



Η ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΒΛΕΝΝΑ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ ΩΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σπαθή Αργυρώ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Μπακόπουλος Βασίλειος

Μυτιλήνη, Οκτώβριος 2022

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αποφοίτου του Π.Μ.Σ. «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παράκτιων Περιοχών»

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**Η ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΒΛΕΝΝΑ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ ΩΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ
ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ**

Τριμελής Επιτροπή Επίβλεψης και Κρίσης της Εργασίας

Υπογραφές

Μπακόπουλος Βασίλειος

Τζωράκη Ουρανία

Ιωάννης Μπατζάκας

Ευχαριστίες

Στο μέρος αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν για την επιτυχή διεκπεραίωση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Η περίοδος αυτή ήταν αρκετά απρόβλεπτη και δύσκολη, δεδομένων των συνθηκών της πανδημίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, λοιπόν, τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μπακόπουλου που με καθοδήγησε μέσα σε αυτή τη δύσκολη περίοδο, αλλά και όλους τους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παράκτιων Περιοχών» που κατάφεραν, εξ αποστάσεως, να μας μεταδώσουν όλες αυτές τις γνώσεις. Ένα ακόμα ευχαριστώ σε όλους τους συμφοιτητές μου που έκαναν, έστω και μέσω της οθόνη του υπολογιστή, ευχάριστη και γεμάτη γέλιο όλη αυτή τη διαδρομή. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το χρωστάω στην οικογένεια μου που ήταν δίπλα μου, υποστηρίζοντας την προσπάθεια μου, τόσο στις όμορφες όσο και στις δύσκολες στιγμές.

Περίληψη

Η παρούσα εργασία διερευνά την παρατήρηση των αλλαγών που συμβαίνουν στη βλέννα μολυσμένων ιχθύων από μικροοργανισμούς, παράσιτα αλλά και λόγω του στρες, με σκοπό την ανάπτυξη διαγνωστικών αναλύσεων της και την πρόληψη ή θεραπεία αυτών των καταστάσεων. Οι αυξημένες εμπορικές απαιτήσεις, τόσο σε απόθεμα όσο και σε ποιότητα, στον κλάδο των υδατοκαλλιέργειών και πιο συγκεκριμένα στις ιχθυοκαλλιέργειες έχουν οδηγήσει στην ολοένα και αυξανόμενη επιστημονική μελέτη τους. Για αυτό το λόγο κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική η ανάπτυξη μεθόδων διαχείρισης του ζωικού κεφαλαίου, με σημαντικότερη την ανάπτυξη αναλύσεων της βλέννας των ιχθύων για παρατήρηση της ποιότητας της ιχθυοκαλλιέργειας.

Η βλέννα παράγεται και βρίσκεται στις εξωτερικές και εσωτερικές επιφάνειες διεπαφής μεταξύ των ψαριών και του περιβάλλοντος και διαθέτει σημαντικές βιολογικές και οικολογικές λειτουργίες. Η έρευνα για τη βλέννα των ψαριών αυξάνεται ραγδαία, μαζί με την ανάπτυξη τεχνικών υψηλής απόδοσης, που επιτρέπουν την ταυτόχρονη μελέτη πολλών γονιδίων και μορίων, επιτρέποντας τη βαθύτερη κατανόηση της σύνθεσης της βλέννας των ψαριών και των λειτουργιών της. Η βλέννα παίζει σημαντικό ρόλο κατά των λοιμώξεων των ψαριών και η έρευνα έχει ως επί το πλείστον επικεντρωθεί στη μελέτη βιοενεργών μορίων (π.χ. αντιμικροβιακά πεπτίδια και μόρια που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό) και των σχετικών μικροβίων λόγω των δυνατοτήτων τους στην υδατοκαλλιέργεια και την ιατρική. Η βλέννα περιέχει επίσης πολλούς παράγοντες όπως αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMPs), λυσοζύμες, λεκτίνες, πρωτεάσες κ.λπ. που παρέχουν έμφυτη ανοσία.

Ωστόσο, οι εξωτερικές βλεννογόνιες επιφάνειες των ψαριών διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στις κοινωνικές σχέσεις μεταξύ ομοειδών ατόμων (συγχρονισμός ωτοκίας, εύρεση κατάλληλου οικοτόπου ή σήματα συναγερμού) και σε διαειδικές αλληλεπιδράσεις όπως σχέσεις θηράματος-θυρευτή, αλληλεπιδράσεις παρασίτου-ξενιστή και συμβίωση. Εκτός από τις δυνατότητές της ως βιολογικής μήτρας για την αξιολόγηση της ανοσίας και της κατάστασης της υγείας των ψαριών, η επιδερμική βλέννα χρησιμεύει επίσης ως εργαλείο οικοτοξικολογικής βιοπαρακολούθησης μέσω ανίχνευσης των αντιδράσεων βιοχημικών βιοδεικτών.

Αυτή η εργασία εξετάζει το ρόλο της βλέννας των ψαριών διερευνώντας τα πιθανά μόρια που μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες για την προστασία των ψαριών από παθογόνα και διάφορους στρεσογόνους παράγοντες. Επιπλέον, θα γίνει αναφορά στις επιστήμες της «ωμικής» στην έρευνα για τη βλέννα των ψαριών και στη σημασία τους στη μελέτη των λειτουργιών της βλέννας των ψαριών και της πρόβλεψης των καταστάσεων υγείας των ψαριών. Σημαντική είναι η ενθάρρυνση για μελλοντικές μελέτες για την αξιολόγηση των δυνατοτήτων της βιολογικής δραστηριότητας της βλέννας χρησιμοποιώντας την

προσέγγιση της ωμικής τεχνολογίας, δεδομένης της ποικιλομορφίας των ειδών ψαριών. Η γνώση σχετικά με την υγεία και την καλή διαβίωση των ψαριών είναι σημαντική για τη διατήρηση της βιοποικιλότητας των ειδών, της ενίσχυσης των υδατοκαλλιεργειών και της φαρμακοβιομηχανίας.

Λέξεις-Κλειδιά: βλέννα ψαριών, μόρια βλέννας, δραστηριότητες βλέννας, αντιμικροβιακά πεπτίδια, έμφυτη ανοσία, λυσοζύμη, πρωτεάσες, βιοδείκτης βλεννογόνου, στρεσογόνος κατάσταση

Abstract

This work investigates the changes that occur in the mucus of fish infected by microorganisms, parasites but also due to stress, with the aim of developing diagnostic tools for the prevention or treatment of these conditions. Increased commercial demands, both in stock and quality, in the aquaculture industry have led to their ever-increasing scientific study. For this reason, the development of livestock management methods is particularly important, with the most important being the development of tools for analysis of fish mucus to observe the quality of fish farming.

Mucus is produced and located at the external and internal interface surfaces between fish and the environment and has important biological and ecological functions. Fish mucus research is growing rapidly, along with the development of high-throughput techniques that allow the simultaneous study of many genes and molecules, enabling a deeper understanding of fish mucus composition and functions.

Mucus plays an important role against fish infections and research has mostly focused on the study of bioactive molecules (e.g. antimicrobial peptides - AMPs and immune-related molecules) and associated microbes due to their potential in aquaculture and medicine. Mucus also contains many factors such as lysozyme, lectins, proteases, etc. which provide a first defense to pathogen attachment and colonization.

However, the external mucus surfaces of fish also play an important role in social relationships between conspecifics (synchronization of spawning, finding suitable habitat or alarm signals) and in interspecific interactions such as prey-predator relationships, parasite-host interactions and symbiosis. In addition to its potential as a biological matrix to assess the immunity and health status of fish, epidermal mucus also serves as an ecotoxicological biomonitoring tool by detecting resulting biochemical biomarker reactions.

This dissertation examines the role of fish mucus by exploring the potential molecules that can act as biomarkers in fish protection against pathogens and in intra- and inter-species interactions. Even the sciences of "omics" in fish mucus research and their importance in studying fish mucus functions and predicting fish health conditions were discussed. Future studies are important to be encouraged for the evaluation the potential of mucus biological activity using the omic technology approach, given the diversity of fish species. Knowledge about fish health and welfare is important for maintaining species biodiversity, growth of aquaculture and pharmaceutical industry.

Keywords: fish mucus, mucus molecules, mucus activities, antimicrobial peptides, innate immunity, lysozyme, proteases, mucosal biomarker, stress state

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη.....	3
Abstract	5
Κατάλογος Πινάκων.....	8
Εισαγωγή	9
Κεφάλαιο 1 Βλέννα ψαριών.....	13
1.1 Συστατικά της επιδερμικής βλέννας ψαριών.....	13
1.2 Δραστηριότητες της βλέννας ως απόκριση στο στρες.....	15
1.3 Δραστηριότητες βλέννας στην έμφυτη ανοσία	17
Κεφάλαιο 2 Δραστικότητα βλέννας ως αντιμικροβιακός παράγοντας	35
2.1 Παρδαξίνη	37
2.2 Πλουεροσιδίνη	37
2.3 Ριβοσωμικά πεπτίδια	37
2.4 Παράγωγα ιστονών	38
Κεφάλαιο 3 Δειγματοληψία και ανάλυση βλέννας	39
3.1 Δειγματοληψία βλέννας.....	39
3.2 Σημαντικότητα ανάλυσης της βλέννας ως δείκτης της κατάστασης υγείας των ψαριών.....	40
3.3 Χρήση της ωμικής τεχνολογίας στην Έρευνα για τη Βλέννα Ψαριών.....	43
Συμπεράσματα	47
Βιβλιογραφία.....	50

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Δραστικότητα της βλέννας των ψαριών ως εργαλείο αξιολόγησης της κατάστασης της υγείας πολλών ειδών ψαριών	24
--	----

Εισαγωγή

Η βλέννα του δέρματος είναι ένα σημαντικό συστατικό του έμφυτου ανοσοποιητικού μηχανισμού στα ψάρια και παρέχει ένα πρώτο φυσικό και χημικό φραγμό έναντι των παθογόνων, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην υγεία των ψαριών (Subramanian et al., 2007). Εκκρίνεται από τρεις διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, τα καλυκοειδή, τα σακοειδή και τα ραβδωτά κύτταρα. Τα καλυκοειδή κύτταρα είναι άφθονα σε όλες τις εξωτερικές επιφάνειες και στην επιφάνεια των βραγχίων. Αυτά τα κύτταρα παράγουν κοκκία βλέννας και περιέχουν γλυκοπρωτεΐνες. Τα σακοειδή κύτταρα αναμειγνύουν τις εκκρίσεις τους με εκείνες των καλυκοειδών κυττάρων και τα ραβδωτά κύτταρα εκκρίνουν κυρίως πρωτεϊνούχα συστατικά. Η βλέννα του δέρματος εκτελεί το ρόλο της με συνεχή παραγωγή και απομάκρυνση, αποτρέποντας τις προσκολλητικές επιθέσεις των παθογόνων και περιέχει αρκετούς αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως πρωτεΐνες, λυσοζύμη, ανοσοσφαιρίνη και λεκτίνες (Dash et al., 2018). Επιπλέον, εμπλέκεται στην οσμορύθμιση και τη χημική επικοινωνία, βελτιώνει την απόδοση της κολύμβησης μειώνοντας την αντίσταση στο νερό και δρα ως φυσικό φράγμα κατά της τριβής και ως φυσικό και βιοχημικό φράγμα έναντι των ρύπων (Menzies and Hood, 2012).

Ανάλογα με το είδος του ψαριού, η βλέννα του δέρματος ποικίλλει σημαντικά ως προς το ιξώδες, το πάχος και την περιεκτικότητα σε γλυκοπρωτεΐνη (βλεννίνη), η οποία αντιπροσωπεύει επίσης το κύριο συστατικό της βλέννας (Dash et al., 2018). Οι βλεννίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες με υψηλό μοριακό βάρος, οι οποίες δίνουν στη βλέννα ιξωδοελαστικές και ρεολογικές ιδιότητες. Άλλα συστατικά που βρίσκονται στη βλέννα των ψαριών είναι η οι γλυκοζαμινογλυκάνες, παράγοντες του συμπληρώματος, καρβονική ανυδράση και η καλμοδουλίνη. Ωστόσο, η σύνθεση της βλέννας του δέρματος των ψαριών είναι πολύ μεταβλητή μεταξύ των ειδών και εντός των ειδών, σε σχέση με το φύλο, μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων και των περιβαλλοντικών συνθηκών (Reverter et al., 2017). Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες της βλέννας του δέρματος των ψαριών έχει αυξηθεί, παίζοντας σημαντικό ρόλο ενάντια στα μικρόβια που μπορούν να αλλάξουν το μικροβίωμα του βλεννογόνου των ψαριών, καθιστώντας τα ψάρια πιο ευάλωτα σε αρκετές ασθένειες.

Το στρες και οι ασθένειες στα ψάρια εμφανίζονται συχνά στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας και στο υδάτινο περιβάλλον. Η μικροβιακή μόλυνση, η ποιότητα του νερού και η μη ορθή διαχείριση είναι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν στρες και ασθένειες στα ψάρια (Guardiola *et al.*, 2016). Τα ψάρια ζουν σε περιβάλλον που περιβάλλεται από μικρόβια. Το δέρμα τους είναι ευαίσθητο σε μολύνσεις λόγω της επαφής και της έκθεσης σε μικροοργανισμούς του νερού. Η μείωση της ποιότητας του νερού οφείλεται σε αλλαγές στο διαλυμένο οξυγόνο, το pH, το διοξείδιο του άνθρακα, τη θερμοκρασία, την αλατότητα, τη φωτοπερίοδο (Cabillon and Lazado, 2019), τη ρύπανση από αμμωνία και τη ρύπανση από βαρέα μέταλλα (Omidi *et al.*, 2020). Το στρες που προκαλείται από παράγοντες διαχείρισης περιλαμβάνει τον συνωστισμό, διατροφικές ελλείψεις και μη σωστό χειρισμό κατά τη διαλογή, την αποθήκευση ή τη μεταφορά, με αποτέλεσμα δυσμενείς επιπτώσεις στη φυσιολογία των ψαριών (Cordero *et al.*, 2015). Το στρες μπορεί να μειώσει την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού, μειώνοντας την αντίσταση στην παθολογία εισβολή και επηρεάζοντας την επιβίωση, γεγονός που τον καθιστά ευάλωτο σε ασθένειες. Τα ψάρια έχουν πολύπλοκους μηχανισμούς άμυνας για να αντιδρούν στο στρες και στις ασθένειες, ένας από τους οποίους είναι η βλέννα που χρησιμεύει ως (i) ένα σταθερό φυσικό και βιοχημικό φράγμα έναντι της παθολογικής εισβολής και των περιβαλλοντικών πιέσεων όπως η έκθεση σε ρύπους και (ii) μια επικάλυψη που προστατεύει τα επιθηλιακά κύτταρα στα βράγχια, το δέρμα και τους γαστρεντερικούς ιστούς. Οι βιοδραστηριότητες του βλεννογόνου στρώματος είναι ένας βασικός μηχανισμός στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα στα ψάρια.

Η παρουσία ανθρωπογενών παραγόντων στο υδάτινο περιβάλλον όπως η ρύπανση οδηγεί επίσης σε οξειδωτικό στρες, επομένως τα ψάρια πρέπει να έχουν ισχυρό αμυντικό σύστημα. Το δέρμα του ψαριού είναι ευαίσθητο στους ρύπους και αποτελεί στόχο οξειδωτικού στρες, γι' αυτό απαιτεί τακτική οικολογική βιοπαρακολούθηση. Η παρακολούθηση της ρύπανσης των υδάτων την τελευταία δεκαετία χρησιμοποίησε την επιδερμική βλέννα ως πιθανή βιολογική μήτρα για την ανάλυση βιοδεικτών οξειδωτικού στρες με μη επεμβατικές μεθόδους για την έγκαιρη ανίχνευση των αντιδράσεων στο στρες και για τον εντοπισμό των επιπτώσεων των ρύπων και των ασθενειών στα ψάρια (Omidi *et al.*, 2020). Η χρήση βλέννας ως βιολογικής μήτρας για την παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας των ψαριών είναι σύμφωνη με την

αρχή της διατήρησης του περιβάλλοντος καθώς η ανάλυση της βλέννας είναι μη επεμβατική μέθοδος που δεν προκαλεί στρες, τραυματισμό ή θάνατο στα ψάρια. Η επιδερμική βλέννα έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως έγκαιρη ανίχνευση στην παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας των ψαριών στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας έναντι παθογόνων εισβολής, ιδιαίτερα βακτηρίων, ιών και παρασίτων.

Η επιδερμική βλέννα χρησιμεύει ως σημαντικό συστατικό του μηχανισμού του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος με δύο τρόπους, πρώτον με την παραγωγή βλέννας συνεχώς για το σχηματισμό αντιβιοτικών παραγόντων και την τακτική απελευθέρωσή τους. Αυτό εμποδίζει τα παθογόνα να εισβάλουν ξανά ή το σχηματισμό σταθερού αποικισμού από δυνητικά μολυσματικά μικρόβια και εμποδίζει την παρασιτική εισβολή (Patel *et al.*, 2020). Επίσης, η επιδερμική βλέννα έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιμικροβιακή δράση μέσω μιας σειράς εγγενών ανοσολογικών παραγόντων όπως η λυσοζύμη, η ανοσοσφαιρίνη, οι πρωτεΐνες συμπληρώματος, οι λεκτίνες, οι C-αντιδρώσες πρωτεΐνες, τα πρωτεολυτικά ένζυμα, οι πρωτεάσες, η αλκαλική φωσφατάση, οι αντιβακτηριδιακές πεπτιδικές πρωτεΐνες (Dash *et al.*, 2018). Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και απελευθερώνονται στη βλέννα είναι η πισικιδίνη, η επινεσιδίνη-1 και οι χρυσοφσίνες (Fekih-Zaghib *et al.*, 2013). Άλλα βιοενεργά συστατικά της επιδερμικής βλέννας είναι οι κυτοκίνες, οι πρωτεΐνες οξειάς φάσης, η καρβονική ανυδράση και η αιμολυσίνη (Dang *et al.*, 2020). Επομένως, το ψάρι βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στο έμφυτο ανοσοποιητικό του σύστημα επειδή το προσαρμοστικό του ανοσοποιητικό σύστημα είναι σχετικά ανεπαρκώς ανεπτυγμένο (Ángeles Esteban, 2012). Επιπλέον, η κορτιζόλη, η γλυκόζη και το γαλακτικό οξύ που ανιχνεύονται στην επιδερμική βλέννα έχουν τη δυνατότητα να αποτελούν βιοδείκτες στρες (Guardiola *et al.*, 2016 ; Fernández-Montero *et al.*, 2020; Ouyang *et al.*, XXXX).

