

ΠΑΝΕΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ ΛΑΥΡΑΚΙΩΝ ΑΠΟ
ΤΕΧΝΗΤΩΣ ΑΕΡΙΖΟΜΕΝΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΚΛΩΒΟ

Όνομα: Θεοχάρη Χαριτίνη (1383)

ΒΟΛΟΣ 2016

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	1
1.1. Η οικονομική σημασία του λαυρακιού και τα γενικά χαρακτηριστικά του.....	1
1.2. Υγεία των ιχθύων.....	1
1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την αύξηση και την υγεία των ιχθύων	2
1.3.1. Έλλειψη οξυγόνου.....	2
1.3.2. Ρύπανση και οξυγόνο σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.....	2
1.3.3. Ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά υδάτων κατάλληλων για εκτροφή.....	3
1.3.4. Υποξία.....	4
1.3.5. Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου και καταπόνηση ιχθύων.....	5
1.4. Καταπόνηση των ιχθύων (στρες).....	6
1.4.1. Αντίδραση των ιχθύων σε στρεσογόνες καταστάσεις	7
1.4.2. Η απόκριση του εγκεφάλου στο οξύ στρες.....	9
1.5. Νευρικός ιστός ιχθύων	9
1.5.1. Στοιχεία Βασικής και Λειτουργικής Νευροανατομίας των Τελεόστεων	10
2. Υλικά και μέθοδοι	15
2.1. Στάδια των τεχνικών ιστολογίας	16
2.1.1. Συλλογή & επεξεργασία ιστολογικού δείγματος.....	17
2.1.2. Μονιμοποίηση του ιστού	18
2.1.3. Επεξεργασία του ιστού	19
2.1.4. Λήψη τομών.....	22
2.1.5. Χρώση τομών.....	25
3. Αποτελέσματα.....	29
4. Συζήτηση – Συμπέρασμα	38
5. Βιβλιογραφία	44
5.1. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	44
5.2. Ελληνική Βιβλιογραφία.....	48

1.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Βερίλλης Παναγιώτης**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροσκοπίας και Ανάλυσης Εικόνας στην Ιστολογία και στους Υδρόβιους Οργανισμούς Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ), Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος (τΓΙΥΠ) , **Επιβλέπων**.
- **Έλενα Μεντέ**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Θρέψης Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ), Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος (τΓΙΥΠ) **Μέλος**.
- **Άρης Πούρλης**, Επίκουρος Καθηγητής Μακροσκοπικής και Μικροσκοπικής Ανατομικής Ζώων. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ), Τμήμα Κτηνιατρικής **Μέλος**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παναγιώτη Βερίλλη για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής αποτελούμενη από την κα. Ελένη Μεντέ και τον κο. Άρη Πούρλη για την άμεση και πολύτιμη βοήθεια τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία είχε ως σκοπό την ιστολογική μελέτη εγκεφάλου λαβρακίων από κανονικά αεριζόμενο κλωβό καθώς και από κλωβό με πρόσθετη παροχή αέρα. Στην παρούσα μελέτη συλλέχθηκαν από μονάδα εκτροφής συνολικά 20 ενήλικα αρσενικά άτομα λαβρακιού. 10 άτομα λαβρακιού από κλωβό χωρίς πρόσθετη παροχή αέρα και 10 άτομα λαβρακιού από κλωβό με επιπλέον παροχή αέρα για συγκεκριμένες ώρες την ημέρα για 37 ημέρες (περίοδος 13 Αυγούστου-18 Σεπτεμβρίου 2014). Η πρώτη δειγματοληψία έλαβε χώρα μετά από 19 ημέρες με επιπλέον παροχή αέρα (28 Αυγούστου 2014) και η δεύτερη μετά από 37 ημέρες με επιπλέον παροχή αέρα (18 Σεπτεμβρίου 2014). Κάθε τμήμα του εγκεφάλου στα δείγματα των κλωβών αναφοράς καθώς και τα δείγματα από τον αεριζόμενο κλωβό, μελετήθηκε για τυχόν αλλοιώσεις και αιμορραγίες. Ακολουθήθηκαν κατά σειρά οι εξής ιστολογικές διαδικασίες: Συλλογή και επεξεργασία των τμημάτων εγκεφάλου, μονιμοποίηση του ιστού, αφυδάτωση, διαύγαση, σκλήνωση, λήψη τομών, χρώση και τέλος μικροσκοπική παρατήρηση. Η μικροσκοπική παρατήρηση των ιστολογικών τομών εγκεφάλου ιχθύων από τον κλωβό με την επιπλέον παροχή αέρα δεν κατέδειξε αλλοιώσεις ή αιμορραγίες.

ABSTRACT

The purpose of this undergraduate dissertation was the brain histological examination of sea basses from sea cages with additional air supply. 20 mature male sea basses were collected from a fish farm, 10 from a sea cage with additional air supply and 10 from a sea cage without additional air supply. The additional air supply system was introduced for 37 days in a sea bass sea cage (August 13 - September 18 2014). Fish samples were collected 15 days after the system was introduced and at the end of the experiment. Brain sections were examined for haemorrhages or histological alterations. Classical histological procedure was followed (fixation, dehydration, embedding, 5-7 μm sectioning, H&E staining). The microscopic examination revealed no brain haemorrhages or alterations.

1. Εισαγωγή

1.1. Η οικονομική σημασία του λαυρακιού και τα γενικά χαρακτηριστικά του.

Το λαβράκι αποτελεί είδος μεγάλης οικονομικής σημασίας για την περιοχή της Μεσογείου, με αποτέλεσμα να θεωρείται κορωνίδα των ειδών με τα οποία ασχολείται η ιχθυολογική έρευνα. Το λαβράκι, (*Dicentrarchus labrax*), ανήκει στην οικογένεια *Serranidae*, στην υπόταξη *Percoidae*, στην τάξη *Perciformes*, στην υφομοταξία *Actinopterygii*, στην ομοταξία *Osteichthyes*. Είναι είδος κοινό σε ολόκληρη την περιοχή της Μεσογείου, καθώς και στις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού Ωκεανού, από τα Βρετανικά νησιά έως τη Σενεγάλη. Χαρακτηρίζεται από επίμηκες σώμα και από την παρουσία δύο ραχιαίων πτερυγίων. Στη φύση το συνηθέστερο μήκος του είναι περίπου 45 εκατοστά, συχνά όμως φτάνει και το 1 μέτρο (Papoutsoglou, 1994).

Επιπλέον έχει την ικανότητα να προσαρμοσθεί και να επιβιώσει σε ύδατα μεγάλου εύρους θερμοκρασιών και αλατότητας. Παρά το ότι είναι ικανό να προσαρμοσθεί και σε γλυκά νερά, προτιμά τα υφάλμυρα, εκεί όπου βρίσκεται κατά τους πρώτους μήνες της άνοιξης. Στη θάλασσα επιστρέφει κατά την περίοδο της αναπαραγωγής του. Έχει παρατηρηθεί ότι συχνάζει στα παράκτια ύδατα, ανεξάρτητα από το βάθος αυτών.

Είναι είδος με ξεχωριστά φύλα. Στην περιοχή της Μεσογείου, η αναπαραγωγή του πραγματοποιείται κατά το χρονικό διάστημα από τέλος Οκτωβρίου έως τις αρχές Μαρτίου, αλλά είναι εντονότερη κατά τον Ιανουάριο. Το λαβράκι είναι εξαιρετικά αδηφάγο. Στη φύση διατρέφεται με μικρούς ιχθύες, καρκινοειδή και κεφαλόποδα (Papoutsoglou, 1994).

1.2. Υγεία των ιχθύων

Η κατάσταση της υγείας των ιχθύων καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες, από την προγενέστερη διαβίωσή τους, από την ποιότητα του περιβάλλοντος διαβίωσής τους, από τη διατροφή τους, από τη φύση των παθογόνων με τα οποία έρχονται σε επαφή μέσω του περιβάλλοντος τους ή της τροφής τους, καθώς και από εγγενείς παράγοντες των ιδίων των ιχθύων που τους προκαλούν καταπόνηση (στρες) (Schreck, 1996).

Η διατροφή και η ποιότητα του νερού αποτελούν σημαντικούς παράγοντες καθορισμού της υγείας των ιχθύων. Ελλιπής διατροφή μπορεί να επηρεάσει αρνητικά

την υγεία τους. Αντίστοιχη είναι και η επίδραση ακατάλληλης ποιότητας νερού (Schreck, 1996).

Έτσι οι ασθένειες είναι είτε περιβαλλοντικής (ασθένεια των βραγχίων, φυσαλιδώδης νόσος, ασβέστωση των νεφρών), είτε διατροφικής (φυκομυκητίαση, λιπώδης εκφύλιση του ήπατος) προέλευσης και αντανακλούν προβλήματα είτε με την ποιότητα του νερού είτε με μη ισορροπημένη διατροφή (Richards, 1987). Πάντως, οποιασδήποτε προέλευσης και αν είναι αυτές, προσβάλλουν κάθε χρόνο το 20% της συνολικής παραγωγής παγκοσμίως, (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2005) γεγονός που καταδεικνύει τη σπουδαιότητα όχι μόνο της εξάλειψης, αλλά κυρίως της πρόληψής τους.

1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την αύξηση και την υγεία των ιχθύων

1.3.1. Έλλειψη οξυγόνου

Η έλλειψη οξυγόνου ως στρεσογόνος παράγοντας, οδηγεί στον τραυματισμό και το θάνατο κυττάρων και ιστών και συνεπώς και των ίδιων των οργανισμών. Οι ιχθύες είναι ιδιαίτερα εκτεθειμένοι στον κίνδυνο της υποξίας, καθώς το νερό περιέχει μικρή μόνο ποσότητα οξυγόνου. Ενώ πολλές φορές ο θάνατος των ιχθύων έχει αποδοθεί στη χαμηλή συγκέντρωση διαλυμένου στο νερό οξυγόνου, οι σχεδόν θανατηφόρες επιδράσεις της υποξίας στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων και την πιθανή συμβολή αυτής στην πρόκληση ασθενειών δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς (Choi et al., 2007). Έχει παρατηρηθεί ότι όλοι οι υδρόβιοι οργανισμοί, όταν υποβάλλονται σε συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας διαλυμένου στο νερό οξυγόνου, παρουσιάζουν μείωση της έκλυσης αντιδρώντων ριζών οξυγόνου από τα κύτταρα του αίματός τους, γεγονός που ισοδυναμεί με καταστολή του μη ειδικού ανοσοποιητικού τους συστήματος (Burnett et al., 1999).

1.3.2. Ρύπανση και οξυγόνο σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία

Όσο αυξάνεται η ρύπανση των νερών, κυρίως με οργανικές ύλες, και ανεβαίνει η θερμοκρασία τους (φαινόμενο του θερμοκηπίου), τόσο μειώνεται το διαλυμένο οξυγόνο, διότι καταναλώνεται λόγω της αερόβιας αναπνοής των μικροοργανισμών που κάνουν αποσύνθεση. Οι συνέπειες μπορεί να είναι καταστροφικές για τους περισσότερους οργανισμούς, αφού κινδυνεύουν από ασφυξία.

Ανάλογα αποτελέσματα έχει και η ρύπανση με ανόργανα άλατα που περιέχουν άζωτο και φώσφορο, τα οποία περιέχονται συνήθως σε λιπάσματα, απόβλητα κτηνοτροφικών και πτηνοτροφικών μονάδων, απορρυπαντικά και βιομηχανικά απόβλητα. Το σημαντικότερο πρόβλημα που δημιουργεί το άζωτο και ο φώσφορος είναι ο ευτροφισμός, δηλαδή η υπερβολική ανάπτυξη άλγης (κυρίως φυτοπλαγκτού) από την υπερβολική τροφοδοσία των νερών με θρεπτικά συστατικά. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί σοβαρή διαταραχή του υδάτινου οικοσυστήματος με διάφορες δυσμενείς συνέπειες, μεταξύ των οποίων είναι η υπερβολική ανάπτυξη ορισμένων ειδών σε βάρος όλων των άλλων, η μείωση ή και η εξαφάνιση ειδών με θανάτωση ή μετανάστευση τους, καθώς και η πλήρης ή μερική αποξυγόνωση των νερών (Katsakoulis, 2010).

Εκτός όμως από την ρύπανση, όπως ήδη αναφέρθηκε, το οξυγόνο στις θάλασσες και στους ωκεανούς μειώνεται και από την αύξηση της θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας στην ατμόσφαιρα οδηγεί στην αύξηση της θερμοκρασίας και των υδάτων. Τα θερμότερα νερά δε μπορούν να απορροφήσουν τις ίδιες ποσότητες οξυγόνου με αυτές που απορροφούν τα πιο ψυχρά, λόγω του ότι στα θερμότερα νερά ευνοείται η ανάπτυξη οργανισμών, οι οποίοι καταναλώνουν ποσοστά οξυγόνου για τη διαδικασία της αναπνοής.

Η εντατικοποίηση των υδατοκαλλιεργειών ως απάντηση στη μείωση των φυσικών ιχθυαποθεμάτων πρέπει να γίνει με γνώμονα την αειφόρο ανάπτυξη. Διαφορετικά, υπάρχει κίνδυνος να επιφέρει χειροτέρευση των περιβαλλοντικών συνθηκών στις καλλιέργειες αυτές. Η δυσοίωνα αυτή προοπτική πρέπει να αποφευχθεί διότι διαφορετικά θα προκληθούν μεγάλα προβλήματα λόγω των ασθενειών που θα ξεσπάσουν, όχι μόνο εξαιτίας της αυξημένης ιχθυοπυκνότητας, αλλά κυρίως εξαιτίας της επίδρασης των άσχημων περιβαλλοντικών συνθηκών (ποιότητα νερού) στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων, με δυσμενείς επιπτώσεις για την παραγωγή (Shoemaker et al., 2001).

1.3.3. Ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά υδάτων κατάλληλων για εκτροφή

Τα χαρακτηριστικά των υδάτινων μαζών σε ότι αφορά την καταλληλότητά τους για την εκτροφή και την καλλιέργεια υδρόβιων οργανισμών, είναι κοινά για όλους, με διαφορετικές ενδεχομένως τιμές. Η κινητική κατάσταση του νερού, η ποσότητά του,

η θερμοκρασία του, η αλατότητα του, η περιεκτικότητα του σε οξυγόνο, το χρώμα του και η διαύγειά του, το PH, το διοξειδίο του άνθρακα, η αλκαλικότητα του, η συγκέντρωση αμμωνίας, νιτρικών και νιτρωδών ιόντων χλωρίου, βαρέων μετάλλων, αζώτου και φωσφόρου, αποτελούν χαρακτηριστικά που καθιστούν μια υδάτινη μάζα κατάλληλη ή όχι για εκτροφή (Papoutsoglou, 1985).

Σήμερα στις υδατοκαλλιέργειες εφαρμόζονται συστήματα και μέθοδοι που επιδιώκουν την εξασφάλιση όλων των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού που θεωρούνται απαραίτητα για τη εκτροφή και την καλλιέργεια των ιχθύων, με σκοπό την πληρέστερη εκμετάλλευση των φυσικών και τεχνητών υδατοσυλλογών, καθώς και των δεξαμενών. Επιδιώκεται δηλαδή, με τα διάφορα συστήματα, η επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής παραγωγής με τη συνεχή διατήρηση της καταλληλότητας του νερού για την εκτροφή και την καλλιέργεια των οργανισμών.

