

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ  
ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επίδραση των τρόπων θανάτωσης στην καταπόνηση εντατικά  
εκτρεφόμενων ψαριών»**

**ΠΙΚΟΥΛΑΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ**

**ΒΟΛΟΣ 2011**

**«Επίδραση των τρόπων θανάτωσης στην καταπόνηση εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

- 1) **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Μόνιμη Επίκουρος Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**.
- 2) **Κλαουδάτος Σπυρίδων**, Καθηγητής, Υδατοκαλλιέργειών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος**, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Γενετικής Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

*Στην οικογένειά μου*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ πως έχω την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Διατριβής.

Ειλικρινά ευχαριστώ την επιβλέπουσά μου κ. Παναγιώτα Παναγιωτάκη, για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε αρχικά με την ανάθεση της παρούσας διατριβής, καθώς και για την υπομονή και την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας. Επίσης θερμές ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, κ. Σπυρίδων Κλαουδάτο και κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, για την ευγενή παραχώρηση του εργαστηρίου Γενετικής Υδρόβιων Οργανισμών, για τις ανάγκες του πειράματος, καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις τους κατά τη συγγραφή της παρούσας.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Εμμανουήλ Μαλανδράκη, υποψήφιο Διδάκτορα, για την ανεκτίμητη βοήθειά του τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και κατά τη διάρκεια της στατιστικής επεξεργασίας και ανάλυσης των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ και του εύχομαι κάθε επιστημονική και προσωπική καταξίωση.

Επίσης θερμές ευχαριστίες οφείλω στον κ. Ερντί Χασάν για την άψογη συνεργασία που είχαμε γενικότερα, αλλά και για τις εύστοχες ανησυχίες του σε θέματα της διατριβής, που μας οδήγησαν σε ευχάριστες συζητήσεις και αξιόλογα συμπεράσματα. Ακόμη ευχαριστώ την κ. Ελένη Γκολομάζου για την καθοδήγησή της κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας, τον κ. Πέτρο Μαρτσικάλη για την βοήθειά του στο εργαστηριακό μέρος της παρούσας καθώς επίσης και την εταιρεία «Ιχθυοτροφεία Παγασητικού Α.Ε.» για την ευγενική χορήγηση των ψαριών.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αν και οι εφαρμοζόμενοι τρόποι θανάτωσης στα ψάρια εντατικής εκτροφής είναι αρκετοί και αν μη τι άλλο, τα τελευταία χρόνια έχουν εξελιχθεί, ωστόσο οι επιπτώσεις τους στην «ευζωία» (welfare) των ψαριών δεν είναι ακόμη οι βέλτιστες. Είναι αλήθεια πως πολλές από τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους, δεδομένου του μεγέθους της καταπόνησης που προσδίδουν στα ψάρια, θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ιδιαίτερα σκληρές και επώδυνες.

Η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών (κυρίως ψαριών) έχει αυξηθεί σε ποσοστό περίπου 8% ετησίως από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 (FAO 2006). Από το 2003 έως το 2005, συνολικά η μέση ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση προϊόντων ιχθυοκαλλιέργειας και αλιείας κυμαίνεται περίπου στα 16,4 kg (FAO 2008). Καθίσταται δεδομένο πλέον ότι η αύξηση κατανάλωσης ψαριών έχει μετατρέψει τις μονάδες εντατικής εκτροφής να λειτουργούν σχεδόν με ρυθμούς «βιομηχανίας», με σκοπό να διαθέσουν στην αγορά φρέσκο και κατά ένα μέρος φθηνό προϊόν που θα αντικαταστήσει τη μείωση των άγριων αλιευτικών αποθεμάτων.

Ωστόσο ενθαρρυντικό είναι το γεγονός πως τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότεροι καταναλωτές δείχνουν να ευαισθητοποιούνται και επιθυμούν να γνωρίζουν και να μένουν ενήμεροι σχετικά με τον τρόπο που φθάνει το προϊόν (εν προκειμένω το ψάρι) στα χέρια τους.

Εν τούτοις, από την πλευρά της επιστήμης της Ιχθυολογίας ευρύτερα, οι έρευνες έχουν εστιαστεί ως επί το πλείστον σε μικρό αριθμό ειδών (όπως σολομό και πέστροφα), παρέχοντας ελάχιστα στοιχεία για τον αντίκτυπο των διάφορων τρόπων θανάτωσης στη πλειονότητα των εκτρεφόμενων ψαριών.

Η αίσθηση της κακομεταχείρισης στα ψάρια μεταφράζεται με την έννοια της

καταπόνησης, η οποία μπορεί να εκτιμηθεί απλά με τη μέτρηση της κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος, αλλά και μοριακά πλέον μέσω της γενετοξικότητας που προκαλείται στο DNA του οργανισμού. Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εμπορικά εκτρεφόμενα είδη στην Ευρώπη και ως εκ τούτου προέκυψε και η επιλογή του είδους για τις ανάγκες του πειράματος που πραγματοποιήθηκε.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της έντασης της καταπόνησης κατά την εφαρμογή σε ψάρια, τεσσάρων από του πιο διαδεδομένους τρόπους θανάτωσης (θανάτωση με ασφυξία, θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι, θανάτωση σε παγόνερο, αναισθησία με διοξείδιο του άνθρακα και μετέπειτα θανάτωση του ψαριού σε παγόνερο). Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 16 άτομα τσιπούρας, μέσου βάρους 120g ( $\pm 30$ ) και μέσου ολικού μήκους 20cm ( $\pm 2$ ), προερχόμενα από κλειστό κύκλωμα δεξαμενών (τέσσερα άτομα για κάθε έναν από τους εφαρμοζόμενους τρόπους θανάτωσης). Τα επίπεδα καταπόνησης καθορίστηκαν μέσω της ανίχνευσης του κατακερματισμένου DNA από κύτταρα ήπατος και αίματος ατόμων τσιπούρας, ενώ πραγματοποιήθηκε και εκτίμηση του βαθμού επιδιόρθωσης του DNA, με τη βοήθεια της μοριακής τεχνικής, Comet Assay.

Μέρος των ηπατοκυττάρων που απομονώθηκαν εξετάστηκαν απευθείας για την εκτίμηση της γενετοξικότητας των τρόπων θανάτωσης (*ex vivo* εκτίμηση) ενώ τα υπόλοιπα επώαστηκαν σε υγρή καλλιέργεια, σε θρεπτικό υλικό, για την αναγνώριση βλάβης του DNA, που δεν εντοπίστηκε κατά το στάδιο της *ex vivo* εφαρμογής, από τα ένζυμα επιδιόρθωσης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, έδειξαν ποσοστά γενετοξικότητας σε όλους τους τρόπους θανάτωσης γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η «ανάλυση κομητών»

είναι μια πρακτική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της καταπόνησης ενός οργανισμού.

Η θανάτωση με ασφυξία κατέγραψε το μεγαλύτερο ποσοστό γενοτοξικότητας σε σχέση με τους άλλους τρόπους θανάτωσης. Σχετική ομοιότητα παρουσιάστηκε στα αποτελέσματα των υπόλοιπων τριών τρόπων θανάτωσης (θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι, θανάτωση σε παγόνερο, αναισθησία με διοξείδιο του άνθρακα και μετέπειτα θανάτωση του ψαριού σε παγόνερο).

Επίσης σημαντικό είναι και το γεγονός ότι τα αποτελέσματα από όλους τους διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης, αποτυπώθηκαν εξ ίσου στον έλεγχο των ηπατοκυττάρων όσο και στον έλεγχο των ερυθροκυττάρων.

Διαφοροποίηση υπήρξε στα αποτελέσματα που προήλθαν από την επιδιόρθωση των ηπατικών κυττάρων, όσον αφορά τον τρόπο θανάτωσης που πραγματοποιήθηκε με χτύπημα στο κεφάλι του ψαριού. Ο τρόπος αυτός παρουσίασε μεγαλύτερο ποσοστό γενοτοξικότητας σε σχέση με την θανάτωση με παγόνερο και την θανάτωση με διοξείδιο του άνθρακα και παγόνερο, των οποίων τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια. Ο τρόπος θανάτωσης με ασφυξία εξακολούθησε να καταγράφει υψηλά επίπεδα γενοτοξικότητας, τα οποία τον διαφοροποιούν κατά πολύ και στην διαδικασία της επιδιόρθωσης από τους άλλους τρεις τρόπους.

Ο τρόπος θανάτωσης με χτύπημα στο κεφάλι του ψαριού έδειξε μεν μικρό ποσοστό γενοτοξικότητας στην εξέταση των ερυθροκυττάρων και των ηπατοκυττάρων αλλά ωστόσο μη επιθυμητό, για το γεγονός και μόνο, ότι εφόσον σαν τρόπος θανάτωσης είναι «ακαριαίος», θα έπρεπε να επιφέρει τα μικρότερα δυνατά ποσοστά γενοτοξικότητας σε σχέση με τους άλλους.

Τέλος, αξιοσημείωτο είναι και το ότι δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά



σημαντική διαφορά του τρόπου θανάτωσης «διοξείδιο του άνθρακα και παγόνερο» σε σχέση με τον απλό τρόπο θανάτωσης με «παγόνερο».

**Λέξεις κλειδιά:** ανάλυση κομητών, θανάτωση, ευζωία, γενοτοξικότητα, καταπόνηση

**Keywords:** comet assay, slaughter, welfare, genotoxicity, stress

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 Τρόποι θανάτωσης .....	15
1.1.1 Θανάτωση με ασφυξία .....	16
1.1.2 Θανάτωση με παγόνερο .....	17
1.1.3 Θανάτωση με διοχέτευση CO <sub>2</sub> στο νερό.....	17
1.1.4 Θανάτωση με άμεση πρόκληση αιμορραγίας .....	18
1.1.5 Θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι.....	18
1.1.6 Θανάτωση με ηλεκτρισμό.....	19
1.1.7 Θανάτωση με χρήση αναισθητικών ουσιών .....	19
1.2 Τεχνική της Comet.....	20
1.3 Σκοπός της παρούσας εργασίας.....	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
2.1 Ιχθύες που χρησιμοποιήθηκαν και συνθήκες εκτροφής .....	23
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός - επιλογή τρόπων θανάτωσης.....	24
2.3 Δειγματοληψία - ανάλυση διαδικασίας τρόπων θανάτωσης .....	26
2.4 Προετοιμασία αίματος – απομόνωση ερυθροκυττάρων.....	28
2.5 Απομόνωση ηπατοκυττάρων .....	28
2.6 Λύση και ηλεκτροφόρηση των ηπατοκυττάρων.....	30
2.7 Επιδιόρθωση .....	31
2.8 Μέτρηση – ανάλυση κομητών.....	32
2.9 Στατιστική επεξεργασία.....	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	36
3.1 Εξέταση ερυθροκυττάρων .....	36
3.2 Εξέταση ηπατοκυττάρων .....	38
3.3 Επιδιόρθωση ηπατοκυττάρων.....	40
3.4 Στατιστικά χαρακτηριστικά των αποτελεσμάτων προερχόμενα από τους τέσσερις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης .....	42
3.5 Συζήτηση .....	43
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	55
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	58

6. ABSTRACT .....	64
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....	67

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως καταπόνηση (stress) μπορεί να χαρακτηριστεί η επίδραση ποικίλων εξωτερικών και εσωτερικών παραγόντων, που προκαλεί μία μεταβολή στην ομοιόσταση ή στην κατάσταση προσαρμογής του οργανισμού (Παπουτσόγλου 1998).

Οι παράγοντες καταπόνησης μπορούν να ταξινομηθούν σε χημικούς, φυσικούς, βιολογικούς, ανθρωπογενείς και ηθολογικούς.

Στους εκτρεφόμενους ιχθείς, η επίδραση της καταπόνησης στην αύξηση του σώματος, στην αναπαραγωγή, στην παραγωγικότητα και στην αντίσταση σε διάφορους νοσογόνους παράγοντες είναι ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας. Ειδικότερα, σε εκτρεφόμενους ιχθείς που υπόκεινται σε καταπόνηση παρατηρούνται: επιβράδυνση της αύξησης και ανάπτυξης του σώματος, μείωση της παραγωγικότητας, διαταραχές της αναπαραγωγής, αυξημένη ευαισθησία σε νοσογόνους παράγοντες, χαμηλή ποιότητα σάρκας κ.λπ. (Iwama 1974).

Κατά τη μαζική παραγωγή των ιχθύων, οι πιο σημαντικές αιτίες προκλήσεως καταπόνησης είναι οι διάφοροι χειρισμοί όπως μεταφορά, διαλογές, ζύγισμα, η αυξημένη πυκνότητα εκτροφής, η ύπαρξη ακατάλληλου περιβάλλοντος διαβίωσης (υποβαθμισμένη ποιότητα νερού), καθώς και η λανθασμένη διαχείριση των εκτρεφόμενων πληθυσμών (ακανόνιστη παροχή τροφής, άσκοπες επισκέψεις στους χώρους εκτροφής κ.λπ.).

Επίσης στην τελική φάση της παραγωγικής διαδικασίας, δηλαδή κατά την εξαλίευση και την θανάτωση των ιχθύων με διάφορους τρόπους, παρατηρείται το φαινόμενο της καταπόνησης, του οποίου η διερεύνηση αποτελεί και τον σκοπό εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Η φυσιολογική ανταπόκριση και προσαρμογή των ιχθύων στην καταπόνηση είναι ανάλογη με αυτή των ανώτερων σπονδυλωτών. Χαρακτηρίζεται από μεταβολές στο αίμα και στους ιστούς ανεξάρτητα από το αν η καταπόνηση προέρχεται από ανθρώπινους χειρισμούς (τεχνικές εκτροφής, μεταφορά, θεραπεία ασθενειών), αλλαγές στις συνθήκες περιβάλλοντος (θολερότητα, μόλυνση, θερμοκρασιακές αλλαγές νερού) ή ηθολογικούς παράγοντες (φόβος, επιβολή ιεραρχίας, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών). Οι διάφορες φυσιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν, καθώς το ψάρι προσπαθεί να αντεπεξέλθει στην καταπόνηση, είναι αντισταθμιστικές (π.χ. προσαρμοστικές) και απαραίτητες για να επιτευχθεί εγκλιματισμός στις νέες συνθήκες. Όλες αυτές οι φυσιολογικές αλλαγές συνολικά, έχουν ονομαστεί ως Γενικό Σύνδρομο Προσαρμογής (General Adaptation Syndrome - GAS) (Παπουτσόγλου 1998).

Ο ιχθύς προσπαθεί να αντιδράσει απέναντι στον παράγοντα καταπόνησης, χρησιμοποιώντας τα ενεργειακά του αποθέματα (Lines & Frost 1999). Οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της ομοιοστασίας προσπαθούν να πετύχουν τον εγκλιματισμό του ιχθύος στις νέες συνθήκες. Ένας ζωικός οργανισμός μπορεί να αντέξει την καταπόνηση για κάποιο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Στο στάδιο της προσαρμογής ή της εξάντλησης οι αντιδράσεις του οργανισμού έχουν σταθεροποιηθεί. Αν ο παράγοντας καταπόνησης δεν απομακρυνθεί, τα ενεργειακά αποθέματα του ιχθύος τελειώνουν και αυτός οδηγείται στην εξάντληση. Στη φάση αυτή, ελαχιστοποιείται η ικανότητά του να αντιστέκεται σε νοσογόνους ή λοιμογόνους παράγοντες. Αν ο οργανισμός του ιχθύος δεν καταφέρει να προσαρμοσθεί, οι διάφορες παθολογικές καταστάσεις που προκύπτουν ενδεχομένως να οδηγήσουν σε θάνατο. Το στάδιο της προσαρμογής ποικίλει ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια

δράσης του παράγοντα καταπόνησης, το είδος του ιχθύος και την ατομική γενοτυπική αντοχή σε παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση (Rice 1996).

