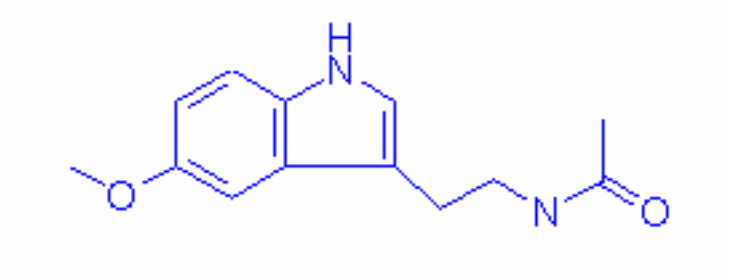
Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

ΔΙΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

«Ο Ρόλος Περιβαλλοντικών Παραγόντων στις Νυχθημερήσιες Διακυμάνσεις της Μελατονίνης στο Φαγκρί, *Pagrus pagrus*»



Καρκάνα Μαρία

Ηράκλειο 2005

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο

Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων

του Τμήματος Βιολογίας

του Πανεπιστημίου Κρήτης

Επιβλέπων καθηγητής: Λέκτορας Παυλίδης Μιχάλης

Δεύτερος εξεταστής: Επικ. Καθηγήτρια Δερμών Κατερίνα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή 1

1.1 Γενικά Στοιχεία για το Φαγκρί (*Pagrus pagrus*) 1

1.2 Γενικά Στοιχεία για τη Μελατονίνη 4

1.2.1 Εισαγωγικά για τις νυχθημερήσιες διακυμάνσεις 4

1.2.2 Η επίφυση ως «βηματοδότης»: ένας νευροχημικός μεταγωγέας 4

1.2.3 Η σύνθεση και ο καταβολισμός της μελατονίνης 6

1.2.4 Οι υποδοχείς της μελατονίνης 7

1.2.5 Έλεγχος του ρυθμού σύνθεσης της μελατονίνης 10

1.2.6 Μελατονίνη και βιολογικές λειτουργίες 12

1.3 Γενικά για την Καταπόνηση («Stress») 15

1.4 Σκοπός της Μελέτης 18

1.4.1 Επιλογή του είδους 18

1.4.2 Αντικειμενικοί στόχοι 19

2. Υλικά & Μέθοδοι 20

2.1 Πειραματικά Ψάρια 20

2.2 Πειραματικές Συνθήκες 20

2.3 Σχεδιασμός Πειραμάτων – Δειγματοληψίες 21

2.3.1 Πείραμα 1ο : « Ο ρόλος της φωτοπεριόδου » 21

2.3.2 Πείραμα 2ο : « Ο ρόλος του μήκους κύματος του φωτός » 21

2.3.3 Πείραμα 3ο : « Ο ρόλος της έντασης του φωτός » 22

2.3.4 Πείραμα 4ο : « Ο ρόλος της θερμοκρασίας » 22

2.3.5 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας 23

2.4 Προσδιορισμός Μελατονίνης 24

2.4.1 Περιγραφή μεθόδου 24

2.4.2 Αξιολόγηση μεθόδου 25
2.4.3 Υπολογισμός αποτελεσμάτων 27
2.5 Προσδιορισμός Γαλακτικού Οξέος 28
2.6 Προσδιορισμός Γλυκόζης 30
2.6 Στατιστική Επεξεργασία 32

3. Αποτελέσματα 33
3.1 Πρωτόκολλο Μελατονίνης 33
3.2 Αξιολόγηση Μεθόδου 36
3.2.1 Γραμμικότητα (Linearity) 36
3.2.2 Ανάκτηση (Recovery) 38
3.3 Μελατονίνη 39
3.3.1 Φωτοπερίοδος 39
3.3.2 Μήκος κύματος φωτός 41
3.3.3 Ένταση φωτός 41
3.3.4 Θερμοκρασία 42
3.4 Γαλακτικό Οξύ 44
3.4.1 Φωτοπερίοδος 44
3.4.2 Μήκος κύματος φωτός 45
3.4.3 Ένταση φωτός 45
3.4.4 Θερμοκρασία 46
3.5 Γλυκόζη 48
3.5.1 Φωτοπερίοδος 48
3.5.2 Μήκος κύματος φωτός 49
3.5.3 Ένταση φωτός 50
3.5.4 Θερμοκρασία 50
3.6 Συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων του πλάσματος 51

4. Συζήτηση **52**

4.1 Πρωτόκολλο Μελατονίνης **52**

4.2 Μελατονίνη **52**

4.3 Γαλακτικό Οξύ **56**

4.4 Γλυκόζη **57**

4.5 Μελλοντικοί Στόχοι **59**

Γενικά Συμπεράσματα **60**

Περίληψη **61**

Summary **62**

Παράρτημα **63**

Βιβλιογραφία **67**

1.1 Γενικά Στοιχεία για το Φαγκρί (*Pagrus pagrus*)

✧ ***Ταξινομική Κατάταξη***

Σχήμα 1.1.1: Φαγκρί (*Pagrus pagrus*) (Γ.Κοτούλιας).

Φύλο: Χορδωτά

Υπέρκλαση: Ψάρια

Κλάση: Οστεϊχθύες

Υφομοταξία: Ακτινοπτερύγιοι

Υπέρταξη: Τελεόστεοι

Τάξη: Περκοειδείς

Οικογένεια: Sparidae

Γένος: *Pagrus*

Είδος: *Pagrus pagrus*

Το 1758 ο Ευρωπαίος φυσιοδίφης Carolus Linnaeus περιέγραψε για πρώτη φορά το Φαγκρί με την ονομασία *Sparus pagrus*. Αργότερα, με την εγκαθίδρυση του γένους *Pagrus* από τον Cuvier (1817), μετονομάστηκε σε *Pagrus pagrus* (Bianchi, 1984).

✧ ***Μορφολογία***

Το σώμα του είναι επίμηκες και πλευρικά πεπιεσμένο. Έχει ροζ-κεραμιδί απόχρωση, με αργυρόχροες-λευκές αποχρώσεις στην κοιλιακή περιοχή του σώματος του. Τα πτερύγια είναι ροζ-λευκόχροα. Τα άκρα του ουραίου πτερυγίου είναι κόκκινα-κεραμιδί, με εξαίρεση τα άκρα του άνω και κάτω τμήματος τα οποία είναι λευκά. Σε περίπτωση στρες το σώμα αποκτά 5-6 κάθετες κόκκινες ραβδώσεις.

Το ραχιαίο πτερύγιο φέρει 11-12 (συνήθως 12) και 9-10 (συνήθως 9) ακτίνες και το ουραίο πτερύγιο φέρει 7-8 (συνήθως 7) ακτίνες. Κατά μήκος της πλευρικής γραμμής υπάρχουν 50-56 λέπια και 5-6 σειρές λεπιών μεταξύ της πλευρικής γραμμής και των τεσσάρων πρώτων ακανθών του ραχιαίου πτερυγίου (Κοκοκύρης, 1998).

Το κεφάλι του είναι μεγάλο με μικρά μάτια και το στόμα του βρίσκεται στο πρόσθιο τμήμα της βάσης του κεφαλιού. Στο πρόσθιο μέρος του στόματος, η άνω σιαγόνα έχει 4, ενώ η κάτω έχει 6 κυνόδοντες. Στο οπίσθιο μέρος τα δόντια είναι μικρότερα και μυτερά. Και στις δύο σιαγόνες έχει από 2 έως 3 σειρές στρογγυλεμένους τραπεζίτες, μερικές φορές ανάμικτους με λεπτά δόντια (Maanoch & Hassler, 1978).

Συνήθως συναντάται σε μέγεθος 30-35 cm. Το μέγιστο μήκος που μπορεί

να φτάσει είναι 91cm TL (στην Ελλάδα φτάνει τα 48cm) και το μέγιστο βάρος είναι 7.720 g (Bauchot & Hureau, 1990). Στον πρώτο χρόνο της ζωής του φτάνει το 35% του μεγέθους του (Vassilopoulou & Papakonstantinou, 1992).

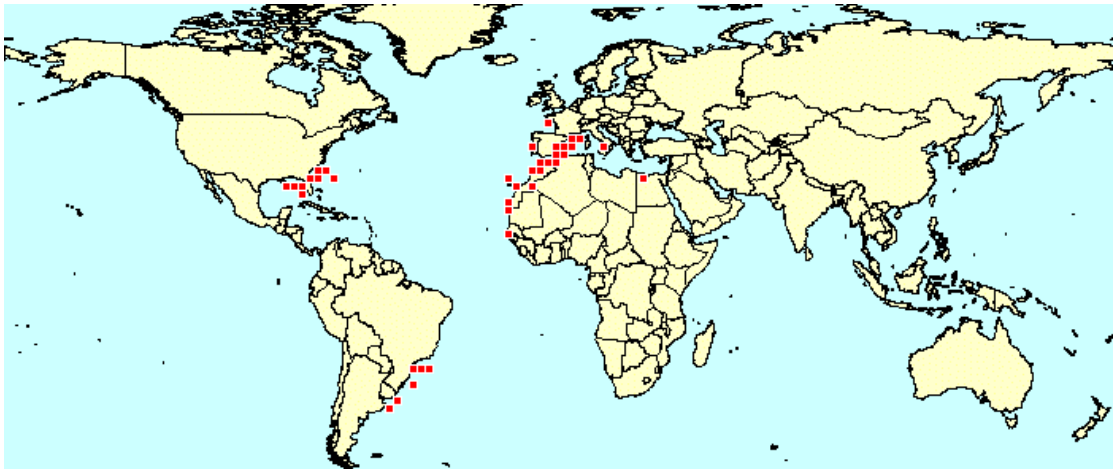
✧ *Αναπαραγωγή*

Το φαγκρί είναι ένα είδος που παρουσιάζει κυρίως πρωτόγυνο ερμαφροδιτισμό και εξωτερική διασταυρούμενη γονιμοποίηση (Pajuelo & Lorenzo, 1996). Τα θηλυκά άτομα ωριμάζουν σε ηλικία δύο, τριών και τεσσάρων ετών (Maanoch & Hassler, 1978). Έρευνες για την αναπαραγωγή του φαγκριού σε συνθήκες εκτροφής έδειξαν ότι πρόκειται για πρωτόγυνο διανδρικό είδος με ηλικία πρώτης ωρίμανσης τόσο για τα θηλυκά όσο και για τα πρώιμα αρσενικά άτομα τα 3 έτη. Ωστόσο ακόμη και στα 4 έτη μόνο το 50% των θηλυκών ατόμων παρουσιάζονται ώριμα αναπαραγωγικά (Κοκοκύρης, 1998). Κατά τη διάρκεια της ετήσιας αναπαραγωγικής περιόδου έχουν παρατηρηθεί ποικίλα στάδια γαμετογένεσης συνυφασμένα με την βιτελλογενίνη του πλάσματος (Kokokiris et al., 2001) και τις στεροειδής αναπαραγωγικές ορμόνες (Kokokiris et al., 2000). Πρόσφατη μελέτη τοποθετεί την περίοδο ωοτοκίας του φαγκριού σε συνθήκες εκτροφής στην Κρήτη από τα μέσα του Ιανουαρίου έως τα μέσα του Απριλίου ή τις αρχές του Μαΐου (Mylonas et al., 2004). Στο φυσικό τους περιβάλλον η ωρίμανση των γονάδων συμβαίνει τον Δεκέμβριο και Ιανουάριο στο Νότιο Ημισφαίριο (Αργεντινή) και από τον Μάρτιο μέχρι τον Ιούνιο στο Βόρειο Ημισφαίριο (Maanoch & Hassler, 1978).

✧ *Οικολογία*

Είναι βενθοπελαγικό είδος με ευρεία γεωγραφική εξάπλωση και προτίμηση υποτροπικών κλιμάτων (57°N - 38°S). Συναντάται στην Μεσόγειο και την Αδριατική, στον Ανατολικό Ατλαντικό από το ύψος της Μ. Βρετανίας μέχρι την Αγκόλα στην Δυτική Αφρική, τις Αζόρες και τις Κανάριες νήσους. Εντοπίζεται επίσης στον Δυτικό Ατλαντικό, στον κόλπο του Μεξικού, και από την Ν. Υόρκη (Η.Π.Α.) μέχρι την Αργεντινή, συμπεριλαμβανομένης και της ηπειρωτικής ακτής της Καραϊβικής (Bauchot & Hureau, 1990). Η γεωγραφική κατανομή του *Pagrus pagrus* φαίνεται στο Σχήμα 1.1.2.

Απαντά σε αμμώδεις, με χαλίκι ή πετρώδεις βυθούς με ακανόνιστη διαμόρφωση. Τα νεαρά άτομα συναντώνται κοντά στις ακτές σε συστοιχίες φυκιών *Posidonia sp.*, ενώ τα ενήλικα άτομα έχουν ευρύτερη οριζόντια και κατακόρυφη κατανομή. Βρίσκεται κυρίως σε βάθη από 25 έως 60 m φτάνει όμως μέχρι και 250 m (Bauchot & Hureau, 1990). Σχηματίζει κοπάδια, δεν εκτελεί μεταναστεύσεις και οι μετακινήσεις του είναι μικρής κλίμακας (Tsimenides et al., 1991).



Σχήμα 1.1.2: Βιογεωγραφικός χάρτης (www.fishbase.org).

Το φαγκρί είναι αρπακτικό και τρέφεται με μεγαπανίδα (da Silva Monteiro & Vanda Marques, 1998). Τα θηράματα του είναι στην πλειοψηφία τους βενθικοί οργανισμοί (Maanoch & Hassler, 1978). Συγκεκριμένα τρέφεται με μικρότερα ψάρια, καρκινοειδή (π.χ. γαρίδες), μαλάκια (π.χ. καλαμάρια), μυσιδώδη και πολύχαιτους, οι οποίοι και κυριαρχούν στην δίαιτά του (Λαμπροπούλου, 1995). Επίσης καταναλώνει εχινόδερμα, δεκάποδα και γαστερόποδα, χάρις στους δυνατούς τραπεζίτες που διαθέτει (Μαραγκουδάκη, 2001).

Θηρευτές του είναι ο άνθρωπος, μεγάλα σαρκοφάγα θαλάσσια θηλαστικά, χελώνες και ψάρια (Maanoch & Hassler, 1978).

1.2 Γενικά Στοιχεία για τη Μελατονίνη

1.2.1 Εισαγωγικά για τις νυχθημερήσιες διακυμάνσεις

Οι οργανισμοί, από τους μονοκύτταρους έως τα σπονδυλωτά, παρουσιάζουν νυχθημερήσιες διακυμάνσεις σε βιοχημικές, φυσιολογικές και ηθολογικές παραμέτρους. Σημαντικό είναι το γεγονός πως πολλοί από αυτούς τους νυχθημερήσιους ρυθμούς παραμένουν σταθεροί υπό σταθερές συνθήκες με περίοδο σχεδόν 24 h, υποδεικνύοντας πως καθοδηγούνται από έναν ενδογενή ρυθμό ή «κιρκαδικό ρολόι». Υπό φυσικές συνθήκες αυτοί οι ρυθμοί συγχρονίζονται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα (όπως το φως και η θερμοκρασία), έτσι ώστε το «κατάλληλο» γεγονός να συμβαίνει την «κατάλληλη» ώρα της ημέρας.

Η χρήση του όρου «κιρκαδικό ρολόι» δε σημαίνει ότι ένα μοναδικό διακριτό «ρολόι» είναι υπεύθυνο για την καθοδήγηση όλων των ημερήσιων ρυθμών ενός οργανισμού. Έχει εκτιμηθεί πως οι πολυκύτταροι οργανισμοί είναι «πολύ-ταλαντωτές», δηλαδή σε κάθε οργανισμό μπορεί να υπάρχουν περισσότερα του ενός κιρκαδικά ρολόγια. Φυσιολογικά, ωστόσο, όλοι οι πολλαπλοί κιρκαδικοί ρυθμοί ενός οργανισμού επιδεικνύουν καθορισμένες συσχετίσεις φάσης μεταξύ τους τόσο υπό συγχρονισμένες όσο και υπό ελεύθερες (free-running) συνθήκες. Επομένως, όταν υπάρχουν πολλαπλά «ρολόγια» σε έναν οργανισμό πρέπει να συζευγνύονται με κάποιο τρόπο (Underwood, 1989).

Στην οργάνωση του κιρκαδικού συστήματος στα σπονδυλωτά εμπλέκονται η επίφυση, περιοχές του εγκεφάλου, π.χ. ο υπερχιασματικός πυρήνας (SCN) του υποθάλαμου, και ο αμφιβληστροειδής. Φαίνεται πως υπάρχουν ενδιαφέρουσες ομοιότητες καθώς και σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών ή των οικογενειών όσον αφορά τους σχετικούς ρόλους που κατέχουν αυτές οι περιοχές στο κιρκαδικό σύστημα του οργανισμού (Menaker et al., 1997). Αν και οι λόγοι αυτών των διαφορών δεν είναι γνωστοί, πιθανότατα αντανακλούν τις διαφορετικές πιέσεις επιλογής που ασκούνται στους οργανισμούς, οι οποίοι καταλαμβάνουν διαφορετικούς οικολογικούς και χρονολογικούς θώκους (Underwood, 1989)

1.2.2 Η επίφυση ως «βηματοδότης»: ένας νευροχημικός μεταγωγέας

Η επίφυση αποτέλεσε θέμα ερευνών κατά τις τελευταίες δεκαετίες διότι παρέχει ένα παραγωγικό πειραματικό μοντέλο για την μελέτη των κιρκαδικών ρυθμών και της νευρικής ρύθμισης των οργάνων. Η σύγχρονη εποχή ερευνών άρχισε με την απομόνωση και την ταυτοποίηση της μελατονίνης από επίφυση βοοειδούς από τους Lerner et al. (1958). Από τότε έγινε δυνατή η εξέταση της

τοποθεσίας, των φυσιολογικών ιδιοτήτων, της σύνθεσης και του μεταβολισμού (Axelrod, 1974).

Ο κύριος ρόλος της επίφυσης στο κιρκαδικό σύστημα αναδεικνύεται παρατηρώντας τις επιπτώσεις της εκτομής της (pinealectomy) στους ελεύθερους ρυθμούς (free-running). Η αφαίρεση μπορεί να προκαλέσει: α) αξιοσημείωτες μεταβολές στην περίοδο των ελεύθερων ρυθμών (*Couesius plumbeus*, *Lota lota*, *Catostomus commersoni*), β) διαχωρισμό του ρυθμού δραστηριότητας σε δύο κύριες κιρκαδικές συνιστώσες (*Catostomus commersoni*) και γ) αρρυθμία (*Heteropneustes fosilis*). Οι παρατηρήσεις αυτές είναι συμβατές με την υπόθεση ότι η επίφυση δρα ως «βηματοδότης» στο πολύ-ταλαντωτικό κιρκαδικό σύστημα. Προφανώς, κιρκαδικές ταλαντώσεις πρέπει να υπάρχουν και εκτός της επίφυσης, καθώς σε μερικά ψάρια μετά την εκτομή η ρυθμικότητα διατηρείται. Όσον αφορά τις επιπτώσεις της εκτομής, τόσο οι ενδοειδικές όσο και οι δια-ειδικές διαφορές ερμηνεύονται με βάση τις μεμονωμένες διακυμάνσεις στην ισχύ της σύζευξης μεταξύ έξω-επιφυσικών κιρκαδικών ταλαντώσεων (Underwood, 1989).

Η επίφυση τυπικά περιλαμβάνει διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των φωτοϋποδοχέων και των νευρικών κυττάρων. Τα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων παρουσιάζουν ομοιότητες με τους φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδή των οφθαλμών και έχουν εντοπιστεί στα πετρόμυζα, στα ψάρια, στα αμφίβια, στα χελώνια και στα σαυρόμορφα. Οι φωτοϋποδοχείς διαθέτουν ένα καλά καθορισμένο εξωτερικό τμήμα και ένα κυτταρικό σώμα με ένα συναπτικό μίσχο ο οποίος συνδέεται με έναν ή περισσότερους δευτερογενείς νευρώνες. Σύμφωνα με μια υπόθεση, οι φωτοϋποδοχείς της επίφυσης θεωρούνται πρόδρομο του εκκριτικού επιφυσικού κυττάρου, το οποίο είναι ο επικρατής κυτταρικός τύπος των οφιοειδών, των πτηνών και των θηλαστικών (Underwood, 1989).

Γενικώς, η επίφυση παρουσιάζει μια αχρωματική ηλεκτρική απόκριση στον φωτισμό. Τα νευρικά κύτταρα που βρίσκονται στην επίφυση διαθέτουν νευράξονες που μεταφέρουν τη πληροφορία σε προ-καλυπτρικά (pretectal) και καλυπτρικά (tegmental) κέντρα του εγκεφάλου. Στους τελεόστεους αυτές οι περιοχές περιλαμβάνουν τον ραχιαίο θάλαμο, την προ-καλυπτρική περιοχή (pretectal area), τον περικοιλιακό υποθάλαμο και τη μεσεγκεφαλική καλύπτρα (tegmentum) (Meissl et al., 1990). Κάποιες από αυτές τις περιοχές είναι κοινές με αυτές των αξόνων που ξεκινούν από τον αμφιβληστροειδή (retinofugal axons) και πιστεύεται πως νευρικές πληροφορίες από την επίφυση συνενώνονται άμεσα με σήματα από τον αμφιβληστροειδή (Ekström, 1987).

Από τα κατώτερα στα ανώτερα σπονδυλωτά υπάρχει μια καθορισμένη φυλογενετική τάση προς μια μείωση των ενδοεπιφυσικών νευρώνων και των ινών που ξεκινούν από την επίφυση (pinealofugal). Επίσης, ενώ η συμπαθητική *pinealopedal* νεύρωση – προερχόμενη από τα ανώτερα αυχενικά γάγγλια – έχει μελετηθεί εκτενώς στα πτηνά και τα θηλαστικά, στα κατώτερα σπονδυλωτά δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία. Φαίνεται πως ορισμένα κατώτερα σπονδυλωτά

διαθέτουν συμπαθητικά (απαγωγά) νεύρα, αλλά η προέλευση αυτών είναι αβέβαιη.

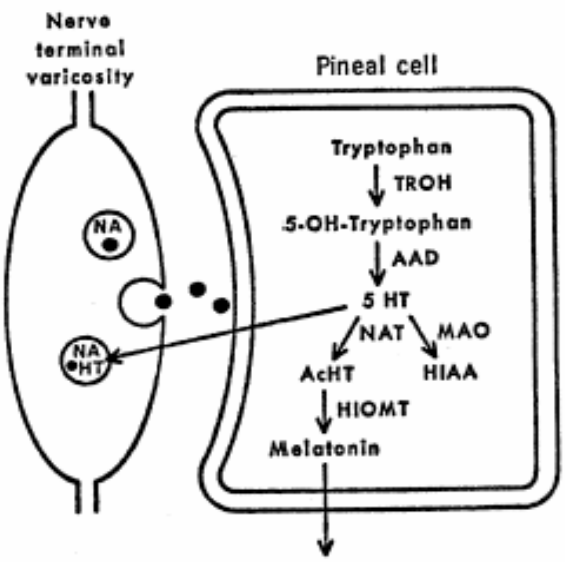
Παράλληλα με τη φωτοευαισθησία του κύριου κυτταρικού τύπου της επίφυσης, υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τη σημαντική βιοσυνθετική δραστηριότητα αυτών των κυττάρων. Για παράδειγμα, μελέτες ανοσοϊστοχημείας και αυτοραδιογραφίας επιβεβαιώνουν ότι τα φωτοευαίσθητα επιφυσικά κύτταρα αποτελούν περιοχές σύνθεσης ινδολοαμινών, συμπεριλαμβανομένης της μελατονίνης (Underwood, 1989).

1.2.3 Η σύνθεση και ο καταβολισμός της μελατονίνης

Η μελατονίνη – μια ινδολοαμίνη - συντίθεται σχεδόν αποκλειστικά μέσα στο φωτοευαίσθητο επιφυσικό κύτταρο σύμφωνα με την εξής ακολουθία (Σχήμα 1.2.3.1): τρυπτοφάνη -› 5-υδροξυτρυπτοφάνη –› σεροτονίνη –› N-ακετυλοσεροτονίνη –› μελατονίνη. Η τρυπτοφάνη υδροξυλιώνεται σε 5-υδροξυτρυπτοφάνη από την τρυπτοφάνη υδροξυλάση. Η l-αρωματική αμινοξική αποκαρβοξυλάση δρα αποκαρβοξυλιώνοντας την 5-υδροξυτρυπτοφάνη σχηματίζοντας την βιογενή αμίνη σεροτονίνη. Η σεροτονίνη στη συνέχεια ακολουθεί σύνθετη πορεία. Ένα μέρος απαμινώνεται σε 5-υδροξυινδολοακετικό οξύ από την μοναμινική οξειδάση (MAO) και ένα άλλο εγκαταλείπει το επιφυσικό κύτταρο και συλλέγεται από κλάδο του συμπαθητικού νεύρου, όπου αποθηκεύεται μαζί με το νευροδιαβιβαστή νοραδρεναλίνη. Ένα τρίτο μέρος ακετυλιώνεται σε N-ακετυλοσεροτονίνη από το ένζυμο N-ακετυλοτρανσφεράση (NAT). Αυτό είναι ένα κρίσιμο ρυθμιστικό βήμα, όπως θα φανεί αργότερα. Η N-ακετυλοσεροτονίνη υπό την επίδραση της υδροξυινδολης O-μεθυλοτρανσφεράσης (HIOMT) σχηματίζει την μελατονίνη (5-μεθοξυ-N-ακετυλτρυπταμίνη). Η HIOMT μεταφέρει μια μεθυλική ομάδα από την S-αδενοσυλμεθειονίνη στο 5-υδροξύλιο της N-ακετυλοσεροτονίνη (Axelrod, 1974).

Στα ψάρια, όπως και στα ερπετά και τα αμφίβια, η HIOMT εντοπίζεται στον οφθαλμό και τον εγκέφαλο καθώς και στην επίφυση. Στα θηλαστικά και τα πτηνά το παραπάνω ένζυμο συγκεντρώνεται κυρίως στην επίφυση , αν και μικρά ποσά ενζύμου έχουν βρεθεί στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του αρουραίου.

Η μελατονίνη είναι λιποδιαλυτή και εκκρίνεται γρήγορα στο αίμα με παθητική διάχυση (Wurtman & Ozaki, 1978) . Στην κυκλοφορία είναι χαλαρά συνδεδεμένη με αλβουμίνη και μεταβολίζεται στο ήπαρ με υδροξυλίωση που ακολουθείται από σύντηξη. Αν κάποια ποσότητα μελατονίνης εκκριθεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό προτού το μεγαλύτερο τμήμα της εισαχθεί στην κυκλοφορία του αίματος, τότε η ορμόνη μπορεί να έχει πολύ διαφορετική μοίρα από αυτή που προαναφέρθηκε. Για παράδειγμα, μπορεί να μεταβολιστεί από ένα ένζυμο του εγκεφάλου που διαχωρίζει τους ινδολικούς πυρήνες (Hirata et al., 1974).



Σχήμα 1.2.3.1: Το επιφυσικό κύτταρο, το συμπαθητικό νεύρο και η σύνθεση της μελατονίνης. Συντομεύσεις: **TROH**-τρυπτοφάνη υδροξυλάση, **AAD**-l-αρωματική αμινοξική αποκαρβοξυλάση, **5 HT**-σεροτονίνη, **NAT**- N-ακετυλοτρανσφεράση, **MAO**-μοναμινική οξειδάση, **AcHT**-N-ακετυλοσεροτονίνη, **HIAA**-5-υδροξυινδολοακετικό οξύ, **HIOMT**- υδροξυινδολη O-μεθυλοτρανσφεράση, **NA**-νοραδρεναλίνη (Axelrod, 1974).

1.2.4 Οι υποδοχείς της μελατονίνης

Το σήμα της μελατονίνης από φωτοδεκτικές περιοχές μεταφέρεται σε εγκεφαλικές περιοχές και σε περιφερειακούς ιστούς επιδρώντας στους κιρκαδικούς ρυθμούς του οργανισμού. Αν και η ανάπτυξη τεχνικών προσδιορισμού υποδοχέων (radioreceptor assay techniques) που χρησιμοποιούν ως σημαντή την [^{125}I]ιωδομελατονίνη ([^{125}I]Mel) έχουν προάγει τις γνώσεις μας σχετικά με τις περιοχές πρόσδεσης της μελατονίνης σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί, αυτή η διαδικασία μεταγωγής δεν έχει κατανοηθεί εξ ολοκλήρου. Η 2-[^{125}I]Mel επέτρεψε την περιγραφή της κεντρικής διασποράς των θέσεων πρόσδεσης της μελατονίνης με αυτοραδιογραφία.

Με βάση τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά τους, οι θέσεις πρόσδεσης διακρίνονται σε δύο τύπους, **ML$_1$** και **ML$_2$** (Dubocovich, 1988). Ο πρώτος τύπος είναι μια υποοικογένεια υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης (G-protein-coupled receptors), η οποία περιλαμβάνει τρία «μέλη», τον Mel 1a, τον Mel 1b και τον Mel 1c (Reppert et al., 1997). Ο υποδοχέας Mel 1a – γνωστός και ως **MT$_1$** – παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με την σημασμένη μελατονίνη ([^{125}I]Mel) και εκφράζεται στον εγκέφαλο, στον αμφιβληστροειδή και σε διάφορους περιφερειακούς ιστούς. Ο υποδοχέας Mel 1b – γνωστός και ως **MT$_2$** – έχει ελαφρώς μικρότερη συγγένεια για την [^{125}I]Mel απ' ότι ο MT$_1$ και εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο και σε διάφορους περιφερειακούς ιστούς κάποιων θηλαστικών (Masana & Dubocovich,

2001). Από την άλλη, ο υποδοχέας ML_2 – γνωστός και ως **MT_3** – ανήκει στην οικογένεια των ρεδουκτασών κινόνης (quinone reductases) και έχει προσφάτως απομονωθεί. Ο φυσιολογικός του ρόλος όμως είναι ακόμη υπό συζήτηση (Noszean et al., 2000).

Σήμερα, η μοριακή κλωνοποίηση ολόκληρων των cDNAs που κωδικοποιούν τους υποδοχείς της μελατονίνης έχει επιτευχθεί στο βάτραχο (*Xenopus sp.*), στο κοτόπουλο και σε αρκετά θηλαστικά. Στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί μόνο οι υποδοχείς Mel 1a και Mel 1b, μεταξύ των οποίων υπάρχουν διαφορές που αφορούν στη μοριακή δομή τους, το χρωμοσωμικό εντοπισμό των αντίστοιχων γονιδίων, τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά και τη σηματοδότηση (Reppert et al., 1994, 1997; Petit et al., 1999). Ίσως οι δύο αυτοί τύποι να εμπλέκονται σε διαφορετικές λειτουργίες και ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Weaver et al., 1996; Dubocovich et al., 1997; Liu et al., 1997).

Σε σύγκριση με τα δεδομένα που υπάρχουν για τα ομοιόθερμα, οι γνώσεις σχετικά με τη μοριακή δομή και τις λειτουργίες των υποδοχέων σε είδη μη-θηλαστικών είναι αρκετά περιορισμένες. Μέχρι σήμερα ο Mel 1a είναι ο μοναδικός υποδοχέας που έχει βρεθεί σε όλες τις ομάδες των σπονδυλωτών που έχουν εξετασθεί και θεωρείται πως στα θηλαστικά εμπλέκεται στην αναπαραγωγή και στους κιρκαδικούς ρυθμούς. Οι υποδοχείς της μελατονίνης έχουν κλωνοποιηθεί για μερικά είδη ιχθύων, όπως η ιριδίζουσα πέστροφα και ο λούτσος (Mazurais et al., 1999; Gaildrat et al., 2002).

Στα ψάρια, οι Martinoli et al. (1991) ασχολήθηκαν πρωταρχικά με τον χαρακτηρισμό μιας τάξης θέσεων πρόσδεσης μελατονίνης υψηλής συγγένειας στο κεντρικό νευρικό σύστημα του χρυσόψαρου με σημαντική διασπορά στην προ-καλυπτρική περιοχή, την οπτική καλύπτρα και την παρεγκεφαλίδα και μικρότερης έκτασης διασπορά σε άλλες περιοχές. Τα δεδομένα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και σε άλλους τελεόστεους (Molina-Borja et al., 1994; Vernadakis et al., 1998), όπως η ιριδίζουσα πέστροφα (Davies et al., 1994), ο σολομός του Ατλαντικού (Ekstrom & Vanecek, 1992) και άλλα σαλμονοειδή (Pang et al., 1994).

Στον εγκέφαλο των ιχθύων η έκφραση τόσο των θέσεων πρόσδεσης της μελατονίνης όσο και των γονιδίων των υποδοχέων παρουσιάζει μια εκτεταμένη διασπορά (Mazurais et al., 1999), σε αντίθεση με τη διακριτή διασπορά της στον εγκέφαλο των θηλαστικών (Morgan et al., 1994; Vanecek, 1998), όπου οι θέσεις πρόσδεσης εντοπίζονται κυρίως στους υπερχιασματικούς πυρήνες και στα φυματώδη τμήματα της υπόφυσης με μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών (Stankov et al., 1993). Εξαιτίας της ευρείας διασποράς των θέσεων πρόσδεσης στον εγκέφαλο των τελεόστεων, προκαλεί ενδιαφέρον η συγκριτική μελέτη τους με τη διασπορά των κύτταρων έκφρασης των υποδοχέων.

Στα θηλαστικά τα μετάγραφα του Mel 1b εκφράζονται κυρίως στον αμφιβληστροειδή και σε μικρότερη έκταση στους υπερχιασματικούς πυρήνες (Reppert et al., 1995; Dubocovich et al., 1998). Στον λούτσο τα mRNAs του Mel 1b παρουσιάζουν εκτεταμένη διασπορά μέσα στον εγκέφαλο και μικρότερη στον αμφιβληστροειδή και την υπόφυση (Gaildrat et al., 2002). Η παρουσία στην

υπόφυση έρχεται σε αντίθεση με δεδομένα για την ιριδίζουσα πέστροφα και άλλα είδη (Ekstrom & Vanecek, 1992; Davies et al., 1994; Mazurais et al., 1999), αλλά επιβεβαιώνεται σε άλλα είδη όπως η πέστροφα (Gaildrat & Falcon, 2000). Η μελατονίνη πιθανόν ελέγχει μέσω των υποδοχέων νευροενδοκρινικές λειτουργίες στην υπόφυση. Η έκφραση του Mel 1b κυρίως στην οπτική καλύπτρα, την παρεγκεφαλίδα (Gaildrat et al., 2002; Liu et al., 1995; Mazurais et al., 1999) και το διεγκέφαλο (Gaildrat et al., 2002), υποδηλώνει τη λειτουργία του ως υποδοχέα που μεσολαβεί στη δράση της μελατονίνης στις αισθητικές περιοχές.

Ο κύριος στόχος δράσης της επιφυσικής μελατονίνης είναι ο εγκέφαλος (Dubocovich, 1988). Ο αμφιβληστροειδής είναι άλλος ένας τόπος δράσης της ορμόνης για την προσαρμογή στο σκοτάδι (Cahill et al., 1991). Όσον αφορά στους περιφερειακούς ιστούς, υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη υποδοχέων μελατονίνης στα βράγχια και στο ήπαρ της ιριδίζουσας πέστροφας και της γλώσσας (*Platichthys flesus*) (Kulczykowska, 2002). Επίσης η μελατονίνη έχει εντοπιστεί στο γαστρεντερικό σύστημα (οισοφάγος, στομάχι, έντερο) κάποιων ειδών ιχθύων, όπως ο οξύρυγχος (*Acipenser fulvescens*), η ιριδίζουσα πέστροφα και ο κυπρίνος (Bubenik & Pang, 1997), όπου η λειτουργία της δεν είναι πολύ γνωστή. Στους ίδιους ιστούς, έχουν ταυτοποιηθεί θέσεις πρόσδεσης για τη μελατονίνη σε αρκετά είδη σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων του κοτόπουλου, της πάπιας, του ποντικού και του ανθρώπου (Martin et al., 1998).

Προσφάτως ανακαλύφθηκε πως η μελατονίνη παρουσιάζει και ενδοκυτταρική δράση. Χάρη στην ιδιότητά της να είναι λιποδιαλυτή και υδατοδιαλυτή, μπορεί να εισέρχεται εύκολα στα κύτταρα. Κατά συνέπεια μπορεί να επηρεάζει διαδικασίες που δεν απαιτούν την αλληλεπίδραση της με μεμβρανικούς υποδοχείς, π.χ. η αντιοξειδωτική της δράση (Reiter, 2000). Επιπλέον, οι πυρηνικές περιοχές πρόσδεσης της μελατονίνης ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν σε πολλά κύτταρα και οι αλληλεπιδράσεις της ορμόνης με τους πυρηνικούς και τους μεμβρανικούς υποδοχείς μελετώνται στα πλαίσια της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Reiter et al., 1996).

✧ *Νυχθημερήσιες διακυμάνσεις της ευαισθησίας των υποδοχέων*

Η ευαισθησία των υποδοχέων κυμαίνεται κατά τη διάρκεια του 24-h κύκλου, γεγονός που ίσως υποδηλώνει μεταβολές της πυκνότητας των υποδοχέων της μελατονίνης πιθανόν λόγω επίδρασης της φωτοπεριόδου, της ώρας της ημέρας και της αναπτυξιακής ή ενδοκρινικής κατάστασης (Venecek, 1998). Ωστόσο, έχουν βρεθεί αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του φωτός στην πυκνότητα και την συγγένεια των θέσεων πρόσδεσης της μελατονίνης. Για παράδειγμα, κάποιες μελέτες αναφέρουν κιρκαδικές μεταβολές της ικανότητας πρόσδεσης (binding capacity) των υποδοχέων του εγκεφάλου σε πτηνά και θηλαστικά, ενώ η συγγένεια (affinity) τους παραμένει αμετάβλητη καθ' όλο το 24-h (Yuan & Pang, 1990,1991,1992; Iigo et al., 1994b,

1995). Από την άλλη στον masu salmon και στον λούτσο έχουν περιγραφεί κιρκαδικές μεταβολές τόσο στην πυκνότητα όσο και στη συγγένεια των υποδοχέων του εγκεφάλου (Gaildrat et al., 1998; Amano et al., 2003).

Οι μηχανισμοί που ελέγχουν την ευαισθητοποίηση ή την απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της μελατονίνης παραμένουν άγνωστοι, αλλά πιστεύεται ότι ίσως εμπλέκονται η φωτοπερίοδος, τα οιστρογόνα (Witt-Enderby et al., 2003) ή η ίδια η μελατονίνη (Gauer et al., 1993; Masson-Pevet et al., 1993; Iigo et al., 1994b, 1995, 2003). Η αντίστροφη σχέση μεταξύ του ρυθμού της μελατονίνης της κυκλοφορίας και της συγγένειας και πυκνότητας των υποδοχέων ενισχύει το ρόλο κλειδί της ενδογενούς ορμόνης (Bayarri et al., 2004). Σε όλα σχεδόν τα είδη που έχουν μελετηθεί οι υποδοχείς φαίνεται πως απευαισθητοποιούνται (χαμηλότερη πυκνότητα και συγγένεια) παράλληλα με τις υψηλές συγκεντρώσεις μελατονίνης στο σκοτάδι. Συνεπώς ο ρυθμός της μελατονίνης της κυκλοφορίας βρίσκεται σε αντίθετη φάση (*out of phase*) με τους ρυθμούς συγγένειας και ικανότητας πρόσδεσης των υποδοχέων (Falcon et al., 1996; Iigo et al., 2003; Witt-Enderby et al., 2003).

1.2.5 Έλεγχος του ρυθμού σύνθεσης της μελατονίνης

✧ ***Ενζυμικοί παράγοντες***

Στα ανώτερα σπονδυλωτά πιστεύεται πως οι νυχθημερήσιες διακυμάνσεις της μελατονίνης προκύπτουν από το ρυθμό της δραστηριότητας του ρυθμοκαθοριστικού ενζύμου NAT. Ωστόσο, το τελικό ένζυμο στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της μελατονίνης – η HIOMT – δε συμβάλει στη ρυθμικότητα της μελατονίνης στα ανώτερα σπονδυλωτά καθώς η δραστηριότητά του παραμένει σχετικά σταθερή κατά τη διάρκεια του εικοσιτετραώρου. Στους τελεόστεους δεν είναι ξεκάθαρη η σχέση μεταξύ φωτοπεριόδου και ενεργότητας του ενζύμου HIOMT. Κάποιοι συγγραφείς υποστηρίζουν έναν ημερήσιο ρυθμό ενεργότητας, ενώ άλλοι όχι ακόμη και στο ίδιο είδος. Τα πειράματα στην επίφυση του λούτσου έδειξαν πως η παραγωγή μελατονίνης δεν εξαρτάται στις ημερήσιες μεταβολές της ενεργότητας της HIOMT, καθώς αυτή παραμένει σχεδόν σταθερή κατά τη διάρκεια του LD κύκλου. Αντίθετα η ίδια μελέτη έδειξε πως μόνο η NAT συγχρονίζεται με τον LD κύκλο. Η ενεργότητά της αυξάνεται απότομα στην έναρξη της σκοτόφασης και μειώνεται σημαντικά στο τέλος της. Όπως και στα ομοιόθερμα, λοιπόν, η ρύθμιση της παραγωγής μελατονίνης από τη σεροτονίνη ελέγχεται από την ενεργότητα της NAT, η οποία εξαρτάται από της συνθήκες φωτισμού του περιβάλλοντος (Falcon et al., 1987). Ωστόσο, σε κάποια είδη ψαριών (*Oncorhynchus tshawytscha*) η δραστηριότητα ή η ποσότητα της HIOMT επιδεικνύει σημαντικές ημερήσιες (και εποχιακές) διακυμάνσεις – σε κάποια άλλα όχι (*Esox lucius*).

Συνεπώς, η συμβολή της δραστηριότητας της NAT έναντι της HIOMT στη ρυθμικότητα της μελατονίνης απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

✧ ***Περιβαλλοντικοί παράγοντες***

Η μελατονίνη είναι γνωστή για τη δράση της ως εσωτερικός «χρονοδότης» (zeitgeber) καθώς μετατρέπει τη φωτεινή πληροφορία σε χημικό σήμα (Reiter, 1991). Οι ημερήσιοι κύκλοι του φωτισμού είναι μέχρι σήμερα ο κύριος περιβαλλοντικός παράγοντας επίδρασης στην παραγωγή μελατονίνης. Στα είδη που έχουν ερευνηθεί μέχρι σήμερα, η παραγωγή μελατονίνης από την επίφυση καταστέλλεται από το φως αλλά διεγείρεται από το σκοτάδι. Συνεπώς κατά τη διάρκεια της μέρας εμφανίζονται χαμηλά επίπεδα μελατονίνης και υψηλά κατά τη διάρκεια της νύχτας (Binkley et al., 1978; Binkley, 1988; Armstrong, 1989; Underwood, 1989).

Ο ρυθμός έκκρισης της μελατονίνης αποτελεί το μηχανισμό επικοινωνίας της επίφυσης με το υπόλοιπο κιρκαδικό σύστημα. Ο συγχρονισμός του κιρκαδικού ρολογιού από ένα ερέθισμά όπως το φως απαιτεί την νυχθημερήσια μεταβολή της ευαισθησίας σε αυτό το ερέθισμα, δηλαδή την ύπαρξη μιας καμπύλης απόκρισης φάσης (phase response curve) στο ερέθισμα. Όλες οι γνωστές καμπύλες απόκρισης είναι ποσοτικά παρόμοιες. Αν υποτεθεί πως η καμπύλη απόκρισης της μελατονίνης διαφέρει μεταξύ των εξω-επιφυσικών «ρολογιών», ο ημερήσιος παλμός της μελατονίνης θα μπορούσε τουλάχιστον θεωρητικά όχι μόνο να συγχρονίσει αυτά τα «ρολόγια» αλλά και να ελέγχει τη φάση στην οποία βρίσκονται, με αποτέλεσμα οι λειτουργίες που αυτά ρυθμίζουν (κινητική δραστηριότητα, επίπεδα ορμονών, δραστηριότητα ενζύμων) να συμβαίνουν την κατάλληλη στιγμή του εικοσιτετραώρου.

Η πλειοψηφία των σύγχρονων ερευνών εστιάζει στην επίδραση της φωτοπεριόδου και της θερμοκρασίας στη σύνθεση της μελατονίνης και έχει τάση να συσχετίζει τις ημερήσιες ή εποχιακές μεταβολές στον οργανισμό των ψαριών με τη μελατονίνη (Max & Menaker, 1992; Meissl & Brandstatter, 1992; Zachmann et al., 1992b). Γενικώς, είναι αποδεκτός ο ρόλος της ορμόνης στο μηχανισμό ελέγχου των ρυθμικών προσαρμογών στους ημερήσιους και εποχιακούς κύκλους. Οι μελέτες κάποιων τελεόστεων, όπως το χρυσόψαρο, το white sucker, ο λούτσος, το zebrafish και η τσιπούρα, προτείνουν την παρουσία κυτταρικών κιρκαδικών ταλαντώσεων στην υπόφυση (Iigo et al., 1991; Zachmann et al., 1992b; Bolliet et al., 1996; Cahill, 1996; Molina-Borja et al., 1996). Μόνο η υπόφυση της ιριδίζουσας πέστροφας, της καφέ πέστροφας και της συναγρίδας δεν παρουσιάζει κιρκαδικές ταλαντώσεις. Σε αυτά τα είδη η σύνθεση ελέγχεται απευθείας από το πρότυπο του φωτισμού (Gern & Greenhouse, 1988; Max & Menaker, 1992; Pavlidis et al., 1999a). Το ετήσιο πρότυπο τη συνθέσης, για παράδειγμα το καλοκαίρι μια βραχεία περίοδος υψηλής σύνθεσης και το χειμώνα μια μακρά, παίζει το ρόλο ενός «ενδοκρινικού ημερολογίου» στον

οργανισμό και συγχρονίζει τον αναπαραγωγικό κύκλο με τους περιβαλλοντικούς κύκλους (Reiter, 1993).

Το φως και η θερμοκρασία, τα πρωτογενή ερεθίσματα για τα ποικιλόθερμα, δρουν σε διάφορα επίπεδα του κιρκαδικού συστήματος. Πρώτον, τόσο το φως όσο και η θερμοκρασία μπορούν να μετατραπούν σε ορμονικό σήμα (μελατονίνη) στο επίπεδο της επίφυσης. Δεύτερον, το φως δρα μέσω υποδοχέων που βρίσκονται εκτός αμφιβληστροειδούς ή επίφυσης για το συγχρονισμό κεντρικών ταλαντώσεων. Τρίτον, το φως (και πιθανώς η θερμοκρασία) δρα στο κιρκαδικό σύστημα μέσω των οφθαλμών (Underwood, 1989).

Στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά η ρυθμικότητα καταστέλλεται σε άτομα που διατηρούνται σε συνεχή φωτισμό, αλλά ο ρυθμός της μελατονίνης διατηρείται σε άτομα που εκτίθενται σε συνεχές σκοτάδι. Ένα ενδογενές ρολόι δίνει κυκλικά σήματα απουσία περιβαλλοντικών εναλλαγών φωτός-σκοταδιού. Στον άνθρωπο έχει παρατηρηθεί πως απαιτούνται 3 με 4 ημέρες για την προσαρμογή της επίφυσης στη νέα φωτοπερίοδο (Wurtman & Ozaki, 1978).

1.2.6 Μελατονίνη και βιολογικές λειτουργίες

Η μελατονίνη θεωρείται σημαντικό συστατικό του κιρκαδικού συστήματος, καθώς εμπλέκεται άμεσα στον έλεγχο πολλών βιολογικών λειτουργιών (Hastings et al., 1989; Nelson & Demas, 1997; Sanchez-Vazquez et al., 1997). Αρχικά, οι κιρκαδικές μεταβολές στο μαύρισμα του δέρματος στους τελεόστεους προκάλεσαν το ενδιαφέρον του Reed (1968) για τη μελατονίνη ως πιθανό υπεύθυνο παράγοντα συσσώρευσης των χρωστικών στα μελανοφόρα. Τις τελευταίες δεκαετίες υπήρξε καταιγίδα πληροφοριών σχετικά με τις μεταβολικές και φυσιολογικές επιδράσεις της μελατονίνης στα σπονδυλωτά και ιδίως στα θηλαστικά (Binkley, 1998; Reiter, 1995). Σήμερα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε ότι η ορμόνη συμμετέχει σε λειτουργίες όπως η αύξηση, η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η γήρανση, η κυτταρική ανοσία, ο χρωματισμός, η θερμορύθμιση, ο ύπνος και η ωσμορύθμιση (Yu & Reiter, 1993, Reiter, 1993, 1995; Arendt, 1998). Ωστόσο οι μελέτες των φυσιολογικών επιδράσεων της μελατονίνης στα ψάρια βρίσκονται ακόμη σε πολύ αρχικό στάδιο σε σύγκριση με τα θηλαστικά και τα πτηνά. Συνεπώς λόγω της έλλειψης ικανοποιητικών δεδομένων στα ψάρια, η χρήση κάποιων παραδειγμάτων από τα ανώτερα σπονδυλωτά είναι απαραίτητη.

✧ ***Οσμωρύθμιση***

Η μελατονίνη ίσως εμπλέκεται στην οσμωρύθμιση - μια υπόθεση που προκύπτει από τις ημερήσιες και εποχιακές μεταβολές της συγκέντρωσης ιόντων Na^+ και Cl^- στο πλάσμα (Kulczykowska, 2002). Στον σολομό του Ειρηνικού

(Folmar & Dickhoff, 1981) και στην συναγρίδα (Pavlidis et al., 1999a) έχει παρατηρηθεί πως οι υψηλές τιμές των ιόντων Na^+ και Cl^- συνυπάρχουν με υψηλές τιμές μελατονίνης. Η σημασία από πλευρά φυσιολογίας αυτών των παρατηρήσεων είναι ακόμη δύσκολο να ερμηνευτεί, αλλά πιθανόν να υπάρχει ανάμειξη της μελατονίνης στο μηχανισμό οσμωτικής προσαρμογής. Υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της μελατονίνης και της αργινίνης βασοτοκίνης (AVT) – ορμόνη οσμωρύθμισης – αλλά απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές (Kulczykowska et al., 2001).

Δύο ορμόνες που συνδέονται στενά με την ιοντική ισορροπία είναι η προλακτίνη και η κορτιζόλη (Gern et al., 1984). Είναι γνωστό πως αυτές οι ορμόνες είτε επηρεάζουν την παραγωγή μελατονίνης ή επηρεάζονται από αυτή. Στο χρυσόψαρο, η αφαίρεση της επίφυσης οδηγεί σε μείωση των επιπέδων κορτιζόλης και μεταβολή της συγκέντρωσης της προλακτίνης στην υπόφυση. Η αύξηση της μελατονίνης κατά την είσοδο του σολομού στο θαλασσινό νερό μπορεί να επάγεται από τα κορτικοστεροειδή ως απόκριση στο stress της προσαρμογής. Το stress προκαλεί γενικά διαταραχή της ισορροπίας στα ψάρια και στους αρουραίους ειδικά αύξηση της μελατονίνης (Lynch et al., 1977).

✧ *Θερμορύθμιση*

Όσον αφορά τη θερμορύθμιση, παρόλο που η μελατονίνη θεωρείται πως μειώνει τη θερμοκρασία του σώματος τόσο στα ενδόθερμα όσο και στα εξώθερμα, κάποια είδη εξωθέρμων δεν ρυθμίζουν την θερμοκρασία τους σε σχέση με τη μελατονίνη. Επιπλέον, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο πως η μελατονίνη συνδυάζει την συμπεριφορά θερμορύθμισης με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα ή πως ρυθμίζει την μελατονίνη. Κάποια συμπεράσματα σχετικά με τη δράση της ορμόνης στα ενδόθερμα δεν είναι εφαρμόσιμα στα εξώθερμα. Ο πιο πιθανός μηχανισμός δράσης της μελατονίνης στην θερμοκρασία σώματος των εξωθέρμων αφορά την ρύθμιση του θερμοκρασιακού *set point* στον υποθάλαμο (Lutterschmidt et al., 2003).

✧ *Αναπαραγωγή-Διατροφή*

Σε μερικά είδη ψαριών τόσο η φωτοπερίοδος όσο και η θερμοκρασία επηρεάζουν μέσω της μελατονίνης την διαδικασία της αναπαραγωγής (Mañanós et al., 1997). Η μελατονίνη έχει αντι-γοναδική δράση στα ψάρια, καθώς η ημερήσια χρήση της έχει αποδειχθεί πως επάγει την μείωση των στεροειδών που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή, ενώ η εκτομή της επίφυσης προκαλεί αύξηση των στεροειδών στην κυκλοφορία (Ekström & Meissl, 1997). Στο λαβράκι η ωρίμανση των γονάδων φαίνεται πως ελέγχεται από την μειούμενη φωτοπερίοδο, αν και η περίοδος ωοτοκίας μπορεί να επεκταθεί ή να καθυστερήσει με μεταβολή της θερμοκρασίας του νερού και της φωτοπεριόδου (Zanuy et al., 1986; Carillo et al., 1995). Υπό φυσικές συνθήκες, το λαβράκι

παρουσιάζει ανάπτυξη των γονάδων το χειμώνα που συμπίπτει με την χαμηλότερη ετήσια συγκέντρωση μελατονίνης (Garcia-Allegue et al., 2001). Περίεργο είναι το γεγονός πως σε προηγούμενη μελέτη το λαβράκι υπό φυσικές συνθήκες παρουσίασε νυχτερινή διατροφική συμπεριφορά την ίδια εποχή του έτους (Sanchez-Vazquez et al., 1998). Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τον καθορισμό της πιθανής σχέσης μεταξύ της μελατονίνης, της διατροφής και της αναπαραγωγής κατά τη διάρκεια του έτους και την επίδραση της φωτοπεριόδου στη μελατονίνη και τον γοναδικό άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης (hypothalamus-pituitary gonadal axis).

✧ ***Χρωματισμός – Όραση***

Η μελατονίνη είναι γνωστός δραστικός παράγοντας συσσώρευσης των μελανοφόρων του δέρματος στα ψάρια. Η χρήση μελατονίνης σε συγκέντρωση 10^{-13} gr/ml οδηγεί σε άμεσο αποχρωματισμό του δέρματος πολλών ψαριών και αμφιβίων (Axelrod, 1974). Επιπρόσθετα, στον οφθαλμό η μελατονίνη έχει τοπική δράση στην κινητική του αμφιβληστροειδούς. Σε αντίθεση με τη ντοπαμίνη, που ρυθμίζει την προσαρμογή στο φως, η μελατονίνη μιμείται την επίδραση του σκοταδιού στον αμφιβληστροειδή (συστολή των ραβδίων και επιμήκυνση των κωνίων) διευκολύνοντας την έκθεση των ραβδίων στον αδύναμο νυχτερινό φωτισμό (Cahill et al., 1991).

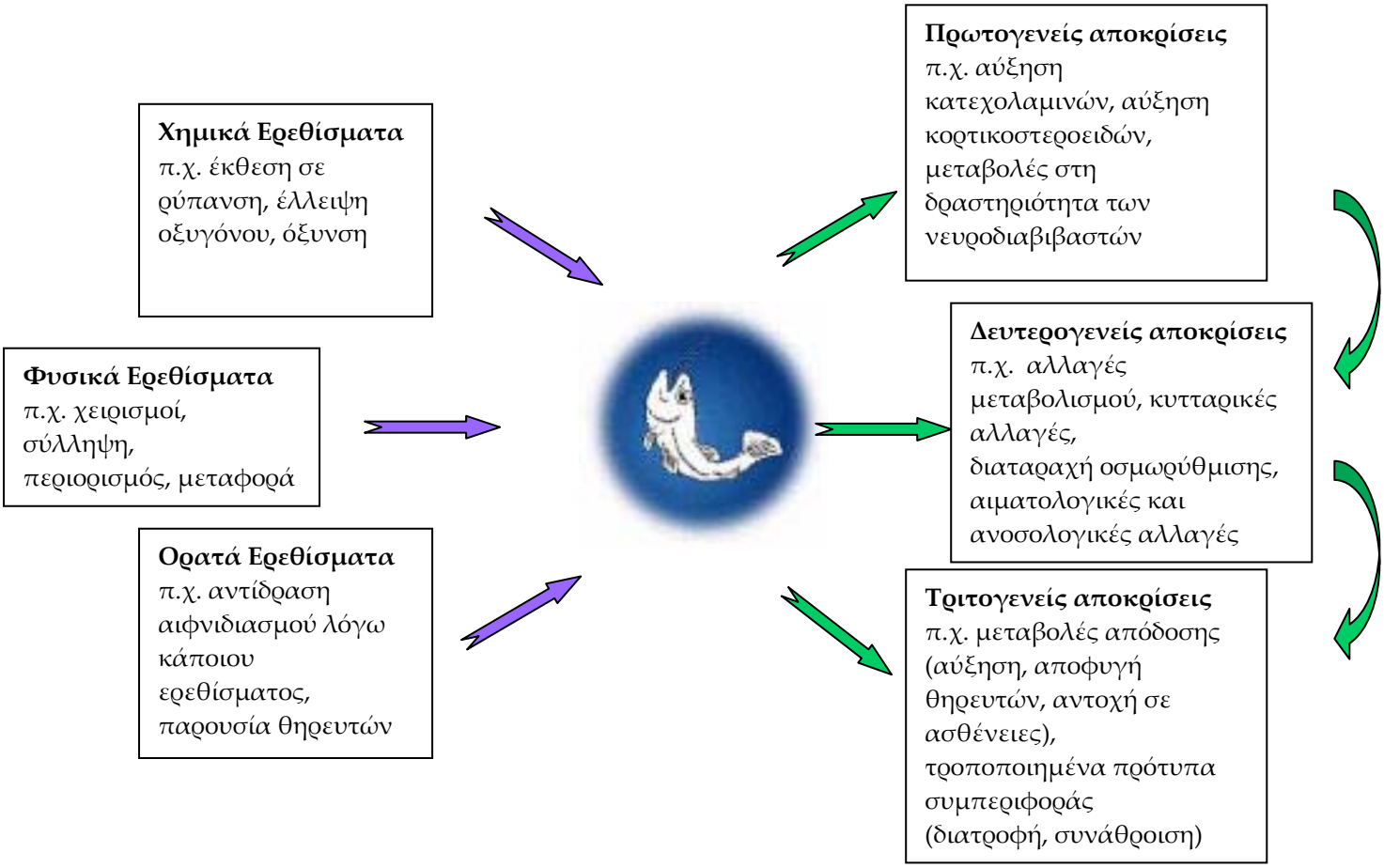
✧ ***Αντιοξειδωτική λειτουργία***

Ωστόσο, φαίνεται πως η πρωταρχική λειτουργία της μελατονίνης ίσως σχετίζεται όχι μόνο με το φωτοπεριοδισμό, αλλά και με έναν αντιοξειδωτικό ρόλο (Reiter et al., 1996; Reiter, 2003). Έχει βρεθεί πως η ορμόνη είναι αρκετά αποτελεσματικό προληπτικό αντιοξειδωτικό *in vivo* και «καθαριστής» (scavenger) των ελευθέρων ριζών *in vitro* που προστατεύει τον οργανισμό από τις φθορές της οξείδωσης (Reiter, 2000). Μάλιστα είναι πιο αποτελεσματική ενάντια στις πολύ τοξικές ρίζες υδροξυλίου και υπεροξυλίου (peroxyl) σε σύγκριση με άλλα γνωστά αντιοξειδωτικά. Επίσης εμποδίζει την τοξικότητα της ελευθερής ρίζας οξυγόνου (O_2^-) και διεγείρει το αντιοξειδωτικό ένζυμο, υπεροξειδάση της γλουταθειονίνης. Οι ποικίλες αντιοξειδωτικές δυνατότητες της μελατονίνης την καθιστούν απαραίτητο συστατικό του αμυντικού συστήματος του οργανισμού (Reiter et al., 1996). Επιπλέον, η μελατονίνη κέρδισε το δημόσιο ενδιαφέρον ως ένα «φάρμακο-θαύμα» κατά της γήρανσης, της αϋπνίας, της αποδιοργάνωσης του βιολογικού ρυθμού (jet lag), της δυσλειτουργίας του αμυντικού συστήματος και του καρκίνου (Bartsch et al., 1992; Reiter, 1995; Liebmann et al., 1997; Arendt, 1998), αλλά η πραγματική της αξία ως υλικό θεραπείας δεν υποστηρίζεται από όλους (Webb & Pulg-Domingo, 1995).

1.3 Γενικά για την Καταπόνηση («Stress»)

✧ ***Καταπόνηση – Ερεθίσματα στρες – GAS***

Ο όρος «**στρες**» περιγράφει μια κατάσταση που προκαλείται από περιβαλλοντικούς ή άλλους παράγοντες **(δράση)** και οδηγεί σε προσαρμοστικές αποκρίσεις του ζώου πέρα των φυσιολογικών ή διαταράσσει τις φυσιολογικές λειτουργίες σε τέτοιο βαθμό που οι πιθανότητες επιβίωσης μειώνονται σημαντικά **(αντίδραση)** (Σχήμα 1.3.1) (Brett, 1958). Ένας άλλος απλούστερος αλλά όχι υποδεέστερος ορισμός, ο οποίος είναι παρόμοιος με αυτόν που προτάθηκε από το Selye (1973), είναι ότι το στρες είναι η απάντηση ενός οργανισμού σε κάθε αίτημα που προκαλεί μια έκταση της φυσιολογικής κατάστασης πάνω από τη συνηθισμένη κατάσταση ηρεμίας. Άλλοι πάλι ορίζουν απλά ως καταπόνηση κάθε απειλή ή διαταραχή της ομοιόστασης (Munck et al., 1984; Hinkle, 1987).



Σχήμα 1.3.1: Απεικόνιση σχέσης δράσης – αντίδρασης.

Ως ερέθισμα στρες (stressor) μπορεί να ορισθεί η συνθήκη, η κατάσταση ή ο παράγοντας που ευθύνεται για την αλλαγή του φυσιολογικού ομοιοστατικού βεληνεκούς ενός οργανισμού. Η απόκριση σε ένα ερέθισμα είναι το στρες. Η καταπόνηση οδηγεί στην κινητοποίηση του οργανισμού και στην αύξηση των δαπανών ενέργειας (Giesy et al., 1988).

Η απόκριση στο στρες αναφέρεται ως «γενικό σύνδρομο προσαρμογής» ή GAS (General Adaptation Syndrome) (Selye, 1950), το οποίο διαχωρίζεται σε τρία στάδια: το στάδιο συναγερμού, το στάδιο αντίστασης και το στάδιο εξάντλησης. Στο στάδιο συναγερμού (alarm ή "fight or flight" stage) τα στρεσογόνα ερεθίσματα προκαλούν κινητοποίηση της άμυνας του οργανισμού. Το στάδιο αντίστασης παρέχει μακροχρόνια προστασία κατά των ερεθισμάτων στρες και η εξάντληση επέρχεται μετά από μακροχρόνια και συνεχή έκθεση στο ερέθισμα. Κατά τη φάση εξαντλήσεως τα αποθέματα ενέργειας εξαντλούνται, η ανθεκτικότητα του οργανισμού μειώνεται και επέρχεται θάνατος λόγω καταπόνησης.

✧ *Οξεία & Χρόνια Καταπόνηση*

Η καταπόνηση καλείται οξεία – acute - όταν προκαλείται από διαδικασίες σύντομες, έντονες και απότομες (π.χ. χειρισμοί, ενδοπεριτοναϊκή ένεση διαλυμάτων), ενώ χρόνια – chronic – όταν οι διαδικασίες είναι ήπιες και μεγάλης χρονικής διάρκειας. Σε περιπτώσεις οξείας καταπόνησης μπορεί να παρατηρηθεί ταχύτατη εξάντληση και θάνατος του οργανισμού, εν αντιθέσει με τη χρόνια όπου η εξάντληση επέρχεται βραδύτατα και δεν αποκλείεται η επιβίωση.

✧ *Φυσιολογικές αλλαγές*

Η αντίδραση στην καταπόνηση, όσον αφορά τους τελεόστεους περιλαμβάνει ένα αριθμό **φυσιολογικών** διαδικασιών, οι οποίες ρυθμίζονται από την νεύρο-ενδοκρινική επικοινωνία μέσω του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – μεσόνεφρος. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία είναι η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH, corticotropin releasing hormone), η αδρενοκορτικοτροπίνη (ACTH, adrenocorticotropin) και η κορτιζόλη (Rotlland et al., 2003). Φυσιολογικοί δείκτες καταπόνησης:

- Το στρες οδηγεί σε ταχύτατη απελευθέρωση κατεχολαμινών (επινεφρίνη) από τα χρωμιόφιλα κύτταρα του μυελό των επινεφριδίων (Andersen et al., 1991). Η επινεφρίνη διεγείρει τη διάσπαση του γλυκογόνου σε **γλυκόζη** σε ηπατικά και μυϊκά κύτταρα με συνέπεια την ταχύτατη σύνθεση ATP.
- Τα κορτικοστεροειδή που απελευθερώνονται από τον φλοιό των επινεφριδίων είναι μια πιο καθυστερημένη απόκριση στο στρες. Μπορούν να λειτουργήσουν ως γενικοί βιοδείκτες στρες. Τα γλυκοκορτικοειδή προωθούν τη σύνθεση της γλυκόζης και την αποθήκευση της με τη μορφή γλυκογόνου

στο ήπαρ (αναβολικά), στους μύες, στο λιπώδη και σε άλλους ιστούς. Έχει αντι-φλεγμονώδη δράση, καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα. Επηρεάζεται από γενετικούς, αναπτυξιακούς και περιβαλλοντικούς μη στρεσογόνους παράγοντες. Στα ψάρια, η κορτιζόλη επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην ιοντική ρύθμιση (Pickering & Pottinger, 1989). Εκτός της ACTH, η α-MSH (Lamers et al., 1992; Balm et al., 1995), η αυξητική ορμόνη (GH) (Young & Lin, 1988), η βασοτοκίνη και οι κατεχολαμίνες (Schreck et al., 1989) διεγείρουν την έκλυση της κορτιζόλης.

- Το αυξημένο **γαλακτικό οξύ** στο πλάσμα συνδέεται με την αυξημένη μυϊκή δραστηριότητα υπό συνθήκες στρες.
- Οσμωμοριακότητα και ηλεκτρολύτες (K+, Na+, Cl^-). Οι αλλαγές υποδηλώνουν υδρομεταλλική έλλειψη ισορροπίας και πιθανή δυσλειτουργία της οσμωρύθμισης.
- Πρωτεΐνες heat-shock.

✧ *Ενεργειακές αλλαγές*

Οι ενεργητικές αποκρίσεις στο στρες σχετίζονται απευθείας με το σύνδρομο GAS. Η αντίσταση ενός οργανισμού στις επιδράσεις των ερεθισμάτων στρες στην ομοιόσταση συνοδεύεται από κατανάλωση ενέργειας. Η ενέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κινητοποίηση ιόντων, τη σύνθεση δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών, τη βιομεταφορά και το μεταβολισμό γενικά. Υπό αρκετά δριμύ στρες, οι ορμονικές αποκρίσεις θα ήταν πιο ενδεικτικές του στρες. Υπό βαθμιαίο υποθνησιγόνο στρες απαιτούνται ενεργητικές ρυθμίσεις για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Καθώς η ανάπτυξη και διατήρηση απαιτούν την περισσότερη ενέργεια του μεταβολισμού, οι επιδράσεις του στρες οδηγούν σε μειωμένη ανάπτυξη. Αποθέματα, όπως το γλυκογόνο και τα λιπίδια, εξαντλούνται εξαιτίας του στρες και παρατηρείται αύξηση στον καταβολισμό των πρωτεϊνών.

Λόγω των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων, οι συγκεντρώσεις **γλυκόζης** στο αίμα αυξάνονται ως απόκριση στο οξύ ή χρόνιο στρες. Η αύξηση και η μείωση της γλυκόλυσης οδηγεί αντίστοιχα σε ελάττωση ή κέρδος γλυκογόνου. Συνεπώς οι επιδράσεις της καταπόνησης προκαλούν κένωση των αποθεμάτων γλυκογόνου.

Το επίπεδο στρες αντανακλάται και στην κολυμβητική ικανότητα των ψαριών (teady-state ή burst κολύμβηση).

1.4 Σκοπός της Μελέτης

1.4.1 Επιλογή του είδους

Από την πρώτη αναφορά των Fenwick et al. (1970), οι οποίοι μελέτησαν την σύνθεση της μελατονίνης στο σολομό του Ειρηνικού, *Oncorhynchus tshawytscha*, πολλοί ερευνητές έχουν μέχρι σήμερα εξετάσει την παραγωγή μελατονίνης στα ψάρια (Zachmann et al., 1992a; Iigo et al., 1994). Τα νυχθημερήσια πρότυπα μελατονίνης έχουν περιγραφεί για αρκετά είδη, συμπεριλαμβανομένων της ιριδίζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss* (Gern et al., 1978a,b; Owen et al., 1978), του σολομού του Ειρηνικού *Oncorhynchus kisutch* (Gern et al., 1984), του κοινού κυπρίνου *Cyprinus carpio* (Kezuka et al., 1988), της πέστροφας *Salvelinus fontinalis* (Zachmann et al., 1992c), του χρυσόψαρου *Carassius auratus* (Kezuka et al., 1992; Iigo & Aida, 1995), του white sucker *Catostomus commersoni* (Zachmann et al., 1992b), του λούτσου *Esox lucius* (Falcon et al., 1987), του σολομού του Ατλαντικού *Salmo salar* (Randall et al., 1995), του γατόψαρου *Silurus asotus* (Iigo et al., 1997), του λαβρακιού *Dicentrarchus labrax* (Sanchez-Vazquez et al., 1997) και της συναγρίδας *Dentex dentex* (Pavlidis et al., 1999a). Δεδομένης της πλειοψηφίας των ειδών του γλυκού νερού στις προαναφερθείσες μελέτες, οι γνώσεις μας σχετικά με τους ρυθμούς της ορμόνης στα Μεσογειακά θαλάσσια είδη είναι αρκετά περιορισμένες. Επίσης όσα θαλάσσια είδη έχουν μελετηθεί ανήκουν στα επιπελαγικά. Για το λόγο αυτό η παρούσα εργασία ασχολείται με ένα βενθοπελαγικό θαλάσσιο είδος, το φαγκρί *Pagrus pagrus*.

Το φαγκρί, λόγω της υψηλής εμπορικής του αξίας παρουσιάζει πέρα από επιστημονικό και οικονομικό ενδιαφέρον. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει σαν είδος για εκτροφή και μελέτη είναι η ανθεκτικότητα του στους χειρισμούς και στις ασθένειες, η γρήγορη ανάπτυξη του και η προσαρμογή του σε σχετικά υψηλές ιχθυοφορτίσεις. Μάλιστα, παρουσιάζει υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης από το λαβράκι και ελαφρώς χαμηλότερο από την τσιπούρα (Divanach et al., 1993). Για τους λόγους αυτούς οι ερευνητές έχουν στραφεί στην ανάπτυξη μεθόδων εκτροφής και τεχνογνωσίας για την καλλιέργεια του είδους.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην μελέτη της αναπαραγωγικής φυσιολογίας και της διατροφικής συμπεριφοράς του (Kentouri et al., 1994, Rotlland et al., 1997, Κοκοκύρης, 1998, Pavlidis et al., 1999b), καθώς και της επίδρασης διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων στο χρώμα του δέρματος και στην ευεξία του ζώου σε συνθήκες πειραματικής εκτροφής (Szisch, 2001; Φανουράκη, 2002; Καρκάνα, 2003; Szisch et al., 2003; Φανουράκη, 2005).

1.4.2 Αντικειμενικοί στόχοι

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό την ανάπτυξη και αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού της μελατονίνης στο αίμα θαλασσινών ιχθύων και συγκεκριμένα του φαγκριού. Επίσης, η μελέτη αυτή έχει στόχο να περιγράψει τις νυχθημερήσιες διακυμάνσεις της ορμόνης και να απαντήσει στο κρίσιμο ερώτημα της ύπαρξης ενδογενούς ρυθμού παραγωγής μελατονίνης στο φαγκρί. Τέλος, διερευνάται η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων – της φωτοπεριόδου, του μήκους κύματος και της έντασης του φωτός, της θερμοκρασίας – στη συγκέντρωση της μελατονίνης στο πλάσμα. Οι παράγοντες αυτοί έχει προταθεί πως επηρεάζουν την ρυθμικότητα των φυσιολογικών, μεταβολικών, και ηθολογικών διεργασιών στα ψάρια (Pavlidis et al., 1999). Οι βιοχημικοί παράγοντες που προσδιορίζονται επιλέγονται ως δείκτες οξείας (γλυκόζη) και χρόνιας (γαλακτικό οξύ) καταπόνησης.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά το ακαδημαϊκό έτος 2004-2005.

2.1 Πειραματικά Ψάρια

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 156 φαγκριά (*Pagrus pagrus*) - βάρους 111.8 gr ± 5.1 gr (x ± SEM), ολικού μήκους 17.34 cm ± 0.20 cm και μεσουραίου μήκους 16.38 cm ± 0.27 cm - τα οποία προήλθαν από εντατική εκτροφή σε χερσαίες ανοικτές δεξαμενές 10 m^3 στις εγκαταστάσεις του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στο Ηράκλειο, που βρίσκονται στην περιοχή του Φάρου. Τα ψάρια μεταφέρθηκαν στις κλειστές εγκαταστάσεις του εργαστηρίου και τοποθετήθηκαν στα πειραματικά ενυδρεία.

2.2 Πειραματικές Συνθήκες

Τα ψάρια κατανέμονταν τυχαία σε ενυδρεία, όπου και παρέμεναν περίπου μια εβδομάδα πριν την έναρξη του πειράματος μέχρι να εγκλιματιστούν. Πρόκειται για γυάλινα ενυδρεία - όγκου 264 lt και διαστάσεων 120 cm x 40 cm x 55 cm (μήκος x πλάτος x βάθος) - κλειστού κυκλώματος, εξοπλισμένα με τρία μηχανικά και ένα βιολογικό φίλτρο (System Aquarium, Kit 17GB, της εταιρίας TUNZE) για τον απαιτούμενο καθαρισμό του νερού, το οποίο ανακυκλώνεται με ρυθμό 300-700L/h. Στον εξοπλισμό των ενυδρείων περιλαμβάνονται επίσης μια λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας για την αποστείρωση του ύδατος (UV Sterilizer, Q81L, 8Watt) και υπερχείλιση (TUNZE).

Τα ενυδρεία βρίσκονταν σε ειδικό ψυκτικό θάλαμο με τεχνητό φωτισμό και δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας και της φωτοπεριόδου. Συνεπώς, καθ' όλη την πειραματική διαδικασία επετεύχθη τόσο η απομόνωση από τον εξωτερικό φωτισμό όσο και η διατήρηση σταθερής της επιλεγόμενης θερμοκρασίας. Για το λευκό φωτισμό χρησιμοποιήθηκαν λάμπές φθορισμού τύπου OSRAM (23 W) και POWERGLO (30 W) και για το μπλε λάμπες Marine-Glo (40 W). Όσον αφορά τον κόκκινο φωτισμό επετεύχθη με κόκκινο φίλτρο Bright Rose (LEE Filters, Andover, Hants).

Τα ψάρια ταΐζονταν καθημερινά δύο φορές (πρώι/απόγευμα) με το χέρι σύμφωνα με την όρεξή τους (*ad libitum* feeding) με βιομηχανική τροφή (τεχνητά σιτηρέσια - «pellets»). Η μέτρηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας, των νιτρικών και των νιτρωδών πραγματοποιείτο σε εβδομαδιαία βάση με ειδικές εμπορικές συσκευασίες (TETRA test, NUTRAFIN test) και η αποχλωρίωση του νερού γινόταν με διάλυμα Mellow (Stress reducer – Water conditioner). Ο καθαρισμός των ενυδρείων γινόταν δύο φορές τα εβδομάδα με τη χρήση σιφωνίου. Επίσης, η αλατότητα του νερού ρυθμιζόταν με θαλασσινό άλας Tropic Marin και ελεγχόταν μετά από κάθε καθαρισμό, ώστε να είναι σταθερά 38‰.

2.3 Σχεδιασμός Πειραμάτων - Δειγματοληψίες

2.3.1 Πείραμα 1ο : « Ο ρόλος της φωτοπεριόδου »

Στο παρόν πείραμα ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές φωτοπερίοδοι: α) 12L:12D (12 ώρες φως & 12 ώρες σκοτάδι), , β) 24L:0D (συνεχές φως) και γ) 0L:24D (συνεχές σκοτάδι).

Τα ψάρια – 36 φαγκριά βάρους 105,3 gr ± 12,1 gr, ολικού μήκους 17.53 cm ± 0.53 cm και μεσουραίου μήκους 16.45 cm ± 0.57 cm - κατανεμήθηκαν τυχαία σε τέσσερα ενυδρεία σε θερμοκρασία 19 ^{O}C, όπου χρησιμοποιήθηκε τεχνητός φωτισμός ορατού φωτός (full spectrum) έντασης 2,515 μmol photons * sec^{-1} * m^{-2}. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε **12L:12D** (06:00h – 18:00h), η οποία θεωρείται φυσική και χρησιμοποιήθηκε ως σημείο ελέγχου (**control**). Τα ψάρια παρέμειναν σε αυτές τις συνθήκες από την ημέρα έναρξης του πειράματος (**D1)** έως την δέκατη ημέρα (**D10)**. Την δέκατη ημέρα έγινε δειγματοληψία ανά τέσσερις ώρες σε έξι χρονικές στιγμές του εικοσιτετραώρου – 06:00, 10:00, 14:00, 16:00, 22:00 και 02:00 - σε διαφορετικά άτομα κάθε φορά.

Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν δύο νέες πειραματικές ομάδες (**LL** & **DD**). Συνολικά 48 φαγκριά βάρους 97,4 gr ± 17,1 gr, ολικού μήκους 16.65 cm ± 0.70 cm και μεσουραίου μήκους 15.38 cm ± 0.62 cm - κατανεμήθηκαν τυχαία σε τέσσερα ενυδρεία (Aq1, Aq2, Aq3, Aq4) στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού. Η φωτοπερίοδος άλλαξε για την ομάδα **LL** σε 24L:0D και για την ομάδα **DD** σε 0L:24D. Μετά από δύο ημέρες **(D2)**, έγινε δειγματοληψία σε τέσσερις χρονικές στιγμές του εικοσιτετραώρου - 10:00, 14:00, 22:00 και 02:00 – σε διαφορετικά άτομα κάθε φορά.

time	LL	DD
10:00	Aq1	Aq3
14:00	Aq2	Aq4
22:00	Aq1	Aq3
02:00	Aq2	Aq4

Σχήμα 2.3.1.1: Οι ώρες της δειγματοληψίας ανά ενυδρείο.

2.3.2 Πείραμα 2ο : « Ο ρόλος του μήκους κύματος του φωτός »

Ελέγχθηκαν τρία διαφορετικά φάσματα φωτισμού παρόμοιας έντασης: α) Full – ορατό φως (λευκό) εντάσεως 2.979 μmol photons * sec^{-1} * m^{-2}, β) Blue – φως με μέγιστο εκπομπής στην περιοχή του μπλε μήκους κύματος του ορατού φωτός (475 nm) και εντάσεως 3.583 μmol * sec^{-1} * m^{-2} και γ) Red - φως με μέγιστο

εκπομπής στην περιοχή του ερυθρού μήκους κύματος του ορατού φωτός (650 nm) εντάσεως 2,769 μmol * sec^{-1} * m^{-2}.

Τα ψάρια – 24 φαγκριά βάρους 120.16 gr ± 16.6 gr, ολικού μήκους 17.67 cm ± 0.71 cm και μεσουραίου μήκους 16.85 cm ± 0.72 cm - κατανεμήθηκαν τυχαία σε τέσσερα ενυδρεία σε θερμοκρασία 19 ^{O}C και φωτοπερίοδο 12L:12D (06:00-18:00). Αρχικά εφαρμόστηκε ορατό φως και τα ψάρια παρέμειναν υπό αυτές τις συνθήκες για εφτά ημέρες έως την ημέρα της δειγματοληψίας. Την έβδομη ημέρα (**D7**) πραγματοποιήθηκε αιμοληψία στις 11:00 (ημέρα) και στις 23:00 (νύχτα) σε έξι διαφορετικά άτομα κάθε φορά.

Στη συνέχεια, τα ψάρια αναμείχθηκαν και χωρίστηκαν τυχαία σε τέσσερα ενυδρεία. Δημιουργήθηκαν δύο νέες πειραματικές ομάδες (Blue & Red) με αλλαγή του φωτισμού σε μπλε και κόκκινο (δύο ενυδρεία/ομάδα). Τα ψάρια εκτέθηκαν στους νέους φωτισμούς για δεκαπέντε ημέρες έως την ημέρα της δειγματοληψίας. Την δέκατη πέμπτη ημέρα (**D15)** πραγματοποιήθηκε αιμοληψία στις 11:00 (ημέρα) και στις 23:00 (νύχτα) σε διαφορετικά άτομα κάθε φορά - έξι από κάθε ομάδα.

2.3.3 Πείραμα 3^{ο} : « Ο ρόλος της έντασης του φωτός »

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος δύο διαφορετικών εντάσεων φωτισμού: α) χαμηλή ένταση 2.979 μmol photons * sec^{-1} * m^{-2} και β) υψηλή ένταση 9.773 μmol photons * sec^{-1} * m^{-2}.

Τα ψάρια - 24 άτομα βάρους 126.1 gr ± 13.8 gr, ολικού μήκους 17.73 cm ± 0.87 cm και μεσουραίου 16.88 cm ± 0.90 cm - κατανεμήθηκαν τυχαία σε τέσσερα ενυδρεία σε θερμοκρασία 19 ^{O}C, όπου χρησιμοποιήθηκε τεχνητός φωτισμός ορατού φωτός με φωτοπερίοδο 12L:12D (06:00-18:00). Δημιουργήθηκαν δύο πειραματικές ομάδες (δύο ενυδρεία/ομάδα), εφαρμόζοντας στη μία χαμηλή ένταση φωτισμού και στην άλλη υψηλή. Η υψηλή ένταση επετεύχθη με τη χρήση κατάλληλου αριθμού (πέντε) λαμπών φθορισμού ανά ενυδρείο. Η διάρκεια του πειράματος ήταν είκοσι επτά ημέρες. Διεξήχθησαν δύο ημερήσιες δειγματοληψίες (11:00) σε όλα τα άτομα από κάθε ομάδα, η πρώτη την έβδομη ημέρα (**D7**) και η δεύτερη την εικοστή έβδομη (**D27**), ώστε να διερευνηθεί τόσο η βραχυπρόθεσμη όσο και μακροπρόθεσμη επίδραση της έντασης φωτισμού.

2.3.4 Πείραμα 4^{ο} : « Ο ρόλος της θερμοκρασίας »

Ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες νερού: α) 15 ^{O}C, β) 19 ^{O}C και γ) 23 ^{O}C.

Τα ψάρια – 24 άτομα βάρους 109.88 gr ± 24.41 gr, ολικού μήκους 17.14 cm ± 1.28 cm και μεσουραίου 16.34 cm ± 1.27 cm - κατανεμήθηκαν τυχαία σε τέσσερα ενυδρεία όπου χρησιμοποιήθηκε τεχνητός φωτισμός ορατού φωτός με

φωτοπερίοδο 12L:12D (06:00-18:00) και ένταση 2,979 μmol photons * sec^{-1} * m^{-2}. Η θερμοκρασία του νερού ρυθμίστηκε στους 15 ^{O}C. Η διάρκεια της έκθεσης των ψαριών στις συγκεκριμένες συνθήκες ήταν δεκαπέντε ημέρες. Την ημέρα λήξης του πειράματος (**D15**) πραγματοποιήθηκε αιμοληψία στις 11:00 (ημέρα) και στις 23:00 (νύχτα) - σε δώδεκα άτομα κάθε φορά.

Στη συνέχεια, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 19 ^{O}C με σταδιακή αύξηση (+1 ^{O}C ανά δύο ημέρες) και ακολούθησε μετά από δεκαπέντε ημέρες δειγματοληψία την ημέρα (11:00) και τη νύχτα (23:00). Κατά τον ίδιο τρόπο, ρυθμίστηκε η θερμοκρασία του νερού στους 23 ^{O}C και ακλούθησε η τελευταία δειγματοληψία.

2.3.5 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας

Κάθε φορά η δειγματοληψία ακολουθούσε ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Πριν την αιμοληψία δεν παρεχόταν τροφή στα ψάρια. Το κάθε ψάρι συλλεγόταν με απόχη και μεταφερόταν γρήγορα σε δοχείο νερού (38‰ αλατότητας) με αναισθητικό (0.25 ml/l Ethynelglycol-monophenylether, Merck, Hohenbrunn). Το ελαφρώς αναισθητοποιημένο άτομο μεταφερόταν στον πάγκο εργασίας, όπου καλύπτονταν τα μάτια του με μια πετσέτα για την αποφυγή της έκθεσης στο φως και την ελαχιστοποίηση της καταπόνησης και με τη χρήση μιας σύριγγας αφαιρούνταν η επιθυμητή ποσότητα αίματος από το ουραίο αγγείο. Στην περίπτωση της νυχτερινής δειγματοληψίας, η συλλογή και η αναισθητοποίηση γινόταν σε πλήρες σκοτάδι και η αιμοληψία σε χαμηλής έντασης κόκκινο φορητό φωτισμό, ο οποίος εφαρμοζόταν τοπικά στην ουραία περιοχή. Οι σύριγγες, χωρητικότητας 1 ml με βελόνες διαστάσεων 0.63x25 mm, είχαν προετοιμαστεί με ηπαρίνη (1:10 αραιωμένη, Heparin Leo). Το αίμα φυγοκεντρούταν στις 1500 g για 15 min σε θερμοκρασία +4 ^{O}C για να γίνει ο διαχωρισμός των κυττάρων και του πλάσματος. Στη συνέχεια, το πλάσμα αποθηκευόταν σε μικροφιαλίδια (eppendorfs) χωρητικότητας 1.5 ml σε θερμοκρασία –20 ^{O}C έως την ημέρα των ποσοτικών προσδιορισμών. Μετά το τέλος της δειγματοληψίας, η οποία διαρκούσε περίπου 15 min ανά ομάδα, τα ψάρια μεταφέρονταν πίσω στα ενυδρεία όπου διοχετευόταν άφθονο οξυγόνο για την επαναφορά από την αναισθησία.

2.4 Προσδιορισμός Μελατονίνης

2.4.1 Περιγραφή μεθόδου

Για την ποσοτική ανάλυση της μελατονίνης χρησιμοποιείται συγκεκριμένη ραδιοανοσοανάλυση (RIA) βασισμένη στο πρωτόκολλο των Valtonen et al. (1993).

✧ ***Προετοιμασία υλικών***

Η προετοιμασία των υλικών που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο ακολουθεί το αρχικό πρωτόκολλο – με εξαίρεση την αραίωση του αντισώματος - και είναι η εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα (RIA buffer): διαλύονται 2 g ζελατίνης (teleostean gelatin, Sigma, G-7041) σε 500 ml HQW (υψηλής ποιότητας νερό) σε θερμοκρασία +50 ^{O}C (υδατόλουτρο). Στη συνέχεια προστίθεται 1 lt HQW, το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει σε RT και προστίθενται τα ακόλουθα άλατα: 0.92 g $NaH_2PO_4*H_2O$, 4.7883 g $Na_2HPO_4*12H_2O$, 16.36 g NaCl, 3 g NaN_3. Προσαρμόζεται ο όγκος στα 2 lt και ελέγχεται το pH του διαλύματος, το οποίο πρέπει να είναι 7. Το buffer αποθηκεύεται στους +4 ^{O}C και με αυτό γίνονται όλες οι αραιώσεις που ακολουθούν.

Πρότυπα διαλύματα (standards): αρχικά προετοιμάζεται το standard M7 σε συγκέντρωση 200 pg/ml από μελατονίνη (Sigma, M-5250) σε λυοφιλοποιημένη μορφή. Στη συνέχεια με διαδοχικές αραιώσεις με buffer ετοιμάζονται τα standards M6 (100 pg/ml), M5 (50 pg/ml), M4 (25 pg/ml), M3 (10 pg/ml), M2 (5 pg/ml), M1 (2.5 pg/ml), M0 (μόνο buffer). Όλα τα διαλύματα αποθηκεύονται στους +4 ^{O}C.

Διαλύματα ποιοτικού ελέγχου (quality control): σε κάθε RIA περιλαμβάνονται δύο διαλύματα ποιοτικού ελέγχου ώστε να παρακολουθείται η απόδοση της μεθόδου. Ετοιμάζονται λοιπόν τα K1 (10 pg/ml) και K2 (50 pg/ml) από μελατονίνη (Sigma, M-5250) σε λυοφιλοποιημένη μορφή και αποθηκεύονται στους +4 ^{O}C.

Αντίσωμα (Ab): χρησιμοποιείται αντίσωμα μελατονίνης (AB/S/021, Stockgrand Ltd, University of Surrey, Guildford, Surrey UK) σε λυοφιλοποιημένη μορφή, το οποίο ανασυστάται με 2 ml HQW. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται 1:75 αραιωμένο με buffer και αποθηκεύεται στους +4 ^{O}C.

Ραδιενεργός ιχνηθέτης (Ag^*): διαλύονται 6.5 μl μελατονίνης επισημασμένης με τρίτιο [O-methyl-^{3}H]-melatonin (Amersham Biosciences, TRK798), σε 2 ml buffer. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται 1:50 αραιωμένο με buffer και αποθηκεύεται στους +4 ^{O}C.

Dextran-coated charcoal (DCC): σε 200 ml buffer διαλύονται 0.08 gr dextran (Sigma, D-1537) και 8 gr activated charcoal (Merck, K33478086 434) με ανάδευση σε stirrer για 1 h στους +4 ^{O}C. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους +4 ^{O}C.

Υγρό σπινθηρισμού (scintillation fluid): σε 2.5 lt τολουένιο (Riedel, 32249) προστίθενται 12.5 gr PPO (Sigma, D-4630) και 0.75 gr POPOP (Sigma, P-3754), 250 ml 1-οκτανόλη (Riedel, 24134) και διαλύονται με overnight ανάδευση σε stirrer σε RT.

✧ ***Εργαστηριακή εκτέλεση***

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγιναν σημαντικές προσαρμογές και αλλαγές του αρχικού πρωτοκόλλου (Βλέπε § 3.1), ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη βελτιστοποίηση και αξιοπιστία της μεθόδου όσον αφορά τους θαλασσινούς ιχθύς και συγκεκριμένα είδος *Pagrus pagrus*. Οι βελτιώσεις που εφαρμόζονται στο στάδιο της εργαστηριακής εκτέλεσης αφορούν στην παράκαμψη της εκχύλισης και στη μεταβολή σχεδόν όλων των συγκεντρώσεων και όγκων.

2.4.2 Αξιολόγηση μεθόδου

Για την αξιολόγηση της μέτρησης εφαρμόζονται οι δοκιμασίες της γραμμικότητας και της ανάκτησης. Οι έλεγχοι αυτοί επιβάλλονται στην εφαρμογή κάθε τροποποιημένου πρωτοκόλλου βιοχημικής ανάλυσης για τον υπολογισμό της επίδρασης των μεταβολών στην ακρίβεια της μεθόδου.

✧ ***Γραμμικότητα (Linearity test)***

Η μέθοδος της γραμμικότητας χρησιμοποιείται για την εκτίμηση τόσο της ακρίβειας της μεθόδου όσο και της βέλτιστης αραίωσης με την οποία πρέπει να συμμετέχουν τα άγνωστα δείγματα στην μέθοδο. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη διαδοχική αραίωση ενός άγνωστου δείγματος με ρυθμιστικό διάλυμα και το σχεδιασμό μιας ευθείας μεταξύ των αραιώσεων και των μετρούμενων τιμών. Στη συνέχεια συγκρίνεται η ευθεία αυτή με την πρότυπη καμπύλη (logit-log) ως προς τον παραλληλισμό τους.

Στην παρούσα μελέτη τα πειράματα γραμμικότητας πραγματοποιούνται σε δείγματα ημέρας καθώς και σε δείγματα νύχτας. Κατόπιν προκαταρκτικών πειραμάτων (συγκεντρώσεις πλάσματος 100%, 50%, 25%, 12.5%, 10% και 100%, 75%, 50%, 25%, 10%), οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμασία γραμμικότητας ήταν οι 100%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% και 10% (Σχήμα 2.4.2.1). Σημειώνεται πως χρησιμοποιούνται διάφορα δείγματα (pool) και όλες οι αναλύσεις γίνονται εις τριπλούν για μεγαλύτερη ακρίβεια.

συγκέντρωση	πλάσμα	buffer
100%	500 μl	-
60%	300 μl	200 μl
50%	250 μl	250 μl
40%	200 μl	300 μl
30%	150 μl	350 μl
20%	100 μl	400 μl
10%	50 μl	450 μl

Σχήμα 2.4.2.1: Έλεγχος γραμμικότητας.

✧ ***Ανάκτηση (Recovery test)***

Ο έλεγχος της ανάκτησης αποτελεί κλασσική τεχνική αξιολόγησης της απόδοσης μιας μεθόδου ανάλυσης, καθώς υπολογίζει το ποσοστό του συστηματικού «λάθους». Το λάθος συχνά προκαλείται από μια ουσία του δείγματος που ανταγωνίζεται το αντιδραστήριο ανάλυσης. Η δοκιμασία περιλαμβάνει την προσθήκη μιας ποσότητας ορμόνης σε ένα δείγμα γνωστής συγκέντρωσης και τον υπολογισμό της ανάκτησης αυτής της ποσότητας. Ορίζεται ως ο λόγος της πραγματικής (μετρούμενης) συγκέντρωσης της ορμόνης προς τη θεωρητική. Στην ουσία η εκατοστιαία σχέση ανάκτησης αντανακλά το ποσοστό του δείγματος που ενδεχομένως «χάνεται» στα διαφορετικά στάδια της ανάλυσης.

Στην παρούσα μελέτη τα πειράματα ανάκτησης πραγματοποιούνται σε δείγματα ημέρας καθώς και σε δείγματα νύχτας. Τα δείγματα της ανάκτησης προέρχονται από την υποδιαίρεση ενός άγνωστου δείγματος σε δυο υποδείγματα (A) και την προσθήκη γνωστής ποσότητας ορμόνης (M) σε ένα από τα δύο (A+M). Επιπλέον η ίδια ποσότητα ορμόνης προστίθεται μόνη της σε buffer (M) και αναλύεται με βάση το πρωτόκολλο (Βλέπε § 3.1), όπως και τα υπόλοιπα δείγματα.

	πλάσμα (3:10)	μελατονίνη (200 pg/ml)	Ag*	Ab	buffer
A	500 μl	-	100 μl	100 μl	100 μl
A + M	500 μl	100 μl	100 μl	100 μl	-
M	-	100 μl	100 μl	100 μl	500 μl

Σχήμα 2.4.2.2: Έλεγχος ανάκτησης.

Σημειώνεται πως χρησιμοποιούνται διάφορα δείγματα (pool) και όλες οι αναλύσεις γίνονται εις τριπλούν για μεγαλύτερη ακρίβεια. Η ποσότητα μελατονίνης που προστίθεται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα υπολογίζεται ίση με 20 pg και ο τελικός όγκος είναι 800 μl.

2.4.3 Υπολογισμός αποτελεσμάτων

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων γίνεται με βάση το αρχικό πρωτόκολλο εφαρμόζοντας συγκεκριμένη μαθηματική φόρμουλα. Από κάθε ζεύγος αναλύσεων – όλες οι αναλύσεις γίνονται εις διπλούν - υπολογίζεται ο μέσος όρος των κρούσεων ανά λεπτό (cpm) που κατέγραψε ο μετρητής ραδιενέργειας. Από τις τιμές που προκύπτουν για τα Total, M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 και M7 σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη (logit-log), με βάση την οποία υπολογίζονται εν συνεχεία οι τιμές των αγνώστων δειγμάτων.

2.5 Προσδιορισμός Γαλακτικού Οξέος

Για την ποσοτική ανάλυση του γαλακτικού οξέος χρησιμοποιείται η εμπορική συσκευασία **Lactate PaP**, bioMérieux. Η αρχή της μεθόδου είναι ενζυματική, χρωματομετρική: το γαλακτικό οξύ των δειγμάτων αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο (O_2) παρουσία του ενζύμου οξειδάση του γαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα να μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό και υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Γαλακτικό οξύ + O_2 $\xrightarrow{\text{οξειδάση}}$ πυροσταφυλικό + H_2O_2

Στη συνέχεια το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με 4-χλωροφαινόλη και 4-αμινο-αντιπυρίνη (περιέχονται στο αντιδραστήριο) και παράγονται κουϊνονιμίδη (quinoneimine), νερό (H_2O) και υδροχλώριο (HCl). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η υπεροξειδάση (POD).

H_2O_2 + 4-χλωροφαινόλη + 4- αμινο-αντιπυρίνη $\xrightarrow{\text{υπεροξειδάση}}$ κουϊνονιμίδη + $2H_2O$ + HCl

✧ ***Εργαστηριακή εκτέλεση***

Για την ποσοτική ανάλυση του γαλακτικού οξέος ακολουθούνται τα εξής βήματα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κιτ (Σχήμα 2.5.1):

- το αντιδραστήριο εργασίας (buffer) προκύπτει με την πρόσθεση 10ml ρυθμιστικού διαλύματος (pH=6.8) στο φιαλίδιο που περιέχει τα ένζυμα σε λυοφιλοποιημένη μορφή
- στη συνέχεια, τοποθετούνται με πιπέττα 10μl από το κάθε δείγμα και 1 ml αντιδραστηρίου εργασίας σε δοκιμαστικούς σωλήνες
- τοποθετούνται επίσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες για το τυφλό (Blank) 1 ml αντιδραστήριο εργασίας και για το πρότυπο (Std) 1 ml αντιδραστήριο εργασίας και 10 μl από το αντιδραστήριο standard (3,00 mmol LAC/l)
- όλοι οι σωλήνες αναδεύονται σε αναδευτήρα (Vortex) και ακολουθεί επώαση επί 5 min σε θερμοκρασία δωματίου
- το τελευταίο βήμα της διαδικασίας είναι η φωτομέτρηση έναντι τυφλού σε μήκος κύματος 505 nm με χρήση ειδικών γυάλινων κιβεττών.

	standard	πλάσμα	buffer

Blank	-	-	1 ml
Std	10 μl	-	1 ml
άγνωστο	-	10 μl	1 ml

Σχήμα 2.5.1: Πρωτόκολλο Lactate PaP, bioMérieux.

Όλες οι αναλύσεις γίνονται εις διπλούν για μεγαλύτερη ακρίβεια αποτελεσμάτων και η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μέσα σε διάστημα 1h από τη στιγμή της επώασης.

✧ ***Υπολογισμός αποτελεσμάτων***

Η ένταση του χρώματος και η απορρόφηση (Absorbance) του διαλύματος στα 505 nm, είναι ανάλογες της συγκέντρωσης του γαλακτικού στο διάλυμα.

Ο υπολογισμός της ποσότητας γαλακτικού οξέος στο πλάσμα γίνεται με βάση τον τύπο:

mmol/l Γαλακτικού οξέος = (Ab_{Δ}/ Ab_s) x C

Όπου,

Ab_{Δ} = τιμή απορρόφησης δείγματος

Ab_s= τιμή απορρόφησης πρότυπου διαλύματος (standard) γαλακτικού οξέος

C = συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος σε mmol/l

2.6 Προσδιορισμός Γλυκόζης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης του πλάσματος πραγματοποιείται με την εμπορική συσκευασία Σάκχαρο GOD/PAP, Biosis. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι ενζυματική (GOD-PAP), χρωματομετρική: η γλυκόζη του πλάσματος, παρουσία του ενζύμου γλυκόζη οξειδάση (GOD), μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

$$\textbf{Γλυκόζη} \xrightarrow{\text{οξειδάση}} \textbf{γλυκονικό οξύ} + H_2O_2$$

Στη συνέχεια το υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με αμινοφαιναζόνη και φαινολικό παράγωγο και παράγεται το τελικό προϊόν ερυθρού χρώματος. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η υπεροξειδάση (POD).

$$H_2O_2 + \textbf{αμινοφαιναζόνη} + \textbf{φαινολικό παράγωγο} \xrightarrow{\text{υπεροξειδάση}} \textbf{Προϊόν (ερυθρού χρώματος)}$$

✧ ***Εργαστηριακή εκτέλεση***

Για την ποσοτική ανάλυση της γλυκόζης ακολουθούνται τα εξής βήματα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κιτ (Σχήμα 2.6.1):

- το αντιδραστήριο εργασίας (buffer) προκύπτει με την ποσοτική μεταφορά ενός φιαλιδίου που περιείχε τα ένζυμα σε λυοφιλοποιημένη μορφή σε ένα φιαλίδιο ρυθμιστικού διαλύματος
- στη συνέχεια, τοποθετούνται με πιπέττα 10μl από το κάθε δείγμα και 1 ml αντιδραστηρίου εργασίας σε δοκιμαστικούς σωλήνες
- τοποθετούνται επίσης σε δοκιμαστικούς σωλήνες για το τυφλό (Blank) 1 ml αντιδραστήριο εργασίας και 10 μl απεσταγμένο νερό dH_2O και για το πρότυπο (Std) 1 ml αντιδραστήριο εργασίας και 10 μl από το αντιδραστήριο standard (100 mg/dl ή 5.55 mmol/l)
- όλοι οι σωλήνες αναδεύονται σε αναδευτήρα (Vortex) και ακολουθεί επώαση επί 15 min σε θερμοκρασία 37 ^{O}C
- το τελευταίο βήμα της διαδικασίας είναι η φωτομέτρηση έναντι τυφλού σε μήκος κύματος 510 nm με χρήση ειδικών γυάλινων κιβεττών.

	standard	πλάσμα	dH_2O	buffer
Blank	-	-	10 μl	1 ml
Std	10 μl	-	-	1 ml
άγνωστο	-	10 μl	-	1 ml

Σχήμα 2.6.1: Πρωτόκολλο Σάκχαρο GOD/PAP, Biosis.

Όλες οι αναλύσεις γίνονται εις διπλούν για μεγαλύτερη ακρίβεια αποτελεσμάτων και η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μέσα σε διάστημα 2h από τη στιγμή της επώασης.

✧ ***Υπολογισμός αποτελεσμάτων***

Η ένταση του χρώματος και η απορρόφηση (Absorbance) του διαλύματος στα 510 nm, είναι ανάλογες της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο διάλυμα.

Ο υπολογισμός της ποσότητας γλυκόζης στο πλάσμα γίνεται με βάση τον τύπο:

$$\textbf{mmol/l γλυκόζης} = (Ab_{\Delta} / Ab_{s}) \times C$$

Όπου,

Ab_{Δ} = τιμή απορρόφησης δείγματος

Ab_{s}= τιμή απορρόφησης πρότυπου διαλύματος (standard) γαλακτικού οξέος

C = συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος σε mmol/l

2.7 Στατιστική Επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Sigma Stat 3.1 (Jandel Scientific). Τα αποτελέσματα ελέγχονται ως προς την κανονικότητα της κατανομής (Normality test) και την ισότητα των διασπορών τους (Equal Variance test). Στη συνέχεια εφαρμόζεται Ανάλυση Διασποράς με έναν (One-way ANOVA) και με δύο παράγοντες (Two-way ANOVA).

Η μηδενική υπόθεση (H_O) στην ANOVA για την οποία ελέγχονται τα δείγματα είναι η ισότητα των μέσων τιμών των πληθυσμών των δειγμάτων:

$$H_O: \mu_1=\mu_2=\ldots=\mu_\kappa.$$

Όπου κ είναι ο αριθμός των δειγμάτων που ελέγχουμε κάθε φορά.

Όπου δεν υπάρχει ομοιογένεια διασπορών, εφαρμόζεται το μη παραμετρικό test Kruskal-Wallis. Στις περιπτώσεις όπου υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά κατά την εφαρμογή της ANOVA σε επίπεδο σημαντικότητας, πάντα 0.05 (όταν δηλαδή το $p_{level}<0.05$), χρησιμοποιείται το Tukey's Test πολλαπλής σύγκρισης (Tukey's multiple comparison Test), για να αναγνωρίσουμε ποιες συγκεκριμένες ομάδες τιμών διαφέρουν σημαντικά. Επίσης, εφαρμόζεται η δοκιμασία συσχέτισης Pearson Product Moment Correlation για τον υπολογισμό της δυναμικότητας της σύνδεσης των μεταβλητών του πλάσματος που υπολογίζονται Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± SEM (standard error of means).

3.1 Πρωτόκολλο Μελατονίνης

Ο εργαστηριακός προσδιορισμός της μελατονίνης στο πλάσμα σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Valtonen et al. (1993) διαρκεί συνολικά τέσσερις ημέρες και περιλαμβάνει δύο στάδια: α) την εκχύλιση των δειγμάτων και β) τη ραδιοανοσοανάλυση. Το παρόν πρωτόκολλο προτείνει την παράκαμψη του πρώτου σταδίου και την σημαντική τροποποίηση του δευτέρου. Τα σημεία τροποποίησης καταγράφονται συνοπτικά στο Σχήμα 3.1.1.

	Valtonen et al., 1993	**παρούσα μελέτη**
διάρκεια	4 ημέρες	2 ημέρες
εκχύλιση	+	-
αραίωση Ab	1:250	1:75
αραίωση άγνωστου	1:1 (με εκχύλιση)	3:10 (χωρίς εκχύλιση)
Ab	50 μl	100 μl
Ag*	50 μl	100 μl
buffer	500 ml	100 ml
scintillation fluid	4 ml	2 ml

Σχήμα 3.1.1: Σύγκριση μεταξύ αρχικού και προτεινόμενου πρωτοκόλλου.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της μελατονίνης του πρότυπου διαλύματος M7 και του διαλύματος ελέγχου K2 δίνει διαφορές μεταξύ των δύο χρησιμοποιούμενων πρωτοκόλλων. Οι αριθμητικές αποκλίσεις φαίνονται στο Σχήμα 3.1.2.

	Valtonen et al., 1993	**παρούσα μελέτη**
M7	185 pg/ml	200 pg/ml
K2	46 pg/ml	50 pg/ml

Σχήμα 3.1.2: Συγκριτικά αποτελέσματα για το πρότυπο διάλυμα M7 και το διάλυμα ελέγχου K2 μεταξύ αρχικού και προτεινόμενου πρωτοκόλλου.

Η διαδικασία της ραδιοανοσοανάλυσης της μελατονίνης που αναπτύσσεται στην παρούσα μελέτη διαρκεί δύο ημέρες. Την πρώτη ημέρα έρχονται σε επαφή η ορμόνη και η επισημασμένη ορμόνη με το αντίσωμα, ενώ τη δεύτερη διαχωρίζονται τα δεσμευμένα από το αντίσωμα μόρια από τα αδέσμευτα, στα οποία τελικά μετράται και η ραδιενέργεια.

✧ *Εργαστηριακή εκτέλεση*

Μετά την προετοιμασία των απαιτούμενων υλικών της μεθόδου, ακολουθεί η ραδιοανοσοανάλυση:

1η Ημέρα

1. Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται 500μl από τα πρότυπα διαλύματα (M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6 & M7), τα διαλύματα ποιοτικού ελέγχου (K1 & K2) και τα άγνωστα δείγματα (αραίωση 30 %). Όλες οι αναλύσεις γίνονται εις διπλούν για μεγαλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων.
2. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 100 μl buffer, 100 μl ιχνηθέτη και 100 μl αντισώματος (Σχήμα 3.1.3). Ο τελικός όγκος είναι 800 μl.
3. Ακολουθεί ανάδευση των σωλήνων σε αναδευτήρα (vortex) και σύντομη φυγοκέντρησή τους για 2 min στις 1000 rpm, ώστε να συγκεντρωθούν όλα τα σταγονίδια στον πυθμένα.
4. Τέλος, καλύπτονται όλοι οι σωλήνες με parafilm και επωάζονται για 17-24 ώρες σε θερμοκρασία +4 ^{o}C.

Σημειώνεται ότι για τον προσδιορισμό της μελατονίνης, όλα τα δείγματα αραιώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 3:10, για να εξασφαλιστεί ότι οι προς μέτρηση συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων βρίσκονται μέσα στο βέλτιστο τμήμα της καμπύλης προσδιορισμού.

	πρότυπα	**πλάσμα (3:10)**	**Ag***	**Ab**	**buffer**
Total	-	-	100 μl	-	700 μl
M0	-	-	100 μl	100 μl	600 μl
M1 έως M7	500 μl	-	100 μl	100 μl	100 μl
K1 & K2	500 μl	-	100 μl	100 μl	100 μl
Άγνωστα	-	500 μl	100 μl	100 μl	100 μl

Σχήμα 3.1.3: Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται την 1η ημέρα του πρωτοκόλλου.

2η Ημέρα

1. Αρχικά, γίνεται ανάδευση του διαλύματος DCC σε αναδευτήρα (stirrer) για 30 min σε θερμοκρασία +0 ^{o}C (ice-water bath).
2. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 250 μl DCC, γίνεται καλή ανάδευση αυτών σε vortex και αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία +0 ^{o}C για 15 min, ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των ελεύθερων και δεσμευμένων μορίων.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωλήνων για 20 min στις 2700 rpm σε θερμοκρασία +4 ^{o}C.

4. Γίνεται γρήγορη απόχυση του υπερκείμενου σε ειδικά φιαλίδια χωρητικότητας 5 ml και προστίθενται 2 ml υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid) (Σχήμα 3.1.4).
5. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια αναδεύονται σε οριζόντια θέση (shaker) για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου RT.
6. Τέλος, ακολουθεί απευθείας μέτρηση της ραδιενέργειας σε κάθε φιαλίδιο για 1 min (cpm) με τη βοήθεια ενός β-μετρητή σπινθηρισμού (b-scintillation counter) κατάλληλου για ^{3}H.

Σημειώνεται ότι μετράται και η ολική ραδιενέργεια (Total) – ίση με αυτή που έχει προστεθεί εξ αρχής σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα - με την προσθήκη 100 μl ιχνηθέτη σε 700 μl buffer.

	DCC	**Scintillation**
Total	-	2 ml
M0	250 μl	2 ml
M1 έως M7	250 μl	2 ml
K1 & K2	250 μl	2 ml
Άγνωστα	250 μl	2 ml

Σχήμα 3.1.4: Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται τη 2η ημέρα του πρωτοκόλλου.

3.2 Αξιολόγηση Μεθόδου

3.2.1 Γραμμικότητα (Linearity)

Ο έλεγχος της γραμμικότητας έδειξε έναν γραμμικό παραλληλισμό μεταξύ των καμπυλών των δειγμάτων και της πρότυπης καμπύλης (Σχήματα 3.2.1.3 & 3.2.1.4). Σημειώνεται ότι οι τιμές υπέστησαν logit-log μετασχηματισμό.

Η ευθεία παλινδρόμησης (y = a + bx) της πρότυπης καμπύλης παρουσιάζει κλίση (slope) -2.1393 και συντελεστή προσδιορισμού (R^2) 0.988. Παράλληλα, η καμπύλη των δειγμάτων της ημέρας παρουσιάζει κλίση –2,4816 και R^2 0.948 και των δειγμάτων νύχτας κλίση –2,5211 και R^2 0.988 (Σχήμα 3.2.1.1).

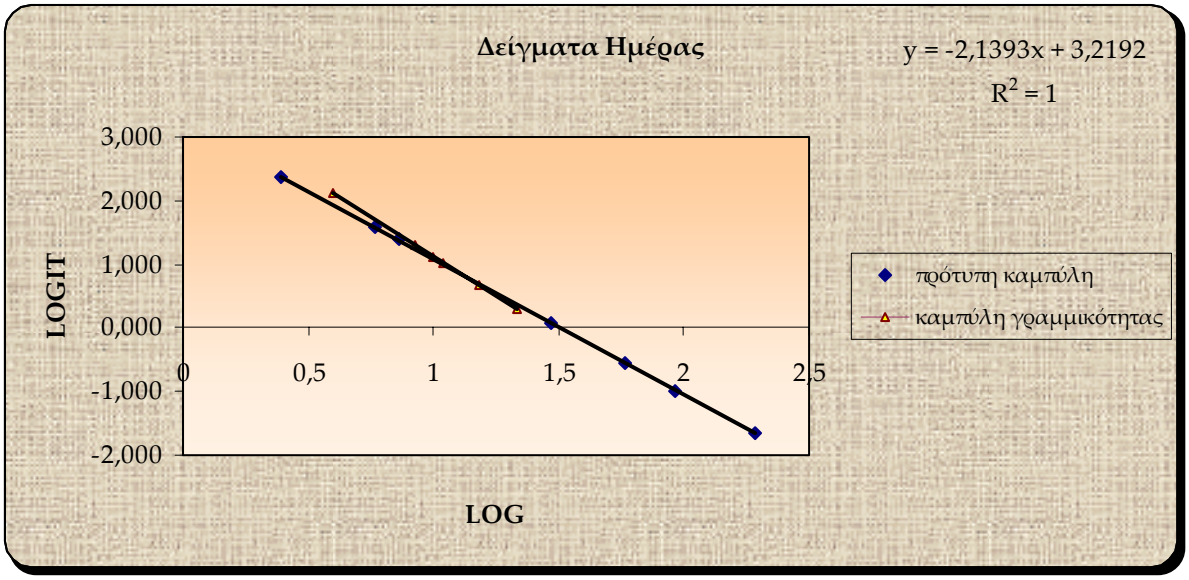
Η διαδικασία αυτή, εκτός από αξιολόγηση της μεθόδου, αποτελεί μέσο προσδιορισμού της βέλτιστης αραίωσης των δειγμάτων με την οποία πρέπει να συμμετέχουν στη ραδιοανοσοανάλυση ώστε να επιτυγχάνεται η ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Στη συγκεκριμένη μελέτη με βάση τις τιμές των διαδοχικών αραιώσεων (Σχήμα 3.2.1.2) και την απόκλιση τους από τις θεωρητικές, επιλέχτηκε η αραίωση 3:10 ως η ιδανικότερη όλων για την επίτευξη της μέγιστης ακρίβειας.

εξίσωση	a	b (slope)	R^2	R
πρότυπη	3.219	-2.139	0.988	-0.994
ημέρα	3.598	-2.482	0.948	-0.974
νύχτα	3.954	-2.521	0.988	-0.994

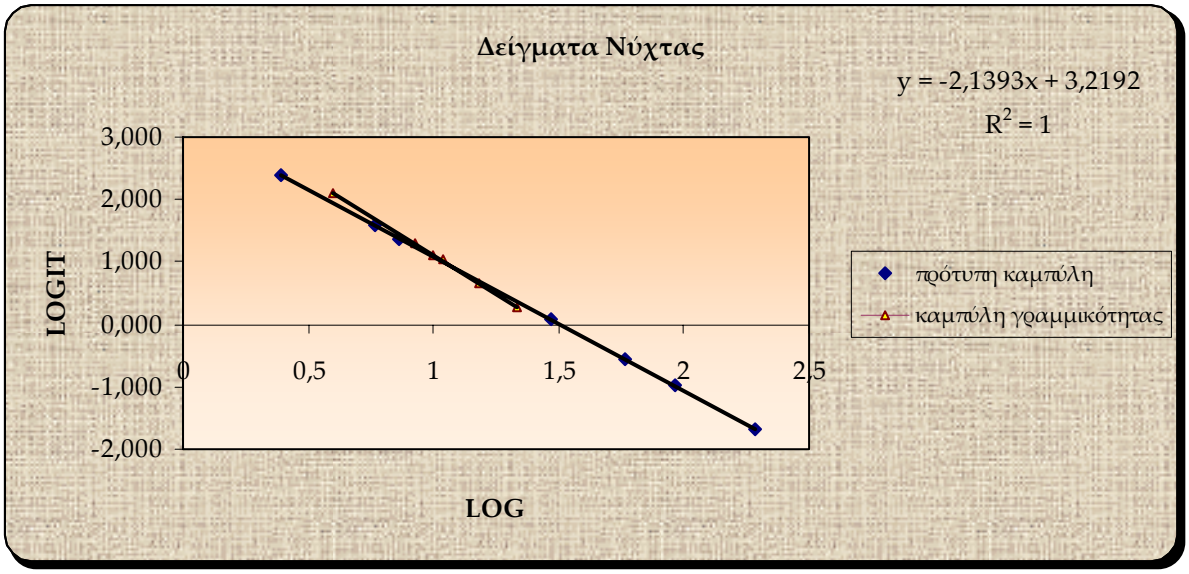
Σχήμα 3.2.1.1: Οι εξισώσεις γραμμικότητας για τα δείγματα ημέρας και νύχτας.

% συγκέντρωση δείγματος	δείγματα ημέρας (pg/ml)	δείγματα νύχτας (pg/ml)
100	23.4	168.9
60	15.5	105.6
50	10.6	83.3
40	9.6	72.1
30	7.9	52.8
20	3.3	29.1
10	-	11.3

Σχήμα 3.2.1.2: Οι τιμές των πειραμάτων γραμμικότητας.



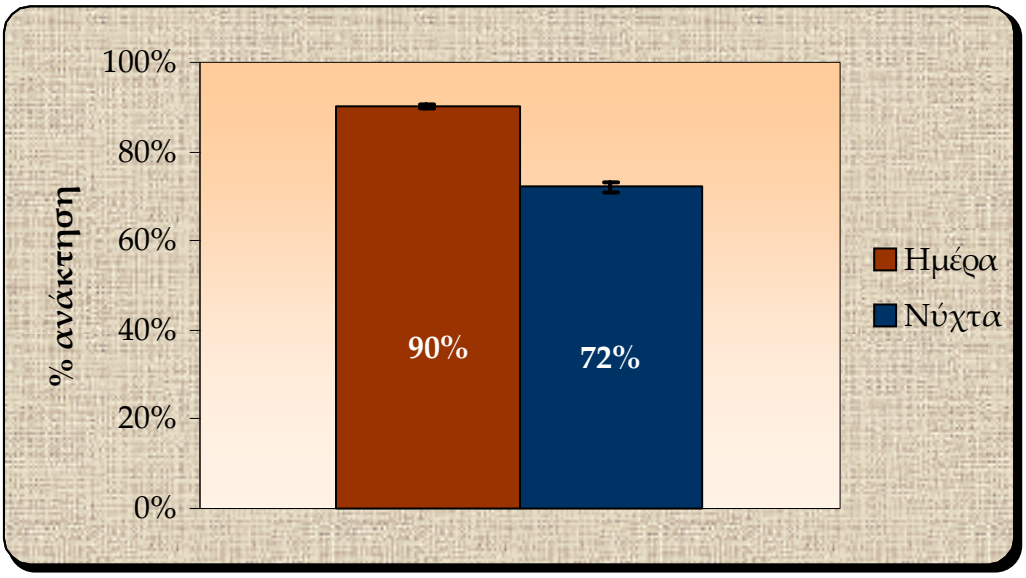
Σχήμα 3.2.1.3: Ο έλεγχος γραμμικότητας για τα δείγματα της ημέρας.



Σχήμα 3.2.1.4: Ο έλεγχος γραμμικότητας για τα δείγματα της νύχτας.

3.2.2 Ανάκτηση (Recovery)

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το μέσο ποσοστό ανάκτησης της μελατονίνης είναι 90 % ± 0.5 % (n=3) για τα δείγματα της ημέρας και 72 % ± 1 % (n=3) για τα δείγματα της νύχτας.

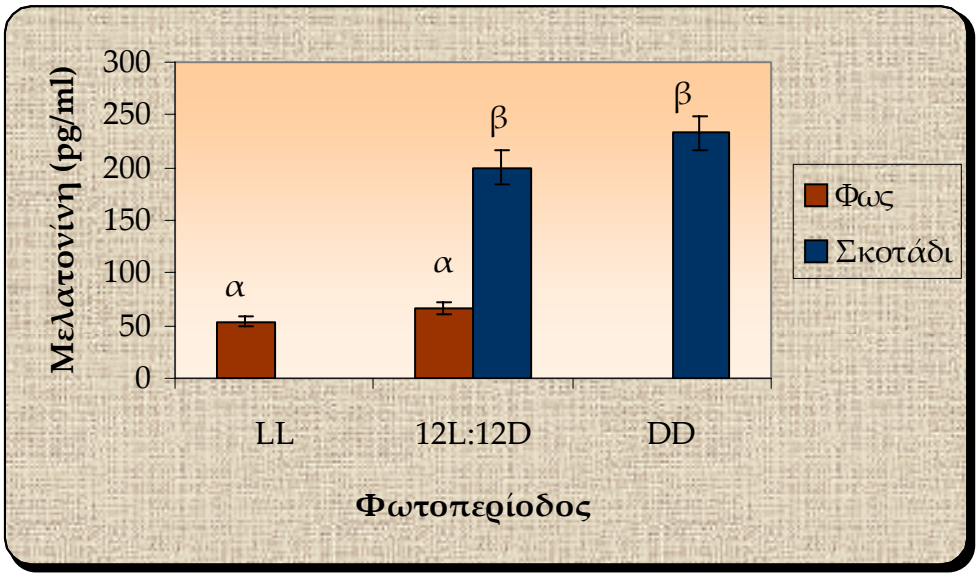


Σχήμα 3.2.2.1: Τα μέσα ποσοστά ανάκτησης (x ± SEM) για τα δείγματα της ημέρας και της νύχτας.

3.3 Μελατονίνη

3.3.1 Φωτοπερίοδος

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική επίδραση της φωτοπεριόδου (παρουσία ή όχι φωτός) τόσο στις τιμές όσο και στις νυχθημερήσιες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της μελατονίνης στο φαγκρί, *Pagrus pagrus*. Γενικά, παρουσία φωτός η μελατονίνη του πλάσματος είναι χαμηλή και απουσία φωτός τετραπλασιάζεται (Σχήμα 3.3.1.1).

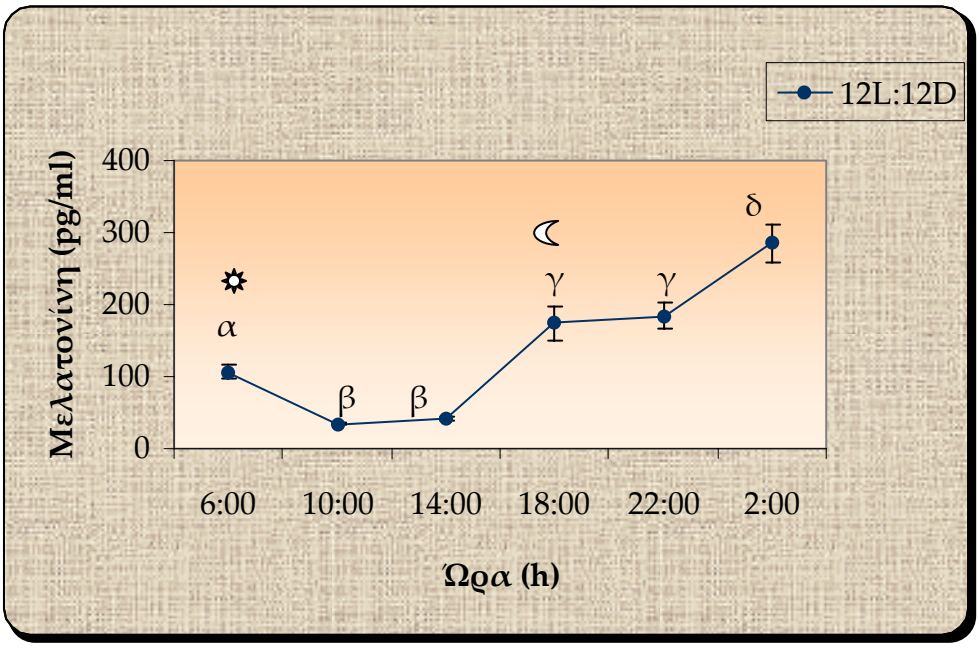


Σχήμα 3.3.1.1: Οι μέσες τιμές της μελατονίνης (± SEM) κατά την φωτόφαση και την σκοτόφαση στις τρεις πειραματικές ομάδες 12L:12D, LL και DD (Παράρτημα, Πίνακας 1). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) μεταξύ των ωρών δειγματοληψίας.

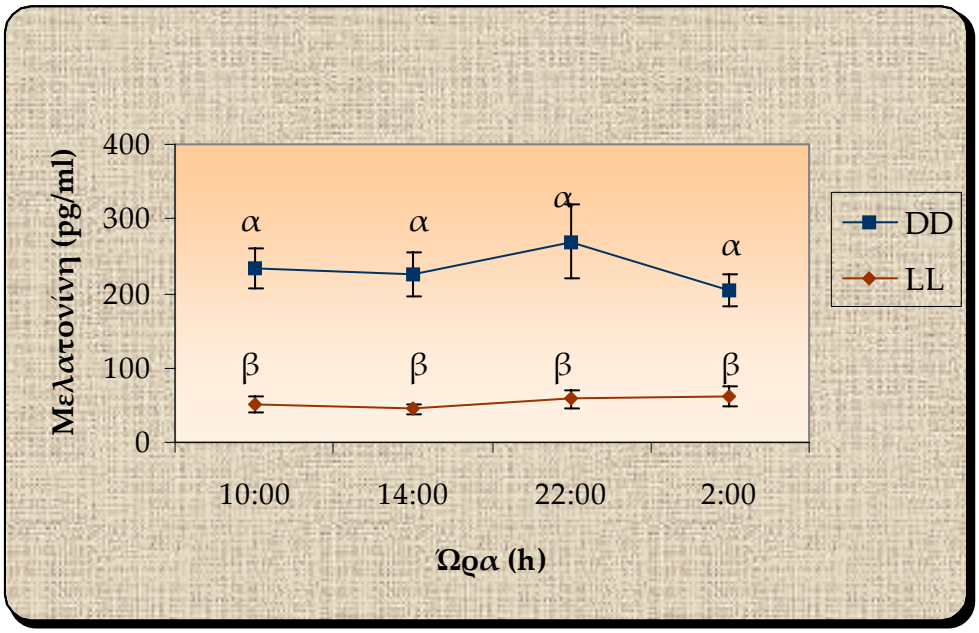
Αναλυτικότερα, οι τιμές της μελατονίνης των ατόμων που εκτέθηκαν σε φωτοπερίοδο 12L:12D παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=<0.001$) μεταξύ σκοτόφασης και φωτόφασης (Σχήμα 3.3.1.2). Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της φωτεινής περιόδου (6:00, 10:00, 14:00) παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα μελατονίνης με ελάχιστό (33.8 ± 1.8 pg/ml) στις 10:00. Αντιθέτως, κατά τη σκοτεινή περίοδο (18:00, 22:00, 2:00) τα επίπεδα της μελατονίνης ήταν αυξημένα με μέγιστό (285.155 ± 26.6 pg/ml) στις 2:00.

Τα άτομα που εκτέθηκαν σε συνεχές φως (LL) ή σκοτάδι (DD), δεν παρουσίασαν νυχθημερήσιες διακυμάνσεις στη συγκέντρωση της μελατονίνης (Σχήμα 3.3.1.3). Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγματοληπτικών ωρών και στις δυο ομάδες (LL: $p=0.684$, DD: $p=0.567$). Ωστόσο, συγκρίνοντας τις δυο ομάδες μεταξύ τους (Σχήμα 3.3.1.1) φάνηκε ότι η ομάδα

DD είχε σημαντικά υψηλότερες τιμές μελατονίνης (232.996 ± 16.586 pg/ml) από την ομάδα LL (54.025 ± 5.261 pg/ml), ανεξαρτήτως ώρας (p=<0.001).



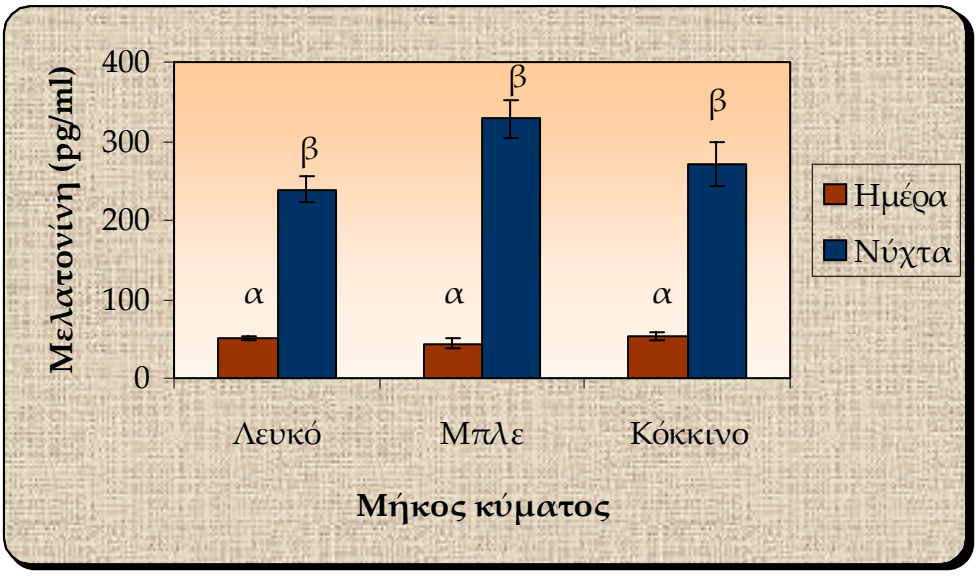
Σχήμα 3.3.1.2: Διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) της μελατονίνης σε συνάρτηση με τις διαφορετικές ώρες δειγματοληψίας υπό φωτοπερίοδο 12L:12D (Παράρτημα, Πίνακας 1). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05) μεταξύ των ωρών δειγματοληψίας.



Σχήμα 3.3.1.3: Διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) της μελατονίνης σε συνάρτηση με τις διαφορετικές ώρες δειγματοληψίας στις δύο πειραματικές ομάδες LL και DD (Παράρτημα, Πίνακας 1). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05) μεταξύ των ωρών δειγματοληψίας.

3.3.2 Μήκος κύματος φωτός

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει επίδραση του μήκους κύματος του φωτισμού στη συγκέντρωση μελατονίνης στο πλάσμα του φαγκριού (Σχήμα 3.3.2.1).

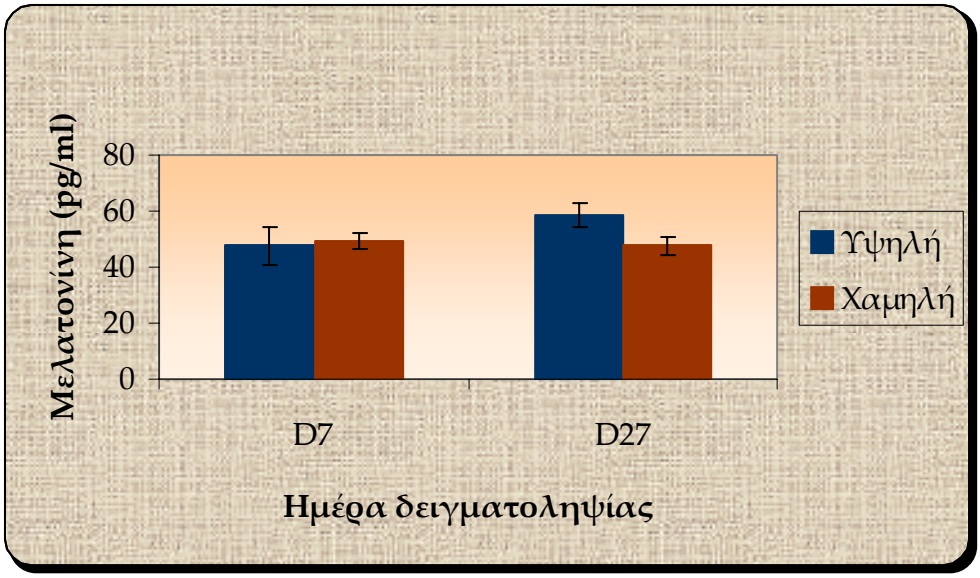


Σχήμα 3.3.2.1: Νυχθημερήσια διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) της μελατονίνης στις τρεις πειραματικές ομάδες διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (Παράρτημα, Πίνακας 2). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$).

Τόσο κατά τη φωτόφαση όσο και κατά τη σκοτόφαση δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων διαφορετικού μήκους κύματος φωτισμού ($p=0.481$ & $p=0.155$ αντίστοιχα). Ωστόσο, παρατηρήθηκαν νυχθημερήσιες διακυμάνσεις της μελατονίνης μέσα σε κάθε ομάδα ($p=<0.001$), καθώς οι συγκεντρώσεις κατά τη νύχτα (Full: 238.2 ± 16.5 pg/ml, Blue: 328.6 ± 24.1 pg/ml, Red: 270.1 ± 28.3 pg/ml) ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με της ημερήσιες (Full: 50.2 ± 3.3 pg/ml, Blue: 44.2 ± 6.6 pg/ml, Red: 53.2 ± 4.5 pg/ml).

3.3.3 Ένταση φωτός

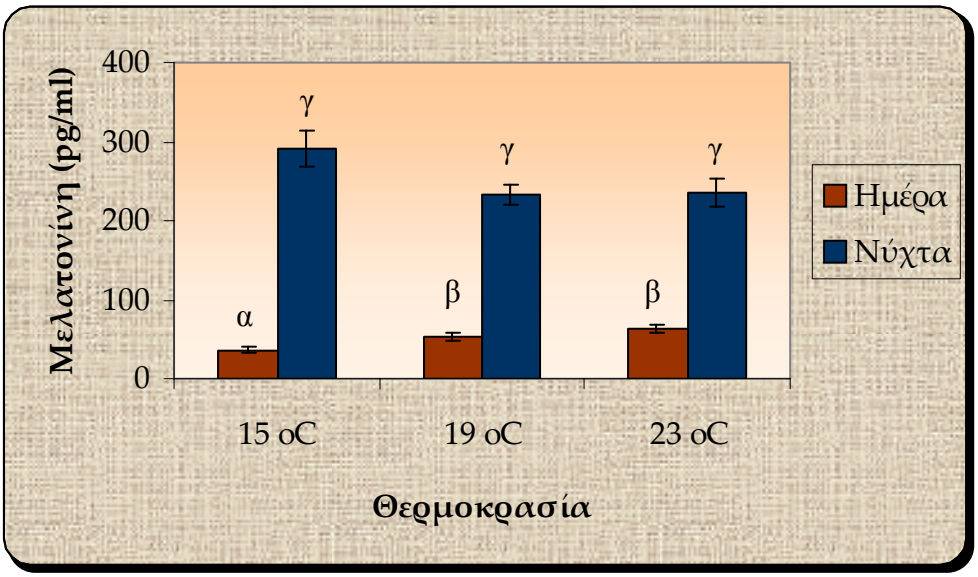
Σύμφωνα με την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων η συγκέντρωση της μελατονίνης στο πλάσμα δεν επηρεάζεται ούτε βραχυπρόθεσμα ($p=0.773$) ούτε μακροπρόθεσμα ($p=0.095$) από την ένταση του φωτός. Επίσης δεν παρατηρείται επίδραση του χρόνου στις τιμές, καθώς δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της D7 και της D27 τόσο στην ομάδα χαμηλής ($p=0.777$) όσο και στην ομάδα υψηλής ($p=0.216$) έντασης (Σχήμα 3.3.3.1).



Σχήμα 3.3.3.1: Διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) της μελατονίνης στις δύο πειραματικές ομάδες υψηλής και χαμηλής έντασης φωτισμού (Παράρτημα, Πίνακας 3). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$).

3.3.4 Θερμοκρασία

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η θερμοκρασία επηρεάζει τη συγκέντρωση της μελατονίνης στο πλάσμα κατά τη φωτόφαση. Η συγκέντρωση της μελατονίνης ήταν μέγιστη στους 23 ^{o}C (63.1 ± 4.7 pg/ml) και ελάχιστη στους 15 ^{o}C (36.3 ± 3.0 pg/ml) (Σχήμα 3.3.4.1).



Σχήμα 3.3.4.1: Νυχθημερήσια διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) της μελατονίνης στις τρεις πειραματικές ομάδες διαφορετικής θερμοκρασίας (Παράρτημα, Πίνακας 4). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$).

Οι τιμές της μελατονίνης στους 15 ^{o}C έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τους 19 ^{o}C ($p=0.016$) και τους 23 ^{o}C ($p=0.003$), ενώ δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 19 ^{o}C και 23 ^{o}C ($p=0.346$).

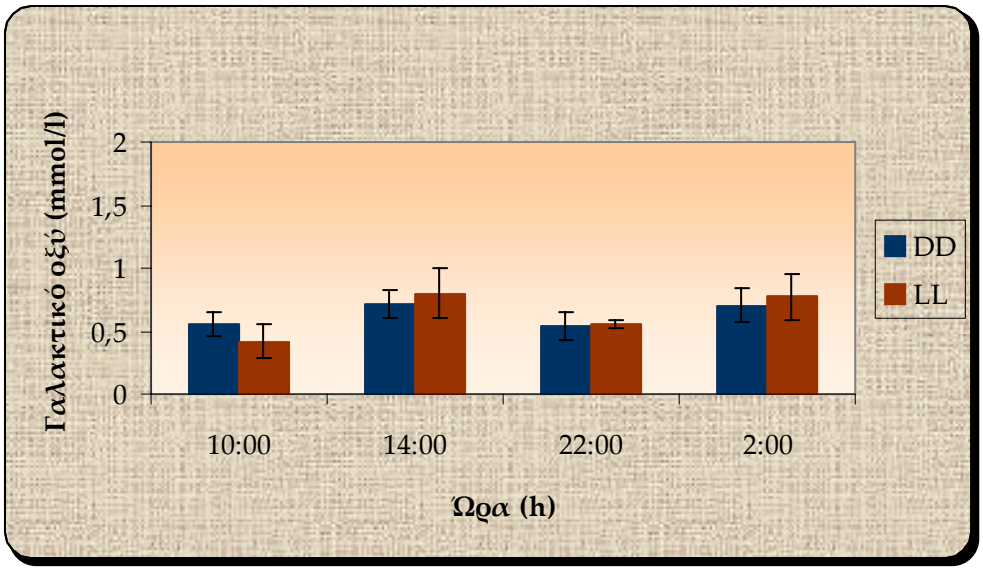
Αντιθέτως, κατά τη σκοτόφαση, δεν υπάρχει επίδραση της θερμοκρασίας στη συγκέντρωση της μελατονίνης, καθώς δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0.054$) μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων (15 ^{o}C: 290.1 ± 23 pg/ml, 19 ^{o}C: 231.7 ± 12.7 pg/ml, 23 ^{o}C: 235.9 ± 18.5 pg/ml).

Σε όλες τις ομάδες υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών της ημέρας και της νύχτας (15 ^{o}C: $p=<0.001$, 19 ^{o}C: $p=<0.001$, 23 ^{o}C: $p=0.002$). Επίσης, υπήρξε αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων θερμοκρασία και φάση της ημέρας ($p=0.009$).

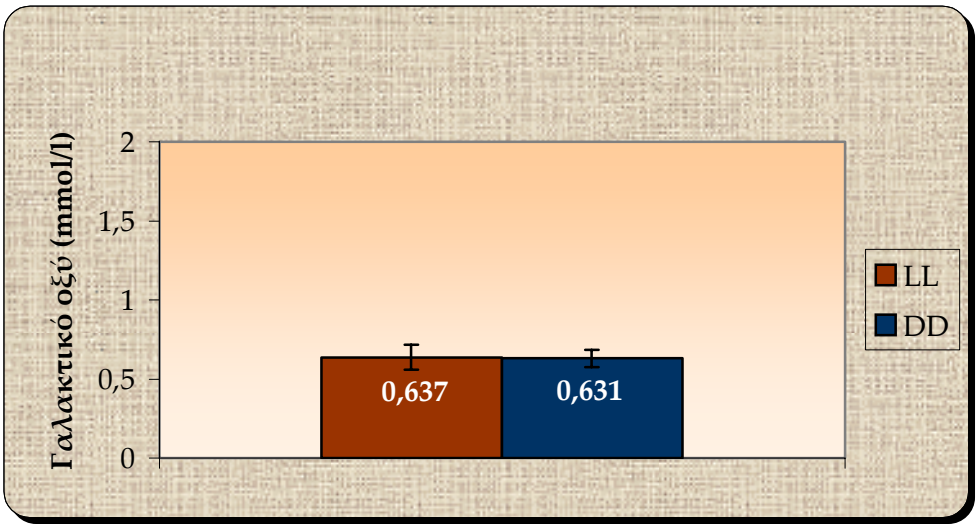
3.4 Γαλακτικό οξύ

3.4.1 Φωτοπερίοδος

Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο πλάσμα δεν επηρεάζεται από την παρουσία ή απουσία φωτός, καθώς δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ψαριών που εκτέθηκαν σε διαφορετικές φωτοπεριόδους. Επίσης η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε μεταβολή των τιμών μεταξύ των δειγματοληπτικών ωρών (Σχήμα 3.4.1.1).



Σχήμα 3.4.1.1: Διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) του γαλακτικού οξέος σχετικά με τις διαφορετικές ώρες δειγματοληψίας στις δύο πειραματικές ομάδες LL και DD (Παράρτημα, Πίνακας 1).



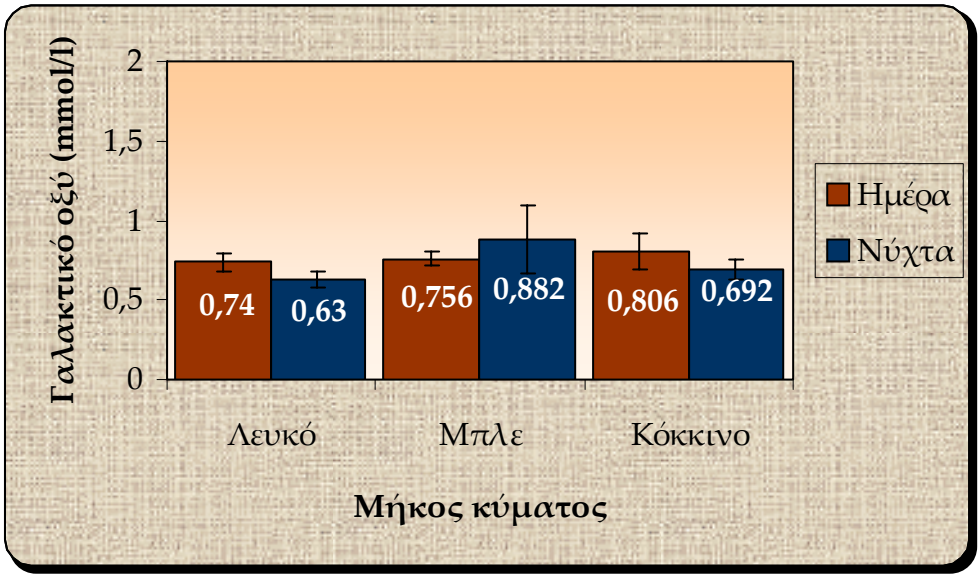
Σχήμα 3.4.1.2: Οι μέσες τιμές (± SEM) του γαλακτικού οξέος στις δύο πειραματικές ομάδες LL και DD (Παράρτημα, Πίνακας 1).

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (p=0.948), οι οποίες όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.4.1.2 διατήρησαν σταθερά και εντός φυσιολογικών ορίων τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος καθ' όλη τη διάρκεια της δειγματοληψίας (LL: p= 0.286, DD: p= 0.587).

3.4.2 Μήκος κύματος φωτός

Το γαλακτικό οξύ δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το μήκος κύματος του φωτισμού. Τόσο κατά τη φωτόφαση όσο και κατά τη σκοτόφαση, τα ψάρια που εκτέθηκαν σε διαφορετικά μήκη κύματος δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές του γαλακτικού οξέος (p=0.806 & p=0.076 αντίστοιχα).

Οι διαφορετικές ομάδες φωτισμού δεν παρουσίασαν νυχθημερήσιες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος (Full: p=0.194, Blue: p=0.536, Red: p=0.556). Σε όλες τις ομάδες οι τιμές διατηρήθηκαν εντός των φυσιολογικών ορίων.



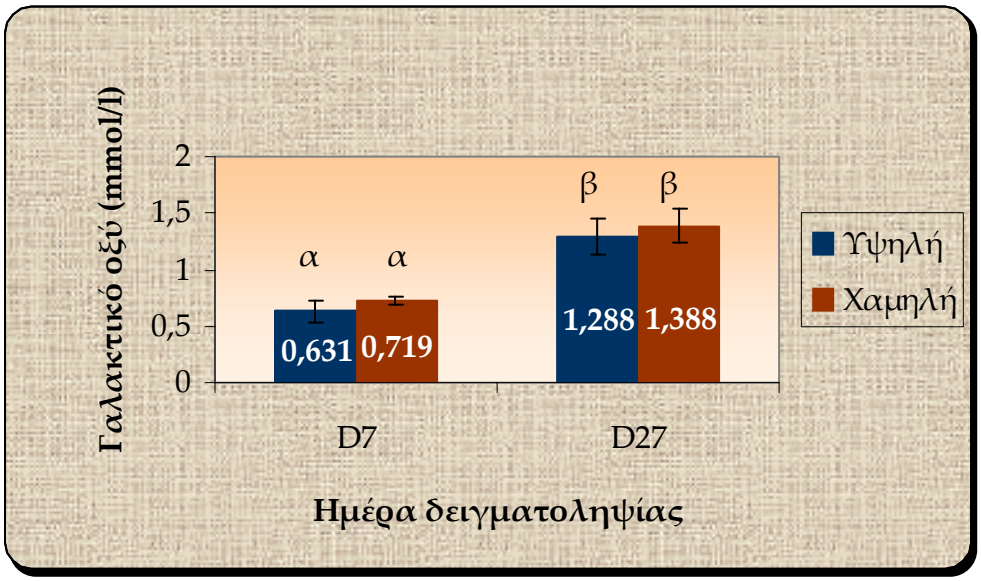
Σχήμα 3.4.2.1: Νυχθημερήσια διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) του γαλακτικού οξέος στις τρεις πειραματικές ομάδες διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (Παράρτημα, Πίνακας 2).

3.4.3 Ένταση φωτός

Η ένταση του φωτός δεν φαίνεται να επηρεάζει τη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο πλάσμα. Τόσο την D7 (p=0.371) όσο και την D27 (p=0.651)

δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ υψηλής και χαμηλής έντασης (Σχήμα 3.4.3.1).

Ωστόσο φαίνεται πως ο χρόνος επηρεάζει σημαντικά τις τιμές του γαλακτικού οξέος. Η επεξεργασία των τιμών έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ D7 και D27 στην ομάδα υψηλής (p=0.008) και στην ομάδα χαμηλής (p=<0.001) έντασης. Οι τιμές την D27 είναι σχεδόν διπλάσιες σε σχέση με αυτές την D7, αλλά όλες βρίσκονται εντός των φυσιολογικών ορίων.



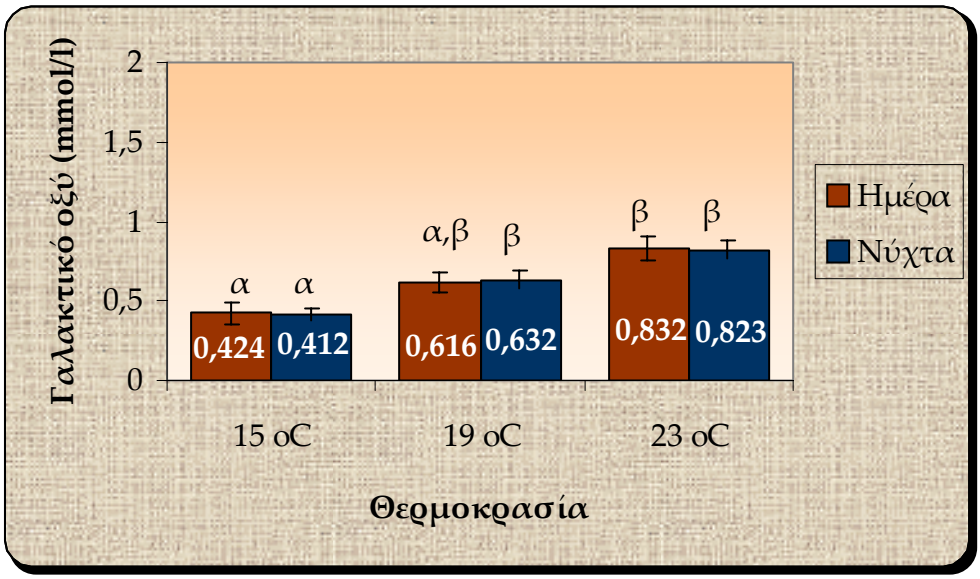
Σχήμα 3.4.3.1: Διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) του γαλακτικού οξέος στις δύο πειραματικές ομάδες υψηλής και χαμηλής έντασης φωτός (Παράρτημα, Πίνακας 3). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).

3.4.4 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία φαίνεται πως επηρεάζει τη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο πλάσμα του φαγκριού. Στη φωτόφαση οι τιμές τις ομάδας των 15 °C παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά με την ομάδα των 23 °C (p=0.033), ενώ δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων των 15 °C και 19 °C (p=0.115) καθώς και μεταξύ των 19 °C και 23 °C (p=0.336). Στη σκοτόφαση η στατιστική ανάλυση έδειξε πως υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών της ομάδας των 15 °C σε σύγκριση τόσο με την ομάδα των 19 °C (p=0.013) όσο και με την ομάδα των 23 °C (p=0.005). Μεταξύ των ομάδων των 19 °C και 23 °C δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.218).

Τα ψάρια που εκτέθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές του γαλακτικού οξέος μεταξύ φωτόφασης και σκοτόφασης (15 °C: p=0.905, 19 °C: p=0.858, 23 °C: p=0.963) (Σχήμα 3.4.4.1). Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος διατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες

εντός των φυσιολογικών ορίων και ήταν μέγιστη στους 23 °C (0.827 ± 0.097 mmol/l) και ελάχιστη στους 15 °C (0.418 ± 0.051 mmol/l).

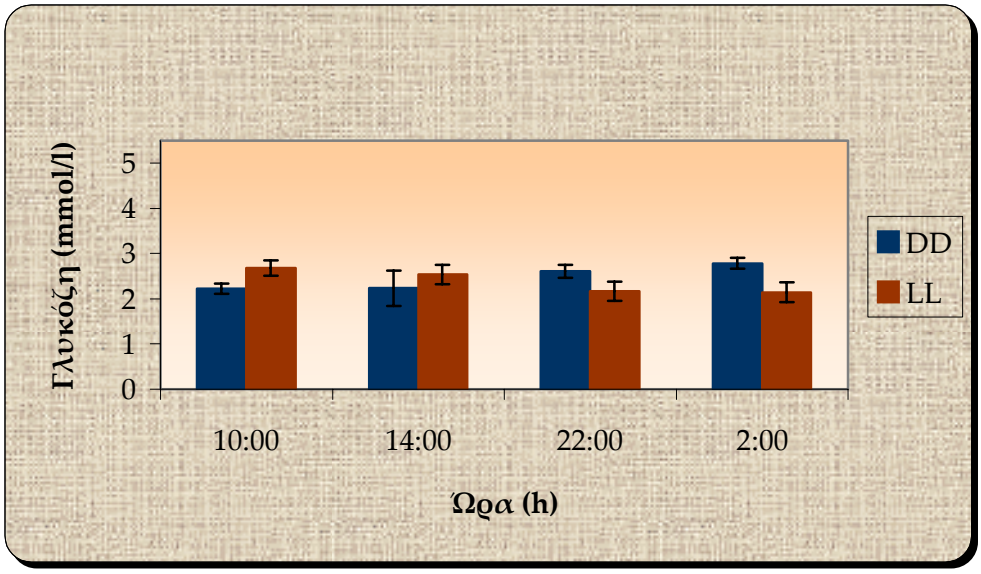


Σχήμα 3.4.4.1: Νυχθημερήσια διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) του γαλακτικού οξέος στις τρεις πειραματικές ομάδες διαφορετικής θερμοκρασίας (Παράρτημα, Πίνακας 4). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$).

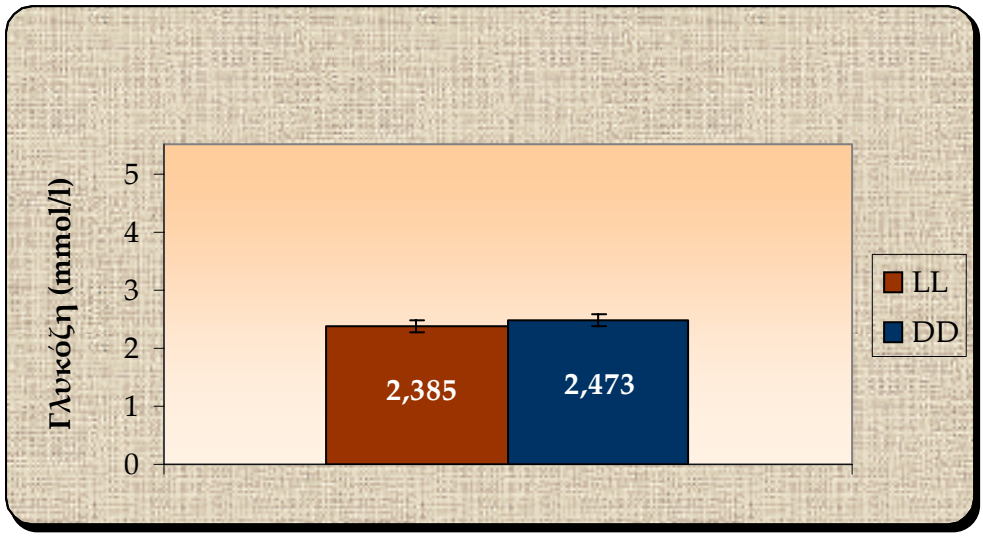
3.5 Γλυκόζη

3.5.1 Φωτοπερίοδος

Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα δεν επηρεάζεται από την φωτοπερίοδο, καθώς δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ψαριών που εκτέθηκαν σε συνεχές φως ή σκοτάδι. Επίσης, η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε μεταβολή των τιμών μεταξύ των δειγματοληπτικών ωρών (Σχήμα 3.5.1.1).



Σχήμα 3.5.1.1: Διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) της γλυκόζης σχετικά με τις διαφορετικές ώρες δειγματοληψίας στις δύο πειραματικές ομάδες LL και DD (Παράρτημα, Πίνακας 1).

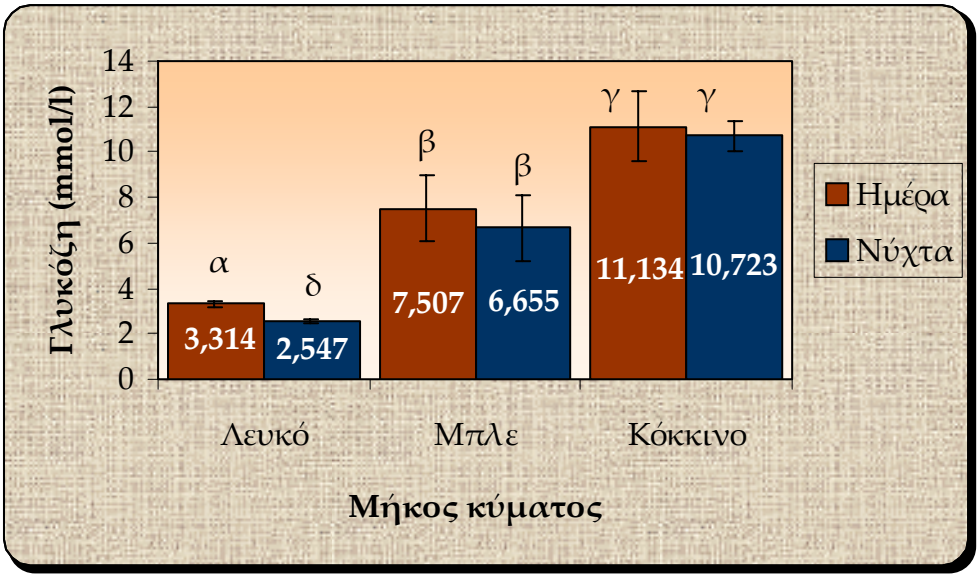


Σχήμα 3.5.1.2: Οι μέσες τιμές (± SEM) της γλυκόζης στις δύο πειραματικές ομάδες LL και DD (Παράρτημα, Πίνακας 1).

Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (p=0.560), οι οποίες όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.5.1.2 διατήρησαν σταθερά και εντός φυσιολογικών ορίων τα επίπεδα της γλυκόζης καθ' όλη τη διάρκεια της δειγματοληψίας (LL: p= 0.195, DD: p= 0.173).

3.5.2 Μήκος κύματος φωτός

Η στατιστική ανάλυση έδειξε πως το μήκος κύματος του φωτισμού επηρεάζει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του φαγκριού. Τόσο στη φωτόφαση όσο και στη σκοτόφαση υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων διαφορετικού φωτισμού (p=<0.001). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ένα κοινό πρότυπο και στις δύο φάσεις του εικοσιτετραώρου, με την ομάδα του κόκκινου φωτισμού να εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές και την ομάδα ορατού φωτός τις χαμηλότερες (Σχήμα 3.5.2.1).



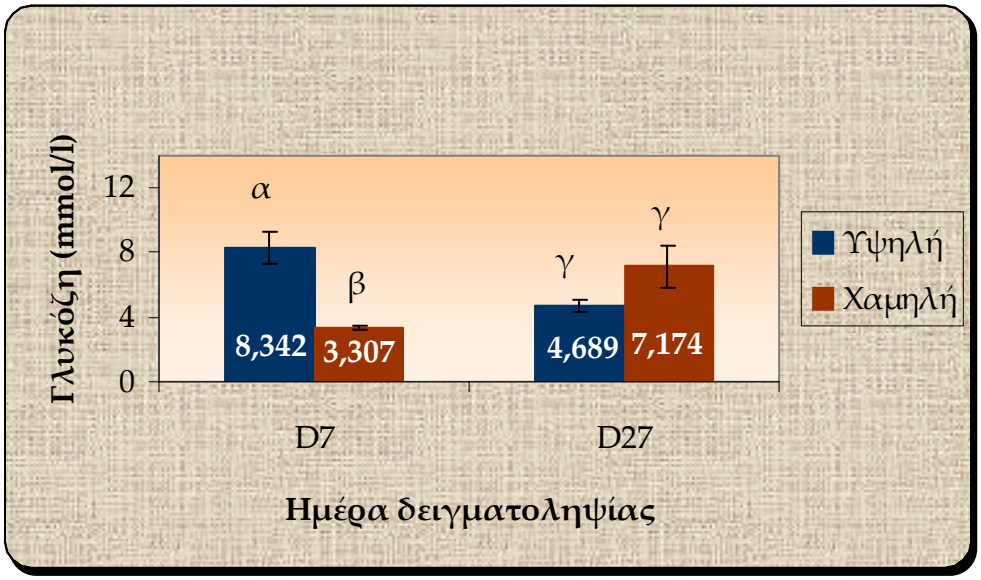
Σχήμα 3.5.2.1: Νυχθημερήσια διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) της γλυκόζης στις τρεις πειραματικές ομάδες διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (Παράρτημα, Πίνακας 2). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).

Στην ομάδα ορατού φωτισμού, όπου οι τιμές διατηρήθηκαν εντός φυσιολογικών ορίων, παρατηρήθηκαν νυχθημερήσιες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις της γλυκόζης (p=<0.001) με τις τιμές της ημέρας να φαίνονται υψηλότερες από της νύχτας. Οι υπόλοιπες ομάδες δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ ημέρας και νύχτας (Blue: p=0.729, Red: p=0.852), αλλά οι τιμές ήταν εκτός των φυσιολογικών ορίων και είχαν μεγάλη τυπική απόκλιση.

3.5.3 Ένταση φωτός

Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα επηρεάζεται βραχυπρόθεσμα από την ένταση φωτισμού αλλά όχι μακροπρόθεσμα. Η ανάλυση έδειξε την D7 υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=<0.001) μεταξύ των δύο ομάδων - οι τιμές είναι υψηλότερες στην υψηλή ένταση σε σύγκριση με τη χαμηλή - ενώ δεν υπάρχει την D27 (p=0.073).

Επίσης, υπάρχει επίδραση του χρόνου στις τιμές της γλυκόζης κατά περίπτωση, δηλαδή στη χαμηλή ένταση παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση (p=<0.001) των τιμών και στην υψηλή στατιστικά σημαντική μείωση (p=0.005) (Σχήμα 3.5.3.1). Οι τιμές βρίσκονται εντός των φυσιολογικών ορίων, εκτός από την τιμή της υψηλής έντασης την D7 και της χαμηλής έντασης την D27.



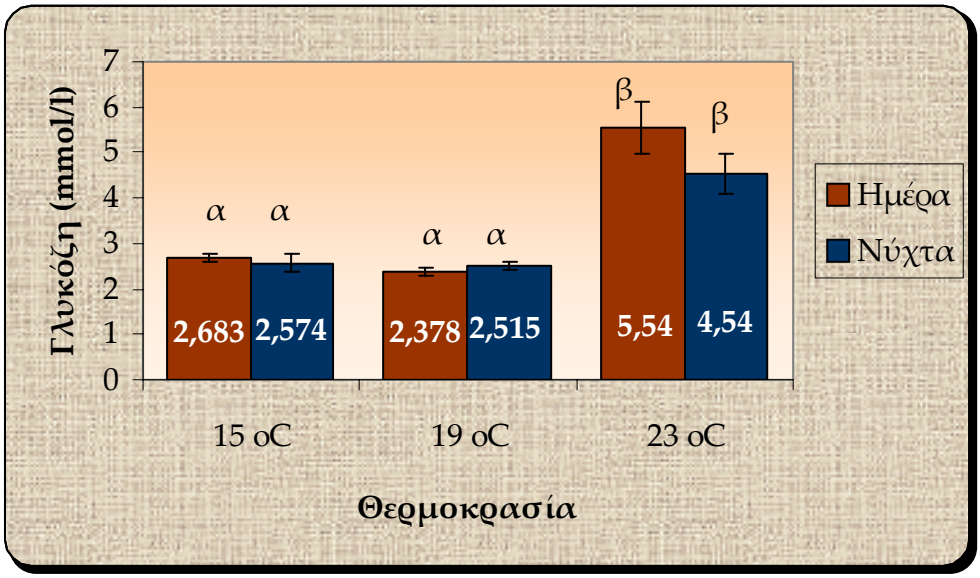
Σχήμα 3.5.3.1: Διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) της γλυκόζης στις δύο πειραματικές ομάδες υψηλής και χαμηλής ένταση φωτός (Παράρτημα, Πίνακας 3). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).

3.5.4 Θερμοκρασία

Όπως προκύπτει από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, η θερμοκρασία επηρεάζει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα. Στατιστικά σημαντική διαφορά υπήρξε στη φωτόφαση στις τιμές της ομάδας των 23 ^{o}C σε σύγκριση τόσο με την ομάδα των 15 ^{o}C (p=<0.001) όσο και με την ομάδα των 19 ^{o}C (p=<0.001). Μεταξύ των ομάδων των 15 ^{o}C και 19 ^{o}C δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.609). Ομοίως, κατά τη σκοτόφαση υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών τις ομάδας των 23 ^{o}C τόσο με την ομάδα

των 15 °C (p=<0.001) όσο και με την ομάδα των 19 °C (p=<0.001). Μεταξύ των ομάδων των 15 °C και 19 °C δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.941).

Τα ψάρια που εκτέθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές της γλυκόζης μεταξύ φωτόφασης και σκοτόφασης (15 °C: p=0.747, 19 °C: p=0.289, 23 °C: p=0.077) (Σχήμα 3.5.4.1). Η συγκέντρωση της γλυκόζης διατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες εντός των φυσιολογικών ορίων και ήταν μέγιστη στους 23 °C (5.04 ± 0.279 mmol/l) και ελάχιστη στους 19 °C (2.445 ± 0.064 mmol/l).



Σχήμα 3.5.4.1: Νυχθημερήσια διακύμανση των μέσων τιμών (± SEM) της γλυκόζης στις τρεις πειραματικές ομάδες διαφορετικής θερμοκρασίας (Παράρτημα, Πίνακας 4). Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).

3.6 Συσχέτιση μεταξύ των παραμέτρων του πλάσματος

Κατά τη δοκιμασία του βαθμού συσχέτισης μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων που προσδιορίσθηκαν στο πλάσμα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση (p=<0.001) μεταξύ γαλακτικού οξέος και γλυκόζης. Οι δύο παράμετροι συσχετίζονται θετικά (r=0.277), το οποίο σημαίνει πως όταν αυξάνεται η μια μεταβλητή αυξάνεται και η άλλη και το αντίστροφο. Αντιθέτως δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της μελατονίνης και του γαλακτικού οξέος (p=0.202) ή της γλυκόζης (p=0.089).

4.1 Πρωτόκολλο Μελατονίνης

Πολλές φυσιολογικές λειτουργίες της επίφυσης ρυθμίζονται από την ορμόνη της, την μελατονίνη. Οι έρευνες της ενδοκρινούς λειτουργίας της επίφυσης και των παραγόντων που την επηρεάζουν στηρίζονται στην ποσοτική εκτίμηση της μελατονίνης, ιδίως στο πλάσμα. Η ραδιοανοσοανάλυση (RIA) είναι το πιο συνηθισμένο μέσο μέτρησης της ορμόνης και περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα στάδιο εκχύλισης πριν τον προσδιορισμό. Δεδομένου του χρονικού και οικονομικού μειονεκτήματος του σταδίου της εκχύλισης, ένας άμεσος προσδιορισμός που παρακάμπτει τη συγκεκριμένη διαδικασία χαρακτηρίζεται από προφανή πλεονεκτήματα. Στη συγκεκριμένη μελέτη περιγράφεται μια ραδιοανοσολογική μέθοδος προσδιορισμού της μελατονίνης, που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την οποία δεν απαιτείται εκχύλιση και συνεπώς μειώνεται ο χρόνος εργασίας κατά το ήμισυ.

Η ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της μελατονίνης έγινε με επιτυχία μέσω της τροποποίησης του αρχικού πρωτοκόλλου που παραχωρήθηκε από τον Dr. J. Laitinen του Πανεπιστήμιου του Kuopio της Φινλανδίας. Το αρχικό πρωτόκολλο υπέστη αρκετές μεταβολές στους όγκους και στις αραιώσεις των χρησιμοποιούμενων υλικών και τελικά προσαρμόσθηκε στα δεδομένα των θαλασσινών ιχθύων και συγκεκριμένα του είδους *Pagrus pagrus*. Η μέθοδος που προτείνεται χαρακτηρίζεται από ακρίβεια, καλό ποσοστό ανάκτησης και φυσικά από επαναληψιμότητα. Πρόκειται για έναν άμεσο και εύχρηστο προσδιορισμό μεγαλύτερης ευαισθησίας. Τέλος, πιστεύεται πως η παρούσα μελέτη θέτει τη βάση για τον προσδιορισμό της μελατονίνης και σε άλλους Μεσογειακούς θαλασσινούς ιχθείς.

4.2 Μελατονίνη

Στην παρούσα εργασία για πρώτη φορά μελετήθηκε η επίδραση της φωτοπεριόδου, του μήκους κύματος και της έντασης του φωτός καθώς και της μέσης θερμοκρασίας του νερού στις νυχθημερήσιες διακυμάνσεις της μελατονίνης στο πλάσμα του φαγκριού, *Pagrus pagrus*. Ο πειραματικός σχεδιασμός έγινε στα πλαίσια της αποφυγής της πιθανής επίδρασης της ιχθυοπυκνότητας, της δίαιτας, του μεγέθους και της αναπαραγωγικής κατάστασης των ατόμων στις μετρούμενες συγκεντρώσεις της ορμόνης. Φαίνεται πως η εναλλαγή φωτόφασης και σκοτόφασης είναι τελικά ο κύριος παράγοντας συγχρονισμού του ρυθμού παραγωγής της μελατονίνης, αποκαλύπτοντας πως **δεν υπάρχει ενδογενής ρυθμός** παραγωγής στο συγκεκριμένο είδος. Επιπλέον, φαίνεται πως η περιβαλλοντική θερμοκρασία

επηρεάζει τη σύνθεση της ορμόνης αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο με το μήκος κύματος και την ένταση του φωτισμού.

Στα περισσότερα θηλαστικά η συγκέντρωση της μελατονίνης την ημέρα είναι φυσιολογικά μικρότερη από 10 pg/ml και κατά τη διάρκεια της νύχτας κυμαίνεται από 50 έως 150 pg/ml (Arendt, 1985). Αντιθέτως στα ψάρια τα επίπεδα της ορμόνης στην κυκλοφορία του αίματος είναι πολύ υψηλότερα. Σε μελέτες των ειδών *Esox lucius* (Falcon et al., 1989), *Oncorhynchus mykiss* (Gern et al., 1978; Kukkonen & Laitinen, 1987), *Salmo salar* (Bromage et al., 1995), *Cyprinus carpio* (Kezuka et al., 1988) και *Dentex dentex* (Pavlidis et al., 1999a) η συγκέντρωση της μελατονίνης είναι κατά τη φωτόφαση 50-100 pg/ml και κατά τη σκοτόφαση 300-500 pg/ml. Κατά συνέπεια, το **προφίλ** της μελατονίνης που περιγράφηκε για το είδος *Pagrus pagrus* – κατά τη φωτόφαση 12.5-102 pg/ml και 118.3-469 pg/ml κατά τη σκοτόφαση - παρουσιάζει ομοιότητες με των υπολοίπων ειδών. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα πως παρουσία φωτός η συγκέντρωση της μελατονίνης μειώνεται και απουσία φωτός τετραπλάσιάζεται.

Η **φωτοπερίοδος**, όμως, φάνηκε πως δεν επιδρά μόνο στις τιμές της μελατονίνης αλλά και στις νυχθημερήσιες διακυμάνσεις αυτών, καθώς δεν παρατηρήθηκε ρυθμικότητα αλλά σταθερά μειωμένες και αυξημένες συγκεντρώσεις καθ' όλο το εικοσιτετράωρο στα άτομα που εκτέθηκαν για 48 h σε φωτοπερίοδο LL και DD αντίστοιχα. Σε αντίθεση λοιπόν με τους περισσότερους τελεόστεους, στους οποίους η παραγωγή μελατονίνης ρυθμίζεται από τον ενδογενή ρυθμό της επίφυσης (Falcon et al., 1989; Kezuka et al., 1989; Zachmann et al., 1991, 1992; Cahill et al., 1994; Porter et al., 2000), η παραγωγή μελατονίνης στο φαγκρί επέρχεται ως απόκριση στην παρουσία ή απουσία περιβάλλοντος φωτός, όπως έχει ομοίως περιγραφεί για την φωτοπερίοδο DD στην ιριδίζουσα πέστροφα (Gern & Greenhouse, 1988; Meissl et al., 1990; Randall et al., 1991; Max & Menaker, 1992; Thibault et al., 1993; Bolliet et al., 1996; Begay et al., 1998) και στη συναγρίδα (Pavlidis et al., 1999a). Η έλλειψη ενδογενούς ρυθμού παραγωγής μελατονίνης ίσως αιτιολογείται με βάση την εξέλιξη ή την οικολογία του είδους (βενθοπελαγικό). Από τα δεδομένα προκύπτει πως η συγκέντρωση της μελατονίνης στο πλάσμα παρέχει μια ακριβή αναπαράσταση της φωτοπεριόδου στο φαγκρί και οποιαδήποτε μεταβολή στην αναλογία διάρκειας φωτός:σκοταδιού δίνει προβλέψιμες αντίστοιχες μεταβολές στη διάρκεια ημερήσιας:νυχτερινής μελατονίνης, όπως έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Iigo & Aida, 1995; Randall et al., 1995; Pavlidis et al., 1999a).

Στην παρούσα μελέτη θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστούν εκτός από τη φωτοπερίοδο και άλλοι παράμετροι του φωτός λιγότερο μελετημένοι μέχρι σήμερα, όπως το μήκος κύματος του φωτισμού και η ένταση. Τα τμήματα του φάσματος του φωτός που καταστέλλουν την βιοσυνθετική δραστηριότητα της επίφυσης και η σχέση μεταξύ της εντάσεως του φωτός και της έκτασης αυτής της καταστολής, έχουν περιγραφεί σε αλμπίνους αρουραίους. Στις μελέτες αυτές, τα ένζυμα της σύνθεσης της μελατονίνης φαίνεται πως καταστέλλονται

in vitro σε άτομα που εκτίθενται σε πράσινο φως (530 nm), αλλά μένουν ανέπαφα στο υπεριώδες και στο κόκκινο φως (Wurtman, 1978). Στο φαγκρί το **μήκος κύματος** του φωτισμού δεν φάνηκε να επιδρά στη συγκέντρωση της μελατονίνης ούτε στις νυχθημερήσιες διακυμάνσεις αυτής, καθώς διατηρήθηκε και στα τρία διαφορετικά μήκη κύματος ίδιας εντάσεως (λευκός, μπλε, κόκκινος φωτισμός) που εφαρμόστηκαν το ίδιο πρότυπο ρυθμού παραγωγής. Από άλλες μελέτες στο συγκεκριμένο είδος φαίνεται πως το κόκκινο χρώμα αποτελεί πρακτικά σκοτάδι για το φαγκρί (Καρκάνα, 2003) και για το λόγο αυτό αναμένονταν κατά τη διάρκεια της ημέρας υψηλές τιμές που θα έφταναν τα επίπεδα της νύχτας. Ωστόσο, το γεγονός της παρόμοιας αντίδρασης της επίφυσης σε όλα τα μήκη κύματος ενισχύει την θεωρία πως δεν διαθέτει την ικανότητα διάκρισης μήκους κύματος, επιδεικνύοντας μια **αχρωματική ηλεκτρική απόκριση** στον φωτισμό (Underwood, 1989) καθώς επηρεάζεται μόνο από την παρουσία ή απουσία φωτός (σύστημα on-off). Στα κατώτερα σπονδυλωτά (αμφίβια, σαύρες, ψάρια) συχνά συναντάται μια δεύτερη συνιστώσα του «συστήματος» της επίφυσης, το παραεπιφυσικό όργανο (parapineal organ), το οποίο διαθέτει συνήθως ικανότητα να διακρίνει τα μήκη κύματος και να επιδεικνύει μια **χρωματική απόκριση** (Underwood, 1989). Πιθανότατα, λοιπόν, να απουσιάζει το παραεπιφυσικό όργανο από το φαγκρί και οι φωτουποδοχείς της επίφυσης να αντιδρούν παρόμοια στα διάφορα μήκη κύματος.

Όσον αφορά την **ένταση** του φωτισμού, τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα, δεν επηρεάζει την παραγωγή της μελατονίνης από την επίφυση του φαγκριού. Αντιθέτως, στον άνθρωπο (Reiter, 2003) , σε ορισμένα άλλα θηλαστικά (Honma et al., 2002) αλλά και σε πτηνά (Tarlow et al., 2003) έχει βρεθεί πως η ένταση του φωτισμού επηρεάζει την παραγωγή μελατονίνης. Σε μελέτες αρουραίων, η ένταση του λευκού φωτός που απαιτείται για να μειώσει τη σύνθεση της μελατονίνης στο 50 % είναι 0,5 $\mu w/cm^2$ ή περίπου δέκα φορές η ένταση του φωτός της πανσέληνου (Wurtman, 1978). Επίσης, οι Tarlow et al. (2003) έδειξαν πως επηρεάζεται η παραγωγή μελατονίνης στο τροπικό είδος πτηνού *Sula granti* από τη μεταβολή της έντασης η οποία σχετίζεται με την πανσέληνο και τη νέα σελήνη. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εντάσεις φωτισμού από 2.515 έως 9.773 μmol photons * sec^{-1} * m^{-2}. Ενδεχομένως, μια βαθμίδωση εντάσεων μικρότερη από 2.500 μmol photons * sec^{-1} * m^{-2} να σημειώσει κάποια σημαντική μεταβολή στην παραγωγή της μελατονίνης, καθώς η έκκριση της ορμόνης ίσως να επηρεάζεται από την αύξηση της έντασης έως ένα σημείο και έπειτα να φτάνει σε ένα πλατό έντασης πάνω από το οποίο να παραμένει σταθερή. Αυτή η σταδιακή αύξηση ή μείωση της έντασης, που θυμίζει στο φυσικό περιβάλλον την ανατολή ή δύση του ηλίου αντίστοιχα, θα πρέπει οπωσδήποτε να μελετηθεί ώστε να διευκρινισθεί ο ρόλος της έντασης.

Αν και η φωτοπερίοδος φαίνεται πως είναι ο κύριος ρυθμιστής της έκκρισης μελατονίνης σε πολλούς θερμόαιμους οργανισμούς (Reiter, 1991), στα

ποικιλόθερμα έχει αποδειχθεί πως είναι σημαντικός επίσης και ο ρόλος της περιβαλλοντικής **θερμοκρασίας** όσον αφορά στο πλάτος του ρυθμού της μελατονίνης (Underwood, 1985; Max & Menaker, 1992; Iigo & Aida, 1995; Randall et al., 1995; Pavlidis et al., 1999). Στην παρούσα εργασία βρέθηκε πως η θερμοκρασία του νερού επηρεάζει τη συγκέντρωση της μελατονίνης στο πλάσμα, καθώς αυξάνεται με την άνοδο της θερμοκρασίας. Πιθανότατα, αυτό να οφείλεται σε επίδραση της θερμοκρασίας στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της μελατονίνης και συγκεκριμένα στην ταχύτητα δράσης των ενζύμων. Ωστόσο, το γεγονός πως μόνο στη διάρκεια της φωτόφασης παρατηρείται αυτή η θερμοεξαρτώμενη μεταβολή του πλάτους του ρυθμού έκκρισης της μελατονίνης, προδίδει την έντονη αλληλεπίδραση μεταξύ φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας και ενισχύει το ρόλο της φωτοπεριόδου.

Η επίφυση στα εξώθερμα λειτουργεί ως μεταγωγέας θερμικής και φωτεινής πληροφορίας. Μελέτες έχουν αποδείξει πως οι κύκλοι είτε του φωτός ή της θερμοκρασίας μπορούν να επηρεάσουν το ρυθμό της επιφυσικής μελατονίνης (πλάτος, φάση, διάρκεια). Όταν παρουσιάζονται μαζί, παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των κύκλων φωτός και θερμοκρασίας στον ρυθμό της μελατονίνης. Οι ετήσιες μεταβολές του ημερήσιου ρυθμού της μελατονίνης που παρατηρούνται σε οργανισμούς εκτεθειμένους σε φυσικές συνθήκες αναμφίβολα αντανακλά την επίδραση του φωτός και της θερμοκρασίας στη σύνθεση της μελατονίνης. *In vitro* μελέτες αποδεικνύουν πως και οι δύο παράγοντες επιδρούν άμεσα στο ρυθμό της μελατονίνης (Max & Menaker, 1992).

Τόσο η φωτοπερίοδος όσο και η θερμοκρασία του νερού αποτελούν σημαντικούς παράγοντες ρύθμισης αρκετών φυσιολογικών λειτουργιών, όπως της κατάστασης του αναπαραγωγικού συστήματος (Mañanós et al., 1997). Η αυξημένη φωτοαπόκριση και παραγωγή μελατονίνης που συμβαίνει στην επίφυση της πέστροφας (Max & Menaker, 1992) με την αύξηση της θερμοκρασίας εντείνει την ικανότητα του ψαριού να διακρίνει τις εποχές, το φθινόπωρο και την άνοιξη. Το φθινόπωρο, που η θερμοκρασία του νερού είναι ακόμη υψηλή, η αυξημένη παραγωγή μελατονίνης σε συνδυασμό με μεγαλύτερη ευαισθησία στο φως έχουν ως αποτέλεσμα μια μεγαλύτερη αντίθεση (ημέρα≠νύχτα) στο 24-h προφίλ της μελατονίνης σε σύγκριση με την άνοιξη, που η φωτοπερίοδος είναι η ίδια ενώ η θερμοκρασία του νερού χαμηλότερη. Αυτή η αλλαγή στο προφίλ της μελατονίνης, που προκύπτει από ανάμειξη της πληροφορίας της φωτοπεριόδου και της θερμοκρασίας, επιτρέπει να γίνονται κατάλληλες επιλογές αναπαραγωγής και μετανάστευσης. Διαφορετικά η φωτοπερίοδος μόνο θα έδινε ασαφή σήματα.

4.3 Γαλακτικό Οξύ

Οι υψηλές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος συνδέονται με το στρες και την άσκηση όπως προκύπτει από μια σειρά μελετών σε τελεόστεους (Dando, 1969; Turner et al., 1983 a, b; Schwalme & Mackay, 1985; Girard & Milligan, 1992). Η ανίχνευση του γαλακτικού οξέος σε καταπονημένα ψάρια συνδυάστηκε με τον απαραίτητο καθορισμό των φυσιολογικών επιπέδων σε ψάρια υπό συνθήκες ηρεμίας. Για το υπό μελέτη είδος *Pagrus pagrus* οι τιμές εκκίνησης για το γαλακτικό οξύ στο πλάσμα έχουν καθοριστεί στα 0.09-1.95 mmol/l (Φανουράκη, 2005). Στην παρούσα μελέτη, ανεξάρτητα από τον περιβαλλοντικό παράγοντα που μελετήθηκε, τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος διατηρήθηκαν εντός των φυσιολογικών ορίων.

Η διατήρηση σταθερών των επιπέδων του γαλακτικού οξέος καθ' όλο το 24 h - δεν παρουσιάζουν νυχθημερήσιες διακυμάνσεις -, τόσο σε άτομα που εκτέθηκαν σε συνεχές φωτισμό όσο και σε συνεχές σκοτάδι, υποδηλώνει ότι η **φωτοπερίοδος** δεν επιδρά στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο πλάσμα.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, το **μήκος κύματος** και η **ένταση** του φωτισμού δεν επηρεάζουν τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος. Μελέτες στο ίδιο είδος (Szisch, 2001; Καρκάνα, 2003) έχουν δείξει πως η έκθεση σε μπλε φωτισμό δεν αυξάνει την καταπόνηση σε σχέση με το λευκό. Ωστόσο, φαίνεται πως η μακροπρόθεσμη παραμονή στα ενυδρεία τόσο σε στην υψηλή όσο και στην χαμηλή ένταση φωτισμού έχει ως συνέπεια την αύξηση του γαλακτικού οξέος του πλάσματος, όπως έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενη μελέτη στο ίδιο είδος (Φανουράκη, 2005). Οι υψηλές τιμές δεν οφείλονται στην καταπόνηση κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας καθώς ακολουθήθηκε σε όλα τα πειράματα το ίδιο πρωτόκολλο δειγματοληψίας. Δεδομένου ότι το γαλακτικό οξύ αποτελεί αξιόπιστο **δείκτη χρόνιας καταπόνησης**, η αύξηση των τιμών ήταν αναμενόμενη.

Η μέση **θερμοκρασία** του νερού φαίνεται πως επιδρά στις τιμές του γαλακτικού οξέος καθώς έχουμε σημαντική μείωση στους 15 ^{o}C. Πιθανότατα, ο μειωμένος μεταβολισμός σε χαμηλές θερμοκρασίες να ευθύνεται για τη συγκεκριμένη παρατήρηση. Επίσης παρατηρήθηκε πως τα άτομα των υψηλότερων θερμοκρασιών είχαν αυξημένη κινητική δραστηριότητα, η οποία έχει αποδειχθεί πως συμβάλλει στην άνοδο των επιπέδων του γαλακτικού οξέος μέσω του αναερόβιου μεταβολισμού στους μύες.

4.4 Γλυκόζη

Η διαθεσιμότητα της τροφής και η ώρα τροφοληψίας είναι γνωστό πως επηρεάζουν τα επίπεδα της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος. Τα ψάρια χαρακτηρίζονται από περιορισμένη ικανότητα μεταβολισμού της γλυκόζης, καθώς η πρόσληψη εύπεπτων υδατανθράκων προκαλεί υπεργλυκαιμία η οποία παραμένει για αρκετές ώρες στον οργανισμό (Bergot, 1979; Kaushik & Oliva-Teles, 1985; Brauge et. al., 1994). Για το λόγο αυτό στην συγκεκριμένη μελέτη ακολουθήθηκε συγκεκριμένο πρωτόκολλο ταΐσματος για όλα τα πειράματα. Έτσι η μετρούμενη στο πλάσμα γλυκόζη αντιμετωπίζεται ως **δείκτης οξείας καταπόνησης** και όχι ως δείκτης διατροφικής συμπεριφοράς.

Ο καθορισμός των τιμών εκκίνησης για κάθε είδος είναι θεμελιώδης, λόγω της πολυπλοκότητας που παρουσιάζουν οι αποκρίσεις στην καταπόνηση, προκειμένου να υπάρχει η δυνατότητα χαρακτηρισμού των ζώων ως καταπονημένων ή όχι σύμφωνα με αυτές τις τιμές ηρεμίας, αλλά και της σύγκρισης και συσχετισμού μεταξύ των αποκρίσεων σε διαφορετικούς χειρισμούς. Για το υπό μελέτη είδος *Pagrus pagrus* οι τιμές αναφοράς για τη γλυκόζη στο πλάσμα έχουν καθοριστεί στα 2.01-5.21 mmol/l (Φανουράκη, 2005).

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα πως η συνεχής απουσία (DD) ή παρουσία φωτός (LL) δεν επηρεάζει τα επίπεδα της γλυκόζης, καθώς διατηρούνται σταθερά όλο το 24 h. Όσον αφορά την έκθεση σε DD, τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη στο είδος από τους Pavlidis et al. (1999b). Ωστόσο, άσχετα με την απουσία σημαντικής διακύμανσης υπό συνεχές φως ή σκοτάδι, οι τιμές διατηρούνται εντός των φυσιολογικών ορίων αποκλείοντας την οξεία καταπόνηση κατά τη δειγματοληψία.

Η γλυκόζη σε άτομα που εκτέθηκαν σε λευκό φωτισμό με **φωτοπερίοδο** 12L:12D φαίνεται πως παρουσιάζει νυχθημερήσιες διακυμάνσεις με τα επίπεδα της ημέρας να είναι αυξημένα σε σύγκριση με της νύχτας. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες στο φαγκρί (Pavlidis et al., 1999b), το λαβράκι (Pavlidis et al., 1997), την τσιπούρα (Pavlidis et al., 1997) και στην ιριδίζουσα πέστροφα (Boujard & Leatherland, 1992; Boujard et al., 1993). Τα υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης την ημέρα μάλλον αντανακλούν την αύξηση της γλυκονεογένεσης ως δευτερογενή απόκριση στα υψηλά επίπεδα κατεχολαμινών, που απελευθερώνονται πρωτογενώς κατά την οξεία καταπόνηση. Τόσο στον μπλε όσο και στον κόκκινο φωτισμό η γλυκόζη δεν παρουσίασε νυχθημερήσιες μεταβολές, πιθανότατα λόγω της μεγάλης τυπικής απόκλισης των τιμών.

Παράλληλα φαίνεται πως το **μήκος κύματος** του φωτός επιδρά στα επίπεδα της γλυκόζης ανεξάρτητα από τη φάση του 24 h. Ενώ στο λευκό φωτισμό η γλυκόζη διατηρείται εντός των φυσιολογικών ορίων, τόσο στο μπλε όσο και στο κόκκινο μήκος κύματος έχουμε αύξηση των τιμών πάνω από τα

φυσιολογικά για το είδος επίπεδα, πιθανότατα υπό την επίδραση οξείας καταπόνησης. Αυτή η υπέρμετρη αύξηση μπορεί να είναι ένας ακόμη λόγος απουσίας νυχθημερήσεων διακυμάνσεων στον μπλε και κόκκινο φωτισμό.

Βραχυπρόθεσμα φαίνεται πως η γλυκόζη επηρεάζεται από την **ένταση** του φωτισμού, παρουσιάζοντας άνοδο των τιμών της στην υψηλή ένταση σε σχέση με τη χαμηλή. Ωστόσο με την πάροδο του χρόνου η συγκέντρωση της γλυκόζης φτάνει σε ένα επίπεδο όμοιο και για τις δύο εντάσεις, το οποίο λαμβάνοντας υπόψη την τυπική απόκλιση βρίσκεται μέσα στα φυσιολογικά όρια. Ο χρόνος εδώ δρα κατά περίπτωση στην προσαρμογή των ατόμων στο περιβάλλον του ενυδρείου - δηλαδή στη χαμηλή ένταση παρατηρείται αύξηση της γλυκόζης και στην υψηλή μείωση αυτής. Ως δείκτης οξείας καταπόνησης, λοιπόν, η γλυκόζη τονίζει την δράση της υψηλής έντασης ως ερέθισμα στρες.

Επιπλέον, η περιβαλλοντική **θερμοκρασία** επηρεάζει τη γλυκόζη του πλάσματος στο φαγκρί. Οι αυξημένες τιμές στους 23 ^{o}C και οι μειωμένες στους 15 ^{o}C και 19 ^{o}C προκύπτουν πιθανόν λόγω αύξησης και μείωσης αντίστοιχα του μεταβολισμού – υπόθεση που ενισχύεται από την ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος του πλάσματος. Μειωμένα επίπεδα γλυκόζης σε χαμηλή θερμοκρασία έχουν σημειωθεί και στο αργυρό γατόψαρο (*Rhamdia quelen*), ενώ αντίθετα τα επίπεδα γλυκόζης αυξήθηκαν στην υψηλότερη των θερμοκρασιών (31°C) (Lermen et al., 2004). Αντίθετα από τα παραπάνω το γατόψαρο του είδους *Ictalurus punctatus*, παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης στους 10°C σε σύγκριση με τους 20 και 30°C (Strange, 1980). Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και στο είδος *Ictalurus melas* (Ottolenghi et al., 1995). Οι Sun et al (1992, 1995) παρατήρησαν σημαντική υπεργλυκαιμία στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*) σε θερμοκρασία 14-16°C μετά από 24 ώρες. Στο φαγκρί έχει αποδειχθεί πως η καταλληλότερη θερμοκρασία εκτροφής είναι αυτή των 19°C, όπου τα επίπεδα γλυκόζης, γαλακτικού οξέος, αλλά και άλλων δεικτών καταπόνησης όπως της κορτιζόλης και των κατεχολαμινών είναι χαμηλά σε σύγκριση με τις άλλες θερμοκρασίες (Φανουράκη, 2005).

4.5 Μελλοντικοί Στόχοι

Η παρούσα εργασία οδήγησε στην ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού της επιφυσικής ορμόνης – της μελατονίνης – στους θαλάσσιους ιχθείς και μια πρώτη αλλά βασική προσέγγιση στο είδος *Pagrus pagrus*. Ωστόσο υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα που απασχολούν τους επιστήμονες και η διαλεύκανση αυτών θα οδηγήσει στην σφαιρική κατανόηση και περιγραφή του θέματος. Ο σχεδιασμός των επόμενων κινήσεων, λοιπόν, περιλαμβάνει σίγουρα τα εξής εγχειρήματα:

1. μελέτη του ρόλου της αλατότητας στα πλαίσια της διερεύνησης της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων στην παραγωγή μελατονίνης. Εξαιτίας του προτεινόμενου ρόλου της μελατονίνης στην οσμωρύθμιση, θα πρέπει να εξεταστεί η επίδραση διαφορετικών ποσοστών αλατότητας (25 ‰ έως 38‰) καθώς και η αλληλεπίδραση της μελατονίνης με τη κορτιζόλη – ορμόνή που συνδέεται με την ιοντική ισορροπία.

2. διαλεύκανση της επίδρασης της θερμοκρασίας. Η μεταβολή της συγκέντρωσης της μελατονίνης με βάση τη θερμοκρασία οφείλεται στη διακύμανση της ευαισθησίας των υποδοχέων της ή στη μεταβολή της δραστηριότητας των ενζύμων (NAT και/ή HIOMT) στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της ορμόνης;

Γενικά Συμπεράσματα

- Η ραδιοανοσοανάλυση (RIA) που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη παρέχει αφενός το οικονομικό και χρονικό πλεονέκτημα της παράκαμψης του σταδίου της εκχύλισης και αφετέρου ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Επιπρόσθετα, αποτελεί σημαντικό «εργαλείο» για τον προσδιορισμό της μελατονίνης και σε άλλους Μεσογειακούς θαλασσινούς ιχθείς.

- Το προφίλ της μελατονίνης που περιγράφεται για το είδος *Pagrus pagrus* παρουσιάζει ομοιότητες με των υπολοίπων ιχθύων. Κατά τη φωτόφαση η συγκέντρωση της μελατονίνης είναι χαμηλή (12.5-102 pg/ml) και κατά τη σκοτόφαση τετραπλασιάζεται (118.3-469 pg/ml).

- Σε αντίθεση με την πλειοψηφία των τελεόστεων, στο φαγκρί δεν υπάρχει ενδογενής ρυθμός παραγωγής μελατονίνης.

- Η παραγωγή μελατονίνης εξαρτάται από την παρουσία ή απουσία φωτός. Επιπλέον, η περιβαλλοντική θερμοκρασία επηρεάζει τη σύνθεση της ορμόνης, καθώς η συγκέντρωσή της είναι αυξάνεται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Ωστόσο, δε συμβαίνει το ίδιο με το μήκος κύματος και την ένταση του φωτός.

- Ο δείκτης χρόνιας καταπόνησης – το γαλακτικό οξύ – δεν επηρεάζεται ούτε από τη φωτοπερίοδο ούτε από το μήκος κύματος και την ένταση του φωτός. Αντιθέτως η επίδραση της μέσης θερμοκρασίας του νερού είναι καταλυτική και οι 15 ^{o}C δημιουργούν τις λιγότερο στρεσογόνες συνθήκες.

- Ο δείκτης οξείας καταπόνησης – η γλυκόζη – επηρεάζεται από την εναλλαγή φωτός-σκοταδιού. Το λευκό φως, η χαμηλή ένταση φωτός και η χαμηλή θερμοκρασία των 15 ^{o}C με 19 ^{o}C αποτελούν τις ιδανικότερη επιλογή για την παραμονή στο περιβάλλον του ενυδρείου.

- Επιβεβαιώνεται πως η καταλληλότερη θερμοκρασία για την εκτροφή του είδους είναι οι 19 ^{o}C, όπου οι δύο θετικά συσχετιζόμενοι παράμετροι καταπόνησης διατηρούν χαμηλά επίπεδα τιμών.

- Η μελατονίνη δεν σχετίζεται με την καταπόνηση.

Περίληψη

Η μελατονίνη, *N*-ακέτυλο-5-μεθοξυτρυπταμίνη, είναι ένα ινδολοαμίδιο γνωστό για τη δράση του ως εσωτερικός «χρονοδείκτης» καθώς μετατρέπει τη φωτεινή πληροφορία σε χημικό σήμα. Οι ημερήσιοι κύκλοι της φωτεινότητας είναι μέχρι σήμερα ο κύριος περιβαλλοντικός παράγοντας επίδρασης στην παραγωγή μελατονίνης. Στα ψάρια, όπως και στα άλλα σπονδυλωτά, η μελατονίνη συντίθεται από την επίφυση και απελευθερώνεται στο αίμα με ρυθμικό τρόπο. Στα είδη που έχουν ερευνηθεί μέχρι σήμερα, η παραγωγή μελατονίνης από την επίφυση καταστέλλεται από το φως αλλά διεγείρεται από το σκοτάδι. Συνεπώς κατά τη διάρκεια της μέρας εμφανίζονται χαμηλά επίπεδα μελατονίνης και υψηλά κατά τη διάρκεια της νύχτας. Εκτός από τον ρόλο της στο βιολογικό ρολόι, η μελατονίνη συμμετέχει επίσης στον έλεγχο πολλών άλλων βιολογικών λειτουργιών, όπως η αύξηση, η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η γήρανση, η κυτταρική ανοσία, ο χρωματισμός, η θερμορύθμιση, ο ύπνος και η οσμωρύθμιση.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν (α) η ανάπτυξη και αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού της μελατονίνης στο πλάσμα ενός θαλάσσιου είδους, του φαγκριού *Pagrus pagrus*, (β) η διερεύνηση της ύπαρξης ενδογενούς ρυθμού παραγωγής μελατονίνης στο υπό μελέτη είδος, (γ) η περιγραφή του προφίλ της μελατονίνης του είδους και (δ) ο έλεγχος των νυχθημερήσιων διακυμάνσεων της ορμόνης υπό διαφορετικές φωτοπεριόδους (12L:12D, LL, DD), μήκη κύματος (λευκό, μπλε, κόκκινο) και εντάσεις (υψηλή, χαμηλή) φωτός, και θερμοκρασίες (15 ^{o}C, 19 ^{o}C, 23 ^{o}C).

Η ραδιοανοσοανάλυση (RIA) που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη παρέχει αφενός το οικονομικό και χρονικό πλεονέκτημα της παράκαμψης του σταδίου της εκχύλισης και αφετέρου ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Επιπρόσθετα, αποτελεί σημαντικό «εργαλείο» για τον προσδιορισμό της μελατονίνης και σε άλλους Μεσογειακούς θαλασσινούς ιχθείς. Το προφίλ της μελατονίνης που περιγράφεται για το είδος *Pagrus pagrus* παρουσιάζει ομοιότητες με των υπολοίπων ιχθύων. Κατά τη φωτόφαση η συγκέντρωση της μελατονίνης είναι χαμηλή (12.5-102 pg/ml) και κατά τη σκοτόφαση τετραπλασιάζεται (118.3-469 pg/ml).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν για πρώτη φορά πως στο φαγκρί – σε αντίθεση με την πλειοψηφία των τελεόστεων - δεν υπάρχει ενδογενής ρυθμός παραγωγής μελατονίνης. Η σύνθεση της ορμόνης εξαρτάται από την παρουσία ή απουσία φωτός. Επιπλέον, η περιβαλλοντική θερμοκρασία επηρεάζει τη συγκέντρωση της μελατονίνης, καθώς αυξάνεται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Ωστόσο, δε συμβαίνει το ίδιο με το μήκος κύματος και την ένταση του φωτός. Τέλος, οι δείκτες stress (γαλακτικό οξύ, γλυκόζη) δεν παρουσίασαν καμία συσχέτιση με την παραγωγή της ορμόνης, υποδεικνύοντας πως πιθανότατα η μελατονίνη δεν συνδέεται με την καταπόνηση.

Summary

Melatonin, *N*-acetyl-5-methoxytryptamine, is an indolamide, which is well known to act as an internal zeitgeber, transducing light information into a chemical signal. The daily cycle of illumination is by far the main environmental factor affecting melatonin production. In fish as well as in other vertebrates, melatonin is synthesized by the pineal organ and released into blood in a rhythmic fashion. In all species investigated so far, melatonin production in the pineal is inhibited by light but stimulated by darkness, so that low levels appear during the day and high levels at night. In addition to its role in the circadian system, melatonin is also involved in the control of many other biological functions such as growth, development, reproduction, aging, cellular immunity, skin coloration, thermoregulation, sleep and osmoregulation.

The aim of this study was (a) the development and validation of a method for the determination of melatonin concentrations in the plasma of a marine species, the red porgy *Pagrus pagrus*, (b) the examination of the existence or not of an endogenous rhythm in melatonin production of red porgy, (c) the description of melatonin profile for this species and (d) the investigation of diel rhythms of the hormone under different photoperiodic regimes (12L:12D, LL, DD), light spectrum (full, blue, red) and intensities (high, low) and water temperature levels (15 ^{o}C, 19 ^{o}C, 23 ^{o}C).

The radioimmunoassay (RIA), which was developed in the present study, provides firstly the financial and time advantage by skipping the extraction stage and secondly the accuracy and repeatability of the determination. Moreover, this method represents an important "tool" for measuring melatonin contents in other Mediterranean seawater species. The pattern of changes in plasma melatonin currently reported for the red porgy closely resemble those found in other species of fish. During the photophase plasma melatonin levels fluctuate around 12.5-102 pg/ml, while nighttime melatonin levels are clearly higher around 118.3-469 pg/ml.

With this study, it is shown for the first time that in contrast to most teleosts the red porgy doesn't exhibit an endogenous rhythm in melatonin production. The melatonin synthesis occurs primarly in response to the presence or absence of light. Also, the environmental temperature affects melatonin levels, as they are higher in increased temperature. However, neither the light spectrum nor light intensity has an effect on melatonin levels. Finally, the absence of correlation between the chosen stress indicators (lactate, glucose) and the hormone production indicates that probably melatonin doesn't involve with stress in fish.

- **Amano, M., Iigo, M., Ikuta, K., Kitamura, S. & Yamamori, K. (2003).** Daily variations in melatonin binding sites in the masu salmon brain, Neurosci. Lett. 350 (1): 9– 12.
- **Andersen, D. E., Reid, S. D., Moon, T. W. & Perry, S. F. (1991).** Metabolic effects associated with chronically elevated Cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 48: 1811-1817.
- **Arendt, J. (1985).** Assay of melatonin and its metabolites: Results in normal and unusual environments. *In* ''Proceedings of the First International Conference on Melatonin in Humans'' (R. J. Wurtman and F.Waldhauser, Eds.), pp. 11–32.
- **Arendt, J. (1998)**. Complex effects of melatonin. Therapie 53: 479–488.
- **Armstrong, S.M. (1989).** Melatonin: The internal zeitgeber of mammals. Pineal Reseach Reviews 7: 157-202.
- **Axelrod, J., Shein, H.M. & Wurtman, R.J. (1969).** Stimulation of C-melatonin synthesis from C-tryptophanby noradrenaline in rat pineal in organ culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 62: 544-549.
- **Axelrod, J. (1974).** The pineal gland: a neurochemical transducer. Science 184 (4144): 1341-1348.
- **Balm, P. H. M., Hovens, M. L. M. & Wendelaar Bonga, S. E. (1995).** Endorphin and MSH in concert form the cortico-tropic principle released by Tilapia (Oreochromis mossambicus; Teleostei) melanotropes. Peptides 16 (3): 463– 469.
- **Bartsch, C., Bartsch, H. & Lippert T.H. (1992)**. The pineal gland and cancer: facts, hypotheses and perspectives. The Cancer J. 5: 194–199.
- **Bauchot, M. L. & Hureau, J. C. (1990).** www.fishbase.org
- **Bayarri, M.J., Iigo, M., Muňoz-Cueto, J.A., Isorna, E., Delgado, M.J., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. & Alonso-Gómez, A.L. (2004).** Binding characteristics and daily rhythms of melatonin receptors are distinct in the retina and the brain areas of the European sea bass retina (*Dicentrarchus labrax*). Brain Research 1029: 241-250.
- **Begay, V., Falcón, J., Cahill, G.M., Klein, D.C. & Coon, S.L. (1998).** Transcripts endoding two melatonin synthesis enzymes in the teleost pineal organ: circadian regulation in pike and zebrafish, but not in trout. Endocrinology 139: 905–912.
- **Bergot, F. (1979).** Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Comp. Biochem. Physiol. 63A: 543–547.
- **Bianchi, G. (1984).** Study on the morphology of five Mediterranean and Atlantic sparid fishes with reinstatement of the genus *Pagrus*, Cuvier, 1817. Cybium, 8 (4): 31-56.
- **Binkley, S., Riebman, J.B. & Reilly, K.B. (1978).** The pineal gland: a biological clock *in vitro*. Science 202: 1198–1201.
- **Binkley, S. (1988)**. The pineal: endocrine and nonendocrine function. In: Hadley, M.E. (ed.), Prentice Hall Endocrinology Series. Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, pp. 175–184.

- **Bolliet, V., Begay, V., Taragnat, C., Ravault, J.P., Collin, J.P. & Falcon, J. (1996)**. Photoreceptor cells of the pike pineal organ as cellular circadian oscillators. Europ. J. Neurosci. 9: 643–653.
- **Boujard, T. & Leatherland, J.F. (1992).** Diel pattern of hepatosomatic index, liver glycogen and lipid content, plasma non-esterified free fatty acid, glucose, T3, T4, growth hormone and cortisol concentrations in *Oncorhynchus mykiss* held in different photoperiod regimes and fed using demand-feeders. Fish Physiology and Biochemistry 10: 111–122.
- **Boujard, T., Brett, S., Lin, L. & Leatherland, J.F. (1993).** Effect of restricted access to demand feeders on diurnal pattern of liver composition, plasma metabolites and hormone levels in *Oncorhynchus mykiss*. Fish Physiology and Biochemistry 11: 337-344.
- **Brauge, C., Medale, F. & Corraze, G. (1994).** Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. Aquaculture 123: 109–120.
- **Brett, J. R. (1958).** Implications and assessment of environmental stress. In: The investigation of Fish-Power Problems. Larkin, P. A. (ed.), H. R. MacMillan Lectures in Fisheries. University of British Columbia, Vancouver, pp. 69-83.
- **Bromage, N. R., Randall, C. F., Porter, M. J. R. & Davies, B. (1995).** How do photoperiod, the pineal gland, melatonin, and circannual rhythms interact to co-ordinate seasonal reproduction in salmonid fish? *In* ''Proceedings of Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish'' (F. W. Goetz and P. Thomas, eds.), pp. 164–166. Fish Symposium 95, Austin.
- **Bubenik, G.A. & Pang, S.F. (1997)**. Melatonin levels in the gastrointestitial tissues of fish, amphibians, and reptile. *Gen. Comp. Endocrinol*. 106: 415–419.
- **Cahill, G.M., Grace M.S. & Beshare J.C. (1991).** Rhythmic regulation of retinal melatonin: metabolic pathways, neurochemical mechanisms and ocular circadianclck. Cell Mol Neurobiol. 11: 529-560.
- **Cahill, G.M. (1996)**. Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res.* 708: 177–181.
- **Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerdá, J., Ramos, J., Maňanós, E. & Bromage, N. (1995).** Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality. N.R. Bromage, R.J. Roberts, eds. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 138–168.
- **da Silva Monteiro & Vanda Marques (1998).** www.fishbase.org
- **Dando, P.R. (1969).** Lactate metabolism in fish. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 49: 209–223.
- **Davies, B., Hannah, L.T., Randall, C.F., Bromage, N. & Williams, L.M. (1994)**. Central melatonin binding sites in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Gen. Comp. Endocrinol. 96: 19-26.
- **Divanach, P., Kentouri, M., Charalampakis, G., Pouget, F. & Sterioti, A. (1993).** Comparison of growth performance of six Mediterranean species reared under intensive farming conditions in Crete (Greece), in raceways with the use of self

feeders. In: Production, Environment and Quality, Bordeaux, Aquaculture '92, Barnabé, G. & Kestemont, P. (eds), European Aquaculture Society, Special Publication No 18, Ghent, Belgium.

- **Dubocovich, M.L. (1988).** Pharmacology and function of melatonin receptors, FASEB J. 2: 2765– 2773.
- **Dubocovich, M.L., Masana, M.I., Jacob, S. & Sauri, D.M. (1997).** Melatonin receptor antagonists that di€erentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 355: 365-375.
- **Dubocovich, M.L., Yun, K., Alghoul, W.M., Benloucif, S. & Masana M.I. (1998).** Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. FASEB J. 12: 1211-1220.
- **Ekström, P. (1987).** Photoreceptors and CSF-contacting neurons in the pineal organ of a teleost fish have direcr axonal connections with the brain: an HRP-electronmicroscopic study. J. Neuroscience 7: 987-995.
- **Ekström, P. & Vanecek, J. (1992).** Localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Neuroendocrinology 55: 529-537.
- **Ekström, P. & Meissl, H. (1997).** The pineal organ of teleost fishes. Rev. Fish Biol. Fish. 7:199–284.
- **Falcón J., Guerlotte´, J., Voisin, P. & Collin, J.P. (1987).** Rhythmic melatonin biosynthesis in a photoreceptive pineal organ: a study in the pike. Neuroendocrinology 45: 479–486.
- **Falcón, J., Brun-Marmillon, J., Claustrat, B. & Collin, J.P. (1989).** Regulation of melatonin secretion in a photoreceptive pineal organ: An *in vitro* study in the pike. J. Neurosci. 45: 479–486.
- **Falcón, J., Molina-Borja, M., Collin, J.-P. & Oaknin, S. (1996).** Age-related changes in 2-[125I]-iodomelatonin binding sites in the brain of sea bass breams (*Sparus aurata,* L.). Fish Physiol. Biochem. 15: 401– 411.
- **Φανουράκη, Ε. (2003).** Ορμονικός έλεγχος του χρώματος του δερματος στο φαγκρί: επίδραση του χρώματος της δεξαμενής. Πτυχιακή διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- **Φανουράκη, Ε. (2005).** Αναπτυξη και αξιολόγηση νέων δεικτών εκτίμησης της καταπόνησης στο φαγκρί. Μεταπτυχιακή διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- **Fenwick, J.C. (1970).** Demonstration and effect of melatonin in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 14: 86-87.
- **Folmar, L.C. & Dickhoff, W.W. (1981).** Evaluation of some physiological parameters as predictive indices of smoltification. Aquaculture 23: 309–324.
- **Gaildrat, P., Ron, B. & Falcón, J. (1998).** Daily and circadian variations in 2-[125I]-iodomelatonin binding sites in the pike brain (*Esox lucius*), J. Neuroendocrinol. 10: 511– 517.

- **Gaildrat, P. & Falcón, J. (2000).** Melatonin receptors in the pituitary of a teleost fish: mRNA expression, 2-[125I]iodomelatonin binding, and cyclic AMP response. Neuroendocrinology 72: 57-66.
- **Gaildrat, P., Ron, B. & Falcon, J. (2002).** First cloning and functional characterization of a melatonin receptor in fish brain: a novel one? J. Pineal Res. 32: 74– 84.
- **Garcıá-Allegue R., Madrid J.A. & Sánchez-Vázquez F.J. (2001).** Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye: influence of seasonal photoperiod and water temperature. J. Pineal Res. 31: 68–75.
- **Gauer, F., Masson-Pévet, M., Skene, D.J., Vivien-Roels, B. & Pévet, P. (1993).** Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. Neuroendocrinology 57: 120–126.
- **Gern, W.A., Owens, D.W. & Ralph, C.L. (1978a).** Plasma melatonin in the trout: Day-night change demonstrated by radioimmunoassay. Gen. Comp. Endocrinol. 34: 453–458.
- **Gern, W.A., Owens, D.W. & Ralph, C.L. (1978b).** Persistence of the nyctohemeral rhythm of melatonin secretion in pinealectomised or optic tract-sectioned trout (*Salmo gairdneri*). J. Exp. Zool. 205: 371-376.
- **Gern, W.A., Dickhoff, W.W. & Folmar, L.C. (1984).** Increases in plasma melatonin titers accompanying seawater adaptation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). General and Comparative Endocrinology 55: 458-462.
- **Gern, W.A. & Greenhouse, S.S. (1988).** Examination of in vitro melatonin secretion from superfused trout (*Salmo gairdneri*) pineal organs maintained under diel illumination or continuous darkness. General and Comparative Endocrinology 71: 163-174.
- **Giesy, J. P., Versteeg, D. J. & Graney R. L. (1988).** A review of selected clinical indicators of stress-induced changes in aquatic organisms. In: Toxic Contaminants and Ecosystem Health: A Great Lakes Focus. Evans, M. S. (ed.).
- **Girard, S.S. & Milligan, C.L. (1992).** The metabolic fate of blood-borne lactate in winter flounder *Pseudopleu-ronectes americanus* during recovery from strenuous exercise. Physiol. Zool. 65: 1114–1134.
- **Gupta, B.B.P. & Premabati, Y. (2002).** Differential effects of melatonin on plasma levels of thyroxine and triiodothyronine levels in the air-breathing fish, *Clarias gariepinus,* during breeding and quiescent periods. General and Comparative Endocrinology 129: 146-151.
- **Hastings, M.H., Vance, G. & Maywood, E. (1989).** Some reflexions on the phylogeny and function of the pineal organ. Eperentia 45: 903-909.
- **Hinkle, Jr., L. E. (1987).** Stress and disease: the concept after fifty years. Social Science and Medicine 25: 561-566.
- **Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T. & Seno, S. (1974).** In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. J. Biol. Chem. 249: 1311-1313.

- **Iigo, M., Kezuka, H., Aida, K. & Hanyu, I. (1991)**. Circadian rhythms of melatonin secretion from superfused goldfish (*Carassius auratus*) pineal glands in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 152–158.
- **Iigo, M., Kezuka, H., Suzuki, T., Tabata, M. & Aida, K. (1994a).** Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. Neurosci. Biobehav. Rev. 18: 563-569.
- **Iigo, M., Kobayashi, M., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Hattory, A., Suzuki, T. & Aida, K. (1994b).** Characteristics, day–night changes, subcellular distribution and localization of melatonin binding sites in the goldfish brain, Brain Res. 644: 213– 220.
- **Iigo, M. & Aida, K. (1995).** Effects of season, temperature, and photoperiod on plasma melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus.* J. Pineal. Res. 18: 62–68.
- **Iigo, M., Furukawa, K., Hattori, A., Hara, M., Ohtani-Kaneko, R., Suzuki, T., Tabata, M. & Aida, K. (1995).** Effects of pinelalectomy and constant light exposure on day–night changes of melatonin binding sites in the goldfish brain, Neurosci. Lett. 197: 61– 64.
- **Iigo, M., Furukawa, K., Hattori, A., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T., Tabata, M., and Aida, K. (1997).** Ocular melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus.* J. Biol. Rhythms 12: 182–192.
- **Iigo, M., Furukawa, K., Tabata, M. & Aida, K. (2003).** Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain, Neurosci. Lett. 347: 49–52.
- **Καρκάνα, Μ. (2003).** Ο ρόλος περιβαλλοντικών και διαχειριστικών παραγόντων στη ρύθμιση του χρώματος του δέρματος του φαγκριού, *Pagrus pagrus*. Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.
- **Kaushik, S.J. & Oliva-Teles, A. (1985).** Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. Aquaculture 50: 89–101.
- **Kentouri, M., O'Neil, D., Divanach, P., Charalampakis, G. (1994).** A study of the quantitative water requirements of the red porgies *Pagrus pagrus* L. (Pisces: Sparidae), during early on-growing under self-feeding conditions. Aquaculture and Fisheries Managements 25: 741-752.
- **Kezuka, H., Furukawa, K., Aida, K. & Hanyu, I. (1988).** Daily cycles in plasmamelatonin levels under long or short photoperiod in the common carp, *Cyprinus carpio.* Gen. Comp. Endocrinol. 72: 296–302.
- **Kezuka, H., Aida, K. & Honey, I. (1989).** Melatonin secretion from goldfish pineal gland in organ culture. Gen. Comp. Endocrinol. 75: 217–221.
- **Kezuka, H., Iigo, M., Furukawa, K., Aida, K. & Hanyu, I. (1992).** Effects of photoperiod, pinealectomy and ophthalmectomy on circulating melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus.* Zool. Sci. 9: 1047–1053.
- **Κοκοκύρης, Λ. (1998).** Ο αναπαραγωγικός κύκλος και η φύση του ερμαφροδιτισμού του φαγκριού (*Pagrus pagrus*). Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, σελ.: 219.

- **Kokokiris, L., Mourot, B., Le Menn, F.M.K. & Fostier, A. (2000).** Endocrine changes during the annual reproductive cycle of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei, Sparidae). Fish Physiology and Biochemistry 23: 1-11.
- **Kokokiris, L., Le Menn, F., Kentouri, M., Kagara, M. & Fostier, A. (2001).** Seasonal cycle of gonadal development and serum levels of vitellogenin of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei, Sparidae). Mar Biol. 139: 549-559.
- **Kukkonen, S. & Laitinen, J. (1987).** Melatoniinierityksen vuodenaikaiset muutokset kirjolohella. *Suomen Ela¨inla¨a¨ka¨rilehti* 93: 359–361.
- **Kulczykowska, E., Warne, J.M. & Balment, R.J. (2001).** Day-night variations in plasma melatonin and arginine vasotocin concentrations in chronically cannulated flounder (*Platichthys flesus*). Comp. Bioch. Physiol. A 130: 827–834.
- **Kulczykowska, E. (2002).** A review of the multifunctional hormone melatonin and a new hypothesis involving osmoregulation. Reviews in Fish Biology and Fisheries 11: 321–330.
- **Λαμπροπούλου, Μ. (1995).** Οικολογία διατροφής βενθικών ψαριών στον κόλπο του Ηρακλείου. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, σελ.: 76-97.

  Lamers, A. E., Flik, J., Atsma, W. & Wendelaar Bonga, S. E. (1992). A role for diacetyl a-MSH in the control of cortisol release in the teleost Oreochromis mossambicus. J. Endocrinol. 135: 285–292.
- **Lermen, L.C., Lappe, R., Crestani, M., Vieira, P.V., Gioda, R.C., Schetinger, C.M.R., Baldisserotto, B., Moraes, G. & Morsch, V.M. (2004).** Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. Aquaculture 239: 497-507.
- **Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H. & Moore, W. (1958).** J. Am. Chem. Soc. 80.
- **Liebmann, P.M.,Wolfler, A., Felsner, P., Hofer, D. & Schauenstein K. (1997).** Melatonin and the immune system. Int. Arch. Allergy Immunol. 112: 203–211.
- **Liu, F., H. Yuan, K.S. Sugamori et al. (1995)**. Molecular and functional characterization of a partial cDNA encoding a novel chicken brain melatonin receptor. FEBS Lett. 374: 273-278.
- **Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K. & Reppert, S.M. (1997).** Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. Neuron 19: 91-102.
- **Lutterschmidt, D.I., Lutterschmidt, W.I. & Hutchison, V.H. (2003).** Melatonin and thermoregulation in ectothermic vertebrates: a review. Can. J. Zool. 81: 1-13.
- **Lynch, H.H., No, M. & Wurtman, R.J. (1977).** The adrenal medulla may mediate the increase in pineal melatonin synthesis induced by stress, but not that caused by exposure to darkness. J. Neural Transm. 40: 87-97.
- **Maanoch, C. S. & Hassler, W. W. (1978).** Synopsis of biological data on the red porgy, *Pagrus pagrus* (Linnaeus), FAO Fisheries Sinopsis, No 116 NOAA Technical Report, NMFS Circular412.

- **Maňanós, E.L., Zanuy, S. & Carrillo, M. (1997).** Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17β-estradiol and vitellogenin levels. Fish Physiol. Biochem. 16: 211–222.
- **Martin, M.T., Azpiroz, F. & Malagelada, J.R. (1998)**. Melatonin and the gastrointestitial tract. Therapie 53: 453–458.
- **Martinoli, M.G., Williams, L.M., Kah, O., Titchener, L.T. & Pelletier, G. (1991).** Distribution of central melatonin binding sites in the goldfish (*Carassius auratus*). Mol. Cell. Neurosci. 2: 78-85.
- **Masana, M.I. & Dubocovich, M.L. (2001).** Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. Science's STKE 107 PE39.
- **Masson-Pévet, M., Gauer, F. & Pévet, P. (1993).** Melatonin regulation of melatonin receptor density in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei. In: Y. Touitou, J. Arendt, P. Pe´vet (Eds.), Melatonin and the Pineal Gland, From Basic Science to Clinical Application, Excerpta Medica, Amsterdam pp. 99–104.
- **Max, M. & Menaker, M. (1992)**. Regulation of melatonin production by light, darkness, and temperature in the trout pineal. J.Comp. Physiol. *A* 170: 479–489.
- **Mazurais, D., Brierley, I. & Anglade, I. (1999).** Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. J. Comp. Neurol. 409: 313– 324.
- **Meek, J. & Nieuwenhuys, R. (1998).** Holosteans and teleosteans. In: The central nervous system of vertebrates. R. Nieuwenhuys, H.J. ten Donkelaar & C. Nicholson (eds), Springer, pp. 769-884.
- **Meissl, H. & Brandstätter, R. (1992).** Photoreceptive functions of the teleost pineal organ and their implications in biological rhythms. *In*: Ali, M.A. (ed.), *Rhythms in Fishes*. New York, Plenum Press, pp. 235–254.
- **Meissl, H., Martin, C. & Tabata, M. (1990).** Melatonin modulates the neural activity in the photosensory pineal organ of the trout: evidence for endocrine-neuronal interactions. Journal of Comparative Physiology A 167: 641-648.
- **Menaker, M., Moreira, L.F. & Tosini, G. (1997).** Evolution of circadian organization in vertebrates. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 30: 305-313.
- **Molina-Borja, M., Fálcon, J., Urquiola, E., & Oaknin, S. (1994).** Characterization of 2[125I]-iodomelatonin binding sites in the brain, intestine and gonad of the gilthead seabream (*Sparus aurata*). Pfluger's Arch. 427(Suppl. 1), R5.
- **Molina-Borja, M., Falcon, J., Urquiola, E. & Ravault, J.P. (1996).** Production of melatonin by the gilthead sea bream pineal: an *in vivo* and *in vitro* study. Fish Physiol. Biochem. 15: 413–419.
- **Morgan, P.J. & Mercer, J.G. (1994).** Control seasonality by melatonin. Proc Nutr Sot 53: 483-493.
- **Munck, A., Guyre, P. M. & Holbrook, N. J. (1984).** Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocrine Reviews **5**: 25-44.

- **Mylonas, C.C., Papadaki, M., Pavlidis, M. & Divanach, P. (2004).** Evaluation of the egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. Aquaculture 232: 637-649.
- **Nelson, R.J. & Demas, G.E. (1997).** Role of melatonin in mediating seasonal energetics and immunologic adaptations. Brain Res. Bull. 44: 423–430.
- **Nosjean, O., Ferros, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchere, J.L., Delagrange, P., Canet, E. & Boutin, J.A. (2000).** Identification of the melatonin binding site MT3 as the quinone reductase 2. J. Biol. Chem. 275: 31311– 31317.
- **Ottolenghi, C., Puviani, A.C., Ricci, D. & Morsiani, E. (1995).** The effect of high temperature on blood glucose level in to two teleosts fish (*Ictalurus melas* and *Ictalurus punctatus*). Comparative Biochemistry and Physiology 111A: 229-235.
- **Owen, D.W., Gern, W.A. & Ralph, C.L. (1978).** Non-relatioship between plasma melatonin and nackground adaption in the trout (*Salmo gairdneri*). Gen. Comp. Endocrinol. 34: 459-467.
- **Pajuelo, J. G. & Lorenzo, J. M. (1996).** www.fishbase.org
- **Pang, C.S., Ali, M.A., Reddy, P.K., Leatherland, J.F., Brown, G.M. & Pang, S.F. (1994).** 2-[125I]-Iodomelatonin binding sites in the brain of four salmonids. Biol. Signals 3: 230-238.
- **Pavlidis, M., Berry, M., Divanach, P. & Kentouri, M. (1997).** Diel pattern of haematocrit, serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormones in sea bass and sea bream. Aquaculture International 5: 237-247.
- **Pavlidis, M., Greenwood, L., Paalavuo, M., Molsa, H. & Laitinen, J.T. (1999a).** The effect of photoperiod on diel rhythms in serum melatonin, cortisol, glucose, and electrolytes in the common dentex, *Dentex dentex*. Gen. Comp. Endocrinol. 113: 240–250.
- **Pavlidis, M., Paspatis, M., Koistinen, M., Paavola, T., Divanach, P. & Kentouri, M. (1999b).** Diel rhythms of serum metabolites and thyroid hormones in red porgy held in different photoperiod regimes. Aquaculture International 7: 29-44.
- **Petit, L., Lacroix, I., De Coppet, P., Strosberg, A.D. & Jockers, R. (1999).** Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3¢-5¢-monophosphate pathway. Biochem. Pharmacol. 58: 633-639.
- **Pickering, A. D. & Pottinger, T. G. (1989).** Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma Cortisol. Fish Physiology and Biochemistry 7: 253-258.
- **Porter, M.J.R., Stefansson, S.O., Nyhammer, G., Karlsen, Ø., Norberg, B. & Bromage, N.R. (2000).** Environmental influences on melatonin secretion in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and their relevance to commercial culture. Fish Physiology and Biochemistry 23: 191–200.

- **Randall, C. F., Trush, M. & Bromage, N. (1991).** Absence of an endogenous component regulating melatonin secretion in the rainbow trout. *In* ''Advances in Pineal Research: 5'' (J. Arendt and P. Pe´vet, Eds.), pp. 279–281. Libbey, London.
- **Randall, C.F., Bromage, N.R., Thorpe, J.E., Miles, M.S., and Muir, J.S. (1995).** Melatonin rhythms in Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained under natural and out-of-phase photoperiods. Gen. Comp. Endocrinol. 98: 73–86.
- **Reed, B.L. (1968)**. The control of circadian pigment changes in the penicil fish: A proposed role for melatonin. *Life Sci. Part II* **7**: 961–973.
- **Reiter, R.J. (1991).** Melatonin: the chemical expression of darkness. Mol. Cell Endocrinology 79: C153-158.
- **Reiter, R.J. (1993).** The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experientia 49: 654–664.
- **Reiter, R.J. (1995).** Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxydant protection and neuroendocrine regulation. Frontiers in Neuroendocrinol. 16: 383–415.
- **Reiter , R.J., Oh, H.-S. & Fujimori O. (1996)**. Melatonin. Its intracellular and genomic actions. Trends Endocrinol. Metab. 7: 22–27.
- **Reiter, R.J., Tan, D., Osuna, C. & Gitto, E. (2000).** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. J. Biomed. Sci. 7: 444–458.
- **Reiter, R.J. (2003).** Melatonin: clinical relevance. Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism 17(2): 273-285.
- **Reppert, S.M., Weaver, D.R. & Ebisawa, T. (1994).** Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. Neuron 13: 1177-1185.
- **Reppert, S.M., Weaver, D.R., Cassone, V.M., Godson, C. & Kolakowski, L.F.JR. (1995).** Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. Neuron 15: 1003-1015.
- **Reppert, S.M., Weaver, D.R. & Godson, C. (1996).** Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. Trends Pharmacol. Sci. 17: 100–102.
- **Reppert, S.M. (1997).** Melatonin receptors: Molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. J. Biol. Rhythms 12: 528–531.
- **Rotllant, J., Pavlidis, M., Kentouri, M., Abad, M. E., Tort, L. (1997).** Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. Aquaculture 156: 279-290.
- **Rotllant, J., Tort, L., Montero, D., Pavlidis, M., Martinez, M., Wendelaar Bonga, S. E. & Balm, P. H. M. (2003).** Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. Aquaculture 62385: 1-11.
- **Sánchez-Vázquez, F.J., Madrid J.A. & Zamora, S. (1995).** Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. : dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. J Biol Rhythms 10: 256-266.

- **Sánchez-Vázquez, F.J., Iigo, M., Madrid J.A., Zamora, S. & Tabata, M. (1997).** Daily cycles in plasma and ocular melatonin in demand-fed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. J Comp Physiol B 167: 409-415.
- **Sánchez-Vázquez, F.J., Azzaydi, M., Marti´nez, F.J., Zamora, S. & Madrid, J.A. (1998)**. Annual rhythms of demand feeding activity in sea bass: Evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. Chronobiol. Int. 15: 607–622.
- **Schreck, C. B., Bradford, C. S., Fitzpatrick, M. S. & Patiňo, R. (1989).** Regulation of the interrenal of fishes: non-classical control mechanisms. Fish Physiol. Biochem. **7**: 259–265.
- **Schwalme, K. & Mackay, W.C. (1985).** The influence of exercise-handling stress on blood lactate, acid-base, and . plasma glucose status of northern pike *Esox lucius* L. . Can. J. Zool. 63: 1125–1129.
- **Selye, H. (1950).** Stress and General adaptation Syndrome. British Medical Journal **1(4667)**: 1383-1392.
- **Selye, H. (1973).** The evolution of the stress concept. American Scientist **61**: 692-699.
- **Stankov, B., Capsoni, S., Lucini, V., Fauteck, J., Gatti, S., Gridelli, B., Biella, G., Cozzi, B. & Fraschini, F. (1993).** Autoradiographic localization of putative melatonin receptors in the brains of twoOldWorld primates: *Cercopithecus aethiops* and *Papio*. Neuroscience 52: 459–468.
- **Strange, R.J. (1980).** Acclimation temperature influences cortisol and glucose concentrations in stressed channel catfish. Trans. Am. Fish. Soc., 109: 298-303.
- **Sun, L.T., Chen, G.R. & Chang, C.F. (1992).** The physiological responses of tilapia exposed to low temperatures. Journal of Thermal Biology 17: 149-153.
- **Sun, L.T., Chen, G.R. & Chang, C.F. (1995).** Acute responses of blood parameters and comatose effects in salt-acclimated tilapias exposed to low temperatures. Journal of Thermal Biology 20: 299-306.
- **Szisch, V. (2001).** Εκτίμηση του ρόλου του μήκους κύματος στην αύξηση, την ένταση (στρες) και το χρώμα του δέρματος του φαγκριού, *Pagrus pagrus*. Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.
- **Szisch, V., van der Salm, A. L., Wendelaar Bonga, S. E. & Pavlidis, M. (2002).** Physiological colour changes in the red porgy, *Pagrus pagrus*, following adaptation to blue lighting spectrum. Fish Physiology and Biochemistry 27: 1–8.
- **Tarlow, E.M., Hau, M., David J., Anderson, D.J. & Wikelski, M. (2003).** Diel changes in plasma melatonin and corticosterone concentrations in tropical Nazca boobies (*Sula granti*) in relation to moon phase and age. Gen. Comp. Endocrinol. 133: 297-304.
- **Tsimenides, N., Tserpes, G., Machias, A. & Kallianiotis, A. (1991).** www.fishbase.org
- **Turner, J.D., Wood, C.M. & Clark, D. (1983a).** Lactate and proton dynamics in the rainbow trout *Salmo gairdner*i. J. Exp. Biol. 104: 247–268.
- **Turner, J.D., Wood, C.M. & Hobe, H. (1983b).** Physiological consequences of severe exercise in the inactive benthic flathead sole *Hippoglossides elassodo*n: a

comparison with the active pelagic rainbow trout *Salmo gairdner*i. J. Exp. Biol. 104: 269–288.

- **Underwood, H. (1985).** Pineal melatonin rhythms in the lizard *Anolis carolinensis*: effects of light and temperature cycles. J.CompPhysiol. A 157: 57-65.
- **Underwood, H. (1989).** The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. Experentia 45: 914-922.
- **Valtonen, M., Laitinen, J. T. & Eriksson, L. (1993).** Renal melatonin excretion in sheep is enhanced by water diuresis. J. Endocrinol. 138: 445–450.
- **Vanecek, J. (1998).** Cellular mechanisms of melatonin action. Physiol. Rev. 78: 687– 721.
- **Vassilopoulou, V. & Papaconstantinou, C. (1992).** Age, growth and mortality of the red porgy *Pagrus pagrus* in the eastern Mediterranean sea (Dodecanese, Greece). Vie Milieu 42 (1): 51 – 55.
- **Vernadakis, A.J., Bemis, W.E. & Bittman, E.L. (1998).** Localization and partial characterization of melatonin receptors in amphioxus, hagfish, lamprey, and skate, Gen. Comp. Endocrinol. 110: 67–78.
- **Weaver, D.R., Liu, C. & Reppert, S.M. (1996).** Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. Mol. Endocrinol. 10: 1478-1487.
- **Webb, S.M. & Pulg-Domingo, M. (1995).** Role of melatonin in health and disease. Clin. Endocrinol. 42: 221–234.
- **Witt-Enderby, P.A., Bennett, J., Jarzynka, M.J., Firestine, S. & Melan, M.A. (2003).** Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms, Life Sci. 72: 2183– 2198.
- **Wurtman, R.J. & Ozaki, Y. (1978).** Physiological control of melatonin synthesis and secretion: mechanisms generating rhythms in melatonin, methoxytryptophol, and arginine vasotocin levels and effects on the pineal of endogenous catecholamines, the estrous cycle, and environmental lighting. Journal of Neural Transmission 13: 59-70.
- **Young, G. & Lin, R. J. (1988).** Response of the interrenal to adrenocorticotropic hormone after short-term thyroxine treatment of coho salmon (Oncorhynchus kisutch). J. Exp. Zool. 245: 53– 58.
- **Yu, H.S. & Reiter, R.J. (1993).** Melatonin. Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Application. CRC Press, Boca Raton, FL.
- **Yuan, H. & Pang, S.F. (1990).** [125I]Melatonin binding sites in membrane preparation of quail brain: characteristics and diurnal variations. Acta Endocrinol. 122: 633–639.
- **Yuan, H. & Pang, S.F. (1991).** [125I]iodomelatonin binding sites in the pigeon brain: binding characteristics, regional distribution and diurnal variations, J. Endocrinol. 128: 475– 482.
- **Yuan, H. & Pang, S.F. (1992).** [125I]iodomelatonin binding sites in the chicken brain: diurnal variation and effects of melatonin injection or pinealectomy, Biol. Signals 1: 208– 218.

- **Zachmann, A., Knijff, S.C.M., Bolliet, V. & Ali, M.A. (1991).** Effects of temperature cycles and photoperiod on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of a teleost (Catostomus commersoni) in vitro. Neuro-Endocrinol. Lett. 13: 325– 330.
- **Zachmann, A., Ali, M.A. & Falcon, J. (1992a)**. Melatonin and its effects in fishes: An overview. *In*: Ali, M.A. (ed.), *Rhythms in fishes*. NATO ASI Series, Series A: Life Sciences Vol. 236. New York: Plenum, pp. 149–163.
- **Zachmann, A., Falcon, J., Knijff, S.C.M., Bolliet, V. & Ali, M.A. (1992b).** Effects of photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*) in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol*. 86: 26–33.
- **Zachmann, A., Knijff, S. C. M., Ali, M. A., and Anctil, M. (1992c).** Effects of photoperiod and different intensities of light exposure on melatonin levels in the blood, pineal organ, and retina of the brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). Can. J. Zool. 70: 25–29.
- **Zanuy, S., Carrillo, M. & Ruiz, F. (1986).** Delayed gametogenesis and spawning of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) kept under different photoperiod and temperature regimes. Fish Physiol. Biochem. 2: 53–63.