1.3.4. Υποξία

Ο όρος της υποξίας είναι δανεισμένος από την ιατρική κοινότητα, ωστόσο, τόσο η έννοια, όσο και οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα είναι οι ίδιες. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την ιατρική η υποξία λαμβάνει χώρα όταν ένα σώμα ή ένα μέρος αυτού στερείται επαρκή ποσότητα οξυγόνου. Το ίδιο όμως μπορεί να συμβεί και σε ένα υδάτινο σώμα. Οι συγκεντρώσεις του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό μπορεί να μειωθούν κάτω από το ποσοστό των 100% του επιπέδου κορεσμού μέσω της διεργασίας της αναπνοής. Το οξυγόνο αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες, αν όχι το σημαντικότερο, για τη διαβίωση όλων των ψαριών και των ασπόνδυλων σε υδάτινα περιβάλλοντα. Εισέρχεται σε αυτά είτε απευθείας μέσω της ατμόσφαιρας, είτε παράγεται μέσω του φυτοπλαγκτόν (Diaz, 2001). Εφόσον διαλυθεί στα επιφανειακά ύδατα, μεταφέρεται προς τα βαθύτερα στρώματα μέσω της μίξης και καλύπτει τις ανάγκες για αναπνοή, όλων των ειδών ακόμη και αυτών που ζουν πολύ κοντά στον πυθμένα.

Οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου στην υδάτινη στήλη εξαρτώνται άμεσα από την ισορροπία μεταξύ των βιο-γεωχημικών διεργασιών (κατά τις οποίες παράγεται ή καταναλώνεται οξυγόνο στην υδάτινη στήλη και στο ίζημα του πυθμένα), από την ανταλλαγή οξυγόνου μεταξύ της ατμόσφαιρας και της θάλασσας αλλά και από τη φυσική του μεταφορά (Pena et al., 2010).

Στην περίπτωση που η παροχή του οξυγόνου διακοπεί προς τα βαθύτερα στρώματα ή ακόμη και όταν ο ρυθμός κατανάλωσης είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό παραγωγής του, τότε η συγκέντρωση του οξυγόνου μειώνεται κάτω από το επίπεδο διατήρησης της ζωής για πολλά είδη. Συμπερασματικά, οποιαδήποτε αλλαγή στην πιο πάνω ισορροπία, μπορεί να προκαλέσει μείωση του οξυγόνου σε ποσοστό κάτω από τα επιτρεπτά όρια για τη διαβίωση των περισσότερων ειδών, κατάσταση γνωστή ως υποξία. Τα πρώτα συμπτώματα υποξίας εμφανίζονται όταν οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου είναι μικρότερες από 2 mg/L. Η παντελής έλλειψη οξυγόνου, δηλαδή συγκέντρωση ίση με 0 mg/L καλείται ανοξία (Diaz, 2001).

1.3.5. Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου και καταπόνηση ιχθύων

Δεδομένου ότι η συγκέντρωση διαλυμένου στο νερό οξυγόνου αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τους ιχθύες, η επιλογή της τοποθεσίας εγκατάστασης των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειών πρέπει να γίνεται με γνώμονα την κίνηση του νερού και την ύπαρξη παλιρροϊκών ρευμάτων στη συγκεκριμένη υδάτινη περιοχή (Papoutsoglou, 1989). Τα επίπεδα οξυγόνου εντός των κλωβών εξαρτώνται από την ύπαρξη των προαναφερθέντων ρευμάτων, αλλά διαμορφώνονται και ανάλογα με την επικρατούσα ιχθυοπυκνότητα (Boeden, 2008).

Πολλές φορές, ιδιαίτερα το καλοκαίρι, έχει παρατηρηθεί σε ευτροφικά περιβάλλοντα, ότι η συγκέντρωση του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου πέφτει κάτω από τα 2mg/L. Κατά τις ήρεμες ημέρες όπου επικρατεί άπνοια η ανανέωση του νερού είναι ελάχιστη, και είναι δυνατό να παρατηρηθεί το φαινόμενο η συγκέντρωση του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου εντός των κλωβών να μειωθεί φτάνοντας σε χαμηλά επίπεδα προκαλώντας καταπόνηση στους ιχθύες, ενώ έξω από αυτούς η συγκέντρωση του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου να είναι ικανοποιητική. Σε τέτοιες και άλλες παρόμοιες περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητη η χρήση τεχνητού αερισμού και αντλιών για την οξυγόνωση και την αύξηση της κυκλοφορίας του νερού, με μόνο περιορισμό το σημείο που θα τοποθετηθούν, το οποίο θα πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να μεγιστοποιεί τα οφέλη της χρήσης τους και να μη δημιουργεί τυχόν καταπόνηση στους ιχθύες (καταπόνηση από μεγάλη ένταση φυσαλίδων που απελευθερώνονται στο νερό μέσω των αντλιών) (Lazar, 2000).

Σε περίπτωση μείωσης του επιπέδου του οξυγόνου στους ιχθύες, το ερέθισμα από ειδικούς υποδοχείς του πρώτου βράγχιου προκαλεί μέσω του ενάτου και δεκάτου

εγκεφαλικού νεύρου αντίδραση του αυτόνομου νευρικού συστήματος, η οποία εκδηλώνεται με βραδυκαρδία και συγχρονισμό των χτύπων της καρδιάς και των αναπνευστικών κινήσεων, με σκοπό την πληρέστερη αξιοποίηση του οξυγόνου. Συγχρόνως προκαλείται σύσπαση των περιφερειακών αιμοφόρων αγγείων, η οποία ακολουθείται από αύξηση της πίεσεων του αίματος που με τη σειρά της προκαλεί αύξηση της κυκλοφορίας του στα βράγχια και επομένως αύξηση της πραγματικής αναπνευστικής επιφάνειας, που συμβάλει στην πληρέστερη αξιοποίηση των χαμηλών ποσοστών του οξυγόνου στο νερό (Papoutsoglou, 1998).

1.4. Καταπόνηση των ιχθύων (στρες)

Είτε οι ιχθύες εκτρέφονται σε κλωβούς στη θάλασσα είτε διαβιούν ελεύθεροι, πρέπει να υιοθετήσουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών συμπεριφορών και βιοχημικών προσαρμογών που επιβάλλονται από τις αλλαγές που συμβαίνουν στο υδάτινο περιβάλλον.

Σύμφωνα με τον ορισμό του Brett (1958), το σύνολο των γεγονότων που οδηγούν τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού να αποκλίνουν από εκείνες της ομοιοστασίας του, είναι γνωστό ως καταπόνηση (στρες) (Schreck, 1996). Ο Hans Sdey ανακάλυψε πρώτος το 1936 ότι το stress μπορεί να επηρεάσει την υγεία των ζώων, παρατήρηση που ισχύει και για τους ιχθύες (Schreck, 1996).

Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τρόποι για να προσδιοριστεί ο όρος στρες. Συγκεκριμένα υπάρχουν τουλάχιστον 3 βασικοί κύριοι τρόποι ερμηνείας (Butler, 1993).

- 1) Ερμηνεία βασισμένη στο ερέθισμα.
- 2) Ερμηνεία με βάση την απόκριση.
- 3) Το stress σαν μια δυναμική διαδικασία.

Η πρώτη άποψη υποστηρίζει ότι το stress είναι αποτέλεσμα πίεσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η πίεση τόσο μεγαλύτερο θα είναι το αποτέλεσμα για τον οργανισμό. Όταν το εξωτερικό ερέθισμα ξεπεράσει κάποια όρια, η κατάρρευση είναι αναπόφευκτο γεγονός. Η εξήγηση αυτή εστιάζεται σε εξωτερικές πηγές στρες και περιλαμβάνει την συσσωρευτική του φύση. Η πρόσθεση ενός επιπλέον στρεσογόνου παράγοντα μπορεί

προκαλέσει μικρή απόκριση του οργανισμού αλλά από την άλλη μπορεί να είναι αρκετή για να οδηγηθεί το σύστημα σε κατάρρευση (Butler, 1993).

Η δεύτερη άποψη εστιάζεται στο stress ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα (Selye, 1956). Συγκεκριμένα μετρήθηκε το stress αναφορικά με τις φυσιολογικές αποκρίσεις του οργανισμού, μετά από κάποιο ερέθισμα. Ο Selye παρατήρησε αυτό που ονόμασε “General Adaptation Syndrome” (GAS) κατά το οποίο μια φυσιολογική διαδικασία περνάει από 3 βασικά στάδια. Αρχικά ο οργανισμός προειδοποιείται και αντιδρά με μια συγκριμένη απόκριση. Στη συνέχεια, πυροδοτούνται αυτόνομες δραστηριότητες καθώς ο οργανισμός προετοιμάζεται για να αντιμετωπίσει το στρες. Το στάδιο αυτό αποτελεί το στάδιο της αντίστασης. Τελικά, εάν το στρες συνεχίσει να υφίσταται και ξεπεράσει το όριο ανοχής του οργανισμού, τότε ο οργανισμός οδηγείται σε κατάρρευση, κάτι το οποίο ονομάστηκε σαν στάδιο εξουθένωσης. Η άποψη αυτή συνεισέφερε αρκετά στην όλη θεώρηση του στρες. Η διάρκεια του σταδίου ανοχής εξαρτάται από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία είναι διαφορετικά ανάλογα με τον οργανισμό που δέχεται το στρες (Butler, 1993).

Η τρίτη άποψη ερμηνεύει το στρες σαν μια δυναμική διαδικασία η οποία αντικατοπτρίζει τόσο εσωτερικούς όσο και εξωτερικούς παράγοντες (Lazarus and Folkman, 1984). Η άποψη αυτή προέρχεται από την βαθύτερη κατανόηση των παραγόντων που εμπλέκονται στην διαδικασία στην οποία υποβάλλεται ο οργανισμός μέσω του στρες. Το στρες σύμφωνα με τους δυο επιστήμονες αποτελεί μια συγκεκριμένη σχέση μεταξύ του οργανισμού και του περιβάλλοντός το οποίο αξιολογείται από το άτομο ως αρκετό ή ελλειμματικό για την διατήρηση της ύπαρξης του.

1.4.1. Αντίδραση των ιχθύων σε στρεσογόνες καταστάσεις

Η επίδραση του στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων είναι ίσως ένα από τα περισσότερο μελετημένα αλλά παρόλα αυτά λιγότερο κατανοητά ζητήματα της βιολογίας τους. Ο όρος στρεσογόνος παράγοντας είναι δύσκολο να οριστεί σε αντιστοιχία με τις επιπτώσεις του στην υγεία των ιχθύων. Στην πραγματικότητα είναι δύσκολο να καθορίσουμε τι είναι το στρες. Η αναγνώρισή του γίνεται με τη διαπίστωση των αποτελεσμάτων του. Έντονη διαφοροποίηση αβιοτικών κυρίως παραγόντων (ποιότητα νερού, εφαρμοζόμενοι χειρισμοί), είναι δυνατό να εξαντλήσει ακόμη και όλα τα άτομα ενός πληθυσμού (de Kloet et al., 2005).

Απότομες αλλαγές στη θερμοκρασία, την αλατότητα, τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου αποτελούν συνήθεις στρεσογόνους παράγοντες που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων (Rise and Arkoosh, 2002). Οι στρεσογόνοι αβιοτικοί παράγοντες σχετίζονται και με τον τρόπο χειρισμού και λειτουργίας της μονάδας. Έτσι ο καθαρισμός των δεξαμενών ή των κλωβών, η διαλογή των ιχθύων ανάλογα με το μέγεθός τους, οι δειγματοληψίες ιχθύων και νερού, η συχνότητα και ο τρόπος παροχής της τροφής, ακόμη και ο εμβολιασμός των ιχθύων αποτελούν παράγοντες, η εφαρμογή των οποίων έμμεσα ή άμεσα επιδρά στην τελική παραγωγή της ιχθυομονάδας (Lumden et al., 1998).

Οι στρεσογόνες καταστάσεις οδηγούν σε μια αλληλουχία αντιδράσεων μέσω του νευρικού και του ενδοκρινικού συστήματος, οι οποίες προκαλούν παύση των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθύων και αλλαγές στη φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών τους. Οι επιστήμονες γνωρίζουν καλά ότι στρεσογόνες καταστάσεις αυξάνουν τα περιστατικά λοιμωδών ασθενειών, καταλήγοντας συχνά σε σημαντικές απώλειες για τις επιχειρήσεις. Η κλασσική φυσιολογική αντίδραση των ιχθύων στο στρες, περιλαμβάνει τυπικά την πρόκληση ωσμωτικής ανισορροπίας, λόγω της συνεχούς αύξησης της διαπερατότητας των επιθηλιακών κυττάρων του δέρματος και των βραγχίων (Wendelaar et al., 1997) και την έκλυση κατεχολαμινών και κορτιζόλης (Pichening and Portinger, 1989). Όταν παραβιάζεται η φυσιολογική ακεραιότητα ενός ατόμου συχνά επέρχεται ανοσοκαταστολή. Η κατάσταση αυτή οδηγεί σε εξάρσεις ασθενειών από παθογόνους που προϋπήρχαν ήδη στο περιβάλλον διαβίωσης των ιχθύων, οι οποίοι τα κρατούσαν σε ανάσχεση (Rice and Arkoosh, 2002).

Ανάλογα με το βαθμό έντασης του στρεσογόνου παράγοντα (δόση και χρόνος εφαρμογής) έχουμε συνέπειες όπως ανοσοκαταστολή και μείωση της ικανότητας αντίστασης στις ασθένειες, καθυστέρηση της ανάπτυξης, προβλήματα αναπαραγωγής ή ακόμη και θάνατος (Person-Le Ruyet, 2003). Συμπτώματα όπως ανορεξία των ιχθύων και χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου στο αίμα τους μπορεί να είναι οι πρώτες ενδείξεις αντίστοιχων καταστάσεων.

Σήμερα, με τα διάφορα συστήματα εκτροφής που εφαρμόζονται, επιδιώκεται η αυξημένη ανάπτυξη των υδρόβιων οργανισμών κάτω από ελεγχόμενες, μη στρεσογόνες συνθήκες. Δημιουργείται δηλαδή μια κατάσταση της οποίας κύριο

χαρακτηριστικό είναι η διαρκής επιδίωξη της παρουσίας, των κατάλληλων για κάθε οργανισμό, συνθηκών νερού που σε συνδυασμό με την εφαρμογή των ενδεδειγμένων χειρισμών και την ελεγχόμενη διατροφή αυτού, οδηγούν στο επιθυμητό οικονομικό αποτέλεσμα (Papoutsoglou, 1985).

1.4.2. Η απόκριση του εγκεφάλου στο οξύ στρες

Κατά την έκθεση του οργανισμού σε κάποιον στρεσογόνο παράγοντα ενεργοποιείται το σύστημα “Υποθάλαμος-Υπόφυση-Επινεφρίδια” (HPA). Το σύστημα HPA πυροδοτεί την παραγωγή και έκκριση στεροειδών ορμονών (γλυκοκορτικοειδή), συμπεριλαμβανομένης και της κορτιζόλης, της κύριας ορμόνης που σχετίζεται με το στρες (Ranabir and Reetu 2011). Η κορτιζόλη είναι πολύ σημαντική για την οργάνωση των συστημάτων μέσα στον οργανισμό έτσι ώστε ο οργανισμός να αντιμετωπίσει τον στρεσογόνο παράγοντα άμεσα. Παράλληλα με την κορτιζόλη, παρατηρείται απελευθέρωση συγκεκριμένων κατεχολαμινών. Αυτές είναι η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη και η αδρεναλίνη. Οι ορμόνες αυτές ενεργοποιούν μια συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου, την αμυγδαλή, η οποία είναι υπεύθυνη για την δημιουργία συναισθηματικής φόρτισης αναφορικά με το στρεσογόνο ερέθισμα. Εκτός από τις κατεχολαμίνες παρατηρείται απελευθέρωση του νευροπεπτιδίου S, το οποίο είναι μια μικρή πρωτεΐνη που ρυθμίζει τα επίπεδα εγρήγορσης του οργανισμού. (Dias-Ferreira et al.,2009)

Οι τραυματισμοί λόγω καταπόνησης βρίσκονται ανάμεσα στις πιο καταστροφικές καταστάσεις που μπορεί να συμβούν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) των ιχθύων, προκαλώντας αιμορραγίες οι οποίες μπορούν να αποβούν μοιραίες για τη ζωή των ιχθύων. Σε κυτταρικό επίπεδο ένα από τα χαρακτηριστικά του τραυματισμού στο ΚΝΣ είναι η μαζική απώλεια πολλαπλών κυτταρικών τύπων. Καθώς το ενήλικο νευρικό σύστημα εμφανίζει περιορισμένο δυναμικό αναγέννησης, η απώλεια αυτή σε κύτταρα οδηγεί συχνά σε μακροχρόνια ανικανότητα. Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί μια αποτελεσματική θεραπεία η οποία θα μπορέσει να ξεπεράσει την αδυναμία αυτή του ΚΝΣ των ιχθύων (Zuranc and Sîrbulescu, 2013).

