



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ
Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

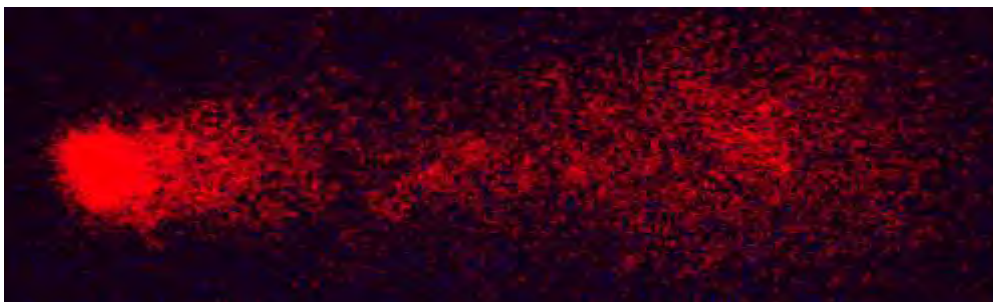
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ – ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ DNA ΒΛΑΒΗΣ/ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΜΕ *COMET*
ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΙΧΘΕΙΣ ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟΥΣ
ΣΕ ΣΤΡΕΣ



ΚΑΣΙΜΑΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΒΟΛΟΣ 2008

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ DNA ΒΛΑΒΗΣ/ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΜΕ *COMET*
ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΙΧΘΕΙΣ ΕΚΤΕΘΕΙΜΕΝΟΥΣ
ΣΕ ΣΤΡΕΣ**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Εξαδάκτυλος Αθανάσιος**, Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
- **Νεοφύτου Χρήστος**, Καθηγητής, Ιχθυολογία-Υδροβιολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.
- **Παναγιωτάκη Παναγιώτα**, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ο συγγραφέας θα ήθελε να ευχαριστήσει όλους όσους δούλεψαν στα εργαστήρια Γενετικής και Υδατοκαλλιεργειών, οι οποίοι βοήθησαν να δημιουργηθεί ένα φιλικό περιβάλλον για εργασία, εφόσον ήταν πάντα πρόθυμοι για βοήθεια και συζήτηση. Ιδιαίτερες ευχαριστίες πάνε στον Μ. Κάβουρα για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την πειραματική διαδικασία, καθώς επίσης και για την πνευματική του καθοδήγηση και συμπαράσταση. Θερμές ευχαριστίες, επίσης, πάνε στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο και στην Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Παναγιώτα Παναγιωτάκη διότι ήταν οι υπεύθυνοι της έρευνας αυτής και χωρίς την παρουσία τους η εργασία δε θα πραγματοποιούνταν. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Πρόεδρο του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Καθηγητή κ. Χ.Ν. Νεοφύτου για τη συμμετοχή του στην επιτροπή και για την καθοδήγησή του στη διόρθωση και διεκπεραίωση της Μεταπτυχιακής Διατριβής. Τέλος, ο συγγραφέας θα ήθελε να εκφράσει τις θερμές του ευχαριστίες στην οικογένειά του για όλη την υποστήριξη και συμπαράσταση στα δύο χρόνια του Μεταπτυχιακού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τσιπούρες αποτελούν μεγάλο αντικείμενο ενδιαφέροντος για τις ιχθυοκαλλιέργειες, διότι έχουν μεγάλη οικονομική αξία. Στη συγκεκριμένη έρευνα, οι εκτρεφόμενοι ιχθείς ήταν εκτεθειμένοι σε παράγοντες που προκαλούν στρες (όπως ασιτία και κακομεταχείριση) και το ποσοστό βλάβης του DNA (δείχνοντας παράλληλα το πόσο στρεσαρισμένοι ήταν οι οργανισμοί) μετρήθηκε με τη μέθοδο της comet ανάλυσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όντως οι τσιπούρες στρεσάρονται (που σημαίνει ότι μέρος του DNA τους καταστρέφεται) όταν βρίσκονται σε συνθήκες ασιτίας και κακομεταχείρισης. Πιο συγκεκριμένα, τσιπούρες που έμειναν άσιτες για μία, δύο και τρεις εβδομάδες έδειξαν στατιστικώς σημαντικότερη διαφορά στην έκφραση του στρες (το DNA τους δηλαδή είχε υποστεί καταστροφή) σε σχέση με τις τσιπούρες, οι οποίες είχαν ταϊστεί κανονικά (μάρτυρες) και με αυτές οι οποίες έμειναν άσιτες για έξι εβδομάδες. Επιπλέον, τσιπούρες που έμειναν στην απόχη και ταρακουνιόντουσαν για ένα και πέντε λεπτά ήταν εκείνες, οι οποίες είχαν υποστεί στρες σε σχέση με αυτές που ταρακουνιόντουσαν για τρία λεπτά (όπως και από τις τσιπούρες του μάρτυρα). Συμπερασματικά, στις τσιπούρες οι οποίες βρισκόντουσαν σε συνθήκες κακομεταχείρισης παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντικότερη διαφορά στην έκφραση του στρες με τη συγκεκριμένη μέθοδο, σε σχέση με τις τσιπούρες που ήταν άσιτες.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενικά δεδομένα για την τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i>).....	1
1.2 Διατροφικές συνήθειες των τσιπουρών.....	3
1.3 Γενικές πληροφορίες για την παραγωγή και την εκτροφή.....	6
1.4 Συστήματα εκτροφής με ανακύκλωση του νερού (κλειστά συστήματα).....	9
1.5 Δεξαμενές εκτροφής.....	11
1.6 Ροή και οξυγόνωση του νερού.....	12
1.7 Γενικά περί «Comet Assay» (ανάλυση κομήτη).....	13
1.8 Η τεχνική της Comet Assay (ανάλυσης κομήτη).....	15
1.9 Εφαρμογές της ανάλυσης κομήτη (comet assay).....	19
1.10 Σκοπός και στόχος της μεταπτυχιακής εργασίας.....	23
2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1 Ιχθύδια και συνθήκες εκτροφής.....	25
2.2 Κατανομή των δεξαμενών.....	26
2.3 Απομόνωση ήπατος.....	28
2.4 Γενετική ανάλυση των δειγμάτων στο εργαστήριο.....	29
2.5 Απομόνωση ηπατικών κυττάρων.....	30
2.6 Προετοιμασία για το στρώσιμο της αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο.....	33

2.7 Λύση, ηλεκτροφόρηση και σκοράρισμα των κομητών.....	34
---	----

3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....37

3.1 Αποτελέσματα του μάρτυρα.....	37
-----------------------------------	----

3.2 Αποτελέσματα της ασιτίας.....	39
-----------------------------------	----

3.2.1 Αποτελέσματα μετά από μία εβδομάδα ασιτίας.....	40
---	----

3.2.2 Αποτελέσματα μετά από δύο εβδομάδες ασιτίας.....	43
--	----

3.2.3 Αποτελέσματα μετά από τρεις εβδομάδες ασιτίας.....	45
--	----

3.2.4 Αποτελέσματα μετά από έξι εβδομάδες ασιτίας.....	47
--	----

3.3 Αποτελέσματα του «Handling Stress» (H.S.).....	49
--	----

3.3.1 Αποτελέσματα της κακομεταχείρισης ενός λεπτού.....	50
--	----

3.3.2 Αποτελέσματα της κακομεταχείρισης τριών λεπτών.....	53
---	----

3.3.3 Αποτελέσματα της κακομεταχείρισης πέντε λεπτών.....	55
---	----

3.4 Σύγκριση μεταξύ τσιπούρες μάρτυρα με τσιπούρες ασιτίας.....	58
---	----

3.5 Σύγκριση μεταξύ τσιπούρες μάρτυρα με τσιπούρες κακομεταχείρισης.....	60
--	----

3.6 Σύγκριση μεταξύ τσιπούρες ασιτίας με τσιπούρες κακομεταχείρισης.....	63
--	----

4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....65

4.1 Ασιτία.....	65
-----------------	----

4.2 Κακομεταχείριση (Handling Stress).....	67
4.3 Επίλογος.....	70
5) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71
6) ABSTRACT.....	81
7) ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	82
7.1 13 ^ο Συνέδριο, Πάτρα.....	82

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Για την εκπόνηση της έρευνας αυτής το πείραμα έπρεπε να χωριστεί σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος έγινε η εκτροφή των ιχθύων (τσιπούρας) σε δεξαμενές στο σταθμό έρευνας και στο δεύτερο μέρος έγινε η γενετική ανάλυση των δειγμάτων στο εργαστήριο. Εισαγωγικά, αναφέρονται μερικά από τα χαρακτηριστικά της τσιπούρας (όπως το πού συναντάται και γενικές πληροφορίες για τη διατροφή και την αναπαραγωγή της), κάποιες εισαγωγικές έννοιες για τις υδατοκαλλιέργειες σε κλειστό κύκλωμα (το οποίο είναι και το πρώτο μέρος του πειράματος), καθώς επίσης και βασικές έννοιες για την τεχνική της «comet assay», όπως τον τρόπο με τον οποίο μπορεί η τεχνική αυτή να χρησιμοποιηθεί, πού μπορεί να χρησιμοποιηθεί, πόσο έμπιστη μπορεί να είναι και γενικώς πώς μπορεί να βοηθήσει στο να μετρήσει το ποσοστό βλάβης του DNA, σε εκτρεφόμενους ιχθείς εκτεθειμένους σε στρες.

1.1 Γενικά δεδομένα για την τσιπούρα (*Sparus aurata*).

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) αποτελούν τον κύριο όγκο της παραγωγής της θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο Θάλασσα. Ως άμεση συνέπεια, το μεγαλύτερο μέρος της απόδοσης της Μεσογειακής ιχθυοτροφίας απαρτίζεται από τα παραπάνω είδη. Η σημαντική αύξηση παραγωγής τους κατέστη δυνατή, χάρις στην προοδευτική βελτίωση των τεχνολογιών σχετικά με την παραγωγή γόνου στα ιχθυοτροφεία. Ως αποτέλεσμα αυτής της τεχνολογικής προόδου, αυξήθηκαν σημαντικά τα ιχθυοτροφεία στη Μεσογειακή λεκάνη, που ασχολούνται με την εκτροφή τους. Σήμερα, η παραγωγή αυτών των δυο ειδών από εκτροφή, η οποία προέρχεται από γόνο παραγόμενο σε ιχθυοτροφείο, είναι

κατά πολύ μεγαλύτερη από τη διαθέσιμη ποσότητα που προέρχεται από την συλλεκτική αλιεία (Moretti et al., 1999).

Η τσιπούρα έχει ευρεία εξάπλωση που εκτείνεται από την Μεσόγειο μέχρι τον Ατλαντικό Ωκεανό. Σήμερα, η εμπορική παραγωγή τσιπούρας έχει γίνει ένας σημαντικός ιχθυοκαλλιεργητικός πόρος στις Μεσογειακές χώρες και η Ελλάδα είναι μια από αυτές. Διάφορες μελέτες έχουν εκπονηθεί για τις ιδιότητες και την ανάπτυξη των τσιπούρων και μερικές από αυτές τις μελέτες ασχολούνται με την αναπαραγωγή. Έχει αναφερθεί, ότι η επιβίωση των νεαρών ατόμων εξαρτάται, κατά κύριο λόγο, από το μέγεθος του αβγού και τα αβγά που λαμβάνονται με ορμονική αγωγή είναι σχετικά μικρότερα σε μέγεθος. Επιπλέον, η διατροφή των γεννητόρων σε ευνοϊκές συνθήκες έχει μεγάλη επίδραση στην ποιότητα των αβγών και αύξηση 2-3% στην αλατότητα, κατά τη διάρκεια της επώασης, αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Ο κύριος παράγοντας όμως, που επηρεάζει τον ρυθμό και την ποιότητα της εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι η θερμοκρασία. Η υπέρβαση των φυσιολογικών ορίων, κατά τη διάρκεια της επώασης, οδηγεί στη απώλεια της κυτταρικής συμμετρίας προκαλώντας μαζική θνησιμότητα και κατά συνέπεια πτώση του ρυθμού παραγωγής προνυμφών κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης (Kamacı et al., 2005).

Η τσιπούρα, *Sparus aurata*, θεωρείται ως ένα από τα πλέον δημοφιλή εδώδιμα είδη (οικογένεια: Σπαρίδες). Είναι βενθικό είδος και συνήθως ζει μοναχικά ή σε μικρές ομάδες. Θεωρείται τροφή πολυτελείας και είναι στόχος εντατικής αλιείας. Στο φυσικό της περιβάλλον αναπαράγεται κατά τους χειμερινούς μήνες, αλλά στα ιχθυοτροφεία είναι δυνατή η αναπαραγωγή της καθ' όλη τη διάρκεια του έτους με ελεγχόμενες μεθόδους (Mehanna et al., 2007).

1.2 Διατροφικές συνήθειες της τσιπούρας.

Η βιομηχανία εκτροφής ιχθύων στην περιοχή της Μεσογείου έχει ακμάσει σε περίοδο λιγότερο από δυο δεκαετίες. Ένα από τα είδη σημαντικού ενδιαφέροντος είναι η τσιπούρα, η οποία συχνάζει στα παράκτια ύδατα και στις λιμνοθάλασσες κατά το μεγαλύτερο μέρος της ζωής της. Γενικά, τρέφονται με γαρίδες και οστρακόδερμα, που βρίσκουν σε αμμώδεις βυθούς. Η εκτροφή της τσιπούρας γίνεται σε λίμνες αλμυρού νερού, λιμνοθάλασσες και το κύριο μέρος της παραγωγής γίνεται σε θαλάσσιους κλωβούς. Οι περισσότερες Μεσογειακές χώρες εκτρέφουν το είδος. Η Ελλάδα, η Τουρκία και η Ισπανία είναι οι κύριοι παραγωγοί, με μερίδιο μεγαλύτερο του 70% (Lupatsch, 2004). Σύμφωνα με τους Chavanne et al. (2008), η παραγωγή της τσιπούρας έφτασε τους 10.4000 τόννους το 2006, με μεγαλύτερη συμβολή από την Ελλάδα (47%), την Ισπανία (20%) και την Ιταλία (17%). Ο αριθμός των ιχθύων προπάχυνσης, που παρήχθησαν το 2006, ήταν 520 εκατομμύρια. Τα ιχθύδια τσιπούρας που ζυγίζουν 2g όταν βρίσκονται στα συστήματα εκτροφής φτάνουν σε εμπορικό μέγεθος (~ 450g) σε 12-14 μήνες, ανάλογα με τη θερμοκρασία του νερού. Κατά την εκτροφή της, η τσιπούρα σιτίζεται με τροφές του εμπορίου που περιέχουν περίπου 45% ακατέργαστη πρωτεΐνη. Η παρούσα τάση είναι η ανάπτυξη αγωγών διαίτας υψηλής ενέργειας με περιεκτικότητα σε λιπίδια μέχρι 23%. Δεδομένου της οικονομικής σημασίας της σίτισης στην υδατοκαλλιέργεια, η ανάγκη ανάπτυξης θρεπτικά ισορροπημένων διαιτητικών αγωγών, ιδιαίτερα σε σχέση με την πρωτεΐνη και τα επίπεδα ενέργειας, είναι έκδηλη. Επιπλέον, υπάρχει τάση στη Μεσόγειο Θάλασσα, να αναπτυχθούν ιχθυοκαλλιέργειες φιλικές ως προς το περιβάλλον σε συνδυασμό με την ανάγκη βελτιστοποίησης των διατροφικών αγωγών της τσιπούρας, ώστε αυτή να επιτύχει το μέγιστο ανάπτυξης της. Σύγχρονες μελέτες μας παρέχουν

επαρκή δεδομένα για τις απαιτήσεις σε ενέργεια και πρωτεΐνη του είδους, που επιτρέπουν την ανάπτυξη των σωστών προτύπων σίτισης (Lupatsch, 2004).

Η πρόσφατη και συνεχιζόμενη ανάπτυξη της εκτρεφόμενης τσιπούρας σε κλωβούς έχει οδηγήσει σε ανησυχίες για την οικολογική επίδραση που έχει στο περιβάλλον και σε μια οξεία πτωτική τάση στην τιμή, λόγω του ότι ο όγκος των ψαριών που παράγονται υπερβαίνει τη ζήτηση. Για να καταπολεμήσουν αυτή την πτωτική πίεση στις τιμές, τα ιχθυοτροφεία πρέπει να βρουν τρόπους να μειώσουν το κόστος παραγωγής των ψαριών. Μια επιλογή είναι να μειώσουν τη φύρα της τροφής και να βελτιώσουν την απόδοση της σίτισης. Έχει οργανωθεί σημαντική έρευνα προς την κατεύθυνση του ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού των βιοχημικών συστατικών των συνθετικών διαιτητικών αγωγών, για να βελτιωθεί η απόδοση σίτισης (Andrew et al., 2003). Η μέγιστη διαιτητική απόδοση αφορά δυο σημαντικά πλεονεκτήματα: μείωση του κόστους σίτισης και μειωμένη φύρα. Η μελέτη της διατροφικής συμπεριφοράς αρκετών ειδών ψαριών έχει καταδείξει, ότι η προσαρμογή των ωρών σίτισης, με το φυσιολογικό ρυθμό τους, βελτιώνει την διατροφική απόδοση, την συχνότητα σίτισης, την απόδοση της τροφικής μετατροπής και μπορεί ακόμα να μεταβάλλει την αξιοποίηση κάποιων θρεπτικών ουσιών. Η κατάλληλη επιλογή του χρόνου σίτισης φαίνεται ότι επιδρά στην ανάπτυξη των ψαριών και έτσι, η ίδια τροφή, όταν λαμβάνεται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της ημέρας, βελτιώνει την διατροφική απόδοση (Sanchez-Muros et al., 2003).

Διάφοροι μηχανισμοί και συμπεριφορές διατροφής έχουν μελετηθεί σε πολλά είδη, με σκοπό να αυξήσουν την ποικιλία της λείας που επιτυχώς καταναλώνουν ή να εξειδικεύσουν τη διατροφή τους σε κάποιους τύπους λείας. Όμως, τέτοιοι μηχανισμοί μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση σίτισης, όταν τα ψάρια τρέφονται με εμπορικές

διαιτητικές αγωγές στην υδατοκαλλιέργεια. Έχει παρατηρηθεί, ότι οι τσιπούρες μασούν και ενίοτε εκτοξεύουν τα σφαιρίδια ή μέρη από τα σφαιρίδια της τροφής από το στόμα τους, κατά τη διάρκεια της σίτισης. Μόνο για τις τσιπούρες, αυτό αναφέρεται στα εγχειρίδια εμπορικής σίτισης ως "παιχνίδι" ή "δοκιμή" σχετικά με τα σφαιρίδια τροφής. Αυτή η επεξεργασία της τροφής αποτελείται από το άνοιγμα του στόματος και τη σύλληψη του τεμαχίου της τροφής, το οποίο στη συνέχεια υποβάλλεται σε κινήσεις "μάσησης". Όταν το στόμα ανοίγει μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εκτόξευση των τεμαχίων της τροφής από το στόμα και σε κάποιες περιπτώσεις την επαναεισαγωγή. Η συμπεριφορά επεξεργασίας της τροφής στην τσιπούρα μπορεί να είναι συνέπεια της μορφολογίας του στόματος της, που είναι κατάλληλο για βόσκηση. Έχει παρατηρηθεί, ότι η άγρια τσιπούρα τρέφεται αναζητώντας τη λεία της σε βραχώδεις επιφάνειες, καταναλώνοντας μαλακόστρακα, μαλάκια, πολυχαίτες, τελεόστεα και εχινόδερμα ως κύριες διατροφικές επιλογές. Η λεία όμως που καταναλώνεται διαφέρει ανάλογα με το μέγεθος του ψαριού. Έχει ευρεθεί, ότι τα ζώα με μαλακό σώμα, όπως οι πολυχαίτες και τα μικρά μαλακόστρακα επικρατούν στα περιεχόμενα του στομάχου της μικρής τσιπούρας (μήκους 5-9 εκ.). Τα περιεχόμενα του στομάχου της μεγαλύτερης τσιπούρας (μήκους 10->25 εκ.) αποτελούνται από μεγαλύτερη, με σκληρό όστρακο λεία, όπως πεταλίδες, δίθυρα μαλάκια και άλλα τελεόστεα. Σε συνθήκες ιχθυοτροφείου, η υπερβολική μάσηση μπορεί να αυξήσει την φύρα, αν τα σφαιρίδια δεν διασπαστούν και αν αποβληθούν σωματίδια από το στόμα και τις σχισμές των βραγχίων. Αυτός είναι ένας σημαντικός παράγοντας, όχι μόνο όταν ταΐζουμε την τσιπούρα σε εμπορική κλίμακα, αλλά και στις δοκιμές σίτισης. (Andrew et al., 2003).

Η πρωτεΐνη είναι μια σημαντική συνιστώσα στις διατροφικές αγωγές των ιχθύων, ως προς την ποσότητα και την ποιότητα, καθότι οι απαιτήσεις τους σε πρωτεΐνη είναι μεγαλύτερες από αυτές των άλλων ζώων. Τα ιχθυάλευρα παρέχουν ένα επαρκές ισοζύγιο αμινοξέων, αλλά η αυξανόμενη ζήτηση και τιμή, καθώς και η αβέβαιη προσφορά καθιστούν αναγκαία την εξεύρεση εναλλακτικών πηγών πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα προβλήματα που σχετίζονται με τις ζωικές πρωτεΐνες καθιστούν τις φυτικές πρωτεΐνες ως τις πλέον υποσχόμενες. Η υψηλή ποιότητα των πρωτεϊνών των ιχθυάλευρων καθιστούν δύσκολη την αντικατάστασή τους, μολονότι γίνονται αρκετές προσπάθειες. Η ποσότητα των ιχθυάλευρων θα μπορούσε να μειωθεί επιπλέον με επαρκή συμπληρώματα βασικών αμινοξέων. Οι φυτικές πρωτεΐνες γενικά έχουν ένα ανεπαρκές ισοζύγιο αμινοξέων έχοντας έλλειψη σε μερικά βασικά αμινοξέα. Η συμπλήρωση της πρωτεΐνης της σόγιας με μεθειονίνη επιτρέπει σημαντική υποκατάσταση (50%) του ιχθυάλευρου, αλλά όχι πλήρη αντικατάσταση. Έχει προταθεί, ότι η ανεπάρκεια των διατροφικών συμπληρωμάτων οφείλεται στην ταχύτερη πρόσληψη και στον επακόλουθο καταβολισμό των βασικών αμινοξέων, σε σχέση με τις πρωτεΐνες των ιχθυάλευρων. Επιπλέον, η αύξηση της συχνότητας σίτισης έχει ως αποτέλεσμα να καταστούν διαθέσιμα όλα τα αμινοξέα για τον οργανισμό και κατά συνέπεια την καλύτερη ανάπτυξή του. (Sanchez-Muros et al., 2003).

1.3 Γενικές πληροφορίες για την παραγωγή και την εκτροφή.

Πριν την εντατική υδατοκαλλιέργεια της τσιπούρας, το είδος εκτρεφόταν παραδοσιακά σε λιμνοθάλασσες σε όλες τις Μεσογειακές ακτές. Όπως και με το λαβράκι, η εξημέρωση της τσιπούρας είναι πρόσφατη και άρχισε ως φυσική συνέπεια

της ανάπτυξης των μεθόδων αναπαραγωγής και καλής διαχείρισης στη δεκαετία του 1980. Τα πρώτα προγράμματα εκτροφής εμφανίστηκαν στη Γαλλία και το Ισραήλ στη δεκαετία του 1990 και ακολούθησε η Ελλάδα και η Κύπρος. Η Εικόνα 1 δείχνει τις χώρες παραγωγής τσιπούρας.



Εικόνα 1: Περιοχή κατανομής των άγριων πληθυσμών (κόκκινο) και των χωρών παραγωγής (πράσινο) (Chavanne et al., 2008).

Η θερμοκρασία εκτροφής παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της τσιπούρας. Μεταξύ των περιοχών της Ευρώπης που εκτρέφεται η τσιπούρα (από τις ακτές του Ατλαντικού μέχρι την ανατολική Μεσόγειο και την Ερυθρά Θάλασσα) παρατηρείται διαφορά μέσω ετήσιων θερμοκρασιών 5-6 °C. Η διαφορά αυτή είναι αρκετή να επηρεάσει τη διάρκεια εκτροφής των ιχθύων ώστε να φθάσουν στο κατάλληλο εμπορικό μέγεθος (~ 450g). Οι χαμηλές χειμερινές θερμοκρασίες (κάτω από 12 °C) που απαντώνται σε κάποιες τοποθεσίες εκτροφής καθυστερεί δραστικά την ανάπτυξή τους για τρεις ως τέσσερις μήνες, κατά τη διάρκεια του έτους. Το χρονικό διάστημα μέχρι την μαζική αλίευση μπορεί να ποικίλει από 18-24 μήνες μετά την εκκόλαψη και εξαρτάται από τις παραπάνω συνθήκες και το χρόνο γέννησης.

