



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



τμήμα βιολογίας



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ : Βιοτεχνολογία – Μοριακή και Μικροβιολογική  
Ανάλυση Τροφίμων και Προϊόντων**

**Αρίστη Ζαφειράκογλου**

**Μεταπτυχιακή φοιτήτρια**

**Ανοσοπροσδιορισμός αλλεργιογόνων σε ιχθύες με  
οικονομική αξία**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Επιβλέποντες καθηγητές :**

**Καθηγητής Μηνάς Γιάγκου**

**Επίκουρη Καθηγήτρια Ευθυμία Αντωνοπούλου**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2016**



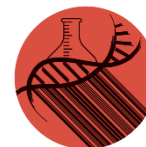
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



τμήμα βιολογίας



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



**MASTER DIRECTION: Biotechnology – Molecular & Microbiological  
Analysis of Products & Food**

**Aristi Zafeirakoglou**

**Postgraduate student**

**Immunodetection of allergens in edible fish with economical  
interest**

**MASTER THESIS**

**Supervisors:**

**Professor Minas Yiangou**

**Assistant Professor Efthimia Antonopoulou**

**THESSALONIKI 2016**

## Περίληψη

Οι παρβαλβουμίνες αποτελούν ομάδα πρωτεϊνών μοριακού βάρους 12–14 kDa. Εμφανίζουν τουλάχιστον 3 ισομορφές (PV-I, PV-II, PV-III). Βιβλιογραφικά δεδομένα καταδεικνύουν τις παρβαλβουμίνες ως κυρίαρχο αλλεργιογόνο σε εδώδιμους ιχθύες. Παρά την παγκοσμιοποιημένη διακίνηση τροφίμων, η ανάπτυξη διατροφικών αλλεργιών είναι ανοσοαντιδράσεις συνδεδεμένες με την τοπική διάθεση τροφίμων. Δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για το πρότυπο των ισομορφών των παρβαλβουμινών σε ιχθύες της ελληνικής αγοράς.

Σκοπός της εργασίας υπήρξε η διερεύνηση της ύπαρξης και η ανίχνευση των παρβαλβουμινών, με ανοσοαποτύπωση κατά Western, σε αλιεύματα του Θερμαϊκού Κόλπου και της Χαλκιδικής. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε ομογενοποιημένα λευκού μυ 27 ειδών ιχθύων, για τα οποία έγιναν 3 βιολογικές επαναλήψεις στο ίδιο αλίευμα και 2 επαναλήψεις ανά άτομο. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε Πήγμα Πολυακρυλαμιδίου Υπό Μετουσιωτικές Συνθήκες (SDS PAGE) 20%, ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά και ανοσοανίχνευση με χρήση των ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων PARV – 19. Ανιχνεύθηκαν περισσότερες από 5 ισομορφές μοριακού βάρους 7–17 kDa, ενώ συνολικά ανιχνεύθηκαν 8 ζώνες από την ανάλυση κατά Western. Βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις επαλήθευσαν το πρότυπο ζωνών παρβαλβουμινών που δείχνει να είναι σταθερό και χαρακτηριστικό για κάθε είδος.

Σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των ειδών, παρουσιάστηκε μια επιπλέον ζώνη στην περιοχή των 46 kDa. Τα 15 είδη ανήκαν στην τάξη Perciformes, 6 από τα οποία ταξινομούνται στην οικογένεια Sparidae. Η στατιστική ανάλυση PCA έδειξε ομαδοποίηση των παρατηρούμενων ισομορφών σε σύνολα που ανήκουν στην ίδια τάξη ή και οικογένεια, όπως στην περίπτωση των συγγενικών *Diplodus sargus sargus* (σαργός), *Sarpa salpa* (σάλπα) και *Diplodus annularis* (σπάρος). Η σύγκριση αγρίων αλιευμάτων και καλλιεργούμενων ατόμων *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι) έδειξε ότι το πρότυπο των ισομορφών των παρβαλβουμινών παραμένει σταθερό μεταξύ αγρίων και εκτρεφόμενων ατόμων του ίδιου είδους. Ομοίως, δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση του προτύπου μεταξύ αγρίων και εκτρεφόμενων για το *Sparus aurata* (τσιπούρα). Τα 2 εκ των 27 ειδών ανήκαν στους Χονδριχθύες (Chondrichthyes), ενώ τα υπόλοιπα 25 στους Οστεϊχθύες (Osteichthyes) οι οποίοι καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο τμήμα των εμπορικών βρώσιμων ιχθύων της ελληνικής αγοράς. Οι

Χονδριχθίες δεν παρουσίασαν ζώνες στην περιοχή 7 – 17 kDa. Το είδος *Galeorhinus galeus* (γαλέος) δεν εμφάνισε καμία ζώνη. Το είδος *Raja radula* (βάτος) (Elasmobranchii) διαφοροποιήθηκε εμφανίζοντας 1 ζώνη στα 46 kDa. Τα 25 είδη (Actinopterygii) που μελετήθηκαν εμφάνιζαν τουλάχιστον 2 ισομορφές, με τουλάχιστον 1 ζώνη κάτω από τα 17 kDa.

Συμπερασματικά, η μέθοδος που αναπτύχθηκε έδωσε τη δυνατότητα ανίχνευσης νέων ισομορφών παραβαλβουμινών σε ολικά ομογενοποιημένα μυ ιχθύων, διακρίνοντας το πρότυπο παραγωγής τους από είδος σε είδος. Η μέθοδος ανιχνεύει ισομορφές σε ολικά αδρά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επιτρέποντας πιθανή εφαρμογή της για την ανίχνευση πιθανά αλλεργιογόνων παραβαλβουμινών σε ιχθυοπροϊόντα της ελληνικής και ευρωπαϊκής αγοράς.

## Abstract

---

Parvalbumins constitute a protein family with a molecular weight of 12–14 kDa. At least 3 isoforms have been detected (PV-I, PV-II, PV-III). Literature indicates parvalbumins as the main allergen in edible fish. Despite the globalized food distribution, food allergies are immune responses related to local food markets. There is a lack of information concerning parvalbumin isoforms' pattern of fish in Greece.

We investigated the existence and the ability to detect parvalbumins among different fish catches of Thermaikos' Gulf and Chalkidiki's fishing regions. For this research, crude protein extracts of homogenized white muscle from 27 biological species ran electrophoresis in 20% SDS PAGE gels. Immunodetection using the specific monoclonal antibodies PARV – 19, showed more than 5 isoforms with molecular weight between 7 – 17 kDa, when there were revealed 8 bands in total. Three biological replications were conducted based on the same catch and two replications for each sample confirming a stable isoform model for each species.

More than 80% of the species presented an extra protein band at around 46 kDa. In total, 15 species out of the 25 were classified in the Perciformes order, 6 of which were members of the same family (Sparidae). PCA analysis grouped our observations into sets of related species belonging in the same order or even the same family. The *Diplodus sargus sargus* (white seabream), *Sarpa salpa* (salema porgy) and *Diplodus annularis* (bream) form such an example, since they were classified in the same group. The comparison between wild and farmed *Dicentrarchus labrax* (seabass) fish showed that parvalbumin isoforms retain the same characteristic pattern. Likewise, wild and farmed *Sparus aurata* (gilt-head bream) fish revealed the same pattern. 2 out of the 27 biological species belong to the Chondrichthyes Class, while the remaining 25 belong to the Osteichthyes Class, which form the majority of edible fish with economical interest in Greece. Chondrichthyes did not reveal any bands between 7 – 17 kDa. *Galeorhinus galeus* (school – shark) did not show any band. *Raja radula* (rough – ray) (Elasmobranchii) only showed 1 protein band at 46 kDa, while the remaining 25 species (Actinopterygii) presented 2 or more isoforms, with at least 1 band below 17 kDa.

In summary, the developed procedure provided the possibility to detect new parvalbumin isoforms in whole protein extracts, indicating the different isoforms'

pattern from one species to another. The following procedure might detect parvalbumin isoforms in raw extracts of fish products of the Greek and the European market.

## Περιεχόμενα

---

### **Πίνακας Περιεχομένων**

Περίληψη .....	3
Abstract .....	5
Περιεχόμενα .....	7
Πρόλογος και Ευχαριστίες .....	9
1. Εισαγωγή .....	11
1.1 Το ανοσοβιολογικό σύστημα .....	11
1.2 Τι είναι αλλεργία; .....	13
1.3 Εντερική μικροχλωρίδα .....	14
1.4 Ανοσοαποκρίσεις και Ανοσοανοχή σε αντιγόνα στον εντερικό βλεννογόνο .....	16
1.5 Είσοδος των αλλεργιογόνων διαμέσου της στοματοφαρυγγικής οδού .....	19
1.6 Τα κυρίαρχα αλλεργιογόνα στα τρόφιμα .....	22
1.7 Τι είναι τρόφιμο; .....	23
1.8 Κίνδυνοι τροφίμων – Νομοθεσία ελέγχου διασφάλισης ποιότητας .....	24
1.9 Διάκριση τροφίμων ως προς την ασφάλεια και ως προς την ορθή σήμανση .....	26
1.10 Χημικοί κίνδυνοι – Αλλεργιογόνα σε τρόφιμα .....	26
1.11 Άγρια και εκτρεφόμενα είδη εδώδιμων εμπορικών ιχθύων στην Ελλάδα ..	27
1.12 Αλλεργιογόνα στα ψάρια .....	29
1.13 Παρβαλβουμίνες .....	31
1.14 Διάγνωση αλλεργίας σε καταναλωτή .....	31
1.15 Απομόνωση και ταυτοποίηση παρβαλβουμινών .....	32
1.16 Ψηφιακός τύπος «Allergome» .....	34
2 Σκοπός εργασίας .....	35
3 Υλικά και Μέθοδοι .....	36
3.1 Λήψη Δειγμάτων – Διαδικασία ομογενοποίησης .....	36
3.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης .....	38
3.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πήγμα πολυακρυλαμίδιου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE) σύμφωνα με το Μοριακό Βάρος .....	39
3.4 Ηλεκτρομεταφορά (Wet Transfer) .....	40
3.5 Ανοσοαπότυπωση κατά Western .....	40
3.6 Ηλεκτροφόρηση σε δύο διαστάσεις 2D SDS PAGE 20% .....	41
3.7 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων .....	42

4	Αποτελέσματα .....	43
4.1	Συστηματική ταξινόμηση των υπό διερεύνηση βιολογικών ειδών.....	43
4.2	Τεχνικές επαναλήψεις.....	45
4.3	Σύγκριση αγρίου αλιεύματος και εκτρεφόμενου για τα είδη <i>Sparus aurata</i> και <i>Dicentrarchus labrax</i> .....	45
4.4	Βιολογικές επαναλήψεις.....	46
4.5	Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης <i>Chelidonichtys lucerna</i> σε 2D SDS PAGE.....	48
4.6	Αναγνώριση διαφορετικών ισομορφών .....	49
4.7	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA).....	55
5	Συζήτηση.....	60
6	Βιβλιογραφία.....	65
6.1	Διεθνής Βιβλιογραφία στην αγγλική γλώσσα.....	65
6.2	Βιβλιογραφία στην ελληνική γλώσσα.....	70
7	Παράρτημα .....	71
7.1	Πρωτόκολλο παρασκευής ρυθμιστικών διαλυμάτων ομογενοποίησης.....	71
7.2	Πρωτόκολλο κατασκευής πρότυπης καμπύλης κατά Bradford .....	71
7.3	Πρωτόκολλο παρασκευής πήγμα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE) .....	72
7.4	Πρωτόκολλο παρασκευής ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer).....	72
7.5	Πρωτόκολλο παρασκευής DAB.....	72
7.6	Φωτογραφικό υλικό δειγμάτων ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα .....	77



## Πρόλογος και Ευχαριστίες

---

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια του τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κατά την περίοδο Ιουνίου 2015 – Ιουνίου 2016, και αποτελεί διπλωματική μεταπτυχιακή εργασία του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο «Εφαρμογές της Βιολογίας» και, συγκεκριμένα, της κατεύθυνσης «Βιοτεχνολογία – Μοριακή και Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων και Προϊόντων». Το πειράματα διεξήχθησαν στο εργαστήριο Ανοσοβιολογίας του Τομέα Γενετικής – Ανάπτυξης – Μοριακής Βιολογίας, το οποίο τελεί υπό την επίβλεψη του καθηγητή κυρίου Μηνά Γιάγκου. Την παρούσα διπλωματική συνεπέβλεπαν ο καθηγητής κύριος Μηνάς Γιάγκου και η επίκουρη καθηγήτρια κυρία Ευθυμία Αντωνοπούλου.

Το προσωπικό ενδιαφέρον για τα αλλεργιογόνα μόρια σε τρόφιμα προήλθε έπειτα από προσωπική ενασχόληση με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία και τις απαιτήσεις που απορρέουν από αυτή αναφορικά με τη διασφάλιση της καταλληλότητας και της ποιότητας των τροφίμων που διακινούνται εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Αναζητώντας πληροφορίες σχετικά με τα αλλεργιογόνα σε ιχθύες και προϊόντα αυτών, φάνηκε ότι ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός (Ε.Ε.) με αριθμό 1169/2011 δεν παρέχει την απαραίτητη επιστημονική πληροφόρηση σχετικά με το ποια ακριβώς είναι εκείνα τα χημικά/βιολογικά μόρια τα οποία προκαλούν αλλεργίες ή/και δυσανεξίες. Με εκτενέστερη αναζήτηση στη διεθνή βιβλιογραφία βρέθηκε το κατάλληλο επιστημονικό υπόβαθρο για να στηθούν και να εφαρμοστούν τα πρωτόκολλα απομόνωσης και ανίχνευσης των κύριων αλλεργιογόνων μορίων στα ιχθυοπροϊόντα που είναι οι παρβαλβουμίνες. Η απουσία επαρκών επιστημονικών δεδομένων που να αφορούν σε ελληνικά και μεσογειακά αλιεύματα, αλλά και το μειωμένο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα αλλεργιογόνα που ανευρίσκονται σε ιχθύες, αλλά και σε άλλες ομάδες τροφίμων που αναφέρονται ως πιθανά αλλεργιογόνα, οδήγησε στην πρωτοβουλία ενασχόλησης με την παρούσα θεματολογία.

Όλες οι δειγματοληψίες αφορούν σε σημεία αλιείας της Βόρειας Ελλάδας και, ειδικότερα, του Θερμαϊκού Κόλπου και της περιοχής της Χαλκιδικής. Τα δείγματα παραλήφθηκαν από ντόπιους ψαράδες της περιοχής της Επανομής και της Χαλάστρας, που διασφάλισαν την ιχνηλασιμότητα των ιχθύων.

Η εκπόνηση της εργασίας δε θα μπορούσε να έχει συμβεί χωρίς την επίβλεψη και τη βοήθεια που δόθηκε από τους επιβλέποντες καθηγητές, καθηγητή κύριο Μηνά Γιάγκου και επίκουρη καθηγήτρια κυρία Ευθυμία Αντωνοπούλου. Η συμβολή του κυρίου Γιάγκου και της κυρίας Αντωνοπούλου στην οργάνωση και εκτέλεση των πειραμάτων, καθώς βέβαια και στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων και στη συγγραφή του κειμένου της παρούσας εργασίας, υπήρξε καθοριστικής σημασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κύριο Μηνά Αρσενάκη για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική μου επιτροπή.

Χωρίς την αδιάκοπη ηθική, αλλά και οικονομική, στήριξη της οικογένειάς μου η συμμετοχή μου στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Βιολογίας θα ήταν μάλλον ανέφικτη. Καταληκτικά, θα ήθελα να αποδώσω ευχαριστίες από καρδιάς στην Επιτροπή Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Βιολογίας η οποία με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, στους επιβλέποντες την εργασία μου καθηγητές, στον καθηγητή κύριο Μιχαηλίδη που μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω χώρο του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζώων, στους γονείς μου και στον αδερφό μου, καθώς επίσης και στους ανθρώπους που από το φιλικό μου περιβάλλον στάθηκαν υποστηρικτές των προσπαθειών μου.

## 1. Εισαγωγή

---

### 1.1 Το ανοσοβιολογικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό ή ανοσοβιολογικό σύστημα αποτελεί ένα σύνολο μηχανισμών που διασφαλίζει ότι όλες οι απαραίτητες βιολογικές διαδικασίες θα τελούνται χωρίς να διαταράσσονται από εξωγενείς παράγοντες οι οποίοι πιθανά να απειλήσουν την υγεία και τελικά, την επιβίωση του οργανισμού. Παραδείγματα μηχανισμών ομοιόστασης του ανθρώπινου σώματος αποτελούν η διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος σταθερής στους 36,6 °C , καθώς επίσης και η ύπαρξη σταθερού pH στα βιολογικά υγρά του σώματος. Ανοσία καλείται το «*σύνολο των φυσιολογικών μηχανισμών που παρέχουν στο ζώο τη δυνατότητα να αναγνωρίζει διάφορες ουσίες σαν ξένες προς τον εαυτό του και να αποκρίνεται προσπαθώντας να τις εξουδετερώσει ή να τις καταστρέψει*» (Χατζηπέτρου – Κουρουνάκη 1987).

Το ανοσοποιητικό σύστημα εξυπηρετεί τρεις μεγάλες βιολογικές λειτουργίες, οι οποίες είναι η άμυνα, η ομοιόσταση και η επιτήρηση. Η λειτουργία της άμυνας αφορά στην αντιμετώπιση τυχόν εισβολικών παθογόνων κυττάρων. Η ομοιόσταση αποτελεί απαραίτητη λειτουργία για τη διατήρηση της φυσιολογικής κατάστασης ενός ορισμένου τύπου κυττάρων, και σε χάρη σε αυτή τελούνται διεργασίες φυσιολογικής απομάκρυνσης καταστραμμένων κυτταρικών στοιχείων μετά από τραυματισμό. Η επιτήρηση αποτελεί λειτουργία αναγνώρισης μεταλλαγμένων κυτταρικών τύπων έπειτα από επίδραση ιών ή χημικών ουσιών στο σώμα (Brodsky & Guagliardi 1991, Guermonprez et al. 2002).

Παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα αντίστασης του ξενιστή αποτελούν η φυλή, η ηλικία, η διατροφή, τυχόν ανωμαλία σε έκκριση ορμονών, η θερμοκρασία, η λήψη φαρμάκων. Η αντίσταση ενός ατόμου, ο οποίος συχνά στη βιβλιογραφία μπορεί να αναφέρεται ως «ξενιστής» καθώς αποτελεί ένα περιβάλλον πρόσφορο για πολλούς δυνητικά παθογόνους – παθογόνους αλλά και ωφέλιμους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς, στηρίζεται σε «μη ειδικούς» και «ειδικούς» μηχανισμούς (Brodsky & Guagliardi 1991).

Η «μη ειδική» αντίσταση είναι έμφυτη και επίκτητη. Ενδεικτικοί μηχανισμοί «μη ειδικής» αντίστασης που παρουσιάζεται έμφυτα στο ανθρώπινο σώμα είναι το δέρμα, οι βλεννογόνοι του σώματος, η ύπαρξη γαλακτικού και λιπαρών οξέων, το κροσσωτό επιθήλιο στη ρινική κοιλότητα, η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης από τα

μακροφάγα, καθώς και βακτηριοκτόνοι παράγοντες του ορού αίματος όπως η προπερδίνη – το συμπλήρωμα – η c αντιδρώσα πρωτεΐνη. «Μη ειδικόι» επίκτητοι «μαχητές» του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν τα φυσικά αντισώματα που υπάρχουν στον ορό των φυσιολογικών ατόμων ως απόκριση του οργανισμού σε βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας κατά την εμβρυακή ή νεογεννητική περίοδο, και η ειδική αντι-ιική πρωτεΐνη ιντερφερόνη που παράγεται από λεμφοκύτταρα ή μακροφάγα κύτταρα μετά από μόλυνση με ιό (Brodsky & Guagliardi 1991, Guermonprez et al. 2002).

Η «ειδική» αντίσταση προϋποθέτει την παράκαμψη όλων των προαναφερθέντων «μη ειδικών» φραγμών από παθογόνους μικροοργανισμούς, και αποτελεί ένα δεύτερο επίπεδο άμυνας που επιφέρει την «ανοσοβιολογική απόκριση» (Brodsky & Guagliardi 1991, Guermonprez et al. 2002). Η «ανοσοβιολογική απόκριση» αποτελεί αντίδραση του ξενιστή σε ουσίες που αντιμετωπίζονται ως ξένες, ανεξάρτητα από το εάν αυτές είναι βλαβερές ή όχι. Η «ειδική» αντίσταση χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση, ετερογένεια και μνήμη. «Εξειδίκευση» φέρει καθώς τα προϊόντα της ανοσοβιολογικής απόκρισης αντιδρούν αποκλειστικά με το υλικό που προκάλεσε την απόκριση. Η «Ετερογένεια» αφορά στην ποικιλία των διαφορετικών προϊόντων απόκρισης που εξαρτώνται από τη διαφορετική φύση του αντιγόνου, δηλαδή της ξένης ουσίας. «Μνήμη» είναι η ικανότητα του οργανισμού να «θυμάται» αντιγόνα με τα οποία έχει έρθει σε επαφή σε παλαιότερο χρόνο και να τα αντιμετωπίζει γρηγορότερα και εντονότερα (Guermonprez et al. 2002).

Η «ειδική» αντίσταση περιλαμβάνει τη χυμική και την κυτταρική ανοσία. Τα αντισώματα αποτελούν προϊόντα του λεμφικού ιστού που μπορούν να παραμένουν συνδεδεμένα με λεμφοκύτταρα ή να εκκρίνονται σαν εξωκυτταρικά προϊόντα. Τα αντισώματα φέρουν την ικανότητα να αντιδρούν μόνο με τα αντιγόνα που προκάλεσαν το σχηματισμό τους. Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες, γ-σφαιρίνες, οι οποίες διακρίνονται στις εξής πέντε (5) ομάδες, IgA, IgM, IgG, IgE και IgD (Brodsky & Guagliardi 1991, Guermonprez et al. 2002). Τα αντισώματα έχουν την ικανότητα σύνδεσης με τα αντίστοιχά τους αντιγόνα. Αν τα αντιγόνα παραμείνουν συνδεδεμένα σε κυτταρική επιφάνεια, τότε τα αντισώματα μπορούν να προκαλέσουν κυτταρόλυση, ενώ αν συμβεί πολλαπλή σύνδεση αντισωμάτων – αντιγόνων ακολουθεί συγκόλληση ή φαγοκυττάρωση. Στους ιστούς όπου διεξάγεται χυμική

ανοσία επιτελείται διαφοροποίηση Β-λεμφοκυττάρων. Οι ιστοί που πραγματοποιούν χυμική απόκριση προέρχονται από εμβρυολογικά θυμο-ανεξάρτητο ιστό, γαστρο-συνδεδεμένο λεμφικό ιστό, ο οποίος φαίνεται να περιλαμβάνει τις πλάκες του Peyer στον εντερικό αυλό (Brodsky & Guagliardi 1991, Guermonprez et al. 2002). Κυτταρική ανοσία είναι μια απόκριση με κύτταρα, η οποία αναφέρεται και ως «Υπερευαισθησία καθυστερημένου τύπου (Delayed Hypersensitivity)». Ο μηχανισμός αυτός καθοδηγείται από το θύμο αδένα μέσω του θυμοεξαρτώμενου λεμφικού ιστού.

## 1.2 Τι είναι αλλεργία;

Οι αλλεργίες είναι καταστάσεις υπερευαισθησίας του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τις οποίες επάγονται ανοσοαποκρίσεις σε διάφορους ιστούς. Κατά την αλλεργική αντίδραση ενός οργανισμού προκαλούνται αλλεργικά συμπτώματα διαφορετικής έντασης που εξαρτώνται από την ευαισθησία του ίδιου του ατόμου, την ηλικία του, την πιθανή ανοσοκαταστολή που το χαρακτηρίζει. Η ένταση των αντιδράσεων εξαρτάται ακόμη από τη δόση του αλλεργιογόνου που έλαβε το αλλεργικό άτομο, από τη δράση του αντιγόνου μέσα στον οργανισμό του προσβληθέντος, και από την ανθεκτικότητά του σε φυσικές βιολογικές διαδικασίες, όπως εκείνη της πέψης της τροφής στο στομάχο. Συνηθέστερα, τα συμπτώματα αλλεργίας αφορούν σε δερματικά εκζέματα, σε προσβολή του αναπνευστικού συστήματος που μπορεί να καταλήξει ακόμα και σε απόφραξη των αναπνευστικών πόρων, σε απορρόφηση των αντιγόνων από το επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα και ευαισθητοποίησή του. Καθοριστικής σημασίας για τα συμπτώματα που θα προκληθούν και τις αντιδράσεις που θα προκύψουν είναι η οδός εισόδου της αλλεργιογόνου ουσίας. Οδοί εισόδου αλλεργιογόνων στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελούν η αναπνευστική οδός, ασυνέχειες στη στιβάδα του δέρματος, καθώς επίσης και η στοματοφαρυγγική οδός η οποία αποτελεί την πύλη εισόδου των αλλεργιογόνων των τροφών.

Πολλοί άνθρωποι εμφανίζουν τέτοια συμπτώματα μετά την επαφή με περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως γύρη, ή και μετά τη λήψη φαρμάκων ή την κατανάλωση τροφίμων. Οι χημικές ουσίες που προκαλούν αλλεργίες καλούνται αλλεργιογόνα. Μερικά άτομα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε βαθμό που μεγάλη πρόσληψη αλλεργιογόνων στον οργανισμό τους να συνδέεται με καταστάσεις οξέων αλλεργικών σοκ ή αναφυλαξίας. Όσον αφορά στις τροφιμογενείς αλλεργίες, αυτές

φαίνεται να διαφοροποιούνται στον πληθυσμό ανάλογα με τις εκάστοτε διατροφικές συνήθειες, την παράλληλη λήψη διαφορετικών ειδών τροφίμων στο ίδιο γεύμα – όπως ψάρια και τυροκομικά προϊόντα, τη λήψη φαρμάκων, ακόμη και το ατομικό μικροβίωμα. Έρευνες δείχνουν ότι κάποιες ομάδες στελεχών συμβιωτικών βακτηρίων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ή όχι ευαισθησίας απέναντι σε δυνητικά αλλεργιογόνες πρωτεΐνες κάποιων τροφίμων, όπως το Ara h 2 του φυσιολογικού *Arachis hypogaea* (Cao et al. 2014).

Η αλλαγή διατροφικών συνηθειών, ο τρόπος γέννησης ενός εμβρύου (με φυσιολογικό τοκετό ή με καισαρική τομή), η έντονη λήψη αντιβιοτικών, όπως triclosan κατά την παιδική ηλικία, καθώς και η έντονη λήψη αντιβιοτικών κατά την κύηση από τη μητέρα οδηγούν σε αύξηση αλλεργικών ατόμων στο Δυτικό κόσμο. Έρευνες δείχνουν ότι τα συμβιωτικά βακτήρια που βρίσκονται εγκατεστημένα στο εντερικό επιθήλιο εμποδίζουν την ευαισθησία σε αλλεργιογόνα, όπως το Ara h 2, αυξάνοντας τη διαφοροποίηση των Foxp3+ Treg (T regulative λεμφοκύτταρα) και την έκκριση ανοσοσφαιρίνης A (IgA), και ρυθμίζοντας το ρυθμό πρόσληψης αλλεργιογόνων στην κυκλοφορία του αίματος από επαγόμενη από βακτήρια παραγωγή IL-22 (Cao et al. 2014, Makarova et al. 2006, Sears 2005, Steinhoff 2005).

