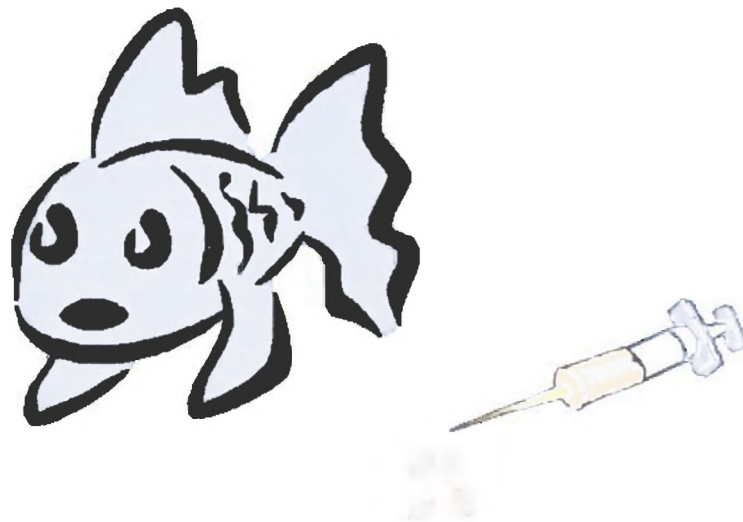


ΤΕΙ ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
Σ.Τ.Ε.Γ.
ΤΜΗΜΑ: ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**FISH,
STRESS,
AND BLOOD**



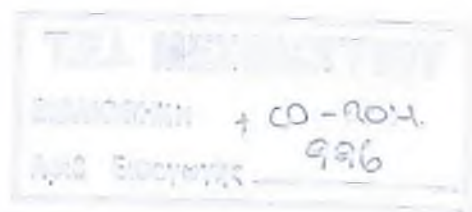
«Μεταβολές των αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L.) μετά την επίδραση δύο επιπέδων νιτρικών»

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ:

Βεκτέση Δέσποινα

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Σωτηροπούλου Άννα



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	σελ 3
Abstract.....	σελ 4
Πρόλογος.....	σελ 5
Εισαγωγή	
1.1 Σημασία των υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα.....	σελ 6
1.2 Συστηματική κατάταξη και στοιχεία βιολογίας λαβρακιού.....	σελ 8
Βιβλιογραφική ανασκόπηση	
2.1 Το κυκλοφορικό σύστημα του ψαριού.....	σελ 10
2.2 Το αίμα	
2.2i Κύριες λειτουργίες του αίματος	σελ 13
2.2ii Συστατικά του αίματος των ψαριών.....	σελ 14
2.3 Βιοχημικοί παράμετροι του ορού.....	σελ 24
2.4 Ένταση – stress.....	σελ 27
2.5 Βιολογική δράση των νιτρικών.....	σελ 28
Υλικά και μέθοδοι	
3.1 Συσκευές- όργανα- αντιδραστήρια.....	σελ 29
3.2 Πείραμα τεχνητής πρόκλησης stress.....	σελ 31
3.3 Μέθοδοι ανάλυσης αιματολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών παραμέτρων.....	σελ 33
3.4 Στατιστική επεξεργασία.....	σελ 37
Αποτελέσματα και συζήτηση.....	σελ 38
Συμπεράσματα.....	σελ 57
Βιβλιογραφικές αναφορές	σελ 58

Ευχαριστίες

Η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας στηρίχθηκε στην βοήθεια προσώπων τα οποία νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω.

Οφείλω θερμές ευχαριστίες στην καθηγήτριά Α. Σωτηροπούλου που υπήρξε η υπεύθυνη για την επίβλεψη της πτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Δρ Γ. Κοτζαμάνη ερευνητή του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ.) για την οργάνωση και εκτέλεση των πειραματισμών που έγιναν στις εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ στον Αγ. Κοσμά, Αθήνα.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την στήριξη που μου έδειξαν κατά την διάρκεια εκτέλεσης αυτής της πτυχιακής.

Αθήνα 10/11/2006

Βεκτέση Δέσποινα

Abstract

Rearing fish successfully depends on a number of factors, including the maintenance of good water quality. On this project we want to examine if nitrate effects on haematology and biochemical factors in serum of sea bass, *Dicentrarchus labrax*.

We experiment in two levels of nitrate, 100 ppm and 700 ppm.

We leave the fishes in nitrate for 3 days. These days the fishes have not been fed.

We calculate the haematology, more specific the Hct, Hb, RBC, WBC, MCV, MCH, MCHC, leucocytes, thrombocytes, granulocytes, monocytes and the biochemical GLU, LDH, TP, TRI, UREA, K, Na, Cl, Mg, P, Ca, Fe, CK. We can see that the levels of thrombocytes, GLU, LDH, TP, TRI, UREA, P, CK were increased and the levels of WBC, K, Na, Cl, Mg, Ca, Fe, were decreased. The levels of Hct, Hb and RBC have not been changed.

We can conclude that fishes are being stressed by nitrate.

Πρόλογος

Η επιτυχημένη εκτροφή ψαριών εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων συμπεριλαμβανομένων της ποιότητας και ποσότητας της παρεχόμενης τροφής καθώς και την διατήρηση της καλής ποιότητας του νερού εκτροφής. Υποβαθμισμένη ποιότητα νερού μπορεί να μειώσει την παραγωγή, την ανάπτυξη και να επιδράσει αρνητικά στο ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών. Στις εντατικές και υπερεντατικές καλλιέργειες καθώς και στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς το νερό εκτροφής λόγω της ιχθυοφόρτισης και συχνότερης τροφοδοσίας επιβαρύνεται καθημερινά με αμμωνία η οποία μέσω του βιολογικού φίλτρου μετατρέπεται σε μη τοξικά νιτρικά ιόντα.

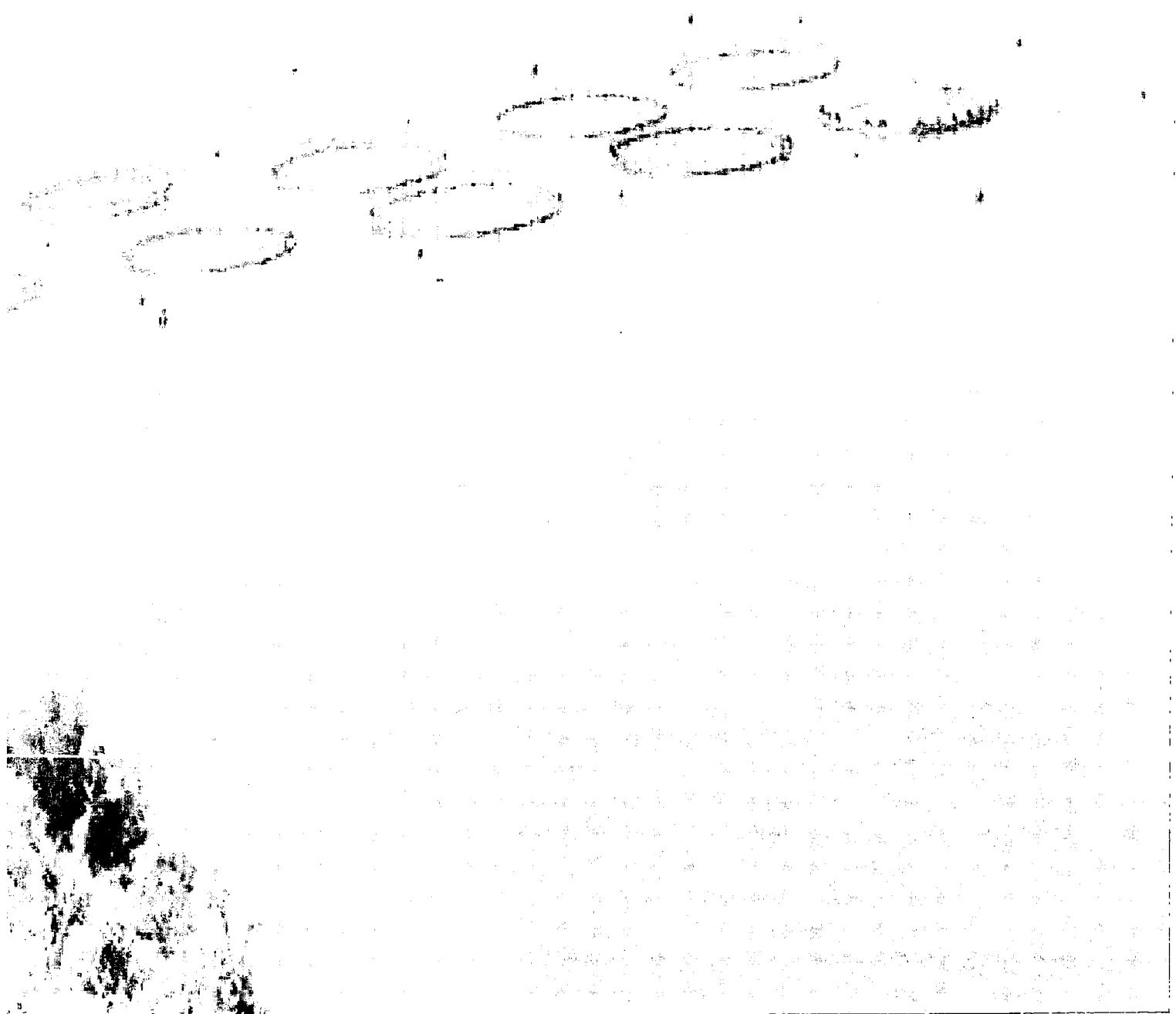
Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να διερευνήσουμε την επίδραση των νιτρικών ιόντων (NO_3^-) σε δυο διαφορετικές τιμές 100 ppm και 700 ppm στις αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους του ορού στο λαβράκι.

Οι αιματολογικές παράμετροι που εξετάστηκαν είναι: ο αιματοκρίτης (Hct), η αιμοσφαιρίνη (Hb), ο αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC), αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV), διαχωρισμός λευκοκυττάρων.

Οι βιοχημικές παράμετροι του ορού είναι: η γλυκόζη (GLU), η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), ολικές πρωτεΐνες (TP), τριγλυκερίδια (TRI), ουρία (UREA), κάλιο (K), νάτριο-χλώριο (Na-Cl), μαγνήσιο (Mg), φώσφορος (P), ασβέστιο (Ca), σίδηρος (Fe), κρεατινική κινάση (CK).

Απώτερος στόχος της παρούσης εργασίας είναι ο καθορισμός ασφαλούς εύρους τιμών νιτρικών ιόντων στο νερό εκτροφής στις υδατοκαλλιέργειες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.1 Σημασία των υδατοκαλλιέργειών στην Ελλάδα

Όταν λέμε υδατοκαλλιέργειες εννοούμε την εκτροφή ή την καλλιέργεια υδρόβιων ζωικών οργανισμών σε ελεγχόμενες συνθήκες αναπαραγωγής και ανάπτυξης.

Οι υδατοκαλλιέργειες είναι μία παραγωγική δραστηριότητα, η οποία συμβάλλει στην οικονομική ανάπτυξη των παράκτιων κυρίως περιοχών, με την προώθηση στην εθνική και διεθνή αγορά των προϊόντων της, αλλά και στον κοινωνικό τομέα με την δημιουργία νέων θέσεων εργασίας. Ο αναπτυξιακός σχεδιασμός του τομέα των υδατοκαλλιέργειών προϋποθέτει την αρμονική συνύπαρξη των διαφόρων χρήσεων της παράκτιας ζώνης διασφαλίζοντας παράλληλα την προστασία του περιβάλλοντος (Αργυρού Ν. Ι., Παπαϊωάννου Ε., Καργιώτη Ε. 2005) και μείωση των επιπτώσεων στο περιβάλλον (Μυλωνόπουλος Δ. 2002).

Σήμερα στη χώρα μας οι υδατοκαλλιέργειες αποτελούν “οικονομική βιομηχανία αιχμής” που καταλαμβάνει ήδη την πρώτη θέση στην Ευρώπη και στην Μεσόγειο από άποψη παραγωγής θαλασσινών ειδών ψαριών κυρίως τσιπούρας και λαβρακιού. Η ετήσια παραγωγή υπερβαίνει τους 90.000 τόνους ενώ συμβάλλει κατά 26% στη συνολική αξία των εξαγόμενων τροφίμων στη χώρα μας. (ΣΕΘ, 2003)

Η επιτυχημένη παρουσία του τομέα σε διεθνές επίπεδο, οφείλεται στην αξιοποίηση των πλεονεκτημάτων του ελληνικού θαλάσσιου περιβάλλοντος, όπως η εκμετάλλευση των εσωτερικών ιχθυοτρόφων υδάτων, αλλά και στη διαρθρωτική πολιτική ενισχύσεων της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Στη χώρα μας λειτουργούν 220 μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας (ΣΕΘ, 2003). Οι δυνατότητες αλιευτικής αξιοποίησης των εκτάσεων αυτών είναι μεγάλες με τη βασική προϋπόθεση όμως ότι θα γίνουν σημαντικά βελτιωτικά έργα και ότι θα ληφθεί μέριμνα για την προστασία των οικοσυστημάτων.

Επισημαίνεται ότι για την Ελλάδα ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας έχει συμβάλει ουσιαστικά στη μείωση του αλιευτικού ελλείμματος και στην προσφορά υγιεινών προϊόντων υψηλής θρεπτικής αξίας και άριστης ποιότητας που ικανοποιούν τις σύγχρονες απαιτήσεις της διαιτητικής διατροφής.

Ακόμα έχει δημιουργήσει ένα κοινωνικοοικονομικό οικοδόμημα, το οποίο απασχολεί άμεσα 35.000 άτομα και έμμεσα 50.000 περίπου. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι οι υδατοκαλλιέργειες αναπτύσσονται σε περιοχές που έχει παρατηρηθεί πληθυσμιακή συρρίκνωση και δεν υπάρχει επενδυτικό ενδιαφέρον για άλλες οικονομικές δραστηριότητες (Μυλωνόπουλος Δ. 2002).

Οι υδατοκαλλιέργειες εξελίχθηκαν με ταχύ ρυθμό τόσο από άποψη του όγκου της παραγωγής, όσο από την άποψη του αριθμού των παραγόμενων ειδών. Η εξέλιξη αφορά κυρίως την αύξηση της παραγωγής και όχι τόσο στα νέα παραγόμενα είδη. Και αυτό γιατί είναι διαπιστωμένο ότι για να λάβει ένα είδος κυρίαρχη θέση στον κατάλογο των καλλιεργούμενων ειδών, πρέπει να δοκιμασθεί, για μεγάλο χρονικό διάστημα, τόσο σε επίπεδο τεχνογνωσίας όσο και σε εμπορικό.

Η υδατοκαλλιέργεια στην Ευρωπαϊκή Ένωση στηρίζεται κυρίως σε 4 είδη (πέστροφα, σολομό, μύδια και στρείδια). Όσον αφορά την ελληνική υδατοκαλλιέργεια αυτή παρουσίασε σημαντικούς ρυθμούς ανάπτυξης ιδίως με συγκεκριμένα είδη, την τσιπούρα και το λαβράκι ενώ τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται ραγδαίως η εκτροφή της συναγρίδας, του φαγκριού, του σαργού, του μυτακιού και της γλώσσας. Στην καλλιέργεια των άλλων ειδών (χέλια, πέστροφες, νέα θαλασσινά είδη, μύδια) η χώρα μας αντιμετωπίζει έντονα προβλήματα τεχνικής και οργανωτικής φύσης (Μυλωνόπουλος Δ. 2002).

Τέλος είναι σημαντικό οι υδατοκαλλιέργειες να στηρίζονται στην εφαρμογή της έρευνας και είναι επιβεβλημένο να βελτιωθούν οι διαδικασίες για την γνωστοποίηση και την διάδοση των αποτελεσμάτων των ερευνητικών προγραμμάτων, προκειμένου να εξασφαλίζεται η καλύτερη εφαρμογή τους.

1.2 Συστηματική κατάταξη και στοιχεία βιολογίας λαβρακιού *Dicentrarchus labrax*.

ΦΥΛΟ	Chordata (χορδωτά)
ΥΠΟΦΥΛΟ	Vertebrata (σπονδυλόζωα)
ΥΠΕΡΟΜΟΤΑΞΙΑ	Gnathostomata (γναθόστομα)
ΟΜΟΤΑΞΙΑ	Osteichthyes (οστειχθύες)
ΥΦΟΜΟΤΑΞΙΑ	Acanthopterygii (ακανθοπτερύγιοι)
ΥΠΕΡΤΑΞΗ	Teleostei (τελεόστεοι)
ΤΑΞΗ	Perciformes (περκόμορφοι)
ΥΠΟΤΑΞΗ	Percoidae (περκοειδείς)
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Moronidae
ΓΕΝΟΣ	<i>Dicentrarchus</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Dicentrarchus labrax</i>

Αγγλικά :Sea bass

Γαλλικά :Bar commun

Ιταλικά :Spigola, Branzino

Ισπανικά :Lubina

Γερμανικά :Seebarsch



Εικόνα 1 : Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*).

Το λαβράκι παρουσιάζει αρκετά ευρεία εξάπλωση. Εκτείνεται στον Ατλαντικό ωκεανό, από τις ακτές του Μαρόκου μέχρι τη Βαλτική θάλασσα (Χώτος Γ. –Ρογδάκης Ι. 1992). Συναντάται σε κάθε περιοχή της Μεσογείου και των γύρω θαλασσών και προτιμά ανοικτές θάλασσες, κόλπους, λιμνοθάλασσες, δέλτα ποταμών ή ακόμα και λιμάνια. Είναι ψάρι που ζει γενικά σε βραχώδεις, αμμώδεις ή με φύκη καλυμμένους βυθούς. Συναντάται όμως και σε περιοχές με υψηλή θολερότητα όπου συνδέεται με την εποχή της έντονης τροφοληψίας του. Μπορεί να επιβιώσει σε ένα ευρύ πεδίο θερμοκρασίας από 2 °C έως 35 °C και αλατότητας από 3-39‰. Είναι σαρκοφάγο και αδηφάγο ψάρι που αρπάζει κάθε κινούμενο οργανισμό γι' αυτό στη Γαλλία ονομάζεται "Le Loup" δηλαδή "λύκος". Τρέφεται βασικά με μικρά ψάρια, γαρίδες και μαλάκια. Την άνοιξη προσεγγίζουν τις ακτές και εισέρχονται στις εκβολές ποταμών ή λιμνοθαλασσών ενώ κατά τα μέσα του φθινοπώρου τις εγκαταλείπουν και επιστρέφουν στην ανοικτή θάλασσα. Η αναπαραγωγική του περίοδο στη Μεσόγειο ξεκινά από το Δεκέμβριο, κορυφώνεται τον Ιανουάριο και τελειώνει τον Μάρτιο σε θερμοκρασία 12-13 °C και αλατότητα 20-30‰. Το λαβράκι είναι είδος γονοχωριστικό όπου τα αρσενικά ωριμάζουν σε ηλικία 2 ετών ενώ τα θηλυκά στο 3 έτος.

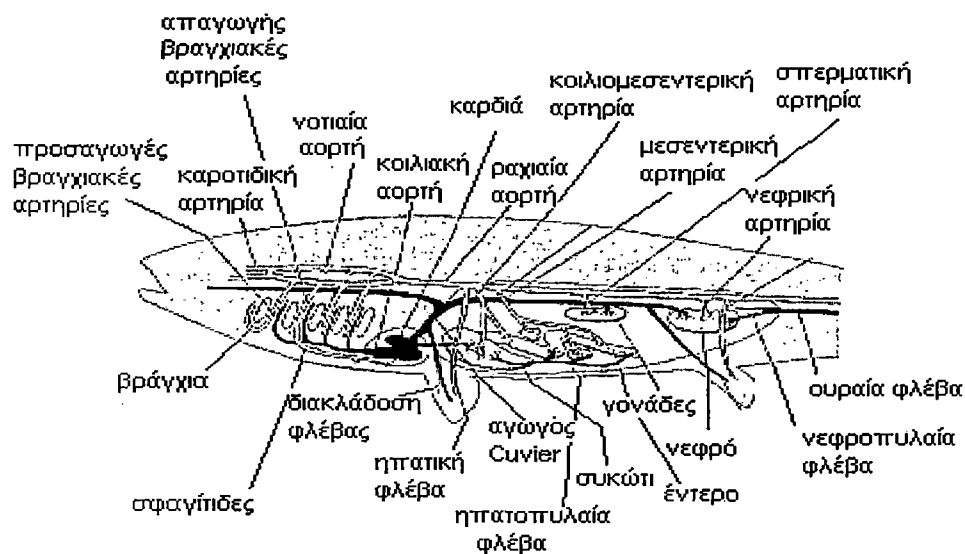
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1 Το κυκλοφορικό σύστημα του ψαριού

Το κυκλοφορικό σύστημα των τελεόστεων είναι απλό και πλήρες, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2, το αίμα κυκλοφορεί μέσα σε ένα κλειστό σύστημα αγγείων, ωθούμενο από την καρδιά προς τα βράγχια και τα διάφορα μέρη του σώματος, όπου επιστρέφει και πάλι στην καρδιά.

