



**ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ - ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΥΔΡΟΒΙΩΝ
ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία

**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ 2-
ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΥΓΕΝΟΛΗΣ ΣΕ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΛΑΒΡΑΚΙ**

ΛΑΓΑΝΗ ΜΑΡΙΑ

Ιανουάριος 2012



**ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ - ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΩΝ ΥΔΡΟΒΙΩΝ
ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία

**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ 2-
ΦΑΙΝΟΞΥΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΥΓΕΝΟΛΗΣ ΣΕ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΤΟ ΛΑΒΡΑΚΙ**

ΛΑΓΑΝΗ ΜΑΡΙΑ

Επόπτης: Δρ. Κοτζαμάνης Ιωάννης

Ιανουάριος 2012

Copyright © Λαγάνη Μαρία, 2012

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης στα παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. η έγκριση της δεν υποδηλώνει απαραίτητως και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Βεβαιώνω ότι η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία είναι αποτέλεσμα δικής μου δουλειάς και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές που αναφέρω έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά όπου απαιτείται και έχω παραθέσει τις πηγές τους στο τμήμα της βιβλιογραφίας.

Υπογραφή:

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ	4
2.1 Ορισμός- Στάδια	4
2.2 Γενικές αρχές	8
2.3 Μη χημικές μέθοδο	11
2.4 Χημική αναισθησία	13
2.4.1 2-φαινοξυαιθανόλη	15
2.4.2 Γαρυφαλέλαιο	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
4.1 Εύρεση συγκέντρωσης γαρυφαλέλαιου	22
4.2 Εύρεση συγκέντρωσης 2φαινοξυαιθανόλης	24
4.3 Αιμοληψία	25
4.4 Στατιστική επεξεργασία	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
5.1 Συγκεντρώσεις αναισθητικών	27
5.1.1 Συγκέντρωση γαρυφαλέλαιου	27
5.1.2 Συγκέντρωση 2φαινοξυαιθανόλης	35
5.1.3 Σύγκριση γαρυφαλέλαιου- 2φαινοξυαιθανόλης	37
5.2 Βιοχημικές παράμετροι	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
6.1 Συγκεντρώσεις αναισθητικών	42
6.1.1 Συγκέντρωση γαρυφαλέλαιου	42
6.2.2 Συγκέντρωση 2φαινοξυαιθανόλης	44
6.1.3 Σύγκριση γαρυφαλέλαιου- 2φαινοξυαιθανόλης	45
6.2 Βιοχημικές παράμετροι	
6.3 Συμπέρασμα	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48
7.1 Ελληνική βιβλιογραφία	48
7.2 Ξένη βιβλιογραφία	48
7.3 Διαδίκτυο	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντικείμενο αυτής της εργασίας ήταν να εκτιμήσει την αποτελεσματικότητα του γαριφαλέλαιου και της 2-φαινοξαιθανόλης ως αναισθητικών στο λαβράκι, να προσδιορίσει την ελάχιστη εκείνη συγκέντρωση που μπορεί να παράξει ικανοποιητικό αποτέλεσμα αναισθησίας στα ψάρια για το κάθε αναισθητικό ξεχωριστά, επιφέροντας την λιγότερη καταπόνηση (στρες) τους και να συγκρίνει τις μεταβολές στις βασικές βιοχημικές παραμέτρους του αίματος τους. Τα ψάρια βάρους 110gr εκτέθηκαν σε διαδοχικές συγκεντρώσεις γαριφαλέλαιου των 75mg/l, 65mg/l, 55mg/l, 50mg/l, 45mg/l, 40mg/l, 35mg/l, 30mg/l και 25mg/l. Στις δύο πρώτες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν υψηλές θνησιμότητες, ενώ η τελευταία απέτυχε να επιφέρει ικανοποιητική αναισθησία στα ψάρια. Οι ελάχιστες δόσεις που επιφέρουν ικανοποιητική αναισθησία στους 19°C και 26°C είναι οι 30mg/l και 35mg/l αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις της φαινοξαιθανόλης που δοκιμάστηκαν ήταν οι 200mg/l, 300mg/l και 400mg/l. Η πρώτη δόση απέτυχε να επιφέρει ικανοποιητική αναισθησία στα ψάρια, ενώ η μικρότερη δόση που βρέθηκε να είναι αποτελεσματική ήταν 300mg/l. Τα αποτελέσματα των βιοχημικών παραμέτρων (GLU, ALP, AST, ALT, UREA, CREA, TP) που μετρήθηκαν στο αίμα των ψαριών έδειξαν ότι οι ελάχιστες δόσεις δεν επέφεραν σημαντικές μεταβολές στις τιμές των βιοχημικών παραμέτρων των ψαριών με εξαίρεση την γλυκόζη, που ήταν και στα δύο αναισθητικά αυξημένη(σε σχέση με τις θεωρητικά φυσιολογικές τιμές). Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε αύξηση των τιμών των βιοχημικών παραμέτρων στο γαριφαλέλαιο σε σχέση με αυτή της 2-φαινοξαιθανόλης.

Λέξεις κλειδιά: Γαρυφαλέλαιο, 2-φαινοξαιθανόλη, αναισθησία, *dicentrarchus labrax*,

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αυτή η εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης στα Παθολογικά Προβλήματα των Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών που διοργανώνει το τμήμα Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με το τμήμα Ιχθυοκομίας- Αλειίας και χρηματοδοτήθηκε σε μεγάλο βαθμό από αυτό. Η εργασία μου ανατέθηκε από την Καθηγήτρια Αθανασοπούλου Φωτεινή.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της χρήση του γαρυφαλέλαιου (ευγενόλης) ως αναισθητικής ουσίας στο λαβράκι, και η επίπτωση που έχει στην καταπόνηση (στρες) των ψαριών.

Η βιβλιογραφική αναζήτηση υπήρξε βασικός άξονας ανεύρεσης πηγών πληροφόρησης για το θέμα και βασίστηκε κυρίως σε μελέτη σύγχρονων συγγραμμάτων και άρθρων.. Το κύριο μέρος όμως της εργασίας βασίστηκε σε πρωτότυπο πείραμα που διεξήχθη στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε στον Αγ Κοσμά, Ελληνικό . Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ερευνητή Β' του εργαστηρίου διατροφής του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. κ. Κοτζαμάνη Ιωάννη καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου του για τη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων έχει εκδώσει μία σύσταση - οδηγία που σχετίζεται με την ευζωία των ζώων κατά την διάρκεια των χειρισμών τους ή του θανάτου τους στις κτηνοτροφικές μονάδες, με την οποία συνιστά περισσότερες έρευνες πάνω στις μεθόδους χειρισμού και θανάτου (welfare) των ζώων (EFSA, 2006). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ψάρια μπορούν να αισθανθούν πόνο

και φόβο με ιδιαίτερα σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στη φυσιολογία τους (Guénette *et al.*, 2007). Εκτός όμως από τον ηθικό προβληματισμό που μπαίνει σε αυτό το ζήτημα, υπάρχουν επίσης οικονομικοί λόγοι για την χρήση πιο “ανθρώπινων” μεθόδων χειρισμού των ζώων, καθώς τα ψάρια που δεν τυγχάνουν σωστών χειρισμών παρουσιάζουν stress. Το stress είναι γνωστό ότι αποτελεί ένα παράγοντα που μπορεί να οδηγήσει σε ανοσοκαταστολή, διευκολύνοντας έτσι τις επικείμενες λοιμώξεις (Ortuno *et al.*, 2001), καθώς και σε υποβάθμιση της ποιότητας του κρέατος και άρα μειωμένο εμπορικό κέρδος (Ribas *et al.*,2007).

Τα δύο κυριότερα είδη ψαριών που παράγονται στην Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια είναι το Ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*), με μέση ετήσια παραγωγή πάνω από 100.000 τόνοι, από την οποία τουλάχιστον η μισή στην Ελλάδα (Mylonas *et al.*, 2005). Όμως παρά την μεγάλη παραγωγή ψαριών στην Ελλάδα δεν υπάρχει ακόμα κανένα εμπορικό αναισθητικό που να έχει λάβει άδεια για νόμιμη χρήση στα ψάρια από τον ΕΟΦ.

Τίθεται λοιπόν ζήτημα για την εύρεση μιας αναισθητικής ουσίας φιλικής προς το περιβάλλον που ταυτόχρονα δεν θα καταπονεί τα ψάρια. Το αντικείμενο αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα του γαρυφαλέλαιου (δραστική ουσία ευγενόλη) ως αναισθητικού για το Ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), και να προσδιορίσει την ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για αναισθησία χωρίς την παραγωγή ανεπιθύμητων ενεργειών συγκριτικά με την πλέον διαδεδομένη αναισθητική ουσία στην Ελλάδα, την 2- φαινοξυαιθανόλη.

Κεφάλαιο 2: ΑΝΑΙΣΘΗΣΙΑ

2.1 Ορισμός- Στάδια

Η αναισθησία ορίζεται ως μία κατάσταση η οποία προκαλείται από την εφαρμογή εξωτερικών παραγόντων με αποτέλεσμα την απώλεια των αισθήσεων εξαιτίας της καταστολής του νευρικού συστήματος. Τα αναισθητικά μπορεί να είναι τοπικά ή γενικά ανάλογα με την εφαρμογή τους (Ackerman *et al.*, 2011).

Πίνακας 2.1. Στάδια αναισθησίας των ψαριών (Γαλάτος, 2011)

Στάδιο	Κατάσταση	Χαρακτηριστικά
0	Εγρήγορση	Φυσιολογική ανταπόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα Φυσιολογικός ρυθμός κίνησης βραγχοκαλυμμάτων Φυσιολογικός μυϊκός τόνος Φυσιολογική κολύμβηση, διατήρηση ισορροπίας
1	Ελαφρά ηρέμηση	Μειωμένη ανταπόκριση σε ακουστικά και οπτικά ερεθίσματα Μειωμένος ρυθμός κίνησης βραγχοκαλυμμάτων

		Φυσιολογικός μυϊκός τόνος
		Κολύμβηση (συνήθως) και διατήρηση ισορροπίας
2	Βαθιά ηρέμηση	Ανταπόκριση μόνο σε ισχυρή πίεση
		Μειωμένος ρυθμός κίνησης βραγχοκαλυμμάτων
		Φυσιολογικός μυϊκός τόνος
		Κολύμβηση (συχνά) και διατήρηση ισορροπίας
3	Μερική απώλεια ισορροπίας	Ανταπόκριση μόνο σε ισχυρά απτικά και δονητικά ερεθίσματα
		Αυξημένος ρυθμός κίνησης βραγχοκαλυμμάτων
		Ελάττωση μυϊκού τόνου
		Ασταθής κολύμβηση και μερική απώλεια ισορροπίας
4	Ελαφρά αναισθησία	Ίσως ανταπόκριση σε πολύ ισχυρή πίεση
		Αργές αλλά ρυθμικές κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων

		Απουσία μυϊκού τόνου
		Κατάργηση νωτιαίων αντανακλαστικών
		Ακινητοποίηση και πλήρης απώλεια ισορροπίας
5	Χειρουργική αναισθησία	Απουσία ανταπόκρισης σε κάθε εξωτερικό ερέθισμα
		Αργές, άρρυθμες και ίσως μικρού εύρους κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων
		Βραδυκαρδία (συχνά έντονη)
		Κατάργηση όλων των αντανακλαστικών
6	Προμηκική παράλυση	Απουσία κινήσεων βραγχοκαλυμμάτων
		Περιστασιακές σπασμωδικές κινήσεις βραγχοκαλυμμάτων
		Καρδιακή ανακοπή
		Θάνατος

Πίνακας 2.2 Στάδια ανάνηψης των ψαριών (Hisaka *et al.*, 1986, Mylonas *et al.*, 2005)

Στάδιο	Κατάσταση	Χαρακτηριστικά
1	Ελαφριά αναισθησία	Επανεμφάνιση κινήσεων των βραγχοκαλυμμάτων
2	Μερική ανάκτηση ισορροπίας	Μερική ανάκτηση της ισορροπίας και της κολύμβησης
3	Ανάκτηση ισορροπίας	Πλήρης ανάκτηση της ισορροπίας
4	Ανάκτηση κολύμβησης	Ανάκτηση της κολύμβησης για την αποφυγή εξωτερικών ερεθισμάτων, αλλά η συμπεριφορά παραμένει απαθής όταν δεν υπάρχουν ερεθίσματα.
5	Πλήρης ανάνηψη	Πλήρης ανάκτησης φυσιολογικής συμπεριφοράς. Φυσιολογική κολύμβηση

Το ιδανικό αναισθητικό για τα ψάρια πρέπει να εγκαθιστά την αναισθησία σε λιγότερο από 3 με 5 λεπτά, με πλήρη απώλεια της ισορροπίας και του μυϊκού τόνου, επιτρέποντας μία ήρεμη και γρήγορη, σε λιγότερο από 10 λεπτά, ανάνηψη χωρίς να

αφήνει σημαντικά επίπεδα κατάλοιπων στο κρέας , έτσι ώστε να είναι ασφαλές για τους χειριστές και τους καταναλωτές. Τέλος πρέπει να είναι οικονομικό και εύχρηστο (Perdikaris *et al.*, 2010).

