

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ: «ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ-
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΥΔΡΟΒΙΩΝ
ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ»**

**ΠΟΝΟΣ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ ΚΑΙ ΛΟΙΠΑ ΥΔΡΟΒΙΑ ΕΙΔΗ- Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΚΕΦΑΛΟΠΟΔΩΝ
ΚΑΙ ΑΣΤΑΚΩΝ/ ΚΑΡΑΒΙΔΩΝ**

ΧΡΙΣΤΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΑΝΔΡΕΑΣ ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΗΣ

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2024

Τριμελής Επιτροπή

ΠΑΝΤΑΖΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ

ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ

ΚΑΤΣΟΥΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF VETERINARY SCIENCE



**GRADUATE PROGRAM OF STUDY: "AQUACULTURE-PATHOLOGICAL PROBLEMS OF
FARMED AQUATIC ORGANISMS"**

**PAIN IN FISH AND OTHER AQUATIC SPECIES - THE CASE OF CEPHALOPODS AND LOBSTERS/
CRAYFISH**

CHRISTAKOPOULOS ANDREAS CHRYSOVALANTIS

KARDITSA 2024

Three-member committee

PANTAZIS PANAGIOTI

ATHANASOPOULOU FOTEINI

KATSOULIS KONSTANTINOS

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ όλους όσους με βοήθησαν με τον χρόνο και την υπομονή τους και την ψυχολογική τους υποστήριξη προκειμένου να διεκπεραιωθεί η συγκεκριμένη εργασία.

Contents

Τριμελής Επιτροπή	1
Ευχαριστίες	3
Περίληψη	5
Abstract	6
Εισαγωγή.....	7
1. Ο Πόνος στα ψάρια	7
1.1 Ορισμός του πόνου	7
1.2 Ορισμός του stress και της συνείδησης.....	9
1.2.1 Stress	9
1.2.2 Συνείδηση	9
1.3 Κεντρικό Νευρικό σύστημα ιχθύων	10
2.1 Ο πόνος στα θηλαστικά και στα ψάρια.....	12
2.2. Παρατηρήσιμοι δείκτες πόνου	17
2.3 Συμπεριφορικές και Φυσιολογικές Αλλαγές	18
2.4 Ευζωία στα ψάρια	19
2.5 Μοριακή βιολογία του πόνου στα ψάρια.....	21
2.6 Χρήση αναλγητικών για τον πόνο	26
3. Μελέτες στους ιχθείς.....	28
3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στον πόνο	28
3.2 Το ψάρι ζέβρα ως μοντέλο.....	30
3.3 Αναισθησία και ευθανασία στα ψάρια.....	34
4. Μελέτες στα μαλάκια και στα καρκινοειδή	35
5. Διαφωνία για την παρουσία του πόνου στα ψάρια.....	39
6. Συμπεράσματα	40
7. Βιβλιογραφία.....	42

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρωθεί όλο και περισσότερο στην έρευνα που εξετάζει την ευημερία των ψαριών. Ένας σημαντικός παράγοντας ανησυχίας είναι η πιθανότητα ότι η ψυχική ευημερία αποτελεί δικαιολογημένο αντικείμενο προσοχής, ιδίως όταν πρόκειται για το ερώτημα εάν τα ψάρια έχουν αίσθηση πόνου και υποφέρουν. Ενώ ορισμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η έλλειψη εξειδικευμένων εγκεφαλικών δομών, όπως ο νεοφλοιός, μπορεί να αποτελεί εμπόδιο για τα ψάρια να αισθάνονται πόνο, πρόσφατες μελέτες έχουν αμφισβητήσει αυτήν την άποψη. Αντίθετα, έχουν επισημανθεί ότι τα τελεόστεα ψάρια είναι ικανά να ανιχνεύουν και να ανταποκρίνονται σε επιβλαβή ερεθίσματα από διάφορες αισθητηριακές μορφές. Οι πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι τα ψάρια διαθέτουν αισθητήρες με χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των θηλαστικών, οι οποίοι μπορούν να ανιχνεύουν πιθανά οδυνηρά ερεθίσματα.

Abstract

In recent years, there has been an increasing emphasis within the scientific community on researching the welfare of fish. An important factor of concern is the possibility that mental well-being is a legitimate concern, particularly in addressing the question of whether fish experience pain and distress. While some authors argue that the lack of specialized brain structures, such as the neocortex might hinder fish from perceiving pain, recent investigations have cast doubt on this perspective. On the contrary, teleost fishes have demonstrated the ability to recognize and respond to harmful stimuli originating from diverse sensory modalities. Current research has revealed that fish possess sensory receptors resembling those found in mammals, enabling them to detect potentially painful stimuli.

Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα που εξετάζει την ευημερία των ψαριών έχει επικεντρωθεί ολοένα και περισσότερο στην πιθανότητα ότι η ψυχική ευημερία αποτελεί δικαιολογημένο παράγοντα ανησυχίας, ιδιαίτερα όσον αφορά το ερώτημα εάν τα ψάρια αισθάνονται πόνο και υποφέρουν. Η παρούσα διατριβή θα αξιολογήσει το πεδίο της αντίληψης του πόνου σε υδρόβια είδη, εστιάζοντας στα ψάρια και για να ερμηνεύσει πώς τα ευρήματα της έρευνας μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόησή της φυσιολογίας και της εξέλιξης του πόνου.

1. Ο Πόνος στα ψάρια

1.1 Ορισμός του πόνου

Αρχικά έχει μεγάλη σημασία να αποδοθεί ένας έγκυρος ορισμός του πόνου έτσι ώστε να εξηγηθούν οι υποκείμενοι μηχανισμοί του. Η βιβλιογραφία αποδίδει τον πόνο με δύο έννοιες, τον πόνο (pain) και την αίσθηση του πόνου (nociception). Ως αίσθηση του πόνου (nociception) ορίζεται από τη Διεθνή Ένωση για τη Μελέτη του Πόνου (IASP- International Association for the Study of Pain) ως «οι νευρικές διεργασίες που κωδικοποιούν επιβλαβή ερεθίσματα», όπου ένα επιβλαβές ερέθισμα είναι «ένα πραγματικό ή δυνητικό γεγονός που προκαλεί βλάβη στον ιστό που μεταγεται και κωδικοποιείται από τους υποδοχείς του πόνου» (Chatigny, 2019). Η Διεθνής Ένωση για τη Μελέτη του Πόνου (IASP) ορίζει τον πόνο (pain) με τα εξής χαρακτηριστικά (i) μια δυσάρεστη αισθητηριακή και συναισθηματική εμπειρία που σχετίζεται με πραγματική ή πιθανή βλάβη των ιστών ή περιγράφεται με τους όρους της βλάβης (ii) ο πόνος είναι πάντα υποκειμενικός και (iii) ο πόνος αναφέρεται μερικές φορές στην απουσία ιστικής βλάβης και ο ορισμός του πόνου θα πρέπει να αποφεύγει τη σύνδεση του πόνου με ένα εξωτερικό διεγερτικό ερέθισμα (Rose *et al.*, 2014).

Ο ορισμός του IASP επεκτείνεται με μια σειρά σημειώσεων που υπογραμμίζουν την πιθανότητα τα ζώα να αισθάνονται πόνο ακόμα κι αν δεν είμαστε σε θέση να αξιολογήσουμε την παρουσία του. Επιπλέον, σύμφωνα με αυτόν τον ορισμό, η εμπειρία του πόνου τους θα ήταν διαφορετική από τη δική μας, καθώς ο πόνος

είναι υποκειμενικός. Τέλος, παρουσιάζει την ιδέα ότι τα ζώα μπορεί να βιώνουν μόνο την αίσθηση του πόνου σε αντίθεση με τον πόνο, επειδή μπορεί να μην βιώνουν μια ψυχολογική κατάσταση παρόμοια με τη δική μας. Η μη λεκτική επικοινωνία καθώς και τα πιθανά συναισθήματα και η ψυχολογία των ζώων βρίσκονται στο επίκεντρο αυτών των πρόσθετων σημειώσεων. Αυτοί είναι παράγοντες που μπορεί να είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αξιολογηθούν, ειδικά στα ψάρια, τα οποία απομακρύνονται περισσότερο από εμάς, από τα θηλαστικά με τα οποία συνήθως αλληλεπιδρούμε (Chatigny, 2019).

Διάφορα φυσικά ερεθίσματα από το περιβάλλον μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στους οργανισμούς και ανιχνεύονται από τους αισθητήρες (nociceptors). Οι “Nociceptors” είναι αισθητικοί νευρώνες με ελεύθερες νευρικές απολήξεις αποτελούμενοι από υποδοχείς ικανούς να ανιχνεύουν επιβλαβή ερεθίσματα. Τα κυτταρικά σώματα των αλγοϋποδοχέων (nociceptors) των νευρώνων των θηλαστικών βρίσκονται στο περιφερικό νευρικό σύστημα στη ραχιαία ρίζα και στο τρίδυμο γάγγλιο. Οι άξονες από τους νευρώνες που προκαλούν πόνο εξέρχονται στα νευρικά κυκλώματα στο ραχιαίο κέρασ του νωτιαίου μυελού, τα οποία με τη σειρά τους μεταδίδουν τις εισόδους στον εγκέφαλο μέσω των ανιόντων των νευρωνικών οδών. Ο πόνος και η αίσθηση του πόνου είναι επομένως διαχωρίσιμες διεργασίες: ο πόνος μπορεί να εμφανιστεί απουσία ερεθισμού και η αίσθηση του πόνου μπορεί να συμβεί απουσία πόνου (Tracey, 2017).

Το αν ένας οργανισμός μπορεί ή όχι να ανιχνεύσει ένα συγκεκριμένο ερέθισμα χρησιμοποιώντας τους αισθητήρες του επηρεάζεται από την εξελικτική του ιστορία, τη θέση που κατοικεί και από τις προσαρμογές του σε αυτή τη θέση. Οι γνωστικοί υποδοχείς μπορούν να ενεργοποιηθούν από την έντονη θερμότητα, το έντονο κρύο, από τα σκληρά μηχανικά ερεθίσματα και από χημικούς ερεθισμούς. Υπάρχει πληθώρα ερευνών σχετικά με τους αισθητήρες των θηλαστικών, οι οποίοι έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με την ταχύτητα αγωγιμότητας (γρήγορη ή αργή), τη διάμετρο, την ποσότητα της μυελίνης και τους τύπους των ερεθισμάτων στους οποίους ανταποκρίνονται. Οι γνωστικοί υποδοχείς μπορεί να είναι πολυμορφικοί και να ενεργοποιούνται από διάφορες κατηγορίες επιβλαβών ερεθισμάτων (δηλαδή

τη θερμότητα, μηχανικά και χημικά ερεθίσματα), ή μπορεί να είναι πιο εξειδικευμένοι στις αντιδράσεις τους (Tracey, 2017).

1.2 Ορισμός του stress και της συνείδησης

1.2.1 Stress

Το stress είναι ένα άλλο σημαντικό φαινόμενο που μπορεί να σχετίζεται με τον πόνο. Ως stress ορίζεται "μια περιβαλλοντική επίδραση σε ένα άτομο, που υπερφορτώνει τα συστήματα ελέγχου του και μειώνει την ικανότητά του ή φαίνεται πιθανό να το κάνει", οι αιτίες των οποίων είναι "επιζήμιες εμπειρίες, που είναι κυρίως συναισθηματικές ή σωματικές ή έχουν σημαντικές συναισθηματικές και σωματικές συνιστώσες (π.χ. πόνο) ". Το στρες στα ψάρια, όπως και σε άλλα ζώα, συνδέεται κυρίως με την απελευθέρωση κορτιζόλης, μια παράμετρος που συχνά μετριέται για να εκτιμηθεί το στρες. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ωστόσο, ότι η συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα συνδέεται όχι μόνο με το άγχος, αλλά εξαρτάται και από τον κερκαδικό ρυθμό τόσο στα θηλαστικά όσο και στα ψάρια και μπορεί να ποικίλει κατά τη διάρκεια της προσαρμογής στις αλλαγές της αλατότητας στα ψάρια (Chatigny, 2019).

1.2.2 Συνείδηση

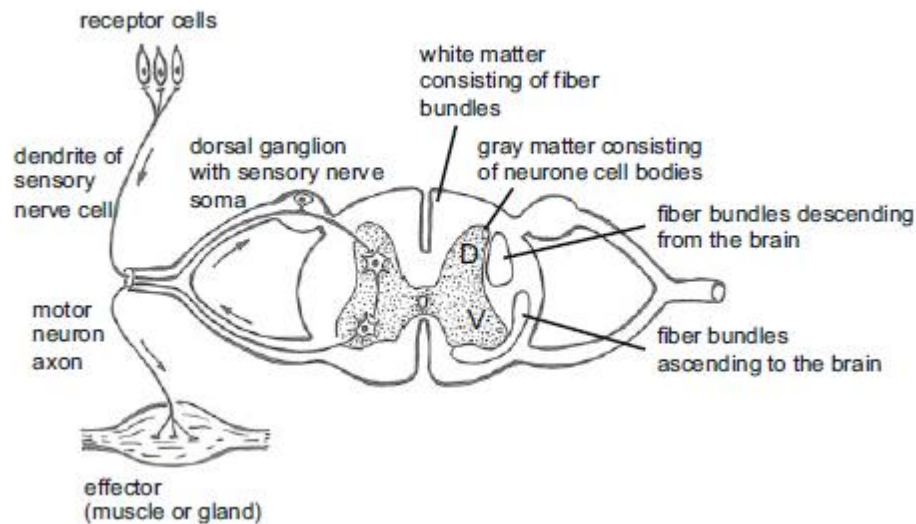
Η συνείδηση αποτελεί την κύρια αιτία της διένεξης σχετικά με τον πόνο στα ψάρια καθώς η παρουσία της στα ψάρια δεν έχει καταστεί σαφής σε αντίθεση με τη μετάδοση επώδυνων ερεθισμάτων. Παρακάτω αποδίδεται ο ορισμός της, αποτελούμενος από δυο εκδηλώσεις συνείδησης που βασίζονται στον άνθρωπο: την πρωταρχική συνείδηση, η στιγμιαία επίγνωση των αισθητηριακών εμπειριών και ορισμένων εσωτερικών καταστάσεων όπως τα συναισθήματα και την (ii) ανώτερη συνείδηση που ονομάζεται επίσης συνείδηση πρόσβασης ή αυτογνωσία. Η ανώτερη συνείδηση περιλαμβάνει την επίγνωση του εαυτού του ως οντότητας που υπάρχει χωριστά από άλλες οντότητες (Rose *et al.*, 2014).

1.3 Κεντρικό Νευρικό σύστημα ιχθύων

Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) των σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, που συνδέεται με τους υποδοχείς και τα όργανα μέσω των κινητικών και αισθητηριακών νεύρων.

Ο νωτιαίος μυελός των ψαριών είναι το αρχαιότερο τμήμα του ΚΝΣ από φυλογενετική άποψη και ως εκ τούτου, είναι παρόμοιος στη δομή του με τους νωτιαίους μυελούς όλων των άλλων σπονδυλωτών. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, το ΚΝΣ σχηματίζεται όταν οι νευρικές πτυχές κυλάνε και συγχωνεύονται. Σε εγκάρσιες τομές, η κεντρική περιοχή φαίνεται πιο σκούρα από την εξωτερική ζώνη. Αυτές οι περιοχές ονομάζονται επομένως "γκρίζα ύλη" και "λευκή ύλη", αντίστοιχα. Η λευκή ουσία αποτελείται κυρίως από ανερχόμενες και κατερχόμενες ίνες που οργανώνονται σε ξεχωριστές οδούς: μια οπίσθια σωματική αισθητηριακή οδό, μια πλευρική σπλαχνική αισθητηριακή και σπλαχνική κινητική οδό και μια μεγάλη κοιλιακή σωματική κινητική οδό (Welfare and Kotrschal, 2020).

Οι τμηματικές ρίζες των οπίσθιων και των κοιλιακών νεύρων προκύπτουν από τον νωτιαίο μυελό και, εκτός από τις λυχνίες, ενώνονται για να σχηματίσουν τα νωτιαία νεύρα, τα οποία μεταφέρουν κινητικά, αισθητηριακά και αυτόνομα σήματα μεταξύ του νωτιαίου μυελού και του σώματος. Οι κοιλιακοί άξονες των σπονδυλικών σωματοκινητικών νευρώνων συνδέονται με το μυϊκό σύστημα, ενώ η οπίσθια ρίζα περιέχει τους αισθητηριακούς νευρώνες, που συνδέονται με τα περιφερικά αισθητηριακά συστήματα. Ενώ τα σώματα των κινητικών νευρώνων σχηματίζουν το κοιλιακό κέρασ της γκρίζας ουσίας του νωτιαίου μυελού, οι αισθητηριακοί νευρώνες βρίσκονται σε τμήματα των γαγγλίων έξω από τον μυελό (Εικόνα 1). Τα περισσότερα από τα κρανιακά νεύρα ακολουθούν το ίδιο βασικό μοτίβο, αλλά προκύπτουν από το οστρικό τμήμα του νωτιαίου μυελού και του εγκεφαλικού στελέχους (Welfare and Kotrschal, 2020).



Εικόνα 1. Ο νωτιαίος μυελός, τα νεύρα και οι συνδέσεις τους με τα αισθητήρια κύτταρα/όργανα και τον τελεστή. Η κεντρική φαιά ουσία σε σχήμα πεταλούδας αποτελείται κυρίως από τα νευρικά κύτταρα. Τα βέλη δίνουν κατεύθυνση δυναμικής αγωγής. Οι δενδρίτες/άξονες των αισθητήριων νευρικών κυττάρων, που βρίσκονται στα ραχιαία γάγγλια, ενεργοποιούνται από περιφερειακούς υποδοχείς και μεταφέρουν τα δυναμικά δράσης προς τα δίκτυα ενδονευρώνων στη φαιά ουσία, η έξοδος των οποίων μεταδίδεται στον τελεστή μέσω των αξόνων της κοιλίας των κινητικών νευρώνων του κέρατος. Τα τοπικά κυκλώματα του νωτιαίου μυελού επικοινωνούν με τον εγκέφαλο μέσω δεσμίδων ινών ανόδου και καθόδου (Welfare and Kotrschal, 2020).

Ο εγκέφαλος είναι ο διευρυμένος πρόσθιος πόλος του νωτιαίου μυελού, ο οποίος έχει αναπτυχθεί επειδή και τα κύρια αισθητήρια συστήματα των σπονδυλωτών βρίσκονται στον πρόσθιο πόλο του σώματος. Για λειτουργικούς λόγους, ιδιαίτερα οι κοιλιακές περιοχές του εγκεφάλου είναι η φυλογενετικά πιο συντηρητική δομή. Ως εκ τούτου, η βασική οργάνωσή της είναι κατά προσέγγιση παρόμοια σε όλα τα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών. Ωστόσο, λόγω του διαφορετικού αισθητηριακού προσανατολισμού των ψαριών, οι διάφορες περιοχές μπορούν να διαφέρουν σημαντικά σε μέγεθος και σχήμα. Στην πραγματικότητα, τα ψάρια παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διακύμανση της ανατομίας του εγκεφάλου και της λειτουργίας του εγκεφάλου σε όλα τα σπονδυλωτά (Welfare and Kotrschal, 2020).

Ενώ οι νευρώνες του πόνου είναι ευρέως διαδεδομένοι αλλά όχι καθολικοί μεταξύ των ζώων, οι ανώτερες εγκεφαλικές δομές που είναι γνωστό ότι είναι απαραίτητες για τον συνειδητό πόνο, ειδικά οι περιοχές του νεοφλοιού και του μεσοφλοιού, βρίσκονται μόνο στα θηλαστικά (Rose et al., 2014). Μια σημαντική δυσκολία για την αξιολόγηση της ευημερίας στα ψάρια είναι ότι οι περισσότεροι από τους κοινώς χρησιμοποιούμενους δείκτες πόνου (Anil, Anil and Deen, 2002) είναι πολύ δύσκολο ή απλά ακατάλληλο να εκτιμηθούν στα ψάρια (Chatigny, 2019).

2.1 Ο πόνος στα θηλαστικά και στα ψάρια

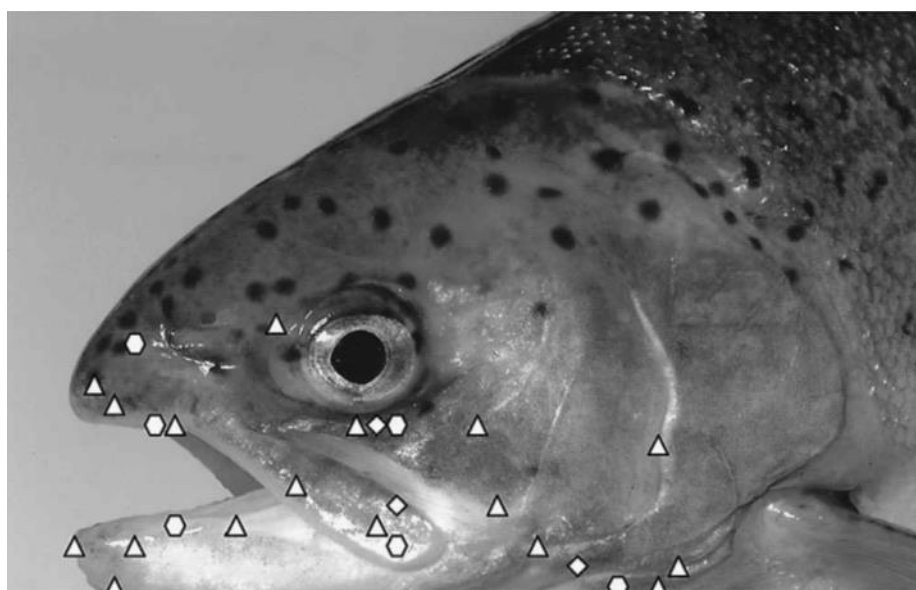
Η αξιολόγηση του πόνου στους ανθρώπους βασίζεται στην αυτοαναφορά στο ότι μοιραζόμαστε μια κοινή γλώσσα και μπορούμε να μεταφέρουμε αν πονάμε ή όχι, και περαιτέρω μπορούμε να αξιολογήσουμε αυτόν τον πόνο. Αυτό καθίσταται προβληματικό στην εκτίμηση του πόνου σε ζώα και νήπια, καθώς δεν μπορούμε να επικοινωνήσουμε άμεσα μαζί τους (Sneddon et al., 2014). Αντίθετα, προσδιορίζουμε συμπεριφορικούς και φυσιολογικούς δείκτες ως απόκριση σε ένα δυνητικά επώδυνο συμβάν που χρησιμοποιούνται για να υποδείξουν τον πόνο και σε ορισμένες περιπτώσεις να μετρήσουν τη σοβαρότητα αυτού του πόνου (Sneddon, 2019). Στην πραγματικότητα, βασιζόμαστε σε επιστημονικά μέτρα που υποδηλώνουν πόνο στα ζώα και κάνουμε μια κρίση με βάση τις απαντήσεις του ζώου για να κάνουμε την αξιολόγησή μας.

Για τον πόνο, ωστόσο, το ζώο πρέπει να επιδείξει μια αλλαγή στις μελλοντικές συμπεριφορικές αποφάσεις και τις αλλαγές κινήτρων (Sneddon et al., 2014). Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι ο πόνος είναι μια αρνητική ψυχολογική εμπειρία που έχει ως αποτέλεσμα τη μάθηση, το σχηματισμό μνήμης και την αλλαγή στρατηγικής λήψης αποφάσεων κατά τη διάρκεια και μετά το συμβάν. Εάν ένα ζώο έχει τη νευρική συσκευή για να ανιχνεύει και να βιώνει επώδυνα

ερεθίσματα, η συμπεριφορά του αλλάζει και αυτό υποδηλώνει αλλαγή από το φυσιολογική συμπεριφορά (τότε αυτά τα στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι εμφανίζεται πόνος). Ο ανθρώπινος πόνος αναφέρεται συχνά όταν εξετάζεται ο πόνος στα ζώα,

αλλά αυτός είναι λανθασμένος με πολλούς τρόπους, καθώς το σύστημα πόνου και η αίσθηση του πόνου θα διαμορφωθεί πολύ διαφορετικά σε ζώα που είχαν διαφορετική οικολογική και εξελικτική ιστορία (Birch, 2018; Lynne et al., 2018).

Τα ερεθίσματα που βλάπτουν τους ιστούς διεγείρουν τους αλγοϋποδοχείς και αυτή η δραστηριότητα διεξάγεται μέσω των περιφερικών νεύρων και σε πολλαπλές συνάψεις μέσω του νωτιαίου μυελού, των υποφλοιωδών δομών του εγκεφάλου και στη συνέχεια στον εγκεφαλικό φλοιό. Εάν ένα άτομο έχει τις αισθήσεις του όταν η δραστηριότητα που σχετίζεται με τον πόνο φθάνει στον φλοιό, η περαιτέρω επεξεργασία από εκτεταμένες περιοχές του φλοιού μπορεί αλλά δεν χρειάζεται να οδηγήσει σε πόνο (Rose et al., 2014). Οι αλγοϋποδοχείς έχουν αποδειχθεί ότι υπάρχουν στα θηλαστικά, στα πουλιά, στα αμφίβια (Chatigny, 2019), στα ψάρια (Sneddon, Braithwaite and Gentle, 2003) και στα ασπόνδυλα (Tracey, 2017).



Εικόνα 2. Θέση πολυτροπικών μηχανοϋποδοχέων ή αλγοϋποδοχέων, μηχανοθερμικών υποδοχέων και μηχανοχημικών υποδοχέων στο κεφάλι και το πρόσωπο της ιριδίζουσας πέστροφας, *Oncorhynchus mykiss* (τρίγωνα: πολυτροπικός υποδοχέας πόνου, διαμάντια: μηχανοθερμικός υποδοχέας πόνου, εξαγωνα: μηχανοχημικός υποδοχέας) (Sneddon, Braithwaite and Gentle, 2003).

Οι υποδοχείς πόνου είναι ελεύθερες νευρικές απολήξεις που ανιχνεύουν κατά προτίμηση βλαβερά ερεθίσματα που προκαλούν βλάβη στους ιστούς. Στα

σπονδυλωτά είναι συνήθως δύο τύπων ινών: μικρές μυελινωμένες ίνες Α-δέλτα και μικρότερες μη μυελινωμένες ίνες C . Οι αλγοϋποδοχείς μπορούν να βρεθούν τόσο στην περιφέρεια όσο και στα σπλάχνα και στους εν τω βάθει ιστούς. Η ηλεκτροφυσιολογική και ανατομική έρευνα μπορεί να προσδιορίσει ποιος τύπος ινών είναι οι αλγοϋποδοχείς, καθώς οι ίνες C στερούνται μυελίνωσης, είναι μικρής διαμέτρου και έχουν αργή ταχύτητα αγωγής. Αρκετοί τύποι ινών πόνου C έχουν χαρακτηριστεί στα θηλαστικά. Για παράδειγμα, ένας τύπος είναι αποκλειστικά μηχανικά ευαίσθητος, ενώ ένας άλλος τύπος ανταποκρίνεται επίσης στο κρύο ή τη ζέστη. Οι «αθόρυβες» ίνες C ανταποκρίνονται στη θερμότητα μόνο όταν ευαισθητοποιούνται. Η πλειονότητα των τύπων ινών δερματικών ινών θηλαστικών έχει λειτουργία ερεθισμού του πόνου (περίπου 67% του συνολικού τύπου ινών) αφήνοντας το 33% ως ίνες αφής και πίεσης (Sneddon, 2019).

Οι δ-μηχανονυποδοχείς διεξάγονται γρήγορα και πιστεύεται ότι σηματοδοτούν τον «πρώτο πόνο». Αυτοί οι υποδοχείς έχουν σχετικά υψηλότερα μηχανικά κατώφλια από τις ίνες αφής, και ένα μικρό ποσοστό ανταποκρίνεται στη θερμότητα (12%) και οι μισοί διεγείρονται από τις χαμηλές θερμοκρασίες. Οι ίνες C πιστεύεται ότι υποστηρίζουν τον μακροπρόθεσμο πόνο με τους ανθρώπους να κατηγοριοποιούν τη διέγερση με Αδ ως πόνο «τρύπημα» και τη διέγερση με τη μεσολάβηση C ως «πιεστικό» και «θαμπό» πόνο (Sneddon, Braithwaite and Gentle, 2003). Περίπου το ένα τρίτο των ινών C στα θηλαστικά είναι πολυτροπικές και ανταποκρίνονται σε επιβλαβείς χημικές ουσίες εκτός από τα μηχανικά και τα θερμικά ερεθίσματα. Οι ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των αλγοϋποδοχέων έχουν διερευνηθεί εκτενέστερα (Marwaha et al., 2016; Burrell, 2017). Λειτουργικά, κωδικοποιούν πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο του ερεθίσματος, την ένταση και τη διάρκεια στα αντανακλαστικά κέντρα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, μεσολαβούν σε παθολογικές αποκρίσεις στέρησης μακριά από το επιζήμιο ερέθισμα και διευκολύνουν μακροπρόθεσμες αλλαγές συμπεριφοράς αφού η συνεχής διέγερσή τους έχει ως αποτέλεσμα παρατεταμένος πόνος (Sneddon et al., 2014).

Έχουν επίσης μελετηθεί και τα μονοπότια που οδηγούν στον πόνο σε υψηλότερες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος των ψαριών. Μελέτες

έχουν δείξει την καταγραφή της ηλεκτρικής δραστηριότητας μετά από ερεθίσματα στον πρόσθιο και τον μεσεγκέφαλο του σολομού του Ατλαντικού (*Salmo salar*), του χρυσόψαρου (*Carassius auratus*) και της ιριδίζουσας πέστροφας (Dunlop and Laming, 2005; Nordgreen *et al.*, 2007). Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η ηλεκτρική δραστηριότητα διέφερε ανάλογα με τον τύπο του ερεθίσματος, καθώς και την έντασή του. Ωστόσο, οι πληροφορίες παραμένουν ελάχιστες σχετικά με το θέμα, και ορισμένοι υποστηρίζουν ότι τα ψάρια δεν έχουν την ικανότητα να επεξεργάζονται τα ερεθίσματα του πόνου στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε κάτι περισσότερο από τον πόνο (Rose *et al.*, 2014). Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν ο εγκέφαλος του ψαριού είναι επαρκώς ανεπτυγμένος ώστε να επιτρέπει αυτά τα συναισθήματα ή εάν αυτό είναι ένα αποκλειστικό χαρακτηριστικό των θηλαστικών. Αρχικά αυτό φάνηκε στην πέστροφα, αλλά μέχρι τώρα έχει δοκιμαστεί και ο κυπρίνος, το χρυσόψαρο, το ψάρι ζέβρα και ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός άλλων ειδών ψαριών και οι συγκρίσεις μεταξύ των ειδών παρέχουν ενδείξεις για γενικούς μηχανισμούς που προκαλούν πόνο και σχετίζονται με τον πόνο (Dunlop and Laming, 2005; Nordgreen *et al.*, 2007).

	Ψάρια (Τελεόστεοι)	Μαλάκια (κεφαλόποδα)	Καρκινοειδή (δεκάποδα)
Υποδοχείς πόνου	Ναι	Ναι	Ναι
Μονοπάτια του ΚΝΣ	Ναι	Ναι	Ναι
Κεντρική επεξεργασία του ΚΝΣ	Ναι	Ναι	Ναι
Υποδοχείς για αναλγητικά φάρμακα	Ναι	Ναι	Ναι
Φυσιολογικές αποκρίσεις	Ναι	Ναι	Ναι
Μετακίνηση μακριά από επιβλαβή ερεθίσματα	Ναι	Ναι	Ναι
Μη φυσιολογικές αλλαγές συμπεριφοράς	Ναι	Ναι	Ναι
Προστατευτική συμπεριφορά	Ναι	Ναι	Ναι
Οι αποκρίσεις μειώνονται από αναλγητικά φάρμακα	Ναι	Ναι	Ναι
Αυτοχορήγηση αναλγησίας	Ναι	Όχι ακόμη	Όχι ακόμη
Αποκρίσεις με υψηλή προτεραιότητα έναντι άλλων ερεθισμάτων	Ναι	Ναι	Ναι
Τροποποιημένες επιλογές/προτιμήσεις συμπεριφοράς	Ναι	Ναι	Ναι
Αντισταθμίσεις με άλλες απαιτήσεις	Ναι	Όχι ακόμη	Ναι

Πίνακας 2. Κριτήρια για τον πόνο των ζώων και το κατά πόσον τα κριτήρια αυτά εκδηλώνονται σε υδρόβια ζώα, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών τελεοστέα, τα κεφαλόποδα και δεκάποδα καρκινοειδών.

-Ναι: υποδεικνύει ότι το κριτήριο έχει επιβεβαιωθεί -Όχι ακόμη: υποδεικνύει έλλειψη στοιχείων για το κριτήριο (Sneddon, 2015).

Τα ψάρια ζουν κυρίως υδρόβιο τρόπο ζωής και επομένως έχουν διαφορετική ιστορία ζωής και οικολογικές πιέσεις που διαμορφώνουν την εξέλιξή τους σε σύγκριση με τα χερσαία ασπόνδυλα και σπονδυλωτά (Sneddon, 2015). Μια εξερεύνηση των ερευνητικών ευρημάτων από τα ψάρια μπορεί να ανακαλύψει την έκταση της εξελικτικής διατήρησης ή τις διαφορές στους υποκείμενους

μηχανισμούς έως τις συμπεριφορικές αντιδράσεις των ζώων στον πόνο (Sneddon, 2009).

2.2. Δείκτες πόνου

Οι περισσότερες συμπεριφορικές αλλαγές στα ψάρια μετά από επιβλαβή διέγερση συμβαίνουν στην περίοδο αμέσως μετά τη θεραπεία για έως και 120 λεπτά, με κορύφωση μεταξύ 60 και 90 λεπτών. Τέτοιες αλλαγές περιλαμβάνουν ανώμαλες συμπεριφορές όπως τρίψιμο της πληγείσας περιοχής, λίκνισμα στο πέρα δώθε και στα δύο θωρακικά πτερύγια και λιγότερο κολύμπι. Αυτές οι συμπεριφορές είναι εμφανείς και εύκολα παρατηρήσιμες εάν τα ψάρια βρίσκονται σε γυάλινες δεξαμενές. Η παρατήρηση είναι πιο δύσκολη σε αδιαφανείς δεξαμενές και σε μεγάλους αριθμούς ψαριών. Η μείωση της δραστηριότητας είναι εύκολα μετρήσιμη, αλλά απαιτεί ένα υπάρχον μέτρο της κανονικής συμπεριφοράς της προεπεξεργασίας. Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες καταγράφουν τις βασικές παρατηρήσεις για 15 έως 30 λεπτά, επομένως αυτό δεν είναι συνήθως πολύ δαπανηρό από άποψη χρόνου, αν και η αξιολόγηση υψηλών αριθμών ψαριών θα απαιτούσε περισσότερο χρόνο.

Ένας άλλος ισχυρός δείκτης που μπορεί εύκολα να μετρηθεί είναι ο ρυθμός αερισμού. Στην ιριδίζουσα πέστροφα, ένας κανονικός μέσος ρυθμός 54 παλμών/λεπτό αυξήθηκε σε πάνω από 90 παλμούς/λεπτό μετά από ένα δυνητικά επώδυνο συμβάν (Sneddon, 2003a). Το ψάρι ζέβρα εμφάνισε παρόμοια αλλαγή στον ρυθμό αερισμού, ενώ ο κυπρίνος δεν παρουσίασε τέτοια αλλαγή (Reilly *et al.*, 2008). Αυτά τα αποτελέσματα απεικονίζουν τις ειδικές για το είδος αποκρίσεις και την αναγκαιότητα σημαντικών και αξιόπιστων δεικτών αξιολόγησης του πόνου για οποιοδήποτε ζώο, ώστε να καταστεί δυνατή η έγκαιρη ανίχνευση και παρέμβαση. Ωστόσο, οι τρέχουσες μελέτες συμπεριφοράς του πόνου στα ψάρια περιορίζονται σε έναν πολύ μικρό αριθμό ειδών (την ιριδίζουσα πέστροφα, τον κυπρίνο και το ψάρι ζέβρα) και σε ένα μοντέλο πόνου (υποδόρια ένεση οξικού οξέος). Υπάρχει σημαντική ανάγκη για περισσότερη έρευνα που να περιλαμβάνει ένα ευρύτερο

φάσμα ειδών, διαφορετικά μέτρα πόνου και διαφορετικά μοντέλα πόνου (π.χ. επιβλαβής διέγερση πτερυγίων και σώματος, ψαλίδισμα πτερυγίων ή άλλα βλάβη ιστού, ασθένεια και προσβολή από παράσιτα) (Sneddon, 2015).

2.3 Συμπεριφορικές και Φυσιολογικές Αλλαγές

Οι αλλαγές συμπεριφοράς που υποδεικνύουν μια προστατευτική λειτουργία ως απάντηση σε ένα δυνητικά οδυνηρό γεγονός είναι σημαντικοί δείκτες μιας αρνητικής συναισθηματικής συνιστώσας που σχετίζεται με την αισθητηριακή εμπειρία. Έτσι, η ικανότητα να μαθαίνει το ζώο να αποφεύγει ένα επιβλαβές ερέθισμα είναι ένας πολύ χρήσιμος δείκτης για το αν ένα ζώο βιώνει ένα ερέθισμα ως αποστροφικό, και μελέτες έχουν δείξει ότι τα τελεόστεα ψάρια είναι ικανά να μάθουν να αποφεύγουν ένα επιβλαβές ερέθισμα. Για παράδειγμα, το χρυσόψαρο έμαθε να αποφεύγει ένα ηλεκτροσόκ, αλλά η μάθηση δεν συνέβη εάν λάμβανε την αναλγητική μορφίνη. Η αποστροφική φύση του ερεθίσματος ήταν σημαντική για τη μάθηση και την εδραίωση της μνήμης. Παρομοίως, η ιριδίζουσα πέστροφα, ο κυπρίνος και το ψάρι ζέβρα που βίωσαν μια επιβλαβή διέγερση παρουσίασαν ταχείες αλλαγές στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά που παρέμειναν για έως και 6 ώρες. Σε άλλες μελέτες, η ιριδίζουσα πέστροφα που έλαβε ένεση αραιωμένου οξικού οξέος στα άνω και τα κάτω μετωπικά χείλη έτριβαν την πληγείσα περιοχή. Αντίθετα, τα ψάρια στα οποία χορηγήθηκε αλμυρό διάλυμα δεν παρουσίασαν αυτή την συμπεριφορά, η οποία μπορεί να είχε ως λειτουργία τη μείωση της έντασης της βλαβερής αίσθησης, όπως έχει περιγραφεί σε ανθρώπους και θηλαστικά που τρίβουν μια πληγείσα περιοχή για να μειώσουν τον πόνο (Sneddon, 2009).

Η μείωση της κολύμβησης και άλλων δραστηριοτήτων στην ιριδίζουσα πέστροφα και στο ψάρι ζέβρα μπορεί επίσης να έχει προστατευτικό ρόλο όσον αφορά την ενεργειακή δαπάνη (επιτρέποντας την εκτροπή της ενέργειας προς ανάκτηση) και την πρόληψη περαιτέρω βλάβης και πόνου (Sneddon, 2003a, 2003b; Reilly *et al.*, 2008). Οι πέστροφες διέκοψαν τη φυσιολογική συμπεριφορά τροφοδοσίας μετά την ένεση οξέος στα χείλη τους και συνέχισαν να τρέφονται μόνο όταν οι δυσμενείς αλλαγές στη φυσιολογία υποχωρούσαν (Sneddon, 2003a, 2003b). Μια τέτοια αλλαγή συμπεριφοράς μπορεί να έχει μια προστατευτική λειτουργία

συγκρίσιμη με τη φύλαξη συμπεριφοράς σε ένα ζώο που μειώνει τη χρήση μιας οδυνηρής περιοχής ή άκρου για να το προστατεύει από περαιτέρω πόνο ή τραυματισμό (Shega *et al.*, 2008; Sneddon, 2009).

Τα ψάρια που βιώνουν ένα επιβλαβές ερέθισμα παρουσιάζουν επίσης μια δραματική αύξηση του ρυθμού εξαερισμού των βραγχίων (αριθμός χτύπων βραγχίων ανά λεπτό). Για παράδειγμα στην πέστροφα και στο ψάρι ζέβρα, σχεδόν διπλασιάζεται σε σχέση με τους κανονικούς ρυθμούς. Οι πέστροφες παρουσιάζουν συνήθως αυτά τα ποσοστά μόνο στην μέγιστη ταχύτητα κολύμβησης τους, αλλά παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας στα ψάρια που ανταποκρίνονται σε επιβλαβή ερεθίσματα (Sneddon, 2009).

Πολλές μελέτες προσπάθησαν να προσδιορίσουν τη σημασία αυτών των επιβλαβών ερεθισμάτων για τα ψάρια. Με τη χρήση ανταγωνιστικών ερεθισμάτων, οι ερευνητές απέδειξαν ότι οι αντιδράσεις στον πόνο είχαν προτεραιότητα στην πέστροφα που είχε βιώσει ένα επιβλαβές ερέθισμα, ενώ το ψάρι δεν έδειξε κατάλληλη αντίδραση φόβου είτε αποφεύγοντας νέα αντικείμενα είτε εκθέτοντας συμπεριφορά κατά των αρπακτικών (Sneddon, 2003b). Μελέτες στα χρυσόψαρα και στις πέστροφες έδειξαν ότι μπορούν να μάθουν να αποφεύγουν την ηλεκτροπληξία, καθώς απέφευγαν να εισέλθουν στην περιοχή όπου έγινε το σοκ ακόμα και όταν υπήρχε φαγητό (Millsopp and Laming 2008). Ωστόσο, η συμπεριφορά αποφυγής εξαρτιόταν από τα επίπεδα πείνας, καθώς τα ψάρια που είχαν έρθει σε κατάσταση σοκ προηγουμένως θα έμπαιναν να βρουν τροφή αν είχαν λιμοκτονήσει. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι ένα δυνητικά επώδυνο γεγονός ήταν σημαντικό για τα ψάρια, αλλοιώνοντας τόσο τη συμπεριφορά όσο και τη φυσιολογία τους και επηρεάζοντας αρνητικά τις φυσιολογικές συμπεριφορικές αποκρίσεις τους (Sneddon, 2009).

2.4 Ευζωία στα ψάρια

Σύμφωνα με τον (Ashley, 2007), ένας ορισμός της ευημερίας δεν βασίζεται μόνο στη σωματική υγεία αλλά και στην έλλειψη ψυχικής οδύνης. Επομένως, η έννοια της ευημερίας είναι ευρύτερη από την απλή έννοια της «ευεξίας», που

αναφέρεται περισσότερο στη σωματική υγεία και στην αποφυγή παρατεταμένου στρες. Το άγχος μπορεί να οριστεί ως μια κατάσταση κατά την οποία η ομοιόσταση, δηλαδή η δυναμική ισορροπία του ζωικού οργανισμού, διαταράσσεται από εγγενή ή εξωγενή ερεθίσματα, που συνήθως ονομάζονται στρεσογόνοι παράγοντες. Η απόκριση στο στρες είναι μια προσαρμοστική λειτουργία και δεν σημαίνει απαραίτητα ταλαιπωρία ή κακή ευημερία (Ashley, 2007).

Για να διασφαλιστεί η καλή διαβίωση των ψαριών που στεγάζονται, είναι απαραίτητο να υπάρχουν καλοί δείκτες που θα πρέπει να είναι άμεσα και αξιόπιστα αναγνωρίσιμοι και ελάχιστα επεμβατικοί. Οι δείκτες ευημερίας θα πρέπει να περιλαμβάνουν διαφορετικές πτυχές που σχετίζονται με τη συμπεριφορά και τη φυσιολογική απόδοση των αιχμαλώτων ατόμων. Οι δείκτες στρες μπορούν να θεωρηθούν ως μέτρο κακής ευημερίας όταν το άγχος είναι μια παρατεταμένη και μακροπρόθεσμη απάντηση, που προκαλεί δυσπροσαρμοστικές συνέπειες (Ashley, 2007). Έτσι, η υγεία και η αποφυγή του άγχους συμβάλλουν στην αξιολόγηση της ευημερίας, αλλά οι θετικές συνθήκες ευημερίας αποτελούν με τη σειρά τους προϋπόθεση για τη σωματική υγεία και την αποφυγή του στρες.

Οι φυσικοί δείκτες για την καλή διαβίωση των ψαριών περιλαμβάνουν το χρώμα των ματιών και του δέρματος και τις αλλαγές (με σκουρόχρωμα που συνήθως συνδέονται με ασθένεια), μορφολογικές αλλοιώσεις (όπως δαγκωμένα πτερύγια), απροθυμία να κινηθούν, αλλοιωμένη στάση σώματος, παραγωγή βλέννας και συχνότητα κραδασμών. Οι συμπεριφορές που γενικά συνιστώνται στην τρέχουσα βιβλιογραφία για την αξιολόγηση της ευημερίας των ψαριών στην έρευνα και την υδατοκαλλιέργεια λαμβάνουν υπόψη τις ακόλουθες κύριες κατηγορίες: (1) χρήση χώρου, επιλογή οικοτόπου και δομική πολυπλοκότητα του περιβάλλοντος εκτροφής (2) συμπεριφορά αναζήτησης τροφής και τροποποιημένη κατανάλωση τροφίμων (3) επιθετικότητα προς τους ομοειδείς, ειδικά σε σχέση με την πυκνότητα των ζώων και, (4) χωροχρονικά μοτίβα συμπεριφοράς, αλλαγές στη χρήση της στήλης του νερού, δραστηριότητα κολύμβησης (μεταβολή ταχύτητας και κατεύθυνσης), ρύπανση για να ξεφύγουν από τα αρπακτικά και διαταραχή του κινκάρδιου ρυθμού (δηλαδή αυξημένη δραστηριότητα όταν τα ζώα πρέπει να είναι ανενεργά). Οι δείκτες συμπεριφοράς έχουν επίσης προταθεί ως χρήσιμα εργαλεία

για την αξιολόγηση της «αγριότητας» των εκτρεφόμενων ψαριών στο πλαίσιο προγραμμάτων υδατοκαλλιέργειας που στοχεύουν στην ανανέωση του αποθέματος (Toni *et al.*, 2019).

2.5 Μοριακή βιολογία του πόνου στα ψάρια

Ο πόνος είναι μια πολύπλοκη φυσιολογική αντίδραση στον τραυματισμό, που κατευθύνει σήματα πόνου από τους υποδοχείς πόνου στον εγκέφαλο (Demin *et al.*, 2020). Στους ανθρώπους, η γενετική διακύμανση που σχετίζεται με μεταβλητούς φαινοτύπους πόνου περιλαμβάνει τα αμινεργικά γονίδια GTP κυκλοϋδρολάση 1 (GCH1), τον μεταφορέα της σεροτονίνης (SLC6A4), τον αδρενοϋποδοχέα b-2 (ADRB2) και τον υποδοχέα της σεροτονίνης 5-HT_{2a} (5-HTR2A) (Young, Lariviere and Belfer, 2012), τα γονίδια του υποτύπου 1 του υποδοχέα των βανιλλοειδών (TRPV1), του υποτύπου 1 του δέλτα υποδοχέα οπιοειδών (OPRD1) και του γονιδίου της κατεχόλης Ο-μεθυλτρανσφεράσης (COMT) (Kim *et al.*, 2004).

Πολλά μόρια και οι υποδοχείς τους εμπλέκονται στον πόνο και στην αίσθηση του πόνου. Παραδείγματα από αυτά που έχουν εμπλακεί στον πόνο των θηλαστικών είναι τα οξεοευαίσθητα κανάλια ιόντων (ASICs), τα οποία μεσολαβούν στις αντιδράσεις πόνου στα οξέα (St, Smith and Lewin, 2009; Omerba *et al.*, 2015; Burrell, 2017), τα κανάλια δυναμικού παροδικού υποδοχέα (TRP), τα οποία υποστηρίζουν τον πόνο λόγω θερμότητας (Marwaha *et al.*, 2016), και οι υποδοχείς οπιοειδών και οι ενδογενείς ουσίες που είναι εγγενείς στην ανακούφιση από τον πόνο ή την αναλγησία που προκαλείται από τα οπιοειδή (Rachinger-adam, Conzen and Azad, 2011).

Όσον αφορά τα μοντέλα πόνου, έχει μελετηθεί η νευρική διαδικασία για την ανίχνευση επιβλαβών ή δυνητικά επιβλαβών ερεθισμάτων που είναι γνωστά ως πόνος. Μια σημαντική οικογένεια υποδοχέων είναι τα πολυτροπικά μεταβατικά δυναμικά κανάλια υποδοχέα (TRP κανάλια) από τα οποία τα πιο σημαντικά, τα Trpv1, Trpa1a και Trpa1b είναι ομόλογα του ανθρώπινου TRPV1 και TRPA1, αντίστοιχα. Αυτοί οι υποδοχείς ανταποκρίνονται σε μια μεγάλη ποικιλία ερεθισμάτων, όπως αλλαγές στη θερμοκρασία, το pH ή την μηχανική πίεση. Η

ενεργοποίηση του καναλιού προκαλεί εισροή του νατρίου και του ασβεστίου και μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία δυναμικού δράσης. Ανάλογα με το αν ο υποδοχέας του πόνου βρίσκεται στο κεφάλι ή στο υπόλοιπο σώμα, αυτό το σήμα στη συνέχεια μεταφέρεται είτε μέσω των γαγγλίων του τριδύμου (TG) είτε μέσω των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας (DRG) και του ραχιαίου κέρατου στον εγκέφαλο (Ohnesorge, Heintz and Lewejohann, 2021).

A) Οξεοευαίσθητα κανάλια ιόντων ASIC

Τα οξεοευαίσθητα κανάλια ιόντων ASIC κωδικοποιούνται από τέσσερα γονίδια που με εναλλακτικό μάτισμα καταλήγουν σε έξι ισομορφές (ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 και ASIC4) που εκφράζονται στους μηχανοαισθητηριακούς νευρώνες θηλαστικών και περικλείονται από χαμηλό pH ή πρωτόνια. Αυτοί οι δεσμευμένοι στη μεμβράνη υποδοχείς ενεργοποιούνται από μειωμένο εξωκυτταρικό pH με αποτέλεσμα το άνοιγμα ενός εγγενούς διαύλου νατρίου που εκτείνεται στη μεμβράνη (Sneddon, 2019). Πριν από αυτή τη μελέτη, υπήρχε η αντίληψη ότι η ενεργοποίηση των ASICs μεσολαβούμενη από πρωτόνια (εκτός των ASIC2b και ASIC4) προήλθε από τους τελεόστεους ιχθείς, καθώς τα ASIC εντοπίστηκαν σε ένα ψάρι χωρίς γνάθο, το *Lampetra fluviatilis*, και ένα χόνδρινο ψάρι, το *Squalus acanthias*, και σχημάτισαν μεμβρανικές πρωτεΐνες που δεν ενεργοποιήθηκαν από πρωτόνια (Coric *et al.*, 2005). Αυτό σημαίνει ότι εάν αυτά τα είδη διαθέτουν υποδοχείς πόνου ή άλλους χημειοαισθητηριακούς υποδοχείς, ενδέχεται να μην ανταποκρίνονται στο οξύ. Έξι ASIC έχουν χαρακτηριστεί στο ψάρι ζέβρα, *Danio rerio*, (zASICs; zASIC1.1, zASIC1.2, zASIC1.3, zASIC2, zASIC4.1 και zASIC4.2) που έχουν παρόμοιες μοριακές μάζες και μοιράζονται το 60-75% ομοιότητας του αμινοξέος με το ASIC του αρουραίου και του ανθρώπου (Viña, Parisi and Cabo, 2015). Η έκθεση ή η έγχυση χημικών ουσιών χαμηλού pH, και ειδικότερα του οξικού οξέος, έχει ως αποτέλεσμα την αλλοιωμένη συμπεριφορά και φυσιολογία στο ψάρι ζέβρα και την ιριδίζουσα πέστροφα που αποτρέπει από αναλγητικά φάρμακα και έχει αποδειχθεί ότι μεσολαβείται από τα ASIC. Έτσι, η λειτουργία των ASIC φαίνεται να διατηρείται εξελικτικά (Sneddon, 2019).

B) Κανάλια δυναμικού παροδικού υποδοχέα

Τα κανάλια ιόντων που καλύπτονται από τον συνδέτη TRP (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 και TRPA1) νευρώνουν τις αισθήσεις που σχετίζονται με τη θερμοκρασία και τα μηχανικά ερεθίσματα και εκφράζονται στους αλγοϋποδοχείς θηλαστικών (Marwaha *et al.*, 2016). Αυτά τα κανάλια ιόντων αποτελούν ένα πρωταρχικό βήμα για την ανίχνευση του πόνου, καθώς μεταφέρουν επιβλαβή ερεθίσματα σε ρεύματα. Εννέα κανάλια θερμό-TRP έχουν εντοπιστεί στο ψάρι ζέβρα, και μερικά από αυτά διαφέρουν από αυτά που υπάρχουν στα θηλαστικά (Saito and Shingai, 2006), γεγονός που μπορεί να οφείλεται στον προηγούμενο γονιδιωματικό διπλασιασμό στο ψάρι ζέβρα. Μόλις ενεργοποιηθούν, τα thermo-TRPs του ψαριού ζέβρα (TRPV1/2, TRPV4, TRPM2, TRPM4a, TRPM4b, TRPM4c, TRPM5, TRPA1a και TRPA1b) προάγουν την εισροή ιόντων προκαλώντας αλλαγές στο δυναμικό ηρεμίας της μεμβράνης. Ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) απέτυχαν να βρουν αλγοϋποδοχείς που να ανταποκρίνονται στο κρύο (Ashley, Sneddon and McCrohan, 2007), αλλά αυτό το είδος ζει σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (0-25°C), ενώ το ψάρι ζέβρα είναι ένα τροπικό είδος που κατοικεί σε μικρότερο εύρος θερμοκρασιών (20- 30°C). Η επιβλαβής ζέστη έχει αρνητική επίδραση στη συμπεριφορά του χρυσόψαρου (*Carassius auratus*) και της ζέβρας που βελτιώνεται από την χρήση αναλγητικών (Nordgreen *et al.*, 2009; Lopez-Luna *et al.*, 2017a).

Γ) Υποδοχείς οπιοειδών

Το ενδογενές σύστημα των οπιοειδών περιλαμβάνει τρεις υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνη, τους μ , δ και κ -υποδοχείς και τους αντίστοιχους συνδέτες τους β -ενδορφίνη, εγκεφαλίνη και δυνορφίνη. Αυτοί οι υποδοχείς και οι ουσίες βρίσκονται κυρίως στις περιοχές του νευρικού συστήματος που εμπλέκονται στον πόνο και στην αίσθηση του πόνου στα θηλαστικά (Rachinger-adam, Conzen and Azad, 2011), και οι ενδογενείς ουσίες προσφέρουν αναλγησία τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό σύστημα πόνου.

Το σύστημα οπιοειδών στα ψάρια είναι πολύ παρόμοιο με αυτό που βρίσκεται στα θηλαστικά (Demin *et al.*, 2018) και έτσι τα μοντέλα ψαριών χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του εθισμού και της απόσυρσης (Bossé and Peterson, 2017). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει σημαντικές αλλαγές στη

συμπεριφορά του ψαριού ζέβρα σε πιθανά επώδυνα ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης δραστηριότητας (Deakin *et al.*, 2019; F. V. Costa *et al.*, 2019), η οποία έχει επίσης παρατηρηθεί στα θηλαστικά (Sneddon *et al.*, 2014). Η συγκέντρωση έκθεσης σε 0.1% οξικό οξύ ή παραπάνω προκαλεί υποκινητικότητα σε 5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση του ψαριού ζέβρα, ενώ τα αναισθητικά ασπιρίνη, λιδοκαΐνη και μορφίνη αποτρέπουν την αλλαγή στη συμπεριφορά (Lopez-Luna *et al.*, 2017b). Η υποδόρια ένεση οξικού οξέος στα μετωπιαία χείλη οδήγησε σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας σε ενήλικο ψάρι ζέβρα και στην ιριδίζουσα πέστροφα (Ashley *et al.*, 2009; Deakin *et al.*, 2019). Αν και απαιτούνται περαιτέρω δοκιμές, τα οπιοειδή φαίνεται να ασκούν την ίδια λειτουργία στον πόνο στο ζωικό βασίλειο.

Όσον αφορά το υδάτινο περιβάλλον που κατοικούν τα ψάρια, είναι απίθανο το σύστημα πόνου και η αίσθηση πόνου τους να είναι παρόμοιο με τα ζώα που ζουν σε ένα χερσαίο περιβάλλον. Η οικολογική και εξελικτική ιστορία των ψαριών είναι πιθανό να παρουσιάζει διαφορετικούς κινδύνους που θα επηρεάσουν τον κίνδυνο να έρθουν σε επαφή με δυνητικά επώδυνα γεγονότα ή ερεθίσματα. Τα ψάρια που έχουν κύστη κολύμβησης μπορούν να προσαρμόσουν την άνωσή τους στο νερό. Έτσι μπορεί να μειωθούν οι τραυματισμοί που σχετίζονται με τη βαρύτητα (πτώσεις). Η αραίωση επιβλαβών χημικών ουσιών που εισέρχονται σε ένα μεγάλο υδάτινο σώμα μπορεί να σημαίνει ότι ενέχουν μικρότερο κίνδυνο εάν η αραίωση έχει ως αποτέλεσμα συγκέντρωση κάτω του ορίου. Σημαντικές αλλαγές στη θερμοκρασία συμβαίνουν λιγότερο σε σύγκριση με τα χερσαία περιβάλλοντα. Συνεπώς, ο κίνδυνος ζημιάς από τη ζέστη ή το κρύο μπορεί να είναι μικρότερος. Οποιοσδήποτε διαφορές στο σύστημα αισθητοποίησης του πόνου των ψαριών μπορεί να αντικατοπτρίζουν αυτές τις περιβαλλοντικές διαφορές.

Στα ψάρια τελεοστέων, ηλεκτροφυσιολογικές και ανατομικές μελέτες έχουν εντοπίσει υποδοχείς πόνου στην ιριδίζουσα πέστροφα (Sneddon, 2003a). Οι ίνες C και οι ίνες Aδ χαρακτηρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες υποδοχέων πόνου, συμπεριλαμβανομένων των πολυτροπικών, μηχανοθερμικών και μηχανοχημικών (Sneddon, 2003a; Ashley, Sneddon and McCrohan, 2006; Mettam, McCrohan and Sneddon, 2012). Αυτές οι ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι οι

αλγοϋποδοχείς της πέστροφας είναι φυσιολογικά πανομοιότυποι με τους αλγοϋποδοχείς των θηλαστικών (Sneddon, 2004). Ωστόσο, υπάρχει μια σειρά από συναρπαστικές διαφορές: για παράδειγμα, οι αλγοϋποδοχείς της πέστροφας δεν ανταποκρίνονται σε επιβλαβείς κρίες θερμοκρασίες κάτω από 4°C (Ashley, Sneddon and McCrohan, 2007). Σε ένα εξελικτικό πλαίσιο, αυτή η έλλειψη ανταπόκρισης στο επιβλαβές κρύο (λιγότερο από 4°C) έχει νόημα, καθώς η πέστροφα βρίσκεται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, καθιστώντας δυσπροσαρμοστικό να έχουμε κρίους υποδοχείς πόνου. Οι προνύμφες των ψαριών ζέβρα στα 5 dpf πραγματοποιούν αλλαγές συμπεριφοράς όταν εκτίθενται σε επιβλαβή θερμότητα, στο νερό με έγχυση CO₂ και οξικό οξύ, αλλά δεν συμβαίνουν αλλαγές συμπεριφοράς όταν παρέχεται μια σειρά αναλγητικών φαρμάκων (Lopez-Luna *et al.*, 2017b, 2017a). Στην πέστροφα, οι ίνες Αδ λειτουργούν ως πολυτροπικοί υποδοχείς πόνου και έτσι έχουν την ίδια λειτουργικότητα με τις ίνες C θηλαστικών. Αυτοί οι πολυτροπικοί αλγοϋποδοχείς ψαριών Αδ είναι μυελινωμένοι, επομένως η ταχύτητα αγωγής είναι πιο γρήγορη και έτσι η σηματοδότηση των επιβλαβών ερεθισμάτων μπορεί να είναι ταχύτερη (Sneddon, 2019).

Η ιριδίζουσα πέστροφα εμφανίζει ανώμαλες κινήσεις του θωρακικού πτερυγίου πλάι-πλάι και τρίψιμο των χειλιών όταν του δοθεί ένα επιβλαβές ερέθισμα (Sneddon, 2003b). Οι νεαροί μπακαλιάροι του Ατλαντικού που έχουν υποστεί αγωγή με καψαϊκίνη, οξικό οξύ ή τραυματίζονται από αγκίστρι, εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό παλμών, μη φυσιολογικό πλευρικό τίναγμα της κεφαλής και συχνά αιωρούνται στον πυθμένα (Eckroth *et al.*, 2014). Τα ψάρια ζέβρα που εκτίθενται σε οξικό οξύ παρουσιάζουν χαρακτηριστική απόκριση που μοιάζει με κοιλιακή συστολή και μειωμένη κινητική δραστηριότητα (F. V Costa *et al.*, 2019; F. V. Costa *et al.*, 2019). Ενώ η έρευνα για τον πόνο στα ψάρια είναι σχετικά νέα, είναι πιθανές διαφορές σε ορισμένα είδη. Για παράδειγμα, τα ψάρια ζέβρα δεν εμφανίζουν αλλοιωμένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πόνο στα γάγγλια της ράχης, μια από τις βασικές δομές στην παθογένεση του πόνου (Malafoglia *et al.*, 2013) και εκφράζουν τον υποδοχέα οπιοειδών nociceptin (NOP) που παίζει διαφορετικό ρόλο από αυτόν των θηλαστικών (Rivas-boyero and Herrero-turrio, 2010).

Υπάρχει μια ενδιαφέρουσα διαστρωμάτωση μεταξύ των ειδών της ευαισθησίας στον πόνο, που διαμορφώνεται από διαφορές μεταξύ των ατόμων στη νευροφυσιολογία, τη νευρογενετική, τη νευροχημεία και τη συμπεριφορά (Coghill, 2010). Οι περισσότεροι δείκτες πόνου στα ψάρια ζέβρα, είναι παρόμοιοι με τα τρωκτικά και τους ανθρώπους. Ομοίως, σε μια ομάδα ζέβρα-μάρτυρα που έγινε ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 2.5% ή 5% οξικό οξύ, υπήρχε 2-4 φορές διαφορά στις μέσες αποκρίσεις που σχετίζονται με την καμπυλότητα της κοιλιάς που μοιάζει με συσπάσεις μεταξύ μεμονωμένων ψαριών που δοκιμάστηκαν, ενισχύοντας περαιτέρω αυτήν την έννοια (Demin *et al.*, 2020).

Ο πρώτος χαρακτηρισμός των αλγοϋποδοχέων σε ένα τελεόστεο (οστεώδες) ψάρι, την ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) δημοσιεύτηκε το 2002. Έκτοτε, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα να εμφανίζουν πόνο τα τελεόστεα ψάρια χρησιμοποιώντας νευροανατομικά, ηλεκτροφυσιολογικά, μοριακά, φυσιολογικά, απεικονιστικά και τεχνικές συμπεριφοράς. Εκτός από την ιριδίζουσα πέστροφα, έχουν διερευνηθεί αρκετά άλλα είδη ψαριών, όπως ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*), το χρυσόψαρο (*Carassius auratus*), ο κοινός κυπρίνος (*Cyprinus carpio*), ο Νείλος και Τιλάπια Μοζαμβίκης (*Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus*), και το ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*). Επιβλαβή ερεθίσματα, όπως το μηχανικό κόψιμο, η υψηλή θερμοκρασία και οι αλγογονικές χημικές ουσίες έχουν ως αποτέλεσμα να επιφέρουν βαθιές αλλαγές στη συμπεριφορά των ψαριών και σε ορισμένες περιπτώσεις αλλοιώνονται οι φυσιολογικές παράμετροι. Κοινό σε όλα τα είδη ψαριών που έχουν δοκιμαστεί μέχρι τώρα είναι οι σημαντικές αλλαγές στη συμπεριφορά που σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προληφθεί με τη χρήση αναλγησίας (ανακούφιση από τον πόνο). Η αποδοχή του πόνου στα ψάρια έχει φυσικά επιπτώσεις στη θεραπεία τους. Στο πλαίσιο επιστημονικών πειραμάτων, τα ψάρια προστατεύονται από τη νομοθεσία σε πολλές χώρες, μεταξύ των οποίων η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) και οι ερευνητές που χρησιμοποιούν μοντέλα ψαριών είναι νομικά υποχρεωμένοι να αποφεύγουν, να ελαχιστοποιούν και να ανακουφίζουν τον πόνο όταν ο πόνος δεν είναι ο στόχος της μελέτης (Sneddon, 2023).

2.6 Χρήση αναλγητικών για τον πόνο

Εκτός από μια πιο διεξοδική κατανόηση των βασικών μηχανισμών, ο γενικός στόχος της έρευνας για τον πόνο στα ψάρια ζέβρα ήταν πάντα είτε να βελτιώσει τις επώδυνες διαδικασίες των ψαριών ζέβρα στα πειράματα σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές 3R (Replace, Reduce, Refine) είτε να ανακαλύψει νέες ευκαιρίες στη μεταφραστική έρευνα. Παρόλο που εξακολουθεί να είναι δύσκολο να αποδειχθούν οι οδυνηρές καταστάσεις στα ψάρια ζέβρα, ο αυξανόμενος αριθμός των κλασικών αναλγητικών που ήταν σε θέση να αποκαταστήσουν τη φυσιολογική συμπεριφορά μετά από θεραπείες που προκαλούν ή ενδεχομένως προκαλούν πόνο, δείχνει εντυπωσιακά τους παραλληλισμούς μεταξύ του συστήματος της αίσθησης του πόνου στα ψάρια και στα θηλαστικά. Αυτές οι αναλγητικές ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τον μηχανισμό δράσης τους ως οπιοειδή, αναισθητικά ή μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ). Η εφαρμογή αναλγητικών θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη για δυνητικά οδυνηρές διαδικασίες ώστε να παραμείνει σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές των 3R. Ένα βέλτιστο αναλγητικό σχήμα δεν είναι μόνο απαραίτητο για την ευημερία των ζώων, αλλά επίσης αποτρέπει την παρέκκλιση του πόνου από το επιστημονικό αποτέλεσμα. Η αποτελεσματικότητα ενός δεδομένου αναλγητικού μπορεί να παρακολουθείται μέσω παρατήρησης της συμπεριφοράς (Deakin *et al.*, 2019). Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η επιλογή του αναλγητικού μπορεί να επηρεάσει τον επιστημονικό στόχο. Πράγματι, η χρήση ΜΣΑΦ θα καταστείλει όχι μόνο τον πόνο αλλά και τις φλεγμονώδεις διεργασίες. Αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει το αποτέλεσμα κατά τη μελέτη της αναγέννησης ιστών του πτερύγιου, της καρδιάς ή του νευρικού συστήματος. Ομοίως, τα οπιοειδή και τα αναισθητικά μπορούν να έχουν συστηματικά αποτελέσματα και να ενεργούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Bao *et al.*, 2019; de Abreu *et al.*, 2019). Επιπλέον, οι Lelek *et al.* (2020) έδειξαν πρόσφατα πώς επέλεξαν ένα κατάλληλο αναλγητικό για την αναγέννηση της καρδιάς μετά από κρυολογική βλάβη. Αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως ένας γενικός χάρτης πορείας και για άλλα μοντέλα, για το πώς μπορεί να ανακουφιστεί ο πόνος αποφεύγοντας παράλληλα τις παρενέργειες (Ohnesorge, Heintz and Lewejohann, 2021).

3. Μελέτες στους ιχθείς

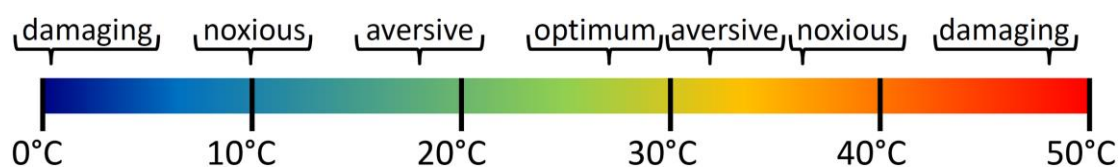
Τα ψάρια έχουν γίνει ολοένα και πιο δημοφιλή μοντέλα ζώων στην έρευνα. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα εργαστηριακά ψάρια είναι το ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*) (Lieschke and Currie, 2010) και η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Schartl, 2014). Αποτελούν σημαντικά ερευνητικά μοντέλα σε γενετικές, φυσιολογικές, τοξικολογικές, καρκινογόνες και παθολογικές μελέτες, καθώς και σε έρευνες που σχετίζονται με το ίδιο το είδος. Επίσης μολύνονται σκόπιμα με ασθένειες για να μελετήσουν παθολογικούς αμυντικούς μηχανισμούς, καθώς και να αναπτύξουν εμβόλια και θεραπείες (Dhar and Manna, 2014).

3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας του νερού στον πόνο

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ψάρια παρουσιάζουν συμπεριφορικές αντιδράσεις σε επιβλαβή ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένης της μηχανικής, χημικής ή θερμικής διέγερσης. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτές οι αποκρίσεις χαρακτηρίζονται από μείωση της κινητικής δραστηριότητας, η οποία με τη σειρά της μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση κατάλληλου αναλγητικού. Οι (Lopez-Luna *et al.*, 2017b) μελέτησαν τις συμπεριφορικές αποκρίσεις των ψαριών νυμφής μετά από διέγερση με ζεστές και κρύες θερμοκρασίες και εξέτασαν μια σειρά αναλγητικών για να προσδιορίσουν εάν αυτά μπορούν να βελτιώσουν την πιθανή επιβλαβή επίδραση της θερμικής διέγερσης. Τα ψάρια ζέβρα μετά τη γονιμοποίηση πέντε ημερών εκτέθηκαν σε θερμές (35 και 40°C) και κρύες (7, 10 και 15°C) θερμοκρασίες για ένα λεπτό. Τα ψάρια που εκτέθηκαν στους 7, 10 και 40°C παρουσίασαν σημαντική μείωση τόσο στην ταχύτητα κολύμβησης όσο και στη συνολική δραστηριότητα, ενώ η έκθεση στους 15 και 35°C είχε μικρότερη επίδραση. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της ασπιρίνης, της λιδοκαΐνης, της μορφίνης και της φλουνιζίνης ως αναλγητικά μέσω εμβάπτισης μετά από έκθεση σε νερό στους 40°C. Η χορήγηση 5 mg/l λιδοκαΐνης και 48 mg/l μορφίνης βελτίωσε τη μείωση της δραστηριότητας όταν οι προνύμφες εκτέθηκαν στους 40°C αλλά η ομάδα που εκτέθηκε στην μορφίνη έδειξε ενδιάμεσες τιμές μεταξύ των μαρτύρων και των προνυμφών που εκτέθηκαν στους 10°C. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το ψάρι ζέβρα των προνυμφών ανταποκρίθηκε στη διέγερση της ζέστης και του κρύου

και ότι οι αλλαγές συμπεριφοράς που προκλήθηκαν από τις υψηλές θερμοκρασίες ήταν απόκριση σε επιβλαβή διέγερση. Αντίθετα, οι αντιδράσεις στο κρύο ήταν πιθανώς συνέπεια τόσο του πόνου όσο και κάποιου είδους άγχους ή/και αναισθητικού αποτελέσματος.

Μια μελέτη των (Nilsson *et al.*, 2019), μελετήσαν τη συμπεριφορική ανταπόκριση του ατλαντικού σολομού που έχει εγκλιματιστεί στους 8°C όταν μεταφέρεται σε θερμοκρασίες της κλίμακας από τους 0 στους 38 °C. Ο χρόνος έκθεσης ήταν 5 λεπτά ή μέχρι να φτάσουν στο τελικό σημείο της απώλειας της ισορροπίας και να ξαπλώσουν στο πλάι, ένα σημάδι επικείμενου θανάτου. Σε θερμοκρασίες κάτω των 28°C, κανένα από τα ψάρια δεν έφτασε στο τελικό σημείο εντός του μέγιστου χρονικού διαστήματος 5 λεπτών. Στη θερμοκρασία των 28°C, τέσσερα από τα πέντε ψάρια έφτασαν στο τελικό σημείο και τα ψάρια έφτασαν στο τελικό σημείο πιο γρήγορα καθώς η θερμοκρασία αυξανόταν περαιτέρω. Τα ψάρια που μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασίες άνω των 28°C είχαν υψηλότερη ταχύτητα κολύμβησης αμέσως μετά τη μεταφορά και διατήρησαν υψηλή ταχύτητα κολύμβησης μέχρι λίγο πριν από την απώλεια της ισορροπίας. Η συμπεριφορά τους χαρακτηριζόταν από την αρχή από συγκρούσεις στους τοίχους των δεξαμενών και κούνημα των κεφαλιών. Λίγο πριν χάσουν την ισορροπία τους άρχισαν να σπάνε την επιφάνεια του νερού, κολυμπούσαν σε κύκλο και σε μερικές περιπτώσεις έδειχναν μια πλάγια κάμψη του σώματός τους. Με άλλα λόγια, οι σολομοί που μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασίες άνω των 28 °C εμφάνισαν άμεσες συμπεριφορικές αντιδράσεις που υποδεικνύουν την αίσθηση του πόνου ή πόνο.



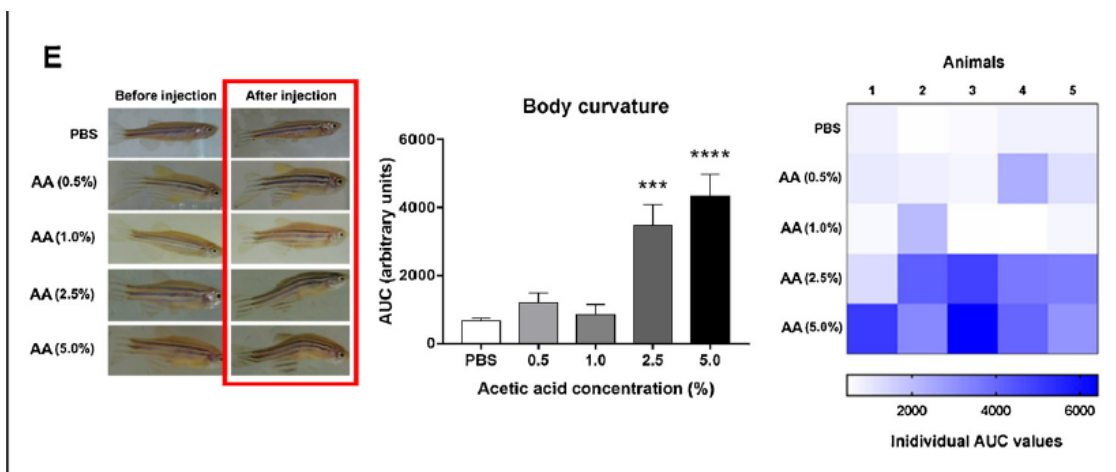
Εικόνα 3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ευημερία των προνυμφών ζέβρα. Ανάλογα με την ηλικία και τον χρόνο έκθεσης των προνυμφών ή των ενηλίκων, οι θερμοκρασίες εκτός του βέλτιστου εύρους των περίπου 23–30°C έγιναν όλο και πιο αποκρουστικές, και επιβλαβείς με την αυξανόμενη ζέστη ή το κρύο. Θερμοκρασίες 10 ή 34°C έχουν περιγραφεί ως επιβλαβείς και στους 0 ή 48°C είναι επιβλαβείς μέσα σε δευτερόλεπτα (Ohnesorge, Heintz and Lewejohann, 2021).

Η θερμοκρασία πάνω από 30°C είναι αποτρεπτική για τις προνύμφες και οι 34 °C θεωρείται το κατώφλι για επιβλαβή θερμότητα (Prober *et al.*, 2008; Haesemeyer *et al.*, 2018). Σε παρόμοια πειράματα, η ταχεία ψύξη κάτω από τους 16°C περιγράφηκε επίσης ως επιβλαβής (Prober *et al.*, 2008; Gau *et al.*, 2013). Οι επιδράσεις του κρύου έχουν επίσης μελετηθεί στο πλαίσιο της αναισθησίας και της ευθανασίας όπου η σταδιακή ψύξη στους 10–12°C προκάλεσε αναισθησία και η ταχεία ψύξη κάτω από αυτό το σημείο ήταν θανατηφόρα (Wallace *et al.*, 2018). Σε αντίθεση με τις προνύμφες, τα ενήλικα ζέβρα μπορούν να προσαρμοστούν αργά σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, αλλά όταν διατηρούνται σε τυπικές συνθήκες περίπου 28°C, ισχύουν παρόμοια εύρη για γρήγορες αλλαγές σε επιβλαβείς θερμοκρασίες όπως για τις προνύμφες (López-Olmeda and Sánchez-Vázquez, 2011).

3.2 Το ψάρι zebra ως μοντέλο

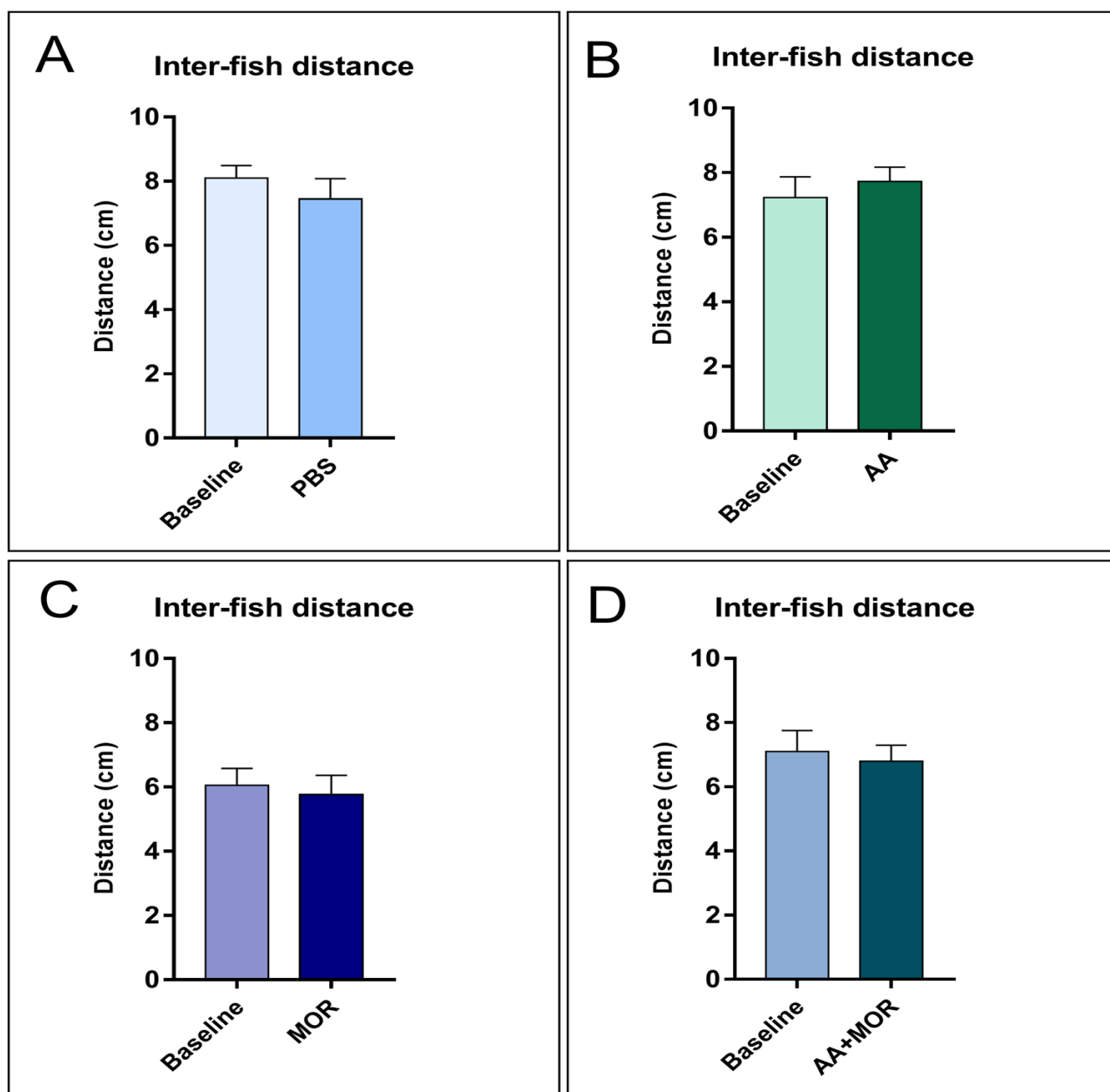
Παρόλο που η χρήση του ψαριού ζέβρα (*Danio rerio*) για τη διερεύνηση τόσο συμπεριφορικών όσο και φυσιολογικών αντιδράσεων που σχετίζονται με την αίσθηση του πόνου επεκτείνεται ταχέως, ο χαρακτηρισμός των φαινοτύπων συμπεριφοράς που αντικατοπτρίζουν την τοποθεσία τραυματισμού είναι περιορισμένος, καθιστώντας τα αποτελέσματα τέτοιων μελετών δύσκολο να ερμηνευθούν. Οι (F. V. Costa *et al.*, 2019) μελέτησαν τους φαινότυπους συμπεριφοράς που σχετίζονται με την ακουστική αντίληψη σε ενήλικα ψάρια ζέβρα μετά από ενδοπεριτονική χορήγηση οξικού οξέος. Το οξικό οξύ (2.5 και 5.0%) προκάλεσε απόκριση που έμοιαζε με συστολή της κοιλιάς, η οποία αξιολογήθηκε με τη μέτρηση του δείκτη καμπυλότητας του σώματος. Η διάρκεια κατάψυξης αυξήθηκε μετά από την χορήγηση 5.0% οξικού οξέος, ενώ τα ψάρια που έλαβαν ένεση 1.0, 2.5, και 5.0% πέρασαν περισσότερο χρόνο στην κορυφή της δεξαμενής. Τόσο η μορφίνη (οπιοειδές αναλγητικό) όσο και η δικλοφενάκη (μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο, ΜΣΑΦ) απέτρεψαν τις αλλαγές του δείκτη καμπυλότητας του σώματος που προκλήθηκαν από το οξικό οξύ κατά 5.0%, ενώ η ναλοξόνη μπλόκαρε αυτές τις επιδράσεις της μορφίνης. Συνολικά, τα ψάρια ζέβρα που εκτέθηκαν σε μία ενδοφλέβια ένεση οξικού οξέος παρουσιάζουν ανώμαλη καμπυλότητα του σώματος και ειδικές αλλαγές στις παραμέτρους συμπεριφοράς

που είναι ευαίσθητες στην αντι- αίσθηση του πόνου. Έτσι συμπέραναν ότι η απάντηση της κοιλιακής σύσφιξης αντιπροσωπεύει ένα νέο ειδικό φαινότυπο που σχετίζεται με την ευαισθησία στα ψάρια ζέβρα (F. V. Costa *et al.*, 2019).



Εικόνα 4. Αντιπροσωπευτικές εικόνες που εμφανίζουν τους φαινοτύπους του ψαριού ζέβρα πριν και μετά την ένεση οξικού οξέος, καθώς και τις επιδράσεις του οξικού οξέος σε διαφορετικές δόσεις σε σχέση με την ομάδα PBS και το διάγραμμα θερμικού χάρτη που δείχνει τις τιμές της AUC (Area Under Curve) που ελήφθησαν για κάθε ψάρι που εξετάστηκε (F. V Costa *et al.*, 2019).

Μια άλλη μελέτη των (Rosa *et al.*, 2022) διερεύνησαν την κοινωνική συμπεριφορά του ψαριού ζέβρα σε ένα πλαίσιο βασισμένο στην αίσθηση του πόνου. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιώντας μια τρισδιάστατη ανάλυση ετερογενών κοπαδιών ψαριών, εξέτασαν τις κύριες συμπεριφορικές αποκρίσεις σε δύο δοκιμές 6 λεπτών: πριν (βασική γραμμή) και μετά από μια μεμονωμένη ενδοπεριτοναϊκή ένεση 10 μ L φυσιολογικού ορού ρυθμισμένου με φωσφορικά (PBS) (control), οξικό οξύ 5% (AA), μορφίνη 2.5 mg/kg (MOR) ή οξικό οξύ 5% με μορφίνη 2.5 mg/kg (AA + MOR) σε ένα ψάρι από ένα κοπάδι τεσσάρων ψαριών.



Εικόνα 5. Η απόσταση μεταξύ των ψαριών μεταξύ όλων των ζώων του κοπαδιού πριν (βασική γραμμή) και μετά την ενδοπεριτοναϊκή ένεση PBS (A), AA (B), MOR (C) και AA + MOR (D) (Rosa et al., 2022).

Ελέγχθηκε επίσης η κοινωνική προτίμηση των ψαριών για δεξαμενές με κοπάδια ψαριών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με PBS, 5% AA ή σε ένα άδειο ενυδρείο. Η μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση οξικού οξέος διέκοψε την ομοιογένεια του κοπαδιού προκαλώντας διασπορά των ψαριών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ταυτόχρονη ομαδοποίηση των ψαριών που δεν είχαν υποστεί χειραγώγηση. Γενικά, η συγχορήγηση μορφίνης προστατεύει από αλλαγές συμπεριφοράς που

προκαλούνται από το οξικό οξύ. Το τεστ κοινωνικής προτίμησης αποκάλυψε μια σαφή προτίμηση στους ομοειδείς (PBS και AA) έναντι μιας άδειας δεξαμενής. Συνολικά, τα ευρήματά έδειξαν ότι ο πόνος μπορεί να ρυθμίσει την κοινωνικότητα των ψαριών ζέβρα, πιθανώς λόγω της οπτικής αναγνώρισης των παθολογικών αποκρίσεων. Αν και απαιτούνται μελλοντικές μελέτες για να αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο ο πόνος ρυθμίζει την κοινωνική συμπεριφορά των ψαριών ζέβρα, τα αποτελέσματά αυτά συμβάλλουν στη βελτίωση της αξιολόγησης της

ευημερίας των κοπαδιών των ψαριών ζέβρα υπό διακριτούς πειραματικούς χειρισμούς (Rosa *et al.*, 2022).

Οι αντιδράσεις συμπεριφοράς σε επιβλαβή ερεθίσματα έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής σε δύο είδη ψαριών. Ωστόσο, δεδομένου ότι παρατηρούνται ειδικές διαφορές στα θηλαστικά, πρέπει να εξεταστούν περισσότερα είδη για να προσδιοριστεί εάν οι αντιδράσεις της αίσθησης είναι γενικές στα ψάρια. Ο (Reilly *et al.*, 2008) εξέτασαν τη συμπεριφορική και αναπνευστική απόκριση σε οξύ ή σε ένα δυνητικά οδυνηρό ερέθισμα στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*), στο ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*) και στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*). Μετρήθηκαν συμπεριφορικές παράμετροι όπως η συχνότητα κολύμβησης, η χρήση κάλυψης και οποιαδήποτε ανώμαλη συμπεριφορά, καθώς και ο ρυθμός εξαερισμού πριν και μετά από την επιβλαβή διέγερση στον κυπρίνο και στο ψάρι ζέβρα. Αν και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συμπεριφορά ή στο ρυθμό εξαερισμού μεταξύ του κυπρίνου που υποβλήθηκε σε επιβλαβή διέγερση και των ψαριών ελέγχου, σε δύο από τα πέντε ψάρια παρατηρήθηκαν ανώμαλες συμπεριφορές, όπως κουνιέται από πλευρά σε πλευρά και τρίβεται τα χείλη του κατά τους τοίχους της δεξαμενής. Αντίθετα, το ψάρι ζέβρα παρουσίασε σημαντική μείωση της συχνότητας κολύμβησης και αύξηση του ρυθμού εξαερισμού, τα οποία ήταν παρόμοια με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ιριδίζουσα πέστροφα. Το ψάρι ζέβρα δεν παρουσίασε καμία ανωμαλία συμπεριφοράς. Οι διαφορές αυτές ως προς την αντίδραση σε δυνητικά οδυνηρή διέγερση καταδεικνύουν ότι υπάρχουν ειδικές συμπεριφορικές και φυσιολογικές αντιδράσεις στα ψάρια σε ένα συμβάν που προκαλεί αίσθηση του πόνου (Reilly *et al.*, 2008).

3.3 Αναισθησία και ευθανασία στα ψάρια

Σύμφωνα με τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού για την Υγεία των Ζώων (ΟΙΕ), «[η] ευημερία των ζώων σημαίνει, πώς ένα ζώο αντιμετωπίζει τις συνθήκες στις οποίες ζει. Ένα ζώο είναι σε καλή κατάσταση αν (όπως υποδεικνύεται από επιστημονικά στοιχεία) είναι υγιές, άνετο, τρέφεται σωστά, είναι ασφαλές, είναι ικανό να εκφράσει έμφυτη συμπεριφορά και δεν υποφέρει από δυσάρεστες καταστάσεις όπως πόνο, φόβο και αγωνία. Η καλή διαβίωση των ζώων απαιτεί την πρόληψη των ασθενειών και την κτηνιατρική θεραπεία, ένα κατάλληλο καταφύγιο, σωστή διαχείριση και διατροφή, μη βάνουσο χειρισμό και ανθρώπινη σφαγή/θανάτωση» (Giménez-Candela, Saraiva and Bauer, 2020).

Από το 2009, τα ψάρια αναγνωρίζονται επίσης ως αισθανόμενα όντα από την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) σύμφωνα με το άρθρο 13 της Συνθήκης για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Έτσι, όχι μόνο στη χερσαία γεωργία αλλά και στην αλιεία, η ΕΕ και τα κράτη μέλη της είναι υποχρεωμένα να «δώσουν πλήρη σημασία στις απαιτήσεις καλής διαβίωσης των ζώων» (Giménez-Candela, Saraiva and Bauer, 2020).

Για την προστασία των ζώων, χρησιμοποιείται η οδηγία 86/609/ΕΟΚ όσον αφορά πειραματικούς σκοπούς. Έτσι, το άρθρο 5 *διασφαλίζει τη γενική φροντίδα, περιποίηση και τη διαβίωση των ζώων*. Όσον αφορά την χρήση αναισθητικών, σύμφωνα με το άρθρο 8 << *όλα τα πειράματα πρέπει να διεξάγονται με γενική ή τοπική αναισθησία. Στην περίπτωση που δεν είναι δυνατή η αναισθησία, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αναλγητικά ή άλλες κατάλληλες μέθοδοι ώστε ο πόνος, η ταλαιπωρία, η αγωνία ή βλάβη να περιορίζονται όσο αυτό είναι δυνατό και, σε κάθε περίπτωση, το ζώο να μην υφίσταται δυνατό πόνο, αγωνία ή ταλαιπωρία. Στην περίπτωση κατά την οποία ένα ζώο που έχει υποστεί αναισθησία υποφέρει δυνατό πόνο επειδή έπαυσε η επίδραση του αναισθητικού, πρέπει να του χορηγούνται εγκαίρως αναλγητικά ή, εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, να θανατώνεται αμέσως με μη βάνουσο τρόπο, υπό τον όρο ότι τα μέτρα αυτά συμβιβάζονται με το στόχο του πειράματος>>.*

Πολλά αναισθητικά, ηρεμιστικά ή αναλγητικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε άλλα σπονδυλωτά μειώνουν το στρες στα ψάρια, μειώνουν το τραύμα χειρισμού, ελαχιστοποιούν τις κινήσεις και τις φυσιολογικές αλλαγές ως απόκριση σε ερεθίσματα πόνου και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ευθανασία (Neiffer and Stamper, 2009).

4. Μελέτες στα μαλάκια και στα καρκινοειδή

Οι συμπεριφορικές και φυσιολογικές αντιδράσεις σε επιβλαβή ερεθίσματα είναι παρόμοιες στα ψάρια και στα καρκινοειδή. Έρευνα έδειξε ότι μετά από ένεση καψαϊκίνης ή οξικού οξέος στα χείλη του μπακαλιάρου, παρατηρήθηκαν παρόμοιες αλλαγές συμπεριφοράς, υποδεικνύοντας ότι και τα ψάρια έχουν υποδοχείς καψαϊκίνης (Eckroth *et al.*, 2014). Ωστόσο, ούτε οι καραβίδες, το *P. clarkii* (Puri and Faulkes, 2015) ούτε τα καβούρια της ακτής, το *C.maenas* (Elwood, Dalton and Riddell, 2017) έδειξαν ανταπόκριση στην εφαρμογή της καψαϊκίνης. Αυτή η διακύμανση στη δεκτικότητα εξαρτάται από σχετικά μικρές διαφορές στη μοριακή δομή των υποδοχέων βανιλλοειδών που συνήθως ανταποκρίνονται σε υψηλή θερμοκρασία και σε ορισμένες χημικές ουσίες, παρόλα αυτά οι οικολογικοί λόγοι για αυτήν την παραλλαγή δεν είναι ξεκάθαροι. Εντούτοις, αυτές οι μικρές διαφορές έχουν ελάχιστη ή καθόλου επίδραση στις αποδείξεις για τις αντιδράσεις συμπεριφοράς και στρες σε επιβλαβή ερεθίσματα που συνάδουν με τον πόνο στα ψάρια και στα καρκινοειδή (Elwood, 2021).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα σπονδυλωτά ζώα βιώνουν πόνο. Ωστόσο, υπάρχουν επί του παρόντος αδιαμφισβήτητα στοιχεία ότι η συναισθηματική συνιστώσα του πόνου εμφανίζεται σε οποιοδήποτε ασπόνδυλο. Ο (Crook, 2021) έδειξε ότι τα χταπόδια, τα πιο νευρολογικά πολύπλοκα ασπόνδυλα, παρουσιάζουν γνωστικές και αυθόρμητες συμπεριφορές ενδεικτικές της συναισθηματικής εμπειρίας του πόνου. Σε δοκιμές προτίμησης συνδεδεμένης θέσης, τα χταπόδια απέφευγαν περιστάσεις στις οποίες βίωσαν πόνο, προτιμούσαν μια τοποθεσία στην οποία βίωσαν ανακούφιση από τον πόνο και δεν έδειξαν καμία συνδεδεμένη προτίμηση στην απουσία πόνου. Η περιποίηση του τόπου της ένεσης συνέβη σε όλα τα ζώα που έλαβαν ενέσεις οξικού οξέος, αλλά αυτό καταργήθηκε με τοπική

αναισθησία. Έτσι, τα χταπόδια είναι πιθανό να βιώσουν την συναισθηματική συνιστώσα του πόνου (Crook, 2021).

Τα κεφαλόποδα είναι τα πιο νευρικά και συμπεριφορικά πολύπλοκα ασπόνδυλα, με εγκεφάλους που ανταγωνίζονται ορισμένων σπονδυλωτών σε μέγεθος και πολυπλοκότητα. Αυτό έχει ενθαρρύνει την άποψη ότι τα κεφαλόποδα, ιδιαίτερα τα χταπόδια, μπορεί να βιώνουν πόνο παρόμοιο με τα σπονδυλωτά όταν τραυματίζονται. Ωστόσο, δεν είναι γνωστό αν τα χταπόδια διαθέτουν αισθητήρες ή αν οι σωματικοί αισθητηριακοί νευρώνες τους παρουσιάζουν ευαισθητοποίηση μετά τον τραυματισμό. Οι (Aluray, Hadjisolomou and Crook, 2014) έδειξαν ότι το χταπόδι *Abdopus aculeatus* εκφράζει επιβλαβείς συμπεριφορές και εμφανίζει έντονο νευρικό υπερενθουσιασμό τόσο στα τραυματισμένα όσο και στα μη τραυματισμένα πλοκάμια για τουλάχιστον 24 ώρες μετά τον τραυματισμό. Αυτά τα ευρήματα δεν αποδεικνύουν ότι τα χταπόδια βιώνουν παρόμοιες με τον πόνο καταστάσεις. Αντίθετα, προσθέτουν στην ελάχιστη υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο τα κεφαλόποδα λαμβάνουν, επεξεργάζονται και ενσωματώνουν επιβλαβείς αισθητηριακές πληροφορίες, ενδεχομένως ενημερώνοντας και εξευγενίζοντας τους κανονισμούς που διέπουν τη χρήση των κεφαλόποδων στην επιστημονική έρευνα (Aluray, Hadjisolomou and Crook, 2014).

Για να προστατεύσουν τα μαλακά τους σώματα, τα περισσότερα μαλάκια παράγουν ένα σκληρό κέλυφος, αλλά πολλά δεν έχουν κέλυφος ή αρκετό κέλυφος για επαρκή προστασία και πρέπει να βασίζονται σε άλλες άμυνες. Από τις επτά υπάρχουσες ταξινομικές τάξεις των μαλακίων, μόνο δύο έχουν μελετηθεί εκτενώς από τους επιστήμονες της συμπεριφοράς και τους νευροβιολόγους: τα γαστρόποδα και τα κεφαλόποδα τα οποία περιλαμβάνουν πολλά είδη που διαθέτουν ελάχιστο ή καθόλου κέλυφος. Τα γαστρόποδα αντιπροσωπεύουν το 80% των ειδών των μαλακίων και καταλαμβάνουν ένα τεράστιο φάσμα θαλάσσιων, γλυκού νερού και χερσαίων οικοτόπων. Μέσα στα μαλάκια, μόνο τα κολεοειδή κεφαλόποδα (χταπόδι, σουπιά και καλαμάρι) έχουν πιο πολύπλοκα νευρικά συστήματα και συμπεριφορές.

Τα καλαμάρια (*Doryteuthis*) μπορούν να παρουσιάσουν ευαισθητοποίηση μετά από τραυματισμό που προκλήθηκε, και εκδηλώνεται ως συμπεριφορική υπερευαισθησία σε ακουστικά και ιδιαίτερα οπτικά ερεθίσματα, και ως

υπερευαισθησία και αυθόρμητη δραστηριότητα στα τερματικά των αισθητήρων. Οι συμπεριφορικές αντιδράσεις σε επιβλαβή ερεθίσματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά συστηματικά για το καλαμάρι *Doryteuthis pealeii*. Μικρός τραυματισμός που προκλήθηκε από ακρωτηριασμό του περιφερικού τρίτου σε έναν από τους 10 βραχίονες ενός μη αναισθητοποιημένου καλαμαριού προκάλεσε αμέσως εκτόξευση και απελευθέρωση μελανιού, ακολουθούμενο από καθίζηση του σώματος στο υπόστρωμα (Crook *et al.*, 2011). Σε καλαμάρια με δεμένα μάτια, εμφανίστηκε δερματική ευαισθητοποίηση κοντά στο σημείο του τραυματισμού. Ωστόσο, εξίσου ισχυρή γενική ευαισθητοποίηση αποκαλύφθηκε από παρόμοια βελτιωμένες αποκρίσεις στο ερέθισμα της απτικής δοκιμής που εφαρμόστηκε σε έναν ετερόπλευρο βραχίονα, το κεφάλι ή τον μανδύα τόσο ελεύθερα κολυμπώντας όσο και μερικώς ενός συγκρατημένου καλαμαριού. Τα καλαμάρια είναι ιδιαίτερα οπτικά είδη, και η μεγαλύτερη ενίσχυση των αμυντικών αντιδράσεων συνέβη σε ελεύθερα κολυμπώντας καλαμάρια χωρίς δεσμίδες, δείχνοντας ότι ο τραυματισμός στο πλοκάμι παρήγαγε μακροχρόνια ευαισθητοποίηση (υπερευαισθησία) σε οπτικά ερεθίσματα (Crook *et al.*, 2011). Το καλαμάρι που είχε υποστεί τραυματισμό ήταν πιο πιθανό να ενταχθεί σε σμήνος άλλων καλαμαριών μετά από έκθεση σε κάποιο αρπακτικό (Oshima *et al.*, 2016). Η περιποίηση του τραυματισμένου βραχίονα (που συμβαίνει μετά από παρόμοια τραύματα σε θηλαστικά) δεν παρατηρήθηκε ποτέ. Οι καταγραφές της επακόλουθης ηλεκτρικής δραστηριότητας από το νεύρο του πτερύγιου σε μια προετοιμασία αποκοπής του πτερύγιου κατά τη διάρκεια μηχανικής διέγερσης εμφάνισαν έναν πληθυσμό ευαίσθητων ινών που πυροδοτούνται σε απάντηση από μηχανικά ερεθίσματα υψηλής έντασης (Crook, Hanlon and Walters, 2013). Επειδή τα νευρωνικά σωμάτια δεν είναι παρόντα στο πτερύγιο, αυτοί οι μηχανοαισθητηριακοί νευρώνες φαίνεται να είναι πρωταρχικοί αισθητήρες, με τα σωμάτια να βρίσκονται κάπου μέσα στο ΚΝΣ.

Η περιφερική βλάβη στα κεφαλόποδα μπορεί να ευαισθητοποιήσει τους πρωτογενείς αισθητήρες στην μηχανική διέγερση των περιφερικών δεκτικών πεδίων τους. Μια βλάβη σε ένα πτερύγιο παρήγαγε τόσο άμεση όσο και μακροπρόθεσμη (διαρκείας τουλάχιστον 24 ωρών) ευαισθητοποίηση, η οποία παρατηρήθηκε ως μείωση του μηχανικού κατώτατου ορίου και αύξηση του αριθμού των δυνατοτήτων

δράσης που προκαλούνται από την διέγερση με μέτρια ένταση ερεθισμού (Crook, Hanlon and Walters, 2013). Όπως και η συμπεριφορική ευαισθητοποίηση που βρέθηκε μετά από τραυματισμό του βραχίονα (Crook *et al.*, 2011), η ευαισθητοποίηση δεν ήταν ειδική για την τραυματισμένη περιοχή. Η μακροχρόνια ευαισθητοποίηση των αντιδράσεων των ευαίσθητων υποδοχέων βρέθηκε επίσης μετά από φυσικούς τραυματισμούς που προκλήθηκαν από επιθέσεις από άλλα καλαμάρια. Η αυθόρμητη δραστηριότητα σε πιθανούς αισθητήρες δεν έχει αναφερθεί προηγουμένως σε ασπόνδυλα, αν και δεν είναι ασυνήθιστη σε μοντέλα επίμονου πόνου στα θηλαστικά (Djouhri *et al.*, 2006; Devor, 2009; Walters, 2012). Αυτή η επίμονη αυθόρμητη δραστηριότητα στην περιφέρεια μπορεί να οδηγήσει σε συνεχιζόμενη δραστηριότητα στον εγκέφαλο που παράγει υπερπροσοχή. Ταυτόχρονα, η αυθόρμητη δραστηριότητα που δημιουργείται σε ευρέως διαδεδομένους αισθητήρες μπορεί να παρέχει ελάχιστες ή καθόλου πληροφορίες σχετικά με την τοποθεσία του τραυματισμού.

Λίγες μελέτες με καρκινοειδή έχουν εξετάσει τις ευαισθητοποιητικές επιδράσεις της επιβλαβούς διέγερσης που παραμένουν για ώρες, ημέρες ή περισσότερο. Μια πρώιμη μελέτη έδειξε ότι ο ακρωτηριασμός και των δύο νυχιών των καραβίδων ευαισθητοποίησε τη συμπεριφορά διαφυγής με την αναστροφή της ουράς που προκλήθηκε από τακτικούς ή οπτικούς ερεθισμούς για τουλάχιστον αρκετές ημέρες (Walters, 2018).

Η μακροχρόνια ευαισθητοποίηση του πόνου που προκαλείται από το αποτρεπτικό σοκ έχει εμπλακεί σε καβούρια ερημιτών που, 24 ώρες μετά το σοκ στο κέλυφός τους, πλησίασαν και κατέλαβαν νέα κελύφη πιο γρήγορα από ό,τι τα καβούρια που δεν είχαν υποστεί σοκ προηγουμένως (Appel and Elwood, 2009). Ευαισθητοποίηση που διήρκεσε ώρες βρέθηκε για την απόκριση αναστροφής της ουράς με τη μεσολάβηση πλευρικών ινών της καραβίδας μετά από επαναλαμβανόμενο ηλεκτροπληξία, η οποία συσχετίστηκε με μακροχρόνια συναπτική ενίσχυση χημικών και ηλεκτρικών συνάψεων στον πλευρικό γιγάντιο νευρώνα εντολής (Edwards *et al.*, 2002).

5. Διαφωνία για την παρουσία του πόνου στα ψάρια

Η σημαντική αύξηση της χρήσης ψαριών ως ζωικών μοντέλων για συμπεριφορικές, φαρμακολογικές και φυσιολογικές μελέτες, καθώς και για τις αλυσίδες παραγωγής υδατοκαλλιέργειας, εγείρει σημαντικά ερωτήματα σχετικά με την ευημερία αυτών των ζώων και την πιθανότητα να υποφέρουν. Ωστόσο, η εμφάνιση πόνου σε βασικά σπονδυλωτά όπως τα ψάρια είναι ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα, ακόμη και στην επιστημονική κοινότητα. Η τρέχουσα κατάσταση της διαμάχης σχετικά με την εμπειρία του πόνου στα ψάρια μπορεί να εκτιμηθεί καλά διαβάζοντας πρόσφατες ανασκοπήσεις που δημοσιεύθηκαν από κάθε πλευρά (Rose *et al.*, 2014). Η διαμάχη περιλαμβάνει κυρίως δύο ομάδες: η μία ομάδα υποστηρίζει ότι τα ψάρια μπορούν να αισθανθούν πόνο – η ομάδα των "υποστηρικτών" - και η άλλη ομάδα υποστηρίζει ότι τα ψάρια δεν μπορούν να αισθανθούν πόνο - η ομάδα των "σκεπτικιστών". Οι σκεπτικιστές υποστηρίζουν ότι τα ψάρια δεν διαθέτουν τις νευρολογικές δομές για τη συνείδηση και την επεξεργασία του πόνου που γνωρίζουμε από τους ανθρώπους, κυρίως την έλλειψη νεοφλοιού. Οι υποστηρικτές υποστηρίζουν ότι, από μια εξελικτική προοπτική, είναι λογικό για έναν οργανισμό να αναπτύξει έναν μηχανισμό που μοιάζει με πόνο για να ανταποκριθεί σε τραυματισμό, ακόμη και αν οι νευρικές δομές των ψαριών δεν είναι παρόμοιες με εκείνες των ανθρώπων. Τα ψάρια δείχνουν πολλές συμπεριφορές που θα μπορούσαν να εξηγηθούν από τη συνείδηση. Τα ψάρια πληρούν διαφορετικά κριτήρια που θα υποδείκνυαν ότι μπορούν να αισθάνονται ή να έχουν συνείδηση, ή ακόμη και να απορρίπτουν τη διαφορά μεταξύ της νοητικής αντίληψης και του πόνου (Chatigny, 2019).

Ενώ ορισμένοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η έλλειψη εξειδικευμένων εγκεφαλικών δομών, όπως ο νεοφλοιός, εμποδίζει τα ψάρια να αισθάνονται πόνο, μια σειρά πρόσφατων μελετών έχουν απομυθοποιήσει αυτή την άποψη, επισημαίνοντας ότι τα τελεόστεα ψάρια είναι σε θέση να ανιχνεύσουν και να ανταποκριθούν σε επιβλαβή ερεθίσματα διαφορετικών αισθητηριακών μορφών. Οι εν λόγω μελέτες έχουν δείξει ότι τα ψάρια έχουν αισθητήρες με παρόμοια χαρακτηριστικά με τους αισθητήρες των θηλαστικών, οι οποίοι είναι ικανοί να

ανιχνεύουν δυνητικά οδυνηρά ερεθίσματα. Επιπλέον, διάφορα είδη ψαριών, όπως το ρίαυσι (*Leporinus macrocephalus*), η τιλαπία (*Oreochromis niloticus*) και η ιριδίζουσα πέστροφα (*Onchorhynchus mykiss*), τα οποία είναι είδη που χρησιμοποιούνται συνήθως σε ιχθυοτροφεία, έχουν δείξει αλλαγές στη συμπεριφορά και στη φυσιολογία ως απάντηση στην εφαρμογή επιβλαβών ερεθισμάτων διαφορετικής φύσης. Αυτές οι αντιδράσεις υποδεικνύουν την πιθανότητα της αντίληψης αυτών των ερεθισμάτων ως αποστροφικών και δυνητικά οδυνηρών. Ωστόσο, παρά τον αυξανόμενο αριθμό μελετών που ασχολούνται με το ζήτημα αυτό, η απόδειξη του πόνου στα ψάρια είναι ένα δύσκολο έργο, διότι ο πόνος θεωρείται μια σύνθετη αισθητηριακή εμπειρία που περιλαμβάνει όχι μόνο την αντίληψη ενός αποστροφικού ερεθίσματος, αλλά και γνωστικές και συναισθηματικές διαδικασίες, οι οποίες είναι συχνά δύσκολο να αξιολογηθούν σε ζωικά μοντέλα. Όσον αφορά τη συναισθηματικότητα, ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν την παρουσία υποδοχέων βενζοδιαζεπίνης και τις ανθυπολυτικές επιδράσεις των φαρμάκων βενζοδιαζεπίνης και του επιλεκτικού αναστολέα της επανεισδοχής της σεροτονίνης φλουοξετίνης στα τελεοστά (Wolkers, 2015).

6. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, οι έρευνες υποδεικνύουν ότι τα ζώα για να επιβιώσουν, πρέπει να αποφεύγουν τραυματισμούς και να έχουν τη δυνατότητα να αντιλαμβάνονται δυνητικά επικίνδυνα ερεθίσματα μέσω των μηχανισμών πόνου. Μολονότι η εμφάνιση πόνου στα ψάρια αποτελεί αμφιλεγόμενο ζήτημα στην επιστημονική κοινότητα πρόσφατες μελέτες έχουν ερευνήσει τις συμπεριφορικές και φυσιολογικές αλλαγές των ψαριών μετά από πρόκληση οδυνηρών ερεθισμάτων. Επομένως, υπάρχουν αρκετά επιστημονικά στοιχεία που υποστηρίζουν την υψηλή πιθανότητα ότι τα ψάρια αισθάνονται πόνο, και οι αλλαγές συμπεριφοράς που σχετίζονται με τον πόνο διατηρούνται στα σπονδυλωτά. Όσον αφορά τα ασπόνδυλα έχουν γίνει λιγότερες μελέτες για να αποδείξουν την εμφάνιση του πόνου. Οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στις συμπεριφορές που υποδηλώνουν τη συναισθηματική εμπειρία του πόνου στο χταπόδι, από τα πιο νευρολογικά πολύπλοκα ασπόνδυλα, και στο καλαμάρι. Η διερεύνηση των μοριακών, γενετικών

και ανατομικών βάσεων του πόνου στα ασπόνδυλα θα αποτελούσε σημαντικό παράγοντα για τον εντοπισμό των μηχανισμών που διαμορφώνουν την εμπειρία του πόνου στα ασπόνδυλα ζώα.

7. Βιβλιογραφία

- Abreu, M. S. *et al.* (2019) 'Effects of lidocaine on adult zebrafish behavior and brain acetylcholinesterase following peripheral and systemic administration', *Neuroscience Letters*, 692, pp. 181–186. doi: 10.1016/j.neulet.2018.11.004.
- Alupay, J. S., Hadjisolomou, S. P. and Crook, R. J. (2014) 'Neuroscience Letters Arm injury produces long-term behavioral and neural hypersensitivity in octopus', *Neuroscience Letters*, 558, pp. 137–142. doi: 10.1016/j.neulet.2013.11.002.
- Appel, M. and Elwood, R. W. (2009) 'Motivational trade-offs and potential pain experience in hermit crabs', *Applied Animal Behaviour Science*, 119(1–2), pp. 120–124. doi: 10.1016/j.applanim.2009.03.013.
- Ashley, P. J. (2007) 'Fish welfare: Current issues in aquaculture', *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3–4), pp. 199–235. doi: 10.1016/j.applanim.2006.09.001.
- Ashley, P. J. *et al.* (2009) 'Effect of noxious stimulation upon antipredator responses and dominance status in rainbow trout', *Animal Behaviour*, 77(2), pp. 403–410. doi: 10.1016/j.anbehav.2008.10.015.
- Ashley, P. J., Sneddon, L. U. and McCrohan, C. R. (2006) 'Properties of corneal receptors in a teleost fish', 410, pp. 165–168. doi: 10.1016/j.neulet.2006.08.047.
- Ashley, P. J., Sneddon, L. U. and McCrohan, C. R. (2007) 'Nociception in fish: stimulus-response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*', *Brain Research*, 1166(1), pp. 47–54. doi: 10.1016/j.brainres.2007.07.011.
- Bao, W. *et al.* (2019) 'NEUROSCIENCE Opioid Neurobiology , Neurogenetics and Neuropharmacology in Zebrafish', *Neuroscience*, 404, pp. 218–232. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.01.045.
- Birch, J. (2018) 'Date of acceptance : 2018-06-28 Degrees of sentience ?', 21. doi: 10.51291/2377-7478.1353.
- Bossé, G. D. and Peterson, R. T. (2017) 'Development of an opioid self-administration

assay to study drug seeking in zebrafish', *Behavioural Brain Research*, 335, pp. 158–166. doi: 10.1016/j.bbr.2017.08.001.

Burrell, B. D. (2017) 'Comparative Biology of Pain : What Invertebrates Can Tell Us about How Nociception Works', pp. 1–43. doi: 10.1152/jn.00600.2016.

Chatigny, F. (2019) 'The Controversy on Fish Pain: A Veterinarian's Perspective', *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 22(4), pp. 400–410. doi: 10.1080/10888705.2018.1530596.

Coghill, R. C. (2010) 'Headache Currents Individual Differences in the Subjective Experience of Pain : New Insights Into Mechanisms and Models', pp. 1531–1535.

Coric, T. *et al.* (2005) 'Proton sensitivity of ASIC1 appeared with the rise of fishes by changes of residues in the region that follows TM1 in the ectodomain of the channel', 3, pp. 725–735. doi: 10.1113/jphysiol.2005.087734.

Costa, F. V. *et al.* (2019) 'Understanding nociception-related phenotypes in adult zebrafish: Behavioral and pharmacological characterization using a new acetic acid model', *Behavioural Brain Research*, 359(August 2018), pp. 570–578. doi: 10.1016/j.bbr.2018.10.009.

Costa, F. V *et al.* (2019) 'Neuroscience Letters Naloxone prolongs abdominal constriction writhing-like behavior in a zebra fi sh-based pain model', 708(May), pp. 1–5. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134336.

Crook, R. J. *et al.* (2011) 'Peripheral injury induces long-term sensitization of defensive responses to visual and tactile stimuli in the squid *Loligo pealeii*, Lesueur 1821', *Journal of Experimental Biology*, 214(19), pp. 3173–3185. doi: 10.1242/jeb.058131.

Crook, R. J. (2021) 'Behavioral and neurophysiological evidence suggests affective pain experience in octopus', *iScience*, 24(3), p. 102229. doi: 10.1016/j.isci.2021.102229.

Crook, R. J., Hanlon, R. T. and Walters, E. T. (2013) 'Squid have nociceptors that display widespread long-term sensitization and spontaneous activity after bodily

- injury', *Journal of Neuroscience*, 33(24), pp. 10021–10026. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0646-13.2013.
- Deakin, A. G. *et al.* (2019) 'Welfare challenges influence the complexity of movement: Fractal analysis of behaviour in zebrafish', *Fishes*, 4(1), pp. 1–16. doi: 10.3390/fishes4010008.
- Demin, K. A. *et al.* (2018) 'Zebrafish models relevant to studying central opioid and endocannabinoid systems', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 86(March), pp. 301–312. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.03.024.
- Demin, K. A. *et al.* (2020) 'Cross-species Analyses of Intra-species Behavioral Differences in Mammals and Fish', *Neuroscience*, 429, pp. 33–45. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.12.035.
- Devor, M. (2009) 'Ectopic discharge in A β afferents as a source of neuropathic pain', *Experimental Brain Research*, 196(1), pp. 115–128. doi: 10.1007/s00221-009-1724-6.
- Dhar, A. K. and Manna, S. K. (2014) 'Viral vaccines for farmed finfish', 25(March), pp. 1–17. doi: 10.1007/s13337-013-0186-4.
- Djoughri, L. *et al.* (2006) 'Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors', *Journal of Neuroscience*, 26(4), pp. 1281–1292. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3388-05.2006.
- Dunlop, R. and Laming, P. (2005) 'Mechanoreceptive and Nociceptive Responses in the Central Nervous System of Goldfish ('), 6(9), pp. 561–568. doi: 10.1016/j.jpain.2005.02.010.
- Eckroth, J. R. *et al.* (2014) 'Physiological and Behavioural Responses to Noxious Stimuli in the Atlantic Cod (*Gadus morhua*)', 9(6), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0100150.
- Edwards, D. H. *et al.* (2002) 'Metamodulation of the crayfish escape circuit', *Brain, Behavior and Evolution*, 60(6), pp. 360–369. doi: 10.1159/000067789.
- Elwood, R. W. (2021) 'Potential Pain in Fish and Decapods: Similar Experimental Approaches and Similar Results', *Frontiers in Veterinary Science*, 8(April), pp. 1–7.

doi: 10.3389/fvets.2021.631151.

Elwood, R. W., Dalton, N. and Riddell, G. (2017) 'Aversive responses by shore crabs to acetic acid but not to capsaicin', *Behavioural Processes*, 140, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.beproc.2017.03.022.

Gau, P. *et al.* (2013) 'The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion', *Annals of Internal Medicine*, 158(6), pp. 5249–5260. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5403-12.2013.

Giménez-Candela, M., Saraiva, J. L. and Bauer, H. (2020) 'The legal protection of farmed fish in Europe – Analysing the range of EU legislation and the impact of international animal welfare standards for the fishes in European aquaculture', *Derecho Animal*, 11(1), pp. 65–119. doi: 10.5565/rev/da.460.

Haesemeyer, M. *et al.* (2018) 'A Brain-wide Circuit Model of Heat-Evoked Swimming Behavior in Larval Zebrafish', *Neuron*, 98(4), pp. 817–831.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.04.013.

Kim, H. *et al.* (2004) 'Comparison of Experimental and Acute Clinical Pain Responses in Humans as Pain Phenotypes', 5(7), pp. 377–384. doi: 10.1016/j.jpain.2004.06.003.

Lieschke, G. J. and Currie, P. D. (2010) 'Animal models of human disease : zebrafish swim into view', 8(May 2007), pp. 353–367. doi: 10.1038/nrg2091.

Lopez-Luna, J. *et al.* (2017a) 'Impact of analgesic drugs on the behavioural responses of larval zebrafish to potentially noxious temperatures', *Applied Animal Behaviour Science*, 188, pp. 97–105. doi: 10.1016/j.applanim.2017.01.002.

Lopez-Luna, J. *et al.* (2017b) 'Reduction in activity by noxious chemical stimulation is ameliorated by immersion in analgesic drugs in zebrafish', *Journal of Experimental Biology*, 220(8), pp. 1451–1458. doi: 10.1242/jeb.146969.

López-Olmeda, J. F. and Sánchez-Vázquez, F. J. (2011) 'Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*)', *Journal of Thermal Biology*, 36(2), pp. 91–104. doi: 10.1016/j.jtherbio.2010.12.005.

Lynne, U. *et al.* (2018) 'Ample evidence for fish sentience and pain', 21. doi:

10.51291/2377-7478.1375.

Malafiglia, V. *et al.* (2013) 'Extreme Thermal Noxious Stimuli Induce Pain Responses in Zebrafish', (July). doi: 10.1002/jcp.24447.

Marwaha, L. *et al.* (2016) 'TRP channels : potential drug target for neuropathic pain', *Inflammopharmacology*. doi: 10.1007/s10787-016-0288-x.

Mettam, J. J., McCrohan, C. R. and Sneddon, L. U. (2012) 'Characterisation of chemosensory trigeminal receptors in the rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss* : responses to chemical irritants and carbon dioxide', pp. 685–693. doi: 10.1242/jeb.060350.

Neiffer, D. L. and Stamper, M. A. (2009) 'Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: Considerations, methods, and types of drugs', *ILAR Journal*, 50(4), pp. 343–360. doi: 10.1093/ilar.50.4.343.

Nilsson, J. *et al.* (2019) 'Sudden exposure to warm water causes instant behavioural responses indicative of nociception or pain in Atlantic salmon', *Veterinary and Animal Science*, 8(February), p. 100076. doi: 10.1016/j.vas.2019.100076.

Nordgreen, J. *et al.* (2007) 'Somatosensory evoked potentials in the telencephalon of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following galvanic stimulation of the tail', (10), pp. 1235–1242. doi: 10.1007/s00359-007-0283-1.

Nordgreen, J. *et al.* (2009) 'Thermonociception in fish: Effects of two different doses of morphine on thermal threshold and post-test behaviour in goldfish (*Carassius auratus*)', *Applied Animal Behaviour Science*, 119(1–2), pp. 101–107. doi: 10.1016/j.applanim.2009.03.015.

Ohnesorge, N., Heintz, C. and Lewejohann, L. (2021) 'Current Methods to Investigate Nociception and Pain in Zebrafish', *Frontiers in Neuroscience*, 15(April), pp. 1–13. doi: 10.3389/fnins.2021.632634.

Omerba, D. *et al.* (2015) 'Neuropharmacology ASICs and mammalian mechanoreceptor function', 94, pp. 80–86. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.007.

Oshima, M. *et al.* (2016) 'Peripheral injury alters schooling behavior in squid,

- Doryteuthis pealeii', *Behavioural Processes*, 128, pp. 89–95. doi: 10.1016/j.beproc.2016.04.008.
- Prober, D. A. *et al.* (2008) 'Zebrafish TRPA1 channels are required for chemosensation but not for thermosensation or mechanosensory hair cell function', *Journal of Neuroscience*, 28(40), pp. 10102–10110. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2740-08.2008.
- Puri, S. and Faulkes, Z. (2015) 'Can crayfish take the heat? *Procambarus clarkii* show nociceptive behaviour to high temperature stimuli, but not low temperature or chemical stimuli', *Biology Open*, 4(4), pp. 441–448. doi: 10.1242/bio.20149654.
- Rachinger-adam, B., Conzen, P. and Azad, S. C. (2011) 'Pharmacology of peripheral opioid receptors'. doi: 10.1097/ACO.0b013e32834873e5.
- Reilly, S. C. *et al.* (2008) 'Behavioural analysis of a nociceptive event in fish : Comparisons between three species demonstrate specific responses', 114, pp. 248–259. doi: 10.1016/j.applanim.2008.01.016.
- Rivas-boyero, A. and Herrero-turrio, M. J. (2010) 'Pharmacological characterization of a nociceptin receptor from zebrafish (*Danio rerio*)'. doi: 10.1530/JME-10-0130.
- Rosa, L. V. *et al.* (2022) 'Acetic acid-induced nociception modulates sociability in adult zebrafish: Influence on shoaling behavior in heterogeneous groups and social preference', *Behavioural Brain Research*, 434(March), p. 114029. doi: 10.1016/j.bbr.2022.114029.
- Rose, J. D. *et al.* (2014) 'Can fish really feel pain?', *Fish and Fisheries*, 15(1), pp. 97–133. doi: 10.1111/faf.12010.
- Saito, S. and Shingai, R. (2006) 'Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates', *Physiological Genomics*, 27(3), pp. 219–230. doi: 10.1152/physiolgenomics.00322.2005.
- Schartl, M. (2014) 'Beyond the zebrafish : diverse fish species for modeling human disease', (November 2013), pp. 1–12. doi: 10.1242/dmm.012245.
- Shega, J. W. *et al.* (2008) 'Validity of pain behaviors in persons with mild to moderate

cognitive impairment', *Journal of the American Geriatrics Society*, 56(9), pp. 1631–1637. doi: 10.1111/j.1532-5415.2008.01831.x.

Sneddon, L. U. (2003a) 'Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception', 972, pp. 44–52.

Sneddon, L. U. (2003b) 'The evidence for pain in fish : the use of morphine as an analgesic', 83, pp. 153–162. doi: 10.1016/S0168-1591(03)00113-8.

Sneddon, L. U. (2004) 'Evolution of nociception in vertebrates : comparative analysis of lower vertebrates', 46, pp. 123–130. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.07.007.

Sneddon, L. U. (2009) 'Pain perception in fish: Indicators and endpoints', *ILAR Journal*, 50(4), pp. 338–342. doi: 10.1093/ilar.50.4.338.

Sneddon, L. U. *et al.* (2014) 'Defining and assessing animal pain', 97. doi: 10.1016/j.anbehav.2014.09.007.

Sneddon, L. U. (2015) 'Pain in aquatic animals', *Journal of Experimental Biology*, 218(7), pp. 967–976. doi: 10.1242/jeb.088823.

Sneddon, L. U. (2019) 'Evolution of nociception and pain: Evidence from fish models', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1785). doi: 10.1098/rstb.2019.0290.

Sneddon, L. U. (2023) 'Fishes Nociception Pain Stress Welfare Zebrafish Rainbow trout', 26, p. 9194.

Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A. and Gentle, M. J. (2003) 'Do fishes have nociceptors ? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system', (December 2002), pp. 1115–1121. doi: 10.1098/rspb.2003.2349.

St, E., Smith, J. and Lewin, G. R. (2009) 'Nociceptors : a phylogenetic view International Association for the Study of Pain', pp. 1089–1106. doi: 10.1007/s00359-009-0482-z.

Toni, M. *et al.* (2019) 'Review : Assessing fish welfare in research and aquaculture , with a focus on European directives', *Animal, The International Journal of Animal Biosciences*, 13(1), pp. 161–170. doi: 10.1017/S1751731118000940.

Tracey, W. D. (2017) 'Current Biology', pp. 129–133. doi: 10.1016/j.cub.2017.01.037.

Viña, E., Parisi, V. and Cabo, R. (2015) 'Acid-sensing ion channels (ASICs) 2 and 4 are expressed in the retina of the adult zebrafish', pp. 223–231. doi: 10.1007/s00441-014-2084-5.

Wallace, C. *et al.* (2018) 'Rapid cooling for euthanasia of young zebrafish', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 57(1), pp. 58–63.

Walters, E. T. (2012) 'Nociceptors as chronic drivers of pain and hyperreflexia after spinal cord injury: An adaptive-maladaptive hyperfunctional state hypothesis', *Frontiers in Physiology*, 3 AUG. doi: 10.3389/fphys.2012.00309.

Walters, E. T. (2018) 'Nociceptive biology of molluscs and arthropods: Evolutionary clues about functions and mechanisms potentially related to pain', *Frontiers in Physiology*, 9(AUG), pp. 1–22. doi: 10.3389/fphys.2018.01049.

Welfare, T. and Kotrschal, F. (no date) 'Fish Brains : Anatomy , Functionality , and Evolutionary Relationships'.

Wolkers, C. P. (2015) 'Jacobs Journal of Aquaculture and Research Aquaculture and Fish Welfare : Evidences for Fish Nociception', (September 2014).

Young, E. E., Lariviere, W. R. and Belfer, I. (2012) 'Genetic basis of pain variability : recent advances', pp. 1–10. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100386.

Εκ, Ο. Η. *et al.* (2003) 'ΟΔΗΓΙΑ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 24ης Νοεμβρίου 1986 για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς