των ψαριών αποκρίνεται σε ερεθίσματα, όπως μόλυνση με παράσιτα ή έκθεση σε ρύπους, με την πάχυνση του στρώματος της βλέννας και υπερπλασία των επιδερμικών κυττάρων (Gaines Jr & Rogers, 1975; Iger *et al.*, 1988; Ferguson, 1989)

Ολόκληρο το επιθήλιο καλύπτεται από έναν μουκοπολυσακχαρικό γλυκοκάλυκα ο οποίος αποτελείται από ένα μίγμα μορίων προερχόμενα κυρίως από τις εκκρίσεις των επιθηλιακών κυττάρων και της βλέννας που απελευθερώνεται από τα καλυκοειδή κύτταρα (Roberts, 2012a).

Στην επιδερμίδα των τελεόστεων μπορούν να αναγνωριστούν πολλοί τύποι κυττάρων: μαλπιγγιανά επιθηλιακά κύτταρα, καλυκοειδή κύτταρα βλέννας, ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα, ροπαλοειδή κύτταρα, αισθητικά κύτταρα, κύτταρα οσμωρύθμισης, κύτταρα Merkel, καθώς και κύτταρα « εισβλητικά» όπως μακροφάγα και άλλα λευκοκύτταρα (Grizzle & Rogers, 1976; Yasutake & Wales, 1983; Zaccone *et al.*, 2001).

Τα μαλπιγγιανά επιθηλιακά κύτταρα είναι τα πιο άφθονα, και η επιφάνεια των εξώτερων κυττάρων διαθέτει μικροράχες που μάλλον βοηθούν στην συγκράτηση της βλενωδούς έκκρισης στο δέρμα αλλά και πιθανώς στην προστασία από μηχανικά τραύματα (Roberts, 2012a). Ακόμη, τα επιθηλιακά κύτταρα είναι ικανά για φαγοκυττάρωση (Iger & Abraham, 1990) ενώ τα κύτταρα που γεμίζουν με εξωγενές υλικό αποβάλλονται από την επιδερμίδα (Asbakk & Dalmo, 1998). Είναι πολύ μικρότερα από τα υπόλοιπα κύτταρα της επιδερμίδας και έχουν βασεόφιλο κυτταρόπλασμα.

Τα καλυκοειδή κύτταρα μπορούν να απελευθερώσουν ταχύτατα το περιεχόμενό τους έπειτα από μια οξεία, βραχύχρονη έκθεση, και ακολούθως να μειώσουν τον αριθμό τους (Iger *et al.*, 1988; Berntssen *et al.*, 1997), ενώ αντίθετα χρόνια έκθεση οδηγεί σε αύξηση του αριθμού τους. Σε κάποιες φορές ακόμα και ένας μέσης έντασης στρεσογόνος παράγοντας όπως ένα μεμονωμένο περιστατικό σύλληψης, μπορεί να προωθήσει την αύξηση του αριθμού των καλυκοειδών κυττάρων. Επίσης, έκθεση σε τοξικούς ή παθογόνους παράγοντες μπορεί να αλλάξει το μέγεθος, την μορφολογία αλλά και την χημική σύσταση του περιεχομένου των καλυκοειδών κυττάρων (Roy, 1988; Garg & Mittal, 1993; Sanchez *et al.*, 1998). Εκτός από εκκριτικές ιδιότητες, τα καλυκοειδή κύτταρα έχουν πιθανώς



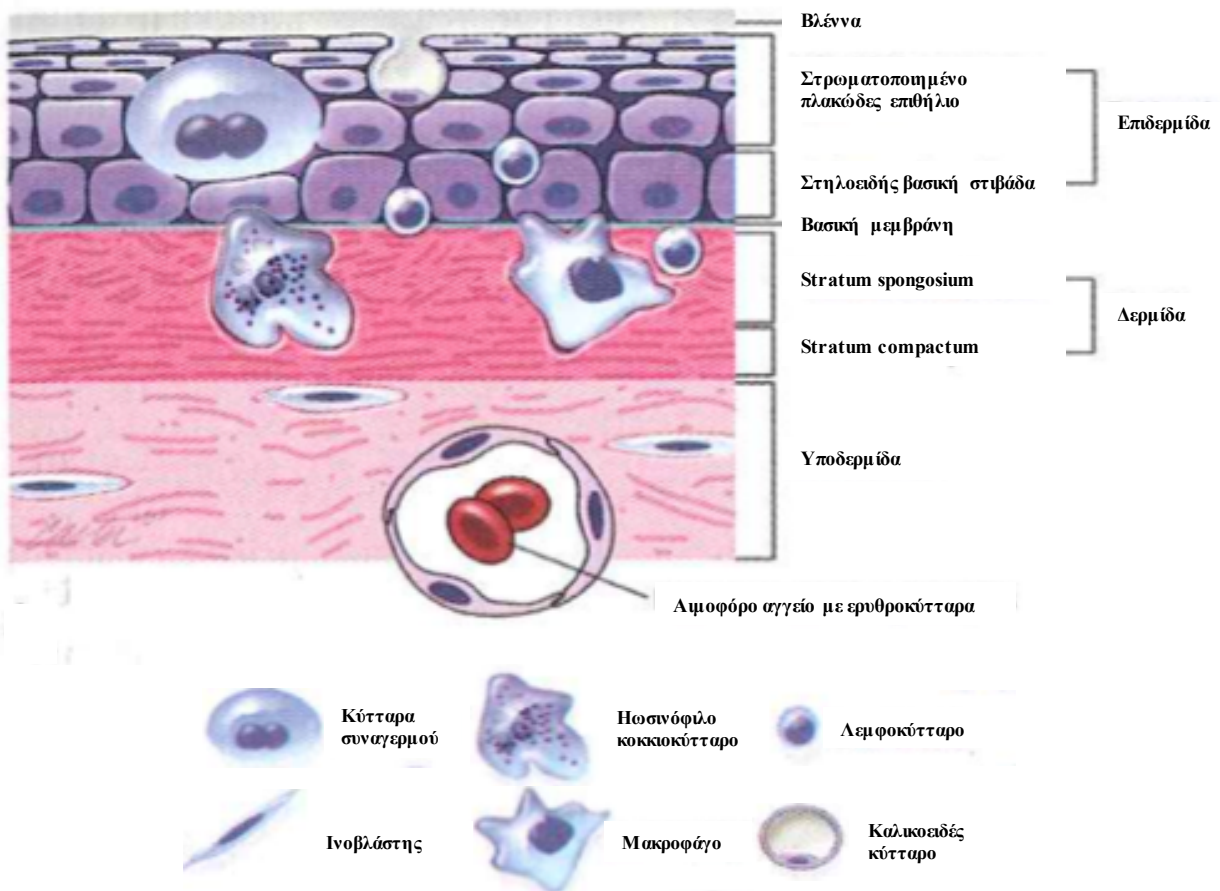
και φαγοκυτταρικές ιδιότητες (Iger & Abraham, 1990), αλλά και συμμετοχή στους ειδικούς μηχανισμούς άμυνας, όπως δείχνει η παρουσία αντισωμάτων στο εσωτερικό τους (Peleteiro & Richards, 1988).

Τα ροπαλοειδή κύτταρα απαντώνται κυρίως στα ostariophysans και λειτουργούν με την χρήση μιας ουσίας συναγερμού (Pfeiffer, 1977; Smith, 1977; Pfeiffer, 1982; Smith, 1982, 1986, 1992) που αφού απελευθερωθεί στο νερό μετά από τραυματισμό της επιδερμίδας, προωθεί αντι-θηρευτικές αντιδράσεις στα υπόλοιπα άτομα του είδους. Στις πολυπτερίδες και στα χέλια, τα ροπαλοειδή κύτταρα δεν φαίνεται να συμμετέχουν σε αντιδράσεις συναγερμού (Henrickson & Matoltsy, 1968; Hugie & Smith, 1987), αλλά μάλλον εκκρίνουν χημικά που προστατεύουν εναντίον παρασίτων και άλλων παθογόνων (Smith, 1977, 1982, 1986; Shiomi *et al.*, 1988; Mittal & Garg, 1994). Τα λευκοκύτταρα είναι πιο άφθονα κυρίως πάνω από την βασική μεμβράνη, αλλά ο αριθμός τους μπορεί να αυξηθεί πολύ κατά τη διάρκεια επούλωσης πληγής (Phromsuthirak, 1977; Iger & Abraham, 1990) σε μολυσματικές ασθένειες (Ferguson, 1989) ή κατά την έκθεση σε ρύπους και στρεσογόνα ((Iger *et al.*, 1988; Iger *et al.*, 1994). Τα κύτταρα Rodlet έχουν προκαλέσει μεγάλη διαφωνία όσον αφορά την προέλευση και την λειτουργία τους. Φαίνεται να σχετίζονται με ερεθίσματα από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες όπως νεοπλασία, παράσιτα, ιική λοίμωξη και γενική βλάβη των ιστών (Reite, 1997; Manera & Dezfuli, 2004; Bielek, 2005; Reite, 2005; Reite & Evensen, 2006; Silphaduang *et al.*, 2006). Κάποιοι θεωρούν πως πρόκειται για σποροζώο παράσιτο (Laguesse, 1895; Anderson *et al.*, 1976; Mayberry *et al.*, 1979) και κάποιοι πως πρόκειται για κύτταρο του ψαριού (Leino, 1974; Desser & Lester, 1975; Morrison & Odense, 1978; Mattey *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1995; Iger & Abraham, 1997). Το πιο πιθανό είναι πως πρόκειται για κάποιο ανώριμο στάδιο κυττάρου που στη συνέχεια αναπτύσσεται σε ηωσινοφιλικό κοκκιοκύτταρο (Manera & Dezfuli, 2004; Reite & Evensen, 2006).

Παρόλο που οργανωμένα λεμφοειδή βλαστικά κέντρα δεν έχουν βρεθεί στο δέρμα των ψαριών (Flajnik, 1998), λεμφοκύτταρα έχουν ανιχνευτεί στο δέρμα (Lobb, 1987), ιδιαίτερα Β λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα (Zhao *et al.*, 2008).

Κατώτερα της επιδερμίδας βρίσκεται η δερμίδα που αποτελείται από δύο στιβάδες. Την ανώτερη σπογγώδη στιβάδα (*stratum spongiosum*) που περιέχει χρωματοφόρα κύτταρα, μαστοκύτταρα/ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα και λέπια, και την κατώτερη συμπαγή στιβάδα πλούσια σε κολλαγόνο. Τα μαστοκύτταρα έχουν δομικές και λειτουργικές ιδιότητες παρόμοιες με τα αντίστοιχα των θηλαστικών (Reite, 1997) και αποθηκεύουν έναν αριθμό αντιφλεγμονωδών και αντιμικροβιακών ουσιών συμπεριλαμβανομένων φωσφολιπιδίων, αλκαλικής φωσφατάσης, περοξειδάσης, λυσοζύμης κ.ά. (Silphaduang *et al.*, 2006).

Πολλά είδη ψαριών διαθέτουν ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα στους συνδετικούς ιστούς του δέρματος και των βραγχίων και στο εντερικό τοίχωμα. Μορφολογικά μοιάζουν με μαστοκύτταρα αλλά οι ιδιότητες χρώσης τους διαφέρουν σε ένα βαθμό. Σε πολλά σημεία τα ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα των ψαριών μοιάζουν με τα μαστοκύτταρα των βλεννογόνων των θηλαστικών, μόνο που μέχρι πρόσφατα μόνο σεροτονίνη είχε βρεθεί στο εσωτερικό τους και όχι ισταμίνη. Όμως πλέον έχει αποδειχθεί η παρουσία ισταμίνης στα ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα των περκόμορφων (Mulero *et al.*, 2007). Τα ψάρια δεν διαθέτουν IgE, όμως είναι πιθανό η αποκοκκιοποίηση των ηωσινοφιλικών κοκκιοκυττάρων/μαστοκυττάρων να γίνεται μέσω της CRP ή του συμπληρώματος (Reite, 1997). Εκτός από βιοενεργές αμίνες, τα ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα πολλών ειδών περιέχουν αντιμικροβιακά πεπτίδια (Murray *et al.*, 2007; Roberts, 2012b).

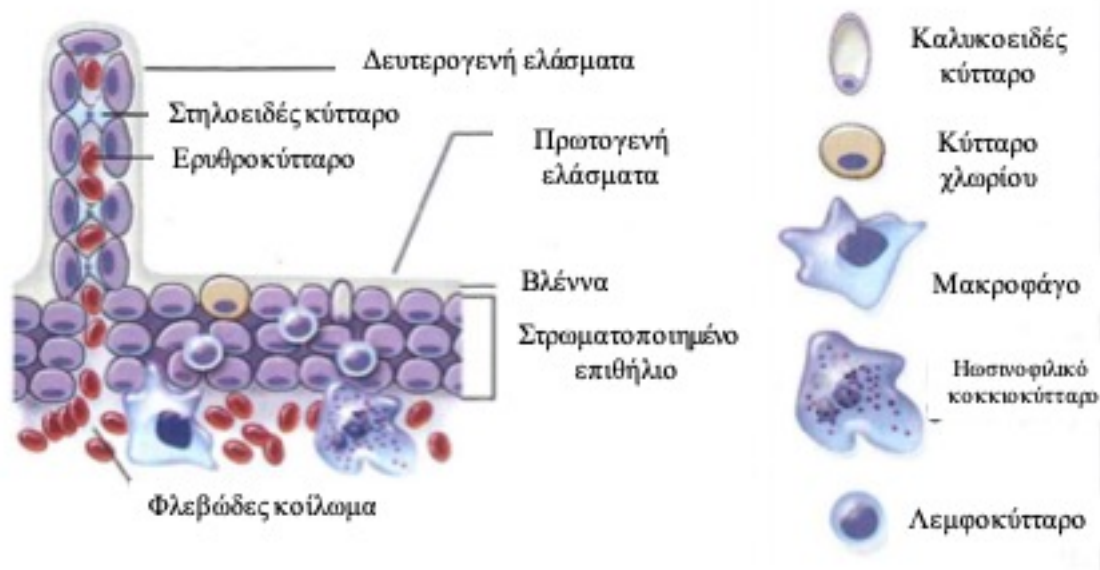


**Εικόνα 1.** Διάγραμμα των βασικών ανατομικών δομών του δέρματος και ταυτοποίηση και εντόπιση των ανοσοσχετιζόμενων κυττάρων. (Dickerson, 2009)

### 1.1.1.2 Βράγχια

Τα βράγχια προστατεύονται μέσω της παραγωγής βλέννας και μέσω ενός επιθηλίου που αποκρίνεται εύκολα με υπερπλασία, όπως φαίνεται σε πολλές λοιμώξεις. Το στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο καλύπτει τόσο τα βραγχιακά ελάσματα όσο και τα βραγχιακά νημάτια, αλλά έχει πλάτος το πολύ δύο κυττάρων, που το καθιστά επιρρεπές σε εισβολή παθογόνων.

Τα βράγχια περιέχουν επίσης φαγοκύτταρα καθώς και λεμφοειδή κύτταρα (Roberts, 2012b), ενώ κύτταρα βλέννας είναι άφθονα στα βραγχιακά νημάτια (Yasutake & Wales, 1983). Ένας αριθμός ερευνών έδειξε την λειτουργική ανοσολογική δραστηριότητα των βραγχίων και των σχετιζόμενων με τα βράγχια λευκοκυττάρων/λεμφοκυττάρων (Goldes *et al.*, 1986; Powell *et al.*, 1991; Lumsden *et al.*, 1995; Davidson *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998; Rombout *et al.*, 1998; Dos Santos *et al.*, 2001a; Dos Santos *et al.*, 2001b). Για παράδειγμα σημαντικοί αριθμοί λεμφοκυττάρων, πλασματοκυττάρων και μακροφάγων βρέθηκαν σε βραγχιακό ιστό από τον σολομό του Ατλαντικού (Lin *et al.*, 1998). Σε εναιωρήματα λευκοκυττάρων από βράγχια κυπρίνου βρέθηκε ένας άφθονος πληθυσμός από ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα που αντέδρασαν με μονοκλωνικό αντίσωμα (mAbWCL38) ειδικό για τα ενδοεπιθηλιακά T λεμφοκύτταρα του εντέρου του κυπρίνου (Rombout *et al.*, 1998). Αυτά τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν τον κύριο πληθυσμό λεμφοειδών κυττάρων, ενώ τα B λεμφοκύτταρα αποτελούν μικρότερο συστατικό των πληθυσμών.



**Εικόνα 2.** Διάγραμμα των βασικών ανατομικών δομών των βραγχίων καθώς και ταυτοποίηση και εντόπιση των ανοσοσχετιζόμενων κυττάρων. (Dickerson, 2009)

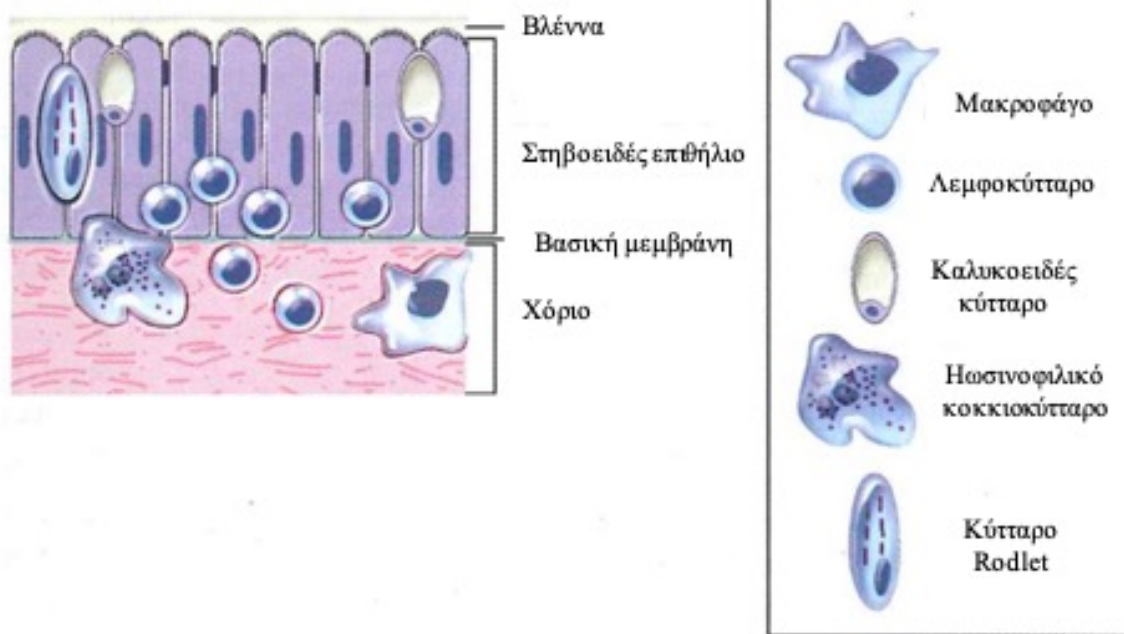
### 1.1.1.3 Εντερο

Οι αποκρίσεις του εντερικού βλεννογόνου μοιάζουν σε αρκετές περιπτώσεις με τις αντίστοιχες στο δέρμα, ωστόσο η πεπτική λειτουργία του εντέρου εξασφαλίζει ένα αρκετά εχθρικό περιβάλλον για πιθανά παθογόνα με τις πολύ όξινες συνθήκες (σε είδη με στομάχι) αλλά και με την έκκριση πεπτικών ενζύμων και χολής (Roberts, 2012b).

Ο οισοφάγος, το στομάχι και το έντερο διαθέτουν τέσσερις βασικές στιβάδες. Η εξώτερη στιβάδα είναι η βλενογόνος, που αποτελείται από επιθήλιο, χόριο συνδετικού ιστού και καμιά φορά μυοβλεννογόνο. Η υποβλεννογόνος, που αποτελείται από ινώδη συνδετικό ιστό, χωρίζει την βλεννογόνο από την μυϊκή στιβάδα. Η εσωτερη ορογόνοσ καλύπτεται από απλό πλακώδες μεσοθήλιο (Grizzle & Rogers, 1976).

Η βλεννογόνος του εντέρου θεωρείται μια σημαντική ανοσολογική τοποθεσία για τα ψάρια (Cain *et al.*, 2000). Για παράδειγμα, στον κυπρίνο το οπίσθιο τμήμα του εντέρου, που αναφέρεται ως δεύτερο τμήμα, καταλαμβάνει το 20-25% του συνολικού μήκους του εντέρου (Rombout *et al.*, 1993; Press & Evensen, 1999) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην βλεννογονική ανοσία (Rombout & van den Berg, 1989; Rombout *et al.*, 1989). Ο σχετιζόμενος με το έντερο λεμφικός ιστός στους περισσότερους τελεόστεους αποτελείται από κύτταρα με λεμφοειδή μορφολογία που διαμένουν ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Rombout *et al.*, 1993; McMillan & Secombes, 1997; Picchiatti *et al.*, 1997). Αυτά είναι κυρίως ενδοεπιθηλιακά T λεμφοκύτταρα (Bernard *et al.*, 2006; Huttenhuis *et al.*, 2006), αλλά επίσης ανιχνεύονται και λεμφοκύτταρα που εκφράζουν ανοσοσφαιρίνες, με τον μεγαλύτερο αριθμό αυτών να εντοπίζεται στο χόριο (Rombout *et al.*, 1993; Danilova & Steiner, 2002; Huttenhuis *et al.*, 2006).

Στα ψάρια δεν ανιχνεύεται οργανωμένος λεμφικός ιστός, όπως οι πλάκες του Peyer των θηλαστικών, αλλά αντίθετα ο εντεροσχετιζόμενος λεμφοειδής ιστός αποτελείται από διάσπαρτα λεμφοκύτταρα διαφόρων μεγεθών, πλασματοκύτταρα, μακροφάγα, καθώς και από διαφόρων τύπων κοκκιοκύτταρα (Du Pasquier & Litman, 2000). Ακόμη ανιχνεύονται ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα που μπορεί να συμμετέχουν στην ρύθμιση αντιδράσεων υπερευαισθησίας.



**Εικόνα 3.** Διάγραμμα των βασικών ανατομικών δομών του εντέρου καθώς και ταυτοποίηση και εντόπιση των ανοσοσχετιζόμενων κυττάρων. (Dickerson, 2009)

## 1.1.2. Έμφυτη βλεννογονική ανοσία

### 1.1.2.1 Οντογένεση λεμφοκυττάρων και ανοσοσχετιζόμενων κυττάρων

Είναι πιθανό το αρχέγονο ανοσοποιητικό σύστημα επίκτητης ανοσίας των σπονδυλωτών να αναπτύχθηκε στο εντερικό επιθήλιο, και πιθανώς και σε επιθήλια δέρματος και βραγχίων (Matsunaga & Rahman, 1998; Cheroutre, 2004). Με την εξέλιξη των συστημάτων, ο θύμος αδένας ανέλαβε τους μηχανισμούς για την ωρίμανση και την επιλογή των T λεμφοκυττάρων, παραγκωνίζοντας τις βλεννογονικές θέσεις. Έτσι οι θέσεις αυτές τελικά δεν είχαν την ευθύνη για την συμμόρφωση των ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων στην αναγνώριση εαυτού και μη εαυτού (Cheroutre, 2004). Ακόμα και στα θηλαστικά, υπάρχουν ειδικά ενδοεπιθηλιακά λεμφοκυττάρια στο έντερο που αναπτύσσονται μέσω ενός μονοπατιού εκτός του θύμου αδένου (Regnault *et al.*, 1994; Lefrancois & Puddington, 1995; Cheroutre, 2004; Bernard *et al.*, 2006). Έχει προταθεί πως ανάπτυξη T λεμφοκυττάρων εκτός θύμου συμβαίνει και στους τελεόστεους, τουλάχιστον για τον κυπρίνο (Huttenhuis *et al.*, 2006), όπου τα ενδοεπιθηλιακά λεμφοκυττάρια αναπτύσσονται στο εμβρυικό έντερο πριν την ανάπτυξη του θύμου αδένου. Τα B λεμφοκύτταρα που απαντώνται στις βλεννογονικές τοποθεσίες θεωρείται ότι αναπτύσσονται σε πρωτογενή λεμφικούς ιστούς του πρόνεφρου και του σπλήνα (Huttenhuis *et al.*, 2006).

### 1.1.2.2 Έμφυτη κυτταρική βλεννογονική ανοσία

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πολλοί κυτταρικοί τύποι συμμετέχουν στην έμφυτη βλεννογονική ανοσία των τελεόστεων. Αυτοί περιλαμβάνουν φαγοκύτταρα (μακροφάγα και ουδετερόφιλα), μη φαγοκυτταρικά κύτταρα (φυσικά φονικά και μη ειδικά κυτταροτοξικά κύτταρα) και καθώς και άλλα κύτταρα (μαστοκύτταρα/ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα και κύτταρα rodlet) (Dickerson, 2009).

Η φλεγμονώδης αντίδραση διακρίνεται σε δύο φάσεις, ξεκινώντας με την εισροή ουδετερόφιλων και αργότερα με την άφιξη μονοκυττάρων και μακροφάγων (Sharp *et al.*, 1991; Neuman *et al.*, 2001). Τα

ουδετερόφιλα προέρχονται από τον πρόνεφρο ενώ τα μακροφάγα προέρχονται από μονοκύτταρα του αίματος που μεταναστεύουν στις σχετικές θέσεις. Εκτός όμως από τα μεταναστεύοντα φαγοκύτταρα οι βλεννογονικές θέσεις έχουν διαμένοντα μακροφάγα που συμμετέχουν στην πρόσληψη, πέψη και παρουσίαση του αντιγόνου (Huttenhuis *et al.*, 2006).

## I. Δέρμα

Μακροφάγα, ουδετερόφιλα και άλλα κοκκιοκύτταρα όπως ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα/μαστοκύτταρα εμφανίζονται στις βαθύτερες στιβάδες της επιδερμίδας, ιδιαίτερα σε αποκρίσεις σε φλεγμονές όπως σε παρασιτικές μολύνσεις (Reite & Evensen, 2006). Ακόμη παρόντα στο δέρμα είναι μεταναστεύοντα μακροφάγα και λεμφοκύτταρα (Peleteiro & Richards, 1990).

Αναφορές για διαμένοντα φαγοκύτταρα που παγιδεύουν αντιγόνα στο δέρμα των τελεόστεων, όπως τα αντίστοιχα δενδριτικά κύτταρα των θηλαστικών, είναι σπάνιες (Mittal *et al.*, 1980; Peleteiro & Richards, 1990). Αυτό βέβαια δεν αποκλείει την πιθανότητα μακροφάγα του δέρματος που μεταναστεύουν διαμέσου της βασικής μεμβράνης στο επιθήλιο, να παγιδεύουν και να παρουσιάζουν αντιγόνα. Η παρουσία φυσικών φονικών ή μη ειδικών κυτταροτοξικών κυττάρων δεν έχει διαπιστωθεί στο δέρμα αλλά είναι πιθανό ενεργοποιημένα κύτταρα, που στρατολογούνται από τον πρόνεφρο στο αίμα, να καταλήγουν στο δέρμα (Graves *et al.*, 1985).

## II. Έντερο

Η γαστρεντερική οδός των τελεόστεων περιέχει ενδοεπιθηλιακά μακροφάγα καθώς και ουδετερόφιλα και μαστοκύτταρα/ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα που βρίσκονται στο χόριο (Rombout *et al.*, 1989; Vallejo Jr & Ellis, 1989; Davidson *et al.*, 1991; Powell *et al.*, 1991; Dorin *et al.*, 1993; Rombout *et al.*, 1993; Sveinbjornsson *et al.*, 1996; Hebert *et al.*, 2002; Leknes, 2002; Grove *et al.*, 2006). Τα μαστοκύτταρα/ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα μπορούν να κινούνται από τις υποβλεννογόνες στιβάδες στις λάχνες ή την βλεννογόνο, ενώ σε συγκεκριμένες αλλεργικές ή βακτηριακές λοιμώξεις, παρατηρείται αποκοκκιοποίηση των κυττάρων (Ellis *et al.*, 1981). Τα κύτταρα rodlet εμφανίζονται συχνά συνδεδεμένα με παρασιτικές λοιμώξεις από τρηματώδη, κεστώδη και κύστεις έλμινθων στο έντερο και τους γύρω ιστούς (Reite, 1997; Dezfuli *et al.*, 1998; Bielek, 2005).

Ένας σημαντικός αριθμός ουδετερόφιλων εντοπίζονται στο έντερο ειδών όπως η τσιπούρα, κυρίως στο χόριο (Mullero *et al.*, 2007). Θεωρείται ότι τα κύτταρα αυτά παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία και στην ανοσολογική επιτήρηση ενώ έρευνες έδειξαν ότι η χορήγηση προβιοτικών προκαλεί αύξηση του αριθμού τους στο έντερο (Picchietti *et al.*, 1997).

Λεμφοκύτταρα που δεν εκφράζουν ανοσοσφαιρίνες είναι διάχυτα κατανεμημένα μέσα στο επιθήλιο. Παρόλο που ο πληθυσμός αυτός αποτελείται κυρίως από T λεμφοκύτταρα, φυσικά φονικά κύτταρα πρέπει να βρίσκονται επίσης σε αυτές τις θέσεις (Rombout *et al.*, 1993). Απομόνωση μη ειδικών κυτταροτοξικών ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων από την πέστροφα έδειξε ότι δεν δρουν με κυτταροτοξικά κοκκία όπως τα φυσικά φονικά κύτταρα των θηλαστικών (McMillan & Secombes, 1997).

## III. Βράγχια

Διάφοροι τύποι λευκοκυττάρων έχουν απομονωθεί από βράγχια των τελεόστεων όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Θεωρείται πως ενώ η κύρια λειτουργία των φαγοκυττάρων των βραγχίων είναι η σύλληψη ξένων ουσιών και η θανάτωση μολυσματικών παραγόντων που εισέρχονται μέσω του νερού, τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν και στην απομάκρυνση ξένων ουσιών από το αίμα (Leknes, 2002). Αν και δεν εντοπίζονται δενδριτικά κύτταρα στα βράγχια, τα μακροφάγα επεξεργάζονται και παρουσιάζουν το αντιγόνο στα λεμφοκύτταρα για την έναρξη ειδικών αποκρίσεων (Davidson *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998).

### 1.1.2.3 Έμφυτη χυμική βλεννογονική ανοσία

Η βλέννα που καλύπτει τα επιθήλια είναι ένα σύνθετο μίγμα μορίων που εκκρίνονται από τα καλυκοειδή κύτταρα και κυτταρικών συστατικών που απελευθερώνεται από εξαντλημένα επιφανειακά επιθηλιακά κύτταρα. Το κύριο συστατικό της βλέννας είναι η μουκίνη που αποτελείται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες.

Οι αμυντικοί χυμικοί παράγοντες, όπως και στην περίπτωση του αίματος (βλ. παρακάτω) , κατατάσσονται σε 4 γενικές κατηγορίες με βάση την επιρροή στα παθογόνα (Alexander & Ingram, 1992) :

1. Αναστολείς μικροβιακής αύξησης
2. Αναστολείς ενζύμων
3. Λυσίνες
4. Συγκολλητίνες/Ιζηματίνες
5. Φυσικά αντισώματα
6. Αντιμικροβιακά πεπτίδια

Αντιμικροβιακοί παράγοντες των παραπάνω κατηγοριών συμπεριλαμβανομένων της θρυψίνης, της λυσοζύμης, των λεκτινών, του συμπληρώματος, βρίσκονται στην βλέννα και στους βλεννογόνους ιστούς όπου λειτουργούν για να αποτρέψουν την προσκόλληση και την δημιουργία αποικιών παθογόνων μικροοργανισμών (Alexander & Ingram, 1992; Dalmo *et al.*, 1996).

Η λυσοζύμη έχει βρεθεί σε ιστούς και εκκρίσεις του εντέρου, του δέρματος και των βραγχίων (Alexander & Ingram, 1992; Magnadottir, 2006), όπου παράγεται από μακροφάγα, ουδετερόφιλα και μαστοκύτταρα/ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα (Murray & Fletcher, 1976).

Μια έρευνα για την δράση του συμπληρώματος στο δέρμα του σολομού του Ατλαντικού έναντι παρασίτων, έδειξε πως η ενεργότητα του είναι περίπου τα 1/20 αυτής του ορού. Επίσης ο οψωνισμός των παρασίτων με αντισώματα δεν ενίσχυσε την θανάτωσή τους, υποδεικνύοντας πως το συμπλήρωμα ενεργοποιείται μέσω της εναλλακτικής οδού (Harris *et al.*, 1998) ή μέσω της οδού των λεκτινών (Buchmann, 1998, 1999).

Η θρυψίνη έχει βρεθεί στην βλέννα και στα βλεννοπαραγωγά κύτταρα του δέρματος, των βραγχίων και του πρόσθιου εντέρου του σολομού και της σπιούρας (Hjelmeland *et al.*, 1983; Braun *et al.*, 1990).

Οι συγκολλητίνες και οι ιζηματίνες της βλέννας περιλαμβάνουν κυρίως τις λεκτίνες, όπως τις C τύπου, και τις πεντραξίνες.

Πηγές των φυσικών αντισωμάτων είναι η παθητική μεταφορά, η έκθεση σε περιβαλλοντικό αντιγόνο και η παραγωγή μέσω γονιδιακού ανασυνδυασμού χωρίς αντιγονικό ερέθισμα (Sinyakov *et al.*, 2002; Magnadottir, 2006). Το γεγονός ότι ειδικά αντισώματα παράγονται στις βλεννογονικές θέσεις υποδεικνύει ότι φυσικά αντισώματα μπορούν επίσης να βρεθούν σε αυτές τις περιοχές, δεδομένου ότι αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων.

Αντιμικροβιακά πεπτίδια έχουν περιγράψει στο δέρμα ενός αριθμού διαφορετικών ειδών ψαριών (Smith *et al.*, 2000; Ellis, 2001). Το πεπτίδιο πισκιδίνη έχει βρεθεί σε ένα μεγάλο εύρος ειδών και παράγεται στα βράγχια, το δέρμα, το στομάχι, το εντερικό επιθήλιο από μαστοκύτταρα/ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα και από κύτταρα rodlet (Cole *et al.*, 1997; Silphaduang *et al.*, 2006). Επίσης, πλευρικιδίνες ευρίσκονται στα κοκκία μουκίνης στο δέρμα και στα εντερικά καλυκοειδή κύτταρα αλλά και στα βραγχιακά νημάτια. Πολλά από τα αντιμικροβιακά πεπτίδια στις βλεννογόνους δεν είναι κλασικά αντιμικροβιακά πεπτίδια αλλά πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά κλάσματα που συμμετέχουν σε άλλες σημαντικές κυτταρικές και φυσιολογικές διαδικασίες. Για παράδειγμα, με την δημιουργία πηλγής, ένας καταρράκτης αντιδράσεων οδηγεί στην πρωτεόλυση της ιστόνης H2A (Cho *et al.*, 2002) και στην παραγωγή παρασίνης που εκκρίνεται στην βλεννογονική στιβάδα και καλύπτει το δέρμα (Cho *et al.*, 2002).

### 1.1.3. Επίκτητη βλεννογονική ανοσία

#### 1.1.3.1 Επαγωγή ειδικής ανοσίας

Η επαγωγή της ειδικής βλεννογονικής ανοσίας γίνεται με μηχανισμούς που απαντώνται σε ανώτερα ασπόνδυλα. Δηλαδή το αντιγόνο προσλαμβάνεται και αφού υποστεί επεξεργασία παρουσιάζεται από τα φαγοκύτταρα ώστε να ενεργοποιηθούν τα Β και Τ λεμφοκύτταρα. Στη συνέχεια τα Β κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται με την συμβολή των Τ βοηθητικών κυττάρων ώστε τελικά να παραχθούν αντισώματα από τελείως διαφοροποιημένα πλασματοκύτταρα (Miller *et al.*, 1998).

#### I. Δέρμα και βράγχια

Μέσα και κάτω από το επιθήλιο του δέρματος και των βραγχίων υπάρχουν φαγοκύτταρα και λευκοκύτταρα που θεωρείται ότι συμμετέχουν στην επαγωγή ειδικών αποκρίσεων (Lobb, 1987; Iger *et al.*, 1994; Davidson *et al.*, 1997) (Lin *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1998). Μελέτες στο λαβράκι έχουν δείξει πως ο εμβολιασμός με εμβύθιση οδηγεί σε μεγάλους αριθμούς πλασμοκυττάρων στα βράγχια χωρίς αντίστοιχη επίδραση στο έντερο ή στα συστηματικά όργανα (Dos Santos *et al.*, 2001b). Δηλαδή η ανάπτυξη της βλεννογονικής και της συστηματικής ανοσίας είναι σε ένα βαθμό διαμερισματοποιημένες, παρόλο που έρευνες έχουν δείξει πως υπάρχει κυτταρική επικοινωνία μεταξύ των θέσεων επαγωγής βλεννογονικής και συστηματικής ανοσίας έπειτα από ανοσοποίηση στην κάθε θέση (St. Louis-Cormier *et al.*, 1984; Rombout *et al.*, 1989; Cain *et al.*, 2000; Maki & Dickerson, 2003).

#### II. Γαστρεντερική οδός

Το οπίσθιο έντερο των τελεόστεων είναι η κύρια θέση της πρόσληψης αντιγόνων και τα εντεροκύτταρα σε αυτή την περιοχή μάλλον λειτουργούν όπως τα εξειδικευμένα μεμβρανώδη επιθηλιακά κύτταρα (Μ κύτταρα) του εντέρου των θηλαστικών (Davina *et al.*, 1982; Egberts *et al.*, 1985; Rombout & van den Berg, 1989; Rombout *et al.*, 1989). Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν αντιγόνα από το οπίσθιο έντερο κάτι που υποδεικνύει πως η θέση αυτή είναι η θέση επαγωγής της ειδικής βλεννογονικής ανοσίας (Rombout *et al.*, 1985; Dogget & Harris, 1991). Η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των διαμενόντων ή των μεταναστευόντων λεμφοκυττάρων μπορεί να γίνει τοπικά ή κεντρικά, με την μετανάστευσή τους στον πρόνεφρο και τον σπλήνα (Rombout & van den Berg, 1989).

#### 1.1.3.2 Τελεστές

Οι τελεστές της ειδικής ανοσίας είναι τα αντιγονοειδικά αντισώματα και τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα. Ωστόσο τα δεδομένα για τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα είναι λίγα (Nakanishi *et al.*, 2002).

#### Αντισώματα

Στους τελεόστεους, το κύριο αντίσωμα που βρίσκεται τόσο στη βλέννα όσο και στο αίμα είναι ένα τετραμερές IgM μοριακού βάρους 600-900 kDa, με κάθε μονομερή υπομονάδα να αποτελείται από δυο ελαφριές και δύο βαριές αλυσίδες (Wilson & Warr, 1992). Αν και συνήθως είναι τετραμερές σε φυσιολογικές συνθήκες, το αντίσωμα των ψαριών έχει έναν βαθμό δομικής ετερογένειας που δεν σχετίζεται με τις ισοτυπικές διαφορές (Bromage, 2006).

Έρευνες στον κυπρίνο (Rombout *et al.*, 2008) και το ψάρι puffer (Hamuro *et al.*, 2007) έδειξαν ότι υπάρχει έκφραση pIg υποδοχέα στο δέρμα και άλλες βλεννογονικές επιφάνειες, ο οποίος έχει λειτουργία στην έκκριση αντισωμάτων.

Εκτός όμως από το τετραμερές IgM, νέοι ισότυποι έχουν ανακαλυφθεί πρόσφατα. Αυτοί περιλαμβάνουν τα IgD αντισώματα στο σολομό, το μπακαλιάρο και σε άλλα ψάρια, καθώς και τα IgZ και IgT αντισώματα στο ψάρι ζέβρα και την πέστροφα αντίστοιχα (Bromage, 2006), που φαίνεται να συμμετέχουν στην βλεννογονική ανοσία.

Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν πως τα αντισώματα της βλέννας παράγονται τοπικά (Lobb & Clem, 1981a, b; Lobb, 1987; Rombout *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1996; Cain *et al.*, 2000; Maki & Dickerson, 2003).

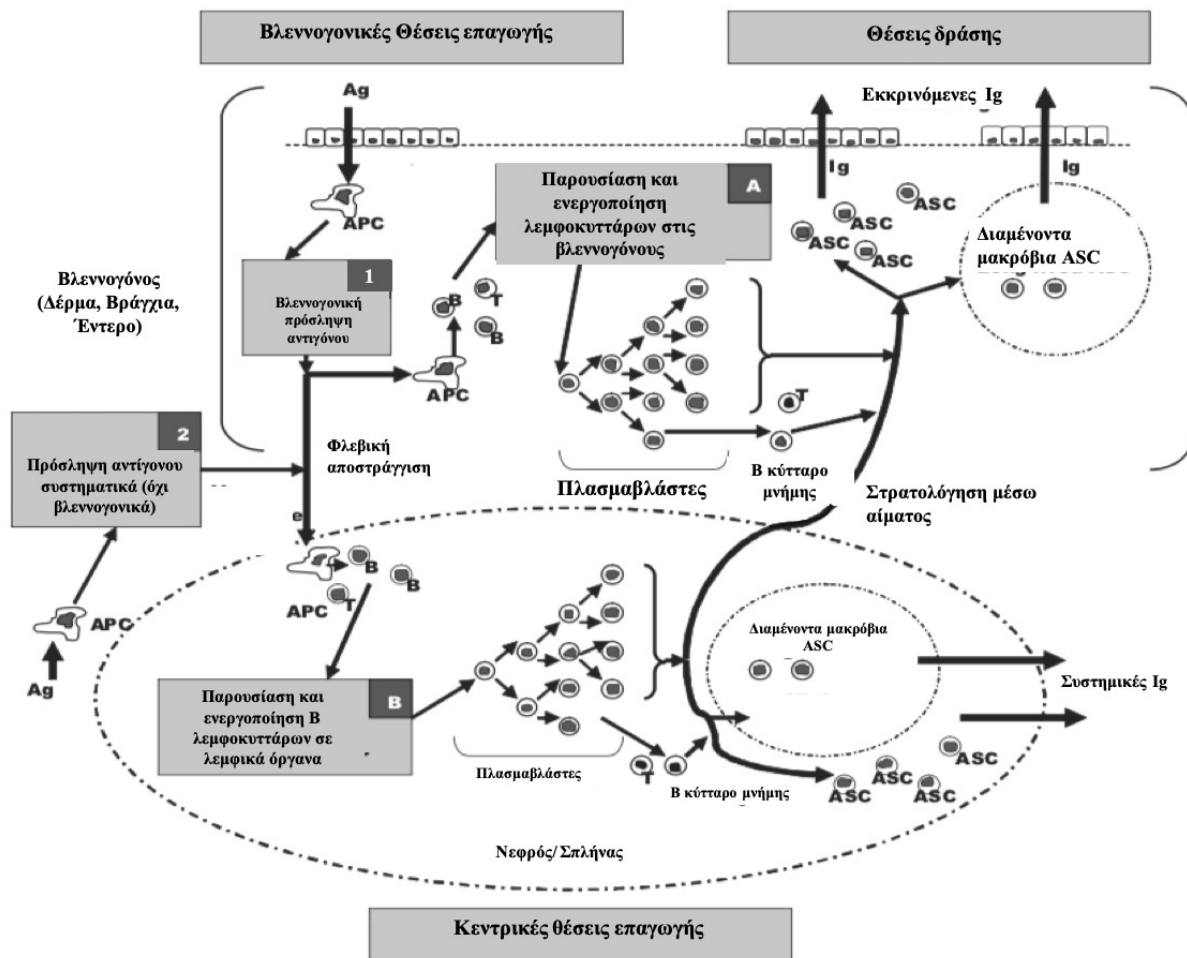
### 1.1.3.3 Διαφοροποίηση B λεμφοκυττάρων στους βλεννογονικούς ιστούς

Είναι πιθανό λεμφοκύτταρα και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που βρίσκονται κάτω από τις επιφάνειες επαφής με αντιγόνα, να λειτουργούν ως πρωταρχική θέση για την παρουσίαση των αντιγόνων στα B λεμφοκύτταρα και κατ'επέκταση ως η πρωταρχική θέση για την διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό B λεμφοκυττάρων μνήμης. Τα B λεμφοκύτταρα των ψαριών φαίνεται να έχουν φαγοκυτταρικές και μικροβιοκτόνες ικανότητες που δεν παρατηρούνται στα αντίστοιχα κύτταρα των θηλαστικών (Jun *et al.*, 2006), υποδηλώνοντας πως συμμετέχουν ενεργά στην έναρξη της ανοσολογικής αντίδρασης.

Στα ψάρια δεν είναι γνωστό αν υπάρχει ωρίμανση συγγένειας και σωματικές υπερμεταλλάξεις, αλλά πρόσφατες αναφορές δείχνουν πως μέτριες αυξήσεις της συγγένειας των αντισωμάτων συμβαίνουν στα αντισώματα IgM της πέστροφας και των IgNAR των καρχαριών ύστερα από ανοσοποίηση με μοντέλο αντιγόνου (Cain *et al.*, 2002; Kaattari, 2002; Dooley, 2006).

Ακόμη η ανίχνευση έκφρασης του ενζύμου AID- επαγόμενη από ενεργοποίηση απαμινάση της κυτιδίνης (activation-induced cytidine deaminase) στο δέρμα του γατόψαρου, ενός ενζύμου απαραίτητου για τις σωματικές υπερμεταλλάξεις και την διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων στα θηλαστικά, υποδεικνύει την τοπική ωρίμανση των B λεμφοκυττάρων στο δέρμα του γατόψαρου (Saunders & Magor, 2004).





**Εικόνα 4.** Στοιχεία της ειδικής βλεννογονικής χυμικής ανοσίας στους τελεόστεους. Ag: αντιγόνο, Ig: ανοσοσφαιρίνη, APC: αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο, ASC: κύτταρο που εκκρίνει αντισώματα, B: B λεμφοκύτταρο, T: T λεμφοκύτταρο (Dickerson, 2009).

#### 1.1.3.4 Ανοσολογική μνήμη

Τα ενεργοποιημένα B λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε πληθυσμούς B κυττάρων μνήμης και κυττάρων που εκκρίνουν αντισώματα τα οποία περιλαμβάνουν πλασμοβλάστες, βραχύβια πλασματοκύτταρα και μακρόβια πλασματοκύτταρα. Τα μακρόβια πλασματοκύτταρα και τα B κύτταρα μνήμης παρέχουν την χυμική ανοσολογική μνήμη (Bernasconi *et al.*, 2002; Gourley *et al.*, 2004). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν πως υποπληθυσμοί λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν αντισώματα βρίσκονται στον πρόνεφρο της πέστροφας (Bromage *et al.*, 2004b). Τα κύτταρα αυτά συσσωρεύονται στον ιστό και μπορούν να εκκρίνουν αντισώματα ακόμη και 35 εβδομάδες μετά την ανοσοποίηση. Στο σπλήνα και το περιφερικό αίμα δεν βρέθηκαν μακρόβια αλλά βραχύβια πλασματοκύτταρα.

#### 1.1.3.5 Βλεννογονική ανοσία και εμβόλια

Εμβόλια με εμβύθιση εναντίον παθογόνων που εισέρχονται μέσω των βραγχίων και του δέρματος είναι αποτελεσματικά, όταν παράγονται αντισώματα που μπλοκάρουν την είσοδο παθογόνων και τον εποικισμό. Μετά από ανοσοποίηση με *Photobacterium damsela* υποδείδος *riscicida* (πρώην *Pasteurella apiscicida*) μέσω εμβύθισης στο λαβράκι, τα βράγχια ήταν η κύρια θέση παραγωγής

πλασματοκυττάρων, που υποδεικνύει ότι προστατευτικά αντισώματα παράγονται τοπικά (Dos Santos *et al.*, 2001b; Barnes *et al.*, 2005).

#### 1.1.4. Έμφυτη συστηματική χυμική ανοσία

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω για την περίπτωση της βλέννας, έτσι και στην συστηματική ανοσία οι αμυντικοί χυμικοί παράγοντες, κατατάσσονται σε 6 γενικές κατηγορίες με βάση την επίδρασή τους στα παθογόνα (Alexander & Ingram, 1992):

1. Αναστολείς μικροβιακής αύξησης
2. Αναστολείς ενζύμων
3. Λυσίνες
4. Συγκολλητίνες/Ιζηματίνες
5. Φυσικά αντισώματα
6. Αντιμικροβιακά πεπτίδια

##### 1.1.4.1 Αναστολείς μικροβιακής αύξησης

Οι ουσίες αυτές δρουν είτε εμποδίζοντας την πρόσβαση των μικροοργανισμών σε θρεπτικά στοιχεία είτε παρεμβαίνοντας στον μεταβολισμό τους (Roberts, 2012b).

###### I. Τρανσφερίνη

Απαντάται στον ορό όλων των σπονδυλωτών συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών. Εμφανίζει μεγάλη προσδετική ικανότητα για τον σίδηρο, και έτσι παρεμποδίζοντας την πρόσβαση των μικροοργανισμών στο σίδηρο, εμφανίζει βακτηριοστατική δράση. Οι μικροοργανισμοί παράγουν δικά τους σιδηροφόρα που ανταγωνίζονται με την τρανσφερίνη για τον σίδηρο (Roberts, 2012b).

###### II. Ιντερφερόνες

Οι ιντερφερόνες παράγονται ως επαγωγή σε ιική λοίμωξη και ενεργοποιούν κατάντη αντιϊούς μηχανισμούς όπως η επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης Mx γονιδίων (Roberts, 2012b).

##### 1.1.4.2 Αναστολείς ενζύμων

Τα παθογόνα παράγουν μια σειρά ενζύμων για να εισέλθουν στον ξενιστή και να αποκτήσουν θρεπτικά από αυτόν. Έτσι, οι ενζυμικοί αναστολείς στα σωματικά υγρά των σπονδυλωτών που προστατεύουν από την πέψη των ιδίων συστατικών, μπορεί να διαδραματίζουν και σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση μικροβιακών ενζύμων. Τέτοιοι αναστολείς περιλαμβάνουν τις αντιπροτεάσες με κυριότερη την περισσότερο μη ειδική α-2-μακροσφαιρίνη (Roberts, 2012b).

##### 1.1.4.3 Λυσίνες

Οι λυσίνες είναι ένζυμα που είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, προκαλούν λύση των κυττάρων των παθογόνων (Roberts, 2012b).

## I. Συμπλήρωμα

Το συμπλήρωμα είναι από τις πιο σημαντικές λυσίνες γιατί εμφανίζει πολλαπλούς ρόλους με την εκκαθάριση ξένων συστατικών, την επαγωγή φλεγμονώδους αγγειοδιαστολής, την χημειοτακτική προσέλκυση λευκοκυττάρων, την προαγωγή της πέψης από τα φαγοκύτταρα και την λύση των μικροβιακών κυττάρων.

Το συμπλήρωμα είναι ένας ενζυμικός καταρράκτης που αποτελείται από περισσότερες από 30 πρωτεΐνες και εμφανίζει πολλές ομοιότητες μεταξύ ψαριών και θηλαστικών (Boshra *et al.*, 2006) αλλά το συμπλήρωμα των ψαριών είναι πιο θερμοευαίσθητο.

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος γίνεται μέσω τριών οδών. Η κλασική οδός, απαιτεί την παρουσία αντισωμάτων στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου, ώστε στη συνέχεια να ενεργοποιηθεί το συμπλήρωμα μέσω των παραγόντων C1q, C1r και C1s. Η εναλλακτική οδός αρχίζει με την πρόσδεση του παράγοντα C3 στις μικροβιακές επιφάνειες όπου αλληλεπιδρά με τον παράγοντα B για την έναρξη του ενζυμικού καταρράκτη. Η τρίτη οδός είναι η οδός των λεκτινών κατά την οποία η πρόσδεση λεκτινών, όπως της λεκτίνης που προσδένει μαννόζη (MBL) στη μικροβιακή επιφάνεια ενεργοποιεί ένζυμα που σχετίζονται με λεκτίνες και οδηγεί σε πορεία καταρράκτη παρόμοια με αυτήν της κλασικής οδού. Το τελικό αποτέλεσμα όλων των οδών ενεργοποίησης είναι η δημιουργία του συμπλέγματος μεμβρανικής επίθεσης που μπορεί να προκαλέσει λύση των μικροβιακών κυττάρων (Roberts, 2012b).

## II. Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη δρα στο πεπτιδοκάλυκα του βακτηριακού τοιχώματος των μικροοργανισμών, και ενώ μπορεί να προκαλέσει απευθείας λύση, στις περισσότερες περιπτώσεις η εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου πρέπει να έχει πρώτα διαταραχθεί από το συμπλήρωμα. Η λυσοζύμη ανιχνεύεται σε φαγοκυτταρικά κύτταρα, στον ορό και στην βλέννα και είναι πιο ενεργή από ότι η λυσοζύμη ανώτερων σπονδυλωτών (Yousif *et al.*, 1994; Roberts, 2012b).

### 1.1.4.4 Συγκολλητίνες και ιζηματίνες

#### I. Πεντραξίνες

Οι πεντραξίνες είναι πενταμερικές πρωτεΐνες αναγνώρισης μοτίβου, απαραίτητα συστατικά της οξείας φάσης ως απόκριση σε λοίμωξη ή τραύμα. Οι πιο γνωστές πεντραξίνες είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) που προσδέεται σε μικροβιακά τοιχώματα και το P αμυλοειδές του ορού (SAP) που προσδέεται φωσφοεθανολαμίνη, γλυκάνες και DNA. Η έκφραση των πεντραξινών μπορεί να αυξηθεί σημαντικά σε λοιμωξιακά μοντέλα (Raida & Buchmann, 2009) και λειτουργούν με την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την απομάκρυνση αποπτωτικών κυττάρων (Roberts, 2012b).

#### II. Λεκτίνες

Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες που μπορούν να δεσμεύουν συγκεκριμένα σάκχαρα και ταξινομούνται με βάση την δομή τους σε διάφορες οικογένειες, με τις C και F τύπου λεκτίνες να κυριαρχούν στα ψάρια. Οι λεκτίνες έχουν συγκολλητική ή ιζηματική δραστηριότητα για ένα εύρος ερυθροκυττάρων, βακτηρίων και πολυσακχαριτών. Εκτός από την εκκρινόμενη μορφή, μπορεί να βρεθούν και προσδεδεμένα στην μεμβράνη λευκοκυττάρων λειτουργώντας ως υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (Roberts, 2012b).

#### 1.1.4.5 Αντιμικροβιακά πεπτίδια

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι μικρού μοριακού βάρους κατιονικές πρωτεΐνες που παράγονται συνήθως από επιθηλιακά κύτταρα, στο συκώτι, σε λεμφοειδείς ιστούς ή από φαγοκύτταρα, είτε συνεχώς είτε επαγόμενα από ξένα συστατικά. Είναι πιθανόν οι βλεννογονικές επιφάνειες και οι εσωτερικοί ιστοί, επειδή αντιμετωπίζουν διαφορετικές προκλήσεις, να εκφράζουν διακριτές σειρές αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Τα περισσότερα αντιμικροβιακά πεπτίδια θανατώνουν τους στόχους τους με την αποσταθεροποίηση της πολικότητας και της διαπερατότητας του εξωτερικού βακτηριακού τοιχώματος ενώ άλλα διαταράσσουν τον κυτταρικό μεταβολισμό ή παρεμβαίνουν στην σύνθεση του DNA (Devine & Hancock, 2002; Zasloff, 2002). Η ανοσολογική δράση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων περιλαμβάνει την απολύμανση των εκτεθειμένων επιφανειών όπως του ματιού, του εντέρου και της ουρογεννητικής οδού αλλά και την θανάτωση βακτηρίων που εισέρχονται στο σώμα μέσω τραυμάτων, αποτρέποντας την ανάπτυξή τους μέχρι να εξαλειφθούν από τα φαγοκύτταρα και άλλα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος. Πολύ λίγα έχουν κυτταροτοξικές επιδράσεις σε ευκαρυωτικά κύτταρα γιατί επιτίθενται σε βακτηριακούς στόχους που έχουν διαφορετική σύσταση από αντίστοιχους στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Συνήθως συντίθενται ως προπεπτίδια που μπορεί να αποθηκεύονται σε ενδοκυτταρικά κοκκία πριν να υποστούν πρωτεολυτική επεξεργασία για την απελευθέρωση ενεργών πεπτιδίων.

Στα ψάρια, τα ηπατοεκφραζόμενα αντιμικροβιακά πεπτίδια (1 –εψιδίνη- και 2) και οι ντιφενσίνες θεωρούνται καθολικά. Τα ηπατοεκφραζόμενα αντιμικροβιακά πεπτίδια (μπορούν να βρεθούν και σε άλλους ιστούς) επάγονται κατά την λοίμωξη και λειτουργούν στους ομοιοστατικούς μηχανισμούς του σιδήρου. Οι ντιφενσίνες των τελεόστεων δρουν αντιβακτηριακά αλλά και αντικά.

Άλλες οικογένειες αντιμικροβιακών πεπτιδίων στα ψάρια είναι οι πισκιδίνες που εμφανίζονται σε ανώτερους τελεόστεους (όπως τα περκόμορφα), και εμφανίζουν αντιβακτηριακή, αντική, αντιμυκητιακή και αντιπαρασιτική δράση, και οι καθελικιδίνες που έχουν βρεθεί μόνο στα σαλμονοειδή και στα γαδοειδή, και αυξάνονται ως απόκριση σε λοίμωξη και από μερικές κυτταροκίνες (Roberts, 2012b). Επίσης οι πλευροκιδίνες εμφανίζονται με πολλαπλές ισομορφές σε διάφορα πλατύψαρα (Patrzykat *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2003).

Για τα αντιμικροβιακά πεπτίδια στις βλεννογονικές επιφάνειες έγινε αναφορά στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Όσον αφορά τα αντιμικροβιακά πεπτίδια των εσωτερικών ιστών στα ψάρια, τα περισσότερα μελετημένα είναι η εψιδίνη και λοιπά κυρίως ηπατοεκφραζόμενα πεπτίδια που όμως τα επίπεδα τους σε άλλους ιστούς όπως ο σπλήνας, ο πρόνεφρος, το αίμα ή οι γονάδες, μπορεί να αυξηθούν έπειτα από ανοσοποίηση (Bao *et al.*, 2005; Bao *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007). Οι καθελικιδίνες εκφράζονται κυρίως σε λεμφοειδείς ιστούς.

#### 1.1.5. Έμφυτη συστηματική κυτταρική ανοσία

##### 1.1.5.1 Φαγοκύτταρα

Δύο τύποι κυττάρων είναι εξειδικευμένα φαγοκύτταρα: τα μονοκύτταρα ή μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα (Secombes, 1996). Τα Β λεμφοκύτταρα έχουν επίσης επιδειξει φαγοκυτταρική δράση στα ψάρια (Li *et al.*, 2006; Roberts, 2012b).

