

**Valutazione di stress biotici su trota iridea
(*Oncorhynchus mykiss*) d'allevamento mediante indici
biochimici antiossidanti**

*Evaluation of biotic stress on farmed rainbow trout
(*Oncorhynchus mykiss*) by biochemical antioxidant indexes*

**Antonia Concetta Elia^{1*}, Valeria Anastasi¹, Rinaldo Brunetti³,
Andrea Gustinelli², Monica Caffara², Maria Illuminata Taticchi¹,
Marino Prearo³**

¹ Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Via Elce di Sotto, 8 – 06100 Perugia

² Dpt. di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO)

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna, 148 – 10154 Torino

RIASSUNTO – E' stata condotta una valutazione dello "stato di salute" di trote iridea d'allevamento mediante l'applicazione degli indici biochimici antiossidanti, come potenziali biomarkers di stress ossidativo in alcuni tessuti bersaglio, quali fegato e rene. Esemplari femmine sono stati campionati mensilmente, da aprile ad agosto 2004, in tre impianti di trota coltura del nord Italia, situati uno in montagna e due in pianura. L'allevamento di montagna è stato scelto come impianto di controllo, in quanto indenne da patologie ittiche, mentre le trote coltivate in pianura hanno presentato problematiche di Malattia Proliferativa Renale. Dai risultati preliminari si evidenzia una risposta antiossidante differente nei vari mesi di campionamento e tra i tre allevamenti, in entrambi i tessuti di trota analizzati. Da aprile ad agosto, si registrano variazioni minori dei livelli degli indici biochimici nelle trote dell'allevamento di montagna, rispetto a quelli di pianura. Inoltre, in questi ultimi l'attività enzimatica della GST, nel fegato (circa 300 nmol/min/mg prot) e nel rene (circa 150 nmol/min/mg prot), è due volte più alta rispetto a quella degli esemplari di montagna; nel rene, anche la Se-GPx (circa 160 nmol/min/mg prot) e la GR (circa 112 nmol/min/mg prot) mostrano valori decisamente più alti (3-4 volte) nelle trote degli impianti di pianura, rispetto a quelle dell'altro impianto. Pertanto, nelle trote degli allevamenti di pianura si rileva un più alto grado di stress ossidativo, rispetto a quelle dell'impianto sito in montagna, soprattutto nei mesi estivi. Gli indici biochimici sopradetti, possono essere considerati come biomarkers di stress ossidativo dovuto non solo all'aumento della temperatura, ma anche ad una parassitosi in atto.

SUMMARY- The evaluation of healthy of rainbow trout of fish farm has been conducted by the application of antioxidant indexes in some tissues target, as liver and kidney. Specimens of females of trout were sampled monthly, from april to august 2004, in three trout farms of north Italy, located one in mountain and two in land. That of mountain has been choisen as a control, because unaffected by fish pathologies. From preliminary results it was evidenced an antioxidant response which was different through the sampling months and between the three farms in both tissues investigated. From april to august, slight variations of levels of biochemical indexes in trout of control were recorded, respect those of land. Futhermore, in these last, GST enzymatic activity in liver (about 300 nmol/min/mg prot) and in kidney (about 150 nmol/min/mg prot), is twice higher respect those of specimens of mountain; in kidney, also Se-GPx (about 160 nmol/min/mg prot) and GR (about 112 nmol/min/mg prot) exhibited marked differences (3-4 times) in trout of land, compared to those of the other farm. Thus, in trout of land was evidenced higher oxidative stress respect to specimens collected from the fish farm of mountain, expecially during summer. These biochemical indexes, can be considered as reliable biomarkers of oxidative stress not only induced by the increase of temperature, but also by a parasite infection.

Key words: Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Biotic stress, Glutathione-dependent enzymes, Biomarkers, Pathologies, Liver, Kidney.

* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale, Università degli Studi di Perugia, Via Elce di Sotto, 8 - 06123 Perugia. Tel.: 075-5855717; Fax: 075-5855725; E-mail: elia@unipg.it

INTRODUZIONE

I pesci, negli allevamenti ittici, sono continuamente esposti a fattori di stress più o meno elevati, sia abiotici che biotici. Infatti, le fluttuazioni dei parametri ambientali, le pratiche di allevamento, il trasporto, i trattamenti con disinfettanti e le vaccinazioni, nonché la scarsa qualità dell'acqua, possono causare considerevoli stress, alterando i meccanismi omeostatici dei pesci, rendendoli pertanto più sensibili ad una grande varietà di patogeni e inquinanti ambientali. In particolare, se i meccanismi fisiologici di riparo divengono insufficienti, prendono il sopravvento le patologie legate alle infezioni batteriche, al parassitismo, alla cancerogenesi, sino alla morte. Le patologie ittiche sono pertanto, uno dei problemi più rilevanti negli impianti di acquacoltura in quanto causano forti perdite anche in termini economici.

La sindrome da stress in esemplari ittici di allevamento può essere opportunamente quantificata mediante l'utilizzo di appropriati indici, noti come "*biomarkers*", ossia quelle variazioni biochimiche, cellulari o fisiologiche, che sono prodotte da fattori esogeni e che sono misurabili in un tessuto o a livello dell'intero organismo. I biomarkers possono fornire indicazioni sulla "*salute*" di una popolazione ed il suo passaggio dallo stato di "*omeostasi*" a quello di "*malattia*". In pratica, valutando a livello molecolare o cellulare l'alterazione dello stato fisiologico degli organismi, si può avere una precoce indicazione degli effetti di stress esogeni, il che può consentire interventi risanatori tempestivi prima che il danno provocato si estenda a tutta la popolazione.

