

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Θανάτωση ιχθύων στην παραγωγική διαδικασία της
ιχθυοκαλλιέργειας: εκτίμηση συντελεστών καταπόνησης»**

Ελένη Αντωνιάδου

ΒΟΛΟΣ 2017

**«Θανάτωση ιχθύων στην παραγωγική διαδικασία της ιχθυοκαλλιέργειας:
εκτίμηση συντελεστών καταπόνησης»**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

1) **Ελένη Γκολομάζου**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα

2) **Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

3) **Ιωάννης Καραπαναγιωτίδης**, Επίκουρος καθηγητής, Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

Στην οικογένεια μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κα. Γκολομάζου Ελένη για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε αρχικά με την ανάθεση της παρούσας διατριβής και για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Παναγιωτάκη Παναγιώτα και Καραπαναγιωτίδη Ιωάννη για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Γιώργο και Νίνα, και τα αδέρφια μου Ναυσικά και Αλέξανδρο για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιλογή του τρόπου θανάτωσης πρέπει να οδηγεί σε μία ταχεία και αμετάκλητη απώλεια συνείδησης. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εφαρμόστηκαν τέσσερις τρόποι θανάτωσης (θανάτωση με ασφυξία, θανάτωση με αφαίμαξη, θανάτωση με παγόνερο και θανάτωση με υπερβολική δόση τεσσάρων αναισθητικών- γαρυφαλέλαιο, κανέλα, MS-222, φαινοξυαιθανόλη). Τα επίπεδα καταπόνησης καθορίστηκαν μέσω της ανίχνευσης του κατακερματισμένου DNA σε ηπατοκύτταρα με τη βοήθεια της μοριακής τεχνικής, «ανάλυση κομητών» (comet assay).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα καταπόνηση παρατηρήθηκε σε όλους τους τρόπους θανάτωσης. Η παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του ποσοστού του κερματισμένου DNA ήταν η TM – Tail Moment.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θανάτωση με ασφυξία είναι η χειρίστη μέθοδος θανάτωσης, καθώς κατέγραψε το μεγαλύτερο ποσοστό γενοτοξικότητας. Η θανάτωση με υπερβολική δόση αναισθητικών είχε τις μικρότερες τιμές TM. Η χρήση αιθέρων ελαίων ως αναισθητικά μειώνει σημαντικά την καταπόνηση των ιχθύων. Στην παρούσα διατριβή, η δόση των 0,4ml παρουσίασε υψηλές τιμές TM σε σύγκριση με τις δόσεις 0,5ml και 1ml.

Συμπερασματικά, η μέθοδος της ανάλυσης κομητών (comet assay) είναι σε θέση να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα στη μελέτη της οξείας μορφής καταπόνησης. Η ασφυξία αποδείχτηκε ότι είναι η χειρίστη μέθοδος θανάτωσης. Το παγόνερο έδειξε υψηλές τιμές TM. Η αφαίμαξη παρουσίασε υψηλές τιμές TM χωρίς κάποια σημαντική διαφορά από το παγόνερο. Σημαντική διαφορά έδειξε η μέθοδος θανάτωσης με την υπερβολική δόση αναισθητικών. Τα αιθέρια έλαια (γαρυφαλέλαιο και κανέλα) έδειξαν τα καλύτερα αποτελέσματα.

Λέξεις κλειδιά : «ευζωία», «τρόποι θανάτωσης», «καταπόνηση», «comet assay»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	vi
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Καταπόνηση (stress) ιχθύων.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.3
1.2 Παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.4
1.3 Επίδραση της καταπόνησης στην ανάπτυξη	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.5
1.4 Διάκριση σε οξεία και χρόνια μορφή καταπόνησης...	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.6
1.5 Τρόποι θανάτωσης ιχθύων	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.7
1.5.1 Θανάτωση από πρόκληση ασφυξίας	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.7
1.5.2 Θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.8
1.5.3 Θανάτωση με αφαίμαξη.....	9
1.5.4 Θανάτωση με εμβάπτιση σε παγωμένο νερό	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.9
1.5.5 Θανάτωση με διοχέτευση CO ₂ στο νερό	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.9
1.5.6 Θανάτωση με ηλεκτρισμό.....	10
1.5.7 Θανάτωση με χρήση αναισθητικών ουσιών	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.10
1.6 Αιθέρια έλαια.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.11
1.6.1 Χρήση των αιθέρων ελαίων στις υδατοκαλλιέργειες.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.11
1.7 Εφαρμογές της Comet assay.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.12
1.8 Ιδιαιτερότητα, ευαισθησία και περιορισμοί της Comet assay..	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.13
1.9 Σκοπός της παρούσας μελέτης	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.16
2.1 Sparus aurata (Τσιπούρα).....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.16
2.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.17

2.1.2	Θερμοκρασία.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	18
2.1.3	Αλατότητα.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	18
2.1.4	Διαλυμένο οξυγόνο.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	18
2.1.5	Θολερότητα.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	18
2.2	Δειγματοληψία-Ανάλυση διαδικασίας τρόπων θανάτωσης.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	19
2.3	Η τεχνική Comet assay.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	21
2.3.1	Ανάλυση κομητών (Comet assay).....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	22
2.3.2	Απομόνωση ηπατοκυττάρων .	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	23
2.3.3	Επίστρωση αгарόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	25
2.3.4	Λύση και ηλεκτροφόρηση.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	26
2.3.5	Μέτρηση κομητών.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	27
2.3.6	Στατιστική ανάλυση	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	27
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	29
3.1	Εξέταση ηπατοκυττάρων.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	29
3.2	Συζήτηση	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	31
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	35
	ABSTRACT		36
	BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	37
	Ξένη βιβλιογραφία.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	37
	Ελληνική βιβλιογραφία.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κίνημα για την ευζωία των ζώων ξεκίνησε το 1960 όταν η βρετανική κυβέρνηση ανέθεσε στον καθηγητή Roger Brambell και την ομάδα του να συντάξουν μία αναφορά για τα ζώα μαζικής παραγωγής. Η Επιτροπή Brambell δημοσίευσε ένα κατάλογο με τα πέντε είδη ελευθερίας που πρέπει να έχουν τα ζώα. Η ελευθερία από πείνα και δίψα, από ενόχληση και από πόνο-τραυματισμό-ασθένεια αφορούν τη φυσική κατάσταση, ενώ η ελευθερία να εκφράζουν τη φυσική τους συμπεριφορά και η ελευθερία από φόβο και άγχος αφορούν την πνευματική κατάσταση.

Η ευζωία των ζωικών οργανισμών και ειδικότερα των υδρόβιων σε συνθήκες εκτροφής είναι ένα πολυδιάστατο ζήτημα, το οποίο τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον, τόσο της επιστημονικής κοινότητας, όσο και των φορέων που εμπλέκονται στην υδρόβια ζωική παραγωγή (Huntingford & Kadri 2009).

Οι πέντε ελευθερίες έχουν υιοθετηθεί από οργανισμούς όπως η World organisation for Animal Health, η Royal society for the Prevention of Cruelty to Animals και η American Society for the Prevention of Cruelty to Animals. Στη Μεγάλη Βρετανία η Royal society συνεργάζεται με τους παραγωγικούς φορείς με σκοπό την προώθηση προτύπων, τα οποία διασφαλίζουν την εύρωστη διαβίωση εκτρεφόμενων σολομών του Ατλαντικού. Τα προϊόντα πωλούνται με διακριτή εμπορική ονομασία (freedom food label) (Μαλανδράκης 2014).

Το θέμα της ευζωίας λαμβάνει ολοένα και μεγαλύτερες διαστάσεις και η Ευρωπαϊκή Ένωση κινείται προς τη θεσμοθέτηση κανόνων στα στάδια εκτροφής. Οι Ευρωπαϊκοί Κανονισμοί που είναι σε ισχύ για τις υδατοκαλλιέργειες και την ευζωία των ιχθύων είναι ο 710/2009 για τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων για τη βιολογική παραγωγή ζώων υδατοκαλλιέργειας και φυκιών, ο οποίος αντικατέστησε τον ΕΚ 834/2007, και ο 1099/2009 που αναφέρεται στην προστασία των ζώων κατά τη θανάτωση τους. Δεν υπάρχει νομοθεσία που να αφορά αποκλειστικά σε θέματα ευζωίας εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών.

Στη μελέτη της ευζωίας των ψαριών σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν δύο παράμετροι: i) Οι παράγοντες που τη συνθέτουν και ii) η εκτίμηση των παραγόντων αυτών με σκοπό να αποδοθεί η πλήρης εικόνα της φυσικής κατάστασης των ψαριών.

Ο ανθρώπινος εγκέφαλος αποτελείται περίπου από 100 δισεκατομμύρια νευρώνες, παρέχοντας τεράστιες δυνατότητες επεξεργασίας των πληροφοριών. Έρευνες που έχουν ως αντικείμενο τον εγκέφαλο των ψαριών απέδειξαν ότι έχουν λιγότερους νευρώνες, αλλά στην πραγματικότητα δεν γνωρίζουμε πόσοι λόγω της ποικιλομορφίας του. Αυτό είναι ένα κρίσιμο σημείο, διότι τα επιχειρήματα που έχουν τεθεί είναι ισχυρισμοί σε σχέση με την ικανότητα για το αν τα ψάρια υποφέρουν και ότι δεν μπορούν να αισθάνονται τον πόνο με τον τρόπο που τον βιώνουν οι άνθρωποι (Braithwaite 2010).

Γενικά, η ευζωία των ψαριών μπορεί να ομαδοποιηθεί σε τρεις μεγάλες κατηγορίες (FSBI 2002): Η πρώτη μεγάλη κατηγορία προσδιορίζεται από τη λειτουργία των αισθήσεων, κατά την οποία η ευπραγία ανταποκρίνεται στην έλλειψη αρνητικών καταστάσεων, όπως είναι ο φόβος και ο πόνος. Αντιθέτως, τα ψάρια έχουν τη δυνατότητα να δέχονται θετικά ερεθίσματα, όπως είναι η ανταμοιβή (Duncan 2006). Άξιο σημείωσης είναι ότι τα ψάρια διαθέτουν τις ανάλογες φυσιολογικές λειτουργίες για τη διαβίωση των σημάτων του πόνου, όπως τα πτηνά και τα θηλαστικά (EFSA 2009). Η παρουσία νευρικών ινών και υποδοχέων είναι απαραίτητη για να γίνει αισθητός ο πόνος, αλλά δεν αποτελεί μόνη της αποδεικτικό στοιχείο ότι τα ψάρια πονούν (Rose *et al.* 2012). Η δεύτερη κατηγορία, η λειτουργική, ορίζεται από τη δυνατότητα των ψαριών να προσαρμόζονται στο φυσικό τους περιβάλλον και να βρίσκονται σε καλή φυσική κατάσταση. Ένα ζώο που δεν διατηρεί τις φυσιολογικές του λειτουργίες, δεν ακολουθεί τα πρότυπα της ευζωίας. Τέλος, η τρίτη κατηγορία αφορά στο φυσικό τρόπο διαβίωσης. Στην περίπτωση αυτή, η ευζωία στηρίζεται στη δυνατότητα που δίνεται στα ψάρια να εκφράσουν τη φυσιολογική τους συμπεριφορά, ειδικότερα σε συνθήκες εκτροφής, όπως θα αναμενόταν στους φυσιολογικούς πληθυσμούς (Kiley-Worthington 1989).

1.1 Καταπόνηση (stress) ιχθύων

Η βασική αρχή της βιοηθικής προστάζει ακαριαίο θάνατο των ζώων με σκοπό την ελαχιστοποίηση- αποφυγή της καταπόνησης του οργανισμού. Στο τελευταίο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας, ανάμεσα στην εξαλίευση και στη θανάτωση, η διατήρηση της ευζωίας προστάζει την εφαρμογή τρόπων θανάτωσης των ζώων με μεθόδους που μειώνουν την καταπόνηση με σκοπό τη διατήρηση της καλής εμφάνισης και ποιότητας του προϊόντος (Πίκουλας 2011).

Καταπόνηση είναι η οποιαδήποτε απόκλιση από το φυσιολογικό, σε έναν ή περισσότερους από τους παράγοντες που συμμετέχουν στην βιολογική και φυσιολογική ισορροπία του οργανισμού του ψαριού.