Ενώ ο τρόπος ωρίμανσης είναι αρκετά σαφής για τα αρσενικά, τα οποία όλα παράγουν σπέρμα μέσα στο δεύτερο έτος της ζωής τους, χρονική κλίμακα της σεξουαλικής συναναστροφής με τα θηλυκά είναι λιγότερο σαφής. Η εξέλιξη του κάθε ατόμου είναι δύσκολο να προβλεφτεί και η σεξουαλική συναναστροφή συμβαίνει γενικά μετά από 1 ως 2 χρόνια αρσενικής λειτουργίας, ή από το δεύτερο ως το τέταρτο έτος της ζωής τους. Αρσενικά που υπερβαίνουν τα 4 kg απαντώνται συνήθως σε γεννήτορες εκτροφής. Οι μηχανισμοί της συναναστροφής του φύλου είναι ακόμα άγνωστοι, ακόμα και αν οι κοινωνικές αλληλεπιδράσεις θεωρούνται ότι παίζουν ένα ρόλο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση του λόγου αρσενικών/θυληκών ατόμων (Chavanne et al., 2008).

Η τσιπούρα ενδημεί σε βυθούς που καλύπτονται από φύκια και άμμο συνήθως σε βάθη μέχρι περίπου 30 μ., ενώ ενήλικα άτομα μπορεί να βρεθούν και σε βάθος 150 μ.. Αναφέρεται κυρίως ως μη πελαγικό είδος, αν και έχουν παρατηρηθεί μεταναστεύσεις στην Ανατολική ακτή του Ατλαντικού, από την Ισπανία μέχρι τις Βρετανικές Νήσους. Αυτές γίνονται είτε μοναχικά είτε σε μικρές ομάδες. Είναι είδος που ζει σε αλμυρά και γλυκά ύδατα, το οποίο μετακινείται στις αρχές της άνοιξης προς προστατευμένα παράκτια ύδατα σε αναζήτηση άφθονης τροφής και ηπιότερων θερμοκρασιών (τροφική αποδημία). Τέλη φθινοπώρου επιστρέφει στην ανοικτή θάλασσα για την αναπαραγωγή, αλλά είναι πολύ ευαίσθητη στις χαμηλές θερμοκρασίες (το χαμηλότερο όριο επιβίωσης είναι 2 °C). Η τσιπούρα είναι πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος: είναι λειτουργικό αρσενικό τα πρώτα δυο χρόνια και όταν υπερβαίνει σε μήκος τα 30 εκ. γίνεται θηλυκό. Κατά τη διάρκεια της αρσενικής φάσης, οι αμφιφυλόφιλοι γονάδες έχουν λειτουργικές ορχικές περιοχές με ασύγχρονη σπερματογένεση και μη λειτουργικές ωοθήκες (Mehanna, 2007 και Lupatsch, 2004).

Η ανάπτυξη της ωοθήκης είναι επίσης ασύγχρονη και τα θηλυκά μπορούν να γεννήσουν 20.000-80.000 αυγά την ημέρα, για μια περίοδο μέχρι 3 μήνες. Στη Μεσόγειο αναπαράγονται από τον Οκτώβριο μέχρι τον Δεκέμβριο (Sola et al.).

1.4 Συστήματα εκτροφής με ανακύκλωση του νερού (κλειστά συστήματα).

Τα τελευταία εικοσιπέντε χρόνια έχει παρατηρηθεί σε όλο τον κόσμο ένα μεγάλο ενδιαφέρον για τα συστήματα υδατοκαλλιέργειών, τα οποία δουλεύουν με τη βοήθεια ανακυκλούμενου νερού, για αυτό και λέγονται κλειστά συστήματα ή κυκλώματα. Πιο συγκεκριμένα εδώ και πάνω από τρεις δεκαετίες έχει αρχίσει μια μεγάλη έρευνα για την ανάπτυξη και βελτίωση των κλειστών αυτών συστημάτων. Ένα κλειστό σύστημα, το οποίο λειτουργεί στο καλύτερο δυνατό επίπεδο αποτελεί ένα εξαιρετικό περιβάλλον εκτροφής των ψαριών, εφόσον βέβαια παρέχει την επαρκή ποσότητα τροφής η οποία απαιτείται για τη μέγιστη δυνατή αύξηση των ψαριών. Αναμενόμενο είναι λοιπόν να υπάρχουν πολλές και εναλλακτικές τεχνολογίες για την κατασκευή και λειτουργία των κλειστών συστημάτων, τα οποία έχουν μεγάλο κόστος για την ολοκλήρωσή τους. Λόγω των αυξημένων λειτουργικών εξόδων, η σχεδίαση τέτοιου συστήματος θα πρέπει να μεγιστοποιεί την απόδοση της παραγωγής σε σχέση με τη νομισματική μονάδα που επενδύεται σε μια τέτοια επιχείρηση. Με όλα τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι τα κλειστά συστήματα είναι μηχανικώς εξεζητημένα και βιολογικώς πολύπλοκα, πράμα που σημαίνει ότι για τη σωστή διαχείρισή τους θα πρέπει να γίνεται σωστή εκπαίδευση και οι αρμόδιοι να έχουν την απαιτούμενη ικανότητα και αφοσίωση (Χώτος, 2006).

Γενικά υπάρχουν πολλές και εναλλακτικές τεχνολογίες για την κατασκευή και τη σωστή λειτουργία τέτοιων συστημάτων εκτροφής. Το είδος το οποίο πρόκειται να

καλλιεργηθεί, η τοποθεσία της μονάδας υδατοκαλλιέργειας, ο βαθμός του επιθυμητού ελέγχου των περιβαλλοντικών παραμέτρων που χρειάζεται για την εκτροφή όπως και η ικανότητα διαχείρισης του συστήματος, αποτελούν βασικές παραμέτρους για την επιλογή μιας ορισμένης τεχνολογίας, η οποία θα χρειαστεί για το σχεδιασμό ενός κλειστού συστήματος. Για την επιτυχημένη λειτουργία ενός συστήματος υδατοκαλλιέργειας με ανακυκλούμενο νερό, οι μελλοντικοί χρήστες θα πρέπει να γνωρίζουν πολύ καλά το πώς χρησιμοποιούνται, αλλά και τι απαιτήσεις έχουν οι συσκευές σε κάθε στάδιο, καθώς επίσης και την τεχνολογία στην οποία βασίζεται η λειτουργία τους. Η διατήρηση της καλής ποιότητας του επαναχρησιμοποιούμενου νερού αποτελεί ίσως το μεγαλύτερο μέλημα για τις υδατοκαλλιέργειες. Η χαμηλή ποιότητα του νερού μπορεί μακροπρόθεσμα να μειώσει την αύξηση των ψαριών και επιπλέον να αποτελέσει στρεσογόνο παράγοντα που θα οδηγήσει σε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών. Το διοξείδιο του άνθρακα, η αμμωνία, τα διαλυμένα και τα αιωρούμενα στερεά, τα οποία μπορεί να προέρχονται είτε από τα υπολείμματα της τροφής, είτε από τα περιττώματα των ψαριών, αποτελούν υποπροϊόντα του μεταβολισμού τους και συμβάλουν στην αύξηση της μη καλής ποιότητας του νερού. Για να περιορισθεί η αύξηση αυτών των υποπροϊόντων και να διασφαλισθεί η ποιότητα του νερού, το νερό μεταφέρεται με αντλίες μέσω ειδικών συστημάτων διήθησης (τα φίλτρα). Συμπερασματικά, τα διάφορα τμήματα από τα οποία δημιουργείται ένα κλειστό σύστημα εκτροφής πρέπει να έχουν τον κατάλληλο σχεδιασμό για την εξουδετέρωση της επιβλαβής δράσης όλων των παραπάνω υποπροϊόντων, έτσι ώστε να μπορεί να διατηρείται η καλή ποιότητα του επαναχρησιμοποιούμενου νερού (Χώτος, 2006).

1.5 Δεξαμενές εκτροφής.

Γενικά, υπάρχουν δύο τύποι δεξαμενών στις οποίες γίνεται η εκτροφή των ψαριών. Αυτές είναι οι ορθογώνιες δεξαμενές ή raceways και οι στρογγυλές δεξαμενές. Κατά κύριο λόγο, στις ορθογώνιες δεξαμενές που περιέχουν ψάρια, το φρέσκο νερό στην εισροή δεν έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με αυτό της εκροής, που σημαίνει ότι δεν επιτυγχάνεται εύκολα πλήρης ανάμιξη του νερού καθόλο το μήκος της δεξαμενής, οπότε και παρουσιάζεται κλιμάκωση των χαρακτηριστικών ποιότητας του νερού τους από την είσοδο έως την έξοδο. Αντιθέτως, στις στρογγυλές δεξαμενές τα χαρακτηριστικά ποιότητας του νερού παρουσιάζονται σχετικά ομοιόμορφα σε όλα τα σημεία τους, άλλα η εναλλαγή του νερού είναι μικρότερη από αυτή των raceways και συνήθως δεν ξεπερνά τις 2 αλλαγές/h. Διαφορά υπάρχει και στις πυκνότητες των ψαριών, όπου στις στρογγυλές δεξαμενές είναι μικρότερες απ' ότι των ορθογώνιων δεξαμενών, καθώς επίσης και στην ταχύτητα του νερού, όπου στις στρογγυλές δεξαμενές είναι 5 με 10 φορές ανώτερη της αντίστοιχης μιας raceway. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει καλύτερη φυσική κατάσταση των εκτρεφόμενων ψαριών στις στρογγυλές δεξαμενές εξαιτίας της συνεχής άσκησης (ως φυσικό επακόλουθο της αυξημένης ταχύτητας του νερού). Η μεγαλύτερη δραστηριότητα των ψαριών όμως, σημαίνει και ανάγκη για περισσότερο οξυγόνο, το οποίο δρα περιοριστικά στην ιχθυοχωρητικότητα της δεξαμενής και αυξάνει την απαιτούμενη τροφή, με αποτέλεσμα την αύξηση στο κόστος παραγωγής (Χώτος, 2006).

Ο τύπος δεξαμενών που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή αυτού του πειράματος ήταν οι στρογγυλές δεξαμενές, οι οποίες έχουν ένα κεντρικό σημείο απορροής του νερού και η είσοδος του νερού αυτού γίνεται συνήθως υπό πίεση από κάποιο σημείο της περιφέρειάς τους. Χαρακτηριστικό των στρογγυλών αυτών

δεξαμενών είναι ότι στο κέντρο της δεξαμενής, στην οποία η κυκλοφορία του νερού είναι φτωχή, δημιουργείται μια δακτυλιοειδής «νεκρή ζώνη». Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει διαφορετική ταχύτητα του νερού σε διαφορετικά σημεία της δεξαμενής. Πιο συγκεκριμένα, στα μεσαία στρώματα βάθους η ταχύτητα του νερού είναι η μέγιστη δυνατή στα περιφερειακά τμήματα, μέτρια κοντά στην απορροή και ελάχιστη στο κέντρο της δεξαμενής. Αυξάνοντας, είτε την πίεση του νερού που διοχετεύεται στην είσοδο, είτε το βάθος της δεξαμενής, το μέγεθος της νεκρής ζώνης και ο βαθμός στασιμότητας του νερού μπορούν να μειωθούν. Τέλος, οι στρογγυλές αυτές δεξαμενές είναι αυτοκαθαριζόμενες. Αυτό οφείλεται στη μείωση της ταχύτητας του νερού από τα περιφερειακά τμήματα προς το κέντρο με αποτέλεσμα, τα στερεά να κινούνται στο κεντρικό σημείο της αποχέτευσης και να παρασύρονται από το στόμιο της απορροής στο κέντρο της δεξαμενής (Χώτος, 2006) .

1.6 Ροή και οξυγόνωση του νερού.

Η ροή του νερού στις υδατοκαλλιέργειες πολλές φορές μπορεί να γίνει είτε λόγω της βαρύτητας, αλλά τις περισσότερες φορές η βαρύτητα δεν επαρκεί και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται αντλίες. Οι αντλίες είναι ένα από τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα μηχανήματα στις υδατοκαλλιέργειες, αφού χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά του νερού προς και από τη μονάδα εκτροφής, στην υπό πίεση παροχή νερού σε συστήματα φίλτρων και στην αύξηση της ροής του νερού για καλύτερη ανάμιξη. Οι αντλίες δουλεύουν μεταφέροντας ενέργεια στο νερό, το οποίο περνώντας μέσα από την αντλία αποκτά κινητική και δυναμική ενέργεια. Κινητική ενέργεια επειδή αυξάνεται η ταχύτητά του και δυναμική ενέργεια επειδή το νερό με τη βοήθεια

της αντλίας ανυψώνεται σε κάποιο ύψος και ύστερα ρέει λόγω της βαρύτητας (Χώτος, 2006).

Η οξυγόνωση του νερού γίνεται με τεχνητά μέσα για τον κύριο λόγο, ότι η εκτρεφόμενη βιομάζα δεν μπορεί να καλύψει τις αναπνευστικές ανάγκες που έχει μόνο με το οξυγόνο το οποίο βρίσκεται διαλυμένο στο νερό (το οποίο οξυγόνο προέρχεται από την ανταλλαγή αερίων μεταξύ νερού και ατμόσφαιρας). Ο ρυθμός μεταφοράς του οξυγόνου από την ατμόσφαιρα στο νερό εξαρτάται από την επιφάνεια του νερού και από το πόσο ελλειμματικό σε οξυγόνο είναι το ίδιο το νερό. Η μεταφορά αυτή γίνεται σε τρεις φάσεις. Στην πρώτη, το οξυγόνο εισέρχεται στο επιφανειακό φιλμ του νερού και ύστερα διαχέεται μέσω αυτού (δεύτερη φάση) στην υποκείμενη μάζα του νερού (τρίτη φάση). Στις δεξαμενές στις οποίες οι υδατοκαλλιέργειες λαμβάνουν χορό και στις οποίες ούτε κυματισμός υπάρχει και ούτε μεγάλη έκταση έχουν, η διάχυση του οξυγόνου δεν είναι τόσο έντονη που να μπορεί να καλύψει τις αναπνευστικές ανάγκες των ψαριών. Για αυτόν ακριβώς τον λόγο η τεχνητή οξυγόνωση του νερού είναι απαραίτητη, είτε με μηχανές επιφανειακής ανάδευσης, είτε με αεριστήρες διάχυσης αέρα, είτε με την απευθείας χρήση καθαρού οξυγόνου (Χώτος, 2006).

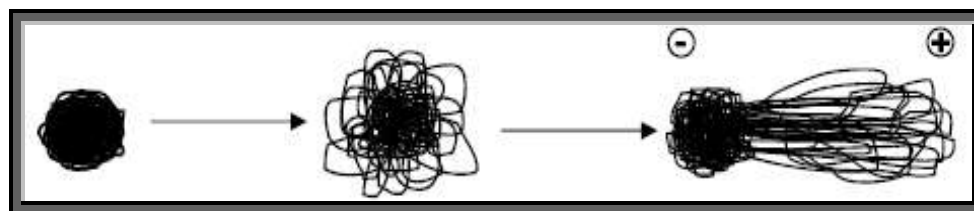
1.7 Γενικά περί «Comet Assay» (ανάλυση κομήτη).

Σύμφωνα με τον Fairbairn et al. (1995) η ανάλυση κομήτη (Comet Assay) που επίσης ονομάζεται ανάλυση μονοκυτταρικής πηκτής (single cell gell assay - SCG) και ηλεκτροφόρηση μικροπηκτής (microgel electrophoresis - MGE) εισήχθη για πρώτη φορά από τους Ostling και Johanson το 1984, ως μια τεχνική μικροηλεκτροφόρησης για την άμεση απεικόνιση της βλάβης του DNA σε απομονωμένα κύτταρα. Ένας

μικρός αριθμός αιωρήματος ακτινοβολημένων κυττάρων σε λεπτή στρώση πηκτώματος αгарόζης επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, υπέστη λύση, ηλεκτροφόρηση και χρώση με φθορίζουσα ουσία που δεσμεύει το DNA. Το ηλεκτρικό πεδίο έλκει το φορτισμένο DNA από τον πυρήνα, έτσι ώστε τα χαλαρωμένα και κερματισμένα κομμάτια του DNA να απομακρύνονται περισσότερο. Οι προκύπτουσες εικόνες, οι οποίες ακολούθως ονομάστηκαν "κομήτες" λόγω της εμφάνισής τους, αναλύονται για να προσδιοριστεί η έκταση της βλάβης του DNA (Klaude et al., 1996).

Στη δεκαετία του 1970, αναπτύχθηκε μια διαδικασία διερεύνησης της πυρηνικής δομής, η οποία βασίζεται στη λύση των κυττάρων με μη ιοντικό αποδιατακτικό παράγοντα σε κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Αυτή η επεξεργασία απομακρύνει τις μεμβράνες, το κυτταρόπλασμα, το καρυόπλασμα, διασπά τα νουκλεοσώματα και αυξάνει τη διαλυτότητα σχεδόν όλων των ιστονών, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης άλατος. Αυτό που μένει είναι ο «πυρήνας» που αποτελείται από ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA) και πρωτεΐνες, μαζί με το υπερελικομένο DNA. Η ύπαρξη των υπερελίξεων συνεπάγεται, ότι η ελεύθερη περιστροφή του DNA δεν είναι δυνατή. Έτσι, προτάθηκε ένα μοντέλο με το DNA κατά διαστήματα προσκολλημένο στον πυρηνικό σκελετό, έτσι ώστε να διατάσσεται αποτελεσματικά με τη μορφή βρόχων, παρά σαν ένα γραμμικό μόριο. Όταν λαμβάνει χώρα η αποέλιξη του DNA προσθέτοντας ως μέσο παρεμβολής το βρωμιούχο αιθίδιο, οι βρόχοι εκτείνονται γύρο από τον πυρήνα και σχηματίζουν ένα "φωτοστέφανο". Ένα παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε όταν ιονίζουσα ακτινοβολία χρησιμοποιήθηκε για να χαλαρώσει τους βρόγχους - μια μονόκλωνη ρήξη είναι επαρκής για να χαλαρώσει τμήμα του υπερελικομένου DNA. Επίσης, η comet

ανάλυση στην πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μορφή της, αφορά τη λύση μετά από την ανάμιξη των κυττάρων σε αгарόζη, έτσι ώστε το DNA να ακινητοποιηθεί για το στάδιο της ηλεκτροφόρησης. Στην πρώτη επίδειξη των "κομητών" οι ουρές περιγράφηκαν με όρους αποέλιξης-χαλάρωσης του DNA και αναφέρονταν στο παραπάνω μοντέλο. Ουσιαστικά, η ουρά του κομήτη φαίνεται να είναι απλά ένα φωτοστέφανο χαλαρωμένων βρόγχων, που έλκονται στη μια πλευρά από το ηλεκτρικό πεδίο (Εικ. 2) (Collins, 2004).



Πυρήνας με
υπερελικομένο DNA

Πυρήνας με
χαλαρωμένο DNA

Κομήτης

Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της μορφής της μετατροπής του DNA όπως φαίνεται από την ανάλυση κομήτη (comet assay). Από αριστερά: Απομονωμένος πυρήνας με υπερελικομένο DNA. Μετά την έκθεση σε κορεσμένο διάλυμα άλατος (ξετύλιγμα) επέρχεται χαλάρωση του DNA, με αποτέλεσμα οι βρόγχοι να εκχύνονται από τον πυρήνα και να σχηματίζεται ένα "φωτοστέφανο". Όταν οι πυρήνες με χαλαρωμένο DNA υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση, αρνητικά φορτισμένα κομμάτια ή βρόχοι φθαρμένου DNA μετακινούνται στο ηλεκτρικό πεδίο προς την άνοδο και σχηματίζεται μια εικόνα παρόμοια με κομήτη (Gichner).

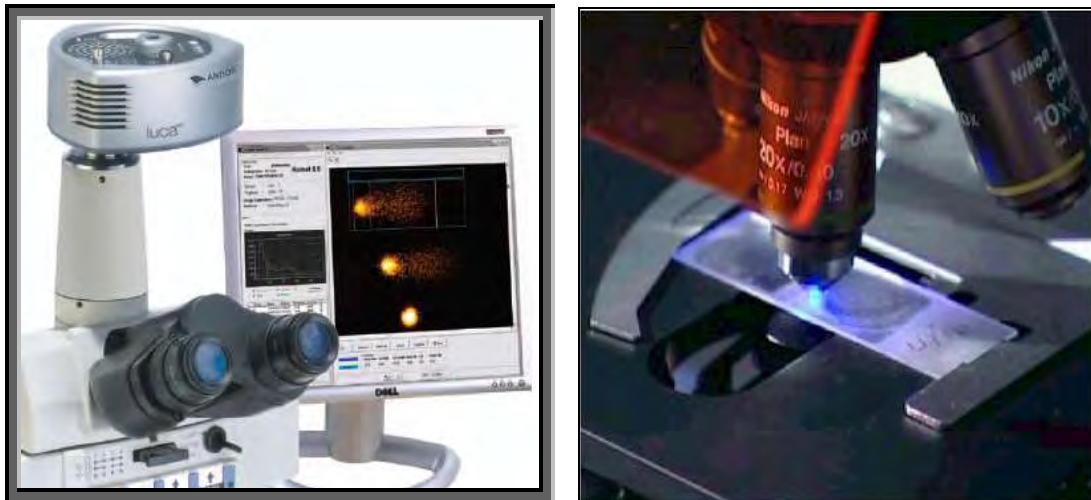
1.8 Η τεχνική της Comet ανάλυσης.

Όταν η comet ανάλυση γίνεται σε αλκαλικές συνθήκες, απομονωμένα κύτταρα τοποθετούνται σε λεπτή στρώση αгарόζης επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ακολουθεί κυτταρική λύση και ξετύλιγμα του DNA, και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό pH, αδρανοποίηση και χρώση με φθορίζουσα ουσία. Τα

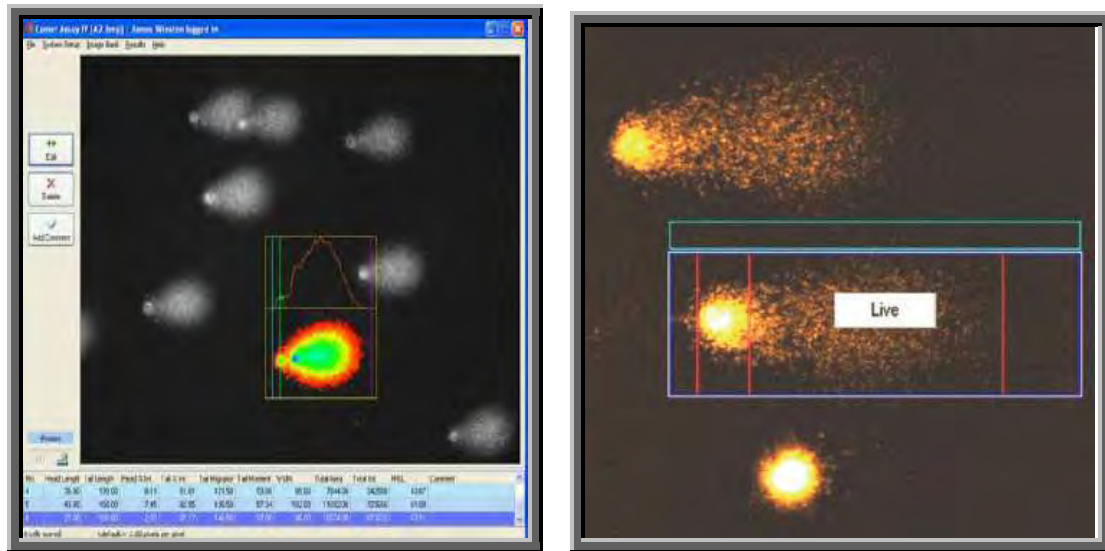
κύτταρα με αυξημένη βλάβη DNA επιδεικνύουν μια αυξημένη μετακίνηση του γενετικού υλικού στη διεύθυνση της ηλεκτροφόρησης. Η έκταση της βλάβης του DNA ποσοτικοποιείται μετρώντας τη μετατόπιση του γενετικού υλικού ανάμεσα στον πυρήνα του κυττάρου (ή "κεφαλή του κομήτη") και στην προκύπτουσα "ουρά". Οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν είτε ομαδοποιώντας τα κύτταρα σύμφωνα με το βαθμό βλάβης του DNA (μήκος ουράς), είτε με ανάλυση εικόνας μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή και κατάλληλου λογισμικού προγράμματος. Όταν πρωτοεμφανίστηκε η comet ανάλυση σε αλκαλικό περιβάλλον (single cell gel electrophoresis), τα μήκη της ουράς χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτης της βλάβης του DNA. Όμως, η εισαγωγή της ανάλυσης εικόνας με ηλεκτρονικό υπολογιστή και κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα έδωσε τη δυνατότητα υπολογισμού και άλλων χαρακτηριστικών του κομήτη (κεφαλή + ουρά), παρέχοντας καλύτερες περιγραφές της συνολικής βλάβης του DNA στα κύτταρα. Το Tail Moment (TM) έχει θεωρηθεί ως ένας από τους καταλληλότερους δείκτες της προκαλούμενης βλάβης στο DNA, ανάμεσα σε άλλες παραμέτρους, όπως η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά, στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα και το συνολικό μήκος του κομήτη. Αυτή η παράμετρος συχνά αναφέρεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του Tail Moment ως δείκτη βλάβης του DNA είναι ότι η ποσότητα του φθαρμένου DNA και η απόσταση μετατόπισης του γενετικού υλικού στην ουρά αντιπροσωπεύονται από ένα μοναδικό αριθμό (Hellman et al, 1995).