1.5. Νευρικός ιστός ιχθύων

Ο νευρικός ιστός προέρχεται από το εξώδερμα και διακρίνεται σε:

- Κεντρικό νευρικό σύστημα (εγκέφαλος, νωτιαίος μυελός), και

- Περιφερικό νευρικό σύστημα (νεύρα, νευρικά γάγγλια)

Ο νευρικός ιστός αποτελείται από:

- νευρικά κύτταρα ή νευρώνες (κινητικοί, αισθητήριοι, διάμεσοι)
- και νευρογλοιακά κύτταρα ή νευρογλοία.

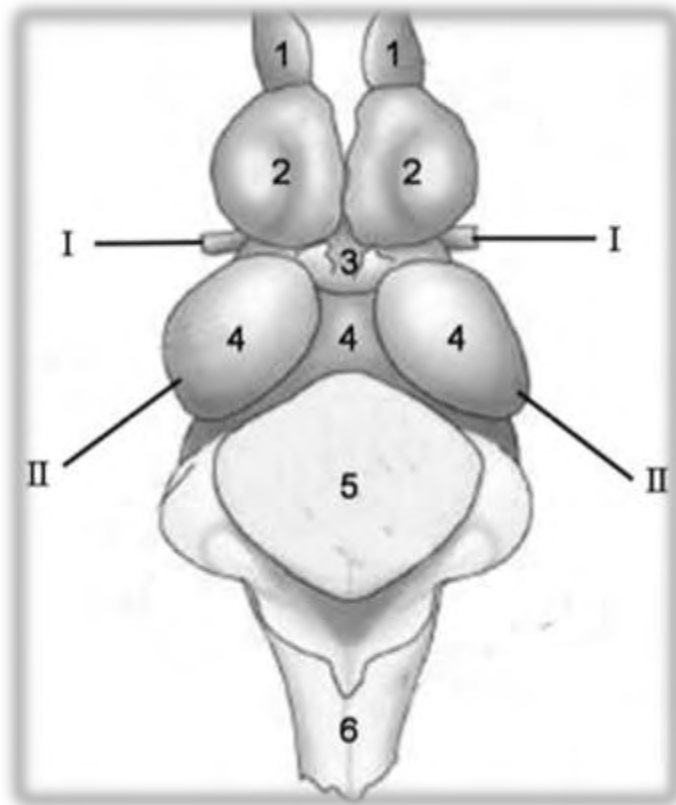
Οι δυο θεμελιώδεις λειτουργίες του νευρικού συστήματος είναι:

1) Να συλλέγει, αναλύει, αξιοποιεί, και μεταβιβάζει τις πληροφορίες που παράγονται από τα αισθητικά ερεθίσματα και από τις χημικές αλλαγές που γίνονται στο εσωτερικό και εξωτερικό περιβάλλον, και

2) Να οργανώνει και συντονίζει, άμεσα ή έμμεσα, τις περισσότερες λειτουργίες που έχει το σώμα (ειδικά τις κινητικές, σπλαχνικές, ενδοκρινικές δραστηριότητες) (Mylonas, 2002).

1.5.1. Στοιχεία Βασικής και Λειτουργικής Νευροανατομίας των Τελεόστεων

Η βασική λειτουργική και ανατομική οργάνωση του εγκεφάλου των τελεόστεων ιχθύων ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με αυτό των υπολοίπων σπονδυλωτών (Igarashi & Kamiya 1972, Romer & Parsons 1978). Κατά τον προσθοπίσθιο άξονα ο εγκέφαλος διαχωρίζεται σε συγκεκριμένα διακριτά τμήματα όπως είναι ο προσεγκέφαλος, ο μεσεγκέφαλος και ο οπίσθιος ή ρομβοειδής εγκέφαλος. Ο προσεγκέφαλος αποτελείται από τον τελεγέφαλο και τον διεγέφαλο, ενώ ο ρομβεγκέφαλος χωρίζεται στον μετεγέφαλο και στον μυελεγέφαλο (Εικ.1).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση ραχιαίας όψης εγκεφάλου ιχθύων. 1: Οσφρητικοί λοβοί, 2: Τελεγκεφάλος, 3: Διεγκεφάλος, 4: Μεσεγκεφάλος, 5: Παρεγκεφαλίδα, 6: Προμήκης μυελός, I: Οπτικά νεύρα, II: Οπτικοί λοβοί

Το ραχιαίο τμήμα του τελεγκεφάλου θεωρείται ότι είναι ομόλογο του φλοιού (pallium) των θηλαστικών, ενώ το κοιλιακό τμήμα θεωρείται ότι αποτελεί ομόλογη της υποφλοιικής (subpallium) περιοχής των θηλαστικών. Από νευροανατομικές μελέτες, καθώς και μελέτες ηλεκτροφυσιολογίας και συμπεριφοράς, προέκυψε ότι η μέση περιοχή του ραχιαίου τμήματος του τελεγκεφάλου, καθώς και η πλάγια περιοχή του ραχιαίου τελεγκεφάλου, αποτελούν ομόλογες περιοχές με το αμυγδαλοειδές σώμα και τον ιππόκαμπο των θηλαστικών αντίστοιχα (Braford 1995, Butler 2000, Portavella et al., 2002).

Οπισθίως και κοιλιακώς του τελεγκεφάλου εντοπίζεται ο διεγκεφάλος ο οποίος διαχωρίζεται σε τέσσερις περιοχές: στον επιθάλαμο, στον ραχιαίο θάλαμο, στον

κοιλιακό θάλαμο και στον υποθάλαμο (Meek & Nieuwenhuys, 1998). Ο διεγκέφαλος των τελεόστεων, και ειδικότερα οι θαλαμικές περιοχές αποτέλεσαν αντικείμενο έντονης αντιπαράθεσης όσο αφορά στις αντιστοιχίες τους με τις ομόλογες περιοχές του θαλάμου των χερσαίων σπονδυλωτών.

Ο επιθάλαμος (Epirhthalmus), αποτελεί το πιο ραχιαίο και πρόσθιο τμήμα του διεγκεφάλου και περιλαμβάνει την ηνία (Habenular), την επίφυση, και τον ραχιαίο σάκο των τελεόστεων (Striedter, 1990). Η επίφυση (Pineal organ, Epirhyse) στους τελεόστεους ιχθύες είναι φωτοδεκτικό όργανο το οποίο συμβάλει στη διαμόρφωση της αντίληψης της φωτοπεριόδου (Ekström, 1987). Ο υποθάλαμος εντοπίζεται νωτιαία του πρόσθιου εγκεφάλου και είναι σε επαφή με την υπόφυση (Hypophyse, pituitary). Ο υποθάλαμος των τελεόστεων ιχθύων είναι μεγάλου μεγέθους και περικλείει τμήμα της τρίτης κοιλίας. Επιπρόσθετα, αποτελεί σημαντικό λειτουργικό τμήμα του εγκεφάλου μιας και μετέχει σε πολλές σημαντικές λειτουργίες κυρίως ως σύστημα ελέγχου και ρύθμισης των ορμονικών εκκρίσεων. Στο πρόσθιο τμήμα του υποθάλαμου υπάρχει μια περιοχή μετάβασης από τον τελεγκέφαλο στον διεγκέφαλο, η οποία καλείται προοπτική περιοχή. Οι προοπτικοί πυρήνες είναι εξέχουσας σημασίας καθώς φέρονται να εμπλέκονται σε σημαντικές και βασικές λειτουργίες του οργανισμού όπως είναι η αναπαραγωγική συμπεριφορά, η επιθετικότητα, η αίσθηση της πείνας, και το στρες (Demski & Knigge, 1971).

Στον διεγκέφαλο εντοπίζεται ο αγγειακός σάκος (saccus vasculosus), του οποίου η λειτουργία δεν είναι πλήρως γνωστή (Kent 1992). Ωστόσο πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην αντίληψη των μεταβολών της πίεσης του νερού κινούμενο σε μεγαλύτερα βάθη. Στον μεσεγκέφαλο εντοπίζονται η μεσεγκεφαλική καλύπτρα (*tegmentum*), η οπτική καλύπτρα (*tectum opticum*), το διαμήκες κέρασ (*longitudinal torus*), και το ημικυκλικό κέρασ (*torus semicircularis*). Η οπτική καλύπτρα, η οποία αποτελεί κύριο σταθμό επεξεργασίας των οπτικών ερεθισμάτων, θεωρείται ομόλογη των πρόσθια διδύμιων (*superior colliculus*) (Wullimann & Vernier 2007) των θηλαστικών και αποτελείται από στοιβάδες. Η εξωτερική στοιβάδα SM (*marginal layer*) αποτελείται από πολλές μικρές αμμύελες ίνες που προέρχονται από τα κύτταρα του δακτυλοειδή πυρήνα. Ακολουθεί η SO στοιβάδα (*stratum opticum*) η οποία σχηματίζεται από ίνες του αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού, έπειτα ακολουθεί η SFGS (*stratum fibrosum et griseum superficiale*) στοιβάδα, και η SGC στοιβάδα (*stratum griseum centrale*) και κατόπιν η στοιβάδα SAC (*stratum album centrale*) η οποία διαθέτει

εμμύελες ίνες και έπειτα η περικοιλιακή στοιβάδα που λέγεται SPV (stratum periventriculare) η οποία αποτελείται από μικρούς πυκνά διατεταγμένους περικοιλιακούς νευρώνες (Meek & Nieuwenhuys 1998). Ο προμήκης μυελός είναι το υπεύθυνο όργανο για την αναπνοή, για τη ρύθμιση και έλεγχο του κυκλοφορικού συστήματος καθώς και για τον συντονισμό των κινήσεων του σώματος.

Μια σημαντική διαφορά των ιχθύων με τα υπόλοιπα σπονδυλωτά αποτελεί η έλλειψη δύο ζευγών εγκεφαλικών νεύρων του υπογλώσσιου (hypoglossal, XII) και του παραπληρωματικού (spinal accessory, XI) (Wullimann & Vernier 2007).

Η παρεγκεφαλίδα στους τελεόστεους ιχθύες αποτελείται από τρία τμήματα, την πρόσθια ή βαλβιδική παρεγκεφαλίδα η οποία διακρίνεται σε μέση και σε πλάγια, στο παρεγκεφαλιδικό σώμα και στο πλάγιο αιθουσαίο λοβό ο οποίος περιλαμβάνει και το μέσο οπίσθιο λοβό της παρεγκεφαλίδας. Το παρεγκεφαλιδικό σώμα θεωρείται ομόλογο του παρεγκεφαλιδικού σκόληκα (vermis) των θηλαστικών (Ito 1978). Αντίθετα η βαλβιδική ή πρόσθια παρεγκεφαλίδα είναι μοναδική δομή των ακτινοπερυγίων ιχθύων και δεν φαίνεται να είναι ομόλογη με καμία παρεγκεφαλιδική δομή των υπολοίπων σπονδυλωτών (Wullimann & Northcutt 1989). Η οργάνωση της παρεγκεφαλίδας είναι αντίστοιχη με αυτή των υπολοίπων σπονδυλωτών (Butler & Hodos 1996). Εξωτερικά τοποθετείται η μοριώδης στοιβάδα, ακολουθεί η γαγγλιακή στοιβάδα (ganglionic layer) των κυττάρων Purkinje η οποία ακολουθείται από τη κοκκιώδη στοιβάδα της παρεγκεφαλίδας (Ito 1984, Butler & Hodos 1996).

Το κεντρικό νευρικό σύστημα των ιχθύων έχει σχέση με τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Ο εγκέφαλος δεν είναι πολύ ανεπτυγμένος και ποικίλλει από είδος σε είδος. Αρκετά ανεπτυγμένοι οι οσφρητικοί λοβοί και οι οπτικοί θάλαμοι του εγκέφαλου, όπως και η παρεγκεφαλίδα (τέλεια ανάπτυξη) που είναι η έδρα του κέντρου ισορροπίας και συντονισμού των κινήσεων. Ο νωτιαίος μυελός είναι προέκταση του εγκέφαλου και βρίσκεται σ' όλο το μήκος του σώματος των ιχθύων μέσα στο νευρικό σωλήνα που σχηματίζουν οι σπόνδυλοι. Παρακάτω παρουσιάζεται η ιστολογική απεικόνιση του εγκεφάλου *Dicentrarchus labrax* του πειράματός μας (εικόνα 1.1), με αριθμημένα τα μέρη στα οποία χωρίζεται ο εγκέφαλος των τελεόστεων ιχθύων.



Εικόνα 1.1: Ιστολογική απεικόνιση οριζόντια τομής εγκεφάλου *Dicentrarchus labrax* του πειράματός μας 1. Τελεγκέφαλος. 2. Διεγκέφαλος. 3. Μεσεγκέφαλος. 4. Παρεγκεφαλίδα. 5. Μυελεγκέφαλος

Ο τραυματισμός του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος αποτελεί καταστροφικό γεγονός για τους περισσότερους οργανισμούς. Αυτό οφείλεται στο ότι οι οργανισμοί αυτοί, ανάμεσα τους και τα θηλαστικά, εμφανίζουν σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς, εξαιρετικά μικρό δυναμικό αναγέννησης του νευρικού ιστού (Tsarouchas, 2014). Ο κυριότερος λόγος είναι ότι για να γίνει επιδιόρθωση χρειάζεται ο οργανισμός νέα κύτταρα. Όμως στο ενήλικο νευρικό σύστημα των περισσότερων οργανισμών ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι περιορισμένος σε συγκεκριμένες περιοχές και δεν μπορεί να καλύψει τις ανάγκες του εγκεφάλου ύστερα από κάποια διαταραχή της δομής του. Σημαντική αντίθεση σε αυτό αποτελούν οι τελεόστειοι ιχθύες όπως και διάφορα άλλα σπονδυλωτά (πχ αμφίβια), οι οποίοι χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά υψηλό δυναμικό αναγέννησης και διαφοροποίησης του νευρικού ιστού τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες, όσο και μετά από κάποιον τραυματισμό. Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα των συγκεκριμένων οργανισμών είναι ο συνεχής κυτταρικός πολλαπλασιασμός και στην ενήλικη ζωή σε πάρα πολλές περιοχές του ΚΝΣ.