Υπό την επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα προκαλούνται μεταβολές στο αίμα και στους ιστούς. Η κορτιζόλη στο αίμα αυξάνεται. Οι διάφορες φυσιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν καθώς το ψάρι προσπαθεί να ανταπεξέλθει από την καταπόνηση είναι αντισταθμιστικές (πχ προσαρμοστικές) και απαραίτητες για να επιτευχθεί εγκλιματισμός στις νέες συνθήκες (Πίκουλας 2011). Όλες οι φυσιολογικές αλλαγές αναφέρονται ως Γενικό Σύνδρομο Προσαρμογής (General Adaptation Syndrome - GAS) (Παπουτσόγλου 1998). Τα ψάρια προσπαθούν να αντιδράσουν απέναντι στον παράγοντα καταπόνησης, χρησιμοποιώντας τα ενεργειακά τους αποθέματα (Lines & Frost 1999). Το Γενικό Σύνδρομο Προσαρμογής περιλαμβάνει 3 επίπεδα απόκρισης, ενώ οι επιπτώσεις γίνονται διαδοχικά ορατές από αλλαγές στη συμπεριφορά, τη φυσιολογία και σε κυτταρικό επίπεδο.

Πρωτογενή (Alarm): Αμέσως μόλις το ψάρι εκτεθεί σε κάποιο παράγοντα καταπόνησης λαμβάνουν χώρα διάφορες νευροενδοκρινικές αλλαγές οι οποίες συνοδεύονται από έκλυση ορμονών στο αίμα χαρακτηριστικών της κατάστασης «stress».

Δευτερογενή (Resistance): Τα αυξημένα επίπεδα κατεχολαμινών και κορτιζόλης επηρεάζουν τις βιοχημικές και φυσιολογικές λειτουργίες των ψαριών προκαλώντας διαφοροποίηση στους ρυθμούς έκκρισης ορμονών από την υπόφυση και τον

θυρεοειδή αδένα Τροποποιήσεις στους ρυθμούς ανανέωσης των νευροδιαβιβαστών όπως είναι η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη επίσης, προκαλούν αυξημένη ροή αίματος προς τα βράγχια, καλύτερη οξυγόνωση λόγω αύξησης του καρδιακού παλμού και βελτιωμένες κολυμβητικές επιδόσεις. Ενεργοποίηση του καταβολισμού (αντί του αναβολισμού) και κινητοποίηση ενέργειας λόγω αποδόμησης των αποθεμάτων. Αύξηση της γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία λόγω έντονης γλυκογενόλυσης και γλυκονεογένεσης) για ικανοποίηση των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων.

Τριτογενή (Exhaustion) : Όταν η διάρκεια (ένταση) του «stress» αγγίζει ή υπερβαίνει τα όρια ανοχής των ψαριών δυσχεραίνοντας τον εγκλιματισμό τους, τότε παρατηρείται σειρά παρενεργειών σε επίπεδο πληθυσμού που επηρεάζουν την επιβίωση, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγική ικανότητα και το ανοσοποιητικό σύστημα καθιστώντας τα ψάρια ευάλωτα σε ασθένειες.

1.2 Παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση

Οι παράγοντες καταπόνησης μπορούν να ταξινομηθούν σε χημικούς, φυσικούς, βιολογικούς, ανθρωπογενείς, φυσιολογικούς ή φυσιοπαθολογικούς και ψυχολογικούς ή ηθολογικούς.

Μπορεί να προέρχεται από ανθρώπινους χειρισμούς που μπορεί να είναι απρόσεκτοι και βεβιασμένοι. Καταπόνηση προκαλεί η ιχθυοφόρτιση, η οποία οδηγεί σε έλλειψη ζωτικού χώρου και περιορισμό της κίνησης. Καταπόνηση μπορεί να προκληθεί κατά τη μεταφορά και εξάλειψη και λόγω ασθενειών και παρασίτων, αλλαγές στις συνθήκες του περιβάλλοντος όπως θολερότητα, μόλυνση και απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας του νερού (ακραίες τιμές για μεγάλο χρονικό διάστημα). Στους ψυχολογικούς παράγοντες ανήκει ο ανταγωνισμός για τη διεκδίκηση της τροφής αλλά και η επιθετικότητα που δείχνουν τα μεγαλύτερα ψάρια σε βάρος των μικρότερων όταν στον πληθυσμό υπάρχει έντονη ανομοιομορφία με αποτέλεσμα τον κανιβαλισμό. Ενδείξεις της καταπόνησης μπορούν να είναι η ασυνήθης συμπεριφορά, η αυθόρμητη μετανάστευση προς το ένα μέρος του κλωβού,

η αύξηση της αναπνευστικής δραστηριότητας, η μειωμένη επιβίωση των νεαρών ιχθυδίων (Iwama G.K. *et al.* 1995).

Ο ιχθύς προσπαθεί να αντιδράσει απέναντι στον παράγοντα καταπόνησης, χρησιμοποιώντας τα ενεργειακά του αποθέματα. Οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της ομοιοστασίας προσπαθούν να πετύχουν τον εγκλιματισμό του ιχθύος στις νέες συνθήκες. Ένας ζωικός οργανισμός μπορεί να αντέξει την καταπόνηση για κάποιο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Κατά τη διάρκεια του χρονικού αυτού διαστήματος μπορεί να φαίνεται ότι όλα είναι φυσιολογικά, στην πραγματικότητα όμως τα ενεργειακά του αποθέματα εξαντλούνται εξαιτίας των αυξημένων απαιτήσεων λόγω της ύπαρξης του παράγοντα καταπόνησης (Lines & Frost 1999). Στο στάδιο της προσαρμογής ή της εξάντλησης οι αντιδράσεις του οργανισμού έχουν σταθεροποιηθεί. Αν ο παράγοντας καταπόνησης δεν απομακρυνθεί, τα ενεργειακά αποθέματα του ιχθύος τελειώνουν και αυτός οδηγείται στην εξάντληση. Στη φάση αυτή, η ικανότητά του να αντιστέκεται σε νοσογόνους παράγοντες με τους οποίους βρίσκεται σε συνεχή επαφή μειώνεται δραματικά και μπορεί να αρρωστήσει ή ακόμη και να πεθάνει.

Το στάδιο της προσαρμογής ποικίλει ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια δράσης του παράγοντα καταπόνησης, το είδος του ιχθύος και την ατομική γονοτυπική αντοχή σε παράγοντες που προκαλούν καταπόνηση (Rice 1996). Η αντίδραση του οργανισμού στην καταπόνηση μπορεί να περιλαμβάνει μεταβολές στη συμπεριφορά (επιθετικότητα, μεταβολές στην πρόσληψη τροφής, κ.λπ.), δυσλειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος, ανοσοκαταστολή, καθώς και ανεπαρκή πέψη και απορρόφηση των συστατικών της τροφής. Ακόμη, είναι δυνατό να προκαλέσει ή να επιδεινώσει διάφορες διατροφικές ανεπάρκειες (Lines & Frost 1999).

1.3 Επίδραση της καταπόνησης στην ανάπτυξη

Κατά τη χρόνια μορφή καταπόνησης παρατηρείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ιχθύων, που οφείλεται κατά ένα μέρος στα παρατηρούμενα, στο αίμα τους, υψηλά επίπεδα κορτιζόλης. Έτσι, εναλλακτικά

χρησιμοποιείται η μέτρηση της κορτιζόλης για την εκτίμηση της καταπόνησης. Η έννοια του μειωμένου ρυθμού ανάπτυξης, στην περίπτωση αυτή, συνίσταται στην παρατηρούμενη ανεπιθύμητη σχέση μεταξύ της ποσότητας της χορηγηθείσης τροφής και της επιτευχθείσης ανάπτυξης των ιχθύων (αυξημένος συντελεστής εκμεταλλεύσεως της τροφής). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στις καταβολικές ιδιότητες της κορτιζόλης από τις οποίες επιδιώκεται η κάλυψη των αυξημένων από την καταπόνηση ενεργειακών αναγκών των ιχθύων. Επίσης, πειράματα έχουν δείξει ότι η έκκριση της αυξητικής ορμόνης μπορεί να μειώνεται σε ιχθείς που καταπονούνται και που στο αίμα τους υπάρχουν αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης. Έχει, ωστόσο, αποδειχθεί ότι η κορτιζόλη δεν αποκλείεται να διεγείρει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης, η οποία όμως με τη σειρά της είναι πιθανόν να προάγει τη δραστηριοποίηση των μηχανισμών εκκρίσεων της κορτιζόλης (Pankhurst *et al.* 1995).

1.4 Διάκριση σε οξεία και χρόνια μορφή καταπόνησης

Η καταπόνηση μπορεί να διακριθεί σε οξεία και σε χρόνια (οξύ και χρόνιο stress). Η οξεία μορφή καταπόνησης διαρκεί λεπτά ή ώρες και είναι ουσιαστικά μία φυσιολογική αντίδραση, που σταματά μόλις παύσει η επίδραση του στρεσογόνου παράγοντα, αφήνοντας βέβαια τον οργανισμό με εξαντλημένες τις ενεργειακές του πηγές, αλλά κατά τα άλλα σε καλή φυσιολογική κατάσταση. Παρά το ενεργειακό κόστος, είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός προσαρμογής σε μεταβολές του περιβάλλοντος και ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί φυσικά συχνότατα. Αν η επίδραση του παράγοντα που προκαλεί την καταπόνηση συνεχίζεται, τότε αυτή είναι πλέον χρόνια (διαρκεί ημέρες, μήνες ή και περισσότερο). Παρόλο που και σ' αυτή την περίπτωση οι αντιδράσεις του οργανισμού αποσκοπούν στην προσαρμογή, μπορεί μακροπρόθεσμα να έχουν δυσμενείς συνέπειες στο μεταβολισμό, στο κυκλοφορικό, στο πεπτικό και στο ανοσοποιητικό σύστημα (Weerd & Komen 1998).

Κατά τη διαδικασία της μαζικής ελεγχόμενης παραγωγής των ιχθύων, οι περιπτώσεις οξείας και χρόνιας καταπόνησης είναι γεγονός. Μελέτες (Turnbull *et al.* in Branson, 2008) καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η πυκνότητα εκτροφής μπορεί να προκαλέσει «stress» αλλά πάντα σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους διότι,

επηρεάζει το ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου και παραγωγής προϊόντων μεταβολισμού (π.χ. CO₂, αμμωνία). Επίσης είναι απαραίτητοι ορισμένοι χειρισμοί οι οποίοι γίνονται προγραμματισμένα και αφορούν τον τρόπο διαχείρισης των ιχθυοπληθυσμών όπως π.χ. εμβολιασμοί, διαλογές κ.λπ.. Οι χειρισμοί αυτοί προκαλούν οξεία καταπόνηση η οποία οφείλεται σε έκθεση του ψαριού σε συνθήκες ατμόσφαιρας για ορισμένο χρονικό διάστημα. Στη βιβλιογραφία αυτό αναφέρεται σαν καταπόνηση που προκαλείται από αερισμό (handling stress). Ο εξαναγκασμός των ιχθύων να αντιμετωπίσουν τις συνέπειες της καταπόνησης, συνεπάγεται συνεχή ενεργοποίηση ενεργειοβόρων βιοχημικών μηχανισμών, το κόστος των οποίων ζημιώνει τελικά τον ίδιο τον παραγωγό.

1.5 Τρόποι θανάτωσης ιχθύων

Σύμφωνα με τους Ottera *et al.* (2001) οι διάφοροι εφαρμοζόμενοι τρόποι θανάτωσης θα πρέπει να οδηγούν σε μια ταχύτατη και αμετάκλητη απώλεια συνείδησης (Southgate & Wall. 2001). Η επιλογή του κατάλληλου τρόπου θανάτωσης εξαρτάται από το είδος του ψαριού και τις φυσιολογικές του λειτουργίες. Σε αυτούς κατατάσσονται τα χτυπήματα στο κεφάλι και η αφαίμαξη (άμεση πρόκληση αιμορραγίας), η πρόκληση ασφυξίας μέσω απομάκρυνσης του οργανισμού από το νερό και η εμβάπτιση σε παγωμένο νερό. Επίσης, θανάτωση προκαλείται από εμβάπτιση σε νερό κορεσμένο με CO₂ που προκαλεί αναισθησία και διακοπή της εγκεφαλικής λειτουργίας και με τη χρήση αναισθητικών ουσιών. Για τη θανάτωση της εκτρεφόμενης πέστροφας στην Αγγλία χρησιμοποιούν, κυρίως, τη μέθοδο του ηλεκτρικού σοκ η οποία είναι άμεσα θανατηφόρα και μπορεί να εφαρμοστεί μέσα ή έξω από το νερό (μέσα στις σωλήνες των αντλιών που μεταφέρουν τα ψάρια από τις εγκαταστάσεις πάχυνσης στις εγκαταστάσεις συσκευασίας) (Adams *et al.* 2007).