Η ευαισθησία της comet ανάλυσης στην ανίχνευση της βλάβης του DNA σε απομονωμένα κύτταρα εξαρτάται από την ακρίβεια των μετρήσεων του DNA στις περιοχές της κεφαλής και της ουράς του κομήτη. Θραύσματα μονόκλωνου DNA σε

απομονωμένα κύτταρα μπορούν να ποσοτικοποιηθούν, χρησιμοποιώντας την comet ανάλυση. Η ικανότητα ανίχνευσης της βλάβης του DNA σε κάθε κύτταρο μπορεί να δώσει τη δυνατότητα ταυτοποίησης υποπληθυσμών κυττάρων ανθεκτικών ή ευαίσθητων σε παράγοντες βλάβης του DNA. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το τελευταίο βήμα της comet ανάλυσης είναι η χρώση του DNA των λυμένων κυττάρων. Έτσι, μετά τη χρώση τα απομονωμένα κύτταρα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού και αναλύονται με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος επεξεργασίας εικόνας (Εικ. 3 και 4).

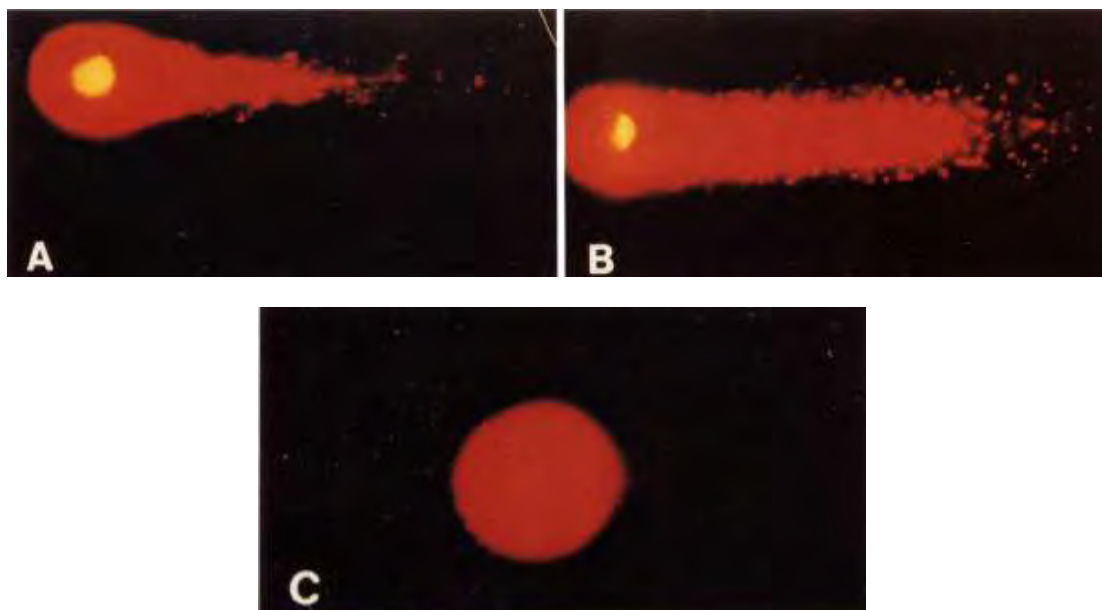


Εικόνα 3: Χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού (Perspective instruments and Andor technology).



Εικόνα 4: Χρήση συστήματος επεξεργασίας εικόνας. Μια ζωντανή εμφάνιση εικόνας εύρεσης ενός κομήτη. Έναρξη λήψης και ανάλυσης της μετατόπισης του DNA. Το ανέπαφο DNA παραμένει στην "κεφαλή" του κομήτη και το φθαρμένο DNA μετατοπίζεται στην "ουρά". Η κάθετες γραμμές με κόκκινο χρώμα (δεξιά φωτογραφία) δείχνει την έκταση της κεφαλής και της ουράς (Perspective instruments and Andor technology).

Κάθε κύτταρο έχει την εμφάνιση κομήτη με λαμπρή φθορίζουσα κεφαλή και ουρά, της οποίας το μήκος και η ένταση φθορισμού (το γινόμενο αυτών των δυο παραμέτρων ονομάζεται Tail Moment, T.M.) σχετίζεται με τον αριθμό θραυσμάτων του κλώνου του DNA που προκαλούνται από διάφορους παράγοντες, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, το μεταβολικό στρες, η κακομεταχείριση, τα γενετοξικά φάρμακα, το θερμικό σοκ, το κάπνισμα και άλλοι παράγοντες (Εικ. 5) (Olive et al., 1992, Betancourt et al., 1995, Andreoli et al., 1997, Anitha et al. 2000 και Sardas et al., 1995).



Εικόνα 5: Φωτομικρογραφήματα φθορισμού που δείχνουν απομονωμένους κομήτες, πάνω σε αγαρόζη, μετά τη λύση και την έκθεσή τους σε ηλεκτρικό πεδίο. Το B είναι πιο φθαρμένο από το A και το C έχει το DNA του εντελώς άθικτο (Olive et al., 1992).

1.9 Εφαρμογές της comet ανάλυσης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η comet ανάλυση είναι μια ταχεία, ευαίσθητη και φτηνή μέθοδος μέτρησης των θραυσμάτων του DNA. Πλεονεκτεί σε σχέση με τις άλλες μεθόδους μέτρησης βλάβης του DNA, λόγω της υψηλής της ευαισθησίας και του γεγονότος ότι τα θραύσματα του DNA προσδιορίζονται σε απομονωμένα κύτταρα. Η βλάβη του DNA είναι για την έρευνα σε πολλά πεδία, ιδιαίτερα στην έρευνα για τον καρκίνο και την τοξικολογία. Αναλύσεις που μετρούν την βλάβη του DNA χρησιμοποιούνται ως ρουτίνα, για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων των χημικών ουσιών στα κύτταρα, της ικανότητας των κυττάρων να επιδιορθώσουν την προκαλούμενη φθορά στο DNA και της πιθανής ανταπόκρισης των όγκων σε χημειοθεραπείες και ακτινοθεραπείες (Fairbairn et al., 1994).

Η comet ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετρήσει το φθαρμένο DNA και σε υδρόβια ζώα και στους ανθρώπους. Πιο συγκεκριμένα, φυσικοί παράγοντες, όπως η ηλιακή ακτινοβολία, οι ακτίνες X και μια ποικιλία χημικών ενώσεων μπορούν να καταστρέψουν το DNA των ζώντων κυττάρων. Αν δεν επιδιορθωθούν αυτές οι αλλοιώσεις του DNA, μπορούν να προκαλέσουν μια διαδοχική ακολουθία βιολογικών συνεπειών σε κυτταρικό, οργανικό, ολιστικό για τον οργανισμό και τελικά σε πληθυσμιακό επίπεδο. Η βλάβη του DNA σε μια ποικιλία υδρόβιων ζώων έχει συσχετιστεί με την μειωμένη αύξηση, την ανώμαλη ανάπτυξη και τη μειωμένη επιβίωση των εμβρύων, των προνυμφών και των ενηλίκων. Παραδείγματα αλλοιώσεων του DNA, που παράγονται από χημικούς και φυσικούς παράγοντες, περιλαμβάνουν θραύσεις των κλώνων, τροποποιημένες βάσεις, δεσμούς DNA-DNA και δεσμούς DNA-πρωτεΐνης. Κατά κύριο λόγο οι θραύσεις κλώνου μπορούν να προκληθούν άμεσα από γενοτοξικές χημικές ενώσεις, με συνέπεια την απόπτωση ή τη νέκρωση και κατά δεύτερο λόγο, μέσω της αλληλεπίδρασης με τις ελεύθερες ρίζες ή άλλες ενδιάμεσες δραστικές ενώσεις.

Τα πλεονεκτήματα της comet ανάλυσης στην καταγραφή της βλάβης του DNA σε υδρόβιους οργανισμούς περιλαμβάνει:

- τη μέτρηση βλάβης του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα
- μικρό αριθμό κυττάρων για την ανάλυση (<10000)
- την εφαρμογή της σε ευκαρυωτικά κύτταρα και
- την ευαισθησία σε ότι αφορά την ανίχνευση βλάβης του DNA (Lee and Steinert, 2003).

Υπάρχουν αρκετές ανασκοπήσεις που αφορούν τη χρήση της comet ανάλυσης στην αποτίμηση της βλάβης του DNA σε υδρόβιους οργανισμούς. Όπως αναφέρουν

οι Mitchelmore και Chipman (1998), είναι μια ευαίσθητη, ταχεία και οικονομική τεχνική για την ανίχνευση των θραυσμάτων μονόκλωνου DNA, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης γενοτοξικότητας στα ψάρια και σε άλλα υδρόβια είδη.

Όπως είναι γνωστό, η ζήτηση για καθαρή και ασφαλή παροχή ύδατος προς πόση, για τη γεωργία και την αναψυχή έχει ταχύτατα αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Οι λίμνες, οι ποταμοί και οι παραθαλάσσιες περιοχές είναι υποδοχείς τεραστίων ποσοτήτων αποβλήτων, που παράγονται άμεσα από τη βιομηχανία, τη γεωργία και τους αστικούς οικισμούς ή έμμεσα από την ατμοσφαιρική εναπόθεση των αέριων εκπομπών. Ανάμεσα σε αυτά τα ύδατα υπάρχει ένα περιβαλλοντικά πολύπλοκο μείγμα γνωστών τοξικών ουσιών, μαζί με αυξανόμενο αριθμό νεοεμφανιζομένων στο προσκήνιο ρυπαντών, που απειλούν και τα υδρόβια οικοσυστήματα και την υγεία και την ευημερία των ανθρωπίνων πληθυσμών. Είναι γνωστό, ότι ένας αριθμός των παρόντων χημικών ουσιών προκαλούν μεταλλάξεις. Η ανίχνευση μεταλλακτικών/γενοτοξικών κινδύνων, που σχετίζονται με τη ρύπανση του ύδατος, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα τέλη της δεκαετίας του 1970. Τότε αναπτύχθηκαν μέθοδοι που βασίζονταν στην βιοαποτίμηση της Σαλμονέλλας ή επισφαλών ειδών, όπως τα μύδια και τα ψάρια, για την παρακολούθηση της ύπαρξης μεταλλαξιόγόνων γενοτοξικών ουσιών στα υδάτινα περιβάλλοντα. (Frenzilli et al., 2008).

Σύμφωνα με τους Frenzilli et al., η χρήση μεθόδων για την καταγραφή των αλλαγών-μεταβολών του DNA των υδρόβιων οργανισμών είναι κατάλληλες για την αποτίμηση της γενοτοξικής επίδρασης του περιβάλλοντος, επειδή είναι ευαίσθητες σε χαμηλές συγκεντρώσεις ρυπαντών, σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών. Γενικά, αυτές οι μέθοδοι που αποτιμούν άμεσα τα θραύσματα των κλώνων του DNA, έχουν το

πλεονέκτημα της ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της γενοτοξικής επίδρασης, χωρίς να απαιτείται λεπτομερής γνώση της ταυτότητας των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των υπαρχόντων ρυπαντών και έχουν εφαρμογή στη μελέτη των υδρόβιων οργανισμών. Η comet ανάλυση είναι μία από αυτές τις μεθόδους, η οποία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στην οικοτοξικολογία περίπου 15 χρόνια πριν και είναι η πλέον εφαρμόσιμη τεχνική για την ανίχνευση θραυσμάτων DNA στους υδρόβιους οργανισμούς. (Frenzilli et al., 2008).

Έχειδειχθείστην πράξη ότι η comet ανάλυση έχει ευρεία δυνατότητα εφαρμογής στους υδρόβιους οργανισμούς, σε επίπεδο ατόμων, ιστών και κυττάρων. Επιπλέον, οι βλάβες στο DNA, η επιδιόρθωση του και η απόπτωση των κυττάρων μπορούν να αποτιμηθούν με διάφορες παραλλαγές της μεθόδου αυτής. Η βλάβη του DNA, όπως ανιχνεύεται από την comet ανάλυση, έχει συνδεθεί με την έκθεση σε ένα ευρύ φάσμα γενοτοξικών και κυτταροτοξικών χημικών ενώσεων, καθώς επίσης και με φυσικούς παράγοντες, όπως το φως του ηλίου και η ραδιενέργεια. Η βλάβη του DNA, σε υδρόβιους οργανισμούς που προέρχονται από μολυσμένα-ρυπασμένα περιβάλλοντα, συσχετίζεται με επιπτώσεις στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή και στην πληθυσμιακή δυναμική (Lee and Steinert, 2003).

Από όλες τις παραπάνω πληροφορίες, είναι φανερό ότι η comet ανάλυση έχει ευρεία εφαρμογή στη ανίχνευση του κερματισμένου DNA για τους υδρόβιους οργανισμούς. Μπορεί, επίσης, να εφαρμοστεί για την εκτίμηση του φθαρμένου DNA σε λεμφοκύτταρα από σχιζοφρενείς ασθενείς (Psimadas et al., 2004), από εργάτες θερμοκηπίων και γενικά από κατ' επάγγελμα εργάτες στη γεωργία που εκτίθενται σε φυτοφάρμακα (Piperakis et al., 2003 και Piperakis et al., 2006) ή από άτομα που εκτίθενται επαγγελματικά σε αναισθητικά αέρια (Sardas et al., 1998α και Sardas et

al., 1998β). Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της βλάβης του DNA στο ανθρώπινο σπέρμα όπως και των ιχθύων (Cabrita et al., 2005) σε διαφορετικές φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες (Haines et al., 2002 και Haines et al., 2001).

1.10 Σκοπός και στόχος της μεταπτυχιακής εργασίας.

Ο πρωταρχικός σκοπός αυτής της έρευνας είναι η ανίχνευση βλάβης του DNA σε εκτρεφόμενους ιχθείς, οι οποίοι είναι εκτεθειμένοι σε παράγοντες που προκαλούν στρες. Πιο συγκεκριμένα, οι εκτρεφόμενοι ιχθείς που είναι οι τσιπούρες είχαν χωριστεί σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη ομάδα οι τσιπούρες δεν είχαν υποστεί στρες, ταΐζόντουσαν κανονικά και όλες οι συνθήκες ήταν σταθερές (μάρτυρες), στη δεύτερη ομάδα οι τσιπούρες είχαν υποστεί στρες λόγω ασιτίας και στην τρίτη ομάδα οι τσιπούρες είχαν υποστεί στρες λόγω κακομεταχείρισης (αλλά ταΐζόντουσαν κανονικά). Μετά από την απομόνωση του DNA στο εργαστήριο, τα δείγματα των τριών αυτών ομάδων συγκρίθηκαν μεταξύ τους με τη μέθοδο της ανάλυσης των κομητών (Comet Assay), έτσι ώστε να φανεί το κατά πόσο ο παράγοντας ασιτία και ο παράγοντας της κακομεταχείρισης στρεσάρουν τα ψάρια.

Η τσιπούρα αποτελεί τον κύριο όγκο της παραγωγής της θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας στη Μεσόγειο Θάλασσα, όπως και στην Ελλάδα και για αυτόν ακριβώς τον λόγο επιλέχθηκε και το συγκεκριμένο ψάρι για αυτή την έρευνα. Εξαιτίας της οικονομικής του αξία η τσιπούρα έχει γίνει σημαντικό αντικείμενο ιχθυοκαλλιεργητικών ερευνών και αποτελεί έναν από τους ιχθυοκαλλιεργητικούς πόρους στις Μεσογειακές χώρες (Moretti et al., 1999). Στο παρελθόν, είχαν προηγηθεί έρευνες για τη μέτρηση του στρες σε ιχθείς, οι οποίες ανίχνευαν τα επίπεδα κορτιζόλης του οργανισμού και αναλόγως με το πόσο μεγάλα είναι τα

επίπεδα αυτά αντιστοιχεί και μεγαλύτερο ποσοστό στρες για το ψάρι. Στη παρούσα εργασία το κατά πόσο οι ιχθείς στρεσάρονται εάν βρεθούν σε δυσμενείς συνθήκες ερευνάται με πιο λεπτομέρεια, εφόσον γίνεται εκτίμηση της βλάβης του γενετικού υλικού.

Το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι στην τσιπούρα έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο της αντιστάθμισης στην αύξηση (growth compensation) μετά από περιόδους ασιτίας. Σε συνθήκες εντατικής καλλιέργειας, το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε πιθανών να αποτελέσει μία διέξοδο μείωσης του κόστους της εκτροφής, εφόσον οι τροφές αποτελούν περίπου το μισό κόστος στην εκτροφή (Zhu et al., 2001). Επιπλέον, θα πρέπει να ελέγχονται διάφοροι παράμετροι όπως, η μεταφορά ψαριών, η μεταχείρισή τους, το φαγητό και η ασιτία για να μπορεί να ελέγχεται και να διατηρείται η καλή υγεία του ψαριού στις ιχθυοκαλλιέργειες (Ashley, 2007).

2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

2.1 Ιχθύδια και συνθήκες εκτροφής.

Άτομα τσιπούρας με μέσο μήκος 12-16cm και μέσου βάρους 60-90g προερχόμενα από μονάδα εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας της περιοχής του βόρειου Ευβοϊκού κόλπου, φιλοξενήθηκαν σε έξι δεξαμενές θαλασσινού νερού κλειστού κυκλώματος 500l στο εργαστήριο. Τα άτομα τσιπούρας χωρίστηκαν σε δύο μεταχειρίσεις επιπλέον του μάρτυρα και καθεμιά περιλάμβανε δύο επαναλήψεις. Οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν οι ακόλουθες: ιχθυοπυκνότητα 4kg/m^3 , θερμοκρασία $17\text{-}20^\circ\text{C}$, οξύτητα pH 7,4, συγκέντρωση αμμωνίας (NH_3) 0,5-2ppm, αλατότητα 3,4g/l, διαλυμένο οξυγόνο 5-7ml/l. Οι παράγοντες αυτοί διατηρήθηκαν σταθεροί σε όλες τις δεξαμενές καθόλη τη χρονική διάρκεια του πειράματος. Η διάρκεια προσαρμογής τους ήταν μία εβδομάδα και στη συνέχεια τα αναπτυσσόμενα ιχθύδια ταΐζονταν με βιομηχανική τροφή δύο φορές την ημέρα από 7 g τη φορά ανά δεξαμενή.

Κάθε δεξαμενή περιείχε θαλασσινό νερό με σταθερή παροχή οξυγόνου. Το κλειστό κύκλωμα διαχείρισης του νερού περιελάμβανε μηχανικό, χημικό και βιολογικό φίλτρο τύπου Tetra Pond PF 10.000 και UV. Με τις απόχες τα διάφορα στερεά σωματίδια απομακρύνονται και με τα ρυθμιζόμενα βιολογικά φίλτρα, η τοξική αμμωνία μετατρέπεται σε ακίνδυνα νιτρικά (νιτροποίηση). Κατά τη νιτροποίηση, η αμμωνία οξειδώνεται σε νιτρώδη (NO_2) από διάφορα γένη αυτότροφων βακτηρίων, με σημαντικότερα τα *Nitrosomonas*, και στη συνέχεια, τα νιτρώδη οξειδώνονται σε νιτρικά (NO_3) από διάφορα άλλα γένη βακτηριδίων, με σημαντικότερα τα *Nitrobacter* (Χώτος, 2006). Με τη χρήση λοιπόν της απόχης και

του βιολογικού φίλτρου, το ανακυκλούμενο νερό μπορούσε να διατηρηθεί καθαρό για αρκετές ημέρες, άλλα δυστυχώς η αυξημένη ποσότητα της αμμωνίας (μετά από αρκετές μέρες και παρόλο τη χρησιμοποίηση του φίλτρου) έκανε αναγκαία την αλλαγή του νερού με φρέσκο θαλασσινό νερό, το οποίο προτού εισέλθει στο σύστημα των δεξαμενών περνούσε πρώτα από το βιολογικό φίλτρο.

2.2 Κατανομή των δεξαμενών.

Οι δεξαμενές που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα αυτό ήταν έξι. Στις έξι αυτές δεξαμενές υπήρξαν τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις. Οι δεξαμενές είχαν χωριστεί σε τρεις δυάδες (εφόσον υπήρχαν τρεις διαφορετικές συνθήκες, κάθε δυάδα είχε τη δικιά του μεταχείριση), έτσι ώστε τα δείγματα τα οποία παίρνονταν από τη μία δεξαμενή για μία συγκεκριμένη μεταχείριση να είχαν και την επανάληψή τους. Η πρώτη δυάδα δεξαμενών περιείχε τα ψάρια του μάρτυρα, δηλαδή στις δύο αυτές δεξαμενές οι τσιπούρες ταΐζόντουσαν κανονικά. Η δεύτερη δυάδα περιείχε τα ψάρια τα οποία παρέμειναν άσιτα για όσο καιρό διήρκεσε το πείραμα. Η τρίτη και τελευταία δυάδα δεξαμενών περιείχε τις τσιπούρες οι οποίες ταΐζόντουσαν κανονικά, αλλά είχαν υποστεί κακομεταχείριση (Handling Stress, HS). Στην κάθε δεξαμενή γίνονταν τυχαία δειγματοληψία με τρία ψάρια. Μετά τη θανάτωσή τους το σκώτι από το καθένα εξάγονταν και στη συνέχεια μεταφέρονταν στο εργαστήριο της γενετικής για απομόνωση των κυττάρων.

Από τις δύο δεξαμενές της πρώτης ομάδας, στις οποίες τα ψάρια ταΐζόντουσαν κανονικά, έξι συνολικά δείγματα αποκομίσθηκαν (τρία από κάθε δεξαμενή, η δεύτερη τριάδα ήταν για επανάληψη). Τα συγκεκριμένα δείγματα αποτελούν τους «μάρτυρες» του πειράματος, εφόσον οι συνθήκες στις οποίες

εκτρεφόντουσαν οι τσιπούρες ήταν ιδανικές και κανένας παράγοντας που μπορούσε να προκαλέσει στρες δεν εφαρμόζονταν στις συγκεκριμένες δεξαμενές. Τα αποτελέσματα αυτών όσον αφορά το στρες, θα συγκριθούν με τα αποτελέσματα των άλλων δύο ομάδων (της ασιτίας και της κακομεταχείρισης).

Από τις δύο δεξαμενές της δεύτερης ομάδας, όπου οι τσιπούρες βρισκόντουσαν σε συνθήκες ασιτίας, εικοσιτέσσερα δείγματα συγκεντρώθηκαν (δώδεκα από τη μία δεξαμενή και άλλα δώδεκα από την άλλη δεξαμενή για επανάληψη). Πιο συγκεκριμένα, μετά από την πρώτη εβδομάδα της ασιτίας τρία δείγματα από τη μία και τρία δείγματα από τη δεύτερη δεξαμενή αποκομίσθηκαν. Μετά από τη δεύτερη εβδομάδα της ασιτίας ακόμα έξι δείγματα συγκεντρώθηκαν (τρία από τη μία και τρία από τη δεύτερη δεξαμενή πάλι) και ο ίδιος αριθμός δειγμάτων υπήρξε και μετά το τέλος της τρίτης εβδομάδας (έξι δηλαδή). Τα τελευταία έξι δείγματα ήταν μετά από έξι εβδομάδες ασιτίας, οπότε και συλλέχθηκαν συνολικά 24 δείγματα. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων αυτών θα συγκριθούν μεταξύ τους (για να βρεθεί αν υπάρχει διαφορά στο στρες των ψαριών που είναι άσιτα μία εβδομάδα, με αυτών που είναι άσιτα δύο, τριών και έξι εβδομάδων), καθώς επίσης και με τα αποτελέσματα των άλλων δύο ομάδων (του μάρτυρα και της κακομεταχείρισης).

Τέλος, από τις δύο δεξαμενές της τρίτης ομάδας, όπου οι τσιπούρες ταϊζόντουσαν κανονικά, αλλά είχαν υποστεί κακομεταχείριση (Handling Stress, HS), δεκαοχτώ συνολικά δείγματα συλλέχθηκαν (εννιά από τη μία δεξαμενή και ακόμα εννιά από τη δεύτερη δεξαμενή για επανάληψη). Η κακομεταχείριση των ατόμων έγινε με δίχτυ απόχης εκτός φυσικού τους περιβάλλοντος για ένα, τρία και πέντε λεπτά. Έξι τσιπούρες (τρεις από τη μία δεξαμενή και τρεις από τη δεύτερη δεξαμενή) προτού εισέλθουν σε νερό με αναισθητικό, μένανε στην απόχη και

ταρακουνιόντουσαν για ένα λεπτό. Η ίδια μέθοδος ακολουθήθηκε και για έξι ακόμα τσιπούρες, μόνο που αυτές παρέμειναν στην αποχή για τρία λεπτά. Οι τελευταίες έξι τσιπούρες (τρεις από κάθε δεξαμενή) ταρακουνιόντουσαν στην αποχή για πέντε λεπτά, οπότε ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που προήλθε από τις τσιπούρες, οι οποίες υπέστησαν Handling Stress, ήταν 18. Όπως και στα δείγματα της δεύτερης ομάδας (ασιτίας), τα αποτελέσματα των δειγμάτων αυτών θα συγκριθούν μεταξύ τους, έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει διαφορά στο στρες των ψαριών που παρέμειναν στην αποχή και έξω από το νερό για ένα λεπτό, με αυτών που παρέμειναν στην αποχή για τρία και πέντε λεπτά. Τα αποτελέσματα αυτά θα συγκριθούν επίσης και με τα αποτελέσματα των άλλων δύο ομάδων (του μάρτυρα και της ασιτίας).

2.3 Απομόνωση ήπατος.

Για να μελετηθεί το κατά πόσο τα ψάρια, τα οποία υπάγονταν σε μία από τις παραπάνω τρεις ομάδες, είχαν στρεσαριστεί έπρεπε να τους αφαιρεθεί το ήπαρ. Αυτό ήταν απαραίτητο, αφού το ποσοστό βλάβης του DNA θα υπολογίζονταν σε υπατικά κύτταρα. Για αυτό το λόγο λοιπόν μετά την αφαίρεση του ήπατος θα ακολουθούσε η απομόνωση των υπατικών κυττάρων. Το κάθε δείγμα αποτελούσε ένα ήπαρ και από το κάθε ήπαρ απομονώνονταν 100 ηπατικά κύτταρα στα οποία μέσω της τεχνικής της «Comet Assay» το κατεστραμμένο DNA μπορούσε να μετρηθεί. Αυτό γίνονταν με τη βοήθεια του προγράμματος «Casp», το οποίο μπορεί να σκοράρει τους κομήτες μετρώντας το «Tail Moment» (TM) του κάθε ένα από αυτούς. Το TM ορίζεται ως το μήκος της «ουράς» του DNA που έχει απομακρυνθεί από τον πυρήνα και το ποσοστό του DNA, το οποίο βρίσκεται στην «ουρά» (Εικ. 4). Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του TM (μεγάλη τιμή του TM σημαίνει ότι κομήτης έχει μεγάλη και γεμάτη «ουρά») από

ένα δείγμα, τόσο μεγαλύτερη καταστροφή έχει υποστεί το DNA του συγκεκριμένου δείγματος.

Για την εξαγωγή του ήπαρ από τις τσιπούρες χρειάστηκαν μία αποστειρωμένη λαβίδα και ένα αποστειρωμένο ψαλίδι. Το κάθε ψάρι, αναισθητοποιήθηκε με φαινοξαιθανόλη, συγκέντρωσης 5 ppm σε θαλασσινό νερό και έγινε τομή στην κοιλιακή του περιοχή για την αφαίρεση του ήπατος το οποίο τοποθετήθηκε σε πλαστικούς σωλήνες Falcon (50 ml) με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (Hanks Balanced Salt Solution).

2.4 Γενετική ανάλυση των δειγμάτων στο εργαστήριο.

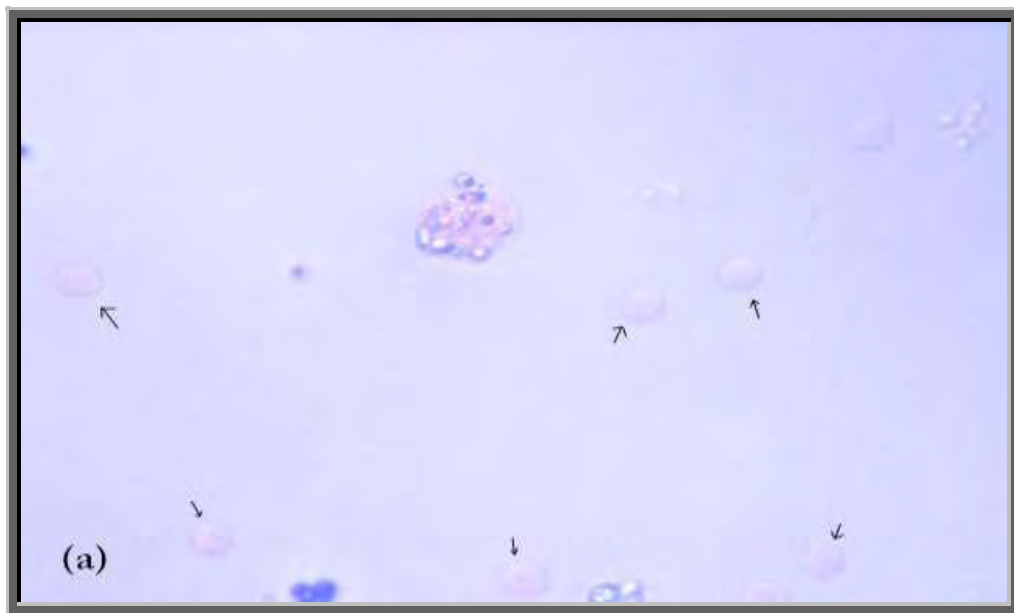
Συνολικά τα 48 δείγματα που συλλέχθηκαν από το πρώτο μέρος του πειράματος (τα οποία όλα ήταν ήπαρ), πέρασαν από την ίδια παρακάτω διαδικασία αμέσως μετά από την εξαγωγή τους από τις τσιπούρες. Η διαδικασία αυτή, η οποία στηρίχτηκε στους Singh et al. (1988) με κάποιες παραλλαγές, είχε να κάνει με την απομόνωση των ηπατικών κυττάρων και τη μεταφορά τους πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, την πλύση και λύση αυτών των κυττάρων για την απελευθέρωση του DNA, την ηλεκτροφόρηση σε ειδικό «μπάνιο» ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια το σκοράρισμα των κομητών (McKelvey-Martin et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα, από τα 6 δείγματα του μάρτυρα (οι τσιπούρες που ταΐζόντουσαν κανονικά και δεν είχαν υποστεί κανένα στρες), από τα 24 δείγματα που προήλθαν από τις τσιπούρες, οι οποίες βρισκόντουσαν σε ασιτία και από τα 18 δείγματα, τα οποία προήλθαν από τις τσιπούρες, οι οποίες είχαν υποστεί Handling Stress, τα υπατικά κύτταρα αποσπάστηκαν από το κάθε συκώτι. Στη συνέχεια, υπέστησαν λύση και μετά το

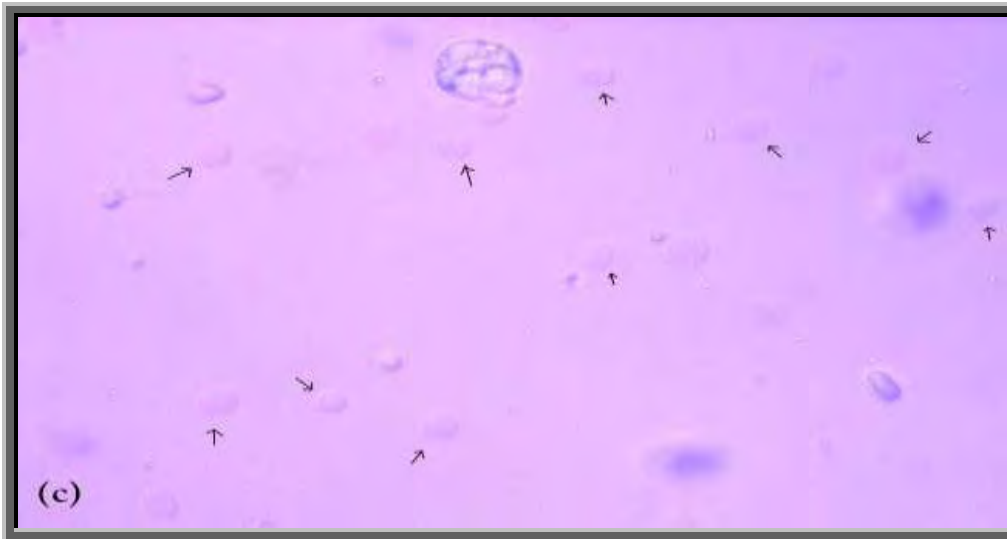
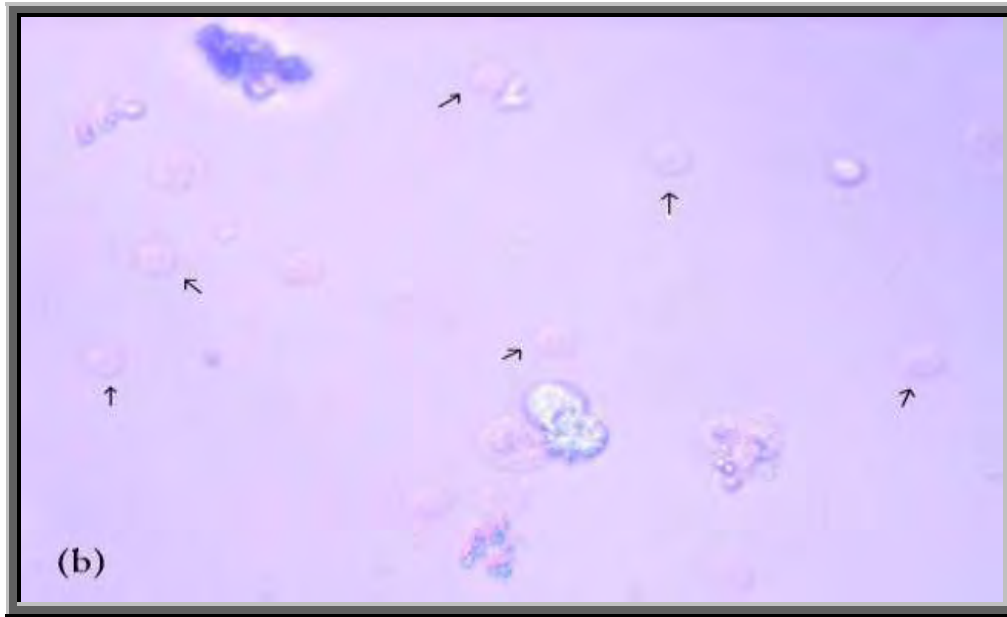
ποσοστό βλάβης του DNA μπορούσε να μετρηθεί με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος (CASP – Comet Assay Software Project) σε υπολογιστή.

2.5 Απομόνωση ηπατικών κυττάρων

Για την απομόνωση ηπατικών κυττάρων έχουν γίνει πολλές έρευνες στο παρελθόν, όχι μόνο για απομόνωση ηπατικών κυττάρων από ψάρια, αλλά και από πτηνά, θηλαστικά, ποντίκια και άλλους οργανισμούς (Brendler-Schwaab et al., 1994). Όσον αφορά τα ψάρια, η απομόνωση κυττάρων από το ήπαρ έχει γίνει σε πολλά είδη και ένα από αυτό είναι και η τσιπούρα (Baksie & Fazier, 1990). Η διαδικασία απομόνωσης κυττάρων που ακολουθήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα βασίζεται σε δύο φάσεις (Mitchelmore & Chipman, 1998, Devaux et al., 1997 και Baksie & Fazier, 1990). Στην πρώτη φάση γίνεται ο καθαρισμός του ήπαρ από το αίμα και στη δεύτερη φάση γίνεται η αφομοίωση του ήπατος. Αμέσως μετά την εξαγωγή του ήπαρ από την τσιπούρα, το ίδιο τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου «Falcon», το οποίο περιείχε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (ή Hank's salt solution) χωρίς να περιέχει ασβέστιο ή μαγνήσιο (Ca ή Mg). Το ασβέστιο αφαιρείται από το διάλυμα, διότι δρα ανασταλτικά στο διαχωρισμό των ηπατικών κυττάρων. Το μαγνήσιο επίσης αφαιρείται από το διάλυμα, διότι εμποδίζει τη δράση του ενζύμου κολαγενάση, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στη δεύτερη φάση του πειράματος (Baksie & Fazier, 1990). Με το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα το συκώτι καθαρίζεται από τυχόν αίμα που θα είχε από τα σωθικά της τσιπούρας. Στη συνέχεια, γίνεται μία δεύτερη πλύση του ήπαρ και αμέσως μετά γίνονται ενέσεις κολαγενάσης συγκέντρωσης 0,04% (η κολαγενάση διαλύεται σε διάλυμα HBSS). Η κολαγενάση είναι ένα ένζυμο το οποίο βοηθάει στον να αφομοιωθεί ο ιστός του ήπατος. Αφού γίνει η «πέψη» του ιστού για 10 – 15 λεπτά,

το ήπαρ μεταφέρεται σε πιατάκι “petri”, όπου και τεμαχίζεται σε πολύ μικρά κομματάκια πάνω σε τριμμένο πάγο. Όλο το τεμαχισμένο ήπαρ μαζί με το διάλυμα HBSS, το οποίο περιέχει και κολλαγένη, μεταφέρονται σε μικρό γυάλινο δοχείο ζέσεως και τοποθετείται πάνω σε μηχανήμα ανάδευσης. Εκεί με τη βοήθεια ενός μικρού μαγνήτη (ο οποίος έχει τοποθετηθεί μέσα στο δοχείο ζέσεως) το μίγμα αναδεύεται για περίπου μισή ώρα. Μετά τη μισή ώρα, το εσωτερικό του δοχείου μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα «Falcon», αφού πρώτα φιλτραριστεί με αποστειρωμένη γάζα. Ακολουθεί φυγοκέντριση του «Falcon» στις 2,000 στροφές για πέντε λεπτά και μετά το υπερκείμενο χύνεται και προστίθεται φρέσκο και κρύο HBSS στην πελέτα που μένει. Στη συνέχεια, γίνονται δύο ακόμα τέτοιες πλύσεις με HBSS και φυγοκέντριση στις 2,000 στροφές για πέντε λεπτά και τέλος η πελέτα που μένει επαναδιαλύεται 7 – 10 ml από ρυθμιστικό διάλυμα PBS (phosphate buffered saline). Το διάλυμα αυτό περιέχει κύτταρα από το ήπαρ της τσιπούρας, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στην επόμενη φάση του πειράματος.





Εικόνα 6:Κύτταρα τα οποία έχουν απομονωθεί από το ήπαρ της τσιπούρας και έχουν χρωματιστεί με προσθήκη εωσίνης στο κυτταρικό αιώρημα. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για να βρεθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα τα οποία έχουν απομονωθεί και είναι ζωντανά χρωματίζονται με κόκκινο χρώμα: **(a)** τα κύτταρα μόλις έχουν αρχίσει να χρωματίζονται και διακρίνεται η κυτταρική μεμβράνη και ο πυρήνας τους, **(b)** κύτταρα στα οποία έχει αρχίσει να διακρίνεται η χρώση του κόκκινου μετά από λίγα λεπτά της προσθήκης της εωσίνης και **(c)** κύτταρα τα οποία έχουν χρωματιστεί εξολοκλήρου κόκκινα.



Εικόνα 7: Κύτταρο το οποίο έχει χρωματιστεί με τη προσθήκη του «Trypan Blue». Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για να βρεθεί ποια κύτταρα είναι νεκρά (το αντίθετο ακριβώς από τη χρωστική εωσίνη). Τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται μπλε.

2.6 Προετοιμασία για το στρώσιμο της αгарόζης σε αντικειμενοφόρο.

Εφόσον τα υπατικά κύτταρα είχαν απομονωθεί στο προηγούμενο στάδιο, σειρά είχε η μεταφορά των κυττάρων αυτών πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Για να επιτευχθεί αυτό η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετούταν σε καθαρή αλκοόλη και στη συνέχεια στους -20°C μέχρι να παγώσει. Στο διάστημα αυτό 0,5% συγκέντρωσης αγαρόζης φτιάχνονταν (η σκόνη της αγαρόζης διαλύονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS) και αφού κρύωνε λίγο μία στρώση της αγαρόζης αυτής κάλυπτε την επιφάνεια της παγωμένης αντικειμενοφόρου πλάκας (η αντικειμενοφόρος πλάκα από τότε και στο εξής ήταν τοποθετημένη πάνω σε τριμμένο πάγο). Ωστόσο το μείγμα να ζελατινοποιηθεί πάνω στη πλάκα, ένα καινούργιο μίγμα αγαρόζης ετοιμάζονταν. Η αγαρόζη πάλι διαλύονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και σε συγκέντρωση 0,5%, μόνο που αυτή τη φορά η αγαρόζη που χρησιμοποιούνταν είχε χαμηλότερο σημείο τήξης από την κανονική αγαρόζη (που χρησιμοποιήθηκε για να καλύψει την

αντικειμενοφόρο πλάκα). Μετά από λίγη ώρα ώστε η αγαρόζη να μην είναι καυτή προσθέτονταν 20μl από το κυτταρικό αιώρημα σε 80μl της αγαρόζης (με το χαμηλότερο σημείο τήξης) και αμέσως μετά όλο το μείγμα αγαρόζης με το κυτταρικό αιώρημα τοποθετούνταν πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, η οποία ήταν καλυμμένη με μία στρώση αγαρόζης που είχε ζελατινοποιηθεί. Στην συνέχεια, ακολουθούσε η τοποθέτηση καλυπτρίδας πάνω ακριβώς από εκεί που βρίσκονταν τα ηπατικά κύτταρα. Μετά τη ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αγαρόζης, η καλυπτρίδα απομακρύνονταν με προσοχή έτσι ώστε να μην υπάρχουν τυχόν απώλειες.

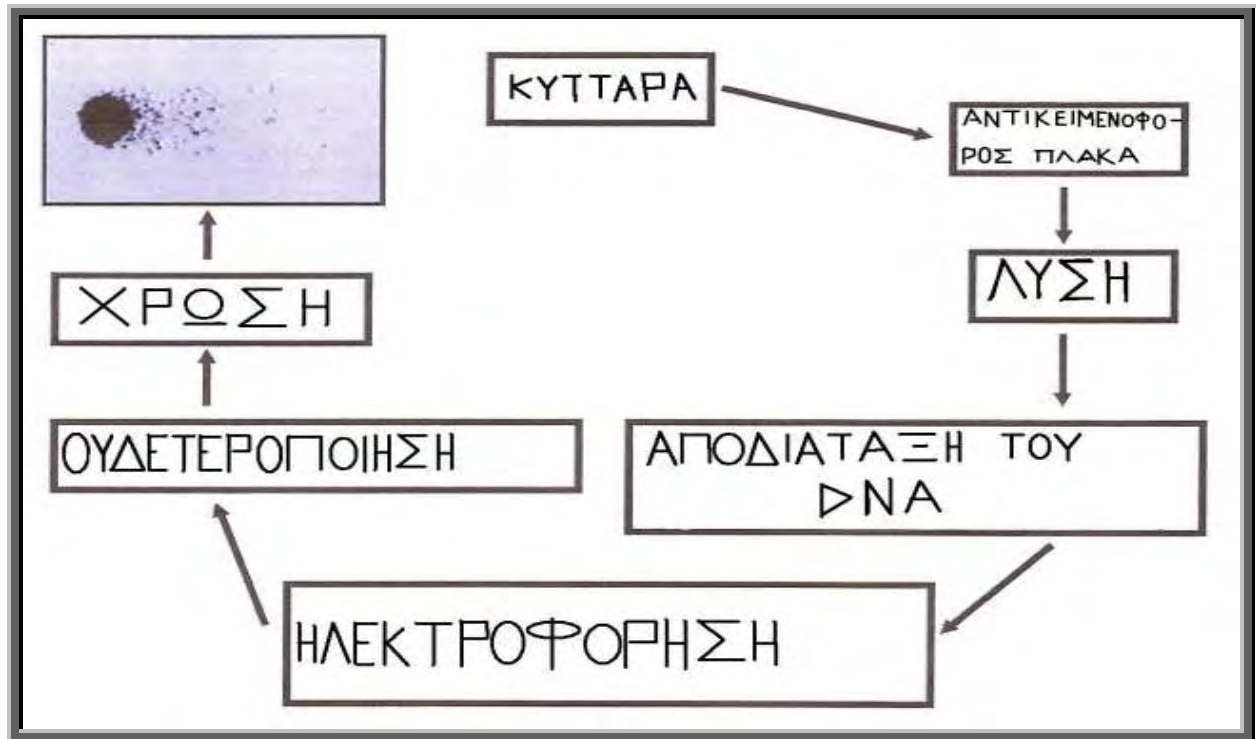
2.7 Λύση, ηλεκτροφόρηση και σκοράρισμα των κομητών.

Μετά το τέλος της προηγούμενης φάσης, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε διάλυμα λύσης, το οποίο φτιάχτηκε εκείνη την ώρα για να είναι φρέσκο. Το διάλυμα αυτό περιείχε NaCl συγκέντρωσης 2.5 M, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) συγκέντρωσης 100 mM, Tris συγκέντρωσης 10 mM και στο τέλος προσθέτονταν 1% Triton – X 100 και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide). Στη συνέχεια, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με συμπυκνωμένο διάλυμα HCl ή NaOH έτσι ώστε να φτάσει στο 10 και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους 4 °C για περίπου τριάντα λεπτά μέχρι να κρυώσει (το κρύο διάλυμα βοηθάει στο να διατηρήσει τη σταθερότητα της αγαρόζης) (Tice et al., 2000). Στο κρύο πλέον διάλυμα λύσης, τοποθετήθηκε η αντικειμενοφόρος πλάκα (στην οποία βρισκότουσαν τα ηπατικά κύτταρα) και όλο το παραπάνω παρέμεινε στους 4 °C για τουλάχιστον μία ώρα. Κατά τη διάρκεια της μίας αυτής ώρας γίνονταν η λύση των

κυττάρων καθώς η κυτταρική μεμβράνη καταστρέφονταν και το DNA αυτών μπορούσε πλέον να απελευθερωθεί.

Πριν την ηλεκτροφόρηση, η αντικειμενοφόρος πλάκα ξεπλύθηκε με αποσταγμένο νερό μόλις βγήκε από το διάλυμα λύσης (για να απομακρυνθούν τα διάφορα χημικά όπως το EDTA και το αλάτι NaCl) και στη συνέχεια τοποθετήθηκε για 15 – 20 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε να γίνει η αποδιάταξη του DNA (ή αλλιώς να «ξεδιπλωθεί» το DNA) και να δημιουργηθούν μονόκλωνες ρήξεις του DNA. Το τελευταίο διάλυμα περιείχε 0,075 M NaOH και 1 mM EDTA και το pH του ήταν πάνω από 12. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα βρίσκονταν μέσα σε οριζόντιο «μπάνιο» ηλεκτροφόρησης. Μετά το τέλος των 20 λεπτών άρχισε η ηλεκτροφόρηση του μονόκλωνου DNA, η οποία κράτησε 15 λεπτά. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες η ηλεκτροφόρηση έλαβε μέρος ήταν στα 25 V και 300 mA (Hartmann et al., 2003).

Μετά την ηλεκτροφόρηση η αντικειμενοφόρος πλάκα βυθίζεται οριζοντίως και με προσοχή (για να μη ξεκολλήσει η αγαρόζη) σε ουδέτερο διάλυμα για να απομακρυνθεί το EDTA, έτσι ώστε το βρομιούχο εθίδιο να μπορεί να δράσει κατά τη διάρκεια της χρώσης (στο επόμενο βήμα). Το διάλυμα αυτό περιέχει Tris συγκέντρωσης 0,4 M και το pH του είναι 7,5 και μέσα σε αυτό γίνονται τρεις πλύσεις της αντικειμενοφόρου πλάκας (McKelvey-Martin et al., 2003). Στη συνέχεια, προσθέτονταν το βρομιούχο εθίδιο και το DNA (που είχε τη μορφή κομήτη) μπορούσε να φανεί με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε μεγέθυνση x100. Όλη η παραπάνω διαδικασία συνοψίζεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων σημείων στην Comet Assay, τα οποία είναι τα κύτταρα (cells), οι αντικειμενοφόρες πλάκες (slides), η λύση των κυττάρων (lysis), η αποδιάταξη του DNA (alkali unwinding), η ηλεκτροφόρηση (electrophoresis), η ουδετεροποίηση των κυττάρων (neutralization), και το «βάψιμο» του DNA με βρομιούχο εθίδιο (staining) (Tice et al., 2000).

3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα του μάρτυρα.

Ο Πίνακας 1.1 αναφέρεται στον αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν από το ήπαρ της κάθε τσιπούρας (N), καθώς επίσης και στο μέσο όρο του «Tail Moment» (Μέσος T.M.) που μετρήθηκε για κάθε τσιπούρα ξεχωριστά.

Πίνακας 1.1: Στατιστικές πληροφορίες για το μάρτυρα.

Άτομα Τσιπούρας	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος T.M.
1 ^ο	100	,1802628
2 ^ο	100	,2194209
3 ^ο	100	,2642851
4 ^ο	100	,1209539
5 ^ο	100	,2053075
6 ^ο	100	,0442031
Σύνολο	600	,1724056

Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι οι τσιπούρες που ανήκουν στην ομάδα του μάρτυρα δεν έχουν υποστεί κάποιο στρες αφού η τιμή του μέσο όρου είναι κοντά στο μηδέν (0,17), το οποίο σημαίνει ότι το DNA των ψαριών αυτών έχει υποστεί ελάχιστη έως καθόλου καταστροφή. Στη συνέχεια έγινε στατιστικό τεστ «One Way Anova» για να βρεθεί εάν τα δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους. Οι Πίνακες 1.2 και 1.3 δείχνουν τα αποτελέσματα του «One Way Anova».

Πίνακας 1.2: Στατιστικό τεστ, One Way Anova για μάρτυρες.

	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	3,088	5	,618	,720	,609

Στον Πίνακα 1.2 φαίνεται ότι οι έξι τσιπούρες μεταξύ τους είναι ίδιες στατιστικώς, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,609 που σημαίνει ότι είναι μεγαλύτερη από το επίπεδο σημαντικότητας του 0,01 ($0,609 > 0,01$) και άρα οι ομάδες (οι έξι τσιπούρες) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο αποτέλεσμα δείχνει και ο Πίνακας 1.3, ο οποίος συγκρίνει τις ομάδες μεταξύ τους.

Πίνακας 1.3: Πολλαπλές συγκρίσεις μάρτυρα από Anova.

(I) Μάρτυρας	(J) Μάρτυρας	Μέση Παραλλακτικότητα(I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
1ος	2 ^{ος}	-,03915808	,13100512	1,000
	3 ^{ος}	-,08402223	,13100512	,988
	4 ^{ος}	,05930893	,13100512	,998
	5 ^{ος}	-,02504462	,13100512	1,000
	6 ^{ος}	,13605977	,13100512	,905
2ος	1 ^{ος}	,03915808	,13100512	1,000
	3 ^{ος}	-,04486414	,13100512	,999
	4 ^{ος}	,09846702	,13100512	,975
	5 ^{ος}	,01411346	,13100512	1,000
	6 ^{ος}	,17521785	,13100512	,764
3ος	1 ^{ος}	,08402223	,13100512	,988
	2 ^{ος}	,04486414	,13100512	,999
	4 ^{ος}	,14333116	,13100512	,884
	5 ^{ος}	,05897760	,13100512	,998
	6 ^{ος}	,22008200	,13100512	,546
4ος	1 ^{ος}	-,05930893	,13100512	,998
	2 ^{ος}	-,09846702	,13100512	,975
	3 ^{ος}	-,14333116	,13100512	,884
	5 ^{ος}	-,08435355	,13100512	,988
	6 ^{ος}	,07675084	,13100512	,992
5ος	1 ^{ος}	,02504462	,13100512	1,000
	2 ^{ος}	-,01411346	,13100512	1,000
	3 ^{ος}	-,05897760	,13100512	,998
	4 ^{ος}	,08435355	,13100512	,988
	6 ^{ος}	,16110439	,13100512	,822
6ος	1 ^{ος}	-,13605977	,13100512	,905
	2 ^{ος}	-,17521785	,13100512	,764
	3 ^{ος}	-,22008200	,13100512	,546
	4 ^{ος}	-,07675084	,13100512	,992
	5 ^{ος}	-,16110439	,13100512	,822

Στον Πίνακα 1.3 φαίνεται ότι καμία τσιπούρα μάρτυρας δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την άλλη, εφόσον όλες οι τιμές της πιθανότητας (P) είναι πάνω από 0,01.

3.2 Αποτελέσματα της ασιτίας.

Για την ασιτία υπήρξαν τέσσερις διαφορετικές μετρήσεις για να υπολογισθεί το στρες που έχουν οι τσιπούρες (σύμφωνα πάντα με το ποσοστό του

κατεστραμμένου DNA). Η πρώτη μέτρηση αφορούσε τις τσιπούρες, οι οποίες ήταν άσιτες για μία εβδομάδα, η δεύτερη έγινε για αυτές που ήταν άσιτες για δύο εβδομάδες, η τρίτη για αυτές που ήταν άσιτες τρεις εβδομάδες και η τέταρτη μέτρηση έγινε για τις τσιπούρες, οι οποίες ήταν άσιτες έξι εβδομάδες. Οι Πίνακες 2, 3, 4 και 5 αναφέρονται στις τσιπούρες που έμειναν άσιτες για μία, δύο, τρεις και έξι εβδομάδες αντίστοιχα, όπου φαίνεται πόσα κύτταρα μετρήθηκαν από το ήπαρ της κάθε τσιπούρας (N), καθώς επίσης και ο μέσος όρος του «Tail Moment» (Mean T.M.) που μετρήθηκε για κάθε τσιπούρα ξεχωριστά. Στον κάθε πίνακα αναγράφονται οι μετρήσεις από έξι τσιπούρες, εφόσον για κάθε μία από τις τέσσερις μεταχειρίσεις ασιτίας, το πείραμα έγινε σε τρεις τσιπούρες όπου ακολούθησε και η επανάληψη σε άλλες τρεις (σύνολο έξι).

3.2.1 Αποτελέσματα μετά από μία εβδομάδα ασιτίας.

Πίνακας 2.1: Άσιτες τσιπούρες μίας εβδομάδας.

Άτομα Τσιπούρας	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος T.M.
1 ^ο	99	,9890346
2 ^ο	100	,8100555
3 ^ο	99	2,6146695
4 ^ο	100	,7779168
5 ^ο	99	1,3707626
6 ^ο	99	1,1446563
Σύνολο	596	1,2828698

Στον Πίνακα 2.1 φαίνεται ότι οι άσιτες τσιπούρες της πρώτης μεταχείρισης (που έχουν μείνει μία εβδομάδα σε συνθήκες ασιτίας) έχουν δείξει να στρεσάρονται,

αφού η τιμή του μέσο όρου του «Tail Moment» είναι πάνω από το μηδέν (1,28) που σημαίνει ότι το DNA των ψαριών αυτών έχει υποστεί κάποια καταστροφή. Στη συνέχεια, όπως και στους μάρτυρες έγινε στατιστικό τεστ «One Way Anova» για να βρεθεί εάν τα δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους. Οι Πίνακες 2.2 και 2.3 δείχνουν τα αποτελέσματα του «One Way Anova».

Πίνακας 2.2: Στατιστικό τεστ, One Way Anova για τις άσπιτες τσιπούρες μίας εβδομάδας.

	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	234,652	5	46,930	1,830	,105

Στον Πίνακα 2.2 φαίνεται ότι οι έξι τσιπούρες μεταξύ τους είναι όμοιες στατιστικώς, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,105 που σημαίνει ότι είναι μεγαλύτερη από το επίπεδο σημαντικότητας του 0,01 ($0,105 > 0,01$) και άρα οι ομάδες (οι έξι τσιπούρες) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο αποτέλεσμα δείχνει και ο Πίνακας 2.3, ο οποίος συγκρίνει τις ομάδες μεταξύ τους.

Πίνακας 2.3: Πολλαπλές συγκρίσεις μίας εβδομάδας άσιτων ψαριών.

(I) Τσιπούρα	(J) Τσιπούρα	Μέση Παραλλακτικότητα (I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
1 ^η	2 ^η	,17897906	,71793181	1,000
	3 ^η	-1,62563492	,71973340	,213
	4 ^η	,21111779	,71793181	1,000
	5 ^η	-,38172796	,71973340	,995
	6 ^η	-,15562169	,71973340	1,000
2 ^η	1 ^η	-,17897906	,71793181	1,000
	3 ^η	-1,80461398	,71793181	,122
	4 ^η	,03213873	,71612569	1,000
	5 ^η	-,56070701	,71793181	,971
	6 ^η	-,33460075	,71793181	,997
3 ^η	1 ^η	1,62563492	,71973340	,213
	2 ^η	1,80461398	,71793181	,122
	4 ^η	1,83675271	,71793181	,109
	5 ^η	1,24390697	,71973340	,514
	6 ^η	1,47001323	,71973340	,320
4 ^η	1 ^η	-,21111779	,71793181	1,000
	2 ^η	-,03213873	,71612569	1,000
	3 ^η	-1,83675271	,71793181	,109
	5 ^η	-,59284574	,71793181	,963
	6 ^η	-,36673948	,71793181	,996
5 ^η	1 ^η	,38172796	,71973340	,995
	2 ^η	,56070701	,71793181	,971
	3 ^η	-1,24390697	,71973340	,514
	4 ^η	,59284574	,71793181	,963
	6 ^η	,22610626	,71973340	1,000
6 ^η	1 ^η	,15562169	,71973340	1,000
	2 ^η	,33460075	,71793181	,997
	3 ^η	-1,47001323	,71973340	,320
	4 ^η	,36673948	,71793181	,996
	5 ^η	-,22610626	,71973340	1,000

Στον Πίνακα 2.3 φαίνεται ότι καμία τσιπούρα που έχει μείνει άσιτη για μία εβδομάδα δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την άλλη, εφόσον όλες οι τιμές της πιθανότητας (P) είναι πάνω από 0,01.

3.2.2 Αποτελέσματα μετά από δύο εβδομάδες αστίας.

Πίνακας 3.1: Άσιτες τσιπούρες δύο εβδομάδων.

Άτομα Τσιπούρας	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος Τ.Μ.
1 ^ο	99	4,9927851
2 ^ο	100	,2152772
3 ^ο	100	,4783619
4 ^ο	99	2,0782940
5 ^ο	100	,8338034
6 ^ο	100	,5523155
Σύνολο	598	1,5184158

Στον Πίνακα 3.1 φαίνεται ότι οι άσιτες τσιπούρες της δεύτερης μεταχείρισης (που έχουν μείνει δύο εβδομάδες σε συνθήκες αστίας) έχουν δείξει επίσης να στρεσάρονται, αφού η τιμή του μέσο όρου του «Tail Moment» είναι πάνω από το μηδέν (1,52). Οι Πίνακες 3.2 και 3.3 δείχνουν τα αποτελέσματα του «One Way Ανονα».

Πίνακας 3.2: Στατιστικό τεστ, One Way Ανονα για τις άσιτες τσιπούρες δύο εβδομάδων.

	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	1644,279	5	328,856	8,87 2	,000

Στον Πίνακα 3.2 φαίνεται ότι οι έξι τσιπούρες μεταξύ τους δεν είναι όμοιες στατιστικώς, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,000 που σημαίνει ότι είναι μικρότερη από το επίπεδο σημαντικότητας του 0,01 ($0,000 < 0,01$) και άρα οι ομάδες (οι έξι

τσιπούρες) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο αποτέλεσμα δείχνει και ο Πίνακας 3.3, ο οποίος συγκρίνει τις ομάδες μεταξύ τους.

Πίνακας 3.3: Πολλαπλές συγκρίσεις δύο εβδομάδων άσιτων ψαριών.

(I) Τσιπούρα	(J) Τσιπούρα	Μέση Παραλλακτικότητα (I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
1 ^η	2 ^η	4,77750796(*)	,86319646	,000
	3 ^η	4,51442328(*)	,86319646	,000
	4 ^η	2,91449110	,86536258	,010
	5 ^η	4,15898175(*)	,86319646	,000
	6 ^η	4,44046960(*)	,86319646	,000
2 ^η	1 ^η	-4,77750796(*)	,86319646	,000
	3 ^η	-,26308468	,86102489	1,000
	4 ^η	-1,86301686	,86319646	,259
	5 ^η	-,61852621	,86102489	,980
	6 ^η	-,33703836	,86102489	,999
3 ^η	1 ^η	-4,51442328(*)	,86319646	,000
	2 ^η	,26308468	,86102489	1,000
	4 ^η	-1,59993218	,86319646	,432
	5 ^η	-,35544153	,86102489	,998
	6 ^η	-,07395368	,86102489	1,000
4 ^η	1 ^η	-2,91449110	,86536258	,010
	2 ^η	1,86301686	,86319646	,259
	3 ^η	1,59993218	,86319646	,432
	5 ^η	1,24449065	,86319646	,701
	6 ^η	1,52597850	,86319646	,487
5 ^η	1 ^η	-4,15898175(*)	,86319646	,000
	2 ^η	,61852621	,86102489	,980
	3 ^η	,35544153	,86102489	,998
	4 ^η	-1,24449065	,86319646	,701
	6 ^η	,28148785	,86102489	1,000
6 ^η	1 ^η	-4,44046960(*)	,86319646	,000
	2 ^η	,33703836	,86102489	,999
	3 ^η	,07395368	,86102489	1,000
	4 ^η	-1,52597850	,86319646	,487
	5 ^η	-,28148785	,86102489	1,000

Στον Πίνακα 3.3 φαίνεται ότι μόνο η πρώτη από τις τσιπούρες που έχουν μείνει άσιτες για δύο εβδομάδες διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις άλλες, εφόσον οι τιμές της πιθανότητας (P) είναι κάτω από 0,01 (εκτός σε σύγκριση με την τέταρτη τσιπούρα με την οποία είναι οριακά στατιστικώς όμοιες, αφού το «P» είναι 0,010),

ενώ όλες οι υπόλοιπες τσιπούρες είναι στατιστικώς όμοιες μεταξύ τους, αφού οι τιμές του «P» είναι πάνω από 0,01. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες, οι οποίες έχουν αστερίσκο -* στο «Mean Difference» σημαίνει ότι έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ αυτές που δεν έχουν είναι στατιστικώς όμοιες μεταξύ τους.

3.2.3 Αποτελέσματα μετά από τρεις εβδομάδες ασιτίας.

Πίνακας 4.1: Άσιτες τσιπούρες τριών εβδομάδων

Άτομα Τσιπούρας	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος T.M.
1 ^ο	100	,7725200
2 ^ο	100	,8885812
3 ^ο	100	1,8176013
4 ^ο	100	4,2755690
5 ^ο	100	3,1248412
6 ^ο	100	,4330972
Σύνολο	600	1,8853683

Στον Πίνακα 4.1 φαίνεται ότι οι άσιτες τσιπούρες της τρίτης μεταχείρισης (που έχουν μείνει τρεις εβδομάδες σε συνθήκες ασιτίας) έχουν δείξει να στρεσάρονται, αφού για ακόμη μία φορά η τιμή του μέσο όρου του «Tail Moment» είναι πάνω από το μηδέν (1,88). Οι Πίνακες 4.2 και 4.3 δείχνουν τα αποτελέσματα του «One Way Anova».

Πίνακας 4.2: Στατιστικό τεστ, One Way Anova για τις άσιτες τσιπούρες τριών εβδομάδων.

	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	1159,505	5	231,901	9,745	,000

Στον Πίνακα 4.2 φαίνεται ότι οι έξι τσιπούρες μεταξύ τους δεν είναι όμοιες στατιστικώς, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,000 που σημαίνει ότι είναι μικρότερη από το επίπεδο σημαντικότητας του 0,01 ($0,000 < 0,01$) και άρα οι ομάδες (οι έξι τσιπούρες) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο αποτέλεσμα δείχνει και ο Πίνακας 4.3, ο οποίος συγκρίνει τις ομάδες μεταξύ τους.

Πίνακας 4.3: Πολλαπλές συγκρίσεις τριών εβδομάδων άσιτων ψαριών.

(I) Τσιπούρα	(J) Τσιπούρα	Μέση Παραλλακτικότητα (I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
1 ^η	2 ^η	-,11606126	,68989307	1,000
	3 ^η	-1,04508137	,68989307	,655
	4 ^η	-3,50304903(*)	,68989307	,000
	5 ^η	-2,35232119(*)	,68989307	,009
	6 ^η	,33942273	,68989307	,996
2 ^η	1 ^η	,11606126	,68989307	1,000
	3 ^η	-,92902012	,68989307	,759
	4 ^η	-3,38698777(*)	,68989307	,000
	5 ^η	-2,23625994	,68989307	,016
	6 ^η	,45548399	,68989307	,986
3 ^η	1 ^η	1,04508137	,68989307	,655
	2 ^η	,92902012	,68989307	,759
	4 ^η	-2,45796766(*)	,68989307	,005
	5 ^η	-1,30723982	,68989307	,406
	6 ^η	1,38450410	,68989307	,340
4 ^η	1 ^η	3,50304903(*)	,68989307	,000
	2 ^η	3,38698777(*)	,68989307	,000
	3 ^η	2,45796766(*)	,68989307	,005
	5 ^η	1,15072783	,68989307	,554
	6 ^η	3,84247176(*)	,68989307	,000
5 ^η	1 ^η	2,35232119(*)	,68989307	,009
	2 ^η	2,23625994	,68989307	,016
	3 ^η	1,30723982	,68989307	,406
	4 ^η	-1,15072783	,68989307	,554
	6 ^η	2,69174392(*)	,68989307	,001
6 ^η	1 ^η	-,33942273	,68989307	,996
	2 ^η	-,45548399	,68989307	,986
	3 ^η	-1,38450410	,68989307	,340
	4 ^η	-3,84247176(*)	,68989307	,000
	5 ^η	-2,69174392(*)	,68989307	,001

Στον Πίνακα 4.3 φαίνεται ότι οι τσιπούρες που έχουν μείνει άσιτες για τρεις εβδομάδες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, εφόσον ορισμένες τιμές της πιθανότητας (P) είναι πάνω από 0,01. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες, οι οποίες έχουν αστερίσκο -*-* στο «Mean Difference» σημαίνει ότι έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ αυτές που δεν έχουν είναι στατιστικώς όμοιες μεταξύ τους.

3.2.4 Αποτελέσματα μετά από έξι εβδομάδες ασιτίας.

Πίνακας 5.1: Άσιτες τσιπούρες έξι εβδομάδων.

Άτομα Τσιπούρας	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος Τ.Μ.
1 ^ο	100	,3441244
2 ^ο	100	,9241233
3 ^ο	100	,3715316
4 ^ο	99	,0841852
5 ^ο	100	,0776843
6 ^ο	100	,5884610
Σύνολο	599	,3988761

Στον Πίνακα 5.1 φαίνεται ότι οι άσιτες τσιπούρες της τέταρτης μεταχείρισης (που έχουν μείνει έξι εβδομάδες σε συνθήκες ασιτίας) δεν έχουν υποστεί κάποιο στρες (ή έχουν υποστεί ελάχιστο) αφού η τιμή του μέσο όρου είναι κοντά στο μηδέν (0,40). Παρακάτω έγινε στατιστικό τεστ «One Way Anova» για να βρεθεί εάν τα δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους. Οι Πίνακες 5.2 και 5.3 δείχνουν τα αποτελέσματα του «One Way Anova».

Πίνακας 5.2: Στατιστικό τεστ, One Way Anova για τις άσπιτες τσιπούρες έξι εβδομάδων.

	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	51,678	5	10,336	1,989	,078

Στον Πίνακα 5.2 φαίνεται ότι οι έξι τσιπούρες μεταξύ τους είναι ίδιες στατιστικώς, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,078 που σημαίνει ότι είναι μεγαλύτερη από το επίπεδο σημαντικότητας του 0,01 ($0,078 > 0,01$), οπότε οι έξι τσιπούρες δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο αποτέλεσμα δείχνει και ο Πίνακας 5.3, ο οποίος συγκρίνει τις ομάδες μεταξύ τους.

Πίνακας 5.3: Πολλαπλές συγκρίσεις έξι εβδομάδων άσιτων ψαριών.

(I) Τσιπούρα	(J) Τσιπούρα	Μέση Παραλλακτικότητα (I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
1 ^η	2 ^η	-,57999892	,32234225	,467
	3 ^η	-,02740724	,32234225	1,000
	4 ^η	,25993916	,32315522	,967
	5 ^η	,26644009	,32234225	,963
	6 ^η	-,24433660	,32234225	,974
2 ^η	1 ^η	,57999892	,32234225	,467
	3 ^η	,55259169	,32234225	,523
	4 ^η	,83993808	,32315522	,099
	5 ^η	,84643902	,32234225	,093
	6 ^η	,33566232	,32234225	,904
3 ^η	1 ^η	,02740724	,32234225	1,000
	2 ^η	-,55259169	,32234225	,523
	4 ^η	,28734639	,32315522	,949
	5 ^η	,29384733	,32234225	,944
	6 ^η	-,21692937	,32234225	,985
4 ^η	1 ^η	-,25993916	,32315522	,967
	2 ^η	-,83993808	,32315522	,099
	3 ^η	-,28734639	,32315522	,949
	5 ^η	,00650093	,32315522	1,000
	6 ^η	-,50427576	,32315522	,625
5 ^η	1 ^η	-,26644009	,32234225	,963
	2 ^η	-,84643902	,32234225	,093
	3 ^η	-,29384733	,32234225	,944
	4 ^η	-,00650093	,32315522	1,000
	6 ^η	-,51077669	,32234225	,609
6 ^η	1 ^η	,24433660	,32234225	,974
	2 ^η	-,33566232	,32234225	,904
	3 ^η	,21692937	,32234225	,985
	4 ^η	,50427576	,32315522	,625
	5 ^η	,51077669	,32234225	,609

Στον Πίνακα 5.3 φαίνεται ότι καμία τσιπούρα που έχει μείνει άσιτη για έξι εβδομάδες δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την άλλη, εφόσον όλες οι τιμές της πιθανότητας (P) είναι πάνω από 0,01.

3.3 Αποτελέσματα του «Handling Stress» (H.S.).

Για την κακομεταχείριση (το handling stress) υπήρξαν τρεις διαφορετικές μετρήσεις για να υπολογισθεί το στρες που υπέστησαν οι τσιπούρες. Η πρώτη μέτρηση αφορούσε τις τσιπούρες, οι οποίες ήταν στην απόχλη έξω από το νερό και

ταρακουνιόντουσαν για ένα λεπτό, η δεύτερη για αυτές που ταρακουνιόντουσαν κατά τον ίδιο τρόπο για τρία λεπτά και η τρίτη για αυτές που βρισκόντουσαν έξω από το νερό και ταρακουνιόντουσαν για πέντε λεπτά. Οι Πίνακες 6, 7 και 8 αναφέρονται στις τσιπούρες που υπέστησαν κακομεταχείριση για ένα, τρία και πέντε λεπτά αντίστοιχα, όπου όπως και παραπάνω φαίνεται πόσα κύτταρα μετρήθηκαν από το ήπαρ της κάθε τσιπούρας (N), καθώς επίσης και ο μέσος όρος του «Tail Moment» (Mean T.M.) που μετρήθηκε για κάθε τσιπούρα ξεχωριστά. Επίσης, στον κάθε πίνακα αναγράφονται οι μετρήσεις από έξι τσιπούρες, εφόσον για κάθε μία από τις τρεις συνθήκες κακομεταχείρισης (του πρώτου, τρίτου και πέμπτου λεπτού), το πείραμα έγινε σε τρεις τσιπούρες όπου ακολούθησε και η επανάληψη σε άλλες τρεις (σύνολο έξι).

3.3.1 Αποτελέσματα της κακομεταχείρισης ενός λεπτού.

Πίνακας 6.1: Τσιπούρες που υπέστησαν κακομεταχείριση για 1 λεπτό.

Άτομα Τσιπούρας	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος T.M.
1 ^ο	93	21,7035899
2 ^ο	101	7,8959067
3 ^ο	101	8,0888226
4 ^ο	101	6,5870749
5 ^ο	99	16,0008431
6 ^ο	108	6,9700174
Σύνολο	603	11,0033689

Στον Πίνακα 6.1 φαίνεται ότι οι τσιπούρες της πρώτης μεταχείρισης του «handling stress» (αυτές που παρέμειναν εκτός νερού για ένα λεπτό και ταρακουνιόντουσαν) έχουν δείξει να στρεσάρονται πολύ, αφού η τιμή του μέσο

όρου του «Tail Moment» είναι κατά πολύ πάνω από το μηδέν (11), που σημαίνει ότι το DNA των ψαριών αυτών έχει υποστεί μεγάλη καταστροφή. Οι Πίνακες 6.2 και 6.3 δείχνουν τα αποτελέσματα του «One Way Anova».

Πίνακας 6.2: Στατιστικό τεστ, One Way Anova για τσιπούρες κακομεταχείρισης για ενός λεπτού.

	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	18680,556	5	3736,111	8,837	,000

Στον Πίνακα 6.2 φαίνεται ότι οι έξι τσιπούρες μεταξύ τους δεν είναι όμοιες στατιστικώς, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,000 που σημαίνει ότι είναι μικρότερη από το επίπεδο σημαντικότητας του 0,01 ($0,000 < 0,01$) και άρα οι ομάδες (οι έξι τσιπούρες) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο αποτέλεσμα δείχνει και ο Πίνακας 6.3, ο οποίος συγκρίνει τις ομάδες μεταξύ τους.

Πίνακας 6.3: Πολλαπλές συγκρίσεις ψαριών που υπέστησαν κακομεταχείριση για ένα λεπτό.

(I) Τσιπούρα	(J) Τσιπούρα	Μέση Παραλλακτικότητα (I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
1 ^η	2 ^η	13,80768319(*)	2,95502872	,000
	3 ^η	13,61476724(*)	2,95502872	,000
	4 ^η	15,11651497(*)	2,95502872	,000
	5 ^η	5,70274681	2,96930319	,390
	6 ^η	14,73357250(*)	2,90875859	,000
2 ^η	1 ^η	-13,80768319(*)	2,95502872	,000
	3 ^η	-,19291595	2,89345887	1,000
	4 ^η	1,30883177	2,89345887	,998
	5 ^η	-8,10493639	2,90803558	,061
	6 ^η	,92588930	2,84618798	1,000
3 ^η	1 ^η	-13,61476724(*)	2,95502872	,000
	2 ^η	,19291595	2,89345887	1,000
	4 ^η	1,50174773	2,89345887	,995
	5 ^η	-7,91202043	2,90803558	,073
	6 ^η	1,11880526	2,84618798	,999
4 ^η	1 ^η	-15,11651497(*)	2,95502872	,000
	2 ^η	-1,30883177	2,89345887	,998
	3 ^η	-1,50174773	2,89345887	,995
	5 ^η	-9,41376816	2,90803558	,016
	6 ^η	-,38294247	2,84618798	1,000
5 ^η	1 ^η	-5,70274681	2,96930319	,390
	2 ^η	8,10493639	2,90803558	,061
	3 ^η	7,91202043	2,90803558	,073
	4 ^η	9,41376816	2,90803558	,016
	6 ^η	9,03082569	2,86100554	,021
6 ^η	1 ^η	-14,73357250(*)	2,90875859	,000
	2 ^η	-,92588930	2,84618798	1,000
	3 ^η	-1,11880526	2,84618798	,999
	4 ^η	,38294247	2,84618798	1,000
	5 ^η	-9,03082569	2,86100554	,021

Στον Πίνακα 6.3 φαίνεται ότι μόνο η πρώτη από τις τσιπούρες που έχουν υποστεί κακομεταχείριση για ένα λεπτό διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις άλλες, εφόσον οι τιμές της πιθανότητας (P) είναι κάτω από 0,01 (εκτός σε σύγκριση με την πέμπτη τσιπούρα με την οποία είναι στατιστικώς όμοιες, αφού το «P» είναι 0,390), ενώ όλες οι υπόλοιπες τσιπούρες είναι στατιστικώς σημαντικά όμοιες μεταξύ τους, αφού οι τιμές της πιθανότητας (P) είναι πάνω από 0,01. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες,

οι οποίες έχουν αστερίσκο **-*** στο «Mean Difference» σημαίνει ότι έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ αυτές που δεν έχουν είναι στατιστικώς όμοιες μεταξύ τους.

3.3.2 Αποτελέσματα της κακομεταχείρισης τριών λεπτών.

Πίνακας 7.1: Τσιπούρες που υπέστησαν κακομεταχείριση για 3 λεπτά.

Άτομα Τσιπούρας	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος T.M.
1 ^ο	100	2,5632549
2 ^ο	100	2,2900245
3 ^ο	100	2,4698603
4 ^ο	100	1,2161829
5 ^ο	100	3,2105899
6 ^ο	100	2,1620178
Σύνολο	600	2,3186551

Στον Πίνακα 7.1 φαίνεται ότι οι τσιπούρες της δεύτερης μεταχείρισης του «handling stress» (αυτές που παρέμειναν εκτός νερού για τρία λεπτά και ταρακουνιόντουσαν) έχουν δείξει να στρεσάρονται, αφού η τιμή του μέσο όρου του «Tail Moment» είναι πάνω από το μηδέν (2,32). Στη συνέχεια, έγινε στατιστικό τεστ «One Way Anova» για να βρεθεί εάν τα δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους. Οι Πίνακες 7.2 και 7.3 δείχνουν τα αποτελέσματα του «One Way Anova».

Πίνακας 7.2: Στατιστικό τεστ, One Way Anova για τσιπούρες κακομεταχείρισης τριών λεπτών.

	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	211,904	5	42,381	,867	,503

Στον Πίνακα 7.2 φαίνεται ότι οι έξι τσιπούρες μεταξύ τους είναι ίδιες στατιστικώς, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,503 που σημαίνει ότι είναι μεγαλύτερη από το επίπεδο σημαντικότητας του 0,01 ($0,503 > 0,01$), οπότε οι έξι τσιπούρες δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο αποτέλεσμα δείχνει και ο Πίνακας 7.3, ο οποίος συγκρίνει τις ομάδες μεταξύ τους.

Πίνακας 7.3: Πολλαπλές συγκρίσεις ψαριών που υπέστησαν κακομεταχείριση για **τρία** λεπτά.

(I) Τσιπούρα	(J) Τσιπούρα	Μέση Παραλλακτικότητα (I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
1 ^η	2 ^η	,27323037	,98871450	1,000
	3 ^η	,09339458	,98871450	1,000
	4 ^η	1,34707202	,98871450	,749
	5 ^η	-,64733503	,98871450	,987
	6 ^η	,40123706	,98871450	,999
2 ^η	1 ^η	-,27323037	,98871450	1,000
	3 ^η	-,17983579	,98871450	1,000
	4 ^η	1,07384165	,98871450	,887
	5 ^η	-,92056540	,98871450	,938
	6 ^η	,12800669	,98871450	1,000
3 ^η	1 ^η	-,09339458	,98871450	1,000
	2 ^η	,17983579	,98871450	1,000
	4 ^η	1,25367744	,98871450	,802
	5 ^η	-,74072961	,98871450	,976
	6 ^η	,30784248	,98871450	1,000
4 ^η	1 ^η	-1,34707202	,98871450	,749
	2 ^η	-1,07384165	,98871450	,887
	3 ^η	-1,25367744	,98871450	,802
	5 ^η	-1,99440705	,98871450	,334
	6 ^η	-,94583496	,98871450	,931
5 ^η	1 ^η	,64733503	,98871450	,987
	2 ^η	,92056540	,98871450	,938
	3 ^η	,74072961	,98871450	,976
	4 ^η	1,99440705	,98871450	,334
	6 ^η	1,04857209	,98871450	,897
6 ^η	1 ^η	-,40123706	,98871450	,999
	2 ^η	-,12800669	,98871450	1,000
	3 ^η	-,30784248	,98871450	1,000
	4 ^η	,94583496	,98871450	,931
	5 ^η	-1,04857209	,98871450	,897

Ο Πίνακας 7.3 μας δείχνει ότι καμία τσιπούρα που έχει υποστεί κακομεταχείριση για τρία λεπτά δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την άλλη, εφόσον όλες οι τιμές της πιθανότητας (P) είναι πάνω από 0,01.

3.3.3 Αποτελέσματα της κακομεταχείρισης πέντε λεπτών.

Πίνακας 8.1: Τσιπούρες που υπέστησαν κακομεταχείριση για 5 λεπτά.

Άτομα Τσιπούρας	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος T.M.
1 ^ο	93	6,2483980
2 ^ο	95	4,6498241
3 ^ο	96	10,7402654
4 ^ο	97	8,1639640
5 ^ο	93	10,3141963
6 ^ο	103	8,3841817
Σύνολο	577	8,0911530

Στον Πίνακα 8.1 φαίνεται ότι οι τσιπούρες της τρίτης μεταχείρισης του «handling stress» (αυτές που παρέμειναν εκτός νερού για πέντε λεπτά) έχουν δείξει να στρεσάρονται επίσης πολύ, αφού η τιμή του μέσο όρου του «Tail Moment» είναι κατά πολύ πάνω από το μηδέν (8,1), που σημαίνει ότι το DNA των ψαριών αυτών έχει υποστεί μεγάλη καταστροφή. Το στατιστικό τεστ «One Way Anova» ακολούθησε για να βρεθεί εάν τα δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους. Οι Πίνακες 8.2 και 8.3 δείχνουν τα αποτελέσματα του «One Way Anova».

Πίνακας 8.2: Στατιστικό τεστ, One Way Anova για τσιπούρες κακομεταχείρισης πέντε λεπτών.

	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	2583,531	5	516,706	1,534	,177

Στον Πίνακα 8.2 φαίνεται ότι οι έξι τσιπούρες μεταξύ τους είναι ίδιες στατιστικώς, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,177 που σημαίνει ότι είναι μεγαλύτερη από το επίπεδο σημαντικότητας του 0,01 ($0,177 > 0,01$), οπότε οι έξι τσιπούρες δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο αποτέλεσμα δείχνει και ο Πίνακας 8.3, ο οποίος συγκρίνει τις ομάδες μεταξύ τους.

Πίνακας 8.3: Πολλαπλές συγκρίσεις ψαριών που υπέστησαν κακομεταχείριση για πέντε λεπτά.

(I) Τσιπούρα	(J) Τσιπούρα	Μέση Παραλλακτικότητα (I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
1 ^η	2 ^η	1,59857392	2,67736808	,991
	3 ^η	-4,49186747	2,67046103	,544
	4 ^η	-1,91556603	2,66367903	,980
	5 ^η	-4,06579832	2,69157172	,658
	6 ^η	-2,13578375	2,62542963	,965
2 ^η	1 ^η	-1,59857392	2,67736808	,991
	3 ^η	-6,09044138	2,65614450	,199
	4 ^η	-3,51413995	2,64932585	,770
	5 ^η	-5,66437224	2,67736808	,281
	6 ^η	-3,73435767	2,61086618	,709
3 ^η	1 ^η	4,49186747	2,67046103	,544
	2 ^η	6,09044138	2,65614450	,199
	4 ^η	2,57630144	2,64234550	,926
	5 ^η	,42606915	2,67046103	1,000
	6 ^η	2,35608372	2,60378273	,945
4 ^η	1 ^η	1,91556603	2,66367903	,980
	2 ^η	3,51413995	2,64932585	,770
	3 ^η	-2,57630144	2,64234550	,926
	5 ^η	-2,15023229	2,66367903	,966
	6 ^η	-,22021772	2,59682660	1,000
5 ^η	1 ^η	4,06579832	2,69157172	,658
	2 ^η	5,66437224	2,67736808	,281
	3 ^η	-,42606915	2,67046103	1,000
	4 ^η	2,15023229	2,66367903	,966
	6 ^η	1,93001457	2,62542963	,978
6 ^η	1 ^η	2,13578375	2,62542963	,965
	2 ^η	3,73435767	2,61086618	,709
	3 ^η	-2,35608372	2,60378273	,945
	4 ^η	,22021772	2,59682660	1,000
	5 ^η	-1,93001457	2,62542963	,978

Ο Πίνακας 8.3 μας δείχνει ότι καμία τσιπούρα που έχει υποστεί κακομεταχείριση για τρία λεπτά δε διαφέρει στατιστικώς από την άλλη, εφόσον όλες οι τιμές της πιθανότητας (P) είναι πάνω από 0,01.

3.4 Σύγκριση μεταξύ τσιπούρες μάρτυρα με τσιπούρες ασιτίας.

Πίνακας 9.1: Σύγκριση ασιτίας με τον μάρτυρα.

Ομάδα	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος T.M.
Μάρτυρας	600	,1724056
1 ^η εβδομάδα	596	1,2828698
2 ^η εβδομάδα	598	1,5184158
3 ^η εβδομάδα	600	1,8853683
6 ^η εβδομάδα	599	,3988761

Στην κάθε ομάδα του Πίνακα 9.1 και τα έξι ψάρια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως στις μετρήσεις, από την κάθε μεταχείριση (του μάρτυρα, της πρώτης, δεύτερης, τρίτης και έκτης εβδομάδας ασιτίας) εμφανίζονται ομαδοποιημένα και συγκρίνονται οι μεταξύ τους ομάδες. Στον Πίνακα 9.1 είναι προφανές ότι οι τσιπούρες της πρώτης, δεύτερης και τρίτης εβδομάδας ασιτίας έχουν υποστεί στρες σε σχέση με τις τσιπούρες του μάρτυρα και της έκτης εβδομάδας ασιτίας, εφόσον η τιμή του μέσο όρου του «Tail Moment» των πρώτων είναι μεγαλύτερη από αυτή των δεύτερων. Το ότι οι ομάδες του παραπάνω πίνακα δεν είναι όμοιες μεταξύ τους φαίνεται και από τους Πίνακες 9.2 και 9.3.

Πίνακας 9.2: Στατιστικό τεστ, One Way Anova για τις ομάδες του μάρτυρα και της ασιτίας.

	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	1298,286	4	324,571	16,752	,000

Στον Πίνακα 9.2 φαίνεται ότι οι ομάδες του πίνακα 9.1 δεν είναι ίδιες στατιστικώς μεταξύ τους, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,00 που είναι μικρότερη από το επίπεδο

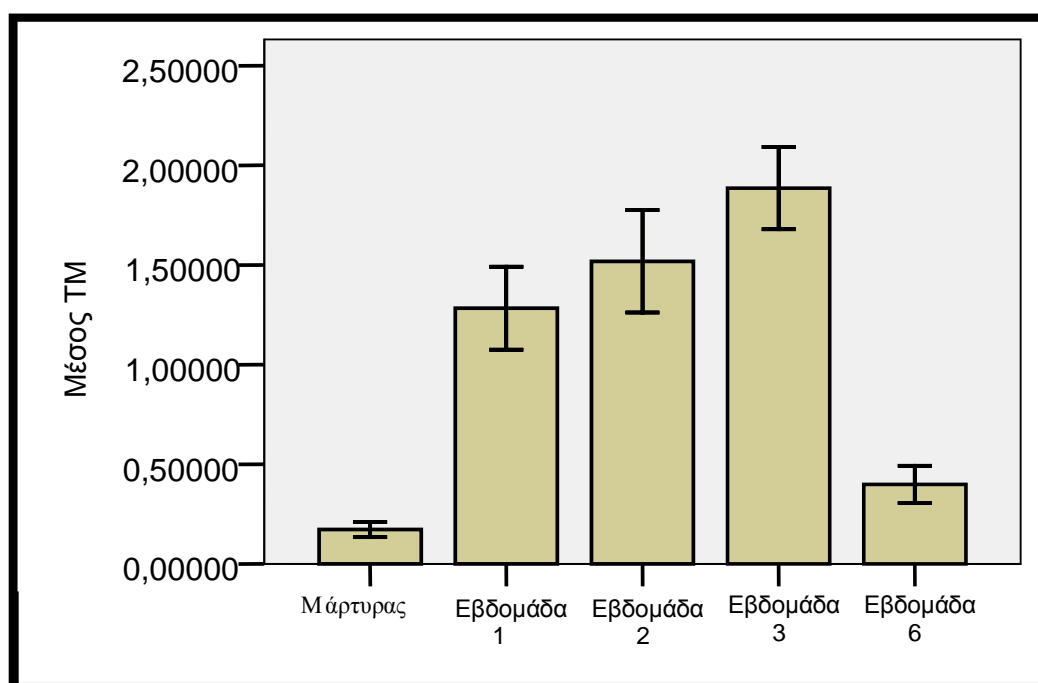
σημαντικότητας του 0,01 ($0,00 < 0,01$), οπότε η ομάδα του μάρτυρα με αυτές της 1^{ης}, 2^{ης}, 3^{ης} και 6^{ης} εβδομάδας αστίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο δείχνει και ο Πίνακας 9.3 και αναφέρει επίσης ποια ομάδα διαφέρει στατιστικώς με ποια.

Πίνακας 9.3: Πολλαπλές συγκρίσεις για τις ομάδες του μάρτυρα και της αστίας.

(I) Ομάδα	(J) Ομάδα	Μέση Παραλλακτικότητα (I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
Μάρτυρας	Εβδομάδα 1	-1,11046426(*)	,25455858	,000
	Εβδομάδα 2	-1,34601023(*)	,25434493	,000
	Εβδομάδα 3	-1,71296276(*)	,25413254	,000
	Εβδομάδα 6	-,22647058	,25423858	,900
Εβδομάδα 1	Μάρτυρας	1,11046426(*)	,25455858	,000
	Εβδομάδα 2	-,23554597	,25477062	,887
	Εβδομάδα 3	-,60249850	,25455858	,125
	Εβδομάδα 6	,88399368(*)	,25466444	,005
Εβδομάδα 2	Μάρτυρας	1,34601023(*)	,25434493	,000
	Εβδομάδα 1	,23554597	,25477062	,887
	Εβδομάδα 3	-,36695253	,25434493	,600
	Εβδομάδα 6	1,11953965(*)	,25445089	,000
Εβδομάδα 3	Μάρτυρας	1,71296276(*)	,25413254	,000
	Εβδομάδα 1	,60249850	,25455858	,125
	Εβδομάδα 2	,36695253	,25434493	,600
	Εβδομάδα 6	1,48649218(*)	,25423858	,000
Εβδομάδα 6	Μάρτυρας	,22647058	,25423858	,900
	Εβδομάδα 1	-,88399368(*)	,25466444	,005
	Εβδομάδα 2	-1,11953965(*)	,25445089	,000
	Εβδομάδα 3	-1,48649218(*)	,25423858	,000

Στον Πίνακα 9.3 φαίνεται ότι η ομάδα του μάρτυρα με την ομάδα της έκτης εβδομάδας αστίας δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, αφού η τιμή της πιθανότητας (P) είναι 0,90 που σημαίνει ότι είναι μεγαλύτερη του 0,01 ($0,90 > 0,01$) οπότε οι δύο ομάδες αυτές είναι στατιστικώς όμοιες. Οι δύο αυτές ομάδες (η ομάδα του μάρτυρα και της έκτης εβδομάδας αστίας) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά με την ομάδα της πρώτης, δεύτερης και τρίτης εβδομάδας αστίας διότι η

τιμή της πιθανότητας (P) είναι σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερη του 0,01. Τέλος, η ομάδα της πρώτης εβδομάδας αστίας με τη δεύτερη και τρίτη εβδομάδα δεν έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, εφόσον η τιμή της πιθανότητας (P) σε όλες τις περιπτώσεις είναι πάνω από το 0.01 (οι ομάδες, οι οποίες έχουν αστερίσκο -* στο «Mean Difference» σημαίνει ότι έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ αυτές που δεν έχουν είναι στατιστικώς όμοιες μεταξύ τους). Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9. Σύγκριση στρες του μάρτυρα με αστία.

3.5 Σύγκριση μεταξύ τσιπούρες μάρτυρα με τσιπούρες κακομεταχείρισης.

Πίνακας 10.1: Σύγκριση μάρτυρα με κακομεταχείριση.

Ομάδα	Αριθμός κυττάρων (N)	Μέσος Τ.Μ.
Μάρτυρας	600	,1724056
1 λεπτό	603	11,0033689
3 λεπτά	600	2,3186551
5 λεπτά	577	8,0911530

Στην κάθε ομάδα του Πίνακα 10.1 και τα έξι ψάρια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως στις μετρήσεις, από την κάθε μεταχείριση (του μάρτυρα, του πρώτου, τρίτου και πέμπτου λεπτού κακομεταχείρισης) εμφανίζονται ομαδοποιημένα και συγκρίνονται οι μεταξύ τους ομάδες. Από τον Πίνακα 10.1 είναι προφανές ότι οι τσιπούρες του πρώτου, τρίτου και πέμπτου λεπτού κακομεταχείρισης έχουν υποστεί στρες σε σχέση με τις τσιπούρες του μάρτυρα, εφόσον η τιμή του μέσο όρου του «Tail Moment» των πρώτων είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτή των δεύτερων. Το ότι οι ομάδες του παραπάνω πίνακα δεν είναι όμοιες μεταξύ τους φαίνεται και από τους Πίνακες 10.2 και 10.3.

Πίνακας 10.2: Στατιστικό τεστ, One Way Anova για τις ομάδες του μάρτυρα και της κακομεταχείρισης.

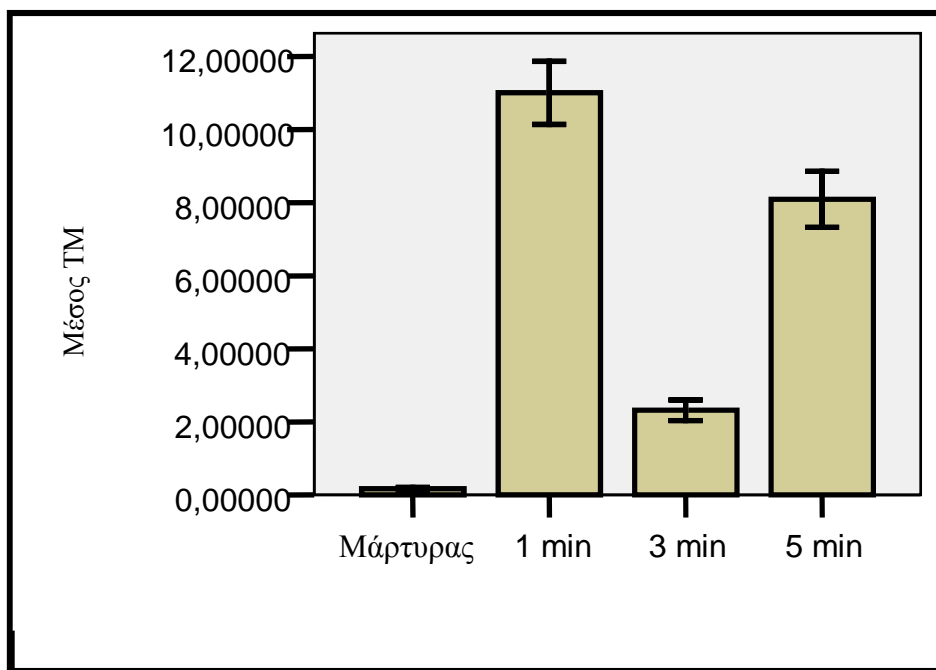
	Άθροισμα Τετραγώνων	df	Άθροισμα Μέσων Τετραγώνων	F	P
Μεταξύ των Ομάδων	45203,893	3	15067,964	72,212	,000

Στον Πίνακα 10.2 φαίνεται ότι οι ομάδες του Πίνακα 10.1 δεν είναι ίδιες στατιστικώς μεταξύ τους, εφόσον η πιθανότητα (P) είναι 0,00 που είναι μικρότερη από το επίπεδο σημαντικότητας του 0,01 ($0,00 < 0,01$), οπότε η ομάδα του μάρτυρα με αυτές του 1^{ου}, 3^{ου} και 5^{ου} λεπτού κακομεταχείρισης διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Το ίδιο δείχνει και ο Πίνακας 10.3 και αναφέρει επίσης ποια ομάδα διαφέρει στατιστικώς με ποια.

Πίνακας 10.3: Πολλαπλές συγκρίσεις για τις ομάδες του μάρτυρα και της κακομεταχείρισης.

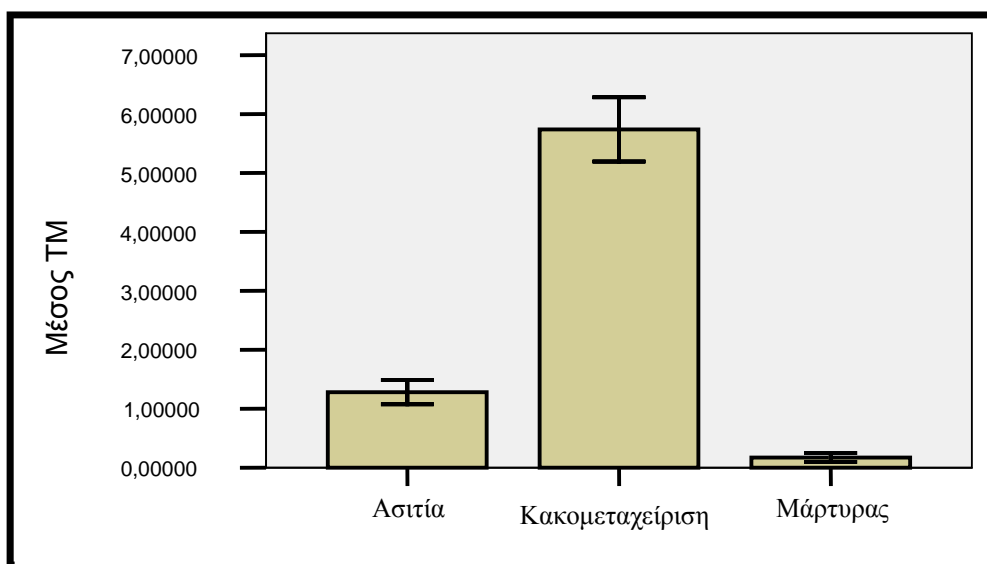
(I) Ομάδα	(J) Ομάδα	Μέση Παραλλακτικότητα (I-J)	Τυπικό Σφάλμα	P
Μάρτυρας	1 Λεπτό	-10,83096331(*)	,83295379	,000
	3 Λεπτά	-2,14624951	,83399174	,050
	5 Λεπτά	-7,91874741(*)	,84226175	,000
1 Λεπτό	Μάρτυρας	10,83096331(*)	,83295379	,000
	3 Λεπτά	8,68471380(*)	,83295379	,000
	5 Λεπτά	2,91221589(*)	,84123400	,003
3 Λεπτά	Μάρτυρας	2,14624951	,83399174	,050
	1 Λεπτό	-8,68471380(*)	,83295379	,000
	5 Λεπτά	-5,77249790(*)	,84226175	,000
5 Λεπτά	Μάρτυρας	7,91874741(*)	,84226175	,000
	1 Λεπτό	-2,91221589(*)	,84123400	,003
	3 Λεπτά	5,77249790(*)	,84226175	,000

Στον Πίνακα 10.3 φαίνεται ότι η ομάδα του μάρτυρα με την ομάδα του τρίτου λεπτού κακομεταχείρισης δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, αφού η τιμή της πιθανότητας (P) είναι 0,05 που σημαίνει ότι είναι μεγαλύτερη του 0,01 ($0,05 > 0,01$) οπότε οι δύο ομάδες αυτές είναι στατιστικώς όμοιες. Οι δύο αυτές ομάδες (η ομάδα του μάρτυρα και του τρίτου λεπτού κακομεταχείρισης) διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά με την ομάδα του πρώτου και πέμπτου λεπτού κακομεταχείρισης, διότι η τιμή της πιθανότητας (P) είναι σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερη του 0,01. Τέλος, η ομάδα του πρώτου λεπτού και πέμπτου λεπτού κακομεταχείρισης διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά με όλες τις υπόλοιπες ομάδες και μεταξύ τους, εφόσον η τιμή «P» σε όλες τις περιπτώσεις είναι κάτω από το 0.01 (οι ομάδες, οι οποίες έχουν αστερίσκο -* στο «Mean Difference» σημαίνει ότι έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, ενώ αυτές που δεν έχουν είναι στατιστικώς όμοιες μεταξύ τους). Όλα τα παραπάνω συνοψίζονται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10. Σύγκριση στρες του μάρτυρα με κακομεταχείριση.

3.6 Σύγκριση μεταξύ τσιπούρες ασιτίας με τσιπούρες κακομεταχείρισης.



Εικόνα 11. Σύγκριση στρες τσιπούρας ασιτίας με κακομεταχείρισης (H.S.).

Στην Εικόνα 11 είναι προφανές ότι το στρες, το οποίο υπέστησαν οι τσιπούρες της κακομεταχείρισης (Handling Stress) είναι πολύ μεγαλύτερο από το στρες το οποίο υπέστησαν οι τσιπούρες της ασιτίας.

4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

4.1 Αστία.

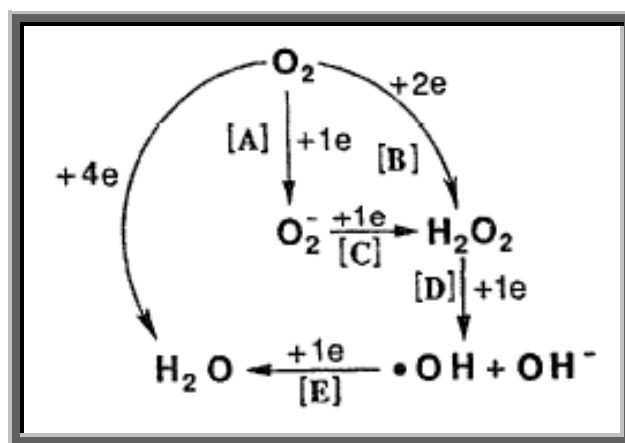
Το DNA των ιχθύων υφίσταται καταστροφή εξαιτίας της αστίας, όπως προκύπτει από την έρευνα αυτή. Πιο συγκεκριμένα, τα άτομα που έμειναν άσιτα για 1, 2 και 3 εβδομάδες έδειξαν ότι είχαν υποστεί στρες (το DNA τους δηλαδή είχε υποστεί καταστροφή) σε σχέση με τις τσιπούρες, οι οποίες είχαν ταϊστεί κανονικά και με αυτές οι οποίες έμειναν άσιτες για 6 εβδομάδες (Εικ. 9). Από την Εικόνα 9 φαίνεται ότι οι τσιπούρες των τριών εβδομάδων αστίας είχαν στρεσαριστεί πιο πολύ από αυτές που έμειναν άσιτες για μία και δύο εβδομάδες, αλλά στατιστικώς το στρες που είχαν οι τρεις αυτές ομάδες (της πρώτης, δεύτερης και τρίτης εβδομάδας αστίας) δεν είχε σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Το στρες προκλήθηκε από την αύξηση των ελεύθερων ριζών, οι οποίες ελεύθερες ρίζες αυξήθηκαν λόγω της αστίας. Στην έκτη εβδομάδα όμως, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βλάβη του DNA μειώθηκε, το οποίο μπορεί να οφείλεται στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μηχανισμών επιδιόρθωσης, οι οποίοι αντιστρέφουν τις δυσμενείς επιπτώσεις της αστίας στο γενετικό υλικό.

Γενικότερα, έχει παρατηρηθεί αύξηση της συγκέντρωσης ελευθέρων ριζών, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ρίζα του υδροξυλίου, σε συνθήκες αστίας και ειδικότερα, αιτίες που προκαλούν βλάβη στο DNA μπορεί να είναι η επίδραση γενοτοξικών ουσιών, ο μεταβολισμός του κυττάρου και κάθε είδους καταπόνηση. Θραύσματα στο DNA προκαλούνται επίσης, από τον μηχανισμό επιδιόρθωσης DNA των ίδιων των κυττάρων. (Eastman and Barry, 1992). Η βλάβη στο DNA μπορεί να προκληθεί:

1. με άμεσο τρόπο όπως για παράδειγμα, από χημικές ουσίες, από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), από τις ελεύθερες ρίζες (που προέρχονται από το μεταβολισμό ή από τον οξειδοαναγωγικό κύκλο ή από άλλες αλληλεπιδράσεις των προϊόντων μεταβολισμού), από τα μέταλλα, από την ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία και

2. με έμμεσο τρόπο που δε σχετίζονται άμεσα με τη γενετοξικότητα, αλλά με την ενεργοποίηση ενζύμων όπως ενδονουκλεάσες και τοποϊσομεράσες (από ενδογενείς μηχανισμούς που μεταβάλλουν τη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου) και επιπλέον με την παραγωγή υπεροξειδίων και μονοξειδίου του αζώτου (Mitchelmore and Chipman, 1998).

Η ρίζα του υπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ρίζα του υδροξυλίου σχηματίζονται στο κύτταρο κατά τη διάρκεια του αερόβιου μεταβολισμού, καθώς επίσης και από την επίδραση της ακτινοβολίας. Η Εικόνα 12 δείχνει τον μεταβολισμό αναγωγής οξυγόνου.



Εικόνα 12. Οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού αναγωγής οξυγόνου. Απαιτούνται τέσσερα ηλεκτρόνια για την πλήρη αναγωγή του μοριακού

οξυγόνου σε νερό, κατά τη διάρκεια της αεροβικής αναπνοής. Η αναγωγή κατά 1 ηλεκτρόνιο [A] παράγει ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται με απευθείας αναγωγή 2 ηλεκτρονίων [B] ή με αποδεκτά βήματα 1 ηλεκτρονίου [A] και [C]. Η ρίζα του υδροξυλίου με οξειδωτική δράση παράγεται μέσω της αναγωγής 1 ηλεκτρονίου του υπεροξειδίου του υδρογόνου [D]. Η αναγωγή 1 ηλεκτρονίου της ρίζας του υδροξυλίου παράγει νερό [E] (Winston and Di Giulio, 1991).

Αν και τα κύτταρα έχουν αναπτύξει διάφορα ενζυμικά και μη ενζυμικά συστήματα για να ελέγχουν τη συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών, κάποιο ποσοστό διαφεύγει από την κυτταρική άμυνα και μπορεί να προκαλέσει μόνιμη ή παροδική βλάβη στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα. Έχει προταθεί, ότι η οξειδωτική βλάβη συμβάλλει στη γήρανση και στην πρόκληση ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των χρόνιων φλεγμονών, της ισχαιμίας, των εκφυλιστικών αρτηριακών και των αυτοάνοσων νόσων. Επίσης, μπορούν να προκαλέσουν διάφορους τύπους βλάβης στο DNA, όπως πρόκληση θραυσμάτων και οξείδωση των πεντοζών (Richter et al., 1998). Έχει παρατηρηθεί αύξηση της συγκέντρωσης ελευθέρων ριζών, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ρίζα του υδροξυλίου, σε συνθήκες αστιτίας.

4.2 Κακομεταχείριση (Handling Stress).

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι εξαιτίας της κακομεταχείρισης, τα άτομα έχουν υποστεί καταστροφή του DNA τους. Πιο συγκεκριμένα, η καταπόνηση των ατόμων με δίχτυ απόχης εκτός φυσικού τους περιβάλλοντος για ένα και πέντε λεπτά έδειξαν μεγαλύτερη βλάβη στο DNA σε σχέση με τα άτομα της μεταχείρισης των τριών λεπτών (όπως και από τα άτομα του μάρτυρα). Όπως δείχνει και η Εικόνα 10, τα άτομα που κακομεταχειρίστηκαν για ένα

λεπτό είχαν στρεσαριστεί πιο πολύ σε σύγκριση με αυτές των τριών και πέντε λεπτών. Αυτό σημαίνει, ότι στο πρώτο λεπτό οι τσιπούρες «αιφνιδιάζονται» από την κακομεταχείριση και για αυτό το λόγο το ποσοστό βλάβης του DNA είναι μεγαλύτερο σε σύγκριση με αυτό του τρίτου και πέμπτου λεπτού. Παρόλο αυτά, θα ήταν αναμενόμενο το ποσοστό βλάβης του DNA να είναι μεγαλύτερο στις τσιπούρες που κακομεταχειρίζονταν για τρία λεπτά σε σύγκριση με αυτό από τις τσιπούρες των πέντε λεπτών, αλλά τα αποτελέσματα δείχνουν το αντίθετο (ότι δηλαδή οι τσιπούρες που κακομεταχειρίστηκαν για τρία λεπτά είναι λιγότερο στρεσαρισμένες από αυτές των πέντε λεπτών). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να έγινε κάποιο λάθος κατά τη διαδικασία της κακομεταχείρισης των τριών λεπτών με αποτέλεσμα οι τσιπούρες να ταρακουνιόντουσαν πολύ δυνατά και ένα ποσοστό αυτών να απεβίωσε μέσα στην απόχη. Συγκριτικά πάντως, το στρες το οποίο προκλήθηκε στις τσιπούρες λόγω της κακομεταχείρισης ήταν πολύ μεγαλύτερο σε σύγκριση με το στρες που προκλήθηκε στις τσιπούρες λόγω της ασιτίας (Εικ. 11).

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν τμήμα της ευρύτερης έρευνας που αφορούν τη μελέτη στρεσογόνων παραγόντων στις υδατοκαλλιέργειες και μπορούν να συγκριθούν με τις αντίστοιχες έρευνες κορτιζόλης. Ειδικότερα, οι αντιδράσεις που έχουν σχέση με το στρες στους ιχθείς, συχνά χαρακτηρίζονται ως πρωτογενείς, δευτερογενείς και τριτογενείς. Μια πρωτογενής αντίδραση είναι η ενεργοποίηση των κέντρων του εγκεφάλου, που τελικά έχει ως αποτέλεσμα την έκλυση κορτιζόλης από τα κύτταρα παραγωγής στεροειδών και κατεχολαμίνες από τα χρωμόφιλα κύτταρα του κυρίως νεφρού. Για αυτή την αντίδραση, όπως προτείνουν οι Rottland et al. (2001), έχει διαπιστωθεί η εμπλοκή του υποθαλάμου και της υπόφυσης στον έλεγχο της παραγωγής κορτιζόλης για τους τελεόστεους ιχθείς και η αδρενοκορτικοτροπική

ορμόνη (adrenocorticotropic hormone - ACTH) έχει θεωρηθεί ως ο κύριος παράγοντας που ελέγχει τη σύνθεση και την έκλυση κορτιζόλης από τα εσωνεφρικά κύτταρα στο κυρίως νεφρό. Δευτερογενείς αντιδράσεις ορίζονται ως οι επακόλουθες δράσεις και επιδράσεις αυτών των ορμονών σε επίπεδο αίματος και ιστών. Οι τριτογενείς αντιδράσεις, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την αναστολή της ανάπτυξης, την παρακώληση της αναπαραγωγής και την καταστολή του ανοσοποιητικού, αφορούν την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού (Arends et al., 1999).

Οι ιχθείς σε εγκαταστάσεις εντατικής εκτροφής εκτίθενται διαρκώς σε πρακτικές διαχείρισης, όπως ο χειρισμός, η μεταφορά και ο περιορισμός. Τα ψάρια αντιδρούν με διάφορους τρόπους για τη διατήρηση της ομοιόστασής τους σε συνθήκες στρες. Πολλές φυσιολογικές μεταβολές εμπεριέχονται σε αυτού του είδους αντιδράσεις, όπως η ικανότητα της οσμωτικής ρύθμισης στο αίμα, η απελευθέρωση ορμονών και ο ενεργητικός μεταβολισμός. Μια από τις πιο παραδεκτές πρωτογενείς αντιδράσεις στο στρες είναι η αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης στο πλάσμα. Έρευνες έδειξαν ότι η έκθεση στον αέρα προκάλεσε μια 50-πλάσια αύξηση στις συγκεντρώσεις κορτιζόλης σε άτομα τσιπούρας *Sparus aurata*. Δυο ημέρες διαδικασιών εγκλεισμού σε περιορισμένο χώρο αύξησε στο τριπλάσιο την κορτιζόλη πλάσματος. Στο καλκάνι, *Scorpthalmus maximus*, οι διαδικασίες εγκλεισμού στα δίχτυα προκάλεσαν 10-πλάσια αύξηση στην κορτιζόλη πλάσματος. Υπάρχει μια αύξηση στα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος μετά από στρεσογόνες διαδικασίες όπως ο χειρισμός-σύλληψη ή κακομεταχείρισης. Η αύξηση του επιπέδου της γλυκόζης στο αίμα, ως απόκριση στο στρες, είναι γενικά παραδεκτή, ως ένα μέσο παροχής πηγών επιπλέον ενέργειας που διευκολύνει τον οργανισμό να υπερβεί την

διαταραχή. Ομοίως, έχει παρατηρηθεί αύξηση του γαλακτικού οξέος στο πλάσμα σε πολλά είδη μετά από έντονη άσκηση ή ως αποτέλεσμα της υποξίας (Acerete et al., 2004).

4.3 Επίλογος.

Τον τελευταίο καιρό η τεχνική της «comet assay» (ανάλυση κομητών) έχει εδραιωθεί στον χώρο της επιστήμης και η προσαρμοστική της χρήση την καθιστά ως ένα ευαίσθητο εργαλείο για τους τοξικολόγους (και όχι μόνο) για τη μέτρηση και την εκτίμηση του ποσοστού βλάβης του DNA. Η τεχνική αυτή έχει πολλές εφαρμογές αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε φυτικά και σε ανθρώπινα δείγματα (υδρόβια και γήινα), όπως επίσης και σε μια πληθώρα από οργανισμούς, ιστούς και κύτταρα (Dhawan et al., 2008).

Παρόλο αυτά, η περαιτέρω έρευνα στον τομέα της ιχθυοκαλλιέργειας και πιο συγκεκριμένα, στην ανίχνευση βλάβης του γενετικού υλικού με τη χρήση της ανάλυσης των κομητών «comet assay» σε ιχθείς οι οποίοι υπόκεινται σε συνθήκες στρες (ασιτίας και κακομεταχείρισης) είναι απαραίτητη, εφόσον μέχρι στιγμής δεν έχει γίνει ξανά τέτοιο πείραμα έτσι ώστε να μπορεί να γίνει μια σύγκριση των παραπάνω αποτελεσμάτων.

5) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

1. ACERETE L., BALASCH J.C., ESPINOSA E., JOSA A. AND TORT L. (2004). Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237 : 167-178.
2. ANDREOLI C., LEOPARDI P. AND CREBELLI R. (1997). Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutation Research*, 377 : 95-104.
3. ANDREW J.E., BEGOUT ANRAS M.L., SADRI S., HOLM J. AND HUNTINGFORD F.A. (2003). Feeding Responses of Hatchery-Reared Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) to a Commercial Diet and Natural Prey Items. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 36 (2) : 77-86.
4. ANITHA B., CHANDRA N., GOPINATH P.M. AND DURAIRAJ G. (2000). Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius aurata*). *Mutation Research*, 469 : 1-8.
5. ARENDSI R.J., MANCERA L.M., MUNOZ J.L., WENDELAAR BONGA S.E. AND FLIK G. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, 163 : 149-157.

6. ASHLEY P.J. (2007). Fish welfare: Current issuew in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104 (3-4) : 199-235.
7. BAKSI S.M. AND FRAZIER J.M. (1990). Review. Isolated fish hepatocytes-model system for toxicology research. *Aquatic Toxicology*, 16 : 229-256.
8. BETANCOURT M., ORTIZ R., GONZALEZ C., PEREZ P., CORTES L., RODRIGUEZ L. AND VILLASENOR L. (1995). Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 331 (1) : 65-77.
9. BRENDLER-SCHWAAB S.Y., SCHMEZER P., LIEGIBEL U., WEBER S., MICHALEK K., TOMPA A. AND POOL-ZOBEL B.L. (1994). Cells of different tissues for in vitro and in vivo studies in toxicology: compilation of isolation methods. *Toxicology in Vitro*, 8 (6) : 1285-1302.
10. CABRITA E., ROBLES V., REBORDINOS L., SARASQUETE C. AND HERRAEZ M.P. (2005). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50 : 144-153.

11. CHAVANNE H., CHATAIN B., HAFFARY P. AND BATARGIAS K. (2008). Review on breeding and reproduction of European aquaculture species. Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Aqua Breeding*
12. COLLINS A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26 : 249-261.
13. DEVAUX A., PESONENS M. AND MONOD G. (1997). Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 11 : 71-79.
14. DHAWAN A., BAJPAYEE M. AND PARMAR D. (2008). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol.*
15. EASTMAN A. AND BARRY M.A. (1992). The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Investigation*, 10 (3) : 229-240.
16. FAIRBAIRN D.W., OLIVE P.L. AND O'NEILL K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339 : 37-59.

17. FAIRBAIRN D.W., REYES W.A., GRIGSBY R.V. AND O'NEILL K.L. (1994). Laser scanning microscopic analysis of DNA damage in frozen tissues. *Cancer Letters*, 76 : 127-132.
18. FRENZILLI G., NIGRO M. AND LYONS B.P. (2008). The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*.
19. GICHNER T. Comet assay in higher plants.
20. HAINES G.A., HENDRY J.H. DANIEL C.P. AND MORRIS I.D. (2002). Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation. *Biology of Reproduction*, 67 : 854-861.
21. HAINES G.A., HENDRY J.H., DANIEL C.P. AND MORRIS I.D. (2001). Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic- or X-irradiation of spermatogonia. *Mutation Research*, 495 : 21-32.
22. HELLMAN B., VAGHEF H. AND BOSTROM B. (1995). The conceptys of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, 336 : 123-131.

23. KAMACI H.O., SAKA S. AND FIRAT (2005). The cleavage and embryonic phase of gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus) eggs. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 22 (1-2) : 205-209.
24. KLAUDE M., ERIKSSON S., NYGREN J. AND AHNSTROM G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, 363 : 89-96
25. Comet imaging software, DNA damage and repair analysis. Andor Technology.
26. LEE R.F. AND STEINERT S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544 : 43-64.
27. LUPATSCH I. (2004). Gilthead Seabream. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond*, 1 (1) : 16-18.
28. MCKELVEY-MARTIN V.J., GREEN M.H.L., SCHMEZER P., POOL-ZOBEL B.L., DE MEO M.P. AND COLLINS A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288 : 47-63.

29. MEHANNA S.F. (2007). A Preliminary Assessment and Management of Gilthead Bream *Sparus aurata* in the Port Said Fishery, the Southeastern Mediterranean, Egypt. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7 : 123-130.
30. MITCHELMORE C.L. AND CHIPMAN J.K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 339 : 135-147.
31. MITCHELMORE C.L. AND CHIPMAN J.K. (1998). Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquatic Toxicology*, 41 :161-182.
32. MORETTI A., PEDINI M., COTOLLIN G. AND GUIDASTRI R. (1999). Manual On Hatchery Production Of Seabass And Gilthead Seabream. Volume 1. Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
33. OLIVE P., WLODEK D., DURAND R.E. AND BANATH J.P. (1992). Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 198 : 259-267.

34. PIPERAKIS S.M., KONTOGIANNI K. AND PIPERAKIS M.M. (2006). Measuring the effects of pesticides on occupationally exposed humans with the comet assay. *Environmental Toxicology*.
35. PIPERAKIS S.M., PETRAKOU E., TSILIMIGAKI S., SAGNOU M., MONOGIOUDIS E., HANIOTAKIS G., KARKASELI H. AND SARIKAKI E. (2003). Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41 : 104-110.
36. PSIMADAS D., MESSINI-NIKOLAKI N., ZAFIROPOULOU M, FORTOS A., TSILIMIGAKI S. AND PIPERAKIS S. (2004). DNA damage and repair efficiency in lymphocytes from schizophrenic patients. *Cancer Letters*, 204 : 33-40.
37. RICHTER C., PARK J.W. AND AMEST B.N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Genetics*, 85 : 6465-6467.
38. ROTLANT J., BALM P.H.M., PEREZ-SANCHEZ J., WENDELAAR-BONGA S.E. AND TORT L. (2001). Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., teleostei) after handling and confinement stress. *General and Comparative Endocrinology*, 121 : 333-342.

39. SANCHEZ-MUROS M.J., CORCHETE V., SUAREZ M.D., GARDENETE G., GOMEZ-MILAN E. AND HIGUERA M. (2003). Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns. *Aquaculture*, 224 : 89-103.
40. SARDAS S., AYGUN N., GAMLI M., UNAL Y., UNAL N., BERK N. AND KARAKAYA A.E. (1998). Use of alkaline comet assay single cell gel electrophoresis technique to detect DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutation Research*, 418 : 93-100.
41. SARDAS S., KARABIYIK L., AYGUN N. AND KARAKAYA A.E. (1998). DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetised with isoflurane. *Mutation Research*, 418 : 1-6.
42. SARDAS S., WALKER D., AKYOL D. AND KARAKAYA A.E. (1995). Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique. *Mutation Research*, 335 : 213-217.
43. SINGH N.P., MCCOY M.T., TICE R.R. AND SCHNEIDER E.L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175 : 184-191.

44. SMITH A., SPEIT G.S., THYBAUD V.T. AND TICE R.R. (2003).
Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay.
Mutagenesis, 18 (1) : 45-51.
45. SOLA L., MORETTI A., CROSETTI D., KARISKOU N., MAGOULAS A.,
ROSSI A.R., RYE M., TRANTAFYLLIDIS A. AND TSIGENOPOULOS
C.S. Gilthead Seabream – *Sparus aurata*. Genimpact Final Scientific Report.
47 – 54.
46. The ultimate comet assay scoring system. Perspective Instruments.
47. TICE R.R., AGURELL E., ANDERSON D., BURLINSON B., HARTMANN
A., KOBAYASHI H., MIYAMAE Y., ROJAS E., RYU J.C. AND 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.
48. WINSTON G.W. AND DI GIULIO R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant
mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19 : 137-161.
49. ZHU X., CUI Y., AI M. AND WOOTTON R.J. (2001). Comparison of
compensatory growth responses of juvenile three-spined stickleback and
minnow following similar food deprivation protocols. *Journal of Fish Biology*,
58 : 1149-1165.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

50. ΧΩΤΟΣ Γ. (2006). Υδατοκαλλιέργειες σε Ανακυκλούμενα νερά. Τμήμα
Ιχθυολογίας-Αλιείας, Τ.Ε.Ι. Μεσολογίου.

6) ABSTRACT.

The seabream has a wide distribution from the Mediterranean to Atlantic Ocean and this fish has become an important subject of aquacultural researches because of its economic value. In the present study, the stress response of seabreams, which were left under conditions of starvation and handling stress was measured, with the help of the comet assay. The results of this research have showed that the seabreams are indeed stressed if they are left without food (starvation), or if they are under conditions of handling stress (staying out of the water for 1, 3 and 5 minutes). More specifically, seabreams which were left without food for one, two and three weeks were stressed (thus, they had their DNA damaged) compared with the seabreams of the control group and the seabreams, which were left in starvation for six weeks, whose DNA was not so much damaged. Moreover, the seabreams, which were under handling stress conditions for one and five minutes were also stressed compared with the seabreams of the control group and those which were under handling stress condition for three minutes. In conclusion, the seabreams have showed to be more stressed (meaning, they had a higher percentage of DNA damage) under handling stress conditions comparing to conditions of starvation.

7) ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.

7.1 13ο Συνέδριο, Πάτρα

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΒΛΑΒΗΣ ΤΟΥ DNA ΜΕ COMET ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΕΝΤΑΤΙΚΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟΥΣ ΙΧΘΥΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ STRESS

Κάβουρας Μ., Κασσιμάτης Δ., Ντανταλή Ο., Χατζηπλή Κ., Μαλανδράκης Ε.Ε., Γκολομάζου Ε., Εξαδάκτυλος Α., Παναγιωτάκη Π.

Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Οδός Φυτόκου, 38446, Ν. Ιωνία Μαγνησίας, Ελλάς.

Περίληψη

Αντικείμενο της εργασίας είναι η ανίχνευση βλάβης του DNA σε ηπατοκύτταρα τσιπούρας (*Sparus aurata*) εντατικής εκτροφής σε συνθήκες stress όπως καταπόνηση λόγω χειρισμών (handling stress) για 1, 3, και 5 min, και σε ασιτία για 1, 2, 3 και 6 εβδομάδες, παράγοντες που σχετίζονται με την ευζωία των οργανισμών και έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ποιότητα και ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος στην υδατοκαλλιέργεια. Αμφότερες μεταχειρίσεις παρουσίασαν σημαντική αύξηση της βλάβης του DNA συγκριτικά με τα άτομα του μάρτυρα. Εξάιρεση αποτέλεσαν τα άτομα σε ασιτία 6 εβδομάδων και καταπόνησης χειρισμών 3 min που δε διέφεραν από το μάρτυρα. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η καταπόνηση χειρισμών είναι περισσότερο στρεσογόνο παράγοντας σε σχέση με την ασιτία. Η ασιτία για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι πιθανόν να εντάσσει τον οργανισμό σε μια φάση μειωμένου μεταβολισμού και κινητικότητας μέχρι την επαναπρόσληψη τροφής. Στη βιβλιογραφία επίσης, αναφέρονται ενδογενείς μηχανισμοί επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA οι οποίοι δεν ενεργοποιούνται απαραίτητα αναλόγως της χρονικής έκτασης του stress.

Λέξεις κλειδιά: *Sparus aurata*, βλάβη DNA, comet ανάλυση, stress.

THE USE OF COMET ASSAY FOR DETECTION OF DNA DAMAGE IN INTENSIVELY REARED FISH UNDER STRESSFUL CONDITIONS

Kavouras M., Kassimatis D., Dadali O., Chatzipli K., Malandrakis E.E., Golomazou E., Exadactylos A., Panagiotaki P.

Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Fytokou str., 38446, Nea Ionia Magnesia's, Hellas.

Abstract

The aim of the project is the detection of hepatocytes' DNA damage of intensively reared sea bream (*Sparus aurata*) under stressful conditions, such as handling stress for 1, 3 and 5 minutes and fasting for 1, 2, 3 and 6 weeks. Both treatments are of major importance in aquaculture production, also involved in fish welfare. Results indicated a significant increase in DNA damage in all treatments compared with the control one, apart from the six weeks fasting group and the three minute period of handling stress. Handling stress was significantly more stressful than fasting. Fasting for long periods possibly introduce fish in a phase of lower metabolism and mobility till re-feeding. It is possible that endogenous DNA repair mechanisms are functioning independently to stress duration.

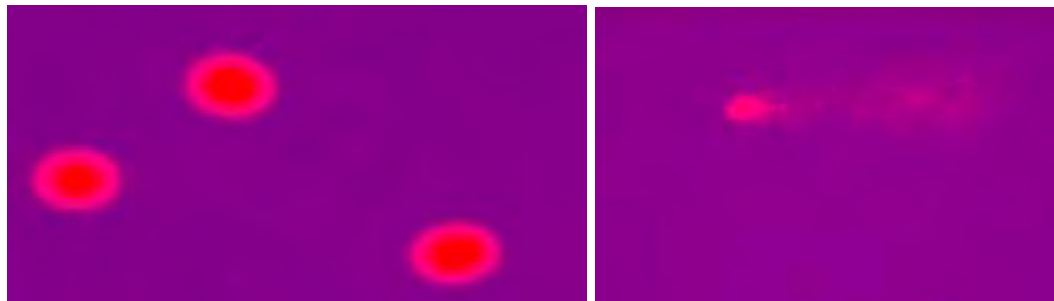
Keywords: *Sparus aurata*, DNA damage, comet assay, stress.

1. Εισαγωγή

Η comet ανάλυση (comet assay) που εφαρμόζεται σε απομονωμένα κύτταρα με ηλεκτροφόρηση (single cell gel electrophoresis - SCGE) εισήχθη για πρώτη φορά από τους Ostling & Johanson (1984) ως μια τεχνική για την άμεση απεικόνιση της βλάβης του DNA (Fairbairn et al. 1995).

Όταν η τεχνική εφαρμόζεται σε αλκαλικές συνθήκες, τα απομονωμένα κύτταρα που ενσωματώνονται στο πήκτωμα αгарόζης επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα λύνονται, ακολουθεί χαλάρωση και αποδιάταξη του DNA, ηλεκτροφόρηση του σε αλκαλικό pH και τέλος η αδρανοποίηση και η χρώση του. Τα κύτταρα με βλάβη στο DNA τους εμφανίζουν μια αυξημένη μετακίνηση του κατά την ηλεκτροφόρηση που λαμβάνει το σχήμα "κομήτη". Η έκταση της βλάβης του DNA ποσοτικοποιείται μετρώντας τη μετατόπιση του ανάμεσα στον πυρήνα του κυττάρου ή "κεφαλή του κομήτη" και την προκύπτουσα "ουρά" (Εικ. 1). Μεταξύ άλλων παραμέτρων (εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά, εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος

του πυρήνα και το συνολικό μήκος του κομμάτι) η TM (tail moment) έχει θεωρηθεί ως ένας από τους ασφαλέστερους δείκτες της προκληθείσης βλάβης στο DNA και είναι ευθέως ανάλογος με το ποσοστό του κερματισμένου DNA. Αυτή η παράμετρος αναφέρεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομμάτι (Hellman et al. 1995).



Εικόνα 1. Ηπατοκύτταρα τσιπούρας (*S. aurata*) σε πήκτωμα αγαρόζης και αλκαλικό pH μετά από χρήση με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Αριστερά, κύτταρα με ελάχιστο βαθμό κερματισμού και δεξιά κύτταρο που έχει υποστεί εκτεταμένο κερματισμό.

Η comet ανάλυση έχει ευρεία δυνατότητα εφαρμογής σε υδρόβιους οργανισμούς, όπως και σε διάφορους τύπους ιστών και κυττάρων (Lee & Steinert 2003). Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό την εκτίμηση της βλάβης του DNA ηπατικών κυττάρων σε εκτρεφόμενα άτομα τσιπούρας, ως αποτέλεσμα καταπόνησης χειρισμών (handling stress) και περιόδων ασιτίας. Η επίδραση της καταπόνησης κατά τη μεταφορά, τους εμβολιασμούς, τη διαλογή και το ζύγισμα (συνήθειες πρακτικές σε μια μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας) είναι ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας, διότι επιβραδύνουν την αύξηση, καταστρέφουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και γενικότερα μειώνουν την ολική παραγωγή της μονάδας, με ενδεχόμενο αποτέλεσμα την προσφορά χαμηλής ποιότητας προϊόντος στον καταναλωτή (Iwama 2004). Η διατήρηση των οργανισμών σε ασιτία για μεγάλο χρονικό διάστημα και η επαναδιατροφή τους έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση του φαινομένου της αντιστάθμισης στην αύξηση (growth compensation) (Ali et al. 2003). Σε συνθήκες εντατικής εκτροφής, η αύξηση αντιστάθμισης παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς η κατανόηση της δυναμικής της θα επιτρέψει το σχεδιασμό σιτηρεσιών που θα βελτιώσουν το ρυθμό ανάπτυξης (Hayward et al. 1997) και πιθανώς να μειώσει το κόστος εκτροφής, δεδομένου ότι η διατροφή συμμετέχει στο 50% και πλέον των εξόδων.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Συνθήκες εκτροφής

Άτομα τσιπούρας μήκους 12-16cm και βάρους 60-90g προερχόμενα από μονάδα εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας της περιοχής του βόρειου Ευβοϊκού κόλπου, τοποθετήθηκαν σε έξι δεξαμενές με θαλασσινό νερό 500L σε κλειστό κύκλωμα στο εργαστήριο και εγκλιματίστηκαν για τρεις εβδομάδες. Ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε δύο μεταχειρίσεις, με δύο επαναλήψεις, επιπλέον του μάρτυρα. Οι συνθήκες κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν οι ακόλουθες: ιχθυοφόρτιση 4kg/m³, θερμοκρασία 17-20°C, pH 7,4, συγκέντρωση αμμωνίας 0,5-2ppm, αλατότητα 34, διαλυμένο οξυγόνο 5-7mg/L. Οι παράγοντες αυτοί διατηρήθηκαν σταθεροί καθόλη τη διάρκεια του πειράματος (14 εβδομάδες).

2.2 Μεταχειρίσεις

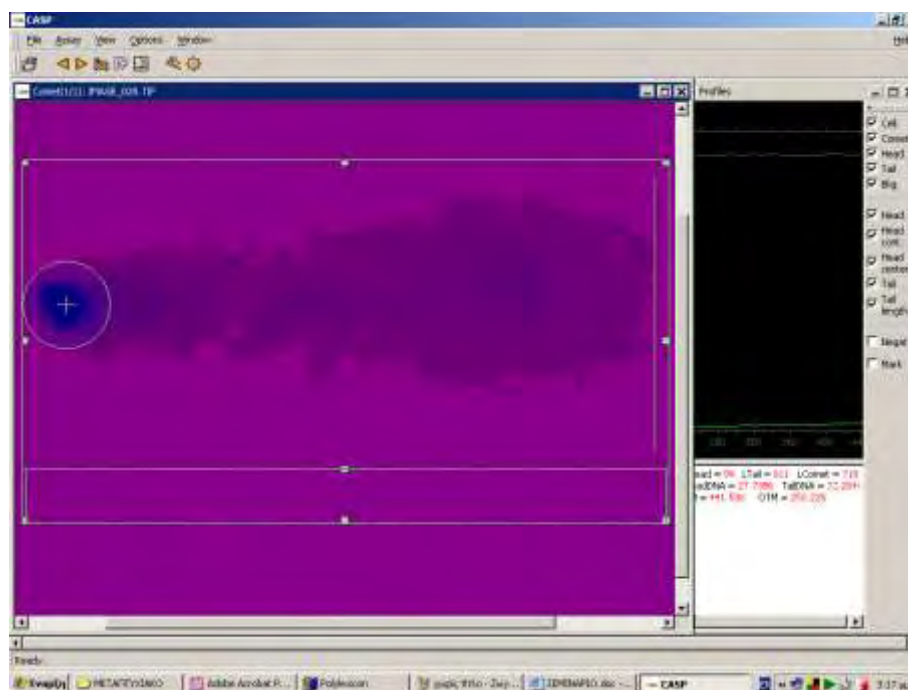
Αναλυτικά, οι μεταχειρίσεις αποτελούνταν από το μάρτυρα, την ομάδα της καταπόνησης χειρισμών και την ομάδα της ασιτίας. Η καταπόνηση χειρισμών περιελάμβανε σύλληψη ιχθύων με αόχη, απομάκρυνση τους από τη δεξαμενή και ελαφρά ανακίνηση τους για ένα (1), τρία (3) και πέντε (5) min. Αντίστοιχα, στην άλλη μεταχείριση, δείγματα ελήφθησαν μετά την πρώτη, δεύτερη, τρίτη και έκτη εβδομάδα ασιτίας. Τα δείγματα ηπατικών κυττάρων που συγκεντρώθηκαν από τις παραπάνω μεταχειρίσεις (48 συνολικά), αποτελούνταν από 6 άτομα μάρτυρα, 18 της ομάδος handling stress και 24 της ομάδος ασιτίας. Το κάθε άτομο θανατώθηκε με υψηλή δόση φαινοξυαιθανόλης, αφαιρέθηκε το ήπαρ και τοποθετήθηκε σε πλαστικούς σωλήνες Falcon (50ml) με ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (Hanks Balanced Salt Solution).

2.3 Απομόνωση ηπατοκυττάρων

Η διαδικασία απομόνωσης ηπατικών κυττάρων περιελάμβανε τον καθαρισμό του ιστού με πλύσεις HBSS ελεύθερου ιόντων Ca-Mg, λήψη κυτταρικού αιωρήματος με δράση κολλαγενάσης, συγκέντρωσης 0,04% και επιπλέον διαδοχικές πλύσεις με HBSS και PBS (Phosphate Buffered Saline) (Mitchellmore & Chirman 1998). Ο υπολογισμός του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων έγινε με χρώση ηωσίνης συγκέντρωσης 4% και καταμέτρησή τους σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer.

2.4 Comet ανάλυση

Κυτταρικό αιώρημα 20μl προστέθηκε σε 80μl αγαρόζης Low Melting Point (LMP) 0,5% και τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα καλυμμένη με λεπτή στρώση αγαρόζης Normal Melting Point (NMP) 0,5%, σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε πάγο για περίπου 10-20min. Στη συνέχεια η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε, η πλάκα βυθίστηκε σε διάλυμα λύσης (NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, 1% Triton - X100, 10% DMSO) και παρέμεινε στους 4°C για τουλάχιστον μία ώρα (Tice et al. 2000). Μέχρι και την επεξεργασία-ανάλυση των κομητών η διαδικασία διεξήχθη σε συνθήκες αμυδρού φωτισμού. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν για 15 - 20min στη σκοτεινή συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης που περιείχε διάλυμα (0,075M NaOH και 1mM EDTA) με pH>12,1. Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση στα 25V, 300mA για 15 λεπτά. Μετά την ηλεκτροφόρηση οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν σε ουδέτερο διάλυμα (Tris 0,4M), και ακολούθησε χρώση με 50μl βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) συγκέντρωσης 20μl/ml (Mitchellmore & Chirman 1998). Εκατό κύτταρα συνελέγησαν τυχαία από κάθε άτομο και αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss AxioStar plus) εφοδιασμένο με φίλτρο διέγερσης και αποκοπής στα 515-560nm και 590nm αντίστοιχα, σε μεγέθυνση 100x. Οι εικόνες προβάλλονταν σε βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και η επεξεργασία-ανάλυση των κομητών έγινε σε H/Y με το λειτουργικό πρόγραμμα CASP (Εικ. 2) (Konca et al. 2002).

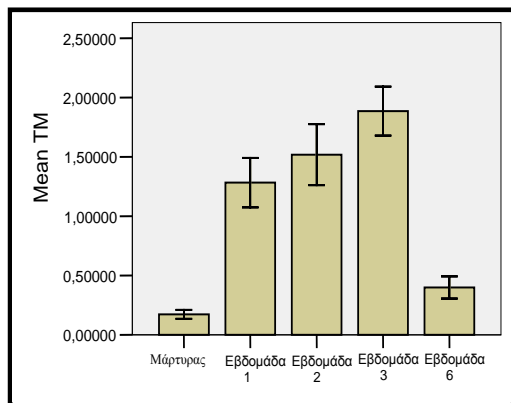


Εικόνα 2. Υπολογισμός των παραμέτρων (εκατοστιαία αναλογία DNA στην ουρά, εκατοστιαία αναλογία DNA στον πυρήνα, μήκος ουράς, διάμετρος πυρήνα και συνολικό μήκος κομητή) του κερματισμένου DNA, μέσω του λογισμικού "CASP".

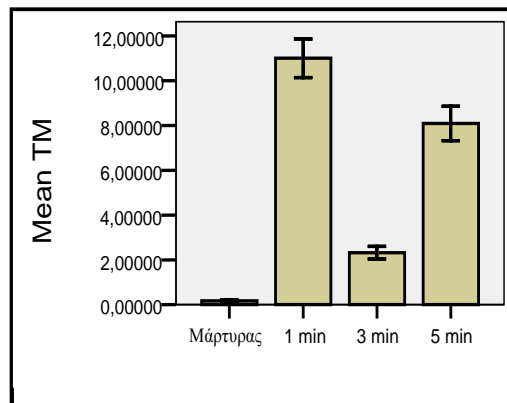
3. Αποτελέσματα

Το TM κατά τις μεταχειρίσεις των εβδομάδων αστίας παρουσίασε τη μέγιστη τιμή του την τρίτη εβδομάδα (1,88), ενώ την έκτη εβδομάδα την ελάχιστη (0,39). Η σύγκριση των τιμών του TM μεταξύ των εβδομάδων, έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές (Σχ. 1). Κατά συνέπεια, στα άτομα που παρέμειναν άσιτα για μία, δύο και τρεις εβδομάδες διαπιστώθηκε μεγαλύτερη βλάβη του

γενετικού τους υλικού συγκρινόμενα με το μάρτυρα και τα άσιτα άτομα για έξι εβδομάδες. Αντίστοιχα, παρατηρήθηκε ότι κατά τις μεταχειρίσεις της καταπόνησης χειρισμών το TM παρουσίασε τη μέγιστη τιμή του στο πρώτο min (11,00) και την ελάχιστη στο τρίτο min (2,32). Η σύγκριση των τιμών του TM μεταξύ των περιόδων καταπόνησης χειρισμών, έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές (Σχ. 2). Στα άτομα που καταπονήθηκαν για ένα και πέντε min παρατηρήθηκε μεγαλύτερη βλάβη του γενετικού τους υλικού σε σχέση με το μάρτυρα και τα άτομα που καταπονήθηκαν για τρία min.



Σχήμα 1: Η μεταβολή της τιμής του TM κατά τις εβδομάδες ασιτίας.



Σχήμα 2: Η μεταβολή της τιμής του TM κατά τη μεταχείριση handling stress σε διαφορετικούς χρόνους.

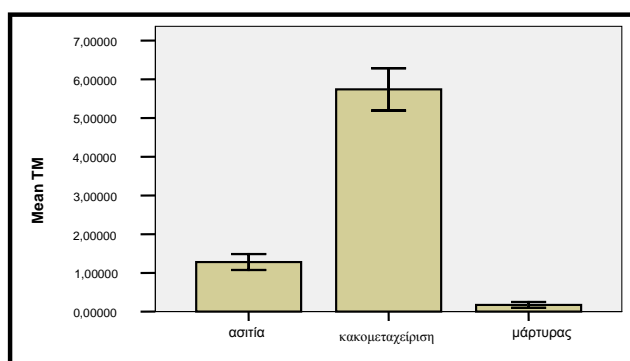
4. Συμπεράσματα / Συζήτηση

Κατά την εφαρμογή της ασιτίας αλλά και της καταπόνησης χειρισμών στην τσιπούρα και συγκεκριμένα κατά το πρώτο χρονικό διάστημα που η αντίδραση του οργανισμού είναι εντονότερη, η μέθοδος φαίνεται ότι μπορεί να αποτυπώσει το βαθμό βλάβης του DNA. Συνεπώς, το στιγμιαίο και έντονο stress προκαλεί βλάβη στο DNA των ηπατοκυττάρων, η οποία με την ενδεχόμενη παρέμβαση μηχανισμών επιδιόρθωσης μειώνεται, παρόλο που ο στρεσογόμος παράγοντας εξακολουθεί να υφίσταται (Lee & Steinert 2003).

Ειδικότερα, η παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά τις πρώτες εβδομάδες ασιτίας πιθανώς να ευθύνεται για τη βλάβη στο γενετικό υλικό, ενώ κατά το επόμενο διάστημα φαίνεται να δρουν μηχανισμοί που την επιδιορθώνουν (Robinson et al. 1997). Η παρατεταμένη ασιτία έχει βρεθεί ότι θέτει τον οργανισμό σε φάση προσαρμογής με σταθεροποίηση του μεταβολισμού σε χαμηλά επίπεδα (Wieser et al. 1992). Επιπλέον, συσσωρευμένη βλάβη του DNA είτε άμεση είτε έμμεση στους μηχανισμούς επιδιόρθωσής του είναι πιθανόν να μην ανιχνεύεται (van Dyk & Pretorius 2005).

Στη διάρκεια του ενός min φαίνεται ότι οι ιχθύες καταπονήθηκαν περισσότερο. Η τεχνική φαίνεται να αποτυπώνει επιτυχώς την οξεία μορφή καταπόνησης. Στα πέντε min καταπόνησης, το DNA των ιχθύων εμφάνισε αυξημένη βλάβη συγκριτικά με τα τρία min, αλλά όχι μεγαλύτερη από εκείνη του ενός min. Η φάση αντίστασης του οργανισμού στο stress είναι πιθανόν να εξηγεί τη μειωμένη τιμή TM στα τρία min, ενώ στη φάση εξουθένωσης όπου αδυνατούν να δράσουν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης η βλάβη συσσωρεύεται εξηγώντας την παρατηρούμενη αύξηση της TM στα πέντε min (Wedemeyer, 1996).

Στο σχήμα 3, γίνεται η σύγκριση των τιμών του TM μεταξύ της καταπόνησης χειρισμών και της ασιτίας. Τα άτομα που υπέστησαν καταπόνηση χειρισμών φαίνεται να εμφανίζουν περισσότερες βλάβες στο γενετικό τους υλικό σε σχέση με τα άτομα της ασιτίας. Και στις δύο περιπτώσεις, ενδοκυτταρικές ενώσεις όπως οι ελεύθερες ρίζες, το μονοξειδίο του αζώτου, τα υπεροξειδία και τα ιόντα ασβεστίου που ενεργοποιούν ένζυμα όπως οι ενδονουκλεάσες και οι τοποϊσομεράσες φαίνεται να συντελούν άμεσα ή έμμεσα στον κερματισμό του DNA (McConkey et al. 1988).



Σχήμα 3: Σύγκριση βλάβης DNA μεταξύ ατόμων αστίας και κακομεταχείρισης (H.S.).

Περαιτέρω έρευνα στον τομέα της ιχθυοκαλλιέργειας που αφορά την ανίχνευση βλάβης του DNA με τη χρήση της comet ανάλυσης σε ιχθείς σε συνθήκες stress κρίνεται απαραίτητη για τη συλλογή περισσότερων δεδομένων και την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Επόμενο στάδιο της μελέτης, είναι η εκτίμηση της συμμετοχής των μηχανισμών επιδιόρθωσης του ίδιου του οργανισμού ως αντίδραση στις προκληθείσες βλάβες του γενετικού υλικού από τις προαναφερθείσες μεταχειρίσεις..

5. βιβλιογραφικές αναφορές

- Fairbairn D.W., Reyes W.A., Grigsby R.V., O'Neill K.L. (1994). Laser scanning microscopic analysis of DNA damage in frozen tissues. *Cancer Letters* 76: 127-132.
- Hayward, R. S., Noltie, D. B. Wang, N. (1997). Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. *Transactions of the American Fisheries Society* 126: 316-322.
- Hellman B., Vaghef H., Bostrom B. (1995). The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 336: 123-131.
- Iwama G., Afonso L., Vijayan M. (2004). *Stress in Fish*. B.C. Canada: AquaNet Workshop on Fish Welfare.
- Konca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózd S., Koza Z., Wojcik A. (2003). A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research* 534: 15-20.
- McConkey D.J., Hartzell P., Nicotera P., Wyllie A.H., Orrenius S. (1988). Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology Letters* 42: 123-130.
- Mitchelmore C.L., Chipman J.K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research* 339: 135-147.
- Östling O., Johanson K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123: 291-298.
- Robinson M.K., Rustum R.R., Chambers E.A., Rounds J.D., Wilmore D.W., Jacobs D.O. (1997). Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. *Journal of surgical research* 69: 325-330.
- Tice R.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.
- Wieser, W., Krumschnabel, G. and Ojwang-Okwor, J.P. (1992). The energetics of starvation and growth after refeeding in juveniles of three cyprinid species. *Environmental Biology of Fishes* 33: 63-71