

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ- ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ  
ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Ενδοκρινική ρύθμιση της αναστροφής του φύλου στην τσιπούρα (*Sparus aurata*): ο ρόλος των θυρεοειδικών ορμονών»



Αποστολίδη Κωστίτσα

Ηράκλειο 2007

**Επιβλέπων:**

**Παυλίδης Μιχάλης, Επίκουρος καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.**

**Εξεταστής:**

**Μυλωνάς Κωνσταντίνος, Ερευνητής Β', ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Περιβαλλοντική Βιολογία-Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων.

Πρώτα απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης Μιχάλη Παυλίδη, για την ανάθεση της εργασίας, την επιστημονική του καθοδήγηση αλλά και τη συνεχή στήριξη και βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής της εργασίας αυτής. Επίσης, ευχαριστώ τον Κωνσταντίνο Μυλωνά, Ερευνητή Β' του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. που δέχθηκε να αποτελέσει μέλος της εξεταστικής επιτροπής, για την παραχώρηση των εγκαταστάσεων του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. όπου πραγματοποιήθηκε ένα μέρος της εργασίας αυτής, όπως επίσης για τις διορθώσεις και τα χρήσιμα σχόλια.

Ευχαριστώ τη Vera Szisch για τη βοήθειά της στις δειγματοληψίες και σε ότι άλλο χρειάστηκε π.χ στη μέθοδο προσδιορισμού των θυρεοειδικών ορμονών. Τη Μαρία Παπαδάκη και την Ειρήνη Συγγελάκη ευχαριστώ για τη βοήθειά τους στις δειγματοληψίες και στην επεξεργασία των ιστολογικών τομών. Επίσης ευχαριστώ την Κωνσταντίνα Κοκκάρη για τη βοήθεια της στη χρήση του γ-counter.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τις φίλες μου Μαρίνα Κονσολάκη και Ελευθερία Φανουράκη για την κάθε είδους συμπαράσταση και βοήθεια που μου προσέφεραν, όπως επίσης και για την υπομονή τους.... Ευχαριστώ επίσης τον Γρηγόρη Σκουραδάκη για τη βοήθειά του.

Ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου για τη στήριξή τους με κάθε τρόπο σ' όλες μου τις επιλογές. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τη Χρυσάνθη Αποστολίδη και τον μικρό αδελφό της, για το δικό τους μοναδικό τρόπο να μου δίνουν δύναμη.

Τέλος, στον σύζυγο μου Γιώργο Ντουκάκη οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την υπομονή που κατέδειξε όλο αυτό το διάστημα αλλά και για την ανεξάντλητη στήριξή του.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Στοιχεία βιογεωγραφίας και αναπαραγωγής της τσιπούρας ( <i>Sparus aurata</i> , Linnaeus, 1758) .....	1
1.2. Η αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα.....	3
1.2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την αναστροφή του φύλου.....	6
1.3. Δομή και δράση των θυρεοειδικών ορμονών στα ψάρια.....	7
1.3.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία του άξονα HPT.....	13
1.3.2. Ο ρόλος των θυρεοειδικών ορμονών στη φυσιολογία των ψαριών.....	15
1.3.3. Αντιθυρεοειδικά φάρμακα.....	17
1.4. Σκοπός της εργασίας.....	18

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα.....	20
2.1.1. Ψάρια και πειραματικές συνθήκες.....	20
2.1.2. Ιστολογική επεξεργασία των γονάδων και εκτίμηση του ποσοστού ορχικού και ωθητικού ιστού.....	21
2.2. Προσδιορισμός των θυρεοειδικών ορμονών.....	22
2.2.1. Εκχύλιση των θυρεοειδικών ορμονών από τους ιστούς.....	22
2.2.2. Ραδιοανοσοανάλυση (RIA).....	23
2.2.3. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων.....	25
2.2.4. Αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού των θυρεοειδικών ορμονών...	25
2.3. Επίδραση του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου methimazole στην περιφερική ρύθμιση του θυρεοειδή και στην αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.....	29
2.3.1. Ψάρια και πειραματικές συνθήκες.....	29
2.3.2. Αναλυτικοί προσδιορισμοί.....	30
2.4. Στατιστική ανάλυση.....	32

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα.....	33
3.1.1. Βάρος σώματος και γοναδοσωματικός δείκτης.....	33
3.1.2. Εποχιακή μεταβολή του ποσοστού ωθητικού/ορχικού ιστού.....	33
3.1.3. Εποχιακή μεταβολή στην αναλογία φύλου.....	40

3.2. Εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς της τσιπούρας.....	42
3.2.1. Συγκεντρώσεις των θυρεοειδικών ορμονών στις γονάδες πριν την έναρξη της πρώτης περιόδου ωοτοκίας.....	46
3.2.2. Σύγκριση των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς.....	46
3.2.3. Ο λόγος $\ln (T_4/T_3)$ .....	47
3.3. Μεταβολές των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών κατά την αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.....	49
3.3.1. Συγκεντρώσεις των θυρεοειδικών ορμονών στις γονάδες ατόμων τσιπούρας (φάση Φ1 και Φ2) πριν την έναρξη της πρώτης περιόδου ωοτοκίας.....	53
3.3.2. Ο λόγος $\ln (T_4/T_3)$ .....	54
3.4. Επίδραση του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου methimazole στην περιφερική ρύθμιση του θυρεοειδή και στην αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.....	57
3.4.1. Επίδραση του methimazole στη γενική κατάσταση των ψαριών.....	57
3.4.2. Επίδραση του methimazole στην αναστροφή του φύλου.....	57
3.4.3. Εκτίμηση της καταπόνησης των ψαριών.....	58
3.4.4. Επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς.....	59

#### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

4.1. Αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα.....	63
4.2. Εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς της τσιπούρας .....	64
4.3. Μεταβολές των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών κατά την αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.....	70
4.4. Επίδραση του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου methimazole στην περιφερική ρύθμιση του θυρεοειδή και στην αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.....	73
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	76
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	78
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</b> .....	82
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ</b> .....	83
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	84

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Σήμερα η χώρα μας κατέχει την πρώτη θέση στην Ευρωπαϊκή Ένωση στην καλλιέργεια Μεσογειακών θαλασσινών ψαριών. Συγκεντρωτικά, η Ελλάδα παράγει το ήμισυ της Ευρωπαϊκής παραγωγής στα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη που είναι η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*). Η ετήσια παραγωγή της τσιπούρας έφτασε το 2002 στην περιοχή της Μεσογείου, τους 80.421 τόνους (F.E.A.P., 2002).

### 1.1. Στοιχεία βιογεωγραφίας και αναπαραγωγής της τσιπούρας (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758).

Η τσιπούρα από την πλευρά της συστηματικής ταξινόμησης, ανήκει στην οικογένεια των Σπαροειδών (Πίνακας 1.1). Η οικογένεια αυτή είναι μια από τις πιο μεγάλες των τελεόστεων, όπου η τσιπούρα μαζί με τα υπόλοιπα 20 είδη τα οποία την απαρτίζουν και τα οποία συναντάμε σήμερα στις ελληνικές θάλασσες, σχηματίζουν από μορφολογική άποψη ένα αρκετά ομοιογενές σύνολο με χαρακτηριστικά γνωρίσματα, το υψηλό και συμπιεσμένο πλευρικό σώμα, τα μεγάλα κτενοειδή λέπια, ένα και μοναδικό ραχιαίο πτερύγιο, το οποίο εν μέρει αποτελείται από ακανθώδεις ακτίνες και ένα διχλωτό (ομόκεντρο) ουραίο πτερύγιο.

**Πίνακας 1.1.** Συστηματική κατάταξη της τσιπούρας (D' Ancona, 1949).

	<b>ΑΓΓΛΙΚΑ</b>	<b>ΕΛΛΗΝΙΚΑ</b>
<b>ΦΥΛΟ</b>	Chordata	Χορδωτά
<b>Ομάδα</b>	Vertebrata	Σπονδυλωτά
<b>Υποφύλο</b>	Gnathostomata	Γναθόστομα
<b>Υπερκλάση</b>	Pisces	Ιχθύες
<b>ΚΛΑΣΗ</b>	Osteichthyes	Οστέιχθες
<b>Υποκλάση</b>	Actinopterygii	Ακτινοπτερύγιοι
<b>Υπερτάξη</b>	Teleostei	Τελεόστεοι
<b>ΤΑΞΗ</b>	Perciformes	Περκόφορμοι
<b>Υποτάξη</b>	Percoidei	Περκοειδή
<b>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ</b>	Sparidae	Σπαροειδή
<b>ΓΕΝΟΣ</b>	Sparus	
<b>ΕΙΔΟΣ</b>	<i>Sparus aurata</i>	
<b>Κοινό όνομα</b>	Gilthead seabream	Τσιπούρα

Το σώμα της τσιπούρας έχει σχήμα ελαφρώς ωοειδές προς την κεφαλή, με κυκλική κατανομή (Εικόνα 1.1). Το μέσο μήκος του είδους κυμαίνεται στα 60–65 cm και το βάρος του πολλές φορές υπερβαίνει τα 5 kg. Στο μέτωπο μεταξύ των οφθαλμών φέρει μια χαρακτηριστική λωρίδα σε σχήμα V χρώματος λαμπρού κίτρινου (χρυσόχροη). Στην επάνω γωνία της βραγχιακής σχισμής και πίσω από το βραγχιακό επικάλυμμα που χωρίζει την κεφαλή από τον κορμό, υπάρχει μια μεγάλη κηλίδα χρώματος μαύρου-μενεξεδένιου. Στη ράχη το χρώμα είναι γκριζο ανοικτό, ενώ στα πλευρά ασημί με έντονες χρυσές αντανακλάσεις (FAO, 2007).



Εικόνα 1.1. Ενήλικο άτομο τσιπούρας (Φωτ: Γ. Κωτούλας).

Η τσιπούρα είναι ευρύαλο και ευρύθερμο είδος, πολύ κοινό στη Μεσόγειο, στην Αδριατική θάλασσα και στον Ατλαντικό ωκεανό όπου απαντάται από τα Βρετανικά νησιά ως το Κάπε Βέρντε, ενώ συναντάται σπάνια στη Μαύρη θάλασσα. Ζει σε παράκτιες περιοχές, κοντά σε αμμώδεις βυθούς και λειμώνες ποσειδωνίας (*Posidonia oceanica*). Τα ιχθύδια ζουν σε βάθη 30 μέτρων ενώ τα ενήλικα άτομα κατεβαίνουν μέχρι τα 150 μέτρα. Η διατροφή της τσιπούρας στηρίζεται σε δίθυρα, καρκινοειδή και ψάρια (Rosacchi, 1987).

Η τσιπούρα είναι διαδοχικά ερμαφρόδιτο, πρώτανδρο είδος (Zohar et al., 1978). Στη βορειοδυτική Μεσόγειο θάλασσα η πρώτη ωρίμανση σαν αρσενικό γίνεται στο τέλος του δεύτερου έτους της ζωής της τσιπούρας και η αναστροφή του φύλου



ολοκληρώνεται ένα έτος ή μερικές φορές δύο έτη μετά (Pasquali, 1941; D' Ancona, 1941, Από: Zohar et al., 1978). Στην Κρήτη η πρώτη ωρίμανση σαν αρσενικό γίνεται στο τέλος του δεύτερου έτους της ζωής της τσιπούρας. Η πλειονότητα των ατόμων τσιπούρας στην Κρήτη, αρχίζουν να ωριμάζουν σαν θηλυκά στην ηλικία των 3 ετών (Pavlidis et al., 2006). Τα υπόλοιπα αρσενικά άτομα μπορεί να αναστρέφουν το φύλο τους υπό κάποιες προϋποθέσεις σε μεταγενέστερο στάδιο (βλ. § 1.2).

Η ωοτοκία στην τσιπούρα διαρκεί 3-4 μήνες και πραγματοποιείται από τον Σεπτέμβριο έως τον Μάιο, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος της περιοχής (Zohar et al., 1995). Η τσιπούρα αποτελεί ασύγχρονο είδος (Meiri et al., 2004), δηλαδή φέρει ωοκύτταρα σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης (Tyler and Sumpter, 1996). Κατά την ωοτοκία τα θηλυκά γεννούν 0,5-2 φορές το βάρος τους σε αυγά (Meiri et al., 2004). Στην Κρήτη η αναπαραγωγή περίοδος της τσιπούρας διαρκεί από τον Δεκέμβριο έως τον Μάιο (Méndez et al., 1995). Η αναπαραγωγή της τσιπούρας προκαλεί απώλεια του σωματικού βάρους της και απαιτούνται αρκετοί μήνες για να αναπληρωθεί μετά από την αναπαραγωγική περίοδο (Kissil et al., 2001).

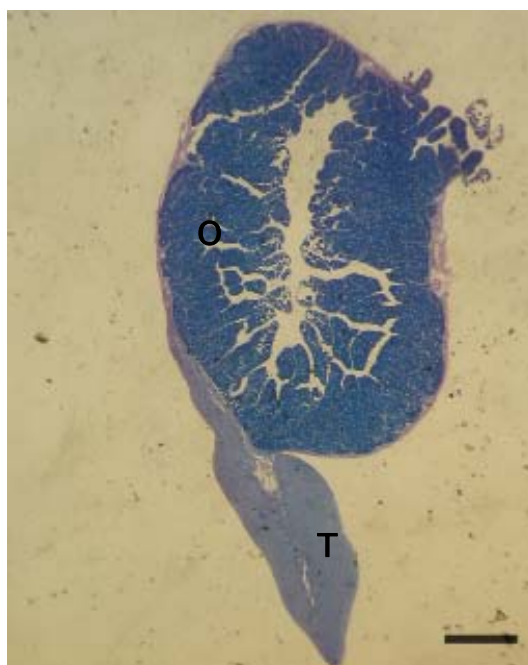
## **1.2. Η αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα.**

Τα διαδοχικά ερμαφρόδιτα είδη κατατάσσονται σε πρώτανδρα αν ωριμάζουν πρώτα σαν αρσενικά όπως η τσιπούρα (Zohar et al., 1978; Bruslé-Sicard and Fourcault, 1997) και σε πρωτόγυνα αν ωριμάζουν πρώτα σαν θηλυκά όπως το φαγκρί (*Pagrus pagrus*) (Devlin and Nagahama, 2002). Στην οικογένεια Sparidae άλλα πρώτανδρα ερμαφρόδιτα είδη είναι το surf bream (*Acanthopagrus australis*), το twobar seabream (*A. bifasciatus*), το yellowfin seabream (*A. latus*), ο τσαούσης (*Dentex gibbosus*), η μουρμούρα (*Lithognathus mormyrus*) και η σάλπα (*Sarpa salpa*) (Buxton, and Garratt, 1990). Η πρωτανδρία στα ψάρια έχει αναφερθεί εκτός από την οικογένεια Sparidae και στις οικογένειες Ostariophysi, Polynemidae, Scorpaeniformes (Platycephalidae), Stomiatiformes (Lee et al., 2001).

Η πρωτανδρία και πρωτογυνία στην οικογένεια Sparidae παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ασυνήθιστης διαμόρφωσης της ερμαφρόδιτης γονάδας (Buxton and Garratt, 1990). Στη νωτιαία περιοχή της γονάδας των σπαροειδών βρίσκεται η ωοθήκη ενώ στην κοιλιακή περιοχή βρίσκεται ο όρχις και διαχωρίζονται μεταξύ τους

από συνδετικό ιστό (Bruslé-Sicard and Fourcault, 1997) (Εικόνα 1.2). Εξ ορισμού, στην πρωτανδρία τα άτομα αρχικά είναι λειτουργικά αρσενικά, στη συνέχεια πραγματοποιείται αναστροφή του φύλου και γίνονται λειτουργικά θηλυκά, επομένως όλα τα θηλυκά άτομα προέρχονται απαραίτητως από αρσενικά άτομα (Buxton and Garratt, 1990).

Σύμφωνα με τους Zohar et al. (1978) στην τσιπούρα, τα άτομα τους πρώτους 4 μήνες της ζωής τους εμφανίζουν μη διαφοροποιημένες γονάδες. Από τους 4 μήνες και μετά εμφανίζονται κάποιες αλλαγές. Γενικά, η περιοχή των όρχεων αναπτύσσεται σε μεγάλο βαθμό και το ψάρι είναι ένα λειτουργικό αρσενικό άτομο. Αργότερα σε κάποια από αυτά τα ψάρια, η ανάπτυξη των γονάδων τους αναστρέφεται και έτσι η περιοχή που αντιστοιχεί σε όρχεις γίνεται μικρότερη και τελικά μειώνεται σε ένα μικρό, μη-λειτουργικό κατάλοιπο. Η περιοχή των γονάδων που αντιστοιχεί στις ωθήκες μεγαλώνει πάρα πολύ και ουσιαστικά αποτελεί πλέον σχεδόν ολόκληρο τον ιστό των γονάδων του ψαριού. Συνεπώς τα ψάρια αυτά που έχουν υποστεί αυτή την αλλαγή λειτουργούν ως θηλυκά άτομα (Zohar et al., 1978).



**Εικόνα 1.2.** Ερμαφρόδιτη γονάδα τσιπούρας όπου παρατηρείται η συνύπαρξη ωθηκικού και ορχικού ιστού. Ο (ovary): ωθήκη, Τ (testis): όρχις. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1mm. (Φωτ. Κ. Αποστολίδη).

Οι Pasquali (1941) και D' Ancona (1941) μελετώντας την τσιπούρα στην Αδριατική θάλασσα βρήκαν ότι ολόκληρος ο πληθυσμός αποτελείται από αρσενικά άτομα στο τέλος του δεύτερου χρόνου ζωής, κατόπιν αλλάζει φύλο και αποτελείται από θηλυκά στο τέλος του τρίτου έτους (Zohar et al., 1978). Σύμφωνα με τους Zohar et al. (1978), η τσιπούρα σε συνθήκες εκτροφής ωριμάζει σεξουαλικά στο τέλος του πρώτου έτους της ζωής της και η αναστροφή του φύλου γίνεται σε ποσοστό 80% των ατόμων στο τέλος του δεύτερου έτους. Επομένως, σύμφωνα με τους Pasquali (1941) και D' Ancona (1941) η τσιπούρα φτάνει στην πρώτη πλήρη αναπαραγωγική ωρίμανση στο τέλος του δεύτερου έτους της ζωής της ενώ η μελέτη των Zohar et al. (1978) έδειξε ότι αυτό συμβαίνει στο τέλος του πρώτου έτους ζωής. Αυτές οι αποκλίσεις της μελέτης των Zohar et al. (1978) από τη μελέτη των Pasquali (1941) και D' Ancona (1941) σύμφωνα με τους Zohar et al. (1978) θα μπορούσαν να αποδοθούν στις διαφορές στον κύκλο των γονάδων των ατόμων που ζούσαν στο φυσικό τους περιβάλλον στη μελέτη των Pasquali (1941) και D' Ancona (1941) και στις συνθήκες εκτροφής των Zohar et al. (1978). Στις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υψηλή και σταθερή θερμοκρασία νερού κατά τη διάρκεια του έτους όπως και στην καθημερινή παροχή τροφής στη μελέτη των Zohar et al. (1978) θα μπορούσε για παράδειγμα να αποδοθεί η επιταχυμένη ανάπτυξη των γονάδων και η πρώιμα ανεπτυγμένη σεξουαλική ωρίμανση σε σύγκριση με τη μελέτη των Pasquali (1941) και D' Ancona (1941). Επίσης, τα ψάρια στη μελέτη των Pasquali (1941) και D' Ancona (1941) προέρχονταν από την Αδριατική θάλασσα ενώ στη μελέτη των Zohar et al. (1978) από τη ανατολική Μεσόγειο. Ακόμα, η ακριβής ηλικία των ψαριών της μελέτης των Pasquali (1941) και D' Ancona (1941) ήταν αβέβαιη σε αντίθεση με την ηλικία των ψαριών της μελέτης των Zohar et al. (1978) η οποία ήταν ακριβώς καθορισμένη.

Η μελέτη των Zohar et al. (1978) έδειξε τη μεταβλητότητα της αναστροφής του φύλου. Αν και σε όλα τα ψάρια ηλικίας πάνω από ενός έτους, τα οποία στην ηλικία των δώδεκα μηνών ήταν λειτουργικά αρσενικά, ο ιστός των όρχεων αρχίζει να εκφυλίζεται και να σχηματίζεται η ωοθήκη, δεν ολοκληρώθηκε η αναστροφή του φύλου σε όλα τα άτομα. Σε κάποια άτομα σχηματίστηκε ξανά αρσενικός ιστός και παρέμειναν λειτουργικά αρσενικά στην ηλικία των δύο ετών. Αυτή η διακύμανση μεταξύ αρσενικού και θηλυκού χαρακτήρα μπορεί σύμφωνα με τους Zohar et al. (1978)

να είναι το αποτέλεσμα του κοινωνικού ελέγχου της αναστροφής ο οποίος εξασφαλίζει την κατάλληλη αναλογία αρσενικών/θηλυκών ατόμων στον πληθυσμό. Μέσω ενός ανασταλτικού παράγοντα από τα άτομα με πιο ανεπτυγμένη ωοθήκη, ο μηχανισμός ελέγχου μπορεί να επιδρά στην περαιτέρω ανάπτυξη του ωοθηκικού ιστού στα ψάρια στα οποία το τμήμα αυτό είναι λιγότερο ανεπτυγμένο. Έτσι, η ωοθήκη αρχίζει να εκφυλίζεται ενώ το ενυπάρχων αλλά αφανές τμήμα των όρχεων αναπτύσσεται. Στα υπόλοιπα άτομα, η ωοθήκη ωριμάζει ενώ το τμήμα των όρχεων εκφυλίζεται (Zohar et al., 1978).

Οι Bruslé-Sicard and Fourcault (1997) αναφέρουν ότι σε συνθήκες εκτροφής, η αναστροφή του φύλου της τσιπούρας πραγματοποιείται σε ποσοστό 30-40% των ατόμων στο τέλος του δεύτερου έτους ζωής της. Το ποσοστό αυτό είναι αρκετά μικρότερο απ' αυτό που βρέθηκε στη μελέτη των Zohar et al. (1978). Οι Chaoui et al. (2006) κατά τη μελέτη της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής της τσιπούρας στη λιμνοθάλασσα Mellah στην Αλγερία αναφέρουν επίσης ότι το 40% των ατόμων άλλαξαν φύλο σε ηλικία 2+.

### **1.2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την αναστροφή του φύλου.**

Η αναστροφή του φύλου στα ψάρια ελέγχεται από γενετικούς, ορμονικούς, κοινωνικούς, περιβαλλοντικούς, αλλά και διαχειριστικούς παράγοντες (Zohar et al., 1984; Haffray et al., 2005). Η ωχρινοποιητική ορμόνη (luteinizing hormone - LH) ή GtH II φαίνεται ότι παίζει ρόλο στον έλεγχο της αναστροφής του φύλου στην τσιπούρα πέρα από το ρόλο της στην τελική ωρίμανση των ωοκυττάρων και στην ωοτοκία στα θηλυκά και στην σπερμιάση στα αρσενικά άτομα (Meiri et al., 2004). Επίσης η χορήγηση οιστραδιόλης ( $E_2$ ) σε άτομα τσιπούρας είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη του ωοθηκικού και τη μείωση του ορχικού ιστού στην ερμαφρόδιτη γονάδα (Condeça and Canario, 1999). Οι θυρεοειδικές ορμόνες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των γονάδων στα ψάρια (Cyr and Eales, 1996). Επίσης είναι γνωστό ότι στην ωοθήκη ορισμένων ειδών ψαριών συσσωρεύεται ιώδιο (Eales, 1979) το οποίο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών. Έτσι, είναι πιθανό ότι και οι θυρεοειδικές ορμόνες επιδρούν στην αναστροφή του φύλου.

Σε πολλά είδη ψαριών, οι κοινωνικοί παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην

αναστροφή του φύλου: τα θηλυκά άτομα τα οποία είναι μεγαλύτερα από τα αρσενικά, εμποδίζουν την αναστροφή του φύλου των αρσενικών ατόμων και η έλλειψη των θηλυκών σε μία δεξαμενή επιτρέπει τη μετατροπή των αρσενικών σε θηλυκά άτομα (Haffray et al., 2005). Στις μελέτες των Zohar et al. (1978, 1984) η παρουσία προχωρημένης ηλικίας θηλυκών ατόμων τσιπούρας στον πληθυσμό, μείωσε το ποσοστό των νεαρών αρσενικών που ανέστρεψαν το φύλο τους και η παρουσία νεαρών αρσενικών αύξησε το ποσοστό των προχωρημένης ηλικίας αρσενικών ατόμων που άλλαξαν φύλο. Επίσης, η διατήρηση των ψαριών σε υψηλή θερμοκρασία και απεριόριστη ποσότητα τροφής θα μπορούσε να συμβάλλει στην επιτάχυνση της ανάπτυξης των γονάδων και σε πρόωμη αναστροφή (Zohar et al., 1978). Στα περισσότερα ερμαφρόδιτα είδη, η ηλικία και το μέγεθος των ατόμων που αναστρέφουν το φύλο τους μπορεί να επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και από κοινωνικούς παράγοντες και ιδιαίτερα την αναλογία φύλου (Jalabert, 2005).

Γενικά, η αναστροφή του φύλου στα ψάρια ευνοείται όταν η αναπαραγωγική αξία του ατόμου σχετίζεται στενά με την ηλικία ή το μέγεθός του και η σχέση αυτή είναι διαφορετική για τα δύο φύλα. Σ' αυτή την περίπτωση η επιλογή ευνοεί τα γονίδια τα οποία καθορίζουν το ποιο φύλο θα είναι πρώτο έτσι ώστε η αναπαραγωγική αξία να αυξάνει πιο αργά με την ηλικία και να αλλάζει φύλο σε μία μετέπειτα φάση (Allsop and West, 2003). Ο πιθανός λόγος για την εξέλιξη του ερμαφροδιτισμού είναι η επιμήκυνση του χρόνου αναπαραγωγής των ψαριών (Buxton and Garratt, 1990). Ειδικότερα, ο διαδοχικός ερμαφροδιτισμός θεωρείται πλεονεκτικός όταν το άτομο αναπαράγεται καλύτερα σαν ένα φύλο σε μία συγκεκριμένη περίοδο της ζωής του (όταν είναι μικρό) και σαν το άλλο φύλο αργότερα (όταν είναι μεγάλο) (Oldfield, 2005).

### **1.3. Δομή και δράση των θυροειδικών ορμονών στα ψάρια.**

Οι θυροειδικές ορμόνες έχουν δύο μορφές, την τετραϊώδο-L-θυρονίνη (θυροξίνη, T<sub>4</sub>) και την τριϊώδο-L-θυρονίνη (T<sub>3</sub>) (Εικόνα 1.3), οι οποίες έχουν παρόμοια χημική δομή αποτελούμενες από τη θυρονίνη η οποία είναι υδρόφοβη, από μία υδροξυλική ομάδα η οποία είναι υδρόφιλη και ενώνεται με το φαινολικό δακτύλιο και από 4 άτομα ιωδίου

στις θέσεις 3, 5, 3' και 5' στη θυροξίνη (T<sub>4</sub>) ή από 3 άτομα ιωδίου στις θέσεις 3, 5 και 3' στην τριϊωδοθυρονίνη (T<sub>3</sub>) (Power et al., 2000b). Οι θυρεοειδικές ορμόνες είναι λιποδιαλυτές. Η T<sub>3</sub> είναι περισσότερο λιποδιαλυτή από την T<sub>4</sub> επειδή αποτελείται από τρία αντί τέσσερα άτομα ιωδίου (Hulbert, 2000).



Τετραϊωδο-L-θυρονίνη (θυροξίνη, T<sub>4</sub>)

Τριϊωδο-L-θυρονίνη (T<sub>3</sub>)

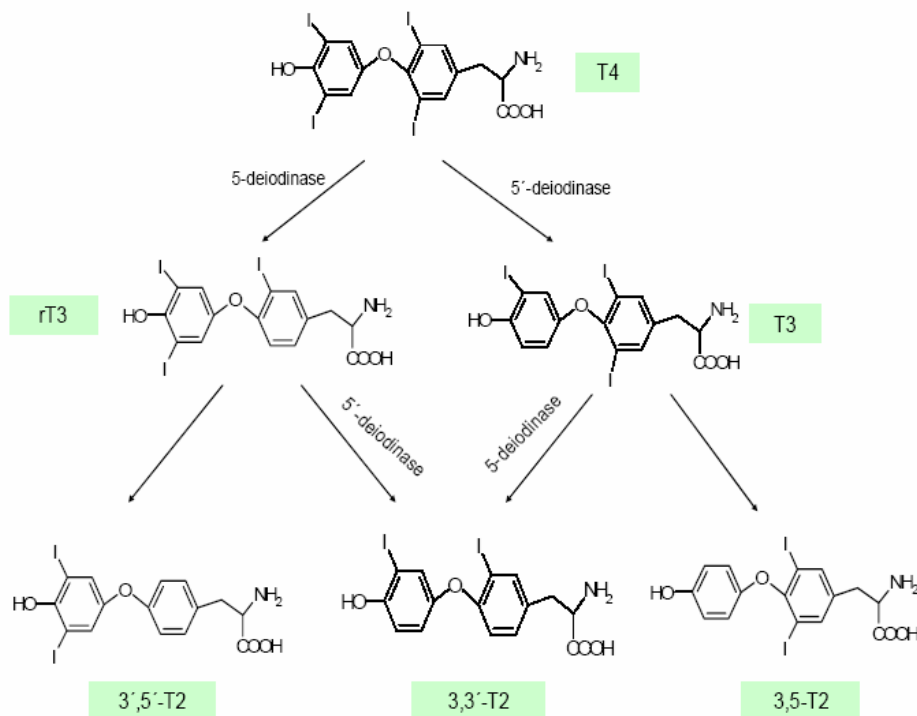
**Εικόνα 1.3.** Χημικοί τύποι της τετραϊωδο-L-θυρονίνης (T<sub>4</sub>) και της τριϊωδο-L-θυρονίνης (T<sub>3</sub>).

Στα ψάρια, οι θυρεοειδικές ορμόνες παράγονται στα θυρεοειδικά θυλάκια τα οποία αποτελούν τη βασική λειτουργική μονάδα του θυρεοειδούς και τα οποία αποτελούνται από μία απλή στοιβάδα επιθηλιακών κυττάρων. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, τα θυρεοειδικά θυλάκια στους περισσότερους τελεόστεους δεν σχηματίζουν ένα συμπαγές όργανο, αλλά μπορεί να διασκορπίζονται σε όλο το σώμα (Higgs et al., 1982), όπως γύρω από την κοιλιακή αορτή, στην περιοχή της κάτω σιαγόνας και στις βραγχιακές αρτηρίες (Power et al., 2000b). Τα θυρεοειδικά θυλάκια αντλούν ανόργανο ιώδιο από το αίμα το οποίο στη συνέχεια ενσωματώνεται στις ρίζες τυροσίνης στη θυρεοσφαιρίνη (Tg, Thyroglobulin) με την επίδραση του ενζύμου θυρεοειδική υπεροξειδάση και παράγεται έτσι η μονοϊωδοτυροσίνη (MIT) και η διϊωδοτυροσίνη (DIT). Όταν συζευχθούν δύο μόρια DIT δημιουργείται ένα μόριο θυροξίνης (T<sub>4</sub>), όταν συζευχθούν ένα μόριο DIT και ένα MIT τότε δημιουργείται ένα μόριο T<sub>3</sub>.

Η παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών ρυθμίζεται από τη θυρεοτροπίνη (TSH) από την υπόφυση, ενώ ο υποθαλαμικός παράγοντας που ελέγχει την παραγωγή της θυρεοτροπίνης είναι άγνωστος στα ψάρια (Yamano, 2005). Η TSH ενισχύει επίσης την

απελευθέρωση των θυρεοειδικών ορμονών από τις θυρεοσφαιρίνες. Η κύρια, αν όχι η αποκλειστική, ορμόνη που συντίθεται στα θυρεοειδικά θυλάκια των ψαριών είναι η T<sub>4</sub> (Eales, 1979; Mol et al., 1998). Η TSH φαίνεται ότι προκαλεί την απελευθέρωση μόνο της T<sub>4</sub> ενισχύοντας την άποψη ότι η T<sub>3</sub> δεν εκκρίνεται σε σημαντική ποσότητα από τον θυρεοειδή στα ψάρια (Eales and Brown, 1993).

Η T<sub>4</sub> έχει λιγότερες άμεσες δράσεις και θεωρείται ότι λειτουργεί κυρίως σαν πρόδρομος της τριιωδοθυρονίνης (T<sub>3</sub>), της βιολογικά ενεργής μορφής της ορμόνης (Tagawa and Hirano, 1990; Power et al., 2001). Η ορμόνη T<sub>4</sub> μεταβολίζεται στην περισσότερο βιολογικά δραστική T<sub>3</sub> με την ενζυματική απομάκρυνση (5'-μονοαποϊώδωση) της μίας υπομονάδας ιωδίου από τον εξωτερικό δακτύλιο της T<sub>4</sub> (outer-ring deiodination-ORD) (Eales and Brown, 1993) ή καταλήγει στον αδρανή μεταβολίτη 3,3',5'-T<sub>3</sub> ή ανάστροφη T<sub>3</sub> (reverse T<sub>3</sub>, rT<sub>3</sub>) με την αποϊώδωση (5-μονοαποϊώδωση) του εσωτερικού δακτυλίου της T<sub>3</sub> (inner-ring deiodination-IRD) (Εικόνα 1.4) στους περιφερικούς ιστούς και ιδιαίτερα στο ήπαρ (Darras et al., 1998). Η T<sub>3</sub> και η rT<sub>3</sub> μπορούν να μεταβολιστούν σε διϊωδοθυρονίνη (T<sub>2</sub>) (Eales et al., 1997).



Εικόνα 1.4. Μεταβολισμός των θυρεοειδικών ορμονών (Από: Hollosi, 2005).

Εκτός από το ήπαρ, η απενεργοποίηση των θυρεοειδικών ορμονών

πραγματοποιείται στα νεφρά, στον εγκέφαλο και στους μυς. Το καθοριστικό μονοπάτι για την απενεργοποίηση των θυρεοειδικών ορμονών είναι η αποϊωδίωση αλλά μπορεί να πραγματοποιηθεί και με οξειδωτική απαμίνωση και αποκαρβοξυλίωση (DiStefano et al., 1988; Eales and Brown, 1993; Finnson et al., 1999). Η διαδικασία της αποϊωδίωσης ρυθμίζει και ελέγχει τα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών στους περιφερικούς ιστούς και τη βιολογική τους δράση και το ήπαρ αποτελεί σημαντικό ιστό για τον μεταβολισμό της T<sub>4</sub>. Επίσης το ήπαρ εκτός από την αποϊωδίωση εμπλέκεται στην απέκκριση της T<sub>4</sub> από τη χολή (Eales and Brown, 1993).

Τα ένζυμα που καταλύουν την αποϊωδίωση των θυρεοειδικών ορμονών είναι γνωστά ως ιωδοθυρονίνη-αποϊωδινάσες και στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα τρεις μορφές: οι τύπου I, II και III (Power et al., 2001) οι οποίες τελευταία αναφέρονται ως D1, D2 και D3 αντίστοιχα (Hulbert, 2000). Στα ψάρια έχουν βρεθεί επίσης οι τρεις μορφές, όμως φαίνεται ότι δεν παρουσιάζουν ακριβώς τις ίδιες ιδιότητες με τα ένζυμα των θηλαστικών (Sanders et al., 1997; Van der Geyten et al., 1998). Στην τιλάπια του Νείλου (*Oreochromis niloticus*) η D1 αποϊωδινάση καταλύει τόσο την ORD όσο και την IRD, η D2 μόνο τη διαδικασία της ORD και η D3 μόνο την IRD (Van der Geyten et al., 2005). Μελέτες σχετικά με άλλα είδη τελεόστεων όπως η πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) έδειξαν ότι και σε αυτά υπάρχουν οι τρεις μορφές που έχουν περιγραφεί στην τιλάπια του Νείλου (Mol et al., 1998; Darras et al., 1998). Η IRD είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για τη μετατροπή της T<sub>4</sub> σε rT<sub>3</sub> και της T<sub>3</sub> σε T<sub>2</sub> και για το λόγο αυτό εμποδίζει τη συσσώρευση της T<sub>4</sub> και της T<sub>3</sub> στους εξωθυρεοειδικούς ιστούς (Leary et al., 1999; Sutija and Joss, 2006). Η επιλογή της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν την 5- και 5' -μονοαποϊωδινάση, προσφέρει στο κύτταρο τον τρόπο ικανοποίησης των αναγκών του σε T<sub>3</sub> (Leary et al., 1999).

Στα σπονδυλωτά, οι θυρεοειδικές ορμόνες κυκλοφορούν στο πλάσμα δεσμευμένες σε πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη και η θυρεοσφαιρίνη. Στα ψάρια, οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταφορά των θυρεοειδικών ορμονών (Power et al., 2000b). Στην τσιπούρα έχει αναφερθεί ότι η τρανσθυρετίνη (transthyretin-TTR) αποτελεί επίσης πρωτεΐνη μεταφοράς των θυρεοειδικών ορμονών (Santos and Power, 1999).

Η εκλεκτική ευαισθησία των ιστών στις ορμόνες οφείλεται στην ύπαρξη ειδικών



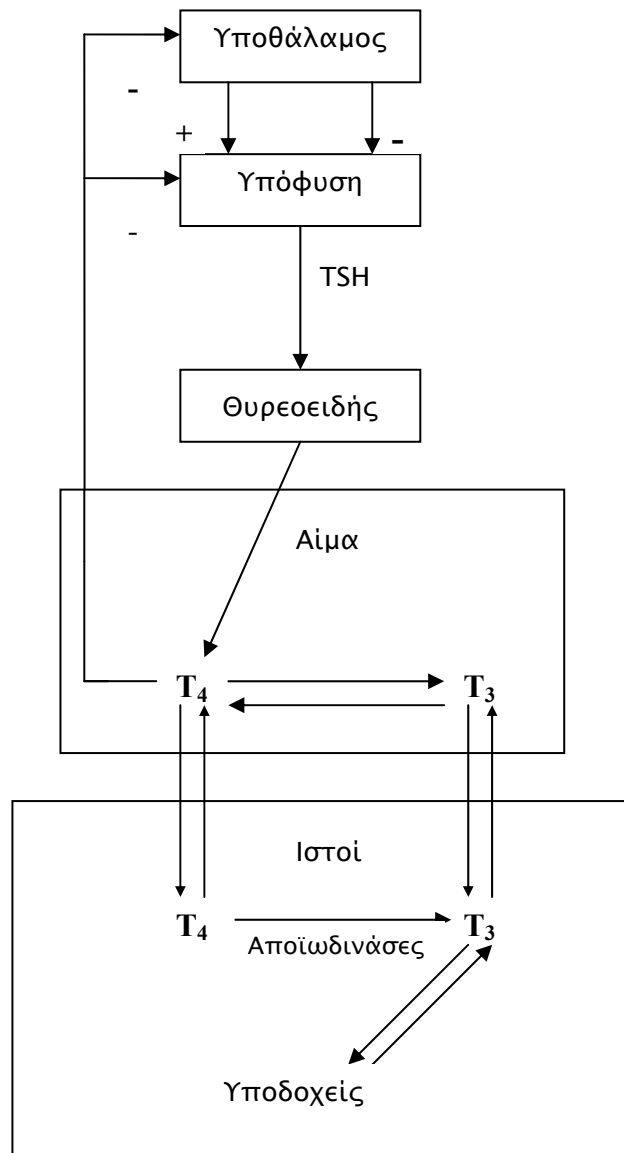
υποδοχέων (receptors) (Κούτρας, 1994). Οι θυρεοειδικοί υποδοχείς ανήκουν στην υπεροικογένεια των στεροειδο-θυρεοειδικών υποδοχέων, που περιλαμβάνει επίσης και υποδοχείς άλλων υποστρωμάτων, όπως είναι οι στεροειδείς ορμόνες, τα ρετινοειδή και η βιταμίνη D (Yen and Chin, 1994). Ο βιολογικός ρόλος των θυρεοειδικών ορμονών πραγματοποιείται με την πρόσδεσή τους στους νουκλεϊκούς υποδοχείς (Thyroid Hormone Receptors, TRs) οι οποίοι δρουν άμεσα στα γονίδια στόχους (Leary et al., 1999). Προσδεδεμένες σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, οι θυρεοειδικές ορμόνες ενισχύουν ή καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων και υλοποιούν έτσι την κυτταρική απάντηση (Yen and Chin, 1994). Οι υποδοχείς έχουν περίπου 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για την  $T_3$  απ' ό τι για την  $T_4$  και μικρή για την  $rT_3$  και την  $T_2$  (Higgs et al., 1982; Cyr and Eales, 1996; Yamano, 2005).

Συνοπτικά, οι διαδικασίες που περιλαμβάνονται στη σύνθεση, αποθήκευση, μεταφορά και στο μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών είναι οι εξής:

1. πρόσληψη ιωδίου από το θυρεοειδή,
2. οξείδωση του ιωδίου και ιωδίωση της τυροσίνης στη θυρεοσφαιρίνη,
3. σύζευξη των ιωδοτυροσινών για το σχηματισμό ιωδοθυρονινών,
4. πρωτεόλυση της θυρεοσφαιρίνης και απελευθέρωση της  $T_4$  και της  $T_3$  στο αίμα,
5. σύνδεση στις πρωτεΐνες μεταφοράς,
6. παραγωγή της  $T_3$  από την  $T_4$  στους ιστούς-στόχους,
7. καταβολισμός της  $T_3$  και της  $T_4$  στους περιφερικούς ιστούς, και
8. καταβολισμός των θυρεοειδικών ορμονών στο ήπαρ και απέκκριση μέσω της χολής (DeVito et al., 1999).

Στους τελεόστεους ισχύει το μοντέλο της περιφερικής ρύθμισης δηλαδή το επίπεδο λειτουργίας του θυρεοειδή καθορίζεται κυρίως από τους περιφερικούς ιστούς και λιγότερο από τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-θυρεοειδής (HPT axis) (Eales and Brown, 1993). Αυτό το μοντέλο δεν περιλαμβάνει την κεντρική ρύθμιση από τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-θυρεοειδής αλλά κυρίως από τα επίπεδα της  $T_3$  στους ιστούς (Εικόνα 1.5). Το επίπεδο λειτουργίας του θυρεοειδή καθορίζεται από την απαίτηση του ιστού σε κατάλληλη ποσότητα  $T_3$  για τη φυσιολογική κατάσταση του ψαριού. Αυτή η απαίτηση του ιστού σε  $T_3$  διατηρείται με την επίτευξη της ισορροπίας μεταξύ της μετατροπής της  $T_4$  σε  $T_3$  και των μεταβολικών μονοπατιών που σχετίζονται με την

αποικοδόμηση και απέκκριση της  $T_3$  (Eales and Brown, 1993).



Εικόνα 1.5. Μοντέλο ρύθμισης του άξονα HPT στους τελεόστεους (Από: Eales and Brown, 1993).

Ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, η  $T_3$  που είναι διαθέσιμη για να προσδεθεί στους υποδοχείς μπορεί να προέρχεται από το αίμα, από το κύτταρο ή και από τις δύο αυτές πηγές αλλά ανεξάρτητα από την πηγή, η διαθεσιμότητα της  $T_3$  ρυθμίζεται εξωθυροειδικά για την κάλυψη των αναγκών των κυττάρων σε  $T_3$ . Όταν η  $T_4$  μετατρέπεται σε  $T_3$  σε μία δεδομένη φυσιολογική κατάσταση, τα επίπεδα της  $T_4$  στο πλάσμα θα μειωθούν αλλά μέσω του μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης από τον

υποθάλαμο και την υπόφυση θα επανέλθουν. Έτσι στο μοντέλο της περιφερικής ρύθμισης η έκκριση της  $T_4$  ελέγχεται κεντρικά αλλά δευτερογενώς σε απάντηση του ρυθμού μείωσης της  $T_4$  από τους περιφερικούς ιστούς (Eales and Brown, 1993). Η απαίτηση του ιστού για  $T_3$  οδηγεί το σύστημα και η απαίτηση αυτή δεν καθορίζεται από τα επίπεδα της  $T_3$  στο πλάσμα αλλά από τη συγκέντρωση της  $T_3$  στους ιστούς. Η απαίτηση αυτή μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον ιστό και να έχει χαμηλή αντιστοιχία με τη συγκέντρωση της  $T_3$  στο πλάσμα (Eales and Brown, 1993).

Γενικά, στους τελεόστεους, οι μεταβολές στα επίπεδα της  $T_4$  και της  $T_3$  στο πλάσμα δεν είναι απαραίτητα ταυτόχρονες ενισχύοντας την άποψη ότι οι μηχανισμοί ελέγχου τους μπορεί να διαφέρουν (Bunnig et al., 1982; Eales and Brown, 1993). Κατά τον προσδιορισμό της  $T_4$  και της  $T_3$  σε ιστούς του coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) βρέθηκαν χρονικές μεταβολές και ασυμφωνίες μεταξύ των επιπέδων της  $T_4$  και της  $T_3$  στο πλάσμα και στους ιστούς του είδους αυτού (Specker et al., 1992).

### 1.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία του άξονα HPT.

Η λειτουργία του θυρεοειδή στους τελεόστεους καθορίζεται από την αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών, ενδοκρινικών, φυσιολογικών και γενετικών παραμέτρων (Leatherland, 1982; Eales and Brown, 1993; Cyr and Eales, 1996). Η έλλειψη ιωδίου στην τροφή δεν αποτελεί πρόβλημα για τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών στα ψάρια επειδή η λήψη του γίνεται κυρίως από το νερό μέσω των βραγχίων (Yamano, 2005). Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν το θυρεοειδή κυριότεροι είναι η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία και η διατροφή. Στα ψάρια, οι θυρεοειδικές ορμόνες μεταβάλλονται ανάλογα με την εποχή αλλά και κατά τη διάρκεια της ημέρας (Eales, 1979). Η φωτοπερίοδος επηρεάζει τη λειτουργία του θυρεοειδή και συνεχόμενο σκοτάδι ή μικρή φωτοπερίοδος την αυξάνουν (Eales, 1979; Brown and Stetson, 1985). Η έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών αυξάνεται σε χαμηλή θερμοκρασία νερού ενώ η μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  στους περιφερικούς ιστούς αυξάνεται με τη θερμοκρασία του νερού (Higgs et al., 1982). Η έλλειψη τροφής μειώνει τη λειτουργία του θυρεοειδή (Higgs et al., 1982; Darras et al., 1998) και εμποδίζει τη μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  (Eales, 1979).

Το στρες μπορεί επίσης να επηρεάσει τη λειτουργία του θυρεοειδή στα ψάρια

(Higgs et al., 1982). Η οξεία καταπόνηση προκαλεί αύξηση της  $T_4$  στο αίμα ενώ η χρόνια καταπόνηση μειώνει τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο αίμα (Eales, 1979; Eales and MacLatchy, 1989; Pickering, 1993). Γενικά, σε υγιή ψάρια, σε ευνοϊκό περιβάλλον και σε αναβολικές καταστάσεις το θυρεοειδικό σύστημα ενεργοποιείται και ευνοείται η μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  (Eales and Brown, 1993; Cerdá-Reverter et. al., 1996). Αντίθετα, σε μη υγιή ψάρια σε μη ευνοϊκό περιβάλλον και σε καταβολικές καταστάσεις το θυρεοειδικό σύστημα καταστέλλεται (Eales, 1979).

Από τους ενδοκρινικούς παράγοντες, οι πιο σημαντικοί είναι η κορτιζόλη, η αυξητική ορμόνη, η μελατονίνη, η προλακτίνη και οι στεροειδείς ορμόνες με τους οποίους οι θυρεοειδικές ορμόνες αλληλεπιδρούν (Hulbert, 2000). Σε ορισμένα είδη τελεόστεων όπως στην τιλάπια της Μοζαμβίκης (*O. Mossambicus*), οι θυρεοειδικές ορμόνες ενίσχυσαν τη δράση της αυξητικής ορμόνης και της κορτιζόλης κατά την προσαρμογή των ψαριών στο θαλασσινό νερό (McCormick, 2001). Επίσης η κορτιζόλη βρέθηκε ότι είχε συνεργατικό ρόλο, επιδρώντας θετικά στη δράση των θυρεοειδικών ορμονών, κατά τη μεταμόρφωση του Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) (de Jesus et al., 1993) και στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του sixfinger threadfin (*Polydactylus sexfilis*) (Kim and Brown, 1997). Στα ψάρια, η μελατονίνη φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση των θυρεοειδικών ορμονών στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, καταστέλλοντας τη δράση τους (Gurta and Premabati, 2002). Η δράση της μελατονίνης πιθανόν να οφείλεται στην επίδρασή της στην ενεργότητα της 5' -μονοαποϊωδινάσης (Gurta and Premabati, 2002). Επίσης η προλακτίνη επιδρά αρνητικά στην περιφερική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  (Leatherland, 1982).

Οι στεροειδείς ορμόνες πιθανόν επηρεάζουν τη λειτουργία του θυρεοειδή σε διάφορα επίπεδα (Cyr and Eales, 1996). Σε συγκεκριμένες φάσεις του αναπαραγωγικού κύκλου στις οποίες τα αποθέματα ενέργειας μειώνονται και η ενέργεια διοχετεύεται στις γονάδες οι στεροειδείς ορμόνες συμβάλλουν στην καταστολή του θυρεοειδικού συστήματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι η  $E_2$  συμβάλλει στη μείωση της  $T_3$  του πλάσματος λόγω του ότι τροποποιεί τον περιφερικό μεταβολισμό των θυρεοειδικών ορμονών προκαλώντας αναστολή της 5' -μονοαποϊωδινάσης και της μετατροπής της  $T_4$  σε  $T_3$ . Αντίθετα τα ανδρογόνα τείνουν στο να αυξάνουν το επίπεδο της λειτουργίας του θυρεοειδή και να συμβάλλουν στη σωματική αύξηση μετά την αναπαραγωγή (Cyr

and Eales, 1996). Τέλος, τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών εξαρτώνται και από το είδος του ψαριού (Cyr and Eales, 1996).

### 1.3.2. Ο ρόλος των θυρεοειδικών ορμονών στη φυσιολογία των ψαριών.

Στα σπονδυλωτά, οι θυρεοειδικές ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και στο μεταβολισμό και τα περισσότερα θηλαστικά δεν μπορούν να αναπτυχθούν και να φτάσουν στην ενήλικη μορφή χωρίς αυτές (Power et al., 2001). Ένα από τα πιο ξεκάθαρα παραδείγματα της σημασίας των θυρεοειδικών ορμονών στην ανάπτυξη είναι η μεταμόρφωση των αμφίβιων (Tagawa and Hirano, 1990) και ιδιαίτερα η μεταμόρφωση των γυρίνων σε βάτραχους (DeVito et al., 1999).

Στα ψάρια, οι θυρεοειδικές ορμόνες ρυθμίζουν την ανάπτυξη, την αύξηση, την αναπαραγωγή (Eales and Brown, 1993), το βασικό μεταβολισμό, την ομοιόσταση, (Yamano, 2005) και την ωσμωρύθμιση (Sower and Schreck, 1982; Klaren et al., 2005; Varsamos et al., 2005). Οι θυρεοειδικές ορμόνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταμόρφωση η οποία περιλαμβάνει την μετάβαση των νυμφών προς ανήλικα άτομα (Yamano et al., 1991; Reddy and Lam, 1992). Η πιο εντυπωσιακή εκδήλωση της μεταμόρφωσης στους τελεόστεους είναι η κλασική μεταμόρφωση των πλατύψαρων. Εκεί, η αναπτυξιακή διαδικασία της μεταμόρφωσης περιλαμβάνει το μετασχηματισμό μιας πελαγικής, αμφίπλευρα συμμετρικής προνύμφης προς τη βενθική, ασύμμετρη μορφή του ανηλικού και βρέθηκε ότι ρυθμίζεται από τις θυρεοειδικές ορμόνες (Inui and Miwa, 1985; Inui et al., 1995). Οι θυρεοειδικές ορμόνες διέγειραν τη διαφοροποίηση του στομαχιού και των γαστρικών αδένων των νυμφών καθώς και τη μεταμόρφωση του Japanese flounder (Inui and Miwa, 1985; Schreiber and Specker, 1998; Falk-Petersen, 2005). Επίσης, οι ορμόνες αυτές διέγειραν την ανάπτυξη των νυμφών της τιλάπιας της Μοζαμβίκης (Reddy and Lam, 1992). Αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελούν οι άγνωστοι μύξινοι (*Petromyzon marinus*), στους οποίους έχει βρεθεί ότι οι θυρεοειδικές ορμόνες ακολουθούν παράδοξο πρότυπο μεταβολής, κατά το οποίο τα επίπεδα των ορμονών αυξάνονταν στις νύμφες μέχρι την έναρξη της μεταμόρφωσης και στη συνέχεια επήλθε μία δραματική μείωση των συγκεντρώσεων (Manzon et al., 2001). Επίσης, έχει βρεθεί ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της T<sub>4</sub> και των ανατομικών αλλαγών στο περιφερικό

οσφρητικό σύστημα των σαλμονοειδών κατά τη μετανάστευσή τους στη θάλασσα (Lema and Nevitt, 2004).

Γενικά, έχει βρεθεί θετική συσχέτιση ανάμεσα στη λειτουργία του θυρεοειδή και στην αναπαραγωγή στα ψάρια και έχει παρατηρηθεί μία εποχιακή αύξηση των θυρεοειδικών ορμονών η οποία συμπίπτει με την ωρίμανση των γονάδων και την αναπαραγωγή (Eales, 1979; Cyr and Eales, 1996). Διάφορες μελέτες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Cyr et al., 1988) απέδειξαν τις εποχιακές συσχετίσεις μεταξύ του επιπέδου λειτουργίας του θυρεοειδή και των γονάδων. Η πιο πειστική *in vitro* μελέτη αφορά στη χορήγηση θυρεοειδικών ορμονών σε χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) κατά την οποία αυξήθηκε η ικανότητα της γοναδοτροπίνης να διεγείρει την ανάπτυξη των γονάδων και τη λεκιθογένεση (Hurlburt, 1977). Σε άλλες πειραματικές μελέτες, ο τεχνητά προκαλούμενος υποθυρεοειδισμός είχε σαν αποτέλεσμα την επιβράδυνση της ανάπτυξης των γονάδων στους τελεόστεους. Στην πέστροφα οι θυρεοειδικές ορμόνες διέγειραν τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των γονάδων εντείνοντας τη δράση των γοναδοτροπινών οι οποίες δίνουν το τελικό σήμα για την παραγωγή της E<sub>2</sub> στα ωκύτταρα (Eales and Brown, 1993). Σε πολλά είδη σαλμονοειδών διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών ήταν υψηλά πριν την λεκιθογένεση και κατόπιν μειώνονταν όσο εξελισσόταν η ωρίμανση (Sullivan et al., 1989).

Είναι πιθανόν ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα γεννητόρων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου να είναι απαραίτητες για την εξασφάλιση μιας επαρκούς συγκέντρωσης των ορμονών στο αναπτυσσόμενο ωκύτταρο (Power et al., 2001). Τα αγονιμοποιητά αυγά των ψαριών περιέχουν σημαντικές ποσότητες θυρεοειδικών ορμονών. Οι ορμόνες αυτές στα αυγά θεωρούνται ότι είναι μητρικής προέλευσης (Tagawa and Hirano, 1987; Mylonas et al., 1994; Power et al., 2001). Γενικά, τα αυγά των ειδών του γλυκού νερού περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα T<sub>4</sub> απ' ό τι T<sub>3</sub>, ενώ στα αυγά θαλασσινών ειδών συμβαίνει το αντίθετο (Tagawa et al., 1990; Lam, 1994). Στα αυγά της τσιπούρας, η T<sub>3</sub> βρέθηκε σε υψηλότερη συγκέντρωση από την T<sub>4</sub> (Szisch, 2005).

Σε ορισμένα είδη ανάδρομων σαλμονοειδών του γένους *Oncorhynchus* παρατηρήθηκε αύξηση του επιπέδου λειτουργίας του θυρεοειδή στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των γονάδων αλλά μείωση κατά την εξέλιξη της λεκιθογένεσης και της

ανάπτυξης των όρχεων (Cyr et al., 1988; Pavlidis et al., 1991). Σημαντική ποσότητα  $T_3$  ( $5 \text{ ng g}^{-1}$ ) βρέθηκε στους όρχεις του chum salmon (*Oncorhynchus keta*) όταν παράγονται τα σπερματοζωάρια, στοιχείο που επιβεβαιώνει το ρόλο της  $T_3$  στην ωρίμανση των όρχεων (Cyr and Eales, 1996). Η χορήγηση  $T_3$  σε ενέσιμη μορφή σε θηλυκά άτομα του είδους striped bass (*Morone saxatilis*) κατά την τελική ωρίμανση των ωοκυττάρων είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της  $T_3$  στα αυγά (Brown et al., 1988). Στο είδος αυτό τα επίπεδα της  $T_4$  μειώθηκαν σημαντικά κατά την περίοδο της σπερμιάσης ενώ της τα επίπεδα της  $T_3$  παρουσίασαν μία μικρή αύξηση. Επίσης κατά την τελική ωρίμανση των ωοκυττάρων στο είδος αυτό, τα επίπεδα της  $T_4$  μειώθηκαν και της  $T_3$  δεν μεταβλήθηκαν (Mylonas et al., 1997).

Σε άλλα είδη τελεόστεων όπως σε είδη του γένους *Hypseleotris*, τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών αυξήθηκαν κατά τη λεκιθογένεση (MacKay, 1973). Σε ορισμένες μελέτες μη ανάδρομων ειδών δεν παρατηρήθηκε ξεκάθαρη σχέση ανάμεσα στα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών και την αναπαραγωγή (Cyr and Eales, 1996) αλλά γενικά παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών αυξήθηκαν στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των γονάδων, μειώθηκαν κατά την αύξηση των γονάδων και αυξήθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις κατά την ωοτοκία (Cyr and Eales, 1996). Σε είδη του γένους *Salmo* τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα αυξήθηκαν πριν την απελευθέρωση των αυγών (Norberg et al., 1989).

### 1.3.3. Αντιθυρεοειδικά φάρμακα.

Τα αντιθυρεοειδικά φάρμακα καταστέλλουν τη λειτουργία του θυρεοειδή. Παραδείγματα φαρμάκων τα οποία καταστέλλουν τη λειτουργία του θυρεοειδή στα ψάρια είναι κυρίως τα perchlorate, thyocyanate, propylthiouracil (PTU) (Cyr and Eales, 1996) και το methimazole (Brown, 1997). Τα αντιθυρεοειδικά φάρμακα εμποδίζουν τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών αλλά δεν επηρεάζουν τα επίπεδα των ορμονών που υπήρχαν ήδη στο αίμα (Holloosi, 2005).

Το methimazole (1-methyl-2-mercaptoimidazole) χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική επιστήμη για τη θεραπεία του υπερθυρεοειδισμού (Hengstmann and Hohn, 1985). Η ουσία αυτή εμποδίζει τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών στα θυρεοειδικά θυλάκια μπλοκάροντας την οξείδωση του ιωδίου και την ενσωμάτωσή του με τη δράση

της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης στην τυροσίνη, στο μόριο της θυρεοσφαιρίνης, (Melander et al., 1980; Laurence et al., 1998) για τον σχηματισμό της μονοϊωδοτυροσίνης (MIT) και της διϊωδοτυροσίνης (DIT). Ο μεταβολισμός του methimazole πραγματοποιείται στο ήπαρ και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μεταβολίζεται πολύ γρήγορα. Ο χρόνος ημιζωής του στο πλάσμα είναι 6–8 ώρες (He et al., 2004).

Το methimazole έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες που αφορούν στο θυρεοειδή. Για παράδειγμα, το αναπτυξιακό στάδιο της μεταμόρφωσης των ανούρων το οποίο εξαρτάται πλήρως από τη δράση των θυρεοειδικών ορμονών, έχει μπλοκαριστεί από το methimazole (Degitz et al., 2005). Η χορήγηση methimazole σε zebrafish (*Danio rerio*) είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της μεταμόρφωσης των νυμφών λόγω της αναστολής της λειτουργίας του θυρεοειδή (Brown, 1997). Επίσης στο zebrafish προκλήθηκαν ανωμαλίες στην ανάπτυξη των εμβρύων και των νυμφών (Liu and Chan, 2000; Elsalini and Rohr, 2003). Στην τιλάπια του Νείλου και στην blackchin τιλάπια (*Sarotherodon melanotheron*) ο υποθυρεοειδισμός που προκλήθηκε από τη χορήγηση methimazole είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της  $T_4$  και της  $T_3$  στο αίμα (Van der Geyten et al., 2001). Επίσης, κατά τη μελέτη της επίδρασης των θυρεοειδικών ορμονών στον καρδιακό μυ της πέστροφας διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση methimazole σε ενέσιμη μορφή είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της  $T_3$  στο πλάσμα, ανωμαλίες στην κίνηση και εξανθήματα στο δέρμα (Tiitu and Vornanen, 2003).

#### **1.4. Σκοπός της εργασίας.**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα και να εξεταστεί ο ρόλος των θυρεοειδικών ορμονών στη διαδικασία αυτή. Η τσιπούρα όπως αναφέρθηκε είναι ένα πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος και μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν στο ρόλο των θυρεοειδικών ορμονών στην αναστροφή του φύλου του είδους αυτού. Η διερεύνηση του ρόλου του θυρεοειδή στην αναστροφή θα διευρύνει τις γνώσεις μας για την ορμονική ρύθμιση της αναστροφής του φύλου στα ψάρια και είναι δυνατό να συμβάλει στον έλεγχο της αναστροφής σε επίπεδο εφαρμογής. Ο έλεγχος του φύλου στα ερμαφρόδιτα ψάρια συμβάλει στην ορθολογική διαχείριση των γεννητόρων στις ιχθυοκαλλιέργειες.



Πιο συγκεκριμένα τα αντικείμενα της μελέτης ήταν:

1. Η περιγραφή και ο καθορισμός των φάσεων αναστροφής του φύλου της τσιπούρας.
2. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα, στο ήπαρ (κύριος περιφερικός ιστός παραγωγής  $T_3$ ) και στις γονάδες, τόσο εποχιακά όσο και στις διάφορες φάσεις αναστροφής του φύλου.
3. Η μελέτη της επίδρασης του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου methimazole στην περιφερική ρύθμιση του θυρεοειδή και στην αναστροφή του φύλου.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 2.1. Αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα.

### 2.1.1. Ψάρια και πειραματικές συνθήκες.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις ανοικτές πειραματικές εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., στο Ηράκλειο Κρήτης και οι αναλύσεις στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 67 άτομα τσιπούρας ηλικίας 2+, βάρους  $518,5 \pm 22,1$  g (mean  $\pm$  SEM) και μεσουραίου μήκους  $320,3 \pm 3,9$  mm. Τα ψάρια τοποθετήθηκαν σε πολυεστερική, κυλινδρική δεξαμενή όγκου 2 m<sup>3</sup> και ταΐζονταν με εμπορική τροφή 2<sup>ης</sup> περιόδου (Excel 2<sup>o</sup>, Hendrix, s.p.a., Italy). Η θερμοκρασία του νερού κυμάνθηκε από 17°C έως 26°C και η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου από 4,5 έως 8,6 mg L<sup>-1</sup>. Η αλατότητα κατά τη διάρκεια όλων των δειγματοληψιών ήταν 39–40‰. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε φυσικές συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας.

#### Δειγματοληψίες.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 9 δειγματοληψίες (από 1/4/05 έως 15/12/05) ανά 15–20 ημέρες κατά τις οποίες συλλεγόταν 5–12 άτομα. Η περίοδος δειγματοληψίας βασίστηκε στη μελέτη των Zohar et al. (1978) κατά την οποία η αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα ξεκινά αμέσως μετά το τέλος της 1<sup>ης</sup> αναπαραγωγικής περιόδου. Στην Κρήτη η αναπαραγωγή περιόδου της τσιπούρας διαρκεί από τον Δεκέμβριο έως τον Μάιο (Méndez et al., 1995).

Τα ψάρια με τη βοήθεια απόχης μεταφερόταν σε δοχεία στα οποία γινόταν αναισθησία με γαρυφαλέλαιο (clove oil) διαλυμένο σε αιθανόλη 1:10, σε συγκέντρωση 0,04 mg L<sup>-1</sup>. Όταν τα ψάρια ήταν αναισθητοποιημένα, μεταφερόταν σε πάγκο εργασίας και ακολουθούσε η αιμοληψία από την ουραία φλέβα. Το αίμα συλλεγόταν με σύριγγα μίας χρήσεως του 1 ml και μεταφέρονταν σε σωληνάκια με αντιπηκτικό (ηπαρίνη, Leo, Denmark). Στη συνέχεια μετρούνταν το βάρος και το μεσουραίο μήκος και ακολούθησε η λήψη του ήπατος και των γονάδων των ψαριών. Η μία από τις δύο γονάδες χρησιμοποιήθηκε για την ιστολογική επεξεργασία η οποία πραγματοποιήθηκε στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. και η άλλη, αφού έγινε διαχωρισμός ορχικού και ωθηκικού ιστού, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των θυρεοειδικών ορμονών. Οι ιστοί

συντηρήθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την πραγματοποίηση των προσδιορισμών. Δεν πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των θυρεοειδικών ορμονών στις γονάδες της πρώτης δειγματοληψίας. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι εξαιτίας της αναστροφής και του μικρού μεγέθους των γονάδων, ο ορχικός ιστός καταλάμβανε πολύ μικρό τμήμα των γονάδων και δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός των θυρεοειδικών ορμονών στον ιστό αυτό εκτός από την τελευταία δειγματοληψία όπου οι γονάδες των ψαριών ήταν αρκετά μεγάλες.

Η φυγοκέντρηση του αίματος, για το διαχωρισμό του πλάσματος, έγινε σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ , στις 3000 rpm, για 15 min. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε δοχεία erpendorf και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι την ανάλυσή του. Ο γοναδοσωματικός δείκτης (GSI) των ψαριών υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\text{GSI} = (\text{βάρος γονάδας} / \text{σωματικό βάρος ατόμου}) * 100.$$

### **2.1.2. Ιστολογική επεξεργασία των γονάδων και εκτίμηση του ποσοστού ορχικού και ωθηκικού ιστού.**

Τμήμα από το μεσαίο παχύτερο τμήμα της αριστερής γονάδας κάθε ατόμου τοποθετήθηκε σε μονιμοποιητικό διάλυμα φορμαλδεΰδη : γλουταραλδεΰδη (4:1) για τουλάχιστον 24 ώρες. Στη συνέχεια αφυδατώθηκε εμβαπτιζόμενο σε σειρά διαλυμάτων αιθυλικής αλκοόλης ανιούσας πυκνότητας (70–96%) και πραγματοποιήθηκε έγκλειση σε μεθακρυλική ρητίνη Technovit 7100 (Heraeus, Kulzer, Germany). Οι τομές πάχους 3–5  $\mu\text{m}$  (από το μέσο της γονάδας και στο πιο παχύ σημείο) έγιναν σε μικροτόμο Biocut 2035 (Reichert Jung, Germany) και πραγματοποιήθηκε η χρώση τους με Methylene blue (Sigma, Germany)/Azure II (Sigma, Germany)/Basic Fuchsin (Polysciences, USA). Η παρατήρησή τους πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο (BH–2, Olympus, Japan) και σε στερεοσκόπιο (SZH, Olympus, Japan) στο οποίο ήταν προσαρμοσμένη ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Nikon, CoolPix 4500) για τη λήψη φωτογραφιών των τομών των δειγμάτων. Ιστολογική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε στα 65 από τα 67 άτομα τσιπούρας.

Η εκτίμηση του ποσοστού του ορχικού και ωθηκικού ιστού πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Adobe Photoshop 7.0 από τις φωτογραφίες των τομών των γονάδων στο στερεοσκόπιο. Με τη χρήση του Wand Magic Tool (W) γινόταν επιλογή ολόκληρης της τομής της γονάδας και αφού γινόταν αφαίρεση του συνδετικού ιστού επιλεγόταν από το μενού η εντολή «Image» και στη συνέχεια η εντολή «Histogram». Με τον τρόπο αυτό προσδιοριζόταν ο αριθμός των pixel που καταλαμβάνει ολόκληρη η επιφάνεια της τομής. Στη συνέχεια γινόταν επιλογή μόνο του ωθηκικού ιστού της γονάδας και καθοριζόταν ομοίως ο αριθμός των pixel της επιφάνειάς του. Από τη σχετική αναλογία του αριθμού των pixel προσδιορίστηκε το ποσοστό που καταλαμβάνει ο ωθηκικός ιστός στη γονάδα. Από κάθε άτομο τσιπούρας πάρθηκαν 3-4 φωτογραφίες και υπολογίστηκε ο μέσος όρος για κάθε άτομο. Επίσης, στα 56 από τα 67 άτομα τσιπούρας είχε προηγηθεί μακροσκοπική εκτίμηση του ποσοστού ορχικού και ωθηκικού ιστού κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας.

## **2.2. Προσδιορισμός των θυρεοειδικών ορμονών.**

Η εκχύλιση των θυρεοειδικών ορμονών από τους ιστούς (ήπαρ και γονάδα) και ο καθαρισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Tagawa and Hirano (1987) με κάποιες τροποποιήσεις (Szisich et al., 2005). Στη συνέχεια ο ποσοτικός προσδιορισμός των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς πραγματοποιήθηκε με ραδιοανοσομετρική μέθοδο (RIA, Radio-Immuno Assay). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικές συσκευασίες Coat-A-Count, (DPC, Los Angeles, CA, USA).

### **2.2.1. Εκχύλιση των θυρεοειδικών ορμονών από τους ιστούς.**

Τμήμα του ήπατος ή του ωθηκικού ή ορχικού ιστού της γονάδας κάθε ατόμου της τσιπούρας (0,5-1 g) ζυγιζόταν σε ζυγό ακριβείας (Mettler AL 204, USA) και τοποθετούνταν σε γυάλινο σωλήνα ο οποίος βρισκόταν σε πάγο. Ακολουθούσε προσθήκη 2 ml παγωμένου διαλύματος μεθυλικής αμμωνίας (99:1 v/v) το οποίο περιείχε 1 mM 6-N-propyl-2-thiouracil (PTU). Η 6-N-propyl-2-thiouracil παρεμποδίζει την ενζυμική μετατροπή της T<sub>4</sub> σε T<sub>3</sub>. Στη συνέχεια γινόταν ομογενοποίηση του δείγματος και μετάγγιση σε σωλήνα Falcon. Το μαχαίρι του ομογενοποιητή (Yellowline

DI 18, IKA) και ο γυάλινος σωλήνας στον οποίο τοποθετούνταν αρχικά το δείγμα ξεπλένονταν με 3 ml συνολικά από το διάλυμα της μεθυλικής αμμωνίας και γινόταν προσθήκη του εκπλύματος στο ομογενοποιημένο δείγμα. Το δείγμα βρισκόταν συνολικά σε 5 ml μεθανόλης. Ακολουθούσε ανάδευση σε οριζόντια θέση για 10 min στους 4°C (σε κρυοθάλαμο) σε ομογενοποιητή (MS 1 Minishaker, IKA®) και κατόπιν φυγοκέντρηση για 15 min στις 2000 g και 4°C (Kubota 5800, Japan). Το υπερκείμενο διάλυμα που προέκυπτε μετά τη φυγοκέντρηση μεταφερόταν σε σωλήνα Falcon και διατηρούνταν στους 4°C. Στη συνέχεια και για 2 φορές γινόταν προσθήκη 2 ml διαλύματος μεθυλικής αμμωνίας στον αρχικό σωλήνα και ακολουθούσε ανάδευση και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Ο συνολικός όγκος του υπερκείμενου διαλύματος που προέκυπτε από την παραπάνω διαδικασία ήταν 9 ml. Τα δείγματα εξατμιζόταν σε ξηραντήρα κενού.

Στη συνέχεια ακολούθησε ο καθαρισμός των δειγμάτων. Στο δείγμα που παρέμενε στο σωλήνα Falcon μετά την εξάτμιση πραγματοποιείτο ανασύσταση με την προσθήκη 3,5 ml διαλύματος μεθυλικής αμμωνίας-χλωροφορμίου σε αναλογία 1:6 και 0,5 ml βαρβιτουρικού ρυθμιστικού διαλύματος (barbital buffer). Στη συνέχεια ακολουθούσε ανάδευση για 10 min και κατόπιν φυγοκέντρηση στις 2000 g για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Από το υπερκείμενο που προέκυπτε μεταφερόταν 700 μl σε δοχεία erpendorf των 1,5 ml, τα οποία υποβάλλονταν σε εξάτμιση σε speed-vac (Heto, Denmark) στους 45°C για 4 ώρες. Το δείγμα που προέκυπτε από την εξάτμιση επαναδιαλυόταν σε διάλυμα barbital buffer (50 mM pH 8,6 CaCl<sub>2</sub> 0,05%) στο οποίο γινόταν προσθήκη BSA (0,1%). Στην περίπτωση του ήπατος ο όγκος του διαλύματος αυτού ήταν 200 μl ενώ στη γονάδα ήταν 160 μl. Το δείγμα αναδευόταν για κάποια λεπτά στον αναδευτήρα για πλήρη διάλυση. Στη συνέχεια οι θυρεοειδικές ορμόνες προσδιορίστηκαν με ραδιοανοσοανάλυση.

Για την αξιολόγηση της τροποποιημένης μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια αξιολόγησης της ανάκτησης και της γραμμικότητας (βλ. § 2.2.4).