### 1.3 Εντερική μικροχλωρίδα

Η αύξηση των καταγεγραμμένων περιπτώσεων αλλεργικών περιστατικών σε τρόφιμα είναι ένα φαινόμενο που προκαλεί ανησυχία. Η εκπόνηση μελετών σχετικά με τους μικροοργανισμούς που συμβιών στο έντερο και το ρόλο που έχουν στο έντερο των θηλαστικών, ίσως βοηθήσει στην ερμηνεία του φαινομένου και την εύρεση πιθανών θεραπευτικών στόχων. Η ανάγκη αυτή αποτυπώνεται πλέον σε παγκόσμια ερευνητικά προγράμματα, όπως το Human Microbiome Project, το οποίο στοχεύει στη χαρτογράφηση του ανθρώπινου μικροβιώματος και στην αποκρυπτογράφηση του ρόλου των συμβιωτικών μικροοργανισμών στον ανθρώπινο οργανισμό (Human Microbiome Project). Ήδη 778 πακέτα δεδομένων, τα οποία βρίσκονται υπό επεξεργασία στα πλαίσια του HMP, αφορούν μόνο σε γονιδιώματα σχετικά με το γαστρεντερικό αυλό. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τα σχόλια που διατυπώνονται σε σχετικές εργασίες, η διάκριση πρωτεϊνών τροφίμων, οι οποίες δυνητικά προκαλούν αλλεργίες από εκείνες που δεν αποτελούν κίνδυνο για την υγεία, αποτελεί μια σύγχρονη πρόκληση.

Το ανθρώπινο σώμα φιλοξενεί περισσότερα από 100 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμούς στο έντερο (Björkstén et al. 2001, Guarner & Malagelada 2003, Savage 1977, Sears 2005, Steinhoff 2005). Μεταξύ των οργανισμών που φυσιολογικά φιλοξενούνται στο ανθρώπινο έντερο βρίσκονται βακτήρια, τα οποία αποτελούν περίπου το 60% του συνόλου της εντερικής μικροχλωρίδας. Στο έντερο διαβιούν μύκητες, πρωτόζωα και αρχαία, ο ρόλος τους ωστόσο παραμένει άγνωστος (Beaugerie & Petit 2004). Οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι διαβιούν στο ανθρώπινο έντερο και δεν προκαλούν φλεγμονές, αποτελούν τη φυσιολογική, ωφέλιμη, μικροχλωρίδα του εντέρου (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Κατανομή μερικών από τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται φυσιολογικά ανθρώπινο έντερο (τροποποιημένο από το «The Missing Human Manual» - Gut Flora)

Figure 1. Distribution of the human gastrointestinal microflora (modified – «The Missing Human Manual» - Gut Flora)

Οι αλλαγές του περιεχομένου της διατροφής, ιδίως στο Δυτικό Κόσμο, προκαλούν μεταβολές στη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου, κάτι που μάλλον σχετίζεται με την πρόκληση αλλεργικών περιστατικών. Υποστηρίζεται ότι οι χρήσιμοι μικροοργανισμοί προσφέρουν περισσότερα γονίδια που εκφράζονται σε χρήσιμα βιομόρια για τον άνθρωπο από ότι εκείνα που διαθέτει το ανθρώπινο γονιδίωμα (O'Hara & Shanahan 2006).

Η εντερική μικροχλωρίδα συμβάλλει σε διαδικασίες, όπως η πέψη των τροφών (Sears 2005). Οι χρήσιμοι, για τα θηλαστικά, εντερικοί μικροοργανισμοί συμβάλλουν στον καταβολισμό άπεπτων υδατανθράκων και στην απορρόφηση

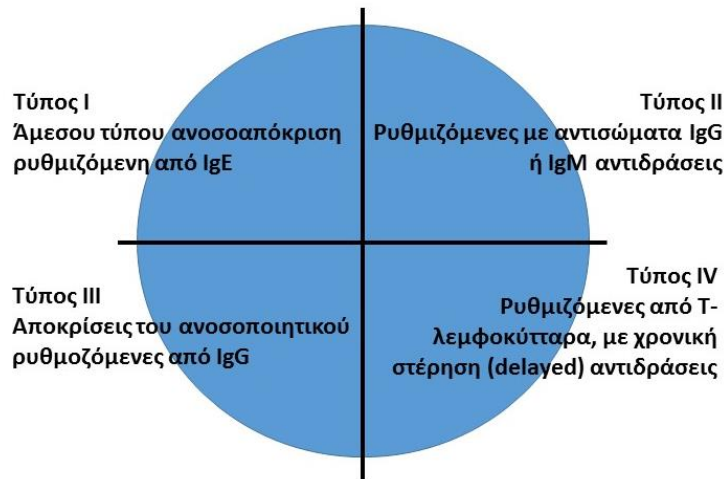
λιπαρών οξέων (Short – Chain Fatty Acid SCFA). Από αυτά τα λιπαρά οξέα, το βουτυρικό μεταβολίζεται στο κόλον, το προπιονικό στο ήπαρ, και το ακετονικό στο μυϊκό ιστό. Οι εντερικοί προκαρυωτικοί συμβιωτικοί μικροοργανισμοί συμβάλλουν στη σύνθεση Βιταμίνης Β, στερολών και ξενοβιοτικών ουσιών (Cummings & MacFarlane 1997). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι μικροοργανισμοί επιδρούν στα αντιγόνα των τροφίμων δεν είναι πλήρως γνωστοί. Φαίνεται ότι οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί συνεισφέρουν όχι μόνο στον καταβολισμό των τροφών και την παραγωγή χρήσιμων ουσιών, όπως η βιταμίνη Κ και βιοτίνη, αλλά και στην προστασία του λεπτού εντέρου από την πρόκληση αλλεργικών αντιδράσεων σε μόρια δυνητικά αλλεργιογόνα (Baltasar & VanSinderen 2010, Cummings & McFarlane 1997, O' Hara & Shanahan 2006, Savage 1977).

Έχει βρεθεί ότι ένα στέλεχος αναερόβιων συμβιωτικών βακτηρίων, το οποίο σχετίζεται με το βλεννογόνο, προφυλάσσει από αλλεργίες ενεργοποιώντας ένα μονοπάτι εξαρτώμενο από την ιντερλευκίνη IL-22, περιορίζοντας την είσοδο των αντιγόνων στην κυκλοφορία του αίματος (Cao et al. 2014). Επάγεται η διαφοροποίηση Foxp3+ Treg κυττάρων και τελικά αποκτάται ανοσία σε αλλεργιογόνα τροφίμων καθώς δεν ενεργοποιούνται μηχανισμοί αλλεργικής απόκρισης. Τα Treg κύτταρα αποτελούν μια ομάδα Τ λεμφοκυττάρων που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα δημιουργώντας ανοσία σε αντιγόνα του ίδιου του ατόμου (self-antigens) και αποτρέπουν αυτοάνοσες ασθένειες. Βακτηριακοί μεταβολίτες, όπως λιπαρά οξέα, επάγουν τη διαφοροποίηση των Foxp3+ Treg κυττάρων.

#### 1.4 Ανοσοαποκρίσεις και Ανοσοανοχή σε αντιγόνα στον εντερικό βλεννογόνο

Η αλλεργία αποτελεί μία από τις τέσσερις μορφές εμφάνισης υπερευαισθησίας (Εικόνα 2). Κατά την εκδήλωση αλλεργίας συμβαίνει άμεσου τύπου αντίδραση υπερευαισθησίας ή ανοσοαντίδραση τύπου Ι (Type Ι hypersensitivity) η οποία αποτελεί ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίον ακίνδυνων ουσιών. Η επαγωγή ανοσοαντίδρασης τύπου Ι προϋποθέτει την προηγούμενη έκθεση του ανοσοποιητικού συστήματος στο υπεύθυνο για τη νόσο αλλεργιογόνο, η οποία προκαλεί την παραγωγή ειδικών ανοσοσφαιρινών IgE.

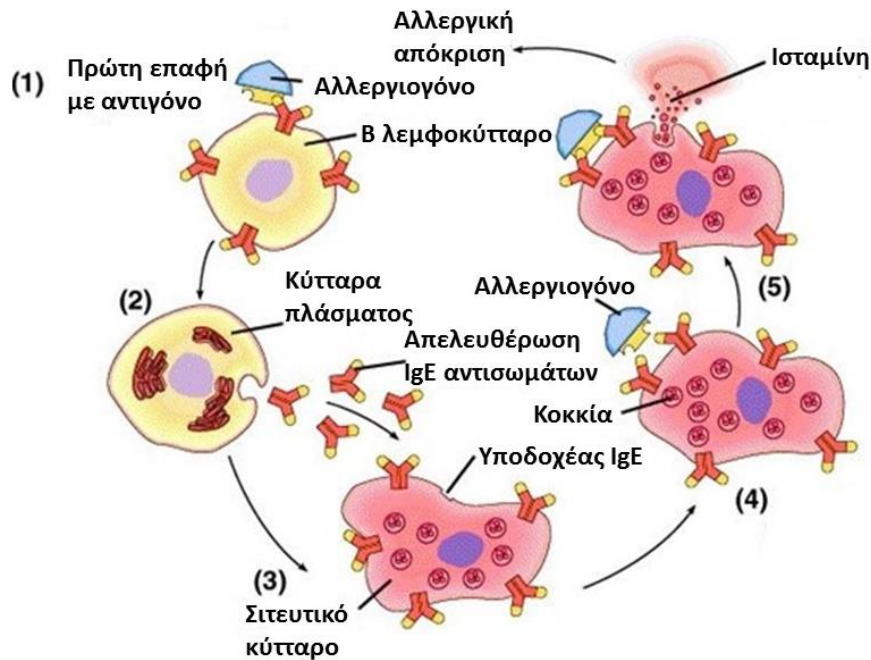




Εικόνα 2. Οι βασικοί τέσσερεις τύποι υπερευαισθησίας στα θηλαστικά

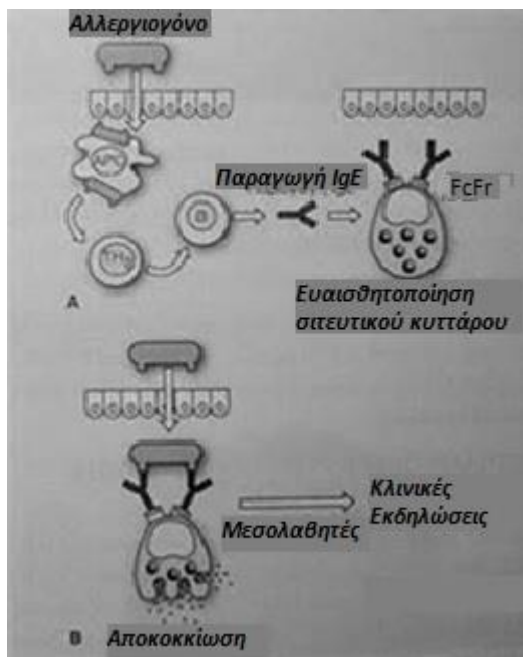
Figure 2. Four basic hypersensitivity types in mammals

Τα σιτευτικά κύτταρα είναι κύτταρα τα οποία κατανέμονται ευρέως στους ιστούς των θηλαστικών. Αυτά παρουσιάζουν αντιγόνα επιφανείας κοινά με τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Παραμένουν μόνιμα στους ιστούς σε αντίθεση με τα βασεόφιλα που μετακινούνται σε περιοχές φλεγμονής. Σχηματικά, οι διαδικασίες που τελούνται κατά την εκδήλωση αλλεργίας παρουσιάζονται ακόλουθα (Εικόνα 3). Κατά τη διαδικασία της ευαισθητοποίησης, οι ανοσοσφαιρίνες IgE καθλώνονται με τη βοήθεια μορίων – υποδοχέων στην επιφάνεια σιτευτικών κυττάρων και βασεόφιλων λευκοκυττάρων παραμένοντας σε κατάσταση ετοιμότητας (Μάργαρης 2012). Σε επόμενη έκθεση του οργανισμού στο ίδιο αλλεργιογόνο μόριο, το αλλεργιογόνο συνδέει δύο μόρια ειδικής για αυτό IgE και προκαλεί την αποκοκκίωση σιτευτικών κοκκιοκυττάρων και την απελευθέρωση μεσολαβητών αλλεργικής αντίδρασης, οι οποίοι αποτελούν βιολογικά δραστικές ουσίες που προκαλούν την εμφάνιση αλλεργικών συμπτωμάτων (Εικόνα 4) (Μάργαρης 2012). Η κύρια διαταραχή του αλλεργικού ατόμου οφείλεται στην παραγωγή εξειδικευμένων ανοσοσφαιρινών IgE οι οποίες στοχεύουν ακίνδυνες για άλλους οργανισμούς ουσίες που αντιμετωπίζονται ως ξένες.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της εισόδου ενός αλλεργιογόνου στον οργανισμό. Το αλλεργιογόνο προσδένεται στα Β λεμφοκύτταρα. Ακολουθεί παραγωγή IgE αντισωμάτων. Σιτευτικά κύτταρα συγκεντρώνονται στην περιοχή της φλεγμονής, συνδέονται με τα IgE και έρχονται σε επαφή με το αλλεργιογόνο. Παράγεται και απελευθερώνεται ισταμίνη. (τροποποιημένο από Lewis 1998)

Figure 3. Allergen entrance in organism. The allergen binds on B – cells causing IgE production. Mast cells are collected around the inflammatory region binding with IgE antibodies that carry the antigen. Histamine molecules are produced and released (modified – Lewis 1998)



Εικόνα 4. Μηχανισμός ανοσοαντίδρασης τύπου I (Μάργαρης 2012)

Figure 4. Hypersensitivity reaction Type I (Μάργαρης 2012)

Η παραγωγή IgE καθοδηγείται κυρίως από δύο κυτοκίνες, την Ιντερλευκίνη IL-4 που παράγεται από Th-2 βοηθητικά λεμφοκύτταρα και επάγει τη σύνθεσή της, και τον παράγοντα IFN-γ που παράγεται από Th-1 λεμφοκύτταρα. Ο IFN-γ έχει

ανασταλτική δράση. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε τους επιστήμονες στην υπόθεση ότι η αλλεργική νόσος πιθανά να οφείλεται σε διαταραχή της κατανομής ή της δραστηριότητας των Th-2 έναντι των Th-1 λεμφοκυττάρων (Μάργαρης 2012). Σε μια αλλεργική νόσο φαίνεται να εμπλέκονται πολλοί τύποι κυττάρων άμεσα ή έμμεσα.

Τα Τ βοηθητικά κύτταρα ή T4 κύτταρα ή CD4+ Τ λεμφοκύτταρα αποτελούν λευκά αιμοσφαίρια που παρουσιάζουν τη CD4 γλυκοπρωτεΐνη που απαντάται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων (Dendritic Cells DC). Αυτά συμβάλλουν στην ενεργοποίηση άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού, όπως τα CD8 κύτταρα, σε μια κατάσταση φλεγμονής.

Οι κυτοκίνες αποτελούν μια κατηγορία μικρών πρωτεϊνών, με μοριακό βάρος 5 – 20 kDa με σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση. Απελευθερώνονται από κύτταρα και επιδρούν στη συμπεριφορά άλλων κυττάρων. Οι κυτοκίνες περιλαμβάνουν τη χυμοκίνες, ιντερφερόνες, ιντερλευκίνες, λεμφοκίνες, TNF, αλλά όχι ορμόνες και αναπτυξιακούς παράγοντες. Οι κυτοκίνες παράγονται από μακροφάγα, Β λεμφοκύτταρα, Τ λεμφοκύτταρα, σιτευτικά κύτταρα, ινοβλάστες και ενδοθηλιακά κύτταρα. Συμπεριφέρονται σαν υποδοχείς, και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα καθώς ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ χυμικής απόκρισης και κυτταρικής απόκρισης. Επίσης, ρυθμίζουν την αύξηση και διαφοροποίηση κάποιων κυτταρικών πληθυσμών. Διαφοροποιούνται από την κυτταρική ρύθμιση που ασκούν οι ορμόνες καθώς εμφανίζουν μικρότερη εξειδίκευση στα είδη κυττάρων που στοχεύουν. Οι κυτοκίνες είναι σημαντικές για τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού.

#### 1.5 Είσοδος των αλλεργιογόνων διαμέσου της στοματοφαρυγγικής οδού

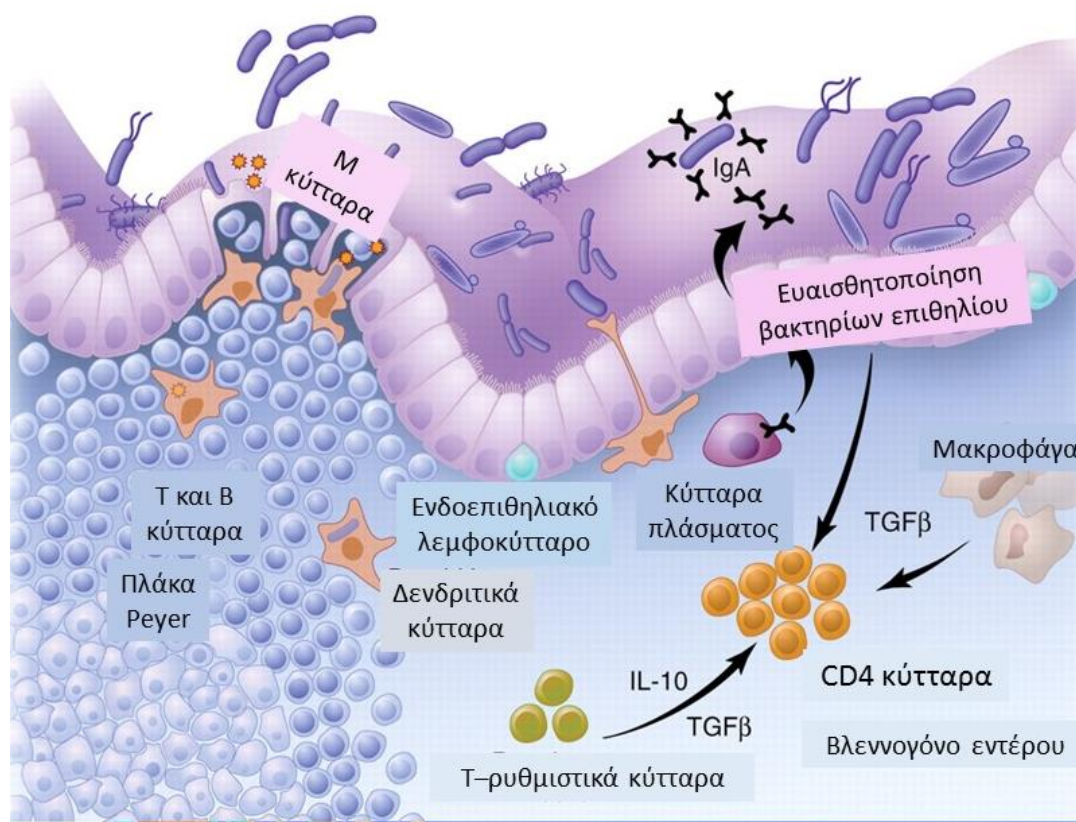
Τα αλλεργιογόνα των τροφών εισέρχονται στον οργανισμό διαμέσου της στοματοφαρυγγικής οδού ακολουθώντας τη μονόδρομη διαδρομή των μεριδίων τροφής από το στόμα διαμέσου του φάρυγγα κατά μήκος του γαστρεντερικού αυλού. Δεδομένου ότι ακολουθείται η ισχυρή διαδικασία της πέψης των συστατικών της τροφής στο στόμαχο, ανθεκτικά βιομόρια, όπως πρωτεΐνες, ή θραύσματα αυτών με δραστικές περιοχές που τυχόν ανευρίσκονται σε δυνητικά αλλεργιογόνες τροφές διέρχονται στο λεπτό έντερο από όπου και μπορεί να απορροφηθούν και να αντιμετωπιστούν ως αντιγόνα. Στο λεπτό έντερο τα GAP (Goblet Associated Cells) συμβάλλουν στην πρόσληψη και πέψη αντιγόνων.

Τα αντιγόνα των τροφών μπορούν να εγκυστωθούν από εξειδικευμένα επιθηλιακά Μ κύτταρα που βρίσκονται κοντά στις πλάκες του Peyer (Microfold cells). Τα Μ κύτταρα δε διαθέτουν γλυκοκάλυκα όπως άλλα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, αλλά φέρουν μεγάλα κυστίδια στο κυτόπλασμα, τα οποία επιτρέπουν τη διακυτταρική μεταφορά αντιγόνων. Τα Μ κύτταρα έρχονται σε επαφή με τον εντερικό λεμφικό ιστό (Gut Associated Lymphoid Tissue GALT) όπου αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα APC (Antigen Presenting Cells) παρουσιάζουν τα αντιγόνα σε βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα. Τα Μ κύτταρα και τα Goblet κύτταρα που παράγουν βλεννώδεις εκκρίσεις στο επιθήλιο συμβάλλουν στην αντιμετώπιση των αντιγόνων. Τα Goblet κύτταρα (Goblet Cells) αποτελούν κωδωνοειδή επιθηλιακά κύτταρα που παράγουν μουκοπρωτεΐνες. Συνήθως ακολουθούν μεροκρινή έκκριση. Τα Goblet κύτταρα εμφανίζουν υποκυτταρικά πολικότητα, καθώς ο πυρήνας και τα οργανίδιά τους βρίσκονται προς τη βάση του κυττάρου. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζονται στο επιθήλιο των οργάνων, όπως στο εντερικό και το αναπνευστικό επιθήλιο. Συγκεκριμένα στο γαστρεντερικό σωλήνα βρίσκονται στο λεπτό και στο παχύ έντερο.

Η ομοίωση του οργανισμού, σε μη στρεσογόνες καταστάσεις, επιτρέπει τη διέλευση πρωτεϊνών, μεταβολιτών και προϊόντων μικροβίων. Σημαντικός είναι ο ρόλος και η δράση των κυτοκινών ειδικά σε περιπτώσεις φλεγμονής. Επίσης, οι νευρικές απολήξεις δενδριτικών κυττάρων DC στο λεπτό έντερο συμβάλλουν στο φιλτράρισμα των βιομορίων στις περιοχές αυτές που σχηματίζονται οι ισχυρές συνδέσεις στο επιθήλιο. Τα DC παρεμβάλλονται μεταξύ των εντεροκυττάρων (Εικόνα 5).

Τα Β λεμφοκύτταρα με τα αντισώματά τους συνεισφέρουν στην αύξηση της στοματοφαρυγγικής ανοχής. Η IgA είναι η πιο άφθονη ανοσοσφαιρίνη και απαντάται σε δύο μορφές, (α) μια μονομερική μορφή στη συστηματική κυκλοφορία, και (β) μια διμερική σε βλεννώδεις περιοχές. Η IgA βοηθά στην προστασία βλεννωδών περιοχών, όπως του εντερικού λεμφικού ιστού (Gut Associated Lymphoid Tissue GALT), επειδή προσδένεται σε αντιγόνα και τα παρεμποδίζει να διέλθουν το επιθήλιο. Το αντιγόνο διαπερνά το εντερικό επιθήλιο και εισέρχεται στον εντερικό λεμφικό ιστό, όπου δεσμεύεται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) και παρουσιάζεται για να προσελκύσει Τ λεμφοκύτταρα. Στη Στοματοφαρυγγική Ανοχή φαίνεται να εμπλέκονται δύο κυρίως ομάδες APC, τα δενδριτικά κύτταρα (DC) που

εκφράζουν CD11c και CD103, και μακροφάγα που εκφράζουν CD11b και CX3CR1. Τα DC CD11c και CD103 προκαλούν απόκριση του MHC II συστήματος, και ο υποδοχέας CCR7 επιτρέπει τη μετανάστευση στο Μεσεντέριο Λεμφικό Κόμβο (Μεσεντέριος Λεμφαδένας, Mesenteric Lymph Node MLN), και είναι υπεύθυνα για την πρόσληψη και καταβολισμό αντιγόνων. Τα DC ενεργοποιούν τα CD4+ Treg.



Εικόνα 5. Απεικόνιση τμήματος του λεπτού εντέρου. Κύτταρα του λεπτού εντέρου. Συμβιωτικοί μικροοργανισμοί στο εντερικό επιθήλιο. Ανοσολογική απόκριση (τροποποιημένο από Martin et al. 2013)

Figure 5. Mammalian gut. Upper intestine cells. Commensal bacteria in lamina propria. Sensitization and immunoreaction in the human gut. (modified – Martin et al 2013)

Ο παράγοντας TGF-β παράγεται από τα CD103+ DC που εκφράζουν υψηλά επίπεδα ενζύμων RALDH (RetinalAldehyde DeHydrogenase) και ALDH (ALdehyde DeHydrogenase). Σε συνθήκες ομοιόστασης, υψηλές συγκεντρώσεις TGF-β και ρετινοϊκού οξέος στο MLN προκαλούν τη δημιουργία ενός ανθεκτικού περιβάλλοντος που βοηθά στη διαφοροποίηση των Treg. Το ρετινοϊκό οξύ ενισχύει την TGF-β-εξαρτώμενη ρύθμιση του Foxp3, ρυθμίζοντας έτσι τη διαφοροποίηση των Treg. Απουσία βιταμίνης Α δεν παράγεται αρκετό ρετινοϊκό οξύ (RA), άρα δεν ενισχύεται η

TGF-εξαρτώμενη ρύθμιση Foxp3 συνεπώς δεν ανιχνεύονται αρκετά Treg κύτταρα (Cao et al. 2014).

Απουσία φλεγμονής, σε συνθήκες ομοιόστασης, τα CX3CR1 μακροφάγα δε μεταναστεύουν και δεν επάγουν έντονη διαφοροποίηση Treg κυττάρων. Παρόλα αυτά, απουσία CX3CR1 η πρόσληψη των αντιγόνων της τροφής και η εξάπλωση των T λεμφοκυττάρων μειώνεται προκαλώντας την εμφάνιση Καθυστερημένου Τύπου Υπερευαισθησίας DTH (Delayed Type Hypersensitivity reaction to antigen). Επίσης, τα CX3CR1 πρώτα ανιχνεύουν και προσδέονται σε αντιγόνα του επιθηλίου, και, στη συνέχεια, τα μεταφέρουν κύτταρο-κύτταρο σε CD103+ DC κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους μεταναστεύουν και επικοινωνούν με Treg κύτταρα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα CX3CR1 παράγουν IL-10 που επάγει τη διαφοροποίηση και εξάπλωση Foxp3+ Treg, τα οποία με τη σειρά τους επάγουν την παραγωγή CCR9 και α4β7 που καθοδηγούν τη μετανάστευση πίσω στο λεπτό έντερο. Απουσία Treg οι κυτοκίνες του MLN συνδέονται με Th2 – ρυθμιζόμενη διαφοροποίηση CD4+ T λεμφοκυττάρων παράγοντας IL-4, IL-13 και IL-5.

#### 1.6 Τα κυρίαρχα αλλεργιογόνα στα τρόφιμα

Για την προστασία του καταναλωτικού κοινού, η Ευρωπαϊκή Ένωση ύστερα από γνωμοδότηση της Ευρωπαϊκής Αρχής ελέγχου Ασφάλειας Τροφίμων (European Food Safety Authority E.F.S.A.) συνέταξε τον κανονισμό 1169/2011/EK στον οποίο αναγνωρίζονται οι εξής κυρίαρχες αλλεργιογόνες ομάδες τροφίμων (Πίνακας 1). Ο κανονισμός έχει τεθεί σε αυστηρή εφαρμογή από τις επιχειρήσεις παρασκευής τροφίμων χάρη στην ενημέρωση και τους τακτικούς ελέγχους των κατά τόπους αρμόδιων κρατικών αρχών ελέγχου. Ο κανονισμός καθορίζει τις κυρίαρχες δυνητικά αλλεργιογόνες ομάδες τροφών χωρίς να επισημαίνει όμως τα εκάστοτε υπεύθυνα αλλεργιογόνα μόρια, δηλαδή συγκεκριμένα βιομόρια ή χημικές ουσίες πλην ελαχίστων εξαιρέσεων. Ο κανονισμός ρυθμίζει το νομικό πλαίσιο της ακριβούς σήμανσης όλων των συστατικών με έμφαση στην επισήμανση των αλλεργιογόνων πρώτων υλών.

Πίνακας 1. Κυρίαρχες αλλεργιογόνες τροφές σύμφωνα με τον 1169/2011/EK

Table 1. Main food allergens based on European Regulation 1169/2011

α/α	Τρόφιμο ή Α' ύλη
1	Δημητριακά που περιέχουν γλουτένη, δηλαδή: σιτάρι, σίκαλη, κριθάρι, βρώμη, όλυρα, σιτηρό kamut ή υβριδικές ποικιλίες τους
2	Καρκινοειδή και προϊόντα με βάση τα καρκινοειδή
3	Αυγά και προϊόντα με βάση τα αυγά
4	Ψάρια και προϊόντα με βάση τα ψάρια
5	Αραχίδες (αράπικα φιστίκια) και προϊόντα με βάση τις αραχίδες
6	Σόγια και προϊόντα με βάση τη σόγια
7	Γάλα και προϊόντα με βάση το γάλα (συμπεριλαμβανομένης της λακτόζης)
8	Καρποί με κέλυφος, δηλαδή: αμύγδαλα ( <i>Amygdalus communis</i> ), φουντούκια ( <i>Corylus avellana</i> ), καρύδια ( <i>Juglans regia</i> ), καρύδια κάσιους ( <i>Anacardium occidentale</i> ), καρύδια πεκάν ( <i>Carya illinoensis</i> ), καρύδια Βραζιλίας ( <i>Bertholletia excelsa</i> ), φυστίκια ( <i>Pistacia vera</i> ), καρύδια μακαντάμια ή καρύδια Κουίνσλαντ ( <i>Macadamia ternifolia</i> ) και προϊόντα με βάση τα ανωτέρω
9	Σέλινο και προϊόντα με βάση το σέλινο
10	Σινάπι και προϊόντα με βάση το σινάπι
11	Σπόροι σησαμιού και προϊόντα με βάση τους σπόρους σησαμιού
12	Το διοξείδιο του θείου και οι θειώδεις ενώσεις σε συγκεντρώσεις άνω των 10 mg/kg ή 10 mg/litre
13	Λούπινο και προϊόντα με βάση το λούπινο
14	Μαλάκια και προϊόντα με βάση τα μαλάκια

### 1.7 Τι είναι τρόφιμο;

Ως «τρόφιμα» ή «είδη διατροφής» ορίζονται οι «ουσίες ή τα προϊόντα, είτε αυτά έχουν υποστεί πλήρη ή μερική επεξεργασία είτε όχι, τα οποία προορίζονται για βρώση από τον άνθρωπο ή αναμένεται ευλόγως ότι θα χρησιμεύσουν για το σκοπό αυτό», όπως αναφέρεται στον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 178/2002/EK. Στα τρόφιμα συμπεριλαμβάνονται και το νερό καθώς και αναψυκτικά και ροφήματα ή ακόμη και ποτά, ακόμα και ουσίες που «ενσωματώνονται σκόπιμα κατά την παραγωγική διαδικασία». Οι ζωοτροφές, τα ναρκωτικά, τα ζώντα ζώα, τα φάρμακα, τα καλλυντικά, ο καπνός, και τα φυτά πριν τη συγκομιδή δε συγκαταλέγονται στα τρόφιμα.

Η αναγκαιότητα για καθημερινή πρόσληψη τροφής με σκοπό την κάλυψη των βιολογικών αναγκών καθιστά τα τρόφιμα απαραίτητα για την επιβίωση. Οι σύγχρονοι ρυθμοί ζωής με τα απαιτητικά εργασιακά ωράρια, καθώς και η παγκοσμιοποιημένη διακίνηση προϊόντων, έχουν καταστήσει επιτακτική τη λήψη μέτρων σε εθνικό, ευρωπαϊκό, αλλά και παγκόσμιο επίπεδο. Στόχος των τακτικών και εκτάκτων μέτρων και ελέγχων που πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις θέσεις και τα άρθρα των ευρωπαϊκών κανονισμών, της εθνικής νομοθεσίας, του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, και του Codex Alimentarius, είναι η παροχή ασφαλών και ποιοτικών προϊόντων στην αγορά. Κύριο μέλημα, εξάλλου, όλων των κρατών – μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης μέσω της κοινοτικής νομοθεσίας αποτελεί η διασφάλιση ενός «υψηλού επιπέδου δημόσιας υγείας».

#### 1.8 Κίνδυνοι τροφίμων – Νομοθεσία ελέγχου διασφάλισης ποιότητας

Αναγνωρίζοντας την αλλαγή των καταναλωτικών συνηθειών σε παγκόσμια κλίμακα, προκύπτει η συνεχώς αυξανόμενη σίτιση των καταναλωτών σε / από επιχειρήσεις τροφίμων. Η μεταποίηση πρώτων υλών προς τελικά προϊόντα στην οικιακή κουζίνα έχει αντικατασταθεί από την κατανάλωση έτοιμων συσκευασμένων ή χύδην προϊόντων, ή μερικώς – μαγειρεμένων τροφίμων συχνά καταψυγμένων ή συσκευασμένων σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με παρατεταμένη «διάρκεια ζωής» (ημετοίμων). Γνωρίζοντας, ακόμη, ότι υπηρεσίες παραγωγής τροφίμων παρέχουν όχι μόνο ιδιωτικές επιχειρήσεις κερδοσκοπικού χαρακτήρα, αλλά επίσης δημόσιοι οργανισμοί και φορείς μη κερδοσκοπικού χαρακτήρα, όπως Νοσοκομεία και δημόσια συσσίτια, όλοι οι φορείς, ιδιωτικοί και μη, καλούνται να εφαρμόσουν το σύνολο των κανονισμών και οδηγιών που αφορούν στη διασφάλιση της υγιεινής και της ποιότητας των τροφίμων.

Τα τρόφιμα απειλούνται από τρεις γενικές ομάδες κινδύνων, οι οποίες συνοψίζονται στους «φυσικούς», τους «χημικούς» και τους «βιολογικούς» κινδύνους. Οι κίνδυνοι αυτοί προκύπτουν από «πηγές κινδύνου» που έχουν τη δυνατότητα να βλάψουν το τρόφιμο και τελικά να προκαλέσουν αρνητικές συνέπειες στην υγεία του καταναλωτή.

Ως φυσικοί ορίζονται οι κίνδυνοι που δεν αλλοιώνουν τη χημική σύσταση ενός προϊόντος και δεν είναι ζώντες οργανισμοί ούτε μεταβολικά προϊόντα αυτών. Παραδείγματα φυσικών κινδύνων αποτελούν μερίδια σκόνης, πέτρες, θραύσματα



γυαλιού, ακόμη και τρίχες χειριστών τροφίμων. Οι φυσικοί κίνδυνοι αποφεύγονται συνηθέστερα με την προσεκτική επόπτευση των πρώτων υλών και των προϊόντων ως το τέλος της παραγωγικής διαδικασίας, με τη σωστή δόμηση των χώρων του παρασκευαστηρίου, την προσθήκη σιτών, ή ακόμη και μηχανημάτων ελέγχου ανίχνευσης ρινισμάτων μετάλλων.

Ως χημικοί ορίζονται οι κίνδυνοι που αλλοιώνουν τη χημική σύσταση των τροφίμων. Χημικοί κίνδυνοι είναι τα βαρέα μέταλλα, τα φυτοφάρμακα, τα απορρυπαντικά, αλλά και τοξίνες μικροοργανισμών καθώς και δυνητικά αλλεργιογόνες πρωτεΐνες αυτών. Οι χημικοί κίνδυνοι δε μπορούν να αποφευχθούν με μακροσκοπικό έλεγχο από μέρους των χειριστών. Οι χημικοί κίνδυνοι απαιτούν το συστηματικό προγραμματισμένο έλεγχο των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγική διαδικασία, και τη διαρκή εκπαίδευση του προσωπικού. Οι χημικοί κίνδυνοι, όπως η παρουσία απορρυπαντικού σε ένα τελικό προϊόν μπορεί να αποφευχθεί σαφώς με την αυστηρή φύλαξη των καθαριστικών σε κλειδωμένα ντουλάπια προς αποφυγή δολιοφθοράς. Ωστόσο, χημικοί κίνδυνοι όπως τα βαρέα μέταλλα απαιτούν τακτικό φυσικοχημικό έλεγχο των υδάτων που χρησιμοποιούνται στην παραγωγική διαδικασία, και κίνδυνοι όπως τα φυτοφάρμακα απαιτούν σχετικές φυσικοχημικές δοκιμές εργαστηρίου για φρούτα και λαχανικά από μέρους των εκάστοτε προμηθευτών. Όσον αφορά στα αλλεργιογόνα, απαραίτητη και νομοθετημένη είναι έως τώρα η ακριβής σήμανση με έμφαση στις αλλεργιογόνες ουσίες σύμφωνα με το Παράρτημα II του 1169/2011/ΕΚ.

Ως βιολογικοί ορίζονται οι κίνδυνοι που περιλαμβάνουν επαφή του τροφίμου με ζώντες οργανισμούς πολυκύτταρους ή μονοκύτταρους ή ακυτταρικής μορφής. Συνηθέστερα, τα τρόφιμα επιβαρύνονται από επιμολύνσεις από στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Οι επιμολύνσεις προέρχονται είτε από μολυσμένες πρώτες ύλες είτε από κοπρανώδεις επιμολύνσεις από μέρους των χειριστών των τροφίμων οφειλόμενες σε κακές πρακτικές της προσωπικής υγιεινής. Ελεύθεροι ιοί σε τρόφιμα ανευρίσκονται σπανιότερα και οφείλονται σε πολύ κακές παραγωγικές πρακτικές, με νοσούντες χειριστές να μην απομακρύνονται από τη θέση τους στη παραγωγική γραμμή και να μη λαμβάνουν τα απαραίτητα μέσα προστασίας (ένδυση εργασίας, γάντια μιας χρήσης, ποδονάρια, μάσκες).

### 1.9 Διάκριση τροφίμων ως προς την ασφάλεια και ως προς την ορθή σήμανση

Τρόφιμα τα οποία δεν είναι επιβαρυνμένα από τις ανωτέρω ομάδες κινδύνων και άρα δεν εμφανίζουν βιολογικές – χημικές – φυσικές αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται «ασφαλή» προς κατανάλωση σύμφωνα με την Υπουργική Απόφαση 15523 (ΦΕΚ 1187/Παράρτημα VI). Τα τρόφιμα αυτά διατηρούν τα ειδικά για κάθε είδος οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (γεύση, οσμή, χρώμα, σύσταση). Αντίθετα, όσα τρόφιμα δεν πληρούν τους υγειονομικούς κανόνες η κοινοτική και εθνική νομοθεσία χαρακτηρίζονται ως «μη ασφαλή». Τα «μη ασφαλή» διακρίνονται σε «ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση» και «επιβλαβή για την υγεία». Τα «ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση» φέρουν απαγορευμένες ουσίες ή/και στερούνται υγειονομικές επισημάνσεις και πιστοποιητικά καταλληλότητας. Τα «επιβλαβή για την υγεία» εμφανίζουν εκτεταμένη αλλοίωση ή αποσύνθεση με άμεσες ή έμμεσες βλαπτικές συνέπειες για την υγεία του καταναλωτή λόγω φυσικών ή βιολογικών ή χημικών κινδύνων. Τα τρόφιμα τα οποία είναι «μη ασφαλή» δε διατίθενται στην αγορά.

Η ανωτέρω υπουργική απόφαση διακρίνει ακόμη την κατηγορία των «μη κανονικών» τροφίμων, τα οποία μπορεί να είναι «ασφαλή» καθώς δεν ενέχουν υλικούς κινδύνους για τον καταναλωτή, όμως δεν πληρούν τις απαιτήσεις της νομοθεσίας για επισήμανση – παρουσίαση – διαφήμιση παραπλανώντας τους καταναλωτές. Παραδείγματα «μη κανονικών» τροφίμων είναι τα παγωμένα γλυκίσματα με φυτικά έλαια που πωλούνται ως παγωτά (προϊόντα που οφείλουν να περιέχουν λιπαρά ζωικής προέλευσης από το γάλα), ή τυρί αγελαδινό που πωλείται ως προϊόν «Φέτας» που είναι Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης.

### 1.10 Χημικοί κίνδυνοι – Αλλεργιογόνα σε τρόφιμα

Μια μεγάλη ομάδα χημικών κινδύνων που απειλούν τους καταναλωτές μέσω των τροφίμων είναι τα αλλεργιογόνα. Τα αλλεργιογόνα, σύμφωνα με τον 1169/2011/ΕΚ (Παράρτημα II), αποτελούν «*Προϊόντα ή ουσίες που προκαλούν αλλεργίες ή δυσανεξίες*». Οι αλλεργίες αποτελούν καταστάσεις στις οποίες το ανοσοποιητικό σύστημα ενός οργανισμού αποκρίνεται σε αντιγόνα, δηλαδή ξένες προς τον οργανισμό χημικές ουσίες, και ενεργοποιεί μηχανισμούς ώστε να τα αναγνωρίσει και να τα καταστρέψει. Τα κρούσματα τροφικών αλλεργιών φαίνεται να έχουν αυξηθεί τα τελευταία 50 χρόνια, πράγμα το οποίο συνδέεται με την αλλαγή

των διατροφικών συνηθειών, την αύξηση των καισαρικών τομών, την εκτεταμένη λήψη αντιβιοτικών φαρμάκων, καθώς, πιθανόν, και από την επακόλουθη μεταβολή του προτύπου του εντερικού μικροβιώματος (Taylor et al. 2004). Η απουσία κλινικών δεδομένων για το πλήθος και τα πιθανά αίτια αλλεργικών αντιδράσεων σε ασθενείς στην Ελλάδα αλλά και σε άλλα χώρες δημιουργεί ένα κενό στη μελέτη των τροφιογενών αλλεργιών.

#### 1.11. Άγρια και εκτρεφόμενα είδη εδώδιμων εμπορικών ιχθύων στην Ελλάδα

Οι ιχθύες και τα προϊόντα αυτών, όπως κροκέτες, κονσέρβες, μαριναρισμένα φιλέτα και άλλα κατεργασμένα προϊόντα, αποτελούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής των Ελλήνων και γενικότερα των λαών της Μεσογείου. Οι ιχθύες αποτελούν είτε άγρια αλιεύματα, είτε εκτρεφόμενα άτομα από ιχθυοκαλλιέργειες της Ελλάδας. Όσον αφορά στα αλιεύματα των ελληνικών θαλασσών, αναζητώντας τους πίνακες των δεδομένων που παραθέτει ετήσια η Ελληνική Στατιστική Αρχή ΕΛ.ΣΤ.ΑΤ., για το έτος 2014 δηλώθηκαν 60.318,5 τόνοι αλιευμάτων για τα οποία υπολογίζονται συνολικά ακαθάριστα έσοδα περί τις 229.808,5 χιλιάδες ευρώ, από τα οποία τα περισσότερα προέκυψαν από παράκτια και μέση αλιεία (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Κυρίαρχα είδη αλιευμάτων ελληνικών θαλασσών για τα έτη 2012 – 2014 από την Ελληνική Στατιστική Αρχή (η ποσότητα αφορά σε τόνους αλιευμάτων)

Table 2. Main fish catches of greek fishing areas for the period 2012 – 2014 based on the Hellenic Statistical Authority (calculating in tons of fish catch)

Κυριότερα είδη αλιευμάτων	2012	2013	2014	Μεταβολή %	
				2013/12	2014/13
<b>Σύνολο</b>	<b>60.725,4</b>	<b>63.638,1</b>	<b>60.319,2</b>	<b>4,8</b>	<b>-5,2</b>
<b>Ψάρια</b>	<b>50.869,7</b>	<b>53.314,4</b>	<b>50.578,4</b>	<b>4,8</b>	<b>-5,1</b>
Βακαλάοι	4.050,9	4.694,1	3.135,3	15,9	-33,2
Βάτοι	398,5	407,7	332,4	2,3	-18,5
Γάβροι	9.505,9	8.752,3	9.847,2	-7,9	12,5
Γλώσσες	528,0	799,3	465,2	51,4	-41,8
Γόπες	3.135,7	2.947,9	2.868,7	-6,0	-2,7
Κέφαλοι	1.035,3	918,6	1.159,7	-11,3	26,2
Κολιοί	1.599,8	1.940,8	1.584,3	21,3	-18,4
Κουτσομούρες	1.603,3	1.774,4	1.758,8	10,7	-0,9
Λαβράκια	274,0	287,0	242,3	4,7	-15,6
Λιθρίνια	475,4	560,0	493,4	17,8	-11,9
Μαγιάτικα	516,2	582,1	458,7	12,8	-21,2
Μαρίδες	2.157,4	1.747,3	1.554,4	-19,0	-11,0
Μπαλάδες	373,3	424,3	416	13,7	-2,0
Μπαρμπούνια	1.135,5	1.181,0	1.115,1	4,0	-5,6
Ξιφίες	1.504,0	2.146,4	2.081,6	42,7	-3,0
Παλαμίδες	1.127,2	1.478,7	678,1	31,2	-54,1
Πεσκανδρίτσες	908,4	618,0	631,7	-32,0	2,2
Προσφυγάκια	566,8	1.205,9	544,5	112,8	-54,8
Σαρδέλλες	5.147,6	6.865,3	8.404,5	33,4	22,4
Σαφρίδια	2.275,9	1.809,5	1.545,1	-20,5	-14,6
Σκορπιοί	475,7	450,9	465,2	-5,2	3,2
Τόννοι	302,2	342,9	798,7	13,5	132,9
Φαγγριά	373,1	362,3	374,8	-2,9	3,5
Φρίσσες	1.298,0	1.315,8	1.093,9	1,4	-16,9

Επισημαίνεται ότι δεν είναι εύκολη η αντιστοίχιση του ανωτέρω πίνακα (Πίνακας 2) σε συγκεκριμένα βιολογικά είδη, καθώς πολλά από τα εμπορικά είδη τοποθετήθηκαν σε γενικές εμπορικές κατηγορίες. Επίσης, στον παρόντα πίνακα αναφέρονται τα πλέον εμπορικά γνωστά είδη. Σε ποσοστό περίπου 12% συμμετέχουν και άλλα είδη ιχθύων στο σύνολο των ετήσιων αλιευμάτων τα οποία όμως δεν αναφέρονται αναλυτικά.

Σύμφωνα με τη Γενική Διεύθυνση Αλιείας του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, στην Ελλάδα υπήρχαν ενεργές 338 μονάδες εκτροφής Μεσογειακών ιχθύων (θαλασσίων υδάτων), 1 μονάδα πάχυνσης ερυθρού τόνου, και 77 μονάδες εκτροφής ιχθύων εσωτερικών υδάτων από τις οποίες οι περισσότερες αφορούσαν σε χερσαίες δεξαμενές ανοιχτού ή κλειστού κυκλώματος. Για το έτος 2010 η συνολική ετήσια παραγωγή θαλάσσιων ειδών εκτιμήθηκε σε περισσότερους από 102.000 τόνους, ενώ για τα είδη γλυκών υδάτων υπολογίστηκε σε 1.735 τόνους. Τα σημαντικότερα εκτρεφόμενα είδη των θαλάσσιων εκτροφών είναι το *Sparus aurata* (τσιπούρα) και το *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι). Σε μικρότερη κλίμακα εκτρέφονται το *Diplodus puntazzo* (μυτάκι), το *Pagrus pagrus* (φαγκρί), το *Diplodus sargus sargus* (σαργός), το *Dentex dentex* (συναγρίδα), το *Pagellus erythrinus* (λυθρίνι) και το *Thunnus thynnus* (ερυθρός τόνος). Η εκτροφή στις θαλάσσιες εκτροφές πραγματοποιείται, κυρίως, σε μονάδες πλωτών ιχθυοκλωβών. Η εκτροφή αυτού του τύπου χαρακτηρίζεται ως χαμηλού κόστους. Οι ιχθυοκλωβοί αποτελούν πλωτές εγκαταστάσεις στις οποίες προσαρμόζονται τα ανάλογα δίχτυα μέσα στα οποία εκτρέφονται οι ιχθύες. Η τροφή χορηγείται με συστήματα ελεγχόμενα από υπολογιστές ή με το χέρι ή με «ταΐστρες».

Αναφορικά με την παρεχόμενη τροφή, τα σιτηρέσια των ιχθύων ποικίλλουν σύμφωνα πάντα με το επίπεδο καταναλωτή στο οποίο εντάσσεται κάθε διαφορετικό είδος, το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται κάθε άτομο ιχθύος, αλλά και την ενδεχόμενη τελική διατροφική αξία ή και «ποιότητα» που επιθυμεί να προσδώσει ο εκτροφέας στον ιχθυοπληθυσμό. Επιστημονικό έργο διεξάγεται σχετικά με τη διατροφική αξία και την επίδραση των διαφορετικών σιτηρεσίων σε συγκεκριμένα εκτρεφόμενα είδη. Η αποτελεσματικότητα ή η ποιότητα του σιτηρεσίου εκτιμάται λαμβάνοντας υπόψη τη βιωσιμότητα του ιχθυοπληθυσμού, την εξάλειψη ασθενειών, τη μετάβαση από το ένα αναπτυξιακό στάδιο στο επόμενο, την αύξηση της βιομάζας,

πιθανή αύξηση της απόθεσης γόνων. Η τροφή μεταβάλλεται ανάμεσα στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Βελτιωμένα ή εναλλακτικά σιτηρέσια μπορεί να αποτελούν υποπροϊόντα φυτικής ή ζωικής προέλευσης, όπως ιχθύες υδατοκαλλιεργειών, ιχθυάλευρα, παραπροϊόντα κρεάτων ή πουλερικών ή οστών, θαλάσσια μακρόφυτα, ξηρούς καρπούς, έλαια καρπών (Hixson 2014).

### 1.12 Αλλεργιογόνα στα ψάρια

Όπως προκύπτει από βιβλιογραφικά δεδομένα, κυρίαρχα αλλεργιογόνα μόρια των ψαριών και των σκευασμάτων αυτών, όπως φιλέτα, ψαροκροκέτες και έλαια ψαριών, είναι οι πρωτεΐνες παρβαλβουμίνες. Άλλα αλλεργιογόνα προκαλούν αλλεργίες σε μικρότερο του 1% των αλλεργικών σε ψάρια ατόμων όπως είναι το κολλαγόνο. Από τα περίπου 20.000 γνωστά βρώσιμα είδη ψαριών παγκοσμίως, υπάρχει μια ομάδα αρκετά εμπορικών δημοφιλών ψαριών τα οποία αναφέρονται ως κυρίαρχα αλλεργιογόνα είδη ώστε να αποφεύγονται από ευπαθείς ομάδες του καταναλωτικού κοινού (Πίνακας 3). Στον πίνακα παρατίθενται και οι συγκεκριμένες ισομορφές που έχουν απομονωθεί και έχουν χαρακτηριστεί ως αλλεργιογόνες στην πρώτη στήλη. Ως προς την ονοματολογία των ισομορφών, φαίνεται να ισχύει ο κανόνας χρήσης των «τριών πρώτων γραμμάτων του βιολογικού γένους, ακολουθούμενο από τα πρώτα ένα ή δύο γράμματα του είδους και έναν αριθμό που δηλώνει το πλήθος των ισομορφών στο συγκεκριμένο είδος. Μεταξύ αυτών ξεχωρίζουν ο τόνος, ο σολομός, το φαγκρί, το σκουμπρί, ο γάδος, ο κυπρίνος.

Συνιστάται στα αλλεργικά σε ψάρια άτομα να φέρουν μαζί τους ένεση επινεφρίνης για αποφυγή έντονων αλλεργικών και αναφυλακτικών αντιδράσεων. Ιδιαίτερη ευπάθεια σε αλλεργίες σε ψάρια φαίνεται να εμφανίζουν άτομα νεαρά κατά την παιδική τους ηλικία, ενώ έρευνα δείχνει ότι η πιθανότητα έκφρασης αλλεργίας μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ζωής του ίδιου ατόμου (Dannaeus & Inganas 1981).

Τροφικές αλλεργίες και δυσανεξίες σε ψάρια έχουν παρατηρηθεί και καταγραφεί σε διαφορετικό βαθμό στη Βόρεια Αμερική, στην Ασία και στην Ευρώπη. Περίπου 0,5% του πληθυσμού του αναπτυγμένου κόσμου φαίνεται να απειλείται από τροφικές αλλεργίες σε ψάρια (Rona et al. 2007, Venter & Arshad 2011). Το κύριο αλλεργιογόνο που φαίνεται να προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις σε αλλεργικούς σε ψάρια καταναλωτές είναι οι πρωτεΐνες παρβαλβουμίνες (Taylor et al. 2002, Van Do

et al. 2005). Η ομοιότητα που φαίνεται ότι παρουσιάζουν στην αμινοξική τους αλληλουχία οι πρωτεΐνες παρβαλβουμίνες μεταξύ διαφόρων ειδών ιχθύων με εμπορική και διατροφική αξία καθιστούν αυτές παναλλεργιογόνο.

Πίνακας 3. Κυρίαρχα είδη ιχθύων που αναγνωρίζονται παγκοσμίως ως αλλεργιογόνα. Σημειώνεται ότι κοινό όνομα στα ελληνικά φέρουν μόνο όσα αλιεύονται και σε ελληνικές θάλασσες, τα στοιχεία λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων fishbase

Table 3. Main fish species considered globally as allergenic. Fish species trade name based on fishbase

<b>Αλλεργιογόνος Ισομορφή Παρβαλβουμίνης</b>	<b>Επιστημονική ονομασία</b>	<b>Εμπορική ονομασία στα ελληνικά</b>	<b>Κοινό όνομα στα αγγλικά</b>
Ana l 1	<i>Anarhichas lupus</i>	-	Atlantic Wolffish
Ang a 1	<i>Aguilla anguilla</i>	Χέλι	Atlantic Eel
Ang g 1	<i>Anguilla japonica</i>	Χέλι Ιαπωνίας	Japanese Eel
Clu h 1	<i>Clupea harengus</i>	-	Atlantic herring
Cyp c 1	<i>Cyprinus carpio</i>	Κυπρίνο	Carp
Dan r 1	<i>Danio rerio</i>	-	Zebra fish
Gad c 1	<i>Gadus callarias</i>	Γάδος	Baltic cod
Gad m 1	<i>Gadus morhua</i>	Γάδος	Atlantic cod
Hip h 1	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Ιππόγλωσσα	Halibut
Ict p 1	<i>Ictalurus punctatus</i>	-	Channel catfish
Kat p 1	<i>Katsuwonus pelamis</i>	Παλαμίδα	Bonito
Lep l 1	<i>Leptomelanosoma indicum</i>	-	Indian salmon
Ore a 1	<i>Oreochromis aurea</i>	-	Blue tilapia
Ore m 1	<i>Oreochromis mossambicus</i>	-	Mosambique tilapia
Pag m 1	<i>Pagrus major</i>	Φαγκρί	Red seabream
Pam c 1	<i>Pampus chinensis</i>	-	Chinese pomfret
Par ol 1	<i>Paralichthys olivaceus</i>	-	Japanese flounder
Pla f 1	<i>Platichthys flesus</i>	Φασί	European flounder
Sal s 1	<i>Salmo salar</i>	Σολομός	Atlantic salmon
Sar m 1	<i>Sardinops melanisticus</i>	Σαρδέλα Ιαπωνίας	Japanese sardine
Sco a 1	<i>Scomber australasicus</i>	-	Blue mackerel
Sco g 1	<i>Scomberomorus guttatus</i>	-	Spotted spanish mackerel
Sco j 1	<i>Scomber japonicus</i>	Κολιός	Chub mackerel
Sco s 1	<i>Scomber scombrus</i>	Σκουμπρί	Atlantic mackerel
Ser q 1	<i>Seriola quinqueradiata</i>	-	Buri
Sti l 1	<i>Stizotiedion lucioperca</i>	Ποταμολαύρακο	Perch
Sto l 1	<i>Stolephorus indicus</i>	-	Indian anchovy
The c 1	<i>Theragra chalcogramma</i>	-	Alaska pollock
Thu a 1	<i>Thunnus albacares</i>	Κιτρινόπτερος τόνος	Yellowfin tuna
Thu o 1	<i>Thunnus obesus</i>	-	Bigeye tuna
Thu t 1	<i>Thunnus thynnus</i>	Τόνος	Tuna
Tra j 1	<i>Trachurus japonicus</i>	-	Horse mackerel

### 1.13 Παρβαλβουμίνες

Οι παρβαλβουμίνες έχουν μήκος αμινοξικής αλληλουχίας περί τα 108 αμινοξέα και μοριακό βάρος περίπου 12 kDa. Ως προς τη δομή τους, οι παρβαλβουμίνες παρουσιάζουν τρεις επικράτειες έλικας – θηλιάς – έλικας που αναφέρονται ως «EF hand domains», οι οποίες μπορούν να συνδέονται με κατιόντα όπως εκείνα του  $Ca^{2+}$  (Kretsinger 1980). Αποτελούν πρωτεΐνες μάλλον συντηρημένες μεταξύ κατώτερων σπονδυλωτών, όπως διαφορών ειδών ιχθύων και αμφιβίων. Συγκεντρώνονται κυρίως στο λευκό μυ έως και τέσσερις φορές περισσότερο από ότι στον ερυθρό μυ (Wilwert et al. 2006). Παρβαλβουμίνες υπάρχουν και σε σκελετικούς μύες εξελικτικά ανώτερων θηλαστικών, καθώς επίσης και σε ιστούς όπως στο δέρμα, σε νευρικά κύτταρα και σε ενδοκρινείς αδένες (Lehky et al. 1974). Η κύρια λειτουργία των παρβαλβουμινών στα ψάρια είναι η σύσπαση και χάλαση των μυών, η ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων  $Ca^{2+}$  και η μεταγωγή σήματος στην κυτταρική επικοινωνία (De Jongh et al. 2013). Μελέτες έδειξαν ότι οι παρβαλβουμίνες συνιστούν περίπου το 0,15 – 0,625% του νωπού βάρους του μυϊκού ιστού ενός ατόμου γάδου (Kuehn et al. 2010, Koppelman et al. 2012).

Η θερμική σταθερότητα των μορίων αυτών, καθώς και η ανθεκτικότητα που έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν στις μεταβολές του pH καταδεικνύουν την αναγκαιότητα για περαιτέρω έρευνα σχετικά με την ανίχνευσή τους σε διαφορετικά είδη ιχθύων αλλά και σε διαφορετικές μορφές ημιέτοιμων και έτοιμων προς κατανάλωση συσκευασμένων και χύδην προϊόντων. Τα ψάρια έχουν παραδοσιακά ενταχθεί στη διατροφή των καταναλωτών ανά τον κόσμο, καταναλισκόμενα μαγειρεμένα ή ωμά, προερχόμενα από ημερήσια αλίευση ή καταψυγμένα ή ακόμη και κονσερβοποιημένα ή καπνισμένα και μαριναρισμένα οπότε και έχουν υποστεί αλλαγή του pH. Ο κίνδυνος για κατανάλωση δυνητικά αλλεργιογόνων ουσιών μέσω της τροφής αυξάνεται στις περιπτώσεις σκευασμάτων πολλών πρώτων υλών, όπως ψαροκροκετών και μειγμάτων ή αλοιφών ιχθυηρών.

### 1.14 Διάγνωση αλλεργίας σε καταναλωτή

Για να γίνει διάγνωση της τροφικής αλλεργίας απαιτείται η καταγραφή των συμπτωμάτων που τυχόν εμφανίζονται στο ιστορικό ενός ασθενούς, καθώς και η χρονική συσχέτιση με την κατανάλωση συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων. Στην άμεσου τύπου αλλεργία, τα συμπτώματα εμφανίζονται γρήγορα σε σχέση με την

κατανάλωση ενός είδους τροφής, μέσα σε μικρό χρόνο. Η επιβεβαίωση της αλλεργίας πραγματοποιείται με ανώδυνες δερματικές δοκιμασίες νυγμού για συγκεκριμένες ομάδες αλλεργιογόνων. Οι δοκιμασίες αυτές αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως «Skin Prick Tests (SPT)» κατά τις οποίες ειδικός ιατρός αλλεργιολόγος σημαίνει με κύκλους στο χέρι σημεία εφαρμογής 3 – 4 σταγόνων γνωστών αντιγόνων. Οι εξετάσεις αυτές είναι εξαιρετικά αξιόπιστες.

Αν τα δερματικά τεστ είναι θετικά, ο ασθενής παραπέμπεται σε αιματολογική εξέταση, κατά την οποία γίνεται προσπάθεια ποσοτικοποίησης των ειδικών αλλεργικών αντισωμάτων που παράγονται στο σώμα, ώστε να εκτιμηθεί η σοβαρότητα της κατάστασης. Σε περιπτώσεις που πιθανά να εμφανίζεται καθυστερημένου τύπου αλλεργία, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις που η κατανάλωση μιας «επικίνδυνης τροφής» προκαλεί η ατοπική δερματίτιδα, χρησιμοποιούνται Atopy Patch Tests, τα οποία είναι ειδικά αυτοκόλλητα που τοποθετούνται στην πλάτη του ασθενούς, και είναι εμποτισμένα με γνωστά αλλεργιογόνα τροφίμων. Η διάγνωση και πάλι γίνεται από τον αλλεργιολόγο ιατρό.

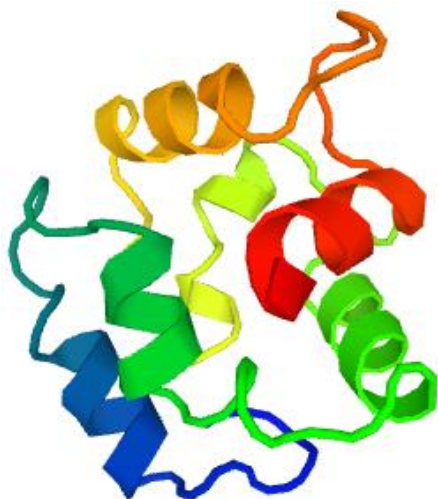
Βιβλιογραφικά, αναφέρονται και τα «Double-Blind Placebo-Controlled Food Challenge (DBPCFC)» τα οποία είναι αρκετά αξιόπιστα για τη διάγνωση μιας τροφικής αλλεργίας. Σε αυτά ο ασθενής λαμβάνει αυξανόμενες δόσεις από ενδεχόμενα αλλεργιογόνες για εκείνον τροφές ή από ένα εικονικό ακίνδυνο φάρμακο (placebo). Το αλλεργιογόνο και το εικονικό φάρμακο εμφανίζουν δομική ομοιότητα ως προς τα μόριά τους και δεν είναι γνωστό ούτε στον ασθενή ούτε στο θεράποντα ιατρό αν λαμβάνει το φάρμακο ή το ενδεχόμενο αντιγόνο. Με αυτό τον τρόπο, το ενδεχόμενο ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω άγχους αποφεύγεται. Επιπρόσθετα, υπάρχουν τα «Single – Blind Food Challenge», κατά το οποίο ο ασθενής ξέρει ότι λαμβάνει το αλλεργιογόνο αλλά ο ιατρός δεν το γνωρίζει, και το «Open – Food Challenge», κατά το οποίο και ο ασθενής και ο ιατρός γνωρίζουν πότε παρέχεται το αλλεργιογόνο.

#### 1.15 Απομόνωση και ταυτοποίηση παρβαλβουμινών

Κάνοντας μια σύντομη ανασκόπηση στις μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα στην έρευνα για την ανίχνευση, την απομόνωση και την ταυτοποίηση των αλλεργιογόνων παρβαλβουμινών, κυριαρχούν οι μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot) και ELISA, με τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν τις παρβαλβουμίνες ή με πολυκλωνικά αντισώματα



που προέκυψαν από ανοσοποίηση πειραματόζων ερευνητικών κέντρων. Λιγότερο έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος RT qPCR για τη διερεύνηση της έκφρασης των παρβαλβουμινών σε δείγματα από νωπά αλιεύματα. Όσον αφορά στην απομόνωση των παρβαλβουμινών, βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι αυτή επιτεύχθηκε μετά το 1970 με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας (Coffee & Bradshaw 1973). Σήμερα προτείνεται η μέθοδος της απομόνωσης με κλασμάτωση από στήλη ιοντοανταλλαγής Sephadex έπειτα από κατάλληλη δειγματοληψία και χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων. Ο χαρακτηρισμός των ισομορφών γίνεται χρησιμοποιώντας το μοριακό βάρος της υπό χαρακτηρισμό άγνωστης πρωτεΐνης όπως φαίνεται να προκύπτει μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήγματα πολυακρυλαμιδίου σε μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE) με τη χρήση αξιόπιστων μοριακών δεικτών (markers). Για το χαρακτηρισμό απαραίτητη είναι η γνώση του ισηλεκτρικού σημείου της υπό χαρακτηρισμό ισομορφής. Για τις πλέον ερευνηθείσες αλλεργιογόνες ισομορφές, όπως αυτή του γάδου *Gadus morhua* Gad m 1 υπάρχουν διαθέσιμες οι αμινοξικές ακολουθίες και προτεινόμενο μοντέλο τεταρτοταγούς δομής στο UniProt (Εικόνα 6).



10	20	30	40	50
MAFAGILNDA	DITAALAACK	AEGSFDHKAF	FTKVGLAAKS	PADIKKVFEI
60	70	80	90	100
IDQDKSDFVE	EDELKLFQLQN	FSAGARALSD	AETKVFLKAG	DSDGDGKIGV
DEFGAMIKA				

Εικόνα 6 Α (άνω). Μοντέλο παρβαλβουμίνης γάδου *Gadus morhua* με ταυτοποίηση 74%, Β (κάτω) Αμινοξική ακολουθία Q90YK9-1 (UniProt.org)

Figure 6. A (up) *Gadus morhua* (cod) parvalbumin model – identification 74%, B (down) Sequence Q90YK9-1 (UniProt.org)

### 1.16 Ψηφιακός τόπος «Allergome»

Η επιτακτική ανάγκη για ικανοποιητική και έγκυρη ενημέρωση σε παγκόσμια κλίμακα, έχει οδηγήσει στη σύσταση ενός ψηφιακού τόπου παροχής σχετικών πληροφοριών διαθέσιμου σε κάθε χρήστη του διαδικτύου στην αγγλική γλώσσα. Ο ιστότοπος έχει πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών από δημοσιευμένες επιστημονικές εργασίες χωρισμένες κατά χρονολογία. Η πλατφόρμα αυτή καλείται «Allergome» και παραθέτει εργαλεία ενημέρωσης και έρευνας αναφορικά με τα γνωστά αλλεργιογόνα. Είναι προσβάσιμη στην ηλεκτρονική διεύθυνση «<http://www.allergome.org/>» (Mari et al. 2009).

## 2 Σκοπός εργασίας

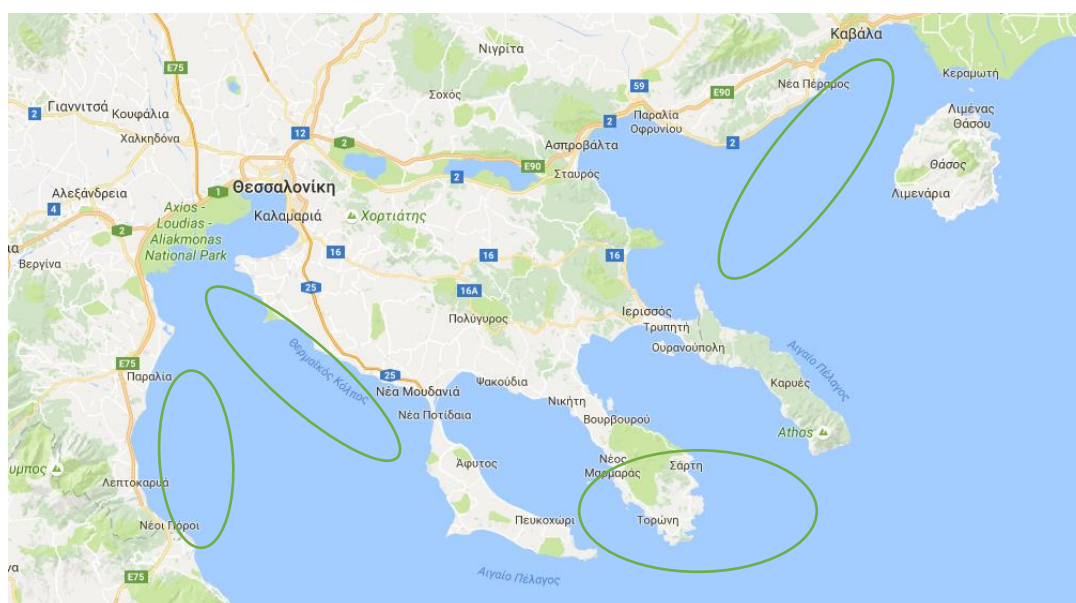
---

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της δυνατότητας ανίχνευσης των ισομορφών των αλλεργιογόνων παρβαλβουμινών σε είδη ιχθύων, τα οποία φαίνεται να είναι από τα πλέον εμπορικά βρώσιμα είδη στην ελληνική αγορά. Λαμβάνοντας υπόψη τις διατροφικές συνήθειες των Ελλήνων, αλλά και των λαών της ευρύτερης λεκάνης της Μεσογείου, και παρατηρώντας έλλειψη επαρκών στοιχείων για πολλά από τα εδώδιμα αλιεύματα της χώρας μας, διερευνήθηκαν 27 είδη των ελληνικών θαλασσών.

### 3 Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Λήψη Δειγμάτων – Διαδικασία ομογενοποίησης

Για την επίτευξη του σκοπού της εργασίας έγινε συλλογή βιολογικού υλικού από ελεύθερα αλιεύματα του Θερμαϊκού Κόλπου και του Τορωναίου Κόλπου στη Χαλκιδική (Εικόνα 7). Τα δείγματα αποτέλεσαν νωπά αλιεύματα ημέρας τα οποία αγοράζονταν από τον αλιέα αμέσως μετά τη διαλογή – «ξεψάρισμα». Χρησιμοποιήθηκαν 27 είδη (Πίνακας 11, Παράρτημα) (ενδεικτικές εικόνες βρίσκονται στο «Παράρτημα» της παρούσας εργασίας (Εικόνα 29 έως και Εικόνα 52)). Από αυτά τουλάχιστον 14 εκ των 27 αποτελούν είδη από τα πλέον εμπορικά (Πίνακας 2, Εισαγωγή – Στοιχεία Ελληνικής Στατιστικής Αρχής).



Εικόνα 7. Περιοχές ενδιαφέροντος – Βόρειο Αιγαίο Τορωναίος Κόλπος Θερμαϊκός Κόλπος

Figure 7. Regions of interest – North Aegean Sea Gulfs of Toroni and Thermaikos

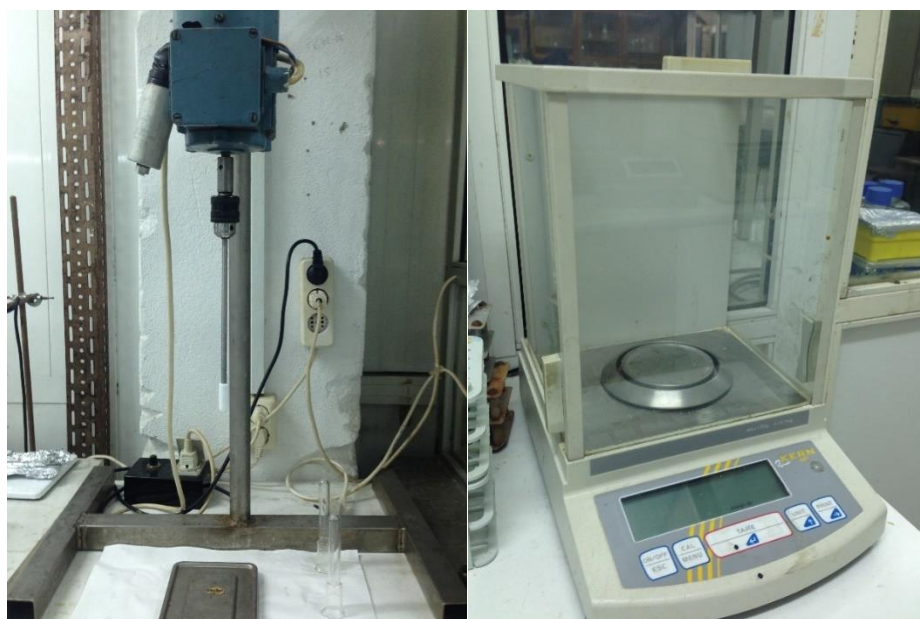
Για τη διασφάλιση της αλυσίδας ψύξης, από τη μεταφορά των ιχθύων έως την ανατομία τους και ομογενοποίηση του λευκού μυ, χρησιμοποιούνταν ισοθερμικά κυτία εξηλασμένης πολυστερίνης, κατάλληλα για επαφή με τρόφιμα, τα οποία γεμίζονταν με πάγο σε σχήμα λεπίδας (Εικόνα 8). Για τον καθαρισμό, την απεντέρωση και την ανατομία των ιχθύων χρησιμοποιούνταν αποστειρωμένα ανοξείδωτα ψαλίδια και λαβίδες, ενώ τηρούνταν πρόγραμμα καθαριότητας των πάγκων εργασίας με κατάλληλα απολυμαντικά και καθαριστικά. Όλα τα tips, περιέκτες erpendorfs των 1,5 ml και 2 ml, περιέκτες falcons των 15 ml και των 50 ml που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώνονταν πριν τη χρήση. Χρησιμοποιούνταν πάντα γάντια μιας χρήσης πριν από κάθε χειρισμό.

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μόνο ο ιστός του λευκού μυ από το εκάστοτε είδος, δηλαδή λήφθηκε δείγμα από το κατεχοχόν εδώδιμο τμήμα που καταναλώνεται πάντα από τον καταναλωτή, και το οποίο αποτελεί το «φιλέτο» του ψαριού. Κατά την ανατομία, τμήμα του λευκού μυ από τη ράχη του ψαριού αποκόπτονταν και ομογενοποιούνταν σε ομογενοποιητή με μαλακές πλαστικές απολήξεις σε γυάλινους περιέκτες χωρητικότητας 5 ml (Εικόνα 9α,β). Πριν και μετά την ομογενοποίηση, ο ομογενοποιητής και οι περιέκτες ξεπλένονταν με άφθονο διαπεσταγμένο ύδωρ.



Εικόνα 8. Άτομο ιχθύος σε κувίο πάγου κατά τη δειγματοληψία

Figure 8. Fish specimen in an ice box during sampling



Εικόνα 9. α (αριστερά) Ομογενοποιητής, β (δεξιά) Ζυγός ακριβείας εργαστηρίων

Figure 9. a (left) Homogenizer, b (right) High accuracy weight scale

Το δείγμα που λαμβανόταν ζυγιζόταν ώστε να λαμβάνεται περίπου 1 g ιστού από κάθε άτομο. Επιπρόσθετα, λαμβάνονταν 2 g ιστού για αποθήκευση σε βαθεία κατάψυξη σε θάλαμο – 32 °C του εργαστηρίου για μελλοντική επανάληψη του πειράματος κατόπιν απόψυξης του ζωικού υλικού. Για την ομογενοποίηση του δείγματος χρησιμοποιούνταν ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης «Buffer A» (Πίνακας 6, Παράρτημα) σε αναλογία 1 : 4, δηλαδή για κάθε 1 g ιστού προσθέτονταν 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος με πιπέτα (Liu et al. 2010). Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούνταν από Tris HCl pH 7,5 και αναστολέα πρωτεασών EDTA pH 8,0. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν στα εργαστήρια του τομέα Μοριακής του τμήματος Βιολογίας Α.Π.Θ.. Κατόπιν της σήμανσης και ταξινόμησης όλων των απαραίτητων πληροφοριών των δειγμάτων, οι ιστοί αποθηκεύονταν άμεσα σε θάλαμο κατάψυξης, και τα ομογενοποιημένα μεταφέρονταν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο του τμήματος για φυγοκέντρηση στους 4 °C στις 13000 rpm για 15 min. Η φυγόκεντρος ρυθμιζόταν στο πρόγραμμα προ-ψύξης (precooling) στους 2 °C 15 min πριν τη χρήση. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, χρησιμοποιώντας πάντα ισοθερμικά κυτία με πάγο, μεταφέρονταν με προσοχή οι μικροπεριέκτες erpendorfs σε καθαρό πάγκο εργασίας όπου σε νέα κατάλληλα σημασμένα και αποστειρωμένους μικροπεριέκτες erpendorfs μεταφέρονταν με μικροπιπέτα το υπερκείμενο προϊόν.

### 3.2 Υπολογισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Ακολουθούσε μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης στο εκάστοτε δείγμα με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιώντας τρυβλία 96 οπών (Πίνακας 7, Παράρτημα). Σε κάθε μέτρηση χρησιμοποιούνταν φωτόμετρο τύπου ELISA (Εικόνες 10 α,β). Κατασκευαζόταν πρότυπη καμπύλη με γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνη ανθρώπου (Πίνακας 7). Κατόπιν ελέγχου των προκυπτόντων τιμών, ακολουθούσε η μέτρηση των δειγμάτων και η μετέπειτα αραιώση με ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης (buffer A) και δημιουργία μικρών αποθεμάτων (aliquots) γνωστής συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης τα οποία αποθηκεύονταν στους – 32 °C. Οι αραιώσεις στην πλειοψηφία των εξετασμένων ειδών ήταν της τάξης 1 : 2.

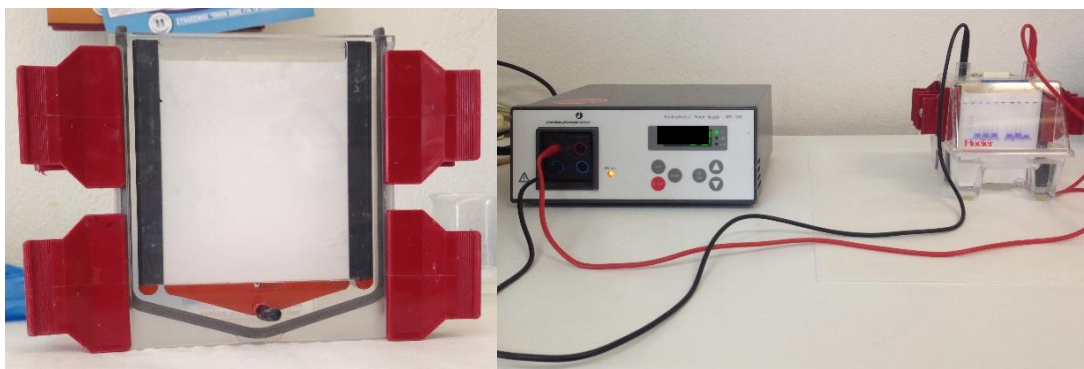


Εικόνα 10. α (αριστερά) Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για υπολογισμό συγκέντρωσης άγνωστης πρωτεΐνης σε τρυβλίο 96 σπών, β (δεξιά) φωτόμετρο ELISA

Figure 10. a (left) Standard curve preparation procedure for the estimation of the concentration of the protein extract using 96 well plate, b (right) ELISA spectrometer

### 3.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE) σύμφωνα με το Μοριακό Βάρος

Την επόμενη μέρα, ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε πήγματα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE) 20% (Πίνακας 8, Παράρτημα). Η παρασκευή των πηκτών και η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων γίνονταν την ίδια ημέρα με συσκευή πολυμερισμού και σε διάταξη ηλεκτροφόρησης, αντίστοιχα, του εργαστηρίου (Εικόνα 11 α, β). Η ηλεκτροφόρηση γινόταν για 3 h και 5 min στα 120 V. Για τη βαθμονόμηση των πηκτών γινόταν χρήση 5,5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder – marker) (ColorPlus Prestained Protein Marker Broad Range, NEB # P7703) με κωδικό P7709S εύρους 7 – 175 kDa (LOT 0231211) που βρισκόταν αποθηκευμένος σε θάλαμο κατάψυξης του εργαστηρίου.