Άλλες αποκρίσεις βιοδεικτών είναι η υπερβολική παραγωγή ενεργών ενώσεων οξυγόνου και η ανίχνευση κυτταρικών αντιοξειδωτικών στην επιδερμική βλέννα, η οποία λειτουργεί επίσης ως μέθοδος πρόωμης ανίχνευσης του οξειδωτικού στρες στα ψάρια (Dzul-Caamal, *et al.*, 2016).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εξέταση των συστατικών της βλέννας του δέρματος των ψαριών και των βιοδραστηριοτήτων τους ως απόκριση στο στρες λόγω της παθογόνου εισβολής

και της περιβαλλοντικής πίεσης αλλά και η καταγραφή των βιοχημικών αποκρίσεων που ανιχνεύονται στη βλέννα του δέρματος των ψαριών ως βιοδείκτες στρες. Οι βιοδείκτες στη βλέννα έχουν τη δυνατότητα ως μη επεμβατική μέθοδος έγκαιρης ανίχνευσης στην αξιολόγηση του στρες και της κατάστασης της υγείας των ψαριών. Αναμένεται ότι η χρήση βιοχημικών αποκρίσεων βλέννας ως βιοδείκτες να βοηθήσει στην αξιολόγηση των θανατηφόρων επιπτώσεων στα ψάρια. Η πλήρης κατανόηση της βιολογικής δραστηριότητας των συστατικών της βλέννας του δέρματος των ψαριών και η πρόβλεψη μέσω των βιοχημικών αποκρίσεων στη βλέννα της κατάστασης στρες που προκαλείται από το περιβάλλον ή από τη μόλυνση των ψαριών από μικροοργανισμούς θα παράσχει εμπειριστατωμένη γνώση σχετικά με τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος του βλεννογόνου των ψαριών που είναι χρήσιμοι για την αξιολόγηση της κατάστασης της υγείας των ψαριών στις βιομηχανίες υδατοκαλλιέργειας και στα πλαίσια της οικοτοξικολογικής βιοπαρακολούθησης και για τη διευκόλυνση της ανάπτυξης νέων στρατηγικών εμβολιασμού για τη θεραπεία των ψαριών που πάσχουν από τέτοιες καταστάσεις στρες ή ασθενειών.

Κεφάλαιο 1 Βλέννα ψαριών

1.1 Συστατικά της επιδερμικής βλέννας ψαριών

Ο βλεννογόνος του δέρματος των ψαριών είναι απαραίτητος φραγμός και χρησιμεύει ως προστασία ενάντια στο περιβάλλον με βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Ο βλεννογόνος αποτελείται από ένα κυτταρικό και ένα χυμικό τμήμα. Το κυτταρικό τμήμα αποτελείται από τη βλεννογόνο μεμβράνη και τον υποκείμενο συνδετικό ιστό και το χυμικό τμήμα αποτελείται από τα εξωκυτταρικά μόρια που υπάρχουν στη βλέννα του δέρματος. Ο βλεννογόνος του δέρματος των ψαριών περιέχει διάφορα συστατικά όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, μεταβολίτες.

Πολλές σημαντικές πρωτεΐνες και ένζυμα όπως οι πρωτεάσες, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMP), οι λεκτίνες, η λυσοζύμη, οι ανοσοσφαιρίνες, οι πρωτεΐνες συμπληρώματος, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), οι τρανσφερρίνες, η αλκαλική φωσφατάση (ALP) και διάφορες άλλες αντιβακτηριακές πρωτεΐνες και πεπτίδια έχουν χαρακτηριστεί στη βλέννα των ψαριών (Swain *et al.*, 2007). Οι βλεννίνες που υπάρχουν στη βλέννα είναι υψηλού μοριακού βάρους γλυκοπρωτεΐνες που προσδίδουν ιξωδοελαστικές και ρεολογικές ιδιότητες στη βλέννα. Ουδέτερες γλυκοπρωτεΐνες μπορεί να βρεθούν στη βλέννα του ψαριού, αλλά συχνά γίνονται όξινες από σιαλικό οξύ (καρβοξυλιωμένος μονοσακχαρίτης) ήθειικούς μονοσακχαρίτες. Οι βλεννίνες διαθέτουν τυπικά επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε θρεονίνη, σερίνη και προλίνη. Η βλέννα του ψαριού περιέχει επίσης λίγα συστατικά υδατανθράκων. Αν και οι λειτουργίες τους δεν είναι καλά καθορισμένες, έχουν προταθεί ορισμένοι προστατευτικοί ρόλοι (Esteban, 2012). Η βλέννα του δέρματος των ψαριών αναφέρεται ότι περιέχει διαφορετικά κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA), μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Τα SFA στη βλέννα είναι τα παλμιτικό οξύ και στεατικό οξύ. Το μονοκορεσμένο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό οξύ. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι το λινολεϊκό, το άλφα λινολενικό και το μοροξικό οξύ. Αυτά τα λιπαρά οξέα πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο άμυνας ενάντια στα παθογόνα. Η βλέννα του δέρματος των ψαριών έχει αναφερθεί επίσης ότι περιέχει λίγους μεταβολίτες με αντιβακτηριακές ιδιότητες όπως αζελαϊκό οξύ, N-ακετυλνεουραμινικό οξύ και N-ακετυλογλυκοζαμίνη και υδροξυισοκαπροϊκό οξύ (Ekman *et al.*, 2015). Η σύνθεση της βλέννας ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών ειδών ψαριών. Τα κύτταρα

της βλέννας και η σύνθεση της βλέννας επηρεάζονται από διάφορους ενδογενείς (π.χ. φύλο, αναπτυξιακό στάδιο) και εξωγενείς παράγοντες (π.χ. στρες, υπερωσμωτικότητα, pH και λοιμώξεις). Σε ορισμένες περιπτώσεις, ειδικά όταν τα ψάρια φοβούνται ή τραυματίζονται, υπάρχει μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών στη βλέννα. Η επιδερμίδα τέτοιων ψαριών εκκρίνει ένα υλικό που μοιάζει με γέλη το οποίο προσκολλάται στο δέρμα ακόμη και όταν κολυμπούν με ποικίλες ταχύτητες και για αρκετές ημέρες.

Υπάρχουν τρία είδη κυττάρων που εκκρίνουν βλέννα στην επιδερμίδα των ψαριών και συγκεκριμένα τα καλυκοειδή, τα σακοειδή κύτταρα και τα ραβδωτά κύτταρα. Τα καλυκοειδή κύτταρα που εκκρίνουν βλέννα είναι άφθονα σε όλες τις επιδερμικές επιφάνειες των ψαριών και ιδιαίτερα στις επιφάνειες των βραγχίων. Αυτά τα κύτταρα παράγουν κοκκία βλέννας που σκάνε για να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους. Τα καλυκοειδή κύτταρα περιέχουν σιαλυλιωμένες, θεικές ή ουδέτερες γλυκοπρωτεΐνες (Shepherd, 1993). Άλλα εκκριτικά κύτταρα έχουν επίσης ταυτοποιηθεί των οποίων οι εκκρίσεις αναμειγνύονται με τις εκκρίσεις των καλυκοειδών κυττάρων για να δημιουργήσουν βλέννα. Αυτά περιλαμβάνουν σακοειδή κύτταρα και οξεόφιλα κοκκιώδη κύτταρα όπου τα τελευταία παράγουν βασικές πρωτεΐνες αντί για γλυκοπρωτεΐνες. Τα σακοειδή κύτταρα μπορεί να είναι ανάλογα με τους κοκκώδεις αδένες των αμφιβίων που παράγουν κρινοτοξικές και απωθητικές ουσίες, αλλά οι εκκρίσεις αυτών των κυττάρων έχουν επίσης προστατευτικό και ρυθμιστικό ρόλο. Οι εκκρίσεις των ραβδωτών κυττάρων έχουν περισσότερα πρωτεϊνικά και λιγότερα υδατανθρακικά συστατικά.

Στα ψάρια, λίγες μελέτες έχουν εξετάσει την απέκκριση ή την παράδοση μορίων εκτός από βλεννίνες στα στρώματα της βλέννας (Baba, 2021). Οι πρωτεΐνες θα μπορούσαν να μεταφερθούν στο στρώμα της βλέννας με την κλασική παροχή εξωκυτταρικού υλικού, όπου οι πρωτεΐνες συντίθενται από ριβοσώματα στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και στη συνέχεια μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της συσκευής Golgi (Kim *et al.*, 1985). Οι πρωτεΐνες (που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα) και άλλα μόρια θα μπορούσαν επίσης να παραδοθούν στα στρώματα της βλέννας μέσω οδών μεταφοράς απευθείας στην κυτταρική μεμβράνη είτε με μεταφορείς είτε μέσω καναλιών ή άλλων μη κλασικών μηχανισμών όπως μεμβρανικά κυστίδια (εξωσώματα και μικροκυστίδια). Τα νεκρά επιδερμικά κύτταρα θα

μπορούσαν επίσης να είναι πηγή πρωτεϊνών βλέννας και άλλων μορίων (Dash *et al.*, 2018). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα μόρια που απελευθερώνονται από τα κυτταρικά υπολείμματα μπορεί να εξακολουθούν να παίζουν σημαντικές λειτουργίες στο στρώμα της βλέννας. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να έχουν πρόσθετες λειτουργίες πέρα από τις γνωστές τους λειτουργίες. Η κοινότητα της κοινής μικροχλωρίδας (βακτήρια και μύκητες) θα μπορούσε επίσης να είναι πηγή ποικίλων μορίων για τη βλέννα όπως αντιμικροβιακά πεπτίδια και δευτερογενείς μεταβολίτες (Sanchez *et al.*, 2012).

1.2 Δραστηριότητες της βλέννας ως απόκριση στο στρες

Η βλέννα καλύπτει το δέρμα και τα βράγχια των ψαριών ως το πρώτο επιφανειακό στρώμα. Είναι πάντα σε επαφή με το υδάτινο περιβάλλον, έτσι ώστε οι αναδυόμενες βιοχημικές αποκρίσεις να είναι κατάλληλες ως βιοδείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση του στρες ή νόσου λόγω εισβολής παθογόνων και περιβαλλοντικών πιέσεων (Dzul-Caamal, *et al.*, 2016). Η βλέννα του δέρματος των ψαριών σύμφωνα με τους Tarnawska *et al.* (2019) έχει χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης στρες, μεταξύ άλλων, ανιχνεύοντας αντιοξειδωτικές δραστηριότητες, ένζυμα (εστεράσες, πρωτεάσες), μη ενζυματικές πρωτεΐνες (βιτελογενίνη, πρωτεΐνες ζώνης ακτινοβολίας), ορμόνες (κορτιζόλη) και άλλα μόρια της έμφυτης ανοσίας. Σύμφωνα με τους Reverter *et al.* (2017), οι μοριακές δραστηριότητες στη βλέννα του δέρματος των ψαριών χρησιμεύουν στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα, στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα, στον κυτταρικό μεταβολισμό, στο μεταβολισμό υδατανθράκων, στο μεταβολισμό λιπιδίων και στην προστασία από την υπεριώδη έκθεση. Οι μοριακές δραστηριότητες στη βλέννα των ψαριών εμπλέκονται επίσης σε οικολογικές αλληλεπιδράσεις όπως η επικοινωνία μεταξύ ατόμων του ίδιου φύλου, ως ενδείξεις εύρεσης κατάλληλου οικοτόπου, συντρόφων ή ως σήμα κινδύνου.

Η επιδερμική βλέννα χρησιμεύει ως δυναμική φυσική και βιοχημική προστασία σε βιολογικές και οικολογικές δραστηριότητες όπως επικοινωνία, αισθητηριακή αντίληψη, κίνηση, αναπνοή, ρύθμιση ιόντων, ωσμωρύθμιση, ρύθμιση θερμοκρασίας, προστασία από την τριβή, προστασία από περιβαλλοντικές τοξίνες και την τοξικότητα βαρέων μετάλλων, γονική διατροφή και προστασία από παθογόνα. Η βλέννα είναι δυναμική και ημιπερατή που επιτρέπει την

ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών, νερού, αερίων, αρώματος, ορμονών και γαμετών. Η βλέννα δρα επίσης ως βιολογικός φραγμός επειδή οι δραστηριότητες των συστατικών της που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση μπορούν να παγιδεύσουν ή να ακινητοποιήσουν παθογόνα, ώστε να μην μπορούν να διεισδύσουν στο επιθηλιακό στρώμα της επιδερμίδας (Cone, 2009).

Τα στρεσαρισμένα ψάρια λόγω της έκθεσης σε χημικούς ρύπους όπως τα βαρέα μέταλλα, εκκρίνουν περισσότερη βλέννα ως φράγμα, αναστέλλοντας τη διάχυση χημικών ουσιών. Η βλέννα μπορεί να δεσμεύσει οργανικά και ανόργανα υλικά και να εξαλείψει αυτά τα υλικά αποβάλλοντάς τα στο περιβάλλον. Κατά συνέπεια, οι χρόνιες εκθέσεις σε τοξίνες στο στρώμα του βλεννογόνου επιθηλίου μειώνουν τον αριθμό των κυττάρων του βλεννογόνου και το πάχος του στρώματος του επιθηλίου (Dang *et al.*, 2020). Ο βλεννογόνιος φραγμός στο δέρμα, τα βράγχια και το έντερο των ψαριών είναι απαραίτητος ως οικοτοξικολογικό εργαλείο βιοπαρακολούθησης.

Η σύνθεση και τα χαρακτηριστικά της βλέννας, όπως οι ρεολογικές ιδιότητες και οι ιδιότητες ιξωδοελαστικότητας είναι απαραίτητα για την υποστήριξη των λειτουργικών τους δραστηριοτήτων στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (Lai *et al.*, 2009). Η περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ενώσεις και τα χαρακτηριστικά της βλέννας των ψαριών ποικίλλει ανάλογα με τα είδη ψαριών, τους ενδογενείς παράγοντες όπως το φύλο και το στάδιο ανάπτυξης και εξωγενείς παράγοντες όπως το στρες, η υπερωσμωτικότητα, η θερμοκρασία, το pH και η μόλυνση. Τα στρεσαρισμένα και τραυματισμένα ψάρια φέρουν πολλή πρωτεΐνη στη βλέννα του δέρματος τους. Η ιξωδοελαστικότητα της βλέννας καθορίζει την ικανότητά της να αντέχει την κινητικότητα των βακτηρίων. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι όταν στρεσάρονται, τα ψάρια παράγουν βλέννα συνεχώς, αυξάνουν την έκκριση βλέννας και αλλάζουν τη σύσταση της βλέννας τους.

Οι βιοδραστηριότητες της βλέννας των ψαριών ως απόκριση στο στρες επικεντρώνονται (i) στα βιοενεργά συστατικά της βλέννας που παίζουν ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου, (ii) στα βιοενεργά συστατικά της βλέννας που λειτουργούν ως αντιμικροβιακά και (iii) στη βλέννα ως πιθανή βιολογική μήτρα για την ανάλυση βιοδεικτών οξειδωτικού στρες λόγω περιβαλλοντικών πιέσεων όπως η ρύπανση από βαρέα μέταλλα και οι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες.

1.3 Δραστηριότητες βλέννας στην έμφυτη ανοσία

Το ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου αποτελείται από έμφυτα και προσαρμοστικά ανοσοκύτταρα και μόρια που συνεργάζονται για να προστατεύσουν τον ξενιστή από παθογόνο εισβολή (Guardiola *et al.*, 2016). Έτσι, το ψάρι έχει ένα ζωτικό συστατικό στο αμυντικό σύστημα που είναι ο λεμφοειδής ιστός που σχετίζεται με τη βλεννογόνο (Guardiola *et al.*, 2015). Έτσι, το δέρμα του ψαριού περιέχει λεμφοειδή ιστό και διάφορους τύπους λευκοκυττάρων, όπως λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα, τα οποία μεταναστεύουν γρήγορα στο σημείο της μόλυνσης για να σκοτώσουν παθογόνα (Xiong *et al.*, 2020). Άλλα κυτταρικά συστατικά που συμβάλλουν στην έμφυτη ανοσία του ψαριού είναι τα μαστοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα του βλεννογόνου (Reverter *et al.*, 2017).

Η βλέννα χρησιμοποιείται ως πηγή για την πρωτεομική χαρτογράφηση και την ανακάλυψη νέων πρωτεϊνικών μορίων που εμπλέκονται στην ανοσία του βλεννογόνου. Επίσης, μια μεταβολομική προσέγγιση για τη βλέννα του δέρματος των ψαριών έχει χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας του *Pimephales promelas* ανιχνεύοντας 204 διαφορετικούς μεταβολίτες (Ekman *et al.*, 2015).