2.2 Γενικές Αρχές

Η χρήση των αναισθητικών ουσιών διευκολύνει τους χειρισμούς και μειώνει το στρες που προκαλείται κατά την εκτέλεσή τους, ενώ επιτρέπει την εκτέλεση επώδυνων επεμβάσεων. Διαχειριστικές ενέργειες σε διαφορετικά στάδια της παραγωγής όπως η διαλογή μεγέθους, το τεστ νηκτικής κύστης, ο εμβολιασμός, η σήμανση, η μεταφορά, η αιμοληψία και η τεχνητή γονιμοποίηση, απαιτούν τη χρήση αναισθητικών ουσιών σε διαφορετικές δόσεις, οι οποίες, ανάλογα με την περίπτωση, εξασφαλίζουν από ελαφρά ηρέμηση μέχρι βαθιά χειρουργική αναισθησία (Τσαντήλας και συν.,2005). Σε όλες τις περιπτώσεις, οι χειρισμοί πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λιγότεροι και ηπιότεροι και να αποφεύγεται η έντονη καταπόνηση. Εξάλλου, η απουσία βλεφάρων συντελεί στην πρόκληση έντονης φωτοφοβίας στα ψάρια, γι' αυτό και ο χαμηλός φωτισμός ή το σκέπασμα του κεφαλιού βοηθούν στην ηρέμησή τους (Neifer, 2007, Γαλάτος, 2011).

Το δέρμα των ψαριών είναι εξαιρετικά ευαίσθητο και τυχόν βλάβη του βλεννώδους επιστρώματός του έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της ισορροπίας υγρών και ηλεκτρολυτών και προδιαθέτει σε μόλυνση. Για το λόγο αυτόν, η σύλληψη και η συγκράτηση των ψαριών δεν πρέπει να γίνεται με γυμνά χέρια, αλλά με τη βοήθεια χειρουργικών γαντιών ή βρεγμένης πετσέτας (Γαλάτος και Ραφτόπουλος, 1995, Γαλάτος, 2011).

Τα ψάρια, με εξαίρεση ελάχιστα πνευμονοφόρα είδη που έχουν προσαρμοστεί σε ένα ημιυδρόβιο τρόπο ζωής, αναπνέουν με βράγχια. Είναι ευαίσθητα στις μεταβολές της περιεκτικότητας του νερού σε οξυγόνο και στις απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας. Η αναισθησία και η ανάνηψη πρέπει να γίνονται σε χώρο με κατάλληλη για το κάθε είδος θερμοκρασία (~24 °C για τα ψάρια του γλυκού νερού και ~22-24 °C για τα ψάρια του θαλασσινού νερού), ενώ το σώμα τους πρέπει να παραμένει υγρό, τυλιγμένο συνήθως με μια πετσέτα εμποτισμένη με νερό, προερχόμενο, κατά προτίμηση, από το χώρο διαβίωσής τους. Η ανταπόκριση των ψαριών στις αναισθητικές ουσίες και, συνεπώς, η επιτυχία και η ασφάλεια της αναισθησίας, επηρεάζεται όχι μόνο από τη θερμοκρασία, το pH και την περιεκτικότητα του νερού στο οποίο διαβιούν σε άλατα, μέταλλα και οξυγόνο, αλλά και από το είδος, το μέγεθος και το σωματικό βάρος των ψαριών, την αναλογία μεταξύ του σωματικού βάρους και της επιφάνειας των βραγχίων τους, τη λιποπεριεκτικότητα, το φύλο, τη σεξουαλική ωριμότητα, τη φυσική κατάσταση και την κατάσταση της υγείας τους ((Zahl *et al.*, 2009, Γαλάτος, 2011). Τα καταπονημένα ζώα εμφανίζουν ανώμαλες συμπεριφορές στα αναισθητικά και μπορεί να χρειάζονται αυξημένες δόσεις για εγκατάσταση και διατήρηση της αναισθησίας (Hall *et al.*, 2001).

Πριν την αναισθησία, συνιστάται να εφαρμόζεται νηστεία διάρκειας 12-48 ωρών, με σκοπό να αποφευχθεί ο έμετος κατά τη διάρκεια της αναισθησίας και ο κίνδυνος ασφυξίας εξαιτίας εναπόθεσης τροφών στα βράγχια (Stoskopf, 2007, Γαλάτος, 2011).

Οι αναισθητικές ουσίες συνήθως προσλαμβάνονται μέσω των βραγχίων, αφού πρώτα διαλυθούν και προστεθούν μέσα στο νερό στο οποίο βρίσκονται τα ψάρια, αν και μπορούν να χορηγηθούν και με ενδοπεριτοναϊκή, ενδοφλέβια ή ενδομυϊκή έγχυση,

κάτι το οποίο όμως δεν είναι σύνηθες σε επίπεδο ιχθυοκαλλιέργειας. Το νερό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του αναισθητικού διαλύματος είναι προτιμότερο να προέρχεται από το χώρο διαβίωσης των ψαριών. Προκειμένου για μεγαλόσωμα ψάρια, μπορούν να βυθιστούν μόνο το κεφάλι και τα βράγχιά τους μέσα στο διάλυμα αναισθητικού ή να γίνει με αυτό ψεκασμός των βραγχίων.

Μετά από μια αρχική φάση διέγερσης, η οποία διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα, ακολουθεί ένα στάδιο ασταθούς κολύμβησης και, σταδιακά, επέρχεται ελάττωση της αντίδρασης στα εξωτερικά ερεθίσματα και της δραστηριότητας των ψαριών, τα οποία τελικά αναστρέφονται και συνήθως βυθίζονται στον πυθμένα του δοχείου ή της δεξαμενής. Κατά το στάδιο αυτό, τα ψάρια απομακρύνονται από το διάλυμα και τοποθετούνται σε υγρή πετσέτα, όπου μπορεί να παραμείνουν αναισθητοποιημένα, συνήθως για 4-5 min. Διατήρηση της αναισθησίας γίνεται με συνεχή βύθιση του κεφαλιού και των βραγχίων ή με επαναβυθίσεις ολόκληρου του ψαριού για μερικά δευτερόλεπτα μέσα στο διάλυμα ή με ψεκασμούς με αυτό των βραγχίων. Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες απαιτείται αναισθησία μακράς διάρκειας, όπως κατά τη μεταφορά, τα ψάρια παραμένουν μέσα στο αναισθητικό διάλυμα, το οποίο όμως πρέπει να είναι πιο αραιό, ενώ, επιπλέον, πρέπει να ρυθμίζονται η θερμοκρασία και η περιεκτικότητά του σε οξυγόνο (Stoskopf, 1997, Γαλάτος, 2011).

Η εκτίμηση του βάθους της αναισθησίας στα ψάρια στηρίζεται στη διαπίστωση ορισμένων σημείων, τα οποία χαρακτηρίζουν το κάθε στάδιο αναισθησίας (Πίνακας 2.1). Ωστόσο, μπορεί να παρατηρηθούν διαφορές, κυρίως όσον αφορά την ταχύτητα και τη σειρά εμφάνισης αυτών, ανάλογα με το είδος του ψαριού και τη χρησιμοποιούμενη αναισθητική ουσία. Σε περίπτωση υπερ-δοσολογίας, η οποία είναι εύκολο να προκληθεί, επειδή η είσοδος από το ένα στάδιο αναισθησίας στο άλλο μπορεί να γίνει πολύ γρήγορα, και επικείμενης, συχνά μη ανατάξιμης, βλάβης του

προμήκους μυελού, προκαλείται έντονη βραδυκαρδία και ακολουθεί αρχικά παύση των ρυθμικών κινήσεων των βραγχοκαλυμμάτων και στη συνέχεια εμφάνιση περιστασιακών σπασμωδικών κινήσεών τους, οι οποίες σταδιακά ελαττώνονται σε ένταση και τελικά παύουν. Μέσα σε 60-90 sec, εάν δε γίνει αναζωογόνηση του ψαριού, ακολουθεί καρδιακή ανακοπή (Stoskopf, 1997, Γαλάτος, 2011).

Η ανάνηψη, αλλά και η αναζωογόνηση σε περίπτωση υπερ-δοσολογίας, γίνεται με τοποθέτηση του ψαριού μέσα σε νερό απαλλαγμένο από αναισθητική ουσία και, ενδεχομένως, παλινδρομική μετακίνησή του με το στόμα ανοικτό, με ξέπλυμα της στοματικής κοιλότητάς του με καθαρό νερό ή με εναλλάξ άνοιγμα και κλείσιμο του στόματός του μέσα σε δοχείο με καθαρό νερό. Απευθείας έγχυση καθαρού νερού πάνω στα βράγχια έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσληψη οξυγόνου και τον κίνδυνο θανάτου από υποξία. Η ανάνηψη, της οποίας η ταχύτητα εξαρτάται από την πυκνότητα του αναισθητικού διαλύματος, είναι πλήρης σε 5-30 λεπτά. Συνιστάται να γίνεται σε ένα δεύτερο δοχείο και όχι στο χώρο μόνιμης διαβίωσης των ψαριών. Αν η αναισθησία είναι μεγάλης διάρκειας, εφαρμόζεται μετεγχειρητική νηστεία για 24-48 ώρες, αυτό όμως δεν είναι αναγκαίο όταν η διάρκεια της αναισθησίας είναι μικρή (Stoskopf, 1997, Γαλάτος, 2011).

Οι κυριότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την αναισθησία των ψαριών είναι δύο: η χημική αναισθησία και οι μη χημικές μέθοδοι.

2.3 Μη χημικές μέθοδοι

Στις μη χημικές μεθόδους περιλαμβάνονται η χρήση του ηλεκτρισμού, η έκθεση στο CO₂ ή η χαμηλή θερμοκρασία (Renault *et al.*, 2011).

Η ηλεκτραναισθησία είναι μια μέθοδος η οποία έχει χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς στην αλιεία ενήλικων και νεαρών ψαριών και για την σήμανση των γεννητόρων σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς (Ackerman *et al.*, 2011). Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων την προτείνει στην εκτροφή του Ευρωπαϊκού χελιού. Η ηλεκτρο-νάρκωση προκαλεί αναισθησία μέσω της συνεχούς ροής ηλεκτρισμού μεταξύ της κεφαλής και της ράχης των ζώων (Renault *et al.*, 2011). Τρεις τύποι ηλεκτρικού ρεύματος έχουν χρησιμοποιηθεί για να ακινητοποιούν τα ψάρια: εναλλασσόμενο ρεύμα (AC), συνεχές ρεύμα (DC), και εναλλασσόμενες μορφές των AC και DC. Το συνεχές ρεύμα μπορεί να προκαλέσει ηλεκτρο-νάρκωση (αναισθητοποίηση) και ηλεκτρο-τέτανο (τετανικές μυϊκές συσπάσεις), ενώ το εναλλασσόμενο ρεύμα προκαλεί μόνο ηλεκτρο-νάρκωση και τετανία (Ackerman *et al.*, 2011). Είναι μια πολύ καλή μέθοδος για την πέστροφα και τον κυπρίνο, αλλά πολύ αργή για είδη όπως το χέλι που είναι ανθεκτικά στην έλλειψη οξυγόνου (Ribas *et al.*, 2007).

