ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μεταβολικές επιπτώσεις της οξείας καταπόνησης στο λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*, και τον κρανιό, *Argyrosomus regius*, σε διαφορετικές εποχές και δοκιμασία καταστολής της κορτιζόλης με δεξαμεθαζόνη στο λαβράκι

Σαμαράς Αθανάσιος

Ηράκλειο 2012

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF BIOLOGY
JOINT POSTGRADUATE PROGRAM
«ENVIRONMENTAL BIOLOGY – MANAGEMENT OF TERRESTRIAL AND MARINE RESOURCES»

Master of Science Thesis

Metabolic effects of acute stress in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and meagre, *Argyrosomus regius*, in different seasons and dexamethasone suppression test in European sea bass

Samaras Athanasios

Heraklion 2012

Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων Καθηγητής:

Μ. Παυλίδης (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Γ. Κουμουνδούρος (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Ν. Παπανδρουλάκης (Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών ΕΛΚΕΘΕ)

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2011-2012 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Περιβαλλοντική Βιολογία – Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρωτίστως τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μιχάλη Παυλίδη για τη βοήθεια, την οργάνωση, τις συμβουλές και την καθοδήγησή του σε ότι αφορά τη διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης, τον Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. κ. Νίκο Παπανδρουλάκη, για τη βοήθεια, την οργάνωση αλλά και την παραχώρηση ζώων στο μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων καθώς και για το σχολιασμό της παρούσας εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Κουμουνδούρο για τα εύστοχα σχόλιά του στο κείμενο της εργασίας. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Κ. Λύκα για τις συμβουλές τις σχετικά με τη στατιστική ανάλυση.

Μεγάλη ήταν η βοήθεια και από το προσωπικό του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στους ιχθυοκλωβούς της Σούδας, του Μιχάλη Ασδέρη και Χρήστου Αγγελή τους οποίους και ευχαριστώ θερμά, καθώς επίσης και την κ. Κ. Κοκκάρη για τον προσδιορισμό της οσμωτικής πίεσης σε ορισμένα πειράματα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στα παιδιά από το εργαστήριο, συγκεκριμένα τους Γ. Σκουραδάκη, Α. Τσαλαφούτα, Α. Θεοδωρίδη, Κ. Κουμάκη και Μ. Κανελλοπούλου, τόσο για τη βοήθεια με τα πειράματα και τις αναλύσεις όσο και για τη δημιουργία ευχάριστου κλίματος στο εργαστήριο.

Κατά το διάστημα της εκπόνησης της διπλωματικής αυτής εργασίας υπήρξα υπότροφος του Κοινωφελούς Ιδρύματος «Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης» το οποίο και ευχαριστώ θερμά.

Περιεχόμενα

Περίληψη 6
Abstract 7
1 Εισαγωγή 9
1.1 Η έννοια της καταπόνησης 9
1.2 Απόκριση στην καταπόνηση 10
1.3 Επίδραση θερμοκρασίας και εποχής στην απόκριση στην καταπόνηση 12
1.4 Είδη μελέτης 13
1.5 Διαταραχές του άξονα Υποθαλάμου – Υπόφυσης – Επινεφριδίων (HPA axis) 14
1.6 Δοκιμασία δεξαμεθαζόνης 15
1.7 Σκοπός εργασίας 16
2 Υλικά και Μέθοδοι 17
2.1 Κινητική του γλυκογόνου έπειτα από οξεία καταπόνηση σε λαβράκι και κρανιό.. 17
2.1.1 Ψάρια και συνθήκες εκτροφής 17
2.1.2 Δειγματοληψία 18
2.1.3 Αναλυτικοί προσδιορισμοί 18
2.1.4 Στατιστική ανάλυση 19
2.2 Μεταβολικές επιπτώσεις οξείας καταπόνησης σε λαβράκι και κρανιό 20
2.2.1 Ψάρια και συνθήκες εκτροφής 20
2.2.2 Δειγματοληψία 21
2.2.3 Αναλυτικοί προσδιορισμοί 21
2.2.4 Στατιστική ανάλυση 22
2.3 Δοκιμασία Δεξαμεθαζόνης στο λαβράκι 23
2.3.1 Ψάρια και συνθήκες εκτροφής 23
2.3.2 Δειγματοληψία 23
2.3.3 Αναλυτικοί προσδιορισμοί 24
2.3.4 Στατιστική ανάλυση 25
3 Αποτελέσματα 26
3.1 Κινητική του γλυκογόνου έπειτα από οξεία καταπόνηση σε λαβράκι και κρανιό.. 26
3.2 Μεταβολικές επιπτώσεις οξείας καταπόνησης σε λαβράκι και κρανιό 34
3.3 Δοκιμασία Δεξαμεθαζόνης στο λαβράκι 47
4 Συζήτηση 52
5 Βιβλιογραφία 75

Περίληψη

Η απόκριση των ιχθύων στην καταπόνηση (stress) εμφανίζει διαφορές τόσο μεταξύ των ειδών, όσο και μεταξύ διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών μέσα στο ίδιο είδος. Στο πλαίσιο αυτό επιχειρήθηκε να μελετηθεί η επίδραση της οξείας καταπόνησης σε δύο τελεόστεους ιχθείς, το λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* και τον κρανιό, *Argyrosomus regius*, είδη που έχουν παρόμοια οικολογικά χαρακτηριστικά, όντας ανθεκτικά σε μεγάλα εύρη αλατότητας, θερμοκρασίας και οξυγόνου, αλλά εμφανίζουν έντονες διαφορές τόσο στις τιμές ηρεμίας όσο και στις μέγιστες συγκεντρώσεις πλάσματος σε βασικούς δείκτες καταπόνησης, όπως η κορτιζόλη, η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ. Η υπόθεση εργασίας ήταν ότι οι διαφορές που παρατηρούνται σχετίζονται με μεταβολικές διαφορές μεταξύ των δυο ειδών.

Η μελέτη αυτή, που έγινε με ψάρια που προέρχονταν από ιχθυοκλωβούς, πραγματοποιήθηκε σε τρεις διαφορετικές εποχές όπου επικρατούσαν διαφορετικές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες, ενώ επίσης διέφερε η φυσιολογική κατάσταση των ατόμων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη της κινητικής της απόκρισης της καταπόνησης στα δύο αυτά είδη, σε συνθήκες εργαστηριακής εκτροφής, με εστίαση στα αποθέματα γλυκογόνου του ήπατος και του μυός καθώς και στις μεταβολές του pH του αίματος και των μυών.

Ακόμα, καθώς το λαβράκι εμφανίζει πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κορτιζόλης, τόσο σε κατάσταση ηρεμίας, όσο και μετά την καταπόνηση, επιχειρήθηκε η μελέτη της λειτουργικότητας του άξονα Υποθαλάμου – Υπόφυσης - Μεσόνεφρου μέσω της δοκιμασίας με χορήγηση δεξαμεθαζόνης, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως σε θηλαστικά, τόσο για ερευνητικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το λαβράκι εμφάνιζε υψηλότερα ενεργειακά αποθέματα υδατανθράκων συγκριτικά με τον κρανιό, αλλά και μεγαλύτερη ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου στους ιστούς. Ακόμα, φάνηκε πως αξιοποιούσε σε μεγαλύτερο βαθμό τον αναερόβιο μεταβολισμό. Επιπλέον, είχε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης, σε όλους τους χειρισμούς αλλά και σε όλες τις θερμοκρασίες σε σχέση με τον κρανιό.

Μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών το πρότυπο της απόκρισης στην καταπόνηση ήταν το ίδιο για κάποια από τα αιματολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά που μελετήθηκαν, ενώ διέφερε για κάποια άλλα.

Τέλος, η δεξαμεθαζόνη προκάλεσε καταστολή των επιπέδων της κορτιζόλης στο 25%-50% της αρχικής συγκέντρωσης, ανάλογα με τη δόση, 24 h μετά τη χορήγησή της. Αντίθετα, 4 h μετά τη χορήγηση δεν κατάφερε να μειώσει τα πιθανώς ήδη αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης. Επιπλέον, οδήγησε σε ελαφριά υπεργλυκαιμία, αλλά και αλκάλωση του αίματος και μείωση του αιματοκρίτη.

Abstract

The stress response in fish varies between different species, as well as between different environmental conditions within the same species. In this context, the stress response of two teleost species, European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and meagre, *Argyrosomus regius*, species that share some common ecological features, such as tolerance to changes in salinity, temperature and oxygen levels, but differ in the baseline and peak plasma values of some commonly used stress indicators, such as cortisol, glucose and lactate concentration. The working hypothesis was that the observed differences were related to metabolic discrepancies between these two species.

Fish reared in net pen sea cages were used, with samplings taking place in three different seasons, with different sea temperature and differences in the physiological condition of the fish. Furthermore, a study of the kinetics of the stress response was conducted in these two species, focusing in the changes in the glycogen concentration of liver and muscle and the alterations of blood and muscle pH levels.

Moreover, since sea bass shows high baseline concentrations of cortisol, as well as intense stress response, the study of the functionality of the Hypothalamus-Pituitary-Interrenal (HPI) axis was conducted via the dexamethasone suppression test, which is widely used in mammals for research and diagnostic reasons.

The results showed that sea bass had higher carbohydrate energy reserves than meagre, as well as higher capacity for oxygen transport to the tissues. It also utilized the anaerobic metabolism in a higher degree. Furthermore, sea bass had higher cortisol concentration than meagre, both in control and stress fish, and in every environmental temperature.

Between the different temperatures the pattern of the stress response was the same for some of the studied hematological and biochemical features, while it differed in some other.

Dexamethasone suppressed cortisol levels to 25%-50% of the initial concentration, depending on the dose, 24 h after the injection. In contrast, it wasn't able to suppress cortisol 4 h after the injection, probably due to the already increased, by the handling, levels of the hormone. Dexamethasone also led to a slight hyperglycemia, as well as blood alkalosis and decreased levels of haematocrit.

1 Εισαγωγή

1.1 Η έννοια της καταπόνησης

Η ιχθυοκαλλιέργεια είναι μία συνεχώς αναπτυσσόμενη βιομηχανία, η ταχύτερη στον τομέα της παραγωγής τροφίμων (FAO 2002). Για την αύξηση της παραγωγής η πιο κοινή πρακτική είναι η αύξηση του αριθμού των ψαριών ανά μονάδα καλλιέργειας, καθώς επίσης και η αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης μέσω γενετικής βελτίωσης και παροχής καλύτερης ποιότητας τροφής.

Όλες αυτές οι νέες συνθήκες που καλούνται να αντιμετωπίσουν τα ζώα στις υδατοκαλλιέργειες είναι δυνητικοί παράγοντες καταπόνησης (stressors). Ως καταπόνηση μπορεί να προσδιοριστεί η κατάσταση που παράγεται από περιβαλλοντικούς ή άλλους παράγοντες, η οποία εκτείνει τις προσαρμοστικές αποκρίσεις ενός ζώου πέρα από τα κανονικά όρια ή διαταράσσει την κανονική λειτουργία σε τέτοιο βαθμό που και στις δύο περιπτώσεις οι πιθανότητες επιβίωσης μειώνονται σημαντικά (Brett 1958). Βέβαια, πιο πρόσφατοι ορισμοί θεωρούν την καταπόνηση ως την κατάσταση όπου απειλείται η ομοιόσταση και η οποία αποκαθίσταται μέσω πολύπλοκων προσαρμοστικών αποκρίσεων (Chrousos 1998).

Από τον τελευταίο ορισμό φαίνεται πως η καταπόνηση δεν είναι απαραίτητο να είναι επιβλαβής για τον οργανισμό, αλλά αποτελεί ένα φυσιολογικό προσαρμοστικό μηχανισμό που επιτρέπει στους ιχθύες να αντιμετωπίσουν έναν παράγοντα καταπόνησης, διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο την ομοιόστασή τους (Barton 2002). Έτσι, φαίνεται πως η απόκριση των ψαριών στην καταπόνηση έχει τόσο προσαρμοστικές όσο και επιβλαβείς συνιστώσες (Barton & Iwama 1991). Παρόλο, λοιπόν, που τα ψάρια μπορούν να αποκρίνονται με φυσιολογικούς μηχανισμούς στην καταπόνηση, όταν οι μηχανισμοί αυτοί εξωθούνται εκτός των ορίων τους οι αποκρίσεις γίνονται επιζήμιες για το ζώο. Έτσι, ο Selye (1985, μέσω Martinez-Porchas *et al.*, 2009) διέκρινε δύο φάσεις της καταπόνησης, την «ευκαταπόνηση» (eustress) και την «αντικαταπόνηση» (distress). Με την πρώτη περιγράφεται η απόκριση του οργανισμού σε καταστάσεις που προκαλούν φυσιολογικές αλλαγές οι οποίες βελτιστοποιούν τη βιολογική του απόδοση, ενώ ως αντικαταπόνηση αναφέρονται οι φυσιολογικές αλλαγές που μπορεί να βλάψουν την ακεραιότητά του οργανισμού.

Στην εντατική ιχθυοκαλλιέργεια υπάρχουν μία σειρά από κοινές πρακτικές που θεωρείται ότι προκαλούν καταπόνηση. Ως σημαντικότερες από αυτές θεωρούνται η ποιότητα του νερού, οι διαχειριστικές πρακτικές (πυκνότητα εκτροφής, χειρισμοί όπως η μεταφορά και η σύλληψη κ.α.), αλλά και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιχθύων, καθώς επίσης και αυτών με παθογόνους μικροοργανισμούς.

1.2 Απόκριση στην καταπόνηση

Όταν κάποιος παράγοντας καταπόνησης διεγείρει έναν οργανισμό προκαλεί ένα σύνολο αποκρίσεων. Το πρώτο βήμα για την απόκριση στην καταπόνηση είναι η αντίληψη του ερεθίσματος από το κεντρικό νευρικό σύστημα, το οποίο στη συνέχεια οργανώνει τις αντιδράσεις του οργανισμού. Η πρωτογενής απόκριση αφορά στη δραστηριοποίηση κέντρων του εγκεφάλου, που έχουν ως αποτέλεσμα τη μαζική απελευθέρωση των βασικών ορμονών της καταπόνησης, των κατεχολαμινών και των κορτικοστεροειδών, ενώ η δευτερογενής απόκριση σχετίζεται με φυσιολογικές προσαρμογές, όπως ο μεταβολισμός και η αναπνοή. Τέλος, η τριτογενής απόκριση αφορά σε αλλαγές στο επίπεδο ολόκληρου του ζώου, όπως η κολυμβητική συμπεριφορά και η ανάπτυξη (Barton 2002).

Η ***πρωτογενής (ενδοκρινική) απόκριση*** περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των αξόνων Υποθάλαμος – Συμπαθητικό Νευρικό Σύστημα – Χρωμιόφιλος Ιστός (chromaffin cells) και Υποθάλαμος – Υπόφυση – Μεσόνεφρος για την έκκριση των κατεχολαμινών και της κορτιζόλης αντίστοιχα. Για την απελευθέρωση κατεχολαμινών (επινεφρίνης και νορεπινεφρίνης) διεγείρεται ο χρωμιόφιλος ιστός του νεφρού μέσω συμπαθητικών νευρικών ινών (Reid *et al.*, 1998). Η αύξηση της συγκέντρωσης αυτών των ορμονών είναι ταχεία μετά την καταπόνηση καθώς υπάρχουν αποθέματα, κυρίως νορεπινεφρίνης, αποθηκευμένα στα χρωμιόφιλα κύτταρα (Reid *et al.*, 1998; Barton 2002). Εκτός από τη γρήγορη αύξηση, τα επίπεδα των κατεχολαμινών εμφανίζουν ταχεία επαναφορά στις αρχικές τιμές σε σχέση με την κορτιζόλη (Milligan 1996; Wendelaar Bonga 1997).

Η δράση των κατεχολαμινών είναι σε μεγάλο βαθμό μεταβολική. Έτσι, έχει φανεί ότι προκαλούν υπεργλυκαιμία στα ψάρια, κυρίως μέσω της ενεργοποίησης της ηπατικής γλυκογενόλυσης και σε μικρότερο βαθμό της ηπατικής γλυκονεογένεσης (Wright *et al.*, 1989; Wendelaar Bonga 1997; Fabbri *et al.*, 1998). Επίσης, θεωρείται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο και στη λιπόλυση, ο οποίος όμως με τα μέχρι

στιγμής δεδομένα δεν είναι ξεκάθαρος. Ακόμα, φαίνεται πως η δράση τους ελαττώνει τις αρνητικές επιπτώσεις της καταπόνησης στην ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου αυξάνοντας τον αιματοκρίτη και επαναφέροντας ταχύτερα το pH των ερυθρών κυττάρων στα αρχικά επίπεδα (Milligan & Wood 1987; Wendelaar Bonga 1997).

Η απελευθέρωση της κορτιζόλης στο κυκλοφορικό μετά την καταπόνηση χρειάζεται περισσότερο χρόνο συγκριτικά με τις κατεχολαμίνες. Αρχικά, εκλύεται από τον υποθάλαμο η κορτικοτροπίνη (CRH), η οποία επάγει την έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) από την υπόφυση (Mommsen *et al.,* 1999; Barton 2002). Αυτή, με τη σειρά της, ενεργοποιεί τη σύνθεση και απελευθέρωση κορτικοστεροειδών από το μεσόνεφρο των ψαριών. Το κύριο κορτικοστεροειδές των τελεόστεων ιχθύων είναι η κορτιζόλη (Barton 2002; Pankhurst 2011). Ο έλεγχος της έκκρισης κορτιζόλης γίνεται μέσω αρνητικού αναδραστικού μηχανισμού σε όλα τα στάδια του HPI άξονα (Wendelaar Bonga 1997).

Η κορτιζόλη προκαλεί επίσης μεταβολικές αλλαγές στον οργανισμό. Όπως και οι κατεχολαμίνες, θεωρείται ότι επάγει αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκόζης του πλάσματος, επιδρώντας όμως στη γλυκονεογένεση και όχι στη γλυκογενόλυση (Van der Boon *et al.,* 1991; Vijayan *et al.,* 1993; Wendelaar Bonga 1997; Mommsen *et al.,* 1999). Οι μεταβολές που προκαλεί στο γλυκογόνο του ήπατος δεν είναι ξεκάθαρες, καθώς έχουν προταθεί όλες οι πιθανές περιπτώσεις, δηλαδή η μείωση της συγκέντρωσης, η αύξηση αλλά και η μη μεταβολή (Mommsen *et al.,* 1999). Ακόμα, επιδρά αρνητικά στη σύνθεση του γλυκογόνου στο μυ μετά από εξαντλητική άσκηση, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό το χρόνο ανάκτησης των ενεργειακών αποθεμάτων του ζώου (Milligan 2003). Επιπλέον, η κορτιζόλη έχει πρωτεολυτική αλλά και λιπολυτική δράση, αυξάνοντας έτσι τόσο τα ελεύθερα αμινοξέα όσο και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα στο πλάσμα (Van der Boon *et al.* 1991; Wendelaar Bonga 1997; Mommsen *et al.,* 1999). Τέλος, έχει σημαντικό ρόλο στην οσμωρύθμιση και στην ισορροπία των ιόντων στο αίμα του οργανισμού (Wendelaar Bonga 1997; Mommsen *et al.,* 1999). Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της αύξησης που προκαλεί σε κύτταρα υπεύθυνα για την απομάκρυνση χλωρίου και νατρίου από τον οργανισμό αλλά και στη διέγερση του ενζύμου Na^+/K^+-ATPase στα βράγχια.

Οι ορμόνες που αναφέρθηκαν ενεργοποιούν, όπως φάνηκε, τις μεταβολές που αποτελούν τη ***δευτερογενή απόκριση***. Αυτή περιλαμβάνει μεταβολικές, αιματολογικές, οσμωρυθμιστικές και ανοσολογικές αποκρίσεις (Barton 2002). Οι μεταβολικές αποκρίσεις περιλαμβάνουν κυρίως αύξηση στη συγκέντρωση της

γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος του αίματος (Woo & Wu 1984; Roche & Boge 1996; Van der Salm *et al.,* 2006; Fanouraki *et al.,* 2007; Fanouraki *et al.,* 2011), επιδράσεις στα αποθέματα του ηπατικού γλυκογόνου, όπως αύξηση (Butler *et al.,* 1968), μείωση (Woo & Wu 1984; Dobson & Hochachka 1987; Pavlidis *et al.,* 2003) ή μη μεταβολή (Pagnotta & Milligan 1991; Milligan & Girard 1993), καθώς και μείωση στα επίπεδα του μυϊκού γλυκογόνου (Woo & Wu 1984; Pagnotta & Milligan 1991). Στο αίμα παρατηρείται αύξηση στην τιμή του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης (Wang *et al.,* 1994; Roche & Boge 1996), ενώ αυξάνεται και η οσμωτική πίεση (Marino *et al.,* 2001; Φανουράκη 2010). Επιπλέον, τροποποιούνται λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος με αύξηση της δραστηριότητας της λυσοζύμης αλλά και την παραγωγή αντισωμάτων (Barton 2002).

Τέλος, η ***τριτογενής απόκριση*** αφορά στις αλλαγές σε επίπεδο ολόκληρου του ζώου, όπως η κολυμβητική συμπεριφορά (Juell & Fosseidengen 2004), η ανάπτυξή του, η αντίσταση στις ασθένειες και η συμπεριφορά (Barton 2002).

1.3 Επίδραση θερμοκρασίας και εποχής στην απόκριση στην καταπόνηση

Οι περιβαλλοντικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του έτους, αλλά και οι μεταβολές στη φυσιολογική κατάσταση που βρίσκονται τα ψάρια στο διάστημα αυτό, προκαλούν έναν ετήσιο κύκλο σε κάποια βιοχημικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά τους (Gutierrez *et al.,* 1987; Kavadias *et al.,* 2003, Lupi *et al.,* 2005; Maricchiolo *et al.,* 2011). Από τις αλλαγές επηρεάζεται τόσο η ικανότητα όσο και η ένταση της απόκρισης στην καταπόνηση.

Έτσι, όσον αφορά στην απόκριση της κορτιζόλης, αυτή φαίνεται να είναι ταχύτερη με την αύξηση της θερμοκρασίας, αλλά και να εμφανίζει γρηγορότερο ρυθμό επαναφοράς στα αρχικά επίπεδα (Barton & Schreck 1987; Davis & Parker 1990; Lankford *et al.,* 2003; King *et al.,* 2006). Επιπλέον, παρόμοια με την κορτιζόλη είναι και η απόκριση της γλυκόζης, με ταχύτερη αύξηση αλλά και επαναφορά στις υψηλότερες θερμοκρασίες. Η απόκριση του γαλακτικού οξέος φαίνεται να μην επηρεάζεται από τη θερμοκρασία (Methling *et al.,* 2010), ενώ η αξιοποίηση του ηπατικού γλυκογόνου μετά την καταπόνηση είναι αυξημένη στις μεγαλύτερες θερμοκρασίες (Barton & Schreck 1987).

1.4 Είδη μελέτης

Παρ' όλο που το πρότυπο των φυσιολογικών αλλαγών ως απόκριση στην καταπόνηση είναι παρόμοιο μεταξύ των διαφορετικών ειδών τελεόστεων ιχθύων, εντοπίζονται διαφορές στην ένταση με την οποία κάθε είδος αποκρίνεται (Pagnotta & Milligan 1991; Barton 2002; Conte 2004; Fanouraki *et al.* 2011). Έτσι, έχουν παρατηρηθεί διαφορές μεταξύ ειδών τόσο στην ένταση, όσο και στο χρονισμό και τη διάρκεια της απόκρισης.

Έντονες διαφορές στην απόκριση στην καταπόνηση όσο αφορά την ένταση και το χρονισμό έχουν παρατηρηθεί μεταξύ του λαβρακιού, *Dicentrarchus labrax* και του κρανιού, *Argyrosomus regius* (Fanouraki *et al.*, 2011). Το λαβράκι είναι ένα είδος που καλλιεργείται εδώ και αρκετά χρόνια στη Μεσόγειο Θάλασσα και αποτελεί μαζί με την τσιπούρα, *Sparus aurata*, τα μεγαλύτερα σε ποσότητα εκτρεφόμενα ψάρια στη Μεσόγειο (FAO 2005-2012). Από την άλλη ο κρανιός, είναι ένα σχετικά καινούργιο είδος για τη βιομηχανία της ιχθυοκαλλιέργειας, η βιολογική γνώση γύρω από το οποίο είναι ακόμα ελλιπής (FAO 2005-2012).

Τα δύο είδη μοιάζουν ως προς τις περιβαλλοντικές απαιτήσεις τους, καθώς ζουν σε παρόμοια βάθη, εμφανίζουν ανοχή στην αλατότητα και στην υποξία ζώντας και σε υφάλμυρα νερά εκβολών και λιμνοθαλασσών, ενώ παρατηρούνται και σε ένα σχετικά μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (FAO 2005-2012, Quemener 2002 μέσω Chatzifotis *et al.*, 2010). Επίσης, τα ενήλικα άτομα και των δύο ειδών τρέφονται κυρίως με ψάρια, ενώ εκτελούν εποχιακές μεταναστεύσεις.

Από την άλλη, εμφανίζουν διαφορές στην περίοδο αναπαραγωγής, με το λαβράκι να αναπαράγεται κατά τη περίοδο του χειμώνα και μέχρι τις αρχές της άνοιξης, ενώ ο κρανιός μεταναστεύει για να αναπαραχθεί κατά την άνοιξη με καλοκαίρι (FAO 2005-2012). Ακόμα, υπάρχουν διαφορές στον τρόπο ζωής, με το λαβράκι να θεωρείται πιο ενεργητικό ψάρι συγκριτικά με τον κρανιό. Τέλος, όπως αναφέρθηκε εμφανίζουν πολύ έντονες διαφορές στην απόκριση στην καταπόνηση, αλλά και στις βασικές τιμές της κορτιζόλης, της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος (Fanouraki *et al.*, 2011). Ειδικότερα, σχετικά με την κορτιζόλη, τα δύο είδη εμφανίζουν εντονότατες διαφορές, με τα επίπεδα της ορμόνης στο λαβράκι να είναι από τα υψηλότερα καταγεγραμμένα στους ιχθύες (Barnett & Pankhurst 1998; Pottinger *et al.*, 2000; Begg & Pankhurst 2004; Van der Salm *et al.*, 2006; Fanouraki *et al.*, 2011), και τη συγκέντρωση των μη καταπονημένων ατόμων του είδους αυτού

να είναι τουλάχιστον κατά τρεις φορές υψηλότερη από τη μέγιστη συγκέντρωση του κρανιού μετά την καταπόνηση (Fanouraki *et al.*, 2011).

1.5 Διαταραχές του άξονα Υποθαλάμου – Υπόφυσης – Επινεφριδίων (HPA axis)

Υψηλές τιμές κορτιζόλης στο αίμα, όπως απαντούν στο λαβράκι, μπορεί να έχουν ποικίλες αιτίες. Στον άνθρωπο κάτι τέτοιο έχει παθολογικά αίτια και αναφέρεται γενικά ως σύνδρομο Cushing. Μία περίπτωση λόγω της οποίας παρατηρείται υπερκορτιζολαιμία είναι η μη σωστή λειτουργία του αναδραστικού μηχανισμού του άξονα Υποθαλάμου – Υπόφυσης – Επινεφριδίων (HPA axis). Κάτι τέτοιο είναι γνωστό στο άνθρωπο ως ασθένεια του Cushing και προκαλείται από την ύπαρξη κάποιου αδενώματος στην υπόφυση που οδηγεί στη μη καταστολή της έκκρισης ACTH παρά την υψηλή συγκέντρωση κορτιζόλης (Newell-Price *et al.*, 1998). Επίσης, η περίσσεια κορτιζόλης μπορεί να προέρχεται από την ύπαρξη αδενώματος στα επινεφρίδια (επινεφριδιακό σύνδρομο Cushing) από το οποίο να υπερπαράγεται κορτιζόλη. Μία άλλη μορφή του συνδρόμου Cushing είναι η έκτοπη παραγωγή ACTH, η οποία διεγείρει τα επινεφρίδια, αλλά διαφεύγει του μηχανισμού ανάδρασης του HPA άξονα.

Επιπλέον, πολύ υψηλή συγκέντρωση κορτιζόλης παρατηρείται σε περιπτώσεις υπερέκκρισης της CRH, όπως έχει φανεί τόσο στον άνθρωπο (Checkley 1996) όσο και σε ποντίκια (Groenink *et al.*, 2002). Εκτός από τα παραπάνω έχει αναφερθεί και η αντίσταση στα κορτικοστεροειδή, η οποία διαφέρει από τις προηγούμενες στο γεγονός ότι δεν παρουσιάζει κλινικά συμπτώματα του συνδρόμου Cushing (Chrousos *et al.*, 1983; Arai & Chrousos 1995) και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη χαμηλής συγγένειας υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών.

Στο λαβράκι έχει παρατηρηθεί πολύ έντονη αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης του αίματος μετά από έκθεση σε έναν οξύ παράγοντα καταπόνησης (Rotllant *et al.*, 2003; Rotllant *et al.*, 2006; Fanouraki *et al.*, 2007; Di Marco *et al.*, 2008; Fanouraki *et al.*, 2011). Για την έντονη αυτή απόκριση έχει υποτεθεί ότι ευθύνονται τόσο η αυξημένη, συγκριτικά με άλλα είδη ιχθύων, ικανότητα των κυττάρων του μεσόνεφρου για βιοσύνθεση της κορτιζόλης, όσο και η παρατεταμένη ευαισθησία των κυττάρων αυτών για διέγερση από την ACTH (Rotllant *et al.*, 2003). Παρόμοια παρατεταμένη ευαισθησία στην ACTH έχει παρατηρηθεί και σε πειράματα με αρουραίους (Campbell *et al.*, 2009).

1.6 Δοκιμασία δεξαμεθαζόνης

Ένας διαγνωστικός έλεγχος ο οποίος χρησιμοποιείται σε ανθρώπους που εμφανίζουν υπερκορτιζολαιμία για να εξακριβωθεί η αιτία αυτής είναι η δοκιμασία της δεξαμεθαζόνης. Το συνθετικό αυτό γλυκοκορτικοειδές έχει επιλεγεί για το συγκεκριμένο έλεγχο διότι προσδένεται στους ίδιους υποδοχείς με την κορτιζόλη, εμφανίζοντας όμως μεγαλύτερη δεσμευτική ικανότητα από αυτήν (Mommsen *et al.*, 1999), χωρίς να περνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, δρώντας με αυτόν τον τρόπο ως παράγοντας αρνητικής ανάδρασης στο επίπεδο της υπόφυσης και της έκκρισης ACTH.

Έτσι, με τη χορήγηση μιας χαμηλής και μιας υψηλής δόσης δεξαμεθαζόνης στις 23:00 και έλεγχο της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στις 08:00 το επόμενο πρωί μπορεί να εξακριβωθεί ποια από τις παραπάνω περιπτώσεις του συνδρόμου Cushing προκαλεί την υπερκορτιζολαιμία. Στην περίπτωση της αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή απαιτείται πολύ υψηλή δόση για να κατασταλεί η συγκέντρωση της κορτιζόλης (Chrousos *et al.*, 1983), ενώ αντίσταση έχει παρατηρηθεί, εκτός του ανθρώπου, και σε ορισμένα είδη ζώων, κυρίως θηλαστικών του νέου κόσμου (Chrousos *et al.*, 1983; Taymans *et al.*, 1997).

Η δοκιμασία δεξαμεθαζόνης χρησιμοποιείται, εκτός του ανθρώπου, και σε άλλα θηλαστικά, όπως τα σκυλιά (Feldman *et al.*, 1996) και τα άλογα (Donaldson *et al.*, 2005) για διαγνωστικούς σκοπούς και σε αρουραίους (Zhukov 1993; Cole *et al.*, 2000) και ποντίκια (Stec *et al.*, 1994; Koerner 1997; Bartolomucci *et al.*, 2004, Helm *et al.*, 2004) για ερευνητικούς σκοπούς. Δεξαμεθαζόνη έχει επίσης χορηγηθεί σε ορισμένες μελέτες σε ψάρια με σκοπό τη μελέτη των μηχανισμών ανάδρασης του HPI άξονα (Donaldson & McBride 1967; Butler *et al.*, 1968; Fagerlund & McBride 1969; McLeay 1973; Pickering *et al.*, 1987 Takahashi *et al.*, 1990), αλλά και για τη μελέτη της δράσης της κορτιζόλης στον μεταβολισμό (Milligan 1997) και στη ρύθμιση της ιοντικής ισορροπίας (Pierson *et al.*, 2004).

Οι επιδράσεις που έχει η δεξαμεθαζόνη σε γονίδια που εμπλέκονται στον HPI άξονα έχει μελετηθεί στη γλώσσα της Σενεγάλης, *Solea senegalensis* (Salas-Leiton *et al.*, 2012). Έτσι, φάνηκε πως η δράση της δεξαμεθαζόνης, αφού προσδεθεί σε υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών στην υπόφυση, επικεντρώνεται στη καταστολή της έκκρισης ACTH από την υπόφυση. Αυτό φαίνεται πως επιτυγχάνεται μέσω της

αύξησης της έκφρασης του γονιδίου *crfbp*, που κωδικοποιεί τις CRF binding proteins, οι οποίες δρουν ανασταλτικά στην επαγόμενη από τη CRF έκκριση της ACTH στην υπόφυση. Επιπλέον, στο είδος αυτό σημειώθηκε μείωση στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρόδρομη ουσία της ACTH, την προοπιομελανοκορτίνη POMC, δείχνοντας έτσι ότι και στα ψάρια δρα μειώνοντας την επαγόμενη από ACTH έκκριση της κορτιζόλης (Takahashi *et al.*, 1990; Salas-Leiton *et al.*, 2012).

1.7 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Όταν τα ψάρια υπόκεινται σε συνθήκες καταπόνησης επάγουν φυσιολογικές αλλαγές οι οποίες μπορεί να διαφέρουν σε ένταση και χρονισμό μεταξύ των ειδών. Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν οι μεταβολικές επιπτώσεις της οξείας καταπόνησης σε δύο μεσογειακά είδη ιχθύων, το λαβράκι και τον κρανιό, τα οποία εμφανίζουν παρόμοια οικολογικά χαρακτηριστικά αλλά διαφορετική απόκριση βασικών δεικτών της καταπόνησης. Επίσης, καθώς τόσο τα βασικά επίπεδα των μεταβολικών χαρακτηριστικών όσο και η απόκρισή τους στην καταπόνηση μεταβάλλονται με τη θερμοκρασία, επιχειρήθηκε η μελέτη τους σε τρεις διαφορετικές περιβαλλοντικές θερμοκρασίες.

Ακόμα, ως δεύτερος στόχος της παρούσας εργασίας τέθηκε η διερεύνηση της αιτίας των υψηλών επιπέδων κορτιζόλης στο αίμα του λαβρακιού μέσω της δοκιμασίας της δεξαμεθαζόνης που χρησιμοποιείται ευρέως διαγνωστικά και ερευνητικά σε πολλά είδη θηλαστικών.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Κινητική του γλυκογόνου έπειτα από οξεία καταπόνηση σε λαβράκι και κρανιό

2.1.1 Ψάρια και συνθήκες εκτροφής

Τα ψάρια προέρχονταν από τις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών. Η εκτροφή γινόταν σε δεξαμενές 10 m^3 εξοπλισμένες με συνεχή παροχή θαλασσινού νερού, με εξόδους για την απομάκρυνση των αποβλήτων και παροχή οξυγόνου. Η θερμοκρασία του νερού κατά την ημέρα του πειράματος ήταν 19,0°C, ενώ η αλατότητα 37, το διαλυμένο O_2 6,0 mg l^{-1} και το pH 7,5. Το πείραμα για τα λαβράκια έλαβε χώρα στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., ενώ οι κρανιοί είχαν πρώτα μεταφερθεί στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, όπου και αφέθηκαν για ένα μήνα μέχρι την έναρξη του πειράματος. Η διατήρηση των ψαριών στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου γινόταν σε δεξαμενές 250 L κλειστού κυκλώματος εφοδιασμένες με μηχανικό και βιολογικό φίλτρο για την κατακράτηση σωματιδίων και την απομάκρυνση της αμμωνίας και των νιτρωδών αντίστοιχα. Οι συνθήκες στις δεξαμενές διατηρούνταν σταθερές, με τη θερμοκρασία την ημέρα του πειράματος να είναι στους 19,1°C, την αλατότητα στο 38, το pH στο 8,0 και το οξυγόνο σε επίπεδα 6,0 mg l^{-1} με κορεσμό 80%, ενώ η φωτοπερίοδος ήταν 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι (12L:12D).

Τα άτομα και των δύο ειδών είχαν διαβεί μία περίοδο μειωμένης τροφοληψίας για περίπου ένα μήνα ακολουθούμενο από ένα μήνα κανονικού ταΐσματος πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 25 άτομα από κάθε είδος με μέσο βάρος σώματος (± SEM):

- Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*): 258,7 ± 13,6 g
- Κρανιός (*Argyrosomus regius*): 83,9 ± 3,9 g

2.1.2 Δειγματοληψία

Το πρωτόκολλο δειγματοληψίας που ακολουθήθηκε ήταν ίδιο και για τα δύο είδη. Αρχικά, λήφθηκαν 5 άτομα από τη δεξαμενή τα οποία τοποθετήθηκαν αμέσως σε νερό με υψηλή δόση αναισθησίας (Ethylene glycol monophenyl ether, φαινοξυαιθανόλη, 0,5 ml l^{-1}) ώστε να θανατωθούν. Η ομάδα αυτή λειτούργησε ως ομάδα ελέγχου. Στη συνέχεια ακολούθησε καταδίωξη των ψαριών με απόχη μέσα στη δεξαμενή για 5 λεπτά και τέλος 20 ψάρια τοποθετήθηκαν ανά 5 σε τέσσερεις μικρότερες δεξαμενές 70 L εφοδιασμένες με παροχή αέρα. Στα χρονικά σημεία ½, 1, 2 και 4 ώρες μετά την καταπόνηση τα ζώα θανατώθηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως και η ομάδα ελέγχου.

Από όλα τα ζώα συλλέχθηκε αίμα από την ουραία φλέβα με τη χρήση ηπαρινισμένων συρίγγων. Αφότου έγιναν οι απαραίτητες μετρήσεις στο αίμα (βλ. 1.1.3), τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C στις 4.000 r.p.m. για 8 λεπτά. Το πλάσμα που προέκυψε διατηρήθηκε στους -20°C για περαιτέρω αναλύσεις. Επιπλέον, λήφθηκαν δείγματα ήπατος και λευκού μυός ραχιαία της πλευρικής γραμμής και κάτω από τις πρώτες ακτίνες του ραχιαίου πτερυγίου, τα οποία αφού τοποθετήθηκαν αρχικά σε υγρό άζωτο στη συνέχεια φυλάχθηκαν στους -80°C έως τη στιγμή της ανάλυσης.

Τέλος, στο νερό στο οποίο έμειναν τα ψάρια μετά την εφαρμογή της καταπόνησης μετρήθηκαν το διαλυμένο οξυγόνο, το pH και η συγκέντρωση της αμμωνίας.

2.1.3 Αναλυτικοί προσδιορισμοί

Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα υπολογίστηκε με τη χρήση φορητού μετρητή (Ascensia™, Contour meter, Bayer Healthcare, USA) και ειδικών ταινιών καταγραφής (Ascenia microfill strips). Η μέτρηση του αιματοκρίτη έγινε μετά από φυγοκέντρηση του αίματος σε φυγόκεντρο μικροαιματοκρίτη (HETTICH GmbH & Co, Germany), ενώ η αιμοσφαιρίνη μετρήθηκε με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας (Spinreact, Spain). Ο προσδιορισμός του pH του αίματος αλλά και των μυών έγινε με χρήση κατάλληλου οργάνου (Crimson pH Meter GLP21).

Για τον υπολογισμό του γλυκογόνου του ήπατος και των μυών ακολουθήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Lo *et al.* (1970), όπως τροποποιήθηκε από τους

Bidinotto *et al.* (1997). Συνοπτικά, δείγματα παγωμένου ήπατος (15-25 mg) ή μυός (150-250 mg) προσθέτονταν σε 1 ml διαλύματος 30% KOH και αφήνονταν για περίπου 5 λεπτά σε νερό στο σημείο βρασμού. Σε 250 μl του διαλυμένου ιστού προσθέτονταν 3 ml 95% αιθανόλης και 100 μl 10% K_2SO_4. Έπειτα από φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 3.000 r.p.m. αφαιρούνταν το υπερκείμενο και ακολουθούσε προσθήκη 2,5 ml αποσταγμένου νερού στο ίζημα. Σε 1 ml του διαλύματος αυτού προσθέτονταν 1 ml 5% φαινόλης και ακολουθούσε προσθήκη 5 ml H_2SO_4 καθώς η φαινόλη παρουσία θειικού οξέος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σακχάρων. Τέλος, μετά από 15 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου το διάλυμα φωτομετρούνταν στα 490 nm έναντι τυφλού που περιείχε 1 ml νερού, 1 ml 5% φαινόλης και 5 ml H_2SO_4. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του γλυκογόνου γίνονταν με βάσει την πρότυπη καμπύλη από τις απορροφήσεις των προτύπων γλυκογόνου (Merck 1.04202, Germany), συγκέντρωσης 0,4 – 0,025 mg ml^{-1}, μέσω του τύπου

$$C = \frac{A_{490}}{a} \times \frac{V}{v} \times \frac{W}{10^{-3}}$$

όπου C η συγκέντρωση του γλυκογόνου (mg g^{-1}), A_{490} η απορρόφηση του δείγματος, a η κλίση της πρότυπης καμπύλης, V ο ολικός όγκος του διαλύματος γλυκογόνου μετά την επανασύσταση του γλυκογόνου με νερό (ml), v ο όγκος από το αρχικό ομογενοποίημα που χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση (ml) και W το βάρος του ιστού που χρησιμοποιήθηκε για ομογενοποίηση (g).

Τέλος, έλαβαν χώρα μετρήσεις των συγκεντρώσεων ηλεκτρολυτών στο πλάσμα των ψαριών. Συγκριμένα, υπολογίστηκαν, με τη χρήση εμπορικών συσκευασιών, οι συγκεντρώσεις του χλωρίου, Cl^-, και του καλίου, K^+ (Spinreact, Spain) αλλά και του ασβεστίου, Ca^{2+}, του μαγνησίου, Mg^{2+}, και του φωσφόρου P (Diasis Diagnostic Systems, Turkey).

2.1.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Sigma Stat 3.1 (SYSTAT Software Inc., Germany). Τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους και την ομοιογένεια των διασπορών τους και

όποτε ήταν απαραίτητο εφαρμόστηκαν log10 μετασχηματισμοί. Για να προσδιοριστεί η επίδραση της καταπόνησης στα ψάρια στις διάφορες χρονικές στιγμές δειγματοληψίας ελέγχθηκαν στατιστικά οι μέσες τιμές των πληθυσμών με Ανάλυση Διασποράς (ANOVA), ενώ όταν δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις του ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal - Wallis. Στις περιπτώσεις που εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ($p<0,05$) εφαρμόστηκαν εκ των υστέρων πολλαπλές συγκρίσεις (Tukey για τον παραμετρικό έλεγχο και Dunn για τον μη παραμετρικό).

2.2 Μεταβολικές επιπτώσεις οξείας καταπόνησης σε λαβράκι και κρανιό

2.2.1 Ψάρια και συνθήκες εκτροφής

Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό προήλθαν από ιχθυοκλωβούς του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών στον κόλπο της Σούδας του νομού Χανίων. Κατά συνέπεια βρίσκονταν υπό συνθήκες φυσικής περιβαλλοντικής θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου, ενώ κατανάλωναν εμπορική τροφή ίδιας σύστασης (44% πρωτεΐνη, 19% λίπος), ενώ είχαν υποστεί νηστεία την προηγούμενη ημέρα από τη διεξαγωγή του πειράματος. Οι πυκνότητες εκτροφής και για τα δύο είδη ήταν μεταξύ 8 – 10 kg m^{-3}.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες σε διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 25°C τον Ιούλιο του 2011 (φωτοπερίοδος 14L:10D), στους 15°C το Φεβρουάριου του 2012 (φωτοπερίοδος 10L:14D) και στους 20°C το Μάιο του 2012 (13,5L:9,5D). Η αλατότητα του νερού και για τις τρεις δειγματοληψίες ήταν 38‰. Για κάθε θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκαν 12 άτομα από κάθε είδος που είχαν τα εξής βάρη (mean ± SEM):

- Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*): 15°C 585,0 ± 27,8 g
  20°C 215,7 ± 12,9 g
  25°C 302,1 ± 22,9 g
- Κρανιός (*Argyrosomus regius*): 15°C 875,3 ± 67,3 g
  20°C 922,2 ± 68,3 g
  25°C 329,8 ± 27,4 g

2.2.2 Δειγματοληψία

Σε κάθε δειγματοληψία τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Τα ψάρια της μίας ομάδας, που θεωρήθηκε ως ομάδα ελέγχου, θανατώθηκαν σε πλαστικό δοχείο 70 L που περιείχε θαλασσινό νερό και περίσσεια φαινοξυαιθανόλης (0,5 ml l^{-1}) και αμέσως συλλέχθηκε δείγμα αίματος από την ουραία φλέβα με τη χρήση ηπαρινισμένων συρίγγων, ενώ υπολογίστηκε το βάρος σώματος του ζώου. Από την άλλη, τα υπόλοιπα άτομα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία 70 L με θαλασσινό νερό όπου και υποβλήθηκαν σε καταπόνηση μέσω καταδίωξης με απόχη για 5 λεπτά. Έπειτα από μισή ώρα θανατώθηκαν και αυτά με τον ίδιο τρόπο και λήφθηκε αίμα από την ουραία φλέβα. Αφότου έγιναν οι απαραίτητες μετρήσεις στο αίμα, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C στις 4.000 r.p.m. για 8 λεπτά. Το πλάσμα που προέκυψε διατηρήθηκε στους -20°C για περαιτέρω αναλύσεις. Εκτός από αίμα λήφθηκαν και δείγματα ήπατος και λευκού μυός ακριβώς κοιλιακά από το ραχιαίο πτερύγιο, τα οποία αφού πάγωσαν αρχικά σε υγρό άζωτο στη συνέχεια φυλάχθηκαν στους -80°C έως την ανάλυση.

Επιπλέον, στο νερό στο οποίο έμειναν τα ψάρια για μισή ώρα μετά την εφαρμογή της καταπόνησης μετρήθηκαν το διαλυμένο οξυγόνο και το pH ανά 10 λεπτά, καθ’ όλη τη μισή ώρα, ενώ στο τέλος ελέγχθηκε η παρουσία αμμωνίας.

2.2.3 Αναλυτικοί προσδιορισμοί

Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα υπολογίστηκε με τη χρήση φορητού μετρητή (Ascensia™, Contour meter, Bayer Healthcare, USA) και ταινιών καταγραφής (Ascenia microfill strips). Για το γαλακτικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ο φορητός μετρητής Accutrend® Lactate meter (Roche, Germany) με ταινίες καταγραφής (BM-Lactate test strips). Η μέτρηση του αιματοκρίτη έγινε μετά από φυγοκέντρηση του αίματος σε φυγόκεντρο μικροαιματοκρίτη (HETTICH GmbH & Co, Germany), ενώ η αιμοσφαιρίνη στη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου και του Ιουλίου μετρήθηκε με τη χρήση εμπορικών συσκευασιών (Cayman Chemical Co., USA και Spinreact, Spain, αντίστοιχα), ενώ τα δείγματα που λήφθησαν τον Ιούλιο με το φορητό μετρητή STAT-Site M^{Hgb} (Stanbio Laboratory, USA). Ο προσδιορισμός του pH του αίματος αλλά και των μυών έγινε με όργανο που έφερε κατάλληλο ηλεκτρόδιο (Crimson pH Meter GLP21).

Εν συνεχεία, στο πλάσμα προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση της οσμωτικής πίεσης με το οσμόμετρο Osmomat 030 (Gonotec GmbH, Germany) καθώς και της χοληστερόλης, των τρυγλυκεριδίων και των ολικών πρωτεϊνών μέσω των αντίστοιχων εμπορικών συσκευασιών (BIOSIS, Greece). Για τον προσδιορισμό της κορτιζόλης το πλάσμα εκχυλίστηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Fanouraki *et al.* (2008) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η εμπορική ανοσολογική συσκευασία (EIA) της εταιρείας Cayman Chemical Co., USA. Η συσκευασία αυτή έχει αξιολογηθεί στο εργαστήριο για τον προσδιορισμό της κορτιζόλης στο zebrafish (Pavlidis *et al.*, 2011). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Fanouraki *et al.*, 2011) ο κρανιός έχει πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις κορτιζόλης, ενώ το λαβράκι πολύ υψηλές. Η συσκευασία Cayman έχει πολύ χαμηλή ευαισθησία και κατά συνέπεια μπορεί να μετρήσει της συγκεντρώσεις κορτιζόλης στον κρανιό, χωρίς αραίωση των δειγμάτων. Για να αποφευχθούν σφάλματα λόγω αναλυτικής τεχνικής και να είναι εφικτή η σύγκριση μεταξύ των δυο ειδών, η συσκευασία αυτή χρησιμοποιήθηκε και για το λαβράκι όπου όλα τα δείγματα αραιώθηκαν 1:600 με τη χρήση ρυθμιστικού διαλειμματος (Cayman EIA buffer).

Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ και τους μύες υπολογίστηκε με τη μέθοδο που αναφέρθηκε στην υποενότητα *2.1.3*.

2.2.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω του λογισμικού Sigma Stat 3.1 (SYSTAT Software Inc., Germany). Τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους και την ομοιογένεια των διασπορών τους και όποτε ήταν απαραίτητο εφαρμόστηκαν log10 μετασχηματισμοί. Αφού πληρούνταν οι παραπάνω προϋποθέσεις έγινε στατιστικός έλεγχος με Ανάλυση της Διασποράς Δύο Παραγόντων (two-way ANOVA) για κάθε μία θερμοκρασία ξεχωριστά, με τους παράγοντες να είναι το είδος και η εφαρμογή ή όχι καταπόνησης.

Στις περιπτώσεις που διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 χρησιμοποιήθηκε ο εκ των υστέρων έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων Tukey.

Άμεση σύγκριση μεταξύ των δειγματοληψιών δεν επιχειρήθηκε, καθώς μεταβάλλονταν μία σειρά περιβαλλοντικών και φυσιολογικών παραμέτρων

(θερμοκρασία, φωτοπερίοδος, στάδιο αναπαραγωγικού κύκλου) καθιστώντας έτσι την εξαγωγή συμπερασμάτων και συσχετίσεων επισφαλή.

2.3 Δοκιμασία Δεξαμεθαζόνης στο λαβράκι

2.3.1 Ψάρια και συνθήκες εκτροφής

Τα ψάρια εκτρέφονταν στο Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών, μεταφέρθηκαν όμως στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, όπου και αφέθηκαν για τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν την έναρξη των πειραμάτων ώστε να προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον. Η διατήρηση των ψαριών γινόταν σε δεξαμενές 250 L κλειστού κυκλώματος εφοδιασμένες με μηχανικό και βιολογικό φίλτρο για την κατακράτηση σωματιδίων και την απομάκρυνση της αμμωνίας και των νιτρωδών αντίστοιχα. Οι συνθήκες στις δεξαμενές διατηρούνταν σταθερές, με τη θερμοκρασία να είναι στους 19,0 ± 0,2°C, την αλατότητα στο 38, το pH στο 8,0 ± 0,1 και το οξυγόνο σε επίπεδα 6,0 ± 0,3 mg l^{-1} με κορεσμό 80%, ενώ η φωτοπερίοδος ήταν 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι (12L:12D). Τα ψάρια κατανάλωναν εμπορική τροφή (Irida B, 44% πρωτεΐνη, 19% λίπος), ενώ οι πυκνότητες εκτροφής τους ήταν μεταξύ 6,2 και 8,1 kg m^{-3}.

2.3.2 Δειγματοληψία

Για να εξακριβωθεί η επίδραση της δεξαμεθαζόνης στην έκκριση της κορτιζόλης στο λαβράκι ελέχθησαν διαφορετικές δόσεις και χρόνοι δράσης του φαρμάκου. Χρησιμοποιήθηκε το φαρμακευτικό σκεύασμα Dexamethasone – G.A.P. (G.A. Pharmaceuticals S.A., Greece) που έχει ως δραστική ουσία την dexamethasone sodium phosphate και έκδοχα sodium bisulfate, sodium citrate, methylparaben, polyparaben sodium, creatinine και water for injections.

Το ένα σετ πειραμάτων είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών δόσεων δεξαμεθαζόνης στην κορτιζόλη του πλάσματος του λαβρακιού. Χρησιμοποιήθηκαν ζώα μέσου βάρους (± SEM) 176 (± 7,2) g, με τα βάρη των διαφορετικών ομάδων να κυμαίνονται μεταξύ 153,7 (± 11,7) g και 203,7 (± 9,8) g, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα ψάρια χωρίστηκαν σε

ομάδες των δέκα και δέχτηκαν μία εκ των εξής δόσεων: ½ mg kg^{-1}, 1 mg kg^{-1} και 10 mg kg^{-1}. Οι αρχικές συγκεντρώσεις της δεξαμεθαζόνης προσέχθηκε να είναι τέτοιες ώστε ο ανώτατος όγκος χορήγησης να μην ξεπερνάει τα 500 μl σε κάθε ψάρι. Η δεξαμεθαζόνη χορηγούνταν με ενδομυϊκή ένεση στη βάση του ραχιαίου πτερυγίου, αφότου πρώτα τα ζώα είχαν αναισθητοποιηθεί (Ethylene glycol monophenyl ether, φαινοξυαιθανόλη, 0,3 ml l^{-1}). Τα ζώα που λειτούργησαν ως ομάδα ελέγχου δέχτηκαν ένεση με φυσιολογικό ορό (NaCl 0,9%). Έπειτα από τη χορήγηση της ουσίας τα ψάρια επέστρεψαν στις αρχικές τους δεξαμενές όπου αφήνονταν για 24 ώρες έως την αιμοληψία. Η επιλογή του 24ώρου έγινε με βάση αποτελέσματα της σχετικής βιβλιογραφίας σε άλλα είδη ψαριών (Butler *et al.*, 1968; Milligan 1997; Pottinger & Carrick 2001). Μετά το πέρας των 24 ωρών 5 από τα ψάρια της κάθε ομάδας θανατώθηκαν αμέσως σε νερό που έφερε υψηλή δόση φαινοξυαιθανόλης και συλλέχθηκε αίμα με τη χρήση ηπαρινισμένων συρίγγων από την ουραία φλέβα. Στα υπόλοιπα 5 ψάρια εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της οξείας καταπόνησης, κυνηγητό δηλαδή με την απόχη για 5 λεπτά και τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές 70 L εφοδιασμένες με παροχή αέρα. Έπειτα από 1 ώρα θανατώθηκαν και αυτά και έγινε αιμοληψία όπως περιγράφηκε. Στις δεξαμενές όπου έμειναν τα ψάρια για 1 ώρα ελέγχθηκε η ποιότητα του νερού (O_2, NH_3).

Το δεύτερο σετ πειραμάτων αφορούσε στη διερεύνηση του χρόνου δράσης της δεξαμεθαζόνης. Επιλέχθηκαν δύο δόσεις που είχαν μειώσει τα επίπεδα της κορτιζόλης στα προηγούμενα πειράματα, συγκεκριμένα οι δόσεις 1 mg kg^{-1} και 10 mg kg^{-1}. Έτσι, 10 συνολικά ψάρια, μέσου βάρους (± SEM) 210,7 (± 15) g (διακύμανση ομάδων 200 (± 4,2) g έως 221,4 (± 3,2) g, μη σημαντική διαφορά), αναισθητοποιήθηκαν και συλλέχτηκε αίμα με τη χρήση ηπαρινισμένων συρίγγων. Αμέσως μετά την αιμοληψία στα 5 ψάρια χορηγήθηκε ενδομυϊκώς η χαμηλή δόση δεξαμεθαζόνης και στα υπόλοιπα 5 η υψηλή. Οι δύο ομάδες ψαριών χωρίστηκαν σε δύο διαφορετικές δεξαμενές, εφοδιασμένες με παροχή αέρα, ώστε να ληφθεί ξανά αίμα 4 ώρες μετά τη χορήγηση. Το νερό των δεξαμενών έπειτα από το πέρας των 4 ωρών ελέγχθηκε ως προς την ποιότητά του.

2.3.3 Αναλυτικοί προσδιορισμοί

Ο υπολογισμός της γλυκόζης, του αιματοκρίτη και του pH του αίματος έγιναν με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω (υποενότητα 2.1.3). Η αιμοσφαιρίνη

μετρήθηκε με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας (Cayman Chemicals Co., USA) όπως και η κορτιζόλη του πλάσματος (Cortisol ELISA, DRG Instruments GmbH, Germany). Η συγκεκριμένη εμπορική συσκευασία δεν απαιτεί εξαγωγή της κορτιζόλης, αλλά δουλεύει με το πλάσμα βασισμένη στην ίδια αρχή με την συσκευασία της Cayman. Για να ελέγχουμε την αξιοπιστία της συγκεκριμένης συσκευασίας έλαβε χώρα μία σειρά αναλύσεων σχετικά με τη γραμμικότητα που εμφανίζουν οι αραιώσεις, αλλά και με την ανάκτηση (recovery) που παρουσιάζει η μέθοδος. Χρησιμοποιήθηκαν ένα pool δείγμα χαμηλής (89,7 ng ml^{-1}) και ένα υψηλής (580,6 ng ml^{-1}) συγκέντρωσης κορτιζόλης. Στο πρώτο έγιναν οι αραιώσεις 1/2, 1/4 και 1/8, ενώ στο δεύτερο οι αραιώσεις 1/2, 1/4, 1/8 και 1/16. Οι συντελεστές συσχέτισης που προέκυψαν για τις αραιώσεις των δύο δειγμάτων ήταν r = 0,997 και r = 0,993 για τη χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση αντίστοιχα. Ως προς την ανάκτηση, για το δείγμα χαμηλής κορτιζόλης αυτή ήταν 101,8% με την προσθήκη του προτύπου συγκέντρωσης 200 ng ml^{-1} και 122,7% με το πρότυπο 400 ng ml^{-1}, ενώ για το δείγμα υψηλής συγκέντρωσης οι τιμές ανάκτησης ήταν 97,3% και 93,9% αντίστοιχα.

2.3.4 Στατιστική ανάλυση

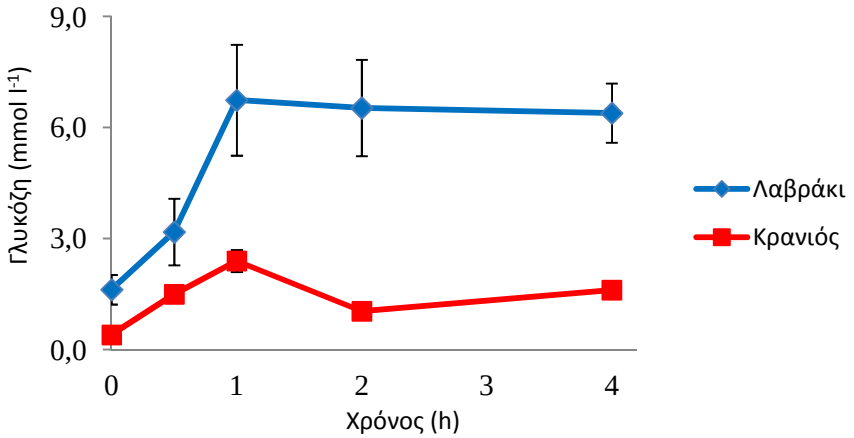
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Sigma Stat 3.1 (SYSTAT Software Inc., Germany). Για το πρώτο πειραματικό σετ με τη δεξαμεθαζόνη εφαρμόστηκε ανάλυση διασποράς δύο παραγόντων (two-way ANOVA), με παράγοντες τη δόση και την εφαρμογή ή όχι καταπόνησης. Στις περιπτώσεις όπου δεν τηρούνταν οι προϋποθέσεις της κανονικότητας της κατανομής και της ομοιογένειας της διασποράς για κάποια μεταβλητή εφαρμοζόταν μετασχηματισμός log10 στα δεδομένα. Στις περιπτώσεις που εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ($p<0,05$) εφαρμόστηκαν εκ των υστέρων πολλαπλές συγκρίσεις (Tukey και Bonferroni).

Τα αποτελέσματα του δεύτερου πειράματος με δεξαμεθαζόνη, αφότου τα δεδομένα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους, αναλύθηκαν με το στατιστικό έλεγχο paired t-test, καθώς οι τιμές ελέγχου των μεταβλητών και οι τιμές μετά τη χορήγηση της δεξαμεθαζόνης προέρχονταν από τα ίδια άτομα.

3 Αποτελέσματα

3.1 Κινητική του γλυκογόνου έπειτα από οξεία καταπόνηση σε λαβράκι και κρανιό

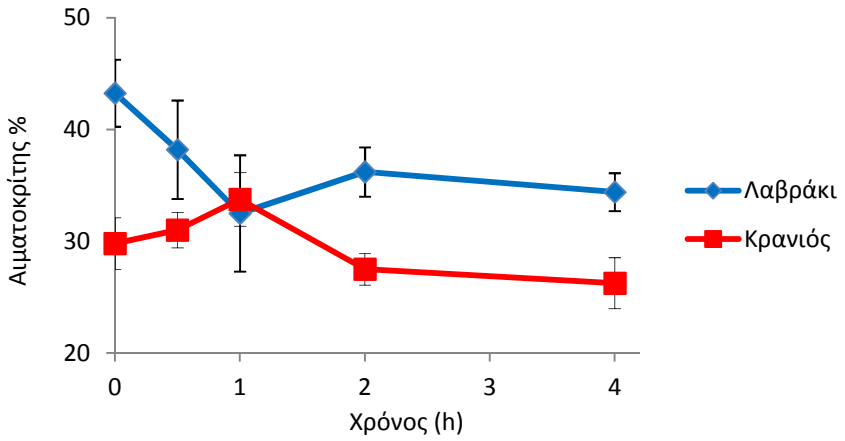
Η οξεία καταπόνηση φάνηκε να έχει ως απόρροια την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και για τα δύο είδη που μελετήθηκαν (Εικόνα 3.1.1). Οι τιμές στο λαβράκι κυμάνθηκαν μεταξύ 0,4 – 11,5 mmol l^{-1}, ενώ στον κρανιό μεταξύ 0,3 - 3,6 mmol l^{-1}. Επιπλέον, το σημείο μεγιστοποίησης των επιπέδων της γλυκόζης ήταν και για τα δύο είδη η 1 h μετά την καταπόνηση, με το λαβράκι να διατηρεί υψηλές τιμές έως και τις 4 h, ενώ στον κρανιό να υπάρχει μείωση στις 2 h.



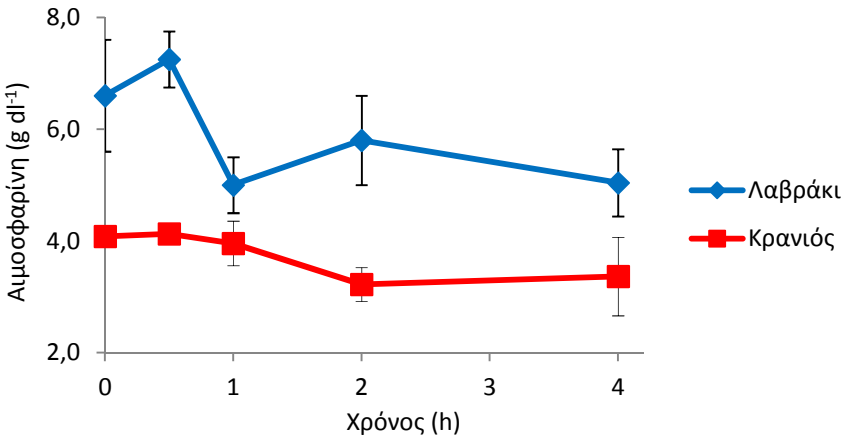
Στατιστική ανάλυση					
	0h	**1/2h**	**1h**	**2h**	**4h**
Λαβράκι	a	ab	b	b	b
Κρανιός	a	bc	c	ab	bc

Εικόνα 3.1.1. Απόκριση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο πλάσμα λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών μέσα στο ίδιο είδος.

Αντίθετα με την γλυκόζη, ο αιματοκρίτης και η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης δε μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά την καταπόνηση (Εικόνες 3.1.2 και 3.1.3). Ο αιματοκρίτης του λαβρακιού κυμάνθηκε από 22 έως 53 και του κρανιού από 14 έως 39, ενώ η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης για το λαβράκι ήταν μεταξύ 2,9 – 10,2 g dl^{-1} και του κρανιού μεταξύ 2,1 – 5,4 g dl^{-1}.

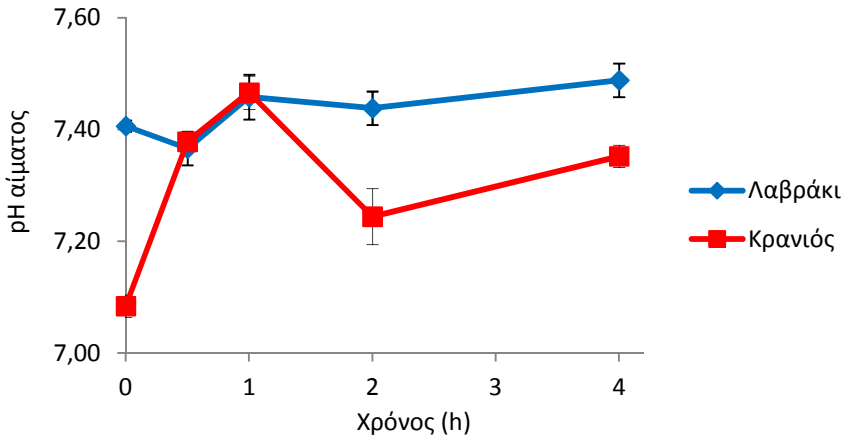


Εικόνα 3.1.2. Απόκριση του αιματοκρίτη λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Οι διαφορές είναι μη στατιστικά σημαντικές.



Εικόνα 3.1.3. Απόκριση της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης στο αίμα λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Οι διαφορές είναι μη στατιστικά σημαντικές.

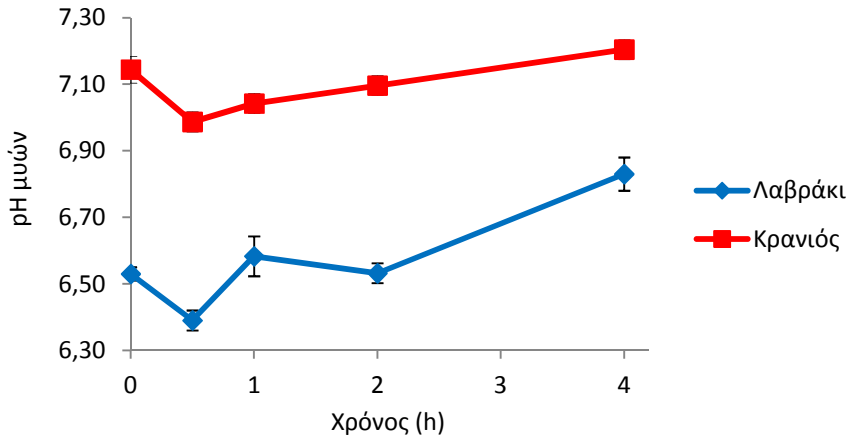
Οι τιμές του pH του αίματος εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μετά την καταπόνηση και για τα δύο είδη, αν και με αντίθετα πρότυπα (Εικόνα 3.1.4). Οι μεταβολές ήταν μικρές στο λαβράκι, συγκεκριμένα οι τιμές ήταν μεταξύ 7,31 και 7,60, ενώ στον κρανιό ήταν εντονότερες και κυμάνθηκαν μεταξύ 7,02 και 7,59. Ως προς το χρονισμό της απόκρισης, στο λαβράκι παρατηρήθηκε αρχικά μία στατιστικά σημαντική μείωση του pH στη ½ h ακολουθούμενη από μία αύξηση η οποία κορυφώθηκε 4 h μετά την καταπόνηση. Αντίθετα, στον κρανιό υπήρχε μία έντονη αύξηση στο διάστημα ½ h – 1 h, με επιστροφή στα αρχικά επίπεδα από τις 2 h.



Στατιστική ανάλυση					
	0h	**1/2h**	**1h**	**2h**	**4h**
Λαβράκι	ab	b	bc	bc	c
Κρανιός	a	bc	c	ab	ab

Εικόνα 3.1.4. Απόκριση του pH στο αίμα λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών μέσα στο ίδιο είδος.

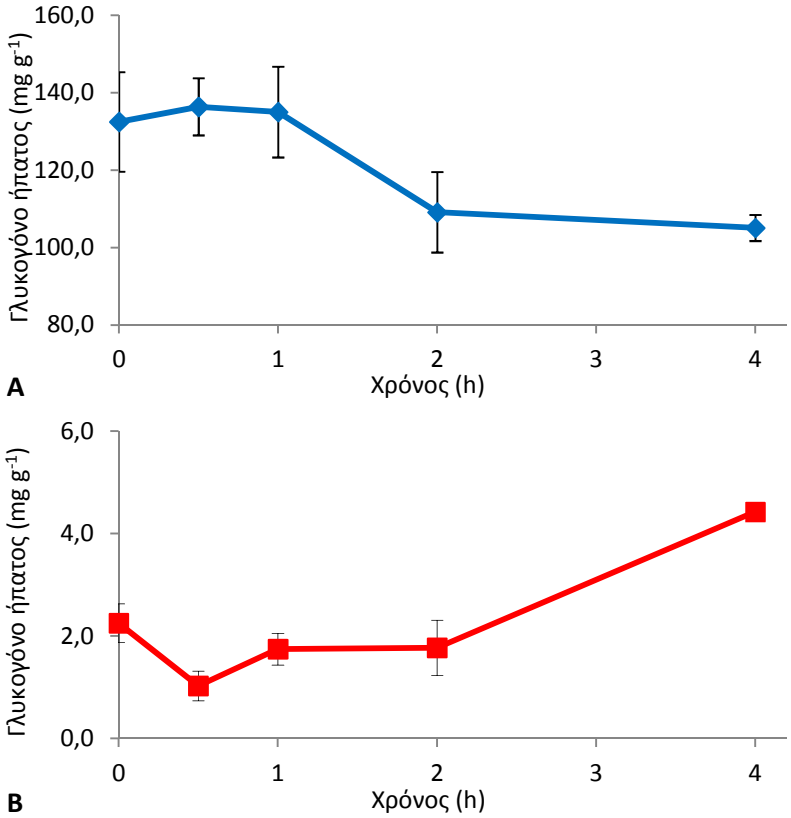
Η απόκριση στην οξεία καταπόνηση επέφερε αλλαγές και στο pH των μυών (Εικόνα 3.1.5). Έτσι, στο λαβράκι οι τιμές ήταν μεταξύ 6,34 – 6,98 και στον κρανιό μεταξύ 6,89 – 7,29. Το πρότυπο και για τα δύο είδη ήταν το ίδιο, με μία στατιστικά σημαντική μείωση του pH ½ h μετά την καταπόνηση και μία σταδιακή αύξηση του ώσπου να φτάσει στο μέγιστο επίπεδο στις 4 h.



Στατιστική ανάλυση					
	0h	**1/2h**	**1h**	**2h**	**4h**
Λαβράκι	a	b	a	a	c
Κρανιός	a	b	a	a	c

Εικόνα 3.1.5. Απόκριση του pH στους μύες λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών μέσα στο ίδιο είδος.

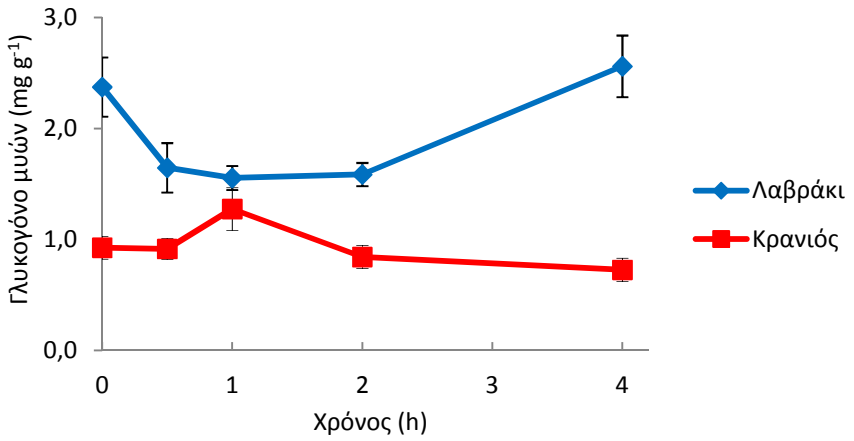
Η καταπόνηση φάνηκε να επιδρά στη συγκέντρωση του γλυκογόνου του ήπατος και στα δύο είδη (Εικόνα 3.1.6). Στο λαβράκι οι τιμές κυμαίνονταν μεταξύ 73,7 – 181,5 mg g^{-1}, ενώ στον κρανιό ήταν πολύ χαμηλότερα και συγκεκριμένα μεταξύ 0,2 – 6,5 mg g^{-1}. Ως προς το χρονισμό, στο λαβράκι σημειώθηκε μία ελαφριά αύξηση στα επίπεδα του γλυκογόνου ½ h μετά την καταπόνηση, με τη συγκέντρωση να μειώνεται στις 2 h και να γίνεται σημαντικά χαμηλότερη στις 4 h. Για τον κρανιό, από την άλλη, το πρότυπο ήταν διαφορετικό, με τα επίπεδα του γλυκογόνου να μη μεταβάλλονται μέχρι τις 4 h μετά την καταπόνηση όποτε και παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση.



Στατιστική ανάλυση					
	0h	**1/2h**	**1h**	**2h**	**4h**
Λαβράκι	ab	a	ab	ab	b
Κρανιός	a	a	a	a	b

Εικόνα 3.1.6. Απόκριση του ηπατικού γλυκογόνου λαβρακιών (A) και κρανιών (B) (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών μέσα στο ίδιο είδος. Η κλίμακα στον κάθετο άξονα είναι διαφορετική στα δύο διαγράμματα.

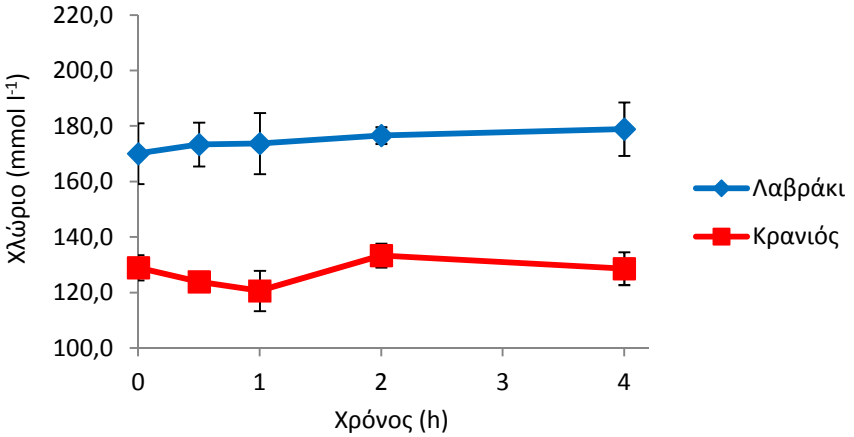
Η συγκέντρωση του γλυκογόνου των μυών, εν αντιθέσει με αυτό του ήπατος, ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη στο λαβράκι συγκριτικά με τον κρανιό (Εικόνα 3.1.7). Έτσι, στο μεν λαβράκι κυμάνθηκε μεταξύ 1,19 - 3,47 mg g^{-1} και στον κρανιό μεταξύ 0,41 - 1,69 mg g^{-1}. Μετά την καταπόνηση, όπως και με το γλυκογόνο του ήπατος, η απόκριση των δύο ειδών διέφερε. Στο λαβράκι, παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση ήδη από τη ½ h και η επαναφορά της συγκέντρωσης στα αρχικά επίπεδα έγινε στις 4 h. Στον κρανιό, αντίθετα, δεν εμφανίστηκε καμία σημαντική μεταβολή.



Στατιστική ανάλυση					
	0h	**1/2h**	**1h**	**2h**	**4h**
Λαβράκι	a	b	b	b	a
Κρανιός	Μη στατιστικά σημαντική διαφορά				

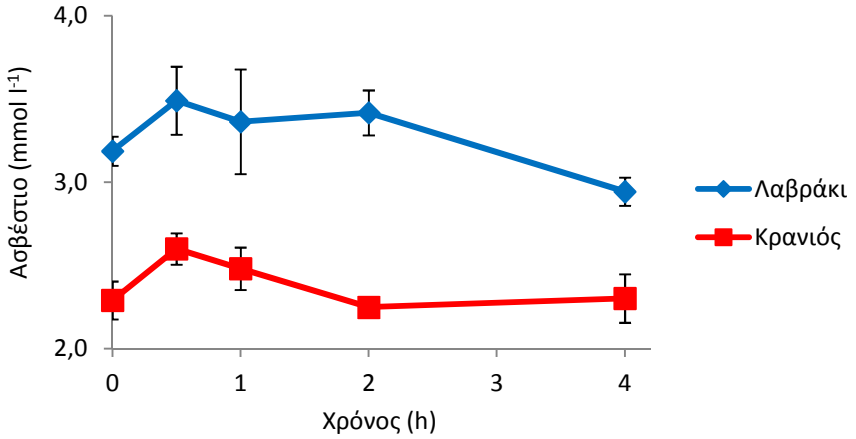
Εικόνα 3.1.7. Απόκριση του γλυκογόνου των μυών λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών μέσα στο ίδιο είδος.

Οι ηλεκτρολύτες που μελετήθηκαν εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα απόκρισης στην καταπόνηση. Έτσι, η συγκέντρωση του χλωρίου στο πλάσμα έδειξε να μην επηρεάζεται από την καταπόνηση, τόσο στο λαβράκι όσο και στον κρανιό (Εικόνα 3.1.8). Οι συγκεντρώσεις στο πρώτο ήταν μεταξύ 148,9 – 215,7 mmol l^{-1} και στο δεύτερο μεταξύ 96,1 – 145,6 mmol l^{-1}.



Εικόνα 3.1.8. Απόκριση της συγκέντρωσης χλωρίου (Cl^{1-}) λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Οι διαφορές είναι μη στατιστικά σημαντικές.

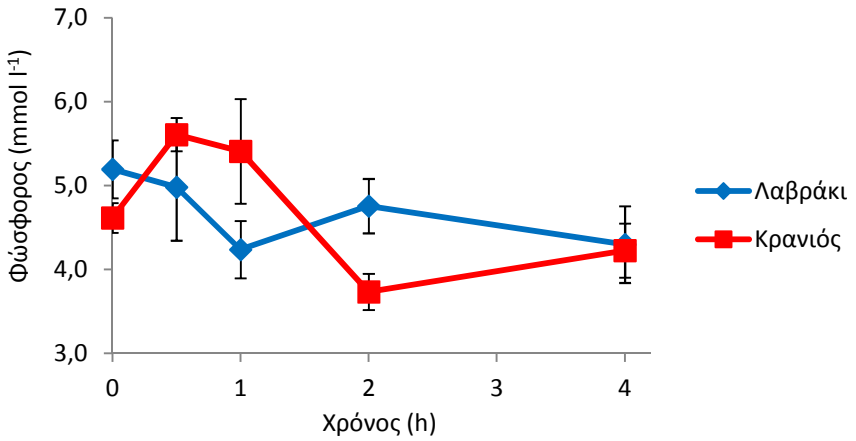
Απουσία σημαντικής επίδρασης της καταπόνησης και για τα δύο είδη παρατηρήθηκε επίσης στη συγκέντρωση του ασβεστίου του πλάσματος (Εικόνα 3.1.9). Στο λαβράκι σημειώθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις (2,7 – 4,6 mmol l^{-1}) σε σχέση με τον κρανιό (2,0 – 2,8 mmol l^{-1}).



Εικόνα 3.1.9. Απόκριση της συγκέντρωσης ασβεστίου (Ca^{2+}) λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Οι διαφορές είναι μη στατιστικά σημαντικές.

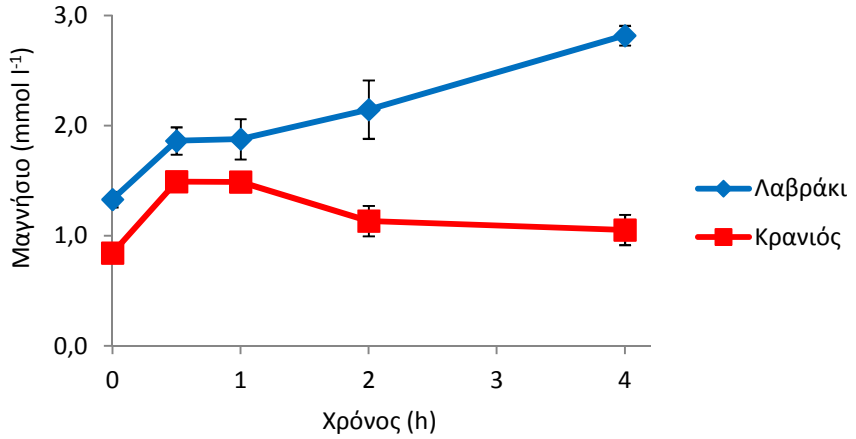
Οι συγκεντρώσεις του φωσφόρου κυμαίνονταν μεταξύ 3,1 – 7,0 mmol l^{-1} στο λαβράκι και 3,2 – 7,0 mmol l^{-1} στον κρανιό (Εικόνα 3.1.10). Οι μεταβολές που έλαβαν χώρα μετά την καταπόνηση στα δύο είδη ήταν διαφορετικής έντασης και προτύπου. Συγκεκριμένα, στο λαβράκι δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή, ενώ στον κρανιό παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση ½ και 1 h μετά την καταπόνηση και στις 2 h τα επίπεδα του φώσφορου είχαν επανέλθει στις αρχικές τιμές.

Σημαντική επίδραση της καταπόνησης παρατηρήθηκε και στη συγκέντρωση του μαγνησίου. Στο λαβράκι οι συγκεντρώσεις ήταν μεταξύ 1,1 – 3,1 mmol l^{-1} και εμφάνισαν μία συνεχή αυξητική τάση μετά την καταπόνηση, η οποία ήταν σημαντική ήδη από τη ½ h ενώ στις 4 h αυξήθηκε ακόμα περισσότερο (Εικόνα 3.1.11). Στον κρανιό η συγκέντρωση ήταν λίγο χαμηλότερα συγκριτικά με το λαβράκι, συγκεκριμένα μεταξύ 0,8 – 1,7 mmol l^{-1}, ενώ ως προς το χρονισμό μετά από μία αρχική αύξηση στις ½ h και 1 h παρατηρήθηκε επαναφορά στα αρχικά επίπεδα από τις 2 h και έπειτα.



Στατιστική ανάλυση					
	0h	**1/2h**	**1h**	**2h**	**4h**
Λαβράκι	Μη στατιστικά σημαντική διαφορά				
Κρανιός	abc	b	bc	a	ac

Εικόνα 3.1.10. Απόκριση της συγκέντρωσης φωσφόρου λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών μέσα στο ίδιο είδος.

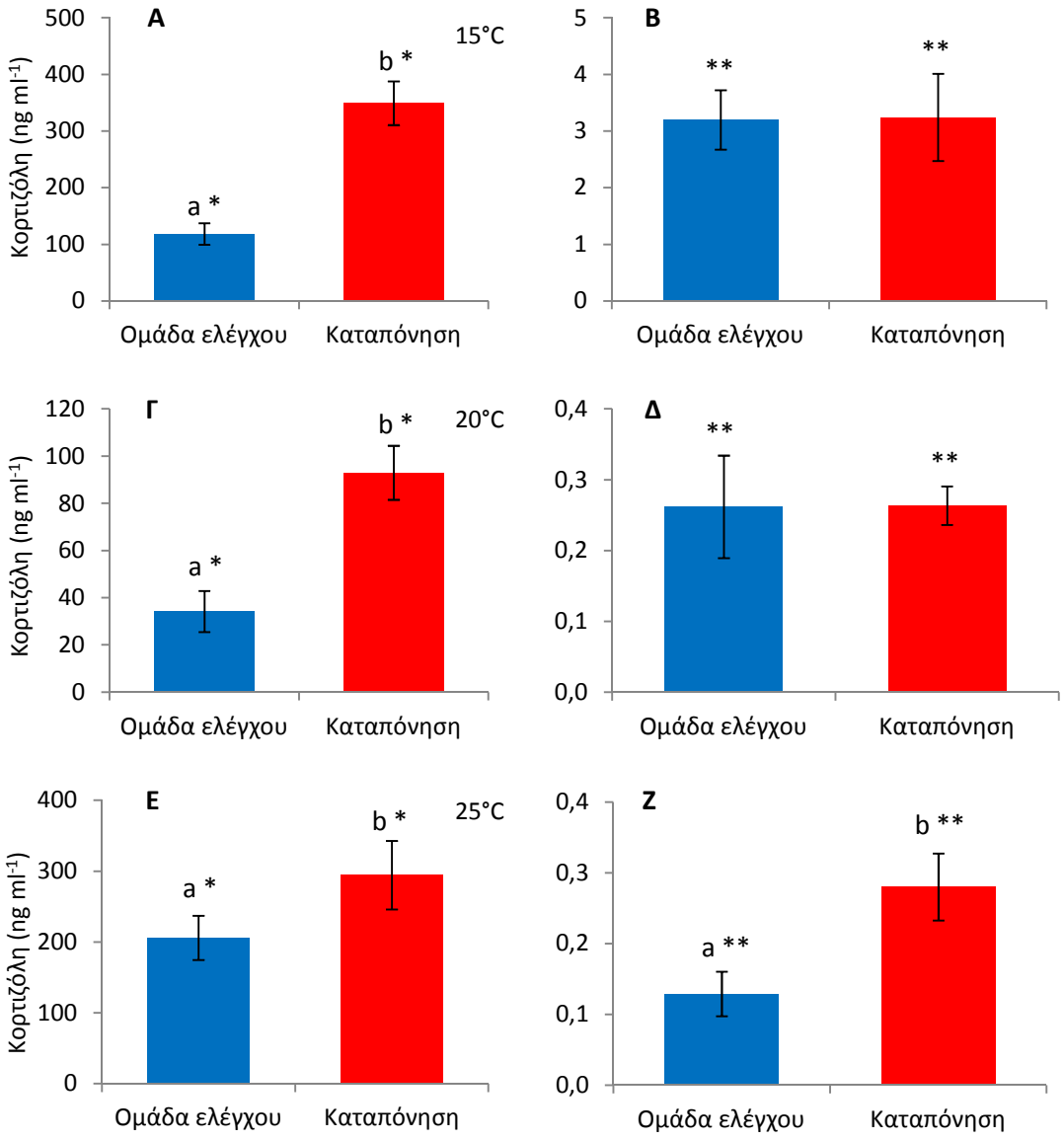


Στατιστική ανάλυση					
	0h	**1/2h**	**1h**	**2h**	**4h**
Λαβράκι	a	b	b	b	c
Κρανιός	a	b	b	a	a

Εικόνα 3.1.11. Απόκριση της συγκέντρωσης μαγνησίου (Mg^{+2}) λαβρακιών και κρανιών (mean ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα) μετά από έκθεση σε οξεία καταπόνηση. Τα διαφορετικά γράμματα δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών μέσα στο ίδιο είδος.

3.2 *Μεταβολικές επιπτώσεις οξείας καταπόνησης σε λαβράκι και κρανιό*

Τα άτομα και των δύο ειδών έδειξαν μία έντονη απόκριση μισή ώρα μετά την καταπόνηση στο σύνολο σχεδόν των φυσιολογικών παραμέτρων που μελετήθηκαν. Η απόκριση αυτή δεν ήταν πάντα η ίδια και για τα δύο είδη, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις διέφερε και στο ίδιο είδος μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών.



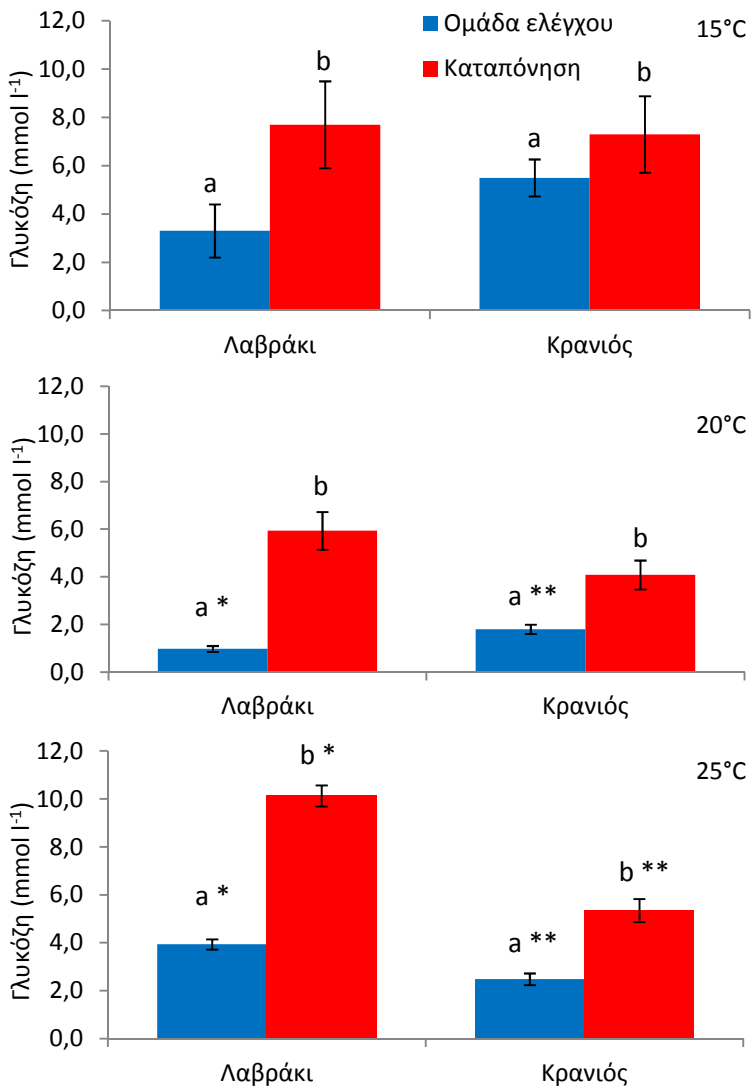
Εικόνα 3.2.1. Μεταβολές στη συγκέντρωση της κορτιζόλης του πλάσματος μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών (Α, Γ και Ε) και κρανιών (Β, Δ και Ζ) για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας. Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών. Η κλίμακα του κάθετου άξονα διαφέρει στα διαγράμματα.

Τα επίπεδα της κορτιζόλης μισή ώρα μετά την καταπόνηση αυξήθηκαν στο λαβράκι και στις τρεις δειγματοληψίες, ενώ παρέμειναν αμετάβλητα στον κρανιό για τις δειγματοληψίες των 15°C και 20°C και αυξήθηκαν στους 25°C (Εικόνα 3.2.1). Επιπλέον, σε όλες τις δειγματοληψίες το λαβράκι εμφάνιζε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τον κρανιό τόσο για την ομάδα ελέγχου όσο και για τα καταπονημένα άτομα.

Ακόμα, οι συγκεντρώσεις κορτιζόλης διέφεραν μεταξύ των δειγματοληψιών, με την ελάχιστη τιμή στο λαβράκι να εμφανίζεται στους 20°C και τη μέγιστη στους 25°C, ενώ στον κρανιό η μέγιστη ήταν στους 15°C με τα ψάρια στους 20°C και τους 25°C να έχουν παρόμοιες συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα των ιχθύων αυξήθηκε μισή ώρα μετά την έκθεση στην καταπόνηση (Εικόνα 3.2.2). Η αύξηση αυτή ήταν σημαντική σε όλες τις δειγματοληψίες. Οι διαφορές μεταξύ των ειδών ποίκιλαν ανάλογα με την εποχή. Έτσι, στους 15°C τα δύο είδη εμφάνιζαν παρόμοιες συγκεντρώσεις γλυκόζης στο αίμα για τα καταπονημένα και μη άτομα, στους 20°C ο κρανιός είχε υψηλότερη συγκέντρωση στην ομάδα ελέγχου χωρίς να υπάρχει διαφορά στα καταπονημένα άτομα και τέλος στους 25°C το λαβράκι παρουσίαζε υψηλότερες συγκεντρώσεις και για τους δύο χειρισμούς.

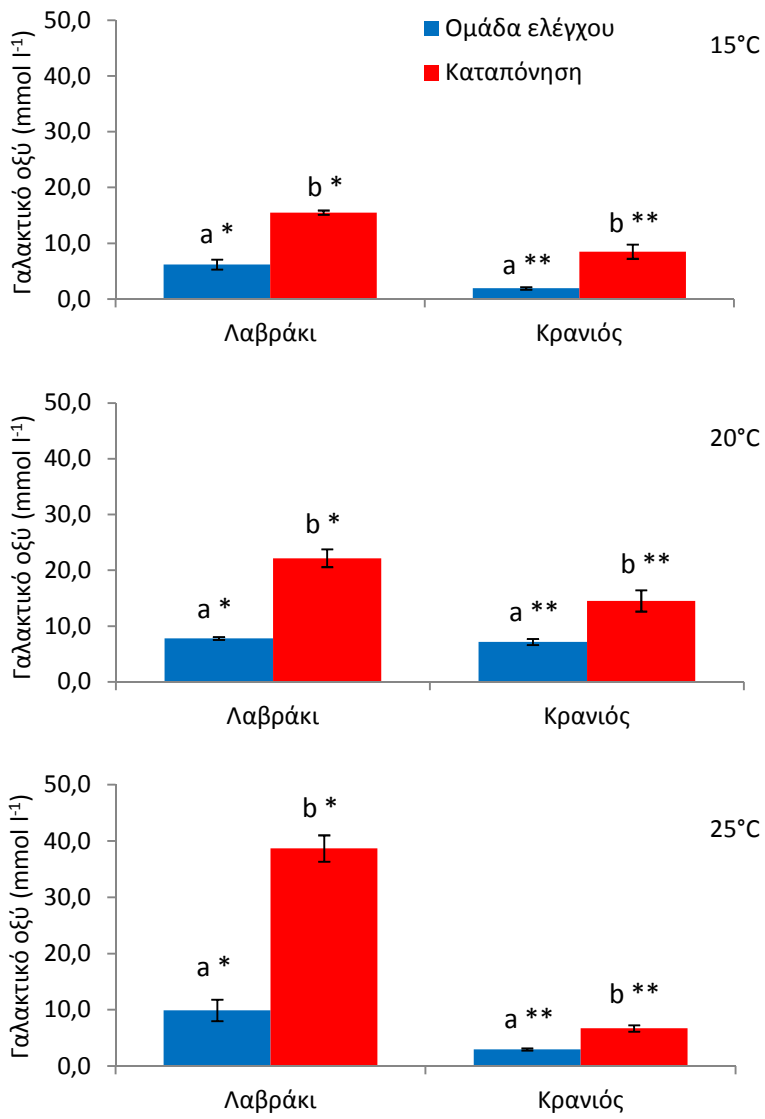
Αναφορικά με τις διαφορές στις τιμές μεταξύ των δειγματοληψιών, η ελάχιστη συγκέντρωση για την ομάδα ελέγχου παρατηρήθηκε στους 20°C και για τα δύο, ενώ στο λαβράκι η γλυκόζη ήταν παρόμοια στους 15°C και τους 25°C και ο κρανιός εμφάνιζε ένα μέγιστο στους 15°C (Εικόνα 3.2.2). Για τα καταπονημένα άτομα το πρότυπο ήταν το ίδιο, με τη διαφορά ότι η μέγιστη τιμή για το λαβράκι ήταν στους 25°C.



Εικόνα 3.2.2. Μεταβολές στη συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

Μισή ώρα μετά την καταπόνηση παρατηρήθηκε και στα δύο είδη σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος του αίματος σε όλες τις δειγματοληψίες (Εικόνα 3.2.3). Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις το λαβράκι εμφάνιζε υψηλότερα επίπεδα γαλακτικού οξέος συγκριτικά με τον κρανιό.

Σχετικά με τις διαφορές της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος ανάμεσα στις θερμοκρασίες, στο λαβράκι σημειώθηκε μία σταδιακή ελαφριά αύξηση από τους 15°C στους 25°C, ενώ στον κρανιό η μέγιστη τιμή ήταν στους 20°C και η ελάχιστη στους 15°C (Εικόνα 3.2.3).

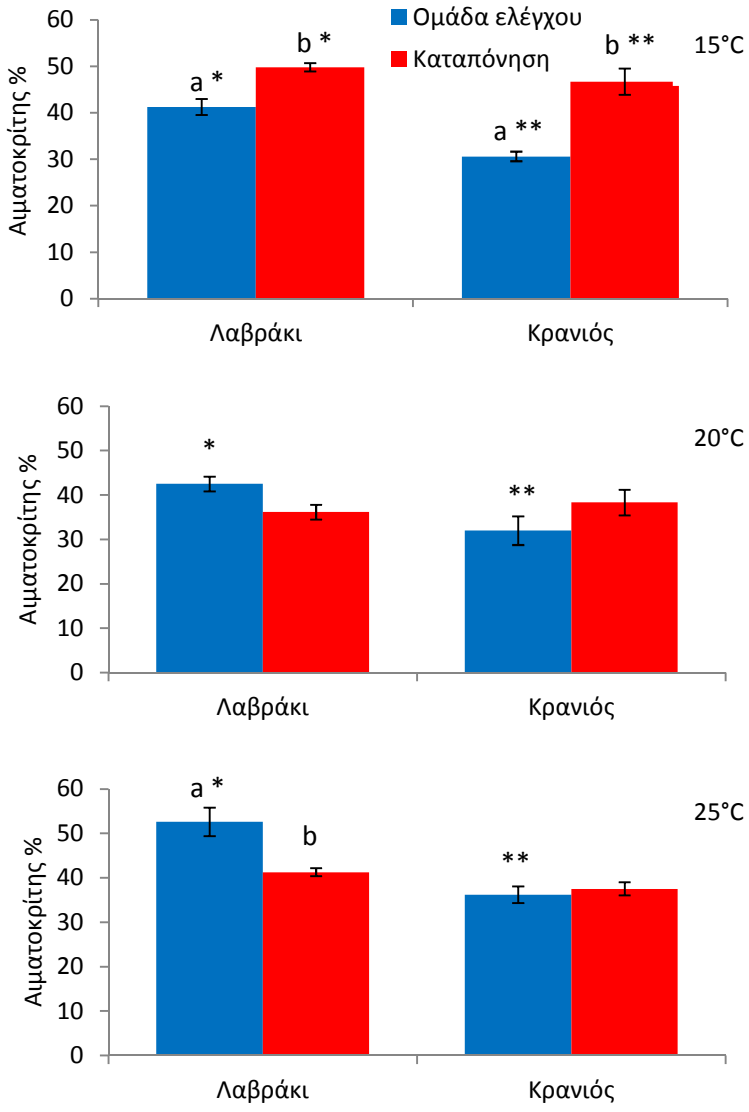


Εικόνα 3.2.3. Μεταβολές στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος του αίματος μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

Η απόκριση του αιματοκρίτη στην καταπόνηση διέφερε τόσο μεταξύ των δειγματοληψιών όσο και μεταξύ των ειδών (Εικόνα 3.2.4). Συγκεκριμένα, οι μοναδικές περιπτώσεις ενδοειδικών διαφορών μετά την καταπόνηση ήταν η αύξηση του αιματοκρίτη σε λαβράκια και κρανιούς στους 15°C και η μείωση στα λαβράκια στους 25°C. Για τον κρανιό και στις υπόλοιπες θερμοκρασίες εμφανίστηκε μία τάση αύξησης του αιματοκρίτη, αν και μη στατιστικά σημαντική, ενώ στο λαβράκι υπήρξε μία ελαφριά μείωση στους 20°C. Διαφορές μεταξύ των ειδών εντοπίστηκαν μεταξύ των ατόμων της ομάδας ελέγχου για όλες τις θερμοκρασίες, αλλά και μεταξύ των

καταπονημένων ατόμων στους 15°C, όπου το λαβράκι σε όλες τις περιπτώσεις είχε υψηλότερες τιμές.

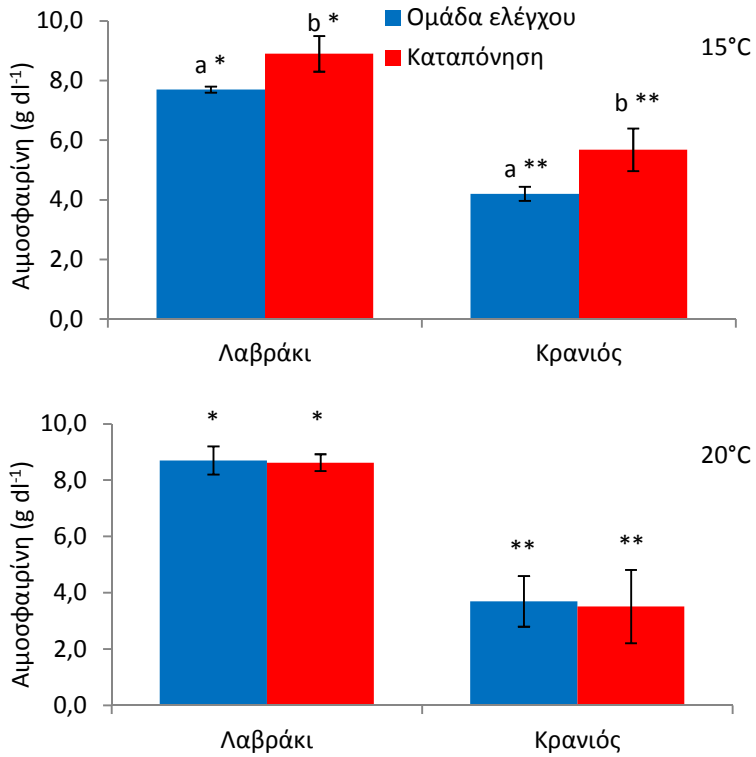
Μεταξύ των διαφορετικών δειγματοληψιών φάνηκε ο αιματοκρίτης να είναι υψηλότερος στην υψηλή θερμοκρασία και χαμηλότερος αλλά παρόμοιος στις άλλες δύο θερμοκρασίες και για τα δύο είδη (Εικόνα 3.2.4). Μετά την καταπόνηση, ωστόσο, η μέγιστη τιμή αιματοκρίτη παρατηρήθηκε και για τα δύο είδη στους 15°C.



Εικόνα 3.2.4. Μεταβολές στον αιματοκρίτη μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης δεν υπολογίστηκε για τον κρανιό της δειγματοληψίας των 25°C, καθώς ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της φορητής συσκευής που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση (<6 g dl^{-1}). Για το λαβράκι η αιμοσφαιρίνη σε αυτήν τη δειγματοληψία ήταν (mean ± S.E.M.) 9,3 ± 0,5 g dl^{-1} για την ομάδα ελέγχου και 8,5 ± 0,3 g dl^{-1} για τα καταπονημένα ψάρια. Η καταπόνηση φάνηκε να επιδρά στη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μόνο στη δειγματοληψία των 15°C, όπου και για τα δύο είδη παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσής της. Από την άλλη οι διαφορές μεταξύ των ειδών ήταν έντονες, με το λαβράκι να εμφανίζει πάντα υψηλότερες τιμές (Εικόνα 3.2.5).

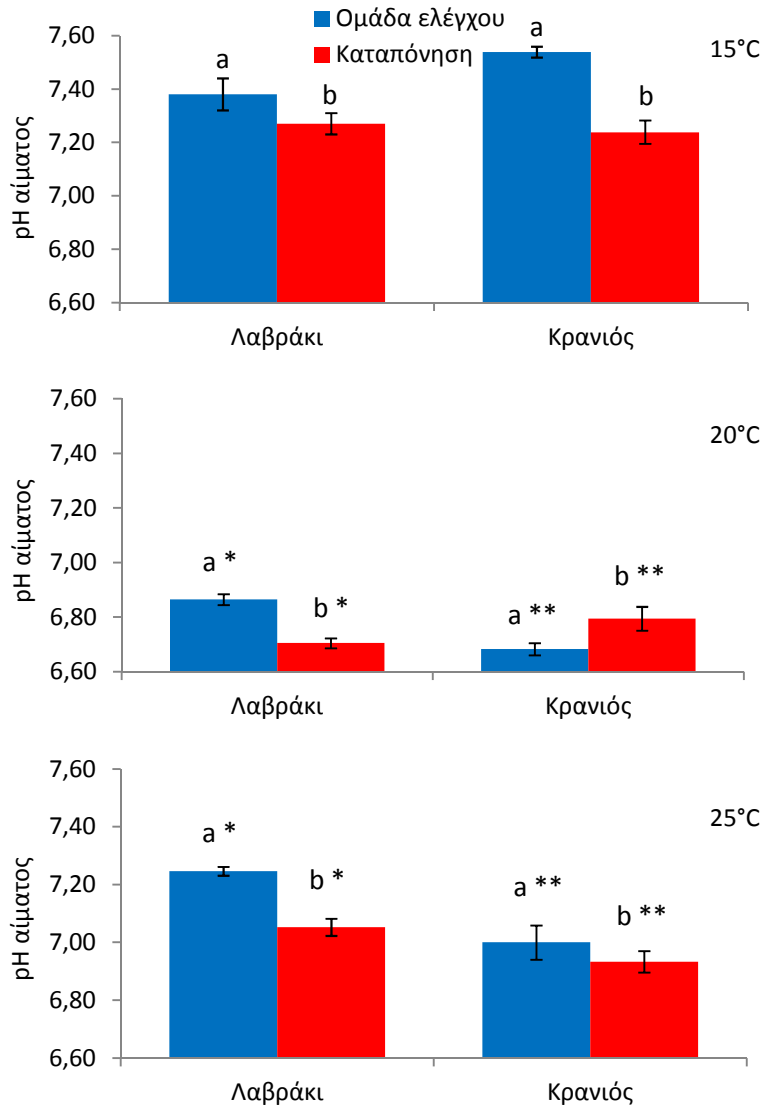
Μεταξύ των θερμοκρασιών δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση στη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης. Βέβαια, καθώς χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές εμπορικές συσκευασίας για τον υπολογισμό της αιμοσφαιρίνης στις τρεις δειγματοληψίες η εξαγωγή οποιουδήποτε συμπεράσματος είναι επισφαλής.



Εικόνα 3.2.5. Μεταβολές στη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις δύο διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C και 20°C).

Μισή ώρα μετά την καταπόνηση παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στο pH του αίματος σε όλες τις δειγματοληψίες και για τα δύο είδη (Εικόνα 3.2.6). Σε

κάθε περίπτωση η μεταβολή ήταν μείωση στην τιμή του pH, εκτός από τον κρανιό στη δειγματοληψία των 20°C, όπου παρατηρήθηκε αύξηση. Επιπλέον, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών, με το λαβράκι να έχει υψηλότερες τιμές βάσης συγκριτικά με τον κρανιό για τις δειγματοληψίες των 20°C και 25°C.

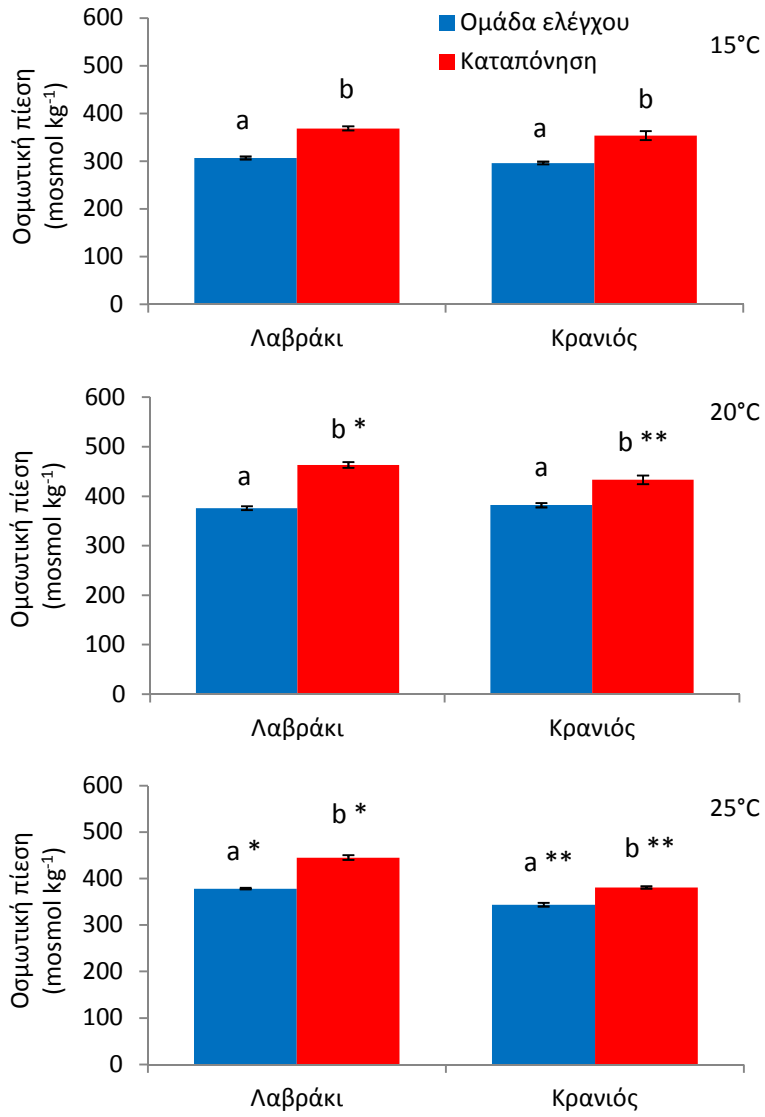


Εικόνα 3.2.6. Μεταβολές στο pH του αίματος μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

Αναφορικά με τις διαφορές στην τιμή του pH για τις διαφορετικές δειγματοληψίες, αυτή παρουσίαζε και για τα δύο είδη ελάχιστο στους 20°C, ενώ μεγιστοποιούνταν στους 15°C (Εικόνα 3.2.6). Ειδικά για τον κρανιό στους 15°C το

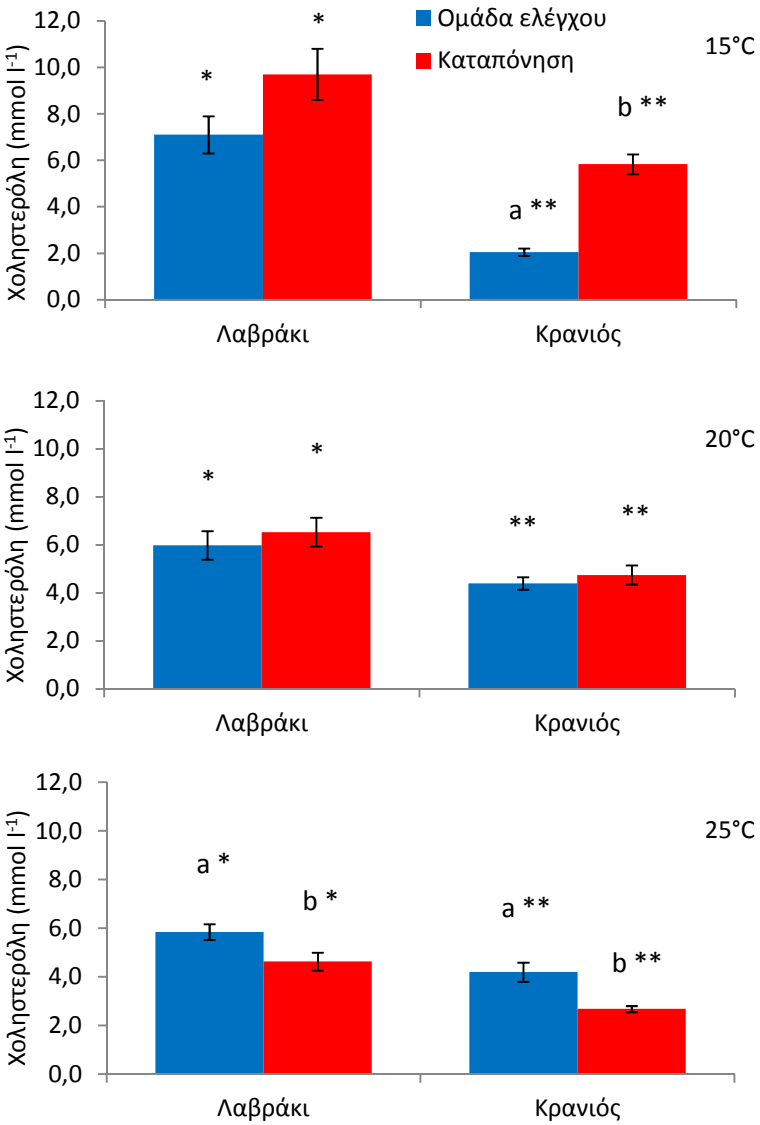
pH εμφάνισε πολύ υψηλή τιμή. Το πρότυπο αυτό ήταν ίδιο τόσο για την ομάδα ελέγχου όσο και για τα καταπονημένα ψάρια.

Όσον αφορά στην οσμωτική πίεση, υπήρχε αύξηση μετά την καταπόνηση και για τα δύο είδη σε όλες τις δειγματοληψίες (Εικόνα 3.2.7). Διαειδικές διαφορές εντοπίστηκαν στους 25°C και για τους δύο χειρισμούς και στους 20°C μόνο για τα καταπονημένα άτομα, με υψηλότερες τιμές πάντοτε στο λαβράκι. Η οσμωτική πίεση ήταν και για τα δύο είδη χαμηλότερη στη δειγματοληψία των 15°C, με τις άλλες δύο δειγματοληψίες να βρίσκονται σε παρόμοια επίπεδα.



Εικόνα 3.2.7. Μεταβολές στην οσμωτική πίεση μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

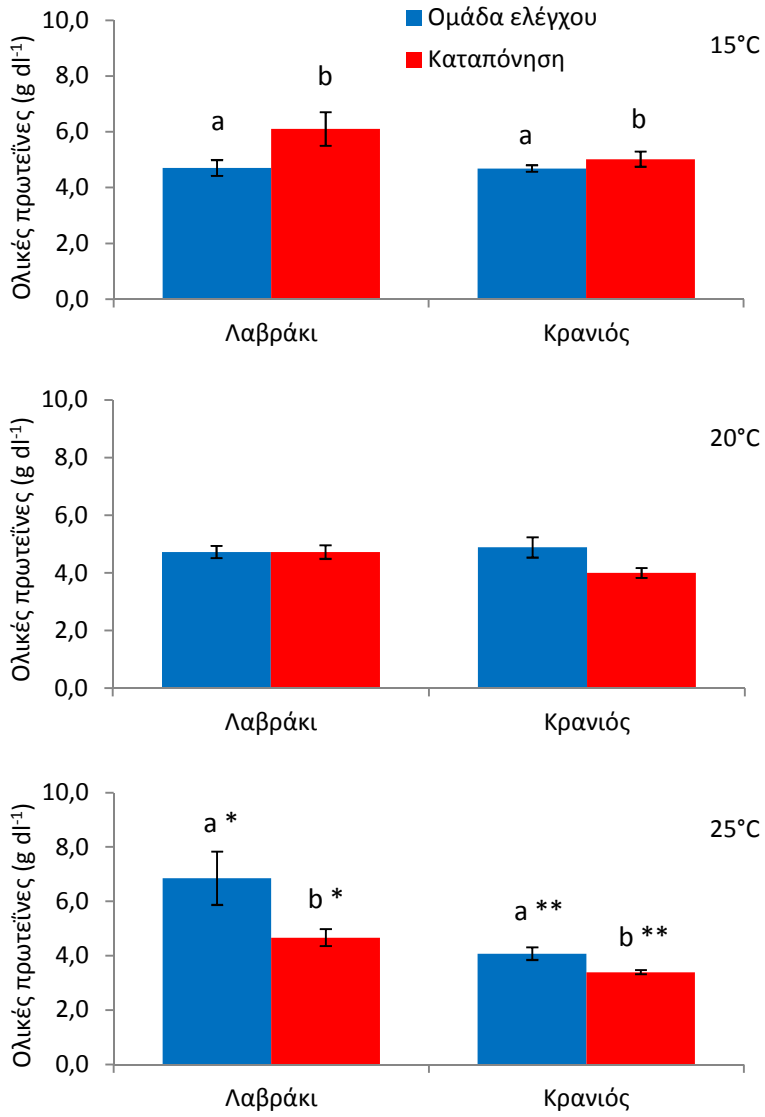
Η απόκριση της χοληστερόλης στην καταπόνηση ποίκιλε μεταξύ των δειγματοληψιών και των ειδών (Εικόνα 3.2.8). Έτσι, η συγκέντρωσή της στο λαβράκι παρέμεινε σταθερή στους 15°C και 20°C, ενώ μειώθηκε στους 25°C. Αντίθετα, στον κρανιό, αυξήθηκε στους 15°C, παρέμεινε σταθερή στους 20°C και μειώθηκε στους 25°C. Η συγκέντρωση της χοληστερόλης δεν φάνηκε να μεταβάλλεται στις διαφορετικές θερμοκρασίες για το λαβράκι, ενώ στον κρανιό, ήταν σε αρκετά χαμηλότερα επίπεδα στους 15°C συγκριτικά με τις άλλες δειγματοληψίες.



Εικόνα 3.2.8. Μεταβολές στη συγκέντρωση της χοληστερόλης μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

Η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών παρουσίασε σημαντική αύξηση στους 15°C, σημαντική μείωση στους 25°C, ενώ στην ενδιάμεση θερμοκρασία δεν παρατηρήθηκε μεταβολή και στα δύο είδη (Εικόνα 3.2.9). Επιπλέον, δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ λαβρακιού και κρανιού για τους 15°C και τους 20°C, ενώ στους 25°C το λαβράκι είχε μεγαλύτερες τιμές ολικών πρωτεϊνών.

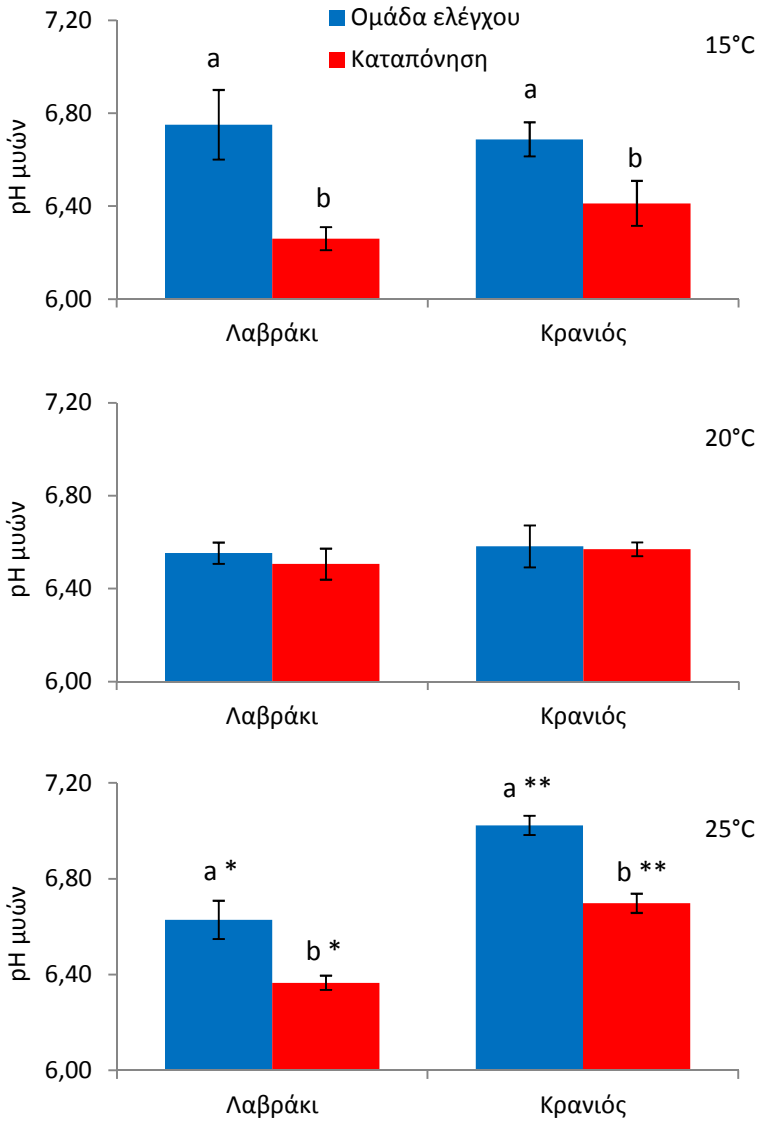
Αναφορικά με τις συγκεντρώσεις στις διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 25°C σημειώθηκε η υψηλότερη τιμή για το λαβράκι και η χαμηλότερη για τον κρανιό, αν και για τον τελευταίο οι διαφορές ήταν πολύ μικρές (Εικόνα 3.2.9).



Εικόνα 3.2.9. Μεταβολές στη συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

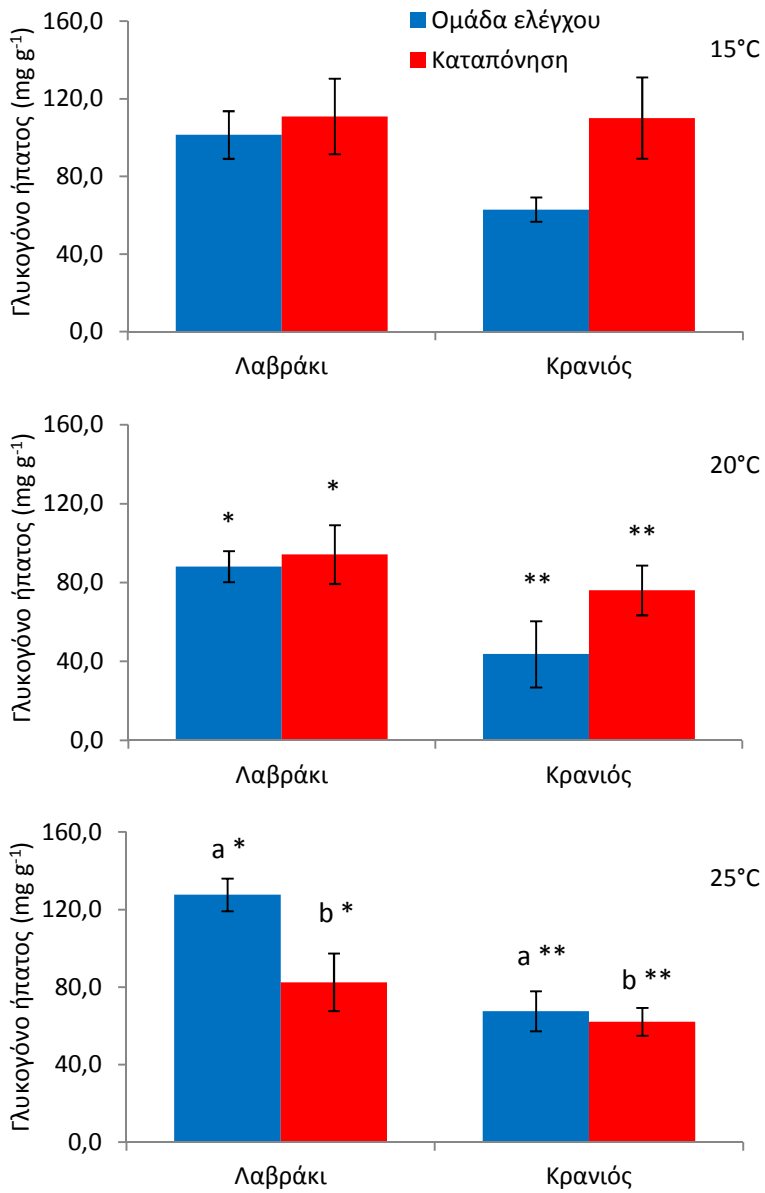
Το pH των μυών παρουσίασε σημαντική μείωση μετά την καταπόνηση και για τα δύο είδη στις δειγματοληψίες των 15°C και 25°C, ενώ αντίθετα δεν σημειώθηκε κάποια μεταβολή στους 20°C (3.2.10). Διαφορές μεταξύ των ειδών υπήρξαν μόνο στους 25°C, όπου ο κρανιός είχε υψηλότερες τιμές σε σχέση με το λαβράκι.

Μεταξύ των δειγματοληψιών οι διαφορές ήταν πολύ μικρές για το λαβράκι, με την εντονότερη διαφορά να εντοπίζεται στην υψηλή τιμή του pH των μυών στους 15°C (Εικόνα 3.2.10). Στον κρανιό, από την άλλη, η τιμή του pH στους 25°C ήταν πολύ υψηλότερη σε σχέση με τις άλλες δύο δειγματοληψίες.



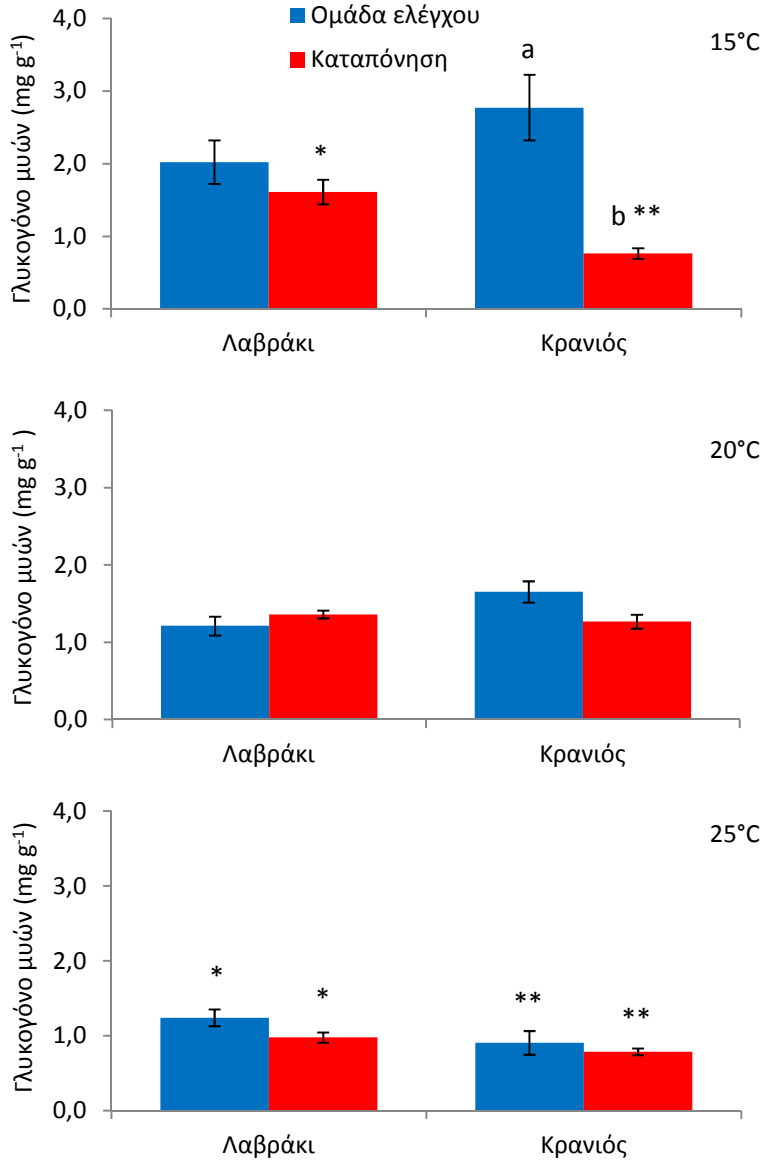
Εικόνα 3.2.10. Μεταβολές στο pH των μυών μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

Η επίδραση της οξείας καταπόνησης στη συγκέντρωση του ηπατικού γλυκογόνου διαφοροποιούνταν μεταξύ των ειδών και των θερμοκρασιών (Εικόνα 3.2.11). Έτσι, ενώ στους 15°C και στους 20°C δεν σημειώθηκε σημαντική επίδραση της καταπόνησης στα επίπεδα του γλυκογόνου για κανένα είδος, στους 25°C παρατηρήθηκε σημαντική μείωση και στο λαβράκι αλλά και στον κρανιό. Επιπλέον, στις δύο υψηλότερες θερμοκρασίες το λαβράκι εμφάνιζε υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκογόνου συγκριτικά με τον κρανιό τόσο πριν όσο και μετά την καταπόνηση.



Εικόνα 3.2.11. Μεταβολές στη συγκέντρωση του γλυκογόνου του ήπατος μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

Η συγκέντρωση του ηπατικού γλυκογόνου φάνηκε να είναι χαμηλή στους 20°C και για τα δύο είδη και υψηλότερη για τις άλλες δύο δειγματοληψίες (Εικόνα 3.2.11). Στον κρανιό, επιπλέον, παρατηρήθηκε πολύ υψηλή συγκέντρωση γλυκογόνου μετά την καταπόνηση στους 15°C.



Εικόνα 3.2.12. Μεταβολές στη συγκέντρωση του γλυκογόνου των μυών μεταξύ καταπονημένων και μη λαβρακιών και κρανιών για τις τρεις διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας (15°C, 20°C και 25°C). Με τα διαφορετικά γράμματα σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0,05$) μεταξύ καταπονημένων και μη ατόμων εντός του ίδιου είδους, ενώ με αστερίσκους μεταξύ των ειδών.

Το γλυκογόνο των μυών φανέρωσε μία τάση μείωσης μετά την καταπόνηση, η οποία όμως εκτός από τη περίπτωση του κρανιού στους 15°C δεν ήταν στατιστικά

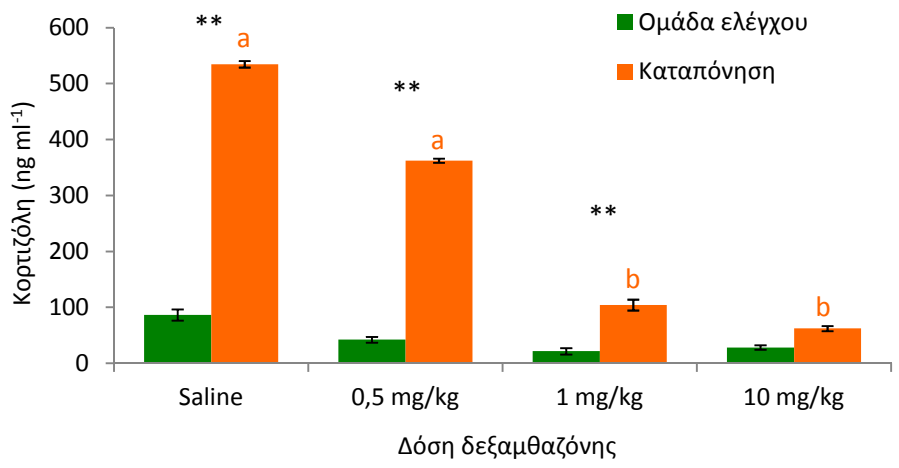
σημαντική (3.2.12). Διαφορές μεταξύ των ειδών παρατηρήθηκαν στους 25°C για κάθε χειρισμό και στους 15°C μόνο για τα καταπονημένα άτομα, με το λαβράκι να εμφανίζει υψηλότερες τιμές.

Η συγκέντρωση του γλυκογόνου των μυών εμφάνιζε την υψηλότερη τιμή στη δειγματοληψία των 15°C και για τα δύο είδη (Εικόνα 3.2.12). Για το λαβράκι οι τιμές στις άλλες δύο δειγματοληψίες ήταν παρόμοιες, ενώ για τον κρανιό η δειγματοληψία των 25°C εμφάνιζε τη διπλάσια συγκέντρωση σε σχέση με αυτή των 20°C.

3.3 Δοκιμασία Δεξαμεθαζόνης στο λαβράκι

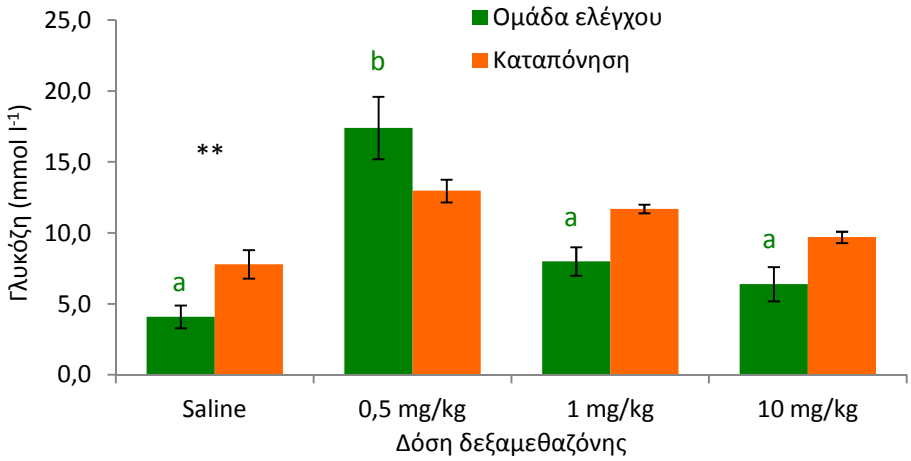
Η χορήγηση δεξαμεθαζόνης φάνηκε να μειώνει σημαντικά τη συγκέντρωση της κορτιζόλης, τόσο στα άτομα της ομάδας ελέγχου όσο και σε αυτά στα οποία εκτέθηκαν σε οξύ στρες 24 h μετά από τη χορήγηση της (Εικόνα 3.3.1). Όσον αφορά την επίδραση της δεξαμεθαζόνης στη μέση συγκέντρωση της κορτιζόλης στα άτομα της ομάδας ελέγχου αυτή μπορεί μεν να μην ήταν στατιστικά σημαντική για καμία δόση, αλλά η παρατηρούμενη μείωση ήταν της τάξης του 50% για τη μικρότερη δόση και του 75% για τις δύο μεγαλύτερες δόσεις.

Σημαντική επίδραση της δεξαμεθαζόνης φαίνεται να υπάρχει στην απόκριση της κορτιζόλης μία ώρα μετά την καταπόνηση (Εικόνα 3.3.1). Συγκεκριμένα, οι δύο μεγαλύτερες δόσεις (1 mg kg^{-1} και 10 mg kg^{-1}) παρεμπόδισαν σημαντικά την αύξηση της κορτιζόλης μετά την καταπόνηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου αλλά και τη μικρότερη δόση. Επιπλέον, η χορήγηση της μεγαλύτερης δόση των 10 mg kg^{-1} οδήγησε σε καταστολή της αύξησης της κορτιζόλης μια ώρα μετά από την εφαρμογή της καταπόνησης.



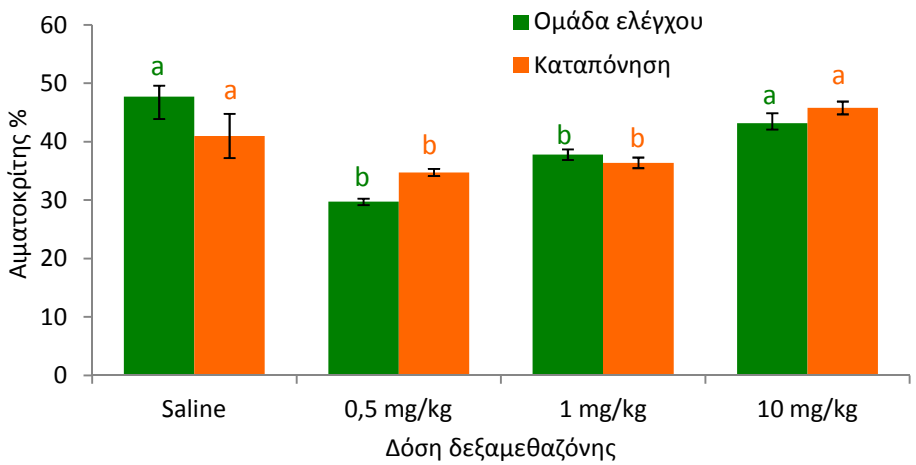
Εικόνα 3.3.1 Απόκριση της κορτιζόλης του πλάσματος 24 h μετά τη χορήγηση διαφορετικών δόσεων δεξαμεθαζόνης για τα καταπονημένα και μη άτομα. Οι τιμές δίνονται ως x ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα. Με ** σημειώνονται οι σημαντικές μεταβολές ($p<0,05$) λόγω καταπόνησης για κάθε δόση χωριστά, ενώ με διαφορετικά γράμματα οι διαφορές στις συγκεντρώσεις μεταξύ των δόσεων για τον ίδιο χειρισμό. Το χρώμα των γραμμάτων αντιστοιχεί με τον χειρισμό στον οποίο αναφέρεται.

Επιπλέον, η χορήγηση της δεξαμεθαζόνης είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της γλυκόζης στο πλάσμα, με τη μέγιστη επίδραση να εντοπίζετε στη χαμηλότερη δόση των ½ mg kg^{-1}, όπου και η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.3.2). Ακόμα, μετά την καταπόνηση δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση για τις ομάδες όπου είχαν δεχτεί ένεση με δεξαμεθαζόνη, εν αντιθέσει με την ομάδα ελέγχου.



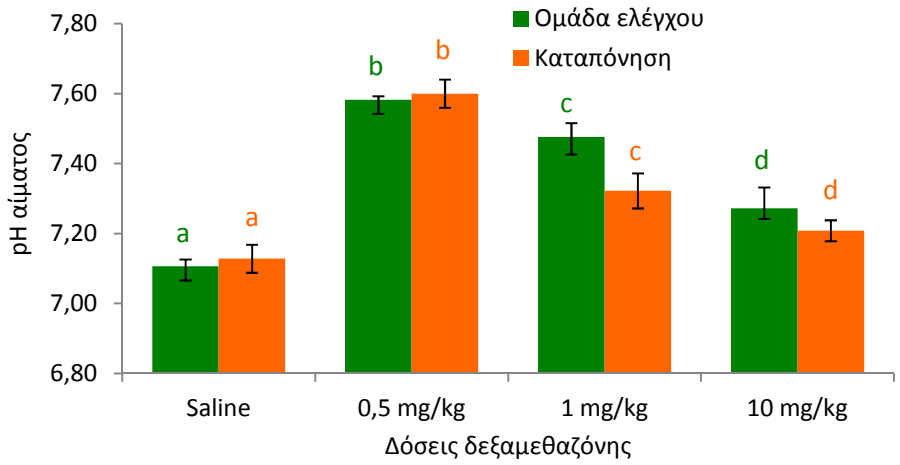
Εικόνα 3.3.2. Απόκριση της γλυκόζης του πλάσματος 24 h μετά τη χορήγηση διαφορετικών δόσεων δεξαμεθαζόνης, για τα καταπονημένα και μη άτομα. Οι τιμές δίνονται ως x ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα. Με ** σημειώνονται οι σημαντικές μεταβολές ($p<0,05$) λόγω καταπόνησης για κάθε δόση χωριστά, ενώ με διαφορετικά γράμματα οι διαφορές στις συγκεντρώσεις μεταξύ των δόσεων για τον ίδιο χειρισμό. Το χρώμα των γραμμάτων αντιστοιχεί με τον χειρισμό στον οποίο αναφέρεται.

Οι χαμηλές δόσεις δεξαμεθαζόνης (½ mg kg^{-1} και 1 mg kg^{-1}) φάνηκε πως είχαν επίδραση στον αιματοκρίτη των ψαριών, συγκεκριμένα μειώνοντάς τον (Εικόνα 3.3.3). Αντίθετα, η μεγάλη δόση δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή στον αιματοκρίτη. Επιπλέον, μετά την εφαρμογή της καταπόνησης στα ψάρια δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή για καμία ομάδα λαβρακιών.



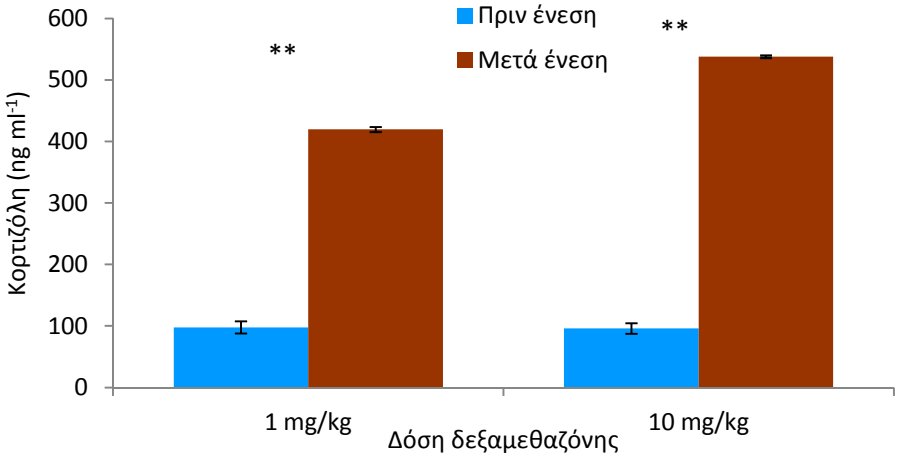
Εικόνα 3.3.3. Απόκριση του αιματοκρίτη 24 h μετά τη χορήγηση διαφορετικών δόσεων δεξαμεθαζόνης, για τα καταπονημένα και μη άτομα. Οι τιμές δίνονται ως x ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα. Με ** σημειώνονται οι σημαντικές μεταβολές ($p<0,05$) λόγω καταπόνησης για κάθε δόση χωριστά, ενώ με διαφορετικά γράμματα οι διαφορές στις συγκεντρώσεις μεταξύ των δόσεων για τον ίδιο χειρισμό. Το χρώμα των γραμμάτων αντιστοιχεί με τον χειρισμό στον οποίο αναφέρεται.

Διαφορά ανάλογα με το δόση φάνηκε να υπάρχει και για την τιμή του pH του αίματος (Εικόνα 3.3.4). Συγκεκριμένα, η ομάδα που δέχτηκε ένεση με φυσιολογικό ορό είχε το χαμηλότερο pH, ακολουθούμενη σε αύξουσα σειρά από τις δόσεις 10 mg kg^{-1}, 1 mg kg^{-1} και ½ mg kg^{-1}. Τέλος, όπως και για τον αιματοκρίτη δεν παρατηρήθηκε για καμία δόση σημαντική μεταβολή στην τιμή του pH μετά την καταπόνηση.



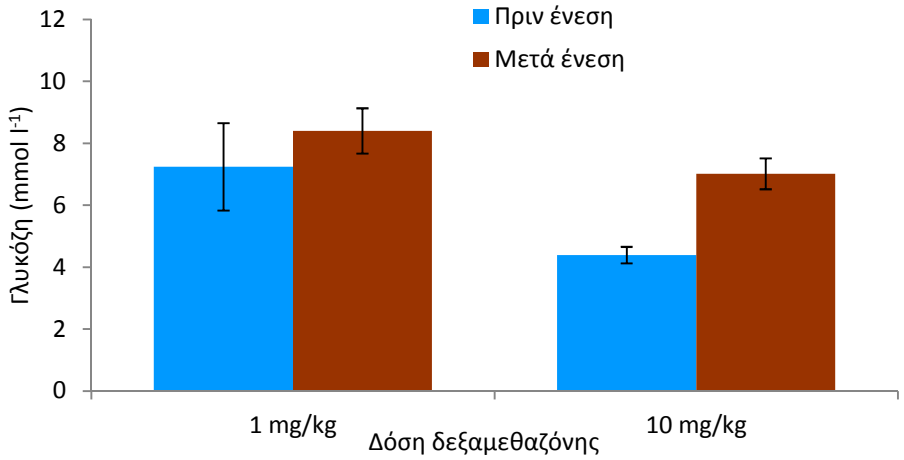
Εικόνα 3.3.4. Απόκριση του pH του αίματος 24 h μετά τη χορήγηση διαφορετικών δόσεων δεξαμεθαζόνης, για τα καταπονημένα και μη άτομα. Οι τιμές δίνονται ως x ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα. Με ** σημειώνονται οι σημαντικές μεταβολές ($p<0,05$) λόγω καταπόνησης για κάθε δόση χωριστά, ενώ με διαφορετικά γράμματα οι διαφορές στις συγκεντρώσεις μεταξύ των δόσεων για τον ίδιο χειρισμό. Το χρώμα των γραμμάτων αντιστοιχεί με τον χειρισμό στον οποίο αναφέρεται.

Για να ελεγχθεί η πιθανή δράση της δεξαμεθαζόνης σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 24 h, χορηγήθηκε σε δυο δόσεις (1 mg kg^{-1} και 10 mg kg^{-1}) και μετρήθηκε η συγκέντρωση της κορτιζόλης στα ίδια άτομα στις 0 και 4 h μετά από την χορήγηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δεξαμεθαζόνη οδήγησε σε σημαντική αύξηση της μέσης συγκέντρωσης της κορτιζόλης στις 4 h από την ένεση (Εικόνα 3.3.5), σε αντίθεση με την μείωση που παρατηρήθηκε στις 24 h μετά την χορήγηση της στο προηγούμενο πείραμα (Εικόνα 3.3.1).



Εικόνα 3.3.5. Απόκριση της κορτιζόλης του πλάσματος 4 h μετά τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης. Οι τιμές δίνονται ως x ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα. Με ** σημειώνονται οι σημαντικές μεταβολές ($p<0,05$) μετά τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης για κάθε δόση χωριστά.

Παρ' όλο που 4 h μετά την ένεση με δεξαμεθαζόνη εμφανίστηκε μία αύξηση στην κορτιζόλη, δεν φάνηκε να υπάρχει αλλαγή στη συγκέντρωση της γλυκόζης (Εικόνες 3.3.6).



Εικόνα 3.3.6. Απόκριση της γλυκόζης του πλάσματος 4 h μετά από χορήγηση δεξαμεθαζόνης. Οι τιμές δίνονται ως x ± S.E.M., n = 5 άτομα ανά ομάδα. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

4 Συζήτηση

Η μελέτη της απόκρισης στην καταπόνηση σε λαβράκια και κρανιούς με τη χρήση ίδιου πρωτόκολλου καταπόνησης και ίδιων συνθηκών εκτροφής επιβεβαίωσε τις ειδο-ειδικές διαφορές που έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των δύο αυτών ειδών τόσο στην ένταση, όσο και στο χρονισμό της απόκρισης (Fanouraki *et al.*, 2011).

Όσον αφορά στη γλυκόζη, οι μεταβολές στη συγκέντρωσή της στο αίμα μετά την καταπόνηση ταιριάζουν με το πρότυπο που έχει παρατηρηθεί για το λαβράκι (Di Marco *et al.*, 2008; Fanouraki *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα, ήδη από τη ½ h παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη γλυκόζη, η οποία μεγιστοποιήθηκε στη 1 h, παραμένοντας αμετάβλητη μέχρι και τις 4 h. Στον κρανιό το μέγιστο της απόκρισης εμφανίστηκε επίσης στη 1 h, μισή ώρα αργότερα δηλαδή σε σχέση με τη βιβλιογραφία (Fanouraki *et al.*, 2011). Εν αντιθέσει με το λαβράκι, στον κρανιό τα επίπεδα της γλυκόζης μειώθηκαν πολύ σύντομα, φτάνοντας στα αρχικά επίπεδα ήδη από τις 2 h. Επιπλέον, οι τιμές της γλυκόζης στο λαβράκι ήταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος υψηλότερες από αυτές του κρανιού.

Παρόλο που η απόκριση στην καταπόνηση ήταν παρόμοια με την αναμενόμενη σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης ήταν σχετικά χαμηλές και για τα δύο είδη (Cerda-Reverter *et al.*, 1998; Santulli *et al.*, 1999; Marino *et al.*, 2001; Caruso *et al.*, 2005; Di Marco *et al.*, 2008; Chatzifotis *et al.*, 2010; Enes *et al.*, 2010; Chatzifotis *et al.*, 2011; Fanouraki *et al.*, 2011; Petochi *et al.*, 2011). Αν και για αυτές τις χαμηλές τιμές θα μπορούσε να ευθύνεται η νηστεία που υπέστησαν τα ζώα για ένα περίπου μήνα, την οποία ακολούθησε κανονική τροφοληψία για ένα μήνα πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων (βλ. υποενότητα 2.1.1.), κάτι τέτοιο μάλλον δεν ισχύει, καθώς σε λαβράκια που υπόκεινται δύο μήνες νηστείας τους οποίους ακολουθούν δύο μήνες κανονικής τροφοληψίας δε μεταβάλλεται η γλυκόζη του αίματος σε σχέση με αυτά που τρέφονταν κανονικά σε όλο το διάστημα των τεσσάρων μηνών (Chatzifotis *et al.*, 2011).

Αντίθετα με τη γλυκόζη, ο αιματοκρίτης δεν παρουσίασε κάποια σημαντική μεταβολή στην καταπόνηση για κανένα είδος. Τα επίπεδα του αιματοκρίτη για το λαβράκι εμφανίστηκαν λίγο αυξημένα σε σχέση με προηγούμενες μελέτες (Caruso *et al.*, 2005; Peruzzi *et al.*, 2005; Petochi *et al.*, 2011), ενώ για τον κρανιό δεν βρέθηκαν δημοσιευμένες τιμές, παρουσίασε όμως λίγο χαμηλότερες τιμές από το συγγενικό του

mulloway, *Argyrosomus japonicus*, που εμφάνιζε τιμές μεταξύ 43% - 46%, ανάλογα με την πυκνότητα στην οποία εκτρέφονταν (Woolley 2009).

Μη σημαντική επίδραση της καταπόνησης παρατηρήθηκε και στην αιμοσφαιρίνη των δύο ειδών. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος το λαβράκι εμφάνιζε υψηλότερες συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης σε σχέση με τον κρανιό. Συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης ήταν ελαφρώς μικρότερα στο λαβράκι (Caruso *et al*., 2005; Petochi *et al*., 2011), ενώ για τον κρανιό δεν υπάρχουν δεδομένα. Σε σχέση όμως και πάλι με το συγγενικό του mulloway, *Argyrosomus japonicus*, που η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης ήταν περίπου 7,7 mg dl^{-1}, ο κρανιός φάνηκε να έχει χαμηλότερη συγκέντρωση (Wolley 2009).

Διαφορετική απόκριση των δύο ειδών παρατηρήθηκε και στο pH του αίματος. Στο λαβράκι εμφανίστηκε ελάχιστο στην τιμή του pH ½ h μετά την καταπόνηση, ενώ στις 4 h σημειώθηκε η μέγιστη τιμή. Από την άλλη στον κρανιό αρχικά παρατήθηκε μία πολύ μεγάλη αύξηση στο pH του αίματος η οποία παρέμεινε μέχρι τη 1 h, επιστρέφοντας στην αρχική τιμή στις 2 h. Μεταξύ των ειδών, στο λαβράκι το pH του αίματος ήταν υψηλότερο από του κρανιού, εκτός από τη ½ h και 1 h, όποτε παρουσιάστηκε το μέγιστο στον κρανιό φτάνοντας έτσι τα επίπεδα του λαβρακιού.

Οι τιμές που παρατηρήθηκαν για το λαβράκι ήταν σε συμφωνία με αυτές προηγούμενων μελετών (Sammouth *et al.*, 2009; Lemarie *et al.*, 2011; Petochi *et al.*, 2011), ενώ δεν υπάρχουν δημοσιευμένες τιμές για τον κρανιό. Ως προς την κινητική δεν υπάρχουν δεδομένα για τα συγκεκριμένα είδη, συγκρινόμενα όμως με άλλα από τη βιβλιογραφία, κυρίως την ιριδίζουσα πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss* (Milligan & Wood 1987; Schulte *et al.*, 1992) και το starry flounder, *Platichthys stellatus,* (Milligan & Wood 1987) παρατηρήθηκε ίδιο πρότυπο για το λαβράκι, ενώ η αύξηση στο pH του αίματος του κρανιού δεν έχει σημειωθεί σε κανένα είδος. Επιπλέον και τα δύο είδη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία εμφάνιζαν γρήγορη επαναφορά στις αρχικές τιμές (1 h για το λαβράκι και 2 h για τον κρανιό), εν αντιθέσει με την πέστροφα και το starry flounder για τα οποία απαιτούνταν 2 έως 4 h και 4 h αντίστοιχα, γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται στη χαμηλότερη θερμοκρασία νερού στην οποία εκτρέφονται τα είδη αυτά (10-15°C).

Αναφορικά με το pH των μυών, τα δύο είδη αποκρίθηκαν με τον ίδιο τρόπο σημειώνοντας μείωση στην ½ h με επαναφορά στα αρχικά επίπεδα ήδη από την 1 h και αύξηση πέραν της βασικής τιμής στις 4 h. Εν αντιθέσει με τις προηγούμενες παραμέτρους, το pH στους μύες εμφάνιζε υψηλότερες τιμές στον κρανιό συγκριτικά

με το λαβράκι. Οι τιμές που βρέθηκαν και στα δύο είδη είναι στα ίδια επίπεδα με προηγούμενες μελέτες (Poli *et al.*, 2003; Acerete et al., 2009). Όπως και με το pH του αίματος, το pH των μυών εμφανίζει και για τα δύο είδη γρήγορη επαναφορά στα αρχικά επίπεδα σε σχέση με την ιριδίζουσα πέστροφα, όπου η ανάκτηση απαιτεί 2 με 6 h (Milligan & Wood 1986; Tang & Boutilier 1991; Kieffer *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994; Milligan 1996). Η ταχύτερη επαναφορά στο λαβράκι και τον κρανιό μπορεί να σχετίζεται με την υψηλότερη, συγκριτικά με την ιριδίζουσα πέστροφα, θερμοκρασία νερού στο οποίο εκτρέφονταν. Αύξηση του pH πέρα των αρχικών επιπέδων, όπως συνέβη για τον κρανιό και το λαβράκι, δεν έχει παρατηρηθεί σε καμία από τις παραπάνω μελέτες.

Το ήπαρ αποτελεί μία πολύ μεγάλη αποθήκη υδατανθράκων, υπό μορφή γλυκογόνου, στα ψάρια. Συνεπώς η απόκριση του ηπατικού γλυκογόνου στην καταπόνηση εμφανίζει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον. Στο λαβράκι, μετά την καταπόνηση αρχικά παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση στη ½ h ακολουθούμενη από μία πτώση στις 2 h η οποία έγινε στατιστικά σημαντική στις 4 h. Στον κρανιό αντίθετα, δε σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές παρά μόνο μία αύξηση στις 4 h. Μεταξύ των δύο ειδών η διαφορά στη συγκέντρωση ήταν τεράστια με το λαβράκι να εμφανίζει 60 περίπου φορές περισσότερο γλυκογόνο στο ήπαρ.

Οι τιμές ηπατικού γλυκογόνου για το λαβράκι ήταν υψηλότερες από αυτές ορισμένων εργασιών (Perez *et al.*, 1989; Perez *et al.*, 1991; Pastoureaud 1991; Perez *et al.*, 1999; Chatzifotis *et al.*, 2011), ενώ ήταν στα ίδια επίπεδα με κάποιες άλλες (Perez-Jimenez *et al.*, 2007; Enes *et al.*, 2010). Βέβαια, καθώς οι θρεπτικές καταστάσεις στις οποίες βρίσκονταν τα ζώα αλλά και λόγω των διαφορών στις μεθόδους που ακολουθούνται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ηπατικού γλυκογόνου μεταξύ των μελετών είναι δύσκολο να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα από αυτές τις συγκρίσεις.

Στον κρανιό η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι πολύ μικρή συγκριτικά με τη μοναδική δημοσιευμένη μελέτη (Chatzifotis *et al.*, 2010) αλλά και με τις τιμές που παρατηρήθηκαν στο δεύτερο πείραμα της παρούσας εργασίας που έλαβε χώρα σε ψάρια εκτρεφόμενα σε ιχθυοκλωβούς. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται είτε στο μικρό μέγεθος των ψαριών, είτε στο γεγονός ότι μερικούς μήνες πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων τα ψάρια είχαν μειωμένη πρόσβαση σε τροφή. Βέβαια, το ηπατικό γλυκογόνο σε ένα άλλο είδος ψαριού, τον κουτσουρά, *Carassius carassius*, φαίνεται να είναι αυξημένο και να αποτελεί τη μεγαλύτερη αποθήκη γλυκογόνου στα

μικρά και όχι στα μεγάλα άτομα του είδους (Vornanen *et al.,* 2011). Επίσης, όταν η νηστεία ακολουθείται από κανονική τροφοληψία τα αποθέματα του ηπατικού γλυκογόνου αναπληρώνονται σχετικά γρήγορα τόσο στο λαβράκι (Chatzifotis *et al.,* 2011), όσο και στην τσιπούρα (Power *et al.,* 2000). Επομένως, είναι δύσκολο να εξακριβωθεί ποιά ήταν η αιτία για τα χαμηλά αποθέματα ηπατικού γλυκογόνου στους κρανιούς, καθώς είναι πιθανό να ευθύνεται κάποιος άλλος παράγοντας εκτός από τους προαναφερθέντες, ή ακόμα να είναι αποτέλεσμα συνδυασμού παραγόντων.

Η απόκριση του ηπατικού γλυκογόνου μετά την καταπόνηση ποικίλει μεταξύ των ειδών αλλά και του αναπτυξιακού σταδίου και της μεταβολικής κατάστασης στην οποία βρίσκονται τα άτομα (Pagnotta & Milligan 1991). Έτσι, στη βιβλιογραφία έχουν σημειωθεί διαφορετικές αποκρίσεις για το ίδιο είδος (την ιριδίζουσα πέστροφα), που περιλαμβάνουν τη μείωση του γλυκογόνου (Dobsdon & Hochachka 1987) ή τη μη σημαντική μεταβολή του (Pagnotta & Milligan 1991; Milligan & Girard 1993). Το πρότυπο της απόκρισης του γλυκογόνου στο λαβράκι, έχει παρατηρηθεί και σε άλλα ενεργητικά είδη, όπως η ιριδίζουσα πέστροφα (Dobsdon & Hochachka 1987; Milligan & Girard 1993), ενώ του κρανιού σε νωθρά είδη όπως το winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus,* (Pagnotta & Milligan 1991).

Εν αντιθέσει με το γλυκογόνο του ήπατος, το γλυκογόνο των μυών εμφάνισε για το λαβράκι μία σημαντική μείωση από την ½ h έως και τις 2 h μετά την καταπόνηση. Στον κρανιό από την άλλη δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή. Τα αποθέματα του μυ σε γλυκογόνο ήταν υψηλότερα για το λαβράκι απ' ότι για τον κρανιό, χωρίς όμως να παρατηρείται η έντονη διαφορά που σημειώθηκε στο ήπαρ. Οι τιμές που βρέθηκαν για το λαβράκι ήταν παρόμοιες με αυτές άλλες εργασιών (Perez *et al.,* 1999; Enes *et al.,* 2010) ενώ όπως και για το ήπαρ ήταν υψηλότερες συγκριτικά με κάποιες άλλες μελέτες (Perez *et al.,* 1989; Greco *et al.,* 2010; Chatzifotis *et al.,* 2011). Για τον κρανιό δεν υπάρχουν δημοσιευμένες τιμές.

Το πρότυπο της κινητικής για το λαβράκι είναι παρόμοιο με αυτό που έχει παρατηρηθεί τόσο για την ιριδίζουσα πέστροφα όσο και για το winter flounder, με τη διαφορά ότι στο λαβράκι σημειώθηκε συντομότερη επιστροφή στα αρχικά επίπεδα (Dobson & Hochachka 1987; Pearson *et al.,* 1990; Pagnotta & Milligan 1991; Schulte *et al.,* 1992; Milligan & Girrard 1993; Kieffer *et al.,* 1994; Wang *et al.,* 1994, Milligan 1996). Η πιο γρήγορη αυτή επιστροφή πιθανώς να οφείλεται σε διαφορετική ένταση της καταπόνησης, καθώς στις παραπάνω μελέτες τα ψάρια αναγκάζονταν να κολυμπήσουν μέχρι την πλήρη εξάντληση, αλλά και στη χαμηλότερη θερμοκρασία

νερού συγκριτικά με τα πειράματα της παρούσας εργασίας. Μία άλλη εξήγηση θα μπορούσε να σχετίζεται με τη γρήγορη, εν αντιθέσει με τα προαναφερθέντα είδη, επαναφορά του pH των μυών ήδη από τη 1 h στο λαβράκι, καθώς θεωρείται πως για να ξεκινήσει η αναπλήρωση του γλυκογόνου των μυών απαιτείται να επανέλθει το pH τους σε φυσιολογικά επίπεδα (Milligan & Wood 1986).

Από την άλλη, η μη αξιοποίηση των αποθεμάτων γλυκογόνου τόσο του ήπατος όσο και των μυών κατά την καταπόνηση στον κρανιό δεν έχει παρατηρηθεί σε άλλα είδη. Έτσι, η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης που παρατηρείται πιθανώς να προέρχεται κυρίως από ηπατική γλυκονεογένεση, από υποστρώματα όπως η γλυκερόλη, η αλανίνη και το ασπαρτικό οξύ, όπως έχει φανεί στο αμερικανικό χέλι, *Anguilla rostrata*, όπου όταν τα παραπάνω υποστρώματα είναι σε αφθονία προάγεται η γλυκονεογένεση έναντι της γλυκογενόλυσης (Renaud & Moon 1980).

Από τους ηλεκτρολύτες που μελετήθηκαν μόνο στο φώσφορο για τον κρανιό και στο μαγνήσιο και για τα δύο είδη παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μετά την καταπόνηση. Ο φώσφορος (P) εμφάνισε μία μικρή αύξηση στο διάστημα ½ h και 1 h, η οποία ακολουθήθηκε από μία σημαντική μείωση στις 2 h. Στο λαβράκι, όπως αναφέρθηκε, η συγκέντρωση του φώσφορου παρέμεινε αμετάβλητη μετά την καταπόνηση, ενώ ήταν σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες στο είδος (Peruzzi *et al.*, 2005). Το μαγνήσιο (Mg^{2+}), από την άλλη, παρουσίασε μία σημαντική αύξηση στη ½ h και στα δύο είδη, η οποία αυξήθηκε περαιτέρω στις 4 h στο λαβράκι, ενώ επανήλθε στα αρχικά επίπεδα στις 2 h στον κρανιό. Η συγκέντρωση του μαγνησίου στο λαβράκι ήταν όμοια με αυτή προηγούμενων μελετών, ενώ το πρότυπο ήταν παρόμοιο, με τη διαφορά ότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία παρατηρήθηκε μείωση στις 2 h (Peruzzi *et al.*, 2005, Φανουράκη 2010). Όσον αφορά στον κρανιό, υπάρχει ταύτιση τόσο με τις τιμές όσο και με το πρότυπο της απόκρισης που έχει σημειωθεί στη βιβλιογραφία, με μόνη απόκλιση το γεγονός ότι σε προηγούμενες μελέτες η συγκέντρωση του μαγνησίου μειωνόταν ήδη από τη 1 h (Φανουράκη 2010).

Το χλώριο (Cl^-) ήταν στα ίδια επίπεδα με προηγούμενες μελέτες για το λαβράκι (Pavlidis *et al.*, 1997; Marino *et al.*, 2001; Peruzzi *et al.*, 2005; Petochi *et al.*, 2011), και η συγκέντρωσή του παρέμεινε αμετάβλητη μετά την καταπόνηση. Για τον κρανιό δεν υπάρχουν σχετικά δεδομένα. Η συγκέντρωση του ασβεστίου (Ca^{+2}) ήταν επίσης στο εύρος των δημοσιευμένων τιμών για το λαβράκι (Marino *et al.*, 2001; Peruzzi *et al.*, 2005, Φανουράκη 2010) αλλά και για τον κρανιό (Φανουράκη 2010).

Επίσης, η μη μεταβολή της συγκέντρωσης ασβεστίου και στα δύο είδη έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενη μελέτη (Φανουράκη 2010).

Γενικά, για την αύξηση της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών στο πλάσμα των θαλασσινών ειδών ιχθύων θεωρείται ότι ευθύνεται η δράση της επινεφρίνης. Η αύξηση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στην αυξημένη εισροή ιόντων από τα βράγχια, είτε στη μειωμένη απώλεια ιόντων από τα ούρα είτε τέλος στη μείωση του όγκου του ορού. Η κορτιζόλη, από την άλλη φαίνεται να έχει δράση που οδηγεί στην εξώθηση ιόντων νατρίου και χλωρίου από τα βράγχια (Wendelaar Bonga 1997).

Το πείραμα της κινητικής της απόκρισης στην καταπόνηση επιβεβαίωσε, αλλά και επέκτεινε, τις ήδη παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ λαβρακιού και κρανιού τόσο στην ένταση όσο και στο χρονισμό της απόκρισης (Fanouraki *et al.,* 2011). Τα αποτελέσματά του επίσης χρησιμοποιήθηκαν ώστε να αποφασιστεί ποιά είναι η κατάλληλη χρονική στιγμή για τη λήψη δειγμάτων για το δεύτερο πείραμα της εργασίας αυτής. Έτσι, επιλέχθηκε η ½ h μετά την καταπόνηση καθώς στο σημείο αυτό έχουν ήδη μεταβληθεί σημαντικά η συγκέντρωση της κορτιζόλης, της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος του πλάσματος (Fanouraki *et al.,* 2011), καθώς επίσης και το pH του αίματος και των μυών.

Η απόκριση στην καταπόνηση σε άτομα λαβρακιού και κρανιού που προέρχονται από ιχθυοκλωβούς είναι η πρώτη φορά που μελετάται εποχιακά. Με τον τρόπο αυτό επιχειρήθηκε να διερευνηθεί σε διαφορετικές εποχές ο τρόπος με τον οποίο αντιμετωπίζουν τα δύο αυτά είδη τις ενεργειακές προκλήσεις που θέτει η καταπόνηση, υπό συνθήκες εκτροφής βιομηχανικής κλίμακας. Βέβαια, καθώς εκτός από τις διαφορές στη θερμοκρασία μεταξύ των δειγματοληψιών διέφερε και η φωτοπερίοδος αλλά και η φυσιολογική κατάσταση στην οποία βρίσκονταν τα άτομα, ειδικά για το λαβράκι που ήταν αναπαραγωγικά ώριμα, για τις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των δειγματοληψιών δεν μπορεί να εξακριβωθεί ποιοι από όλους τους παράγοντες ευθύνονται. Συγκεκριμένα, έχει φανεί πως η συγκέντρωση της γλυκόζης (Kavadias *et al.,* 2003) και της κορτιζόλης στο λαβράκι (Planas *et al.,* 1990) σχετίζονται με τη φωτοπερίοδο, ενώ και η αναπαραγωγική ωρίμανση έχει επίδραση στα επίπεδα της κορτιζόλης στο είδος αυτό, συγκεκριμένα αυξάνοντάς τα (Φανουράκη 2010). Έτσι, η αναφορά στο κείμενο των διαφορετικών δειγματοληψιών με βάση τη θερμοκρασία που επικρατούσε γίνεται χάριν ευκολίας χωρίς να σημαίνει ότι αναγνωρίζεται αυτός ως μοναδικός παράγοντας διαφοροποίησης των εποχών.

Η πρωτογενής απόκριση των ψαριών στην καταπόνηση αποτελεί το πρώτο βήμα μέσω του οποίου ενεργοποιούνται στη συνέχεια και οι υπόλοιπες αποκρίσεις. Έτσι, σε όλες τις δειγματοληψίες παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση στην κορτιζόλη για το λαβράκι ½ h μετά την καταπόνηση, μία αύξηση που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία κορυφώνεται στη 1 h (Fanouraki *et al.*, 2011). Από την άλλη, στον κρανιό αύξηση σημειώθηκε μόνο στη δειγματοληψία των 25°C, ενώ στις άλλες δύο έμεινε σταθερή. Στο είδος αυτό δεν έχει σημειωθεί σημαντική αύξηση στην ½ h, παρά μόνο στη 1 h με το μέγιστο να εμφανίζεται στις 2 h (Fanouraki *et al.*, 2011). Το γεγονός ότι στους 25°C η κορτιζόλη στον κρανιό αυξάνεται ήδη από τη ½ h πιθανώς να σχετίζεται με αυξημένο μεταβολικό ρυθμό στην υψηλότερη θερμοκρασία και επομένως ταχύτερη απόκριση στην καταπόνηση, όπως έχει παρατηρηθεί στο ραβδωτό λαβράκι, *Morone saxatilis* (Davis & Parker 1990) και στον οξύρυγχο, *Acipenser medirostris*, (Lankford *et al.*, 2003) όχι όμως και σε νεαρά άτομα Chinook salmon, *Oncyrhynchus tsawytscha* (Barton & Schreck 1987), μπακαλιάρου, *Gadus morhua* και haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (King *et al.*, 2006), για τα οποία σημειώθηκε μόνο ταχύτερος ρυθμός εκκαθάρισης της κορτιζόλης.

Συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες, οι τιμές που παρατηρήθηκαν για το λαβράκι βρίσκονταν μέσα στο εύρος των δημοσιευμένων τιμών (Cerda-Reverter *et al.*, 1998; Marino *et al.*, 2001; Rotlland *et al.*, 2003; Caruso *et al.*, 2005; Rotlland *et al.*, 2006; Di Marco *et al.*, 2008; Fanouraki *et al.*, 2008; Fanouraki *et al.*, 2011; Pascoli *et al.*, 2011; Petochi *et al.*, 2011), ενώ για τον κρανιό οι δειγματοληψίες των 20°C και 25°C ήταν χαμηλότερα και των 15°C στα ίδια επίπεδα με τη μοναδική τιμή που υπάρχει στο βιβλιογραφία (Fanouraki *et al.*, 2011). Οι τιμές σε μη καταπονημένα άτομα συγγενικών του κρανιού ειδών όπως το mulloway, *Argyrosomus japonicus* και το kob, *Argyrosomus hololepidotus*, είναι επίσης χαμηλές, 2,5 ng ml^{-1} και 4,2 ng ml^{-1} κατά μέσο όρο αντίστοιχα (Broadhurst & Barker 2000; Butcher *et al.*, 2007).

Στις διαφορετικές δειγματοληψίες οι τιμές βάσης και για τα δύο είδη διαφέρουν. Έτσι, για το λαβράκι η μεγαλύτερη τιμή εμφανίστηκε στη δειγματοληψία των 25°C, ενώ η ελάχιστη στους 20°C. Στο συγκεκριμένο είδος έχει παρατηρηθεί ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας και της φωτοπεριόδου με τη συγκέντρωση κορτιζόλης (Planas *et al.*, 1990; Pascoli *et al.*, 2011), αν και καθώς τα άτομα ήταν αναπαραγωγικά ώριμα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και το στάδιο του αναπαραγωγικού κύκλου στο οποίο βρίσκονται. Έτσι, στη βιβλιογραφία, οι χαμηλότερες τιμές παρατηρούνται κατά τη διάρκεια του χειμώνα, που συμπίπτει με

την περίοδο ωοτοκίας για το συγκεκριμένο είδος, παρόλο που έχει φανεί ότι τα ώριμα άτομα, τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά, έχουν υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης από τα ανώριμα (Φανουράκη 2010). Οι μέγιστες συγκεντρώσεις κορτιζόλης σημειώνονται τους καλοκαιρινούς μήνες κατά την εποχή που προηγείται της ωοτοκίας. Η ιδιαίτερα χαμηλή τιμή του λαβρακιού στους 20°C, κάτω και από τους 15°C, μπορεί να σχετίζεται με το ότι η άνοδος της θερμοκρασίας της θάλασσας ήταν πολύ απότομη, συγκεκριμένα από 16°C τον Απρίλιο σε 21°C το Μάιο, επομένως η δειγματοληψία αυτή συμπίπτει με το τέλος της δριμείας περιόδου του χειμώνα που χαρακτηρίζεται από χαμηλό μεταβολισμό, μικρό ρυθμό ανάπτυξης και πολύ χαμηλή ημερήσια πρόσληψη τροφής (Kavadias *et al.*, 2003; Maricchiolo *et al.*, 2011). Συγκεκριμένα, η ημερήσια πρόσληψη τροφής ελαχιστοποιείται τον Απρίλιο, λίγες μέρες δηλαδή πριν τη διεξαγωγή της δειγματοληψίας και έχει φανεί ότι η χαμηλή πρόσληψη τροφής στο λαβράκι οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση κορτιζόλης, τόσο σε μη όσο και σε καταπονημένα ζώα (Lupatsch *et al.*, 2010).

Αντίθετα με το λαβράκι, στον κρανιό παρατηρήθηκε μία μείωση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ειδικά στους 15°C η συγκέντρωση της κορτιζόλης ήταν πολύ μεγάλη συγκριτικά με τις άλλες δύο δειγματοληψίες. Το γεγονός αυτό πιθανώς να υποδεικνύει τη μη ανοχή του είδους στις χαμηλές θερμοκρασίες και για το λόγο αυτό στους 15°C να εμφανίζεται έντονη ενεργοποίηση του HPI άξονα επάγοντας έτσι υψηλές τιμές κορτιζόλης. Αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης ως απόκριση σε μη προβλέψιμες ή ακραίες καιρικές συνθήκες έχουν παρατηρηθεί σε πτηνά, αλλά και σε κάποια είδη ψαριών (Pankhurst 2011; Pottinger *et al.*, 2011).

Όπως έχει αναφερθεί, τα δύο είδη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία εμφανίζουν πολύ μεγάλες διαφορές στη συγκέντρωση της κορτιζόλης του πλάσματος, με το λαβράκι να έχει περίπου 150 φορές περισσότερη κορτιζόλη από τον κρανιό (Fanouraki *et al.*, 2011). Έτσι και στη μελέτη αυτή το λαβράκι εμφάνιζε από 40 μέχρι 1.000 φορές υψηλότερη συγκέντρωση κορτιζόλης.

Απόκριση στην καταπόνηση παρατηρήθηκε και στη συγκέντρωση της γλυκόζης με αύξηση στην τιμή της και στα δύο είδη και στις τρεις δειγματοληψίες. Οι τιμές που έχουν σημειωθεί για το λαβράκι ήταν στα επίπεδα προηγούμενων μελετών (Cerda-Reverter *et al.*, 1998; Santulli *et al.*, 1999; Marino *et al.*, 2001; Caruso *et al.*, 2005; Di Marco *et al.*, 2008; Enes *et al.*, 2010; Chatzifotis *et al.*, 2011; Fanouraki *et al.*, 2011; Petochi *et al.*, 2011). Από την άλλη, στον κρανιό η συγκέντρωση της

γλυκόζης ήταν χαμηλότερη συγκριτικά με τις δημοσιευμένες τιμές, εκτός από τη δειγματοληψία των 15°C (Chatzifotis *et al.*, 2010; Fanouraki *et al.*, 2011), αλλά στα ίδια επίπεδα με το συγγενικό του mulloway, όπου ήταν περίπου 1,0 mmol l^{-1} (Butcher *et al.*, 2007).

Μεταξύ των δειγματοληψιών υπήρχαν διαφορές στη συγκέντρωση της γλυκόζης και για τα δύο είδη. Στο λαβράκι, η μεγαλύτερη τιμή παρατηρήθηκε στους 25°C, ενώ η ελάχιστη στους 20°C. Τα αποτελέσματα αυτά ταιριάζουν με προηγούμενες μελέτες, όπου η γλυκόζη του αίματος στο λαβράκι έπαιρνε την ελάχιστη τιμή το Μάιο και τη μέγιστη τον Ιούλιο (Kavadias *et al.*, 2003), ενώ διαφέρουν με άλλες όπου η μέγιστη τιμή παρατηρήθηκε στους 15°C το Φεβρουάριο και η μικρότερη το Σεπτέμβριο στους 23°C (Maricchiolo *et al.*, 2011). Στον κρανιό η ελάχιστη τιμή παρατηρήθηκε στους 20°C, όπως και στο λαβράκι, ενώ η μέγιστη στους 15°C. Η ελάχιστη τιμή στους 20°C πιθανώς να σχετίζεται με τη μειωμένη πρόσληψη τροφής κατά την περίοδο των χαμηλών θερμοκρασιών που μόλις πέρασε (FAO 2005-2012), ενώ η μέγιστη είναι σε συμφωνία με τις υψηλές τιμές κορτιζόλης στη δειγματοληψία αυτή, υποδεικνύοντας και με αυτόν τον τρόπο μη ανοχή του είδους στις χαμηλές θερμοκρασίες.

Αναφορικά με τις διαφορές μεταξύ των ειδών, αυτές ήταν σημαντικές στους 20°C, όπου ο κρανιός εμφάνιζε υψηλότερη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα για τα μη καταπονημένα και στους 25°C, όπου το λαβράκι είχε περισσότερη γλυκόζη και στους δύο χειρισμούς. Στη μοναδική συγκριτική μελέτη που περιλαμβάνει και τα δύο αυτά είδη δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ τους (Fanouraki *et al.*, 2011).

Όπως και στη γλυκόζη, έτσι και στο γαλακτικό οξύ σημειώθηκε αύξηση στη συγκέντρωσή του στο αίμα και των δύο ειδών ½ h μετά την καταπόνηση σε όλες τις δειγματοληψίες. Το γαλακτικό οξύ τόσο στο λαβράκι όσο και στον κρανιό ήταν σε παρόμοια επίπεδα συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες (Santulli *et al.*, 1999; Peruzzi *et al.*, 2005; Chatzifotis *et al.*, 2011; Fanouraki *et al.*, 2011). Η αύξηση αυτή υποδεικνύει τη χρησιμοποίηση του αναερόβιου μεταβολισμού και για τα δύο είδη.

Τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος στις διαφορετικές δειγματοληψίες εμφάνιζαν μικρές διαφορές για τα δύο είδη, με τη συγκέντρωση στο λαβράκι να αυξάνεται με τη θερμοκρασία, ενώ στον κρανιό το μέγιστο ήταν στους 20°C και το ελάχιστο στους 15°C. Σε προηγούμενη μελέτη στο λαβράκι έχει φανεί το γαλακτικό οξύ να μεγιστοποιείται σε θερμοκρασία 20°C τον Ιούλιο και να είναι ελάχιστη στους 23°C το Σεπτέμβριο (Maricchiolo *et al.*, 2011). Από την άλλη, αύξηση του με τη

θερμοκρασία έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη, όπως ο οξύρυγχος, *Acipenser medirostris*, (Lankford *et al.*, 2003), η γλώσσα της Σενεγάλης, *Solea senegalensis* (Costas *et al.*, 2012), αλλά και ο ροφός, *Epinephelus marginatus* (Φανουράκη 2010). Η μεγιστοποίηση του γαλακτικού οξέος στη δειγματοληψία των 20°C στον κρανιό είναι δύσκολο να εξηγηθεί, ίσως όμως να σχετίζεται με μεγαλύτερη κολυμβητική δραστηριότητα των ψαριών καθώς συμπίπτει με την περίοδο που τα ψάρια στο φυσικό τους περιβάλλον μεταναστεύουν στις εκβολές ποταμών (FAO 2005-2012).

Διαφορές μεταξύ των δύο ειδών εντοπίστηκαν σε όλες τις δειγματοληψίες, με το λαβράκι να εμφανίζει υψηλότερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος από τον κρανιό σε καταπονημένα και μη άτομα. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και στη μοναδική συγκριτική μελέτη που έχει εκπονηθεί για αυτά τα είδη (Fanouraki *et al.*, 2011). Οι διαφορές αυτές πιθανώς σχετίζονται με εντονότερη κολυμβητική δραστηριότητα (Larsson *et al.*, 1976) στο λαβράκι σε σχέση με τον κρανιό. Επιπλέον, η αύξηση του γαλακτικού οξέος στο αίμα του λαβρακιού ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με τον κρανιό στους 20°C και 25°C (185% Vs. 103% και 291% Vs. 125% αντίστοιχα) όχι όμως και στους 15°C (151% Vs. 340%). Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στο λαβράκι διατηρούνται υψηλά επίπεδα γαλακτικού οξέος στο αίμα έως και τις 2 h μετά την καταπόνηση ενώ στον κρανιό έως ½ h (Fanouraki *et al.*, 2011) φαίνεται ότι στο λαβράκι, τουλάχιστον για τις δύο δειγματοληψίες με υψηλή θερμοκρασία, λειτουργεί εντονότερα ο αναερόβιος μεταβολισμός συγκριτικά με τον κρανιό, καθώς παράγεται πολύ μεγαλύτερη ποσότητα γαλακτικού οξέος. Στους 15°C, από την άλλη, η πολύ αυξημένη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος μετά την καταπόνηση στον κρανιό πιθανώς σχετίζεται με το γεγονός ότι η μέγιστη αερόβια ικανότητα ενός είδους εξαρτάται από τη θερμοκρασία, οδηγώντας έτσι την παραγωγή ενέργειας προς αναερόβια μονοπάτια σε θερμοκρασίες εκτός των βέλτιστων (Brett & Groves 1979).

Η απόκριση του αιματοκρίτη διέφερε τόσο μεταξύ των δειγματοληψιών όσο και μεταξύ των ειδών. Έτσι, στους 15°C παρατηρήθηκε αύξηση στον αιματοκρίτη και για τα δύο είδη, ενώ στους 20°C δεν υπήρξε μεταβολή και στους 25°C σημειώθηκε μείωση μόνο στο λαβράκι. Γενικά, θεωρείται ότι μετά την καταπόνηση οι κατεχολαμίνες δρουν επάγοντας την αύξηση του αιματοκρίτη μέσω της διόγκωσης των ερυθρών κυττάρων (Wendellar Bonga 1997), παρόλα αυτά η μείωση του αιματοκρίτη στους 25°C υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα της κινητικής της καταπόνησης, αν και εκεί οι παρατηρούμενες διαφορές δεν ήταν σημαντικές. Οι τιμές για το λαβράκι ήταν λίγο μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές προηγούμενων μελετών

(Caruso *et al.*, 2005; Pascoli *et al.*, 2011; Peruzzi *et al.*, 2011), ενώ για το κρανιό δεν υπάρχουν δεδομένα, παρουσίαζε όμως λίγο χαμηλότερες τιμές από το συγγενικό του mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Woolley 2009).

Μεταξύ των δειγματοληψιών η τιμή του αιματοκρίτη φάνηκε να αυξάνει με τη θερμοκρασία, φτάνοντας σε πολύ υψηλά επίπεδα στους 25°C. Συσχέτιση με τη θερμοκρασία έχει φανεί να υπάρχει μεταξύ της θερμοκρασίας και του αιματοκρίτη στο λαβράκι (Maricchiolo *et al.*, 2011, Pascoli *et al.*, 2011). Βέβαια, στη συγκεκριμένη μελέτη η διαφορά μεταξύ 15°C και 20°C ήταν πολύ μεγαλύτερη από τη διαφορά που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία. Παρόμοια απόκριση έχει παρατηρηθεί και στην τσιπούρα, *Sparus aurata* (Tort *et al.*, 1998). Η μείωση του αιματοκρίτη με τη θερμοκρασία σχετίζεται με το γεγονός ότι σε χαμηλή θερμοκρασία νερού η διαλυτότητα του οξυγόνου είναι μεγαλύτερη σε σχέση με της υψηλής θερμοκρασίας, επιτρέποντας έτσι την αποτελεσματική μεταφορά του οξυγόνου με μικρότερο αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων (Stolen *et al.*, 1984). Επιπλέον, λόγω μειωμένου μεταβολισμού και δραστηριότητας και για τα δύο είδη κατά τους ψυχρότερους μήνες (Kavadias *et al.*, 2003; FAO 2005-2012) είναι αναμενόμενο να απαιτείται λιγότερο οξυγόνο από τα ψάρια.

Τα δύο είδη που μελετήθηκαν διέφεραν στις βασικές τιμές του αιματοκρίτη, με το λαβράκι και πάλι να εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές σε όλες τις δειγματοληψίες. Περισσότερα ερυθρά κύτταρα στο αίμα σημαίνουν υψηλή ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου, ιδίως αν ληφθεί υπόψη ότι το λαβράκι έχει έντονη συγγένεια οξυγόνου αιμοσφαιρίνης (Pichavant *et al.*, 2003).

Τα αποτελέσματα της αιμοσφαιρίνης μοιάζουν πολύ με αυτά του αιματοκρίτη. Διαφορά μετά την καταπόνηση παρατηρείται μόνο στους 15°C, όπου η συγκέντρωση αυξάνεται. Φαίνεται, λοιπόν έτσι, ότι και στα δύο είδη υπάρχει ανάγκη για περισσότερη οξυγόνωση μετά την καταπόνηση στις χαμηλές θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με αυτά από το ραβδωτό λαβράκι, *Morone saxatilis*, όπου η απαίτηση σε οξυγόνο, εκφρασμένη μέσα από την τιμή του αιματοκρίτη, αυξάνονταν μετά την καταπόνηση στις υψηλές θερμοκρασίες ενώ παρέμενε σταθερή στις χαμηλές (Davis & Parker 1990).

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο λαβράκι ήταν σε παρόμοια επίπεδα με προηγούμενες μελέτες (Caruso *et al.*, 2005; Peruzzi *et al.*, 2005; Pascoli *et al.*, 2011). Από την άλλη, για τον κρανιό δεν υπάρχουν δημοσιευμένες τιμές, συγκρίνοντάς το

όμως με το συγγενικό του είδος mulloway, *Argyrosomus japonicus*, φαίνεται να έχει χαμηλότερη συγκέντρωση (Woolley 2009).

Η σύγκριση των τιμών αιμοσφαιρίνης μεταξύ των δειγματοληψιών θα ήταν επισφαλές να επιχειρηθεί διότι οι μετρήσεις έγιναν με διαφορετικές εμπορικές συσκευασίες (βλέπε υποενότητα 2.2.3).

Όπως και στον αιματοκρίτη, έτσι και η αιμοσφαιρίνη ήταν υψηλότερη στο λαβράκι για όλες τις δειγματοληψίες. Η περισσότερη αιμοσφαιρίνη, συνδυαστικά με τον υψηλότερο αιματοκρίτη στο είδος αυτό, ανακλά ακόμα περισσότερο την εντονότερη ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου και πιθανώς σχετίζονται με αυξημένη κολυμβητική δραστηριότητα και μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις (Hall & Gray 1929; Larsson *et al.*, 1976; Filho *et al.*, 1992).

Οι ενεργειακές απαιτήσεις μπορούν να φανούν έμμεσα από το μεταβολικό ρυθμό των ζώων. Συγκεκριμένα, οι Standard Metabolic Rate (SMR) και Routine Metabolic Rate (RMR) αναφέρονται στην απαιτούμενη κατανάλωση οξυγόνου όταν ένα ζώο είναι σε κατάσταση απόλυτης ηρεμίας και όταν εκτελεί τη φυσική δραστηριότητά του αντίστοιχα. Έτσι, υψηλότερες τιμές SMR και RMR για ένα είδος συγκριτικά με κάποιο άλλο υποδεικνύουν εντονότερη κατανάλωση ενέργειας για καταστάσεις ηρεμίας και φυσιολογικής δραστηριότητας.

Συγκρίνοντας τους μεταβολικούς ρυθμούς του λαβρακιού με το συγγενικό με τον κρανιό είδος mulloway, καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα για τον κρανιό, παρατηρούνται κάποιες ενδιαφέρουσες διαφορές. Έτσι, ενώ για το mulloway ο SMR στους 22°C είναι 55 mg O_2 kg^{-1} h^{-1} (Fitzgibbon *et al.*, 2007), στο λαβράκι οι τιμές αυτές κυμαίνονται από 56 mg O_2 kg^{-1} h^{-1} έως 117 mg O_2 kg^{-1} h^{-1} ανάλογα με τη θερμοκρασία όπου έλαβαν χώρα οι μετρήσεις (Claireaux & Lagardere 1999; Chatelier *et al.*, 2005; Claireaux *et al.*, 2006; Luna-Acosta *et al.*, 2011). Αν θεωρήσουμε ότι οι απαιτήσεις του κρανιού είναι παρόμοιες με αυτές του mulloway, γεγονός που μπορεί να ισχύει λόγω της όμοιας βιολογίας των ειδών, αλλά και των παρόμοιων συγκεντρώσεων κορτιζόλης, γλυκόζης, αιματοκρίτη και αιμοσφαιρίνης στο αίμα, τότε το λαβράκι εμφανίζει όντως υψηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις συγκριτικά με τον κρανιό.

Η οξεία καταπόνηση είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της οσμωτικής πίεσης και στα δύο είδη. Οι τιμές που παρατηρήθηκαν αλλά και η απόκριση στην καταπόνηση ήταν στα ίδια επίπεδα με αυτές προηγούμενων μελετών στο λαβράκι (Pavlidis *et al.*, 1997, Marino *et al.*, 2001; Peruzzi *et al.*, 2005; Φανουράκη 2010;

Petochi *et al.*, 2011). Στον κρανιό από την άλλη ήταν λίγο χαμηλότερες, ενώ επιπλέον δεν έχει φανεί αύξηση από τη ½ h, παρά μόνο 2 h μετά την καταπόνηση (Φανουράκη 2010).

Η αύξηση αυτή στα επίπεδα της οσμωτικής πίεσης πιθανολογείται να οφείλεται στη μεταφορά υγρού από την εξωκυττάρια στην ενδοκυττάρια περιοχή αλλά και σε μία γενική μείωση στον όγκο του ορού (Marino *et al.*, 2001). Λόγω της ταχείας διατάραξης της οσμωρυθμιστικής ομοιόστασης έχει προταθεί ότι για αυτήν ευθύνεται η δράση των κατεχολαμινών.

Η οσμωτική πίεση ήταν μεγαλύτερη στους 20°C και 25°C σε σχέση με τους 15°C και στα δύο είδη. Γενικά δεν υπάρχει ένα σταθερό πρότυπο για τις επιπτώσεις της θερμοκρασίας στην οσμωτική πίεση, με κάποιες μελέτες να υποστηρίζουν την αύξηση αυτής με την αύξηση της θερμοκρασίας (Nordlie 1976) και κάποιες άλλες τη μη ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ τους (Burton 1986).

Μεταξύ των δύο ειδών παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην οσμωτική πίεση στη δειγματοληψία των 25°C και των 20°C μόνο για τα καταπονημένα άτομα. Όπου σημειώθηκαν διαφορές το λαβράκι εμφάνιζε την υψηλότερη τιμή.

Επιπλέον, η χοληστερόλη στο πλάσμα των ζώων αποκρίθηκε διαφορετικά τόσο μεταξύ των δειγματοληψιών όσο και των ειδών. Έτσι, στους 15°C, σημαντική μεταβολή, συγκεκριμένα αύξηση, παρατηρήθηκε μόνο στον κρανιό, στους 20°C δεν υπήρξε μεταβολή για κανένα είδος, ενώ τέλος στους 25°C παρουσιάστηκε μείωση και για τα δύο είδη. Η απόκριση μετά από οξεία καταπόνηση που έχει σημειωθεί στη βιβλιογραφία για το λαβράκι ήταν η μη εμφάνιση σημαντικών αλλαγών (Di Marco *et al.*, 2008), με τις τιμές που παρατηρηθήκαν να είναι στα ίδια επίπεδα με προηγούμενες μελέτες για το είδος αυτό (Coz-Rakovaz *et al.*, 2005; Di Marco *et al.*, 2008; Chatzifotis *et al.*, 2011) και λίγο υψηλότερες για τον κρανιό (Chatzifotis *et al.*, 2010).

Οι μεταβολές που σημειώθηκαν στη συγκέντρωση της χοληστερόλης δεν έχουν παρατηρηθεί σε άλλα πειράματα καταπόνησης σε ψάρια. Συγκεκριμένα, στο ιαπωνικό φαγκρί, *Pagrus major*, και στον κυπρίνο, *Cyprinus carpio*, η σύλληψη με απόχη και ο συνωστισμός αντίστοιχα δε φάνηκε να επιδρούν στα επίπεδα της χοληστερόλης (Ruane *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2006).

Η υψηλή συγκέντρωση χοληστερόλης στο λαβράκι κατά τη δειγματοληψία των 15°C έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (Fernandez *et al.*, 1989; Kavadias *et al.*, 2003). Αυτή πιθανώς δεν σχετίζεται με τη θερμοκρασία, αλλά με τον

αναπαραγωγικό κύκλο. Έτσι, το Φεβρουάριο που έγινε η δειγματοληψία των 15°C τα ζώα ήταν στην αρχή της ωοαπόθεσης, έχοντας υψηλά επίπεδα χοληστερόλης ακόμα από την περίοδο της εξωγενούς λεκιθογένεσης (Fernandez *et al.*, 1989). Από την άλλη, στον κρανιό που τα άτομα ήταν ανώριμα, στους 15°C παρατηρείται ελάχιστο στην τιμή της χοληστερόλης. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με τη μειωμένη πρόσληψη τροφής κατά τους χειμερινούς μήνες για το είδος αυτό (FAO 2005-2012), καθώς η χοληστερόλη φαίνεται να σχετίζεται με τα επίπεδα τροφοληψίας (Kavadias *et al.*, 2003).

Το pH του αίματος φαίνεται να μειώνεται μετά την καταπόνηση σε όλες τις δειγματοληψίες και για τα δύο είδη, εκτός από τον κρανιό στους 20°C όπου αυξάνεται. Για τη μείωση αυτή ευθύνεται η συσσώρευση H^+ στο αίμα προερχόμενη είτε από τη διάσπαση του ATP σε ADP και P_i ή από το γαλακτικό οξύ (Robergs *et al.*, 2004). Η αύξηση στον κρανιό στη δειγματοληψία των 20°C είναι δύσκολα ερμηνεύσιμη, πάντως ταιριάζει με το πρότυπο που παρατηρήθηκε στην κινητική της καταπόνησης, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 19°C.

Οι τιμές που σημειώθηκαν για το λαβράκι είναι στα ίδια επίπεδα με αυτές προηγούμενων μελετών (Sammouth *et al.*, 2009; Lemarie *et al.*, 2011; Petochi *et al.*, 2011), ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για τον κρανιό.

Αναφορικά με τις διαφορές στο pH του αίματος των ψαριών μεταξύ των δειγματοληψιών, η ελάχιστη τιμή παρατηρήθηκε και για τα δύο είδη στους 20°C. Η μέγιστη τιμή όμως διέφερε στα δύο είδη, με το λαβράκι να την εμφανίζει στους 25°C και τον κρανιό στους 15°C. Τα αποτελέσματα αυτά αντιτίθενται στη βιβλιογραφία, όπου έχει βρεθεί η τιμή του pH στο αίμα να μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας (Heisler 1984).

Ο κρανιός εμφάνιζε χαμηλότερη τιμή pH αίματος σε σχέση με το λαβράκι στις δειγματοληψίες των 20°C και 25°C, όχι όμως και των 15°C. Οι υψηλές τιμές στο λαβράκι πιθανώς να σχετίζονται με την παρουσία ισχυρού bohr effect στο είδος αυτό, καθιστώντας έτσι χαμηλές τιμές στο pH του αίματος επιζήμιες για την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου (Pichavant *et al.*, 2003).

Αναφορικά με το pH των μυών, παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδά του και για τα δύο είδη στις δειγματοληψίες των 15°C και 25°C. Στους 20°C από την άλλη το pH παρέμεινε αμετάβλητο μετά την καταπόνηση. Στο πείραμα της κινητικής που πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία όμοια με αυτή των 20°C, παρατηρήθηκε μείωση ½ h μετά την καταπόνηση, επομένως για τη μη μεταβολή στο πείραμα αυτό πιθανώς

σχετίζεται η μικρότερη αξιοποίηση του γλυκογόνου των μυών και επομένως η μικρότερη παραγωγή γαλακτικού οξέος, ιδίως στο λαβράκι, στη θερμοκρασία αυτή.

Συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες, το λαβράκι έχει παρόμοια επίπεδα pH στο μυ (Acerete *et al.*, 2009), ενώ για τον κρανιό παρατηρούνται παρόμοια επίπεδα για τη δειγματοληψία των 25°C και χαμηλότερα στους 15°C και 20°C (Poli *et al.*, 2003).

Μεταξύ των δειγματοληψιών οι διαφορές για το λαβράκι ήταν μικρές, με τη μέγιστη τιμή να παρατηρείται στους 15°C, ενώ το pH ήταν παρόμοιο στις άλλες δύο. Από την άλλη, στον κρανιό το pH ήταν αρκετά υψηλότερο στους 25°C, πέφτοντας στα επίπεδα του λαβρακιού στις άλλες δύο δειγματοληψίες. Υψηλότερο pH σε μειωμένες θερμοκρασίες έχει παρατηρηθεί και σε ένα είδος του ατλαντικού, το halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (Olsson *et al.*, 2003), ενώ το πρότυπο που σημειώθηκε στον κρανιό δεν έχει παρατηρηθεί αλλού.

Το γλυκογόνο του ήπατος παρουσίασε διαφορετική απόκριση μεταξύ των δειγματοληψιών. Έτσι, ενώ στους 25°C υπήρξε σημαντική μείωση στα αποθέματα του γλυκογόνου και για τα δύο είδη που μελετήθηκαν, στις υπόλοιπες δειγματοληψίες δε σημειώθηκε σημαντική μεταβολή. Συγκρίνοντας τη μείωση που παρατηρήθηκε στους 25°C με την απόκριση του γλυκογόνου στο πείραμα της κινητικής, όπου τα αποθέματα του γλυκογόνου για το λαβράκι χρησιμοποιήθηκαν μόνο 2 h μετά την καταπόνηση, ενώ για τον κρανιό δεν υπήρξε μεταβολή, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αυξημένη θερμοκρασία οδηγεί σε ταχύτερη και πιο έντονη κατανάλωση ηπατικού γλυκογόνου στα είδη που μελετήθηκαν, όπως έχει φανεί και στο chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Barton & Schreck 1987).

Οι τιμές ηπατικού γλυκογόνου για το λαβράκι ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στο πείραμα της κινητικής αλλά και σε κάποιες προηγούμενες μελέτες (Perez-Jimenez *et al.*, 2007; Enes *et al.*, 2010), ενώ ήταν υψηλότερες από αυτές ορισμένων άλλων εργασιών (Perez *et al.*, 1989; Perez *et al.*, 1991; Pastoureaud 1991; Perez *et al.*, 1999; Chatzifotis *et al.*, 2011). Βέβαια, καθώς οι θρεπτικές καταστάσεις στις οποίες βρίσκονταν τα ζώα αλλά και λόγω των διαφορών στις μεθόδους που ακολουθούνται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του ηπατικού γλυκογόνου μεταξύ των μελετών είναι δύσκολο να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα από αυτές τις συγκρίσεις. Στον κρανιό, η συγκέντρωση του γλυκογόνου ήταν αρκετά υψηλότερη από το πείραμα της κινητικής, γεγονός που όπως αναφέρθηκε παραπάνω πιθανώς αποδίδεται στη μειωμένη τροφοληψία που αντιμετώπισαν κάποια στιγμή τα

ψάρια αυτού του πειράματος. Από την άλλη, ήταν λίγο χαμηλότερη από τη συγκέντρωση που έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενη μελέτη (Chatzifotis *et al.*, 2010).

Το πρότυπο με τη θερμοκρασία ήταν παρόμοιο για τον κρανιό και το λαβράκι. Έτσι, η χαμηλότερη συγκέντρωση παρατηρήθηκε στους 20°C και στα δύο είδη, ενώ στο λαβράκι μεγιστοποιήθηκε στους 25°C και στον κρανιό δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ 15°C και 25°C. Η χαμηλή συγκέντρωση στους 20°C πιθανώς οφείλεται, όπως αναφέρθηκε και στη γλυκόζη, στην πολύ χαμηλή πρόσληψη ενέργειας κατά τους χειμερινούς μήνες, έως και τον Απρίλιο, στα δύο αυτά είδη (Kavadias *et al.*, 2003; FAO 2005-2012).

Στις δειγματοληψίες του Μαΐου και του Ιουλίου το λαβράκι εμφάνιζε σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση ηπατικού γλυκογόνου συγκριτικά με τον κρανιό. Το Φεβρουάριο όμως δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των μη καταπονημένων ατόμων των δύο ειδών, αν και στο λαβράκι η συγκέντρωση ήταν σχεδόν δύο φορές υψηλότερη. Στα μεγαλύτερα αποθέματα ηπατικού γλυκογόνου στο λαβράκι θα μπορούσε πιθανά να αποδοθεί και η εντονότερη απόκριση του είδους αυτού σε σχέση με τον κρανιό όσον αφορά στη γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ του αίματος (Larsson 1973).

Εν αντιθέσει με τα αποτελέσματα της κινητικής του γλυκογόνου των μυών όπου φάνηκε να υπάρχει μείωση στο λαβράκι ήδη από τη ½ h, δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή στο γλυκογόνο των ψαριών από τους ιχθυοκλωβούς, παρά μόνο στον κρανιό για τη δειγματοληψία των 15°C. Το γενικό πρότυπο, βέβαια, ήταν μία μείωση στο γλυκογόνο των μυών, χωρίς όμως να είναι σημαντική. Σε άλλα ήδη ψαριών, όπως η ιριδίζουσα πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss* και το winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, άσκηση μέχρι την εξουθένωση έχει προκαλέσει σημαντική μείωση στα επίπεδα του γλυκογόνου των μυών (Dobson & Hochachka 1987; Pearson *et al.*, 1990; Pagnotta & Milligan 1991; Schulte *et al.*, 1992; Milligan & Girrard 1993; Kieffer *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994, Milligan 1996). Η μη σημαντική μείωση στην παρούσα εργασία πιθανώς οφείλεται στο ότι η καταπόνηση δεν ήταν τόσο έντονη όσο η άσκηση έως την εξουθένωση που επιβλήθηκε στις παραπάνω μελέτες.

Από την άλλη, η σημαντική μείωση στον κρανιό στους 15°C είναι σε συμφωνία με την πολύ εντονότερη συσσώρευση γαλακτικού οξέος στο αίμα στη δειγματοληψία αυτή (3 φορές αύξηση σε σχέση με επίπεδα ηρεμίας, σε σχέση με τη 1

φορά αύξηση στις άλλες δειγματοληψίες). Καθώς η κατανάλωση μυϊκού γλυκογόνου και η συσσώρευση γαλακτικού οξέος είναι ενδεικτικά της δραστηριότητας του αναερόβιου μεταβολισμού (Goolish 1991) φαίνεται να υπάρχει εντονότερη δράση των αναερόβιων μονοπατιών παραγωγής ενέργειας για το είδος αυτό στις χαμηλές θερμοκρασίες, κάτι που πιθανώς οφείλεται στη σχέση μεταξύ μέγιστης αερόβιας ικανότητας και θερμοκρασίας (Brett & Groves 1979).

Οι τιμές που σημειώθηκαν για το λαβράκι ήταν παρόμοιες με αυτές του πειράματος της κινητικής αλλά και άλλων εργασιών (Perez *et al.*, 1999; Enes *et al.*, 2010) ενώ όπως και για το ήπαρ ήταν υψηλότερες συγκριτικά με κάποιες άλλες μελέτες (Perez *et al.*, 1989; Greco *et al.*, 2010; Chatzifotis *et al.*, 2011). Για τον κρανιό δεν υπάρχουν δημοσιευμένες τιμές, αλλά η συγκέντρωση ήταν παρόμοια μεταξύ αυτού του πειράματος και τους πειράματος της κινητικής.

Φαίνεται να υπάρχει μία τάση μείωσης στα αποθέματα γλυκογόνου των μυών και για τα δύο είδη με την αύξηση της θερμοκρασίας. Παρόμοιο πρότυπο έχει βρεθεί σε ψάρια γλυκού νερού, όπως το roach, *Rutilus rutilus* (van Dijk *et al.*, 2005).

Μεταξύ των ειδών υπήρχαν διαφορές μόνο στη δειγματοληψία των 25°C αλλά και στους 15°C για τα καταπονημένα άτομα, με το λαβράκι και στις δύο περιπτώσεις να εμφανίζει υψηλότερες τιμές.

Με βάση όλα τα παραπάνω έγινε φανερό πως τα δύο είδη εμφανίζουν βασικές διαφορές σε ένα σύνολο βιοχημικών και μεταβολικών χαρακτηριστικών τόσο σε κατάσταση ηρεμίας, όσο και σε συνθήκες καταπόνησης. Φάνηκε λοιπόν πως το λαβράκι διαθέτει υψηλότερα ενεργειακά αποθέματα υδατανθράκων συγκριτικά με τον κρανιό. Επιπλέον, οι υψηλότερες τιμές αιματοκρίτη και αιμοσφαιρίνης στο είδος αυτό πιθανώς ανακλούν μεγαλύτερη ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου στους ιστούς, υποδηλώνοντας έτσι υψηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις, οι οποίες φαίνεται να καλύπτονται σε μεγαλύτερο βαθμό από τον αναερόβιο μεταβολισμό.

Το λαβράκι, όπως φάνηκε και από το συγκριτικό πείραμα με τον κρανιό, εμφανίζει πολύ υψηλές τιμές συγκέντρωσης κορτιζόλης στο πλάσμα. Πολλά από τα είδη τελεόστεων ιχθύων που έχουν μελετηθεί εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές κορτιζόλης σε μη καταπονημένα άτομα, αλλά και μικρότερης έντασης απόκριση στην καταπόνηση. Αυτό έχει φανεί έντονα σε μία συγκριτική μελέτη της καταπόνησης σε οχτώ είδη μεσογειακών ειδών, όπου το λαβράκι εμφάνιζε υψηλότερη κορτιζόλη ηρεμίας από την τσιπούρα, *Sparus aurata*, το λυθρίνι, *Pagellus erythrinus*, το μυτάκι, *Diplodus puntazzo*, το ροφό, *Epinephelus marginatus*, τον κρανιό, *Argyrosomus*

regius, τη συναγρίδα, *Dentex dentex* και το φαγκρί, *Pagrus pagrus* (Φανουράκη 2010; Fanouraki *et al.*, 2011). Βέβαια υπάρχουν και κάποια είδη που έχουν μελετηθεί και εμφανίζουν συγκεντρώσεις κορτιζόλης στα επίπεδα του λαβρακιού, όπως είναι ο κέφαλος, *Squalius cephalus* (Pottinger *et al.*, 2000) και ο κυπρίνος, *Cyprinus carpio* (Ruane *et al.*, 2001).

Για τα υψηλά επίπεδα κορτιζόλης στο αίμα των λαβρακιών έχει φανεί ότι ευθύνεται η έντονη δραστηριότητα που εμφανίζουν τα επινεφρίδια στο είδος αυτό (Rottlant *et al.*, 2003). Η ισχυρή και ταχεία απόκριση στην καταπόνηση από την άλλη μπορεί να εξηγηθεί επιπλέον από τη μεγάλη συγκέντρωση κορτικοστεροειδών στο μεσόνεφρο των ψαριών, αλλά και στη μη απώλεια ευαισθησίας του μεσόνεφρου στη κορτικοτρόπο ορμόνη ACTH που επάγει την απελευθέρωση κορτιζόλης στο πλάσμα (Rottlant *et al.*, 2003). Επιπλέον, έχει υποτεθεί ότι για αυτήν την αντίσταση στην κορτιζόλη (cortisol resistance), την ανοχή δηλαδή στις υψηλές συγκεντρώσεις της ορμόνης, πιθανώς ευθύνεται η ύπαρξη υποδοχέων χαμηλής συγγένειας, όπως έχει φανεί στον κέφαλο, *Squalius cephalus* (Pottinger *et al.*, 2000).

Η αντίσταση στην κορτιζόλη είναι μία σπάνια ασθένεια στον άνθρωπο (Chrousos *et al.*, 1983; Arai & Chrousos 1995) η οποία όμως έχει παρατηρηθεί να αποτελεί τη φυσιολογική κατάσταση σε θηλαστικά του Νέου Κόσμου, όπως κάποια πρωτεύοντα (Chrousos *et al.*, 1983) και τρωκτικά (Taymans *et al.*, 1997). Τα ζώα αυτά χαρακτηρίζονται από i) υψηλές τιμές κορτιζόλης ηρεμίας (κορτικοστερόνης για τα τρωκτικά), ii) ύπαρξη κιρκαδικού κύκλου, iii) απαίτηση υψηλών δόσεων δεξαμεθαζόνης για καταστολή της κορτιζόλης και iv) χαμηλής συγγένειας υποδοχείς των κορτικοστεροειδών. Στην περίπτωση του λαβρακιού τα i και ii ισχύουν, με τις τιμές να είναι υψηλές όπως αναφέρθηκε και τη συγκέντρωση της κορτιζόλης να μεταβάλλεται με κιρκαδικό ρυθμό (Cerda-Reverter *et al.*, 1998), ενώ τα iii και iv δεν έχουν μελετηθεί στο είδος αυτό.

Στα πειράματα αυτής της εργασίας οι πολύ υψηλές αυτές τιμές στο λαβράκι φάνηκε να καταστέλλονται με τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης ενδομυϊκά. Αν και οι διαφορές μεταξύ των ψαριών που δέχτηκαν τις διαφορετικές δόσεις δεξαμεθαζόνης με την ομάδα ελέγχου που δέχτηκε ένεση με φυσιολογικό ορό δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, σημειώθηκε πτώση 50% - 75% στη συγκέντρωση της κορτιζόλης. Παρόλο που μεταξύ των δόσεων ½ mg kg^{-1} και 1 mg kg^{-1} παρατηρήθηκε πιο έντονη καταστολή με τη μεγαλύτερη δόση, γενικά δεν μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ένταση της πτώσης ήταν άμεσα εξαρτώμενη από τη δόση της δεξαμεθαζόνης,

καθώς οι συγκεντρώσεις για τις δόσεις 1 mg kg^{-1} και 10 mg kg^{-1} ήταν στα ίδια επίπεδα.

Αντίθετα, η δράση της δεξαμεθαζόνης φάνηκε να εμφανίζει διαφορές ανάλογα με τη δόση στα ψάρια που είχαν υποστεί καταπόνηση. Έτσι, η μικρή δόση δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση της κορτιζόλης 1 h μετά την καταπόνηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι δύο υψηλότερες όμως δόσεις μείωσαν σημαντικά την απόκριση των ψαριών στην καταπόνηση, με την δόση των 10 mg kg^{-1} να έχει ως αποτέλεσμα τη μη σημαντική αύξηση της κορτιζόλης μετά την καταπόνηση.

Μείωση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης του πλάσματος έπειτα από χορήγηση δεξαμεθαζόνης έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη ιχθύων. Στην ιριδίζουσα πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss*, έχει φανεί πως χαμηλές δόσεις της τάξης των 0,06 mg kg^{-1} είχαν σαν αποτέλεσμα την πολύ έντονη μείωση των επιπέδων της κορτιζόλης του πλάσματος μία ημέρα μετά τη χορήγηση της δεξαμεθαζόνης (Milligan 1997). Σε άλλες μελέτες στο ίδιο είδος, με τη χρήση υψηλότερων δόσεων (1 mg kg^{-1}) αυτή τη φορά, παρατηρήθηκε και πάλι μείωση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης, μικρότερης όμως έντασης (Donaldson & McBride 1967; Pottinger & Carrick 2001). Ακόμα υψηλότερη δόση (2-3 mg kg^{-1}) η οποία χορηγούνταν καθημερινά για 6 ημέρες προκάλεσε δύο ειδών αντιδράσεις στο είδος αυτό (Pierson *et al.*, 2004). Σε κάποια ψάρια σημειώθηκε πτώση στα επίπεδα της κορτιζόλης του πλάσματος, ενώ σε κάποια άλλα πολύ μεγάλη αύξηση (από 10 σε 220 ng ml^{-1}). Η αύξηση αυτή πιθανώς να οφείλεται είτε στην έντονη καταπόνηση από τη συνεχή μεταχείριση των ψαριών λόγω των πολλαπλών ενέσεων, είτε στη διέγερση της παραγωγής κορτιζόλης από νευροποφυσιακές ορμόνες ή από την α-MSH. Τέλος, δόση του 1 mg kg^{-1} φάνηκε πως δεν επέτρεπε την αύξηση της συγκέντρωσης κορτιζόλης σε άτομα που είχαν υποστεί καταπόνηση (Takahashi *et al.*, 1990), κάτι που παρατηρήθηκε και στο coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Sumpter & Donaldson 1986).

Σε άλλα είδη όπως ο sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, πολλαπλές ενδοπεριτονιακές ενέσεις δεξαμεθαζόνης (1 mg kg^{-1}) έφεραν μικρή μείωση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης (Fagerlund & McBride 1969). Παρά τη μικρή επίδραση στις βασικές τιμές, στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε έντονη αναχαίτιση της αύξησης της κορτιζόλης 1 h μετά από την καταπόνηση, όπως παρατηρήθηκε και για το λαβράκι. Επιπλέον, μείωση της κορτιζόλης με τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης (4 και 6 mg kg^{-1}) παρατηρήθηκε και στο χέλι, *Anguila rostrata* (Butler *et al.*, 1968).

Στους ιχθύες έχει επιχειρηθεί η χορήγηση δεξαμεθαζόνης και μέσω της τροφής. Μελέτες στην καφέ πέστροφα, *Salmo trutta*, αλλά και στην τσιπούρα, *Sparus aurata*, έδειξαν ότι η χορήγηση 300 mg δεξαμεθαζόνης για κάθε kg τροφής μπορούσε να καταστείλει τα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα ήδη από τις 24 ώρες μετά την τροφοληψία, αλλά και να μειώσει την άνοδο της συγκέντρωσής της μετά την καταπόνηση (Pickering *et al.*, 1987; Guerreiro *et al.*, 2006).

Στα θηλαστικά, τόσο σε ποντίκια όσο και σε αρουραίους, η δράση της δεξαμεθαζόνης φαίνεται να είναι άμεσα εξαρτώμενη από τη δόση, το οποίο όμως στο λαβράκι δεν ίσχυε μεταξύ των δύο μεγαλύτερων δόσεων (Cole *et al.*, 2000; Bartolomucci *et al.*, 2004). Το ίδιο εξαρτώμενη από τη δόση φαίνεται να είναι και η απόκριση της κορτικοστερόνης στην καταπόνηση, χωρίς να καταστέλλεται πλήρως η αύξηση της μετά την καταπόνηση, όπως παρατηρήθηκε και στο λαβράκι (Zhukov 1993; Cole *et al.*, 2000; Bartolomucci *et al.*, 2004).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχουν ενδείξεις ότι αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα θηλαστικών, όπως τα κουνέλια και ο άνθρωπος, επάγουν τον ταχύτερο μεταβολισμό της δεξαμεθαζόνης, μειώνοντας το χρόνο ημιζωής της στον οργανισμό (Stokes *et al.*, 2002a, Stokes *et al.*, 2002b). Επιπλέον, η δοκιμασία της δεξαμεθαζόνης όταν εφαρμόζεται σε ποντίκια και αρουραίους συνήθως λαμβάνονται δείγματα 4 – 6 h μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (Koerner 1997; Bartolomucci *et al.*, 2004; Helm *et al.*, 2004). Για το λόγο αυτό, παρόλο που η κορτιζόλη στο πλάσμα φάνηκε να μειώνεται 24 h μετά την ένεση κατά ένα ποσοστό της τάξης του 50% - 70%, ανάλογα με τις δόσεις δεξαμεθαζόνης που χορηγήθηκαν, σε ένα επόμενο πείραμα επιχειρήθηκε να μελετηθεί αν 4 h μετά τη ένεση τα αποτελέσματα θα ήταν ακόμα εντονότερα.

Η συγκέντρωση της κορτιζόλης και για τις δύο δόσεις που χορηγήθηκαν (1 mg kg^{-1}, 10 mg kg^{-1}) αυξήθηκε σημαντικά 4 h μετά την ένεση, σε αντίθεση με τη μείωση που παρατηρήθηκε στις 24 h μετά τη χορήγηση της. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι οι δύο χειρισμοί που έγιναν στα ψάρια, δηλαδή αρχικά η πρώτη αιμοληψία και η ένεση και 4 h έπειτα η δεύτερη αιμοληψία οδήγησαν σε αύξηση της κορτιζόλης λόγω καταπόνησης. Η αύξηση αυτή στο λαβράκι είναι πολύ ταχεία (μόλις σε 6 λεπτά, Rotllant *et al.*, 2003) ώστε ακόμα και αν υποθέσουμε πως η δεξαμεθαζόνη δρα άμεσα μετά τη χορήγηση, δεν θα μπορούσε να έχει επίδραση στα ήδη αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα ψάρια μετά τη χορήγηση της ένεσης παρέμειναν σε δεξαμενές με διπλάσια σε σχέση με πριν ιχθυοφόρτιση πιθανώς να

επέτεινε περισσότερο την ήδη υπάρχουσα καταπόνηση. Από την άλλη, είναι πιθανό η δεξαμεθαζόνη να έχει όντως μπλοκάρει την επαγόμενη από τον εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτρόπου ορμόνης (CRH) έκκριση της ACTH, αυτή όμως λόγω της καταπόνησης που δέχτηκαν τα ψάρια να εκκρίνεται μέσω διέγερσης από άλλες ορμόνες όπως η αργινίνη-βασοτοκίνη (Balment *et al.*, 2006) κάτι που έχει φανεί να συμβαίνει σε αρουραίους (Murphy *et al.*, 1995).

Με βάση όλα τα παραπάνω είναι δύσκολο να απαντηθεί κατά πόσο απαιτείται υψηλή δόση στο λαβράκι για να κατασταλεί η κορτιζόλη του πλάσματος, όπως συμβαίνει σε ζώα με ανοχή στην κορτιζόλη. Αυτό συμβαίνει διότι αν και φάνηκε πως δόση ½ mg kg^{-1} είναι δυνατό να μειώσει τη συγκέντρωση της κορτιζόλης κατά 50%, δεν είναι γνωστό εάν αυτή η δόση θεωρείται μικρή ή μεγάλη. Συγκρίνοντας με άλλα είδη ιχθύων υπάρχουν έντονες διακυμάνσεις μεταξύ των μελετών. Για παράδειγμα, στην ιριδίζουσα πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss*, δόση κατά 10 φορές μικρότερη (Milligan 1997) ή παρόμοια (Donaldson & McBride 1967) με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη προκάλεσε πολύ εντονότερη μείωση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης, ενώ σε άλλες μελέτες παρόμοιες δόσεις προκάλεσαν παρόμοια αποτελέσματα (Pottinger & Carrick 2001; Pierson *et al.*, 2004). Είναι φανερό επομένως ότι μεταξύ διαφορετικών μελετών δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με το ποιά δόση δεξαμεθαζόνης θεωρείται μικρή και ποιά μεγάλη για τα ψάρια.

Στα τρωκτικά, από την άλλη, οι δόσεις που καταστέλλουν επιτυχώς τα επίπεδα της κορτικοστερόνης είναι πολύ χαμηλότερες από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα, αλλά και στις προαναφερθείσες μελέτες με ψάρια. Έτσι, οι δόσεις που μειώνουν επιτυχώς τη συγκέντρωση της ορμόνης είναι της τάξης των 0,005 – 0,025 mg kg^{-1} τόσο σε ποντίκια όσο και σε αρουραίους (Zhukov 1993; Koerner 1997; Cole *et al.*, 2000; Bartolomucci *et al.*, 2004; Helm *et al.*, 2004).

Από τη στιγμή που η χορήγηση της δεξαμεθαζόνης δεν είναι βαθμονομημένη στα ψάρια μία εναλλακτική προσέγγιση θα ήταν ένα συγκριτικό πείραμα με ένα είδος παρόμοιων οικολογικών απαιτήσεων και μεταβολικού ρυθμού με το λαβράκι, που να εμφανίζει όμως φυσιολογικές τιμές συγκέντρωσης κορτιζόλης στο πλάσμα. Έτσι, θα εξακριβωνόταν αν οι ίδιες δόσεις προκαλούν παρόμοιες επιδράσεις, ή αν για το λαβράκι απαιτούνται υψηλότερες δόσεις.

Τέλος, η γνώση για την αφθονία και τη συγγένεια των υποδοχέων της κορτιζόλης στο λαβράκι (GR1, GR2 και MR) είναι ελλιπής και κατά συνέπεια δεν

μπορεί να εξακριβωθεί εάν το λαβράκι τελικά εμφανίζει αντίσταση στην κορτιζόλη του τύπου που περιγράφηκε προηγουμένως.

Εν αντιθέσει με την κατασταλτική της δράση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης, η δεξαμεθαζόνη οδήγησε σε αύξηση τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα των ψαριών. Οι διαφορές αυτές βέβαια ήταν σημαντικές μόνο στην περίπτωση της μικρής δόσης, αν και στις άλλες δύο δόσεις τα επίπεδα της γλυκόζης ήταν 1,5 – 2 φορές ψηλότερα από την ομάδα ελέγχου, ενώ μη σημαντικές ήταν και στο πείραμα με τη χορήγηση της δεξαμεθαζόνης για 4 h. Γενικά, θεωρείται ότι η δεξαμεθαζόνη προκαλεί υπεργλυκαιμία τόσο σε θηλαστικά όσο και σε ψάρια (Mommsen *et al.*, 1992; Basque *et al.*, 1996), προάγοντας κατά κύριο λόγω τη γλυκογενόλυση, μειώνοντας ταυτόχρονα την ενσωμάτωση γλυκόζης σε γλυκογόνο. Επιπλέον, παρόλο που αυξήθηκαν τα βασικά επίπεδα της γλυκόζης, δεν παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωσή της μετά την καταπόνηση, όπως σημειώθηκε για τα ψάρια που είχαν δεχτεί ένεση με φυσιολογικό ορό.

Αντίθετα με τη βιβλιογραφία, η χορήγηση δεξαμεθαζόνης προκάλεσε μείωση στα επίπεδα του αιματοκρίτη των ψαριών, η οποία ήταν σημαντική στην περίπτωση των δύο χαμηλότερων δόσεων (Pierson *et al.*, 2004). Φαίνεται, όπως και στη γλυκόζη, να υπάρχει μία τάση ο αιματοκρίτης να είναι χαμηλότερος στις χαμηλότερες δόσεις. Μετά την καταπόνηση δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα επίπεδα του αιματοκρίτη τόσο στην ομάδα ελέγχου όσο και στις ομάδες που δέχτηκαν ένεση με δεξαμεθαζόνη.

Η συγκέντρωση του pH του αίματος ήταν υψηλότερη στις ομάδες που χορηγήθηκε δεξαμεθαζόνη, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η αύξηση αυτή είχε αντίστροφη τάση από αυτή των δόσεων, με το υψηλότερο pH να παρατηρείται στη μικρότερη δόση. Γενικά, η χορήγηση στεροειδών μπορεί να προκαλέσει αλκάλωση του αίματος σε θηλαστικά όπως οι κατσίκες (Watkins *et al.*, 1973), σε μικρό όμως βαθμό για τη δεξαμεθαζόνη σε σχέση με άλλα στεροειδή (Chernow *et al.*, 1985). Τα καταπονημένα ψάρια δε διέφεραν από αυτά που ήταν σε κατάσταση ηρεμίας σε καμία δόση δεξαμεθαζόνης, αλλά ούτε και στην ομάδα ελέγχου.

Εκτός από την περίπτωση της κορτιζόλης, σε όλες τις άλλες παραμέτρους που υπολογίστηκαν φάνηκε να υπάρχει κάποιου είδους αντίστροφη εξάρτηση από την ποσότητα δεξαμεθαζόνης που χορηγήθηκε στα ζώα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ δύσκολο να εξηγηθούν με το μικρό αριθμό δόσεων που πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα. Μία εικασία θα μπορούσε να είναι ότι ίσως η δεξαμεθαζόνη δρα με

διφασικό τρόπο τόσο στον αιματοκρίτη όσο και στο pH του αίματος, με τις δύο υψηλότερες δόσεις να βρίσκονται στο τμήμα της καμπύλης που παρά τη μεγαλύτερη ποσότητα της δραστικής ουσίας η δράση της είναι μικρότερη. Έχει φανεί ότι η δεξαμεθαζόνη μπορεί να φέρει διφασικές αποκρίσεις τόσο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου σε αρουραίους, κάτι που πιθανώς εξηγεί το πρότυπο της γλυκόζης (Zheng *et al.*, 2009) όσο και στην αύξηση και τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων στον άνθρωπο (Calabrese 2005).

5 Βιβλιογραφία

Acerete, L., L. Reig, D. Alvarez, R. Flos & L. Tort, 2009. Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 287: 139-144.

Arai, K. & G.P. Chrousos, 1995. Syndromes of glucocorticoid and mineralocorticoid resistance. *Steroids*, 60: 173-179.

Balment, R.J., W. Lu, E. Weybourne & J.M. Warne, 2006. Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behavior: a review with insights from mammalian models. *General and Comparative Endocrinology*, 147: 9-16.

Baque, S., A. Roca, J.J. Guinovart & A.M. Gomez-Foix, 1996. Direct activating effects of dexamethasone on glycogen metabolizing enzymes in primary cultures rat hepatocytes. *European Journal of Endocrinology*, 236: 772-777.

Barnett, C.W. & N.W. Pankhurst, 1998. The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea taparina (*Gunther, 1862). *Aquaculture*, 162: 313-329.

Bartolomucci, A., T. Pederzani, P. Sacerdote, A.E. Panerai, S. Parmigiani & P. Palanza, 2004. Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 29: 899-910.

Barton B.A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 517-525.

Barton, B.A. & C.B. Schreck, 1987. Influence of acclimation temperature on interregnal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 62: 299-310.

Barton, B.A. & G.K. Iwama, 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Reviews of Fish Diseases*, 6: 3-26.

Begg, K & N.W. Pankhurst, 2004. Endocrine and metabolic responses to stress in a laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus. Journal of Fish Biology*, 64: 133-145.

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

Brett, J.R. & T.D.D. Groves, 1979. In: Physiological energetic. Hoar W.S., D.J Randall, J.R. Brett (eds) Fish Physiology, Volume 8, Academic Press, New York, pp. 280-344.

Brett, J.R., 1958. Implications and assessment of environmental stress. In: The Investigation of Fish-Power Problems. Larkin, P.A. (eds): 69-83. H.R. MacMllan Lectures in Fisheries. University of British Columbia, Vancouver.

Broadhurst, M.K. & D.T. Barker, 2000. Effects of capture by hook and line on plasma cortisol, scale loss and survival in juvenile mulloway, *Argyrosomus hololepidotus*. *Archive of Fishery Marine Research,* 48 (1): 1-10.

Burton, R.F., 1986. Ionic regulation in fish: the influence of acclimation temperature on plasma composition and apparent set points. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 85A: 23-28.

Butcher, P.A., M.K. Broadhurst, D. Reynolds, D.D. Reid & C.A. Gray, 2007. Release method and anatomical hook location: effects on short-term mortality of angler-caught *Acanthopagrus australis* and *Argyrosomus japonicus*. *Diseases of Aquatic Organisms,* 74: 17-26.

Butler, D.G., E.M. Donaldson & W.C Clarke, 1968. Physiological evidence for a pituitary-adrenocortical feedback mechanism in the eel (*Anguilla rostrata). General and Comparative Endocrinology,* 12 (1): 173-176.

Calabrese, E.J., 2005. Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. *Critical Reviews in Toxicology,* 35: 463-582.

Campbell, J.E., N. Rakhshani, S. Fediuc, S. Bruni & M.C. Riddell, 2009. Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. *Journal of Applied Physiology,* 106: 66-72.

Caruso, G., L. Genovese, G. Maricchiolo & A. Modica, 2005. Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. *Aquaculture International*, 13: 67-73.

Cerda-Reverter, J.M., S. Zanuy, M. Carrillo & J.A. Madrid, 1998. Time course studies on plasma glucose, insulin and cortisol in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiology and Behavior*, 64 (3): 245-250.

Chatelier, A., D.J. McKenzie & G. Claireaux, 2005. Effects of changes in water salinity upon exercise and cardiac performance in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology,* 147: 855-862.

Chatzifotis, S., M. Panagiotidou, N., Papaioannou, M. Pavlidis, I. Nengas & C.C. Mylonas, 2010. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. *Aquaculture,* 307: 65-70.

Chatzifotis, S., M. Papadaki, S. Despoti, C. Roufidou & E. Antonopoulou, 2011. Effect of starvation and re-feeding on reproductive indices, body weight, plasma metabolites and oxidative enzymes of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture,* 316: 53-59.

Checkley, S., 1996. The neuroendocrinology of depression and chronic stress. *British Medical Bulletin,* 52 (3): 597-617.

Chernow, B., B.K. Vernoski, G.P. Zaloga, D. D'Angona, M. van Ness, L.C., Casey & J.R. Fletcher, 1985. Dexamethasone causes less steroid-induced alkalemia than methyprednisolone or hydrocortisone. *Survey of Anesthesiology,* 29 (1): 10.

Chrousos, G.P., 1998. Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptive response. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 851: 311-335.

Chrousos, G.P., D.L. Loriaux, D. Brandon, M. Tomita, A.C.M. Vingerhoeds, G.R. Merriam, E.O. Johnson & M.B. Lipsett, 1983. Primary cortisol resistance: a familiar syndrome and an animal model. *Journal of Steroid Biochemistry,* 19 (1): 567-575.

Claireaux, G. & J.P. Lagardere, 1999. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research,* 42: 157-168.

Claireaux, G., C. Couturier & A.L. Groison, 2006. Effect of temperature on maximum swimming speed and cost of transport in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *The Journal of Experimental Biology,* 209: 3420-3428.

Cole, M.A., P.J. Kim, B.A. Kalman & R.L. Spencer, 2000. Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by

receptor measures and functional studies. *Psychoneuroendocrinology,* 25: 151-167.

Conte, F.S., 2004, Stress and welfare of cultured fish. *Applied Animal Behavior Science*, 86: 205-223.

Costas, B., C. Aragao, I,R. Jarabo, L. Vargas-Chacoff, F.J. Arjona, J.M. Mancera, M.T. Dinis, & L.E.C. Conceicao, 2012. Different environmental temperatures affect amino acid metabolism in the eurytherm teleost Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) as indicated by changes in plasma metabolites. *Amino acids*, 43: 327-335.

Coz-Rakovac, R., I. Strunjak-Perovic, M. Hacmanjek, N. T. Popovic, Z. Lipej & B. Sostaric. Blood chemistry and histology properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the north Adriatic Sea. *Veterinary Research Communications,* 29: 677-687.

Davis, K.B. & N.C. Parker, 1990. Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. *Aquaculture,* 91: 349-358.

Di Marco, P., A. Priori, M.G. Finoia, A. Massari, A. Mandich & G. Marino 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture,* 275: 319-328.

Dobson, G.P. & P.W. Hochachka, 1987. Role of glycolysis in adenylate depletion and repletion during work and recovery in teleost white muscle. *The Journal of Experimental Biology,* 129: 125-140.

Donaldson, E.M. & J.R. McBride, 1967. The effects of hypophysectomy in the rainbow trout *Salmo gairdnerii* (Rich.) with special reference to the pituitary-interrenal axis. *General and Comparative Endocrinology,* 9: 93-101.

Donaldson, M.T., S.M. McDonnell, B.J. Schanbacher, S.V. Lamb, D. McFarlane & J. Beech, 2005. Variation in plasma adrenocorticotropic hormone concentration and dexamethasone suppression test results with season, age and sex in healthy ponies and horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine,* 19 (2): 217-222.

Enes, P., J. Sanchez-Gurmaches, I. Navarro, J. Gutierrez & A. Oliva-Teles, 2010. Role of insulin and IGF-I on the regulation of glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed with different dietary carbohydrate levels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A,* 157: 346-353.

Fabbri, E.L., A. Capuzzo & T.W. Moon, 1998. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 120: 177-192.

Fagerlund, U.H.M. & J.R. McBride, 1969. Suppression by dexamethasone of interregnal activity in adult sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *General and Comparative Endocrinology*, 12: 651-657.

Fanouraki, E., C.C. Mylonas, N. Papandroulakis & M. Pavlidis 2011. Species specificity in the magnitude and duration of the acute stress response in Mediterranean marine fish in culture. *General and Comparative Endocrinology*, 173: 313-322.

Fanouraki, E., N. Papandroulakis, T. Ellis, C.C. Mylonas, A.P. Scott & M. Pavlidis, 2008. Water cortisol is a reliable indicator of stress in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Behaviour*, 145: 1267-1281.

FAO, 2002. The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA). FAO Rome, Italy.

FAO. © 2005-2012. Cultured Aquatic Species Information Programme. Argyrosomus regius. Cultured Aquatic Species Information Programme. **Text by Stipa, P.; Angelini, M.** In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 10 February 2005.

Feldman, E.C., R.W. Nelson & M.S. Feldman, 1996. Use of low- and high-dose dexamethasone tests for distinguishing pituitary-dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209 (4): 772-775.

Fernandez, J., J. Gutierrez, M. Carrillo, S. Zanuy & J. Planas, 1989. Annual cycle of plasma lipids in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L: effects of environmental conditions and reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 93A (2): 407-412.

Filho, D.W., G.J. Eble, G. Kassner, F.X. Caprario, A. L. Dafret & M. Ohira 1992. Comparative hematology in marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 102A (2): 311-321.

Fitzgibbon, Q.P., A. Strawbridge & R.S. Seymour, 2007. Metabolic scope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture*, 270: 358-368.

Goolish, E.M., 1991. Aerobic and anaerobic scaling in fish. *Biological Reviews*, 66: 33-56.

Groenink, L., A. Dirks, P.M. Verdouw, M.L. Schipholt, J.G. Veening, J. van der Gugten & B. Olivier, 2002. HPA axis dysregulation in mice overexpressing corticotropin releasing hormone. *Biological Psychiatry,* 51: 875-881.

Gutierrez, J., J. Fernandez, M. Carrillo, S. Zanuy & J. Planas, 1987. Annual cycle of plasma insulin and glucose of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. *Fish Physiology and Biochemistry,* 4 (3): 137-141.

Gutierrez, J., J. Perez, I. Navarro, S. Zanuy & M. Carrillo, 1991. Changes in plasma glucagon and insulin associated with fasting in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry,* 9 (2): 107-112.

Hall, F.G. and I.E. Gray 1929. The haemoglobin concentration of the blood of marine fishes. *Journal of Biological Chemistry*, 81: 589-594.

Heisler, N., 1984. Acid-base regulation in fishes. In: Physiological energetic. Hoar W.S., D.J Randall (eds) Fish Physiology, Volume 8, Academic Press, New York p.315-400.

Helm, K.A., D.R. Ziegler & M. Gallagher, 2004. Habituation to stress and dexamethasone suppression in rats with selective basal forebrain cholinergic lesions. *Hippocampus,* 14: 628-635.

Juell, J.E. & J.E. Fosseidengen, 2004. Use of artificial light to control swimming depth and fish density of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in production cages. *Aquaculture,* 233: 269-282.

Kavadias, S., J. Castritsi-Catharios & A. Dessypris, 2003. Annual cycles of growth rate, feeding rate, food conversion, plasma glucose and plasma lipids in a population of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) farmed in floating marine cages. *Journal of Applied Ichthyology,* 19: 29-34.

Kieffer, J.D., S. Currie & B.L. Tufts, 1994. Effects of environmental temperature on the metabolic and acid-base responses of rainbow trout to exhaustive exercise. *The Journal of Experimental Biology,* 194: 299-317.

King, W., L.J. Buckley & D.L. Berlinsky, 2006. Effect of acclimation temperature on the acute stress response in juvenile Atlantic cod, *Cadus morhua* L., and haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquaculture Research,* 37: 1685-1693.

Koerner, K.M., 1997. Establishing a protocol for dexamethasone suppressing testing in mice. *Honors Theses,* Paper 205.

Lankford, S.E., T.E. Adams & J.J. Cech Jr., 2003. Time of day and water temperature modify the physiological stress response in green sturgeon, *Accipenser medirostris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A,* 135: 291-302.

Larsson, A., M.L. Johansson-Sjobeck and R. Fange 1976. Comparative study of some haematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. *Journal of Fish Biology,* 9: 425-440.

Larsson, A.L. 1973. Metabolic effects of epinephrine and norepinephrine in the eel *Anguilla anguilla* L. *General and Comparative Endocrinology,* 20: 155-167.

Lemarie, G., C.D. Hosfeld, G. Breuil & S. Fivelstad, 2011. Effects of hyperoxic water conditions under different total gas pressures in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture,* 318: 191-198.

Luna-Acosta, A., C. Lefrancois, S. Millot, B. Chatain & M.L. Begout, 2011. Physiological response in different strains of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): swimming and aerobic metabolic capacities. *Aquaculture,* 317: 162-167.

Lupatsch, I., G.A. Santos, J.W. Schrama & J.A.J. Verreth, 2010. Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture,* 298: 245-250.

Lupi, P., V. Vigiani, M. Mecatti & R. Bozzi, 2005. First haematic results for the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) metabolic profile assessment. *Italian Journal of Animal Science,* 4: 167-176.

Maricchiolo, G., S. Mirto, G., Caruso, T. Caruso, R. Bonaventura, M. Celi, V. Matranga & L. Genovese, 2011. Welfare status of cage farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A comparison between submerged and surface cages. *Aquaculture,* 314: 173-181.

Marino, G., P. Di Marco, A. Mandich, M.G. Finoia & S. Cataudella, 2001. Changes in serum cortisol, metabolites, osmotic pressure and electrolytes in response to different blood sampling procedures in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Applied Ichthyology,* 17: 115-120.

Martinez-Porchas, M., L.R., Martinez-Cordova & Ramos-Enriquez R., 2009. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences,* 4 (2): 158-178.

McLeay, D.J., 1973. Effects of cortisol and dexamethasone on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology,* 21: 441-450.

Methling, C., N. Aluru, M.M. Vijayan & J.F. Steffensen, 2010. Effect of moderate hypoxia at three acclimation temperatures on stress responses in Atlantic cod with different haemoglobin types. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 156: 485-490.

Milligan, C.L. & C.M Wood, 1986. Tissue intracellular acid-base status and the fate of lactate after exhaustive exercise in the rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology*, 123: 123-144.

Milligan, C.L. & C.M. Wood, 1987. Regulation of blood oxygen transport and red cell pH_i after exhaustive activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and starry flounder (*Platichthys stellatus*). *The Journal of Experimental Biology*, 133: 261-282.

Milligan, C.L. and S.S. Girard 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 180: 175-193.

Milligan, C.L., 1996. Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113A (1): 51-60.

Milligan, C.L., 1997. The role of cortisol in amino acid mobilization and metabolism following exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 16 (2): 119-128.

Milligan, C.L., 2003. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 3167-3173.

Mommsen, T.P., E. Danulat & P.J. Walsh, 1992. Metabolic actions of glucagon and dexamethasone in liver of the ureogenic teleost *Opsanus beta*. *General and Comparative Endocrinology*, 85: 316-326.

Mommsen, T.P., M.M. Vijayan & T.W. Moon, 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211-268.

Murphy, H.M., C.H. Wideman & J.P. Row, 1995. Vasopressin, immobilization and the dexamethasone suppression test in rats. *Peptides*, 16 (3): 437-440.

Newell-Price, J., P. Trainer, M. Besser & A. Grossman, 1998. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing syndrome and pseudo-Cushing's state. *Endocrine Reviews*, 19 (5): 647-672.

Nordlie, F.G., 1976. Influence of environmental temperature on plasma ionic and osmotic concentrations in *Mugil cephalus* Lin. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 55A: 379-381.

Olsson, G.B., R.L. Olsen, M. Carlehog & R. Ofstad, 2003. Seasonal variations in chemical and sensory characteristics of farmed and wild Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture,* 217: 191-205.

Pagnotta, A. & C.L. Milligan 1991. The role of blood glucose in the restoration of muscle glycogen during recovery from exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Journal of Experimental Biology,* 161: 489-508.

Pankhurst, N.W., 2011. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology,* 170: 265-275.

Pascoli, F., G.S. Lanzano, E. Negrato, C. Poltronieri, A. Trocino, G. Radaelli & D. Bertotto, 2011. Seasonal effects on hematological and innate immune parameters in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellifish Immunology,* 31: 1081-1087.

Pastoureaud, A., 1991. Influence of starvation at low temperatures on utilization of energy reserves, appetite recovery and growth character in sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture,* 99: 167-178.

Pavlidis, M., L. Angellotti, N. Papandroulakis & P. Divanach, 2003. Evaluation of transportation procedures on water quality and fry performance in red porgy (*Pagrus pagrus)* fry. *Aquaculture,* 218: 187-202.

Pavlidis, M., M. Sundvik, Y.C. Chen & P. Panula, 2011. Adaptive changes in zebrafish brain in dominant-subordinate behavioral context. *Behavioural Brain Research,* 225: 529-537.

Pavlidis, M., M., Berry, P., Divanach & M. Kentouri, 1997. Diel pattern of haematocrit, serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormones in sea bass and sea bream. *Aquaculture International,* 5: 237-247.

Pearson, M.P., L.L. Spriet & E.D. Stevens, 1990. Effect of sprint training on swim performance and white muscle metabolism during exercise and recovery in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *The Journal of Experimental Biology,* 149: 45-60.

Peres, H., P. Goncalves & A. Oliva-Teles, 1999. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture,* 179: 415-423.

Perez, J., J. Gutierrez, M. Carrillo, S. Zanuy & J. Fernandez, 1989. Effect of bonito insulin injection on plasma immunoreactive glucagon levels and carbohydrate and lipid metabolism of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology,* 49A (1): 33-36.

Perez-Jimenez, A., M.J. Guedes, A.E. Morales & A. Oliva-Teles, 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture,* 265: 325-335.

Peruzzi, S., S. Varsamos, B. Chatain, C. Fauvel, B. Menu, J.C. Falguiere, A. Severe & G. Flik, 2005. Hamatological and physiological characteristics of diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture,* 244: 359-367.

Petochi, T., P. Di Marco, A. Priori., M.G. Finoia, I. Mercatali & G. Marino, 2011. Coping strategy and stress response of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to acute and chronic environmental hypercapnia under hyperoxic conditions. *Aquaculture,* 315: 312-320.

Pichavant, K., V. Maxime, P. Soulier, G. Boeuf & G. Nonnotte, 2003. A comparative study of blood oxygen transport in turbot and sea bass: effect of chronic hypoxia. *Journal of Fish Biology,* 62: 928-937.

Pickering, A.D., T.G. Pottinger & J.P. Sumpter, 1987. On the use of dexamethasone to bloc pituitary-interrenal axis in the brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology,* 65: 346-353.

Pierson, P.M., A. Lamers, G. Flik & N. Mayer-Gostan, 2004. The stress axis, stanniocalcin, and ion balance in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology,* 137: 263-271.

Planas, J., J. Gutierrez, J. Fernandez, M. Carrillo & P. Canals, 1990. Annual and daily variations of plasma cortisol in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture,* 91: 171-178.

Poli, B.M., G. Parisi, G. Zampacavallo, F., Iurzan, M. Mecatti, P. Lupi & A. Bonelli, 2003. Preliminary results on quality and quality changes in reared meagre (*Argyrosomus regius*): body and fillet traits and freshness changes in refrigerated commercial-size fish. *Aquaculture International,* 11: 301-311.

Pottinger, T.G. & T.R. Carrick, 2001. ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A,* 129: 399-404.

Pottinger, T.G., A. Cook, M.D. Jurgens, M. Sebire, P.A. Henrys, I Katsiadaki, J.L. Balaam, A.J. Smith & P. Matthiessen, 2011. Indices of stress in three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* in extreme weather events and exposure to wastewater effluent. *Journal of Fish Biology,* 79: 256-279.

Pottinger, T.G., T.R., Carrick, A. Appleby & W.E. Yeomans, 2000. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: is the chub, *Leuciscus cephalus,* a cortisol-resistant teleost? *General and Comparative Endocrinology,* 120: 108-117.

Power, D.M., J. Melo & C.R.A. Santos, 2000. The effect of food deprivation and refeeding on the liver thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *Journal of Fish Biology,* 56: 374-387.

Reid, S.G., N.J. Bernier & S.F. Perry, 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release, *Comparative Biochemistry and Physiology,* 120C: 1-27.

Renaud, J.M. & T.W. Moon, 1980. Characterization of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from the American eel, *Anguilla rostrata* LeSueur, *Journal of Comparative Physiology,* 135: 115-125.

Robergs, R.A., F. Ghiasvard & D. Parker, 2004. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology,* 287: R502-R516.

Roche, H. & G. Boge 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research,* 41 (1): 27-43.

Rotllant, J., N.M. Ruane, M.J Caballero, D. Montero & L. Tort, 2003. Response to confinement in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is characterized by an increased biosynthetic capacity of interrenal tissue with no effect on ACTH sensitivity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A,* 136: 613-620.

Rotllant, J., N.M. Ruane, M.T. Dinis, A.V.M. Canario & D.M. Power, 2006. Intra-adrenal interactions in fish: Catecholamine stimulated cortisol release in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A,* 143: 375-381.

Ruane, N.M., E.A. Huisman & J. Komen, 2001. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. *Journal of Fish Biology,* 59: 1-12.

Salas-Leiton, E., O. Coste, E. Asensio, C. Infante, J.P. Canavate & M. Manchado, 2012. Dexamethasone modulates expression of genes involved in the innate immune system, growth and stress and increases susceptibility to bacterial disease in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish & Shellifish Immunology,* 32: 769-778.

Sammouth, S., E. R. d'Orbcastel, E. Gasset, G., Lemarie, G., Breuil, G. Marino, J.L. Coeurdacier, S. Fivelstad & J.P. Blancheton, 2009. The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering,* 40: 72-78.

Santulli, A., A. Modica, C. Messina, L. Ceffa, A. Curatolo, G. Rivas, G. Fabi & V. D'Amelio 1999. Biochemical responses of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) to the stress induced by off shore experimental seismic prospecting. *Marine Pollution Bulletin,* 38 (12): 1105-1114.

Schulte, P.M., C.D. Moyes & P.W. Hochachka, 1992, Integrating metabolic pathways in post-exercise recovery of white muscle. *The Journal of Experimental Biology,* 166: 181-195.

Stec, I., N. Barden, J.M.H.M. Reul & F. Holsboer, 1994. Dexamethasone nonsuppression in transgenic mice expressing antisense RNA to the glucocorticoid receptor. *Journal of Psychiatric Research,* 28 (1): 1-5.

Stokes, P.E., C., Sikes, B. Lasley & P. Stoll, 2002a. HPA hyperactivity with increased plasma cortisol affects dexamethasone metabolism and DST outcome. *Journal of Psychiatric Research,* 36: 417-421.

Stokes, P.E., P.M. Stoll, J.H. Schluger & B. Lasley, 2002b. Hypercortisolemia decreases dexamethasone half-life in rabbit. *Journal of Psychiatric Research,* 36: 423-428.

Stolen, J.S., T. Gahn, V. Kasper & J.J. Nagle, 1984. The effect of environmental temperature on the immune response of a marine teleost (*Paralichthys dentatus*). *Developmental and Comparative Immunology,* 8: 89-98.

Sumpter, J.P. & E.M. Donaldson, 1986. The development and validation of a radioimmunoassay to measure plasma ACTH levels in salmonid fishes. *General and Comparative Endocrinology,* 62: 367-376.

Takahashi, A., T. Ogasawara, H. Kawauchi & T. Hirano, 1990. Plasma profiles of the N-terminal peptide of proopiomelanocortin in the rainbow trout with reference to stress. *General and Comparative Endocrinology,* 77: 98-106.

Tang, Y. & R.G. Boutilier, 1991. White muscle intracellular acid-base and lactate status following exhaustive exercise: a comparison between freshwater- and seawater- adapted rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology,* 156: 153-171.

Taymans, S.E, A.C. DeVries, M.B. DeVries, R.J., Nelson, T.C. Friedman, M. Castro, S. Detera-Wadleigh, C.S. Carter & G.P. Chrousos, 1997. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis of prairie voles (*Microtus ochrogaster*): evidence for target tissue glucocorticoid resistance. *General and Comparative Endocrinology,* 106: 48-61.

Tort, L., J. Rotllant & L. Rovira, 1998. Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A,* 120: 175-179.

Van der Boon, J., G.E.E.J.M van der Thillart, & A.D.F. Addink1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 100A (1): 47-53.

Van der Salm, A.L., M. Pavlidis. G. Flik & S.E. Wendelaar Bonga, 2006. The acute stress response of red porgy, *Pagrus pagrus,* kept on a red or white background. *General and Comparative Endocrinology,* 145: 247-253.

Van Dijk, P.L.M., I. Hardewig & F. Holker, 2005. Energy reserves during food deprivation and compensatory growth in juvenile roach: the importance of season and temperature. *Journal of Fish Biology,* 66: 167-181.

Vijayan, M.M., G.D. Foster & T.W. Moon, 1993. Effects of cortisol on hepatic carbohydrate metabolism and responsiveness to hormones in the sea raven, *Hemitripterus americanus*. *Fish Physiology and Biochemistry,* 12 (4): 327-335.

Vornanen, M., J. Asikainen & J. Haverinen, 2011. Body mass dependence of glycogen stores in the anoxia tolerant crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Naturwissenschaften,* 98 (3): 225-232.

Wang, Y., G.J.F., Heigenhauser & C.M. Wood, 1994. Integrated responses to exhaustive exercise and recovery in rainbow trout white muscle: acid-base, phosphogen, carbohydrate, lipid, ammonia, fluid volume and electrolyte metabolism. *The Journal of Experimental Biology*, 195: 227-258.

Watkins, B.E., G.D. Riegle & S.R. Heisey, 1973. Respiratory responses to ACTH and dexamethasone in unanesthetized goats. *Respiration Physiology*, 17: 127-133.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77 (3): 591-625.

Woo, N.Y.S. & R.S.S. Wu, 1984. Changes in biochemical composition in the red grouper, *Epinephelus akaara (*Temminck and Schlegel), and the black sea bream, *Mylio macrocephalus* (Basilewsky), during hypoxic exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 77A (3): 475-482.

Wooley, L., 2009. The development of a practical diet for juvenile dusky kob, *Argyrosomus japonicus*, for the south African mariculture industry. *Master of Science Theses*, Rhodes University.

Wright, P.A., S.F. Perry & T.W. Moon, 1989. Regulation of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis by catecholamines in rainbow trout during environmental hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*, 147: 169-188.

Zheng, X.F., L. Liu, J. Zhou, M.Y. Miao, J.R. Zhou, D. Zhu, Z.F. Xia & C.L. Jiang, 2009. Biphasic effects of dexamethasone on glycogen metabolism in primary cultured rats hepatocytes. *Journal of Endocrinological Investigation*,32 (9): 756-758.

Zhukov, D.A., 1993. The dexamethasone suppression test in genetically different rats exposed to inescapable and escapable electric shocks. *Psychoneuroendocrinology*, 18 (7): 467-474.

Φανουράκη, Ε., 2010. Μελέτη της καταπόνησης και ανάπτυξη μη-επεμβατικής μεθόδου προσδιορισμού της ελεύθερης κορτιζόλης στο θαλασσινό νερό σε μεσογειακά είδη ιχθύων, με έμφαση στο λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.