

## Περιεχόμενα

---

- ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ miR-143/145 ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ
- ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΣΕ ΑΛΙΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΤΑ ΤΟ ΕΝΔΟΚΟΙΝΟΤΙΚΟ ΕΜΠΟΡΙΟ ΚΑΙ ΤΙΣ ΕΙΣΑΓΩΓΕΣ ΑΠΟ ΤΡΙΤΕΣ ΧΩΡΕΣ. ΑΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2020-ΙΟΥΝΙΟΣ 2022.

Ήρθε το φθινόπωρο, τέλος η θερινή ραστώνη. Εποχή μετάβασης, μελαγχολική, ανήσυχη, η φύση μεταμορφώνεται. Ο ουρανός συννεφιάζει, το σκληρό φως του καλοκαιριού μαλακώνει, χάνεται, το τοπίο γεμίζει σκιές. Στις φυλλωσιές, οι συσχετισμοί χλωροφύλλης, καροτενοειδών και ανθοκυανινών, χαρίζουν απλόχερα το παιχνιδίσμα των χρωμάτων. Ακόμα κι αν πολλά πάνε στραβά στη ζωή μας, σαν τη Σκάρλετ Ο' Χάρα ξέρουμε, ότι κάθε «αύριο ξημερώνει μια καινούργια μέρα». Γιατί όπως μας θυμίζει η Άλμα, «Η ζωή είναι γεμάτη από μικρές ευτυχισμένες στιγμές, όχι μεγάλες και σπουδαίες, αλλά μικρές και βολικές. Έτσι μπορούμε να συνεχίσουμε το δρόμο μας».

Αγαπητοί συνάδελφοι, καλή συνέχεια σε όλους,

\* Όσα παίρνει ο άνεμος ταινία του 1939, σκηνοθεσία Victor Fleming, βασισμένη στο βιβλίο της Margaret Mitchell, *Gone with the Wind*.

\*\**Tennessee Williams. Καλοκαίρι και καταχνιά (1948).*

## Συντακτική Επιτροπή

---

Α. ΓΡΗΓΟΡΑΤΟΥ

Ε. ΚΩΝΣΤΑ

Α. ΜΕΛΠΙΔΟΥ

Μ. ΣΤΑΜΟΥΛΗ

Ανδριανή Γρηγοράτου



WWW.LM4MS.ORG

**LABORATORY  
MEDICINE FOR  
MOBILE SOCIETIES  
IN OUR AREA**

**2 — 5 OCTOBER 2022**  
Aquila - Atlantis Hotel, Heraklion, Crete, Greece

**LM4MS**  
SECOND AFCB – EFLM CONFERENCE

Co-organized with the 20<sup>th</sup> GSCC-CB annual Congress and XXIX BCLF annual meeting

UNDER THE AUSPICES OF:   ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
UNIVERSITY OF CRETE

 ARAB FEDERATION OF CLINICAL BIOLOGY  
AFCB  
 EFLM  
EUROPEAN FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY  
AND LABORATORY MEDICINE

 BCLF  GSCC-CB  
GREEK SOCIETY OF CLINICAL CHEMISTRY  
CLINICAL BIOCHEMISTRY

## SECOND AFCB – EFLM CONFERENCE “LABORATORY MEDICINE FOR MOBILE SOCIETIES IN THE MEDITERRANEAN AREA”

Co-organized with the 20<sup>th</sup> GSCC-CB annual Congress and XXIX BCLF annual meeting

*A Joint initiative of GSCC-CB, BCLF, AFCB, EFLM and the University of Crete under the auspices of IFCC*

***Date: 2 - 5 October 2022***

**President of the Conference: Dr. Konstantinos Makris**

**Venue: Aquila - Atlantis Hotel, Heraklion, Crete, Greece.**

## ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ miR-143/145 ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΣΤΟΝ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ

Κατερίνα-Μαρίνα Πιλάλα<sup>1</sup>, Μαρία-Αλεξάνδρα Παπαδημητρίου<sup>1</sup>, Κωνσταντίνα Πανουτσοπούλου<sup>1</sup>, Πέτρος Μπαρμπαρίγος<sup>1</sup>, Παναγιώτης Λεβής<sup>2</sup>, Γεώργιος Κοτρονόπουλος<sup>2</sup>, Κωνσταντίνος Στραβοδήμος<sup>2</sup>, Ανδρέας Σκορίλας<sup>1</sup>, Μαργαρίτης Αυγέρης<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

<sup>2</sup> Α' Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γεν. Νοσ. «Λαϊκό», Αθήνα, Ελλάδα

<sup>3</sup> Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας – Μοριακής Διαγνωστικής, Β' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γεν. Νοσ. Παίδων «Π.&Α. Κυριακού», Αθήνα, Ελλάδα.

e-mail: [margaritis.avgeris@gmail.com](mailto:margaritis.avgeris@gmail.com); [mavgeris@med.uoa.gr](mailto:mavgeris@med.uoa.gr)

### Εισαγωγή

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως (Bladder Cancer, BlCa) αποτελεί την 2η πιο συχνά διαγνωσμένη κακοήθεια του ανδρικού ουρογεννητικού συστήματος -μετά τον καρκίνο του προστάτη- καθώς επίσης και την 6η πιο κοινή μορφή καρκίνου στους άνδρες, παγκοσμίως [1, 2]. Ο επιπολασμός της νόσου είναι υψηλότερος στους άνδρες, ενώ η συχνότητα διάγνωσής της αυξάνει με την ηλικία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η Ελλάδα εμφανίζει το υψηλότερο δείκτης επίπτωσης της νόσου παγκοσμίως [1]. Η συντριπτική πλειοψηφία των όγκων της ουροδόχου κύστεως ξεκινά από τη σιβάδα του μεταβατικού επιθηλίου (ουροθηλιακό καρκίνωμα, >90%), οι οποίοι ταξινομούνται περαιτέρω βάσει της διήθησης του εξωστήρα μυός σε μη-μυοδιηθητικό (Non-muscle Invasive Bladder Cancer, NMIBC) και μυοδιηθητικό (Muscle Invasive Bladder Cancer, MIBC) καρκίνο της ουροδόχου κύστεως [3, 4]. Οι ασθενείς με διαγνωσμένα πρωτοπαθές NMIBC συνιστούν το ~75% των νέων περιπτώσεων και χαρακτηρίζονται από συχνές υποτροπές (~50-70%) και εξέλιξη σε υψηλότερα στάδια της νόσου (~15%) [5, 6], ενώ ο MIBC χαρακτηρίζεται από ισχυρό μεταστατικό δυναμικό και φτωχότερο προσδόκιμο επιβίωσης [7].

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστεως χαρακτηρίζεται από υψηλού βαθμού ετερογένειας των όγκων, τόσο σε μοριακό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο, αποτελώντας τροχοπέδη για την ακριβή πρόγνωση και την εξατομικευμένη θεραπεία των ασθενών [8-11]. Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς υποβάλλονται σε επεμβατικές θεραπείες (διουρηθρική ή ριζική κυστεκτομή), καθώς και σε δια βίου μεταθεραπευτική παρακολούθηση (lifelong follow-up), γεγονός που επιφέρει επιδείνωση στην ποιότητα ζωής τους και την ανάδειξη του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως ως την κακοήθεια με το μεγαλύτερο κόστος θεραπείας ανά ασθενή για τα συστήματα υγείας [12]. Στο πλαίσιο αυτό, η ταυτοποίηση και αξιοποίηση νέων μοριακών δεικτών, για την βελτίωση της εξατομικευμένης πρόγνωσης και της υποστήριξη σύγχρονης ιατρικής ακριβείας, εμφανίζει έντονο κλινικό ενδιαφέρον.

Τα miRNAs (miRNAs) είναι ενδογενή μονόκλινα μη-κωδικά μόρια RNA, μήκους ~22 νουκλεοτιδίων, τα οποία ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των μικρών μη-κωδικών μορίων RNA (small non-coding RNAs, sncRNAs) [13]. Τα miRNAs αποτελούν τους σημαντικότερους ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, επάγοντας την αποσιώπηση γονιδίων-στόχων μέσω μερικής ή και πλήρους συμπληρωματικότητας με την 3'-αμετάφραστης περιοχής (3'-UTR) των mRNA [14]. Ως αποτέλεσμα, τα miRNAs συμμετέχουν στην ρύθμιση πλήθους βιολογικών διαδικασιών, επιδεικνύοντας ογκοκατασταλτική ή ογκογονική δράση βάσει της επίδρασής τους στην κυτταρική εξαλλαγή και την ομοιόσταση [15]. Τα miR-143 και miR-145 μεταγράφονται από το δυσιστρικό σύμπλεγμα (gene cluster) *MIR143/145* στην 5q32 χρωμοσωμική περιοχή [16], και θεωρούνται μόρια με ογκοκατασταλτική δράση, καθώς στοχεύουν γνωστά ογκογονίδια, συμπεριλαμβανομένων των *KRAS*, *MYC*, *AKT*, *IGF1R* και *IRS1/2* [17]. Τα επίπεδα έκφρασης των miR-143/145 είναι συχνά απορρυθμισμένα στις ανθρώπινες νεοπλασίες, όπως στον καρκίνο του μαστού [18], του προστάτη [19], του νεφρού [20] και στον ορθοκολικό καρκίνο [21], συμμετέχοντας στην καρκινογένεση και την εξέλιξη της νόσου. Πιο συγκεκριμένα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας έχουν αναδείξει ότι miR-143/145 σύμπλεγμα υποεκφράζεται στους όγκους σε σχέση με το φυσιολογικό ουροθήλιο, ενώ τα αυξημένα επίπεδά του σχετίζονται με επιθετικό φαινότυπο της νόσου, με αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης των επιθηλιακών όγκων σε διηθητικούς και με μειωμένες πιθανότητες επιβίωσης των ασθενών με μυοδιηθητική μορφή της νόσου [22].

**Σκοπός**, της εν λόγω εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου και της κλινικής σημασίας της μεθυλίωσης του *MIR143/145* στον καρκίνο της ουροδόχου κύστεως.

## Υλικά-Μέθοδοι

### Βιολογικό υλικό

Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας αξιοποιήθηκαν συνολικά 162 ιστοτεμάχια όγκων ουροδόχου κύστεως. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην Α' Πανεπιστημιακή Ουρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό». Οι ασθενείς με NMIBC (T<sub>a</sub>, T<sub>1</sub>) υποβλήθηκαν σε διουρηθρική κυστεκτομή, ενώ το σύνολο των ασθενών με MIBC (T<sub>2</sub>-T<sub>4</sub>) υπεβλήθη σε ριζική κυστεκτομή. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν μέχρι την επεξεργασία τους στους -80 °C.

### Ομογενοποίηση ιστών-Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

Η ομογενοποίηση των ιστοτεμαχίων όγκων ουροδόχου κύστεως (40-100 mg) και η απομόνωση ολικού RNA και γενωμικού DNA (gDNA) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση TRI-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA). Το ολικό RNA διαλυτοποιήθηκε σε RNA Storage Solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) και το gDNA σε διάλυμα NaOH 8 mM, pH 8.6. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά.

### Πολυαδενυλίωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή

Αρχικά πραγματοποιήθηκε 3'-πολυαδενυλίωση 1 μg ολικού RNA σε τελικό όγκο αντίδρασης 10 μL, εμπιέροντας 800 μM ATP και 1 U *E. coli* poly (A) polymerase (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 60 min, ενώ η απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65 °C για 10 min.

Το 3'-πολυαδενυλιωμένο RNA υποβλήθηκε σε αντίστροφη μεταγραφή, κάνοντας χρήση ενός oligo-dT προσαρμογέα (adapter), σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μL, περιέχοντας 50 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), 40 U RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen), 500 μM dNTPs mix και 0.25 μM oligo-dT adapter. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37 °C για 60 min, για να ακολουθήσει θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου στους 70 °C για 15 min.

### **Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time qPCR)**

Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων των miR-143-3p και miR-145-5p αναπτύχθηκαν ειδικά πρωτόκολλα qPCR, με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I. Στο πλαίσιο αυτό, σχεδιαστήκαν ειδικοί πρόσθιοι εκκινητές για τα miR-143-3p, miR-145-5p και RNU48 (SNORD48), βάσει των δημοσιευμένων αλληλουχιών τους (NCBI Reference Sequence: NR\_029684.1, NR\_029686.1 και NR\_002745.1, αντίστοιχα) και *in silico* ανάλυσης, ενώ χρησιμοποιήθηκε ένας κοινός ανάστροφος εκκινητής συμπληρωματικός στον oligo-dT adapter.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) κυκλοποιητή, σε τελικό όγκο 10 µL περιλαμβάνοντας Kapa SYBR® Fast Universal 2X qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA), 200 nM πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή και 0.2 ng cDNA υποστρώματος. Το θερμικό πρωτόκολλο των αντιδράσεων αποτελείται από: α) 95°C για 3 min, β) 95 °C για 15 sec και 60 °C για 1 min για 40 κύκλους. Η αξιολόγηση της μοναδικότητας των προϊόντων πραγματοποιήθηκε μέσω καμπυλών τήξης και ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η ανάλυση έκφρασης των miR-143-3p και miR-145-5p διεξήχθη με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης 2- $\Delta\Delta C_T$ . Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το RNU48 (SNORD48).

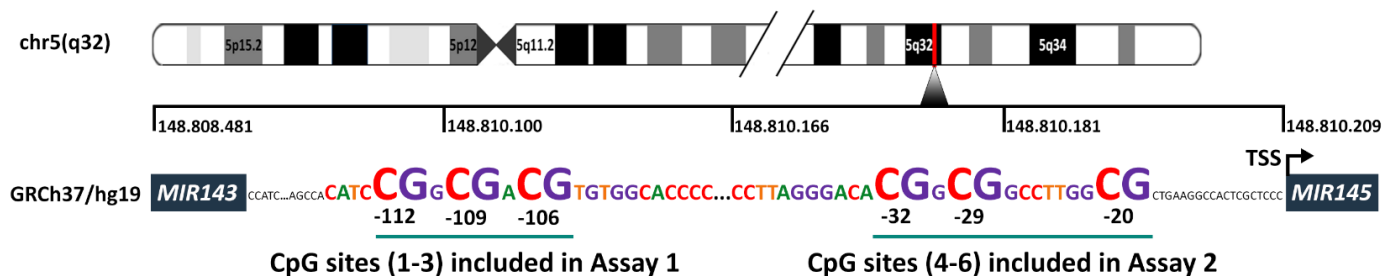
### **Επώαση gDNA με όξινο θειώδες νάτριο (bisulfite treatment)**

Η μετατροπή των μη μεθυλιωμένων καταλοίπων κυτοσίνης (C) σε ουρακίλη (U) πραγματοποιήθηκε με το EpiMark Bisulfite Conversion Kit (New England Biolabs). Πιο συγκεκριμένα, 1.5 µg gDNA επώαστηκε με διάλυμα όξινου θειώδους νατρίου (sodium bisulfite mix) υπό το θερμικό πρωτόκολλο: 95 °C για 5 min, 65 °C για 30 min, 95 °C για 5 min, 65 °C για 60 min, 95 °C για 5 min και 65 °C για 90 min. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε αντίδραση αποσουλφούρωσης (desulphonation), καθαρίστηκαν και εκλούστηκαν σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες της εταιρείας.

### **Ενίσχυση του τροποποιημένου gDNA με PCR**

Αναπτύχθηκαν δύο PCR πρωτόκολλα (assays) για τη μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης σε δύο διακριτές περιοχές του υποκινητή του *MIR145* (1 και 2), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Το bisulfite-treated gDNA χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την ενίσχυση και παραγωγή των προς αλληλούχηση προϊόντων. Ειδικοί εκκινητές σχεδιάστηκαν

αξιοποιώντας τη δημοσιευμένη αλληλουχία του *MIR145* (NCBI Reference Sequence: NC\_000005.9) και με τη χρήση του PyroMark Assay Design 2.0 Software (Qiagen, Manchester, UK). Ο ανάστροφος εκκινητής -και στα δύο assays- ήταν βιοτινυλιωμένος στο 5'-άκρο του.



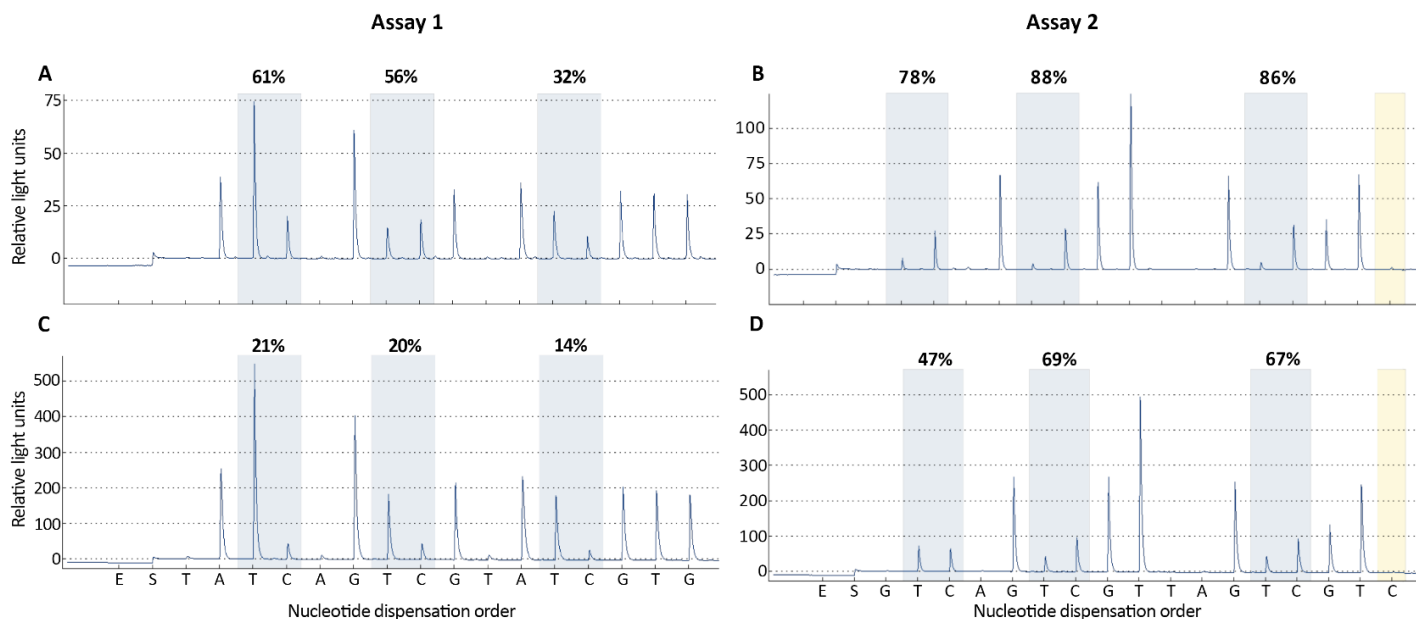
**Εικόνα 1.** Οι προς μελέτη CpG θέσεις στον γενετικό τόπο *MIR143/145*.

Κάθε PCR αντίδραση διεξήχθη σε τελικό όγκο 25  $\mu$ L περιλαμβάνοντας 1.5  $\mu$ L bisulfite-treated DNA, 200  $\mu$ M dNTPs mix, 400 nM εκκινητή και 1 U EpiMark Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs). Το θερμικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε αποτελείται από: α) 95  $^{\circ}$ C για 30 sec, β) 95  $^{\circ}$ C για 15 sec, 55  $^{\circ}$ C (assay 1) ή 56  $^{\circ}$ C (assay 2) για 30 sec και 68  $^{\circ}$ C για 1 min για 40 κύκλους και γ) 68  $^{\circ}$ C για 5 min. Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για την αξιολόγηση των ενισχυμένων προς αλληλούχηση προϊόντων, καθώς και της απουσίας μη ειδικών προϊόντων και/ή διμερή εκκινητών.

### Μελέτη μεθυλίωσης με πυροαλληλούχηση

Τα βιοτινυλιωμένα PCR προϊόντα (18  $\mu$ L) αναμιγνύονται με 20  $\mu$ L Binding Buffer (Qiagen) και 2  $\mu$ L σφαιρίδια σεφαρόζης -επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη- (GE Healthcare, Chicago, USA) και ανακινώνται στα 1200 rpm για 20 min. Με τη χρήση της PyroMark Q24 (Qiagen) πλατφόρμας και τις κατευθυντήριες οδηγίες του κατασκευαστή, τα ακινητοποιημένα προς αλληλούχηση προϊόντα καθαρίζονται και αποδιατάσσονται, έτσι ώστε τα ακινητοποιημένα μονόκλιωνα μόρια DNA αναμιγνύονται με 0.3  $\mu$ M εκκινητή αλληλούχησης σε Annealing buffer (Qiagen). Ακολουθεί θέρμανση για 2 min στους 80  $^{\circ}$ C και επώαση στους 25  $^{\circ}$ C για 7 min για την υβριδοποίηση των εκκινητών αλληλούχησης. Για την ανάλυση μεθυλίωσης μέσω πυροαλληλούχησης έγινε χρήση των PyroMark Gold Q24 (Qiagen)

αντιδραστηρίων και της PyroMark Q24 (Qiagen) πλατφόρμας αλληλούχησης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η % ποσοτικοποίηση μεθυλίωσης των προς μελέτη CpG θέσεων διεξήχθη με το λογισμικό PyroMark Q24 2.0 (Qiagen).



**Εικόνα 2.** Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα πυροαλληλούχησης NMIBC (A & B) και MIBC (C & D) όγκων.

