

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

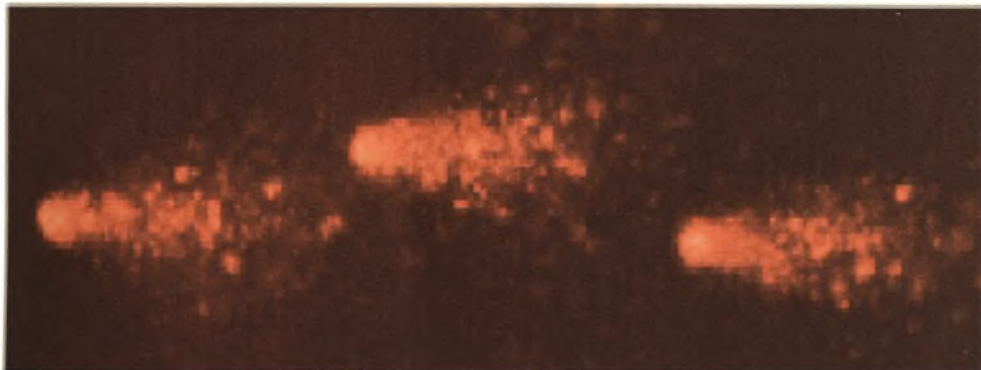
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η επίδραση της αστίας στη διαμόρφωση των επιπέδων
καταπόνησης (stress) στην τσιπούρα *Sparus aurata*

ΝΤΑΝΤΑΛΗ ΟΛΓΑ



ΒΟΛΟΣ 2008



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 6825/1
Ημερ. Εισ.: 14-01-2009
Δωρεά: Συγγραφέας
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΙΥΠ
2008
ΝΤΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Παναπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα
- Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Παναπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος
- Γκολομάζου Ελένη, Διδάσκουσα με το ΠΔ/407, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Παναπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1	Η ΤΣΙΠΟΥΡΑ (SPARUS AURATA L.)	3
1.2	Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	5
1.2.1	Η τσιπούρα στις Ελληνικές υδατοκαλλιέργειες	5
1.2.2	Ελληνική και παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια	6
1.3	ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗ (STRESS) ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΤΡΟΦΗΣ	7
1.3.1	Φυσιολογικές μεταβολές	8
1.3.2	Η κυτταρική αντίδραση στο stress	10
1.3.3	Συμπεριφορά	14
1.3.4	Stress και αναπαραγωγή	15
1.3.5	Παράμετροι που προκαλούν stress	15
1.3.6	Φυσική καταπόνηση	17
1.3.7	Διαχειριστική καταπόνηση	17
1.4	ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΚΟΜΗΤΗ (COMET ASSAY)	18
1.4.1	Πλεονεκτήματα	19
1.4.2	Μειονεκτήματα	20
1.4.3	Εφαρμογές	20
1.5	ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	26
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1	ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	27
2.1.1	Έμβιο υλικό (ψάρια)	28
2.1.2	Πειραματικός εξοπλισμός	29
2.1.3	Πειραματικός σχεδιασμός	30
2.2	ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	31
2.2.1	Απομόνωση δειγμάτων ήπατος	31
2.2.2	Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών	32
2.2.3	Λύση	32
2.2.4	Ηλεκτροφόρηση	33
2.2.5	Μέτρηση παραμέτρων και στατιστική ανάλυση	35
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	48
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας, το πείραμα χρειάστηκε να χωριστεί σε δύο μέρη. Το πρώτο ήταν αυτό που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Γεωπονίας Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος και στο οποίο έγινε εκτροφή ιχθύων τσιπούρας καθώς και στο εργαστήριο Γενετικής στο οποίο έγινε η γενετική ανάλυση των δειγμάτων. Η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας έγινε με τη σημαντική συμβολή πολλών προσώπων, τα οποία νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω.

Καταρχήν, οφείλω θερμές ευχαριστίες στην επιβλέπουσά μου Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Π. Παναγιωτάκη. Η βοήθεια που μου παρείχε ήταν ουσιαστική και στήριξε τις προσπάθειές μου, τόσο ακαδημαϊκά, όσο και ηθικά καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Επ. Καθηγητή κ. Α. Εξαδάκτυλο. Η βοήθειά του στο σχεδιασμό, την οργάνωση και εκτέλεση του πειράματος, αλλά και η καθοδήγηση σε ότι αφορούσε το ερευνητικό μέρος του πειράματος, υπήρξε πολύτιμη και καθοριστική για την επιτυχή διεξαγωγή της εργασίας μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω, την Δρ. Ε. Γκολομάζου, για τη συμμετοχή της στην επιτροπή και το ενδιαφέρον που έδειξε για την επιτυχή εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην οικογένειά μου για τα όσα μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μου. Επίσης, θα ήθελα να αναφέρω την σημαντική συμβολή των φιλικών μου προσώπων, Μαλανδράκη Μανόλη, Κάβουρα Μενέλαο, Κασιμάτη Δημήτριο, και Χατζηπλή Αικατερίνη, τα οποία βοήθησαν τόσο κατά τη διάρκεια της οργάνωσης του εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών όσο και για την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

1 Εισαγωγή

1.1 Η τσιπούρα (*Sparus aurata* L.)

Η τσιπούρα ανήκει στην οικογένεια των σπαριδών (Sparidae) και στην κλάση των οστειθύων (Teleostei). Έχει σώμα ατρακτοειδές, πλευρικά πεπεσμένο, κυρτή ράχη και κοντό ρύγχος. Έχει κεφαλή ισχυρή, χείλη χονδρά και μεγάλους οφθαλμούς. Το μπροστινό τμήμα των σιαγόνων χαρακτηρίζεται από την παρουσία έξι κωνοειδών δοντιών, ενώ πλευρικά στην πάνω σιαγόνα έχει τέσσερις σειρές μυλοειδών δοντιών και 3-4 σειρές στην κάτω σιαγόνα. Τα μπροστινά δόντια είναι δυνατά, κυρτά και μυτερά. Στο μέτωπο ανάμεσα στα μάτια έχει μια λωρίδα σε σχήμα V και πάνω στην άκρη του βραγχιοκαλύμματος μια μαύρη κηλίδα. Γενικά, έχει χρώμα ασημένιο – γκρι με πιο σκούρη πλάτη και περισσότερο ανοιχτό χρώμα στις πλευρές και την κοιλιά. Οι παρυφές του ουραίου πτερυγίου είναι μαύρες (Miller and Loates, 1997). Έχει μεγάλο μεγέθους κτενοειδή λέπια και θωρακικά πτερύγια. Το μήκος της φτάνει μέχρι τα 50 – 80 cm και το βάρος της πάνω από 5 kg (Νεοφύτου, 2001).



Εικόνα 1 Η τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα ανήκει στην κατηγορία των βενθοπελαγικών ψαριών της εύκρατης και υποτροπικής ζώνης και ζει σε παράκτιες περιοχές με αμμώδεις πυθμένες, σε φυκιάδες και σε περιοχές όπου σπάει το κύμα, φθάνοντας σε βάθος έως 30m τα νεαρά άτομα και 150m τα ενήλικα. Δεν είναι μεταναστευτικό είδος και ζει είτε μοναχικό είτε σχηματίζει μικρά κοπάδια (Νεοφύτου, 2001).

Πρόκειται για ζώο ευρύθερμο και ευρύαλο και γι' αυτό συναντάται σε νερά με θερμοκρασίες από 5° - 27° C και σε νερά με μεγάλο εύρος αλατότητας (άριστο εύρος ανάπτυξης 25 - 40‰). Δεν παρουσιάζει όμως την ίδια ανοχή στις τιμές του οξυγόνου εφόσον έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε χαμηλές τιμές οξυγόνου.

Η τσιπούρα ανήκει στα σαρκοφάγα ψάρια. (Νεοφύτου, 2001). Έχει αποδειχθεί ότι οι διατροφικές συνήθειες της τσιπούρας εξαρτώνται από το μέγεθός της. Τα μικρής ηλικίας ιχθύδια τρέφονται κυρίως με πολύχαιτους και μικρού μεγέθους καρκινοειδή. Τα μεγαλύτερα με μύδια, γαστερόποδα και καρκινοειδή (Χώτος, 1992).

Στην τσιπούρα, έχει αποδειχθεί η ύπαρξη ενός πρωτανδροικού ερμαφροδιτισμού. Σύμφωνα με αυτόν, όλος ο πληθυσμός μέχρι το τέλος του 2^{ου} έτους, λειτουργεί σαν ένα σύνολο αρσενικών ατόμων, μετά λαμβάνει χώρα αλλαγή του φύλου και αρχίζουν να εμφανίζονται θηλυκά άτομα στο τέλος του 2^{ου} και αρχή του 3^{ου} έτους (Χώτος, 2001). Παρόλα αυτά η σεξουαλική αναστροφή δεν φαίνεται να επηρεάζει το σύνολο των ατόμων αφού μερικά από αυτά παραμένουν αρσενικά σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους, πιθανότατα λόγω κοινωνικών, περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων (Zohar *et al.*, 1978). Η αναπαραγωγή της τσιπούρας λαμβάνει χώρα την περίοδο Οκτωβρίου – Δεκεμβρίου. Την άνοιξη εισέρχεται σε ημίκλειστες παράκτιες περιοχές υφάλμυρων νερών. Κατά τα μέσα του φθινοπώρου τις εγκαταλείπουν και επιστρέφουν στην ανοιχτή θάλασσα. Η έξοδος αυτή από τα ρηχά υφάλμυρα νερά συμπίπτει με την έναρξη της ωρίμανσης των γονάδων τους, η οποία ολοκληρώνεται με την έναρξη της φυσικής αναπαραγωγής, που όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιείται από τον Οκτώβριο μέχρι το Δεκέμβριο. (Νεοφύτου, 2001).

Η τσιπούρα είναι είδος που χαρακτηρίζεται από πολύ γρήγορη ανάπτυξη και ακριβώς αυτό της προσδίδει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον για τις καλλιέργειες. Έχει κρέας άσπρο, τρυφερό και εξαιρετικής ποιότητας. Έχει υψηλή εμπορική αξία με μέσο όρο παραγωγής από εκτροφή της τάξης των 100 εκατομμυρίων τόνων/χρόνο. Η ολική παραγωγή εκτρεφόμενης τσιπούρας στη χώρα μας ανέρχεται στους 76000 τόνους (FAO, 2006). Εξάγεται κυρίως στη Γαλλία, Ιταλία, Ισπανία και Βουλγαρία.

1.2 Η συμβολή των υδατοκαλλιεργειών

1.2.1 Η τσιπούρα στις Ελληνικές υδατοκαλλιέργειες

Οι υδατοκαλλιέργειες, ως ανθρώπινη δραστηριότητα, ξεκίνησαν από πολύ παλιά και αποτελούν σήμερα τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο κλάδο παραγωγής τροφών στον κόσμο. Η αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού καθώς και η στροφή του καταναλωτικού κοινού προς την ποιοτική διατροφή, έφεραν τα θαλασσινά εδέσματα στο κέντρο του ενδιαφέροντος.

Η Ελλάδα ξεκίνησε νωρίς την προσπάθεια ανάπτυξης των υδατοκαλλιεργειών από τα γλυκά νερά, με την εισαγωγή αυγών για εκκόλαψη της ιριδίζουσας πέστροφας, το 1951 (Κλαουδάτος, 2005). Οι ευνοϊκές θερμοκρασίες, οι φυσικοχημικές παράμετροι των θαλασσών της Ελλάδος, το πλήθος και η μορφολογία των ακτών, το πλήθος των νησιών (3000) καθώς και η επιτυχής εφαρμογή του συστήματος εκτροφής των ιχθύων σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς, σε συνδυασμό με το έντονο επενδυτικό ενδιαφέρον και τις ευνοϊκές συνθήκες αγοράς, είχαν σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη του κλάδου των θαλασσοκαλλιεργειών (1985) σε πολύ μεγάλο βαθμό, με συνέπεια η Ελλάδα τα τελευταία 20 χρόνια να έχει κατακτήσει την πρώτη θέση μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όσον αφορά στην παραγωγή ανταγωνιστικών προϊόντων και διαθέτει τεχνογνωσία υψηλού επιπέδου (Πράπας, 2000).

Τα κύρια είδη που καλλιεργούνται στην Ελλάδα και γενικότερα στη Μεσόγειο είναι ψάρια σαρκοφάγα, όπως η τσιπούρα και το λαβράκι και

απαιτούν στην τροφή τους υψηλά ποσοστά πρωτεϊνών, στις οποίες όμως αποδίδεται και το μεγάλο ποσοστό των ιχθυοτροφών.

Η τσιπούρα είναι περισσότερο ενδιαφέρον ψάρι στις ημιεντατικές και εκτατικές εκτροφές για τους εξής λόγους:

- ◆ Εκμεταλλεύεται τη φυσική παραγωγή της λεκάνης σε βενθικούς ασπόνδυλους οργανισμούς.
- ◆ Έχει πολύ καλή τιμή στην αγορά
- ◆ Εκτρέφεται με επιτυχία σε συστήματα πολυκαλλιεργειών εντατικής, ημιεντατικής ή εκτατικής μορφής με άλλα είδη, τα οποία δεν ανταγωνίζεται στην τροφή όπως, *Mugil cephalus* (Κέφαλος), *Chelon labrosus* (λαυκίνος), *Puntazzo puntazzo* (μυτάκι) (Χώτος, 1992).

1.2.2 Ελληνική και παγκόσμια υδατοκαλλιέργεια

Η μέχρι σήμερα συμβολή των υδατοκαλλιεργειών στα παραγόμενα προϊόντα δεν μπορεί να θεωρηθεί ιδιαίτερα σημαντική. Το 1979, για παράδειγμα, η ετήσια παραγωγή ψαριών από τις ιχθυοκαλλιέργειες έφθασε τους 6 εκατομμύρια τόνους. Η ποσότητα αυτή αντιπροσώπευε το 8% περίπου της παγκόσμιας αλιευτικής παραγωγής αλλά σε αντίθεση με την αλιευτική παραγωγή, ακολούθησε ανοδική πορεία. Άμεση συνέπεια αυτής της ανοδικής πορείας ήταν το 2001 να έχει ξεπεράσει τους 37 εκατομμύρια τόνους και σύμφωνα με τις προβλέψεις του FAO, το 2010 να τείνει στους 60 εκατομμύρια τόνους (Κλαουδάτος, 2005).

Πίνακας 1 Παγκόσμια παραγωγή (Αλιευτική και Υδατοκαλλιεργειών σε εκατομμύρια τόνους) (πηγή: FAO, 2002)

	1996	1997	1998	1999	2000	2001
	Παραγωγή σε εκατομμύρια τόνους					
	Εσωτερικών Υδάτων					
Αλιευόμενα	7,4	7,5	8,0	8,5	8,8	8,8
Εκτρεφόμενα	15,9	17,5	18,5	20,1	21,4	22,4
Σύνολο	23,3	25,0	26,5	28,6	30,2	31,2

Θαλασσών						
Αλιευόμενα	86,1	86,4	79,3	84,7	86,0	82,5
Εκτρεφόμενα	10,8	11,1	12,0	13,3	14,2	15,1
Σύνολο	96,9	97,5	91,3	98,0	100,2	97,6

Το βασικό πρόβλημα είναι η διατήρηση της ανταγωνιστικότητας, της παραγωγικότητας και της βιωσιμότητας του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας.

Η περαιτέρω ανάπτυξη του κλάδου πρέπει να ακολουθήσει μία προσέγγιση βάσει της οποίας οι τεχνολογίες εκτροφής, τα κοινωνικοοικονομικά προβλήματα, η χρήση των φυσικών πόρων και η διαχείριση να ενσωματωθούν μεταξύ τους, έτσι ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί η βιωσιμότητα.

1.3 Καταπόνηση (stress) σε συνθήκες εκτροφής

Το στρες είναι μια κατάσταση κατά την οποία ο οργανισμός δεν μπορεί να διατηρήσει κανονική φυσιολογική κατάσταση, διότι κάποιοι παράγοντες δρουν δυσμενώς στην ευζωία του. Η καταπόνηση αυτή επηρεάζει αρνητικά τις φυσικές άμυνες του οργανισμού, με αποτέλεσμα να μένει απροστάτευτος από την εισβολή παθογόνων και την πρόκληση νοσηρών καταστάσεων. Τα διαφορετικά είδη ιχθύων εμφανίζουν διαφορετική ανθεκτικότητα απέναντι στους στρεσογόνους παράγοντες. Οι ιχθύες εκτίθενται σε τέτοιου είδους παράγοντες, τόσο στη φύση όσο και σε ελεγχόμενες συνθήκες, όπως η ιχθυοκαλλιέργεια ή το εργαστήριο. Η διαρκώς αυξανόμενη ρύπανση των υδάτινων οικοσυστημάτων, λόγω ανθρωπογενών επιδράσεων, είναι μια κατηγορία περιβαλλοντικής καταπόνησης. Από την άλλη πλευρά στην εντατική υδατοεκτροφή η διαλογή, η μεταφορά, ο εμβολιασμός και οι λοιπές διαχειριστικές πρακτικές αποτελούν παράγοντες καταπόνησης. Η αντίδραση των ψαριών σε τέτοιους στρεσογόνους παράγοντες περιλαμβάνει όλα τα επίπεδα οργάνωσης, από το κύτταρο (Hightower, 1991), στο μεμονωμένο οργανισμό (Barton and Iwama, 1991) ως και τη δομή του πληθυσμού (Adams 1990).

1.3.1 Φυσιολογικές μεταβολές

Ως αντίδραση σε έναν παράγοντα καταπόνησης (stress), όπως είναι ο χειρισμός ή η αυξημένη ιχθυοφόρτιση, το ψάρι θα υποβληθεί σε μια σειρά βιοχημικών και φυσιολογικών αλλαγών ώστε να αντισταθμιστεί η αλλαγή που επιβάλλεται επάνω σε αυτό. Οι προκαλούμενες, από παράγοντες stress, διάφορες φυσιολογικές μεταβολές στους ιχθύς θεωρούνται αναμενόμενες και αποτελούν το σύνολο της αντιδράσεώς τους, το οποίο χαρακτηριζόμενο τόσο από ταχύτατες και άμεσης αποτελεσματικότητας όσο και από περισσότερο μακρόχρονες (με τάσεις προσαρμογής) νευροορμονικές διεργασίες, ονομάστηκε από τον Selye, Γενικό Σύνδρομο Προσαρμογής (ΓΣΠ) (Παπουτσόγλου, 1998).

Το ΓΣΠ σχεδόν σε όλους τους σπονδυλωτούς οργανισμούς περιλαμβάνει τις ακόλουθες 3 φάσεις με συγκεκριμένη σειρά εξέλιξης: φάση συναγερμού (Alarm stage), η οποία περιλαμβάνει το στάδιο της καταπληξίας (Shock) και το στάδιο της αντικαταπληξίας (Counter shock), φάση αντιστάσεως (Resistance stage) και φάση εξαντλήσεως (Exhaustive stage). (Παπουτσόγλου, 1998).

1.3.1.1 Στάδιο συναγερμού

Στους ιχθύς κατά τη φάση του συναγερμού προκαλείται η πρωτογενής αντίδραση η οποία είναι νευροενδοκρινική και αποτελεί μέρος της γενικότερης αντίδρασης των ψαριών στο stress (Gampert *et al.* 1994). Αυτή η αντίδραση περιλαμβάνει τη γρήγορη απελευθέρωση των ορμονών που προκαλούν stress, των κατεχολαμινών και των κορτικοστεροειδών (π.χ. κορτιζόλης), στην κυκλοφορία. Οι καταχολαμίνες απελευθερώνονται από το χρωμίοφιλο ιστό που βρίσκεται στον εμπρόσθιο νεφρό των τελεόστεων καθώς επίσης από τις απολήξεις του συμπαθητικού νευρικού συστήματος (Randall and Perry, 1992). Η κορτιζόλη απελευθερώνεται από τον εσωτερικό ιστό, που βρίσκεται στον επικεφαλή (εμπρόσθιο) νεφρό, ως αντίδραση σε διάφορες ορμόνες, αλλά κυρίως ως αντίδραση στην φλοιοεπινεφριδιοτρόπο ορμόνη (ACTH);

(Balm *et al.* 1994). Τα επίπεδα καταπόνησης στο πλάσμα των σαλμονοειδών είναι < 3 ή 20 - 70 nmoles/L για την αδρεναλίνη και < 10 ή 40 - 200 ng/mL για την κορτιζόλη, αντίστοιχα. Αυτές οι τιμές πρέπει να χρησιμοποιούνται ως οι γενικές κατευθυντήριες γραμμές (Barton *et al.*, 2002).

1.3.1.2 Φάση αντίστασης

Κατά τη φάση της αντίστασης, παρατηρείται η δευτερογενής αντίδραση των ιχθύων. Αυτή η αντίδραση περιλαμβάνει τις διάφορες βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές που σχετίζονται με το stress και οι οποίες προκαλούνται, σε μεγάλο βαθμό, από τις ανωτέρω στρεσογόνες ορμόνες. Οι στρεσογόνες αυτές ορμόνες ενεργοποιούν έναν αριθμό διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών που οδηγούν σε αλλαγές στη χημική σύσταση του αίματος (Barton and Iwama 1991; Randall and Perry 1992; Vijayan *et al.* 1994; Mommsen *et al.*, 1999; Barton *et al.*, 2002).

Οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης και της κορτιζόλης του πλάσματος έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες stress και πιθανόν είναι οι συνηθέστεροι δείκτες για τη μέτρηση της δευτερογενούς (μεταβολικής) αντίδρασης των ψαριών στους στρεσογόνους παράγοντες (Barton *et al.*, 2002). Η συγκέντρωση γλυκόζης του πλάσματος στην κυκλοφορία εξαρτάται από την παραγωγή της και την εκκαθάρισή της από την κυκλοφορία

Η παραγωγή της γλυκόζης μέσω του stress, βοηθά το ζώο παρέχοντάς του ενεργειακά υποστρώματα στους ιστούς, όπως στον εγκέφαλο, τα βράγχια και τους μύες, προκειμένου να αντιμετωπιστεί η αυξανόμενη ενεργειακή απαίτηση. Το συκώτι είναι η κύρια πηγή για την παραγωγή γλυκόζης, μέσω της γλυκογένεσης και της γλυκονεογένεσης. Η αδρεναλίνη και η κορτιζόλη έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση παραγωγής γλυκόζης στα ψάρια και διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση του stress, μέσω της αύξησης στη συγκέντρωση της γλυκόζης του πλάσματος. Αν και η αδρεναλίνη αποβάλλεται γρήγορα από την κυκλοφορία μετά από στρες (< 30 λεπτά), η γλυκόζη του πλάσματος παραμένει σε υψηλά επίπεδα για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους (Vijayan *et al.* 1994).

1.3.1.3 Φάση εξάντλησης

Κατά τη φάση της εξάντλησης, παρατηρείται η τριτογενής αντίδραση των ιχθύων. Αυτή η μεταβολή αντιπροσωπεύει τις αλλαγές σε επίπεδο ατόμων και πληθυσμών που συνδέονται με το stress. Εάν το ψάρι είναι ανίκανο να εγκλιματιστεί ή να προσαρμοστεί στον στρεσογόνο παράγοντα, μπορούν να προκύψουν αλλαγές συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης αναπαραγωγικής ικανότητας και της αύξησής του. Η μειωμένη στρατολόγηση και παραγωγικότητα, που συνδέονται με το στρες μπορούν επίσης να αλλάξουν την αφθονία και την ποικιλομορφία των ειδών στους φυσικούς πληθυσμούς (Barton *et al.*, 2002).

Οι φυσιολογικές αντιδράσεις με τις μεταβολές στη συμπεριφορά, σε κάποιον παράγοντα stress συσχετίζονται στενά. Η προσαρμοστική αντίδραση σε κάποιον παράγοντα stress, μπορεί να μειώσει τις ενεργειακές απαιτήσεις στα φυσιολογικά συστήματα που πρέπει να ανταποκριθούν σε αυτήν. Η φυσιολογική απόκριση στο stress, αφ' ετέρου, χρησιμεύει στο να διατηρήσει, να κατευθύνει και ενδεχομένως να περιορίσει την αντίδραση που σχετίζεται με τη συμπεριφορά (Power, 1997).

1.3.2 Η κυτταρική αντίδραση στο stress

Η γενικευμένη αντίδραση στο stress σε κυτταρικό επίπεδο χαρακτηρίζεται από ένα πλήθος πρωτεϊνών και ορμονών.

Οι ορμόνες του θυροειδούς (TH) αντιπροσωπεύουν μια ομάδα ορμονών που ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια των μεταβολικών αντιδράσεων σε περιόδους ασιτίας, καθώς και κατά τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας και της γλυκογενόλυσης (De Pedro *et al.*, 2003). Έχει αναφερθεί ότι η νηστεία ή η μειωμένη σίτιση μπορεί να ρυθμίσει τον άξονα υποθάλαμο-υπόφυση-θυροειδής και σύμφωνα με τον οποίο, η αναβολική δραστηριότητα βρίσκεται σε αναστολή κατά τη διάρκεια αυτών των περιόδων ασιτίας (Bentley, 1998).

Οι πρωτεΐνες θερμικού shock (HSPs) είναι ιδιαίτερα συντηρημένες κυτταρικές πρωτεΐνες που έχουν παρατηρηθεί σε όλους τους οργανισμούς (Feder and Hofmann, 1999), συμπεριλαμβανομένων των ψαριών (Iwama *et al.*, 1998). Εκτενείς μελέτες σε είδη - μοντέλα έχουν αποκαλύψει τρεις σημαντικές οικογένειες HSPs οι οποίες έχουν ταξινομηθεί σύμφωνα με το

μοριακό τους βάρος: την HSP90 (85-90 kDa), την HSP70 (68-73 kDa) και την χαμηλού μοριακού βάρους HSPs (16-24 kDa). Στο μη στρεσαρισμένο κύτταρο, υπάρχει στοιχειώδης παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών, που είναι απαραίτητες για την κυτταρική ομοιόσταση. Η Hsp70 είναι γνωστή για την βοήθεια που παρέχει στην πτύχωση των δημιουργούμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, για την δράση της σε πρωτεϊνικά συμπλέγματα, για την επισκευή και την υποβάθμιση των μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Η HSP90 δρα στην υποστήριξη των διαφόρων συστατικών του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένου του κυτοσκελετού, των ενζύμων και των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών. Η χαμηλού μοριακού βάρους HSP έχει διαφορετικές λειτουργίες που είναι για συγκεκριμένα είδη και είναι αντίθετες από τις άλλες HSP. Αυτές οι πρωτεΐνες δεν έχουν καμία γνωστή ουσιώδη λειτουργία και φαίνεται να εκφράζονται μόνο κατά τη διάρκεια του stress. Συμπερασματικά, η λειτουργία των HSP ενισχύει τη σημασία τους, καθώς εμπλέκεται στις πιο βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η κυτταροδιαίρεση και η αύξηση.

Τα αυξανόμενα επίπεδα των διάφορων HSPs πρωτεϊνών έχουν μετρηθεί στους ιστούς των ψαριών που εκτίθενται σε βακτηριακά παθογόνα (Forsyth *et al.*, 1997; Ackerman and Iwama, 2001) και σε περιβαλλοντικούς ρυπαντές, όπως είναι τα βαρέα μέταλλα, τα βιομηχανικά απόβλητα (Vijayan *et al.*, 1998), τα φυτοφάρμακα και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Είναι αξιοσημείωτο ότι ενώ πολλοί δείκτες stress των ψαριών, όπως είναι η συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα, μεταβάλλοντας από διαχειριστικές και δειγματοληπτικές διαδικασίες, οι Vijayan *et al* (1997), καταδεικνύουν ότι το stress ύστερα από διαχειριστικές διαδικασίες, δεν αλλάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης HSP70 στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*).

Μια ακόμη αντίδραση στο stress σε κυτταρικό επίπεδο χαρακτηρίζεται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid receptor). Τα γλυκοκορτικοειδή, η τελική ορμόνη του άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης - επινεφριδίων, παίζουν τεράστιο ρόλο στον έλεγχο της φλεγμονώδους αντίδρασης. Αυτή τους η φυσική ιδιότητα είναι και ο κύριος λόγος που εξακολουθούν να είναι από τα πιο ισχυρά και χρήσιμα όπλα της ιατρικής επιστήμης στη θεραπεία νόσων που έχουν να κάνουν με φλεγμονή. Ουσίες με γλυκοκορτικοειδή δράση, χρησιμοποιούνται καθημερινώς για τον έλεγχο

σοβαρών παθήσεων σε κάθε όργανο και ιστό του οργανισμού. Πέραν του ανοσολογικού συστήματος και της φλεγμονής, όμως, τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν σχεδόν κάθε άλλη λειτουργία, συμπεριλαμβανόμενης της λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος, του μεταβολισμού, του καρδιαγγειακού συστήματος κ.ά. Η στεροειδής ορμόνη κορτιζόλη, είναι ευρέως αποδεκτή ως δείκτης για την μέτρηση του stress στα ψάρια, η οποία αυξάνεται μετά την έκθεση των ψαριών σε φυσικούς στρεσογόνους παράγοντες (Schreck, 1981; Barton and Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997;). Οι διαχειριστικές εργασίες και η ιχθυοφόρτιση αυξάνουν πολύ τα επίπεδα κορτιζόλης πολυάριθμων ειδών ψαριών (Strange *et al.*, 1978; Redding and Schreck, 1983;). Οι περιβαλλοντικές παράμετροι, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, της διάρκειας της ημέρας και της διαίτας της διατροφής, έχουν αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν επιπτώσεις στη μεταβολή της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στο πλάσμα, σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες (Barton *et al.*, 1988;). Ελλείψει άλλων παραγόντων stress, η αστία των ψαριών μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση (Peterson and Small, 2004), μείωση (Barton *et al.*, 1988) ή μη – αναστρέψιμη κατάσταση του επιπέδου της κορτιζόλης (Czesny *et al.*, 2003; Pottinger *et al.*, 2003) ανάλογα με τα είδη. Διαφορετικές διατροφικές δίαιτες μπορούν να μεταβάλλουν τα επίπεδα κορτιζόλης.

Ως πυρηνικές ορμόνες, τα γλυκοκορτικοειδή δρουν κατευθείαν στο γονιδίωμα μέσω πρωτεϊνικών ενδοκυτταρικών υποδοχέων που υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού. Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται στο κυτταρόπλασμα, σε σύμπλεγμα με τις «θερμικού shock» πρωτεΐνες. Σ' αυτή τη μορφή αναγνωρίζουν την ορμόνη με μεγάλη χημική συγγένεια. Μετά την ένωση της ορμόνης με τον υποδοχέα, το σύμπλεγμα ορμόνης - υποδοχέα απελευθερώνεται από τις «θερμικού shock» πρωτεΐνες και περνάει μέσα στον πυρήνα του κυττάρου μέσω των πυρηνικών πόρων, με τη βοήθεια ειδικού μεταφορικού συστήματος. Μέσα στον πυρήνα, το σύμπλοκο μεταβάλλει την ταχύτητα μεταγραφής ρυθμιζόμενων γονιδίων με δύο κυρίως τρόπους: 1) αντιδρώντας ως ομοδιμερές με ειδικές ακολουθίες βάσεων στους εκκινητές αυτών των γονιδίων ή 2) αντιδρώντας με άλλους συστηματικούς παράγοντες,

αλλάζοντας την ικανότητα αυτών των παραγόντων να ασκούν τις δικές τους δράσεις επάνω σε γονίδια που αυτοί ρυθμίζουν.

Οι μεταλλοθειονίνες (MT) είναι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, πλούσιες σε κυστεΐνη που δεσμεύουν ιόντα μετάλλου και θεωρούνται αξιόπιστοι δείκτες έκθεσης σε βαρέα μέταλλα. Η συγκέντρωση των MT και άλλων μορίων, όπως η δραστικότητα της ακετυλχολινεστεράσης (AChE) και η συγκέντρωση του cAMP, στους ιστούς των ζώων μεταβάλλονται ανάλογα με το βαθμό της ρύπανσης.

1.3.2.1 Βλάβη γενετικού υλικού

Κάθε στιγμή, το DNA, που είναι το γενετικό υλικό των κυττάρων, καταστρέφεται από εσωτερικές και εξωτερικές τοξίνες. Το DNA μπορεί να καταστραφεί με πολλούς τρόπους. Για παράδειγμα, η παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα μπορεί να παράγει τοξικά μόρια, αποκαλούμενα αντενεργά είδη οξυγόνου, τα οποία αποτελούν μια κατηγορία ελεύθερων ριζών (free radicals). Αυτές οι ουσίες μπορούν να αντιδράσουν και να τροποποιήσουν τις βάσεις του DNA καθώς και να αποτρέψουν τον κώδικα από το να χρησιμοποιηθεί κατάλληλα. Εάν το DNA είναι σαν ένα φερμουάρ («zipper»), οι ελεύθερες ρίζες παράγουν σκόρπια νημάτια ή διαστρεβλωμένα δόντια που μπορούν να φράξουν και να σπάσουν αυτή τη δομή. Η έκθεση σε τοξίνες, όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία ή ο καπνός των τσιγάρων, μπορεί επίσης να καταστρέψει το DNA. Επίσης, τα ένζυμα που φτιάχνουν νέο DNA (που συμβαίνει αμέσως πριν διαιρεθεί ένα κύτταρο) μπορεί να κάνουν λάθη προκαλώντας ανάρμοστα (αταίριαστα) ζεύγη βάσεων. Βλάβες στο DNA ή λάθη σε πρόσφατα ξαναδιπλωμένο DNA, είναι αρκετά συχνά. Στην πραγματικότητα, σε καθημερινή βάση, το DNA σε κάθε κύτταρο του οργανισμού μας πιθανόν υφίσταται 10.000 βλάβες ή λάθη.

1.3.2.2 Επιδιόρθωση γενετικού υλικού

Όπως είναι φυσικό, τα λάθη στο DNA (ζημιά) πρέπει να επισκευαστούν. Ευτυχώς, ο οργανισμός μας έχει αναπτύξει περίπλοκα συστήματα αναγνώρισης των λαθών στο DNA και της διευθέτησής τους, τα οποία

μπορούν να διατηρούν την ακεραιότητα και την λειτουργία του γενετικού μας κώδικα και των κυττάρων μας. Με το πέρασμα του χρόνου, εντούτοις, τα συστήματα επισκευής του DNA μας υποχωρούν. Μερικοί επιστήμονες θεωρούν ότι η συσσώρευση της μη διορθωμένης ζημίας στο DNA κατά τη διάρκεια ετών, είναι μια σημαντική αιτία της γήρανσης.

Η βλάβη στο DNA, που μπορεί να συμβάλει σε χρόνιες παθήσεις, προκύπτει και από εξωτερικές τοξίνες και από φυσικές διαδικασίες. Μερικές από αυτές τις χρόνιες παθήσεις περιλαμβάνουν:

- ◆ Καρδιακές παθήσεις
- ◆ Αρτηριακές ασθένειες
- ◆ Νευρολογικές διαταραχές

1.3.3 Συμπεριφορά

Ένα από τα άμεσα σημάδια μιας στρεσογόνου κατάστασης στα ψάρια είναι η απότομη αλλαγή στη συμπεριφορά. Δραστηριότητες όπως η σύλληψη τροφής, αποφυγή αρπαγής, μετανάστευση και η επιλογή ενδιαιτήματος, είναι κρίσιμες για την επιβίωση του οργανισμού και κατ' επέκταση του πληθυσμού, και συνήθως χρησιμοποιούνται ως δείκτες περιβαλλοντικών παραγόντων stress. Οι αλλαγές τέτοιων συμπεριφορών μπορούν να διαρκέσουν από λίγα λεπτά έως και μερικές εβδομάδες έως ότου επιστρέψουν σε συνθήκες προ – στρες, ανάλογα με τη φύση και το μέγεθος του παράγοντα που το προκάλεσε. Οι συμπεριφορές που είναι οι σημαντικότερες για την επιβίωση του οργανισμού τείνουν να επιστρέψουν σε φυσιολογικές καταστάσεις σε συντομότερο χρονικό διάστημα (Schreck *et al.*, 1997). Οι κατάλληλες αντιδράσεις από την αλλαγή στην συμπεριφορά από κάποιον παράγοντα stress, πιθανόν να μειώσουν το μέγεθος του και να αυξήσουν τις πιθανότητες επιβίωσης του οργανισμού. Οι Schreck *et al.* (1997) επισήμαναν ότι η κατάλληλη αντίδραση μπορεί να είναι η αποφυγή ή κάποια άλλη αλλαγή στη συμπεριφορά που μπορεί να μετριάσει την έκθεση στον παράγοντα stress.