Η έκθεση των ψαριών στο CO₂ στο νερό είναι μία ευρεία μέθοδος στην πράξη που χρησιμοποιείται για να προκαλέσει αναπνευστική οξέωση στα ψάρια, καθώς παράγει μια σταθερή και αναπαραγωγική μείωση του pH του αίματος όταν τα ψάρια εκτεθούν σε αυτό. Το CO₂ είναι ασφαλές για χρήση, αλλά ένα επίπεδο 10% ή περισσότερο στον αέρα, θα προκαλέσει αναισθησία ή ακόμη και θάνατο στο χειριστή και ως εκ τούτου είναι απαραίτητο να παρέχεται επαρκής εξαερισμός (Ackerman *et al.*, 2011).

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου της υποθερμίας τα ψάρια τοποθετούνται σε θρυμματισμένο πάγο για 10-15 λεπτά. Η υποθερμία επιτυγχάνει την αναισθησία επηρεάζοντας την δραστηριότητα, τον μεταβολισμό και την συγκέντρωση οξυγόνου με τελικό αποτέλεσμα την ακινητοποίηση του ψαριού. Ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποδηλώνουν ότι προκαλεί και αναλγησία, αντίθετα μπορεί να

προδιαθέσει σε νόσο ή ακόμα και στον θάνατο των ψαριών (Γαλάτος, 2011). Για αυτό είναι περισσότερο αποτελεσματική για την ακινητοποίηση και τον χειρισμό δηλητηριωδών και επιθετικών ειδών ή ψαριών που ζουν σε θερμά νερά, όπως είναι τα Μεσογειακά, και χρησιμοποιείται κυρίως για την μεταφορά τους (Ribas *et al.*, 2007)

2.4 Χημική αναισθησία

Κατά την χημική αναισθησία γίνεται χρήση διάφορων χημικών ουσιών και πρωτοκόλλων (Renault *et al.*, 2011). Οι κυριότερες ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι οι: τρικαΐνη, βενζοκαΐνη, κιναλδίνη και θειική κυναλδίνη, μετομιδάτη, 2-φαινοξυαιθανόλη και το γαριφαλέλαιο (Perdikaris *et al.*, 2010).

Η τρικαΐνη (MS-222) είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αναισθητικό στην ιχθυοκαλλιέργεια μιας και είναι η μόνη αναισθητική ουσία που έχει άδεια από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ για χρήση σε ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών (Τσαντήλας *et al.*, 2005). Είναι ένα ισομερές της βενζοκαΐνης με ένα πρόσθετο θειικό μόριο, το οποίο την κάνει πιο διαλυτή αλλά και πιο όξινη (Velisek *et al.*, 2010). Είναι εύχρηστη και θεωρείται ασφαλής τόσο για τα ψάρια όσο και για το χρήστη, έχει όμως υψηλό κόστος αγοράς και απαιτείται χρόνος αναμονής 21 ημερών παρά το ότι 24 ώρες μετά τη χρήση της ελάχιστα υπολείμματά της παραμένουν στους ιστούς,. Απορροφάται γρήγορα από τα βράγχια και η δράση της εκδηλώνεται ταχύτατα. Η κατάσταση αναισθησίας επέρχεται σε 1-2 min και η ανάνηψη σε 5-10 min. Στις παρενέργειές της, οι οποίες εμφανίζονται κυρίως με τις υψηλότερες δόσεις, περιλαμβάνονται η υποξία, η υπερκαπνία, η υπεργλυκαιμία, η αύξηση του γαλακτικού οξέος και του αιματοκρίτη, καθώς διαταραχές της

οξεοβασικής ισορροπίας και ηλεκτρολυτικές και ορμονικές διαταραχές (Γαλάτος, 2011).

Η βενζοκαΐνη είναι ουσία παρόμοια με την τρικαΐνη, αλλά πολύ λιγότερο υδατοδιαλυτή, οπότε τα διαλύματά της πρέπει να παρασκευάζονται με αιθανόλη ή ακετόνη. Είναι όμως πιο οικονομική, μετά τη χρήση της απαιτείται χρόνος αναμονής μόνο 24 ωρών και θεωρείται αρκετά ασφαλής για τα ψάρια και το χρήστη (Τσαντήλας *et al.*, 2005).

Η κιναλδίνη και η θευική κιναλδίνη είναι ένα καλό αναισθητικό το οποίο απορροφάται γρήγορα και αποβάλλεται από το ψάρι σχεδόν αναλλοίωτο, με αποτέλεσμα την γρήγορη αναισθησία και ανάνηψη (Ortuno and Meseguer, 2001). Παρόλα αυτά η θευική κιναλδίνη, η οποία είναι και η περισσότερο ασφαλής, είναι ιδιαίτερα ακριβή. Έχει αναφερθεί ότι μπορεί να προκαλέσουν ερεθισμό των βραγχίων και βλάβες του κερατοειδούς χιτώνα των ψαριών, καθώς και ερεθισμό του επιπεφυκότα και αναπνευστικά προβλήματα στο χρήστη (Tsantilas *et al.*, 2005).

Η μετομιδάτη εξασφαλίζει ταχεία εγκατάσταση, ενώ η ανάνηψη από την αναισθησία μπορεί να είναι παρατεταμένη όταν ο χρόνος έκθεσης είναι μεγάλος. (Τσαντήλας *et al.*, 2005). Προκαλεί βαθιά αναισθησία χωρίς όμως να απομακρύνει την αντίδραση στον πόνο (Weber *et al.*, 2011). Κατά την χρήση της η κορτιζόλη στο αίμα παραμένει σε φυσιολογικά επίπεδα, και ενώ παλιότερα θεωρείτο ότι αυτό συνέβαινε εξαιτίας της μη πρόκλησης στρες, σήμερα πιστεύεται ότι η μη αύξηση της κορτιζόλης οφείλεται σε παρεμπόδιση της σύνθεσής της από τη μετομιδάτη, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό, και όχι σε μη πρόκληση στρες (Γαλάτος, 2011).

2.4.1 Φαινοξυαιθανόλη

Η φαινοξυαιθανόλη κυκλοφορεί υπό μορφή άχρωμου ελαφρώς αρωματικού ελαιώδους υγρού με μοριακό βάρος 138,2 και σημείο βρασμού 245 °C. Είναι μετρίως υδατοδιαλυτή (26,7 g/l), αλλά διαλύεται σε αιθανόλη (Γαλάτος, 2011). Οι πιο συχνές της παρενέργειες, οι οποίες εμφανίζονται συνήθως με τις υψηλότερες δόσεις περιλαμβάνουν την υποξία, την υπερκαπνία, την υπεργλυκαιμία, την αύξηση του γαλακτικού οξέος και του αιματοκρίτη, καθώς και τις διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας και τις ηλεκτρολυτικές και ορμονικές διαταραχές (Γαλάτος, 2011).

Παρά τις δευτερογενείς της παρενέργειες (Ortuno *et al.*, 2002), και την πιθανότητα να γίνει επικίνδυνη για τον χρήστη (Kaiser and Vine, 1998) αποτελεί το πιο κοινό αναισθητικό εδώ και πολλά χρόνια στην ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια. Αυτό συμβαίνει γιατί εξασφαλίζει γρήγορη αναισθησία (2-4 min), και αν δεν έχει γίνει υπερδοσολογία, η ανάνηψη είναι επίσης γρήγορη (3-6 min) και ικανοποιητική (Puceat *et al.*, 1989). Επιπλέον η πολύ εύκολη προετοιμασία της (Ortuno and Meseguer, 2001), η φθηνή της τιμή και οι αντιβακτηριδιακές και αντι-μυκητιακές της ιδιότητες κάνουν πολύ ελκυστική την χρήση της (Tsantilas *et al.*, 2005).

2.4.2 Γαρίφαλόελλαιο

Τα τελευταία χρόνια έχει δοκιμαστεί με επιτυχία σε αρκετά είδη ψαριών ένα νέο εντελώς φυσικό αναισθητικό, το γαρυφαλόελλαιο, το οποίο χρησιμοποιείται στην οδοντιατρική εδώ και εκατοντάδες χρόνια ως τοπικός αναλγητικός παράγοντας, εξαιτίας της ικανότητας του να μειώνει τον πονόδοντο που προκαλείται κυρίως από επώδυνα θερμικά ερεθίσματα (Park *et al.*, 2009), αλλά και ως ενισχυτικό γεύσης σε

τρόφιμα, ενώ αναγνωρίζεται ως GRAS (κατά κανόνα θεωρείται ασφαλής) ουσία από την Αμερικανική FDA (Αμερικάνικη διαχείριση Τροφίμων και Φαρμάκων) για χρήση σε ανθρώπους (Holloway *et al.*, 2004) αν και στα ψάρια ακόμα η χρήση του δεν έχει νομιμοποιηθεί (Mylonas *et al.*, 2005). Παράγεται από το απόσταγμα του μίσχου, των φύλλων και του άνθους των δέντρων *Eugenia caryophyllata* και *E. aromatica*. Αποτελεί ένα ελαιώδες υγρό μείγμα, του οποίου δραστηκές ουσίες είναι η ευγενόλη, η ισοευγενόλη και η μεθυλευγενόλη. Αν και η ευγενόλη αποτελεί το 70-90% του γαρυφαλέλαιου, ενδέχεται να είναι η ισοευγενόλη αυτή που έχει την καλύτερη αναισθητική δράση (Γαλάτος, 2011). Δρουν ως αναστολείς του νευρικού συστήματος (Cunha *et al.*, 2010). Και οι δύο απορροφούνται και μεταβολίζονται πολύ γρήγορα για αυτό και δεν υπάρχει χρόνος αναμονής μετά την χορήγηση του (Holloway *et al.*, 2004). Έχει επίσης πολύ καλές αντιμυκητιακές και αντιβακτηριδιακές ιδιότητες (Τσαντήλας *et al.*, 2005), αλλά δεν είναι διαλυτή στο νερό. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιείται συνήθως αλκοόλη ως παράγοντας διάλυσης (Boyer *et al.*, 2008).

Πίνακας 2.3 Αναφερθείσες δόσεις του γαρυφαλέλαιου για την εγκατάσταση αναισθησίας σταδίου A5 μέσα σε 2-5 λεπτά για διαφορετικά είδη ψαριών.

Επιστημονική ονομασία	Δόση (mg/l)	Θερμοκρασία (°C)	Αναφορές
<i>Salmo salar</i>	100	5	Iversen et al., 2003
<i>Lepomis macrochirus</i>	20	12	Stehly and Gingerich, 1999
<i>Ictalurus punctatus</i>	150	23	Waterstrat, 1999
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	20		Cho and Health, 2000
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	20		Cho and Health, 2000

<i>Pomacentrus amboinensis</i>	22	29	Munday and Wilson, 1997
<i>Salvelinus fontinalis</i>	20	12	Stehly and Gingerich, 1999
<i>Anguilla reinhardtii</i>	100	17-25	Walsh and Pease, 2002
<i>Siganus lineatus</i>	50-100	27-29	Soto and Burhanuddin, 1995
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	25	8	Holloway et al., 2004
''	30	16-18	Prince and Powell, 2000
''	60	9	Keene et al., 1998
<i>Bidyanus bidyanus</i>	50	13,2	Kildea et al., 2004
<i>Micropterus dolomieu</i>	60	10	Peake, 1998
<i>Perca flavescence</i>	20	12	Stehly and Gingerich, 1999
<i>Bathygobius cocsensis</i>	40	18	Griffiths, 2000
<i>Enneapterygius rufopileus</i>	40	18	Griffiths, 2000

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Η αξιολόγηση των βιοχημικών παραμέτρων του αίματος στα ζώα είναι μια μέθοδος ρουτίνας και ένα σημαντικό εργαλείο στην σύγχρονη κτηνιατρική κλινική πράξη.