### Βιοστατιστική ανάλυση

Η βιοστατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με λογισμικό IBM SPSS Statistics 20 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Η ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης των προς μελέτη CpG θέσεων στον υποκινητή του *MIR145* συναρτήσει των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών -διήθηση του εξωστήρα μύος της κύστης (NMIBC και MIBC), το παθολογικό στάδιο του όγκου (tumor stage) και το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου (Grade)- έγινε με τη χρήση των μη παραμετρικών δοκιμασιών Mann-Whitney *U* test και Kruskal-Wallis test. Η ανάλυση επιβίωσης των ασθενών διεξήχθη με την κατασκευή καμπυλών επιβίωσης κατά Kaplan-Meier, όπου ελέγχθηκαν η ολική

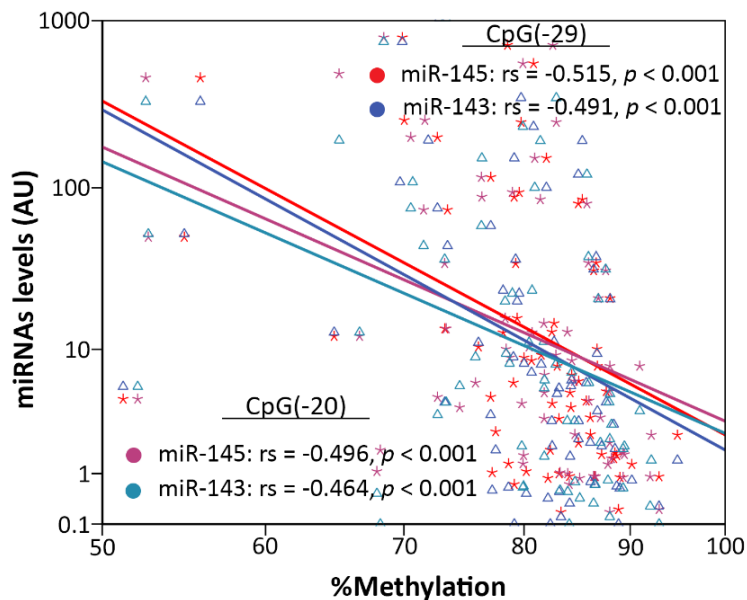


επιβίωση των ασθενών και η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου, καθώς επίσης και με τη μονομεταβλητή ανάλυση κατά Cox.

## Αποτελέσματα

### Επιγενετικός έλεγχος του miR-143/145 συμπλέγματος

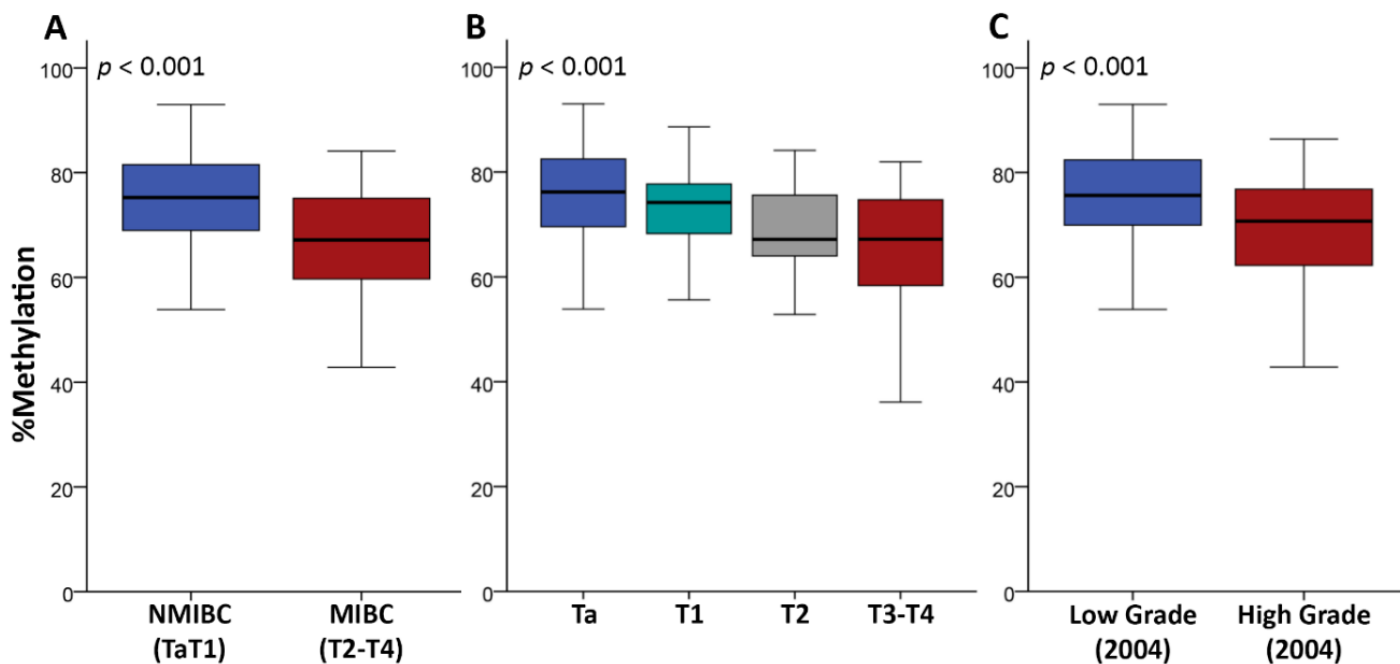
Η ανάλυση μεθυλίωσης ανέδειξε ότι οι θέσεις CpG (-29) και (-20) αναρροϊκά του σημείου έναρξης της μεταγραφής (transcription start site – TSS) του *MIR145* παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη μέση τιμή μεθυλίωσης,  $78,3\% \pm 0,9$  (εύρος: 7,2–94,9%) και  $77,3\% \pm 0,9$  (εύρος: 8,1–92,9%), αντίστοιχα, σε σχέση με τις υπόλοιπες τέσσερις CpG θέσεις που μελετήθηκαν. Σύμφωνα με τον συντελεστή συσχέτισης κατά Spearman, τα επίπεδα έκφρασης των miR-143/145 εμφάνισαν αρνητική συσχέτιση με το σύνολο των CpG θέσεων στόχων, και σημαντικά ισχυρότερη για τις θέσεις -20 και -29 αναρροϊκά του TSS του *MIR145* ( $r_s = -0,515, p < 0,001$  και  $r_s = -0,496, p < 0,001$ , αντίστοιχα) (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3.** Συσχέτιση κατά Spearman των επιπέδων έκφρασης των miR-143/145 και των επιπέδων μεθυλίωσης των θέσεων CpG (-20) και (-29) αναρροϊκά του TSS του *MIR145*.

## Μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του *MIR145* σχετίζονται με επιθετικό φαινότυπο του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως

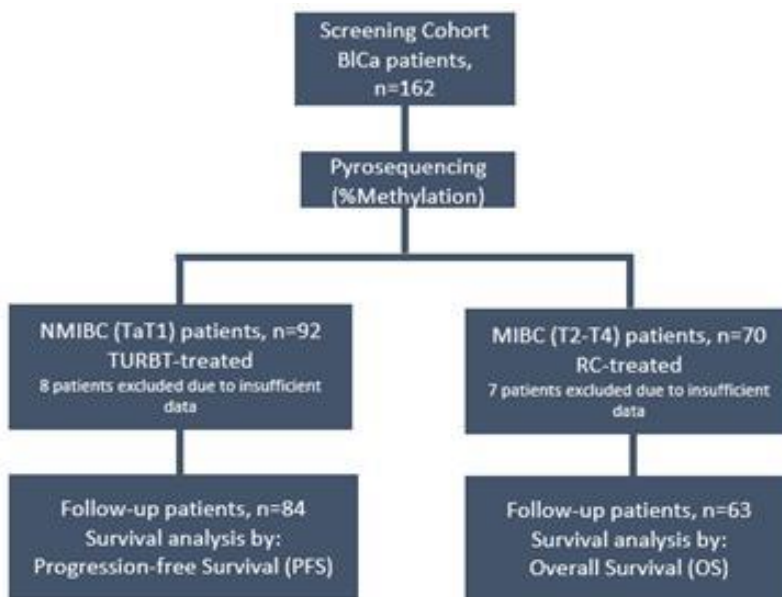
Σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, όπου η έκφραση των miR-143/145 σχετίστηκε με δυσμενή κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου και κακή πρόγνωση των ασθενών, τα μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του *MIR145* συσχετίστηκαν με όγκους υψηλότερου παθολογοανατομικού σταδίου και βαθμού κακοήθειας (grade). Πιο συγκεκριμένα, μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG καταλοίπων του *MIR145* υποκινητή συσχετίστηκαν με μυοδιηθητικούς όγκους ( $p < 0,001$ ), όγκους προχωρημένου σταδίου ( $p < 0,001$ ) και βαθμού κακοήθειας ( $p < 0,001$ ) συγκριτικά με επιφανειακούς και χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκους (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG θέσεων του εγγύς υποκινητή του *MIR145* με NMIBC και MIBC (A), το στάδιο (B) και το βαθμού κακοήθειας (C) των όγκων.

### Κλινική αξιολόγηση των επιπέδων μεθυλίωσης στον υποκινητή του *MIR145*

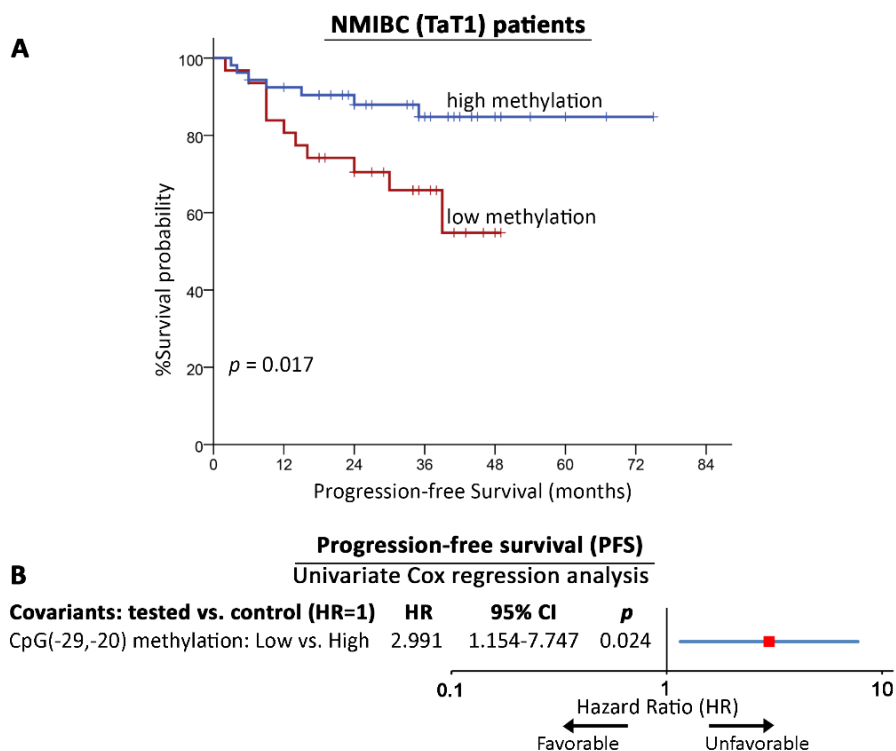
Λαμβάνοντας υπ' όψιν την διαφορετική έκβαση της νόσου, η ανάλυση επιβίωσης πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για τους NMIBC και MIBC ασθενείς, χρησιμοποιώντας την εξέλιξη της νόσου (Progression-free Survival, PFS), και την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) των ασθενών ως κλινικές μεταβλητές, αντίστοιχα. Στο πλαίσιο αυτό, 153 ασθενείς (NMIBC: 87 και MIBC: 66) συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση επιβίωσης, ενώ 9 ασθενείς εξαιρέθηκαν λόγω μη επαρκών δεδομένων παρακολούθησης (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5.** Διάγραμμα ροής μελέτης.