Molti fattori proossidanti possono causare un'alterazione della difesa antiossidante con conseguente variazione dell'attività specifica degli enzimi coinvolti nei meccanismi di difesa antiossidante (Winston & Di Giulio, 1991).

La glutazione perossidasi (Se-GPx, EC 1.11.1.9), tramite la riduzione dei perossidi di idrogeno provvede ad una efficiente protezione contro il danno ossidativo prodotto dai radicali liberi. La glutazione reduttasi (GR, EC 1.6.4.2) catalizza la rigenerazione del glutazione ridotto (GSH) dal glutazione ossidato (GSSG), con consumo di una molecola di NADPH. Le glutazione S-transferasi (GST, EC 2.5.1.18) sono una famiglia multienzimatica e la loro azione detossificante consiste nel catalizzare la coniugazione del GSH con differenti composti elettrofili: mutageni, carcinogeni ed altri composti chimici. Questi enzimi ricoprono un ruolo doppiamente importante poiché, coniugando gli elettrofili potenzialmente tossici con il GSH, assicurano da un lato la protezione dei centri nucleofili della cellula e dall'altro, facilitano l'eliminazione degli xenobiotici con l'escrezione. Il ruolo funzionale della gliossalasi I (GI, EC 4.4.1.5), insieme alla gliossalasi II (GII, EC 3.1.2.6) è quello di fornire un'efficiente protezione dalle α -chetoaldeidi, che si formano come conseguenza dei processi di perossidazione lipidica indotti da vari contaminanti ambientali.

Nell'ambito del progetto finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, è stata condotta questa ricerca allo scopo di valutare, mediante gli indici biochimici detossificanti, gli effetti degli stress biotici su tessuti di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) d'allevamento.

MATERIALI E METODI

E' stato studiato lo "*stato di salute*" di trote iridea d'allevamento, mediante la valutazione degli indici sopra descritti, come biomarkers di stress ossidativo in alcuni tessuti bersaglio, quali fegato e rene. Sono state prelevate mensilmente 10 trote femmine, da aprile ad agosto 2004, in ciascuno dei tre impianti di trota coltura presi in considerazione in questo studio, tutti

situati nel nord Italia, uno ubicato in montagna in territorio piemontese e utilizzato come controllo (allevamento A) e due in pianura in territorio veneto (allevamenti B e C) (Tab. 1).

Mesi		A	B	C
Aprile 2004	Peso (g)	249,4 ± 0,9	227,3 ± 26,1	457,5 ± 56,3
	Lungh (cm)	25,9 ± 1,2	27,8 ± 1,4	31,4 ± 1,2
Maggio 2004	Peso (g)	255,0 ± 46,4	215,6 ± 55,5	562,5 ± 83,8
	Lungh (cm)	27,3 ± 1,7	25,9 ± 2,2	34,8 ± 1,3
Giugno 2004	Peso (g)	182,5 ± 42,9	219,0 ± 15,2	330,1 ± 22,1
	Lungh (cm)	26,4 ± 2,5	25,3 ± 0,4	28,9 ± 0,8
Luglio 2004	Peso (g)	182,5 ± 42,9	195,5 ± 13,3	405,1 ± 23,3
	Lungh (cm)	26,4 ± 2,5	24,6 ± 1,2	31,9 ± 0,9
Agosto 2004	Peso (g)	157,2 ± 67,9	358,6 ± 66,7	511,4 ± 35,7
	Lungh (cm)	25,5 ± 2,4	30,6 ± 1,8	33,2 ± 1,2

Tabella 1 - Peso e lunghezza degli esemplari di trote campionati negli allevamenti da aprile a agosto 2004.
 A= allevamento di montagna; B e C = allevamenti di pianura
 Table 1 - Weight and length of specimens of trout sampled from fish farm from april to august 2004.
 A= montain farm; B and C = land farms

Da ciascuna trota campionata sono stati prelevati fegato e rene e congelati in ghiaccio secco direttamente in allevamento, quindi conservati in laboratorio alla temperatura di -80° C in attesa di effettuare le analisi biochimiche.

Analisi dei biomarkers

I tessuti sono stati lavati in soluzione fisiologica per rimuovere l'eccesso di sangue. L'omogenizzazione (100 g/l) in 100 mM di tampone di TRIS pH 7,8, contenente 100 µM di fenilmetilsulfonil-fluoride (PMSF), bacitracina e aprotinina, è stata realizzata con omogenizzatore Ultra-Turrax. L'omogenato ottenuto è stato centrifugato per 15 minuti a 20.000 g e successivamente a 100.000 g per 60 min. Il sedimento è stato eliminato ed i supernatanti sono stati utilizzati per la determinazione delle attività enzimatiche (Elia *et al.*, 2000).

L'attività enzimatica della Glutazione perossidasi (Se-GPx) è stata determinata usando acqua ossigenata (H₂O₂) come substrato, secondo il metodo di Lawrence & Burk (1976). In base a tale procedura, che consiste in un saggio enzimatico accoppiato, si determina l'ossidazione del NADPH a 340 nm in presenza di Glutazione riduttasi (GR) che catalizza la riduzione del GSSG prodotto dall'attività della Glutazione perossidasi (GPx). La reazione

viene fatta iniziare con l'aggiunta di perossido d'idrogeno (H_2O_2) e il decremento del NADPH viene seguito spettrofotometricamente a 340 nm ($\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La velocità di ossidazione non enzimatica è determinata in assenza di GPx ed è sottratta dalla velocità determinata in presenza dell'enzima. L'unità enzimatica di GPx è stata espressa come la quantità di enzima richiesto per ossidare 1 μmole di NADPH al minuto, nelle condizioni descritte.

L'attività enzimatica della Glutazione S-transferasi (GST) è stata misurata secondo il metodo di Habig *et al.* (1974) usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) come substrato. La miscela di reazione conteneva il tampone sodio fosfato a pH 6,5 100 mM, CDNB 1 mM, GSH 1 mM e un'opportuna aliquota di campione. Una unità di enzima è definita come la quantità che produce 1,0 $\mu\text{mol/min}$ del tioetere dal CDNB ed è stata misurata spettrofotometricamente a 340 nm ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L'attività della Glutazione reduttasi è stata determinata secondo il metodo di Chung *et al.* (1991) con alcune modifiche. Con tale metodica si valuta il decremento della concentrazione di NADPH dovuta alla sua ossidazione in presenza di GSSG. La mistura di saggio contiene un volume finale di 1 ml: tampone sodio fosfato 100 mM a pH 7, una mM di GSSG, 60 μM di NADPH e 50 o 100 μl di campione. La reazione è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm ($\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L'attività della Gliossalasi I (GI) è stata determinata secondo una modificazione del metodo di Oray & Norton (1977). In particolare è stata misurata la velocità iniziale della produzione di S-D-lactoilglutazione (LSG) dall'addotto emittioacetale che si forma spontaneamente tra metilgliossale (MG) e GSH. La reazione è stata seguita spettrofotometricamente a 240 nm valutando la formazione del legame tioestere ($\epsilon \text{ SLG} - \epsilon \text{ emittioacetale} = 3,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Un volume finale di 1 ml conteneva tampone 100 mM sodio fosfato a pH 6,8, 1 mM di GSH, 1 mM di MG e il campione.

La determinazione delle proteine totali citosoliche è stata condotta con il metodo di Lowry *et al.* (1951).

Analisi statistiche

Per determinare le differenze nelle risposte epatiche e renali dei campioni raccolti nei diversi allevamenti è stata utilizzata l'analisi della varianza a una via (ANOVA) con il test di comparazione multipla di Keuls-Newman, scegliendo come livello minimo di significatività $P < 0,05$, sebbene molte differenze siano risultate significative anche a $P < 0,01$.

RISULTATI

La valutazione della risposta antiossidante e detossificante in rene e fegato di ciascuna trote è stata condotta mediante l'analisi spettrofotometrica degli enzimi antiossidanti (biomarkers). Nelle Figg. 1-4 sono riportati i risultati ottenuti per ogni indice biochimico in termini di media e deviazione standard (DS). Le lettere (a, b, c) indicano differenze statisticamente significative tra gli esemplari dei tre allevamenti per mese di campionamento, per $P < 0,05$.

Allevamento A (montagna): da aprile ad agosto si registra una leggera fluttuazione degli indici biochimici, sia nel rene che nel fegato.

Allevamento B (pianura): nel rene si evidenziano alti livelli di attività enzimatica di Se-GPx (Figura 1A), rispetto al controllo di circa 100% in tutti i mesi di campionamento. Nel fegato (Figura 1B), l'attività enzimatica è più alta nei mesi di maggio e luglio (60%) e agosto (130%). In generale, la GR in entrambi i tessuti analizzati (Figure 2A, B), mostra delle differenze rispetto al controllo in tutti i mesi di campionamento, ma raggiunge valori

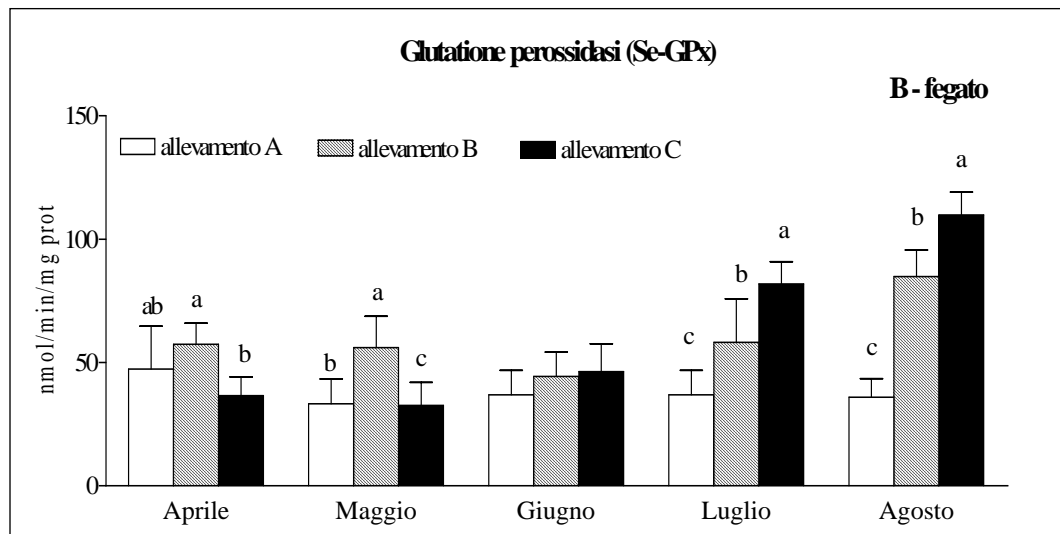
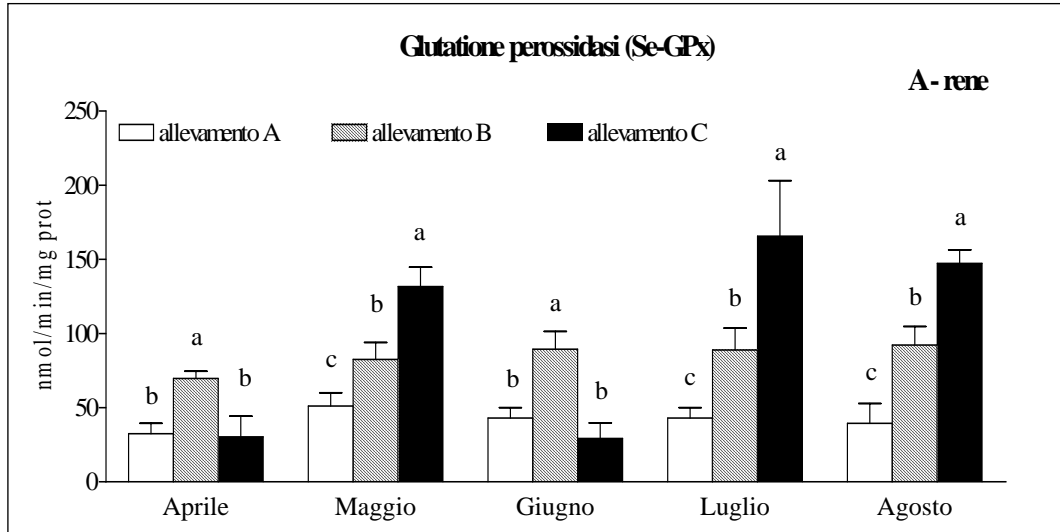