1.5.1 Θανάτωση από πρόκληση ασφυξίας

Η ασφυξία μπορεί να χαρακτηριστεί ως η χειρίστη μέθοδος θανάτωσης λόγω της μεγιστοποίησης της καταπόνησης. Η έξοδος από το νερό συνοδεύεται με

«κατάρρευση - κλείσιμο» των βράγχων αποτρέποντας την ανταλλαγή οξυγόνου με το περιβάλλον, κάτι που ουσιαστικά οδηγεί στην ανοξία (Robb & Kestin 2002). Ο χρόνος που θα παραμείνει ζωντανός ο οργανισμός εξαρτάται όμως και από τις συνθήκες περιβάλλοντος.

Όπως είναι γνωστό τα ψάρια είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί και η θερμοκρασία του σώματός τους κυμαίνεται ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Όταν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή η απαίτηση των ιστών σε οξυγόνο μειώνεται παρατείνοντας ουσιαστικά το χρόνο θανάτωσης.

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

1.5.2 Θανάτωση με χτύπημα στο κεφάλι

Με αυτή τη μέθοδο θανάτωσης τα ψάρια χτυπιούνται γρήγορα στο κεφάλι, με συνέπεια τη βίαια μετακίνηση του κρανίου προς τον εγκέφαλο, που προκαλεί διάσειση ή και εγκεφαλική δυσλειτουργία (Van de Vis *et al.* 2003). Αναφέρεται κυρίως σε ψάρια μεγάλου μεγέθους. Αυτή η μέθοδος καθιστά τα ψάρια αναίσθητα αμέσως και αμετάκλητα ενίοτε εάν η ικανοποιητική δύναμη εφαρμόζεται στο σωστό μέρος του κεφαλιού (HSA 2005).

Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να προκληθούν αλλοιώσεις οι οποίες θα καταστήσουν το προϊόν μη εμπορεύσιμο. Επίσης, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα επέρχεται κούραση των χειριστών με αποτέλεσμα να μειώνεται η ακρίβεια κρούσης και επιπλέον να αυξάνεται η δράση της καταπόνησης. Γι' αυτό το λόγο επικρατεί η άποψη πως η μέθοδος πρέπει να γίνεται με τεχνητά και αυτοματοποιημένα μέσα (Roth *et al.* 2007).

1.5.3 Θανάτωση με αφάιμαξη

Συνιστά μια αργή σχετικά μέθοδο, δεδομένου ότι τα ψάρια δεν καθίστανται αμέσως αναίσθητα. Τις περισσότερες φορές αυτή πραγματοποιείται είτε με την άμεση αποκοπή των βράγχων και ακριβώς λίγο πιο πάνω από αυτά προς το κεφάλι, ή ακόμη και τρύπημα στην καρδιά των ψαριών (EFSA 2004).

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

1.5.4 Θανάτωση με εμβάπτιση σε παγωμένο νερό

Αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδος θανάτωσης και συνδυάζει την ευκολία, τη μαζικότητα και έχει το ελάχιστο δυνατό κόστος. Η ψύξη γενικά και ειδικότερα η απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας προκαλεί την παράλυση των μυών του ψαριού. Το ψάρι που θανατώνεται από τον υγρό πάγο πεθαίνει γρηγορότερα και παρουσιάζει μικρότερα επίπεδα καταπόνησης από το συμβατικό πάγο αν και έχει αποδειχθεί πως γενικά η ψύξη αποτελεί σοβαρό στρεσογόνο παράγοντα για τα ψάρια (Skjervold *et al.* 2001). Έρευνες έχουν δείξει ότι εισάγει χαμηλή καταπόνηση ισοδύναμη με αυτή που εισάγουν οι τρόπους που επιφέρουν θανάτωση σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα.

1.5.5 Θανάτωση με διοχέτευση CO₂ στο νερό

Αποτελεί μέθοδο κατά την οποία, κορεσμός ύδατος με το διοξείδιο του άνθρακα δημιουργεί όξινο και ανοξικό περιβάλλον με αποτέλεσμα τη νάρκωση των εκτιθέμενων σε αυτό ψαριών. Ένα από τα κύρια μειονεκτήματα της μεθόδου είναι οι σπασμωδικές κινήσεις των ψαριών που παρατηρούνται κατά τα πρώτο με δεύτερο

λεπτό της διαδικασίας οι οποίες αφήνουν ανοικτό το ενδεχόμενο ύπαρξης της καταπόνησης (Robb & Kestin, 2002 : Southgate & Wall 2001)

1.5.6 Θανάτωση με ηλεκτρισμό

Ανάλογα με την τάση, τη συχνότητα και την διάρκεια που εφαρμόζεται ηλεκτρισμός μπορεί να επιτευχθεί απλή νάρκωση έως και ακαριαίος θάνατος. μικρή εφαρμογή τάσης, αφ' ενός, δύναται να ζαλίσει το ψάρι και αφ' ετέρου εφαρμογή μεγαλύτερης τάσης (ηλεκτροπληξία) είναι ικανή να καταστρέψει τη λειτουργία του εγκεφάλου και επομένως να αφαιρέσει από το ζώο εκτός των άλλων την αίσθηση επιτέλεσης της λειτουργίας της αναπνοής (HSA 2005). Αποτελεί ουσιαστικά την πιο γρήγορη μέθοδο θανάτωσης των ζώων, αν και παρ' όλα αυτά πολλές φορές έχουν παρατηρηθεί διάφορες κηλίδες αίματος στην περιοχή των μυών των ψαριών καθώς και παραδείγματα σπασμένων σπονδύλων (Poll *et al.* 2005).

1.5.7 Θανάτωση με χρήση αναισθητικών ουσιών

Η νάρκωση ηρεμεί τα προς θανάτωση ψάρια και επομένως μειώνει ενδεχόμενα επίπεδα καταπόνησης. Όταν είναι απαραίτητο, η υπερβολική δόση αναισθητικών ουσιών ως τρόπος θανάτωσης είναι αποδεκτός (AVMA 2007). Η δόσεις αναισθητικών ουσιών που χρησιμοποιούνται είναι συγκέντρωσης πέντε με δέκα φορές περισσότερο για συγκεκριμένα είδη. Η πιο συχνή επιλογή είναι το MS222 (Ross & Ross 1984). Η νομοθεσία της ΕΕ απαγορεύει τη χρήση αναισθητικών πριν την θανάτωση των ψαριών (EFSA 2004). Το χημικό αναισθητικό MS-222, ως το ευρέως χρησιμοποιούμενο είναι το μόνο εγκεκριμένο αναισθητικό από την U.S Food and Drugs Administration (FDA) για χρήση σε υδρόβιους οργανισμούς.

Οι αναισθητικές ουσίες προσλαμβάνονται μέσω των βραγχίων και εισέρχονται γρήγορα στο κυκλοφορικό σύστημα. Η ανταπόκριση των ψαριών στα αναισθητικά εξαρτάται από το είδος, το μέγεθος και το σωματικό βάρος του ψαριού, την αναλογία μεταξύ του σωματικού βάρους και της επιφάνειας των βραγχίων του, τη

λιποπεριεκτικότητα, το φύλο, τη σεξουαλική ωριμότητα, τη φυσική κατάσταση και την κατάσταση της υγείας του, αλλά και τη θερμοκρασία, το pH και την περιεκτικότητα του νερού στο οποίο διαβιεί σε άλατα, μέταλλα και οξυγόνο (Τσαντήλας και συν. 2005).

1.6 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά υγρά που περιέχουν τις ουσίες που είναι υπεύθυνες για τα αρώματα των φυτών, που έχουν παραχθεί από διάφορα όργανα, όπως άνθη, μπουμπούκια, σπόροι, φύλλα, κλαδιά, φλοιούς, βότανα, ξύλο, φρούτα και ρίζες (Bakkali *et al.* 2008). Χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορους τομείς (βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων) αλλά και ως αναισθητικά, τα οποία συνήθως προσλαμβάνονται μέσω των βραγχίων, αφού πρώτα διαλυθούν στο νερό στο οποίο βρίσκονται τα ψάρια (Τσαντήλας και συν. 2005) και ως ανοσοενισχυτικά σε διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς (Summer & Smith 1990, Ross L.G. and Ross B. 1999, Iwama *et al.* 1997). Ακόμη τα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί σε θεραπείες (Christaki *et al.* 2012).

1.6.1 Χρήση των αιθέρων ελαίων στις υδατοκαλλιέργειες

Η λέξη «αναισθησία» επινοήθηκε από τον Oliver Wendell Holmes το 1846 (Fishbein 1976). Είναι μία εναλλάκτική επιλογή για την αναισθησία των ψαριών, η οποία είναι απαραίτητη για την ευζωία σε εντατικά εκτρεφόμενες συνθήκες. Τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιούνται ως αναισθητικά συνδυάζουν το χαμηλό κόστος, την εύκολη πρόσβαση, την αποτελεσματικότητα και είναι ασφαλή για το περιβάλλον και το χρήστη (Akbulut *et al.* 2010).

Τα εκτρεφόμενα ψάρια είναι εκτεθειμένα σε πολλούς στεσσογόνους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την εμφάνιση, την ανάπτυξη και την επιβίωση τους (Barton 1997, 2000). Η χρήση των αναισθητικών στον τομέα της αλιείας και των υδατοκαλλιεργειών διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό στο χειρισμό κατά τη διάρκεια της

αφαίρεσης και της μεταφοράς των γεννητόρων, καθώς επίσης τα αναισθητικά χρησιμοποιούνται για να μειωθεί το επίπεδο του στρες που συνδέονται με τις εν λόγω διαδικασίες (Summer and Smith 1990, Ross L.G. and Ross B. 1999, Iwama *et al.* 1997). Το ιδανικό αναισθητικό πρέπει να προκαλεί αναισθησία σε 180 sec, επαναφορά σε 300 sec και να μην προκαλεί τοξικότητα (Marking and Meyer 1985).

Περίπου 3000 αιθέρια έλαια παράγονται από 2000 είδη φυτών (Paut & Karuppayil 2014). Το πιο δημοφιλές είναι το γαρυφαλέλαιο (*Eugenia aromatica*). Το έλαιο γαριφάλου είναι ελαιώδες υγρό το οποίο περιέχει τις δραστικές ουσίες ευγενόλη και ισοευγενόλη. Είναι οικονομικό και εύκολο στη χρήση, έχει αντιμυκητιακή και αντιβακτηριακή δράση, θεωρείται αρκετά ασφαλής για τα ψάρια και τους ανθρώπους, και δεν απαιτείται μεγάλη περίοδος αναμονής μετά τη χρήση του (Ross and Ross 2008). Έχει χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια σε ανθρώπους, θηλαστικά, στα ψάρια και στα αμφίβια (Mitchell 2009). Θεωρείται καλύτερο από άλλα αναισθητικά όπως κιναλδίνη, βενζοκαΐνη και τρικαΐνη (MS-222). Το γαρυφαλέλαιο είναι ένα φυτικό προϊόν, πιο φθηνό και πιο αποτελεσματικό από άλλα αναισθητικά για ψάρια. Είναι ασφαλές για τον άνθρωπο (Munday 1997). Το γαρυφαλέλαιο είναι πιο κατάλληλο για χρήση σε εμπορικές υδατοκαλλιέργειες, όπου τα αναισθητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλες ποσότητες από ανειδίκευτους εργάτες. Στο εμπόριο έχει περίπου 84% ευγενόλη, αλλά μπορεί κανείς να βρει και 100% ευγενόλη. Η ευγενόλη και το γαρυφαλέλαιο είναι διαλυτά στο νερό και κυρίως στη χαμηλή θερμοκρασία.