Η καταπόνηση μπορεί να διακριθεί σε οξεία και σε χρόνια (οξύ – acute και χρόνιο – chronic stress). Η οξεία μορφή καταπόνησης διαρκεί λεπτά ή ώρες και είναι ουσιαστικά μία φυσιολογική αντίδραση, που σταματά μόλις παύσει η επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα. Παρά το ενεργειακό κόστος, είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός προσαρμογής σε μεταβολές του περιβάλλοντος και ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί φυσικά συχνότατα. Αν η επίδραση του παράγοντα που προκαλεί την καταπόνηση συνεχίζεται, τότε αυτή είναι πλέον χρόνια (διαρκεί ημέρες, μήνες ή και περισσότερο). Παρόλο που και σ' αυτή την περίπτωση οι αντιδράσεις του οργανισμού αποσκοπούν στην προσαρμογή, μπορεί μακροπρόθεσμα να έχουν δυσμενείς συνέπειες στις μεταβολικές και φυσιολογικές διεργασίες του (Weerd & Komen 1998).

Κατά τη διαδικασία της μαζικής ελεγχόμενης παραγωγής των ιχθύων, οι περιπτώσεις οξείας και χρόνιας καταπόνησης είναι γεγονός. Χρόνια καταπόνηση εισάγει στους ιχθυοπληθυσμούς κυρίως η αυξημένη ιχθυοφόρτιση μέσα στους κλωβούς η οποία είναι αναγκαία συνθήκη για την επιτυχή εκτροφή και σχετίζεται άμεσα με τους οικονομικούς δείκτες της παραγωγής.

Επίσης, είναι απαραίτητοι ορισμένοι χειρισμοί οι οποίοι γίνονται προγραμματισμένα και αφορούν τον τρόπο διαχείρισης των ιχθυοπληθυσμών όπως π.χ. εμβολιασμοί, διαλογές, αλλαγές διχτυών κ.λπ.. Οι χειρισμοί αυτοί προκαλούν οξεία καταπόνηση η οποία οφείλεται και στην έκθεση του ψαριού σε συνθήκες ατμόσφαιρας για ορισμένο χρονικό διάστημα (handling stress).

Κατά το τελευταίο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας όπου ουσιαστικά πραγματοποιείται η εξαλίευση και η θανάτωση των ψαριών, εφαρμόζονται διάφοροι

τρόποι θανάτωσης με σκοπό την ελαχιστοποίηση – αποφυγή της καταπόνησης του οργανισμού, καθώς και τη διατήρηση καλής εμφάνισης του προϊόντος, λίγο πριν την προώθηση του στην κατανάλωση.

### 1.1 Τρόποι θανάτωσης

Οι περισσότερο διαδεδομένοι τρόποι θανάτωσης που χρησιμοποιούνται και σε εργαστηριακά πειράματα για την διερεύνηση της καταπόνησης είναι οι εξής:

- Ασφυξία μέσω απομάκρυνσης του οργανισμού από το νερό
- Πρόκληση θερμικού σοκ και έμμεσα ασφυξία με εμβάπτιση του οργανισμού σε παγόνερο
- Θανάτωση μέσω διοχέτευσης υψηλής ποσότητας CO<sub>2</sub> σε νερό όπου περιέχονται τα ψάρια
- Πρόκληση αιμορραγίας – κοινώς αφαιμάξη (χωρίς την ύπαρξη νάρκωσης προγενέστερα)
- Χτύπημα, στο κεφάλι του ψαριού με αποτέλεσμα την ζάλη ή και την άμεση κατάληξη αυτού
- Πρόκληση θανάτου με ηλεκτρισμό
- Νάρκωση με αναισθητικά πριν την θανάτωση του ψαριού

Η επίδραση των τρόπων αυτών θανάτωσης, είναι που μας ενδιαφέρει περισσότερο, διότι είναι αφ' ενός δεδομένο ότι υπάρχει διαφορά από τρόπο σε τρόπο και αφ' ετέρου είναι σημαντικό να ειπωθεί πως ο κάθε τρόπος θανάτωσης εξαρτάται από διάφορα χαρακτηριστικά όπως:

- το κατά πόσο έντονη είναι η διαδικασία με την οποία επιτελείται ο τρόπος θανάτωσης

- τη χρονική διάρκεια που μεσολαβεί από τη στιγμή όπου τα ψάρια απομακρύνονται από το νερό, έως και τη στιγμή που θα θανατωθούν
- τους χειρισμούς από μέρος του εκτροφέα, οι οποίοι στοχεύουν, στην πλειονότητα, στην ελαχιστοποίηση της υποβάθμισης της σάρκας

### 1.1.1 Θανάτωση με ασφυξία

Αποτελεί μια εξαιρετικά βίαιη και επώδυνη μέθοδο κατά την οποία τα ψάρια, κατά την εξαγωγή τους από το νερό, στην προσπάθειά τους να ξεφύγουν, ασκούν μεγάλη πίεση στο σώμα τους με αποτέλεσμα την μεγιστοποίηση της καταπόνησης. Ωστόσο πρόκειται για την πρώτη μέθοδο θανάτωσης που χρησιμοποιείται από παλιά.

Η έξοδος από το νερό συνοδεύεται με αφυδάτωση και επομένως αδυναμία κίνησης των βραγχίων αποτρέποντας την ανταλλαγή οξυγόνου με το περιβάλλον, κάτι που ουσιαστικά οδηγεί στην ανοξία (Robb & Kestin 2002). Ο χρόνος που θα παραμείνει ζωντανός ο οργανισμός εξαρτάται όμως και από τις συνθήκες περιβάλλοντος.

Παραδείγματος χάριν, σε άτομα ιριδίζουσας πέστροφας μελέτες έδειξαν πως ο θάνατος επέρχεται μετά από 2,6 λεπτά σε 20°C, μετά από 3 λεπτά σε 14 °C και μετά από 9,6 λεπτά σε 2 °C (Kestin *et al*, 1991).

Όπως σε όλους τους ποικιλόθερμους οργανισμούς, έτσι και στα ψάρια η θερμοκρασία του σώματός τους κυμαίνεται σύμφωνα με την θερμοκρασία περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα όταν η θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι πολύ χαμηλή, η απαίτηση των ιστών σε οξυγόνο μειώνεται παρατείνοντας ουσιαστικά το χρόνο θανάτωσης.



### 1.1.2 Θανάτωση με παγόνερο

Αποτελεί έναν σχετικά έντονο αλλά αναμφισβήτητα γρήγορο τρόπο θανάτωσης, γι' αυτό ενδεχομένως χαρακτηρίζεται και ως η πιο διαδεδομένη μέθοδος θανάτωσης. Η ψύξη γενικά και ειδικότερα η απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας προκαλεί την παράλυση των μυών του ψαριού.

Το ψάρι που θανατώνεται με τον υγρό πάγο τείνει να πεθαίνει γρηγορότερα και παρουσιάζει μικρότερα επίπεδα καταπόνησης από τη χρήση συμβατικού πάγου, αν και έχει αποδειχθεί πως γενικά η ψύξη αποτελεί σοβαρό στρεσογόνο παράγοντα για τα ψάρια (Skjervold *et al*, 2001).

### 1.1.3 Θανάτωση με διοχέτευση CO<sub>2</sub> στο νερό

Αποτελεί μέθοδο κατά την οποία, ο κορεσμός ύδατος με το διοξείδιο του άνθρακα δημιουργεί αφενός όξινο και αφετέρου ανοξικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα την νάρκωση των εκτιθέμενων σε αυτό ψαριών. Ένα από τα κύρια μειονεκτήματα της μεθόδου είναι οι σπασμωδικές κινήσεις των ψαριών που παρατηρούνται κατά τα πρώτο λεπτό της διαδικασίας οι οποίες ενισχύουν το ενδεχόμενο της ύπαρξης καταπόνησης (Robb & Kestin 2002, Southgate & Wall 2001).

Σε μερικά είδη, όπως στην πέστροφα και στον κυπρίνο η διοχέτευση διοξειδίου του άνθρακα στο νερό συνδυάζεται με την αύξηση παραγωγής βλέννας στο σώμα τους, γεγονός που ενισχύει αναμφισβήτητα την πιθανότητα καταπόνησης (Conte 2004, Shephard 1994).

#### **1.1.4 Θανάτωση με άμεση πρόκληση αιμορραγίας**

Συνιστά μια αργή σχετικά μέθοδο, δεδομένου ότι τα ψάρια δεν αναισθητοποιούνται άμεσα. Τις περισσότερες φορές αυτή πραγματοποιείται είτε με την άμεση αποκοπή των βραγχίων, ή ακόμη και με απευθείας διάτρηση με αιχμηρό αντικείμενο στην καρδιά των ψαριών (EFSA 2004).

Αν και αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται πλέον εμπορικά στο Ηνωμένο Βασίλειο και στη Νορβηγία, χαρακτηρίστηκε ως απάνθρωπη από την επιστημονική επιτροπή της υγείας των ζώων και της ευημερίας της ευρωπαϊκής αρχής, διότι δεν χρησιμοποιείται αναισθησία προηγουμένως (Van de Vis *et al.* 2003, EFSA 2004).

#### **1.1.5 Θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι**

Με τη μέθοδο θανάτωσης αυτή τα ψάρια χτυπιούνται γρήγορα – ακαριαία στο κεφάλι, με συγκεκριμένο και συνήθως μεταλλικό αντικείμενο, με συνέπεια τη βίαια μετακίνηση του κρανίου προς τον εγκέφαλο προκαλώντας παροδική διάσειση ή και καθολική και μη αναστρέψιμη εγκεφαλική βλάβη (Van de Vis *et al.* 2003).

Αυτή η μέθοδος καθιστά τα ψάρια αναίσθητα αμέσως και αμετάκλητα ενίοτε εάν η ικανοποιητική δύναμη εφαρμόζεται στο σωστό μέρος του κεφαλιού (HSA 2005).

Από άλλη πλευρά η θανάτωση που προκαλείται με χτύπημα το οποίο προέρχεται από ανθρώπινο χέρι, παρουσιάζει αμφιλεγόμενες προκλήσεις, συμπεριλαμβανομένης και της κούρασης των χειριστών με αποτέλεσμα να μειώνεται η ακρίβεια κρούσης και επιπλέον να αυξάνεται η δράση της καταπόνησης. Γι αυτό το λόγο επικρατεί η άποψη πως η μέθοδος πρέπει να γίνεται με τεχνητά και αυτοματοποιημένα μέσα (Roth *et al.* 2007).

### 1.1.6 Θανάτωση με ηλεκτρισμό

Ανάλογα με την τάση, τη συχνότητα και τη διάρκεια που εφαρμόζεται ηλεκτρισμός μπορεί να επιτευχθεί απλή νάρκωση έως και ακαριαίος θάνατος. Η μικρή εφαρμογή τάσης αφ' ενός, δύναται να ζαλίζει το ψάρι και αφ' ετέρου η μεγαλύτερη εφαρμογή τάσης (ηλεκτροπληξία) είναι ικανή να καταστρέψει τη λειτουργία του εγκεφάλου και επομένως να αφαιρέσει από το ζώο εκτός των άλλων την αίσθηση επιτέλεσης της λειτουργίας της αναπνοής (HSA 2005). Η εφαρμογή μικρής τάσης αποτελεί αναστρέψιμη διαδικασία και επομένως θα πρέπει κατευθείαν να ακολουθηθεί η διαδικασία θανάτωσης του ψαριού, πριν αυτό ανακτήσει τις αισθήσεις του.

Αποτελεί ουσιαστικά την πιο γρήγορη μέθοδο θανάτωσης των ζώων, αν και παρ' όλα αυτά πολλές φορές έχουν παρατηρηθεί διάφορες κηλίδες αίματος στην περιοχή των μυών των ψαριών καθώς και παραδείγματα σπασμένων σπονδύλων (Poli *et al.* 2005)

Αν και η ηλεκτρική μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί πιο ανθρωπιστική, όταν συγκρίνεται με άλλες μεθόδους όπως η ασφυξία, αυτό δεν σημαίνει ότι είναι μια μέθοδος χωρίς μειονεκτήματα.

### 1.1.7 Θανάτωση με χρήση αναισθητικών ουσιών

Η αναισθησία ηρεμεί τα προς θανάτωση ψάρια και επομένως μειώνει ενδεχόμενα επίπεδα καταπόνησης. Η αναισθησία στοχεύει κυρίως στον περιορισμό της κινητικότητας των ιχθύων. Η εκτροφή των ψαριών απαιτεί μεγάλο αριθμό διαχειριστικών παρεμβάσεων οι οποίες προκειμένου να πραγματοποιηθούν με ευκολία και ασφάλεια, καθιστούν αναγκαία τη χρήση των αναισθητικών ουσιών.

Επίσης η αναισθησία αποτελεί ενδεδειγμένο τρόπο μεταφοράς των ψαριών εκτός του νερού, προκειμένου να συνεχιστεί ήρεμα η διαδικασία θανάτωσης με

οποιοδήποτε τρόπο. Εντούτοις, η νομοθεσία της ΕΕ απαγορεύει τη χρήση αναισθητικών πριν την θανάτωση των ψαριών (EFSA 2004).

Οι αναισθητικές ουσίες προσλαμβάνονται μέσω των βραγχίων και εισέρχονται γρήγορα στο κυκλοφορικό σύστημα. Η ανταπόκριση των ψαριών στα αναισθητικά εξαρτάται από το είδος, το μέγεθος και το σωματικό βάρος του ψαριού, την αναλογία μεταξύ του σωματικού βάρους και της επιφάνειας των βραγχίων του, τη λιποπεριεκτικότητα, το φύλο, τη σεξουαλική ωριμότητα, τη φυσική κατάσταση και την κατάσταση της υγείας του, αλλά και τη θερμοκρασία, το pH και την περιεκτικότητα του νερού στο οποίο διαβίει σε άλατα, μέταλλα και οξυγόνο (Τσαντήλας και συν. 2005).

## 1.2 Τεχνική της Comet

Η ανάλυση κομητών ή “comet assay” ή “Single – Cell Gel Electrophoresis” (SCGE), είναι μια τεχνική ανίχνευσης του κερματισμένου πυρηνικού DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ονομάζεται έτσι λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος που παρατηρείται, σε περίπτωση μεγάλης έκτασης βλάβης, κατά την έξοδο του κατακερματισμένου DNA από τον πυρήνα και τη μετακίνησή του προς την άνοδο (Ostling *et al.* 1984, Tice 1985).

Η “Comet assay” συνιστά πλέον μια καθιερωμένη, σχετικά απλή, γρήγορη και με αρκετά μεγάλη ευαισθησία τεχνική που μετρά την καταστροφή και την επιδιόρθωση του DNA ποσοτικοποιημένα σε ατομικά κύτταρα πληθυσμών (Olive & Banath 2006). Κάποιες άλλες αλλοιώσεις του γενετικού υλικού, όπως οι διασταυρώσεις πολυμερούς (π.χ. μάντρες θυμιδίνης) και η καταστροφή του DNA μέσω οξειδωσης μπορούν επίσης να μετρηθούν με την αλλοίωση συγκεκριμένων αντισωμάτων ή συγκεκριμένων επανορθωτικών ενζύμων στην Comet assay. Χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικό εργαλείο

για τη μελέτη της βλάβης του DNA (Speit & Hartmann 2005), ερευνώντας την τοξικότητα (Moller 2005) και τη βιοπαρακολούθηση ανθρώπων (Moller 2006a).

Ο κομήτης που παρατηρείται κατά την ανάλυση της εικόνας αποτελείται από μια χαρακτηριστική «κεφαλή» και μια «ουρά». Η περιοχή της κεφαλής αντιπροσωπεύει το DNA το οποίο δεν μετακινείται έξω από τον πυρήνα, ενώ στην ουρά παρατηρούνται ενδεχόμενα θραύσματα του DNA τα οποία εξέρχονται από τον πυρήνα και ολόκληρο το κυτταρικό σώμα.

Ανάλογα με τις συνθήκες, ελέγχεται αν η βλάβη αφορά το μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA. Σε αλκαλικό περιβάλλον γίνεται η αποπεριέλιξη και η μετουσίωση του DNA και ανιχνεύεται η βλάβη στο μονόκλωνο, ενώ σε ουδέτερο περιβάλλον λαμβάνει χώρα η μετουσίωση, και επομένως ανιχνεύονται οι βλάβες της διπλής αλυσίδας. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον και οι συνδεόμενες στο DNA πρωτεΐνες απομακρύνονται, ώστε να μην παρεμβάλλονται κατά τη μετανάστευση στο ηλεκτρικό πεδίο. Η μετέπειτα έκπλυση του πηκτώματος σε διαλύματα κατάλληλου pH συντελεί στην απομάκρυνση τυχόν ευρισκόμενων ιόντων, που ενδεχομένως μεταβάλλουν τις συνθήκες κατά τις οποίες θα πραγματοποιηθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

Με βάση ότι το ποσοστό του DNA είναι ανάλογο της έντασης φθορισμού και σε συνδυασμό με τη χρήση ειδικών λογισμικών, είναι δυνατή η εκτίμηση της βλάβης του DNA η οποία συνεκτιμάται με τη εξέταση ορισμένων παραμέτρων όπως: την ύπαρξη και την ποσοστιαία αναλογία των κυττάρων με ουρά, την εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά καθώς και το μήκος της ουράς (Nelms 1997, Collins 1997).

Η παράμετρος tail moment (TM) (το γινόμενο του μήκους της ουράς, επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη) και η παράμετρος Olive tail moment (OTM)

δίνουν μια καλή ένδειξη για τις μελέτες γενοτοξικότητας (Kumaravel & Jha 2006). Διάφορες μελέτες έχουν αναφέρει αυτές τις δύο παραμέτρους αλλά από τότε που το OTM αναφέρεται ως αυθαίρετη μονάδα και τα διαφορετικά προγράμματα επεξεργασίας των δεδομένων δίνουν ξεχωριστά αποτελέσματα, το TM θεωρείται καλύτερη και περισσότερο αξιόπιστη παράμετρος (Kumaravel & Jha 2006).

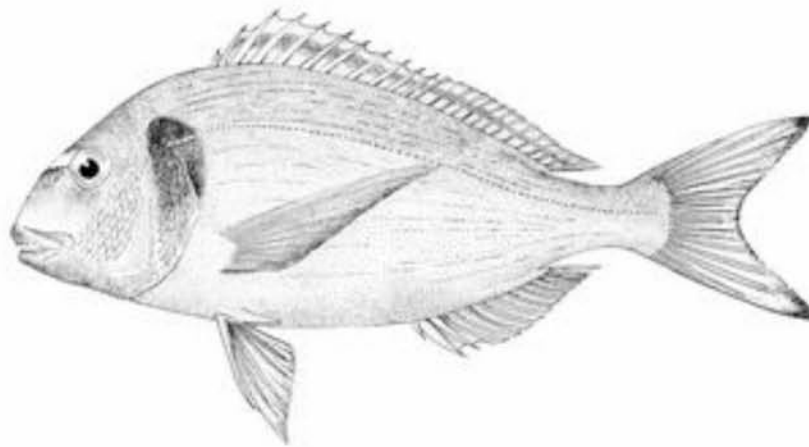
### **1.3 Σκοπός της παρούσας εργασίας**

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του μεγέθους της καταπόνησης με τη χρησιμοποίηση τεσσάρων τρόπων θανάτωσης (ασφυξία, χτύπημα στο κεφάλι, εμβάπτιση σε παγόνη, αναισθησία με διοξείδιο του άνθρακα και μετέπειτα εμβάπτιση του ψαριού σε παγόνη). Τα επίπεδα καταπόνησης θα καθοριστούν μέσω της ανίχνευσης του κατακερματισμένου DNA από το ήπαρ και το αίμα ατόμων τσιπούρας, με τη βοήθεια της μοριακής τεχνικής, «ανάλυση κομητών» (comet assay).

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Ιχθύες που χρησιμοποιήθηκαν και συνθήκες εκτροφής

Ο ιχθύς που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας ήταν η τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Εικόνα 1), η ακριβής κατάταξη του οποίου είναι η παρακάτω:



Εικόνα 1. Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

**Βασίλειο:** *Animalia*

**Υποβασίλειο:** *Metazoa*

**Φύλο:** *Chordata*

**Υποφύλο:** *Vertabrata*

**Κλάση:** *Teleostei*

**Υποκλάση:** *Euteleostei*

**Οικογένεια:** *Sparidae*

**Γένος:** *Sparus*

**Είδος:** *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758)

Το πείραμα έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις κλειστού κυκλώματος θαλασσινού νερού του σταθμού, του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα του Ιουνίου 2010. Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 16 άτομα τσιπούρας, μέσου βάρους 120g ( $\pm 30$ ) και μέσου μήκους 20cm ( $\pm 2$ ), προερχόμενα από ιχθυοκαλλιέργεια του Παγασητικού κόλπου.

## 2.2 Πειραματικός σχεδιασμός - επιλογή τρόπων θανάτωσης

Για την εκτέλεση του παρόντος πειράματος επιλέχθηκαν τέσσερις (4) τρόποι θανάτωσης με το σκεπτικό αφενός ότι αποτελούν τους περισσότερο διαδεδομένους τρόπους κατά την μαζική θανάτωση ιχθύων στις υδατοκαλλιέργειες και αφετέρου ότι αποτελούν αναίμακτους τρόπους και ειδικότερα δεν επηρεάζουν τα εξωτερικά χαρακτηριστικά (υφή σάρκας, παραμόρφωση, οσμή) του προς διάθεση προϊόντος στον καταναλωτή. Ως εκ τούτου επιλέχθηκαν οι παρακάτω τρόποι θανάτωσης:

1. Θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι
2. Θανάτωση με εμβάπτιση σε παγόθερο
3. Θανάτωση με χρήση CO<sub>2</sub> ως αναισθητικό και εμβάπτιση σε παγόθερο
4. Θανάτωση με ασφυξία

Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα χωρίστηκαν σε τέσσερις διαφορετικές δεξαμενές (τέσσερα ψάρια σε κάθε δεξαμενή), από όπου κάθε φορά γινόταν τυχαία δειγματοληψία ενός ψαριού από κάθε δεξαμενή με σκοπό την μετέπειτα θανάτωσή του. Μια ημερήσια πειραματική διαδικασία, περιελάμβανε τη θανάτωση τεσσάρων διαφορετικών ιχθύων, από μια δεξαμενή, για κάθε έναν από τους τέσσερις τρόπους θανάτωσης. Επίσης στην κάθε μία από τις τέσσερις μέρες που χρειάστηκαν για



να πραγματοποιηθεί το πείραμα, γινόταν εναλλαγή ως προς την σειρά του τρόπου θανάτωσης. Η βάση αυτού του συλλογισμού απορρέει από την χρήση του στατιστικού μοντέλου των λατινικών τετραγώνων (Latin Squares). Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται αυτό το μοντέλο είναι για να μειωθεί η επίδραση της οποιασδήποτε «ανεπιθύμητης» μεταβλητής (εν προκειμένω η σειρά με την οποία λάμβανε χώρα το πείραμα, καθώς επίσης και η σειρά εξαλίευσης των ψαριών από την κάθε δεξαμενή), με σκοπό τη μείωση του ενδεχόμενου πειραματικού σφάλματος. Ειδικότερα το πώς σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε το πείραμα φαίνεται παρακάτω στον Πίνακα 1.

**Πίνακας 1.** Χαρακτηριστική απεικόνιση σχετικά με τον τρόπο που πραγματοποιήθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός, όπου αριστερά διακρίνονται οι τρόποι θανάτωσης, πάνω δεξιά ο αριθμός των δεξαμενών και ακριβώς από κάτω η εναλλαγή της σειράς του τρόπου θανάτωσης

<b>Latin Squares</b>					
		<b>ΔΕΞ/ΝΗ 1</b>	<b>ΔΕΞ/ΝΗ 2</b>	<b>ΔΕΞ/ΝΗ 3</b>	<b>ΔΕΞ/ΝΗ 4</b>
<b>Ημέρες πειράματος</b>		<b>1η</b>	<b>2η</b>	<b>3η</b>	<b>4η</b>
<b>ΧΤΥΠΗΜΑ</b>	<b>A</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>ΠΑΓΟΝΕΡΟ</b>	<b>B</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
<b>CO<sub>2</sub>+ΠΑΓΟΝΕΡΟ</b>	<b>C</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>ΑΣΦΥΞΙΑ</b>	<b>D</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>

### 2.3 Δειγματοληψία - ανάλυση διαδικασίας τρόπων θανάτωσης

Η σειρά κατά την οποία τα ψάρια θανατώθηκαν, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, άλλαξε σε κάθε επόμενη δειγματοληψία. Έτσι την πρώτη ημέρα, ως αρχική μέθοδος θανάτωσης χρησιμοποιήθηκε το χτύπημα στο κεφάλι. Το ψάρι αφού εξαλειύτηκε όσο το δυνατόν πιο ανώδυνα και ταχύτερα με απόχη από την δεξαμενή, δέχτηκε ένα δυνατό και ακαριαίο χτύπημα στην περιοχή του κεφαλιού. Το συγκεκριμένο αντικείμενο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και η διαδικασία έγινε από το ίδιο άτομο ώστε να εφαρμόζεται, όσο το δυνατόν, ίδια δύναμη κάθε φορά. Όλα τα ψάρια έπειτα από το χτύπημα έχαναν τις αισθήσεις τους και αμέσως λάμβανε χώρα η διαδικασία μέτρησης του βάρους (Εικόνα 2) και του μήκους τους (Εικόνα 3), ώσπου σε τελευταίο πλέον στάδιο πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και εκτομή για την αφαίρεση του ήπατος.



Εικόνα 2. Μέτρηση μήκους



Εικόνα 3. Μέτρηση βάρους

Κατά την διαδικασία θανάτωσης με παγόνερο, το ψάρι αφού εξαλειύτηκε με απόχη από την δεξαμενή, τοποθετήθηκε αμέσως σε δοχείο που περιείχε πάγο και νερό σε ποσοστό περιεκτικότητας περίπου 1:1. Όταν το ψάρι σταματούσε πλέον να κινεί το σώμα του και τα βραγχιακά του επικαλύμματα, τοποθετήθηκε εκτός του παγόνερου και ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες όπως περιγράφηκαν προηγουμένως (μετρήσεις

σωματομετρικών χαρακτηριστικών, αιμοληψία και αφαίρεση ήπατος).

Στην επόμενη διαδικασία θανάτωσης, η οποία περιελάμβανε νάρκωση με διοξείδιο του άνθρακα και εμβάπτιση σε παγόνερο, το ψάρι αφού εξαλειύτηκε με γρήγορες κινήσεις από την δεξαμενή, τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε: θαλασσινό νερό (ίδιας θερμοκρασίας με αυτό της δεξαμενής), καθώς επίσης και έναν σωλήνα παροχής ποσότητας διοξειδίου του άνθρακα. Η περιεκτικότητα του νερού σε διοξείδιο του άνθρακα ήταν η μεγαλύτερη δυνατή (έως κορεσμού).

Το ψάρι μετά την βύθισή του στο δοχείο και σε χρόνο από έξι έως δέκα δευτερόλεπτα, παρουσίασε έντονες σπασμωδικές κινήσεις και προσπαθούσε να εξέλθει της επιφάνειας του νερού (απόρροια του ανοξικού περιβάλλοντος). Ως εκ τούτου η επιφάνεια του δοχείου κρατιόταν καλυμμένη και μετά από χρόνο 30 δευτερολέπτων, κατά μέσο όρο, το ψάρι περνούσε σε φάση αναισθησίας. Αμέσως τοποθετούταν σε δοχείο που περιείχε παγόνερο (σύσταση 50%πάγος – 50%νερό), ώσπου ορατά τουλάχιστον αλλά και δια της αφής να μην παρατηρείται οποιαδήποτε κίνηση. Οι τελικές φάσεις περιελάμβαναν μετρήσεις σωματομετρικών όπως και αιμοληψία και αφαίρεση ήπατος.

Στην τελευταία μέθοδο θανάτωσης (ασφυξία), το ψάρι μετά την εξαλίευση του από την δεξαμενή, παρέμεινε στην απόχρη εκτός νερού, για τόσο χρόνο ώστε να μην παρατηρείται πλέον οποιαδήποτε κίνηση από αυτό. Ο συνήθης απαιτούμενος χρόνος για να χάσει πλήρως τις αισθήσεις του το ψάρι, κυμάνθηκε γύρω στα δέκα λεπτά. Οι τελικές φάσεις περιελάμβαναν μετρήσεις σωματομετρικών όπως και αιμοληψία και αφαίρεση ήπατος.

## 2.4 Προετοιμασία αίματος – απομόνωση ερυθροκυττάρων

Η διαδικασία απομόνωσης των ερυθροκυττάρων, περιελάμβανε δύο βασικά στάδια. Κατ' αρχάς πραγματοποιήθηκε άμεση λήψη αίματος μετά τη θανάτωση του ψαριού και κατά δεύτερον έγινε η περαιτέρω επεξεργασία αυτού στο εργαστήριο. Η ποσότητα αίματος που λαμβανόταν από το κάθε ψάρι ήταν 2ml, η οποία αμέσως τοποθετούνταν σε κυβέτα που περιείχε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) σε ποσότητα 1 ml.

Μετέπειτα στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε η αραίωση του αίματος και στη συνέχεια η χρώση του σε αντικειμενοφόρους πλάκες, λύση και ηλεκτροφόρηση των ερυθροκυττάρων – μια διαδικασία που θα περιγραφεί εκτενώς στην επόμενη παράγραφο (§ 2.5) και αφορά στην απομόνωση των κυττάρων ήπατος.

## 2.5 Απομόνωση ηπατοκυττάρων

Η διαδικασία απομόνωσης των ηπατοκυττάρων που ακολουθήθηκε περιελάμβανε δύο στάδια (Baksie & Fazier 1990, Devaux *et al.* 1997, Mitchelmore & Chipman 1998).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του ιστού από τυχόν ιστούς αίματος με διαδοχικές πλύσεις με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα HBSS ελεύθερο ασβεστίου-μαγνησίου (Ca ή Mg) και έπειτα, έλαβε χώρα η αφομοίωση του ήπατος. Αμέσως μετά, εφαρμόστηκαν ενέσεις κολλαγενάσης (CLS, type I) συγκέντρωσης 0,04% (κολλαγενάση σε διάλυμα HBSS). Η κολλαγενάση είναι ένζυμο το οποίο βοηθάει στην αφομοίωση του ήπατος. Αφού παρέμεινε ο ιστός για 15 λεπτά σε διάλυμα HBSS, το ήπαρ μεταφέρθηκε σε δισκίο “petri”, όπου τεμαχίστηκε σε αρκετά μικρά τμήματα. Καθ' όλη την διάρκεια που πραγματοποιούνταν η συγκεκριμένη εργασία, το δισκίο ήταν

τοποθετημένο πάνω σε τριμμένο πάγο. Το τεμαχισμένο ήπαρ μαζί με διάλυμα HBSS, μεταφέρθηκε έπειτα σε μικρό γυάλινο δοχείο ζέσεως και τοποθετήθηκε σε μηχανήμα ανάδευσης για περίπου μισή ώρα. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του δοχείου μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου «Falcon», αφού πρώτα φιλτραρίστηκε με αποστειρωμένη γάζα. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση του αιωρήματος των κυττάρων στις 2.000 στροφές για πέντε λεπτά και μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου, κρατήθηκε το “pellet” (το ίζημα κατά κάποιο τρόπο που εμφανίζεται στο κάτω μέρος του ειδικού δοχείου) και προστέθηκε φρέσκο και κρύο διάλυμα HBSS. Έγινε επανάληψη με δύο διαδοχικές πλύσεις με HBSS επαναλαμβάνοντας και την διαδικασία της φυγοκέντρισης στις 2,000 στροφές για πέντε λεπτά, ώσπου τέλος το εναπομείναν “pellet” αναμιχθηκε σε 7 – 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate Buffered Saline). Η ποσότητα του διαλύματος PBS που είχε προστεθεί υπολογίστηκε ώστε η τελική συγκέντρωση των βιώσιμων κυττάρων να είναι 100.000/ml.

Έπειτα έγινε η μεταφορά των ηπατοκυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Για να επιτευχθεί αυτό, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε καθαρή αλκοόλη και στη συνέχεια στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι να παγώσει για χρονικό διάστημα τουλάχιστον δυο ωρών πριν. Στο διάστημα αυτό ετοιμάστηκε διάλυμα - πήκτωμα αγαρόζης (NMP Normal Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% και αφού κρύωσε λίγο, έγινε κάλυψη με μία στρώση της αγαρόζης στην ειδική επιφάνεια της παγωμένης αντικειμενοφόρου. Σημαντικό είναι να ειπωθεί πως η αντικειμενοφόρος πλάκα από την στιγμή που έβγαине από το διάλυμα αλκοόλης από τους  $-20^{\circ}\text{C}$  παρέμεινε τοποθετημένη πάνω σε τριμμένο πάγο. Ωστόσο το μείγμα να «ζελατινοποιηθεί» πάνω στην αντικειμενοφόρο, προετοιμάστηκε ένα νέο μίγμα αγαρόζης LMP (Low Melting Point) συγκέντρωσης 0,5%. Μετά από λίγη ώρα και αφού η νέα αγαρόζη είχε κρυώσει προστέθηκαν 20μl από

το κυτταρικό αιώρημα σε 80μl του διαλύματος της αγαρόζης (LMP), έγινε μια ανάδευση μέσα στην κυβέτα και αμέσως μετά όλο το μείγμα αγαρόζης με το κυτταρικό αιώρημα τοποθετήθηκε πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, στο σημείο όπου η οποία ήταν ήδη καλυμμένη με την παλιά στρώση αγαρόζης που είχε ζελατινοποιηθεί (η διαδικασία πάνω σε πάγο). Ακολούθησε η τοποθέτηση καλυπρίδας πάνω ακριβώς από εκεί που βρίσκονταν τα ηπατικά κύτταρα. Μετά τη ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αγαρόζης, η καλυπρίδα απομακρύνθηκε με προσοχή έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι ενδεχόμενες απώλειες κυττάρων.

## **2.6 Λύση και ηλεκτροφόρηση των ηπατοκυττάρων**

Μετά το τέλος της προηγούμενης φάσης, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε ειδικό διάλυμα λύσης για μία ώρα, το οποίο είχε φτιαχτεί εκείνη την ώρα για να είναι φρέσκο (και προφανώς ήταν κρύο – διότι το κρύο διάλυμα βοηθάει στο να διατηρείται η σταθερότητα της αγαρόζης) (Tice *et al.* 2000). Το διάλυμα αυτό περιείχε NaCl συγκέντρωσης 2.5 M, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) συγκέντρωσης 100 mM, Tris συγκέντρωσης 10 mM και στο τέλος προστέθηκαν 1% Triton – X 100 και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide). Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος με συμπυκνωμένο διάλυμα HCl, έτσι ώστε να φτάσει στο 10 και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους 4 °C για περίπου τριάντα λεπτά μέχρι να κρυώσει

Ύστερα ακολούθησε εξαγωγή της αντικειμενοφόρου από το διάλυμα λύσης, με σκοπό την προετοιμασία της για το στάδιο της ηλεκτροφόρησης. Έτσι η αντικειμενοφόρος πλάκα αμέσως μετά την έξοδό της από το διάλυμα λύσης ξεπλύθηκε με αποσταγμένο νερό (για να απομακρυνθούν τα διάφορα χημικά όπως το EDTA και το αλάτι NaCl) και στη συνέχεια τοποθετήθηκε για 20 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα

ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε να συμβεί η αποπεριέλιξη του DNA (ή αλλιώς να «ξεδιπλωθεί» το DNA) και να δημιουργηθούν μονόκλωνες ρήξεις του DNA. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 0,075 M NaOH και 1 mM EDTA και το pH του ήταν πάνω από 12 (συνήθως 12,5 – 12,8). Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα βρισκόταν μέσα σε οριζόντιο «μπάνιο» ηλεκτροφόρησης. Μετά το τέλος των 20 λεπτών ξεκίνησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης του μονόκλωνου DNA, η οποία διήρκεσε 10 λεπτά. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε ήταν στα 25 V και 300 mA (Hartmann *et al.* 2003).

Μετά την ηλεκτροφόρηση η αντικειμενοφόρος πλάκα ξεπλύθηκε προσεκτικά (για να μη ξεκολλήσει η αγαρόζη) με ουδέτερο διάλυμα για να απομακρυνθεί αρχικά το EDTA, καθώς επίσης και για να επανέλθει το DNA στη δίκλωνη μορφή του, έτσι ώστε η χρησιμοποιούμενη χρωστική (SYBR Green I), να μπορεί να δράσει κατά τη διάρκεια της χρώσης (στο επόμενο βήμα). Το διάλυμα αυτό περιείχε Tris συγκέντρωσης 0,4 M και το pH του ήταν 7,5. Με αυτό γίνονταν περίπου τρεις πλύσεις της αντικειμενοφόρου πλάκας (McKelvey-Martin *et al.* 2003).

## 2.7 Επιδιόρθωση

Σκοπός της *in vitro* επιδιόρθωσης είναι η αναγνώριση της βλάβης του DNA των κυττάρων, που δεν εντοπίστηκε κατά το στάδιο της *ex vivo* εφαρμογής της comet ανάλυσης, από τα ένζυμα επιδιόρθωσης, καθώς και η εκτίμηση της επίδρασης των γενοτοξικών παραγόντων στην αναστολή, ενεργοποίηση και ενίσχυση των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν εκείνα που συμμετέχουν στο μηχανισμό επιδιόρθωσης και εκτομής βάσεων, τα οποία αφαιρούν και αναπληρώνουν τα τμήματα του μορίου DNA που έχουν υποστεί τη βλάβη, δημιουργώντας εγκοπές στον έναν

κλώνο. Αυτές οι εγκοπές είναι δυνατό να ανιχνευθούν. Η αύξηση του DNA στην «ουρά» του κομήτη αντικατοπτρίζει τη δραστηριότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης.

Έτσι ηπατοκύτταρα ατόμων τσιπούρας απομονώθηκαν και επωάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια που περιείχε ως θρεπτικό υλικό Leibovitz L-15. Συγκεκριμένα, μέρος των ηπατοκυττάρων που απομονώθηκαν όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.5, επωάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια που περιείχε για θρεπτικό υλικό Leibovitz L-15, 10% βόειο ορό (Fetal Calf Serum, FCS) και 1% αντιβιοτικά πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν στην υγρή καλλιέργεια σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) για χρονικό διάστημα δύο (2) ωρών (Lawrence *et al.* 1991). Υπενθυμίζεται ότι όλη η διαδικασία της ανάλυσης κομητών, από τη λήψη του ιστού μέχρι το στάδιο της ηλεκτροφόρησης, επιτελέστηκε σε θερμοκρασία μικρότερη των 4°C, ώστε να παρεμποδιστεί όσο το δυνατόν περισσότερο η λειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης (Henderson *et al.* 1998).

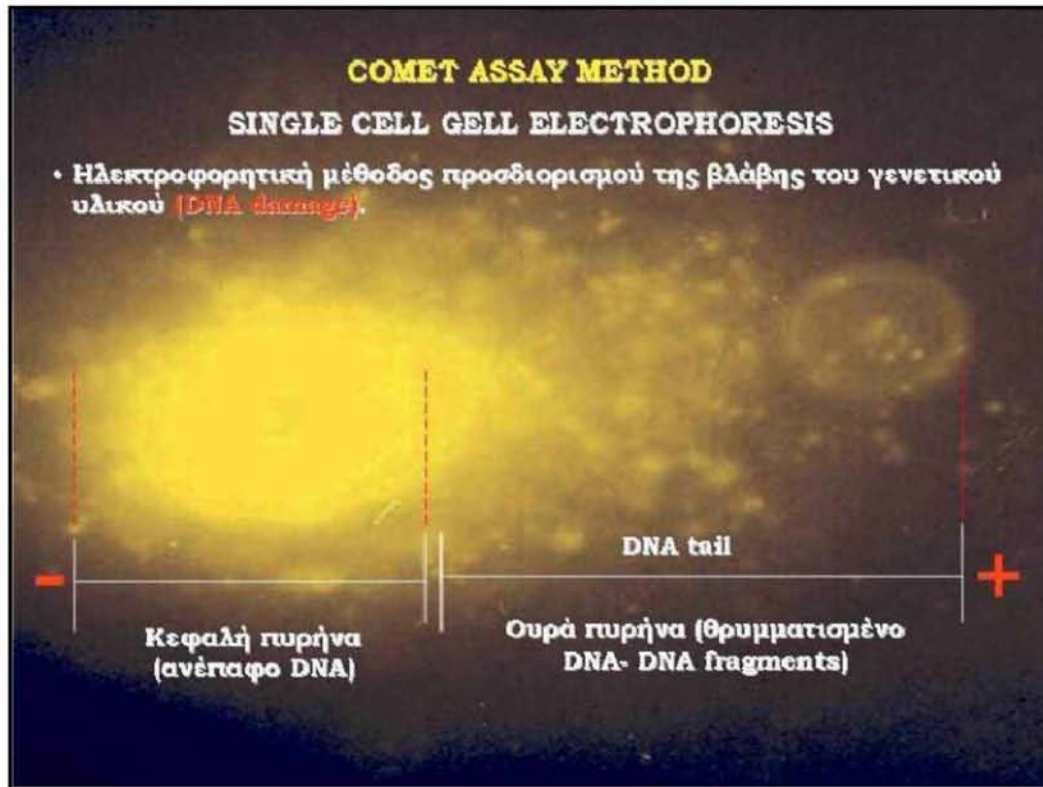
## **2.8 Μέτρηση – ανάλυση κομητών**

Για την εκτίμηση της βλάβης του γενετικού υλικού, ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση των πλακών, όπου διακρινόταν το γενετικό υλικό των πυρήνων. Η χρώση του DNA έγινε με τη χρωστική SYBR Green I, η οποία χρωματίζει τους πυρήνες με έντονο φωτεινό πράσινο χρώμα. Η ποσότητα που προστέθηκε σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα ήταν περίπου 20 μl. Συγκεκριμένα, περίπου 100 πυρήνες φωτογραφήθηκαν τυχαία σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού και σε μεγέθυνση 100X (ZEISS, HBO 50/AC) και η φωτογράφιση των πυρήνων έγινε με ειδικό πρόγραμμα του μικροσκοπίου (ProgRes Capture Pro, rets. 2.1).



Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το ειδικό λογισμικό CASP v.1.2.2 (Comet Assay Software Project), (Konca 2006), το οποίο έχει τη δυνατότητα να δίνει τα στοιχεία του κάθε κομήτη, όπως το ποσοστό του γενετικού υλικού στην ουρά ή την κεφαλή και το μήκος της ουράς. Αυτό το πρόγραμμα μπορεί να σκοράρει τους κομήτες μετρώντας το «Tail Moment» (TM) του κάθε ένα από αυτούς. Το TM ορίζεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη). Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του TM (ο κομήτης έχει μεγάλη και γεμάτη «ουρά») από ένα δείγμα, τόσο μεγαλύτερη καταστροφή έχει υποστεί το DNA του.

Συνολικά εξετάστηκαν για κάθε ψάρι τρία δείγματα (σε αντικειμενοφόρο πλάκα) μαζί με τις επαναλήψεις τους, από τις οποίες η μία περιείχε κύτταρα αίματος, η άλλη κύτταρα ήπατος και η τελευταία κύτταρα ήπατος που είχαν υποστεί την διαδικασία «επιδιόρθωσης».



**Εικόνα 4.** Πυρήνας σε σχήμα κομήτη, όπως προκύπτει μετά από ηλεκτροφόρηση. Διακρίνονται η κεφαλή του κομήτη, αποτελούμενη από το άθικτο γενετικό υλικό, καθώς και η ουρά που αποτελείται από το θρυμματισμένο γενετικό υλικό (DNA fragment). Το χαρακτηριστικό σχήμα κομήτη προκύπτει καθώς τα κομμάτια του γενετικού υλικού που έχουν υποστεί θρυμματισμό μετακινούνται προς το θετικό πόλο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, λόγω του αρνητικού τους φορτίου (Νταϊλιάνης 2005).

## 2.9 Στατιστική επεξεργασία

Στη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα ΤΜ για κάθε μεταχείριση. Για τον έλεγχο της ομοιογένειας των διασπορών χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο του Levene και για τον έλεγχο της κανονικότητας το κριτήριο των Kolmogorov-Smirnov.

Επειδή στα δεδομένα οι μέσες τιμές ήταν ανάλογες των διακυμάνσεων και, οι τιμές ήταν πολύ κοντά στο 0, δηλ. πολύ μικρές, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος  $\sqrt{x}$  για τη μετατροπή των δεδομένων (Zar 1984). Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το Γενικό Γραμμικό Μοντέλο (GLM - UniANOVA) με

την παραμετροποίηση του μοντέλου σε συγκρίσεις μέσων όρων ανά ζεύγη (main effects). Για τις πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Tukey HSD. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε  $\alpha=0,05$ .

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 Εξέταση ερυθροκυττάρων

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται ο αριθμός (N) των ερυθροκυττάρων που συλλέχθηκαν για παρατήρηση τελικά από κάθε διαφορετικό τρόπο θανάτωσης, καθώς επίσης και οι μέσοι όροι των τιμών του TM (υπό μορφή λογαρίθμου).

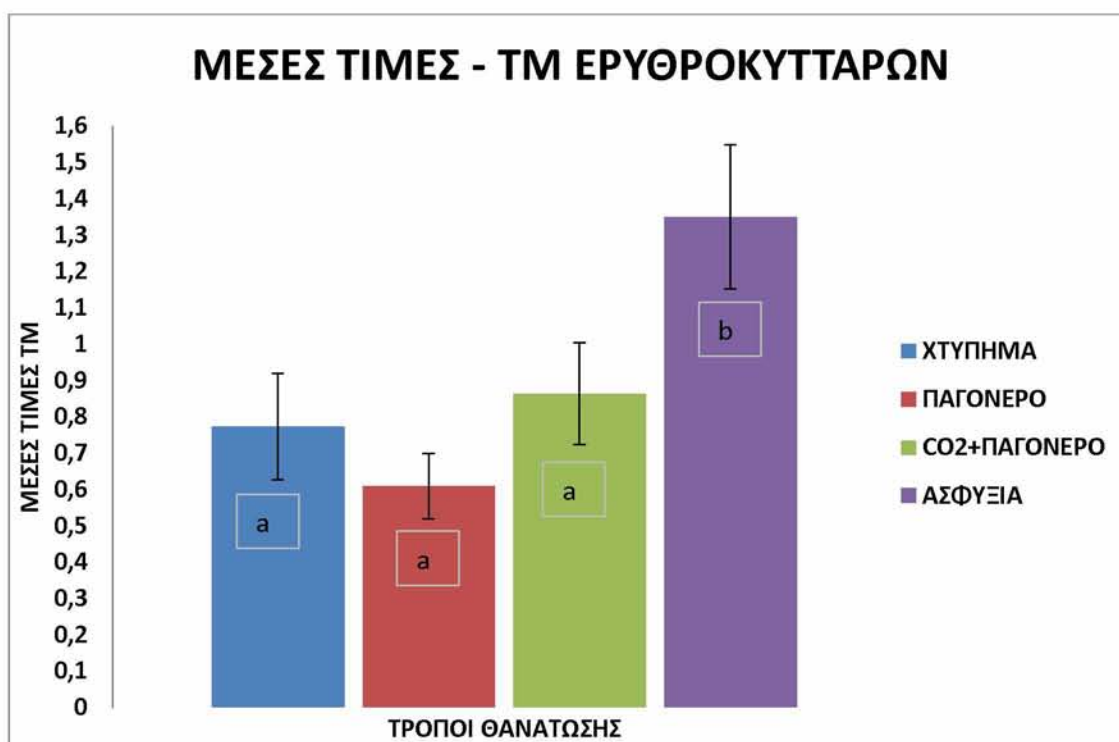
Όπως φαίνεται στον πίνακα ο τρόπος θανάτωσης με ασφυξία καταγράφει αφενός το μεγαλύτερο μέσο όρο τιμών TM και αφετέρου οι τιμές αυτού διαφέρουν στατιστικά ( $P < 0,05$ ) από τις τιμές των υπόλοιπων τρόπων θανάτωσης.

Οι τιμές των TM όσον αφορά τους τρεις πρώτους εφαρμοζόμενους τρόπους θανάτωσης (θανάτωση με παγόνερο, θανάτωση με CO<sub>2</sub> και παγόνερο και θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι) δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0,05$ ).

Οι μικρότερες τιμές TM που καταγράφηκαν ήταν στη μέθοδο θανάτωσης με «παγόνερο» (όπως φαίνεται στο Σχήμα 1) ωστόσο, δεν υπήρξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (όπως ειπώθηκε και προηγούμενα) που να υποδεικνύει πως το παγόνερο είναι αποτελεσματικότερος τρόπος θανάτωσης ούτως ώστε να διαχωρίζεται από τη θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι και με CO<sub>2</sub> και παγόνερο.

**Πίνακας 2.** Τρόποι θανάτωσης και λογαριθμικοί μέσοι όροι των τιμών TM από τα ερυθροκύτταρα των εξεταζόμενων ψαριών

Μέθοδος θανάτωσης	N	Subset	
		1	2
Ice(a)	373	,1267	
Stunning(a)	400	,1360	
CO <sub>2</sub> +ice(a)	391	,1415	
<b>Asphyxia(b)</b>	400		<b>,1934</b>
Sig.		,835	1,000



**Σχήμα 1.** Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών TM και στατιστικές διαφορές (a,b) που καταγράφηκαν από τους τέσσερις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης

### 3.2 Εξέταση ηπατοκυττάρων

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται ο αριθμός (N) των ηπατοκυττάρων που συλλέχθηκαν για παρατήρηση τελικά από κάθε διαφορετικό τρόπο θανάτωσης, καθώς επίσης και οι μέσοι όροι των τιμών του TM (υπό μορφή λογαρίθμου).

Όπως διακρίνεται από τον παρακάτω πίνακα ο τρόπος θανάτωσης με ασφυξία καταγράφει το μεγαλύτερο μέσο όρο τιμών TM και επιπλέον οι τιμές οι τιμές του, διαφέρουν στατιστικά ( $P < 0,05$ ) από τις τιμές των υπόλοιπων τρόπων θανάτωσης.

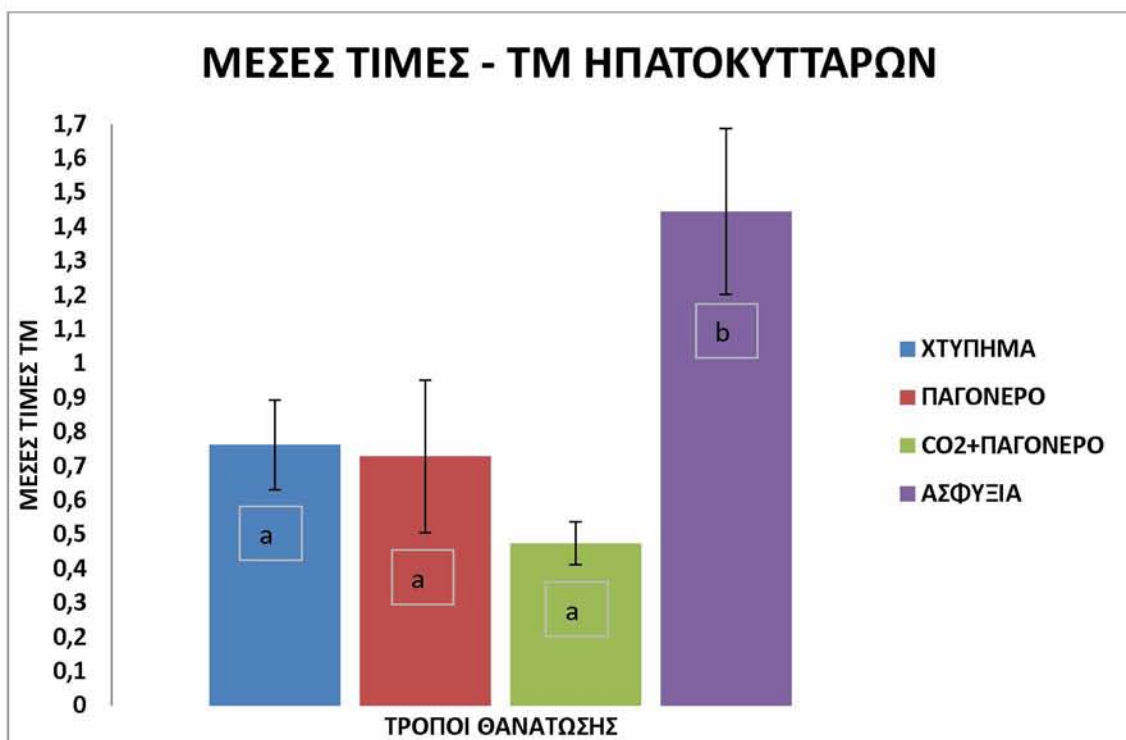
Οι τιμές των TM όσον αφορά τους τρεις πρώτους εφαρμοζόμενους τρόπους θανάτωσης (θανάτωση με παγόνερο, θανάτωση με CO<sub>2</sub> και παγόνερο και θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι), δεν παρουσιάζουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $P > 0,05$ ).

Οι μικρότερες τιμές TM που καταγράφηκαν ήταν στη μέθοδο θανάτωσης με διοξείδιο του άνθρακα και παγόνερο (όπως φαίνεται στο Σχήμα 2) ωστόσο, δεν υπήρξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (όπως ειπώθηκε και προηγούμενα) που να υποδεικνύει πως η μέθοδος θανάτωσης «CO<sub>2</sub> και παγόνερο» είναι βέλτιστος τρόπος θανάτωσης.

Χαρακτηριστικό επίσης είναι ότι η εξέταση της ενδεχόμενης γενοτοξικότητας μέσω των ηπατοκυττάρων έδειξε οριακά μεγαλύτερες μέσες τιμές TM από αυτές που ελήφθησαν από την εξέταση των ερυθροκυττάρων, με τη διαφορά όμως ότι και στους δύο ελέγχους η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων παρέμεινε η ίδια. Δηλαδή οι τιμές και των δύο μεθόδων κατέδειξαν τα ίδια στατιστικά αποτελέσματα και στις δύο εξεταζόμενες περιπτώσεις.

**Πίνακας 3.** Τρόποι θανάτωσης και λογαριθμικοί μέσοι όροι των τιμών ΤΜ από τα ηπατοκύτταρα των εξεταζόμενων ψαριών

Μέθοδος θανάτωσης	N	Subset	
		1	2
CO <sub>2</sub> +ice(a)	398	,1083	
Ice(a)	386	,1164	
Stunning(a)	385	,1368	
<b>Asphyxia(b)</b>	398		<b>,1832</b>
Sig.		,335	1,000



**Σχήμα 2.** Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών ΤΜ και στατιστικές διαφορές (a,b) που καταγράφηκαν από τους τέσσερις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης

### 3.3 Επιδιόρθωση ηπατοκυττάρων

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται ο αριθμός (N) των ηπατοκυττάρων που συλλέχθηκαν για παρατήρηση τελικά από κάθε διαφορετικό τρόπο θανάτωσης, καθώς επίσης και οι μέσοι όροι του TM (υπό μορφή λογαρίθμου).

Αυτό που διακρίνεται άμεσα από τον παρακάτω πίνακα είναι ότι τα αποτελέσματα από τον τρόπο θανάτωσης με ασφυξία και από τον τρόπο θανάτωσης με χτύπημα στο κεφάλι, δεν εμφανίζουν μεταξύ τους στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P > 0,05$ ).

Δηλαδή κατά την διαδικασία επιδιόρθωσης των ηπατοκυττάρων, για πρώτη φορά, οι τιμές του τρόπου θανάτωσης με χτύπημα στο κεφάλι ακολουθούν τις τιμές της ασφυξίας και επιπλέον διαφέρουν στατιστικά ( $P < 0,05$ ) από τις τιμές των άλλων δύο τρόπων θανάτωσης (θανάτωση με παγόνερο και θανάτωση με CO<sub>2</sub> και παγόνερο).

Επίσης τα αποτελέσματα από τη θανάτωση με παγόνερο και θανάτωση με CO<sub>2</sub> και παγόνερο, δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ούτε στην διαδικασία της επιδιόρθωσης ( $P > 0,05$ ).

Αυτό που παρατηρείται ακόμη στην διαδικασία επιδιόρθωσης είναι η αύξηση των μέσων τιμών TM των ηπατοκυττάρων σε σχέση με τις δύο προηγούμενες διαδικασίες ανίχνευσης (όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3).

Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο άλλωστε, οι τιμές της μεθόδου θανάτωσης με «ασφυξία» διέφεραν στατιστικά με τους άλλους εφαρμοζόμενους τρόπους αλλά και κατέγραψαν τις μεγαλύτερες τιμές. Ωστόσο σημαντικό και άξιο περαιτέρω σχολιασμού είναι το γεγονός της αύξησης των μέσων τιμών στη μέθοδο θανάτωσης με χτύπημα στο κεφάλι.



**Πίνακας 4.** Τρόποι θανάτωσης και λογαριθμικοί μέσοι όροι των τιμών ΤΜ από τη διαδικασία επιδιόρθωσης των ηπατοκυττάρων των εξεταζόμενων ψαριών

Μέθοδος θανάτωσης	N	Subset	
		1	2
Ice(a)	366	,1460	
CO <sub>2</sub> +ice(a)	359	,1630	
<b>Stunning(b)</b>	370		<b>,2643</b>
<b>Asphyxia(b)</b>	376		<b>,2767</b>
Sig.		,914	,964



**Σχήμα 3.** Γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών ΤΜ και στατιστικές διαφορές (a,b) που καταγράφηκαν από τους τέσσερις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης

### 3.4 Στατιστικά χαρακτηριστικά των αποτελεσμάτων προερχόμενα από τους τέσσερις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης

Στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 5) δίνονται δεδομένα από τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για τους τέσσερις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης και συγκεκριμένα, ο αριθμός (N) των κυττάρων που εξετάστηκαν, η μέση τιμή του Tail Moment (TM) που προέκυψε από τον κάθε τρόπο θανάτωσης χωριστά, καθώς και το τυπικό σφάλμα.

Όπως παρατηρούμε στον παρακάτω πίνακα, αλλά και από τα γραφήματα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, οι μέσες τιμές του TM κατά την θανάτωση με ασφυξία καταγράφονται αρκετά μεγαλύτερες, από τις μέσες τιμές των άλλων τρόπων θανάτωσης και στις τρεις διαδικασίες ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν (ερυθροκύτταρα, ηπατοκύτταρα και επιδιόρθωση ηπατοκυττάρων).

Επιπλέον η αποτύπωση της ενδεχόμενης γενετοξικότητας στο αίμα και στο ήπαρ δείχνει να κυμαίνεται σχεδόν στα ίδια επίπεδα (βάσει των μέσω τιμών TM). Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό και πιθανώς να ενισχύει την άποψη ότι, τόσο στο αίμα όσο και στα ηπατικά κύτταρα η ένδειξη πιθανής γενετοξικότητας είναι εξίσου ορατή χωρίς να υπάρχουν ουσιαστικά μεγάλες διαφορές – αποκλίσεις ανάμεσα στις δυο μεθόδους.

Επίσης καθίσταται απόλυτα εμφανές πως κατά την διαδικασία επιδιόρθωσης των ηπατοκυττάρων οι μέσες τιμές των TM από όλους τους τρόπους θανάτωσης είναι αρκετά μεγαλύτερες, σε σχέση με τις άλλες διαδικασίες ελέγχου.

Άξιο σχολιασμού είναι και το γεγονός ότι η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος θανάτωσης (παγόνερο), προκαλεί επιθυμητό, χαμηλό ποσοστό γενετοξικότητας στα ψάρια που εξετάστηκαν. Τέλος από τον έλεγχο τυπικού σφάλματος παρατηρούμε, ότι

οι μεγαλύτερες διαφορές εμφανίζονται κατά την διαδικασία της επιδιόρθωσης των ηπατικών κυττάρων.