Figura 1 (A, B) – Livelli di Se-GPx nel rene e fegato degli esemplari di trote dei tre allevamenti (A, B, C). Le lettere (a, b, c) indicano differenze statisticamente significative tra gli esemplari dei tre allevamenti per mese di campionamento ($P < 0,05$).

Figure 1 (A, B) – Levels of Se-GPx in kidney and liver of specimens of trouts of three fish farms (A, B, C). Different letters (a, b, c) indicate significant differences between specimens of three fish farms in the same month ($P < 0,05$).

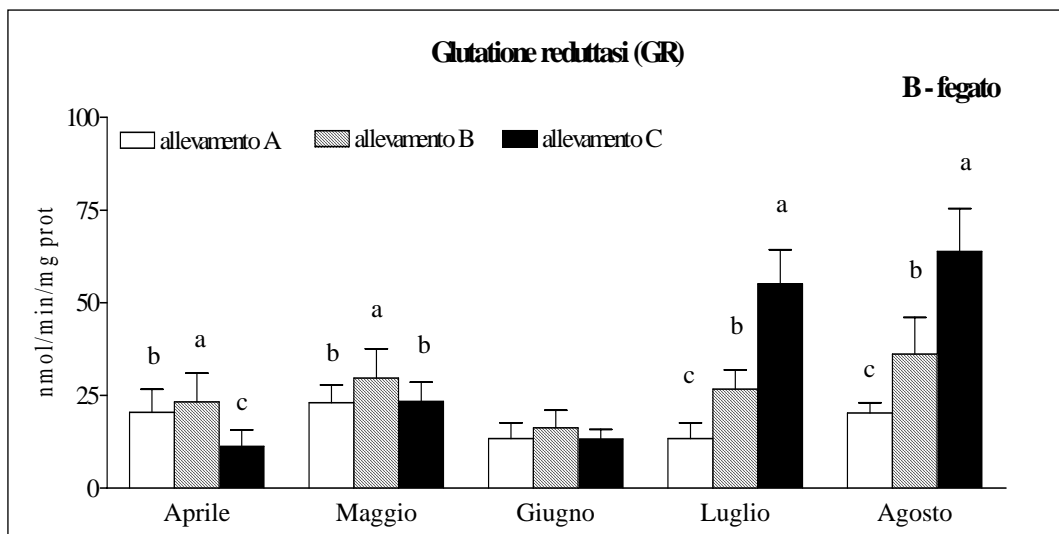
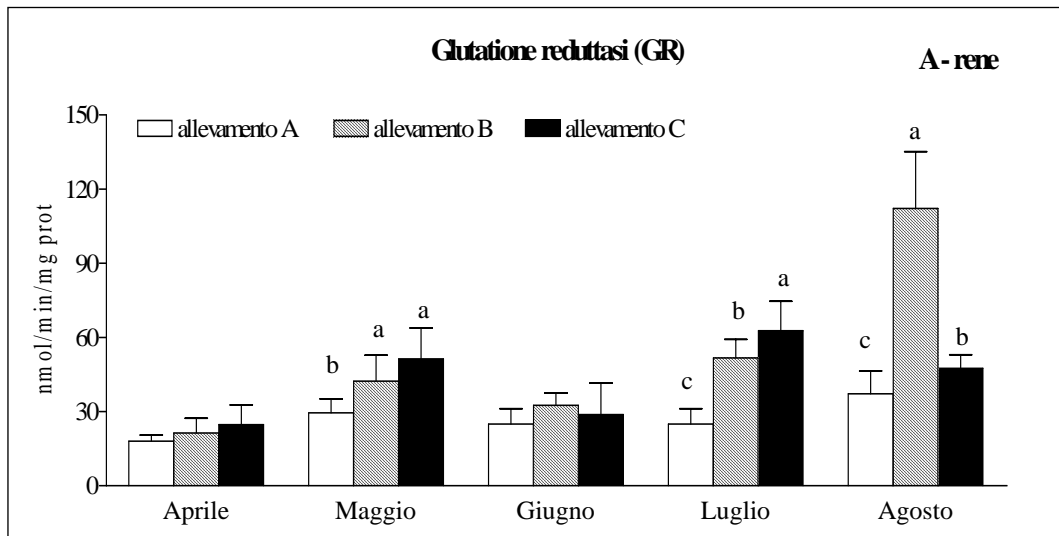


Figura 2 (A, B) – Livelli di GR nel rene e fegato degli esemplari di trote dei tre allevamenti (A, B, C). Le lettere (a, b, c) indicano differenze statisticamente significative tra gli esemplari dei tre allevamenti per mese di campionamento ($P < 0,05$).