Εικόνα 11. α (αριστερά) Συσσκευή πολυμερισμού ακρυλαμίδης, β (δεξιά) Συσσκευή ηλεκτροφόρησης

Figure 11. a (left) SDS PAGE polymerization, b (right) Electrophoresis box

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, φορτώνονταν 10 μg ολικής πρωτεΐνης από κάθε είδος και ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading ή sample buffer) (Πίνακας

8, Παράρτημα) με SDS (2x) το οποίο παρασκευαζόταν επίσης στο εργαστήριο και περιείχε μερκαπτοαιθανόλη και γλυκερόλη. Ετοιμαζόταν απόθεμα προς φύλαξη σε βαθιά κατάψυξη (stock) 23 μl και τα δείγματα επωάζονταν, με κλείστρα ασφαλείας, για 5 min στους 95 – 100 °C σε χύτρα με ανοικτό καπάκι.

Αφού ολοκληρωνόταν ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, κατόπιν σχολαστικού ελέγχου και σήμανσης των οπών (πηγαδάκια – wells), οι πηκτές τοποθετούνταν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και η συσκευή γεμιζόταν με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running ή Tank Buffer) που περιείχε γλυκίνη. Τα πηγαδάκια ξεπλένονταν με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tank Buffer) μετά την απομάκρυνση των κτενών, και κατόπιν φορτώνονταν 17,5 μl δείγματος στις μεσαίες οπές. Αποφευγόταν η χρήση των ακραίων οπών των πηκτών.

### 3.4 Ηλεκτρομεταφορά (Wet Transfer)

Μετά το πέρας των 3 h και 5 min, και ελέγχοντας την κατάσταση των πηκτών, και βλέποντας ότι όλες οι σημασμένες πρωτεΐνες του μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder) έχουν διέλθει στο πήγμα διαχωρισμού (separating gel), γινόταν προσεκτική απομάκρυνση του πήγματος επιστοίβασης (stacking gel). Κρατούνταν αυτούσια τα τμήματα των πηγμάτων διαχωρισμού (separating gels), τα οποία με πλαστικές λαβίδες τοποθετούνταν έναστο πάνω σε μεμβράνη PVDF (8,5 cm x 7,5 cm), η οποία προηγουμένως είχε τοποθετηθεί για 5 sec σε καθαρή μεθανόλη, για 2 min σε δις απεσταγμένο νερό, και 2 min σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer). Εκατέρωθεν πήγματος – μεμβράνης που επαφίονταν, τοποθετούνταν νοτισμένα, με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer), χαρτιά Whatman. Το σάντουιτς που προέκυπτε τοποθετούνταν μεταξύ δύο νοτισμένων με διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) σπόγγων, και τοποθετούνταν σε κατάλληλα πλαστικά πλέγματα με κλείστρα ασφαλείας. Στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τοποθετούνταν καθαρός πλαστικοποιημένος μαγνήτης, και η συσκευή τοποθετούνταν σε θάλαμο συντήρησης στους 2 - 4 °C στα 100 mA για 14 – 15 h (overnight) επάνω σε αναδευτήρα (stirrer).

### 3.5 Ανοσοαπότυπωση κατά Western

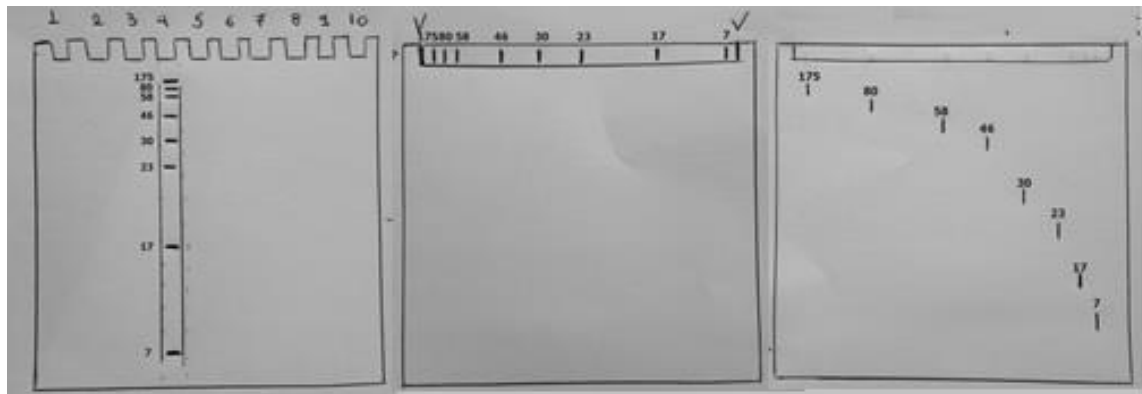
Την τρίτη (3<sup>η</sup>) ημέρα κατά σειρά, αφού προετοιμαζόταν διάλυμα σκόνης γάλακτος σε PBS 1x – Tween (PBS – T), αφαιρούνταν με προσοχή οι PVDF μεμβράνες και γίνοντας 3 πλύσεις με PBS – T. Γινόταν αποφυγή της μη ειδικής σύνδεσης του 1<sup>ου</sup> αντισώματος (Blocking) με το διάλυμα γάλακτος, και ακολούθως χυνόταν το γάλα και



προσθέτονταν 1<sup>ο</sup> αντίσωμα μονοκλωνικό ποντικού PARV – 19 (1 : 4000) (mouse IgG anti-parvalbumin | SIGMA Aldrich). Η επώαση με το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα κρατούσε 2 h. Ακολουθούσαν 3 πλύσεις με PBS – T, και επώαση 1 h με 2<sup>ο</sup> αντίσωμα πολυκλωνικό (1 : 5000) παραγμένο σε κασίικα (goat anti – mouse anti – IgG | SANTACRUZ). Ακολουθούσαν 3 πλύσεις με PBS – T, και στις μεμβράνες γινόταν αντίδραση με DAB (διανιζιδίνης – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(Πίνακας 6). Η εμφάνιση των ζωνών με DAB γινόταν σε χρόνο 1,5 – 2 min. Κατόπιν σταματούσε η αντίδραση, στεγνώνονταν οι μεμβράνες, φυλάσσονταν σε ξηρό και σκοτεινό μέρος σε χαρτιά Whatman. Ακολουθούσε εξουδετέρωση της DAB με διάλυμα χλωρίνης (Πίνακας 10, Παράρτημα).

### 3.6 Ηλεκτροφόρηση σε δύο διαστάσεις 2D SDS PAGE 20%

Για το δείγμα *Chelidonichtys lucerna* έγινε ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων με διαδοχική ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE) 20%. Έγινε φόρτωση 10 μg ολικής πρωτεΐνης και 4 μl μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder) καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) σε πηγαδάκι πήγματος πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE) 20%. Έγινε ηλεκτροφόρηση στα 120 V για 3 h και 40 min. Αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση έγινε αποκοπή της λωρίδας στην οποία έτρεξε πρωτύτερα το δείγμα. Η λωρίδα μετατέθηκε σε οριζόντια θέση σε καινούργιο πήγμα (SDS PAGE) 20%, στο οποίο έγινε επικόλληση της λωρίδας με τη χρήση αγαρόζης 0,1% (Εικόνα 12). Με προσεκτικούς χειρισμούς ώστε να μη χαθεί η απαιτούμενη υγρασία των πηγμάτων, επανατοποθετήθηκε τζάμι και το gel τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Έγινε εκ νέου ηλεκτροφόρηση για 3 h και 30 min. Ακολούθησε ηλεκτρομεταφορά σε ψυκτικό θάλαμο 2-4 °C για 16 h. Έγινε η ίδια διαδικασία για την ανοσοαποτύπωση κατά Western και χρήση DAB.



Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση 2D SDS PAGE 20% : Ηλεκτροφόρηση δείγματος μαζί με μάρτυρα μοριακού βάρους, κοπή και επανατοποθέτηση λωρίδας σε καινούργιο gel χωρίς πηγαδάκια, επικόλληση λωρίδας με αγαρόζη, ηλεκτροφόρηση εκ νέου – διαχωρισμός σε δύο διαστάσεις

Figure 12. 2D SDS PAGE 20% electrophoresis : Electrophoresis run of specimen and molecular marker in the same well, cut of the lane of the first SDS PAGE 20% gel, transposition of the lane upon new SDS PAGE 20% gel instead of well's area, agarose ceiling, new run of electrophoresis – two dimension separation of isoforms

### 3.7 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Μετά τη συλλογή των αποτελεσμάτων ακολούθησε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων στο λογισμικό MS Excel 2016 για την κατασκευή πινάκων και ιστογραμμάτων συχνότητας εμφάνισης των διαφορετικών ισομορφών παρβαλβουμινών. Για τη συσχέτιση της εμφάνισης των διαφορετικών ισομορφών των παρβαλβουμινών με παραμέτρους όπως η βιολογική συγγένεια σε επίπεδο οικογένειας και τάξης, οι τροφικές συνήθειες των ειδών ιχθύων, η βιομάζα των διαφορετικών ειδών, έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου minitab17.

## 4 Αποτελέσματα

### 4.1 Συστηματική ταξινόμηση των υπό διερεύνηση βιολογικών ειδών

Στον Πίνακα 4 ακολούθως παρατίθεται η συστηματική ταξινόμηση για το σύνολο των διαφορετικών ειδών από τα οποία έγινε λήψη ιστού και διερεύνηση της δυνατότητας ανίχνευσης πιθανών ισομορφών παρβαλβουμινών.

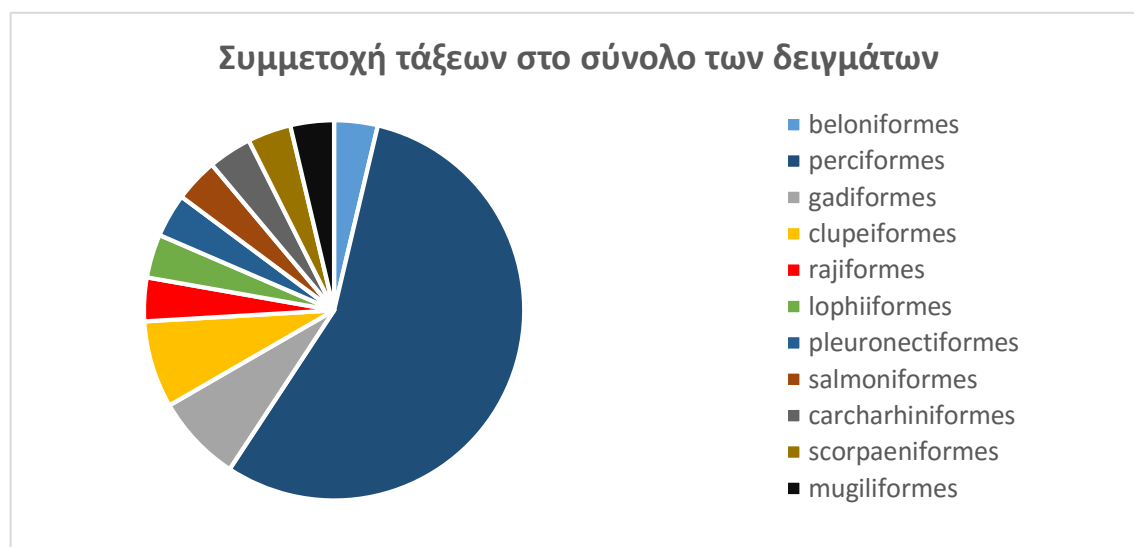
Πίνακας 4. Συστηματική ταξινόμηση ειδών που διερευνήθηκαν

Table 4. Taxonomy of investigated species

Επιστημονική ονομασία	Εμπορική ονομασία	Τάξη	Οικογένεια
<i>Lithognathus mormyrus</i>	μουρμούρα	Perciformes	Sparidae
<i>Scomber scombrus</i>	σκουμπρί	Perciformes	Scombridae
<i>Sparus aurata</i>	τσιπούρα	Perciformes	Sparidae
<i>Chelidonichthys lucerna</i>	χελιδονόψαρο	Scorpaeniformes	Triglidae
<i>Dicentrarchus labrax</i>	λαβράκι	Perciformes	Moronidae
<i>Sarpa salpa</i>	σάλπα	Perciformes	Sparidae
<i>Belone belone</i>	ζαργάνα	Beloniformes	Belonidae
<i>Merluccius merluccius</i>	μπακαλιαράκι	Gadiformes	Merluccidae
<i>Sardina pilchardus</i>	σαρδέλα	Clupeiformes	Clupeidae
<i>Liza aurata</i>	κεφαλόπουλο	Mugiliformes	Mugilidae
<i>Spicara smaris</i>	μαρίδα	Perciformes	Centracanthidae
<i>Diplodus sargus sargus</i>	σαργός	Perciformes	Sparidae
<i>Sphyaena sphyaena</i>	λούτσος	Perciformes	Sphyaenidae
<i>Pomatomus saltatrix</i>	γοφάρι	Perciformes	Pomatomidae
<i>Pagellus erithrinus</i>	λυθρίνι	Perciformes	Sparidae
<i>Gobius spp</i>	γοβιός	Perciformes	Gobiidae
<i>Diplodus annularis</i>	σπάρος	Perciformes	Sparidae
<i>Engaulis encrasicolus</i>	γαύρος	Clupeiformes	Engaulidae
<i>Sparisoma cretense</i>	σκάρος	Perciformes	Scaridae
<i>Merlangius merlangus</i>	ταούκι	Gadiformes	Gadidae
<i>Raja radula</i>	βάτος	Rajiformes	Rajidae
<i>Mullus surmuletus</i>	μπαρμπούνι	Perciformes	Mullidae
<i>Lophius piscatorius</i>	πεσκανδρίτσα	Lophiiformes	Lophiidae
<i>Solea solea</i>	γλώσσα	Pleuronectiformes	Soleidae
<i>Mullus barbatus</i>	κουτσομούρα	Perciformes	Mullidae
<i>Salmo salar</i>	σολομός	Salmoniformes	Salmonidae
<i>Galeorhinus galeus</i>	γαλέος	Carcharhiniformes	Triakidae

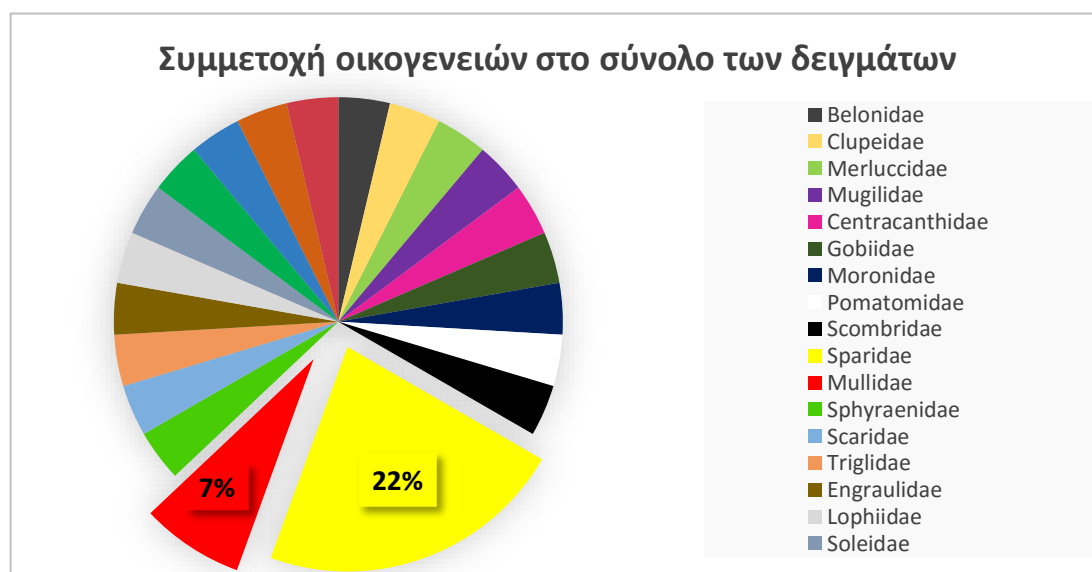
Συνολικά τα είδη που διερευνήθηκαν ταξινομήθηκαν στις 11 τάξεις που αναφέρονται στον πίνακα 4 στην τρίτη στήλη («τάξη»), και συνολικά 21 οικογένειες που αναφέρονται στον πίνακα 4 στην τέταρτη στήλη («οικογένεια»). Τα περισσότερα δείγματα που συνήθως αλιεύονται με σκοπό την κατανάλωση από τις θάλασσες του

Βορείου Αιγαίου, και άτομα των οποίων λήφθηκαν για διερεύνηση, όπως διαφαίνεται και στον πίνακα 4, ανήκουν στην τάξη Perciformes και πολλά ανήκουν στην οικογένεια Sparidae (Εικόνες 13, 14). Με κίτρινο χρώμα (ποσοστό 22%) σημαίνεται η οικογένεια Sparidae, και με κόκκινο χρώμα (ποσοστό 4%) η Mullidae. Οι υπόλοιπες οικογένειες ισοκατανέμονται με ποσοστό 4% επί του συνόλου, δηλαδή αντιπροσωπεύονται μόνο από ένα άτομο στο σύνολο των δειγμάτων.



Εικόνα 13. Συμμετοχή των 11 διαφορετικών τάξεων που αναγνωρίστηκαν στα δείγματα που διερευνήθηκαν στο σύνολο των ιχθύων

Figure 13. Participation of the 11 different orders identified in our samples



Εικόνα 14. Συμμετοχή των 21 διαφορετικών οικογενειών που αναγνωρίστηκαν στα δείγματα που διερευνήθηκαν στο σύνολο των ιχθύων (κίτρινο χρώμα οικογένεια Sparidae)

Figure 14. Participation of the 21 different families identified in our samples

## 4.2 Τεχνικές επαναλήψεις

Αρχικά θεωρήθηκε σημαντικό να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα στην ανίχνευση των διαφόρων ισομορφών των παρβαλβουμινών με την Ανάλυση Κατά Western. Οι τεχνικές επαναλήψεις του ίδιου δείγματος σε διαφορετικά ηλεκτροφορήματα (Εικόνα 15 α, β) επιβεβαίωσαν ότι το πρότυπο των εμφανιζόμενων ανά είδος ζωνών παραμένει σταθερό, οπότε και ακολουθήθηκαν με ικανοποιητική ακρίβεια τα πρωτόκολλα παρασκευής των πηγμάτων πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE), η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης και ηλεκτρομεταφοράς έως και την ανοσοαποτύπωση κατά Western που περιγράφονται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Ενδεικτικά, παρατίθενται δύο μεμβράνες PVDF στις οποίες έχει ηλεκτροφορηθεί το ίδιο δείγμα του ίδιου ατόμου σε ίση ποσότητα προς επιβεβαίωση του προτύπου.



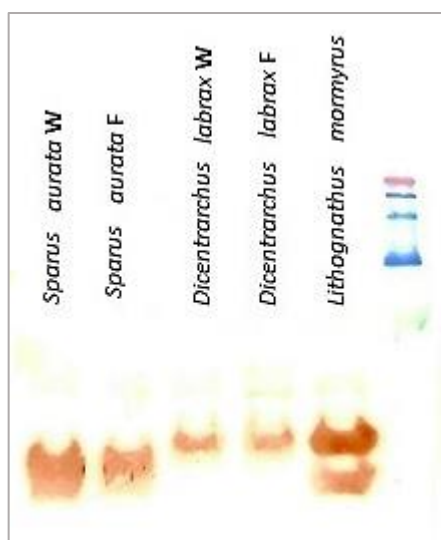
Εικόνα 15 α,β. Μεμβράνες PVDF μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western και εφαρμογή DAB. Σταθεροποίηση του προτύπου για τα δείγματα σε δύο τεχνικές επαναλήψεις (μεμβράνη α αριστερά : 1<sup>η</sup> τεχνική δοκιμή, μεμβράνη β δεξιά : 2<sup>η</sup> τεχνική δοκιμή)

Figure 15 a,b. PVDF membranes after Western Blot procedure DAB stained indicate a characteristic parvalbumin pattern for the same specimens during two technical replication (membrane a left : 1<sup>st</sup> replicate, membrane b right : 2<sup>nd</sup> replicate)

## 4.3 Σύγκριση αγρίου αλιεύματος και εκτρεφόμενου για τα είδη *Sparus aurata* και *Dicentrarchus labrax*

Διερευνήθηκε στη συνέχεια κατά πόσο οι συνθήκες διαβίωσης-διατροφής επηρεάζουν το πρότυπο παραγωγής των παρβαλβουμινών. Για το σκοπό δείγματα που απομονώθηκαν από άγρια αλιεύματα ή εκτρεφόμενα άτομα *Sparus aurata* (τσιπούρα) και *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι) υποβλήθηκαν σε ανάλυση κατά Western. Δε φάνηκε να προκύπτει διαφοροποίηση μεταξύ άγριων και

καλλιεργούμενων σε καμία εκ των τριών βιολογικών επαναλήψεων (Εικόνα 16). Λαμβάνοντας αυτά τα αποτελέσματα επιλέχθηκαν άτομα αγρίων πληθυσμών και όχι καλλιεργούμενα για τη συνέχεια του πειράματος.



Εικόνα 16. Μembrάνη pvdf μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western και εφαρμογή DAB. Δεν παρατηρείται διαφοροποίηση των ισομορφών των ίδιων ειδών μεταξύ αγρίων αλιευμάτων και εκτρεφόμενων ατόμων (*Lithognathus mormyrus* (μουρμούρα) θετικός μάρτυρας)

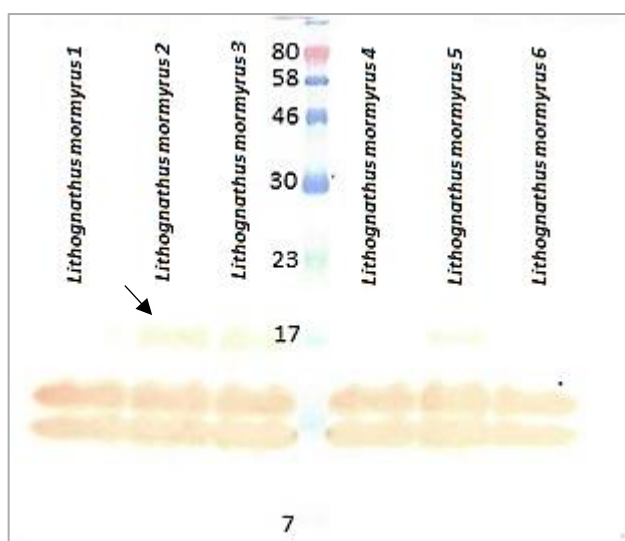
Figure 16. PVDF membrane after Western Blot procedure DAB stained indicating the exact same parvalbumin pattern between wild and farmed fish of the same fish species (Wild and Farmed *Sparus aurata*, Wild and Farmed *Dicentrarchus labrax*) (positive parvalbumin control *Lithognathus mormyrus*)

#### 4.4 Βιολογικές επαναλήψεις

Στη συνέχεια θεωρήθηκε σημαντικό να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου απομόνωσης των παρβαλουμινών. Για το σκοπό αυτό τριπλά ή διπλά δείγματα λευκού μυός που απομονώθηκαν από διαφορετικά είδη, υποβλήθηκαν σε Ανάλυση Κατά Western όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι βιολογικές επαναλήψεις τριών ή δύο ατόμων από κάθε αλίευμα παρουσιάζονται στην εικόνες 17 – 18 και δείχνουν σταθερό πρότυπο ισομορφών των παρβαλουμινών για κάθε είδος. Επιπλέον, φαίνεται να προκύπτει ότι βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις μεταξύ ατόμων δύο διαφορετικών αλιευμάτων, της ευρύτερης περιοχής της Χαλκιδικής, επιβεβαιώνουν σταθερό πρότυπο ζωνών για το ίδιο είδος (Εικόνα 17).

Ειδικότερα, στην εικόνα 17, τα άτομα του ίδιου αλιεύματος (10/11/2015) του είδους *Lithognathus mormyrus* (μουρμούρα) που αλιεύθηκαν στην περιοχή της Χαλκιδικής (Τορωναίος Κόλπος) καθώς και άτομα του ίδιου είδους που αλιεύθηκαν από τον ίδιο αλιέα (12/01/2016) επίσης στην περιοχή Μαρμαράς της Χαλκιδικής (Μαρμαράς) δείχνουν το ίδιο ακριβώς πρότυπο ισομορφών παρβαλβουμινών.

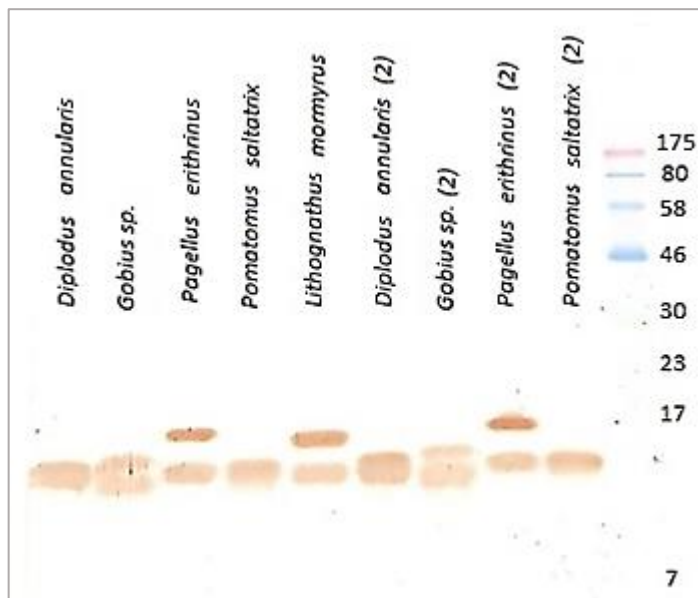
Στις εικόνες 17 – 18 διακρίνονται τρεις ζώνες από τις ισομορφές των παρβαλβουμινών, δύο από τις οποίες με μέγεθος περίπου 10 – 12 kDa είναι έντονες ενώ η τρίτη που είναι λιγότερο έντονη έχει μέγεθος περίπου 17 kDa.



Εικόνα 17. Μεμβράνη pvdf μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western και εφαρμογή DAB. Αριστερά του μοριακού μάρτυρα τα 3 δείγματα *Lithognathus mormyrus* 1,2,3: *Lithognathus mormyrus* (μουρμούρα) αλιευμένα 10/11/2015, δεξιά του μοριακού μάρτυρα τα 3 δείγματα *Lithognathus mormyrus* 4,5,6: αλιευμένα 12/01/2016 στη Χαλκιδική. Το βέλος δείχνει λιγότερο έντονη ζώνη στην περιοχή των 17 kDa

Figure 17. PVDF membrane after Western Blot procedure DAB stained indicating a characteristic parvalbumin pattern for *Lithognathus mormyrus*. The six different persons of the same fish species *Lithognathus mormyrus* – three persons caught specimens 1,2,3 : caught on 10/11/2015 and three specimens 4,5,6 : caught 12/01/2016 all in Chalkidiki's fishing are during two technical replication (on the left of the molecular marker : 1<sup>st</sup> biological replicate, on the right of the molecular marker : 2<sup>nd</sup> biological replicate)

Στην εικόνα 18, φαίνονται οι ζώνες που λήφθηκαν από 5 διαφορετικά βιολογικά είδη και είναι ενδεικτική των αποτελεσμάτων, καταδεικνύει ότι το πρότυπο μεταβάλλεται από είδος σε είδος. Φαίνεται, επίσης, ότι και σε αυτή την περίπτωση το πρότυπο παραμένει σταθερό μεταξύ διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους.



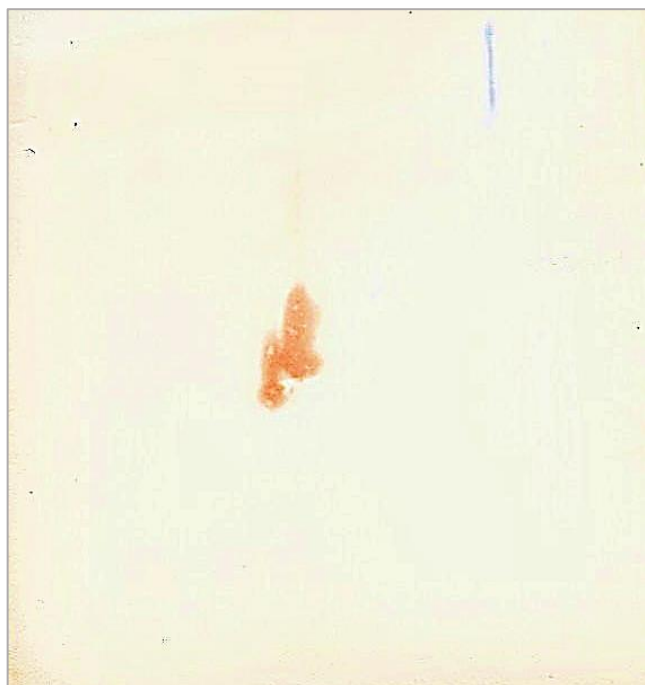
Εικόνα 18. Μembrάνη pvdf μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western και εφαρμογή DAB. Διαφοροποίηση των ισομορφών των διαφορετικών ειδών μεταξύ τους, με εμφάνιση σταθερού προτύπου ζωνών για το ίδιο είδος (*Lithognathus mormyrus* (μουρμούρα) θετικός μάρτυρας)

Figure 18. PVDF membrane after Western Blot procedure DAB stained indicating a differentiation of the parvalbumin pattern between different fish species, while indicating a characteristic isoform pattern for the same fish species (positive parvalbumin control *Lithognathus mormyrus*)

#### 4.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης *Chelidonichtys lucerna* σε 2D SDS PAGE

Για να επιβεβαιωθεί ότι οι μικρού μεγέθους εμφανιζόμενες έντονες ζώνες στην περιοχή μεταξύ 7 – 17 kDa αποτελούν περισσότερες της μίας (1) διαφορετικές ισομορφές, έγινε προσπάθεια παρασκευής και ηλεκτροφόρησης 2D SDS PAGE gel για δείγμα του *Chelidonichtys lucerna* (χελιδονόψαρο). Στην εικόνα 19 φαίνεται να ενισχύεται η άποψη ότι οι έντονες κατώτερες ζώνες της μεμβράνης δεν αποτελούν απλά ένδειξη ύπαρξης μιας ισομορφής κάτω των 17 kDa, αλλά ότι είναι άθροισμα δύο ή και τριών ισομορφών με παραπλήσιο μοριακό βάρος οι οποίες προσπίπτουν η μία πλησίον της άλλης.



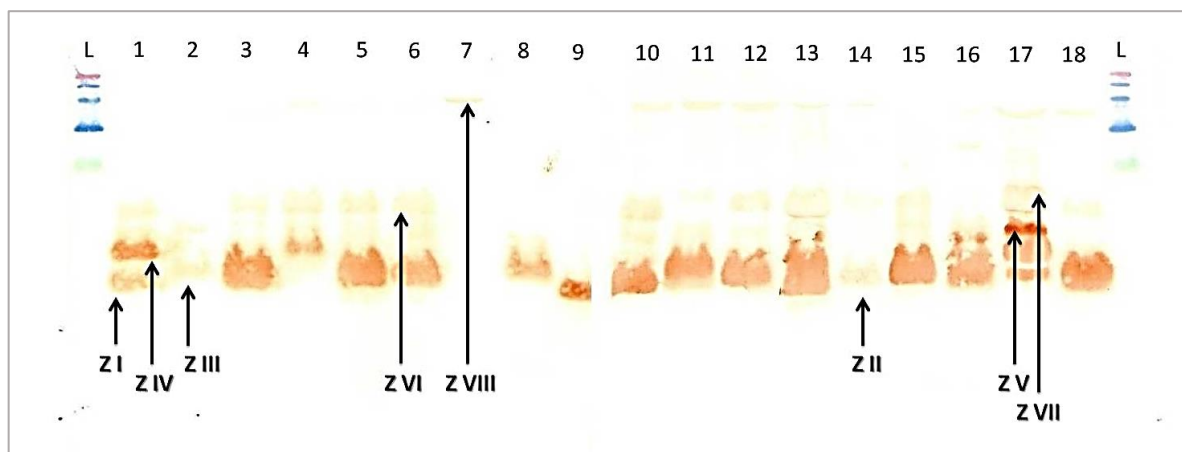


Εικόνα 19. Διαχωρισμός των κατώτερων (7 – 17 kDa) έντονων ζωνών παρβαλβουμινών από 2D SDS PAGE μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western για το είδος *Chelidonichthys lucerna* (χελιδονόψαρο)

Figure 19. Separation of the lower bands (7 – 17 kDa) after 2D SDS PAGE 20% electrophoresis and Western Blot (DAB stained) for *Chelidonichthys lucerna* species

#### 4.6 Αναγνώριση διαφορετικών ισομορφών

Με βάση την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων όσον αφορά στο ηλεκτροφορητικό πρότυπο των διαφόρων ισομορφών των παρβαλβουμινών στα διάφορα είδη (Εικόνα 18) έγινε στη συνέχεια ανάλυση κατά Western και ανοσοαποτύπωση όλων των δειγμάτων ταυτόχρονα. Το δείγμα από *Lithognathus mormyrus* (μουρμούρα) χρησιμοποιήθηκε ως κοινός μάρτυρας σε όλα τα ηλεκτροφορήματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 20 και δείχνουν την ανίχνευση 8 διαφορετικών ζωνών που αντιστοιχούν σε ισομορφές των παρβαλβουμινών. Στον πίνακα 5 παρουσιάζεται το μέγεθος των ισομορφών αυτών. Με τις ακόλουθες δύο μεμβράνες, παρατίθενται οι 8 διαφορετικές ζώνες οι οποίες φαίνεται να εμφανίζονται στα διερευνηθέντα είδη ιχθύων.



Εικόνα 20. Μembrάνη pvdf μετά από ανάλυση κατά Western για την ανίχνευση των διαφόρων ισομορφών της παρβαλβουμίνης. L:Ladder, 1:*Lithognathus mormyrus*, 2:*Scomber scombrus*, 3:*Sparus aurata*, 4:*Dicentrarchus labrax*, 5:*Sphyræna sphyræna*, 6:*Pomatomus saltatrix*, 7:*Raja radula*, 8:*Engaulis encrasicolus*, 9:*Solea solea*, 10:*Mullus barbatus*, 11:*Belone belone*, 12:*Liza aurata*, 13:*Gobius spp*, 14:*Merluccius merluccius*, 15:*Spicara smaris*, 16:*Sardina pilchardus*, 17:*Chelidonichtys lucerna*, 18:*Diplodus sargus sargus*, ZI:Ζώνη I, ZII:Ζώνη II, ZIII:Ζώνη III, ZIV:Ζώνη IV, ZV:Ζώνη V, ZVI:Ζώνη VI, ZVII:Ζώνη VII, ZVIII:Ζώνη VIII

Figure 20. PVDF membrane after Western Blot procedure DAB stained indicating parvalbumin patterns of eighteen fish species detecting eight different bands. Different bands are probably different parvalbumin isoforms. L:Ladder, 1:*Lithognathus mormyrus*, 2:*Scomber scombrus*, 3:*Sparus aurata*, 4:*Dicentrarchus labrax*, 5:*Sphyræna sphyræna*, 6:*Pomatomus saltatrix*, 7:*Raja radula*, 8:*Engaulis encrasicolus*, 9:*Solea solea*, 10:*Mullus barbatus*, 11:*Belone belone*, 12:*Liza aurata*, 13:*Gobius spp*, 14:*Merluccius merluccius*, 15:*Spicara smaris*, 16:*Sardina pilchardus*, 17:*Chelidonichtys lucerna*, 18:*Diplodus sargus sargus*, ZI:Band I, ZII:Band II, ZIII:Band III, ZIV:Band IV, ZV:Band V, ZVI:Band VI, ZVII:Band VII, ZVIII:Band VIII

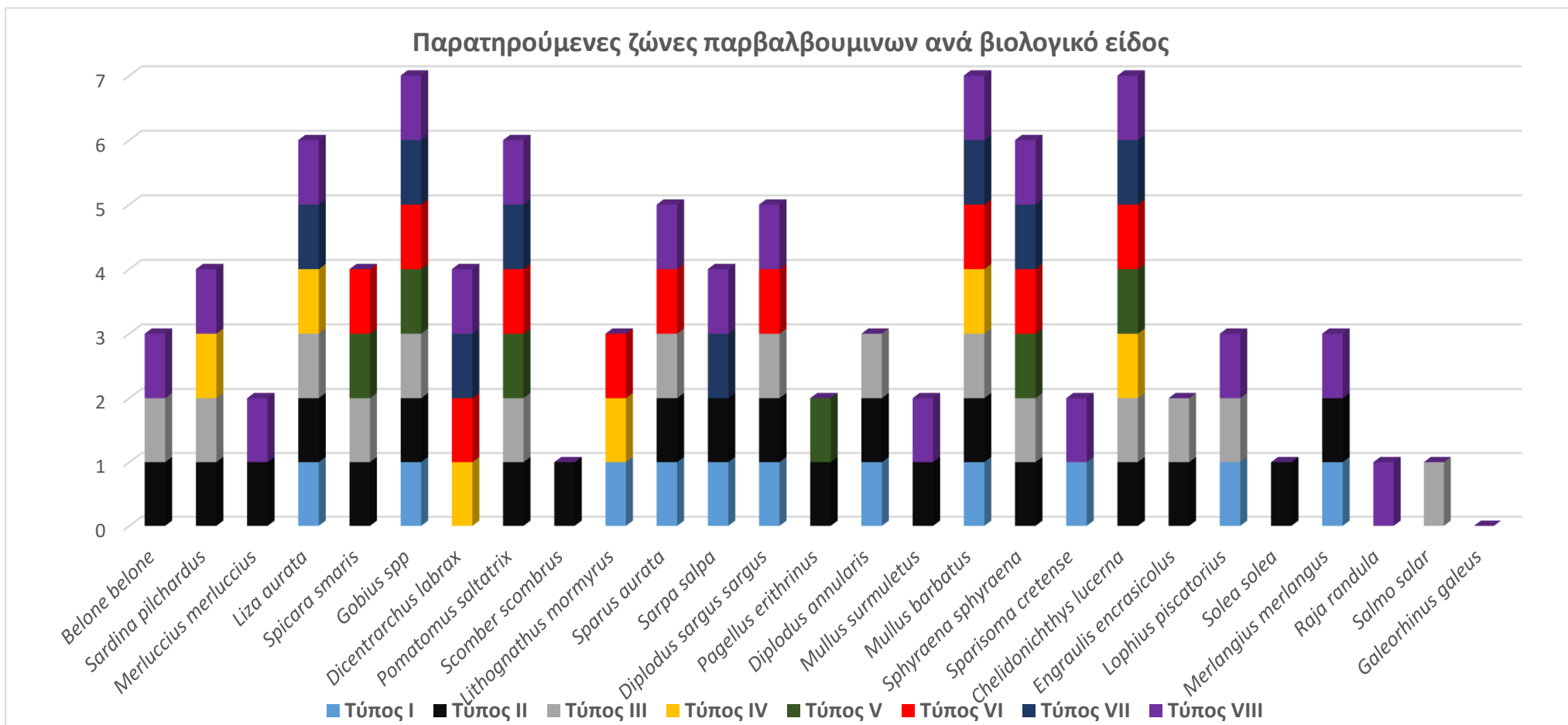
Πίνακας 5. Παρατηρούμενες ζώνες ισομορφών ανά είδος ιχθύος

Table 5. Observed parvalbumin isoforms among different fish species

Τύπος Ισομορφής	Εκτιμώμενο Μοριακό Βάρος (kDa)
Τύπος I	10 - 11
Τύπος II	11 - 12
Τύπος III	12 - 14
Τύπος IV	14 - 15
Τύπος V	17
Τύπος VI	18 - 19
Τύπος VII	21
Τύπος VIII	46

Συγκεντρώνοντας τα δεδομένα (Πίνακας 11, Παράρτημα) που προέκυψαν από τις μεμβράνες σχετικά με τις εμφανιζόμενες ζώνες οι οποίες φαίνεται να αποτελούν διαφορετικές ισομορφές παρβαλβουμινών, κατασκευάστηκε ιστόγραμμα

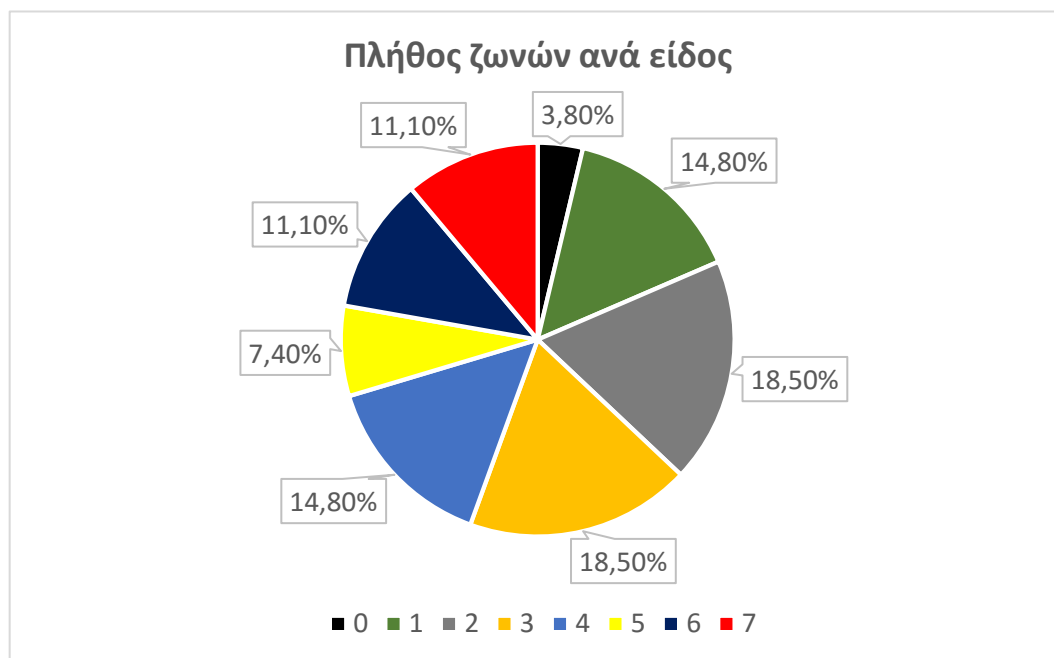
συχνότητων εμφάνισης των ισομορφών ανά βιολογικό είδος (Εικόνα 21). Το ιστόγραμμα συνέβαλε σε μια αρχική ποιοτική εκτίμηση της μεταβολής των ισομορφών των παρβαλβουμινών μεταξύ των διαφορετικών ειδών ιχθύων. Τα συγγενικά μεταξύ τους, σε επίπεδο οικογένειας (Sparidae), είδη *Sparus aurata* (τσιπούρα) και *Diplodus sargus sargus* (σαργός), φαίνεται να εμφανίζουν το ίδιο σταθερό χαρακτηριστικό πρότυπο ισομορφών παρβαλβουμινών. Είδη της οικογένειας Sparidae, όπως και τα *Diplodus sargus sargus* και το *Diplodus annularis* (σπάρος) έχουν περισσότερες των δύο κοινές ισομορφές. Επίσης, τα *Mullus barbatus* (κουτσομούρα) και *Mullus surmuletus* (μπαρμπούνι) που ανήκουν στην ίδια οικογένεια (Mullidae) έχουν δύο κοινές ισομορφές.



Εικόνα 21. Ιστόγραμμα συχνότητας εμφάνισης των 8 διαφορετικών ζωνών ισομορφών οι οποίες φαίνεται να ανιχνεύονται στα 27 είδη ιχθύων που διερευνήθηκαν

Figure 21. Histogram of frequency of the existence of the 8 different isoforms' bands investigated in 27 species

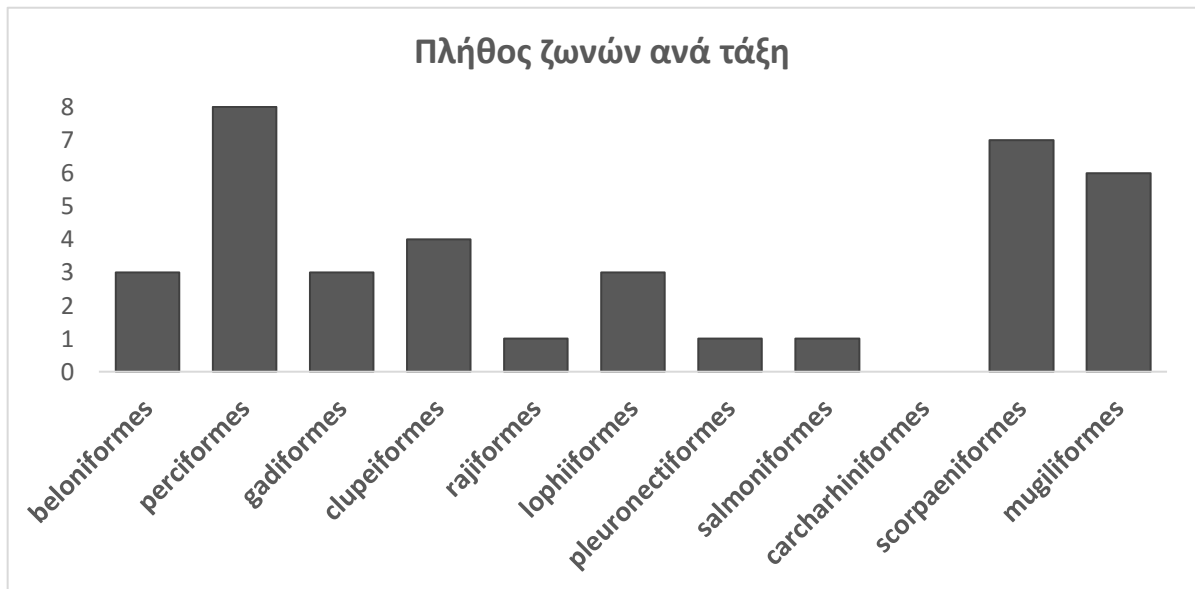
Στο Διάγραμμα που ακολουθεί φαίνεται το πλήθος των διαφορετικών ισομορφών που φέρουν τα 27 διερευνηθέντα είδη (Εικόνα 22). Το 14,8% εμφανίζει μόλις 1 ισομορφή, με την πλειοψηφία αυτών να έχουν την ισομορφή αυτή στην περιοχή 7 – 17 kDa. Το 37% των παρατηρήσεων έδειξαν μεταξύ 2 και 3 διαφορετικών ισομορφών, ενώ το 44,4% εμφάνισε 4 ή και περισσότερες διαφορετικές ισομορφές (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Πλήθος ισομορφών στα διαφορετικά είδη. Ένα είδος δεν εμφάνισε καμία ισομορφή 3,80%, 14,80% των ειδών έδειξε μία ισομορφή, 11,10% έδειξε τρεις ισομορφές

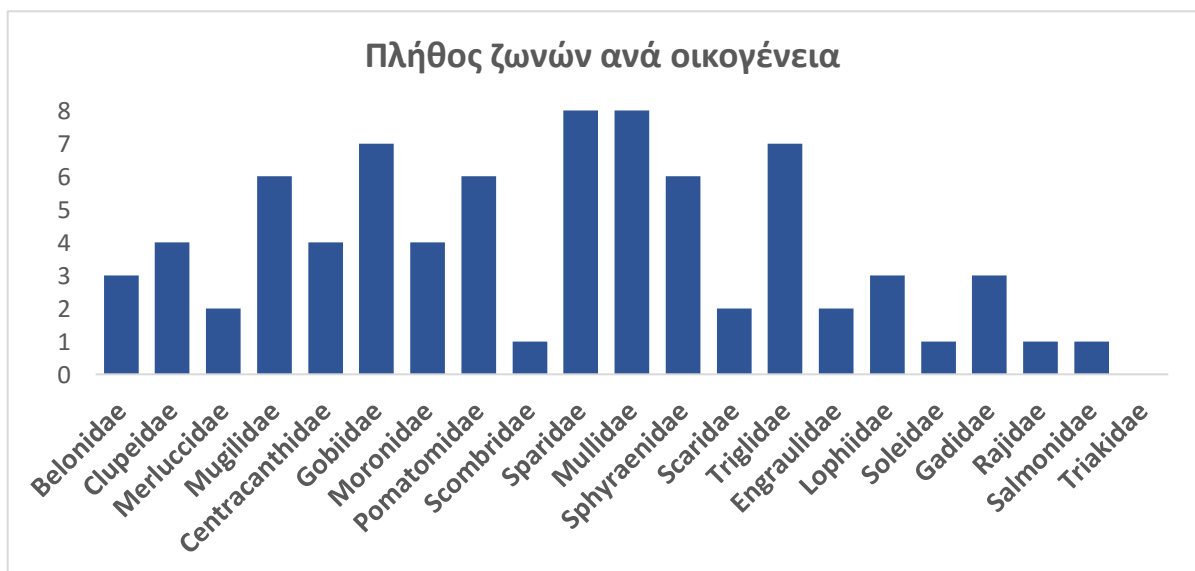
Figure 22. Number of different isoforms revealed in 27 different species. One species showed none isoform forming 3,80% of total specimens observations, 14,80% of the investigated species presented only one isoform, 11,10% of the species presented three isoforms

Όσον αφορά στις παρατηρούμενες ζώνες που εμφανίστηκαν από την ανάλυση κατά Western, φαίνεται ότι η τάξη Perciformes, και ειδικότερα, η οικογένεια Sparidae εμφάνισαν το σύνολο των διαφορετικών ισομορφών. Η τάξη Rajiformes δεν εμφάνισε ισομορφές μεταξύ 7 – 17 kDa. Η τάξη Carcharhiniformes δεν εμφάνισε καμία ισομορφή (Εικόνα 23). Στο Διάγραμμα 6, φαίνονται οι διαφορετικές ζώνες που παρατηρήθηκαν αναφορικά με τις επιμέρους διερευνηθείσες οικογένειες (Εικόνα 24).



Εικόνα 23. Ιστόγραμμα συχνότητας εμφάνισης των 8 διαφορετικών ισομορφών από τις διαφορετικές τάξεις ιχθύων

Figure 23. Histogram of frequency of the eight investigated isoforms among the different investigated orders

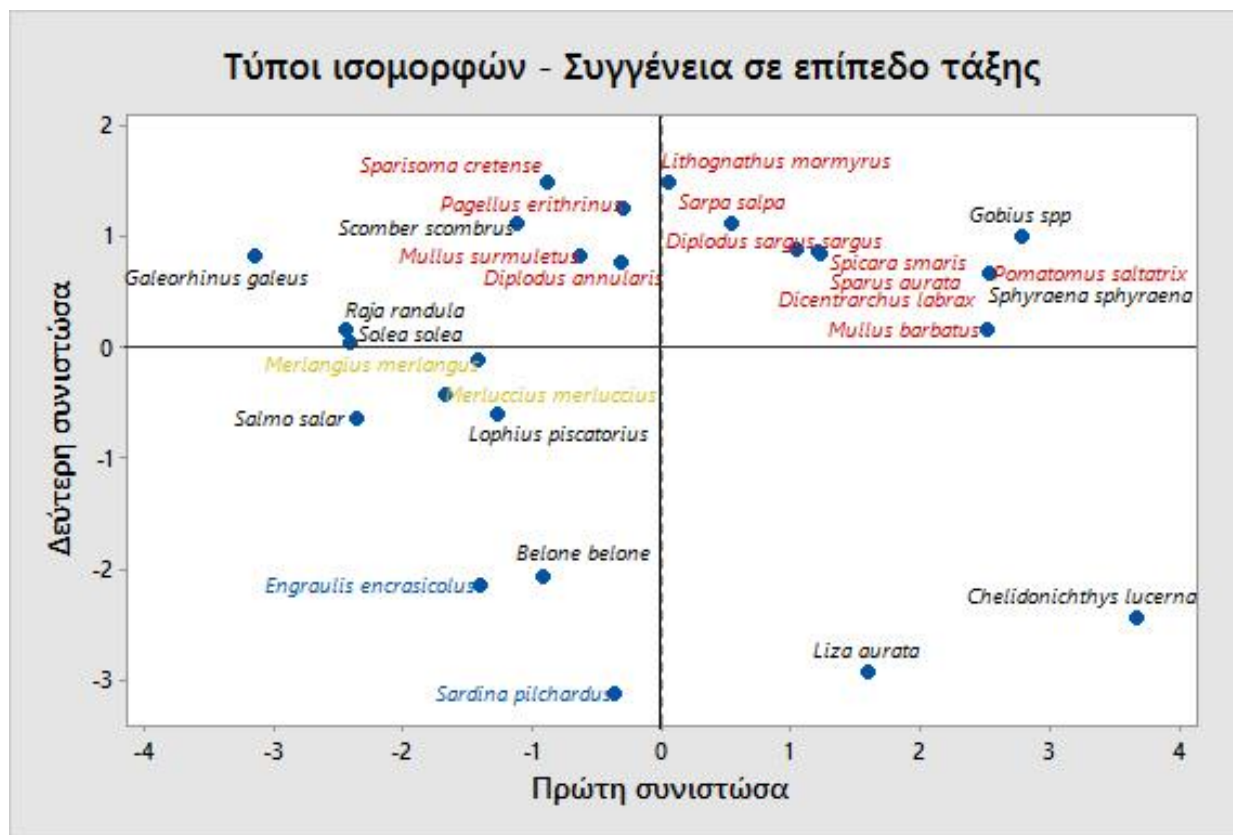


Εικόνα 24. Ιστόγραμμα συχνότητας εμφάνισης των 8 διαφορετικών ισομορφών από τις διαφορετικές οικογένειες ιχθύων

Figure 24. Histogram of frequency of eight investigated isoforms among the different investigated families

#### 4.7 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

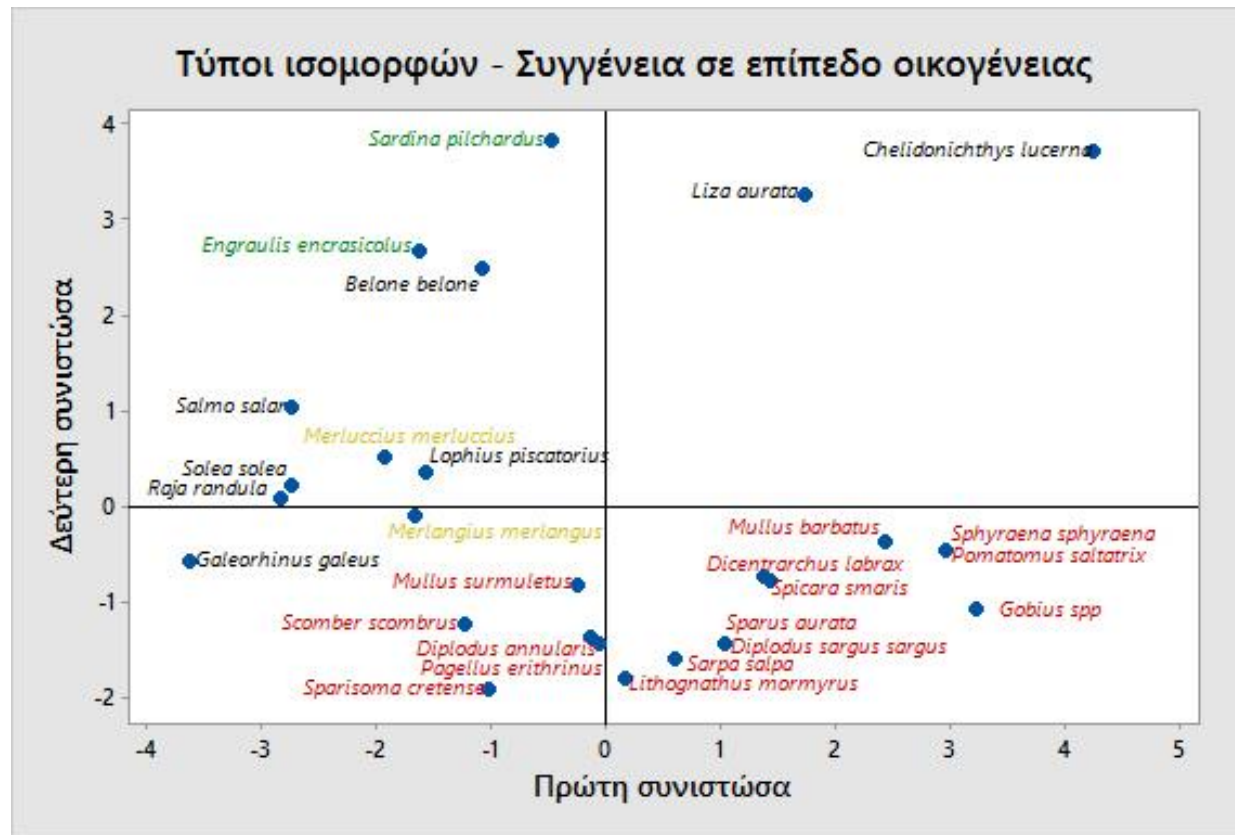
Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) στο λογισμικό minitab17 συνέβαλε σε περαιτέρω ποιοτική εκτίμηση των δοθέντων, από τις αναλύσεις κατά Western, αποτελεσμάτων. Τοποθετώντας τα δεδομένα σχετικά με την ύπαρξη των παρατηρούμενων ζωνών στις μεμβράνες μετά την ανάλυση κατά Western, και συνεκτιμώντας τη συγγένεια των ειδών σε επίπεδο τάξης, τάξης και οικογένειας, αλλά και σε συνάρτηση με άλλους παράγοντες όπως το σχήμα σώματος και το βάθος στο οποίο φαίνεται να διαβιούν τα διερευνηθέντα είδη ιχθύων σύμφωνα με την επιστημονική βάση δεδομένων «fishbase», λήφθηκαν διαγράμματα (τύπου «score plots»). Στην εικόνα 25 φαίνεται ότι οι παρατηρούμενες ανά είδος ισομορφές συνεκτιμημένες με τη συγγένεια σε επίπεδο τάξης ομαδοποιούν τα διερευνηθέντα είδη της τάξης Perciformes (Εικόνα 25). Συνυπολογίζοντας τη συγγένεια σε επίπεδο οικογένειας, ομαδοποιούνται πάλι τα συγγενικά είδη (τάξη Perciformes, οικογένειες Sparidae και Mullidae) (Εικόνα 26). Δίνοντας στο λογισμικό την πληροφορία για τις παρατηρούμενες ισομορφές και το σχήμα σώματος του είδους, φαίνεται ότι υπάρχει σχετική ομαδοποίηση των βιολογικών ειδών σε ομάδες που τυγχάνουν συγγενικές σε επίπεδο τάξης ή ακόμη και οικογένειας, όπως τα είδη της οικογένειας Sparidae (Εικόνα 27). Τέλος, άλλες παράμετροι όπως το βάθος της στήλης του ύδατος στο οποίο φέρονται να διαβιούν τα συγκεκριμένα βιολογικά είδη, το σημείο αλίευσης και η μάζα σώματος δε φάνηκε να ομαδοποιούν ικανοποιητικά τις παρατηρήσεις (ενδεικτικά Εικόνα 28).



Εικόνα 25. Ανάλυση PCA στο minitab17. Ομαδοποίηση παρατηρούμενων ισομορφών σε συνάρτηση της συγγένειάς τους σε επίπεδο τάξης (πράσινο : Clupeiformes, κόκκινο : Perciformes, κίτρινο : Gadiformes)

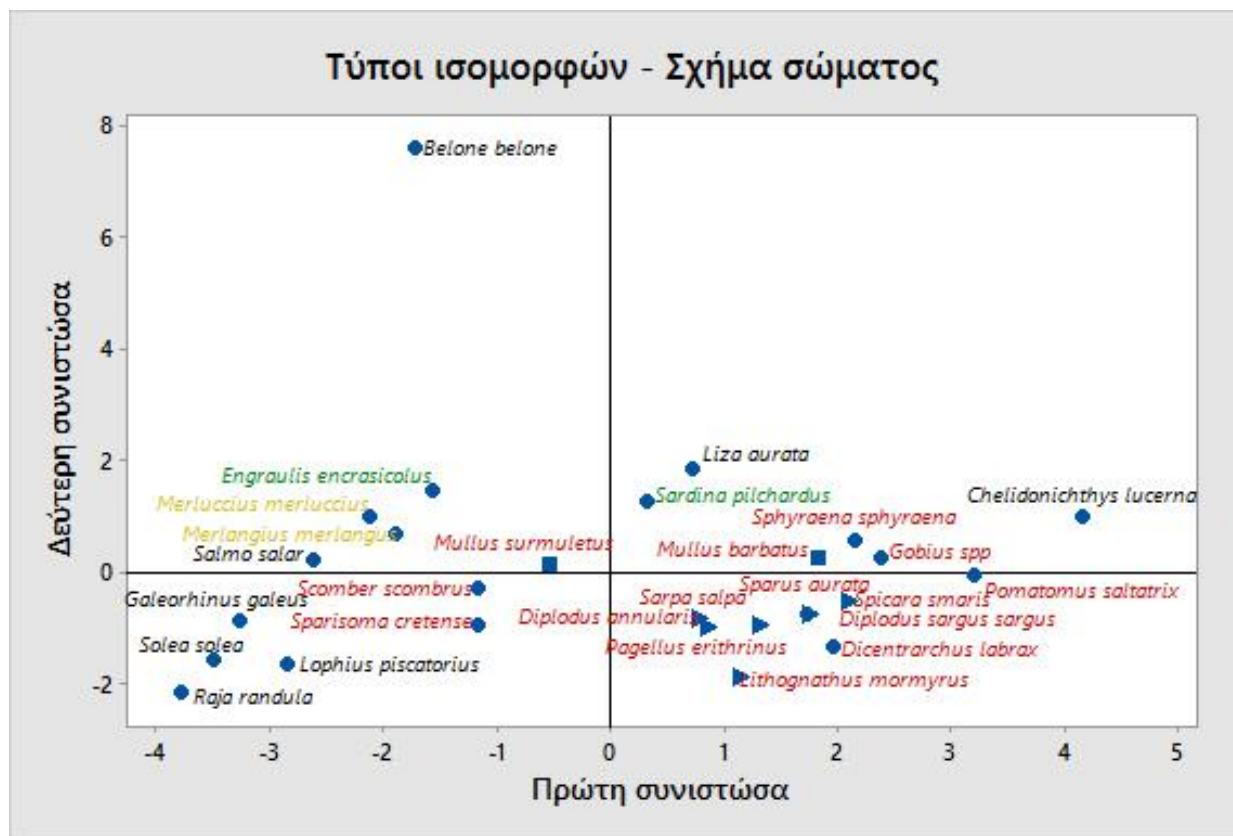
Figure 25. PCA analysis on minitab17 indicating the formation of groups of the investigated parvalbumin isoforms correlated with the taxonomic relation of order (green : Clupeiformes, red : Perciformes, yellow : Gadiformes)





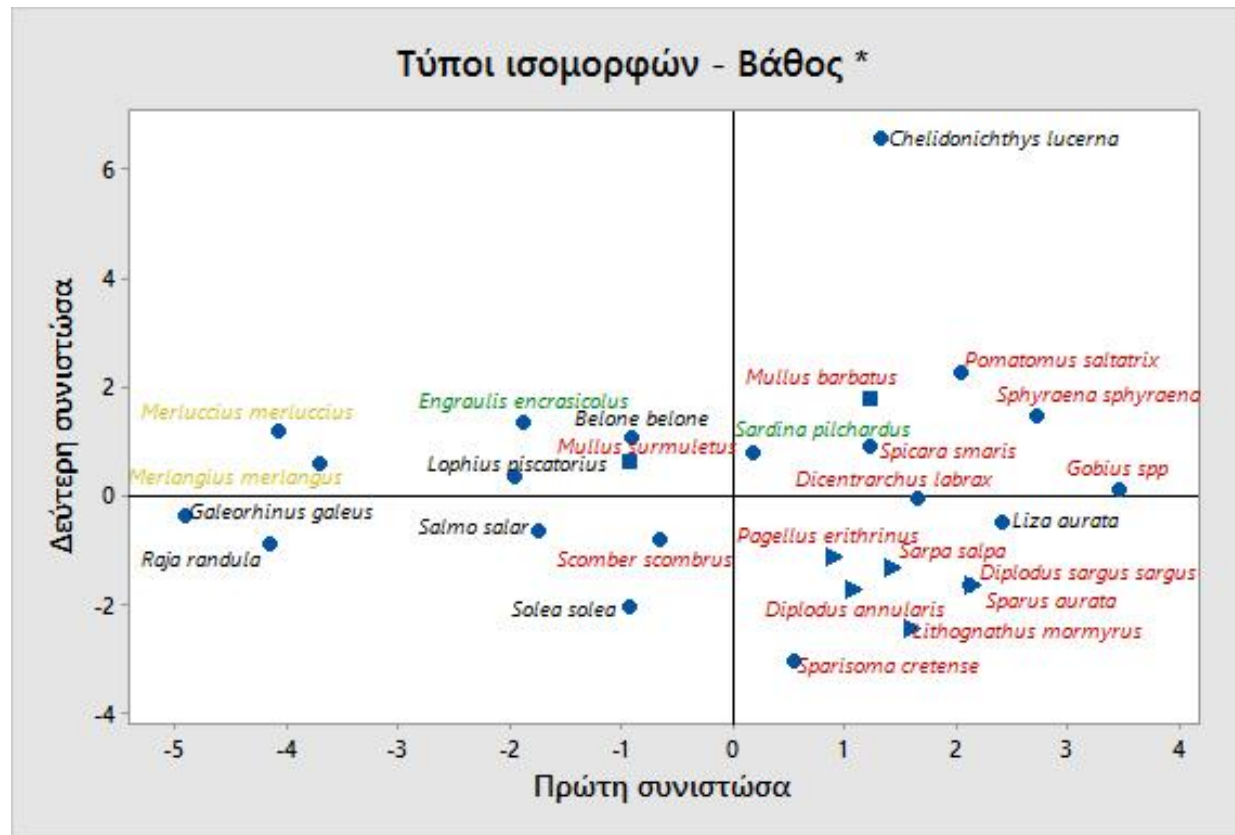
Εικόνα 26. Ανάλυση PCA στο minitab17. Ομαδοποίηση παρατηρούμενων ισομορφών σε συνάρτηση της συγγένειάς τους σε επίπεδο τάξης και οικογένειας (πράσινο : Clupeiformes, κόκκινο : Perciformes, κίτρινο : Gadiformes | τρίγωνο : Sparidae, τετράγωνο : Mullidae)

Figure 26. PCA analysis on minitab17 indicating the formation of groups of the investigated parvalbumin isoforms correlated with the taxonomic relation of order and family (green : Clupeiformes, red : Perciformes, yellow : Gadiformes | triangle : Sparidae, square : Mullidae)



Εικόνα 27. Ανάλυση PCA στο minitab17. Ομαδοποίηση παρατηρούμενων ισομορφών σε συνάρτηση με το σχήμα σώματος (πράσινο : Clupeiformes, κόκκινο : Perciformes, κίτρινο : Gadiformes | τρίγωνο : Sparidae, τετράγωνο : Mullidae)

Figure 27. PCA analysis on minitab17 indicating the formation of groups of the investigated parvalbumin isoforms correlated with body shape (green : Clupeiformes, red : Perciformes, yellow : Gadiformes | triangle : Sparidae, square : Mullidae)



Εικόνα 28. Ανάλυση PCA στο minitab17. Ομαδοποίηση παρατηρούμενων ισομορφών σε συνάρτηση με το βάθος της θέσης του στη στήλη του ύδατος (πράσινο : Clupeiformes, κόκκινο : Perciformes, κίτρινο : Gadiformes | τρίγωνο : Sparidae, τετράγωνο : Mullidae) \* Βάθος : δεδομένο από τη βάση δεδομένων fishbase.org

Figure 28. PCA analysis on minitab17 not indicating any specific pattern of groups considering the investigated parvalbumin isoforms correlated with usual depth of its species habitat (green : Clupeiformes, red : Perciformes, yellow : Gadiformes | triangle : Sparidae, square : Mullidae)\*Depth based on fishbase.org data

## 5 Συζήτηση

Η παρούσα εργασία αποτελεί μία από τις πρώτες προσπάθειες διερεύνησης της δυνατότητας ανίχνευσης των ισομορφών των δυνητικά αλλεργιογόνων παρβαλβουμινών σε άγρια αλιεύματα των ελληνικών θαλασσών. Πολλά εκ των διερευνηθέντων ειδών φαίνεται να συμμετέχουν για πρώτη φορά σε έλεγχο αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε παγκόσμια κλίμακα (ενδεικτικές εργασίες Van Do et al. 2005, Liu et al. 2010, Kuehn et al. 2010, πίνακες Allergome). Ενδεικτικά, αναφέρονται τα είδη *Belone belone* (ζαργάνα), *Pomatomus saltatrix* (γοφάρι), *Lithognathus mormyrus* (μυρμούρα), *Sarpa salpa* (σάλπα), *Chelidonichthys lucerna* (χελιδονόψαρο), *Raja radula* (βάτος), τα οποία αποτελούν γνωστά βρώσιμα αλιεύματα των ελληνικών θαλασσών ιδίως σε νησιωτικές περιοχές της Ελλάδας και δεν έχουν διερευνηθεί (ενδεικτικά «Ελληνική Στατιστική Αρχή» για στοιχεία θαλάσσιας αλιείας 2012 – 2014 (Πίνακας 2, Εισαγωγή), Διεύθυνση Αλιείας Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης). Αυτό καθιστά τα προαναφερθέντα είδη τμήμα της διατροφής των Ελλήνων αλλά και τουριστών που επισκέπτονται τη χώρα, ιδίως τους καλοκαιρινούς μήνες. Κατά συνέπεια, τα δεδομένα της παρούσας εργασίας συμβάλλουν στην καταγραφή πιθανών αλλεργιογόνων ισομορφών των παρβαλβουμινών σε είδη ιχθύων με οικονομική και διατροφική αξία σε ελληνικό και, ενδεχομένως, μεσογειακό επίπεδο.

Η παρασκευή και ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE) 20% παρείχε τη δυνατότητα καλύτερου διαχωρισμού των πρωτεϊνών συγκριτικά με πήγματα 15% και 18% τα οποία δοκιμάστηκαν για την εξυπηρέτηση του σκοπού της παρούσας εργασίας (Schagger 2006). Η σταδιακή αύξηση της σύστασης των gel σε ακρυλαμίδη, αύξανε μεν τον απαιτούμενο χρόνο ηλεκτροφόρησης και ηλεκτρομεταφοράς κατά περίπου 1,5 h, δίνοντας όμως καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών στις μεμβράνες PVDF που προέκυπταν μετά την ανάλυση κατά Western.

Η χρώση με DAB, όπως προτεινόταν από ενδεικτικά δημοσιευμένα πρωτόκολλα ανίχνευσης παρβαλβουμινών, αποτελεί γρήγορη και οικονομική μέθοδο ανίχνευσης των πρωτεϊνών κατά την ανάλυση Western (Liu et al. 2010). Μειονεκτήματα της χρώσης με DAB αποτελούν η τοξικότητα της διανιζιδίνης, η οποία

απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή κατά το χειρισμό και την εξουδετέρωσή της. Δοκιμές ECL και ECL plus, το οποίο δεν αναφερόταν στα προτεινόμενα πρωτόκολλα, σε μεμβράνες που έφεραν ακριβώς τα ίδια δείγματα στις ίδιες θέσεις και ηλεκτροφορήθηκαν στην ίδια συσκευή στον ίδιο χρόνο (εμπρός και πίσω θέση) δεν εμφάνισαν ζώνες παρβαλβουμινών που ανιχνεύθηκαν όμως με DAB.

Αναφορικά με τις παρατηρούμενες ισομορφές παρβαλβουμινών, στην παρούσα εργασία ανιχνεύονται 8 ζώνες οι οποίες πιθανά να αποτελούν διαφορετικές ισομορφές παρβαλβουμινών. Οι ζώνες οι οποίες εμφανίζονται μεταξύ των 7 – 17 kDa είναι πολύ πιθανά ισομορφές των παρβαλβουμινών. Ζώνες άνω των 17 και 23 kDa ενδεχόμενα να αποτελούν ισομορφές ή ολιγομερή παρβαλβουμινών. Η μέχρι σήμερα βιβλιογραφία αναφέρει περί τις 4 διαφορετικές ισομορφές. Σημειώνεται βέβαια ότι τα πειράματα της παρούσας εργασίας δε συμπεριέλαβαν έλεγχο της πιθανούς ικανότητας των ανιχνευόμενων μορίων να προκαλούν αλλεργίες ή/και δυσανεξίες σε καταναλωτές αλλεργικούς σε ιχθύες.

Με εξαίρεση το είδος *Galeorhinus galeus* (γαλέος), στο οποίο δε φάνηκε να ανιχνεύεται καμία ζώνη παρβαλβουμινών στα πειράματα που διεξήχθησαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, παρβαλβουμίνες φάνηκε να ανιχνεύονται στο σύνολο των υπολοίπων ειδών. Σε όλα τα είδη Οστεϊχθύων, δηλαδή στα 25 από τα 27 διερευνηθέντα είδη, τα οποία αποτελούν και τα πλέον βρώσιμα είδη ιχθύων, ανιχνεύθηκαν 1 ή και περισσότερες ισομορφές παρβαλβουμινών μεταξύ 7 – 17 kDa. Στο είδος *Raja radula* (βάτος) ανιχνεύθηκε μόνο 1 ζώνη άνω των 23 kDa. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα δύο είδη που ανήκουν στους Χονδριχθύες, το βάτο και το γαλέο, δε φαίνεται να έχουν ισομορφές παρβαλβουμινών μεταξύ των 7 – 17 kDa. Συνυπολογίζοντας στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας τις βιβλιογραφικές αναφορές για αλλεργίες καταναλωτών σε ιχθυοπροϊόντα, η έρευνα έχει έως τώρα επικεντρωθεί σε είδη Οστεϊχθύων αφήνοντας τα λιγοστά βρώσιμα είδη Χονδριχθύων αδιερεύνητα ως προς τυχόν αλλεργιογόνα μόρια.

Το δύο διαστάσεων πήγμα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (2D SDS PAGE) φαίνεται να αποτελεί χρήσιμο εργαλείο, αν και απαιτεί άρτιους χειρισμούς αποτελώντας μια χρονοβόρα διαδικασία, η οποία βέβαια συμβάλλει στο διαχωρισμό μορίων κοντινού μοριακού βάρους. Στην περίπτωση του *Chelidonichthys lucerna* (χελιδονόψαρο) έδειξε ότι οι κατώτερες έντονες ζώνες πλησίον των 14 kDa

δεν αποτελούσαν μία αλλά τουλάχιστον 3 ισομορφές. Οι ισομορφές αυτές λόγω του πολύ κοντινού μοριακού βάρους δεν κατάφεραν να διαχωριστούν ικανοποιητικά στο πήγμα πολυακρυλαμιδίου σε μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE) 20%. Όταν εξαναγκάστηκαν σε διαχωρισμό 2 διαστάσεων διαχωρίστηκαν έστω και οριακά.

Το 44,4 % των ειδών παρουσίασαν περισσότερες από 4 ισομορφές, 18,5 % εμφάνισε μόνο 2 ισομορφές, 14,8 % εμφάνισε μόνο 1 ισομορφή, ενώ μόνο 1 είδος (7,5 % επί του συνόλου των διαφορετικών ειδών) δεν παρουσίασε καμία ζώνη πιθανής ισομορφής παρβαλουμίνης. Σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των ειδών, παρουσιάστηκε μια επιπλέον ζώνη στην περιοχή των 46 kDa. Τα 15 είδη ανήκαν στην τάξη Perciformes, 6 από τα οποία ταξινομούνται στην οικογένεια Sparidae. Η οικογένεια Sparidae (Perciformes), είδη της οποίας αποτελούν κατεξοχήν εμπορικά είδη στην Ελλάδα, αλλά και σε Μεσογειακή και Ευρωπαϊκή κλίμακα, εμφανίζει τις περισσότερες διαφορετικές ισομορφές, καθώς επίσης και το μεγαλύτερο πλήθος ισομορφών σε είδος ιχθύος.

Η σύγκριση άγριων αλιευμάτων και καλλιεργούμενων ατόμων του είδους *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι) έδειξε ότι δε διαφοροποιείται το πρότυπο των παρατηρούμενων ισομορφών του βιολογικού είδους. Ομοίως για το είδος *Sparus aurata* (τσιπούρα), δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση του προτύπου των παρβαλουμινών μεταξύ φυσικών και εκτρεφόμενων ατόμων. Επισημαίνεται ότι βιβλιογραφικά δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα σύγκριση μεταξύ φυσικών και εκτρεφόμενων ατόμων του ίδιου είδους.

Αξιοποιώντας την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) επιτυγχάνεται μια ποιοτική εκτίμηση των αποτελεσμάτων της εργασίας. Προκύπτει ότι οι ισομορφές που λαμβάνονται από τις αναλύσεις κατά Western ομαδοποιούνται σε σύνολα συγγενικά μεταξύ τους. Η συγγένεια σε επίπεδο Τάξης ομαδοποιεί τις παρατηρήσεις. Η συγγένεια σε επίπεδο Οικογένειας ομαδοποιεί επίσης ικανοποιητικά τις παρατηρήσεις. Η παράμετρος του Σχήματος Σώματος ομαδοποιεί τις παρατηρήσεις σε σύνολα που εμφανίζουν βιολογική συγγένεια μεταξύ τους.

Παράμετροι οι οποίες αφορούν τα στοιχεία δειγματοληψίας, όπως το σημείο αλίευσης και η μάζα του αλιεύματος, δε φάνηκε να ομαδοποιούν τις παρατηρήσεις ως προς τις ανιχνευόμενες ισομορφές. Η παράμετρος του Βάθους του ενδιαιτήματος

στο οποίο αναφέρεται βιβλιογραφικά ότι ζουν και μεταβολίζουν τα διερευνηθέντα είδη επίσης δε φάνηκε να ομαδοποιεί τις παρατηρήσεις.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της παρούσας εργασίας συνηγορούν ότι με την παρούσα μέθοδο, βασισμένη στο πρωτόκολλο απομόνωσης κατά Liu et al. (2010), είναι εφικτή η απομόνωση και ανίχνευση πιθανά αλλεργιογόνων ισομορφών παρβαλβουμινών σε αδρά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό με κλασμάτωση σε στήλη ιοντοανταλλαγής. Με την εξαίρεση του *Galeorhinus galeus*, ισομορφές ή/και ολιγομερή των παρβαλβουμινών ανιχνεύονται σχεδόν στο σύνολο των πλέον εμπορικών και με υψηλή διατροφική αξία ιχθύων των ελληνικών θαλασσών. Βιολογικές και τεχνικές επαναλήψεις επιβεβαίωσαν ότι το πρότυπο των παρβαλβουμινών παραμένει σταθερό και χαρακτηριστικό για κάθε ένα βιολογικό είδος. Είδη συγγενικά μεταξύ τους σε επίπεδο Τάξης ή και Οικογένειας εμφανίζουν κατά περίπτωση περισσότερες των 2 κοινές ισομορφές.

Δεδομένης της δυνατότητας ανίχνευσης του πλήθους αυτών των διαφορετικών ισομορφών, η ποσοτικοποίηση κάθε μίας ισομορφής στο σύνολο της ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος ιχθύος δε θα μπορούσε να επιτευχθεί με εφαρμογή ELISA αν προηγουμένως δεν είχε γίνει περαιτέρω καθαρισμός του δείγματος και διαχωρισμός σε κλάσματα (Liu et al. 2010, Van Do et al. 2005). Ωστόσο, η ποσοτικοποίηση παρβαλβουμινών με τη χρήση ELISA έχει έως τώρα χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία χωρίς να αποσαφηνίζεται και να αποδεικνύεται ότι έχει επιτευχθεί πλήρης απομόνωση των επιμέρους ισομορφών.

Τέλος, η παρούσα μέθοδος μπορεί σε χρόνο 30 h να καταδείξει την ύπαρξη ισομορφών παρβαλβουμινών σε αδρά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα νωπών ιχθύων άγριων και καλλιεργούμενων, και πολύ πιθανά ιχθυοσκευασμάτων, όπως κροκετών και αλοιφών, που κυκλοφορούν στην ελληνική και παγκόσμια αγορά. Η μέθοδος έχει χαμηλό κόστος, με εξαίρεση το κόστος του πρώτου αντισώματος το οποίο θα μπορούσε ενδεχομένως να παραχθεί έπειτα από σχετική ανοσοποίηση ζώων στο εργαστήριο. Οι τεχνικές επαναλήψεις έδειξαν ότι υπάρχει επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα.

Μελλοντικό στόχο της ερευνητικής μας ομάδας αποτελεί η διερεύνηση της δυνατότητας πρόκλησης αλλεργιών από κάθε μία διαφορετική παρατηρούμενη ζώνη

– ισομορφή παρβαλβουμινών στο εργαστήριο με τη χρήση ορού αίματος αλλεργικών ατόμων. Ακόμη, ενδιαφέρον παρουσιάζει η πιθανή μελλοντική διερεύνηση της συλλογής στοιχείων σχετικών με τη βιολογία των ιχθύων και παραμέτρους όπως η κολυμβητική ικανότητα και η διατροφή των ειδών, ώστε να ελεγχθεί πιθανή συσχέτιση των παρατηρούμενων ισομορφών και των προαναφερθέντων παραμέτρων. Πιθανός περαιτέρω καθαρισμός των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε κλάσματα θα συνέβαλε στη διερεύνηση της αμινοξικής αλληλουχίας των διαφόρων ισομορφών και θα παρείχε τη δυνατότητα σύγκρισής τους με καταχωρημένες αλλεργιογόνες ισομορφές της παγκόσμιας ηλεκτρονικής πλατφόρμας Allergome. Κατά συνέπεια, πιθανά να προέκυπτε η δυνατότητα Βιοπληροφορικής ανάλυσης με στόχο, και πάλι, τον έλεγχο της αλλεργιογόνου ιδιότητας των παρατηρούμενων ισομορφών, αλλά και ενημέρωσης του καταναλωτικού κοινού για τυχόν νέες αλλεργιογόνες ισομορφές παρβαλβουμινών σε εδώδιμους ιχθύες.



## 6 Βιβλιογραφία

---

### 6.1 Διεθνής Βιβλιογραφία στην αγγλική γλώσσα

Baltasar, M. and Van Sinderen, D. (2010). *Bifidobacteria : Genomics & Molecular Aspects*. Caister Academic Press.

Beaugerie, L. and Petit, J. C. (2004). Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, vol. 18, p. 337 – 352.

Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T. and Mikelsaar, M. (2001). Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 108, p. 516 – 20.

Brodsky, F.M. and Guagliardi, L.E. (1991). The cell biology of antigen processing and presentation. *Annual Review of Immunology*, vol. 9, p. 707 – 744.

Cao, S., Freehley, T.J. and Cathryn, R.N. (2014). The role of commensal bacteria in the regulation of sensitization to food allergens. *FEBS Letters*, vol. 588, p. 4258 – 4266.

Coffee, C. and Bradshaw, R. (1973). Carp Muscle Calcium – Binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 248, p. 3305 – 3312.

Cummings, J.H. and MacFarlane, G.T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition*, vol. 16, p. 3 – 9.

Dannaeus A. and Inganas M. (1981). A follow-up study of children with food allergy. Clinical course in relation to serum IgE- and IgG-antibody levels to milk, egg and fish. *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 11, p. 533 – 539.

De Jongh, H.H.J., Taylor, S.L. and Koppelman, S.J. (2011). Controlling the aggregation propensity and thereby digestibility of allergens by Maillardation as illustrated for codfish parvalbumin. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, vol. 111, no. 2, pp. 204 – 211.

Dicks, L.M.T., Silvester, M., Lawson, P.A. and Collins, M.D. (2000). *Lactobacillus fornicalis* sp. nov., isolated from the posterior fornix of the human vagina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Society for General Microbiology), vol. 50, p. 1253 – 1258.

- Guarner, F. and Malagelada, J. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, vol. 361, p. 512 – 519.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. and Amigorena S (2002). Antigen Presentation and T cell stimulation by Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, vol. 20, p. 621 – 667.
- Hixson, S. (2014). Fish Nutrition and Current Issues in Aquaculture: The Balance in Providing Safe and Nutritious Seafood, in an Environmentally Sustainable Manner. *Journal of Aquatic Research & Development*, vol. 5, p. 234.
- Human Microbiome Project (2015). Microbiome Analysis, Data Catalog, Gastrointestinal Tract HMP Reference Genomes, <http://www.hmpdacc.org/>
- Junjie, Q., Ruiqiang, L., Jeroen, R., Manimozhiyan, A., Kristoffer Solvsten, B., Chaysavanh, M., Trine, N., Nicolas, P., Florence, L., Takuji, Y., Daniel, Y. R., Li, J., Junming, X., Shaochuan, L., Dongfang, L., Jianjun, C., Bo, W., Huiqing, L., Huisong, Z., Yinlong, X., Julien, T., Patricia, L., Marcelo, B., Jean-Michel, B., Torben, H., Le Paslier, D., Linneberg, D., Nielsen, A., Pelletier, B. and Renault, P. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, vol. 464, p. 59 – 65.
- Koppelman, S.J., Nordlee, J.A., Lee, P.W., Happe, R.P., Helsing, M., Norland, R., Manning, T., Deschene, R., De Jong, G.A. and Taylor, S.L. (2012). Parvalbumin in fish skin – derived gelatin : is there a risk for fish allergic consumers?. *Food Additives and Contaminants A*, vol. 29, pp. 1347 – 1355.
- Kretsinger, R.H. (1980). Structure and evolution of calcium – modulated proteins. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, vol. 8, no. 2, pp. 119 – 174.
- Kuehn, A., Scheuermann, T, Hilger, C. and Hentges, F. (2010). Important variations in parvalbumin content in common fish species : a factor possibly contributing to variable allergenicity. *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 153, no. 4, pp. 359 – 366.
- Lehky, P., Blum, H.E., Stein, E.A. and Fischer, E.H. (1974). Isolation and characterization of parvalbumins from the skeletal muscle of higher vertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, no. 13, pp. 4332 – 4334.

- Lejeune, D., Dumoutier, L., Constantinescu, S., Kruijer, W., Schuringa, J.J. and Renauld, J.C. (2002). Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, p. 33676 – 33682.
- Lewis R. (1998). *Life*, 3<sup>rd</sup> Edition, The McGraw-Hill Companies
- Liu, G.M., Wang, N., Cai, Q.F., Cao, M.J., Sun, C., Su, W.J. and Li, T. (2010). Purification & characterization of parvalbumins from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 90, n. 6, p. 1034 – 1040.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A. and Pavlova, N. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, p. 15611 – 15616.
- Mari, A., Rasi, C., Palazzo, P. and Scala E. (2009). Allergen databases: current status and perspectives. *Current Allergy & Asthma Reports*, vol. 9, p. 376 - 383.
- Martin, R., Miquel, S., Ulmer, J., Kechaou, N., Langella, P. and Bermúdez-Humarán, G.L. (2013). Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease. *Microbial Cell Factories*, vol. 12, p. 71 – 82.
- O' Hara, A. M. and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, vol. 7, p. 688 – 893.
- Rona, R.J., Keil, C., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S.T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D. and Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy : a meta – analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 120, no. 3, pp. 638 – 646.
- Savage, D. C. (1977). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annual Review of Microbiology*, vol. 31, p. 107 – 133.
- Schagger, H. (2006). Tricine SDS – PAGE. *Nature Protocols*, vol. 1, p. 16 – 22.

- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.-C. and Desiere, F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, p. 14422 – 14427.
- Sears, C. L. (2005). A dynamic partnership : Celebrating our gut flora. *Anaerobe*, vol. 11, p. 247 – 251.
- Steinhoff, U. (2005). Who controls the crowd? New findings & old questions about the intestinal microflora. *Immunology Letters*, vol. 99 , p. 12 – 16.
- Taylor, S.L., Hefle, S.L., Bindslev - Jensen, C., Atkins, F.M., Andrez, A., Bruijnzeel – Koomen, C., Burks, A.W., Bush, R.K., Ebisawa, M., Eigenmann, P.A., Host, A., Hourihane, J.O., Isolauri, E., Hill, D.J., Knulst, A., Lack, G., Sampson, H.A., Moneret – Vautrin, D.A., Rance, F., Vadas, P.A., Yunginger, J.W., Zeiger, R.S., Salminen, J.W., Madsen, C. and Abbott, P. (2002). Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods : how much is too much? . *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 109, no. 1, p. 24 – 30.
- Taskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tucková, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadníková, R., Kozakova, H., Rossmann, P., Bartova, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovska, D., Rehakova, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P. and Kokesova, A. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity & chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*, vol. 93, p. 97 – 108.
- Taskalova-Hogenova, H., Renata S., Kozakova, H., Hudcovic, T., Vannucci, T., Tuckova, L., Rossmann, P., Hrncir, T., Miloslav, K., Zakostelska, Z., Klimesova, K., Pribylova, J., Bartova, J., Sanchez, D. and Fundova, P. (2011). The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free & gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular and Molecular Immunology*, vol. 8, p. 110 – 120.

Van Do, T., Elsayed, S., Florvaag, E., Hordvik, I. and Endresen, C. (2005). Allergy to fish parvalbumins : studies on the cross – reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 116, no. 6, pp. 1314 – 1320.

Venter, C. and Arshad, S.H. (2011). Epidemiology of food allergy. *Pediatric Clinics of North America*, vol. 58, no. 2, pp. 327 – 349.

Wilbert, J.L., Madhoun, N.M. and Coughlin, D.J. (2006). Parvalbumin correlates with relaxation rate in the swimming muscle of sheepshead and kingfish. *Journal of Experimental Biology*, vol. 209, no. 2, pp. 227 – 237.

## 6.2 Βιβλιογραφία στην ελληνική γλώσσα

Μάργαρης Π., Κεφάλαιο 2, «Αλλεργιολογία» στο *Εσωτερική Παθολογία*, University Studio Press, 4<sup>η</sup> Έκδοση 2012, Σελ. 33 – 35.

Χατζηπέτρου – Κουρουνάκη Λ. Κεφάλαιο 2, «Βασικές αρχές της ανοσίας : Αντίσταση του ξενιστή» στο *Ανοσοβιολογία*, University Studio Press, Β' Έκδοση 1987, Σελ. 22 – 27.

## 7 Παράρτημα

### 7.1 Πρωτόκολλο παρασκευής ρυθμιστικών διαλυμάτων ομογενοποίησης

Πίνακας 6. Σύσταση απαραίτητων ρυθμιστικών διαλυμάτων ομογενοποίησης ιχθύων

Table 6. Homogenization buffer protocols

<b>Buffer A</b>		
<b>Tris HCl pH 7,5</b>	20 mmol/L	
<b>EDTA pH 8,0</b>	5 mmol/L	
<b>Tris HCl pH 7,5 50x</b>		
<b>Tris Base</b>	48,5 g	<b>ddH<sub>2</sub>O</b> <b>20ml + 980</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	ως 200 ml	
<b>ρύθμιση pH</b>	πυκνό HCl	
<b>EDTA pH 8,0 50x</b>		
<b>EDTA</b>	29,2 g	<b>ddH<sub>2</sub>O</b> <b>20ml + 980</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	ως 200 ml	
<b>ρύθμιση pH</b>	NaOH	

### 7.2 Πρωτόκολλο κατασκευής πρότυπης καμπύλης κατά Bradford

Πίνακας 7. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης

Table 7. Standard curve preparation protocol

<b>οπη</b>	<b>Albumin</b>	<b>PBS 1x</b>	<b>Biorad</b>
<b>A1</b>	0,5 μl	7,5 μl	200 μl
<b>A2</b>	1 μl	7 μl	200 μl
<b>A3</b>	1,5 μl	6,5 μl	200 μl
<b>A4</b>	2 μl	6 μl	200 μl
<b>A5</b>	4 μl	4 μl	200 μl
<b>A6</b>	6 μl	2 μl	200 μl
<b>A7</b>	8 μl	0 μl	200 μl
<b>A8</b>	(τυφλό)		200 μl
<b>διάλυμα Albumin</b>		<b>διάλυμα Biorad</b>	
<b>Human Albumin</b>	100 μl	<b>Biorad</b>	1 ml
<b>PBS 1x</b>	24,9 ml	<b>dd H<sub>2</sub>O</b>	3 ml

### 7.3 Πρωτόκολλο παρασκευής πήγμα πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες (SDS PAGE)

Πίνακας 8. Σύσταση πηγμάτων πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE) – προετοιμασία για ηλεκτροφόρηση

Table 8. SDS – PAGE separating and stacking gels preparation protocols –electrophoresis buffers

<b>Separating Gel</b>	<b>15%</b>	<b>18%</b>	<b>20%</b>
<b>Tris HCl pH 8,8</b>	11 ml	15 ml	16 ml
<b>Acrylamide 29:1</b>	12,5 ml	9,5 ml	7,5 ml
<b>SDS 10%</b>	240 μl	240 μl	240 μl
<b>A.P.S.</b>	120 μl	240 μl	240 μl
<b>TEMED 99%</b>	21 μl	22 μl	22 μl

<b>Stacking Gel</b>	<b>6%</b>
<b>Tris HCl pH 6,8</b>	1,3 ml
<b>Acrylamide 29:1</b>	2 ml
<b>ddH2O</b>	6,5 ml
<b>SDS 10%</b>	100 μl
<b>A.P.S.</b>	100 μl
<b>TEMED 99%</b>	8 μl

<b>SDS 10 %</b>		<b>A.P.S.</b>	
<b>SDS</b>	5 g	<b>Ammonium Persulfate</b>	0,1 g
<b>ddH2O</b>	50 ml	<b>ddH2O</b>	1 ml

<b>Tris HCl pH 8,8</b>		<b>Tris HCl pH 6,8</b>	
<b>Tris Base</b>	36,3 g	<b>Tris Base</b>	3 g
<b>ddH2O</b>	ως 200 ml	<b>ddH2O</b>	ως 50 ml
<b>Ρύθμιση με</b>	πυκνό HCl	<b>Ρύθμιση με</b>	πυκνό HCl

### 7.4 Πρωτόκολλο παρασκευής ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer)

Πίνακας 9. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος (Loading Buffer) για τη φόρτωση των δειγμάτων

Table 9. Loading Buffer preparation protocol

<b>Loading Buffer 4 % SDS (4x) pH 6,8</b>		<b>500 μl L.B. 4x + 500 μl PBS 1x</b>
<b>Glycerol</b>	1,6 ml	
<b>SDS</b>	128 mg	
<b>mercaptoethanol</b>	80 μl	
<b>Tris HCl pH 6,8</b>	240 μl	
<b>Bromophenol blue</b>	μπλε χρωμα	

### 7.5 Πρωτόκολλο παρασκευής DAB

Πίνακας 10. Σύσταση διαλύματος για χρώση με DAB

Table 10. DAB staining solution

<b>DAB</b>	
<b>o- nizidine</b>	0,005 g
<b>methanol</b>	1 ml
<b>P.B.S. 1x</b>	9 ml
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%</b>	3,33 μl



Πίνακας 11. Δεδομένα ληφθέντων δειγμάτων ιχθύων /

Table 11. Species specimen data

\* : μάζα φιλέτου / \*:fish fillet mass

Εμπορική ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Τάξη	Οικογένεια	Σχήμα σώματος	Μάζα (g)	Σημείο αλίευσης	Τρόπος αλίευσης	Ημ/νια αλίευσης
μουρμουρα	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Perciformes	Sparidae	πλευροπλατύμορφο	320	Τορωναίος Κόλπος	Πυροφάνι	10/11/2015
σκουμπρι	<i>Scomber scombrus</i>	Perciformes	Scombridae	ατρακτοειδές	120	Ποταμός - Θερμαϊκός Κόλπος	Ανεμότρατα	10/11/2015
τσιπουρα	<i>Sparus aurata</i>	Perciformes	Sparidae	πλευροπλατύμορφο	520	Ποταμός - Θερμαϊκός Κόλπος	Δίχτυα	10/11/2015
χελιδονοψαρο	<i>Chelidonichthys lucerna</i>	Scorpaeniformes	Triglidae	πλευροπλατύμορφο	370	Ποταμός - Θερμαϊκός Κόλπος	Ανεμότρατα	10/11/2015
λαβρακι	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Perciformes	Moronidae	πλευροπλατύμορφο	400	Ποταμός - Θερμαϊκός Κόλπος	Δίχτυα	12/1/2016
σαλπα	<i>Sarpa salpa</i>	Perciformes	Sparidae	πλευροπλατύμορφο	160	Ποταμός - Θερμαϊκός Κόλπος	Δίχτυα	12/1/2016
μουρμουρα	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Perciformes	Sparidae	πλευροπλατύμορφο	270	Νικήτη - Μαρμαράς (Χαλκιδική)	Πυροφάνι	12/1/2016
ζαργανα	<i>Belone belone</i>	Beloniformes	Belonidae	βελόμορφο	80	Ποταμός - Θερμαϊκός Κόλπος	Δίχτυα	12/1/2016
μπακαλιαρακι	<i>Merluccius merluccius</i>	Gadiformes	Merluccidae	ατρακτοειδές	80	Κατερίνη (Θερμαϊκός)	Τράτα	2/2/2016
σαρδελα	<i>Sardina pilchardus</i>	Clupeiformes	Clupeidae	πλευροπλατύμορφο	35	Σάνη - Μουδανιά (Χαλκιδική)	Δίχτυα	2/2/2016

Εμπορική ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Τάξη	Οικογένεια	Σχήμα σώματος	Μάζα (g)	Σημείο αλίευσης	Τρόπος αλίευσης	Ημ/νια αλίευσης
κεφαλοπουλο	<i>Liza aurata</i>	Mugiliformes	Mugilidae	ατρακτοειδές	320	Τορώνη	Πυροφάνι	9/2/2016
μαριδα	<i>Spicara smaris</i>	Perciformes	Centracanthidae	πλευροπλατύμορφο	40	Χαλκιδική	Δίχτυα	9/2/2016
σαργος	<i>Diplodus sargus sargus</i>	Perciformes	Sparidae	πλευροπλατύμορφο	200	Μαρμαράς (νησιάκια)	Πυροφάνι	9/2/2016
λουτσος	<i>Sphyraena sphyraena</i>	Perciformes	Sphyraenidae	ατρακτοειδές	200	Τριστινίκα	Πυροφάνι	9/2/2016
γοφαρι	<i>Pomatomus saltatrix</i>	Perciformes	Pomatomidae	πλευροπλατύμορφο	320	Κύμια - Θερμαϊκός	Νταλιάνι	9/3/2016
λυθρίνι	<i>Pagellus erithrinus</i>	Perciformes	Sparidae	πλευροπλατύμορφο	180	Κύμια - Θερμαϊκός	Νταλιάνι	9/3/2016
γοβιος	<i>Gobius spp</i>	Perciformes	Gobiidae	ατρακτοειδές	100	Χαλάστρα - Θερμαϊκός	Νταούλια	9/3/2016
σπαρος	<i>Diplodus annularis</i>	Perciformes	Sparidae	πλευροπλατύμορφο	220	Κύμια - Θερμαϊκός	Νταλιάνι	9/3/2016
γαυρος	<i>Engaulis encrasicolus</i>	Clupeiformes	Engaulidae	ατρακτοειδές	45	Κατερίνη (Θερμαϊκός)	Καΐκι	15/3/2016
σκαρος	<i>Sparisoma cretense</i>	Perciformes	Scaridae	ατρακτοειδές	150	Κατερίνη (Θερμαϊκός)	Ανεμότρατα	15/3/2016
ταούκι	<i>Merlangius merlangus</i>	Gadiformes	Gadidae	ατρακτοειδές	310	Κατερίνη (Θερμαϊκός)	Ανεμότρατα	15/3/2016
τραχύβατος	<i>Raja radula</i>	Rajiformes	Rajidae	νωτοκοιλιακά πεπλατ	310	Άγιον Όρος - Καβάλα	Ανεμότρατα	21/3/2016
μπαρμπούνι	<i>Mullus surmuletus</i>	Perciformes	Mullidae	ατρακτοειδές	60	Νέα Καλλικράτεια	Καΐκι	21/3/2016

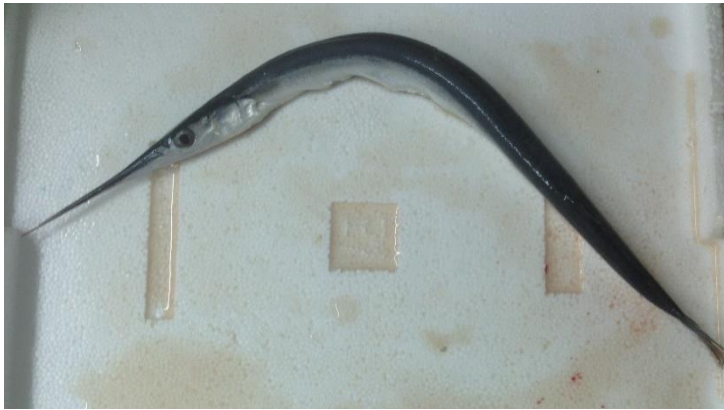
Εμπορική ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Τάξη	Οικογένεια	Σχήμα σώματος	Μάζα (g)	Σημείο αλίευσης	Τρόπος αλίευσης	Ημ/νια αλίευσης
πεσκανδρίτσα	<i>Lophius piscatorius</i>	Lophiiformes	Lophiidae	νωτοκοιλιακά πεπλατ	280	Άγιον Όρος - Καβάλα	Ανεμότρατα	21/3/2016
γλωσσα	<i>Solea solea</i>	Pleuronectiformes	Soleidae	νωτοκοιλιακά πεπλατ	180	Αγγελοχώρι	Ανεμότρατα	28/3/2016
κουτσομουρα	<i>Mullus barbatus</i>	Perciformes	Mullidae	ατρακτοειδές	65	Θερμαϊκός - Χαλκιδική	Ανεμότρατα	28/3/2016
λαβρακι Εκτρ	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Perciformes	Moronidae	πλευροπλατύμορφο	360	Εκτροφείο Ολυμπιάδας		15/4/2016
τσιπουρα Εκτρ	<i>Sparus aurata</i>	Perciformes	Sparidae	πλευροπλατύμορφο	440	Εκτροφείο Ολυμπιάδας		15/4/2016
σολομος	<i>Salmo salar</i>	Salmoniformes	Salmonidae	ατρακτοειδές	280*		Ανεμότρατα	15/4/2016
γαλεος	<i>Galeorhinus galeus</i>	Carcharhiniformes	Triakidae	ατρακτοειδές	170*		Ανεμότρατα	15/4/2016

Πίνακας 12. Ισομορφές που εμφανίστηκαν ανά βιολογικό είδος που διερευνήθηκε

Table 12. Parvalbumin isoforms investigated in each species

Επιστημονική ονομασία	Εμπορική ονομασία	Τύπος I	Τύπος II	Τύπος III	Τύπος IV	Τύπος V	Τύπος VI	Τύπος VII	Τύπος VIII
<i>Belone belone</i>	ζαργάνα	0	1	1	0	0	0	0	1
<i>Sardina pilchardus</i>	σαρδέλα	0	1	1	1	0	0	0	1
<i>Merluccius merluccius</i>	μπακαλιαράκι	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Liza aurata</i>	κεφαλόπουλο	1	1	1	1	0	0	1	1
<i>Spicara smaris</i>	μαρίδα	0	1	1	0	1	1	0	0
<i>Gobius spp</i>	γοβιός	1	1	1	0	1	1	1	1
<i>Dicentrarchus labrax</i>	λαβράκι	0	0	0	1	0	1	1	1
<i>Pomatomus saltatrix</i>	γοφάρι	0	1	1	0	1	1	1	1
<i>Scomber scombrus</i>	σκουμπρί	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Lithognathus mormyrus</i>	μουρμούρα	1	0	0	1	0	1	0	0
<i>Sparus aurata</i>	τσιπούρα	1	1	1	0	0	1	0	1
<i>Sarpa salpa</i>	σάλπα	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Diplodus sargus sargus</i>	σαργός	1	1	1	0	0	1	0	1
<i>Pagellus erithrinus</i>	λυθρίνι	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>Diplodus annularis</i>	σπάρος	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>Mullus surmuletus</i>	μπαρμπούνι	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Mullus barbatus</i>	κουτσομούρα	1	1	1	1	0	1	1	1
<i>Sphyræna sphyræna</i>	λούτσος	0	1	1	0	1	1	1	1
<i>Sparisoma cretense</i>	σκάρος	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Chelidonichthys lucerna</i>	χελιδονόψαρο	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>Engaulis encrasicolus</i>	γαύρος	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Lophius piscatorius</i>	πεσκανδρίτσα	1	0	1	0	0	0	0	1
<i>Solea solea</i>	γλώσσα	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Merlangius merlangus</i>	ταούκι	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>Raja radula</i>	βάτος	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Salmo salar</i>	σολομός	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Galeorhinus galeus</i>	γαλέος	0	0	0	0	0	0	0	0

7.6 Φωτογραφικό υλικό δειγμάτων ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα Παρατίθεται ενδεικτικό φωτογραφικό υλικό από τα διερευνηθέντα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Όλες οι φωτογραφίες λήφθηκαν με μηχανή κινητού στον εργαστηριακό πάγκο πριν την εκδορά και λήψη ιστού για ομογενοποίηση, και δεν έχουν υποστεί καμία επεξεργασία. Σημειώνεται ότι τα δείγματα τηρούνταν όλα σε πάγο πριν και κατά τη διάρκεια λήψης ιστού (Εικόνες 29 – 52).



Εικόνα 29/ Figure 29. *Belone belone* (ζαργάνα/garfish)



Εικόνα 30/ Figure 30. *Chelidonichthys lucerna* (χειδονόψαρο/tub gurnard)



Εικόνα 31/ Figure 31. *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι/European seabass)



Εικόνα 32/Figure 32. *Diplodus annularis* (σπάρος/annular seabream)



Εικόνα 33/Figure 33. *Diplodus sargus sargus* (σαργός/white seabream)



Εικόνα 34/Figure 34. *Engraulis encrasicolus* (γαύρος/European anchovy)



Εικόνα 35/Figure 35. *Gobius spp* (γοβιός/goby)



Εικόνα 36/Figure 36. *Lithognathus mormyrus* (μουρμούρα/sand steenbras)



Εικόνα 37/Figure 37. *Mullus barbatus* (κουτσομούρα/red mullet)



Εικόνα 38/Figure 38. *Liza aurata* (κεφαλόπουλο/golden grey mullet)



Εικόνα 39/Figure 39. *Lophius piscatorius* (πεσκανδρίτσα/angler) (μετά τη φιλετοποίηση/fillet)



Εικόνα 40/Figure 40. *Merlangius merlangus* (ταούκι/whiting)



Εικόνα 41/Figure 41. *Merluccius merluccius* (μπακαλιάρaki/European hake)



Εικόνα 42/Figure 42. *Mullus surmuletus* (μπαρμπούνι/surmullet)



Εικόνα 43/Figure 43. *Pagellus erythrinus* (λυθρίνι/common pandora)



Εικόνα 44/Figure 44. *Pomatomus saltatrix* (γοφάρι/bluefish)





Εικόνα 45/Figure 45. *Raja radula* (βάτος/rough ray) (φιλετο/fillet)



Εικόνα 46/Figure 46. *Sardina pilchardus* (σαρδέλα/European pilchard)



Εικόνα 47/Figure 47. *Sarpa salpa* (σάλπα/salema)



Εικόνα 48/Figure 48. *Scomber scombrus* (σκουμπρί/atlantic mackerel)



Εικόνα 49/Figure 49. *Sparisoma cretense* (σκάρος/parrotfish)



Εικόνα 50/Figure 50. *Sparus aurata* (τσιπούρα/gilthead seabream)



Εικόνα 51/Figure 51. *Sphyræna sphyræna* (λούτσος/european barracuda)



Εικόνα 52/Figure 52. *Spicara smaris* (μαρίδα/picarel)