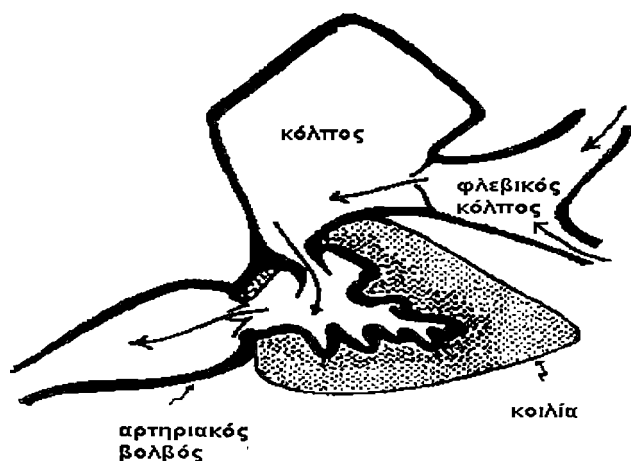
Η καρδιά στα περισσότερα ψάρια βρίσκεται στο πρόσθιο μέρος της κοιλιάς κάτω από τις βραγχιακές αψίδες και περιβάλλεται από σάκο. Ο όγκος της καρδιάς διαφέρει στα ελεύθερα και στα εκτρεφόμενα ψάρια όπου τα πρώτα έχουν υπερτροφική και τα δεύτερα υποτροφική καρδιά καθώς επίσης και ο αριθμός των καρδιακών παλμών ποικίλλει ανάλογα με τη θερμοκρασία και το είδος. Η καρδιά χωρίζεται σε δύο διαμερίσματα τον κόλπο και την κοιλία (εικόνα 3), που συγκοινωνούν μεταξύ τους με το κολποκοιλιακό στόμιο, το οποίο φέρει βαλβίδες και επιτρέπει την κίνηση του αίματος από τον κόλπο στην κοιλία κατά τη συστολή του κόλπου (όχι όμως και αντίστροφα).



Εικόνα 2: Κυκλοφορικό σύστημα τελεόστεου

Κατά τη συστολή της κοιλιάς το αίμα εισέρχεται στον αρτηριακό κώνο ή βολβό, ο οποίος το οδηγεί στα βράγχια. Από τον αρτηριακό κώνο συνεχίζει ο αρτηριακός βραγχιακός κορμός ή κοιλιακή αορτή, όπου από το ύψος των βραγχιακών αψίδων αναχωρούν σε κάθε πλευρά 4 προσαγωγές βραγχιακές αρτηρίες, όπου διακλαδίζονται στα πρωτογενή και δευτερογενή βραγχιακά ελάσματα. Εκεί το αίμα αποβάλλει το CO_2 και εμπλουτίζεται με O_2 από το νερό που περιβρέχει τις βραγχιακές αψίδες.

Από τα τριχοειδή αγγεία των βραγχίων σχηματίζονται 4 ζεύγη απαγωγών βραγχιακών αρτηριών (επιβραγχιακές αρτηρίες) που έχουν πια αρτηριακό αίμα πλούσιο σε O₂. Αυτές ενωμένες πίσω από το κεφάλι σχηματίζουν την νωτιαία αορτή. Οι δύο πρόσθιες επιβραγχιακές αρτηρίες αναστομώνονται και σχηματίζουν τον κεφαλικό κύκλο, απ' όπου αναχωρούν οι δύο πρόσθιες και οι δύο οπίσθιες καρωτίδες, που διανέμουν το αίμα στην κεφαλική μοίρα. Η νωτιαία αορτή διακλαδίζεται σε πολλές αρτηρίες που οι κυριότερες απ' αυτές είναι η κοιλιομεσεντερική (που διανέμει το αίμα στο στομάχι, το ήπαρ και το έντερο) και η μεσεντερική. Η νωτιαία αορτή στο πίσω μέρος του σώματος εισχωρεί στην κοιλότητα που σχηματίζουν οι αιματοποφύσεις των τελευταίων σπονδύλων και παίρνει το όνομα «ουραία αρτηρία». Όλες αυτές οι αρτηριακές διακλαδώσεις απολήγουν σε τριχοειδή με αποτέλεσμα να αιματώνονται όλοι οι ιστοί κανονικά.



Εικόνα 3: Καρδιά τελεόστεου

Από τα τριχοειδή σχηματίζονται οι φλέβες οι οποίες ακολουθούν την ίδια σχεδόν διαδρομή με τις αρτηρίες και επαναφέρουν το αίμα στην καρδιά. Οι φλέβες που αναχωρούν από το πρόσθιο τμήμα του σώματος και μαζεύουν το αίμα του κεφαλιού, σχηματίζουν τις δύο κύριες πρόσθιες φλέβες (σφαγίτιδες), ενώ εκείνες που αναχωρούν από το οπίσθιο τμήμα του σώματος και μαζεύουν το αίμα από τον κορμό, τα γεννητικά όργανα και τους νεφρούς, σχηματίζουν τις δύο κύριες οπίσθιες φλέβες (ή οπίσθιες κοίλες φλέβες). Η κύρια πρόσθια και η κύρια οπίσθια φλέβα κάθε πλευράς ενώνονται στο ύψος της καρδιάς και σχηματίζουν τον αγωγό Cuvier. Οι δύο αγωγοί Cuvier εκβάλλουν χωριστά στον κόλπο της καρδιάς. Στους αγωγούς του Cuvier εκβάλλει επίσης η ηπατική φλέβα.

Εκτός από το φλεβικό αυτό σύστημα, υπάρχουν και άλλα δύο φλεβικά συστήματα. Το ένα είναι το νεφροπυλαίο φλεβικό σύστημα όπου η ούραία φλέβα προτού εισέλθει στην οπίσθια κοίλη φλέβα, δίνει ένα κλάδο προς το νεφρό, ο οποίος διακλαδίζεται μέσα σε αυτόν σε τριχοειδή. Από τα τριχοειδή σχηματίζεται η νεφροπύλαια φλέβα, που εκβάλλει στην σύστοιχη οπίσθια κοίλη φλέβα. Το άλλο ονομάζεται ηπατοπυλαίο φλεβικό σύστημα και σχηματίζεται από τις εντερικές φλέβες που ενώνονται και σχηματίζουν την ηπατοπυλαία φλέβα που διακλαδίζεται στο ήπαρ. Από τα τριχοειδή της σχηματίζεται η ηπατική φλέβα που εκβάλλει στον αγωγό Cuvier (Καββαδίας Σπ. 1994).

2.2 ΤΟ ΑΙΜΑ

2.2 i) Κύριες λειτουργίες του αίματος.

Ο κύριος ρόλος των υγρών που κυκλοφορούν στο σώμα είναι να παρέχουν γρήγορη και μαζική μεταφορά θρεπτικών ουσιών και αερίων σε αποστάσεις όπου η διάχυση είναι ανεπαρκής ή αργή. Η κυκλοφορία είναι επομένως σημαντική σε όλα σχεδόν τα ζώα μεγέθους μεγαλύτερου από μερικά χιλιοστά και αναγκαία για όλα τα μεγάλα ζώα τα οποία και έχουν μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα. Η μεταφορά των αερίων, O_2 και CO_2 είναι επίσης μια σημαντική παράμετρος της κυκλοφορίας του αίματος.

Παρακάτω αναγράφονται οι πιο σημαντικές λειτουργίες που είναι η εξής.

- Μεταφορά θρεπτικών συστατικών από τον πεπτικό σωλήνα στους ιστούς και από (και προς) τα όργανα αποθήκευσης (π.χ. λιπώδης ιστός, ήπαρ).
- Μεταφορά μεταβολιτών (π.χ. γαλακτικό οξύ από τους μυς στο ήπαρ).
- Μεταφορά των απεκκριτικών προϊόντων από τους ιστούς στα απεκκριτικά όργανα ή από τα όργανα σύνθεσης (π.χ. ουρία στο ήπαρ) στους νεφρούς.
- Μεταφορά των αερίων (O_2 και CO_2) μεταξύ αναπνευστικών οργάνων και ιστών.
- Μεταφορά ορμονών π.χ. αδρεναλίνη (γρήγορη απόκριση) ή αυξητική ορμόνη (αργή απόκριση).
- Μεταφορά κυττάρων μη αναπνευστικής λειτουργίας (π.χ. λευκοκύτταρα σπονδυλόζωων) και έμμορφων στοιχείων του αίματος.
- Μεταφορά θερμότητας από τα βαθύτερα όργανα στην επιφάνεια για εκπομπή.
- Συντήρηση του «εσωτερικού μέσου» κατάλληλου για κύτταρα (pH, ιόντα, μεταβολίτες). (Καπαρελιώτης Απ. 1997)

2.2 ii) Συστατικά του αίματος των ψαριών.

Αίμα είναι ο ιστός που αποτελείται από κύτταρα που κυκλοφορούν σε ένα υγρό μέσο, το πλάσμα, ή στην περίπτωση ορισμένων σπονδυλόζων στην αιμολέμφο. Ο ρόλος του αίματος είναι η μεταφορά του O₂, τροφικών προϊόντων, απεκκρίσεων μέσα στο σώμα σε διαφορετικά όργανα και ιστούς. Συνήθως περιέχει αναπνευστικές χρωστικές. Το αίμα κυκλοφορεί με μυϊκές συσπάσεις αγγείων ή εξειδικευμένων οργάνων (καρδιά) (*Basic techniques in fish haematology*).

Το αίμα του ψαριού πήζει σε 20-30" ενώ το αίμα του ανθρώπου σε 7-8' (*Κουφός Σ. - Βορεινάκης Φ. 1994*)

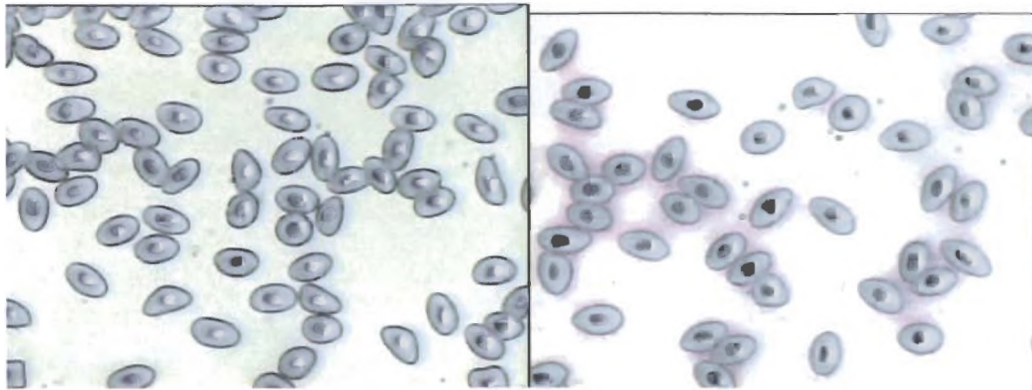
Πλάσμα: Το πλάσμα αποτελείται από 90% νερό και 10% διαλυμένες οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Οι οργανικές ουσίες συμπεριλαμβάνουν τις πρωτεΐνες, όπως σφαιρίνες, αλβουμίνες, ινωδογόνο και αντισώματα (*Basic techniques in fish haematology*). Το πλάσμα περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων νατρίου και χλωρίου που παραμένουν σε σταθερή αναλογία με τα ιόντα καλίου, ασβεστίου και μαγνησίου. Όταν αυτή η ιοντική ισορροπία διαταραχθεί μπαίνει άμεσα σε κίνδυνο η ζωή του οργανισμού (*Καββαδίας Σπ. 1994*).

Ορός: Είναι υγρό κιτρινωπού χρώματος, το οποίο απομένει μετά την πήξη του αίματος. Η σύνθεση είναι η ίδια με του πλάσματος, μόνο που ο ορός δεν περιέχει ινωδογόνο (*Basic techniques in fish haematology*).

Κύτταρα: Τα αιμοκύτταρα διακρίνονται σε 2 κύριες κατηγορίες: ερυθροκύτταρα (ερυθρά αιμοσφαίρια) και λευκοκύτταρα (λευκά αιμοσφαίρια)

Ερυθροκύτταρα : Ο όρος ερυθροκύτταρο αναφέρεται στα εμπύρνα αιμοκύτταρα (εικόνα 3) τα οποία φέρουν την κόκκινη χρωσμένη πρωτεΐνη, αιμοσφαιρίνη. Τα ερυθροκύτταρα διαφέρουν από τα λευκοκύτταρα και η πρωταρχική λειτουργία τους είναι η μεταφορά αερίων σε ολόκληρο το σώμα (*Basic techniques in fish haematology*). Η αύξηση του αριθμού τους σε συνδυασμό με τη μείωση του μεγέθους τους αποτελεί τον καλύτερο εφοδιασμό του οργανισμού με οξυγόνο (*Κουφός Σ. - Βορεινάκης Φ. 1994*)

Τα ερυθροκύτταρα είναι τα κυρίαρχα αιμοκύτταρα στα ψάρια. Υπάρχει σημαντική διαφορά στον αριθμό τους από είδος σε είδος. Μπορεί επίσης να υπάρχει διαφορά μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, εξαρτώμενη άμεσα από την κατάσταση της υγείας του ψαριού. Για παράδειγμα στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) ο αριθμός των ερυθροκυττάρων ποικίλει από 0,77 έως $1,58 \cdot 10^6$ κυττ/mm³.



Εικόνα 4: Ερυθροκύτταρα λαβρακιού (χρώση May-Grunwald και Giemsa)

Το ποσοστό ερυθροκυττάρων στο σύνολο των αιμοκυττάρων είναι:

Λαβράκι 96,5%

Σαργός 96,5%

Σάλπα 98% (*Basic techniques in fish haematology*).

Δομή: Τα ερυθροκύτταρα των ψαριών είναι επιμήκη, ελλειπτικά κύτταρα, με ωοειδή, κεντρικό πυρήνα. Τα ανώριμα ερυθροκύτταρα ονομάζονται πολυχρωματοκύτταρα.

Φυσιολογικά στο αίμα των ψαριών παρατηρούμε μόνο ερυθροκύτταρα και οξεόφιλους ερυθροβλάστες στα τελευταία στάδια ωρίμανσής τους. Σε παθολογικές καταστάσεις μπορεί κανείς να συναντήσει στάδια εκφυλισμού ή γήρανσης των ερυθροκυττάρων (κύτταρα τα οποία διογκώνονται, έχουν υπερτροφικό πυρήνα και χάνουν το περιεχόμενό τους) (*Καββαδίας Σπ. 1994*).

Προέλευση: Τα ερυθροκύτταρα σχηματίζονται από πρόδρομα κύτταρα, τους ερυθροβλάστες από το περιφερειακό αίμα. Οι ερυθροβλάστες υπόκεινται σε διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις περιέχουν μεγάλες ποσότητες αιμοσφαιρίνης, σχηματίζοντας τελικά πλήρως διαφοροποιημένα ερυθροκύτταρα (*Basic techniques in fish haematology*).

Στα πιο εξελιγμένα τελεόστεα, τους οστειχθείς, οι νεφροί είναι το όργανο όπου πραγματοποιείται η ερυθροποίηση, ενώ στα πιο πρωτόγονα ψάρια, τα άγναθα και τους χονδριχθείς, το αίμα αποτελεί το κέντρο σύνθεσης των ερυθροκυττάρων.

ΛΕΥΚΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ

Λευκά αιμοσφαίρια : Ο όρος λευκοκύτταρα αναφέρεται στα μη χρωσμένα εμπύρρηνα αιμοσφαίρια των οποίων κύρια λειτουργία είναι η καταπολέμηση των μολύνσεων και σε μικρές περιπτώσεις η φαγοκύτωση και η πέψη των θραυσμάτων. Διαφέρουν από τα ερυθροκύτταρα στο ότι εγκαταλείπουν το αγγειακό σύστημα για να πραγματοποιήσουν τις λειτουργίες τους περνώντας μέσα από τα τοιχώματα των μικρών αγγείων του αίματος.

Τα λευκά αιμοσφαίρια διακρίνονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: τα λεμφοκύτταρα, τα θρομβοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα, κάθε μία με τα δικά της ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και γι' αυτό είναι δύσκολο να παρέχει κανείς μια λεπτομερή περιγραφή των λευκοκυττάρων χωρίς να κάνει αναφορά σε κάθε τύπο κυττάρου ξεχωριστά.

Στα ψάρια, ο συνολικός αριθμός λευκοκυττάρων ποικίλει σε αριθμό, για παράδειγμα, η φυσιολογική κλίμακα των λευκοκυττάρων, του κυρίαρχου τύπου λευκοκυττάρων, στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) είναι μεταξύ 7,8 και $20,9 \times 10^3$ κυττ/mm³.

Τα λευκά αιμοσφαίρια αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των συνολικών αιμοκυττάρων:

Λαβράκι 3,5%

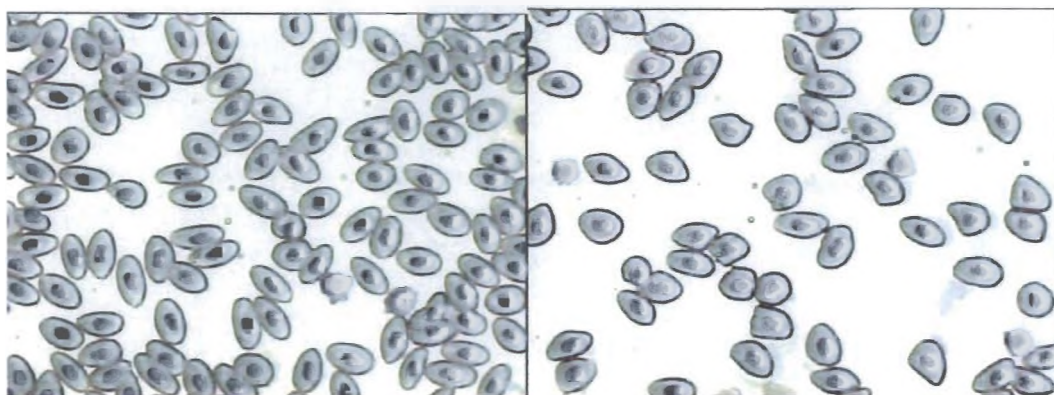
Σαργός 3,5%

Σάλπα 2% (*Basic techniques in fish haematology*).

Στα ανώτερα σπονδυλωτά όπως τα θηλαστικά, η δημιουργία των λευκών αιμοσφαιρίων περιορίζεται στο νωτιαίο μυελό, τον σπλήνα και τους λεμφαδένες.

Στα ψάρια, όργανα όπως οι νεφροί, ο σπλήνας και ο θύμος αδένας συμμετέχουν στην διαδικασία της αιμοποίησης.

Λεμφοκύτταρα: Η αναλογία των λευκοκυττάρων που είναι λεμφοκύτταρα σε μερικά είδη ψαριών μπορεί να είναι μέχρι και 85%. Τα λεμφοκύτταρα αποτελούν το 89 - 98% των λευκοκυττάρων στο νεαρό άτομο της πέστροφας. Ωστόσο, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί επακριβώς ο αριθμός των λεμφοκυττάρων στο αίμα των ψαριών καθώς συχνά είναι δύσκολο να διακριθούν από τα θρομβοκύτταρα.



Εικόνα 5: Λεμφοκύτταρα λαβρακιού (χρώση May-Grunwald και Giemsa).

Αναλογία λεμφοκυττάρων ως προς : i) τα λευκοκύτταρα και ii) όλα τα αιμοκύτταρα

Λαβράκι	i) 90% w.b.c.	ii) 3,15% a.b.
Σαργός	i) 70%	ii) 2,45%
Σάλπα	i) 88%	ii) 1,76%

(*Basic techniques in fish haematology*).

Δομή: Τα λεμφοκύτταρα είναι σφαιρικά κύτταρα όπου μερικές φορές παρατηρούνται μεγαλύτερα ανώριμα λεμφοκύτταρα (*Basic techniques in fish haematology*).

Τα λεμφοκύτταρα διακρίνονται σε μικρά με διάμετρο 6-8 μm και σε μεγάλα με διάμετρο 9-12 μm. Τα μεγάλα διαφέρουν από τα μικρά στο μέγεθος, διαθέτουν περισσότερο κυτταρόπλασμα, περιέχουν γενικά περισσότερα οργανίδια και επομένως είναι πιο ογκώδη από τα δεύτερα (Κουφός Σ. - Βορεινάκης Φ. 1994)

Υπάρχουν τρεις τύποι κυττάρων που χαρακτηρίζουν τη σειρά αυτή: λεμφοβλάστες, λεμφοκύτταρα και πλασμοκύτταρα.

Οι λεμφοβλάστες είναι στρογγυλά κύτταρα ή ελαφρώς ωοειδή, διαμέτρου 7-11 μm όπου ο πυρήνας υπάρχει η χρωματίνη και ένας ή δυο πυρηνίσκοι.

Τα λεμφοκύτταρα σχηματίζονται από τους λεμφοπλάστες με ελάττωση του μεγέθους και συμπύκνωση της χρωματίνης. Είναι κύτταρα ακανόνιστα εξαιτίας των πολυάριθμων ψευδοποδίων. Το κυτταρόπλασμα είναι βασεόφιλο και στερείται

κοκκίων. Ο πυρήνας με συμπυκνωμένη χρωματίνη, καλύπτει σχεδόν όλο το κυτταρικό όγκο. Υπάρχουν δύο τύποι λεμφοκυττάρων με μέγεθος 4-7 μm και 7-10 μm αντίστοιχα.