### **2.2.2. Ραδιοανοσοανάλυση (RIA).**

Η αρχή της μεθόδου της ραδιοανοσοανάλυσης βασίζεται στον ανταγωνισμό της ορμόνης θυροξίνης (T<sub>4</sub>) ή της τριιωδοθυρονίνης (T<sub>3</sub>) που περιέχεται στα δείγματα και στα πρότυπα διαλύματα με μια γνωστή ποσότητα των ορμονών επισημασμένων με

ραδιοϊσότοπο  $^{125}\text{I}$  (ιχνηθέτης), για τη δέσμευση συγκεκριμένων θέσεων των ειδικών αντισωμάτων της  $T_4$  ή της  $T_3$ . Βάση αυτής της αρχής μετρώνται σε  $\gamma$ -counter οι κρούσεις ανά λεπτό (cpm-counts per minute) των προτύπων (standards) και των άγνωστων δειγμάτων των ορμονών και με βάση την καμπύλη των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης προσδιορίζεται με ακρίβεια η τιμή της συγκέντρωσης των θυρεοειδικών ορμονών των άγνωστων δειγμάτων. Η ραδιενέργεια που δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα αντισώματα είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της ορμόνης στο δείγμα. Η διαδικασία του προσδιορισμού είχε ως εξής:

Τα αντιδραστήρια και τα δείγματα έρχονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα αναδεύονταν ελαφρά και μεταφερόταν συγκεκριμένες ποσότητες (Παράρτημα I) στα σωληνάρια RIA, τα οποία είναι εσωτερικά επικαλυμμένα με το ειδικό αντίσωμα. Μετά την προσθήκη και της επισημασμένης ορμόνης, ακολουθούσε ανάδευση των σωληναρίων για 5 sec, επώαση σε υδατόλουτρο (Memmert, Germany) στους  $37^\circ\text{C}$ , για 1 ώρα για την  $T_4$  και για 2 ώρες για την  $T_3$  (κάλυψη των σωληναρίων με αλουμινόχαρτο), απόχυση και πλήρης αναρρόφηση όλων των καταλοίπων πάνω σε απορροφητικό χαρτί.

Σημειώνεται ότι τα δείγματα του πλάσματος και των ιστών (ήπαρ και γονάδα) για τον προσδιορισμό των θυρεοειδικών ορμονών αραιώνονταν με φυσιολογικό ορό και barbital buffer+BSA αντίστοιχα, για να εξασφαλιστεί ότι οι προς μέτρηση συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων βρίσκονται μέσα στο βέλτιστο τμήμα της καμπύλης προσδιορισμού. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στο πλάσμα ήταν 1:3, στο ήπαρ 1:2 και 1:5 και στη γονάδα 1:2, 1:3 και 1:4 για τον προσδιορισμό της  $T_3$ . Για τον ίδιο λόγο, σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερος όγκος δείγματος για τον προσδιορισμό της  $T_4$ . Η ποσότητα του δείγματος στην περίπτωση του πλάσματος ήταν 50  $\mu\text{l}$  ή 75  $\mu\text{l}$ , στο ήπαρ 25  $\mu\text{l}$  ή 50  $\mu\text{l}$  και στη γονάδα ήταν 50  $\mu\text{l}$  ή 75  $\mu\text{l}$ . Η ποσότητα των δειγμάτων προσδιορίστηκε σε κάθε περίπτωση μετά από προκαταρκτικές δοκιμές. Η αναλυτική ευαισθησία των εμπορικών συσκευασιών της ραδιοανοσοανάλυσης είναι 2,5  $\text{ng ml}^{-1}$  για την  $T_4$  και 0,07  $\text{ng ml}^{-1}$  για την  $T_3$ .

### 2.2.3. Υπολογισμός των αποτελεσμάτων.

Από τις τιμές που προέκυψαν από τις κρούσεις στο μετρητή ραδιενέργειας (Wallac, 1275 Minigamma) των προτύπων διαλυμάτων σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη με την οποία υπολογίστηκαν οι τιμές των άγνωστων δειγμάτων. Η καμπύλη αυτή (logit-log) σχεδιάζεται αυτόματα από υπολογιστικό πρόγραμμα (Walag, Pharmacia). Η συγκέντρωση των θυρεοειδικών ορμονών από το πρόγραμμα αυτό υπολογίστηκε σε ng ml<sup>-1</sup>. Οι εμπορικές συσκευασίες προδιορισμού των θυρεοειδικών ορμονών είναι σχεδιασμένες για πλάσμα αίματος και ως εκ τούτου στην περίπτωση των ιστών απαιτούνται κατάλληλοι υπολογισμοί (Παράρτημα II) για να αναχθούν τα αποτελέσματα ανά g δείγματος από το ήπαρ ή τη γονάδα.

### 2.2.4. Αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού των θυρεοειδικών ορμονών.

#### I. Δοκιμασία ανάκτησης (Recovery).

Η δοκιμασία ανάκτησης είναι ένα από τα κριτήρια αξιολόγησης της ακρίβειας μιας μεθόδου. Ακρίβεια θεωρείται ο βαθμός προσέγγισης των πραγματικών τιμών των ουσιών υπό προσδιορισμό. Δοκιμασία ανάκτησης ονομάζεται η ικανότητα ανάκτησης μιας ποσότητας θυρεοειδικών ορμονών, η οποία προστίθεται σε ένα γνωστής συγκέντρωσης δείγμα. Ως ανάκτηση, ορίζεται ο λόγος της μετρούμενης συγκέντρωσης της ορμόνης προς τη θεωρητική.

$$\text{Ανάκτηση} = \frac{\text{Μετρούμενη συγκέντρωση} * 100}{\text{Θεωρητική συγκέντρωση}}$$

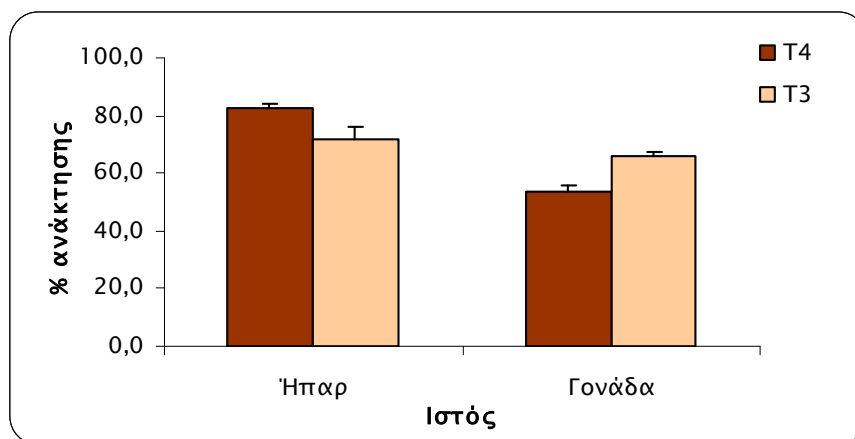
Για τον προσδιορισμό του ποσοστού ανάκτησης στην παρούσα μελέτη ετοιμάστηκαν δείγματα ανάκτησης. Τα δείγματα αυτά προέρχονταν από την υποδιαίρεση ενός αγνώστου δείγματος, σε τρία υποδείγματα του ίδιου όγκου. Στα δύο από τα τρία υποδείγματα έγινε προσθήκη γνωστής ποσότητας προτύπου ορμόνης (T<sub>4</sub> ή T<sub>3</sub>) (δύο συγκεντρώσεις για κάθε ορμόνη). Στη συνέχεια υποβάλλονταν και τα τρία υποδείγματα στα ίδια ακριβώς βήματα όπως και τα προς ανάλυση άγνωστα δείγματα. Οι ποσότητες των πρότυπων διαλυμάτων των ορμονών που προστέθηκαν στα δείγματα (Πίνακας 2.1) υπολογίστηκαν έτσι ώστε να μην ξεφεύγουν από τα όρια ανίχνευσης της πρότυπης καμπύλης του προσδιορισμού.



**Πίνακας 2.1.** Ποσότητες των θυρεοειδικών ορμονών που προστέθηκαν στις δοκιμασίες ανάκτησης στους ιστούς της τσιπούρας.

	T <sub>4</sub>	T <sub>3</sub>
Ήπαρ	10 ng & 16 ng	0,5 ng & 1,5 ng
Γονάδα	1 ng & 2 ng	0,5 ng & 1,5 ng

Το μέσο ποσοστό ανάκτησης της θυροξίνης (T<sub>4</sub>) στο ήπαρ ήταν  $82,6 \pm 1,8\%$  ( $x \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$ ) και στη γονάδα ήταν χαμηλότερο και βρέθηκε  $53,9 \pm 1,8\%$  ( $n=3$ ). Το μέσο ποσοστό ανάκτησης της τριϊωδοθυρονίνης (T<sub>3</sub>) στο ήπαρ ήταν  $71,4 \pm 4,7\%$  ( $n=3$ ) και στη γονάδα ήταν επίσης χαμηλότερο και βρέθηκε  $66,1 \pm 1,4\%$  ( $n=3$ ) (Διάγραμμα 2.1). Τα ποσοστά αυτά λήφθηκαν υπόψιν στον υπολογισμό των τελικών συγκεντρώσεων της θυροξίνης και της τριϊωδοθυρονίνης στους ιστούς.



**Διάγραμμα 2.1.** Μέσο ποσοστό ανάκτησης του προσδιορισμού της θυροξίνης (T<sub>4</sub>) και της τριϊωδοθυρονίνης (T<sub>3</sub>) στο ήπαρ και στη γονάδα της τσιπούρας ( $n=3$ ).

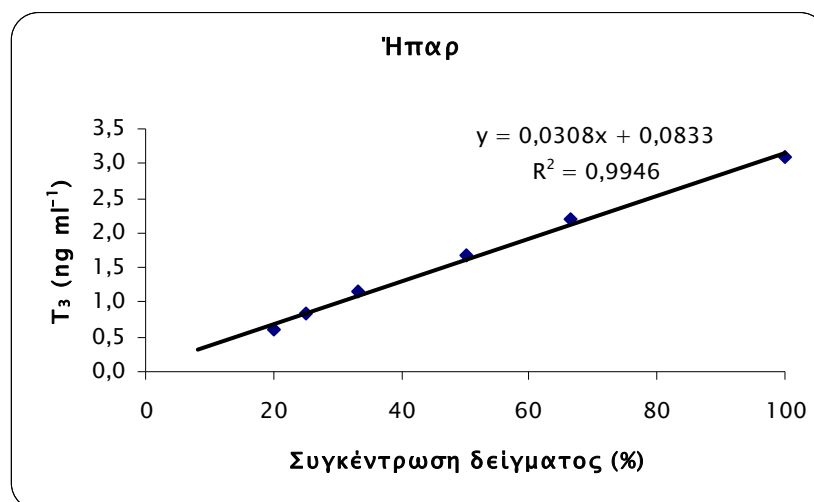
## II. Γραμμικότητα (Linearity).

Μια άλλη μέθοδος εκτίμησης της ακρίβειας του προσδιορισμού είναι η γραμμικότητα. Δείγματα γονάδας και ήπατος γνωστής συγκέντρωσης της ορμόνης T<sub>3</sub> αραιώθηκαν διαδοχικά με διάλυμα barbital buffer+BSA και σχεδιάστηκε η ευθεία

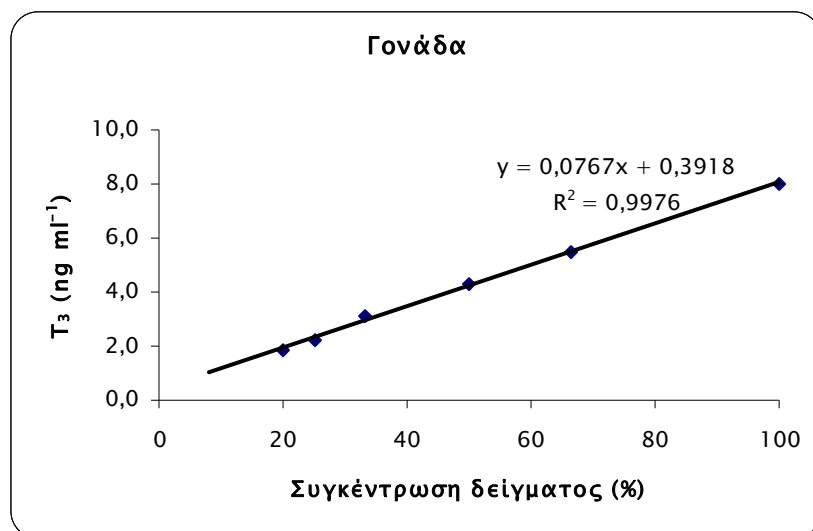
παλινδρόμησης μεταξύ των αραιώσεων και των μετρούμενων τιμών. Η προέκταση της ευθείας πρέπει να τέμνει τους άξονες στη μηδενική συγκέντρωση. Αυτό δείχνει απουσία παρεμβολών από το περιβάλλον του barbital buffer+BSA.

Για τη δοκιμασία της γραμμικότητας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ήπατος και δείγματα γονάδας, τα οποία αραιώθηκαν διαδοχικά με barbital buffer+BSA (αραιώσεις: 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4 και 1:5). Για την  $T_4$  αντί για αραιώση πραγματοποιήθηκε η μέτρηση δειγμάτων αυξανόμενης ποσότητας (25 μl, 50 μl για το ήπαρ και 25 μl, 50 μl, 75 μl για τη γονάδα). Αυτό έγινε για να συμπίσουν οι αναμενόμενες τιμές με την περιοχή καλής ευαισθησίας της καμπύλης αναφοράς.

Από τα Διαγράμματα 2.2 και 2.3 διαπιστώνεται ότι η ευθεία παλινδρόμησης της  $T_3$  στο ήπαρ και στη γονάδα πλησιάζει τους άξονες στη μηδενική συγκέντρωση. Επομένως η ακρίβεια των αποτελεσμάτων δεν επηρεάστηκε από την αραιώση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της  $T_3$ .



**Διάγραμμα 2.2.** Δοκιμασία γραμμικότητας της τριϊωδοθυρονίνης ( $T_3$ ) στο ήπαρ της τσιπούρας.



**Διάγραμμα 2.3.** Δοκιμασία γραμμικότητας της τριώδοθυρονίνης (T<sub>3</sub>) στη γονάδα της τσιπούρας.

Όπως αναφέρθηκε για την T<sub>4</sub> αντί για αραιώση πραγματοποιήθηκε η μέτρηση δειγμάτων αυξανόμενης ποσότητας, 25 μl, 50 μl στο ήπαρ και 25 μl, 50 μl, 75 μl στη γονάδα. Η δοκιμασία αυτή έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα στους δύο ιστούς (Πίνακας 2.2 και 2.3).

**Πίνακας 2.2.** Δείγματα γραμμικότητας της θυροξίνης (T<sub>4</sub>) στο ήπαρ της τσιπούρας.

	25 μl	50 μl
<b>Δείγμα 1</b>	15,8	16,4
<b>Δείγμα 2</b>	7,9	8,0
<b>Δείγμα 3</b>	8,8	9,0

**Πίνακας 2.3.** Δείγματα γραμμικότητας της θυροξίνης (T<sub>4</sub>) στη γονάδα της τσιπούρας.

	25 μl	50 μl	75 μl
<b>Δείγμα 1</b>	4,1	4,0	4,4
<b>Δείγμα 2</b>	4,4	4,7	4,0
<b>Δείγμα 3</b>	4,3	4,5	4,2

## 2.3. Επίδραση του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου methimazole στην περιφερική ρύθμιση του θυρεοειδή και στην αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.

### 2.3.1. Ψάρια και πειραματικές συνθήκες.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις κλειστές πειραματικές εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., στο Ηράκλειο Κρήτης και οι αναλύσεις στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης. Χρησιμοποιήθηκαν 20 άτομα τσιπούρας ηλικίας 2+. Το πείραμα αυτό ξεκίνησε στις 28/4/06 και ολοκληρώθηκε στις 12/5/06.

Οι κυλινδρικές δεξαμενές ήταν όγκου 500 L και βάθους 1 m και εξοπλισμένες με είσοδο συνεχούς παροχής θαλασσινού ύδατος, με εξόδους για την απομάκρυνση των αποβλήτων και παροχή οξυγόνου. Τα ψάρια κατανάλωναν εμπορική τροφή (pellets, Biomar–Aqualim SA 3 mm) και η παροχή της γινόταν με το χέρι, δύο φορές την ημέρα. Η μέση θερμοκρασία του νερού ήταν 19,2°C και η μέση συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου ήταν 7,9 mg L<sup>-1</sup>. Η αλατότητα κατά τη διάρκεια όλων των δειγματοληψιών ήταν 39–40‰. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε φυσικές συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 20 άτομα τσιπούρας ηλικίας 2+ τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, την ομάδα Control και την ομάδα Methimazole. Η ομάδα Control περιλάμβανε 10 άτομα βάρους 214,2 ± 14,9 g (mean ± SEM) στα οποία καθημερινά στις 12:30 μμ και για 14 ημέρες γινόταν ενδοπεριτοναϊκή ένεση με διάλυμα φυσιολογικού ορού (0,09% NaCl + 0,03% BSA). Η ομάδα Methimazole περιλάμβανε 10 άτομα τσιπούρας βάρους 241,1 ± 17,1 g και στα οποία καθημερινά στις 13:00 μμ και για 14 ημέρες γινόταν ενδοπεριτοναϊκή ένεση με το αντιθυρεοειδικό φάρμακο methimazole (Sigma–Aldrich, Germany, 98%) (40mg kg<sup>-1</sup> ημέρα<sup>-1</sup>) σε διάλυμα φυσιολογικού ορού.

### Δειγματοληψίες.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες. Στην πρώτη δειγματοληψία (D 0), η οποία έγινε πριν ξεκινήσει η χορήγηση των διαλυμάτων με ενέσεις στα ψάρια, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και στις δύο ομάδες (Control και Methimazole). Τα ψάρια

με τη βοήθεια απόχης μεταφερόταν σε πλαστικά δοχεία (των 50L) που περιείχαν αναισθητικό (0,3 ml L<sup>-1</sup> Ethylenglycol–monophenylether, Merck 99%). Όταν τα ψάρια (n=10) ήταν αναισθητοποιημένα, μεταφερόταν στον πάγκο εργασίας, με το κεφάλι σκεπασμένο με μία πετσέτα και ακολουθούσε η αιμοληψία από την ουραία φλέβα. Το αίμα συλλεγόταν με σύριγγα μίας χρήσεως του 1ml και μεταφέρονταν σε σωληνάκια με αντιπηκτικό (ηπαρίνη, Leo, Denmark). Στη συνέχεια μετρούνταν το βάρος. Ακολούθησε δειγματοληψία την 7<sup>η</sup> μέρα (D 7) με όμοιο τρόπο, όπου επίσης πάρθηκε μόνο αίμα όπως παραπάνω και τέλος την 14<sup>η</sup> μέρα (D 14) τα ψάρια (n=10) θανατώθηκαν με αναισθητικό αφού είχε προηγηθεί αιμοληψία και ακολούθησε η λήψη του ήπατος και των γονάδων. Η μία από τις δύο γονάδες χρησιμοποιήθηκε για την ιστολογική επεξεργασία η οποία πραγματοποιήθηκε στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. (βλ. §2.1.2) και η άλλη χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των θυρεοειδικών ορμονών. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός του ωθηκικού από τον ορχικό ιστό, λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των γονάδων. Οι ιστοί συντηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την πραγματοποίηση των προσδιορισμών.

Η φυγοκέντρηση του αίματος, για τον διαχωρισμό του πλάσματος, έγινε σε θερμοκρασία 4°C, στις 3000 rpm, για 15 min. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε δοχεία errendorf και στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την ανάλυσή του.

### 2.3.2. Αναλυτικοί Προσδιορισμοί.

#### I. Προσδιορισμός της γλυκόζης του πλάσματος.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης είναι ενζυματική χρωματομετρική (GOD / PAP) και πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικής συσκευασίας (Biosis, Hellas). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο ότι η γλυκόζη του πλάσματος, μετατρέπεται σε γλυκονικό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) με την παρουσία του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (GOD):



Στη συνέχεια το υπεροξειδίο του υδρογόνου, μαζί με αμινοφαιναζόνη και φαινολικό παράγωγο, με τη βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδάση (POD), παράγει το τελικό προϊόν ερυθρού χρώματος.



Η διαδικασία του προσδιορισμού έχει ως εξής:

- Τα αντιδραστήρια και το πλάσμα έρχονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έγινε η ανασύσταση των αντιδραστηρίων: προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα στο φιαλίδιο που περιείχε τα ένζυμα σε λυοφιλοποιημένη μορφή.
- Κατόπιν έγινε προσθήκη σε δοκιμαστικά σωληνάκια των παρακάτω:

	Δείγμα	Πρότυπο	Τυφλό
Πρότυπο	-	10 μl	-
Δείγμα	10 μl	-	-
Αντιδραστήριο εργασίας	1 ml	1 ml	1 ml

- Ακολούθησε επώαση τους σε υδατόλουτρο στους 37°C επί 15 min.
- Ανάδευση σε ειδικό αναδευτήρα (Vortex).
- Τέλος αφού μεταφέρθηκαν σε ειδικές γυάλινες κιβέττες, φωτομετρήθηκαν έναντι τυφλού σε μήκος κύματος 510 nm.

Το πρότυπο διάλυμα (Standard) έχει συγκέντρωση 100 mg dl<sup>-1</sup>. Κάθε δείγμα υπέστη την παραπάνω διαδικασία δύο φορές, όπως και το πρότυπο διάλυμα (Standard).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης γλυκόζης σε κάθε δείγμα έγινε με βάση τον τύπο:

$$\text{Γλυκόζη (mg\%)} = C_{\text{std}} * \frac{A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{std}}}$$

$A_{\text{δείγματος}}$  = τιμή απορρόφησης δείγματος και

$A_{\text{std}}$  = τιμή απορρόφησης πρότυπου διαλύματος γλυκόζης (100 mg%).

Για τη μετατροπή των mg% σε mmol L<sup>-1</sup>, η τιμή πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό 5,55, δηλαδή:

$$\text{Γλυκόζη (mg\%)} = 5,55 * \frac{\text{A δείγματος}}{\text{A std}}$$

## II. Προσδιορισμός των θυρεοειδικών ορμονών.

Για τον προσδιορισμό των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς βλ. § 2.2.

### 2.4. Στατιστική ανάλυση.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Sigma Stat 3.1 (Jandel Scientific). Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής τους (Normality Test) και την ισότητα των διασπορών τους (Equal Variance Test) και σε περίπτωση που ήταν απαραίτητο εφαρμόστηκε λογαριθμικός (log10) μετασχηματισμός των τιμών. Το επόμενο βήμα, αφού πληρούνταν οι ανωτέρω προϋποθέσεις, ήταν ο έλεγχος με t-test, όταν επρόκειτο για δύο πειραματικές ομάδες, με Ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα (One-Way Analysis of Variance, ANOVA), όταν επρόκειτο για περισσότερες από δύο πειραματικές ομάδες και ένα παράγοντα και με Ανάλυση διασποράς με δύο παράγοντες (Two-Way Analysis of Variance, ANOVA), όταν επρόκειτο για περισσότερες από δύο πειραματικές ομάδες και πάνω από ένα παράγοντα. Σε περίπτωση που δεν πληρούνταν οι προϋποθέσεις της κανονικότητας και της ισότητας των διασπορών των πληθυσμών χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικά τεστ (Mann-Whitney ή Kruskal-Wallis). Στις περιπτώσεις που διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 ( $P < 0,05$ ), χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα τα Tuckey's ή Dunn's τεστ πολλαπλής σύγκρισης (multiple comparison Tests (all pairwise)) για να αναγνωρίσουμε ποιες συγκεκριμένες ομάδες τιμών διέφεραν στατιστικά σημαντικά. Τέλος, για τον έλεγχο του βαθμού συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών που προσδιορίστηκαν χρησιμοποιήθηκε το τεστ πολλαπλής συσχέτισης κατά Pearson (Pearson Product Moment Correlation).

Ως επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε το 0.05 (εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά). Όλες οι τιμές δίνονται σε μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα (mean  $\pm$  standard error).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



### 3.1. Αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα.

#### 3.1.1. Βάρος σώματος και γοναδοσωματικός δείκτης.

Κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών το βάρος σώματος των ψαριών κυμάνθηκε από  $374,6 \pm 7,5$  έως  $835,9 \pm 38,9$  g, το μεσουραίο μήκος από  $292,0 \pm 3,1$  έως  $375,9 \pm 5,3$  mm και το βάρος των γονάδων από  $0,8 \pm 0,1$  έως  $42,8 \pm 3,7$  g. Η μέση τιμή του γοναδοσωματικού δείκτη των ατόμων τσιπούρας κυμάνθηκε από  $0,13 \pm 0,04$  έως  $0,29 \pm 0,03$  (Πίνακας 3.1) εκτός από την τελευταία δειγματοληψία στην οποία αυξήθηκε εντυπωσιακά ( $5,14 \pm 0,36$ ,  $n=12$ ).

**Πίνακας 3.1.** Αριθμός, βάρος σώματος, μεσουραίο μήκος, βάρος γονάδας και γοναδοσωματικός δείκτης των ατόμων τσιπούρας ανά δειγματοληψία. Οι τιμές που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

Δειγματοληψία	Αριθμός Ατόμων	Βάρος Σώματος (g) (mean $\pm$ SEM)	Μεσουραίο Μήκος (mm) (mean $\pm$ SEM)	Βάρος Γονάδων (g) (mean $\pm$ SEM)	GSI (%) (mean $\pm$ SEM)
1/04/05	5	$374,6 \pm 7,5^{abd}$	$292,0 \pm 3,1^a$	$0,8 \pm 0,1^a$	$0,20 \pm 0,02^a$
22/04/05	10	$345,4 \pm 10,5^a$	$290,0 \pm 2,4^a$	$0,9 \pm 0,1^a$	$0,26 \pm 0,04^a$
5/05/05	8	$393,5 \pm 17,4^{abd}$	$299,0 \pm 3,7^{ab}$	$0,6 \pm 0,1^a$	$0,16 \pm 0,03^a$
18/05/05	8	$463,4 \pm 32,1^{dc}$	$304,4 \pm 6,1^{ab}$	$0,9 \pm 0,1^a$	$0,20 \pm 0,03^a$
2/06/05	6	$459,0 \pm 25,4^{bc}$	$312,3 \pm 2,3^{ad}$	$0,9 \pm 0,1^a$	$0,18 \pm 0,04^a$
23/06/05	6	$504,4 \pm 19,6^c$	$320,3 \pm 5,3^{bd}$	$0,7 \pm 0,1^a$	$0,13 \pm 0,04^a$
14/07/05	6	$548,9 \pm 29,4^c$	$329,8 \pm 6,2^{cd}$	$1,6 \pm 0,3^a$	$0,29 \pm 0,03^a$
8/08/05	6	$575,7 \pm 15,3^c$	$331,7 \pm 3,1^d$	$1,5 \pm 0,4^a$	$0,27 \pm 0,07^a$
15/12/05	12	$835,9 \pm 38,9^e$	$375,9 \pm 5,3^e$	$42,8 \pm 3,7^b$	$5,14 \pm 0,36^b$

#### 3.1.2. Εποχιακή μεταβολή του ποσοστού ωοθηκικού/ορχικού ιστού.

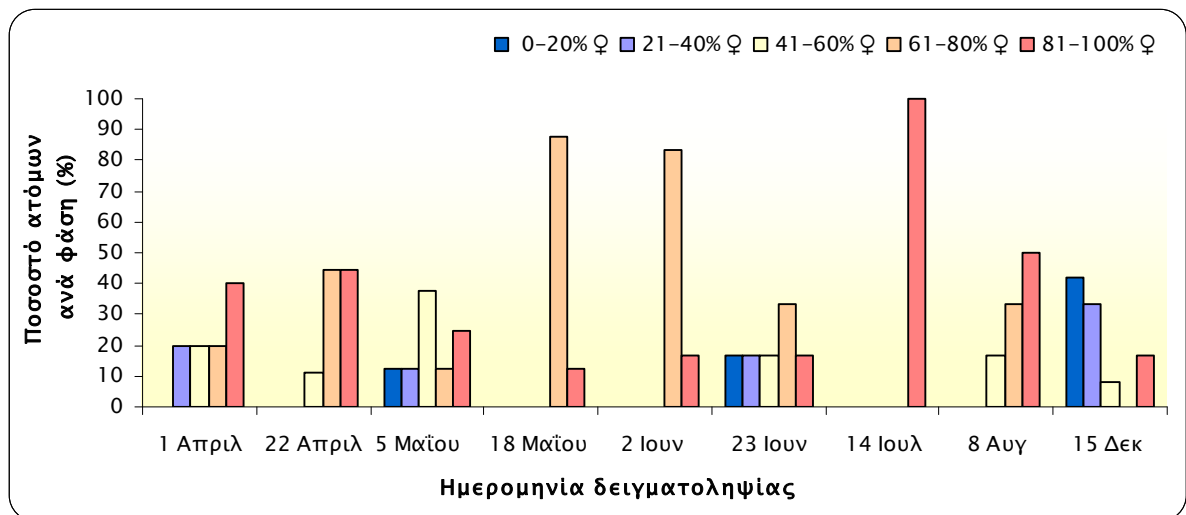
Όπως αναφέρθηκε στην §2.1.2, στα 65 από τα 67 άτομα τσιπούρας πραγματοποιήθηκε ιστολογική επεξεργασία των γονάδων για την εκτίμηση του ποσοστού ωοθηκικού και ορχικού ιστού. Επιπλέον, στα 56 από τα 65 άτομα

πραγματοποιήθηκε και μακροσκοπική εκτίμηση των γονάδων κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας. Παρατηρήθηκε διαφορά μεγαλύτερη από 20% στο ποσοστό εκτίμησης του ωθητικού ιστού μεταξύ της μακροσκοπικής και της μικροσκοπικής μεθόδου μόνο σε 9 από τα 56 άτομα τσιπούρας ενώ στα υπόλοιπα υπήρξε συμφωνία μεταξύ των δύο τρόπων εκτίμησης. Ο διαχωρισμός της αναστροφής του φύλου της τσιπούρας σε φάσεις ανά 20% ωθητικού ιστού (Πίνακας 3.2) πραγματοποιήθηκε με βάση την εξέταση των τομών στο στερεοσκόπιο ενώ για τη μία από τις δύο γονάδες στις οποίες δεν πραγματοποιήθηκε ιστολογική επεξεργασία ελήφθη υπόψιν η μακροσκοπική εξέταση.

**Πίνακας 3.2.** Φάσεις αναστροφής του φύλου της τσιπούρας.

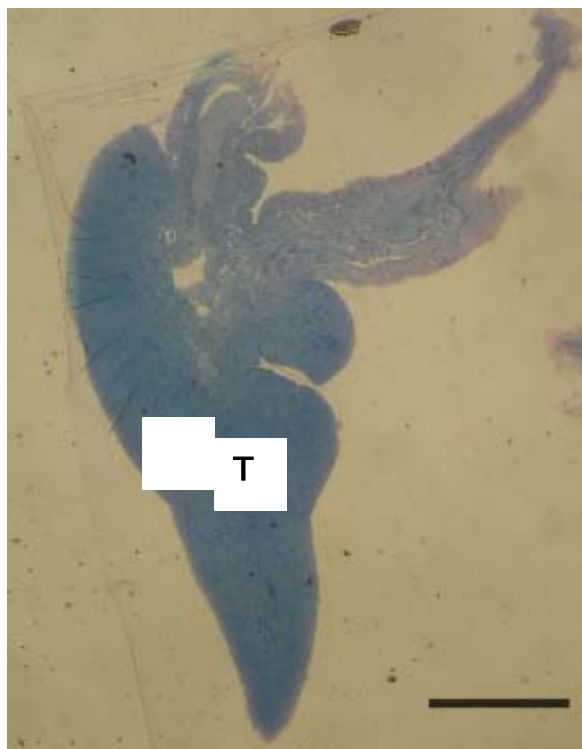
<b>ΦΑΣΗ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ</b>	<b>Εικόνα</b>
Φ1: 0-20% ♀	3.1
Φ2: 21-40% ♀	3.2
Φ3: 41-60% ♀	3.3
Φ4: 61-80% ♀	3.4
Φ5: 81-100% ♀	3.5

Η εποχιακή μεταβολή του ποσοστού ωθητικού και ορχικού ιστού των ατόμων τσιπούρας παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.1. Τον Απρίλιο τα άτομα βρέθηκαν κυρίως στις φάσεις Φ3, Φ4, Φ5 και στις αρχές Μαΐου βρέθηκαν άτομα σ' όλες τις φάσεις αναστροφής. Στα μέσα Μαΐου με αρχές Ιουνίου τα περισσότερα άτομα βρέθηκαν στη φάση Φ4 και λίγα άτομα στη φάση Φ5, ενώ στα τέλη Ιουνίου βρέθηκαν άτομα σ' όλες τις φάσεις αναστροφής. Στα μέσα Ιουλίου όλα τα άτομα βρέθηκαν στη φάση Φ5 και στις αρχές Αυγούστου τα άτομα βρέθηκαν στις φάσεις Φ3, Φ4, Φ5. Στα μέσα Δεκεμβρίου βρέθηκαν άτομα σ' όλες τις φάσεις αναστροφής εκτός από την Φ4 και τα περισσότερα άτομα βρέθηκαν στη φάση Φ1 (41,7%).

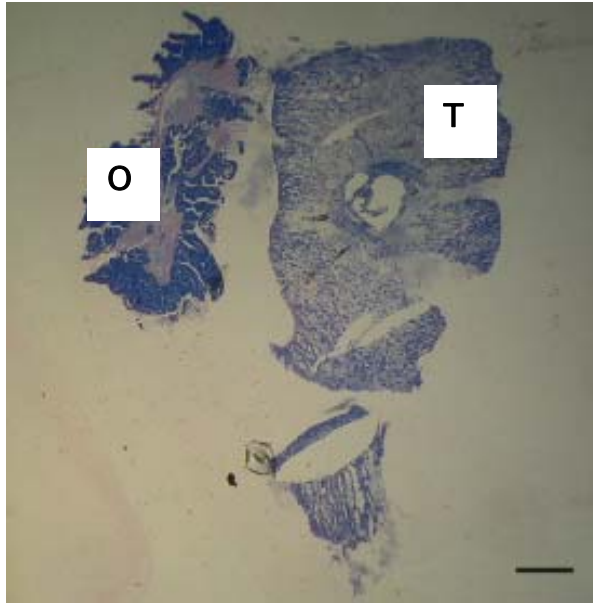


**Διάγραμμα 3.1.** Εποχιακή μεταβολή του ποσοστού ωθητικού/ορχικού ιστού στον πειραματικό πληθυσμό της τσιπούρας με βάση την ιστολογική επεξεργασία.

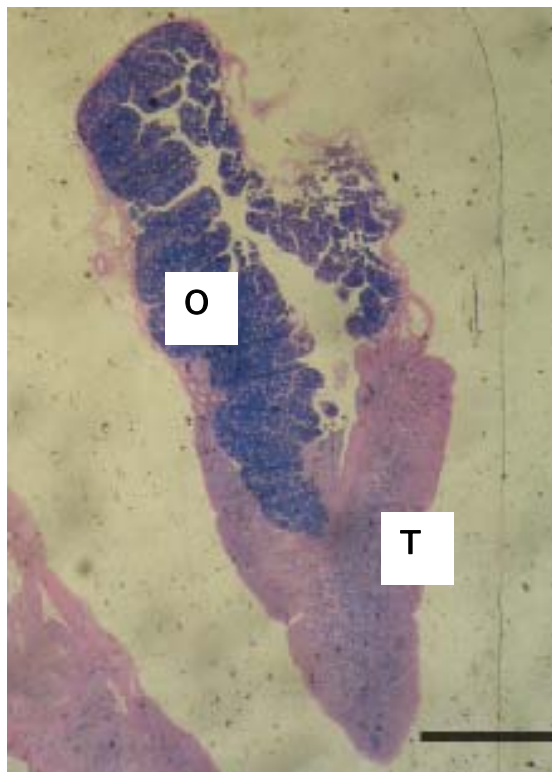
Παρακάτω παραθέτονται φωτογραφίες των τομών των γονάδων των ατόμων τσιπούρας από όλες τις φάσεις αναστροφής:



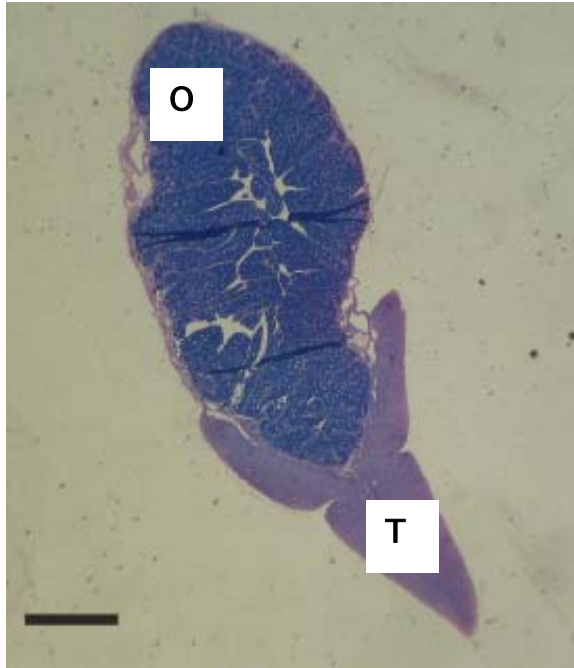
**Εικόνα 3.1.** Τομή γονάδας τσιπούρας ηλικίας 2+ στη φάση αναστροφής Φ1 (0-20% ♀). T (testis): όρχις. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1mm.