##### I. Μακροφάγα

Τα μακροφάγα στους τελεόστεους είναι διάσπαρτα στους ιστούς αλλά ευρίσκονται κυρίως ως δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα στο νεφρό και τον σπλήνα αλλά και στην καρδιά. Τα ψάρια δεν διαθέτουν αντίστοιχα κύτταρα με τα κύτταρα Kupffer των θηλαστικών στο συκώτι.

Τα μονοκύτταρα απαντώνται κυρίως στο νεφρό και σε μικρό αριθμό στο αίμα (περίπου 0,1%), αν και ο αριθμός τους αυξάνεται για περίπου 48 ώρες έπειτα από την εισαγωγή ξένου υλικού. Θεωρούνται πρόδρομες μορφές των ιστικών μακροφάγων, αφού έχουν την δυνατότητα να μεταναστεύουν μέσω του αίματος στις περιοχές όπου εκδηλώνεται η φλεγμονή, και να διαφοροποιούνται σε μακροφάγα όταν και όπου πρέπει.

Πολλά μακροφάγα περιέχουν μελανίνη μέσα στα λυσοσώματα, και ορίζονται ως μελανο-μακροφάγα. Ο ρόλος της μελανίνης δεν είναι πλήρως κατανοητός αλλά μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στους βακτηριοκτόνους μηχανισμούς και στην παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου. Οι λειτουργικοί ρόλοι των μακροφάγων περιλαμβάνουν την φαγοκύτωση, την χημειοταξία, την βακτηριοκτόνο δράση μέσω της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου, την παραγωγή κυτταροκινών όπως IL-1, και την επεξεργασία και την παρουσία αντιγόνου (Ganassin & Bols, 1998). Τα κύτταρα που μοιάζουν με μονοκύτταρα από καλλιέργειες μακροφάγων του νεφρού έχουν σημαντικά μεγαλύτερη βασική έκρηξη ριζών οξυγόνου από ότι τα ώριμα μακροφάγα (Stafford *et al.*, 2001). Αντίθετα, η απόκριση των μακροφάγων είναι ανάλογη του χρόνου που έρχονται σε επαφή με τον ενεργοποιητικό παράγοντα (Neumann *et al.*, 2000).

Η αναγνώριση των παθογόνων από τα μακροφάγα γίνεται μέσω μοριακών προτύπων που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs) (Medzhitov, 2001). Αυτά είναι ειδικά για τα παθογόνα, είναι απαραίτητα για την επιβίωσή τους και δεν εμφανίζουν μεγάλη δομική ποικιλομορφία. Τέτοια πρότυπα είναι οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) για τα Gram- βακτήρια και το δίκλωνο RNA για τους ιούς. Τα πρότυπα αυτά αναγνωρίζονται από υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου που διακρίνονται σε εκκρινόμενους, που λειτουργούν συνήθως ως οψωνίνες ή ενεργοποιητές του συμπληρώματος, σε ενδοκυτταρικούς, που προσδένουν παθογόνα και λειτουργούν στην φαγοκύτωση, και σε σηματοδοτικούς που ενεργοποιούν μηχανισμούς γονιδιακής έκφρασης που ενεργοποιούν τα κύτταρα. Στους υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου ανήκουν:

- Λεκτίνες. Πολλές από τις λεκτίνες που συμμετέχουν στην αναγνώριση και την αδρανοποίηση των παθογόνων είναι μέλη των λεκτινών C-τύπου ή των ασβεστιοεξαρτώμενων λεκτινών (Weis *et al.*, 1998). Δύο είναι οι κύριες ομάδες μεταξύ αυτών. Οι κολλεκτίνες - πρωτεΐνες που δεσμεύουν μαννόζη (Drickamer & Taylor, 1993), που δρουν μέσω του συμπληρώματος, και ο υποδοχέας μαννόζης που προωθεί την φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών (Ross, 1989; Ezekowitz *et al.*, 1990).
- Υποδοχείς συμπληρώματος, που αναγνωρίζουν οψωνισμένα παθογόνα μέσω του υποδοχέα CR3 (Wright *et al.*, 1983).
- Υποδοχέας εκκαθαριστής, που συμμετέχει στην άμυνα του οργανισμού με την εκκαθάριση ξένων προϊόντων (Haworth *et al.*, 1997).
- CD14, που αναγνωρίζει τους βακτηριακούς LPS (Wright, 1995)
- Υποδοχείς τύπου Toll, που συμμετέχουν και στην έναρξη και την μεταγωγή ενδοκυτταρικών σημάτων που επάγουν έμφυτους ανοσολογικούς μηχανισμούς (Medzhitov, 2001).
- Λοιποί υποδοχείς προτύπου PRR αποτελούν οι υποδοχείς που μοιάζουν με το επαγόμενο γονίδιο I του ρετινοϊκού οξέος (RIG-I-like, RLRs) και οι υποδοχείς που μοιάζουν με την περιοχή ολιγομερισμού που προσδένει νουκλεοτίδια (NOD-like, NLRs) (Roberts, 2012b).

## II. Ουδετερόφιλα

Τα ουδετερόφιλα των ψαριών έχουν πολλά κοινά μορφολογικά και ιστοχημικά χαρακτηριστικά με τα ουδετερόφιλα των θηλαστικών και διακρίνονται από την παρουσία μυελοπεροξειδάσης στα κυτταροπλασματικά κοκκία. Απαντώνται στο νεφρό, στο σπλήνα, στο αίμα και σε φλεγμονώδεις περιοχές. Τα ουδετερόφιλα στο αίμα των ψαριών ευρίσκονται περίπου στις ίδιες ποσότητες, αλλά αποτελούν πολύ μικρότερο ποσοστό του συνολικού πληθυσμού λευκοκυττάρων (περίπου 6-8% σε σχέση με τα 60-70% των θηλαστικών). Ως απόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα, γίνεται απελευθέρωση των ουδετερόφιλων στο αίμα (ουδετεροφιλία) από το νεφρό και τον σπλήνα. Τα

ουδετερόφιλα εκδηλώνουν φαγοκυτταρική, χημειοτακτική και βακτηριοκτόνο δράση (Secombes, 1996). Είναι ικανά για έντονη αναπνευστική έκρηξη όταν έρχονται σε επαφή με παθογόνα (Lamas & Ellis, 1994; Roberts, 2012b).

### III. Ενεργοποίηση φαγοκυττάρων

Η φαγοκυτταρική δράση των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων μπορεί να ενισχυθεί από οψωνίνες και από κυτταροκίνες. Οι οψωνίνες δρουν μη ειδικά στην περίπτωση του συμπληρώματος, των λεκτινών και της CRP και ειδικά στην περίπτωση των αντισωμάτων. Γενικά το αντίσωμα των ψαριών φαίνεται να έχει χαμηλή οψωνιστική δράση αλλά σε συνδυασμό με το συμπλήρωμα, ο οψωνισμός ενισχύεται λόγω της ενεργοποίησης της κλασικής οδού (Secombes, 1996). Οι κυτταροκίνες μπορούν να προσελκύσουν τα φαγοκύτταρα στην θέση της φλεγμονής όπως φαίνεται με τις χημοκίνες και τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες όπως η IL-1β, ο TNF-α και η IL-6. Οι κυτταροκίνες που λειτουργούν κατά τις ειδικές αποκρίσεις ενεργοποιούν τα φαγοκύτταρα όπως η IFN-γ και οι IL-17/IL-22 (Secombes *et al.*, 2009; Roberts, 2012b).

#### 1.1.5.2 Φυσικά κυτταροτοξικά κύτταρα (NCC)

Κύτταρα παρόμοια με τα φυσικά φονικά (NK) κύτταρα των θηλαστικών έχουν βρεθεί στα ψάρια και έχουν χαρακτηριστεί ως φυσικά κυτταροτοξικά κύτταρα (NCC) που μοιάζουν μορφολογικά με μη κοκκιώδη λεμφοκύτταρα ή μονοκύτταρα και εκφράζουν περφορίνη και κοκκιολυσίνη. Συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσία (Connor *et al.*, 2008) χωρίς να είναι πλήρως ξεκαθαρισμένος ο ρόλος τους αν και μία οικογένεια νέων υποδοχέων ανοσολογικού τύπου στα ψάρια θεωρείται ομόλογος με τον υποδοχέα των NK κυττάρων των θηλαστικών (Yoder, 2009).

#### 1.1.5.3 Ηωσινόφιλα

Η βιβλιογραφία σχετικά με την παρουσία και την φύση των ηωσινόφιλων κυττάρων στα ψάρια δεν δίνει ξεκάθαρα συμπεράσματα. Γενικά αναφέρονται σπάνια στο αίμα των ψαριών και οι περισσότερες περιγραφές αφορούν τα ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα του δέρματος και του εντέρου που είναι σχεδόν σίγουρα διακριτά από τα πραγματικά ηωσινόφιλα (Dezfuli & Giari, 2008). Το μόνο κριτήριο για την ταυτοποίηση των ηωσινοφιλικών κυττάρων στα ψάρια είναι η παρουσία σχετικά μεγάλων ηωσινοφιλικών κυτταροπλασματικών κοκκίων. Τα ηωσινόφιλα των ψαριών έχουν συσχετιστεί με την φλεγμονή ενώ υπάρχουν και αναφορές φαγοκυτταρικής δραστηριότητας.

#### 1.1.5.4 Βασεόφιλα και μαστοκύτταρα

Η παρουσία βασεόφιλων στα ψάρια υποστηρίζεται από κάποιους ερευνητές και από άλλους αμφισβητείται (Ellis, 1977). Δεν έχει προσδιοριστεί η δράση τους σε κανέναν αμυντικό μηχανισμό των ψαριών. Από την άλλη, κύτταρα που ορίζονται ως μαστοκύτταρα έχουν ταυτοποιηθεί με βάση τα κοινά τους χαρακτηριστικά με τα μαστοκύτταρα των θηλαστικών (μαστοκύτταρα/ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα όπως αναλύθηκαν παραπάνω).

## 1.2. Φλεγμονή

Όταν ένα παθογόνο εισβάλλει στον ξενιστή, εκτός από τους αμυντικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω, συναντά και μία πολύπλοκη ενορχηστρωμένη απόκριση του ξενιστή, με την συμβολή πολλών χυμικών και κυτταρικών παραγόντων, την φλεγμονώδη αντίδραση. Τα κύρια χαρακτηριστικά

της οξείας φλεγμονής είναι η αγγειοδιαστολή και η χημειοτακτική εισροή λευκοκυττάρων από το αίμα στην θέση φλεγμονής, και είναι ίδια μεταξύ ψαριών και θηλαστικών. Η κυτταρική απόκριση εκδηλώνεται σε δύο φάσεις, αρχικά με την αύξηση του αριθμού των ουδετερόφιλων στην περιοχή, λόγω της μετανάστευσής τους από τα αγγεία, και έπειτα με την εμφάνιση των μονοκύτταρων και των μακροφάγων (Roberts, 2012b).

### 1.2.1. Έλεγχος της φλεγμονής

Η φλεγμονή επάγεται και ελέγχεται από έναν αριθμό μεσολαβητών. Οι μεσολαβητές που δρουν γρήγορα, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι αγγειοενεργές αμίνες ξεκινούν την διαδικασία, ενώ αργότερα παράγοντες όπως εικοσανοειδή και κυτταροκίνες προσελκύουν και ενεργοποιούν λευκοκύτταρα. Τα λευκοκύτταρα μετά την άφιξη τους απελευθερώνουν τα ίδια μεσολαβητές που ρυθμίζουν την διαδικασία (Secombes, 1996; Roberts, 2012b).

#### 1.2.1.1 Συμπλήρωμα

Τα ψάρια διαθέτουν τα συστατικά του συμπληρώματος C3 και C5 που διασπώνται στα αναφυλακτικά στοιχεία C3a και C5a, που προάγουν την απελευθέρωση αγγειοενεργών αμινών από τα ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα/μαστοκύτταρα και πιθανόν και από θρομβοκύτταρα. Επίσης ο παράγων C5a είναι ισχυρά χημειοτακτικός για τα ουδετερόφιλα (Roberts, 2012b).

#### 1.2.1.2 Εικοσανοειδή

Τα εικοσανοειδή είναι μια ομάδα μεσολαβητών που προέρχονται από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το αραχιδονικό οξύ. Απελευθερώνονται από τα κύτταρα αμέσως μετά την επαγόμενη σύνθεσή τους. Περιλαμβάνουν τις προσταγλανδίνες, τις θρομβοξάνες, τα λευκοτριένια και τις λιποξίνες. Είναι γνωστό ότι οι παραπάνω μεσολαβητές μπορούν να απελευθερωθούν από τα λευκοκύτταρα των ψαριών όπως τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα αλλά και θρομβοκύτταρα (Rowley *et al.*, 1995).

Τα λευκοτριένια και οι λιποξίνες ενισχύουν την φαγοκυττάρωση και είναι ισχυρά χημειοτακτικά προσελκυστικά για τα ουδετερόφιλα των ψαριών. Οι προσταγλανδίνες αλληλεπιδρούν με τις αγγειοενεργές αμίνες για να επάγουν την αγγειοδιαστολή και την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα αλλά μειώνουν έναν αριθμό κυτταρικών αποκρίσεων όπως την έκρηξη ριζών οξυγόνου των μακροφάγων, τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων (Secombes, 1996; Roberts, 2012b).

#### 1.2.1.3 Κυτταροκίνες

Ένας αριθμός κυτταροκινών συμμετέχουν στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις των ψαριών. Αυτές περιλαμβάνουν τις IL-1, TNF- $\alpha$  και IL-6 που στα θηλαστικά σχηματίζουν έναν καταρράκτη προφλεγμονοδών κυτταροκινών ως απόκριση σε λοίμωξη. Η IL-1 απελευθερώνεται από αρκετούς κυτταρικούς τύπους στα ψάρια, συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων, των μακροφάγων, των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, και επάγει την δική της έκφραση αλλά και της IL-6 και της COX-2. Η IL-6 επίσης εκφράζεται στα παραπάνω κύτταρα και επάγει την έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων όπως η επιδίνη και η καθελικιδίνη. Διάφορες χημοκίνες επίσης απελευθερώνονται, όπως η IL-8 (CXCL8) που προσελκύει και ενεργοποιεί ουδετερόφιλα.

Κυτταροκίνες συμμετέχουν επίσης και στην καταστολή των γεγονότων φλεγμονής για την πρόληψη της κυτταρικής βλάβης και της αυτοανοσίας. Για παράδειγμα η παραγωγή του TGF- $\beta$ 1 από μακροφάγα ψαριών έχει αντι-φλεγμονώδη δράση (Haddad *et al.*, 2008; Roberts, 2012b).

## 1.3. Ειδική συστηματική ανοσία

### 1.3.1. Λεμφοκύτταρα

Τα λεμφοκύτταρα είναι απαραίτητα για την έναρξη και την διαμεσολάβηση τριών πτυχών της ειδικής ανοσίας, της χυμικής ανοσίας, της κυτταρικής ανοσίας και της ανοσολογικής μνήμης. Τα λεμφοκύτταρα μπορούν να βρεθούν στην κυκλοφορία, στα λεμφικά όργανα και σε άλλους ιστούς ιδιαίτερα κατά την διάρκεια γεγονότων φλεγμονής. Στα ψάρια τα λεμφοκύτταρα αποτελούν το 20 έως και το 99% του συνολικού λευκοκυττάρων στο αίμα. Υπάρχουν δύο διακριτικοί πληθυσμοί λεμφοκυττάρων ειδικής ανοσίας. Τα Β λεμφοκύτταρα που είναι υπεύθυνα για την χυμική ειδική ανοσία μέσω της παραγωγής ανοσοσφαιρινών-αντισωμάτων και τα Τ λεμφοκύτταρα που είναι υπεύθυνα για την κυτταρομεσολαβούμενη ειδική ανοσία και περιλαμβάνουν τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CD8+), τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (CD4+) και τα κατασταλτικά Τ λεμφοκύτταρα.

Τα λεμφοκύτταρα είναι παρόντα στο κυκλοφορούν αίμα και την λέμφο και απαντώνται σε όλα τα κύρια λεμφικά όργανα των ψαριών (θύμος αδένας, νεφρός και σπλήνας) αλλά και στις βλεννογόνους των ψαριών (δέρματος, βραγχίων και εντέρου) όπου ο αριθμός τους μπορεί να αυξηθεί σημαντικά κάτω από συγκεκριμένες παθολογικές ή φυσιολογικές περιπτώσεις (Davidson *et al.*, 1993a, b; Davidson *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2010).

Τα κύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα διακρίνονται σε δύο τουλάχιστον τύπους στα ψάρια: τους πλασμαβλάστες και τα πλασματοκύτταρα (Bromage *et al.*, 2004a; Zwollo *et al.*, 2005) με διαφορετικές λειτουργίες. Οι πλασμαβλάστες ορίζονται ως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα που εκκρίνουν αντισώματα και διατηρούν ένα ποσοστό έκφρασης μεμβρανικών ανοσοσφαιρινών (Martin & Kearney, 2000; Sze *et al.*, 2000; Wehrli *et al.*, 2001). Τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος μπορούν να παράγουν μόνο πλασμαβλάστες (Bromage *et al.*, 2004a) πιθανώς λόγω της έλλειψης κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος για την διατήρηση τελικώς διαφοροποιημένων πλασματοκυττάρων, τα οποία έχουν σαν κύρια λειτουργία την έκκριση μεγάλων ποσοτήτων ειδικών αντισωμάτων (Shapiro-Shelef & Calame, 2005), σε διπλάσιες ποσότητες από ότι εκκρίνουν οι πλασμαβλάστες στον ίδιο χρόνο (Zwollo *et al.*, 2005).

Ένα πιθανό μοντέλο για την κυκλοφορία των Β λεμφοκυττάρων στους τελεόστεους είναι ότι τα Β κύτταρα που εκφράζουν μεμβρικές ανοσοσφαιρίνες (mIgM+ Β κύτταρα) συναντούν αντιγόνα στην περιφέρεια και ξεκινούν την εσωτερίκευση και την επεξεργασία του αντιγόνου. Έπειτα, κινούνται σε δευτερογενείς λεμφικούς ιστούς όπως ο σπλήνας και το οπίσθιο νεφρό όπου παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα Τ λεμφοκύτταρα και λαμβάνουν δευτερεύουσα σηματοδότηση μέσω κυτταροκινών για να εκκινήσουν τον πολλαπλασιασμό και την έκκριση αντισωμάτων. Οι πλασμαβλάστες στη συνέχεια κινούνται στον πρόνεφρο όπου μετατρέπονται σε βραχύβια ή μακρόβια πλασματοκύτταρα (Davidson *et al.*, 1992; Davidson *et al.*, 1997; Shaffer *et al.*, 2002).

### 1.3.2. Λεμφικά όργανα

#### 1.3.2.1 Θύμος αδένας

Στα ανώτερα σπονδυλόζωα, ο θύμος έχει έναν εξειδικευμένο ρόλο ως πρωτογενές λεμφικό όργανο στο οποίο τα Τ λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται και ωριμάζουν ώστε να αφήσουν το όργανο και να συμμετάσχουν στις ανοσολογικές αποκρίσεις σε περιφερικά λεμφικά όργανα και ιστούς.

Στα ψάρια είναι ένα δίλοβο όργανο που εμφανίζει πολλές ομοιότητες με τον θύμο αδένων των θηλαστικών, με την παρουσία κυρίως λεμφοκυττάρων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης που βρίσκονται σε στενή επαφή με δικτυενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα τροφούς (Xie *et al.*, 2006). Η διαφοροποίηση του θύμου σε φλοιό και μυελό είναι ξεκάθαρη σε κάποια είδη ενώ σε άλλα δεν υπάρχει



δομική σταθερότητα. Πάντως σε όλες τις περιπτώσεις τόσο το ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων μέσα στο όργανο όσο και το φαρυγγικό επιθήλιο που το καλύπτει διαθέτουν στενές συνδέσεις οι οποίες αποκλείουν αποτελεσματικά τα αντιγόνα να έρθουν σε επαφή με τα θυμοκύτταρα (Chilmonczyk, 1992; Castillo *et al.*, 1998; Roberts, 2012b).

Ατροφία του θύμου αδένος παρατηρείται στα ανώτερα σπονδυλωτά περίπου στον χρόνο της σεξουαλικής ωρίμανσης. Στα ψάρια, η ατροφία του θύμου είναι μια αργή διαδικασία με την συσσώρευση συνδετικού ιστού κατά την ωρίμανση, αν και λεμφικός ιστός μπορεί να ανιχνευθεί και σε γηραιά ψάρια (Roberts, 2012b).

### 1.3.2.2 Νεφρός

Στους τελεόστεους, ο νεφρός αποτελείται από δύο τμήματα: το πρόσθιο τμήμα (κεφαλικό ή πρόνεφρος) που περιέχει κυρίως αιμοποιητικό ιστό (δεν διαθέτει νεφρική λειτουργία) και ένα μεσαίο και οπίσθιο τμήμα (οπισθόνεφρο) που κυριαρχείται από τον νεφρικό ιστό αλλά περιέχει και λεμφοαιμοποιητικό ιστό (Zapata & Cooper, 1990). Εκτός από τον ρόλο του στην παραγωγή ερυθροκυττάρων, λεμφικών και μυελικών κυττάρων (Smith *et al.*, 1970; Zapata, 1979, 1981), ο νεφρός συμμετέχει και στην παγίδευση αντιγόνων και στην παραγωγή αντισωμάτων (Zapata & Cooper, 1990).

Ο αιμοποιητικός ιστός του νεφρού φέρει στενή ομοιότητα με τον μυελό των οστών των ανώτερων σπονδυλωτών αλλά διαφέρει έχοντας ένα ιδιαίτερα ενεργό δικτυοενδοθηλιακό και ανοσοσφαιρινοπαραγωγικό στοιχείο. Υπό αυτή την έννοια φέρει λειτουργικές ομοιότητες με τους λεμφικούς αδένες των θηλαστικών. Λεμφικά κύτταρα όλων των αναπτυξιακών σταδίων (μικρά και μεγάλα λεμφοκύτταρα, πλασμοβλάστες και πλασματοκύτταρα) είναι παρόντα στον αιμοποιητικό ιστό. Μέσα στον αιμοποιητικό ιστό απαντώνται σφαιρικές συγκεντρώσεις κυττάρων πλούσια σε χρωστική που ονομάζονται μελανομακροφαγικά κέντρα (Agius & Agbede, 1984).

Τα μελανομακροφαγικά κέντρα διαφέρουν στον βαθμό οργάνωσης ανάλογα με το είδος. Στους κατώτερους τελεόστεους, είναι συμπλέγματα σκοτεινών κυττάρων διάσπαρτα μέσα στον αιμοποιητικό ιστό. Στους ανώτερους τελεόστεους, η ποσότητα της σκοτεινής χρωστικής που βρίσκεται μέσα στα κέντρα είναι πολύ μικρή, με την πλειονότητα της χρωστικής να είναι πολύ πιο ανοιχτόχρωμη. Επίσης, η μορφολογία των κέντρων στα ανώτερα ψάρια είναι πολύ πιο καλά ορισμένη. Γενικά θεωρούνται σαν θέση μεταβολικών απορριμμάτων. Μετά από το αντιγονικό ερέθισμα, σφαιρικές συγκεντρώσεις μεταβολικών ενεργών κυττάρων σχηματίζονται στον αιμοποιητικό ιστό. Το μέγιστο αυτής της απόκρισης προηγείται του μέγιστου των αντισωμάτων στον ορό, υποδεικνύοντας την συμμετοχή της στην παραγωγή των αντισωμάτων. Οι συγκεντρώσεις αυτές θεωρούνται ότι τελικά αναπτύσσονται σε μελανομακροφαγικά κέντρα και δρουν με ανάλογο τρόπο όπως τα βλαστικά κέντρα των ανώτερων σπονδυλωτών ειδικά εφόσον σχετίζονται με κύτταρα που εκφράζουν τον δείκτη σωματικών υπερμεταλλάξεων, AID (απαμινάση της κυτιδίνης που επάγεται από ενεργοποίηση) (Saunders *et al.*, 2010).

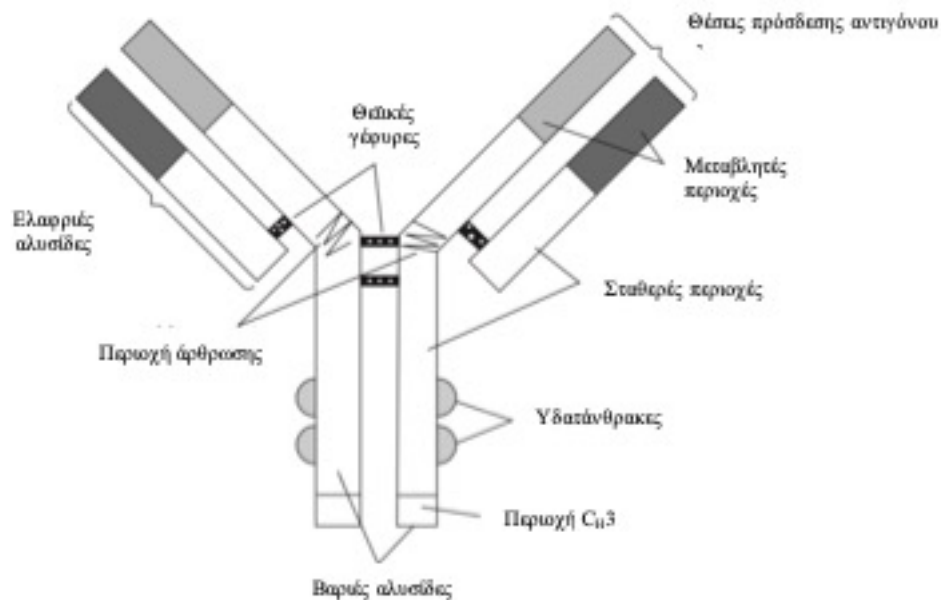
### 1.3.2.3 Σπλήνας

Ο σπλήνας των τελεόστεων έχει μια ινώδη κάψουλα με μικρά ελάσματα που εκτείνονται μέσα στο παρέγχυμα που διακρίνεται σε ερυθρό και λευκό πολφό. Ο ερυθρός πολφός καταλαμβάνει την πλειονότητα του οργάνου (Grace & Manning, 1980; Secombes & Manning, 1980), και αποτελείται από δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα που υποστηρίζουν κολποειδή γεμάτα με αίμα τα οποία διατηρούν ποικίλους πληθυσμούς κυττάρων συμπεριλαμβανομένων μακροφάγων και λεμφοκυττάρων. Ο λευκός πολφός συνήθως είναι λίγο ανεπτυγμένος και διακρίνεται σε μελανομακροφαγικά κέντρα (βλ. παραπάνω) και σε ελλειψοειδή. Τα ελλειψοειδή είναι τερματικές θέσης αγγείων με στενό αγωγό που διαπερνούν έναν κολεό από ίνες, δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα (Zapata & Cooper,

1990; Espenes *et al.*, 1995b). Φαίνεται να έχουν εξειδικευμένο ρόλο στην παγίδευση συστατικών του αίματος, ιδιαίτερα ανοσοσυμπλεγμάτων (Ellis, 1980; Secombes & Manning, 1980; Espenes *et al.*, 1995a), και την επόμενη μετανάστευση των μακροφάγων σε μελανομακροφαγικά κέντρα (Ellis *et al.*, 1976; Ferguson, 1976; Ellis, 1980). Ακόμη η μακρόχρονη διατήρηση ανοσοσυμπλεγμάτων μπορεί να συμμετέχει στην ανάπτυξη της ανοσολογικής μνήμης (Roberts, 2012b).

### 1.3.3. Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες (Ig) ή αντισώματα (Ab) είναι μια κλάση πρωτεϊνών που παράγεται από τα Β λεμφοκύτταρα ως απόκριση σε μη-εαυτά μόρια. Η βασική δομή των ανοσοσφαιρινών διακρίνεται σε δύο βαριές και δύο ελαφριές αλυσίδες που σχηματίζουν την θέση πρόσδεσης του αντιγόνου. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της βαριάς αλυσίδας καθορίζουν την ταξινόμηση της τάξης της ανοσοσφαιρίνης. Τρεις κλάσεις είναι γνωστές στους τελεόστεους: IgM, IgD και IgT (ή IgZ) (Hansen *et al.*, 2005), σε σχέση με τις πέντε των θηλαστικών. Ακόμη στα θηλαστικά, η κύρια ανοσοσφαιρίνη του ορού (IgM) είναι πενταμερής ενώ στους τελεόστεους είναι τετραμερείς αν και μπορούν να ανιχνευθούν και μονομερείς μορφές IgM (Zhang *et al.*, 2010).



Εικόνα 5. Δομή μορίου αντισώματος σχήματος Y (Bone & Moore, 2008).

#### 1.3.3.1 Γενετικοί τόποι βαριών αλυσίδων

##### I. Μεταβλητή περιοχή

Η μεταβλητή περιοχή βαριάς αλυσίδας των τελεόστεων αποτελείται από τέσσερις περιοχές πλαισίου που παρενθέτουν τρεις περιοχές που καθορίζουν συμπληρωματικότητα (CDR) (Kabat *et al.*, 1979). Οι τρεις περιοχές CDR των βαριών αλυσίδων αντιπροσωπεύουν τα τρία από τα έξι σημεία επαφής του αντιγόνου που δίνουν την αντιγονική ειδικότητα, με τα υπόλοιπα τρία να κωδικοποιούνται από τις μεταβλητές περιοχές των ελαφριών αλυσίδων. Ο αριθμός των γονιδίων  $V_h$  και οικογενειών  $V_h$ , καθώς και η συνδυαστική ποικιλότητα που παράγεται μέσω σωματικών ανασυνδυασμών με γονίδια  $D_h$  και  $J_h$  είναι οι κύριοι παράγοντες για την παραγωγή της ποικιλομορφίας των αντισωμάτων. Άλλοι παράγοντες αποτελούν η σωματική μετάλλαξη, η παρουσία ψευδογονιδίων (Yang *et al.*, 2006), η

διαγραφή νουκλεοτιδίων και η προσθήκη νουκλεοτιδίων στην 5' περιοχή (N προσθήκες) και στην 3' περιοχή (P προσθήκες).

## II. Σταθερή περιοχή

Τρεις έως πέντε διαφορετικοί ισότυποι βαριάς αλυσίδας έχουν ταυτοποιηθεί στους τελεόστεους ανάλογα με το είδος. Αυτοί είναι οι IgM1, IgM2 (Hordvik *et al.*, 1997; Hordvik *et al.*, 2002), IgD (Wilson *et al.*, 1997), IgZ (Danilova *et al.*, 2005) και IgT (Hansen *et al.*, 2005). Σε αντίθεση με τα τετράποδα, δεν υπάρχουν στοιχεία για μετάπτωση τάξης, καθώς μπορεί να μην είναι απαραίτητη στους τελεόστεους λόγω της δομής του τόπου της βαριάς αλυσίδας (Danilova *et al.*, 2005) ή λόγω της έλλειψης εξελιγμένων περιοχών μετάπτωσης (Barreto *et al.*, 2005).

Ο ισότυπος IgM είναι η κύρια ανοσοσφαιρίνη στους τελεόστεους και ανιχνεύεται στον ορό κύρια ως τετραμερές με οχτώ θέσης πρόσδεσης αντιγόνου (Acton *et al.*, 1971; Clem, 1971), αλλά μπορεί να βρεθεί και προσδεμένο στην μεμβράνη των κυττάρων ως μονομερές (Clem & McLean, 1975; Warr *et al.*, 1976; Wilson *et al.*, 1992).

Ο ισότυπος IgD εμφανίζει ομοιότητα ακολουθίας με την αντίστοιχη ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη και συνεκφράζεται με την IgM (Wilson *et al.*, 1997). Αν και ο ρόλος της δεν είναι ξεκάθαρος, επειδή ευρίσκεται κυρίως στην μεμβρανική μορφή, προτείνεται ο ρόλος της ως υποδοχέας των B λεμφοκυττάρων ή των φαγοκυττάρων ως οψονίνη (Stenvik *et al.*, 2001; Stafford *et al.*, 2006).

Οι ισότυποι IgT και IgZ μπορεί να αντιπροσωπεύουν τον ίδιο ισότυπο και φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις βλεννογονικές θέσεις.

### 1.3.3.2 Γενετικοί τόποι ελαφριών αλυσίδων

Οι μεμονωμένες ελαφριές αλυσίδες συνδέονται με τις βαριές συνήθως με δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των σταθερών περιοχών (Bengtén *et al.*, 2000). Η θέση πρόσδεσης του αντιγόνου ολόκληρου του μορίου σταθεροποιείται με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταβλητών περιοχών των ελαφριών και των βαριών αλυσίδων (Secher *et al.*, 1977).

Στους τελεόστεους, τα γονίδια των ελαφριών αλυσίδων είναι οργανωμένα σε πολλαπλά συμπλέγματα. Οι βαριές περιοχές (V<sub>h</sub>) κωδικοποιούνται από τον ανασυνδυασμό των V<sub>h</sub>, D<sub>h</sub> και J<sub>h</sub> γονιδίων, αλλά για τις ελαφριές αλυσίδες δεν υπάρχουν D<sub>l</sub> γονίδια, μόνο V<sub>l</sub> και J<sub>l</sub> (Shambloott & Litman, 1989a, b). Παρόλα αυτά οι ελαφριές αλυσίδες μπορούν επίσης να χρησιμοποιήσουν τυχαίο σωματικό ανασυνδυασμό μεταξύ των V<sub>l</sub> και J<sub>l</sub> γονιδίων, συνεισφέροντας στην μεγάλη ποικιλομορφία των θέσεων πρόσδεσης αντιγόνου.

### 1.3.3.3 Δομή Οξειδοαναγωγής

Μία μοναδική και ενδιαφέρουσα διαφορά μεταξύ της ανοσοσφαιρίνης των τελεόστεων και των θηλαστικών είναι η δομική ετερογένεια λόγω των δισουλφιδικών γεφυρών που παρατηρείται καθολικά στους τελεόστεους. Η δομική αυτή ετερογένεια δημιουργείται από την μη-ομοιόμορφη διασύνδεση των μονομερών ή διμερών μέσω δισουλφιδίων. Αυτά τα διαφοροποιημένα ως προς τους δισουλφιδικούς δεσμούς ισομερή καλούνται δομές οξειδοαναγωγής (Evans *et al.*, 1998; Kaattari *et al.*, 1998), και αποτελούν μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ανοσοσφαιρινών. Έχει προταθεί πως ο μικρότερος δισουλφιδικός πολυμερισμός οδηγεί σε μεγαλύτερη ευελιξία και ικανότητα σύνδεσης μέσω πολυσθενικότητας σε περισσότερους φορείς, και επίσης ασκεί ρυθμιστικό έλεγχο στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και άλλων λειτουργιών που διαμεσολαβούνται από την σταθερή περιοχή των αντισωμάτων (Fc).

### 1.3.3.4 Λειτουργίες ανοσοσφαιρινών

#### I. Εξουδετέρωση

Τα αντισώματα απενεργοποιούν την μολυσματικότητα των ιών και πιθανώς διαδραματίζουν και ρόλο στην εξουδετέρωση μολυσματικών παραγόντων των βακτηρίων όπως διάφορες τοξίνες και προσκολλητίνες (Ellis, 1999; Roberts, 2012b).

#### II. Ενεργοποίηση συμπληρώματος

Τα αντισώματα ενεργοποιούν τον καταρράκτη του συμπληρώματος μέσω της κλασικής οδού όπως στην περίπτωση των θηλαστικών, με την απαραίτητη παρουσία ιόντων ασβεστίου. Όμως στην πέστροφα για παράδειγμα, τα αντισώματα μπορούν να ενεργοποιήσουν και την εναλλακτική οδό (Roberts, 2012b).

#### III. Οψωνισμός σωματιδίων

Στα ψάρια, ένα ειδικό αντίσωμα προσδεδεμένο σε ένα σωματίδιο απουσία συμπληρώματος μπορεί να οδηγήσει σε κάποιας μορφής ενίσχυση της φαγοκυτταρικής ενεργότητας, αλλά μεγάλες αυξήσεις συνήθως απαιτούν την παρουσία συμπληρώματος (Secombes, 1996). Έτσι στα ψάρια η δράση της IgM ως οψωνίνης δεν γίνεται άμεσα στα περισσότερα είδη, δηλαδή μέσω υποδοχέων για την IgM, αλλά έμμεσα μέσα υποδοχέων του συμπληρώματος. Πάντως υπάρχουν δεδομένα για την παρουσία διαλυτού υποδοχέα της σταθερής περιοχής IgM σε διάφορα είδη (Roberts, 2012b).

#### IV. Αποκρίσεις υπερευαισθησίας

Είναι γνωστές στα ψάρια αλλά οι μηχανισμοί δεν είναι πλήρως κατανοητοί καθώς στα ψάρια δεν υπάρχει ο αντίστοιχος ισότυπος IgE και μόνο στα περκόμορφα τα ηωσινοφιλικά κοκκιοκύτταρα/μαστοκύτταρα περιέχουν ισταμίνη. Οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας σχετίζονται με την CRP αλλά και με τα στοιχεία του συμπληρώματος C3a και C5a που διαμεσολαβούν αντιδράσεις υπερευαισθησίας όπως στα θηλαστικά (Roberts, 2012b).

### 1.3.4. Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας

Τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) είναι απαραίτητα στοιχεία της ειδικής ανοσίας των σπονδυλωτών και είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση και την παρουσίαση των αντιγόνων. Οι γενετικοί τόποι των μορίων MHC διακρίνονται σε κλασικούς, που έχουν καλά χαρακτηρισμένη λειτουργία, και σε μη κλασικούς που η λειτουργία τους δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως.

Τα κλασικά μόρια MHC τάξης I βρίσκονται στα εμπύρηννα κύτταρα και ενεργοποιούνται έπειτα από την πρόσδεση ενδοκυτταρικού αντιγόνου (π.χ. ιών). Τα αντιγόνα παρουσιάζονται στα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CD8+) που ενεργοποιούνται και καταστρέφουν τα μολυσμένα κύτταρα, με την κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία (βλ. παρακάτω) (Barber & Parham, 1993).

Τα κλασικά μόρια MHC τάξης II περιορίζονται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), όπως τα B λεμφοκύτταρα και τα φαγοκύτταρα, και ενεργοποιούν τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (CD4+) που με την σειρά τους ενεργοποιούν τα B λεμφοκύτταρα για την ωρίμανσή τους σε πλασματοκύτταρα και σε κύτταρα μνήμης. Τα ίδια τα βοηθητικά κύτταρα διαφοροποιούνται στην συνέχεια σε κύτταρα λειτουργούς που ενεργοποιούν την παραγωγή κυτταροκινών και κυττάρων μνήμης (Flajnik &

Kasahara, 2009). Παρά την παραπάνω διάκριση, τα MHC I μόρια είναι ικανά να αναγνωρίζουν και να παρουσιάζουν εξωγενή αντιγόνα στα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (cytotoxic T cells, CTL) μέσω της διαδικασίας της διασταυρωτής παρουσίασης (Ackerman & Cresswell, 2004).

Τα κλασικά μόρια MHC I αποτελούνται από μία  $\alpha$ -αλυσίδα και μία  $\beta$ 2 μικροσφαιρίνης ενώ αντίθετα τα μόρια MHC II είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες. Μετά την σύνθεσή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μόρια MHC II πρέπει να μεταφερθούν σε εξειδικευμένα ενδοσώματα. Κατά την διάρκεια της μεταφοράς, στην περίπτωση των θηλαστικών μια εξειδικευμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα προσδένεται στη περιοχή πρόσδεσης του μορίου για να εμποδίσει την πρόσδεση άλλων μορίων (Rocha & Neefjes, 2008). Στη συνέχεια ένας μοριακός συνοδός (DM) αφαιρεί την πολυπεπτιδική αλυσίδα και σταθεροποιεί το μόριο. Ωστόσο στους τελεόστεους δεν υπάρχει αυτός ο μοριακός συνοδός, οπότε κάποιος εναλλακτικός μηχανισμός μεταφοράς πρέπει να υπάρχει (Dijkstra *et al.*, 2013).

Ακόμη, τόσο στα γαδόμορφα όσο και στα συγναθόμορφα έχει γίνει ξεχωριστή απώλεια των κλασικών μορίων MHC II αν και εμφανίζουν ισχυρή απόκριση σε ανοσολογικές προκλήσεις. Για την περίπτωση του μπακαλιάρου, είναι πιθανό να ισχύει η διασταυρωτή παρουσίαση από τα MHC I μόρια (Datta *et al.*, 2003), ενώ και οι υποδοχείς Toll επίσης έχουν εμπλακεί στην διασταυρωτή αντίδραση, ώστε η δράση του MHC I/CTL άξονα να αντισταθμίζει την απώλεια του MHC II/Th (T helper) άξονα.

### 1.3.5. Κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία (Cell-mediated immunity, CMI)

Στα θηλαστικά η κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία είναι αποτέλεσμα της δράσης των T λεμφοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά δρουν είτε άμεσα, όπως με τις ειδικές κυτταροτοξικές αντιδράσεις που διαμεσολαβούνται από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL/Tc), ή έμμεσα μέσω της παραγωγής κυτταροκινών από τα βοηθητικά T λεμφοκύτταρα (Th) που επάγεται από αντιγόνο. Οι εκκρινόμενες κυτταροκίνες στρατολογούν και ενεργοποιούν άλλους κυτταρικούς τύπους, ιδιαίτερα φαγοκύτταρα, για την πραγματοποίηση της απόκρισης. Έρευνες ανοσίας μοσχευμάτων στα ψάρια έδειξαν την εισβολή λεμφοκυττάρων που χαρακτηρίστηκαν ως T λεμφοκύτταρα με βάση τον *in situ* υβριδισμό με ανιχνευτές του υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων (TCR) (Romano *et al.*, 2005). Επίσης, έρευνες έδειξαν πως τα κύτταρα που διαμεσολαβούν στην θανάτωση κυττάρων μολυσμένων από ιό αλλά και στην απόρριψη μοσχεύματος είναι TCR+/CD8+ κύτταρα και δρουν με ανάλογο τρόπο όπως στα θηλαστικά (Somamoto *et al.*, 2009; Shibasaki *et al.*, 2010). Επίσης έρευνες αποκάλυψαν πως τα Ig- κύτταρα είναι αυτά που εκκρίνουν παράγοντες όπως ειδικές κυτταροκίνες αλλά και ότι τα CD4+ κύτταρα δεν επιδρούν στην ειδική κυτταροτοξικότητα (Graham & Secombes, 1990; Roberts, 2012b).

### 1.3.6. Κυτταροκίνες ειδικής ανοσίας

Στα θηλαστικά αναγνωρίζουμε δύο πληθυσμούς CD4+ βοηθητικών Th λεμφοκυττάρων, τα Th1 και Th2 με βάση το ρεπερτόριο κυτταροκινών και με τον τρόπο ρύθμισης των B και T αποκρίσεων (Mosmann & Coffman, 1989; Mosmann & Sad, 1996; Mosmann *et al.*, 2005). Ένας τρίτος πληθυσμός Treg συμμετέχει στην ρύθμιση των Th αποκρίσεων μέσω της έκκρισης κυτταροκινών, και βοηθά στην αναστολή επιβλαβών παθολογικών αποκρίσεων έναντι ιδίων ή ξένων αντιγόνων (Miller & Morahan, 1992; Maloy & Powrie, 2001; Maloy *et al.*, 2003). Οι πληθυσμοί Th1 και Th2 έχουν αντίθετους ρόλους: Τα κύτταρα Th1 διαμεσολαβούν στην κυτταρομεσολαβούμενου τύπου απόκριση υπερευαισθησίας και στην παροχή προστασίας έναντι ενδοκυτταρικών παθογόνων και ιών. Αντίθετα τα κύτταρα Th2 παρέχουν βοήθεια στα B λεμφοκύτταρα και δρουν εναντίον έλμινθων και εξωκυτταρικών παρασίτων (Sher & Coffman, 1992; Mosmann *et al.*, 2005). Οι κυτταροκίνες που σχετίζονται με την ανάπτυξη των Th1 κυττάρων είναι πιο μελετημένες σε αντίθεση με τις αντίστοιχες των Th2 κυττάρων.

Η παρουσία της IL-4 είναι το πιο σημαντικό ερέθισμα για την διαφοροποίηση των Th2 λεμφοκυττάρων ενώ οι IL-12, IL-18, IL-23 και IL-27 ευνοούν την ανάπτυξη των Th1 κυττάρων (O'Garra, 2000; Szabo *et al.*, 2003).

Μετά την ενεργοποίησή τους, τα Th1 κύτταρα εκκρίνουν IL-2, IFN- $\gamma$  και TNF- $\beta$  που ενεργοποιούν αντιμικροβιακές άμυνες καθώς και την παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα (Abbas *et al.*, 1996; Romagnani, 1997; O'Garra, 1998).

Τα κύτταρα Th2 εκκρίνουν τις κυτταροκίνες IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 και IL-13 (Bird *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2007).

Τα κύτταρα Tr καταστέλλουν τις αποκρίσεις είτε μέσω κυτταρικής επαφής είτε εμμέσως με τις κυτταροκίνες IL-10 και TGF- $\beta$  (Read *et al.*, 2000).

### 1.3.7. Ανοσολογική μνήμη

Η ανοσολογική μνήμη μπορεί να είναι είτε θετική είτε αρνητική. Η τελευταία μορφή ορίζεται ως ανοχή. Η θετική μνήμη εκφράζεται σε μια δευτερογενή απόκριση με μικρότερη λανθάνουσα περίοδο και μεγαλύτερο τίτλο αντισωμάτων ή μικρότερο χρόνο απόρριψης μοσχεύματος σε σχέση με την πρωτογενή απόκριση. Ο μηχανισμός της ανοσολογικής μνήμης βρίσκεται στην διαφοροποίηση μακρόβιων B και T λεμφοκυττάρων μνήμης και στην αλλαγή της φύσης των αντιδρώντων κυττάρων με επιλογή κλώνων μεγαλύτερης συγγένειας. Οι μηχανισμοί της ανοχής περιλαμβάνουν την ειδική διαγραφή αντιδρώντων κυττάρων, την αντιστρεπτή απενεργοποίηση αντιδρώντων κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από τα T λεμφοκύτταρα που αναστέλλουν B λεμφοκύτταρα. Στα ψάρια δεν υπάρχει φανερή μετάπτωση τάξης ανοσοσφαιρινών και οι πολλαπλοί τύποι Ig που παρατηρούνται παράγονται από διακριτούς B υποπληθυσμούς. Επίσης η αύξηση της συγγένειας ανιχνεύεται στα ψάρια αλλά είναι σχετικά μικρή (Kaattari, 2002). Ακόμη η αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων δεν είναι τόσο μεγάλη στα ψάρια όσο στα θηλαστικά (10πλάσια σε σύγκριση με την 100πλάσια). Η ανοχή στα ψάρια έχει αποδειχθεί αλλά δεν είναι τόσο ευρέως μελετημένη (Roberts, 2012b).

## 1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις διακρίνονται σε τρεις γενικές κατηγορίες:

1. Εξωγενείς παράγοντες που σχετίζονται με το περιβάλλον και την φύση του αντιγόνου
2. Ενδογενείς παράγοντες που σχετίζονται με ανοσορυθμιστικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος και της φυσιολογίας του οργανισμού
3. Οντογενετικοί παράγοντες που σχετίζονται με την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος των νεαρών ατόμων.

Ένας σημαντικός εξωγενής παράγοντας είναι η θερμοκρασία (Bly & Clem, 1992; Eggset *et al.*, 1997; Raida & Buchmann, 2007; Lorenzen *et al.*, 2009). Γενικά, όσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία του φυσιολογικού εύρους του είδους, τόσο πιο γρήγορα εκδηλώνεται η ανοσολογική απόκριση και σε πιο έντονο βαθμό. Το θερμοευαίσθητο βήμα για την παραγωγή της ανοσολογικής απόκρισης στα ψάρια φαίνεται να σχετίζεται με τα πρώτα στάδια ενεργοποίησης των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Έτσι, η επίδραση χαμηλής θερμοκρασίας έχει σχέση κυρίως με εξαρτώμενες από T λεμφοκύτταρα αποκρίσεις παρά με τις ανεξάρτητες. Ο μηχανισμός της καταστολής της ενεργοποίησης των Th κυττάρων λόγω χαμηλής θερμοκρασίας φαίνεται να σχετίζεται με την ρευστότητα της μεμβράνης των T λεμφοκυττάρων (Bly & Clem, 1992; Roberts, 2012b). Άλλοι εξωγενείς παράγοντες αποτελούν οι δόση του αντιγόνου που εισάγεται, η δομή του αντιγόνου, η οδός εισαγωγής αλλά και η ταυτόχρονη εισαγωγή άλλου αντιγόνου ή ανοσοδιεγερτικού (Roberts, 2012b).

Οι ενδογενείς παράγοντες περιλαμβάνουν την αρνητική ανατροφοδότηση από περίσσεια αντισώματος και από ανοσοσυμπλέγματα που δημιουργούν διασταυρωτές συνδέσεις στην επιφάνεια των B

λεμφοκυττάρων (Roberts, 2012b). Σημαντικούς ενδογενείς παράγοντες αποτελούν οι κυτταροκίνες που δημιουργούν δίκτυα θετικής και αρνητικής ρύθμισης. Ακόμη η φυσιολογική κατάσταση του ψαριού μπορεί να επιδράσει στις ανοσολογικές αποκρίσεις (Roberts, 2012b).

Όσον αφορά τους οντογενετικούς παράγοντες ένα σημαντικό συμπέρασμα των ερευνών είναι ότι η πλήρης ανοσολογική ικανότητα αποκτάται όταν ικανοποιηθεί ένας κρίσιμος αριθμός ώριμων ανοσοκυττάρων και δεν εξαρτάται τόσο από την εμφάνιση συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων.

## 1.5. Επίδραση της διατροφής στο ανοσοποιητικό σύστημα

Οι υδατοκαλλιέργειες συνεισφέρουν σημαντικά στην παγκόσμια παροχή τροφής και η ταχύτατη εξέλιξη αυτού του κλάδου οδήγησε στην ανάγκη για περιβαλλοντικά ορθές και αποτελεσματικές διατροφικές πρακτικές. Ανάμεσα στους κατασκευαστές τροφής και στους παραγωγούς υπάρχει η συμφωνία πως η τροφή δεν θα πρέπει να εξασφαλίζει μόνο την βέλτιστη αύξηση αλλά και να προωθεί την υγεία του ψαριού. Για αυτό τα πιθανά οφέλη για την υγεία του οργανισμού πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον σχεδιασμό της τροφής (Kiron, 2012).

Ο ρόλος των θρεπτικών συστατικών και συμπληρωμάτων στην λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών έχει ερευνηθεί εδώ και δεκαετίες. Δεν έχουν λάβει όλα τα θρεπτικά την ίδια σημασία, με τις περισσότερες έρευνες να στρέφονται προς τις βιταμίνες C και E και στα λιπαρά οξέα. Δημοφιλή συμπληρώματα αποτελούν προϊόντα προερχόμενα από την μαγιά όπως γλυκάνες και ολιγοσακχαρίτες μαννόζης, καθώς και προβιοτικά (Kiron, 2012).

### 1.5.1. Ιχνοστοιχεία

Τα ιχνοστοιχεία είναι απαραίτητα για όλες τις φυσιολογικές λειτουργίες, και τα ψάρια, όπως όλα τα ζώα, απαιτούν αυτά τα στοιχεία. Τα ψάρια μπορεί να παραλάβουν αυτά τα ιχνοστοιχεία από την διατροφή τους αλλά και από το περιβάλλον νερό. Οι συγκεντρώσεις και οι λειτουργικές μορφές των ιχνοστοιχείων πρέπει να διατηρούνται μέσα σε ένα στενό εύρος για την ορθή λειτουργία των μεταβολικών δραστηριοτήτων των κυττάρων και των ιστών. Οι διατροφικές απαιτήσεις για τα μακροθρεπτικά όπως Ca, K, Mg, Na και P αλλά και για τα μικροθρεπτικά (ιχνοστοιχεία) όπως Cu, Fe, I, Mn, Se και Zn είναι καθορισμένες για κάποια είδη ψαριών (NRC, 2011). Τα ιχνοστοιχεία δεν βρίσκονται μόνα τους αλλά σε συνδυασμό με άλλα, επομένως έλλειψη ή υπερβολική ποσότητα από ένα μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία σε άλλα με αποτέλεσμα την εκδήλωση ασθενειών και αρνητικές επιδράσεις τον μεταβολισμό (Chanda *et al.*, 2015). Πολλές έρευνες έχουν δείξει την επίδραση των ιχνοστοιχείων στο ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών αλλά και άλλων οργανισμών (Smith *et al.*, 2018). Οι επιδράσεις αυτές σχετίζονται με μειωμένα επίπεδα κοκκιοκυττάρων, μειωμένη φαγοκυτταρική δράση, μειωμένο πολλαπλασιασμό T και B κυττάρων και γενικότερα φλεγμονώδεις διαταραχές, μολύνσεις και διαφορετική αποτελεσματικότητα εμβολίων.

#### 1.5.1.1 Ψευδάργυρος (Zn)

Όσον αφορά την έμφυτη ανοσία, ο ψευδάργυρος έχει σημαντικό ρόλο για την διατήρηση της υγείας και της ακεραιότητας του δέρματος και των βλεννογόνων, λόγω του ρόλου του στην κυτταρική επιδιόρθωση και αντικατάσταση (Moynahan, 1981; Miller *et al.*, 1988) αλλά και στην ταχύτητα επούλωσης των πληγών (Moynahan, 1981). Ο ψευδάργυρος απαιτείται για την διατήρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων και της παραγωγής αντισωμάτων. Ακόμη είναι συστατικό πάνω από 300 ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων αυτών του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η αλκαλική φωσφατάση (ALP) και η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) που παράγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Smith *et al.*, 2018). Ο ψευδάργυρος επηρεάζει κυρίως τις κυτταρομεσολαβούμενες αποκρίσεις ιδιαίτερα της Th1 τύπου και όχι τόσο της Th2, και επηρεάζει, οριακά μόνο, την λειτουργία

των Β λεμφοκυττάρων (McClure, 2008). Η βιοδιαθεσιμότητα του ψευδαργύρου διαφέρει ανάμεσα στις φυτικές και τις ζωικές πηγές, με τις πρώτες να εμφανίζουν σημαντικά μικρότερη συγκέντρωση ψευδαργύρου (Chanda *et al.*, 2015).

#### 1.5.1.2 Χαλκός

Ο χαλκός συμμετέχει στην παροχή ενέργειας για το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της ενεργοποίησης της οξειδάσης του κυτοχρώματος-*c* στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Failla, 2003). Ο χαλκός είναι ενεργός στην παραγωγή των ουδετερόφιλων και επηρεάζει την ικανότητα θανάτωσης των φαγοκυττάρων (Linder, 1991). Ακόμη απαιτείται για την σύνθεση των αντισωμάτων και την ωρίμανση των λεμφοκυττάρων. Ο χαλκός σε συνδυασμό με τον ψευδάργυρο συμμετέχουν στην υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) προστατεύοντας τις κυτταρικές μεμβράνες έναντι βλάβης από ελεύθερες ρίζες. Εκτός από την SOD, ο χαλκός περιέχεται και στην σερουλοπλασμίνη, που σχετίζεται με αντιφλεγμονώδη δράση (Chanda *et al.*, 2015). Τα επίπεδα του ψευδαργύρου, του σιδήρου, του ασβεστίου και του μολυβδαίνιου επηρεάζουν τα επίπεδα του χαλκού εφόσον είναι μεταβολικοί ανταγωνιστές για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης. Ωστόσο στην πέστροφα για παράδειγμα, η απορρόφηση του χαλκού στο έντερο δεν εμφανίζει ανταγωνισμό με τον ψευδάργυρο (Knox *et al.*, 1982; Lanno *et al.*, 1985).

#### 1.5.1.3 Μαγγάνιο

Το μαγγάνιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αφαίρεση υπεροξειδικών ριζών που παράγονται από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Η μαγγανιοεξαρτώμενη υπεροξειδική δισμουτάση προστατεύει τις ευπαθείς μιτοχονδριακές μεμβράνες από τις δραστικές ελεύθερες ρίζες. Δεν υπάρχουν ευρεία στοιχεία για τον ρόλο του μαγγανίου στο ανοσοποιητικό σύστημα. Έχουν προταθεί ρόλοι του μαγγανίου για την αύξηση του τίτλου των ανοσοσφαιρινών και στοιχείων της μη ειδικής άμυνας όπως της ικανότητας θανάτωσης των μακροφάγων.

#### 1.5.1.4 Σίδηρος

Σε χαμηλά επίπεδα ο σίδηρος λειτουργεί αντιοξειδωτικά βοηθώντας στην προστασία των κυττάρων από δραστικές ρίζες. Σε επίπεδα πάνω από το οριακό, ο σίδηρος μετατρέπεται σε προ-οξειδωτικό οδηγώντας σε σημαντική κυτταρική βλάβη (Miller *et al.*, 1997). Ο σίδηρος σε συνδυασμό με τον ψευδάργυρο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των κυττάρων του ανοσοποιητικού αλλά και στην κλωνική επέκταση των λεμφοκυττάρων ως απόκριση σε αντιγονική διέγερση (Failla, 2003). Ο σίδηρος επίσης έχει ρόλο κλειδί στην άμυνα του οργανισμού για την παραγωγή υποχλωριδούς οξέος μέσω της μυελοπεροξειδάσης αλλά και της συνθετάσης μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Το αντιμικροβιακό πεπτιδίο εψιδίνη εξαρτάται από τα επίπεδα του σιδήρου και με την σειρά του ρυθμίζει την συγκέντρωση του σιδήρου. Επειδή τα βακτήρια βασίζονται στα επίπεδα σιδήρου του ξενιστή για την αύξηση τους, η έλλειψη σιδήρου βελτιώνει την επιβίωση του οργανισμού σε βακτηριακές μολύνσεις. Σε έρευνα φάνηκε ότι η έλλειψη σιδήρου αυξάνει τα επίπεδα λυσοζύμης σε ποντίκια (Smith *et al.*, 2018).

#### 1.5.1.5 Σελήνιο

Η επίδραση του σεληνίου στο ανοσοποιητικό σύστημα επικεντρώνεται στην σεληνοπρωτεΐνη, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) που απενεργοποιεί δραστικές ρίζες οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και αποτρέπει την πρόκληση κυτταρικής βλάβης. Επίσης μπορεί να επηρεάζει την μετανάστευση των ουδετερόφιλων στους ιστούς και την επακόλουθη ανάπτυξη



φλεγμονής. Η έλλειψη σεληνίου επηρεάζει κύριες λειτουργίες του ανοσοποιητικού, με μειωμένη σύνθεση αντισωμάτων και μειωμένη ικανότητα θανάτωσης των ουδετερόφιλων (Spallholz & Stewart, 1989). Μειωμένη ενεργότητα λυσοζύμης παρατηρήθηκε σε ποντίκια με έλλειψη σεληνίου (Smith *et al.*, 2018).

#### 1.5.1.6 Ιώδιο

Το ιώδιο είναι απαραίτητο για την σύνθεση των θυροειδών ορμονών (θυροξίνη), που ρυθμίζει τον ρυθμό του μεταβολισμού. Χαμηλότερη δόση ιωδίου οδηγεί σε μειωμένες ανοσολογικές αποκρίσεις και αφορά κυρίως τα ψάρια του γλυκού νερού (Chanda *et al.*, 2015). Μπορεί να ευθύνεται για την μικροβιοκτόνο δράση της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) (Spallholz & Stewart, 1989).

#### 1.5.1.7 Αλληλεπιδράσεις ιχνοστοιχείων

Δεδομένου ότι ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και το μαγγάνιο συμμετέχουν στην δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οι μεταβολές του ενός θα πρέπει να επηρεάζουν την δράση των υπόλοιπων στο ανοσοποιητικό σύστημα. Υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ του σεληνίου και του χαλκού σε βοοειδή και στην πέστροφα και το σολομό του Ατλαντικού. Ακόμη, η υπερβολική δόση χαλκού οδηγεί σε καταστολή των T λεμφοκυττάρων ως αποτέλεσμα της δευτερογενούς έλλειψης ψευδαργύρου (Chanda *et al.*, 2015). Διάφορες έρευνες σε βοοειδή έδειξαν συνδυαστικές επιδράσεις του χαλκού της διατροφής με άλλα θρεπτικά στο ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ λειτουργική έλλειψη χαλκού βρέθηκε σε ζώα που δέχθηκαν υψηλές δόσεις σιδήρου ή μολυβδαινίου (Kubena & McMurray, 1996).

Η συμπλήρωση φωσφόρου σε φυτικές δίαιτες στην πέστροφα επηρεάζει αρνητικά την απορρόφηση και την χρησιμοποίηση μικροθρεπτικών στοιχείων ιδιαίτερα του ψευδαργύρου, του χαλκού και του σεληνίου (Prabhu *et al.*, 2014b). Γενικότερα στις φυτικές δίαιτες η ενδογενής απώλεια ψευδαργύρου είναι μεγάλη και του χαλκού μικρή με αποτέλεσμα την απώλεια ψευδαργύρου και την συσσώρευση χαλκού στο σώμα. Ακόμη η συγκέντρωση σεληνίου στο σώμα είναι μικρή ενώ η συγκέντρωση σιδήρου στο σώμα και στο αίμα είναι ψηλότερη (Prabhu *et al.*, 2016). Στην τσιπούρα η χορήγηση σιδήρου δεν επηρέασε το περιεχόμενο του σώματος σε χαλκό (Serra *et al.*, 1996). Στο ψάρι *Epinephelus coioides* χορήγηση σιδήρου δεν επηρέασε την σωματική συγκέντρωση μαγγανίου και ψευδαργύρου (Ye *et al.*, 2007). Αντίθετα, λειτουργική έλλειψη χαλκού βρέθηκε σε ζώα που δέχθηκαν υψηλές δόσεις σιδήρου (Kubena & McMurray, 1996). Στην τιλάπια του Νείλου η χορήγηση χαλκού αύξησε τα επίπεδα σιδήρου στο ήπαρ (Damasceno *et al.*, 2016). Η υπερβολική δόση χαλκού οδηγεί σε καταστολή των T λεμφοκυττάρων ως αποτέλεσμα της δευτερογενούς έλλειψης ψευδαργύρου (Chanda *et al.*, 2015). Στην τιλάπια του Νείλου η χορήγηση ψευδαργύρου μειώνει τον σίδηρο στα όργανα και τα οστά (Do Carmo e Sa *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2015). Στον φυτοφάγο κυπρίνο η περίσσεια ψευδαργύρου αλλοίωσε τον φυσικό και ανοσολογικό φραγμό του εντέρου με την μείωση της συσσώρευσης ψευδαργύρου ή με ανταγωνισμό με αλλά δισθενή κατιόντα (Song *et al.*, 2017). Στην κόμπια (*Rachycentron canadum* L.) και το *Epinephelus lanceolatus* × *E. fuscoguttatus* η χορήγηση μαγγανίου δεν επηρέασε σημαντικά την σωματική συγκέντρωση χαλκού και ψευδαργύρου (Nie *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). Αντίθετα στο κίτρινο γατόψαρο τα επίπεδα σιδήρου στο σώμα ήταν αντιστρόφως ανάλογα της δόσης του μαγγανίου που χορηγήθηκε (Tan *et al.*, 2012). Στην πέστροφα καμία αλληλεπίδραση δεν βρέθηκε μεταξύ του σεληνίου, σιδήρου και μαγγανίου της διατροφής (Rider, 2009) ενώ αντίθετα στον σολομό του Ατλαντικού βρέθηκαν αρκετές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του σεληνίου και του ψευδαργύρου και του μαγγανίου της διατροφής που επηρεάζουν την διαθεσιμότητά τους.

## 1.6. Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) ανήκει στην οικογένεια των Μορονιδών. Είναι κοινό σε όλη την Μεσόγειο, την Μαύρη Θάλασσα και τον ΒΑ Ατλαντικό σε παράκτια ύδατα έως 100 μέτρα βάθος καθώς και σε υφάλμυρα νερά σε εκβολές και λιμνοθάλασσες το καλοκαίρι. Είναι θηρευτής που τρέφεται με καρκινοειδή, μαλάκια και ψάρια. Στην Μεσόγειο φτάνει την σεξουαλική ωριμότητα στα τρία χρόνια για τα αρσενικά και στα τέσσερα για τα θηλυκά, ενώ στον Ατλαντικό στα τέσσερα και επτά χρόνια αντίστοιχα (Commission, 2012).

Το λαβράκι, όπως και η τσιπούρα, παραδοσιακά καλλιεργούνταν με εκτατικές μεθόδους. Στα τέλη της δεκαετίας του '60 αναπτύχθηκαν εντατικές μέθοδοι ανάπτυξης με βάση πολύπλοκα συστήματα εκκόλαψης. Μετά την παραγωγή των αυγών και την εκκόλαψή τους, οι προνύμφες μεταφέρονται σε δεξαμενές όπου μετά την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου τρέφονται με μικροφύκη και ζωοπλαγκτόν και στη συνέχεια με μικρά καρκινοειδή (Αρτέμια). Καθώς τα ψάρια αυξάνονται σε μέγεθος μεταφέρονται σε νέες δεξαμενές όπου τρέφονται με τροφή υπό μορφή πέλετ. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι δεξαμενές είναι πλεούμενα κλουβιά αλλά σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να είναι δεξαμενές στεριάς που χρησιμοποιούν σύστημα ανακύκλωσης που ελέγχει την θερμοκρασία του νερού. Η χρήση παραδοσιακών εκτατικών και ημι-εκτατικών μεθόδων είναι περιορισμένη. Οι καλλιέργειες διαρκεί μέχρι περίπου το βάρος των 300-500g που μπορεί να πάρει από ένα μισή έτος έως δύο χρόνια (Commission, 2012).

Παρόλου που η υδατοκαλλιέργεια είναι η κύρια οδός παραγωγής του λαβρακίου, η αλιεία συμμετέχει σε ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 10% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής. Η Ευρωπαϊκή Ένωση είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός με μερίδιο περίπου 80%, ενώ μέσα στην Ευρωπαϊκή Ένωση η Ελλάδα αποτελεί τον πρώτο παραγωγό, ακολουθούμενη από την Ισπανία (Commission, 2012).

## 2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της χορήγησης φυτικής διατροφής (χαμηλό ποσοστό ιχθυάλευρου), που περιέχει διαφορετικά επίπεδα μίγματος ιχνοστοιχείων, στην συστημική και βλεννογονική χυμική και κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία του λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*). Η μελέτη της συστημικής ανοσίας αφορά παραμέτρους του ολικού αίματος και του ορού, ενώ η βλεννογονική ανοσία αξιολογήθηκε με παραμέτρους της βλέννας του δέρματος και του εντερικού σωλήνα. Η επίδραση των επιπέδων των ιχνοστοιχείων αφορά την μη επαρκή συγκέντρωση, την παρουσία χαμηλής και μέσης συγκέντρωσης αλλά και την υπερβολική δόση αυτών. Ακόμη, εκτός από την επίδραση του επιπέδου των ιχνοστοιχείων, αξιολογήθηκε και η επίδραση της διαφορετικής πηγής προέλευσης αυτών, διακρίνοντάς τα σε οργανικά (χηλικά σύμπλοκα με πεπτίδια) και ανόργανα.

Επιπλέον των ανωτέρων πειραμάτων, προηγήθηκαν προπαρασκευαστικά πειράματα για την προσαρμογή των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιήθηκαν. Τα πειράματα αυτά είχαν ως στόχο την εύρεση των βέλτιστων όγκων και πειραματικών συνθηκών ώστε να καταστεί δυνατή η χρησιμοποίηση μικροπλακών 384 βοθρίων που συμβαδίζει με τις σύγχρονες τάσεις. Επιπλέον, ήταν αναγκαία η προσαρμογή των πρωτοκόλλων για την ορθή μέτρηση των ανοσολογικών παραμέτρων της βλέννας δέρματος και εντέρου. Τέλος, ένα σημαντικό κομμάτι της προσαρμογής των μεθόδων αφορούσε την μέτρηση της συνολικής αντιβακτηριακής δράσης με την χρήση των κατάλληλων όγκων και αντιδραστηρίων και την πιθανή απόδοση της αντιβακτηριακής δράσης σε διαφορετικούς τελεστές με βάση την επίδοσή τους παρουσία διαφορετικών ανασταλτικών παραγόντων.

### 3. Βελτιστοποίηση ανοσολογικών μεθόδων

#### 3.1. Προσαρμογή πρωτοκόλλων σε μικροπλάκες 384 βοθρίων

Παραδοσιακά για τις ανοσολογικές αναλύσεις χρησιμοποιούνται μικροπλάκες με 96 βοθρία. Αυτό περιορίζει τον αριθμό των δειγμάτων που μπορούν να αναλυθούν (ειδικά όταν γίνονται τρεις επαναλήψεις από κάθε δείγμα), ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται ο όγκος που απαιτείται για τις αναλύσεις, κάτι που, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις βιολογικών υλικών που λαμβάνονται σε μικρές ποσότητες, δημιουργεί σημαντικό πρόβλημα.

Για αυτό διενεργήθηκαν μια σειρά από προπαρασκευαστικά πειράματα για κάθε μετρούμενη παράμετρο, για την προσαρμογή των πρωτοκόλλων σε μικροπλάκες 384 βοθρίων. Μετά από κάποιες αρχικές δοκιμές, χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος για την μετατροπή των όγκων:

$$V_{384} = \frac{V_{96} * 120}{300} = V_{96} * 0,4 \mu\text{L} \quad (1)$$

Όπου:  $V_{384}$ : ο όγκος του δείγματος ή του αντιδραστηρίου σε μικροπλάκα 384

$V_{96}$ : ο όγκος του δείγματος ή του αντιδραστηρίου σε μικροπλάκα 96 βοθρίων

120: μέγιστος όγκος μικροπλάκας 384 βοθρίων

300: μέγιστος όγκος μικροπλάκας 96 βοθρίων

##### 3.1.1. Λυσοζύμη

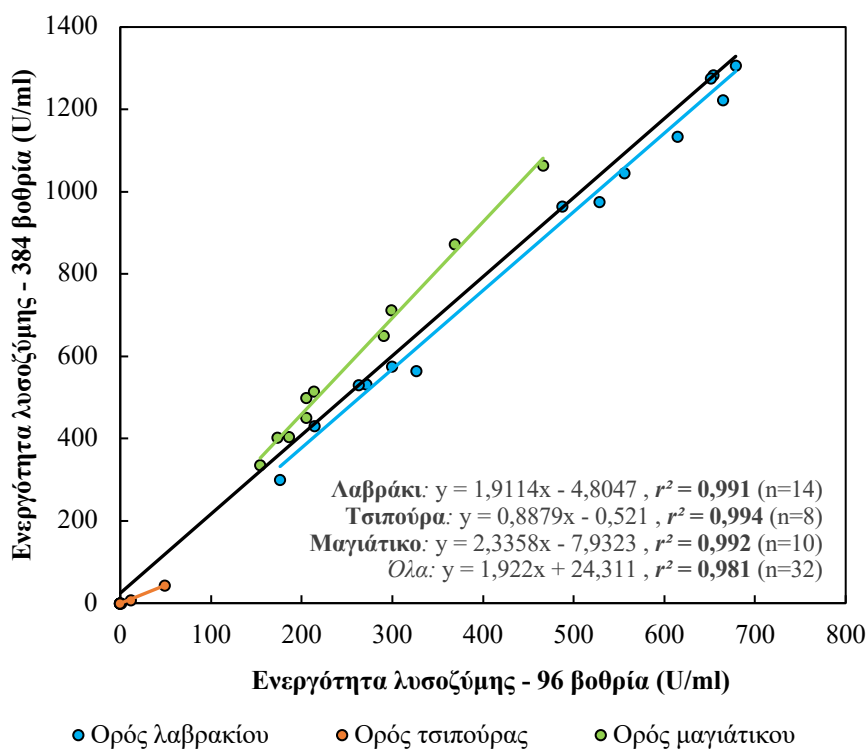
Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Δρ. Henry, για την μέτρηση της ενεργότητας λυσοζύμης χρησιμοποιούνται 10  $\mu\text{L}$  δείγματος και 200  $\mu\text{L}$  εναιωρήματος βακτηρίων *Micrococcus luteus* συγκέντρωσης 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Μείωση της οπτικής πυκνότητας κατά 0,001 ανά λεπτό αντιστοιχεί σε 1 U ενζυμικής ενεργότητας.

Με βάση την παραπάνω εξίσωση οι όγκοι αυτοί μετατρέπονται σε 4  $\mu\text{L}$  δείγματος και 80  $\mu\text{L}$  εναιωρήματος βακτηρίων. Για την επικύρωση της υπόθεσης μετρήθηκε η ενζυμική ενεργότητα λυσοζύμης σε ορό από λαβράκια, τσιπούρες και μαγιάτικα, τόσο σε μικροπλάκα 96 βοθρίων όσο και σε μικροπλάκα 384 βοθρίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σφάλμα! Άγνωστη παράμετρος αλλαγής.** Παρατηρούμε πως για κάθε είδος ξεχωριστά αλλά και συγκεντρωτικά για όλα τα ψάρια, οι συντελεστές συσχέτισης εμφανίζουν εξαιρετικά καλές τιμές (μεγαλύτερες από 0,99). Επομένως η προσαρμογή του πρωτοκόλλου έγινε με επιτυχία.

Μια παρατήρηση είναι πως οι τιμές για την τσιπούρα είναι ιδιαίτερα χαμηλές. Επιπλέον, οι τιμές για την ενεργότητα λυσοζύμης για την βλέννα δέρματος και εντέρου εμφανίζουν επίσης χαμηλές τιμές (προσωπικές παρατηρήσεις). Έτσι έγινε μια προσπάθεια για την επιλογή μιας καλύτερης συγκέντρωσης εναιωρήματος βακτηρίων που θα οδηγεί σε μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας. Για την επιλογή της καλύτερης συγκέντρωσης τα δεδομένα αναλύθηκαν με μη παραμετρική δοκιμασία Wilcoxon κατά ζεύγη, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον **Σφάλμα! Άγνωστη παράμετρος αλλαγής.**

Παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση των 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  οδηγεί σε αύξηση ενεργότητας σε περισσότερα ψάρια σε σχέση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις (6 ψάρια), ενώ δεν οδηγεί σε καμία μείωση ενεργότητας. Οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές ( $p = 0,028$ ). Ταυτόχρονα η ίδια συγκέντρωση εμφανίζει τον καλύτερο συντελεστή συσχέτισης με την συγκέντρωση αναφοράς για τον ορό του λαβρακιού ( $r = 0,996$ ), οδηγώντας σε μείωση της ενεργότητας σε όλα τα ψάρια ( $p = 0,012$ ).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η χρήση μεγαλύτερου όγκου (20  $\mu$ L) για την αύξηση της διακριτικής ικανότητας της αντίδρασης. Πράγματι, η δοκιμασία Wilcoxon κατά ζεύγη έδειξε θετική μεταβολή για το 80% των ψαριών ( $p = 0,028$ ). Επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν 20  $\mu$ L δείγματος με αντίστοιχη συγκέντρωση βακτηρίου 125  $\mu$ g/ml.



**Γράφημα 1.** Ενεργότητα λυσοζύμης μετρημένη σε μικροπλάκα 96 βοθρίων και σε μικροπλάκα 384 βοθρίων για ορούς από λαβράκι, τσιπούρα και μαγιάτικο. Αναφέρονται οι εξισώσεις των ευθειών γραμμικής παλινδρόμησης καθώς και οι συντελεστές  $r^2$  των ευθειών για κάθε είδος ξεχωριστά αλλά και για όλα τα ψάρια συγκεντρωτικά.

**Πίνακας 1.** Δοκιμασία Wilcoxon κατά ζεύγη για ορό και βλέννα δέρματος τσιπούρας και για ορό λαβρακίου. Οι συγκεντρώσεις του εναιωρήματος *Micrococcus* συγκρίθηκαν με την συγκέντρωση αναφοράς των 200 µg/ml. Στη συνέχεια συγκρίθηκαν ο όγκος δείγματος 20 µL με τον όγκο αναφοράς 4 µL για την συγκέντρωση των 125 µg/ml. Αναφέρονται επίσης οι συντελεστές συσχέτισης  $r$  ανάμεσα στην υπό εξέταση συγκέντρωση ή όγκο με την συγκέντρωση ή τον όγκο αναφοράς.

Ορός και βλέννα δέρματος από τσιπούρα		µg/ml <i>Micrococcus luteus</i>			
		100	125	150	175
Συντελεστής συσχέτισης $r$		<b>0,995</b>	0,922	0,112	0,993
Wilcoxon κατά ζεύγη	Αρνητική Μεταβολή	2	0	2	1
	Θετική Μεταβολή	2	<b>6</b>	1	1
	Καμία Μεταβολή	12	10	13	14
	$p$	0,465	<b>0,028</b>	1	0,655

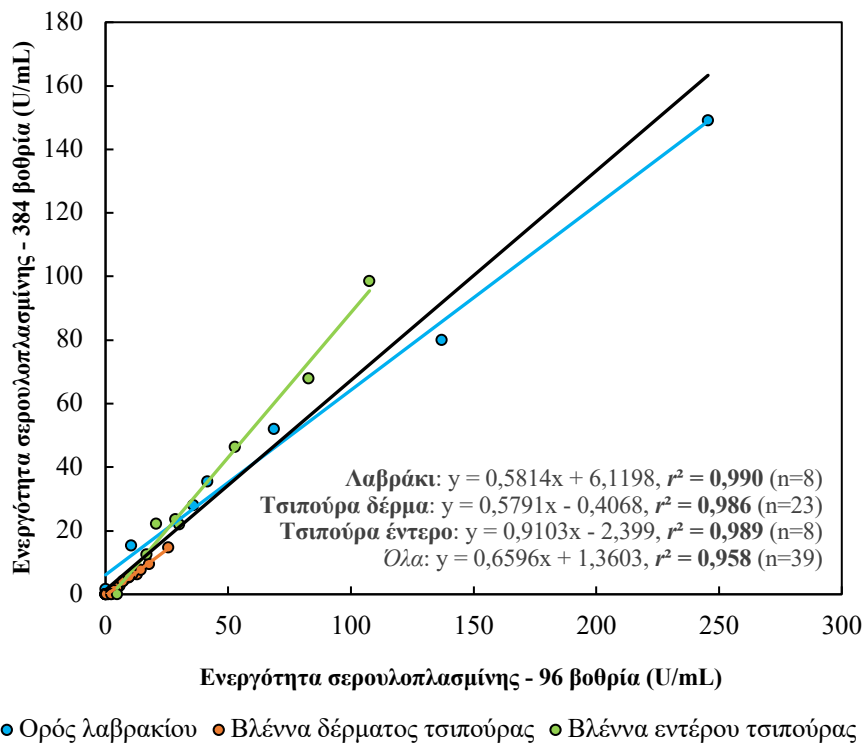
Ορός από λαβράκι		µg/ml <i>Micrococcus luteus</i>			
		100	125	150	175
Συντελεστής συσχέτισης $r$		0,798	<b>0,996</b>	0,696	0,854
Wilcoxon κατά ζεύγη	Αρνητική Μεταβολή	8	8	8	8
	Θετική Μεταβολή	0	0	0	2
	Καμία Μεταβολή	0	0	0	0
	$p$	0,012	<b>0,012</b>	0,012	0,263

Ορός και βλέννα δέρματος από τσιπούρα		125 µg/ml <i>Micrococcus luteus</i>
		20 µl δείγματος
Συντελεστής συσχέτισης $r$		0,976
Wilcoxon κατά ζεύγη	Αρνητική Μεταβολή	2
	Θετική Μεταβολή	<b>11</b>
	Καμία Μεταβολή	2
	$p$	<b>0,028</b>

### 3.1.2. Σερουλοπλασμίνη

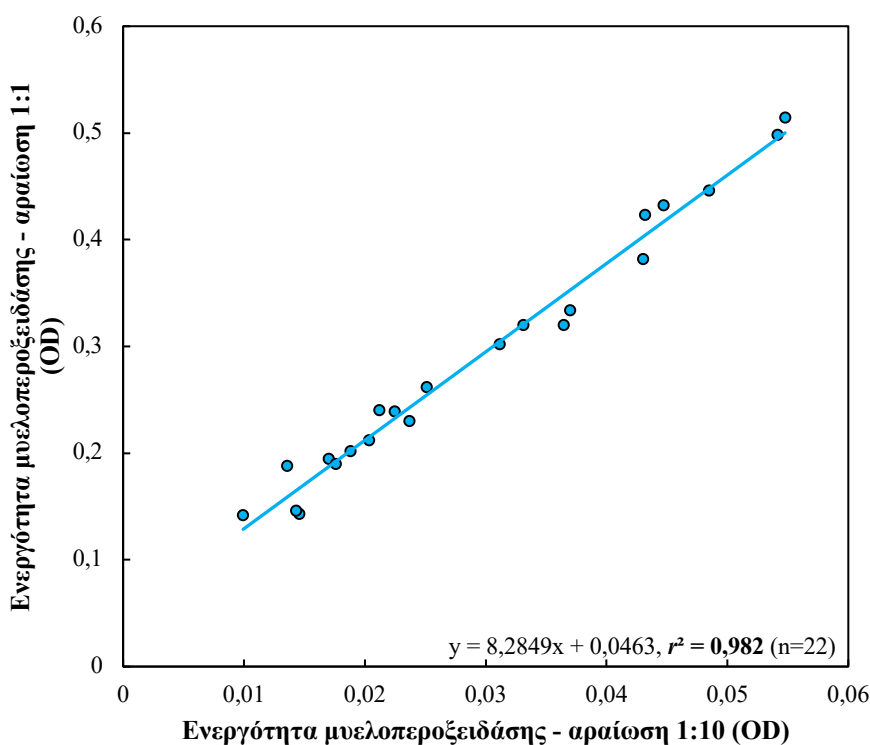
Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Δρ. Henry, για την μέτρηση της ενεργότητας σερουλοπλασμίνης χρησιμοποιούνται 10  $\mu\text{L}$  δείγματος και 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος παραφαιλυλενοδιαμίνης (PPD) 0,1%. Αύξηση της οπτικής πυκνότητας κατά 0,001 ανά λεπτό αντιστοιχεί σε 1 U ενζυμικής ενεργότητας.

Ακολουθώντας την προσέγγιση που ακολουθήθηκε για την λυσοζύμη, χρησιμοποιώντας την εξίσωση (1), οι όγκοι που πρέπει να χρησιμοποιηθούν είναι 4  $\mu\text{L}$  δείγματος και 40  $\mu\text{L}$  PPD. Έγινε επαλήθευση της υπόθεσης χρησιμοποιώντας δείγματα ορού λαβρακίου καθώς και βλέννα δέρματος και βλέννα εντέρου από τσιπούρα (**Γράφημα 2**). Οι υψηλές τιμές των συντελεστών συσχέτισης (0,99) αποδεικνύουν πως η χρήση των παραπάνω όγκων ήταν ορθή.



**Γράφημα 2.** Ενεργότητα σερουλοπλασμίνης μετρημένη σε μικροπλάκα 96 βοθρίων και σε μικροπλάκα 384 βοθρίων για ορό από λαβράκι, βλέννα δέρματος και εντέρου από τσιπούρα. Αναφέρονται οι εξισώσεις των ευθειών γραμμικής παλινδρόμησης καθώς και οι συντελεστές  $r^2$  των ευθειών για κάθε βιολογικό υλικό ξεχωριστά αλλά και για όλα τα ψάρια συγκεντρωτικά.



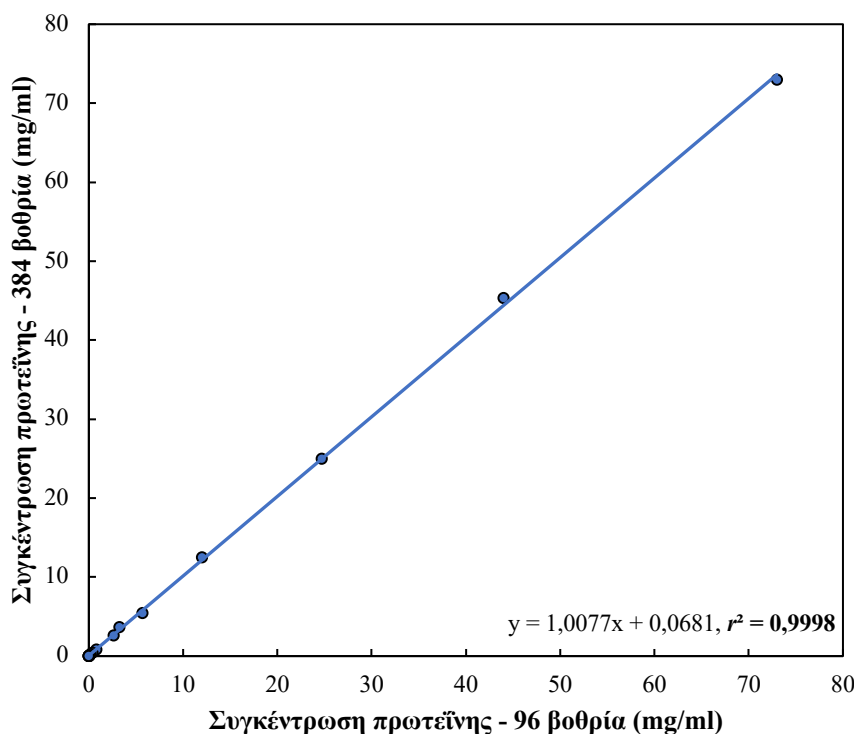


**Γράφημα 4.** Ενεργότητα μυελοϋπεροξειδάσης δειγμάτων βλέννας δέρματος τσιπούρας με αραιώση 1:10 και με αραιώση 1:1. Αναφέρεται η εξίσωση της ευθείας γραμμικής παλινδρόμησης καθώς και ο συντελεστής  $r^2$ .

### 3.1.4. Πρωτεΐνες

Η μέτρηση της ποσότητας των πρωτεϊνών στα δείγματα γίνεται με την μέθοδο Bradford, και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Δρ. Morgane Henry, χρησιμοποιούνται 20  $\mu\text{L}$  δείγματος και 200  $\mu\text{L}$  διαλύματος μπλε του Coomassie. Σύμφωνα λοιπόν με την εξίσωση (1), οι νέοι όγκοι θα πρέπει να είναι 8  $\mu\text{L}$  και 80  $\mu\text{L}$  αντίστοιχα. Επειδή στην μέθοδο χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη με αλβουμίνη ορού από βοοειδή (BSA) μπορούν να συγκριθούν οι πρότυπες καμπύλες στις δύο περιπτώσεις (96 και 384 βαθμιά). Αν οι προκύψουσες ποσότητες πρωτεΐνης είναι ίδιες για τις δύο καμπύλες, δηλαδή αν η ευθεία γραμμικής παλινδρόμησης έχει την μορφή  $y=x$ , δηλαδή έχει κλίση 1 και σημείο τομής στον  $y$  άξονα το  $O(0,0)$ , τότε η υπόθεση είναι σωστή. Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 5**, ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ των μετρήσεων είναι σχεδόν ίσος με 1 ( $r^2 = 0,9998$ ). Ακόμη με την χρήση του προγράμματος Prism 7 (GraphPad), έγινε ο έλεγχος της κλίσης και του σημείου τομής της ευθείας. Πράγματι, η κλίση της ευθείας δεν διαφέρει σημαντικά από την τιμή 1 [ANOVA  $F_{(1, 14)} = 0,9297$ ;  $p = 0,3513$ ], ενώ το σημείο τομής δεν διαφέρει σημαντικά από την τιμή 0 [ANOVA  $F_{(1, 14)} = 0,5325$ ;  $p = 0,4776$ ]. Επομένως η υπόθεσή μας είναι ορθή.

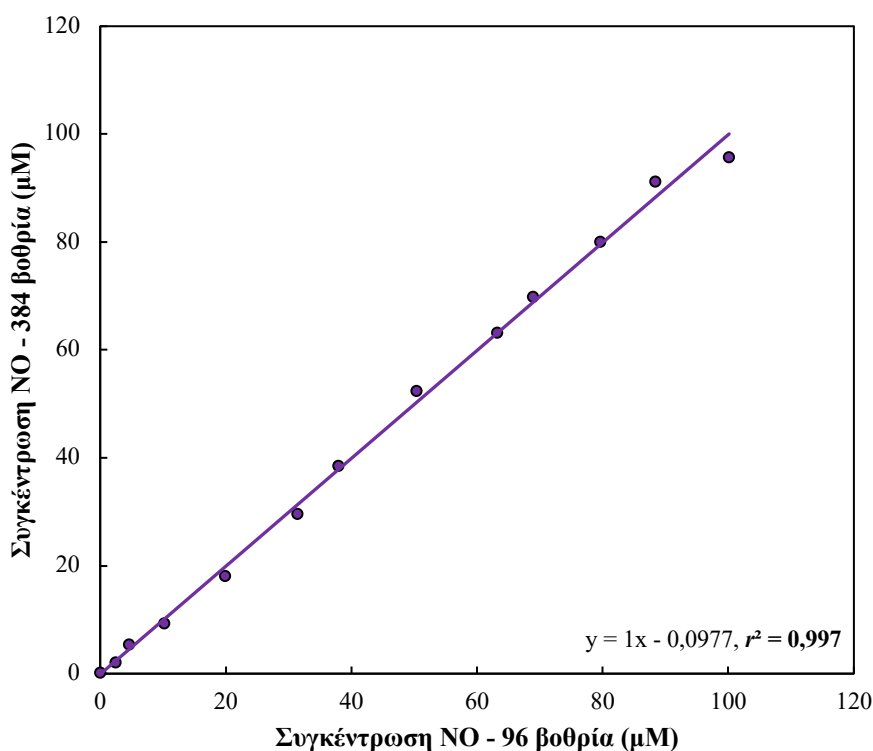




**Γράφημα 5.** Συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/ml) που προκύπτει από πρότυπη καμπύλη με βάση την οπτική απορρόφηση των πρότυπων δειγμάτων για ανάλυση 96 και 384 βοθρίων. Αναφέρεται η εξίσωση της ευθείας γραμμικής παλινδρόμησης καθώς και ο συντελεστής  $r^2$ . Έγινε έλεγχος με το πρόγραμμα Prism7, GraphPad και βρέθηκε ότι η κλίση της ευθείας δεν διαφέρει σημαντικά από την τιμή 1 [ANOVA  $F_{(1,14)} = 0,9297$ ;  $p = 0,3513$ ], και το σημείο τομής στον y άξονα δεν διαφέρει σημαντικά από το 0 (0,0) [ANOVA  $F_{(1,14)} = 0,5325$ ;  $p = 0,4776$ ].

### 3.1.5. Μονοξειδίο του αζώτου (NO)

Για την ανίχνευση του μονοξειδίου του αζώτου χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Griess. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Δρ. Henry, χρησιμοποιούνται 150  $\mu\text{L}$  δείγματος αραιωμένα με την προσθήκη 130  $\mu\text{L}$  νερού, και 20  $\mu\text{L}$  από το αντιδραστήριο Griess. Σύμφωνα με την εξίσωση (1), οι νέοι όγκοι θα πρέπει να είναι 60  $\mu\text{L}$  δείγματος, 52  $\mu\text{L}$  νερού και 8  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου Griess. Όπως και στην περίπτωση της μεθόδου κατά Bradford, και για την μέτρηση του μονοξειδίου του αζώτου χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη. Έτσι για την επιβεβαίωση της χρήσης των νέων όγκων λειτουργούμε όπως και παραπάνω, σχεδιάζοντας την ευθεία γραμμικής παλινδρόμησης ανάμεσα στις προβλεπόμενες τιμές στα 96 και 384 βοθρία, και ελέγχοντας αν η κλίση της ευθείας γραμμικής παλινδρόμησης ισούται με 1 και αν το σημείο τομής στον y άξονα ισούται με 0. Στο **Γράφημα 6** φαίνονται γραφικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης. Ο συντελεστής συσχέτισης είναι πολύ καλός ( $r^2 = 0,997$ ) ενώ και πάλι με την χρήση του προγράμματος Prism 7 (GraphPad), αποδείχτηκε πως η κλίση της ευθείας είναι ίση με 1 [ANOVA  $F_{(1,11)} = 0,06175$ ;  $p = 0,8083$ ] ενώ το σημείο τομής είναι όντως το 0(0,0) [ANOVA  $F_{(1,11)} = 0,1796$ ;  $p = 0,6799$ ].



**Γράφημα 6.** Συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου ( $\mu\text{M}$ ) που προκύπτει από πρότυπη καμπύλη με βάση την οπτική απορρόφηση των πρότυπων δειγμάτων για ανάλυση 96 και 384 βοθρίων. Αναφέρεται η εξίσωση της ευθείας γραμμικής παλινδρόμησης καθώς και ο συντελεστής  $r^2$ . Έγινε έλεγχος με το πρόγραμμα Prism7 (GraphPad) και βρέθηκε ότι η κλίση της ευθείας δεν διαφέρει σημαντικά από την τιμή 1 [ANOVA  $F_{(1, 11)} = 0,06175$ ;  $p = 0,8083$ ], και το σημείο τομής στον  $y$  άξονα δεν διαφέρει σημαντικά από το  $O(0,0)$  [ANOVA  $F_{(1, 11)} = 0,1796$ ;  $p = 0,6799$ ].

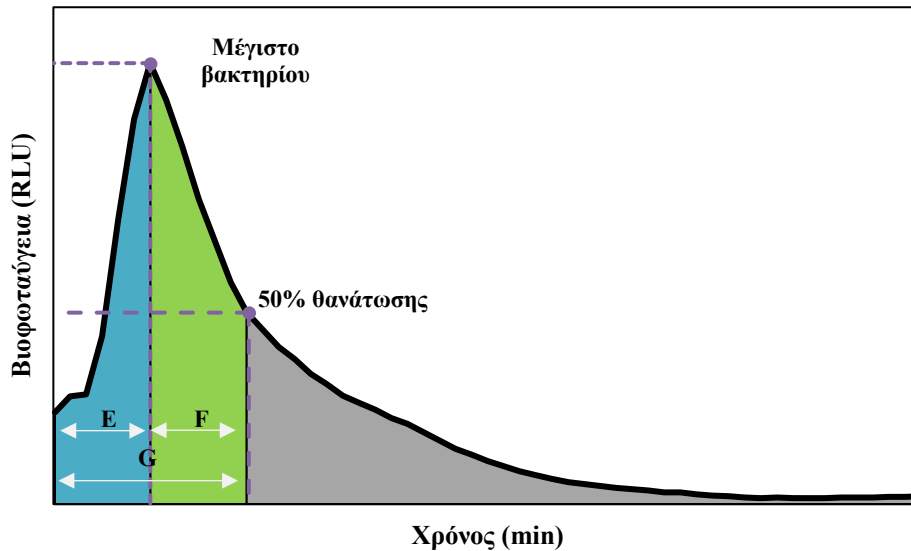
Συμπερασματικά, έγινε προκαταρκτικός έλεγχος για την επιτυχή προσαρμογή σε μικροπλάκες 384 βοθρίων όλων των πρωτοκόλλων που θα χρησιμοποιηθούν στα πειράματα της εργασίας. Η προσαρμογή των πρωτοκόλλων βασίστηκε στην διατήρηση των ίδιων συγκεντρώσεων δειγμάτων και αντιδραστηρίων, ενώ έγινε αλλαγή του όγκου τους, αναλογικά με τον μέγιστο όγκο των εκάστοτε βοθρίων. Ακόμη, έγινε επιτυχής δομική για την χρήση μεγαλύτερου όγκου ή μικρότερης αραιώσης δείγματος σε κάποιες αναλύσεις όπως στην μέτρηση της λυσοζύμης και της μυελοϋπεροξειδάσης, για την αύξηση της διακριτικής ικανότητας των μεθόδων.

### 3.2. Προσαρμογή πρωτοκόλλου συνολικής αντιβακτηριακής δράσης – δράσης συμπληρώματος

Για την μέτρηση της αντιβακτηριακής δράσης του ορού και της βλέννας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατά Henry *et al.* (2015) με μερικές τροποποιήσεις για την βελτιστοποίηση της ανάλυσης. Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους *E.coli* K-12 (pEGFP<sub>lux</sub>ABCDEamp), το οποίο φέρει τροποποιημένο πλασμίδιο με τα γονίδια *luxABCDE* κάτω από τον έλεγχο του Lac υποκινητή (Atosuo *et al.*, 2013). Τα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα *E.coli* παράγουν ισχυρή βιοφωταύγεια και επομένως η επώαση τους με δείγματα ορού ή βλέννας και η μέτρηση της μείωσης του φωτεινού σήματος σε πραγματικό χρόνο αντικατοπτρίζει την δράση αντιβακτηριακών παραγόντων. Θα πρέπει να σημειωθεί πως παρόλο που παραδοσιακά η δράση αυτή αποδίδεται στη δράση του συμπληρώματος, εν τούτοις στη θανάτωση των βακτηρίων συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες, όπως αντιμικροβιακά πεπτιδικά, πεντραζίνες, λεκτίνες, λυσοζύμη κ.ά. (Henry *et*

al., 2009). Για αυτό είναι ορθότερο να αναφέρεται η παραπάνω δράση σαν συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα και όχι απλά δραστηριότητα συμπληρώματος.

Σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο, τα δείγματα επωάζονται μαζί με συγκεκριμένη ποσότητα εναιωρήματος βακτηρίων, παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ , και παρακολουθείται η κινητική του φωτεινού σήματος. Στο **Γράφημα 7** φαίνεται μία τυπική καμπύλη που προκύπτει από τέτοιου είδους αναλύσεις.



**Γράφημα 7.** Κινητική της θανάτωσης του ανασυνδυασμένου βακτηρίου *E.coli* από δείγμα ορού λαβρακίου. Το μπλε τμήμα της καμπύλης στο οποίο οι μονάδες σχετικής φωτεινότητας (RLU) αυξάνονται, αντιστοιχεί στην αύξηση του βακτηρίου έως ότου ενεργοποιηθούν οι αντιβακτηριακοί μηχανισμοί (π.χ. συγκρότηση του συμπλέγματος μεμβρανικής επίθεσης MAC). Στο πράσινο τμήμα της καμπύλης, οι φωτεινότητα μειώνεται, επομένως οι αντιβακτηριακοί μηχανισμοί ξεκινούν την δράση τους, έως το σημείο που έχουν θανατωθεί το 50% των βακτηρίων. Στο γκρι τμήμα της καμπύλης, οι αντιβακτηριακοί παράγοντες συνεχίζουν την δράση τους μέχρι την εξολοκλήρου θανάτωση του βακτηρίου. E = χρονικό διάστημα από την έναρξη έως την ενεργοποίηση των αντιβακτηριακών μηχανισμών, F = χρονικό διάστημα από το μέγιστο του βακτηρίου έως το 50% της μέγιστης συγκέντρωσης, G = το άθροισμα των χρονικών διαστημάτων E και F (προσωπικές μετρήσεις).

Η κινητική της θανάτωσης των μικροοργανισμών μπορεί να χωριστεί σε δύο διακριτές φάσεις. Στην πρώτη φάση, η βιοφωταύγεια αυξάνεται μέχρι ενός μέγιστου αντί να μειώνεται, ενδεικτικό της αύξησης των μικροοργανισμών. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης «καθυστερήσης», οι αντιβακτηριακοί μηχανισμοί αναγνωρίζουν το βακτήριο και ξεκινούν τους καταρράκτες για την ενεργοποίησή τους. Ωστόσο ακόμα δεν γίνεται λύση των βακτηρίων. Ένα παράδειγμα για την εξήγηση αυτής της φάσης είναι ο χρόνος που απαιτείται από τον καταρράκτη του συμπληρώματος προκειμένου να γίνει η αναγνώριση του παθογόνου και σταδιακά να καταλήξει στο σχηματισμό του συμπλέγματος μεμβρανικής επίθεσης (Kilpi *et al.*, 2009). Η δεύτερη φάση ξεκινάει από την μέγιστη τιμή της φωτεινότητας και συνεχίζει με σιγμοειδή μείωση μέχρι την πλήρη θανάτωση των βακτηρίων (ή μέχρι να ολοκληρωθεί ο χρόνος επώασης). Σε αυτή την φάση οι αντιβακτηριακοί παράγοντες έχουν λάβει ενεργό δράση και θανατώνουν το βακτήριο με διάφορους μηχανισμούς π.χ. μέσω του συμπλέγματος μεμβρανικής επίθεσης, το οποίο είναι το καταληκτικό στάδιο και για τα τρία μονοπάτια ενεργοποίησης του συμπληρώματος.

Προκειμένου να περιγράψουμε την κινητική της αντίδρασης και να χαρακτηρίσουμε με ακρίβεια της αντιβακτηριακή δράση εισάγουμε μια σειρά από παραμέτρους. Η πρώτη είναι το ποσοστό της θανάτωσης των βακτηρίων το οποίο προκύπτει από την εξίσωση:

$$\text{ποσοστό θανάτωσης βακτηρίων (\%)} = 100 - \left( 100 \times \frac{\text{Μέγιστο RLU στο δείγμα}}{\text{Μέγιστο RLU στο μάρτυρα}} \right)$$

Ωστόσο πολλές φορές η παράμετρος αυτή δεν μπορεί να περιγράψει ικανοποιητικά την αντιβακτηριακή δράση, καθώς μπορεί τα βακτήρια να φτάνουν στην ίδια συγκέντρωση τόσο στο δείγμα όσο και στο μάρτυρα, αλλά να εμφανίζουν διαφορετικό ρυθμό αύξησης η θανάτωσης. Επειδή η παράμετρος του ποσοστού θανάτωσης δεν λαμβάνει υπόψιν την κινητική της αντίδρασης, πολλές φορές οδηγεί σε λανθασμένη εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

Για τον λόγο αυτό εισάγουμε τρεις ακόμα παραμέτρους που σχετίζονται με την κινητική της αντίδρασης και αναφέρονται σε χρονικά διαστήματα. Η πρώτη παράμετρος συμβολίζεται με το γράμμα E, και αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα από την έναρξη της επώασης μέχρι την χρονική στιγμή που τα βακτήρια αποκτούν την μέγιστη συγκέντρωση, δηλαδή εκπέμπουν την μέγιστη φωτεινότητα. Η δεύτερη παράμετρος συμβολίζεται με το γράμμα F και αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα από την χρονική στιγμή της μέγιστης φωτεινότητας μέχρι την χρονική στιγμή που η φωτεινότητα έχει μειωθεί στο 50% οπότε θεωρούμε ότι έχει θανατωθεί το 50% των βακτηρίων. Η τρίτη και τελευταία παράμετρος συμβολίζεται με το γράμμα G και αντιστοιχεί στο άθροισμα των χρονικών διαστημάτων E και F, δηλαδή από την έναρξη της επώασης μέχρι την χρονική στιγμή της θανάτωσης του 50% των βακτηρίων. Τα διαστήματα αυτά φαίνονται στο **Γράφημα 7** (Kilpi *et al.*, 2009; Henry *et al.*, 2015). Συνοπτικά μπορούμε να περιγράψουμε το χρονικό διάστημα E σαν τον ρυθμό της φάσης ενεργοποίησης, το χρονικό διάστημα F σαν τον ρυθμό της θανάτωσης του 50% των βακτηρίων από την λυτική φάση και το χρονικό διάστημα G σαν τον ρυθμό της θανάτωσης του 50% των βακτηρίων από το σύνολο των φάσεων τόσο της ενεργοποίησης όσο και της λυτικής φάσης.

Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των Atosuo *et al.* (2013) και Henry *et al.* (2015), τα βακτήρια που επωάζονται μαζί με το δείγμα βρίσκονται σε εναιώρημα ισότονου ή ρυθμιστικού διαλύματος (π.χ. HBSS, PBS κλπ.). Δηλαδή θεωρείται ότι τα βακτήρια δεν έχουν θρεπτικό μέσο προκειμένου να αναπτυχθούν. Με αυτό τον τρόπο όμως δεν μπορούμε να γνωρίζουμε με ακρίβεια αν η πτώση της φωτεινότητας οφείλεται στην θανάτωση των βακτηρίων από αντιμικροβιακούς παράγοντες ή αν ο πληθυσμός των βακτηρίων μειώνεται λόγω της έλλειψης θρεπτικών συστατικών.

Για αυτό το λόγο διενεργήθηκαν μια σειρά από προπαρασκευαστικά πειράματα στα οποία το ισότονο ή ρυθμιστικό διάλυμα αντικαταστάθηκε από θρεπτικό μέσο (LB), ώστε να είμαστε σίγουροι πως τα βακτήρια είναι ικανά για μέγιστη δυνατή αύξηση παρουσία του βιολογικού δείγματος. Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν η εύρεση: α) της βέλτιστης συγκέντρωσης και ποσότητας του βακτηρίου και β) της βέλτιστης ποσότητας του ορού και της βλέννας, που απαιτούνται για την αντίδραση.

Επειδή η δοκιμασία γίνεται σε λευκή μικροπλάκα με 384 βοθρία, ο όγκος της αντίδρασης είναι περιορισμένος στα 120 μl. Προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανή υπερχειλίση των βοθρίων όπως στην περίπτωση της δημιουργίας φυσαλίδων, ο τελικός όγκος της αντίδρασης καθορίστηκε στα 100 μl.

Στον **Πίνακα 2** φαίνονται οι διαφορετικοί όγκοι δείγματος και βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκαν. Αποφασίστηκε πως σε κάθε συνδυασμό, τα βακτήρια μαζί με το επιπλέον θρεπτικό υλικό θα καταλαμβάνουν το μισό του συνολικού όγκου της αντίδρασης, δηλαδή 50 μL. Το άλλο μισό θα καταλαμβάνει το δείγμα μαζί με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος PBS έως τον τελικό όγκο των 40 μL. Η προσθήκη των 10 μl MgCa απαραίτητων για την λειτουργία της κλασικής οδού του συμπληρώματος, ολοκληρώνει τον όγκο αντίδρασης στα 100 μL. Όσον αφορά την συγκέντρωση του εναιωρήματος των βακτηρίων αυτό καθορίστηκε σύμφωνα με την οπτική πυκνότητά (OD) του, αφαιρώντας τον μάρτυρα. Οι οπτικές πυκνότητες που δοκιμάστηκαν είναι οι τιμές 0,6 , 0,3 (αραιώση δέκα φορές του εναιωρήματος με OD = 0,6) και 0,4.

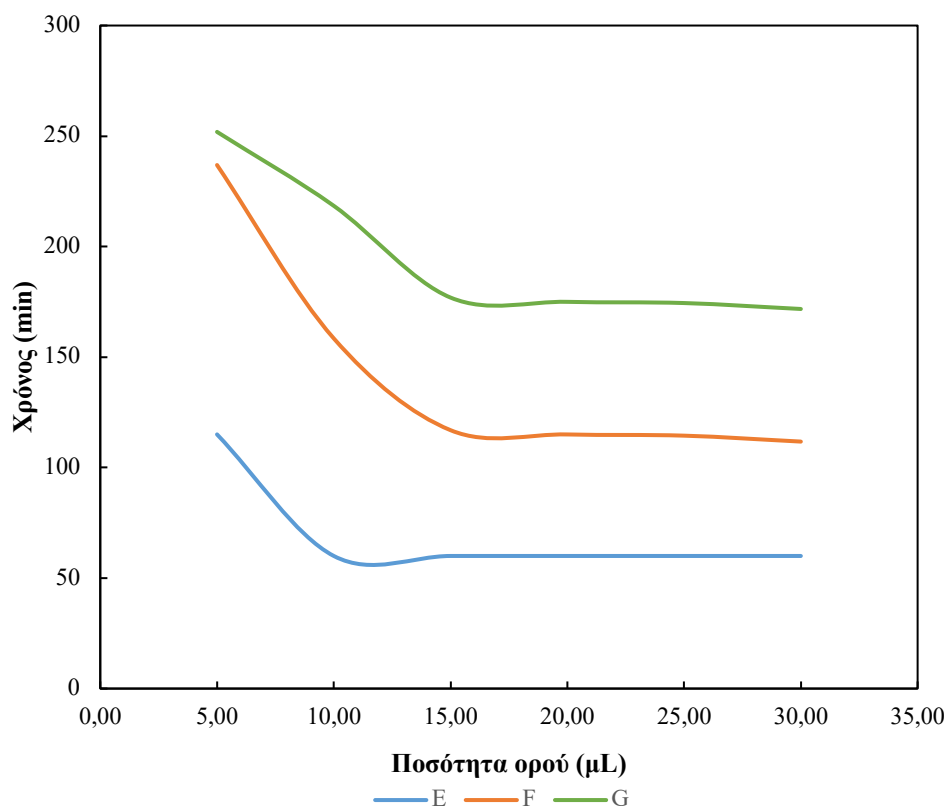
Σύμφωνα με τους (Kilpi *et al.*, 2009), η σχέση των τριών παραμέτρων E, F, G συναρτήσει της αυξανόμενης ποσότητας δείγματος ακολουθεί εκθετική μείωση (**Γράφημα 8**). Έτσι, θεωρούμε ότι οι κατάλληλοι όγκοι-στόχοι για την αντίδραση, είναι αυτοί που βρίσκονται στο τελευταίο τμήμα της καμπύλης, όπου η μείωση είναι πολύ μικρή και δεν υπάρχει σχεδόν καμία μεταβολή στις παραμέτρους

με την αύξηση του όγκου. Στις αναλύσεις και στα γραφήματα που αναφέρονται παρακάτω έχει επιλεγθεί να παρουσιαστούν δύο παράμετροι που περιγράφουν ικανοποιητικά την δοκιμασία: η παράμετρος G, δηλαδή ο χρόνος από την έναρξη μέχρι την θανάτωση του 50% των βακτηρίων, καθώς και η παράμετρος του ποσοστού θανάτωσης βακτηρίων.

Τα αρχικά πειράματα έγιναν με εναιώρημα βακτηρίων με οπτική πυκνότητα  $OD_{450nm}=0,6$ , όπως στο αρχικό πρωτόκολλο (Κοκού *et al.*, 2012) καθώς και με αραιωμένο εναιώρημα 1/10 με οπτική πυκνότητα  $OD_{450nm} = 0,3$ .

**Πίνακας 2.** Ποσότητες βιολογικού δείγματος (ορού ή βλέννας), σε συνδυασμό με ποσότητες βακτηρίων *E.coli* σε θρεπτικό μέσο LB, που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του βέλτιστου συνδυασμού. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν πάντα 100 μλ. Η συγκέντρωση των βακτηρίων καθορίστηκε με βάση την οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις εναιωρημάτων με απορρόφηση 0,6, 0,3 και 0,4 ( με αφαίρεση του μάρτυρα).

10 μl MgCa +βιολογικό δείγμα	<i>E.coli</i> σε LB					
	5 μl <i>E.coli</i> + 45 μl LB	10 μl <i>E.coli</i> + 40 μl LB	20 μl <i>E.coli</i> + 30 μl LB	30 μl <i>E.coli</i> + 20 μl LB	40 μl <i>E.coli</i> + 10 μl LB	45 μl <i>E.coli</i> + 5 μl LB
10 μl δείγματος	+ 30 PBS	+ 30 PBS	+ 30 PBS	+ 30 PBS	+ 30 PBS	+ 30 PBS
20 μl δείγματος	+ 20 PBS	+ 20 PBS	+ 20 PBS	+ 20 PBS	+ 20 PBS	+ 20 PBS
25 μl δείγματος	+ 15 PBS	+ 15 PBS	+ 15 PBS	+ 15 PBS	+ 15 PBS	+ 15 PBS
30 μl δείγματος	+ 10 PBS	+ 10 PBS	+ 10 PBS	+ 10 PBS	+ 10 PBS	+ 10 PBS
40 μl δείγματος	-	-	-	-	-	-



**Γράφημα 8.** Εκθετική μείωση των παραμέτρων E, F και G της συνολικής αντιβακτηριακής δράσης ορού συναρτήσει της αυξανόμενης ποσότητας ορού λαβρακίου. Επιλέγοντας ποσότητες ορού που βρίσκονται στο σταθερό τμήμα της καμπύλης (δηλαδή μεγαλύτερες από 15-20  $\mu\text{L}$ ) αυξάνεται η βεβαιότητα για τα αποτελέσματα της δοκιμασίας.

Στο **Γράφημα 9** παρουσιάζονται οι τιμές της παραμέτρου G (A, Γ) και το ποσοστό θανάτωσης βακτηρίων (B, Δ) συναρτήσει του όγκου του ορού για το λαβράκι (A, B) και για την τσιπούρα (Γ, Δ), και στο **Γράφημα 10** παρουσιάζονται οι ίδιοι παράμετροι για την βλέννα δέρματος στα ίδια είδη. Βλέποντας τα γραφήματα συμπεραίνουμε ότι:

- Για τον ορό του λαβρακίου, βέλτιστες ποσότητες βακτηρίου αποτελούν τα 5  $\mu\text{L}$  με  $\text{OD}=0,6$  ή 40-45  $\mu\text{L}$  με  $\text{OD}=0,3$ , με ποσότητα ορού μεγαλύτερη από 20  $\mu\text{L}$ .
- Για τον ορό της τσιπούρας, βέλτιστη ποσότητα βακτηρίου αποτελούν τα 5  $\mu\text{L}$  με  $\text{OD}=0,6$  ή 30-45  $\mu\text{L}$  με  $\text{OD}=0,3$ , με ποσότητα ορού μεγαλύτερη από 20  $\mu\text{L}$ .
- Για την βλέννα δέρματος του λαβρακίου, βέλτιστες ποσότητες βακτηρίου αποτελούν τα 10  $\mu\text{L}$  με  $\text{OD}=0,6$  ή 45  $\mu\text{L}$  με  $\text{OD}=0,3$ , με ποσότητα ορού μεγαλύτερη από 20  $\mu\text{L}$ , ωστόσο το ποσοστό θανάτωσης για αυτές τις τιμές είναι πάντα μηδενικό. Οι καμπύλες δεν έχουν το προβλεπόμενο σχήμα και δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα.
- Για την βλέννα δέρματος της τσιπούρας, βέλτιστες ποσότητες βακτηρίου αποτελούν τα 10  $\mu\text{L}$  με  $\text{OD}=0,6$  με ποσότητα ορού μεγαλύτερη από 20  $\mu\text{L}$ , ωστόσο το ποσοστό θανάτωσης για αυτές τις τιμές δεν είναι σταθερό αλλά φθίνει. Όπως και στην περίπτωση της βλέννας του λαβρακίου δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα εφόσον οι καμπύλες δεν έχουν το προβλεπόμενο σχήμα.

Εκτός όμως από την περίπτωση της βλέννας όπου οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν δεν ήταν οι κατάλληλες, ακόμα και στην περίπτωση των ορών, η ποσότητα των 5  $\mu\text{L}$  των βακτηρίων είναι πολύ μικρή και πολλές φορές μπορούμε να οδηγηθούμε σε πειραματικά λάθη κατά την μεταφορά, ενώ η

ποσότητα των 45  $\mu\text{L}$  είναι αρκετά μεγάλη και μειώνει τον όγκο που θα μπορούσε να καταλάβει καθαρό θρεπτικό υλικό.

Έτσι, υποτέθηκε πως η βέλτιστη συγκέντρωση βακτηρίου θα πρέπει να βρίσκεται μεταξύ αυτών των δύο παραπάνω συγκεντρώσεων. Για να εξακριβωθεί η βέλτιστη συγκέντρωση, εξετάστηκε η αρχική φωτεινότητα (RLU) που εξέπεμπαν τα βακτήρια στην αρχή της επώασης στις παραπάνω «βέλτιστες» περιπτώσεις. Το εύρος της αρχικής φωτεινότητας κυμαινόταν από 70.000 έως 110.000 RLU. Έπρεπε λοιπόν να εξακριβωθεί ποια οπτική απορρόφηση – συγκέντρωση βακτηρίων αντιστοιχεί σε αυτό το εύρος RLU καθώς και τον ακριβή όγκο που πρέπει να χρησιμοποιηθεί. Για αυτό τον λόγο έγιναν διαδοχικές αραιώσεις εναιωρήματος *E.coli* σε LB, αρχικής οπτικής πυκνότητας  $\text{OD} = 0,6$  και αφού μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα 200  $\mu\text{L}$  από κάθε αραιώση, στη συνέχεια μετρήθηκε η αρχική φωτεινότητα RLU από ένα εύρος όγκων για κάθε μία από τις παραπάνω αραιώσεις. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν όγκοι: 5, 10, 15, 20, 30, 40 και 45  $\mu\text{L}$  από κάθε αραιώση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 3**. Στη συνέχεια σχεδιάστηκε σε γράφημα (**Γράφημα 11**) η σχέση φωτεινότητας – οπτικής απορρόφησης για κάθε όγκο εναιωρήματος βακτηρίων.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα, φαίνεται πως οι αραιώσεις με οπτική απορρόφηση 0,4 και 0,5 σε εύρος όγκων 20-40  $\mu\text{L}$  και 10-20  $\mu\text{L}$  αντίστοιχα ικανοποιούν τις συνθήκες που αναφέραμε παραπάνω. Ωστόσο επειδή η αραιώση με  $\text{OD}=0,5$  σε όγκους μεγαλύτερους από 20  $\mu\text{L}$  εμφανίζει τιμές φωτεινότητας αρκετά μεγαλύτερες από το επιθυμητό εύρος, τελικά καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η απαιτούμενη συγκέντρωση βακτηρίων είναι αυτή που αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα 0,4 με αφαίρεση της τιμής του μάρτυρα.