1.7 Εφαρμογές της Comet assay

Η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως για α) τη μελέτη του μηχανισμού βλάβης του DNA και της βιολογικής σημασίας αυτής, β) την καταγραφή των μεταλλαξιογόνων και των καρκινογόνων ουσιών *in vivo* και *in vitro* και γ) τον έλεγχο της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών. Τροποποιήσεις και παραλλαγές της αρχικής μεθόδου με χρήση ενζύμων επιδιόρθωσης, εξωγενών και ενδογενών, πολλαπλασιάζουν τις δυνατότητες εφαρμογής της. Σε σύγκριση με τις άλλες δοκιμασίες ανίχνευσης της βλάβης στο DNA, η μέθοδος Comet assay υπερέχει, διότι εμφανίζει μεγάλη

ευαισθησία, είναι σχετικά εύκολη και απαιτεί μικρό χρόνο προετοιμασίας. Δίνει πληροφορίες για την κατάσταση κάθε κυττάρου και συνεπώς, επιτρέπει λεπτομερή στατιστική ανάλυση. Μπορεί να εφαρμοστεί στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα και σε δείγματα που περιέχουν μικρό αριθμό κυττάρων (<10.000).

Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μετρά την απάντηση στη βλάβη του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα και συνεπώς, επιτρέπει τη μελέτη της ετερογένειας ενός δεδομένου κυτταρικού πληθυσμού. Λόγω του εκτεταμένου κατακερματισμού του DNA, που χαρακτηρίζει την αποπτωτική διεργασία και με τη βοήθεια της τεχνολογίας, που επιτρέπει τη χρήση ψηφιακής εικόνας για την παρατήρηση, η εφαρμογή της τεχνικής Comet assay διευκολύνει την αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων, δεδομένου ότι το σύνολο του DNA μεταναστεύει έξω από την κεφαλή του κομήτη.

1.8 Ιδιαιτερότητα, ευαισθησία και περιορισμοί της Comet assay

Η Comet assay τυγχάνει ευρείας αποδοχής στην ανίχνευση της καταστροφής και επιδιόρθωσης του DNA σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Όμως, υπάρχουν θέματα που σχετίζονται με την ιδιαιτερότητα, την ευαισθησία και τους περιορισμούς της μεθόδου που χρήζουν διευθέτησης από τοξικολόγους πριν γίνουν αποδεκτά από το ρυθμιστικό πλαίσιο εργασίας περιλαμβάνοντας δια-εργαστηριακή επικύρωση της *in vitro* και *in vivo* Comet assay.

Η διακύμανση στα αποτελέσματα της Comet assay είναι μεγάλη λόγω της ευαισθησίας και των ελάχιστων διαφορών στις συνθήκες διαφορετικών εργαστηρίων, καθώς και η επίδραση συγγεόμενων παραγόντων στις ανθρώπινες μελέτες (τρόπος ζωής, ηλικία, διατροφή, μεταξύ των οργανισμών και εποχική διακύμανση). Πιθανές μελέτες που υποστηρίζουν αυτό δεν έχουν διεξαχθεί ώστε να βρουν την προβλεπόμενη τιμή της Comet assay στην ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση, προάγοντας περιορισμού της εφαρμογής (Moller 2006a). Από κύτταρο σε κύτταρο, από πηκτή σε πηκτή, από καλλιέργεια σε καλλιέργεια, από οργανισμό σε οργανισμό, καθώς και από ποικίλα συστήματα εικόνας ανάλυσης ή οπτικό σκοράρισμα και τη χρήση διαφορετικών παραμέτρων της Comet assay, συνεισφέρουν στις δια-

εργαστηριακές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων.

Ο περιορισμός της Comet assay είναι ότι ανιχνεύει την καταστροφή του DNA στη μορφή θραυσμένων κλώνων. Η αλκαλική έκδοση (pH>13) της μεθόδου εκτιμά απ' ευθείας τη ζημιά που έχει υποστεί το DNA ή αλκαλικές ασταθείς θέσεις, ενώ συγκεκριμένες κλάσεις της καταστροφής του DNA περιλαμβάνουν οξείδωση των βάσεων δεν είναι δυνατό να μετρηθούν. Η συγκεκριμένη και ευαίσθητη ανίχνευση αυτών των βλαβών απαιτεί τη χρήση συγκεκριμένων ενζύμων (Collins 2004). Αυτά τα ένζυμα είναι βακτηριακά ένζυμα γλυκοσιλιάσης/ενδονουκλεάσης, τα οποία αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη βλάβη και το μετατρέπουν σε ένα θραύσμα που μπορεί εύκολα να μετρηθεί από την Comet assay. Γι' αυτό το λόγο ευρείες κλάσεις οξειδωτικής καταστροφής του DNA και επηρεασμός του από υπεριώδη φωτοπροϊόντα μπορούν να ανιχνευθούν ως αυξημένη ποσότητα του DNA στην ουρά (Moller 2006a). Οι οξειδωμένες πυριμιδίνες ανιχνεύονται με τη χρήση ενδονουκλεασών, ενώ οι οξειδωμένες πουρίνες με φορμαμιδοπυριμιδίνη DNA γλυκόλαση (FPG). Τροποποιήσεις στο πρωτόκολλο έχουν γίνει, ώστε να καθορίσουν την ανίχνευση θραυσμάτων δύο κλώνων (neutral Comet assay: Singh 2000), μονόκλινα θραύσματα (pH 12.1: Miyamae *et al.* 1997), και απόπτωση (Singh, 2000). Η ουδέτερη Comet assay βοηθά επίσης στη διάκριση της απόπτωσης από τη νέκρωση κι αυτό αποδεικνύεται από τις αυξημένες τιμές της Comet assay στα αποπτωτικά κύτταρα και σχεδόν μηδενικές για τα νεκρωτικά (Yasuhara *et al.* 2003). Μια προσαρμογή της Comet assay αναπτύχθηκε, επίσης, η οποία καθιστά ικανή τη διάκριση των βιώσιμων, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (Morley *et al.* 2006).

Η ουρά (%) του DNA (TM) και το Olive tail moment (OTM) δίνει μια καλή ένδειξη για τις μελέτες γενοτοξικότητας (Kumaravel & Jha, 2006) και όπως οι περισσότερες μελέτες, έχουν αναφέρει αυτές τις παραμέτρους κι έχουν προτείνει και τις δύο παραμέτρους για χρήσεις ρουτίνας. Από τότε που το OTM αναφέρεται ως αυθαίρετη μονάδα και τα διαφορετικά προγράμματα επεξεργασίας των δεδομένων δίνουν ξεχωριστά αποτελέσματα, το TM θεωρείται καλύτερη και περισσότερο αξιόπιστη παράμετρος (Kumaravel & Jha 2006).

1.9 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

Η διερεύνηση των επιπέδων καταπόνησης με τη χρησιμοποίηση τεσσάρων τρόπων θανάτωσης (ασφυξία, αφαίμαξη, παγόνερο, υπερβολική δόση αναισθητικού- κανέλα, γαρύφαλέλαιο, φαινοξυαιθανόλη, MS-222) στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) με την εκτίμηση του κερματισμού που προκαλεί η καταπόνηση στο DNA.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 *Sparus aurata* (Τσιπούρα)

Το ψάρι που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η τσιπούρα (*Sparus aurata*), ως ένα από τα πιο εμπορικά είδη της Μεσογείου. Η ακριβής κατάταξη της είναι η παρακάτω:

Βασίλειο: Ζώα

Συνομοταξία: Χορδωτά

Υποσυνομοταξία: Σπονδυλωτά

Ομοταξία: Οστεϊχθύες

Υφομοταξία (κλάση): Ακτινοπτερύγιοι

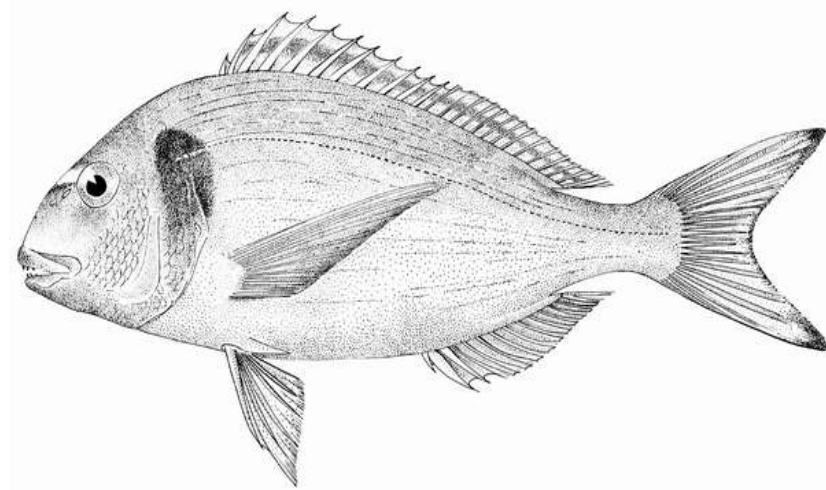
Υπέρταξη: Τελεόσταιοι

Τάξη: PERCIFORMES

Οικογένεια: SPARIDAE

Γένος: *Sparus*

Είδος: *Sparus aurata* (Linnaeus 1758)



Εικόνα 1. Τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι κατεξοχήν ευρύαλο και ευρύθερμο είδος, ανήκει στην οικογένεια των Sparidae και έχει ευρεία εξάπλωση από τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα μέχρι τον Ατλαντικό Ωκεανό και νότια μέχρι τη Σενεγάλη. Η βαθυμετρική κατανομή είναι 30 μέτρα για τα ιχθύδια και 150 για τα ενήλικα άτομα. Η χωρική κατανομή στον Ατλαντικό περιορίζεται μέχρι τις Κανάριες νήσους και το Cape Verde, ενώ έχουν αναφερθεί εμφανίσεις στη Μ. Βρετανία και τη Μαύρη Θάλασσα (Bauchot & Hureau 1986). Η διατροφή της περιλαμβάνει δίθυρα και καρκινοειδή (Breber & Strada 1995). Παρουσιάζει προτίμηση στις λιμνοθάλασσες και σε παράκτια συστήματα με αμμώδεις βυθούς και με λιβάδια Ποσειδωνίας (*Posidonia oceanica*) (Fischer *et al.* 1987). Συχνό φαινόμενο που παρατηρείται είναι να σκάβουν την άμμο με το κεφάλι τους για την εύρεση τροφής. Τέλη φθινοπώρου με χειμώνα μετακινείται σε βαθύτερα νερά για αναπαραγωγή. Τα ενήλικα άτομα επιστρέφουν στα ρηχά αμέσως μετά την αναπαραγωγή, ενώ ο γόνος επιστρέφει αργότερα και παραμένει μέχρι τη σεξουαλική ωρίμανση. Είναι ερμαφρόδιτο είδος, με πρωτανδρική εμφάνιση και μετά το δεύτερο έτος της ηλικίας της πολλά άτομα μετατρέπονται σε θηλυκά.

Οι Μεσογειακές χώρες σήμερα, αποτελούν τις κυριότερες χώρες παραγωγής της τσιπούρας στον κόσμο. Στην Ελλάδα, η τσιπούρα μαζί με το λαβράκι αποτελούν τη μεγαλύτερη μερίδα της παραγωγής αλιευμάτων από τις υδατοκαλλιέργειες.

2.1.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) έχει σώμα ατρακτοειδές ελαφρώς ωοειδές-κυκλικό και έχει αργυροκίτρινο χρωματισμό στον οποίο διακρίνονται ελαφρά καθετες λεπτές γκρίζες γραμμές. Στο μπροστινό μέρος του κεφαλιού και πάνω από τα μάτια υπάρχει μία λεπτή, έντονη, κίτρινη λωρίδα στην οποία οφείλει τα ονόματα *Chrysophrys auratus* (Linnaeus 1758) και *Chrysophrys crassirostris* (Valenciennes, 1830). Το στόμα της τσιπούρας έχει ισχυρά χείλη, οι σιαγόνες στο πρόσθιο τμήμα τους χαρακτηρίζονται από την παρουσία 6 κυνοειδούς μορφής δοντιών, ενώ στην άνω σιαγόνα πλευρικά υπάρχουν 4-5 γομφιοειδούς μορφής δόντια και στην κάτω 3-4 σειρές ίδιου τύπου. Στο άνω μέρος του βραγχιακού επικαλυμμάτος υπάρχει μία

κηλίδα στο χρώμα σκουριάς. Το ραχιαίο πτερύγιο είναι μακρύ, αρχίζει από τη βάση σχεδόν των θωρακικών και τελειώνει πριν από το τέλος του εδρικού. Το εξωτερικό περίβλημα της τσιπούρας καλύπτεται ως επί το πλείστον από μικρά λεπτά λέπια και η διάταξη τους γίνεται με μερική αλληλοκάλυψη. Κατά τον Barnade, (1990) και σύμφωνα με παρατηρήσεις από εκτροφές οι ανεκτοί παράγοντες του περιβάλλοντος για το είδος οι οποίοι επηρεάζουν την εξάπλωση του είδους είναι:

2.1.2 Θερμοκρασία

Ως ευρύθερμο είδος η τσιπούρα, απαντάται το χειμώνα σε θερμοκρασίες 5 °C- 6 °C και το καλοκαίρι σε θερμοκρασίες έως 25 °C- 27 °C. Η μέγιστη θερμοκρασία επιβίωσης είναι 34 °C και η ελάχιστη 5 °C.

2.1.3 Αλατότητα

Ως ευρύλαο είδος η τσιπούρα, απαντάται σε νερά με αλατότητα 7 psu έως και 42 psu. Οι ιδανικές συνθήκες είναι μεταξύ 25 psu και 42 psu.

2.1.4 Διαλυμένο οξυγόνο

Στο φυσικό περιβάλλον στη θάλασσα το οξυγόνο είναι σχεδόν πάντα κοντά στο επίπεδο κορεσμού, οπότε σπανίως παρατηρούνται μαζικοί θάνατοι του είδους από την πτώση του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό. Το ιδανικό επίπεδο κορεσμού του νερού σε διαλυμένο οξυγόνο σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία είναι 90% (Barnade, 1990).

2.1.5 Θολερότητα

Η τσιπούρα δεν φαίνεται να προτιμά τα θολά νερά των εκβολών των ποταμών ή των παράκτιων περιοχών κατά τις θαλασσοταραχές.

2.2 Δειγματοληψία-Ανάλυση διαδικασίας τρόπων θανάτωσης

Τριάντα τρία (33) άτομα τσιπούρας (*Sparus aurata*) μέσου βάρους $14,97 \pm 5$ g και μήκους $10,25 \pm 5$ εκ. εγκλιματίστηκαν για ένα μήνα στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος. Επελέγησαν τέσσερις τρόποι θανάτωσης (ασφυξία, αφαίμαξη, παγόνερο, υπερβολική δόση γαρυφαλέλαιου, κανέλας, 2-phenoxyethanol, Tricaine methanesulfonate (MS-222). Για κάθε τρόπο υπήρχαν τρεις επαναλήψεις. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος τα ψάρια ήταν υγιή και δεν παρατηρήθηκαν θνησιμότητες, ενώ ταΐζονταν καθημερινά με εμπορικά σύμπηκτα (pellets) κατάλληλα για τσιπούρα. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 21°C , με την ποιότητα νερού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες σταθερές.

Αμέσως μετά τη θανάτωση μετρήθηκε το ολικό και σταθερό μήκος, το βάρος και έγινε εκτομή για την αφαίρεση του ήπατος (Εικ. 2,3). Οι ιστοί μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου «Falcon» που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα HBSS (Hank's salt solution) και τοποθετήθηκαν πάνω σε πάγο μέχρι να μεταφερθούν στο εργαστήριο. Το διάλυμα HBSS είναι ελεύθερο ασβεστίου και μαγνησίου. Το ασβέστιο επιδρά ανασταλτικά στο διαχωρισμό των κυττάρων του ιστού, ενώ το μαγνήσιο αναστέλλει τη δράση της κολλαγόνωσης (Baksi & Fazier 1990).



Εικόνα 2. Μέτρηση βάρους



Εικόνα 3. Μέτρηση μήκους

Στη μέθοδο θανάτωσης με ασφυξία, το ψάρι μετά την εξαλίευση του από την δεξαμενή, παρέμεινε στην απόχη εκτός νερού, για τόσο χρόνο ώστε να χάσει τελείως τις αισθήσεις του και μην παρατηρείται πλέον οποιαδήποτε κίνηση από αυτό. Ο συνήθης απαιτούμενος χρόνος για να χάσει πλήρως τις αισθήσεις του το ψάρι, κυμάνθηκε γύρω στα δέκα λεπτά. Οι τελικές φάσεις περιελάμβαναν σωματομετρικές μετρήσεις και αφαίρεση του ήπατος.

Κατά την διαδικασία θανάτωσης με παγόνερο, το ψάρι αφού εξαλιεύτηκε με απόχη από την δεξαμενή, τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε νερό και πάγο, περιεκτικότητας 1:1. Στη φάση αδράνειας πλέον των μυϊκών συσπάσεων και των βραγχιακών επικαλλυμάτων, ακολούθησε η διαδικασία μέτρησης σωματομετρικών αναλογιών και η αφαίρεση του ήπατος.

Στη θανάτωση με άμεση πρόκληση αιμορραγίας έγινε εξαλίευση του ψαριού με απόχη και άμεση αποκοπή της κεντρικής αορτής. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία μετρήσεων.

Τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το αιθέριο έλαιο του φυτού *Eugenia aromatica* (γαρυφαλέλαιο) και το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα). Εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης της ευγενόλης το γαρυφαλέλαιο αναισθητοποιεί σε σύντομο χρονικό διάστημα ανεξάρτητα από το είδος και το μέγεθος του ψαριού.

Η δόση χορήγησης για το κάθε αναισθητικό με σκοπό τη θανάτωση των ψαριών ήταν: για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Cinnamomum zeylanicum* (κανέλα) δοκιμάστηκαν οι δόσεις 1 ml, 0,4ml, 0,5ml. Για το αιθέριο έλαιο του φυτού *Eugenia aromatica*, (γαρυφαλέλαιο) δοκιμάστηκαν οι ίδιες δόσεις αντίστοιχα. Τα αιθέρια έλαια διαλύθηκαν σε αιθανόλη σε αναλογία 1:10. Μετά από ένα χρονικό διάστημα περίπου δύο λεπτών και εφόσον δεν παρατηρήθηκε κάποια κίνηση του ψαριού ακολούθησαν οι σωματομετρικές μετρήσεις και η αφαίρεση του ήπατος.

Τα χημικά αναισθητικά που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν το MS-222 (Tricaine methanesulfonate), το οποίο είναι το πιο κοινό και ευρέως

χρησιμοποιούμενο αναισθητικό (Kelsch and Shields 1996) και η φαινοξυαιθανόλη (2-Phenoxyethanol), το οποίο είναι ένα άχρωμο, ελαιώδες, αρωματικό υγρό.

Η δόση χορήγησης της φαινοξυαιθανόλης ήταν 5ml, ενώ του MS222 0,7 gr τα οποία διαλύθηκαν σε 5ml H₂O. Ακολούθησαν σωματομετρικές μετρήσεις και αφαίρεση του ήπατος.

2.3 Η τεχνική Comet assay

Η ανάλυση κομητών ή comet assay (ή single – cell gel) είναι μία τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση της βλάβης του DNA σε επίπεδο απομονωμένων κυττάρων. Η τεχνική της ανάλυσης κομητών (Comet assay) εισήχθη για πρώτη φορά από τους Östling and Johanson το 1984. Η Comet assay συνδυάζει την ευαισθησία στην ανίχνευση χαμηλών επιπέδων βλάβης DNA, την ευελιξία, το χαμηλός κόστος, την ευκολία εφαρμογής, το μικρό χρονικό διάστημα για την ολοκλήρωση της και το γεγονός ότι χρειάζεται μικρό αριθμό κυττάρων ανά δείγμα (<10.000). Η ονομασία της οφείλεται στην εικόνα κομήτη που σχηματίζεται σε περίπτωση μεγάλης έκτασης βλάβης, κατά την έξοδο του κερματισμένου DNA από τον πυρήνα και το κύτταρο και τη μετακίνησή του προς την άνοδο. Ο κομήτης αποτελείται από την κεφαλή, η οποία αντιπροσωπεύει το DNA που δε μεταναστεύει έξω από τον πυρήνα και την ουρά, στην οποία βρίσκονται τα θραύσματα DNA που εξέρχονται από τον πυρήνα και το κυτταρικό σώμα. Ανάλογα με τις συνθήκες, ελέγχεται αν η βλάβη αφορά το μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA. Η χρήση του έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια (Fairbairn *et al.* 1995). Η αλκαλική εκδοχή της μεθόδου εφαρμόστηκε από τους Singh *et al.* (1988), εκτελώντας ηλεκτροφόρηση σε pH >13, κατέστη δυνατή η ανίχνευση θραυσμάτων μονόκλωνου DNA. Η εμφάνιση SSBs (single strand breaks) αντιπροσωπεύει διαταραχή της δομικής ακεραιότητας του γενετικού υλικού και χαρακτηρίζεται ως βλάβη του DNA (DNA damage)

Από την έναρξή της, η Comet assay έχει τροποποιηθεί σε διάφορα σημεία (βήματα) (lysis, electrophoresis) ώστε να γίνει κατάλληλη για τον υπολογισμό

διαφόρων ειδών καταστροφής σε διαφορετικά κύτταρα (Collins 2004: Speit & Hartmann 2005).

Η τεχνική αυτή αποτελεί στις μέρες μας ένα απλό, ευαίσθητο, γρήγορο και ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την ανίχνευση και επιδιόρθωση της βλάβης του DNA, ποσοτικά και ποιοτικά, σε απομονωμένα ευκαρυωτικά αλλά και σε μερικά προκαρυωτικά κύτταρα και βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τομείς που κυμαίνονται από τη γενετική τοξικολογία ως την ανθρώπινη επιδημιολογία (Dhawan et al., 2009).

2.3.1 Ανάλυση κομητών (Comet assay)

Σ'αυτή την τεχνική της μικρο-γέλης ηλεκτροφόρησης, ένας μικρός αριθμός κυττάρων, όπως κύτταρα που προέρχονται από καλλιέργειες ή κύτταρα που απομονώνονται από διάφορους ιστούς, τοποθετούνται με τη μορφή αιωρήματος σε λεπτό στρώμα αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κύτταρα λύνονται από διάλυμα κορεσμένο σε NaCl. Σχηματίζονται πυρήνες αποτελούμενοι από μη νουκλεοσωμικό αλλά υπερελικωμένο DNA. Ακολουθώντας της ηλεκτροφόρησης και της χρώσης τους με τη φθορίζουσα ουσία, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), τα κύτταρα με βλάβη στο DNA, εμφανίζουν αυξημένη μετανάστευση του κερματισμένου χρωμοσωμικού DNA από τον πυρήνα προς την άνοδο, λαμβάνοντας το σχήμα του κομήτη. Η εφαρμογή της μεθόδου σε αλκαλικό περιβάλλον είναι η πιο συχνή και το ποσοστό των θραυσμάτων που μεταναστεύουν, είναι ανάλογο της βλάβης του DNA. Μεταξύ των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του ποσοστού του κερματισμένου DNA, είναι η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά του κομήτη, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα, το συνολικό μήκος του κομήτη και η παράμετρος TM – Tail Moment, όπου ορίζεται το γινόμενο του μήκους της ουράς, επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η TM-Tail Moment.