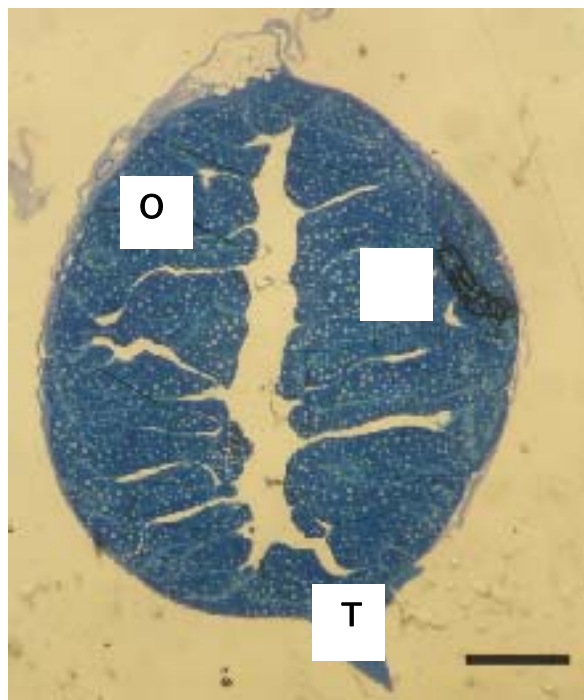
**Εικόνα 3.2.** Τομή ερμαφρόδιτης γονάδας τσιπούρας ηλικίας 2+ στη φάση αναστροφής Φ2 (21–40% ♀). Ο (ovary): ωθήκη, Τ (testis): όρχις. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1 mm.



**Εικόνα 3.3.** Τομή ερμαφρόδιτης γονάδας τσιπούρας ηλικίας 2+ στη φάση αναστροφής Φ3 (41–60% ♀). Ο (ovary): ωθήκη, Τ (testis): όρχις. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1 mm.

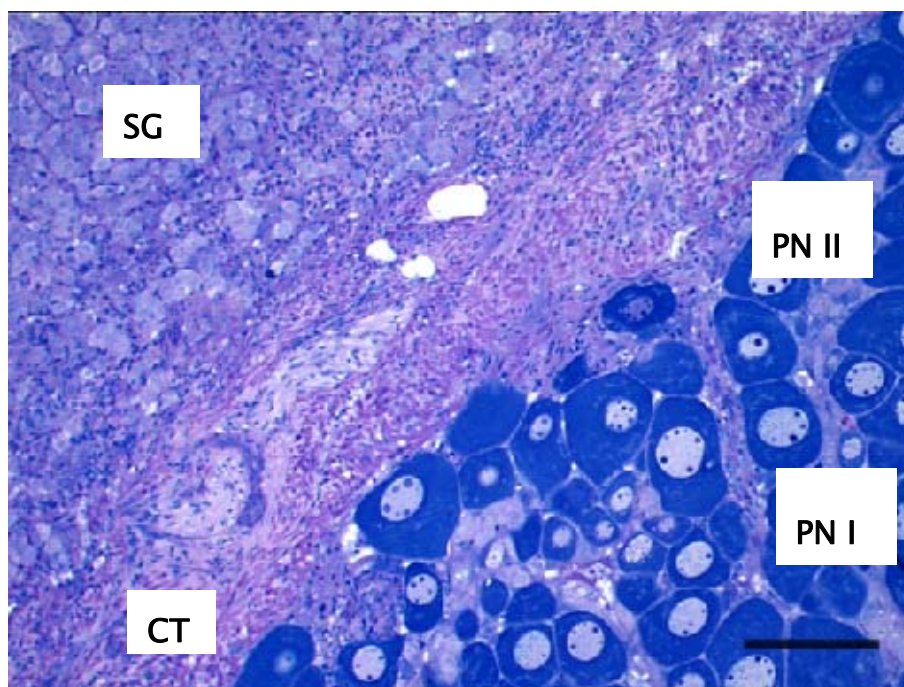


**Εικόνα 3.4.** Τομή ερμαφρόδιτης γονάδας τσιπούρας ηλικίας 2+ στη φάση αναστροφής Φ4 (61–80% ♀). Ο (ovary): ωθήκη, Τ (testis): όρχις. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1mm.



**Εικόνα 3.5.** Τομή ερμαφρόδιτης γονάδας τσιπούρας ηλικίας 2+ στη φάση αναστροφής Φ5 (81–100% ♀). Ο (ovary): ωθήκη, Τ (testis): όρχις. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 1mm.

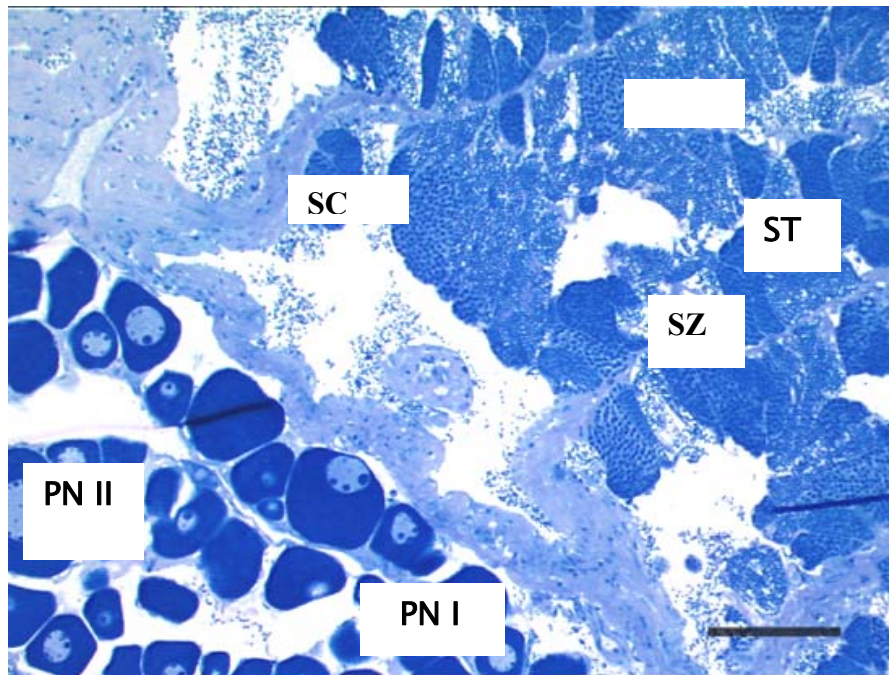
Από τον Απρίλιο μέχρι τον Αύγουστο ο ορχικός ιστός περιείχε σπερματογόνια. Ωστόσο το πρώτο διάστημα (μέχρι αρχές Μαΐου) στον ορχικό ιστό υπήρχαν και κάποια εναπομείναντα σπερματοζωάρια. Το ωθητικό τμήμα στο διάστημα αυτό περιείχε πρωτογενή ωκύτταρα (primary oocytes – PO) κυρίως στην αρχική και τελική περιπυρηνική φάση (Εικόνα 3.6).



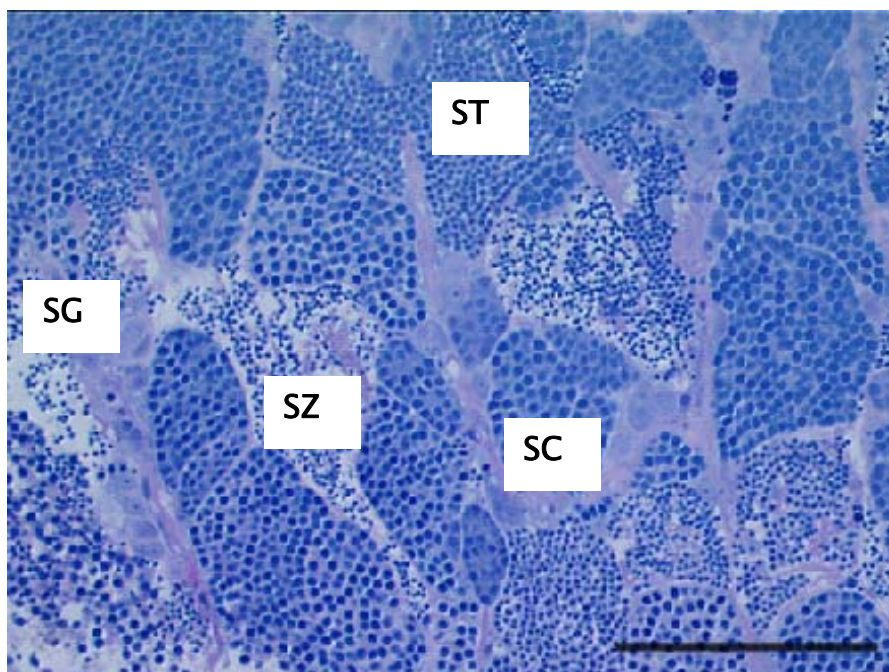
**Εικόνα 3.6.** Τομή ερμαφρόδιτης γονάδας τσιπούρας ηλικίας 2+ στα μέσα Μαΐου στην οποία συνυπάρχει ωθητικός και ορχικός ιστός. Διακρίνονται πρωτογενή ωκύτταρα στην αρχική (early perinucleolar-PN I) και τελική περιπυρηνική φάση (late perinucleolar-PN II), σπερματογόνια (spermatogonia-SG) και συνδετικός ιστός (connective tissue-CT). Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 100μm.

Στα μέσα Δεκεμβρίου τα ψάρια βρίσκονταν σε φάση σπερματογένεσης και σπερμιογένεσης ενώ δύο άτομα ολοκλήρωσαν την αναστροφή και βρίσκονταν σε φάση λεκιθογένεσης. Στα άτομα τα οποία στα μέσα Δεκεμβρίου βρίσκονταν σε φάση σπερματογένεσης και σπερμιογένεσης το ωθητικό τμήμα ήταν μικρό και αποτελούνταν από πρωτογενή ωκύτταρα (Εικόνα 3.7) ενώ στον ορχικό ιστό τα στάδια που διακρίθηκαν ήταν κυρίως αυτά των σπερματοκυττάρων (spermatocytes – SC), των σπερματίδων (spermatids – ST), των σπερματοζωαρίων (spermatozoa – SZ) και υπήρχαν ελάχιστα σπερματογόνια (spermatogonia – SG) (Εικόνα 3.7 και 3.8).



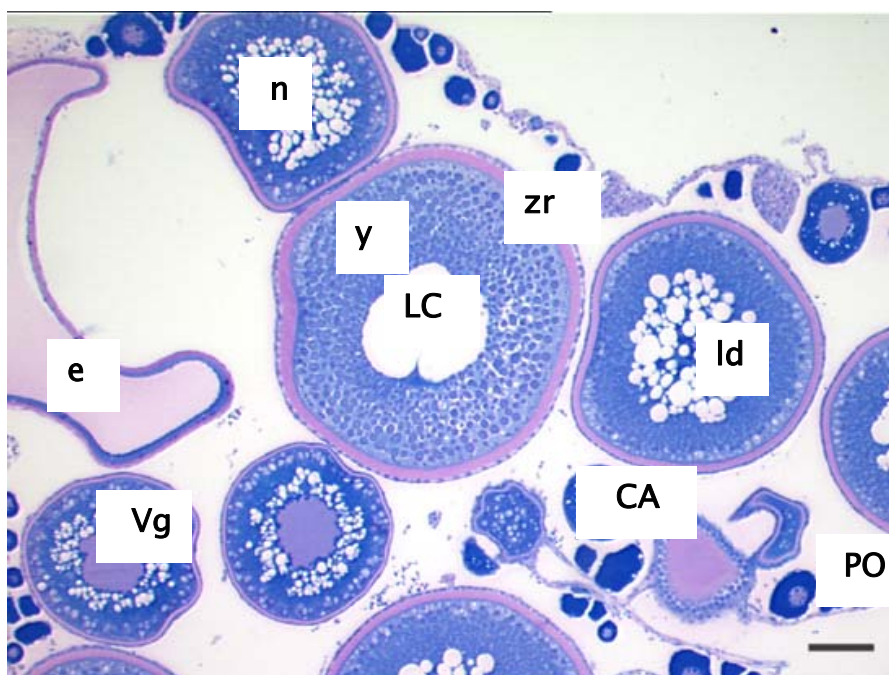


**Εικόνα 3.7.** Τομή ερμαφρόδιτης γονάδας τσιπούρας ηλικίας 2+ στα μέσα Δεκεμβρίου στην οποία συνυπάρχει ωθητικός και ορχικός ιστός. Διακρίνονται πρωτογενή ωκύτταρα στην αρχική περιπυρηνική φάση (early perinucleolar-PN I) και τελική περιπυρηνική φάση (late perinucleolar-PN II), σπερματοκύτταρα (spermatocytes-SC), σπερματίδες (spermatids-ST) και σπερματοζωάρια (spermatozoa-SZ). Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 100μm.



**Εικόνα 3.8.** Τομή όρχεων τσιπούρας ηλικίας 2+ στα μέσα Δεκεμβρίου. Διακρίνονται σπερματογόνια (spermatogonia-SG), σπερματοκύτταρα (spermatocytes-SC), σπερματίδες (spermatids-ST) και σπερματοζωάρια (spermatozoa-SZ). Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 100μm.

Η ωοθήκη των ατόμων στα οποία ολοκληρώθηκε η αναστροφή περιείχε ωκύτταρα σε διάφορες φάσεις όπως πρωτογενή ωκύτταρα (primary oocytes – PO), cortical alveoli ωκύτταρα (CA) και ωκύτταρα σε φάση λεκιθογένεσης (vitellogenesis–Vg). Σε κάποια ωκύτταρα είχε ξεκινήσει η συγχώνευση των σταγόνων λιπιδίων (lipid coalescence–LC) ενώ υπήρχαν και αυγά (Εικόνα 3.9).



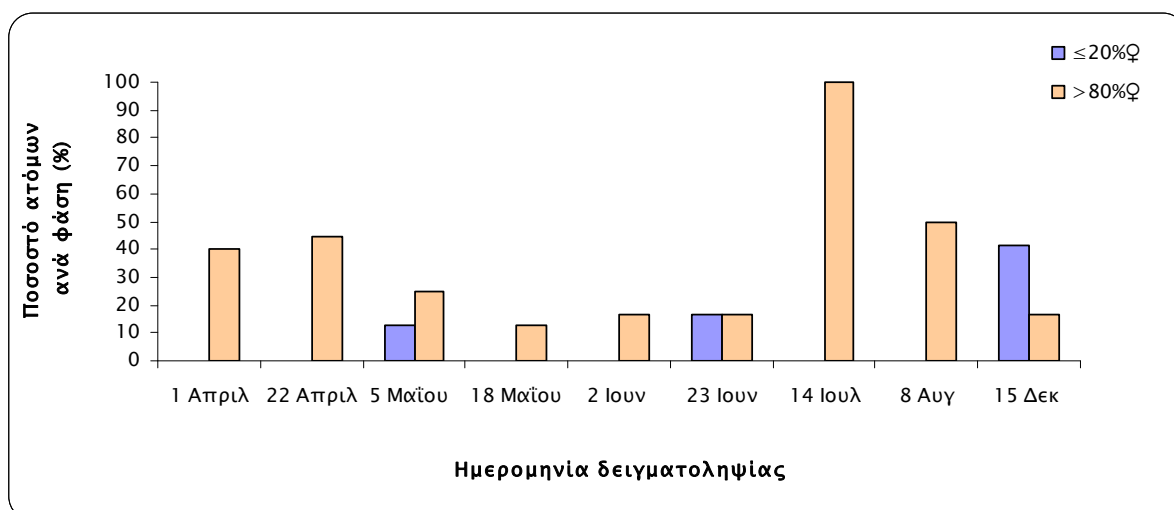
**Εικόνα 3.9.** Ωκύτταρα τσιπούρας ηλικίας 2+ σε διάφορες φάσεις, στα μέσα Δεκεμβρίου. Διακρίνονται πρωτογενή ωκύτταρα (primary oocytes – PO), cortical alveoli ωκύτταρα (CA), ωκύτταρα σε φάση λεκιθογένεσης (vitellogenesis–Vg) από τα οποία σε κάποια είχε ξεκινήσει η συγχώνευση των σταγόνων λιπιδίων (lipid coalescence–LC) και αυγά. e (egg): αυγό, Id (lipid droplet): σταγόνα λιπιδίου, n (nucleous): πυρήνας, y (yolk): λέκιθος, zr (zona radiata): ακτινωτή ζώνη. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 100μm.

### 3.1.3. Εποχιακή μεταβολή στην αναλογία φύλου.

Θέτοντας ως αρσενικά ή θηλυκά άτομα αυτά στα οποία ο ωοθηκικός ιστός καταλαμβάνει μέχρι 20% και περισσότερο από 80% της γονάδας αντίστοιχα, η αναλογία των αρσενικών ( $\leq 20\%$  ♀) και των θηλυκών ( $> 80\%$  ♀) ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.2. Τον Απρίλιο στο 40–45% (αρχές και τέλος Απριλίου, αντίστοιχα) των ατόμων του πληθυσμού της τσιπούρας ο ωοθηκικός ιστός καταλάμβανε το 81–100% της γονάδας (Φ5). Προφανώς η αναστροφή του φύλου ξεκίνησε πριν το τέλος της 1<sup>ης</sup> αναπαραγωγικής περιόδου και



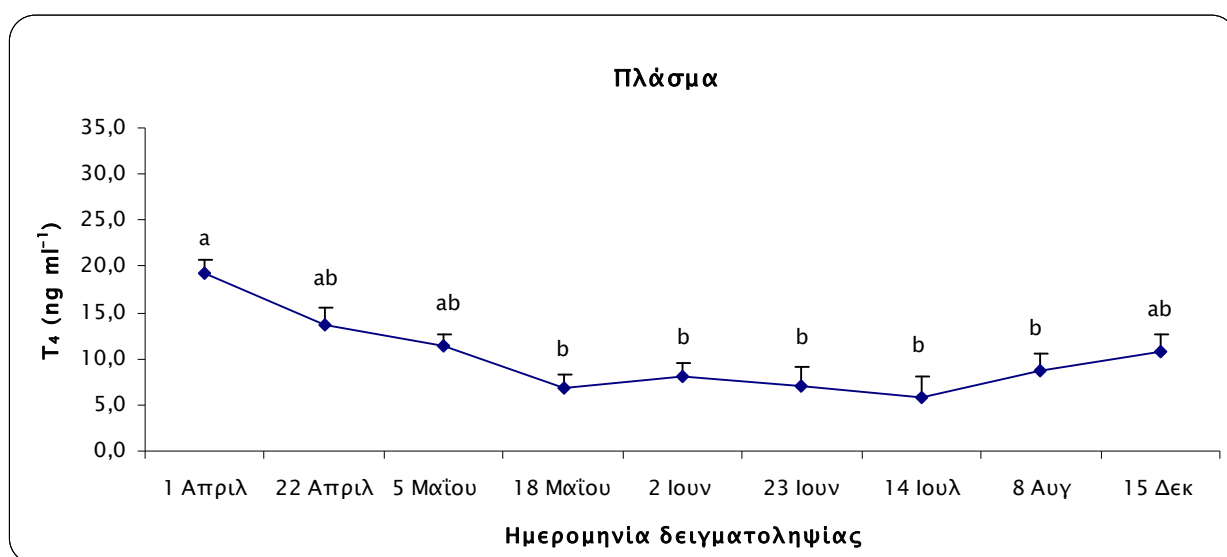
προχώρησε πολύ γρήγορα. Στη συνέχεια το ποσοστό των ατόμων στη φάση Φ5 (81–100% ♀) μειώθηκε στο 25% στις αρχές Μαΐου, διατηρήθηκε περίπου στο 15% το χρονικό διάστημα από μέσα Μαΐου μέχρι τα τέλη Ιουνίου (στις αρχές Μαΐου και στα τέλη Ιουνίου βρέθηκαν επίσης αρσενικά άτομα σε ποσοστό 12,5% και 16,6%, αντίστοιχα) αλλά στα μέσα Ιουλίου όλα τα άτομα βρέθηκαν στη φάση Φ5 (81–100% ♀). Στις αρχές Αυγούστου το 50% των ατόμων βρέθηκαν στη φάση Φ5 (81–100% ♀). Στα μέσα Δεκεμβρίου το 41,7 % του πληθυσμού βρέθηκε στη φάση Φ1 (0–20% ♀) και το 16,6% στη φάση Φ5 (81–100% ♀) και η αναλογία των θηλυκών και αρσενικών ατόμων ήταν περίπου 1:2,5. Τα θηλυκά άτομα στα οποία ολοκληρώθηκε η αναστροφή βρίσκονταν σε φάση λεκιθογένεσης και όλα τα υπόλοιπα άτομα στα μέσα Δεκεμβρίου βρίσκονταν σε φάση σπερματογένεσης και σπερμιογένεσης.



**Διάγραμμα 3.2.** Εποχιακή μεταβολή του ποσοστού των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων στον πειραματικό πληθυσμό της τσιπούρας με βάση την ιστολογική επεξεργασία. Αρσενικά θεωρήθηκαν τα άτομα στα οποία ο ωθητικός ιστός καταλάμβανε  $\leq 20\%$  της γονάδας και θηλυκά αυτά στα οποία καταλάμβανε  $> 80\%$  της γονάδας.

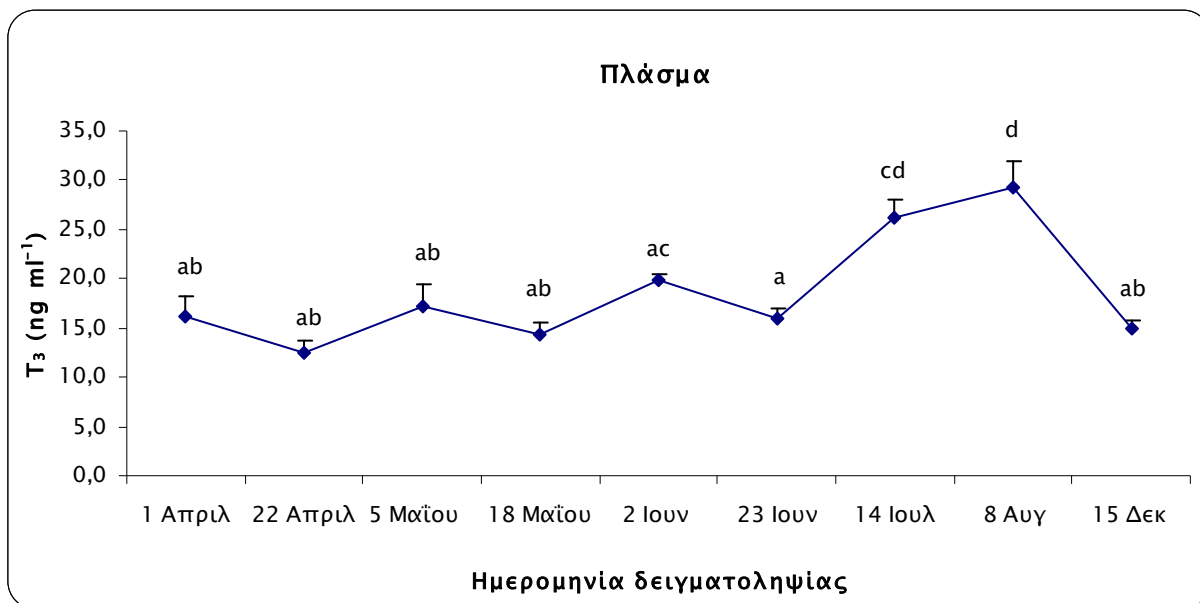
### 3.2. Εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς της τσιπούρας.

Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της θυροξίνης ( $T_4$ ) στο πλάσμα όλων των ατόμων της τσιπούρας ανεξάρτητα από τη φάση αναστροφής παρουσίασε γενικά πτωτική τάση (Διάγραμμα 3.3). Στις αρχές Απριλίου η συγκέντρωση της  $T_4$  στο πλάσμα είχε τη μέγιστη τιμή ( $19,2 \pm 1,6 \text{ ng ml}^{-1}$ ,  $n=5$ ), στη συνέχεια παρουσίασε πτωτική τάση μέχρι τα μέσα Μαΐου, σταθεροποιήθηκε σε χαμηλές τιμές μέχρι τα μέσα Ιουλίου και παρουσίασε μη στατιστικά σημαντική αύξηση από τις αρχές Αυγούστου μέχρι τα μέσα Δεκεμβρίου ( $P<0,05$ ,  $F=4,212$ ).



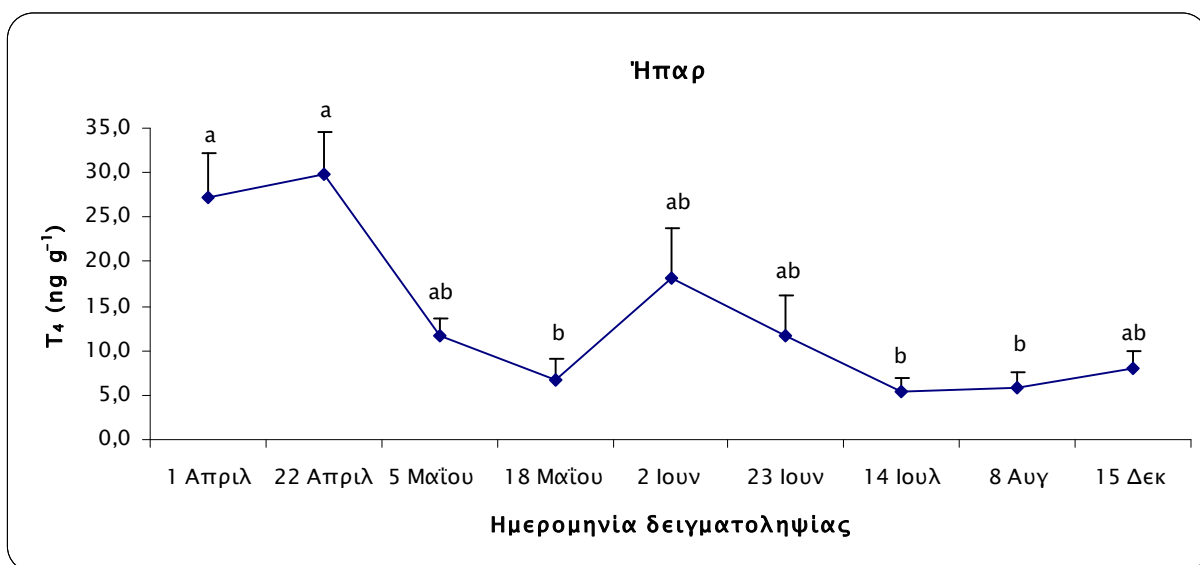
**Διάγραμμα 3.3.** Συγκέντρωση θυροξίνης ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) στο πλάσμα των ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P<0.05$ ).

Οι τιμές των συγκεντρώσεων της τριϊωδοθυρονίνης ( $T_3$ ) στο πλάσμα (Διάγραμμα 3.4) παρουσίασαν μικρή ανοδική τάση. Στις αρχές Απριλίου η συγκέντρωση της  $T_3$  βρέθηκε  $16,1 \pm 2,2 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $n=5$ ), στη συνέχεια παρουσίασε μικρές αυξομειώσεις και στις αρχές Αυγούστου είχε τη μέγιστη τιμή ( $29,3 \pm 2,6 \text{ ng ml}^{-1}$ ,  $n=6$ ). Στα μέσα Δεκεμβρίου η συγκέντρωση της  $T_3$  μειώθηκε σημαντικά και βρέθηκε  $15,1 \pm 0,7 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $n=12$ ). Γενικά, οι συγκεντρώσεις της  $T_3$  παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών της στα μέσα Ιουλίου και στις αρχές Αυγούστου με τις υπόλοιπες δειγματοληψίες ( $P<0,05$ ,  $F=12,717$ ).



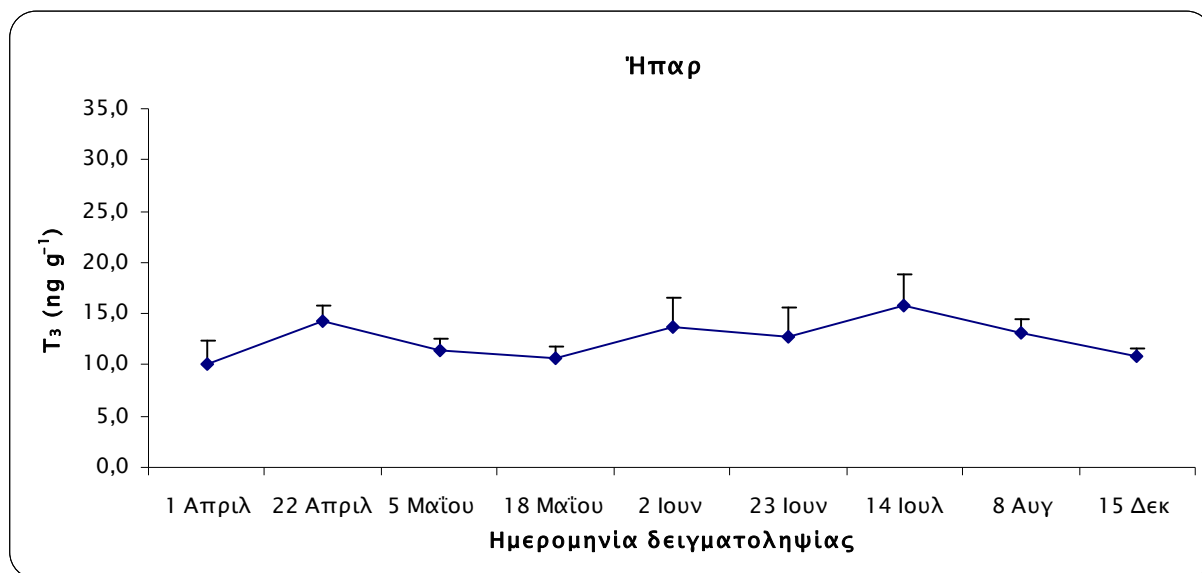
**Διάγραμμα 3.4.** Συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης (ng ml<sup>-1</sup>) στο πλάσμα των ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της T<sub>4</sub> στο ήπαρ της τσιπούρας (Διάγραμμα 3.5) παρουσίασε τη μέγιστη τιμή ( $29,8 \pm 4,8$  ng g<sup>-1</sup>, n=10) στα τέλη Απριλίου ενώ στη συνέχεια παρουσίασε γενικά πτωτική τάση εκτός από τις αρχές και τα τέλη Ιουνίου όπου σημείωσε μία παροδική αύξηση ( $P < 0,05$ ,  $F = 4,537$ ).



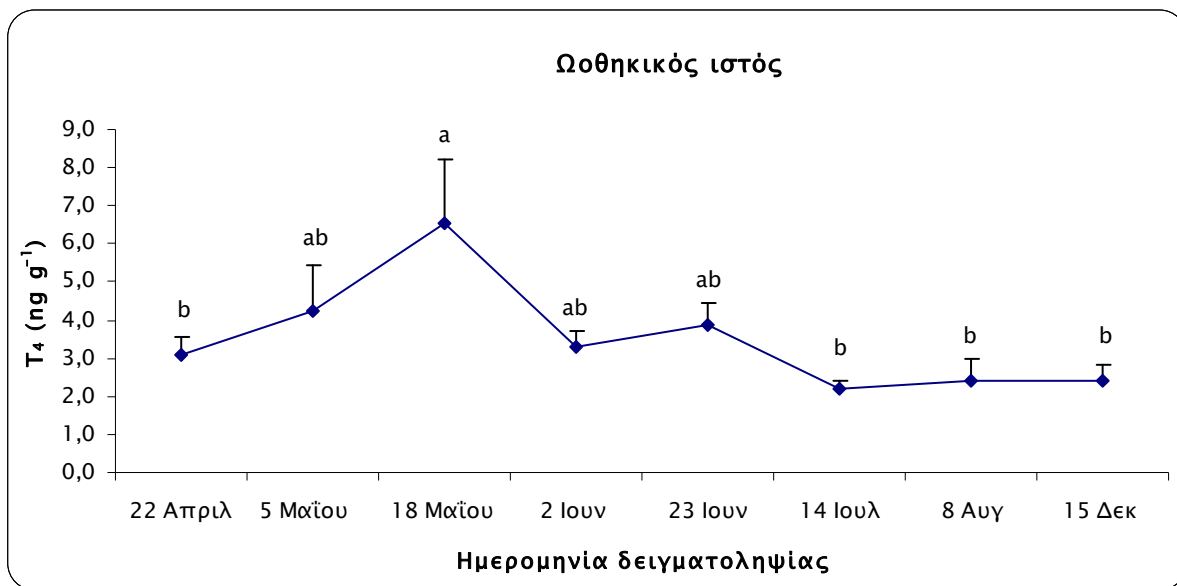
**Διάγραμμα 3.5.** Συγκέντρωση θυροξίνης (ng g<sup>-1</sup>) στο ήπαρ των ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

Οι συγκεντρώσεις της  $T_3$  στο ήπαρ της τσιπούρας (Διάγραμμα 3.6) παρέμειναν στα ίδια περίπου επίπεδα στη διάρκεια των δειγματοληψιών και κυμάνθηκαν από  $10,1 \pm 2,2 \text{ ng g}^{-1}$  έως  $15,9 \pm 3,0 \text{ ng g}^{-1}$ . Οι τιμές των συγκεντρώσεων της  $T_3$  στο ήπαρ δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγματοληψιών ( $P=0,318$ ,  $F=1,195$ ).



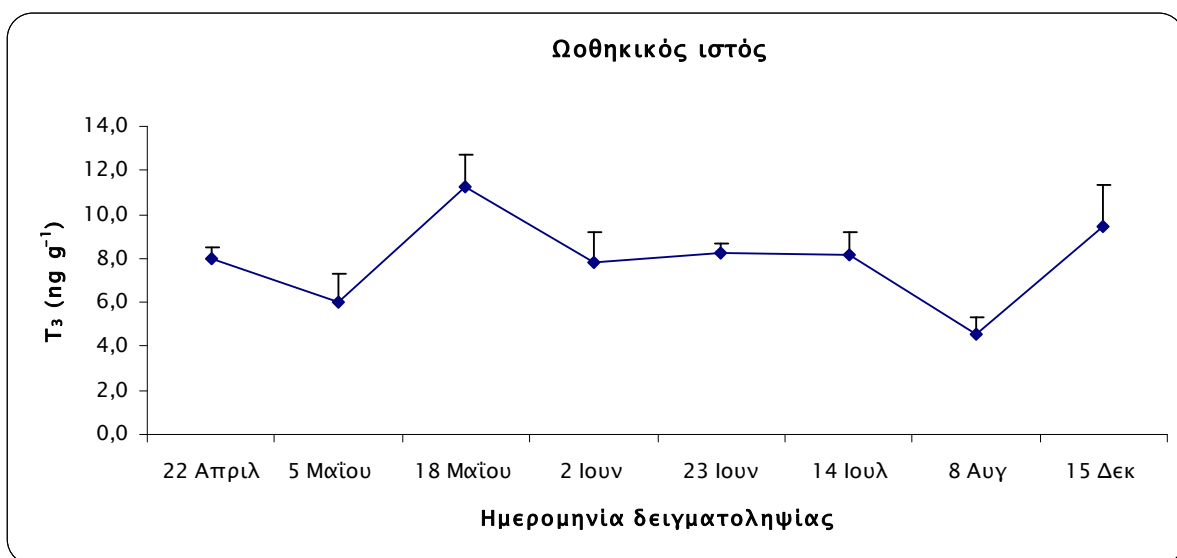
**Διάγραμμα 3.6.** Συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης ( $\text{ng g}^{-1}$ ) στο ήπαρ των ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών.

Οι συγκεντρώσεις της  $T_4$  στον ωοθηκικό ιστό της τσιπούρας (Διάγραμμα 3.7) κυμάνθηκαν από  $2,2 \pm 0,2 \text{ ng g}^{-1}$  έως  $4,2 \pm 1,2 \text{ ng g}^{-1}$ , εκτός από τα μέσα Μαΐου όπου βρέθηκε στατιστικά μεγαλύτερη συγκέντρωση ( $6,6 \pm 1,7 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $n=4$ ) σε σχέση με αυτήν που βρέθηκε στις αρχές Απριλίου και στις τρεις τελευταίες δειγματοληψίες ( $P<0,05$ ,  $F=3,531$ ).