Για να επιβεβαιώσουμε το παραπάνω συμπέρασμα, επαναλαμβάνουμε τα αρχικά πειράματα χρησιμοποιώντας αυτή την φορά καλλιέργεια ανασυνδυασμένων βακτηρίων *E.coli* που έχει προσαρμοστεί σε οπτική πυκνότητα 0,4. Δοκιμάστηκαν πέντε διαφορετικοί όγκοι καλλιέργειας (10, 20, 30, 40 και 50  $\mu\text{L}$ ) καθώς και πέντε διαφορετικοί όγκοι δείγματος ορού ή βλέννας (10, 20, 25, 30 και 40  $\mu\text{L}$ ), για να καθοριστούν οι τελικοί όγκοι που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στις αναλύσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα **Γραφήματα 13, 14** για τον ορό και βλέννα δέρματος τσιπούρας καθώς και για τον ορό λαβρακίου. Παρατηρώντας τα γραφήματα συμπεραίνουμε ότι:

- Για τον ορό λαβρακίου ο βέλτιστος όγκος δείγματος είναι από 20 έως 30  $\mu\text{L}$  ενώ ο βέλτιστος όγκων βακτηρίων είναι από 10 έως 30  $\mu\text{L}$ .
- Για τον ορό τσιπούρας ο βέλτιστος όγκος δείγματος είναι από 20 έως 30  $\mu\text{L}$  ενώ ο βέλτιστος όγκων βακτηρίων είναι από 20 έως 30  $\mu\text{L}$ .
- Για την βλέννα δέρματος τσιπούρας ο βέλτιστος όγκος δείγματος είναι από 20 έως 30  $\mu\text{L}$  ενώ ο βέλτιστος όγκων βακτηρίων είναι από 20 έως 40  $\mu\text{L}$ .

Με βάση τα παραπάνω, ο βέλτιστος όγκος δείγματος για την δοκιμασία είναι από 20 έως 30  $\mu\text{L}$ . Για την εξοικονόμηση όγκου δείγματος, σαν βέλτιστος όγκος επιλέγονται τα 20 $\mu\text{L}$ . Ακόμη ο βέλτιστος όγκος βακτηρίων που να ικανοποιεί και τα τρία παραπάνω βιολογικά δείγματα είναι από 20 έως 30  $\mu\text{L}$ .

Χρησιμοποιώντας ως σταθερό όγκο δείγματος τα 20  $\mu\text{L}$ , πραγματοποιούμε μια επιπλέον ανάλυση για την βλέννα δέρματος λαβρακίου και για την βλέννα εντέρου τσιπούρας που παρουσιάζεται στο **Γράφημα 15**, ώστε να διαθέτουμε δεδομένα από το σύνολο των βιολογικών υλικών που θα εξεταστούν. Εξάγουμε το συμπέρασμα πως ο όγκος των βακτηρίων πρέπει να είναι ίσος ή μεγαλύτερος από 30  $\mu\text{L}$ .

Συγκεντρώνοντας λοιπόν τις παρατηρήσεις, ο όγκος δείγματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί στην δοκιμασία είναι τα 20  $\mu\text{L}$  ενώ ο όγκος βακτηρίων είναι τα 30  $\mu\text{L}$ , με οπτική πυκνότητα  $\text{OD}_{450\text{nm}}_{200\mu\text{L}} = 0,4$ , έχοντας αφαιρέσει την τιμή του μάρτυρα. Έτσι οδηγούμαστε στους παρακάτω όγκους αντίδρασης:

- ◆ 20 $\mu\text{L}$  δείγματος
- ◆ 10  $\mu\text{L}$  MgCa

- ◆ 30  $\mu\text{L}$  *E.coli*
- ◆ 20  $\mu\text{L}$  LB
- ◆ 20  $\mu\text{L}$  PBS

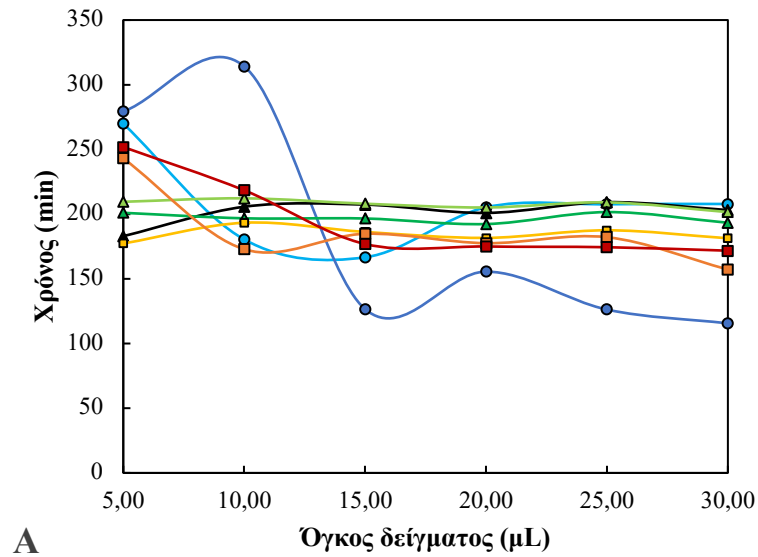
Όμως εφόσον οι όγκοι του δείγματος και των βακτηρίων είναι σταθεροί, δεν υπάρχει ανάγκη συμπλήρωσης του όγκου με PBS για εξισορρόπηση των διαφορών. Αντίθετα αν τον όγκο του PBS τον καταλάβει θρεπτικό υλικό LB, τότε θα επιτευχθεί καλύτερη αύξηση των βακτηρίων.

Πραγματοποιήθηκε λοιπόν μία δοκιμαστική αντίδραση με δείγματα βλέννας δέρματος από τσιπούρα, για να είμαστε σίγουροι πως η αντικατάσταση του PBS από θρεπτικό υλικό δεν αλλοιώνει τα αποτελέσματα. Στο **Γράφημα 16** φαίνεται η σχέση ανάμεσα στο ποσοστό θανάτωσης βακτηρίων μεταξύ των δύο αυτών περιπτώσεων για τα ίδια δείγματα. Παρατηρούμε ότι ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ των τιμών είναι αρκετά καλός ( $r=0,901$  &  $r^2=0,812$ ) και ότι το ποσοστό θανάτωσης χωρίς PBS είναι μεγαλύτερο για κάθε ψάρι. Επομένως είναι προτιμότερο να αντικατασταθεί το ρυθμιστικό φωσφορικό διάλυμα με θρεπτικό υλικό.

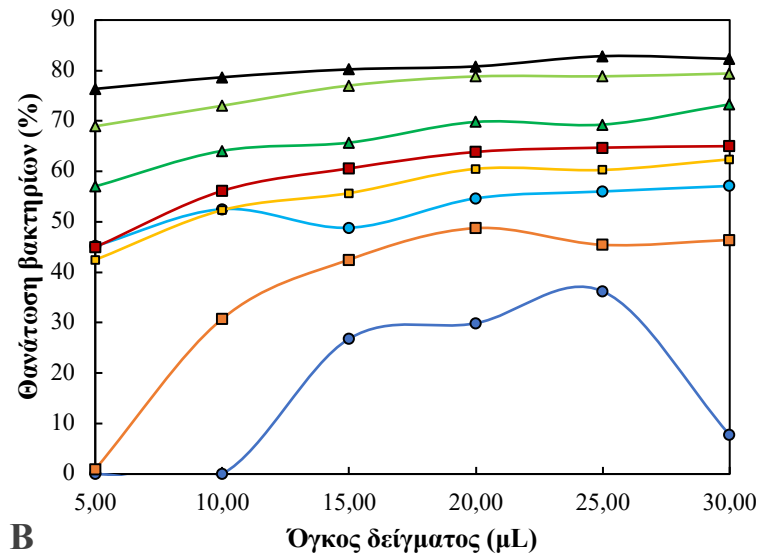
Καταλήγουμε λοιπόν στο οριστικό πρωτόκολλο με τους εξής όγκους:

- ◆ 20  $\mu\text{L}$  δείγματος
- ◆ 10  $\mu\text{L}$  MgCa
- ◆ 30  $\mu\text{L}$  *E.coli* με  $\text{OD}_{450\text{nm}}_{200\mu\text{L}} = 0,4$  με αφαίρεση του μάρτυρα
- ◆ 40  $\mu\text{L}$  LB

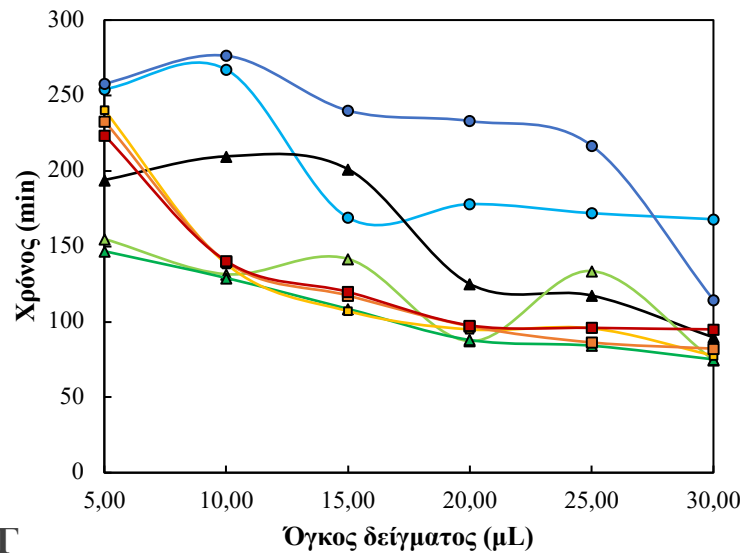




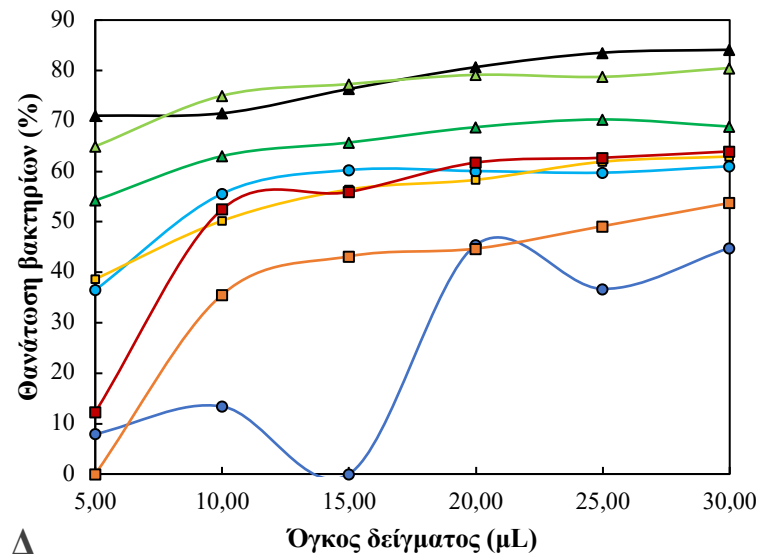
A



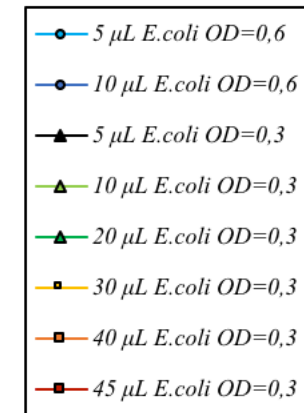
B



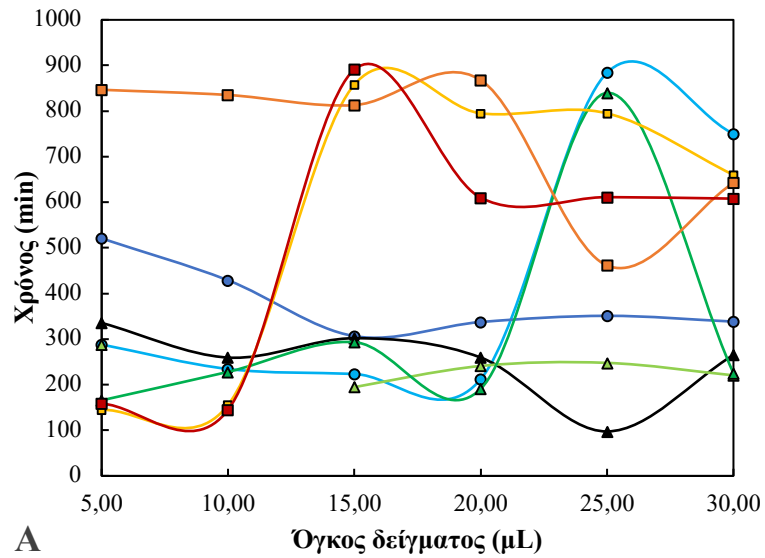
Γ



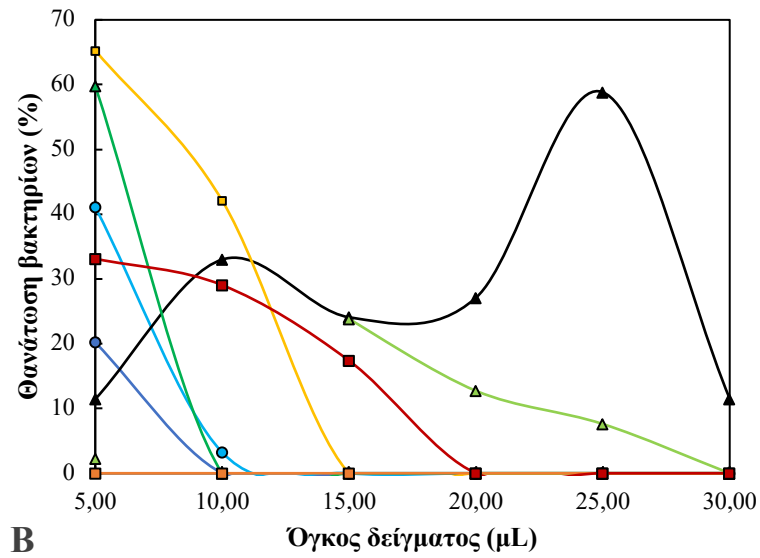
Δ



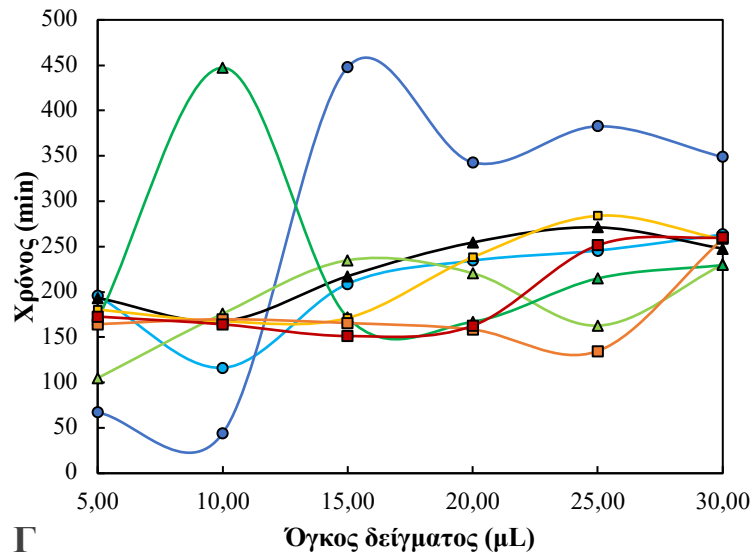
**Γράφημα 9.** Τιμές για την παράμετρο G (A και Γ) και για το ποσοστό θανάτωσης βακτηρίων (B και Δ) συναρτήσει της ποσότητας του ορού για το λαβράκι (A και B) και για την τσιπούρα (Γ και Δ).



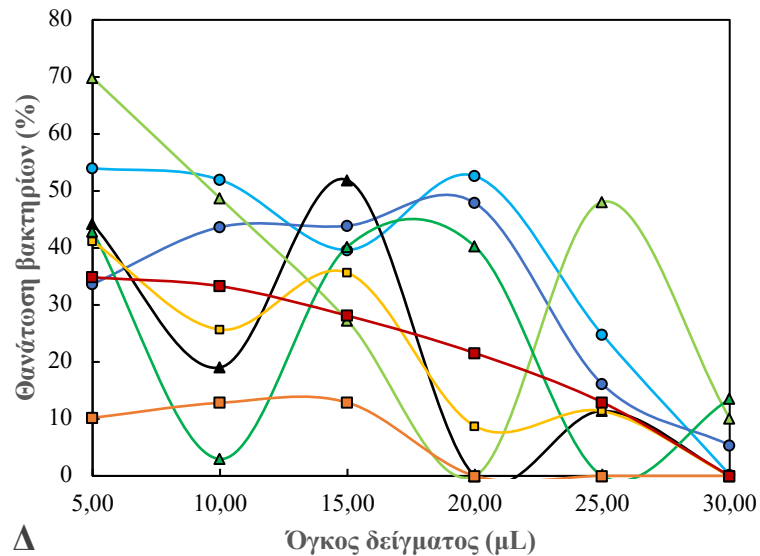
Α



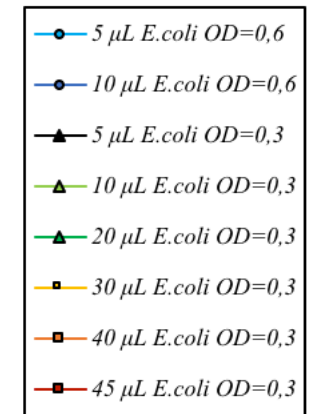
Β



Γ



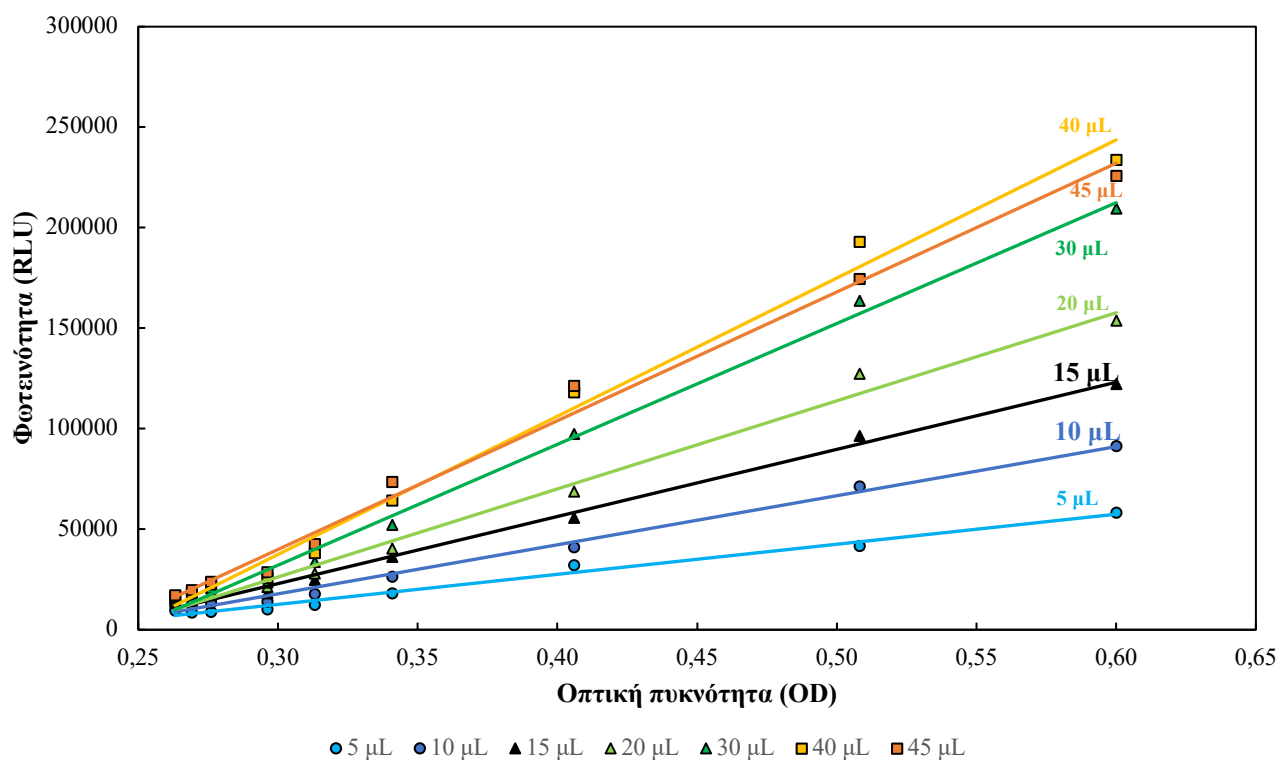
Δ



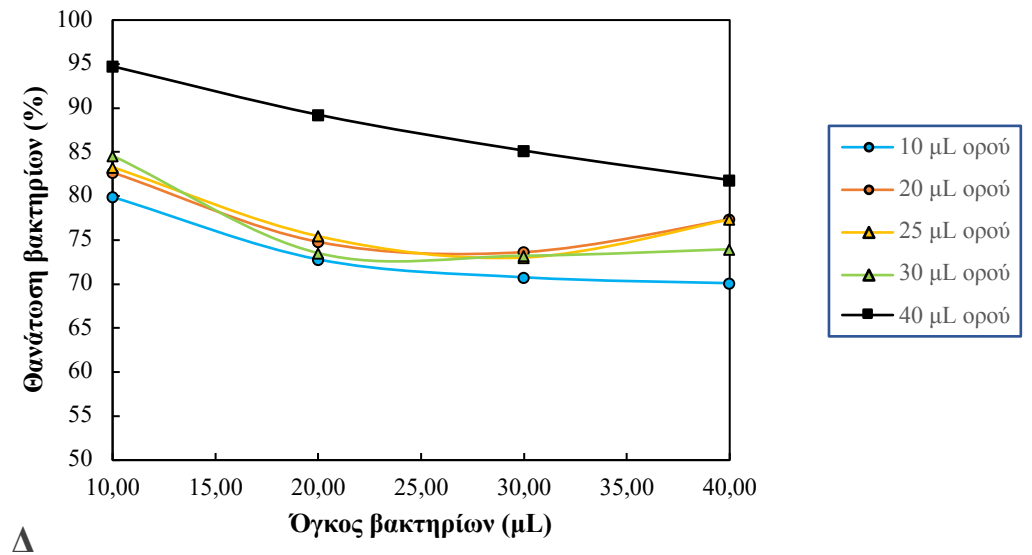
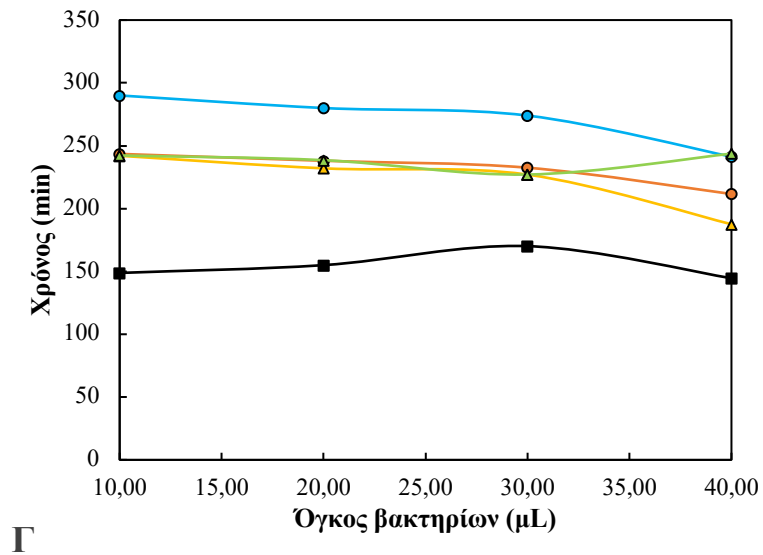
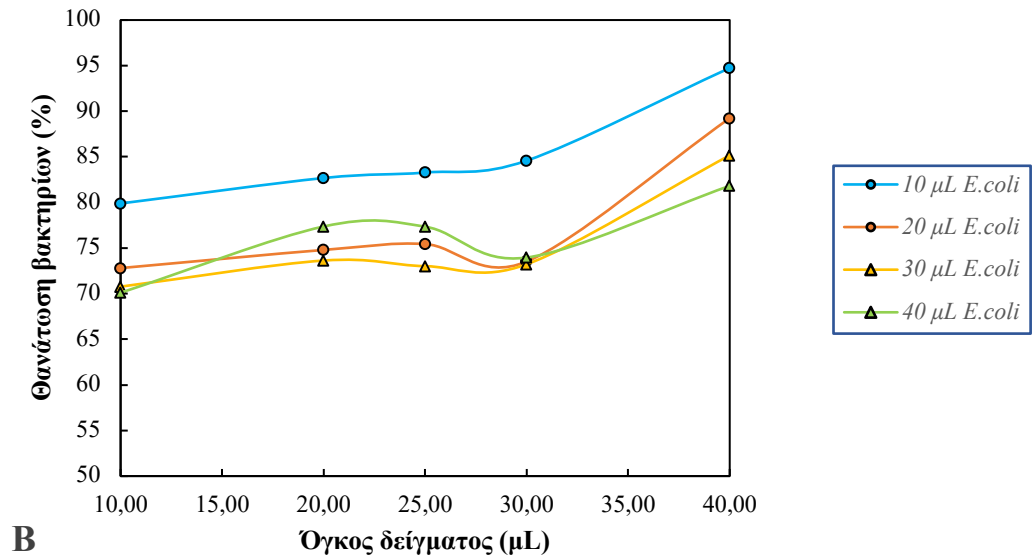
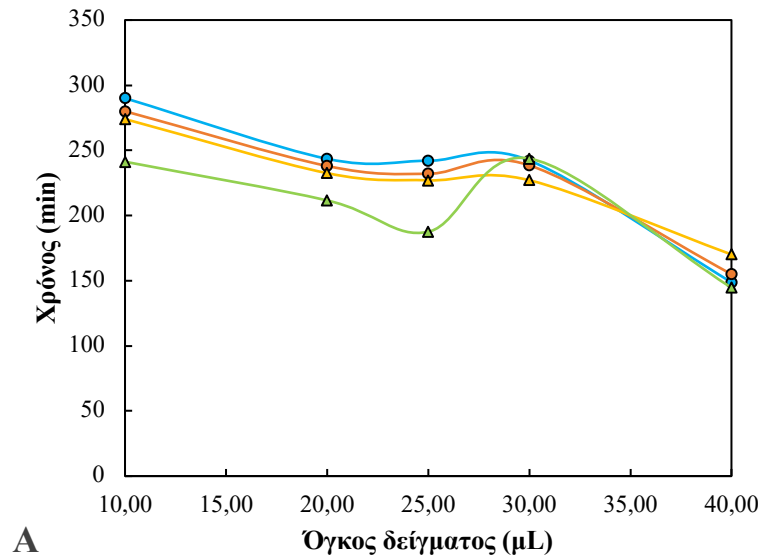
**Γράφημα 10.** Τιμές για την παράμετρο G (Α και Γ) και για το ποσοστό θανάτωσης βακτηρίων (Β και Δ) συναρτήσει της ποσότητας της βλέννας δέρματος για το λαβράκι (Α και Β) και για την τσιπούρα (Γ και Δ).

**Πίνακας 3.** Οπτική πυκνότητα όγκου 200  $\mu\text{L}$  (αφαιρώντας την τιμή του μάρτυρα) καθώς και φωτεινότητα (RLU) διαφορετικών όγκων από διαδοχικές αραιώσεις καλλιέργειας ανασυνδυασμένων βακτηρίων *E.coli*. Αναφέρονται επίσης οι συντελεστές συσχέτισης  $r^2$  για κάθε στήλη φωτεινότητας συγκεκριμένου όγκου σε σχέση με την οπτική απορρόφηση των 200  $\mu\text{L}$ . Με πράσινο χρώμα έχουν επισημανθεί τα κελιά που συνδυάζουν την επιθυμητή φωτεινότητα με τον επιθυμητό όγκο για την επιτυχή πραγματοποίηση του πειράματος.

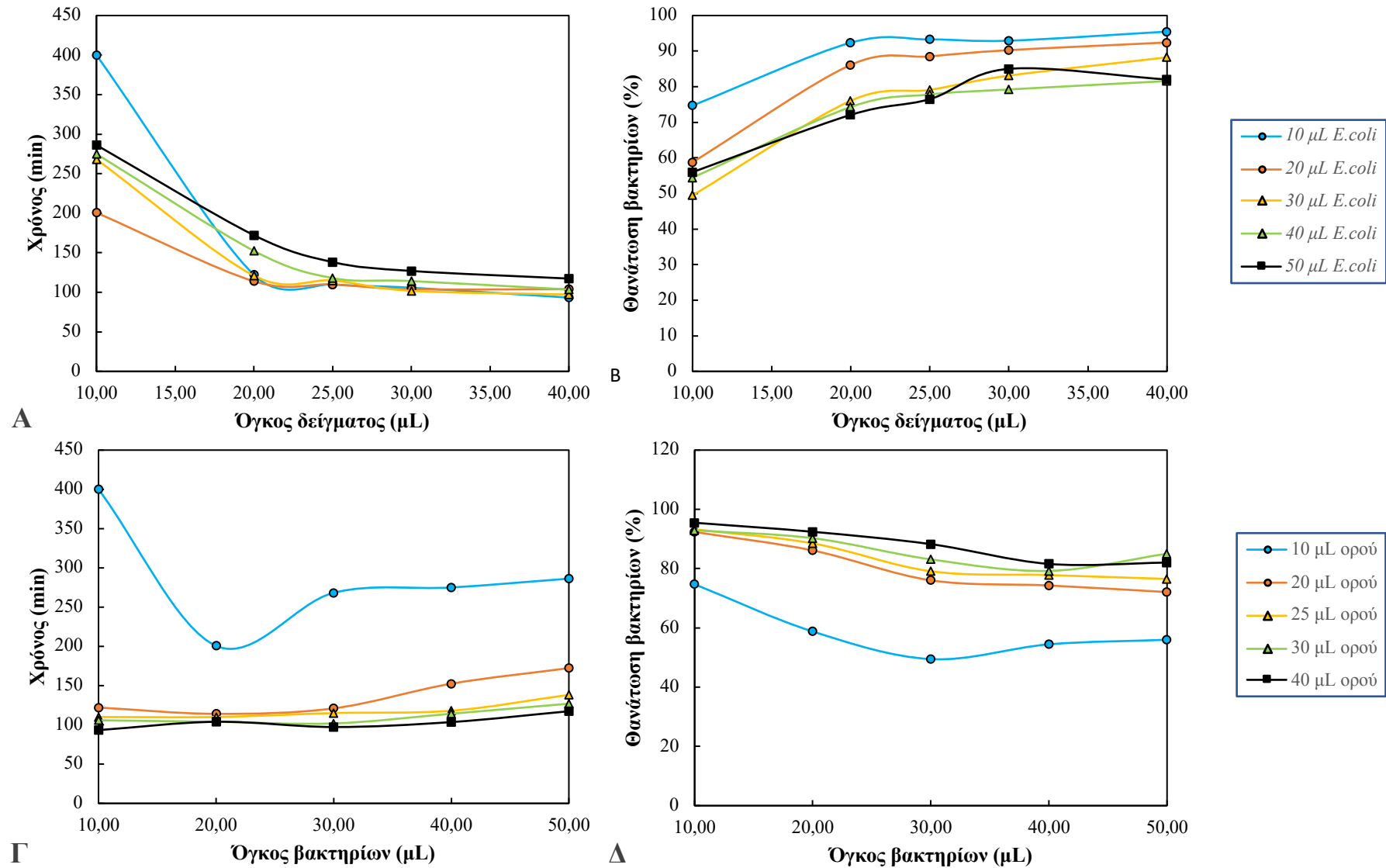
Αραίωση	OD450nm 200 $\mu\text{L}$	Φωτεινότητα (RLU)						
		5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$	45 $\mu\text{L}$
Καμία	0,60	58236	91335	122098	153804	209528	233667	225702
1:1	0,51	41528	71249	96478	127453	163703	192940	174425
1:2	0,41	32142	41110	55625	68805	97444	118207	121180
1:3	0,34	18060	26422	36121	40260	52199	64385	73380
1:4	0,31	12294	17898	24858	27854	33729	38267	42570
1:5	0,30	9980	13967	17929	21134	23492	25768	28565
1:6	0,28	8907	13151	17057	18474	20507	22549	23829
1:7	0,27	8638	12508	14209	15290	17469	18501	19528
1:8	0,26	9422	12868	13417	14153	15381	16619	17208
$r^2$		0,986	0,992	0,995	0,991	0,995	0,991	0,992



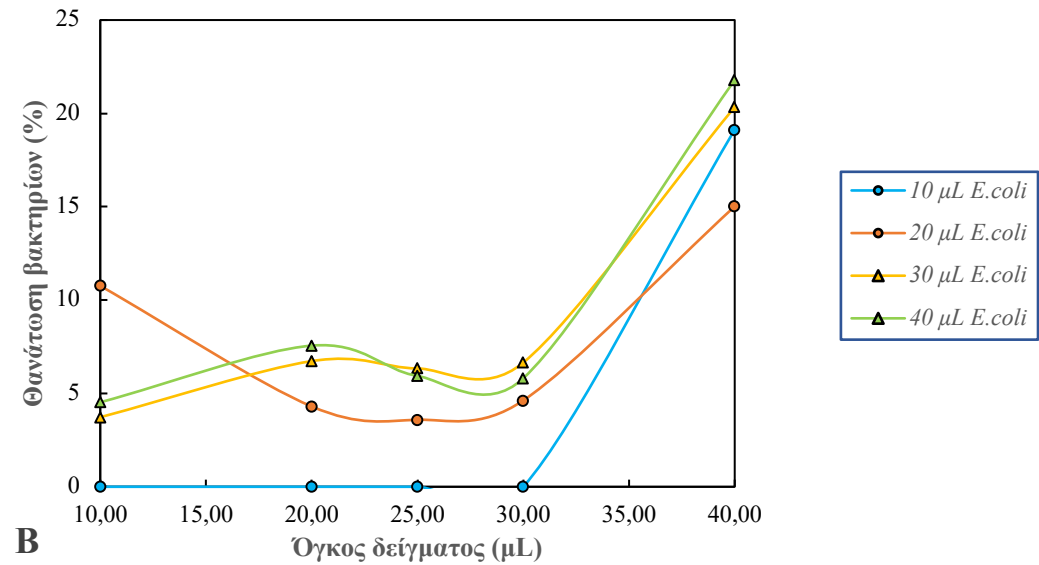
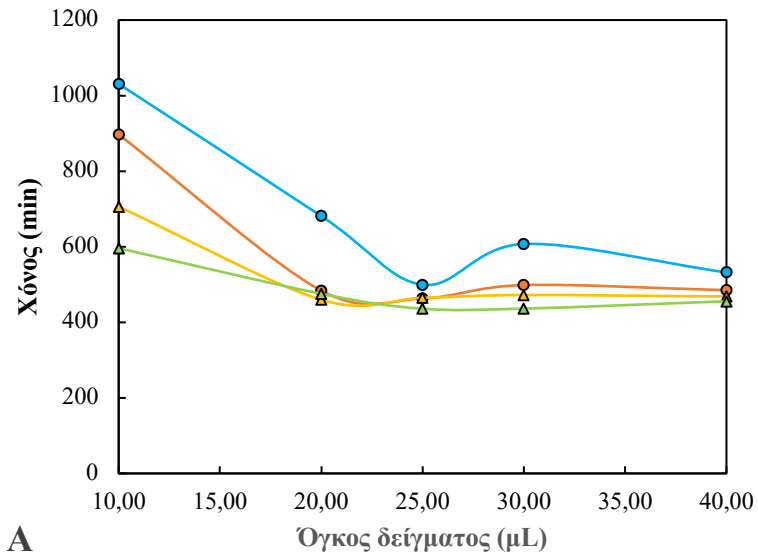
**Γράφημα 11.** Σχέση οπτικής πυκνότητας και φωτεινότητας για διαδοχικές αραιώσεις καλλιέργειας ανασυνδυασμένων βακτηρίων *E.coli* σε LB.H οπτική πυκνότητα μετρήθηκε σε 200 $\mu\text{L}$  δείγματος ενώ η φωτεινότητα μετρήθηκε σε διαφορετικούς όγκους δείγματος (5-45  $\mu\text{L}$ ). Από τις τιμές της οπτικής πυκνότητας έχει αφαιρεθεί η τιμή του μάρτυρα.



**Γράφημα 12.** Τιμές για την παράμετρο G (A, Γ) και για το % ποσοστό θανάτωσης βακτηρίων (B, Δ) συναρτήσει του όγκου ορού (A, B) και του όγκου βακτηρίων (Γ, Δ) για τον ορό του λαβρακίου.

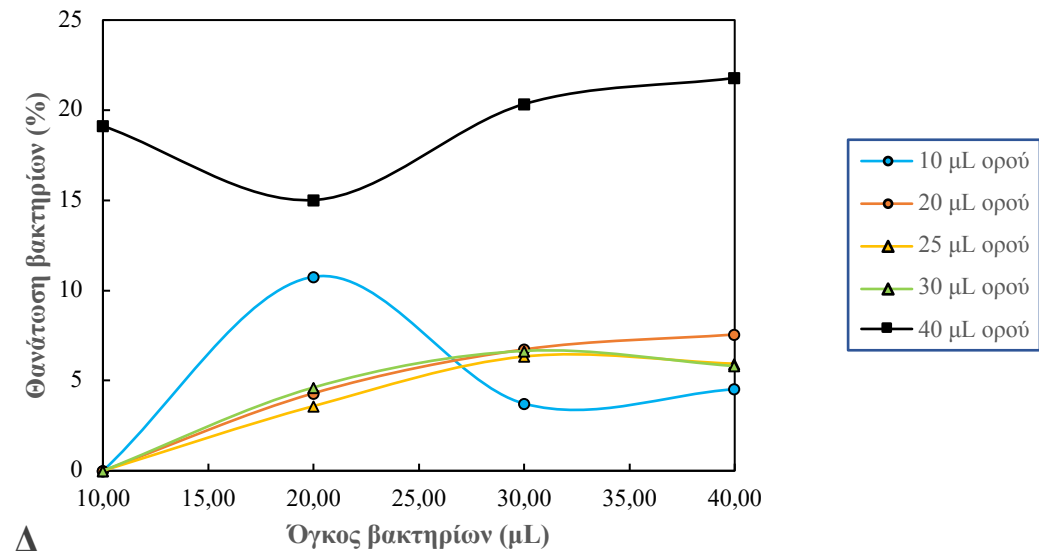
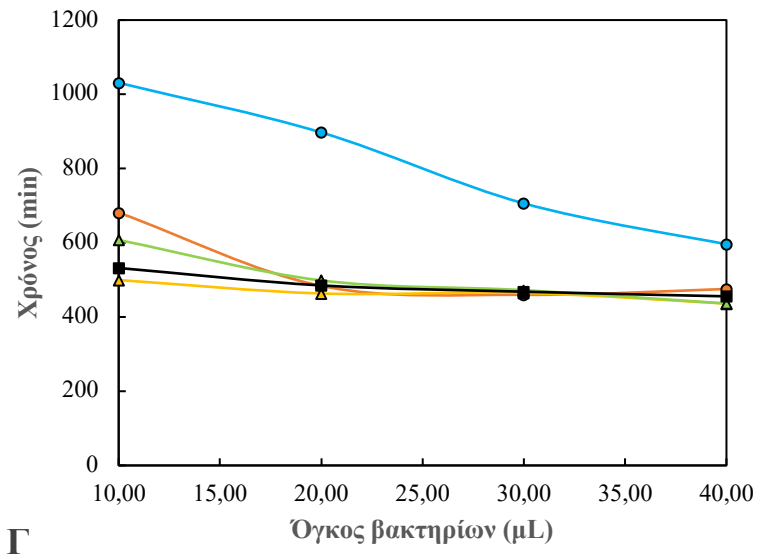


**Γράφημα 13.** Τιμές για την παράμετρο G (A, Γ) και για το % ποσοστό θανάτωσης βακτηρίων (B, Δ) συναρτήσει του όγκου ορού (A, B) και του όγκου βακτηρίων (Γ, Δ) για τον ορό της τσιπούρας.



A

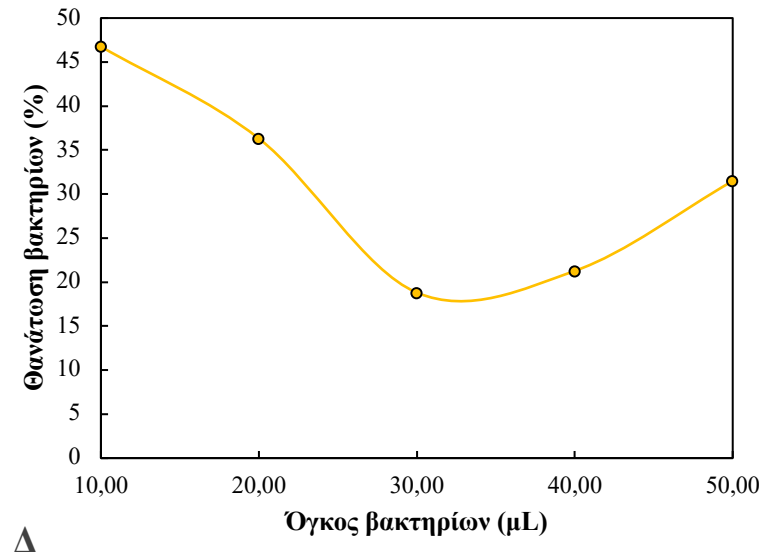
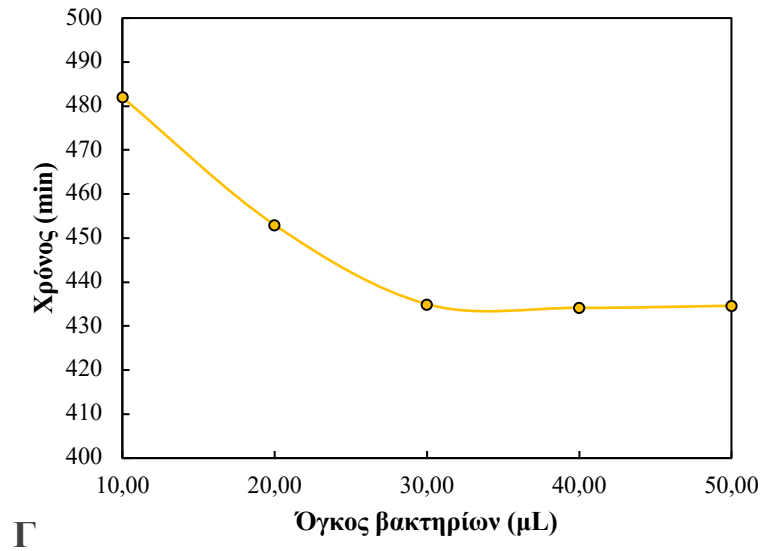
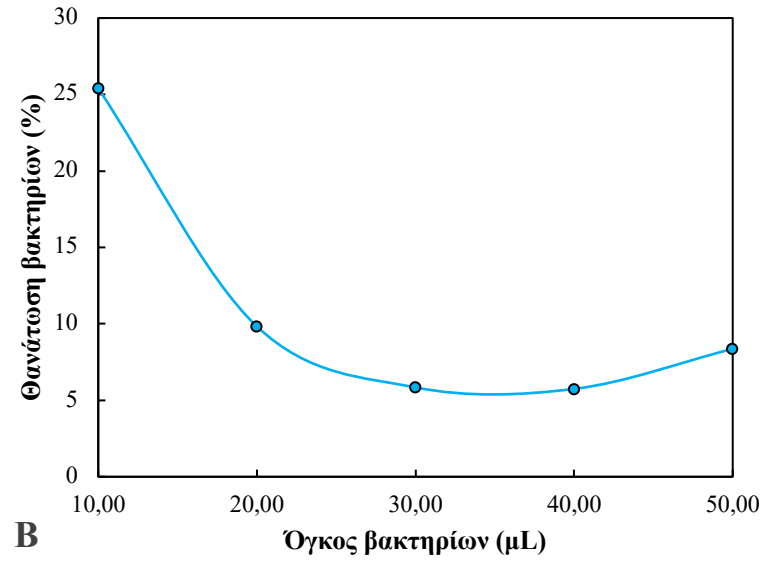
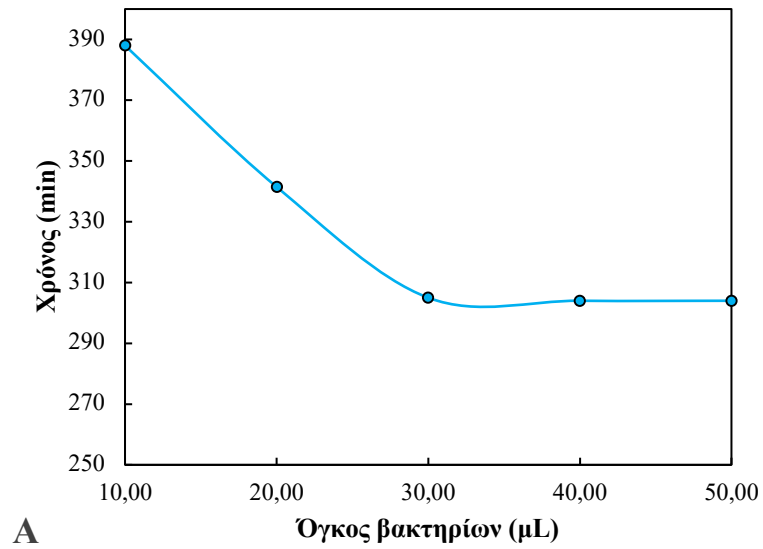
B



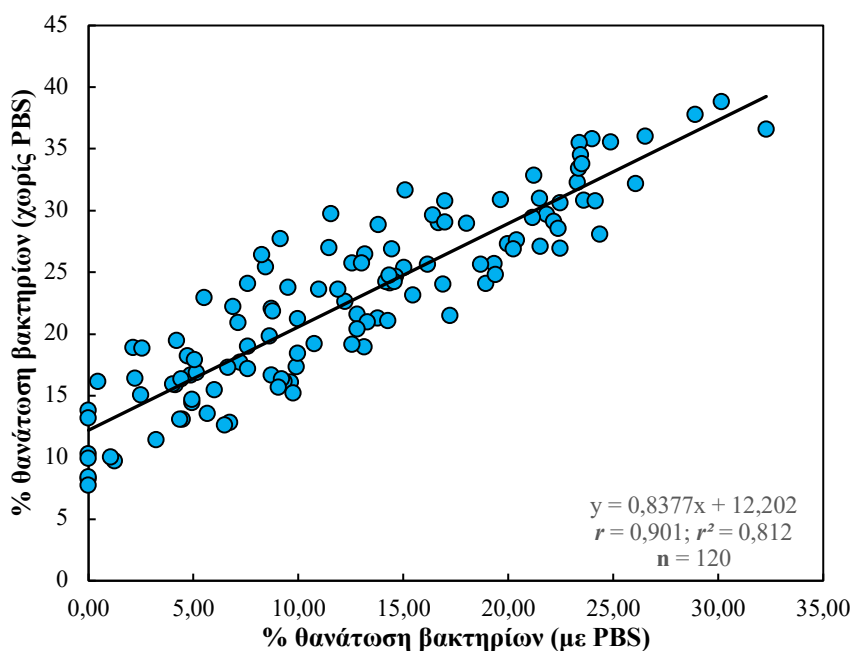
Γ

Δ

**Γράφημα 14.** Τιμές για την παράμετρο G (A, Γ) και για το % ποσοστό θανάτωσης βακτηρίων (B, Δ) συναρτήσει του όγκου βλέννας δέρματος (A, B) και του όγκου βακτηρίων (Γ, Δ) για την βλέννα δέρματος της τσιπούρας.



**Γράφημα 15.** Τιμές για την παράμετρο G (A, Γ) και για το % ποσοστό θανάτωσης βακτηρίων (B, Δ) συναρτήσει του όγκου βακτηρίων για την βλέννα δέρματος λαβρακίου (A, B) και για την βλέννα εντέρου τσιπούρας (Γ, Δ).



**Γράφημα 16.** Ποσοστό θανάτωσης ανασυνδυασμένων βακτηρίων *E.coli* από βλέννα δέρματος τσιπούρας όταν στο βοθρίο τοποθετείται PBS για την συμπλήρωση του όγκου, σε σχέση με το ποσοστό αυτό όταν το PBS έχει αντικατασταθεί από θρεπτικό υλικό LB.

### 3.2.1. Συμπλήρωμα – Χημικοί παράγοντες

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επειδή η δοκιμασία της συνολικής αντιβακτηριακής δράσης αντικατοπτρίζει την δράση πολλών μορίων, προκειμένου να εξακριβωθεί ποια μόρια έχουν μεγαλύτερη δράση χρησιμοποιούνται μια σειρά από ανασταλτικοί παράγοντες – χειρισμοί των δειγμάτων. Τα ιόντα ασβεστίου αποτελούν απαραίτητο παράγοντα για την λειτουργία της κλασικής οδού του συμπληρώματος καθώς και της οδού των λεκτινών, για την λειτουργία πεντραζινών και άλλων μορίων (Henry *et al.*, 2015). Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  είναι απαραίτητα για την λειτουργία της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Κάποια μόρια, όπως η λυσοζύμη, κάποιες λεκτίνες και αντιμικροβιακά πεπτιδία δρουν ανεξαρτήτως αυτών των ιόντων, και η αναστολή μερικών από αυτών μπορεί να επιτευχθεί με θερμική απενεργοποίηση των δειγμάτων. Με θέρμανση αναστέλλονται επίσης όλες οι οδοί του συμπληρώματος. Ακόμη όμως και τότε κάποια θερμοανθεκτικά πεπτιδία συνεχίζουν να διατηρούν δράση.

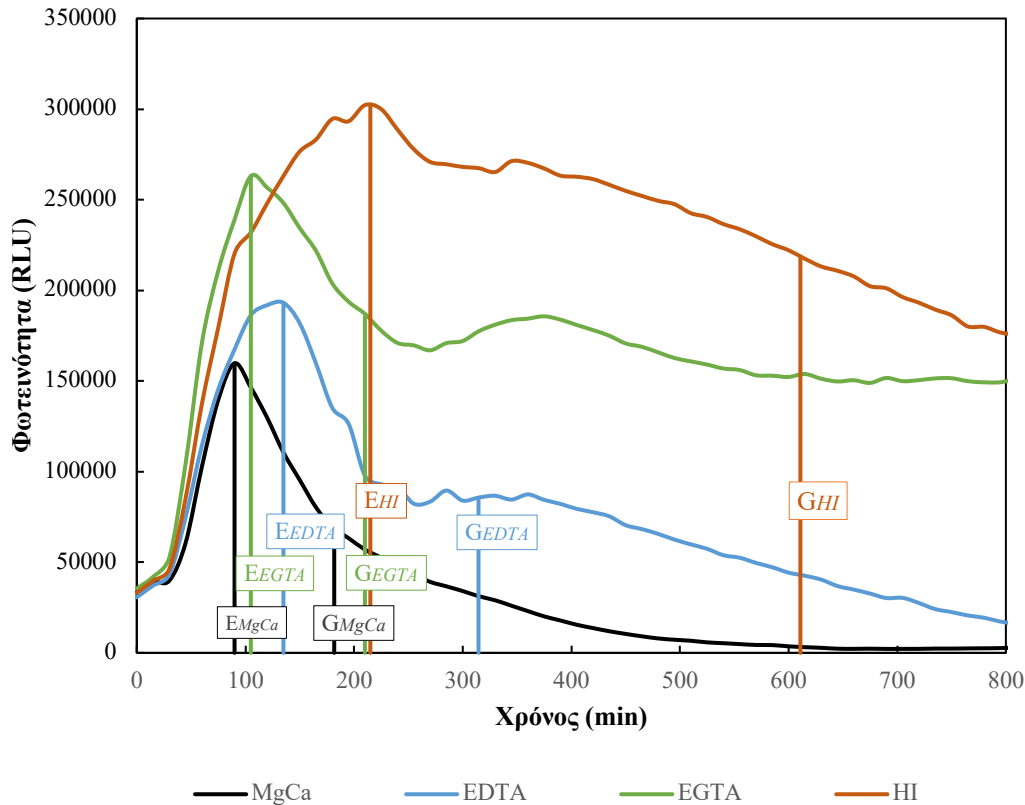
Έτσι, αντί για την προσθήκη  $MgCa$ , μπορεί να προστεθεί ένας από τους δύο χηλικούς παράγοντες: EDTA ή EGTA παρουσία  $Mg$ , ή τέλος να γίνει θερμική απενεργοποίηση των δειγμάτων.

- Το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) προσδένει τόσο τα ιόντα  $Mg^{2+}$  όσο και τα ιόντα  $Ca^{2+}$ .
- Το EGTA προσδένει τα ιόντα ασβεστίου αλλά επειδή μπορεί να προσδέσει και κάποια ιόντα  $Mg^{2+}$  προστίθενται επιπλέον ιόντα μαγνησίου για να βρίσκονται σε περίσσεια.
- Για την θερμική απενεργοποίηση, τα δείγματα θερμαίνονται για 30 λεπτά στους 56 °C.

Στο **Γράφημα 17** φαίνεται μια τυπική κινητική τέτοιων αντιδράσεων. Η παρουσία ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου επιτρέπει την ταχύτερη θανάτωση των βακτηρίων πριν αυτά φτάσουν υψηλή συγκέντρωση (καμπύλη  $MgCa$ ). Η απουσία και των δύο ιόντων αυξάνει τον χρόνο που απαιτείται για την θανάτωση των βακτηρίων, ενώ τα τελευταία αποκτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση (σε σχέση με την προηγούμενη περίπτωση) πριν αρχίσει η θανάτωσή τους (καμπύλη EDTA). Η παρουσία μόνο ιόντων μαγνησίου προκαλεί παρόμοια μεταβολή με την επίδραση EDTA, αλλά σε μικρότερη έκταση. Όμως τα βακτήρια δεν θανατώνονται ικανοποιητικά αφού μετά την θανάτωση του 50% αυτών, η συγκέντρωσή τους παραμένει σταθερή (καμπύλη EGTA). Τέλος, η θερμική



απενεργοποίηση προκαλεί τις μεγαλύτερες αλλαγές, αφού επιτρέπει στα βακτήρια να φτάσουν την υψηλότερη συγκέντρωση από όλες τις προηγούμενες περιπτώσεις, ενώ η θανάτωσή τους γίνεται εξαιρετικά αργά. Πιθανόν στην πτώση της συγκέντρωσης να συμμετέχει περισσότερο η εξάντληση θρεπτικού υλικού αναλογικά με τον αριθμό των κυττάρων παρά η αντιβακτηριακή δράση παραγόντων του ορού (καμπύλη HI).



**Γράφημα 17.** Σύγκριση της κινητικής της δοκιμασίας συνολικής αντιβακτηριακής δράσης για τον ορό λαβρακίου ανάμεσα σε 4 συνθήκες: α) Παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  (MgCa), β) Απουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  (EDTA), γ) Παρουσία μόνο ιόντων  $\text{Mg}^{2+}$  (EGTA), δ) παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  αλλά με προηγούμενη θερμική απενεργοποίηση του ορού (HI).

Στο **Γράφημα 18** παρουσιάζονται οι αντίστροφες τιμές των παραμέτρων E, G, F για τον ορό και την βλέννα δέρματος λαβρακίου και τσιπούρας καθώς και για την βλέννα εντέρου τσιπούρας σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες:

1. Παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  (MgCa)
2. Απουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  (EDTA)
3. Απουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA)
4. Μετά από θερμική απενεργοποίηση των δειγμάτων (HI)

Με βάση τις τιμές των παραμέτρων, μπορούμε να διακρίνουμε τους διάφορους συντελεστές που συμμετέχουν στην αντιβακτηριακή δραστηριότητα σε κάθε περίπτωση. Με βάση το **Γράφημα 19** διακρίνουμε τις εξής περιπτώσεις:

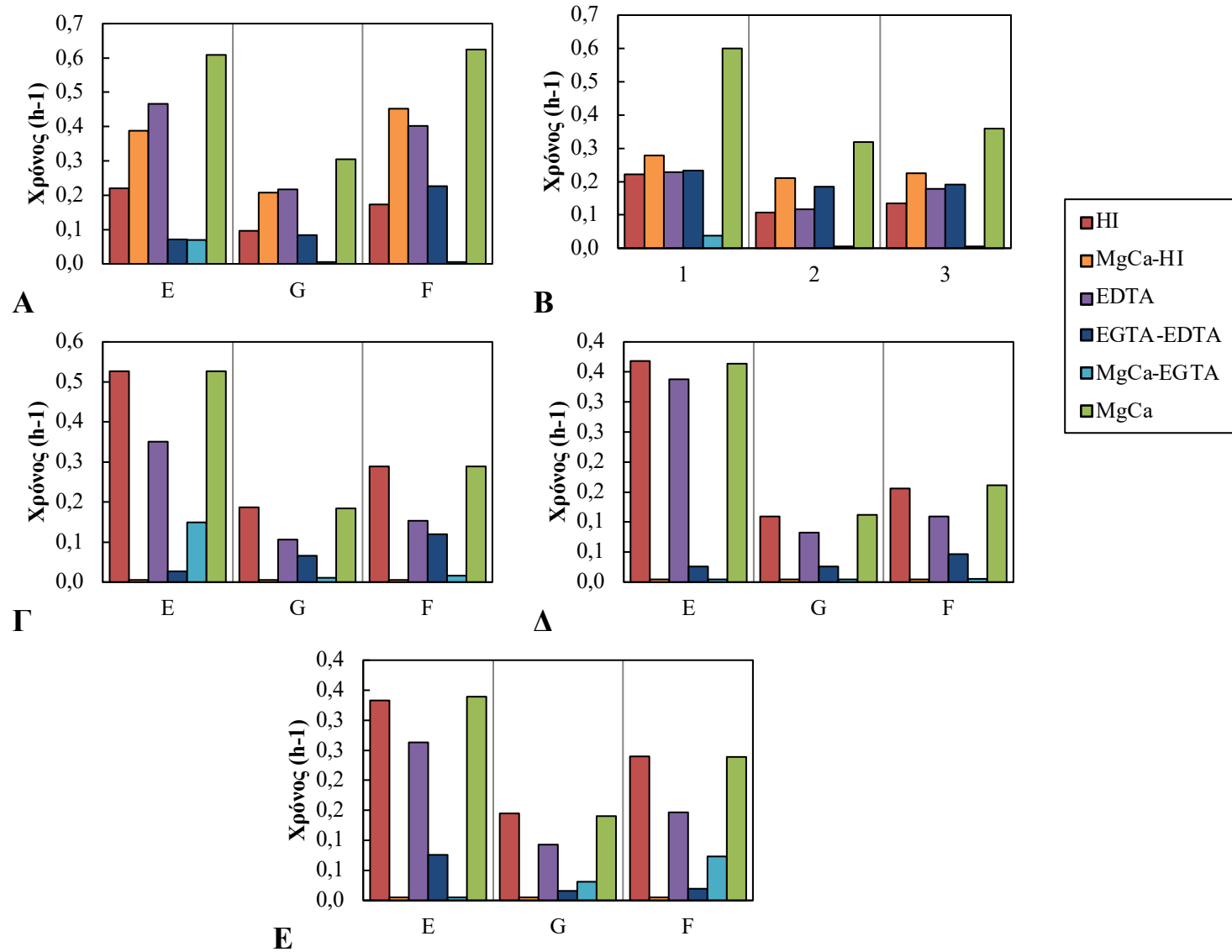
- Η τιμή MgCa απεικονίζει την συνολική αντιβακτηριακή δράση όλων των αντιμικροβιακών παραγόντων.
- Η διαφορά MgCa . EGTA απεικονίζει την αντιβακτηριακή δράση που εξαρτάται από τα ιόντα ασβεστίου, όπως η κλασική οδός του συμπληρώματος, οι λεκτίνες C τύπου, πεντραζίνες κλπ. (Henry *et al.*, 2009).

- Η διαφορά EGTA - EDTA απεικονίζει την αντιβακτηριακή δράση που εξαρτάται από τα ιόντα μαγνησίου, όπως η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος.
- Η τιμή EDTA απεικονίζει την αντιβακτηριακή δράση που δεν εξαρτάται ούτε από τα ιόντα ασβεστίου ούτε από τα ιόντα μαγνησίου όπως είναι η λυσοζύμη, διάφορες λεκτίνες, αντιμικροβιακά πεπτίδια κλπ. (Henry *et al.*, 2009).
- Η τιμή HI απεικονίζει θερμοανθεκτικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως θερμοανθεκτικά αντιμικροβιακά πεπτίδια.
- Η διαφορά MgCa-HI απεικονίζει θερμοευαίσθητους αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως η λυσοζύμη και οι παράγοντες του συμπληρώματος.

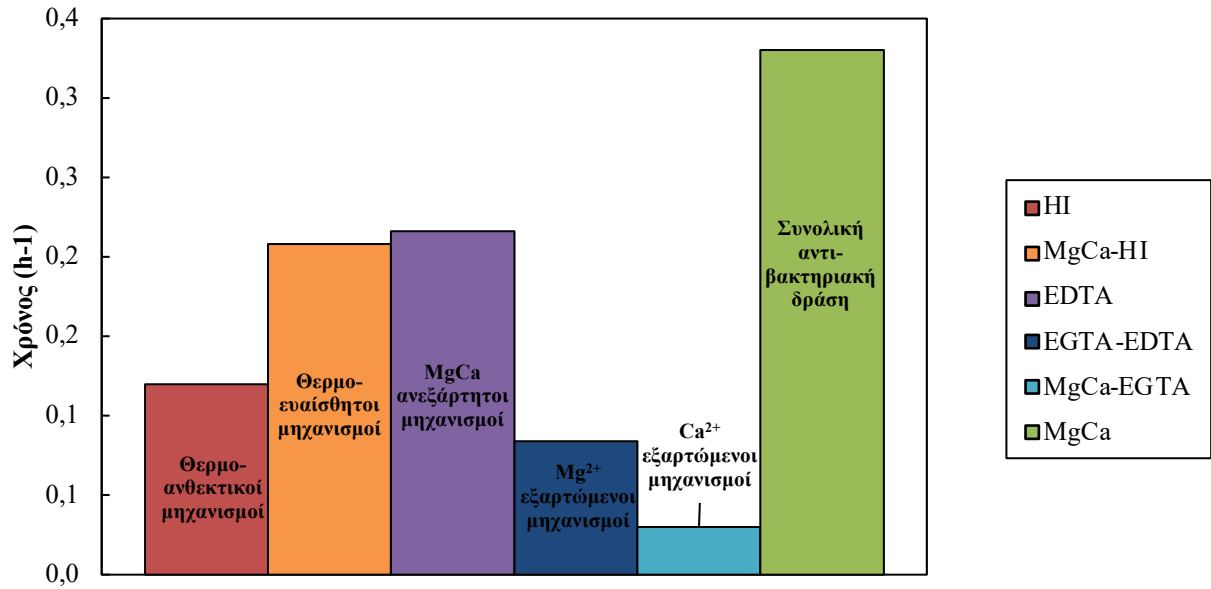
Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, παρατηρούμε ότι:

- Για τον ορό λαβρακίου, το μεγαλύτερο ποσοστό της αντιβακτηριακής δράσης είναι θερμοευαίσθητο και ιοντοανεξάρτητο, ενώ το ιοντοεξαρτώμενο τμήμα καλύπτεται σχεδόν αποκλειστικά από  $Mg^{2+}$  εξαρτώμενους μηχανισμούς (εναλλακτική οδός συμπληρώματος).
- Για τον ορό τσιπούρας, το μεγαλύτερο ποσοστό της αντιβακτηριακής δράσης καταλαμβάνουν θερμοευαίσθητοι και ιοντοεξαρτώμενοι μηχανισμοί, σχεδόν αποκλειστικά  $Mg^{2+}$  εξαρτώμενοι.
- Η βλέννα δέρματος λαβρακίου και τσιπούρας εμφανίζουν παρόμοια πρότυπα. Το σύνολο της αντιβακτηριακής δράσης είναι θερμοανθεκτικό. Το μεγαλύτερο ποσοστό της δράσης καλύπτεται από ιοντοανεξάρτητους μηχανισμούς, ενώ το ιοντοεξαρτώμενο τμήμα καλύπτεται κυρίως από  $Mg^{2+}$  εξαρτώμενους παράγοντες.
- Για την βλέννα εντέρου τσιπούρας, το σύνολο της αντιβακτηριακής δράσης είναι θερμοανθεκτικό. Το μεγαλύτερο ποσοστό της δράσης είναι ιοντοανεξάρτητο, ενώ σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις, το ιοντοεξαρτώμενο τμήμα καλύπτεται κυρίως από εξαρτώμενους από  $Ca^{2+}$  παράγοντες με μικρή παρουσία  $Mg^{2+}$  εξαρτώμενων παραγόντων.

Συνοψίζοντας, με τα προπαρασκευαστικά αυτά πειράματα, έγινε η επιτυχής προσαρμογή και η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων για την μέτρηση της συνολικής αντιβακτηριακής δράσης. Βρέθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση ανασυνδυασμένων βακτηρίων *E. coli*, η οποία αντιστοιχεί σε καλλιέργεια με οπτική πυκνότητα 0,4 έχοντας αφαιρέσει την τιμή του μάρτυρα. Επιπλέον υπολογίστηκαν οι βέλτιστοι όγκοι βακτηρίων (30  $\mu$ L) και δείγματος (20  $\mu$ L) που να ικανοποιούν τις δοκιμασίες τόσο με ορό όσο και με βλέννα και στα δύο είδη, τσιπούρα και λαβράκι. Τέλος, έγινε μια προκαταρκτική εξέταση της δράσης και δοκιμή των πρωτοκόλλων, κάτω από διαφορετικές ανασταλτικές συνθήκες, και εξήχθησαν κάποια συμπεράσματα για το ποιόν της αντιβακτηριακής δράσης κάθε βιολογικού υλικού. Η αντιβακτηριακή δράση του ορού εκδηλώνεται μέσω θερμοευαίσθητης, σε μεγαλύτερο ποσοστό ιοντοανεξάρτητης και σε μικρότερο ποσοστό κυρίως  $Mg^{2+}$  εξαρτώμενης δράσης (**Γράφημα 18 A & B**), ενώ αντίθετα στην βλέννα δέρματος η αντιβακτηριακή δράση διαμεσολαβείται από θερμοανθεκτικούς ιοντοανεξάρτητους παράγοντες και σε μικρότερο ποσοστό  $Mg^{2+}$  εξαρτώμενους παράγοντες (**Γράφημα 18 Γ & Δ**). Τέλος, στην βλέννα εντέρου η αντιβακτηριακή δράση διαμεσολαβείται από θερμοανθεκτικούς ιοντοανεξάρτητους παράγοντες και σε μικρότερο ποσοστό από  $Ca^{2+}$  εξαρτώμενους παράγοντες (**Γράφημα 18 E**).



**Γράφημα 18.** Αντίστροφες τιμές των παραμέτρων E, F, G σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες για τον ορό λαβρακίου (A), τον ορό τσιπούρας (B), την βλέννα δέρματος λαβρακίου (Γ), την βλέννα δέρματος τσιπούρας (Δ) και την βλέννα εντέρου τσιπούρας (E). HI=θερμοανθεκτικοί μηχανισμοί, MgCa-HI=θερμοευαίσθητοι μηχανισμοί, EDTA=ιοντοανεξάρτητοι μηχανισμοί, EGTA-EDTA= $Mg^{2+}$  εξαρτώμενοι μηχανισμοί, MgCa-EGTA= $Ca^{2+}$  εξαρτώμενοι μηχανισμοί, MgCa=συνολική αντιβακτηριακή δράση.



**Γράφημα 19.** Διάκριση των διαφόρων τελεστών της αντιβακτηριακής δράσης με βάση την θερμοανθεκτικότητά τους και την εξάρτησή τους από ιόντα  $Mg^{2+}$  και  $Ca^{2+}$ , ανάλογα με τις τιμές της παραμέτρου G σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. HI=θερμοανθεκτικοί μηχανισμοί, MgCa-HI=θερμοευαίσθητοι μηχανισμοί, EDTA=ιοντοανεξάρτητοι μηχανισμοί, EGTA-EDTA= $Mg^{2+}$  εξαρτώμενοι μηχανισμοί, MgCa-EGTA= $Ca^{2+}$  εξαρτώμενοι μηχανισμοί, MgCa=συνολική αντιβακτηριακή δράση.

## 4. Πειραματική διαδικασία

### 4.1. Σχεδιασμός διαιτών

Ο σκοπός των πειραμάτων είναι η εξέταση της επίδρασης των μεταλλικών ιχνοστοιχείων στην αύξηση και το ανοσοποιητικό σύστημα του λαβρακίου, και πιο συγκεκριμένα η εξέταση της επίδρασης της διαφορετικής προέλευσης αυτών (ανόργανα και οργανικά) καθώς έχουν προηγηθεί πειράματα στα πλαίσια του προγράμματος ARRAINA που έχουν σκιαγραφήσει ένα πλαίσιο για τις βέλτιστες ποσότητες ανόργανων μεταλλικών ιχνοστοιχείων για την εκτροφή του λαβρακίου.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, σχεδιάστηκαν έξι πειραματικές δίαιτες (**Πίνακας 4**):

- Δίαιτα θετικός μάρτυρας (Control +, στο εξής CTRL+): Η δίαιτα αυτή περιείχε ιχθυάλευρο σε ποσοστό 30% και μίγμα ανόργανων ιχνοστοιχείων σε ποσοστό 100% της δόσης που είχε οριστεί από τα αποτελέσματα του ARRAINA.
- Δίαιτα αρνητικός μάρτυρας (Control -, στο εξής CTRL-): Η δίαιτα αυτή περιείχε ιχθυάλευρο σε ποσοστό 10% ενώ δεν περιείχε καθόλου μίγμα ιχνοστοιχείων (deficient).
- Δίαιτα 1 (Diet 1, στο εξής ORG): Η δίαιτα αυτή περιείχε ιχθυάλευρο σε ποσοστό 10% και μίγμα οργανικών ιχνοστοιχείων στο 100% της δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων που ορίστηκε από το ARRAINA.
- Δίαιτα 2 (Diet 2, στο εξής INORG): Η δίαιτα αυτή περιείχε ιχθυάλευρο σε ποσοστό 10% και μίγμα ανόργανων ιχνοστοιχείων στο 100% της δόσης που ορίστηκε από το ARRAINA.
- Δίαιτα 3 (Diet 3, στο εξής ORGlow): Η δίαιτα αυτή περιείχε ιχθυάλευρο σε ποσοστό 10% και μίγμα οργανικών ιχνοστοιχείων στο 65% της δόσης των ανόργανων ιχνοστοιχείων που ορίστηκε από το ARRAINA.
- Δίαιτα 4 (Diet 4, στο εξής ORGhigh): Η δίαιτα αυτή περιείχε ιχθυάλευρο σε ποσοστό 10% και μίγμα οργανικών ιχνοστοιχείων σε υπερβολική δόση (overdose) 400% της δόσης των ανόργανων ιχνοστοιχείων που ορίστηκε από το ARRAINA.

Οι τροφές για τις παραπάνω δίαιτες παρασκευάστηκαν στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. με την χρήση εξωθητή μύλου πέλλετ. Όλες οι τροφές ήταν ισοενεργειακές και ισοπρωτεϊνικές.

**Πίνακας 4.** Σύσταση των τροφών των έξι διαιτών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

Συστατικά (g/100 <sup>-1</sup> )	C -	ORGlow	ORG	ORGhigh	INORG	CTRL+
Ιχθυάλευρο 68	10	10	10	10	10	30
Αλεύρι κριθι	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	
Αλεύρι σίτου	13,614	13,579	13,564	13,395	13,581	16,574
Γλουτένη σίτου	22	22	22	22	22	15
Γλουτένη αραβοσίτου	10	10	10	10	10	10
Σόγια 60	25	25	25	25	25	15
Ιχθυέλαιο	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	7,0
Κραμβέλαιο	4	4	4	4	4	4
Μίγμα βιταμινών <sup>α</sup>	0,086	0,086	0,086	0,086	0,086	0,084
Μίγμα μεταλλικών ιχνοστοιχείων <sup>β</sup>		0,035	0,05	0,219	0,033	0,042
Δισόξινο φωσφορικό ασβέστιο – Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	3	3	3	3	3	1,5
Λυσίνη	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,4
Μεθειονίνη	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2
Χοληστερόλη	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
Χλωριούχος χολίνη	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Ιστιδίνη	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	

<sup>α</sup> Παροχή βιταμινών; **Βιταμίνη Α** – Ρετινόλη, **Βιταμίνη Β1** – Θειαμίνη, **Βιταμίνη Β2** – Ριβοφλαβίνη, **Βιταμίνη Β3** – Νιασίνη, **Βιταμίνη Β5** – Παντοθενικόξύ, **Βιταμίνη Β6** – Πυριδοξίνη, **Βιταμίνη Β7** – Βιοτίνη, **Βιταμίνη Β8** – Ινοσιτόλη, **Βιταμίνη Β9** – Φολικόξύ, **Βιταμίνη Β12** – Κοβαλαμίνη, **Βιταμίνη C** – Ασκορβικόξύ, **Βιταμίνη D3** – Χοληκαλσιφερόλη, **Βιταμίνη E** – Τοκοφερόλη, **Βιταμίνη K3** – Μεναδιόνη.

<sup>β</sup> Σχεδιάστηκαν δύο μίγματα ιχνοστοιχείων, ένα με ανόργανα και ένα με οργανικά ιχνοστοιχεία. Το μίγμα με τα ανόργανα ιχνοστοιχεία για τις δίαιτες INORG και CTRL+ περιείχε **Θεικό χαλκό** – CuSO<sub>4</sub>, **Θεικό σίδηρο** – FeCuSO<sub>4</sub>, **Σεληνικό νάτριο** – Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, **Οξείδιο μαγγανίου**–MnO και **Οξείδιο ψευδαργύρου** – ZnO. Το μίγμα με τις οργανικές μορφές των ιχνοστοιχείων για τις δίαιτες ORGLOW,ORG και ORGHIGH περιείχε τα παραπάνω ιχνοστοιχεία αλλά σε χηλική μορφή, δεσμευμένα με πεπτίδια.

## 4.2. Πειραματικός σχεδιασμός και αύξηση

Η διάρκεια του πειράματος ήταν 94 μέρες. Τα ψάρια ταΐστηκαν με το χέρι μέχρι προφανή κορεσμό, δύο φορές την ημέρα (ώρες 09:00 και 15:00) με τις έξι δίαιτες οι οποίες είχαν διανεμηθεί τυχαία σε δεξαμενές σε τέσσερις επαναλήψεις η κάθε μία. Η κατανάλωση τροφής καταγράφηκε καθημερινά ενώ τακτικά παρακολούθηθηκαν τα ψάρια για μικροβιακές και παρασιτικές μολύνσεις, χωρίς να εμφανιστούν παθολογικά επεισόδια. Δεδομένα για την αύξηση αποκτήθηκαν από μία αρχική, δύο ενδιάμεσες (μία στον 1<sup>ο</sup> μήνα και μία στον 2<sup>ο</sup> μήνα αύξησης) και μία τελική ζύγιση όλων των ψαριών, τα οποία είχαν προηγουμένως στερηθεί τροφή για μία ημέρα. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία όπως περιγράφεται παρακάτω. Οι παράμετροι αύξησης υπολογίστηκαν με βάση τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\text{Μετατρεψιμότητα τροφής (FC)} = \frac{\text{Κατανάλωση τροφής}}{\text{Βάρος}_{\text{τελικό}} - \text{Βάρος}_{\text{αρχικό}}}$$

$$\text{Ειδικός ρυθμός αύξησης (SGR)} = \frac{\ln(\text{Βάρος}_{\text{τελικό}} - \text{Βάρος}_{\text{αρχικό}})}{\text{Ημέρες πειράματος}} \times 100$$

$$\text{Ημερήσια πρόσληψη τροφής \% (DFI)} = \frac{\frac{\text{Κατανάλωση Τροφής} \times 100}{\text{Βάρος}_{\text{αρχικό}} + \text{Βάρος}_{\text{τελικό}}}}{2} / \text{Ημέρες ταΐσματος}$$

### 4.3. Δειγματοληψία

Στο τέλος της πειραματικής αύξησης τριών μηνών, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για την συλλογή αίματος, δερματικής βλέννας και εντερικής βλέννας. Η δειγματοληψία διήρκησε 4 μέρες (30-2/10/18) και σε κάθε μέρα λήφθηκαν ψάρια από μία δεξαμενή επανάληψης κάθε διαίτας.



**Εικόνα 1.** Διάταξη δεξαμενών στους χώρους του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών.

**Πίνακας 5.** Κατανομή δεξαμενών ανά διαίτα και προγραμματισμός δειγματοληψιών ανά ημέρα. **CTRL-**: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, **ORGIow**: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORG**: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORGhigh**: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **INORG**: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, **CTRL+**: διαίτα θετικός μάρτυρας.

Δίαιτες	Δεξαμενές			
C+	1	7	16	21
CTRL-	2	8	17	24
D1	3	9	13	23
D2	4	10	14	19
D3	5	11	18	22
D4	6	12	15	20

Δεξαμενές			
30/10/2018	31/10/2018	1/11/2018	2/11/2018
1 <sup>η</sup> Ημέρα	2 <sup>η</sup> Ημέρα	3 <sup>η</sup> Ημέρα	4 <sup>η</sup> Ημέρα
1	8	14	20
2	9	15	22
3	7	17	19
4	11	13	24
5	12	16	23
6	10	18	21



**Εικόνα 2.** Χώρος δειγματοληψίας στις εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ.

### 4.3.1. Συλλογή βλέννας δέρματος

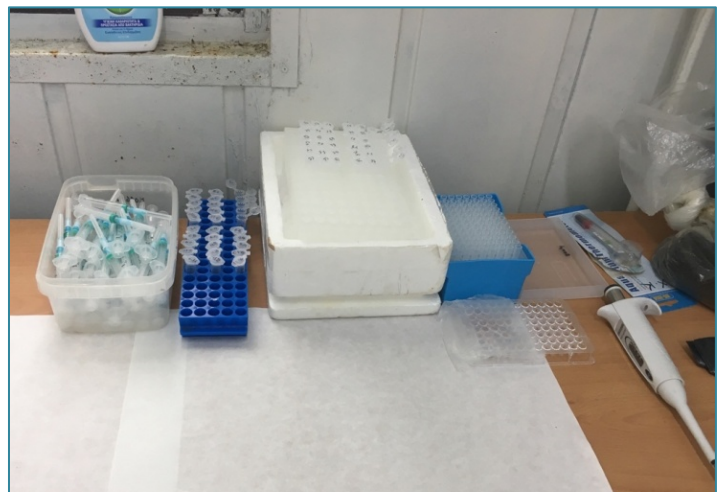
Για την συλλογή της βλέννας του δέρματος ακολουθήθηκε η μέθοδος των (Ross *et al.*, 2000) με κάποιες τροποποιήσεις. Μετά την αναισθητοποίηση των ψαριών με την χρήση γαρυφαλέλαιου, τοποθετήθηκαν ένα-ένα (5 ψάρια ανά δεξαμενή) σε σακούλα πολυαιθυλενίου που περιείχε 2,5 mL ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος (PBS). Οι σακούλες ανακινήθηκαν και πιέστηκαν απαλά για 1 λεπτό προκειμένου να συλλεχθεί η βλέννα. Στη συνέχεια το περιεχόμενο της σακούλας μεταφέρθηκε σε σωλίνες και φυγοκεντρήθηκε στα 1500xg για δέκα λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο κάθε δείγματος χωρίστηκε σε κλάσματα του 1 ml και τα κλάσματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Το ίζημα κάθε δείγματος επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 200 μL PBS και χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της χημειοφωταύγειας και τις κυτταρικές αναλύσεις (βλ. παρακάτω).



**Εικόνα 3.** Εξοπλισμός για την συλλογή βλέννας δέρματος. Στην εικόνα φαίνονται οι σακούλες πολυαιθυλενίου καθώς και οι σωλίνες συλλογής του υγρού.

### 4.3.2. Συλλογή αίματος

Μετά την λήψη δερματικής βλέννας έγινε λήψη αίματος από 6 αναισθητοποιημένα ψάρια ανά δεξαμενή με ουραία παρακέντηση. Το αίμα τοποθετήθηκε σε σωλίνες φυγόκεντρου τύπου Eppendorf ενώ 100 μL μεταφέρθηκαν σε μικροπλάκα 96 βοθρίων με πυθμένα τύπου U, στα οποία είχαν προηγουμένως τοποθετηθεί 10 μL ηπαρίνης 5000 U/mL, για την μέτρηση των κυττάρων, της αιμοσφαιρίνης και της έκκρισης ριζών οξυγόνου. Το υπόλοιπο αίμα αφέθηκε να πήξει για 24 ώρες στους 4 °C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 20.000 g. Ο ορός παραλήφθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι να γίνουν οι αναλύσεις.



**Εικόνα 4.** Εξοπλισμός για την συλλογή αίματος. Στην εικόνα φαίνονται οι σύριγγες, οι σωλίνες συλλογής αίματος καθώς και οι μικροπλάκα που περιέχει την ηπαρίνη, για την μέτρηση των κυττάρων, της χημειοφωταύγειας και της αιμοσφαιρίνης.



### 4.3.3. Συλλογή βλέννας εντέρου

Για την συλλογή της βλέννας του εντέρου ακολουθήθηκε παρόμοια μέθοδος με την μέθοδο συλλογής δερματικής βλέννας. Στα πέντε ψάρια, από τα οποία προηγουμένως είχε συλλεχθεί η δερματική βλέννα και το αίμα, έγινε κοιλιακή τομή και αφαιρέθηκε με προσοχή το έντερο από το σημείο μετά τις πλωρικές εκπτυχώσεις έως και την έδρα. Στη συνέχεια έγινε έκλουση του εντέρου με 2,5 mL ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος (PBS) και το υγρό μεταφέρθηκε σε σωλήνες και φυγοκεντρήθηκε στα 1500xg για δέκα λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο κάθε δείγματος χωρίστηκε σε κλάσματα του 1 ml και τα κλάσματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Το ίζημα κάθε δείγματος επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 200 μL PBS και χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της χημειοφωταύγειας και τις κυτταρικές αναλύσεις (βλ. παρακάτω).

## 4.4. Κυτταρικές αναλύσεις

### 4.4.1. Μέτρηση κυττάρων

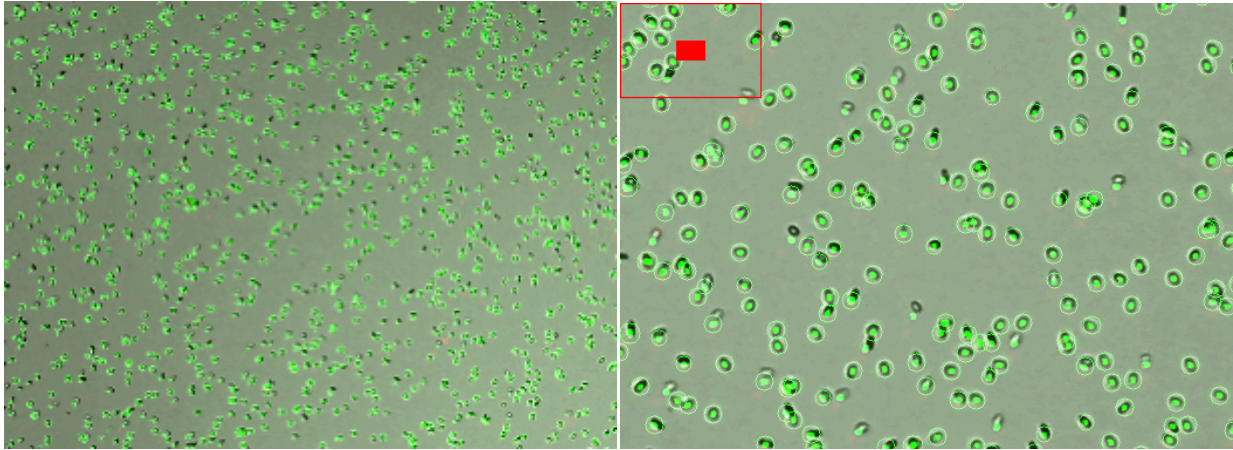
Για την μέτρηση του αριθμού, της βιωσιμότητας και του μέσου μεγέθους των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυτταρομετρητής LUNA FL της Logos Biosystem. Η συσκευή αυτή χρησιμοποιεί δύο διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες αντιδρούν διαφορετικά στα ζωντανά και τα νεκρά κύτταρα: το πορτοκαλί της ακριδίνης (Acridine Orange–AO) και το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide–PI). Το πορτοκαλί της ακριδίνης (AO) είναι μια χρωστική διαπερατή στην κυτταρική μεμβράνη, που προσδέεται σε νουκλεϊκά οξέα και εκπέμπει πράσινο φθορισμό. Το ιωδιούχο προπίδιο (PI) είναι μια χρωστική νουκλεϊκών οξέων κόκκινου φθορισμού που δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη ζωντανών κυττάρων.

Έτσι το πορτοκαλί της ακριδίνης εισέρχεται σε ζωντανά και νεκρά κύτταρα και βάφει όλα τα εμπύρηννα κύτταρα για να παράξει πράσινο φθορισμό. Το ιωδιούχο προπίδιο θα εισέλθει μόνο στα νεκρά κύτταρα και θα βάψει τα νεκρά εμπύρηννα κύτταρα για να παράξει κόκκινο φθορισμό. Τα νεκρά κύτταρα που βάφονται και με τις δύο χρωστικές φθορίζουν με κόκκινο χρώμα λόγω της απόσβεσης φθορισμού. Έτσι όλα τα ζωντανά εμπύρηννα κύτταρα εκπέμπουν πράσινο φθορισμό και όλα τα νεκρά εμπύρηννα κύτταρα εκπέμπουν κόκκινο φθορισμό. Για την επιβεβαίωση ότι δεν γίνεται χρώση βακτηρίων με την παραπάνω μέθοδο, έγινε χρώση βακτηριακής καλλιέργειας *E.coli* με τις παραπάνω χρωστικές, και κανένα σήμα φθορισμού δεν ανιχνεύτηκε.

Έτσι, σε μικροπλάκα 96 βοθρίων με πυθμένα τύπου U τοποθετήθηκαν 4 μL δείγματος αίματος ή βλέννας, 14 μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS και 2 μL μίγματος χρωστικών AO/PI της Logos Biosystem. Ο συντελεστής αραιώσης είναι 1:5. Λόγω του μεγάλου αριθμού κυττάρων στο αίμα, χρειάστηκε να γίνει προηγούμενη αραιώση του 100 φορές (5 μL αίματος σε 245 μL διαλύματος PBS και στη συνέχεια 10 μL αραιωμένου αίματος σε 10 μL διαλύματος PBS). Ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή έγιναν όλες οι μετρήσεις και στη συνέχεια έγινε εξαγωγή των δεδομένων που μετρήθηκαν για κάθε ψάρι. Οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις στατιστικές αναλύσεις είναι ο συνολικός αριθμός κυττάρων/mL, η βιωσιμότητα των κυττάρων (%) και το μέσο μέγεθος κυττάρων (μm).



Εικόνα 5. Αυτόματος μετρητής κυττάρων LUNA FL της LogosBiosystem.



**Εικόνα 6.** Τυπική εικόνα καταμέτρησης κυττάρων σε δείγμα αίματος με την χρήση του κυτταρομετρητή LUNA FL και το μίγμα χρωστικών πορτοκαλί της ακριδίνης και ιωδιούχο προπύδιο. Η βιωσιμότητα αγγίζει το 100% για αυτό και δεν εμφανίζεται κόκκινος φθορισμός.

#### 4.4.2. Χημειοφωταύγεια – Έκρηξη ριζών οξυγόνου

Η μέτρηση της έκρηξης ριζών οξυγόνου έγινε με βάση την μέθοδο χημειοφωταύγειας των (Nikoskelainen *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 2009). Όταν τα φαγοκύτταρα διεγείρονται, παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου σε μία διαδικασία που ονομάζεται αναπνευστική έκρηξη που διαμεσολαβείται από το σύμπλοκο της NADPH οξειδάσης και την μυελοϋπεροξειδάση. Όταν οι ηλεκτρονικά διεγερμένες καταστάσεις των παραγμένων ριζών οξυγόνου επιστρέψουν στην θεμελιώδη κατάσταση, παράγονται φωτόνια. Το φωτεινό σήμα είναι πολύ αδύναμο αλλά μπορεί να ενισχυθεί με την χρήση χημικών όπως η λουμινόλη.

Για την περίπτωση του ηπαρινισμένου αίματος αυτό αραιώθηκε 1:200 με διάλυμα ισότονου διαλύματος Hank's (HBSS) που περιείχε ζελατίνη σε συγκέντρωση 0,4% (gHBSS), ηπαρίνη, πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και λουμινόλη, που είχε προηγουμένως διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικού καλίου, που εξασφαλίζει το αλκαλικό περιβάλλον για την δράση της λουμινόλης. Η ζελατίνη προστίθεται για να αποφευχθεί η προσκόλληση των κυττάρων στα τοιχώματα, καθώς έχει παρατηρηθεί ένα ερέθισμα που σχετίζεται με την προσκόλληση σε επιφάνειες. Τα αντιβιοτικά (τόσο ενάντια Gram- όσο και εναντίον Gram+ βακτηρίων) προστίθενται για την αποφευχθεί η επιμόλυνση. 280  $\mu$ L αίματος προστέθηκαν σε λευκή μικροπλάκα 96 βοθρίων εις διπλούν. Στο ένα βοθρίο προστέθηκαν επιπλέον 20  $\mu$ L διαλύματος HBSS για την παρακολούθηση της αυθόρμητης χημειοφωταύγειας, ενώ στο άλλο προστέθηκαν 20  $\mu$ L διαλύματος μη οψωνισμένου Zymosan A συγκέντρωσης 5 mg/ml. Το Zymosan παρασκευάζεται από κυτταρικό τοίχωμα μαγιάς και χρησιμοποιείται για να επάγει πειραματικά στείρες ανοσολογικές αντιδράσεις. Στη συνέχεια μετρήθηκε η χημειοφωταύγεια για 2 ώρες κάθε 10 λεπτά με την χρήση του αυτόματου αναλυτή μικροπλακών Genios Pro (TECAN, Austria). Στη συνέχεια εξάγεται η τιμή της μέγιστης ανιχνεύσιμης χημειοφωταύγειας μετρημένη σε μονάδες σχετικής φωτεινότητας (Relative



**Εικόνα 7.** Αναλυτής μικροπλακών Genios Pro της εταιρίας TECAN, Austria.

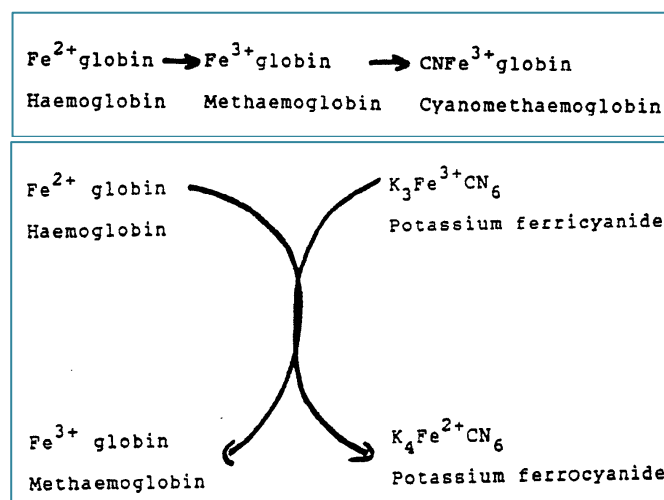
Luminescence Units –RLU) στο χρονικό διάστημα της μέτρησης.

Στην περίπτωση της βλέννας λόγω της μικρότερης συγκέντρωσης κυττάρων, ο συντελεστής αραιώσης ήταν 1,88 (150  $\mu\text{L}$  βλέννας σε 90  $\mu\text{L}$  διαλύματος gHBSS 0,8%) ενώ χρησιμοποιήθηκε και λευκή μικροπλάκα 384 βοθρίων οπότε το πρωτόκολλο υπέστη μικρές τροποποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα αντί για 280  $\mu\text{L}$  δείγματος, προστέθηκαν 90  $\mu\text{L}$  βλέννας, τα οποία αναμείχθηκαν με 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος HBSS ή με 10  $\mu\text{L}$  εναιωρήματος ZymoZan A. Η μέτρηση της χημειοφωταύγειας έγινε για 8 ώρες κάθε 15 λεπτά γιατί σε προκαταρκτικές δοκιμές φάνηκε πως η έκρηξη ριζών οξυγόνου στους βλεννογόνους είναι καθυστερημένη σε σχέση με το ολικό αίμα. Στο τέλος εξάγεται η τιμή της μέγιστης ανιχνεύσιμης χημειοφωταύγειας όπως και στην περίπτωση του αίματος.

Τόσο στην περίπτωση του αίματος όσο και στη περίπτωση της δερματικής και εντερικής βλέννας, τα δεδομένα της χημειοφωταύγειας εκφράστηκαν ανά 1 εκατομμύρια κύτταρα ώστε οι διαφορές στην μέγιστη χημειοφωταύγεια να μην οφείλονται στην διαφορά του αριθμού των κυττάρων. Τέλος, τα δεδομένα υπέστησαν λογαριθμική μετατροπή για να εξομαλυνθούν οι τυπικές αποκλίσεις και οι διαφορές στις τάξεις τιμών μεταξύ των βιολογικών υλικών.

## 4.5. Αιμοσφαιρίνη

Για την μέτρηση της αιμοσφαιρίνης ακολουθήθηκε τροποποιημένη μέθοδος Drabkin (Rigos *et al.*, 2010). Η μέθοδος Drabkin βασίζεται στην οξείδωση της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη με την παρουσία αλκαλικού σιδηροκυανιούχου καλίου. Η μεθαιμοσφαιρίνη αντιδρά με το κυανιούχο κάλιο για να παραχθεί κυανομεθαιμοσφαιρίνη που έχει μέγιστο απορρόφησης στα 540 nm. Έτσι η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συνολικής αιμοσφαιρίνης.



**Εικόνα 8.** Πορεία αντιδράσεων για την μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη.

2  $\mu\text{L}$  ηπαρινισμένου αίματος διαλύθηκαν σε 500  $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου Drabkin και αφέθηκαν για 3 ώρες στο σκοτάδι. Έπειτα, 200  $\mu\text{L}$  μεταφέρθηκαν σε διαφανή μικροπλάκα 96 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα, και η οπτική πυκνότητα διαβάστηκε στα 540 nm. Τα δεδομένα εκφράστηκαν σε g αιμοσφαιρίνης/ dl αίματος με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης αιμοσφαιρίνης.

## 4.6. Χυμικές αναλύσεις

### 4.6.1. Πρωτεΐνες

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης ακολουθήθηκε τροποποιημένη μέθοδος Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση της χρωστικής μπλε του Coomassie, η οποία σε όζινες συνθήκες προσδένεται στις πρωτεΐνες κυρίως μέσω των βασικών αμινοξέων. Ο αριθμός των προσδεδεμένων μορίων χρωστικής σε κάθε μόριο πρωτεΐνης είναι περίπου ανάλογος με τον αριθμό των θετικών φορτίων στην πρωτεΐνη. Η πρόσδεση της χρωστικής στην πρωτεΐνη προκαλεί αλλαγή χρώματος από κοκκινωπό καφέ σε έντονο μπλε.

Σε διαφανή μικροπλάκα 384 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα τοποθετήθηκαν 8  $\mu\text{L}$  δείγματος και 80  $\mu\text{L}$  διαλύματος μπλε του Coomassie εις τριπλούν. Έπειτα από την πάροδο 5 λεπτών έγινε ανάγνωση της οπτικής πυκνότητας της μικροπλάκας στον αναλυτή Genios Pro (TECAN, Austria) στα 600 nm. Τα δεδομένα εκφράστηκαν σε mg πρωτεΐνης / ml με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης από αλβουμίνη ορού βοοειδούς (BSA). Σημειώνεται ότι οι οροί αίματος αραιώθηκαν προηγουμένως 50 φορές για να εμπίπτουν με το εύρος της πρότυπης καμπύλης.

### 4.6.2. Λυσοζύμη

Για την μέτρηση της ενεργότητας λυσοζύμης χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη θολερομετρική μέθοδος (Henry *et al.*, 2015). Οι λυσοζύμες είναι μια οικογένεια ενζύμων με αντιμικροβιακή δράση που δρα εναντίον του κυτταρικού τοιχώματος κυρίως Gram+ βακτηρίων. Έτσι, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την μείωση της οπτικής πυκνότητας βακτηριακού εναιωρήματος που κατεργάζεται με όγκο δείγματος, ως μέτρο για την ενεργότητα της λυσοζύμης στο δείγμα.

Σε διαφανή μικροπλάκα 384 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα προστέθηκαν 4  $\mu\text{L}$  ορού αίματος (ή 4  $\mu\text{L}$  διαλύματος PBS ως αρνητικός μάρτυρας) ή 20  $\mu\text{L}$  βλέννας δέρματος ή εντέρου (ή 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος PBS ως αρνητικός μάρτυρας) και 80  $\mu\text{L}$  εναιωρήματος *Micrococcus luteus* συγκέντρωσης 125  $\mu\text{g/ml}$ . Η μείωση της οπτικής πυκνότητας στα 450 nm παρακολούθηθηκε για 20 λεπτά με την χρήση του αυτόματου αναλυτή Genios Pro (TECAN, Austria). 1 Unit ενεργότητας λυσοζύμης ορίζεται ως μείωση απορρόφησης 0,001 ανά λεπτό. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ενεργότητα λυσοζύμης (Units) ανά ml δείγματος με αφαίρεση του αρνητικού μάρτυρα.

### 4.6.3. Σερουλοπλασμίνη

Για την μέτρηση της ενεργότητας σερουλοπλασμίνης χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη μέθοδος των (Henry *et al.*, 2015). Η σερουλοπλασμίνη είναι μία  $\alpha_2$ -γλυκοπρωτεΐνη που θεωρείται μία από τις κύριες πρωτεΐνες οξείας φάσης. Διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από τοξικούς μεταβολίτες των φαγοκυττάρων κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Επίσης συμμετέχει στην μεταφορά του χαλκού και στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού μέσω της αναστολής σχηματισμού δραστικών ριζών οξυγόνου, των οποίων ο σχηματισμός επάγεται από ιόντα χαλκού.

Για την μέτρηση της ενεργότητας της σερουλοπλασμίνης χρησιμοποιείται η p-φαινυλενοδιαμίνη, της οποίας η αυτοοξείδωση καταλύεται από την σερουλοπλασμίνη, για τον τελικό σχηματισμό ιώδους προϊόντος οξείδωσης.

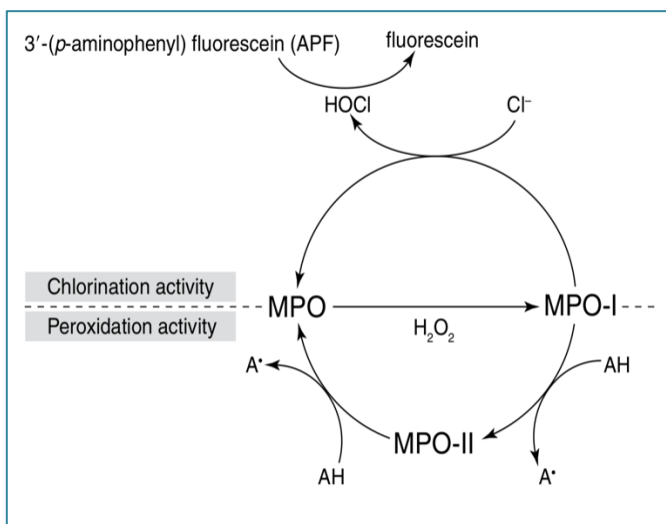
Σε διαφανή μικροπλάκα 384 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα προστέθηκαν 4  $\mu\text{L}$  ορού αίματος (ή 4  $\mu\text{L}$  διαλύματος PBS ως αρνητικός μάρτυρας) ή 20  $\mu\text{L}$  βλέννας δέρματος ή εντέρου (ή 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος PBS ως αρνητικός μάρτυρας) και 40  $\mu\text{L}$  διαλύματος πάρα-φαινυλενοδιαμίνης συγκέντρωσης 0,1%. Η αύξηση της οπτικής πυκνότητας στα 550 nm παρακολούθηθηκε για 15 λεπτά

με την χρήση του αυτόματου αναλυτή GeniosPro (TECAN, Austria). 1 Unit ενεργότητας σερουλοπλασμίνης ορίζεται ως αύξηση απορρόφησης 0,001 ανά λεπτό. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ενεργότητα σερουλοπλασμίνη (Units) ανά ml δείγματος με αφαίρεση του αρνητικού μάρτυρα.

#### 4.6.4. Μυελοϋπεροξειδάση (MPO)

Για την μέτρηση της ενεργότητας μυελοϋπεροξειδάσης χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη μέθοδος των (Henry *et al.*, 2015). Η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) απελευθερώνεται από τα φαγοκύτταρα για την αποικοδόμηση των εισβαλώντων παθογόνων, καταλύοντας την διαμεσολαβούμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου οξείδωση των αλογονιδίων ιόντων σε προϊόντα όπως το υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Για την μέτρηση της ενεργότητας της μυελοϋπεροξειδάσης χρησιμοποιήθηκε το χρωμογόνο υπόστρωμα 3,3',5,5'- τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), που αντιδρώντας με την MPO παράγει μπλε χρώμα το οποίο μετά την όξυνση του pH γίνεται κίτρινο με μέγιστο απορρόφησης τα 450 nm.

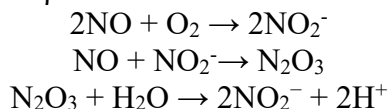
Σε διαφανή μικροπλάκα 384 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα προστέθηκαν 6 μL ορού αίματος (ή 6 μL διαλύματος HBSS ως αρνητικός μάρτυρας) ή 30 μL βλέννας δέρματος ή εντέρου (ή 30 μL διαλύματος HBSS ως αρνητικός μάρτυρας) και 56 μL ή 30 μL ισότονου διαλύματος Hank's αντίστοιχα εις τριπλούν. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 20 μL διαλύματος TMB συγκέντρωσης 2,5 mM και έπειτα από την πάροδο 2 λεπτών έγινε προσθήκη 20 μL διαλύματος H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N. Στη συνέχεια διαβάστηκε η οπτική απορρόφηση της μικροπλάκας στον αυτόματο αναλυτή Genios Pro (TECAN, Austria) και τα δεδομένα εκφράστηκαν ως οπτική απορρόφηση (OD) με αφαίρεση του αρνητικού μάρτυρα.



**Εικόνα 9.** Κύκλος αντιδράσεων της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO). Η MPO αντιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου για να σχηματίσει το ενδιάμεσο σύμπλοκο MPO-I, που καταλύει την οξείδωση των ιόντων χλωρίου σε υποχλωριώδες οξύ. Ακόμη η MPO καταλύει την οξείδωση μιας ποικιλίας υποστρωμάτων (AH).

#### 4.6.5. Μονοξείδιο αζώτου (NO)

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης του μονοξειδίου του αζώτου χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη μέθοδος Griess (Henry *et al.*, 2015). Η μέθοδος Griess στην πραγματικότητα μετράει τα νιτρώδη (NO<sub>2</sub>). Όμως, η δραστηριότητα του μονοξειδίου του αζώτου (NO) καταλήγει στον σχηματισμό νιτρωδών μέσω των αντιδράσεων:

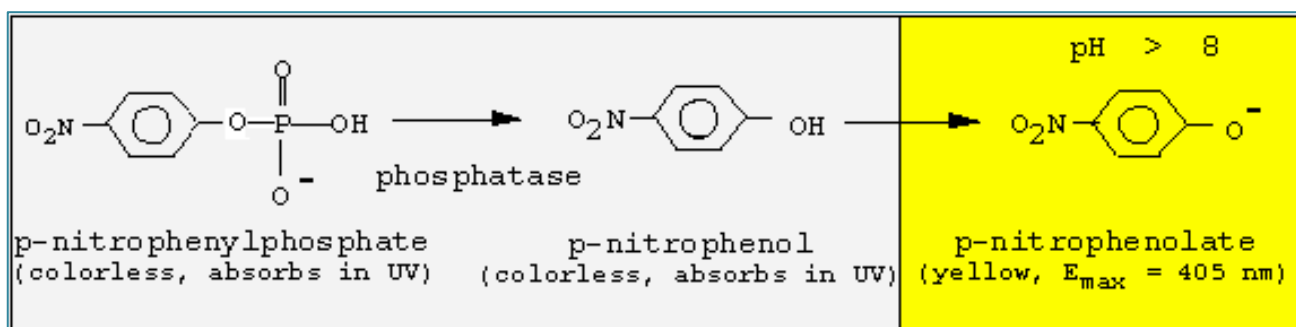


Η σύγχρονη μέθοδος της αντίδρασης Griess περιλαμβάνει την αντίδραση των νιτρωδών με την σουλφανιλαμίδα κάτω από όξινες συνθήκες (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) για τον σχηματισμό ενδιάμεσο διαζωνιακού άλατος. Το ενδιάμεσο διαζωνιακό άλας αντιδρά στη συνέχεια με την N-(1-ναφθυλ)αιθυλενοδιαμίνη (NED) για τον σχηματισμό σταθερής υδατοδιαλυτής αζοχρωστικής της οποίας η συγκέντρωση αποτελεί έμμεσο δείκτη της συγκέντρωσης νιτρωδών και επέκταση της συγκέντρωσης μονοξειδίου του αζώτου στο δείγμα.

Σε διαφανή μικροπλάκα 384 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα προστέθηκαν 60  $\mu\text{L}$  ορού αίματος ή βλέννας δέρματος/εντέρου εις τριπλούν τα οποία αραιώθηκαν με την προσθήκη 52  $\mu\text{L}$  ισότονου διαλύματος Hanks (HBSS). Στη συνέχεια έγινε ανάμειξη ίσων όγκων σουλφανιλαμίδης 1% σε  $\text{H}_3\text{PO}_4$  και NED 0,1% σε  $\text{H}_3\text{PO}_4$  για τον σχηματισμό του αντιδραστηρίου Griess. Έπειτα έγινε προσθήκη 8  $\mu\text{L}$  του αντιδραστηρίου σε κάθε βοθρίο. Η μικροπλάκα επωάστηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια έγινε ανάγνωση της οπτικής απορρόφησης στα 550 nm στον αυτόματο αναλυτή Genios Pro (TECAN, Austria). Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης νιτρώδους νατρίου ( $\text{NaNO}_2$ ).

#### 4.6.6. Αλκαλική φωσφατάση (ALP)

Για την μέτρηση της ενεργότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη μέθοδος των (Guardiola *et al.*, 2014). Οι αλκαλικές φωσφατάσες καταλύουν την αποφωσφορυλίωση φωσφορικών ομάδων από φωσφορικούς εστέρες κάτω από αλκαλικές συνθήκες. Οι αλκαλικές φωσφατάσες συμμετέχουν στα πρώτα στάδια της επούλωσης πληγών, ενώ μπορεί να έχουν και αντιβακτηριακή δράση. Για αυτό έχει προταθεί ο ρόλος τους ως δείκτης στρες. Χρησιμοποιούμε σαν υπόστρωμα την παρα-φωσφονιτροφαινόλη (pNPP), η υδρόλυση της οποίας απελευθερώνει ανόργανα φωσφορικά και την συζυγή βάση παρα-νιτροφαινόλη (pNP) η οποία δίνει κίτρινο προϊόν με μέγιστη απορρόφηση στα 405 nm.



**Εικόνα 10.** Μηχανισμός δράσης της αλκαλικής φωσφατάσης στο υπόστρωμα της παρα-φωσφονιτροφαινόλης για την τελική παραγωγή έγχρωμου προϊόντος.

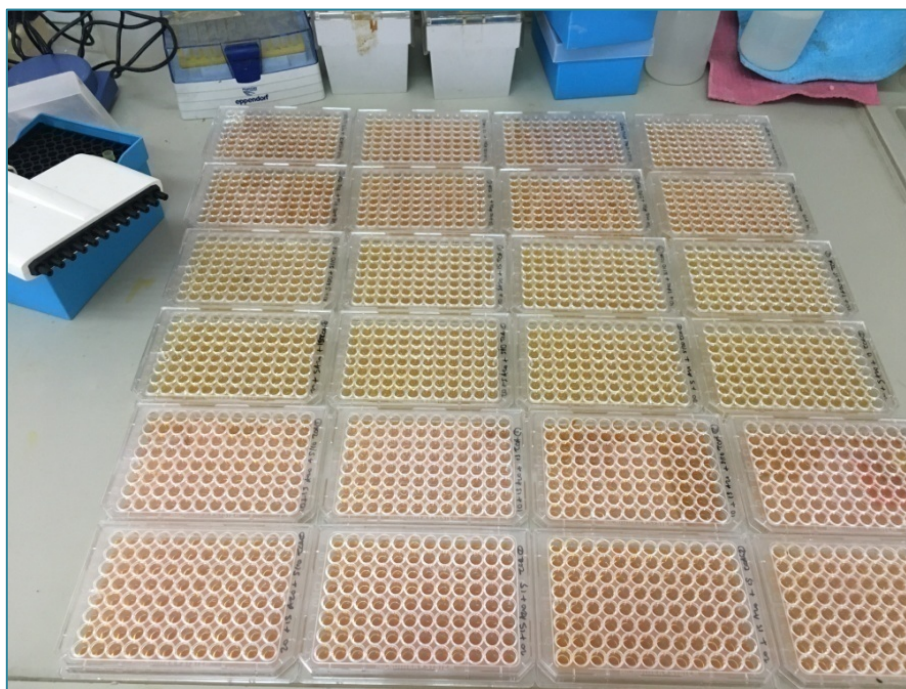
Σε διαφανή μικροπλάκα 384 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα προστέθηκαν 5  $\mu\text{L}$  ορού αίματος (ή 5  $\mu\text{L}$  διαλύματος PBS ως αρνητικός μάρτυρας) και 15  $\mu\text{L}$  φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) ή 20  $\mu\text{L}$  δερματικής ή εντερικής βλέννας (ή 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος PBS ως αρνητικός μάρτυρας). Στη συνέχεια προστέθηκαν 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος pNPP συγκέντρωσης 8 mM σε διάλυμα PBS pH=7,8 που περιείχε  $\text{MgCl}_2$  σε συγκέντρωση 1 mM. Τα ιόντα μαγνησίου είναι συμπαράγοντες για την αλκαλική φωσφατάση όπως και τα ιόντα ψευδαργύρου. Η αύξηση της οπτικής πυκνότητας στα 405 nm παρακολούθηθηκε για 30 λεπτά με την χρήση του αυτόματου αναλυτή Genios Pro (TECAN, Austria). 1 Unit ενεργότητας αλκαλικής φωσφατάσης ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που χρειάζεται για την απελευθέρωση 1 mmol παρα-νιτροφαινόλης ανά λεπτό. Ο συντελεστής απόσβεσης της παρα-νιτροφαινόλης στα βοθρία της μικροπλάκας καθορίστηκε πειραματικά. Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης (Units) ανά ml δείγματος με αφαίρεση του αρνητικού μάρτυρα.

#### 4.6.7. Πρωτεάσες

Για την μέτρηση της ενεργότητας πρωτεασών ακολουθήθηκε τροποποιημένη μέθοδος υδρόλυσης αζοκαζεΐνης των (Ross *et al.*, 2000). Η αζοκαζεΐνη είναι ένα μη ειδικό υπόστρωμα για

πρωτεάσες, η υδρόλυση της οποίας απελευθερώνει την αζοχρωστική η οποία ανιχνεύεται με απορρόφηση στα 440nm. Η επώαση ενός δείγματος με αζοκαζεΐνη απελευθερώνει μικρού μοριακού βάρους μόρια τα οποία δεν κατακρημνίζονται έπειτα από κατεργασία με τριχλωροακετικό οξύ (TCA), το οποίο τερματίζει την ενζυμική αντίδραση και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες, που καθίστανται αδιάλυτες. Έτσι, έπειτα από φυγοκέντρηση, η απορρόφηση του υπερκείμενου αποτελεί μέτρηση της χρωστικής, δηλαδή των ελεύθερων αμινοξέων και πεπτιδίων που την περιέχουν. Οι πρωτεάσες διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο εναντίον παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ συμμετέχουν και στην ενεργοποίηση άλλων ανοσολογικών μηχανισμών (π.χ. συμπλήρωμα) (Guardiola *et al.*, 2014). Βέβαια υπάρχει φυσική παρουσία πρωτεασών στην εντερική οδό που σχετίζεται με την πεπτική λειτουργία.

Σε διαφανή μικροπλάκα 96 βοθρίων με στρογγυλό πυθμένα τύπου U, προστέθηκαν 50  $\mu\text{L}$  δείγματος εις τριπλούν ή 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος PBS ως αρνητικός μάρτυρας (0% ενεργότητα πρωτεάσης) ή 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος θρυψίνης συγκέντρωσης 5 mg/ml ως θετικός μάρτυρας (100% ενεργότητα πρωτεάσης), τα οποία επώαστηκαν με 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος αζοκαζεΐνης συγκέντρωσης 3,5 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Μετά από επώαση 19 ωρών στους 25°C, η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  τριχλωροακετικού οξέος συγκέντρωσης (TCA) 4,5 %. Μετά την παραμονή 30 λεπτών στον πάγο, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1900g για 5 λεπτά, και 100  $\mu\text{L}$  υπερκείμενου διαλύματος μεταφέρθηκαν σε διαφανή μικροπλάκα 96 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα στην οποία είχαν ήδη προστεθεί 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος NaOH 0,5 M. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm με την χρήση του αυτόματου αναλυτή Genios Pro (TECAN, Austria). Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως % ενεργότητα πρωτεασών με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης ενεργότητας θρυψίνης.



**Εικόνα 11.** Μικροπλάκες ανάλυσης ενεργότητας πρωτεασών και αντιπρωτεασών.

#### 4.6.8. Αντιπρωτεάσες

Για την μέτρηση της ενεργότητας αντιπρωτεασών ακολουθήθηκε η μέθοδος των (Henry *et al.*, 2015). Η μέτρηση της ενεργότητας αντιπρωτεασών γίνεται με την μέθοδο της αναστολής υδρόλυσης αζοκαζεΐνης. Δηλαδή η προσέγγιση είναι ακριβώς αντίθετη με την μέτρηση της ενεργότητας πρωτεασών (βλ. παραπάνω). Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη σταθερής ποσότητας θρυψίνης στα δείγματα, η οποία υδρολύει την αζοκαζεΐνη. Οι αντιπρωτεάσες που βρίσκονται στο δείγμα αναστέλλουν την υδρόλυση της αζοκαζεΐνης από την θρυψίνη. Έτσι, λόγω της αναστολής, η δράση της θρυψίνης δεν αντιστοιχεί στην ποσότητα ενζύμου που προσθέσαμε, αλλά σε μικρότερη ποσότητα. Με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης θρυψίνης, μπορούμε να ανάγουμε την συγκέντρωση θρυψίνης που θεωρητικά ανιχνεύεται στο δείγμα, σε ποσοστό αναστολής θρυψίνης, δηλαδή σε ενεργότητα αντιπρωτεασών. Οι αντιπρωτεάσες δρουν σαν άμυνα του οργανισμού εναντίον εισβαλλόντων παθογόνων, ανταποκρινόμενες στην παραγωγή πρωτεασών από παράσιτα ή βακτηρία (Henry *et al.*, 2015).

Σε διαφανή μικροπλάκα 96 βοθρίων με στρογγυλό πυθμένα τύπου U, προστέθηκαν 10  $\mu\text{L}$  δείγματος εις τριπλούν ή 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος PBS ως αρνητικός μάρτυρας (0% ενεργότητα αντιπρωτεασών/100% ενεργότητα θρυψίνης), τα οποία επώαστηκαν με 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος θρυψίνης συγκέντρωσης 5 mg/ml για 10 λεπτά στους 22°C. Ο θετικός μάρτυρας προήλθε από αντικατάσταση του δείγματος και του διαλύματος θρυψίνης με διάλυμα PBS (100% ενεργότητα πρωτεασών/0% ενεργότητα θρυψίνης). Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος αζοκαζεΐνης συγκέντρωσης 10mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS). Μετά από επώαση 1 ώρα στους 25 °C, η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  τριχλωροακετικού οξέος συγκέντρωσης (TCA) 10 %. Μετά την παραμονή 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1900g για 5 λεπτά, και 100  $\mu\text{L}$  υπερκείμενου διαλύματος μεταφέρθηκαν σε διαφανή μικροπλάκα 96 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα στην οποία είχαν ήδη προστεθεί 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος NaOH 1 M. Η οπτική απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm με την χρήση του αυτόματου αναλυτή Genios Pro (TECAN, Austria). Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως % ενεργότητα αντιπρωτεασών με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης ενεργότητας (αναστολής) θρυψίνης.

#### 4.6.9. Συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα (Συμπλήρωμα)

Για την μέτρηση της συνολικής αντιβακτηριακής δραστηριότητας (ΣΑΔ) (συνχά αναφέρεται ως δράση συμπληρώματος) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των (Henry *et al.*, 2015), με τις τροποποιήσεις βελτιστοποίησης που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Περιληπτικά, για την μέτρηση της ΣΑΔ χρησιμοποιήθηκε μετασχηματισμένο στέλεχος *Escherichia coli* (K12, LuxABCDEamp, που παραχωρήθηκε από τους J. Atosuo και E. M. Lilius του Πανεπιστημίου Turku στη Φιλανδία). Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν κατά την διάρκεια της νύχτας σε θρεπτικό υλικό LB στους 37°C μέχρι τη λογαριθμική φάση, και η βακτηριακή συγκέντρωση εναιωρήματος – καλλιέργειας αυτών σε LB προσαρμόστηκε σε απορρόφηση OD = 0,4 στα 450 nm. 20  $\mu\text{L}$  δείγματος ορού αίματος ή βλέννας δέρματος/εντέρου ή 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος PBS ως αρνητικός μάρτυρας προστέθηκαν εις τριπλούν σε λευκή μικροπλάκα 384 βοθρίων με επίπεδο πυθμένα και επώαστηκαν για 30 λεπτά με 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος  $\text{Mg}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  συγκέντρωσης 50 mM ή 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος EDTA συγκέντρωσης 100 mM ή 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος EGTA συγκέντρωσης 100 mM αντίστοιχα. Περισσότερες πληροφορίες για την δράση των αντιδραστηρίων αναφέρονται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 40  $\mu\text{L}$  θρεπτικού υλικού LB και 30  $\mu\text{L}$  της καλλιέργειας *E.coli*. Η μέτρηση της φωτεινότητας παρακολούθηθηκε κάθε 15 λεπτά για 20 ώρες στον αυτόματο αναλυτή Genios Pro (TECAN, Austria). Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν με τις λειτουργίες προσαρμογής καμπύλης Gauss και σιγμοειδούς καμπύλης του λογισμικού Origin. Η έκφραση των δεδομένων έγινε με δύο παραμέτρους: α) Τον χρόνο



(σε ώρες) που απαιτείται για την συναρμολόγηση των αμυντικών μηχανισμών και την έναρξη της θανάτωσης βακτηρίων (παράμετρος Ε όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο) και β) Τον χρόνο (σε ώρες) που απαιτείται για την θανάτωση του 50% των βακτηρίων, με έναρξη του χρονικού διαστήματος τον χρόνο συναρμολόγησης (παράμετρος F όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο). Οι τιμές εκφράστηκαν ανεστραμμένες.

#### 4.7. Στατιστικές αναλύσεις

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την χρήση του λογισμικού SPSS 23.0 (Chicago, IL, USA) στο επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Η κανονική κατανομή των δεδομένων και η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκαν με την χρήση των δοκιμασιών Kolmogorov-Smirnov και Levene αντίστοιχα. Όταν επαληθεύθηκε η κανονική κατανομή και η ομογένεια των διακυμάνσεων, χρησιμοποιήθηκε η μονόδρομη ANOVA και το Tukey t-test για την σύγκριση των μέσων όρων των μεταβλητών με χρήση της δίαιτας ως ανεξάρτητη μεταβλητή. Όταν δεν μπορούσαν να ικανοποιηθούν οι παραπάνω προϋποθέσεις, χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis σε συνδυασμό με το Tamhane t-test. Για τους δείκτες αύξησης, ο μέσος όρος των δεξαμενών χρησιμοποιήθηκε ως στατιστική μονάδα, ενώ τα μεμονωμένα ψάρια ήταν η στατιστική μονάδα για τις ανοσολογικές παραμέτρους.

## 5. Αποτελέσματα

### 5.1. Αύξηση

Τα δεδομένα των παραμέτρων αύξησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**. Όσον αφορά το τελικό βάρος των ψαριών και την αύξηση βάρους, η διαίτα ORG φαίνεται να εμφανίζει μικρή υπεροχή (τελικό βάρος  $74,44 \pm 2,49\text{g}$ , αύξηση βάρους  $54,22 \pm 2,15\text{g}$ ). Αναφορικά με την κατανάλωση τροφής οι τιμές είναι πολύ κοντά μεταξύ τους, με την μέγιστη τιμή να εμφανίζεται στην διαίτα CTRL+ ( $62,10 \pm 3,35$ ) και την ελάχιστη στην διαίτα CTRL- ( $59,42 \pm 1,59$ ). Η μετατρεψιμότητα τροφής ήταν σε πολύ καλό στενό εύρος τιμών (1,14 - 1,20) με τον χαμηλότερο λόγο να εμφανίζεται στην διαίτα ORG ( $1,14 \pm 0,05$ ). Η μοναδική παράμετρος αύξησης που εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά [ANOVA  $F_{(5, 22)} = 3,00$ ;  $p = 0,041$ ] είναι ο ημερήσιος ρυθμός αύξησης (SGR) με μέγιστο ρυθμό να εμφανίζεται στην διαίτα ORG ( $1,36 \pm 0,02$  % g/ημέρα) που διέφερε σημαντικά από την διαίτα CTRL- ( $1,30 \pm 0,03$  %g/ημέρα). Οι υπόλοιπες δίαιτες εμφάνισαν ενδιάμεσες τιμές μεταξύ των τιμών των διαιτών ORG και CTRL-. Τέλος, η % ημερήσια πρόσληψη τροφής κυμαινόταν σε τιμές 1,59-1,64 με την χαμηλότερη τιμή να εμφανίζει η διαίτα ORG ( $1,60 \pm 0,03$  % g/ημέρα).

**Πίνακας 6.** Συντελεστές απόδοσης του λαβρακίου για κάθε διαίτα που χορηγήθηκε. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος των τεσσάρων δεξαμενών κάθε διαίτας  $\pm$  τυπική απόκλιση. Οι διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια γραμμή αντιστοιχούν σε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες [ANOVA  $F_{(5, 22)} = 3,00$ ;  $P = 0,041$ ]. **CTRL-**: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, **ORGlow**: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORG**: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORGhigh**: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **INORG**: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, **CTRL+**: διαίτα θετικός μάρτυρας.  $n=4$ .

	CTRL-	ORGlow	ORG	ORGhigh	INORG	CTRL+
<b>Αρχικό Βάρος (g)</b>	20,21 $\pm$ 0,31	20,22 $\pm$ 0,32	20,23 $\pm$ 0,41	19,85 $\pm$ 0,35	19,92 $\pm$ 0,53	20,46 $\pm$ 0,74
<b>Τελικό Βάρος (g)</b>	69,59 $\pm$ 1,08	71,40 $\pm$ 1,07	74,44 $\pm$ 2,49	70,30 $\pm$ 3,88	70,32 $\pm$ 3,23	72,76 $\pm$ 2,36
<b>Αύξηση Βάρους (g)</b>	49,47 $\pm$ 0,92	51,19 $\pm$ 1,35	54,22 $\pm$ 2,15	50,45 $\pm$ 3,74	50,40 $\pm$ 2,81	52,30 $\pm$ 1,67
<b>Κατανάλωση τροφής</b>	59,42 $\pm$ 1,59	60,29 $\pm$ 1,80	61,58 $\pm$ 2,27	60,29 $\pm$ 2,42	60,74 $\pm$ 3,99	62,10 $\pm$ 3,35
<b>FCR</b>	1,19 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,05	1,14 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,02	1,19 $\pm$ 0,04
<b>SGR (%g/ημέρα)</b>	1,30 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,32 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	1,36 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	1,32 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	1,32 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	1,33 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>
<b>DFI (%g/ημέρα)</b>	1,61 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,05	1,60 $\pm$ 0,03	1,64 $\pm$ 0,03	1,65 $\pm$ 0,03	1,63 $\pm$ 0,05

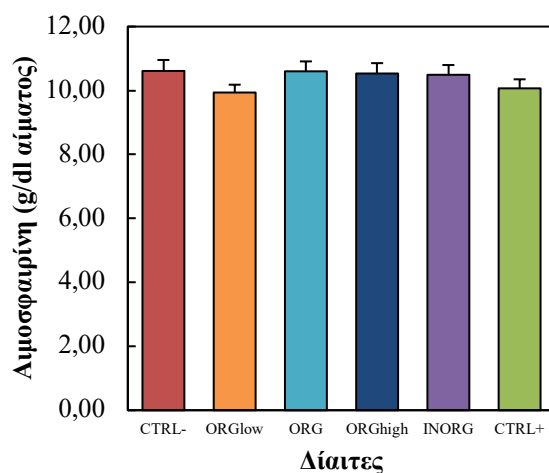
## 5.2. Ανοσολογικοί παράμετροι

### 5.2.1. Αιμοσφαιρίνη

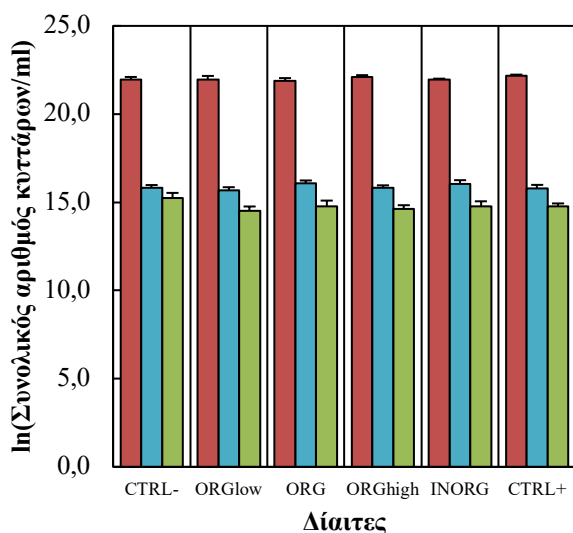
Όσον αφορά την συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες (Γράφημα 20). Η υψηλότερη τιμή εμφανίζεται στην δίαιτα CTRL- ( $10,61 \pm 0,34$  g/dl αίματος), ενώ η χαμηλότερη τιμή εμφανίζεται στην δίαιτα ORGlow ( $9,94 \pm 0,24$  g/dl αίματος). Η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης είναι της τάξης των  $10,44 \pm 0,12$  g/dl αίματος.

### 5.2.2. Αριθμός και μέγεθος κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα δεδομένα του αριθμού των κυττάρων (Γράφημα 21) παρουσιάζονται έπειτα από λογαριθμική μετατροπή (ln) για την εξομάλυνση της τυπικής απόκλισης και την εξισορρόπηση της διαφοράς τάξης μεγέθους του αριθμού των κυττάρων ανάμεσα στα τρία βιολογικά υλικά.

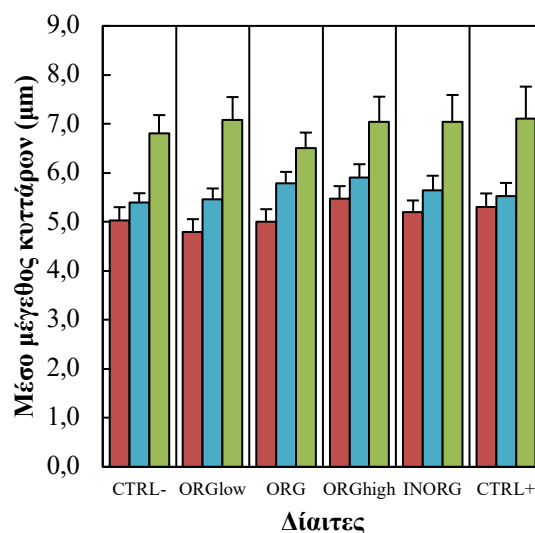


Γράφημα 20. Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (g/dl) για κάθε δίαιτα. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα, n=24. CTRL-: δίαιτα αρνητικός μάρτυρας, ORGlow: δίαιτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORG: δίαιτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORGhigh: δίαιτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, INORG: δίαιτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, CTRL+: δίαιτα θετικός μάρτυρας.



■ Αίμα ■ Βλέννα δέρματος ■ Βλέννα εντέρου

Γράφημα 21. Συνολικός αριθμός κυττάρων/ml για κάθε δίαιτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Τα δεδομένα έχουν υποστεί λογαριθμική μετατροπή. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα, n=12. CTRL-: δίαιτα αρνητικός μάρτυρας, ORGlow: δίαιτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORG: δίαιτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORGhigh: δίαιτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, INORG: δίαιτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, CTRL+: δίαιτα θετικός μάρτυρας.



■ Αίμα ■ Βλέννα δέρματος ■ Βλέννα εντέρου

Γράφημα 22. Μέσο μέγεθος κυττάρων για κάθε δίαιτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο των επαναλήψεων κάθε δίαιτας  $\pm$  τυπικό σφάλμα, n=12. CTRL-: δίαιτα αρνητικός μάρτυρας, ORGlow: δίαιτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORG: δίαιτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORGhigh: δίαιτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, INORG: δίαιτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, CTRL+: δίαιτα θετικός μάρτυρας.

Δεν εμφανίζεται σημαντική διαφορά στον αριθμό των κυττάρων ανάμεσα στις δίαιτες για κανένα από τα βιολογικά υλικά που εξετάστηκαν (αίμα, δερματική βλέννα, εντερική βλέννα). Ο νεπέριος λογάριθμος του μέσου αριθμού κυττάρων στο αίμα είναι  $21,99 \pm 0,05$  κύτταρα/ml, και για την δερματική και την εντερική βλέννα είναι  $15,87 \pm 0,07$  κύτταρα/ml και  $14,78 \pm 0,10$  κύτταρα/ml αντίστοιχα. Ο μέσος αριθμός κυττάρων στο αίμα είναι 3 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος σε σχέση με την δερματική (~500 φορές μεγαλύτερος) και την εντερική βλέννα (~1500 φορές μεγαλύτερος), που εμφανίζουν μέσο αριθμό κυττάρων στην ίδια τάξη μεγέθους, με την δερματική βλέννα να υπερέχει σε μικρό βαθμό (τριπλάσιος αριθμός κυττάρων). Η δίαιτα CTRL+ εμφανίζει τον μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων για το αίμα (νεπέριος λογάριθμός  $22,16 \pm 0,07$  κύτταρα/ml). Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας, μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων εμφανίζει η δίαιτα ORG (νεπέριος λογάριθμός  $16,08 \pm 0,16$  κύτταρα/ml) και μικρότερο αριθμό κυττάρων η δίαιτα ORGlow (νεπέριος λογάριθμός  $15,68 \pm 0,17$  κύτταρα/ml), ενώ στην περίπτωση της εντερικής βλέννας μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων εμφανίζει η δίαιτα CTRL- (νεπέριος λογάριθμός  $15,25 \pm 0,28$  κύτταρα/ml) και μικρότερο αριθμό επίσης η δίαιτα ORGlow (νεπέριος λογάριθμός  $14,52 \pm 0,24$  κύτταρα/ml) όπως στην περίπτωση της δερματικής βλέννας.

Αναφορικά με το μέσο μέγεθος των κυττάρων (**Γράφημα 22**), επίσης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για κανένα από τα τρία βιολογικά υλικά που εξετάστηκαν. Για το αίμα το μέσο μέγεθος κυττάρων είναι της τάξης των  $5,13 \pm 0,11$   $\mu\text{m}$ , για την δερματική βλέννα της τάξης των  $5,62 \pm 0,1$   $\mu\text{m}$  και για την εντερική βλέννα της τάξης των  $6,94 \pm 0,2$   $\mu\text{m}$ . Για την περίπτωση του αίματος το μικρότερο μέγεθος κυττάρων εμφανίζεται στην δίαιτα ORGlow ( $4,8 \pm 0,25$   $\mu\text{m}$ ) και το μεγαλύτερο μέγεθος στην δίαιτα ORGhigh ( $5,5 \pm 0,25$   $\mu\text{m}$ ). Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας το μικρότερο μέγεθος κυττάρων εμφανίζεται στην δίαιτα CTRL- ( $5,4 \pm 0,19$   $\mu\text{m}$ ) και το μεγαλύτερο μέγεθος κυττάρων εμφανίζεται στην δίαιτα ORGhigh ( $5,9 \pm 0,27$   $\mu\text{m}$ ). Τέλος, στην περίπτωση της εντερικής βλέννας, το μικρότερο μέγεθος κυττάρων εμφανίζεται στην δίαιτα ORG ( $6,5 \pm 0,32$   $\mu\text{m}$ ) και το μεγαλύτερο μέγεθος κυττάρων εμφανίζεται στην δίαιτα ORGhigh ( $7,1 \pm 0,65$   $\mu\text{m}$ ).

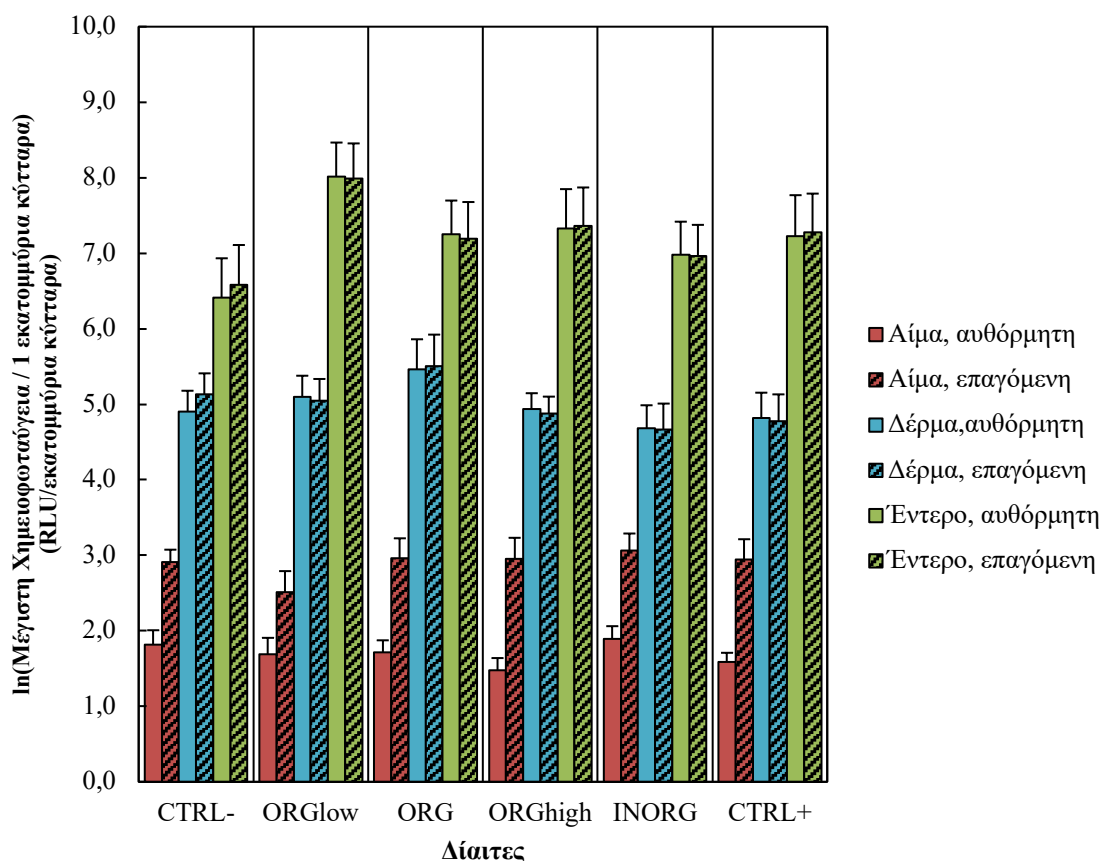
### 5.2.3. Χημειοφωταύγεια

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα δεδομένα της χημειοφωταύγειας (**Γράφημα 3**) εκφράστηκαν ανά ένα εκατομμύριο κύτταρα, λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των κυττάρων/ml δείγματος όπως μετρήθηκε παραπάνω και την ποσότητα δείγματος που τοποθετήθηκε στα βοθρία της αντίδρασης. Στη συνέχεια τα δεδομένα υπέστησαν λογαριθμική μετατροπή (νεπέριος λογάριθμος) για την εξομάλυνση της τυπικής απόκλισης των μετρήσεων.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην μέγιστη χημειοφωταύγεια (έκρηξη ριζών οξυγόνου) ανάμεσα στις δίαιτες για κανένα από τα βιολογικά υλικά που εξετάστηκαν. Ακόμη, στην περίπτωση του αίματος υπήρχε διαφορά στην μετρούμενη φωτεινότητα ανάμεσα στα δείγματα που δεν είχαν δεχθεί την προσθήκη Zymosan A, και σε αυτά που το Zymosan είχε προστεθεί, με τα τελευταία να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές φωτεινότητας. Αντίθετα, για την δερματική και την εντερική βλέννα, οι τιμές φωτεινότητας ανάμεσα στις δύο πειραματικές συνθήκες ήταν σχεδόν ίδιες. Ανάμεσα στα τρία βιολογικά δείγματα, το αίμα εμφάνισε τις χαμηλότερες τιμές φωτεινότητας/εκατομμύριο κύτταρα, με αμέσως μεγαλύτερες τιμές να εντοπίζονται στην δερματική βλέννα και τις μεγαλύτερες τιμές να εμφανίζονται στην εντερική βλέννα.

Για την περίπτωση του αίματος και για την περίπτωση της αυθόρμητης χημειοφωταύγειας, μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει η δίαιτα ORGhigh ( $1,89 \pm 0,17$  RLU/εκατομμύρια κύτταρα) και μικρότερη τιμή η δίαιτα INORG ( $1,48 \pm 0,16$  RLU/εκατομμύρια κύτταρα). Για την περίπτωση της δερματικής βλέννας, τόσο για την αυθόρμητη όσο και για την επαγόμενη χημειοφωταύγεια, την μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει η δίαιτα ORG ( $5,47 \pm 0,39$  RLU/εκατομμύρια κύτταρα επαγόμενη χημειοφωταύγεια,  $5,50 \pm 0,42$  RLU/εκατομμύρια κύτταρα αυθόρμητη χημειοφωταύγεια) και την μικρότερη τιμή η δίαιτα ORGhigh ( $4,68 \pm 0,31$  RLU/εκατομμύρια κύτταρα αυθόρμητη χημειοφωταύγεια/  $4,67 \pm 0,34$

RLU/εκατομμύρια κύτταρα επαγόμενη χημειοφωταύγεια). Τέλος, για την περίπτωση της εντερικής βλάννας, τόσο στην περίπτωση της αυθόρμητης όσο και στην περίπτωση της επαγόμενης χημειοφωταύγειας, μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει η διαίτα ORGlow ( $8,01 \pm 0,45$  RLU/εκατομμύρια κύτταρα αυθόρμητη χημειοφωταύγεια,  $7,99 \pm 0,47$  RLU/εκατομμύρια κύτταρα επαγόμενη χημειοφωταύγεια) και την μικρότερη τιμή η διαίτα CTRL- ( $6,41 \pm 0,52$  RLU/εκατομμύρια κύτταρα αυθόρμητη χημειοφωταύγεια,  $6,58 \pm 0,53$  RLU/εκατομμύρια κύτταρα επαγόμενη χημειοφωταύγεια).



**Γράφημα 23.** Μέγιστη αυθόρμητη και επαγόμενη από μη οψωνισμένο κυτταρικό τοίχωμα μαγιάς (Non-opsonized Zymosan A, Sigma-Aldrich) χημειοφωταύγεια (Σχετικές μονάδες φωτεινότητα –RLU– ανά ένα εκατομμύρια κύτταρα) για κάθε διαίτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Τα δεδομένα έχουν υποστεί λογαριθμική μετατροπή. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . **CTRL-**: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, **ORGlow**: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORG**: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORGhigh**: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **INORG**: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, **CTRL+**: διαίτα θετικός μάρτυρας.

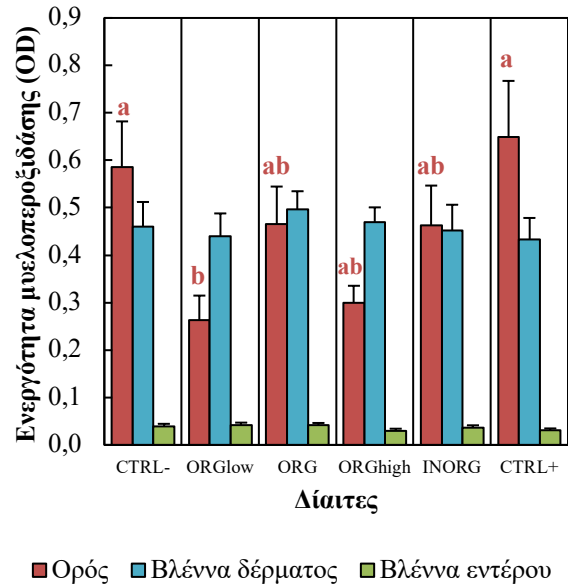
#### 5.2.4. Μυελοϋπεροξειδάση

Όσον αφορά την ενεργότητα μυελοϋπεροξειδάσης (**Γράφημα 24**), στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαιτών εμφανίστηκαν μόνο στην περίπτωση του ορού αίματος (Kruskal-Wallis  $X^2_{(5,137)}=12,25$ ,  $p=0,032$ ). Οι δίαιτες CTRL+ ( $0,65 \pm 0,12$  OD) και CTRL- ( $0,59 \pm 0,1$  OD) εμφανίζουν τις μεγαλύτερες ενεργότητες, οι οποίες διαφέρουν σημαντικά από την ενεργότητα της διαίτας ORGlow ( $0,26 \pm 0,05$  OD) η οποία εμφανίζει την μικρότερη ενεργότητα. Οι υπόλοιπες δίαιτες εμφανίζουν ενδιάμεσες ενεργότητες. Οι τιμές ενεργότητας στην δερματική βλάννα ήταν πολύ κοντινές μεταξύ τους. Μεγαλύτερη ενεργότητα εμφάνισε η διαίτα ORG ( $0,50 \pm 0,04$  OD) και μικρότερη

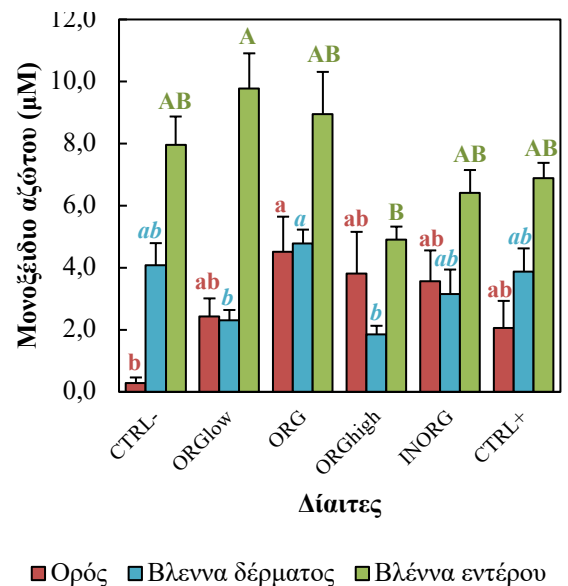
ενεργότητα η διαίτα CTRL+ ( $0,43 \pm 0,04$  OD). Οι τιμές ενεργότητας για την εντερική βλέννα είναι σχεδόν μηδενικές (εύρος  $0,03 - 0,04$  OD).

### 5.2.5. Μονοξειδίο του αζώτου

Η συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου (Γράφημα 25) εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για την περίπτωση του αίματος (Kruskal-Wallis  $X^2_{(5,86)}=13,41$ ,  $p=0,020$ ) της δερματικής [ANOVA  $F_{Welch(5, 46)} = 7,336$ ;  $P < 0,001$ ] και της εντερικής βλέννας (Kruskal-Wallis  $X^2_{(5,103)}=11,42$ ,  $p=0,009$ ). Και στα τρία βιολογικά υλικά η συγκέντρωση του μονοξειδίου του αζώτου ήταν χαμηλή ( $<12$   $\mu\text{M}$ ). Στην περίπτωση του ορού αίματος, την μεγαλύτερη συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου (NO) εμφανίζει η διαίτα ORG ( $4,50 \pm 1,14$   $\mu\text{M}$ ) η οποία διαφέρει σημαντικά (Tamhane t-test  $p=0,011$ ) από την μικρότερη συγκέντρωση της διαίτας CTRL- ( $0,29 \pm 0,17$   $\mu\text{M}$ ). Οι υπόλοιπες δίαιτες εμφανίζουν μέση συγκέντρωση NO. Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας, μεγαλύτερη συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου εμφανίζει η διαίτα ORG ( $4,78 \pm 0,45$   $\mu\text{M}$ ) η οποία διαφέρει σημαντικά από τις συγκεντρώσεις των διαιτών ORGlow ( $2,31 \pm 0,33$   $\mu\text{M}$ ) (Games – Howell test,  $p=0,047$ ) και ORGhigh ( $1,85 \pm 0,28$   $\mu\text{M}$ ) (Games – Howell test  $p=0,006$ ) που εμφανίζουν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Οι υπόλοιπες δίαιτες εμφανίζουν μέση συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου (NO). Στην περίπτωση της εντερικής βλέννας, μεγαλύτερη συγκέντρωση NO εμφανίζει η διαίτα ORGlow ( $9,78 \pm 1,12$   $\mu\text{M}$ ), η οποία διαφέρει σημαντικά (Tamhane t-test  $p=0,005$ ) από την διαίτα ORGhigh που εμφανίζει την μικρότερη συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου ( $4,91 \pm 0,42$   $\mu\text{M}$ ). Οι υπόλοιπες δίαιτες εμφανίζουν ενδιάμεση συγκέντρωση.



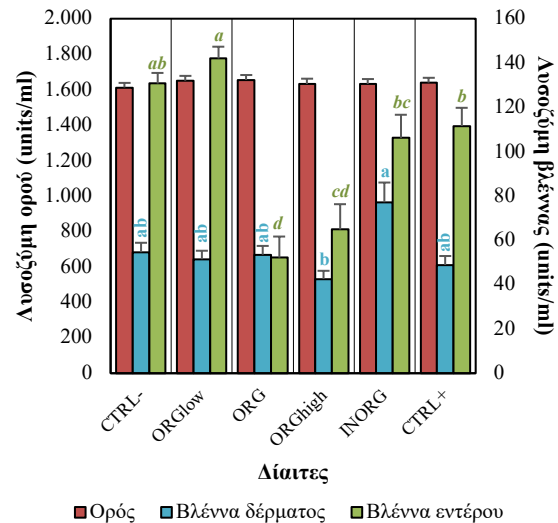
**Γράφημα 24.** Ενεργότητα μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) για κάθε διαίτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . Τα γράμματα αναπαριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για τον ορό αίματος στο επίπεδο  $p < 0,05$ . CTRL-: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, ORGlow: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORG: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORGhigh: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, INORG: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, CTRL+: διαίτα θετικός μάρτυρας.



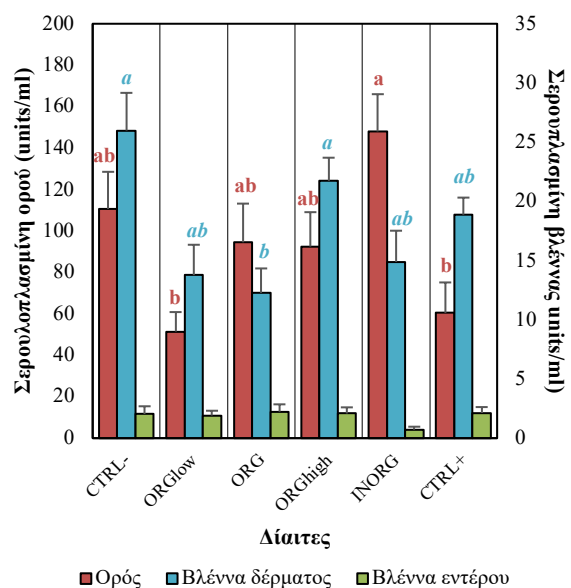
**Γράφημα 25.** Συγκέντρωση NO για κάθε διαίτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . Τα γράμματα αναπαριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για  $p < 0,05$  (Με κανονική γραμματοσειρά για τον ορό, με italics για την δερματική βλέννα και με κεφαλαία για την εντερική βλέννα). CTRL-: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, ORGlow: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORG: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORGhigh: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, INORG: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, CTRL+: διαίτα θετικός μάρτυρας.

## 5.2.6. Λυσοζύμη

Αναφορικά με την ενεργότητα λυσοζύμης (Γράφημα 26) ο ορός αίματος εμφάνισε την μεγαλύτερη ενεργότητα από τα τρία βιολογικά υλικά, χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες. Μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας εμφανίζει η διαίτα ORG ( $1654 \pm 27,65$  U/ml) και μικρότερη τιμή η διαίτα CTRL- ( $1612 \pm 25,76$  U/ml). Στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίστηκαν ανάμεσα στις δίαιτες, τόσο στην δερματική [ANOVA  $F_{Welch(5, 44)} = 32,91$ ;  $p = 0,024$ ] όσο και στην εντερική βλέννα [ANOVA  $F_{Welch(5, 42)} = 18,71$ ;  $P < 0,001$ ]. Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας υψηλότερη τιμή ενεργότητας εμφάνισε η διαίτα INORG ( $77,19 \pm 8,87$  U/ml) η οποία διέφερε σημαντικά (Games – Howell test  $p = 0,020$ ) από την χαμηλότερη τιμή ενεργότητας της διαίτας ORGhigh ( $42,55 \pm 3,68$  U/ml). Οι υπόλοιπες δίαιτες εμφάνισαν ενδιάμεσες ενεργότητες. Στην περίπτωση της εντερικής βλέννας, μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας εμφάνισε η διαίτα ORGlow ( $142,07 \pm 5,30$  U/ml) η οποία διέφερε σημαντικά από όλες τις δίαιτες εκτός της CTRL- ( $130,76 \pm 4,77$  U/ml). Χαμηλότερη τιμή ενεργότητας εμφάνισε η διαίτα ORG ( $52,21 \pm 9,48$  U/ml) η οποία διέφερε σημαντικά από όλες τις δίαιτες εκτός της ORGhigh ( $64,88 \pm 11,40$  U/ml). Οι δίαιτες INORG και CTRL+ εμφάνισαν ενδιάμεσες ενεργότητες.

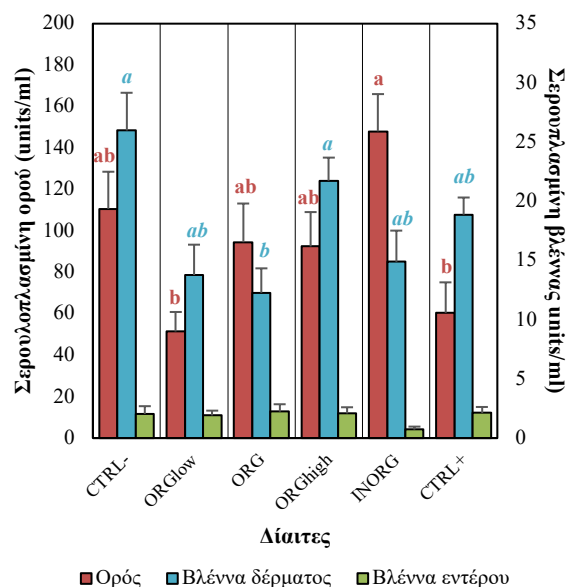


**Γράφημα 26.** Ενεργότητα λυσοζύμης για κάθε διαίτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Ο αριστερός κατακόρυφος άξονας αναφέρεται στον ορό αίματος και ο δεξιός στην δερματική και εντερική βλέννα. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . Τα διαφορετικά γράμματα αναπαριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για  $p < 0,05$ . (Με κανονική γραμματοσειρά για την δερματική βλέννα και με *italics* για την εντερική βλέννα. CTRL-: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, ORGlow: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORG: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORGhigh: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, INORG: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, CTRL+: διαίτα θετικός μάρτυρας.



**Γράφημα 27.** Ενεργότητα σερουλοπλασμίνης για κάθε διαίτα και για κάθε βιολογικό που εξετάστηκε. Ο αριστερός κατακόρυφος άξονας αναφέρεται στον ορό αίματος και ο δεξιός στην δερματική και εντερική βλέννα. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . Τα διαφορετικά γράμματα αναπαριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για  $p < 0,05$ . (Με κανονική γραμματοσειρά για τον ορό αίματος και με *italics* για την δερματική βλέννα. CTRL-: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, ORGlow: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORG: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORGhigh: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, INORG: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, CTRL+: διαίτα θετικός μάρτυρας.

## 5.2.7. Σερουλοπλασμίνη

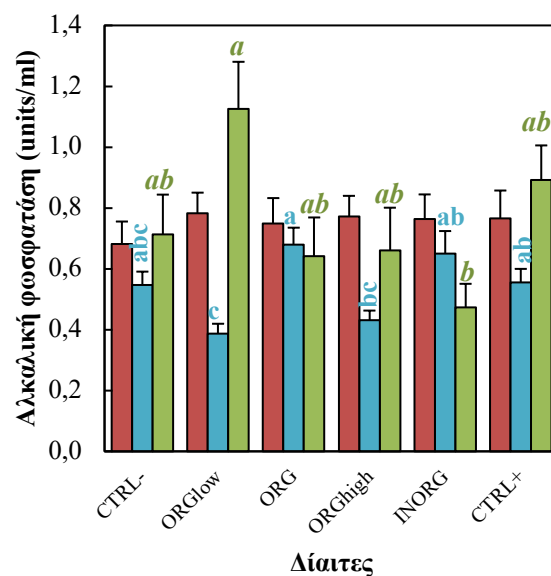


Οι τιμές ενεργότητας της σερουλοπλασμίνης ( Γράφημα 27) ήταν αρκετά χαμηλές ειδικά για την περίπτωση της δερματικής και της εντερικής βλέννας. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες υπήρχαν για τον ορό (Kruskal-Wallis  $X^2_{(5,110)}=16,9$ ,  $p=0,005$ ) και την δερματική βλέννα [ANOVA  $F_{Welch(5, 42)} = 4,171$ ;  $P=0,004$ ]. Για την περίπτωση του ορού αίματος την μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας εμφάνισε η διαίτα INORG ( $148,05 \pm 17,96$  U/ml) η οποία διέφερε σημαντικά από τις χαμηλότερες τιμές των διαιτών ORGlow ( $51,46 \pm 9,40$  U/ml) (Tamhane t-test  $p=0,008$  και CTRL+ ( $60,45 \pm 14,71$  U/ml) (Tamhane t-test  $p=0,013$ ). Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας εμφανίζουν οι δίαιτες CTRL- ( $25,98 \pm 3,17$  U/ml) και ORGhigh ( $21,74 \pm 1,94$  U/ml) οι οποίες διαφέρουν σημαντικά (Games – Howell test  $p=0,015$  και  $p=0,025$  αντίστοιχα) από την μικρότερη τιμή ενεργότητας της διαίτας ORG ( $12,27 \pm 2,06$  U/ml). Τέλος, στην περίπτωση της εντερική βλέννας μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας εμφανίζει η διαίτα ORG ( $2,24 \pm 0,62$  U/ml) και μικρότερη ενεργότητα η διαίτα INORG ( $0,72 \pm 0,25$  U/ml).



## 5.2.8. Αλκαλική Φωσφατάση

Αναφορικά με την ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης (**Γράφημα 28**), στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες εμφανίστηκαν στην περίπτωση της δερματικής βλέννας [ANOVA  $F_{\text{Welch}(5, 45)} = 6,43; p < 0,001$ ] και της εντερικής βλέννας [ANOVA  $F_{\text{Welch}(5, 45)} = 3,60; p = 0,008$ ]. Για την δερματική βλέννα την μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας εμφανίζει η διαίτα ORG ( $0,68 \pm 0,05$  U/ml) η οποία διαφέρει σημαντικά από τις ενεργότητες των διαιτών ORGlow ( $0,39 \pm 0,03$  U/ml) (Games -Howell test  $p=0,001$ ) και ORGhigh ( $0,43 \pm 0,03$  U/ml) (Games - Howell test  $p=0,007$ ) που εμφανίζουν τις μικρότερες ενεργότητες. Οι δίαιτες INORG ( $0,65 \pm 0,07$  U/ml) και CTRL+ ( $0,55 \pm 0,04$  U/ml) εμφανίζουν τις αμέσως μικρότερες ενεργότητες μετά την διαίτα ORG και διαφέρουν σημαντικά μόνο με την διαίτα ORGlow (Games -Howell test  $p=0,038$  και  $p=0,045$  αντίστοιχα) που εμφανίζει την μικρότερη ενεργότητα από όλες τις δίαιτες. Η διαίτα CTRL- εμφανίζει ενδιάμεση ενεργότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες δίαιτες. Στην περίπτωση της εντερικής βλέννας, μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας εμφανίζει η διαίτα ORGlow ( $1,12 \pm 0,13$  U/ml) που διαφέρει σημαντικά (Games -Howell test  $p=0,009$ ) από την μικρότερη τιμή ενεργότητας της διαίτας INORG ( $0,47 \pm 0,08$  U/ml). Στην περίπτωση του ορού αίματος, μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας εμφανίζει η διαίτα ORGlow ( $0,78 \pm 0,07$  U/ml) και μικρότερη τιμή η διαίτα CTRL- ( $0,68 \pm 0,07$ ).



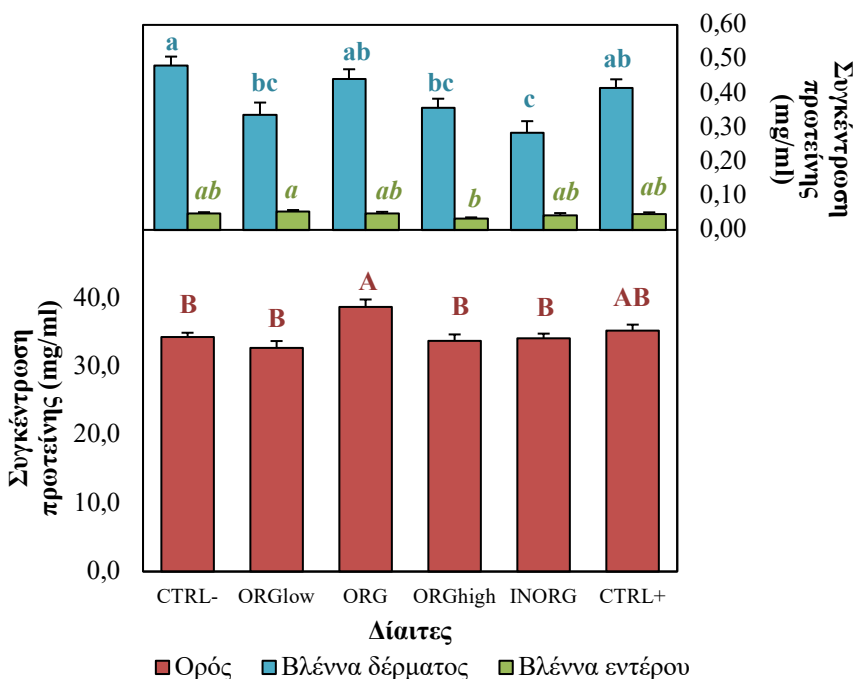
**Γράφημα 28.** Ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης για κάθε διαίτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . Τα διαφορετικά γράμματα αναπαριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για  $p < 0,05$ . (Με κανονική γραμματοσειρά για την βλέννα δέρματος και με italics για την εντερική βλέννα. CTRL-: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, ORGlow: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORG: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORGhigh: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, INORG: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, CTRL+: διαίτα θετικός μάρτυρας.

## 5.2.9. Πρωτεΐνη

Η συγκέντρωση πρωτεΐνης (**Γράφημα**) εμφάνισε διαφορά στην τάξη μεγέθους για κάθε βιολογικό υλικό (η εντερική βλέννα μια τάξη μεγέθους με την δερματική βλέννα και η τελευταία δύο τάξεις μεγέθους με τον ορό αίματος). Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαιτών εμφανίστηκαν στην περίπτωση του ορού αίματος [ANOVA  $F_{(5, 129)} = 5,49; P < 0,001$ ], της δερματικής βλέννας [ANOVA  $F_{(5, 105)} = 5,94; P < 0,001$ ] και της εντερικής βλέννας [ANOVA  $F_{\text{Welch}(5, 50)} = 3,41; p = 0,01$ ]. Στην περίπτωση του αίματος, μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών εμφανίζει η διαίτα ORG ( $38,70 \pm 1,11$  mg/ml), η οποία διαφέρει σημαντικά από όλες τις δίαιτες εκτός της CTRL+ ( $35,28 \pm 0,85$  mg/ml). Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζει η διαίτα CTRL- ( $0,48 \pm 0,03$  mg/ml) η οποία διαφέρει σημαντικά από τις δίαιτες ORGlow ( $0,34 \pm 0,03$  mg/ml) ORGhigh ( $0,36 \pm 0,03$  mg/ml) και INORG ( $0,28 \pm 0,04$  mg/ml) (Games -Howell test  $p=0,012$ ,  $p=0,035$ ,  $p < 0,001$  αντίστοιχα). Οι δίαιτες ORG ( $0,44 \pm 0,03$  mg/ml) και CTRL+ ( $0,41 \pm 0,03$  mg/ml) διέφεραν σημαντικά (Games -Howell test  $p=0,006$  και  $p=0,029$  αντίστοιχα) μόνο με την διαίτα INORG που εμφάνισε την μικρότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών. Στην περίπτωση της εντερική βλέννας, μεγαλύτερη τιμή

εμφανίζει η διαίτα ORGlow ( $0,055 \pm 0,004$  mg/ml) που διαφέρει σημαντικά (Games -Howell test  $p=0,003$ ) από την μικρότερη τιμή της διαίτας ORGhigh ( $0,033 \pm 0,004$  mg/ml).

### 5.2.10. Πρωτεάσες - Αντιπρωτεάσες

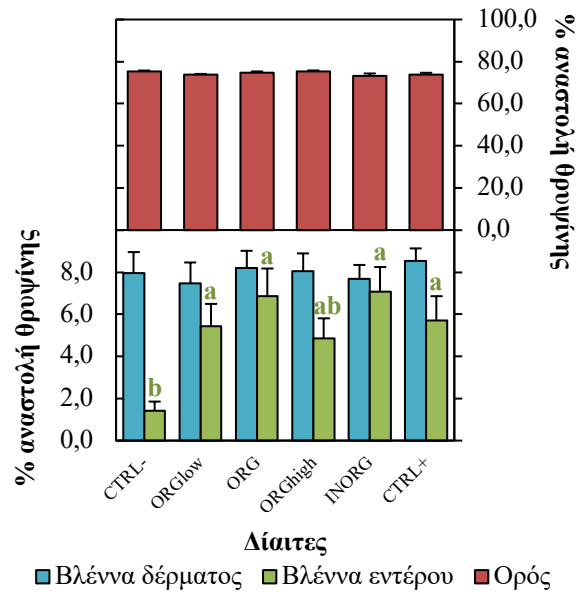
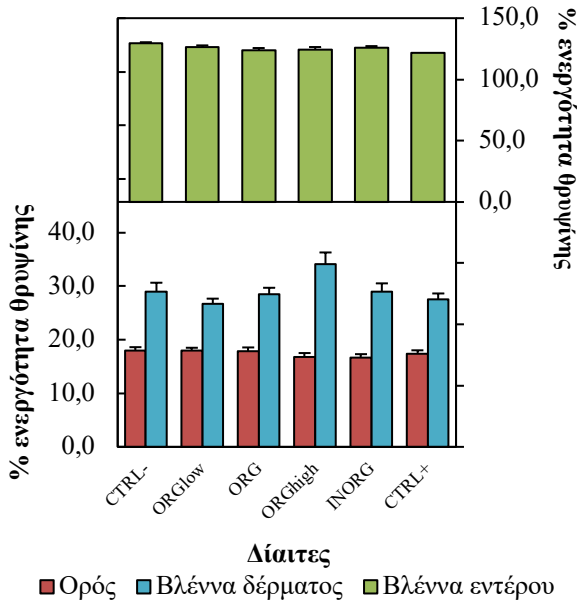


**Γράφημα 29.** Συγκέντρωση πρωτεΐνης για κάθε διαίτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . Τα γράμματα αναπαριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για  $p<0,05$  (Με κεφαλαία γράμματα για τον ορό, με μικρά γράμματα για την δερματική βλέννα και με *italics* για την εντερική βλέννα). CTRL-: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, ORGlow: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORG: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, ORGhigh: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, INORG: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, CTRL+: διαίτα θετικός μάρτυρας.

Αναφορικά με την ενεργότητα των πρωτεασών (Γράφημα 30), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές ανάμεσα στις δίαιτες, τουλάχιστον για τον ορό αίματος και για την δερματική βλέννα, γιατί στην εντερική βλέννα, η φυσική παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων στην εντερική οδό οδήγησε σε συγκεντρώσεις θρυψίνης πέραν των τιμών της πρότυπης καμπύλης, επομένως τα δεδομένα δεν λαμβάνονται υπόψη. Στην περίπτωση του ορού, μεγαλύτερη ενεργότητα εμφανίζει η διαίτα CTRL- ( $17,93 \pm 0,68$  %) και μικρότερη ενεργότητα η διαίτα INORG ( $16,68 \pm 0,63$  %). Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας μεγαλύτερη ενεργότητα εμφανίζει η διαίτα ORGhigh ( $34,11 \pm 2,17$  %) και μικρότερη ενεργότητα η διαίτα ORGlow ( $26,68 \pm 0,98$  %). Όσον αφορά την ενεργότητα των αντιπρωτεασών (Γράφημα 31), στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίστηκαν μόνο στην περίπτωση της εντερικής βλέννας [ANOVA  $F_{Welch(5, 46)} = 8,02$ ;  $P<0,0001$ ]. Η διαίτα CTRL- εμφάνισε την χαμηλότερη τιμή ενεργότητας ( $1,41 \pm 0,44$  %) η οποία διαφέρει σημαντικά από όλες τις άλλες δίαιτες που εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα ((INORG:  $7,08 \pm 1,16$ %, Games -Howell test  $p=0,002$ ; ORG:  $6,86 \pm 1,3$ %,  $p=0,006$ ; ORGlow:  $5,44 \pm 1,05$ %,  $p=0,005$ ; CTRL+:  $5,71 \pm 1,15$ %,  $p=0,034$ ) εκτός της διαίτας ORGhigh που εμφανίζει μέση ενεργότητα ( $4,07 \pm 0,92$  %). Στην περίπτωση του ορού αίματος, η ενεργότητα αντιπρωτεασών ήταν ιδιαίτερα υψηλή σε όλες τις δίαιτες ( $>70$  %). Μεγαλύτερη ενεργότητα εμφανίζει η διαίτα CTRL- ( $75,25 \pm 0,52$  %) και μικρότερη ενεργότητα η διαίτα INORG

(73,22 ± 1,15%). Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας, μεγαλύτερη ενεργότητα εμφανίζει η διαίτα CTRL+ (8,52 ± 0,61%) και μικρότερη ενεργότητα η διαίτα ORGhigh (7,54 ± 0,69%).

### 5.2.11.Συνολική Αντιβακτηριακή Δράση – Συμπλήρωμα

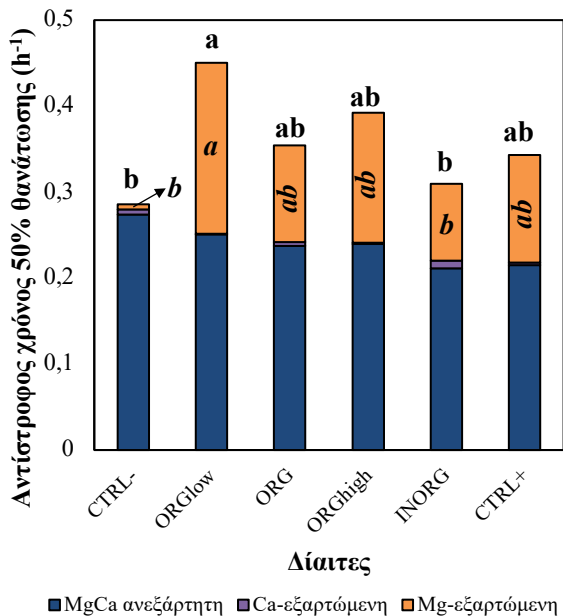


**Γράφημα 30.** Ενεργότητα πρωτεασών (% ενεργότητα θρυψίνης) για κάθε διαίτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα, n=20. Οι τιμές ενεργότητας για την εντερική βλέννα δεν πρέπει να ληφθούν υπόψη καθώς η φυσική παρουσία πρωτεασών στον εντερικό σωλήνα οδήγησε σε τιμές ενεργότητας πέραν αυτών της πρότυπης καμπύλης θρυψίνης. **CTRL-**: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, **ORGlow**: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORG**: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORGhigh**: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **INORG**: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, **CTRL+**: διαίτα θετικός μάρτυρας.

**Γράφημα 31.** Ενεργότητα αντιπρωτεασών (% αναστολή θρυψίνης) για κάθε διαίτα και για κάθε βιολογικό υλικό που εξετάστηκε. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα, n=20. Τα γράμματα αναπαριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαίτες για την βλέννα εντέρου για p<0,05. **CTRL-**: διαίτα αρνητικός μάρτυρας, **ORGlow**: διαίτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORG**: διαίτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORGhigh**: διαίτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **INORG**: διαίτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, **CTRL+**: διαίτα θετικός μάρτυρας.

Τα δεδομένα της συνολικής αντιβακτηριακής δράσης παρουσιάζονται ξεχωριστά για κάθε βιολογικό υλικό, στο **Γράφημα** για τον ορό αίματος, στο **Γράφημα** για την δερματική βλέννα και στο **Γράφημα** για την εντερική βλέννα. Στα γραφήματα παρουσιάζεται ο χρόνος για την θανάτωση του 50% των βακτηρίων, κάτω από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (MgCa, EDTA, EGTA) που αντιστοιχούν στην ιοντοανεξάρτητη (EDTA), την μαγνησιοεξαρτώμενη (EGTA-EDTA), την ασβεστιοεξαρτώμενη δράση (MgCa-EGTA) και την συνολική δράση (MgCa) . Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι χρόνοι αυτοί παρουσιάζονται με αντιστροφή.

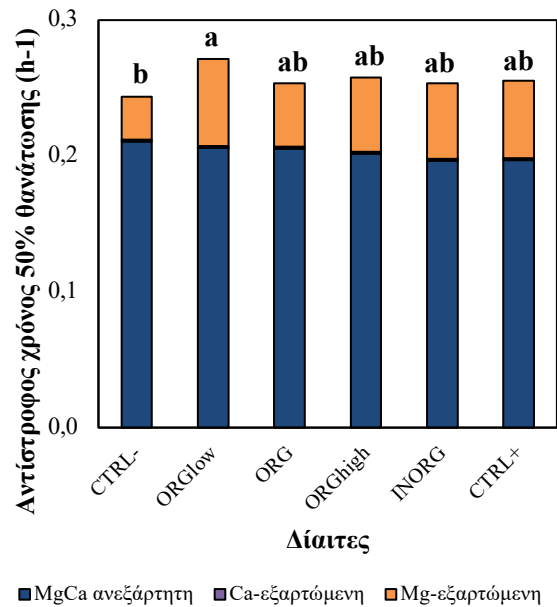
Στην περίπτωση του ορού αίματος παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαίτες για το σύνολο της αντιβακτηριακής δράσης [ANOVA  $F_{(5, 110)} = 2,624; P=0,028$ ] και για την μαγνησιοεξαρτώμενη δράση [ANOVA  $F_{(5, 110)} = 5,74; P<0,001$ ]. Δεν παρατηρήθηκε ασβεστιοεξαρτώμενη δράση ενώ η ιοντοανεξάρτητη δράση δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η μαγνησιοεξαρτώμενη δράση ήταν μεγαλύτερη στην διαίτα ORGlow ( $0,199 \pm 0,016 \text{ h}^{-1}$ )



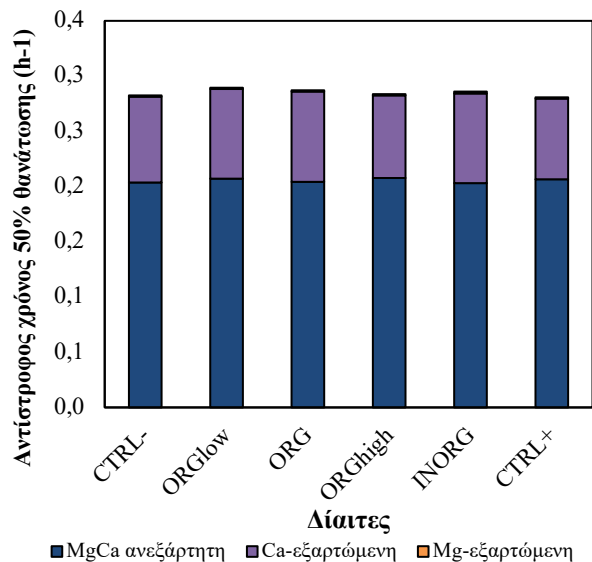
**Γράφημα 32.** Συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα (δράση συμπληρώματος) για κάθε δίαιτα για τον ορό αίματος. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . Το ύψος κάθε μπάρας αναπαριστά την συνολική αντιβακτηριακή δράση. Τα γράμματα αναπαριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για  $p<0,05$ . (Με μικρά γράμματα για την συνολική αντιβακτηριακή δράση, με *italics* για την μαγνησιοεξαρτώμενη δράση). **CTRL-**: δίαιτα αρνητικός μάρτυρας, **ORGlow**: δίαιτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORG**: δίαιτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORGhigh**: δίαιτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **INORG**: δίαιτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, **CTRL+**: δίαιτα θετικός μάρτυρας.

και διέφερε σημαντικά (Tukey test  $p<0,0001$ ) από την μικρότερη τιμή της διαίτας CTRL- ( $0,006 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$ ). Η δίαιτα CTRL- διέφερε σημαντικά και από τις δίαιτες ORGhigh ( $0,151 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$ ) και CTRL+ ( $0,125 \pm 0,019 \text{ h}^{-1}$ ) (Tukey test  $p=0,004$  και  $p=0,033$  αντίστοιχα). Όσον αφορά την συνολική δράση, μεγαλύτερη τιμή εμφάνισε η δίαιτα ORGlow ( $0,451 \pm 0,033 \text{ h}^{-1}$ ) που διέφερε σημαντικά από τις χαμηλότερες τιμές των διαιτών CTRL- ( $0,286 \pm 0,017 \text{ h}^{-1}$ ) και INORG ( $0,309 \pm 0,023 \text{ h}^{-1}$ ) (Tukey test  $p=0,002$  και  $p=0,017$  αντίστοιχα). Η ιοντοανεξάρτητη δράση ήταν μεγαλύτερη στην δίαιτα CTRL- ( $0,274 \pm 0,018 \text{ h}^{-1}$ ) και μικρότερη στην δίαιτα INORG ( $0,211 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$ ).

Στην περίπτωση της βλέννας δέρματος επίσης δεν παρατηρήθηκε ασβεστιοεξαρτώμενη δράση. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο για το σύνολο της αντιβακτηριακής δράσης [ANOVA  $F_{(5, 103)} = 2,466$ ;  $P=0,037$ ].



**Γράφημα 33.** Συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα (δράση συμπληρώματος) για κάθε δίαιτα για την βλέννα δέρματος. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . Το ύψος κάθε μπάρας αναπαριστά την συνολική αντιβακτηριακή δράση. Τα γράμματα αναπαριστούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για την συνολική αντιβακτηριακή δράση για  $p<0,05$ . **CTRL-**: δίαιτα αρνητικός μάρτυρας, **ORGlow**: δίαιτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORG**: δίαιτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORGhigh**: δίαιτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **INORG**: δίαιτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, **CTRL+**: δίαιτα θετικός μάρτυρας.



**Γράφημα 34.** Συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα (δράση συμπληρώματος) για κάθε δίαιτα για την βλέννα εντέρου. Οι μπάρες αναπαριστούν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα,  $n=20$ . Το ύψος κάθε μπάρας αναπαριστά την συνολική αντιβακτηριακή δράση. **CTRL-**: δίαιτα αρνητικός μάρτυρας, **ORGlow**: δίαιτα χαμηλής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORG**: δίαιτα μέσης δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **ORGhigh**: δίαιτα υπερβολικής δόσης οργανικών ιχνοστοιχείων, **INORG**: δίαιτα μέσης δόσης ανόργανων ιχνοστοιχείων, **CTRL+**: δίαιτα θετικός μάρτυρας.

Μεγαλύτερη τιμή εμφάνισε η διαίτα ORGlow ( $0,271 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ ) που διέφερε σημαντικά (Tukey test  $p=0,015$ ) από την χαμηλότερη τιμή της διαίτας CTRL- ( $0,244 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ ). Για την ιοντοανεξάρτητη δράση μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει η διαίτα CTRL- ( $0,210 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ ) και μικρότερη τιμή η διαίτα INORG - ( $0,197 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ ). Τέλος για την μαγνησιοεξαρτώμενη δράση μεγαλύτερη τιμή είχε η διαίτα ORGlow ( $0,064 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ ) και χαμηλότερη τιμή η διαίτα CTRL- ( $0,032 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ ).

Στην περίπτωση της βλέννας εντέρου, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες. Σε αντίθεση με τον ορό αίματος και την βλέννα δέρματος, εντοπίζεται ασβεστιοεξαρτώμενη δράση και απουσιάζει η μαγνησιοεξαρτώμενη δράση. Για την ιοντοανεξάρτητη δράση μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει η διαίτα ORGhigh ( $0,208 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ ) και μικρότερη τιμή η διαίτα INORG ( $0,203 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ ). Για την ασβεστιοεξαρτώμενη δράση υψηλότερη δράση επιδεικνύουν οι δίαιτες ORG ( $0,081 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ ) και INORG ( $0,081 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ ) και χαμηλότερη η CTRL+ ( $0,072 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ ). Για το σύνολο της δράσης μεγαλύτερη τιμή έχει η διαίτα ORGlow ( $0,288 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$ ) και μικρότερη η CTRL+ ( $0,279 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ ).

## 6. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια δημοσιεύονται όλο και περισσότερες έρευνες που ρίχνουν φως στους μηχανισμούς λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών με αποτέλεσμα να γνωρίζουμε πλέον περισσότερα για τις ομοιότητες και τις διαφορές που εμφανίζουν με τα υπόλοιπα σπονδυλωτά (Rauta *et al.*, 2012). Παρόλο που αρκετά στοιχεία παραμένουν αχαρτογράφητα, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που αφορούν διαφορετικές πτυχές της ανοσολογικής απόκρισης των ψαριών όπως η χυμική ανοσία (Ye *et al.*, 2013), η δράση των κυτταροκινών (Secombes, 2016), των μορίων MHC και των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπου (Li *et al.*, 2016; Wilson, 2017) κ.ά., ενώ μελετάται συγχρόνως και η γονιδιακή έκφραση των ανοσοσχετιζόμενων γονιδίων (Zhu *et al.*, 2013). Λόγω της καίριας θέσης των βλεννογόνων, αφού αποτελούν τον πρώτο φυσικό φραγμό και την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι εισβλητικών παθογόνων, αρκετές έρευνες έχουν στραφεί στην μελέτη της βλεννογονικής ανοσίας στο δέρμα (Dash *et al.*, 2018), στα βράγχια (Salinas, 2015) και στον εντερικό σωλήνα (Rombout *et al.*, 2011; Rombout *et al.*, 2014). Είναι πλέον αποδεδειγμένο πως το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών, συστημικό και βλεννογονικό, ανταποκρίνεται σε ανοσοδιεγερτικά και ανοσοκατασταλτικά στοιχεία της διατροφής που παρέχονται στα ψάρια (Vallejos-Vidal *et al.*, 2016), έτσι οι έρευνες στοχεύουν στην βελτίωση της υγείας και της άμυνας των ψαριών μέσω της παροχής κατάλληλης τροφής. Η σημασία των ιχνοστοιχείων για την υγεία των ψαριών έχει πλέον εδραιωθεί (Chanda *et al.*, 2015) για αυτό και θα πρέπει να γίνουν γνωστές οι απαιτήσεις σε ιχνοστοιχεία κάθε είδους που καλλιεργείται, για να μπορέσει να προσδιοριστεί η ανάγκη συμπλήρωσης της τροφής με εξωγενή θρεπτικά (Prabhu *et al.*, 2014a) ανόργανης ή οργανικής μορφής (Prabhu, 2015) που διαφέρουν στην βιοδιαθεσιμότητά τους.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικού επιπέδου μεταλλικών ιχνοστοιχείων (Fe, Cu, Mn, Zn, and Se) ανόργανης ή οργανικής προέλευσης στην αύξηση και την συστημική και βλεννογονική ανοσία του λαβρακίου *Dicentrarchus labrax* που δέχθηκε τροφές με χαμηλό ποσοστό ιχθυάλευρου. Η επίδραση των ιχνοστοιχείων στην βλεννογονική ανοσία είναι πολύ λιγότερο μελετημένη, ενώ λίγες έρευνες έχουν παρουσιάσει συγκριτικά δεδομένα για τις ανοσολογικές παραμέτρους στο αίμα, στο δέρμα και το έντερο όπως γίνεται στην παρούσα εργασία.

### 6.1. Αύξηση

Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο τελικό βάρος και στις παραμέτρους κατανάλωσης τροφής ανάμεσα στις δίαιτες, ο ειδικός ρυθμός αύξησης ήταν στατιστικά μεγαλύτερος στην διαίτα ORG και μικρότερος στην διαίτα CTRL-. Η αρνητική επίδραση της τροφής CTRL- στην

αύξηση είναι λογική αφού η χαμηλή παρουσία ιχθυάλευρου σε συνδυασμό με την έλλειψη εξωγενών ιχνοστοιχείων δημιουργεί εμπόδιο στον οργανισμό για την επίτευξη της μέγιστης αύξησης. Η υπεροχή της διαίτας ORG υποδεικνύει πως στο ίδιο επίπεδο προσθήκης με τα ανόργανα ιχνοστοιχεία, τα οργανικά ιχνοστοιχεία επιτυγχάνουν να προωθήσουν την μέγιστη αύξηση, πιθανόν λόγω καλύτερης απορρόφησης και λιγότερων ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών. Οι διαίτες ORGlow και ORGhigh εμφανίζουν μέσο ρυθμό αύξησης εφόσον η μικρότερη ή υπερβάλλουσα συγκέντρωση ιχνοστοιχείων γίνεται τροχοπέδη για την επιτάχυνση της αύξησης. Η διαίτα CTRL+ δεν μπόρεσε να ξεχωρίσει πιθανόν γιατί το μεγαλύτερο ποσοστό ιχθυάλευρου στο σιτηρέσιο να περιείχε επαρκή ιχνοστοιχεία οπότε η εξωγενής προσθήκη ανόργανων ιχνοστοιχείων δεν βελτίωσε την αύξηση, ενώ ίσως και να οδήγησε και σε ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζονται και άλλες έρευνες. Η συνδυασμένη προσθήκη οργανικών μορφών Se, Zn και Mn στην τσιπούρα προώθησε σημαντικά την αύξηση σε αντίθεση με την αντίστοιχη προσθήκη ανόργανων (Izquierdo *et al.*, 2016) παρόλο που το αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε σε αντίστοιχη έρευνα (Dominguez *et al.*, 2017). Ακόμη στον σεβαστό της Κορέας, η προσθήκη χηλικών ιχνοστοιχείων οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση βάρους σε σχέση με την προσθήκη ανόργανων ιχνοστοιχείων ή την απουσία προσθήκης (Katya *et al.*, 2017). Αντικατάσταση των προστιθέμενων ανόργανων Zn, Cu και Mn με οργανικές μορφές στο επίπεδο 50% ή 100% ενίσχυσε την σωματική αύξηση και την ανοσία σε νεοσσούς κοτόπουλων (Das *et al.*, 2014) ενώ στην λευκή γαρίδα του Ειρηνικού, η προσθήκη χηλικών Cu, Zn και Mn σε τροφές φυτικής βάσης οδήγησε σε καλύτερη επίδοση με μικρότερη δόση από ότι τα αντίστοιχα ανόργανα (Katya *et al.*, 2016).

## 6.2. Αιμοσφαιρίνη

Δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης ανάμεσα στις διαίτες. Παρατηρείται μια μη σημαντική αύξηση της αιμοσφαιρίνης στην διαίτα CTRL- η οποία μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο αριθμό ερυθροκυττάρων ή με αιμόλυση (Vectesi *et al.*, 2011). Η αύξηση αυτή δεν φαίνεται να σχετίζεται με την αυξημένη συσσώρευση σιδήρου στις φυτικές διαίτες (Prabhu *et al.*, 2016) αφού σε αρκετές έρευνες όπου μελετήθηκε η χορήγηση ανόργανου ή οργανικού σιδήρου σε ψάρια δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση στις αιματολογικές παραμέτρους (Ye *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009; Rigos *et al.*, 2010). Η αντίστοιχη μη σημαντική μείωση της αιμοσφαιρίνης στην διαίτα ORGlow μπορεί να σχετίζεται με ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιχνοστοιχείων που δεν μπόρεσαν να εξισορροπηθούν λόγω των μειωμένων συγκεντρώσεων.

## 6.3. Αριθμός και μέγεθος κυττάρων

Αναφορικά με τις κυτταρικές αναλύσεις δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον αριθμό και το μέγεθος των κυττάρων σε κανένα από τα τρία βιολογικά υλικά. Πιθανόν οι πολυπλοκότεροι μηχανισμοί της κυτταρομεσολαβούμενης ανοησίας και γενικότερα της γένεσης κυττάρων να μην επηρεάζονται σε τέτοιο βαθμό από τις παρούσες συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων και τις αντίστοιχες πηγές τους. Ωστόσο αξίζει να σημειωθούν ορισμένες παρατηρήσεις. Αρχικά, είναι φανερό πως ο αριθμός των κυττάρων στο αίμα είναι κατά 3 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος από τον αριθμό των κυττάρων της δερματικής και εντερικής βλέννας που εμφανίζουν σχεδόν ίσες τιμές. Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων του αίματος πρέπει να παρακολουθείται σε συνδυασμό με την αύξηση του μεγέθους. Στο λαβράκι το τμήμα των μικρών λευκοκυττάρων περιλαμβάνει τα λεμφοκύτταρα και τα θρομβοκύτταρα ενώ το τμήμα των μεγάλων λευκοκυττάρων περιλαμβάνει τα κοκκιοκύτταρα και τα μακροφάγα (Esteban *et al.*, 2000). Ωστόσο η πλειοψηφία των μετρούμενων κυττάρων είναι τα ερυθροκύτταρα, οπότε μικρότερο μέσο μέγεθος αντικατοπτρίζει μικρότερη τιμή MCV (mean corpuscular volume - μέσος όγκος ερυθρών) και μεγαλύτερο μέσο μέγεθος αντικατοπτρίζει μεγαλύτερη τιμή MCV. Με βάση τα παραπάνω, παρόλο που δεν υπάρχουν στατιστικά

σημαντικές διαφορές, η δίαιτα ORGlow εμφανίζει μικρότερο μέγεθος κυττάρων που σε συνδυασμό με την χαμηλότερη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης αποτελεί ένδειξη αναιμίας. Αντίστοιχα η δίαιτα ORGhigh εμφανίζει μεγάλο αριθμό κυττάρων μεγαλύτερου μεγέθους που επίσης αποτελεί ένδειξη διατροφικών ελλείψεων και συνθηκών στρες (Mohammadi-Sarpiri *et al.*, 2016) αν και δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές. Σε κάποιες έρευνες, η χορήγηση οργανικού ή ανόργανου σιδήρου σε ψάρια δεν προκάλεσε καμία σημαντική επίδραση στον αριθμό των ερυθροκυττάρων (Ye *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2013), ενώ σε άλλες υπήρξαν σημαντικές διαφορές (Zhang *et al.*, 2015), όπως στην τσιπούρα (Rigos *et al.*, 2010), όπου η μέγιστη δόση σιδήρου οδηγεί στον ελάχιστον αριθμό ερυθροκυττάρων. Ενδεικτική είναι η έρευνα των (Mohammadi-Sarpiri *et al.*, 2016) στον κυπρίνο όπου η συνδυασμένη προσθήκη Zn και Cu οδήγησε στον μεγαλύτερο αριθμό ερυθροκυττάρων και στην μικρότερη τιμή MCV που φανερώνει την δυναμική των αλληλεπιδράσεων των ιχνοστοιχείων.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, για την περίπτωση των βλεννογόνων, η αύξηση του αριθμού των κυττάρων όταν συνοδεύεται από αύξηση και του μεγέθους τους αντικατοπτρίζει την παρουσία περισσότερων καλυκοειδών κυττάρων που δεν έχουν αδειάσει το περιεχόμενο τους, δηλαδή μειωμένες συνθήκες στρες (Torrecillas *et al.*, 2011; Torrecillas *et al.*, 2015). Αντίθετα η αύξηση του αριθμού των κυττάρων που συνοδεύεται από μείωση του μεγέθους τους αντικατοπτρίζει την αύξηση του αριθμού των επιθηλιακών κυττάρων ή/και την απελευθέρωση του περιεχομένου των καλυκοειδών κυττάρων δηλαδή αυξημένες συνθήκες στρες (Gaines Jr & Rogers, 1975; Iger *et al.*, 1988; Ferguson, 1989). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η μη σημαντική μείωση των κυττάρων στην δίαιτα ORGlow τόσο στο δέρμα όσο και στο έντερο αποτελεί ένδειξη καλύτερης λειτουργίας του δερματικού και εντερικού φραγμού αφού αποβάλλονται λιγότερα κύτταρα με την μέθοδο συλλογής. Το αντίθετο συμβαίνει στην δίαιτα CTRL- για το έντερο όπου υπάρχει τάση για αύξηση του αριθμού των κυττάρων και ένδειξη αποσταθεροποίησης του εντερικού φραγμού. Σε λαβράκι που τράφηκε με ολιγοσακχαρίτες μαννόζης (MOS) αυξήθηκε η παραγωγή βλέννας και η πυκνότητα των ηωσινοφιλικών κοκκιοκυττάρων στον βλεννογόνο του εντέρου, ένδειξη της ενίσχυσης του εντερικού φραγμού έναντι προσβολής από παθογόνα (Torrecillas *et al.*, 2012), ενώ η χρήση MOS σε συνδυασμό με δίαιτα σόγιας αύξησε το μέγεθος των καλυκοειδών κυττάρων (Torrecillas *et al.*, 2015) χωρίς καμία επίδραση στην κυτταρική οργάνωση του δερματικού βλεννογόνου. Αντίστοιχες έρευνες πρέπει να πραγματοποιηθούν και με ιχνοστοιχεία για να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί απόκρισης των φυσικών φραγμών.

#### 6.4. Χημειοφωταύγεια – Έκρηξη ριζών οξυγόνου

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για κανένα βιολογικό υλικό για την μέγιστη χημειοφωταύγεια ανά εκατομμύρια κύτταρα. Παρατηρούμε ότι ενώ στην περίπτωση του αίματος η δράση είναι επαγομένη, δηλαδή με την παρουσία του Zymosan, αυξάνεται η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, στην περίπτωση της δερματικής και εντερικής βλέννας δεν παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στην αυθόρμητη και την επαγόμενη χημειοφωταύγεια. Αυτό είναι ένδειξη της ενεργοποιημένης κατάστασης των κυττάρων. Ακόμη τα κύτταρα της εντερικής βλεννογόνου έχουν την ισχυρότερη αντίδραση ακολουθούμενη από το κύτταρα του δέρματος με μέση δραστηριότητα, ενώ τα κύτταρα του αίματος εμφανίζουν την μικρότερη δραστηριότητα (όταν γίνει αναγωγή στον ίδιο αριθμό κυττάρων). Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί με βάση την διαφορετική φύση των κυττάρων στο αίμα και τις βλεννογόνους. Στο αίμα τα κύτταρα που παράγουν οξειδωτικές ρίζες είναι τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα που αποτελούν μικρό αριθμό των συνολικών κυττάρων. Αντίθετα στις βλεννογόνους, κύτταρα ικανά για παραγωγή ριζών οξυγόνου είναι τα μακροφάγα και εισβλητικά ουδετερόφιλα. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα μονοκύτταρα των ψαριών είναι πιο δραστικά στην παραγωγή ριζών οξυγόνου έπειτα από ολιγόχρονη έκθεση σε παράγοντες (Neumann *et al.*, 2000; Grayfer *et al.*, 2008; Rieger *et al.*, 2010), ενώ αντίθετα τα ώριμα μακροφάγα επιδεικνύουν δραστηριότητα ανάλογη του χρόνου έκθεσης (Secombes, 1987; Graham & Secombes,

1990; Neumann *et al.*, 2000). Δεδομένου ότι οι βλεννογόνοι αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι της εισβολής παθογόνων, σε συνδυασμό με την έντονη παρουσία συμβιωτικών βακτηρίων, είναι πιθανό τα κύτταρα των βλεννογόνων να λαμβάνουν μια σταθερή ροή μηνυμάτων ενεργοποίησης. Τα αποτελέσματα μας έρχονται σε αντίθεση με έρευνα των (Salinas *et al.*, 2007) στην τσιπούρα όπου η παραγωγή ριζών οξυγόνου από κύτταρα του εντέρου ήταν πολύ μικρή υποδεικνύοντας την παρουσία μικρού αριθμού μακροφάγων ή ότι τα κύτταρα αυτά χρειάζονταν προηγούμενη ενεργοποίηση (Salinas *et al.*, 2007). Είναι πιθανό να υπάρχει διαφορετική απόκριση μεταξύ των δυο ειδών αφού σε προηγούμενη έρευνα μας στον εντερικό βλεννογόνο τσιπούρας που είχε προσβληθεί από παράσιτα στα βράγχια, πράγματι δεν ανιχνεύτηκε σήμα χημειοφωταύγειας (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Ωστόσο θα πρέπει να γίνει προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας κάθε βιολογικού υλικού γιατί η αυξημένη παραγωγή ROS μπορεί να σχετίζεται με μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα (Volpatti *et al.*, 2012). Προσθήκη οργανικού ή ανόργανου Zn στο λαβράκι δεν οδήγησε σε σημαντική διαφορά στην έκρηξη ριζών οξυγόνου (Fountoulaki *et al.*, 2010), ενώ το ίδιο συνέβη και με την προσθήκη Se στην πέστροφα (Rider, 2009). Αντίθετα η προσθήκη οργανικού Se στο μαγιάτικο (Mansour *et al.*, 2017) και το πακού (Takahashi *et al.*, 2017) οδήγησε σε σημαντική αύξηση στην αναπνευστική έκρηξη.

## 6.5. Μυελοϋπεροξειδάση (MPO)

Η ενεργότητα της μυελοπεροξειδάσης εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο στην περίπτωση του όρου αίματος, ενώ αντίθετα στην βλέννα εντέρου δεν ανιχνεύτηκε καθόλου. Στον ορό αίματος, οι δίαιτες CTRL- και CTRL+ εμφάνισαν υψηλότερες τιμές ενεργότητας ενώ η διαίτα ORGlow εμφάνισε την χαμηλότερη τιμή. Για την αξιολόγηση του αποτελέσματος πρέπει να σημειώσουμε πως η μέτρηση της MPO περιλαμβάνει την εξωκυτταρική δραστηριότητα του ενζύμου που έχει απελευθερωθεί από το κύτταρο. Η αύξηση της ενεργότητας της MPO στην διαίτα CTRL- μπορεί να σχετίζεται με μειωμένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα ενώ η διαίτα CTRL+ επιδεικνύει αυξημένη δράση MPO ως ένδειξη ανοσοδιέγερσης από την ορθή χορήγηση ιχνοστοιχείων και του αυξημένου ποσοστού ιχθυάλευρου. Η χαμηλότερη ενεργότητα της διαίτας ORGlow υπογραμμίζει την ανοσοκατασταλτική δράση της μικρότερης από την βέλτιστη συγκέντρωσης ιχνοστοιχείων. Πιθανόν οι βέλτιστες περιπτώσεις να είναι οι δίαιτες με τις μέσες τιμές ενεργότητας που φαίνεται να ισορροπούν τις αντίρροπες οξειδωτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις. Η προσθήκη οργανικού σεληνίου αυξάνει την ενεργότητα της μυελοϋπεροξειδάσης σε ψάρια (Lee *et al.*, 2016; Mansour *et al.*, 2017) σε συνδυασμό με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Όσον αφορά το δέρμα, η σχετική σταθερότητα της ενεργότητας της μυελοϋπεροξειδάσης έχει αποδειχτεί και για την βλέννα δέρματος της τσιπούρας (Guardiola *et al.*, 2016).

## 6.6. Μονοξειδίο του αζώτου (NO)

Η συγκέντρωση μονοξειδίου του αζώτου εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλα τα βιολογικά υλικά, με χαμηλές όμως συγκεντρώσεις, κάτι που αποτελεί καλό διαγνωστικό δείκτη σε συνδυασμό με την χαμηλή ενεργότητα της σερουλοπλασμίνης. Στην περίπτωση του ορού το μονοξειδίο του αζώτου (NO) ήταν περισσότερο στην διαίτα ORG και ελάχιστον στην διαίτα CTRL-. Η μέγιστη τιμή NO για την διαίτα ORG ισχύει και στην περίπτωση της δερματικής βλέννας, όπου ήταν λιγότερο στις δίαιτες ORGlow και ORGhigh. Τέλος, στην περίπτωση της εντερικής βλέννας μεγαλύτερη τιμή NO εμφανίστηκε στην διαίτα ORGlow και μικρότερη στην διαίτα ORGhigh.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του μονοξειδίου του αζώτου δεν σημαίνει απαραίτητα κάποιο φλεγμονώδες μήνυμα, αφού συμμετέχει στην γενική αγγειοδιαστολή και νευροδιαβίβαση, διαμεσολαβώντας σε αρκετές λειτουργίες (Azeredo *et al.*, 2017). Ειδικά οι μικρές αλλά σημαντικές αυξήσεις που παρατηρήθηκαν στην παρούσα έρευνα τείνουν προς αυτό το συμπέρασμα,



υποδεικνύοντας πως η μέση σύγκεντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων είναι βέλτιστη για τον ορό και την δερματική βλέννα και η μικρότερη συγκέντρωση οργανικών είναι βέλτιστη για την εντερική βλέννα.

## 6.7. Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη αδρανοποιεί βακτήρια, ιούς, παράσιτα και μύκητες παρά την απουσία έλλειψης της τυπικής πεπτιδογλυκάνης, ενώ προωθεί και την φαγοκυττάρωση με την ενεργοποίηση κυττάρων και τον οφωνισμό και συμμετέχει στην γενική απόκριση συναγερμού (Dash *et al.*, 2018). Στον ορό αίματος, όπου ανιχνεύτηκε και η μεγαλύτερη ενεργότητα λυσοζύμης δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες, σε αντίθεση την δερματική και την εντερική βλέννα. Η ύπαρξη απόκρισης στις βλεννογονικές θέσεις, σε συνδυασμό με την ισχυρή σχετική ενεργότητα της λυσοζύμης στις θέσεις αυτές σε σύγκριση με τον ορό (ανά mg πρωτεΐνης), καταδεικνύει την σημασία του ενζύμου για τις βλεννογόνους. Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας υψηλότερη τιμή εμφάνισε η δίαιτα INORG η οποία διέφερε σημαντικά από την χαμηλότερη τιμή της διαίτας ORGhigh. Φαίνεται ότι η ανόργανη πηγή ιχνοστοιχείων είναι πιο ικανή για να αυξήσει την λυσοζύμη της δερματικής βλέννας από ότι οι οργανικές πηγές. Πρέπει να τονιστεί ότι ο δερματικός βλεννογόνος είναι εκτεθειμένος στο θαλασσινό νερό οπότε δέχεται και εισροή ιχνοστοιχείων από αυτή την οδό. Η καταστολή της δράσης της λυσοζύμης της δερματικής βλέννας λόγω υπερβολικής δόσης στοιχείων της διατροφής έχει βρεθεί και σε άλλες έρευνες (Yan *et al.*, 2017). Σε αντίστοιχες έρευνες σε ψάρια με άλλα ανοσοδιεγερτικά στοιχεία διατροφής εκτός ιχνοστοιχείων, φάνηκε ότι οι μέσες προς χαμηλές συγκεντρώσεις προωθούν καλύτερα την ενεργότητα της βλεννογονικής λυσοζύμης (Doan *et al.*, 2018; Mansour *et al.*, 2018). Στην περίπτωση της εντερικής βλέννας, η δίαιτα ORGlow εμφανίζει στατιστικά υψηλότερη ενεργότητα λυσοζύμης από την δίαιτα ORG και ORGhigh που εμφανίζουν την μικρότερη ενεργότητα, ενώ στην ομάδα αυτή ανήκει στατιστικά και η δίαιτα INORG. Το έντερο σαν θέση λαμβάνει ισχυρή επίδραση από την συγκέντρωση των ιχνοστοιχείων αφού αποτελεί την θέση απορρόφησης των θρεπτικών. Για αυτό ίσως να λειτουργεί βέλτιστα με μικρότερες συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων της τροφής από ότι άλλες θέσεις του σώματος. Σε έρευνα φάνηκε ότι η έλλειψη σιδήρου αυξάνει τα επίπεδα λυσοζύμης σε ποντίκια (Smith *et al.*, 2018) ενώ αντίθετα μειωμένη ενεργότητα λυσοζύμης παρατηρήθηκε σε ποντίκια με έλλειψη σεληνίου (Smith *et al.*, 2018). Η προσθήκη οργανικού σεληνίου βρέθηκε ότι αυξάνει την ενεργότητα της λυσοζύμης σε γαστερόποδα (Kong *et al.*, 2018), ψάρια (Biller-Takahashi *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016; Mansour *et al.*, 2017; Saffari *et al.*, 2018), ενώ η υπερβολική δόση σεληνίου μειώνει τα επίπεδα λυσοζύμης (Takahashi *et al.*, 2017). Η συνδυασμένη προσθήκη βιταμινών και ιχνοστοιχείων (Se, Zn, Cu, Mn, and Fe) σε σωστές δόσεις αυξάνει την ενεργότητα λυσοζύμης, ενώ σε λανθασμένες την καταστέλλει (Huang *et al.*, 2015). Είναι πιθανόν λοιπόν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιχνοστοιχείων να οδηγούν σε αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης μερικών εξ αυτών επηρεάζοντας τις ανοσολογικές παραμέτρους.

## 6.8. Σερουλοπλασμίνη

Η ενεργότητα σερουλοπλασμίνης εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δίαιτες για τον ορό αίματος και την βλέννα δέρματος αν και σε όλες τις θέσεις οι τιμές του ενζύμου ήταν χαμηλότερες από αυτές που υποδεικνύουν την ύπαρξη σοβαρής φλεγμονής, αφού η σερουλοπλασμίνη ανήκει στις πρωτεΐνες οξείας φάσης (Henry & Fountoulaki, 2014). Για τον ορό, η δίαιτα INORG εμφανίζει την μεγαλύτερη ενεργότητα σερουλοπλασμίνης και την ελάχιστη η δίαιτα ORGlow. Δηλαδή, τα ανόργανα πρόσθετα ιχνοστοιχεία σε φυτικές δίαιτες εμφανίζουν ήπια προφλεγμονώδη δράση σε αντίθεση με την χαμηλότερη συγκέντρωση οργανικών που εμφανίζουν κάποια προφλεγμονώδη δράση. Στο δέρμα, οι δίαιτες CTRL- και ORGhigh εμφάνισαν την υψηλότερη ενεργότητα σε αντίθεση με την δίαιτα ORG που είχε την ελάχιστη ενεργότητα. Δηλαδή η απουσία

εξωγενών ιχνοστοιχείων αλλά και η υπερβολική συγκέντρωση αυτών επάγουν προφλεγμονώδη δράσεις στο δέρμα, ενώ η μέση συγκέντρωση οργανικών. Ωστόσο θα πρέπει να τονίσουμε ότι οι τιμές της σερουλοπλασμίνης δεν βρίσκονται στο εύρος των παθολογικών τιμών (τιμές λοίμωξης), ενώ το ίδιο μόριο συμμετέχει και σε πλήθος άλλων δράσεων που μπορεί να επηρεάζονται από την συγκέντρωση ιχνοστοιχείων (Das & Sahoo, 2018).

## 6.9. Αλκαλική φωσφατάση (ALP)

Στην περίπτωση της ALP στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίστηκαν στην περίπτωση της δερματικής και εντερικής βλέννας. Για την δερματική βλέννα η διαίτα ORG εμφανίζει την μέγιστη τιμή που διαφέρει από την ελάχιστη τιμή της διαίτας ORGlow και την αμέσως μεγαλύτερη τιμή της διαίτας ORGhigh. Δεύτερες στην σειρά ενεργότητας μετά την διαίτα ORG είναι η διαίτες INORG και CTRL+ που διαφέρουν από την ελάχιστη τιμή. Εμφανίζεται λοιπόν ένα σαφές πρότυπο. Η μέση συγκέντρωση οργανικών και ανόργανων ιχνοστοιχείων ενισχύει την ενεργότητα της δερματικής ALP με τα οργανικά να υπερέχουν σε σχέση με τα ανόργανα. Αντίθετα, η μειωμένη ή η υπερβολική συγκέντρωση ιχνοστοιχείων καταστέλλουν την δράση της δερματικής ALP. Από τις σημαντικότερες δράσεις της ALP είναι η ικανότητά της να αποφωσφορυλιώνει προφλεγμονώδη βακτηριακά συστατικά όπως οι λιπολυσασακχαρίτες (LPS) (Lalles, 2019). Παρόλο που σε μια έρευνα στο λευκό ψάρι της Κασπίας η δερματική και η εντερική ALP εμφανίζουν θετική συσχέτιση (Mirghaed *et al.*, 2018) στην παρούσα έρευνα, ακολουθούν διαφορετικά πρότυπα. Στην εντερική βλέννα, μεγαλύτερη τιμή εμφάνισε η διαίτα ORGlow και στατιστικά χαμηλότερη τιμή η διαίτα INORG. Ακόμη, στα ψάρια τα δημοσιευμένα δεδομένα υποδεικνύουν θετική συσχέτιση μεταξύ της ALP του ορού και της δερματικής βλέννας (Du *et al.*, 2015; Mirghaed *et al.*, 2018) που στην παρούσα εργασία δεν επιβεβαιώνεται. Για τον ορό η διαίτα CTRL- εμφανίζει μικρότερη ενεργότητα χωρίς αυτό να είναι στατιστικά σημαντικό. Η προσθήκη σιδήρου, μαγγανίου ή ψευδαργύρου στον κυπρίνο έδειξε ότι αυξάνει την ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης (Ling *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2014; Dekani *et al.*, 2019). Επίσης η προσθήκη ανόργανου ψευδαργύρου στο είδος *Megalobrama amblycephala* αυξάνει την ενεργότητα της ALP του ορού (Jiang *et al.*, 2016). Αντίθετα, η χορήγηση ψευδαργύρου σε ινδικά χοιρίδια δεν επηρέασε την ενεργότητα ALP του ορού (Shinde *et al.*, 2006).

## 6.10. Πρωτεΐνη

Η ολική πρωτεΐνη εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλα τα βιολογικά υλικά με εμφανή διαφορά τάξης ανάμεσά τους. Στον ορό αίματος, μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών εμφανίζεται στην διαίτα ORG που διαφέρει από όλες τις διαίτες εκτός της CTRL+. Η αύξηση της πρωτεΐνης είναι μέσα σε φυσιολογικό εύρος κάτι που αποτελεί δείκτη ευρωστίας του ψαριού. Χορήγηση ψευδαργύρου σε ποντίκια δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση στην συνολική πρωτεΐνη του ορού (Nagalakshmi *et al.*, 2015), ενώ σε ινδικά χοιρίδια οδήγησε σε αύξηση της συνολικής πρωτεΐνης (Shinde *et al.*, 2006). Στα ψάρια, χορήγηση σεληνίου στον κυπρίνο οδήγησε σε υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης του ορού (Saffari *et al.*, 2018).

Στην περίπτωση της δερματικής βλέννας, την μέγιστη συγκέντρωση πρωτεΐνης εμφανίζει η διαίτα CTRL- ενώ αμέσως χαμηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίζουν οι διαίτες ORG και CTRL+. Παρόλο που σε αρκετές έρευνες η αύξηση της πρωτεΐνης της δερματικής βλέννας συγκαταλέγεται στα θετικά αποτελέσματα (Hoseinifar *et al.*, 2015; Miandare *et al.*, 2016; Hoseinifar *et al.*, 2019), εντούτοις, επειδή παρατηρείται υπέρμετρη αύξηση πρωτεΐνης στην διαίτα CTRL- που είναι ελλιπής σε ιχνοστοιχεία, μπορεί το φαινόμενο αυτό να αντικατοπτρίζει στρεσογόνες συνθήκες. Έτσι, η αύξηση πρωτεΐνης στην διαίτα ORG μπορεί πραγματικά να δείχνει την ενισχυμένη προστασία του ψαριού, εφόσον συμβαδίζει και με την τιμή του θετικού μάρτυρα. Η πτώση της πρωτεΐνης στην διαίτα INORG φανερώνει την αδυναμία των ανόργανων ιχνοστοιχείων σε φυτικές διαίτες να ενισχύσουν την

δερματική βλεννογονική ανοσία με δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες παρόλο που στην περίπτωση της λυσοζύμης, έδειξαν την μεγαλύτερη ενεργότητα πιθανόν λόγω ιδιαίτερων αλληλεπιδράσεων που ευνοούν την καλύτερη λειτουργία ή την αυξημένη παραγωγή του ενζύμου. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι ιδιαίτερα χαμηλή αλλά υπάρχουν στατιστικές διαφορές με την δίαιτα ORGIow να εμφανίζει την μέγιστη συγκέντρωση και την ORGhigh την ελάχιστη, συμβαδίζοντας με το γενικότερο πρότυπο που παρατηρήθηκε στην εντερική βλέννα. Πάντως, η θετική συσχέτιση της πρωτεΐνης της βλέννας και της πρωτεΐνης του ορού έχει αναφερθεί και σε άλλες έρευνες (Miandare *et al.*, 2016).

### 6.11. Πρωτεάσες-Αντιπρωτεάσες

Οι πρωτεάσες και οι αντιπρωτεάσες συμμετέχουν στην άμυνα εναντίον βακτηρίων ή παρασίτων. Στην δερματική βλέννα, οι πρωτεάσες κατέχουν προστατευτικό ρόλο έναντι παθογόνων αλλά επίσης ενεργοποιούν και επάγουν την δράση άλλων ανοσολογικών στοιχείων όπως το συμπλήρωμα, τα αντισώματα και αντιμικροβιακά πεπτίδια (Guardiola *et al.*, 2016). Λόγω της ανάγκης ισορροπίας μεταξύ πρωτεασών και αντιπρωτεασών, οι παράμετροι αυτοί εξετάζονται από κοινού. Στην εντερική βλέννα, οι πρωτεάσες ήταν παρά πολύ ενεργές, εύλογη παρατήρηση εφόσον συμμετέχουν και στις πεπτικές λειτουργίες, με αποτέλεσμα να κατέστη αδύνατη η μέτρηση τους με την δεδομένη καμπύλη αναφοράς. Η ισχυρή αυτή πρωτεολυτική ικανότητα πιθανόν να οδήγησε και στην μειωμένη συγκέντρωση πρωτεΐνης που ανιχνεύτηκε στο έντερο. Στον όρο αίματος και στην δερματική βλέννα οι ενεργότητες πρωτεασών ήταν μικρότερες και σε επίπεδα αντίστοιχα με άλλες έρευνες στο λαβράκι (Guardiola *et al.*, 2014), χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, αλλά μια τάση της δίαιτας ORGhigh για αυξημένη αποσταθεροποιητική δράση πρωτεασών. Σε έρευνα στην τσιπούρα, η επαγωγή στρες δεν μετέβαλε σημαντικά τα επίπεδα πρωτεασών του ορού, ενώ και τα επίπεδα πρωτεασών στην δερματική βλέννα παρότι αυξήθηκαν σημαντικά στην αρχή, σύντομα επέστρεψαν στις φυσιολογικές τιμές (Guardiola *et al.*, 2016).

Στον ορό, η ενεργότητα αντιπρωτεάσης είναι πολύ υψηλή που συμφωνεί με προηγούμενες έρευνες στο λαβράκι (Henry *et al.*, 2018). Η ενεργότητα αντιπρωτεάσης στο δέρμα είναι αρκετά χαμηλότερη (Guardiola *et al.*, 2014) χωρίς σημαντικές διαφορές, ενώ στο έντερο οι τιμές είναι λίγο μικρότερες, με την δίαιτα CTRL- να εμφανίζει την ελάχιστη ενεργότητα που διαφέρει σημαντικά από όλες τις δίαιτες εκτός της ORGhigh που εμφανίζει μέση ενεργότητα. Είναι λοιπόν φανερό πως η έλλειψη ιχνοστοιχείων, αλλά και η υπερβολική συγκέντρωση αυτών, αναστέλλει την φυσιολογική λειτουργία των αντιπρωτεασών του εντέρου επηρεάζοντας τόσο την ανοσολογική αλλά και γενικότερα την φυσιολογική λειτουργία. Η ισορροπία πρωτεασών/αντιπρωτεασών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την υγεία του ψαριού, αφού οι αντιπρωτεάσες αποτρέπουν την φλεγμονώδη ζημιά από την πλεονάζουσα δράση των πρωτεασών. Για την επίτευξη θετικού αποτελέσματος από κάποιο ανοσοδιεγερτικό, θα ήταν επιθυμητό να παρατηρείται αύξηση και στις πρωτεάσες και στις αντιπρωτεάσες για την αποφυγή ανισορροπίας (Cerezuela *et al.*, 2016). Χορήγηση οργανικού σιδήρου στον κυπρίνο οδήγησε σε αυξημένη ενεργότητα θρυψίνης (Ling *et al.*, 2010), ενώ έρευνες για την επίδραση των ιχνοστοιχείων στις πρωτεάσες και αντιπρωτεάσες είναι ελλιπείς. Χορήγηση ανοσοδιεγερτικών στοιχείων στην πέστροφα και τον κυπρίνο αυξάνει την ενεργότητα των πρωτεασών της βλέννας (Sheikhzadeh *et al.*, 2012; Hoseinifar *et al.*, 2019), ενώ η χορήγηση MOL στην τσιπούρα αυξάνει συγχρόνως την ενεργότητα των πρωτεασών του ορού και της βλέννας (Mansour *et al.*, 2018).

### 6.12. Συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα – Συμπλήρωμα

Η συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα εναντίον Gram- βακτηρίων μελετήθηκε σε τρεις πειραματικές συνθήκες, παρουσία ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου, παρουσία μόνο ιόντων μαγνησίου και απουσία και των δύο ιόντων με βάση όσα αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 2.

Με βάση τον χρόνο θανάτωσης του 50% των βακτηρίων που θεωρείται η πιο αξιόπιστη παράμετρος, ο ορός αίματος εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές για το σύνολο της αντιβακτηριακής δράσης, με την δίαιτα ORGlow να έχει την μεγαλύτερη δράση που διαφέρει από τις δίαιτες CTRL- και INORG-, αλλά και για την μαγνησιοεξαρτώμενη δράση, δηλαδή την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος, με την δίαιτα CTRL- να εμφανίζει αναστολή της δράσης διαφέροντας σημαντικά από τις δίαιτες ORGlow, ORGhigh και CTRL+. Η απουσία των ιόντων ασβεστίου δεν προκαλεί σχεδόν καμία επίδραση στην αντιβακτηριακή δράση. Το σύνολο λοιπόν της δράσης διαμεσολαβείται από μαγνησιοεξαρτώμενους (εναλλακτική οδός συμπληρώματος) και από ιοντοανεξάρτητους μηχανισμούς (κάποιες λεκτίνες, αντιμικροβιακά πεπτίδια κλπ) (Henry *et al.*, 2009), ενώ οι τελευταίοι φαίνεται πως δεν επηρεάζονται από τις μεταβολές των ιχνοστοιχείων.

Το πρότυπο της αντιβακτηριακής δράσης στο δέρμα είναι σχεδόν ίδιο με αυτό του ορού αλλά στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίζονται μόνο για το σύνολο της αντιβακτηριακής δράσης με την δίαιτα ORGlow να εκδηλώνει την υψηλότερη δράση και την CTRL- την χαμηλότερη. Άρα η μειωμένη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων πετυχαίνει να ενισχύσει τους αντιβακτηριακούς παράγοντες όπως τα διάφορα αντιμικροβιακά πεπτίδια πιθανόν λόγω της καλύτερης αφομοίωσης και μειωμένων αλληλεπιδράσεων ανταγωνισμού, όπως αυτά εκδηλώνονται στις άλλες δίαιτες. Η απουσία εξωγενών ιχνοστοιχείων όπως και στην περίπτωση του ορού, επιδρά αρνητικά στην αντιβακτηριακή δράση, πιθανώς λόγω και της στέρησης απαραίτητων ιχνοστοιχείων για τα βακτήρια.

Η εντερική βλέννα εμφανίζει ακριβώς αντίθετο πρότυπο από τα άλλα δύο βιολογικά υλικά, αφού η απομάκρυνση των ιόντων ασβεστίου αναστέλλει την αντιβακτηριακή δράση στο επίπεδο της δράσης μόνο των ιοντοανεξάρτητων παραγόντων. Επομένως η ασβεστιοεξαρτώμενη δράση είναι σημαντική και περιλαμβάνει την κλασική οδό του συμπληρώματος, τις λεκτίνες C τύπου, τις πετραζίνες κ.ά. (Henry *et al.*, 2009), ενώ απουσιάζει η μαγνησιοεξαρτώμενη δράση δηλαδή η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, κάτι που πιθανώς υποδεικνύει την επίδραση των ιχνοστοιχείων στην εναλλακτική οδό του συμπληρώματος και σε άλλους μαγνησιοεξαρτώμενους μηχανισμούς, και την απουσία επίδρασης στην κλασική οδό (ασβεστιοεξαρτώμενοι μηχανισμοί) και στους ιοντοανεξάρτητους μηχανισμούς. Είναι σαφές από έρευνες ότι οι λειτουργίες του συμπληρώματος διαμεσολαβούνται στον ορό των ψαριών κυρίως από την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος. Ειδικά στον όρο της τσιπούρας ανιχνεύεται μόνο η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος (Sunyer & Tort, 1995). Ακόμη στην δερματική βλέννα της τσιπούρας έχει αναφερθεί η παρουσία της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (Valero *et al.*, 2019). Αξιολογώντας την διαφορά EGTA - EDTA για τον ορό και την δερματική βλέννα και την διαφορά MgCa - EGTA για την εντερική βλέννα, παρατηρούμε ότι η εναλλακτική και κλασική οδός του συμπληρώματος αντίστοιχα, καταλαμβάνουν μικρότερο ποσοστό της αντιβακτηριακής δράσης, αφού το περισσότερο καταλαμβάνουν ιοντοανεξάρτητοι μηχανισμοί όπως αντιμικροβιακά πεπτίδια. Στην έρευνα των (Valero *et al.*, 2019) στον σολομό του Ατλαντικού, φάνηκε πως ο όρος και η δερματική βλέννα εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα αντιμικροβιακών πεπτιδίων με την NK-λυσίνη να ανιχνεύεται περισσότερο στην βλέννα και την εψιδίνη να βρίσκεται κυρίως στον ορό. Ένα αντίστοιχο πρότυπο αντιμικροβιακών παραγόντων είναι πιθανόν να ανιχνεύεται και στον λαβράκι με αποτέλεσμα η μεταβολή των ιχνοστοιχείων να μην επηρεάζει την δράση του ορού αλλά να επηρεάζει την αντιβακτηριακή δράση σε τοπικές αποκρίσεις στο δέρμα και την βλέννα.

Αυξημένα επίπεδα σιδήρου στις δίαιτες του λαβρακίου βρέθηκε ότι αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης της εψιδίνης περίπου κατά 30% σε σχέση με ψάρια που τράφηκαν με δίαιτα μάρτυρα ή με δίαιτα ελλιπή σε σίδηρο (Rodrigues *et al.*, 2006).

Η χορήγηση μεγαλύτερης δόσης σιδήρου στην τσιπούρα αυξάνει την συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα του ορού (Rigos *et al.*, 2010). Η χορήγηση σεληνίου στο μαγιάτικο και τον κυπρίνο αυξάνει την ενεργότητα του αιμολυτικού συμπληρώματος (Mansour *et al.*, 2017; Saffari *et al.*, 2018). Από την άλλη, η έλλειψη ψευδαργύρου στον κυπρίνο μειώνει την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων (Song *et al.*, 2017).

Στην πέστροφα, η χορήγηση πρε/προ/συνβιοτικών αυξάνει σημαντικά την αντιβακτηριακή δράση της δερματικής βλέννας (Hoseinifar *et al.*, 2015), όπως και η χορήγηση άλλων ανοσοδιεγερτικών (Sheikhzadeh *et al.*, 2012). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην τιλάπια του Νείλου (Doan *et al.*, 2018).

### 6.13. Γενικές παρατηρήσεις

Όπως ανέφεραν οι (Roosta *et al.*, 2014), με την συγκεκριμένη μέθοδο συλλογής βλέννας (Ross *et al.*, 2000) είναι πιθανόν να μην υπάρχει αρκετή ευαισθησία για την ανίχνευση κάποιων παραμέτρων, ειδικά όταν τα επίπεδα τους είναι χαμηλά. Ακόμη η απουσία αντιπρωτεασών στο ρυθμιστικό διάλυμα οδηγεί σε κάποιου βαθμού πρωτεόλυση. Αυτές οι υποθέσεις ωστόσο δεν έχουν επιβεβαιωθεί.

Με βάση το σύνολο των παρατηρήσεων, είναι φανερό πως οι ανοσολογικές παράμετροι δεν έχουν την ίδια απόκριση στην χειραγώγηση των ιχνοστοιχείων. Καταρχάς, υπάρχει διαφορά απόκρισης στην συστηματική ανοσία και τις διάφορες θέσεις της βλεννογονικής απόκρισης. Όσον αφορά τη συστηματική ανοσία (αίμα και ορός αίματος), η αλλαγή μεταξύ ανόργανων και οργανικών ιχνοστοιχείων επηρέασε σημαντικά την ολική πρωτεΐνη του ορού και το μονοξειδίο του αζώτου που αυξήθηκαν με την μέση συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων. Αντίθετα, η συνολική αντιβακτηριακή δράση αυξήθηκε με την χαμηλότερη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων. Ακόμη, η δίαιτα αρνητικός μάρτυρας είχε την τάση να δίνει τα χειρότερα απόδοσης σε αρκετές παραμέτρους, όπως και η μέση συγκέντρωση ανόργανων ιχνοστοιχείων με ενδείξεις προ-φλεγμονής και με μειωμένη συνολική αντιβακτηριακή δράση. Επίσης, η συστηματική ανοσία στα ψάρια που δέχθηκαν φυτικές δίαιτες ήταν στο ίδιο επίπεδο με αυτή των ψαριών που τράφηκαν με ιχθυάλευρο, με την προϋπόθεση ότι δέχθηκαν μίγμα ιχνοστοιχείων, ενώ με την μέση συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων η φυτική δίαιτα ενίσχυσε την συστηματική ανοσία σε επίπεδο ανώτερο της δίαιτας θετικού μάρτυρα (ιχθυάλευρο).

Η δερματική βλεννογονική ανοσία εμφάνισε μια ποικιλία προτύπων. Η μέση συγκέντρωση οργανικών και ανόργανων ιχνοστοιχείων αύξησε την ενεργότητα αλκαλικής φωσφατάσης, αλλά τα οργανικά ιχνοστοιχεία πέτυχαν σχετικά μεγαλύτερη αύξηση. Η μέση συγκέντρωση μόνο οργανικών ιχνοστοιχείων αύξησε την ολική πρωτεΐνη και το μονοξειδίο του αζώτου, ενώ η μέση συγκέντρωση μόνο ανόργανων αύξησε την ενεργότητα λυσοζύμης (βακτηριακή δραστηριότητα εναντίον Gram+ βακτηρίων). Εξαιρέση αποτελεί η συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα που ήταν βέλτιστη στην μειωμένη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων. Η χαμηλότερη (με εξαίρεση την συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα) και η υπερβολική συγκέντρωση ιχνοστοιχείων ήταν ανασταλτικές για επιμέρους στοιχεία της δερματικής ανοσίας. Ανασταλτική ήταν και η χορήγηση ανόργανων ιχνοστοιχείων για την ολική πρωτεΐνη. Η δίαιτα αρνητικός μάρτυρας εμφάνισε ενδείξεις παρουσίας στρες ή ενδείξεις για ευαισθησία στο στρες στα ψάρια. Σε αντίθεση με τον ορό αίματος, το πρότυπο απόκρισης της δερματικής βλεννογονικής ανοσίας στα ιχνοστοιχεία είναι πολύπλευρο και δεν είναι απολύτως φανερό ποια περίπτωση είναι βέλτιστη.

Η εντερική βλεννογονική ανοσία ενισχύεται από την μειωμένη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων, σε αντίθεση με την δερματική και την συστηματική. Η δίαιτα αρνητικός μάρτυρας εμφάνισε ισχυρά μειωμένη δράση αντιπρωτεασών που ενέχει σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των ψαριών. Η υπερβολική συγκέντρωση ιχνοστοιχείων επίσης οδήγησε σε ανασταλτικά αποτελέσματα για την ανοσολογική λειτουργία του εντερικού βλεννογόνου σε αρκετές παραμέτρους, ενώ η μέση συγκέντρωση οργανικών και ανόργανων ιχνοστοιχείων ήταν ακατάλληλες για επιμέρους στοιχεία της εντερικής βλεννογονικής ανοσίας.

Δεν πρέπει βέβαια να αγνοήσουμε και τα αποτελέσματα από την αύξηση των ψαριών που υπέδειξαν πως η μέση συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων πετυχαίνει βελτίωση της αύξησης σε σχέση με την έλλειψη ιχνοστοιχείων που αναστέλλει την φυσιολογική αύξηση των ψαριών.

Αυτό που μπορεί να διαπιστωθεί με μεγαλύτερη βεβαιότητα είναι πως οι φυτικές δίαιτες απαιτούν την προσθήκη πρόσθετων ιχνοστοιχείων (Prabhu *et al.*, 2014b; Prabhu *et al.*, 2016), αφού η δίαιτα

αρνητικός μάρτυρας ανέστειλε την αύξηση των ψαριών και τις περισσότερες ανοσολογικές παραμέτρους.

Η χρήση οργανικών έναντι ανόργανων ιχνοστοιχείων βελτιώνει την αύξηση και την πλειοψηφία των ανοσολογικών παραμέτρων της συστημικής και βλεννογονικής ανοσίας.

Όσον αφορά την συγκέντρωση ιχνοστοιχείων που πρέπει να επιλεγθεί δεν είναι εύκολο να ληφθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα. Η αύξηση, η συστημική και η δερματική βλεννογονική ανοσία φαίνεται ότι βελτιώνονται από την μέση συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων, με εξαίρεση την συνολική αντιβακτηριακή δράση που βελτιώνεται από την χαμηλότερη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων.

Η εντερική βλεννογονική ανοσία αντίθετα βελτιώνεται από την χορήγηση χαμηλότερης συγκέντρωσης οργανικών ιχνοστοιχείων. Επιλέγοντας δηλαδή την μέση συγκέντρωση προωθείται η αύξηση, η συστημική και οι περισσότεροι παράμετροι της δερματικής ανοσίας, δεν συμβαίνει όμως το ίδιο στην εντερική βλεννογονική ανοσία και στην συνολική αντιβακτηριακή δράση καθώς προωθούνται με την χαμηλότερη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων.

## 7. Συμπεράσματα

- Τα πρωτόκολλα μέτρησης των ανοσολογικών παραμέτρων μπορούν να προσαρμοστούν με ακρίβεια σε μικροπλάκες 384 βοθρίων με γνώμονα την διατήρηση ίδιων συγκεντρώσεων και αναγωγή των όγκων στον μέγιστο όγκο των βοθρίων.
- Η μέτρηση της συνολικής αντιβακτηριακής δραστηριότητας με ανασυνδυασμένα βακτήρια *E.coli* για την τσιπούρα και το λαβράκι γίνεται με καλλιέργεια βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο (LB) οπτικής πυκνότητας 0,4 και με 30  $\mu\text{L}$  καλλιέργειας βακτηρίων και 20  $\mu\text{L}$  δείγματος.
- Η αντιβακτηριακή δράση του ορού εκδηλώνεται μέσω θερμοευαίσθητης, σε μεγαλύτερο ποσοστό ιοντοανεξάρτητης και σε μικρότερο ποσοστό κυρίως  $\text{Mg}^{2+}$  εξαρτώμενης δράσης, ενώ αντίθετα στην βλέννα δέρματος η αντιβακτηριακή δράση διαμεσολαβείται από θερμοανθεκτικούς ιοντοανεξάρτητους παράγοντες και σε μικρότερο ποσοστό  $\text{Mg}^{2+}$  εξαρτώμενους παράγοντες. Τέλος, στην βλέννα εντέρου η αντιβακτηριακή δράση διαμεσολαβείται από θερμοανθεκτικούς ιοντοανεξάρτητους παράγοντες και σε μικρότερο ποσοστό από  $\text{Ca}^{2+}$  εξαρτώμενους παράγοντες.
- Η μέση συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων πετυχαίνει βελτίωση της αύξησης του λαβρακίου με βάση την αξιολόγηση του ειδικού ρυθμού αύξησης (SGR).
- Υπάρχει διαφορά απόκρισης στην συστημική ανοσία και τις διάφορες θέσεις της βλεννογονικής απόκρισης στο λαβράκι.
- Η συστημική ανοσία (αίμα και ορός αίματος) βελτιώνεται από την μέση συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων (με βάση την ολική πρωτεΐνη και το μονοξείδιο του αζώτου), αλλά όχι η συνολική αντιβακτηριακή δράση του ορού που βελτιώνεται με την μειωμένη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων
- Η δερματική βλεννογονική ανοσία βελτιώνεται από την μέση συγκέντρωση οργανικών (με βάση την αλκαλική φωσφατάση, το μονοξείδιο του αζώτου και την ολική πρωτεΐνη) και ανόργανων (με βάση την αλκαλική φωσφατάση και την λυσοζύμη) ιχνοστοιχείων. Αντίθετα, η συνολική αντιβακτηριακή δραστηριότητα όπως και στην περίπτωση του ορού είναι βέλτιστη στην μειωμένη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων.

- Η εντερική βλεννογονική ανοσία ενισχύεται από την μειωμένη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων, σε αντίθεση με την δερματική και την συστηματική.
- Οι φυτικές δίαιτες του λαβρακιού απαιτούν την προσθήκη πρόσθετων ιχνοστοιχείων αφού η δίαιτα αρνητικός μάρτυρας ανέστειλε αύξηση των ψαριών και τις περισσότερες ανοσολογικές παραμέτρους.
- Η χρήση οργανικών έναντι ανόργανων ιχνοστοιχείων βελτιώνει την αύξηση και την πλειονότητα των ανοσολογικών παραμέτρων της συστηματικής και βλεννογονικής ανοσίας.
- Το επίπεδο των ιχνοστοιχείων που πρέπει να επιλεγεί δεν μπορεί να αποφασιστεί με απόλυτη βεβαιότητα λόγω των αντικρουόμενων προτύπων της συστηματικής και της βλεννογονικής ανοσίας.
- Επιλέγοντας την μέση συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων προωθείται η αύξηση, η συστηματική ανοσία και οι περισσότεροι παράμετροι της δερματικής βλεννογονικής ανοσίας, αλλά η εντερική βλεννογονική ανοσία και η συνολική αντιβακτηριακή δράση του ορού και της δερματικής βλέννας αναστέλλονται καθώς προωθούνται με την χαμηλότερη συγκέντρωση οργανικών ιχνοστοιχείων.

## 8. Βιβλιογραφία

- Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature (London)* **383**, 787-793.
- Ackerman, A.L.& Cresswell, P., 2004. Cellular mechanisms governing cross- presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* **5**, 678–684.
- Acton, R.T., Weinheimer, P.F., Hall, S.J., Niedermeier, W., Shelton , E., Bennett, J.C., 1971. Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America A* **68**, 107-111.
- Agius, C.& Agbede, S.A., 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *J. Fish Biol.* **24**, 471-488.
- Alexander, J.B.& Ingram, G.A., 1992. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases* **2**, 249-279.
- Anderson, C.D., Roberts, R.J., MacKenzie, K., McVicar, A.H., 1976. The hepato-renal syndrome in cultured turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J. Fish Biol.* **8**, 331-341.
- Asbakk, K.& Dalmo, R.A., 1998. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) epidermal Malpighian cells-motile cells clearing away latex beads in vitro. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 30-34.
- Atosuo, J., Lehtinen, J., Vojteka, L., Liliusa, E., 2013. Escherichia coli K-12 (pEGFPluxABCDEamp): a tool for analysis of bacterial killing by antibacterial agents and human complement activities on a real-time basis. *Luminescence* **28**, 771–779.
- Azeredo, R., Machado, M., Kreuz, E., Wuertz, S., Oliva-Teles, A., Enes, P., Costas, B., 2017. The European seabass (*Dicentrarchus labrax*) innate immunity and gut health are modulated by dietary plant-protein inclusion and prebiotic supplementation. *Fish & Shellfish Immunology* **60**, 78-87

- Bao, B., Peatman, E., Li, P., He, C., Liu, Z., 2005. Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection. *Developmental and Comparative Immunology* **29**, 939-950.
- Bao, B., Peatman, E., Xu, P., Li, P., Zeng, H., He, C., Liu, Z., 2006. The catfish liver- expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated. *Molecular Immunology* **43**, 367-377.
- Barber, L.D.& Parham, P., 1993. Peptide binding to major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Cell Biol.* **9**, 163-206.
- Barnes, A.C., dos Santos, N.M.S., Ellis, A.E., 2005. Update on bacterial vaccines: Photobacterium damsela supsp. Piscicida, in: Midtlyng, P.J. (Ed.), *Developments in Biologicals Progress in Fish Vaccinology*. Karger, Basel, pp. 75-84.
- Barreto, V.M., Pan-Hammarstrom, Q., Zhao, Y., Hammarstrom, L., Misulovin, Z., Nussenzweig, M.C., 2005. AID from bony fish catalyzes class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 733-738.
- Bengtén, E., Wilson, M., Miller, N., Clem, L.W., Pilstrom, L., Warr, G.W., 2000. Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. *Current Topics in Microbiological Immunology* **248**, 189-219.
- Bernard, D., Six, A., Rigottier-Gois, L., Messiaen, S., Chilmoneczk, S., Quillet, E., Boudinot, P., Benmansour, A., 2006. Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *Journal of Immunology* **176**, 3942-3949.
- Bernasconi, N.L., Traggiai, E., Lanzavecchia, A., 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* **298**, 2199-2202.
- Berntssen, M.H.G., Kroglund, F., Rosseland, B.O., Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Responses of skin mucous cells to aluminium exposure at low pH in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**, 1039-1045.
- Bielek, E., 2005. Development of the endoplasmic reticulum in the rodlet cell of two teleost species. *Anatomical Record* **A283**, 239-249.
- Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Mingatto, F.E., Urbinati, E.C., 2015. The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Fish & Shellfish Immunology* **47**, 360-367.
- Bird, S., Zou, J., Savan, R., Kono, T., Sakai, M., Woo, J., Secombes, C.J.J.p., Fugu rubripes. Developmental and Comparative Immunology 29: 775-789., 2005. Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the in the Japanese pufferfish, Fugu rubripes. *Dev Comp Immunol.* **29**, 775-789.
- Bly, J.E.& Clem, L.W., 1992. Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* **2**, 159-171.
- Bone, Q.& Moore, R., 2008. *Biology of Fishes*. Taylor & Francis, NY.



- Boshra, H., Li, J., J.O., S., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 239-262.
- Braun, R., Arnesen, J.A., Rinne, A., Hjelmeland, K., 1990. Immunohistological localization of trypsin in mucus-secreting cell layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **13**, 233-238.
- Bromage, E.R., Kaattari, I.M., Zwollo, P., Kaattari, S.L., 2004a. Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *Journal of Immunology* **173**, 7317-7323.
- Bromage, E.S., 2006. Antibody structural variation in rainbow trout fluids. *Comparative Biochemistry and Physiology* **143**, 61-69.
- Bromage, E.S., Ye, J., Owens, L., Kaattari, I.M., Kaattari, S., 2004b. Use of staphylococcal protein A in the analysis of teleost immunoglobulin structural diversity. *Developmental and Comparative Immunology* **28**, 803-814.
- Buchmann, K., 1998. Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes Monogenea). *Diseases of Aquatic Organisms* **32**, 195.
- Buchmann, K., 1999. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans \_ A model. *Folia Parasitologica* **46**, 1-9.
- Cain, K.D., Jones, D.R., Raison, R.L., 2002. Antibody-antigen kinetics following immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a T-cell dependent antigen. *Developmental and Comparative Immunology* **26**, 181-190.
- Cain, K.D., Jones, D.R., Raison, R.L., 2000. Characterization of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. *Fish and Shellfish Immunology* **10**, 651-666.
- Castillo, A., Razquin, B., Villena, A.J., Zapata, A.G., Lopez- Fierro, P., 1998. Thymic barriers to antigen entry during the post-hatching development of the thymus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol* **8**, 157-170.
- Cerezuela, R., Guardiola, F.A., Cuesta, A., Esteban, M.A., 2016. Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with palm fruit extracts and probiotics: Effects on skin mucosal immunity. *Fish & Shellfish Immunology* **49**, 100-109.
- Chanda, S., Paul, B.N., Ghosh, K., Giri, S.S., 2015. Dietary essentiality of trace minerals in aquaculture-A Review. *Agri. Review* **36**, 100-122.
- Chen, S.L., Li, W., Meng, L., Sha, Z.X., Wang, Z.J., Ren, G.C., 2007. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish and Shellfish Immunology* **22**, 172-181.
- Cheroutre, H., 2004. Starting at the beginning: New perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annual Review of Immunology* **22**: 217-246. *Annual Review of Immunology* **22**, 217-246.
- Chilmonczyk, S., 1992. The thymus in fish: development and possible functions in the immune response. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 181-200.

- Cho, J.H., Park, I.Y., Kim, H.S., Lee, W.T., Kim, M.S., Kim, S.C., 2002. Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. *FASEB Journal* **16**, 429-431.
- Clem, L.W., 1971. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. IV. Immunoglobulins of the giant grouper, *Epinephelus itaira*. *Journal of Biological Chemistry* **246**, 9-15.
- Clem, L.W. & McLean, W.E., 1975. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VII. Monomeric and tetrameric immunoglobulins of the margate, a marine teleost fish. *Immunology* **29**, 791-799.
- Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G., 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry* **18**, 12008-12013.
- Commission, E., 2012. Seabass *Dicentrarchus labrax*, Fisheries and Aquaculture in Europe. Directorate-General Maritime Affairs and Fisheries of the European Commission.
- Connor, M.A., Jaso-Friedmann, L., Leary III, J.H., Evans, D.L., 2008. Role of nonspecific cytotoxic cells in bacterial resistance: Expression of a novel pattern recognition receptor with antimicrobial activity. *Molecular Immunol.* **46**, 953–961.
- Dalmo, R.A., Bogwald, J., Ingebrigtsen, K., Seljelid, R., 1996. The immunomodulatory effect of laminaran (beta(1,3)-D-glucan) on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., anterior kidney leucocytes after intraperitoneal, peroral and peranal administration. *Journal of Fish Diseases* **19**, 449-457.
- Damasceno, F.M., Fleuri, L.F., Sartori, M.M.P., Anorim, R.L., Pezzato, L.E., da Silva, R.L., Carvalho, P.L.P.F., Barros, M.M., 2016. Effect of dietary inorganic copper on growth performance and hematological profile of Nile tilapia subjected to heat-induced stress. *Aquaculture* **454**, 257–264.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K., Steiner, L.A., 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: Identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature Immunology* **6**, 295-302.
- Danilova, N. & Steiner, L.A., 2002. B cells develop in the zebrafish pancreas. *Proceedings of the National Academies of Science of the United States of America* **99**, 13711-13716.
- Das, A., Mishra, S.K., Swain, R.K., Sahoo, G., Behura, N.C., Sethi, K., Chichilichi, B., Mishra, S.R., Behera, T., Dhama, K., Swain, P., 2014. Effects of Organic Minerals Supplementation on Growth, Bioavailability and Immunity in Layer Chicks. *International Journal of Pharmacology* **10**, 237-247.
- Das, S. & Sahoo, P.K., 2018. Ceruloplasmin, a moonlighting protein in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **82**, 460-468.
- Dash, S., Das, S.K., Samal, J., Thatoi, H.N., 2018. Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University* **19**, 72-61.
- Datta, S.K., Redecke, V., Prilliman, K.R., 2003. A subset of toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* **170**, 4102–4110.
- Davidson, G.A., Ellis, A.E., Secombes, C.J., 1991. Cellular responses of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **14**, 651-659.

- Davidson, G.A., Ellis, A.E., Secombes, C.J., 1992. An ELISPOT assay for the quantification of specific antibody secreting cells to *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **15**, 85-89.
- Davidson, G.A., Ellis, A.E., Secombes, C.J., 1993a. Novel cell types isolated from the skin of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish. Biol.* **42**, 301–306.
- Davidson, G.A., Ellis, A.E., Secombes, C.J., 1993b. Route of immunisation influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* **17**, 373–376.
- Davidson, G.A., Lin, S.H., Secombes, C.J., Ellis, A.E., 1997. Detection of specific and ‘constitutive’ antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of the dab (*Limanda limanda*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **58**, 363-374.
- Davina, J.H.M., Parmentier, H.K., Timermans, L.P.M., 1982. Effect of oral administration of *Vibrio* bacterin on the intestine of cyprinid fish. *Developmental and Comparative Immunology* **2**, 157-166.
- Dekani, L., Johari, S.A., Joo, H.S., 2019. Comparative toxicity of organic, inorganic and nanoparticulate zinc following dietary exposure to common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of the Total Environment* **656**, 1191–1198.
- Desser, S.S.& Lester, R., 1975. An ultrastructural study of the enigmatic rodlet cells in the white sucker, *Catostomus commersoni* (Lacépède) (Pisces: Catostomidae). *Can. J. Zool.* **53**, 1483- 1494.
- Devine, D.A.& Hancock, R.E., 2002. Cationic peptides: Distribution and mechanisms of resistance. *Current Pharmacological Diseases* **8**, 703-714.
- Dezfuli, B.S., Capuano, S., Manera, M., 1998. A description of rodlet cells from alimentary canal of *Anguilla anguilla* and their relationship with parasitic helminths. *J. Fish Biol.* **53**, 1084-1095.
- Dezfuli, B.S.& Giari, L., 2008. Mast cells in the gills and intestines of naturally infected fish: evidence of migration and degranulation. *J. Fish Dis.* **31**, 845–852.
- Dickerson, H.W., 2009. The Biology of Teleost Mucosal Immunity, in: G., Z., Perriere, C., Mathis, A., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Defences*. Science Publishers, USA, pp. 1-43.
- Dijkstra, J.M., Grimholt, U., Leong, J., 2013. Comprehensive analysis of MHC class II genes in teleost fish genomes reveals dispensability of the peptide-loading DM system in a large part of vertebrates. *BMC Evol Biol* **13**, 260.
- Do Carmo e Sa, M.V., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Padliha, P.D.M., 2005. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquaculture Nutrition* **11**, 273–281.
- Doan, H.V., Hoseinifar, S.H., Elumalai, P., Tongsir, S., Chitmanat, C., Jatursitha, S., Doolgindachbaporn, S., 2018. Effects of orange peels derived pectin on innate immune response, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under indoor biofloc system *Fish and Shellfish Immunology* **80**, 56–62
- Dogget, T.A.& Harris, J.E., 1991. Morphology of the gut associated lymphoid tissue of *Oreochromis mossambicus* and its role in antigen absorption. *Fish and Shellfish Immunology* **1**, 213-227.

- Dominguez, D., Rimoldi, S., Robaina, L.E., Torrecillas, S., Terova, G., Zamorano, M.J., Karalazos, V., Hamre, K., Izquierdo, M., 2017. Inorganic, organic, and encapsulated minerals in vegetable meal based diets for *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). *PeerJ*.
- Dooley, H., 2006. First molecular and biochemical analysis of in vivo affinity maturation in an ectothermic vertebrate. *Proceedings of the National Academies of Sciences of the United States of America* **103**, 1846-1851.
- Dorin, D., Martin, P., Sire, M.F., Smal, J., Vernier, J.M., 1993. Protein uptake by intestinal macrophages and eosinophilic granulocytes in trout: an in vivo study. *Biology of the Cell* **79**, 37-44.
- Dos Santos, N.M., Taverne-Thiele, J.J., Barnes, A.C., Van Muiswinkel, W.B., Ellis, A.E., Rombout, J.H.W.M., 2001a. The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: An ontogenetic study. *Fish and Shellfish Immunology* **11**, 65-74.
- Dos Santos, N.M.S., Taverne-Thiele, J.J., Barnes, A.C., Ellis, A.E., Rombout, J.H.W.M., 2001b. Kinetics of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) systemic and mucosal antibody secreting cell response to different antigens (*Photobacterium damsela* spp. *piscicida*, *Vibrio anguillarum* and DNP. *Fish and Shellfish Immunology* **11**, 317-331.
- Douglas, S.E., Patrzykat, A., Pytyck, J., Gallant, J.W., 2003. Identification, structure and differential expression of novel pleurocidins clustered on the genome of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Eur. J. Biochem.* **270**, 3720–3730.
- Drickamer, K. & Taylor, M.E., 1993. Biology of animal lectins. *Annual Review of Cellular Biology* **9**, 237-264.
- Du Pasquier, L. & Litman, G.W., 2000. *Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System*. Springer-Verlag, Berlin.
- Du, Y., Yi, M., Xiao, P., Meng, L., Li, X., Sun, G., Liu, Y., 2015. The impact of *Aeromonas salmonicida* infection on innate immune parameters of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **44**, 307–315.
- Egberts, H.J.A., Brinkhoff, M.G.M., Mouven, J.M.V.M., van Dijk, J.E., Koninkz, J.F.J.G., 1985. Biology and pathology of the intestinal M cell. A review. *Veterinary Quarterly* **7**, 333-336.
- Eggset, G., Mikkelsen, H., Killie, J.-E.A., 1997. Immunocompetence and duration of immunity against *Vibrio salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) at low and high temperatures. *Fish & Shellfish Immunol.* **7**, 247–260.
- Ellis, A.E., 1977. The leucocytes of fish; a review. *J. Fish Biol.* **11**, 453–491.
- Ellis, A.E., 1980. Antigen trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Diseases* **3**, 413-426.
- Ellis, A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 291–308.
- Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 827-839.

- Ellis, A.E., Hastings, T.S., Munro, A.L.S., 1981. The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis. *Journal of Fish Diseases* **4**, 41-52.
- Ellis, A.E., Munro, A.L.S., Roberts, R.J., 1976. Defence mechanisms in fish. I. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platex* L.). *J. Fish Biol.* **8**, 67-78.
- Espenes, A., Press, C.M., Dannevig, B.H., Landsverk, T., 1995a. Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.* **282**, 41-48.
- Espenes, A., Press, C.M., Dannevig, B.H., Landsverk, T., 1995b. Investigation of the structural and functional features of splenic ellipsoids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.* **279**, 469-474.
- Esteban, M.A., Munoz, J., Meseguer, J., 2000. Blood Cells of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow Cytometric and Microscopic Studies. *THE ANATOMICAL RECORD* **258**, 80-89.
- Evans, D.A., Klemer, J., Kaattari, S.L., 1998. Heuristic models of the intermonomeric disulfide bonding process. *Journal of Theoretical Biology* **195**, 505-524.
- Ezekowitz, R.A., Sastry, K., Bailly, P., Warner, A., 1990. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: Demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *Journal of Experimental Medicine* **172**, 1785-1794.
- Failla, M.L., 2003. Trace elements and host defense: recent advances and continuing challenges. *J Nutr.* **133**, 1445-1447.
- Ferguson, H.W., 1976. The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centres in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Comp. Pathol.* **86**, 377-380.
- Ferguson, H.W., 1989. *Systemic Pathology of fish*. Iowa State University Press, Ames.
- Flajnik, M.F., 1998. Churchill and the immune system of ectothermic vertebrates. *Immunological Reviews* **166**, 5-14.
- Flajnik, M.F. & Kasahara, M., 2009. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* **11**, 47-59.
- Fountoulaki, E., Morgane, H., Rigos, G., Vasilaki, A., Mente, E., Sweetman, J., Nengas, I., 2010. Evaluation of zinc supplementation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile diets. *Aquaculture Research* **41**, 2080-2216.
- Gaines Jr, J.L. & Rogers, W.A., 1975. Some Skin Lesions of Fishes, in: Ribelin, W.E., Migaki, G. (Eds.), *The Pathology of Fishes*. University of Wisconsin Press, Madison, pp. 429-441.
- Ganassin, R.C. & Bols, N.C., 1998. Development of a monocyte/macrophage-like cell line, RTS11, from rainbow trout spleen. *Fish & Shellfish Immunol.* **8**, 457-476.
- Garg, T.K. & Mittal, A.K., 1993. Observations on the function of mucous cells in the epidermis of the cat-fish *Clarias batrachus* exposed to sodium dodecyl sulfate. *Biomed. Environ. Sci.* **6**, 119-133.

- Goldes, S.A., Ferguson, H.W., Daoust, P.Y., Moccia, R.D., 1986. Phagocytosis of the inert suspended clay kaolin by the gills of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* **9**, 147-152.
- Gourley, T.S., Wherry, E.J., Masopust, D., Ahmed, R., 2004. Generation and maintenance of immunological memory. *Seminars in Immunology* **16**, 323-333.
- Grace, M.F. & Manning, M.J., 1980. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Dev. Comp. Immunol.* **4**, 255-264.
- Graham, S. & Secombes, C.J., 1990. Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **14**, 59-68.
- Graves, S.S., Evans, D.L., Dawe, D.L., 1985. Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **8**, 43-51.
- Grayfer, L., Walsh, J.G., Belosevic, M., 2008. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor-alpha. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 532-543.
- Grizzle, J.M. & Rogers, W.A., 1976. *Anatomy and Histology of the Channel Catfish*. Auburn University, Agricultural Experiment Station, Auburn, AL, USA.
- Grove, S., Johansen, R., Reitan, L.J., Press, C.M., 2006. Immune- and enzyme histochemical characterization of leukocyte populations within lymphoid and mucosal tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 693-708.
- Guardiola, F.A., Cuesta, A., Abellan, E., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2014. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* **40**, 24-31.
- Guardiola, F.A., Cuesta, A., Esteban, M.A., 2016. Using skin mucus to evaluate stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **59**, 323-330.
- Haddad, G., Hanington, P.C., Wilson, E.C., Grayfer, L., Belosevic, M., 2008. Molecular and functional characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) transforming growth factor beta. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 654-663.
- Hamuro, K., Suetake, H., Saha, N.R., Kikuchi, K., Suzuki, Y., 2007. A teleost polymeric Ig receptor exhibiting two Ig-like domains transports tetrameric IgM into the skin. *J. Immunol.* **178**, 5682-5686.
- Hansen, J.D., Landis, E.D., Phillips, R.B., 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6919-6924.
- Harris, P.D., Soleng, A., Bakke, T.A., 1998. Killing of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) mediated by host complement. *Parasitology* **117**, 137-143.
- Haworth, R., Platt, N., Keshav, S., Hughes, D., Darley, E., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T., Gordon, S., 1997. The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 1431-1439.

- Hebert, P., Ainsworth, A.J., Boyd, B., 2002. Histological enzyme and flow cytometric analysis of channel catfish intestinal tract immune cells. *Developmental and Comparative Immunology* **26**, 53-62.
- Henrickson, R.C.& Matoltsy, A.G., 1968. The fine structure of teleost epidermis. III. Club cells and other cell types. *J. Ultrastruct. Res.* **21**, 222-232.
- Henry, M.& Fountoulaki, E., 2014. Optimal dietary protein/lipid ratio for improved immune status of a newly cultivated Mediterranean fish species, the shi drum *Umbrina cirrosa*, L. *Fish & Shellfish Immunology* **37**, 215-219.
- Henry, M.A., Alexis, M.N., Fountoulaki, E., 2009. Effects of a natural parasitological infection (*Lernanthropus kroyeri*) on the immune system of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Parasite Immunology* **31**, 729-740.
- Henry, M.A., Gasco, L., Chatzifotis, S., Piccolo, G., 2018. Does dietary insect meal affect the fish immune system? The case of mealworm, *Tenebrio molitor* on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Developmental and Comparative Immunology* **81**, 204-209.
- Henry, M.A., Nikoloudaki, C., Tsigenopoulou, C., Rigos, G., 2015. Strong effect of long-term *Sparicotyle chrysophrii* infection on the cellular and innate immune responses of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Developmental and Comparative Immunology* **51**, 185-193.
- Hjelmeland, K., Christie, M., Raa, J., 1983. Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology* **23**, 13-22.
- Hordvik, I., Berven, F.S., Solem, S.T., Hatten, F., Endresen, C., 2002. Analysis of two IgM isotypes in Atlantic salmon and brown trout. *Molecular Immunology* **39**, 313-321.
- Hordvik, I., De Vries Lindstrom, C., Voie, A.M., Lilybert, A., Jacob, J., Endresen, C., 1997. Structure and organization of the immunoglobulin M heavy chain genes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Molecular Immunology* **34**, 631-639.
- Hoseinifar, S.H., Hosseini, M., Paknejad, H., Safari, R., Jafar, A., Yousefi, M., Doan, H.V., Mozanzadeh, M.T., 2019. Enhanced mucosal immune responses, immune related genes and growth performance in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles fed dietary *Pediococcus acidilactici* MA18/5M and raffinose *Developmental and Comparative Immunology* **94**, 59-65
- Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M.A., Sharifian, M., M.A., E., 2015. Modulation of innate immune response, mucosal parameters and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) upon synbiotic feeding *Fish & Shellfish Immunology* **45**, 27-32
- Huang, F., Jiang, M., Wen, H., Wua, F., Liu, W., Tian, J., Yang, C., 2015. Dietary zinc requirement of adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed semi-purified diets, and effects on tissue mineral composition and antioxidant responses. *Aquaculture* **439**, 53-59.
- Hugie, D.M.& Smith, R.J.F., 1987. Epidermal club cells are not linked with an alarm response in reedfish, *Erpetoichthys* (= *Calamoichthys*) *calabaricus*. *Can. J. Zool.* **65**, 2057-2061.
- Huttenhuis, H.B.T., Romano, N., Van Oosterhoud, C.N., Taverne-Thiele, A.J., Mastrolia, L., Van Muiswinkel, W.B., Rombout, J.H.W.M., 2006. The ontogeny of mucosal immune cells in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Anatomy and Embryology* **211**, 19-29.

- Iger, Y. & Abraham, M., 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. *J. Fish Biol.* **36**, 421-437.
- Iger, Y. & Abraham, M., 1997. Rodlet in the epidermis of fish exposed to stressor. *Tiss. Cell* **29**, 431-438.
- Iger, Y., Abraham, M., Dotan, A., Fattal, B., Rahamim, E., 1988. Cellular responses in the skin of carp maintained in organically fertilized water. *J. Fish Biol.* **33**, 711-720.
- Iger, Y., Jenner, H.A., Wendelaar Bonga, S.E., 1994. Cellular responses in the skin of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to temperature elevation. *J. Fish Biol.* **44**, 921-935.
- Izquierdo, M.S., Ghrab, W., Roo, J., Hamre, K., Hernandez-Cruz, C.M., Bernardini, G., Terova, G., Saleh, R., 2016. Organic, inorganic and nanoparticles of Se, Zn and Mn in early weaning diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*; Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research* **48**, 2852-2867.
- Jiang, M., Wu, F., Huang, F., Wen, H., Liu, W., Tian, J., Yang, C., Wang, W., 2016. Effects of dietary Zn on growth performance, antioxidant responses, and sperm motility of adult blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture* **464**, 121-128.
- Jun, L., Barreda, D.R., Zhang, Y.A., Boshra, H., Gelman, A.E., LaPatra, S., Tort, L., Sunyer, J.O., 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology* **7**, 1116-1124.
- Kaattari, S., Evans, D., Klemer, J., 1998. Varied redox forms of teleost IgM: An alternative to isotype diversity? *Immunological Reviews* **166**, 133-142.
- Kaattari, S.L., 2002. Affinity maturation in trout: Clonal dominance of high affinity antibodies late in the immune response. *Developmental and Comparative Immunology* **26**, 191-200.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Bilofsky, H., 1979. Sequence of immunoglobulin chains. *National Institute of Health Publication* **80**, 1-107.
- Katya, K., Lee, S., Bharadwaj, A.S., Browdy, C.L., Vazquez-Anon, M., Bai, S.C., 2017. Effects of inorganic and chelated trace mineral (Cu, Zn, Mn and Fe) premixes in marine rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf), fed diets containing phytic acid *Aquaculture Research* **18**, 1-9
- Katya, K., Lee, S., Yun, H., Dagoberto, S., Browdy, C.L., Vazquez-Anon, M., Bai, S.C., 2016. Efficacy of inorganic and chelated trace minerals (Cu, Zn and Mn) premix sources in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed plant protein based diets. *Aquaculture* **459**, 117-123.
- Kilpi, M.K., Atosuo, J.T., Lilius, E.E., 2009. Bacteriolytic activity of the alternative pathway of complement differs kinetically from the classical pathway. *Developmental and Comparative Immunology* **33**, 1102-1110.
- Kiron, V., 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology* **173**, 111-113.
- Knox, D., Cowey, C.B., Adron, J.W., 1982. Effects of dietary copper and copper:zinc ratio on rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* **27**, 111-119.



- Kokou, F., Rigos, G., Henry, M., Kentouri, M., Alexis, M., 2012. Growth performance, feed utilization and non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture* **364–365**, 74-81.
- Kong, Y., Li, S., Liu, M., Chuanwei, Y., Yang, X., Zhao, N., Li, M., 2018. Effect of dietary organic selenium on survival, growth, antioxidation, immunity and gene expressions of selenoproteins in abalone *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture Research* **50**, 847-855.
- Kubena, K.S.& McMurray, D.V., 1996. Nutrition and the immune system: A review of nutrient-nutrient interactions. *J Am Diet Assoc* **96**, 1156-1164.
- Laguesse, E., 1895. Sur le pancréas du Crénilabre et particulièrement sur le pancréas intra-hépatique. *Rev. Biol. NordFrance* **7**, 343-363.
- Lalles, J.-P., 2019. Biology, environmental and nutritional modulation of skin mucus alkalinephosphatase in fish: A review. *Fish and Shellfish Immunology* **89**, 179–186.
- Lamas, J.& Ellis, A.E., 1994. Atlantic salmon (*Salmon salar*,) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* **4**, 201–219.
- Lanno, R.P., Slinger, S.J., Hilton, J.W., 1985. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture* **49**, 257-268.
- Lee, S., Nambi, R.W., Won, S., Katya, K., Bai, S.C., 2016. Dietary selenium requirement and toxicity levels in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **464**, 153–158.
- Lefrancois, L.& Puddington, L., 1995. Extrathymic intestinal T-cell development: Virtual reality? *Immunology Today* **16**, 16-21.
- Leino, R.L., 1974. Ultrastructure of immature, developing, and secretory rodlet cells in fish. *Cell Tiss. Res.* **155**, 367-381.
- Leknes, I.L., 2002. Uptake of foreign ferritin in platy *Xiphophorus maculatus* (Poeciliidae: Teleostei). *Diseases of Aquatic Organisms* **51**, 233-237.
- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.A., Boshra, H., Gelman, A.E., LaPatra, S., Tort, L., Sunyer, J.O., 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and micro- bicidal activities. *Nature Immunology* **7**, 1116–1124.
- Li, Y., Li, Y., Cao, C., Jin, X., Jin, T., 2016. Pattern recognition receptors in zebrafish provide functional and evolutionary insight into innate immune signaling pathways. *Cellular and Molecular Immunology* **13**, 1-10.
- Lieschke, G.J.& Trede, N.S., 2009. Fish immunology. *Current Biology* **19**, 678-682.
- Lin, S.H., Davidson, G.A., Secombes, C.J., Ellis, A.E., 1998. A morphological study of cells isolated from the perfused gill of dab and Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* **53**, 560-568.
- Lin, T.L., Clark, T.G., Dickerson, H., 1996. Passive immunization of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) against the ciliated protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by use of murine monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* **64**, 4085-4090.

- Linder, M.C., 1991. *Biochemistry of Copper*. Plenum Press, New York.
- Ling, J., Feng, L., Liu, Y., Jiang, J., Jiang, W.D., Hu, K., Li, S.H., Zhou, X.Q., 2010. Effect of dietary iron levels on growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Nutrition* **16**, 616–624.
- Liu, Y., Wang, J.Y., Li, B.S., Qiao, H.J., Liu, X.D., Hao, T.T., Wang, X.Y., 2017. Dietary manganese requirement of juvenile hybrid grouper, *Epinephelus lanceolatus* \_ *E. fuscoguttatus*. *Aquaculture Nutrition* **24**, 215-223.
- Lobb, C.J., 1987. Secretory immunity induced in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, following bath immunization. *Developmental and Comparative Immunology* **11**, 727- 738.
- Lobb, C.J.& Clem, L.W., 1981a. Phylogeny of immunoglobulin in structure and function. X. Humoral immunoglobulins of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*. *Developmental and Comparative Immunology* **5**, 271-282.
- Lobb, C.J.& Clem, L.W., 1981b. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. XI. Secretory immunoglobulins in the cutaneous mucus of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*. *Developmental and Comparative Immunology* **5**, 587-596.
- Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Rasmussen, J.S., Kjaer, T.E., Collet, B., Secombes, C.J., Lorenzen, N., 2009. The proective mechanisms induced by a fish rhabdov- irus DNA vaccine depend on temperature. *Vaccine* **27**, 3870–3880.
- Lumsden, J.S., Ostland, V.E., MacPhee, D.D., Ferguson, H.W., 1995. Production of gill- associated and serum antibody by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immersion immunization with acetone killed *Flavobacterium branchophilium* and the relationship to protection from experimental challenge. *Fish and Shellfish Immunology* **5**, 151-165.
- Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (Overview). *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 137-151.
- Maki, J.L.& Dickerson, H.W., 2003. Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **10**, 876-881.
- Maloy, K.J.& Powrie, F., 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunology* **2**, 816-822.
- Maloy, K.J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N.J., Powrie, F., 2003. CD4(+)CD25(+) T-R cells suppress innate immune pathology through cytokine- dependent mechanisms. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 111-119.
- Manera, M.& Dezfuli, B.S., 2004. Rodlet cells in teleosts: a new insight into their nature and functions. *J. Fish Biol.* **65** **3**, 597–619.
- Mansour, A.T., Goda, A.A., Omar, E.A., Khalil, H.S., Esteban, M.A., 2017. Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, *Argyrosomus regius*, juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* **68**, 516-524.

- Mansour, A.T., Miao, L., Espinosa, C., Garcia-Beltran, J.M., Francisco, D.C.C., Esteban, M.A., 2018. Effects of dietary inclusion of *Moringa oleifera* leaves on growth and some systemic and mucosal immune parameters of seabream *Fish Physiol Biochem* **44**, 1223–1240.
- Martin, F. & Kearney, J.F., 2000. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a 'natural immune memory'. *Immunological Reviews* **175**, 70-79.
- Matsunaga, T. & Rahman, A., 1998. What brought the adaptive immune response to vertebrates? The jaw hypothesis and the seahorse. *Immunological Reviews* **166**, 177-186.
- Mattey, D.L., Morgan, M., Wright, D.E., 1979. Distribution and development of rodlet cells in the gills and pseudobranch of the bass *Dicentrarchus labrax*. *J. Fish Biol* **15**, 363-370.
- Mayberry, L.F., Marchiondo, A.A., Ubelaker, J.E., Kazic, D., 1979. *Rhabdospora thelohani* Laguesse, 1895 (Apicomplexa): new host and geographic records with taxonomic consideration. *J. Protozool.* **26**, 168-178.
- McClure, S.J., 2008. How minerals may influence the development and expression of immunity to endoparasites in livestock. *Parasite Immunology* **30**, 89–100.
- McMillan, D.N. & Secombes, C.J., 1997. Isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and measurement of their cytotoxic activity. *Fish and Shellfish Immunology* **7**, 527-541.
- Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **1**, 135-145.
- Miandare, H.K., Farvadin, S., Shabani, A., Hoseinifar, S.H., Ramezani, S.S., 2016. The effects of galactooligosaccharide on systemic and mucosal immune response, growth performance and appetite related gene transcript in goldfish (*Carassius auratus gibelio*) *Fish & Shellfish Immunology* **55**, 479-483
- Miller, J. & Morahan, G., 1992. Peripheral T-cell tolerance. *Annual Review of Immunology* **10**, 51-69.
- Miller, J.K., Campbell, M.H., Motjope, L., Cunningham, P.E., 1997. Effectiveness of vitamin E and zinc as antioxidants for periparturient cows fed excess iron. *Zinpro Final Report*.
- Miller, J.K., Ramsey, N., Madsen, F.C., 1988. The trace minerals, in: Church, D.C. (Ed.), *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ., pp. 342-400.
- Miller, N., Wilson, M., Bengten, E., Stuge, T., Warr, G., Clem, W., 1998. Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunological Reviews* **166**, 187- 197.
- Mirghaed, A.T., Yarahmadi, P., Hoseinifar, S.H., Tahmasebi, D., Gheisvandi, N., Ghaedi, A.A., 2018. The effects singular or combined administration of fermentable fiber and probiotic on mucosal immune parameters, digestive enzyme activity, gut microbiota and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fingerlings. *Fish Shellfish Immunol.* **77**, 194–199.
- Mittal, A.K. & Garg, T.K., 1994. Effect of an anionic detergent\_sodium dodecyl sulphate exposure on club cells in the epidermis of *Clarias batrachus*. *J. Fish Biol.* **44**, 857-875.

- Mittal, A.K., Whitear, M., Bullock, A.M., 1980. Sacciform cells in teleost fish. *Z.Mikrosk. Anat. Forsch. (Leipz.)* **95**, 559-585.
- Mohammadi-Sarpiri, K., Soofiani, N.M., Ebrahimi, E., Keivany, Y., Malekpouri, P., 2016. Hematological changes following copper and zinc manipulations in the common carp (*Cyprinus carpio*) diet *Iran. J. Ichthyol.* **3**, 130–139
- Moore, J.D., Ootake, M., Nakanishi, T., 1998. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gills. *Fish Shellfish Immunol.* **8**, 393-407.
- Morrison, C.M. & Odense, P.H., 1978. Distribution and Morphology of the Rodlet Cell in Fish. *J. Fish. Res. Board Can.* **35**, 101-116.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 2005. Pillars article: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* **175**, 5-14.
- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L., 1989. Th1-cell and Th2-cell - different patterns of lymphokine secretion lead to different functional-properties. *Annual Review of Immunology* **7**, 145-173.
- Mosmann, T.R. & Sad, S., 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* **17**, 138-146.
- Moynahan, E.J., 1981. Acrodermatitis enteropathica and the immunological role of zinc. *Immunodermatology* **30**, 437-447.
- Mulero, I., Sepulcre, P., Meseguer, J., Garcia-Ayala, A., V., M., 2007. Histamine is stored in mast cells of most evolutionary advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19434–19439.
- Murray, C.L. & Fletcher, T.C., 1976. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes Platessa* L.) tissues. *Journal of Fish Biology* **9**, 329-334.
- Murray, H.M., Leggiadro, C.T., Douglas, S.E., 2007. Immunocytochemical localization of pleurocidin to the cytoplasmic granules of eosinophilic granular cells from the winter flounder gill. *J. Fish Biol.* **70**, 336–345.
- Nagalakshmi, D., Sridhar, K., Parashuramulu, S., 2015. Replacement of inorganic zinc with lower levels of organic zinc (zinc nicotinate) on performance, hematological and serum biochemical constituents, antioxidants status, and immune responses in rats *Veterinary World, EISSN* **8**, 2231-0916
- Nakanishi, T., Kiryu, I., Ootake, M., 2002. Development of a new vaccine delivery method for fish: Percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine* **20**, 3764-3769.
- Nam, B., Byon, J., Kim, Y., Park, E., Cho, Y., Cheong, J., 2007. Molecular cloning and characterisation of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) interleukin-6 gene. *Fish and Shellfish Immunology* **23**, 231-236.

- Neuman, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 807-825.
- Neumann, N.F., Barreda, D., Belosevic, M., 2000. Generation and functional analysis of distinct macrophage sub-populations from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney leukocyte cultures. *Fish and Shellfish Immunology* **10**, 1-20.
- Nie, J., Dong, X., Tan, B., Chi, S., Yang, Q., Liu, H., Shuang, Z., 2014. Effects of dietary manganese sources and levels on growth performance, relative manganese bioavailability, antioxidant activities and tissue mineral content of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* L) *Aquaculture Research* **47**, 1–11
- Nikoskelainen, S., Bylund, G., Lilius, E.M., 2004. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Dev Comp Immunol* **28**, 581-592.
- O'Garra, A., 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* **8**, 275-283.
- O'Garra, A., 2000. T-cell differentiation: Commitment factors for T helper cells. *Current Biology* **10**, 492-494.
- Pan, L., Xie, S., Zhu, X., Lei, W., Han, D., Yang, Y., 2009. The effect of different dietary iron levels on growth and hepatic iron concentration in juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *J. Appl. Ichthyol.* **25**, 428–431.
- Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., Hancock, R.E., 2002. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 605-614.
- Peleteiro, M.C.& Richards, R.H., 1988. Immunocytochemical studies on immunoglobulin-containing cells in the epidermis of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson: influence of bath vaccination. *J. Fish Biol.* **32**, 845-858.
- Peleteiro, M.C.& Richards, R.H., 1990. Phagocytic cells in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Dis.* **13**, 225-232.
- Pfeiffer, W., 1977. The Distribution of Fright Reaction and Alarm Substance Cells in Fishes. *Copeia* **4**, 653-655.
- Pfeiffer, W., 1982. Chemical signals in communication, in: Hara, T.J. (Ed.), *Chemoreception in Fishes*. Elsevier, Amsterdam, pp. 307-325.
- Phromsuthirak, P., 1977. Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. *J. Fish Biol.* **11**, 193-206.
- Picchiatti, S., Terribili, L., Mastrolia, G., Abelli, L., 1997. Expression of lymphocyte antigenic determinants in developing gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Anatomy and Embryology* **196**, 177-186.
- Powell, M.D., Wright, G.M., Burka, J.F., 1991. Eosinophilic granule cells in the gills of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Evidence for migration? *Journal of Fish Biology* **37**, 495-497.

- Prabhu, P.A.J., 2015. Minerals in fish: does the source matter? PhD thesis.
- Prabhu, P.A.J., Geurden, I., Fontagne-Dicharry, S., Veron, V., Larroquet, L., Mariojouis, C., Schrama, J.W., Kaushik, S.J., 2016. Responses in Micro-Mineral Metabolism in Rainbow Trout to Change in Dietary Ingredient Composition and Inclusion of a Micro-Mineral Premix *PLoS ONE* **11**.
- Prabhu, P.A.J., Schrama, J.W., Kaushik, S.J., 2014a. Mineral requirements of fish: a systematic review *Reviews in Aquaculture* **6**, 1–48
- Prabhu, P.A.J., Schrama, J.W., Mariojouis, C., Godin, S., Fontagne-Dicharry, S., Geurden, I., Surget, A., Bouyssiere, B., Kaushik, S.J., 2014b. Post-prandial changes in plasma mineral levels in rainbow trout fed a complete plant ingredient based diet and the effect of supplemental di-calcium phosphate *Aquaculture* **430**, 34–43
- Press, C.M.& Evensen, O., 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology* **9**, 309-318.
- Qiao, Y.G., Tan, B.P., Mai, K.S., Ai, Q.H., Zhang, W.B., Xu, W., 2013. Evaluation of iron methionine and iron sulphate as dietary iron sources for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture Nutrition* **19**, 721–730.
- Raida, M.K.& Buchmann, K., 2007. Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Dis. Aquat. Organ.* **77**, 41–52.
- Raida, M.K.& Buchmann, K., 2009. Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri*. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 35-45.
- Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S., 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters* **148**, 23–33.
- Read, S., Malmstrom, V., Powrie, F., 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 295-302.
- Regnault, A., Cumano, A., Vassalli, P., Guy-Grand, D., Kourilsky, P., 1994. Oligoclonal repertoire of the CD8 aa and the CD8 ab TCR-ab murine intestinal intraepithelial T lymphocytes: Evidence for the random emergence of T cells. *Journal of Experimental Medicine* **180**, 1345-1358.
- Reite, O.B., 1997. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish Shellfish Immunol.* **7**, 567-584.
- Reite, O.B., 2005. The rodlet cells of teleostan fish: their potential role in host defense in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. *Fish and Shellfish Immunology* **19**, 253-267.
- Reite, O.B.& Evensen, O., 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol.* **20**, 192-208.
- Rider, S.A.B., 2009. The roles of organic and inorganic zinc and selenium sources in the nutrition and promotion of health in rainbow trout { *Oncorhynchus mykiss*). *A thesis submitted to the University of Plymouth*.

- Rieger, A.M., Hall, B.E., Barreda, D.R., 2010. Macrophage activation differentially modulates particle binding, phagocytosis and downstream antimicrobial mechanisms. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 1144-1159.
- Rigos, G., Samartzis, A., Henry, M., Fountoulaki, E., Cotou, E., Sweetman, J., Davies, S., Nengas, I., 2010. Effects of additive iron on growth, tissue distribution, haematology and immunology of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquacult Int* **18**, 1093–1104.
- Roberts, R.J., 2012a. Anatomy and Physiology of Teleosts, in: Roberts , R.J. (Ed.), *Fish pathology*. Blackwell Publishing Ltd., UK, pp. 17-61.
- Roberts, R.J., 2012b. The Immunology of teleosts, in: Roberts , R.J. (Ed.), *Fish pathology*. Blackwell Publishing Ltd., UK, pp. 144-166.
- Rocha, N.& Neefjes, J., 2008. MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *EMBO J* **27**, 1–5.
- Rodrigues, P.N., Vazquez-Dorado, S., Neves, J.V., Wilson, J.M., 2006. Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 1156-1167.
- Romagnani, S., 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today*. **18**, 263-266.
- Romano, N., Baldassini, M., Buonocore, F., Picchiatti, S., Mastrolia, L., Abelli, L., 2005. In vivo allograft rejection in a bony fish *Dicentrarchus labrax* (L.): characterisation of effector lymphocytes. *Cell and Tissue Res.* **321**, 353–363.
- Rombout, J.H.W.M., Abelli, L., Picchiatti, S., Scapigliati, G., Kiron, V., 2011. Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology* **31**, 616-626.
- Rombout, J.H.W.M., Jang, G., Kiron, V., 2014. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* **40**, 634-643.
- Rombout, J.H.W.M., Joosten, P.H.M., Engelsma, M.Y., Vos, A.P., Taverne, N., Taverne-Thiele, J.J., 1998. Indications for a distinct putative T cell population in mucosal tissue of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology* **22**, 63-77.
- Rombout, J.H.W.M., Taverne-Thiele, A.J., Villena, M., 1993. The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): An immunocytochemical analysis. *Developmental and Comparative Immunology* **17**, 55-66.
- Rombout, J.H.W.M.& van den Berg, A.A., 1989. Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *Journal of Fish Biology* **35**, 13-22.
- Rombout, J.H.W.M., van den Berg, A.A., van den Berg, C.T.G.A., Witte, P., Egberts, E., 1989. Immunological importance of the second gut segment of carp III. Systemic and/or mucosal immune responses after immunization with soluble or particulate antigen. *Journal of Fish Biology* **35**, 179-189.
- Rombout, J.H.W.M., van der Tuin, S.J.L., Yang, G., Schopman, N., Mroczek, A., Hermsen, T., Taverne-Thiele, J.J., 2008. Expression of the polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in mucosal tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunol.* **24**, 620–628.

- Rombout, J.W., Lamers, C.H., Helfrich, M.H., Dekker, A., Taverne-Thiele, J.J., 1985. Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp. *Cell and Tissue Research* **239**, 519-530.
- Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., Hoseinifar, S.H., 2014. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish Physiol Biochem* **40**, 1601–1607.
- Ross, G.D., 1989. Complement and complement receptors. *Current Opinion in Immunology* **2**, 50-62.
- Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burka, J.F., Johnson, S.C., 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Dis Aquat Org* **41**, 43-51.
- Rowley, A.F., Knight, J., Lloyd-Evans, P., Holland, J.W., Vickers, P.J., 1995. Eicosanoids and their role in immune modulation in fish – a brief overview. *Fish Shellfish Immunol.* **5**, 549–567.
- Roy, D., 1988. Statistical analysis of anionic detergent-induced changes in the goblet mucous cells of opercular epidermis and gill epithelium of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae: Pisces). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **15**, 260-271.
- Saffari, S., Keyvanshokoo, S., Zakeri, M., Johari, S.A., Pasha-Zanoosi, H., Mozanzadeh, M.T., 2018. Effects of dietary organic, inorganic, and nanoparticulate selenium sources on growth, hemato-immunological, and serum biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiol Biochem* **44**, 1087–1097.
- Salinas, I., 2015. The Mucosal Immune System of Teleost Fish. *Biology* **4**, 525-539.
- Salinas, I., Meseguer, J., Esteban, M.A., 2007. Assessment of different protocols for the isolation and purification of gut-associated lymphoid cells from the gilthead seabream (*Sparus aurata* L. *Biol. Proced. Online* **9**, 43-55.
- Sanchez, J.G., Speare, D.J., Sims, D.E., Johnson, G.J., 1998. Morphometric assessment of epidermal and mucous-biofilm changes caused by exposure of trout to chloramine-T or formalin treatment. *J. Comp. Pathol.* **118**, 81-87.
- Saunders, H.L. & Magor, B.G., 2004. Cloning and expression of the AID gene in the channel catfish. *Developmental and Comparative Immunology* **28**, 657-663.
- Saunders, H.L., Oko, A.L., Scott, A.N., Fan, C.W., Magor, B.G., 2010. The cellular context of AID expressing cells in fish lymphoid tissues. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 669–676.
- Secher, D.S., Milstein, C., Adetugbo, D.K., 1977. Somatic mutants and antibody diversity. *Immunological Reviews* **36**, 51-72.
- Secombes, C.J., 1987. Lymphokine-release from rainbow trout leucocytes stimulated with concanavalin A. Effects upon macrophage spreading and adherence. *Dev. Comp. Immunol.* **11**, 513-520.
- Secombes, C.J., 1996. The nonspecific immune system: cellular defences., in: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press, San Diego, pp. 63–103.



- Secombes, C.J., 2016. What's new in fish cytokine research? *Fish & Shellfish Immunology* **53**, 1-16.
- Secombes, C.J. & Manning, M.J., 1980. Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians. I. Antigen localization in the carp *Cyprinus carpio*. *J. Fish Dis.* **3**, 399- 412.
- Secombes, C.J., Zou, J., Bird, S., 2009. Fish cytokines: Discovery, activities and potential applications. *Fish defenses* **1**, 1-36.
- Serra, R., Isani, G., Cattani, O., Carpeni, E., 1996. Effects of Different Levels of Dietary Zinc on the Gilthead, *Sparus aurata* During the Growing Season. *Biological Trace Element Research* **51**, 107-116.
- Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltman, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., Staudt, L.M., 2002. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**, 51-62.
- Shamblott, M.J. & Litman, G.W., 1989a. Complete nucleotide sequence of primitive vertebrate immunoglobulin light chain genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 4684-4688.
- Shamblott, M.J. & Litman, G.W., 1989b. Genomic organization and sequences of immunoglobulin light chain genes in a primitive vertebrate suggest coevolution of immunoglobulin gene organization. *EMBO Journal* **8**, 3733-3739.
- Shapiro-Shelef, M. & Calame, K., 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nature Reviews Immunology* **5**, 230-242.
- Sharp, G.J.E., Pike, A.W., Secombes, C.J., 1991. Leucocyte migration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* [Walbaum]): Optimization of migration conditions and responses to host and pathogen (*Diphyllbothrium dendriticum* [Nitzsch]) derived chemoattractants. *Developmental and Comparative Immunology* **15**, 295-305.
- Sheikhzadeh, N., Pashaki, A.K., K., N., Heidarieh, M., Tayefi-Nasrabadi, H., 2012. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Fish & Shellfish Immunology* **32**, 407-410
- Sher, A. & Coffman, R.L., 1992. Regulation of immunity to parasites by T-cells and T-cell derived cytokines. *Annual Review of Immunology* **10**, 385-409.
- Shibasaki, Y., Toda, H., Kobayashi, I., Moritomo, T., Nakanishi, T., 2010. Kinetics of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subsets in graft-versus-host reaction (GVHR) in ginbuna crucian carp *Carassius auratus langsdorfii*. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 1075-1081.
- Shinde, P., Dass, R.S., Garg, A.K., Chaturvedi, V.K., Ripusudan, K., 2006. Effect of Zinc Supplementation from Different Sources on Growth, Nutrient Digestibility, Blood Metabolic Profile, and Immune Response of Male Guinea Pigs. *Biological Trace Element Research* **112**, 247-262.
- Shiomi, K., Takamiya, M., Yamanaka, H., Kikuchi, T., Suzuki, Y., 1988. Toxins in the skin secretion of the oriental catfish (*Plotosus lineatus*): immunological properties and immunocytochemical identification of producing cells. *Toxicon* **26**, 353-361.
- Silphaduang, U., Colorni, A., Noga, E.J., 2006. Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Diseases of Aquatic Organisms* **72**, 241- 252.

- Sinyakov, M.S., Dror, M., Zhevelev, H.M., Margel, S., Avtalion, R.R., 2002. Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen of fish. *Vaccine* **20**, 3668-3674.
- Smith, A.D., Panickar, K.S., Urban Jr., J.F., Dawson, H.D., 2018. Impact of Micronutrients on the Immune Response of Animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **6**, 227–254.
- Smith, A.M., Wivel, N.A., Potter, M., 1970. Plasmacytosis in the pronephros of the carp *Cyprinus carpio*. *Anat. Rec.* **167**, 351-370.
- Smith, R.J.F., 1977. Chemical Communication as Adaptation: Alarm Substance of Fish, in: Miller-Schwarz, D., Mozell, M.M. (Eds.), *Chemical Signals in Vertebrates*. Plenum Press, New York, pp. 303-320.
- Smith, R.J.F., 1982. The adaptive significance of the alarm substance-fright reaction system., in: Hara, T.J. (Ed.), *Chemoreception in Fishes*. Elsevier, Amsterdam, pp. 327-342.
- Smith, R.J.F., 1986. The Evolution of Chemical Alarm Signals in Fishes, in: Duvall, D., Miller-Schwarz, D., Silverstein, R.M. (Eds.), *Chemical Signals in Vertebrates*. Plenum Press, New York, pp. 99-115.
- Smith, R.J.F., 1992. Alarm signals in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* **2**, 33-63.
- Smith, S.A., Caceci, H., Marei, E.S., El-Haback, H.A., 1995. Observations on rodlet cells found in the vascular system and extravascular space of angelfish (*Pterophyllum scalare scalare*). *J. Fish Biol.* **46**, 241-254.
- Smith, V.J., Fernandes, J.M., Jones, S.J., Kemp, G.D., Tatner, M.F., 2000. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology* **10**, 243-260.
- Somamoto, T., Okamoto, N., Nakanishi, T., Ototake, M., Nakao, M., 2009. In vitro generation of viral-antigen dependent cytotoxic T-cells from ginbuna crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Virology* **389**, 26–33.
- Song, Z., Jiang, W., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., 2017. Dietary zinc deficiency reduced growth performance, intestinal immune and physical barrier functions related to NF- $\kappa$ B, TOR, Nrf2, JNK and MLCK signaling pathway of young grass carp (*Ctenopharyngo donidella*) *Fish & Shellfish Immunology* **66**, 497-523
- Spallholz, J.E.& Stewart, J.R., 1989. Advances in the role of minerals in immunobiology. *Biological Trace Element Research* **19**, 129-151.
- St. Louis-Cormier, E.A., Osterland, C.K., Anderson, P.D., 1984. Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Developmental and Comparative Immunology* **8**, 71-80.
- Stafford, J.L., Bengten, E., Warr, G.W., Miller, N.W., Wilson, M., 2006. Channel catfish *Ictalurus punctatus* granulocytes bind IgD. *10th Congress of ISDCI*.
- Stafford, J.L., Neumann, N.F., Belosevic, M., 2001. Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 101-115.

- Stenvik, J., Schroder, M.B., Olsen, K., Zapata, A., Jorgensen, T.O., 2001. Expression of immunoglobulin heavy chain transcripts (VH-families, IgM, and IgD) in head kidney and spleen of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 291-302.
- Sunyer, J.O. & Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **45**, 333-345.
- Sveinbjornsson, B., Olsen, R., Paulsen, S., 1996. Immunocytochemical localization of lysozyme in eosinophilic granular cells (EGC) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **19**, 349-355.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., Glimcher, L.H., 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual Review of Immunology* **21**, 713-758.
- Sze, D.M.-Y., Toellner, K.-M., de Vinuesa, C.G., Taylor, D.R., MacLennan, I.C.M., 2000. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 813-822.
- Takahashi, L.S., Biller-Takahashi, J.D., Mansano, C.F.M., Urbinati, E.C., Gimbo, R.Y., Saita, M.V., 2017. Long-term organic selenium supplementation overcomes the tradeoff between immune and antioxidant systems in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish & Shellfish Immunology* **60**, 311-317.
- Tan, X., Xie, P., Luo, Z., Lin, H., Zhao, Y., Xi, W., 2012. Dietary manganese requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, and effects on whole body mineral composition and hepatic intermediary metabolism. *Aquaculture* **326–329**, 68–73.
- Tang, R., Feng, L., Jiang, W., Liu, Y., Kuang, S., Jiang, J., Zhang, Y., Tang, L., Zhou, X., 2014. Growth, digestive and absorptive abilities and antioxidative capacity in the hepatopancreas and intestine of young grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* Val.) fed graded levels of dietary manganese *Aquaculture Research* **47**, 1–15
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Dhanasiri, A.K., Sweetman, J., Izquierdo, M., 2012. Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.) fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. *J. Fish. Dis.* **35**, 591-602.
- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J., Izquierdo, M., 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannanoligosaccharides (MOS). *Aquacult. Nutr.* **17**, 223-233.
- Torrecillas, S., Montero, D., Caballero, M.J., Pittman, K.A., Custodio, M., Campo, A., Sweetman, J., Izquierdo, M., 2015. Dietary mannan oligosaccharides: counteracting the side effects of soybean meal oil inclusion on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gut health and skin mucosa mucus production? . *Front. Immunol.* **6**, 397.
- Valero, Y., Cortes, J., Mercado, L., 2019. NK-lysin from skin-secreted mucus of Atlantic salmon and its potential role in bacteriostatic activity. *Fish and Shellfish Immunology* **87**, 410–413.
- Vallejo Jr, A.N. & Ellis, A.E., 1989. Ultrastructural study of the response of eosinophilic granule cells to *Aeromonas salmonicida* extracellular products and histamine liberators in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Developmental and Comparative Immunology* **13**, 133-148.

- Vallejos-Vidal, E., Reyes-Lopez, F., Teles, M., MacKenzie, S., 2016. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish and Shellfish Immunology* **56**, 34-69.
- Vectesi, D., Kotzamanis, I., Henry, M.A., Vatsos, I.N., 2011. Haematological and immunological responses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to a short-term exposure to increased water levels of nitrate. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **11**, 430-439.
- Volpatti, D., Chiara, B., Francesca, T., Marco, G., 2012. Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella (Vibrio) anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol of supplemented diets. *Aquaculture Research* **45**, 1-14.
- Warr, G.W., DeLuca, D., Marchalonis, J.J., 1976. Phylogenetic origins of immune recognition: Lymphocyte surface immunoglobulins in the goldfish, *Carassius auratus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 2476-2480.
- Wehrli, N., Legler, D.F., Finke, D., Toellner, K.M., Loetscher, P., Baggiolini, M., MacLennan, I.C., Acha-Orbea, H., 2001. Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes. *European Journal of Immunology* **31**, 609-616.
- Weis, W.I., Taylor, M.E., Drickamer, K., 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev.* **163**, 19-34.
- Wilson, B., 2017. MHC and adaptive immunity in teleost fishes. *Immunogenetics* **69**, 521-528.
- Wilson, M., Bengten, E., Miller, N.W., Clem, L.W., Du Pasquier, L., Warr, G.W., 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4593-4597.
- Wilson, M., Hsu, E., Marcuz, A., Courtet, M., Du Pasquier, L., Steinberg, C., 1992. What limits affinity maturation of antibodies in *Xenopus*—the rate of somatic mutation or the ability to select mutants? *EMBO Journal* **11**, 4337-4347.
- Wilson, M. & Warr, G., 1992. Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Diseases* **2**, 201-221.
- Wright, S.D., 1995. CD14 and innate recognition of bacteria. *Journal of Immunology* **155**, 6-8.
- Wright, S.D., Rao, P.E., Van Voorhis, W.C., Craigmyle, L.S., Iida, K., Talle, M.A., Westberg, E.F., Goldstein, G., Silvertstein, S.C., 1983. Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 5699-5703.
- Xie, H.X., Nie, P., Zhang, Y.A., Sun, B.J., Sun, J., Yao, W.J., Gao, Q., 2006. Histological and cytological studies on the developing thymus of mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Perciformes: Teleostei). *J. Appl. Ichthyology* **22**, 125–131.
- Yan, J., Guo, C., Dawood, M.A.O., Gao, J., 2017. Effects of dietary chitosan on growth, lipid metabolism, immune response and antioxidant-related gene expression in *Misgurnus anguillicaudatus*. *Beneficial Microbes* **8**, 439-449.
- Yang, F., Waldbieser, G.C., Lobb, C.J., 2006. The nucleotide targets of somatic mutation and the role of selection in immunoglobulin heavy chains of a teleost fish. *Journal of Immunology* **176**, 1655-1667.

- Yasutake, W.T. & Wales, J.H., 1983. *Microscopic Anatomy of Salmonids: An Atlas*. United States Department of the Interior Washington, D.C.
- Ye, C.X., Liu, Y.J., Mai, K.S., Tian, L.X., Yang, H.J., Niu, J., Huang, J.W., 2007. Effect of dietary iron supplement on growth, haematology and microelements of juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture Nutrition* **13**, 471–477.
- Ye, J., Kaattari, I.M., Ma, C., Kaattari, S., 2013. The teleost humoral immune response. *Fish & Shellfish Immunology* **35**, 1719–1728.
- Yoder, J.A., 2009. Form, function and phylogenetics of NITRs in bony fish. *Dev. Comp. Immunol.* **33**, 135–144.
- Yousif, A.N., Albright, L.J., Evelyn, T.P.T., 1994. In vitro evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.* **19**, 15–19.
- Zaccone, G., Kapoor, B.G., Fasulo, S., Ainis, L., 2001. Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes., in: Southward, A.J.H., Tyler, P.A., Young, C.M., Fuiman, L.A. (Eds.), *Advances in Marine Biology*. Academic Press, London, pp. 255–347.
- Zapata, A., 1979. Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* **3**, 55–65.
- Zapata, A., 1981. Lymphoid organs of teleost fish. II. Ultra-structure of renal lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev. Comp. Immunol.* **5**, 685–690.
- Zapata, A.G. & Cooper, E.L., 1990. *The Immune System: Comparative Histophysiology*. John Wiley and Sons, Chichester.
- Zaslloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature (London)* **415**, 389–395.
- Zhang, L., Feng, L., Jiang, W.D., Liu, Y., Jiang, J., Li, S.H., Tang, L., Kuang, S.Y., Zhou, X.Q., 2015. The impaired flesh quality by iron deficiency and excess is associated with increasing oxidative damage and decreasing antioxidant capacity in the muscle of young grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture Nutrition* **22**, 191–201.
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S.E., Bartholomew, J., Sunyer, J.O., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology* **11**, 827–835.
- Zhao, X., Findly, R.C., Dickerson, H.W., 2008. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology* **32**, 500–508.
- Zhu, L.-y., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L.-y., Shao, J.-z., 2013. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental and Comparative Immunology* **39**, 39–62.
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E., Kaattari, S., 2005. B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *Journal of Immunology* **174**, 6608–6616.