2. Υλικά και μέθοδοι

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας ήταν η ιστολογική μελέτη εγκεφάλου λαβρακιών από κανονικά αεριζόμενο κλωβό και από κλωβό με πρόσθετη παροχή αέρα, ώστε να προβούμε στο συμπέρασμα για το αν υπήρχαν τυχόν αλλοιώσεις και αιμορραγίες λόγω της πρόσθετης οξυγόνωσης του νερού η οποία στρεσάρει τους ιχθύες.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν από μια μονάδα εκτροφής συνολικά 20 ενήλικα αρσενικά άτομα λαβρακιού. 10 άτομα λαβρακιού από κλωβό χωρίς πρόσθετη παροχή αέρα (κλωβός αναφοράς) και 10 άτομα λαβρακιού από κλωβό με επιπλέον παροχή αέρα για συγκεκριμένες ώρες την ημέρα για 37 ημέρες (περίοδος 13 Αυγούστου – 18 Σεπτεμβρίου 2014). Οι δειγματοληψίες χωρίστηκαν σε δύο στάδια κατά τα οποία ελήφθησαν 5 ιχθύες από κάθε κλωβό. Η πρώτη δειγματοληψία έλαβε χώρα μετά από 19 ημέρες με επιπλέον παροχή αέρα (28 Αυγούστου 2014) και η δεύτερη μετά από 37 ημέρες με επιπλέον παροχή αέρα (18 Σεπτεμβρίου 2014). Ο εγκέφαλος όλων των ατόμων μελετήθηκε ιστολογικά για τυχόν αιμορραγίες και αλλοιώσεις. Η συγκέντρωση του οξυγόνου στον επιπλέον αεριζόμενο κλωβό μετρήθηκε καθ όλη τη χρονική διάρκεια του πειράματος με οξυγονόμετρα, (ο πίνακας των μετρήσεων παρατίθεται στα αποτελέσματα της εργασίας). Έπειτα από τις απαιτούμενες ιστολογικές διαδικασίες τα δείγματα ήταν σε θέση να μελετηθούν μικροσκοπικά. Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με τα χαρακτηριστικά των ιχθύων του πειράματός μας (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Μετρήσεις ολικού βάρους και ολικού μήκους των ιχθύων του πειράματός μας (Όπου control: κλωβός αναφοράς, Airx: Αεριζόμενος κλωβός).

1 ^η Δειγματοληψία (28 Αυγούστου)			2 ^η Δειγματοληψία (18 Σεπτεμβρίου)		
	Ολικό μήκος (cm)	Ολικό βάρος (gr)		Ολικό μήκος (cm)	Ολικό βάρος (gr)
Κλωβός αναφοράς (Control)	35,5 ± 1,8	512,8 ± 91,8	Κλωβός αναφοράς (Control)	38,8 ± 2,2	511 ± 71
Αεριζόμενος κλωβός (Airx)	35,4 ± 1,0	466,5 ± 48,2	Αεριζόμενος κλωβός (Airx)	36,4 ± 1,9	638 ± 67

Κάθε τμήμα του εγκεφάλου στα δείγματα των κλωβών αναφοράς καθώς και τα δείγματα από τον αεριζόμενο κλωβό, μελετήθηκαν για τυχόν αλλοιώσεις και αιμορραγίες ώστε να προβούμε στο συμπέρασμα εάν ο πρόσθετος αερισμός του νερού επιφέρει ιστολογικές αλλοιώσεις.

2.1. Στάδια των τεχνικών ιστολογίας

Προκειμένου να είμαστε σε θέση να μελετήσουμε τα τμήματα εγκεφάλου των ιχθύων του πειράματός μας, ακολουθήθηκαν οι παρακάτω διαδικασίες:

1. Συλλογή και επεξεργασία ιστολογικού δείγματος
2. Μονιμοποίηση του ιστού
3. Επεξεργασία του ιστού (Αφυδάτωση, Διαύγαση, Σκλήνωση)
4. Λήψη τομών
5. Χρώση
6. Παρατήρηση

2.1.1. Συλλογή & επεξεργασία ιστολογικού δείγματος

Στο πρώτο στάδιο είχαμε συλλογή, καταγραφή, ταξινόμηση και μακροσκοπική εξέταση του υλικού. Με τη χρήση λαβίδας και νυστεριού και συλλέχθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή οι εγκέφαλοι από τα 20 λαβράκια του πειράματός μας. Δημιουργήθηκαν τα κατάλληλα δείγματα (δύο τομές ανά εγκέφαλο κατά τον άξονα τελεγκεφάλου-προμήκη μυελού), τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικά καλάθια, αριθμήθηκαν ξεχωριστά (δείγματα κλωβών αναφοράς και δείγματα από τον πρόσθετα αεριζόμενο κλωβό) και αυτά στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε δοχείο με φορμόλη (10%) ώστε να μονιμοποιηθούν.



Εικόνα 2: Απεικόνιση πάγκου εργασίας κατά τη διαδικασία συλλογής των τμημάτων εγκεφάλου προς εξέταση.

2.1.2. Μονιμοποίηση του ιστού

Για την αποφυγή της αποσύνθεσης του ιστού και για να διατηρηθεί η δομή πρέπει ο ιστός να υποστεί κατάλληλη επεξεργασία. Αυτή η επεξεργασία ονομάζεται μονιμοποίηση είναι δυνατόν να γίνει με χημικές ή σπανιότερα με φυσικές μεθόδους.

Κατά την χημική μονιμοποίηση οι ιστοί συνήθως εμβαπτίζονται μέσα σε διαλύματα σταθεροποιητών ή διασυνδεδετικών χημικών ουσιών που ονομάζονται μονιμοποιητικά. Λόγω του ότι το μονιμοποιητικό χρειάζεται κάποιο χρόνο για να διεισδύσει στον ιστό, συνήθως οι ιστοί κόβονται σε μικρότερα κομμάτια πριν από την μονιμοποίηση, ώστε να διευκολυνθεί η ταχεία και έγκαιρη διείσδυση του μονοποιητικού. Η μονιμοποίηση των δειγμάτων εγκεφάλου έγινε αμέσως μετά τη συλλογή του ιστού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η αυτόλυση.

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη μονιμοποίηση είναι:

- pH, (Καλύτερη μονιμοποίηση σε ουδέτερο pH).
- Διαπερατότητα (Αλκοόλες > φορμόλη > φορμαλδεΐδη > υπερμαγγανικά).
- Όγκος μονιμοποιητικού μέσου προς τον ιστό, (10:1 μονιμοποιητή προς ιστό).
- Θερμοκρασία, (Η μονιμοποίηση επιτυγχάνεται σε μέγιστο βαθμό αν λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία πλησίον των 4°C).
- Συγκέντρωση, (Η συγκέντρωση του μονιμοποιητή πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη για αποφυγή αλλοιώσεων του ιστού).
- Χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την αφαίρεση του ιστού μέχρι την μονιμοποίηση.

Δεν υπάρχει τέλεια μονιμοποιητική ουσία.. Η φορμόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα μας, εμφανίζει τα περισσότερα πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων μονιμοποιητικών ουσιών.

2.1.3. Επεξεργασία του ιστού

Προκειμένου να μπορέσουμε να πάρουμε μια λεπτή τομή με τη χρήση μικροτόμου, οι ιστοί θα πρέπει μετά τη μονιμοποίηση να εμποτισθούν με μια ουσία που θα δώσει μια σταθερή συνοχή, απαραίτητη για το κόψιμο. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως με τον εμποτισμό του ιστού σε παραφίνη, αλλά και σε άλλες ουσίες όπως η ρητίνη.

Στο πείραμα μας χρησιμοποιήθηκε παραφίνη. Στην επεξεργασία του ιστού πριν την σκλήνωση (εμποτισμό) προηγούνται 2 κύριες φάσεις:

α) Η αφυδάτωση, και

β) Η διαύγαση.

Ο υγρός μονιμοποιημένος ιστός δεν μπορεί να επεξεργαστεί κατευθείαν με παραφίνη αν δεν αφαιρεθεί πρώτα το νερό. Αυτό επιτυγχάνεται με διαδοχικά εμβάπτισματα σε σειρές από μίγματα αιθανόλης με νερό (συνήθως από 70% μέχρι 100%). Μετά η αιθανόλη αντικαθίσταται από ουσίες με τις οποίες είναι δυνατόν να αναμιχθεί η παραφίνη. Καθώς οι ιστοί εμποτίζονται με το διαλυτικό γίνονται συνήθως διαφανείς και για αυτό το λόγο η φάση αυτή καλείται διαύγαση. Το σύνηθες διαλυτικό που χρησιμοποιείται είναι η ξυλόλη (xylene).

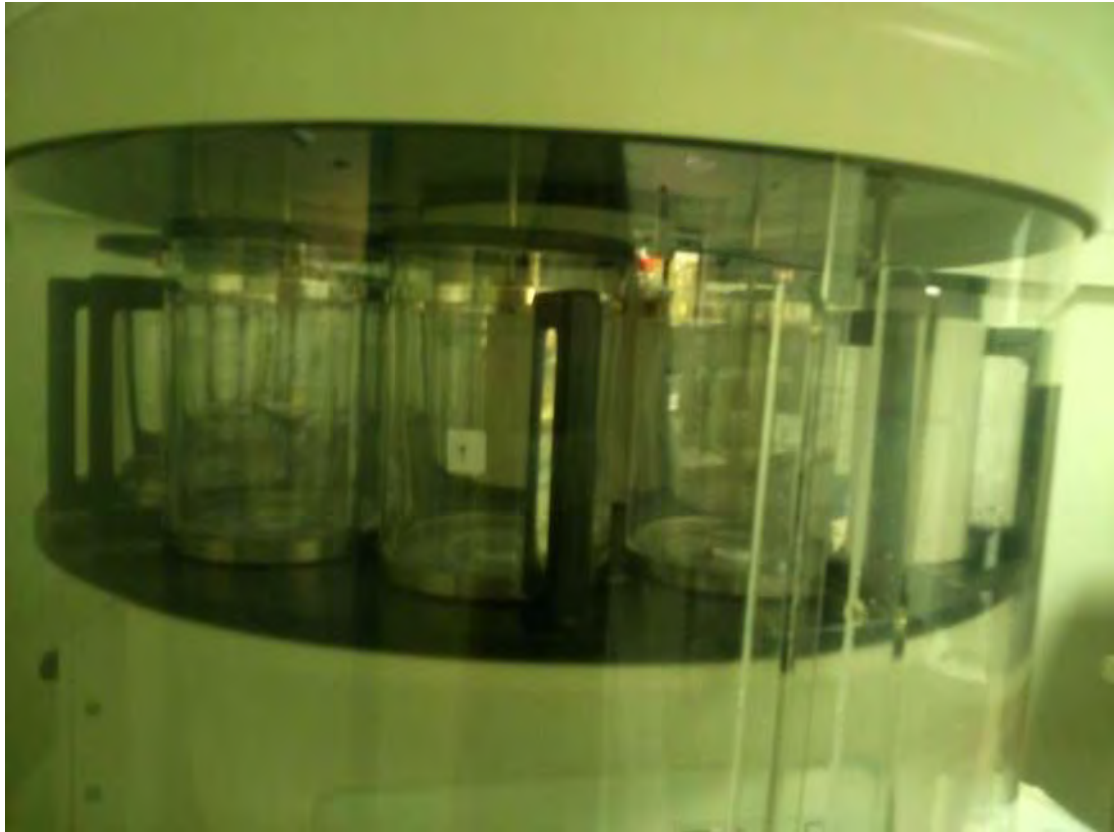
Όταν ο ιστός εμποτισθεί με το διαλυτικό τοποθετείται στη συνέχεια σε λιωμένη παραφίνη (58- 60 °C). Η θερμότητα έχει σαν αποτέλεσμα να εξατμίζεται το διαλυτικό και οι χώροι που αδειάζουν να γεμίζουν με παραφίνη. Αυτή είναι η διεργασία του εμποτισμού ή σκλήνωση. Οι διαποτισμένοι με παραφίνη ιστοί τοποθετούνται σε ειδικές κασέτες έγκλησης.

Η όλη προετοιμασία των δειγμάτων έγινε αυτοματοποιημένα με την χρήση ιστοκινέτας, το πρωτόκολλο της οποίας παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Πρωτόκολλο ιστοκινέτας

ΧΗΜΙΚΑ	ΧΡΟΝΟΣ
Αιθανόλη 70%	1 ώρα
Αιθανόλη 80%	1 ώρα
Αιθανόλη 95%	1 ώρα
Αιθανόλη 95%	2 ώρες
Αιθανόλη 100%	1 ώρα
Αιθανόλη 100%	1 ώρα
Αιθανόλη 100%	2 ώρες
Ευλόλη	2 ώρες
Ευλόλη	2 ώρες
Παραφίνη	2 ώρες
Παραφίνη	4 ώρες

Στην ιστοκινέτα του εργαστηρίου , το πρόγραμμα που επιλέχθηκε ήταν το Νο 5 και διήρκησε 19 ώρες. Μετά το πέρας της διαδικασίας , τα δείγματα ιστών μας ήταν έτοιμα να σκηνωθούν και να τοποθετηθούν σε ανοξειδωτους υποδοχείς έγκλισης των ιστολογικών παρασκευασμάτων σε παραφίνη.



Εικόνα 3: Η ιστοκινέτα του εργαστηρίου.

Τεχνική σκλήρωσης: Αφού ο ιστός διαποτιστεί πλήρως από το διαλύτη, πραγματοποιούμε το βήμα της σκλήρωσης, όπου ο ιστός τοποθετείται μέσα σε λιωμένη παραφίνη με τη βοήθεια ειδικών μεταλλικών καλουπιών. Εν συνεχεία το μπλοκ παραφίνης αφήνεται να κρυώσει και να στερεοποιηθεί..



Εικόνα 4: Σκλήνωση του ιστού.

2.1.4. Λήψη τομών

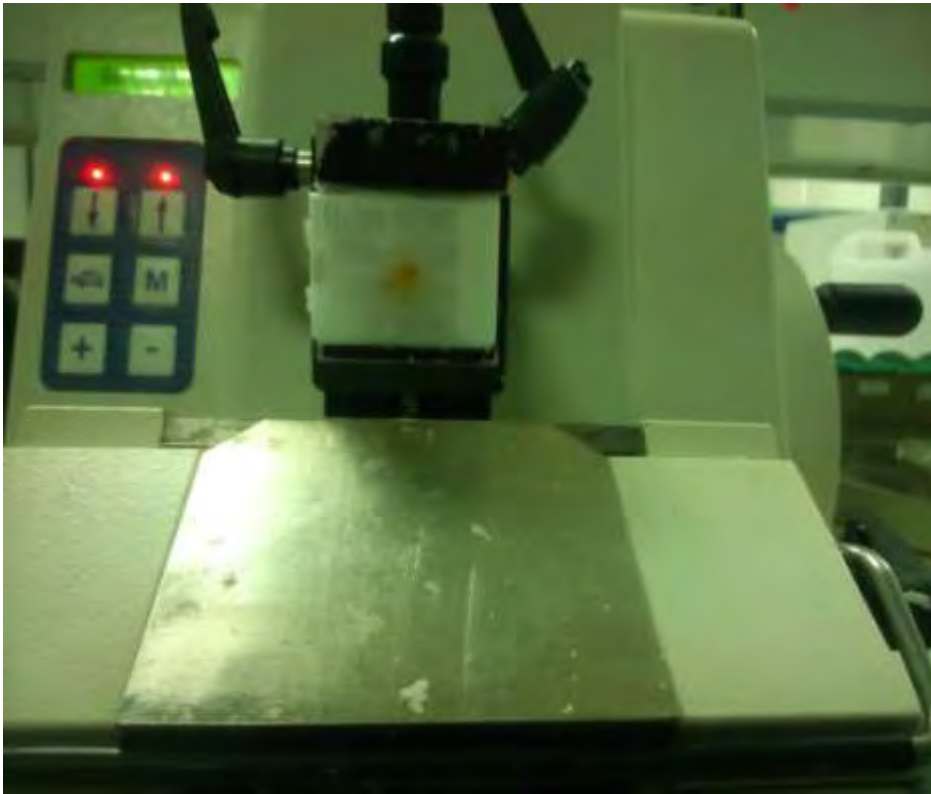
Τέλος, οι σκληροί κύβοι παραφίνης που περιέχουν τους ιστούς κόβονται στη συνέχεια με την ατσάλινη λεπίδα του μικροτόμου σε πάχος από 5-6 μm .