**Διάγραμμα 3.7.** Συγκέντρωση θυροξίνης (ng g<sup>-1</sup>) στον ωθηκικό ιστό των ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. **Σημ:** Η κλίμακα του άξονα Υ διαφέρει από αυτή των διαγραμμάτων που απεικονίζουν τη συγκέντρωση της θυροξίνης στο πλάσμα και στο ήπαρ (Διάγραμμα 3.3 και 3.5). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

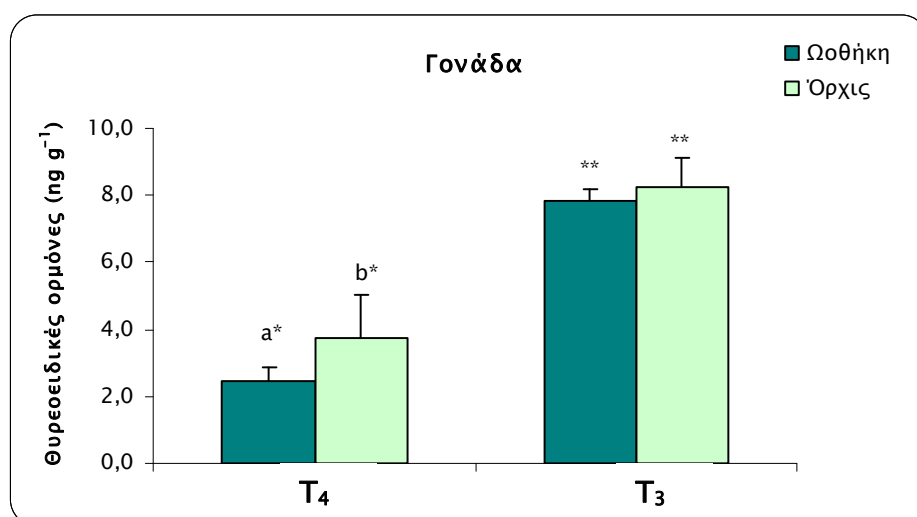
Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της T<sub>3</sub> στον ωθηκικό ιστό της τσιπούρας (Διάγραμμα 3.8) παρουσίασε μία υψηλή τιμή στα μέσα Μαΐου ( $11,2 \pm 1,5$  ng g<sup>-1</sup>, n=5) και μία χαμηλή στις αρχές Αυγούστου ( $4,6 \pm 0,7$  ng g<sup>-1</sup>, n=3) χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές ( $P=0,209$ ,  $F=1,502$ ).



**Διάγραμμα 3.8** Συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης (ng g<sup>-1</sup>) στον ωθηκικό ιστό των ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. **Σημ:** Η κλίμακα του άξονα Υ διαφέρει από αυτή των διαγραμμάτων που απεικονίζουν τη συγκέντρωση της τριϊωδοθυρονίνης στο πλάσμα και στο ήπαρ (Διάγραμμα 3.4 και 3.6). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών.

### 3.2.1. Συγκεντρώσεις των θυρεοειδικών ορμονών στις γονάδες πριν την έναρξη της πρώτης περιόδου ωοτοκίας.

Κατά τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των θυρεοειδικών ορμονών στον ωοθηκικό και στον ορχικό ιστό των ατόμων της δειγματοληψίας που πραγματοποιήθηκε στα μέσα Δεκεμβρίου (Διάγραμμα 3.9), η συγκέντρωση της  $T_4$  στον ωοθηκικό ιστό ( $2,4 \pm 0,4 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $n=9$ ) ήταν σημαντικά μικρότερη από αυτήν που βρέθηκε στον ορχικό ιστό ( $3,7 \pm 0,4 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $n=9$ ) ( $P<0,05$ ). Οι συγκεντρώσεις της  $T_3$  δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ιστών ( $7,8 \pm 1,3 \text{ ng g}^{-1}$  και  $8,2 \pm 0,8 \text{ ng g}^{-1}$ , αντίστοιχα). Τα επίπεδα της  $T_3$  ήταν υψηλότερα από τα επίπεδα της  $T_4$  ανεξάρτητα από τον ιστό ( $P<0,05$ ).



**Διάγραμμα 3.9.** Συγκέντρωση θυρεοειδικών ορμονών ( $\text{ng g}^{-1}$ ) στον ωοθηκικό και στον ορχικό ιστό των ατόμων τσιπούρας στα μέσα Δεκεμβρίου. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα (μεταξύ ιστών) και διαφορετικούς αστερίσκους (μεταξύ ορμονών) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.2. Σύγκριση των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς.

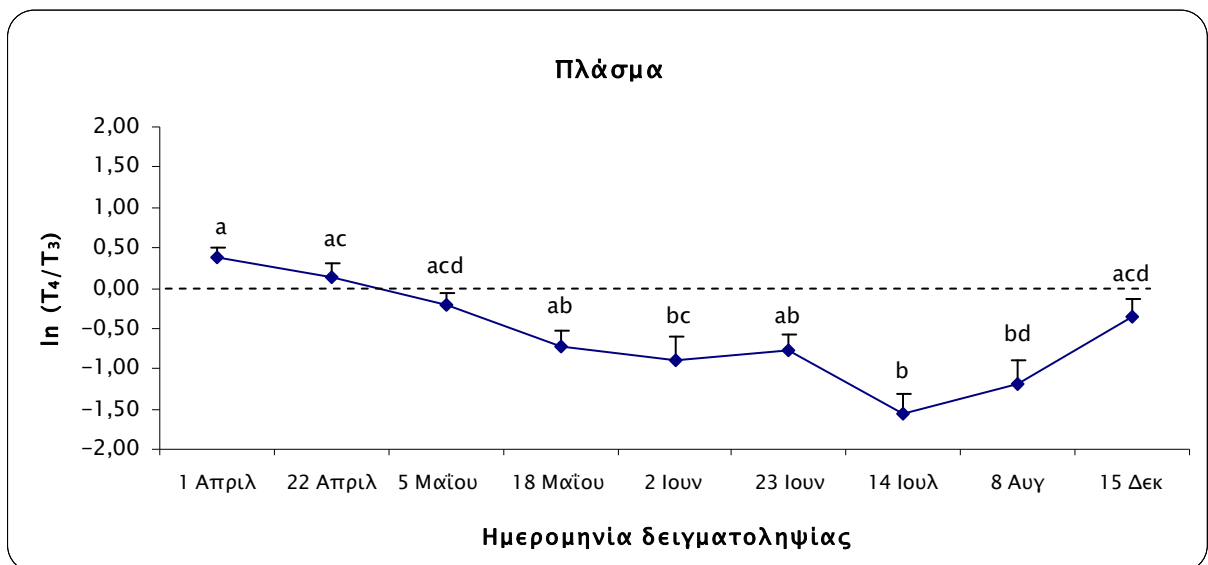
Στον Πίνακα 3.3 απεικονίζεται η μέση τιμή των συγκεντρώσεων των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς (ήπαρ και γονάδες) όλων των ατόμων του πειράματος. Η  $T_3$  εμφάνισε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα, στον ωοθηκικό και στον ορχικό ιστό από αυτές της  $T_4$  ενώ δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ορμονών στο ήπαρ ( $P=0,304$ ).

**Πίνακας 3.3.** Συγκέντρωση των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα, στο ήπαρ, στον ωοθηκικό και στον ορχικό ιστό των ατόμων της τσιπούρας. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικούς αστερίσκους (μεταξύ των ορμονών) και διαφορετικά γράμματα (μεταξύ των ιστών) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

	T <sub>4</sub>	T <sub>3</sub>
<b>Πλάσμα (ng ml<sup>-1</sup>) (n=67)</b>	10,2 ± 0,7 a*	17,7 ± 0,8 a**
<b>Ήπαρ (ng g<sup>-1</sup>) (n=67)</b>	15,4 ± 1,8 a	12,4 ± 0,6 b
<b>Ωοθηκικός ιστός (ng g<sup>-1</sup>) (n=32)</b>	4,4 ± 0,7 b*	8,5 ± 0,7 c**
<b>Ορχικός ιστός (ng g<sup>-1</sup>) (n=10)</b>	3,7 ± 0,4 b*	8,2 ± 0,8 c**

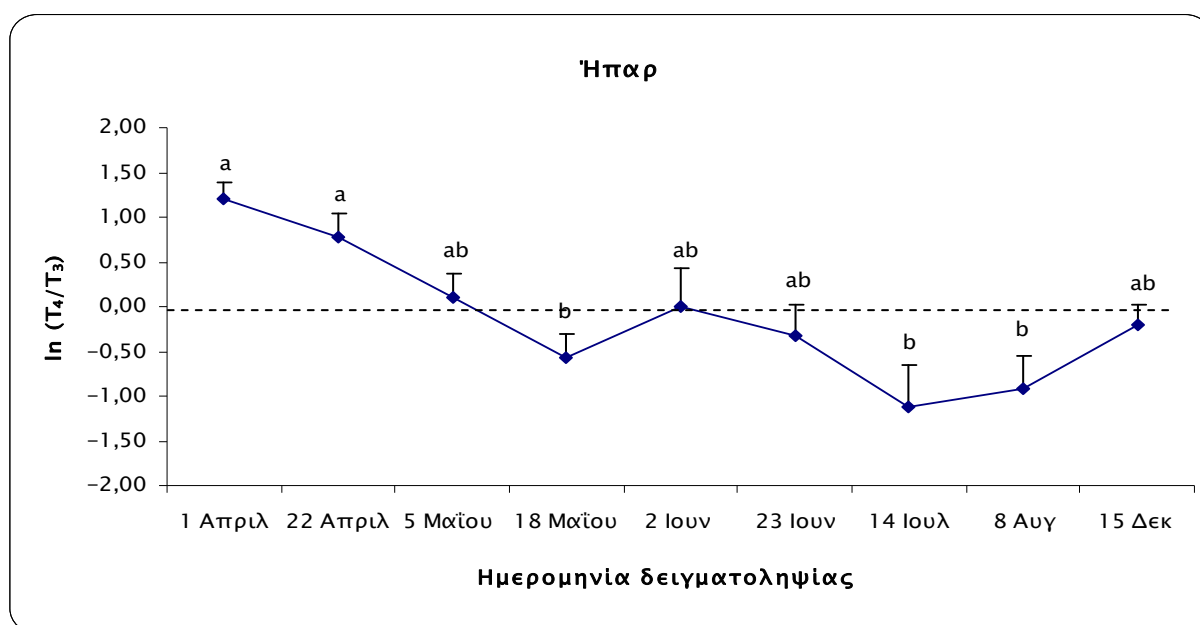
### 3.2.3. Ο λόγος ln (T<sub>4</sub>/T<sub>3</sub>).

Στο Διάγραμμα 3.10 απεικονίζεται η τιμή του λόγου ln (T<sub>4</sub>/T<sub>3</sub>) ( $\ln ([T_4] \cdot MB_{T_4} / [T_3] \cdot MB_{T_3})$ ) στο πλάσμα των ατόμων της τσιπούρας ανά δειγματοληψία. Στις αρχές και στα μέσα Απριλίου ο λόγος ήταν θετικός που σημαίνει ότι η συγκέντρωση της T<sub>4</sub> ήταν μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της T<sub>3</sub> ενώ σε όλες τις υπόλοιπες δειγματοληψίες ήταν μικρότερη (ο λόγος ήταν αρνητικός). Ο λόγος παρουσίασε την ελάχιστη τιμή ( $P < 0,05$ ,  $F = 6,694$ ) στα μέσα Ιουλίου ( $-1,55 \pm 0,24$ ,  $n = 6$ ).



**Διάγραμμα 3.10.** ln (T<sub>4</sub>/T<sub>3</sub>) των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα των ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

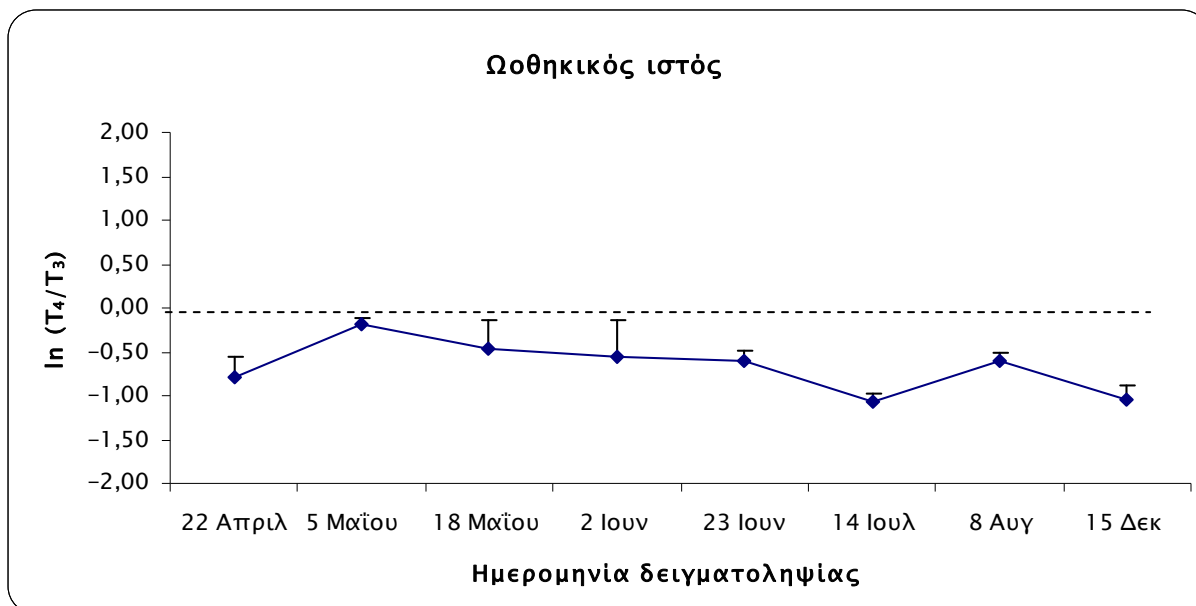
Ο λόγος  $\ln (T_4/T_3)$  στο ήπαρ των ατόμων τσιπούρας (Διάγραμμα 3.11) από τις αρχές Απριλίου έως τις αρχές Μαΐου ήταν θετικός που σημαίνει ότι η συγκέντρωση της  $T_4$  ήταν μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της  $T_3$ , στις αρχές Ιουνίου ο λόγος ήταν κοντά στο μηδέν και οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των δύο ορμονών ήταν περίπου ίσες, ενώ στις υπόλοιπες δειγματοληψίες η συγκέντρωση της  $T_3$  ήταν μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της  $T_4$ . Ο λόγος παρουσίασε την ελάχιστη τιμή στα μέσα Ιουλίου ( $-1,11 \pm 0,46$ ,  $n=5$ ) ( $P<0,05$ ,  $F=5,604$ ).



**Διάγραμμα 3.11.**  $\ln (T_4/T_3)$  των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων των θυρεοειδικών ορμονών στο ήπαρ των ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P<0.05$ ).

Ο λόγος  $\ln (T_4/T_3)$  στον ωοθηκικό ιστό (Διάγραμμα 3.12) ήταν σ' όλες τις δειγματοληψίες αρνητικός και επομένως η συγκέντρωση της  $T_3$  ήταν μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της  $T_4$ . Οι τιμές του λόγου δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P=0,147$ ,  $F=1,759$ ) και ο λόγος παρουσίασε μία υψηλή τιμή στις αρχές Μαΐου ( $-0,18 \pm 0,06$ ,  $n=2$ ) και χαμηλές τιμές στα μέσα Ιουλίου ( $-1,07 \pm 0,08$ ,  $n=4$ ) και στα μέσα Δεκεμβρίου ( $-1,04 \pm 0,16$ ,  $n=9$ ).





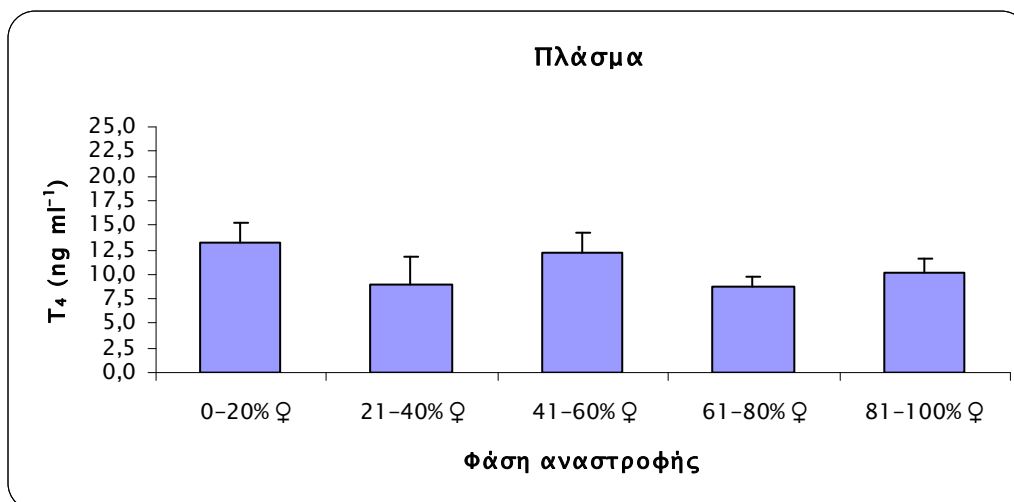
**Διάγραμμα 3.12.** ln (T<sub>4</sub>/T<sub>3</sub>) των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων των θυρεοειδικών ορμονών στον ωοθηκικό ιστό των ατόμων τσιπούρας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Κατά τη δοκιμασία του βαθμού συσχέτισης μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών που προσδιορίστηκαν βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών T<sub>4</sub> πλάσματος και T<sub>4</sub> ήπατος (r=0,563, P<0,001), T<sub>4</sub> και T<sub>3</sub> ωοθηκικού ιστού (r=0,409, P=0,024), T<sub>4</sub> ωοθηκικού και ορχικού ιστού (r=0,831, P=0,021), T<sub>4</sub> ωοθηκικού ιστού και T<sub>3</sub> ορχικού ιστού (r=0,871, P=0,011), T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub> ορχικού ιστού (r=0,738, P=0,015), γοναδοσωματικού δείκτη και βάρους σώματος (r=0,786, P<0,001), γοναδοσωματικού δείκτη και βάρους γονάδων (r=0,980, P<0,001), βάρους σώματος και βάρους γονάδων (r=0,840, P<0,001). Αντίθετα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών βάρους σώματος και T<sub>4</sub> ήπατος (r=-0,422, P<0,001) και βάρους σώματος και T<sub>4</sub> ωοθηκικού ιστού (r=-0,367, P=0,042).

### 3.3. Μεταβολές των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών κατά την αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.

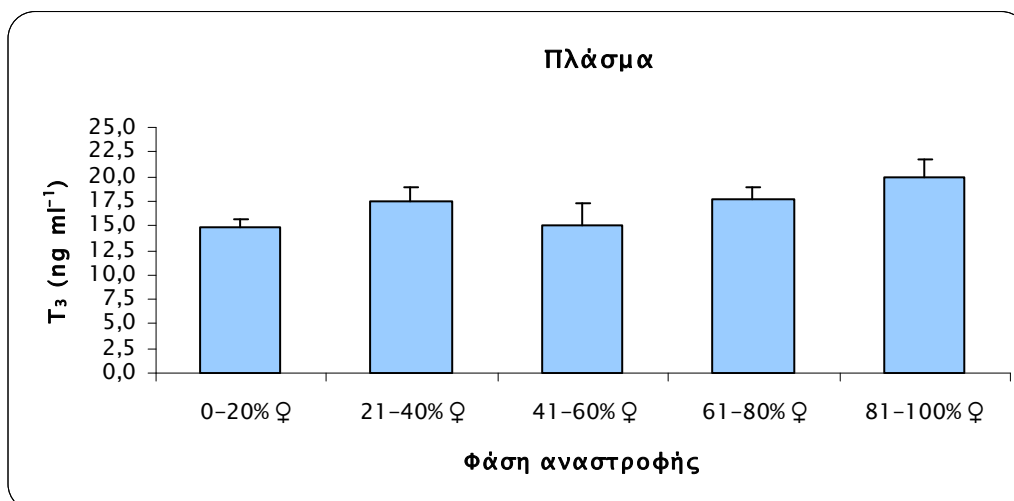
Οι συγκεντρώσεις της θυροξίνης (T<sub>4</sub>) στο πλάσμα των ατόμων κυμάνθηκαν από 8,8 ± 0,1 ng ml<sup>-1</sup> (n=7) έως 13,2 ± 21 ng ml<sup>-1</sup> (n=22) και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές

διαφορές μεταξύ των φάσεων αναστροφής του φύλου (Διάγραμμα 3.13) ( $P=0,320$ ,  $F=1,201$ ).



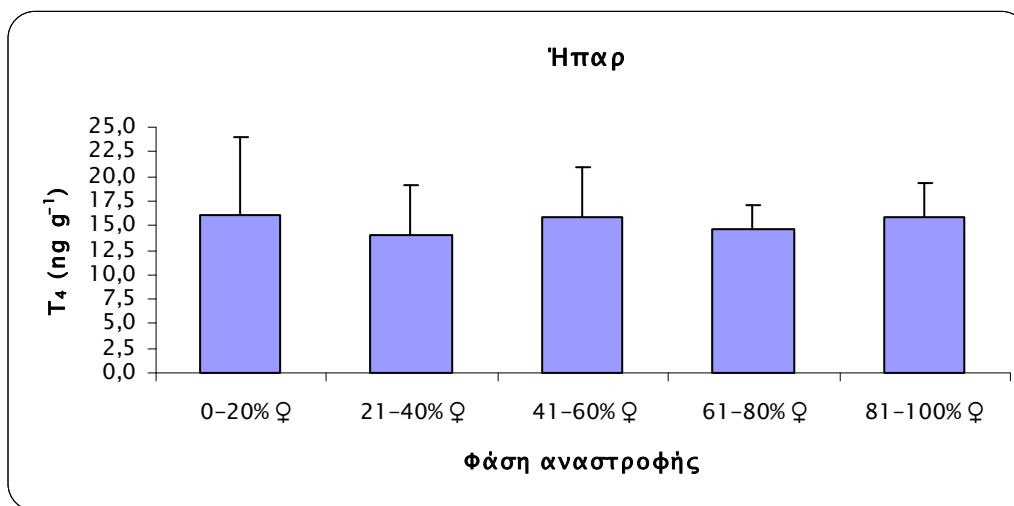
**Διάγραμμα 3.13.** Συγκέντρωση θυροξίνης ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) στο πλάσμα των ατόμων της τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών.

Οι συγκεντρώσεις της τριϊωδοθυρονίνης ( $T_3$ ) στο πλάσμα των ατόμων κυμάνθηκαν από  $14,8 \pm 0,9 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $n=7$ ) έως  $19,9 \pm 1,7 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $n=22$ ) και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φάσεων αναστροφής του φύλου (Διάγραμμα 3.14) ( $P=0,273$ ,  $F=1,319$ ).



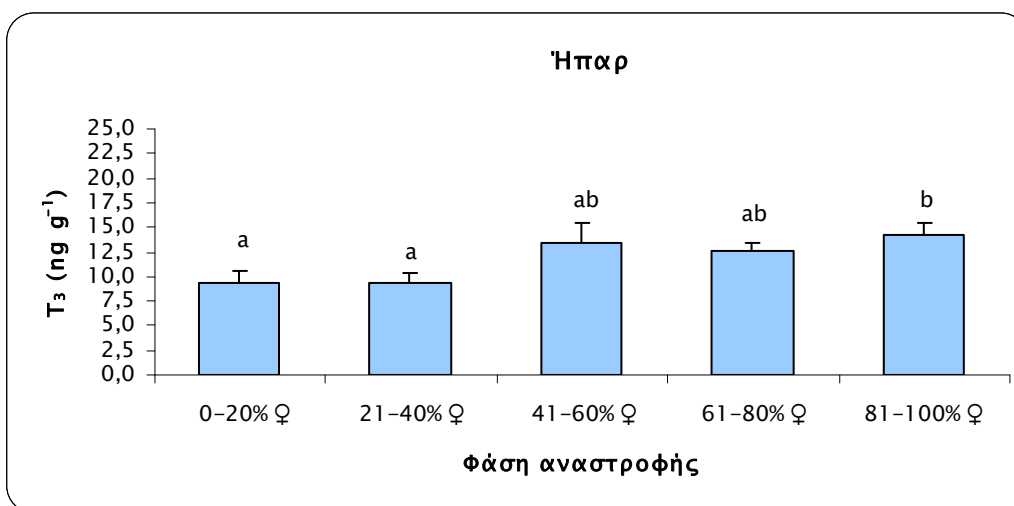
**Διάγραμμα 3.14.** Συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης ( $\text{ng ml}^{-1}$ ) στο πλάσμα των ατόμων τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών.

Οι συγκεντρώσεις της  $T_4$  στο ήπαρ των ατόμων κυμάνθηκαν από  $13,9 \pm 5,1 \text{ ng g}^{-1}$  ( $n=7$ ) έως  $16,0 \pm 7,9 \text{ ng g}^{-1}$  ( $n=22$ ) και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φάσεων αναστροφής του φύλου (Διάγραμμα 3.15) ( $P=0,997$ ,  $F=0,036$ ).



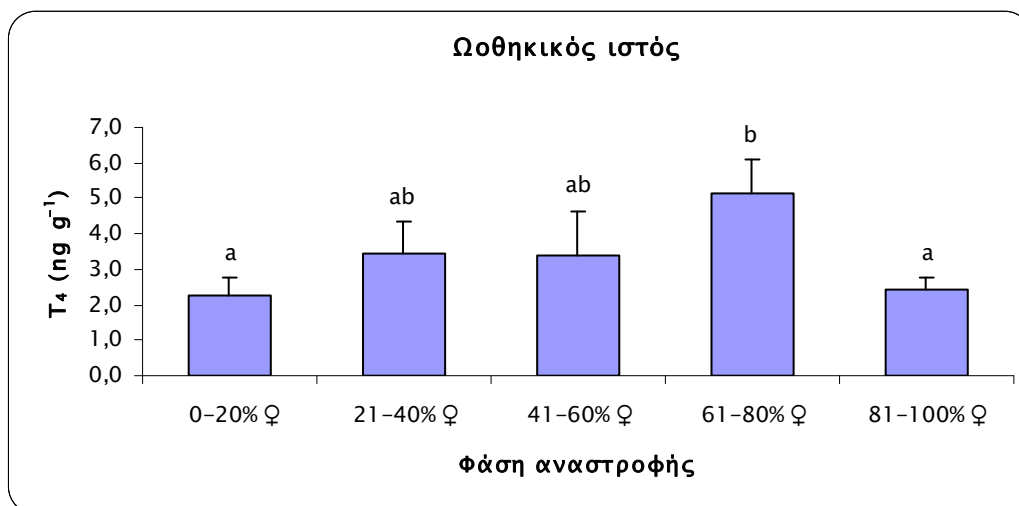
**Διάγραμμα 3.15.** Συγκέντρωση θυροξίνης ( $\text{ng g}^{-1}$ ) στο ήπαρ των ατόμων τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών.

Οι συγκεντρώσεις της  $T_3$  στο ήπαρ της τσιπούρας (Διάγραμμα 3.16) κυμάνθηκαν από  $9,4 \pm 0,9 \text{ ng g}^{-1}$  ( $n=7$ ) έως  $14,3 \pm 1,2 \text{ ng g}^{-1}$  ( $n=22$ ) και παρουσίασαν μία τάση αύξησης από τη φάση Φ3 στη φάση Φ5 ( $P<0,05$ ,  $F=2,606$ ).



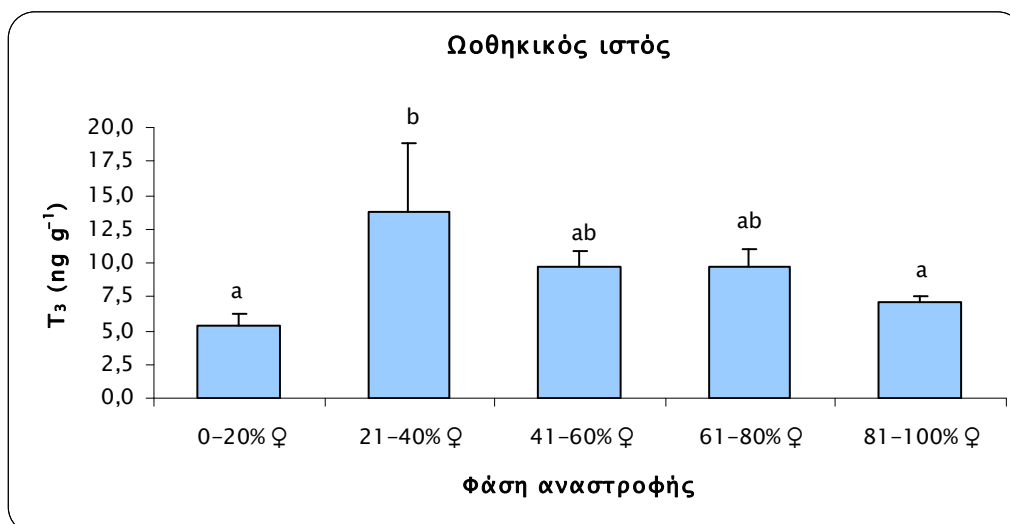
**Διάγραμμα 3.16.** Συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης ( $\text{ng g}^{-1}$ ) στο ήπαρ των ατόμων τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P<0,05$ ).

Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της  $T_4$  στον ωοθηκικό ιστό της τσιπούρας (Διάγραμμα 3.17) βρέθηκε  $2,2 \pm 0,5 \text{ ng g}^{-1}$  ( $n=3$ ) κατά την φάση Φ1 (0–20% ♀), στη συνέχεια παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της μέχρι την φάση Φ4 (61–80% ♀) όπου σημειώθηκε η μέγιστη τιμή της ( $5,1 \pm 1,0 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $n=8$ ) και ακολούθησε μείωση κατά τη φάση Φ5 ( $P<0,05$ ,  $F=3,192$ ).



**Διάγραμμα 3.17.** Συγκέντρωση θυροξίνης ( $\text{ng g}^{-1}$ ) στον ωοθηκικό ιστό των ατόμων τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. **Σημ:** Η κλίμακα του άξονα Y διαφέρει από αυτή των διαγραμμάτων που απεικονίζουν τη συγκέντρωση της θυροξίνης στο πλάσμα και στο ήπαρ (Διάγραμμα 3.13 και 3.15). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P<0.05$ ).

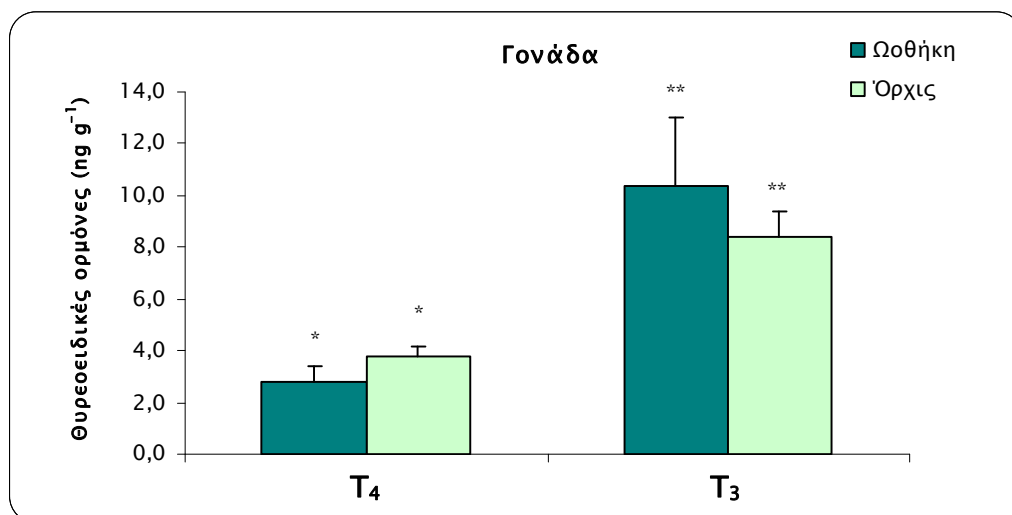
Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της  $T_3$  στον ωοθηκικό ιστό της τσιπούρας (Διάγραμμα 3.18) παρουσίασε σημαντική αύξηση στη φάση Φ2 (21–40% ♀) όπου σημειώθηκε η μέγιστη της τιμή ( $13,7 \pm 5,2 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $n=3$ ) και ακολούθησε μείωση και έφτασε στην φάση Φ5 τα  $7,1 \pm 0,5 \text{ ng g}^{-1}$  ( $n=17$ ) ( $P<0,05$ ,  $F=2,979$ ).



**Διάγραμμα 3.18.** Συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης (ng g<sup>-1</sup>) στον ωοθηκικό ιστό των ατόμων τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. **Σημ:** Η κλίμακα του άξονα Υ διαφέρει από αυτή των διαγραμμάτων που απεικονίζουν τη συγκέντρωση της τριϊωδοθυρονίνης στο πλάσμα και στο ήπαρ (Διάγραμμα 3.14 και 3.16). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.1. Συγκεντρώσεις των θυρεοειδικών ορμονών στις γονάδες ατόμων τσιπούρας (φάση Φ1 και Φ2) πριν την έναρξη της πρώτης περιόδου ωοτοκίας.

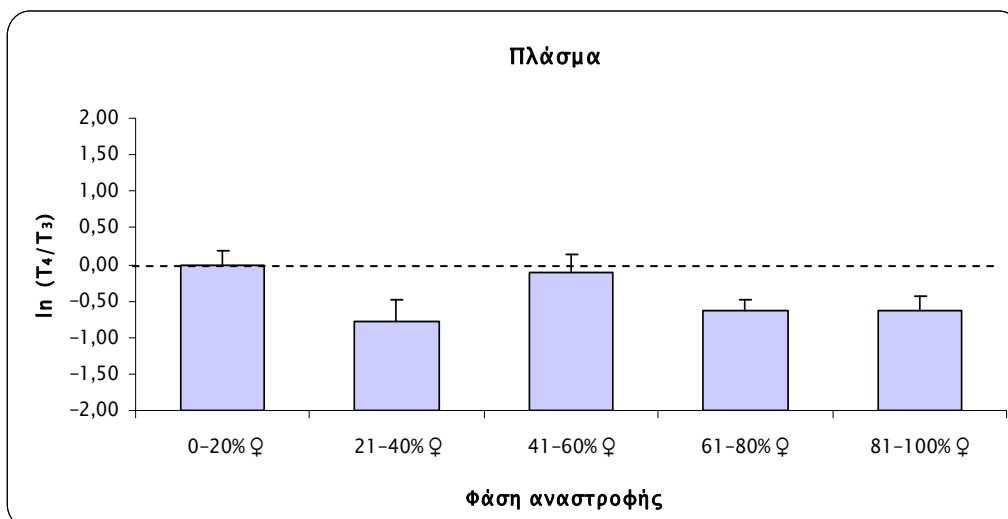
Κατά τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των θυρεοειδικών ορμονών του ωοθηκικού και του ορχικού ιστού των ατόμων στα μέσα Δεκεμβρίου (Διάγραμμα 3.19) των οποίων το μεγαλύτερο μέρος των γονάδων καταλαμβάνονταν από αρσενικό ιστό (φάση Φ1 και Φ2), βρέθηκε ότι τα επίπεδα της T<sub>3</sub> ήταν υψηλότερα από τα επίπεδα της T<sub>4</sub> ανεξάρτητα από τον ιστό ( $P < 0,05$ ) και ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο επίπεδο της κάθε ορμόνης στους διαφορετικούς ιστούς ( $P = 0,395$ ). Η συγκέντρωση της T<sub>4</sub> στον ωοθηκικό ιστό βρέθηκε  $2,8 \pm 0,5$  ng g<sup>-1</sup> (n=6) και στον ορχικό  $3,8 \pm 0,4$  ng g<sup>-1</sup> (n=9). Οι συγκεντρώσεις της T<sub>3</sub> βρέθηκαν  $10,3 \pm 2,6$  ng g<sup>-1</sup> (n=7) και  $8,4 \pm 0,9$  ng g<sup>-1</sup> (n=9), αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 3.19.** Συγκέντρωση θυρεοειδικών ορμονών (ng g<sup>-1</sup>) στον ωοθηκικό και στον ορχικό ιστό των γονάδων των ατόμων τσιπούρας στα μέσα Δεκεμβρίου των οποίων το μεγαλύτερο μέρος των γονάδων καταλαμβάνονταν από αρσενικό ιστό (Φ1, Φ2). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικούς αστερίσκους παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

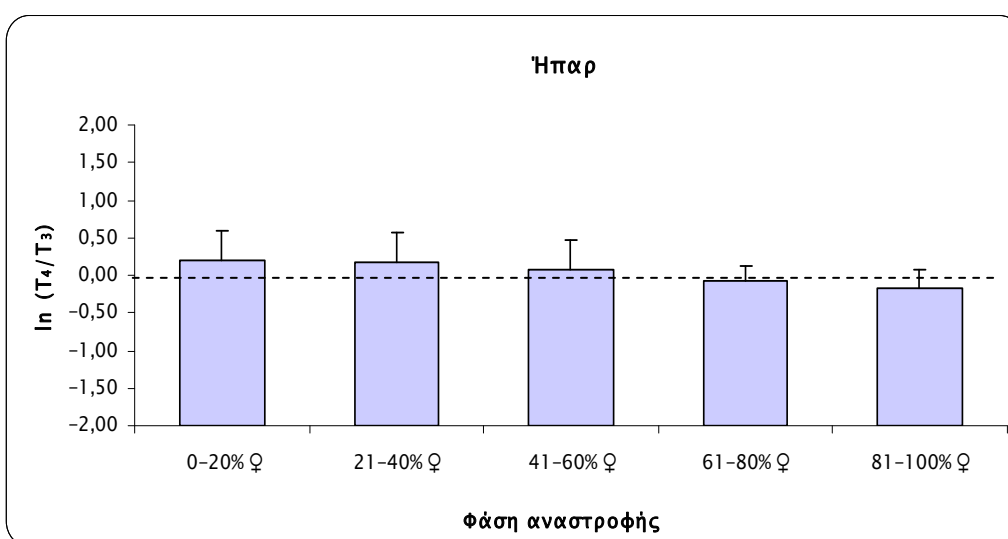
### 3.3.2. Ο λόγος $\ln (T_4/T_3)$ .

Στο Διάγραμμα 3.20 απεικονίζεται η τιμή του λόγου  $\ln (T_4/T_3)$  ( $\ln ([T_4] \cdot MB_{T_4} / [T_3] \cdot MB_{T_3})$ ) στο πλάσμα των ατόμων της τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. Σε όλες τις φάσεις η τιμή του λόγου ήταν αρνητική που σημαίνει ότι η συγκέντρωση της T<sub>3</sub> ήταν μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της T<sub>4</sub>. Οι τιμές του λόγου δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P=0,153$ ,  $F=1,739$ ) και ο λόγος παρουσίασε μία υψηλή τιμή ( $-0,02 \pm 0,20$ ,  $n=7$ ) στην φάση Φ1 (0–20% ♀) και μία χαμηλή ( $-0,77 \pm 0,28$ ,  $n=7$ ) στην φάση Φ2 (21–40% ♀).



**Διάγραμμα 3.20.**  $\ln (T_4/T_3)$  των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων στο πλάσμα των ατόμων της τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

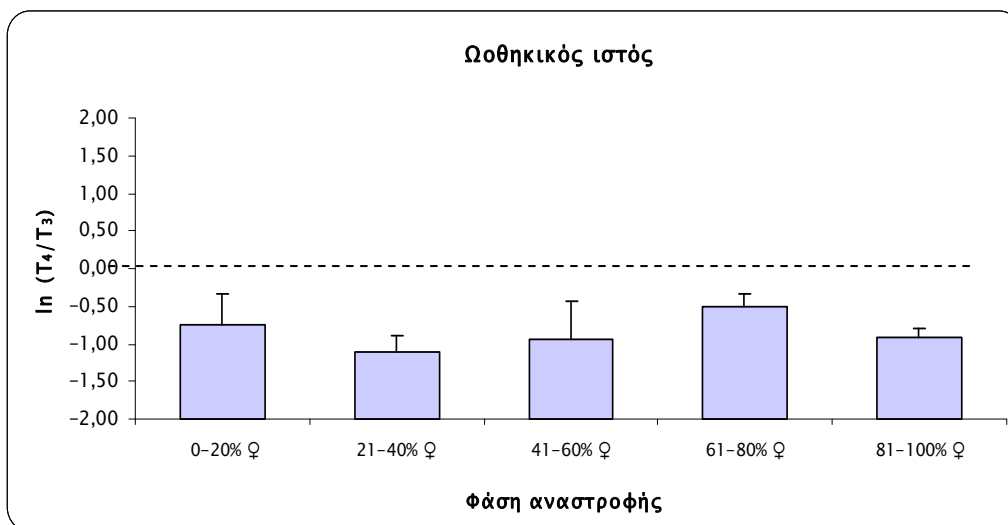
Οι τιμές του λόγου  $\ln (T_4/T_3)$  στο ήπαρ (Διάγραμμα 3.21) κυμάνθηκαν από  $-0,18 \pm 0,25$  ( $n=21$ ) στη φάση Φ5 (81-100% ♀) έως  $0,19 \pm 0,40$  ( $n=7$ ) στη φάση Φ1 (0-20% ♀). Οι τιμές του λόγου δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P=0,885$ ,  $F=0,288$ ).



**Διάγραμμα 3.21.**  $\ln (T_4/T_3)$  των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων στο ήπαρ των ατόμων της τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.

Ο λόγος  $\ln (T_4/T_3)$  στον ωοθηκικό ιστό (Διάγραμμα 3.22) ήταν σ' όλες τις φάσεις αναστροφής του φύλου αρνητικός και επομένως η συγκέντρωση της  $T_3$  ήταν μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της  $T_4$ . Οι τιμές του λόγου δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ( $P=0,338$ ,  $F=1,196$ ) και ο λόγος παρουσίασε μία χαμηλή τιμή ( $-1,11 \pm 0,22$ ,

n=3) στη φάση Φ2 (21-40% ♀) και μία υψηλή ( $-0,51 \pm 0,17$ , n=8) στη φάση Φ4 (61-80% ♀).



**Διάγραμμα 3.22.** ln (T<sub>4</sub>/T<sub>3</sub>) των μέσων τιμών των συγκεντρώσεων της T<sub>4</sub> και της T<sub>3</sub> στον ωοθηκικό ιστό των ατόμων της τσιπούρας κατά την αναστροφή του φύλου. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων.



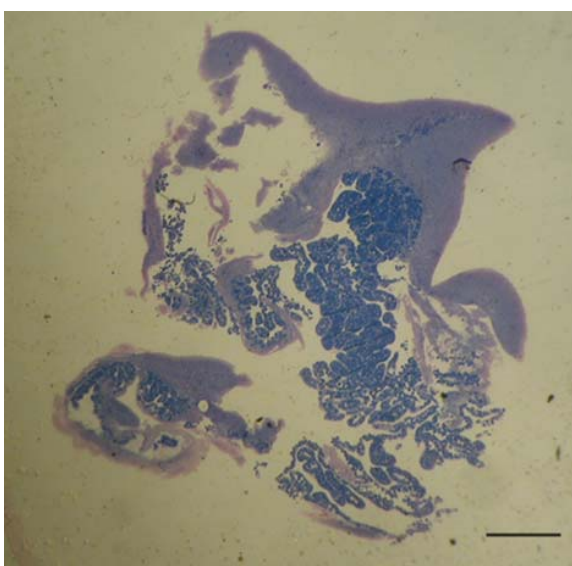
### 3.4. Επίδραση του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου methimazole στην περιφερική ρύθμιση του θυρεοειδή και στην αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.

#### 3.4.1. Επίδραση του methimazole στη γενική κατάσταση των ψαριών.

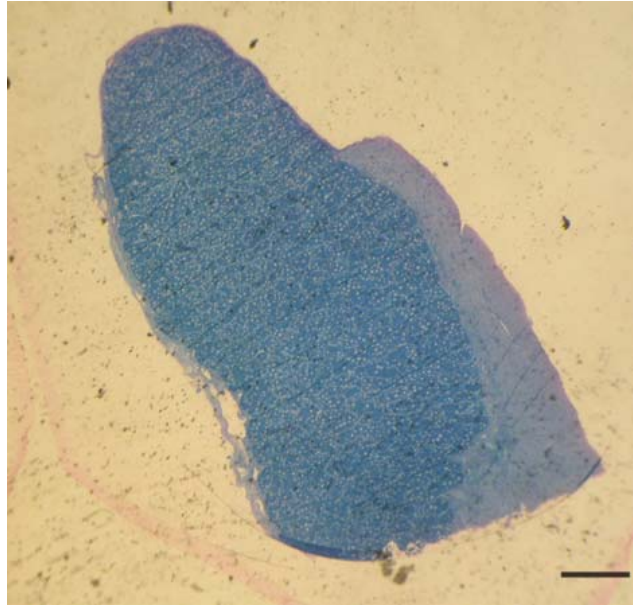
Στο τέλος του πειράματος η θνησιμότητα στην ομάδα Methimazole ήταν 30% ενώ στην ομάδα Control δεν υπήρξε θνησιμότητα. Στα ψάρια της ομάδας Methimazole παρατηρήθηκε από την 2<sup>η</sup> ημέρα και μετά, έντονο κοπάδιασμα, ενώ από την 4<sup>η</sup> ημέρα η κίνηση των ατόμων ήταν πιο αργή (το κοπάδιασμα συνεχιζόταν) σε σύγκριση μ' αυτή των ατόμων της ομάδας Control. Από την 10<sup>η</sup> ημέρα και μετά τα άτομα της ομάδας Methimazole σταμάτησαν να λαμβάνουν τροφή για πολλή ώρα μετά την παροχή της, σε αντίθεση με την ομάδα Control η οποία αντιδρούσε άμεσα στην παροχή τροφής. Επίσης σε κάποια άτομα της ομάδας Methimazole από την 10<sup>η</sup> ημέρα εμφανίστηκε λύση του δέρματος.

#### 3.4.2. Επίδραση του methimazole στην αναστροφή του φύλου.

Στην ομάδα Control και στην ομάδα Methimazole ο ωθητικός ιστός καταλάμβανε το  $52 \pm 12\%$  ( $n=3$ ) και το  $40 \pm 9\%$  ( $n=3$ ) της γονάδας, αντίστοιχα (Εικόνα 3.10 και 3.11). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό του ωθητικού ιστού ανάμεσα στις δύο ομάδες ( $P=0,627$ ).



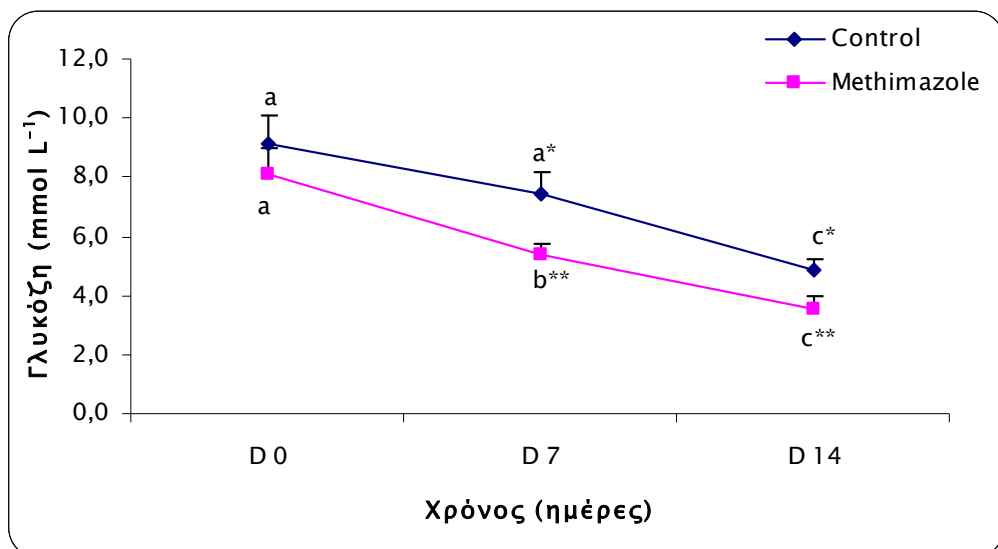
**Εικόνα 3.10.** Ερμαφρόδιτη γονάδα τσιπούρας της ομάδας Control (η ράβδος αντιστοιχεί σε 1 mm).



**Εικόνα 3.11.** Ερμαφρόδιτη γονάδα τσιπούρας της ομάδας Methimazole (η ράβδος αντιστοιχεί σε 1 mm).

### 3.4.3. Εκτίμηση της καταπόνησης των ψαριών.

Μεταξύ της έναρξης και της λήξης του πειράματος παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του πλάσματος και στις δύο ομάδες ( $P < 0,05$ ) (Διάγραμμα 3.23). Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση την ημέρα 7 και την ημέρα 14 στην ομάδα Methimazole σε σύγκριση με την ομάδα Control ( $P < 0,05$ ).

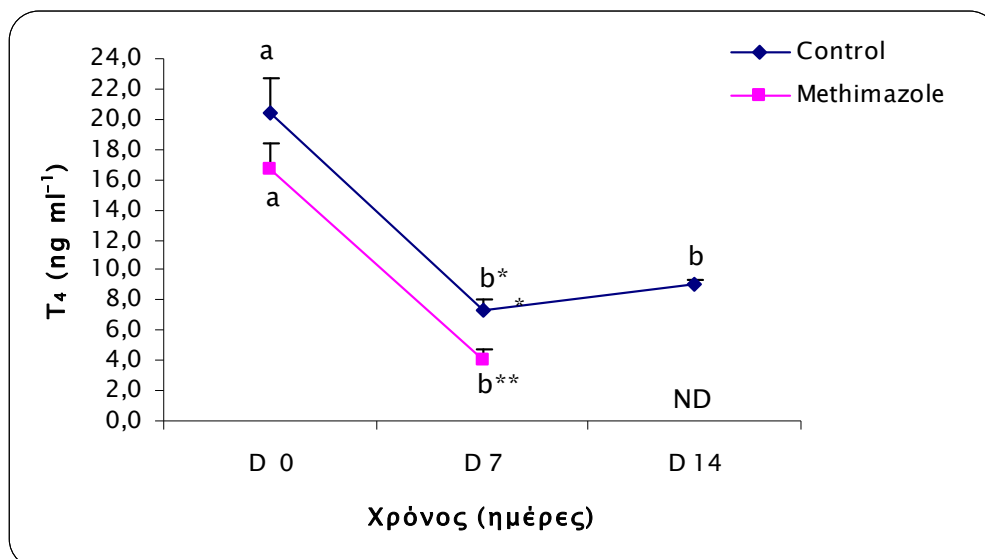


**Διάγραμμα 3.23.** Συγκέντρωση γλυκόζης (mmol L<sup>-1</sup>) στην ομάδα Control και στην ομάδα Methimazole κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα (μεταξύ των ημερών) και διαφορετικούς αστερίσκους (μεταξύ των ομάδων) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0,05$ ).

### 3.4.4. Επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς.

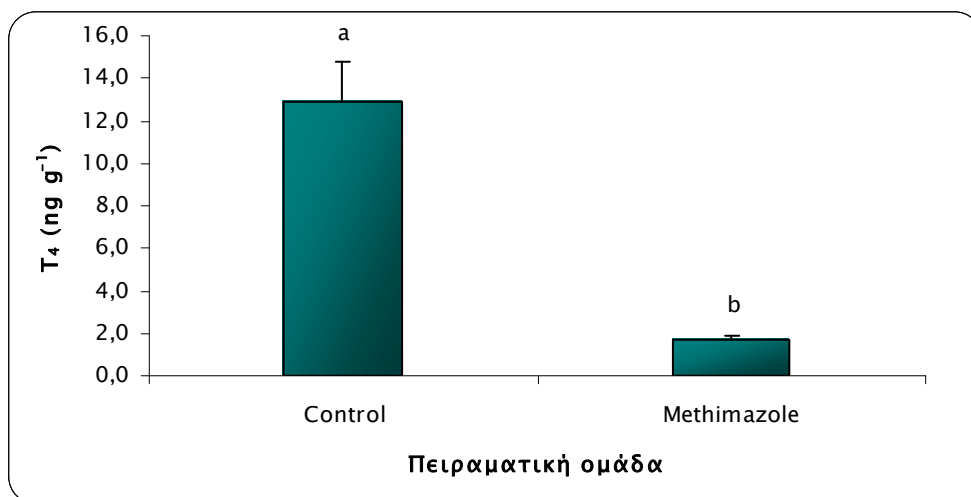
#### Θυροξίνη (T<sub>4</sub>).

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της T<sub>4</sub> του πλάσματος και στις δύο ομάδες μεταξύ της έναρξης και της ημέρας 7 του πειράματος ( $P < 0,05$ ). Επίσης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της T<sub>4</sub> την ημέρα 7 στην ομάδα Methimazole σε σύγκριση με την ομάδα Control ( $P < 0,05$ ). Την ημέρα 7 η συγκέντρωση της T<sub>4</sub> στο πλάσμα των ατόμων της ομάδας Methimazole ήταν μη ανιχνεύσιμη στα 8 από τα 10 άτομα ενώ την ημέρα 14 ήταν μη ανιχνεύσιμη σε όλα τα άτομα της ομάδας αυτής (Διάγραμμα 3.24).



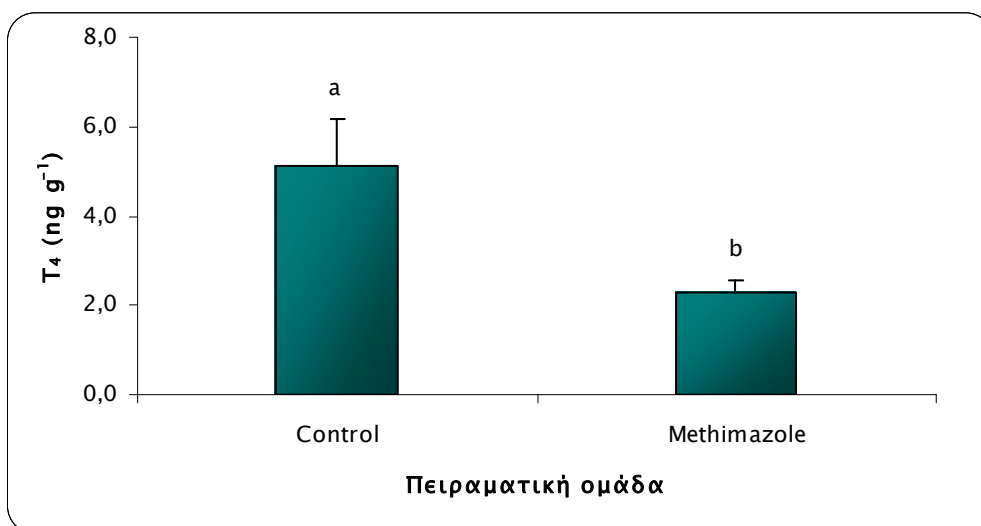
**Διάγραμμα 3.24.** Συγκέντρωση θυροξίνης (ng ml<sup>-1</sup>) στο πλάσμα στην ομάδα Control και στην ομάδα Methimazole κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα (μεταξύ ημερών) και διαφορετικούς αστερίσκους (μεταξύ ομάδων) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0,05$ ), ND: not detected.

Η συγκέντρωση της T<sub>4</sub> στο ήπαρ (Διάγραμμα 3.25) ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη στην ομάδα Methimazole ( $1,7 \pm 0,2$  ng g<sup>-1</sup>, n=5) σε σύγκριση με την ομάδα Control ( $12,9 \pm 1,9$  ng g<sup>-1</sup>, n=9) ( $P < 0,001$ ).



**Διάγραμμα 3.25.** Συγκέντρωση θυροξίνης (ng g<sup>-1</sup>) στο ήπαρ στην ομάδα Control και στην ομάδα Methimazole την ημέρα 14. **Σημ:** Η κλίμακα του άξονα Υ διαφέρει από αυτή του διαγράμματος που απεικονίζει τη συγκέντρωση της θυροξίνης στο πλάσμα (Διάγραμμα 3.24). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.001$ ).

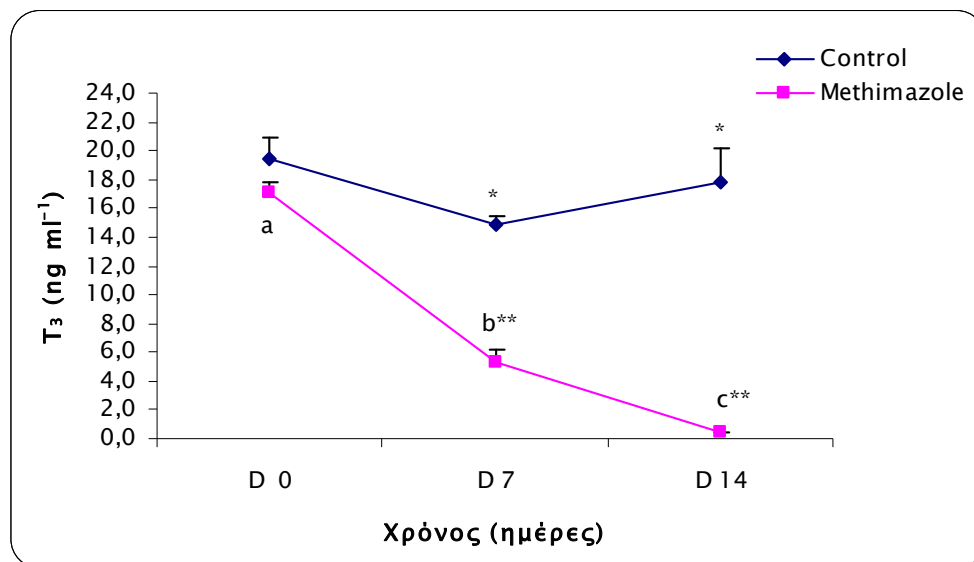
Η συγκέντρωση της T<sub>4</sub> στις γονάδες (Διάγραμμα 3.26) ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη στην ομάδα Methimazole ( $2,3 \pm 0,3$  ng g<sup>-1</sup>, n=3) σε σύγκριση με την ομάδα Control ( $5,5 \pm 1,0$  ng g<sup>-1</sup>, n=4) ( $P < 0,05$ ).



**Διάγραμμα 3.26.** Συγκέντρωση θυροξίνης (ng g<sup>-1</sup>) στις γονάδες στην ομάδα Control και στην ομάδα Methimazole την ημέρα 14. **Σημ:** Η κλίμακα του άξονα Υ διαφέρει από αυτή των διαγραμμάτων που απεικονίζουν τη συγκέντρωση της θυροξίνης στο πλάσμα και στο ήπαρ (Διάγραμμα 3.24 και 3.25). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ( $P < 0.05$ ).

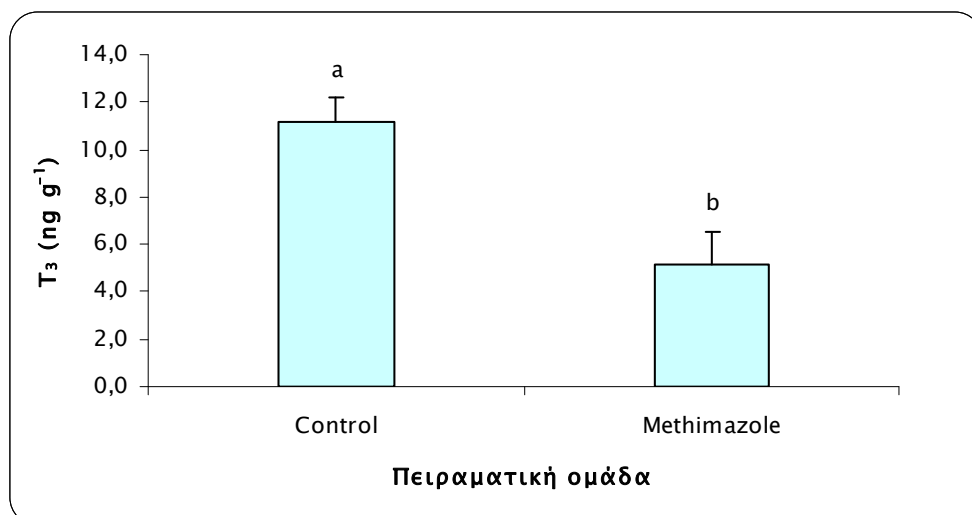
### Τριϊωδοθυρονίνη (T<sub>3</sub>).

Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της T<sub>3</sub> του πλάσματος μεταξύ της έναρξης και της λήξης του πειράματος στην ομάδα Methimazole (P<0,001). Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της T<sub>3</sub> την ημέρα 7 και την ημέρα 14 στην ομάδα Methimazole σε σύγκριση με την ομάδα Control (P<0,001) (Διάγραμμα 3.27).



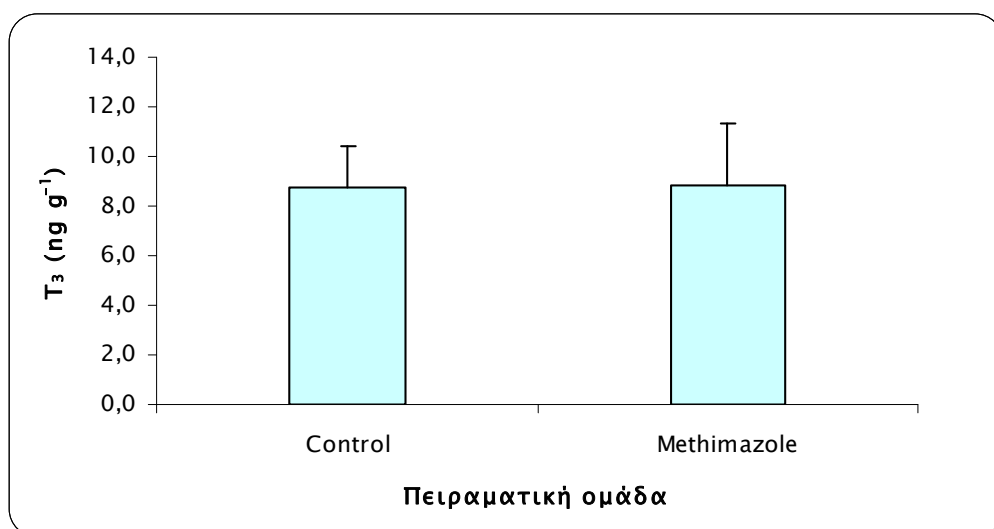
**Διάγραμμα 3.27.** Συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης (ng ml<sup>-1</sup>) στο πλάσμα στην ομάδα Control και στην ομάδα Methimazole κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα (μεταξύ ημερών) και διαφορετικούς αστερίσκους (μεταξύ ομάδων) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (P<0.001).

Η συγκέντρωση της T<sub>3</sub> στο ήπαρ (Διάγραμμα 3.28) ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη στην ομάδα Methimazole ( $5,2 \pm 1,3$  ng g<sup>-1</sup>, n=6) σε σύγκριση με την ομάδα Control ( $11,1 \pm 1,1$  ng g<sup>-1</sup>, n=9) (P<0,01).



**Διάγραμμα 3.28.** Συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης (ng g<sup>-1</sup>) στο ήπαρ στην ομάδα Control και στην ομάδα Methimazole την ημέρα 14. **Σημ:** Η κλίμακα του άξονα Υ διαφέρει από αυτή του διαγράμματος που απεικονίζει τη συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης στο πλάσμα (Διάγραμμα 3.27). Οι ομάδες που χαρακτηρίζονται με διαφορετικά γράμματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (P < 0.01).

Η συγκέντρωση της T<sub>3</sub> στις γονάδες (Διάγραμμα 3.29) στην ομάδα Control (8,7 ± 1,7 ng g<sup>-1</sup>, n=4) δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με αυτήν της ομάδας Methimazole (8,8 ± 0,4 ng g<sup>-1</sup>, n=3) (P=0,969).



**Διάγραμμα 3.29.** Συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης (ng g<sup>-1</sup>) στις γονάδες στην ομάδα Control και στην ομάδα Methimazole την ημέρα 14. **Σημ:** Η κλίμακα του άξονα Υ διαφέρει από αυτή του διαγράμματος που απεικονίζει τη συγκέντρωση τριϊωδοθυρονίνης στο πλάσμα (Διάγραμμα 3.27). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

#### 4.1. Αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα.

Στις αρχές και στα τέλη Απριλίου, ο ωοθηκικός ιστός καταλάμβανε το 81–100% της γονάδας (Φ5) στο 40 και 45% των ατόμων της τσιπούρας, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα άτομα το διάστημα αυτό βρέθηκαν να είναι κυρίως στη φάση Φ3 (41–60%♀) και Φ4 (61–80%♀). Προφανώς η αναστροφή του φύλου ξεκίνησε πριν την ολοκλήρωση της 1<sup>ης</sup> αναπαραγωγικής περιόδου και προχώρησε πολύ γρήγορα. Στα μέσα Ιουλίου όλα τα άτομα βρέθηκαν να είναι στη φάση Φ5 (81–100% ♀). Στα μέσα Δεκεμβρίου το 41,7% του πληθυσμού βρέθηκε να είναι στη φάση Φ1 (0–20% ♀) και το 16,6% στη φάση Φ5 (81–100% ♀) και η αναλογία των θηλυκών και αρσενικών ατόμων ήταν περίπου 1:2,5. Τα θηλυκά άτομα στα οποία ολοκληρώθηκε η αναστροφή βρίσκονταν σε φάση λεκιθογένεσης και όλα τα υπόλοιπα άτομα βρίσκονταν σε φάση σπερματογένεσης και σπερμιογένεσης. Ο γοναδοσωματικός δείκτης (GSI) των ψαριών δε μεταβλήθηκε κατά το διάστημα Απριλίου–Αυγούστου αλλά αυξήθηκε σημαντικά στα μέσα Δεκεμβρίου γεγονός που δηλώνει ότι τα ψάρια βρίσκονταν στην αναπαραγωγική περίοδο.

Στη μελέτη των Zohar et al. (1978) η αναστροφή της τσιπούρας ξεκίνησε αμέσως μετά το τέλος της 1<sup>ης</sup> αναπαραγωγικής περιόδου όταν τα ψάρια ήταν ηλικίας 13–16 μηνών και στους 16 μήνες ο ωοθηκικός ιστός καταλάμβανε το 80% της γονάδας σ' όλα τα άτομα. Από την ηλικία των 17 μηνών ξεκίνησε ένας διαχωρισμός στον πληθυσμό όσον αφορά στην αναστροφή του φύλου. Στο 80% των ψαριών η αναστροφή ολοκληρώθηκε ενώ στο υπόλοιπο 20% η αναστροφή δεν ολοκληρώθηκε, ο ορχικός ιστός αυξήθηκε σε μέγεθος και ξεκίνησε η σπερματογένεση. Στους 23 με 24 μήνες (2<sup>η</sup> αναπαραγωγική ωρίμανση) ο ορχικός ιστός ήταν λειτουργικός, περικλείοντας σχεδόν εξολοκλήρου ό,τι απέμεινε από την ωοθήκη. Το αποτέλεσμα ήταν στη 2<sup>η</sup> αναπαραγωγική περίοδο ο πληθυσμός να αποτελείται από 80% θηλυκά και 20% αρσενικά άτομα ενώ στην παρούσα μελέτη το ποσοστό των θηλυκών ήταν αρκετά μικρότερο στα μέσα Δεκεμβρίου.

Οι διαφορές στη χρονική εξέλιξη της αναστροφής στην παρούσα μελέτη σε σχέση με τη μελέτη των Zohar et al. (1978) πιθανά οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες εκτροφής των ψαριών. Η θερμοκρασία νερού στη μελέτη των Zohar et al. (1978) ήταν περίπου 21°C σ' όλη τη διάρκεια του έτους ενώ στην παρούσα μελέτη κυμάνθηκε από 17°C έως 26°C. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η αλλαγή φύλου και η φυλετική δομή ενός



πληθυσμού μπορεί να επηρεαστεί από την επίδραση εξωτερικών παραγόντων. Στην τσιπούρα, η διατήρηση των ατόμων σε υψηλές θερμοκρασίες καθώς και η συνεχής παροχή τροφής προκαλούν τη γρήγορη ανάπτυξη της γονάδας και την πρόωρη αλλαγή του φύλου (Zohar et al., 1978).

Η διαφορετική αναλογία αρσενικά/θηλυκά άτομα στα μέσα Δεκεμβρίου από την αναλογία στη μελέτη των Zohar et al. (1978) πιθανά οφείλεται στο ότι όλα τα ψάρια της παρούσας μελέτης υπήρχαν σε μία κοινή δεξαμενή και επέδρασαν κοινωνικοί παράγοντες στην αναστροφή του φύλου. Προφανώς η ύπαρξη πολλών θηλυκών ατόμων κατά τη διάρκεια του πειράματος προκάλεσε την αναστολή της αναστροφής κάποιων ατόμων στη δεξαμενή με αποτέλεσμα να βρεθεί στα μέσα Δεκεμβρίου υψηλό ποσοστό ατόμων στη φάση Φ1. Έχει αναφερθεί ότι η διαδικασία της αναστροφής του φύλου μπορεί να μην ολοκληρωθεί αλλά, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, να ανασταλεί (Zohar et al., 1978). Σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, ενώ έχει αρχίσει να εκφυλίζεται ο αρσενικός ιστός της γονάδας και να αναπτύσσεται ο θηλυκός ιστός που θα αποτελέσει την ωοθήκη, σταματάει αυτή η διαδικασία, εκφυλίζεται ο θηλυκός ιστός και επανασχηματίζονται οι όρχεις, με αποτέλεσμα το συγκεκριμένο άτομο να λειτουργήσει ως αρσενικό την επόμενη αναπαραγωγική περίοδο.

Σε πολλά είδη ψαριών, οι κοινωνικοί παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο: τα θηλυκά άτομα τα οποία είναι μεγαλύτερα από τα αρσενικά, εμποδίζουν την αναστροφή του φύλου των αρσενικών ατόμων και η έλλειψη των θηλυκών σε μία δεξαμενή επιτρέπει τη μετατροπή των αρσενικών σε θηλυκά άτομα (Haffray et al., 2005). Επομένως, η διαδικασία της αναστροφής του φύλου εξαρτάται από τους κοινωνικούς παράγοντες οι οποίοι εξασφαλίζουν την κατάλληλη αναλογία φύλου στον πληθυσμό (Zohar et al., 1978).

#### **4.2. Εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς της τσιπούρας.**

Η μέση τιμή της συγκέντρωσης της  $T_3$  ( $17,7 \text{ ng ml}^{-1}$ ) στο πλάσμα όλων των ατόμων της παρούσας μελέτης βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της  $T_4$  ( $10,2 \text{ ng ml}^{-1}$ ) γεγονός που ισχύει γενικά στους τελεόστεους, σε αντίθεση με τα

θηλαστικά, στα οποία τα επίπεδα της  $T_4$  είναι συνήθως μεγαλύτερα απ' αυτήν της  $T_3$  (Eales, 1979).

Τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα της τσιπούρας είναι από τα υψηλότερα που έχουν υπολογιστεί στους τελεόστεους. Σε εκτρεφόμενο πληθυσμό τσιπούρας, κατά την έναρξη της αναπαραγωγικής περιόδου, καθορίστηκαν τα όρια αναφοράς για τις θυρεοειδικές ορμόνες ως εξής:  $16,7-38,2 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $T_3$ ) και  $14,6-76,5 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $T_4$ ) (Μπαταργιάς και οι συνεργάτες του, 1997). Επίσης στο πλάσμα ατόμων τσιπούρας, ηλικίας 0+, τα επίπεδα των  $T_3$  και  $T_4$  βρέθηκαν υψηλότερα ( $T_3$ :  $23,1 \text{ ng ml}^{-1}$ ,  $T_4$ :  $31,3 \text{ ng ml}^{-1}$ ) (Cerdá-Reverter et al., 1996) από τα επίπεδα των  $T_3$  και  $T_4$  της παρούσας μελέτης. Οι διαφορές αυτές πιθανά οφείλονται στην ηλικία των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, στη μελέτη των Power et al. (2000a) βρέθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα της τσιπούρας ( $T_3$ :  $66,5 \text{ ng ml}^{-1}$ ,  $T_4$ :  $56,8 \text{ ng ml}^{-1}$ ) από αυτές της παρούσας μελέτης και πιθανόν αυτό οφείλεται αφενός στ' ότι στη μελέτη των Power et al. (2000a) χρησιμοποιήθηκαν άτομα μικρότερης ηλικίας και αφετέρου στη μικρότερη μέση θερμοκρασία νερού ( $14 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Οι θυρεοειδικές ορμόνες έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε σαλμονοειδή και οι συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα γενικά κυμαίνονται από  $0,1-14,0 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $T_3$ ) και  $1-5 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $T_4$ ), με εξαίρεση νεαρά άτομα σολομού κατά την διάρκεια της μετανάστευσης στην θάλασσα ( $T_4$ :  $50-100 \text{ ng ml}^{-1}$ ) (Dickhoff et al., 1978; Youngson and Simpson, 1984). Το εύρος των τιμών είναι μεγαλύτερο σε τροπικά θαλασσινά ψάρια ( $T_3$ :  $0,2-50 \text{ ng ml}^{-1}$ ,  $T_4$ :  $0,2-42,0 \text{ ng ml}^{-1}$ ) (Eales and Shostak, 1987).

Σε πολλά είδη τελεόστεων, στο φυσικό τους περιβάλλον ή σε αιχμαλωσία, έχουν αναφερθεί εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα (Cyr et al., 1988; MacKenzie et al., 1989; Pavlidis et al., 1991; Cyr et al., 1998; Comeau et al., 2000; Comeau et al., 2001). Οι διαφορές μεταξύ των ειδών όσον αφορά στο μέγεθος και στη χρονική εμφάνιση των διακυμάνσεων δείχνουν ότι η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία και η πρόσληψη τροφής μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών και ότι αυτές οι διακυμάνσεις επηρεάζουν την αύξηση, τη μετανάστευση και την αναπαραγωγική ωρίμανση των ψαριών (Loter et al., 2007).

Η θερμοκρασία και η φωτοπερίοδος είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τη λειτουργία του θυρεοειδή στους τελεόστεους. Ο θυρεοειδής διεγείρεται σε χαμηλή θερμοκρασία

νερού (Higgs et al., 1982) και σε μικρή φωτοπερίοδο (Eales, 1979; Brown and Stetson, 1985). Στην παρούσα μελέτη η συγκέντρωση της  $T_4$  στο πλάσμα παρουσίασε πτωτική τάση από τις αρχές Απριλίου και άρχισε να αυξάνεται από τις αρχές Αυγούστου αλλά όχι σημαντικά. Η μείωση των επιπέδων της  $T_4$  από τις αρχές Απριλίου πιθανά οφειλόταν στην σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας του νερού και της φωτοπεριόδου. Αντίθετα στα μέσα Δεκεμβρίου που η φωτοπερίοδος έγινε αρκετά πιο μικρή και η θερμοκρασία μειώθηκε, η συγκέντρωση της  $T_4$  αυξήθηκε αλλά όχι σημαντικά.

Κατά τη μελέτη των ημερήσιων διακυμάνσεων των θυρεοειδικών ορμονών στην τσιπούρα φάνηκε ότι ο θυρεοειδής ανταποκρίνεται στη φωτοπερίοδο (Cerdá-Reverter et al., 1996; Pavlidis et al., 1997) αλλά δεν υπάρχουν αναφορές για εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο είδος αυτό. Εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών έχουν όμως αναφερθεί σε άλλα είδη ψαριών. Στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) παρατηρήθηκε αύξηση της  $T_4$  κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, την περίοδο δηλαδή που η θερμοκρασία του νερού αλλά και η τροφική δραστηριότητα ήταν μέγιστη (MacKenzie et al., 1989), σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όπου η  $T_4$  σημείωσε μείωση κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Στο killifish (*Fundulus heteroclitus*) βρέθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θυρεοειδικών ορμονών σε μικρή φωτοπερίοδο (Brown and Stetson, 1985). Επιπροσθέτως, στο ίδιο είδος βρέθηκε ότι η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία είχαν αντίθετη επίδραση στην ανταπόκριση του θυρεοειδή κατά τη χορήγηση TSH δηλαδή οι αλλαγές που προκαλούνταν στη συγκέντρωση της  $T_4$  λόγω της μικρής φωτοπεριόδου αντισταθμιζόταν από την επίδραση της θερμοκρασίας για τη διατήρηση των επιπέδων της  $T_4$  (Grau et al., 1985). Στο European plaice (*Pleuronectes platessa*) στη Βόρεια θάλασσα παρατηρήθηκαν εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα με μέγιστες συγκεντρώσεις το καλοκαίρι και το χειμώνα (Osborn and Simpson, 1978,). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις των θυρεοειδικών ορμονών στη συναγρίδα (*Dentex dentex*) τον Οκτώβριο αποδόθηκαν στη χαμηλή θερμοκρασία του νερού, στην πρόσληψη τροφής και στην αύξηση των ψαριών την περίοδο αυτή (Pavlidis et al., 2000). Προφανώς οι διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών μπορεί να συνδέονται είτε με τη φωτοπερίοδο είτε με τη θερμοκρασία και εξαρτώνται από το είδος του ψαριού.

Η συγκέντρωση της  $T_3$  στο πλάσμα παρουσίασε μικρή ανοδική τάση, σε αντίθεση με την  $T_4$ , με μέγιστη τιμή τον Αύγουστο και μειώθηκε σημαντικά στα μέσα Δεκεμβρίου. Ο μοριακός λόγος  $\ln (T_4/T_3)$  από τις αρχές Μαΐου ήταν αρνητικός και παρουσίασε ελάχιστη τιμή στα μέσα Ιουλίου. Η μείωση των συγκεντρώσεων της  $T_4$  σε συνδυασμό με τις υψηλές συγκεντρώσεις της  $T_3$  στο πλάσμα και τη σημαντική μείωση του μοριακού λόγου  $\ln (T_4/T_3)$  δείχνουν ότι υπήρξε κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού εκτεταμένη ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  από τους περιφερικούς ιστούς. Έχει αναφερθεί ότι η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της ενζυμικής μετατροπής της  $T_4$  σε  $T_3$  στους περιφερικούς ιστούς (Higgs et al., 1982). Με βάση το μοντέλο της περιφερικής ρύθμισης του θυρεοειδή οι εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών μπορεί να αντανακλούν την περιφερική ρύθμιση των αποϊωδινασών, των ενζύμων δηλαδή που ρυθμίζουν και ελέγχουν τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στους περιφερικούς ιστούς, παρά την ενεργοποίηση του θυρεοειδή κεντρικά (Loter et al., 2007). Επίσης, οι ιδιότητες των πρωτεϊνών που μεταφέρουν τις θυρεοειδικές ορμόνες μεταβάλλονται εποχιακά και ίσως και αυτό να επιδρά στα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα. Στην πέστροφα η μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  *in vivo* βρέθηκε ότι αυξάνει όταν αυξάνεται η θερμοκρασία προσαρμογής (Eales et al., 1982).

Η μείωση των επιπέδων της  $T_3$  και η αύξηση του μοριακού λόγου  $\ln (T_4/T_3)$  στα μέσα Δεκεμβρίου (μετά την σημαντική αύξηση του Αυγούστου) πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι την περίοδο αυτή τα αποθέματα της ενέργειας κατευθύνονταν στις γονάδες. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στα μέσα Δεκεμβρίου ο πληθυσμός της τσιπούρας βρισκόταν σε περίοδο αναπαραγωγής και δεν μπορεί να διευκρινιστεί αν οι μεταβολές των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών οφείλονταν στην εμπλοκή του θυρεοειδή στην αναπαραγωγή ή στις προσαρμογές του μεταβολισμού στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της φωτοπερίόδου ή στο συνδυασμό των παραγόντων αυτών.

Σε αντίθεση με το πλάσμα, η συγκέντρωση της  $T_4$  στο ήπαρ ήταν μεγαλύτερη αλλά δε διέφερε σημαντικά από τη συγκέντρωση της  $T_3$  και παρουσίασε όπως και στο πλάσμα γενικά πτωτική τάση και αυξήθηκε παροδικά, αλλά όχι σημαντικά, τον Ιούνιο. Κατά τη δοκιμασία συσχέτισης ανάμεσα στην  $T_4$  του πλάσματος και στην  $T_4$  του ήπατος βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ τους ( $r= 0,563$ ) που πιθανά αυτό σημαίνει ότι όσο μειωνόταν η  $T_4$  του πλάσματος τόσο μειωνόταν και ο εφοδιασμός του

ήπατος με την ορμόνη αυτή. Αντίθετα η  $T_4$  του ήπατος μειώθηκε κατά την αύξηση του βάρους των ψαριών κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών ( $r = -0,422$ ) πιθανά λόγω της ενζυμικής μετατροπής της σε  $T_3$  λόγω των αυξημένων ενεργειακών αναγκών των ψαριών το διάστημα αυτό εξαιτίας της σωματικής αύξησης τους. Η συγκέντρωση της  $T_3$  στο ήπαρ παρέμεινε στα ίδια περίπου επίπεδα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Οι μεταβολές του μοριακού λόγου  $\ln (T_4/T_3)$  ακολούθησαν το πρότυπο μεταβολής της  $T_4$  στο ήπαρ εφόσον τα επίπεδα της  $T_3$  δεν μεταβλήθηκαν στον ιστό αυτό. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν καταρχήν ότι στην τσιπούρα το ήπαρ αποτελεί σημαντικό ιστό για την παραγωγή της  $T_3$ . Μελέτες από διαφορετικά ταξινομικά είδη στους τελεόστεους έδειξαν ότι το ήπαρ είναι επίσης ο κύριος ιστός εξωθυροειδικής παραγωγής της  $T_3$ . Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι το ήπαρ αποτελεί σημαντικό ιστό για την παραγωγή της  $T_3$  στα σαλμονοειδή (Eales and Brown, 1993; Frith and Eales, 1996), στην τιλάπια του Νείλου (Mol et al., 1993) και στο red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Van Putte et al., 2001). Δεν υπάρχουν όμως μελέτες που να αναφέρονται στις εποχιακές διακυμάνσεις των θυροειδικών ορμονών στους ιστούς. Θα μπορούσε να υποθεθεί ότι οι διακυμάνσεις των θυροειδικών ορμονών στο ήπαρ οφείλονται στις αυξημένες μεταβολικές ανάγκες των ψαριών για αύξηση την περίοδο αυτή και τις μεταβολές στην ενεργότητα της 5'-μονοαποϊωδινάσης.

Τα επίπεδα των θυροειδικών ορμονών στις γονάδες ήταν χαμηλότερα από αυτά που βρέθηκαν στο πλάσμα και στο ήπαρ αλλά όπως και στο πλάσμα οι συγκεντρώσεις της  $T_3$  βρέθηκαν σημαντικά μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις της  $T_4$  γεγονός που δηλώνει την παρουσία ενζύμων μετατροπής της  $T_4$  σε  $T_3$  στις γονάδες. Τα επίπεδα των θυροειδικών ορμονών στον ωθηκικό ιστό διατηρήθηκαν σε σταθερά επίπεδα εκτός από τα μέσα Μαΐου όπου η  $T_4$  παρουσίασε σημαντική αύξηση ενώ η  $T_3$  αυξήθηκε αλλά όχι σημαντικά το διάστημα αυτό. Μετά τα μέσα Μαΐου η  $T_3$  μειώθηκε και αυξήθηκε ξανά αλλά όχι σημαντικά στα μέσα Δεκεμβρίου. Ο μοριακός λόγος  $\ln (T_4/T_3)$  του ωθηκικού ιστού ήταν αρνητικός σ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και δεν μεταβλήθηκε σημαντικά. Επίσης βρέθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ βάρους σώματος και  $T_4$  ωθηκικού ιστού ( $r = -0,367$ ). Τα αυξημένα επίπεδα της  $T_3$  στον ωθηκικό ιστό στα μέσα Δεκεμβρίου πιθανά οφείλονται στις αυξημένες μεταβολικές ανάγκες των γονάδων για αναπαραγωγή την περίοδο αυτή. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την

καταστολή του θυρεοειδικού συστήματος και τη μείωση των επιπέδων της  $T_3$  του πλάσματος κατά τη διάρκεια της περιόδου που η ενέργεια διοχετεύεται στις γονάδες (Cyr et al., 1988). Πράγματι διαπιστώθηκε σημαντική πτώση των επιπέδων στο πλάσμα της τσιπούρας στα μέσα Δεκεμβρίου σε σχέση με το διάστημα Ιουλίου-Αύγουστου. Πάντως η βιολογικά δραστική ορμόνη  $T_3$  ήταν παρούσα σε σημαντικές ποσότητες στην ωθήκη καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι στον ωθηκικό ιστό της τσιπούρας πραγματοποιείται ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$ . Κατά τη δοκιμασία του βαθμού συσχέτισης βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ  $T_4$  και  $T_3$  ωθηκικού ιστού ( $r=0,409$ ) που σημαίνει ότι όσο αυξανόταν η παραγωγή της  $T_4$  τόσο αυξανόταν και η ενζυμική της μετατροπή σε  $T_3$ .

Στην τσιπούρα έχουν κλωνοποιηθεί θυρεοειδικοί υποδοχείς από την ωθήκη και μάλιστα *in vitro* πειράματα έδειξαν, ότι η TR- $\beta$  υπομονάδα προσδένει την  $T_3$  με μεγαλύτερη συγγένεια από την  $T_4$  (Nowell et al., 2001). Έχει αναφερθεί ότι η  $T_3$  η οποία προσδέεται στους νουκλεϊνικούς υποδοχείς των τελεόστεων ενδέχεται να μην προέρχεται μόνο από το πλάσμα αλλά από την μετατροπή της  $T_4$  που βρίσκεται κοντά στα κύτταρα-στόχους (Eales and Brown, 1993) κάτι που προφανώς συμβαίνει και στην ωθήκη της τσιπούρας. Υπάρχουν αρκετές αναφορές για την ύπαρξη θυρεοειδικών υποδοχέων στην ωθήκη και άλλων ψαριών όπως στα σαλμονοειδή, στο ευρωπαϊκό χέλι και σε πολλά είδη γατόψαρων (Eales and Brown, 1993).

Κατά τον προσδιορισμό των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών στον ωθηκικό και στον ορχικό ιστό όλων των ατόμων τσιπούρας στα μέσα Δεκεμβρίου όπου βρέθηκαν 2 ώριμα θηλυκά άτομα ενώ τα υπόλοιπα ήταν ώριμα αρσενικά, οι συγκεντρώσεις της  $T_4$  στον ορχικό ιστό ήταν σημαντικά μεγαλύτερες απ' ότι στον ωθηκικό ιστό. Οι συγκεντρώσεις της  $T_3$  δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ιστών αλλά ήταν υψηλότερες από της  $T_4$  ανεξάρτητα από τον ιστό. Επίσης βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ  $T_4$  ωθηκικού και ορχικού ιστού ( $r=0,831$ ),  $T_4$  ωθηκικού ιστού και  $T_3$  ορχικού ιστού ( $r=0,871$ ) και  $T_4$  και  $T_3$  ορχικού ιστού ( $r=0,738$ ). Στα μέσα Δεκεμβρίου φάνηκε ότι πραγματοποιήθηκε ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  στις γονάδες και πιθανά η  $T_3$  να λειτούργησε σαν αναβολικός παράγοντας για την ανάπτυξη των γονάδων και τη δημιουργία των γαμετικών κυττάρων. Είναι γνωστό ότι στα τελευταία στάδια της σεξουαλικής ωρίμανσης η σωματική αύξηση

μειώνεται αφού τα αποθέματα της ενέργειας κατευθύνονται στις γονάδες (Pickering, 1993). Επομένως είναι πιθανόν η  $T_3$  να συνετέλεσε σ' αυτή την αναβολική διαδικασία. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη η μεγαλύτερη συγκέντρωση της  $T_4$  στον ορχικό ιστό πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι σε όλα τα άτομα ο ορχικός ιστός βρισκόταν σε φάση σπερματογένεσης και σπερμιογένεσης ενώ ο ωοθηκικός ιστός (πλην δύο ατόμων που βρίσκονταν σε φάση λεκιθογένεσης) περιείχε πρωτογενή ωοκύτταρα. Γενικά, έχουν υπάρξει αναφορές για την ενεργοποίηση του θυρεοειδή κατά την ωρίμανση των γονάδων των τελεόστεων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν έχει φανεί μία ξεκάθαρη σχέση μεταξύ του επιπέδου λειτουργίας του θυρεοειδή και της ωρίμανσης διότι εμπλέκονταν και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η φωτοπερίοδος, η θερμοκρασία του νερού και η αλατότητα (Eales, 1979). Τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών προσδιορίστηκαν στις γονάδες του chin salmon κατά την αναπαραγωγική ωρίμανση (Tagawa et al., 1994) και βρέθηκε όπως και στην παρούσα μελέτη ότι τα επίπεδα της  $T_3$  ήταν μεγαλύτερα από της  $T_4$ . Επιπλέον οι συγκεντρώσεις της  $T_3$  ήταν μέγιστες όταν οι όρχεις περιείχαν σπερματογόνια και στη συνέχεια μειώθηκαν όταν δημιουργήθηκαν σπερματοκύτταρα και σπερματοζωάρια. Επομένως η μεγάλη συγκέντρωση της  $T_3$  στη φάση που εμφανίζονταν τα σπερματογόνια δείχνει ότι πιθανόν η  $T_3$  εμπλέκεται στα αρχικά στάδια ωρίμανσης των γαμετών και των όρχεων στο είδος αυτό (Tagawa et al., 1994).

#### **4.3. Μεταβολές των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών κατά την αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.**

Όσο και αν φαίνεται περίεργο, ενώ είναι γνωστό ότι οι θυρεοειδικές ορμόνες ελέγχουν την αναπαραγωγή σε πολλά ερμαφρόδιτα είδη ψαριών, δεν υπάρχει καμία μελέτη για το ρόλο των θυρεοειδικών ορμονών στην αναστροφή του φύλου στα ψάρια. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα με τη σταδιακή αύξηση του ωοθηκικού ιστού στις γονάδες, αλλά μόνο μία μικρή τάση αύξησης της  $T_3$  μετά από τη φάση Φ3. Η αύξηση αυτή της  $T_3$  στο πλάσμα μπορεί να οφείλεται ή στη μειωμένη χρήση της από τους περιφερικούς ιστούς ή στην αυξημένη περιφερική μονοαποϊώδωση της  $T_4$  σε  $T_3$ . Ωστόσο, οι αυξημένες συγκεντρώσεις της  $T_3$  στο ήπαρ, μετά τη φάση Φ3 καθώς και η

μείωση της τιμής του λόγου  $\ln (T_4/T_3)$  στο ήπαρ, επίσης μετά τη φάση Φ3, αποτελούν ενδείξεις για την ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  στον ιστό αυτό (Leatherland, 1982). Οι αυξομειώσεις των τιμών του λόγου  $\ln (T_4/T_3)$  στο πλάσμα δείχνουν ότι πιθανά τα επίπεδα των δύο ορμονών δεν μεταβάλλονταν παράλληλα. Γενικά, θεωρείται ότι η παραγωγή της  $T_3$  αυξάνεται σε αναβολικές διαδικασίες ενώ καταστέλλεται σε καταβολικές διαδικασίες (Eales and McLatchy, 1989). Η τάση αύξησης των επιπέδων της  $T_3$  του πλάσματος σε σχέση με την σταδιακή αύξηση του ωοθηκικού ιστού, στην τσιπούρα, δεν είναι εύκολο να ερμηνευτεί. Αν θεωρήσουμε όμως τη διαδικασία της αναστροφής του φύλου σαν μία σύνθετη διαδικασία κατά την οποία αποικοδομείται ο ορχικός ιστός και σχηματίζεται σταδιακά ο ωοθηκικός ιστός τότε ο ακριβής φυσιολογικός μηχανισμός της  $T_3$  σ' αυτή τη διαδικασία μένει να διευκρινιστεί.

Στο ήπαρ μόνο η  $T_3$  παρουσίασε σημαντικές διαφορές και τα επίπεδα της ορμόνης αυτής ήταν μεγαλύτερα στα ψάρια που είχαν αναστραφεί κατά 81-100% σε σχέση με τα ψάρια που οι γονάδες τους καταλαμβάνονταν από μικρό ποσοστό ωοθηκικού ιστού (0-20%). Επιπλέον η τιμή του λόγου  $\ln (T_4/T_3)$  μειώθηκε αλλά όχι σημαντικά μετά τη φάση Φ3 προφανώς λόγω της αυξημένης αποϊωδίωσης της  $T_4$  που πραγματοποιήθηκε στο ήπαρ. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι πιθανά η μεταβολικά ενεργή ορμόνη  $T_3$  είναι απαραίτητη κατά τον σταδιακό σχηματισμό του ωοθηκικού ιστού στην τσιπούρα και το ήπαρ συμβάλει στη διαδικασία αυτή. Στην πέστροφα παρατηρήθηκε αύξηση της  $T_3$  του πλάσματος και της ενεργότητας της αποϊωδινάσης  $D_2$  του ήπατος ταυτόχρονα με την έναρξη της διαφοροποίησης των γονάδων (Orozco et al., 2003).

Η συγκέντρωση της  $T_4$  στον ωοθηκικό ιστό αυξήθηκε παράλληλα με την αύξηση του στις γονάδες εκτός από την τελευταία φάση αναστροφής όπου μειώθηκε σημαντικά ενώ η  $T_3$  διατηρήθηκε σε υψηλά αλλά σταθερά επίπεδα εκτός από τη φάση Φ2 όπου αυξήθηκε σημαντικά. Επιπλέον το γεγονός ότι η τιμή του λόγου  $\ln (T_4/T_3)$  δεν μεταβλήθηκε σημαντικά και ήταν αρνητική σε όλες τις φάσεις αναστροφής σε συνδυασμό με το ότι οι συγκεντρώσεις της  $T_3$  ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από της  $T_4$  δείχνει ότι πραγματοποιήθηκε ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  στον ιστό αυτό και ότι η ορμόνη  $T_3$  υπήρξε σε σημαντικές ποσότητες στον ωοθηκικό ιστό σε όλες τις φάσεις αναστροφής του φύλου στην τσιπούρα.



Κατά τον προσδιορισμό των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών του ωθηκικού και του ορχικού ιστού των ατόμων τσιπούρας στα μέσα Δεκεμβρίου των οποίων το μεγαλύτερο μέρος των γονάδων καταλαμβάνονταν από αρσενικό ιστό (Φ1 και Φ2), βρέθηκε ότι τα επίπεδα της  $T_3$  ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα επίπεδα της  $T_4$  ανεξάρτητα από τον ιστό και ότι δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στο επίπεδο της κάθε ορμόνης στους διαφορετικούς ιστούς. Στα άτομα αυτά ο ωθηκικός ιστός καταλαμβάνονταν κυρίως από πρωτογενή ωκύτταρα (primary oocytes - PO), στην αρχική και τελική περιπυρηνική φάση ενώ στον ορχικό ιστό τα στάδια που διακρίθηκαν ήταν κυρίως αυτά των σπερματοκυττάρων (spermatocytes - SC), των σπερματιδίων (spermatids - ST) και των σπερματοζωαρίων (spermatozoa - SZ) και ελάχιστα σπερματογόνια (spermatogonia - SG) δηλαδή στα μέσα Δεκεμβρίου τα ψάρια βρίσκονταν σε φάση σπερμιόγνεσης και σπερμιάσης. Φαίνεται λοιπόν ότι το διάστημα αυτό πραγματοποιήθηκε ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  και πιθανά η  $T_3$  λειτούργησε σαν αναβολικός παράγοντας κατά την αύξηση των γονάδων και τη δημιουργία των γαμετικών κυττάρων στον ορχικό ιστό. Στον ωθηκικό ιστό των ατόμων αυτών υπήρχαν όπως αναφέρθηκε πρωτογενή ωκύτταρα στην αρχική και τελική περιπυρηνική φάση, αλλά όχι λεκιθογενή ωκύτταρα. Πιθανά οι αυξημένες συγκεντρώσεις της  $T_3$  στον ιστό αυτό οφείλονταν αποκλειστικά στην αύξηση του βάρους των γονάδων. Διάφορες μελέτες αναφέρουν θετική σχέση μεταξύ των θυρεοειδικών ορμονών και της αναπαραγωγής στα ψάρια (Cyr et al., 1988; Mylonas et al., 1994; Cyr and Eales, 1996; Power et al., 2001). Στις γονάδες της πέστροφας έχει βρεθεί η αποϊωδινάση  $D_2$  η οποία αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ρύθμισης των επιπέδων της  $T_3$  κατά τη γαμετογένεση του είδους αυτού (Sambroni et al., 2001). Στη συναγρίδα η  $T_3$  παρουσίασε θετική συσχέτιση με την 11-κετοτεστοστερόνη (11-KT), δείχνοντας τον πιθανό ρόλο των θυρεοειδικών ορμονών στην σπερμιάση (spermiation) (Pavlidis et al., 2000). Επιπλέον, σε ορισμένα είδη τελεόστεων εκφράζονται υποδοχείς της TSH στα γαμετικά τους κύτταρα. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη της σημασίας της έκκρισης των θυρεοειδικών ορμονών από τις γονάδες κατά τη γαμετογένεση (Kumar et al., 2000).

#### 4.4. Επίδραση του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου methimazole στην περιφερική ρύθμιση του θυρεοειδή και στην αναστροφή του φύλου της τσιπούρας.

Το αντιθυρεοειδικό φάρμακο methimazole χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του υπερθυρεοειδισμού στους ανθρώπους (Κούτρας, 1994) και έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση υποθυρεοειδισμού σε πειράματα σε ποντίκια (Rondeel et al., 1992; Hood et al., 2004) σε άγναθους μύξινους (Manzon et al., 2001) και σε ψάρια όπως το zebrafish (Brown et al., 1997, Lam et al., 2005). Δεν έχει μελετηθεί όμως μέχρι σήμερα η επίδραση του φαρμάκου methimazole στα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα και στους ιστούς της τσιπούρας ή σε ιστούς γενικά στα ψάρια. Η ουσία αυτή όπως αναφέρθηκε (§1.3.3) εμποδίζει τη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών στα θυρεοειδικά θυλάκια μπλοκάροντας την οξείδωση του ιωδίου και την ενσωμάτωση του με τη δράση της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης στην τυροσίνη στο μόριο της θυρεοσφαιρίνης (Melander et al., 1980; Laurence et al., 1998). Στην παρούσα εργασία η χορήγηση του methimazole είχε σαν αποτέλεσμα τη θνησιμότητα του 30% των ατόμων προς το τέλος του πειράματος (μετά τη 12<sup>η</sup> μέρα) στην ομάδα Methimazole ενώ στην ομάδα Control δεν υπήρξε θνησιμότητα. Η θνησιμότητα στην ομάδα Methimazole πιθανόν να οφείλεται στην εξασθένηση των ψαριών λόγω της συνδυασμένης επίδρασης του υποθυρεοειδισμού και της καταπόνησης από τη μεταχείριση εφόσον η καταπόνηση από μόνη της δεν αποτέλεσε αιτία πρόκλησης της θνησιμότητας στην ομάδα Control.

Η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα και των δύο ομάδων σε σχέση με την έναρξη του πειράματος οφείλεται πιθανά στην προσαρμογή των ψαριών στη μεταχείριση. Ωστόσο η στατιστικά σημαντικά μικρότερη τιμή της γλυκόζης στο πλάσμα των ατόμων της ομάδας Methimazole οφείλεται στη μικρότερη κατανάλωση ενέργειας λόγω της πιο αργής κίνησης των ψαριών και στη μειωμένη πρόσληψη τροφής. Ο υποθυρεοειδισμός επηρέασε προφανώς τη λήψη τροφής αλλά και την κίνηση των ψαριών. Επίσης, ο υποθυρεοειδισμός προκάλεσε εξανθήματα στο δέρμα στα ψάρια της ομάδας Methimazole. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν κατά την πρόκληση υποθυρεοειδισμού με τη χορήγηση methimazole στην πέστροφα (Tiitu and Vornanen, 2003). Αντιθέτως, κατά τη χορήγηση ενέσιμου διαλύματος methimazole (150μg g<sup>-1</sup>) 3 φορές την εβδομάδα για 1 μήνα σε άτομα του είδους coho salmon τα

ψάρια που επέζησαν φαινόταν υγιή και δεν επηρεάστηκε η λήψη τροφής (Moriyama et al., 1997).

Η συγκέντρωση των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση στην ομάδα Methimazole σε σύγκριση με την ομάδα Control. Η μείωση της συγκέντρωσης της  $T_4$  στο πλάσμα στην ομάδα Control πιθανόν να οφείλεται στην καταπόνηση των ψαριών λόγω του χειρισμού τους. Την τελευταία ημέρα του πειράματος η συγκέντρωση της  $T_4$  του πλάσματος στην ομάδα Methimazole ήταν μη ανιχνεύσιμη. Στον ανθρώπινο οργανισμό, όταν ο θυρεοειδής δυσκολεύεται στο έργο του, τότε ελαττώνει πρώτα την έκκριση  $T_4$  και αργότερα της πιο πολύτιμης  $T_3$  (Κούτρας, 1994). Στους τελεόστεους το methimazole εμποδίζει τη δράση της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης και προκαλεί μείωση στη σύνθεση της  $T_4$ , της κύριας ορμόνης που εκκρίνεται από το θυρεοειδή. Η μείωση του υποστρώματος, δηλαδή της  $T_4$ , έχει προφανώς σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ενζυμικής μετατροπής της  $T_4$  σε  $T_3$  και τη μείωση των επιπέδων της  $T_3$  στο πλάσμα. Παρόμοια αποτελέσματα, δηλαδή μείωση των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα, παρατηρήθηκαν στο coho salmon (Moriyama et al., 1997). Αρχικά παρατηρήθηκε μείωση της  $T_3$  και αργότερα της  $T_4$  ενώ στην παρούσα μελέτη η μείωση της  $T_4$  και της  $T_3$  στο πλάσμα ήταν σχεδόν ταυτόχρονη (από την 7<sup>η</sup> ημέρα). Επίσης η χορήγηση του methimazole στην τροφή ( $2,5 \text{ mg g}^{-1}$ ) στην πέστροφα είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των θυρεοειδικών ορμονών η οποία όμως παρατηρήθηκε μετά από 4 εβδομάδες (Larsen et al., 1997) σε αντίθεση με την παρούσα μελέτη όπου η μείωση αυτή παρατηρήθηκε πολύ γρήγορα (μετά από 7 ημέρες). Κατά τη μελέτη της επίδρασης του υποθυρεοειδισμού στην περιφερική ρύθμιση του θυρεοειδή στην τιλάπια του Νείλου με τη χορήγηση 0,2% methimazole στην τροφή για 11 ημέρες, διαπιστώθηκε επίσης σημαντική μείωση των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα σε σύγκριση με την ομάδα Control (Mol et al., 1999). Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε αύξηση της  $D_2$  αποϊωδινάσης στο ήπαρ και μείωση της  $D_3$  αποϊωδινάσης στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και στα βράγχια. Αυτό πιθανά οφείλεται στην προσπάθεια διατήρησης των επιπέδων της  $T_3$  του πλάσματος, αλλά τελικά λόγω της μείωσης του υποστρώματος, δηλαδή της  $T_4$ , η παραγωγή της  $T_3$  τελικά μειώνεται (Mol et al., 1999). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν στην τιλάπια του Νείλου και στην blackchin τιλάπια (Van der Geyten et al., 2001). Προφανώς, το χρονικό διάστημα που

απαιτείται για την εμφάνιση του υποθυρεοειδισμού εξαρτάται από τη δόση του φαρμάκου, τον τρόπο χορήγησης του αλλά και το είδος του οργανισμού.

Στην παρούσα μελέτη, στο ήπαρ και στις γονάδες, η συγκέντρωση της  $T_4$  μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στην ομάδα Methimazole σε σχέση με την ομάδα Control και η σημαντικότερη μείωση παρατηρήθηκε στο ήπαρ. Η μείωση της  $T_4$  του ήπατος πιθανά οφείλεται στη μείωση της  $T_4$  του πλάσματος εξαιτίας του υποθυρεοειδισμού. Η συγκέντρωση της  $T_3$  μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα Control, μόνο στο ήπαρ αλλά η μείωση αυτή ήταν μικρότερη από αυτή της  $T_4$  πιθανά εξαιτίας της εξωθυρεοειδικής μετατροπής της  $T_4$  σε  $T_3$ . Το χρονικό διάστημα των 14 ημερών της επίδρασης του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου προφανώς δεν ήταν αρκετό για τη μείωση των επιπέδων της  $T_3$  στις γονάδες ενώ όπως προαναφέρθηκε παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της  $T_4$ . Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι δε μειώθηκε η δραστηριότητα της 5' -μονοαποϊωδινάσης από το methimazole και ότι η  $T_3$  ήταν απαραίτητη στον ιστό αυτό. Το methimazole φαίνεται ότι αποτελεί ένα αποτελεσματικό φάρμακο για τη δημιουργία υποθυρεοειδικών ατόμων τσιπούρας, καταστέλλοντας όχι μόνο τη σύνθεση της  $T_4$  στο θυρεοειδή αλλά και το μεταβολισμό της στους περιφερικούς ιστούς (ήπαρ, γονάδες).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η αναστροφή του φύλου της τσιπούρας ξεκίνησε πριν την ολοκλήρωση της 1<sup>ης</sup> αναπαραγωγικής περιόδου και προχώρησε πολύ γρήγορα. Στα μέσα Ιουλίου όλα τα άτομα βρέθηκαν στη φάση Φ5 (81-100% ♀) και στα μέσα Δεκεμβρίου η αναλογία των θηλυκών και αρσενικών ατόμων ήταν περίπου 1:2,5. Τα θηλυκά άτομα στα οποία ολοκληρώθηκε η αναστροφή βρίσκονταν σε φάση λεκιθογένεσης και όλα τα υπόλοιπα άτομα βρίσκονταν σε φάση σπερματογένεσης και σπερμιογένεσης. Οι διαφορές στην εξέλιξη της αναστροφής στην παρούσα μελέτη σε σχέση με τη μελέτη των Zohar et al. (1978, 1984) πιθανά οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες εκτροφής των ψαριών και σε κοινωνικούς παράγοντες.

Τα επίπεδα της  $T_3$  στο πλάσμα των ατόμων της τσιπούρας της παρούσας μελέτης βρέθηκαν σημαντικά μεγαλύτερα από τα επίπεδα της  $T_4$ . Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού υπήρξε εκτεταμένη ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  στους περιφερικούς ιστούς. Η μείωση των επιπέδων της  $T_3$  στο πλάσμα στα μέσα Δεκεμβρίου πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι την περίοδο αυτή τα αποθέματα της ενέργειας κατευθύνονται στις γονάδες. Στην τσιπούρα το ήπαρ αποτελεί σημαντικό ιστό για την παραγωγή της  $T_3$ . Οι εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο ήπαρ αντανakλούν τις μεταβολικές ανάγκες των ψαριών για αύξηση και τις μεταβολές στην ενεργότητα της 5'-μονοαποϊωδινάσης. Η βιολογικά δραστική ορμόνη  $T_3$  ήταν παρούσα σε σημαντικές ποσότητες στην ωθήκη καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και τα επίπεδα της ήταν υψηλότερα από τα επίπεδα της  $T_4$ . Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στον ωθηκικό ιστό της τσιπούρας πραγματοποιείται ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$ . Τα αυξημένα επίπεδα της  $T_3$  στον ωθηκικό ιστό στα μέσα Δεκεμβρίου αντανakλούν τις μεταβολικές ανάγκες των γονάδων κατά τη φάση της ανάπτυξης των ωκυττάρων.

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα με τη σταδιακή αύξηση του ωθηκικού ιστού στις γονάδες αλλά μόνο μία μικρή τάση αύξησης της  $T_3$  μετά από τη φάση Φ3. Στο ήπαρ μόνο η  $T_3$  παρουσίασε σημαντικές διαφορές κατά την αναστροφή του φύλου και πιθανά η ορμόνη αυτή είναι απαραίτητη κατά τον σταδιακό σχηματισμό του ωθηκικού ιστού στην τσιπούρα και

φαίνεται ότι το ήπαρ συμβάλει στη διαδικασία αυτή. Η συγκέντρωση της  $T_4$  στον ωοθηκικό ιστό αυξήθηκε παράλληλα με την εμφάνιση του στις γονάδες ενώ η  $T_3$  διατηρήθηκε σε υψηλά αλλά σταθερά επίπεδα στον ωοθηκικό ιστό σε όλες τις φάσεις αναστροφής του φύλου στην τσιπούρα και φάνηκε ότι πραγματοποιήθηκε ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  στον ιστό αυτό. Το methimazole αποτέλεσε ένα αποτελεσματικό φάρμακο για τη δημιουργία υποθυρεοειδικών ατόμων τσιπούρας, καταστέλλοντας όχι μόνο τη σύνθεση της  $T_4$  στο θυρεοειδή αλλά και το μεταβολισμό της στους περιφερικούς ιστούς (ήπαρ, γονάδες).

Συμπερασματικά, από την παρούσα εργασία εικάζεται ότι οι θυρεοειδικές ορμόνες εμπλέκονται στη διαδικασία σχηματισμού του ωοθηκικού ιστού αλλά ο ακριβής ρόλος τους στη διαδικασία αυτή απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Επίσης περαιτέρω έρευνα απαιτείται για την κατανόηση των ενδοκρινολογικών, περιβαλλοντικών και κοινωνικών παραγόντων οι οποίοι μπορεί να επηρεάσουν την αναστροφή του φύλου. Χρειάζεται επίσης έρευνα σε θέματα όπως ο μεταβολισμός των αντιθυρεοειδικών φαρμάκων στην τσιπούρα αλλά και των τοξικών ουσιών που προέρχονται από το περιβάλλον οι οποίες μπορεί να δράσουν στο θυρεοειδή και να υπάρξουν αρνητικές επιπτώσεις στις λειτουργίες που επηρεάζει όπως την αύξηση, την αναπαραγωγή και γενικότερα το μεταβολισμό των ψαριών.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**  
**ABSTRACT**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι ένα ερμαφρόδιτο πρώτανδρο είδος. Στην Κρήτη, η πρώτη ωρίμανση σαν αρσενικό γίνεται στο τέλος του δεύτερου έτους της ζωής του και ακολουθεί η αναστροφή του φύλου.

Η αναστροφή του φύλου στα ψάρια ελέγχεται από γενετικούς, ορμονικούς, περιβαλλοντικούς και κοινωνικούς παράγοντες. Στα ψάρια, οι θυρεοειδικές ορμόνες παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού, στη μεταμόρφωση, στην ανάπτυξη, στην αύξηση, στην αναπαραγωγή και είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και την ωρίμανση των γονάδων. Είναι πιθανό ότι οι θυρεοειδικές ορμόνες παίζουν ρόλο και στην αναστροφή του φύλου.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα, στο ήπαρ και στις γονάδες εκτρεφόμενου πληθυσμού τσιπούρας ηλικίας 2+ το διάστημα Απρίλιος–Δεκέμβριος 2005. Απ' όσο γνωρίζουμε μέχρι σήμερα δεν έχουν προσδιοριστεί τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών σε ιστούς της τσιπούρας και δεν έχει γίνει καμία μελέτη για το ρόλο των ορμονών αυτών στην αναστροφή του φύλου.

Τα αντικείμενα της μελέτης ήταν α) η περιγραφή και ο καθορισμός των φάσεων αναστροφής του φύλου με ιστολογική τεχνική β) ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των θυρεοειδικών ορμονών στο πλάσμα, στο ήπαρ (κύριος περιφερικός ιστός παραγωγής  $T_3$ ) και στις γονάδες (ξεχωριστά στον ορχικό και ωθητικό ιστό κάθε γονάδας), τόσο εποχιακά όσο και στις διάφορες φάσεις αναστροφής του φύλου γ) η μελέτη της επίδρασης του αντιθυρεοειδικού φαρμάκου methimazole στην περιφερική ρύθμιση του θυρεοειδή και στην αναστροφή του φύλου.

Η αναστροφή του φύλου ξεκίνησε πριν το τέλος της 1<sup>ης</sup> αναπαραγωγικής περιόδου και προχώρησε πολύ γρήγορα. Στα μέσα Ιουλίου όλα τα άτομα βρέθηκαν στη φάση Φ5 (81–100% ♀) και στα μέσα Δεκεμβρίου η αναλογία των θηλυκών και αρσενικών ατόμων ήταν περίπου 1:2,5. Είναι πιθανό ότι κοινωνικοί παράγοντες καθόρισαν αυτή την αναλογία.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα της  $T_3$  στο πλάσμα της τσιπούρας ήταν σημαντικά μεγαλύτερα από της  $T_4$ , γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση ότι στους



τελεόστεους τα επίπεδα της  $T_3$  είναι μεγαλύτερα από της  $T_4$ . Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού υπήρξε εκτεταμένη ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$  στους περιφερικούς ιστούς. Η μείωση των επιπέδων της  $T_3$  του πλάσματος στα μέσα Δεκεμβρίου πιθανά αντανακλά το γεγονός ότι την περίοδο αυτή τα αποθέματα ενέργειας κατευθύνονταν στις γονάδες. Οι εποχιακές διακυμάνσεις των θυρεοειδικών ορμονών στους ιστούς αντανακλούν κυρίως τις μεταβολικές ανάγκες των ψαριών για αύξηση και αναπαραγωγή αλλά και τις μεταβολές στην ενεργότητα της 5'-μονοαποϊωδινάσης. Στην τσιπούρα, το ήπαρ αποτελεί σημαντικό ιστό για την παραγωγή της  $T_3$  κάτι που εξηγεί τα υψηλά επίπεδα της  $T_3$  στο πλάσμα. Η βιολογικά δραστική ορμόνη  $T_3$  ήταν παρούσα σε σημαντικές ποσότητες στην ωθήκη καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι στον ωθηκικό ιστό της τσιπούρας πραγματοποιείται σημαντική ενζυμική μετατροπή της  $T_4$  σε  $T_3$ .

Κατά την σταδιακή αύξηση του ωθηκικού ιστού (φάση Φ3 έως Φ5) παρατηρήθηκε μόνο μία μικρή τάση αύξησης της  $T_3$  του πλάσματος. Στο ήπαρ μόνο η  $T_3$  παρουσίασε σημαντικές διαφορές και το γεγονός αυτό δείχνει ότι η ορμόνη αυτή είναι απαραίτητη για τον σταδιακό σχηματισμό του ωθηκικού ιστού στην τσιπούρα και φαίνεται ότι το ήπαρ συμβάλει στη διαδικασία αυτή. Τα επίπεδα της  $T_4$  στον ωθηκικό ιστό αυξήθηκαν παράλληλα με την εμφάνιση του στις γονάδες εκτός από την τελευταία φάση αναστροφής (Φ5) όπου μειώθηκε σημαντικά ενώ η  $T_3$  διατηρήθηκε σε υψηλά αλλά σταθερά επίπεδα. Τα παρόντα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ορμόνη  $T_3$  υπάρχει σε σημαντικές ποσότητες σε όλες τις φάσεις αναστροφής του φύλου στην τσιπούρα.

Το methimazole αποτέλεσε ένα αποτελεσματικό φάρμακο για τη δημιουργία υποθυρεοειδικών ατόμων τσιπούρας, καταστέλλοντας όχι μόνο τη σύνθεση της  $T_4$  στο θυρεοειδή αλλά και το μεταβολισμό της στους περιφερικούς ιστούς (ήπαρ, γονάδες).

## ABSTRACT

The gilthead seabream (*Sparus aurata*) is a protandrous hermaphrodite teleost. In Crete, the initial sexual maturity as a male takes place at the end of the second year of life and then the fish begin to undergo sex reversal.

Sex reversal in fish is controlled by genetic, hormonal, environmental and social factors. Thyroid hormones regulate a wide range of functions, such as metabolism, metamorphosis, development, growth, reproduction and have been shown to be essential to the development and maturation of gonads. It's possible that thyroid hormones also play a role in sex reversal.

In the present study, we have determined the levels of thyroid hormones in plasma, liver and gonads of a reared population of gilthead seabream aged 2+ from April to December 2005. Based on our Knowledge up to date, the levels of thyroid hormones in tissues of this species have not been determined and there has been no study regarding the role of these hormones in sex reversal.

The objectives of the study were 1) the description and characterization of the sex reversal phases using histological techniques 2) the determination of thyroid hormone levels in plasma, liver –the main peripheral tissue of T<sub>3</sub> production– and gonads, both seasonally and during the different phases of sex reversal and 3) the study of the effect of antithyroid drug, methimazole, in the peripheral regulation of the thyroid and in sex reversal.

Sex reversal started before the end of the first reproductive period and developed rapidly. In mid July all fish were found in phase  $\Phi_5$  (81–100% ♀) and in mid December the ratio of females to males was approximately 1:2,5. It is likely that social factors determined this ratio.

It was shown that plasma T<sub>3</sub> levels were significantly higher than those of T<sub>4</sub>, which supports the hypothesis that plasma T<sub>3</sub> levels are higher than those of T<sub>4</sub> in teleosts. During summer, there was an extended enzymatic conversion of T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub> in peripheral tissues. On the contrary, the decreased plasma T<sub>3</sub> levels in mid December possibly reflected the fact that during this period, the energy was directed to the gonads. Seasonal variations of tissue

thyroid hormones mainly reflect the metabolic needs of fish for growth and reproduction and changes in activity of the 5'-monodeiodinase enzyme. In gilthead seabream, the liver is considered to be important tissue for  $T_3$  production, justifying the high levels of plasma  $T_3$ . The levels of the biologically active hormone  $T_3$  were high in the ovary during the whole study and these results show that in the ovarian tissue an important enzymatic conversion of  $T_4$  to  $T_3$  exists.

During the gradual growth of ovarian tissue ( $\Phi 3$ - $\Phi 5$  phases), only a minor increase of plasma  $T_3$  was observed. In the liver,  $T_3$  levels were significantly fluctuated indicating that  $T_3$  is essential for the gradual formation of ovarian tissue and that the liver contributes to this process. The levels of  $T_4$  in the ovarian tissue increased along with the appearance of this tissue in the gonads excluding the last reversal phase ( $\Phi 5$ ) where an important decrease was observed while  $T_3$  levels remained high but stable. The current results showed that  $T_3$  hormone exists in significant quantities during all sex reversal phases in gilthead seabream.

Methimazole was a effective drug for the production of hypothyroid individuals of gilthead seabream, preventing not only  $T_4$  synthesis in the thyroid but also its metabolism in peripheral tissues (liver, gonads).

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – Ραδιοανοσοανάλυση (RIA).

**Πίνακας Ι:** Όγκος προτύπων διαλυμάτων και άγνωστων δειγμάτων κατά τη διαδικασία προσδιορισμού των θυρεοειδικών ορμονών κατά την αναστροφή του φύλου στην τσιπούρα<sup>α</sup> και κατά τη δημιουργία υποθυρεοειδικών ατόμων τσιπούρας<sup>β</sup>.

		Πρότυπα	Άγνωστα <sup>a</sup>	Άγνωστα <sup>b</sup>
<b>T<sub>4</sub></b>	<b>Πλάσμα</b>	25μl+1ml <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>	50 μl +1ml <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>	50 ή 75 μl +1ml <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>
	<b>Ήπαρ</b>	25μl+1ml <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>	25 μl +1ml <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>	50 μl +1ml <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>
	<b>Γονάδα</b>	25μl+1ml <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>	75 μl +1ml <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>	75 μl +1ml <sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>
<b>T<sub>3</sub></b>	<b>Πλάσμα</b>	100μl+1ml <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>	100μl (αραίωση 1:3) + 1ml <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>	100μl (αραίωση 1:3) + 1ml <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>
	<b>Ήπαρ</b>	100μl+1ml <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>	100μl (αραίωση 1:2 ή 1:5 ) + 1ml <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>	100μl (αραίωση 1:2) + 1ml <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>
	<b>Γονάδα</b>	100μl+1ml <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>	100μl (αραίωση 1:2 ή 1:3 ή 1:4) + 1ml <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>	100μl (αραίωση 1:2) + 1ml <sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II – Βήματα αναγωγής των αποτελεσμάτων σε ng g<sup>-1</sup> ιστού.**

**Πίνακας I:** Βήματα αναγωγής των αποτελεσμάτων σε ng g<sup>-1</sup> ιστού.

Ορμόνη	ng ml <sup>-1</sup>	ng/RIA tube	ng/200μl *	ng/850μl	ng/9ml	ng g <sup>-1</sup> ιστού
T <sub>4</sub>	τιμή	X 25/1000	X 200/25	X 850/700	X 9/V	/g
T <sub>3</sub>	τιμή	X 100/1000	X 200/100	X 850/700	X 9/V	/g

\* ή ng/160μl γονάδας

όπου:

*ng ml<sup>-1</sup>*: η τιμή που υπολογίζεται από τον γ-counter

*ng/RIA tube*: η ποσότητα σε ng της ορμόνης στο σωλήνα του κιτ

*ng/200μl ή ng/160μl* : η ποσότητα σε ng της ορμόνης που βρίσκεται στο ομογενοποιημένο δείγμα μετά τον καθαρισμό του δείγματος

*ng/850μl*: η ποσότητα σε ng της ορμόνης στην άνω φάση στην οποία βρίσκονταν οι θυρεοειδικές ορμόνες

*ng/9ml*: η ποσότητα σε ng της ορμόνης στα 9ml μεθυλικής αμμωνίας +PTU κατά την εκχύλιση του δείγματος διορθωμένα κατά την πολύ μικρή ποσότητα που μπορεί να διέφευγε κατά την μετάγγιση των διαλυμάτων και

*ng g<sup>-1</sup> ιστού*: διαιρώντας με το βάρος του δείγματος βρίσκεται η ποσότητα σε ng της ορμόνης ανά g ιστού.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allsop**, D.J., West, S.A., 2003. Constant relative age and size at sex change for sequentially hermaphroditic fish. *Journal of Evolutionary Biology* 16, 921–929.
- Bau**, F., Parent, J.P., 2000. Seasonal variations of thyroid hormone levels in wild fish. *C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* 323, 365–372.
- Brown**, C.L., Stetson, M.H., 1985. Photoperiod-dependent negative feedback effects of thyroid hormones in *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology* 58, 186–191.
- Brown**, C.L., Doroshov, S.I., Nunez, J.M., Hadley, C., Vaneenenaam, J., Nishioka, R.S., Bern, H.A., 1988. Maternal T<sub>3</sub> injections cause increases in swimbladder inflation and survival rates in larval striped bass. *Journal of Experimental Zoology* 248, 168–176.
- Brown**, D.D., 1997. The role of thyroid hormone in zebrafish and axolotl development. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, Developmental Biology* 94, 13011–13016.
- Bruslé-Sicard**, S., Fourcalt, B., 1997. Recognition of sex-inverting protandric *Sparus aurata*: ultrastructural aspects. *Journal of Fish Biology* 50, 1094–1103.
- Bunng**, T., Idler, D.R., Eales, J.G., 1982. Pituitary hormones that stimulate the thyroidal system in teleost fishes. *General and Comparative Endocrinology* 48, 372–389.
- Buxton**, C.D., Garratt, P.A., 1990. Alternative reproductive styles in seabreams (Pisces: Sparidae). *Environmental Biology of Fishes* 28, 113–124.
- Cerdá-Reverter**, J.M., Zanuy, S., Carillo, M., Kah, O., 1996. Development of enzyme immunoassays for 3,5,3'-triido-L-thyronine and L-thyroxine: time-course studies on the effect of food deprivation on plasma thyroid hormones in two marine teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology* 103, 290–300.
- Chaoui**, L., Kara, M.H., Faure, E., Quignard, J.P., 2006. Growth and reproduction of the gilthead seabream *Sparus aurata* in Mellah lagoon (north-eastern Algeria). *Scientia Marina* 70 (3), 545–552.
- Comeau**, L.A., Campana, S.E., Hanson, J.M., Chouinard, G.A., 2000. Seasonal changes of thyroid hormones in field-collected atlantic cod in relation to condition indices,



- water temperature and photoperiod. *Journal of Fish Biology* 57 (3), 571–588.
- Comeau, L.A., Campana, S.E., Chouinard, G.A., Hanson, J.M., 2001.** Timing of Atlantic cod *Gadus morhua* seasonal migrations in relation to serum levels of gonadal and thyroid hormones. *Marine Ecology Progress Series* 221, 245–253.
- Condeça, J.B., Canario, A.V.M., 1999.** The effect of estrogen on the gonads and on in vitro conversion of androstenedione to testosterone, 11-ketotestosterone and estradiol-17 beta in *Sparus aurata* (Teleostei, Sparidae). *General and Comparative Endocrinology* 116 (1), 59–72.
- Cyr, D.G., Eales, J.G., 1988.** Influence of thyroidal status on ovarian function in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology* 248, 81–87.
- Cyr, D.G., Bromage, N.R., Duston, J., Eales, J.G., 1988.** Seasonal patterns in serum levels of thyroid hormones and sex steroids in relation to photoperiod-induced changes in spawning time in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *General and Comparative Endocrinology* 69, 217–225.
- Cyr, D.G., Eales, J.G., 1996.** Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, 165–200.
- Cyr, D.G., Idler, D.R., Audet, C., McLeese, J.M., Eales, J.G., 1998.** Effects of long-term temperature acclimation on thyroid hormone deiodinase function, plasma thyroid hormone levels, growth, and reproductive status of male atlantic cod, *Gadus morhua*. *General and Comparative Endocrinology* 109, 24–36.
- D' Ancona, U., 1941.** Ulteriori osservazioni sull'ermafroditismo e il differenziamento sessuale dell'orata (*Sparus auratus* L.) (Completamento delle ricerche della Dott. A. Pasquali). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli* 18, 313–336.
- Darras, V.M., Mol, K.A., Van der Geyten, S., Kuhn, E.R., 1998.** Control of peripheral hormone levels by activating and inactivating deiodinases. *Annals New York Academy of Sciences* 839, 80–86.
- Degitz, S.J., Holcombe, G.W., Flynn, K.M., Kosian, P.A., Korte, J.J., Tietge, J.E., 2005.** Progress towards development of an amphibian-based thyroid screening assay using *Xenopus laevis*. Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-propylthiouracil, methimazole, and thyroxine. *Toxicological Sciences* 87(2), 353–364.

- de Jesus**, E.G., Hirano, T., Inui, Y., 1993. Flounder metamorphosis: its regulation by various hormones. *Fish Physiology and Biochemistry* 11(1-6 ), 323-328.
- Devlin** R.H., Nagahama, Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191-364.
- DiStefano**, J.J., Ron, B., Nguyen, T.T., Weber, G.M., Grau, E.G., 1988. 3,5,3'-Triiodothyronine T<sub>3</sub> clearance and T<sub>3</sub>-glucuronide (T<sub>3</sub>G) appearance kinetics in plasma of freshwater-reared male tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology* 111, 123-140.
- DeVito**, M., Biegel, L., Brouwer, A., Brown, S., Brucker-Davis, F., Cheek, A.O., Christensen, R., Colborn, T., Cooke, P., Crissman, J., Crofton, K., Doerge, D., Gray, E., Hauser, P., Hurley, P., Kohn, M., Lazar, J., McMaster, S., McClain, M., McConnell, E., Meier, C., Miller, R., Tietge, T., and Tyl, R., 1999. Screening methods for thyroid hormone disruptors. *Environmental Health Perspectives* 107, 407-415.
- Dickhoff**, W.W., Folmar, L.C., Gorbman, A., 1978. Changes in plasma thyroxine during smoltification of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 36, 229-332.
- Eales**, J.G., 1979. Thyroid function in cyclostomes and fishes. In: Barrington E.J.W.(Ed), *Hormones and Evolution*, Academic Press, New York, pp. 341-436.
- Eales**, J.G., Chang, J.P., Van Der Kraak, G.J., Omeljaniuk, R.J., Uin, L.A., 1982. Effects of temperature on plasma thyroxine and iodide kinetics in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *General and Comparative Endocrinology* 47, 295-307.
- Eales**, J.G., 1984. The peripheral metabolism of thyroid hormones and regulation of thyroidal status in poikilotherms. *Canadian Journal of Zoology* 63, 1217-1231.
- Eales**, J.G., Shostak, S., 1987. Total and free thyroid hormones in plasma of tropical marine teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 3 (3), 127-131.
- Eales** J.G., MacLatchy, D.L., 1989. The relationship between T<sub>3</sub> production and energy balance in salmonids and other teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry* 7 (1-4), 289-293.
- Eales**, J.G., Brown, S.B., 1993. Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3, 299-347.

- Eales, J.G., Holmes, J.A., McLeese, J.M., and Youson, J.H., 1997.** Thyroid hormone deiodination in various tissues of larval and upstream-migrant Sea Lampreys, *Petromyzon marinus*. *General and Comparative Endocrinology* 106, 202–210.
- Elsalini, O.A., Rohr, K.B., 2003.** Phenylthiourea disrupts thyroid function in developing zebrafish. *Development Genes and Evolution* 212, 593–598.
- Falk-Petersen, I.B., 2005.** Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 397–412.
- FAO, 2007.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/fi/>.
- F.E.A.P, 2002.** The Federation of European Aquaculture Producers. <http://www.feap.info/feap/>.
- Finnson, K.W., McLeese, J.M., Eales, J.G., 1999.** Deiodination and deconjugation of thyroid hormone conjugates and type I deiodination in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 115, 387–397.
- Frith, S.D., Eales, J.G., 1996.** Thyroid hormone deiodination pathways in brain and liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 10, 323–332.
- Grau, E.G., Brown, C.L., Stetson, M.H., 1985.** Photoperiodic regulation of thyroid responsiveness to TSH in *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Zoology* 234, 199–205.
- Gupta, B.B.P., Premabati, Y., 2002.** Differential effects of melatonin on plasma levels of thyroxine and triiodothyronine levels in the air-breathing fish, *Clarias gariepinus*, during breeding and quiescent periods. *General and Comparative Endocrinology* 129, 146–151.
- Haffray, P., Bruant, J.S., Facqueur, J.M, Fostier, A., 2005.** Gonad development, growth, survival and quality traits in triploids of the protandrous hermaphrodite gilthead seabream *Sparus aurata* (L.). *Aquaculture* 247, 107– 117.
- He, C.T., Hsieh, A.T., Pei, D., Hung, Y.J., Wu, L.Y., Yang, T.C., Lian, W.C., Huang, W.S., Kuo, S.W., 2004.** Comparison of single daily dose of methimazole and propylthiouracil in the treatment of Graves' hyperthyroidism. *Clinical Endocrinology* 60, 676–681.

- Hengstmann, J.H., Hohn, H., 1985.** Pharmacokinetics of methimazole in humans. *Klin Wochenschr* 63, 1212–1217.
- Higgs, D.A., Fagerlund, U.H.M., Eales, J.G., McBride, J.R., 1982.** Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73B (1), 143–176.
- Hollosi, L., 2005.** Development and application of analytical methods for the determination of methimazole and its metabolites and their effects to thyroid homeostasis in zebrafish (*Danio rerio*). Ph.D. Thesis. Technische Universität München. Department für Biowissenschaften, 206pp.
- Hood, A., Liu, Y.P., Gattone, V.H., Klaassen, C.D., 1999.** Sensitivity of thyroid gland growth to thyroid stimulating hormone (TSH) in rats treated with antithyroid drugs. *Toxicological Sciences* 49 (2), 263–271.
- Hulbert, A.J., 2000.** Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biology Reviews* 75, 519–631.
- Inui, Y., Miwa, S., 1985.** Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *General and Comparative Endocrinology* 60, 450–454.
- Inui, Y., Yamano, K., Miwa, S., 1995.** The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. *Aquaculture* 135, 87–98.
- Jalabert, B., 2005.** Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development* 45, 261–279.
- Kim, B.G., Brown, C.L., 1997.** Interaction of cortisol and thyroid hormone in the larval development of pacific threadfin. *American Zoologist* 37, 470–481.
- Kissil, G.W., Lupatsch, I., Elizur, A., Zohar, Y., 2001.** Long photoperiod delayed spawning and increased somatic growth in gilthead sea-bream *Sparus aurata*. *Aquaculture* 200, 363–379.
- Klaren, P.H.M., Guzmán, J.M., Mancera, J.M., Geven, E.J.W., Flik, G., 2005.** The involvement of thyroid hormone metabolism in gilthead sea bream (*Sparus auratus*) osmoregulation. *Annals New York Academy Of Sciences* 1040, 360–362.
- Kokokiris, L., Bruslé, S., Kentouri M., Fostier A., 1999.** Sexual maturity and hermaphroditism of the red porgy *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). *Marine Biology* 134, 621–629.

- Κούτρας, Δ.Α.,** Αδαμόπουλος, Δ.Α., Ράπτης, Σ.Α., Σουβατζόγλου, Α.Μ., 1994. Βασική ενδοκρινολογία. Εκδόσεις Παρισιάνου. Αθήνα,σελ. 1-1159.
- Kumar, R.S.,** Ijiri, S., Kight, K., Swanson, P., Dittman, A., Alok, D., Zohar, Y., Trant, J.M., 2000. Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor from the gonads of a vertebrate (bony fish): Potential thyroid-independent role for thyrotropin in reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* 167 (1-2), 1-9.
- Lam, T.J.,** 1994. Hormones and egg / larval quality in fish. *Journal of the World Aquaculture Society* 25 (1), 2-12.
- Lam, S.H.,** Sin, Y.M., Gong, Z., Lam, T.J., 2005. Effects of thyroid hormone on the development of immune system in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology* 142, 325-335.
- Larsen, D.A.,** Dickey, J.T., Dickhoff, W.W., 1997. Quantification of salmon alpha- and thyrotropin (TSH) beta-subunit messenger RNA by an RNase protection assay: Regulation by thyroid hormones. *General and Comparative Endocrinology* 107, 98-108.
- Laurence, C.,** El Ghomari, M.J., Le Questel, J., Berthelot, M., Mokhlisse, R. 1998. Structure and molecular interactions of anti-thyroid drugs. Methimazole: a diiodine sponge. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 1545-1551.
- Leary, S.C.,** Ballantyne, J.S., Leatherland, J.F., 1999. Evaluation of thyroid hormone economy in elasmobranch fishes, with measurements of hepatic 5' - monodeiodinase activity in wild dogfish. *Journal of Experimental Zoology* 284, 492-499.
- Leatherland, J.F.,** 1982. Environmental physiology of the teleostean thyroid gland: a review. *Environmental Biology of Fishes* 7 (1), 83-110.
- Lee, Y.H.,** Du, J.L, Yueh, W.S, Lin, B.Y, Huang, J.D, Lee, C.Y, Lee, M.F, Lau, E.L, Lee, F.Y, Morrey, C., Nagahama, Y., Chang, C.F., 2001. The sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. *Journal of Experimental Zoology* 290, 715-726.
- Lema, S.C.,** Nevitt, G.A., 2004. Evidence that thyroid hormone induces olfactory cellular proliferation in salmon during a sensitive period for imprinting. *Journal of Experimental Biology* 207, 3317-3327.

- Liu, Y.W., Chan, W.K., 2000.** Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. *Differentiation* 70, 36–45.
- Loter, T.C., MacKenzie, D.S., McLeese, J., Eales, J.G., 2007.** Seasonal changes in channel catfish thyroid hormones reflect increased magnitude of daily thyroid hormone cycles. *Aquaculture* 262, 451–460.
- MacKay, N.J., 1973.** The effects of methallibure (I.C.I. 33,828) and thiourea on gametogenesis in the firetail gudgeon, *Hypseleotris galii*. *General and Comparative Endocrinology* 20, 221–35.
- MacKenzie, D.S., Thomas, P., Farrar, S.M., 1989.** Seasonal changes in thyroid and reproductive steroid hormones in female channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Pond culture. *Aquaculture* 18, 63–80.
- Manzon, R.G., Holmes, J.A., Youson, J.H., 2001.** Variable effects of goitrogens in inducing precocious metamorphosis in sea lampreys (*Petromyzon marinus*). *Journal of Experimental Zoology* 289, 290–303.
- McCormick, S.D., 2001.** Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist* 41, 781–794.
- Meiri, I., Knibb, W.R., Zohar, Y., Elizur, A., 2004.** Temporal profile of b follicle-stimulating hormone, and growth hormone gene expression in the protandrous hermaphrodite, gilthead seabream, *Sparus aruata*. *General and Comparative Endocrinology* 137, 288–299.
- Melander, A., Hallengren, B., Rosendal-Helgesen, S., Söberg, A., Wåhlin-Boll, E., 1980.** Comparative in vitro effects and in vivo kinetics of antithyroid drugs. *European Journal of Clinical Pharmacology* 17, 295–299.
- Méndez, E., Anastasiadis, P., Kentouri, M., Pavlidis, M., Divanach, P., 1995.** Preliminary data on spawning activity of five mediterranean teleost species kept in captivity, in Crete (Greece). In: *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*, May 10–13, Sant Carles de la Rápita, Spain (ed. by F. Castelló, F. and A. Calderer, A), pp. 398–403.
- Mol, K.A., Kaptein, E., Darras, V.M., de Greef, W.J., Kühn, E.R., Visser, T.J., 1993.** Different thyroid hormone deiodinating systems in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. *Federation of European Biochemical Societies* 321, 140–144.

- Mol, K.A., Van der Geyten, S., Burel, C., Kühn, E.R., Boujard, T., Darras, V.M., 1998.** Comparative study of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in five teleostean fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 18, 253–266.
- Mol, K.A., Van der Geyten, S., Kühn, E.R., Darras, V.M., 1999.** Effects of experimental hypo- and hyperthyroidism on iodothyronine deiodinases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 20, 201–207.
- Moriyama, S., Swanson, P., Larsen, D.A., Miwa, S., Kawauchi, H., Dickhoff, W.W., 1997.** Salmon thyroid-stimulating hormone: Isolation, characterization, and development of a radioimmunoassay. *General and Comparative Endocrinology* 108, 457–471.
- Μπαταργιάς, Κ., Παυλίδης, Μ., Κεντούρη, Μ., Ζούρος, Ε., 1997.** Τιμές αναφοράς βιοχημικών και ορμονικών παραμέτρων στον ορό εκτρεφόμενου πληθυσμού τσιπούρας (*Sparus aurata*, L.), κατά την έναρξη της αναπαραγωγικής περιόδου. Πρακτικά 5ου Πανελληνίου Συμποσίου Ωκεανογραφίας & Αλιείας, Τόμος II, σελ. 157–160.
- Μπαταργιάς, Κ., 1998.** Γενετική της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Μελέτη των μικροδορυφορικών αλληλουχιών και χρήση τους στην εκτίμηση γενετικών παραμέτρων της αύξησης και άλλων ποσοτικών χαρακτήρων. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.
- Mylonas, C.C., Sullivan, C.V., Hinshaw, J.M., 1994.** Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. *Fish Physiology and Biochemistry* 13, 485–493.
- Mylonas, C.C., Scott, A.P., Zohar, Y., 1997.** Plasma gonadotropin II, sex steroids, and thyroid hormones in wild striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation and final oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology* 108, 223–236.
- Norberg, B., Björnsson, B.T., Brown, C.L., Wichardt, U.P., Deftos, L.J., Haux, C., 1989.** Changes in plasma vitellogenin, sex steroids, calcitonin, and thyroid hormones related to sexual maturation in female brown trout (*Salmo trutta*). *General and Comparative Endocrinology* 75, 316–326.
- Nowell, M.A., Power, D.M., Canario, A.V.M., Llewellyn, L., Sweeney, G.E., 2001.** Characterization of a sea bream (*Sparus aurata*) thyroid hormone receptor-β clone

- expressed during embryonic and larval development. *General and Comparative Endocrinology* 123, 80–89.
- Oldfield**, R.G., 2005. Genetic, abiotic and social influences on sex differentiation in cichlid fishes and the evolution of sequential hermaphroditism. *Fish and Fisheries* 6, 93–110.
- Orozco**, A., Fenton, B., Valverde-R, C., 2003. Temporal profile of the outer- and inner-ring iodothyronine deiodinase pathways in the liver and skin in developing rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry* 29, 297–303.
- Osborn**, R.H., Simpson, T.H., 1978. Seasonal changes in thyroidal status in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Journal of Fish Biology* 126, 519–526.
- Pasquali**, A., 1941. Contributo allo studio dell' ermafroditismo e del differenziamento della gonade nell' orata (*Sparus auratus* L.). *Publicazioni della Stazione Zoologica di Napoli* 18, 282–312.
- Pavlidis**, M., Dessypris, A., Christofidis, I., 1991. Seasonal fluctuations in plasma thyroid hormones, in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), during the first and second reproductive cycle: relation with their photoperiodically altered spawning time. *Aquaculture* 99, 365–385.
- Pavlidis**, M., Berry, M., Divanach, P., Kentouri, M., 1997. Diel pattern of haematocrit, serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormones in sea bass and sea bream. *Aquaculture International* 5, 237–247.
- Pavlidis**, M., Greenwood, L., Mourot, B., Kokkari, C., Le Menn, F., Divanach, P., Scott, A.P., 2000. Seasonal variations and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroids, vitellogenin, and thyroid hormones in the common dentex (*Dentex dentex*). *General and Comparative Endocrinology* 118, 14–25.
- Pavlidis**, M., Kokokiris, L., Paspatis, M., Somarakis, S., Kentouri, M., Divanach, D., 2006. Gonadal development in hybrids of Mediterranean sparids: *Sparus aurata* (female) × *Pagrus pagrus* (male). *Aquaculture Research* 37, 302–305.
- Pickering**, A.D., 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture* 111, 51–63.
- Power**, D.M., Melo, J., Santos, C.R.A., 2000a. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *Journal of Fish Biology* 56, 374–387.



- Power, D.M., Elias, N.P., Richardson, S.J., Mendes, J., Soares, C.M., Santos, C.R.A., 2000b.** Evolution of the thyroid hormone binding protein, transthyretin. *General and Comparative Endocrinology* 119, 241–255.
- Power, D.M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M.A., Björnsson, B.T., Einarsdottir, I.E., Canario, A.V.M., Sweeney, G.E., 2001.** Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130, 447–459.
- Reddy, P.K., Lam, T.J., 1992.** Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*): Effects of the hormones and an antithyroid drug on yolk absorption, growth and development. *Fish Physiology and Biochemistry* 9 (5/6), 473–485.
- Rondeel, J.M.M., De Greef, W.J., Klootwijk, W., Visser, T.J., 1992.** Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 130 (2), 651–656.
- Rosecchi, E., 1987.** The feeding of *Diplodus annularis*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris* and *Sparus aurata* (Pisces, Sparidae) in the Lion Gulf and the coastal lagoons. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes* 49 (3–4), 125–141.
- Sambroni, E., Gutieres, S., Cauty, C., Guiguen, Y., Breton, B., Lareyre, J.J., 2001.** Type II iodothyronine deiodinase is preferentially expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and gonads. *Molecular Reproduction and Development* 60, 338–350.
- Sanders, J.P., Van der Geyten, S., Kaptein, E., Darras, V.M., Kühn, E.R., Leonard, J.L., Visser, T.J., 1997.** Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* 138, 5153–5160.
- Santos, C.R.A., Power, D.M., 1999.** Identification of transthyretin in fish (*Sparus aurata*): cDNA cloning and characterisation. *Endocrinology* 140 (5), 2430–2433.
- Schreiber, G., Richardson, S.J., 1997.** The evolution of gene expression, structure and function of transthyretin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 116B, 137–160.
- Schreiber, A.M., Specker, J.L., 1998.** Metamorphosis in the summer flounder (*Paralichthys dentatus*): stage-specific developmental response to altered thyroid status. *General and Comparative Endocrinology* 111, 156–166.
- Shapiro, D.Y., 1992.** Plasticity of gonadal development and protandry in fishes. *Journal of Experimental Zoology* 261, 194–203.

- Sower, S.A., Schreck., C.B., 1982.** Steroid and thyroid hormones during sexual maturation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in seawater or fresh water. *General and Comparative Endocrinology* 47, 42–53.
- Specker, J.L., Brown, C.L., Bern, H.A., 1992.** Asynchrony of changes in tissue and plasma thyroid hormones during the parr–smolt transformation of coho salmon. *General and Comparative Endocrinology* 88, 397–405.
- Sullivan, C.V., Bernard, M.G., Hara, A., Dickhoff, W.W., 1989.** Thyroid hormones in trout reproduction: Enhancement of gonadotropin–releasing hormone analogue and partially purified salmon gonadotropin–induced ovarian maturation in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology* 250, 188–195.
- Sutija, M., Joss, J.M.P., 2006.** Thyroid hormone deiodinases revisited: insights from lungfish: a review. *Journal of Comparative Physiology (B)* 176, 87–92.
- Szisch, V., Papandroulakis, N., Fanouraki, E., Pavlidis, M., 2005.** Ontogeny of the thyroid hormones and cortisol in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *General and Comparative Endocrinology* 142 (1–2), 186–192.
- Tagawa, M., Hirano, T., 1987.** Presence of thyroxine in eggs and changes in its content during early development of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *General and Comparative Endocrinology* 68, 129–135.
- Tagawa, M., Hirano, T., 1990.** Changes in tissue and blood concentrations of thyroid hormones in developing chum salmon. *General and Comparative Endocrinology* 76, 437–443.
- Tagawa, M., Ogasawara, T., Sakamoto, T., Miura, T., Yamauchi, K., Hirano, T., 1994.** Thyroid hormone concentrations in the gonads of wild chum salmon during maturation. *Fish Physiology and Biochemistry* 13, 233–240.
- Tiitu, V., Vornanen, M., 2003.** Does different thyroid state effect on the contractility of the cardiac muscle of eurythermal fish species, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)? *Journal of Thermal Biology* 28, 35–42.
- Tyler, J.R., Sumpter, J.P., 1996.** Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, 287–318.

- Van der Geyten, S., Mol, K., Pluymers, W., Kühn, E.R., Darras, V.M., 1998.** Changes in plasma T<sub>3</sub> during fasting/refeeding in tilapia (*Oreochromis niloticus*) are mainly regulated through changes in hepatic type II iodothyronine deiodinase. *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 135–143.
- Van der Geyten, S., Toguyeni, A., Baroiller, J.F., Fauconneau, Fostier, A., Sanders, J.P., Visser, T.J., Kühn, E.R., Darras, V.M., 2001.** Hypothyroidism induces type I iodothyronine deiodinase expression in tilapia liver. *General and Comparative Endocrinology* 124, 333–342.
- Van der Geyten, S., Byamungu, N., Reyns, G.E., Kühn, E.R., Darras V.M., 2005.** Iodothyronine deiodinases and the control of plasma and tissue thyroid hormone levels in hyperthyroid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Endocrinology* 184, 467–479.
- VanPutte, C.L.M., MacKenzie, D.S., Eales, J.G., 2001.** Characterization of hepatic low-K<sub>m</sub> outer-ring deiodination in red drum *Sciaenops ocellatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology (B)* 128, 413–423.
- Varsamos, S., Nebel, C., Charmantier, G., 2005.** Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology* 141, 401–429.
- Yamano, K., Tagawa, M., de Jesus, E.G., Hirano, T., Miwa, S., Inui, Y., 1991.** Changes in whole body concentrations of thyroid hormones and cortisol in metamorphosing conger eel. *Journal of Comparative Physiology (B)* 161, 371–375.
- Yamano, K., 2005.** The role of thyroid hormone in fish development with reference to aquaculture. *Japan Agricultural Research Quarterly* 39 (3), 161–168.
- Yen, P.M., Chin, W.W., 1994.** Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Molecular Endocrinology* 8 (11), 1450–1454.
- Youngson, A.F., Simpson, T.H., 1984.** Changes in serum thyroxine levels during smolting in captive and wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology* 24, 29–39.
- Zohar, Y., Abraham, M., Gordin, H., 1978.** The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphrodite teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 18 (4), 877– 882.
- Zohar, Y., Billard, R., Weil, C., 1984.** La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexuel et contrôle de la gamétogenèse

et de la ponte. In: L'Aquaculture du Bar et des Sparidés. G. Barnabe, R. Billard, (eds).  
INRA Publications, Paris, pp. 3–24.

**Zohar**, Y., Harel, M., Hassin, S., Tandler, A., 1995. Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). In:  
Broodstock management and egg and larval quality, N.R. Bromage and R.J. Roberts  
(eds), Chapter 5, Blackwell Science Ltd, London, pp. 94–117.