**Πίνακας 5.** Στατιστικά στοιχεία των μέσων τιμών ΤΜ ( $\pm$  Τυπικό Σφάλμα)

TAIL MOMENT	ΤΡΟΠΟΙ ΘΑΝΑΤΩΣΗΣ	N	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ ( $\pm$ ΤΥΠΙΚΟ ΣΦΑΛΜΑ)
ΤΜ ΗΠΑΤΟΚΥΤ.	ΧΤΥΠΗΜΑ	385	0,762 $\pm$ 0,13
	ΠΑΓΟΝΕΡΟ	386	0,728 $\pm$ 0,22
	CO <sub>2</sub> + ΠΑΓΟΝΕΡΟ	398	0,474 $\pm$ 0,06
	<b>ΑΣΦΥΞΙΑ</b>	<b>398</b>	<b>1,444<math>\pm</math>0,24</b>
	ΣΥΝΟΛΟ	1567	0,853 $\pm$ 0,9
ΤΜ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΗΠΑΤΟΚΥΤ.	ΧΤΥΠΗΜΑ	<b>370</b>	<b>1,926<math>\pm</math>0,24</b>
	ΠΑΓΟΝΕΡΟ	366	1,248 $\pm$ 0,33
	CO <sub>2</sub> + ΠΑΓΟΝΕΡΟ	359	1,267 $\pm$ 0,23
	<b>ΑΣΦΥΞΙΑ</b>	<b>376</b>	<b>4,159<math>\pm</math>0,74</b>
	ΣΥΝΟΛΟ	1471	2,167 $\pm$ 0,22
ΤΜ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤ.	ΧΤΥΠΗΜΑ	400	0,772 $\pm$ 0,14
	ΠΑΓΟΝΕΡΟ	373	0,609 $\pm$ 0,09
	CO <sub>2</sub> + ΠΑΓΟΝΕΡΟ	391	0,863 $\pm$ 0,14
	<b>ΑΣΦΥΞΙΑ</b>	<b>400</b>	<b>1,350<math>\pm</math>0,19</b>
	ΣΥΝΟΛΟ	1564	0,904 $\pm$ 0,07

### 3.5 Συζήτηση

Η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών (κυρίως ψαριών) έχει αυξηθεί σε ποσοστό περίπου 8% ετησίως από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 (FAO 2006). Συνολικά η

μέση ετήσια κατά κεφαλήν κατανάλωση προϊόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας και αλιείας ήταν 16,4 kg από το 2003 έως το 2005 (FAO 2008) και πολύ εύκολα θα μπορούσε να αυξηθεί σε τουλάχιστον 22,5 kg έως το 2030 (FAO 2002). Έτσι δεδομένου ότι η αύξηση κατανάλωσης ψαριών έχει ξεπεράσει από κάθε πλευρά την ικανότητα διάθεσης στην αγορά προϊόντων από την παγκόσμια αλιεία, έχει δοθεί κίνητρο στην παραγωγή ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας με σχεδόν «βιομηχανικούς» ρυθμούς.

Ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει προσπάθειες που αποσκοπούν σε μια πιο συνειδητοποιημένη αντιμετώπιση ως προς την ευζωία των οργανισμών (welfare) σε θέματα που αφορούν τόσο στη γενικότερη διαχείριση κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας όσο και κατά τις μεθόδους θανάτωσης.

Αν και οι τρόποι θανάτωσης διάφορων θηλαστικών και πτηνών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, ρυθμίζονται από ειδικούς νόμους σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένων και όλων των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, κάτι τέτοιο δεν έχει εφαρμοστεί ακόμη για τα ψάρια (Robb *et al.* 2000).

Είναι προφανές ότι η έννοια της ευζωίας των ζώων, που είναι από παλιά άμεσα αποδεκτή για τα θηλαστικά, αποτελεί μια σχετικά νέα έννοια για τα ψάρια. Παρ' όλα αυτά ομοιότητες που αφορούν τη βασική δομή των νευρώνων του εγκεφάλου των θηλαστικών και των ψαριών, αλλά και ομοιότητες συμπεριφοράς των ψαριών που εμφανίζονται με άμεση απόκριση στρες όπως και στα ανώτερα σπονδυλωτά, αποτελούν θέματα προς εξέταση για την ευζωία των ψαριών (Lambooij *et al.* 2003).

Έτσι, αν και η γενικότερη ευαισθησία σε θέματα ευζωίας των ψαριών δεν είναι τόσο ανεπτυγμένη όσο για τα προαναφερθέντα πτηνά και θηλαστικά, εν τούτοις η ανησυχία για ευζωία των υδρόβιων οργανισμών κερδίζει όλο και περισσότερο το

ενδιαφέρον των πολιτών αλλά και των επιστημόνων (Chandroo *et al.* 2004, Huntingford *et al.* 2006).

Η διερεύνηση της ευζωίας των εκτρεφόμενων ψαριών είναι εμφανώς δυσκολότερη από τις πρακτικές αξιολόγησης που εφαρμόζονται στα χερσαία παραγωγικά ζώα. Οι Hastein *et al.* (2005) επισημαίνουν πως αντίθετα με τα χερσαία παραγωγικά ζώα οι υδρόβιοι οργανισμοί παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγάλες διαφορές και προέρχονται από μακρινές ταξινομικές ομάδες ποικίλων φυλογενετικών ηλικιών (phylogenetic ages) και συνδέσμων (linkages) οι οποίοι κυμαίνονται από τα μεγαλύτερα και ιδιαίτερα ανεπτυγμένα θαλάσσια θηλαστικά έως και τα μικρότερα ασπόνδυλα, όλα με μεγάλες ανατομικές διαφορές αλλά και διαφορές στη φυσιολογία και στη συμπεριφορά.

Οι ιχθύες ως αντίδραση σε έναν παράγοντα stress ανταποκρίνονται με μια σειρά από βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές (Basu *et al.* 2001). Όταν οι ιχθύες εκτίθενται σε συνθήκες stress, η φυσιολογική αντίδραση αρχίζει με την αναγνώριση της απειλής από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (Barton 2002). Ο μηχανισμός αντίδρασης των ιχθύων στο stress περιλαμβάνει τρεις φάσεις: την πρωτογενή, τη δευτερογενή και την τριτογενή αντίδραση.

Η φάση της πρωτογενούς αντίδρασης περιλαμβάνει την γρήγορη απελευθέρωση των ορμονών που προκαλούν stress, των κατεχολαμινών και των κορτικοστεροειδών (π.χ. κορτιζόλη) στο κυκλοφορικό σύστημα. Οι κατεχολαμίνες εκκρίνονται από το άνω-νεφρικό σύστημα που βρίσκεται στον εμπρόσθιο νεφρό των τελεόστεων ιχθύων καθώς επίσης και από τις απολήξεις του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Η κορτιζόλη εκκρίνεται από το ενδο-νεφρικό σύστημα ως αντίδραση σε διάφορες ορμόνες της

υπόφυσης, αλλά κυρίως ως αντίδραση στην ορμόνη ACTH (φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη) (Iwama *et al.* 2004).

Η φάση της δευτερογενούς αντίδρασης περιλαμβάνει τις διάφορες βιοχημικές και φυσιολογικές μεταβολές που σχετίζονται με το stress οι οποίες σε μεγάλο βαθμό προκαλούνται από τις στρεσογόνες ορμόνες. Αυτές ενεργοποιούν έναν αριθμό διαφόρων μεταβολικών διαδικασιών που οδηγούν σε αλλαγές στη βιοχημική σύσταση του αίματος. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της κατάστασης stress και πιθανόν είναι οι συνηθέστεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της δευτερογενούς αντίδρασης των ιχθύων στους στρεσογόνους παράγοντες (Iwama *et al.* 2004).

Η παραγωγή της γλυκόζης μέσω του stress, βοηθά τον οργανισμό παρέχοντάς του ενεργειακά υποστρώματα στους ιστούς, όπως στον εγκέφαλο, τα βράγχια και τους μύες, προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι αυξημένες ενεργειακές ανάγκες. Το ήπαρ είναι το κυριότερο όργανο για την παραγωγή της γλυκόζης μέσω της γλυκογένεσης και γλυκονογένεσης. Η αδρεναλίνη και η κορτιζόλη σύμφωνα με τους Vijayan & Moon (1994) παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση παραγωγής της γλυκόζης στους ιχθύς και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση των καταστάσεων stress μέσω της αύξησης στη συγκέντρωση της γλυκόζης του πλάσματος.

Η φάση της τριτογενούς αντίδρασης, η ύπαρξη της οποίας προϋποθέτει τη συνέχιση της εφαρμογής του στρεσογόνου παράγοντα ή την ανεπιτυχή προσαρμογή των ιχθύων στον παράγοντα αυτό, περιλαμβάνει συνήθως τη μείωση του ρυθμού αύξησης, τη διαταραχή της αναπαραγωγικής διαδικασίας και την εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί ταχύτατη εξάντληση και θάνατος των ιχθύων, ενώ σε άλλες η εξάντληση επέρχεται

βραδύτατα και δεν αποκλείεται η επιβίωσή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα. Στην πρώτη περίπτωση το stress καλείται οξύ (acute) και στη δεύτερη χρόνια (chronic) (Παπουτσόγλου 1998). Οι κυριότεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του stress στους ιχθύς αναλύονται περιγραφικά παρακάτω στον Πίνακα 6.

**Πίνακας 6.** Κυριότεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του stress στους ιχθύς (τροποποιημένο από Barton & Iwama 1991)

<b>Δείκτες πρωτογενούς αντίδρασης</b>	
	Κατεχολαμίνες πλάσματος Κορτικοστεροειδή πλάσματος ACTH πλάσματος
<b>Δείκτες δευτερογενούς αντίδρασης</b>	
Μεταβολικοί δείκτες	Γλυκόζη πλάσματος Γαλακτικό οξύ πλάσματος Γλυκογόνο του ήπατος και των μυών Χοληστερόλη πλάσματος
Αιματολογικοί δείκτες	Αιματοκρίτης Αριθμός ερυθροκυττάρων Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων Αιμογλοβίνη Νάτριο πλάσματος Κάλιο πλάσματος Πρωτεΐνη πλάσματος
Δομικοί δείκτες	Κύτταρα ενδο-νεφρικού συστήματος Μορφολογία γαστρικών ιστών Οργανοσωματικοί δείκτες
<b>Δείκτες τριτογενούς αντίδρασης</b>	
	Αύξηση Μεταβολικός ρυθμός Ανθεκτικότητα στις ασθένειες Θερμική ανοχή Ανοχή στην υποξία Κολυμβητική ικανότητα Αναπαραγωγική ικανότητα

Η Comet assay βρίσκει ευρεία εφαρμογή ως μια απλή και ευαίσθητη τεχνική εκτίμησης της *ex vivo*, καθώς και της *in vitro* βλάβης του DNA σε διαφορετικούς ιστούς (βράγχια, συκώτι, αίμα) ψαριών εκτεθειμένων σε ποικίλους παράγοντες στο υδρόβιο περιβάλλον (Winter *et al.* 2004).

Στην παρούσα εργασία ο παράγοντας καταπόνησης που μελετήθηκε για την εκτίμηση της ενδεχόμενης γενοτοξικότητας σε εκτρεφόμενους ιχθείς ήταν η επίδραση των διάφορων χρησιμοποιούμενων τρόπων θανάτωσης. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν είναι εμφανές ότι οι ιχθείς υπέστησαν μεγαλύτερη καταπόνηση κατά τη θανάτωση με ασφυξία. Ουσιαστικά η μέθοδος αυτή είναι και η μόνη που εκθέτει τον οργανισμό για περισσότερη ώρα εκτός φυσικού περιβάλλοντος (για τουλάχιστον 10 λεπτά), εν αντιθέσει με τις άλλες μεθόδους που αρχικά είναι πιο σύντομες έως και ακαριαίες, όπως είναι η θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι. Είναι γεγονός πως πρωταρχικό στοιχείο για την ύπαρξη ενός ικανοποιητικού συστήματος θανάτωσης των ψαριών θα πρέπει να είναι η διαδικασία που οδηγεί σε μεθόδους οι οποίες δεν θα απομακρύνουν τα ψάρια από το υδάτινο περιβάλλον, ή τουλάχιστον για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 15 δευτερολέπτων (HSA 2005). Συνήθως μετά από αυτό το χρονικό διάστημα τα ψάρια υιοθετούν «απωθητική συμπεριφορά» (HSA 2008).

Ο κλασικός τρόπος θανάτωσης με παγόνηρο, παρουσίασε αρκετά καλά αποτελέσματα και στους τρεις διαφορετικούς ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν. Η έντονη δραστηριότητα του ψαριού (για 5 – 7 περίπου δευτερόλεπτα έως αυτό να ακινητοποιηθεί) που παρατηρήθηκε κατά την «αναισθησία» με διοξείδιο του άνθρακα, πριν την θανάτωσή του με παγόνηρο, δεν έδειξε μεγάλα επίπεδα γενοτοξικότητας κάτι που ενδεχομένως να ενισχύει την άποψη της ύπαρξης αναισθησίας πριν την θανάτωση του οργανισμού.

Είναι προφανές πως οι περισσότεροι τρόποι θανάτωσης όπως η κοινή ασφυξία και η ζωντανή απεντέρωση των ψαριών επιλέχθηκαν από παλιά ως απλές και ελάχιστα δαπανηρές λύσεις. Η ασφυξία η οποία είναι γνωστή μέθοδος από πολύ παλιά συνιστά μια εξαιρετικά βίαιη και επώδυνη μέθοδο κατά την οποία τα ψάρια, κατά την εξαγωγή



τους από το νερό, στην προσπάθειά τους να ξεφύγουν, ασκούν μεγάλη πίεση στο σώμα τους με αποτέλεσμα την μεγιστοποίηση της καταπόνησης. Η έξοδος από το νερό συνοδεύεται με «κατάρρευση - κλείσιμο» των βραγχίων αποτρέποντας την ανταλλαγή οξυγόνου με το περιβάλλον, κάτι που ουσιαστικά οδηγεί στην ανοξία (Robb & Kestin 2002). Ο χρόνος που θα παραμείνει ζωντανός ο οργανισμός εξαρτάται και από τις συνθήκες περιβάλλοντος.

Παραδείγματος χάριν, σε άτομα Ιριδίζουσας Πέστροφας μελέτες έδειξαν πως πεθαίνουν μετά από 2,6 λεπτά σε 20°C, μετά από 3 λεπτά σε 14 °C και μετά από 9,6 λεπτά σε 2 °C (Kestin *et al.* 1991). Είναι χαρακτηριστικό πως επειδή τα ψάρια είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί, όπως όλα τα ζώα η θερμοκρασία του σώματός τους κυμαίνεται σύμφωνα με την θερμοκρασία περιβάλλοντος και έτσι η ενδεχόμενη μικρή θερμοκρασία περιβάλλοντος τους παρατείνει το χρόνο έως την ανοξία (η απαίτηση των ιστών σε οξυγόνο μικραίνει, επομένως μεγαλώνει το μέγεθος της καταπόνησης).

Σύμφωνα με τους Ottera *et al.* (2001) οι διάφοροι εφαρμοζόμενοι τρόποι θανάτωσης θα πρέπει να οδηγούν σε μια ταχύτατη και αμετάκλητη απώλεια συνείδησης. Έτσι όταν τα ψάρια θανατώνονται γρήγορα η καταπόνηση να μπορεί να μειωθεί, ενώ παράλληλα να βελτιστοποιείται αντίστοιχα ο παράγοντας ευζωία καθώς και η ποιότητα της σάρκας του ψαριού.

Ένα διόλου ευκαταφρόνητο βήμα για την εξεύρεση μεθόδων αναισθητοποίησης που διάγουν την ευζωία και την ποιότητα των ψαριών, έχει γίνει πρόσφατα, λόγω και του ενδιαφέροντος που επιδεικνύει και ο τομέας της υδατοκαλλιέργειας, με το μεγαλύτερο ποσοστό να προτείνει διάφορες μεθόδους αναισθητοποίησης (Savenije *et al.* 2002). Από την άλλη πλευρά όμως οι μέθοδοι αυτοί που βασίζονται σε χρήση χημικών ουσιών ως αναισθητικά, καθιστούν τα ψάρια ακατάλληλα για κατανάλωση

από τον άνθρωπο, λόγω των τυχόν υπολειμμάτων που παραμένουν στο μυϊκό ιστό των ψαριών.

Οι Ribas *et al.* (2007) συνέκριναν τρεις διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης στη γλώσσα (*Solea senegalensis*) χρησιμοποιώντας αρχικά γαρυφαλέλαιο ως αναισθητικό, ασφυξία και πρόκληση υποθερμίας (σε παγόνερο) με στόχο τη μείωση του στρες αρχικά και δευτερευόντως την αύξηση της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Η εκτίμηση της καταπόνησης έγινε με τη μέτρηση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης στο αίμα, όπου τις μεγαλύτερες τιμές κατέγραφε η μέθοδος της ασφυξίας, έπειτα πιο μικρές τιμές κατέγραφε η πρόκληση υποθερμίας, ενώ τέλος τις μικρότερες τιμές κορτιζόλης κατέγραφε το γαρυφαλέλαιο (σχεδόν τόσο μικρές, όσο του μάρτυρα).

Οι Marques *et al.* (2003) απέδειξαν ότι η κακομεταχείριση που συμβαίνει σε ιχθείς μετά από το χειρισμό της αναισθησίας δεν προκαλεί καταπόνηση στους οργανισμούς. Αυτό συνάγεται από τα αποτελέσματα που δεν έδειξαν σημαντική διαφορά στην καταπόνηση μέσα σε 48 ώρες από την αναισθησία.

Οι Lambooij *et al.* (2002) σε μια μελέτη όσων αφορά την ευζωία των υδρόβιων οργανισμών, διαπίστωσαν ότι τουλάχιστον 5% των ψαριών που μεταφέρονταν από το οικείο περιβάλλον τους με θερμοκρασία νερού 18 °C σε παγόνερο με μέση θερμοκρασία 0,2 °C για να αναισθητοποιηθούν, δεν ήταν επαρκώς αναισθητοποιημένα, έως ότου μεταφέρονταν αργότερα και κατέληγαν σε ψυχρή άλμη στους -18 °C περίπου.

Σύμφωνα με τους Kestin *et al.* (2002) υπάρχουν διάφοροι δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας αλλά και του επιπέδου αναισθησίας των προς θανάτωση ψαριών. Μερικοί απ' αυτούς σε πρώτη φάση έγκεινται σε μακροσκοπική παρατήρηση όπου το ψάρι δεν μπορεί να κολυμπήσει κανονικά χάνοντας την ισορροπία του, έπειτα στον τρόπο απόκρισης εξωτερικών

ερεθισμάτων όπως στην απόπειρα διαφυγής ενδεχόμενης σύλληψης ή και στην απόκριση μετά από τσίμπημα με αιχμηρό αντικείμενο ή ηλεκτρικά ερεθίσματα, καθώς επίσης και στο ρυθμό επιτέλεσης της αναπνοής. Μια μέθοδος που μπορεί να αξιολογήσει επίσης αν το ψάρι είναι αναισθητο, επιτυγχάνεται με την παρατήρηση της κινητικότητας των οφθαλμών του (eye – rolling). Συγκεκριμένα, όταν τα ψάρια έχουν τις αισθήσεις τους, με μια ενδεχόμενη κίνηση του κεφαλιού τα μάτια θα κυλήσουν ανάλογα της κίνησης αυτής. Αντίθετα όταν το ψάρι έχει χάσει πλήρως τις αισθήσεις του, τότε τα μάτια του θα παραμείνουν σταθερά σε οποιαδήποτε κίνηση του κεφαλιού.

Οι Roth *et al.* (2006) έπειτα από παρατήρηση σε ψάρια που είχαν υποστεί αναισθησία μετά από αρκετή ώρα παραμονής σε παγόνερο, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ακόμη και αν μερικά από αυτά είχαν παραμείνει ακίνητα, κάποια άλλα παρουσίαζαν μια βαθμιαία κινητική δραστηριότητα, καθώς επίσης και σημάδια όπως η μετακίνηση του ματιού (eye – rolling) που υποδείκνυαν πως είχαν τις αισθήσεις τους όταν πραγματοποιούνταν η διαδικασία αποκοπής των βραγχίων και η αφαιμάξη.

Μια γενικότερη αρχή που διέπει τον ορθό τρόπο θανάτωσης των ψαριών αλλά και των ζώων γενικότερα, πρέπει να περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά σε πρώτο στάδιο το ζώο θα πρέπει να καταστεί αναισθητο, με σκοπό να μην αντιλαμβάνεται τον πόνο, έτσι ώστε σε δεύτερο στάδιο ο θάνατος του ζώου να μπορεί να επιτευχθεί, είτε με άμεση πρόκληση αιμορραγίας, είτε με την παύση λειτουργίας της καρδιάς, είτε τέλος με την παρεμπόδιση της αναπνοής δηλαδή τη διαδικασία πρόσληψης οξυγόνου. Τα στάδια αυτά μπορούν άνετα να εφαρμοστούν και να αλληλοενεργήσουν αρκεί όμως να πραγματοποιηθούν τόσο σύντομα, ώστε να αποτραπεί οποιαδήποτε αποκατάσταση της συνείδησης του οργανισμού έως ότου θανατωθεί (Lines *et al.* 2003).

Όσον αφορά τη μέθοδο θανάτωσης με αφαιμάξη των ψαριών οι Morzel *et al.* (2003) έδειξαν σε προηγούμενη μελέτη πως το καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) παρόλο που είχε υποστεί ζωντανή αφαιμάξη, ήταν σε θέση να παρουσιάσει κινητική δραστηριότητα, εβρισκόμενο πάνω σε τριμμένο πάγο, για τουλάχιστον 15 – 30 λεπτά, ενώ παρατήρησαν επίσης ότι ψάρια τα οποία είχαν υποστεί ζωντανή αφαιμάξη σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, θα μπορούσαν να παρουσιάσουν κινητικότητα για τουλάχιστον 90 λεπτά. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη μελέτη που πραγματοποίησαν στο ίδιο είδος οι Roth *et al.* (2007), όπου πολλά από τα ψάρια του πειράματος έπρεπε να σκοτωθούν με το χέρι, ακόμη και 60 λεπτά μετά την ζωντανή αφαιμάξη που είχε προηγηθεί.

Οι Marx *et al.* (1997) απέδειξαν ότι η χρήση CO<sub>2</sub> ως αναισθητικό, που προκαλεί το θάνατο στον εκτιθέμενο οργανισμό μέσω ανοξίας, καθιστά μια πολύ γρήγορη μέθοδο για την πέστροφα και τον κυπρίνο (3,2 και 9,3 λεπτά αντίστοιχα), αλλά αντίθετα μια πολύ αργή μέθοδο για πιο ανθεκτικά στις ανοξικές συνθήκες είδη όπως το χέλι (109,7 λεπτά), ενώ παρατηρήθηκε επίσης πως κατά την αναισθησία παρατηρήθηκαν σημάδια αύξησης παραγωγής βλέννας, κάτι που συνεπώς έχει επιπτώσεις στην ποιότητα των μυϊκών ιστών.

Σε μελέτη στο λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*) ως προς την ευζωία αρχικά του ψαριού αλλά και ως προς την τελική ποιότητά του (ως προϊόν) μέσω τριών διαφορετικών τρόπων θανάτωσης (α. ασφυξία σε παγόνερο σύστασης 50% πάγο – 50% θαλασσινό νερό, β. αναισθησία σε θαλασσινό νερό κορεσμένο με CO<sub>2</sub>, γ. κοινή ασφυξία), οι Acerete *et al.* (2009) μετρώντας τα επίπεδα κορτιζόλης, γλυκόζης και γαλακτικού οξέος στο πλάσμα του αίματος, έδειξαν πως η θανάτωση με ασφυξία επιφέρει αρχικά μεγαλύτερα επίπεδα καταπόνησης στο ψάρι, καθώς επίσης και

ταχύτερη ποιοτική υποβάθμιση. Η αναισθησία με CO<sub>2</sub> και η ασφυξία στο παγόνερο, έδειξαν περίπου τα ίδια αποτελέσματα καταπόνησης με ελάχιστα καλύτερα αυτά της αναισθησίας με CO<sub>2</sub>. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία (όσον αφορά την τσιπούρα) χρησιμοποιώντας τους ίδιους τρόπους θανάτωσης, αν και η ιχθυοφόρτιση κρατήθηκε σε αρκετά χαμηλά επίπεδα.

Μέχρι πρόσφατα το CO<sub>2</sub> αποτελούσε το μόνο ουσιαστικά επιτρεπόμενο αναισθητικό για τα ψάρια που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Είναι γεγονός πως η χρήση του CO<sub>2</sub> στο νερό ως αναισθητικό σε υψηλές ποσότητες (συνήθως ως κορεσμού), αν και καθιστά τα ψάρια αναίσθητα αμέσως μετά από 2 – 3 λεπτά (Robb 2001, Wall 2001) δεν παύει να λειτουργεί σαν παράγοντας που αυξάνει σε αυτά το μέγεθος της καταπόνησης (Bernier & Randall 1998, Robb *et al.* 2000, Robb 2001).

Σε μια μελέτη τους οι Erikson *et al.* (2006) με σκοπό να ελαχιστοποιήσουν τις παρενέργειες της αναισθησίας με CO<sub>2</sub> πρότειναν έναν συνδυασμό ο οποίος συνιστούσε αρχικά, μεταφορά των ψαριών σε δεξαμενή με ψυχρότερο νερό από αυτό που βρισκόνταν (ήπια πρόκληση υποθερμίας στους 8 – 10 °C) και έπειτα χορήγηση μικρότερης και αυξομειούμενης ποσότητας CO<sub>2</sub> από ότι συνήθως στην δεξαμενή. Τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά και έδειξαν πως ο σολομός Ατλαντικού που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, θα μπορούσε πλέον εύκολα να περάσει στο επόμενο στάδιο της διαδικασίας θανάτωσης για την πραγματοποίηση κοπής των βραγχίων υπό συνθήκες σχεδόν πλήρους αναισθησίας. Στην παρούσα μελέτη ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε το αντίθετο (αρχικά έκθεση σε CO<sub>2</sub> και έπειτα σε παγόνερο) και τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά αφού η απευθείας έκθεση σε CO<sub>2</sub> προκάλεσε stress σε μικρό ωστόσο ποσοστό.

Οι Bagni *et al.* (2007) σε πείραμα που διεξήγαγαν σε άτομα τσιπούρας και

λαυρακιού ταυτόχρονα, το οποίο αφορούσε τη θανάτωση με ασφυξία και τη θανάτωση με παγόνερο, συνεκτίμησαν και τον παράγοντα της πολύ υψηλής ιχθυοφόρτισης ( $70 \text{ kg} / \text{m}^3$ ) πριν τη θανάτωση των ψαριών και παρατήρησαν πως παρόλο που η ιχθυοφόρτιση αποτελεί σημαντικό παράγοντα – δείκτη καταπόνησης, οι τρόποι θανάτωσης συνεχίζουν να επιδρούν εξίσου, με μεγαλύτερο ποσοστό η ασφυξία και έπειτα το παγόνερο. Επίσης σημαντικό είναι και το γεγονός πως η τσιπούρα, σύμφωνα με το συγκεκριμένο πείραμα, έδειξε να επηρεάζεται λιγότερο στην υψηλή ιχθυοφόρτιση.

Οι Roth *et al.* (2007) χρησιμοποιώντας ένα ειδικό «επίπεδο» κυλινδρικό σφυρί (Παράρτημα - Εικόνα 1) για να θανατώσουν άτομα σολομού του Ατλαντικού, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως εάν εφαρμοστεί σωστή δύναμη στο κεφάλι των ψαριών (ακόμη και με μία μόνο προσπάθεια), είναι σχεδόν σίγουρο ότι θα προκύψει ανεπανόρθωτη βλάβη με άμεσο αποτέλεσμα το θάνατο του ψαριού, κάτι που έχει ξανά διατυπωθεί για το συγκεκριμένο εργαλείο και με προηγούμενη μελέτη των Robb *et al.* (2000b).

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, έδειξαν ποσοστά γενотоξικότητας σε όλους τους τρόπους θανάτωσης γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η «ανάλυση κομητών είναι μια πρακτική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της καταπόνησης μέσω της εξέτασης των ιστών ή του αίματος ενός οργανισμού. Επίσης σημαντικό είναι και το γεγονός, ότι τα αποτελέσματα από όλους τους διαφορετικούς τρόπους θανάτωσης, αποτυπώθηκαν εξ ίσου στον έλεγχο των ηπατοκυττάρων όσο και στον έλεγχο των ερυθροκυττάρων κατά την *ex vivo* διαδικασία. Ωστόσο στην *in vitro* διαδικασία της επιδιόρθωσης των ηπατοκυττάρων παρατηρήθηκε διαφοροποίηση.

Ουσιαστικά η μέθοδος της θανάτωσης με ασφυξία θα μπορούσε άνετα να ειπωθεί πως λειτούργησε και σαν «μάρτυρας» στο πείραμα. Τα αποτελέσματα από τα ψάρια που θανατώθηκαν με ασφυξία έδειξαν μακράν τα μεγαλύτερα επίπεδα γενотоξικότητας και στους τρεις ελέγχους που πραγματοποιήθηκαν (ερυθροκύτταρα, ηπατοκύτταρα, επιδιόρθωση ηπατοκυττάρων) σε σχέση με τους άλλους τρόπους θανάτωσης.

Σχετική ομοιότητα παρουσίασαν τα αποτελέσματα των τριών υπολοίπων εφαρμοζόμενων τρόπων θανάτωσης. Συγκεκριμένα στον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε στο αίμα και στο ήπαρ του ψαριού, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά στατιστικές διαφορές ανάμεσα στη θανάτωση με παγόνερο, με CO<sub>2</sub> και παγόνερο και με χτύπημα στο κεφάλι. Στη διαδικασία επιδιόρθωσης όμως των ηπατικών κυττάρων, η μέθοδος θανάτωσης με χτύπημα στο κεφάλι κατέδειξε μεγαλύτερο ποσοστό γενотоξικότητας με επακόλουθο, τα αποτελέσματα να μην διαφέρουν σημαντικά ακόμη σε σχέση και με τη θανάτωση με ασφυξία.

Το σκεπτικό ότι ενδεχομένως η αναισθησία με CO<sub>2</sub> πριν τη θανάτωση, προκαλεί μικρότερο ποσοστό γενοτοξικότητας δεν επαληθεύτηκε στην παρούσα εργασία, πράγμα που ενισχύει την άποψη πως οι έντονες κινήσεις διαφυγής που παρατηρούνται στη δεξαμενή αναισθησίας καταπονούν το ψάρι έως ότου αναισθητοποιηθεί πλήρως.

Επίσης η μέθοδος θανάτωσης με παγόνερο, παρόλο που θεωρείται ιδιαίτερα επώδυνη, στην παρούσα εργασία κατέδειξε ήπιας μορφής ποσοστά γενοτοξικότητας ή τουλάχιστον τέτοια ώστε να μπορεί να διαφοροποιηθεί από τους άλλους τρόπους θανάτωσης (εκτός της ασφυξίας).

Ο τρόπος θανάτωσης με χτύπημα στο κεφάλι του ψαριού έδειξε μεν μικρό ποσοστό γενοτοξικότητας στην εξέταση των ερυθροκυττάρων και των ηπατοκυττάρων αλλά ωστόσο μη επιθυμητό, για το γεγονός και μόνο ότι αφού σαν τρόπος θανάτωσης είναι «ακαριαίος», θα έπρεπε να επιφέρει τα μικρότερα δυνατά ποσοστά γενοτοξικότητας σε σχέση με τους άλλους. Το συμπέρασμα που εύκολα εξάγεται, είναι ότι τα ψάρια δεν ήταν αρκετά αναισθητοποιημένα μετά από το χτύπημα και προφανώς για αυτό το λόγο έδειξαν επίπεδα καταπόνησης. Πιθανώς είτε λόγω του ότι η εφαρμοζόμενη δύναμη δεν ήταν ικανοποιητική, ώστε να τα αναισθητοποιήσει απευθείας, είτε λόγω του ότι η δύναμη δεν εφαρμόστηκε στοχευμένα στο σωστό σημείο του κρανίου.