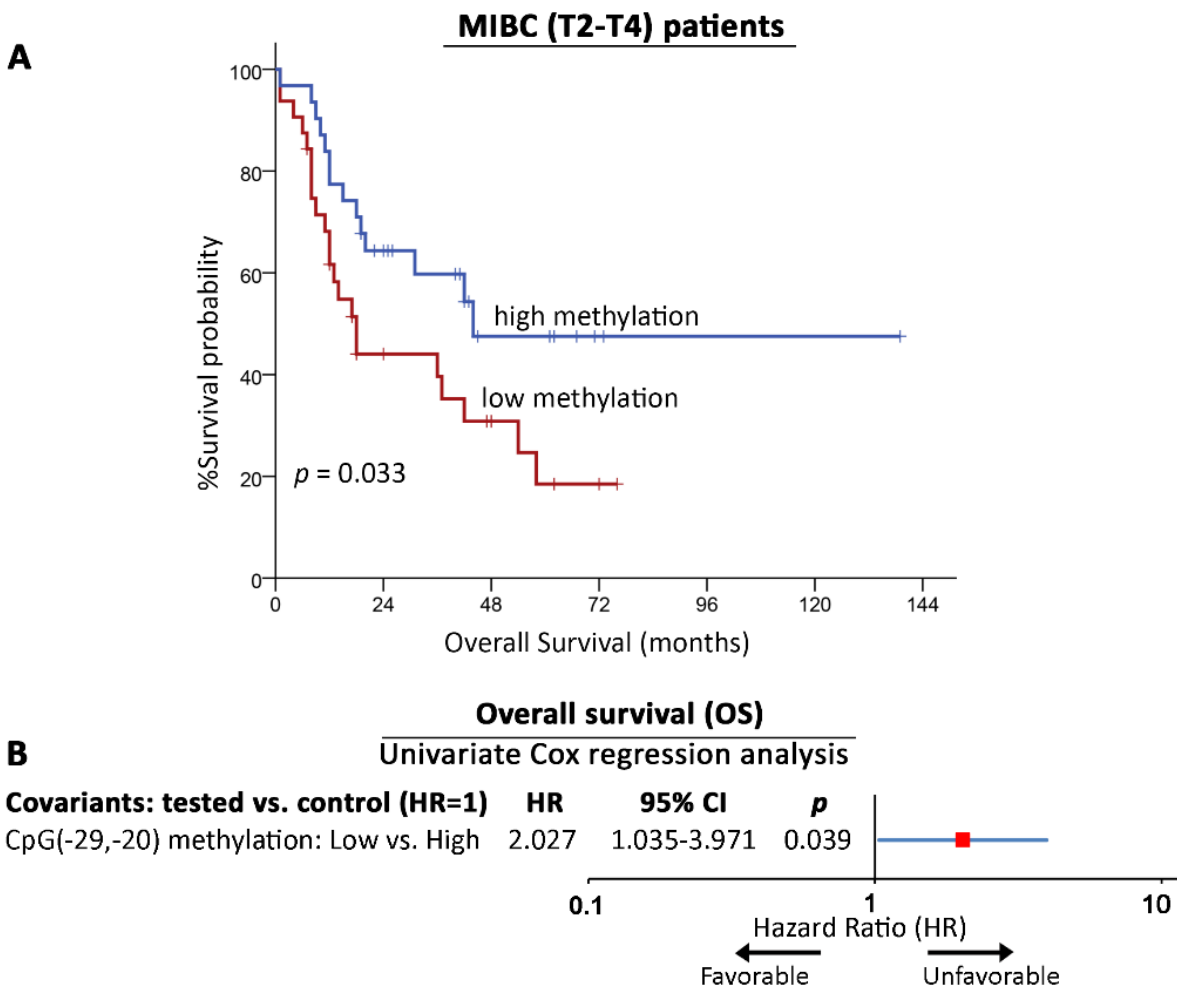
Οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier ανέδειξαν τον σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο εξέλιξης σε διηθητική νόσο των TaT1 ασθενών με μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG(-29) και CpG(-20) στον υποκινητή του *MIR145* ( $p=0,017$ ) (Εικόνα 6A).

Επιπρόσθετα, η μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox επιβεβαίωσε τον σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο (Cox: HR=2,991, 95% CI: 1,154–7,747,  $p=0,024$ ) βραχυπρόθεσμης εξέλιξης της νόσου των NMIBC ασθενών με υπομεθυλωμένες τις CpG(-29) και CpG(-20) θέσεις του *MIR145* υποκινητή (Εικόνα 6B).



**Εικόνα 6:** Καμπύλες Kaplan-Meier (A) και μονομεταβλητή ανάλυση κατά Cox (B) για τους NMIBC.

Όσον αφορά τους ασθενείς με μυοδιηθητική νόσο, οι καμπύλες επιβίωσης κατά Kaplan-Meier ανέδειξαν την φτωχότερη επιβίωση ( $p=0,033$ ) των T2-T4 ασθενών με μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG(-29) και CpG(-20) θέσεων, έπειτα από τη ριζική κυστεκτομή (Εικόνα 7A). Επίσης, η μονομεταβλητή ανάλυση κατά Cox επιβεβαίωσε την χειρότερη ολική επιβίωση (Cox: HR=2,027, 95% CI: 1,035–3,971,  $p=0,039$ ) των MIBC ασθενών με υπομεθυλωμένες τις CpG θέσεις του εγγύς *MIR145* υποκινητή (Εικόνα 7B).



**Εικόνα 7:** Καμπύλες Kaplan-Meier (A) και μονομεταβλητή ανάλυση κατά Cox (B) για τους MIBC.

### Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε και αξιολογήσαμε το ρόλο και την κλινική αξία του μοτίβου μεθυλίωσης στον υποκινητή του *MIR143/145* γονιδιακού συμπλέγματος σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Η μελέτη ανέδειξε τον επιγενετικό έλεγχο της έκφρασης των miR-143/145 μέσω της μεθυλίωσης των θέσεων CpG(-29) και (-20) αναρροϊκά του TSS του *MIR145*. Επιπλέον, τα μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης του εγγύς υποκινητή του *MIR145*

συσχετίσθηκαν ισχυρά με μυοδιηθητικούς όγκους και όγκους προχωρημένου σταδίου και αυξημένου βαθμού κακοήθειας. Τέλος, NMIBC και MIBC ασθενείς με μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG(-29) και CpG(-20) θέσεων εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο για δυσμενή μετα-θεραπευτική εξέλιξη της νόσου και επιβίωση, αντίστοιχα.

### Ευχαριστίες

Η έρευνα υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνεΚ) (κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ-02196) στο ΕΚΠΑ (ΚΕ17358).

### Βιβλιογραφία

1. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
2. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2020*. CA Cancer J Clin, 2020. **70**(1): p. 7-30.
3. Sanli, O., et al., *Bladder cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17022.
4. Prasad, S.M., et al., *Urothelial carcinoma of the bladder: definition, treatment and future efforts*. Nat Rev Urol, 2011. **8**(11): p. 631-42.
5. Babjuk, M., et al., *EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016*. Eur Urol, 2017. **71**(3): p. 447-461.
6. van Rhijn, B.W., et al., *Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy*. Eur Urol, 2009. **56**(3): p. 430-42.
7. Alfred Witjes, J., et al., *Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer*. Eur Urol, 2017. **71**(3): p. 462-475.
8. Jordan, B. and J.J. Meeks, *T1 bladder cancer: current considerations for diagnosis and management*. Nat Rev Urol, 2019. **16**(1): p. 23-34.

9. Soukup, V., et al., *Risk Stratification Tools and Prognostic Models in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Critical Assessment from the European Association of Urology Non-muscle-invasive Bladder Cancer Guidelines Panel*. Eur Urol Focus, 2020. **6**(3): p. 479-489.
10. Knowles, M.A. and C.D. Hurst, *Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 25-41.
11. Meeks, J.J. and S.P. Lerner, *Molecular Landscape of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer*. Cancer Cell, 2017. **32**(5): p. 550-551.
12. Bhanvadia, S.K., *Bladder Cancer Survivorship*. Curr Urol Rep, 2018. **19**(12): p. 111.
13. Grosshans, H. and W. Filipowicz, *Molecular biology: the expanding world of small RNAs*. Nature, 2008. **451**(7177): p. 414-6.
14. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
15. Croce, C.M., *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(10): p. 704-14.
16. Poli, V., L. Secli, and L. Avalle, *The MicroRNA-143/145 Cluster in Tumors: A Matter of Where and When*. Cancers (Basel), 2020. **12**(3).
17. Das, A.V. and R.M. Pillai, *Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis*. Cancer Cell Int, 2015. **15**: p. 92.
18. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
19. Avgeris, M., et al., *The loss of the tumour-suppressor miR-145 results in the shorter disease-free survival of prostate cancer patients*. Br J Cancer, 2013. **108**(12): p. 2573-81.
20. Wach, S., et al., *MicroRNA profiles classify papillary renal cell carcinoma subtypes*. Br J Cancer, 2013. **109**(3): p. 714-22.
21. Akao, Y., et al., *Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors*. Cancer Gene Ther, 2010. **17**(6): p. 398-408.
22. Avgeris, M., et al., *Uncovering the clinical utility of miR-143, miR-145 and miR-224 for predicting the survival of bladder cancer patients following treatment*. Carcinogenesis, 2015. **36**(5): p. 528-37. **15. 36**(5): p. 528-37.

## **ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΣΕ ΑΛΙΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΤΑ ΤΟ ΕΝΔΟΚΟΙΝΟΤΙΚΟ ΕΜΠΟΡΙΟ ΚΑΙ ΤΙΣ ΕΙΣΑΓΩΓΕΣ ΑΠΟ ΤΡΙΤΕΣ ΧΩΡΕΣ. ΑΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΔΟ ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2020-ΙΟΥΝΙΟΣ 2022.**

**Κορού Λασκαρίνα Μαρία, Ρίζου Στέλλα**

**Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Περιφερειακής Ενότητας Πειραιά**

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Οι διατροφικοί κίνδυνοι στα αλιευτικά προϊόντα διαχωρίζονται, ανάλογα με τη φύση τους, σε κινδύνους βιολογικούς (βακτήρια, ιοί, παράσιτα), χημικούς (αλλεργιογόνοι παράγοντες, τοξίνες, προστιθέμενες χημικές ύλες) ή φυσικούς (ξένα σώματα) ή αφορούν τη γενικότερη κατάσταση υγιεινής του προϊόντος. Το Σύστημα Έγκαιρης Προειδοποίησης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (RASFF, RapidAlert System for Food and Feed) είναι ένα αποτελεσματικό μέσο ανταλλαγής πληροφοριών μεταξύ των αρχών ελέγχου των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα μέτρα τα οποία πρέπει να ληφθούν ώστε να διασφαλισθεί η ασφάλεια των τροφίμων. Μέσω του συστήματος RASFF εξασφαλίζεται η ταχεία ενημέρωση όλων των κρατών μελών ώστε να αποφευχθούν οκίνδυνοι για την ασφάλεια των τροφίμων που μπορούν να βλάψουν την υγεία του καταναλωτή.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η παρουσίαση των διατροφικών κινδύνων που ανακοινώθηκαν μέσω του συστήματος RASFF την περίοδο από 01.01.2020 έως και 30.06.2022 κατά το ενδοκοινοτικό εμπόριο και τις εισαγωγές από Τρίτες Χώρες ιχθύων, κεφαλόποδων και διθύρων μαλακίων και αφορούσαν τόσο την χώρα μας όσο και τα υπόλοιπα κράτη μέλη.

Η αξιολόγηση της συχνότητας εμφάνισης των παραπάνω κινδύνων μπορεί να οδηγήσει σε συμπεράσματα τα οποία θα συντελέσουν στον ορθότερο προγραμματισμό των ελέγχων τόσο στα εισαγόμενα όσο και στα εγχώρια αλιευτικά προϊόντα, ενώ παράλληλα θα συμβάλλει στην βελτίωση των συνθηκών παραγωγής, επεξεργασίας και διακίνησης των προϊόντων αυτών με στόχο την αποφυγή ενδεχόμενων διατροφικών κρίσεων.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ιχθύες και τα λοιπά αλιευτικά προϊόντα αποτελούν προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας και ένα εξαιρετικό υποκατάστατο του κρέατος εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνη. Αξίζει να σημειωθεί η κατανάλωση 100g σάρκας ιχθύος παρέχει στον άνθρωπο το 1/3 ή το 1/2 των καθημερινών αναγκών του σε ζωϊκή πρωτεΐνη. Τα ιχθυηρά είναι επιπρόσθετα ιδιαίτερης θρεπτικής αξίας δεδομένης της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, και ειδικότερα σε ω-3 λιπαρά οξέα. Τα τελευταία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου και κυρίως για τις αισθήσεις της όρασης και της ακοής. Τέλος στα λιπαρά οξέα αυτά αποδίδονται υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες και σημαντική αντι-αθηροσκληρωτική δραστηριότητα (1, 2).

Παρά την απaráμιλλη θρεπτική τους αξία, η κατανάλωση ιχθύων και λοιπών αλιευτικών προϊόντων μπορεί να ελλοχεύει κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία λόγω της ύπαρξης παθογόνων μικροοργανισμών ή/και των τοξινών τους, παρασίτων, ενδογενών τοξινών ή της παρουσίας χημικών προσμείξεων σε αυτά(3).

Η κοινή πολιτική της Κοινότητας αναφορικά με θέματα δημόσιας υγείας οδήγησε στηνεντατικοποίηση των ελέγχων αναφορικά με την ασφάλεια των τροφίμων. Μέρος αυτής της πολιτικής αποτελεί και η δημιουργία του Κανονισμού 178/2002/ΕΚ ευρύτερα γνωστού ως

«Γενική νομοθεσία για τα τρόφιμα-General Food Law». Ο Κανονισμός αυτός περιγράφει μεταξύ άλλων την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA, European Food Safety Authority) η οποία είναι η ανεξάρτητη ευρωπαϊκή υπηρεσία για την ανάλυση των κινδύνων στον τομέα των τροφίμων. Επιπρόσθετα ο Κανονισμός αυτός θεσπίζει τη δημιουργία του Συστήματος Ταχείας Ανταλλαγής Πληροφοριών για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (RASFF). Με γνώμονα το σύστημα αυτό, ταΚράτη Μέλη υποχρεούνται μέσω των εθνικών σημείων επαφής τους για το σύστημα και σε συνεργασία με τις εμπλεκόμενες αρμόδιες κτηνιατρικές και λοιπές αρχές, να ενημερώνουν τηνΚοινότητα για οποιαδήποτε μέτρα έχουν ληφθεί σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων, όπως ανακλήσεις από την αγορά τροφίμων ή παρεμπόδιση εισόδου στην κοινότητα προϊόντωνπροέλευσης Τρίτων Χωρών που δεν συμβαδίζουν με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Νομοθεσίας για την ασφάλεια των τροφίμων (4). Όταν ένα μέλος του δικτύου διαθέτει οποιαδήποτε πληροφορία σχετικά με την ύπαρξη σοβαρού άμεσου ή έμμεσου κινδύνου για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων, που προέρχεται από τρόφιμα ή ζωοτροφές, κοινοποιεί αμέσως την πληροφορία αυτή στην Επιτροπή, μέσω του

συστήματος έγκαιρης προειδοποίησης. Η Επιτροπή διαβιβάζει αμέσως την εν λόγω πληροφορία στα μέλη του δικτύου.

## Κατηγορίες κινδύνων στα ιχθυηρά και τα λοιπά αλιευτικά προϊόντα Βιολογικοί κίνδυνοι

### I. Βακτήρια

Όσον αφορά τους, ιχθύες οι μύες και τα εσωτερικά όργανά τους είναι ελεύθερα μικροοργανισμών. Μετά το θάνατό τους εξαιτίας της απώλειας της συνεκτικότητας του μυϊκού ιστού διευκολύνεται η διόδος βακτηρίων από την επιφάνεια του δέρματος και το πεπτικό σύστημα των ιχθύων, στον μυϊκό ιστό τους. Η μικροβιολογική ποιότητα των ιχθύων όταν αυτοί αλιευθούν εξαρτάται τόσο από την περιεκτικότητα του γαστρεντερικού συστήματός τους όσο και από την μέθοδο με την οποία εξαλιεύθηκαν. Η καταστροφή του δέρματος των ιχθύων έχει ως συνέπεια την αύξηση της επιμόλυνσης των μυών τους. Τα βακτήρια που μπορούν να απειλήσουν την υγεία των ανθρώπου εξαιτίας της κατανάλωσης μολυσμένων ιχθύων διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες (5-7).

1 <sup>η</sup> κατηγορία	2 <sup>η</sup> κατηγορία	3 <sup>η</sup> κατηγορία
βακτήρια που φυσιολογικά αναπτύσσονται σε υδρόβιο περιβάλλον	βακτήρια η παρουσία των οποίων οφείλεται στην επιμόλυνση των ιχθυηρών με ανθρώπινα και ζωικά απόβλητα	βακτήρια που επιμολύνουν τα ιχθυηρά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής ή της μεταποίησής του
<i>Vibrio Parahaemolyticus</i>	<i>Salmonella</i> spp.,	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Shigella</i> spp	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Cambylobacter</i> spp	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	

**Πίνακας 1. Κατηγορίες παθογόνων βακτηρίων σε αλιευτικά προϊόντα**

Οι συνήθεις τρόποι μαγειρέματος περιορίζουν τον κίνδυνο που προκύπτει έπειτα από κατανάλωση μολυσμένων αλιευτικών προϊόντων από τον άνθρωπο ενώ η ανεπαρκής θερμική επεξεργασία τους, όπως και η κατανάλωσή τους ως ωμά (πχ σούσι) ελλοχεύει κινδύνους (1, 8).

Η κατανάλωση οστρακοειδών μπορεί να οδηγήσει σε τροφικές δηλητηριάσεις βακτηριακής αιτιολογίας προκαλούμενες από βακτήρια όπως τα *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* (9, 10) και *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. και *Escherichia coli* (6, 11).

Τέλος κεφαλόποδα, καρκινοειδή και μαλακόστρακα ευθύνονται για τροφοδηλητηριάσεις από *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* κλπ.

## II. Βιογενείς αμίνες - Ισταμίνη

Οι βιογενείς αμίνες αποτελούν πρωτογενείς αμίνες που παράγονται στους οργανισμούς σαν αποτέλεσμα της αφαίρεσης μια υδροξυλικής ομάδας από ένα μόριο αμινοξέος. Είναι απαραίτητες για την διατήρηση της κυτταρικής βιοσιμότητας και για την ορθή εύρυθμη των κυτταρικών λειτουργιών και επιπρόσθετα αποτελούν συστατικά των συνενζύμων.

Η ισταμίνη υπάρχει φυσιολογικά στα θηλαστικά και το βιολογικό της αποτέλεσμα φαίνεται όταν αυτή παράγεται σε μεγάλη ποσότητα όπως για παράδειγμα κατά τη διάρκεια αλλεργικών αντιδράσεων. Ποσότητα ισταμίνης σε ιχθύες μεγαλύτερη από 50mg/100 g συνδέεται με κατάσταση γνωστή ως δηλητηρίαση από σκομβροειδή ή δηλητηρίαση από ισταμίνη (12). Η δηλητηρίαση αυτή σχετίζεται με κατανάλωση ιχθύων της οικογένειας *Scombridae* όπως το σκουμπρί (13).

## III. Ιοί

Οι ιοί που σχετίζονται με αλιεύματα και ζώντα δίθυρα μαλάκια είναι οι καλυκοϊοί, οι αστροϊοί, οι ροταϊοί, οι αδενοϊοί, οι εντεροϊοί και ο ιός της ηπατίτιδας Α. Η λοίμωξη από τον ιό αυτό είναι η πιο σοβαρή ιογενής λοίμωξη που οφείλεται συνήθως σε κατανάλωση οστρακοειδών οδηγώντας στον θάνατο σε κάποιες περιπτώσεις (14). Η κατανάλωση ωμών ζώντων δίθυρων μαλακίων εγκυμονεί κίνδυνο λοίμωξης από νοροϊό (8).

#### IV. Τοξίνες

Οι ιχθύες όπως και τα δίθυρα μαλάκια είναι πολύ συχνά τοξικά εξαιτίας της απορρόφησης τοξινών που παράγονται από θαλάσσια μικροφύκη που αποικούν το ίδιο υδάτινο με αυτά περιβάλλον (15) (3, 16).

Σε αντίθεση με τα βακτήρια και τα παράσιτα οι τοξίνες είναι θερμοανθεκτικές και οι συνήθεις πρακτικές μαγειρέματος δεν οδηγούν στην αδρανοποίησή τους.