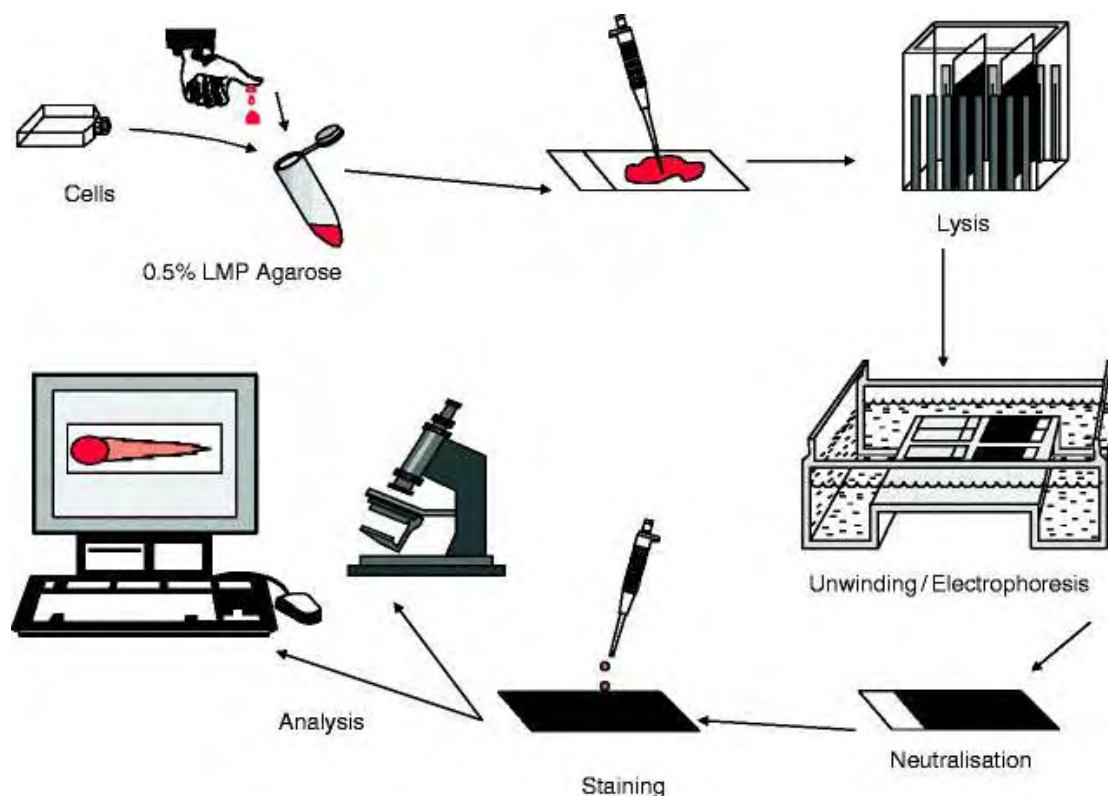
2.3.2 Απομόνωση ηπατοκυττάρων

Η απομόνωση των ηπατοκυττάρων πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια (Baksi & Fazier 1990: Devaux *et al.* 1997: Mitchelmore and Chipman 1998): Το πρώτο στάδιο περιλάμβανε τον καθαρισμό του ιστού με διάλυμα HBSS (Biochrom AG, Germany) με διαδοχικές πλύσεις. Το δεύτερο στάδιο περιλάμβανε την αφομοίωση του ήπατος. Στη συνέχεια, έγιναν ενέσεις κολλαγονάσης στον ιστό (CLS, type I) συγκέντρωσης 0,04% (Biochrom AG, Germany). Η κολλαγονάση είναι ένζυμο που βοηθάει στην αφομοίωση του ήπατος. Ακολούθησε μηχανικός τεμαχισμός του ιστού σε μικρά τμήματα. Η παραπάνω διαδικασία έλαβε χώρα πάνω σε τριμμένο πάγο. Στη συνέχεια, έγινε μεταφορά του τεμαχισμένου ήπατος σε “tube”, όπου έγινε ξανά τεμαχισμός με ειδικό εργαλείο. Ακολούθησε ανάδευση 10 λεπτών. Μετά την ανάδευση, το περιεχόμενο μεταφέρθηκε σε καινούριο σωληνάριο, αφού πρώτα φιλτραρίστηκε σε αποστειρωμένη γάζα. Τέλος, προστέθηκε κολλαγονάση μέσα στο δείγμα.



Εικόνα 4. Φυγόκεντρος Universal 320 R

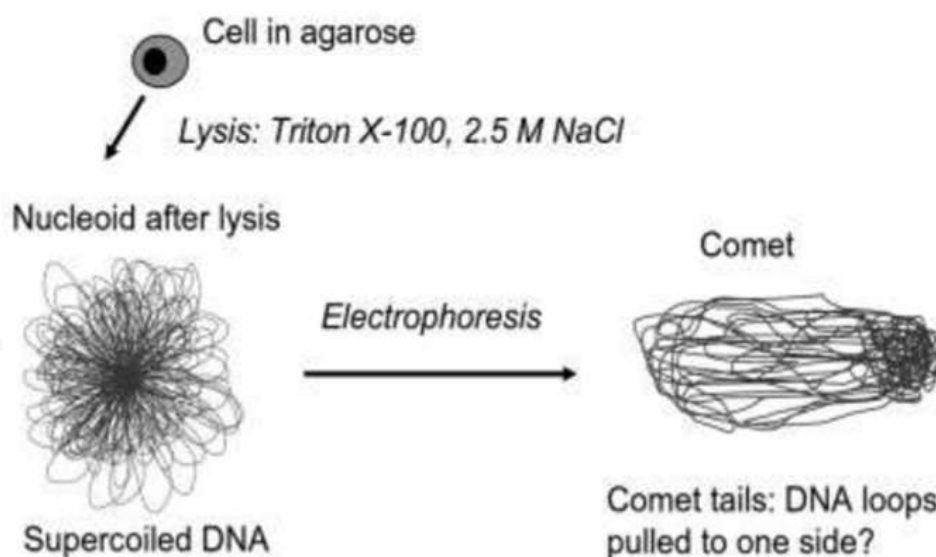
Ακολούθησε φυγοκέντρηση του αιωρήματος των κυττάρων στις 3000rpm για 5 λεπτά. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε φρέσκο διάλυμα HBSS. Η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές και τέλος η εναπομείνουσα πελέτα αραιώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Biochrom AG, Germany).



Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων σημείων της ανάλυσης κομητών: το κυτταρικό αιώρημα (cells), οι αντικειμενοφόρες πλάκες με λεπτή στρώση αγαρόζης (slides), η λύση των κυττάρων (lysis), η αποδιάταξη του DNA σε αλκαλικές συνθήκες (alkali unwinding), η ηλεκτροφόρηση (electrophoresis), η έκλυση με ουδέτερο διάλυμα (neutralization), και η χρώση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο (staining) (Tice *et al.* 2000).

2.3.3 Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Αφού απομονώθηκαν τα ηπατικά κύτταρα τοποθετήθηκαν με μορφή αιωρήματος σε λεπτό στρώμα αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα SLIF (Labbox Labware, Spain). Το πήκτωμα αγαρόζης (Normal Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε σε διάλυμα PBS. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων (2min) μέχρι να γίνει διαυγές. Η αντικειμενοφόρος πλάκα εμβαπτίστηκε στη ζεστή αγαρόζη (>60 °C) για 3-4 δευτερόλεπτα. Καθαρίστηκε η κάτω επιφάνεια της και αφέθηκε να στεγνώσει. Το δεύτερο διάλυμα αγαρόζης (Low Melting Point) παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο. Αφού έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου (20 °C-25 °C), σε καθαρό tube προστέθηκαν 20μl κυτταρικού αιωρήματος και 80μl αγαρόζης (LMP) και τοποθετήθηκαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα με το πήκτωμα αγαρόζης με καλυπτίδα από πάνω. Αφέθηκε να στεγνώσει για περίπου 15 λεπτά και αφαιρέθηκε η καλυπτίδα με προσοχή.



Σχημα 2. Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας κομήτη κατά το στάδιο της ηλεκτροφόρησης. Εφαρμογή της ανάλυσης κομητών (comet assay) σε ουδέτερο περιβάλλον. Απο αριστερά: Απομονωμένος πυρήνας με υπερελικωμένο DNA. Μετά την έκθεση σε κορεσμένο διάλυμα άλατος (αποπεριέλιξη) επέρχεται χάλαση του DNA, με αποτέλεσμα οι βρόγχοι να εκχύνονται από τον πυρήνα και να σχηματίζουν "φωτοστέφανο". Όταν οι πυρήνες με χαλαρωμένο DNA υπόκεινται σε

ηλεκτροφόρηση, αρνητικά φορτισμένα κομμάτια ή βρόχοι DNA μετακινούνται στο ηλεκτρικό πεδίο προς την άνοδο και σχηματίζεται μια εικόνα παρόμοια με κομήτη (Shaposhnikov *et al.* 2008).

2.3.4 Λύση και ηλεκροφόρηση

Αφού αφαιρέθηκε η καλυπτρίδα, η αντικειμενοφόρος πλάκα παρέμεινε στους 4°C για τουλάχιστον μία ώρα σε διάλυμα λύσης. Κατά τη διάρκεια αυτής της ώρας λύεται η κυτταρική μεμβράνη και το DNA σχηματίζει πυρήνες. Το κρύο διάλυμα λύσης βοηθάει στην σταθεροποίηση της αγαρόζης (Tice *et al.* 2000). Στη συνέχεια, έγινε έκπλυση με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκε σε σκοτεινή συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης, σε αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH>12) για 15min ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη του DNA που είναι απαραίτητη για την ανίχνευση θραυσμάτων μονόκλωνου DNA. Μετά την ηλεκτροφόρηση (30V, 300mA) τα δείγματα εκπλύθηκαν με διάλυμα εξουδετέρωσης (διάλυμα Tris 0,4M), ώστε το βρωμιούχο αιθίδιο να μπορεί να δράσει κατά τη διάρκεια της χρώσης (McKelvey-Martin *et al.* 1993).



Εικόνα 5. Συσκευή ηλεκτροφόρησης

2.3.5 Μέτρηση κομητών

Η χρώση του DNA έγινε με το βρωμιούχο αιθίδιο. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα προστέθηκαν 30μl και τοποθετήθηκε καλυπτρίδα. Σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα συλλέχθηκαν με τυχαία επιλογή 50 κύτταρα. Ακολούθησε η ανάλυση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss AxioStar plus) εφοδιασμένο με φίλτρο διέγερσης και αποκοπής στα 515-560nm 590nm αντίστοιχα. Οι εικόνες καταγράφονταν από βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και προβάλλονταν σε οθόνη H/Y μέσω του λογισμικού ProgRes Capture Pro 2.1. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με το ειδικό λογισμικό CASP (Comet Assay Software Project).

Οι παράμετροι που υπολογίζει το λογισμικό CASP χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της βλάβης του DNA και είναι: HeadArea, TailArea, HeadDNA, TailDNA, HeadDNA%, TailDNA%, HeadRadius, TailLength, CometLength, HeadMeanX, TailMeanX και Tail Moment. Το TM που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ορίζεται ως το μήκος της ουράς του DNA που έχει απομακρυνθεί από τον πυρήνα επί το ποσοστό του DNA, το οποίο βρίσκεται στην ουρά. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του TM (μεγάλη τιμή του TM σημαίνει ότι ο κομήτης έχει μεγάλη και γεμάτη ουρά) από ένα δείγμα, τόσο μεγαλύτερη βλάβη έχει υποστεί το DNA του συγκεκριμένου δείγματος.

2.3.6 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS statistics 17.0 και με το excel MS office 2007. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $\alpha = 0,05$. Για τις πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό τεστ “one way Anova” και το κριτήριο Tukey HSD.

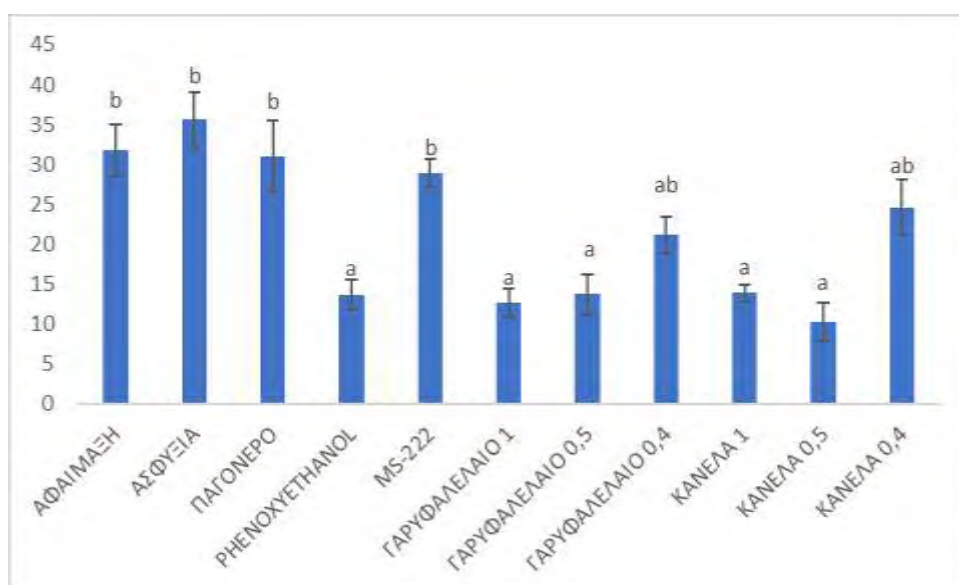


Εικόνα 6. Μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axiostar plus)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Εξέταση ηπατοκυττάρων

Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των τιμών TM για όλους τους τρόπους θανάτωσης που χρησιμοποιήθηκαν.



Σχήμα 3. Τρόποι θανάτωσης και μέσες τιμές TM ηπατοκυττάρων

Όπως φαίνεται στον πίνακα, οι μεγαλύτερες τιμές TM καταγράφηκαν με τη μέθοδο της ασφυξίας. Ακολουθεί η αφαιμάξη και το παγόνερο. Παρατηρείται ότι με μεθόδους θανάτωσης χωρίς την ύπαρξη αναισθητικού αυξάνονται τα επίπεδα καταπόνησης των ψαριών.

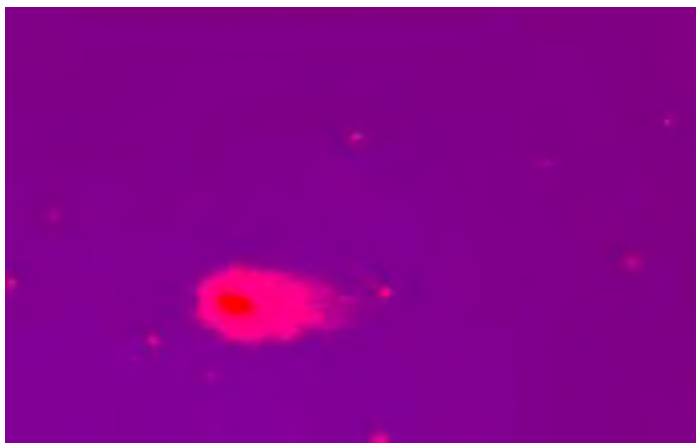
Οι αυξημένες τιμές TM με τη μέθοδο της χορήγησης αναισθητικού MS-222 πιθανόν να οφείλονται στη δόση που χρησιμοποιήθηκε, η οποία ήταν δεκαπλάσια από το κανονική δόση για αναισθητοποίηση, με αποτέλεσμα την αυξημένη γενοτοξικότητα.

Η φαινοξυαιθανόλη, όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, προκαλεί την ταχύτερη αναισθησία. Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν χαμηλές τιμές TM με καμία σημαντική διαφορά από τα αιθέρια έλαια, ακόμα και αν χρησιμοποιήθηκε πολύ μεγάλη ποσότητα.

Οι μεγαλύτερες τιμές TM για τα αιθέρια έλαια (γαρυφαλέλαιο και κανέλα) παρατηρήθηκαν στη δόση των 0,4ml. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η δόση ήταν χαμηλή, με αποτέλεσμα την αργή απώλεια συνείδησης.



Εικόνα 7. Ηπατοκύτταρο τσιπούρας (*Sparus aurata*) με ακέραιο DNA



Εικόνα 8. Ηπατοκύτταρο τσιπούρας (*Sparus aurata*) με κερματισμένο DNA

3.2 Συζήτηση

Τα ψάρια καταλαμβάνουν τη δεύτερη θέση στο βάθρο με τα σημαντικότερα ελληνικά εξαγόμενα προϊόντα. Ο κλάδος της ιχθυοκαλλιέργειας, που στηρίζεται τόσο από μεγάλες όσο και από μικρομεσαίες επιχειρήσεις, εξάγει το 85% της παραγωγής του, με τον κύριο όγκο να διοχετεύεται στις ευρωπαϊκές αγορές (93%) και το υπόλοιπο στη Β. Αμερική (4%) και άλλες χώρες (3%). Κύριες ευρωπαϊκές χώρες εξαγωγής είναι η Ιταλία (η μεγαλύτερη αγορά για τα ψάρια ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας), η Ισπανία και η Γαλλία.

Το 2015 η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού ανήλθε σε 110.000 τόνους, αξίας 595 εκατ. ευρώ. Υπήρχε μία μείωση περίπου 2% σε σχέση με το 2014, αλλά μία αύξηση 10% σε σχέση με την αξία πωλήσεων. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων, εκτιμάται ότι μέχρι το 2030 η ζήτηση σε ιχθυηρά θα αυξηθεί κατά 30 εκατ. τόνους, η οποία δεν μπορεί να καλυφθεί με την ελεύθερη αλιεία. Το 2017 αναμένεται να υπάρξει αύξηση της παραγωγής και των εξαγωγών.

Στην Ελλάδα η ετήσια κατανάλωση ψαρικών κατ' άτομο είναι 19,6 κιλά. Έτσι λόγω της αυξημένης κατανάλωσης έχει δοθεί κίνητρο στην παραγωγή ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας με σχεδόν «βιομηχανικούς» ρυθμούς. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια το θέμα της ευζωίας έχει πάρει μεγαλύτερες διαστάσεις και γίνονται προσπάθειες που αποσκοπούν σε μια πιο συνειδητοποιημένη αντιμετώπιση ως προς την ευζωία των οργανισμών σε θέματα που αφορούν τόσο στη γενικότερη διαχείριση κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας όσο και κατά τις μεθόδους θανάτωσης. Η ανησυχία για την ευζωία των υδρόβιων οργανισμών κερδίζει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των πολιτών αλλά και των επιστημόνων (Chandroo et al. 2004, Huntingford et al. 2006)

Υπάρχουν διάφορα αναισθητικά καθώς και τρόποι θανάτωσης που χρησιμοποιούνται συνήθως στο τομέα της αλιείας ή υδατοκαλλιέργειας σε Ευρωπαϊκό επίπεδο για μερικά από τα πιο σημαντικά εκτρεφόμενα είδη.

Είναι γεγονός πως πρωταρχικό στοιχείο για την ύπαρξη ενός ικανοποιητικού συστήματος θανάτωσης των ψαριών θα πρέπει να είναι η διαδικασία που οδηγεί σε μεθόδους, οι οποίες δεν θα απομακρύνουν τα ψάρια από το υδάτινο περιβάλλον, ή

τουλάχιστον για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 15 δευτερολέπτων (HSA 2005). Συνήθως μετά από αυτό το χρονικό διάστημα τα ψάρια υιοθετούν «απωθητική συμπεριφορά» (HSA 2008).

Η ανάλυση των κομητών «comet assay» βρίσκει ευρεία εφαρμογή ως μια απλή και ευαίσθητη τεχνική εκτίμησης της *ex vivo*, καθώς και της *in vitro* βλάβης του DNA σε διαφορετικούς ιστούς (βράγχια, συκώτι, αίμα) ψαριών εκτεθειμένων σε ποικίλους παράγοντες στο υδρόβιο περιβάλλον (Winter *et al.* 2004). 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). Στην παρούσα εργασία τα αποτελέσματα έδειξαν καταπόνηση σε όλους τους τρόπους θανάτωσης με χειρίστη μέθοδο την ασφυξία. Το παγόνερο και η αφαιμάξη δεν διέφεραν σημαντικά. Στους τρόπους θανάτωσης με χρήση αναισθητικού οι τιμές TM ήταν σημαντικά πιο χαμηλές. Σημαντικό ρόλο παίζει η δόση του αναισθητικού, η οποία μπορεί να δημιουργήσει γενοτοξικότητα. Τα αιθέρια έλαια (γαρύφαλο και κανέλα) σε ποσότητες 1ml και 0,5ml και η φαινοξυαιθανόλη είχαν τα μικρότερα ποσοστά καταπόνησης. Το χημικό αναισθητικό MS-222, ως το ευρέως χρησιμοποιούμενο και το μόνο εγκεκριμένο από την U.S Food and Drugs Administration (FDA) για χρήση σε υδρόβιους οργανισμούς παρουσίασε υψηλές τιμές TM στη συγκεκριμένη δόση.

Η ασφυξία θεωρείται ως ένας από τον πλέον στρεσογόνο τρόπο θανάτωσης κατόπιν συγκρίσεων αποτελεσμάτων κατά την διεξαγωγή πειραμάτων που σχετίζονται με μεθόδους θανάτωσης των ψαριών σε σύγκριση για παράδειγμα, με την αναισθητοποίηση, την αφαιμάξη (Erikson *et al.* 1997) τη ψύξη και τη διοχέτευση CO₂ στο νερό (Ottera *et al.* 2001).

Χαμηλή δραστηριότητα των μυών, έχει αναφερθεί να προκύπτει από την εφαρμογή μεθόδων θανάτωσης που αφήνουν τα ψάρια αμέσως αναίσθητα, όπως το χτύπημα με αιχμηρό αντικείμενο στο σημείο του εγκεφάλου (Boyd *et al.* 1984), ένα χτύπημα στο κεφάλι (Ottera *et al.* 2001), και την καταστροφή του νωτιαίου της χορδής (Mochizuki & Sato 1994).

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

Σύμφωνα με τους Kestin *et al.* (2002) υπάρχουν διάφοροι δείκτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας αλλά και του επιπέδου αναισθησίας των προς θανάτωση ψαριών. Μερικοί απ' αυτούς σε πρώτη φάση έγκεινται σε μακροσκοπική παρατήρηση όπου το ψάρι δεν μπορεί να κολυπήσει κανονικά χάνοντας την ισορροπία του, έπειτα στον τρόπο απόκρισης εξωτερικών ερεθισμάτων όπως στην απόπειρα διαφυγής ενδεχόμενης σύλληψης ή και στην απόκριση μετά από τσίμπημα με αιχμηρό αντικείμενο ή ηλεκτρικά ερεθίσματα, καθώς επίσης και στο ρυθμό επιτέλεσης της αναπνοής. Μια μέθοδος που μπορεί να αξιολογήσει επίσης αν το ψάρι είναι αναισθητο, επιτυγχάνεται με την παρατήρηση της κινητικότητας των οφθαλμών του (eye - rolling). Συγκεκριμένα, όταν τα ψάρια έχουν τις αισθήσεις τους, με μια ενδεχόμενη κίνηση του κεφαλιού τα μάτια θα κυλήσουν ανάλογα της κίνησης αυτής. Αντίθετα όταν το ψάρι έχει χάσει πλήρως τις αισθήσεις του, τότε τα μάτια του θα παραμείνουν σταθερά σε οποιαδήποτε κίνηση του κεφαλιού.

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

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

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

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

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι όλοι οι τρόποι θανάτωσης παρουσίασαν ποσοστά γενοτοξικότητας. Η μέθοδος της ανάλυσης κομητών (comet assay) είναι σε θέση να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα στη μελέτη της οξειάς μορφής καταπόνησης. Ωστόσο, είναι αναγκαία η τελειοποίηση της μεθόδου για ακόμη καλύτερα αποτελέσματα στο μέλλον.

Η θανάτωση με τη μέθοδο της ασφυξίας έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Σε σχέση με τις άλλες μεθόδους είχε τις μεγαλύτερες τιμές TM, δηλαδή τα μεγαλύτερα ποσοστά γενοτοξικότητας και αποδείχτηκε ξανά ότι είναι η χειρίστη μέθοδος θανάτωσης.

Το παγόνερο, το οποίο είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος έδειξε υψηλές τιμές TM που σημαίνει ότι είναι μία επώδυνη μέθοδος θανάτωσης. Η αφαίμαξη παρουσίασε υψηλές τιμές TM χωρίς κάποια σημαντική διαφορά από το παγόνερο.

Σημαντική διαφορά έδειξε η μέθοδος θανάτωσης με την υπερβολική δόση αναισθητικών. Στην περίπτωση της φαινοξυαιθανόλης τα ποσοστά καταπόνησης ήταν χαμηλά. Το ποσοστό αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς, όπως επιβεβαιώνουν και οι Weber *et al.* (2009) η φαινοξυαιθανόλη προκαλεί την ταχύτερη αναισθησία που σημαίνει την ταχύτερη απώλεια συνείδησης των ψαριών.

Στην περίπτωση του χημικού αναισθητικού MS-222 τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένα επίπεδα καταπόνησης. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στην μεγάλη δόση που χρησιμοποιήθηκε με αποτέλεσμα την αυξημένη γενοτοξικότητα.

Τα αιθέρια έλαια (γαρυφαλέλαιο και κανέλα) έδειξαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Άξιο σχολιασμού είναι το γεγονός ότι τα αιθέρια έλαια μπορούν να μειώσουν την καταπόνηση και η αποτελεσματικότητά τους διαφέρει ανάλογα με τη δόση.

ABSTRACT

The mode of slaughtering method should lead to a rapid and irreversible loss of consciousness. In this study, four slaughtering methods (asphyxia, bleeding, immersion in ice-water and over-dose of four anesthetics (*Eugenia aromatica*, *Cinnamomum zeylanicum*, MS-222, phenoxyethanol) were applied. Stress responses were determined by detecting fragmented DNA in hepatocytes using the molecular technique, comet assay.

The parameter used to estimate the percentage of DNA was TM - Tail Moment.

The results showed that asphyxia was the worst slaughtering method, as it recorded the highest rate of genotoxicity. Ice water showed high TM values. Bleeding showed high TM values without any significant difference from ice water. Method with over-dose anesthetics had the lowest TM values. An important difference showed the method with overdose of anesthetics. In the present study, 0.4ml dose showed high TM values compared to 0.5ml and 1ml.

In conclusion, comet assay is able to provide satisfactory results in the study of acute stress. Asphyxia has proven to be the worst killing method. The use of essential oils as anesthetics significantly reduces stress of fish.

Key words: "welfare", "slaughtering methods", "stress", "comet assay".

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Acerete A., Reig L., Alvarez D., Flos R., Tort L. (2009). Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 287:139-144.

Adams, C., Huntingford, F., Turnbull, J., Arnott, S., Bell, A. (2006). Size heterogeneity can reduce aggression and promote growth in Atlantic salmon parr. *Aquaculture Int.* 8, 543-549

Akbulut, B., Cakmak, E., Aksungur, N., Cavdar, Y. (2010). Effect of exposure, duration on time to recovery from anaesthesia of clove oil in juvenile for Russian sturgeon. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 11, 463-467.

AVMA [American Veterinary Medical Association]. (2007). Guidelines on Euthanasia (formerly the Report of the AVMA Panel on Euthanasia). Available online (http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf).

Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils- a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.

Baksi S.M. and J.M. Frazier, (1990). Isolated hepatocytes—model systems for toxicology research. *Aquatic Toxicology*, 16:229–259.

Banath O. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *NatProtoc.*, 1 (1):23-9.

Barton, B.A. (1997). Stress in fish: past, present and future—a historical perspective. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp.1-33.

Barton, B.A. (2000). Stress. In: Stickney, R.R. (Ed.), *Encyclopedia of Aquaculture*. John Wiley and Sons, New York.

Boyd, N.S., Wilson, N.D., Jerret, A.R., Hall, B.I. (1984). Effects of brain destruction on post-harvest muscle metabolism in the fish kahawai (*Arripis trutta*) J.Food Sci. 49, 177-179

Braithwaite V. (2010) Do fish feel pain?Oxford university pressGreat Clarendon Street, Oxford ox2 6dp Animals (Scientifi c Procedures) Act 1986.

Breber, P., Strada, R. (1995). The abundance in an extensive brackishwater fish farm (valle da pesca') of the animal macrobenthon that feeds the seabream (*Sparus aurata*). Rivista Italiana Acquacoltura 30: 181–186.

Chandroo K.P., Yue S., Moccia R.D. (2004). An evaluation of current perspectives on consciousness and pain in fishes. Fish and Fisheries, 5:281-95.

Collins A. R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications and Limitations. Molecular Biotechnology, 26(3):249-262.

Devaux, A., Pesoren, M., Monod, G. (1997). Alcaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. Toxicol. in Vitro 71-79.

Dhawan A., Bajpayee M. and Parmar D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. Cell Biology and Toxicology 25: 5-32.

EFSA Journal. (2004). Scientific report of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of animal stunning and killing methods, p. 172.

EFSA Journal. (2004). Welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals 45, 1-29.

EFSA Journal (2009). – Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the European Commission on species specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed seabass and seabream. EFSA J., 1010, 1–52.

ECVAM. (2002). Genotoxicity and carcinogenicity. *Altern. Lab. Anim.* 30, Suppl. 1, 83-93.

Erikson U., Hultmann L., Steen J.E. (2006). Live chilling of Atlantic salmon (*Salmo salar*) combined with mild carbon dioxide anaesthesia I. Establishing a method for large-scale processing of farmed fish. *Aquaculture*, 252:183-198.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. (1995). The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339:37–59.

Fishbein M. M. D., ed. (1976). "Anesthesia". *The New Illustrated Medical and Health Encyclopedia*. 1 (Home Library Edition ed.). New York, N.Y. 10016: H. S. Stuttman Co. pp. 87.

Fisher W., Schneider M., Bauchaut M.L. (1987). *Fishes* FAO Catalogue d'identification des especes pour les besoins de la peche. Mediterranee et Mer Noire, (Zone de peche 37), rev. I, Vol. II Vertebres. FAO CEE, Rome: 761-1529.

FSBI (Fisheries Society of the British Isles), (2002). *Fish Welfare*. Breifing Report 2. Granta Information systems.

Huntingford F.A., Adams C., Braithwaite V.A., Kadri S., Pottinger T.G., Sandoe P., Turnbull J.F. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, 68:332-72.

HSA. (2005). Humane harvesting of salmon and trout: Guidance notes No. 5. (Wheathamstead, U.K.: Humane Slaughter Association).

Iwama, G. K., J. D. Morgan, and B. A. Barton. (1995). Simple field methods for monitoring stress and general condition of fish. *Aquaculture Research* 26:273–282.

Iwama G.K, Pickering A.D., Sumpter J.P.and Schreck C.B. (1997). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, UK. pp 278

Kiley-Worthington M. (1989). Ecological, ethological, and ethically sound environments for animals: toward symbiosis. *Journal of Agricultural Ethics* 2: 323-347.

Kelsch SW, Shields B. (1996). Care and handling of sampled organisms. In: Murphy BR, Willis DW (eds) *Fisheries techniques*, 2nd edn. American Fisheries Society, Bethesda, Md, pp 121–155

Kestin S.C., Wotton S.B., Gregory N.G. (1991). Effect of slaughter by removal from water on visual evoked activity in the brain and reflex movement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Veterinary Record*, 128:443-6.

Kestin S.C., Van De Vis J.W., Robb D.H.F. (2002). Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. *The Veterinary Record*, 150:302-7.

Kumaravel T. S. and Jha A. N. (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat. Res.* 605 (1-2): 7-16.

Lines, J.A. & Frost, A.R. (1999). Review of opportunities for low stress and selective control of fish. *Aquaculture Engineering*, 20:211-230.

Marking, L. L. & Meyer, F. P. (1985). Are better anesthetics needed in fisheries *Fisheries* 10, 2–5.

Maurici D, Aardema M, Corvi R, Kleber M, Krul C, Laurent C, Loprieno N, Pasanen M, Pfuhrer S, Phillips B, Sabbioni E, Sanner T, Vanparys P. (2005). Genotoxicity and mutagenicity. *Altern Lab Anim* 33(suppl 1):117–130

McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P. & Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288 : 47-63.

Mitchell, M.A. (2009). Anesthetic Considerations for Amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine* (18):1, 40-49.

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.

Miyamae Y., Iwasaki K, Kinae N, Tsuda S, Murakami M and Tanaka M. (1997). Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay: relationship between DNA migration and alkaline conditions. *Mutat Res*: 393:107-13.

Mochizuki, S., Sato, A., (1994). Effects of various killing procedures and storage temperatures on post-mortem changes in the muscle of horse mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 60 (1), 125-130.

Morley N., Rapp A., Dittmar H., Salter L., Gould D. and Greulich K. (2006). UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis*, 21 (2): 105-14.

Moller P. (2006). The alkaline Comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98(4):336-45.

Morzel M., Sohier D., Van De Vis H. (2002). Evaluation of slaughtering methods for turbot with respect to animal welfare and flesh quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82:19-28.

Munday PL, Wilson SK. (1997). Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *J Fish Biol* 51:931–938

Pankhurst N. W., Van Der Kraak G. and Peter R.E. (1995). Evidence that the inhibitory effects of stress on reproduction in teleost fish are mediated by the action of cortisol on ovarian steroidogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 99 (3): 249-257.

Poli B.M., Parisi G., Scappini F. & Zampacavallo G. (2005). – Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquacult. int.*, 13, 29–49.

Robb D.H.F. & Kestin S.C. (2002). – Methods used to kill fish: field observations and literature reviewed. *Anim. Welf.*, 11, 269–282.

Ostling O. and Johanson K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298.

Ottera H., Roth B., Torrissen O.J. (2001). Do killing methods affect the quality of Atlantic Salmon? In: Kestin, S.C., Warriss P.D. (Eds.), *Farmed Fish Quality*. Blackwell Science Ftd, Oxford, pp. 398-399.

Ribas L., Flos R., Reig L., MacKenzie S., Barton B.A., Tort L. (2007). Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. *Aquaculture*, 269:250-258.

Ross L.G., Ross B. (1984). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Fish*. Glasgow: Nautical Press. Ross L.G. and Ross B. (1999). Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. *Institute of Aquaculture, University of Stirling*. (58): 145-155.

Ross, L., Ross, B. (2008). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Blackwell, Oxford.

Roth B., Slinde E., Robb D.H.F. (2007). Percussive stunning of Atlantic salmon (*Salmo alar*) and the relation between force and stunning. *Aquacultural Engineering*, 36:192-97.

Roth B., Imsland A., Gunnarsson S., Foss A., Schelvis-Smit R. (2007). Slaughter quality and rigor contraction in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*); a comparison between different stunning methods. *Aquaculture*, 272:754-761.

Roth B., Slinde E., Robb D.H.F. (2006). Field evaluation of live chilling with CO₂ on stunning Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the subsequent effect on quality. *Aquaculture Research*, 37:799-804.

Roth B., Moeller D., Veland J.O., Imsland A., Slinde E. (2002). The Effect of Stunning Methods on Rigor Mortis and Texture Properties of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Journal of Food Science*, 67:1462-1466.

Shaposhnikov, S.A., Salenko, V.B., Brunborg, G., Nygren, G., Collins, A.R., (2008). Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): Loops or fragments?. *Electrophoresis* 2008, 29, 3005–3012

Skjervold. P.O., Rpra, A.M.B., Fjaera, S.O., Vegusdal, A., Vorre, A., Einen, O. (2001). Effects of pre-, in- or post-rigor filleting of live chilled Atlantic salmon. *Aquaculture* 194, 315-326.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Scheider, E.L. (1998). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res* 237, 123-130.

Singh N. P. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res.*, 455 (1-2): 111-27. Southgate P., Wall T. (2001). Welfare of farmed fish at slaughter. *In Practice*, 23:277-84.

Speit G., Hartmann A. (1995). The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, 10:555-559.

Summer felt R.C. and Smith L.S. (1990). Anaesthesia, Surgery and related techniques. In: C. B. Scherelk and P.B. Moyle (ed) *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 213-272

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.

Van de Vis, J.W., Kestin, S.C., Robb, D.F.H., Oehlenschlager, J., Lambooij, E., Miinkner, W., Kuhlmann, H., Miinkner, W., Kloosterboer, R.J., Tejada, M., Huidobro, A., Tejada, M., Ottera, H., Roth, B., Sprensen, N.K., Aske, L., Byrne, EL, Nesvadba, P. (2003). Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Research* 34, 211-220.

Villarini M., Scassellati-Sforzolini G., Moretti M. and Pasquini R. (2000). In vitro genotoxicity of terbutryn evaluated by the alkaline single-cell microgel-electrophoresis "comet" assay. *Cell Biology and Toxicology* 16: 285-292.

Weerd Van J. H. and Komen J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120: 107-112.

Valenciennes, A. (1830). In: Cuvier, G. L. C.; Valenciennes, A.: *Histoire Naturelle des poissons*. Paris. 22 vols.

Winter M, Day N, Hayes RA, Taylor EW, Butler PJ, Chipman JK. (2004). DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutat Res* 552:163-75.

Yasuhara, S., Zhu, Y., Matsui, T., Tipirneni, N., Yasuhara, Y. and Kaneki M. (2003). Comparison of comet assay, electron microscopy and flow cytometry for detection of apoptosis. *J. Histochem Cytochem.* 51(7):873-85.

Ελληνική βιβλιογραφία

Γεροντής, Θ. (2015). Αντιμετώπιση ασθενειών και ευζωία εντατικά εκτρεφόμενων ιχθύων. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαλανδράκης, Ε. (2014). Καταπόνηση και ευζωία εντατικά εκτρεφόμενων ιχθύων. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καβουρας, Μ. (2009). Ανίχνευση DNA βλάβης/επιδιόρθωσης με COMET ανάλυση σε εκτρεφόμενους και φυσικούς πληθυσμούς ιχθύων εκτεθειμένους σε βαρέα μέταλλα. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπουτσόγλου, Σ.Ε. (1998). “Ένδοκρινολογία Ιχθύων“, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα

Πίκουλας, Θ. (2011). Επίδραση των τρόπων θανάτωσης στην καταπόνηση εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

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