Διαδικασία δημιουργίας τομών - Μικροτόμος

- Τομή :
 - α. Τοποθετούμε την κασετίνα με τον σκληνωμένο ιστό στο μικροτόμο.
 - β. Ρυθμίζουμε την απόσταση της λεπίδας από την κασετίνα όσο πιο κοντά γίνεται χωρίς να ακουμπάει η λεπίδα στην κασετίνα.
 - γ. Ρυθμίζουμε το βήμα κοπής.
 - δ. Γυρίζοντας το χειρομοχλό κινούμε την κασετίνα για να κόψουμε τομές με την λεπίδα.

ε. Παίρνουμε τις τομές και τις τοποθετούμε στο υδατόλουτρο (40°C) έτσι ώστε να ανοίξουν.

Στη συνέχεια τις συλλέγουμε προσεκτικά με γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες. Οι αντικειμενοφόρες τοποθετούνται σε θερμαινόμενη πλάκα..



Εικόνα 5: Δείγμα έτοιμο προς παραγωγή τομής στη μικροτόμο.



Εικόνα 6: Συλλογή τομών από το υδατόλουτρο.



Εικόνα 7: Στέγνωμα ιστολογικών δειγμάτων στην θερμαινόμενη πλάκα.

2.1.5. Χρώση τομών

Με λίγες εξαιρέσεις οι περισσότεροι ιστοί είναι άχρωμοι, γεγονός που δυσκολεύει τη μικροσκοπική τους παρατήρηση. Γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για τη χρώση των ιστών, που επιτρέπουν τόσο τη παρατήρηση των επιμέρους συστατικών του ιστού, αλλά και τη διάκριση ανάμεσα τους. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση μιγμάτων χρωστικών που έχουν τη τάση να χρωματίζουν τα στοιχεία του ιστού περισσότερο ή λιγότερο εκλεκτικά. Οι περισσότερες χρωστικές συμπεριφέρονται σαν βασικές ή όξινες ενώσεις, και έχουν τη τάση να σχηματίζουν άλατα με τις ιονίζουσες ρίζες των ιστών. Από όλες τις χρωστικές, ο συνδυασμός της αιματοξυλίνης και ηωσίνης είναι αυτός που χρησιμοποιείται πιο συχνά.

Προκειμένου οι τομές παραφίνης να παρατηρηθούν μικροσκοπικά ως προς πιθανές αλλοιώσεις στη δομή του οστίτη ιστού, πραγματοποιήθηκε χρώση τους με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Η χρώση αιματοξυλίνης εντοπίζεται πυρηνικά, ενώ η ηωσίνη παράγει κυτταροπλασματική χρώση.

Παρακάτω παρατίθεται το πρωτόκολλο της Αιματοξυλίνης –Ηωσίνης (Πίνακας 4).

Πίνακας 3: Πρωτόκολλο Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης

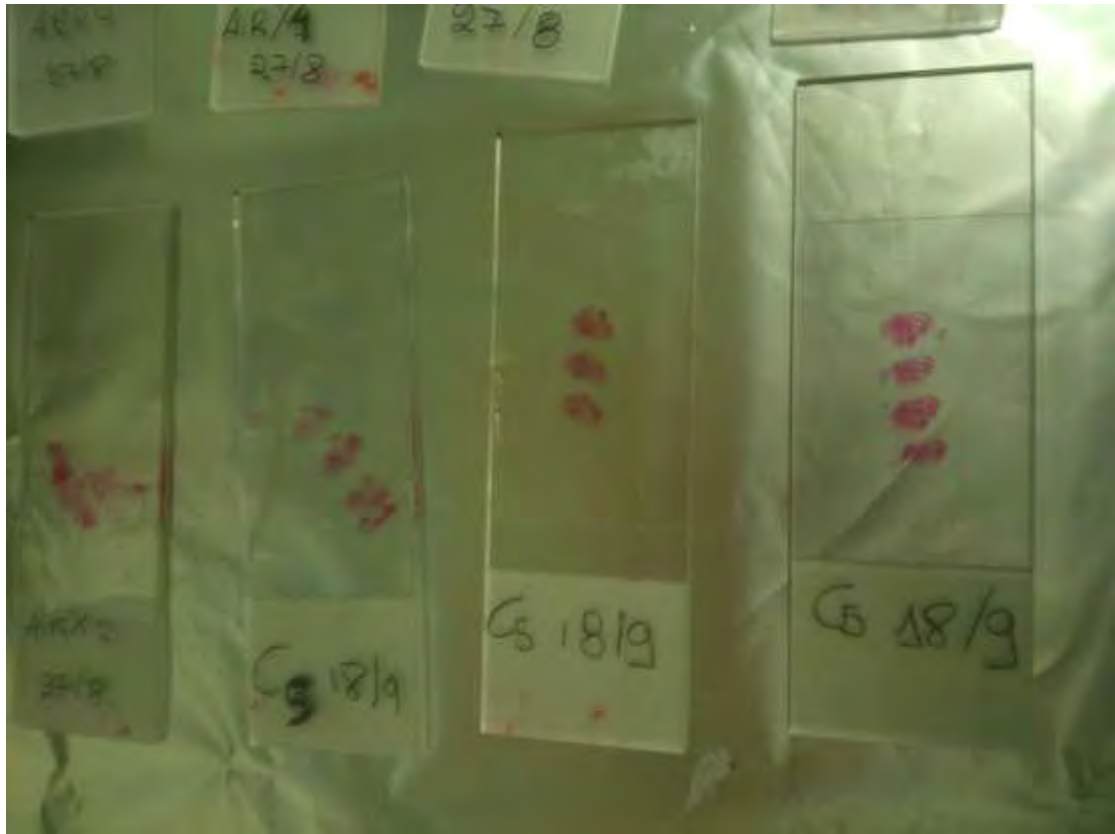
ΧΗΜΙΚΑ	ΧΡΟΝΟΣ
Ξυλόλη	15 λεπτά
Ξυλόλη	15 λεπτά
Αλκοόλη 100%	2 λεπτά
Αλκοόλη 100%	2 λεπτά
Αλκοόλη 96%	2 λεπτά
Αλκοόλη 80%	1 λεπτό
Αλκοόλη 70%	1 λεπτό
Τρεχούμενο νερό βρύσης	2 λεπτά
Αιματοξυλίνη	8 λεπτά
Τρεχούμενο νερό βρύσης	2 λεπτά
Acid alcohol 1%	1-3 εμβαπτίσεις σε νερό βρύσης
Ηωσίνη	3 λεπτά
Νερό βρύσης	30 δευτερόλεπτα
Αλκοόλη 70%	30 δευτερόλεπτα
Αλκοόλη 80%	30 δευτερόλεπτα
Αλκοόλη 96%	30 δευτερόλεπτα x2
Αλκοόλη 100%	2 λεπτά
Αλκοόλη 100%	2 λεπτά
Ξυλόλη	2 λεπτά
Ξυλόλη	2 λεπτά

Αρχικά, έγινε αποπαραφίνωση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης, ενώ ακολούθησε ενυδάτωση των ιστών σε κατιούσα σειρά αλκοολών. Αυτό ήταν απαραίτητο αφού οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν με μορφή υδατικών διαλυμάτων. Κατόπιν, οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης και αφού εκπλύθηκαν σε νερό και οξυνισμένη αλκοόλη, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ηωσίνης. Ακολούθως, οι τομές

αφυδατώθηκαν σε ανιούσα αλκοολών και, αφού απομακρύνθηκε και η αλκοόλη με εμβάπτιση σε διάλυμα ξυλόλης, πραγματοποιήθηκε επικάλυψη των τομών με καλυπτρίδες. Τέλος, οι τομές παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά σε μικροσκόπιο (Bresser) με προσαρμοσμένη ψηφιακή κάμερα



Εικόνα 8: Τοποθέτηση αντικειμενοφόρων πλακών στο καλάθι ώστε να ξεκινήσει η χρώση.



Εικόνα 9: Ιστολογικές τομές εγκεφάλου έτοιμες για μικροσκοπική μελέτη.

3. Αποτελέσματα

Η μέτρηση του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό με οξυγονόμετρο είναι μία ακριβής μέθοδος που δίνει γρήγορα αξιόπιστα αποτελέσματα, σε μετρήσεις τόσο εντός όσο και εκτός Εργαστηρίου. Στο πείραμά μας, τα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου τόσο στον κλωβό αναφοράς, όσο και στον πρόσθετα αεριζόμενο κλωβό καταγράφηκαν καθ' όλη τη χρονική περίοδο διεξαγωγής του. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5) και δίνονται ως διάμεσοι \pm ενδοτεταρτημοριακό εύρος, αφού τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή.

Πίνακας 4: Ποσοστά διαλυμένου οξυγόνου(%) που καταγράφηκαν κατά τη χρονική διάρκεια διεξαγωγής του πειράματός μας. Ανά στήλη οι διάμεσοι που έχουν διαφορετικό εκθέτη διαφέρουν στατιστικά. (Οι διαφορετικοί εκθέτες στις τιμές φανερώνουν ότι οι μετρήσεις μας διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικά).

	10 ΙΟΥΛΙΟΥ- 12 ΑΥΓΟΥΣΤΟΥ	13 ΑΥΓΟΥΣΤΟΥ- 28 ΑΥΓΟΥΣΤΟΥ	28 ΑΥΓΟΥΣΤΟΥ- 18 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ
ΚΛΩΒΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (Κανονικής παροχής οξυγόνου)	97.05 ^a \pm 10.53	84.09 ^b \pm 12.67	91.05 ^d \pm 11.36
ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΑΕΡΙΖΟΜΕΝΟΣ ΚΛΩΒΟΣ	96.94 ^a \pm 6.42	92.16 ^c \pm 11.29	91.91 ^e \pm 8.73

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, στον οποίο αναγράφονται οι διαλυμένες ποσότητες οξυγόνου στο νερό προέκυψαν οι εξής παρατηρήσεις: Την περίοδο 13 Αυγούστου-28 Αυγούστου στον αεριζόμενο κλωβό το διαλυμένο οξυγόνο παρουσιάζεται αυξημένο σε σχέση με τον κλωβό αναφοράς. Κάτι τέτοιο προκλήθηκε

λόγω της εμφάνισης μελτεμιών που έπνεαν στη συγκεκριμένη περιοχή εκείνη τη χρονική περίοδο με αποτέλεσμα να αυξηθούν τα ποσοστά του διαλυμένου οξυγόνου στον αεριζόμενο κλωβό και να προκύψει αυτή η διαφορά μεταξύ αεριζόμενου κλωβού και κλωβού αναφοράς.

Αξιίζει να σημειωθεί ότι τις χρονικές περιόδους 10 Ιουλίου-12 Αυγούστου (πριν την έναρξη του επιπλέον αερισμού) καθώς και 28 Αυγούστου-18 Σεπτεμβρίου δεν προέκυψε σημαντική διαφορά στα επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου στον κλωβό αναφοράς καθώς και στον επιπλέον αεριζόμενο κλωβό.

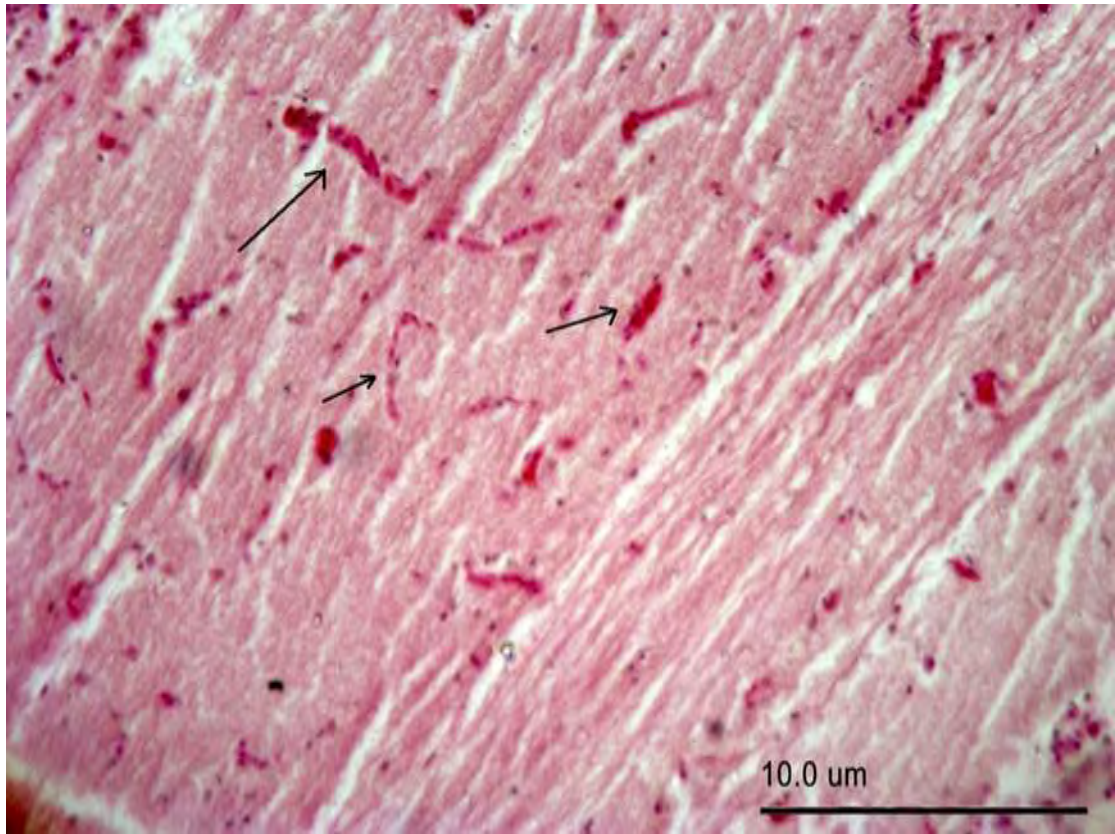
Στην παρούσα εργασία, δε παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις, σημαντικές αιμορραγίες ή αιματώματα στους ιχθύες από την περίσσια οξυγόνου ή λόγω στρεσαρίσματος από την αναταραχή του νερού κατά την παροχή πρόσθετου αέρα. Παρακάτω παρατίθεται ένας περιγραφικός πίνακας (Πίνακας 5), ο οποίος συγκεντρώνει τις ιστολογικές παρατηρήσεις που λήφθηκαν έπειτα από την μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων εγκεφάλου λαυρακίων του πειράματός μας, τόσο από τον κλωβό αναφοράς (C), όσο και από τον κλωβό με την επιπρόσθετη παροχή αέρα (Airx), έπειτα και από τις δύο δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 5: Συνοπτικές παρατηρήσεις έπειτα από ιστολογική μελέτη των δειγμάτων εγκεφάλου *Dicentrarchus labrax*. (Όπου C: Κλωβός αναφοράς και Airx: Πρόσθετα αεριζόμενος κλωβός)