Οι θαλάσσιες τοξίνες είναι ουσίες οι οποίες είναι λιποδιαλυτές ή υδατοδιαλυτές και συνηθέστερα ταξινομούνται με βάση τα μακροσκοπικά συμπτώματα της τοξίκωσης που προκαλούν. Οι υδατοδιαλυτές τοξίνες είναι οι ακόλουθες: η παραλυτική τοξίνη των οστρακοειδών (PSP, paralytic shellfish poisoning), η τετροδοτοξίνη (TTX, tetrodotoxin) και η αμνησιακή τοξίνη των οστρακοειδών (ASP, amnesic shellfish poisoning). Η κατηγορία των λιποδιαλυτών τοξινών περιλαμβάνει την διαρροϊκή τοξίνη των οστρακοειδών (DSP, diarrhoeticshellfish poisoning), τη νευροτοξική τοξίνη των οστρακοειδών (NSP, neurotoxic shellfish poisoning) και την σιγκουατοξίνη (CFP, ciguatera fish poisoning) (10, 17).

#### V. Παράσιτα

Από τα κυριότερα παράσιτα που ανευρίσκονται σε ιχθύες, σύμφωνα με τα δεδομένα του συστήματος RASFF είναι αυτό του γένους *Anisakis spp.* Είναι ένα γένος παρασιτικών νηματόζων, στον κύκλο ζωής των οποίων περιλαμβάνονται τα ψάρια και τα θαλάσσια θηλαστικά. Ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί από την κατανάλωση ωμών ή ελαφρώς επεξεργασμένων ψαριών. Σε άτομα ευαίσθητα στην ανοσοσφαιρίνη E προκαλεί αναφυλακτικό σοκ (18, 19). Το παράσιτο αυτό διαπερνά τα εντερικά τοιχώματα του ψαριού, με ένα μηχανισμό ο οποίος δεν είναι απολύτως γνωστός, αλλά μάλλον δρουν κάποια ιστολυτικά ένζυμα και δημιουργούν πόρους διαμέσου των οποίων περνά το παράσιτο. Διάφορες έρευνες (20, 21) έχουν δείξει ότι ταιστολυτικά αυτά ένζυμα υπάρχουν με μορφή κοκκιωδών σωματιδίων που εκκρίνονται από τους εξωκρινείς αδένες του ώριμου παρασίτου και καταστρέφουν το ψάρι. Τα παράσιτα αυτά εντοπίζονται συνήθως στον εντερικό σωλήνα, στο μεσεντέριο λίπος και μεσεντέρια λεμφογάγγλια, στο στομάχι και στην πυλωρική μοίρα του γαστρεντερικού σωλήνα. Όμως, μπορούν να ανευρεθούν και στους μυς διαφόρων ψαριών, κυρίως του μπακαλιάρου (22-24).

## Χημικοί κίνδυνοι

Η εντατικοποιημένη βιομηχανική ανάπτυξη, η αστικοποίηση και η εισαγωγή της τεχνολογίας στον αγροτικό τομέα έχουν οδηγήσει στην αύξηση των τοξικών συστατικών που εντοπίζονται στα διάφορα υδρόβια οικοσυστήματα. Επίσης, οι διάφοροι τοξικοί μεταβολίτες είναι δυνατόν να φτάσουν σταυδρόβια οικοσυστήματα μέσω του αέρα, των βροχών, της ομίχλης και γενικά της μόλυνσης του περιβάλλοντος (3). Οι κυριότεροι χημικοί κίνδυνοι που εμφανίζονται στους θαλάσσιους οργανισμούς (ψάρια, δίθυρα μαλάκια κτλ.) σύμφωνα με το σύστημα RASFF περιγράφονται παρακάτω:

**Υδράργυρος:** Είναι το ανόργανο στοιχείο που συσσωρεύεται συχνότερα στη σάρκα των ψαριών. Με τη συνεργασία διαφόρων βακτηρίων ο υδράργυρος μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ιδιαίτερα τοξικών ουσιών. Τα ψάρια των θαλασσών έχει αναφερθεί ότι περιέχουν αυξημένα ίχνη της μεθυλιωμένης μορφής υδραργύρου σε σχέση με τα ψάρια τα οποία εκτρέφονται σε υδατοκαλλιέργειες (3).

Η μεθυλιωμένη μορφή του υδραργύρου είναι συνδεδεμένη συνήθως με πρωτεΐνες, ιδίως αυτές που περιέχουν διαθέσιμες θειομάδες. Επίσης, οι συγκεντρώσεις του υδραργύρου αυξάνονται και στη συνέχεια μειώνονται με γρηγορότερους ρυθμούς στα ψάρια που τρέφονται με πλαγκτόν παρά σε αυτά που τρέφονται με μικρότερα ψάρια, αλλά και στα δύο είδη οι συγκεντρώσεις υδραργύρου παραμένουν πάνω από τα φυσιολογικά όρια (25, 26). Ακόμη, τα επίπεδα υδραργύρου αυξάνονται με την αύξηση του μεγέθους του ψαριού. Συνήθως, τα μεγαλύτερα σε μέγεθος και ηλικία ψάρια έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ότι τα μικρότερα σε μέγεθος και ηλικία (27). Οι διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων υδραργύρου στα ψάρια των διαφόρων υδάτινων συστημάτων εξαιτίας των διαφορών όσο αφορά τη χημεία του νερού και τις συγκεντρώσεις του σε υδράργυρο σε αυτά (28).

**Κάδμιο:** Το κάδμιο είναι επίσης πολύ συχνά ανιχνεύσιμο σε ψάρια από διάφορα υδάτινα οικοσυστήματα, αν και οι συγκεντρώσεις του εξαρτώνται από περιβάλλον διαβίωσης τους (3). Από διάφορες έρευνες που έχουν γίνει σε δίθυρα μαλάκια, χρησιμοποιούμενα ως πειραματικά μοντέλα, έχει διαπιστωθεί μια αλληλεπίδραση μεταξύ των στοιχείων Κάδμιο και Ψευδάργυρο (29). Η έκθεση των δίθυρων μαλακίων σε περιβάλλον με αυξημένες συγκεντρώσεις του μη-απαραίτητου μετάλλου Καδμίου δεν έχει καμία επίδραση στη συσσώρευση του απαραίτητου μετάλλου Ψευδαργύρου στον οργανισμό των ψαριών, ενώ αντιθέτως η έκθεση τους σε περιβάλλον με αυξημένες συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου

μειώνει τη βιοσυσώρευση του Καδμίου στον οργανισμό τους (29). Ακόμη, μελέτες που έχουν γίνει σε πέστροφες (*Rainbow trout*) δείχνουν ότι έκθεση των ψαριών σε αυξημένες ποσότητες διατροφικού καδμίου αυξάνει τα ποσοστά θνησιμότητας (β) ή μειώνει τους ρυθμούς ανάπτυξης τους (Ng and Wood, 2008). Από την άλλη, υπάρχουν και ορισμένες μελέτες οι οποίες προτείνουν ότι οι συγκεντρώσεις του καδμίου δεν επηρεάζουν καθόλου το ποσοστά θνησιμότητας ούτε τους ρυθμούς ανάπτυξης των ψαριών(31, 32). Το ήπαρ είναι η κυριότερη αποθήκη καδμίου στα ψάρια όπου βρίσκονται τα μεγαλύτερα ποσοστά αυτού του στοιχείου μεταξύ των διαφόρων οργάνων του ψαριού (33).

### **Φυσικοί κίνδυνοι**

Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οποιοδήποτε ξένο με το τρόφιμο υλικό που δύναται να προξενήσει βλάβη. Τα ξένα σώματα που τυχόν υπάρχουν στα προϊόντα μπορεί να είναι μέταλλα, πέτρες, ξύλο, γυαλί, πλαστικά τεμάχια ή ρύποι προερχόμενοι από τον εξοπλισμό ή το προσωπικό που χειρίστηκε το προϊόν κατά τη διανομή ή την επεξεργασία του (34).

### **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ- ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η παρουσίαση των διατροφικών κινδύνων που ανακοινώθηκαν μέσω του συστήματος RASFF την χρονική περίοδο από 01.01.2020 έως και 30.06.2022 κατά το ενδοκοινοτικό εμπόριο και τις εισαγωγές από Τρίτες Χώρες, ιχθύων, κεφαλόποδων και διθύρων μαλακίων και αφορούσαν τόσο την χώρα μας όσο και τα υπόλοιπα κράτη μέλη. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων θα γίνει με τη χρήση πινάκων και γραφημάτων. Τα στοιχεία των κοινοποιήσεων εξήχθησαν από την ηλεκτρονική πλατφόρμα RASFF Window της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΤΥΠΟΣ ΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗΣ	2020		2021		01.01.2022-30.06.2022	
	Αριθμός Κοινοποιήσεων	Ποσοστό επί του συνόλου	Αριθμός Κοινοποιήσεων	Ποσοστό επί του συνόλου	Αριθμός Κοινοποιήσεων	Ποσοστό επί του συνόλου
ALERT NOTIFICATION	122	33.34%	92	23.77%	37	23.72%
INFORMATION NOTIFICATION FOR ATTENTION	117	31.96%	154	39.79%	55	35.25%
INFORMATION NOTIFICATION FOR FOLLOW UP	22	6%	31	8%	14	8.97%
BORDER REJECTION	102	27.87%	106	27.39%	50	32.05%
NEWS	3	0.82%	4	1.03%	0	
ΣΥΝΟΛΟ	366		387		156	

**Πίνακας 2. Συχνότητα και αριθμός Ειδοποιήσεων του Συστήματος RASFF το διάστημα 2020-Ιούνιος 2022 ανα τύπο ειδοποίησης**

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΑ Η ΚΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ	2020		2021		01.01.2022-30.06.2022	
	Αριθμός Κοινοποιήσεων	Ποσοστό επί του συνόλου	Αριθμός Κοινοποιήσεων	Ποσοστό επί του συνόλου	Αριθμός Κοινοποιήσεων	Ποσοστό επί του συνόλου
ΙΧΘΥΕΣ	245	66.94%	282	72.87%	108	69.23%
ΚΕΦΑΛΟΠΟΔΑ	24	6.56%	33	8.53%	16	10.25%
ΔΙΘΥΡΑ ΜΑΛΑΚΙΑ	97	26.5%	72	18.6%	32	20.51%

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΚΙΝΔΥΝΟΥ						
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ/	119	32.51%	124	32.04%	46	29.48%
ΧΗΜΙΚΟΣ	93	25.41%	88	22.74%	40	25.64%
ΦΥΣΙΚΟΣ	0	0%	0	0%	0	0%
ΑΛΛΟ	154	42.07%	175	45.22%	70	44.87%
ΣΥΝΟΛΟ	366		387		156	

**Πίνακας 3. Συχνότητα και αριθμός Ειδοποιήσεων του Συστήματος RASFF το διάστημα 2020-Ιούνιος 2022 ανα κατηγορία προϊόντος & ανά κατηγορία κινδύνου**

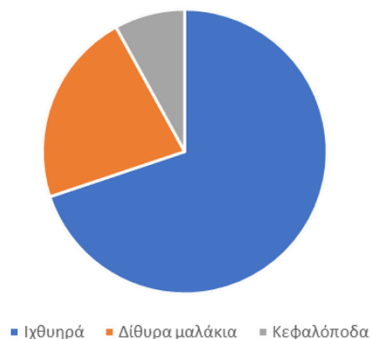
	Τίτλος κοινοποίησης	Κωδικός κοινοποίησης
Κοινοποιήσεις από την Ελλάδα	1. Mercury (0,62mg/kg) in chilled seabream ( <i>Pagrus pagrus</i> ) from Tunisia.	2021.4543
	2. Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) toxins (okadaic acid : 293,6 µg/kg) in frozen stuffed mussels( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) from Turkey	2021.3331
Κοινοποιήσεις που αφορούν διανομή προϊόντος στην Ελλάδα	1. dried fish products with logo Mama Africa	2022.3560 2022.1024
	2. Bisphenol-A (BPA) in canned sprat paste from Latvia	2021.5341 2021.5025
	3. cadmium (6.7 mg/kg - ppm) in thawed squids ( <i>Illex argentinus</i> ) from Italy, with raw material from Spain	2020.2454
	4. Histamine in tuna	



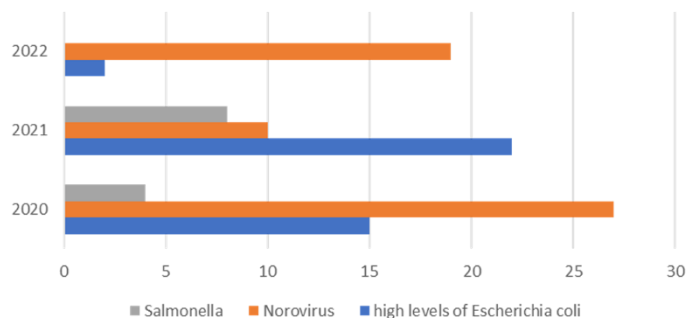
	5. Histamine in frozen tuna from Vietnam	
Κοινοποιήσεις με χώρα προέλευσης του προϊόντος την Ελλάδα	1. Sostanze non consentite in pesci di allevamento (orata) Crystal violet - Leucocrystal violet 2. mercurio in pesce spada refrigerato 3. too high count of Escherichia coli in live clams from Greece 4. Too high count of E.coli in bearded horse mussel (Modiolus barbatus) from Greece	2021.1723 2020.5134 2020.3882 2020.3687

**Πίνακας 4. Κοινοποιήσεις RASFF σε ιχθυηρά, κεφαλόποδα και δίθυρα μαλάκια, που αφορούν την Ελλάδα είτε ως χώρα κοινοποίησης, ή ως χώρα προέλευσης των προϊόντων ή ως χώρα διανομής τους**

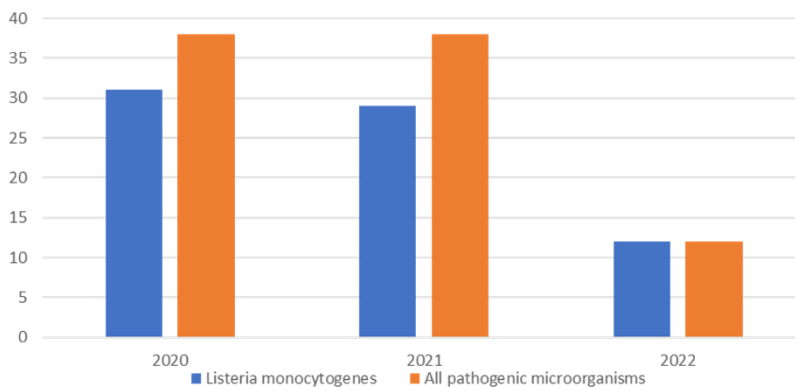
Αριθμός Κοινοποιήσεων 2020-06.2022



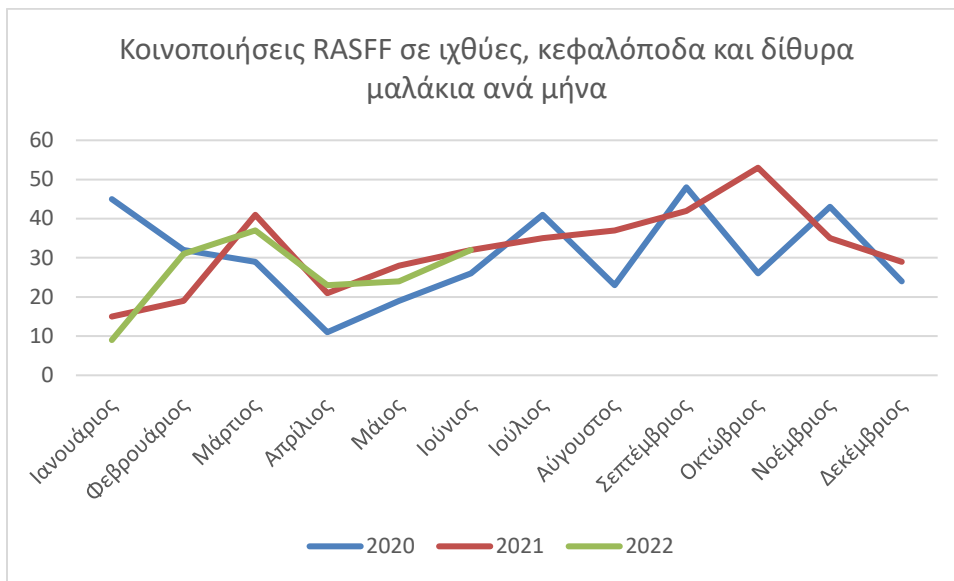
Συχνότερες κοινοποιήσεις για μικροβιολογικούς κινδύνους σε δίθυρα μαλάκια τα έτη 2020-06.2022



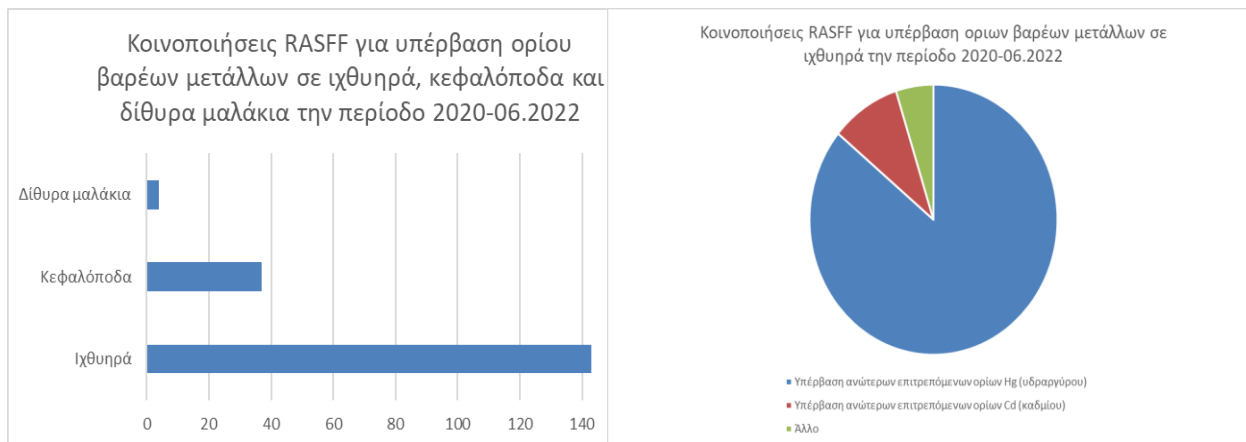
Κοινοποιήσεις RASFF που σχετίζονται με παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών σε ιχθυηρά τα έτη 2020-06.2022



**Εικόνα 1. Κοινοποιήσεις RASFF σε ιχθυηρά, κεφαλόποδα και δίθυρα μαλάκια βάσει της κατηγορίας προϊόντος & κοινοποιήσεις που αφορούσαν σε παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών σε ιχθυηρά και δίθυρα μαλάκια**

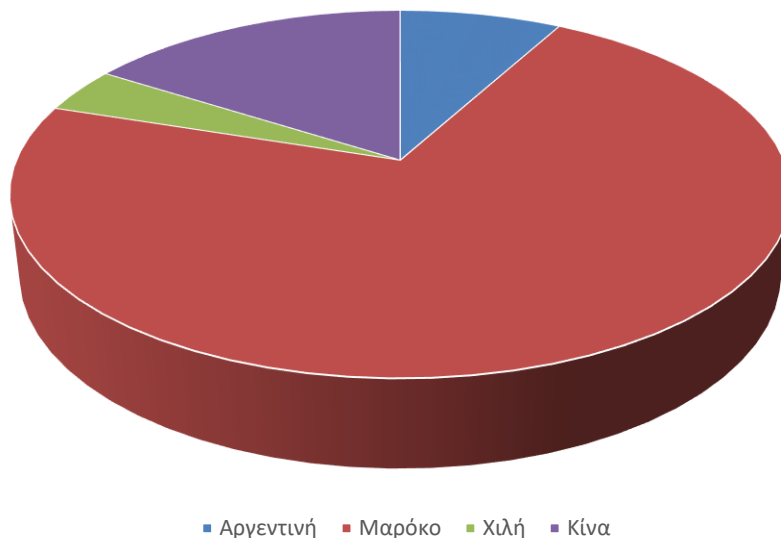


**Εικόνα 2. Κοινοποιήσεις RASFF σε ιχθυηρά, κεφαλόποδα και δίθυρα μαλάκια ανά μήνα**



**Εικόνα 3. Κοινοποιήσεις RASFF για παρουσία βαρέων μετάλλων άνω των επιτρεπόμενων οριών σε ιχθυηρά, κεφαλόποδα και δίθυρα μαλάκια**

Χώρα προέλευσης σε κοινοποιήσεις RASFF για παρουσία παρασίτων *Anisakis spp.* κατά τις εισαγωγές ιχθυηρών από Τρίτες Χώρες τα έτη 2020-06.2022



**Εικόνα 4. Κοινοποιήσεις RASFF (Border Rejections) για παρουσία παρασίτων *Anisakis spp.* σε ιχθυηρά που εισήχθησαν από Τρίτες Χώρες την περίοδο 2020-06.2022 , βάσει της χώρας προέλευσης**

Το σύστημα RASFF περιέχει ειδοποιήσεις που αφορούν μια μεγάλη ποικιλία αναμενόμενων και καλά μελετημένων κινδύνων. Η εποπτεία της ασφάλειας των τροφίμων από τα μέλη του Συστήματος εστιάζει σε αυτούς τους κινδύνους. Η κοινοποίηση συνοδεύεται από λεπτομερή αιτιολόγηση της δράσης που ανέλαβαν οι αρμόδιες αρχές του κράτους μέλους στο οποίο εκδόθηκε η κοινοποίηση. Ακολουθείται, σε εύθετο χρόνο από συμπληρωματικές πληροφορίες, ιδιαίτερα όταν τα μέτρα στα οποία βασίζεται η κοινοποίηση έχουν τροποποιηθεί ή ανακληθεί. Εντούτοις οι ειδοποιήσεις αυτές μπορεί να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για κινδύνους που επανεμφανίζονται ή για αυτούς που ανιχνεύονται σε προϊόντα τα οποία προηγουμένα δεν θεωρούνταν πιθανό να τους περιέχουν (2).

Οι ενημερώσεις βοηθούν στη λήψη μέτρων ανάλογα των κινδύνων και στην αξιολόγηση των δράσεων εκ μέρους της κοινότητας και των τρίτων χωρών τα οποία και κρίνονται ως προς την αποτελεσματικότητά τους.

Από τις 909 κοινοποιήσεις συνολικά για την περίοδο μελέτης, η Ιταλία κοινοποίησε 299, η Ισπανία 218 και η Γαλλία 108 αντιστοίχως, όντας στην κορυφή των κρατών με τον μεγαλύτερο αριθμό κοινοποιήσεων ανά έτος.

Η πλειοψηφία των κοινοποιήσεων και για τα τρία έτη της περιόδου μελέτης, αφορά σε ιχθυρά σε ποσοστό 66.94% - 72.87%, ακολουθούν τα δίθυρα μαλάκια και τα κεφαλόποδα, ενώ οι βιολογικοί κίνδυνοι (κυρίως παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών) αποτελούν την κυριότερη αιτία έκδοσης κοινοποιήσεων για όλα τα είδη προϊόντων ζωικής προέλευσης υπό μελέτη και καθόλη την χρονική περίοδο μελέτης.

Αναφορικά με τα δίθυρα μαλάκια, εκ των 201 κοινοποιήσεων, οι 118 αφορούσαν σε μικροβιολογικούς κινδύνους και κυρίως την παρουσία *Norovirus* και *E.coli* (υψηλά επίπεδα) ενώ ακολουθεί η ανίχνευση *Salmonella* spp.

Η ανίχνευση *Listeria monocytogenes* είναι η συχνότερη αιτία έκδοσης κοινοποιήσεων σε ιχθυρά την περίοδο 2020-2022.

Η ανίχνευση βαρέων μετάλλων άνω των μέγιστων επιτρεπόμενων ορίων υπερτερεί στα ιχθυρά συγκριτικά με τα κεφαλόποδα και τα δίθυρα μαλάκια. Στα ιχθυρά το κυριότερο μέταλλο που ανιχνεύτηκε άνω των μέγιστων επιτρεπόμενων ορίων ήταν ο υδράργυρος (Hg) και εν συνεχεία το κάδμιο (Cd).

Αναφορικά με την ανίχνευση παρασίτων, το είδος *Anisakis* spp. επικρατεί στις ειδοποιήσεις στα ιχθυρά, ενώ στις κοινοποιήσεις *Border rejections* (απόρριψη στα σύνορα) που αφορούσαν παρουσία *Anisakis* spp σε ιχθυρά από Τρίτες Χώρες, το Μαρόκο αναφέρεται συχνότερα ως χώρα προέλευσης των προϊόντων.

Έπειτα από αξιολόγηση της συχνότητας εμφάνισης όλων των κατηγοριών κινδύνων με βάση στοιχεία από το Σύστημα RASFF σε σχέση με το εξάμηνο κάθε έτους που δημοσιεύτηκαν οι ειδοποιήσεις, είναι χαρακτηριστικό ότι για όλες τις κατηγορίες προϊόντων οι περισσότερες ειδοποιήσεις εκδόθηκαν το δεύτερο εξάμηνο του έτους, και για τα τρία έτη μελέτης, με το έτος 2020 να διαφοροποιείται σε σχέση με τη συχνότητα έκδοσης κοινοποιήσεων ανά μήνα ειδοποιήσεων, συγκριτικά με τα έτη 2021 και 2022, γεγονός που ενδεχόμενα σχετίζεται με την έναρξη της πανδημίας λόγω Covid 19.

Από τις κοινοποιήσεις του Συστήματος RASFF που αφορούσαν προϊόντα προέλευσης Ελλάδας την εν λόγω περίοδο, αυτές αφορούσαν σε δίθυρα μαλάκια ελληνικής προέλευσης και με υπέρβαση των επιτρεπόμενων ορίων ανίχνευσης *Escherichia coli* , υπέρβαση ορίων υδραργύρου σε ιχθύες και χρήση μη επιτρεπόμενων χρωστικών σε ιχθύες υδατοκαλλιέργειας.

Η αξιολόγηση των κοινοποιήσεων RASFF από τις αρμόδιες αρχές αλλά και από τη βιομηχανία τροφίμων, πλέον των άμεσων ενεργειών που επιβάλλεται να λάβουν χώρα, μπορεί να συμβάλει στην εντατικοποίηση των ελέγχων σε συγκεκριμένες κατηγορίες προϊόντων και αναφορικά με συγκεκριμένους κινδύνους και στη βελτίωση των διαδικασιών κατά τα στάδια της παραγωγής και διακίνησης των τροφίμων.

#### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Uradzński J, Wysok B, Gomółka-Pawlicka M. Biological and chemical hazards occurring in fish and fishery products. *Pol J Vet Sci.* 2007;10(3):183-8.
2. Cho JH, Kim IH. Fish meal – nutritive value. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 2011;95(6):685-92.
3. Landrigan PJ, Stegeman JJ, Fleming LE, Allemand D, Anderson DM, Backer LC, et al. Human Health and Ocean Pollution. *Ann Glob Health.* 2020;86(1).
4. Kleter GA, Prandini A, Filippi L, Marvin HJ. Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) during a four-year period. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(5):932-50.
5. Feldhusen F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect.* 2000;2(13):1651-60.
6. Illness associated with seafood. *Can Commun Dis Rep.* 1992;18(3):19-23.
7. Heinitz ML, Ruble RD, Wagner DE, Tatini SR. Incidence of Salmonella in fish and seafood. *J Food Prot.* 2000;63(5):579-92.
8. Savini F, Giacometti F, Tomasello F, Pollesel M, Piva S, Serraino A, et al. Assessment of the Impact on Human Health of the Presence of Norovirus in Bivalve Molluscs: What Data Do We Miss? *Foods.* 2021;10(10).
9. Hackney C, Dicharry A. Seafood borne bacterial pathogens of marine origins. *Food Tech.* 1988;42:104-9.
10. Παπαδοπούλου Χ. Μικροβιολογία τροφίμων. Θεωρία, μεθοδολογία και υγιεινή. . Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
11. Carmona-Salido H, Fouz B, Sanjuán E, Carda M, Delannoy CMJ, García-González N, et al. The widespread presence of a family of fish virulence plasmids in *Vibrio vulnificus* stresses its relevance as a zoonotic pathogen linked to fish farms. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10(1):2128-40.
12. Lehane L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited. *Int J Food Microbiol.* 2000;58(1-2):1-37.
13. Novak SM. Foodborne illness — chemical fish and shellfish poisoning. *Clinical Microbiology Newsletter.* 1998;20(3):17-21.
14. Lees D. Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol.* 2000;59(1-2):81-116.
15. Watters MR. Organic neurotoxins in seafoods. *Clin Neurol Neurosurg.* 1995;97(2):119-24.

16. Isbister GK, Kiernan MC. Neurotoxic marine poisoning. *Lancet Neurol.* 2005;4(4):219-28.
17. Poletti R, Milandri A, Pompei M. Algal biotoxins of marine origin: new indications from the European Union. *Vet Res Commun.* 2003;1:173-82.
18. Akbar A, Ghosh S. Anisakiasis--a neglected diagnosis in the West. *Dig Liver Dis.* 2005;37(1):7-9.
19. Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. Allergic reactions to Anisakis found in fish. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14(8):014-0455.
20. Miller PS. An "Abundance of Fish". *Science.* 1972;175(4029):1418-9.
21. Lee HF, Chen IL, Lin RP. Ultrastructure of the excretory system of Anisakis larva (Nematoda: Anisakidae). *J Parasitol.* 1973;59(2):289-98.
22. Young PC. The Relationship Between the Presence of Larval Anisakine Nematodes in Cod and Marine Mammals in British Home Waters. *Journal of Applied Ecology.* 1972;9:459.
23. Mackenzie K, Hemmingsen W. Parasites as biological tags in marine fisheries research: European Atlantic waters. *Parasitology.* 2015;142(1):54-67.
24. Smith JW, Wootten R. Experimental studies on the migration of Anisakis sp. larvae (Nematoda : ascaridida) into the flesh of herring, *Clupea harengus* L. *International Journal for Parasitology.* 1975;5(2):133-6.
25. Bodaly RA, Hecky RE, Fudge RJP. Increases in Fish Mercury Levels in Lakes Flooded by the Churchill River Diversion, Northern Manitoba. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 1984;41(4):682-91.
26. Johnston TA, Bodaly RA, Mathias JA. Predicting Fish Mercury Levels from Physical Characteristics of Boreal Reservoirs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 1991;48(8):1468-75.
27. Jernelöv A, Lann H. Mercury Accumulation in Food Chains. *Oikos.* 1971;22(3):403-6.
28. Mierle G, Ingram R. The role of humic substances in the mobilization of mercury from watersheds. *Water Air & Soil Pollution.* 1991;56(1):349-57.
29. Amiard-Triquet C, Amiard J-C. Influence of ecological factors on accumulation of metal mixtures. In: Langston WJ, Bebianno MJ, editors. *Metal Metabolism in Aquatic Environments.* Boston, MA: Springer US; 1998. p. 351-86.
30. Handy RD. The effect of acute exposure to dietary Cd and Cu on organ toxicant concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology.* 1993;27(1):1-14.
31. Mount DR, Barth AK, Garrison TD, Barten KA, Hockett JR. Dietary and waterborne exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to copper, cadmium, lead and zinc using a live diet. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 1994;13(12):2031-41.
32. Berntssen MH, Lundebye AK. Energetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2001;128(3):311-23.
33. Dang F, Wang W-X. Assessment of tissue-specific accumulation and effects of cadmium in a marine fish fed contaminated commercially produced diet. *Aquatic Toxicology.* 2009;95(3):248-55.
34. Αμβροσιάδης Ι. Εφαρμογή και έλεγχος του συστήματος HACCP. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία. 2005



*«Εδώ αράξαμε το καράβι να ματίσουμε τα σπασμένα κουλιά, να πιούμε νερό και να κοιμηθούμε. Η θάλασσα που μας πίκρανε είναι βαθιά κι ανεξερεύνητη και ξεδιπλώνει μιαν απέραντη γαλήνη ... Ξαναμπαρκάραμε με τα σπασμένα μας κουλιά.»*

*Γιώργος Σεφέρης. Μυθιστόρημα. ΙΒ' Μπoτίλια στο πέλαγο (1935). Εκδ. Ίκαρος, Αθήνα 2001.*





