ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Τμήμα Βιολογίας

ΠΜΣ: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ
ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

Μελέτη της επίδρασης της άσκησης στη μορφολογία και στα οστά του zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822)

Πρίντζη Αλίκη
2019

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Τμήμα Βιολογίας

ΠΜΣ: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

Μελέτη της επίδρασης της άσκησης στη μορφολογία και στα οστά του zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822)

Επιβλέπων Καθηγητής
Κουμουνδούρος Γεώργιος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή
Κουμουνδούρος Γεώργιος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
Κεντούρη Μαρουδιώ (Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
Σωμαράκης Στυλιανός (Διευθυντής Ερευνών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του ΠΜΣ: «Περιβαλλοντική Βιολογία - Διαχείριση Χερσαίων Και Θαλασσίων Βιολογικών Πόρων». Πιο συγκεκριμένα, το σύνολο των πειραματικών διαδικασιών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Θαλάσσιας Βιολογίας - Βιολογίας Ιχθύων του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την Ελληνική (Οδηγία 63/2010) και Ευρωπαϊκή (Οδηγία 56/2013) νομοθεσία σχετικά με την καλή διαβίωση των ζώων. Όλα τα πρωτόκολλα εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Περιφερειακής Φροντίδας Ζώων (Αριθμός Άδειας: 115487/19).

Πρωταρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Γεώργιο Κουμουνδούρο, για τη διαρκή στήριξη και βοήθειά του κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Η καθοδήγησή του υπήρξε αναγκαία και με εφοδίασε κατάλληλα για τα επόμενα βήματά μου στην ένταξη της ενεργούς επιστημονικής κοινότητας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κεντούρη Μαρουδιώ και τον κ. Στέλιο Σωμαράκη, μέλη της εξεταστική μου επιτροπής, για τις παρατηρήσεις και τα σχόλιά τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Prof. P. Eckhard Witten για την εκπαίδευση και τη συμβολή του στην ιστολογική επεξεργασία των δειγμάτων, η οποία έλαβε χώρα στο Πανεπιστήμιο της Γάνδης (Βέλγιο), στο Εργαστήριο Εξελικτικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς, τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς συνεργάτες του εργαστηρίου για τη συνεργασία και δημιουργική συμβίωση που είχαμε τόσο καιρό στον ίδιο εργασιακό χώρο. Κλείνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στους δικούς μου ανθρώπους για την καθημερινή τους στήριξη ώστε να παραχθεί η εργασία αυτή.

Περίληψη

Η φαινοτυπική πλαστικότητα αποτελεί γνώρισμα της ομάδας των τελεόστεων, καθώς οι τελευταίοι αποτελούν μία υποομάδα των σπονδυλωτών που διαβιεί σε ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Πλαστικές αποκρίσεις δύναται να παρατηρηθούν τόσο σε χαρακτήρες της εξωτερικής μορφολογίας (όπως το σχήμα του σώματος) αλλά και σε σκελετικά στοιχεία. Αλλαγές σε μηχανικά φορτία μπορούν να επάγουν επιτυχώς αλλαγές σε σκελετικά στοιχεία στους ιχθύες. Η κολυμβητική άσκηση αποτελεί ένα επιτυχές μέσο αύξησης της μηχανικής τάσης που ασκείται στα σκελετικά στοιχεία. Αν συμπεριληφθεί και η σημαντική επίδραση της άσκησης στην διαμόρφωση της εξωτερικής μορφολογίας μπορούμε να κάνουμε λόγο για ένα παράγοντα με δυνατότητα πρόκλησης έντονων πλαστικών αποκρίσεων.

Στόχος της παρούσας εργασίας υπήρξε η μελέτη της επίδρασης της κολυμβητικής άσκησης στο σχήμα του σώματος καθώς και στη σπονδυλική στήλη νυμφών zebrafish, που υποβλήθηκαν σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα κολυμβητικής έντασης (0, 5,0, 6,5 ή 8,0 $TL \cdot s^{-1}$). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η διάρκεια, όσο και η ένταση της άσκησης επέδρασαν σημαντικά ($p<0,05$, G-test) στην ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης, προκαλώντας αιματική λόρδωση. Αυξανόμενης της κολυμβητικής έντασης, η συχνότητα της παραμόρφωσης αυξήθηκε σημαντικά από 0,5±1,3% στους πληθυσμούς ελέγχου (0 $TL \cdot s^{-1}$), σε 7,5±10,6% , 47,5±10,6% ή 92.5±6.0%, στα 5,0, 6,5 ή 8,0 $TL \cdot s^{-1}$. Η λόρδωση ήταν εμφανής από μόλις τη δεύτερη ημέρα στα 6,5 και 8,0 $TL \cdot s^{-1}$ ενώ στα 5,0 $TL \cdot s^{-1}$ η ανάπτυξη της λόρδωσης ήταν μορφολογικά εμφανής δύο ημέρες αργότερα. Κύριο χαρακτηριστικό της παρατηρούμενης παραμόρφωσης φάνηκε να αποτελεί μία νωτιαία αναδίπλωση των άνω άκρων των τελικών πλακών των σπονδύλων που βρίσκονται στο κέντρο της λόρδωσης. Μια σημαντική διόγκωση των προσαγωγών και απαγωγών ουραίων αγγείων στην ίδια περιοχή ολοκλήρωσε την περιγραφή των αλλαγών γύρω από την περιοχή ενδιαφέροντος στη σπονδυλική στήλη.

Η κολυμβητική άσκηση επέδρασε σημαντικά και στο σχήμα του σώματος των φυσιολογικών ιχθυδίων zebrafish (Wilks' $\lambda=0,1652$, $p<0,001$). Τα ιχθύδια της ομάδας ελέγχου παρουσίασαν μια νωτοκοιλιακή διεύρυνση στο μέσο του σώματος αποκλίνοντας από το υδροδυναμικό πρότυπο σχήματος που παρουσίασαν τα ασκούμενα.

Τα αποτελέσματα συζητούνται ως προς τη δυνατότητα χρησιμοποίησης του zebrafish για την κατανόηση των μηχανισμών απόκρισης του σκελετού έναντι των μηχανικών ερεθισμάτων, καθώς και του μηχανισμού ανάπτυξης της αιματικής λόρδωσης στα εκτρεφόμενα ψάρια. Η μεθοδολογία που εφαρμόσθηκε θα μπορούσε να αποτελέσει στο μέλλον τη πειραματική βάση για τη σχετική μελλοντική έρευνα.

Abstract

Phenotypic plasticity is present within teleosts regarding their continuously changing environment. Both external morphology and skeletal elements are subjected to extended plastic responces. Increased mechanical loads can evoke skeletal changes. Swimming exercise can induce mechanical strain on those elements. If we take into account the significant effect of exercise on body shape, exercise can be viewed as a challenging factor to induce plastic responses.

Aim of the present study is to test the effect of swimming exercise on body shape and the vertebral column of zebrafish larvae, subjected to three different swimming velocities (5,0, 6,5 ή 8,0 $TL \cdot s^{-1}$). According the results arisen, exercise duration and intensity significantly affected ($p<0,05$, G-test) the induction of haemal lordosis. Frequency of lordodis increased from 0,5±1,3% (0 $TL \cdot s^{-1}$), to 7,5±10,6% , 47,5±10,6% or 92.5±6.0%, at 5,0, 6,5 ή 8,0 $TL \cdot s^{-1}$ respectively. Depending on exercise intensity, lordosis was first detected two (at 6.5-8.0 $TL \cdot s^{-1}$) to four (at 5.0 TL s^{-1}) days after the beginning og the exercise. A dorsal folding of the vertebral body end plates of vertebrae located in the centre of lordosis, is a special feature of the deformity observed. An enlargement of caudal veins under the affected area of the vertebral column was also spotted.

Simultaneously exercise significantly affected larvae body shape (Wilks' $\lambda=0,1652$, $p<0,001$). Juveniles from control group developed an enlargement of the abdominal cavity deviating from the streamlined body shape of the exercised ones.

Results of the present study reveal zebrafish advantages concerning skeletal responses to mechanical stimuli and induction of haemal lordosis. Methodology applied could in the future be the experimental basis for relevant research.

Περιεχόμενα

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος 1
Περίληψη 2
Abstract 3
Περιεχόμενα 4
1 Εισαγωγή 5
1.1 Φαινοτυπική πλαστικότητα 5
1.2 Φαινοτυπική πλαστικότητα στους τελεόστεους 5
1.2.1 Πλαστικότητα των σκελετικών στοιχείων των τελεόστεων 7
1.3 Σκελετικές παραμορφώσεις 9
1.4 Άσκηση 11
1.4.1 Επίδραση στο σχήμα του σώματος 12
1.4.2 Επίδραση στα σκελετικά στοιχεία 13
1.5 Πρόκληση παραμορφώσεων στο εργαστήριο 16
1.6 Το υπό μελέτη είδος 17
1.7 Στόχοι της παρούσας διατριβής 20
2 Υλικά και μέθοδοι 22
2.1 Βασικός πειραματικός σχεδιασμός 22
2.2 Σύσταση και διατήρηση πειραματικών πληθυσμών 22
2.3 Λήψη και προετοιμασία δειγμάτων 23
2.4 Κολυμβητική άσκηση 24
2.5 Εκτίμηση επίδρασης άσκησης στον ρυθμό αύξησης 26
2.6 Ποσοτικοποίηση και περιγραφή της λόρδωσης 26
2.7 Μικροτομογραφία 28
2.8 Προετοιμασία δειγμάτων για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο 29
2.9 Ανάλυση του σχήματος σώματος των ιχθυδίων zebrafish 29
3 Αποτελέσματα 31
3.1 Επίδραση της άσκησης στον ρυθμό αύξησης του zebrafish 31
3.2 Ανάπτυξη αιματικής λόρδωσης ως απόκριση στην κολυμβητική άσκηση 32
3.3 Επίδραση άσκησης στο σχήμα του σώματος 36
3.4 Επίδραση της λόρδωσης στο σχήμα του σώματος 38
4 Συζήτηση 40
5 Βιβλιογραφία 47

1 Εισαγωγή

1.1 Φαινοτυπική πλαστικότητα

Ο όρος της φαινοτυπικής πλαστικότητας έχει απασχολήσει κατά κόρον την επιστημονική κοινότητα και αποτελεί αντικείμενο πολλών επιστημονικών συζητήσεων και συγκρούσεων. Κι αυτό μπορεί εύκολα να γίνει κατανοητό, αν συλλάβουμε την ευελιξία νοήματος που επιτρέπει ο ορισμός της. Με τον όρο φαινοτυπική πλαστικότητα περιγράφεται η ιδιότητα ενός διακριτού γονότυπου να παράξει διαφορετικούς φαινότυπους, σε απόκριση διάφορων περιβαλλοντικών συνθηκών (Pigliucci 2001). Ωστόσο το χάσμα που δημιουργείται στην προσπάθεια επεξήγησης του όρου δεν αποτελεί αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας. Το ενδιαφέρον μας επικεντρώνεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ γονότυπου και περιβάλλοντος, καθώς η εμφάνιση ενός χαρακτήρα σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον θα πρέπει να αντιμετωπίζεται ως το αποτέλεσμα μιας δυναμικής και πολύπλοκης σχέσης μεταξύ αυτών των δύο.

Η λειτουργική σημασία της φαινοτυπικής πλαστικότητας συγχέεται, συνήθως, με την ικανότητα ενός οργανισμού να προσαρμόζεται σε ποικίλα περιβάλλοντα και συνεπώς με αυξημένη ικανότητα επιβίωσης. Τις περισσότερες φορές, οι πιθανές αρνητικές επιπτώσεις ερμηνεύονται ως παθολογικές καταστάσεις. Αυτή η οπτική δεν είναι λανθασμένη, απλά πιθανώς παρερμηνεύει τον ουδέτερο καθορισμό της φαινοτυπικής πλαστικότητας. Στην πραγματικότητα, ελάχιστα είναι τα παραδείγματα εκείνα στα οποία τα πλεονεκτήματα που επιφέρει η πλαστικότητα δεν συνοδεύονται από μειονεκτήματα (λόγου χάρη υψηλά ενεργειακά κόστη) (Burggren and Dubansky 2018).

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η φαινοτυπική πλαστικότητα μπορεί να εκδηλωθεί σε συμπεριφορικό, μορφολογικό, βιοχημικό ή φυσιολογικό επίπεδο ενός οργανισμού σε διαφορετικές εντάσεις και μορφές (Nicoglou 2015). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μία εργασία σε αμφίβια *Rana sylvatica* σε νεαρά οντογενετικά στάδια (Maher *et al.* 2013). Πιο συγκεκριμένα, τα αμφίβια αυτά σαν αντιθηρευτικό μηχανισμό επιβίωσης εμφανίζουν αύξηση του μήκους της ουράς σε σχέση με τον κορμό τους. Η ρύθμιση των επιπέδων μίας στρεσογόνου ορμόνης φαίνεται να επάγει την πλαστικότητα των χαρακτήρων αυτών.

Η φαινοτυπική πλαστικότητα μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες: την αναπτυξιακή πλαστικότητα, η οποία περιλαμβάνει περιπτώσεις στις οποίες η φαινοτυπική διακύμανση είναι προϊόν αλλαγών σε νεαρά οντογενετικά στάδια, και τον εγκλιματισμό, στον οποίο ανήκουν περιπτώσεις φαινοτυπικής διακύμανσης που οφείλονται σε αντιστρεπτές αλλαγές των ενήλικων ατόμων (Beldade *et al.* 2011).

1.2 Φαινοτυπική πλαστικότητα στους τελεόστεους

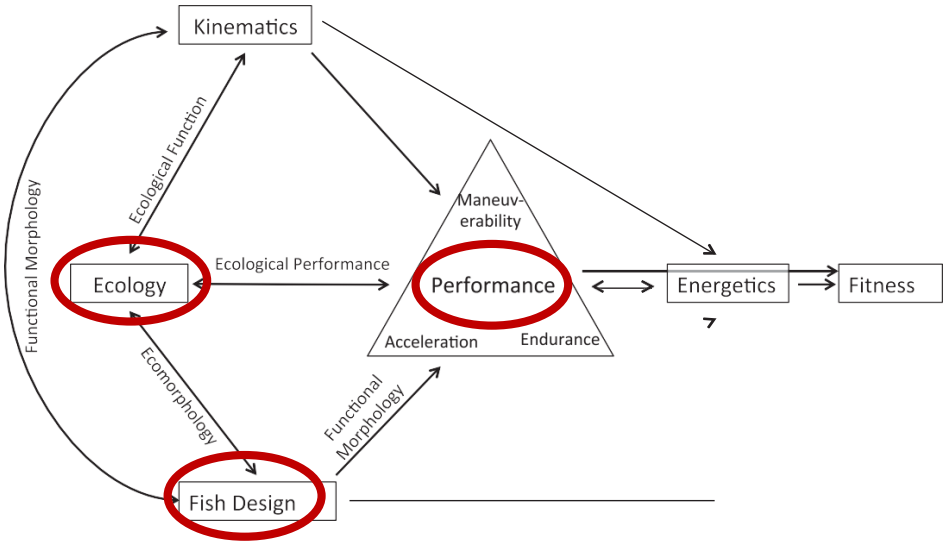
Καθώς οι τελεόστεοι διαβιούν σε ένα συνεχώς μεταβαλλόμενο και πολυποίκιλο περιβάλλον, θα ήταν αδύνατο να μην έχει μελετηθεί η φαινοτυπική πλαστικότητα σε αυτή την ομάδα των σπονδυλωτών. Η ύπαρξή της έχει αποδοθεί σε πληθώρα παραγόντων, βιοτικών και αβιοτικών (π.χ. διατροφή, θερμοκρασία), που επιδρούν

άμεσα ή έμμεσα και αφορά ως επί το πλείστον μορφολογικούς, φυσιολογικούς ή συμπεριφορικούς χαρακτήρες.

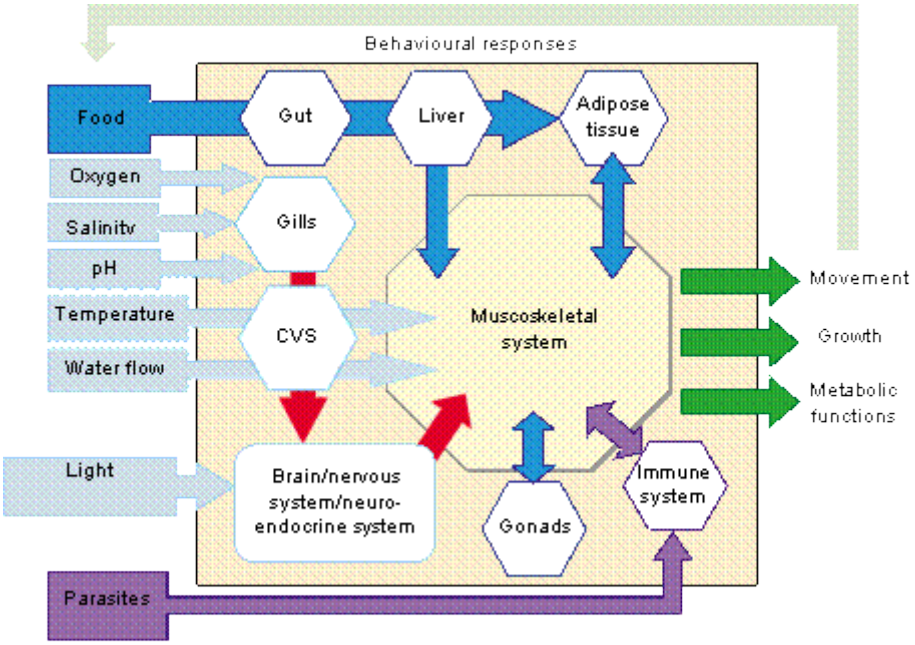
Η θερμοκρασία ανάπτυξης (Koumoundouros *et al.* 2002, Georgakopoulou *et al.* 2007, Dimitriadi *et al.* 2018), οι μεταβολές στην περιεκτικότητα του νερού σε οξυγόνο σε πρώιμα οντογενετικά στάδια (Vulesevic and Perry 2006), η φωτοπερίοδος και η αλατότητα (Lindsey 1998), η αφθονία της τροφής (Meyer 1987), η μέθοδος εκτροφής των ψαριών (Koumoundouros *et al.* 1999), η παρουσία θηρευτών και η πυκνότητα των ψαριών (Amundsen *et al.* 2007), το περιβάλλον ανάπτυξης (Marks *et al.* 2005), ή η παρουσία «ανταγωνιστών» (Paszkowski *et al.* 1990) έχουν τα τελευταία χρόνια καταγραφεί να επιδρούν σημαντικά στους μεριστικούς χαρακτήρες, στο σχήμα του σώματος των ιχθύων, στην κολυμβητική τους ικανότητα, στον ρυθμό ανάπτυξης και διαφοροποίησης, στη μυογένεση και στην αναλογία φύλου. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι σε ιχθύδια πέστροφας *Salvelinus fontinalis* που διαβιούσαν σε συνθήκες υψηλής έντασης ρευμάτων παρατηρήθηκε διαφορά στο μήκος του ουραίου πτερυγίου και στο σχήμα σώματος, το οποίο εμφανίζεται πιο επίμηκες σε σχέση με ιχθύδια σε χαμηλής ταχύτητας ρεύματα (Imre *et al.* 2002). Ακόμα, πλαστικές αποκρίσεις έχουν παρατηρηθεί και στο σύστημα μετακίνησης ιχθύων και συγκεκριμένα στην κολυμβητική δραστηριότητά τους (Nelson *et al.* 2015), αποδεικνύοντας την αλληλεξάρτηση περιβάλλοντος και φαινότυπου (Εικόνα 1.1).

Πληθώρα εργασιών έχουν ως αντικείμενο την πλαστικότητα μαλακών ιστών, όπως οι μύες (Johnston 2006) ή η καρδιά (Dimitriadi *et al.* 2018), ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Αναφορικά με την πλαστικότητα της μυογένεσης, αλλαγές στην τροφή, θερμοκρασία, σωματική άσκηση ή φωτοπερίοδο μπορούν να επάγουν τροποποιήσεις σε σημαντικά μονοπάτια του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης πρόδρομων μυϊκών κυττάρων (Johnston 2006) (Εικόνα 1.2).

Στο σημείο αυτό εύλογα γεννάται το ερώτημα αν οι αλλαγές αυτές, που οφείλονται στη φαινοτυπική πλαστικότητα, περιορίζονται στους μαλακούς ιστούς και στην εξωτερική μορφολογία ή αν η δράση του περιβάλλοντος μπορεί να παρατηρηθεί και σε πιο φαινομενικά σκληρές δομές (π.χ. οστά).



Εικόνα 1.1 Αναπαράσταση της περίπλοκης δυναμικής της κολυμβητικής δραστηριότητας των ψαριών. Από Oufiero and Whitlow (2016). Το μοντέλο απεικονίζει τους κυριότερους παράγοντες που μπορούν να επιδράσουν στην κολυμβητική δραστηριότητα (π.χ οικολογία) καθώς και την άμεση ή έμμεση εμπλοκή τους στη διαμόρφωση των σχετικών φαινοτυπικών χαρακτήρων.



Εικόνα 1.2 Τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και τα φυσιολογικά συστήματα που επηρεάζουν τις λειτουργικές αποκρίσεις του σκελετικού μυός στους τελεόστεους. Από Johnston (2006).

1.2.1 Πλαστικότητα των σκελετικών στοιχείων των τελεόστεων

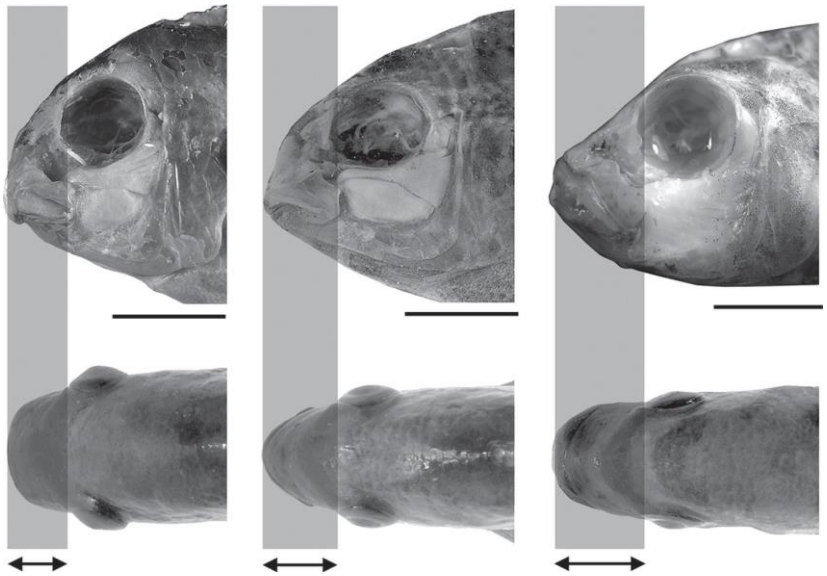
Αρχικά καλούμαστε να προσδιορίσουμε σε ποιες δομές αναφερόμαστε όταν κάνουμε λόγο για σκελετικά στοιχεία. Ο όρος σκελετικά στοιχεία αναφέρεται λοιπόν σε σκελετικά κύτταρα, ιστούς και όργανα (οστά) των τελεόστεων. Η πλαστικότητα των δομών αυτών είναι δεδομένη σήμερα ανάμεσα στα σπονδυλωτά και άκρως διατηρημένη στην ομάδα των τελεόστεων (Hall and Witten 2018). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ο όρος της λειτουργικής προσαρμογής των οστών των τελεόστεων, που υιοθετήθηκε από τους Ruff et al. (2006), σε μία προσπάθεια να προσεγγιστεί, με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιτυχία, ο νόμος του Wolff σχετικά με την ανικανότητα του σκελετού να παραμείνει στατικός. Παρά το γεγονός ότι ο σκελετός θεωρείται δομή μικρότερης ποικιλομορφίας σε σχέση με άλλους ιστούς (ιδιαίτερα μαλακούς), στην πραγματικότητα υπόκειται σε συνεχείς αλλαγές. Σήμερα, γνωρίζουμε πλέον με βεβαιότητα ότι επιγενετικοί παράγοντες μπορούν να αποτελέσουν ερεθίσματα φαινοτυπικής πλαστικότητας στους τελεόστεους (Hall 2005). Η ανατομία των σκελετικών χαρακτήρων, οι μηχανικές ιδιότητές τους, καθώς και το πλήθος των δομών τους είναι μερικοί μόνο από τους δέκτες της πλαστικότητας που χαρακτηρίζει την ομάδα. Οι αλλαγές των σκελετικών στοιχείων των τελεόστεων παρατηρούνται σε ποικίλα στάδια της οντογένεσης, από ακυτταρικές μορφές οστού έως πτερύγια και άκανθες (Witten and Huysseune 2009).

Η λειτουργική προσαρμογή των οστών των τελεόστεων μπορεί να αποδοθεί τόσο σε κυτταρικά οστά όσο και σε ακυτταρικές μορφές οστού (Fiaz *et al.* 2010, Grunbaum *et al.* 2012, Kranenbarg *et al.* 2005). Τα κυτταρικά οστά περιλαμβάνουν οστεοκύτταρα στο εσωτερικό τους, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στα ακυτταρικά λόγω του ότι οι οστεοβλάστες δεν παγιδεύονται και δεν συμμετέχουν στη διαδικασία της οργανοποίησης (Witten *et al.* 2009, Hall and Witten 2007). Οι πιο εξελιγμένες μορφές

τελεόστεων χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ακυτταρικού οστού, κάτι το οποίο γεννά ποικίλα ερωτήματα σχετικά με τις διαδικασίες της τροποποίησης, διαφοροποίησης, μεταπλασίας και αναδιαμόρφωσης των δομών, κύριες διεργασίες που μεταβάλλουν τη φαινοτυπική πλαστικότητα των σκελετικών στοιχείων (Hall and Witten 2018). Ωστόσο, οι σχετικές αμφιβολίες κάμφθηκαν με τη διευκρίνιση της εμφάνισης αλλαγών σε ακυτταρικά οστά ως απόκριση σε μηχανικά φορτία (Kranenbarg *et al.* 2005).

Αναφορικά, με τις πλαστικές αποκρίσεις του σκελετού των τελεόστεων χαρακτηριστικές είναι οι μορφολογικές και δομικές αλλαγές των γνάθων, συνοδευόμενες από τροποποιήσεις των προτύπων γονιδιακής έκφρασης, ως απόκριση σε διατροφικούς χειρισμούς (Εικόνα 1.3). Στο είδος *Astatoreochromis alluaudi* οι Huysseune *et al.* (1995) έδειξαν ότι τα άτομα εκείνα που τρέφονται με σκληρές τροφές επενδύουν στην ανάπτυξη μεγάλων σε μέγεθος δοντιών, σε σχέση με εκείνα που τρέφονται με μαλακές δομές και εμφανίζουν περισσότερα σε πλήθος, αλλά κανονικά σε μέγεθος δόντια. Οι Parsons *et al.* (2014) έδειξαν ότι η κατανάλωση σκληρών τροφών από είδη της οικογένειας Ciclidae της λίμνης Μαλάουι επιφέρει μείωση στα επίπεδα της Bmp4 που συμβάλλει στον σχηματισμό των γνάθων.

Προκειμένου, όμως, να αποσαφηνίσουμε τον μηχανισμό των αλλαγών αυτών στα πλαίσια του αντικειμένου της παρούσας εργασίας, καλούμαστε να επικεντρωθούμε στους παράγοντες εκείνους που μπορούν να επιδράσουν στα σκελετικά στοιχεία.

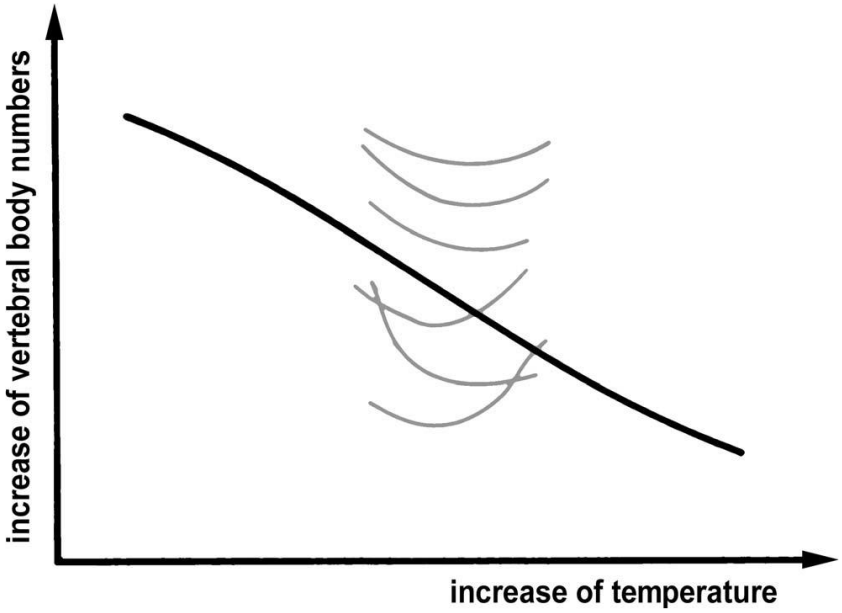


Εικόνα 1.3 Χαρακτηριστικά είδη Cichlidae από την λίμνη Malawi. Ορατές διαφορές στην περιοχή του ρύγχους και ιδίως των γνάθων, που αποδίδονται στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες των ειδών. Από Parsons *et al.* (2014).

Σε προηγούμενη ενότητα, είδαμε αρκετούς παράγοντες που επιδρούν στην εξωτερική μορφολογία (π.χ. σχήμα σώματος), καθώς και σε μαλακούς ιστούς στους τελεόστεους. Σε ορισμένους από τους παράγοντες αυτούς θα αναφερθούμε και εδω. Σε κάθε περίπτωση, ακόμα και οι μορφολογικές αλλαγές απαιτούν τις περισσότερες φορές αλλαγές σε σκελετικούς ιστούς. Αναφορικά με τα σκελετικά στοιχεία, η δράση των επιγενετικών παραγόντων μπορεί να γίνει ορατή πριν ή κατά τη διάρκεια της σκελετογένεσης (Herbing *et al.* 1996), αλλά και σε μετέπειτα οντογενετικά στάδια. Η πλαστικότητα του σκελετού των τελεόστεων αποδίδεται συχνότερα σε θερμοκρασιακά

επαγόμενη πλαστικότητα, πλαστικότητα λόγω βιοχημικών ερεθισμάτων και ως απόκριση σε διάφορους επιγενετικούς παράγοντες (Hall 2015).

Από τους πιο μελετημένους παράγοντες που επάγουν αναδιαμορφώσεις και τροποποιήσεις σε σκελετικά στοιχεία είναι τα μηχανικά φορτία (Currey 2003). Ο σχηματισμός, η αύξηση, καθώς και η διατήρηση πολλών οστών εξαρτώνται από μηχανικά φορτία που επάγονται από τη βαρύτητα και τους μύες. Χρησιμοποιώντας ένα πρωτόκολλο έντονης κολυμβητικής άσκησης για την αύξηση των μηχανικών φορτίων, οι Fiaz et al. 2012 έδειξαν ότι σε νύμφες zebrafish επιταχύνονται οι διαδικασίες της αύξησης, της χονδρογένεσης και της οστεογένεσης. Μάλιστα η κολυμβητική άσκηση δίνει προτεραιότητα στο σχηματισμό οστέινων δομών της ουράς και της κεφαλής των ασκούμενων νυμφών. Η εμφανής αυτή εξάρτηση των σκελετικών στοιχείων από διάφορους παράγοντες δεν θα μπορούσε, όμως, να επάγει μόνο ευεργετικές αλλαγές. Οι παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα αποδεικνύουν περίτρανα αυτό το συμπέρασμα (Kihara *et al.* 2002). Σε ένα επόμενο επίπεδο μάλιστα, η πλαστικότητα της σπονδυλικής στήλης έχει παρατηρηθεί ακόμα και σε ήδη παραμορφωμένους σπόνδυλους στον σολομό του Ατλαντικού (Witten *et al.* 2006).



Εικόνα 1.4 Σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας και του αριθμού των σπονδύλων σύμφωνα με τον Fowler (1970). Η μαύρη γραμμή αναπαριστά τη γενική σχέση της θερμοκρασίας και του αριθμού των σπονδύλων στους τελεόστεους, ενώ οι γκρι καμπύλες αναπαριστούν ορισμένες εξαιρέσεις.

1.3 Σκελετικές παραμορφώσεις

Καθώς οποιαδήποτε απόκλιση από τη φυσιολογική δομή ή λειτουργία ενός ζώου χαρακτηρίζεται υπό τον όρο ασθένεια, οι μορφοανατομικές ανωμαλίες περιγράφονται ως μη λοιμώδεις ασθένειες, οι οποίες διακρίνονται ξεκάθαρα από μορφολογικές παθήσεις που προκαλούνται από μολύνσεις και παθογόνους μικροοργανισμούς. Έτσι, λοιπόν, οι μη αντιστρέψιμες μορφολογικές αποκλίσεις των ψαριών από τον «άγριο» φαινότυπο είναι γνωστές ως μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις (Koumoundouros

2010). Με εξαίρεση τις παραμορφώσεις που σχετίζονται με τον χρωματισμό και την πλευρική γραμμή, θα μπορούσαμε να διακρίνουμε δύο κύριες κατηγορίες μορφοανατομικών ανωμαλιών: τις παραμορφώσεις που σχετίζονται με την παρουσία και λειτουργικότητα της νηκτικής κύστης και τις δυσπλασίες του σκελετού, κατηγορία που αφορά την πλειονότητα.

Οι σκελετικές ανωμαλίες, δυσπλασίες ή παραμορφώσεις είναι κοινές μεταξύ των ψαριών και πολλά είδη από όλο τον κόσμο επηρεάζονται από αυτές (Dawson 1964, 1966, 1971, Dawson and Heal 1976). Οι ανωμαλίες αυτές είναι στενά συνδεδεμένες με τη μη φυσιολογική ανάπτυξη του σκελετού των ιχθύων, καθώς και σε κάποιες περιπτώσεις με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Andrades *et al.* 1996). Έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν όλες τις ανατομικές περιοχές στο ψάρι, από το κρανίο έως την σπονδυλική στήλη και τα πτερύγια. Χαρακτηρίζονται από ελλείψεις, πολλαπλασιασμό, μεταβολές θέσης ή/και σχήματος ποικίλων σκελετικών στοιχείων (Boglione *et al.* 2013)**.**

Οι παραμορφώσεις του κρανίου εμφανίζονται κυρίως στο βραγχιακό επικάλυμμα, στις γνάθους και στο υοειδές τόξο, με ποικίλες εντάσεις και διαφορετικό βαθμό ποικιλομορφίας. Οι παραμορφώσεις του βραγχιακού επικαλύμματος είναι οι συχνότερα παρατηρούμενες και μπορούν να επηρεάσουν ως και το 80% του πληθυσμού (Koumoundouros 2010). Εμφανίζονται κυρίως ως «ατροφία» ή «έλλειψη» του επικαλυμματικού οστού με παράλληλη έκθεση των βράγχιων. Είναι η πλέον μελετημένη κρανιακή παραμόρφωση και ανατομικά αποδίδεται στην προς τα έσω κάμψη του επικαλυμματικού ή/και υποκαλυμματικού οστού κατά το στάδιο των νυμφών (Koumoundouros *et al.* 1997a). Οι παραμορφώσεις των γνάθων περιλαμβάνουν τη βράχυνση της άνω ή κάτω γνάθου, καθώς και το σύνδρομο του «διασταυρούμενου δαγκώματος» (πλευρική μετατόπιση κάτω γνάθου) (Koumoundouros *et al.* 2004, Koumoundouros 2010, Fragkoulis *et al.* 2018). Ακόμη, παρά την απουσία εκτενών αναφορών, η έντονη κοιλιακή προβολή του υοβραγχιακού σκελετού είναι μία συχνά εμφανιζόμενη ανωμαλία (Cobcroft *et al.* 2001). Δεδομένου του καθοριστικού ρόλου του κρανίου στην αναπνοή, στη λήψη τροφής, καθώς και στην ομαλή λειτουργικότητα αισθητήριων οργάνων, οι παραμορφώσεις στην περιοχή αυτή έχουν άμεσο αντίκτυπο στην αύξηση, την επιβίωση, καθώς και στον βαθμό ευαισθησίας αναφορικά με ασθένειες των ατόμων που τις φέρουν (Koumoundouros 2010).

Μία επόμενη διάκριση αποτελούν οι παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης. Μακροσκοπικά, οι παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης διακρίνονται σε λόρδωση, κύφωση, σκολίωση και σύντηξη. Παρουσιάζονται είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό και εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό έντασης (Divanach et al. 1997, Koumoundouros *et al.* 2002). Η λόρδωση εμφανίζεται τόσο στην προ-αιματική περιοχή όσο και στην αιματική περιοχή της σπονδυλικής στήλης, επαγομένη από διαφορετικούς παράγοντες (Chatain 1989,1994, Andrades *et al.* 1996, Divanach *et al.* 1997, Sfakianakis *et al.* 2006a). Τα λορδωτικά άτομα παρουσιάζουν νωτοκοιλιακή κάμψη της σπονδυλικής στήλης σχήματος V (Barahona- Femades 1982, Andrades *et al.* 1996). Στην προ-αιματική λόρδωση συνήθως εμπλέκονται 2-3 σπόνδυλοι στο σημείο της φυσικής κάμψης της σπονδυλικής στήλης (τελευταίοι προαιματικοί σπόνδυλοι, Chatain 1989). Όσον αφορά την κύφωση, η σπονδυλική στήλη των προβληματικών ατόμων εμφανίζει νωτοκοιλιακή κάμψη σχήματος Λ. Παρατηρείται τόσο στην προ-αιματική περιοχή (Boglione *et al.* 1995, Koumoundouros *et al.* 2002), ραχιαία της νηκτικής κύστης, και συχνά στους σπονδύλους 5 και 6 (Koumoundouros *et al.* 2002), όσο και στην αιματική περιοχή (Koumoundouros 2010). Η σκολίωση αναφέρεται στην πλευρική κάμψη της

σπονδυλικής στήλης. Θεωρείται σπάνια παραμόρφωση για εκτρεφόμενους πληθυσμούς (Villeneuve *et al.* 2007).

Τέλος κάνουμ λόγο για τις παραμορφώσεις των πτερυγίων. Συναντούμε συχνότερα παραμορφώσεις του ουραίου πτερυγίου (Koumoundouros *et al.* 1997b), που συχνότερα αποδίδονται σε δυσπλασίες και συντήξεις των ουραίων οστών, καθώς και η παραμόρφωση που χαρακτηρίζεται ως saddleback. Η παραμόρφωση αυτή χαρακτηρίζεται από έλλειψη ενός τμήματος ή και ολόκληρου του ραχιαίου πτερυγίου, το οποίο μάλιστα πρόσφατα συσχετίστηκε με την πλήρωση της νηκτικής κύστης κατά τα πρώτα στάδια της ζωής των ιχθύων (Iwasaki *et al.* 2017). Μάλιστα, έχει βρεθεί θετική συσχέτιση εμφάνισης του saddleback με την εμφάνιση άλλων σκελετικών παραμορφώσεων (Sfakianakis *et al.* 2003). Επιπλέον, οι Koumoundouros *et al.* 2001 περιγράφουν την ύπαρξη παραμορφώσεων τόσο στο εδρικό όσο και στο ραχιαίο πτερύγιο, ενώ οι Fragkoulis *et al.* 2017 απέδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση εμφάνισης του saddleback με τις παραμορφώσεις στα κοιλιακά και εδρικά πτερύγια.

Το φάσμα των ηλικιών στις οποίες έχουν κατά καιρό εντοπιστεί σκελετικές παραμορφώσεις είναι ευρύ, καθώς μπορούμε να κάνουμε λόγο είτε για παραμορφώσεις που εμφανίζονται ως αναπτυξιακές αποκλίσεις από το φυσιολογιό πρότυπο κατά τη διάρκεια του εμβρυϊκού και νυμφικού σταδίου (Koumoundouros et al. 1997, Georga *et al.* 2010, Loizides *et al.* 2014), είτε για παραμορφώσεις φυσιολογικά ανεπτυγμένων οστών κατά τη μεταμόρφωση και το στάδιο του ιχθυδίου (Sfakianakis *et al.* 2006; Mazurais et al. 2009). Συγκεντρωτικά, οι κυριότεροι παράγοντες που εντοπίζονται πίσω από την εμφάνιση σκελετικών παραμορφώσεων είναι οι δυσμενείς αβιοτικές συνθήκες, η ακατάλληλη διατροφή ή ο γενετικός παράγοντας. Από εκεί και πέρα το ζήτημα τείνει να γίνεται ειδοειδικό (Koumoundouros *et al.* 2010).

1.4 Άσκηση

Οι φυσικές ιδιότητες του νερού, καθώς και οι υδροστατικές και υδροδυναμικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται, όταν ένας οργανισμός κινείται σε αυτό, αποτελούν σημαντικές παραμέτρους της κολυμβητικής άσκησης. Τα ψάρια κολυμπούν υπό φυσιολογικές συνθήκες σε ταχύτητες όπου οι δυνάμεις αδράνειας κυριαρχούν. Οι κινήσεις ταλάντωσης του σώματος και των πτερυγίων είναι ικανές να παράγουν ορμή ανάλογη των ταλαντώσεων και της μάζας του νερού που έρχεται σε άμεση επαφή. Σε ένα επόμενο βήμα, ο ρυθμός αλλαγής της ορμής με προσανατολισμό αντίστροφο στην κίνηση της κολύμβησης οδηγεί στην ώθηση των ψαριών, στη βάση του τρίτου νόμου του Νεύτωνα (Videler 2012). Η πλειονότητα των ιχθύων κολυμπά με κινήσεις του σώματος και της ουράς που πραγματοποιούνται με τη βοήθεια του πλευρικού μυϊκού συστήματος. Διαθέτουν 2 κύριες μυϊκές ομάδες, τους κόκκινους μύες που είναι υπεύθυνοι για αργή κολυμβητική αερόβια κίνηση, και τους λευκούς μύες για ξαφνικές προωθήσεις (Videler 2012).

Τα πρότυπα κολύμβησης των ιχθύων περιλαμβάνουν τη διαρκή κολύμβηση (sustained swimming), την παρατεταμένη κολύμβηση (prolonged ή endurance swimming) και την κολύμβηση εκτίναξης (burst swimming) (Beamish 1978). Όσον αφορά τη διαρκή κολύμβηση αποτελεί καθαρά αερόβια τροφοδοτούμενη διαδικασία με τη συμμετοχή κυρίως κόκκινων μυϊκών ινών. Όσον αφορά την παρατεταμένη κολύμβηση, στην αρχή επιστρατεύονται κόκκινες μυϊκές ίνες ενώ σε ταχύτητες

μεγαλύτερες του 80% της Ucrit συμμετέχουν επιπρόσθετα και ροζ μυϊκές ίνες αλλά και άσπρες (Hammer 1995).

Έως σήμερα ο πιο αποδεκτός τρόπος υπολογισμού της κολυμβητικής ικανότητας των ψαριών είναι μέσω μέτρησης της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης (Ucrit, Brett, 1964). Κατά τον (Brett 1964), Ucrit είναι η μέγιστη παρατεταμένη ταχύτητα κολύμβησης που επιτυγχάνεται στο σημείο της κόπωσης, κατά την οποία λαμβάνει χώρα η μέγιστη παρατεταμένη λήψη οξυγόνου.

Από την άποψη της ευζωίας των ψαριών, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι τα περιβάλλοντα με επικρατούσες ταχύτητες που δεν υπερβαίνουν τις προτιμώμενες ταχύτητες κολύμβησης των ειδών, θα πρέπει να παρέχουν καλή διαβίωση δεδομένου ότι τα άτομα είναι ελεύθερα να εκφράζουν συμπεριφορές εντός των φυσικών ορίων αντοχής τους (Palstra *et al.* 2011). Τι συμβαίνει άραγε όταν τα άτομα υποβάλλονται σε συνθήκες ταχύτητας ρεύματος που βρίσκονται πάνω από το 50% της Ucrit τους;

1.4.1 Επίδραση στο σχήμα του σώματος

Σε γενικές γραμμές, γνωρίζουμε ότι η μορφολογία των ψαριών είναι ένας χαρακτήρας που προσαρμόζεται στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες. Όσον αφορά τους ιχθύες, η ταχύτητα του περιβάλλοντος νερού αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες. Προσπαθώντας να συνδέσουμε την κολυμβητική άσκηση με το σχήμα του σώματος, οι συχνότερες αναφορές εντοπίζονται στον τρόπο με τον οποίο το σχήμα του σώματος επηρεάζει την κολυμβητική δραστηριότητα (π.χ. Pakkasmaa and Piironen 2001). Ωστόσο, η συγκεκριμένη εργασία επικεντρώνεται σε ένα ερώτημα ανάποδο από αυτό μονοπάτι, στο οποίο η κολυμβητική άσκηση, ιδίως λόγω της επίδρασης της ταχύτητας του νερού στο γύρω περιβάλλον, μπορεί να δράσει στο σχήμα του σώματος.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα μορφολογικών αλλαγών σε απόκριση διακυμάνσεων της ταχύτητας του νερού, και συνεπώς προσαρμοσμένης κολυμβητικής άσκησης, αποτελούν μελέτες σε είδη όπως ο σολομός (*Salmo salar*) και η πέστροφα (*Salmo trutta*), όπου εντοπίζονται κυρίως διαφορές στο μέγεθος της κεφαλής, στο ύψος του σώματος, καθώς και στο μέγεθος των πτερυγίων (Pakkasmaa and Piironen 2001). Στον σολομό (*Salvelinus fontinalis, Salvelinus alpines*) (Peres-Neto and Magnan 2004) μεγαλύτερο ύψος σώματος εντοπίζεται σε άτομα που ασκούνται περισσότερο λόγω έντονου ρεύματος, ενώ σε ένα είδος πέστροφας (*Salmo trutta*) συμβαίνει το αντίστροφο (Imre *et al.* 2001, Pakkasmaa and Riironen 2001). Οι Grunbaum *et al.* (2007) εφάρμοσαν τέσσερις διαφορετικές ταχύτητες ρεύματος σε άτομα *S. salar*, για να επιβεβαιώσουν την αύξηση του μέσου σωματικού μεγέθους με την αύξηση της ταχύτητας. Η αύξηση του μεγέθους κι όχι οι αλλαγές στο σχήμα του σώματος προτιμούνται λόγω της δυσλειτουργικότητας υπολογισμού των συνεργικών επιδράσεων που περιλαμβάνουν οι τελευταίες. Στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) που υποβλήθηκε σε άσκηση για 30 ημέρες στα 0.8 και 1.6 $BL \cdot s^{-1}$ (BD, body length), δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στο μήκος σε σχέση με τα άτομα ελέγχου (control). Τα άτομα, ωστόσο, που υποβλήθηκαν στις συνθήκες άσκησης παρουσίασαν μεγαλύτερο βάρος από τα άτομα ελέγχου, ενδεχομένως λόγω της αύξησης του μυϊκού ιστού (Martin and Johnston 2005). Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν και οι Laporte *et al.* (2015) στο *Salaria fluviatilis,* όπου 28 μέρες άσκησης σε 20 και 30 cm s^{-1} ταχύτητα ήταν επαρκές ερέθισμα προκειμένου το σώμα να γίνει πιο λεπτό και τα πτερύγια πιο μακριά. Ακόμη, λεπτότεροι ουραίοι μίσχοι και μικρότερα ουραία πτερύγια έχουν

παρατηρηθεί ως αποκρίσεις σε αυξημένες ταχύτητες (Magnan *et al.* 2014). Συνολικά, κατά τη μετάβαση από μικρότερης σε υψηλότερης έντασης άσκηση το σχήμα του σώματος τείνει να γίνεται περισσότερο υδροδυναμικό, με τις επιμέρους σωματικές αναλογίες να μεταβάλλονται με έντονο ειδο-ειδικό τρόπο (Davison and Herbert 2012, Grunbaum *et al.* 2007).

Ωστόσο οι παραπάνω αλλαγές αναφέρονται στην εφαρμογή ταχύτητας ρευμάτων εντός των φυσιολογικών ορίων των ειδών. Έντονες συνθήκες κολυμβητικής άσκησης μπορεί να προκαλέσουν και μη επιθυμητές αλλαγές στο σχήμα του σώματος των ιχθύων μέσω της ανάπτυξης παραμορφώσεων. Η περίπτωση αυτή θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω.

1.4.2 Επίδραση στα σκελετικά στοιχεία

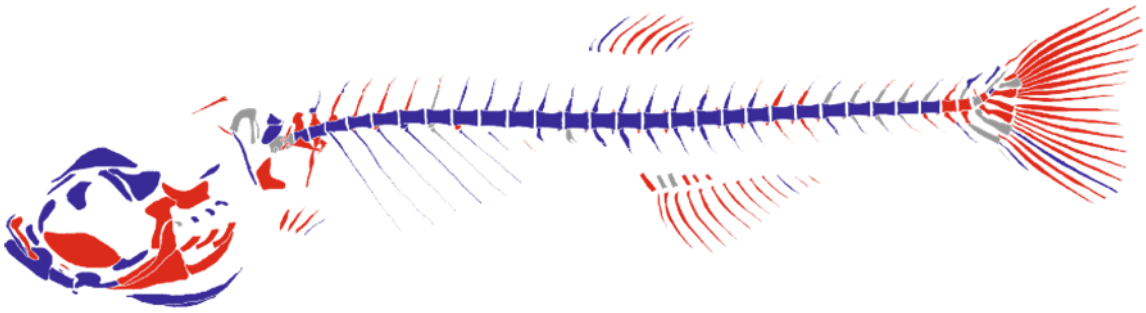
Η άσκηση θα μπορούσε να διακριθεί σε δύο επιμέρους κατηγορίες. Σε εκείνη που βρίσκεται εντός των φυσιολογικών ορίων των ατόμων και οδηγεί σε φυσιολογικές αποκρίσεις, και σε εκείνη που υπερβαίνει ορισμένα όρια (εντός του πλαισίου διαβίωσης, αλλά εκτός πιθανόν άλλων ορίων π.χ. ενεργειακών) και μπορεί να οδηγήσει σε αποκλίσεις από το φυσιολογικό ή και σε παθολογικές καταστάσεις.

Η έρευνα στο πεδίο της άσκησης και των επιδράσεών της στο καρδιαγγειακό, μυϊκό και σκελετικό σύστημα είναι ιδιαίτερα εκτενής, λόγω της ανάγκης ανάπτυξης φαρμάκων για τους αθλητές (Clausen 1977) και για την αντιμετώπιση παθήσεων (π.χ. άσθμα – Rosimini 2003). Στα θηλαστικά είναι δυνατή η μελέτη των αποκρίσεων ακόμη και μετά από άσκηση σύντομης διάρκειας (Holloszy and Booth 1976). Στα κατώτερα τετράποδα κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό, λόγω των δυσκολιών στην τήρηση ενός σταθερού, επαναλήψιμου και γρήγορου πρωτοκόλλου άσκησης (Janssen *et al.* 2011). Αντίθετα, τα ψάρια φαντάζουν ιδανικοί οργανισμοί για τη μελέτη των επιδράσεων της άσκησης. Η απουσία των επιδράσεων της βαρύτητας, με την παρουσία της νηκτικής κύστης, και η συγκέντρωση του μυϊκού συστήματος γύρω από την σπονδυλική στήλη συνθέτουν ένα κατάλληλο υπόστρωμα για τη μελέτη των μυοσκελετικών αποκρίσεων.
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η άσκηση καταναλώνει ενέργεια και επομένως εύκολα θα μπορούσε να υποτεθεί ότι ο ρυθμός αύξησης των ασκούμενων ψαριών μειώνεται (Palstra and Planas 2012). Στον αντίποδα όμως, ποικίλες εργασίες αποδεικνύουν το αντίθετο. Στα σαλμονοειδή, εδώ και αρκετά χρόνια, γνωρίζουμε ότι αυξημένοι ρυθμοί άσκησης έχουν ευεργετική επίδραση στον ρυθμό αύξησης (αύξηση ρυθμού κατά 38% στον σολομό του Ατλαντικού, Totland *et al.* 1987). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και στην τσιπούρα (*Sparus aurata*), αποδεικνύοντας ότι το φαινόμενο αυτό δεν αφορά αποκλειστικά είδη που στο φυσικό τους περιβάλλον υπόκεινται στη δράση ρευμάτων. Οι Palstra *et al.* 2010 απέδειξαν ότι η άσκηση μπορεί να έχει θετική επίδραση στο ρυθμό αύξησης σε ενήλικα zebrafish, μέσω της ρυθμιζόμενης έκφρασης γονιδίων δεικτών της αύξησης, ανοίγοντας τους ορίζοντες για περαιτέρω μελέτη στο είδος. Στο ίδιο είδος, μία πιο πρόσφατη εργασία προτείνει μία συντονισμένη απόκριση των γρήγορων μυών που οδηγεί σε αύξηση της μυϊκής μάζας, ως τον μηχανισμό πίσω από την τροποποίηση του ρυθμού αύξησης λόγω άσκησης (Palstra *et al.* 2014). Ωστόσο, το συμπέρασμα ότι ο ρυθμός σωματικής αύξησης σχετίζεται πάντα θετικά με την κολυμβητική άσκηση δεν μπορεί να γενικευθεί, χωρίς να συνυπολογίζεται η πολυποίκιλη φύση του ρυθμού αύξησης.

Τι συμβαίνει, όμως, με τις αποκρίσεις του σκελετού στην άσκηση; Προκειμένου να απαντήσουμε στο ερώτημα αυτό καλούμαστε να κάνουμε λόγο για τα αυξημένα

μηχανικά φορτία της μυϊκής δραστηριότητας επί των οστών που επάγονται από την κολυμβητική άσκηση. Οι μηχανικές δυνάμεις λόγω μυϊκών συσπάσεων γνωρίζουμε ότι επηρεάζουν την ανάπτυξη, αλλά και τη μορφή των στοιχείων του σκελετού. Στα θηλαστικά, τα φορτία λόγω άσκησης αυξάνουν τον σχηματισμό οστών και τη πυκνότητα των οργανικών ουσιών τους (Chilibeck *et al.* 1995). Στον άνθρωπο, οι Rodríguez *et al.* (1988) διαπίστωσαν ότι η εμβρυική ακινησία μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη πιο λεπτών οστών και με μικρότερο ποσοστό ανόργανων αλάτων. Στα τετράποδα με το ίδιο ερέθισμα επάγεται αύξηση των μυών μέσω ενός αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (Adams 1998). Ακόμα, στα ψάρια και ειδικότερα στον σολομό του Ατλαντικού έχει βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ αυξημένων μηχανικών φορτίων και του ρυθμού οστεοποίησης του αναπτυσσόμενου σκελετού (Grunbaum and Cloutier 2010).

Τα αυξημένα λόγω άσκησης μηχανικά φορτία μπορούν να επιδρούν στον σκελετό τόσο πριν και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του σκελετού (νυμφικό στάδιο), όσο και μετά την ολοκλήρωσή της (στάδιο ιχθυδίων). Όσον αφορά την πρώτη περίπτωση, γνωρίζουμε ότι από τα νεαρά νυμφικά στάδια είναι δυνατόν να εμφανιστούν ετεροτοπικές και ετεροχρονικές αλλαγές στην ανάπτυξη του σκελετού του zebrafish, ως απόκριση σε μηχανικές δυνάμεις λόγω άσκησης (Fiaz *et al.* 2010) (Εικόνα 1.5). Οι αλλαγές αυτές αφορούν κυρίως τμήματα του κρανιακού και ουραίου σκελετού που χαρακτηρίζονται ως πιο αναγκαία υπό τις δεδομένες συνθήκες. Μία ομάδα από το ίδιο εργαστήριο απέδειξε ακολούθως την επιτάχυνση της ανάπτυξης στοιχείων του ουραίου πτερυγίου λόγω άσκησης διάρκειας εννέα ωρών τη μέρα σε νύμφες zebrafish ηλικίας μόλις 5-14 dpf (Fiaz *et al.* 2012). Η επιτάχυνση της διαδικασίας της οστεοποίησης λόγω άσκησης έχει επιβεβαιωθεί και στον σολομό του Ατλαντικού (Grunbaum *et al.* 2012). Οι Witten και Huysseune (2009) προτείνουν ένα πιθανό μηχανισμό αποδοχής των μηχανικών ερεθισμάτων σε περίπτωση ακυτταρικών οστών, όπως στο zebrafish. Πιο συγκεκριμένα, όπως συμβαίνει με τα θηλαστικά, τα οστεοκύτταρα των τελεόστεων έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν εκτεταμένα δίκτυα κυττάρων (Huysseune 1999). Ωστόσο, στην περίπτωση των τελεόστεων με ακυτταρικές μορφές οστού, οι οστεοβλάστες και τα κύτταρα που επενδύουν τα οστά φαίνεται να συμμετέχουν στις ανάλογες διαδικασίες αποδοχής μηχανικών ερεθισμάτων σε αντίθεση με τα οστεοκύτταρα που επιτελούν τις ίδιες διαδικασίες στα κυτταρικά οστά.



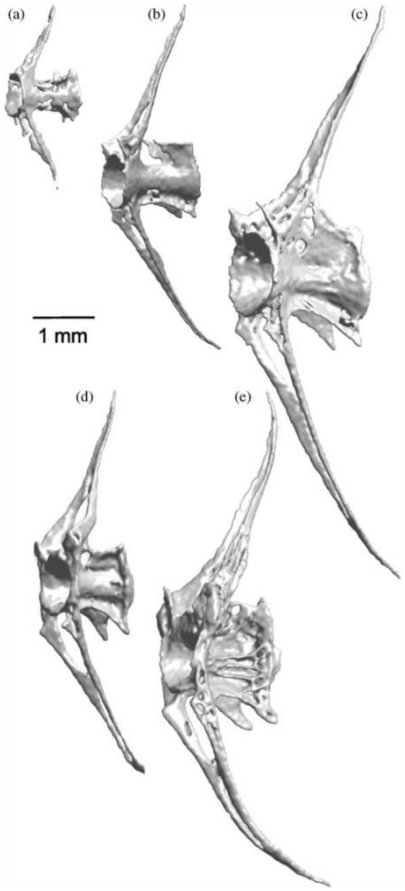
Εικόνα 1.5 Χρονική διαφοροποίηση της σκελετογένεσης σε νύμφη zebrafish. Με κόκκινο χρώμα είναι ορατά τα οστά εκείνα που ο σχηματισμός τους επιταχύνεται σε σχέση με τις νύμφες που δεν υποβλήθηκαν σε άσκηση. Με μπλε χρώμα αναπαρίστανται ανάλογα οι δομές που ο σχηματισμός τους επιβραδύνεται σε σχέση με τις νύμφες που δεν υποβλήθηκαν σε άσκηση. Από Palstra and Planas (2013).

Τι αλλάζει, όμως, μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του σκελετού όσον αφορά στην επίδραση της άσκησης; Η κυριότερη αλλαγή έγκειται στο ότι οι αποκρίσεις του

σκελετού μετά την ολοκλήρωση της οστεοποίησης πραγματοποιούνται μέσω διαδικασιών αναδιαμόρφωσης και μετασχηματισμού των ήδη αναπτυγμένων οστών. Στο πλαίσιο αυτό οι Suniaga *et al.* (2018) εφάρμοσαν σε ενήλικα zebrafish ένα πρωτόκολλο άσκησης τεσσάρων εβδομάδων με αποτέλεσμα αυξημένο όγκο ιστού και πιο επιμήκεις σπονδύλους στα ασκούμενα ψάρια. Σε επίπεδο ιστού, στα ασκούμενα άτομα παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των οστεοβλαστών (υπεύθυνα για σχηματισμό νέου οστού), καθώς και σχηματισμός νέου οστού στις περιοχές με αυξημένη καταπόνηση.

Οι σκελετικές παραμορφώσεις αποτελούν επίσης συχνές αποκρίσεις του σκελετού στην άσκηση. Οι Divanach *et al.* (1997) έδειξαν ότι λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) εκτρεφόμενα απουσία ρευμάτων δεν εμφάνισαν εξωτερικές δυσμορφίες (0%), ενώ μόλις το 7% εμφάνισαν λόρδωση στην αιματική περιοχή της σπονδυλικής στήλης, η οποία ωστόσο ήταν ορατή μόνο με τη χρήση ακτινογραφίας. Παρουσία ισχυρών ρευμάτων, τα ποσοστά αυξήθηκαν σε 47% και 20% αντίστοιχα. Παρόμοια, ιχθύδια τσιπούρας (*Sparus aurata*) ή λαβρακιού χωρίς λειτουργική νηκτική κύστη ανέπτυξαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό λόρδωσης (στην προαιματική περιοχή) από τους πληθυσμούς ελέγχου όταν εκτέθηκαν σε ισχυρό ρεύμα νερού (90% έναντι 20-30% ανάλογα με το είδος, Chatain 1994). Στο ιαπωνικό φαγκρί (*Pargus major*) μετά από αποκοπή τμήματος του ουραίου πτερυγίου παρουσιάστηκαν περιστατικά λόρδωσης σε συνθήκες αυξημένης κολυμβητικής δραστηριότητας (10 ημέρες σε ταχύτητα 2-4 $TL \cdot s^{-1}$), που αποδόθηκαν στις δυνάμεις που ασκούνται από τους μύες στους σπονδύλους λόγω αυξημένης δραστηριότητας του ουραίου μίσχου (Kihara *et al.* 2002). Επιπρόσθετα, μέσω μίας επιτυχούς σύγκρισης του σκελετού φυσιολογικών και λορδωτικών ατόμων, υπογραμμίζεται η διττή φύση της επίδρασης της άσκησης στην αρχιτεκτονική των οστών στο λαβράκι (Kranenbarg *et al.* 2005). Από τη μία παρατηρείται μία αδυναμία κάμψης των λορδωτικών σπονδύλων, που συνοδεύεται, όμως, από μία επιπρόσθετη εναπόθεση οστού λόγω συμπίεσης από αυξημένα μηχανικά φορτία (Εικόνα 1.6). Συγχρόνως, παρατηρείται μη φυσιολογική ασβεστοποίηση του σκελετού, καθώς ο αυξημένος χτύπος της ουράς λόγω άσκησης αυξάνει τη σχετική τάση και τη μυϊκή δραστηριότητα στα λορδωτικά άτομα.

Η αποσαφήνιση των επιδράσεων της κολυμβητικής άσκησης στον σκελετό παραμένει σήμερα ελλιπής, τόσο αναφορικά με κρίσιμα όρια της έντασης της κολυμβητικής ταχύτητας, όσο και με την εκάστοτε επίδρασή της στα σκελετικά στοιχεία.



Εικόνα 1.6 Μορφολογική αναπαράσταση φυσιολογικών(a-c) και λορδωτικών (d-e) σπονδύλων στο λαβράκι. Από Kranenbarg et al. 2005.

1.5 Πρόκληση παραμορφώσεων στο εργαστήριο

Στον τομέα της έρευνας των αλλαγών των σκελετικών στοιχείων, αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει για την ανάπτυξη ενός γρήγορου, απλού και με σεβασμό προς τα πειραματόζωα μοντέλου για πρόκληση παραμορφώσεων in vivo, που να ανήκει στα σπονδυλωτά. Στο σύνολό τους οι σκελετικές παραμορφώσεις εμφανίζονται με ποικίλους φαινότυπους και σε διάφορες εντάσεις. Επομένως, υπάρχουν πολλές προκλήσεις στην προσπάθεια αποσαφήνισης των μηχανισμών που προκαλούν την εκάστοτε περίπτωση και μεσολαβούν σε αυτήν, κυρίως υπό την ευρύτερη πιθανότητα εύρεσης κατάλληλων μεθόδων πρόληψης ή εξομάλυνσης της έντασης των παραμορφωμένων ατόμων.

Επιτυχημένα πειράματα σε κοτόπουλα άνοιξαν τον δρόμο για την εισαγωγή παραμορφώσεων της σπονδυλικής στήλης μέσω χειρουργικής αφαίρεσης της υπόφυσης (Machida *et al.* 1993). Η υπόφυση έχει σημαντικό ρόλο στην αύξηση και ομαλή ανάπτυξη των οστών μέσω της έκκρισης μελατονίνης. Ωστόσο, πέρα από τη μη ανώδυνη φύση της διαδικασίας, τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν αρκετά υψηλά στον σολομό του Ατλαντικού (Fjelldal *et al*. 2004). Επιπρόσθετα, η ερευνητική ομάδα παρατήρησε προβληματικούς συνδέσμους μεταξύ των σπονδύλων των ιχθύων μετά από το διάστημα έξι μηνών από την εκτομή. Πειράματα με σκοπό την εισαγωγή παραμορφώσεων στη σπονδυλική στήλη σε κουνέλια περιλαμβάνουν τη χρήση θώρακα

ή χειρουργικές επεμβάσεις στις ανάλογες περιοχές (Hakkarainen 1981). Στο μεγαλύτερο μέρος τους, οι μέθοδοι που περιγράφονται παραπάνω είχαν σαν αποτέλεσμα την εισαγωγή σκολίωσης (Janssen *et al.* 2011, Bobyn *et al.* 2014). Μάλιστα ,στο ίδιο πλαίσιο, άτομα του ψαριού guppy (*Poecilia reticulata*) έχουν παρατηρηθεί να φέρουν παρόμοιες με ανθρώπινες σφηνώσεις στη σπονδυλική στήλη, που σχετίζονται με μία μορφή σκολίωσης (Gorman and Breden *et al.* 2009) ανοίγοντας τον δρόμο για τη μελλοντική χρήση των ιχθύων ως μοντέλα για τη μελέτη των παραμορφώσεων.

Η υπόθεση ότι τα ψάρια υπόκεινται στη δράση φορτίων της σπονδυλικής στήλης παρόμοια με εκείνα στον άνθρωπο λόγω έντονης κολυμβητικής άσκησης έχει συζητηθεί εκτενώς. Μία πιο πρόσφατη προσέγγιση αφορά την εισαγωγή λόρδωσης σε ενήλικα άτομα ιαπωνικού φαγκριού μετά την αφαίρεση του ουραίου πτερυγίου και την έκθεση σε συνθήκες υψηλής κολυμβητικής άσκησης που έχει αναφερθεί και νωρίτερα (Kihara *et al.* 2002). Ωστόσο, το σύνολο των μεθόδων που γνωρίζουμε έως σήμερα για την εισαγωγή παραμορφώσεων στους ιχθύες αποτυγχάνει να εισάγει με ευκολία, ταχύτητα, επαναληψιμότητα ή χαμηλή θνησιμότητα μία ή περισσότερες σκελετικές παραμορφώσεις στα υπό εξέταση άτομα. Η απουσία μίας τέτοιας μεθόδου κρίνεται κρίσιμη για τη μελλοντική έρευνα γύρω από τις σκελετικές παραμορφώσεις.

1.6 Το υπό μελέτη είδος

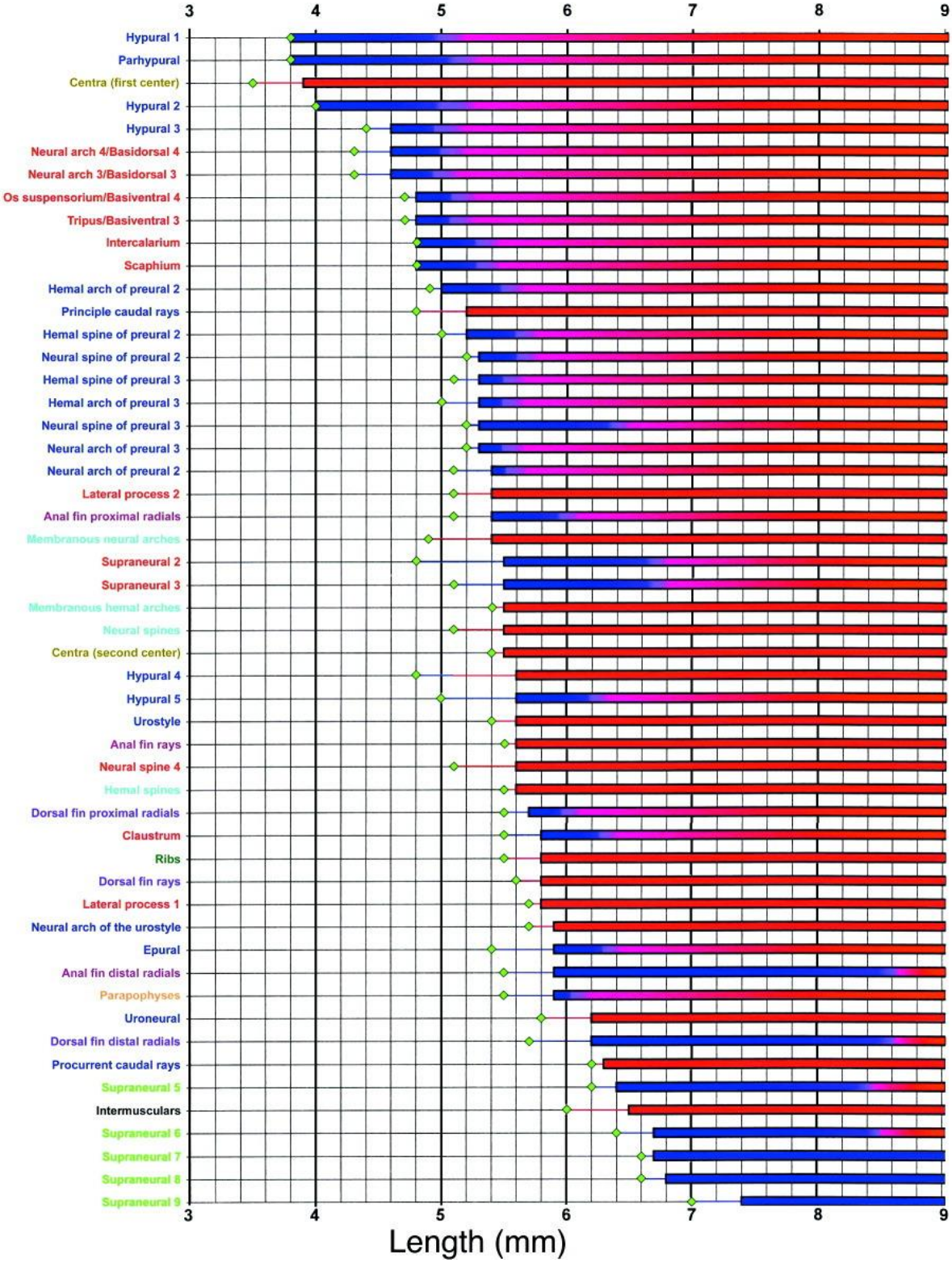
Το zebrafish (*Danio rerio*) είναι ένα είδος του γλυκού νερού που συναντάται σε τροπικές περιοχές της Ασίας, με υψηλές πληθυσμιακές συγκεντρώσεις στη ΒΔ Ινδία, στο Μπαγκλαντές και στη Μιανμάρ. Ανήκει στα κυπρινοειδή, μία από τις πιο πλούσιες σε είδη ομάδες σπονδυλωτών (Nelson *et al.* 1994). Όσον αφορά τα οικολογικά πλαίσια διαβίωσής του, πρόκειται για ένα ευρύθερμο είδος, με τις ταχύτητες ρευμάτων στο γύρω περιβάλλον να είναι από στατικές έως ρευμάτων σε ποτάμια (Daniels 2002). Τα άτομα του είδους μπορούν να ζήσουν σε όλη τη στήλη του νερού, αν και συνήθως στα ενδιαιτήματα που προτιμούν η στάθμη του νερού δεν ξεπερνά τα 30 εκατοστά. Είναι παμφάγοι οργανισμοί και στη φύση συναντιούνται συνήθως σε μικρά κοπάδια (Spence *et al.* 2007). Είναι ωοτόκο είδος και η φωτοπερίοδος καθορίζει την αναπαραγωγή. Τόσο στο εργαστήριο (Selman *et al.* 1993) όσο και στη φύση (Spence *et al.* 2006) το zebrafish ωοτοκεί τις πρώτες ώρες του πρωινού. Τα αυγά του είδους είναι βενθικά και ανάλογα με τις συνθήκες (θερμοκρασία, χημεία νερού) εκκολάπτονται σε 4-7 ημέρες σε ελεύθερες νύμφες που έχουν ικανότητα κολύμβησης (Lawrence 2007).

Το zebrafish έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τομείς της έρευνας, κυρίως λόγω του ευνοϊκού συνδυασμού χαρακτηριστικών του. Ο εύκολος γενετικός χειρισμός και η φύση της εμβρυολογίας και ανάπτυξής του το καθιστούν ιδανικό από πολλές απόψεις (Nusslein-Volhard and Dahm 2002 –book). Στο πλαίσιο, όμως, του αντικειμένου της παρούσας εργασίας, αξίζει να σημειωθεί ότι το είδος αυτό επιτρέπει τη ζωντανή απεικόνιση ακόμη και σε κυτταρικό επίπεδο σε σύνθετες διαδικασίες, όπως ο σχηματισμός της σπονδυλικής στήλης και του νωτιαίου μυελού (Jun Du *et al.* 2001). Αναφορικά με την οντογένεση του είδους, γνωρίζουμε ότι περίπου στις 72 hpf (σε θερμοκρασία 28°C) ολοκληρώνεται το εμβρυϊκό στάδιο με την εκκόλαψη των αυγών (Kimmel *et al.* 1995). Ακολουθεί το νυμφικό στάδιο, το οποίο ξεκινά με την κάμψη της νωτοχορδης από 4,6 έως 6,3 mm SL (Parichy *et al.* 2009). Ακόμα γνωρίζουμε ότι στις 7 dpf έχουμε τις πρώτες ενδείξεις εμφάνισης του αξονικού σκελετού. Στις 16 dpf (περίπου 6,2 mm TL) μπορούν να διακριθούν τα οστά της ουράς και οι αποφύσεις, ενώ

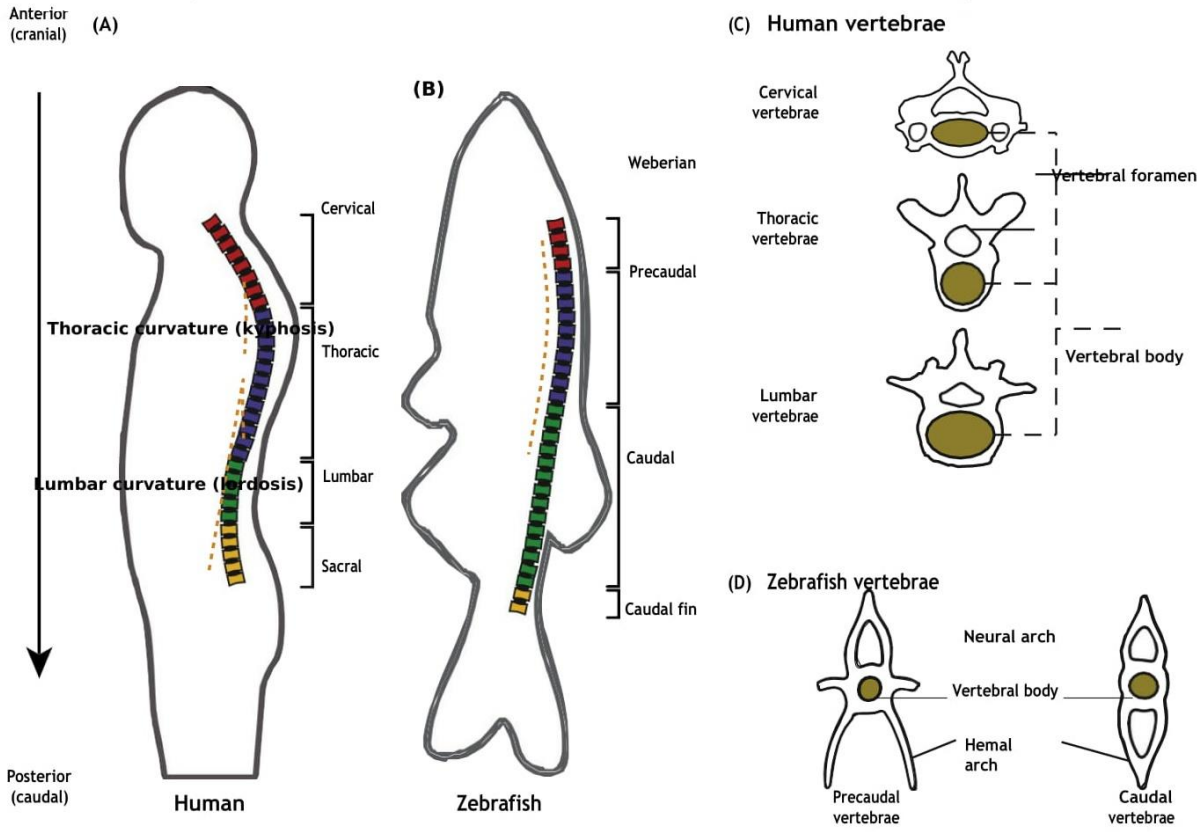
περίπου στα 10 mm TL είναι ορατοί χόνδροι και οστά (Jun Du *et al*. 2001, Parichy *et al*. 2009). Ωστόσο, δεν θα μπορούσε να παραλειφθεί το στάδιο της μεταμόρφωσης, το οποίο λαμβάνει χώρα μεταξύ νυμφικού σταδίου και σταδίου του ιχθυδίου. Ακολουθεί το στάδιο του ιχθυδίου, από τα 11mm SL περίπου, όπου ολοκληρώνεται η μεταμόρφωση και πρόκειται να ξεκινήσει η διαφοροποίηση των γονάδων (Hsiao and Tsai 2003). Η μετάβαση από το ιχθύδιο στο ενήλικο άτομο δεν έχει κάποιο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό, αλλά, καθώς τα άτομα μεταβαίνουν από το ένα στο άλλο έχουν ολοκληρώσει τις διαδικασίες οστεοποίησης, χρωματισμού και σχηματισμού λεπιών. Καθορίζεται ίσως από την παραγωγή γαμετών και των δευτερογενών φυλετικών χαρακτηριστικών (στρογγυλή κοιλιά στα θηλυκά, διαφορές στο χρωματισμό του σώματος) τα οποία αρχίζουν και γίνονται ορατά στα 17,5 ± 0,6 mm SL για τα αρσενικά και στα 18,3 ± 0,7 mm SL για τα θηλυκά άτομα (Parichy *et al.* 2009). Υπάρχουν πολλές απόψεις σχετικά με τον συνολικό αριθμό των σπονδύλων στο είδος μεταξύ 29-34 και έχει δειχθεί ότι ο αριθμός αυτός εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία (Sfakianakis *et al*. 2011).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο βαθμός ομοιότητας της μορφολογίας και της δομής της σπονδυλικής στήλης μεταξύ ανθρώπου και zebrafish (Εικόνα 1.7). Μάλιστα, αρκετές εργασίες προτείνουν το συγκεκριμένο είδος σαν οργανισμό μοντέλο για τη μελέτη αλλαγών στη δομή των οστών που σχετίζονται με την ηλικία (Chang *et al.* 2018). Αυτό είναι εφικτό στη βάση ότι οι σπόνδυλοι βασικών τετράποδων ομοιάζουν με αυτούς των προγόνων τους που ζούσαν στο νερό (Liem 2001). Και στους δύο οργανισμούς η νωτοχορδή σχηματίζει το αρχικό σχήμα των σπονδύλων και μάλιστα εμφανίζουν μία φυσική πρόσθια κύφωση (Boswell and Ciruna 2017). Κατά μήκος της γραμμής εξέλιξης των ειδών, οι σπόνδυλοι γίνονται πιο ανθεκτικοί και σκληροί με την επιμήκυνση των επιμέρους αυτών στοιχείων τους.

Με τη χρώση καλσεΐνης γνωρίζουμε σήμερα ότι στο zebrafish ακολουθείται ένα οπισθοπρόσθιο πρότυπο οστεοποίησης των σπονδύλων (Parichy *et al.* 2009). Παρόμοιο πρότυπο ακολουθεί και η οστεοποίηση των πλευρικών αποφύσεων με μία χρονική καθυστέρηση (Εικόνα 1.7). Οι πρώτοι σκελετικοί χαρακτήρες της σπονδυλικής στήλης εντοπίζονται στα 4mm NL(Notochord Length) και αφορούν την εμφάνιση του πρώτου οστεοποιημένου κέντρου σπονδύλου (Bird *et al.* 2003). Η πρώτη εικόνα του συνόλου της σπονδυλικής στήλης δύναται να αποκτηθεί μόλις στις 21 dpf κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Jun Du *et al.* 2001). Χρησιμοποιώντας μία πιο ακριβή μέθοδο προσδιορισμού, θα μπορούσαμε να πούμε ότι νύμφες zebrafish που αγγίζουν τα 8.5-9mm SL εμφανίζουν ένα σχεδόν πλήρως οστεοποιημένο σκελετό, συμπεριλαμβανομένου της σκελετικής περιοχής που θα αποτελέσει αντικείμενο της παρούσας εργασίας (Parichy *et al*. 2009, Bird and Mabee 2003).



Εικόνα 1.7 Απεικόνιση της σειράς ανάπτυξης και οστεοποίησης των βασικότερων στοιχείων του αξονικού σκελετού στο zebrafish. Με μπλε χρώμα σημειώνονται οι χόνδρινες δομές και με κόκκινο οι οστέινες. Από Bird and Mabee 2003.



Εικόνα 1.8 Αναπαράσταση της σπονδυλικής στήλης και των σπονδύλων στον άνθρωπο (A,C) και στο zebrafish (B,D) αντίστοιχα. Από Boswell and Ciruna 2017.