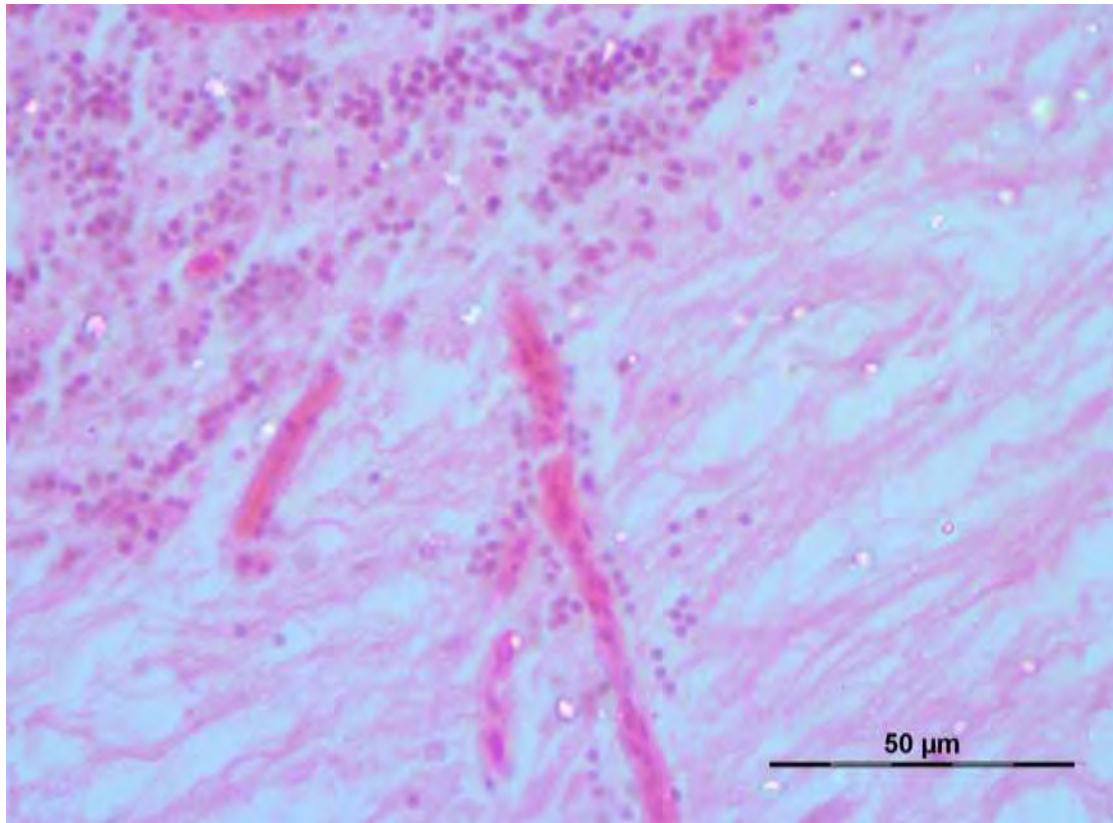
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
C1 (18/9)	Στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας είχαμε έντονα εμφανή τη κοκκιώδη στιβάδα καθώς και τα κύτταρα Purkinje. Παρατηρήθηκαν επίσης έντονα χρωματισμένα ερυθρά αιμοσφαίρια σε τομή αρτηρίας, χωρίς την ένδειξη αιμορραγίας.
C2 (18/9)	Αιμοφόρα αγγεία με ομαλή κατανομή ερυθρών αιμοσφαιρίων στον αυλό τους.
C3 (18/9)	Παρατηρήθηκε έντονα χρωματισμένο κόκκινο στη περιοχή του τελεγκεφάλου, χωρίς ωστόσο αυτό να αποτελεί ένδειξη αιμορραγίας. Παρατηρήθηκαν επίσης ευδιάκριτα αστροκύτταρα και δενδρίτες.
C4 (18/9)	Υπήρχαν ευδιάκριτα χρωματισμένα κύτταρα στον τελεγκέφαλο (κοκκώδης στιβάδα ευδιάκριτη, γύρω από την κοκκώδη στιβάδα παρατηρήθηκε μια πιο αραιή στρωμάτωση με ευδιάκριτα μικρότερα κύτταρα. Περιφερειακά παρατηρήθηκε στρωμάτωση με διαβαθμίσεις. Φλέβες και αρτηρίες χωρίς ενδείξεις αιμορραγιών.
C5 (18/9)	Παρατηρήθηκε ένα ωχρόλευκο χρώμα, διαφορετικό από τα υπόλοιπα δείγματα εγκεφάλων, ωστόσο μικροσκοπικά δε μπορέσαμε να προσδιορίσουμε το γιατί. Παρατηρήθηκε μια αραιότερη στρωμάτωση στον διεγέφαλο. Διακρίνονται καθαρά τα αστροκύτταρα και οι δενδρίτες.
Airx2(27/8)	Η επιφάνεια της παρεγκεφαλίδας καλύπτεται από τις μήνιγγες. Οι μήνιγγες είναι συνεχόμενες και όχι διασπασμένες πράγμα που αποδεικνύει τη μη ύπαρξη αιμορραγιών.
Airx3 (27/8)	Ευδιάκριτα κύτταρα Purkinje, ευδιάκριτες και συνεχόμενες φλέβες και αρτηρίες.
Airx4 (27/8)	Εμφανείς φλέβες κ αρτηρίες χωρίς να υπάρξει αιμοραγία. Έντονα ερυθρά αιμοσφαίρια στην άκρη της αρτηρίας. Διακρίνονται στιβάδες, καθώς και εμφανείς δενδρίτες που φανερώνουν την ομαλή λειτουργία του εγκεφάλου.
Airx 5 (27/8)	Παρατηρήθηκαν δενδρίτες και φλέβες, διάσπαρτες, χωρίς ενδείξεις αιμορραγιών.
Airx6 (27/8)	Παρατηρήθηκαν ευδιάκριτα αστροκύτταρα. Επιπλέον παρατηρήθηκαν έντονα χρωματισμένα ερυθρά αιμοσφαίρια, πράγμα που οφείλεται στην έντονη οξυγόνωση.
Airx1 (18/9)	Φλέβες και αρτηρίες ευδιάκριτες και με έντονη παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων εξαιτίας της πρόσθετης οξυγόνωσης.
Airx2 (18/9)	Παρατηρήθηκαν μικρογλοιακά κύτταρα καθώς και εμφανείς δενδρίτες.
Airx3(18/9)	Στη φαιά ουσία του εγκεφάλου παρατηρούνται ευδιάκριτοι κινητικοί νευρώνες καθώς και νευρογλοιακά κύτταρα. Δεν υπήρξε ένδειξη μη ομαλής λειτουργίας του εγκεφάλου.
Airx4 (18/9)	Παρατηρήθηκαν συνεχείς μήνιγγες, χωρίς ρήξη στα τοιχώματα

	τους.
Airx5(18/9)	Εντοπίστηκαν ευδιάκριτα κύτταρα πυκκίνη , καθώς και οι στιβάδες (μοριώδης και κοκκιώδης) τους, ευδιάκριτες και συνεχόμενες ήταν επίσης φλέβες και αρτηρίες.

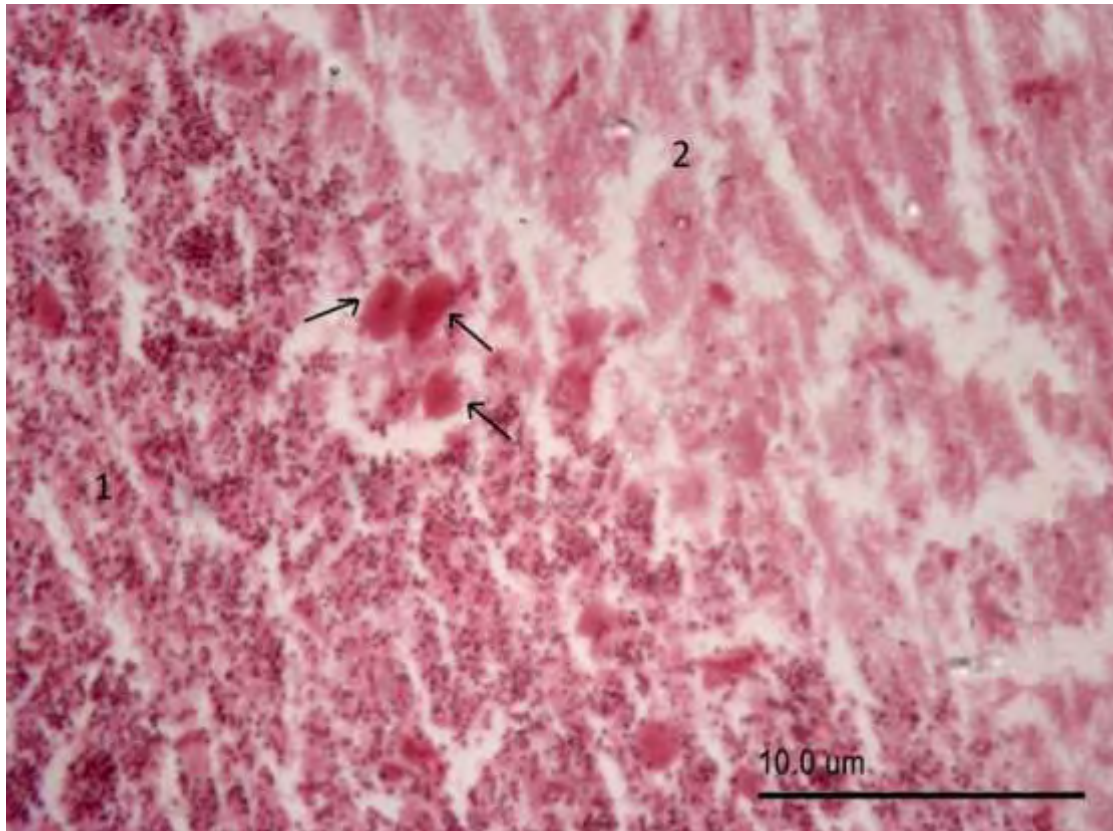
Παρακάτω παρατίθενται ιστολογικές εικόνες από τμήματα των εγκεφάλων των υπό εξέταση ιχθύων, οι οποίες αποδεικνύουν τη μη ύπαρξη αιμορραγιών, φανερώνοντας έτσι ότι οι ιχθύες του πειράματος μας δε καταπονήθηκαν σημαντικά από την επιπλέον παροχή αέρα, αλλά και ότι τα επίπεδα του οξυγόνου ήταν ικανοποιητικά.



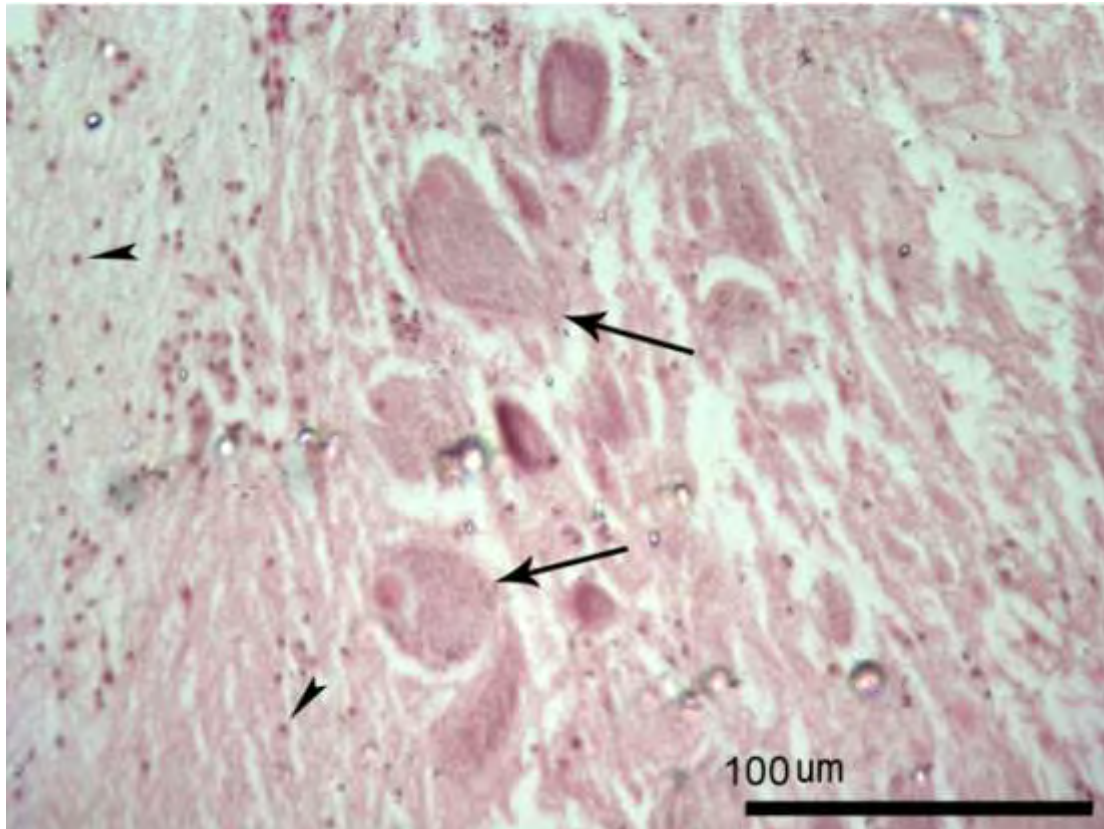
Εικόνα 10: Ιστολογική εικόνα παρεγκεφαλίδας *Dicentrarchus labrax* από τον αεριζόμενο κλωβό. Παρατηρούνται αιμοφόρα αγγεία χωρίς ενδείξεις αιμορραγιών.



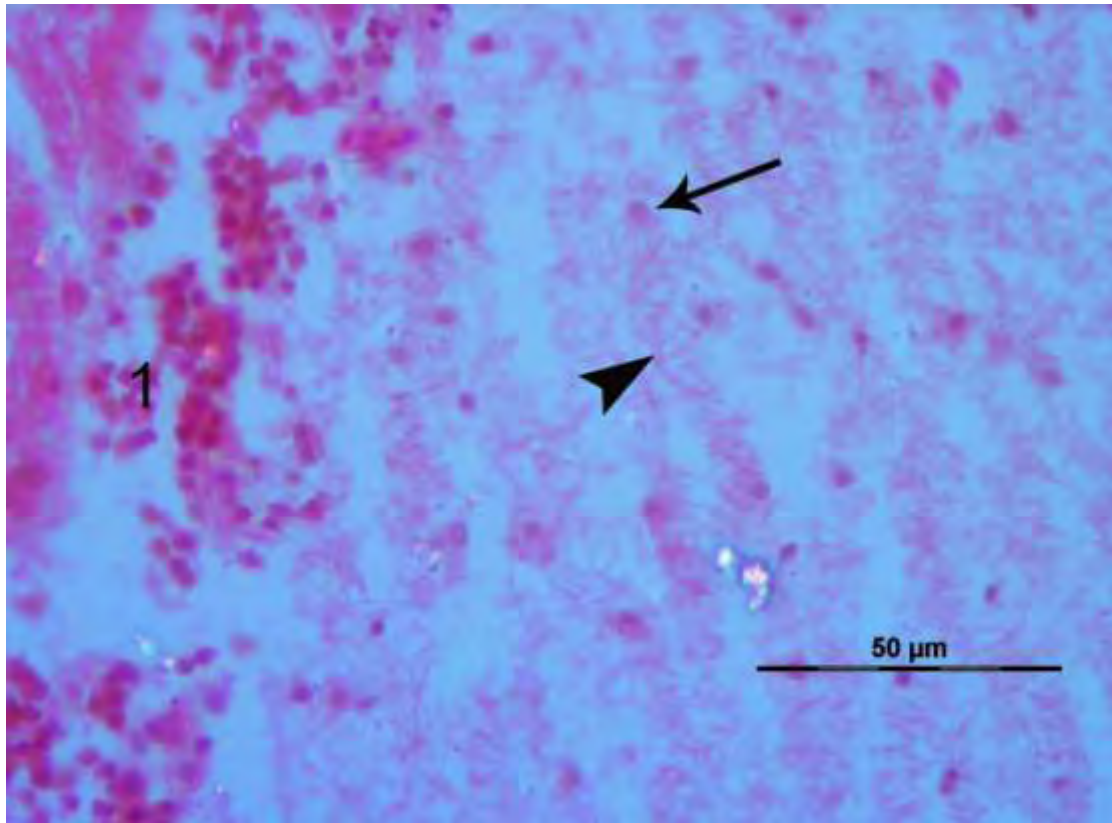
Εικόνα 11: Ιστολογική εικόνα παρεγκεφαλίδας *Dicentrarchus labrax* από τον αεριζόμενο κλωβό με μεγαλύτερη μεγένθυση. Παρατηρούνται αιμοφόρα αγγεία χωρίς ενδείξεις αιμορραγιών.