Καθίσταται λοιπόν σαφές πως για την επίτευξη ενός αποτελεσματικού χτυπήματος, η χρήση αυτοματοποιημένων μηχανημάτων αποτελεί πανάκεια για την αποφυγή καταπόνησης στους εκτρεφόμενους οργανισμούς (κάτι που στην παρούσα εργασία δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί εφόσον το χτύπημα έγινε με το χέρι).

Εν κατακλείδι, μια τυπική κατάταξη των τρόπων θανάτωσης που εξετάστηκαν, ως προς τις βλάβες που προκαλούν στα ψάρια, αλλά και ως προς την ευζωία γενικότερα



θα μπορούσε να περιλαμβάνει την ασφυξία ως χείριστη μέθοδο θανάτωσης με τους άλλους τρόπους να ακολουθούν σε δεύτερο στάδιο γενικότερα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acerete A., Reig L., Alvarez D., Flos R., Tort L. (2009). Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 287:139-144.
- Anderson, D., Yu T.W., Phillips B.J., Schmezer P. (1994). The effects of various antioxidants and other modifying agents on oxygen radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research*, 307:261-271.
- Bagni M., Civitareale C., Priori A., Ballerini A., Finoia M., Brambilla G., Marino G. (2007). Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 263:52-60.
- Barton B.A., Peter R.E. (1982). Plasma cortisol stress response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to various transport conditions, anesthesia, and cold shock. *Journal of Fish Biology*, 20:39-51.
- Basu N., Nakano T., Grau E.G., Iwama G.K. (2001). The Effects of Cortisol on Heat Shock Protein 70 Levels in Two Fish Species. *General and Comparative Endocrinology*, 124:97-105.
- Bernier N.J., Randall D.J. (1998). Carbon dioxide anaesthesia in rainbow trout: effects of hypercapnic level and stress on induction and recovery from anaesthetic treatment. *Journal of Fish Biology*, 52:621-637.
- Chandroo K.P., Yue S., Moccia R.D. (2004). An evaluation of current perspectives on consciousness and pain in fishes. *Fish and Fisheries*, 5:281-95.
- Chandroo K.P., Duncan I.J.H., Moccia R.D. (2004a). Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behaviour Science*, 86:225-250.
- Collins A., Dobson V., Dusinska M., Kennedy G., Stetina R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375:183-193.
- Conte F.S. (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86:205-23.
- Erikson U., Hultmann L., Steen J.E. (2006). Live chilling of Atlantic salmon (*Salmo salar*) combined with mild carbon dioxide anaesthesia I. Establishing a method for large-scale processing of farmed fish. *Aquaculture*, 252:183-198.

- European Food Safety Authority. (2004). Scientific report of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of animal stunning and killing methods, p. 172. [www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific\\_Opinion/opinion\\_ahaw\\_02\\_ej45\\_stunning\\_report\\_v2\\_en1,1.pdf?sbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/opinion_ahaw_02_ej45_stunning_report_v2_en1,1.pdf?sbinary=true). (Πρόσβαση: 15-11-2010)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008). Appendix I - Fish and fishery products – apparent consumption. <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/appIybc.pdf>. (Πρόσβαση: 20-09-2010)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006). Nearly half of all fish eaten today farmed, not caught. FAO Newsroom. [www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000383/index.html](http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000383/index.html). (Πρόσβαση: 20-09-2010)
- Hans Van De Vis, Steve Kestin, David Robb, Jörg Oehlenschläger, Bert Lambooi, Werner Münkner, Holmer Kuhlmann, Karin Kloosterboer, Margarita Tejada, Almudena Huidobro, Håkon Otterå, Bjørn Roth, Nils Kristian Sørensen, Leif Akse, Hazel Byrne, Paul Nesvadba (2003). Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Research*, 34:211-20.
- Hartmann A., Herkommer K., Glóck M., Speit G. (1995). The DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single cell gel test (SCG). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25:180-187.
- Hastein T., Scarfe A.D., Lund V.L. (2005). Science-based assessment of welfare: aquatic animals. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 24:529-547.
- Henderson I., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. (1998). The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13:89-94.
- HSA. (2005). Humane harvesting of salmon and trout: Guidance notes No. 5. (Wheatthamstead, U.K.: Humane Slaughter Association).
- Huntingford F.A., Adams C., Braithwaite V.A., Kadri S., Pottinger T.G., Sandoe P., Turnbull J.F. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, 68:332-72.
- Iwama G., Afonso L., Vijayan M. (2004). Stress in Fish. B.C. Canada: AquaNet Workshop on Fish Welfare.
- Iwama G.K., Afonso L.O.B., Vijayan M.M., (2004). Stress in Fish. AquaNet Workshop on Fish Welfare, Campbell River, B.C. Canada.
- Iwama S. (1974). Systematized Techniques of Agriculture. Rural Culture Association, Tokyo.

- Iwana G.K. (1997). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Science*, 851: 304-310.
- Kestin S.C., Van De Vis J.W., Robb D.H.F., (2002). Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. *The Veterinary Record*, 150:302-7.
- Kestin S.C. (1994). Pain and stress in fish. In: Report for the Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals, University of Bristol, Bristol, UK, 36pp.
- Kestin S.C., Wotton S.B., Gregory N.G. (1991). Effect of slaughter by removal from water on visual evoked activity in the brain and reflex movement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Veterinary Record*, 128:443-6.
- Kumaravel T.S., Jha A.N. (2006). Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research* 605:7-16.
- Lambooj E., Kloosterboer R.J., Pieterse C., Gerritzen M.A., Van De Vis J.W. (2003). Stunning of farmed African catfish (*Clarias gariepinus*) using a captive needle pistol; assessment of welfare aspects. *Aquaculture Research*, 34:1353-8.
- Lambooj E., Van De Vis J.W., Kloosterboer R.J., Pieterse C. (2002). Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eels (*Anguilla anguilla*): neurological and behavioural assessment. *Aquaculture*, 210:159-69.
- Lawrence J.N., Foster B., Benford D.J. (1991). The application of a wedge perfusion technique to the in vivo-in vitro rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mutation Research*, 252:129-137.
- Lines J.A., Robb D.H., Kestin S.C., Crook S.C., Benson T. (2003). Electric stunning: a humane slaughter method for trout. *Aquacultural Engineering*, 28:141-54.
- Lines J.A., Frost A.R. (1999). Review of opportunities for low stress and selective control of fish. *Aquaculture Engineering*, 20:211-230.
- Marx H., Brunner B., Weinzierl W., Hoffmann R., Stolle A. (1997). Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of animal welfare. *Chemistry and Materials Science*, 204:282-286.
- McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P., Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288:47-63.
- Moller P. (2006). The alkaline Comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic & Clinic Pharmacology & Toxicology*, 98:336-45.

- Moller P. (2005). Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic & Clinic Pharmacology & Toxicology*, 96:1-42.
- Morzel M., Sohler D., Van De Vis H. (2002). Evaluation of slaughtering methods for turbot with respect to animal welfare and flesh quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82:19-28.
- Nelms B. (1997). Measuring apoptosis in individual cells with the comet assay. *Promega Notes*, 64:13-16.
- Olive P.L., Banath J.P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Natural Protocols* 1, pp. 23–29.
- Ostling O., Johanson K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123:291-298.
- Ottera H., Roth B., Torrissen O.J. (2001). Do killing methods affect the quality of Atlantic Salmon? In: Kestin, S.C., Warriss P.D. (Eds.), *Farmed Fish Quality*. Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 398-399.
- Pankhurst N.W., Van Der Kraak G., Peter R.E. (1995). Evidence that the inhibitory effects of stress on reproduction in teleost fish are mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 99(3):249-257.
- Poli B.M., Parisi G., Scappini F., Zampacavallo G. (2005.) Fish welfare and quality as affected by preslaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13:29-49.
- Power M. (1997). Assessing the effects of environmental stressors on fish populations. *Aquatic Toxicology*, 39:151-169.
- Ribas L., Flos R., Reig L., MacKenzie S., Barton B.A., Tort L. (2007). Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. *Aquaculture*, 269:250-258.
- Robb D.F.H., Kestin S.C. (2002). Methods used to kill fish: field observations and literature reviewed. *Animal Welfare*, 11:269-282.
- Robb D.H.F., Wotton S.B., McKinstry J.L., Sorensen N.K., Kestin S.C. (2000b). Commercial slaughter methods used on Atlantis salmon: determination of the onset of brain failure by electroencephalography. *Veterinary Record*, 147:298-303.
- Robb D.H.F., Wotton S.B., McKinstry J.L., Sørensen N.K., Kestin S.C. (2000). Commercial slaughter methods used on Atlantic salmon: determination of the

- onset of brain failure by electroencephalography. *The Veterinary Record*, 147:298-303.
- Roth B., Slinde E., Robb D.H.F. (2007). Percussive stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the relation between force and stunning. *Aquacultural Engineering*, 36:192-97.
- Roth B., Imsland A., Gunnarsson S., Foss A., Schelvis-Smit R. (2007). Slaughter quality and rigor contraction in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*); a comparison between different stunning methods. *Aquaculture*, 272:754-761.
- Roth B., Slinde E., Robb D.H.F. (2006). Field evaluation of live chilling with CO<sub>2</sub> on stunning Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the subsequent effect on quality. *Aquaculture Research*, 37:799-804.
- Roth B., Moeller D., Veland J.O., Imsland A., Slinde E. (2002). The Effect of Stunning Methods on Rigor Mortis and Texture Properties of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Journal of Food Science*, 67:1462-1466.
- Savenije B., Schreurs F.J., Winkelman-Goedhart H.A., Gerritzen M.A., Korf J., Lambooij E. (2002). Effects of feed deprivation and electrical, gas, and captive needle stunning on early postmortem muscle metabolism and subsequent meat quality. *Institute for Animal Science and Health*, 81:561-571.
- Shephard K.L. (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4:401-29.
- Skjervold P.O., Fjæra S.O., Ostby P.B., Einen Olai. (2001). Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 192:265-80.
- Southgate P., Wall T. (2001). Welfare of farmed fish at slaughter. *In Practice*, 23:277-84.
- Speit G., Hartmann A. (1995). The contribution of excision repair to the DNA-effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, 10:555-559.
- Stevenson P. (2007). Closed waters: the welfare of farmed Atlantic salmon, rainbow trout, Atlantic cod & Atlantic halibut (Surrey, U.K.:CIWF and WSPA).
- Tice R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.

- Urbietta F.J., Gines R. (2000). Optimisation of slaughtering method in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Industrial application in fish farms. Cahiers Options Méditerranées, 51:71-77.
- Vijayan M.M., Moon T.W. (1994). The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. Canadian journal of zoology, 72:379-386.
- Wall A.J. (2001). Ethical considerations in the handling and slaughter of farmed fish. In: Kestin S., Wariss P. (Eds.), Farmed Fish Quality. Blackwell Science Oxford, pp: 108-115.
- Weerd V.J.H., Komen J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Comparative Biochemistry and Physiology, 120:107-112.

### **Ελληνική βιβλιογραφία**

- Νταϊλιάνης Σ. (2005). Μελέτη βιοχημικών παραμέτρων και μηχανισμών που σχετίζονται με την μεταγωγή του σήματος στους ιστούς του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* (Lmc) μετά από έκθεσή του σε ρυπογόνους παράγοντες. Συμβολή στην καθιέρωση νέων βιομαρτύρων ρύπανσης. Διδακτορική διατριβή.
- Παπουτσόγλου Σ.Ε. (1998). Ενδοκρινολογία Ιχθύων. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα, σελ. 179, 517-518.
- Τσαντήλας Η., Γαλάτος Α.Δ., Αθανασοπούλου Φ. (2005). Χρήση αναισθητικών ουσιών σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών. Περιοδικό Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας, 56:130-137.

## 6. ABSTRACT

Even if the applied methods of slaughtering fish in aquaculture are many and the last years have developed, however their impact on welfare of fish is not the best. It is true that many of those methods which used because of the stress that causing to fish, they could be characterized as extremely hard and painful.

Fish aquaculture has been increased by about 8% annually from mid 1980 (FAO 2006). From 2003 to 2005 total average annual per capita consumption of aquaculture fish and fisheries varies around 16.4kg. (FAO 2008). It is obvious that the increasing of fish farms to work in rythms of “industry” in order to dispose to the market fresh and cheap product that will replace the decline of wild stocks.

However is encouraging that the last years more and more consumers seem to be aware of and they want to know and stay informed about the way the product reaches (fish) in their hands.

From the site of science of Ichthyology more widely, the researchers have focused mostly on small number of species (such as salmon and trout) providing little evidence on the impact of various ways of killing the majority of farmed fish.

The sense of stress in fish, can be appreciated simply by measuring cortisol levels in blood plasma, but also molecular through the genotoxicity induced in the DNA of organism.

The gilthead sea bream (*Sparus aurata*) is one of the commercially farmed fish in Europe and consequently it was used for the purposes of the experiment.

The purpose of this study was to investigate the intensity of stress in the application o fish, four of the most common ways of slaughtering fish (asphyxia,



percussive stunning, chilling water and CO<sub>2</sub> with chilling water). Totally sixteen (16) fish of average weight 120g. ( $\pm 30$ ) and average total length 20cm. ( $\pm 2$ ) from closed – system tanks (four fish for each one of the applied methods of slaughtering). Stress responses were established by detection of fragmented DNA from liver and blood cells of gilthead sea bream, while was realized also estimate of repair of DNA, using the molecular technique, Comet Assay.

Part of the isolated hepatocytes were examined directly to access the genotoxicity of slaughtering methods (*ex vivo* assessment) while the rest were incubated in liquid culture in nutritious material, for the identification of damage DNA, which was not detected during the *ex vivo* application, by repair enzymes.

The results showed genotoxicity rates to all slaughtering methods, which reinforces the view that “Comet analysis” is a practical technique that could be used to assess the stress responses of an organism.

Killing by asphyxiation recorded the largest percentage of genotoxicity, in relation of the other slaughtering methods. Relative similarity presented the results of the other three ways of killing (percussive stunning, chilling water and CO<sub>2</sub> with chilling water).

Also important is the fact that the results from all the different slaughtering methods reflected equally in control of hepatocytes and erythrocytes.

Diversification appeared from the results obtained from the repair of liver cells, on the way of percussive stunning to the head of the fish. This method showed a higher percentage of genotoxicity in relation to the killing with chilling water and CO<sub>2</sub> with chilling water, whose results were similar. The method of killing with asphyxia continued to record high levels of genotoxicity, which vary it greatly in the process of

repair by the other three methods.

The method of percussive stunning in the head, while showed a small percentage of genotoxicity in the examination of erythrocytes and hepatocytes but still not desirable because this method used to be “instantaneous” and should produce the minimum percentage of genotoxicity.

Finally, remarkable it is also that was not observed certain statistically important difference in the way of killing with CO<sub>2</sub> and chilling water concerning the simple way of chilling water.

**Keywords:** comet assay, slaughter, welfare, genotoxicity, stress

## 7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



**Εικόνα 1.** Απεικόνιση ειδικών σφυριών (όπου Α. το επίπεδο, Β. το κωνικό και C. με ακίδα) τα οποία χρησιμοποιούνται σε ειδικά αυτοματοποιημένα μηχανήματα για την θανάτωση των ψαριών (Roth *et al.* 2007)



**Εικόνα 2.** Θανάτωση ατόμων λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*) σε δεξαμενή που περιέχει παγόνερο (φωτογραφία από προσωπικό αρχείο)