Τα πλασμοκύτταρα είναι κύτταρα ωοειδή διαμέτρου 10-12 μm. Ο πυρήνας είναι σχεδόν σφαιρικός, διαμέτρου 7 μm και μετατοπισμένος προς την περιφέρεια του κυττάρου (Καβαδιάς Σπ. 1994).

Λειτουργία: Υπάρχουν μερικές ενδείξεις ότι τα λεμφοκύτταρα στα ψάρια διαφοροποιούνται σε δύο τουλάχιστον λειτουργικούς υποπληθυσμούς με λειτουργίες παρόμοιες με εκείνες των Β και Τ –λεμφοκυττάρων στα θηλαστικά. Η λειτουργία των λεμφοκυττάρων είναι να διαμεσολαβούν στη χημική και ανοσοβιολογική απόκριση:

Η επαφή τους με ξένο υλικό (αντιγόνο) προκαλεί πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, τα οποία τότε εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων ανοσοσφαιρών (*Basic techniques in fish haematology*).

Προέλευση: Τα θυμοκύτταρα τα οποία προέρχονται από το θύμο αδένα διαφοροποιούνται σε Τ-λεμφοκύτταρα. Μεγάλοι αριθμοί μικρών λεμφοκυττάρων βρίσκονται επίσης στα νεφρά και στο σπλήνα και πιστεύεται ότι τα λεμφοκύτταρα που κυκλοφορούν είναι δύο τύπων: τα Τ-λεμφοκύτταρα προέλευσης από το θύμο αδένα, και Β-λεμφοκύτταρα τα οποία πιστεύεται ότι προέρχονται από τους νεφρούς (*Basic techniques in fish haematology*).

Θρομβοκύτταρα : Στα θηλαστικά τα θρομβοκύτταρα είναι οι πρόδρομοι των κυττάρων που καλούνται αιμοπετάλια, τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα και είναι υπεύθυνα για την θρόμβωση. Τα θρομβοκύτταρα των θηλαστικών σπάνια βρίσκονται στην κυκλοφορία. Στα ψάρια ωστόσο, σε αντίθεση με τα θηλαστικά τα θρομβοκύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα.

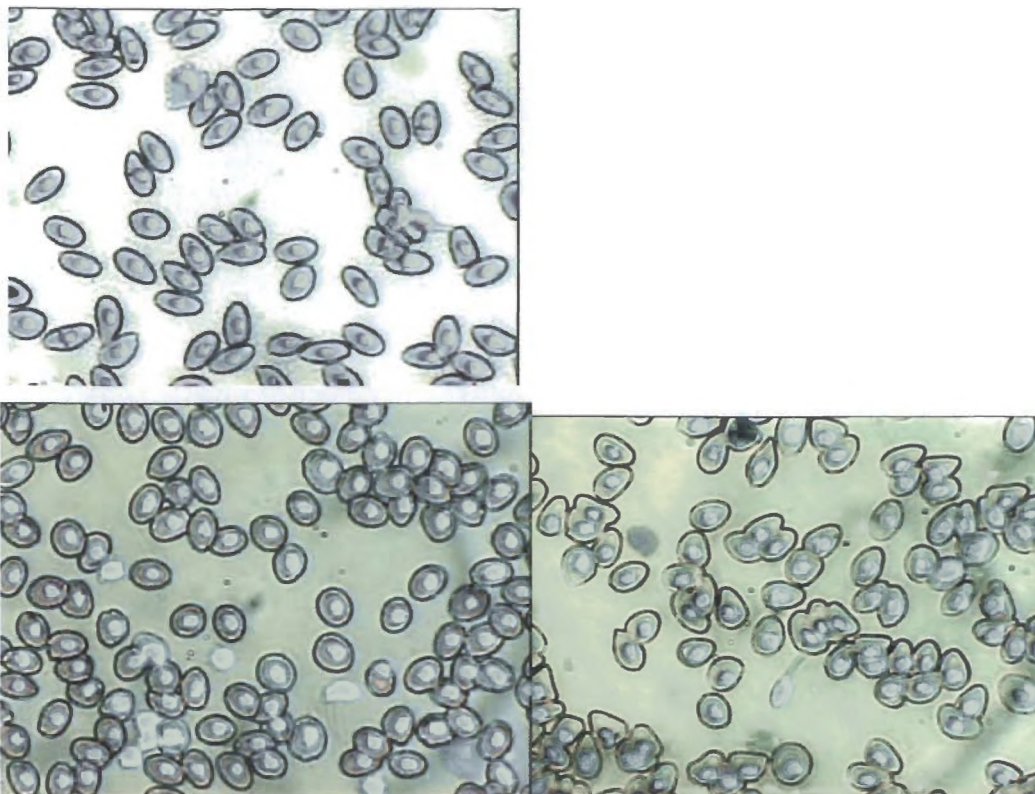
Υπάρχει διαφωνία σχετικά με τους αριθμούς των θρομβοκυττάρων που βρίσκονται στο περιφερειακό αίμα των ψαριών, η οποία προκύπτει από την ευκολία με την οποία μπορούν να θεωρηθούν εσφαλμένα λεμφοκύτταρα.

Στα νεαρά άτομα της ιριδίζουσας πέστροφας τα θρομβοκύτταρα αντιστοιχούν στο 1-6% των συνολικών λευκοκυττάρων.

Η αναλογία των λεμφοκυττάρων ως προς τα θρομβοκύτταρα στην ιριδίζουσα πέστροφα έχει βρεθεί πως είναι 25:1, ωστόσο για το ίδιο είδος έχει μετρηθεί μια αναλογία 2:1.

Αντιστρόφως, στη γλώσσα (*Pleuronectes platessa*) έχει καταγραφεί μια αναλογία λεμφοκυττάρων προς θρομβοκύτταρα 1:3.

Για το ποσοστό των λευκοκυττάρων που αποτελούν από θρομβοκύτταρα στον κυπρίνο, έχει μετρηθεί μια τιμή 70% από κάποιους ερευνητές, ενώ άλλοι έχουν δώσει μια τιμή μόνο 3-13% (*Basic techniques in fish haematology*).



Εικόνα 6: Θρομβοκύτταρα λαβρακιού (χρώση May-Grunwald και Giemsa).

Δομή: Υπάρχουν τέσσερις μορφολογικοί τύποι θρομβοκυττάρων που συνήθως ταξινομούνται ως : ωσειδή, ατρακτοειδή, αιχμηρά και διαμερισματοποιημένα. Τα ωσειδή ή ατρακτοειδή κύτταρα θεωρούνται φυσιολογικές μορφές των θρομβοκυττάρων *in vivo*, και είναι αυτές που συγχέονται εύκολα με τα λεμφοκύτταρα καθώς μοιάζουν πολύ. Τα θρομβοκύτταρα μερικές φορές επίσης εμφανίζονται στα παρασκευάσματα αιχμηρά ή τεμαχισμένα (*Basic techniques in fish haematology*).

Στο λαβράκι δυο τύποι είναι δυνατό να παρατηρηθούν: το νεαρό και το ώριμο θρομβοκύτταρο. Το νεαρό είναι κύτταρο στρογγυλεμένο διαμέτρου 5-9 μm. Το ώριμο μπορεί να είναι στρογγυλεμένο, ωσειδές ή επιμηκυσμένο μεγέθους 6-8 μm (*Καβαδαδίας Σπ. 1994*).

Λειτουργία: Τα θρομβοκύτταρα παίρνουν μέρος στην πήξη του αίματος. Η συμμετοχή τους στην διαδικασία της πήξης έχει παρατηρηθεί *in vitro*. Στα θρομβοκύτταρα έχει παρατηρηθεί φαγοκύτωση, αλλά δεν πιστεύεται ότι είναι

γνήσια, καθώς τα τεμάχια δεν εγκολπώνονται πλήρως από το κύτταρο (*Basic techniques in fish haematology*).

Προέλευση: Η προέλευση των θρομβοκυττάρων παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστη. Μερικοί θεωρούν ότι προέρχονται από τα ίδια κύτταρα με τα λεμφοκύτταρα, και άλλοι ότι στην πραγματικότητα προέρχονται από μικρά λεμφοκύτταρα. Ωστόσο τα θρομβοκύτταρα παρατηρούνται σε μεγάλους αριθμούς στο σπλήνα υποδηλώνοντας ότι η κύρια πηγή αυτών των κυττάρων είναι ο ιστός του σπλήνα (*Basic techniques in fish haematology*).

Μονοκύτταρα: Στα ψάρια το αίμα περιλαμβάνει διαφορετικό αριθμό μονοκυττάρων, αλλά γενικά βρίσκονται σε χαμηλά ποσοστά.

Για παράδειγμα στη γλώσσα αντιστοιχούν μόνο στο 0,1% του συνολικού αριθμού των λευκοκυττάρων. Στο γατόψαρο όμως είναι περισσότερα, αντιστοιχώντας στο 1-8% των λευκοκυττάρων.

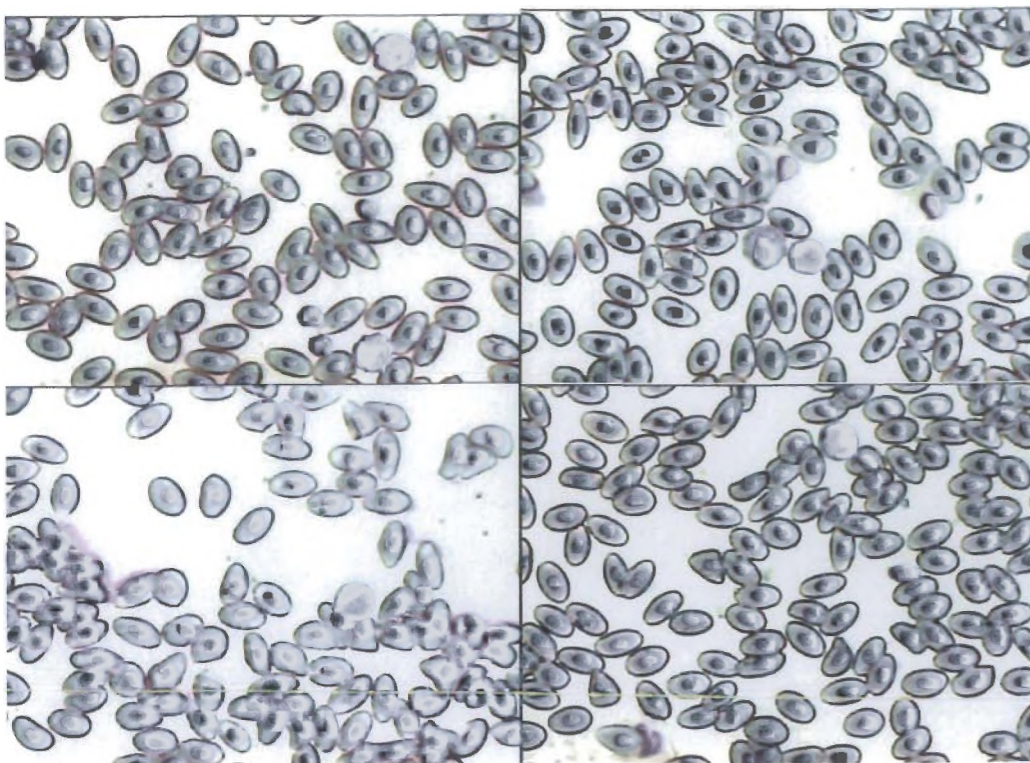
Ποσοστό μονοκυττάρων ως προς: i) τα λευκοκύτταρα και ii) όλα τα αιμοκύτταρα

Λαβράκι i) 2% _{w.b.c.} ii) 0,07% _{a.b.}

Σαργός i) 2% ii) 0,07%

Σάλπα i) 0% ii) 0%

(*Basic techniques in fish haematology*).



Εικόνα 7: Μονοκύτταρα λαβρακιού (χρώση May-Grunwald και Giemsa).

Δομή: Τα μονοκύτταρα είναι μεγάλα κύτταρα με μεγάλο πυρήνα, ο οποίος καταλαμβάνει το $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{2}$ του κυττάρου. Στο κυτταρόπλασμα τους βρίσκονται μικρά διασκορπισμένα κοκκία (*Basic techniques in fish haematology*).

Έχουν σχήμα ωοειδές διαμέτρου 9-25 μm (Κουφός Σ. - Βορεινάκης Φ. 1994)

Το μέγεθός του ποικίλει από 12 έως 15 μm . Το κυτταρικό περίβλημα είναι ακανόνιστο λιγότερο ή περισσότερο στρογγυλεμένο. Ο πυρήνας είναι κοίλος, σφαιρικός ή επιμηκυσμένος, μετατοπισμένος στην περιφέρεια. Το κυτταρόπλασμα είναι ελαφρώς γκρι-μπλε και παρουσιάζει κοκκινωπά κοκκία (Καββαδίας Σπ. 1994).

Λειτουργία: Τα μονοκύτταρα είναι οι πρόδρομοι των μακροφάγων. Η λειτουργία των μονοκυττάρων είναι η απόκριση σε μόλυνση. Γι' αυτό τα μονοκύτταρα όπως και τα κοκκιοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη μη ειδική ανοσία και στη φλεγμονώδη αντίδραση. Ωστόσο τα μονοκύτταρα διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα φαγοκύτωσης σε σχέση με τα κοκκιοκύτταρα (*Basic techniques in fish haematology*).

Προέλευση: Τα μονοκύτταρα βρίσκονται επίσης σε μεγάλους αριθμούς στους νεφρούς υποδηλώνοντας ότι προέρχονται από τα βλαστοκύτταρα του συγκεκριμένου οργάνου (*Basic techniques in fish haematology*).

Κοκκιοκύτταρα Τα κοκκιοκύτταρα μπορεί να αντιστοιχούν σε ποσοστό 4-60% των λευκοκυττάρων των ψαριών και υπάρχει σημαντική διαφορά στον αριθμό των κοκκιοκυττάρων που βρίσκονται σε διαφορετικά είδη ψαριών.

Τα κοκκιοκύτταρα πιστεύεται ότι αποτελούν το 1-9% του συνόλου των λευκοκυττάρων στα νεαρά άτομα της ιριδιζουσας πέστροφας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι διαφορετικοί ερευνητές έχουν καταγράψει διαφορετικές τιμές για τα ίδια είδη.

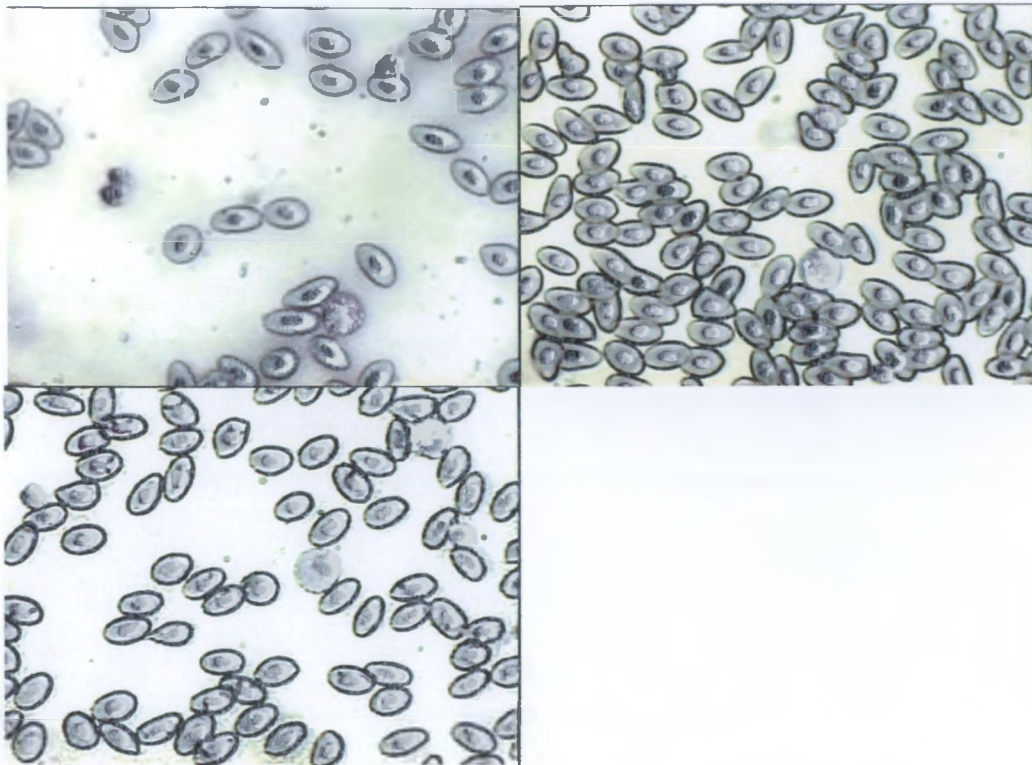
Ποσοστό κοκκιοκυττάρων ως προς: i) τα λευκοκύτταρα ii) όλα τα αιμοκύτταρα

Λαβράκι i) 8% w.b.c. ii) 0,28% a.b.

Σαργός i) 28% ii) 0,98%

Σάλπα i) 12% ii) 0,24%

(*Basic techniques in fish haematology*).



Εικόνα 8 : Κοκκιοκύτταρα λαβρακιού χρώση (May-Grunwald και Giemsa).

Δομή: Αυτά τα κύτταρα έχουν μια χαρακτηριστική δομή και μερικές φορές αναφέρονται ως πολυμορφοπύρνα λευκά αιμοσφαίρια. Το κυτταρόπλασμα περιέχει πολυάριθμα λεπτά κοκκία. Τα κοκκιοκύτταρα κατανέμονται σε διαφορετικούς υπόπληθυσμούς ανάλογα με τα χαρακτηριστικά χρώσης των κοκκίων με ιστολογικές χρωστικές σε παρασκευάσματα επιχρίσματος (π.χ. χρωστικές Romanowsky) (*Basic techniques in fish haematology*).

Στα ψάρια, τα κοκκιοκύτταρα είναι τριών τύπων: τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα.

Ουδετερόφιλα: Λευκοκύτταρα που δεν έχουν συγγένεια προς τις όξινες ή βασικές χρωστικές, είναι όμως δυνατόν να χρωσθούν με ουδέτερες χρωστικές. Αποτελούν τον πιο συνήθη τύπο λευκοκυττάρων. Έχουν τη δυνατότητα να κινούνται εκτός του αίματος μέσα στους ιστούς, και να επιτίθενται στα βακτήρια που εισέρχονται στον οργανισμό (*Basic techniques in fish haematology*).

Τα ουδετερόφιλα είναι κύτταρα στρογγυλά διαμέτρου 10 μm. Ο πυρήνας είναι μετατοπισμένος προς τον ένα πόλο του κυττάρου με την χρωματίνη σε σχήμα αμπούλας. Το κυτταρόπλασμα είναι σιελ ανοιχτό και μερικές φορές γκριζωπό ενώ τα κοκκία είναι άχρωμα (Καββαδίας Σπ. 1994).

Ηωσινόφιλα: ειδική κατηγορία λευκοκυττάρων (κοκκιοκυττάρων), τα οποία χρωματίζονται από όξινες χρωστικές, όπως η ηωσίνη. Αυτά τα κύτταρα συμμετέχουν

στην καταστροφή εσωτερικών παρασίτων και στη εκδήλωση αλλεργικών φλεγμονωδών αντιδράσεων (*Basic techniques in fish haematology*).

Κύτταρα στρογγυλά ή ωσειδή διαμέτρου 9-10 μm . Ο πυρήνας μακριά από το κέντρο, περιέχει πυκνή χρωματίνη, μερικές φορές σε σχήμα ταινίας με πολλούς ή λίγους λοβούς. Το κυτταρόπλασμα είναι ανοικτό γκρίζο και παρουσιάζει κοκκινωπά κοκκία (*Καββαδίας Σπ. 1994*).

Βασεόφιλα: χρωματίζονται από αλκαλικές χρωστικές και κανονικά ο αριθμός τους είναι πολύ μικρός στο αίμα (*Basic techniques in fish haematology*).

Πρόκειται για στρογγυλά κύτταρα διαμέτρου 8-10 μm με κυτταρόπλασμα γεμάτο από βασεόφιλα κοκκία σχεδόν μαύρο. Ο πυρήνας βρίσκεται στον ένα πόλο του κυττάρου (*Καββαδίας Σπ. 1994*).

Λειτουργία: Τα κοκκιόκύτταρα συμμετέχουν στους μη ειδικούς μηχανισμούς άμυνας, δηλ ενεργοποιούνται με την παρουσία ξένου υλικού στον οργανισμό, αλλά δεν αναγνωρίζουν ειδικά αντιγόνα. Αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν σε τμήματα του σώματος όπου υπάρχει εισβολή και καταστρέφουν τα αντιγόνα με φαγοκύτωση ή με άμεση θανάτωση που είναι γνωστή ως κυτταροτοξική αντίδραση. Αυτή η διαδικασία ορίζεται ως φλεγμονώδης αντίδραση (*Basic techniques in fish haematology*).

Προέλευση: Τα κοκκιόκύτταρα προέρχονται από εμβρυϊκά κύτταρα που ονομάζονται κοκκιοβλάστες στους αιμοποιητικούς ιστούς των νεφρών (*Basic techniques in fish haematology*).

2.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΟΡΟΥ

Σίδηρος (Fe)

Ο σίδηρος είναι το κυριότερο συστατικό της αιμοσφαιρίνης. Χωρίς τον σίδηρο δεν είναι δυνατόν να γίνει φυσιολογικά η μεταφορά του οξυγόνου στα κύτταρα. Σε κατάσταση καλής υγείας έχουμε αποθέματα σιδήρου στον οργανισμό μας σε όργανα όπως το συκώτι, ο σπλήνας κτλ.

Ασβέστιο (Ca)

Το ασβέστιο βρίσκεται σε μικρές ποσότητες στα περισσότερα κύτταρα, αλλά το 90% του ασβεστίου του οργανισμού μας βρίσκεται στα οστά και στα δόντια.

Το ασβέστιο είναι ακόμα απαραίτητο:

Για την καλή λειτουργία του νευρικού και μυϊκού μας συστήματος

Τη φυσιολογική πήξη του αίματος

Την καλή ορμονική λειτουργία του οργανισμού μας

Την καλή λειτουργία της πέψης

Φώσφορος (P)

Ο φώσφορος, όπως και το ασβέστιο, είναι βασικό δομικό στοιχείο των οστών, αλλά βρίσκεται επίσης σε μικρές ποσότητες και στα περισσότερα κύτταρα. Το 80% του φωσφόρου στον οργανισμό μας βρίσκεται ενωμένο με το ασβέστιο στα οστά.

Ο φώσφορος παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών στον οργανισμό μας (www.geocities.com).

Μαγνήσιο (Mg)

Η μεγαλύτερη ποσότητα του μαγνησίου στον οργανισμό μας βρίσκεται στα οστά μαζί με το ασβέστιο και το φώσφορο.

Το μαγνήσιο από την άλλη πλευρά, ενεργοποιεί επίσης διάφορα ένζυμα στον οργανισμό μας που είναι απαραίτητα για την παραγωγή ενέργειας (www.geocities.com).

Νάτριο-Χλώριο (Na-Cl)

Το νάτριο είναι απαραίτητο για την καλή λειτουργία του νευρικού και μυϊκού συστήματος.

Κάλιο (K)

Το κάλιο βρίσκεται στα ενδοκυτταρικά υγρά.

Όπως και για το νάτριο, η έλλειψη καλίου μπορεί να εμφανιστεί στον άνθρωπο μόνο όταν έχουμε απώλεια υγρών (www.geocities.com).

Ουρία (UREA)

Η ουρία είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών. Συντίθεται στο ήπαρ και από εκεί περνάει στο αίμα και απεκκρίνεται από τους νεφρούς. Τα επίπεδα ουρίας στο αίμα είναι κατά κύριο λόγο ένδειξη της νεφρικής λειτουργίας, επειδή τα περισσότερα νεφρικά νοσήματα επηρεάζουν την απέκκρισή της.

Υψηλές τιμές παρατηρούνται σε:

νεφρικά νοσήματα

αφυδάτωση

Τριγλυκερίδια (TRI)

Τα τριγλυκερίδια αποτελούν μορφή λιπιδίων που χρησιμεύει για την μεταφορά των λιπαρών οξέων στο αίμα. Τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή και την αποθήκευση ενέργειας.

Τα τριγλυκερίδια συναντώνται στο αίμα για 2-3 ώρες μετά από τη λήψη ενός λιπαρού γεύματος. Τις υπόλοιπες ώρες συναντώνται με τη μορφή των πολύ χαμηλής έως χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών που παράγονται από το ήπαρ και τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου. Όταν οι τιμές των τριγλυκεριδίων είναι αυξημένες, ακόμα κι αν υπάρχουν χαμηλές τιμές LDL και υψηλές HDL, συνιστούν κίνδυνο για την ανάπτυξη αθηροσκληρώσεως.

Υψηλές τιμές τριγλυκεριδίων συναντώνται στην κίρρωση του ήπατος, το νεφρωτικό σύνδρομο, την παγκρεατίτιδα, την οικογενή υπερλιποπρωτεϊναιμία, τη διατροφή με πολλούς υδατάνθρακες και λίγες πρωτεΐνες.

Χαμηλές τιμές συναντώνται στον υποσιτισμό, τη δίαιτα που είναι χαμηλή σε λιπαρά και σε προβλήματα απορρόφησης των λιπών.

Λιπαρά που λαμβάνονται από τις τροφές και παράγονται στο σώμα από την υπερβολική λήψη τροφής. Ο οργανισμός αποθηκεύει το λίπος υπό μορφή τριγλυκεριδίων

Ολικές πρωτεΐνες (TP)

Οι πρωτεΐνες βρίσκονται στα διάφορα όργανα του σώματος, τους μύες, και το δέρμα. Επίσης αποτελούν δομικό συστατικό των ορμονών και των ενζύμων. Με την διάσπαση των αμινοξέων παράγεται ουρία

Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών στο αίμα, είναι ένας καλός δείκτης της λειτουργίας του ήπατος. Η μείωση της αλβουμίνης και των ολικών πρωτεϊνών στο αίμα, μπορεί να έχουν σχέση με βλάβη ή λειτουργική ανεπάρκεια του ήπατος αλλά και με άλλες παθήσεις.

Γαλακτική αφυδρογονάση (LDH)

Πρόκειται για ένζυμο που υπάρχει στο ήπαρ αλλά και σε πολλούς ιστούς και όργανα. Η αύξηση του στο αίμα μπορεί να σχετίζεται με ηπατική βλάβη (www.iatronet.gr).

Γλυκόζη (GLU)

Η γλυκόζη αποτελεί το κύριο προϊόν του μεταβολισμού των πιο σύνθετων υδατανθράκων. Η γλυκόζη οξειδώνεται στα κύτταρα για να δώσει ενέργεια, αποθηκεύεται στο ήπαρ και στον μυϊκό ιστό με μορφή γλυκογόνου. Η γλυκόζη είναι το μόνο θρεπτικό συστατικό που χρησιμοποιείται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες από τα εγκεφαλικά κύτταρα και το κεντρικό νευρικό σύστημα.

Όταν το σάκχαρο του αίματος παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα σε χαμηλά επίπεδα μπορεί να εκδηλωθούν επιληπτικές κρίσεις και απώλεια συνείδησης. Αντιθέτως μακροχρόνια υπεργλυκαιμία έχει σαν αποτέλεσμα την εκδήλωση επιπλοκών από τους νεφρούς, τα νεύρα η τα μεγάλα αγγεία.

Κρεατινική κινάση (CK)

Η κρεατινική κινάση (CK) είναι ένα διμερές ένζυμο. Η συνολική ενεργότητα που μετράται στον ορό, συνίσταται από τις ενεργότητες των κυτταροπλασματικών διμερών ισοενζύμων CK-MM (τύπος των μυών), CK-BB (τύπος του εγκεφάλου) και CK-MB (τύπος του μυοκαρδίου), καθώς και των τροποποιημένων μετά τη σύνθεση μορφών τους, και από τις ενεργότητες των μακρο-κρεατινικών κινασών (macro-CK).

2.4 Ένταση- Stress

Κάθε φορά που μεταβάλλονται ουσιαστικά οι εξωτερικές συνθήκες, ο οργανισμός υφίσταται μια πρόκληση, μία «επίθεση» και αντιδρά, αμυνόμενος. Ένταση-stress είναι η αύξηση των απαιτήσεων του οργανισμού, το «ζόρισμά» του. Στις αυξημένες απαιτήσεις ο οργανισμός αποκρίνεται με το «σύνδρομο προσαρμογής», που είναι η κινητοποίηση των προσαρμοστικών του μηχανισμών.

Στο φυσικό περιβάλλον η ένταση προκαλείται από συνδυασμό εξωτερικών παραγόντων όπως θερμοκρασία και ο φωτισμός.

Οι παράγοντες έντασης μπορεί να είναι εξωγενείς ή ενδογενείς και κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες, με τα ακόλουθα αποτελέσματα:

περιοριστικοί (π.χ. ανοξία, πείνα, ψύχος). Προκαλούν αναστολή του μεταβολικού τάχους χωρίς να διακόπτουν τελείως τις βιοχημικές αντιδράσεις.

ανασταλτικοί (π.χ. δηλητήρια, ναρκωτικά, κατάψυξη, οινόπνευμα, φορμόλη). Προκαλούν παράλυση του μεταβολικού τάχους.

επιβαρυντικοί (π.χ. υπερθέρμανση, υπεραλμυρότητα, υπερκινητικότητα). Προκαλούν υπεραύξηση του μεταβολικού τάχους.

Οι ακραίες (οριακές) συνθήκες επιβαρύνουν τόσο πολύ τις φυσιολογικές λειτουργίες ώστε τελικά να καταρρέουν. Η διακοπή γίνεται στο πλέον ασθενές σημείο της αλυσίδας και στην πλέον ευαίσθητη λειτουργία (*Κατταρελιώτης Απ. 1997*).

2.5 Βιολογική δράση των νιτρικών

Η αμμωνία είναι το κύριο αζωτούχο προϊόν που αποβάλλεται από τα ψάρια καθώς σχηματίζεται και από την διάσπαση της καταναλωμένης τροφής. Η μετατροπή της αμμωνίας με την βακτηριδιακή οξειδωση σε νιτρικά NO_3^- ονομάζεται νιτροποίηση. Τα βακτήρια *Nitrosomonas* spp μεταβάλλουν τη NH_3 σε νιτρώδη NO_2^- που ενεργοποιείται από τα βακτήρια του είδους *Nitrobacter* για να σχηματιστούν τα NO_3^- . Τα νιτρικά απορροφώνται από τα φυτά και μεταβάλλονται αναερόβια σε υποοξείδιο του αζώτου ή μεταβάλλονται από κανονικές αλλαγές του νερού. Η αμμωνία και τα νιτρώδη είναι τοξικά για τα ψάρια σε διαφορετικές όμως συγκεντρώσεις. Η τοξικότητα της αμμωνίας πιστεύεται ότι συμβαίνει λόγω οσμορυθμιστικής ανισορροπίας δημιουργώντας νεφρική ανεπάρκεια και βλάβη στο επιθήλιο των βραγχίων των ψαριών που προκαλεί ασφυξία, μείωση της αποβαλλόμενης ενδογενούς αμμωνίας και γενικά· νευρολογική και κυττολογική ανεπάρκεια. Αυξημένα επίπεδα νιτρώδων δημιουργούν μεθαιμοσφαιριναιμία (νόσος του καφέ αίματος). Τα νιτρικά γενικά θεωρούνται μη τοξικά στα ψάρια. Στα περισσότερα συστήματα υδατοκαλλιεργειών τα επίπεδα των νιτρικών είναι περίπου 50 mg/lit, αλλά σε εντατικά συστήματα καλλιεργειών, τα επίπεδα νιτρικών συχνά υπερβαίνουν τα 100 mg/lit. Τα επίπεδα νιτρικών, σε ανακυκλώσιμα συστήματα που έχουν περιορίσει την εισαγωγή φρέσκου νερού, μπορεί να είναι 200 mg/lit ή περισσότερο (*Hrubec T.C, Smith S. A, Robertson J. L, 2002*).



ΥΛΙΚΑ

ΚΑΙ

ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Συσκευές – όργανα - αντιδραστήρια

Συσκευές

- Βιοχημικός αναλυτής Kuadro Automatic Analyzer, BPC Biosed.
- Ηλεκτρολύτης Biolyte 2000, electrolyte analyzer.
- Φωτόμετρο TECAN, Genios pro
- Φυγόκεντροs erpendorf, centrifuge 5810 R.
- Φυγόκεντροs Mikro 12-24, Hettich zentrifugen.
- Οξυγονόμετρο GLI international, model 63
- Μικροσκόπιο Olympus Vanox-T, optical co LTD, AH-2
- pH μετρο HANNA instruments
- Νιτρικά HACH, DR/890 colorimeter.
- Ζυγός 2 δεκαδικών ψηφίων.
- Αναλυτικός ζυγός 5 δεκαδικών ψηφίων
- Vortex
- θερμόμετρο

Όργανα

- Σύριγγες των 2 ml, 23 G*1"
- Ependorf των 2 ml, 1.5 ml, 0.5 ml
- Microhaematocrit tubes Na- heparinized 80iu/ml
- Slides microscope
- Καλυπτρίδα
- Πλαστελίνη Hirschmann EM
- Μετρητής κυττάρων
- Πιπέτες των 20 µl, 100µl, 1 ml, 5 ml, tips
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer improved, bright-line
- Στατό
- Δοκιμαστικοί σωλήνες γυάλινοι
- Πλαστικά μπουκαλάκια των 500 ml
- Γυάλινα μπουκαλάκια των 20 ml

Αντιδραστήρια

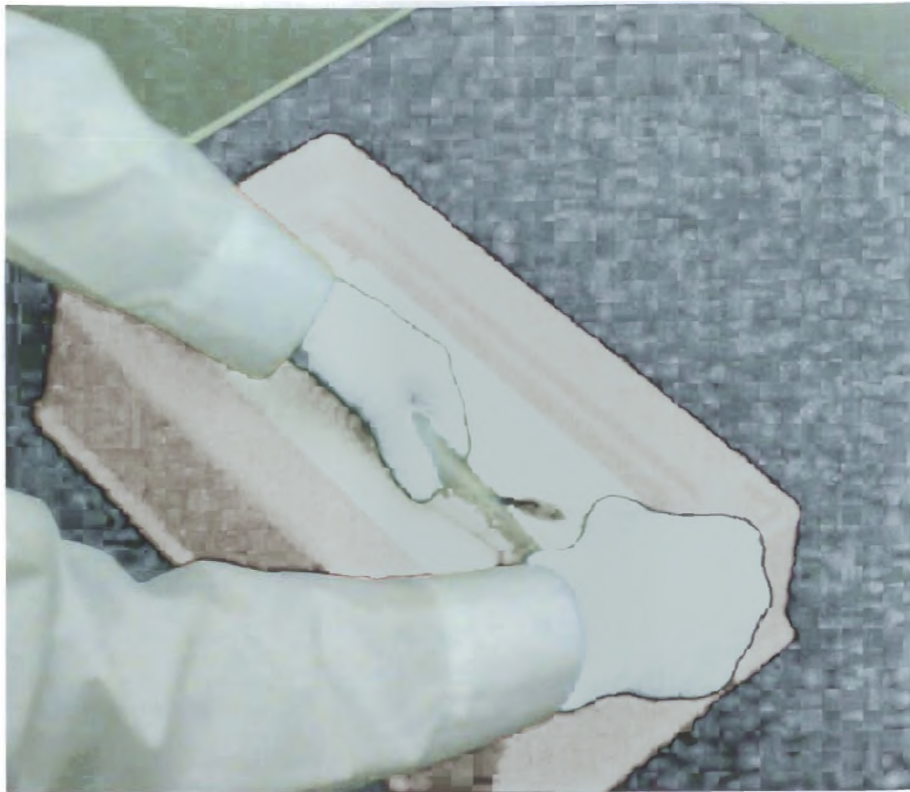
- αναισθητικό (2-phenoxyethanol + ethanol 1:1)
- ηπαρίνη λιθίου (111.73 mg/ml)
- Drabkin's solution (1 drabkin's reagent, 0.5ml Brij 35 30%, 1000ml d.H₂O)

- Dacie's fluid (5 ml formaldehyde 37%, 15,65 ml trisodium citrate, 0,5 ml Brilliant Cresyl blue 500 ml d.H₂O (φιλτράρισμα πριν την χρήση)
- Giemsa – Stammlosung, May – Grunwald - Losung
- Buffer Water (A. stock solution KH₂PO₄ 9,1 gr/lt, B. stock solution Na₂PO₄ 9,5 gr/lt, Γ. Phosphate buffer Sorensen's pH 6,8, (50,8ml απο το διαλ. Α) + (49,2ml απο το διάλ. Β), Δ. Buffer Water (50ml απο το διάλ. Γ) + 950ml d.H₂O
- Νιτρικό νάτριο (Sodium nitrate, Fluka)
- Nitrate reagent
- Test'n tubes, high range ammonia 0-50 mg/L N
- Για τις βιοχημικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της Thermo και Sentinel.
- Οι ηλεκτρολύτες έγιναν με αντιδραστήρια της Biolyte.

3.2 Πείραμα τεχνητής πρόκλησης stress και δειγματοληψία

Τα ψάρια ήταν εγκλιματισμένα για 2 μήνες περίπου σε δεξαμενές χωρητικότητας 80 lt και η ιχθυοχωρητικότητα ήταν 5 ψάρια βάρους 120-180 gr σε κάθε δεξαμενή. Στο πείραμα μας διερευνήσαμε την επίδραση των νιτρικών του νερού στα ψάρια. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικών. Μια δεξαμενή χρησίμευσε για control (να μετρήσουμε τις φυσιολογικές τιμές) και στις άλλες δύο προσθέσαμε νιτρικά ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση νιτρικών 150 ppm και 700 ppm αντίστοιχα. Ποσότητα νιτρικού νατρίου διαλύθηκε σε θαλασσινό νερό και προστέθηκε στις δεξαμενές αφού κλείσαμε την παροχή του νερού για να μην μειωθεί η ποσότητα των νιτρικών με την ανανέωση του νερού. Τα νιτρικά παρέμειναν 3 ημέρες στις δεξαμενές και αυτές τις ημέρες στα ψάρια δεν χορηγούσαμε τροφή. Η αιμοληψία έγινε στις 9:30 π.μ.

Επίσης μετρήσαμε το O₂ όπου κυμαινόταν από 16-20 ppm, τη θερμοκρασία ήταν 23,7-24,5 °C, το pH του νερού ήταν 7.3, την αμμωνία όπου η συγκέντρωση της έφτανε τα 1-2 ml/lit και τα νιτρικά στο νερό των δεξαμενών πριν και μετά την προσθήκη των νιτρικών. Μετά την παρέλευση των 3 ημερών εξαλιεύσαμε τα ψάρια για την αιμοληψία. Για το σκοπό αυτό αδειάσαμε το μισό νερό της δεξαμενής και προσθέσαμε λίγο αναισθητικό (2-phenoxyethanol + ethanol 1:1) (μέχρι να ζαλιστούν για να μην στρεσαριστούν) και τα πιάσαμε με μία απόχη. Στη συνέχεια τα βάλουμε σε ένα κουβά με θαλασσινό νερό και αναισθητικό, αναλογίας 0,5 ml ανά 1 lt θαλασσινού νερού, και περιμέναμε μέχρι να αναισθητοποιηθούν (1 λεπτό περίπου). Το αναισθητοποιημένο ψάρι ζυγίζεται γρήγορα. Η λήψη του αίματος γίνεται από το ουραίο αγγείο.



Εικόνα 9: Αιμοληψία από το ουραίο αγγείο

Με το ένα χέρι κρατάμε το ψάρι και με το άλλο εισάγουμε τη βελόνα με μία πλάγια κλίση στη διάμεση κοιλιακή γραμμή, πίσω από το εδρικό πτερύγιο. Ωθούμε τη βελόνα στο μυϊκό σύστημα μέχρι να φτάσει στη σπονδυλική στήλη και με μία πολύ

μικρή κίνηση τραβάμε τη βελόνα λίγο πίσω για να εισέλθει το αίμα στη σύριγγα. Αφού πάρουμε αίμα και βγάλουμε τη σύριγγα από το ψάρι, αφαιρούμε τη βελόνα από τη σύριγγα και με αργό τρόπο αδειάζουμε το αίμα σε 2 erendorf. Το ένα το αφήσαμε να καθίσει για να πάρουμε τον ορό και στο άλλο είχαμε βάλει 15μl ηπαρίνη λιθίου για 400μl αίματος τα οποία τα αναδεύσαμε καλά αναστρέφοντας μαλακά γύρο στις 10 επαναλήψεις και τα χρησιμοποιήσαμε για να τον αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνη, και καταμέτρηση ερυθρών και λευκών κυττάρων. Για να διατηρήσουμε το αίμα φρέσκο κατά τη διάρκεια των χειρισμών το φυλάσσουμε σε πάγο. Αμέσως μετά ξεκινάμε τις αναλύσεις του αίματος και πρώτα με τον αιματοκρίτη και ακολουθούν καταμέτρηση ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων, αιμοσφαιρίνη, διαχωρισμός λευκοκυττάρων και ολοκληρώσαμε με τις βιοχημικές εξετάσεις.

Τον παραπάνω πειραματισμό τον επαναλάβαμε τρεις συνεχόμενες φορές.

3.3 Μέθοδοι ανάλυσης αιματολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών παραμέτρων

Αιματοκρίτης

Ο όγκος των ερυθροκυττάρων (των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος), που παράγεται από τη φυγόκεντρη μιας συγκεκριμένης ποσότητας αίματος.

Παρεμβάλουμε ένα τριχοειδή σωλήνα στο δείγμα του αίματος και το αφήνουμε να γεμίσει κατά $\frac{3}{4}$ και σφραγίζουμε το ένα άκρο του σωλήνα με κατάλληλο υλικό στεγανοποίησης (πλαστελίνη). Φυγοκεντρούμε τον τριχοειδή σωλήνα για 5 λεπτά στις 10500 rpm σε μία μικροφυγόκεντρο αιματοκρίτη. Απομακρύνουμε το καπάκι από τη φυγόκεντρο και μετράμε τον όγκο του τριχοειδή σωλήνα που καταλαμβάνεται από τα κυτταρικά συστατικά τοποθετώντας πάνω ένα διαφανές πιάτο που δείχνει μετρήσεις.

Αιμοσφαιρίνη

Αιμοσφαιρίνη είναι το κεχρωσμένο μέρος των ερυθρών αιμοσφαιρίων που περιέχει σίδηρο. Η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς.

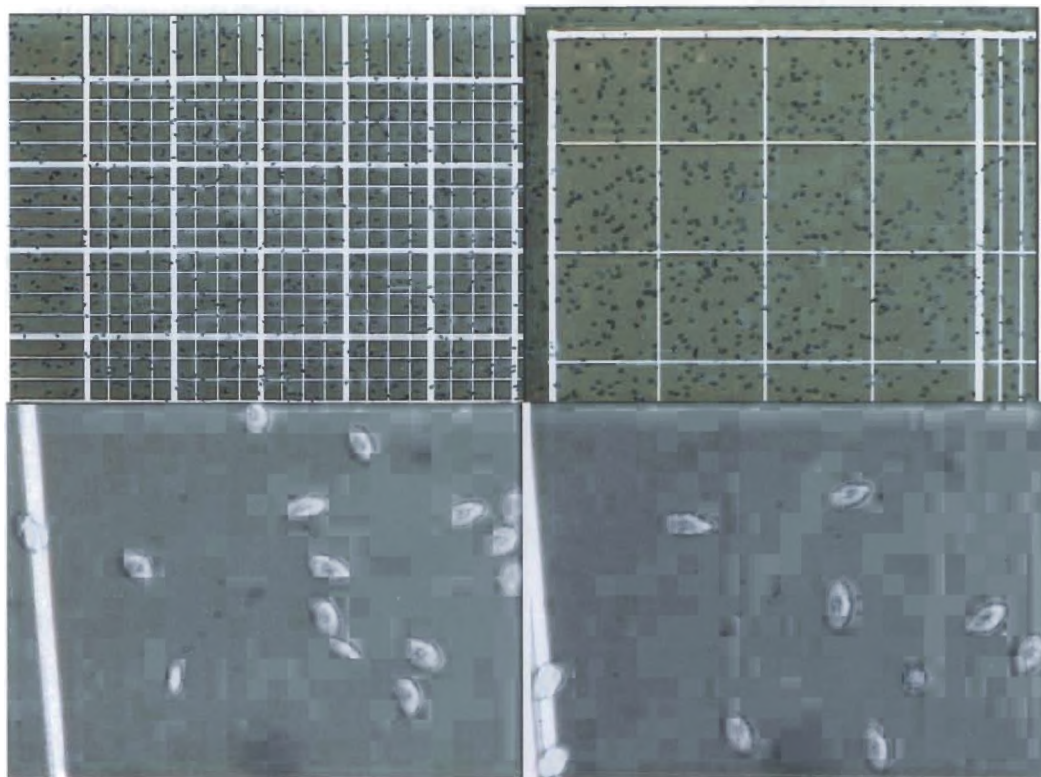
Η μέτρηση της αιμοσφαιρίνης έγινε ως εξής:

Αμέσως μετά την αιμοληψία Σε διάλυμα 5 ml Drabkin's προσθέσαμε 20 μl ολικό αίμα, το ανακινήσαμε καλά και το αφήσαμε σε σκοτεινό μέρος για 20 λεπτά. Μετά το μετρήσαμε την απορρόφηση στο φωτόμετρο στα 540 nm.

Μέτρηση ερυθρών και λευκών αιμοκυττάρων.

Για την μέτρηση των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων χρησιμοποιήσαμε το αντιδραστήριο Dacie's. Η αραιώση που κάναμε είναι αναλογίας 1:500 αίμα/ Dacie's (20μl αίμα σε 9980μl Dacie's).

Τα κύτταρα μετριοούνται σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (ο προσοφθάλμιος φακός στην μεγέθυνση 40 . Το αιμοκυτταρόμετρο έχει ένα κεντρικό πλακίδιο διαστάσεων 1*1 mm το οποίο υποδιαιρείται σε 16 μικρότερα πλακίδια διαστάσεων 0,25*0,25 mm και καθένα απ' αυτά υποδιαιρείται σε 25 μικρότερα πλακίδια διαστάσεων 0,05*0,05 mm. Το αιμοκυτταρόμετρο διαθέτει επίσης και 4 περιφερειακά πλακίδια διαστάσεων 1*1 mm που το καθένα υποδιαιρείται σε 16 μικρότερα πλακίδια χωρίς περαιτέρω υποδιαιρέσεις.



Εικόνα 10 : τετράγωνα καταμέτρησης ερυθρών και λευκών κυττάρων στο Neubauer με χρωστική Dacie's

Έτσι αφού αναμίξουμε πολύ καλά και ήπια 20μl αίμα σε 9980μl Dacie's σε ένα γυάλινο μπουκαλάκι παίρνουμε γρήγορα με μια πιπέτα μια μικρή ποσότητα του μείγματος και βάζουμε στο αιμοκυτταρόμετρο στο οποίο έχουμε τοποθετήσει μια καλυπτρίδα. Μετά από 2-3 λεπτά μετράμε στο μικροσκόπιο. (προσοχή! Το μείγμα να καλύπτει ομοιόμορφα την επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου και τα κύτταρα να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα στα τετραγωνάκια).

Τα ερυθρά αιμοσφαίρια τα μετρήσαμε σε 5 τετράγωνα των 0,25 mm του κεντρικού τετραγώνου. Ο τύπος είναι:

$$\begin{aligned} \text{Ερυθροκύτταρα} &= \frac{\eta \text{ (αρ. ερυθρών 5 τετρ.)} \times \text{(αραίωση)}}{0,1(\text{βύθισμα πλακιδίου}) \times 0,2(\text{εμβ. τετρ})} \\ &= \text{αριθμός ερυθροκυττάρων} \times 10^6 \end{aligned}$$

Τα λευκά αιμοσφαίρια τα μετρήσαμε στα 4 περιφερειακά τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου όπου χωρίζονται σε 16 μικρότερα διαστάσεων 0,25*0,25 mm. Ο τύπος είναι:

$$\begin{aligned} \text{Λευκοκύτταρα} &= \frac{\eta \text{ (αρ. λευκών 4 τετρ.)} \times \text{(αραίωση)}}{0,1(\text{βύθισμα πλακιδίου}) \times 4 \text{ (εμβ. τετρ)}} \\ &= \text{αριθμός λευκοκυττάρων} \times 10^4 \end{aligned}$$

Διαχωρισμός λευκοκυττάρων.

Αμέσως μετά την αιμοληψία τοποθετούμε μια μικρή σταγόνα αίματος στην άκρη μιας αντικειμενοφόρου πλάκας και με την βοήθεια μιας καλυπτρίδας όπου την κρατάμε με κλίση 40^ο περίπου, αφήνουμε τη σταγόνα αίματος να κυλήσει κατά μήκος της κοινής επιφάνειας των δυο αντικειμενοφόρων πλακών. Πιέζουμε σταθερά την καλυπτρίδα με το επίχρισμα και τραβάμε κατά μήκος της αντικειμενοφόρου πλάκας για να δημιουργηθεί μια λεπτή μεμβράνη αίματος και το αφήνω να στεγνώσει στον αέρα.

Βάζω την αντικειμενοφόρο σε ένα δοχείο με μεθανόλη 99,9% για 5-10 λεπτά. Το μεταφέρω σε άλλο δοχείο που περιέχει May-Grunwald το οποίο έχει διαλυθεί 1:1 με φρέσκο buffer H₂O. Το αφήνω για 15 λεπτά. Το μεταφέρω χωρίς να το ξεπλύνω σε άλλο δοχείο που περιέχει Giemsa που είναι αραιωμένο 1:9 με buffer H₂O pH 6,8. Το αφήνω 10-15 λεπτά να βαφτεί. Το μεταφέρω σε άλλο δοχείο που περιέχει buffer H₂O και αλλάζω το H₂O 3-4 φορές. (ξέπλυμα). Το αφήνω την τελευταία φορά στο buffer H₂O για 2-5 λεπτά. Στεγνώνουν και μετράμε.

Αιματολογικοί παράμετροι:

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hb (g/100 ml)} \times 10}{\text{RBC (x } 10^6/\text{mm}^3)} \quad \text{μέση αιμοσφαιρίνη ανά αιμοσφαίριο}$$

$$\text{MCV} = \frac{\text{Hct (\%)} \times 10}{\text{RBC (x } 10^6/\text{mm}^3)} \quad \text{μέσος όγκος αιμοσφαιρίων}$$

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hb (g/100 ml)} \times 100}{\text{Hct (\%)}} \quad \text{μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ανά αιμοσφαίριο}$$

Βιοχημικές αναλύσεις.

Μετά την αιμοληψία αφήσαμε το αίμα στο ψυγείο για 24 ώρες να καθίσει. Μετά φυγοκεντρίσαμε στα 14000 για 10 λεπτά στους 4 °C. Μεταφέραμε τον ορό σε άλλα tubes. Όλες οι βιοχημικές αναλύσεις έγιναν στον αυτόματο βιοχημικό αναλυτή Kuadro. Αντιδραστήρια της Thermo με τους παρακάτω κωδικούς χρησιμοποιήθηκαν για τις αναλύσεις των T.P. (TR34021/1700-250), TRI (TR22421/2780-250), GGT(TR19110) , PHO (TR30021/1610-250) ενώ για τις αναλύσεις των LDH (17615), CK (17296), URE (17629), MG (17637), CA (17667), GLU(17630), FE (17648) χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της Sentinel. Οι ηλεκτρολύτες έγιναν στο μηχάνημα της Biolyte 2000.

Αναλύσεις ηλεκτρολυτών

Οι ηλεκτρολύτες Na, K, Cl έγιναν στον αυτόματο αναλυτή Biolyte 2000, electrolyte analyzer σε ορό δείγματος.

Αναλύσεις νιτρικών.

Βάζουμε 10 ml δείγματος θαλασσινού νερού στα ειδικά μπουκαλάκια του μηχανήματος. Προσθέτουμε γρήγορα το αντιδραστήριο nitra ver 5 nitrate reagent powder pillow που είναι σε σκόνη κ το αναδεύουμε στο vortex για 1' κ μετά το αφήνουμε για 5' σε ήρεμο σημείο. Τέλος μετράμε την απορρόφηση.

Αναλύσεις αμμωνίας.

Σε ένα μπουκαλάκι που υπάρχει ήδη το αντιδραστήριο diluent reagent high range vials, προσθέτουμε 0,1 ml δείγματος θαλασσινού νερού και μετά προσθέτουμε τα αντιδραστήρια ammonia salicylate reagent powder pillow και ammonia cyanurate reagent powder pillow για 5 ml δείγματος σε κάθε δοχείο. Ανακινούμε καλά μέχρι να διαλυθούν τα αντιδραστήρια που ήταν σε σκόνη και τα αφήνουμε για 20'. Τέλος μετράμε στο μηχάνημα την απορρόφηση.

3.4 Στατιστική επεξεργασία

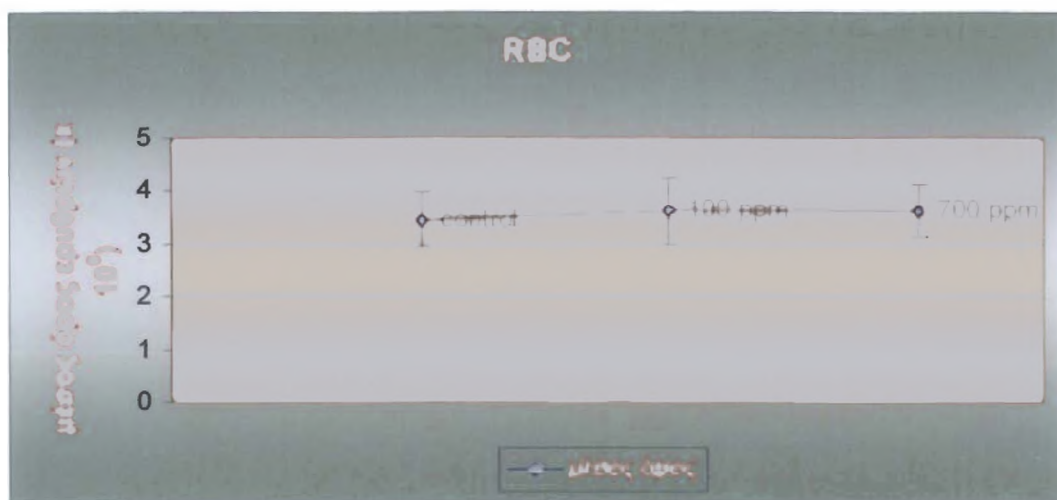
Όλα τα πειραματικά δεδομένα εξετάστηκαν εξεπλάστηκαν ως προς την ανάλυση της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διασποράς χρησιμοποιώντας τους ελέγχους των Kolmogorov-Smirnov και Leven αντίστοιχα πριν την ανάλυση της διασποράς. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σε $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα

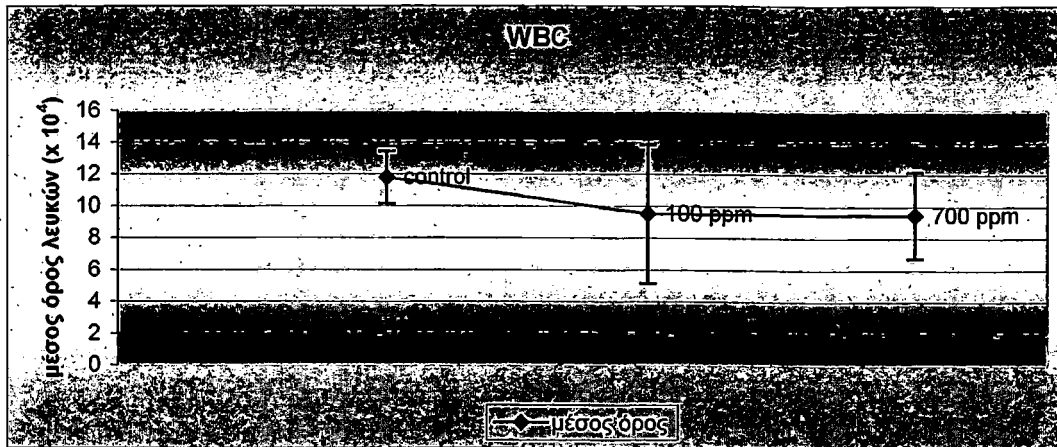
Αιματολογικοί παράμετροι

	control		100 ppm		700 ppm	
	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.
RBC *10 ⁶	3,45	0,51	3,62	0,64	3,63	0,50
WBC *10 ⁴	11,78	1,64	9,49	4,35	9,45	2,72
Λεμφοκ%	75,57	11,19	73,39	7,53	68,93	17,57
Θρομβ %	12,40	9,65	17,89	9,26	16,93	12,70
κοκκιοκ %	10,37	8,26	7,43	3,76	12,05	5,55
μονοκ %	1,67	1,21	1,29	0,70	2,10	1,00
Hct	32,67	5,68	28,71	4,72	32,25	2,75
Hb	12,59	1,28	11,86	1,38	12,54	0,24
MCV	94,60		79,32		88,88	
MCH	36,46		32,77		34,55	
MCHC	38,54		41,31		38,87	



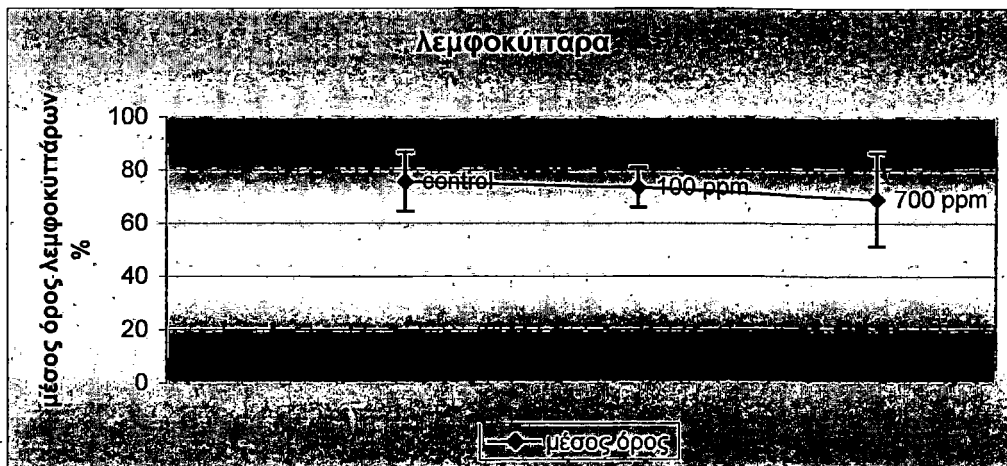
Εικόνα 11 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο λαβράκι

Στην εικόνα 11 απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Παρατηρούμε μια πολύ μικρή αύξηση των ερυθρών στις τιμές των νιτρικών αλλά δεν είναι σημαντικές στατιστικά. Στο πείραμά μας δεν έχει επηρεαστεί ο αριθμός των ερυθροκυττάρων.



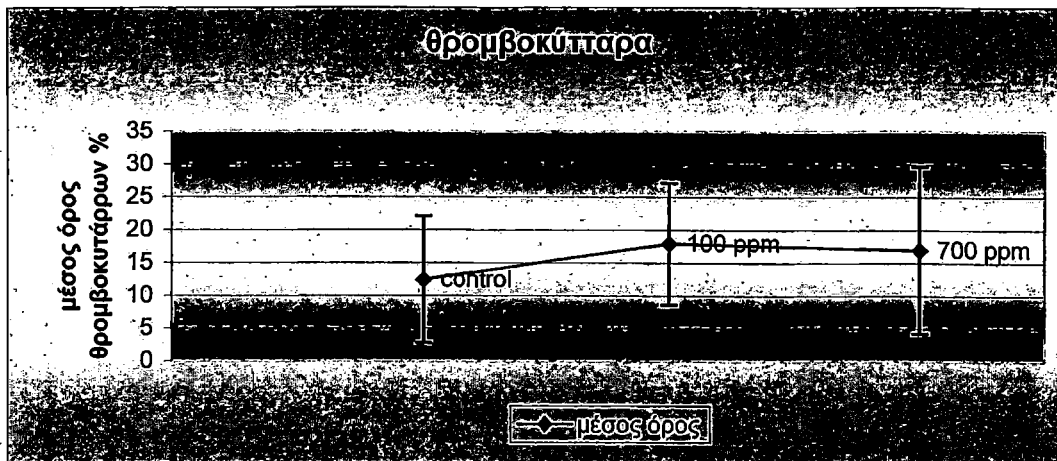
Εικόνα 12 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των συνολικών λευκοκυττάρων στο λαβράκι

Στην εικόνα 12 απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των συνολικών λευκοκυττάρων. Παρατηρούμε μια πτώση των λευκοκυττάρων στα επίπεδα των νιτρικών. Σύμφωνα και με την έρευνα των (Terry C. Hrubec, Stephen A. Smith, John L. Robertson) συμπεραίνουμε πως μειώνεται η άμυνα των ψαριών στη νόσο.



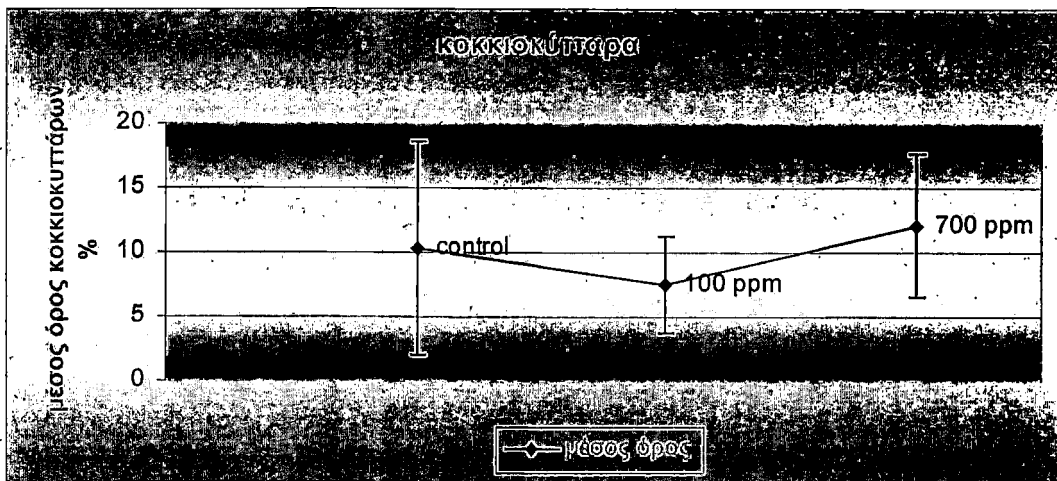
Εικόνα 13 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των λεμφοκυττάρων στο λαβράκι

Στην εικόνα 13 απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των λεμφοκυττάρων. Εδώ παρατηρούμε μια μικρή σταδιακή πτώση των λεμφοκυττάρων στις τιμές των νιτρικών αλλά όχι πολύ σημαντική στατιστικά.



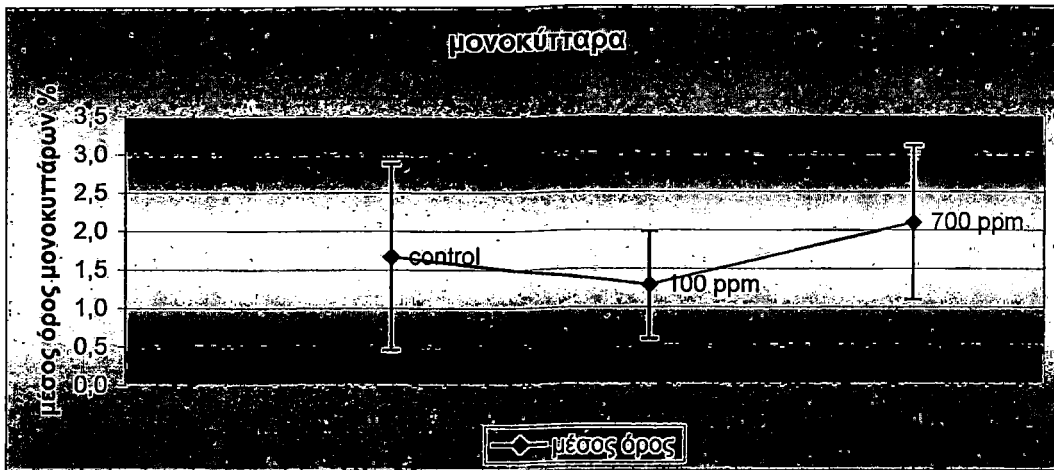
Εικόνα 14 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των θρομβοκυττάρων στο λαβράκι

Στην εικόνα 14 απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των θρομβοκυττάρων. Παρατηρούμε μια αύξηση των κυττάρων στις τιμές των νιτρικών και συμπεραίνουμε ότι το αίμα ίσως δεν κυκλοφορεί καλά και δημιουργούνται θρόμβοι.



Εικόνα 15 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των κοκκιοκυττάρων στο λαβράκι

Στην εικόνα 15 απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των κοκκιοκυττάρων. Παρατηρούμε μια ανομοιότητα γενικότερα. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης των 100 ppm μας δείχνει μια πτώση από τα επίπεδα ελέγχου ενώ ο μέσος όρος της συγκέντρωσής των 700 ppm μας δείχνει μία αύξηση και από τα δύο επίπεδα σύγκρισης. Αυτή την αύξηση υποστηρίζουν και οι Hrubec C. Terry, Smith A. Stephen, Robertson L. John (2002) στην έρευνά τους.

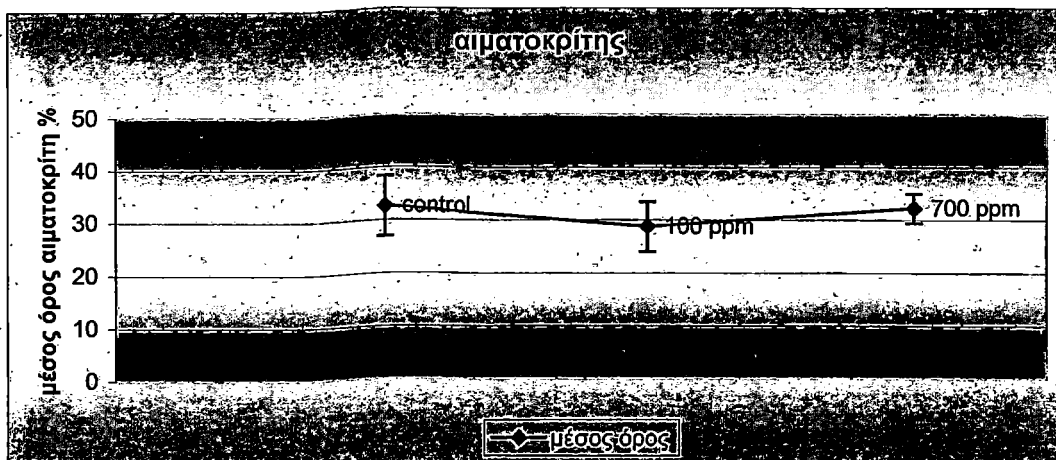


Εικόνα 16 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των μονοκυττάρων στο λαβράκι

Στην εικόνα 16 απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των μονοκυττάρων. Παρατηρούμε μια ανομοιότητα και εδώ. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης των 100 ppm μας δείχνει μια πτώση από τα επίπεδα ελέγχου ενώ ο μέσος όρος της συγκέντρωσής των 700 ppm μας δείχνει μία αύξηση και από τα δύο επίπεδα σύγκρισης. Την αύξηση αυτή παρατήρησαν και οι Hrubec C. Terry, Smith A. Stephen, Robertson L. John (2002) στην έρευνά τους.

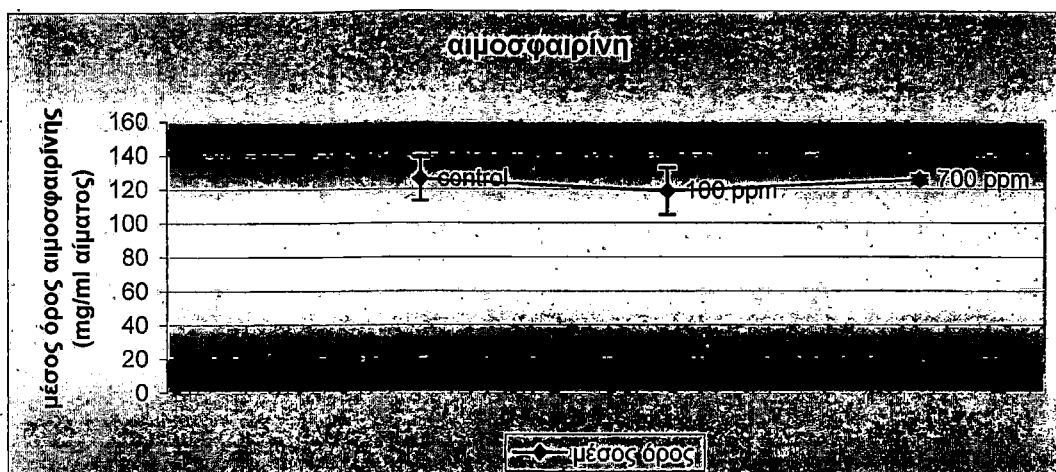
Οι αλλαγές στον αριθμό των λευκοκυττάρων σχετίζονται με την μεταβολή του ανοσολογικού συστήματος (Rensom et al., 1984, Hine Wain, 1988) και μολυσματικοί παράγοντες όπως το βακτήριο, *Renibacterium salmoninarum* (που προκαλούν την βακτηριακή νεφρική νόσο) αυξάνουν τον αριθμό των μονοκυττάρων, ουδετερόφιλων και θρομβοκυττάρων στα σαλμονοειδή (Bruno & Munro, 1986).

Αλλαγές στα λευκοκύτταρα επίσης συμβαίνουν όταν τα ψάρια στρεσάρονται καθώς και από μεταβολές της ποιότητας του περιβάλλοντος νερού (Casillas & Smith 1977, Lamas et al., 1994).



Εικόνα 17 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του αιματοκρίτη στο λαβράκι

Στην εικόνα 17 απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση του αιματοκρίτη. Εδώ παρατηρούμε μία μικρή πτώση στη συγκέντρωση των 100 και μία επαναφορά στα επίπεδα ελέγχου στη συγκέντρωση των 700. Όχι στατιστικά σημαντική διαφορά.

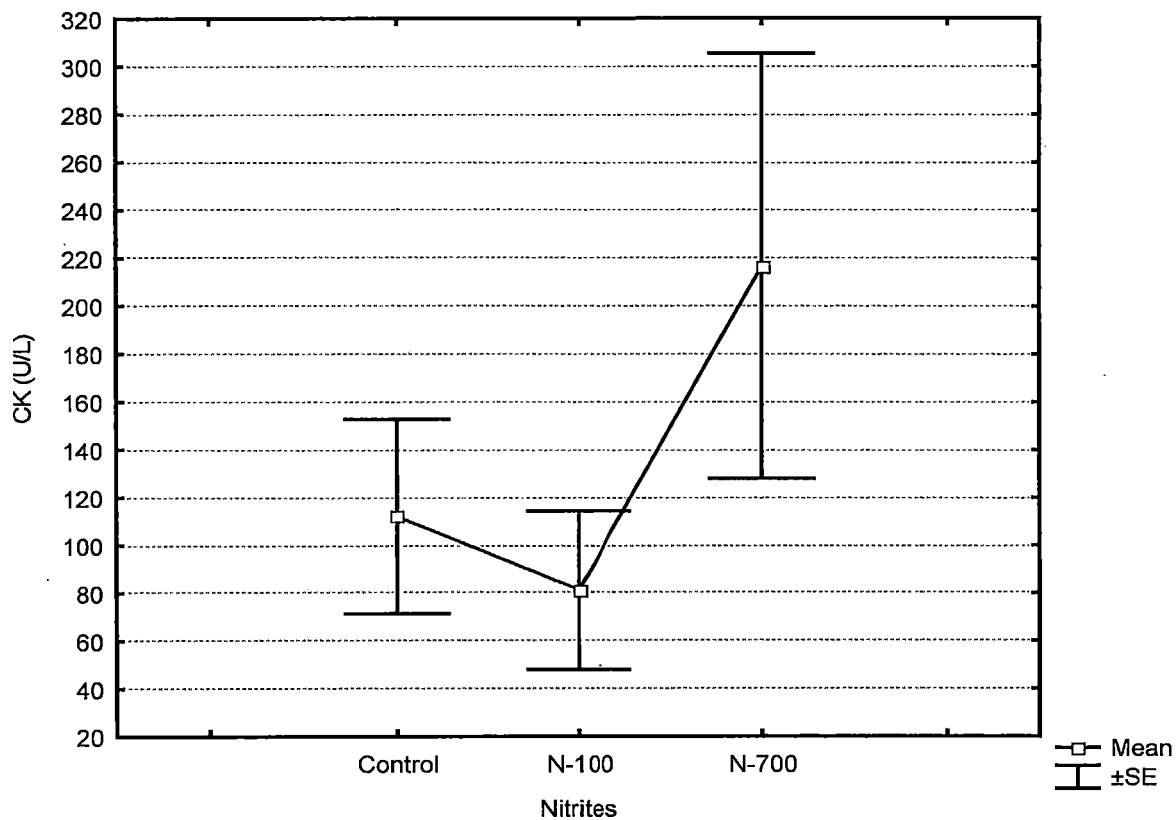


Εικόνα 18 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση της αιμοσφαιρίνης στο λαβράκι

Στην εικόνα 18 απεικονίζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση της αιμοσφαιρίνης. Εδώ παρατηρούμε την ίδια συμπεριφορά με τον αιματοκρίτη. Συνεπώς στο πείραμά μας δεν έχουν επηρεαστεί ο αιματοκρίτης και η αιμοσφαιρίνη.

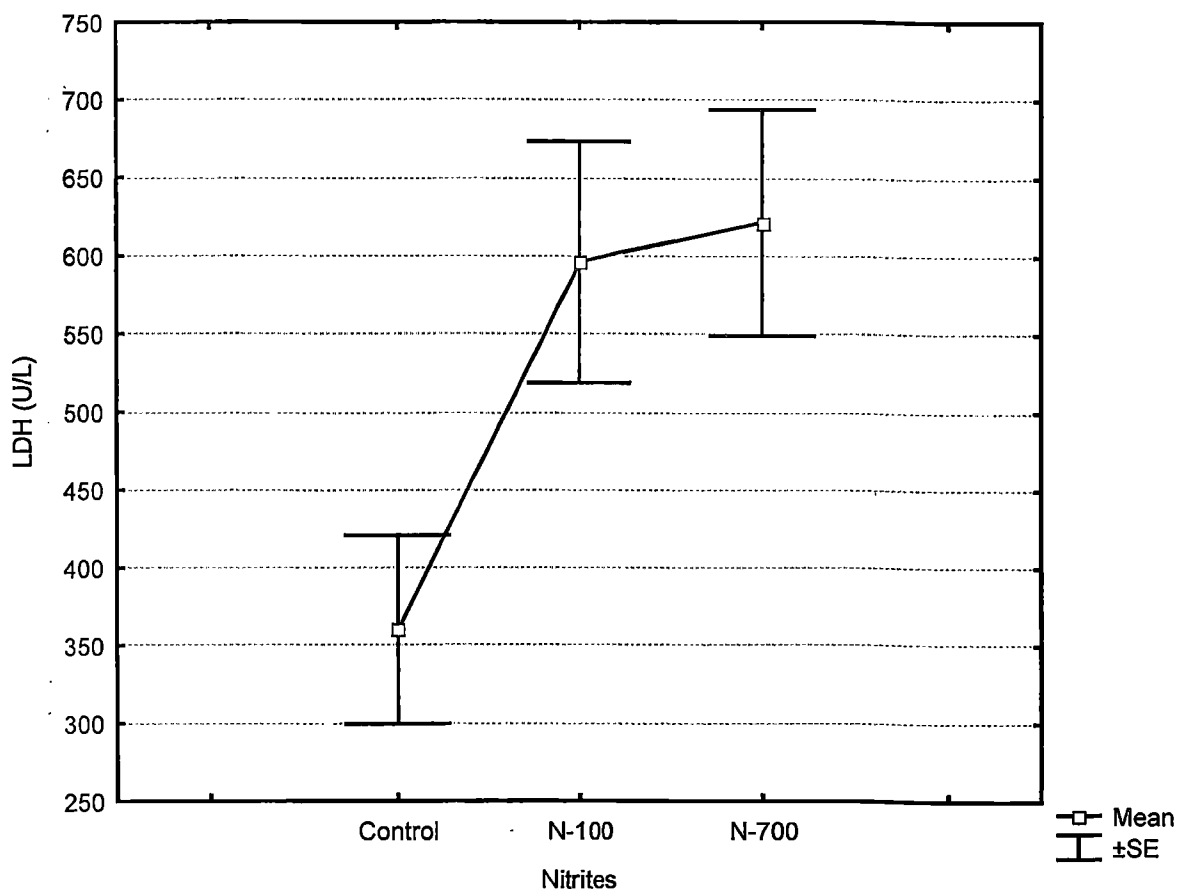
Βιοχημικές παράμετροι

	Αρ. Δειγμ.	Μέσος όρος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Τυπική απόκλιση	Τυπικό σφάλμα
CK	34	136.9	9	766	201	34.5
LDH	29	504.6	120	980	244.5	45.4
GLU	36	79.5	52	127	19.5	3.2
TP	38	4.1	2.1	5.5	0.7	0.1
TRI	23	626.3	286	900	165.5	34.5
URE	43	13.5	10	23	3.0	0.4
FE	30	66.5	12	112	25.5	4.6
CA	16	11.8	9.2	16.3	2.1	0.5
MG	29	3.7	2.5	6.0	1	0.2
PHO	24	8.0	4.8	15.2	2.3	0.5
Na	34	181.6	105	198	21.4	3.7
K	19	2,0	1	4.2	1.1	0.2
Cl	33	145.1	69	166	21.6	3.8



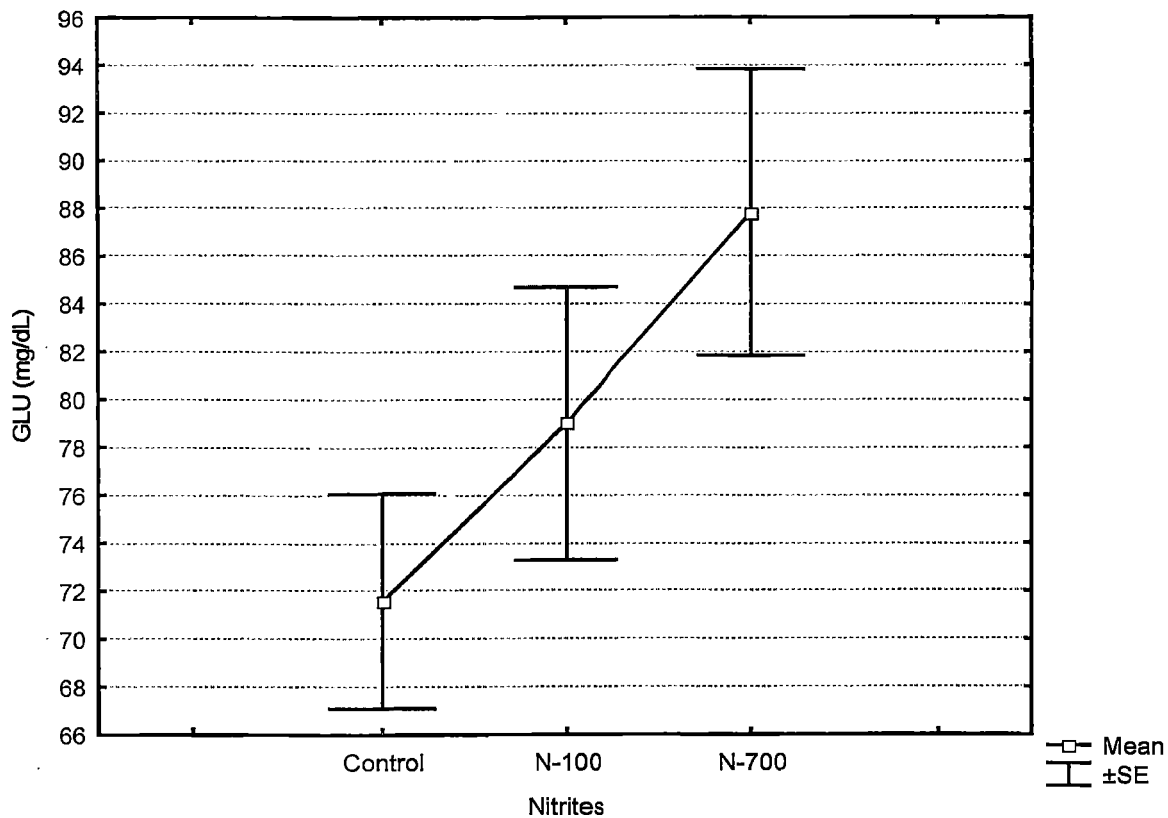
Εικόνα 19 : Διάγραμμα κρεατινικής κινάσης (CK) στο λαβράκι

Στην εικόνα 19 παρατηρούμε μια πτώση της CK σε συγκέντρωση 100 ppm νιτρικών αλλά όχι στατιστικά σημαντική όσο η αύξηση που παρατηρούμε στο επίπεδο των 700. Αυξημένες τιμές της CK παρατηρούνται σε παθολογικές καταστάσεις και πιθανό να επιφέρουν βλάβη στους μύες και στο μυοκάρδιο.



Εικόνα 20 : Διάγραμμα Γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) στο λαβράκι .

Στην εικόνα 20 παρατηρούμε μια σημαντική αύξηση της LDH και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών σε σχέση με τον μάρτυρα. Η αύξησή της υποδεικνύει ασθένεια στα βράγχια, οίδημα των νεφρών καθώς και ασθένειες στο συκώτι και στο καρδιακό μυ.

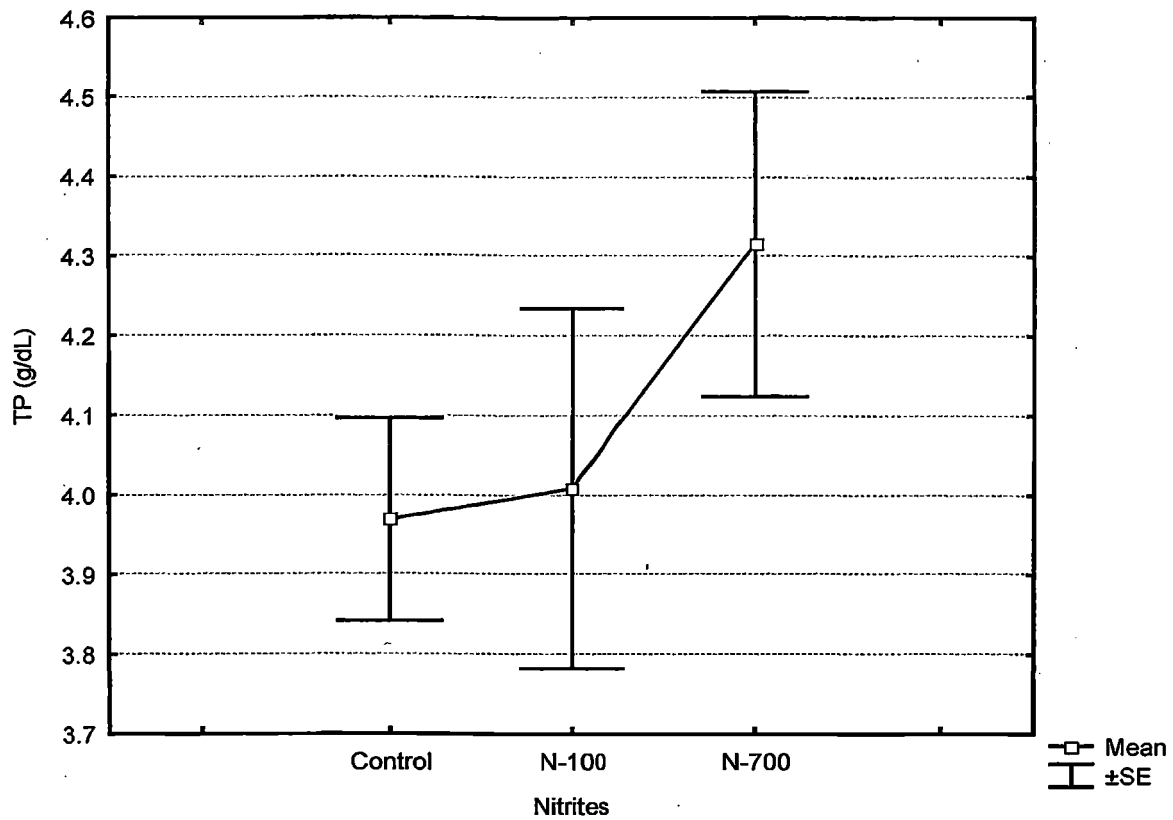


Εικόνα 21 : Διάγραμμα Γλυκόζης (GLU) στο λαβράκι

Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας του οργανισμού και του εγκεφάλου. Στο πείραμά μας παρατηρούμε μια σημαντική και βαθμιαία αύξηση της γλυκόζης στις 2 συγκεντρώσεις των νιτρικών, (εικόνα 21). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε άλλες έρευνες σύμφωνα με τις οποίες τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σχετίζονται με τα επίπεδα του stress στο ψάρι και υποδεικνύουν τις αναπνευστικές ή διατροφικές διαταραχές, (*Hideaki Endo et al., 2006*) *D.T. Nolan, et al (1999)*, *C.E. Trenzado, et al (2003)*, *R.D. Van Anholt, et al(2004)* , *M.J. Chowdhury, et al (2004)*, *S. Jentoft, et al (2005)*, *M. Carballo et al (2005)*

Η μακροχρόνια υπεργλυκαιμία έχει σαν αποτέλεσμα την εκδήλωση επιπλοκών από τους νεφρούς, τα νεύρα η τα μεγάλα αγγεία.

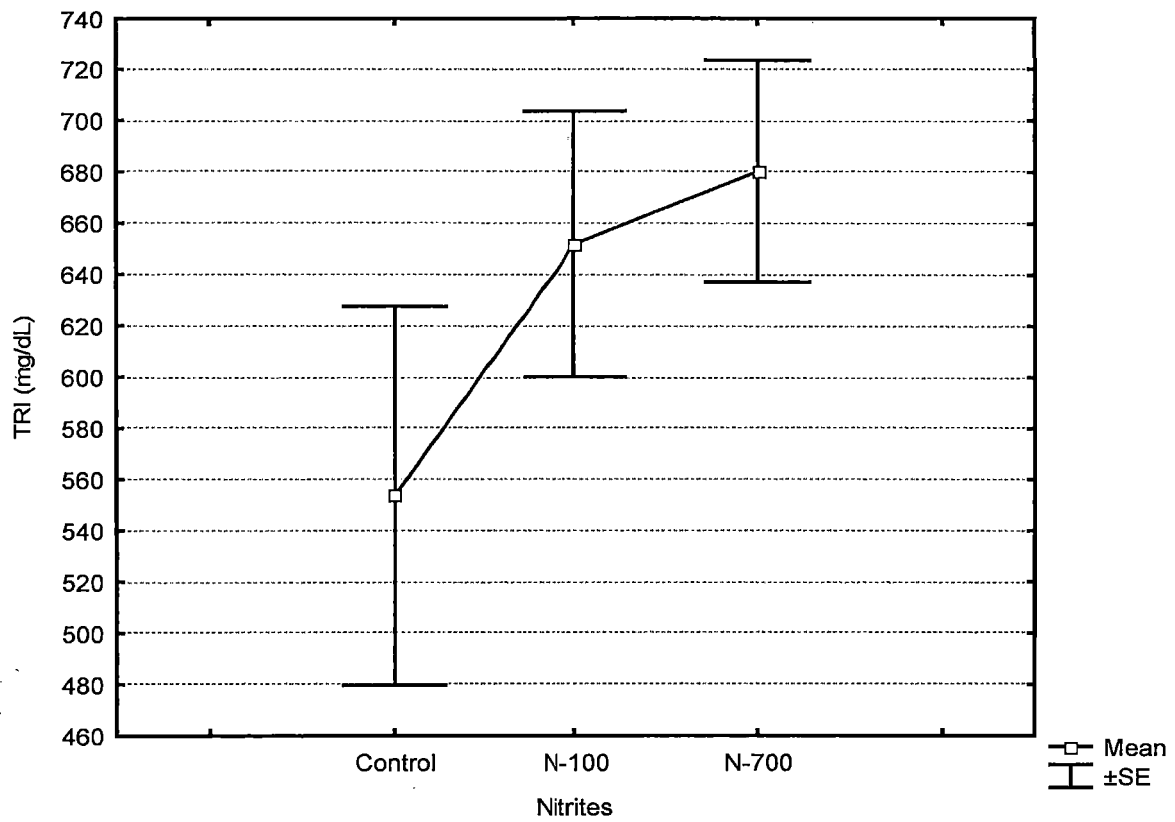
Αυξημένες τιμές της γλυκόζης παρατήρησαν και οι *Barcellos Leonardo Jose Gil et al. (2003)*, στο είδος *Rhamdia quelen Quoy* και *Gaimard pimelodidae* μετά από στιγμιαίο στρες.



Εικόνα 22 : Διάγραμμα ολικών πρωτεϊνών (TP) στο λαβράκι

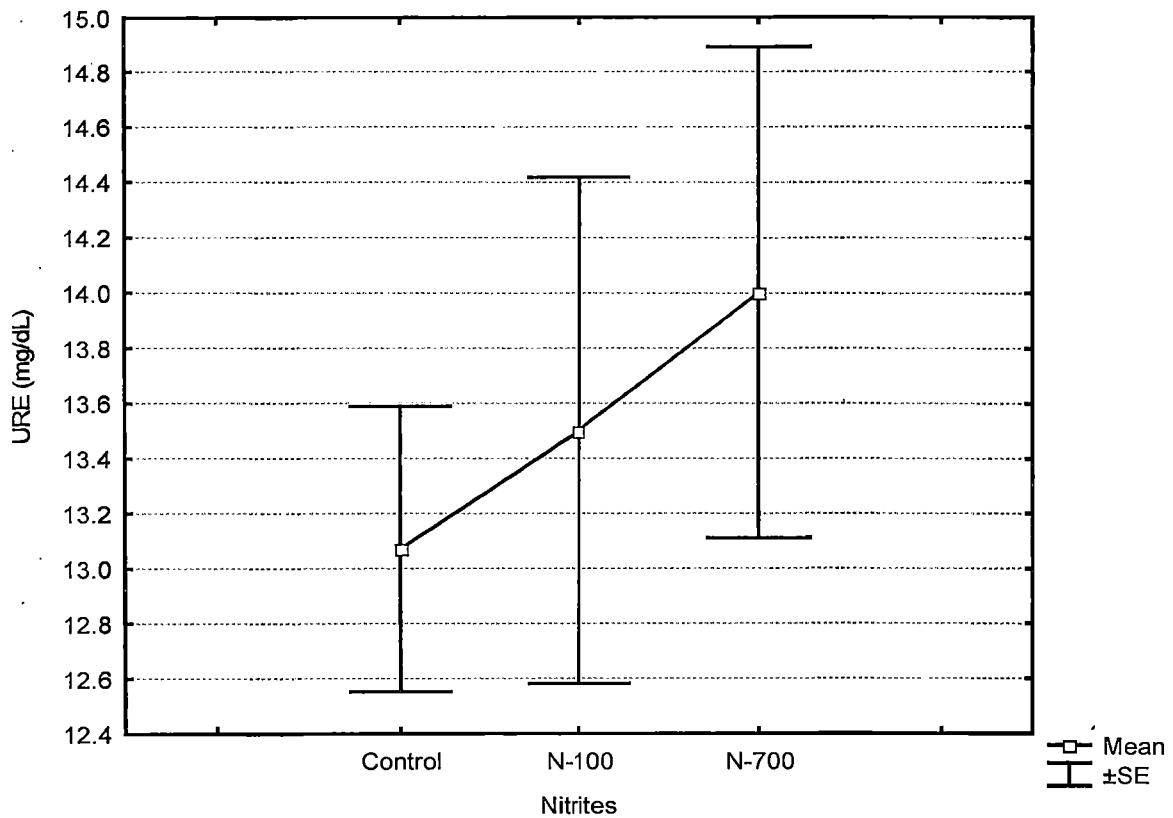
Οι ολικές πρωτεΐνες είναι ένας καλός δείκτης της λειτουργίας του ήπατος. Στην εικόνα 22 παρατηρούμε μια αύξηση των ολικών πρωτεϊνών και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών. Αυξημένα επίπεδα προκαλούν χρόνια ηπατική νόσο.

Ο Barcellos L.J.G. et al. (2003) παρατήρησαν ότι στο είδος *Rhamdia quelen* Quoy μετά από στιγμιαίο στρες αυξήθηκαν τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 23 : Διάγραμμα Τριγλυκεριδίων (TRI) στο λαβράκι

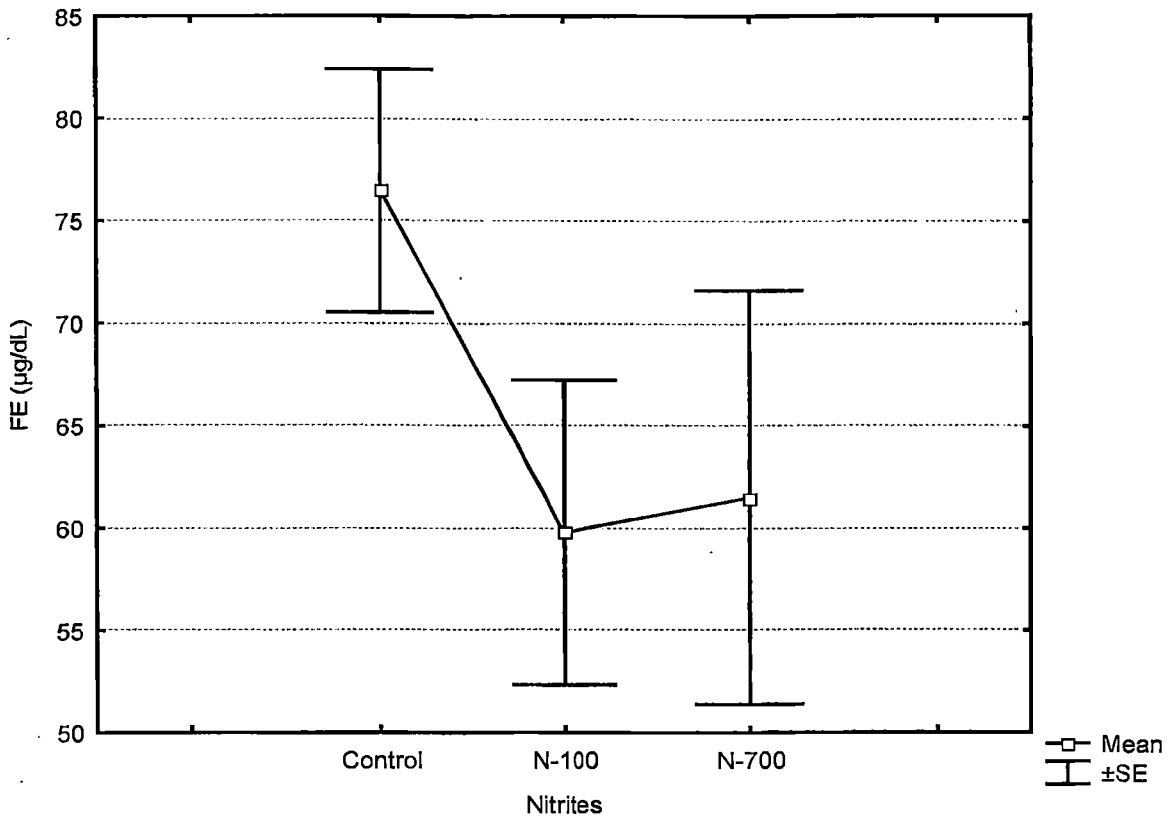
Στην εικόνα 23 παρατηρούμε μια αύξηση των τριγλυκεριδίων και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών. Υψηλές τιμές τριγλυκεριδίων επιφέρουν διαταραχές του ήπατος, λιπώδη διήθηση ή εκφύλιση του ήπατος και του παγκρέατος.



Εικόνα 24: Διάγραμμα Ουρίας (UREA) στο λαβράκι

Η ουρία είναι τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών, έτσι πρέπει να σχετίζονται και τα αποτελέσματα τους όπως και συμβαίνει. Στο διάγραμμα της εικόνας 24 παρατηρούμε μια αύξηση της ουρίας και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών. Υψηλές τιμές παρουσιάζουν νεφρικά νοσήματα.

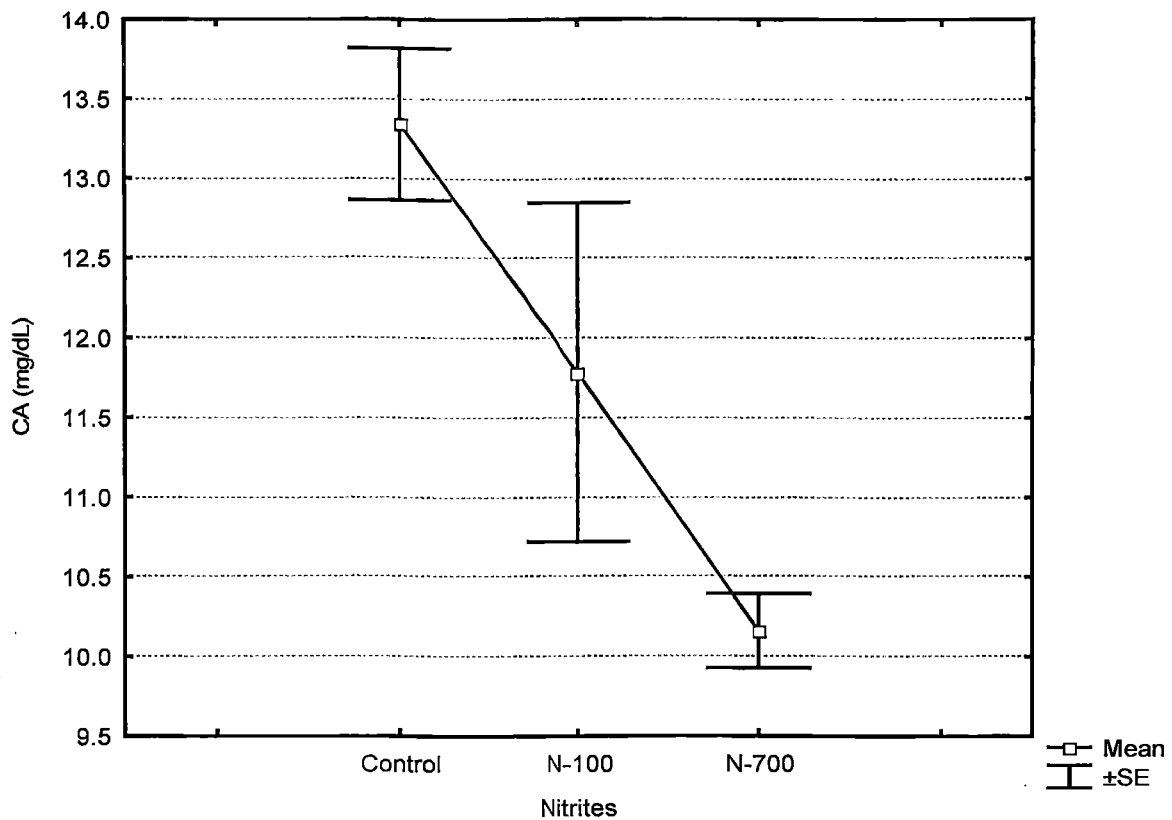
Ο Barcellos L.J.G. et al. (2003) παρατήρησαν ότι στο είδος *Rhamdia quelen* Quoy μετά από στιγμιαίο στρες αυξήθηκαν τα επίπεδα της ουρίας.



Εικόνα 25 : Διάγραμμα Σιδήρου (Fe) στο λαβράκι

Στην εικόνα 25 παρατηρούμε μια σημαντική πτώση του σιδήρου και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών από τα επίπεδα ελέγχου. Σε κακή κατάσταση υγείας χάνονται τα αποθέματα σιδήρου του οργανισμού σε όργανα όπως το συκώτι και ο σπλήνας. Μειωμένα επίπεδα σιδήρου παρατηρούνται στην αναιμία λόγω κακής απορρόφησης του, ως αποτέλεσμα γαστρεντερικών παθήσεων.

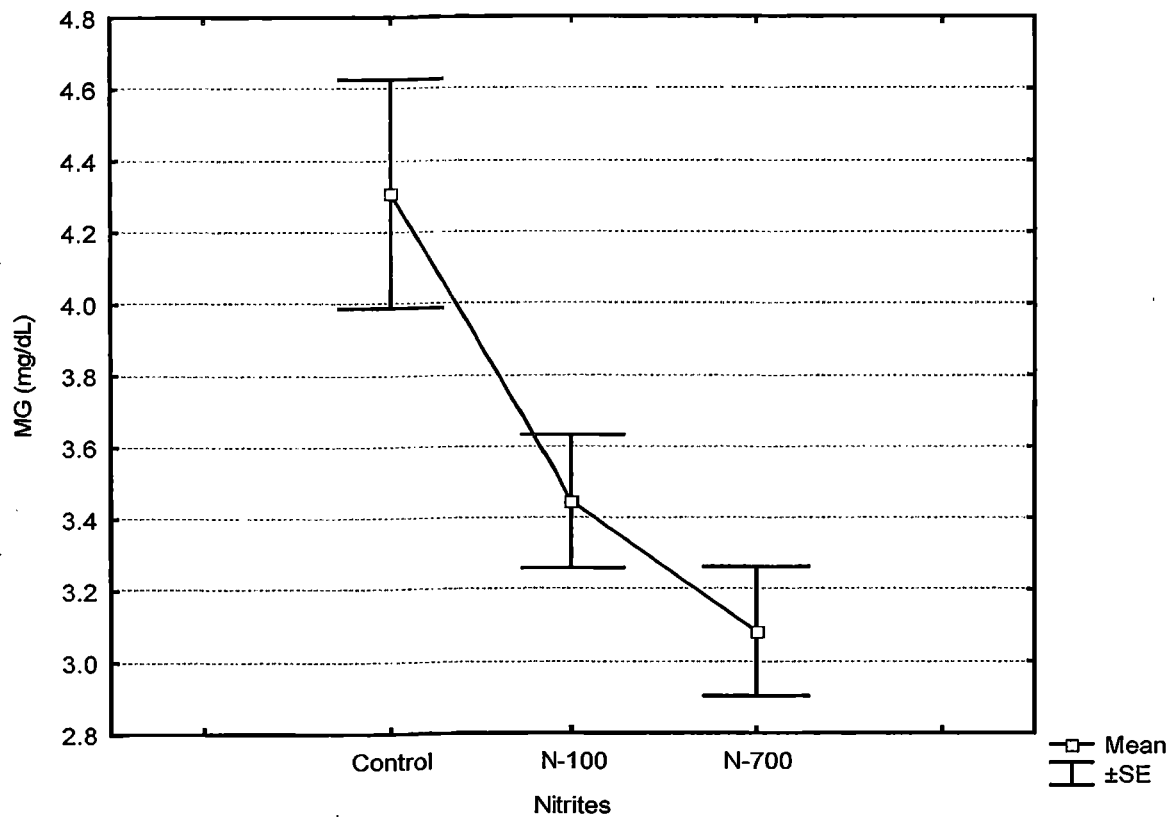
Πτώση του σιδήρου του ορού παρουσιάστηκε σε άρρωστα λαβράκια σύμφωνα με την έρευνα του Rodrigues N.S. Pedro, et al. (2006).



Εικόνα26 : Διάγραμμα Ασβεστίου (Ca) στο λαβράκι

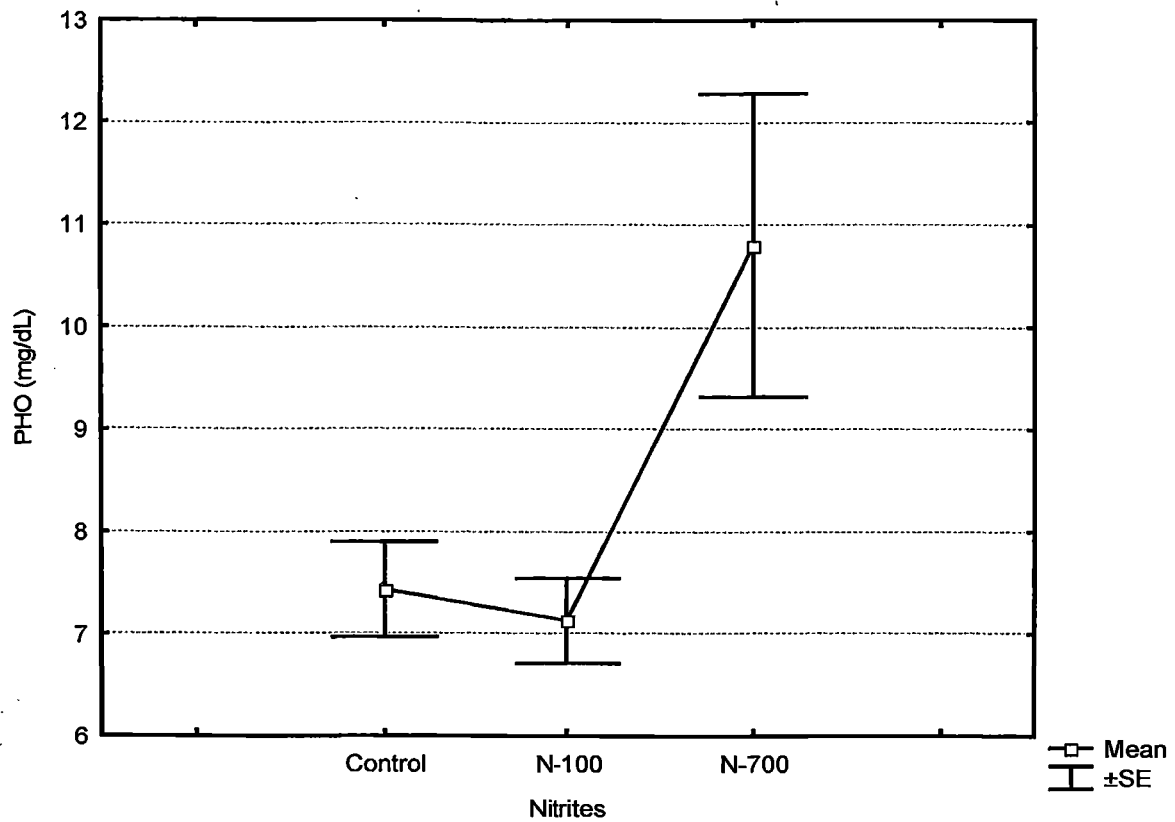
Στο διάγραμμα της εικόνας 26 παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική πτώση του ασβεστίου και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την κακή λειτουργία του νευρικού και μυϊκού συστήματος, την κακή πήξη του αίματος, την κακή ορμονική λειτουργία του οργανισμού και τέλος την κακή λειτουργία της πέψης.

Μείωση του ασβεστίου παρατήρησαν επίσης και οι H. Yavuzcan Yildiz & S. Pulatsu (1999) στο είδος Nile tilapia μετά από την έκθεση του ψαριού σε μίγμα φορμαλίνης, πράσινο του μαλαχίτη και το μπλε του μεθυλαινίου όπως πτώση του ασβεστίου παρατήρησαν και οι Rerdon & Harrel (1994) στο είδος rainbow trout μετά από έκθεσή του σε φορμαλίνη συγκέντρωσης 200 ml/lit.



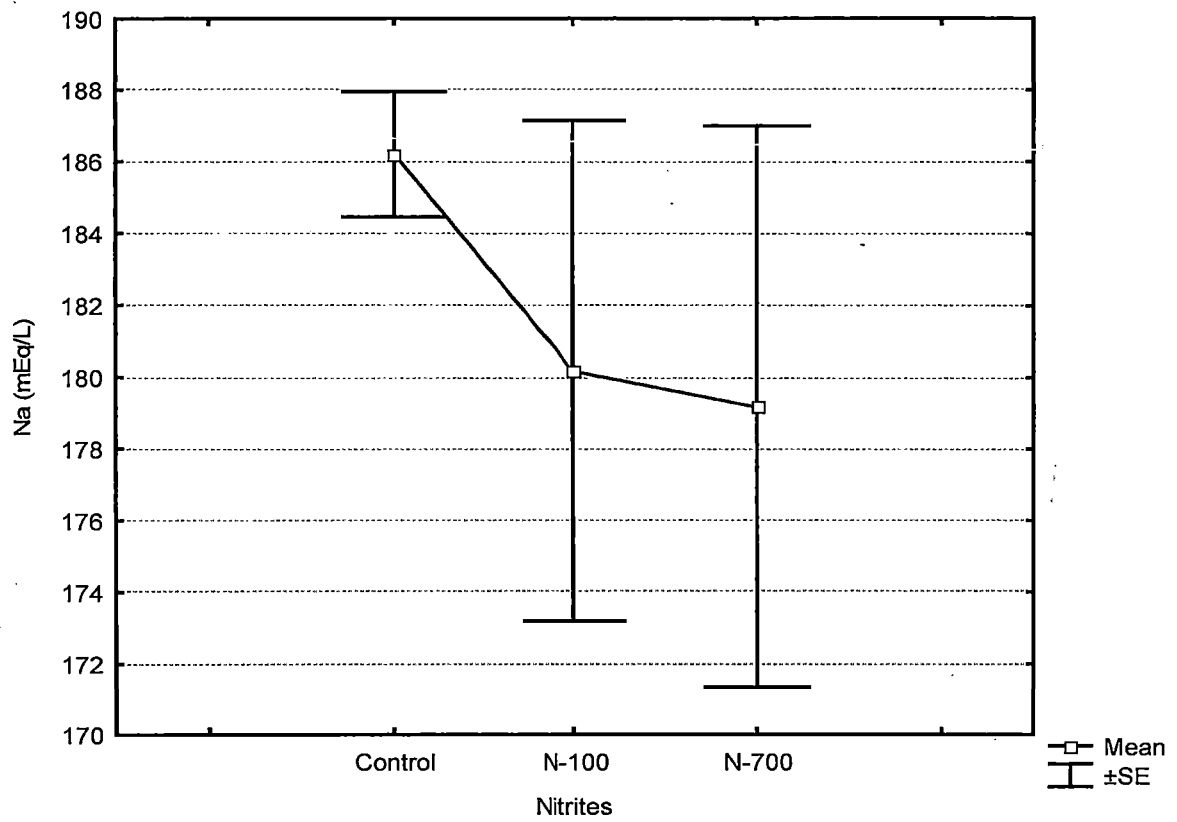
Εικόνα 27 : Διάγραμμα Μαγνησίου (Mg) στο λαβράκι

Στην εικόνα 27 παρατηρούμε στατιστικά σημαντική πτώση του μαγνησίου και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών. Το μαγνήσιο βρίσκεται στα οστά καθώς επίσης και ενεργοποιεί διάφορα ένζυμα στον οργανισμό που είναι απαραίτητα για την παραγωγή ενέργειας. Αυτό δημιουργεί καταστολή της λειτουργίας αυτών των ενζύμων. Η μείωση του μαγνησίου ακολουθεί αυτή του ασβεστίου.



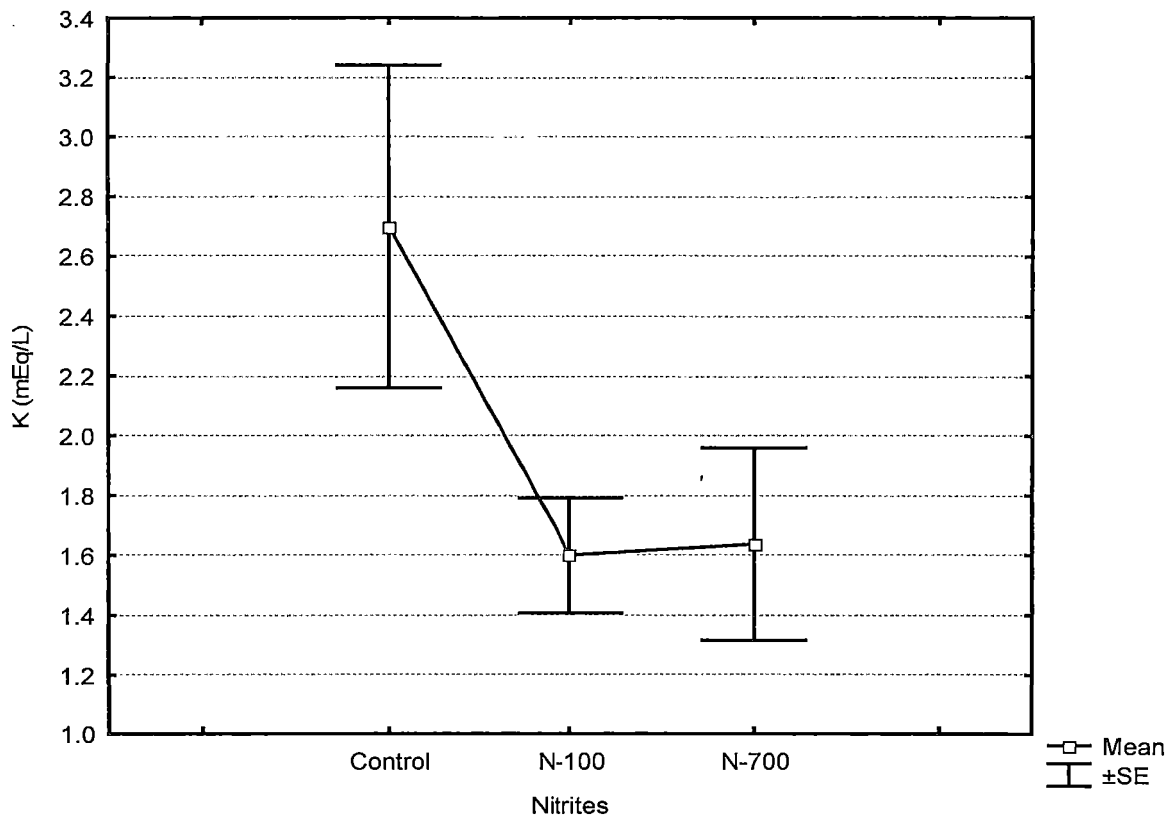
Εικόνα 28 : Διάγραμμα Φωσφόρου (P) στο λαβράκι

Ο φώσφορος παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών του οργανισμού. Στην εικόνα 28 παρατηρούμε μια μικρή πτώση του φωσφόρου στο επίπεδο των 100 ppm και μια στατιστικά σημαντική αύξηση στο επίπεδο των 700 ppm. Αυξημένα επίπεδα φωσφόρου στον ορό παρατηρούνται σε νεφρικές νόσους.



Εικόνα 29 : Διάγραμμα Νατρίου (Na) στο λαβράκι

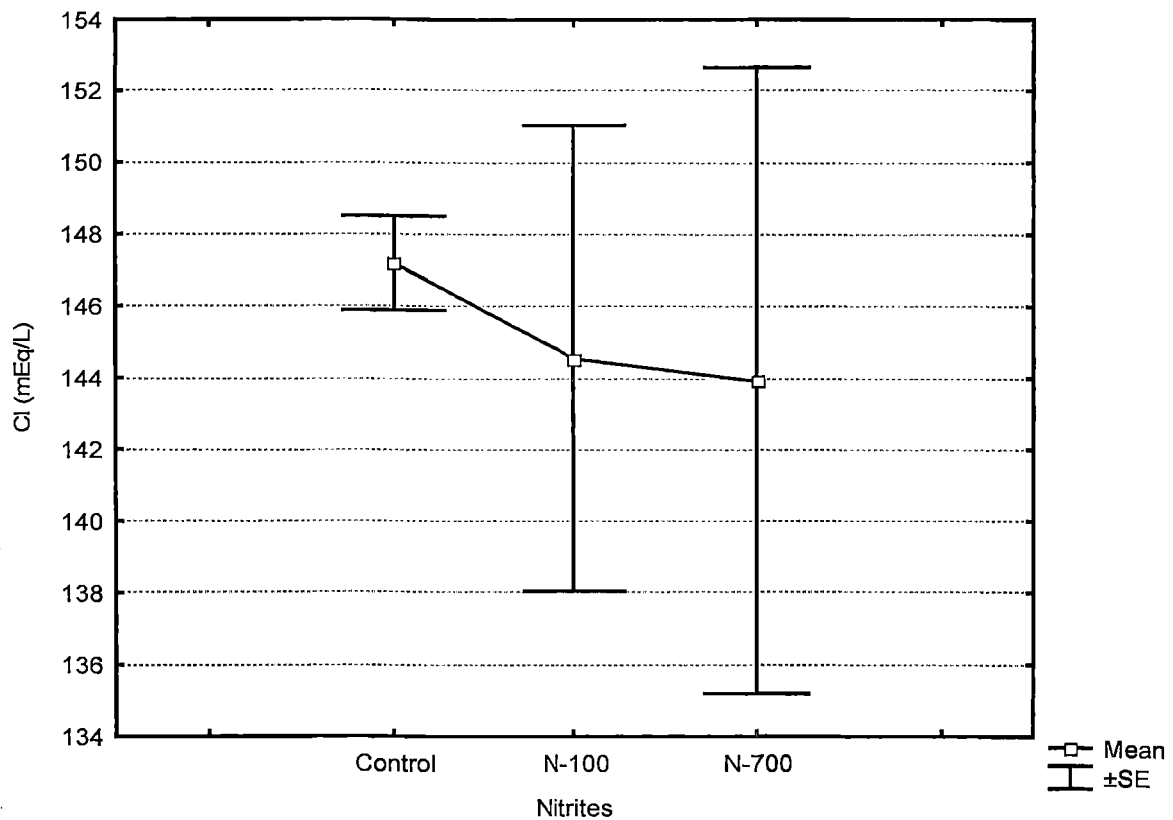
Στο διάγραμμα της εικόνας 29 παρατηρούμε σταδιακή πτώση του νατρίου και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών. Αυτό πιθανόν να επηρεάζει την καλή λειτουργία του νευρικού και μυϊκού συστήματος



Εικόνα 30 : Διάγραμμα Καλίου (K) στο λαβράκι

Στην εικόνα 30 παρατηρούμε πτώση του καλίου και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών από τα επίπεδα ελέγχου. Το κάλιο φυσιολογικά βρίσκεται σε μία ισορροπία αναλογιών με το νάτριο και το χλώριο. Έτσι είναι αναμενόμενη η πτώση και του καλίου. Επίσης αυτή η μείωση συχνά σχετίζεται με την μείωση του ασβεστίου και του μαγνησίου.

Πτώση του καλίου παρατήρησαν και οι ερευνητές Sala-Rabanal M. et al. (2004) στο πείραμά τους με απότομη πτώση της θερμοκρασίας ως παράγοντας στρες.



Εικόνα 31 : Διάγραμμα Χλωρίου (Cl) στο λαβράκι

Στην εικόνα 31 παρατηρούμε πτώση αλλά και μια μεγάλη απόκλιση του χλωρίου και στις δύο συγκεντρώσεις των νιτρικών από τα επίπεδα ελέγχου. Μειωμένες ποσότητες χλωριούχου νατρίου στον οργανισμό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της αρτηριακής πίεσης.

Πτώση του χλωρίου παρατήρησαν και οι Cataldi E. et al. (1998) στο είδος *Adriatic sturgeon* με εναλλαγή της θερμοκρασίας όπως και οι Masson N. et al. στο είδος *Salmo trutta fario* παρατήρησαν πτώση μετά από στρες με όξινο διάλυμα.

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων συμπεραίνουμε ότι η μείωση του αριθμού των λευκών κυττάρων και η αύξηση των θρομβοκυττάρων με την ταυτόχρονη αύξηση των τιμών βιοχημικών παραμέτρων όπως η γλυκόζη (GLU), η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH), ολικές πρωτεΐνες (TP), τριγλυκερίδια (TRI), ουρία (UREA), φώσφορος (P), κρεατινική κινάση (CK) και την ταυτόχρονη μείωση του καλίου (K), νατρίου-χλωρίου (Na-Cl), μαγνησίου (Mg), ασβεστίου (Ca) και σιδήρου (Fe) μπορούν να χρησιμεύσουν στο λαβράκι ως δείκτες στρες που προέρχεται από υποβάθμιση της ποιότητας του νερού εκτροφής.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Αργυρού Ν. Ιωάννα, Παπαϊωάννου Εύα, Καργιώτη Ειρήνη, «Καθορισμός περιοχών οργανωμένης ανάπτυξης θαλασσίων υδατοκαλλιεργειών (Π.Ο.Α.Υ) στο βόριο Ευβοϊκό και Μαλιακό κόλπο» 12^ο πανελλήνιο συνέδριο ιχθυολόγων, Δράμα 13-16 Οκτωβρίου 2005
- Barcellos L.J.G., Kreutz.L.C., Rodrigues L.B., Fioreze I., Quevedo R.M., Cericato L., Conrad J., Soso A.B., Fagundes M., Lacerda L.A. and Terra S. (2003). «Haematological and biochemical characteristics of male jundia (*Rhamdia quelen* Quoy και *Gaimard Pimelodidae*): changes after acute stress».
- Basic techniques in fish haematology
- Bruno, D.W. & Munor, A.L.S. (1986). «Haematological assessment of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*». *Journal of Fish Diseases* 9, 195-204.
- C.E. Trenzado, T.R. Carrick, T.G. Pottinger, *Gen. Comp. Endocrinol.* 133 (2003) 332.
- Casillas, E. & Smith, L.S. (1977). «Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)». *Journal of Fish Biology* 10, 481-491.
- Cataldi E., Di Marco P., Mandich A., Cataudella S. (1998). «Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress».
- D.T. Nolan, R.L.J.M. Op't Veld, P.H.M. Balm, S.E.W. Bonga, *Aquaculture* 177 (1999) 297.
- Hideaki Endo, Yuki Yonemori, Kazuya Musiya, Masashi Maita, Toru Shibuya, Huifeng Ren, Tetsuhito Hayashi, Kohji Mitsubayashi (2006). «A needle-type optical enzyme sensor system for determining glucose levels in fish blood».
- Hine, P.M. & Wain, J.M. (1988). «Characterization of inflammatory neutrophils induced by bacterial endotoxin in the blood of eels, *Anguilla australis*». *Journal of Fish Biology* 32, 579-592.
- Hrubec C. Terry, Smith A. Stephen, Roberison L. John (2002). «Nitrate Toxicity: A Potential Problem of Recirculating Systems».

- Hrubec T. C, Smith S. A, Robertson J. L 2002 «Nitrate Toxicity: A Potential Problem of Recirculating Systems»
- Καββαδίας Σπυρίδων 1994, «Αιματολογικές και βιοχημικές μελέτες στο λαβράκι το ευρωπαϊκό *Dicentrarchus labrax* L σε σχέση με αβιοτικές παραμέτρους του θαλασσινού νερού και το σιτηρέσιο»
- Καπαρελιώτης Απ. 1997, «Σημειώσεις φυσιολογίας ιχθύων».
- Κουφός Σ. - Βορεινάκης Φ. 1994, «Η αιματολογία στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) και στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)»
- Lamas, J., Santos, Y., Bruno, D.W., Toranzo, A. E. & Anadon, R. (1994). «Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs)». *Journal of Fish Biology* 45, 839-854.
- M. Carballo, J.A. Jimenez, A. de la Torre, J. Roset, M.J. Munoz, *Environ. Toxicol.* 20 (2005) 119.
- M.J. Chowdhury, E.F. Pane, C.M. Wood, *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 139 (2004) 163.
- Masson N., Guerold F., Dangles O. (2002). «Use of blood parameters in fish to assess acidic stress and chloride pollution in French running waters».
- Μυλωνόπουλος Δημήτριος 2002, «Το δίκαιο της αλιείας»
- R.D. Van Anholt, F.A. Spanings, W.M. Koven, S.E. Bonga, *Gen. Comp. Endocrinol.* 139 (2004) 215–226.
- Ransom, D.P., Lannan, C.N., Rohovec, J.S. & Fryer, J.L. (1984) «Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon». *Journal of Fish Diseases* 7, 107-115.
- Rerdon I.S. & Harrel R.M. (1994). «Effects of varying salinities on the toxicity of potassium permanganate to larval and juvenile striped bass, *Morone saxalitis* (Walbaum)».
- Rodrigues N.S. Pedro, Vazquez-Dorado S., Neves V.J., Wilson M.J. (2006). «Dual function of fish nepcidin: Response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)».
- S. Jentoft, A.H. Aastveit, P.A. Torjesen, O. Andersen, *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 141 (2005) 353.
- Sala-Rabanal M., Sanchez J., Ibarz A., Fernandez-Borras J., Blasco J., Gallardo M.A. (2004). «Effects of low temperatures and fasting on

hematology and plasma composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)».

- ΣΕΘ, 2003
- Yavuzcan H. Yildiz & Pulatsu S. (1999). «Evaluation of the secondary stress response in healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) after treatment with mixture of formalin, malachite green and methylene blue».
- Χώτος Γ. –Ρογδάκης Ι. 1992, «Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών»
- Αναφορές από το διαδίκτυο
 - www.geocities.com
 - [www.cyprus dietetic association.gr](http://www.cyprusdieteticassociation.gr)
 - www.elais.gr
 - www.iatronet.gr