Εικόνα 12: Ιστολογική εικόνα παρεγκεφαλίδας *Dicentrarchus labrax* από τον αεριζόμενο κλωβό. Παρατηρείται φυσιολογική δομή με εμφανή κύτταρα του Purkinje, (βέλη) κοκκώδη (1) και μοριώδη στοιβάδα (2).



Εικόνα 13: Ιστολογική εικόνα φαιάς ουσίας εγκεφάλου *Dicentrarchus labrax* από τον αεριζόμενο κλωβό. Παρατηρούνται ευδιάκριτοι κινητικοί νευρώνες (βέλη) και νευρογλοιακά κύτταρα (κεφαλές βέλων).



Εικόνα 14: Ιστολογική απεικόνιση ευδιάκριτων δεδρίτων (μαύρο βέλος) και αστροκυττάρων (κόκκινο βέλος) καθώς και κοκκίωδους στιβάδας (1) στον κλωβό αναφοράς. Παρατηρούνται επίσης διάσπαρτα ερυθρά αιμοσφαίρια.

4. Συζήτηση – Συμπέρασμα

Το έντονο στρεσάρισμα των ιχθύων στους ιχθυοκλωβούς, η πιθανή ιχθυοφόρτισή τους, αλλά και η αναγκαιότητα να διατηρούνται τα επιθυμητά επίπεδα των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του νερού είναι παράγοντες που επηρεάζουν την υγεία και την ευζωία των εκτρεφόμενων ιχθύων. Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο εγκέφαλος λαβρακίων (*Dicentrarchus Labrax*) για την ύπαρξη πιθανών αλλοιώσεων από κλωβό από πρόσθετη παροχή οξυγόνου σε ιχθυοκλωβό. Η ιστολογική μελέτη τομών του εγκεφάλου των ατόμων *Dicentrarchus Labrax* δεν κατέδειξε ιστοπαθολογικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις, σημαντικές αιμορραγίες ή αιματώματα στους ιχθύες από την πρόσθετη παροχή οξυγόνου ή λόγω στρεσαρίσματος λόγω της αναταραχής του ύδατος κατά την παροχή του πρόσθετου οξυγόνου. Εν αντιθέσει με την μελέτη των Xinge Yu και Yang V (2011) στο ζεβρόψαρο (*Danio rerio*), οι οποίοι απέδειξαν ότι η πειραματική υποξία προκαλεί σημαντική βλάβη στον εγκέφαλο του συγκεκριμένου ιχθύος. Κάθε Zebrafish τοποθετήθηκε μεμονωμένα σε μπουκάλι υποξικών συνθηκών και παρέμεινε εκεί έως ότου να μην είναι σε θέση να κολυπήσει. Ο συντομότερος χρόνος έπειτα από τον οποίο επήλθαν υποξικές συνθήκες, οι οποίες προκάλεσαν τον θάνατο των ιχθύων ήταν 540 δευτερόλεπτα (9 λεπτά). Ο μακρύτερος χρόνος έπειτα από τον οποίο οι ιχθύες δεν κατάφεραν και πάλι να επιβιώσουν ήταν 940 δευτερόλεπτα (\approx 16 λεπτά).

Τα ζεβρόψαρα που κατάφεραν να επιζήσουν από τις συνθήκες υποξίας, μεταφέρθηκαν σε μπουκάλι θεραπείας ανάκτησης της κίνησης τους και το κατάφεραν μέσα σε περίπου 10 λεπτά από την τοποθέτησή τους, αρχικά με ασύμμετρες ή ακανόνιστες κινήσεις, μέχρι να ανακτήσουν την ισορροπία στο κολύμπι τους. Μετά από 11 λεπτά υποξίας ($DO = 0,6-0,8 \text{ mg / L}$), το ζεβρόψαρο άρχισε σταδιακά να χάνει την κινητικότητά του. Οι χρόνοι υποξίας για την πλειονότητα των ζεβρόψαρων που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ($> 70\%$) ήταν μεταξύ 10-12 λεπτών. Ουσιαστικά, 60,87% των ιχθύων του πειράματος δεν ανέκαμψαν ή πέθαναν από τις υποξικές συνθήκες που επικρατούσαν. Επιπλέον, το γεγονός ότι η χρώση TTC (triphenyltetrazolium chloride), (χλωριούχο τριφαινυλοτετραζολίο) που χρησιμοποιήθηκε έδειξε μη αντιστρεπτές εγκεφαλικές βλάβες, οι οποίες υποτροπίασαν όσο αύξανε η χρονική διάρκεια της υποξίας, υποδηλώνει τη σαφή συσχέτιση μεταξύ του χρόνου υποξίας και της εγκεφαλικής βλάβης. Σύμφωνα με τα

αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη χρώση, ο εγκέφαλος του ζεβρόψαρου αποξυγονώθηκε πλήρως έπειτα από 35 λεπτά έκθεσης του σε υποξικές συνθήκες. Κάτι τέτοιο γίνεται κατανοητό αν σκεφτούμε ότι η μείωση του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό προκαλεί σταδιακά εξάντληση του οξυγόνου που βρίσκεται στο αίμα του ζεβρόψαρου, προκαλώντας μείωση της κυκλοφορίας του αίματος και αναστολή των λειτουργιών του ιχθύων, κάτι το οποίο αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τη λειτουργία του εγκεφάλου και κατ' επέκταση και για τη βιωσιμότητά του.

Από τα πιο στρεσογόνα γεγονότα είναι ο χειρισμός και η μεταφορά των ιχθύων (Barton et al., 1980; Davis and Schreck, 1997; Sharpe et al., 1998).

Οι ιστολογικές παρατηρήσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας, δειγμάτων εγκεφάλου λαυρακιών, τόσο από τον κλωβό αναφοράς όσο και από τον κλωβό με την επιπρόσθετη παροχή οξυγόνου, δεν κατέδειξαν αιμορραγίες ή κάποια μορφή σοβαρής αλλοίωσης. Αντίθετα, σε μελέτη του Nilsson (1996), προέκυψε ότι ακόμη και οι ιχθύες με μεγάλο μέγεθος εγκέφαλο, όπως το *G. Petersii*, οι οποίοι μπορούν να ανεχτούν ακόμα και πολύ μικρά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου και να επιβιώσουν.

Η εντυπωσιακή ανοχή της υποξίας του ψαριού *G. petersii* μπορεί να εμφανιστεί παράδοξη για ένα ον με έναν τέτοιο ενεργειακά δαπανηρό εγκέφαλο. Ωστόσο, το *G. petersii* έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την ταχύτητα πρόσληψης του διαλυμένου στο νερό O_2 όταν επικρατούν χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 . Ωστόσο, η ικανότητα του, να χρησιμοποιεί χαμηλά επίπεδα O_2 που απαντώνται εκείνη τη στιγμή στο περιβάλλον, είναι πιθανώς σημαντική για την προστασία του εγκεφάλου από υποξική βλάβη. (Nilsson et al. 1993). Οι συγκεκριμένοι ιχθύες κατοικούν σε θολά ευτροφικά τροπικά ύδατα στα οποία είναι πολύ πιθανό να εκδηλωθούν ανά πάσα στιγμή υποξικές συνθήκες. Στα περισσότερα σπονδυλωτά, ο εγκέφαλος είναι έντονα εξαρτώμενος από την παραγωγή αερόβιας ενέργειας και δεν είναι σε θέση να ανταποκριθεί σε υψηλές απαιτήσεις ATP (Lutz and Nilsson, 1994). Στον ιχθύ *G. petersii*, ο εγκέφαλος είναι πιθανό να είναι το πρώτο όργανο το οποίο επηρεάζεται από την ενεργειακή ανεπάρκεια κατά τη διάρκεια της ανοξίας. Στο πείραμα του, ο Nilsson, τοποθέτησε πέντε ιχθύες σε ένα ενυδρείο 5 λίτρων στο οποίο η περιεκτικότητα σε O_2 μειώθηκε μέσα σε 2 ώρες σε επίπεδα χαμηλότερα από 0.3mg/L, με διοχέτευση φυσσαλίδων N_2 . Όταν η συγκέντρωση του O_2 έπεσε κάτω από τα 0.8mg/L, τα ψάρια άρχισαν να καταπίνουν αέρα από την επιφάνεια, κάνοντας έτσι μια προσπάθεια ώστε να αυξήσουν την πρόσληψη τους σε O_2 . Τέλος, όταν η περιεκτικότητα σε O_2 έπεσε κάτω από τα 0.3mg/L, το πείραμα έπρεπε να διακοπεί, καθώς μέσα στα επόμενα 14-18

λεπτά όλα ψάρια παρουσίασαν προβλήματα με τη διατήρηση μιας κατακόρυφης στάσης του σώματός τους αναφέροντας έτσι την ανικανότητα τους να ανεχτούν μια τέτοια χαμηλή συγκέντρωση O₂ στο περιβάλλον τους .

Ο ιχθύς *G. petersii* δεν μπορεί να ανεχθεί μια συγκέντρωση O₂ στο υδάτινο περιβάλλον που διαβιεί κάτω από τα επίπεδα των 0.3mg/L, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ικανότητά του να παράγει αναερόβια ATP δεν είναι επαρκής για να ταιριάζει με το ποσοστό της ATP που χρειάζεται για να καταναλώσει. (Kramer και McClure, 1982). Στην παρούσα πτυχιακή εργασία τα άτομα λαυρακιού που εξετάστηκαν για αιμορραγίες και αλλοιώσεις ήταν όλα ενήλικα. Γενικά το μέγεθος των ιχθύων δεν επηρεάζει την προσαρμογή των ιχθύων σε υποξικές ή ανοξικές καταστάσεις, ωστόσο οι Nilsson & Nilsson (2008), μελέτησαν εκτενέστερα αν το μέγεθος των ιχθύων παίζει ρόλο στην ανοχή τους στην υποξία. Τα συμπεράσματα που εξήγαν ήταν τα εξής: (1) Το μέγεθος του σώματος του ιχθύος έχει μικρή ή ακόμη και καθόλου επίδραση στην ικανότητα του ιχθύος να προσλαμβάνει το οξυγόνο από το περιβάλλον του κατά τη διάρκεια συνθηκών υποξίας, κυρίως επειδή η περιοχή της αναπνευστικής επιφάνειας ταιριάζει με τον μεταβολικό ρυθμό των ιχθύων σε ένα ευρύ φάσμα μεγέθους. (2) Κατά τη διάρκεια σοβαρής υποξίας και ανοξίας, όπου τα ψάρια πρέπει να βασίζονται για την επιβίωσή τους στην αναερόβια παραγωγή ATP (γλυκόλυση), τα μεγάλα άτομα έχουν ένα σαφές πλεονέκτημα έναντι των μικρότερων, διότι οι μικρότεροι ιχθύες θα φτάσουν στο σημείο να ξεμείνουν από γλυκογόνο ή τα επίπεδα των αναερόβιων τελικών τους προϊόντων θα ελαττωθούν σημαντικά σε σημείο να προκαλέσουν θνησιμότητες. Η υποξία συναντάται τακτικά από τα ψάρια που ζουν σε τροπικά ενδιαιτήματα γλυκού νερού, ακόμη και σε κοραλλιογενείς υφάλους (Val, Almeida-Val & Randall, 2006). Ωστόσο, η μεγαλύτερη και σοβαρότερη κατάσταση υποξίας είναι εκείνη που αντιμετωπίζουν τα ψάρια σε λίμνες στο βόρειο ημισφαίριο, όπου η μικρού μήκους ημέρα σε συνδυασμό με το παχύ στρώμα πάγου σταματά εντελώς τη φωτοσύνθεση και τη διάχυση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα. Η πιο βιώσιμη στρατηγική των οργανισμών για τη μακροπρόθεσμη επιβίωση τους από την υποξία είναι να έχουν ένα κρίσιμο επίπεδο οξυγόνου αρκετά χαμηλό ώστε να αποφεύγουν να χρησιμοποιούν τους αναερόβιους μεταβολισμούς. Αυτό προτείνεται διότι η αναερόβια γλυκόλυση οδηγεί στη συσσώρευση αναερόβιων τελικών προϊόντων και σε ταχεία εξάντληση της γλυκόζης, η οποία αποθηκεύεται ως γλυκογόνο (Hochachka & Somero, 2002). Ως εκ τούτου, ένας ιχθύς έχει δύο βασικές επιλογές κατά τη διάρκεια της υποξίας: Να προσλάβει όσο το δυνατόν περισσότερο

O₂ από το νερό, επιτρέποντας έτσι να συνεχιστεί η οξειδωτική φωσφορυλίωση ή να χρησιμοποιήσει την αναερόβια γλυκόλυση ώστε να αντισταθμιστεί έτσι η μειωμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ο Rombough (1988) διαπίστωσε επίσης ότι τα κρίσιμα επίπεδα οξυγόνου, αυξάνονται με την ηλικία κατά την εμβρυϊκή φάση των πεστρόφων. Αυτό έχει επίσης παρατηρηθεί σε άλλα ψάρια (Kamler, 1992) και πιθανότατα αντανάκλα την ανικανότητα του εμβρύου να ρυθμίζει την πρόσληψη του O₂ από το νερό, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διάχυση του O₂ πάνω στην επιφάνεια του αυγού. Καθώς το έμβρυο, αυξάνονται και οι απαιτήσεις του για O₂, ενώ η περιοχή της αναπνευστικής επιφάνειας του ιχθύος παραμένει σταθερή. Συχνά αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια σταθερή μείωση στην ικανότητα αντιμετώπισης της υποξίας μέχρι την εκκόλαψη, ενώ τα έμβρυα κάποιων ειδών φαίνεται να επιβιώνουν της υποξίας εφαρμόζοντας μια επιβράδυνση στην ανάπτυξή τους, ή ακόμη και με το να αδρανοποιούν τελείως τον μεταβολισμό τους (Podrabsky et al., 2007). Ο χρόνος επιβίωσης των ιχθύων σε επίπεδα οξυγόνου κάτω από τα φυσιολογικά μπορεί να αυξηθεί σημαντικά αν οι ιχθύες μπορούν να μειώσουν το ποσοστό της χρήσης ATP (μεταβολική κατάπτωση). Μερικοί ιχθύες ανεκτικοί σε καταστάσεις υποξίας και ανοξίας, συμπεριλαμβανομένων του χρυσόψαρου (*Carassius auratus*), κυπρίνου (*Carassius Carassius*), τιλάπιας (*Oreochromis mossambicus*) μπορούν να μειώσουν μέχρι και κατά 70% το ποσοστό ATP όταν βρίσκονται σε τέτοιες καταστάσεις (Van Waversveld, Addink & Van den Thillart, 1989, Van Ginneken et al., 1996, Muusze et al., 1998), ενώ άλλα είδη όπως ο κυπρίνος, σχετικά ανεκτικά στην υποξία, δεν υφίστανται καμία μεταβολική αλλαγή ώστε να είναι ανεκτικός στην υποξία (Van Ginneken et al., 1998). Στη παρούσα διπλωματική εργασία, δεν βρέθηκαν αιμορραγίες στους εγκεφάλους των ιχθύων που μελετήθηκαν. Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται τόσο στο μη έντονο στρεσάρισμα τους από την πρόσθετη οξυγόνωση, όσο και στην δυνατότητα των ιχθύων να αναγεννούν τον νευρικό ιστό τους. Κλείνοντας, θα συσχετίσουμε την ικανότητα των ιχθύων και συγκεκριμένα του ζεβρόψαρου (*Danio rerio*) να αναγεννούν τον νευρικό ιστό τους, με τον εγκέφαλο των θηλαστικών και την ανικανότητα τους να αναγεννούν τμήματα του νευρικού ιστού τους. Σύμφωνα με τη μεταπτυχιακή διατριβή του Tsarouchas (2014), ο ανθρώπινος εγκέφαλος αποτελεί ένα θαυμαστό προϊόν της εξελικτικής διαδικασίας, επιτρέποντας στους ανθρώπους να χρησιμοποιούν εργαλεία και να επικοινωνούν μέσω της γλώσσας (Franz and Gillett, 2011; Iriki and Taoka, 2012, Stout and Chaminade, 2012). Ωστόσο, παράλληλα με την εξέλιξη της