Αυτή η απλή τεχνική μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την φυσιολογία των ζώων και έτσι να βοηθήσει τον κλινικό κτηνίατρο να πάρει την σωστή ιατρική απόφαση. Παρόλα αυτά στα ψάρια, η προγνωστική της αξία περιορίζεται εξαιτίας της έλλειψης αξιόπιστων βάσεων δεδομένων και διαθέσιμων εργαστηρίων τα οποία θα μπορούσαν να αναλύσουν τα αιματολογικά δείγματα (Grof and Zinkl, 1999).

Επιπλέον η σχέση μεταξύ ορισμένων ασθενειών και παθολογικών μεταβολών με τις αλλαγές στις βιοχημικές παραμέτρους του αίματος δεν έχουν εντελώς αποσαφηνιστεί, με αποτέλεσμα τα συμπεράσματα να βγαίνουν από την εμπειρία των συστημάτων των θηλαστικών ζώων (Chun- Yao Chen et al, 2004). Η περιορισμένη μας γνώση, για τις βιοχημικές παραμέτρους του αίματος των ψαριών, περιπλέκεται περισσότερο από αναφορές που γίνονται με διαφορετικές μεθόδους δειγματοληψίας οι οποίες βγάζουν κάθε φορά και διαφορετικά αποτελέσματα. Τέλος πολλοί ακόμα παράγοντες όπως περιβαλλοντικοί (θερμοκρασία, αλατότητα, pH, φωτοπερίοδος κλπ), φυσιολογικοί (ηλικία, σεξουαλική ωριμότητα, φύλο, διατροφή κλπ) και κοινωνικοί (κοινωνική ιεραρχία κλπ) έχουν αναφερθεί ότι επιδρούν στις βιοχημικές παραμέτρους του αίματος (Groff and Zinkl, 1999; Hrubec et al., 2000; Johnston et al., 1987; Lone et al., 1982; Verdegem et al., 1997). Όλοι οι παραπάνω λόγοι έχουν συμβάλει ώστε σήμερα να είναι περιορισμένη η χρήση και η διαγνωστική αξία τους στην διαχείριση των ψαριών (Chun- Yao Chen et al, 2002).

Παρόλα τα παραπάνω η βιοχημική ανάλυση του αίματος αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο διάγνωσης (Anver Celik, 2004) η οποία μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την κατάσταση καταπόνησης (στρες) του οργανισμού (Masopust, 2000, Anver Celik, 2004).

Στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν επτά βασικές βιοχημικές παράμετροι (ALP, ALT, AST, Urea, Crea, TP, Glu) με σκοπό να διερευνηθούν οι μεταβολές που προκαλούνται στο λαβράκι από την επίδραση του γαρυφαλέλαιου και της 2-φαινοξυαιθανόλης.

Η Αλκαλική Φωσφατάση (ALP) είναι ένα ένζυμο, μια πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης που συναντάται σε όλους τους ιστούς. Ο κύριος μεταβολικός ρόλος της είναι άγνωστος, αλλά πιστεύεται ότι συμβάλει στην μεταφορά των ιόντων και στην απορρόφηση του νερού κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών (Gasser and Kirshner, 1987; Moss, 1992). Η ALP του πλάσματος είναι ανενεργή και προέρχεται από την ALP του κυττάρου, η οποία απελευθερώνεται από το ήπαρ, τα οστά, το έντερο, το νεφρό και άλλους ιστούς μέσα σε εξωκυττάρια υγρά (Johnston et al, 1994) και συχνά αυξάνεται σε απόφραξη των χοληφόρων πόρων (Velisek et al, 2011)

Οι τρανσαμινάσες (ALT, AST) αποτελούν ένζυμα των κυττάρων του ήπατος. Όταν ένα κύτταρο υποστεί βλάβη, αυτές απελευθερώνονται στο αίμα όπου και τις μετράμε. Η ALT καθώς και η AST αυξάνονται ραγδαία σε οξεία ηπατική βλάβη, αλλά η AST είναι παρούσα επίσης στα ερυθρά κύτταρα αλλά και στον καρδιακό και στους σκελετικούς μυς (Roncarati et al, 2005).

Η ουρία εξυπηρετεί ένα σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των αζωτούχων ενώσεων στα ζώα και συντίθεται στον σώμα πολλών οργανισμών ως μέρος του κύκλου της ουρίας, είτε από την οξείδωση των αμινοξέων ή από αμμωνία. Ειδικότερα στα ψάρια

αποβάλλεται κυρίως με την μορφή αμμωνίας. Εκτεταμένη συσσώρευση αμμωνίας οδηγεί σε εκτεταμένη βλάβη του ήπατος και τον θάνατο του οργανισμού (<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/633ureacycle.html>).

Η κρεατινίνη είναι μεταβολικό προϊόν της διάσπασης της φωσφορικής κρεατίνης των μυών. Η παραγωγή της εξαρτάται από τη μυϊκή μάζα και αποβάλλεται από τους νεφρούς. Σε διαταραχές της νεφρικής λειτουργίας η απέκκριση της κρεατινίνης μειώνεται με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της στο αίμα. Η κρεατινίνη αποτελεί πιο ειδικό και ευαίσθητο δείκτη από την ουρία στη διάγνωση διαταραχών της νεφρικής λειτουργίας.

Οι ολικές πρωτεΐνες είναι δείκτης μέτρησης των συνολικών πρωτεϊνών που υπάρχουν στο πλάσμα του αίματος και αποτελούνται από τις αλβουμίνες και τις σφαιρίνες. Η αλβουμίνη παίζει ρόλο στην διατήρηση της κολλοειδοσμοτικής πίεσης του αίματος, και στην μεταφορά διαφόρων ουσιών (λιπαρά οξέα, P, Ca κλπ). Ενώ οι σφαιρίνες αποτελούν το κύριο συστατικό των αντισωμάτων του σώματος (Σμοκοβίτης, 2004).

Τέλος, η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα του σώματος, του αίματος και των λιπιδίων (με τη μορφή των λιπών και ελαίων),. Η γλυκόζη μεταφέρεται από το έντερο ή συκώτι στα κύτταρα του σώματος μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, και είναι διαθέσιμη για την απορρόφηση των κυττάρων μέσω της ορμόνης ινσουλίνης, που παράγεται από το σώμα κυρίως στο πάγκρεας . Αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα μπορεί να προκαλέσει ένα έντονο επεισόδιο στρες, ένα τραύμα, κάποια φάρμακα ή βλάβη στο πάγκρεας (Σμοκοβίτης, 2004).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα διεξήχθη στις πειραματικές εγκαταστάσεις του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. στον Αγ. Κοσμά, Αθήνα από τον Αύγουστο ως τον Νοέμβριο του 2011. Τα λαβράκια μεταφέρθηκαν από ιδιωτική μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στο ΕΛΚΕΘΕ δυο μήνες πριν την διεξαγωγή του πειράματος. Όλες οι ομάδες του πειράματος φυλάσσονταν σε χωριστές δεξαμενές για να διασφαλιστεί ότι δεν θα χρησιμοποιηθεί πάνω από μία φορά το κάθε ψάρι.

4.1 Εύρεση συγκέντρωσης Γαρυφαλέλαιου

Αρχικά θέλαμε να προσδιορίσουμε την ελάχιστη συγκέντρωση γαρυφαλέλαιου που απαιτείται για αναισθησία χωρίς την παραγωγή ανεπιθύμητων ενεργειών.

Το πείραμα χωρίστηκε σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν είχαν μέσο βάρος $110 \pm 20\text{g}$. Βρίσκονταν σε 3 ανοιχτές πλαστικές δεξαμενές συνεχούς ροής και χωρητικότητας 1000 λίτρων η καθεμία. Οι δεξαμενές εφοδιάζονταν με αεριζόμενο θαλασσινό νερό σε θερμοκρασία $26,9 \pm 1,4$ °C, αλατότητα 38‰ και επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου $6,2-6,5$ mgL⁻¹. Στο δεύτερο μέρος τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν είχαν μέσο βάρος $221,5 \pm 50$ g, βρίσκονταν σε πολυεστερικές δεξαμενές 1000 λίτρων συνεχούς ροής. Το νερό ήταν και εδώ θαλασσινό αεριζόμενο, με θερμοκρασία $19,6 \pm 2$ °C, αλατότητα 38‰ και επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου $6,6-6,7$ mgL⁻¹. Η κινητικότητα και η εξωτερική εμφάνιση των ψαριών και στα δύο μέρη του πειράματος παρακολουθούνταν καθημερινά από ειδικευμένο προσωπικό του ΕΛΚΕΘΕ ώστε να εκτιμηθεί όσο το δυνατόν καλύτερα η κατάσταση της υγείας τους. Πριν από κάθε πείραμα τα ψάρια παρέμεναν νηστικά για

24 ώρες. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε 100% καθαρό έλαιο γαρυφάλλου (Nelke, Ολλανδία) το οποίο διαλύθηκε πρώτα σε μικρή ποσότητα αιθανόλης. Η αναλογία mg και ml του ελαίου βρέθηκε ότι ήταν 1:1,0041 mg/gr.

Πίνακας 4.1. ποσότητα αιθανόλης σε ml που χρησιμοποιήθηκε για την διάλυση του γαρυφαλέλαιου (κατ' εκτίμηση).

Δόση γαρυφαλέλαιου (mg)	Ποσότητα αιθανόλης (ml/l)
75	2,5
65	1,5
55	1,2
50	0,8
45	0,8
40	0,5
35	0,5
30	0,4
25	0,4

Πίνακας 4.2. ποσότητα αιθανόλης σε ml που χρησιμοποιήθηκε για την διάλυση της φαινοξυαιθανόλης (κατ' εκτίμηση).

Δόση φαινοξυαιθανόλης (mg)	Ποσότητα αιθανόλης (ml/l)
----------------------------	---------------------------

400	0,4
300	0,3
200	0,2

Το πρώτο μέρος διεξήχθη τον Αύγουστο 2011 και περιείχε 10 δοκιμές. Στις πρώτες 9 δοκιμές τα ψάρια από τις μεγάλες δεξαμενές μεταφέρονταν ανά 2, πρώτα σε πλαστικά δοχεία, χωρητικότητας 8 λίτρων και στην συνέχεια μεταφέρονταν σε άλλα χωρητικότητας 5 λίτρων, τα οποία περιείχαν το αναισθητικό διαλυμένο σε αιθανόλη σε διαφορετικές δόσεις (Πίνακας 4.1). Εκεί έμεναν συνολικά 20 λεπτά. Για να ανανήψουν μεταφέρονταν πάλι στα δοχεία των 8 λίτρων. Για να αποφευχθεί η υποξία, τα δοχεία οξυγονώνονταν. Το νερό των δοχείων προερχόταν από το περιβάλλον διαβίωσης των ψαριών.

Συνολικά σε κάθε δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν 4 ψάρια (σε κάποιες δοκιμές όταν τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, αυτές επαναλήφθηκαν).

Στην δέκατη δοκιμή χρησιμοποιήθηκε η δόση του γαρυφαλέλαιου που θεωρήθηκε η ελάχιστη δυνατή για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος, αυτή την φορά με περισσότερα ψάρια. Τυχαία αλιεύθηκαν 10 ψάρια από την δεξαμενή και μεταφέρθηκαν σε 5 δοχεία χωρητικότητας 8 λίτρων, έτσι ώστε το κάθε δοχείο να περιέχει 2 ψάρια. Εκεί έμειναν 2-3 λεπτά, και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ένα δοχείο με 25 λίτρα θαλασσινού νερού από το περιβάλλον διαβίωσης τους.

Το δεύτερο μέρος διεξήχθη τον Οκτώβριο 2011 και περιείχε 4 δοκιμές. Στις 3 πρώτες ακολουθήθηκε ακριβώς η διαδικασία που έγινε και στο πρώτο μέρος.

Στην τέταρτη δοκιμή επιλέχθηκε μια δεξαμενή 1000 λίτρων, η οποία περιείχε 35 ψάρια. Η στάθμη της δεξαμενής κατέβηκε στα 73 λίτρα, και στην συνέχεια προστέθηκε το γαριφαλέλαιο στην ελάχιστη επιθυμητή δόση. Μετά από 10 λεπτά από την δεξαμενή επιλέχθηκαν 10 ψάρια τα οποία μεταφέρθηκαν σε 5 δοχεία των 5 λίτρων με την ίδια αναλογία αναισθητικού, όπου και παρέμειναν μέχρι να συμπληρώσουν τα 20 λεπτά.

4.2 Εύρεση ελάχιστης συγκέντρωσης της 2- φαινοξυαιθανόλης

Στην συνέχεια προσδιορίστηκε και η ελάχιστη συγκέντρωση της 2-φαινοξυαιθανόλης που απαιτείται για αναισθησία χωρίς την παραγωγή ανεπιθύμητων ενεργειών.

Εξαιτίας της ευρείας χρήσης της 2-φαινοξυαιθανόλης στην ιχθυοκαλλιέργεια, η εύρεση της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης, προσδιορίστηκε κυρίως με βάση την βιβλιογραφία που υπάρχει.

Το πείραμα διεξήχθη τον Σεπτέμβριο 2011 και αποτελούνταν από ένα μόνο μέρος. Τα ψάρια που έλαβαν μέρος ζύγιζαν $200\text{g} \pm 20\text{g}$. Φυλάσσονταν σε 2 ανοιχτές πολυεστερικές δεξαμενές συνεχούς ροής και χωρητικότητας 1000 λίτρων. Οι δεξαμενές εφοδιάζονταν με αεριζόμενο θαλασσινό νερό σε θερμοκρασία $24,5 \pm 0,5$ °C, αλατότητα 38‰ και επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου 6,2-6,5 mgL^{-1} . Η κινητικότητα και η εξωτερική εμφάνιση των παρακολουθούνταν καθημερινά από ειδικευμένο προσωπικό του ΕΛΚΕΘΕ ώστε να εκτιμηθεί όσο το δυνατόν καλύτερα η κατάσταση της υγείας τους. Πριν από κάθε δοκιμή τα ψάρια παρέμεναν νηστικά για 24 ώρες. Για

το πείραμα χρησιμοποιήθηκε 99,9% φαινοξυαιθανόλη (Pharmaqua) η οποία διαλύθηκε πρώτα σε μικρή ποσότητα αιθανόλης (1/1 v/v).

Το πείραμα περιείχε 4 δοκιμές. Στις 3 πρώτες, τα ψάρια από τις μεγάλες δεξαμενές μεταφέρονταν πρώτα σε πλαστικά δοχεία, χωρητικότητας 8 λίτρων και στην συνέχεια ανά 2 μεταφέρονταν σε άλλα χωρητικότητας 5 λίτρων, τα οποία περιείχαν το αναισθητικό με την αιθανόλη. Εκεί έμεναν συνολικά 20 λεπτά. Τέλος για να ξυπνήσουν μεταφέρονταν πάλι στα δοχεία των 8 λίτρων. Για να αποφευχθεί η υποξία, τα δοχεία οξυγονώνονταν. Το νερό των δοχείων προερχόταν από το περιβάλλον διαβίωσης των ψαριών. Συνολικά σε κάθε δοκιμή από τις 3, χρησιμοποιήθηκαν 2 ψάρια (σε κάποιες δοκιμές όταν τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, αυτές επαναλήφθηκαν). Σε κάθε δοκιμή η δόση του αναισθητικού μειωνόταν μέχρι να βρεθεί η ιδανική αναλογία.

Στην τέταρτη δοκιμή επιλέχτηκε η δόση που βρέθηκε ότι είναι η ελάχιστη επιθυμητή και σε μία από τις δεξαμενές χωρητικότητας 1000 λίτρων, απομακρύνθηκε το νερό μέχρι να φτάσει τα 73 λίτρα. Στην συνέχεια προστέθηκε τη φαινοξυαιθανόλη στην παραπάνω δόση. Τέλος από την δεξαμενή επιλέχτηκαν 10 ψάρια, από τα 35-40 που περιείχε, τα οποία μεταφέρθηκαν σε 5 δοχεία των 5 λίτρων με την ίδια αναλογία αναισθητικού, όπου και παρέμειναν μέχρι να συμπληρώσουν τα 20 λεπτά.

4.3 Αιμοληψία

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος της μελέτης, αφού είχαν προσδιοριστεί οι ιδανικές δόσεις των δύο αναισθητικών έπρεπε να ληφθεί ποσότητα αίματος από τα ψάρια. Συγκεκριμένα κατά την διάρκεια της τέταρτης δοκιμής στο πείραμα με το

γαρυφαλέλαιο αλλά και την φαινοξαιθανόλη, όπου τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν ομαδικά σε δεξαμενές που περιείχαν 73 λίτρα λήφθηκε αίμα από 10 ψάρια την κάθε φορά.

Το αίμα λήφθηκε από την ουραία φλέβα με την χρήση συριγγών 2,5ml με βελόνες μεγέθους 21G και 1". Το αίμα μεταγγίστηκε από την σύριγγα σε απλά σωληνάρια αιμοληψίας και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε σε ψυχρή φυγόκεντρο (centrifuge 5810R erpendorf). Στην συνέχεια ο ορός μεταφέρθηκε σε μικρά φιαλίδια του 1ml. Οι βιοχημικές παράμετροι που μετρήθηκαν στο αίμα περιελάμβαναν τις GLU, ALT, ALP, CREA, UREA, ALP και TP. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε ο vitalab flexor E (Holland) βιοχημικός αναλυτής. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις καθορισμένες τυποποιημένες διαδικασίες λειτουργίας του εργαστηρίου Διατροφής του ΕΛΚΕΘΕ.

4.4 Στατιστική επεξεργασία

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA). Επιπλέον εφαρμόστηκε ο έλεγχος Tukey ($\alpha=0,05$) για αποτιμηθούν οι σημαντικές διαφορές των παραμέτρων. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού πακέτου STATISTICA[®] 7.0 (StatSoft Inc. Tulsa, USA).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Συγκεντρώσεις αναισθητικών

Όλα τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ελέγχονταν καθημερινά για την κατάσταση της υγείας τους. Τα ψάρια παρακολούθηθηκαν για 48 ώρες μετά την ανάνηψη τους και δεν παρατηρήθηκε κανένας θάνατος ούτε ανώμαλη συμπεριφορά, ενώ η όρεξη τους ήταν φυσιολογική.

Η έκθεση των ψαριών στην αιθανόλη δεν προκάλεσε καμία επίδραση στην συμπεριφορά τους, ούτε και στην δράση του αναισθητικού.

Η καταγραφή των χρόνων αναισθησίας και ανάνηψης στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται στα στάδια A4 (ελαφριά αναισθησία) και R4 (ανάκτηση κολύμβησης).

Οι χρόνοι που μετρήθηκαν ήταν με χρονόμετρο από παρατηρητές και με ακρίβεια 5 δευτερολέπτων. Τα αποτελέσματα παραθέτονται σε πίνακες που χρησιμοποιούν ως μονάδα μέτρησης τα sec και όχι τα min, αυτό έγινε εξαιτίας των μικρών χρόνων ανάνηψης και αναισθησίας.

5.1.1 Συγκέντρωση Γαριφαλέλαιου

Κατά την αναισθητοποίηση με το γαριφαλέλαιο παρατηρήθηκε ότι τα λαβράκια παρουσίαζαν ελάχιστο στρες όταν έμπαιναν απευθείας σε νερό με το αναισθητικό, ενώ αντίθετα όταν το αναισθητικό έμπαινε στο νερό που ήδη υπήρχαν τα ψάρια, αυτά παρουσίαζαν μια πολύ έντονη κινητικότητα, τόση ώστε να προκαλούνται σε κάποια και τραυματισμοί.

A) Πρώτο μέρος

Στο πρώτο μέρος του πειράματος τα αποτελέσματα από τις 10 δοκιμές ήταν τα παρακάτω:

1^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 75mg/l.

Πίνακας 5.1. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια (N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	40	540
2	45	Θάνατος
3	50	Θάνατος
4	65	Θάνατος
Μέσος όρος	50±10,8	-

2^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 65mg/l.

Πίνακας 5.2. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	35	480
2	40	Θάνατος
3	40	660
4	45	Θάνατος

Μέσος όρος	40±4,1	-
-------------------	---------------	---

3^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 55mg/l

Πίνακας 5.3. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	40	270
2	40	300
3	45	310
4	45	330
Μέσος όρος	42,5±2,9	302,5±25

4^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 50mg/l

Πίνακας 5.4 Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	50	60
2	55	100
3	60	120
4	65	100
Μέσος όρος	57,5±6,5	95±25,2

5^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 45mg/l

Πίνακας 4.5. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	30	60
2	45	90
3	60	180
4	60	90
Μέσος όρος	48,8±14,4	105±51,9

6^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 40mg/l

Πίνακας 5.6. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	40	80
2	45	90
3	45	90
4	60	70
Μέσος όρος	47,5±8,7	82,5±9,6

7^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 35mg/l

Πίνακας 5.7. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	60	70
2	70	90
3	70	80
4	80	90
Μέσος όρος	70±8,2	82,5±9,6

8^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 30mg/l

Πίνακας 5.8. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	60	80
2	90	70
3	105	80
4	120	90
Μέσος όρος	93,8±25,6	80±8,2

9^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 25mg/l

Πίνακας 5.9. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
Μέσος όρος	-	-

10^η δοκιμή

Η δόση του γαρυφαλέλαιου στα 30mg/l δοκιμάστηκε ξανά, αυτή την φορά με περισσότερα ψάρια.

Πίνακας 5.10. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4), χρόνος ανάνηψης και θνησιμότητα.

Δόση (mg/l)	Αναισθησία (min)	Ανάνηψη (min)	Θνησιμότητα
30	85*	100*	0%

*Τα δεδομένα αναφέρονται στον Μέσο όρο.

Αναλυτικότερα φαίνεται ότι, οι συγκεντρώσεις των 75mg/l και 65mg/l παρουσίασαν μεγάλες θνησιμότητες της τάξης του 75% και 50% αντίστοιχα. Πρέπει όμως να

σημειωθεί ότι στα 10 λεπτά αναισθησίας κανέναν από τα ψάρια δεν είχε σταματήσει να αναπνέει. Επίσης στην συγκέντρωση των 25mg/l τα ψάρια δεν αναισθητοποιήθηκαν, είχαν χάσει τόσο την ισορροπία τους, όσο και την ικανότητα κολύμβησης αλλά κουνούσαν γρήγορα και ρυθμικά και τα βραγχοκαλύμματα τους αλλά και την ουρά. Σε όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις η αναισθησία στα δοχεία των 5 λίτρων έγινε χωρίς μεγάλες αποκλίσεις περίπου στα 60-120’’(εξαίρεση αποτελεί η συγκέντρωση των 45mg/l εξαιτίας όμως του μικρού δείγματος (n=4) ίσως δεν μπορεί να ληφθεί τόσο πολύ υπόψη), ενώ αντίθετα η ανάνηψη παρουσίαζε μεγάλες αποκλίσεις. Στο τελευταίο κομμάτι του πρώτου μέρους όπου έγινε η αναισθησία των 10 ψαριών σε μεγαλύτερο δοχείο οι χρόνοι αναισθησίας και ανάνηψης διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με αυτούς της ίδιας συγκέντρωσης που είχαν γίνει στο μικρότερο δοχείο.

B) Δεύτερο μέρος

Στο δεύτερο μέρος τα αποτελέσματα από τις 4 δοκιμές ήταν τα παρακάτω:

1^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 30mg/l

Πίνακας 5.11. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
Μέσος όρος	-	-

2^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 35mg/l

Πίνακας 5.12. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	40	60
2	50	70
3	60	65
4	65	90
Μέσος όρος	53,8±11,1	71,3±13,1

3^η δοκιμή

Δόση γαρυφαλέλαιου: 40mg/l

Πίνακας 5.13. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	40	100
2	40	110
3	50	120
4	65	60
Μέσος όρος	48,8±11,8	97,5±26,3

4^η δοκιμή

Η δόση του γαρυφαλέλαιου στα 35mg/l δοκιμάστηκε ξανά, αυτή την φορά με περισσότερα ψάρια (περίπου 35-40).

Πίνακας 5.14. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4), χρόνος ανάνηψης και θνησιμότητα.

Δόση (mg/l)	Αναισθησία (min)	Ανάνηψη (min)	Θνησιμότητα
35	197,5*	89*	0%

*Τα δεδομένα αναφέρονται στον Μέσο όρο.

Στο δεύτερο μέρος, δοκιμάστηκαν οι δόσεις των 40mg/l και 35mg/l, οι οποίες έδωσαν καλά αποτελέσματα όσον αφορά την αναισθησία, χωρίς πολύ μεγάλες αποκλείσεις στους χρόνους, προτιμήθηκε όμως η μικρότερη δόση των 35mg/l, η οποία έδωσε πολύ καλά αναισθητικά αποτελέσματα αλλά έχοντας απόκλιση σε σχέση με τους χρόνους που κατεγράφησαν στο μικρότερο δοχείο.

5.1.2 Συγκέντρωση Φαινοξυαιθανόλης

1^η δοκιμή

Δόση φαινοξυαιθανόλης: 200mg/l.

Πίνακας 5.15. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
-----------------------------	-----------------------------	--------------------------

1	-	-
2	-	-
Μέσος όρος	-	-

2^η δοκιμή

Δόση φαινοξυαιθανόλης: 300mg/l.

Πίνακας 5.16. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	200	50
2	220	70
Μέσος όρος	210±14,1	60±14

3^η δοκιμή

Δόση φαινοξυαιθανόλης: 400mg/l.

Πίνακας 5.17. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4) και χρόνος ανάνηψης.

Ψάρια(N₀)	Αναισθησία (sec)	Ανάνηψη (sec)
1	100	65
2	130	90
Μέσος όρος	115±21,2	77,5±17,7

4^η δοκιμή

Η δόση της φαινοξυαιθανόλης στα 300mg/l δοκιμάστηκε ξανά.

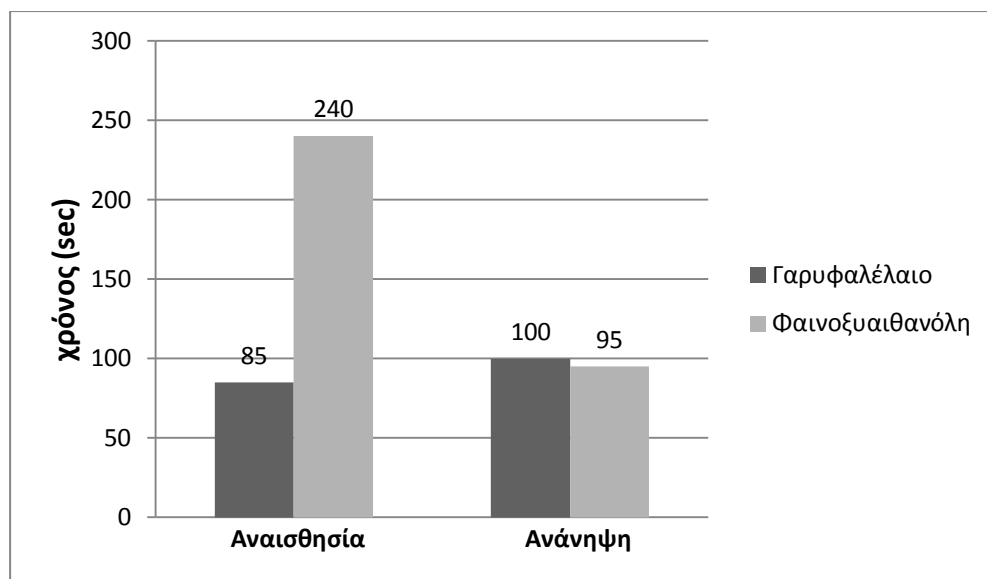
Πίνακας 5.18. Χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία (επίπεδο 4), χρόνος ανάνηψης και θνησιμότητα.

Δόση (mg/l)	Αναισθησία (min)	Ανάνηψη (min)	Θνησιμότητα
300	*240	*95	0%

*Τα δεδομένα αναφέρονται στον Μέσο όρο.

Στην δόση των 200mg/l, η φαινοξυαιθανόλη απέτυχε να εγκαταστήσει ικανοποιητική αναισθησία. Αντίθετα οι άλλες δύο δόσεις των 300 και 400 mg/l εγκατέστησαν σε μικρό χρόνο αναισθησία, χωρίς μεγάλες αποκλείσεις μεταξύ των δόσεων, αλλά προτιμήθηκε η ελάχιστη δυνατή, των 300 mg/l, η οποία και στην τελική δοκιμή με τα περισσότερα ψάρια έδωσε πολύ καλά αναισθητικά αποτελέσματα αλλά είχε και εκείνη σημαντική απόκλιση στον χρόνο αναισθησίας σε σχέση με το μικρότερο δοχείο.

5.1.3. Σύγκριση γαρυφαλέλαιου- 2φαινοξυαιθανόλης



Γράφημα 4.1. Σύγκριση των μέσων όρων των χρόνων αναισθησίας και ανάνηψης του λαβρακιού (n=10) με τα αναισθητικά γαρυφαλέλαιο και 2-φαινοξυαιθανόλη, στις ελάχιστες δόσεις, όπως εκείνες υπολογίστηκαν στους πίνακες 5.10 και 5.18.

Από το παραπάνω γράφημα προκύπτει ότι ο χρόνος αναισθησίας του γαρυφαλέλαιου είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν της φαινοξυαιθανόλης ενώ αυτός της ανάνηψης είναι πρακτικά ίδιος.

5.2. Βιοχημικές παράμετροι

Τα βιοχημικά προφίλ του ορού των αναισθητοποιημένων λαβρακιών, με γαρυφαλέλαιο και φαινοξυαιθανόλη για 20', ν δίνονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 5.19. Αποτελέσματα της αναισθησίας με γαρυφαλέλαιο στις βιοχημικές παραμέτρους του αίματος στο λαβράκι.

ΨΑΠΙ	GLU	ALT	AST	CREA	ALP	TP
N ₀	mg/dl	u/l	u/l	mg/dl	u/l	g/dl
1	92	9	79	0,1	82	2,83

2	120	5	16	0,29	96	3,1
3	113	10	103	0,33	139	2,98
4	137	6	45	0,24	84	3,26
5	133	9	114	0,36	102	3,07
6	140	4	16	0,39	82	3,15
7	177	5	48	0,38	90	2,87
8	159	2	17	0,42	92	3,28
9	169	5	33	0,65	81	3,15
10	145	14	130	0,43	109	3,28

Πίνακας 5.20. Αποτελέσματα της αναισθησίας με φαινοξαιθανόλη στις βιοχημικές παραμέτρους του αίματος στο λαβράκι.

ΨΑΡΙ	GLU	ALT	AST	CREA	ALP	TP
N ₀	mg/dl	u/l	u/l	mg/dl	u/l	g/dl
1	123	4	10	0,12	78	2,44
2	100	4	18	0,13	78	3,08
3	126	3	10	0,22	110	2,62
4	136	4	19	0,27	92	2,62
5	173	11	82	0,29	104	2,96
6	123	9	82	0,38	69	2,88
7	108	9	97	0,27	69	2,7
8	136	2	13	0,26	62	2,88
9	138	8	64	0,25	95	2,93
10	192	5	33	0,41	117	3,09

Πίνακας 5.21. Μέσοι όροι των βιοχημικών παραμέτρων της αναισθησίας με γαρυφαλέλαιο και 2-φαινοξαιθανόλη στο λαβράκι.

ΑΝΑΙΣΘΗΤΙΚΟ	GLU	ALT	AST	CREA	ALP	TP
	mg/dl	u/l	u/l	mg/dl	u/l	g/dl
Γαρυφαλέλαιο	138,5±25,9	6,9±3,5	60,1±43,3	0,36±0,14	95,7±17,9	3,1±0,16 ^a

Φαινοξυαιθανόλη	135,5±27,9	5,9±3,1	42,8±34,6	0,26±0,09	87,4±18,9	2,82±0,2 ^b
-----------------	------------	---------	-----------	-----------	-----------	-----------------------

^{a,b}Τιμές με διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (P<0,05).

Εξαιτίας της δυσκολίας που υπήρχε για να ληφθεί αίμα από μη αναισθητοποιημένα ψάρια, οι σύγκριση με τις φυσιολογικές τιμές έγινε με βάση την έρευνα του Roncarati (2006), η οποία αναφέρεται στο *Dicentrarchus labrax* ή σε συγγενικά είδη και παρατίθενται στον Πίνακα 4.22.

Πίνακας 5.22. Φυσιολογικές τιμές βιοχημικών παραμέτρων σύμφωνα με την βιβλιογραφικές αναφορές για το λαβράκι ή συγγενικά του είδη.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΤΙΜΗ	ΠΗΓΗ
GLU	60,1±23 mg/dl	Roncarati et al, 2006
ALT	4,8±1,5 u/l	Young, G et al., 1992
AST	48,7±7 u/l	Roncarati et al, 2006
CREA	0,15±0,52 mg/dl	Dawson, M.A. 1982
ALP	61,2±13 u/l	Roncarati et al, 2006
TP	3,2±0,4 g/dl	Roncarati et al, 2006

Τα αποτελέσματα έδειξαν:

1. Τα επίπεδα της γλυκόζης, της ALP και της AST ήταν σημαντικά μεγαλύτερα με το γαρυφαλέλαιο και την φαινοξυαιθανόλη σε σύγκριση με τα φυσιολογικά επίπεδα.
2. Οι τιμές της ALT δεν έχει σημαντικές διαφορές από τα φυσιολογικά επίπεδα, όπως αυτά αναφέρονται στον πίνακα 5.22, με κανένα από τα αναισθητικά. Το ίδιο συμβαίνει και με τις ολικές πρωτεΐνες και την κρεατινίνη.
3. Τέλος, παρατηρήθηκε μια αυξητική τάση στις τιμές όλων των βιοχημικών παραμέτρων που μελετήθηκαν στο γαρυφαλέλαιο σε σύγκριση με την 2-

φαινοξυαιθανόλη. Η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική, με εξαίρεση αυτή των ολικών πρωτεϊνών ($P < 0,05$).

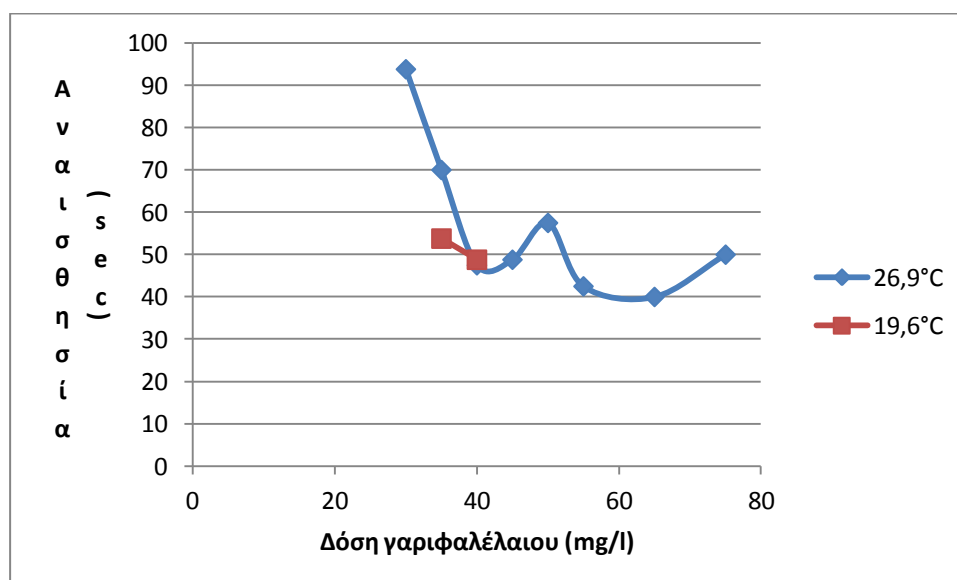
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1. Συγκεντρώσεις αναισθητικών

6.1.1. συγκέντρωση γαρυφαλέλαιου

Οι συγκεντρώσεις κάτω των 30mg/l απέτυχαν να αναισθητοποιήσουν τα ψάρια, κάτι το οποίο συμφωνεί με τα ευρήματα άλλων εργασιών (Mylonas et al., 2005).

Το γαρυφαλέλαιο είναι ιδιαίτερα λιπόφιλο και έτσι προσκολλάται και διεισδύει εύκολα και γρήγορα στο επιθήλιο των βραγχίων και απορροφάται από ιστούς όπως το λίπος και ο εγκέφαλος (Stoskopf, 1993). Οι χρόνοι εισαγωγής στην αναισθησία, ήταν <3 λεπτά σε όλα τα πειράματα που έγιναν, και στις δύο θερμοκρασίες, και ενώ δεν διέφεραν σημαντικά όσο άλλαζε η δόση, μπορούμε να πούμε ότι όσο εκείνη αύξανε μειωνόταν ο χρόνος εισαγωγής (Γράφημα 6.1).



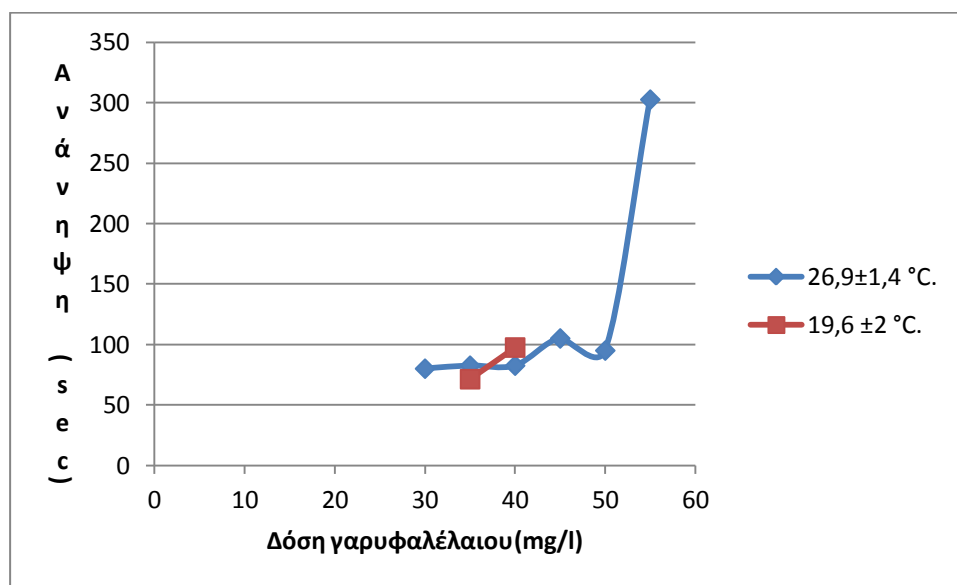
Γράφημα 6.1 Μέσος χρόνος αναισθησίας του Ευρωπαϊκού λαβρακιού, το οποίο εκτέθηκε σε διάφορες δόσεις γαρυφαλέλαιου στους 26,9 και 19,6°C.

Αυτό που φάνηκε κατά κύριο λόγο είναι ότι ο χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία επηρεάζεται από την θερμοκρασία. Συγκεκριμένα στην θερμοκρασία των 26,9⁰C η ελάχιστη δόση για εισαγωγή σε ικανοποιητική αναισθησία ήταν 30mg/l ενώ στην θερμοκρασία των 19,6⁰C ήταν 35mg/l. Οι Mylonas et al βρήκαν ότι όσο αυξανόταν η θερμοκρασία τόσο έπρεπε να αυξηθεί και η δόση του αναισθητικού. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της αύξησης του μεταβολισμού στα ποικιλόθερμα ζώα όπως είναι τα ψάρια, η οποία συμβαίνει λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος (Tsantilas et al). Γενικότερα, μικρότερα ψάρια έχουν μεγαλύτερη αναλογία σώματος-βραγχίων από τα μεγαλύτερα (Stenhly and Gingerich, 1999) και έτσι χρειάζονται και μικρότερες δόσεις. Επιπλέον η δόση αλλάζει και με βάση την ηλικία, την σεξουαλική ωριμότητα, το λίπος του κάθε ψαριού (Γαλάτος, 2011). Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω μπορούμε να πούμε ότι η ελάχιστη δόση για εισαγωγή σε ικανοποιητική αναισθησία άλλαξε γιατί το πείραμα διήρκησε 4 μήνες, μέσα στους οποίους τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν απέκτησαν επιπλέον βάρος και μειώθηκε η αναλογία σώματος/βραγχίων.

Οι χρόνοι ανάνηψης βρέθηκαν να είναι περίπου 60-100 δευτερόλεπτα και διαφέρουν σημαντικά από αυτούς άλλων εργασιών για το ίδιο ή άλλα είδη ψαριών (Mylonas et al., 2005; Woody et al., 2002; Prince and Powell, 2000; Taylor and Roberts, 1999). Αυτό μπορεί να οφείλεται στον διαφορετικό χρόνο έκθεσης που στο παρόν πείραμα ήταν μόνο 20 λεπτά.

Όπως είναι γνωστό, όσο μικρότερο διάστημα μείνει ένα ψάρι στο αναισθητικό, τόσο μικρότερη είναι η δραστική ουσία του αναισθητικού που απορροφάται από το σώμα, και τόσο γρηγορότερη είναι η αποβολή του από το αίμα (Sladky et al., 2001). Αυτό που παρατηρήθηκε όμως και βρίσκει σύμφωνα και άλλους ερευνητές (Mylonas et al.,

2005) είναι ότι αυξάνοντας την δόση του αναισθητικού, αυξάνεται και ο χρόνος ανάνηψης. Παρατηρήσαμε λοιπόν ότι στην συγκέντρωση των 55mg/l ο χρόνος είναι 302,5'', ενώ στην συγκέντρωση των 30mg/l έχει πέσει στα 80'' (Γράφημα 5.2).



Γράφημα 6.2. Μέσος χρόνος ανάνηψης του Ευρωπαϊκού λαβρακιού, το οποίο εκτέθηκε σε διάφορες δόσεις γαρυφαλέλαιου στους 26,9 και 19,6°C.

6.1.2. Συγκέντρωση Φαινοξυαιθανόλης

Αν και ο τρόπος δράσης της δεν είναι ακριβώς γνωστός (Ortuno et al, 2002), η 2-φαινοξυαιθανόλη είναι γνωστό ότι δρα γρήγορα και έχει επίσης γρήγορη ανάνηψη (όταν δεν έχει δοθεί σε υπερδοσολογία) σε διάφορα είδη ψαριών (Puceat et al., 1989, Hseu et al., 1994, Weyl et al., 1996, Kaminski et al., 2001).

Η παρούσα εργασία έδειξε ότι η ελάχιστη δόση φαινοξυαιθανόλης για εισαγωγή σε ικανοποιητική αναισθησία είναι 300mg/l στους 19,6°C. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκουν σύμφωνη και την εργασία του Mylona et al (2005) στους 25 °C.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και σε αυτό το αναισθητικό ο χρόνος εισαγωγής στην αναισθησία μειώνονταν και ο χρόνος ανάνηψης αυξάνονταν όσο αυξάνονταν και οι συγκεντρώσεις, αν και οι δοκιμές που έγιναν ήταν πολύ λιγότερες από εκείνες του γαρυφαλέλαιου. Αυτό συμφωνεί και με άλλες έρευνες (Josa et al., 1992, Weyl et al., 1996).

Επίσης σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, η χαμηλότερη δόση των 200mg/l μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προκαλέσει ελαφρά αναισθησία στο ψάρι, όχι όμως και να δώσει ένα ικανοποιητικό αναισθητικό αποτέλεσμα.

6.1.3. Σύγκριση γαρυφαλέλαιου- 2φαινοξυαιθανόλης

Και στις δύο περιπτώσεις τα ψάρια εμφάνισαν τα συμπτώματα όλων των σταδίων της αναισθησίας (Summerfelt and Smith, 1990, Ross and Ross, 1999) και της ανάνηψης. Παρόλα αυτά το γαρυφαλέλαιο ήταν αποτελεσματικό στην υποδεκαπλάσια δόση από ότι η 2φαινοξυαιθανόλη

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικότερα και παραπάνω, οι χρόνοι αναισθησίας και οι χρόνοι ανάνηψης, ακολουθούσαν μια αντιστρόφως ανάλογη και ανάλογη αντίστοιχα πορεία, με τις δόσεις των αναισθητικών.

Σε αντίθεση με τον Mylonas et al, (2005), στην παρούσα εργασία το γαρυφαλέλαιο δεν έχει μεγαλύτερο χρόνο ανάνηψης από την φαινοξυαιθανόλη αλλά αντίθετα έχει παρόμοιο, ενώ ο χρόνος αναισθησίας είναι σαφώς πολύ μικρότερος (Γράφημα 4.1).

Μετά από τα παραπάνω μπορούμε να πούμε ότι το γαρυφαλέλαιο πλεονεκτεί αρκετά έναντι της φαινοξυαιθανόλης όσο αναφορά το αναισθητικό του αποτέλεσμα παρουσιάζοντας μάλιστα σοβαρά πλεονεκτήματα όπως την μικρότερη περιβαλλοντική επιβάρυνση και τον μικρότερο χρόνο αναισθησίας και ανάνηψης,

6.2. Βιοχημικές παράμετροι

Η αύξηση της γλυκόζης του πλάσματος τόσο στο γαρυφαλέλαιο όσο και στην 2-φαινοξυαιθανόλη, πιθανώς οφείλεται στην απελευθέρωση των κατεχολαμινών (προφανώς ως απάντηση στην υποξία που προκαλείται από τη διακοπή της αναπνοής), οι οποίες αυξάνονται στο αίμα των αναισθητοποιημένων ψαριών (Gingerch and Drottar, 1989, Iwama et al, 1989). Τα ευρήματα της έρευνας μας συμφωνούν με αυτά των Velisek et al (2009), Ortuno et al., (2002), Park et al., (2002), Velisek et al (2011). Αντίθετα η έρευνα διαφωνεί με τους Velisek and Svobodova (2004) και Velisek et al (2007) οι οποίοι βρήκαν ότι δεν υπήρξε αλλαγή στην συγκέντρωση της γλυκόζης στον κοινό κυπρίνο (*Cyprinus carpio*) και στο Ευρωπαϊκό γατόψαρο (*Silurus glanis*).

Η δράση των τρανσαμινασών (ALT, AST) στο πλάσμα του αίματος μπορεί να είναι δείκτης στρες. Μια σημαντική αύξηση τους μπορεί να δείξει βλάβη των ιστών που μπορεί να έχει προκληθεί από το στρες (Svoboda, 2001). Η αύξηση που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία δείχνει ενισχυμένες υψηλή τρανσαμίνωση. Μια αύξηση της τρανσαμίνωσης δείχνει την αυξημένη ροή αμινοξέων στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος για την αντιμετώπιση του ενεργειακού ελλείμματος κατά την διάρκεια του στρες (Philip and Rajasree,1996). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τους Velisek et al (2011) που παρατήρησαν αύξηση της τρανσαμίνωσης στην πέστροφα, αλλά έρχονται σε αντίθεση με τους Svoboda (2004) και Velisek et al (2005) που παρατήρησαν μείωση των τιμών τους στο ίδιο ψάρι.

Στο πείραμα μας παρατηρήθηκε αύξηση στην τιμή της ALP, η οποία καταδεικνύει αυξημένη δραστηριότητα στο ήπαρ ή τον νεφρό. Ο Velisek et al (2009) παρατήρησε επίσης αύξηση της δραστηριότητας στην πέρκα μετά από αναισθησία με 2-

φαινοξυαιθανόλη, ενώ αντίθετα ο Gomulka et al (2008) παρατήρησε μείωση της δραστηριότητας στον Οξύρυγχο.

Συνοπτικά φαίνεται ότι 2-φαινοξυαιθανόλη έχει επηρεάσει λιγότερο τις βιοχημικές παραμέτρους σε σύγκριση με το γαρυφαλέλαιο.

6.3 Συμπέρασμα

Η παρούσα εργασία έδειξε ότι η 2-φαινοξυαιθανόλη και το γαρυφαλέλαιο, στις ελάχιστες δόσεις των 300mg/l και 30mg/l αντίστοιχα ($T=19^{\circ}\text{C}$), δεν επέφεραν σημαντικές μεταβολές στις τιμές των βιοχημικών παραμέτρων των ψαριών με εξαίρεση την γλυκόζη, που ήταν και στα δύο αναισθητικά αυξημένη (σε σχέση με τις θεωρητικά φυσιολογικές τιμές). Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε αύξηση των τιμών των βιοχημικών παραμέτρων στο γαρυφαλέλαιο σε σχέση με αυτή της 2-φαινοξυαιθανόλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

7.1 Ελληνική βιβλιογραφία

Γαλάτος Α., 2011, Αναισθησία ψαριών, αμφιβίων και υδρόβιων ασπόνδυλων ζώων. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, Καρδίτσα.

Γαλάτος ΑΔ, Ραπτόπουλος Δ (1995). Αναισθησία εξωτικών ζώων. Ασπόνδυλα, ψάρια, αμφίβια, ερπετά. Δελτίον Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, 46: 250-262.

Σμοκοβίτης Α., 2004. Φυσιολογία. Εκδοτικός οίκος αδελφών Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη. Σελ. 1031.

Τσαντήλας Η., Α. Δ. Γαλάτος, Φ. Αθανασοπούλου, 2005, Χρήση αναισθητικών ουσιών σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών. Περιοδικό Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας 56(2): 130-137.

Τσαντήλας Η (2011). Χρήση αναισθητικών ουσιών στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L.), συμβολή τους στον περιορισμό του στρες και επίδρασή τους στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην ανάπτυξη. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής Π.Θ.

7.2. Διεθνής βιβλιογραφία

Ackerman A. Paige, John D. Morgan, George K. Iwama, 2011, www.ccac.ca/Documents/Standards/.../Add.../Fish_Anesthetics.pdf, accessed 1 December 2011.

Anver Celic E., 2004. Blood chemistry (electrolytes, lipoprotein and enzymes) values of black scorpion fish (*Scorpaena porcus*) in the Dardanelles. Turkey. J. Biol. Sci. 4, 716-719.

- Boyer S.E., J.S. White, A.C. Stier, C.W. Osenberg, 2009, Effects of the fish anaesthetic, clove oil (eugenol), on coral health and growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 369: 53-57.
- Cho, G.K., Heath, D.D., 2000. Comparison of tricaine methanesulfonate (MS 222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research* 31, 537– 546.
- Chun-Yao Chen, Gregory A. Wooster, Paul R. Bowser, 2004. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. *Aquaculture* 239: 421-443.
- Chun-Yao Chena, Gregory A. Woostera, Rodman G. Getchella, Paul R. Bowsera,* , Michael B. Timmons, 2003. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treat tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture* 218: 89-102.
- Cunha da Mauro Alves, Carla Cristina Zeppenfeld, Luciano de Oliveira Garcia, Vania Lucia Loro, Milene Braga da Fonseca, Tatianna Emanuelli, Ana Paula de Lima Veeck, Carlos Eduardo Copatti, Bernardo Baldisserotto, 2010, Anaesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciencia Rural* 40(10): 2107-2114.
- Dawson, M.A. 1982. Effects of long-term mercury exposure on hematology of striped bass, *Moronesaxatilis*. *Fish. Bull.* 80:389-392.
- Gasser, K. W. & Kirschner, L. B. (1987). The response of alkaline phosphatase to osmoregulatory changes in the trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Comparative Physiology* 157, 469–475.

- Gingerich, W.H., Drottar K.R., 1989. Plasma catecholamine concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest and after anaesthesia and surgery. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73, 390-397.
- Gomes Diego Prestes, Brunele Weber Chaves, Alexssandro Geferson Becker, Bernardo Baldisserotto, 2011, Water parameters affect anaesthesia induced by eugenol in silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture Research* 42:878-886.
- Griffiths, S.P., 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal fishes. *J. Fish Biology* 57, 1453– 1464.
- Groff, J.M., Zinkl, J.G., 1999. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. *Vet. Clin. North Am.-Exotic* 2, 741– 776.
- Guenette S.A., F.C. Uhland, P. Helie, F. Beaudry, P. Vachon, 2007, Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 266: 262-265.
- Hall L.W., Clarke K.W., Trim C.M., 2001, *Veterinary anaesthesia*. W.B. Saunders, London.
- Hisaka, Y., Takase, K., Ogasawara, T., and Ogasawara, S. 1986, Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. *Jap. J. Vet. Sci.* 48(2): 341-51.
- Holloway C. Alison, Joel L. Keene, David G. Noakes, Richard D. Moccia, 2004, Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. *Aquaculture Research* 35: 1025-1030.
- Hoskonen, P., Pirhonen, J., 2004. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in sex temperate-zone fishes. *J. Fish Biology* 64, 1136–1142.
- Hseu J.R, Yeh S.L., Chu Y.T., Ting Y.Y., 1994. The anesthetic effect of 2- phenoxyethanol in goldined sea bream (*Sparus Sarba*). *Joural of Taiwan Fisheries Research* 2: 41-49.

- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., 2003, The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-Sk and BenzoakR as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture* 221, 549–566.
- Iwama G.K., McGeer J.C., Pawluk M.P., 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol and adrenaline in rainbow trout. *Can. J. Zool.* 67, 2065-2073.
- Johnston C. E., Horney B. S., Deluca S., MacKenzie A., Eales G. J., Angus R., 1994. Changes in alkaline phosphatase isoenzyme activity in tissues and plasma of Atlantic salmon (*Salmo Salar*) before and during smoltification and gonadal maturation. *Fish physiology and biochemistry* 12, 485-497.
- Josa A., Espinosa E., Cruz J.L., Gil L., Falceto M.V., Lozano R., 1992. Use of 2-phenoxyethanol as an anesthetic agent in goldfish (*Cyprinus Carpio*). *Veterinary Record* 131: 468.
- Kaminski R., Myszkowski L., Wolnicki J., 2001. Response to 2 phenoxyethanol in juvenile *Vimba vimba* (L). *Archives of polish Fisheries* 9, 71-78.
- Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D., Soto, C.G., 1998. The efficacy of clove as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 29, 89– 101.
- Kildea, M.A., Allan, G.A., Kearney, R.E., 2004. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-Sk from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 232, 265– 277.
- Kiessling Anders, Marit Espe, Kari Ruohonen, Turid Morkore, 2004, Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO₂ anaesthesia. *Aquaculture* 236: 645-657.

- Moss, D. W. (1992). Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clinical Chemistry* 38, 2486–2492.
- Munday, P.L., Wilson, S.K., 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *J. Fish Biol.* 51, 931–938.
- Mylonas C. Constantinos , Gloriana Cardinaletti, Irini Sigelaki, Alberta Polzonetti- Magni, 2005, Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anaesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture* 246: 467-481.
- Neiffer D (2007). Boney fish (lungfish, sturgeon, and teleosts). In: *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*. G West, D Heard, N Caulkett (eds), Blackwell, Ames, pp. 159-196.
- Ortuno J., M.A. Esteban, J. Meseguer, 2002a, Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 12: 49-59.
- Ortuno J., M.A. Esteban, J. Meseguer, 2002b, Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to crowding stress. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 89, 29-36.
- Park Chul-Kyu, Kihwan Kim, Sung Jung Jung, Min Ji Kim, Dong Kuk Ahn, Seong-Doo Hong, Joong Soo Kim, Seog Bae Oh, 2009, Molecular mechanism for local anaesthetic action of eugenol in the rat trigeminal system. *Pain* 144: 84-94.

- Park M.O., Hur W.J., Im S.Y., Seol D.W., Lee J., Park I.S., 2008. Anesthetic efficacy and physiological responses to clove oil anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Aquacult. Res.* 39, 877-884.
- Peake, S., 1998. Sodium bicarbonate and clove oil as potential anesthetics for nonsalmonid fishes. *North Am. J. Fish. Manage.* 18, 919–924.
- Perdikaris Costas, Cosmas Nathanailides, Evangelia Gouva, Ugwemorubong Ujagwung Gabriel, Konstantina Bitchava, Fotini Athanasopoulou, Ageliki Paschou, Ioannis Paschos, 2010, Size-relative Effectiveness of clove oil as an Anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) and Goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1958). *Acta-vet* 79:481-490.
- P. Lemaire, P. Drai, A. Mathieu, S. Lemaire, S. Carrière, J. Giudicelli, M. Lafaurie, 1991, changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea- bass. *Aquaculture* 93, Issue: 63-75
- Prince, A., Powell, C., 2000. Clove oil as an anesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. *North Am. J. Fish. Manage.* 20, 1029– 1032.
- Renault S., F. Daverat, F. Pierron, P. Gonzalez, S. Dufour, L. Lanceleur, J. Schafer, M. Baudrimont, 2011, The use of eugenol and electro-narcosis as anaesthetics: Transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla Anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, doi:10.1016/j.
- Ribas L., R. Flos, L. Reig, S. MacKenzie, B.A. Barton, L. Tort, 2007, comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. *Aquaculture* 269: 250-258.
- Roncarati A. , P. Melotti, A. Dees, O. Mordenti³ and L. Angellotti, 2005. Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. *J. Appl. Ichthyol.* 22 , 225–234

- Ross LG, Ross B (2008). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*, 3rd ed. Blackwell, Oxford. p. 159.
- Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., Lewbart, G.A., 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetic in red pacu (*Piaractus brachypomus*). *Am. J. Vet. Res.* 62, 337– 342.
- Soto, C.G., Burhanuddin, 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight in rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 136, 149–152.
- Stehly, G.R., Gingerich, W.H., 1999. Evaluation of AQUI-Sk (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic/ sedative for public aquaculture in the United States. *Aquaculture Research* 30, 365–372.
- Stoskopf, M., 1993. Anaesthesia. In: Brown, L. (Ed.), *Aquaculture for Veterinarians*. Pergamon Press, Oxford, pp. 161– 167.
- C.B., Moyle, P.B. (Eds). *Methods in fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, pp. 213-272.
- Taylor, P.W., Roberts, S.D., 1999. Clove oil: an alternativ anaesthetic for aquaculture. *N. Am. J. Aquac.* 61, 150– 155.
- Tsantilas H., A.D. Galatos, F. Athanasopoulou, N.N. Prassinou, K. Kousoulaki, 2006, Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. *Aquaculture* 253: 64-70.
- Velisek Josef, Alzbeta Stara, Zhi-Hua Li, Sarka Silovska, Jan Turek, 2011, Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. *Aquaculture* 310: 369-375.
- Velisek J., Stejskal V., Kouril J., Svobodova Z., 2009. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch. *Aquacult. Res.* 40. 354-361.

- Velisek J., Svobodova Z., 2004. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio*) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. *Acta. Vet. Brno* 73, 247-252.
- Velisek J., Wlasow T., Gomulko P., Svobodova Z., Novonty L., 2007. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis*). *Vet. Med. Czech* 52, 103-110.
- Walsh, C.T., Pease, B.C., 2002. The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). *Aquaculture Research* 33, 627– 635.
- Waterstrat, P.R., 1999. Induction and recovery from anesthesia in channel catfish *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. *J. World Aquaculture Soc.* 30, 250– 255.
- Weber R.A., J.B. Peleteiro, L.O. Garcia Martin, M. Aldegunde, 2009, The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture* 288: 147-150.
- Weber R.A., J.J. Perez-Maceira, J.B. Peleteiro, L. Garcia-Martin, M. Aldegunde, 2011, Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegale sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture*, doi: 10.1016/j.
- Woody, C.A., Nelson, J., Ramstad, K., 2002. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. *J. Fish Biology* 60, 340– 347.
- Young, G., C.L. Brown, R.S. Nishioka, L.C. Folmar, M. Andrews, J.R. Cashman and H.A. Bern. 1992, Physiological and morphological study of the annual summer die-off of striped bass (*Moronesaxatilis*) in the Sacramento-San Joaquin delta. *Mar. Environ. Sci.* (in press).
- Zahl Inger Hilde, Anders Kiessling, Ole Bent Samuelson, Magne Kjerulf Hansen, 2009, Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. *Aquaculture* 295: 52-59.

6.3 Διαδίκτυο

<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/633ureacycle.html>, (accesed 272/2012).