Figure 2 (A, B) – Levels of GR in kidney and liver of specimens of trouts of three fish farms (A, B, C). Different letters (a, b, c) indicate significant differences between specimens of three fish farms in the same month ($P < 0,05$).

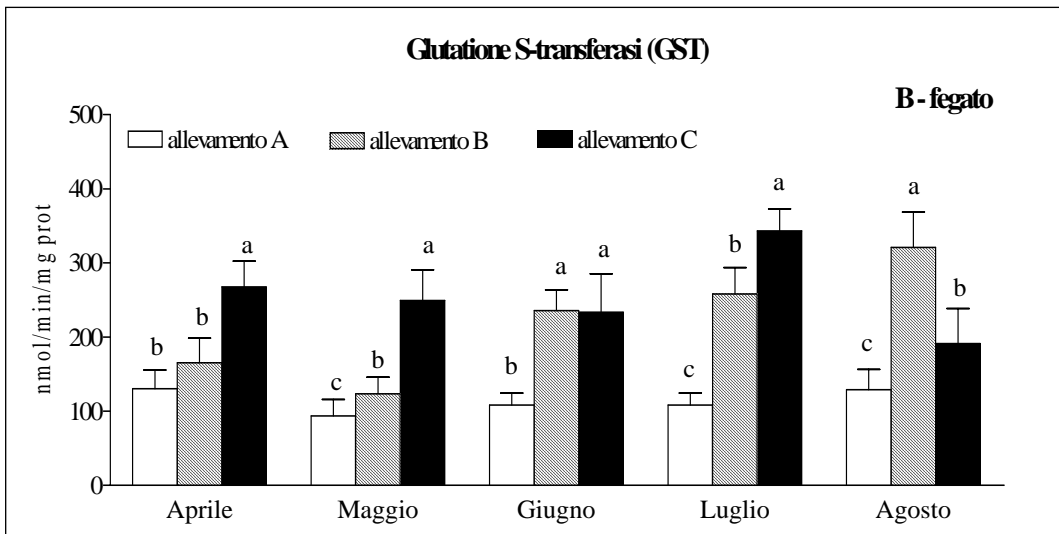
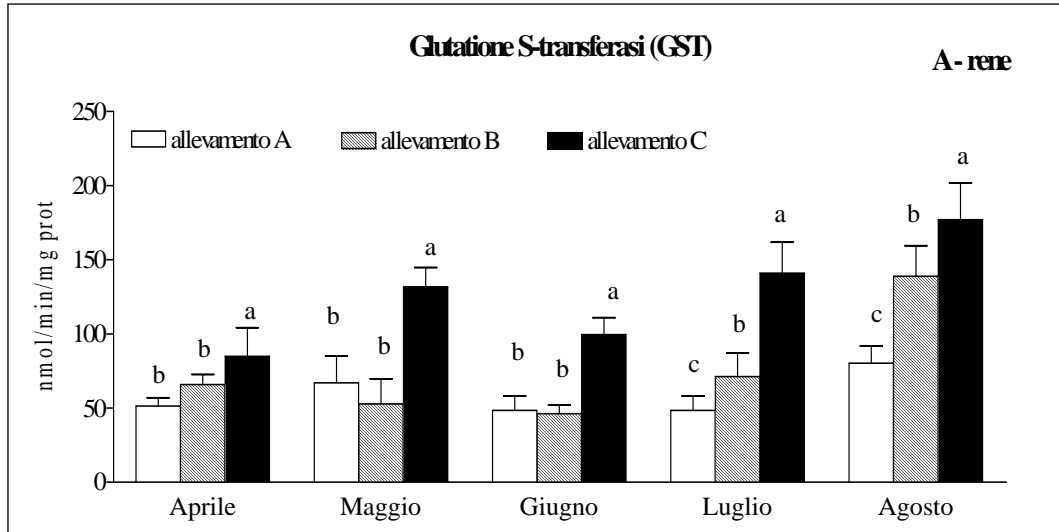


Figura 3 (A, B) – Livelli di GST nel rene e fegato degli esemplari di trote dei tre allevamenti (A, B, C). Le lettere (a, b, c) indicano differenze statisticamente significative tra gli esemplari dei tre allevamenti per mese di campionamento ($P < 0,05$).

Figure 3 (A, B) – Levels of GST in kidney and liver of specimens of trouts of three fish farms (A, B, C). Different letters (a, b, c) indicate significant differences between specimens of three fish farms in the same month ($P < 0,05$).

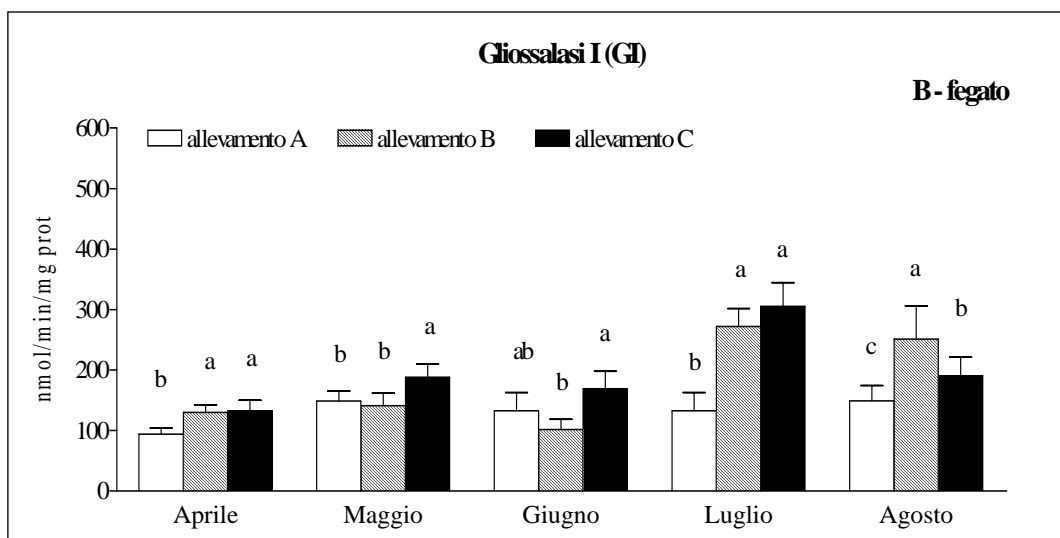
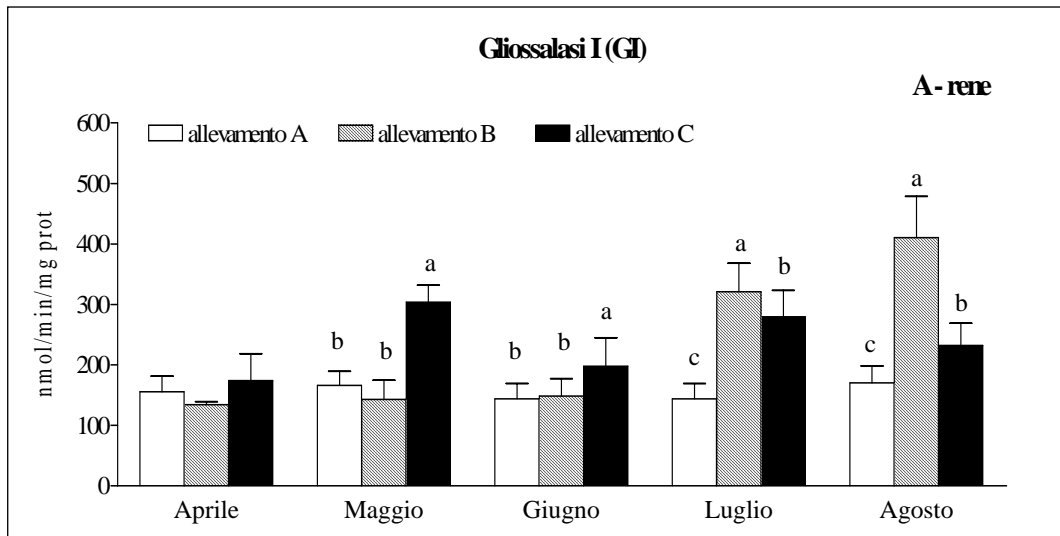


Figura 4 (A, B) – Livelli di GI nel rene e fegato degli esemplari di trote dei tre allevamenti (A, B, C). Le lettere (a, b, c) indicano differenze statisticamente significative tra gli esemplari dei tre allevamenti per mese di campionamento ($P < 0,05$).

Figure 4 (A, B) – Levels of GI in kidney and liver of specimens of trouts of three fish farms (A, B, C). Different letters (a, b, c) indicate significant differences between specimens of three fish farms in the same month ($P < 0,05$).

decisamente più elevati nei reni in agosto (circa 4 volte), rispetto al controllo. Anche per la GST misurata nei reni (Figura 3A), si evidenziano marcate differenze in luglio (circa 50%) e agosto (circa il 70%), mentre per l'enzima epatico (Figura 3B) le differenze sono notevolmente più alte a partire da giugno (circa 100%) rispetto al controllo. Anche la GI in entrambi i tessuti (Figure 4A, B), evidenzia livelli più alti in luglio di circa il 100%, rispetto agli esemplari dell'allevamento A, mentre in agosto si evidenziano marcate differenze solo nel rene (100%), rispetto al controllo.

Allevamento C (pianura): la Se-GPx valutata nel rene è notevolmente più alta, di quella dell'allevamento di controllo, di circa 150% in maggio e 250% in luglio e agosto, mentre in aprile e giugno i valori dell'enzima sono uguali a quelli del controllo (Figura 1A). L'enzima epatico evidenzia, negli stessi esemplari, delle variazioni statisticamente significative soprattutto nei mesi estivi di circa 120% (luglio) e circa 200% (agosto), rispetto al controllo (Figura 1B). In generale, l'attività enzimatica della GST, sia nel fegato che nel rene (Figure 3A, B), è sempre più alta in tutti i mesi di campionamento, rispetto a quella degli esemplari di montagna, raggiungendo valori di circa il 200% (luglio). Similmente alla GST, anche la GR mostra valori decisamente più alti in entrambi i tessuti delle trote campionate nei mesi estivi, rispetto a quelle dell'impianto A (Figure 2A, B). E' interessante evidenziare come l'attività enzimatica della GR sia elevata nel fegato in luglio e agosto (circa 300%). Anche la GI in rene e fegato (Figure 4A, B), evidenzia livelli più alti, in quasi tutti i mesi di campionamento, rispetto al controllo. Anche per questo enzima si raggiungono valori di attività enzimatica decisamente più alti in maggio (rene) e luglio (fegato e rene) di circa il 100%, rispetto a quelli degli esemplari dell'allevamento A.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In generale, i sistemi antiossidanti, enzimatici e non, rappresentano un importante sistema biologico di difesa contro lo stress ossidativo indotto da vari fattori, sia esogeni che endogeni (Leckner, 1998). Alcuni di questi fattori agiscono da forti proossidanti, inducendo il metabolismo cellulare alla costante produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che causano, conseguentemente, una variazione di livello di alcuni enzimi antiossidanti (GST, GPx, GR e GI). Recentemente, gli enzimi antiossidanti sopraccitati sono stati proposti come biomarkers di stress ossidativo, in quanto possono fornire un segnale precoce di alterazioni individuali negli organismi bersaglio (Winston & Di Giulio, 1991).

Nella presente ricerca, l'induzione delle attività enzimatiche, valutate in entrambi i tessuti di trota (fegato e rene) degli impianti B e C, potrebbe essere la conseguenza di una marcata condizione di stress ossidativo probabilmente indotto, in questi organismi, da fattori essenzialmente biotici. Infatti, negli esemplari dell'impianto C, campionati nei mesi di maggio, luglio e agosto 2004, è stata riscontrata positività alla Malattia Proliferativa Renale (MPR). Questo allevamento è storicamente noto per essere affetto da tale parassitosi. L'affermarsi della MPR è generalmente associata ad un incremento stagionale della temperatura dell'acqua, con trasmissione della malattia al di sopra di 12-14° C.

E' da notare che l'attività della Se-GPx misurata nei tessuti di trota proveniente dall'allevamento di montagna è simile a quella riportata da altri autori per la stessa specie ittica (Roy *et al.*, 1995; Lindström-Seppä *et al.*, 1996), ma comunque molto più bassa rispetto a quella riportata per altre specie ittiche (Gallagher & Di Giulio, 1992; Ahmad *et al.*, 2000; Berntssen *et al.*, 2000; Elia *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2004; Elia *et al.*, 2005). La Se-GPx, nel rene e nel fegato degli esemplari dell'allevamento C, evidenzia una forte induzione della sua attività enzimatica, rispetto a quella degli esemplari dell'allevamento A, proprio nei mesi in cui è stata riscontrata la positività alla MPR. Al contrario, l'attività dell'enzima

valutata in entrambi i tessuti degli esemplari dell'allevamento B, non subisce sostanziali variazioni durante i mesi di campionamento, ad eccezione dell'attività enzimatica epatica misurata in agosto, che comunque è sempre più alta rispetto a quella del controllo. L'allevamento B è storicamente noto essere affetto da infezioni batteriche. Quindi, la più alta attività enzimatica di Se-GPx registrata negli esemplari di questo allevamento, potrebbe essere il risultato di un qualche tipo di infezione, che ha probabilmente interessato l'allevamento da maggio ad agosto. Quindi il notevole aumento dell'attività della Se-GPx nelle trote di pianura sarebbe da collegare allo stress indotto da agenti patogeni. Come noto, la Se-GPx è un enzima antiossidante coinvolto nello "scavenging" di derivati del metabolismo degli ossiradicali, prodotti durante lo stress ossidativo; riveste un ruolo predominante nella protezione contro la perossidazione lipidica negli organismi acquatici (Winston & Di Giulio, 1991).

In generale, le patologie ittiche, comprese le infezioni da parassiti, possono indurre un aumento dei ROS, causando pertanto uno stato di stress ossidativo (Cnubben *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2004). Una delle risposte degli organismi parassitati è l'attivazione della difesa antiossidante, con l'incremento delle attività enzimatiche detossificanti. Infatti, come riportato da Dautremepuits *et al.* (2003), esemplari di carpa parassitati da *Ptychobothrium* sp. presentavano livelli di attività enzimatiche di GST, GR, Se-GPx e CAT più alte nel fegato e nel rene nei confronti di soggetti non parassitati. Secondo questi autori, il potenziamento della risposta antiossidante potrebbe contribuire a neutralizzare lo stress ossidativo normalmente indotto dal parassita.

L'attività enzimatica della GR nel fegato dei controlli di trota iridea è simile a quella riportata da altri autori per la stessa specie ittica (Roy *et al.*, 1995; Otto *et al.*, 1996). Da questi dati emerge che la trota iridea ha una grande capacità di rigenerare il glutatione ridotto dalla sua forma ossidata e di garantire adeguati livelli di GSH per neutralizzare lo stress ossidativo. In questo studio la GR, in entrambi i tessuti analizzati, mostra delle differenze rispetto al controllo in tutti i mesi di campionamento, ma raggiunge valori decisamente elevati nei reni degli esemplari dell'impianto B, colpito da lattococcosi in agosto (circa 300%), rispetto al controllo. L'attività della GR valutata nel rene degli esemplari dell'allevamento C, evidenzia livelli più alti nei mesi in cui è stata riscontrata positività alla MPR. Particolarmente interessante è l'attività dell'enzima nel tessuto epatico che mostra, in entrambi i mesi estivi, dei valori di circa il doppio rispetto ai controlli.

La GST, valutata in entrambi i tessuti, mostra un'attività enzimatica più alta nel rene sia degli esemplari dell'allevamento B in agosto, in concomitanza con la lattococcosi, che degli esemplari dell'allevamento C in maggio, luglio ed agosto, quando è stata diagnosticata la MPR. Le trote dell'allevamento C indicano valori dell'enzima epatico più alti in tutti i mesi di campionamento, mentre quelle dell'allevamento B solo da maggio ad agosto.

Questa differente risposta può essere dovuta, oltre che alle infezioni diagnosticate, anche alla diversa tipologia di impianto dove sono state campionate le trote. Infatti, quello situato in montagna utilizza acqua di torrente, con temperatura dell'acqua quasi costante durante i mesi del campionamento, a differenza degli altri due ubicati in pianura, che utilizzano acqua di fiume e di pozzo, la cui temperatura è soggetta a maggiori variazioni durante l'arco dell'anno.

E' noto, infatti, che la risposta antiossidante dei pesci varia in relazione sia allo stato fisiologico dell'organismo (alimentazione e ciclo riproduttivo) che ai cambiamenti di alcuni parametri ambientali (temperatura, concentrazione di ossigeno, ecc.) (Ronisz *et al.*, 1999). Poiché l'allevamento della trota iridea richiede acqua ben ossigenata, a flusso costante e con temperatura intorno ai 12-14° C, l'aumento della temperatura negli impianti di pianura potrebbe essere responsabile dell'aumento di stress ossidativo e della conseguente induzione delle attività enzimatiche, inclusa quella della GST. Tale induzione enzimatica è indicativa

di un potenziamento della capacità di questi organismi di detossificare da composti esogeni, inclusi i contaminanti (Winston & Di Giulio, 1991) eventualmente presenti nell'ambiente.

Non vi sono informazioni in letteratura per quanto riguarda la GI e GII nei vertebrati acquatici parassitati. Questi enzimi sono recentemente stati utilizzati come biomarkers di contaminazione ambientale negli organismi acquatici sia vertebrati che invertebrati (Regoli, 1998; Elia *et al.*, 2001; Antognelli *et al.*, 2003; Elia *et al.*, 2003). Nel nostro caso è particolarmente interessante l'aumento delle attività della GI riscontrato negli esemplari di pianura che indica, anche in questo caso, un potenziamento del sistema di difesa.

In conclusione, gli enzimi indagati possono essere utilizzati come biomarkers di stress ossidativo negli esemplari di trota di allevamento. Inoltre, la valutazione dell'alterazione dello "stato di salute", mediante l'utilizzo di questi indici biochimici nella specie ittica considerata, rende possibile degli interventi risanatori tempestivi, prima che il danno indotto da fattori biotici possa diventare irreversibile.

RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è stato condotto con il finanziamento del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, VI piano Acquacoltura.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad I., Hamid T., Fatima M., Chand H.S., Jain S.K., Athar M. & Raisuddin S. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Fish Physiol. Biochem.*, 23: 35-48.
- Ahmad I., Pacheco M. & Santos M.A. (2004). Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 57: 290-302.
- Antognelli C., Romani R., Baldracchini F., De Santis A., Andreani G. & Talesa V. (2003). Different activity of glyoxalase system enzymes in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chemico-Biological Interaction*, 142: 297-305.
- Berntssen M.H.G., Lundbye A.K. & Hamre K. (2000). Tissue lipid peroxidative responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed high levels of dietary copper and cadmium. *Fish Physiol. Biochem.*, 23: 35-48.
- Chung P.M., Cappel R.E. & Gilbert H.F. (1991). Inhibition of glutathione disulfide reductase by glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 288: 48-53.
- Cnubben N.H.P., Rietjens I.M.C.M., Woltelboer H., van Zanden J. & van Bladeren P.J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 10: 141-152.
- Chu F.F., Esworthy S. & Doroshov J. H. (2004). Role of se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radical Biol. Med.*, 36: 1481-1495.
- Dautremepuits C., Betoulle S. & Vernet G. (2003). Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Fish and Shellfish Immunol.*, 15: 467-471.

- Elia A.C., Dörr M.J., Mantilacci L., Taticchi M.I. & Galarini R. (2000). Effects of mercury on glutathione-dependent enzymes in catfish (*Ictalurus melas* R.). In: Market B., Friese K., ed., "Trace metal in the environment", Elsevier Science Holland Biomedical Press, Amsterdam: 411-421.
- Elia AC., Ludovisi A. & Taticchi M.I. (2001). Study of seasonal variations of Glutathione and detoxificant enzymes in *Lophopus crystallinus* Pallas (Bryozoa) from Piediluco lake (Umbria, Italy). *Ital. J. Zool.*, 68: 291-297.
- Elia A.C., Galarini R., Taticchi M.I., Dörr A.J.M. & Mantilacci L. (2003). Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 55: 162-167.
- Elia A.C., Galarini R., Dörr A.J.M., Carnevali O., Fioroni L. & Taticchi M.I. (2005). Polychlorinated biphenyls and antioxidant enzymes in liver of *Cyprinus carpio* L. from Lake Trasimeno. *Ital. J. Zool.*, 72: 1-7.
- Gallagher E.P. & Di Giulio R.T. (1992). A comparison of glutathione-dependent enzymes in liver, gills and posterior kidney of channel catfish. *Comparative Biochem. Physiol.*, 102 C: 543-547.
- Habig W.H., Pabst M.J. & Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.
- Lawrence R.A. & Burk R.F. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophysical Res. Com.*, 71: 592-598.
- Leckner R. (1998). Oxidative stress in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck T., Hinton D.E., Streit B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*, Birkhause, Basle: 203-204.
- Lindström-Seppä P., Roy S., Huuskonen S., Tossavainen K., Ritola O. & Marin E. (1996). Biotransformation and glutathione homeostasis in rainbow trout exposed to chemical and physical stress. *Marine Environ. Research*, 42: 323-327.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Oray B. & Norton S.J. (1977). Two step purification of mouse liver glyoxalase I and evidence of its dimeric constitution. *Biochem. Biophysical Acta*, 483: 203-208.
- Otto, D.M.E., Buttener, J.K., Arquette, D.M. & Moon, T.W. (1996). Impaired inducibility of xenobiotics and antioxidant responses in rainbow trout exposed to polychlorinated biphenyl contaminated sediments in the St. Lawrence river. *Chemosphere*, 33: 2021-2032.
- Regoli F. (1998). Trace metal and antioxidant mechanisms seasonal variations in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 34: 48-63.
- Ronisz D., Larsson D.G.J. & Förlin L. (1999). Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Compar. Biochem. Physiology*, 124 C: 271-279.
- Roy S., Lindström-Seppä P., Huuskonen S. & Hänninen O. (1995). Responses of biotransformation and antioxidant enzymes in *Lemna minor* and *Oncorhynchus mykiss* exposed to simultaneously to xesachlorobenzene. *Chemosphere*, 30: 1489-1498.

Winston G.W. & Di Giulio R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol.*, 19: 137-161.