Οι Fast *et al.* (2002) με την προσέγγιση της πρωτεομικής κατάφεραν να εντοπίσουν 1192 πρωτεΐνες από τη βλέννα του δέρματος σολομού του Ατλαντικού. Συνολικά 918 πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί από τους Xiong *et al.* (2020) που αναφέρονται στη βάση δεδομένων γονιδιώματος του κίτρινου γατόψαρου (*Pelteobagrus fulvidraco*). Η προσέγγιση της πρωτεομικής έχει εντοπίσει ότι πρωτεΐνες όπως οι λεκτίνες, οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια και οι ανοσοσφαιρίνες παίζουν ρόλο στην έμφυτη ανοσία. Τα δεδομένα πρωτεομικής παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα προφίλ πρωτεϊνών για την πλήρη κατανόηση της λειτουργίας και της βιολογικής δραστηριότητας της βλέννας του δέρματος των ψαριών στην καταπολέμηση μικροβιακών λοιμώξεων. Αυτές οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται στη βλέννα, επομένως είναι χρήσιμες για την αξιολόγηση του στρες και της κατάστασης της υγείας των ψαριών (Dang *et al.*, 2020). Η βλέννα είναι επίσης μια πηγή για την ανάλυση αλλαγών σε μια χυμική ανοσολογική δραστηριότητα όπως η ανοσοσφαιρίνη, η λυσοζύμη ή η αλκαλική φωσφατάση (Cordero *et al.*, 2016).

Η ανοσία του βλεννογόνου στην επιδερμική βλέννα των ψαριών εξαρτάται από οικολογικές και φυσιολογικές συνθήκες όπως οι εποχικοί κύκλοι και τα αναπτυξιακά στάδια. Για παράδειγμα, τα επίπεδα της λυσοζύμης επηρεάζονται από τους εποχιακούς κύκλους. Την εποχή που ο κίνδυνος προσβολής ασθενειών είναι υψηλός, τα επίπεδα λυσοζύμης στη βλέννα και στο αίμα θα αυξηθούν. Τα στάδια ανάπτυξης του ανοσοποιητικού συστήματος δείχνουν ότι όσο μικρότερο είναι το επίπεδο ανοσολογικής ωριμότητας, τόσο μικρότερη είναι η ικανότητα εξόντωσης παθογόνων μικροοργανισμών. Η ακεραιότητα της επιδερμικής βλέννας είναι πολύ σημαντική για την ευημερία και την επιβίωση των ψαριών.

Οι δραστηριότητες της βλέννας στην έμφυτη ανοσία εξαρτώνται από τα πρωτεϊνικά συστατικά της όπως η λυσοζύμη, η φωσφατάση, οι εστεράσες, τα πρωτεολυτικά ένζυμα, οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος, οι λεκτίνες, οι ανοσοσφαιρίνες και οι C-αντιδρώσες πρωτεΐνες. Οι δραστηριότητες αυτών των πρωτεϊνικών συστατικών επιδιώκουν να εξαλείψουν τα παθογόνα και να παράγουν ανοσία όταν εμφανίζεται μόλυνση (Reverter et al. 2017). Οι λυσοζύμες, οι αλκαλικές φωσφατάσες και οι πρωτεάσες έχουν δράση ως υδρολυτικά ένζυμα στη βλέννα του δέρματος της ιριδιζουσας πέστροφας (Al-Zaidan et al., 2013). Η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο που διασπά τον δεσμό των β-1,4-γλυκοσιδίων μεταξύ του N-ακετυλογλυκοζαμινοξέος και του μουραμικού N-ακετυλικού οξέος στην πεπτιδογλυκάνη, έτσι μπορεί να βλάψει τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων σε υποωσμωτικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Dash et al., 2018). Η λυσοζύμη που βρίσκεται στην επιδερμική βλέννα παίζει ρόλο στον αμυντικό μηχανισμό του βλεννογόνου έναντι βακτηριακών, ιογενών και παρασιτικών λοιμώξεων (Guardiola et al., 2014). Η εκτίμηση των επιπέδων της λυσοζύμης είναι διαγνωστική για τον προσδιορισμό της κατάστασης της νόσου των ψαριών.

Οι όξινες και αλκαλικές φωσφατάσες και εστεράσες είναι σημαντικά ένζυμα στην επιδερμική βλέννα των ψαριών, έχοντας αντιβακτηριακή δράση και αποτελώντας πιθανούς δείκτες στρες. Η δραστηριότητα των ενζύμων της αλκαλικής φωσφατάσης στην επιδερμική βλέννα των ψαριών βοηθά στην επούλωση των πληγών (Easy and Ross, 2010). Η αλκαλική φωσφατάση έχει αποδειχθεί ότι δρα ως αντιβακτηριακός παράγοντας λόγω της υδρολυτικής της δράσης (Dash et al., 2011).

Το επίπεδο της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης της στρεσογόνου κατάστασης του ψαριού καθώς έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται κατά την αναγέννηση του δέρματος, στα αρχικά στάδια της επούλωσης πληγών, σε καταστάσεις στρες και εξαιτίας παρασιτικής μόλυνσης. Στην περίπτωση της ιριδίζουσας πέστροφας, του σολομού coho και του σολομού του Ατλαντικού δεν ανιχνεύτηκε ALP στη βλέννα του δέρματος εκτός εάν τα ψάρια μεταφέρθηκαν από το γλυκό νερό στο θαλάσσιο νερό (Fast *et al.*, 2002). Μελέτες έχουν δείξει αρκετούς στρεσογόνους παράγοντες όπως η οξύτητα, η θερμική ανύψωση και το μολυσμένο νερό προκάλεσαν αυξήσεις στον αριθμό των θετικών στην αλκαλική φωσφατάση κυττάρων Rodlet στο δέρμα της ιριδίζουσας πέστροφας.

Η πρωτεάση είναι ένα καταλυτικό ένζυμο για την υδρόλυση των πρωτεϊνικών πεπτιδικών δεσμών. Η επιδερμική βλέννα των ψαριών περιέχει διάφορες πρωτεάσες που παίζουν ρόλο στον έμφυτο μηχανισμό του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι πρωτεάσες ταξινομούνται ευρέως σε τέσσερις κατηγορίες, όπως πρωτεάσες σερίνης, πρωτεάσες κυστεΐνης, ασπαρτικές πρωτεάσες και μεταλλοπρωτεάσες ανάλογα με τις χημικές ομάδες που είναι υπεύθυνες για την κατάλυση. Η πρωτεάση της σερίνης αναφέρεται ως μία από τις κύριες πρωτεάσες βλέννας σε πολλά είδη ψαριών όπως τα *Cirrhinus mrigala*, *Labeo rohita*, *Catla catla*, *Rita rita* και *Channa punctata* και αποτελεί περισσότερο από το 25% του συστήματος συμπληρώματος πρωτεϊνών. Πρωτεάσες όπως η θρυψίνη (πρωτεάση σερίνης), η καθεψίνη B και L (πρωτεάσες κυστεΐνης), η καθεψίνη D (ασπαρτική πρωτεάση) και οι μεταλλοπρωτεάσες έχουν εντοπιστεί στη βλέννα ψαριών της ιριδίζουσας πέστροφας, του coho και του σολομού του Ατλαντικού και του ιαπωνικού χελιού. Οι πρωτεάσες στη βλέννα δρουν άμεσα σε ένα παθογόνο ή μπορεί έμμεσα να αποτρέψουν την εισβολή του παθογόνου, τροποποιώντας τη συνοχή της βλέννας απομακρύνοντας τα παθογόνα από την επιφάνεια του σώματος και έτσι χρησιμοποιούνται ως δείκτης ανίχνευσης της κατάστασης της υγείας του ψαριού. Επιπλέον, οι πρωτεάσες πιστεύεται ότι ενεργοποιούν και ενισχύουν την παραγωγή εγγενών ανοσοσυστατικών όπως το συμπλήρωμα πρωτεϊνών, τις ανοσοσφαιρίνες ή τα AMP στο ανοσοποιητικό σύστημα (Dash *et al.*, 2018).

Αρκετές πρωτεάσες έχουν χαρακτηριστεί στη βλέννα του δέρματος των ψαριών και εμφανίζουν διάφορες δραστηριότητες, π.χ. η καθεψίνη D συμμετέχει στην παραγωγή της παρασίνης I, ενός ισχυρού αντιμικροβιακού πεπτιδίου από την ιστόνη H2A στον βλεννογόνο του δέρματος του γατόψαρου. Η καθεψίνη D απενεργοποιεί το προένζυμο προκαθεψίνη D και μια μεταλλοπρωτεάση, η οποία διασπά την προκαθεψίνη D για να δημιουργήσει ενεργή καθεψίνη D. Η ενεργοποιημένη καθεψίνη D με τη σειρά της διασπά τον δεσμό Ser19-Arg20 της ιστόνης H2A για να παράγει αντιμικροβιακά πεπτιδικά όπως η παρασίνη I. Παρομοίως, η έκφραση μιας πρωτεάσης σερίνης όπως η τυσίνη στη βλέννα του δέρματος του σολομού του Ατλαντικού, *Salmo salar*, σε απόκριση στη μόλυνση με την ψείρα του σολομού, *Lepeophtheirus salmonis* καταδείχθηκε από τους Firth *et al.* (2000). Άλλη έρευνα κατέδειξε την παρουσία αμινοπεπτιδάσης, καθεψίνης B και πρωτεασών που μοιάζουν με καθεψίνη L στο επιδερμικό κυτταρικό στρώμα του ιαπωνικού χελιού (*Anguilla japonica*) καθώς και από τη ραχιαία επιφάνεια του ευρωπαϊκού χελιού (*A. anguilla*). Οι καθεψίνες B και L εμφάνισαν υψηλή βακτηριολυτική δράση έναντι των παθογόνων ψαριών *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare* και *L. anguillarum*.

Η ανάλυση της βλέννας του δέρματος πέντε Ινδικών κυπρίνων έδειξε υψηλή δραστηριότητα πρωτεάσης στα *C. punctata* και *C. mrigala* και χαμηλή δραστηριότητα σε *L. rohita* και *C. catla* (Nigam *et al.*, 2012). Σε μια άλλη μελέτη, η δραστηριότητα πρωτεάσης της επιδερμικής βλέννας του *L. rohita* αναφέρθηκε ότι είναι υψηλότερη μεταξύ των τριών κυρίων ειδών Ινδικού κυπρίνου, δηλ. *C. mrigala*, *C. catla* και *L. rohita* (Dash, *et al.* 2014). Οι πρωτεάσες που απομονώθηκαν από τη βλέννα του δέρματος διαφορετικών ψαριών και χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτης της κατάστασης της υγείας του ψαριού έχουν συνοψιστεί στον Πίνακα 1.

Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με τους υδατάνθρακες που εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και μπορούν να συσσωρεύσουν παθογόνα κύτταρα που ζουν στη βλέννα. Μπορούν να συσσωματώσουν βακτήρια στην επιφάνεια των βλεννογόνων κυττάρων αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες θέσεις σε γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια ή πολυσακχαρίτες πάνω στα βακτήρια. Στη βλέννα, οι λεκτίνες παίζουν ενεργό ρόλο στο αμυντικό σύστημα του

βλεννογόνου με τη δραστηριότητά τους στην εξωτερική επιφάνεια του σώματος και αποτελούν δείκτη της αναγνώρισης της κατάστασης υγείας του ψαριού (Dash *et al.*, 2018).

Διαφορετικοί τύποι λεκτινών έχουν αναφερθεί στην επιδερμική βλέννα των ψαριών. Οι Tsutsui *et al.* (2003) ανέφεραν την παρουσία ενός νέου τύπου λεκτίνης της βλέννας στο ψάρι *Silurus asotus* που εμφάνιζε δραστηριότητα δέσμευσης μαννόζης εξαρτώμενη από Ca^{+2} . Μια λεκτίνη που δεσμεύει τη μαννόζη που συνδέεται με παθογόνα αναφέρθηκε στη βλέννα του μπακαλιάρου του Ατλαντικού.

Οι γαλακτίνες διαφορετικών μορφών έχουν επίσης αποδειχθεί ότι έχουν αντιβακτηριακή δράση (Cha *et al.*, 2015). Η ναπτεκτίνη, μια λεκτίνη τύπου C που συνδέεται με τη γαλακτόζη, αναφέρθηκε επίσης σε σολομό του Ατλαντικού που προσβλήθηκε από τη νόσο των αμοιβάδων. Η λεκτίνη που δεσμεύει τη φρουκτόζη αναφέρθηκε στη βλέννα του λαβρακιού (Cordero *et al.*, 2015). Οι λεκτίνες υπάρχουν πιθανώς στη βλέννα του δέρματος πολλών επιπλέον ειδών, επειδή η βλέννα πολλών ψαριών προκαλεί αιμοσυγκόλληση, μια ιδιότητα τυπική των λεκτινών. Ορισμένες λεκτίνες της βλέννας ψαριών ως δείκτες αναγνώρισης της στρεσογόνου κατάστασης της υγείας του ψαριού συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Το σύστημα συμπληρώματος αποτελεί ένα άλλο σημαντικό συστατικό της έμφυτης απόκρισης στη βλέννα. Περιέχει μια ομάδα πρωτεϊνικών και μη πρωτεϊνικών συστατικών που παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην έμφυτη όσο και στην προσαρμοστική ανοσία. Περιέχει περίπου 35 πρωτεΐνες που συνδέονται με το πλάσμα και τη μεμβράνη που μεσολαβούν σε μια αλυσιδωτή αντίδραση πρωτεόλυσης που έχει ως αποτέλεσμα την εξάλειψη των μικροοργανισμών εισβολής (Boshra *et al.*, 2006). Σημαντικές πρωτεΐνες συμπληρώματος όπως C3, C7 και C1q έχουν αναφερθεί στον βλεννογόνο του δέρματος της ιππόγλωσσας του Ατλαντικού (*H. hippoglossus*), του κυπρίνου (*Ctenopharyngodon idella*) και του οξύρρυγχου Σιβηρίας (*Acipenser baerii*) αντίστοιχα (Fan *et al.*, 2015).

Οι ανοσοσφαιρίνες (IgM και IgT/IgZ) είναι τα βασικά συστατικά της έμφυτης ανοσίας στην επιδερμική βλέννα, με την IgT/IgZ να έχει την κύρια δραστηριότητα στην ανοσία του βλεννογόνου των ψαριών.

Οι C-αντιδρώσες πρωτεΐνες είναι μόρια πρωτεΐνης στα εξωκυτταρικά κυστίδια της επιδερμικής βλέννας που παίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη άμυνα του ανοσοποιητικού. Οι C-αντιδρώσες πρωτεΐνες ανήκουν στις πενταζίνες, μια οικογένεια πολυλειτουργικών πρωτεϊνών και σχηματίζονται ως αντίδραση από μόλυνση, τραυματισμό και φλεγμονώδεις διεργασίες. Συνδέονται με φωσφορυλοχολίνη που υπάρχει στο κυτταρικό τοίχωμα των παθογόνων με σκοπό την ενεργοποίηση του συμπληρώματος (Nauta *et al.*, 2003). Τα υψηλά επίπεδα σε C-αντιδρώσες πρωτεΐνες δείχνουν φλεγμονή στο σώμα. Οι C-αντιδρώσες πρωτεΐνες παίζουν ρόλο στην επιδιόρθωση κατεστραμμένων ιστών (Easy and Ross, 2010). Τα ψάρια που έχουν στρες έχουν υψηλότερα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης από το κανονικό.

Επίσης, αυξημένα επίπεδα CRP βρέθηκαν στον ορό και τη βλέννα του *Tilapia mossambica* μετά από σωματικό τραυματισμό που υποδηλώνει το ρόλο του στην έγκαιρη ανίχνευση ασθενειών. Αυξημένα επίπεδα μορίων που μοιάζουν με πενταζίνη έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη τελεοστέων ψαριών, όπως ο σολομός του Ατλαντικού (*S. salar*), ο κοινός λύκος (*Anarhichas lupus*), ο μπακαλιάρος (*Gadus morhua*), η ιππόγλωσσα (*H. hippoglossus*) και ο Ινδικός κυπρίνος (*Catla catla*) που βίωναν στρεσογόνο κατάσταση.

Άλλα μόρια που εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσολογική δραστηριότητα είναι οι γλυκοπρωτεΐνες όπως η τρανσφερίνη (Easy *et al.*, 2012). Η τρανσφερίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που δεσμεύει τον σίδηρο που παίζει ρόλο στη μεταφορά σιδήρου (απορρόφηση, αποθήκευση, διάθεση) στην επιδερμική βλέννα των ψαριών. Ως εκ τούτου, η τρανσφερίνη παίζει σημαντικό ρόλο στον έμφυτο αμυντικό μηχανισμό δεσμεύοντας τον σίδηρο και μειώνοντας τη διαθεσιμότητά του από παθογόνα χηλώνοντάς τον.

Η δραστηριότητα της τρανσφερίνης βοηθά στην αντίσταση στην παθογόνο ανάπτυξη μέχρι την εμφάνιση της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος (Dash *et al.*, 2018). Η βλέννα του γατόψαρου περιέχει βλεννίνες των οποίων το κύριο συστατικό είναι οι γλυκοπρωτεΐνες. Οι βλεννίνες στη βλέννα χρησιμεύουν (i) για την επικάλυψη της επιφάνειας του επιθηλιακού ιστού, (ii) ως λιπαντικό και προστατευτικό, (iii) αποτρέπουν τον αποικισμό παρασιτικών, βακτηρίων και μυκήτων, (iv) γίνονται η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στην τριβή του νερού και την παθογόνο εισβολή (Abdel-Shafi *et al.*, 2019). Η επιδερμική βλέννα των ψαριών περιέχει επίσης

αντιβακτηριακά πεπτίδια που λειτουργούν για να ρυθμίζουν τη λειτουργία των Β λεμφοκυττάρων που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα (Reverter *et al.*, 2017). Η επιδερμική βλέννα και τα συστατικά της από διάφορα είδη ψαριών μπορούν να αποτελέσουν πηγή νέων αντιμικροβιακών παραγόντων και εμπλέκονται στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Δραστικότητα της βλέννας των ψαριών ως εργαλείο αξιολόγησης της κατάστασης της υγείας πολλών ειδών ψαριών

Δραστηριότητα	Βιοενεργά μόρια εμπλέκονται σε αντιδράσεις του ανοσοποιητικού και/ή στρες	Στρεσογόνοι παράγοντες	Είδος ψαριού	Αναφορά
Βλεννογόσιος Φραγμός	Λεκτίνη, αλκαλική φωσφατάση, λυσοζύμη	Παρασιτική μόλυνση	<i>Ctenophryngodon idella</i> , <i>Hypophthalmichthys moiltrix</i> , <i>Labeo rohita</i> , <i>Cirrhinus mrigala</i> , <i>Catla</i>	(Abdel-Shafi et al., 2019)
	Σιαλικό οξύ (N-ακετυλνεουραμινικό οξύ)	Έκθεση στον ψευδάργυρο	<i>catla</i> , <i>Cyprinus carpio</i>	(Eddy and Fraser, 1982)
Αντιβακτηριδιακή δράση	Γλυκοπρωτεΐνη	Λοίμωξη από βακτήρια	Ιριδίζουσα Πέστροφα (<i>Salmo gairdneri</i> , Richardson)	(Abolfathi et al., 2020)
	Υπεροξειδάση, IgM, πρωτεάση	Στέρηση τροφής	Αφρικανικό γατόψαρο	(Al-Zaidan et al., 2013)
	Αντιβακτηριακά πεπτίδια	<i>Escherichia coli</i>	(<i>Clarias gariepinus</i>)	(FAN et al., 2015)
	NK-λυσίνη	<i>Aeromonas salmonicida</i> ,	<i>Gilthead Seabream</i>	(Fagan et al., 2003)

	Gaduscidins Κατιονικά, αμφιπαθητικά, α-έλικας	Βακτήρια, ιοί	μπακαλιάρος Ατλαντικού	(Browne <i>et al.</i> , 2011)
	Συμπλήρωμα C1qC	<i>Vibrio anguillarum</i>	(<i>Sparus aurata</i>)	(FAN <i>et al.</i> , 2015)
	Συμπλήρωμα C7	<i>Escherichia coli.</i>	Κυπρίνος	(Shen <i>et al.</i> , 2012)
	Το αντιμικροβιακό πεπτίδιο, Chrysophsin	<i>Aeromonas spp</i>	(<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)	(Fekih- Zaghib <i>et al.</i> , 2013)
	Γλυκοπρωτεΐνες	Υδρόφιλα βακτήρια	<i>Salmo Salar</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2019)
	Πισκιδίνες Κατιονικά, αμφιπαθητικά, α-έλικας	-	<i>Gadus morhua</i>	(Ruangsri <i>et al.</i> , 2010)
	Πρωτεϊνικές ενώσεις	-	Σιβηρικός οξύρρυγχος	(Mahadev an <i>et al.</i> , 2019)
	Αντιμικροβιακά πεπτίδια	-	(<i>Acipenser baerii</i>)	(Patel <i>et al.</i> , 2020)
	Αντιμικροβιακά πολυπεπτίδια, πισκιδίνες	-	Κυπρίνος	(Terova <i>et al.</i> , 2011)
	SAMP H1 Θραύσμα πεπτιδίου H1 N-τερματικού ιστόνης πλούσιο σε προλίνη	Gram-θετικά και Gram- αρνητικά βακτήρια	Σολομός Ατλαντικού	(Lüders <i>et al.</i> , 2005)
	Λυσοζύμη, πρωτεάση, αλκαλική φωσφατάση,	<i>B. subtilis, S. aureus, E. coli,</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	(Srichaiyo <i>et al.</i> , 2020)

	εστεράση	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Morone saxatilis</i> , <i>Melanogrammus</i> <i>aeglefinus</i> , <i>Myxine</i> <i>glutinosa</i>	(Subramani an, Ross and MacKinnon , 2008)
	Grammistin	-	<i>Grammistes</i> <i>sexlineatus</i>	(Sugiyama <i>et al.</i> , 2005)
Βλεννογόνια κυτταρική έμφυτη ανοσία	Λυσοζύμη, πρωτεάσες αλκαλικής φωσφατάσης	Επιδράσεις της εποχής και του μεγέθους των ψαριών	<i>Oncorhynchus</i> <i>mykiss</i>	(Abolfathi <i>et al.</i> , 2020)
	Υπεροξειδάση, IgM, πρωτεάση	Στέρηση τροφής	<i>Sparus aurata</i>	(Al-Zaidan <i>et al.</i> , 2013)
	Τερματικοί υδατάνθρακες, πρωτεάση, αντιπρωτεάση, υπεροξειδάση, λυσοζύμη, IgM	Δερματικά έλκη	<i>Sparus aurata</i>	(Tapia- Paniagua <i>et al.</i> , 2018)
	Λυσοζύμη, υπεροξειδάση	-	<i>Oreochromis</i> <i>niloticus</i>	(Srivastava <i>et al.</i> , 2018)
	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, λυσοζύμη	Χημικά λυμάτων	<i>Cyprinus carpio L.</i>	(Tarnawska <i>et al.</i> , 2019)
	Θρυψίνη	Περιβαλλοντική επιρροή	<i>Salmo salar L.</i>	(Bulloch <i>et</i> <i>al.</i> , 2020)

	Υπεροξειδάση	Έκθεση σε κάδμιο	<i>Cyprinus carpio L.</i>	(Cabillon and Lazado, 2019)
	Αλκαλική φωσφατάση, καθεψίνη Β, λυσοζύμη, κορτιζόλη	Βραχυπρόθεσμο στρες, μακροχρόνιο στρες	<i>Salmo salar L.</i>	(Easy and Ross, 2010)
	Τρανσφερρίνη		<i>Gadus morhua</i>	(Easy et al., 2012)
	Λυσοζύμη	Εξέλιξη για θαλάσσια διαβίωση (smoltification)	<i>Salmo salar</i>	(Fagan et al., 2003)
	Λυσοζύμη	συγκέντρωση άλατος	<i>Cyprinus carpio</i>	(Fernández-Montero et al., 2020)
	Πρωτεΐνη, αλκαλική φωσφατάση, μυελοϋπεροξειδάση, λυσοζύμη	Λοίμωξη από <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	(Gobi et al., 2018)
	Τερματικοί υδατάνθρακες(N-ακετυλνεουραμινικό οξύ, μαννόζη, γλυκόζη και N-ακετυλγαλακτοζαμίνη), πρωτεάσες, λυσοζύμη, υπεροξειδάση, αλκαλική φωσφατάση, εστεράσες, σερούλοπλασμίνη	Λοίμωξη από <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	<i>Solea senegalensis, Kaup</i>	(Guardiola et al., 2017)

	Πρωτεάση, υπεροξειδάση	Οξύς συνωστισμός, αναισθητικά, έκθεση σε αέρα	<i>Sparus aurata L.</i>	(Guardiola <i>et al.</i> , 2015)
	Λεκτίνη, τελικός υδατάνθρακας	Βαριά μέταλλα (Όπως, Cd, Hg)	<i>Sparus aurata L.</i>	(Guardiola, Cuesta and Esteban, 2016)
	Υπεροξειδάση	Θερμική ρύπανση	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Iger, Jenner and Bonga, 1994)
	Αλκαλική φωσφατάση, λυσοζύμη, πρωτεάση, λεκτίνη	Πολυκαλλιέργεια υφάλμυρου νερού	<i>Lates calcarifer, Chanos chanos, Mugil cephalus</i>	(Kumar <i>et al.</i> , 2019)
	Αλκαλική φωσφατάση	-	Διάφορα είδη ψαριών	(Lallès, 2019)
	Γλυκοπρωτεΐνη	Περιβάλλον, θρέψη	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2019)
	Λυσοζύμη	Βραχυπρόθεσμη στέρηση τροφής	<i>Ictalurus punctatus</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
	Πεπτιδυλαργινίνη απαμινάση, συμπλήρωμα συστατικό C3, C-αντιδρώσες πρωτεΐνες	-	<i>Gadus morhua L.</i>	(Magnadóttir <i>et al.</i> , 2019)
	Λυσοζύμη, πρωτεάση, αλκαλική φωσφατάση, εστεράση, τρανσφερίνη, IgM	Λοίμωξη από <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	(Palaksha <i>et al.</i> , 2008)

<p>Πρωτεομικό προφίλ: Καλμοδουλίνη, κυστατίνη-B, ιστόνη H2B, υπεροξειρεδοξίνη1, απολιποπρωτεΐνη A1, νατερίνη-2, πρωτεΐνη 14-3-3, άλφα ενολάση, πενταξίνη, θερμός εγκλιματισμός θερμοκρασίας 65 kDa (WAP65kDa) και πρωτεΐνες θερμικού σοκ</p>	<p>Παθογόνα και εξωτερικοί στρεσογόνοι παράγοντες</p>	<p><i>Cyclopterus lumpus</i></p>	<p>(Patel et al., 2020)</p>
<p>Πρωτεΐνες οξείας φάσης, αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, κυτοκίνες, λεκτίνη, λυσοζύμες, βλεννίνη, υπεροξειδάση, πρωτεάσες, οξειδοοξειδοουκτάση</p>	<p>-</p>	<p><i>Cyprinus carpio</i></p>	<p>(Pietrzak, Mazurkiewicz and Slawinska, 2020)</p>
<p>Μικρή υπομονάδα Calpain 1, ωμέγα 1 γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση, υπομονάδα πρωτεασώματος 26S, απολιποπρωτεΐνη 14-kDa, βήτα 2-τουμπουλίνη, πρωτεΐνη δέσμευσης RNA που προκαλείται από ψυχρό, μηλική αφυδρογονάση 2 (μιτοχονδριακή) και κερατίνη τύπου II</p>	<p><i>Vibrio anguillarum</i></p>	<p><i>Gadus morhua</i></p>	<p>(Rajan et al., 2013)</p>
<p>Πρωτεάση, κορτιζόλη</p>	<p>Θαλάσσιες ψείρες</p>	<p><i>Salmo salar</i></p>	<p>(Ross et al., 2000)</p>
<p>Ακτίνες, κερατίνες, γλυκολυτικά ένζυμα, ουμπικιτίνη, πρωτεΐνες θερμικού σοκ, τρανσφερρίνη,</p>	<p>-</p>	<p><i>Sparus aurata</i></p>	<p>(Sanahuja and Ibarz, 2015)</p>

	αιμοπηξίνες			
	Λυσοζύμη, πρωτεάση, καρβοξυλεστεράση, αλκαλική φωσφατάση, όξινη φωσφατάση, καταλάση, υπεροξειδάση,	-	<i>Labeo rohita</i>	(Srivastava et al., 2018)
	Λυσοζύμη, πρωτεάσες, καθειψίνη Β; αλκαλική φωσφατάση	-	<i>Salvelinus alpinus, S. fontinalis, Cyprinus carpio, Morone saxatilis, Melanogrammus aeglefinus, Gadus morhua, Myxine glutinosa.</i>	(Subramanian, MacKinnon and Ross, 2007)
	Λυσοζύμη, αλκαλική φωσφατάση, εστεράση, πρωτεάση, πρωτεΐνη	-	<i>Clarias gariepinus, Channa micropeltes, Channa striatus, Oxyeleotris marmorata, Oreochromis niloticus, Hemibagrus nemurus</i>	(Timalata, 2015)
	Λυσοζύμη, υπεροξειδάση, εναλλακτικό συμπλήρωμα (ACH50)	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Oreochromis niloticus</i>	(Van Doan et al., 2019)

	Λυσόζυμη, πρωτεάση, αντι-πρωτεάση, καθεψίνη Β, αλκαλική φωσφατάση, υπεροξειδάση)	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Amphiprion clarkii</i>	(Wang et al., 2019)
	IgZ	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Megalabrama amblycephala</i>	(Xia et al., 2016)
	Λεκτίνες, συστατικά συμπληρώματος, αντιβακτηριακά πεπτιδία, ανοσοσφαιρίνες, δομικές πρωτεΐνες	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	(Xiong et al., 2020)
Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες	F2-ισοπροστάνες	Ρύπανση από απόβλητα	<i>Esox lucius</i> , <i>Salvelinus namaycush</i>	(Bulloch et al., 2020)
	Μεταλλοθειονίνες, HSP70O2	Απόβλητα χημικών	<i>Cyprinus carpio L.</i>	(Tarnawska et al., 2019)
	O ₂ •, H ₂ O ₂ , TBARS (δραστικές ουσίες θειοβαρβιτουρικού οξέος), καρβονυλικές πρωτεΐνες, υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT), υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx), βιτελογενίνη (VTG) και μεταλλοθειονίνη (MT)	Μέταλλα και PAH	<i>Girardinichthys viviparus</i>	Dzul-Caamal et al. (2016a)
	O ₂ •, H ₂ O ₂ , TBARS, καρβονυλικές πρωτεΐνες, υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT), υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx), βιτελογενίνη (VTG) και μεταλλοθειονίνη (MT)	Έκθεση σε αργό πετρέλαιο	<i>Goodea gracilis</i>	(Dzul-Caamal, Olivares-Rubio, et al., 2016)

	Αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), αντιδραστικά είδη αζώτου (RNS), αντιοξειδωτικές παράμετροι υπεροξειδίου δισμουτάση (SOD), υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx)	Λοίμωξη από <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Oreochromis mossambicus</i>	(Gobi <i>et al.</i> , 2018)
	Καρβοξυλεστεράση	Έκθεση σε οργανοφωσφορικά	<i>Cirrhinus mrigala</i>	(Nigam, Kumari, <i>et al.</i> , 2014)
	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, ολική οξειδωτική κατάσταση, εστεράση, κορτιζόλη	Χρυσά νανοσωματίδια	<i>Sparus aurata L.</i>	(Oliveira <i>et al.</i> , 2018)
Ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και του βιοενεργού φορέα	Νανοσωματίδια με βάση την πρωτεΐνη	-	<i>Lophiosilurus alexandri</i>	(Charlie-Silva <i>et al.</i> , 2019)
	IgM	Επίδραση κατάψυξης και λυοφιλίωσης	<i>Sparus aurata</i>	(Cordero <i>et al.</i> , 2016)
Χυμική ανοσία του βλεννογόνου	IgM	<i>Vibrio harveyi</i> , <i>Vibrio angillarum</i> , <i>Photobacterium damsela</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i>)	<i>Sparus aurata</i> , <i>Dicentrarchus labrax</i> , <i>Umbrina cirrosa</i> , <i>Dentex dentex</i> , <i>Epinephelus marginatus</i>	(Guardiola <i>et al.</i> , 2014)
	IgM	Οξύς συνωστισμός, αναισθητικά, έκθεση στον αέρα	<i>Sparus aurata L.</i>	(Guardiola, Cuesta and Esteban,

				2016)
Βιοδείκτης στρεσογόνου κατάστασης	Γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, πρωτεΐνη, κορτιζόλη	Υποξία και δίχτυα	<i>Argyrosomus regius</i>	(Fernández-Alacid et al., 2019)
	Γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, πρωτεΐνη, κορτιζόλη	Σύλληψη ψαριών, βακτηριακή μόλυνση, νηστεία	<i>Argyrosomus regius, D. labrax, S. aurata</i>	(Fernández-Alacid et al., 2018)
	Κορτιζόλη, έκφραση γονιδίου muc-2	Χειρισμός, πυκνότητα, θερμοκρασία, νηστεία	<i>Seriola dumerili</i>	(Fernández-Montero et al., 2020)
	Κορτιζόλη	Οξύς συνωστισμός, αναισθητικά, έκθεση στον αέρα	<i>Sparus aurata L.</i>	(Guardiola et al., 2015)
	Χολινεστεράση	Έκθεση σε οργανοφωσφορικά άλατα	<i>Cirrhinus mrigala, Labeo rohita, Catla catla</i>	(Nigam, Srivastava, et al., 2014)
	Λυσοζύμη, IgM, αλκαλική φωσφατάση, ολική πρωτεΐνη	Ρύπανση από μόλυβδο	<i>Neogobius melanostomus</i>	(Omidi et al., 2020)
	Κορτιζόλη, γλυκόζη, γαλακτικό οξύ	Έκθεση σε MS-222	<i>Symphysodon aequifasciata</i>	(Ouyang et al., 2020)
	Κυτοκερατίνες	Χρόνιο στρες	<i>Sparus aurata L.</i>	(Pérez-Sánchez et al., 2017)

Βιοδείκτης ενδοκρινικής διαταραχής	Βιτελογενίνη, πρωτεΐνη ζωνών ακτίνων	Υδατογενής εννεύλοφαινόλη	<i>Salmo salar L.</i>	(Meucci and Arukwe, 2005)
---	--------------------------------------	---------------------------	-----------------------	----------------------------------

Κεφάλαιο 2 Δραστικότητα βλέννας ως αντιμικροβιακός παράγοντας

Η βλέννα των ψαριών περιέχει αντιμικροβιακά πεπτίδια, τα οποία είναι ένα από τα κύρια μόρια για την καταπολέμηση των παθογόνων μικροβιακών εισβολών. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι ενδογενή πεπτίδια βραχείας αλυσίδας, κατιονικά, αμφιπαθητικά και με μοριακό βάρος μικρότερο από 13 kDa. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι ένα συστατικό του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος που βρίσκεται στο επιφανειακό στρώμα των κυτταρολυτικών και μικροβιοκτόνων επιθηλιακών ιστών. Αυτά τα πεπτίδια αποτελούνται γενικά από 10 έως 50 αμινοξέα με 2 έως 8 θετικά φορτία και έχουν διάφορες δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της μικροβιακής ανάπτυξης Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων, μυκήτων, ιών και παρασίτων (Liu *et al.*, 2019). Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια είναι βασικά συστατικά του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος που δρα ως η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε διάφορες παθογόνους μικροβιακές εισβολές χωρίς να έχουν υψηλή εξειδίκευση ή μνήμη. Άλλες βιολογικές δραστηριότητες των αντιμικροβιακών πεπτιδίων είναι η ανοσοϊκανότητα και η ομοιόσταση, καθώς και ένας ανοσοτροποποιητής για την ενίσχυση της ανοσίας του σώματος (Gokhale and Satyanarayana, 2014).

Οι τύποι των αντιμικροβιακών πεπτιδίων που βρέθηκαν είναι (i) α-έλικας πεπτίδια-πισικιδίνες (μορονεσιδίνες, πλευροσιδίνες, δικεντρασίνες και χρυσοψίνες, (ii) γραμμικά πεπτίδια όπως η παρδαξίνη και η πελτεοβαγκρίνη, (iii) η ντεφενσίνη, (iv) συγκεκριμένα πλούσια σε κυστεΐνη, αντιβακτηριακά πεπτίδια, γραμμιστίνες (v) καθελιδίνες (vi) πρωτεΐνες που μοιάζουν με ιστόνες. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια προέρχονται από βιολογικά ανενεργές πρωτεΐνες που υποβάλλονται σε επεξεργασία για να πάρουν την τελική δραστική τους μορφή (Reverter *et al.*, 2017). Η έκφραση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων προκαλείται από μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα και αλλά και μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με κάποια άλλη κυτταρική βλάβη (Chaturvedi *et al.*, 2020). Ο μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης αυτών των πεπτιδικών μορίων γίνεται με διασταύρωση της κυτταρικής μεμβράνης και αλληλεπίδραση με μικροβιακό DNA, διαταράσσοντας έτσι τη μεταγραφή ή/και την αντιγραφή (Chaturvedi *et al.*, 2020). Πεπτίδια στην επιδερμική βλέννα του *Clarias gariepinus* έχουν λειτουργήσει ως αντιβακτηριακός παράγοντας αποτρέποντας τον αποικισμό θετικών και αρνητικών κατά Gram

παθογόνων. Τα πεπτίδια περιέχουν επίσης νευροπεπτίδια εκκριτίνης/γλυκαγόνης που έχουν ανοσοαπόκριση σε οξείες βακτηριακές λοιμώξεις (Abdel-Shafi *et al.*, 2019). Άλλες αντιβακτηριακές πρωτεΐνες που βρίσκονται στη βλέννα των ψαριών είναι οι οξειδάσες L-αμινοξέων, οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες όπως οι L40, L36A, L35 και S30 και πρωτεΐνες όπως η αιμοσφαιρίνη (Hb-β) (Reverter *et al.*, 2017).

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια γενικά ορίζονται ως κατιονικά μόρια ευρέος φάσματος που έχουν πεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους (μέγεθος <10 kDa, μήκος 12-50 αμινοξέα) με καθαρό θετικό φορτίο λόγω της παρουσίας περίσσειας υπολειμμάτων βασικής λυσίνης και αργινίνης πάνω από όξινα υπολείμματα. Διπλώνουν, λόγω της παρουσίας δισουλφιδικών γεφυρών ή επαφής με μεμβράνες, σε τρισδιάστατες αμφιφιλικές δομές. Ωστόσο, ορισμένες ανιονικές μορφές AMPs έχουν επίσης αναφερθεί. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια ανήκουν σε μια μεγαλύτερη ομάδα φυσικών βραχέων πολυπεπτιδίων και μοιράζονται παρόμοιες αμφιπαθικές α-ελικοειδείς δομές που μπορούν να αλληλεπιδράσουν έντονα και να διαποτίσουν τις μεμβράνες φωσφολιπιδίων (Rakers *et al.*, 2013).

Το πλεονέκτημα των αντιμικροβιακών πεπτιδίων είναι ότι μπορούν να λειτουργήσουν χωρίς υψηλή εξειδίκευση ή μνήμη. Επίσης αυτά συντίθενται με χαμηλό μεταβολικό κόστος, μπορούν να αποθηκεύονται μαζικά και είναι άμεσα διαθέσιμα μετά τη μόλυνση. Τέτοια μόρια είναι κατάλληλα για αλληλεπίδραση με βακτηριακές μεμβράνες που έχουν αρνητικά φορτισμένες και υδρόφιλες ομάδες κεφαλής και υδρόφοβους πυρήνες. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια υιοθετούν διάφορους μηχανισμούς για τις δραστηριότητές τους: μερικά φαίνεται να συνδέονται στην επιφάνεια της μεμβράνης και να μετατοπίζουν την εξωτερική διπλοστιβάδα (Shai, 2002) και άλλα έχουν δείξει ότι εκτείνονται στη διπλή στιβάδα και συνδέονται για να σχηματίσουν το κανάλι που εκπολώνει τα κύτταρα-στόχους. Λίγα πεπτίδια έχουν προταθεί να διασχίζουν τη διπλή στιβάδα και να αλληλεπιδρούν με το μικροβιακό DNA παρόμοια με αυτό των ιστονών στο ευκαρυωτικό DNA, διαταράσσοντας τη μεταγραφή και/ή την αντιγραφή. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια μπορούν να αλληλεπιδράσουν με κύτταρα βακτηρίων, μυκήτων ή πρωτόζωων και πολλά τα αναγνωρίζουν και τα τρία. Υπάρχουν επίσης στοιχεία σχετικά με το ρόλο των πεπτιδίων στη διέγερση άλλων ανοσολογικών διεργασιών και στην επιδιόρθωση των ιστών μέσω της

δράσης τους ως σηματοδοτικά μόρια στην απόκριση του ξενιστή. Μερικά από τα σημαντικά αντιμικροβιακά πεπτίδια που βρίσκονται στα ψάρια και αποτελούν ένα δείκτη ανάλυσης της βλέννας για την πρόβλεψη της κατάστασης των ψαριών περιγράφονται παρακάτω:

2.1 Παρδαξίνη

Η παρδαξίνη αποτελείται από 33 αμινοξικά κατάλοιπα και έχει δομή έλικας-άρθρωσης-έλικας παρόμοια με την κεκροπίνη και τη μελιτίνη. Αυτό το πεπτίδιο εμφανίζει χαρακτηριστικές ιδιότητες σχηματισμού πόρων στις μεμβράνες των μεταζωαρίων και επίσης εμφανίζει ιδιότητες απώθησης καρχαριών στην περίπτωση της γλώσσας *Pardachirus marmoratus* (Oren and Shai, 1986). Αυτό το αντιμικροβιακό πεπτίδιο είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό έναντι των Gram⁺ και Gram⁻ βακτηρίων.

2.2 Πλουεροσιδίνη

Η πλουεροσιδίνη, ένα κατιονικό πεπτίδιο 25 υπολειμμάτων αναφέρθηκε στο *Plueronectes americanus*. Η ανάλυση του γονιδιωματικού DNA αποκάλυψε επίσης την παρουσία πολυγονιδιακών οικογενειών γονιδίων που σχετίζονται με την πλουεροσιδίνη στην ιππόγλωσσα του Ατλαντικού (*Hippoglossus hippoglossus*), στην χωματίδα με κίτρινη ουρά (*Pleuronectes ferruginea*) και στην αμερικανική χωματίδα (*Hippoglossoides platessoides*). Οι πλουεροσιδίνες μπορεί να παρέχουν αναγνώριση προτύπων με άμεση θανάτωση και σε πολλές περιπτώσεις είναι πιθανό να εξοικονομήσουν τα ψάρια από το κόστος μιας πιο εμπλεκόμενης απόκρισης οξείας φάσης (Lauth *et al.*, 2002).

2.3 Ριβοσωμικά πεπτίδια

Μια πρωτεΐνη (6,7 kDa) που απομονώθηκε από το δέρμα της πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) είναι αποτελεσματική έναντι των Gram⁺ βακτηρίων και βρέθηκε ότι είναι παρόμοια με τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S30 που απομονώθηκε από διάφορα είδη. Παρομοίως, τρεις ριβοσωμικές πρωτεΐνες 60S, L40, L36A και L35 ταυτοποιήθηκαν από το δέρμα του μπακαλιάρου του Ατλαντικού που επίσης αναφέρθηκε ότι είχαν αντιμικροβιακή δράση (Bergsson *et al.*, 2005).

2.4 Παράγωγα ιστονών

Ορισμένα αντιμικροβιακά πεπτίδια σε ψάρια πιστεύεται ότι προέρχονται από διάφορες ιστόνες. Η υποζίνη της υπόγλωσσας του Ατλαντικού (*H. hippoglossus*) και η παρασίνη Ι του γατόψαρου (*Parasilurus asotus*), αναγνωρίζονται ως τα N-τερματικά θραύσματα του H2A. Η υποζίνη, ένα μακρόστενο κατιονικό πεπτίδιο 51 υπολειμμάτων αποτελεσματικό έναντι μεγάλου αριθμού θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων βρίσκεται στη βλέννα του δέρματος της υγιούς υπόγλωσσας (Birkemo *et al.*, 2003). Ένα αμινοτελικά ακετυλιωμένο πεπτίδιο 30 αμινοξικών καταλοίπων που προέρχεται από το αμινοτελικό τμήμα της ιστόνης H1 στη βλέννα του δέρματος του σολομού Ατλαντικού (*S. salar*) (Lüders *et al.*, 2005) ορίζεται ως αντιμικροβιακό πεπτίδιο σολομού [SAMP H1] και βρέθηκε ότι είναι δραστικό έναντι τόσο των Gram-αρνητικών όσο και θετικών βακτηρίων. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια που απομονώθηκαν από τη βλέννα του δέρματος των ψαριών και χρησιμοποιούνται ως δείκτες αναγνώρισης της κατάστασης της υγείας των ψαριών συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Η μικροχλωρίδα στην επιδερμική βλέννα των ψαριών παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των παθογόνων. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει συγκεκριμένους μηχανισμούς με τους οποίους ο ξενιστής μπορεί να αναγνωρίσει τα συγγενικά βακτήρια και οι μεταβολίτες τους μπορούν να ελέγξουν τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων βακτηρίων. Για παράδειγμα, οι Reverter *et al.* (2017) εξηγούν ότι το βακτήριο *Flectobacillus major* από το βλεννογόνο στρώμα του δέρματος της ιριδιζουσας πέστροφας παράγει σφιγγολιπίδια που επάγουν την παραγωγή ανοσοσφαιρίνης T (IgT), σχηματίζοντας B λεμφοκύτταρα και αποκρίσεις αντισωμάτων, για τον έλεγχο της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων. Μια άλλη μελέτη βρήκε ειδικούς μεταβολίτες που έχουν αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση σε βακτηριακά στελέχη που απομονώνονται από τη βλέννα των ψαριών, έτσι ώστε να μπορούν να ελέγξουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων ξενιστή.

Κεφάλαιο 3 Δειγματοληψία και ανάλυση βλέννας

3.1 Δειγματοληψία βλέννας

Η μελέτη της εξωτερικής βλέννας των ψαριών γίνεται πιο δημοφιλής καθώς παρέχει μη θανατηφόρες εναλλακτικές λύσεις τόσο για την ανίχνευση μολύνσεων των ψαριών όσο και για την παρακολούθηση των περιβαλλοντικών ρύπων. Η δειγματοληψία της εξωτερικής βλέννας των ψαριών γίνεται συνήθως με απαλή απόξεση (Liang *et al.*, 2011). Ωστόσο, ένα επαναλαμβανόμενο πρόβλημα με αυτή τη μέθοδο είναι η πιθανή μόλυνση της βλέννας από άλλους ιστούς όπως το αίμα ή τα επιθηλιακά κύτταρα. Η χρήση προσροφητικών υλικών όπως διηθητικό χαρτί ή βαμβακερά μάκτρα έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στη συλλογή βλέννας ψαριών ως στρατηγική για την αποφυγή μόλυνσης του επιθηλίου.

Οι Raj *et al.* (2011) έδειξαν ότι η χρήση μπατονετών αφαιρεί τα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας, ενώ η χρήση διηθητικού χαρτιού επέτρεψε την αφαίρεση βλέννας χωρίς εμφανή βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το μεταβολίωμα των δειγμάτων βλέννας που ελήφθησαν μέσω της απορρόφησης εμφάνισε την υψηλότερη επαναληψιμότητα, ενώ εκείνα από την βλέννα που παραλήφθηκε με απόξεση παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα. Άλλες στρατηγικές συλλογής βλέννας ψαριών περιλαμβάνουν το ξέπλυμα των επιφανειών των ψαριών με διαφορετικά διαλύματα, την αναρρόφηση της βλέννας των ψαριών χρησιμοποιώντας ηλεκτρική συσκευή και τη χρήση πλαστικών σακουλών γεμισμένων με διαφορετικά διαλύματα.

Ιστοκυτταροχημικές τεχνικές όπως η ιστοχημεία, η ανοσοϊστοχημεία ή ακόμα και οι κυτταροχημικές μέθοδοι με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της κατανομής των μορίων στα επιθηλιακά στρώματα και τη βλέννα των ψαριών (Nakamura *et al.*, 2001). Η εφαρμογή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας παρέχει το πλεονέκτημα της ανίχνευσης μορίων *in situ*, αποφεύγοντας ταυτόχρονα τη μόλυνση από βλέννα. Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές περιορίζονται σε μόρια για τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί τα αντισώματά τους.

Αντίθετα, η φασματομετρία μάζας εκρόφησης/ιονισμού-απεικόνισης λέιζερ που αναπτύχθηκε πρόσφατα με τη βοήθεια μήτρας (MALDI-IMS) επιτρέπει τη μελέτη χωρικών μοριακών

διατάξεων σε τομές ιστού χωρίς την ανάγκη ειδικών για τον στόχο αντιδραστηρίων. Σε σύγκριση με την ανοσοχημεία όπου συνήθως μελετάται ένα μεμονωμένο αντιγόνο, η φασματομετρία μάζας απεικόνισης (IMS) επιτρέπει τη μέτρηση χιλιάδων αναλυτών παράλληλα, ενώ επιτρέπει τη μελέτη της συμβατικής ιστολογίας (Schwamborn and Carpioli, 2010). Το κύριο πλεονέκτημα του MALDI-IMS είναι το ευρύ φάσμα αναλυτών που μπορεί να μελετηθεί με αυτήν την *in situ* τεχνική που κυμαίνεται από πρωτεΐνες και πεπτίδια έως λιπίδια και δευτερογενείς μεταβολίτες. Η φασματομετρία μάζας εκρόφησης/ιονισμού-απεικόνισης με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα (MALDI-IMS) έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να τονίσει τον εντοπισμό των σαπωνινών στο στρώμα βλέννας του θαλάσσιου αστερία *Asterias rubens* (Demeyer *et al.*, 2015), και παρουσιάζει μεγάλες δυνατότητες για την ανακάλυψη νέων μορίων στην βλέννα των ψαριών, ένα μέσο για τη μελέτη της χωρικής κατανομής αυτών των μορίων και τον εντοπισμό νέων τεχνικών εκχύλισης.

3.2 Σημαντικότητα ανάλυσης της βλέννας ως δείκτης της κατάστασης υγείας των ψαριών

Η μελέτη της βλέννας των ψαριών ως δυνητική βιολογική μήτρα για την αξιολόγηση του στρες και της κατάστασης της υγείας των ψαριών λόγω εισβολής παθογόνων και περιβαλλοντικού στρες έχει αυξηθεί τελευταία. Η βλέννα ψαριών που πρόκειται να αναπτυχθεί ως εργαλείο αξιολόγησης της υγείας των ψαριών και τα βιοενεργά συστατικά της βλέννας είναι πολύ διαφορετικά, έτσι ώστε να έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό φαρμακευτικό συστατικό.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ουσίες της επιδερμικής βλέννας και των βραγχίων μπορούν να δράσουν ως πληροφοριακά χημικά συστήματα σε διαφορετικές αλληλεπιδράσεις, όπως σε σχέσεις θηράματος-θηρευτή, αλληλεπιδράσεις παρασίτου-ξενιστή και στη συμβίωση. Τα μόρια της βλέννας των ψαριών μπορούν να ανιχνευθούν από ένα ευρύ φάσμα οργανισμών και μπορούν να δημιουργήσουν διαφορετικούς τύπους αποκρίσεων. Για παράδειγμα, μια πρόσφατη μελέτη διαπίστωσε ότι η απουσία του N-ακετυλνεουραμινικού οξέος (Neu5Ac) στη βλέννα του δέρματος των ψαριών κλόουν (*Amphiprion ocellaris*), προστατεύει τα ψάρια από το

τοίμπημα από την ανεμώνη *Hetractis magnifica*, της οποίας η απελευθέρωση τοξίνης προκαλείται από την ανίχνευση του Neu5Ac (Larsen, et al, 2001). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι διαφορετικά παθογόνα βακτήρια παρουσιάζουν θετική χημειοταξία προς τη βλέννα του ξενιστή τους. Αν και συγκεκριμένα μόρια υπεύθυνα για αυτή τη δραστηριότητα δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί, οι O'Toole *et al.* (1999) πρότειναν ότι τα ελεύθερα αμινοξέα και οι υδατάνθρακες θα μπορούσαν να δράσουν ως χημειοελκτικά μόρια στη βλέννα της πέστροφας (δέρμα και έντερο), ενώ οι Klesius *et al.* (2008) πρότειναν ότι μια ουσία που μοιάζει με λεκτίνη μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη βακτηριακή χημειοταξία στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*). Σε πρόσφατες μελέτες, οι Padra *et al* (2017) βρήκαν ότι τα σιαλικά οξέα του βλεννογόνου των ψαριών και συγκεκριμένα η N-ακετυλογλυκοζαμίνη (GlcNac) παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη δέσμευση των παθογόνων βακτηρίων *Aeromonas salmonicida* με τον ξενιστή του.

Χημειοανίχνευση βλέννας ψαριών και τροποποίηση της συμπεριφοράς έχουν επίσης αναφερθεί σε παράσιτα, όπως τα ακτινοσπόρια από ολιγοχαίτες, μυξόζωα και εξωπαράσιτα όπως τα κωπηπόποδα (Brooker *et al.*, 2013). Οι Kallert *et al.* (2011) διαπίστωσαν ότι οι ελεύθεροι νουκλεοζίτες, οι οποίοι απελευθερώνονται συνεχώς στη βλέννα της πέστροφας (ινοσίνη, 2'-δεοξυϊνοσίνη και γουανοσίνη), διεγείρουν την προσκόλληση των μυξοζωικών παρασίτων.

Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η γλυκοπρωτεΐνη WAP65-2 από τη βλέννα του ψαριού τίγρης (*Takifugu rubripes*, *Tetraodontidae*) προκάλεσε την προσκόλληση ογκομιρακιδίων του *Neobenedenia girellae* (*Monogenea, capsalidae*). Η τετροδοτοξίνη από το pufferfish (*Takifugu niphobles*) θα μπορούσε επίσης να δράσει ως ελκυστικό για τα μολυσματικά στάδια του παράσιτου *Pseudocaligus fugu* (Ito *et al.*, 2006). Ομοίως, είναι γνωστό ότι οι θαλάσσιες ψείρες εντοπίζουν και αναγνωρίζουν ειδικά τους σολομονικούς ξενιστές τους με χημειοανίχνευση (Mordue (Luntz) and Birkett, 2009), και μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα πεπτίδια καθελιδίνης που απομονώθηκαν από τη βλέννα του σολομού προώθησαν την ανάπτυξη της θαλάσσιας ψείρας *Caligus rogercresseyi*. Μια μάλλον περίπτωση είναι η προστατευτική δράση των βλεννογόνων των παπαγαλόψαρων έναντι των παρασίτων των γναθειδών, αν και είναι ακόμη

άγνωστο εάν αυτή η προστατευτική δράση οφείλεται στις χημικές ή φυσικές ιδιότητες του φραγμού του βλεννογόνου (Grutter *et al.*, 2011).

Οι ουσίες της βλέννας των ψαριών συχνά δρουν ως σημειοχημικά στις σχέσεις θηρευτών-θηραμάτων, είτε ως αποτρεπτικά θηρευτή είτε ως σήματα τόσο για τα αρπακτικά όσο και για τα θηράματα. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι η παρδαξίνη (αντιμικροβιακό πεπτίδιο), οι παβονινίνες και οι μοσεσίνες (μονογλυκοσιδικά χολοστεανοειδή) που εκκρίνονται από διάφορα είδη ψαριών γλώσσας απωθούν τους καρχαρίες δρώντας στις οσφρητικές τους αισθήσεις. Η τετροδοτοξίνη από ψάρια τετραοδοντίδες έχει επίσης αναφερθεί ότι απωθούν τη θήρευσή τους από σφυρίδες. Οι Purcell and Anderson (1995) βρήκαν ότι η *Physalia physalis* μπορούσε να αναγνωρίσει τη λεία της χρησιμοποιώντας χημικές ενδείξεις από την επιδερμική βλέννα των ψαριών. Αρκετοί οργανισμοί είναι επίσης σε θέση να αναγνωρίσουν χημικές ουσίες στη βλέννα των ψαριών για να ανιχνεύσουν θηρευτές και να αποφύγουν το θήραμα. Οι Forward and Rittschof (2000) πρότειναν ότι τα προϊόντα αποικοδόμησης δισακχαριτών της βλέννας θηρευτών που περιέχουν θειικές και ακετυλιωμένες αμίνες μπορούν να χρησιμεύσουν ως καιρομόνες, ενώ οι Beklioglu, *et al* (2006) πρότειναν ότι τόσο τα ψάρια όσο και τα βακτήρια που κατοικούν στη βλέννα αλληλεπιδρούν στην απελευθέρωση καιρομονών. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι το πολύχαιτος *Nereis* spp. ανέπτυξε χημειοαισθητηριακούς μηχανισμούς για την ανίχνευση αρπακτικών (χημικές ενδείξεις από τη βλέννα των ψαριών) για να ελαχιστοποιήσει τους κινδύνους θήρευσης.

Αρκετές μελέτες που έχουν διεξαχθεί είναι η εφαρμογή της ανοσοκυτταροχημικής δοκιμής *Streptavidin Biotin* (SB) στην επιδερμική βλέννα της σφυρίδας τίγρης (*Epinephelus fuscoguttatus*) ως πρώιμο διαγνωστικό τεστ για τη νόσο της ιογενούς νευρικής νέκρωσης (VNN). Το γρήγορο και ακριβές τεστ SB είναι κατάλληλο για εφαρμογή σε προγράμματα βιοπαρακολούθησης και πρόληψης του βητανοϊού σε ψάρια, επειδή μπορεί να γίνει χωρίς τη θανάτωση των ψαριών, είναι επιστημονικά αποδεκτό και δεν ρυπαίνει το περιβάλλον (Sanahuja and Ibarz, 2015). Η μελέτη του Su (2011) με υπολογιστική μέθοδο *in silico* προσομοιώνει με επιτυχία τη δυνατότητα της επιδερμικής βλέννας ως πηγής αντιμικροβιακών πεπτιδίων, η οποία χρησιμεύει ως η πρώτη γραμμή άμυνας στον άνθρωπο έναντι παθογόνων βακτηρίων, όπως το *Escherichia coli*.

Ορισμένα αντιμικροβιακά πεπτίδια που απομονώνονται από τη βλέννα του δέρματος του κίτρινου γατόψαρου (*Pelteobagrus fulvidraco*) μπορούν να αναστείλουν την πρωτεΐνη δέσμησης πενικιλίνης 3 (PBP3) στο *Escherichia coli*, συμπεριλαμβανομένων των πεπτιδίων Pelteobagrin, Myxinidin, Pleurocidin και Pardaxin-P1. Αυτά τα αντιμικροβιακά πεπτίδια μπορούν να επιλεγούν ως φυσικά υποψήφια αντιμικροβιακά, συστατικά.

3.3 Χρήση της ωμικής τεχνολογίας στην Έρευνα για τη Βλέννα Ψαριών

Το πεδίο της έρευνας για τη βλέννα των ψαριών αυξάνεται ραγδαία (Reverter *et al.*, 2017). Οι πρόοδοι σε ωμικές τεχνολογίες όπως η γονιδιωματική, η μεταγραφομική, η πρωτεομική και η μεταβολομική επιτρέπουν την ταυτόχρονη μελέτη και ταυτοποίηση πολυάριθμων γονιδίων και μορίων και, ως εκ τούτου, έχει τεράστιες δυνατότητες για την ανακάλυψη μη αναφερόμενων μορίων και λειτουργιών στη βλέννα των ψαριών. Οι εξελίξεις στον τομέα της γονιδιωματικής διευκολύνουν τη μελέτη των γονιδίων στη βλέννα των ψαριών και επιτρέπουν την ταχεία επέκταση της μικροβιωματικής (χαρακτηρισμός μικροβιώματος). Μια πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύθηκε από τους Carda-Diéguez *et al.* (2017) ανέλυσε την αλληλουχία του DNA της βλέννας του δέρματος των ευρωπαϊκών χελιών και βρήκε στοιχεία του ρόλου των επιφανειών της βλέννας των ψαριών ως φυσικές κόγχες για την εξέλιξη των παθογόνων του υδρόβιου βλεννογόνου.

Η μεταγραφομική, η οποία είναι η μελέτη του πλήρους συνόλου των μεταγραφών RNA που παράγονται από το γονιδίωμα, είναι επίσης ένα ισχυρό εργαλείο για την ανακάλυψη νέων γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσία του βλεννογόνου και μπορεί να αποκαλύψει σημαντικές πτυχές των λειτουργιών του βλεννογόνου, όπως η έκκριση, μικροβιακή παθογένεση, ανοσοαποκρίσεις του ξενιστή, καθώς και την κινητική για αυτές τις αποκρίσεις (Malachowicz *et al.*, 2017). Η βιολογική ερμηνεία της αλληλουχίας RNA (αλληλουχία ολόκληρου του μεταγραφώματος) παραμένει προκλητική και εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα καλά αναλυμένων γονιδιωμάτων, τα οποία παραμένουν ασυνήθιστα σε μη εμπορικά είδη ψαριών (Salinas and Magadán, 2017). Η γονιδιακή έκφραση και η μεταγραφική έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον χαρακτηρισμό των αποκρίσεων του βλεννογόνου μετά από βακτηριακές

λοιμώξεις στα ψάρια (Karlsen *et al.*, 2018). Μια πρόσφατη μελέτη γονιδιώματος του σολομού του Ατλαντικού βρήκε επτά υποτιθέμενα γονίδια βλεννίνης με μοτίβα μεταγραφής ειδικά για τον ιστό και αποκάλυψε ότι η μεταγραφή βλεννίνης ρυθμίζεται διαφορετικά από διαφορετικούς στρεσογόνους παράγοντες υδατοκαλλιέργειας, παρέχοντας νέες γνώσεις για την υγεία του βλεννογόνου (Sveen *et al.*, 2017).

Η πρωτεομική ανάλυση - Proteomics, η οποία είναι η μελέτη των πρωτεϊνών που εκφράζονται από μια βιολογική οντότητα, είναι το πιο χρησιμοποιούμενο εργαλείο υψηλής απόδοσης στην έρευνα για τη βλέννα των ψαριών μέχρι στιγμής (Dash *et al.*, 2018). Η προοπτική των πρωτεομικών μελετών για τη βιολογική δραστηριότητα της επιδερμικής βλέννας πρέπει να ενθαρρυνθεί, δεδομένης της ποικιλομορφίας της βιοποικιλότητας των ψαριών που έχει τη δυνατότητα να παράγει βιοενεργά συστατικά και μεταβολίτες που εμπλέκονται ειδικά στο βλεννογόνο και στο αντιμικροβιακό ανοσοποιητικό σύστημα. Η έρευνα με την προσέγγιση της πρωτεομικής αναμένεται να εντοπίσει με επιτυχία νέες πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην έμφυτη ανοσία.

Προηγούμενες μελέτες δεν γνώριζαν για τα προφίλ πρωτεϊνών, επομένως η γνώση σχετικά με τη βιοδραστηριότητά της είναι πολύ περιορισμένη. Τα δεδομένα πρωτεομικής παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα προφίλ πρωτεϊνών, τα οποία θα φέρουν μια ολοκληρωμένη κατανόηση της λειτουργίας και της βιολογικής δραστηριότητας της βλέννας του δέρματος των ψαριών στην καταπολέμηση του στρες και των μικροβιακών λοιμώξεων (Xiong *et al.*, 2020). Οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στη βλέννα είναι χρήσιμες για το στρες και την κατάσταση της υγείας των ψαριών (Dang *et al.*, 2020). Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια που προέρχονται από τη βλέννα των ψαριών έχουν ευρέως φάσματος βιοδραστηριότητες, οι οποίες παίζουν ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία, ως ρυθμιστές, μεσολαβητές, ορμόνες, τελεστές, συμπαράγοντες, ενεργοποιητές και διεγέρτες. Πρόσφατες μελέτες σχετικά με τις φαρμακολογικές επιδράσεις των πεπτιδίων ψαριών δείχνουν αντιυπερτασικές, ανοσοτροποποιητικές, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές δραστηριότητες, με αποτέλεσμα δυνητικά επιπλέον συστατικά για διάγνωση και θεραπεία για ανθρώπους και ζώα (Fæste *et al.*, 2020). Εκτός από τις μελέτες για την πρωτεομική, οι μελέτες της επίδρασης των παραλλαγών των

περιβαλλοντικών παραγόντων στην παραγωγή και τη λειτουργία της βλέννας είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία της ως βιολογικού φραγμού και τον ρόλο της στην ανοσία του βλεννογόνου. Σύμφωνα με τους Cabillon and Lazado (2019) οι αλλαγές στους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όχι μόνο επηρεάζουν τον φαινότυπο των δομών του βλεννογόνου στρώματος και τις μοριακές αποκρίσεις, αλλά επηρεάζουν επίσης τα βιοενεργά συστατικά της βλέννας και τη δομή της μικροχλωρίδας που επενδύει την επιφάνεια του βλεννογόνου.

Είναι σημαντικό να ληφθεί υπόψη η επίδραση διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων στους προσαρμοστικούς μηχανισμούς στην παραγωγή βλέννας. Έχουν δημοσιευτεί αρκετά πρωτεύματα βλέννας του δέρματος αναφοράς για εμπορικά είδη ψαριών όπως το *Symphysodon aequifasciata* (Cordero *et al.*, 2015), ο μπακαλιάρος του Ατλαντικού, το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (Cordero *et al.*, 2015), η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το κοτόψαρο (*Cyclopterus lumpus*) (Patel and Brinchmann, 2017). Η χρήση τεχνικών υψηλής απόδοσης όπως η πρωτεομική επιτρέπει την επιδίωξη περιεκτικών συγκριτικών μελετών για την καλύτερη κατανόηση της δυναμικής της βλέννας των ψαριών. Μελέτες πρωτεομικής έχουν ρίξει φως στη δυναμική της βλέννας των ψαριών σε μολυσμένα ψάρια, στον υπερπληθυσμό, στο χρόνιο στρες (Dong *et al.*, 2016) και στα ψάρια που εκτίθενται σε διαφορετικές δίαιτες (Micallef *et al.*, 2017).

Η μεταβολομική είναι η ολοκληρωμένη μελέτη των μικρών μορίων ενός οργανισμού και παρέχει ένα στιγμιότυπο της κατάστασης ενός οργανισμού σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Δεδομένου ότι οι μεταβολίτες είναι τα τελικά προϊόντα των ρυθμιστικών διεργασιών, τα επίπεδά τους μπορούν να θεωρηθούν ως η τελική απόκριση των βιολογικών συστημάτων σε γενετικές ή περιβαλλοντικές αλλαγές, καθιστώντας τη μεταβολομική εξαιρετικά χρήσιμη για την κατανόηση των αποκρίσεων του οργανισμού και για την ανακάλυψη βιοδεικτών (Kosmides *et al.*, 2013). Η μελέτη του μεταβολισμού της βλέννας των ψαριών μπορεί να βοηθήσει στην ανακάλυψη μορίων βλέννας, αλλά και στην κατανόηση των διεργασιών και των λειτουργιών στις οποίες εμπλέκεται η βλέννα των ψαριών. Ωστόσο, ο μεταβολισμός της βλέννας των ψαριών παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητος, με επί του παρόντος μόνο τρεις δημοσιευμένες μελέτες (Ivanova *et al.*, 2018). Οι Ekman *et al.* (2015) μελέτησαν το μεταβολισμό της βλέννας του δέρματος σε αρσενικά και θηλυκά που εκτέθηκαν

σε δισφαινόλη Α. Οι Reverter *et al.* (2017) μελέτησαν το μεταβολισμό της βλέννας των βραγχίων πολλών χαιτοδοντίδων σε σχέση με διαφορετικά χαρακτηριστικά ψαριών (γεωγραφική τοποθεσία, τύπος οικοτόπου, ταξινόμηση ειδών, φυλογένεση, διατροφή και επίπεδο παρασιτισμού) και διαπίστωσαν ότι η διατροφή ήταν ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει τον μεταβολισμό της βλέννας των βραγχίων. Τέλος, όπως και άλλες ωμικές τεχνολογίες, οι μελέτες μεταβολισμού της βλέννας των ψαριών παραμένουν πρόκληση για τους επιστήμονες λόγω του μεγάλου όγκου δεδομένων που λαμβάνονται και της έλλειψης πληροφοριών για τους μεταβολίτες των ψαριών και τις εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων, που καθιστούν την ταυτοποίηση μεταβολιτών εξαιρετικά δύσκολη.

Τέλος, η ενσωμάτωση διαφορετικών ωμικών τεχνολογιών, αν και επί του παρόντος αποτελεί σημαντική πρόκληση, θα συμβάλει σημαντικά στην πρόοδο της έρευνας για τη βλέννα των ψαριών και στην κατανόηση του συστήματος βλέννας των ψαριών συνολικά. Η ωμικές τεχνολογίες παρέχουν νέες ευκαιρίες για την αποκάλυψη μονοπατιών και διεργασιών που διαφορετικά θα παρέμεναν μη ανιχνεύσιμες (Buescher and Driggers, 2016).

Συμπεράσματα

Η εξωτερική (δέρμα και βράγχια) βλέννα είναι η κύρια επιφάνεια ανταλλαγής μεταξύ των ψαριών και του περιβάλλοντός τους, και επομένως παίζει βασικό ρόλο στην ενδοειδική και διαειδική χημική επικοινωνία. Η βλέννα δρα ως ένα δυναμικό φυσικό και βιοχημικό φράγμα, επιδεικνύοντας πολυάριθμους βιολογικούς και οικολογικούς ρόλους όπως ωσμορύθμιση, προστασία από τριβή, προστασία από περιβαλλοντικές τοξίνες και τοξικότητα βαρέων μετάλλων, γονική σίτιση, προστασία από παθογόνα και χημική επικοινωνία. Η βλέννα των ψαριών περιέχει επίσης πολυάριθμα ανοσολογικά μόρια, όπως λυσοζύμες, ανοσοσφαιρίνες, συμπληρώματα πρωτεϊνών, λεκτίνες και αντιμικροβιακά πεπτίδια, και άλλα μόρια.

Η σύνθεση της βλέννας των ψαριών και οι ρεολογικές της ιδιότητες είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση των λειτουργιών της βλέννας. Οι επιφάνειες της βλέννας είναι δυναμικές μήτρες και η σύνθεσή τους ποικίλλει μεταξύ των ειδών ψαριών και με ενδογενείς (φύλο και στάδιο ανάπτυξης) και εξωγενείς παράγοντες (στρες, θερμοκρασία νερού, pH και λοιμώξεις). Οι συνθήκες στρες (π.χ. χειρισμός άγχους, περιορισμός, στέρηση τροφής, έκθεση σε τοξικές ουσίες) μπορούν να αλλάξουν την παραγωγή και τη σύνθεση του βλεννογόνου (π.χ. επίπεδο πρωτεϊνών και μορίων του ανοσοποιητικού), θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία των ψαριών και αυξάνοντας την ευαισθησία των ψαριών σε παθογόνα. Η ιξωδοελαστικότητα της βλέννας καθορίζει την ικανότητά της να μπλοκάρει πολλούς τύπους κινητών βακτηρίων και αρκετές μελέτες έδειξαν ότι τα ψάρια τείνουν να αυξάνουν την έκκριση βλέννας και να αλλάζουν τη σύνθεσή τους όταν εκτίθενται σε παθογόνα, τα οποία μπορεί να συμβάλλουν στην άμυνα ενάντια σε αυτά τα παθογόνα.

Επιπλέον, οι λοιμώξεις από παθογόνους παράγοντες (ιοί, βακτήρια) μπορούν επίσης να αλλάξουν το μικροβίωμα του βλεννογόνου των ψαριών, διευκολύνοντας την αύξηση των παθογόνων βακτηρίων. Η βλέννα των ψαριών είναι ένα δυναμικό στρώμα που εμφανίζει σημαντικές λειτουργίες στα ψάρια, παίζοντας κύριο ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες όπως η ωσμορύθμιση και η προστασία από μολύνσεις, αλλά και στην ενδοειδική επικοινωνία. Η μελέτη των συστατικών της βλέννας των ψαριών έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, αλλά εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά συστατικά βλέννας που χρειάζονται περαιτέρω έρευνα

προκειμένου να χαρακτηριστούν καλύτερα τα μόρια που υπάρχουν και να διευκρινιστούν οι ρόλοι τους.

Έχουν εξεταστεί οι πολλαπλοί ρόλοι της βλέννας στις αλληλεπιδράσεις των οργανισμών στη φύση (θηρευτής-θήραμα, παράσιτο-ξενιστής), τονίζοντας την οικολογική σημασία της βλέννας και την ανάγκη εντοπισμού των μορίων που είναι υπεύθυνα για αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Ο εντοπισμός των μορίων που είναι υπεύθυνα για τη χημική μεσολάβηση μεταξύ της βλέννας των ψαριών και άλλων οργανισμών θα επιτρέψει μια βαθύτερη κατανόηση της δυναμικής του θαλάσσιου οικοσυστήματος και έτσι θα δώσει νέες ιδέες για τη διαχείριση των παρασίτων στην υδατοκαλλιέργεια.

Επιπλέον, η καλύτερη κατανόηση των αλλαγών στη βλέννα λόγω βιολογικών και φυσικών στρεσογόνων παραγόντων θα μπορούσε να βοηθήσει στην πρόληψη των εστιών ασθένειας των ψαριών και στην παρακολούθηση της υγείας του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Μέχρι σήμερα, σχεδόν όλες οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των μακρομορίων, μέσω πολλαπλών τεχνικών όπως η πρωτεομική, αλλά λίγες μελέτες έχουν προσπαθήσει να αποσαφηνίσουν μικρότερους εξειδικευμένους μεταβολίτες. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στη σημασία των δευτερογενών μεταβολιτών και των ποικίλων βιοδραστηριοτήτων τους σε καλύτερα μελετημένα είδη όπως τα θαλάσσια ασπόνδυλα και την πιθανή παρουσία και σημασία τους στη βλέννα των ψαριών. Επιπλέον, η ανάπτυξη νέων κλάδων όπως η μεταβολομική θα επιτρέψει την αποτελεσματικότερη μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών των ψαριών. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το μικροβίωμα της βλέννας των ψαριών είναι ένα άλλο πολλά υποσχόμενο πεδίο τόσο για την ανακάλυψη νέων μεταβολιτών όσο και για την καλύτερη κατανόηση της ίδιας της βλέννας και των βιολογικών και οικολογικών λειτουργιών της. Τέλος, η έρευνα για τη βλέννα των ψαριών πρέπει να προσεγγιστεί από μια ολοκληρωμένη προοπτική προκειμένου να μελετηθεί ολόκληρο το σύστημα του βλεννογόνου.

Επιπλέον, η μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση της βλεννογονικής ανοσολογικής απόκρισης της βλέννας των ψαριών έχει ωφελήσει την αναπτυσσόμενη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας παγκοσμίως. Η ανάγκη ανάπτυξης εναλλακτικών αντιμικροβιακών φαρμάκων για την καταπολέμηση ασθενειών έχει προκαλέσει αυξημένη προσοχή στα αντιμικροβιακά συστατικά

της βλέννας των ψαριών και στους τρόπους με τους οποίους μπορούν να αξιοποιηθούν έναντι ασθενειών που προκαλούνται από ποικίλα παθογόνα. Για αυτό, απαιτείται καλύτερη κατανόηση του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος του βλεννογόνου για την πρόληψη και τον έλεγχο μολυσματικών ασθενειών και στρεσογόνων καταστάσεων στα ψάρια. Η βλέννα του δέρματος των ψαριών διαθέτει πολλές σημαντικές βακτηριοκτόνες ουσίες που μπορούν να αποτελέσουν πιθανή πηγή νέων αντιβακτηριακών συστατικών στις πρακτικές υδατοκαλλιέργειας. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια που εκκρίνονται από διαφορετικά ψάρια με δομικές παραλλαγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων για τη θεραπεία παθογόνων μικροοργανισμών ανθεκτικών στα φάρμακα. Τέλος, η μελέτη των ενεργών συστατικών της βλέννας θα συμβάλει ακόμα περισσότερο την ανάπτυξη εμβολίων τόσο για τη βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας όσο και για την βιομηχανία ανθρώπινων φαρμάκων.

Βιβλιογραφία

Abdel-Shafi, S. *et al.* (2019) 'Biochemical, biological characteristics and antibacterial activity of glycoprotein extracted from the epidermal mucus of African catfish (*Clarias gariepinus*)', *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, pp. 773–780. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.150.

Abolfathi, M. *et al.* (2020) 'Seasonal changes of hydrolytic enzyme activities in the skin mucus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* at different body sizes', *Developmental & Comparative Immunology*, 103, p. 103499. doi: 10.1016/j.dci.2019.103499.

Al-Zaidan, A. S. *et al.* (2013) 'A toxicity bioassay study concerning the effect of un-ionized ammonia on the mucus cells response originating from the gills of zebrafish *Danio rerio*', *Fisheries Science*, 79(1), pp. 129–142. doi: 10.1007/s12562-012-0573-6.

Ángeles Esteban, M. (2012) 'An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin', *ISRN Immunology*, 2012, pp. 1–29. doi: 10.5402/2012/853470.

Baba, E. (2021) 'Analysis of Some Immune Parameters in The Skin Mucus of Four Cultured Fish Species', *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 73. doi: 10.46989/001c.29916.

Beklioglu, M., TELLİ, M. and GOZEN, A. G. (2006) 'Fish and mucus-dwelling bacteria interact to produce a kairomone that induces diel vertical migration in *Daphnia*', *Freshwater Biology*, 51(12), pp. 2200–2206. doi: 10.1111/j.1365-2427.2006.01642.x.

Bergsson, G. *et al.* (2005) 'Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*)', *FEBS Journal*, 272(19), pp. 4960–4969. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04906.x.

Birkemo, G. A. *et al.* (2003) 'Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1646(1–2), pp. 207–215. doi: 10.1016/S1570-9639(03)00018-9.

Boshra, H., Li, J. and Sunyer, J. O. (2006) 'Recent advances on the complement system of teleost fish', *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), pp. 239–262. doi: 10.1016/j.fsi.2005.04.004.

- Brooker, A. J. *et al.* (2013) 'Role of kairomones in host location of the pennellid copepod parasite, *Lernaeocera branchialis* (L. 1767)', *Parasitology*, 140(6), pp. 756–770. doi: 10.1017/S0031182012002119.
- Browne, M. J. *et al.* (2011) 'Characterization and expression studies of Gaduscidin-1 and Gaduscidin-2; paralogous antimicrobial peptide-like transcripts from Atlantic cod (*Gadus morhua*)', *Developmental & Comparative Immunology*, 35(3), pp. 399–408. doi: 10.1016/j.dci.2010.11.010.
- Buescher, J. M. and Driggers, E. M. (2016) 'Integration of omics: more than the sum of its parts', *Cancer & Metabolism*, 4(1), p. 4. doi: 10.1186/s40170-016-0143-y.
- Bulloch, P. *et al.* (2020) 'F2-isoprostanes in Fish mucus: A new, non-invasive method for analyzing a biomarker of oxidative stress', *Chemosphere*, 239, p. 124797. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124797.
- Cabillon, N. and Lazado, C. (2019) 'Mucosal Barrier Functions of Fish under Changing Environmental Conditions', *Fishes*, 4(1), p. 2. doi: 10.3390/fishes4010002.
- Carda-Diéguez, M. *et al.* (2017) 'Wild eel microbiome reveals that skin mucus of fish could be a natural niche for aquatic mucosal pathogen evolution', *Microbiome*, 5(1), p. 162. doi: 10.1186/s40168-017-0376-1.
- Cha, G.-H. *et al.* (2015) 'Molecular cloning, expression of a galectin gene in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the antibacterial activity of its recombinant protein', *Molecular Immunology*, 67(2), pp. 325–340. doi: 10.1016/j.molimm.2015.06.014.
- Charlie-Silva, I. *et al.* (2019) 'Novel nanostructure obtained from pacamã, *Lophiosilurus alexandri*, skin mucus presents potential as a bioactive carrier in fish', *Aquaculture*, 512, p. 734294. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734294.
- Chaturvedi, P., Bhat, R. A. H. and Pande, A. (2020) 'Antimicrobial peptides of fish: innocuous alternatives to antibiotics', *Reviews in Aquaculture*, 12(1), pp. 85–106. doi: 10.1111/raq.12306.

- Cone, R. A. (2009) 'Barrier properties of mucus', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(2), pp. 75–85. doi: 10.1016/j.addr.2008.09.008.
- Cordero, H. *et al.* (2015) 'Skin mucus proteome map of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)', *PROTEOMICS*, 15(23–24), pp. 4007–4020. doi: 10.1002/pmic.201500120.
- Cordero, H. *et al.* (2016) 'Changes in the levels of humoral immune activities after storage of gilthead seabream (*Sparus aurata*) skin mucus', *Fish & Shellfish Immunology*, 58, pp. 500–507. doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.059.
- Dang, M. *et al.* (2020) 'Histological mucous cell quantification and mucosal mapping reveal different aspects of mucous cell responses in gills and skin of shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*)', *Fish & Shellfish Immunology*, 100, pp. 334–344. doi: 10.1016/j.fsi.2020.03.020.
- Dash, S. *et al.* (2011) 'Dose dependence specific and non-specific immune responses of Indian major carp (*L. rohita* Ham) to intraperitoneal injection of formalin killed *Aeromonas hydrophila* whole cell vaccine', *Veterinary Research Communications*, 35(8), pp. 541–552. doi: 10.1007/s11259-011-9498-2.
- Dash, S. *et al.* (2018) 'Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review.', *Iranian journal of veterinary research*, 19(2), pp. 72–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30046316>.
- Dash, S., Samal, J. and Thatoi, H. (2014) 'A comparative study on innate immunity parameters in the epidermal mucus of Indian major carps', *Aquaculture International*, 22(2), pp. 411–421. doi: 10.1007/s10499-013-9649-2.
- Demeyer, M. *et al.* (2015) 'Inter- and intra-organ spatial distributions of sea star saponins by MALDI imaging', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(29), pp. 8813–8824. doi: 10.1007/s00216-015-9044-0.
- Dong, X. *et al.* (2016) 'Identification and expression analysis of toll-like receptor genes (TLR8 and TLR9) in mucosal tissues of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) following bacterial challenge', *Fish & Shellfish Immunology*, 58, pp. 309–317. doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.021.

Dzul-Caamal, R., Olivares-Rubio, H. F., *et al.* (2016) 'Multivariate analysis of biochemical responses using non-invasive methods to evaluate the health status of the endangered blackfin goodeid (*Girardinichthys viviparus*)', *Ecological Indicators*, 60, pp. 1118–1129. doi: 10.1016/j.ecolind.2015.09.017.

Dzul-Caamal, R., Salazar-Coria, L., *et al.* (2016) 'Oxidative stress response in the skin mucus layer of *Goodea gracilis* (Hubbs and Turner, 1939) exposed to crude oil: A non-invasive approach', *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 200, pp. 9–20. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.05.008.

Easy, R. H. *et al.* (2012) 'Identification of transferrin in Atlantic cod *Gadus morhua* epidermal mucus', *Journal of Fish Biology*, 81(6), pp. 2059–2063. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03452.x.

Easy, R. H. and Ross, N. W. (2010) 'Changes in Atlantic salmon *Salmo salar* mucus components following short- and long-term handling stress', *Journal of Fish Biology*, 77(7), pp. 1616–1631. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02796.x.

Eddy, F. B. and Fraser, J. E. (1982) 'Sialic acid and mucus production in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) in response to zinc and seawater', *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 73(2), pp. 357–359. doi: 10.1016/0306-4492(82)90135-6.

Ekman, D. R. *et al.* (2015) 'Metabolite Profiling of Fish Skin Mucus: A Novel Approach for Minimally-Invasive Environmental Exposure Monitoring and Surveillance', *Environmental Science & Technology*, 49(5), pp. 3091–3100. doi: 10.1021/es505054f.

Esteban, M. A. (2012) 'An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin', *ISRN Immunology*, <https://doi.org/10.5402/2012/853470>.

Fæste, C. K. *et al.* (2020) 'Proteomic profiling of salmon skin mucus for the comparison of sampling methods', *Journal of Chromatography B*, 1138, p. 121965. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121965.

Fagan, M. S. *et al.* (2003) 'A biochemical study of mucus lysozyme, proteins and plasma thyroxine

of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during smoltification’, *Aquaculture*, 222(1–4), pp. 287–300. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00128-5.

Fan, C. *et al.* (2015) ‘Functional C1q is present in the skin mucus of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)’, *Integrative Zoology*, 10(1), pp. 102–110. doi: 10.1111/1749-4877.12100.

Fast, M. . *et al.* (2002) ‘Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon’, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(3), pp. 645–657. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00109-5.

Fekih-Zaghib, S. *et al.* (2013) ‘A complementary LC-ESI-MS and MALDI-TOF approach for screening antibacterial proteomic signature of farmed European Sea bass mucus’, *Fish & Shellfish Immunology*, 35(2), pp. 207–212. doi: 10.1016/j.fsi.2013.04.017.

Fernández-Alacid, L. *et al.* (2018) ‘Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: A valuable non-invasive method to study teleost marine species’, *Science of The Total Environment*, 644, pp. 1323–1335. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.083.

Fernández-Alacid, L. *et al.* (2019) ‘Skin mucus metabolites and cortisol in meagre fed acute stress-attenuating diets: Correlations between plasma and mucus’, *Aquaculture*, 499, pp. 185–194. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.039.

Fernández-Montero, A. *et al.* (2020) ‘Stress response and skin mucus production of greater amberjack (*Seriola dumerili*) under different rearing conditions’, *Aquaculture*, 520, p. 735005. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735005.

Firth, K. J., Johnson, S. C. and Ross, N. W. (2000) ‘Characterization of proteases in the skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) infected with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and in whole-body louse homogenate.’, *The Journal of parasitology*, 86(6), pp. 1199–205. doi: 10.1645/0022-3395(2000)086[1199:COPITS]2.0.CO;2.

Forward, R. B. and Rittschof, D. (2000) ‘Alteration of photoresponses involved in diel vertical migration of a crab larva by fish mucus and degradation products of mucopolysaccharides’,

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 245(2), pp. 277–292. doi: 10.1016/S0022-0981(99)00169-0.

Gobi, N. *et al.* (2018) 'Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*', *Fish & Shellfish Immunology*, 74, pp. 501–508. doi: 10.1016/j.fsi.2017.12.066.

Gokhale, A. S. and Satyanarayanajois, S. (2014) 'Peptides and peptidomimetics as immunomodulators', *Immunotherapy*, 6(6), pp. 755–774. doi: 10.2217/imt.14.37.

Grutter, A. S. *et al.* (2011) 'Fish mucous cocoons: the "mosquito nets" of the sea', *Biology Letters*, 7(2), pp. 292–294. doi: 10.1098/rsbl.2010.0916.

Guardiola, F. A. *et al.* (2014) 'Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*)', *Fish & Shellfish Immunology*, 36(2), pp. 545–551. doi: 10.1016/j.fsi.2014.01.001.

Guardiola, F. A. *et al.* (2015) 'Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*)', *Fish & Shellfish Immunology*, 45(1), pp. 112–123. doi: 10.1016/j.fsi.2015.02.010.

Guardiola, F. A. *et al.* (2017) 'Terminal carbohydrates abundance, immune related enzymes, bactericidal activity and physico-chemical parameters of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) skin mucus', *Fish & Shellfish Immunology*, 60, pp. 483–491. doi: 10.1016/j.fsi.2016.11.025.

Guardiola, F. A., Cuesta, A. and Esteban, M. Á. (2016) 'Using skin mucus to evaluate stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)', *Fish & Shellfish Immunology*, 59, pp. 323–330. doi: 10.1016/j.fsi.2016.11.005.

Iger, Y., Jenner, H. A. and Bonga, S. E. W. (1994) 'Cellular responses in the skin of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to temperature elevation', *Journal of Fish Biology*, 44(6), pp. 921–935. doi: 10.1111/j.1095-8649.1994.tb01265.x.

- Ito, K. *et al.* (2006) 'Detection of tetrodotoxin (TTX) from two copepods infecting the grass puffer *Takifugu niphobles*: TTX attracting the parasites?', *Toxicon*, 48(6), pp. 620–626. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.06.020.
- Ivanova, L. *et al.* (2018) 'Workflow for the Targeted and Untargeted Detection of Small Metabolites in Fish Skin Mucus', *Fishes*, 3(2), p. 21. doi: 10.3390/fishes3020021.
- Kallert, D. M. *et al.* (2011) 'No shot in the dark: Myxozoans chemically detect fresh fish', *International Journal for Parasitology*, 41(3–4), pp. 271–276. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.09.012.
- Karlsen, C. *et al.* (2018) 'Atlantic salmon skin barrier functions gradually enhance after seawater transfer', *Scientific Reports*, 8(1), p. 9510. doi: 10.1038/s41598-018-27818-y.
- Kim, K. C. *et al.* (1985) 'Biochemical characterization of mucous glycoproteins synthesized and secreted by hamster tracheal epithelial cells in primary culture.', *The Journal of biological chemistry*, 260(7), pp. 4021–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3980465>.
- Klesius, P. H., Shoemaker, C. A. and Evans, J. J. (2008) 'Flavobacterium columnare chemotaxis to channel catfish mucus', *FEMS Microbiology Letters*, 288(2), pp. 216–220. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01348.x.
- Kosmidis, A. K. *et al.* (2013) 'Metabolomic Fingerprinting: Challenges and Opportunities', *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 41(3), pp. 205–221. doi: 10.1615/CritRevBiomedEng.2013007736.
- Kumar, P. *et al.* (2019) 'Comparative Immunological and Biochemical Properties of the Epidermal Mucus from Three Brackishwater Fishes', *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89(1), pp. 95–103. doi: 10.1007/s40011-017-0923-3.
- Lai, S. K. *et al.* (2009) 'Micro- and macrorheology of mucus', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(2), pp. 86–100. doi: 10.1016/j.addr.2008.09.012.
- Lallès, J.-P. (2019) 'Biology, environmental and nutritional modulation of skin mucus alkaline phosphatase in fish: A review', *Fish & Shellfish Immunology*, 89, pp. 179–186. doi:

10.1016/j.fsi.2019.03.053.

Larsen, M. H., Larsen, J. L. and Olsen, J. E. (2001) 'Chemotaxis of *Vibrio anguillarum* to fish mucus: role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen', *FEMS Microbiology Ecology*, 38(1), pp. 77–80. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00884.x.

Lauth, X. *et al.* (2002) 'Discovery and Characterization of Two Isoforms of Moronecidin, a Novel Antimicrobial Peptide from Hybrid Striped Bass', *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), pp. 5030–5039. doi: 10.1074/jbc.M109173200.

Liang, Y. *et al.* (2011) 'Isolation and Identification of a Novel Inducible Antibacterial Peptide from the Skin Mucus of Japanese Eel, *Anguilla japonica*', *The Protein Journal*, 30(6), pp. 413–421. doi: 10.1007/s10930-011-9346-9.

Liu, H. *et al.* (2019) 'In-depth proteomic analysis of *Boleophthalmus pectinirostris* skin mucus', *Journal of Proteomics*, 200, pp. 74–89. doi: 10.1016/j.jprot.2019.03.013.

Liu, L. *et al.* (2013) 'Short-Term Feed Deprivation Alters Immune Status of Surface Mucosa in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*)', *PLoS ONE*. Edited by P. Jiravanichpaisal, 8(9), p. e74581. doi: 10.1371/journal.pone.0074581.

Lüders, T. *et al.* (2005) 'Proline Conformation-Dependent Antimicrobial Activity of a Proline-Rich Histone H1 N-Terminal Peptide Fragment Isolated from the Skin Mucus of Atlantic Salmon', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), pp. 2399–2406. doi: 10.1128/AAC.49.6.2399-2406.2005.

Magnadóttir, B. *et al.* (2019) 'Extracellular vesicles from cod (*Gadus morhua* L.) mucus contain innate immune factors and deiminated protein cargo', *Developmental & Comparative Immunology*, 99, p. 103397. doi: 10.1016/j.dci.2019.103397.

Mahadevan, G. *et al.* (2019) 'Biotic potential of mucus extracts of giant mudskipper *Periophthalmodon schlosseri* (Pallas, 1770) from Pichavaram, southeast coast of India', *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 80(1), p. 13. doi: 10.1186/s41936-019-0084-4.

- Malachowicz, M., Wenne, R. and Burzynski, A. (2017) 'De novo assembly of the sea trout (*Salmo trutta m. trutta*) skin transcriptome to identify putative genes involved in the immune response and epidermal mucus secretion', *PLOS ONE*. Edited by P. Prunet, 12(2), p. e0172282. doi: 10.1371/journal.pone.0172282.
- Menzies, K. J. and Hood, D. A. (2012) 'The role of SirT1 in muscle mitochondrial turnover', *Mitochondrion*, 12(1), pp. 5–13. doi: 10.1016/j.mito.2011.03.001.
- Meucci, V. and Arukwe, A. (2005) 'Detection of vitellogenin and zona radiata protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol', *Aquatic Toxicology*, 73(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.03.021.
- Micallef, G. *et al.* (2017) 'Dietary Yeast Cell Wall Extract Alters the Proteome of the Skin Mucous Barrier in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Increased Abundance and Expression of a Calreticulin-Like Protein', *PLOS ONE*. Edited by A. Vlahou, 12(1), p. e0169075. doi: 10.1371/journal.pone.0169075.
- Mordue (Luntz), A. J. and Birkett, M. A. (2009) 'A review of host finding behaviour in the parasitic sea louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Caligidae: Copepoda)', *Journal of Fish Diseases*, 32(1), pp. 3–13. doi: 10.1111/j.1365-2761.2008.01004.x.
- Nauta, A. J *et al.* (2003) 'Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins', *Trends. Immunol*, 24(3), pp. 148-54. doi: 10.1016/s1471-4906(03)00030-9.
- Nakamura, O. *et al.* (2001) 'Galectin containing cells in the skin and mucosal tissues in Japanese conger eel, *Conger myriaster*: an immunohistochemical study', *Developmental & Comparative Immunology*, 25(5–6), pp. 431–437. doi: 10.1016/S0145-305X(01)00012-X.
- Nigam, A. K. *et al.* (2012) 'Comparative analysis of innate immune parameters of the skin mucous secretions from certain freshwater teleosts, inhabiting different ecological niches', *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(5), pp. 1245–1256. doi: 10.1007/s10695-012-9613-5.
- Nigam, A. K., Kumari, U., *et al.* (2014) 'Characterization of carboxylesterase in skin mucus of *Cirrhinus mrigala* and its assessment as biomarker of organophosphate exposure', *Fish*

Physiology and Biochemistry, 40(3), pp. 635–644. doi: 10.1007/s10695-013-9872-9.

Nigam, A. K., Srivastava, N., *et al.* (2014) 'The first evidence of cholinesterases in skin mucus of carps and its applicability as biomarker of organophosphate exposure', *Environmental Toxicology*, 29(7), pp. 788–796. doi: 10.1002/tox.21807.

O'Toole, R. *et al.* (1999) 'The Chemotactic Response of *Vibrio anguillarum* to Fish Intestinal Mucus Is Mediated by a Combination of Multiple Mucus Components', *Journal of Bacteriology*, 181(14), pp. 4308–4317. doi: 10.1128/JB.181.14.4308-4317.1999.

Oliveira, M. *et al.* (2018) 'Can non-invasive methods be used to assess effects of nanoparticles in fish?', *Ecological Indicators*, 95, pp. 1118–1127. doi: 10.1016/j.ecolind.2017.06.023.

Omidi, F. *et al.* (2020) 'Biochemical biomarkers of skin mucus in *Neogobius melanostomus* for assessing lead pollution in the Gulf of Gorgan (Iran)', *Toxicology Reports*, 7, pp. 109–117. doi: 10.1016/j.toxrep.2019.12.003.

Oren, Z. , Shai, Y. (1986) 'A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin; a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*', *Eur. J. Biochem*, 237(1), pp. 237:303–310. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0303n.x.

Ouyang, M. *et al.* (2020) 'Minimally invasive evaluation of the anaesthetic efficacy of MS-222 for ornamental discus fish using skin mucus biomarkers', *Aquaculture Research*, 51(7), pp. 2926–2935. doi: 10.1111/are.14631.

Padra, J. T. *et al.* (2017) 'Aeromonas salmonicida Growth in Response to Atlantic Salmon Mucins Differs between Epithelial Sites, Is Governed by Sialylated and N -Acetylhexosamine-Containing O -Glycans, and Is Affected by Ca²⁺', *Infection and Immunity*. Edited by B. McCormick, 85(8). doi: 10.1128/IAI.00189-17.

Palaksha, K. J. *et al.* (2008) 'Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)', *Fish & Shellfish Immunology*, 24(4), pp. 479–488. doi: 10.1016/j.fsi.2008.01.005.

- Patel, D. M. and Brinchmann, M. F. (2017) 'Skin mucus proteins of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*)', *Biochemistry and Biophysics Reports*, 9, pp. 217–225. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.12.016.
- Patel, M. *et al.* (2020) 'Profiling and Role of Bioactive Molecules from *Puntius sophore* (Freshwater/Brackish Fish) Skin Mucus with Its Potent Antibacterial, Antiadhesion, and Antibiofilm Activities', *Biomolecules*, 10(6), p. 920. doi: 10.3390/biom10060920.
- Pérez-Sánchez, J. *et al.* (2017) 'Skin Mucus of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.). Protein Mapping and Regulation in Chronically Stressed Fish', *Frontiers in Physiology*, 8. doi: 10.3389/fphys.2017.00034.
- Pietrzak, E., Mazurkiewicz, J. and Slawinska, A. (2020) 'Innate Immune Responses of Skin Mucosa in Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Fed a Diet Supplemented with Galactooligosaccharides', *Animals*, 10(3), p. 438. doi: 10.3390/ani10030438.
- Purcell, J. E. and Anderson, P. A. V. (1995) 'Electrical responses to water-soluble components of fish mucus recorded from the cnidocytes of a fish predator, *Physalia physalis*', *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 26(2–4), pp. 149–162. doi: 10.1080/10236249509378936.
- Raj, V. S. *et al.* (2011) 'Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells', *Veterinary Research*, 42(1), p. 92. doi: 10.1186/1297-9716-42-92.
- Rajan, B. *et al.* (2013) 'Differentially expressed proteins in the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) upon natural infection with *Vibrio anguillarum*', *BMC Veterinary Research*, 9(1), p. 103. doi: 10.1186/1746-6148-9-103.
- Rakers, S. *et al.* (2013) 'Antimicrobial Peptides (AMPs) from Fish Epidermis: Perspectives for Investigative Dermatology', *Journal of Investigative Dermatology*, 133(5), pp. 1140–1149. doi: 10.1038/jid.2012.503.
- Reverter, Miriam *et al.* (2017) 'Characterisation of the gill mucosal bacterial communities of four butterflyfish species: a reservoir of bacterial diversity in coral reef ecosystems', *FEMS Microbiology Ecology*, 93(6). doi: 10.1093/femsec/fix051.

Reverter, M. *et al.* (2017) 'Fish mucus metabolome reveals fish life-history traits', *Coral Reefs*, 36(2), pp. 463–475. doi: 10.1007/s00338-017-1554-0.

Ross, N. *et al.* (2000) 'Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation', *Diseases of Aquatic Organisms*, 41, pp. 43–51. doi: 10.3354/dao041043.

Ruangsi, J. *et al.* (2010) 'Antimicrobial activity in the tissues of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)', *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5–6), pp. 879–886. doi: 10.1016/j.fsi.2010.02.006.

Salinas, I. and Magadán, S. (2017) 'Omics in fish mucosal immunity', *Developmental & Comparative Immunology*, 75, pp. 99–108. doi: 10.1016/j.dci.2017.02.010.

Sanahuja, I. and Ibarz, A. (2015) 'Skin mucus proteome of gilthead sea bream: A non-invasive method to screen for welfare indicators', *Fish & Shellfish Immunology*, 46(2), pp. 426–435. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.056.

Sanchez, L. M. *et al.* (2012) 'Examining the Fish Microbiome: Vertebrate-Derived Bacteria as an Environmental Niche for the Discovery of Unique Marine Natural Products', *PLoS ONE*. Edited by J. A. Gilbert, 7(5), p. e35398. doi: 10.1371/journal.pone.0035398.

Schwamborn, K. and Caprioli, R. M. (2010) 'MALDI Imaging Mass Spectrometry - Painting Molecular Pictures', *Molecular Oncology*, 4(6), pp. 529–538. doi: 10.1016/j.molonc.2010.09.002.

Shai, Y. (2002) 'From Innate Immunity to de-Novo Designed Antimicrobial Peptides', *Current Pharmaceutical Design*, 8(9), pp. 715–725. doi: 10.2174/1381612023395367.

Shen, Y. *et al.* (2012) 'Expression of complement component C7 and involvement in innate immune responses to bacteria in grass carp', *Fish & Shellfish Immunology*, 33(2), pp. 448–454. doi: 10.1016/j.fsi.2012.05.016.

Shephard, K. L. (1993) 'Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11(3), pp. 403–417. doi: 10.1016/0169-409X(93)90018-Y.

Srichaiyo, N. *et al.* (2020) 'The effects gotu kola (*Centella asiatica*) powder on growth

performance, skin mucus, and serum immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings', *Aquaculture Reports*, 16, p. 100239. doi: 10.1016/j.aqrep.2019.100239.

Srivastava, A. *et al.* (2018) 'Role of aloin in the modulation of certain immune parameters in skin mucus of an Indian major carp, *Labeo rohita*', *Fish & Shellfish Immunology*, 73, pp. 252–261. doi: 10.1016/j.fsi.2017.12.014.

Su, Y. (2011) 'Isolation and identification of pelteobagrins, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158(2), pp. 149–154. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.11.002.

Subramanian, S., MacKinnon, S. L. and Ross, N. W. (2007) 'A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(3), pp. 256–263. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.06.003.

Subramanian, S., Ross, N. W. and MacKinnon, S. L. (2008) 'Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), pp. 85–92. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.01.011.

Sugiyama, N. *et al.* (2005) 'Further isolation and characterization of grammistins from the skin secretion of the soapfish *Grammistes sexlineatus*', *Toxicon*, 45(5), pp. 595–601. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.12.021.

Sveen, L. R. *et al.* (2017) 'Genome-wide analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) mucin genes and their role as biomarkers', *PLOS ONE*. Edited by P. Xu, 12(12), p. e0189103. doi: 10.1371/journal.pone.0189103.

Swain, P. *et al.* (2007) 'Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations', *Fish & Shellfish Immunology*, 22(1–2), pp. 38–43. doi: 10.1016/j.fsi.2006.03.010.

Tapia-Paniagua, S. T. *et al.* (2018) 'Mucus glycosylation, immunity and bacterial microbiota

associated to the skin of experimentally ulcerated gilthead seabream (*Sparus aurata*)', *Fish & Shellfish Immunology*, 75, pp. 381–390. doi: 10.1016/j.fsi.2018.02.006.

Tarnawska, M. *et al.* (2019) 'Immune response of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to a mixture of sewage chemicals', *Fish & Shellfish Immunology*, 88, pp. 17–27. doi: 10.1016/j.fsi.2019.02.049.

Terova, G. *et al.* (2011) 'Impact of acute stress on antimicrobial polypeptides mRNA copy number in several tissues of marine sea bass (*Dicentrarchus labrax*)', *BMC Immunology*, 12(1), p. 69. doi: 10.1186/1471-2172-12-69.

Timalata, K. D. (2015) 'Elucidation of innate immune components in the epidermal mucus of different freshwater fish species', *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 45(3), pp. 221–230. doi: 10.3750/AIP2015.45.3.01.

Tsutsui, S. *et al.* (2003) 'Lectins Homologous to Those of Monocotyledonous Plants in the Skin Mucus and Intestine of Pufferfish, *Fugu rubripes*', *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), pp. 20882–20889. doi: 10.1074/jbc.M301038200.

Van Doan, H. *et al.* (2019) 'Effects of Assam tea extract on growth, skin mucus, serum immunity and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae*', *Fish & Shellfish Immunology*, 93, pp. 428–435. doi: 10.1016/j.fsi.2019.07.077.

Wang, H. *et al.* (2019) 'Analysis of enzyme activity, antibacterial activity, antiparasitic activity and physico-chemical stability of skin mucus derived from *Amphiprion clarkii*', *Fish & Shellfish Immunology*, 86, pp. 653–661. doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.066.

Xia, H. *et al.* (2016) 'sIgZ exhibited maternal transmission in embryonic development and played a prominent role in mucosal immune response of *Megalabrama amblycephala*', *Fish & Shellfish Immunology*, 54, pp. 107–117. doi: 10.1016/j.fsi.2016.03.165.

Xiong, Y. *et al.* (2020) 'Proteomic profiling of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) skin mucus identifies differentially-expressed proteins in response to *Edwardsiella ictaluri* infection', *Fish & Shellfish Immunology*, 100, pp. 98–108. doi: 10.1016/j.fsi.2020.02.059.