1.3.4 Stress και αναπαραγωγή

Η πρακτική διάσταση της πιθανούς δυσμενούς επιδράσεως του stress στην αναπαραγωγή των ιχθύων, αφορά στην εκτροφή των γεννητόρων μιας μονάδος. Γενικά, το από μεταβολές των επιπέδων περιβαλλοντικών παραγόντων προερχόμενο χρόνιο ή οξύ stress, μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης, αποτέλεσμα του οποίου μπορεί να είναι η παρεμπόδιση της φυσιολογικής εξελίξεως των διαφόρων διεργασιών που αποσκοπούν στη γεννητική ωρίμανση των ιχθύων (Παπουτσόγλου, 1998) .

1.3.5 Παράμετροι που προκαλούν stress

Αξίζει να αναφερθεί ότι κάθε υδρόβιος οργανισμός που κρίνεται κατάλληλος για εκμετάλλευση, έχει τις δικές του απαιτήσεις σε ό, τι αφορά το περιβάλλον εκτροφής ή καλλιέργειάς του. Είναι όμως γεγονός ότι ορισμένα από τα χαρακτηριστικά των υδάτινων μαζών σε ό,τι αφορά την καταλληλότητα τους για την εκτροφή ή την καλλιέργεια υδρόβιων οργανισμών, είναι κοινά για πολλούς οργανισμούς. Συνεπώς, για τη σωστή απόφαση χρησιμοποίησης των μαζών αυτών ή όχι, χρειάζεται να γίνει ο ακριβής προσδιορισμός κάποιων παραγόντων.

1.3.5.1 Χημικοί παράγοντες

Αναφερόμενοι στους χημικούς παράγοντες οι οποίοι προκαλούν stress στους υδρόβιους οργανισμούς, πρέπει να τονίσουμε ότι πρέπει να αποφεύγονται οι κακής ποιότητας υδάτινες μάζες.

Η σημασία της παρουσίας του οξυγόνου στις διαδικασίες του φαινομένου της ζωής είναι γνωστή. Με άλλα λόγια δηλαδή, η ποσότητα του δεσμευμένου, στο νερό, οξυγόνου αποτελεί όχι μόνο βασικό χαρακτηριστικό του, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις, ακόμα και περιοριστικό παράγοντα σε ό,τι αφορά την παρουσία της υδρόβιας ζωής. Συνεπώς, για την μεγαλύτερη επιβίωση των ψαριών, είναι αναγκαίο οι τιμές του διαλυμένου οξυγόνου να διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα. Εκείνο όμως που πρέπει να καταστεί σαφές είναι ότι η ευαισθησία των υδρόβιων οργανισμών σε χαμηλές συγκεντρώσεις

διαλυμένου οξυγόνου διαφέρει από είδος σε είδος (Alabaster and Loyd, 1980).

Εξετάζοντας τα δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με την επίδραση της τιμής του pH στο ρυθμό ανάπτυξης των ψαριών ή γενικότερα στην επιβίωση και τη συμπεριφορά τους, διαπιστώνεται ότι οι ακατάλληλες τιμές pH για κάθε υδρόβιο οργανισμό πρέπει να αποφεύγονται. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι διακυμάνσεις του pH πρέπει να βρίσκονται στα όρια 7,5 – 8,5 (Χώτος, 1992).

Η παρουσία διαφόρων ανόργανων και οργανικών ουσιών «ξένων» προς το νερό σήμερα δυστυχώς είναι μια πραγματικότητα που δεν μπορεί να αγνοηθεί. Ιδιαίτερα όταν πρόκειται μια υδατοσυλλογή να αξιολογηθεί, για να κριθεί κατάλληλη ή όχι για υδατοκαλλιέργεια. Εκτός από την καθαρά οικολογική υποβάθμιση που επέρχεται, υδατοσυλλογές μεγάλων εκτάσεων κινδυνεύουν ή έχουν ήδη καταστεί αχρησιμοποίητες για εκτροφή και καλλιέργεια υδρόβιων οργανισμών εξαιτίας του «στρεσσαρίσματος» που προκαλούν σε αυτούς. Η σημαντικότερη πηγή ρύπανσης των υδάτων, πιστεύεται ότι είναι η κατευθείαν εισροή βιομηχανικών και αστικών απόβλητων. Για να κριθεί ότι ρυπάνθηκε μια φυσική υδατοσυλλογή ως προς την συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων και ιχνοστοιχείων, θα πρέπει η συγκέντρωση όλων ή ανάλογα με την περίπτωση, πολλών από τα στοιχεία αυτά, να είναι μεγαλύτερη από εκείνη του φυσιολογικά παραδεκτού ως ακίνδυνου νερού (Παπουτσόγλου, 1997).

Η συγκέντρωση της ολικής αμμωνίας στο νερό της εκτροφής, εξαρτάται από την εκτρεφόμενη βιομάζα καθώς και από το είδος και τη σύνθεση της χορηγούμενης τροφής. Το επίπεδο της ολικής αμμωνίας δεν πρέπει να υπερβαίνει τη μέγιστη συγκέντρωση 100 – 120 µg/L για τις συνήθεις τιμές του θαλασσινού νερού pH (8,0 – 8,3) (Blockway, 1950, Danecker, 1964).

1.3.5.2 Βιολογικοί παράγοντες

Μελετώντας τους βιολογικούς στρεσογόνους παράγοντες, από τους οποίους εξαρτάται η επίτευξη υψηλού ποσοστού επιβίωσης των ψαριών, εύκολα αντιλαμβάνεται κανείς ότι η ιχθυοπυκνότητα θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην υπάρξει πιθανότητα συνωστισμού. Ακόμη, σημαντικά

προβλήματα, για πολλούς από τους υδρόβιους οργανισμούς, είναι δυνατό να προκαλέσει η επιθετικότητα μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Τέλος, η διατήρηση υγιεινών συνθηκών διαβίωσης των ατόμων είναι απαραίτητη για την αποφυγή παθογόνων μικροοργανισμών.

1.3.6 Φυσική καταπόνηση

Αναφερόμενοι στους φυσικούς παράγοντες οι οποίοι προκαλούν stress στους υδρόβιους οργανισμούς, είναι γεγονός ότι η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών. Ο ρυθμός αναπνοής (αριθμός αναπνευστικών κινήσεων στη μονάδα του χρόνου), στους ποικιλόθερμους οργανισμούς, εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία του νερού. Σε γενικές γραμμές, ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ταχύς στους 20 – 22 °C, ενώ αντίθετα στους 17 – 19 °C ο ρυθμός αύξησης είναι βραδύτερος. Εκτός από την θερμοκρασία, η κάθε κατηγορία των οργανισμών, έχει τις δικές τις ξεχωριστές απαιτήσεις φωτισμού. Η ένταση του φωτισμού θα πρέπει να κυμαίνεται από 1000 έως 3000 lux.

1.3.7 Διαχειριστική καταπόνηση

Είναι γεγονός ότι το stress μειώνει τη δυνατότητα των ψαριών να αναπαραχθούν επιτυχώς και ελαττώνει τη φυσική διάρκεια ζωής του. Ένα μικρό ποσό stress από μόνο του, δεν είναι συνήθως θανατηφόρο, αλλά καθώς τα επίπεδα του stress αυξάνονται, η δυνατότητα των ψαριών να το αντιμετωπίσουν αυτό, μειώνεται. Κατά συνέπεια, ένας από τους σημαντικότερους στόχους είναι να αφαιρεθούν οι πηγές stress οπουδήποτε είναι δυνατόν. Κατά τη μαζική παραγωγή των ιχθύων οι σημαντικότερες αιτίες προκλήσεως stress είναι εκείνες που αφορούν στους διάφορους χειρισμούς (μεταφορά, ζύγισμα κ.λ.π.), σε αυξημένη πυκνότητα εκτροφής, στην ύπαρξη ακατάλληλου περιβάλλοντος διαβίωσης, καθώς και στην ύπαρξη «κακών σχέσεων» εκτροφέα και εκτρεφόμενων πληθυσμών (Παπουτσόγλου, 1998).

Όλες οι ενέργειες και οι εργασίες που απαιτούνται για την χωρίς προβλήματα λειτουργία συνίσταται από όλες εκείνες τις επιμέρους εργασίες που αφορούν στην επίτευξη των όσο το δυνατό καλύτερων συνθηκών παραγωγής (εκτροφής ή καλλιέργειας). Επίσης, στην φάση αυτή υπάγονται όλες οι διαδικασίες, οι χειρισμοί και η χρήση κατάλληλων συσκευών και ουσιών για την ευχερή μεταφορά και αντιμετώπιση πιθανών προσβολών. Θεωρείται λοιπόν απαραίτητο, όλες αυτές οι εργασίες, να έχουν προκαθοριστεί, ανάλογα με το είδος του οργανισμού (Χώτος, 1992).

1.4 Μέθοδος του κομήτη (Comet assay)

Η Comet assay έχει γίνει ευρέως αποδεκτή ως ένα απλό, ευαίσθητο και γρήγορο εργαλείο για την εκτίμηση της ζημιάς (καταστροφής) του DNA καθώς και της επισκευής σε μεμονωμένα ευκαρυωτικά καθώς επίσης και σε μερικά προκαρυωτικά κύτταρα. Έχει αποδειχθεί ότι έχει βρει εφαρμογή σε διαφορετικούς τομείς που κυμαίνονται από τη γενετική τοξικολογία ως την ανθρώπινη επιδημιολογία.

Οι Ostling και Johanson (1984) ήταν οι πρώτοι οι οποίοι ποσοτικοποίησαν τη ζημία στο DNA των κυττάρων χρησιμοποιώντας μια τεχνική ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης γνωστή ως “μονοκύτταρη ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων” ή “Comet assay”. Εντούτοις, οι ουδέτερες συνθήκες που χρησιμοποίησαν, επέτρεψαν την ανίχνευση μόνο των σπασιμάτων διπλού κλώνου DNA. Αργότερα, η δοκιμή προσαρμόστηκε σε αλκαλικές συνθήκες από τους Singh *et al.* (1988), οι οποίοι οδήγησαν σε μια ευαίσθητη έκδοση της τεχνικής που θα μπορούσε να αξιολογήσει και τα δίκλινα και τα μονόκλινα σπασίματα του DNA. Από την έναρξή χρήσης της, η δοκιμή έχει τροποποιηθεί στα διάφορα βήματα (λύση, ηλεκτροφόρηση) για να καταστεί κατάλληλη για τα διάφορα είδη ζημιάς σε διαφορετικά κύτταρα (Collins, 2004; Speit and Hartmann, 2005).

Τα κύρια βήματα της διαδικασίας είναι η προετοιμασία των διαθέσιμων κυττάρων (cell suspension), η ενσωμάτωση των κυττάρων σε ένα πήκτωμα αγαρόζης και η τοποθέτησή τους σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα, η λύση των κυττάρων για να αφαιρεθούν οι ενώσεις που δεν περιέχουν DNA, η έκθεση

του DNA σε ουδέτερο ή αλκαλικό διάλυμα, η υποβολή (τοποθέτηση) των πηκτωμάτων αγαρόζης με το DNA στην ηλεκτροφόρηση (όπου σχηματίζονται οι κομήτες) και η μέτρηση του μεγέθους της απομάκρυνσης (μετανάστευσης) και της εξάπλωσης του DNA από τη μικροσκοπική ανάλυση. Δεδομένου ότι μετριούνται πολλά κύτταρα (π.χ. 100 κύτταρα ανά αντικειμενικό πεδίο πλάκα) η στατιστική κατανομή των μετρήσεων των μεμονωμένων κυττάρων αντιπροσωπεύει το ποσό της ζημίας/αλλαγής του DNA του δείγματος κυττάρων.

1.4.1 Πλεονεκτήματα

Η comet assay, είναι μια ευπροσάρμοστη μέθοδος, εφόσον μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών τύπων κυττάρων των ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών. Ακόμη, μπορεί να εφαρμοστεί σε καλλιεργημένα ή σε απομονωμένα από τον οργανισμό κύτταρα καθώς και σε εκείνα που έχουν την ικανότητα ή όχι πολλαπλασιασμού.

Η comet assay έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι μερικών άλλων δοκιμών γεντοξικότητας δεδομένου ότι είναι ευρέως εφαρμόσιμη. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη γενετική τοξικολογία για τη διαλογή και τη ρυθμιστική δοκιμή των βιομηχανικών χημικών ουσιών, φαρμακευτικών ειδών, βιοκτόνων και καλλυντικών. Επιπρόσθετα, συμβάλλει στον έλεγχο της μόλυνσης του περιβάλλοντος από τους γεντοξικούς παράγοντες. Έχει εφαρμοστεί στη Μοριακή Επιδημιολογία καθώς και στην κλινική διάγνωση αποτελεσμάτων των ασθενειών και ελέγχου της θεραπείας. Όσον αφορά στον τομέα της διατροφής, είναι δυνατόν να εντοπίσει τα επιβλαβή και ευεργετικά αποτελέσματα της διατροφής και των διαιτητικών συστατικών.

Επιπλέον, η comet assay, είναι μια τεχνική σχετικά ευαίσθητη, η διαδικασία είναι αρκετά γρήγορη και απλή και παρόλο που απαιτείται μικρός σχετικά αριθμός κυττάρων ($\square 10,000$), θεωρείται πολύ αξιόπιστη. Ανιχνεύει όχι μόνο τη ζημιά του DNA αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την

ανίχνευση της επισκευής του DNA. Τέλος, η εκτέλεσή της είναι σχετικά χαμηλού κόστους (Dhawan *et al.*, 2008).

1.4.2 Μειονεκτήματα

Ένας περιορισμός της comet assay είναι ότι δεν ανιχνεύονται οι επιδράσεις, οι οποίες μπορεί να αποτελέσουν ένα πιθανό μηχανισμό ανάπτυξης της καρκινογένεσης καθώς και οι επιγενετικοί μηχανισμοί (έμμεσοι) για την πρόκληση βλάβης στο DNA. Άλλοι ανασταλτικοί παράγοντες, όπως είναι δεδομένα από ενός είδους κύτταρα (που μπορούν να αποτελέσουν ποσοστό περιορισμού), το μικρό δείγμα κυττάρων και η τεχνική μεταβλητότητα είναι μερικά από τα μειονεκτήματά της.

Η comet assay είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος εκτίμησης της ζημιάς του DNA. Αυτή η ευαισθησία πρέπει να αντιμετωπιστεί προσεκτικά δεδομένου ότι είναι ευάλωτη στις φυσικές αλλαγές οι οποίες μπορεί να έχουν επιπτώσεις στη δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων. Ουσιαστικά, οτιδήποτε μπορεί να προκαλέσει τη ζημία ή την αλλοίωση του DNA, εκτός από τον παράγοντα που ερευνάται, δεν πρόκειται να αποφευχθεί.

Τα πλεονεκτήματά της ξεπερνούν κατά πολύ τα μειονεκτήματα και ως εκ τούτου, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως (Dhawan *et al.*, 2008).

1.4.3 Εφαρμογές

1.4.3.1 Βακτήρια

Η πρώτη μελέτη για να αξιολογηθεί η γενετική ζημία στα βακτήρια, χρησιμοποιώντας την τεχνική της Comet assay, διεξήχθη από τους Singh *et al.* το 1999. Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκε ουδέτερη comet assay για τον άμεσο (οπτικό) προσδιορισμό των σπασμάτων των διπλών κλώνων του DNA σε κύτταρο της *Escherichia coli* στέλεχος JM101.

1.4.3.2 Φυτά

Η βοήθεια βιολογικών αναλύσεων ανιχνεύει τη γενετοξική μόλυνση στο περιβάλλον (Maluszynska and Juchimiuk 2005). Τα φυτικά μοντέλα, μπορούν να παρέχουν τις πληροφορίες για ένα ευρύ φάσμα της γενετικής ζημιάς, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλαγμένων γονιδίων και των παρεκκλίσεων των χρωμοσωμάτων. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, η Comet assay έχει εφαρμοστεί εκτενώς σε φυτά (φύλλα, βλαστό και ρίζες) για να ανιχνεύσει τη ζημία του DNA που προκύπτει λόγω της βιομηχανικής δραστηριότητας ή των γεωργικών απορροών σε μολυσμένα νερά καθώς και λόγω χημικών ουσιών και βαρέων μετάλλων στο μολυσμένο χώμα.

Πιο συγκεκριμένα, το *V. faba* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αξιολόγηση της ζημιάς του DNA με την τεχνική της Comet assay (Angelis *et al.* 2000; Menke *et al.* 2000). Επίσης, η comet assay, έχει βρει εφαρμογή στα φυτά *Phaseolus vulgaris* (Vandenhove *et al.*, 2006) και *Impatiens balsamina* (Poli *et al.*, 1999). Οι Vajpayee *et al.*, (2006) χρησιμοποίησαν ένα υδρόβιο φυτό, το *Bacopa monnieri* L., ως πρότυπο για την αξιολόγηση της γενετοξικότητας, με την βοήθεια της Comet assay.

1.4.3.3 Μύκητες

Ο μύκητας *Schizosaccharomyces pombe* έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπος οργανισμός για να ερευνηθεί η ζημία του DNA λόγω του χλωριωμένου απολυμαντικού σε δείγματα πόσιμου νερού (Banerjee *et al.*, 2008). Οι Hahn and Hock (1999) χρησιμοποίησαν μυκήλια *Sordaria macrospora* σε καλλιέργεια, με ποικίλους παράγοντες καταστροφής του DNA απευθείας σε αγαρόζη για την αξιολόγηση της γενετοξικότητας, χρησιμοποιώντας την τεχνική της comet assay.

1.4.3.4 Άλγη

Τα υδρόβια φυτά όπως η άλγη, παρέχουν πληροφορίες πιθανής γενετοξικότητας του ύδατος στο οποίο αυξάνονται. Όντας μονοκύτταρες υδρόβιες δομές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπο για την αξιολόγηση της ζημίας του DNA και τον έλεγχο της περιβαλλοντικής ρύπανσης χρησιμοποιώντας την τεχνική της comet assay. Η comet assay βρέθηκε να είναι χρήσιμη για τη χημικά προκληθείσα ζημιά και την επισκευή του DNA στην *Euglena gracilis* (Aoyama *et al.*, 2003).

1.4.3.5 Ζώα

Για να αξιολογηθεί η ασφάλεια και η τοξικότητα των χημικών ουσιών και των, ολοκληρωμένης διαχείρισης, προϊόντων, έχει εφαρμοστεί η τεχνική της comet assay, σε διάφορα ζωικά πρότυπα.

1.4.3.6 Ανώτερα Ζώα

Το *Tetrahymena thermophila* είναι ένα πρωτόζωο, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για γενετικές μελέτες. Το συγκεκριμένο πρωτόζωο, έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπος οργανισμός για την αξιολόγηση της ζημίας του DNA, με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο της comet assay, που σταντάρεται (τυποποιείται) με τα γνωστά μεταλλαξιογόνα όπως φαινόλη, υπεροξειδίο του υδρογόνου και φορμόλη (Lah *et al.*, 2004).

1.4.3.7 Ασπόνδυλα

Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα υδρόβια (θαλάσσια και εσωτερικών υδάτων) και χερσαία ασπόνδυλα, χρησιμοποιώντας την comet assay. Η αξιολόγηση της γενετοξικότητας στα θαλάσσια ασπόνδυλα, μέσω

της comet assay, έχει μελετηθεί από τους Lee και Steinert (2003). Ακόμη, κύτταρα από έμβρυα, βράγχια, πεπτικούς αδένες και από μύδια (*Mytilus edulis*), (Rank *et al.*, 2005), από μύδι ζέβρα (*Dreissena polymorpha*) και μαλάκια (*Mya arenaria*), έχουν χρησιμοποιηθεί για μελέτες γενετοξικότητας με την τεχνική της comet assay . Η ζημία του DNA έχει αξιολογηθεί επίσης στους γεωσκώληκες (Rajaguru *et al.*, 2003) και στη Δροσόφιλα (Mukhopadhyay *et al.*, 2004). Η Comet assay έχει υιοθετηθεί για να αξιολογήσει την έκταση της ζημίας του DNA σε μολυσμένες περιοχές σε σύγκριση με περιοχές αναφοράς στο περιβάλλον. Στο εργαστήριο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως εργαλείο για να καθοριστούν αποτελέσματα της μόλυνσης και οι μηχανισμοί της ζημίας του DNA (Mitchelmore and Hyatt, 2004).

1.4.3.8 Σπονδυλωτά

Μελέτες σπονδυλωτών ειδών στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί η Comet assay, περιλαμβάνουν τα ψάρια, τα αμφίβια, τα πουλιά και τα θηλαστικά. Τα κύτταρα (αίμα, βράγχια, νεφρά, και συκώτια) διαφορετικών ειδών ψαριών, γυρίνων και ενήλικων βατράχων, καθώς επίσης και των τρωκτικών έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της *in vivo* και *in vitro* γενετοξικότητας, διαφόρων χημικών ουσιών , με χρήση της comet assay.

1.4.3.9 Ψάρια

Τα διάφορα είδη ψαριών (εσωτερικών υδάτων και θαλάσσια) έχουν χρησιμοποιηθεί για περιβαλλοντική επισκόπηση. Η comet assay, έχει βρει ευρεία εφαρμογή ως απλή και ευαίσθητη μέθοδος, για την *in vivo* και την *in vitro* ζημία του DNA σε διαφορετικούς ιστούς (βράγχια, συκώτι, αίμα) των ψαριών που εκτίθενται στο διάφορες ουσίες στο υδρόβιο περιβάλλον.

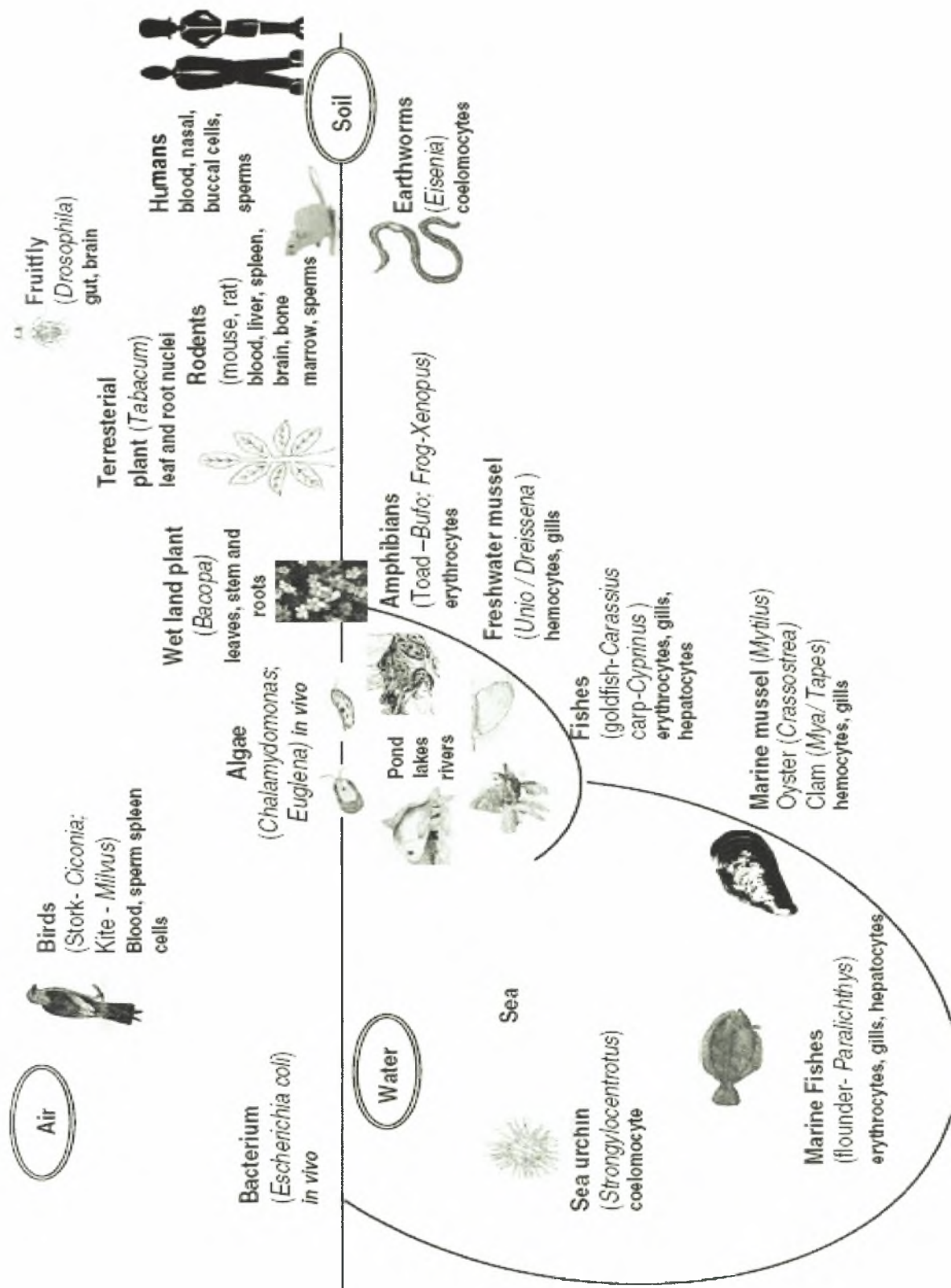
Το βασικό επίπεδο της ζημίας του DNA στα ψάρια, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι για παράδειγμα η θερμοκρασία του νερού στα ερυθροκύτταρα του κεφαλου (*Mugil cephalus*) (de Andrade *et al.*, 2004a) και η ηλικία και το φύλο στο είδος *Limanda limanda*

(Akcha *et al.*, 2003). Επομένως, αυτοί οι παράγοντες πρέπει να υπολογισθούν κατά τη διάρκεια των μελετών περιβαλλοντικής εποπτείας για τη γενεοτοξικότητα. Η ευαισθησία της τεχνικής μπορεί να επηρεαστεί από την υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των ατόμων (Akcha *et al.*, 2003). Η χρήση των χημικών και μηχανικών διαδικασιών για την απόκτηση των κυττάρων, μπορεί επίσης να οδηγήσει στη ζημία του DNA (Kosmehl *et al.*, 2006).

1.4.3.10 Άνθρωπος

Η Comet assay έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την πρόβλεψη του κινδύνου από την ανάπτυξη ασθενειών (καρκίνος της κύστης, του οισοφάγου και του πνεύμονα) λόγω της ευαισθησίας του ατόμου στη ζημία του DNA (Lin *et al.*, 2007; Schabath *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2005).

Η comet assay είναι μια πολύτιμη μέθοδος για την ανίχνευση των επαγγελματικών και περιβαλλοντικών εκθέσεων των ανθρώπων σε τοξικές ουσίες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο στην αξιολόγηση του κινδύνου. Οι μελέτες σε ανθρώπους, που χρησιμοποιούν την τεχνική της comet assay, παρέχουν ένα ακριβές και αποδοτικό εργαλείο για την ανθρώπινη έκθεση σε γενεοτοξικές ουσίες, βοηθώντας κατά συνέπεια στην αξιολόγηση καθώς και στον προσδιορισμό κινδύνου. Η comet assay έχει καθιερωθεί ως αξιόπιστη τεχνική και η μεταβλητότητά της, έχει δώσει ένα ευαίσθητο εργαλείο στους τοξικολόγους για την αξιολόγηση της ζημίας του DNA.



Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση χρήσης της Comet assay για την ανίχνευση της ζημιάς του DNA σε διαφορετικά μοντέλα, από τα βακτήρια μέχρι τους ανθρώπους.

1.5 Σκοπός και στόχοι της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση της καταπόνησης λόγω ασιτίας της τσιπούρας (*Sparus aurata*) όπου αντιπροσωπεύει ένα εκ των δύο εμπορικότερων ειδών που εκτρέφονται σε εντατικές συνθήκες στην Ελλάδα. Το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι στην τσιπούρα έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο της αντιστάθμισης στην αύξηση (growth compensation) μετά από περιόδους ασιτίας (Wilson and Osbourn, 1960; Ζίνκον, 1982). Σε συνθήκες εντατικής καλλιέργειας, το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε πιθανώς να αποτελέσει μία διέξοδο μείωσης του κόστους της εκτροφής. Είναι γνωστό εξάλλου ότι οι τροφές αποτελούν περίπου το μισό κόστος στην εκτροφή (Zhu *et al.*, 2001).

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα της παρούσας εργασίας, αρχικά έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών του τμήματος Γεωπονίας



Εικόνα 3 Εξωτερική άποψη του Εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών

Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κι έπειτα ακολούθησαν γενετικές αναλύσεις στο εργαστήριο Γενετικής και διήρκησε δύο μήνες. Το πείραμα έγινε με σκοπό τη διερεύνηση της καταπόνησης λόγω αστίας της τσιπούρας (*Sparus aurata*).

2.1 Πρώτο μέρος πειράματος

Η χρονική διάρκεια του πρώτου πειράματος ήταν 2 μήνες και χρησιμοποιήθηκαν άτομα τσιπούρας ηλικίας 4 μηνών που μεταφέρθηκαν από την Sea Farm Ionian A.E. Αμέσως μετά τη μεταφορά τους, οι τσιπούρες τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές “καραντίνας”, όπου παρέμειναν για διάστημα 24 ωρών. Στη συνέχεια εγκλιματίστηκαν στις συνθήκες του εργαστηρίου για 2 μήνες σε 4 ειδικές κυλινδρικές δεξαμενές χωρητικότητας 500L. Κάθε δεξαμενή περιείχε 500L θαλασσινού νερού και η παροχή του γινόταν με κλειστό

κύκλωμα. Το όλο σύστημα περιελάμβανε μηχανικό, χημικό και βιολογικό φίλτρο ώστε να υπάρχει πλήρης καθαρισμός του επανακυκλοφορούμενου νερού

2.1.1 Έμβιο υλικό (ψάρια)

Οι τσιπούρες, που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα, είχαν μέσο βάρος περίπου $62,25 \pm 15,27$. Τα ψάρια ταΐζονταν με ιχθυοτροφές της εταιρίας Biomar τύπου Ecolife 64 και βρισκόταν κάτω από τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και ποιότητας νερού.

Πίνακας 2 Τα μέσα μήκη και βάρη ανά μεταχείριση (\pm Τυπική απόκλιση). Σε παρένθεση οι συντελεστές παραλλακτικότητας (CV%).

	Μάρτυρας	1η Εβδομάδα	2η Εβδομάδα	3η Εβδομάδα	6η Εβδομάδα
Μήκος	13,6 \pm 0,91 (6,6)	13,8 \pm 1,15 (8,3)	12,7 \pm 1,09 (8,6)	14 \pm 0,74 (5,29)	13,6 \pm 0,69 (5)
Βάρος	68,29 \pm 14,9 (21,7)	58,72 \pm 17,6 (30)	60,21 \pm 23,4 (38,9)	64,66 \pm 11,9 (18,4)	59,37 \pm 7,1 (11,9)



Εικόνα 4 Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματισμό και τα οποία βρίσκονται στις δεξαμενές του Εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών.

2.1.2 Πειραματικός εξοπλισμός

Το πείραμα έλαβε χώρα σε ειδικά σχεδιασμένες δεξαμενές στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Το σύστημα περιελάμβανε τέσσερις κυλινδρικές δεξαμενές όγκου 500L.



Εικόνα 5 Οι δεξαμενές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματισμό και οι οποίες βρίσκονται στον εσωτερικό χώρο του Εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών.

Σε κάθε δεξαμενή υπήρχε συνεχής παροχή αέρα ($2,5 \text{ m}^3/\text{h}$). Το νερό προερχόταν από την ευρύτερη θαλάσσια περιοχή των Αλυκών του Παγασητικού κόλπου. Η θερμοκρασία, η αλατότητα και όλα τα άλλα αβιοτικά χαρακτηριστικά του νερού ήταν όμοια για όλες τις δεξαμενές.

Μετρήσεις του διαλυμένου οξυγόνου πραγματοποιούνταν και καταγράφονταν καθημερινά μεταξύ των πρωινών ωρών 10:00 και 11:00 σε όλες τις δεξαμενές. Τα ψάρια ταιζόνταν δύο φορές ημερησίως, 9:00 – 10:00 και 17:00. Οι ιχθυοτροφές ήταν σύμπηκτα (pellets) διαμέτρου 3 mm της εταιρίας Biomar τύπου Ecolife. Η προσφερόμενη ποσότητα τροφής ήταν αυτή που πρότεινε μέσα από τους πίνακες εκτροφής της η Biomar (συναρτήσεως της θερμοκρασίας και του μεγέθους των ψαριών).

Το θαλασσινό νερό (αλατότητας $\sim 37,4 \pm 0.6$) ήταν από την ευρύτερη περιοχή του Παγασητικού Κόλπου και ανακυκλώνονταν κατά τη διάρκεια της ημέρας περνώντας με τη βοήθεια αντλιών από μηχανικό, χημικό και βιολογικό φίλτρο και στη συνέχεια από υπεριώδη ακτινοβολία (U.V). Η μέση θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν περίπου 20-24°C. Οι τιμές του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό, οι οποίες καταγράφονταν κάθε μέρα μετά το δεύτερο τάισμα, ήταν 5,7 mg/L. Σε κάθε δεξαμενή υπήρχαν δύο πέτρες αέρα για τον διασκορπισμό του παρεχόμενου αέρα από τους δύο αεροσυμπιεστές, έτσι ώστε να μην υπάρξει πρόβλημα μη καλής οξυγόνωσης του νερού λόγω βλάβης κάποιου από τους δύο.

Η αλατότητα καθώς και το pH του νερού μετριόταν σε καθημερινή βάση. Η αμμωνία κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές και πιο συγκεκριμένα μικρότερες του 1 mg / L (Tetrapond NH₃ kit). Τα ψάρια εκτέθηκαν σε φυσική φωτοπερίοδο.

2.1.3 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 δεξαμενές. Μία ημέρα πριν ξεκινήσει το πείραμα. Τα ψάρια ζυγίστηκαν και μετρήθηκε το σταθερό μήκος. Στη συνέχεια τα ψάρια, μέσου βάρους 62,25gr ($\pm 15,27$) και μέσου μήκους 13,56cm ($\pm 0,99$) ισοκατανεμήθηκαν στις 4 δεξαμενές και κάθε μεταχείριση κατέλαβε δύο δεξαμενές. Στις δύο από τις τέσσερις δεξαμενές, οι τσιπούρες ταΐζονταν κανονικά, δηλαδή οι δύο αυτές δεξαμενές περιείχαν τα ψάρια του μάρτυρα. Στην ομάδα αυτή των δεξαμενών, στα ψάρια προσφέρονταν καθημερινά τροφή. Στις υπόλοιπες δύο δεξαμενές τα ψάρια δεν ταΐζονταν καθόλου, δηλαδή τα ψάρια βρίσκονταν υπό συνθήκες πλήρους ασιτίας.

Έξι συνολικά δείγματα πάρθηκαν από τις δύο δεξαμενές που περιείχαν τα ψάρια που ταΐζονταν κανονικά. Την πρώτη φορά μία τριάδα και μια δεύτερη τριάδα που ήταν η επανάληψη της πρώτης. Τα έξι αυτά δείγματα αποτέλεσαν τους «μάρτυρες» του πειράματος.

Από τις υπόλοιπες δύο δεξαμενές, οι οποίες περιείχαν ψάρια που βρίσκονταν σε συνθήκες αστικής, συγκεντρώθηκαν συνολικά εικοσιτέσσερα δείγματα. Πιο αναλυτικά, μετά το πέρασμα της πρώτης, της δεύτερης, της τρίτης και της έκτης εβδομάδας αστικής, ελήφθησαν έξι δείγματα κάθε μέρα (τρία δείγματα από τη μία δεξαμενή και τρία από τη δεύτερη). Τα αποτελέσματα αυτών των δειγμάτων θα συγκριθούν μεταξύ τους καθώς και με την ομάδα των μαρτύρων για να διαπιστωθεί το ύψος του stress.

Τα δείγματα που συγκεντρώθηκαν από τις παραπάνω μεταχειρίσεις, ήταν δείγματα ήπατος. Πιο αναλυτικά, σε κάθε ψάρι, αφού πρώτα είχε αναισθητοποιηθεί σε λεκάνη με νερό και αναισθητικό, έγινε μία τομή στην κοιλιακή του περιοχή από όπου αφαιρέθηκε το ήπαρ και τοποθετήθηκε σε πλαστικούς σωλήνες τύπου Falcon (50 ml) με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (Hanks Balanced Salt Solution). Η αναισθητοποίηση των ψαριών έγινε με τη διάλυση σε νερό αναισθητικού φαινοξυαιθανόλης, περίπου 5 p.p.m..

2.2 Δεύτερο μέρος πειράματος

2.2.1 Απομόνωση δειγμάτων ήπατος

Το δεύτερο πειραματικό μέρος της εργασίας περιελάμβανε την απομόνωση των δειγμάτων ήπατος με σκοπό την μελέτη του ποσοστού καταστροφής του DNA. Για την πραγματοποίηση του δεύτερου μέρους του πειράματος, χρειάστηκε να μεταφερθούν τα δείγματα ήπατος στο εργαστήριο Γενετικής, συντηρημένα σε πλαστικούς σωλήνες τύπου Falcon (50 ml) με διάλυμα HBSS (χωρίς Ca⁺⁺, Mg⁺⁺). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη πλύση του ήπατος με HBSS. Το διάλυμα αυτό βοηθάει στον καθαρισμό του ιστού. Στη συνέχεια, ακολούθησαν ενέσεις κολαγενάσης συγκέντρωσης 0,04%. Η κολαγενάση είναι ένα ένζυμο που καταστρέφει τους πεπτιδικούς δεσμούς του κολλαγόνου, το οποίο αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού στους ζωικούς οργανισμούς. Ύστερα από το πέρασμα 10 – 15 λεπτών, ο ιστός μεταφέρθηκε σε τρυβλίο “petri” όπου και τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο νυστέρι και λαβίδα.

Στη συνέχεια, ο ιστός του ήπατος μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα HBSS τοποθετήθηκαν μέσα σε ποτήρι ζέσεως. Έγινε ανάδευση με αναδευτήρα (hot plate stirrer) για περίπου μισή ώρα. Μετά το πέρασμα της μισής ώρας, το ομογενοποιημένο διάλυμα φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια αποστειρωμένης γάζας και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 2.000 στροφές για πέντε λεπτά (αφού είχε τοποθετηθεί πρώτα σε Falcon). Ακολούθως, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από το ομογενοποιημένο διάλυμα και προστέθηκε νέα ποσότητα HBSS. Η διαδικασία με τις πλύσεις, επαναλήφθηκε δύο φορές και στο τέλος της δεύτερης φοράς, προστέθηκαν 7 – 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (phosphate buffered saline) στο Falcon με την πελέτα των κυττάρων.

2.2.2 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών

Το στάδιο της απομόνωσης των κυττάρων, ακολούθησε η τοποθέτηση τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Για την συγκράτηση των κυττάρων πάνω στις πλάκες, χρειάστηκε πρώτα η εμβάπτιση τους σε αιθανόλη 100% και έπειτα η τοποθέτησή τους στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, με σκοπό το στέγνωμα και το πάγωμά τους. Κατόπιν, στην παγωμένη πλάκα, προστέθηκε αгарόζη συγκέντρωσης 0,5 %, η οποία είχε διαλυθεί νωρίτερα σε PBS. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε ακόμα μία φορά, χρησιμοποιώντας όμως αгарόζη με χαμηλότερο σημείο τήξης από την προηγούμενη. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 20 μl κυτταρικού αιωρήματος σε 80 μl αгарόζης (low melting point) και όλο μαζί το μείγμα τοποθετήθηκε έπειτα στην αντικειμενοφόρο πλάκα (που περιείχε την αρχική στρώση αгарόζης). Για να διατηρηθεί το μείγμα πάνω στην αντικειμενοφόρο και για να μην μετατοπιστούν τα κύτταρα από τη θέση τους, τοποθετήθηκε καλυπτρίδα.

2.2.3 Λύση

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες βυθίζονται έπειτα σε διάλυμα λύσης που αναγκάζει τα κύτταρα να λυθούν. Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιείται συχνά στην comet assay, αποτελείται από ένα πυκνό διάλυμα NaCl, συγκέντρωσης 2.5 M (συχνά το κοινό επιτραπέζιο άλας μπορεί να

χρησιμοποιηθεί), ένα απορρυπαντικό (triton - X100), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 100 mM, Tris Base 10 mM και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide). Το υδατινό άλας διασπά τις πρωτεΐνες και τα δεσμευμένα μοντέλα τους μέσα στο κύτταρο. Το απορρυπαντικό διαλύει τις κυτταρικές μεμβράνες. Μέσω της δράσης του διαλύματος της λύσης, τα κύτταρα καταστρέφονται. Όλες οι πρωτεΐνες, το RNA, οι μεμβράνες και τα κυτταροπλασματικά και νουκλεοπλασματικά συστατικά διασπώνται και διασκορπίζονται στη στρώση της αгарόζης. Μόνο το DNA του κυττάρου παραμένει και ξετυλίγεται για να γεμίσει την κοιλότητα στην αгарόζη. Αυτή η δομή καλείται πυρηνοειδής (ένας γενικός όρος για μια δομή στην οποία συγκεντρώνεται το DNA).

Το pH του διαλύματος της λύσης γενικά μπορεί να ρυθμιστεί (συνήθως μεταξύ του ουδέτερου και του αλκαλικού pH) ανάλογα με τον τύπο βλάβης που μελετάει ο ερευνητής. Πιο αναλυτικά, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με διάλυμα HCl ή NaOH με σκοπό να φτάσει σε pH 10 και στη συνέχεια μεταφέρθηκε στους 4 °C έως ότου κρυώσει (Tice *et al.*, 2000). Στο παγωμένο διάλυμα λύσης, τοποθετήθηκε η αντικειμενοφόρος πλάκα και έτσι παρέμεινε στους 4 °C για μία ώρα περίπου, το ελάχιστο. Κατά τη διάρκεια της μίας αυτής ώρας γίνονταν η λύση των κυττάρων, καθώς η κυτταρική μεμβράνη καταστρέφονταν και το DNA αυτών μπορούσε πλέον να απελευθερωθεί.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση

Μετά από τη διαδικασία της λύσης των κυττάρων (περίπου 1 έως 2 ώρες στους 4°C) οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό για να αφαιρεθούν όλα τα άλατα και βυθίστηκαν σε ένα δεύτερο διάλυμα, αυτό της ηλεκτροφόρησης, για 15 – 20 λεπτά. Η εμφάνιση αυτή στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, το οποίο περιείχε NaOH συγκέντρωσης 0,075 M και 1 mM EDTA, πραγματοποιήθηκε με σκοπό να αποδιαταχθεί το DNA και να δημιουργηθούν αλληλουχίες μονής έλικας. Πάλι αυτό το διάλυμα μπορεί γενικά να ρυθμίσει το pH του ανάλογα με τον τύπο ζημίας που ερευνάται. Πιο συγκεκριμένα, το pH του ρυθμίστηκε να είναι μεγαλύτερο του 12.

Ένα οριζόντιο μπάνιο ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε για να μεταναστεύσει το αποδιαταγμένο DNA ακολουθούμενο από τη λύση των κυττάρων. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες αφέθηκαν για ~20 λεπτά στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, πριν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο. Με το πέρασμα των 20 λεπτών, άρχισε η ηλεκτροφόρηση του DNA, η οποία διήρκεσε 15 λεπτά (αντιπροσωπευτικά στα 25 V και 300 mA) (Hartmann *et al.*, 2003).

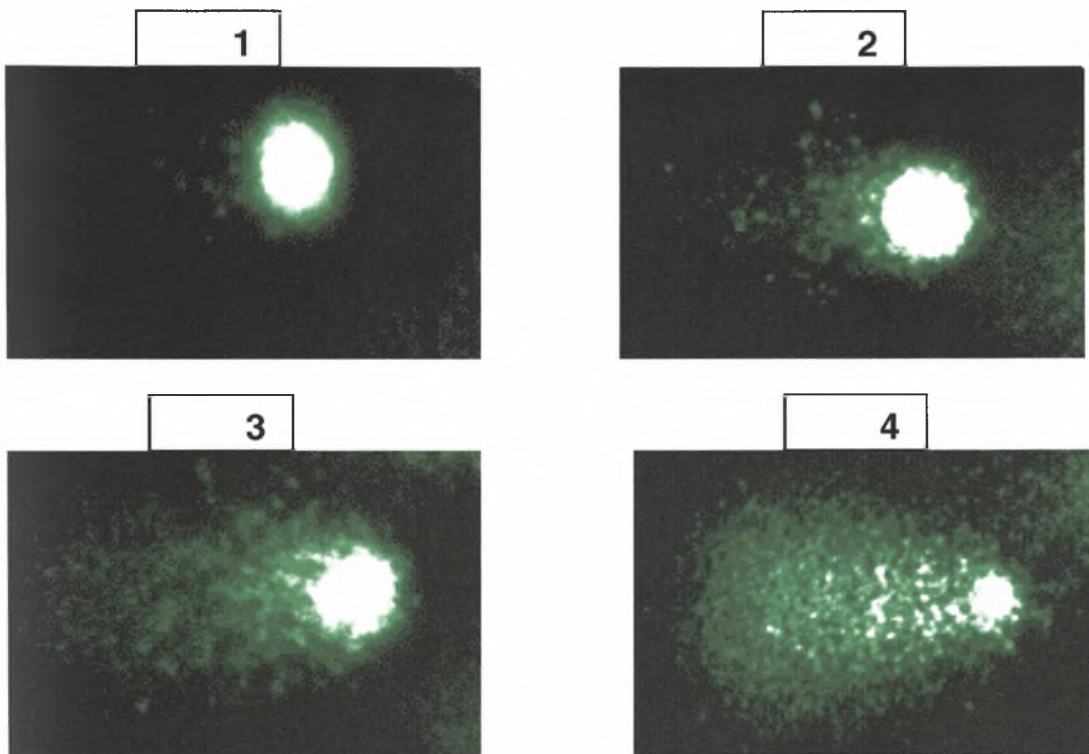
Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι αντικειμενοφόρες πλάκες αδρανοποιήθηκαν σε ουδέτερο διάλυμα (pH = 7) έτσι ώστε να ξεπλυθούν από το EDTA. Το διάλυμα αυτό περιείχε Tris συγκέντρωσης 0,4 M (pH = 7,5) και μέσα σε αυτό πραγματοποιήθηκαν τρεις πλύσεις (McKelvey-Martin *et al.*, 2003). Έπειτα, βάφτηκαν με μια χρωστική φθορισμού, το βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide, EtBr) και αναλύθηκαν, χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο με φθορισμό, μια ψηφιακή φωτογραφική μηχανή, που συνδέεται με έναν υπολογιστή με λογισμικό ανάλυσης εικόνας.



Εικόνα 6 Οριζόντιο μπάνιο ηλεκτροφόρησης.

Όταν το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται στο DNA, το οποίο έχει αρνητικό φορτίο κατευθύνεται προς την κάθοδο. Τα μη κατεστραμμένα (άθικτα) σκέλη DNA είναι τόσο πολύ μεγάλα που δεν αφήνουν την κοιλότητα, ενώ όσο μικρότερα είναι τα τεμάχια τόσο περισσότερο είναι ελεύθερα να κινηθούν σε μια δεδομένη χρονική περίοδο. Επομένως, το ποσό του DNA που αφήνει την κοιλότητα είναι ένα μέτρο του ποσού της βλάβης του DNA στο κύτταρο.

Η γενική δομή μοιάζει με έναν κομήτη (ως εκ τούτου "comet assay") με ένα κυκλικό κεφάλι που αντιστοιχεί στο άθικτο DNA που παραμένει στην κοιλότητα και μια ουρά που αντιστοιχεί στο κατεστραμμένο DNA. Όσο φωτεινότερη και μακρύτερη είναι η ουρά, τόσο υψηλότερο είναι το επίπεδο ζημίας.



Εικόνα 7 Φωτογραφίες που παρουσιάζουν διαφορετικές εικόνες των κομητών ([1 – 2] μη κατεστραμμένοι, [3 – 4] μέγιστα κατεστραμμένοι).

2.2.5 Μέτρηση παραμέτρων και στατιστική ανάλυση

Η "μετανάστευση" – απομάκρυνση του DNA μπορεί να καθοριστεί οπτικά από την κατηγοριοποίηση των κομητών σε διαφορετικές κατηγορίες μετανάστευσης (Collins *et al.*, 1993) ή με τη χρησιμοποίηση ενός μικρομέτρου το οποίο υπολογίζει από την εικόνα το μήκος των ουρών. Οι παράμετροι που μετριοούνται στον κομήτη για να διαπιστωθεί το κατά πόσο ο παράγοντας της αστίας στρεσάει τα ψάρια, είναι οι ακόλουθες: το ποσοστό του DNA της ουράς πολλαπλασιασμένο με το μήκος ουράς (tail moment), το μήκος της ουράς (length tail), το συνολικό μήκος του κομήτη (length comet), το μήκος

κεφαλής (head DNA), το ποσοστό του DNA στην ουρά (tail DNA) και το Olive Tail Moment.

- ◆ Το olive tail moment, υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{OTM} = (\text{Tail meanX} - \text{Head meanX}) \times \text{Tail DNA\%}$$

- ◆ Το tail moment, υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

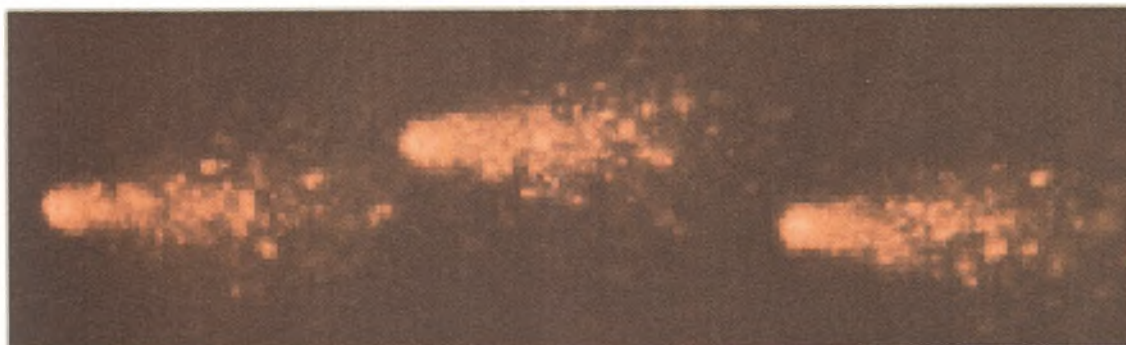
$$\text{TM} = \text{TL} \times \text{Tail DNA}$$

Όπου:

TL: μήκος ουράς κομητών, δηλαδή η απόσταση (μm) μεταξύ του κέντρου του κεφαλιού του κομήτη και του τελευταίου σημείου της

tail DNA: το ποσοστό DNA στην ουρά του κομήτη συγκρινόμενο με τη συνολική περιεκτικότητα σε DNA βασισμένη στη μέτρηση έντασης φθορισμού.

Από αυτές τις παραμέτρους, το tail moment και το μήκος της ουράς είναι που χρησιμοποιούνται συνήθως.



Εικόνα 8 Χαρακτηριστική μορφή κομητών.

Μετά τη μέτρηση των μορφομετρικών στοιχείων κάθε κομήτη (περίπου 100 ανά ψάρι), έγινε έλεγχος με Student t test μεταξύ των δύο επαναλήψεων

και εφόσον δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όλα τα αποτελέσματα ομογενοποιήθηκαν ανά μεταχείριση. Η ισοδυναμία των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με το test των Brown and Forsythe (1974) και η κανονικότητα των συχνοτήτων με το goodness of fit test των Shapiro and Wilk (1965). Εφόσον οι δύο αυτές προϋποθέσεις δεν πληρούνταν, τα δεδομένα λογαριθμήθηκαν (Zar, 1996) και πραγματοποιήθηκε ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA). Το κριτήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το q κριτήριο του Tukey. Το πακέτο με τη βοήθεια του οποίου έγιναν οι στατιστικές αναλύσεις ήταν το JMP 7.0 (SAS Institute, NC, USA). Το επίπεδο σημαντικότητας που επελέγη ήταν $\alpha = 0.99$.

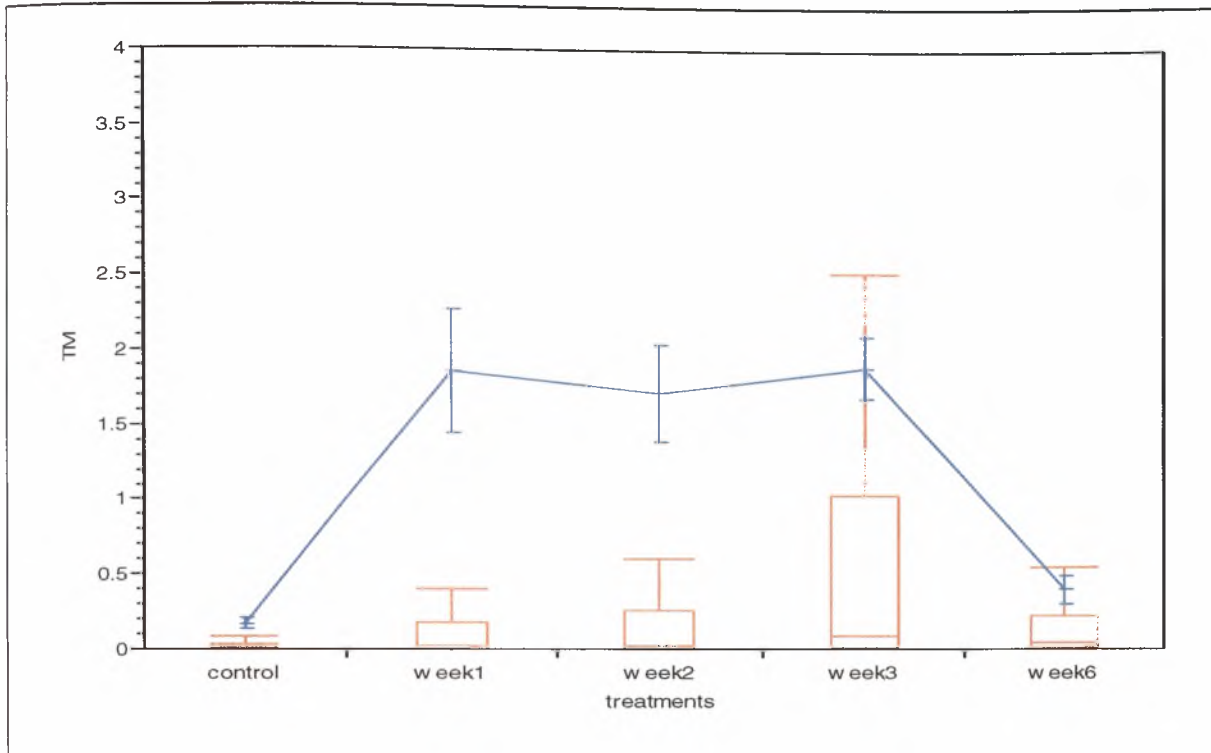
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μεταβολή των παραμέτρων επίδρασης των ψαριών κατά τις εβδομάδες ασιτίας, φαίνεται στα παρακάτω σχήματα και στον πίνακα δίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής τους επεξεργασίας.



Πίνακας 3 Τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά των κομητών από τις 5 μεταχειρίσεις και τον μάρτυρα. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται με τον μέσο όρο (\pm τυπικό σφάλμα). Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια στήλη υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,01$).

Χαρακτηριστικό κομήτη	TM	LTAIL	LCOMET	HEAD DNA	TAIL DNA	OTM
Μεταχείριση						
Μάρτυρας	0.17 \pm 0.04 ^D	9.04 \pm 0.5 ^C	144.86 \pm 0.8 ^A	99.39 \pm 0.05 ^A	0.61 \pm 0.05 ^D	0.39 \pm 0.04 ^D
1^η Εβδομάδα	1.85 \pm 0.41 ^A	23.93 \pm 1.98 ^A	164.42 \pm 2.2 ^B	98.50 \pm 0.14 ^{B,C}	1.50 \pm 0.14 ^{B,C}	1.62 \pm 0.27 ^A
2^η Εβδομάδα	1.71 \pm 0.32 ^A	24.43 \pm 1.71 ^A	163.29 \pm 1.8 ^D	98.39 \pm 0.14 ^C	1.61 \pm 0.14 ^D	1.39 \pm 0.17 ^A
3^η Εβδομάδα	1.88 \pm 0.21 ^A	27.59 \pm 1.35 ^A	162.19 \pm 1.4 ^D	97.47 \pm 0.16 ^D	2.53 \pm 0.16 ^A	1.93 \pm 0.14 ^A
6^η Εβδομάδα	0.39 \pm 0.09 ^D	16.61 \pm 0.71 ^B	149.24 \pm 0.9 ^A	99.05 \pm 0.07 ^{A,D}	0.95 \pm 0.07 ^{C,D}	0.63 \pm 0.06 ^D



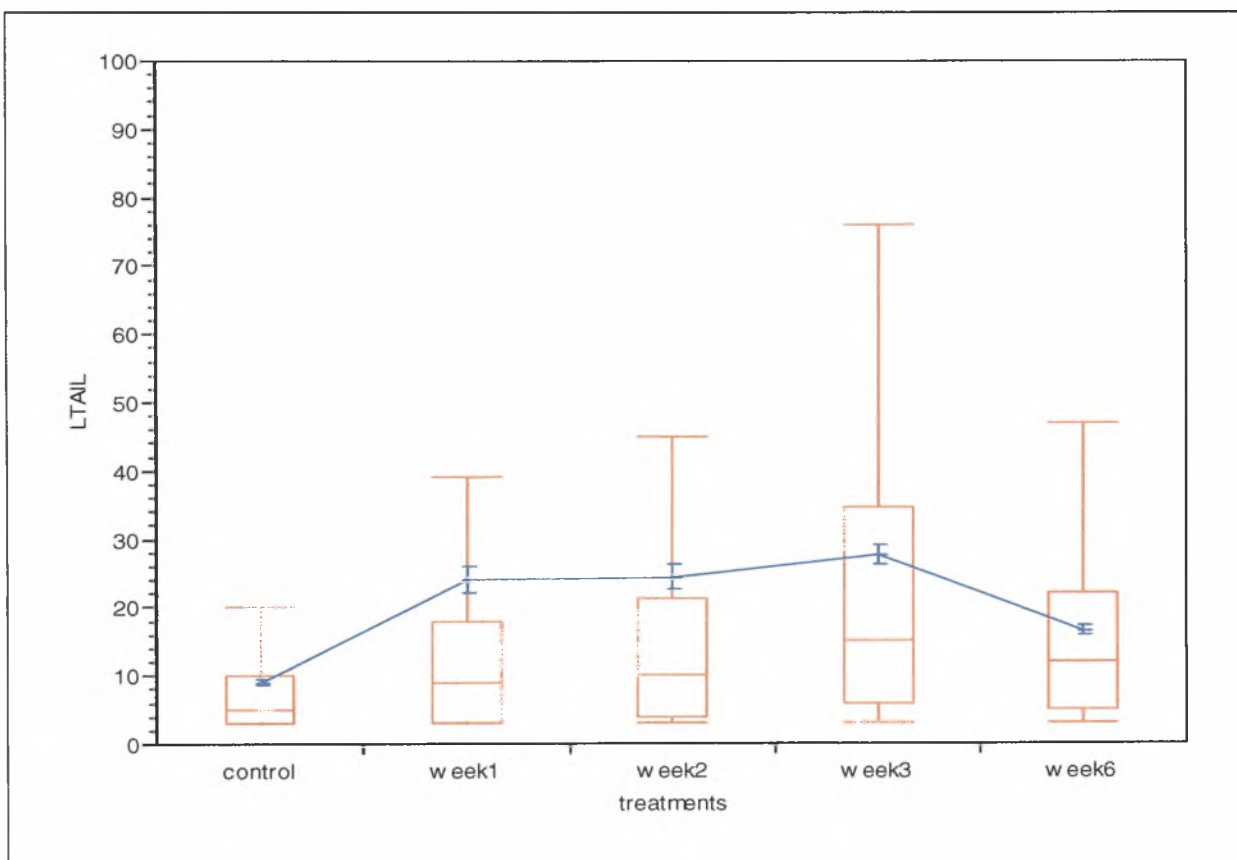
Σχήμα 1 Η μεταβολή της τιμής του TM κατά τις εβδομάδες αστίας. Η μπλε γραμμή απεικονίζει τον μέσο όρο και τα όρια του τυπικού σφάλματος.

Όσον αφορά το Tail Moment, αρχικά παρατηρείται μια τάση σταδιακής αύξησής του μέχρι την μεταχείριση της τρίτης εβδομάδας και στη συνέχεια μια τάση μείωσής του (στην τελευταία μεταχείριση). Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1, διαπιστώθηκε ότι κατά τις μεταχειρίσεις των τριών πρώτων εβδομάδων το TM κυμάνθηκε σε σχετικά υψηλά επίπεδα, παίρνοντας την μέγιστη τιμή του την τρίτη εβδομάδα (1,88). Στη διάρκεια της έκτης εβδομάδας, το TM είχε πολύ χαμηλότερη τιμή (0,39).

Η σύγκριση των τιμών του TM (και κατά συνέπεια του ποσοστού στρεσσαρίσματος των ψαριών) μεταξύ των πέντε μεταχειρίσεων, έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,01$). Κατά συνέπεια τα ψάρια, κατά την διάρκεια της πρώτης, δεύτερης και τρίτης εβδομάδας αστίας έδειξαν ότι έχουν υποστεί βλάβη στο γενετικό τους υλικό σε σχέση με τους μάρτυρες και με τα ψάρια που είχαν μείνει άσιτα κατά την διάρκεια έξι εβδομάδων.

Συνοπτικά, παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση των τιμών TM κατά τις πέντε μεταχειρίσεις:

- ◆ Από την μεταχείριση του μάρτυρα (αρχή της πειραματικής διαδικασίας) μέχρι την πρώτη εβδομάδα ασιτίας υφίσταται στατιστικά σημαντική αύξηση
- ◆ Από την πρώτη εβδομάδα έως την δεύτερη εβδομάδα ασιτίας παρατηρείται πολύ μικρή μείωση της τιμής (μη στατιστικά σημαντική)
- ◆ Από την δεύτερη μέχρι την τρίτη εβδομάδα παρατηρείται μια μικρή αύξηση της τιμής, πάλι μη στατιστικά σημαντική
- ◆ Από την τρίτη έως την έκτη εβδομάδα διαπιστώνεται μια στατιστικά σημαντική μείωση της τιμής του.



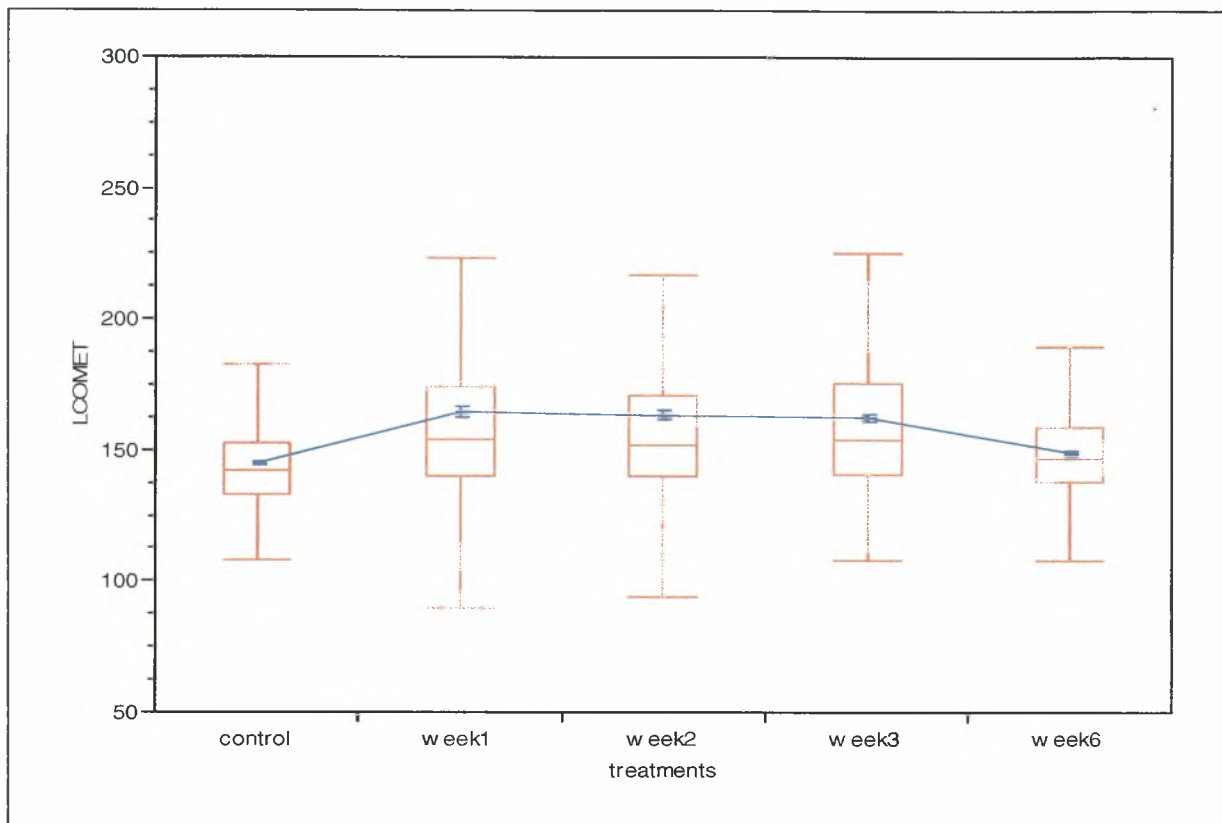
Σχήμα 2 Η μεταβολή της τιμής του LTail κατά τις εβδομάδες ασιτίας. Η μπλε γραμμή απεικονίζει τον μέσο όρο και τα όρια του τυπικού σφάλματος.

Όσον αφορά το μήκος ουράς, κατά τις τρεις πρώτες εβδομάδες ασιτίας διαπιστώθηκε μια άνοδος των τιμών από 9,04 μέχρι 27,59 και στη συνέχεια (στην τελευταία μεταχείριση) μια αξιόλογη πτώση των τιμών της. Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στο σχήμα 2, η μέγιστη τιμή της διαπιστώθηκε την τρίτη εβδομάδα (27,59).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραπάνω διαγραμματικής απεικόνισης, οι τιμές TL σε όλες τις μεταχειρίσεις παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.01$). Το γεγονός ότι στις τρεις πρώτες εβδομάδες, τα ψάρια φάνηκε να έχουν στρεσοαριστεί περισσότερο σε σχέση με τους μάρτυρες και με τα ψάρια που είχαν παραμείνει άσιτα για χρονικό διάστημα έξι εβδομάδων, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το επιπλέον χρονικό διάστημα εκπόνησης των ιχθύων ίσως να βοηθάει στη βελτίωση της ποιότητας του κατεστραμμένου DNA.

Συνοπτικά, παρατηρείται η εξής διαδοχική μεταβολή των τιμών TL κατά τις πέντε μεταχειρίσεις:

- ◆ Από την στιγμή έναρξης του πειράματος ξεκινάει μια στατιστικά σημαντική άνοδος της τιμής μέχρι την δεύτερη εβδομάδα
- ◆ Η ίδια ανοδική πορεία διαπιστώνεται και μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης εβδομάδας ασιτίας (μη στατιστικά σημαντική)
- ◆ Η ανοδική πορεία της τιμής TL εξακολουθεί και συνεχίζεται μέχρι την τρίτη εβδομάδα (μη στατιστικά σημαντική)
- ◆ Μεταξύ της τρίτης και της έκτης εβδομάδας υφίσταται στατιστικά σημαντική μείωση από 27.59 σε 16.61.



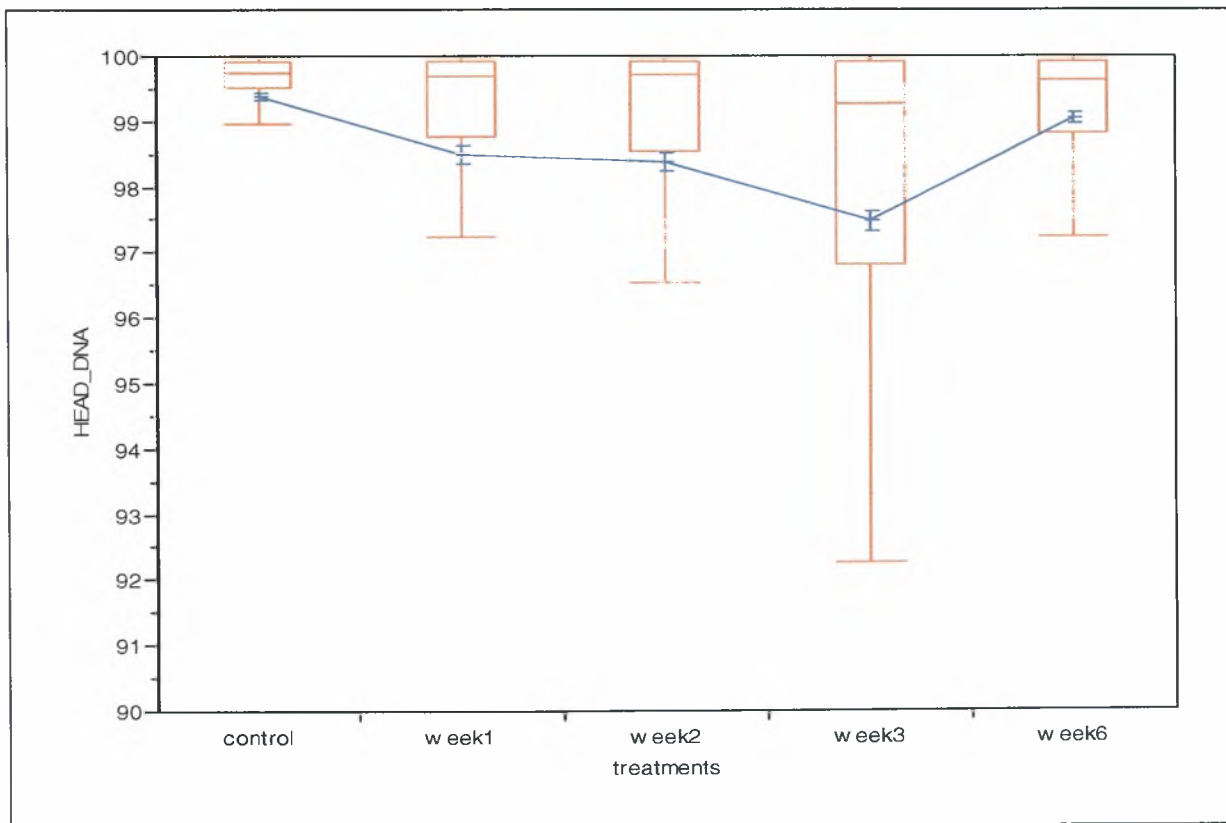
Σχήμα 3 Η μεταβολή της τιμής του LComet κατά τις εβδομάδες αστίας. Η μπλε γραμμή απεικονίζει τον μέσο όρο και τα όρια του τυπικού σφάλματος.

Παρατηρώντας την σχηματική απεικόνιση των μεταχειρίσεων με το μήκος κομήτη (σχήμα 3), διαπιστώνεται μια τάση σταδιακής αύξησης της τιμής του LC μέχρι την μεταχείριση της τρίτης εβδομάδας. Η αύξηση αυτή ακολουθείται από μια μικρής τάξεως μείωση, από 162.19 μέχρι 149.24. Πιο αναλυτικά, διαπιστώθηκε ότι κατά τις μεταχειρίσεις των τριών πρώτων εβδομάδων το LC κυμάνθηκε σε αρκετά υψηλές τιμές, έχοντας τη μέγιστη τιμή του την πρώτη εβδομάδα (164.42).

Συγκρίνοντας τις τιμές LC μεταξύ των πέντε μεταχειρίσεων, διαπιστώνεται ότι ο χρόνος είναι αντιστρόφως ανάλογος με το μέγεθος της βλάβης του DNA. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ελάχιστη μείωση των τιμών LC μεταξύ της τρίτης και έκτης εβδομάδας εν αντιθέσει με τις τρεις πρώτες εβδομάδες αστίας.

Συνοπτικά, παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση των τιμών LC κατά τις πέντε μεταχειρίσεις:

- ◆ Ταχεία αύξηση της τιμής LC μέχρι την πρώτη εβδομάδα (στατιστικά σημαντική μεταβολή)
- ◆ Πέραν της πρώτης εβδομάδας, μια σταδιακή μικρή μείωση μέχρι την δεύτερη εβδομάδα (μη στατιστικά σημαντική)
- ◆ Για την δεύτερη έως την τρίτη εβδομάδα παρατηρείται ελάχιστη μείωση των τιμών από 162.29 σε των τιμών
- ◆ Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ της τρίτης και της έκτης εβδομάδας, όπου μειώθηκε η τιμή LC.



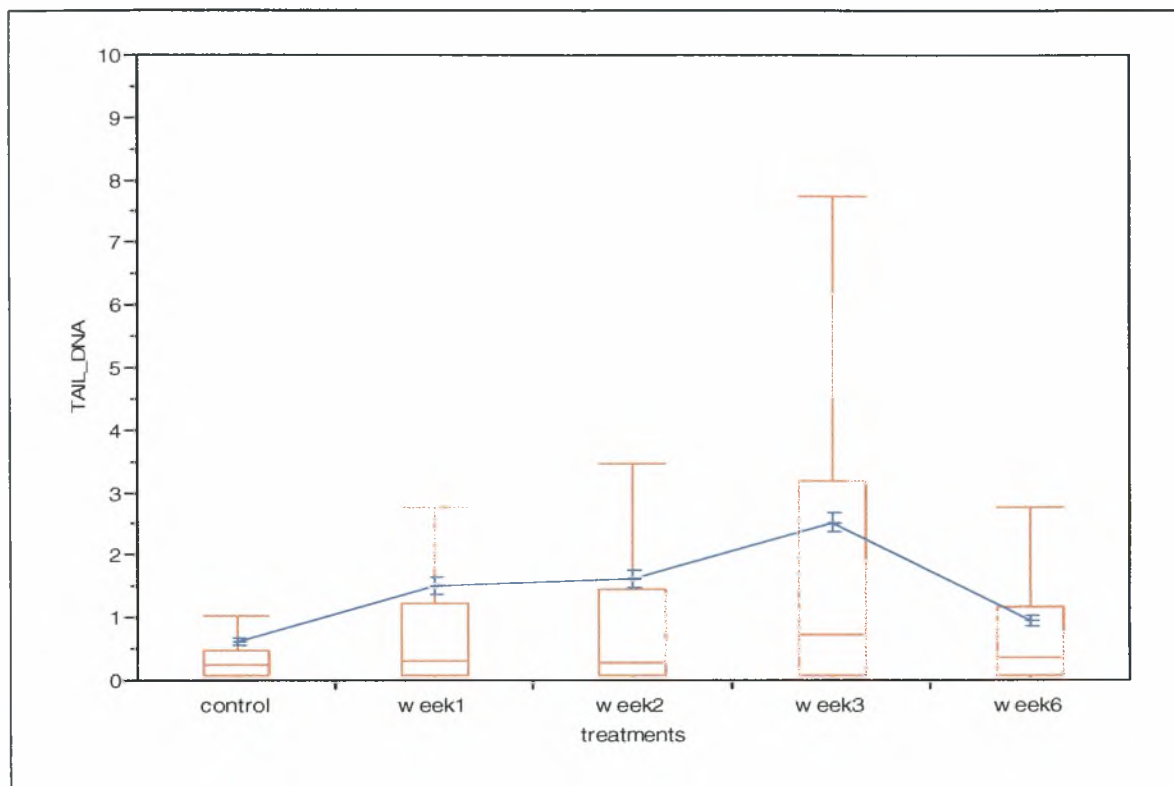
Σχήμα 4 Η μεταβολή της τιμής του Head DNA κατά τις εβδομάδες ασιτίας. Η μπλε γραμμή απεικονίζει τον μέσο όρο και τα όρια του τυπικού σφάλματος.

Οι τιμές του μήκους κεφαλής για κάθε μεταχείριση (για όλες τις εβδομάδες δηλαδή της ασιτίας) δίνονται στο Σχήμα 4. Παρατηρείται μια τάση σταδιακής μείωσης τους ανά εβδομάδα, η οποία φτάνει μέχρι την τρίτη εβδομάδα. Στην τελευταία εβδομάδα παρατηρείται ελάχιστη άνοδος των τιμών, από 97,47 σε 99,05.

Σε ότι αφορά τις τιμές Head-DNA, διαπιστώθηκε πολύ υψηλό ποσοστό κατεστραμμένου DNA την τρίτη εβδομάδα. Τα αποτελέσματα αυτής της παραμέτρου παρουσιάζονται ως ίδια με αυτά των άλλων παραμέτρων, σύμφωνα με τα οποία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,01$) μεταξύ των μεταχειρίσεων, με εξαίρεση εκείνη της πρώτης και της τελευταίας εβδομάδας (έκτης).

Συνοπτικά, παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση των τιμών Head DNA κατά τις πέντε μεταχειρίσεις:

- ◆ Ελάχιστη μείωση μέχρι την πρώτη εβδομάδα (στατιστικά σημαντική μεταβολή)
- ◆ Πέραν της πρώτης εβδομάδας, ακολούθως μια σταδιακή μικρή μείωση μέχρι την δεύτερη εβδομάδα, από 98.50 μέχρι 98.39 (μη στατιστικά σημαντική)
- ◆ Την τρίτη εβδομάδα συνεχίζεται η πτώση των τιμών του φτάνοντας 97,47
- ◆ Από την τρίτη εβδομάδα και μετά μια μικρή άνοδος μέχρι την τιμή 99,05 (χαμηλότερη σε σχέση με αυτήν της πρώτης εβδομάδας)



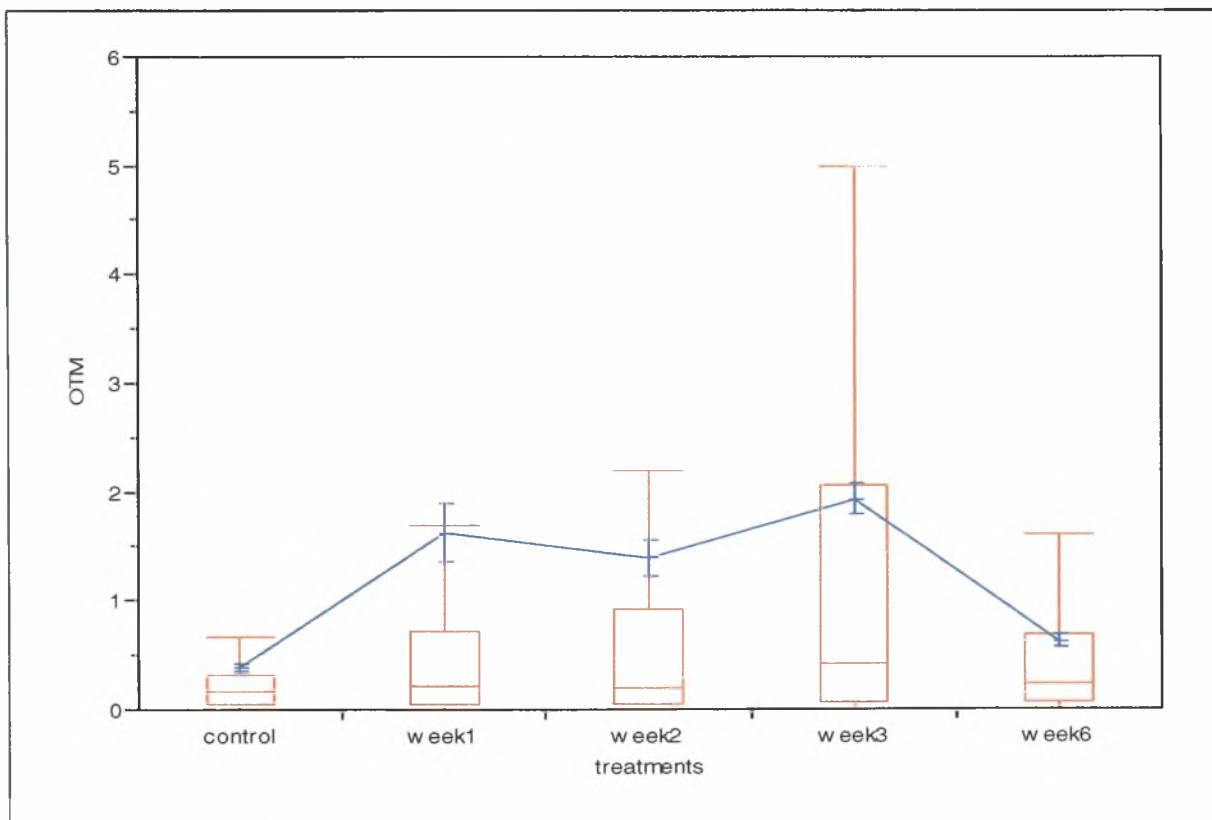
Σχήμα 5 Η μεταβολή της τιμής της Tail DNA κατά τις εβδομάδες ασιτίας. Η μπλε γραμμή απεικονίζει τον μέσο όρο και τα όρια του τυπικού σφάλματος.

Στηριζόμενοι στη σχηματική απεικόνιση με το Tail DNA (σχήμα 5), συμπεραίνουμε ότι μέχρι την τρίτη εβδομάδα η τιμή της αυξήθηκε σταδιακά, ξεκινώντας από 0,61 και φτάνοντας 2,53, όπου αυτή είναι και η μέγιστη τιμή της ενώ την έκτη εβδομάδα παρατηρήθηκε μία πτώση της τιμής της.

Η μελέτη των τιμών Tail DNA μεταξύ των μεταχειρίσεων έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,01$). Πιο συγκεκριμένα, τις τρεις πρώτες εβδομάδες φάνηκε να έχει σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό βλάβης στο DNA σε σχέση με την τελευταία μεταχείριση καθώς και με εκείνη των μαρτύρων.

Συνοπτικά, παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση των τιμών Tail DNA κατά τις πέντε μεταχειρίσεις:

- ◆ Από την στιγμή έναρξης του πειράματος ξεκινάει μια στατιστικά σημαντική άνοδος της τιμής μέχρι την πρώτη εβδομάδα
- ◆ Ακολούθως, συνεχίζεται αυτή η αύξηση μέχρι την δεύτερη εβδομάδα αστίας (μη στατιστικά σημαντική)
- ◆ Η ανοδική πορεία της τιμής Tail DNA συνεχίζεται μέχρι και την τρίτη εβδομάδα (μη στατιστικά σημαντική)
- ◆ Μεταξύ της τρίτης και της έκτης εβδομάδας, όπου μειώθηκε η τιμή της Tail DNA, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά



Σχήμα 6 Η μεταβολή της τιμής του OTM κατά τις εβδομάδες αστίας. Η μπλε γραμμή απεικονίζει τον μέσο όρο και τα όρια του τυπικού σφάλματος.

Όσον αφορά το Olive Tail Moment, κατά τις τρεις πρώτες εβδομάδες ασιτίας οι τιμές της κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην παραπάνω σχηματική απεικόνιση, η μέγιστη τιμή της διαπιστώθηκε την τρίτη εβδομάδα (1.93). Την έκτη εβδομάδα, η τιμή της μειώθηκε αρκετά φτάνοντας την τιμή 0.63.

Αναλυτικότερα, παρατηρείται η εξής διαδοχική συσχέτιση των τιμών OTM κατά τις πέντε μεταχειρίσεις:

- ◆ Από την στιγμή έναρξης του πειράματος ξεκινάει μια στατιστικά σημαντική άνοδος της τιμής μέχρι την δεύτερη εβδομάδα
- ◆ Μεταξύ της πρώτης και τη δεύτερης εβδομάδα ασιτίας παρατηρείται σταδιακή μικρή πτώση των τιμών (μη στατιστικά σημαντική)
- ◆ Την τρίτη εβδομάδα διαπιστώνεται μικρή άνοδος των τιμών (μη στατιστικά σημαντική)
- ◆ Από την τρίτη έως την έκτη εβδομάδα, παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική διαφορά, με την μείωση της τιμής OTM.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διατροφή είναι από τις σημαντικότερες παραμέτρους για την σωστή διατήρηση των ψαριών καθώς επηρεάζει πολλούς τομείς όπως την ανάπτυξη τους, την εμφάνιση τους αλλά και την υγεία τους. Τα ψάρια δηλαδή μέσω της τροφής, πρέπει να λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και τη σωματική τους αύξηση.

Υπάρχει όμως πλήθος ερευνών (Rueda *et al.*, 1998; Boujard *et al.*, 1992) που για λόγους οικονομικότερης διαχείρισης προτείνουν την εκμετάλλευση του φαινομένου της αντιστάθμισης στην αύξηση. Κατά συνέπεια κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η έκταση της βλάβης του DNA των ψαριών λόγω καταπόνησης σε συνθήκες ασιτίας. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί το γεγονός ότι η μέθοδος του κομήτη που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα αξιόπιστο εργαλείο για την εκτίμηση του γενεοτοξικού στρες (Weerd *et al.*, 1998). Η πρωτογενής αντίδραση του οργανισμού στην καταπόνηση μπορεί να αποτυπωθεί από τη μέθοδο του κομήτη. Κατά συνέπεια το στιγμιαίο και έντονο στρες προκαλεί γενεοτοξικότητα στα κύτταρα του ήπατος, η οποία με την παρέμβαση μηχανισμών επιδιόρθωσης μειώνεται.

Το ήπαρ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε θέματα ενεργειακής ροής στους τελεόστεους (Jurss and Bittorf, 1990). Επομένως, εάν η διαθεσιμότητα της τροφής αλλάζει, το ήπαρ αναμένεται να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού και συνεπώς στην αύξηση των ψαριών. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από την ανάλογη αύξηση στο σωματικό δείκτη του ήπατος εξαιτίας της απόθεσης υδατανθράκων και λιπιδίων (Jurss and Nicolai, 1976; Hickling and March, 1982; Jezierska *et al.*, 1982) καθώς αυξάνεται το ποσοστό της τροφής. Το ήπαρ είναι το όργανο που εμπλέκεται στις διαδικασίες του μεταβολισμού και καθότι η καταπόνηση έχει μεταβολικό χαρακτήρα, αποτελεί όργανο στόχο για την προαναφερθείσα μεθοδολογία.

Έως τώρα στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πλήθος μελετών που αφορούν τις βιοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν λόγω ασιτίας (Pascual *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 2008) . Πολύ βασική μεταβολή είναι αυτή της γλυκόζης του πλάσματος. Σε πολλά είδη έχει αναφερθεί μείωση της γλυκόζης του αίματος κάτω από διαφορετικές περιόδους στέρησης τροφής (Soengas *et al.*,

1996: Figueroa *et al.*, 2000: Blasco *et al.*, 2001). Η ταυτόχρονη μείωση της γλυκόζης του αίματος και του γλυκογόνου του ήπατος μετά από περίοδο επτά ημερών ασιτίας καταδεικνύει ότι η γλυκόλυση λόγω αντίδρασης στην ασιτία δεν είναι ικανή να διατηρήσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα (Soengas *et al.*, 1996). Εντούτοις, στον μπακαλιάρο υπό συνθήκες ασιτίας, τα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος διατηρήθηκαν, μειώνοντας το ποσοστό χρησιμοποίησης της γλυκόζης και αυξάνοντας την γλυκονεογένεση (Hemre *et al.*, 1993). Αυτή η διαφορετική αντίδραση σε περιόδους ασιτίας είναι δυνατόν να προκαλείται από πολλούς παράγοντες, όπως τη διαφορετικότητα μεταξύ των ειδών, την ηλικία, το διατροφικό ιστορικό, την εποχή και άλλους, όπως έχει υποστηριχτεί από αρκετούς ερευνητές (Soengas *et al.*, 1996: Boujard *et al.*, 2000). Η διαφορετικότητα αυτή μπορεί να ελεγχθεί από την τεχνική του κομήτη και να ποσοτικοποιηθεί.

Ίσως ο πιο σημαντικός βιοχημικός δείκτης στρες είναι η κορτιζόλη, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως από τους ερευνητές (Schreck, 1981: Barton and Iwama, 1991: Wendelaar Bonga, 1997: Barton, 2002). Για το στρες όμως που προέρχεται από την ασιτία η κορτιζόλη ίσως να μην είναι και ο ορθότερος δείκτης, διότι ανάλογα με τη διάρκειά του μπορεί να γίνει και χρόνιο. Γενικά, τα επίπεδα της κορτιζόλης μεταξύ των ψαριών που ταΐζονται κανονικά και εκείνων που βρίσκονται σε ασιτία, ποικίλλουν ευρέως ανάλογα με το είδος των ψαριών. Πιο συγκεκριμένα, η ασιτία δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα κορτιζόλης του πλάσματος στην πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* (Pottinger *et al.*, 2003: Bastrop *et al.*, 1992) και σε ενήλικους ιχθύες του είδους *Stizostedion vitreum* (Czesny *et al.*, 2003). Ωστόσο, σε ενήλικα άτομα σολομού που βρίσκονταν υπό κανονικές συνθήκες διατροφής, μετρήθηκαν πολύ χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης συγκριτικά με τα άτομα που βρίσκονταν υπό συνθήκες ασιτίας (Barton *et al.*, 1988). Αντιθέτως, η ασιτία στο γατόψαρο, *Ictalurus punctatus*, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης του πλάσματος (Peterson and Small, 2004). Στην παρούσα έρευνα όμως υφίσταται καταστροφή του γενετικού υλικού και σε μεγάλο ποσοστό μάλιστα ακόμα και μετά το πέρασμα τριών εβδομάδων από την έναρξη της ασιτίας. Από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι μετά το πέρασμα των 3 εβδομάδων οι δείκτες βλάβης του DNA δείχνουν να μειώνονται.

Οι νευροδιαβιβαστές υφίστανται μεταβολές κατά τις περιόδους ασιτίας, οι οποίες όμως είναι εξαρτημένες από το είδος του ψαριού. Το περιεχόμενο του υποθαλάμου σε κατεχολαμίνες στο γληνί (*Tinga tinga*) ήταν παρόμοιο με αυτό που βρέθηκε και σε άλλα κυπρινοειδή, όπως στο χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) (De Pedro *et al.*, 1997, 1998) αλλά η μεταβολή των κατεχολαμινών στη στέρση τροφής, ήταν διαφορετική. Πιο συγκεκριμένα, η ασιτία προκάλεσε μια αύξηση στο υποθαλαμικό περιεχόμενο σε νορεπινεφρίνη και ντοπαμίνη στο γληνί, ενώ προκάλεσε μείωση των κατεχολαμινών στο χρυσόψαρο (De Pedro *et al.*, 2001). Αυτή η αντίθεση πιθανώς προκύπτει από διαφορές στο μοτίβο σίτισης καθώς, το γληνί δείχνει νυκτερινή δραστηριότητα διατροφής, ενώ το χρυσόψαρο ημερήσια (Sanchez-Vazquez *et al.*, 1996). Επίσης, το γληνί είναι πιο ευαίσθητο σε στρεσογόνους παράγοντες από ότι το χρυσόψαρο. Αντιθέτως η τσιπούρα είναι ένα είδος αρκετά ανθεκτικό σε στρεσογόνους παράγοντες και μπορεί να επανέλθει ταχύτατα μετά από ένα επεισόδιο στρες σε φυσιολογικούς ρυθμούς.

Κατά το διάστημα των έξι εβδομάδων ασιτίας, η γενοτοξικότητα που προκάλεσε το μεταβολικό στρες κλιμακώνεται περίπου στα μέσα του πειράματος και έπειτα δείχνει πτωτική πορεία. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια, κατά τις πρώτες εβδομάδες ασιτίας ευθύνεται για τη ζημιά στο DNA, ενώ για το επόμενο διάστημα δρουν μηχανισμοί επιδιόρθωσης που καταστέλλουν τη βλάβη (Malcolm *et al.*, 1997). Αν οι μηχανισμοί αυτοί δεν ανταποκριθούν σωστά, το αποτέλεσμα μπορεί να είναι ακόμα και η δημιουργία καρκινικών κυττάρων, καθώς η βλάβη συσσωρεύεται στον πυρήνα.

Στις μέρες μας, με το πέρας της αποκωδικοποίησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, η επιστημονική κοινότητα προβλέπεται να ασχοληθεί με τους μηχανισμούς βλάβης και επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού. Μεγάλο θέμα γίνεται σχετικά με τους μηχανισμούς γήρανσης, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το σύνδρομο της πρόωρης γήρανσης (σύνδρομο Werner). Η μελέτη του και η κατανόηση των μηχανισμών βλάβης και επιδιόρθωσης μπορεί να μας δώσει τη δυνατότητα να αντιληφθούμε τους μηχανισμούς βλάβης και επιδιόρθωσης στην κανονική γήρανση. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της βλάβης

και την αύξηση των ρυθμών επιδιόρθωσης του DNA, με αποτέλεσμα την υγεία και τη μακροζωία μας.

Βιβλιογραφία

- Ackerman, P. A. and Iwama, G. K. (2001). Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis. *J. Aquat. Anim. Health*, 13:173 -180.
- Adams WW III, Demmig-Adams B, Winter K (1990a). Relative contributions of zeaxanthin-related and zeaxanthin-unrelated types of highenergy-state quenching of chlorophyll fluorescence in spinach leaves exposed to various environmental conditions. *Plant Physiol.*, 92: 302–309
- Akcha F, Vincent Hubert F, Pfohl-Leszkowicz A. (2003). Potential value of the Comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat Res.*, 534 (1–2):21–32.
- Alabaster JS, Lloyd R (1980). Water Quality Criteria for Freshwater Fish. Butterworths, London-Boston
- Angelis KJ, McGuffie M, Menke M, Schubert I. (2000). Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the Comet assay. *Environ Mol Mutagen*, 36(2):146–50.
- Aoyama K, Iwahori K, Miyata N. (2003). Application of *Euglena gracilis* cells to Comet assay: evaluation of DNA damage and repair. *Mutat Res.*, 538(1–2) :155–62.
- Arends RJ, Mancera JM, Munoz JL, Wendelaar Bonga SE, and Flik G (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*.163 (1): 149-157.
- Balm P. H. M., P. Pepels, S. Helfrich, M. L. Hovens and S. E. Wendelaar Bonga, (1994). Adrenocorticotrophic hormone in relation to interrenal function during stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 96:347–360.
- Banerjee P, Talapatra SN, Mandal N, Sundaram G, Mukhopadhyay A, Chattopadhyay D, et al. (2008). Genotoxicity study with special reference to DNA damage by Comet assay in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* exposed to drinking water. *Food Chem Toxicol.*, 46(1):402–7.

- Barton B.A. Iwama G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1:3–26.
- Barton, B.A., (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.*, 42, 517–525.
- Barton, G.M. and Medzhitov, R. (2002). Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:14943–14945.
- Bastrop R., Jurss K., Wacke R.,(1992). Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Camp. Biochem Physiol. A* . 102 (1): 151-161.
- Blasco J, Marimon I, Viaplana I, Fernandez Borrás J (2001). Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiol Biochem.*, 24:247–258
- Boujard T, Burel C, Medale F, Haylord G, Moisan A (2000). Effect of past nutritional history and fasting on feed intake and growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Living Resour.*, 13:129–137
- Boujard T., D. Xavier, D. Genner, C. Gosset and G. Grig, (1992). Description of a modular, low cost, eater meter for the study of feeding behavior and food preferences in fish. *Physiol. Behavior* 52:1101–1106.
- Brockway D.R. (1950). Metabolic products and their effects. *Progressive Fish-Culturist.*, 12:127–129.
- Brown, Morton B. and Forsythe, Alan B. (1974). Robust Tests for Equality of Variances, *Journal of the American Statistical Association*, 69:364-367.
- Bruce A. Barton, (1988). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids, *Integrative and Comparative Biology*, 42(3):517-525
- Collins A.R., Duthie S.J. and Dobson,V.L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14:1733–1735.
- Collins AR. (2004). The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.*, 26:249–60

- Czesny, S., Rinchar, J., Garcia Abiado, M.A., Dabrowski, K., (2003). The effects of fasting, prolonged swimming, and predator presence on energy utilization and stress in juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*). *Physiol. Behav.*, 79:597–603.
- Danecker, E. (1964). Die Jauchvergiftung von Fischen-eine Ammoniakvergiftung. *Osterreichs Fischerei*. 3: 455-68.
- De Andrade VM, de Freitas TR, da Silva J. (2004a). Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutat Res.*, 560(1):57–67.
- De Pedro N, Alonso-Gomez AL, Gancedo B, Valenciano AI, Delgado MJ, Alonso-Bedate M (1997). The effect of alpha-helical-CRF[9–41] on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholamines. *Behav Neurosci.*, 3:398–403
- De Pedro N, Delgado MJ, Alonso-Bedate M (1998). α 1-adrenergic and dopaminergic receptors are involved in the anorectic effect of CRF in goldfish. *Life Sci.*, 62:1801–1808
- De Pedro N, Delgado MJ, Alonso-Bedate M (2001). Fasting and hypothalamic catecholamines in goldfish (*Carassius auratus*). *J Fish Biol.*, 58:1404–1413
- De Pedro N. Delgado Z M. J. Z Gancedo B. Alonso-Bedate M. (2003). Changes in glucose, glycogen, thyroid activity and hypothalamic catecholamines in tench by starvation and refeeding. *J Comp Physiol B* 173: 475–48.
- Dhawan Alok, Bajpayee Mahima and Devendra Parmar. (2008). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.* 5:123-132.
- Feder, M. E. and Hofmann, G. E (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 61:243-282.
- Figueroa RI, Rodriguez-Sabari's R, Aldegunde M, Soengas JL (2000). Effects of food deprivation on 24-h changes in brain and liver carbohydrate and ketone body metabolism of rainbow trout. *J Fish Biol.*, 57:631–646

- Forsyth L.M., Jackson L.A., Wilkie G., Sanderson A., Brown C.G. and Preston P.M. (1997). Bovine cells infected in vivo with *Theileria annulata* express CD11b, the C3bi complement receptor. *Vet. Res. Commun.*, 21:249–263.
- Gamperl, A.K. and Boutilier, R.G. (1994). Effect of acute and chronic epinephrine administration on the clearance and metabolism of [³H] epinephrine in trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol. B.* 23: 56.
- Gamperl, A.K., M.M. Vijayan and R.G. Boutilier. 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4:215-255.
- Hahn A, Hock B. (1999). Assessment of DNA damage in filamentous fungi by single cell gel electrophoresis, Comet assay. *Environ Toxicol Chem.*, 18:1421–24.
- Hartmann, S. Sollwedel, A. Hoffmann A., Sonnenburg S. and Lucius R., (2003). Characterization of IgE responses in a rodent model of filariasis and the allergenic potential of filarial antigens using an in vitro assay. *Parasite Immunol.* 25:9–16
- Hemre GI, Lie O, Sundby A (1993). Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*): metabolic responses to feeding and fasting. *Fish Physiol Biochem.*, 10:455–463
- Hightower LE. (1991). Heat shock, stress protein, chaperones, and proteotoxicity. *Cell.* 66:191–197.
- Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B., Vijayan, M.M., (1998). Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 8:35-56.
- Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B., Ackerman, P.A., (1999). Heat shock proteins and physiological stress in fish. *Am. Zool.*, 39:901-909.
- Iwama, George, Afonso, Luis και Vijayan, Mathilakath. (2004) *Stress in Fish*. B.C. Canada : AquaNet Workshop on Fish Welfare,
- Jeziarska B., Hazel J. R. and Gerking S. D. (1982) Lipid mobilization during starvation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with attention to fatty acids. *J. Fish Biol.*, 21:681-692.
- Jurss K. and Bittorf Th. (1990). The relationship between biochemical liver status and growth in immature rainbow trout (*Salmo gairdneri*

- Richardson). I. Effects of feeding and salinity. *Zool. Jb. Physiol.*, 94:474-485.
- Kosmehl T, Hallare AV, Reifferscheid G, Manz W, Braunbeck T, Hollert H. (2006). A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environ Toxicol Chem.*, 25(8):2097–106.
- Lah B, Malovrh S, Narat M, Cepeljnik T, Marinsek-Logar R. (2004). Detection and quantification of genotoxicity in wastewater- treated *Tetrahymena thermophila* using the Comet assay. *Environ Toxicol.*, 19(6):545–53.
- Lee RF, Steinert S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/Comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res.*, 544:43–64.
- Lin X, Wood CG, Shao L, Huang M, Yang H, Dinney CP, et al. (2007). Risk assessment of renal cell carcinoma using alkaline Comet assay. *Cancer*, 110(2):282–8.
- Malcolm K. Robinson, M.D., Rami R. Rustum, M.D., Elizabeth A. Chambers, M.S., Jan D. Rounds, B.S., Douglas W. Wilmore, M.D., and Danny O. Jacobs, M.D., M.P.H. (1997). Starvation Enhances Hepatic Free Radical Release Following Endotoxemia. *Journal of surgical research* 69:325–330.
- Maluszynska J, Juchimiuk J. (2005). Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arh Hig Rada Toksikol.*, 56(2):177–84.
- McKelvey-Martin, V.J., Ho, E.T.S., McKeown, S.R., McCarthy, P.J., Rajab, N.F. and Downes, C.S. (1998). Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent *in situ* hybridization comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis*, 13:1–8
- Miller, P.J. and Loates, M.J., (1997). *Fish of Britain and Europe*, Harper Collins, London
- Mitchelmore CL, Hyatt S. (2004). Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. *Mar Environ Res.*, 58(2–5):707–11.

- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. & Moon, T.W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 9:211–268.
- Mukhopadhyay I, Chowdhuri DK, Bajpayee M, Dhawan A. (2004). Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 19(2):85–90.
- Olsen Rolf Erik, Sundell Kristina, Ringø Einar, Myklebust Reidar, Hemre Gro-Ingunn, Hansen Tom, Karlsen Ørjan. (2008) The acute stress response in fed and food deprived Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture*. 280:232–241
- Ostling O, Johanson KJ, (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. 123(1):291-8
- Pascual P., Pedrajas J.R., Toribio F., Lo´pez-Barea J., Peinado J. (2003). *Chemico-Biological Interactions*. 145:191-199.
- Peterson, B.C., Small, B.C., (2004). Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domest. Anim. Endocrinol.*, 26:231–240.
- Poli P, Buschini A, Restivo FM, Ficarella A, Cassoni F, Ferrerol, et al. (1999). Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagen*, 14:547–55.
- Pottinger, T.G., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P., (2003). Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilisation. *Comp. Biochem. Physiol., A* 136:403–417.
- Power M. (1997). Assessing the effects of environmental stressors on fish populations. *Aquatic Toxicology* 39:151-169.
- Rajaguru P, Suba S, Palanivel M, Kalaiselvi K. (2003). Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline Comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ Mol Mutagen.*, 41(2):85–91.
- Randall, D.J., Perry, S.F., (1992). Catecholamines. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. (Eds.), *Fish Physiology—The Cardiovascular System*, Vol. XIIB. Academic Press, New York, pp. 255–300.

- Rank J, Jensen K, Jespersen PH. (2005). Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. *Mutat Res.*, 585 (1–2):33–42.
- Redding, J. M., Schreck, C. B. (1983). Influence of ambient salinity on osmoregulation and cortisol concentration in yearling coho salmon during stress. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112: 800 – 807
- Rueda, B.R., Hamernik, D.L., Hoyer, P.B. and Tilly, J.L., (1998). Potential regulators of physiological cell death in the corpus luteum. In: Tilly, J.L., Strauss, J. and Tenniswood, M., Editors, *Cell Death in Reproductive Physiology. Sero Symposium*, Springer-Verlag, New York, pp. 161–181
- Sánchez P, Peñarroja R, Gallegos F, Bravo JL, Rojas E, Benítez-Bribiesca L. (2004). DNA damage in peripheral lymphocytes of untreated breast cancer patients. *Arch Med Res.*, 35(6):480–3.
- Schabath MB, Spitz MR, Grossman HB, Zhang K, Dinney CP, Zheng PJ, *et al.* (2003). Genetic instability in bladder cancer assessed by the Comet assay. *J Natl Cancer Inst.*, 95(7):540–7.
- Schreck C.B., Olla B.L. and Davis M.W. (1997). Behavioral responses to stress. In: G.W. Iwama, J. Sumpter, A.D. Pickering and C.B. Schreck, Editors, *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Cambridge Univ. Press, Cambridge pp. 745–770.
- Schreck, C.B., (1981). Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: Pickering, A.D. (Ed.), *Stress and Fish. Academic Press*, 295–321.
- Schreck, Carl B, Contreras-Sanchez, Wilfrido and Fitzpatrick, Martin S. (2001) Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny. *Aquaculture*. 197:3-24.
- Shao L, Lin J, Huang M, Ajani JA, Wu X. (2005). Predictors of esophageal cancer risk: assessment of susceptibility to DNA damage using Comet assay. *Genes Chromosomes Cancer*, 44(4):415–22.
- Shapiro, S. S. and Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples) *Biometrika*, 52, 3 and 4: 591-611.

- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, 175(1):184–91
- Singh NP, Stephens RE, Singh H, Lai H. (1999). Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. *Mutat Res.*, 429:159–68.
- Soengas JL, Strong EF, Fuentes J, Veira JAR, Andres MD (1996). Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol Biochem.*, 15:491–511
- Speit G, Hartmann A. (2005). The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol.*, 291:85–95.
- Strange, R. J. (1978). Changes in plasma cortisol concentration of juvenile salmonids during stress. Ph.D. Thesis, Oregon State University, U.S.A.
- Strange, R. J. Schreck, C. B. (1978). Anaesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Fish. Res. Bd Can.*, 35:345–349.
- Strange, R. J., Schreck, C. B. Ewing, R. D. (1978). Cortisol concentrations in confined juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107:812–819
- Tice R.R, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.-C. Ryu and Y.F. Sasaki, (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35:206–221
- Vajpayee P, Dhawan A, Shanker R. (2006). Evaluation of the alkaline Comet assay conducted with the wetlands plant *Bacopamonnieri L.* as a model for ecogenotoxicity assessment. *Environ Mol Mutagen.*, 47(7):483–9.
- Vandenhove H, Cuypers A, Van Hees M, Koppen G, Wannijn J. (2006). Oxidative stress reactions induced in beans (*Phaseolus vulgaris*) following exposure to uranium. *Plant Physiol and Biochem.*, 44:795–805.
- Vijayan, M. M. and Moon, T. W. (1994). The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Can. J. Zool.* 72:379–386.

- Vijayan, M.M., Pereira, C., Kruzynski, G., Iwama, G.K., 1998. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat-shock protein 70 in 2 salmonids. *Aquat. Toxicol.*, 40:101-108.
- Weerd J.H. Van, Komen J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 120:107–112.
- Wendelaar Bonga, S.E., (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591–625.
- Wilson P.N. and Osbourn D.F. (1960). Compensatory growth after undernutrition in mammals and birds. *Biological Review*, 35:324-363.
- Yu, T. and Bentley, P. (1998). Methods to Evolve Legal Phenotypes. In Proceedings of the Fifth Int. Conf. on Parallel Problem Solving From Nature. Amsterdam: 280-282.
- Zar, J., H. (1996). Biostatistical analysis. 2nd Edition. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Zhu X., Cui Y., Al M. and Wootton, R.J. (2001). Comparison of compensatory growth responses of juvenile three-spined stickleback and minnow following similar food deprivation protocols. *Journal of Fish Biology*, 58:1149-1165.
- Zivkov, M.T. (1982). On the effect and nature of growth compensation of fish. *Vestnik Ceskoslovenske Spolecnosti Zoologicke*, 46:142-160.
- Zohar Y., M. Abraham and H. Gordin (1978). The gonadal cycle of the captivity reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* during the first two years of life. *Ann. Biol. Anim., Biochem., Biophys.*, 18:877–882.
- Κλαουδάτος, Σπ. (2005). Υδατοκαλλιέργειες Ι. Πανεπιστημιακές παραδόσεις. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Νεοφύτου, Χ., (2001). Βιολογία Υδρόβιων Σπονδυλωτών. Πανεπιστημιακές παραδόσεις. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Παπουτσόγλου Σωφρόνιος,. (1998) *Ενδοκρινολογία Ιχθύων*. Α. Σταμούλης. Αθήνα : Α. Σταμούλης
- Παπουτσόγλου, Σωφρόνιος. (1997) *Εισαγωγή στις υδατοκαλλιέργειες*. Αθήνα : Α. Σταμούλης

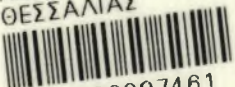
Πράπας, Α. (2000). Πρακτικός Οδηγός Ιχθυοπαθολογίας Εκτρεφόμενων στην Ελλάδα ειδών και Οστρακόδερμων. Υπουργείο Γεωργίας, Γενική Δ/ση Αλιείας. Αθήνα.

Χώτος, Γεώργιος και Ρογδάκης, Ιωάννης. (1992). *Υδατοκαλλιέργειες ευρύστων ψαριών*. Αθήνα : Εκδόσεις Ιων.





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000097461