1.7 Στόχοι της παρούσας διατριβής

Η άσκηση και τα πλεονεκτήματα που αποφέρει έχουν απασχολήσει πολύ την επιστημονική κοινότητα και έχουν μελετηθεί σε διάφορους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (Schindel *et al*. 2015). Οι Jain and Vokes (2019) παρατήρησαν ότι αυξημένα επίπεδα άσκησης σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα πυροδοτούν υψηλότερη οστική πυκνότητα. Συγχρόνως, οι σκελετικές παραμορφώσεις αποτελούν σήμερα πολυσυζητημένο αντικείμενο, όντας σημαντική συνιστώσα της υποβάθμισης της ποιότητας των παραγόμενων ιχθύων (Boglione *et al.* 2001, Koumoundouros *et al.* 2001). Από την πλευρά της βιολογίας των οστών, οι παραμορφώσεις χαρακτηρίζονται ως παθήσεις στις οποίες έως σήμερα δεν εφαρμόζεται κάποια ακριβής και ασφαλής μέθοδος πρόληψης. Κι αυτό συμβαίνει, διότι η εισαγωγή παραμορφώσεων στο εργαστήριο δεν έχει τελειοποιηθεί, ώστε να μπορούν να μελετηθούν οι παραμορφώσεις στη χρονική στιγμή της γένεσής τους και να αποκρυπτογραφηθούν οι αλλαγές των σκελετικών στοιχείων πίσω από αυτές.

Σε μία προσπάθεια συνδυασμού των παραπάνω γνώσεων, αυξημένος ρυθμός περιπτώσεων ασυμμετρίας του κορμού και υπερκύφωσης στον άνθρωπο συνδέθηκαν με την κολυμβητική δραστηριότητα (Zaina *et al.* 2015). Σε ένα ανάλογο πλαίσιο, στους ιχθύες, μόνο οι Kihara *et al*. (2002) προσπάθησαν να σχεδιάσουν ένα πειραματικό

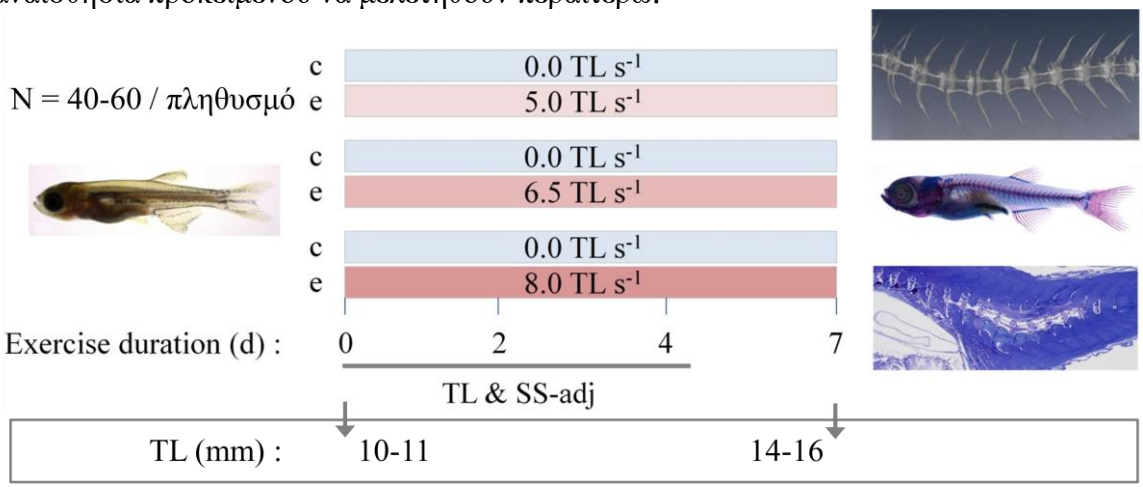
πρωτόκολλο εισάγοντας επιτυχώς λόρδωση σε άτομα *P. major* υπό την συνεπίδραση της αφαίρεσης της ουράς και την έντονης κολυμβητικής δραστηριότητας.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι να μελετήσει τις αποκρίσεις στην εξωτερική μορφολογία και τη σκελετική διάπλαση ενός οργανισμού μοντέλου, όπως το zebrafish, έναντι της αυξημένης κολυμβητικής άσκησης. Χρησιμοποιώντας διαφορετικές εντάσεις άσκησης, η εργασία επιπρόσθετα στοχεύει στον προσδιορισμό των κρίσιμων εκείνων επιπέδων, πέρα των οποίων η άσκηση ενδεχομένως προκαλεί μη φυσιολογικές αποκρίσεις των οστών, και συγκεκριμένα λόρδωση της αιματικής περιοχής της σπονδυλικής στήλης.

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βασικός πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός στηρίχθηκε σε ένα πρωτόκολλο άσκησης, σύμφωνα με αυτό το οποίο, νύμφες στο στάδιο της μεταμόρφωσης με ολικό μήκος (TL) 10-11 mm TL υποβλήθηκαν σε συνεχόμενη άσκηση τριών διαφορετικών ταχυτήτων, 5,0, 6,5 ή 8,0 TL·s^{-1} (Εικόνα 2.1). Η άσκηση είχε διάρκεια επτά ημέρες, κατά τις οποίες η ταχύτητα προσαρμοζόταν στο αυξανόμενο μήκος των ιχθυδίων. Παράλληλα με την κάθε πειραματική δοκιμή διατηρούνταν και μία ομάδα ελέγχου (control) σε μηδενική ταχύτητα άσκησης (Εικόνα 2.1). Πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικές επαναλήψεις στις διαφορετικές εντάσεις ταχύτητας, με τη χρήση ατόμων από δύο διαφορετικές εκτροφές. Μετά τη λήξη της περιόδου κολύμβησης, τα ιχθύδια θυσιάστηκαν με αναισθησία προκειμένου να μελετηθούν περαιτέρω.



Εικόνα 2.1 Αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού. Μεταμορφούμενες νύμφες υποβλήθηκαν σε συνεχόμενη άσκηση για μία περίοδο επτά ημερών. Δίνονται οι διαφορετικές ταχύτητες που εφαρμόστηκαν, 5,0, 6,5 ή 8,0 TL·s^{-1}, καθώς και οι ανάλογες της αύξησης του μεγέθους (TL) προσαρμογές σε αυτές που πραγματοποιήθηκαν (TL & SS-adj). Με το πέρας της εβδομάδας πραγματοποιήθηκε οστεολογική εξέταση των ατόμων, ασκούμενων (e-exercised) και μη (c-control), με ιστολογικές τεχνικές και αξονική μικροτομογραφία. Το πρωτόκολλο αυτό ακολουθήθηκε για δύο πειραματικές επαναλήψεις.

2.2 Σύσταση και διατήρηση πειραματικών πληθυσμών

Το σύνολο των αυγών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πειραματική επανάληψη, προερχόταν από απόθεμα που συστάθηκε από έναν κοινό πληθυσμό γεννητόρων άγριου τύπου (ZF WT2 F13, Wageningen Agricultural University, The Netherlands). Η διατήρηση και η εκτροφή των γεννητόρων πραγματοποιήθηκε βάσει της μεθοδολογίας που περιγράφεται στο «The Zebrafish Book» (Westerfield 1995). Οι άγριου τύπου γεννήτορες διατηρούνταν σε ενυδρεία χωρητικότητας 100L με πυκνότητα 3 άτομα/L με αναλογία φύλου 1:1. Τα ενυδρεία ήταν εξοπλισμένα με κλειστό κύκλωμα επεξεργασίας του νερού. Η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 28±1 °C, η φωτοπερίοδος στις 14 : 10 h L:D, το pH είναι ίσο με 7.0-7.2, η συγκέντρωση αμμωνιακών και νιτρωδών ιόντων διατηρούταν σε επίπεδα μικρότερα του 0,1 mg/L και ο κορεσμός του οξυγόνου στο νερό ήταν 80-100%. Στα ενυδρεία, η ανανέωση του νερού ήταν 100% ανά ώρα,

ενώ το σύνολο του κλειστού συστήματος υποβαλλόταν σε 20% ανανέωση του νερού κάθε 3 ημέρες. Το νερό των ενυδρείων προερχόταν από το νερό του αστικού δικτύου ύδρευσης, αφού περνούσε από επεξεργασία με σύστημα ανάστροφης όσμωσης. Οι γεννήτορες ταΐζονταν με ξηρή βιομηχανική τροφή (Zebrafeed 400-600) με εξαίρεση τη μέρα πριν την ωοτοκία όπου χορηγούνταν επιπρόσθετα ναύπλιοι *Artemia sp.* (Salt Creek, Select Brine Shrimp Eggs, Nitro Pak). Για τη λήψη αυγών τοποθετούνταν ειδικές κατασκευές που προσομοιώνουν το περιβάλλον ωοτοκίας (ωοσυλλέκτες) αργά το απόγευμα. Η ωοτοκία γινόταν αυθόρμητα χωρίς χρήση ορμονών τις πρώτες πρωινές ώρες με φως. Τα ενυδρεία καθαρίζονταν καθημερινά (σιφωνισμός) από περιττώματα και υπολείμματα τροφής.

Ακολουθούσε η εξαγωγή των ωοσυλλεκτών από τα ενυδρεία και η συλλογή των αυγών, περίπου 6 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Η επιλογή της ώρας σχετίζεται με την πιο αποτελεσματική συλλογή γονιμοποιημένων αυγών, καθώς τα περισσότερα βρίσκονταν πλέον μετά το στάδιο του 50% της επιβολής. Μετά τη συλλογή τα έμβρυα μεταφέρονταν σε νέο ενυδρείο στους 28°C για εγκλιματισμό διάρκειας 15 λεπτών και στη συνέχεια τοποθετούνταν στις υπό έλεγχο συνθήκες στο εσωτερικό επωαστήρα όγκου (4,5L) στο ίδιο ενυδρείο. Οι επιλεγμένες συνθήκες θερμοκρασίας (28°C), οξυγόνου (80-95%) και αγωγιμότητας (450-550 μS cm^{-1}) ανήκουν στο εύρος στο οποίο διαβιεί το υπό μελέτη είδος (Tsang 2017). Οι νύμφες αρχικά ταΐζονταν με ζωντανή τροφή *Artemia sp.*, ενώ ακολούθως μεταβιβάστηκαν σταδιακά σε αλεσμένη βιομηχανική τροφή με διάμετρο κόκκων ανάλογη του μεγέθους τους (Zebrafeed). Τα ταΐσματα ανέρχονταν σε πέντε ημερησίως από την εκκόλαψη έως και το τέλος του πειράματος. Οι συνθήκες αυτές ελέγχονταν καθημερινά και σε αυτές διατηρούνταν τα ψάρια μέχρι να μεταβούν στη συσκευή κολύμβησης. Ακόμη καθημερινός ήταν και ο καθαρισμός των ενυδρείων από περιττώματα και υπολείμματα τροφής.

2.3 Λήψη και προετοιμασία δειγμάτων

Η δειγματοληψία των υπό μεταμόρφωση νυμφών έλαβε χώρα στα 10-11 mm TL (20-25 dpf - days post fertilization). Η επιλογή ατόμων του συγκεκριμένου εύρους μηκών βασίζεται στην ολοκλήρωση του σχηματισμού των σπονδύλων και του αριθμού των ακτίνων των πτερυγίων στο μέγεθος αυτό (Parichy *et al.* 2009). Κατά τη διάρκεια συλλογής των επιθυμητών ατόμων, τα άτομα αναισθητοποιούνταν με φαινοξυ-αιθανόλη (2-phenoxyethanol, C= 0,2-0,4 ml/L), ελέγχονταν μακροσκοπικά για την απουσία παραμορφώσεων στο σώμα και εν συνεχεία φωτογραφίζονταν με ψηφιακή μηχανή, προσαρτημένη σε στερεοσκόπιο (Olympus SZ61). Ακολούθως, τα άτομα μοιράζονταν τυχαία σε δύο ίσες ομάδες για να αποτελέσουν την ομάδα ελέγχου και την ομάδα άσκησης σε κάθε ταχύτητα και πειραματική επανάληψη (Πίνακας 1). Οι μετρήσεις του μήκους (TL) (Εικόνα 2.2) έγιναν με τη χρήση του προγράμματος Infinity Analyze (version 6.5.4., Lumenera corporation). Με το πρόγραμμα αυτό είναι δυνατή η μέτρηση των ατόμων μέσω ψηφιακών φωτογραφιών ορίζοντας δύο σημεία για την αρχή και το τέλος της μέτρησης σε κάθε φωτογραφία. Το σύνολο των ιχθυδίων, καθώς και το μέσο μήκος εκείνων που επιλέχθηκαν για τη σύσταση των πειραματικών ομάδων δίνεται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Μέγεθος των πειραματικών πληθυσμών (N) και μέσο μήκος (TL mean) των ιχθυδίων στις τρεις ταχύτητες άσκησης (5,0, 6,5, 8,0 TL·s^{-1}) που εφαρμόστηκαν και στις δύο πειραματικές επαναλήψεις (1, 2), κατά την επιλογή τους (πριν την εισαγωγή τους στη συσκευή κολύμβησης).

Trial	Regime	Replicate	TL (mm) ± SD
5	c	1	9,4 ± 0,5
	e		
	c	2	10,4 ± 0,5
	e		
6,5	c	1	10,4 ± 0,3
	e		
	c	2	10,4 ± 0,4
	e		
8	c	1	10,5 ± 0,3
	e		
	c	2	10,5 ± 0,3
	e		

Εικόνα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση των σημείων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του μήκους (Total Length) των νυμφών και ιχθυδίων.

2.4 Κολυμβητική άσκηση

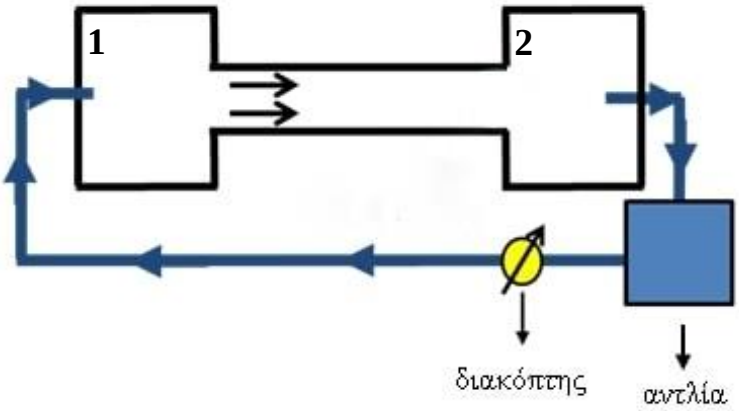
Οι δύο ομάδες κάθε πειραματικής δοκιμής μεταφέρονταν σε ένα επόμενο βήμα στη συσκευή κολύμβησης για τη διεξαγωγή των πειραμάτων άσκησης (Εικόνα 2.3). Τα ψάρια τοποθετούνταν στο κανάλι (exercised-ομάδα άσκησης) ή στη μία δεξαμενή εκτός τους καναλιού (control-ομάδα ελέγχου), όπου οι συνθήκες ήταν όμοιες και δεν παρέκκλιναν από τις συνθήκες εκτροφής. Η θερμοκρασία (28°C), το οξυγόνο (80-95%)

και η αγωγιμότητα (450-550) ήταν ρυθμισμένα και ελέγχονταν καθημερινά. Στη συσκευή αυτή, το νερό μεταφέρονταν από τη μία δεξαμενή στην άλλη μέσω του καναλιού κολύμβησης, με τη χρήση αντλιών (EHEIM, μοντέλο 2217) ελεγχόμενης ροής (Εικόνα 2.3). Η θερμοκρασία ρυθμιζόταν με τη βοήθεια αντιστάσεων (FLUVAL tronic, 300W) και με ψυκτικό μηχάνημα (SFILIGOI, 200W). Πλαστικά καλαμάκια μεγάλης διατομής ήταν τοποθετημένα και στις δύο άκρες του καναλιού συμβάλλοντας στη διαμόρφωση ελασματικής ροής μέσα στο κανάλι και στην αποτροπή της διαφυγής των ψαριών από αυτό.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, τα ψάρια αρχικά τοποθετούνταν μέσα στο κανάλι κολύμβησης για συνεχόμενη κολύμβηση επτά ημερών, με ένταση κολυμβητικής άσκησης ίση με 5,0, 6,5 ή 8,0 $TL \cdot s^{-1}$. Οι εντάσεις αυτές βρίσκονται εντός των ανεκτών ορίων του είδους το οποίο τείνει να εποικίζει γλυκά νερά ποταμών και ρεμάτων με ρεύματα υπό φυσιολογικές συνθήκες (Spence *et al.* 2008). Με βάση την υπάρχουσα σχετική βιβλιογραφία, τα υπό έλεγχο επίπεδα αντιστοιχούν σε λιγότερο από το 50% της Ucrit του είδους, το οποίο δύναται να αγγίξει έως και 18 $SL \cdot s^{-1}$ υπό φυσιολογικές συνθήκες (Plaut 2001, Palstra *et al.* 2010, Scott and Johnston 2012, Dimitriadi *et al.* 2018). Μάλιστα το είδος χαρακτηρίζεται από υψηλή Uopt (ταχύτητα στο ελάχιστο κόστος μεταφοράς), της τάξεως των 13 $SL \cdot s^{-1}$ (72% of Ucrit, Palstra *et al.* 2010).Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων το βάθος του νερού στο κανάλι διατηρούνταν στα 5 cm. Ο υπολογισμός της ταχύτητας του ρεύματος που αναλογεί να εφαρμοστεί στην εκάστοτε πειραματική δοκιμή στηριζόταν στη διατομή του καναλιού και υπολογιζόταν με βάση το μέσο μήκος των ατόμων, καθώς και τον όγκο του νερού που διερχόταν από τις αντλίες. Μάλιστα, η ταχύτητα αυτή επιδέχονταν προσαρμογές κατά την $2^{η}$ και $4^{η}$ ημέρα άσκησης λόγω σημαντικής διαφοροποίησης του μέσου μήκους μεταξύ των χρονικών αυτών πλαισίων. Για να καταστούν εφικτές οι προσαρμογές αυτές, τις συγκεκριμένες ημέρες ακολουθήθηκε μία διαδικασία αναισθητοποίησης και φωτογράφισης των ιχθυδίων όπως περιγράφηκε στην αρχή του πειράματος. Αμέσως μετά την ανάνηψη από την αναισθησία τα ψάρια οδηγούνταν στις προϋπάρχουσες συνθήκες άσκησης.

Αναφορικά με το πρόγραμμα διατροφής, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε νωρίτερα, σταματώντας τη ροή για 15 λεπτά προκειμένου να τραφούν επαρκώς. Όσον αφορά τα άτομα που βρίσκονταν στο εσωτερικό της συσκευής κολύμβησης, αλλά σε επωαστήρα (4,5L) κι όχι στο κανάλι κολύμβησης, η θερμοκρασία (28°C), το οξυγόνο (80-95%) και η αγωγιμότητα (450-550 $\mu S\ cm^{-1}$) ήταν ρυθμισμένα και ελέγχονταν καθημερινά με τον ίδιο τρόπο. Συγχρόνως το τάισμα πραγματοποιούταν με τον ίδιο τρόπο όπως και στο κανάλι.

Στο τέλος κάθε πειραματικής δοκιμής, το σύνολο των ατόμων απομακρύνονταν από τη συσκευή και υποβάλλονταν σε ευθανασία με υπερβολική δόση αναισθητικού φαινοξυ-αιθανόλης (2-phenoxyethanol).



Εικόνα 2.3 Κάτοψη της συσκευής κολύμβησης. Το νερό διέρχεται από τη μία δεξαμενή (1) στην άλλη (2) διαμέσω του καναλιού. Η ταχύτητα ρυθμίζεται με τη βοήθεια αντλιών και διακοπτών ροής. Μορφοποιημένη εικόνα από Δημητριάδη (2018).

2.5 Εκτίμηση επίδρασης άσκησης στον ρυθμό αύξησης

Ο ρυθμός αύξησης ασκούμενων και μη ατόμων εκτιμήθηκε από το σύνολο των μετρήσεων του ολικού μήκους (TL) που αποκτήθηκαν από τις ψηφιακές φωτογραφίες των ατόμων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων κολύμβησης, . Οι μετρήσεις αυτές προέρχονταν από τέσσερις δειγματοληψίες, στην αρχή και στο τέλος της πειραματικής εβδομάδας, καθώς και στη δεύτερη και τέταρτη ημέρα άσκησης. Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν στο εκθετικό μοντέλο αύξησης $TL= a \cdot e^{SGR \cdot t}$ (Ricker 1979), όπου TL το μέσο ολικό μήκος (mm) κάθε δείγματος, a το μέγεθος των ατόμων σε χρόνο $t_0=0$, SGR ο ειδικός ρυθμός αύξησης του TL (ημέρες^{-1}), και t ο χρόνος (ημέρες). Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί το γραμμικό μοντέλο αύξησης ($\ln TL=SGR \cdot t + \ln a$) πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των δεδομένων TL σε λογαριθμική μορφή. Η ανάλυση συνδιασποράς ANCOVA (Stagraphics Plus v.5) επέτρεψε τον στατιστικό έλεγχο της επίδρασης της άσκησης στο ρυθμό αύξησης των ατόμων. Η λήψη των στοιχείων για τις μεμονωμένες γραμμικές σχέσεις αύξησης έγινε με ανάλυση απλής παλινδρόμησης για κάθε ευθεία (STATISTICA, version 7).

2.6 Ποσοτικοποίηση και περιγραφή της λόρδωσης

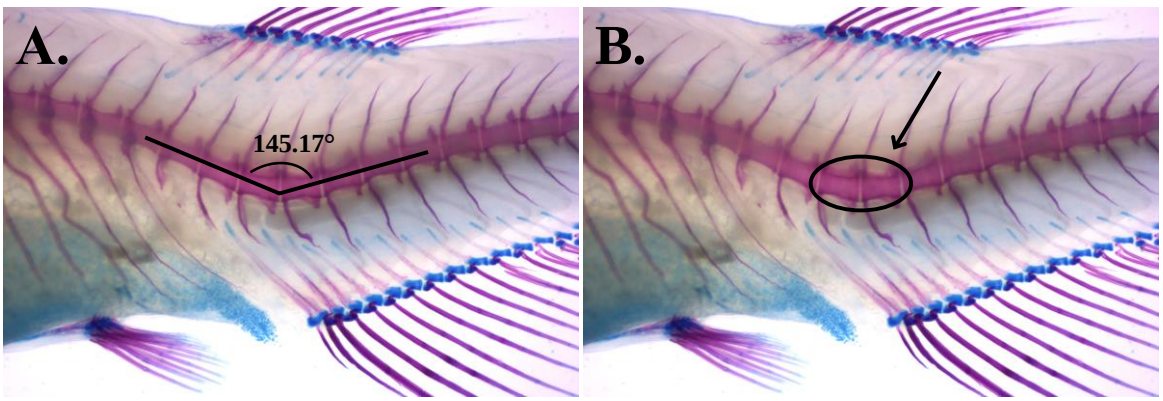
Οι ψηφιακές φωτογραφίες που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών εβδομάδων αποτέλεσαν το πρωτογενές υλικό για μία πρώτης μορφής διαλογή των ατόμων βάση του φαινότυπου. Η διάκριση των λορδωτικών ατόμων στηρίχθηκε σε χαρακτήρες όπως η χαρακτηριστική κάμψη σχήματος V της σπονδυλικής στήλης, η οποία ;ήταν ορατή στο μέγεθος των ατόμων που είχαμε επιλέξει. Ακολούθως η ανοδική κάμψη του ουραίου μίσχου σε σύγκριση με τη φυσιολογική κατεύθυνσή του αποτέλεσε επιπλέον κριτήριο διάκρισης (Sfakianakis *et al*. 2006, Fragkoulis *et al.* 2019).

Με το τέλος της κολυμβητικής εβδομάδας το σύνολο των ατόμων τοποθετούνταν σε διάλυμα φορμόλης 5% με PBS για δύο ημέρες. Με εξαίρεση έναν αριθμό δειγμάτων που απομονώθηκαν για αξονική μικροτομογραφία (8 άτομα από τη δεύτερη πειραματική επανάληψη στη ταχύτητα των $8TL \cdot s^{-1}$, ισόποσα ληφθέντα από ασκούμενα και μη) και ιστολογική επεξεργασία για μικροσκοπική παρατήρηση, το σύνολο των δειγμάτων υποβλήθηκε, σε χρώση κυανού της Αλσατίας και ερυθρού της Αλιζαρίνης. Η

μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη χρώση ομοιάζει με αυτήν που περιγράφεται από τους Walker and Kimmel (2007) με ορισμένες τροποποιήσεις. Με τη χρώση αυτή έγινε δυνατή η διάκριση οστέινων και χόνδρινων δομών, καθώς το ερυθρό της Αλιζαρίνης και το κυανό της Αλσατίας επικάθονται στις δομές αυτές αντίστοιχα. Με το πέρας της διαδικασίας της χρώσης, τα άτομα φωτογραφίζονταν και από τις δύο πλευρές και με ποικίλες μεγεθύνσεις στην σπονδυλική στήλη με ψηφιακή μηχανή προσαρτημένη σε ηλεκτρονικό στερεοσκόπιο (Olympus SZ61), αφού είχε προηγηθεί καθαρισμός της συνολικής επιφάνειας από λέπια προκειμένου να είναι ορατές οι δομές στο εσωτερικό των ιχθυδίων. Ο καθαρισμός αυτός πραγματοποιήθηκε σε στερεοσκόπιο (Carl Zeiss Werk, Gottingen, Germany) με τη χρήση λαβίδας με πολύ λεπτά και εύκαμπτα άκρα για την αποφυγή τραυματισμού ή καταστροφής των δειγμάτων. Μετά την ολοκλήρωση της φωτογράφισής τους, τα άτομα αποθηκεύτηκαν σε γλυκερόλη 50% , έως ότου να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω αναλύσεις.

Το σύνολο των φωτογραφιών που αποκτήθηκαν μετά την ιστολογική επεξεργασία των δειγμάτων αποτέλεσε το υλικό για τη διάκριση των ατόμων σε φυσιολογικά και παραμορφωμένα. Σε ένα επόμενο βήμα, αναφορικά με τις μετρήσεις των γωνιών της λόρδωσης, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό tpsDig (Rohf 2015). Για το σύνολο των μετρήσεων των γωνιών στα φυσιολογικά άτομα, επιλέχθηκε η γωνία μεταξύ 2^{ου} και 6^{ου} αιματικού σπόνδυλου, σε αντιστοιχία με τις μετρήσεις στα παραμορφωμένα άτομα, όπου το κέντρο της γωνίας της παραμόρφωσης εντοπιζόταν κυρίως στην περιοχή αυτή (βλ. αποτελέσματα). Η μέτρηση της γωνίας στα παραμορφωμένα άτομα είχε ως αρχή τον πρώτο σπόνδυλο, από όπου ξεκινούσε η χαρακτηριστική κάμψη της σπονδυλικής στήλης σχήματος V και ως τέλος τον αντίστοιχο τελευταίο της κάμψης (Εικόνα 2.4A). Επιπλέον, για την εκτίμηση του κέντρου της παραμόρφωσης στη σπονδυλική στήλη, επιλέχθηκαν οι σπόνδυλοι που βρίσκονταν στο κατώτερο άκρο της γωνίας της παραμόρφωσης (Εικόνα 4B).

Ο έλεγχος της σημαντικότητας των διαφορών της συχνότητας της λόρδωσης μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων έγινε με τη βοήθεια του G test (Sokal and Rolhf 1981). Πριν τον στατιστικό έλεγχο των αποτελεσμάτων των γωνιών, προηγήθηκε μετασχηματισμός των μετρήσεων (συνημίτονο της κάθε γωνίας). Ακολούθησε ο έλεγχος της επίδρασης των πειραματικών συνθηκών στη γωνία της λόρδωσης με μη παραμετρική δοκιμή Kruskal-Wallis (STATISTICA, version 7). .

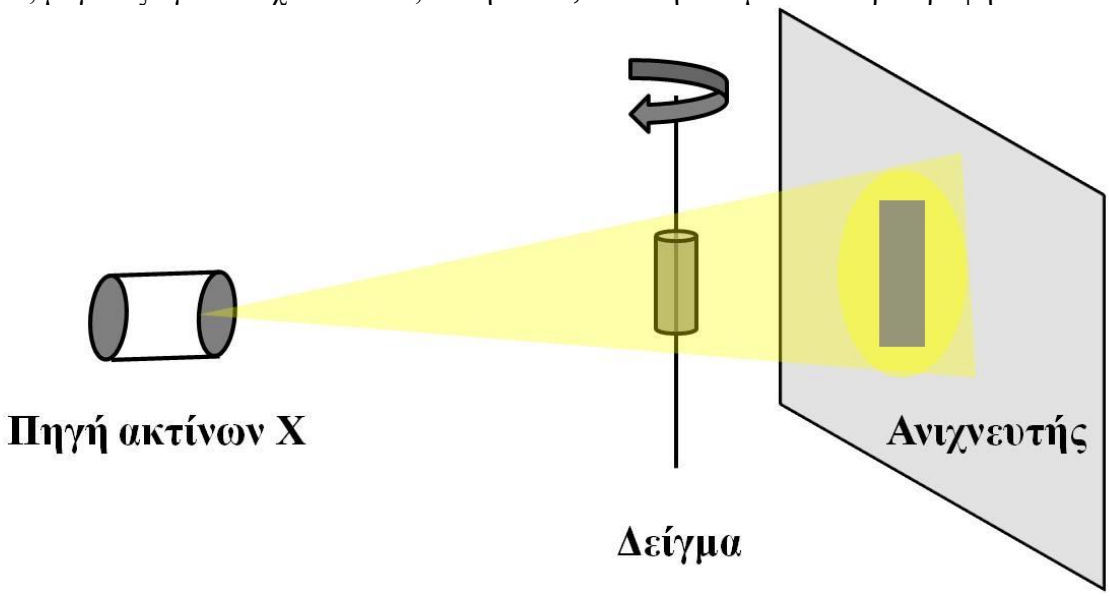


Εικόνα 2.4 Αντιπροσωπευτική εικόνα των μετρήσεων για τις γωνίες της λόρδωσης των παραμορφωμένων ατόμων (A), καθώς και της θέσης του κέντρου της παραμόρφωσης στη σπονδυλική στήλη (B). Με κύκλο υποδεικνύεται ο πρώτος και δεύτερος αιματικός σπόνδυλος.

2.7 Μικροτομογραφία

Για τη μελέτη των δειγμάτων σε τρεις διαστάσεις έγινε χρήση ενός υπολογιστικού μικροτομογράφου Skyscan 1172, ο οποίος βρίσκεται στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών Κρήτης (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.). Όσον αφορά στην προετοιμασία των δειγμάτων πριν τη σάρωση, επιλέχθηκαν 12 άτομα, εκ των οποίων τα μισά ήταν σοβαρά λορδωτικά και προέρχονταν από την ομάδα άσκησης των 8 $TL \cdot s^{-1}$, ενώ τα υπόλοιπα ανήκαν σε ομάδες ελέγχου που δεν υποβλήθηκαν σε άσκηση. Τα 4 από τα άτομα αυτά είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε ιστολογικές τεχνικές και είχαν αποθηκευτεί σε 50% γλυκερόλη. Τα υπόλοιπα 8 είχαν παραμείνει στη φορμαλδεΰδη χωρίς να υποστούν οποιασδήποτε μορφής χρώση. Σε κάθε περίπτωση, προκειμένου να υποβληθούν σε σάρωση μικροτομογραφίας, τα επιλεγμένα δείγματα απομονώθηκαν από το διάλυμα αποθήκευσης και μεταφέρθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια μέχρι τον θάλαμο σάρωσης. Για να τοποθετηθούν στον θάλαμο σάρωσης τα δείγματα σταθεροποιούνταν όσο το δυνατόν περισσότερο σε μία βάση ενός δοχείου σάρωσης, το οποίο από την επάνω πλευρά σφραγίζεται με parafilm.

Η σάρωση και η απεικόνιση των υπό μελέτη οστών σε τρεις διαστάσεις πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ακτίνων Χ. Κατά τη σάρωση, το δείγμα τοποθετείται και περιστρέφεται μεταξύ μιας σειράς ανιχνευτών και μιας πηγής ακτίνων Χ υψηλής ενέργειας. Καθώς περιστρέφεται, αποκτάται μια εικόνα προβολής (projection image) από κάθε δυνατή γωνία (Εικόνα 2.5). Οι εικόνες προβολής είναι εικόνες διαβαθμίσεων του γκρι, στις οποίες απεικονίζεται η απορρόφηση των ακτίνων Χ από το αντικείμενο. Πυκνές περιοχές (μικρή διέλευση των ακτίνων Χ) αντιστοιχούν στο λευκό χρώμα, ενώ λιγότερο πυκνές περιοχές (μεγάλη διέλευση των ακτίνων Χ) αντιστοιχούν στο μαύρο (Δημητριάδη 2018). Οι παράμετροι σάρωσης που εφαρμόστηκαν διατηρήθηκαν κοινές για τη σάρωση όλων των δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε χρόνος έκθεσης 970ms, μέγεθος ογκοστοιχείου 1-1.3, τάση 40kV, ένταση 250 μA και περιστροφή 180°.



Εικόνα 2.5 Απεικόνιση της διαδικασίας λήψης των εικόνων προβολής κατά τη σάρωση στον μικροτομογράφο. Από Δημητριάδη (2018).

Από το σύνολο των εικόνων προβολής που συλλέχθηκαν μέσω του λογισμικού NRecon (SKYSCAN), προέκυψε ένα δεύτερο σύνολο εικόνων (ψηφιακές τομές, cross

sections), αφού επικεντρωθήκαμε στην περιοχή ενδιαφέροντος. Οι εικόνες αυτές εξάγονται σε μορφή αρχείου φωτογραφίας TIFF, που μπορεί να αναλυθεί ποιοτικά και ποσοτικά. Με τη μορφή αυτή είναι δυνατόν να εισαχθούν στο λογισμικό Amira v.5.2. (VSG, Burlington USA), όπου κατέστη δυνατή η εξαγωγή των επιθυμητών διαδικασιών για τη μελέτη των οστέινων δομών της αιματικής περιοχής ενδιαφέροντος σε τρεις διαστάσεις.

2.8 Προετοιμασία δειγμάτων για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Σε μία προσπάθεια για περαιτέρω εμβάθυνση στη φύση των αλλαγών που συμβαίνουν στην περιοχή ενδιαφέροντος, τα 8 άτομα που δεν υποβλήθηκαν σε καμία άλλη τεχνική πέρα της σάρωσης με μικροτομογράφο υποβλήθηκαν σε ιστολογική επεξεργασία, τμήση και χρώση με μπλε της τολουϊδίνης (0.5% και 4% βορικό νάτριο) προκειμένου να γίνουν ορατές οι αλλαγές σε επίπεδο κυττάρου. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα στο εργαστήριο Εξελικτικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας στο πανεπιστήμιο της Γάνδης (Βέλγιο). Πιο αναλυτικά, ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο εμβάπτισης των δειγμάτων στο υδατοδιαλυτό ενδιάμεσο Glycol Methanlacrylate Acrylic (GMA). Η διαδικασία περιλαμβάνει διαδοχικές πλύσεις αιθανόλης των δειγμάτων που βρίσκονταν αποθηκευμένα σε διάλυμα φορμόλης και εν συνεχεία πλύση με απιονισμένο νερό. Ακολούθησε η εμβάπτιση για 48 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris (100 mmol, ρH 7,2) που περιείχε 10% EDTA με σκοπό την απασβεστοποίηση των οστών. Μετά τον έλεγχο της επιτυχίας της απασβεστοποίησης, ακολουθήθηκε μία σταδιακή αφυδάτωση (διαδοχικές πλύσεις ακετόνης) και επώαση σε διάλυμα μονομερών. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε βάζα από πολυαιθυλένιο με καπάκια. Ο πολυμερισμός πραγματοποιήθηκε στους 4 ° C για 24 ώρες και ολοκληρώθηκε μέσα σε άλλες 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Witten *et al.* 2001). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εμβάπτιση στο πολυμερές GMA για δύο εικοσιτετράωρα σε θερμοκρασία 4°C και θερμοκρασία δωματίου αντίστοιχα. Εν συνεχεία, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στη μικροτόμο, όπου κατέστη δυνατή η συλλογή επιμήκους τομών, πάχους 2-3 μm. Μετά την πλήρη απομάκρυνση του νερού από τις τομές, εμβαπτίζονταν σε διάλυμα της χρωστικής μπλε της τολουϊδίνης για πέντε έως εφτά δευτερόλεπτα και ξεπλένονταν σταδιακά με απιονισμένο νερό. Τέλος, αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και καλύφθηκαν με καλυπτρίδα, ώστε να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. Κατά την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο, τα ιχθύδια φωτογραφίζονταν στην αιματική περιοχή σε διάφορες μεγεθύνσεις.

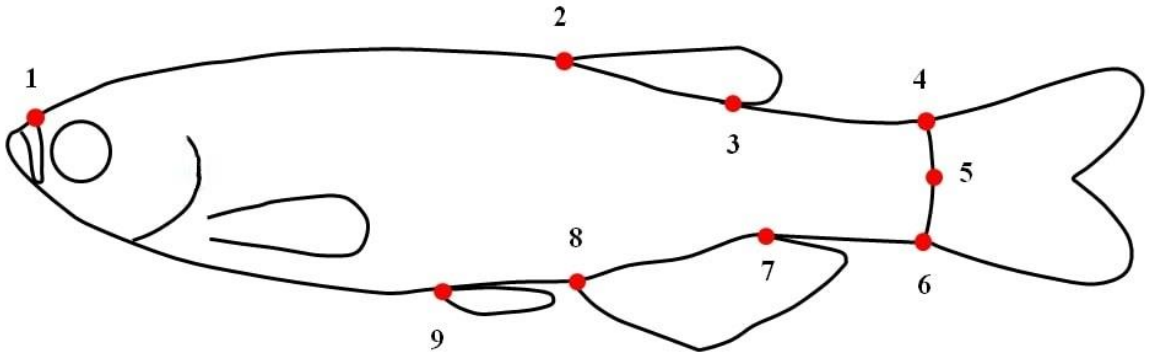
2.9 Ανάλυση του σχήματος σώματος των ιχθυδίων zebrafish

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της άσκησης στο σχήμα του σώματος των ιχθυδίων, σημαντικό στοιχείο αποτέλεσε η απομάκρυνση των ατόμων που έφεραν οποιασδήποτε εντάσεως παραμόρφωση από την ανάλυση. Για να είναι στατιστικά συγκρίσιμες οι ομάδες, επιλέχθηκαν τυχαία 5 άτομα από κάθε ομάδα ελέγχου κάθε πειραματικής συνθήκης, ώστε να αποτελέσουν μία ενιαία ομάδα ατόμων. Κριτήριο για τη σύσταση της ομάδας αυτής υπήρξε η απουσία μορφοανατομικών ανωμαλιών. Έτσι, συστάθηκε μια ομάδα ελέγχου, η οποία δεν είχε υποβληθεί σε άσκηση (0 $TL \cdot s^{-1}$) και αριθμούσε 30 άτομα. Αντίστοιχα, επιλέχθηκε από κάθε επίπεδο κολυμβητικής άσκησης το σύνολο των ατόμων που δεν έφεραν καμία ένδειξη λόρδωσης.

Ο έλεγχος της σημαντικότητας των διαφορών στο σχήμα του σώματος μεταξύ των ομάδων (0, 5,0, 6,5 και 8,0 $TL \cdot s^{-1}$) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της γεωμετρικής μορφομετρίας. Με τη μέθοδο αυτή και τη χρήση του λογισμικού tpsDig (Rohlf 2013, version 2.17), 9 ορόσημα μορφομετρικά σημεία τοποθετήθηκαν σε ανατομικά διακριτές περιοχές (Εικόνα 2.5). Σε ένα επόμενο βήμα τα σημεία τέθηκαν σε επεξεργασία στο πρόγραμμα MorphoJ, για να προσδιοριστεί η μέση διαμόρφωση σχήματος και το κεντροειδές μέγεθος. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι συντεταγμένες που προέκυψαν με τη μέθοδο του Προκρούστη. Αφού υπολογίστηκε ο πίνακας βαρύτητας (weight matrix), στα δεδομένα αυτά εφαρμόστηκε ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA, Principal Component Analysis), για την εκτίμηση της σημαντικότητας των διαφορών σχήματος μεταξύ των ομάδων. Η ανάλυση αυτή επέτρεψε την εξαγωγή των αποστάσεων Mahalanobis, καθώς και των vectors για τις ακραίες τιμές του σχήματος σώματος.

Αντίστοιχα, στην περίπτωση του ελέγχου της επίδρασης της λόρδωσης στο σχήμα του σώματος αξιοποιήθηκαν 40 άτομα, που ασκήθηκαν σε ταχύτητα ρεύματος 8 $TL \cdot s^{-1}$ και χαρακτηρίστηκαν ως παραμορφωμένα, και 10 άτομα ισάξια ληφθέντα από τις ομάδες ελέγχου κάθε πειραματικής επανάληψης. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι όμοια με την ανάλυση σχήματος σώματος που περιγράφηκε παραπάνω, δηλαδή ανάλυση κύριων συνιστωσών για τον συγκεκριμένο σκοπό. Κι εδώ η ανάλυση αυτή επέτρεψε την εξαγωγή των vectors για τις ακραίες τιμές των συνιστωσών του σχήματος σώματος.

Σε ένα επόμενο επίπεδο, προκειμένου να εξεταστεί η σημαντικότητα της συνολικής επίδρασης της άσκησης, τα δεδομένα που εξήχθησαν από την ανάλυση κανονικών συνιστωσών αποτέλεσαν τη βάση μία ανάλυσης (Discriminant Analysis) στο πρόγραμμα STATISTICA (έκδοση 7.0).

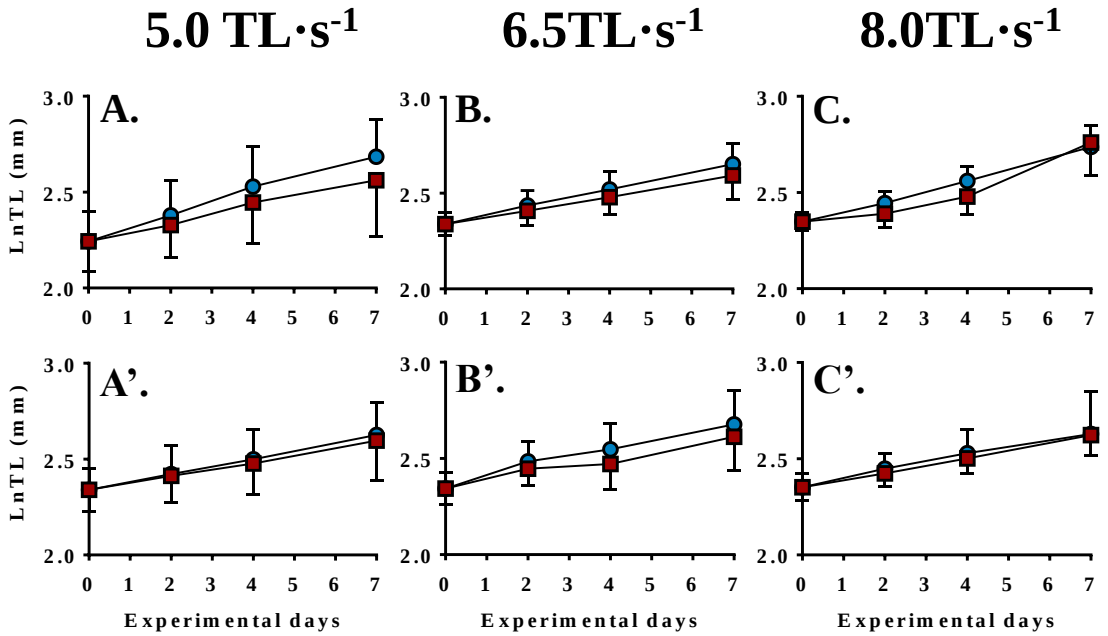


Εικόνα 2.6 Θέση των ορόσημων μορφομετρικών σημείων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση του σχήματος σώματος. Τα σημεία αφορούν την άνω πρόσθια άκρη του ρύγχους (1), τη βάση του ραχιαίου πτερυγίου (2, 3), το ραχιαίο, μέσο και κοιλιακό άκρο του ουραίου πτερυγίου (4, 5, 6), τη βάση του εδρικού (7, 8) και τέλος τη βάση του αριστερού κοιλιακού πτερυγίου (9). Εικόνα μορφοποιημένη από Δημητριάδη (2018).

3 Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση της άσκησης στον ρυθμό αύξησης του zebrafish

Εξετάστηκε η επίδραση της έντασης της κολυμβητικής άσκησης στο ρυθμό αύξησης των μεταμορφούμενων νυμφών zebrafish. Η εξέλιξη του ολικού μήκους σώματος κατά την περίοδο της άσκησης απεικονίζεται στην Εικόνα 3.1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνδιαποράς, τα πειραματικά δεδομένα είχαν καλή προσαρμογή στο θεωρητικό μοντέλο αύξησης που εφαρμόστηκε. Στα 5,0 $TL \cdot s^{-1}$, καθώς και στη μία πειραματική επανάληψη των 6,5 $TL \cdot s^{-1}$, ο ρυθμός αύξησης του σώματος ήταν σημαντικά μικρότερος από ό, τι στους πληθυσμούς ελέγχου. Αντίθετα, στα 8,0 $TL \cdot s^{-1}$, η κολυμβητική άσκηση δεν είχε κάποια σημαντική επίδραση στον ρυθμό αύξησης του TL (Πίνακας 3.1).



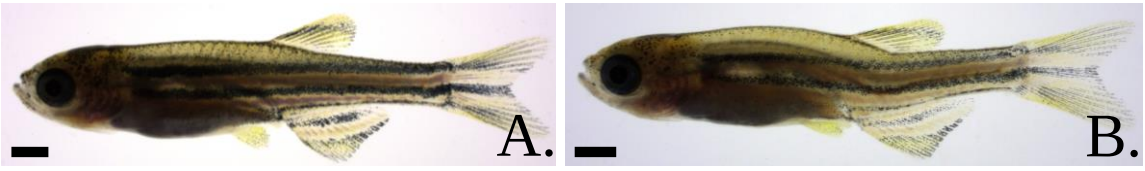
Εικόνα 3.1 Εξέλιξη του TL των ασκούμενων (Exercised) και μη (Control) ατόμων κατά τη διάρκεια της πειραματικής εβδομάδας. Οι δειγματοληψίες μεγέθους πραγματοποιήθηκαν στην αρχή, στη δεύτερη και τέταρτη ημέρα, καθώς και στο τέλος της πειραματικής εβδομάδας, σε όλες τις ταχύτητες άσκησης (5,0, 6,5 και 8,0 TL s^{-1}) και πειραματικές επαναλήψεις (A-B-C και (A'-B'-C').

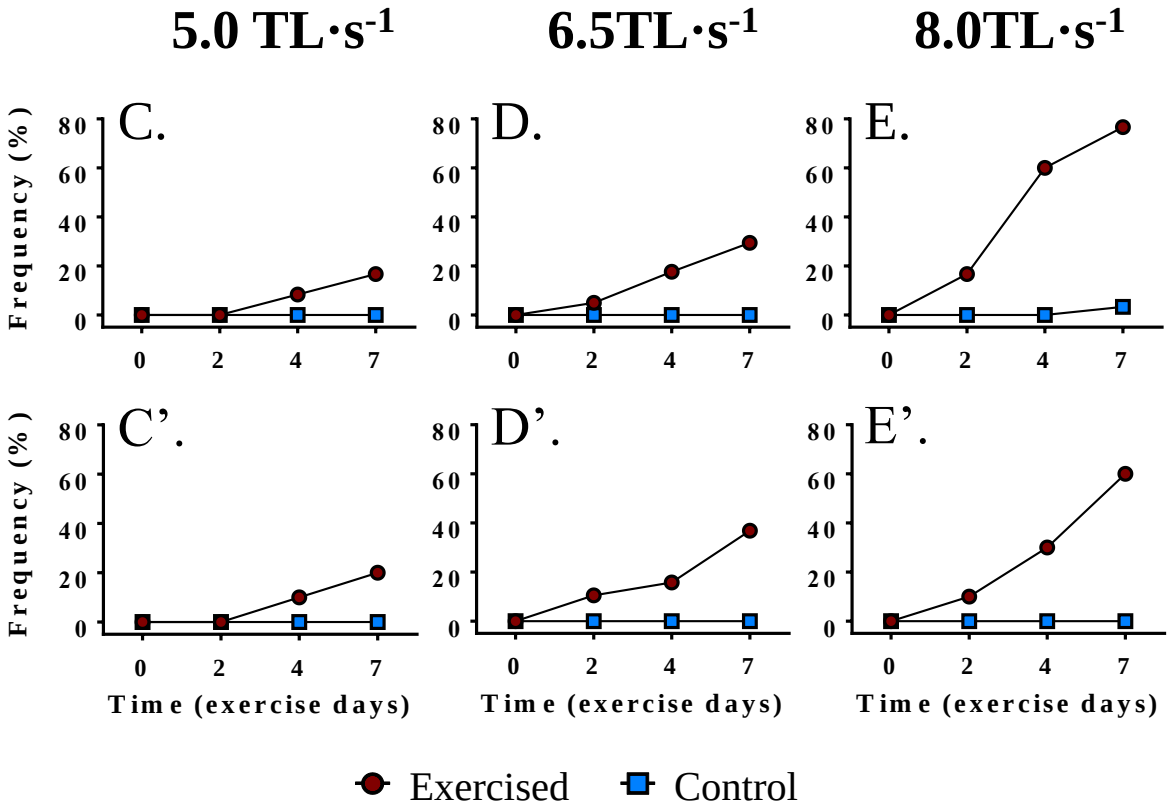
Πίνακας 3.1 Οι παράμετροι της σχέσης $TL = a \cdot e^{SGR \cdot t}$ για κάθε ταχύτητα άσκησης και πειραματική επανάληψη (1 και 2), για ασκούμενα (e) και μη (c) άτομα. Trial, ταχύτητα πειραματικής δοκιμής. Replicate, η πειραματική επανάληψη. Condition, η διάκριση σε ασκούμενα και μη άτομα. a, το ολικό μήκος σώματος για t_0=0. SGR, ο ειδικός ρυθμός αύξησης. r^2, ο συντελεστής προσδιορισμού. n, ο αριθμός των ζευγών τιμών TL-t. p (c-e), το μικρότερο επίπεδο σημαντικότητας για τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών SGR των ατόμων που υποβλήθηκαν σε άσκηση και εκείνων σε μηδενικές ταχύτητες άσκησης, εντός κάθε πειραματικής επανάληψης.

Trial ($TL \cdot s^{-1}$)	Replicate	Condition	a	SGR	SE(a)	SE(SGR)	r^2	n	p (c - e)
5,0	1	c	9,512	0,064	0,015	0,004	0,993	4	0,019
		e	9,432	0,046	0,011	0,003	0,993	4	
	2	c	10,377	0,041	0,002	0,001	0,999	4	0,022
		e	10,363	0,036	0,004	0,001	0,998	4	
6,5	1	c	10,403	0,044	0,003	0,001	0,999	4	0,001
		e	10,346	0,036	0,002	0,001	0,999	4	
	2	c	10,633	0,046	0,021	0,005	0,976	4	0,254
		e	10,483	0,037	0,020	0,005	0,965	4	
8,0	1	c	10,390	0,056	0,007	0,002	0,998	4	0,797
		e	9,985	0,059	0,053	0,013	0,917	4	
	2	c	10,609	0,039	0,010	0,002	0,992	4	0,849
		e	10,472	0,039	0,003	0,001	0,999	4	

3.2 Ανάπτυξη αιματικής λόρδωσης ως απόκριση στην κολυμβητική άσκηση

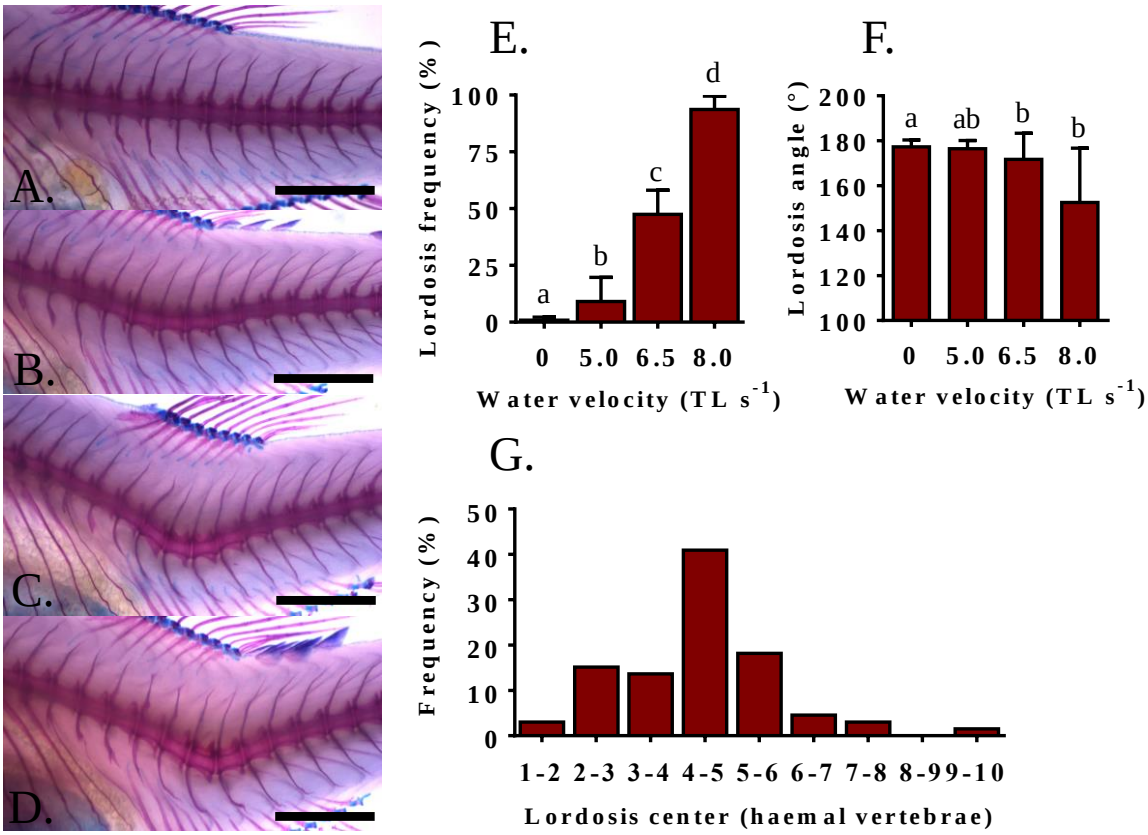
Σε όλα τα επίπεδα κολυμβητικής άσκησης που εξετάστηκαν, οι ασκούμενοι πληθυσμοί ανέπτυξαν λόρδωση της μεταεδρικής περιοχής του σώματος, υπό τη μορφή της χαρακτηριστικής κάμψης σχήματος V της σπονδυλικής στήλης, καθώς και της νωτιαίας μετατόπισης του ουραίου μίσχου (Εικόνα 3.2A, 3.2B). Ανάλογα με την ένταση της άσκησης, η λόρδωση ήταν εμφανής από μόλις τη δεύτερη ημέρα στα 6,5 και 8,0 $TL \cdot s^{-1}$. Στα 5,0 $TL \cdot s^{-1}$ η ανάπτυξη της λόρδωσης ήταν μορφολογικά εμφανής δύο ημέρες αργότερα (Εικόνα 3.2). Στο τέλος της πειραματικής περιόδου, το ποσοστό της αιματικής λόρδωσης κυμάνθηκε από 15,4-20,0% στα 5,0 $TL \cdot s^{-1}$, σε 25,0-35,0% ή 60,0-76,7% στα 6,5 και 8,0 TL s^{-1} ταχύτητα άσκησης αντίστοιχα (Εικόνα 3.2C-E'). Όσον αφορά στις ομάδες ελέγχου (control), δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική απόκλιση από τον φυσιολογικό φαινότυπο (Εικόνα 3.2).





Εικόνα 3.2 Επίδραση της άσκησης στην ανάπτυξη αιματικής λόρδωσης στο zebrafish. Ιχθύδια zebrafish με φυσιολογικό (A) και παραμορφωμένο (B) εξωτερικό φαινότυπο. C-E', εξέλιξη της συχνότητας της λόρδωσης κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, στα τρία διαφορετικά επίπεδα κολυμβητικής έντασης (5,0, 6,5, 8,0 TL s^{-1}). Τα C-E και C'-E' αντιστοιχούν στις δύο πειραματικές επαναλήψεις που πραγματοποιήθηκαν. Η κλίμακα των A και B αντιστοιχεί σε 1 mm.

Η εξέταση των ατόμων μετά τη διπλή χρώση τους (με κυανό της Αλσατίας και Αλιζαρίνη) επιβεβαίωσε πως η in vivo παρατηρούμενη λόρδωση της μεταεδρικής περιοχής αφορούσε λόρδωση με επίκεντρο στην αιματική περιοχή της σπονδυλικής στήλης (Εικόνα 3.3, B-D). Επίσης επιβεβαιώθηκε ότι η κολυμβητική άσκηση διάρκειας επτά ημερών επιδρά σημαντικά ($p<0,05$, G-test) στη συχνότητα αιματικής λόρδωσης. Αυξανόμενης της κολυμβητικής έντασης, η συχνότητα της παραμόρφωσης αυξήθηκε σημαντικά από 0,5±1,3% στους πληθυσμούς ελέγχου (0 TL·s^{-1}), σε 7,5±10,6% , 47,5±10,6% ή 92.5±6.0%, στα 5,0, 6,5 ή 8,0 TL·s^{-1} (Εικόνα 3.3E). Όμοια, σημαντική ήταν και η επίδραση της κολυμβητικής έντασης στη μέση γωνία της λόρδωσης (ενδεικτική της έντασης της παραμόρφωσης). Συγκρινόμενη με τις τιμές ελέγχου, η μέση γωνία λόρδωσης μειώθηκε σημαντικά σε επίπεδα άσκησης 6,5 και 8,0 TL·s^{-1} (Εικόνα 3.3F). Η μέση γωνία λόρδωσης ήταν 176.4±2.1° στα 5,0 TL·s^{-1}, 171.7±6.8° στα 6.5 TL·s^{-1} και 152.6±15.8° at 8,0 TL·s^{-1}. Η αντίστοιχη μέτρηση στην ίδια αιματική περιοχή των φυσιολογικών ατόμων ελέγχου (0 TL·s^{-1}) ήταν 177.3±1.73°.



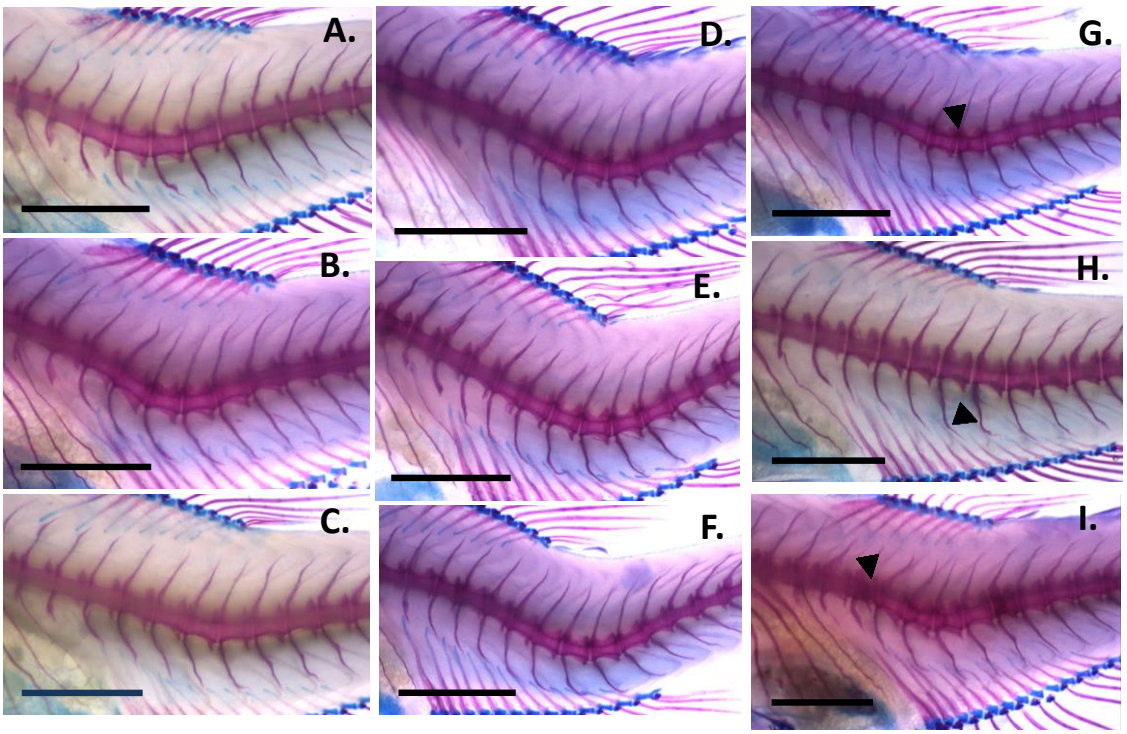
Εικόνα 3.3 Ανατομικά χαρακτηριστικά και συχνότητα της λόρδωσης στις διαφορετικές συνθήκες που εξετάστηκαν. Φυσιολογικά (A) και διαφορετικής έντασης λορδωτικά άτομα (B-D), μετά από χρώση των ιχθυδίων με Ερυθρό της Αλιζαρίνης και Κυανό της Αλσατίας. E,F, συχνότητα και γωνία της λόρδωσης στις τέσσερις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. G, κατανομή συχνοτήτων της θέσης του κέντρου της αιματικής λόρδωσης. Οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 1 mm. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές επισημαίνονται με απουσία κοινού γράμματος ($p < 0,05$).

Οι αιματικοί σπόνδυλοι συγκεντρώνουν το σύνολο των κέντρων της παραμόρφωσης για τα περιστατικά λόρδωσης που καταγράφηκαν. Οι περισσότερες περιπτώσεις λόρδωσης αναπτύχθηκαν με επίκεντρο τους αιματικούς σπονδύλους 2-6 (Εικόνα 3.3G, 3.4A). Το 41% των περιπτώσεων λόρδωσης (27 εκ των 66 ατόμων) αναπτύχθηκαν μεταξύ του τέταρτου και πέμπτου αιματικού σπονδύλου. Η συγκεκριμένη λόρδωση φαίνεται ότι αναπτύσσεται πάντα μεταξύ δύο σπονδύλων, επηρεάζοντας τη δομή τόσο αυτών, όσο και της ενδιάμεσης περιοχής (Εικόνα 3.4).

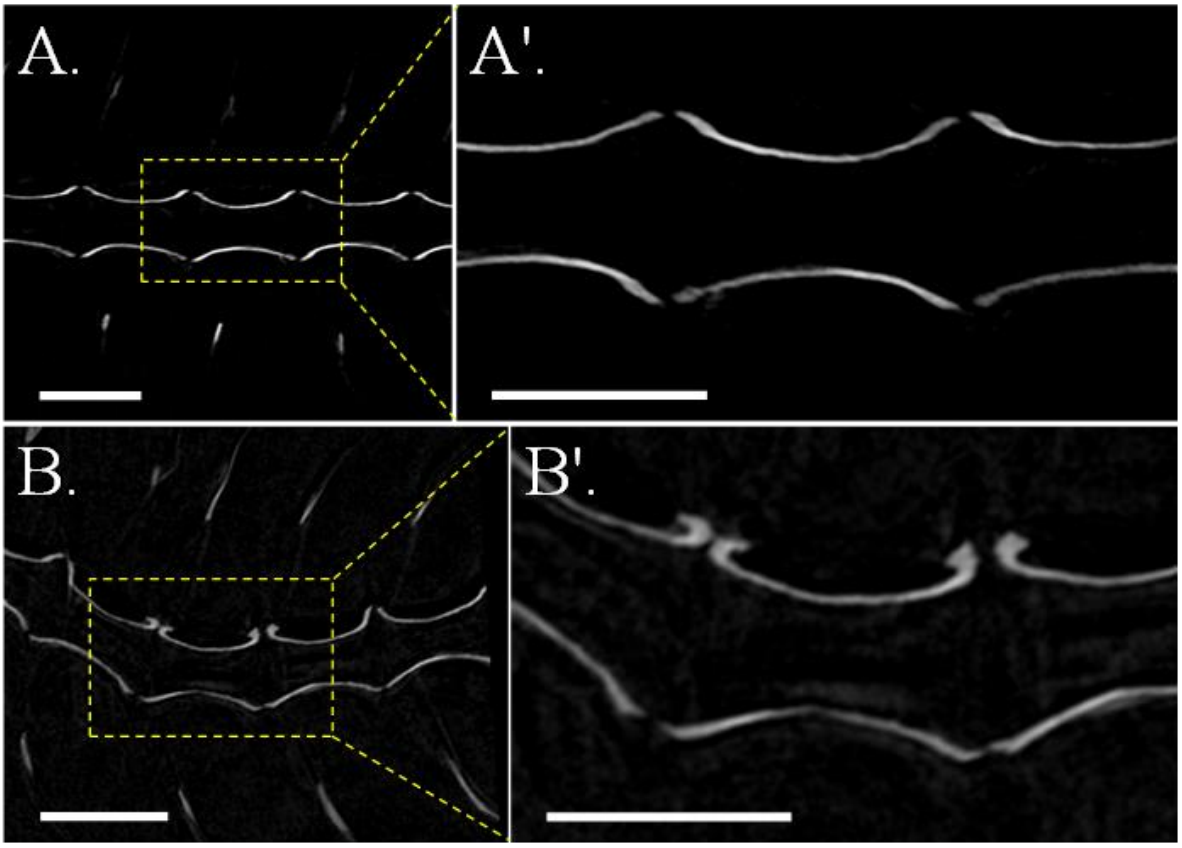
Οι σπόνδυλοι εμφάνισαν ένα τραπεζοειδές σχήμα, το οποίο ήταν περισσότερο ορατό στους σπονδύλους που βρίσκονταν στο κέντρο της παραμόρφωσης πάνω στην σπονδυλική στήλη. Μάλιστα όσο πιο έντονη η λόρδωση τόσο πιο έντονο ήταν και το τραπεζοειδές σχήμα των εμπλεκόμενων σπονδύλων. Επιπλέον, οι νευρικές αποφύσεις των σπονδύλων στην περιοχή αυτή παρουσίαζαν μία ανεστραμμένη φορά (Εικόνες 3.4, B, F, I), ενώ συχνά ήταν και τα φαινόμενα κακώσεων των αποφύσεων (Εικόνα 3.4G).

Με τη βοήθεια της ψηφιακής απεικόνισης και τη χρήση αξονικού μικροτομογράφου, κατέστη δυνατή η λεπτομερής περιγραφή των αναδιαμορφώσεων στους σπονδύλους της λορδωτικής περιοχής. Όπως παρατηρήθηκε από απεικονίσεις τομών κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης, οι σπόνδυλοι στο κέντρο της λόρδωσης παρουσίασαν μία νωτιαία αναδίπλωση των άνω άκρων των τελικών πλακών (Εικόνα 3.5). Στο κατώτερο τμήμα δεν παρατηρήθηκε κάποια ανάλογη διαφοροποίηση οποιασδήποτε μορφής από το

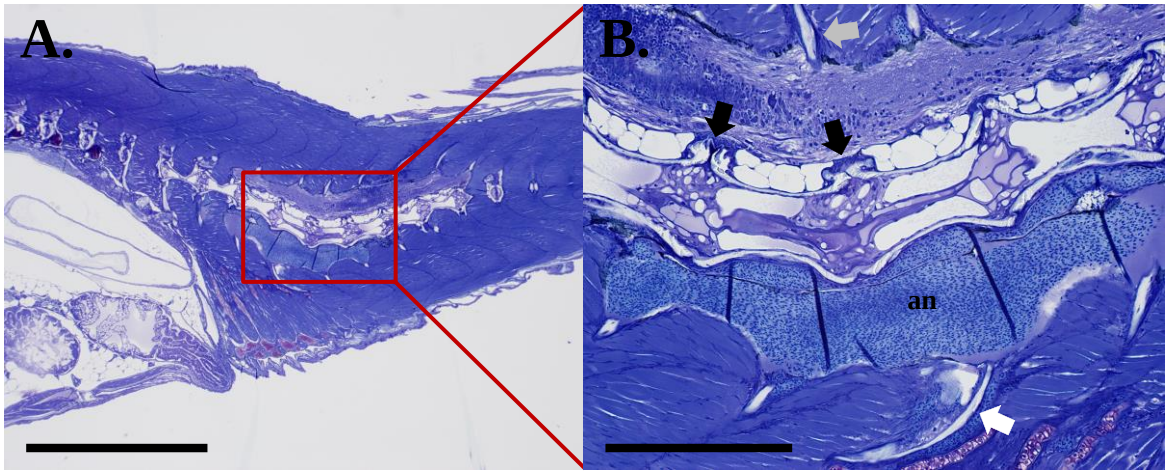
φυσιολογικό. Η αναδίπλωση των παραμορφωμένων σπονδύλων επιβεβαιώθηκε και μετά από την ιστολογική εξέταση της παραμόρφωσης, η οποία έδειξε επιπλέον πως κοιλιακά του κέντρου της λόρδωσης αναπτύσσεται μια σημαντική διόγκωση των προσαγωγών και απαγωγών ουραίων αγγείων (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.4 Χαρακτηριστικές περιπτώσεις λορδώσεων στα ιχθύδια μετά από ιστολογική παρατήρηση. A-F αντικατοπτρίζουν το κέντρο της λόρδωσης μεταξύ διαφορετικών σπονδύλων της αιματικής περιοχής. Ακόμη η λόρδωση φαίνεται να επηρεάζει τη δομή των ζυγαποφύσεων (G), των νευρικών αποφύσεων (H), καθώς και το σώμα των σπονδύλων στην ευρύτερη περιοχή ενδιαφέροντος (I), τα οποία σημαίνονται με μαύρα βέλη.



Εικόνα 3.5 Ψηφιακή απεικόνιση οβελιαίας τομής της περιοχής ενδιαφέροντος σε φυσιολογικό (A) και λορδωτικό (B) άτομο, με μεγέθυνση στον ίδιο αιματικό σπόνδυλο (A'-B'). Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 0.25 mm.



Εικόνα 3.6 Οβελιαίες τομές της αιματικής περιοχής ασκούμενου λορδωτικού ιχθυδίου, ύστερα από χρώση με Κυανό της Τολουϊδίνης. Οι κλίμακες αντιστοιχούν σε 1mm (A) και 0.25mm (B). Τα βέλη υποδεικνύουν τις περιοχές αναδίπλωσης των τελικών πλακών.

3.3 Επίδραση άσκησης στο σχήμα του σώματος

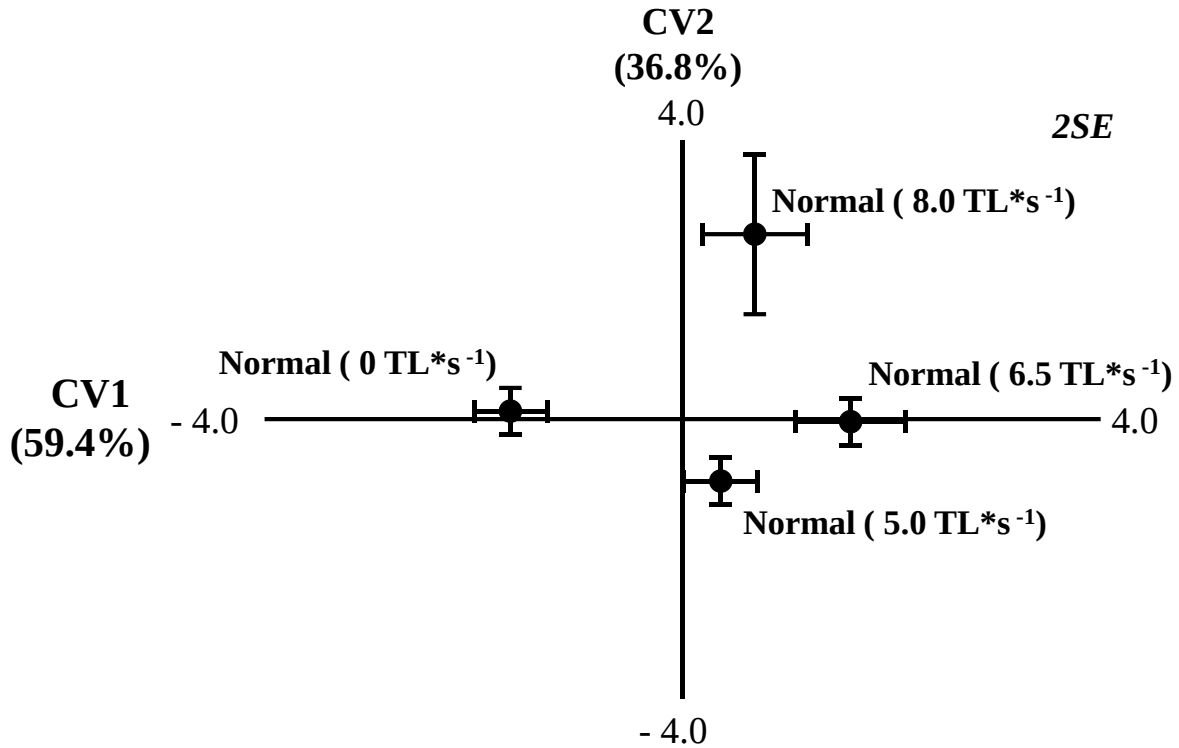
Από την ανάλυση του σχήματος του σώματος με τη μέθοδο της γεωμετρικής μορφομετρίας, κατέστη δυνατή η διάκριση των διαφορών που οφείλονται στην άσκηση μεταξύ των ομάδων. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κανονικών μεταβλητών (CVA)

βάση της διασποράς των ομάδων έδειξαν ότι η άσκηση επέδρασε σημαντικά στο σχήμα του σώματος των φυσιολογικών ατόμων (Wilks' λ=0,1652, p<0,001). Κατά μήκος της πρώτης κανονικής μεταβλητής (CV1), εξηγήθηκε το 59,4% της παρατηρούμενης ποικιλομορφίας και διαχωρίστηκαν τα άτομα που υποβλήθηκαν σε οποιασδήποτε έντασης άσκηση με εκείνα που δεν ασκήθηκαν (ομάδα ελέγχου) (Εικόνα 3.7). Η δεύτερη κανονική μεταβλητή (CV2) διαχώρισε κατά διαβάθμιση έντασης κολύμβησης τα ιχθύδια που υποβλήθηκαν σε άσκηση, ερμηνεύοντας το 36,8% της συνολικής ποικιλομορφίας του σχήματος (Εικόνα 3.7). Οι αποστάσεις Mahalanobis μεταξύ των πειραματικών ομάδων αποδείχθηκαν στο σύνολό τους σημαντικές (Πίνακας 3.2).

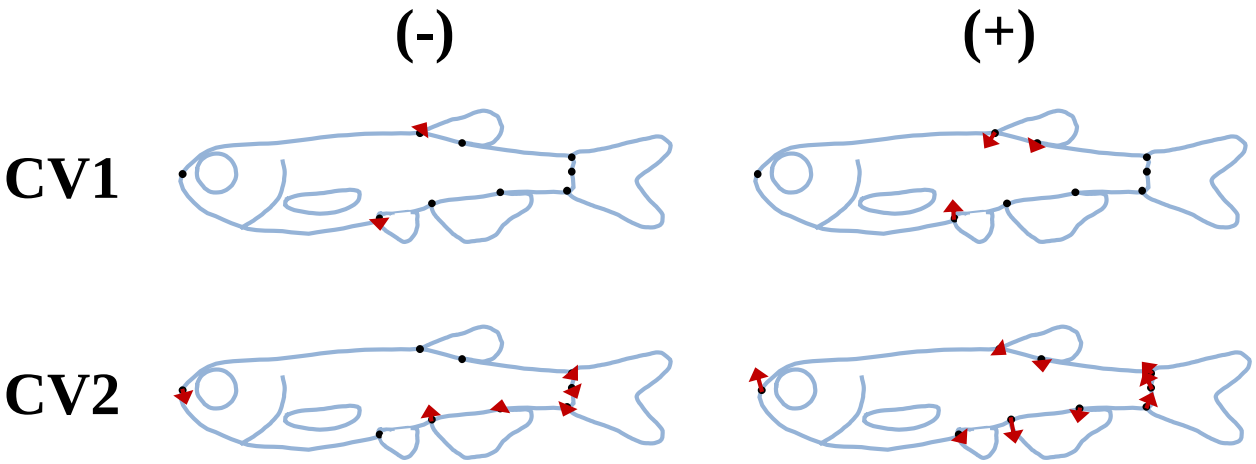
Σύμφωνα με τα διαγράμματα συνιστωσών δυνάμεων, συγκρινόμενα με τις υπόλοιπες ομάδες, τα ιχθύδια της ομάδας ελέγχου παρουσίασαν μια νωτοκοιλιακή διεύρυνση στο μέσο του σώματος, οφειλόμενη στην άπω μετατόπιση της βάσης των κοιλιακών και του ραχιαίου πτερυγίου (Εικόνα 3.8).

Τα άτομα της ομάδας που ασκήθηκαν ενάντια σε ταχύτητα 8.0 $TL \cdot s^{-1}$, διαχωρίστηκαν συγκριτικά με τα υπόλοιπα ασκούμενα άτομα βάση:

- μίας νωτιαίας μετατόπισης του ρύγχους της κεφαλής,
- μίας κοιλιακής μετατόπισης του μέσου του σώματος, όπως ορίζεται από τις βάσεις των κοιλιακών, ραχιαίου και εδρικού πτερυγίου, και
- μίας νωτιαίας μετατόπισης της βάσης του ουραίου πτερυγίου



Εικόνα 3.7 Επίδραση της άσκησης (5.0, 6.5 και 8.0 $TL \cdot s^{-1}$) στο σχήμα του σώματος σε ιχθύδια zebrafish κατά μήκος των δύο κανονικών μεταβλητών (CV1,CV2). Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των μεταβλητών και εντός των παρενθέσεων περικλείεται το ποσοστό της φαινοτυπικής διακύμανσης που ερμηνεύει η κάθε κανονική μεταβλητή. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ±2SE.



Εικόνα 3.8 Διαγράμματα συνιστωσών δυνάμεων που δείχνουν τις αλλαγές στο σχήμα του σώματος κατά μήκος των αξόνων των δύο κανονικών μεταβλητών (x2),.

Πίνακας 3.2 Αποστάσεις Mahalanobis (άνω τμήμα πίνακα) μεταξύ των ομάδων και τα επίπεδα σημαντικότητας τους (κατώτερο μισό πίνακα). **, p<0,01. ***, p<0,001.

	Control (0TL/sec)	Normal (5.0TL/sec)	Normal (6.5TL/sec)	Normal (8.0TL/sec)
Control (0TL/sec)	–	2.3	3.2	3.3
Normal (5TL/sec)	***	–	1.6	3.5
Normal (6,5TL/sec)	***	**	–	3.1
Normal (8TL/sec)	***	***	***	–
n	30	30	20	9

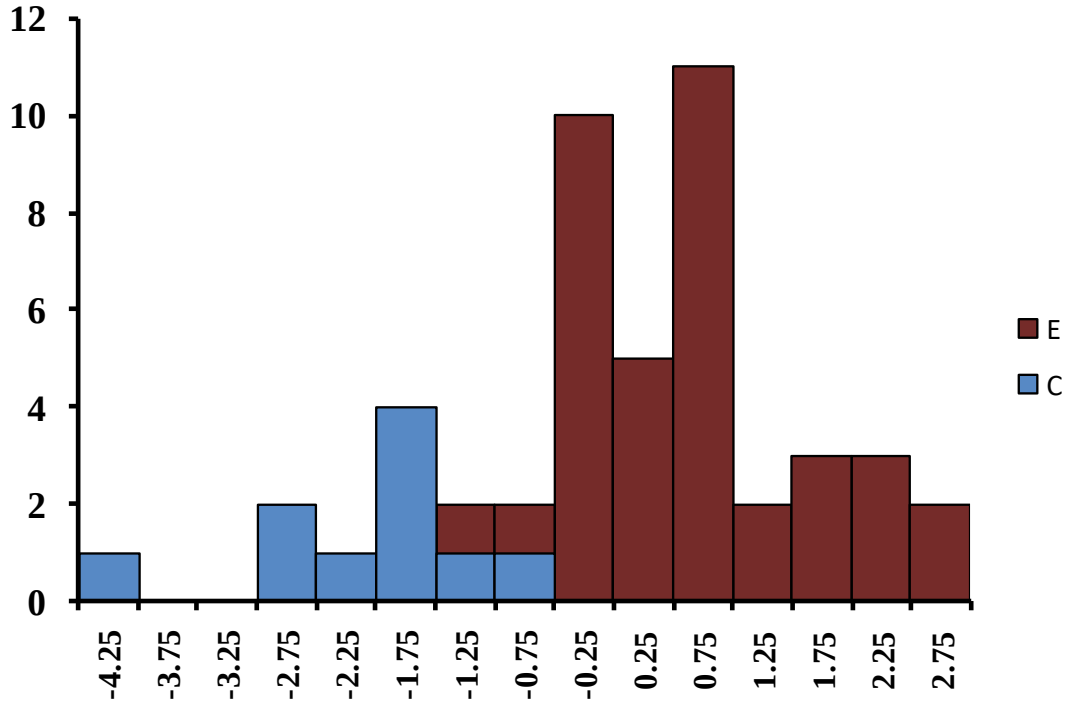
3.4 Επίδραση της λόρδωσης στο σχήμα του σώματος

Πλην όμως της σημαντικής, όπως είδαμε, επίδρασης της άσκησης στο σχήμα του σώματος των φυσιολογικών ατόμων, εξίσου ενδιαφέρον προκαλεί και η επίδραση της λόρδωσης στο σχήμα του σώματος. Για τον σκοπό αυτό, τα άτομα της ομάδας κάθε επανάληψης που υποβλήθηκαν σε άσκηση εντάσεως 8 $TL \cdot s^{-1}$ διακρίθηκαν σε παραμορφωμένα και φυσιολογικά για την παρούσα ανάλυση. Βάση της ανάλυσης με τη μέθοδο της γεωμετρικής μορφομετρίας, η επίδραση της παρατηρούμενης παραμόρφωσης στο σχήμα του σώματος ήταν σημαντική (Wilks' λ=0.4586265, $p<0.05$). Η ανάλυση κανονικών μεταβλητών (CVA) βάσει της διασποράς των ομάδων έδειξε ότι οι ομάδες διακρίνονται πλήρως μεταξύ τους κατά μήκος της πρώτης κανονικής μεταβλητής.

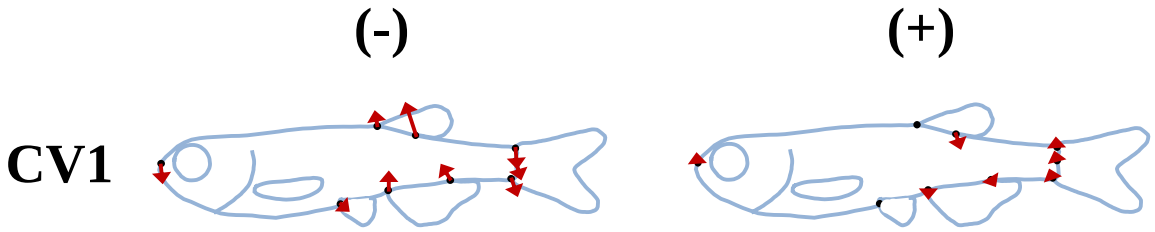
Κατά μήκος της πρώτης κανονικής μεταβλητής (CV1), οι κατανομές των συχνοτήτων παραμορφωμένων και φυσιολογικών ατόμων τείνουν να διαχωρίζονται εμφανώς (Εικόνα 3.9).

Σύμφωνα με τα διαγράμματα συνιστωσών δυνάμεων, συγκρινόμενα με τα άτομα με φυσιολογικό φαινότυπο, τα λορδωτικά διαφοροποιούνται βάσει μίας άνω μετατόπισης

της βάσης του ουραίου πτερυγίου και μίας ταυτόχρονης νωτιαίας μετατόπισης της βάσης των κοιλιακών και του ραχιαίου πτερυγίου (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9 Κατανομή συχνοτήτων των canonical scores για τις δύο υπό εξέταση ομάδες (control – exercised).



Εικόνα 3.10 Διαγράμματα συνιστωσών δυνάμεων που δείχνουν τις αλλαγές στο σχήμα του σώματος κατά μήκος των αξόνων των δύο κανονικών μεταβλητών (x2),.

4 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν οι αλλαγές σε επίπεδο σκελετού και εξωτερικής μορφολογίας, που εμφανίζονται ως απόκριση σε συνθήκες αυξημένης κολυμβητικής άσκησης, σε νύμφες zebrafish κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης. Η κολυμβητική άσκηση φαίνεται να επιδρά σημαντικά στο επίπεδο της σπονδυλικής στήλης με την εμφάνιση της λόρδωσης στην αιματική περιοχή. Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης παραμόρφωσης εμφανίζεται ως χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη, με τη συχνότητα της λόρδωσης να αυξάνεται με την αύξηση τόσο της διάρκειας όσο και της έντασης της κολυμβητικής άσκησης. Παράλληλα, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν πως η κολυμβητική άσκηση επιδρά σημαντικά και στην εξωτερική μορφολογία των φυσιολογικών ατόμων, τείνοντας στη σμίλευση ενός πιο υδροδυναμικού, νωτοκοιλιακά συμπιεσμένου, σχήματος σώματος ιχθύων.

Ο όρος έντονη κολυμβητική άσκηση θα μπορούσε εύκολα να υποπέσει στην εσφαλμένη αντίληψη περί εκτοπισμού πέρα από τα όρια της φυσιολογικής ικανότητας κολύμβησης του είδους. Προκειμένου να αρθεί η αντίληψη αυτή, στο πλαίσιο των ταχυτήτων κολυμβητικής άσκησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (5,.0, 6,5 και 8,0 $TL \cdot s^{-1}$) καλούμαστε να αναφερθούμε στην κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (RU_{crit}) (Brett, 1964). Η σύγκριση της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης του είδους στους 28°C με τις χρησιμοποιούμενες από τον παρόντα πειραματικό σχεδιασμό, προβάλλει ότι ακόμα και η μέγιστη (8,0 $TL \cdot s^{-1}$) επιλεχθείσα ταχύτητα βρίσκεται κάτω από το 50% της ταχύτητας αερόβιας κόπωσης του είδους, που επέρχεται κατά τη μέγιστη παρατεταμένη λήψη οξυγόνου. Αυτό προκύπτει βάση του γνωστικού υπόβαθρου περί αυξημένης ικανότητας παρατεταμένης κολύμβησης του είδους, που κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μπορεί να φτάσει έως τα 18 $SL \cdot s^{-1}$ (Palstra *et al*. 2011, Scott and Johnston 2012, Dimitriadi *et al*. 2018).

Το σημαντικότερο ίσως εύρημα της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη της παραμόρφωσης της λόρδωσης. Μάλιστα, κάνουμε λόγο για αιματική λόρδωση, καθώς για το 100% των λορδωτικών ατόμων, το κέντρο της παρατηρηθείσας παραμόρφωσης βρισκόταν στους πρώτους αιματικούς σπονδύλους. Η αιματική λόρδωση αποτελεί έως σήμερα μία παραμόρφωση με σημαντικές απώλειες για τη σύγχρονη ιχθυοκαλλιέργεια και έχει συσχετιστεί με την παρουσία αυξημένων ρευμάτων (Divanach *et al*. 1997, Sfakianakis *et al*. 2006). Ωστόσο η αιματική λόρδωση που περιγράφεται από τους Divanach *et al*. (1997) στο λαβράκι, καθώς και από τους Kihara *et al*. (2002) στο ιαπωνικό φαγκρί τείνει να έχει διαφορές αλλά και ομοιότητες στην ανατομία από αυτήν που περιγράφεται στην παρούσα εργασία. Πιο συγκεκριμένα, έως τώρα το κέντρο της αιματικής λόρδωσης περιγραφόταν να αναπτύσσεται τόσο μεταξύ δύο διαδοχικών σπονδύλων, όσο και επί ενός μοναδικού αιματικού σπονδύλου, κάτι το οποίο δεν φαίνεται να συμβαίνει στο zebrafish. Η έκταση του κέντρου περιλαμβάνει στο σύνολο των περιπτώσεων δύο σώματα αιματικών σπονδύλων. Οι ανεστραμμένες όμως αποφύσεις δεν είναι καινοτόμος παρατήρηση, καθώς είχαν γίνει αντιληπτές και στο παρελθόν στο λαβράκι (Divanach *et al*. 1997). Όσον αφορά το πιο τραπεζοειδές σχήμα των λορδωτικών σπονδύλων, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συνάδουν με το βιβλιογραφικό σχετικό υπόβαθρο (Divanach *et al*. 1997, Sfakianakis *et al*. 2006).

Έως τώρα γνωρίζουμε ότι η απόκριση των οστών σε φυσικά ερεθίσματα μπορεί να αποτελείται από αλλαγές στο σχήμα ή τη δομή τους (Currey 2003). Η φυσιολογική δομή ενός σπονδύλου τελεόστεου περιλαμβάνει το κεντρικό σώμα του, μία νευρική και

μία αιματική απόφυση. Η οστεοποίηση του κέντρου είναι μεμβρανικής προέλευσης (Liem *et al.* 2001), ενώ οι αποφύσεις περιλαμβάνουν χόνδρινα ενδιάμεσα στάδια (Bird and Mabee, 2003). Η άσκηση είναι ικανή σε πολύ νεαρά νυμφικά στάδια να επιφέρει τροποποιήσεις στις διαδικασίες της σκελετογένεσης (Fiaz *et al.* 2010). Ακόμα, η επίδραση της σε ψάρια που βρίσκονται μετά το στάδιο της μεταμόρφωσης είναι επαρκώς μελετημένη και η ανατομία των αλλαγών που επιφέρει πλήρως καταγεγραμμένη (Totland *et al.* 2011, Suniaga *et al.* 2018). Μάλιστα, οι αλλαγές που λαμβάνουν χώρα σε επίπεδο σπονδύλων ως αποτέλεσμα της εμφάνισης αιματικής λόρδωσης έχουν καταγραφεί λεπτομερώς. Οι κυριότερες αφορούν αλλαγές στο σχήμα, καθώς και την οστέινη μάζα (Kihara *et al.* 2002, Kranenbarg *et al.* 2005). Η λεπτομερής, όμως, καταγραφή των αλλαγών σε σκελετικό επίπεδο που συμβαίνουν κατά τη γένεση της παραμόρφωσης της λόρδωσης αποτελεί πρωτοπορία της συγκεκριμένης εργασίας. Σχεδιάζοντας για πρώτη φορά ένα πείραμα άσκησης που επιτρέπει τον εντοπισμό της λόρδωσης από τα πρώτα στάδια ανάπτυξής της, είμαστε σε θέση να κάνουμε λόγο για τη διαδικασία εμφάνισής της βήμα προς βήμα. Με τη χρήση της αξονικής τομογραφίας παράλληλα με τις ιστολογικές τεχνικές, η συγκεκριμένη εργασία υπογραμμίζει μία χαρακτηριστική αναδίπλωση προς τα έξω των άνω τμημάτων των τελικών πλακών των σπονδύλων που εντοπίζονται στο κέντρο της αιματικής λόρδωσης, σφυρηλατώντας τη βάση των οστέινων αλλαγών σε απόκριση στην άσκηση. Η χαρακτηριστική κάμψη σχήματος V που έχει συνδεθεί άκριτα με τη συγκεκριμένη παραμόρφωση εμπλουτίζεται πλέον από μία γνώση σε ιστολογικό επίπεδο, θέτοντας τα θεμέλια μίας πιο ασφαλούς προσέγγισης των γενεσιουργών μηχανισμών της. Στο σημείο αυτό τίθεται το ερώτημα περί εξέλιξης της συγκεκριμένης παρατήρησης μετά το πέρας της πειραματικής εβδομάδας, που οριοθετήθηκε στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής. Καθώς, όμως, κάνουμε λόγο για ένα είδος με σύντομο βιολογικό κύκλο, η περαιτέρω παρακολούθηση της αναδίπλωσης αυτής δεν θα ήταν ασφαλής, καθώς θα συνέπιπτε με τη μετάβαση στο στάδιο των ιχθυδίων ή και στην απαρχή της διαφοροποίησης των γονάδων των ατόμων, γεγονότα που θα περιέπλεκαν τον αρχικό στόχο.

Καινοτομία της συγκεκριμένης εργασίας υπήρξε και η σύνδεση της εμφάνισης και της συχνότητας της παραμόρφωσης με τον πειραματικό χρόνο. Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με την ένταση της άσκησης, η ανάπτυξη της αιματικής λόρδωσης στο zebrafish γίνεται ορατή μόλις μετά από 2 (5,0 $TL \cdot s^{-1}$) ή 4 (8,0 $TL \cdot s^{-1}$) ημέρες άσκησης. Η in vivo παρακολούθηση των ατόμων επέτρεψε τη σύγκριση της εμφάνισης της παραμόρφωσης μεταξύ των υπό μελέτη εντάσεων άσκησης, αλλά και τη διάκριση της συσσωρευτικής τάσης που φαίνεται να ακολουθεί η λόρδωση με το πέρας του χρόνου. Αναφορικά, λοιπόν, με την εμφάνιση της παραμόρφωσης, αυτή φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με την ένταση της εφαρμοζόμενης άσκησης τείνοντας να μειώνει τον χρόνο εμφάνισης, καθώς κινούμαστε προς υψηλότερες συνθήκες άσκησης. Μάλιστα, αναφορικά με τη συχνότητά της παρατηρήθηκε διττή εξάρτηση από τον χρόνο και την ένταση της άσκησης. Αυξανόμενης της έντασης της άσκησης, αλλά και του πειραματικού χρόνου οι συχνότητες σκαρφαλώνουν σε υψηλότερα επίπεδα σε κάθε πειραματική ταχύτητα. Ωστόσο, το κομμάτι της εξαρτώμενης από την ένταση της υποβληθείσας ταχύτητας συχνότητας της λόρδωσης έχει παρατηρηθεί και στο λαβράκι (Sfakianakis *et al.* 2006). Σύμφωνα με την εργασία αυτή, άτομα λαβρακιού υποβλήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές κολυμβητικές ταχύτητες αντίστοιχες με το 0%, 25%, 50% και 75% της RU_{crit} που αντιστοιχεί στο είδος στις εκάστοτε θερμοκρασίες, εξάγοντας το αποτέλεσμα περί αυξανομένων περιστατικών λόρδωσης με την αύξηση

της έντασης της ταχύτητας. Μάλιστα, υπογραμμίζεται και η αύξηση της έντασης των λορδωτικών περιστατικών από αρχικά σημάδια παραμόρφωσης προς έντονα λορδωτικά όσο κινούμαστε προς την ομάδα που ασκήθηκε στο 75% της RU_{crit}. Παρόμοια αποτελέσματα εξάγονται και από την παρούσα διατριβή, καθώς με την αύξηση της κολυμβητικής έντασης από τα 5,0 $TL \cdot s^{-1}$ προς τα 8,0 $TL \cdot s^{-1}$ τείνουν τα περιστατικά λόρδωσης από ήπια να γίνονται πιο σοβαρά με βάση τις μετρήσεις των γωνιών της παραμόρφωσης. Η οντογενετική διαφοροποίηση της απόκρισης των σπονδύλων έναντι της κολυμβητικής άσκησης θα ήταν ένα ενδιαφέρον ερώτημα για μελλοντική έρευνα.

Και στο σημείο αυτό δημιουργείται εύλογα το ερώτημα περί ορίων ταχύτητας άσκησης για την εισαγωγή της συγκεκριμένης παραμόρφωσης. Βρισκόμενοι πάντα εντός των φυσιολογικών ορίων των ειδών, όπως είδαμε παραπάνω, γνωρίζουμε ότι η λόρδωση δεν εμφανίστηκε σε άτομα φαγκριού 25-40 mm TL που υποβλήθηκαν σε άσκηση εντάσεως 2.0 $TL \cdot s^{-1}$ (Kihara *et al*. 2002), κάτι που βρίσκεται σε συμφωνία με ανάλογα αποτελέσματα στο λαβράκι (Divanach *et al*. 1997). Οι Suniaga *et a*l. 2018 υπέβαλαν ενήλικα zebrafish σε κολυμβητική άσκηση εντάσεως 5,0 $TL \cdot s^{-1}$ επάγοντας αλλαγές στον οστέινο όγκο και το σχήμα των σπονδύλων των ασκούμενων ατόμων. Μάλιστα, παρατήρησαν και αυξημένη παρουσία κυττάρων που συμμετέχουν στον σχηματισμό νέου οστού εντός της ομάδας άσκησης συγκρινόμενης με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου. Με βάση λοιπόν τα παραπάνω δεδομένα, ο πειραματικός σχεδιασμός της παρούσας διατριβής σχεδιάστηκε με κατώτερο όριο τα 5,0 $TL \cdot s^{-1}$ στα οποία έχουν σημειωθεί αναδιαμορφώσεις οστών ως απόκριση στην άσκηση και ανώτερο όριο τα 8,0 $TL \cdot s^{-1}$, ώστε να εφαρμοστούν επίπεδα άσκησης εντός των φυσιολογικών ορίων του είδους.

Έχοντας καθορίσει την άσκηση ως μέσο πρόκλησης αλλαγών σε σκελετικό επίπεδο και πιο συγκεκριμένα πλέον ως μέσο πρόκλησης αιματικής λόρδωσης, καλούμαστε να διεισδύσουμε ένα βήμα πιο πίσω, στον μηχανισμό πρόκλησης των αλλαγών αυτών. Οι Divanach et al. (1997) αποδίδουν την εμφάνιση της παραμόρφωσης στην πιο έντονη μυϊκή δραστηριότητα του οπίσθιου τμήματος των ατόμων λόγω άσκησης. Καθώς το λαβράκι δεν ανήκει στους κολυμβητές υψηλής αερόβιας κολυμβητικής ικανότητας (με μέγιστη RU_{crit} = 8,0 $TL \cdot s^{-1}$, (Koumoundouros *et al*. 2002), έναντι 16 $TL \cdot s^{-1}$ στο zebrafish, (Dimitriadi *et al.* 2018), η κολύμβησή του σε μεγάλες ταχύτητες γρήγορα ενεργοποιεί και λευκές μυϊκές ίνες που χρησιμοποιούν την ενέργεια αναερόβιου μεταβολισμού (Beamish 1979). Έτσι, στην περίπτωση έντονης άσκησης επιστρατεύεται ο ανοξικός μεταβολισμός μέσω του γαλακτικού οξέος, το οποίο μπορεί να δημιουργήσει μεγάλες απαιτήσεις στο κυκλοφορικό σύστημα. Μία εκτεταμένη εμπλοκή στο σύστημα αυτό θα μπορούσε να συσχετιστεί με την εμφάνιση της παραμόρφωσης. Σε συνέχεια αυτής της υπόθεσης, οι Kihara et al. (2002), υπογραμμίζουν τον ασήμαντο ρόλο του ουραίου πτερυγίου στην πρόκληση της αιματικής λόρδωσης. Έχοντας αφαιρέσει τμήμα του ουραίου πτερυγίου και υποβάλλοντας τους ιχθύες σε άσκηση ύστερα από την αφαίρεση αυτή, απόδωσαν την πρόκληση της λόρδωσης στη αυξημένη μυϊκή δραστηριότητα (συχνότητα συσπάσεων ουραίου μίσχου), που απαιτείται για την παραγωγή ώθησης από ένα άτομο χωρίς ουραίο πτερύγιο, και όχι στα άμεσα μηχανικά φορτία του ουραίου πτερυγίου επί της σπονδυλικής στήλης. Δημιουργείται δηλαδή μία αυξημένη κατάσταση μυϊκής ισχύος που εκτονώνεται με τη μορφή αύξησης της ροπής κάμψης και του φορτίου συμπίεσης στον άξονα των ατόμων που γίνονται λορδωτικά. Μάλιστα, υπογραμμίζουν τη θέση του κέντρου της παραμόρφωσης στο σημείο του σώματος που είναι υπεύθυνο για τις κινήσεις της ουράς. Στο είδος *Cyprinus carpio*, οι Backiel *et al.* (1984) έδειξαν ότι τα λορδωτικά άτομα χαρακτηρίζονταν από διαφοροποιημένες μυϊκές

ίνες των πλευρικών μυών και φαινόμενα υπερτοφίας των ινών αυτών που μπορεί να τροποποιήσουν τις τάσεις στα οστά από τους προσφύοντες μύες. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η πρόκληση της αιματικής λόρδωσης στο zebrafish θα μπορούσε να αποδοθεί στην αυξημένη μυϊκή δραστηριότητα λόγω της έντονης άσκησης, και κατ' επέκταση στις αυξημένες τάσεις των μυών επί των σπονδύλων.

Σε ένα επόμενο βήμα, η αυξημένη μυϊκή δραστηριότητα προτείνεται ότι έχει διττή επίδραση στην εμφάνιση λόρδωσης (Kranenbarg *et al*. 2005). Από τη μία η αύξηση των φορτίων στον σκελετό που οδηγεί σε αποτυχία κάμψης του και από την άλλη η μη φυσιολογική ασβεστοποίησή του. Όσον αφορά την πρώτη περίπτωση, καθώς οι ιδιότητες του σκελετού αποτελούν συνάθροιση των πιέσεων που δέχεται από όλα τα επιμέρους στοιχεία του, είναι δυνατόν κατά την ευαίσθητη περίοδο της μετάβασης από τη νωτοχορδή σε μία πιο σκληρή μορφή της σπονδυλικής στήλης, οι αυξημένες πιέσεις λόγω άσκησης να οδηγήσουν σε λόρδωση. Όσον αφορά τη δεύτερη περίπτωση, δυναμικές πιέσεις λόγω άσκησης μπορούν να οδηγήσουν σε προσαρμογές οστών στα αυξημένα μηχανικά φορτία (Turner 1998). Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, οι αλλαγές των οστών σε απόκριση στην άσκηση δεν θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως προσαρμογές, καθώς είναι ορατή η παραμόρφωση των τελικών πλακών των λορδωτικών σπονδύλων. Ακόμα, βάση της αξονικής μικροτομογραφίας, δεν παρατηρήθηκε επιπρόσθετη εναπόθεση οστού στο κύριο σώμα των σπονδύλων, όπως οι πλευρικές προεξοχές που παρατηρήθηκαν από τους Kranenbarg *et al.* (2005) στο λαβράκι.

Σύμφωνα με τους Suniaga *et al*. (2018), οι περιοχές αυξημένου στρες πάνω στη σπονδυλική των ατόμων που υποβλήθηκαν σε άσκηση, αποτελούν κύριες πηγές εστίασης για σχηματισμό νέου οστού. Μάλιστα, στις περιοχές αυτές έχουμε την υψηλότερη συγκέντρωση οστεοκυττάρων για την εκτόνωση του στρες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε σχέση με την παρούσα εργασία συγκεντρώνουν οι παρατηρήσεις αναφορικά με τις ζώνες αύξησης των σπονδύλων ύστερα από άσκηση. Συγκεκριμένα, οι Suniaga *et al.* (2018) παρατήρησαν διπλές ζώνες αύξησης στις τελικές πλάκες των σπονδύλων των ατόμων που ασκήθηκαν σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Η παρατήρηση αυτή δεν αποκλείεται να έχει άμεση σχέση με την εμφάνιση της αιματικής λόρδωσης, όπως περιγράφεται στην παρούσα εργασία. Γίνεται η υπόθεση περί εντοπισμού της απαρχής των αλλαγών λόγω άσκησης στην περιοχή των τελικών πλακών των σπονδύλων της αιματικής περιοχής. Επίσης, διαμορφώνεται η υπόθεση ότι στην περίπτωση εφαρμογής κολυμβητικής άσκησης έως ένα όριο αυτή επάγει αύξηση σχηματισμού οστών και ξεπερνώντας το όριο αυτό έχουμε την εμφάνιση της παραμόρφωσης.

Η εμφάνιση της αιματικής λόρδωσης έχει κατά καιρούς συσχετιστεί με διάφορους περιβαλλοντικούς και μη παράγοντες. Άτομα λαβρακιού, από το στάδιο του αυγού έως τη μεταμόρφωση, υποβλήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες, 15°C και 20°C, και εξετάστηκε η συχνότητα της εμφάνισης της αιματικής λόρδωσης στο στάδιο του ιχθυδίου (Sfakianakis *et al*. 2006). Με τον τρόπο αυτό κατέστη φανερό ότι η θερμοκρασία κατά τα νεαρά αναπτυξιακά στάδια του είδους είναι καθοριστική για την ανάπτυξη της λόρδωσης, με τα ποσοστά της στην περίπτωση των ατόμων από τους 20°C να είναι σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα των 15°C. Μάλιστα, μεταξύ των δύο θερμοκρασιών, υπάρχει διαφοροποίηση και στον αριθμό των συμβαλλόμενων στην λόρδωση σπονδύλων, αλλά και στην ένταση της γωνίας της παραμόρφωσης (Sfakianakis *et al*. 2006). Πέραν όμως της επίδρασης της θερμοκρασίας πρώιμης ανάπτυξης, η απουσία ρετινόλης στη διατροφή των νυμφών λαβρακιού έχει δειχθεί να

ευνοεί την εμφάνιση της αιματικής λόρδωσης στο ακόλουθο στάδιο των ιχθυδίων (Mazurais *et al*. 2009). Τόσο στην περίπτωση της θερμοκρασίας όσο και της διατροφής, η εμφάνιση της παραμόρφωσης αποδόθηκε σε αλλοιωμένη ανάπτυξη των σπονδύλων κατά το νυμφικό στάδιο, οι οποίοι ακολούθως επέδειξαν μειωμένη ανθεκτικότητα έναντι της κολυμβητικής άσκησης. Η υπόθεση περί επαγόμενης μέσω αυτού του μηχανισμού αιματικής λόρδωσης στην περίπτωση της παρούσας εργασίας δεν μπορεί να ευσταθεί, καθώς το σύνολο των ατόμων έλαβε τον ίδιο πειραματικό χειρισμό, κάτω από όμοιες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, διατροφή).

Η αιματική λόρδωση έχει δειχθεί ότι μπορεί να έχει και γενετική βάση (Bardon *et al.* 2009) με δείκτη κληρονομησιμότητας στο λαβράκι της τάξεως του 0.33±0.06. Η πρόκληση αιματικής λόρδωσης στην παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να αποτελεί προϊόν κάποιας γενετικής επίδρασης, καθώς οι πληθυσμοί (και συνεπώς οι ομάδες ελέγχου και άσκησης σε κάθε πειραματική επανάληψη) προέρχονταν από κοινό απόθεμα γεννητόρων, σε κοινές συνθήκες εκτροφής.

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, σε ποικίλα είδη (όπως σολωμός, λαβράκι, zebrafish) παρατηρείται θετική συσχέτιση μεταξύ της άσκησης και του ρυθμού σωματικής αύξησης (Jorgensen and Jobling 1993, Totland et al. 1987, Fiaz *et al.* 2012, Palstra *et al*. 2014). Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε σημαντική, αλλά αρνητική επίδραση της άσκησης στο ρυθμό αύξησης μεταξύ ασκούμενων και μη ατόμων στην περίπτωση των δύο χαμηλότερων κολυμβητικών εντάσεων (5,0 και 6,5 $TL \cdot s^{-1}$). Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση περί συνεπίδρασης της παραμόρφωσης της λόρδωσης από ένα σημείο και μετά, γεγονός που θα μπορούσε να διαστρεβλώνει τα αποτελέσματα. Εναλλακτικά, ενδέχεται να υπάρχει ένα όριο στην επίδραση της εφαρμοζόμενης άσκησης στην αύξηση και σε επίπεδα κατώτερα του ορίου αυτού η άσκηση να είναι ευεργετική στο ρυθμό αύξησης, ενώ στην αντίθετη περίπτωση να έχει αρνητικές επιπτώσεις. Σε κάθε περίπτωση, βέβαια, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα τεχνικού σφάλματος λόγω μικρού μεγέθους πληθυσμού αναφορικά με την εξαγωγή αποτελεσμάτων για την αύξηση, ανοίγοντας πιθανό παράθυρο στο μέλλον για βελτίωση της παρούσας προσέγγισης. Ο μηχανισμός επίδρασης της άσκησης στο ρυθμό αύξησης έχει αποδοθεί, έως τώρα, σε αυξημένη πρόσληψη τροφής, αλλά και βελτιωμένη αξιοποίηση της παρεχόμενης ενέργειας μέσω διατροφής (Davison and Goldspink 1977). Σε μία πιο πρόσφατη εργασία σημειώθηκε μία προσαρμοστική απόκριση των γρήγορων μυών, που οδηγεί σε αυξημένη μυϊκή μάζα μέσω υπερτροφίας (Palstra *et al.* 2014). Οι αλλαγές αυτές σε σηματοδοτικά μονοπάτια αποδόθηκαν σε εκτεταμένες μεταγραφικές αλλαγές λόγω άσκησης. Στα πλαίσια αυτά, προτείνεται στο μέλλον ο εμπλουτισμός του πειραματικού σχεδιασμού της παρούσας εργασίας με μεθόδους που παραμένουν ανεπηρέαστες από την εμφάνιση της παραμόρφωσης (π.χ. βάρος) ή και την ανάλυση του μυοσκελετικού συστήματος ασκούμενων και μη ατόμων με το πέρας της πειραματικής εβδομάδας. Με την εφαρμογή σχετικών τεχνικών θα είμαστε σε θέση να εξάγουμε ασφαλέστερα αποτελέσματα αναφορικά με την επίδραση της άσκησης στον ρυθμό αύξησης σε σχέση με την εικόνα από το ολικό μήκος που λαμβάνουμε τώρα. Επιπρόσθετα, μία ταυτόχρονη διαδικασία εξέτασης των μυϊκών αλλά και σκελετικών αλλαγών θα επιτρέψει πιθανόν τη διάκριση σε βάθος του μηχανισμού γένεσης της αιματικής λόρδωσης.

Αναφορικά με το σχήμα του σώματος, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν τις έως τώρα παρατηρήσεις περί αύξησης της υδροδυναμικότητάς του υπό την επίδραση συνθηκών άσκησης (Grunbaum *et al*. 2007). Κατά την αύξηση της

έντασης της ταχύτητας κολύμβησης δημιουργείται μία διαβάθμιση των χαρακτηριστικών σχετικά με το σχήμα σώματος από ένα πιο ρωμαλέο προς ένα πιο υδροδυναμικό (επίμηκες) πρότυπο (Imre *et al*. 2001, 2002, Pakkasmaa and Piironen 2001). Ωστόσο, η παραπάνω σχέση δεν είναι απόλυτη, καθώς κατά καιρούς έχει παρατηρηθεί αυξημένη πλαστικότητα του συγκεκριμένου χαρακτήρα σε απόκριση στην κολυμβητική άσκηση (Grunbaum *et al.* 2007). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής επιβεβαιώνουν την επίδραση της έντασης της κολυμβητικής άσκησης στο σχήμα του σώματος των φυσιολογικών ατόμων, καθώς σύμφωνα με την ανάλυση κανονικών μεταβλητών, τα άτομα που ανήκουν στην ομάδα υψηλότερης εντάσεως άσκησης (8.0 $TL \cdot s^{-1}$) διακρίθηκαν ξεκάθαρα σε σχέση με εκείνα στις χαμηλότερες ταχύτητες. Οι κύριες διαφορές σχετίζονται με αλλαγές στον κύριο κορμό των ατόμων, συμπέρασμα το οποίο συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία, η οποία προτείνει ένα πιο λεπτό κορμό στα ασκούμενα άτομα, με συχνά μακρύτερα εδρικά και ουραία πτερύγια (Laporte *et al.* 2015). Συνολικά, η τάση προς πιο υδροδυναμικό σχήμα σώματος ως απόρροια άσκησης θα πρέπει να προσεγγίζεται ως μία προσαρμοστική απόκριση, η οποία, όμως, τείνει να περιλαμβάνει περισσότερους από έναν χαρακτήρες (π.χ. πτερύγια) για να μελετηθεί πλήρως. Προσαρμοστική απόκριση του σχήματος σώματος, όμως, δεν είναι, όπως διατυπώθηκε και παραπάνω, η εμφάνιση της αιματικής λόρδωσης. Η επίδραση της συγκεκριμένης παραμόρφωσης στο σχήμα του σώματος σύμφωνα με την παρούσα διατριβή περιλαμβάνει τη χαρακτηριστική και ευρέως καταγεγραμμένη κάμψη στην αιματική περιοχή με μία ανοδική τάση του ρύγχους και του ουραίου πτερυγίου των παραμορφωμένων ατόμων σε σύγκριση με εκείνα με φυσιολογικό φαινότυπο (Sfakianakis *et al*. 2006). Πιο αναλυτικά, βλέπουμε έντονες διαφοροποιήσεις στην οπίσθια κοιλιακή περιοχή του σώματος πλαισιωμένη από την πρόσθια και μεσαία βάση του ραχιαίου πτερυγίου, τη βάση των πλευρικών πτερυγίων, την πρόσθια βάση του εδρικού πτερυγίου και τη βάση του ουραίου πτερυγίου.

Συνολικά, η άσκηση κρίνεται ως αποτελεσματικό μέσο πρόκλησης αλλαγών στο σκελετό και την εξωτερική μορφολογία του zebrafish (παρούσα εργασία). Σε ένα επόμενο βήμα, αν προσεγγίσουμε την κολυμβητική άσκηση ως μέσο πρόκλησης σκελετικών παραμορφώσεων, μπορούμε να αναγνωρίσουμε μία επιτυχημένη προσπάθεια που θέτει ένα πολλά υποσχόμενο υπόβαθρο αναφορικά με τη βιολογία των οστών. Έως τώρα, η κατευθυνόμενη πρόκληση σκελετικών παραμορφώσεων, σε εργαστηριακές συνθήκες, έχει επιχειρηθεί είτε σε νεαρά αναπτυξιακά στάδια μέσω χορήγησης ρετινοϊκού οξέος ή ρετινόλης (π.χ. Mazurais *et al*. 2009), είτε σε μεταγενέστερη ηλικία μέσω χειρουργικών επεμβάσεων ή εφαρμογής κάποιου είδους μηχανικού κηδεμόνα (Fjelldal *et al.* 2004). Στην πρώτη περίπτωση, με τη χορήγηση ρετινόλης ή του αντίστοιχου οξέος, που είναι ο κύριος μεταβολίτης της βιταμίνης Α, έχουν παρατηρηθεί συμπιέσεις σπονδύλων (Takeuchi *et al*. 1998), καθώς και αλλαγές στα οστά του κρανίου σε ιχθύες (Emmanouil-Nikoloussp *et al*. 2000). Ωστόσο, ο μηχανισμός πίσω από τις αλλαγές αυτές σχετίζεται με τροποποιημένο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης και ανάπτυξης, το οποίο ωστόσο επιφέρει γενικευμένες αλλαγές του σκελετού, τροποποιώντας συνολικά τον οργανισμό (Haga *et al*. 2011). Προβλήματα, όμως, παρουσιάζει και η προσέγγιση μέσω χειρουργικής αφαίρεσης της απόφυσης, καθώς πέρα από τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που ακολουθούν τις επόμενες μέρες από την εκτομή (Fjelldal *et al*. 2004), ο ρόλος της υπόφυσης στους ιχθύες δεν είναι σαφώς καθορισμένος (Mayer 2000). Στον αντίποδα, η πρόκληση παραμορφώσεων της σπονδυλικής στήλης ως απόκριση στην κολυμβητική άσκηση είναι πολλά υποσχόμενη. Για πρώτη φορά μάλιστα στην παρούσα εργασία, προτείνεται

ένα σαφώς καθορισμένο πρωτόκολλο άσκησης για την πρόκληση αιματικής λόρδωσης στο zebrafish. Στην παρούσα εργασία, η θνησιμότητα λόγω κολυμβητικής άσκησης ήταν μηδενική στο σύνολο της πειραματικής διαδικασίας. Επιπρόσθετα, η προτεινόμενη μέθοδος δεν υπερβαίνει τα φυσιολογικά όρια του είδους και συνεπώς δεν αντιβαίνει στους κανόνες ευζωίας των πειραματόζωων. Από την άλλη, η αποσαφήνιση των αλλαγών στο μυοσκελετικό σύστημα του συγκεκριμένου οργανισμού μοντέλου δεν εγείρει προβλήματα, καθώς είναι επαρκώς μελετημένος και εύκολα διαχωρίσιμος οργανισμός (Spence *et al.* 2008). Ταυτόχρονα με την πολύ σύντομη από χρονικής απόψεως πειραματική διαδικασία, συντίθεται ένα μοναδικό πλαίσιο για τη μελέτη των σκελετικών παραμορφώσεων στη γένεσή τους και την αποσαφήνιση των μηχανισμών πίσω από αυτές. Σύμφωνα μάλιστα με τους Fragkoulis *et al.* (2019), γνωρίζουμε ότι υπάρχει ικανότητα επιδιόρθωσης της παραμόρφωσης της λόρδωσης με την αύξηση του μεγέθους των ατόμων τσιπούρας. Η γνώση αυτή σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορεί να αποτελέσει ένα υπόβαθρο για αναγωγή του zebrafish σε οργανισμό μοντέλο για τη σκελετική βιολογία, αποσαφηνίζοντας πλήρως τις ικανότητες των οστών για αναδιαμορφώσεις προς κάθε κατεύθυνση (παραμόρφωση ή επιδιόρθωσή της). Δεν θα πρέπει να ξεχνάμε ότι το υπό μελέτη είδος ανήκει στα σπονδυλωτά, άρα η σημασία των αποτελεσμάτων αυτών δεν θα περιορίζεται στα όρια των τελεόστεων.

5 Βιβλιογραφία

Adams, G. R. (1998). "Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skeletal muscle adaptation to increased loading." Exercise and sport sciences reviews 26: 31-60.

AMUNDSEN, P. A., et al. (2007). "Intraspecific competition and density dependence of food consumption and growth in Arctic charr." Journal of Animal Ecology 76(1): 149-158.

Andrades, J., et al. (1996). "Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)." Aquaculture 141(1-2): 1-11.

Barahona-Fernandes, M. (1982). "Body deformation in hatchery reared European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L). Types, prevalence and effect on fish survival." Journal of Fish Biology 21(3): 239-249.

Bardon, A., et al. (2009). "What is the heritable component of spinal deformities in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)?" Aquaculture 294(3): 194-201.

Beamish, F. W. H. (1978). "Swimming Capacity." Fish Physiology 7: 101-187.

Beldade, P., et al. (2011). "Evolution and molecular mechanisms of adaptive developmental plasticity." Molecular Ecology 20(7): 1347-1363.

Bird, N. C. and P. M. Mabee (2003). "Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae)." Developmental dynamics 228(3): 337-357.

Bobyn, J., et al. (2014). "Maximizing bone formation in posterior spine fusion using rhBMP-2 and zoledronic acid in wild type and NF1 deficient mice." Journal of Orthopaedic Research 32(8): 1090-1094.

Boglione, C., et al. (2001). "Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758)." Aquaculture 192(1): 1-22.

Boglione, C., et al. (2013). "Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors." Reviews in Aquaculture 5: S121-S167.

Boglione, C., et al. (1995). Skeletal anomalies in *Dicentrarchus labrax* juveniles selected for functional swimbladder. ICES Mar. Sci. Symp.

Boswell, C. W. and B. Ciruna (2017). "Understanding Idiopathic Scoliosis: A New Zebrafish School of Thought." Trends in Genetics 33(3): 183-196.

Brett, J. R. (1964). "The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon." Journal of the Fisheries Research Board of Canada 21(5): 1183-1226.

Burggren, W. and B. Dubansky (2018). Development and environment, Springer.

Chang, N., et al. (2013). "Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos." Cell Research 23: 465.

Chatain, B. (1994). "Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (Dicentrarchus labrax) and sea bream (*Sparus auratus*)." Aquaculture 119(4): 371-379.

Chatain, B. and G. Dewavrin (1989). "Influence des anomalies de développement de la vessie natatoire sur la mortalité de *Dicentrarchus labra*x au cours du sevrage." Aquaculture 78(1): 55-61.

Chilibeck, P. D., et al. (1995). "Exercise and Bone Mineral Density." Sports Medicine 19(2): 103-122.

Clausen, J. P. (1977). "Effect of physical training on cardiovascular adjustments to exercise in man." Physiological Reviews 57(4): 779-815.

Cobcroft, J., et al. (2001). "Jaw development and malformation in cultured striped trumpeter *Latris lineata*." Aquaculture 199(3-4): 267-282.

Currey, J. (2003). "The many adaptations of bone." Journal of biomechanics 36(10): 1487-1495.

Daniels, R. J. R. (2002). Freshwater Fishes of Peninsular India, Universities Press.

Davison, W. and G. Goldspink (1977). "The Effect of Prolonged Exercise on the Lateral Musculature of the Brown Trout (*Salmo Trutta)."* Journal of Experimental Biology 70(1): 1-12.

Davison, W. and N. A. Herbert (2013). Swimming-Enhanced Growth. Swimming Physiology of Fish: Towards Using Exercise to Farm a Fit Fish in Sustainable Aquaculture. A. P. Palstra and J. V. Planas. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 177-202.

Dawson, C. (1966). "A bibliography of anomalies of fishes, supplement 1." Gulf and Caribbean Research 2(2): 169-176.

Dawson, C. (1971). "A bibliography of anomalies of fishes, supplement 2." Gulf and Caribbean Research 3(2): 215-239.

Dawson, C. and E. Heal (1976). "A bibliography of anomalies of fishes: Supplement 3." Gulf and Caribbean Research 5(2): 35-41.

Dawson, C. E. (1964). "A bibliography of anomalies of fishes." Gulf and Caribbean Research 1(6): 308-399.

Dimitriadi, A., et al. (2018). "Developmental temperature has persistent, sexually dimorphic effects on zebrafish cardiac anatomy." Scientific reports 8(1): 8125.

Divanach, P., et al. (1997). "Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase." Aquaculture 156(1-2): 145-155.

Du, S. J., et al. (2001). "Visualizing Normal and Defective Bone Development in Zebrafish Embryos Using the Fluorescent Chromophore Calcein." Developmental Biology 238(2): 239-246.

Emmanouil-Nikoloussp, E. N., et al. (2000). "Craniofacial abnormalities induced by retinoic acid: a preliminary histological and scanning electron microscopic (SEM) study." Experimental and Toxicologic Pathology 52(5): 445-453.

Fiaz, A., et al. (2010). "Phenotypic plasticity and mechano-transduction in the teleost skeleton." Journal of Applied Ichthyology 26(2): 289-293.

Fiaz, A. W., et al. (2012). "Swim-Training Changes the Spatio-Temporal Dynamics of Skeletogenesis in Zebrafish Larvae (*Danio rerio*)." PLoS One 7(4): e34072.

Fjelldal, P. G., et al. (2004). "Pinealectomy induces malformation of the spine and reduces the mechanical strength of the vertebrae in Atlantic salmon, *Salmo salar*." Journal of Pineal Research 36(2): 132-139.

Fowler, J. A. (1970). "Control of vertebral number in teleosts-an embryological problem." The Quarterly Review of Biology 45(2): 148-167.

Fragkoulis, S., et al. (2017). "Saddleback syndrome in E uropean sea bass *D icentrarchus labrax* (L innaeus, 1758): anatomy, ontogeny and correlation with lateral-line, anal and pelvic fin abnormalities." Journal of fish diseases 40(1): 83-95.

Fragkoulis, S., et al. (2019). "Recovery of haemal lordosis in Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)." Scientific reports 9(1): 9832.

Georga, I. and G. Koumoundouros (2010). "Thermally induced plasticity of body shape in adult zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822)." Journal of morphology 271(11): 1319-1327.

Georgakopoulou, E., et al. (2007). "The influence of temperature during early life on phenotypic expression at later ontogenetic stages in sea bass." Journal of Fish Biology 70(1): 278-291.

Gorman, K. F. and F. Breden (2009). "Idiopathic-type scoliosis is not exclusive to bipedalism." Medical Hypotheses 72(3): 348-352.

Grünbaum, T. and R. Cloutier (2010). "Ontogeny, variation, and homology in *Salvelinus alpinus* caudal skeleton (Teleostei: Salmonidae)." Journal of morphology 271(1): 12-24.

Grünbaum, T., et al. (2007). "Early developmental plasticity and integrative responses in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): effects of water velocity on body size and shape." Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 308B(4): 396-408.

Grünbaum, T., et al. (2012). "Dynamic skeletogenesis in fishes: insight of exercise training on developmental plasticity." Developmental dynamics 241(10): 1507-1524.

Haga, Y., et al. (2011). "Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bone deformity model." Aquaculture 315(1): 26-33.

Hakkarainen, S. (1981). "Experimental Scoliosis: Production of Structural Scoliosis by Immobilization of Young Rabbits in a Scoliotic Position." Acta Orthopaedica Scandinavica 52(sup192): 1-57.

Hall, B. K. (2005). Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology, Elsevier.

Hall, B. K. and P. Witten (2007). "Plasticity of and transitions between skeletal tissues in vertebrate evolution and development." Major transitions in vertebrate evolution: 13-56.

Hall, B. K. and P. E. Witten (2018). "7 Plasticity and Variation of Skeletal Cells and Tissues and the Evolutionary Development of Actinopterygian Fishes." Evolution and Development of Fishes: 126.

Hammer, C. (1995). "Fatigue and exercise tests with fish." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 112(1): 1-20.

Herbing, I. H. V., et al. (1996). "Ontogeny of feeding and respiration in larval Atlantic cod *Gadus morhua* (Teleostei, Gadiformes): I. Morphology." Journal of morphology 227(1): 15-35.

Holloszy, J. O. and F. W. Booth (1976). "Biochemical Adaptations to Endurance Exercise in Muscle." Annual Review of Physiology 38(1): 273-291.

Hsiao, C.-D. and H.-J. Tsai (2003). "Transgenic zebrafish with fluorescent germ cell: a useful tool to visualize germ cell proliferation and juvenile hermaphroditism in vivo." Developmental Biology 262(2): 313-323.

Huysseune, A. (1995). "Phenotypic plasticity in the lower pharyngeal jaw dentition of *Astatoreochromis alluaudi* (Teleostei: Cichlidae)." Archives of Oral Biology 40(11): 1005-1014.

Imre, I., et al. (2001). "Temporal Persistence of Resource Polymorphism in Brook Charr, *Salvelinus Fontinalis*." Environmental Biology of Fishes 60(4): 393-399.

Imre, I. n., et al. (2002). "The effect of visual isolation on territory size and population density of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 59(2): 303-309.

Iwasaki, T., et al. (2017). "Swim bladder inflation as a possible cause of saddleback-like syndrome malformation in hatchery-reared red spotted grouper *Epinephelus akaara*." Fisheries science 83(3): 447-454.

J. I. Rodríguez, A. G.-A., J. Palacios, R. Paniagua (1988). "Changes in the long bones due to fetal immobility caused by neuromuscular disease. A radiographic and histological study." J Bone Joint Surg Am. 170(7): 1052–1060.

Jain, R. K. and T. Vokes (2019). "Physical activity as measured by accelerometer in NHANES 2005–2006 is associated with better bone density and trabecular bone score in older adults." Archives of Osteoporosis 14(1): 29.

Jansen, M. J., et al. (2011). "Strength training alone, exercise therapy alone, and exercise therapy with passive manual mobilisation each reduce pain and disability in people with knee osteoarthritis: a systematic review." Journal of Physiotherapy 57(1): 11-20.

Janssen, M. M. A., et al. (2011). "Experimental animal models in scoliosis research: a review of the literature." The Spine Journal 11(4): 347-358.

Johnston, I. A. (2006). "Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish." Journal of Experimental Biology 209(12): 2249-2264.

Jørgensen, E. H. and M. Jobling (1993). "The effects of exercise on growth, food utilisation and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*." Aquaculture 116(2): 233-246.

Kihara, M., et al. (2002). "Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity." Aquaculture 212(1-4): 149-158.

Kimmel, C. B., et al. (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." Developmental dynamics 203(3): 253-310.

Koumoundouros, G. (2010). "Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture." Recent advances in aquaculture research 66: 125-148.

Koumoundouros, G., et al. (2004). "The rearing of common dentex *Dentex dentex* (L.) during the hatchery and on-growing phases." Aquaculture 240(1-4): 165-173.

Koumoundouros, G., et al. (2001). "Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." Marine Biology 139(5): 817-830

Koumoundouros, G., et al. (1999). "Ontogeny and allometric plasticity of *Dentex dentex* (Osteichthyes: Sparidae) in rearing conditions." Marine Biology 135(3): 561-572.

Koumoundouros, G., et al. (2001). "The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.)." Aquaculture 200(3-4): 285-304.

Koumoundouros, G., et al. (2002). "Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality." Aquaculture 209(1-4): 49-58.

Koumoundouros, G., et al. (1997). "The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description." Aquaculture 156(1-2): 165-177.

Koumoundouros, G., et al. (2002). "Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles." Journal of Fish Biology 60(4): 923-932.

Kranenbarg, S., et al. (2005). "Adaptive bone formation in acellular vertebrae of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)." Journal of Experimental Biology 208(18): 3493-3502.

Kranenbarg, S., et al. (2005). "Lordotic vertebrae in sea bass (*Dicentrarchus labrax L*.) are adapted to increased loads." Journal of biomechanics 38(6): 1239-1246.

Laporte, M., et al. (2015). "Genetic structure of a vulnerable species, the freshwater blenny (*Salaria fluviatilis*)." Conservation Genetics 16(3): 571-581.

Lawrence, C. (2007). "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review." Aquaculture 269(1): 1-20.

Liem, K. F. (2001). Functional Anatomy of the Vertebrates: An Evolutionary Perspective, Harcourt College Publishers.

Lindsey, P., et al. (1998). "Recycled landscape irrigation water and ornamental plant compatibility study."

Loizides, M., et al. (2014). "A new type of lordosis and vertebral body compression in Gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.: aetiology, anatomy and consequences for survival." Journal of fish diseases 37(11): 949-957.

Machida, M., et al. (1993). "An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis." Spine 18(12): 1609-1615.

Magnan, P., et al. (2014). "Morphological variation in the freshwater blenny *Salaria fluviatilis* from Corsican rivers: adaptive divergence, phenotypic plasticity or both?" Journal of Fish Biology 84(1): 31-44.

Marks, C., et al. (2005). "Developmental environment alters conditional aggression in zebrafish." Copeia 2005(4): 901-908.

Martin, C. I. and I. A. Johnston (2005). "The role of myostatin and the calcineurin-signalling pathway in regulating muscle mass in response to exercise training in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Walbaum." Journal of Experimental Biology 208(11): 2083-2090.

Mayer, I. (2000). "Effect of long-term pinealectomy on growth and precocious maturationin Atlantic salmon, *Salmo salar* parr." Aquatic Living Resources 13(3): 139-144.

Mazurais, D., et al. (2009). "Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type." Aquaculture 294(3): 262-270.

Meyers, S. (1987). "Aquaculture feeds and chemoattractants." Infofish Marketing Digest 1(87): 35-37

Middlemis Maher, J., et al. (2013). "Stress hormones mediate predator-induced phenotypic plasticity in amphibian tadpoles." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 280(1758): 20123075.

Nelson, J. A., et al. (2015). "Repeatability and phenotypic plasticity of fish swimming performance across a gradient of urbanization." Environmental Biology of Fishes 98(5): 1431-1447.

Nelson, J. S., et al. (2016). Fishes of the World, Wiley.

Nicoglou, A. (2015). Phenotypic plasticity: from microevolution to macroevolution. Handbook of evolutionary thinking in the sciences, Springer: 285-318.

Nusslein-Volhard, C. and R. Dahm (2002). Zebrafish, OUP Oxford.

Oufiero, C. E. and K. R. Whitlow (2016). "The evolution of phenotypic plasticity in fish swimming." Current zoology 62(5): 475-488.

PAKKASMAA, S. and J. PIIRONEN (2008). "Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations." Biological Journal of the Linnean Society 72(2): 231-239.

Palstra, A. P. and J. V. Planas (2011). "Fish under exercise." Fish Physiology and Biochemistry 37(2): 259-272.

Palstra, A. P. and J. V. Planas (2012). Swimming Physiology of Fish: Towards Using Exercise to Farm a Fit Fish in Sustainable Aquaculture, Springer Berlin Heidelberg.

Palstra, A. P., et al. (2014). "Swimming-induced exercise promotes hypertrophy and vascularization of fast skeletal muscle fibres and activation of myogenic and angiogenic transcriptional programs in adult zebrafish." Bmc Genomics 15(1): 1136.

Palstra, A. P., et al. (2011). "Establishing Zebrafish as a Novel Exercise Model: Swimming Economy, Swimming-Enhanced Growth and Muscle Growth Marker Gene Expression." PLoS One 5(12): e14483.

Parichy, D. M., et al. (2009). "Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish." Developmental dynamics 238(12): 2975-3015.

Parsons, K. J., et al. (2014). "Wnt signalling underlies the evolution of new phenotypes and craniofacial variability in Lake Malawi cichlids." Nature communications 5: 3629.

Paszkowski, C. A., et al. (1990). Behavioral and population-level aspects of intraspecific competition in crucian carp. Annales Zoologici Fennici, JSTOR.

Peres-Neto, P. R. and P. Magnan (2004). "The influence of swimming demand on phenotypic plasticity and morphological integration: a comparison of two polymorphic charr species." Oecologia 140(1): 36-45.

Pigliucci, M. (2001). Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture, JHU Press.

Plaut, I. (2001). "Critical swimming speed: its ecological relevance." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 131(1): 41-50.

Ricker, W. E. (1979). "Growth rates and models." Fish Physiology: 673-743.

Rohlf FJ. (2013b) tpsDig, version 2.17. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.

Rosimini, C. (2003). "Benefits of Swim Training for Children and Adolescents with Asthma." Journal of the American Academy of Nurse Practitioners 15(6): 247-252.

Ruff, C., et al. (2006). "Who's afraid of the big bad Wolff?:“Wolff's law” and bone functional adaptation." American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists 129(4): 484-498.

Schindel, C. S., et al. (2015). "Physical Exercise Recommendations Improve Postural Changes Found in Children and Adolescents with Cystic Fibrosis: A Randomized Controlled Trial." The Journal of Pediatrics 166(3): 710-716.e712.

Scott, G. R. and I. A. Johnston (2012). "Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish." Proceedings of the National Academy of Sciences 109(35): 14247-14252.

Selman, K., et al. (1993). "Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*." Journal of morphology 218(2): 203-224.

Sfakianakis, D., et al. (2006). "Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)." Aquaculture 254(1-4): 54-64.

Sfakianakis, D., et al. (2003). "Development of a saddleback-like syndrome in reared white seabream *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758)." Aquaculture 217(1-4): 673-676.

Sfakianakis, D. G., et al. (2011). "The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles." Environmental Biology of Fishes 92(2): 197.

Sokal, R. R. and F. J. Rohlf (1981). Biometry.

Spence, R., et al. (2006). "The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh." Journal of Fish Biology 69(5): 1435-1448.

Spence, R., et al. (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*." Biological Reviews 83(1): 13-34.

Spence, R. and C. Smith (2006). "Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance." Behavioral Ecology 17(5): 779-783.

Suniaga, S., et al. (2018). "Increased mechanical loading through controlled swimming exercise induces bone formation and mineralization in adult zebrafish." Scientific reports 8(1): 3646.

Takeuchi, T., et al. (1998). "Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)." Aquaculture 169(3): 155-165.

Totland, G. K., et al. (2011). "Sustained swimming increases the mineral content and osteocyte density of salmon vertebral bone." Journal of Anatomy 219(4): 490-501.

Totland, G. K., et al. (1987). "Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) during long-term sustained swimming." Aquaculture 66(3): 299-313.

Tsang, et al. (2017). "Breeding Zebrafish: A Review of Different Methods and a Discussion on Standardization." Zebrafish 14(6): 561-573.

Turner, C. H. (1998). "Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli." Bone 23(5): 399-407.

Videler, J. J. (2012). Fish Swimming, Springer Netherlands.

Villeneuve, L., et al. (2005). "Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae." British Journal of Nutrition 93(6): 791-801.

Vulesevic, B. and S. Perry (2006). "Developmental plasticity of ventilatory control in zebrafish, *Danio rerio*." Respiratory physiology & neurobiology 154(3): 396-405.

Walker, M. and C. Kimmel (2007). "A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae." Biotechnic & Histochemistry 82(1): 23-28.

Westerfield, M. (2000). The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio Rerio*), University of Oregon Press.

Witten, P. E., et al. (2001). "Features of mono- and multinucleated bone resorbing cells of the zebrafish *Danio rerio* and their contribution to skeletal development, remodeling, and growth." Journal of morphology 250(3): 197-207.

Witten, P. E. and A. Huysseune (2009). "A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function." Biological Reviews 84(2): 315-346.

Witten, P. E., et al. (2006). "Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): development, aggravation and pathways of containment." Aquaculture 258(1-4): 164-172.

Zaina, F. and S. Negrini (2015). "Letter to the Editor concerning: “Reliability and validity of non-radiographic methods of thoracic kyphosis measurement: A systematic review.” by Barrett E, McCreesh K, Lewis J. Man Ther. 2014 Feb; 19(1):10–7." Manual Therapy 20(2): e5.

Δημητριάδη Ν. (2018). "Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην καρδιά, στην κολυμβητική ικανότητα και στη γονιμότητα του zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822). Διδακτορική διατριβή.