πολυπλοκότητας, ο ανθρώπινος εγκέφαλος έχασε πρακτικά την ικανότητα να αναγεννάται όταν αυτό είναι απαραίτητο μετά από κάποιον τραυματισμό. Αντί αυτού, πραγματοποιείται αλλαγή των λειτουργιών και μεταβίβασή τους σε μη κατεστραμμένες περιοχές (Basak and Taylor, 2009; Tanaka and Ferretti, 2009). Παρά το γεγονός ότι άλλοι ιστοί, όπως το εντερικό επιθήλιο και το δέρμα ανανεώνονται συνεχώς, οι περισσότεροι νευρώνες στον εγκέφαλο των θηλαστικών δημιουργούνται αποκλειστικά κατά το διάστημα της ανάπτυξης και θεωρείται ως ένα μη ανανεώσιμο όργανο το οποίο αποτελείται από πλήρως διαφοροποιημένους νευρώνες (Rakic, 2002; Basak and Taylor, 2009; Reynolds and Weiss, 1992). Στα πτηνά και στα θηλαστικά οι περιοχές των βλαστικών κυττάρων περιορίζονται σε μια συγκεκριμένη περιοχή, τον τελεγκεφαλο. Στα τρωκτικά οι περιοχές αυτές είναι τα κοκκιώδη και περισπειραματικά στρώματα των οσφρητικών λοβών που δέχονται νέους διάμεσους νευρώνες (Altman, 1969; Luskin, 1993; Alvarez-Buylla et al., 1994; Hack et al., 2005) και ο οδοντωτός πυρήνας του ιπποκάμπου όπου είναι το κέντρο παραγωγής νέων κοκκιωδών κυττάρων κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Στα ωδικά πτηνά, νέοι νευρώνες παράγονται στην περιοχή του τελεγκεφάλου. Το πιο καλά μελετημένο παράδειγμα αποτελεί ο πυρήνας HVC στα καναρίνια, όπου διάμεσοι νευρώνες αλλά και νευρώνες με μεγάλες προβολές συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της ζωής του και επιβιώνουν για αρκετούς μήνες (Kirn et al., 1991; Nottebohm et al., 1994) υποδηλώνοντας αύξηση του συγκεκριμένου πυρήνα. Παρά το γεγονός ότι τα θηλαστικά δεν διαθέτουν την ικανότητα αναγέννησης του εγκεφαλικού ιστού, υπάρχουν αρκετά σπονδυλωτά, ανάμεσά τους και το zebrafish (Kroehne et al., 2011) που μπορούν να ξαναδημιουργήσουν τον κατεστραμμένο νευρικό ιστό. Συγκεκριμένα το zebrafish μπορεί να αναδημιουργήσει σημαντικά τμήματα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Επιπλέον ο εγκέφαλος του διαθέτει τη δυνατότητα απόκρισης σε έναν τραυματισμό με την ενεργοποίηση προγονικών βλαστικών κυττάρων τα οποία μεταναστεύουν στο σημείο του τραυματισμού και ωριμάζουν σε νευρικά κύτταρα αντικαθιστώντας τα κατεστραμμένα κύτταρα (Kizil et al., 2012; Kroehne et al., 2011). Για παράδειγμα, ένας τραυματισμός από βελόνα στον εγκέφαλο του zebrafish αρχικά επάγει την αποδιοργάνωση του ιστού μέσω απόπτωσης και καθαρισμό των υπολειμμάτων μέσω φαγοκύτωσης (Kaslin et al., 2008). Στη συνέχεια ακολουθεί η ανίχνευση μιτωτικά ενεργών κυττάρων σε ζώνες πολλαπλασιασμού κοντά στην περιοχή του τραύματος τα οποία θα συμμετάσχουν

στην διαδικασία επιδιόρθωσης (Kaslin et al., 2008). Αυτό επιτρέπει την αποκατάσταση των συνδέσεων των νευρώνων που έχουν χαθεί από την περιοχή τραυματισμού καλύπτοντας τα κενά με νέα νευρικά κύτταρα (Kaslin et al., 2008). Η αποδοτική επιδιόρθωση του κατεστραμμένου ΚΝΣ στο zebrafish αποτελεί μια πολύ ενδιαφέρουσα περιοχή μελέτης με πάρα πολλές ομάδες να προσπαθούν να ανακαλύψουν τα μυστικά της αναγέννησης του εγκεφάλου (Kizil et al., 2012)

5. Βιβλιογραφία

5.1. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Altman, J., (1969), “Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis: IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.” *J. Comp. Neurol.* 137, 433–457
- Basak O, Taylor V. (2009), “Stem cells of the adult mammalian brain and their niche.” *Cell. Mol. Life Sci.*, 66:1057-1072.
- Braford, M.R. (1995), “Comparative aspects of forebrain organization in the rayfinned fishes: touchstones or not” *Brain Behavior Evol* 46, 259-274.
- Butler, A.B. & Hodos, W. (1996), “Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaption.” New York: Wiley-Liss.
- Butler, A.B. (2000). “Topography and topology of the teleost telencephalon: a paradox resolved.” *Neurosci Lett* 293, 95–98.
- de Kloet, E.R. et al. (2005), “Stress and the brain: from adaptation to disease.” *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–475
- Demski, L.S. & Knigge, K.M. (1971). “The telencephalon and hypothalamus of the bluegill (*Lepomis macrochirus*): Evoked feeding, aggressive and reproductive behavior with representative frontal sections.” *J Comp Neuro* 143, 1–16
- E Dias-Ferreira. (2009), “Chronic stress causes Frontostriatal Reorganization and affects Decision Making”. *Science* 325 no. 5940: 621-25.
- E Dias-Ferreira. (2009), “Chronic stress causes Frontostriatal Reorganization and affects Decision Making”. *Science* 325 no. 5940:621-25.
- Ekström, P. (1987), “Distribution of choline acetyltransferase immunoreactive neurons in the brain of a cyprinid teleost (*Phoxinus phoxinus*, L.).” *J Comp Neurol* 256, 494–515.
- Hochachka, P. W & Somero, G. N. (2002), “Biochemical Adaptation.” Oxford University Press, New York.

- Igarashi, S. & Kamiya, T. (1972), “Atlas of the vertebrate brain,” University of Tokyo, Press, London
- Iriki A, Taoka M (2012), “Triadic (ecological, neural, cognitive) niche construction: a scenario of human brain evolution extrapolating tool use and language from the control of reaching actions. Phil.” Trans. R. Soc. B , 367:1023
- Ito, H. (1978), “A catalogue of histological preparations of the teleost brains.” Med J Osaka University 28,219–228.
- J Person-Le Ruyet (2004), “Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*.” p. 269–280
- Kamler, E. (1992), “Early Life History of Fishes,” London
- Kaslin J, Ganz J, Brand M (2008), “Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain.” Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 363:101-122.
- Kaslin J, Ganz J, Geffarth M, Grandel H, Hans S, Brand M, 2009, “Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche.” J Neurosci, 29:6142-6153.
- Kaslin, J. & Panula, P. (2001), “Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*).” J comp Neurol 440, 342-377
- Kent, G.C. (1992), “Nervous system. In: Kent GC (eds) Comparative anatomy of vertebrates.” Mosby-Year Book, St. Louis, pp 543-594.
- Kirn, J.R., Alvarez-Buylla, A., Nottebohm, F., (1991), “Production and survival of projection neurons in a forebrain vocal center of adult male canaries. J. Neurosci. 11, 1756–1762.
- Kizil C, Dudczig S, Kyritsis N, Machate A, Blaesche J, Kroehne V, Brand M (2012), “The chemokine receptor *cxcr5* regulates the regenerative neurogenesis response in the adult zebrafish brain.” Neural Development, 7:27.
- Kramer, D. L. and McClure, M. (1982), “Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes.” *Env. Biol. Fish.* 7, 47–55.

- Kroehne V, Freudenreich D, Hans S, Kaslin J, Brand M (2011), “Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors.” *Development* 138:4831–4841
- Lazarus R S and Folkman S (1984) *Stress, Appraisal and Coping*. New York, Springer.
- Lutz , P. L. and Nilsson, G. E (1994). “The Brain Without Oxygen, Causes of Failure and Mechanisms for Survival.” Austin, Texas: R. G. Landes.
- Meek, J. & Nieuwenhuys, R. (1998), “Holosteans and Teleosts. In The central nervous system of vertebrates (eds R. Nieuwenhuys, H. J. ten Donkelaar & C. Nicholson.” Berlin, Germany: Springer: 759–939
- Nilsson, G. (1996), “Brain and body oxygen requirements of *Gnathonemus petersii*, a fish with an exceptionally large brain.” *Journal of Experimental Biology* 199.3: 603-607
- Nilsson, G. E. & Renshaw, G. M. C. (2004), “Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark.” *Journal of Experimental Biology* 207, 3131–3139
- Nilsson, G. E. and Östlund- Nilsson, S. (2004), “Hypoxia in paradise: widespread hypoxia tolerance in coral reef fishes. *Proceedings of the Royal Society Series B (Biology Letters Supplement)* 271, S30–S33.
- Nilsson, G. E., Lutz, P. L., & Jackson, T. L. (1991). “Neurotransmitters and anoxic survival of the brain: a comparison between anoxia-tolerant and anoxia-intolerant vertebrates.” *Physiological Zoology* 64, 638–652.
- Nilsson, G. E., Östlund- Nilsson, S., Penfold, R & Grutter, A. S. (2007), “From record performance to hypoxia tolerance –respiratory transition in damselfish larvae settling on a coral reef.” *Proceedings of the Royal Society Series B* 274: 79–85.
- Nilsson, G. E., Perez-Pinzo N, M., Dimberg, K. & Winberg, S. (1993), “Brain sensitivity to anoxia in fish as reflected by changes in extracellular potassium-ion activity.” *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 264: 250–253.
- Nilsson, Göran E., and Sara Östlund-Nilsson. (2008), “Does size matter for hypoxia tolerance in fish.” *Biological Reviews* 83.2: 173-189.

- Podrabsky, J. E., Lopez, J. P., Fan, T. W. M., Higashi, R. & Somero, G. N (2007), “Extreme anoxia tolerance in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: insights from a metabolomics analysis.” *Journal of Experimental Biology* 210, 2253–2266.
- Portavella, M., Vargas, J.P., Torres, B. & Salas, C. (2002), “The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish.” *Brain Res Bull* 57, 397–399.
- Pullsford et al., (1994). “The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment”
- Reynolds A, Weiss S (1992), “Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System.” *Science* 255, 1707 -1710.
- Richards, RH (1987), “Greece. The implication of fish disease and its control in the Greek aquaculture industry.” F.A.O. report.
- Rombough, P. J. (1988), “Growth, aerobic metabolism, and dissolved oxygen requirements of embryos and alevins of steelhead trout (*Salmo gairdneri*).” *Canadian Journal of Zoology* 66, 651–660.
- Schreck, C (1996), “Immunomodulation: Endogenous factors”, *The fish immune system*, Academic Press, San Diego: 311-337
- Shang, Eva HH, and Rudolf SS Wu. (2004), “Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development.” *Environmental science & technology* 38.18: 4763-4767.
- Shoemaker, C, Klesius, P, Lim, C (2001). “Immunity and Disease Resistance in Fish”, *Nutrition and Fish Health*: 149-162
- Striedter, G.F. (1990), “The diencephalon of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. II. Retinal, tectal, cerebellar and telencephalic connections.” *Brain Behav Evol* 36, 355-377
- Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F. & Randall, D. J. (2006), “Fish Physiology Vol. 21. The Physiology of Tropical Fishes.” Elsevier/ Academic Press, London.
- Van Ginneken, V. J. T., Van Caubergh P, Nieveen, M., Balm, P., Van Den Thillart, G. & Addink, A. (1998), “Influence of hypoxia exposure on the

energy metabolism of common carp (*Cyprinus carpio* L)”. *Netherland Journal of Zoology* 48: 65–82.

- Van Waversverld, J., Addink, A. D. F. & Van den thillart, G (1989), “Simultaneous direct and indirect calorimetry on normoxic and anoxic goldfish.” *Journal of Experimental Biology* 142, 325–335
- Wendelaar bonga, S.E., (1997) *The stress response in fish, physiology review*, 77
- Wulliman, M.F. & Vernier, P. (2007), “Evolution of the Nervous System in Fishes.” Elsevier, Netherlands: 39-60
- Yu X and Li YV (2011), “Zebrafish as an alternative model for hypoxic-ischemic brain damage.” *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 3: 88-96.
- Zupanc GKH, Sîrbulescu RF (2011), “Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish.” : 917–929

5.2. Ελληνική Βιβλιογραφία

- Αμπατζής, Κ. (2008). «Μηχανισμοί πλαστικότητας στον ενήλικο εγκέφαλο του zebrafish (*danio rerio*): φυλετικές διαφοροποιήσεις.» Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Ευρωπαϊκή επιτροπή (2005). «Η υγεία των εκτρεφόμενων ιχθύων». Αλιεία και Υδατοκαλλιέργεια στην Ευρώπη», αρ. 27, σελ 8.
- Ιωακειμίδου, Ν. (2008). Επίδραση της καταπόνησης (στρες) και της διατροφής, στα χαρακτηριστικά αύξησης και υγείας των μεσογειακών εκτρεφόμενων ειδών ψαριών, Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Αιγαίου
- Κατσακούλης, Π. (2010). «Διερεύνηση της αντίδρασης σε οξύ στρες του λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*) υπό συνθήκες διαφορετικού χρώματος (μήκους κύματος) φωτός. Μεταπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Μυλωνάς Μ. (2002). Εργαστήριο Ζωολογίας Ι, Ιστολογία. Πανεπιστημιακές σημειώσεις τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Παπουτσόγλου, ΣΕ (1985). «Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες», Εκδόσεις Καραμπερόπουλος, σελ 595.

- Παπουτσόγλου, ΣΕ (1989). «Κατασκευές Υδατοκαλλιεργειών», Εκδόσεις Λιβάνη, Α.Α. και ΣΙΑ Ε.Ε., σελ 624
- Παπουτσόγλου, ΣΕ (1994). «Εκτροφές υδρόβιων οργανισμών». Εκδόσεις Γεωργικού Πανεπιστημίου Αθηνών, σελ 195
- Παπουτσόγλου, ΣΕ, (1998) «Ενδοκρινολογία ιχθύων», Εκδόσεις Σταμούλης Α., σελ 599
- Γσαρούχας, Θ. (2014). «Αλλοστατικοί μηχανισμοί στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα σε μοντέλα πειραματικού τραυματισμού και στρες», Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών