

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΟΞΕΟΣ STRESS ΣΤΑ
ΠΕΠΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ
ΔΟΝΤΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

Συμβουλευτική επιτροπή :

Καρακατσούλη Ν. Επ. Καθηγήτρια

Παπουτσόγλου Σ.Ε. Καθηγητής

Μουντζούρης Κ. Επ. Καθηγητής

Αθήνα, Νοέμβριος 2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΟΞΕΟΣ STRESS ΣΤΑ
ΠΕΠΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ
ΔΟΝΤΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

Εξεταστική επιτροπή :

Καρακατσούλη Ν. Επ. Καθηγήτρια

Μήλιου Ε. Επ. Καθηγήτρια

Μουντζούρης Κ. Επ. Καθηγητής

Παπουτσόγλου Σ.Ε. Καθηγητής

Χαδιώ Σ. Αν. Καθηγήτρια

Αθήνα, Νοέμβριος 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπων που με διαφορετικούς τρόπους συνέβαλαν στη δημιουργία της:

1. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή μου κ. Σωφρόνιο Παπουτσόγλου για την εμπιστοσύνη, τη στήριξη στο πρόσωπό μου και την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ σε αυτό το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.
2. Ευχαριστώ πολύ την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ναυσικά Καρακατσούλη, για την υπομονή της, τις ακούραστες συμβουλές και τη γενικότερη υποστήριξη στην εκπόνηση αυτής της εργασίας.
3. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ελένη Μήλιου για την ζεστασιά της και τις συμβουλές της στην βελτίωση της τελικής μορφής αυτής της εργασίας.
4. Ευχαριστώ πολύ τον Λέκτορα κ. Ευστράτιο Παπουτσόγλου για τη συμβολή του στην κατανόηση και την εκπόνηση του πειραματικού μέρους αυτής της μελέτης.
5. Ευχαριστώ πολύ τους δυο τεχνικούς του εργαστηρίου κ. Βρεττό Ξενοφώντα και κ. Κωνσταντίνου Γεώργιο με τους οποίους η συνεργασία και η καθημερινή προσωπική επικοινωνία αποτέλεσαν σημαντικό παράγοντα επιτυχίας και καλής διάθεσης σε όλο το χρονικό διάστημα φοίτησης μου.
6. Ευχαριστώ πολύ τους φοιτητές Φανουράκη Στέλλιο, Καπέλο Κωνσταντίνο, Λουκά Χριστίνα, Joanna Wyruch και τον Ανδρέα Μπρέζα για τη στήριξη και τη βοήθεια τους στη διάρκεια των αναλύσεων του πειράματος.

7. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην αδερφούλα μου, Ελευθερία για την αμέριστη και ανιδιοτελής αγάπη στο πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

8. Κυρίως όμως οφείλω ένα ακόμα μεγαλύτερο ευχαριστώ στη μητέρα μου που στην πιο δύσκολη ίσως περίοδο της οικογένειάς μας αποτέλεσε το μεγάλο στήριγμα σε αυτή την προσπάθειά μου εξασφαλίζοντας μου ηρεμία, τόνωση της αυτοπεποίθησής μου και πίστη στις δυνατότητές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A/A	Τίτλος	Σελίδα
•	Ευχαριστίες	I, II
•	Περιεχόμενα	III
1.A	Περίληψη	IV-V
B	Abstract	V-VI
2	Εισαγωγή	1-17
2.1	Γενικά περί της ιριδίζουσας πέστροφας	1-2
2.2	Γενικά περί stress: Ορισμός-Φάσεις-Διαχωρισμός	2-3
2.3	Αναφορά σε περιπτώσεις χρόνιου stress	3-4
2.4	Η επίδραση του οξέος stress σε διάφορα είδη ιχθύων με έμφαση στον συνωστισμό (confinement)	4-6
2.5	Δυνατότητα επαναφοράς ιχθύων γλυκού και θαλασσινού νερού από τις επιπτώσεις του stress	6-11
2.6	Πεπτικός σωλήνας, πέψη και πεπτικά ένζυμα ιριδίζουσας πέστροφας	12-14
2.7	Προσδιορισμός πεπτικών ενζύμων διαφόρων ιχθύων	14-16
2.8	Σκοπός της εργασίας	16-17
3	Υλικά και μέθοδοι	18-25
3.1	Διατήρηση ψαριών πειράματος πριν το stress και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού πριν τη δειγματοληψία	18-20
3.2	Θανάτωση, αιμοληψία και προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης, κορτιζόλης	20
3.3	Προσδιορισμός πεπτικών ενζύμων	21-25
3.3.1	Ομογενοποίηση-Φυγοκέντρωση	21
3.3.2	Προσδιορισμός πρωτεασών	21-24
3.3.3	Προσδιορισμός καρβοϋδρασών	24-25
4	Στατιστική επεξεργασία	26
5	Αποτελέσματα πειράματος	26-44
6	Συζήτηση	45-52
7	Βιβλιογραφία	53-56

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΟΞΕΟΣ STRESS ΣΤΑ ΠΕΠΤΙΚΑ ENZYMATA ΤΗΣ ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑΣ ΠΕΣΤΡΟΦΑΣ

ΔΟΝΤΑΣ ΣΠΥΡΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ, ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ, Ιερά Οδός 75, ΤΚ 11855, Αθήνα, Ελλάδα

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Ναυσικά Καρακατσούλη nafsika@aia.gr

1.Α ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της πειραματικής αυτής μελέτης ήταν η εκτίμηση της επίδρασης οξέος stress (αυξημένη πυκνότητα εκτροφής μέσω της μείωσης του όγκου του νερού) στα πεπτικά ένζυμα της ιριδίζουσας πέστροφας, *Oncorhynchus mykiss*. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε τις εξής επεμβάσεις: 1) οξύ stress για μία ώρα, 2) οξύ stress για δύο ώρες, 3) οξύ stress για μία ώρα και επαναφορά φυσιολογικών συνθηκών για μία ώρα, 4) οξύ stress για δύο ώρες και επαναφορά φυσιολογικών συνθηκών για μία ώρα, 5) οξύ stress για μία ώρα και επαναφορά φυσιολογικών συνθηκών για τρεις ώρες, 6) οξύ stress για δύο ώρες και επαναφορά φυσιολογικών συνθηκών για τρεις ώρες, 7) οξύ stress για μία ώρα και επαναφορά φυσιολογικών συνθηκών για έξι ώρες, 8) οξύ stress για δύο ώρες και επαναφορά φυσιολογικών συνθηκών για έξι ώρες, 9) μάρτυρες. Η αντίδραση στο stress εκτιμήθηκε με μέτρηση της κορτιζόλης και της γλυκόζης του πλάσματος, ενώ έγινε εκτίμηση και των επιπέδων πεπτικών ενζύμων (καρβοϋδράσες χρησιμοποιώντας υπόστρωμα αμύλου σε τιμή του pH=7.6 και ολικές πρωτεάσες σε εύρος τιμών του pH=1.5-10.0 χρησιμοποιώντας υπόστρωμα καζεΐνης).

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση (πότε αύξηση και πότε μείωση) στις παραμέτρους των πεπτικών ενζύμων στις 2 περιπτώσεις εφαρμοζόμενου οξέος stress (1 ή 2 ώρες), οι οποίες συχνά επανερχόταν στα αρχικά επίπεδα του μάρτυρα, ανάλογα με την χρονική διάρκεια επαναφοράς των αρχικών συνθηκών εκτροφής για 1, 3 και 6 ώρες μετά την εφαρμογή του stress.

Τα επίπεδα κορτιζόλης παρουσίασαν μία στατιστικά σημαντική αύξηση κατά την εφαρμογή του οξέος stress 1 ώρας και μία μικρότερη αύξηση κατά την αντίστοιχη εφαρμογή των 2 ωρών. Επαναφορά των επιπέδων κορτιζόλης στα προ-stress επίπεδα επιτεύχθηκε 6 ώρες μετά από οξύ stress 1 ώρας και 1 ώρα μετά από οξύ stress 2 ωρών.

Αντίθετα τα επίπεδα γλυκόζης, είτε δεν διαφοροποιήθηκαν καθόλου σε σχέση με τα προ-stress επίπεδα (οξύ stress 2 ωρών), είτε η παρατηρούμενη αύξησή τους (οξύ stress 1 ώρας) οδήγησε στην επαναφορά τους στα προ-stress επίπεδα 6 ώρες μετά.

Τα συμπεράσματα του παρόντος πειράματος ήταν η διαπίστωση της διαφοροποίησης τόσο της ενεργότητας όσο και της πεπτικής ικανότητας των πεπτικών ενζύμων των δύο μελετηθέντων κατηγοριών (πρωτεάσες και καρβοϋδράσες) μετά την εφαρμογή του συνωστισμού στις

πειραματικές ομάδες, καθώς και η μη επαναφορά στα προ-stress επίπεδα στους χρόνους που εξετάστηκαν. Το παρόν πείραμα σε συνδυασμό με άλλα που θεωρείται σκόπιμο να πραγματοποιηθούν στο μέλλον, μπορούν να οδηγήσουν σε χρήσιμα συμπεράσματα για την εκτίμηση τόσο του χρόνου επαναφοράς των πεπτικών ενζύμων στα προ-stress επίπεδα μετά από οξύ συνωστισμό, όσο και του χρόνου παροχής τροφής σε άτομα ιριδίζουσας πέστροφας μετά από κάποιον χειρισμό εκτροφής.

Λέξεις-κλειδιά: οξύ stress, ιριδίζουσα πέστροφα, συνωστισμός, επαναφορά, κορτιζόλη, γλυκόζη, πεπτικά ένζυμα, πρωτεάσες, καρβοϋδράσες.

INVESTIGATION ON THE EFFECT OF ACUTE STRESS ON DIGESTIVE ENZYMES OF RAINBOW TROUT, *Oncorhynchus mykiss*

DONTAS SPYRIDON

***FACULTY OF ANIMAL SCIENCE AND AQUACULTURE, AGRICULTURAL UNIVERSITY
OF ATHENS, IERA ODOS 75, Postal Code 11855, Athens, Greece***

DEPARTMENT OF APPLIED HYDROBIOLOGY

PROFESSOR: Nafsika Karakatsouli email: nafsika@aua.gr

1.B ABSTRACT

The main purpose of this experimental study was the evaluation of the influence of acute stress (increased density by means of reduced water volume) on the digestive enzymes levels of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. The experimental plan included the following interventions: 1) one hour acute stress, 2) two hours acute stress, 3) one hour acute stress and one hour recovery to the pro-stress conditions, 4) two hours acute stress and one hour recovery to the pro-stress conditions, 5) one hour acute stress and three hours recovery to the pro-stress conditions, 6) two hours acute stress and three hours recovery to the pro-stress conditions, 7) one hour acute stress and six hours recovery to the pro-stress conditions, 8) two hours acute stress and six hours recovery to the pro-stress conditions, 9) no-stress. The response to stress was estimated by plasma cortisol and glucose and the digestive enzymes (carbohydrases using starch as substrate at pH=7.6 and total protease at pH range 1.5-10.0 using casein as substrate) were assayed.

The results showed, a differentiation was shown in the digestive enzymes parameters according to the two cases of the applied acute stress (1 or 2 hours), parameters that frequently returned to the initial levels, according to the recovery period of the initial rearing condition for 1, 3 or 6 hours after the stress application.

Cortisol levels presented a clear significant increase during the application of the stress factor for 1 hour and a less clear differentiation for 2 hours of stress. Recovery to pro-stress

levels was managed 6 hours after the 1 hour acute stress application and 1 hour after the 2 hours acute stress application.

In contrast to cortisol levels, glucose levels, showed either no differentiation to the pro-stress levels (2 hours of acute stress), or the observed increase (1 hour of acute stress) led to a recovery to pro-stress levels after 6 hours.

The conclusions of the present experiment were the differentiation in the activity and capacity of digestive enzymes (increase or decrease) from the two studied categories (proteases and carbohydrases) after the application of confinement in the experimental groups and the lack of recovery to pro-stress levels in the examined times. The present experiment in combination with others that must be performed in the future, can lead to useful conclusions for the estimation of the digestive enzymes recovery time to the pro-stress levels after an acute stress confinement and subsequently the food supplementation time in rainbow trout individuals after handling.

Key Words: Acute stress, rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, confinement, recovery, cortisol, glucose, digestive enzymes, proteases, carbohydrases.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Γενικά περί της ιριδίζουσας πέστροφας

ΟΜΟΤΑΞΙΑ: *Osteichthyes* **ΥΦΟΜΟΤΑΞΙΑ:** *Actinopterygii* **ΤΑΞΗ:** *Clupeiformes*
ΥΠΟΤΑΞΗ: *Salmonidae* **ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ:** *Salmonidae* **ΓΕΝΟΣ:** *Oncorhynchus* **ΕΙΔΟΣ:**
mykiss

Η ιριδίζουσα πέστροφα (εικόνα 1) είναι είδος των γλυκών νερών με αρκετά ικανοποιητικού επιπέδου προσαρμοστικότητα σε υφάλμυρα-θαλάσσια νερά, όταν το σωματικό της βάρος είναι περίπου 100 g (Παπουτσόγλου, 2008).

Το σώμα της ιριδίζουσας πέστροφας είναι επίμηκες και καλύπτεται με αρκετή βλέννη. Από τα δύο ραχιαία πτερύγια, το πρώτο στηρίζεται πάνω σε οστεώδεις ακτίνες, ενώ το δεύτερο (το λιπώδες) είναι μικρότερο χωρίς ακτίνες και με αμφίβολο λειτουργικό ρόλο. Διαφέρει από την πέστροφα των ρευμάτων (*Salmo trutta fario*) από την ύπαρξη μίας πορφυροϊώδους λωρίδας πλάτους 3-4 εκ., η οποία εκτείνεται σε όλο το μήκος των πλευρών του σώματός της, από την ύπαρξη μαύρων κηλίδων στο ουραίο πτερύγιο, το οποίο καταλήγει σε κοίλη γραμμή, από την έλλειψη των κόκκινων κηλίδων στο σώμα της, από την έλλειψη του πορτοκαλί χρώματος στο άκρο του λιπώδους πτερυγίου και το μεγάλο αριθμό μαύρων κηλίδων στο κεφάλι (Παπαγεωργίου, 1989).

Το μήκος του σώματος της ιριδίζουσας πέστροφας μπορεί να φτάσει τα 70 εκ. και το βάρος αυτής τα 5-6 Kg. Η περίοδος αναπαραγωγής της εκτείνεται από το Νοέμβριο ως τα μέσα Φεβρουαρίου με τον αριθμό των αυγών να ποικίλει από 1500 έως 3000 ανά Kg βάρους ψαριού και τη γενετική ωρίμανση να επέρχεται στην ηλικία των 2-3 χρόνων (Παπαγεωργίου, 1989).

Οι λόγοι για τους οποίους η εκτροφή της πέστροφας έχει διαδοθεί και ενδείκνυται σε σχεδόν όλα τα μέρη του κόσμου είναι:

1. Η μεγάλη προσαρμοστικότητά της στην οικόσιτη ανάπτυξή της
2. Η δυνατότητα διατροφής της με τεχνητό σιτηρέσιο
3. Η αντοχή της σε πολλές ασθένειες
4. Η ταχεία ανάπτυξή της
5. Η εύκολη τεχνητή αναπαραγωγή της και
6. Η μεγάλη και διεθνής εμπορική της αξία

Η εκτροφή της πέστροφας μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χρήση τεχνητών υδατοσυλλογών, είτε με τη χρήση δεξαμενών με συνεχή ροή νερού (κατά προτίμηση

μακρόστενων) ή ακόμα και με τη χρήση πλωτών κλωβών (Παπουτσόγλου, 1994). Η μέγιστη ανάπτυξη της παρατηρείται σε θερμοκρασιακό εύρος 15-17°C, με περιεκτικότητα των νερών σε οξυγόνο όχι μικρότερη από 7-8 ppm, διοξείδιο του άνθρακα μικρότερη από 2 ppm, ολικής σκληρότητας (κυρίως Ca και Mg) 200 ppm και τιμής του pH 7,1-7,5 (Παπουτσόγλου, 2008).

Η πέστροφα είναι είδος σαρκοφάγο και τρέφεται αποκλειστικά με υδρόβια είδη όπως καρκινοειδή, μαλάκια, οστρακόδερμα και άλλα μικρά ψάρια άλλων ειδών ή ακόμα και του ίδιου είδους (Παπαγεωργίου, 1989). Ωστόσο φαίνεται πως έχει τη δυνατότητα επιβίωσης διατρεφόμενη με σαφώς μειωμένα ποσοστά τροφής ζωικής προέλευσης, ή ακόμη με μόνο φυτικής προέλευσης τροφή (Παπουτσόγλου, 2008).



EIKONA 1: Εξωτερική εμφάνιση της ιριδίζουσας πέστροφας (www.cyprusffa.com/freshwater_fish_of_cyprus.htm, 2005)

2.2 Γενικά περί stress: Ορισμός- Φάσεις- Διαχωρισμός

Ο όρος stress προέρχεται από την επιστήμη της Φυσικής και χαρακτηρίζεται από διπλή σημασία, η οποία συνίσταται στη σχεδόν ταυτόχρονη ύπαρξη δράσης και αντίδρασης. Ως δράση εννοείται η βλαπτική επίδραση διαφόρων εξωτερικής και εσωτερικής προέλευσης παραγόντων, ενώ ως αντίδραση το αποτέλεσμα της προκαλούμενης “κινητοποίησης” των διαφόρων νευροορμονικών μηχανισμών προς αποκατάσταση της διαταραχθείσης ομοιοστασίας (Παπουτσόγλου, 1998).

Οι διάφορες φυσιολογικές μεταβολές που προκαλούνται στους ιχθύς και είναι αποτέλεσμα της επίδρασης ενός ή περισσοτέρων παραγόντων stress, αποτελούν την αντίδραση τους και περιγράφονται από τον όρο Γενικό Σύνδρομο Προσαρμογής (ΓΣΠ).

Το ΓΣΠ περιλαμβάνει τρεις φάσεις:

1. Φάση του συναγερμού (Στάδιο καταπληξίας και αντικαταπληξίας) Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η πρωτογενής αντίδραση του οργανισμού της οποίας άμεσο αποτέλεσμα είναι η σύνθεση και έκκριση κατεχολαμινών (αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη) και κορτικοστεροειδών ορμονών (κορτιζόλη) (Παπουτσόγλου, 1998).

2. Φάση της αντίστασης

Σε αυτή τη φάση πραγματοποιείται η δευτερογενής αντίδραση του οργανισμού, η οποία περιλαμβάνει μεταβολές των τιμών διαφόρων βιοχημικών και αιματολογικών παραμέτρων όπως

αύξηση επιπέδου της γλυκόζης, διατάραξη ιοντικής και ωσμωτικής ομοιοστασίας, πτώση του επιπέδου του γλυκογόνου και αύξηση του επιπέδου του γαλακτικού οξέος. Αυτές οι μεταβολές ακολουθούνται από ταχυκαρδία, διούρηση και μεταβολή του χρώματος των ιχθύων (Παπουτσόγλου, 1998).

3. Φάση της εξάντλησης

Όταν η αντίδραση του οργανισμού στις δύο προηγούμενες φάσεις είναι ανεπιτυχής, ή αν ο παράγοντας που προκαλεί stress συνεχίζει την βλαπτική επίδρασή του, ο οργανισμός περνάει στην τριτογενή φάση αντίδρασης, αυτή της εξάντλησης η οποία συνοδεύεται από μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, διαταραχή της αναπαραγωγικής διαδικασίας και πτώση της ανοσολογικής αντίδρασης αυτού (Παπουτσόγλου, 1998).

Η ένταση και η ταχύτητα αυτής της φάσης καθορίζει και το είδος του εφαρμοζόμενου stress. Έτσι σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί ταχύτερη εξάντληση και θάνατος των ιχθύων με το stress να χαρακτηρίζεται ως οξύ, ενώ σε άλλες περιπτώσεις η εξάντληση μπορεί να επέλθει βραδύτατα και επομένως να δοθεί η δυνατότητα προσαρμογής του οργανισμού στις επιβαλλόμενες συνθήκες, έστω και αν γι' αυτό χρειαστεί μικρού ή μεγάλου επιπέδου μεταβολές στη φυσιολογία του. Τότε το stress καλείται χρόνια (Παπουτσόγλου, 1998).

2.3 Αναφορά σε περιπτώσεις χρόνιου stress

Στα εντατικά συστήματα εκτροφής οι ιχθύες έρχονται συχνά αντιμέτωπα τόσο με βραχυπρόθεσμες, όσο και με μακροπρόθεσμες περιόδους stress (οξύ και χρόνια αντίστοιχα) αποτέλεσμα των οποίων είναι μία συνεχιζόμενη απώλεια ομοιοστασίας. Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχει πραγματοποιηθεί για να καταδείξει τον τρόπο με τον οποίο διάφοροι παράγοντες (κυρίως περιβαλλοντικοί όπως θερμοκρασία, φωτοπερίοδος, φάσμα φωτός, ποιότητα του νερού, τιμή του pH, αλατότητα) προκαλούν χρόνια stress και μέσω αυτού επηρεάζουν την ανάπτυξη των ιχθύων (Van Weerd and Komen, 1998).

Το πιο χαρακτηριστικό αποτέλεσμα της επίδρασης χρόνιου stress στους εκτρεφόμενους ιχθύς είναι τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης αποτέλεσμα που έχει παρατηρηθεί στην τιλάπια (Biswas et al., 2004), στον κοινό κυπρίνο (Ruane and Komen, 2003), στην ιριδίζουσα πέστροφα (North et al., 2006; Pottinger and Pickering, 1992) και στον οξύρυγχο (Wuertz et al., 2006). Βασικός παράγοντας (με εξαίρεση την περίπτωση της τιλάπιας που ήταν η αλλαγή της φωτοπερίοδου) που προκάλεσε αυτή την αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης ήταν η αλλαγή της πυκνότητας εκτροφής και ο συνεπαγόμενος από αυτή συνωστισμός.

Η αλλαγή της πυκνότητας εκτροφής οδηγεί και σε άλλα αποτελέσματα-ενδείξεις επίδρασης χρόνιου stress όπως χαμηλό συντελεστή ευρωστίας (ιριδίζουσα πέστροφα-North et al., 2006) και υψηλά επίπεδα γλυκόζης (λαβράκι-Di Marco et al., 2008), ενώ χαμηλή πυκνότητα εκτροφής σε

συνδυασμό με κατάλληλο χρώμα δεξαμενών (κυανό) έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε καλύτερη ανάπτυξη στον σαργό *Diplodus sargus* (Karakatsouli et al., 2007).

Η αλλαγή της φωτοπεριόδου επίσης έχει αποδειχθεί παράγοντας stress στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς όπως έχει ήδη αναφερθεί στην περίπτωση της τιλάπιας (Biswas et al., 2004). Ωστόσο η αλλαγή της ενδέχεται να μην προκαλέσει κάποια φανερή διαφοροποίηση στα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης όπως συμβαίνει στην περίπτωση του είδους *Pagrus major* (Biswas et al., 2006) στο οποίο πάντως παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης στα άτομα της υψηλής φωτοπεριόδου (24:0).

Η αλλαγή της τιμής του pH του νερού (stress οξύτητας) σε τιμή 4,15 έχει επίσης αποδειχθεί παράγοντας stress στο είδος πέστροφας *Salvelinus fontinalis* (Mackett et al., 1992) με βασικότερο αποτέλεσμα αυτής της επίδρασης, η μειωμένη πρόσληψη της τροφής καθώς και τα μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης, ενώ το κοινωνικό stress προκάλεσε αλλοιώσεις στον στόμαχο στο ευρωπαϊκό χέλι *Anguilla anguilla* (Peters, 1982).

Τέλος το φάσμα φωτός επιδρά στην ανάπτυξη και αποδείχθηκε ιδιαίτερα έντονος παράγοντας stress στην ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss*. Σε αυτό το είδος το κυανό χρώμα αποδείχθηκε παράγοντας stress, με το ερυθρό να δίνει (σε σύγκριση τόσο με το κυανό, όσο και με το λευκό) καλύτερο συντελεστή ευρωστίας και συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (Karakatsouli et al., 2008).

2.4 Η επίδραση του οξέος stress σε διάφορα είδη ιχθύων με έμφαση στον συνωστισμό (confinement)

Στις Υ/Κ το stress και οι συνεπαγόμενες από αυτό χημικές, βιολογικές και φυσικές διαταραχές στο υδάτινο περιβάλλον έχουν σαν αποτέλεσμα μία αυξημένη ευπάθεια των εκτρεφόμενων οργανισμών. Οι ιχθύς κάτω από τις υπάρχουσες συνθήκες εκτροφής είναι συχνά εκτεθειμένοι σε περιβαλλοντικές μεταβολές ή επεμβάσεις όπως οι διάφοροι χειρισμοί (π.χ. διαλογές, συνωστισμός, μεταφορές και φυσικά η αλλαγή της ποιότητας του νερού). Αυτές οι περιβαλλοντικές μεταβολές μπορούν να αποδειχθούν παράγοντες stress για τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς, άμεση συνέπεια του οποίου είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης του πλάσματος. Ο εκάστοτε παράγοντας stress προκαλεί αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, τα οποία επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες stress (Kubilay and Ulukoy, 2002).

Πολλές μελέτες έχουν διενεργηθεί στην ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* για τα αποτελέσματα τα οποία παρατηρούνται όταν ένας χειρισμός που εφαρμόζεται για μικρό χρονικό διάστημα αποδειχθεί παράγοντας stress γι αυτή. Το πλέον κοινό από αυτά τα αποτελέσματα είναι τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης και ο χειρισμός που προκάλεσε αυτήν την αύξηση είναι ο συνωστισμός και η καταδίωξη ή η αλίευση των εκτρεφόμενων ατόμων με απόχη (Kubilay and Ulukoy, 2002; Barton et al., 1987; Olsen et al., 2005; Karakatsouli et al., 2008).

Ωστόσο αυτή η αυξημένη συγκέντρωση κορτιζόλης μπορεί να περιοριστεί με χρήση κατάλληλου φάσματος φωτός όπως απέδειξε η τελευταία αναφορά (Karakatsouli et al., 2008) με το κυανό φάσμα να αποδεικνύεται σε αυτή την περίπτωση ο καλύτερος παράγοντας μείωσης των αυξημένων (λόγω οξέος stress συνωστισμού) επιπέδων κορτιζόλης. Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Barton et al., 1987) οξύ stress οφειλόμενο σε καταδίωξη των εκτρεφόμενων ατόμων με απόχη μέσα στη δεξαμενή (15') προκαλεί μείωση του συντελεστή ευρωστίας ενώ όταν ο ίδιος χειρισμός σε συνδυασμό με οξύ συνωστισμό, εφαρμοστεί ξεχωριστά σε διατρεφόμενα και άσιτα άτομα, τα διατρεφόμενα παρουσιάζουν σε σχέση με τα άσιτα αυξημένο αιματοκρίτη και αλλοίωση της δομής των εντεροκυττάρων (Olsen et al., 2005). Τα ίδια αποτελέσματα έχει και η εφαρμογή του ίδιου χειρισμού (οξύ stress συνωστισμού και καταδίωξη) σε διατρεφόμενα και άσιτα άτομα σολομού του Ατλαντικού *Salmo salar* (Olsen et al., 2002), αν και διαφοροποιούνται προς την αντίθετη κατεύθυνση (αυξημένο stress στα άσιτα άτομα) στο είδος *Gadus morhua* χωρίς να παρατηρείται η οποιαδήποτε μεταβολή στην ιστολογία του εντέρου (Olsen et al., 2008). Την ίδια ώρα άλλη μελέτη (Delaney et al., 2004) αποδεικνύει την αυξημένη ευπάθεια της τιλάπιας στην απότομη μεταβολή της θερμοκρασίας, άμεση συνέπεια της οποίας είναι τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης.

Η αλίευση των εκτρεφόμενων ατόμων με απόχη και ο μετέπειτα συνωστισμός τους οδηγεί επίσης σε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης (ακόμα και μετά από 15 ώρες), τα οποία επανέρχονται μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (87 ώρες το λιγότερο) ή και καθόλου στον κοινό κυπρίνο *Cyprinus carpio* (Ruane et al., 2002), στην πέστροφα *Salmo trutta* (Pickering et al., 1981) και στο είδος *Pagrus major* (Biswas et al., 2006), ενώ ακόμα και η απλή αλίευση με απόχη (χωρίς τον μετέπειτα συνωστισμό) συνεπάγεται την έστω και για μικρότερο χρονικό διάστημα αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης (4 ώρες μετά) και της γλυκόζης (1 ώρα μετά) στην πέρκα *Perca fluviatilis* (Acerete et al., 2004).

Η μεταφορά των εκτρεφόμενων ατόμων έχει επίσης αποδειχθεί παράγοντας οξέος stress. Στον σολομό του Ατλαντικού, *Salmo salar* (Iversen et al., 1998) αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης έχουν παρατηρηθεί αυξανόμενης της απόστασης μεταφοράς, ενώ τα ίδια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν άτομα αυτού του είδους υπέστησαν οξύ συνωστισμό. Αυτός ο οξύς συνωστισμός είχε και άλλα πιο ορατά αποτελέσματα όπως έντονη κολύμβηση, αναπήδηση και παραμονή των ιχθύων στον πυθμένα της δεξαμενής, αρκετό χρόνο μετά την εφαρμογή του (περίπου 2 ώρες για συνωστισμό 30-40'). Οι επιδράσεις και το χρονικό διάστημα στο οποίο παρατηρούνται αυτές οι επιδράσεις του συνωστισμού στα εκτρεφόμενα άτομα, εξαρτάται και από την ταχύτητα του νερού με την υψηλή ταχύτητα να αποδεικνύεται παράγοντας ανακούφισης των ιχθύων από αυτές τόσο για τον σολομό του Ατλαντικού *Salmo salar* (Veiseth et al., 2006), όσο και για το είδος *Gadus morhua* (Artigas et al., 2005).

Ο οξύς συνωστισμός και οι επακόλουθες από αυτόν συνέπειες στα εκτρεφόμενα άτομα (αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης) έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει και την τσιπούρα. Σύμφωνα με μελέτη (Papoutsoglou et al., 1999) η πρόκληση με απόχη των συνωστισμένων ατόμων αυτού του είδους μετά από οξύ συνωστισμό 15' έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα

κορτιζόλης 15' μετά το stress και γλυκόζης 15' και 45' μετά. Αντίθετα όταν μετά τον συνωστισμό δεν υπάρξει πρόκληση με απόχη τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης εμφανίζονται 20' μετά τον συνωστισμό και της γλυκόζης 14' και 40' μετά. Επαναφορά στα προ-stress επίπεδα επιτυγχάνεται μετά από 2 ώρες. Όταν στο ίδιο είδος δεν εφαρμοστεί απλά συνωστισμός, αλλά και μεταφορά των ιχθύων σε μικρότερες δεξαμενές τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης διαρκούν πολύ περισσότερο χρονικό διάστημα (4 ώρες μετά και επαναφορά στα προ-stress επίπεδα μετά από 5 ώρες).

Τι γίνεται όμως όταν υπάρχει συνωστισμός ατόμων ιριδιζουσας πέστροφας σε μικρές ή μεγάλες δεξαμενές; Ποιες οι συνέπειες του επιβαλλόμενου stress σε αυτά τα άτομα; Σε πείραμα συνωστισμού ατόμων ιριδιζουσας πέστροφας που είχαν παρουσιάσει προηγουμένως υψηλά (ομάδα HR) και χαμηλά (ομάδα LR) επίπεδα κορτιζόλης λόγω διαφορετικών πυκνοτήτων εκτροφής, εφαρμόστηκε οξύς συνωστισμός χρονικής διάρκειας 15' (confinement) για τη διερεύνηση αυτού του παράγοντα στην ανάπτυξη και την ευζωία των εκτρεφόμενων ατόμων (North et al., 2006).

Έτσι διαπιστώθηκε πως τα επίπεδα γλυκόζης και ο αιματοκρίτης παρουσίασαν υψηλότερες τιμές στους ιχθύς της ομάδας HR (υψηλά επίπεδα κορτιζόλης) μετά τον συνωστισμό.

Τέλος, στο λαβράκι οξύς συνωστισμός 15' σε τρεις διαφορετικές πυκνότητες εκτροφής (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) φανερώνει τη μεγαλύτερη δυνατή αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης στην υψηλή και των επιπέδων της γλυκόζης στη χαμηλή πυκνότητα εκτροφής (Di Marco et al., 2008).

2.5 Δυνατότητα επαναφοράς ιχθύων γλυκού και θαλασσινού νερού από τις επιπτώσεις του stress

Η δυνατότητα επαναφοράς των εκτρεφόμενων ιχθύων στην προ-stress κατάσταση αποτελεί σημαντικό επίτευγμα, γιατί η πρόκληση stress στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς κάτω από εντατικά συστήματα εκτροφής αποτελεί αναγκαίο "κακό". Η επαναφορά (recovery) έχει μελετηθεί σε πολλά είδη ιχθύων και πολλά πειράματα έχουν διεξαχθεί προς αυτή την κατεύθυνση.

Στους ιχθύς της οικογένειας των *Salmonidae* προσπάθεια επαναφοράς από καταστάσεις οξέος συνωστισμού, έχει πραγματοποιηθεί στον σολομό του Ατλαντικού *Salmo salar*, στην ιριδιζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* καθώς και στην άγρια πέστροφα *Salmo trutta*.

Στην περίπτωση του σολομού του Ατλαντικού προσπάθεια επαναφοράς έχει πραγματοποιηθεί ύστερα από οξύ stress συνωστισμού χρησιμοποιώντας σαν παράμετρο επαναφοράς την ταχύτητα του νερού (Veiseth et al., 2006). Αποδείχθηκε ότι υψηλή ταχύτητα του νερού μετά από 6 ώρες επανέφερε τα επίπεδα κορτιζόλης των εκτρεφόμενων ιχθύων στα προ-stress επίπεδα. Στο ίδιο πείραμα πάντως μετά από 12 ώρες με μεσαία ταχύτητα του νερού

επιτεύχθηκε η επαναφορά και των επιπέδων της γλυκόζης στα προ-stress επίπεδα. Άλλοι συγγραφείς (Iversen et al., 1998) αποδεικνύουν ότι η μεταφορά ατόμων σολομού του Ατλαντικού, απαιτεί ένα πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα επαναφοράς της κορτιζόλης στα προ-stress επίπεδα (άνω των 24 ωρών) εξαρτώμενο πάντα και από την απόσταση μεταφοράς, σε σχέση με έναν οξύ συνωστισμό (6 ώρες περίπου).

Σε άτομα άγριας πέστροφας (Pickering et al., 1981) η αλίευση με απόχη και ο οξύς συνωστισμός έδειξαν μία διαφορετική (πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τον σολομό του Ατλαντικού) χρονική διάρκεια επαναφοράς ανάμεσα στα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης καταδεικνύοντας μία πιθανή ευαισθησία του συγκεκριμένου είδους των *Salmonidae* στην αλίευση. Έτσι τα επίπεδα γλυκόζης επανήλθαν στα προ-stress επίπεδα 72 ώρες μετά τον συνωστισμό και αυτά της κορτιζόλης τουλάχιστον 2 εβδομάδες μετά από αυτόν. Αντίστοιχα υψηλός ήταν ο χρόνος επαναφοράς και σε άτομα ιριδίζουσας πέστροφας (Pottinger and Pickering, 1992) ενώ η παρουσία ατόμων αυτού του είδους είτε σε ζεύγη, είτε σε ομάδες των 5-10 ατόμων παρέτεινε ακόμα περισσότερο τον χρόνο επαναφοράς των επιπέδων της κορτιζόλης λόγω του υφιστάμενου κοινωνικού stress αλληλεπίδρασης.

Σε περιπτώσεις ιχθύων άλλων οικογενειών έχουν επίσης πραγματοποιηθεί αντίστοιχες προσπάθειες επαναφοράς μετά από οξύ stress. Στην πέρκα (Acerete et al., 2004) αλίευση με απόχη και παραμονή των ιχθύων εκτός νερού για 1' είχε σαν αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης με την επαναφορά τους να επιτυγχάνεται 4 ώρες μετά τον χειρισμό. Η αλίευση με απόχη επηρέασε και το είδος *Gadus morhua*, ένα από τα πιο εμπορικά εκτροφόμενα είδη του Βόρειου Ατλαντικού. Η αλίευση αυτή συνδυαζόταν με μεταφορά σε μικρότερες δεξαμενές και συνωστισμό ενώ παράλληλα στο μπροστινό τμήμα των δεξαμενών είχε τοποθετηθεί μαύρο κάλυμμα. Η επαναφορά στα προ-stress επίπεδα πραγματοποιούταν 2 ώρες μετά το stress το οποίο οπτικά εκδηλωνόταν κυρίως με την παραμονή των ιχθύων στον πυθμένα της δεξαμενής και με έντονη κολύμβηση σε αυτόν (Olsen et al., 2008).

Τέλος η μεταφορά φάνηκε να αποτελεί παράγοντα stress και για την τσιπούρα. Σχετική μελέτη (Papoutsoglou et al., 1999) κατέδειξε ότι επαναφορά των ιχθύων στα προ-stress επίπεδα παρατηρήθηκε μόνο 2 ώρες μετά από αυτήν, ενώ όταν η μεταφορά συνδυαστεί και με πρόκληση με απόχη τότε ο χρόνος επαναφοράς αυξάνεται στις 5 ώρες καταδεικνύοντας πως η αλίευση με απόχη αποτέλεσε και για την τσιπούρα (όπως και για την καφέ πέστροφα και την πέρκα) έναν επιπρόσθετο παράγοντα οξέος stress.

Παρακάτω παρατίθεται ένας συνοπτικός πίνακας (πιν.1) με περιπτώσεις οξέος και χρόνιου stress καθώς και τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν σε διάφορα είδη ιχθύων:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων από μελέτες οξέος και χρόνιου stress

Είδος ιχθύος	Βάρος-Ηλικία	Είδος Stress	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφία
ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΧΡΟΝΙΟΥ STRESS				
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	4-5 g	Διατροφή με σύμπηκτα που περιείχαν κορτιζόλη 3% Σ.Β., για 10 εβδομάδες	Μειωμένος P.A, Σ.Ε., αριθμός λεμφοκυττάρων, γλυκογόνο ήπατος. Αυξημένα επίπεδα αιματοκρίτη και ενεργότητας τυροσίνης	Barton et al., 1987
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	145 g	3 διαφορετικά φάσματα φωτός (λευκό, κυανό, ερυθρό) για 111 ημέρες	Καλύτερα αποτελέσματα βάρους, Σ.Ε., Π.Α, Σ.Ε.Τ, ολικό μήκος στο ερυθρό φάσμα φωτός σε σχέση με τα άλλα δύο	Karakatsouli et al., 2008
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	150-210 g	3 διαφορετικές Π.Ε. για 9 μήνες	Χαμηλή πυκνότητα: αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, χαμηλός Σ.Ε., μειωμένη ενεργότητα λυσοζύμης	North et al., 2006
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	28-38 g	2 διαφορετικές Π.Ε. για 4 εβδομάδες σε 3 διαφορετικές ομάδες ιχθύων LR, HR, C	LR καλύτερα από HR σε P.A. και πρόσληψη της τροφής και στις δύο Π.Ε.	Trenzado et al., 2006
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	212-312 g	Συνωστισμός για 6 εβδομάδες σε διάφορες Π.Ε και σε ομάδες ιχθύων (ζεύγη ή 5-10 μαζί)	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης σε όλες τις ομάδες- Αυξημένο κοινωνικό stress όταν τα άτομα τοποθετήθηκαν σε ζεύγη ή 5-10 μαζί	Pottinger and Pickering, 1992
Πέστροφα ρυακίων <i>Salvelinus fontinalis</i>	55-129 g	Οξύτητας για 2 μήνες (pH=4,15)	Μειωμένη πρόσληψη τροφής και μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης.	Mackett et al., 1992
Τιλάπια <i>Oreochromis niloticus</i>	6 μηνών	Αλλαγή της φωτοπεριόδου από 12:12 σε 6:6 για 3 μήνες	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης	Biswas et al., 2004

Κοινός κυπρίνος <i>Cyprinus carpio</i>	90-100 g	Π.Ε. (χαμηλή και υψηλή) για 28 ημέρες	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης στην υψηλή πυκνότητα εκτροφής	Ruane and Komen, 2003
Σαργός <i>Diplodus sargus</i>	17,3 g	Χρώμα δεξαμενών (λευκό, κυανό, μαύρο)+ Π.Ε. για 87 ημέρες	Χαμηλή Π.Ε.+λευκό (ή κυανό) χρώμα δεξαμενών οδηγεί σε καλύτερη ανάπτυξη	Karakatsouli et al., 2007
Οξύρυγχος <i>Acipenser brevirostrum</i>	3300 g-4 ετών	Π.Ε. (χαμηλή, μέση και υψηλή) για 14 ημέρες	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης σε μέση και υψηλή πυκνότητα	Wuertz et al., 2006
Ευρωπαϊκό χέλι <i>Anguilla anguilla</i>	40-150 g	Κοινωνικό (κυρίαρχα-υποτελή άτομα) 10 ημερών	Αλλοιώσεις στον στόμαχο των υποτελών ατόμων (βλεννογόνος μεμβράνη με πτυχώσεις ή απύσα, ατροφικό βλεννογόνο επιθήλιο, απώλεια κυτταρικής επαφής)	Peters, 1982
Λαβράκι <i>Dicentrarchus labrax</i>	139,8 g	3 διαφορετικές Π.Ε. για 6 εβδομάδες	Χαμηλά επίπεδα κορτιζόλης και υψηλά επίπεδα γλυκόζης μετά το τέλος του πειράματος σε όλες τις ομάδες	Di Marco et al., 2008
<i>Pagrus major</i>	1-30 g	4 διαφορετικοί φωτοπερίοδοι (6:6, 12:12, 16:8, 24:0) για 8 εβδομάδες	Αυξημένος P.A. στους ιχθύς της ομάδας 24:0. Καμία διαφοροποίηση σε επίπεδα κορτιζόλης, γλυκόζης	Biswas et al., 2006
ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΟΞΕΟΣ STRESS				
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	147 g	Συνωστισμός 10' και καταδίωξη με απόχη	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, γλυκόζης και ενεργότητα λυσοζύμης, 10' μετά τον χειρισμό	Kubilay and Ulukoy, 2002
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	4-5 g	Καταδίωξη με απόχη μέσα στη δεξαμενή για 15'	Μείωση επιπέδου γλυκογόνου, ηπατοσωματικού δείκτη και Σ.Ε.	Barton et al., 1987
Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	360 g	Συνωστισμός 15' και καταδίωξη με απόχη σε διατρεφόμενα και άσιτα άτομα	Αλλοίωση δομής κυττάρων ενδιάμεσου τμήματος εντέρου για 12 ώρες μετά το stress και αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, αιματοκρίτη (4 ώρες) και γλυκόζης (12 ώρες) στα διατρεφόμενα άτομα	Olsen et al., 2005

Ιριδίζουσα πέστροφα <i>Oncorhynchus mykiss</i>	145 g	Συνωστισμός 1 ώρα για κάθε τύπο φωτισμού (Λ,Ε,Κ)	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, γλυκόζης και αιματοκρίτη. Χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης πάντως στο κυανό φάσμα	Karakatsouli et al., 2008
Σολομός Ατλαντικού <i>Salmo salar</i>	15-75 g	Μεταφορά 30'-4,5 ωρών	Αύξηση επιπέδων κορτιζόλης ανάλογη της απόστασης πριν τη μεταφορά και αντιστροφή 1 ώρα μετά από αυτή. Αυξημένα επίπεδα γλυκόζης	Iversen et al., 1998
Σολομός Ατλαντικού <i>Salmo salar</i>	3,5-6 kg	Συνωστισμός (>200 kg/m ³) για 40'	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης ανάλογα με την ταχύτητα του νερού	Veiseth et al., 2006
Σολομός Ατλαντικού <i>Salmo salar</i>	570 g	Συνωστισμός 15' και καταδίωξη με απόχη σε διατρεφόμενα και άσιτα άτομα	Αλλοίωση δομής κυττάρων ενδιάμεσου τμήματος εντέρου για 12 ώρες μετά το stress και αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, αιματοκρίτη (4 ώρες) και γλυκόζης (12 ώρες) στα διατρεφόμενα άτομα	Olsen et al., 2002
Κοινός κυπρίνος <i>Cyprinus carpio</i>	80-90 g	Περιορισμός με δίχτυ 1 ώρα	Αύξηση επιπέδων κορτιζόλης ακόμα και μετά από 15 ώρες	Ruane et al., 2002
<i>Gadus morhua</i>	175-325 g	Συνωστισμός 15' σε άσιτα και διατρεφόμενα άτομα	Αύξηση επιπέδων αιματοκρίτη, Cl ⁻ , κορτιζόλης. Μεγαλύτερη στα άσιτα άτομα 24 h μετά το stress παρά στα διατρεφόμενα. Καμία επίδραση στην ιστολογία εντέρου	Olsen et al., 2008
<i>Gadus morhua</i>	5 μηνών	Συνωστισμός 30'	Έντονη κολύμβηση, αναπήδηση και παραμονή στον πυθμένα της δεξαμενής 2 ώρες μετά το stress	Artigas et al., 2005
Πέρκα <i>Perca fluviatilis</i>	50-64 g	Αλίευση με απόχη και παραμονή εκτός νερού 1'	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης ως 4 ώρες μετά το stress και γλυκόζης 1 ώρα μετά από αυτό	Acerete et al., 2004
<i>Pagrus major</i>	17-25 g	Αλίευση με απόχη και συνωστισμός 1 ώρα	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης 30' μετά το stress. Επαναφορά 24 h μετά	Biswas et al., 2006

Τσιπούρα <i>Sparus aurata</i>	190-198 g	Συνωστισμός 15' και πρόκληση με απόχη	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης 15' μετά το stress και γλυκόζης 15' και 45' μετά	Papoutsoglou et al., 1999
Τσιπούρα <i>Sparus aurata</i>	190-198 g	Συνωστισμός 15' χωρίς πρόκληση με απόχη	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης 20' μετά το stress και γλυκόζης 10' και 40' μετά. Επαναφορά 2 ώρες μετά το stress	Papoutsoglou et al., 1999
Τσιπούρα <i>Sparus aurata</i>	190-198 g	Μεταφορά ιχθύων διάρκειας 15' σε μικρότερες δεξαμενές και πρόκληση με απόχη	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης 4 ώρες μετά τη μεταφορά. Επαναφορά στα προ-stress επίπεδα 5 ώρες μετά	Papoutsoglou et al., 1999
Λαβράκι <i>Dicentrarchus labrax</i>	139,8 g	Συνωστισμός 15' σε Π.Ε.=100 kg/m ³ με αρχικές Π.Ε. 15, 30, 45 kg/m ³	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης 1 ώρα μετά τον συνωστισμό σε όλες τις Π.Ε. Μεγαλύτερη αύξηση στην υψηλή Π.Ε. Αυξημένα επίπεδα γλυκόζης 1 ώρα μετά σε χαμηλή και μεσαία Π.Ε. Συνέχιση αύξησης 6 ώρες μετά στη χαμηλή Π.Ε.	Di Marco et al., 2008
Τιλάπια <i>Oreochromis niloticus</i>	5 μηνών	Απότομη αύξηση της θερμοκρασίας από 27 σε 38 και 40°C	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης ανεξαρτήτως χρόνου επαναφοράς (10' ή 60')	Delaney et al., 2004
Καφέ πέστροφα <i>Salmo trutta</i>	150-395 g	Αλίευση με απόχη, συνωστισμός 2' και επαναφορά στην αρχική δεξαμενή	Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης. Επαναφορά στα προ-stress επίπεδα 72 ώρες μετά.	Pickering, et al., 1981

P.A.= Ρυθμός Ανάπτυξης, Σ.Ε.= Συντελεστής Ευρωστίας, Σ.Ε.Τ.= Συντελεστής Εκμετάλλευσης της Τροφής, Π.Ε.= Πυκνότητα Εκτροφής, LR: Low Response (χαμηλή αντίδραση στο υφιστάμενο stress), HR: High Response (υψηλή αντίδραση στο υφιστάμενο stress), C: Control (μάρτυρες), Σ.Β.: Σωματικό Βάρος.

2.6 Πεπτικός σωλήνας, πέψη και πεπτικά ένζυμα ιριδιζουσας πέστροφας

A. Πεπτικός σωλήνας

Η ιριδιζουσα πέστροφα είναι σαρκοφάγο είδος που παρουσιάζει λίγες ανατομικές εξειδικεύσεις όσον αφορά τη σύλληψη και την πέψη της λείας της, σε σχέση με τα υπόλοιπα σαρκοφάγα είδη ιχθύων. Τα δόντια είναι απλά και μικρά χωρίς κάποια άλλη λεπτομέρεια στους μηχανισμούς σύλληψης, συγκράτησης ή κατάποσης της λείας (Pillay, 1980).

Άλλωστε τα Salmonidae καταπίνουν την τροφή τους διαμέσου ενός πλατύ οισοφάγου που καταλήγει σε ένα στόμαχο σχήματος-Y με μυώδη τοιχώματα τα οποία διαστέλλονται σημαντικά όταν γεμίζει τροφή. Μεταξύ του στομάχου και του εντέρου υπάρχει ένας μυώδης σφιγκτήρας (πυλωρικός) πέραν του οποίου υπάρχει μία διόγκωση του πεπτικού σωλήνα, η οποία φέρει ένα μεγάλο αριθμό σκωληκοειδών αποφύσεων, τα πυλωρικά τυφλά (Παπαγεωργίου, 1989).

Αυτά διακλαδίζονται κοντά στο πυλωρικό άκρο του μεσαίου τμήματος του εντέρου, με τον αριθμό τους να ποικίλει και να αποτελεί χαρακτηριστικό ταξινόμησης στα διάφορα είδη αυτής της οικογένειας (Pillay, 1980). Συγκεκριμένα στην ιριδιζουσα πέστροφα ο αριθμός τους κυμαίνεται μεταξύ 32-45 (Παπουτσόγλου, 2008).

Πολύ σημαντικό ρόλο στην πέψη από την άποψη της σύνθεσης πολλών πεπτικών ενζύμων, παίζει το πάγκρεας, το οποίο δεν εντοπίζεται εύκολα και είναι διασκορπισμένο σε όλη την έκταση του λιπώδους στρώματος, το οποίο περιβάλλει τα πυλωρικά τυφλά. Η εξωκρινής δράση του παγκρέατος συνδέεται με την έκκριση του παγκρεατικού υγρού, που περιέχει ουσιώδη ένζυμα για την πέψη των θρεπτικών ουσιών. Η ενδοκρινής δράση του παγκρέατος συνδέεται με την έκκριση των ορμονών ινσουλίνη και γλυκαγόνη που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των σακχάρων με τη δράση των δύο τους να είναι έντονα ανταγωνιστική (Παπαγεωργίου, 1989).

Κατά τα άλλα η ιριδιζουσα πέστροφα, αποτελεί χαρακτηριστικό είδος των Salmonidae παρουσιάζοντας όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Είναι ένα σχετικά αρχέγονο είδος, τυπικό σαρκοφάγο, με υψηλή κολυμβητική ικανότητα για την αιχμαλωσία της λείας της, ένα στόμαχο που μπορεί εύκολα να επεκταθεί για να επιτευχθεί η αφομοίωση σχετικά μεγάλου μεγέθους λείας και ένα μικρού μήκους έντερο για να διαχειριστεί τροφή που περιέχει μικρές ποσότητες άπεπτου υλικού. Ο λόγος του ολικού μήκους του πεπτικού σωλήνα (από τον οισοφάγο στην έδρα) προς το μήκος σώματος είναι 0,6-0,8 (Pillay, 1980).

B. Πεπτικά ένζυμα και χημική πέψη

Στις χημικές διεργασίες περιλαμβάνονται εκείνες οι διεργασίες της πέψης που επιτελούνται με τη χρήση χημικών ουσιών στην προσληφθείσα τροφή και των οποίων το αποτέλεσμα είναι η αποδόμηση των συστατικών της. Τα πεπτικά ένζυμα που μετέχουν στη χημική πέψη είναι πρωτεϊνικής δομής, υδατοδιαλυτά ένζυμα (υδρολάσες) που καταλύουν μεταξύ άλλων, την υδρόλυση πρωτεϊνών (πρωτεολυτικά ένζυμα ή πρωτεάσες), εστέρων (λιπολυτικά ένζυμα ή

λιπάσες, εστεράσες) και υδατανθράκων (αμυλομυτικά ένζυμα ή καρβοϋδράσες) (Παπουτσόγλου, 2008).

Στην ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss*, οι εμπλεκόμενες ουσίες δρουν σε όλα τα τμήματα του πεπτικού σωλήνα και ο στόμαχος είναι το πρώτο τμήμα στο οποίο αρχίζουν οι διεργασίες αυτές, ακολουθούμενο από το πρόσθιο τμήμα του εντέρου, τα πυλωρικά τυφλά και το οπίσθιο τμήμα του εντέρου. Σε αυτό το σημείο θεωρείται σκόπιμο να αναφερθεί ότι οι ουσίες που δρουν στον στόμαχο της ιριδίζουσας πέστροφας, είναι κυρίως: α) το υδροχλωρικό οξύ στο οποίο οφείλεται η όξινη τιμή του pH του στομάχου και η ενεργοποίηση του πεψινογόνου και β) το πρωτεολυτικό ένζυμο της πεψίνης (Παπουτσόγλου, 2008).

Η πεψίνη είναι μία πεπτική πρωτεάση της οποίας βασική λειτουργία είναι η διάσπαση των πρωτεϊνών της τροφής σε πεπτίδια. Κύριος εκφραστής-ρυθμιστής της ποσότητας της πεψίνης στον στόμαχο είναι ένα ζυμογόνο (προένζυμο), το πεψινογόνο το οποίο ενεργοποιείται μοναχά σε όξινες συνθήκες (τιμή $\text{pH} < 6$) οι οποίες επικρατούν στον στόμαχο λόγω της δράσης του υδροχλωρικού οξέος (Florjkin, 1957). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μεγιστοποίηση της ενεργότητας της πεψίνης στον στόμαχο της ιριδίζουσας πέστροφας έχει παρατηρηθεί όταν η τιμή του pH στον συγκεκριμένο ιστό είναι 2,8 (Παπουτσόγλου, 2008).

Στα ένζυμα του εντέρου περιλαμβάνονται οι εντερικής προέλευσης πρωτεάσες (αμινοπεπτιδάσες, διπεπτιδάσες, τριπεπτιδάσες), οι παγκρεατικής προέλευσης πρωτεάσες (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και καρβοξυπεπτιδάση) και οι καρβοϋδράσες α-αμυλάση, α,β-γλυκοσιδάση. Η θρυψίνη και η χυμοθρυψίνη είναι τα πρώτα ένζυμα που επιδρούν στις πρωτεΐνες του προερχόμενου από τον στόμαχο, χυμού, προκαλώντας τη διάσπασή τους σε μικρότερου μοριακού βάρους πολυπεπτίδια. Ακολουθεί η υδρολυτική δράση των καρβοξυπεπτιδασών και των αμινοπεπτιδασών από την οποία προκύπτουν διπεπτίδια, τριπεπτίδια ή και αμινοξέα. Το τέλος της υδρόλυσης των πρωτεϊνών στο έντερο χαρακτηρίζεται από την επίδραση διπεπτιδασών και τριπεπτιδασών από την οποία προκύπτουν τελικά αμινοξέα (Παπουτσόγλου, 2008).

Η χημική πέψη των υδατανθράκων στο έντερο πραγματοποιείται από παγκρεατικά ένζυμα (α-αμυλάση), από ένζυμα του εντερικού υγρού (α, β-γλυκοσιδάση), καθώς και από ένζυμα δεσμευμένα στην περιοχή του γλυκοκάλυκα⁽¹⁾ των μικρολαχνών⁽²⁾ όπως η α και η γ-αμυλάση που ανήκουν στην κατηγορία των καρβοϋδρασών, το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων καταλαμβάνουν οι αμυλάσες. Η υδρόλυση του αμύλου επιτελείται κυρίως από την παγκρεατική α-αμυλάση, από τη δράση της οποίας προκύπτουν δισακχαρίτες που στη συνέχεια υφίστανται την υδρολυτική διεργασία της γ-αμυλάσης με τελικό προϊόν τη γλυκόζη (Παπουτσόγλου, 2008).

Τέλος στον κατάλογο των ενζύμων που έχει αποδειχθεί ότι μάλλον συντίθενται στα κύτταρα των πυλωρικών τυφλών έχει πιστοποιηθεί η σύνθεση της θρυψίνης, αλλά και της μαλτάσης, α-

¹ Πολυσακχαρίτες μικρού MB στη μεμβράνη των μικρολαχνών με τη μορφή επιχρίσματος που διευκολύνουν τη διαδικασία της απορρόφησης, παρουσιάζοντας ανθεκτικότητα στη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων

² Το σημαντικότερο γνώρισμα των απορροφητικών κυττάρων τόσο από μορφολογικής όσο και από λειτουργικής άποψης. Προεκβολές του πρωτοπλάσματος αυτών

γλυκοσιδάσης. Στην ιριδίζουσα πέστροφα έχει αποδειχθεί ότι η ένταση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των πυλωρικών τυφλών μεγιστοποιείται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες νερού της τάξης των 11-18°C και με μόνο αυξημένα ποσοστά πρωτεϊνών στην τροφή. Η θερμοκρασία δεν επηρεάζει την πρωτεολυτική δραστηριότητα των πυλωρικών τυφλών σε επίπεδα κάτω των 6°C, αλλά ούτε όταν η τροφή είναι φτωχή σε πρωτεΐνες. Στο ίδιο είδος η όποια αξιόλογη ενζυμική δραστηριότητα εκπροσωπείται κυρίως από την καρβοϋδράση β-γλυκοσιδάση (Παπουτσόγλου, 2008).

2.7 Προσδιορισμός πεπτικών ενζύμων διαφόρων ιχθύων

Διάφορα πειράματα έχουν διεξαχθεί με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό (ενεργότητα και πεπτική ικανότητα) των προαναφερθέντων ενζύμων τα οποία απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (πίν.2):

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων από πειράματα μέτρησης πεπτικών ενζύμων

Είδος ιχθύος	Βάρος-Ηλικία	Διάρκεια	Πεπτικά ένζυμα	Επίπεδα	Βιβλιογραφία
Ιαπωνικό χέλι , <i>Anguilla japonica</i>	140-150 g	14 μήνες	Ε θρυψίνης/πεψίνης /χυμοθρυψίνης	5,1-25,4/0,09-0,28/12-54,7 units/g ιστού	Chiu and Pan, 2002
Ιριδίζουσα πέστροφα, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	70-120 g	2 μήνες	Ε πεψίνης- (θρυψίνης)	0,72-10,78 (7,2-183) mg τυροσίνης/g νεπού βάρους./hour	Dabrowski and Glogowsky, 1977
<i>O. mykiss</i>	35 g	10 ημέρες	Ε α-αμυλάσης	16,60±5,89 mg γλυκόζης/g ιστού/min	Spannhof and Plantikow, 1983
Οξύρυγχος, <i>Acipenser naccarii</i>	530-574g/ 1+ έτους	72 ημ. ασιτία/60 ημ. επανασίτιση	Πρωτεολυτική Ε σε τιμές του pH 1,5-10	0,099-0,333/0,483- 3,757units/mg πρωτεΐνης	Furne et al., 2008
<i>O. mykiss</i>	273-326 g	72 ημ. ασιτία/60 ημ. επανασίτιση	Πρωτεολυτική Ε σε τιμές του pH 1,5-10	0,530-2,503/0,648-5,640 σε units/mg πρωτεΐνης	Furne et al., 2008
Σκάρος <i>Sparisoma cretense</i>	38-91 g/ 2 ετών	- (Άγριοι πληθυσμοί)	Ολική πρωτεολυτική Π.Ι σε pH 1,5-10	1,64-7,75 mg τυροσίνης/min/g ΣΒ	Papoutsoglou and Lyndon, 2006

<i>S. cretense</i>	38-91 g/ 2 ετών	- (Άγριοι πληθυσμοί)	Ολική Π.Ι. καρβοϋδρασών σε θερμοκρασίες επώασης 5-37°C	0,26-1,09 mg γλυκόζης/min/g Σ.Β.	Papoutsoglou and Lyndon, 2006
Χρυσόψαρο, <i>Carassius auratus</i> , tench, <i>Tinca tinca</i> , <i>C. carpio</i> , Τσιπούρα, <i>Sparus aurata</i> , <i>O.mykiss</i> , <i>A.anguilla</i>	11,47-150 g/12- 18 μην.	2 ημέρες ασιτία	Πρωτεολυτική Ε (Ε αμυλάσης)	0,46-3,44 (1,30-75,47) units/mg πρωτεΐνης	Hidalgo et al., 1999
Χάνος, <i>Chanos chanos</i>	35 g	3 μήνες	Ε α-αμυλάσης/β- γλυκοσιδάσης/ β- γαλακτοσιδάσης	130,3-177,8/6,6-39,1/5,2-9,8 μmol γλυκόζης/g ιστού	Chiu and Benitez, 1981
Λύχνος, <i>Uranoscopus scaber</i> , <i>S. Cretense</i>	89-345 και, 38- 91 g/2 ετών	- (Άγριοι πληθυσμοί)	Ε (Π.Ι.) α- αμυλάσης/g Π.Σ.	0,202 (0,48) και 35,9 (125,4)	Papoutsoglou and Lyndon, 2003
<i>O. mykiss</i> , <i>A. nacarii</i>	27-294, 487-587 g/ 1+ έτους	2 ημέρες ασιτία	Ε ολικών πρωτεασών σε τιμές του pH 1,5- 10	0,45-14,87/0,61-6,51 units/mg πρωτεΐνης	Furne et al., 2005
<i>S. aurata</i>	50 g	2 ημέρες ασιτία	Ε καρβοϋδρασών	26,6-6625 mg γλυκόζης/ g ιστού/ min υδρόλυσης	Alarcon et al., 2001
Γόπα, <i>Boops boops</i> , Λυθρίνι, <i>Pagellus erithrynus</i> , <i>Pagellus bogaraveo</i> , Φαγκρ ί, <i>Pagrus pagrus</i> , <i>Diplodus annularis</i>	100-250 g	2 ημέρες ασιτία	Ε α-αμυλάσης	40,9/19,2/11/9,5/ 6,2 σε units/ mg πρωτεΐνης	Fernandez et al., 2001
Τούρνα, <i>Esox lucius</i> , Πέρκα, <i>Perca fluviatilis</i> , <i>Abramis brama</i> και <i>Rutilus rutilus</i>	1,1-310 g/0-7 ετών	2 ημέρες ασιτία	Ε α-αμυλάσης και πρωτεολυτική Ε	0,95-45,8 mg γλυκόζης/g ιστού/min και 3,63-8,77 μmol/g ιστού/min	Kuz'mina, 1996

<i>O. mykiss</i> , Σολομός Ατλαντικού, <i>Salmo salar</i> , Λαβράκι, <i>Dicentrarchus labrax</i> , <i>S. aurata</i> , Μπλε τιλάπια, <i>Oreochromis aureus</i>	16-146 g	5 ημέρες ασιτίας	Ε α-γλυκοσιδάσης σε θερμοκρασίες επώασης 5-37°C	0,020-0,197 mg/g ιστού/min	Papoutsoglou and Lyndon, 2005
<i>D. labrax</i> , <i>S. aurata</i> , <i>O. aureus</i>	86-146, g	5 ημέρες ασιτίας	Ε α-αμυλάσης σε θερμοκρασίες επώασης 5- 37 °C	0,268-83,34 mg/g ιστού/min	Papoutsoglou and Lyndon, 2005
Wolfish, <i>Anarhichas minor</i>	86-110 g/1 έτους	22 ημέρες με 2 σιτηρέσια (LP, HP)	Ε ολικών καρβουδρασών	LP: 0,01-2,57 HP: 0,02-2,66 mg γλυκόζης/g ιστού	Papoutsoglou and Lyndon, 2006
<i>A. minor</i>	86-110 g/1 έτους	22 ημέρες με 2 σιτηρέσια (LP, HP)	Ε α-αμυλάσης και α-γλυκοσιδάσης	nmoles γλυκοσιδικού/g ιστού/min LP: 0,13-0,27 HP:0,13-0,24 mg a-p νιτροφαινόλης/g ιστού/min LP: 0,017-0,14 HP:0,06-0,24	Papoutsoglou and Lyndon, 2006

LP: Low Protein (σιτηρέσιο με χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες), HP: High Protein (σιτηρέσιο με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες), E: Ενεργότητα, Π.Ι.: Πεπτική Ικανότητα, Π.Σ.: Πεπτικός Σωλήνας, ΣΒ: Σωματικό Βάρος

2.8 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός του διεξαχθέντος αυτού πειράματος είναι η διαπίστωση της επίδρασης μίας μορφής οξέος stress (συνωστισμός), στην ενεργότητα των καρβουδρασών και των πρωτεασών της ιριδιζουσας πέστροφας. Όπως θα αναφερθεί παρακάτω τα άτομα του πειράματος χωρίστηκαν σε 12 δεξαμενές ορθογώνιου παραλληλόγραμμου σχήματος με διαστάσεις ύψος X βάθος X μήκος: 42 εκ. X 49 εκ. X 83 εκ., 171 l στις οποίες εφαρμόστηκε διαφορετική μορφή stress με την έννοια της χρονικής διάρκειάς του. Σε δύο από αυτές δεν εφαρμόστηκε καθόλου stress (μάρτυρες) σε δύο από αυτές εφαρμόστηκε αυξημένη πυκνότητα εκτροφής για 1 ώρα, σε άλλες η διάρκεια έφτασε τις δύο ώρες και στις άλλες έξι δεξαμενές, μετά την εφαρμογή του παράγοντα stress για 1 ή 2 ώρες υπήρξε επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για 1, 3 και 6 ώρες αντίστοιχα.

Με αυτόν τον τρόπο επιδιώχθηκε η διερεύνηση του κατά πόσο η ενεργότητα των πεπτικών ενζύμων διαφοροποιήθηκε υπό την επίδραση του stress, και αν ναι, εάν επανήλθε στα

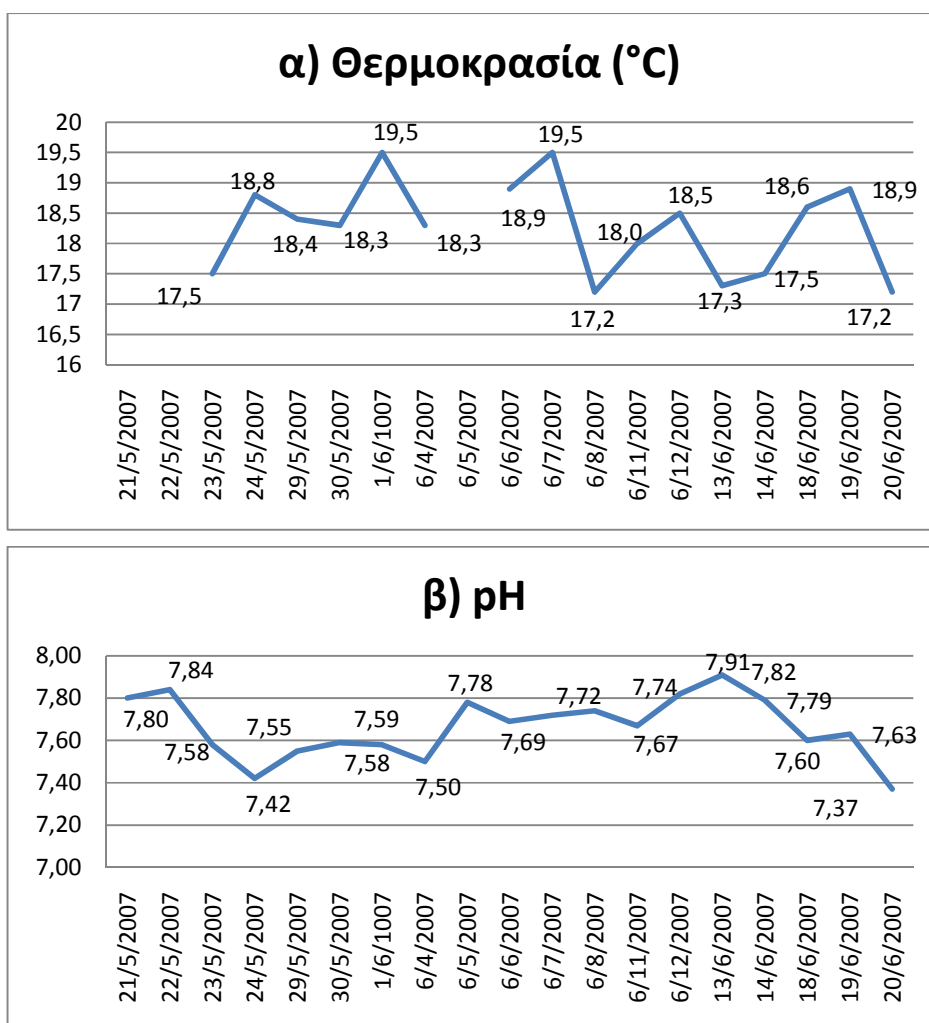
φυσιολογικά (προ stress) επίπεδα με την επαναφορά της στάθμης του νερού στα επίπεδα, που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα έπρεπε να είναι ανάλογα πάντα με τον αριθμό και το βάρος των ατόμων πέστροφας που υπήρχαν ανά δεξαμενή.

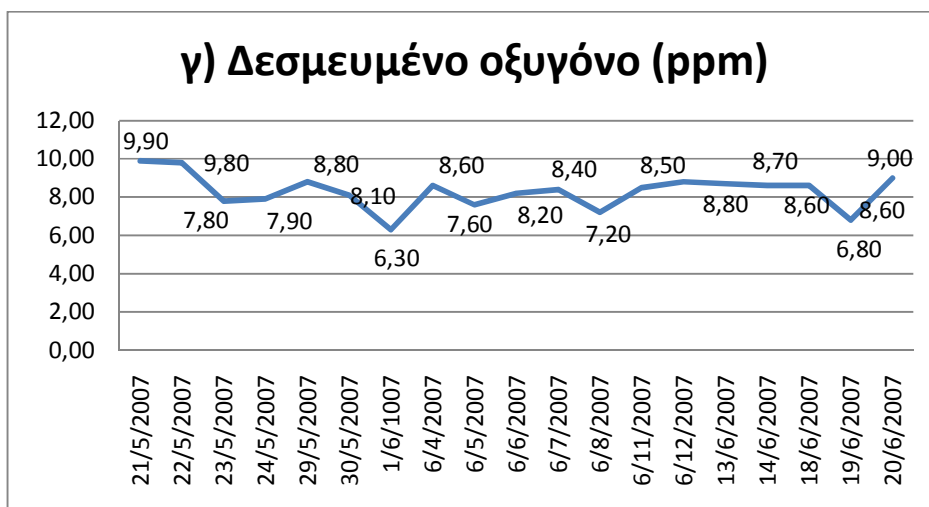
Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι η επίδραση του stress στα εκτρεφόμενα άτομα πέστροφας εκφράζεται με τη συγκέντρωση της κατ' εξοχήν καταβολικής και υπεύθυνης για το οξύ stress ορμόνης, κορτιζόλης.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Διατήρηση ιχθύων πειράματος πριν το stress και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού πριν τη δειγματοληψία

Στο παρόν πείραμα, 112 άτομα ιριδίζουσας πέστροφας μέσου βάρους $557,3 \pm 134,2$ g διατηρήθηκαν στους χώρους του εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας του ΓΠΑ, σε 12 δεξαμενές στις οποίες τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού 1 μήνα πριν την μέρα δειγματοληψίας παρατίθενται παρακάτω (διαγράμματα 1α,β,γ, πίνακας 3):





Διάγραμμα 1: α) Διακύμανση της ημερήσιας θερμοκρασίας σε °C ως ένα μήνα πριν τη δειγματοληψία, β) Διακύμανση της τιμής του pH, ως ένα μήνα πριν την δειγματοληψία, γ) Διακύμανση των ppm δεσμευμένου οξυγόνου του νερού, ως ένα μήνα πριν τη δειγματοληψία

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ± ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ

Θερμοκρασία, °C	18.3±0.19
Δεσμευμένο οξυγόνο, ppm	8.3±0.21
pH	7.66±0.034

Η τιμή του pH μετρήθηκε με ειδικό όργανο (pH-μετρό Oxyguard, Handy pH) μία φορά τη μέρα σε δύο διαφορετικές δεξαμενές (στον πίνακα παρατίθεται ο μέσος όρος). Όσο για τη συγκέντρωση του δεσμευμένου οξυγόνου αυτή μετρήθηκε με ειδικό οξυγονόμετρο (Oxyguard, Handy Mk III) επίσης σε δύο δεξαμενές. Το όργανο αυτό παρείχε τη δυνατότητα μέτρησης και της θερμοκρασίας στο εσωτερικό της εκάστοτε δεξαμενής.

Τα άτομα του πειράματος ταίζονταν με σύμπηκτα του εμπορίου και υποβλήθηκαν σε οξύ stress πυκνότητας εκτροφής για να διαπιστωθεί η επίδραση αυτού του χειρισμού στην ενεργότητα των πεπτικών ενζύμων δύο κατηγοριών: πρωτεάσες και καρβοϋδράσες.

Οι χώροι εκτροφής ήταν δώδεκα δεξαμενές ορθογώνιου παραλληλόγραμμου σχήματος με διαστάσεις ύψος X βάθος X μήκος: 42 εκ. X 49 εκ. X 83 εκ., 171 lt. Ο αριθμός των ατόμων, το μέσο σωματικό βάρος ανά δεξαμενή και η επέμβαση η οποία λάμβανε χώρα σε καθεμιά από αυτές περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα (πιν.4):

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Συνοπτικός πίνακας περιγραφής του πειράματος από την άποψη του αριθμού και του μέσου βάρους ιχθύων αλλά και του χειρισμού ανά δεξαμενή.

ΕΠΕΜΒΑΣΗ	ΔΕΞΑΜΕΝΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ	ΜΕΣΟ Σ.Β. ΣΕ g
Μάρτυρες	A1	10	385,4
	A7	10	774,0
Μείωση στάθμης νερού στα 7cm για 1h	A2	10	341,9
	A8	8	901,4
Μείωση στάθμης νερού στα 7cm για 2h	A3	11	577,7
	A9	10	285,8
Μείωση στάθμης νερού στα 7cm για 1h με ακόλουθη επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για 1h	A4	10	241,2
Μείωση στάθμης νερού στα 7cm για 1h με ακόλουθη επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για 3h	A5	10	394,6
Μείωση στάθμης νερού στα 7cm για 1h με ακόλουθη επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για 6h	A6	8	782,0
Μείωση στάθμης νερού στα 7cm για 2h με ακόλουθη επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για 1h	A10	10	778,9
Μείωση στάθμης νερού στα 7cm για 2h με ακόλουθη επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για 3h	A11	8	732,6
Μείωση στάθμης νερού στα 7cm για 2h με ακόλουθη επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για 6h	A12	8	686,3

3.2. Θανάτωση, αιμοληψία και προσδιορισμός συγκέντρωσης γλυκόζης, κορτιζόλης

Για τη θανάτωση των ιχθύων έγινε χρήση αναισθητικού 2-φαινόξυ-αιθανόλη (2 phenoxyethanol) σε συνολική ποσότητα 0,00456 ml αναισθητικού/ lt νερού/ g ζώντος βάρους, χωρίς κάποια άλλη επέμβαση. Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε από ραχιαία φλέβα με ηπαρινισμένες σύριγγες του 1ml. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης ηπαρινισμένα φιαλίδια των 1,5 ml για την αποφυγή της πήξης των δειγμάτων. Ακολούθως το αίμα φυγοκεντρήθηκε για τον προσδιορισμό του αιματοκρίτη (Micro-haematocrit Centrifuge, Hawksley and Sons Ltd). Το υπόλοιπο δείγμα φυγοκεντρήθηκε (12.000 x g για 10') με τη φυγόκετρο Jouan, για την απομόνωση του πλάσματος. Τέλος το πλάσμα συντηρήθηκε σε κατάψυξη (-30°C) για να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης γλυκόζης (με τη χρήση ενζυμικής φωτομετρικής μεθόδου, Elitechdiagnostics, Sees, France) και της συγκέντρωσης κορτιζόλης που μετρήθηκε με ραδιοανοσολογική μέθοδο χρησιμοποιώντας τυποποιημένη μέθοδο εμπορίου (kit) (Coat-A-Count Cortisol, DPC, Los Angeles, CA, USA).

3.3 Προσδιορισμός πεπτικών ενζύμων

3.3.1 Ομογενοποίηση – Φυγοκέντρωση

Με τα δείγματα (πεπτικός σωλήνας) να έχουν διατηρηθεί στην κατάψυξη (-30°C), το πρώτο στάδιο, για τον μετέπειτα προσδιορισμό της ενεργότητας των πεπτικών ενζύμων ήταν ο διαχωρισμός των τμημάτων, η ομογενοποίηση και η φυγοκέντρωσή τους. Το πρώτο βήμα αφορούσε στον διαχωρισμό των τμημάτων μετά την εξ ολοκλήρου ζύγισή του.

Πριν από αυτό λαμβάνονταν μετρήσεις που αφορούσαν στο μήκος στομάχου και στο μήκος του εντέρου. Αμέσως μετά με κατάλληλα εργαλεία ανοίγματος και διαχωρισμού (ψαλίδια, νυστέρια, λαβίδες, ανατομικές βελόνες) το κάθε τμήμα του πεπτικού σωλήνα (στομάχι, έντερο και πυλωρικά τυφλά) απομονωνόταν και ζυγιζόταν σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι από τον στόμαχο απομονωνόταν και ζυγιζόταν ξεχωριστά, το περιεχόμενο (βλέννη) αυτού. Αυτό γινόταν λόγω πιθανότητας το περιεχόμενο του στομάχου να μετέβαλλε την ενεργότητα των ενζύμων όλου του ιστού κατά τρόπο τέτοιο που να μην γινόταν σαφές αν η παρατηρούμενη ενεργότητα (και η αντίστοιχη πεπτική ικανότητα) οφείλεται σε ένζυμα τα οποία βρισκόντουσαν στην βλέννη ή στον ιστό αυτόν καθ' αυτόν. Μετά το διαχωρισμό και το ζύγισμα των επιμέρους τμημάτων του πεπτικού σωλήνα ακολουθούσε 10 φορές αραίωση με φυσιολογικό ορό.

Η όλη διαδικασία του διαχωρισμού των τμημάτων του πεπτικού σωλήνα λάμβανε χώρα πάνω σε πάγο (χρήση παγοκυστών) ώστε να μην χάνεται πολύτιμη και (μετρήσιμη ακολούθως) ενζυμική ενεργότητα.

Ακολουθούσε ομογενοποίηση με φυσιολογικό ορό και φυγοκέντρωση για 10' ($4200 \times g$ στους 4°C) των δειγμάτων πριν το υπερκείμενο αποθηκευθεί σε erpendorf όγκου 1,5 ml (και από εκεί στην κατάψυξη στους -30°C), από τα οποία θα ξεκινούσε ο προσδιορισμός πρωτεασών και καρβουδρασών. Η χρησιμοποιούμενη μέθοδος ομογενοποίησης ήταν αυτή της λύσης κυττάρων με υπερήχους μέσα σε πάγο για να διατηρηθεί η χαμηλή θερμοκρασία (κάτω από 0°C) ώστε να αποφευχθεί η πρόωρη ενεργοποίηση των πεπτικών ενζύμων.

3.3.2 Προσδιορισμός πρωτεασών

Η ολική πρωτεολυτική ενεργότητα υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας με μικρές τροποποιήσεις τη μέθοδο της υδρόλυσης της καζεΐνης, μέθοδος που διατυπώθηκε από τον Kunitz το 1947 και τροποποιήθηκε από τον Walter 37 χρόνια μετά (1984). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) σε εύρος (1,5-10) των τιμών

του pH, τα οποία παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (πίν.5) μαζί με τα ένζυμα που αντιστοιχούν στην κάθε τιμή της κλίμακας του pH:

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα και αντιστοίχιση ενζύμων της κατηγορίας των πρωτεασών σε δεδομένες τιμές του pH

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	ΤΙΜΗ ΤΟΥ pH	ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ ENZYMA
0,1 M KCl-HCl	1,5	Πεψίνη
0,1 M citrate-0,2 M phosphate	7,0	Θρυψίνη, χυμοθρυψίνη
0,1 M glycine-NaOH	10,0	Καρβοξυπεπτιδάσες, αμινοπεπτιδάσες

Οι τιμές για κάθε επίπεδο pH αποτελούν μία ένδειξη για την ενεργότητα συγκεκριμένων πρωτεασών όπως φαίνεται από στον ανωτέρω πίνακα και περιγράφηκε από τους Papoutsoglou και Lyndon (2006).

Ο προσδιορισμός των ενζύμων διεξαγόταν στο έντερο, στα πυλωρικά τυφλά και στον στόμαχο (ιστό και περιεχόμενο όπου υπήρχε). Αρχικά γινόταν εξαγωγή των υπό εξέταση δειγμάτων από την κατάψυξη και ακολουθούσε ανάδεδυσή τους με συσκευή Vortex προκειμένου αφενός μεν να ξεπαγώσουν και αφετέρου να μην περιέχουν τεμάχια πάγου.

Σύμφωνα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο, 250 μl από κάθε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), 100 μl δείγματος (από τα erpendorfs που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προηγούμενη φάση της ομογενοποίησης-φυγοκέντρωσης) και 250 μl υποστρώματος καζεΐνης τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες διαβάθμισης και αυτοί με τη σειρά τους στον επωαστήρα στους 17°C (θερμοκρασία ανάλογη με αυτή των χώρων εκτροφής των ιχθύων μία ημέρα πριν τη δειγματοληψία) για 60', ώστε να επιτευχθεί η ελεγχόμενη ενεργοποίηση των ενζύμων κάτω από την προαναφερθείσα συγκεκριμένη θερμοκρασία. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης δινόταν τέλος στην ενζυμική αντίδραση με προσθήκη 600 μl TCA 8% (τριχλωροακετικό οξύ) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με το σύνολο αυτών να διατηρείται στον πάγο (60' στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2°C) για να μην υπάρξει ενζυμική απώλεια.

Ακολούθησε φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 1800 x g στους 4 °C για 10' και φωτομέτρηση στα 280 nm στην οποία υπολογιζόταν και καταγραφόταν η απορρόφηση του υπερκείμενου.

Για κάθε σωλήνα-ιστό χρησιμοποιούσαν και ένας αντίστοιχος σωλήνας control. Η μοναδική διαφορά στη μέθοδο που αφορούσε στα control ήταν η παντελής απουσία επώασης. Γινόταν η προσθήκη TCA και τα δείγματα τοποθετούνταν στο ψυγείο επίσης για 60', ενώ σαν standard διάλυμα (για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης) χρησιμοποιήθηκε τυροσίνη. Η πρότυπη καμπύλη δημιουργήθηκε σε συγκεντρώσεις 0-40-60-80-100 και 200 μl τυροσίνης.

Με την απορρόφηση του υπερκείμενου, δεδομένη από τις ενδείξεις του φωτόμετρου, χρησιμοποιώντας την καμπύλη των standards ακολουθούσε ο προσδιορισμός αρχικά της ενεργότητας του στομάχου (Σ1, Σ2 σε τιμή pH=1,5), των πυλωρικών τυφλών και του εντέρου σε τιμές pH=7 και 10 (mg τυροσίνης/ g ιστού/ min υδρόλυσης) και τελικά στον υπολογισμό των ακόλουθων μεγεθών :

- ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ Σ1 (Π.Ι.Σ1)=Ενεργότητα Σ1 X Βάρος Σ1
όπου Σ1= Περιεχόμενο στομάχου (βλέννη και επίχρισμα).
- ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ Σ2 (Π.Ι.Σ2)=Ενεργότητα Σ2 X Βάρος Σ2
όπου Σ2= Ιστός στομάχου
- ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΥΛΩΡΙΚΩΝ ΤΥΦΛΩΝ ΣΕ ΤΙΜΗ pH=7 (Π.Ι.Π.Τ.7)=
Ενεργότητα πυλωρικών τυφλών σε τιμή pH=7 X Βάρος πυλωρικών τυφλών
 - Ομοίως και για τιμή pH=10 (Π.Ι.Π.Τ.10)
 - Ομοίως και για το έντερο (Π.Ι.Ε7, Π.Ι.Ε.10)
- ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ Σ1 (Π.Ι.Σ1)+ ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ Σ2 (Π.Ι.Σ2)=
ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ Σ1Σ2 (Π.Ι.Σ1Σ2)
 - ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΥΛΩΡΙΚΩΝ ΤΥΦΛΩΝ ΣΕ ΤΙΜΗ pH=7 (Π.Ι.Π.Τ.7)+
ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΥΛΩΡΙΚΩΝ ΤΥΦΛΩΝ ΣΕ ΤΙΜΗ pH=10 (Π.Ι.Π.Τ.10)=
ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΥΛΩΡΙΚΩΝ ΤΥΦΛΩΝ ΣΕ ΤΙΜΕΣ pH=7+10 (Π.Ι.Π.Τ.710)
 - Ομοίως και για το έντερο Π.Ι.Ε.7+Π.Ι.Ε.10=Π.Ι.Ε.710
 - ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΥΛΩΡΙΚΩΝ ΤΥΦΛΩΝ ΣΕ ΤΙΜΗ pH=7 (Π.Ι.Π.Τ.7)+
ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΝΤΕΡΟΥ ΣΕ ΤΙΜΗ pH=7 (Π.Ι.Ε.7)= ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ
(Π.Ι.Π.Τ.+Ε.7) ΣΕ ΤΙΜΗ pH=7
 - Ομοίως και για τιμή του pH=10 (Π.Ι.Π.Τ.+Ε.10)
- ΟΛΙΚΗ ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ
(Ο.Π.Ι.)=Π.Ι.Σ1+Π.Ι.Σ2+Π.Ι.Π.Τ.7+Π.Ι.Π.Τ.10+Π.Ι.Ε.7+Π.Ι.Ε.10
 - (Π.Ι.Σ1/Ο.Π.Ι.) X 100. Προσδιορισμός του ποσοστού της ολικής πεπτικής ικανότητας που εντοπίζεται στο Σ1
 - (Π.Ι.Σ2/Ο.Π.Ι.) X 100. Προσδιορισμός του ποσοστού της ολικής πεπτικής ικανότητας που εντοπίζεται στο Σ2
 - (Π.Ι.Π7/Ο.Π.Ι.) X 100. Προσδιορισμός του ποσοστού της ολικής πεπτικής ικανότητας που εντοπίζεται στα πυλωρικά τυφλά σε τιμή pH=7
 - (Π.Ι.Π10/Ο.Π.Ι.) X 100. Προσδιορισμός του ποσοστού της ολικής πεπτικής ικανότητας που εντοπίζεται στα πυλωρικά τυφλά σε τιμή pH=10
 - (Π.Ι.Ε7/Ο.Π.Ι.) X 100. Προσδιορισμός του ποσοστού της ολικής πεπτικής ικανότητας που εντοπίζεται στο έντερο σε τιμή pH=7
 - (Π.Ι.Ε10/Ο.Π.Ι.) X 100. Προσδιορισμός του ποσοστού της ολικής πεπτικής ικανότητας που εντοπίζεται στο έντερο σε τιμή pH=10.
 - (Π.Ι.Σ1Σ2/Ο.Π.Ι.) X 100

- (Π.Ι.Π.Τ.710/Ο.Π.Ι.) X 100
- (Π.Ι.Ε.710/Ο.Π.Ι.) X 100
- (Π.Ι.Π.Τ+E.7/ΟΠ.Ι.) X 100
- (Π.Ι.Π.Τ+E.10/Ο.Π.Ι.) X 100
- ΟΛΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ= Ο.Π.Ι./ βάρος Σ1+Σ2+Π+E
- {ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ Σ1 (Π.Ι.Σ1)/ ΒΑΡΟΣ ΨΑΡΙΟΥ ΣΕ g} X 100
- Ομοίως για Π.Ι.Σ2, Π.Ι.Π.7, Π.Ι.Π.10, Π.Ι.Ε.7, Π.Ι.Ε.10, Π.Ι.Σ1Σ2, Π.Ι.Π.Τ.710, Π.Ι.Ε.710, Π.Ι.Π.Τ + Ε.7, Π.Ι.Π.Τ.+Ε.10
- (Ο.Π.Ι./ g σωματικού βάρους ψαριού) X 100
- ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΜΜΕΣΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ Σ1Σ2 (Ε.Ε.Σ1Σ2) που ορίζεται ως το κλάσμα της πεπτικής ικανότητας του στομάχου στο σύνολό του (Σ1+Σ2) προς το βάρος του στομάχου στο σύνολό του δηλαδή: $E.E.Σ1Σ2=Π.Ι.Σ1Σ2/βάρος Σ1+Σ2$

3.3.3 Προσδιορισμός καρβοϋδρασών

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των καρβοϋδρασών χρησιμοποιήθηκε με μικρές τροποποιήσεις, η μέθοδος της υδρόλυσης του αμύλου Somogyi-Nelson (Papoutsoglou and Lyndon, 2006).

Αναλυτικά σε αυτή τη διαδικασία γινόταν χρήση ενός ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) σε τιμή pH=7,6 (0,1M citrate-0,2 M phosphate) και 4 διαφορετικά αντιδραστήρια (1,2,3,4). Το αντιδραστήριο 3 κίτρινου χρώματος (μολυβδούχο αμμώνιο, θεικό οξύ και αρσενικό νάτριο) χρησιμοποιούταν αυτούσιο ενώ τα 1 (ανθρακικά και θεικά άλατα του νατρίου) και 2 (θεικός χαλκός και θεικό οξύ) χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του αντιδραστηρίου 4 σε αναλογία 25:1.

Τα δείγματα εξάγονταν από την κατάψυξη στην οποία είχαν διατηρηθεί, για να ξεπαγώσουν και ακολουθούσε ανάδευσή τους με συσκευή Vortex ώστε να αποκτήσουν υγρή μορφή χωρίς τεμάχια πάγου.

Σύμφωνα με τη διαδικασία σε δοκιμαστικούς σωλήνες (15 ml) αρχικά τοποθετούνταν 1 ml από το προαναφερόμενο buffer και 0,1 ml δείγματος. Η συνέχεια περιελάμβανε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας (0,5 ml) αμύλου το οποίο παρασκευαζόταν με ανάμειξη 1 g αμύλου με 3 ml μεθανόλης, προσθηκη 150 ml απεσταγμένου νερού και βρασμός 15-20' για δημιουργία όγκου 100 ml.

Στα δείγματα εφαρμοζόταν επώαση στον επωαστήρα (πάλι στους 17°C) για 90'. Την διαδικασία της επώασης ακολουθούσε βρασμός χρονικής διάρκειας 20' αφού πρώτα γινόταν

λήψη 0,1 ml επωασμένου δείγματος και προσθήκη σε αυτό 0,9 ml απεσταγμένου νερού (δημιουργία όγκου 1 ml). Λίγο πριν το βρασμό στους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνταν 1 ml αντιδραστήριου 4 κυανού χρώματος (όπως προέκυπτε από την ανάμειξη των αντιδραστηρίων 1 και 2 που αναφέρθηκαν παραπάνω), ενώ μετά από αυτόν, καθώς επίσης και μετά από ένα σύντομη χρονικής διάρκειας κρύωμα των σωλήνων για 10' ακολουθούσε άμεση προσθήκη 1 ml από το αντιδραστήριο 3, ανάδευση (συσκευή Vortex) των δειγμάτων, προσθήκη 10 ml απεσταγμένου νερού και φωτομέτρηση των δειγμάτων στην οποία υπολογιζόταν η απορρόφηση του υπερκείμενου σε μήκος κύματος 600 nm.

Στους δοκιμαστικούς σωλήνες των control δεν εφαρμοζόταν η επώαση των 90', με την υπόλοιπη διαδικασία να είναι κοινή με τους δοκιμαστικούς σωλήνες των δειγμάτων (buffer, δείγμα, άμυλο, προσθήκη 0,1 ml από μίγμα και συνέχιση της διαδικασίας). Σαν standard διάλυμα (για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης) χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 0-40-60-80-100 και 200 μl γλυκόζης.

Έχοντας ως δεδομένη την απορρόφηση του υπερκείμενου από τις ενδείξεις του φωτόμετρου, χρησιμοποιώντας την καμπύλη των standards υπολογίστηκαν αρχικά η ενεργότητα πυλωρικών τυφλών και εντέρου σε mg γλυκόζης/ g ιστού/ min υδρόλυσης) και τελικά τα ακόλουθα μεγέθη :

- ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΥΛΩΡΙΚΩΝ ΤΥΦΛΩΝ (Π.Ι.Π.Τ.) = Ενεργότητα πυλωρικών τυφλών X βάρος πυλωρικών τυφλών
- ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΕΝΤΕΡΟΥ (Π.Ι.Ε.) = Ενεργότητα εντέρου X βάρος εντέρου
- ΟΛΙΚΗ ΠΕΠΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (Ο.Π.Ι.) = Π.Ι.Π.Τ.+Π.Ι.Ε.
- ΟΛΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ =Ο.Π.Ι./ βάρος εντέρου+ βάρος πυλωρικών τυφλών
- (Π.Ι.Π.Τ./Ο.Π.Ι.) X 100. Προσδιορισμός του ποσοστού της ολικής πεπτικής ικανότητας που εντοπίζεται στα πυλωρικά τυφλά.
- (Π.Ι.Ε./Ο.Π.Ι.) X 100. Προσδιορισμός του αντίστοιχου ποσοστού για το έντερο.
- (Ο.Π.Ι./ g σωματικού βάρους ψαριού) X 100
- (Π.Ι.Π.Τ./ g σωματικού βάρους ψαριού) X 100
- (Π.Ι.Ε./ g σωματικού βάρους ψαριού) X 100

4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Σε όλες τις παραπάνω μαθηματικές εκφράσεις διενεργήθηκε στατιστική επεξεργασία στην οποία το σωματικό βάρος και ο γοναδοσωματικός δείκτης χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβλητές εξαιτίας των διαφορετικών βαρών των ιχθύων και της διαφορετικής φάσης ωρίμανσης των γονάδων τους.

Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση της παραλλακτικότητας ενός παράγοντα (one-way ANOVA, Analysis of Variance) και μέσω του Statgraphics 4.0. Το επίπεδο της σημαντικότητας (P-significance level) ορίστηκε στο 5% (ποσοστό ακριβείας 95%). Σε κάθε περίπτωση πάντως για την οποία το επίπεδο σημαντικότητας ήταν μικρότερο ή ίσο του 5% ακολουθούσε η διαδικασία των πολλαπλών συγκρίσεων (multiple range tests) με τη βοήθεια του κριτηρίου Duncan. Στην περίπτωση που δεν ίσχυε η κανονική κατανομή και δεν υπήρχε ομοιογένεια της διασποράς, τα δεδομένα υπόκεινταν σε μαθηματικούς μετασχηματισμούς (π.χ. λογαρίθμηση, τετραγωνική ρίζα) ή ακολουθούσε ο έλεγχος της σημαντικότητας κατά Kruskal-Wallis.

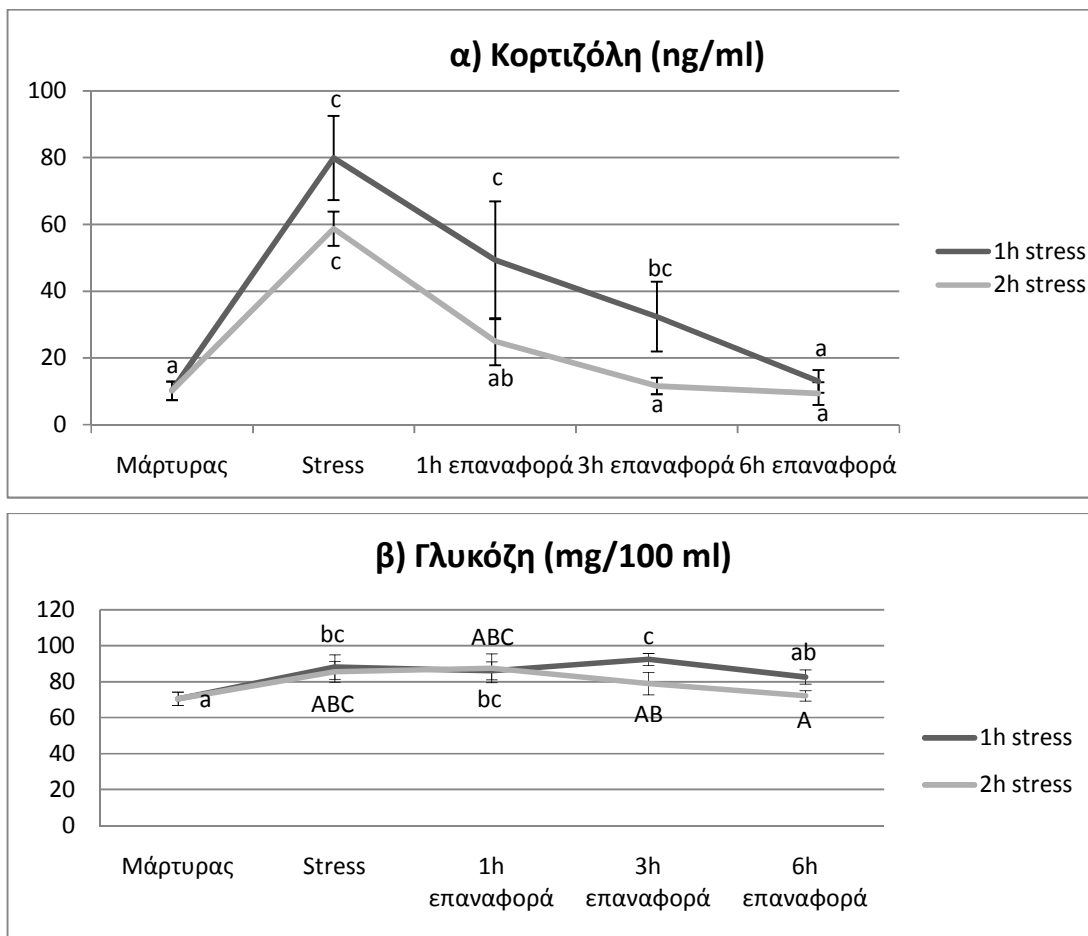
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της διενεργηθείσας στατιστικής επεξεργασίας τόσο σε επίπεδο αιματολογικών παραμέτρων, όσο και σε επίπεδο πεπτικών ενζύμων της κατηγορίας των καρβοϋδρασών και των πρωτεασών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ ng/ml	ΓΛΥΚΟΖΗ mg/100ml
Μάρτυρας	10,2±2,76 a	70,48±3,809 a
1h stress	79,9±12,61 c	88,12±6,773 bc
1h επαναφορά	49,3±17,65 c	86,02±4,964 bc
3h επαναφορά	32,4±10,45 bc	92,37±3,306 c
6h επαναφορά	13,0±3,41 a	82,61±3,915 ab
2h stress	58,8±5,10 c	85,45±5,675 abc
1h επαναφορά	24,9±7,04 ab	87,45±8,001 abc
3h επαναφορά	11,6±2,46 a	78,88±6,231 ab
6h επαναφορά	9,4±3,39 a	72,10±2,823 a
(P)	***	**

(P) : Επίπεδο σημαντικότητας Μ.Σ.= Μη Σημαντικό * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά



Διάγραμμα 2-ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ: α) Διακύμανση επιπέδων κορτιζόλης ανά χειρισμό σε ng/ml β) Διακύμανση επιπέδων γλυκόζης ανά χειρισμό σε mg/100 ml

Στην περίπτωση της κορτιζόλης (πίνακας 6, διάγραμμα 2α) με την εφαρμογή του stress παρατηρήθηκε μία αύξηση των επιπέδων αυτής της ορμόνης, τόσο μετά από 1, όσο και μετά από 2 ώρες stress. Όταν το stress είχε διάρκεια 1 ώρα τα επίπεδα της κορτιζόλης επανήλθαν στα επίπεδα του μάρτυρα 6 ώρες μετά. Όταν το stress είχε διάρκεια 2 ώρες, επαναφορά των τιμών στα επίπεδα του μάρτυρα παρατηρήθηκε ήδη από την 1 ώρα επαναφοράς των φυσιολογικών συνθηκών

Το οξύ stress συνωστισμού είχε σαν συνέπεια επίσης την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης (πίνακας 6-διάγραμμα 2β) σε σχέση με εκείνα του μάρτυρα στην περίπτωση που η χρονική διάρκεια ήταν 1 ώρα. Στην περίπτωση των 2 ωρών δεν παρουσιάστηκε αυτή η διαφοροποίηση. Το μέγιστο (6 ώρες) μετά-stress χρονικό διάστημα επαναφοράς των φυσιολογικών συνθηκών, εξασφάλισε όπως και στην περίπτωση της κορτιζόλης επαναφορά των επιπέδων της γλυκόζης στα προ-stress επίπεδα ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας του οξέος stress (1 ή 2 ώρες).

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΕΠΤΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΣΤΟΜ%Π.Σ.	Σ1%Π.Σ	Σ2%Π.Σ	Π%Π.Σ.
Μάρτυρας	40,54±1,287	15,64±1,359	23,78±1,115	34,28±1,374
1h stress	40,29±1,615	13,71±1,152	24,14±0,870	32,19±1,604
1h επαναφορά	44,18±3,777	19,00±4,910	21,53±2,155	28,72±2,202
3h επαναφορά	39,33±1,616	12,78±0,989	21,70±0,279	29,22±1,743
6h επαναφορά	37,14±0,938	14,38±2,005	20,34±1,287	36,27±0,707
2h stress	45,33±1,549	18,94±1,178	24,07±1,439	30,09±1,050
1h επαναφορά	40,82±2,165	13,98±1,337	23,16±0,899	32,99±0,812
3h επαναφορά	43,15±1,394	13,74±1,628	23,69±1,024	30,64±1,234
6h επαναφορά	45,69±1,288	12,46±0,854	22,23±1,436	30,84±1,254
(P)	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ENT% Π.Σ.	ΣΧ.ΜΗΚ.ΣΤΟΜ.	ΣΧ.ΜΗΚ.ENT.
Μάρτυρας	18,77±0,562	0,203±0,0082	0,440±0,0382 a
1h stress	22,23±1,559	0,202±0,0077	0,446±0,0180 a
1h επαναφορά	19,13±2,195	0,195±0,0097	0,496±0,0123 ab
3h επαναφορά	20,71±0,752	0,183±0,0073	0,519±0,0246 ab
6h επαναφορά	19,42±1,373	0,183±0,0066	0,412±0,0196 a
2h stress	17,90±1,154	0,208±0,0071	0,443±0,0238 a
1h επαναφορά	21,48±1,541	0,204±0,0102	0,514±0,0113 b
3h επαναφορά	19,14±1,342	0,206±0,0135	0,483±0,0253 ab
6h επαναφορά	18,30±1,385	0,208±0,0115	0,485±0,0095 ab
(P)	Μ.Σ.	Μ.Σ.	*

(P) : Επίπεδο σημαντικότητας Μ.Σ.= Μη Σημαντικό * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. ΣΤΟΜ.= Στόμαχος (Σ1+Σ2) σε g, Σ1=Περιεχόμενο στομάχου (Βλέννη+Επίχρισμα) σε g, Σ2=Μυς στομάχου σε g, Π.= Πυλωρικά τυφλά σε g, ENT.= Βάρος εντέρου σε g, Π.Σ.=Πεπτικός Σωλήνας σε g, ΣΧ.ΜΗΚ.ΣΤΟΜ.= Σχετικό Μήκος Στομάχου σε cm, ΣΧ.ΜΗΚ.ENT.= Σχετικό Μήκος Εντέρου σε cm

Το σχετικό μήκος εντέρου (πίνακας 7) δεν διαφοροποιήθηκε στατιστικά σε σχέση με εκείνο του μάρτυρα τόσο στα άτομα στα οποία εφαρμόστηκε οξύ stress 1 ώρας, όσο και σε εκείνα στα οποία το stress ήταν χρονικής διάρκειας 2 ωρών. Διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα παρατηρήθηκε μόνο στα άτομα της κατηγορίας χειρισμού 2 ώρες stress-1 ώρα επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8 : ΤΥΠΙΚΕΣ ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ (g)	ΟΛ. ΜΗΚ. (cm)	ΣΥΝΤ.ΕΥΡ. (gr/cm ³)x100
Μάρτυρας	614,89±65,730 bcd	36,325±1,1792 cde	1,21±0,040 bc
1h stress	613,17±87,488 bc	35,188±1,3534 bcd	1,24±0,052 bc
1h επαν.	247,58±21,524 a	28,400±0,3625 a	1,04±0,067 a
3h επαν.	414,95±42,307 b	32,963±0,8233 bc	1,11±0,042 ab
6h επαν.	781,98±86,447 cd	39,813±1,4606 e	1,17±0,021 abc
2h stress	447,95±45,850 b	32,156±1,0225 b	1,20±0,042 abc
1h επαν.	825,27±72,070 d	39,078±1,1519 de	1,33±0,037 c
3h επαν.	732,58±45,941 cd	38,813±0,7600 de	1,24±0,031 bc
6h επαν.	686,28±80,633 cd	37,750±1,4047 de	1,23±0,057 bc
(P)	***	***	*

ΟΛ.ΜΗΚ.= Ολικό μήκος, ΣΥΝΤ.ΕΥΡ.= Συντελεστής Ευρωστίας

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά, επαν. = επαναφορά (recovery).

Παρόμοια με το σχετικό μήκος εντέρου, κατάσταση παρατηρείται και στο σωματικό βάρος των ιχθύων (πίνακας 8). Διαφορά σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα παρατηρείται μόνο στα άτομα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία χειρισμού 1 ώρα stress-1 ώρα επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών, φαινόμενο που παρατηρείται και στον συντελεστή ευρωστίας. Στην περίπτωση του ολικού μήκους των ιχθύων του πειράματος διαφοροποίηση από τα επίπεδα του μάρτυρα παρατηρείται σε δύο κατηγορίες χειρισμών: 1 ώρα stress-1 ώρα επαναφορά φυσιολογικών συνθηκών και 2 ώρες stress.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9 : ΒΙΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΓΟΝ.%Σ.Β.	Π.Σ.%Σ.Β.	ΣΠΛ.%Σ.Β.	ΗΠΑΡ% Σ.Β.
Μάρτυρας	7,78±1,469 bc	4,75±0,228	0,20±0,014	0,81±0,026
1h stress	8,15±1,698 bc	4,34±0,247	0,16±0,015	0,81±0,034
1h επαν.	5,35±1,876 ab	5,34±0,666	0,17±0,018	0,88±0,059
3h επαν.	4,31±1,506 ab	4,90±0,523	0,13±0,018	0,87±0,053
6h επαν.	7,76±1,247 bc	4,98±0,561	0,18±0,039	0,85±0,032
2h stress	1,28±0,321 a	5,88±0,403	0,17±0,015	0,86±0,034
1h επαν.	11,49±2,146 c	4,72±0,411	0,17±0,021	0,75±0,035
3h επαν.	9,02±1,798 bc	4,72±0,383	0,17±0,015	0,85±0,050
6h επαν.	8,47±2,267 bc	4,44±0,427	0,18±0,036	0,87±0,106
(P)	**	Μ.Σ.	Μ.Σ.	Μ.Σ.

ΓΟΝ.= Γονάδες, Π.Σ.= Πεπτικός Σωλήνας, ΣΠΛ.= Σπλήνας, Σ.Β.= Σωματικό Βάρος

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *= P<0,05, **= P<0,01, ***= P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery)

Όσον αφορά τα βιομετρικά χαρακτηριστικά των ιχθύων του πειράματος (πίνακας 9), στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση που οι γονάδες αυτών εκφράστηκαν σαν ποσοστό του σωματικού τους βάρους και μόνο στα άτομα της κατηγορίας χειρισμού των 2 ωρών stress.

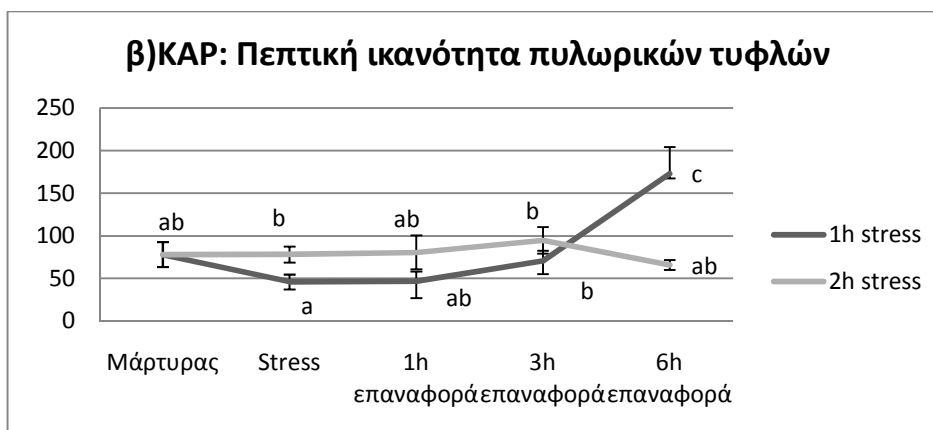
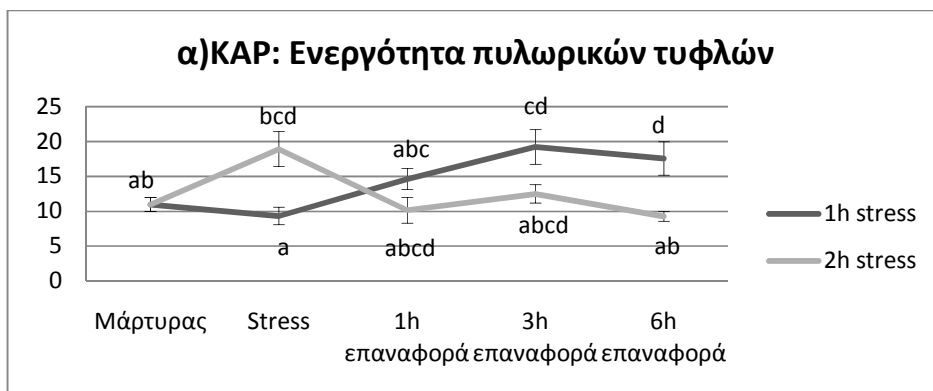
ΚΑΡΒΟΥΔΡΑΣΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: ΚΑΡΒΟΥΔΡΑΣΕΣ- ΠΥΛΩΡΙΚΑ ΤΥΦΛΑ

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Ενεργότητα	Πεπτική ικανότητα	Πεπτική ικανότητα % Σ.Β
Μάρτυρας	10,96±1,016 ab	78,07±14,718 ab	13,23±1,736 abc
1h stress	9,33±1,271 a	46,29±8,307 a	9,79±1,360 a
1h επαν.	14,63±1,524 abc	47,03±10,995 ab	18,03±2,550 bcd
3h επαν.	19,23±2,499 cd	70,67±11,834 b	17,99±2,599 bcd
6h επαν.	17,59±2,384 d	173,03±31,133 c	25,28±1,681 d
2h stress	18,94±2,505 bcd	78,12±9,281 b	26,76±4,088 cd
1h επαν.	10,14±1,820 abcd	80,62±19,853 ab	10,00±2,106 ab
3h επαν.	12,50±1,324 abcd	94,79±15,579 b	12,57±1,453 abc
6h επαν.	9,27±0,703 ab	65,81±5,818 ab	9,40±0,812 ab
(P)	***	***	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery). Σ.Β.= Σωματικό Βάρος

Η ενεργότητα μετρήθηκε σε mg γλυκόζης/g ιστού/min υδρόλυσης και η πεπτική ικανότητα σε mg γλυκόζης/min υδρόλυσης



Διάγραμμα 3-ΚΑΡΒΟΥΔΡΑΣΕΣ: α) Διακύμανση ενεργότητας πυλωρικών τυφλών ανά χειρισμό σε mg γλυκόζης/g ιστού/min υδρόλυσης, β) Διακύμανση της πεπτικής ικανότητας πυλωρικών τυφλών ανά χειρισμό σε mg γλυκόζης/min υδρόλυσης

Όταν το stress διήρκησε 1 ώρα η ενεργότητα των καρβοϋδρασών στα πυλωρικά τυφλά (πίνακας 10, διάγραμμα 3α) δεν διέφερε από αυτή των μαρτύρων. Ωστόσο στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας παρατηρήθηκε 3 και 6 ώρες μετά από επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών. Το οξύ stress χρονικής διάρκειας 2 ωρών είχε σαν αποτέλεσμα μία αυξητική τάση της ενεργότητας των καρβοϋδρασών στα πυλωρικά τυφλά χωρίς να διαφοροποιηθεί σημαντικά από τα επίπεδα των μαρτύρων. Τάση μείωσης της ενεργότητας παρατηρήθηκε σε όλους τους μετά-stress χρόνους, η οποία τελικά επανήλθε πλήρως στα προ-stress επίπεδα μετά από 6 ώρες επαναφοράς των φυσιολογικών συνθηκών. Πάντως σε κανέναν από αυτούς τους χρόνους, η ενεργότητα των πυλωρικών τυφλών δεν διέφερε σημαντικά από αυτή των μαρτύρων.

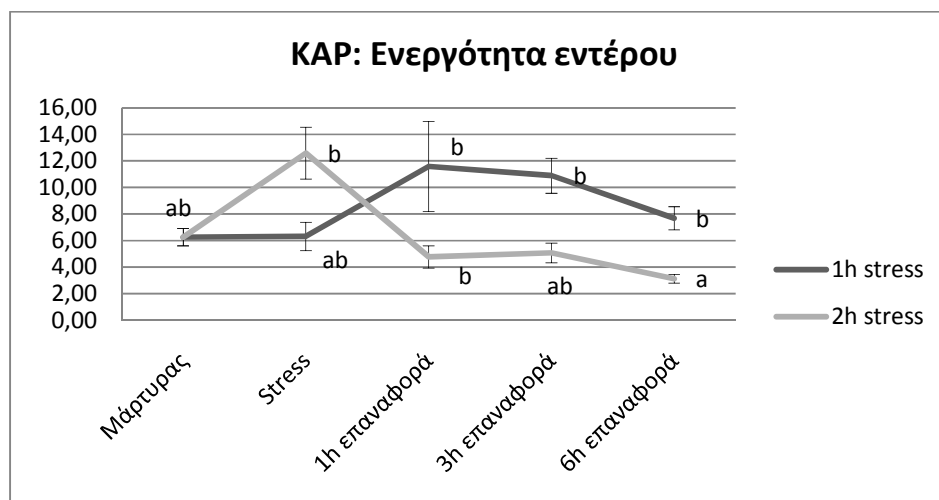
Η πεπτική ικανότητα των καρβοϋδρασών στα πυλωρικά τυφλά (πίνακας 10, διάγραμμα 3β) δεν φάνηκε να επηρεάζεται καθόλου ούτε από το stress, ούτε από τη χρονική διάρκεια αυτού. Η επαναφορά των ιχθύων στις προ-stress συνθήκες είχαν επίσης αποτέλεσμα την παραμονή της πεπτικής ικανότητας στα επίπεδα του μάρτυρα με μοναδική εξαίρεση την παρατηρούμενη αύξηση στην 1 ώρα stress- 6 ώρες επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών. Παρόμοια κατάσταση εμφανίστηκε όταν η πεπτική ικανότητα των καρβοϋδρασών στα πυλωρικά τυφλά εκφράστηκε σαν ποσοστό του σωματικού βάρους των ιχθύων του πειράματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11 : ΚΑΡΒΟΥΔΡΑΣΕΣ-ΕΝΤΕΡΟ

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Ενεργότητα	Πεπτική ικανότητα	Πεπτική ικανότητα % Σ.Β
Μάρτυρας	6,25±0,651 ab	25,44±4,228	4,55±0,661 abc
1h stress	6,32±1,068 ab	18,09±2,369	4,44±0,794 abc
1h επαν.	11,58±3,401 b	25,91±8,562	9,89±2,766 bc
3h επαν.	10,90±1,327 b	20,48±4,406	8,15±1,722 c
6h επαν.	7,68±0,879 b	36,93±4,520	4,27±0,414 bc
2h stress	12,60±1,952 b	33,98±5,382	9,48±1,667 bc
1h επαν.	4,77±0,829 b	21,97±4,728	2,79±0,522 abc
3h επαν.	5,08±0,751 ab	23,08±4,961	2,96±0,473 ab
6h επαν.	3,13±0,325 a	12,87±1,921	1,90±0,265 a
(P)	*	Μ.Σ.	*

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery). Σ.Β.= Σωματικό Βάρος

Η ενεργότητα μετρήθηκε σε mg γλυκόζης/g ιστού/min υδρόλυσης και η πεπτική ικανότητα σαν mg γλυκόζης/min υδρόλυσης



Διάγραμμα 4-ΚΑΡΒΟΥΔΡΑΣΕΣ: Διακύμανση ενεργότητας εντέρου ανά χειρισμό σε mg γλυκόζης/g ιστού/min υδρόλυσης

Το οξύ stress δεν επέφερε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην ενεργότητα των καρβουδρασών του εντέρου (ούτε στην περίπτωση που η πεπτική ικανότητα αυτών στο έντερο εκφράστηκε σαν ποσοστό του σωματικού βάρους) ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας τόσο αυτού, όσο και της επαναφοράς που ακολούθησε. Τα επίπεδα δεν διέφεραν ποτέ από τα προ-stress επίπεδα του μάρτυρα (πίνακας 11, διάγραμμα 4).

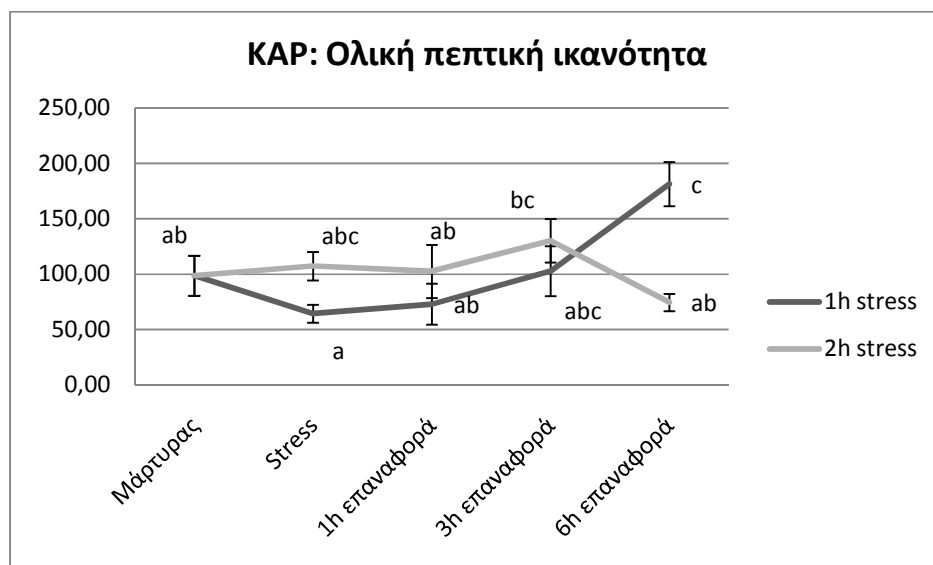
ΠΙΝΑΚΑΣ 12: ΚΑΡΒΟΥΔΡΑΣΕΣ-ΠΥΛΩΡΙΚΑ ΤΥΦΛΑ + ΕΝΤΕΡΟ

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Ο.Ε.	Ο.Π.Ι.	Ο.Π.Ι. % Σ.Β	Π.Ι.Π.%Ο.Π.Ι.	Π.Ι.Ε.%Ο.Π.Ι.
Μάρτυρας	9,26±0,808 ab	98,62±18,070 ab	16,95±2,261 abc	77,59±1,892	25,72±2,782
1h stress	8,27±1,115 a	64,38±8,080 a	14,23±1,805 ab	68,55±4,269	31,45±4,269
1h επαν.	13,26±1,886 abc	72,94±18,510 ab	27,92±4,714 cd	68,34±5,317	31,66±5,317
3h επαν.	15,38±1,988 abc	102,70±22,535 abc	25,18±3,683 bcd	73,47±4,489	26,53±4,489
6h επαν.	14,21±1,623 c	181,32±19,903 c	28,18±3,326 d	81,07±2,472	18,93±2,472
2h stress	16,81±2,107 bc	107,35±12,886 abc	32,01±5,331 cd	72,19±3,287	29,87±3,690
1h επαν.	8,11±1,382 abc	102,58±23,986 ab	12,79±2,544 abc	77,85±1,890	22,15±1,890
3h επαν.	10,59±1,043 abc	130,24±19,671 bc	17,54±2,207 abcd	81,80±1,734	18,20±1,734
6h επαν.	7,03±0,548 a	74,52±7,827 ab	11,30±0,930 a	82,97±1,870	17,03±1,870
(P)	**	**	**	Μ.Σ.	Μ.Σ.

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

επαν. = επαναφορά (recovery), Σ.Β.= Σωματικό Βάρος, Ο.Ε= Ολική Ενεργότητα, Ο.Π.Ι.= Ολική Πεπτική Ικανότητα, Π.Ι.Π.= Πεπτική Ικανότητα Πυλωρικών, Π.Ι. Ε.= Πεπτική Ικανότητα Εντέρου

Η ολική πεπτική ικανότητα (Ο.Π.Ι.) μετρήθηκε σαν άθροισμα της πεπτικής ικανότητας πυλωρικών τυφλών (mg γλυκόζης/min υδρόλυσης) και του εντέρου (mg γλυκόζης/min υδρόλυσης) και η ολική ενεργότητα σαν Ο.Π.Ι./ βάρος Ε+ βάρος Π.Τ. σε g



Διάγραμμα 5-ΚΑΡΒΟΥΔΡΑΣΕΣ: Διακύμανση της ολικής πεπτικής ικανότητας ανά χειρισμό σε mg γλυκόζης/min υδρόλυσης

Το οξύ stress ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας δεν επηρέασε, σε σχέση με τον μάρτυρα, την ολική πεπτική ικανότητα των καρβουδρασών (πίνακας 12, διάγραμμα 5). Μάλιστα παρουσιάστηκε μία εικόνα παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στην ενεργότητα των πυλωρικών τυφλών.

Στην περίπτωση της ολικής ενεργότητας (πίνακας 12) στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση με τον μάρτυρα παρατηρήθηκε μόνο στα άτομα του χειρισμού 1 ώρα stress- 6 ώρες επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών, με την ίδια εικόνα να παρουσιάζεται και όταν η ολική πεπτική ικανότητα των καρβουδρασών εκφράστηκε σαν ποσοστό του σωματικού βάρους.

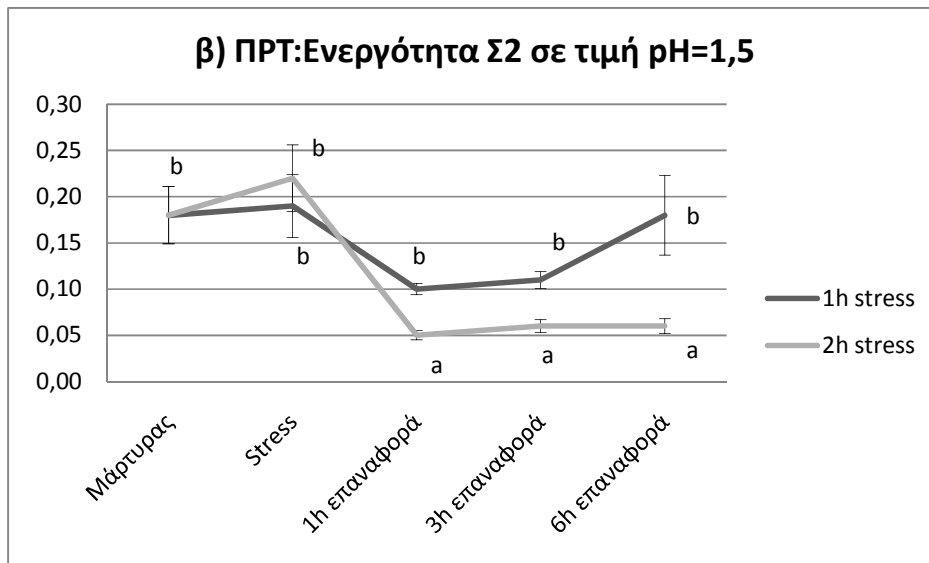
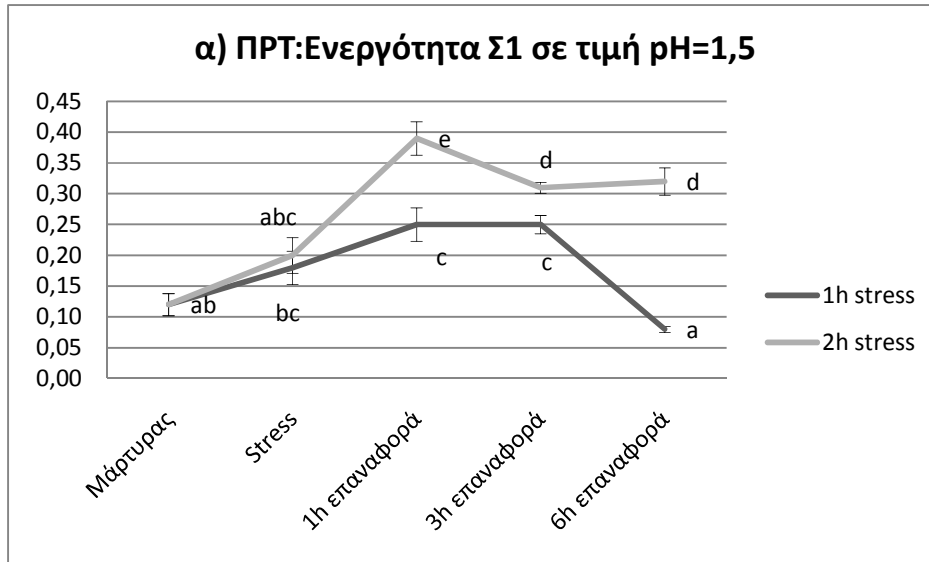
ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 13-ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ: Στομάχου (Σ1, Σ2 σε τιμή pH=1,5), πυλωρικών τυφλών (σε τιμή pH=7 και 10) και εντέρου (σε τιμή pH=7 και 10)

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Σ1 1,5	Σ2 1,5	Π7	Π10	E7	E10
Μάρτυρας	0,12±0,018 ab	0,18±0,031 b	0,13±0,006 d	0,17±0,008 c	0,11±0,003 fg	0,14±0,008 ef
1h stress	0,18±0,027 bc	0,19±0,034 b	0,14±0,009 d	0,20±0,008 d	0,09±0,005 ef	0,12±0,008 de
1h επαν.	0,25±0,027 c	0,10±0,006 b	0,13±0,009 d	0,20±0,008 d	0,12±0,008 g	0,17±0,015 f
3h επαν.	0,25±0,015 c	0,11±0,009 b	0,10±0,005 bc	0,15±0,006 c	0,06±0,005 bc	0,12±0,004 de
6h επαν.	0,08±0,005 a	0,18±0,043 b	0,10±0,015 ab	0,15±0,009 bc	0,05±0,005 b	0,10±0,010 cd
2h stress	0,20±0,029 abc	0,22±0,036 b	0,12±0,007 cd	0,15±0,010 c	0,09±0,008 def	0,11±0,006 cd
1h επαν.	0,39±0,027 e	0,05±0,005 a	0,08±0,010 ab	0,07±0,006 a	0,03±0,006 a	0,08±0,008 bc
3h επαν.	0,31±0,009 d	0,06±0,007 a	0,08±0,006 ab	0,09±0,012 a	0,08±0,002 de	0,05±0,004 a
6h επαν.	0,32±0,022 d	0,06±0,008 a	0,07±0,011 a	0,12±0,009 b	0,07±0,006 cd	0,07±0,003 b
(P)	***	***	***	***	***	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery). Σ1=Περιεχόμενο στομάχου (Βλέννη+Επίχρισμα) , Σ2=Ιστός στομάχου , Π.= Πυλωρικά τυφλά , Ε = Έντερο

Οι ενεργότητες μετρήθηκαν σε mg τυροσίνης/g ιστού/min υδρόλυσης

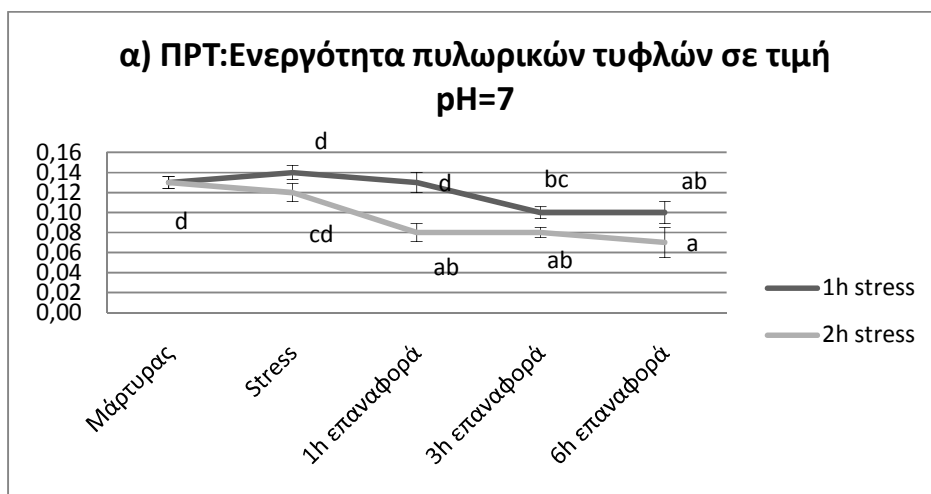


Διάγραμμα 6-ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ: α) Διακύμανση της πρωτεολυτικής ενεργότητας στο περιεχόμενο του στομάχου ανά χειρισμό σε mg τυροσίνης/g ιστού/min υδρόλυσης, β) Διακύμανση της πρωτεολυτικής ενεργότητας στον ιστό του στομάχου ανά χειρισμό σε mg τυροσίνης/g ιστού/min υδρόλυσης

Η πρωτεολυτική ενεργότητα του στομάχου σε επίπεδο περιεχομένου (Σ1) δεν διαφοροποιήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα μετά το οξύ stress (πίνακας 13, διάγραμμα 6α). Στην περίπτωση που το οξύ stress διήρκησε 1 ώρα, παρατηρήθηκε στατιστικά

σημαντική αύξηση της ενεργότητας η οποία επανήλθε στα προ-stress επίπεδα μόνο μετά από 6 ώρες επαναφοράς των φυσιολογικών συνθηκών. Στην περίπτωση του οξέος stress χρονικής διάρκειας 2 ωρών παρατηρήθηκε ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της ενεργότητας η οποία δεν επανήλθε στα προ-stress επίπεδα.

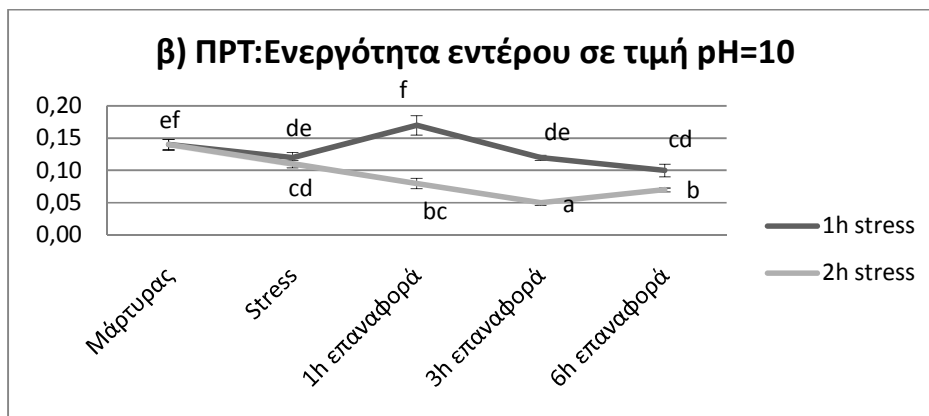
Στον ιστό του στομάχου (Σ2) όταν το οξύ stress συνωστισμού διήρκησε 1 ώρα δεν υπήρξε καμία μεταβολή σε σχέση με τα προ-stress επίπεδα (πίνακας 13, διάγραμμα 6β). Διαφοροποίηση παρατηρείται μόνο στην περίπτωση που το οξύ stress ήταν δίωρης χρονικής διάρκειας. Σε αυτή την περίπτωση αρχικά δεν παρατηρείται διαφοροποίηση από τα επίπεδα του μάρτυρα. Ωστόσο η ενεργότητα μειώθηκε στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα ακόμα και μετά από 6 ώρες επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών.



Διάγραμμα 7-ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ: α) Διακύμανση της πρωτεολυτικής ενεργότητας των πυλωρικών τυφλών σε τιμή του pH=7 ανά χειρισμό σε mg τυροσίνης/g ιστού/min υδρόλυσης, β) Διακύμανση της πρωτεολυτικής ενεργότητας των πυλωρικών τυφλών σε τιμή του pH=10 ανά χειρισμό σε mg τυροσίνης/g ιστού/min υδρόλυσης.

Παρόμοια μη διαφοροποίηση με τα επίπεδα του μάρτυρα, παρατηρήθηκε σε επίπεδο πυλωρικών τυφλών (πίνακας 13, διάγραμμα 7α) ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας του οξέος stress και σε τιμή του pH=7. Διαφοροποίηση παρατηρείται και πάλι μετά το stress. Ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας του stress, 3 και 6 ώρες μετά από επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών, παρατηρείται μείωση της ενεργότητας σε σχέση με τα προ-stress επίπεδα.

Σε τιμή του pH=10 (πίνακας 13, διάγραμμα 7β) το οξύ stress διάρκειας 1 ώρας προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση (αύξηση) της πρωτεολυτικής ενεργότητας σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα, η οποία επανήλθε στα προ-stress επίπεδα 3 και 6 ώρες μετά από επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών. Αντίθετα όταν το οξύ stress ήταν δίωρης χρονικής διάρκειας προκαλείται αρχικά μία διαφοροποίηση-μείωση (στατιστικά μη σημαντική) της ενεργότητας σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα. Η επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας είχε αποτέλεσμα περαιτέρω μείωση, με αυτή να είναι μικρότερη μετά από 6 ώρες.



Διάγραμμα 8-ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ: α) Διακύμανση της πρωτεολυτικής ενεργότητας στο έντερο σε τιμή του pH=7 ανά χειρισμό σε mg τυροσίνης/g ιστού/min υδρόλυσης, β) Διακύμανση της πρωτεολυτικής ενεργότητας στο έντερο σε τιμή του pH=10 ανά χειρισμό σε mg τυροσίνης/g ιστού/min υδρόλυσης

Στο έντερο και σε τιμή του pH=7 (πίνακας 13, διάγραμμα 8α), το οξύ stress συνωστισμού (οποιασδήποτε χρονικής διάρκειας) δεν προκάλεσε κάποια σημαντική διαφοροποίηση της πρωτεολυτικής ενεργότητας από τα επίπεδα του μάρτυρα, παρότι αυτή μειώθηκε ελαφρά. Διαφοροποίηση άρχισε να παρατηρείται κατά την επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών. Έτσι 1 ώρα μετά από επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για οξύ stress χρονικής διάρκειας 1 ώρας παρότι δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα (παρότι αυξήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα μετά από οξύ stress 1 ώρας), παρατηρήθηκε εντονότατη μείωση και διαφοροποίηση από τα προ-stress επίπεδα στην περίπτωση που το stress ήταν δίωρης χρονικής διάρκειας. Μάλιστα τόσο στη 1 όσο και στις 2 ώρες stress η πρωτεολυτική ενεργότητα δεν επανήλθε ποτέ (από εκεί και μετά) στα προ-stress επίπεδα.

Σε τιμή του pH=10 (πίνακας 13, διάγραμμα 8β) ύστερα από οξύ stress 1 ώρας, αρχικά δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφοροποίηση της ενεργότητας σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα παρότι αυτή μειώθηκε. Με την επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για 1 ώρα, η ενεργότητα αυξήθηκε χωρίς να διαφέρει από τα προ-stress επίπεδα, ενώ 3 ώρες μετά παρατηρήθηκε μείωση (όχι διαφοροποίηση πάντως σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα) ενεργότητας σε επίπεδα όμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν μετά από οξύ stress συνωστισμού 1 ώρας. Διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα, που εκφράστηκε με μειωμένα επίπεδα ενεργότητας και στατιστικώς διαφοροποιημένα σε σχέση με τα αντίστοιχα του μάρτυρα, παρατηρήθηκε 6 ώρες μετά από επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών. Το οξύ stress συνωστισμού χρονικής διάρκειας 2 ωρών αρχικά προκάλεσε τη μείωση της πρωτεολυτικής ενεργότητας του εντέρου, η οποία δεν επανήλθε ποτέ στα προ-stress επίπεδα.

ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΜΕΜΟΝΟΜΕΝΩΝ ΙΣΤΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 14-ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ Α': Στομάχου (Σ1, Σ2 σε τιμή pH=1,5), πυλωρικών τυφλών (σε τιμή pH=7 και 10) και εντέρου (σε τιμή pH=7 και 10)

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Σ1 1,5	Σ2 1,5	Π7	Π10	Ε7	Ε10
Μάρτυρας	0,38±0,059 a	1,06±0,302 cd	0,90±0,109 c	1,12±0,149 c	0,42±0,048 d	0,54±0,055 d
1h stress	0,45±0,089 ab	1,15±0,286 cd	1,18±0,289 c	1,63±0,372 c	0,46±0,076 cd	0,53±0,087 cd
1h επαν.	0,80±0,343 bc	0,23±0,029 cd	0,42±0,074 c	0,62±0,108 c	0,27±0,044 d	0,38±0,079 d
3h επαν.	0,34±0,045 ab	0,27±0,026 bc	0,35±0,034 ab	0,48±0,037 b	0,14±0,019 b	0,25±0,018 abcd
6h επαν.	0,29±0,055 a	1,03±0,200 cd	0,98±0,157 bc	1,47±0,185 c	0,25±0,053 bc	0,49±0,073 bcd
2h stress	0,73±0,187 ab	0,72±0,122 d	0,57±0,060 c	0,78±0,109 c	0,27±0,038 cd	0,30±0,033 bcd
1h επαν.	1,19±0,178 c	0,29±0,045 a	0,63±0,153 a	0,55±0,098 a	0,13±0,021 a	0,29±0,061 abc
3h επαν.	1,15±0,250 c	0,32±0,041 ab	0,57±0,051 a	0,69±0,149 a	0,38±0,036 cd	0,31±0,086 a
6h επαν.	0,81±0,140 bc	0,29±0,053 a	0,44±0,049 a	0,82±0,077 b	0,29±0,048 bc	0,30±0,046 ab
(P)	***	***	***	***	***	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *= $P<0,05$, **= $P<0,01$, ***= $P<0,001$, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery). Σ1=Περιεχόμενο στομάχου (Βλέννη+Επίχρισμα), Σ2=Ιστός στομάχου, Π.= Πυλωρικά τυφλά, Ε = Έντερο Οι πεπτικές ικανότητες μετρήθηκαν σαν mg τυροσίνης/min υδρόλυσης

ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΤΙΜΗΣ ΤΟΥ pH

ΠΙΝΑΚΑΣ 15-ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ Β': Στομάχου Σ1+Σ2, πλωρικών τυφλών και εντέρου (σε τιμή pH=7+10)

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Σ1Σ21,5	Π710	E710
Μάρτυρας	1,44±0,317	2,02±0,252 c	0,96±0,102 d
1h stress	1,60±0,283	2,81±0,657 c	0,99±0,158 bcd
1h επαν.	1,03±0,345	1,04±0,180 c	0,64±0,122 cd
3h επαν.	0,59±0,050	0,91±0,120 b	0,40±0,032 b
6h επαν.	1,32±0,239	2,45±0,326 c	0,74±0,122 bcd
2h stress	1,45±0,190	1,35±0,155 c	0,61±0,088 bcd
1h επαν.	1,48±0,210	1,18±0,250 a	0,42±0,079 a
3h επαν.	1,47±0,282	1,26±0,198 ab	0,68±0,109 bc
6h επαν.	1,08±0,186	1,26±0,103 b	0,59±0,090 b
(P)	Μ.Σ.	***	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

επαν. = επαναφορά (recovery). Σ1Σ2=Στόμαχος στο σύνολό του (Σ1+Σ2), Π= Πλωρικά τυφλά, E= Έντερο 710=Συνδυασμός των δύο τιμών του pH (7και 10)

Οι συνδυασμένες πεπτικές ικανότητες μετρήθηκαν σαν άθροισμα των επιμέρους πεπτικών ικανοτήτων π.χ. Σ1Σ21,5= πεπτική ικανότητα Σ1 + πεπτική ικανότητα Σ2 (mg τυροσίνης/min υδρόλυσης)

ΠΙΝΑΚΑΣ 16-ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ Γ': Πλωρικών τυφλών+ εντέρου σε τιμή pH=7, πλωρικών τυφλών και εντέρου σε τιμή pH=10

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	ΠΕ7	ΠΕ10
Μάρτυρας	1,32±0,148 e	1,66±0,192 cd
1h stress	1,64±0,346 de	2,16±0,437 d
1h επαν.	0,69±0,105 de	1,00±0,165 d
3h επαν.	0,46±0,030 ab	0,72±0,008 c
6h επαν.	1,23±0,191 cd	1,97±0,240 c
2h stress	0,84±0,092 de	1,12±0,136 cd
1h επαν.	0,76±0,165 a	0,84±0,126 a
3h επαν.	0,95±0,067 bc	0,99±0,167 ab
6h επαν.	0,73±0,087 ab	1,12±0,116 b
(P)	***	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

επαν. = επαναφορά (recovery). ΠΕ= Πλωρικά τυφλά +Έντερο. Η πεπτική ικανότητα ΠΕ7 υπολογίστηκε σαν άθροισμα της πεπτικής ικανότητας των πλωρικών τυφλών και του εντέρου σε τιμή pH=7. Ομοίως και η πεπτική ικανότητα ΠΕ10 (σε τιμή pH=10) . Όλες σε mg τυροσίνης/min υδρόλυσης

Το οξύ stress συνωστισμού δεν προκάλεσε στατιστική διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα, στην πεπτική ικανότητα του περιεχομένου του στομάχου (Σ1). Σημαντική

διαφοροποίηση επέφερε η επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών στην περίπτωση που το οξύ stress ήταν δίωρης χρονικής διάρκειας, σε όλους τους εξεταζόμενους χρόνους. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στην πεπτική ικανότητα του ιστού του στομάχου ($\Sigma 2$), στα πυλωρικά τυφλά και στο έντερο ανεξαρτήτως τιμής του pH (7 ή 10). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις δεν υπήρξε ποτέ επαναφορά στα προ-stress επίπεδα όταν το οξύ stress ήταν χρονικής διάρκειας 2 ωρών, παρά μόνο όταν η χρονική διάρκεια αυτού ήταν 1 ώρα (πίνακας 14).

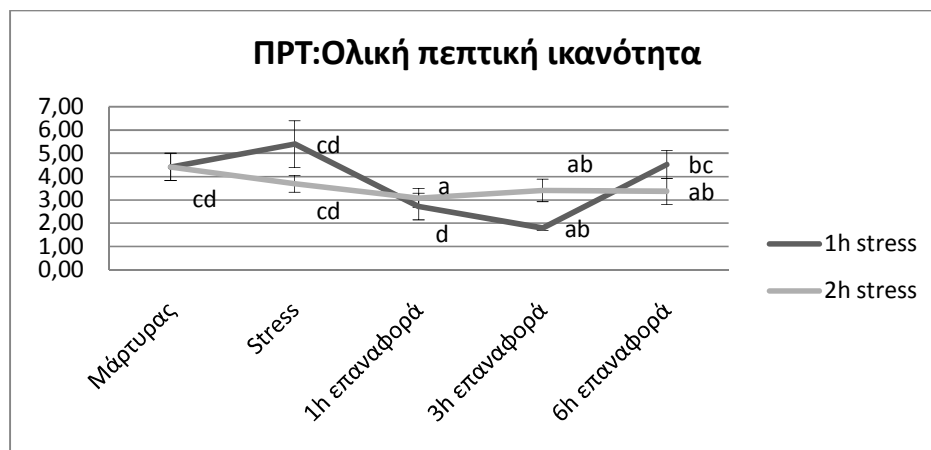
Η εικόνα δεν άλλαξε ακόμα και όταν η πεπτική ικανότητα των πυλωρικών τυφλών και του εντέρου υπολογίστηκε στο ζευγάρι τιμών του pH αλλά και όταν υπολογίστηκε σε ζευγάρι ιστών (πυλωρικά τυφλά και έντερο) σε δεδομένη τιμή του pH (πίνακες 15 και 16).

ΠΙΝΑΚΑΣ 17-ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ Δ': Ολική πεπτική ικανότητα, Ολική πεπτική ικανότητα% $\Sigma 1$, % $\Sigma 2$, %Π σε τιμή pH=7

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Ο.Π.Ι.	Ο.Π.Ι.% $\Sigma 1$	Ο.Π.Ι.% $\Sigma 2$	Ο.Π.Ι.%Π7
Μάρτυρας	4,42±0,585 cd	9,51±1,534 a	18,92±3,286 cd	21,44±1,242
1h stress	5,40±1,007 cd	12,45±2,852 ab	18,78±2,965 cd	19,36±1,496
1h επαν.	2,72±0,577 d	22,51±6,036 bc	10,41±1,694 abc	17,13±2,095
3h επαν.	1,79±0,106 ab	21,56±3,257 cd	13,07±1,290 bcd	18,00±1,004
6h επαν.	4,52±0,598 bc	6,37±0,908 a	22,50±2,735 d	21,85±2,330
2h stress	3,69±0,358 cd	18,13±3,350 abc	24,04±3,975 d	17,47±1,246
1h επαν.	3,08±0,413 a	39,66±4,453 e	9,23±0,567 ab	19,12±2,698
3h επαν.	3,41±0,483 ab	31,67±3,275 e	9,45±0,665 ab	18,50±2,270
6h επαν.	3,37±0,560 ab	31,64±5,186 de	8,50±1,138 a	15,16±2,181
(P)	***	***	***	Μ.Σ.

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *= $P < 0,05$, **= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery). Ο.Π.Ι.= Ολική Πεπτική Ικανότητα, $\Sigma 1$ = Περιεχόμενο στομάχου (Βλέννη+Επίχρισμα), $\Sigma 2$ = Ιστός στομάχου, Π=Πυλωρικά τυφλά 7= η τιμή του pH

Η ολική πεπτική ικανότητα (Ο.Π.Ι.) υπολογίστηκε σαν άθροισμα όλων των επιμέρους (αρχικών) πεπτικών ικανοτήτων (mg τυροσίνης/min υδρόλυσης)



Διάγραμμα 9-ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ: Διακύμανση της ολικής πρωτεολυτικής πεπτικής ικανότητας ανά χειρισμό σε mg τυροσίνης/min υδρόλυσης

Το οξύ stress ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας δεν επηρέασε την ολική πρωτεολυτική πεπτική ικανότητα (πίνακας 17, διάγραμμα 9) ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας. Όταν το οξύ stress εφαρμόστηκε για 1 ώρα, στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με τα προ-stress επίπεδα παρατηρήθηκε 3 ώρες μετά από επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών, για να επανέλθει στα προ-stress επίπεδα 6 ώρες μετά. Με το οξύ stress να εφαρμόζεται για 2 ώρες, επαναφορά στα προ-stress επίπεδα παρατηρήθηκε μόνο μετά από 6 ώρες.

Όταν η ολική πεπτική ικανότητα εκφράστηκε σαν ποσοστό του περιεχομένου του στομάχου (Σ1-πίνακας 17), το οξύ stress δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα. Στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν (σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα) μετά από 1 και 3 ώρες επαναφοράς των φυσιολογικών συνθηκών αποκαταστάθηκαν 6 ώρες μετά το οξύ stress χρονικής διάρκειας 1 ώρας. Επαναφορά στα προ-stress επίπεδα δεν παρατηρήθηκε όταν το οξύ stress εφαρμόστηκε για 2 ώρες, εικόνα που παρατηρήθηκε και στην περίπτωση που η ολική πεπτική ικανότητα υπολογίστηκε σαν ποσοστό του ιστού του στομάχου (Σ2).

ΠΙΝΑΚΑΣ 18-ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ Ε': Ολική πεπτική ικανότητα %Π (σε τιμή pH=10), %Ε (σε τιμή pH=7 και 10)

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Ο.Π.Ι.%Π10	Ο.Π.Ι.%Ε7	Ο.Π.Ι.%Ε10
Μάρτυρας	26,77±1,515 bc	9,91±0,515 cd	13,45±1,041 cd
1h stress	28,10±1,472 bc	9,62±1,255 cd	11,69±1,466 bcd
1h επαν.	24,76±1,809 b	10,64±1,208 cd	14,55±2,346 bcd
3h επαν.	26,14±1,702 bc	7,78±0,734 bc	14,56±0,611 d
6h επαν.	32,93±1,801 c	5,42±0,653 ab	10,94±0,802 bcd
2h stress	23,19±1,846 bc	8,19±0,589 bc	9,89±0,735 ab
1h επαν.	17,59±1,648 a	4,19±0,562 a	11,66±1,407 bcd
3h επαν.	19,56±2,347 a	11,81±0,950 d	7,08±0,797 a
6h επαν.	28,67±1,350 bc	8,96±1,177 cd	9,12±0,701 abc
(P)	***	***	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery). Ο.Π.Ι.= Ολική Πεπτική Ικανότητα, Π= Πυλωρικά τυφλά, Ε= Έντερο, 7, 10= οι τιμές του pH

Όταν η ολική πεπτική ικανότητα υπολογίστηκε σαν ποσοστό είτε των πυλωρικών τυφλών σε τιμή pH=10, είτε του εντέρου (και στις δύο τιμές του pH) το οξύ stress προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα μόνο στην τελευταία περίπτωση (τιμή pH εντέρου=10) και σε χρονική διάρκεια 2 ωρών (πίνακας 18). Σε όλες τις περιπτώσεις (εκτός από την περίπτωση που τιμή pH εντέρου=7) επιτεύχθηκε επαναφορά στα προ-stress επίπεδα 6 ώρες μετά το οξύ stress με εξαίρεση την περίπτωση οξέος stress 1 ώρας όταν η ολική πεπτική ικανότητα εκφράστηκε σαν ποσοστό του εντέρου σε τιμή pH=7.

ΠΙΝΑΚΑΣ 19-ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΣΤ': Ολική πεπτική ικανότητα %Σ1Σ2, %Π710, %Ε710, %ΠΕ7, %ΠΕ10

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Ο.Π.Ι% Σ1Σ2	Ο.Π.Ι.% Π710	Ο.Π.Ι.% Ε710	Ο.Π.Ι.% ΠΕ7	Ο.Π.Ι.% ΠΕ10
Μάρτυρας	28,42±2,910 a	49,71±2,109 c	23,37±1,467	31,35±1,212	40,23±1,987 bc
1h stress	32,46±2,418 bc	47,46±2,870 bc	21,31±2,648	28,99±1,223	38,79±1,548 bc
1h επαν.	32,92±4,631 ab	41,89±3,812 bc	25,19±3,476	27,77±2,346	39,31±2,466 bc
3h επαν.	34,63±2,454 ab	43,02±2,947 bc	22,35±0,925	25,91±1,053	40,71±1,232 bc
6h επαν.	28,86±3,041 a	54,78±3,473 c	16,36±1,283	27,27±2,171	43,86±1,699 c
2h stress	41,54±2,666 abc	40,67±2,685 bc	17,79±1,260	25,38±1,493	33,08±1,649 b
1h επαν.	48,89±4,444 c	36,71±3,981 a	16,21±1,787	23,31±2,727	27,80±2,470 a
3h επαν.	41,12±3,059 bc	38,06±3,759 ab	20,82±2,412	30,31±2,859	28,57±1,836 a
6h επαν.	40,14±5,133 bc	45,24±2,526 bc	18,08±1,805	24,12±2,882	38,09±1,533 bc
(P)	***	***	Μ.Σ.	Μ.Σ.	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery). Σ1Σ2= Στόμαχος στο σύνολό του (Σ1+Σ2) ΠΕ= Πυλωρικά τυφλά+ Έντερο, Ο.Π.Ι.= Ολική Πεπτική Ικανότητα, 7, 10= Οι τιμές του pH, 710= Άθροισμα των δύο τιμών του pH.

Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στην περίπτωση που η ολική πεπτική ικανότητα εκφράστηκε σαν ποσοστό του συνόλου του στομάχου (Σ1Σ2), των πυλωρικών τυφλών και στις δύο τιμές του pH (Π710) και του εντέρου και των πυλωρικών τυφλών σε τιμή pH=10 (ΠΕ10). Το stress δεν προκάλεσε στατιστική διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα παρά μόνο στην πρώτη περίπτωση (εφαρμογή για 1 ώρα). Επαναφορά στα προ-stress επίπεδα παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις και σε όλες τις χρονικές διάρκειας εφαρμογής του stress (πίνακας 19). Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η πρώτη (Σ1Σ2) και όταν το stress εφαρμόζεται για 2 ώρες.

ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ% ΣΩΜΑΤΙΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 20-ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ Ζ': {Σ1, Σ2, Π7, Π10}%Σ.Β.

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Π.Ι.Σ1%Σ.Β.	Π.Ι.Σ2%Σ.Β.	Π.Ι.Π7%Σ.Β.	Π.Ι.Π10%Σ.Β.
Μάρτυρας	0,07±0,012 ab	0,16±0,035 bc	0,16±0,010 b	0,19±0,010 c
1h stress	0,10±0,023 abc	0,15±0,026 bc	0,16±0,018 b	0,23±0,020 c
1h επαν.	0,30±0,114 cd	0,09±0,009 bc	0,16±0,014 b	0,25±0,025 c
3h επαν.	0,10±0,016 abc	0,07±0,006 ab	0,09±0,007 a	0,15±0,014 b
6h επαν.	0,04±0,009 a	0,15±0,031 bc	0,13±0,013 b	0,20±0,019 c
2h stress	0,16±0,031 bcd	0,20±0,043 c	0,15±0,012 b	0,19±0,018 c
1h επαν.	0,16±0,024 e	0,04±0,002 a	0,07±0,011 a	0,07±0,004 a
3h επαν.	0,15±0,030 de	0,04±0,005 a	0,08±0,006 a	0,09±0,016 ab
6h επαν.	0,12±0,015 cde	0,04±0,005 a	0,07±0,009 a	0,13±0,013 b
(P)	***	***	***	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery). Π.Ι.= Πεπτική Ικανότητα, Σ.Β.= Σωματικό Βάρος, Σ1= Περιεχόμενο στομάχου (Βλέννη+Επίχρισμα), Σ2= Ιστός στομάχου, Π= Πυλωρικά τυφλά 7, 10= Οι αντίστοιχες τιμές του pH

Το οξύ stress δεν προκάλεσε καμία διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα όταν οι πρωτεολυτικές πεπτικές ικανότητες του στομάχου (Σ1 και Σ2) και των πυλωρικών

τυφλών (ανεξαρτήτως τιμής του pH) υπολογίστηκαν σαν ποσοστό του σωματικού βάρους (πίνακας 20). Επαναφορά ή διατήρηση στα προ-stress επίπεδα παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση που το οξύ stress ήταν χρονικής διάρκειας 1 ώρας, αλλά ποτέ στην περίπτωση που αυτό ήταν δίωρης χρονικής διάρκειας. Η παρατηρηθείσα εικόνα είναι όμοια με την μεμονωμένη έκφραση των πεπτικών ικανοτήτων των εν λόγω ιστών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 21-ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ Η': {E7, E10, Ολική πεπτική ικανότητα}%Σ.Β.

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Π.Ι.E7%Σ.Β.	Π.Ι.E10%Σ.Β.	Ο.Π.Ι.%Σ.Β
Μάρτυρας	0,07±0,005 de	0,17±0,011 ef	0,74±0,044 cd
1h stress	0,07±0,008 de	0,15±0,015 de	0,81±0,050 cd
1h επαν.	0,11±0,017 e	0,26±0,046 f	1,06±0,160 d
3h επαν.	0,04±0,006 b	0,13±0,017 bcd	0,57±0,068 ab
6h επαν.	0,03±0,008 b	0,10±0,020 bc	0,62±0,078 bc
2h stress	0,07±0,008 cd	0,15±0,016 cde	0,85±0,064 cd
1h επαν.	0,02±0,003 a	0,06±0,007 a	0,39±0,026 a
3h επαν.	0,05±0,003 bcd	0,08±0,006 ab	0,46±0,052 ab
6h επαν.	0,04±0,005 bc	0,08±0,008 ab	0,49±0,042 ab
(P)	***	***	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery) , Ο.Π.Ι.= Ολική Πεπτική Ικανότητα, Π.Ι.= Πεπτική Ικανότητα, E= Έντερο, 7, 10= Οι τιμές του pH, Σ.Β.= Σωματικό Βάρος

Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στην περίπτωση που η πρωτεολυτική πεπτική ικανότητα του εντέρου (ανεξαρτήτως τιμής του pH) εκφράστηκε σαν ποσοστό του σωματικού βάρους (πίνακας 21). Μοναδική διαφοροποίηση το γεγονός ότι επαναφορά στα προ-stress επίπεδα δεν επιτυγχάνεται 6 ώρες μετά, ακόμα και στην περίπτωση που το εφαρμοζόμενο stress είναι διάρκειας 1 ώρας.

Όταν η ολική πεπτική ικανότητα εκφράστηκε σαν ποσοστό του σωματικού βάρους (πίνακας 21) παρατηρείται εικόνα όμοια με αυτή του προηγούμενου πίνακα (20). Καμία διαφοροποίηση μετά την εφαρμογή του stress ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας, επαναφορά στα προ-stress επίπεδα 6 ώρες μετά από επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για οξύ stress χρονικής διάρκειας 1 ώρας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 22-ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ Θ': {Σ1Σ2, Π710, Ε710,ΠΕ7, ΠΕ10}%Σ.Β.

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Π.Ι.Σ1Σ2 %Σ.Β.	Π.Ι.Π710 %Σ.Β.	Π.Ι.Ε710 %Σ.Β.	Π.Ι.ΠΕ7 %Σ.Β.	Π.Ι.ΠΕ10 %Σ.Β.
Μάρτυρας	0,23±0,035	0,35±0,018 c	0,17±0,011 ef	0,23±0,012 e	0,29±0,012 de
1h stress	0,25±0,023	0,39±0,037 c	0,15±0,015 de	0,24±0,020 e	0,32±0,025 de
1h επαν.	0,39±0,110	0,41±0,036 c	0,26±0,046 f	0,27±0,023 e	0,40±0,044 e
3h επαν.	0,21±0,040	0,24±0,020 b	0,13±0,017 bcd	0,14±0,011 abc	0,23±0,023 bc
6h επαν.	0,19±0,038	0,32±0,026 c	0,10±0,020 bc	0,16±0,017 cd	0,27±0,031 cde
2h stress	0,36±0,040	0,34±0,027 c	0,15±0,016 cde	0,21±0,019 de	0,28±0,022 cd
1h επαν.	0,19±0,024	0,14±0,017 a	0,06±0,007 a	0,09±0,012 a	0,11±0,010 a
3h επαν.	0,20±0,033	0,17±0,021 ab	0,08±0,006 ab	0,13±0,005 bc	0,13±0,020 a
6h επαν.	0,16±0,018	0,20±0,019 ab	0,08±0,008 ab	0,11±0,012 ab	0,17±0,014 b
(P)	Μ.Σ.	***	***	***	***

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά

επαν. = επαναφορά (recovery). Π.Ι.= Πεπτική Ικανότητα, Σ1Σ2= Στόμαχος στο σύνολό του (Σ1+Σ2), Σ.Β.= Σωματικό Βάρος, Π= Πυλωρικά τυφλά, Ε= Έντερο, 7, 10= Οι τιμές του pH, 710= Αθροισμα των δύο τιμών του pH

Παρόμοια εικόνα με εκείνη του πίνακα 20 παρατηρείται και στην περίπτωση που συνδυασμένες πρωτεολυτικές πεπτικές ικανότητες (πυλωρικών τυφλών και εντέρου σε ζευγάρι τιμών του pH=7 και 10, αλλά και πυλωρικών τυφλών και εντέρου πρώτα σε τιμή pH=7 και μετά σε τιμή pH=10) εκφράζονται %Σ.Β. (πίνακας 22). Το οξύ stress δεν επιφέρει στατιστική διαφοροποίηση σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα σε καμία περίπτωση. Επαναφορά στα προ-stress επίπεδα μετά από 6 ώρες επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών παρατηρείται μόνο στην περίπτωση που το οξύ stress διήρκησε 1 ώρα. Μοναδική εξαίρεση αυτή στην οποία η πεπτική ικανότητα του εντέρου και στις δύο τιμές του pH εκφράστηκε σαν ποσοστό του σωματικού βάρους.

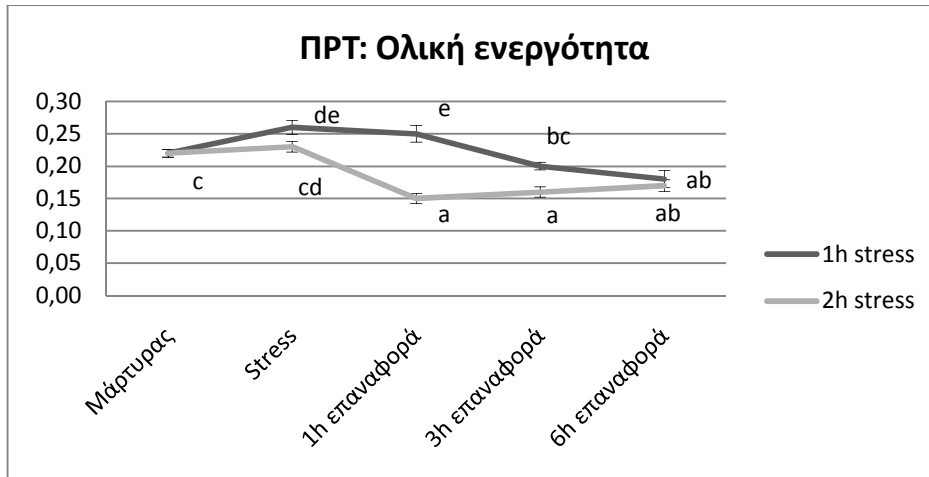
ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 23-ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΕΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ: ΟΛΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ, ΕΜΜΕΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ Σ1Σ2

ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ	Ο.Ε.	Ε.Ε Σ1Σ2
Μάρτυρας	0,22±0,006 c	0,15±0,015
1h stress	0,26±0,011 de	0,20±0,018
1h επαν.	0,25±0,013 e	0,18±0,020
3h επαν.	0,20±0,006 bc	0,16±0,009
6h επαν.	0,18±0,013 ab	0,13±0,022
2h stress	0,23±0,008 cd	0,20±0,016
1h επαν.	0,15±0,008 a	0,18±0,017
3h επαν.	0,16±0,008 a	0,15±0,013
6h επαν.	0,17±0,009 ab	0,16±0,017
(P)	***	Μ.Σ.

(P)= Επίπεδο σημαντικότητας, Μ.Σ.= Μη Σημαντικό, *=P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001, μέσοι όροι με κοινό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά επαν. = επαναφορά (recovery). Ο.Ε.= Ολική Ενεργότητα, Ε.Ε.= Έμμεση Ενεργότητα, Σ1Σ2= Στόμαχος στο σύνολό του (Σ1+Σ2)

Η ολική ενεργότητα υπολογίστηκε σαν κλάσμα της Ο.Π.Ι./βάρος Σ1+Σ2+ πυλωρικών τυφλών+ εντέρου (σε g) και η έμμεση ενεργότητα Σ1Σ2 (Ε.Ε.Σ1Σ2) σαν κλάσμα Π.Ι.Σ1Σ2/βάρος Σ1+ Σ2 (σε g)



Διάγραμμα 10-ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ: Διακύμανση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας ανά χειρισμό σε mg τυροσίνης/g πεπτικού σωλήνα/min υδρόλυσης.

Τέλος το οξύ stress χρονικής διάρκειας 1 ώρας προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση της ολικής πρωτεολυτικής ενεργότητας (πίνακας 23, διάγραμμα 10). Επαναφορά στα προ-stress επίπεδα παρατηρήθηκε μετά από 3 ώρες επαναφοράς των φυσιολογικών συνθηκών, ενώ περαιτέρω χρονική διάρκεια επαναφοράς είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής ενεργότητας κάτω ακόμα και από τα επίπεδα του μάρτυρα. Όταν το οξύ stress εφαρμόστηκε για δύο ώρες, επαναφορά στα προ-stress επίπεδα δεν παρατηρήθηκε ακόμα και μετά από 6 ώρες επαναφοράς των φυσιολογικών συνθηκών.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρά το μεγάλο αριθμό μελετών που αφορούν οξύ stress συνωστισμού, δυνατότητα επαναφοράς από αυτόν, καθώς και τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο της ενεργότητας, όσο και της πεπτικής ικανότητας διαφόρων ενζύμων της κατηγορίας των πρωτεασών και των καρβοϋδρασών, συνδυαστική μελέτη όλων των παραπάνω χαρακτηριστικών για την ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss*, δεν έχει υπάρξει και εκεί ακριβώς στοχεύει η παρούσα μελέτη.

Το οξύ αυτό stress προκάλεσε αρχικά την αναμενόμενη (βιβλιογραφικά και πειραματικά) αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης και της γλυκόζης, οι οποίες όμως ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας του εφαρμοζόμενου stress επανήλθαν στα προ-stress επίπεδα κατά την επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών.

Άλλωστε η βιολογική δράση της κορτιζόλης σε καταστάσεις οξέος stress οι οποίες έχουν προκληθεί από και κατά τη διαδικασία διάφορων χειρισμών (ελεγχόμενη εκτροφή, αναισθησία, αιμοληψία κ.α.), έχει μελετηθεί σε πολλά και διάφορα είδη τελεόστεων ιχθύων. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις η αντίδραση των ιχθύων εκδηλώθηκε με αύξηση του επιπέδου της κορτιζόλης (Παπουτσόγλου, 1998).

Συγκεκριμένα στην ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss*, οξύς συνωστισμός χρονικής διάρκειας 10' (Kubilay and Ulukoy, 2002) προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης σχεδόν 4-πλάσια σε σχέση με αυτή των μαρτύρων. Παρόμοια και μεγαλύτερη στατιστικώς σημαντική αύξηση (σχεδόν 8 φορές) παρουσιάστηκε στο παρόν πείραμα, με τη διαφορά πιθανότατα να οφείλεται στην μεγαλύτερη χρονική διάρκεια του επιβαλλόμενου οξέος stress συνωστισμού (1 ώρα στο παρόν πείραμα).

Οξύ stress συνωστισμού για 40' είχε σαν αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης (περίπου 6-πλάσια των μαρτύρων) στον σολομό του Ατλαντικού *Salmo salar* (Veiseth et al., 2006). Πάντως τα αυξημένα αυτά επίπεδα κορτιζόλης μειώθηκαν σταδιακά και επανήλθαν στα προ-stress επίπεδα 6 ώρες μετά τον οξύ χειρισμό, γεγονός που συμφωνεί απόλυτα και με την παρούσα εργασία. Πράγματι τα επίπεδα κορτιζόλης (μετά από οξύ stress 1 ώρας πάντως) επανήλθαν στα προ-stress επίπεδα μετά από 6 ώρες. Η ομοιότητα τόσο στην αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης, όσο και στο χρονικό διάστημα επαναφοράς πιθανότατα οφείλονται τόσο στον κοινό χειρισμό, όσο και στην κοινή οικογένεια των δύο ειδών.

Τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης κατά το οξύ stress συνωστισμού οδηγούν κατά τη δευτερογενή αντίδραση των ιχθύων σε αυτό, σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης (Παπουτσόγλου, 1998). Σε πείραμα που διενεργήθηκε στο είδος *Ragrus major* (Biswas et al., 2006) οξύς συνωστισμός χρονικής διάρκειας 1 ώρας (όπως και στο παρόν πείραμα) είχε σαν αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης 30' μετά από αυτόν. Επαναφορά στα προ-stress επίπεδα παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά σε αντίθεση με το παρόν πείραμα στο οποίο τα επίπεδα γλυκόζης επανήλθαν σαφώς γρηγορότερα στα προ-stress επίπεδα (6 ώρες μετά). Το γεγονός αυτό ίσως να

οφείλεται στη διαφορά των δύο ειδών αλλά και στο γεγονός ότι στο είδος *Pagrus major*, του οξέος συνωστισμού προηγήθηκε αλίευση των ατόμων με απόχη (επιπρόσθετος παράγοντας stress).

Το οξύ stress συνωστισμού (κατέβασμα της στάθμης του νερού κατά 5-10 εκ. για 15') επηρέασε από αιματολογικής άποψης άτομα σολομού του Ατλαντικού *Salmo salar* (Olsen et al., 2002) και ιριδιίζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* (Olsen et al., 2005). Στα δύο πειράματα, τα δύο αυτά συγγενικά είδη χωρίστηκαν σε δύο πειραματικές ομάδες στη διατρεφόμενη και την άσιτη (3 ημέρες αστίας).

Τα επίπεδα της γλυκόζης αυξήθηκαν άμεσα 1 και 2 ώρες μετά τον οξύ χειρισμό και στις δύο ομάδες ιχθύων. Ωστόσο τα επίπεδα γλυκόζης παρέμειναν υψηλά στα διατρεφόμενα άτομα ως και 12 ώρες μετά το οξύ stress στον σολομό και 48 ώρες μετά το οξύ stress στην ιριδιίζουσα πέστροφα. Αντίθετα στα άσιτα άτομα τα επίπεδα γλυκόζης επανήλθαν στα προ-stress επίπεδα 2 και 4 ώρες αντίστοιχα μετά το οξύ stress.

Τα επίπεδα της κορτιζόλης (Olsen et al., 2002; Olsen et al., 2005) αυξήθηκαν επίσης άμεσα και στις δύο ομάδες ιχθύων 1 και 2 (4 στην ιριδιίζουσα πέστροφα) ώρες μετά το stress. Ωστόσο μειώθηκαν σταδιακά και επανήλθαν στα προ-stress επίπεδα 12 και 48 ώρες μετά.

Τα αποτελέσματα αυτά από τους Olsen et al. (2002) συμφωνούν με το παρόν πείραμα στο οποίο αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης βρέθηκαν τόσο 1, όσο και 3 ώρες μετά το οξύ stress συνωστισμού για να επανέλθουν στα προ-stress επίπεδα μετά από 6 ώρες.

Ωστόσο η διαφορά που παρατηρήθηκε ανάμεσα στα άσιτα και στα διατρεφόμενα άτομα στα δύο αυτά συγγενικά είδη της οικογένειας *Salmonidae* καταδεικνύουν μία σχέση της διατροφής με τη χρονική διάρκεια επιβολής των συνεπειών του οξέος stress στους ιχθύς (αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και γλυκόζης, ιστολογικές αλλοιώσεις).

Παρόμοια χαρακτηριστικά (αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και κορτιζόλης 1 ώρα μετά το stress τόσο στα άσιτα, όσο και στα διατρεφόμενα άτομα) παρουσιάστηκαν και σε ανάλογο πείραμα οξέος συνωστισμού στο είδος *Gadus morhua* (Olsen et al., 2008), με την επαναφορά στα προ-stress επίπεδα να επιτυγχάνεται τον ίδιο χρόνο με την ιριδιίζουσα πέστροφα (Olsen et al., 2005), δηλαδή 48 ώρες μετά, υποδηλώνοντας ότι ο χρόνος επαναφοράς ακόμα και για είδη διαφορετικής οικογένειας, μπορεί να είναι κοινός, όταν το οξύ stress εφαρμόζεται κατά τον ίδιο τρόπο.

Κατά την επίδραση του οξέος stress επιτελείται διαταραχή της ομοιοστασίας των ιχθύων στην οποία καίριο ρόλο διαδραματίζουν τα επίπεδα των κορτικοστεροειδών ορμονών (κυρίως η κορτιζόλη όπως αναφέρθηκε παραπάνω) και οι κατεχολαμίνες (αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη). Η αυξημένη παραγωγή αδρεναλίνης και νοραδρεναλίνης εκτός του ότι συμβάλλει στις μεταβολικές επιδράσεις της κορτιζόλης, επιδρά και στην πέψη. Έτσι μειώνεται η εκκριτική δραστηριότητα του πεπτικού σωλήνα, αποτέλεσμα της οποίας είναι η ανεπαρκής πέψη και απορρόφηση των

διαφόρων συστατικών της χορηγηθείσας τροφής (Παπουτσόγλου, 1998). Υπάρχει λοιπόν μία σύνδεση ορμονών που σχετίζονται με το οξύ stress, με τις πεπτικές διαδικασίες των ιχθύων.

Πράγματι στους ιχθύς, οι πεπτικές διαδικασίες βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο σύνθετων νευροορμονικών διαδικασιών. Πάντως παρά την παρατηρούμενη σύνδεση (που αναφέρθηκε παραπάνω), λίγα πράγματα μπορούν να αναφερθούν σχετικά με την επίδραση κάποιων ορμονών στις πεπτικές διαδικασίες των ιχθύων. Εξαιρετικό ενδιαφέρον πάντως παρουσιάζει η προσπάθεια ερμηνείας της επίδρασης της αδρεναλίνης στην ενεργότητα των πεπτικών υδρολασών. Οι *in vitro* επιδράσεις αυτής της ορμόνης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ηθολογία διατροφής των ιχθύων και φαίνεται να παίζει μεγαλύτερο ρόλο στα ιχθυοφάγα και λιγότερο στα βενθοφάγα είδη (Kuz'mina et al., 2003).

Συγκεκριμένα στο χρυσόψαρο *Carassius auratus* (Kuz'mina et al., 2003) ενέσιμη χορήγηση αδρεναλίνης προκάλεσε διπλασιασμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα 1 ώρα μετά από την ένεση. Τα επίπεδα γλυκόζης παρέμειναν αυξημένα (σε σχέση με αυτά των μαρτύρων) 3 ώρες μετά τον χειρισμό. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο παρόν πείραμα αφού τόσο μία, όσο και τρεις ώρες μετά το οξύ stress συνωστισμού χρονικής διάρκειας 1 ώρας, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης σε σχέση με αυτά των μαρτύρων, με την επαναφορά στα προ-stress επίπεδα να επιτυγχάνεται 6 ώρες μετά. Αντίστοιχα στο χρυσόψαρο, επαναφορά των επιπέδων της γλυκόζης στα προ-stress επίπεδα επιτεύχθηκε 24 ώρες μετά την ενέσιμη χορήγηση της αδρεναλίνης.

Μία άλλη επίδραση της αδρεναλίνης, στο χρυσόψαρο μελετήθηκε στην ολική αμυλολυτική ικανότητα. Από τα αποτελέσματα προκύπτει μείωση αυτής, τρεις ώρες μετά την ενέσιμη χορήγηση αδρεναλίνης στα άτομα της πειραματικής ομάδας. 24 ώρες μετά τη χορήγηση η ολική αμυλολυτική ικανότητα στην πειραματική ομάδα βρέθηκε αυξημένη 1,5 φορά σε σχέση με τις τρεις ώρες. Στο παρόν πείραμα, η αμυλολυτική ικανότητα παρουσίασε αντίθετα αποτελέσματα σε σχέση με το χρυσόψαρο. Έτσι 3 ώρες μετά το οξύ stress συνωστισμού (χρονικής διάρκειας 1 ώρας) αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με αυτή των μαρτύρων. Παρατηρείται δηλαδή μία διαφοροποίηση των συμπερασμάτων που πιθανότατα να οφείλονται τόσο στο διαφορετικό είδος (χρυσόψαρο και ιριδίζουσα πέστροφα), όσο και στο γεγονός ότι στο παρόν πείραμα δεν υπήρξε χορήγηση αδρεναλίνης.

Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί ότι η αύξηση της ολικής αμυλολυτικής ικανότητας που παρατηρήθηκε στο χρυσόψαρο 24 ώρες μετά τη χορήγηση της αδρεναλίνης, στην ιριδίζουσα πέστροφα παρατηρήθηκε πολύ γρηγορότερα από την άποψη της χρονικής διάρκειας. Μέχρι τώρα πάντως, οι λόγοι της διαφορετικής επίδρασης της αδρεναλίνης σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες παραμένουν αδιευκρίνιστες.

Εκτός από την αδρεναλίνη που αναφέρθηκε προηγουμένως (πείραμα στο χρυσόψαρο, Kuz'mina et al., 2003) υπάρχουν επίσης πολλές άλλες ορμόνες που συνδέονται με τη λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα των ιχθύων όπως η γλυκαγόνη (σχετίζεται με τα επίπεδα της ινσουλίνης), η χοληκυστοκινίνη (συνδέεται με την δραστηριότητα του παγκρέατος το οποίο

όπως αναφέρθηκε παραπάνω εκκρίνει αρκετά σημαντικά πεπτικά ένζυμα) και το πεπτίδιο VIP του εντέρου που συνδέεται επίσης με την έκκριση παγκρεατικών ενζύμων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές των ορμονών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες, δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως αλλά θεωρείται ότι ρυθμίζουν τη λειτουργία του πεπτικού συστήματος των ιχθύων.

Όσον αφορά τη σχέση των τριών παραπάνω ορμονών με το οξύ stress λίγα πράγματα μπορούν να ειπωθούν. Η γλυκαγόνη όπως αναφέρθηκε σχετίζεται άμεσα με την ινσουλίνη, αλλά με αντίστροφο τρόπο. Έτσι (Παπουτσόγλου, 1998) υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης της γλυκαγόνης παρατηρούνται κατά την παρουσία των χαμηλότερων της ινσουλίνης.

Επίβεβαίωση τόσο του αντίστροφου αυτού ρόλου της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης, όσο και του αναβολικού χαρακτήρα της πρώτης αποτελεί το πείραμα που διενεργήθηκε στην ιριδίζουσα πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss* (Vijayan et al., 1994), στο οποίο οξύ stress χρονικής διάρκειας 3' εφαρμόστηκε με τη μορφή καταδίωξης με απόχη μέσα στους χώρους εκτροφής, ενώ μετρήσεις λήφθηκαν 1, 3 και 6 ώρες μετά τον χειρισμό (χρόνοι όμοιοι με το παρόν πείραμα). Στο ίδιο πείραμα υπήρξε απομόνωση και επώαση (για 1 ώρα στους 8 °C) ηπατικών κυττάρων είτε με γλυκαγόνη, είτε με ινσουλίνη ίδιας συγκέντρωσης 10^{-8} M.

Αποδείχθηκε λοιπόν ότι ενώ η γλυκαγόνη διέγειρε την παραγωγή γλυκόζης μόνο στους μάρτυρες, η ινσουλίνη όχι μόνο δεν τροποποίησε την παραγωγή γλυκόζης στα προ-stress στάδια, αλλά πέτυχε τη μείωση της συνολικής παραγόμενης ποσότητας γλυκόζης σε όλους τους χρόνους αν και στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της γλυκόζης μέσω δράσης της ινσουλίνης παρατηρήθηκε 3 και 6 ώρες μετά τον οξύ χειρισμό.

Η χοληκυστοκίνη (CCK) και το πεπτίδιο VIP καθορίζουν τη διάθεση του ψαριού για λήψη τροφής. Η μεν CCK διεγείρει την κινητικότητα του πεπτικού σωλήνα, το δε πεπτίδιο VIP την καταστέλλει (Παπουτσόγλου, 1998). Η επίδραση του οξέος stress στα επίπεδα αυτών των δύο ορμονών δεν έχει διευκρινιστεί επακριβώς. Έχοντας όμως ως δεδομένο ότι το stress προκαλεί παρεμπόδιση όλων των αναβολικών διεργασιών, προαγωγή όλων των καταβολικών καθώς και μειωμένη όρεξη, θεωρείται πως τα επίπεδα αυτών των ορμονών θα εμφανίζονται μειωμένα.

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων που αφορούν τις τυπικές σωματομετρήσεις των ιχθύων του πειράματος προκύπτει ότι ο συντελεστής ευρωστίας των ιχθύων του πειράματος δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την επιβολή του οξέος stress αφού δεν διέφερε σημαντικά από αυτόν των μαρτύρων με εξαίρεση την στατιστικά σημαντική μείωση που παρουσίασε, 1 ώρα μετά από οξύ stress συνωστισμού χρονικής διάρκειας επίσης 1 ώρα.

Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με μελέτη στην ιριδίζουσα πέστροφα (Barton et al., 1987) στην οποία το οξύ stress εφαρμόστηκε με τη μορφή καταδίωξης με απόχη των ιχθύων μέσα στην δεξαμενή για 15'. Και σε αυτή την περίπτωση υπήρξε μείωση του συντελεστή ευρωστίας 1 ώρα μετά το οξύ stress, παρά τη διαφορετική χρονική διάρκεια αλλά και τη διαφορετική μορφή του επιβαλλόμενου οξέος stress. Η διαφορά των δύο πειραμάτων έγκειται στο γεγονός ότι στο παρόν πείραμα υπήρξε επαναφορά του συντελεστή ευρωστίας 3 ώρες μετά το οξύ stress, ενώ στο πείραμα των Barton et al. (1987), ο συντελεστής ευρωστίας παρέμεινε μειωμένος μετά από 3

ώρες. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι η καταδίωξη με απόχη αποδείχθηκε πιθανότατα εντονότερος παράγοντας stress για την ιριδίζουσα πέστροφα.

Μείωση του συντελεστή ευρωστίας 15 ώρες μετά από οξύ συνωστισμό χρονικής διάρκειας 1 ώρας (παρόμοιας χρονικής διάρκειας με το οξύ stress που εφαρμόστηκε και στο παρόν πείραμα) παρατηρήθηκε και στον κοινό κυπρίνο *Cyprinus carpio* (Ruane et al., 2002), αλλά και στο λαβράκι *Dicentrarchus labrax* (Di Marco et al., 2008) 1 ώρα μετά από οξύ συνωστισμό χρονικής διάρκειας 15' (παρόμοιο αποτέλεσμα τόσο με το παρόν πείραμα, όσο και με εκείνο του Barton et al., 1987).

Αυτή η έστω και παροδική, στατιστικά σημαντική μείωση του συντελεστή ευρωστίας 1 ώρα μετά το οξύ stress καταδεικνύει την κακή φυσιολογική κατάσταση στην οποία βρέθηκαν τα άτομα της παρούσης μελέτης μετά από αυτό, αφού χαμηλός συντελεστής ευρωστίας και κακή φυσιολογική κατάσταση (Παπουτσόγλου, 1998) είναι έννοιες αλληλένδετες.

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις μετρήσεις του πεπτικού σωλήνα και την επίδραση του συνωστισμού των ιχθύων του πειράματος προκύπτουν τα παρακάτω:

Ένα σημαντικό μέρος του συνολικού βάρους του πεπτικού σωλήνα (το μεγαλύτερο αυτού) καταλάμβαναν τα πυλωρικά τυφλά στα άτομα ιριδίζουσας πέστροφας του πειράματος. Ακολουθούσε το βάρος του στομάχου και τέλος αυτό του εντέρου, το μήκος του οποίου ήταν μικρότερο από το ολικό μήκος των ιχθύων επιβεβαιώνοντας πλήρως με τα δεδομένα που ισχύουν περί εντέρου σαρκοφάγων ειδών (μήκος εντέρου/ολικό μήκος μικρότερο της μονάδας).

Η πεπτική ικανότητα των καρβοϋδρασών στα πυλωρικά τυφλά ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας του επιβαλλόμενου οξέος stress, προσδιορίστηκε αρκετά υψηλή και πάντως αρκετά υψηλότερη από εκείνη του εντέρου. Το συμπέρασμα που εξάγεται από αυτό το αποτέλεσμα είναι πως το μεγαλύτερο μέρος της πέψης των υδατανθράκων διεξαγόταν στα πυλωρικά τυφλά για τα άτομα του πειράματος.

Κατά την επαναφορά, τόσο η ενεργότητα, όσο και η πεπτική ικανότητα των καρβοϋδρασών σε πυλωρικά τυφλά και έντερο αυξήθηκε σε επίπεδα ακόμα υψηλότερα και από αυτά των μαρτύρων, όταν το οξύ stress διήρκεσε 1 ώρα. Στα πυλωρικά τυφλά αυτή η παρατηρούμενη αύξηση ήταν στατιστικώς σημαντική. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω αυτή η αύξηση έρχεται σε αντίθεση με πείραμα που διενεργήθηκε στο χρυσόψαρο (Kuz'mina et al., 2003).

Όσον αφορά τη λειτουργία των πρωτεολυτικών ενζύμων (και συγκεκριμένα της πεψίνης) στον στόμαχο των ατόμων του πειράματος πρέπει να επισημανθεί ότι για λόγους καλύτερης κατανόησης της λειτουργίας αυτού του ενζύμου, υπήρξε διαφορετική εξέτασή της, τόσο στον ιστό του στομάχου, όσο και στο περιεχόμενο αυτού.

Σχετικά λοιπόν με την πέψη των πρωτεϊνών της χορηγηθείσας τροφής προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

Παρά το γεγονός ότι η τελευταία λήψη τροφής από τα άτομα του πειράματος πραγματοποιήθηκε χρονικά 2 ημέρες πριν τη δειγματοληψία, η ύπαρξη τροφής στον στόμαχο

κατά τον διαχωρισμό των τμημάτων του πεπτικού σωλήνα, αποδεικνύει ότι η πέψη δεν είχε ολοκληρωθεί στις 2 ημέρες.

Στον στόμαχο των ατόμων του πειράματος εντοπίστηκε η παρουσία της πεψίνης σε τιμή του pH=1,5 σχετικά αυξημένη λόγω και του διατροφικού τύπου του ψαριού (σαρκοφάγο). Η ποσοτική μελέτη των πρωτεασών (πεψίνη) στον στόμαχο σε ιστό και περιεχόμενο αντίστοιχα, προκάλεσε διαφοροποιήσεις της πρωτεολυτικής πεπτικής ικανότητας ανάλογα με τον χειρισμό και την διάρκεια του εφαρμοζόμενου οξέος stress.

Έτσι ενώ στους μάρτυρες η πεπτική ικανότητα του στομάχου εμφανιζόταν αυξημένη στον ιστό (μυ), κάτι που επαναλήφθηκε και στη μία ώρα stress, όταν το stress αυξήθηκε στις 2 ώρες η εικόνα αντιστράφηκε με αποτέλεσμα αυξημένη πεπτική ικανότητα να παρουσιάζει το περιεχόμενο του στομάχου, γεγονός που συνεπάγεται ότι το οξύ stress χρονικής διάρκειας 1 ώρας περιόρισε αισθητά την αξιοποίηση των πρωτεϊνών της τροφής στο στόμαχο.

Το οξύ stress συνωστισμού δεν επηρέασε σημαντικά την ενεργότητα της πεψίνης τόσο σε επίπεδο ιστού, όσο και σε επίπεδο περιεχομένου. Ωστόσο η ενεργότητα, 1 και 3 ώρες μετά το οξύ stress 1 ώρας και 1,3 και 6 ώρες μετά το οξύ stress χρονικής διάρκειας 2 ωρών αυξήθηκε και δεν επανήλθε στα προ-stress επίπεδα παρά μόνο μετά από επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών για 6 ώρες στο stress χρονικής διάρκειας 1 ώρας.

Η αυξημένη αυτή, ενεργότητα της πεψίνης στον στόμαχο των ιχθύων του πειράματος υποστηρίζεται βιβλιογραφικά από πείραμα ενέσιμης χορήγησης αδρεναλίνης (ανάλογη με κείνη στο χρυσόψαρο) σε δύο είδη τα *Sander canadensis* (πέρκα-Pike perch) και *Lota lota* (Burbot) (Kuz'mina, 2000). Στα δύο αυτά ιχθυοφάγα είδη παρουσιάστηκε μία αύξηση της ενεργότητας των πρωτεασών του στομάχου (πεψίνη) σχεδόν διπλάσια σε τιμή του pH=2. Έτσι η ενεργότητα της πεψίνης στους μάρτυρες ήταν $3,2 \pm 0,6$ (burbot) και $1,2 \pm 0,1$ (pike perch) $\mu\text{mol/g/min}$, με τις αντίστοιχες τιμές στην πειραματική ομάδα $6,7 \pm 0,6$ και $2,8 \pm 0,4$ $\mu\text{mol/g/min}$ και χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα την καζεΐνη. Παρόμοια αποτελέσματα διπλασιασμού της ενεργότητας της πεψίνης, μία ώρα μετά το οξύ stress (χρονικής διάρκειας επίσης 1 ώρας) παρατηρούνται και στο παρόν πείραμα όσον αφορά το περιεχόμενο του στομάχου, γεγονός που συμφωνεί με τη μελέτη της Kuz'mina (2000) στα δύο ιχθυοφάγα είδη. Αυτή η αύξηση της ενεργότητας πιθανότατα οφείλεται στην παρατηρηθείσα σύσπαση του στομάχου, αλλά και στη μείωση του βάρους αυτού αφού είχε προηγηθεί ασιτία 2 ημερών και στα δύο είδη (48 ώρες όπως και στο παρόν πείραμα).

Η αύξηση αυτή της ενεργότητας της πεψίνης στο περιεχόμενο του στομάχου προφανώς αποσκοπεί στην μεγιστοποίηση της δράσης της εντός του στομάχου, ώστε να επιτευχθεί η γρηγορότερη και η πληρέστερη πέψη των πρωτεϊνών της χορηγηθείσας τροφής. Το γεγονός ότι αυτή η αύξηση παρατηρείται 1 ώρα μετά το οξύ stress, πιθανότατα ερμηνεύεται σαν ένα είδος καθυστερημένης αντίδρασης του ψαριού, κατά την οποία επιχειρείται η όσο το δυνατόν καλύτερη αξιοποίηση των πρωτεϊνών της χορηγηθείσας τροφής μετά από μία περίοδο έντονης καταπόνησης λόγω του οξέος stress.

Η υδρόλυση των πρωτεϊνών της τροφής στα πυλωρικά τυφλά σε τιμή pH=7 (θρυψίνη και χυμοθρυψίνη) και pH=10 (καρβοξυπεπτιδάσες και αμινοπεπτιδάσες) στο σύνολό τους παρουσιάστηκε αυξημένη, γεγονός που καταδεικνύει τη μεγάλη σημασία των πυλωρικών τυφλών στην πέψη των πρωτεϊνών από τα άτομα του πειράματος. Μάλιστα βιβλιογραφικά (Παπουτσόγλου, 2008) φαίνεται ότι η πρωτεολυτική δραστηριότητα των πυλωρικών τυφλών στην ιριδίζουσα πέστροφα μεγιστοποιείται σε θερμοκρασίες 11-18°C, θερμοκρασίες που κατά προσέγγιση και οριακά μετρήθηκαν στις δεξαμενές των εκτρεφόμενων ατόμων του πειράματος (18.3±0.19 °C).

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι το οξύ stress συνωστισμού επηρέασε ιστολογικά (όσον αφορά κύτταρα του εντέρου), άτομα σολομού του Ατλαντικού *Salmo salar* (Olsen et al., 2002) και ιριδίζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* (Olsen et al., 2005). Τόσο στην ιριδίζουσα πέστροφα (4 και 48 ώρες), όσο και στον σολομό του Ατλαντικού (12 ώρες) μετά το οξύ stress παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις των εντεροκυττάρων, απώλεια κυτταρικού περιεχομένου και εκτεταμένη απώλεια της επαφής των κυττάρων μεταξύ τους. Ωστόσο η διατρεφόμενη πειραματική ομάδα παρουσίασε σε μεγαλύτερη έκταση τα παραπάνω συμπτώματα του οξέος stress σε σχέση με την άσιτη (3 ημέρες ασιτίας). Οι ιστολογικές μεταβολές που εντοπίστηκαν στο ενδιάμεσο τμήμα του εντέρου τόσο στον σολομό του Ατλαντικού (Olsen et al., 2002), όσο και στην ιριδίζουσα πέστροφα (Olsen et al., 2005) καταδεικνύουν μία άλλη πτυχή της επίδρασης οξέος stress μακριά από αιματολογικές ή ενζυμικές παραμέτρους, παρότι αυτή (η ιστολογική επίδραση του οξέος stress) δεν αποτελούσε πρωταρχικό στόχο της παρούσης μελέτης. Ενδέχεται πάντως αυτές οι μεταβολές να αφορούν και τα άτομα του παρόντος πειράματος, λόγω ομοιότητας τόσο χειρισμού, όσο και είδους με το αντίστοιχο πείραμα των Olsen et al. (2005).

Ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο της παρούσης μελέτης αποτελεί η διαφορά που παρατηρείται στην ενεργότητα και στην πεπτική ικανότητα πεπτικών ενζύμων όχι κατά το χρονικό διάστημα επιβολής του οξέος (με τη μορφή του συνωστισμού) stress, αλλά μετά από αυτό και συγκεκριμένα στην περίοδο της επαναφοράς των ιχθύων στις προ-stress συνθήκες.

Για να δοθεί απάντηση στο φαινόμενο αυτό της διαφοροποίησης των τιμών της ενεργότητας και της πεπτικής ικανότητας των πεπτικών ενζύμων κατά την επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών, πρέπει να δευκρινιστούν ακριβώς ποιοι παράγοντες επηρεάζουν την χρονική διάρκεια επαναφοράς και πως αυτή επηρεάζεται από το εφαρμοζόμενο stress. Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την επαναφορά είναι η διάρκεια και η ένταση του εφαρμοζόμενου stress (Artigas et al., 2005). Επιπροσθέτως οι παράγοντες που ρυθμίζουν την ενεργότητα του πεπτικού σωλήνα είναι η ηλικία, το είδος και το στάδιο ανάπτυξης του ψαριού, το είδος του ενζύμου, η τιμή του pH και η θερμοκρασία του νερού (Kuz'mina, 1996).

Πιο πιθανή εξήγηση του φαινομένου της διαφοροποιημένης ενεργότητας και πεπτικής ικανότητας διαφόρων πεπτικών ενζύμων μεμονωμένων ή συνδυασμού αυτών κατά την επαναφορά, θεωρείται η προσπάθεια προσαρμογής των ιχθύων στις διαφοροποιημένες καταστάσεις διαβίωσης που το stress δημιούργησε για αυτά. Έτσι το οξύ stress ιδιαίτερα όταν διήρκεσε μία ώρα αρχικά δεν διαφοροποίησε σημαντικά την ενεργότητα και την πεπτική

ικανότητα σε σχέση με τα επίπεδα του μάρτυρα. Η μετέπειτα διαφοροποίηση ίσως αποτελεί προσπάθεια αντίδρασης των ιχθύων προς αντιμετώπιση της κατάστασης stress που αντιμετωπίζουν. Επίσης τα αυξημένα επίπεδα των καρβοϋδρασών του εντέρου και των πυλωρικών τυφλών πιθανοτατα οφείλονται στην προσπάθεια κάλυψης των ενεργειακών αναγκών των ιχθύων. Έτσι αρχικά με την εφαρμογή του stress η ενεργότητα παρουσιάζεται αυξημένη ενώ στη συνέχεια με την επαναφορά οι ενεργότητες παρουσιάζονται αισθητά μειωμένες. Παντως βιβλιογραφικά αυξημένα επίπεδα θρυψίνης παρουσιάστηκαν στο σαρκοφάγο είδος *Paralichthys olivaceus* μετά από αιχμαλωσία και μεταφορά ατόμων αυτού του είδους από υψηλή πυκνότητα εκτροφής σε χαμηλή στην οποία συνεχίστηκε η εκτροφή τους για 4 ημέρες (Bolasina et al., 2006).

Τα συμπεράσματα τα οποία μπορούν να εξαχθούν από το παρόν πείραμα είναι:

1) Η διαπίστωση της διαφοροποίησης τόσο της ενεργότητας, όσο και της πεπτικής ικανότητας των πεπτικών ενζύμων των δύο μελετηθέντων κατηγοριών μετά την εφαρμογή του οξέος stress συνωστισμού στα άτομα του πειράματος.

2) Η διαπίστωση της διαφοροποίησης των παραπάνω μεγεθών κατά την επαναφορά των φυσιολογικών συνθηκών με τη μη επιστροφή στα επίπεδα του μάρτυρα για τους χρόνους που εξετάστηκαν.

Το παρόν πείραμα σε συνδυασμό με άλλα που θεωρείται σκόπιμο να πραγματοποιηθούν στο μέλλον μπορούν να οδηγήσουν σε χρήσιμα συμπεράσματα για την διευκρίνιση:

α. Του χρονικού διαστήματος που απαιτείται για να επανέλθουν τα ένζυμα στα επίπεδα του μάρτυρα μετά από οξύ stress συνωστισμού και

β. Του χρόνου παροχής τροφής σε άτομα ιριδιζουσας πέστροφας μετά από κάποιον χειρισμό εκτροφής.

7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ΒΙΒΛΙΑ

A. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Παπαγεωργίου Ν (1989). Η πέστροφα και η εκτροφή της.

Παπουτσόγλου Σ.Ε. (2008). Διατροφή Ιχθύων. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.

Παπουτσόγλου Σ.Ε. (1998). Ενδοκρινολογία Ιχθύων. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.

Παπουτσόγλου Σ.Ε. (1997). Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης.

Παπουτσόγλου Σ.Ε. (1994). Εκτροφές Υδρόβιων Οργανισμών.

B. ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Florkin M. (1957). Discovery of pepsin by Theodor Schwann. *Revue Medical de Liege* 12 (5) : 139-44, PMID 13432398

- ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΑΡΘΡΑ

Acerete L., Balasch J.C., Espinoza E., Josa A., Tort L. (2004). Physiological responses in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L., subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture Research*, 237, 167-178.

Alarcon F.J., Martinez T.F., Diaz M., Moyano F.J. (2001). Characterization of carbohydrase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Hydrobiologia*, 445, 199-204.

Artigas M.L., Skjaeraasen J.E., Utne-Palm A.C., Nilsen T. (2005). Recovery from handling stress in *Gadus morhua*. *Journal of Fish Biology*, 67, 384-391.

Barton B.A., Schreck C.B., Barton, L.D. (1987). Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, Vol.2, 173-185.

Biswas A.K., Seoka M., Tanaka Y., Takii K., Kumai H. (2006). Effect of photoperiod manipulation on the growth performance and stress response of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture Research*, 258, 350-356.

Biswas A.K., Seoka M., Kenji T., Maita M., Kumai H. (2006). Stress response of red sea bream *Pagrus major* to acute handling and chronic photoperiod manipulation. *Aquaculture Research*, 252, 566-572.

Biswas A.K., Maita M., Yoshizaki G., Takeuchi T. (2004) Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. *Journal of Fish Biology*, 65, 811-821.

Chiu S.T and Pan S.B. (2002). Digestive protease activities of juvenile and adult eel (*Anguilla japonica*) fed with floating feed. *Aquaculture Research*, 205, 141-156.

Chiu Y.N. and Benitez L.V. (1981). Studies on carbohydrases in the digestive tract of the Milkfish, *Chanos chanos*. Marine Biology, 61, 247-254.

Dabrowsky K. and Glogowski J. (1977). Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. Hydrobiologia, 54, 129-134.

Delaney M.A., Klesius P.H., Shelby R.A. (2004). Cortisol response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) to temperature changes. Journal of Applied Aquaculture, 16, 95-104.

Di Marco P., Priori A., Finioia M.G., Massari A., Mandich A., Marino G. (2008). Physiological effects of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. Aquaculture Research, 275, 319-328.

Fernandez I., Moyano F.J., Diaz M., Martinez T. (2001). Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (*Sparidae*, *Teleostei*). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 262, 1-12.

Furne M., Garcia-Gallego M., Morales A.E., Domezain A., Domezain J., Sanz A. (2008). Effect of starvation and refeeding on digestive enzymes activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology, A, 149, 420-425.

Furne M., Hidalgo M.C., Lopez A., Garcia-Gallego M., Morales A.E., Domezain A., Domezain J., Sanz A. (2005). Digestive enzymes activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. Aquaculture Research, 250, 391-398.

Hidalgo M.C., Urea E., Sanz A. (1999). Comparative study on digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture Research, 170, 267-283.

Iversen M., Finstad B., Nilssen K.J. (1998). Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. Aquaculture Research, 168, 387-394.

Karakatsouli N., Papoutsoglou S.E., Panopoulos G., Papoutsoglou E.S., Chadio S., Kalogiannis D. (2008). Effects of light spectrum on growth and stress response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* reared under recirculating system conditions. Aquaculture Research, 38, 36-42.

Karakatsouli N., Papoutsoglou S.E., Manolessos G. (2007). Combined effects of rearing density and tank colour, on the growth and welfare of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. in a recirculating water system. Aquaculture Research, 38, 1152-1160.

Kubilay A. and Ulukoy G. (2002). The effects of acute stress on rainbow trout. Turkish Journal of Zoology, 26, 249-254.

Kuz'mina V.V. (1996). Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. Aquaculture Research, 148, 25-37.

Kuz'mina V.V. (2000). Hormonal regulation of metabolism and processes of Exotrophy in fish. Polyfunctionality and polypotentiality (Review). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 36, 670-684.

Kuz'mina V.V., Garina, D.V., Yablochkina E.V. (2003). Effect of adrenaline on amylolytic activity of the intestinal mucosa, glycemia level and glycogen concentration in tissues of the golden carp *Carassius auratus* and crucian carp *Carassius carassius*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 39/2, 184-189.

Mackett D.B., Tam W.H., Fryer J.N. (1992). Histological changes in insulin-immunoreactive pancreatic β -cells, and suppression of insulin secretion and somatotrope activity in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) maintained on reduced food intake or exposed to acidic environment. *Fish Physiology and Biochemistry*, 10, 229-243.

North B.P., Turnbull J.F., Ellis T., Porter M.J., Migaud H., Bron J., Bromage N.R. (2006). The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout. *Aquaculture Research*, 255, 466-479.

Olsen R.E., Sundell K., Ringo E., Myklebust R., Hemre G-I, Hansen T., Karlsen O. (2008). The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture Research*, 280, 232-241.

Olsen R.E., Sundell K., Mayhew T.M., Myklebust R., Ringo E. (2005). Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 250, 480-495.

Olsen R.E., Sundell K., Hansen T., Hemre G-I, Myklebust R., Mayhew T.M., Ringo E. (2002). Acute stress alters the intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: An electron microscopical study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 211-221.

Papoutsoglou E.S. and Lyndon A.R. (2006). Digestive enzymes along the alimentary tract of the parrotfish, *Sparisoma cretense*. *Journal of Fish Biology*, 69, 130-140.

Papoutsoglou E.S. and Lyndon A.R. (2006). Digestive enzymes of *Anarhichas minor* and the effect of diet composition on their performance. *Journal of Fish Biology*, 69, 446-460.

Papoutsoglou E.S. and Lyndon A.R. (2006). Digestive proteases and carbohydrases along the alimentary tract of the stargazer, *Uranoscopus scaber*. *Mediterranean Marine Science*, Volume 7/1, 5-14.

Papoutsoglou E.S. and Lyndon A.R. (2005). Effect of incubation temperature on carbohydrate digestion in important teleosts for aquaculture. *Aquaculture Research*, 36, 1252-1264.

Papoutsoglou E.S. and Lyndon A.R. (2003). Distribution of α -amylase along the alimentary tract of two Mediterranean fish species, the parrotfish *Sparisoma cretense* L. and the stargazer *Uranoscopus scaber* L. *Mediterranean Marine Science*, 4/2, 115-124.

Papoutsoglou S.E., Miliou H., Chadio S., Karakatsouli N., Zarkada A. (1999). Studies on stress response and recovery from removal in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) using recirculated seawater system. *Aquaculture Engineering*, 21, 19-32.

Peters G. (1982). The effect of stress on the stomach of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology*, 21, 497-512.

Pickering A.D., Pottinger T.G., Christie P. (1981). Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L. from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology*, 20, 229-244.

Pillay T.V.R. (1980). *Digestion in Teleost Fishes*. FAO Corporate Document Repository

Pottinger T.G. and Pickering A.D. (1992). The influence of social interaction of the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to chronic stress. *Journal of Fish Biology*, 41, 435-447.

Ruane N.M. and Komen H. (2003). Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*, 218, 685-693.

Ruane N.M., Carbello E.C., Komen J. (2002). Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Aquaculture Research*, 33, 777-784.

Spannhof L. and Plantikow H. (1983). Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture Research*, 30, 95-108.

Trenzado C.E., Morales A.E., De La Higuera M. (2006). Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture Research*, 258, 583-593.

Van Weerd J.H. and Komen J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A, 107-112.

Weiseth E., Fjaera S.O., Bjerkeng B., Skjervold P.O. (2006). Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology*, B, 144, 351-358.

Vijayan M.M., Pereira C. and Moon T.W. (1994). Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 108C, 321-329.

Wuertz S., Lutz I., Gessner J., Loeschau P., Hogans B., Kirschbaum F., Kloas W. (2006). The influence of rearing density as an environmental stressor on cortisol response on Shortnose sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology*, 22 (Suppl. 1), 269-273.

